(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6633523号
(P6633523)
(45)発行日　令和2年1月22日(2020.1.22)　(24)登録日　令和1年12月20日(2019.12.20)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	ZNA
A61K 38/08	(2019.01)	A61K	38/08	
A61K 47/34	(2017.01)	A61K	47/34	
A61K 47/12	(2006.01)	A61K	47/12	
A61P 25/04	(2006.01)	A61P	25/04	

請求項の数 26　(全 53 頁)　最終頁に続く

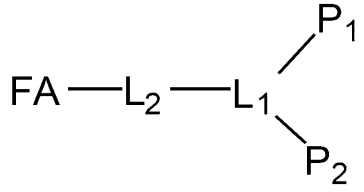
(21)出願番号　特願2016-534121(P2016-534121)
(86)(22)出願日　平成26年11月26日(2014.11.26)
(65)公表番号　特表2017-501132(P2017-501132A)
(43)公表日　平成29年1月12日(2017.1.12)
(86)国際出願番号　PCT/DK2014/050402
(87)国際公開番号　WO2015/078477
(87)国際公開日　平成27年6月4日(2015.6.4)
審査請求日　平成29年11月21日(2017.11.21)
(31)優先権主張番号　PA201370735
(32)優先日　平成25年12月1日(2013.12.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
デンマーク(DK)

(73)特許権者　508335820
ユニバーシティ　オブ　コペンハーゲン
デンマーク国，デーコー－１０１７　コペンハーゲン　コー，ノーレガーデ　１０
(74)代理人　110000774
特許業務法人　もえぎ特許事務所
(72)発明者　ストロムガード，クリスティアン
デンマーク国，ディーケー－４０００　ロスキレ，エスティー．ティービー．モレフセーネ　１７
(72)発明者　バッハ，アンデルス
デンマーク国，ディーケー－２５００　ヴァルビュー，ナクスコッヴァイ　８６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＰＳＤ－９５の二量体阻害剤脂肪酸誘導体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式(II)の一般構造を有するPSD-95の二量体のリガンドであって、
【化１】



式（ＩＩ）

P_1が、アミノ酸配列$X_4X_3X_2X_1$(配列番号1)を含み、かつ、P_2が、アミノ酸配列$Z_4Z_3Z_2Z_1$(配列番号2)を含み、
式中、
X_1およびZ_1が、アミノ酸残基Vであり、
X_2およびZ_2が個々に、A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-SおよびN-Me-Vから選択されるアミノ酸残基であり、
X_3およびZ_3が個々に、SおよびTから選択されるアミノ酸残基であり、
X_4およびZ_4が個々に、E、Q、およびAから選択されるアミノ酸残基であり、かつ、
X_1およびZ_1がともに、遊離カルボン酸を含めた最終的なC末端アミノ酸残基を個々に表し、

P_1およびP_2がともに、それぞれのN末端を介して第一のリンカーL_1と結合し、
L_1が、少なくとも1つの酸素原子が窒素原子で置換されてNPEGになったポリエチレングリコール(PEG)を含み、
L_2が窒素原子を含む任意選択のリンカーであり、かつ、
FAが脂肪酸であり、前記NPEGの窒素原子に、アミド結合により、またはリンカーL_2を介して連結している、PSD-95の二量体のリガンド。

【請求項２】

前記脂肪酸が、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、請求項1に記載の二量体のリガンド。

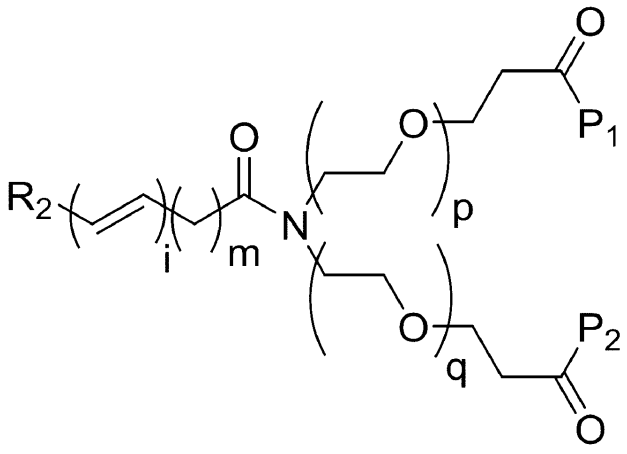
【請求項３】

前記第二のリンカーL_2が、γ-Glu、γ-酪酸(GABA)、5-アミノ吉草酸(5-Ava)、タンパク質構成アミノ酸、非タンパク質構成アミノ酸およびQが任意の適切な原子(1つまたは複数)である一般式H_2N-[Q]-COOHを有する任意の二量体のリガンドからなる群より選択される1つまたは複数の部分を含む、請求項1に記載の二量体のリガンド。

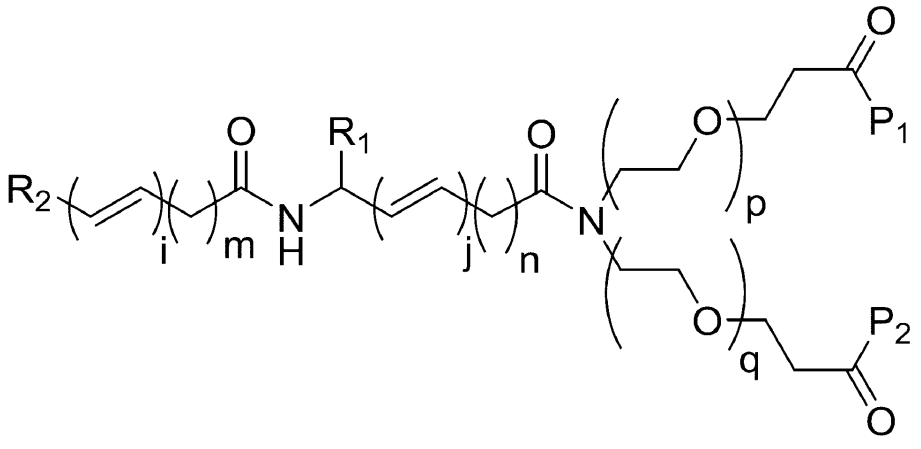
【請求項４】

式(III)または(IV):

【化２】



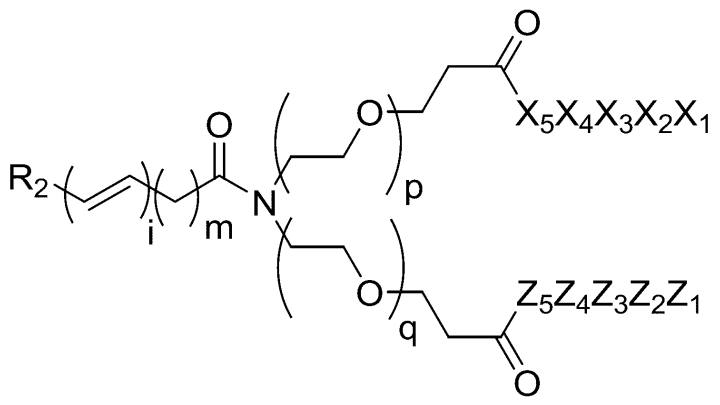
式（ＩＩＩ）



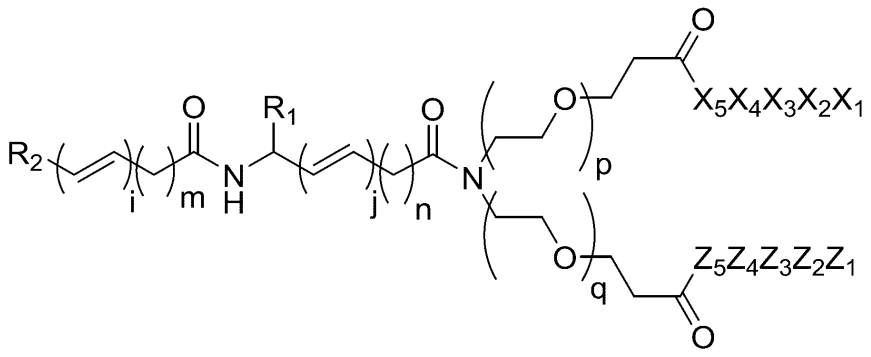
式（ＩＶ）

の一般構造を有し、式中、
R_1およびR_2が個々に、HおよびCOOHからなる群より選択され、
nが0～48の整数であり、
mが1～48の整数であり、
pが0～28の整数であり、
qが0～28の整数であり、
iが0～12の整数であり、

jが0～12の整数であり、
P_1およびP_2が個々に、タンパク質構成アミノ酸残基または非タンパク質構成アミノ酸残基を少なくとも2つ含むペプチドから選択される、
請求項1に記載の二量体のリガンド。
【請求項５】
前記エチレングリコール部分の数pが0～4である、請求項4に記載の二量体のリガンド。
【請求項６】
nが1～3の整数である、請求項4に記載の二量体のリガンド。
【請求項７】
mが10～16の整数である、請求項4に記載の二量体のリガンド。
【請求項８】
前記脂肪酸がC_4～C_{22}脂肪酸である、請求項1に記載の二量体のリガンド。
【請求項９】
前記脂肪酸が、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘニン酸、リグノセリン酸およびセロチン酸からなる群より選択される、請求項1に記載の二量体のリガンド。
【請求項１０】
前記脂肪酸が、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸およびドコサヘキサエン酸からなる群より選択される、請求項1に記載の二量体のリガンド。
【請求項１１】
式(V)または(VI):
【化３】



式（Ｖ）



式（ＶＩ）

の一般構造を有し、式中、
R_1およびR_2が個々に、HおよびCOOHからなる群より選択され、
nが0～48の整数であり、
mが1～48の整数であり、かつ
pが0～28の整数であり、

qが0～28の整数であり、
iが0～12の整数であり、
jが0～12であり、
X_5および/またはZ_5が、任意選択のアミノ酸残基、ペプチドまたはポリペプチドであり、
X_4およびZ_4が個々に、E、Q、およびAから選択されるアミノ酸残基であり、
X_3およびZ_3が個々に、SおよびTから選択されるアミノ酸残基であり、
X_2およびZ_2が個々に、A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-SおよびN-Me-Vから選択されるアミノ酸残基であり、
X_1およびZ_1が、アミノ酸残基Vである、
請求項1に記載の二量体のリガンド。

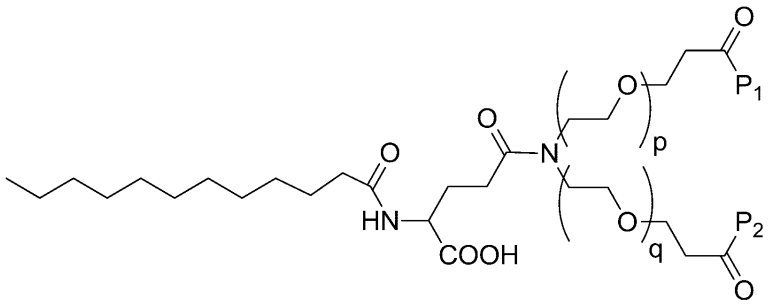
【請求項１２】
X_5が、タンパク質構成アミノ酸残基または非タンパク質構成アミノ酸残基である、請求項11に記載の二量体のリガンド。

【請求項１３】
X_5が、I、A、LおよびVからなる群より選択されるアミノ酸残基である、請求項11に記載の二量体のリガンド。

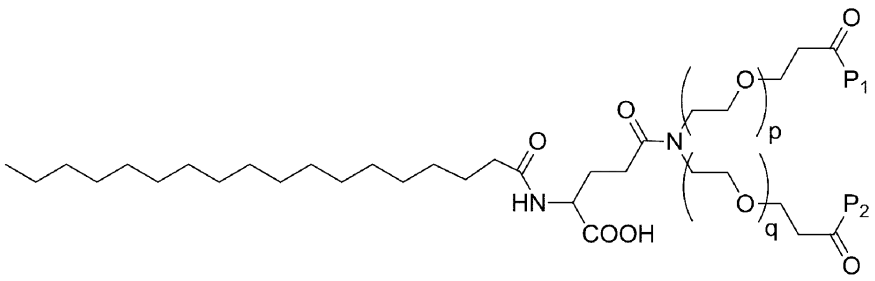
【請求項１４】
X_5が、2～100個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有し、C末端がI、A、LおよびVからなる群より選択されるアミノ酸残基である、ペプチドまたはポリペプチドである、請求項11に記載の二量体のリガンド。

【請求項１５】
X_5が、2～6個のアミノ酸残基を含むペプチドであり、C末端が、I、A、LおよびVからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項11に記載の二量体のリガンド。

【請求項１６】
a)KBN41(5)誘導体
【化４】

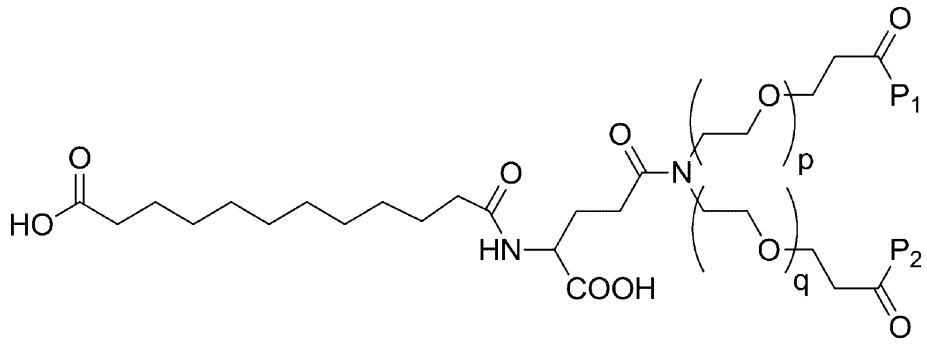


b)KBN42(7)誘導体
【化５】



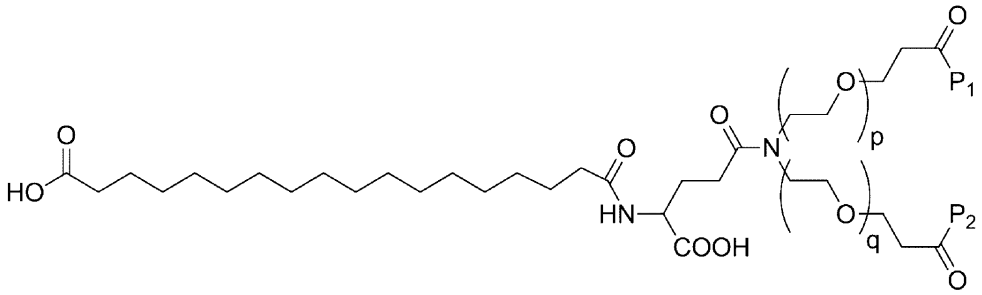
c)KBN43(6)誘導体

【化６】



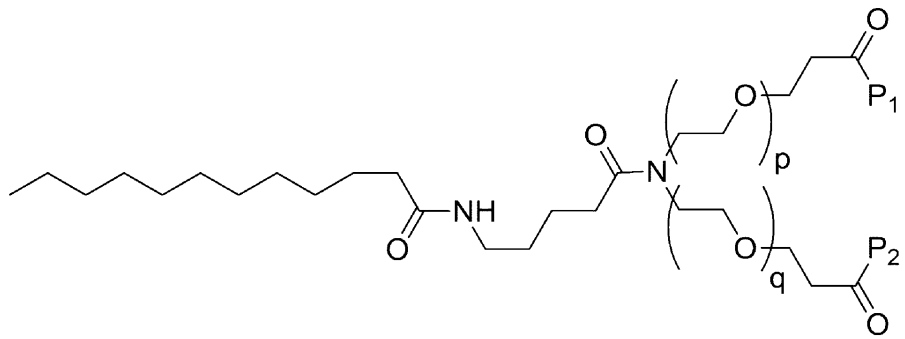
d)KBN44(8)誘導体

【化７】



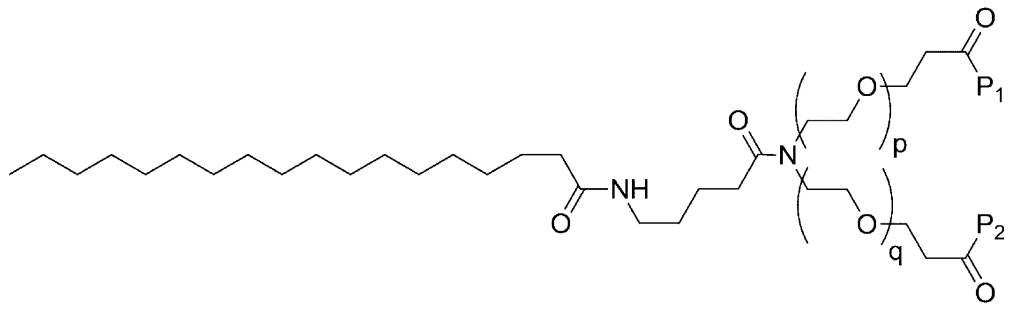
e)KBN45(9)誘導体

【化８】



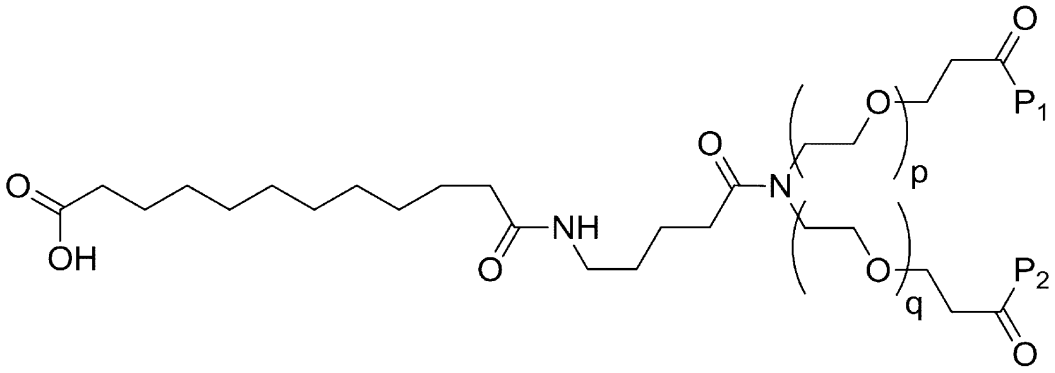
f)KBN46(11)誘導体

【化９】



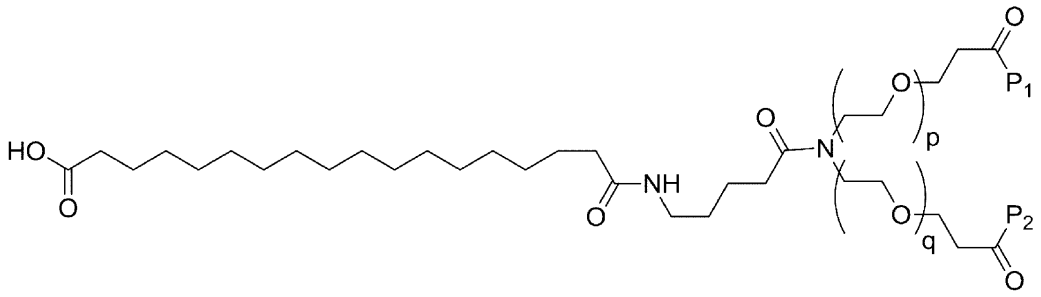
g)KBN47(10)誘導体

【化１０】



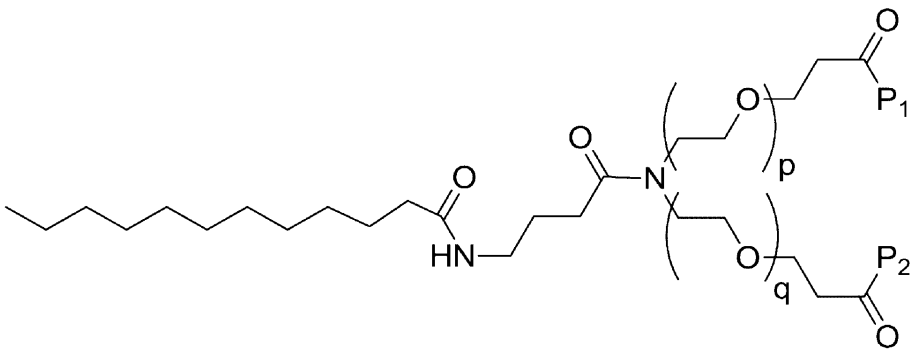
h)KBN48(12)誘導体

【化１１】



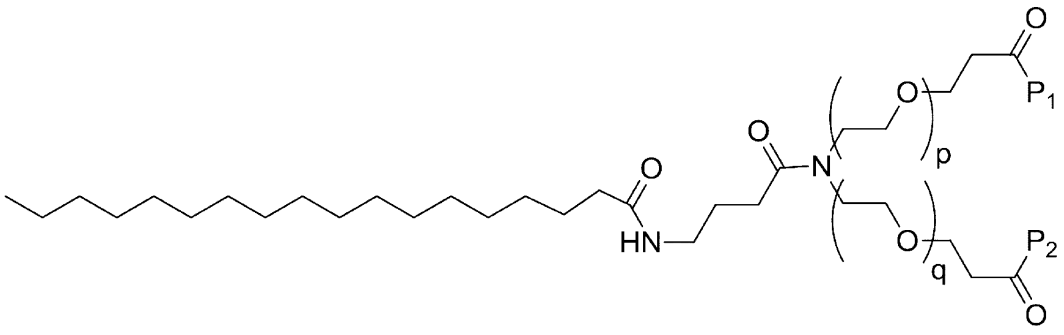
i)KBN52(1)誘導体

【化１２】



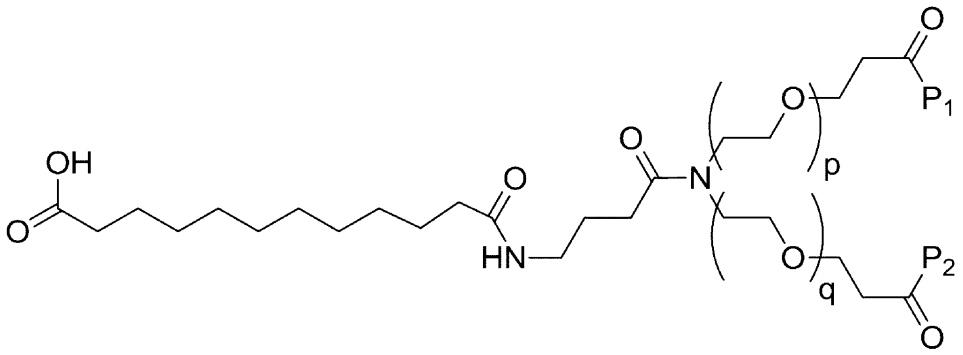
j)KBN53(3)誘導体

【化１３】



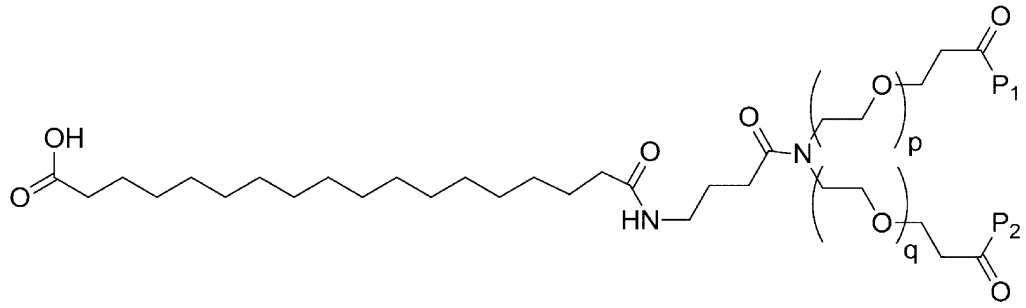
k)KBN54(4)誘導体

【化１４】



l)KBN55(4)誘導体

【化１５】

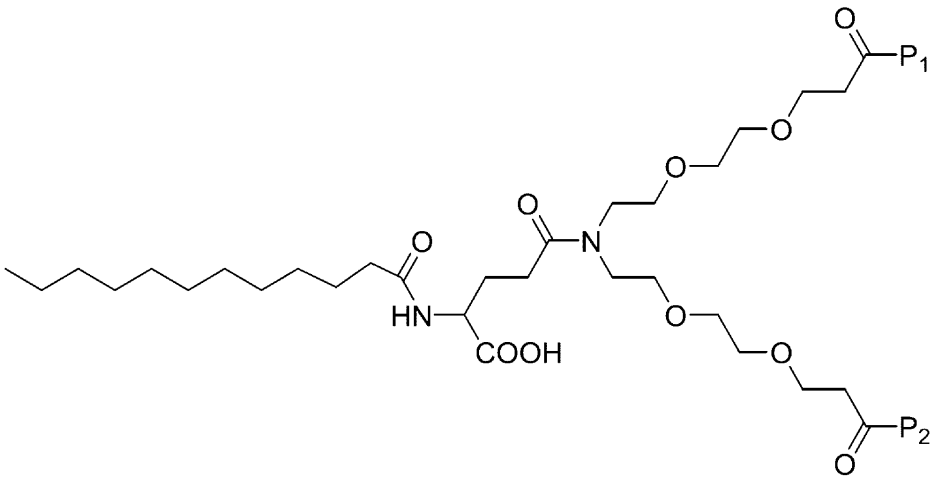


からなる群より選択される、請求項1に記載の二量体のリガンド。

【請求項１７】

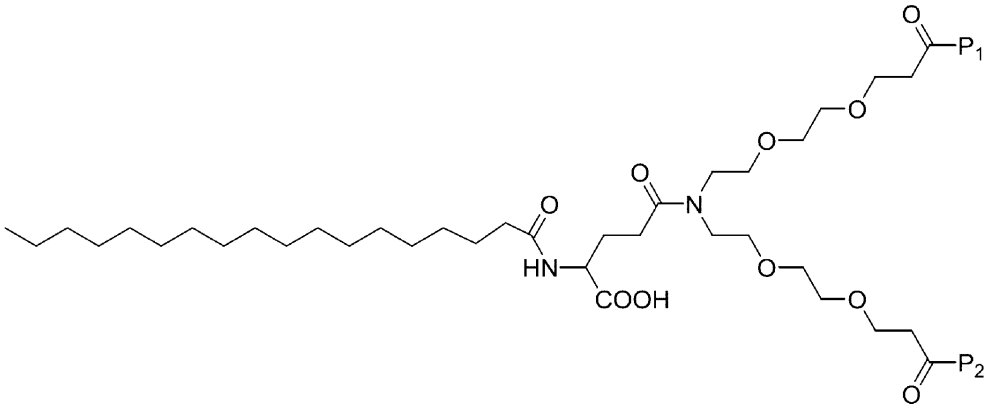
a)KBN41(5)誘導体

【化１６】



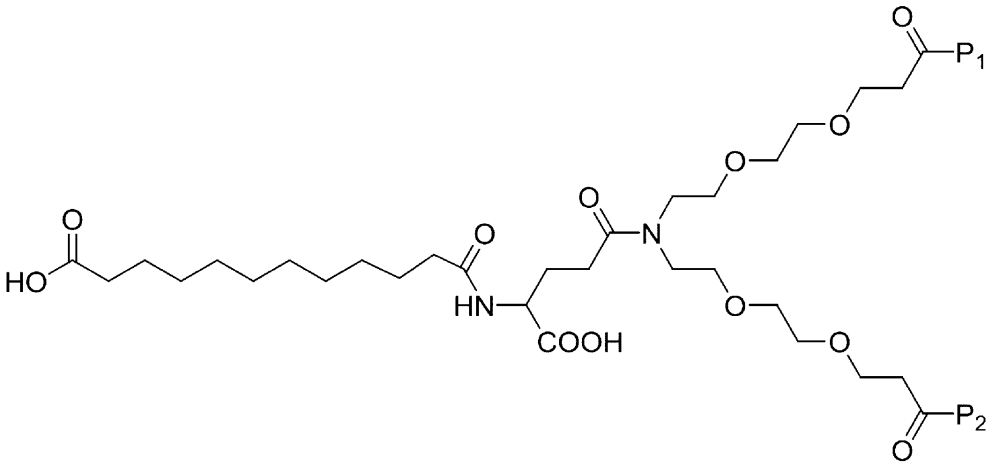
b)KBN42(7)誘導体

【化１７】



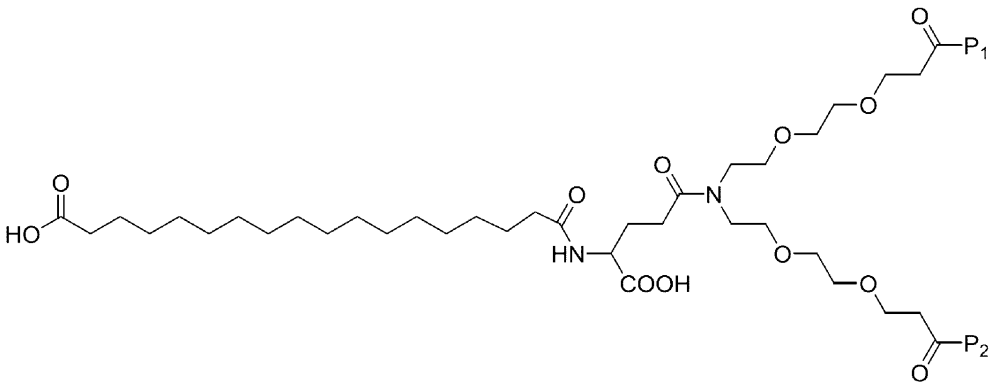
c)KBN43(6)誘導体

【化１８】



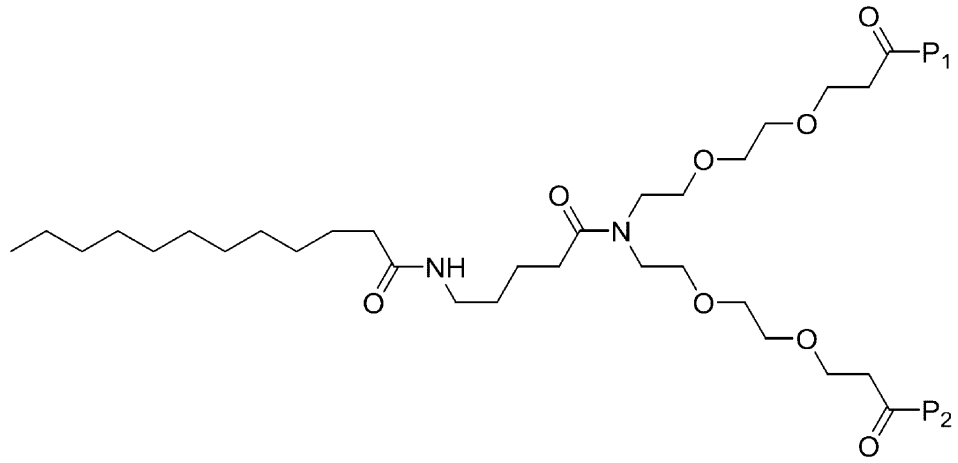
d)KBN44(8)誘導体

【化１９】



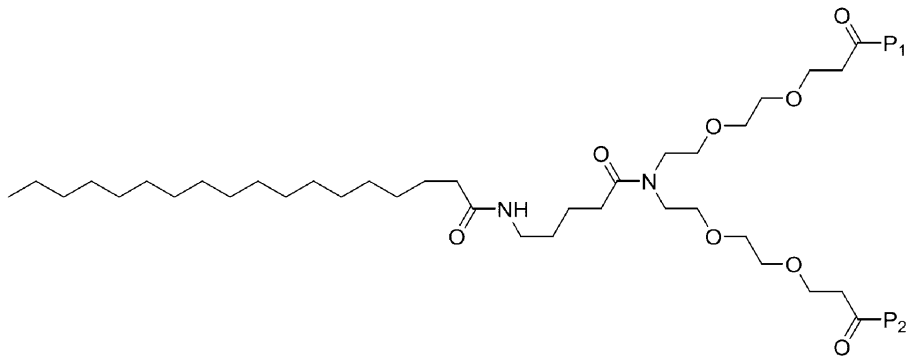
e)KBN45(9)誘導体

【化２０】



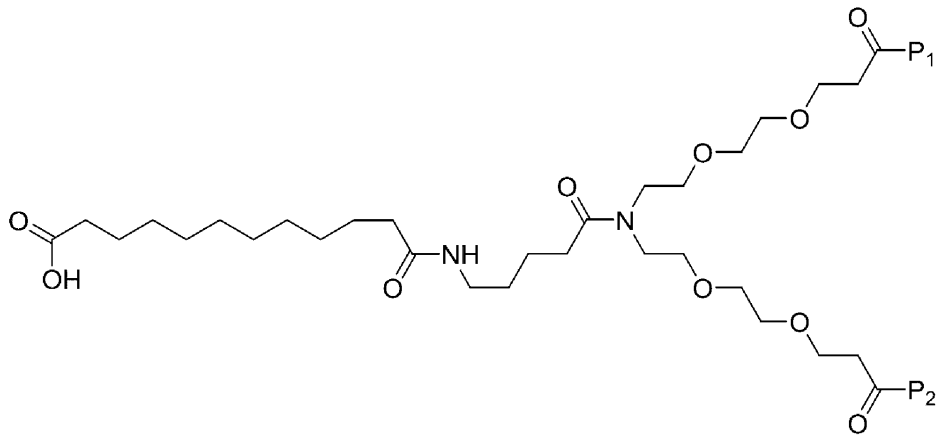
f)KBN46(11)誘導体

【化２１】



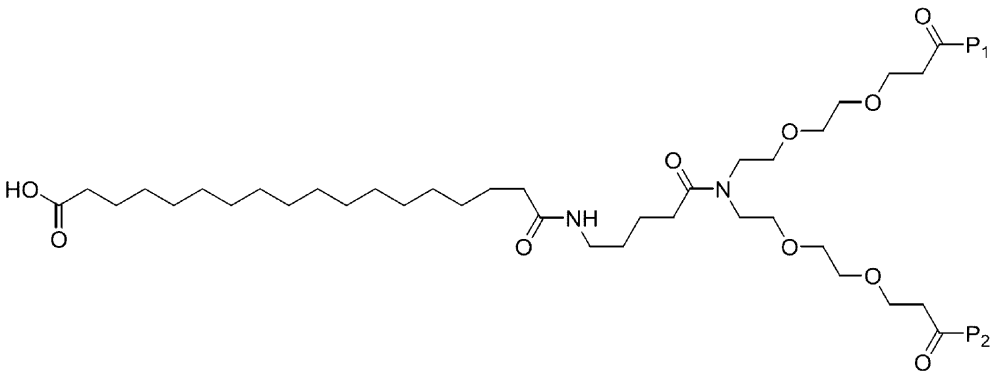
g)KBN47(10)誘導体

【化２２】



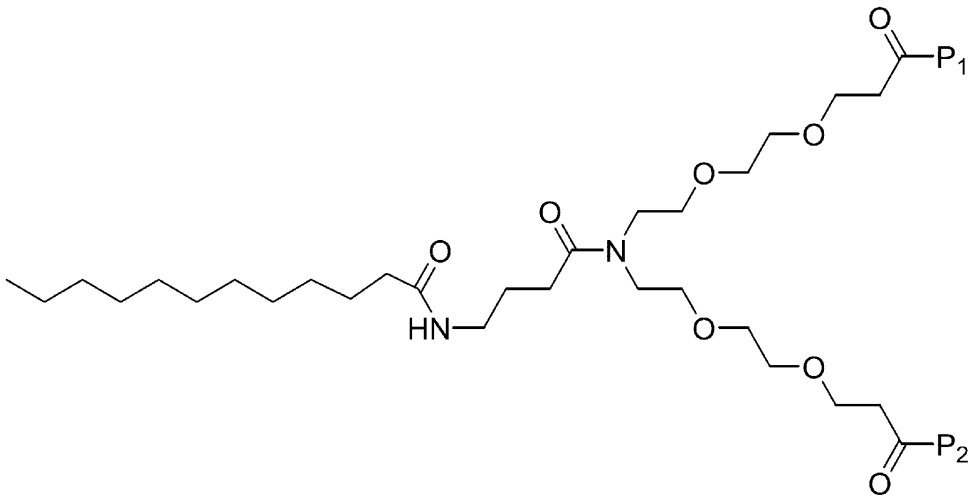
h)KBN48(12)誘導体

【化２３】



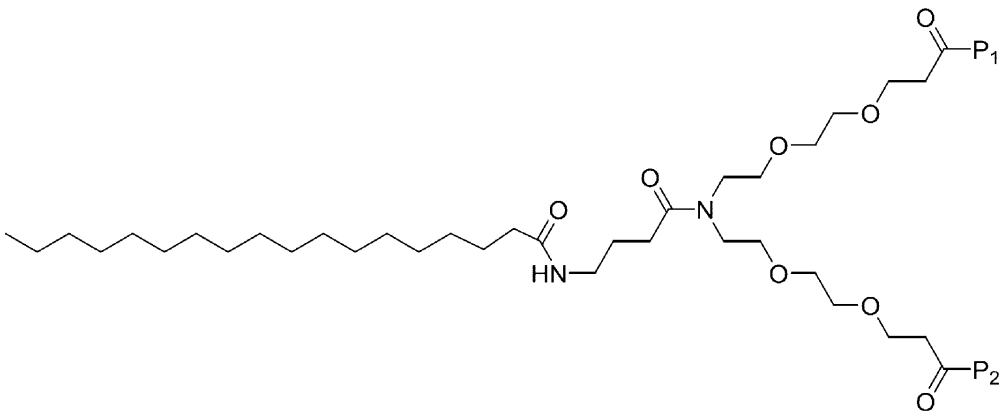
i)KBN52(1)誘導体

【化２４】



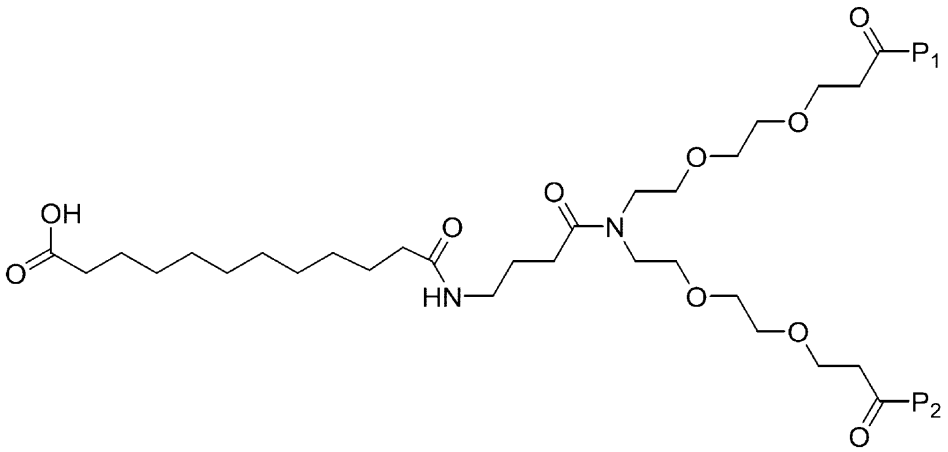
j)KBN53(3)誘導体

【化２５】



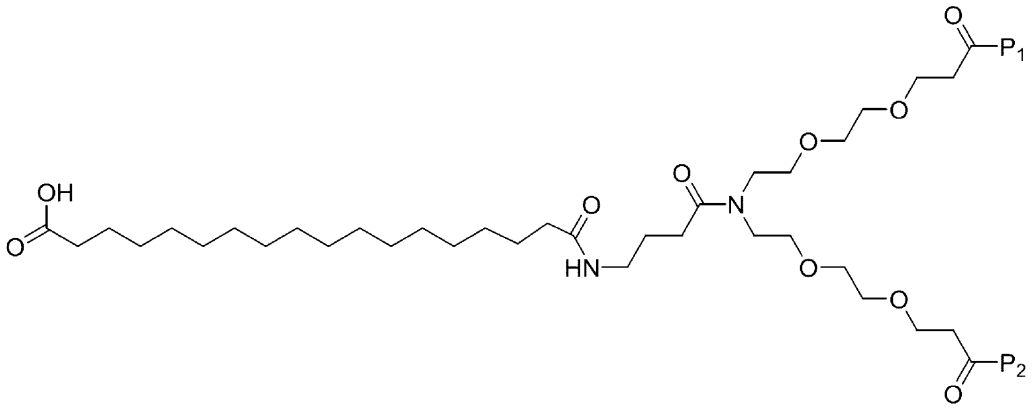
k)KBN54(2)誘導体

【化２６】



l)KBN55(4)誘導体

【化２７】

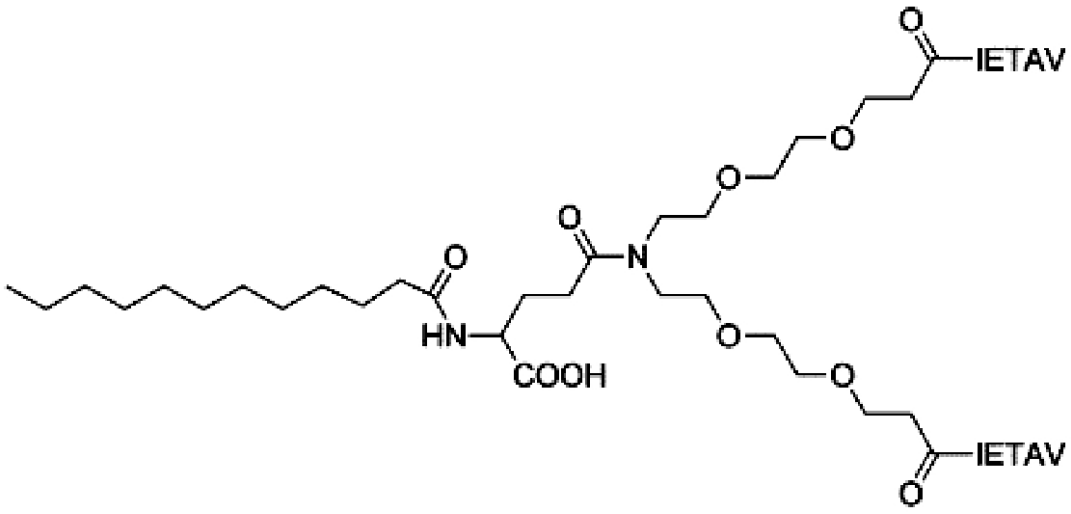


からなる群より選択される、請求項1に記載の二量体のリガンド。

【請求項１８】

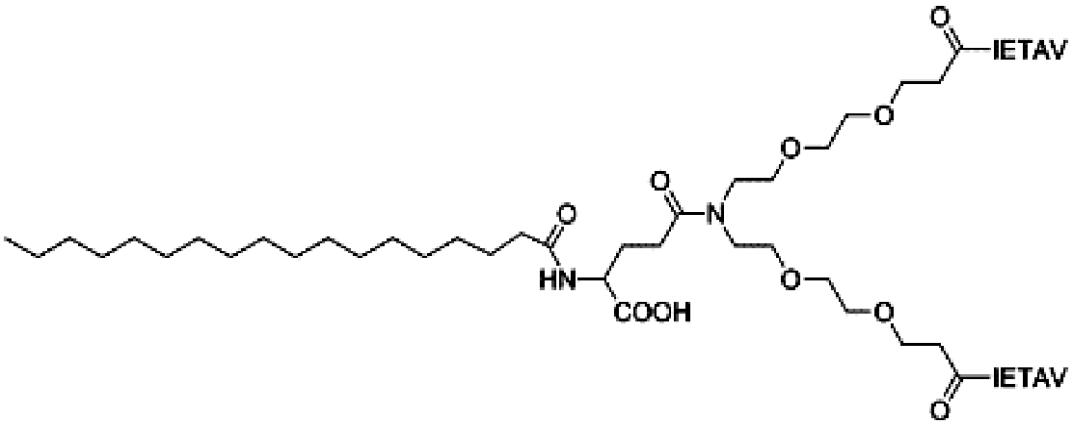
a)KBN41(5)

【化２８】



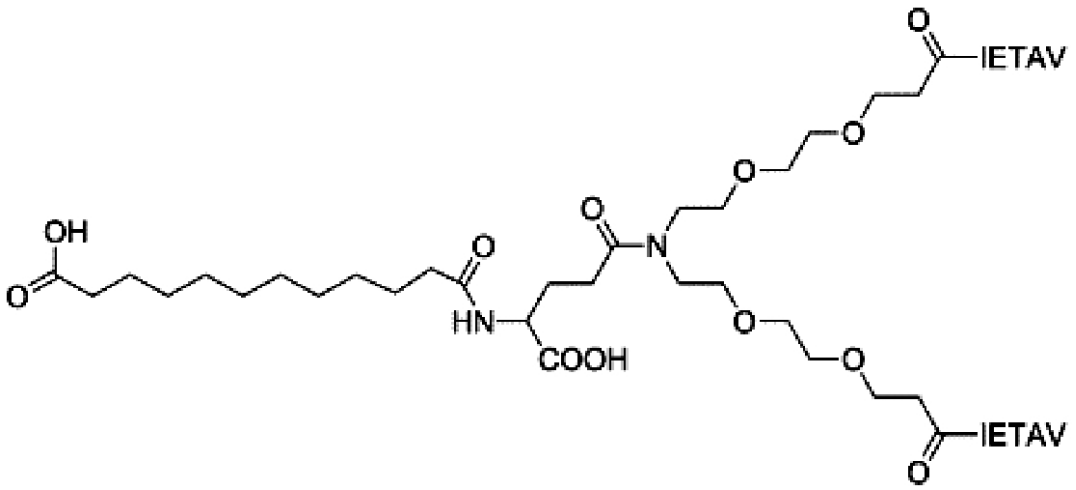
b)KBN42(7)

【化２９】



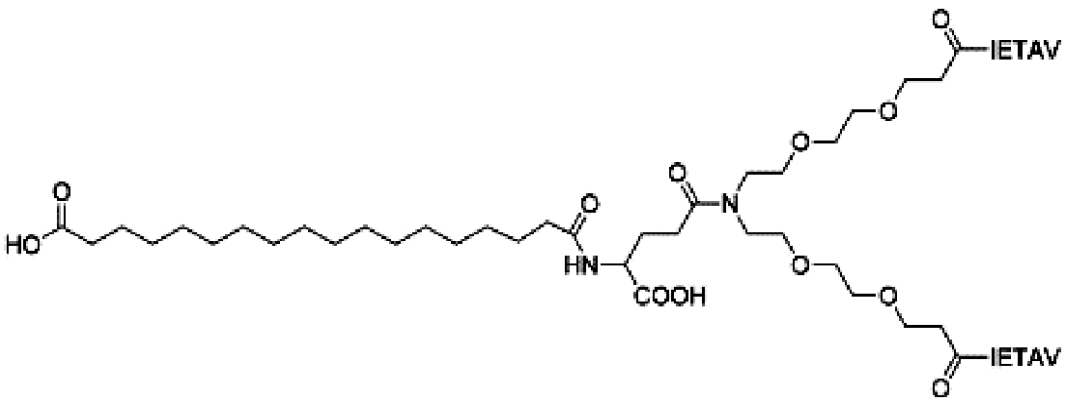
c)KBN43(6)

【化３０】



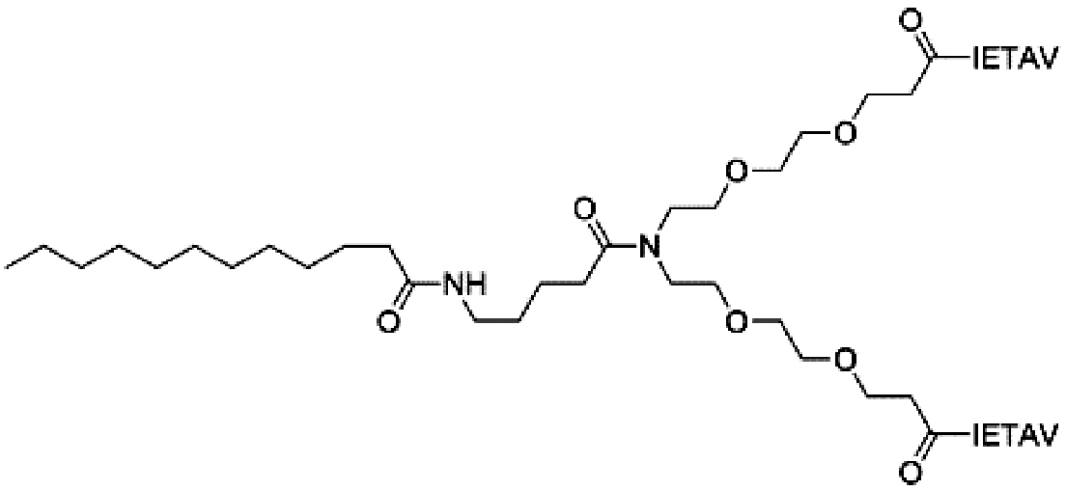
d)KBN44(8)

【化３１】



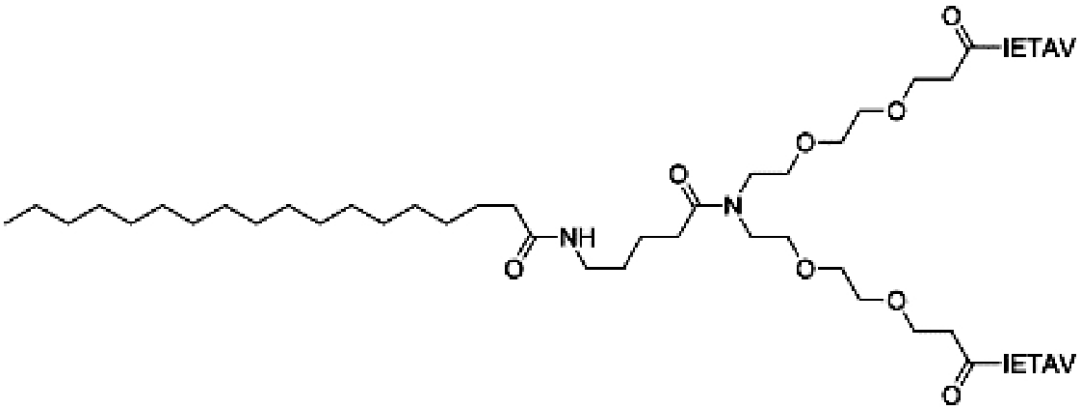
e)KBN45(9)

【化３２】



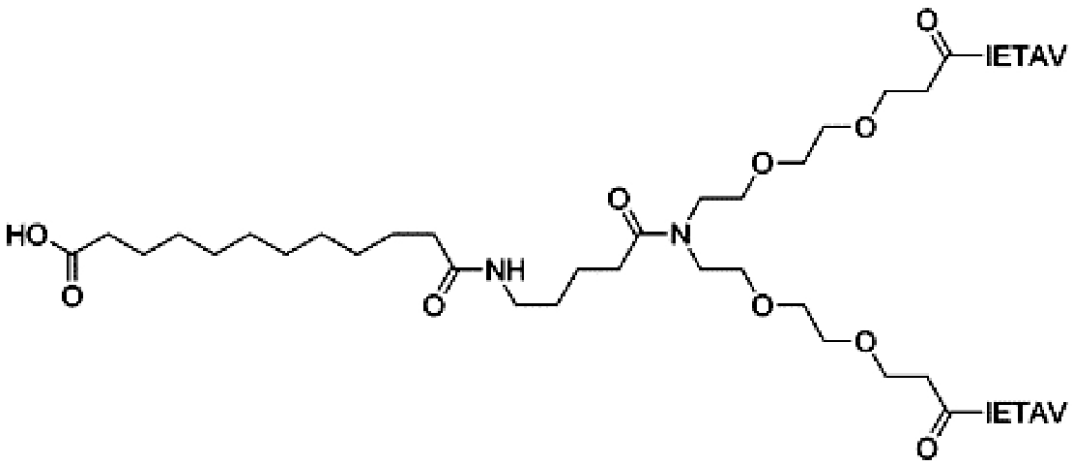
f)KBN46(11)

【化３３】



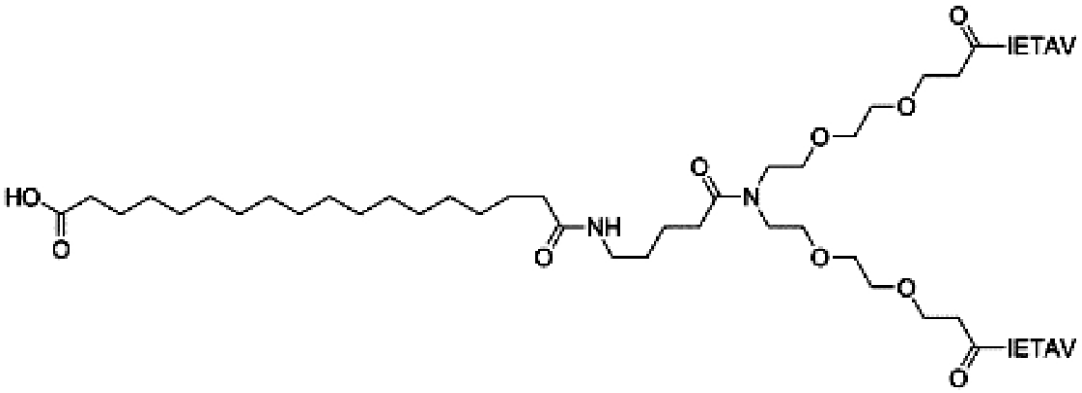
g)KBN47(10)

【化３４】



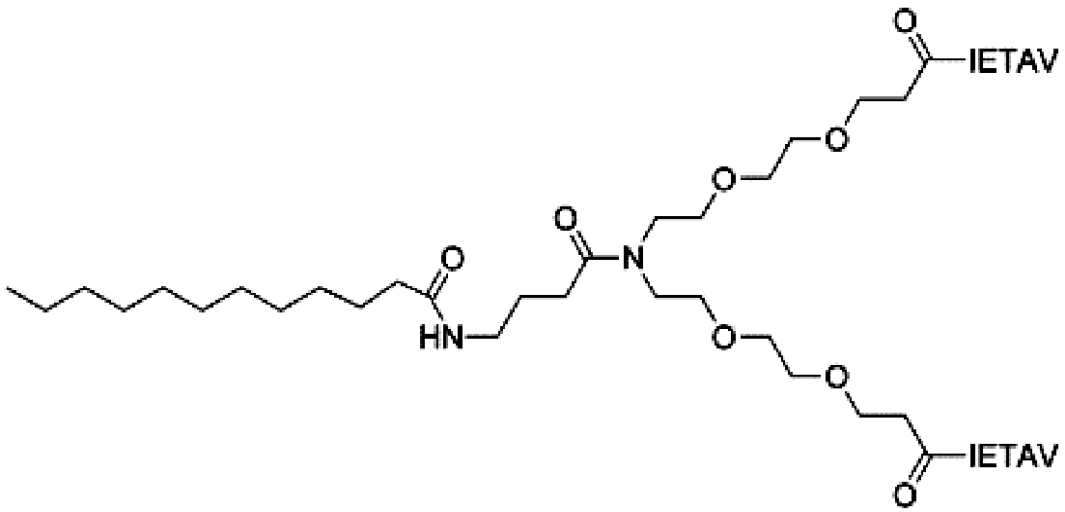
h)KBN48(12)

【化３５】



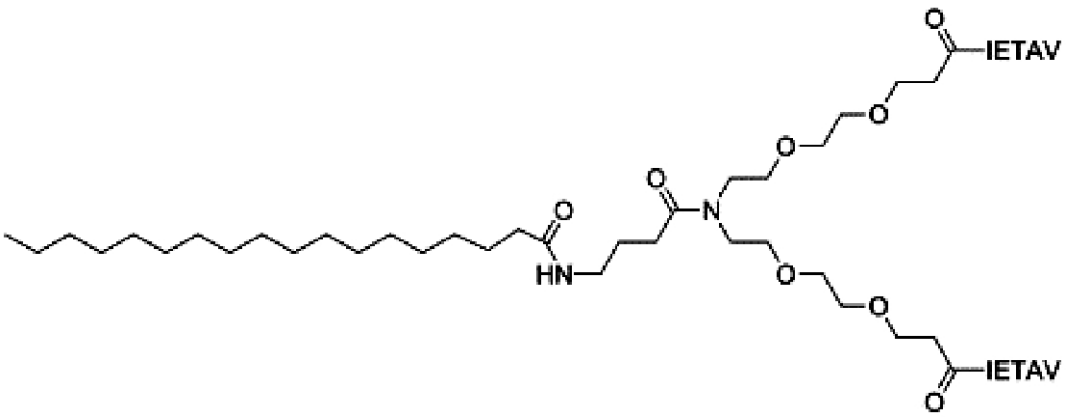
j)KBN52(1)

【化３６】



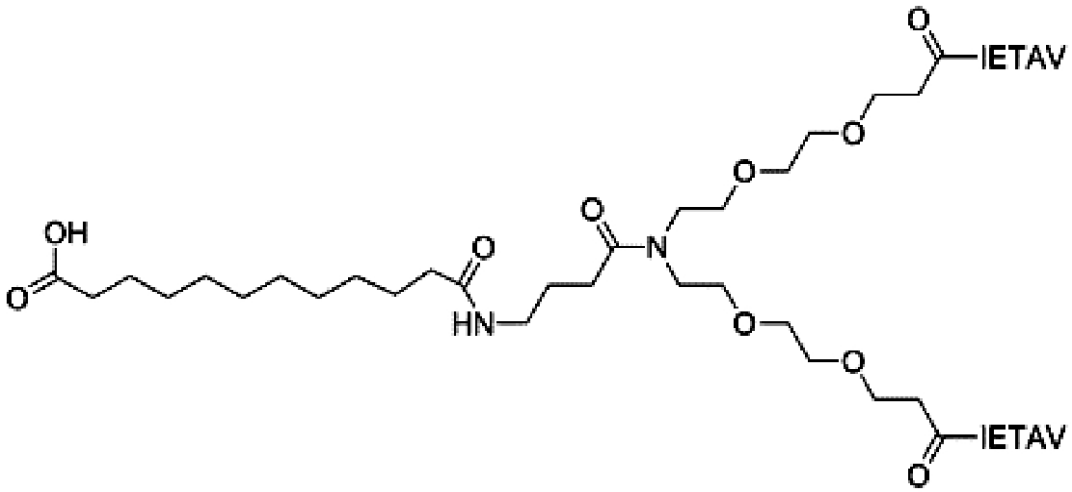
k)KBN53(3)

【化３７】



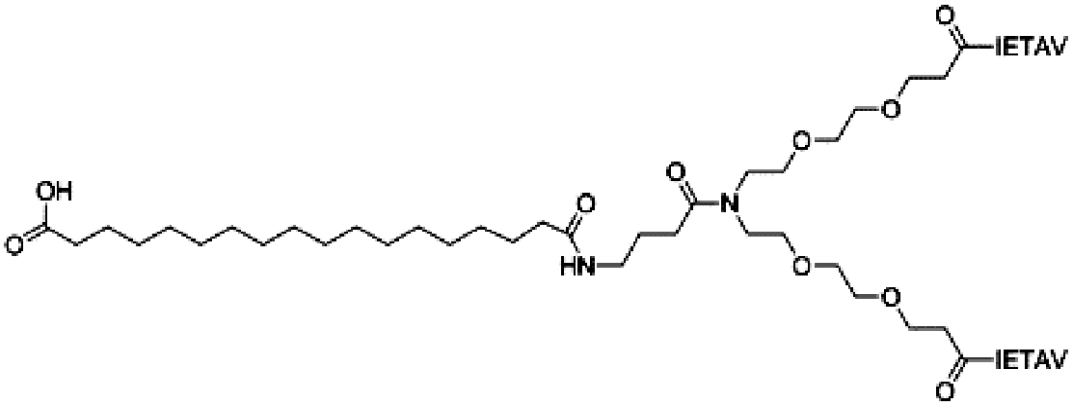
l)KBN54(2)

【化３８】



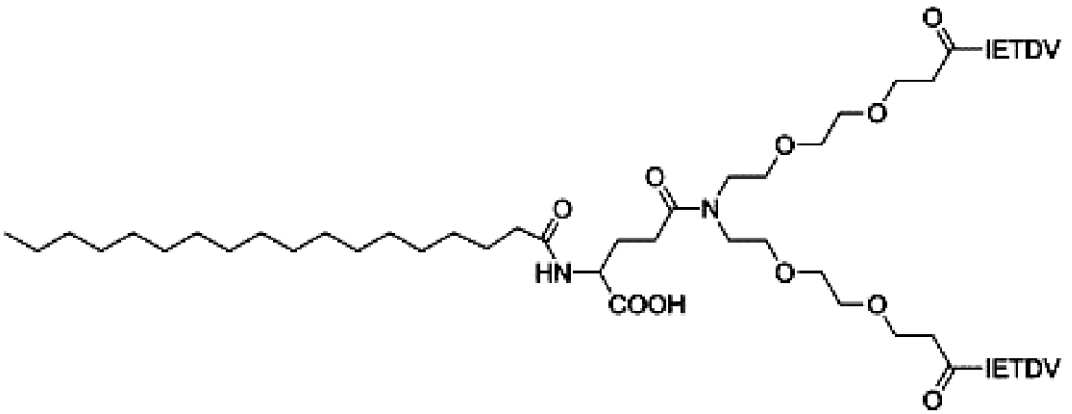
m)KBN55(4)

【化３９】



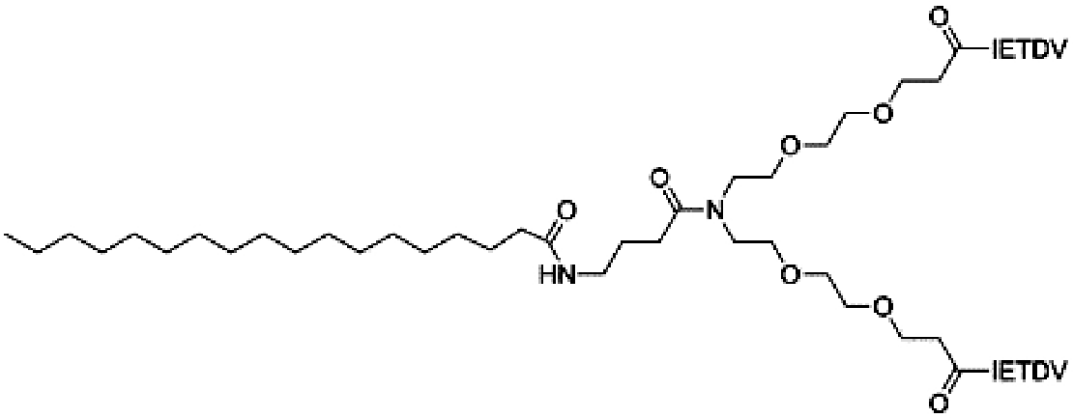
n)KBN63(15)

【化４０】



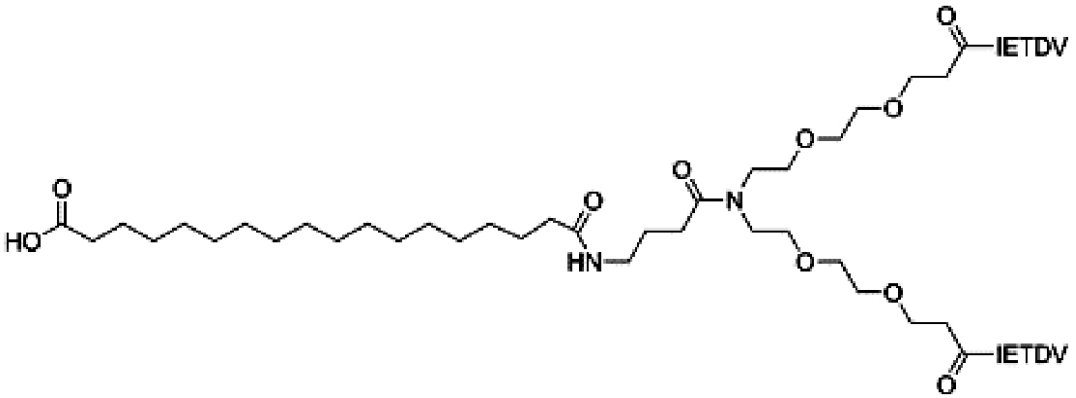
o)KBN64(13)

【化４１】



p)KBN65(14)

【化４２】



からなる群より選択される、請求項1に記載の二量体のリガンド。

【請求項１９】

疼痛の治療または予防に使用するための、請求項1に記載の二量体のリガンドを含む医薬。

【請求項２０】

興奮毒性関連疾患の治療または予防に使用するための、請求項1に記載の二量体のリガンドを含む医薬。

【請求項２１】

前記疾患が、CNSに対する/CNSにおける/CNSの虚血傷害または外傷である、請求項20に記載の医薬。

【請求項２２】

請求項1に記載の二量体のリガンドを製造する方法であって、

a)Ns-NPEG二酸リンカーを調製する段階と、

b)Fmocベースの固相ペプチド合成を用いてペプチドを調製する段階と、

c)Fmoc脱保護ペプチドをNs-NPEG二酸リンカーで二量体化する段階と、

d)任意選択で仲介リンカーを介して、脂肪酸と前記リンカー-二量体結合体とをカップリングする段階と

を含む、方法。

【請求項２３】

請求項22に記載の方法の段階cにおいて、樹脂を化学量論量未満の前記Ns-NPEG二酸リンカー、塩基、カップリング試薬および適切な溶媒で繰り返し処理することを含む、樹脂上での二量体化工程を用いて、あるいは前記Ns-NPEGリンカーの活性エステルの使用により、前記Fmoc脱保護した樹脂結合ペプチドを前記Ns-NPEG二酸リンカーで二量体化する、請求項22に記載の方法。

【請求項２４】

請求項22に記載の方法の段階cにおいて、前記Ns-NPEGリンカーの活性エステルを、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)またはヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)および適切な側鎖保護ペプチドとともに溶媒中で用いて、前記二量体化工程を溶液中で実施する、請求項22に記載の方法。

【請求項２５】

請求項22に記載の方法の段階dにおいて、活性化のためのカップリング試薬および塩基を用いて、または活性エステルを用いて前記脂肪酸と前記リンカー-二量体結合体とをカップリングすることをさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項２６】

請求項22に記載の方法の段階dにおいて、活性化のためのカップリング試薬および塩基を用いることによって、またはFmoc保護アミノ酸リンカーの活性エステルによって、Fmoc保護リンカーを連続的にカップリングすることにより、前記アミノ酸リンカーと、前記NPEGと二量体化し樹脂に結合したペプチドの遊離窒素とをカップリングすることをさらに含む、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＰＳＤ－９５のＰＤＺドメインと結合することができる化合物およびＰＳＤ－９５が仲介するタンパク質間相互作用の阻害剤としてのその使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

シナプス後肥厚部タンパク質－９５（ＰＳＤ－９５）は、ヒトではＤＬＧ４（ｄｉｓｋｓ　ｌａｒｇｅホモログ４）遺伝子によってコードされるタンパク質である。ＰＳＤ－９５は膜結合グアニル酸キナーゼ（ＭＡＧＵＫ）ファミリーのメンバーであり、ＰＳＤ－９３とともに同じＮＭＤＡ受容体およびカリウムチャネルに内に動員される。

【０００３】

ＰＳＤ－９５は、ＰＤＺドメイン含有タンパク質のＭＡＧＵＫファミリーの中で最も盛んに研究されているメンバーである。あらゆるＭＡＧＵＫファミリータンパク質と同じく、ＰＳＤ－９５には３つのＰＤＺドメイン、１つのＳＨ３ドメインおよびリンカー領域によって接続されている１つのグアニル酸キナーゼ様ドメイン（ＧＫ）が含まれている。ＰＳＤ－９５はほぼ例外なく、ニューロンのシナプス後肥厚部に位置しており、シナプスタンパク質の係留に関与している。ＰＳＤ－９５の直接的または間接的な結合パートナーとしては、ニューロリジン、神経型一酸化窒素合成酵素（ｎＮＯＳ）、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）受容体、ＡＭＰＡ受容体およびカリウムチャネルが挙げられる。

【０００４】

ＰＤＺドメインは、ヒトを含めた様々な生物体の足場タンパク質に共通してみられる８０～９０アミノ酸の構造ドメインである。ＰＤＺは、このドメインを含むことが発見された最初の３種類のタンパク質、すなわち、ＰＳＤ－９５、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｄｉｓｃ　ｌａｒｇｅ　ｔｕｍｏｒ　ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ（Ｄｌｇ１）およびＺｏｎｕｌａ　ｏｃｃｌｕｄｅｎｓ－１タンパク質（ＺＯ－１）の最初の１文字を表す頭字語である。

【０００５】

ＰＤＺドメインは一般に、他のタンパク質のＣ末端と結合することにより相互作用する。これは、βシートの補強、すなわち、結合パートナータンパク質のＣ末端尾部が加わることによりＰＤＺドメインのβシートが拡張され、拡張されたβシート様構造が形成されることにより達成される。

【０００６】

真核生物界、真正細菌界ともに、様々なタンパク質にＰＤＺドメインがみられるのに対し、古細菌のタンパク質にはほとんど例がない。ＰＳＤ－９５の３つのＰＤＺドメインで

あるＰＤＺ１～３は、Ｓｅｒ／Ｔｈｒ－Ｘ－Ｖａｌ／Ｉｌｅ／Ｌｅｕ－ＣＯＯＨなどの類似したコンセンサス配列を有するペプチドリガンドと結合する。

【０００７】

ＰＤＺドメインとＣ末端ペプチドとの相互作用の基礎となる構造は最初、天然のペプチドリガンドＣＲＩＰＴ（配列：ＹＫＱＴＳＶ）と複合体を形成したＰＳＤ－９５のＰＤＺ３のＸ線結晶構造によって明らかにされた。ＰＤＺ３には６つの逆並行β鎖（βＡ～βＦ）および２つのαヘリックス（αＡおよびαＢ）が含まれており、βＢ鎖とαＢヘリックスとの間の溝にＣ末端ペプチドリガンドがはまり込んで結合する。ペプチドリガンドの２つの残基、すなわち、Ｃ末端から数えて１つ目（P^{0}）および３つ目（P^{-2}）のアミノ酸は、親和性および特異性に特に重要であると考えられている。P^{0}位のアミノ酸の側鎖は疎水ポケットの中に突出しており、脂肪族側鎖をもつアミノ酸（Ｖａｌ、ＩｌｅおよびＬｅｕ）が必要となる。ＰＤＺ３－ＣＲＩＰＴのＸ線結晶構造では、ＳｅｒまたはＴｈｒ（P^{-2}）のヒドロキシル酸素がＨｉｓ３７２のイミダゾール側鎖の窒素と水素結合を形成しており、この相互作用がＰＤＺドメイン／リガンド相互作用の親和性に重要な決定因子であることが明らかにされている。ＰＤＺドメインの保存されたＧｌｙ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ（ＰＤＺ３の３２２～３２５の位置）モチーフおよび正荷電残基（ＰＳＤ－９５　ＰＤＺ３のＡｒｇ３１８）がＣ末端カルボキシル基との結合を仲介する。

【０００８】

ＰＳＤ－９５のＰＤＺ１ドメインおよびＰＤＺ２ドメインは、ＮＭＤＡ型のイオンチャネル型グルタミン酸受容体および一酸化窒素（ＮＯ）産生酵素ｎＮＯＳとの同時結合を含め、複数のタンパク質と相互作用する。ＮＭＤＡ受容体は、興奮毒性、すなわち、グルタミン酸が仲介し神経変性疾患および急性脳損傷に関与する神経毒性の主要なメディエーターであり、ＮＭＤＡ受容体のアンタゴニストは、グルタミン酸が仲介するイオン流動を妨げることにより興奮毒性を効率的に低下させるが、同時に生理学的に重要な過程も妨げる。このように、ＮＭＤＡ受容体アンタゴニストはこれまで、耐容性が低く効果がみられないことから、例えば脳卒中の臨床試験に失敗している。代わりに、ＰＳＤ－９５阻害剤を用いて細胞内ｎＮＯＳ／ＰＳＤ－９５／ＮＭＤＡ受容体複合体を障害することによって、興奮毒性の特異的阻害をもたらすことができる。

【０００９】

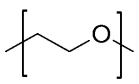
ＰＳＤ－９５は、ＮＭＤＡ受容体、主としてＧｌｕＮ２ＡおよびＧｌｕＮ２ＢサブユニットならびにｎＮＯＳと、それぞれＰＤＺ１およびＰＤＺ２を介して同時に結合する。ＮＭＤＡ受容体が活性化されると、カルシウムイオンの流入が起こり、これがｎＮＯＳを活性化してＮＯが生成される。このように、ＰＳＤ－９５は、長時間持続すると細胞に害を及ぼし得るＮＭＤＡ受容体活性化とＮＯ産生との特異的関係を仲介し、グルタミン酸仲介による神経毒性の重要な促進因子となっている。マウスでは、ＰＳＤ－９５を標的とすることによりＮＯＳ／ＰＳＤ－９５／ＮＭＤＡ受容体三元複合体の相互作用を阻害すると、ＮＭＤＡ受容体のイオン流入および生存促進性シグナル伝達経路などの生理的機能は無傷で維持しながら、カルシウムイオン流入とＮＯ産生との間の機能的結び付きを阻害することによって、虚血性脳損傷が予防されることがわかっている。国際公開第２０１０／００４００３号には、ポリエチレングリコールリンカー（ＰＥＧ）によって連結した二量体ペプチドリガンドによりＰＳＤ－９５を阻害することに関する概念が開示されている。これらの二量体は、ＰＳＤ－９５のＰＤＺ１ドメインおよびＰＤＺ２ドメインと同時に結合する。

【００１０】

ＰＳＤ－９５を標的とする二量体リガンドは、慢性疼痛の治療法として前臨床評価段階にある（Ａｎｄｒｅａｓｅｎら，Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａｃｏｌ，２０１３，６７，１９３－２００；Ｂａｃｈら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，２０１２，１０９，３３１７－３３２２）。しかし、治療用ペプチドは一般に、腎クリアランスおよび肝代謝による血液中からの除去および分解を受けやすい。このため、二量体ペプチドリガンドの薬物動態特性を改善し、ひいてはその安定性および半減期を増大させることが必要とされている。

【発明の概要】
【００１１】
ＰＳＤ－９５の二量体ペプチドリガンドの薬物動態特性を改善し、ｉｎ　ｖｉｖｏ安定性を増大させるという上記の課題に対処するため、本発明は新規な化合物のクラスについて記載し、この化合物のクラスでは、２つのペプチドリガンドがＮＰＥＧリンカーなどのリンカーによって連結されており、かつ１つまたは複数の脂肪酸また脂肪酸誘導体が、ＮＰＥＧリンカーと直接または別のリンカーを介して結合している。
【００１２】
したがって、本発明者らは、脂肪酸が結合していない化合物、例えば国際公開第２０１０／００４００３号に開示されている化合物に比してｉｎ　ｖｉｔｒｏ血漿中半減期が改善された二量体ＰＳＤ－９５リガンドの誘導体を開発した。さらに、この化合物は、皮下投与したときの皮下デポ剤内での滞留時間の増大を示す。
【００１３】
一態様では、本発明は、第一のペプチド（P_1）と第二のペプチド（P_2）とを含む化合物であって、P_1およびP_2が個々に、タンパク質構成アミノ酸残基または非タンパク質構成アミノ酸残基を少なくとも２つ含み、P_1およびP_2がともに、それぞれのＮ末端を介して第一のリンカーL_1と結合し、L_1が、少なくとも１つの酸素原子が窒素原子で置換されてＮＰＥＧになったポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含み、ＮＰＥＧの窒素原子にアルブミン結合部分が、アミド結合により、または任意選択のリンカーL_2を介して連結している、化合物に関する。
【００１４】
本発明の化合物は、本明細書で定義されるP_1およびP_2を選択する場合、ＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２と結合することが明らかにされている。ＰＳＤ－９５は治療剤の重要な標的であるため、一態様では、本発明は、薬剤として使用するための本明細書で定義される化合物に関する。
【００１５】
より具体的には、本発明の化合物は、一態様では、興奮毒性関連疾患の治療または予防あるいは疼痛の予防および／または治療に使用され得る。
【００１６】
本発明の化合物は、
ａ）Ｎｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカーを調製する段階と、
ｂ）Ｆｍｏｃベースの固相ペプチド合成を用いてペプチドを調製する段階と、
ｃ）Ｆｍｏｃ脱保護ペプチドをＮｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカーで二量体化する段階と、
ｄ）任意選択でアミノ酸リンカー（L_2）などの仲介リンカーを介して、脂肪酸とリンカー－二量体結合体とをカップリングする段階と
を含む方法によって、図式的に合成することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】参照リガンドＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４の構造を示す図である。大文字は、「Ｎ」（窒素）、「Ｏ」（酸素）を除き、Ｌ－アミノ酸を表す。
【図２】ＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）ならびにＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４のＨＳＡに対する親和性を示す図である。データは平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）で示されている。
【図３】ＦＰにより決定したＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）ならびにＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４のＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する親和性を示す図である。Ａ）ＴＢＳで測定した；Ｂ）ＴＢＳ＋ＨＳＡで測定した；Ｃ）ＴＢＳ＋ＨＳＡで測定しｆｕについて補正した。データは平均±ＳＥＭ（ｎ≧３）で示されている。
【図４】：化合物（ＵＣＣＢ０１－１２５、１、４、７、１３）のｉｎ　ｖｉｔｒｏの血漿中安定性を示す図である。半減期の計算値は、ＵＣＣＢ０１－１２５が１．７時間であり、１が２３．６時間であり、４、７および１３が２４時間超である。

【図５】二量体リガンドＵＣＣＢ０１－１２５（２種類の投与量）および化合物１、４、７および１３をラットにｓ．ｃ．投与した後の血漿中プロファイルを示す図である。
【図６】：ＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）の合成を示す図である。この図のスキーム１に図示される合成の反応条件は以下の通りであった：（ａ）Ｆｍｏｃ－ＧＡＢＡ－ＯＨ／Ｆｍｏｃ－（Ｌ）－Ｇｌｕ－ＯｔＢｕ／Ｆｍｏｃ－５－Ａｖａ、ＨＡＴＵ、コリジン、ＤＭＦ（１時間×２）、次いでピペリジンの２０％ＤＭＦ溶液；（ｂ）ＦＡ１／ＦＡ２／ＦＡ３／ＦＡ４、ＨＢＴＵ、ＤＩＰＥＡ、ＤＭＦ／ＤＣＭ、４５分、次いでＴＦＡ／ＴＩＰＳ／H_2O（９０／５／５）；（ｃ）０．５Ｍ　ＬｉＯＨ、H_2O／ＡＣＮ（７５／２５）、３０分、次いでＴＦＡによりｐＨ２未満にする。三角形は、ＥおよびＴの側鎖が保護されている（ｔｅｒｔ－ブチル）ことを表す。
【図７】オクタデカン二酸ジメチルエステルのモノけん化を示す図である。反応条件：（ａ）ＮａＯＨ（１当量）、ＭｅＯＨ、４５℃、Ｏ／Ｎ。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
（発明の詳細な説明）
Ｉ．定義
アミド結合：本明細書で使用される「アミド結合」という用語は、カルボン酸とアミンとの間の反応（およびこれに伴う水の除去）によって形成される化学結合のことである。反応が２つのアミノ酸残基の間で起こるものである場合、その反応の結果生じた結合はペプチド結合として知られる。
【００１９】
含む：本明細書で使用される「含む」という用語は、包含的な意味に理解されるべきである。したがって、例として述べると、化合物Ｘを含む組成物は、化合物Ｘと、任意選択で別の化合物とを含み得る。
【００２０】
二量体：本明細書で使用される二量体という用語は、同一のものであるかどうかを問わず、化学的または物理的な相互作用によって結合している２つの化学的部分を指す。例として述べると、二量体はホモ二量体、例えばリンカーにより連結した２つの同一のペプチドなどであり得る。二量体はまた、ヘテロ二量体、例えばリンカーにより連結した２つの異なるペプチドなどであり得る。二量体の例には、リンカーにより共有結合した２つのペプチドまたはペプチド類似体を含み、ペプチドまたはペプチド類似体がＰＳＤ－９５のＰＤＺ１およびＰＤＺ２と同時に結合または相互作用することができる化合物である、本発明のＰＳＤ－９５阻害剤がある。
【００２１】
ジペプチド：本明細書で使用される「ジペプチド」という用語は、ペプチド結合により連結した２つの天然または非天然のアミノ酸を指す。
【００２２】
エチレングリコール部分：本明細書で使用される「エチレングリコール部分」という用語は、ＰＥＧまたはＮＰＥＧリンカーを構成する構成単位を指す。「エチレングリコール部分」の別名は「オキシエチレン」であり、モノマー単位の化学式は、
【化１】



である。
【００２３】
脂肪酸：本明細書で使用される脂肪酸（ＦＡと略記される）という用語は通常、飽和または不飽和であり得る長鎖脂肪族炭素鎖を有する、カルボン酸を指す。脂肪酸は、短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）、中鎖脂肪酸（ＭＣＦＡ）、長鎖脂肪酸（ＬＣＦＡ）および超長鎖脂肪酸（ＶＬＣＦＡ）から選択され得る。短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）とは、脂肪族尾部の炭素数

が６個（すなわち、酪酸）未満の脂肪酸のことである。中鎖脂肪酸（ＭＣＦＡ）とは、脂肪族尾部の炭素数が６～１２個で、中鎖トリグリセリドを形成し得る脂肪酸のことである。長鎖脂肪酸（ＬＣＦＡ）とは、脂肪族尾部の炭素数が１３～２１個の脂肪酸のことである。超長鎖脂肪酸（ＶＬＣＦＡ）とは、脂肪族尾部の炭素数が２２個を上回る脂肪酸のことである。本発明の脂肪酸は、当業者によって知られている任意の適切な脂肪酸または脂肪酸誘導体であり得る。

【００２４】

リンカー：本明細書で使用される「リンカー」という用語は、ある化学物質と別の化学物質との接続を形成する、１つまたは複数の原子を指す。例として述べると、本明細書で言及される「第一のリンカー」は、２つのＰＤＺ－ドメイン結合ペプチドを、それぞれのＮ末端同士の連結を形成することによって結びつける、ＰＥＧまたはＮＰＥＧである。

【００２５】

非タンパク質構成アミノ酸：非コードアミン酸、非標準アミノ酸または非天然アミノ酸とも呼ばれる非タンパク質構成アミノとは、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸のことである。非タンパク質構成アミノ酸の非排他的なリストとしては、α－アミノ－ｎ－酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、イソロイシン、アロイソロイシン、ｔｅｒｔ－ロイシン、α－アミノ－ｎ－ヘプタン酸、ピペコリン酸、α，β－ジアミノプロピオン酸、α，γ－ジアミノ酪酸、オルニチン、アロトレオニン、ホモシステイン、ホモセリン、β－アラニン、β－アミノ－ｎ－酪酸、β－アミノイソ酪酸、γ－アミノ酪酸、α－アミノイソ酪酸、イソバリン、サルコシン、Ｎ－エチルグリシン、Ｎ－プロピルグリシン、Ｎ－イソプロピルグリシン、Ｎ－メチルアラニン、Ｎ－エチルアラニン、Ｎ－メチルβ－アラニン、Ｎ－エチルβ－アラニン、イソセリンおよびα－ヒドロキシ－γ－アミノ酪酸が挙げられる。

【００２６】

ＮＰＥＧ：本明細書で使用されるＮＰＥＧという用語は、ＰＥＧリンカーの１つまたは複数の主鎖酸素原子が窒素原子に置き換わったリンカー誘導体のことである。

【００２７】

Ｎｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカー：「Ｎｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカー」とは、ＮＰＥＧリンカーが窒素上のオルト－ニトロベンゼンスルホニル（Ｎｓ）保護基によって窒素上で保護され、ＮＰＥＧリンカーの末端がカルボン酸含む構造のことである。この化学試薬または構成単位は、２つのペプチド部分、P_1およびP_2を二量体化するのに用いられる。

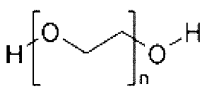
【００２８】

ＰＤＺ：本明細書で使用される「ＰＤＺ」という用語は、シナプス後肥厚部タンパク質－９５（Ｐｏｓｔｓｙｎａｐｔｉｃ ｄｅｎｓｉｔｙ ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＰＳＤ－９５）、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ ｄｉｓｃｓ ｌａｒｇｅ ｔｕｍｏｒ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ（ＤｌｇＡ）、Ｚｏｎｕｌａ ｏｃｃｌｕｄｅｎｓ－１タンパク質（ｚｏ－１）を指す。

【００２９】

ＰＥＧ：本明細書で使用される「ＰＥＧ」という用語は、上述のエチレングリコール部分のポリマーを指す。ＰＥＧは化学式が$C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$であり、その反復構造は

【化２】



であり、この場合、例えば、１２ＰＥＧ部分またはＰＥＧ１２は、１２個のエチレングリコール部分からなるポリマーに対応する。

【００３０】

薬物動態プロファイル：本明細書で使用される「薬物動態プロファイル」という用語は、本明細書に記載される化合物の血流中への吸収、組織内への分布、代謝および排泄とい

ったｉｎ　ｖｉｖｏの特徴を指す。薬物動態プロファイルに含まれるパラメータの例には、血漿プロテアーゼによる化合物の代謝のモデルとなるｉｎ　ｖｉｔｒｏ血漿中半減期がある。

【００３１】

タンパク質構成アミノ酸：天然アミノ酸とも呼ばれるタンパク質構成アミノ酸としては、アラニン、システイン、セレノシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、ピロリジン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンおよびチロシンが挙げられる。

【００３２】

ＰＳＤ－９５：本明細書で使用される「ＰＳＤ－９５」という用語は、シナプス後肥厚部タンパク質－９５を指す。

【００３３】

ＰＳＤ－９５阻害剤：本明細書で使用される「ＰＳＤ－９５阻害剤」は、細胞内でＰＳＤ－９５のＰＤＺ１、ＰＤＺ２またはＰＤＺ１とＰＤＺ２の両方と結合し、これらのＰＤＺドメインによって促進されるタンパク質間相互作用を阻害する化合物を指す。ＰＳＤ－９５阻害剤によって阻害される相互作用の例には、ｎＮＯＳ、ＰＳＤ－９５およびＮＭＤＡ受容体の間の三元複合体形成がある。

【００３４】

ＩＩ．血漿中半減期が改善された二量体化合物

ＰＳＤ－９５を標的とする二量体リガンドは、慢性疼痛および虚血性脳卒中の治療法として前臨床評価段階にある（Ａｎｄｒｅａｓｅｎら，Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａｃｏｌ，２０１３，６７，１９３－２００；Ｂａｃｈら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，２０１２，１０９，３３１７－３３２２）。しかし、治療用ペプチドは一般に、プロテアーゼによる分解ならびに腎ろ過および／または肝代謝による除去を受けやすい（Ｔａｎｇら，Ｊ　Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ，２００４，９３，２１８４－２０４）。二量体リガンドの大きさには上限があり、腎臓は一般に分子量６０ｋＤａ未満の化合物をろ過除去することから、二量体リガンドは腎臓ろ過によって血液中から除去される可能性が高い（Ｄｅｎｎｉｓら，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２００２，２７７，３５０３５－４３）。二量体ペプチドリガンドを神経因性疼痛などの慢性状態での臨床的用途にさらに適したものにするには、投与計画をできる限り単純なもの、好ましくは１日１回にして、コンプライアンスを向上させる必要がある（Ｃｌａｘｔｏｎら，Ｃｌｉｎ　Ｔｈｅｒ　２００１，２３，１２９６－３１０）。さらに、ｉ．ｖ．（静脈内）注射よりも皮下（ｓ．ｃ．）投与などのしかるべき経路を介した患者による自己投与の方が好ましい。ｓ．ｃ．投与の主たる制約になっているものとして、注射量を少なくする必要があること（Ｄｙｃｈｔｅｒら，Ｊ　Ｉｎｆｕｓ　Ｎｕｒｓ　２０１２，３５，１５４－６０）が挙げられ、これには薬物の効力および濃度が高く、薬物が可溶性で、分解および循環血中からの排泄に時間がかかるものである必要がある。さらに、薬物の作用時間を長くするため、薬物が注射デポ剤中で安定であり、循環血中への吸収が遅いものである必要がある（Ｈａｖｅｌｕｎｄら，Ｐｈａｒｍ　Ｒｅｓ　２００４，２１，１４９８－５０４）。したがって、二量体ペプチドリガンドの薬物動態プロファイルおよびｉｎ　ｖｉｖｏ半減期をさらに最適化して、上記の問題点を打ち消す必要がある。

【００３５】

アルブミン結合

ヒト血清中に最も多量に存在し血清総タンパク質の５５％を占めるヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）（Ｅｌｓａｄｅｋら，Ｊ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ　２０１２，１５７，４－２８）は、上に挙げた問題を解決する機会をもたらす。ＨＳＡの平均血中濃度は５２０～８３０μＭであり、分子量は約６６．５ｋＤａである（Ｋｒａｇｈ－Ｈａｎｓｅｎら，Ｂｉｏｌ　Ｐｈａｒｍ　Ｂｕｌｌ　２００２，２５，６９５－７０４）。ＨＳＡは血液、筋組織および皮膚に多量に存在する（Ｓｌｅｅｐら，Ｂｉｏｃｈｉｍ　Ｂｉｏｐｈ

ｙｓ Ａｃｔａ ２０１３，１８３０，５５２６－３４）が、ニューロン内には正常条件下では存在しない。しかし、脳卒中などの脳－血液関門（ＢＢＢ）が損なわれる病的状態では、ニューロン内に侵入することがある（Ｌｏｂｅｒｇ，ＡＰＭＩＳ １９９３，１０１，７７７－８３）。ＨＳＡは、脂肪酸（ＦＡ）、ヘミン、ビリルビンおよびトリプトファン（Ｓｉｍａｒｄら，ＰＮＡＳ ＵＳＡ，２００５，１０２，１７９５８－６３；Ｋｒａｇｈ－Ｈａｎｓｅｎら，Ｂｉｏｌ Ｐｈａｒｍ Ｂｕｌｌ ２００２，２５，６９５－７０４）などの内因性リガンドならびにワルファリンおよびジアゼパムなどの薬物のほか、金属イオン（Ｙａｍａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ ２０１３，１８３０，５４３５－４３）を多岐にわたって輸送し貯蔵するタンパク質としての役割を果たす。

【００３６】

ＨＳＡの構造は精力的に研究されてきており、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（ＰＤＢ、２０１３年9月２６日にアクセス）には、９０を超える様々なＨＳＡのＸ線構造が７１の様々なリガンドとともに保管されている。ＨＳＡは寸法が約８０×８０×３０Åのハート形の分子であり、3つの類似したドメイン（Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩ）から構成されており、この3つのドメインはさらに2つのサブドメイン（ａおよびｂ）に分けられる（Ｓｕｇｉｏら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ １９９９，１２，４３９－４６）。大部分の薬物はＳｕｄｌｏｗ部位Ｉ（ワルファリン部位とも呼ばれる）およびＩＩ（ジアゼパム部位とも呼ばれる）に結合する（Ｅｌｓａｄｅｋら，Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１２，１５７，４－２８；Ｙａｍａｓａｋｉら，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ ２０１３，１８３０，５４３５－４３）。Ｓｕｄｌｏｗ部位は、１９７５年に蛍光分光法によりこの部位を特定したＳｕｄｌｏｗらの先駆的研究（Ｓｕｄｌｏｗら，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ １９７５，１１，８２４－３２）にちなんで名付けられたものである。その後、この２つの薬物結合部位の位置付けが実施され、それぞれサブドメインＩＩａ（サブドメインＩＩＩａおよびＩＩｂの残基が寄与している）およびＩＩＩａに存在することがわかっている（Ｙａｍａｓａｋｉら，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ ２０１３，１８３０，５４３５－４３）。リガンドはＳｕｄｌｏｗ部位ＩおよびＩＩに結合するのが一般的であるが、その重要な例外のひとつが脂肪酸（ＦＡ）である。

【００３７】

ＨＳＡと薬物との結合性が高いと薬物の半減期が増大するという概念は１９７０年代から知られている。しかし、ＨＳＡを用いて治療用ペプチドおよびタンパク質の半減期を増大させるという具体的な概念に発展するにはさらに時間を要し、１年間の刊行物数は２００２年（約２５０件／年）から２０１０年（約５００件／年）までに2倍になった（Ｅｌｓａｄｅｋら，Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１２，１５７，４－２８）。ペプチドベースのＨＳＡ結合部分は、ファージディスプレイによって同定されたＨＳＡ結合配列（Ｄｅｎｎｉｓら，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２００２，２７７，３５０３５－４３）、天然源から単離されたもの（Ｊｏｎｓｓｏｎら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ ２００８，２１，５１５－２７）のほか、いわゆるアドネクチン（Ｌｉｐｏｖｓｅｋら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ ２０１１，２４，３－９）を含め、いくつか記載されている。しかし、これらの結合部分はプロテアーゼによる分解を受けやすく、今回のように、開発された化合物がｓ．ｃ．デポ剤中に数時間存在しなければならないｓ．ｃ．投与の場合に特に問題となり得る。

【００３８】

全体的構造

薬物動態プロファイルを改善するため、本発明者らは、作製された化合物のＨＳＡ親和性、ＰＳＤ－９５に対する親和性および疎水性に及ぼす脂肪酸およびリンカーの種類の影響を検討した。このような検討を実施したところ、所望のＨＳＡ結合プロファイルが得られヒト血漿中での安定性が増大した新規な化合物が同定された。

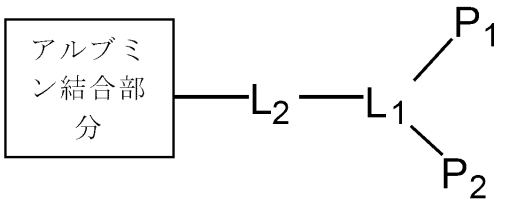
【００３９】

したがって、一態様では、本発明は、第一のペプチド（P_1）と第二のペプチド（P_2）を含む化合物であって、P_1およびP_2が個々に、タンパク質構成または非タンパク質構成アミノ酸残基を少なくとも２つ含み、P_1およびP_2がともに、そのＮ末端を介して第一のリンカーL_1と結合し、L_1が、少なくとも１つの酸素原子が窒素原子で置換されてＮＰＥＧになったポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含み、ＮＰＥＧの窒素原子にアルブミン結合部分が、アミド結合により、または任意選択のリンカーL_2を介して連結している、化合物に関する。

【００４０】

ある特定の実施形態では、前記化合物は一般式（Ｉ）：

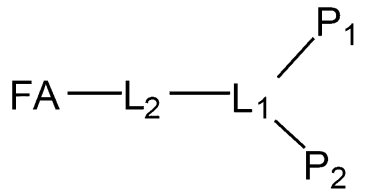
【化３】



式（Ｉ）

の化合物である。アルブミン結合部分は、アルブミンと結合する任意の適切な化学基であってよいが、アルブミン結合部分は脂肪酸（ＦＡ）であるのが好ましい。一実施形態では、化合物は一般式（ＩＩ）：

【化４】



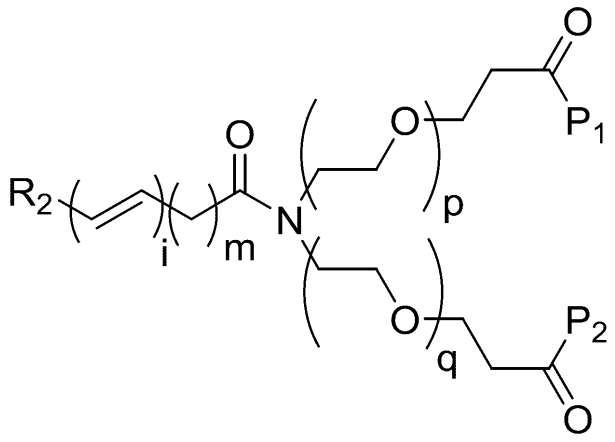
式（ＩＩ）

を有する。脂肪酸は、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸などの任意の適切な脂肪酸であってよい。上の式（Ｉ）および（ＩＩ）に示されるように、脂肪酸などのアルブミン結合部分は、任意選択で、第二のリンカーL_2を介してＮＰＥＧリンカー（L_1）の窒素原子と結合していてもよい。第二のリンカーL_2が含まれる実施形態では、そのリンカーは窒素原子を含む。

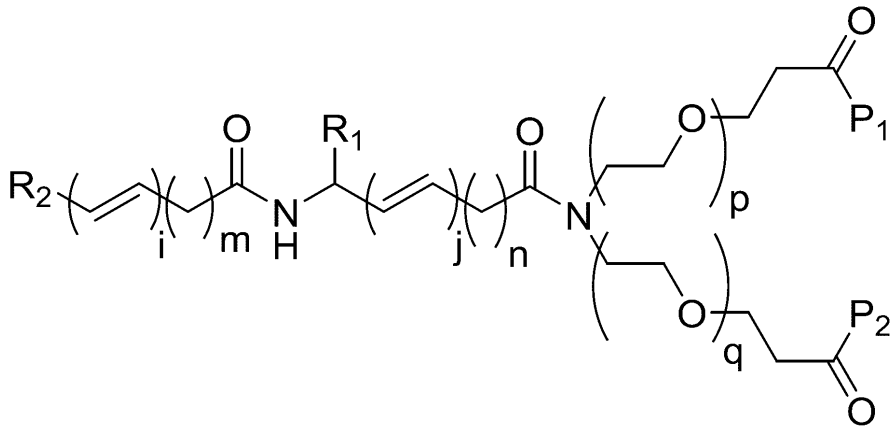
【００４１】

一実施形態では、本発明による化合物は式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）：

【化５】



式（ＩＩＩ）



式（ＩＶ）

の一般構造を有し、式中、

R_1およびR_2は個々に、ＨおよびＣＯＯＨからなる群より選択され、

ｎは０～４８の整数であり、

ｍは１～４８の整数であり、

ｐは０～２８の整数であり、

ｑは０～２８の整数であり、

ｉは０～１２の整数であり、

ｊは０～１２の整数であり、

P_1およびP_2は個々に、タンパク質構成アミノ酸残基または非タンパク質構成アミノ酸残基を少なくとも２つ含むペプチドから選択される。

【００４２】

第一のリンカー（L_1）

脂肪酸が活性ペプチドP_1およびP_2に対して示す特性は、これらの部分と連結する方法に左右される。この連結は第一のリンカーL_1および第二のリンカーL_2を介して得られる。国際公開第２０１２／１５６３０８号にある程度記載されている第一のリンカーL_1は、ポリエチレングリコールを形成する複数のエチレングリコール部分からなり、その酸素原子のうちの１つが窒素原子に置き換わってＮＰＥＧリンカーを形成している。ＮＰＥＧリンカーは、両側に複数（ｐ、ｑ）のエチレングリコール部分が隣接する窒素原子として表すことができる。

【００４３】

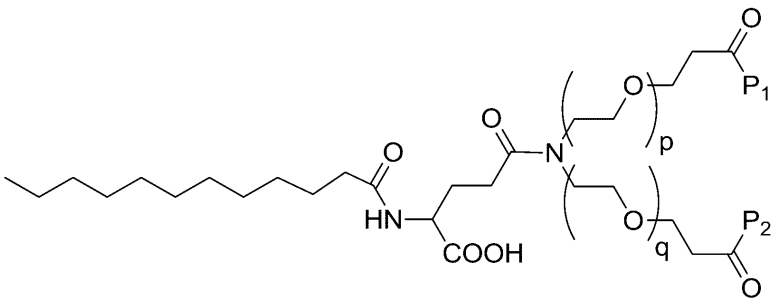
窒素原子に隣接するエチレングリコール部分の数は、本発明の様々な実施形態によって異なり得る。一実施形態では、片側のエチレングリコール部分の数（ｐ）は、反対側のエチレングリコール部分の数と等しい、すなわちｐ＝ｑである。他の実施形態では、ｐ＞ｑまたはｐ＜ｑである。

【００４４】
一実施形態では、ｐとｑの合計は０～２８の整数であり、例えば、エチレングリコール部分の数ｐは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７または２８から選択される。
【００４５】
一実施形態では、ｐの範囲が１～４のとき、ＰＳＤ－９５に対する親和性が最も高くなるため、エチレングリコール部分の数ｐは１～４である。
【００４６】
一実施形態では、エチレングリコール部分の数ｑは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７または２８のエチレングリコール部分から選択される。
【００４７】
一実施形態では、ｑの範囲が１～４とき、ＰＳＤ－９５に対する親和性が最も高くなるため、エチレングリコール部分の数ｑは１～４である。
【００４８】
一実施形態では、リンカーの長さの範囲が２～１２のとき、ＰＳＤ－９５に対する親和性が最も高くなるため、エチレングリコール部分の総数ｐ＋ｑは２～１２である。
【００４９】
一実施形態では、リンカーの長さの範囲が４のとき、ＰＳＤ－９５に対する親和性が際立って最も高くなるため、エチレングリコール部分の総数ｐ＋ｑは４である。
【００５０】
別の実施形態では、リンカーの長さの範囲が６のとき、ＰＳＤ－９５に対する親和性が極めて高くなるため、エチレングリコール部分の総数ｐ＋ｑは６である。
【００５１】
第二のリンカー（L_2）
第二のリンカーL_2は任意選択のものであり、特定の目的に必要な物理的または化学的特性に応じて、含まれていても含まれていなくてもよい。第二のリンカーL_2が存在する場合、それは窒素原子を含む。第二のリンカーL_2は、例えば、γ－Ｇｌｕ、γ－酪酸（ＧＡＢＡ）、５－アミノ吉草酸（５－Ａｖａ）、タンパク質構成アミノ酸、非タンパク質構成アミノ酸およびＱが任意の適切な原子（１つまたは複数）または分子である一般式H_2N－［Ｑ］－ＣＯＯＨを有する任意の化合物からなる群より選択され得る。
【００５２】
本明細書で既に述べたように、第二のリンカーは、反復する炭素部分を含み、これにより、例えばアルキル鎖またはアルケニル鎖を形成するものであり得る。反復単位の数（ｉ）および／または（ｍ）は所望の特性に応じて異なり得る。したがって、ｉおよび／またはｍは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７および４８からなる群より個々に選択され得る整数である。
【００５３】
一実施形態では、ｎ＝１、ｎ＝２またはｎ＝３となる一実施形態のように、ｎは１～３の整数である。
【００５４】
ある特定の実施形態では、ｉおよび／またはｊは０～１２の整数、例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１および１２からなる群より選択される整数である。
【００５５】

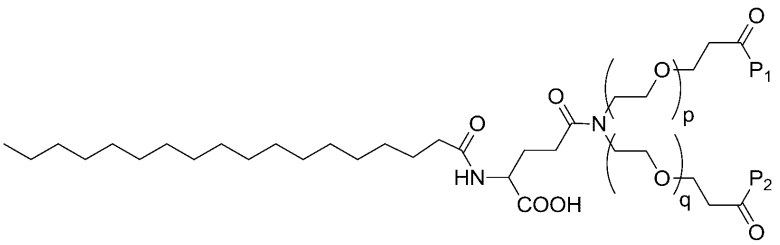
ある特定の実施形態では、リンカーＬ$_1$およびＬ$_2$は、本発明による化合物が以下のものからなる群より選択されるよう選択される。

【表１】

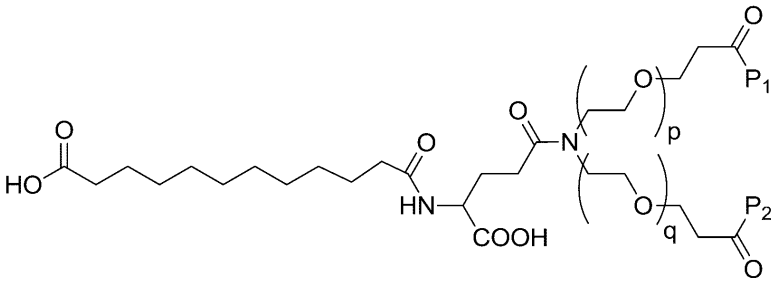
a) KBN41誘導体



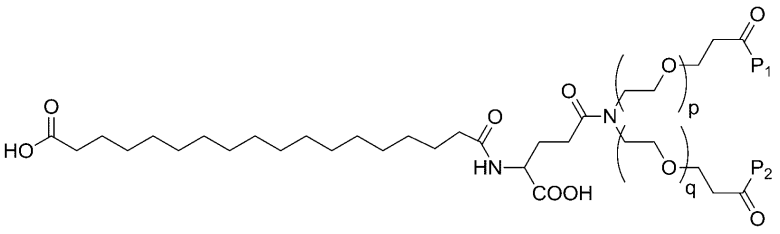
b) KBN42誘導体



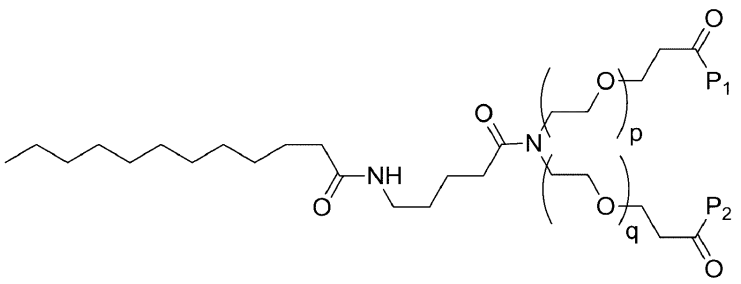
c) KBN43誘導体



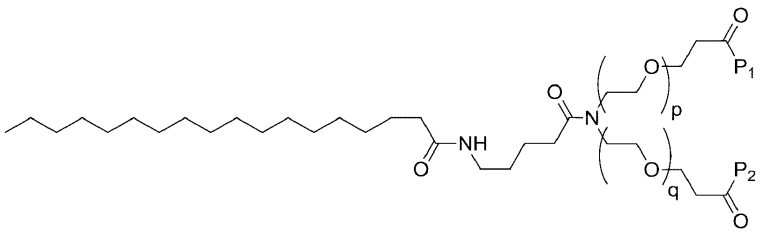
d) KBN44誘導体



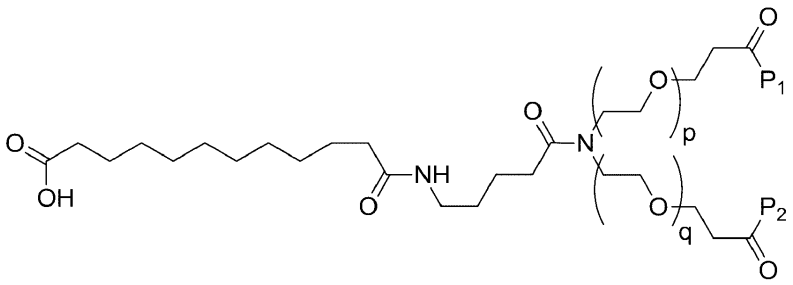
e) KBN45誘導体



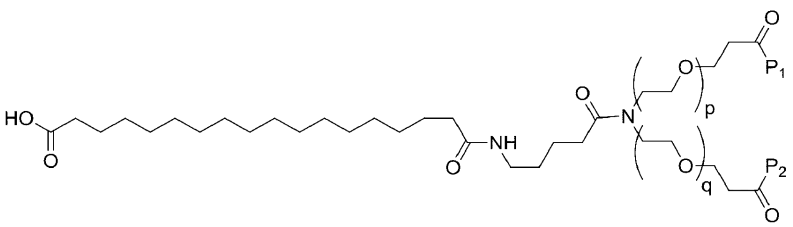
f) KBN46誘導体



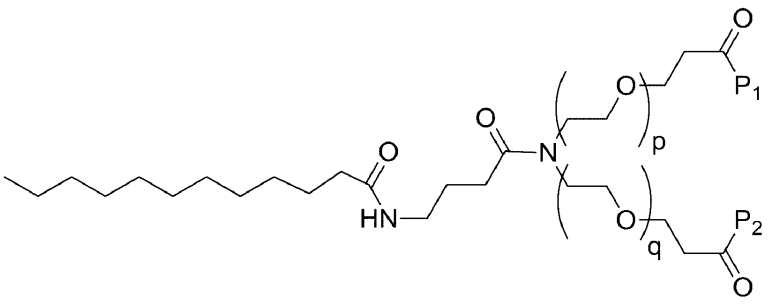
g) KBN47誘導体



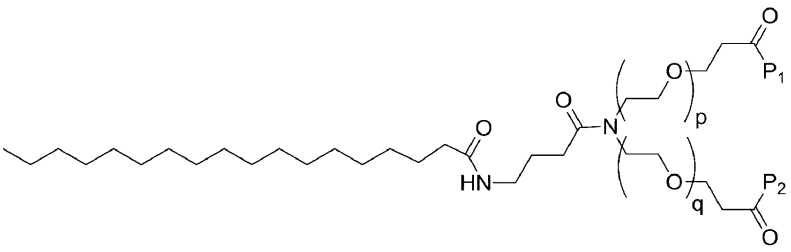
h) KBN48誘導体



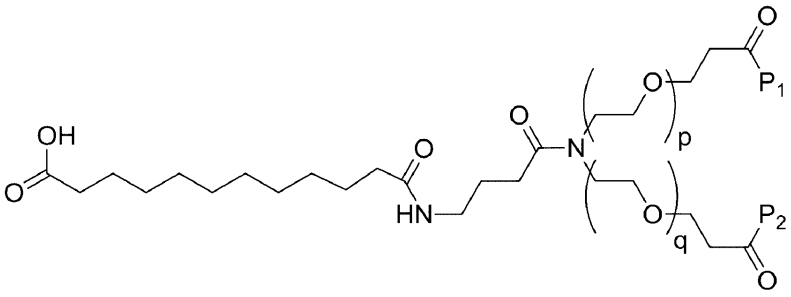
i) KBN52誘導体



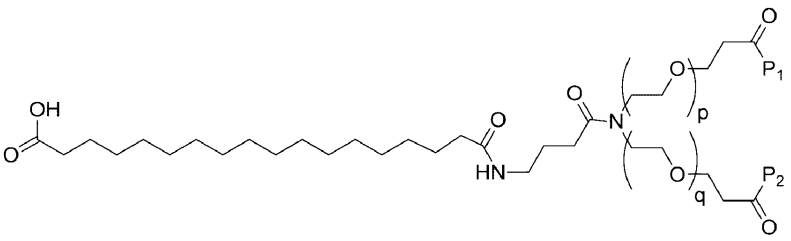
j) KBN53誘導体



k) KBN54誘導体



l) KBN55誘導体

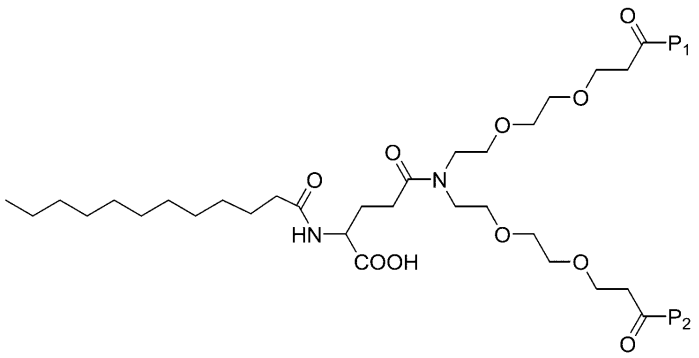


【００５６】

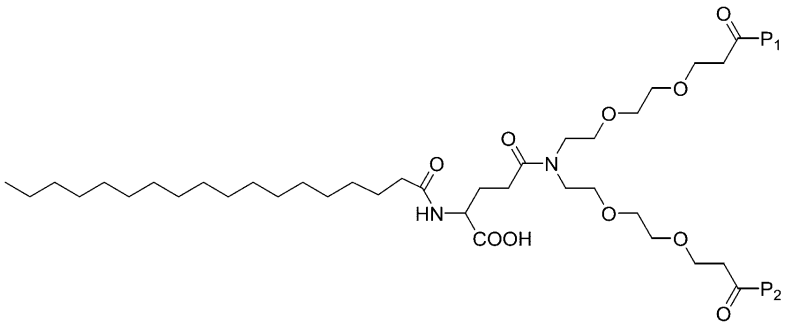
さらなる実施形態では、リンカーは、本発明の化合物が以下のものからなる群より選択されるよう選択される。

【表２】

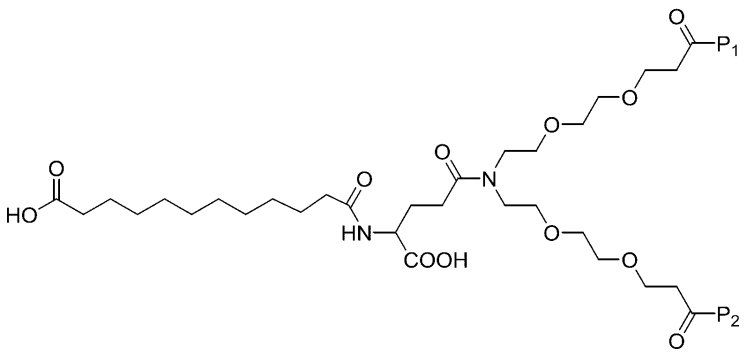
a) KBN41誘導体



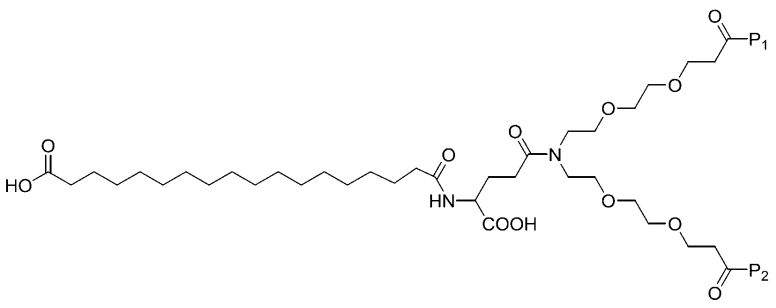
b) KBN42誘導体



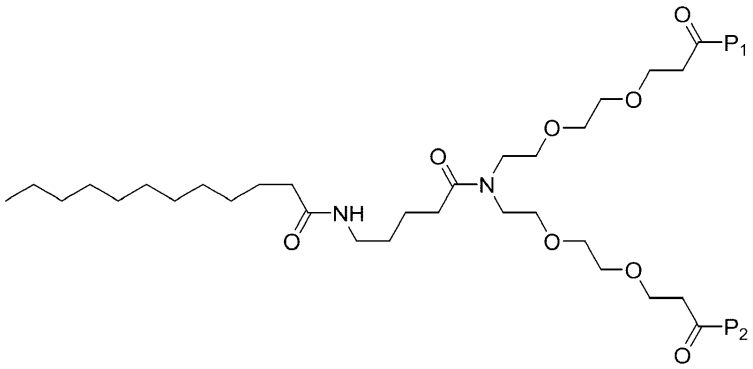
c) KBN43誘導体



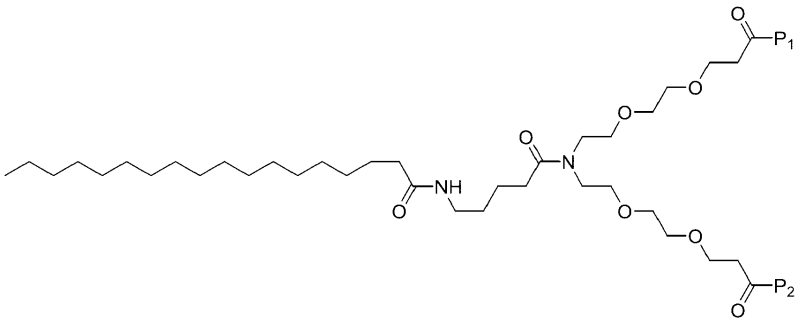
d) KBN44誘導体



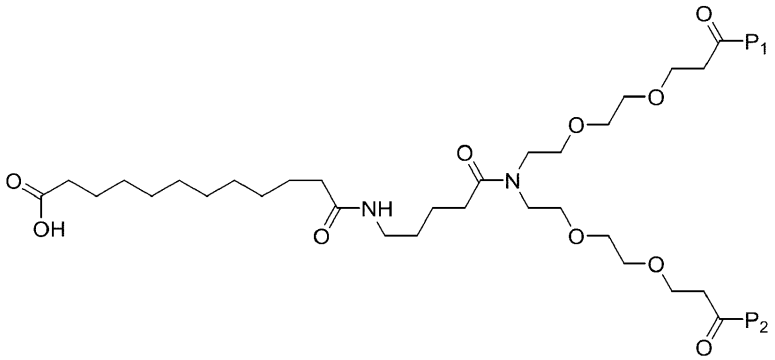
e) KBN45誘導体



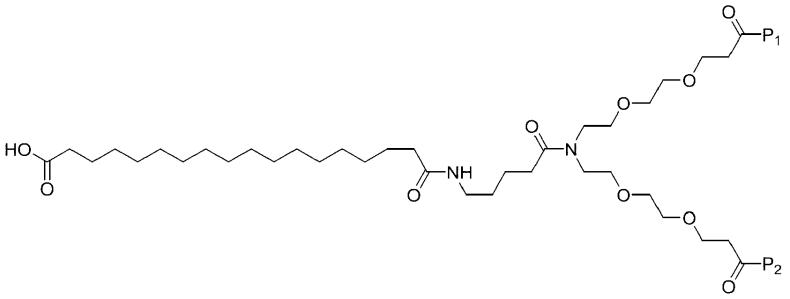
f) KBN46誘導体



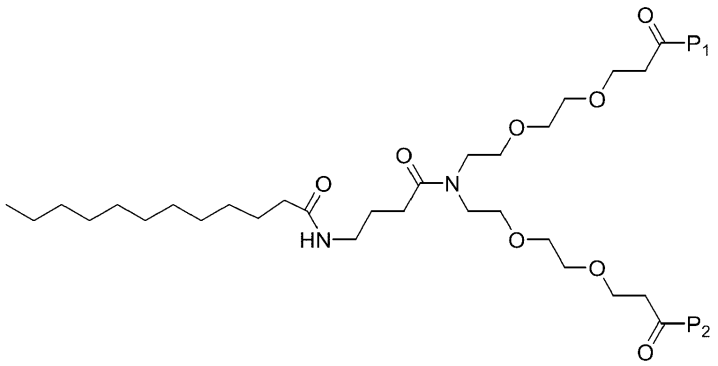
g) KBN47誘導体



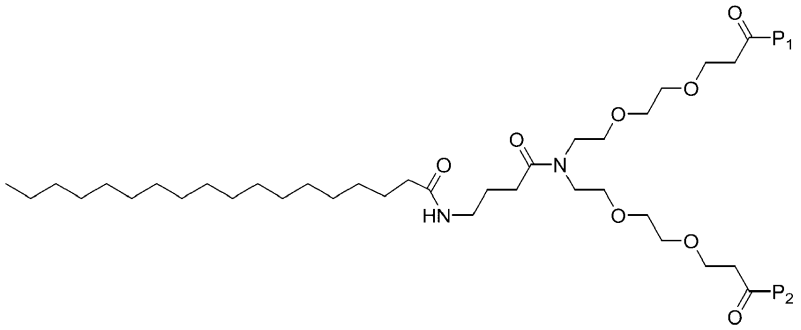
h) KBN48誘導体



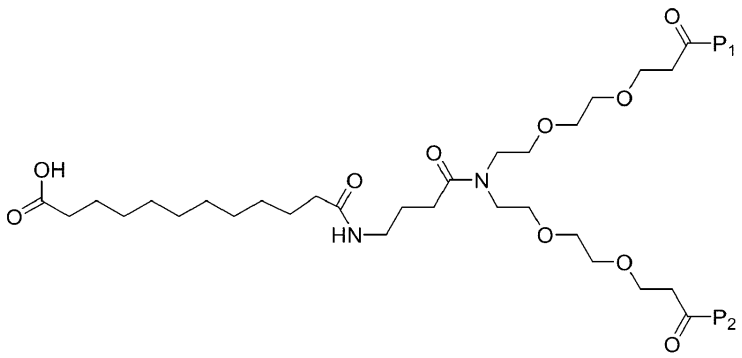
i) KBN52誘導体



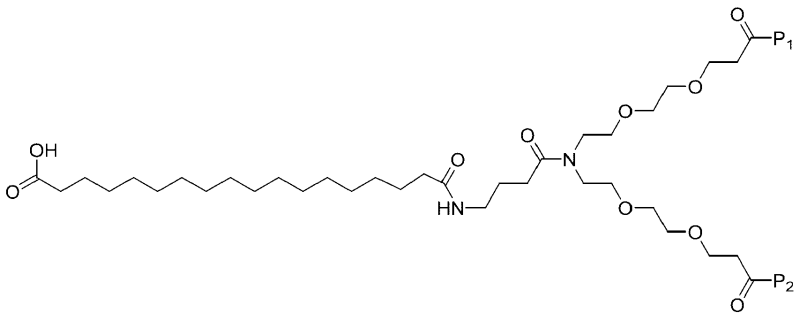
j) KBN53誘導体



k) KBN54誘導体



l) KBN55誘導体



【００５７】

脂肪酸（ＦＡ）

脂肪酸とは、飽和または不飽和のいずれかの脂肪族尾部（鎖）を有するカルボン酸のことである。天然の脂肪酸のほとんどは、４～２８の偶数個の炭素原子からなる鎖を有する。脂肪酸は通常、トリグリセリドまたはリン脂質から誘導される。他の分子と結合していない脂肪酸は遊離脂肪酸として知られる。

【００５８】

炭素間二重結合のある脂肪酸は不飽和脂肪酸として知られるのに対し、二重結合のない脂肪酸は飽和脂肪酸として知られる。不飽和脂肪酸には炭素原子間に１つまたは複数の二重結合がある。ある特定の実施形態では、本発明の化合物は不飽和脂肪酸を含む。このよ

うな実施形態では、一般式（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）または（ＶＩ）の表示（ｉ）および／または（ｊ）は、０～１２の整数から個々に選択される整数、例えば０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１および１２からなる群より選択される整数などである。

【００５９】

不飽和脂肪酸は、シスもしくはトランス立体配置または両方の混合物のいずれかで用いることができる。

【００６０】

シス立体配置は、隣接する水素原子が二重結合の同じ側にあることを意味する。二重結合には柔軟性がないため、その立体配座が固まり、シス異性体の場合、鎖が屈曲して脂肪酸の立体配座の自由度が制限される。鎖にシス立体配置の二重結合が多いほど、その柔軟性は低下する。鎖にシス立体配置の二重結合が多数存在すると、鎖が最もとりやすい立体配座に大きく湾曲する。例えば、二重結合が１つのオレイン酸には「ねじれ」が１つあるのに対して、二重結合が２つのリノール酸にはさらに顕著な屈曲がみられる。二重結合が３つのα－リノレン酸はフック形になりやすい。このことによる影響としては、脂肪酸が脂質二重層のリン脂質の一部である場合またはトリグリセリドが脂肪滴の中にある場合などの制限された環境では、シス二重結合により脂肪酸が密に固まる能力が制限され、ひいては膜または脂肪の融解温度に影響を及ぼし得ることが考えられる。

【００６１】

これに対して、トランス立体配置は、隣接する２つの水素原子が二重結合の反対側に結合していることを意味する。その結果、鎖はあまり屈曲せず、その形状は直鎖飽和脂肪酸とほぼ同じものとなる。

【００６２】

シス、トランスまたはその混合脂肪酸を含め、意図する目的に適した任意の脂肪酸を選択することは、本発明の範囲内にある。

【００６３】

本発明による化合物は、任意の適切な脂肪酸または脂肪酸誘導体を含み得る。一実施形態では、脂肪酸は一般式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）で定義される脂肪酸であり、式中、ｍは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７および４８からなる群より選択される整数、１０～１６の整数などであり、例えば、高度のＨＳＡ相互作用が間違いなく確認されるｍ＝１０またはｍ＝１６である（表１）。

【００６４】

本発明の脂肪酸は、C_{4}～C_{22}脂肪酸またはカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘニン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸およびドコサヘキサエン酸からなる群より選択される脂肪酸であり得る。

【００６５】

ペプチド（P_{1}およびP_{2}）

本発明の化合物は、２つのペプチドP_{1}およびP_{2}を含む。P_{1}およびP_{2}は個々に、それぞれがアミノ酸残基を少なくとも２つ含む任意のペプチドであってよく、したがって、本発明の二量体化合物を意図する目的に適合させ得る。

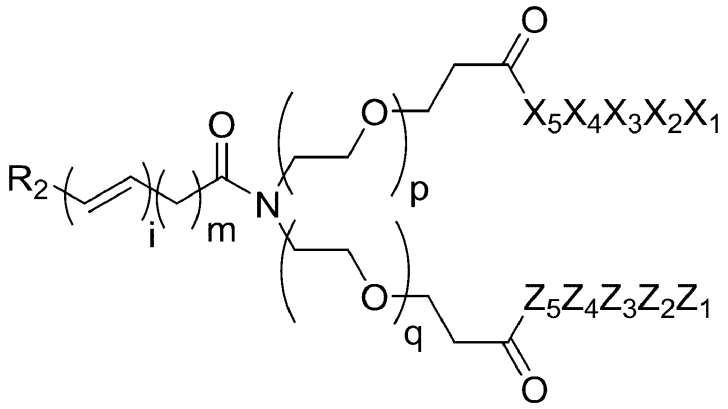
【００６６】

好ましい実施形態では、本発明の化合物は、２つのペプチドがＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２と結合する、ＰＳＤ－９５阻害剤である。したがって、ある特定の実施形態では、化合物は、一般式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のいずれか１つによって定

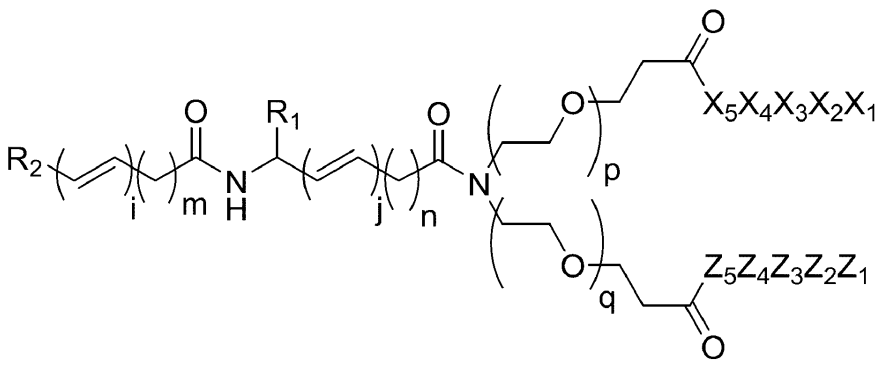
義される化合物であり、式中、
P_1は、アミノ酸配列$X_4X_3X_2X_1$（配列番号１）を含み、
P_2は、アミノ酸配列$Z_4Z_3Z_2Z_1$（配列番号２）含み、上式中、
ａ）X_1は、ＬおよびＶから選択されるアミノ酸残基であり、
ｂ）X_2および／またはZ_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、Ｖ、Ｎ－Ｍｅ－Ａ、Ｎ－Ｍｅ－Ｄ、Ｎ－Ｍｅ－Ｅ、Ｎ－Ｍｅ－Ｑ、Ｎ－Ｍｅ－Ｎ、Ｎ－Ｍｅ－ＳおよびＮ－Ｍｅ－Ｖから選択されるアミノ酸残基であり、
ｃ）X_3および／またはZ_3は、ＳおよびＴから選択されるアミノ酸残基であり、
ｄ）X_4および／またはZ_4は、Ｅ、Ｑ、Ａ、ＮおよびＳから選択されるアミノ酸残基であり、
X_1およびZ_1はともに、遊離カルボン酸を含めた最終的なＣ末端アミノ酸残基を個々に表す。

【００６７】
したがって、ある特定の実施形態では、本発明による化合物は、式（Ｖ）または（ＶＩ）

【化６】



式（Ｖ）



式（ＶＩ）

の一般構造を有し、式中、
R_1およびR_2は個々に、ＨおよびＣＯＯＨからなる群より選択され、
ｎは０～４８の整数であり、
ｍは１～４８の整数であり、かつ
ｐは０～２８の整数であり、
ｑは０～２８の整数であり、
ｉは０～１２の整数であり、
ｊは０～１２の整数であり、
X_5および／またはZ_5は、任意選択のアミノ酸残基、ペプチドまたはポリペプチドであり、
X_4および／またはZ_4は、Ｅ、Ｑ、Ａ、ＮおよびＳから選択されるアミノ酸残基であり、

X_3および／またはZ_3は、ＳおよびＴから選択されるアミノ酸残基であり、X_2および／またはZ_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、Ｖ、Ｎ－Ｍｅ－Ａ、Ｎ－Ｍｅ－Ｄ、Ｎ－Ｍｅ－Ｅ、Ｎ－Ｍｅ－Ｑ、Ｎ－Ｍｅ－Ｎ、Ｎ－Ｍｅ－ＳおよびＮ－Ｍｅ－Ｖから選択されるアミノ酸残基であり、

X_1および／またはZ_1は、Ｉ、ＬおよびＶから選択されるアミノ酸残基である。

【００６８】

X_5が単一のアミノ酸残基である場合、それはタンパク質構成アミノ酸残基および非タンパク質構成アミノ酸残基から選択される。

【００６９】

一実施形態では、X_5は、Ｉ、Ａ、ＬおよびＶからなる群より選択されるアミノ酸残基である。

【００７０】

X_5はこのほか、２～１００個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有し、Ｃ末端がＩ、Ａ、ＬおよびＶからなる群より選択されるアミノ酸残基である、ペプチドまたはポリペプチドであり得る。

【００７１】

本発明のある特定の実施形態では、X_5は、２～１００個の残基、例えば２～９０個のアミノ酸残基など、例えば２～８０個のアミノ酸残基など、例えば２～７０個のアミノ酸残基など、例えば２～６０個のアミノ酸残基など、例えば２～５０個のアミノ酸残基など、例えば２～４０個のアミノ酸残基など、例えば２～３０個のアミノ酸残基など、例えば２～２０個のアミノ酸残基など、例えば２～１０個のアミノ酸残基など、例えば２～９個のアミノ酸残基など、例えば２～８個のアミノ酸残基など、例えば２～７個のアミノ酸残基など、例えば２～６個のアミノ酸残基など、例えば２～５個のアミノ酸残基など、例えば２～４個のアミノ酸残基など、例えば２～３個のアミノ酸残基などを含み、Ｃ末端がＩ、Ａ、ＬおよびＶからなる群より選択されるアミノ酸である、ペプチドである。

【００７２】

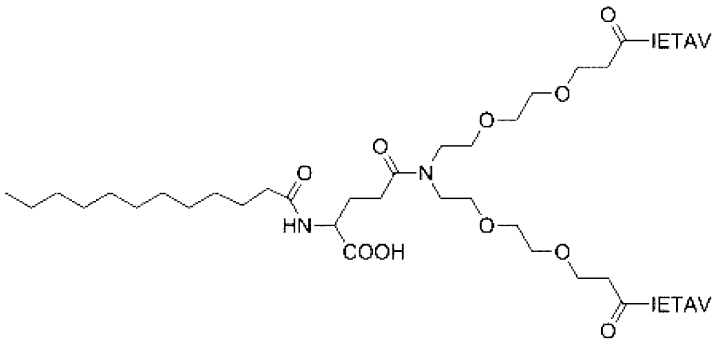
本発明の概念は一般に、一般式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）および（Ｖ）に示されるものとして適用できるものであるが、本発明者らは、本発明の範囲内にある化合物で、ＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２と結合するのに適したP_1およびP_2のペプチドモチーフを含むものを多数調製した。

【００７３】

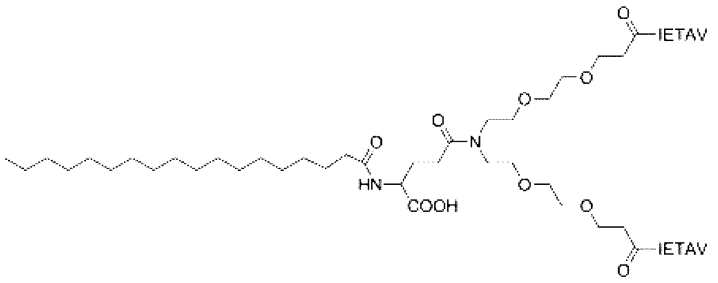
したがって、一実施形態では、本発明による化合物は、以下のものからなる群より選択される。

【表３】

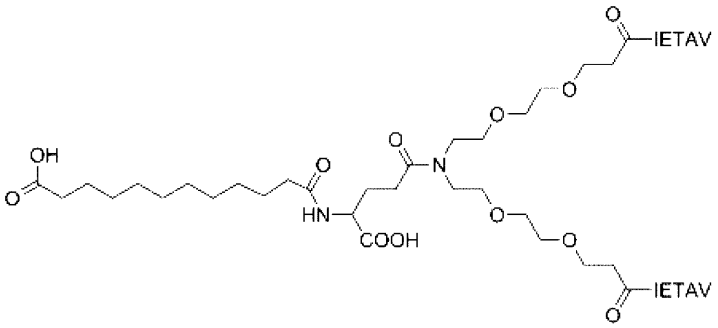
a) KBN41(5)



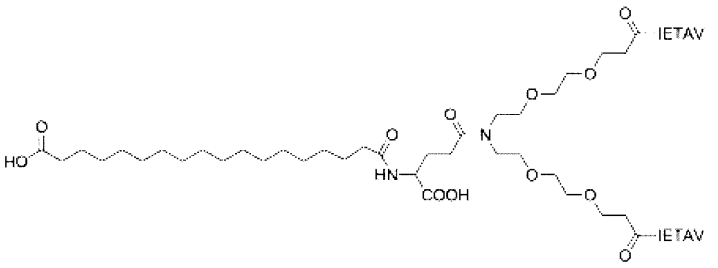
b) KBN42(7)



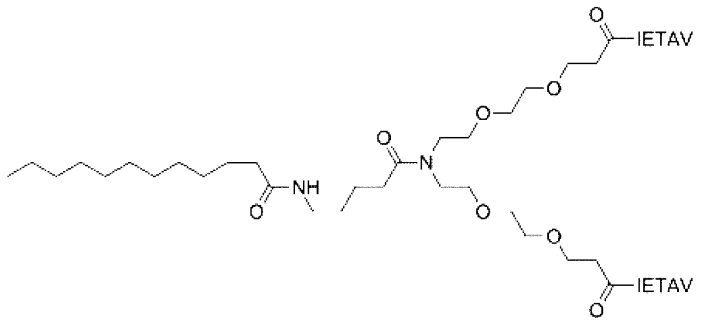
c) KBN43(6)



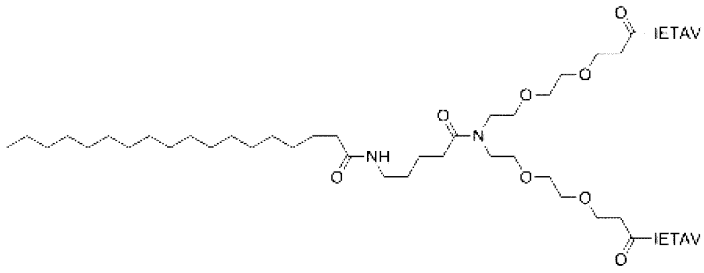
d) KBN44(8)



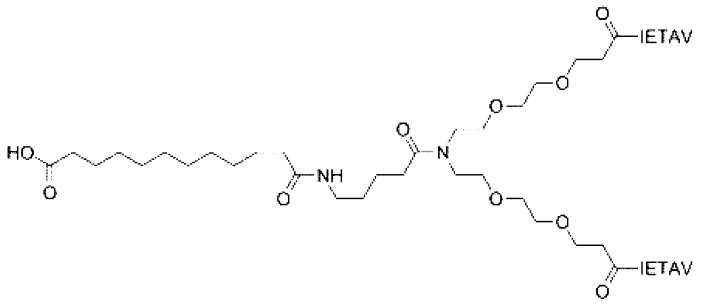
e) KBN45(**9**)



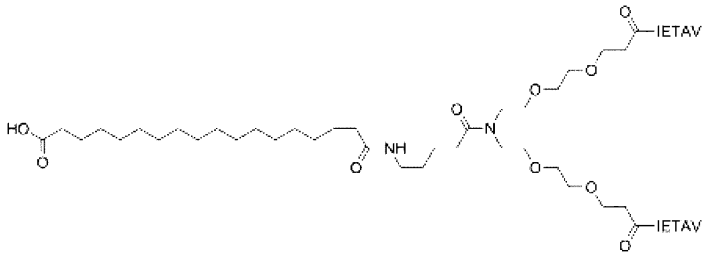
f) KBN46(**11**)



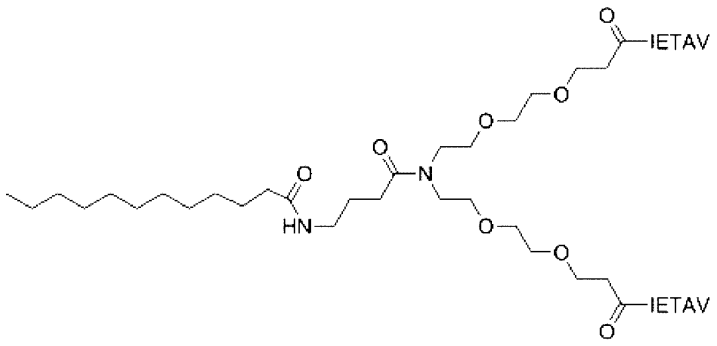
g) KBN47(**10**)



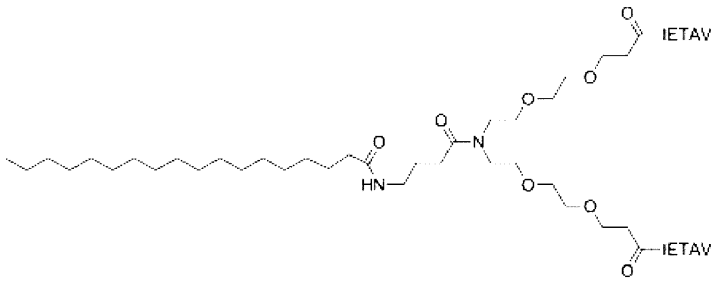
h) KBN48(**12**)



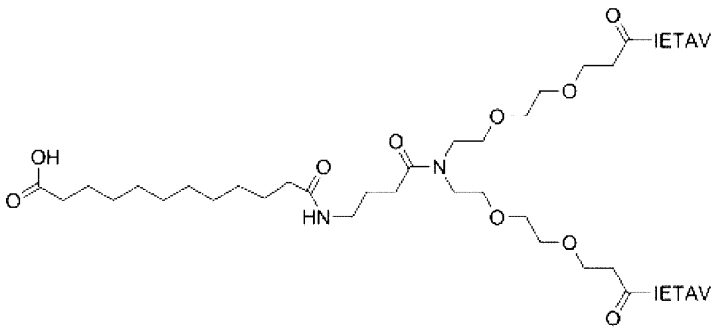
j) KBN52(1)



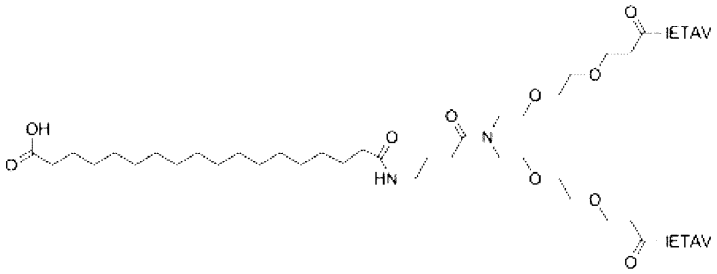
k) KBN53(3)



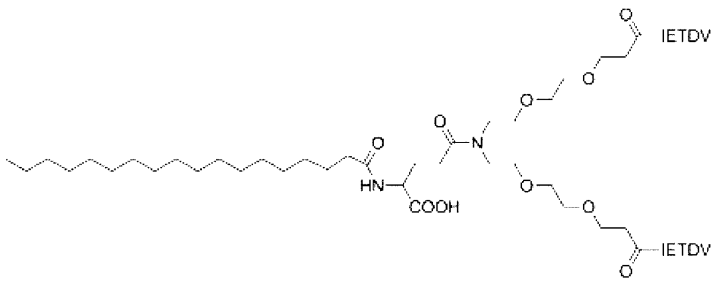
l) KBN54(2)



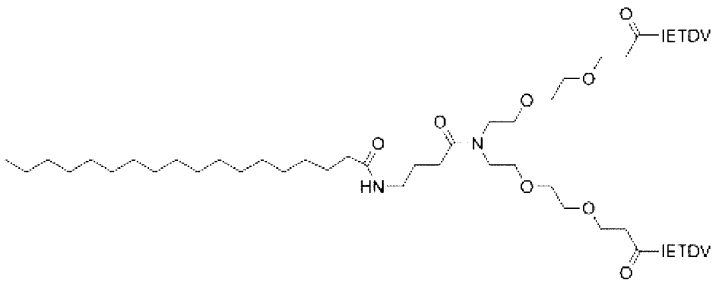
m) KBN55(4)



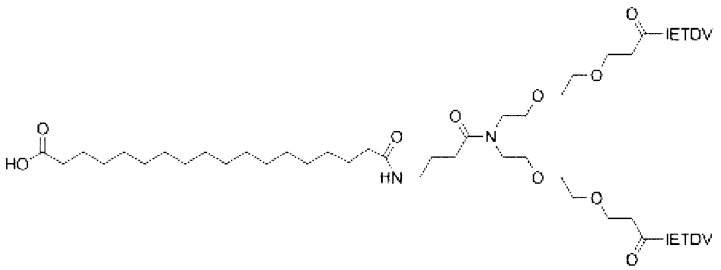
n) KBN63(15)



o) KBN64(13)



p) KBN65(14)



【００７４】

塩形態

本明細書で定義される化合物は、前記化合物の薬学的に許容される塩またはプロドラッグの形態であり得る。本発明の一実施形態では、一般式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）および（ＶＩ）のいずれか１つで定義される化合物は、前記化合物の薬学的に許容される付加塩または水和物、例えば、特に限定されないがK^+、Na^+などのほか、非塩、例えばH^+の形態であり得る。

【００７５】

ＩＩＩ．医学的使用

一態様では、本明細書で定義される本発明の化合物は、薬剤として使用するためのものである。

【００７６】

一実施形態では、本明細書で定義される化合物は、疼痛の治療または予防に使用するためのものである。

【００７７】

別の実施形態では、本明細書で定義される化合物は、興奮毒性関連疾患の治療または予防に使用するためのものである。

【００７８】

さらなる実施形態では、本発明の化合物によって治療可能な疾患は、ＣＮＳの虚血傷害または外傷である。

【００７９】

ＩＶ．合成

本明細書で定義される本発明の脂肪酸誘導ＰＳＤ－９５阻害剤は、以下の一般的な段階：

ａ）Ｎｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカーを調製する段階、

ｂ）Ｆｍｏｃベースの固相ペプチド合成を用いてペプチドを調製する段階、

ｃ）Ｆｍｏｃ脱保護ペプチドをＮｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカーで二量体化する段階および

ｄ）任意選択でアミノ酸リンカー（L_2）などの仲介リンカーを介して、脂肪酸とリンカー－二量体結合体とをカップリングする段階

を含む方法により製造され得る。

【００８０】

本発明の化合物は、一実施形態では、以下に明記する通りに合成することができる。

【００８１】

Ｎｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカー：固相上または溶液中のいずれかでオルト－ニトロベンゼンスルホニル（Ｎｓ）保護ＮＰＥＧリンカーを作製する。

【００８２】

固相法は通常、特定の樹脂に適した有機溶媒（例えば、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＡＣＮ、ＴＨＦ）および塩基（例えば、ＤＩＰＥＡ、ＤＢＵ、コリジン、ＮＭＭ）を用いて、２－クロロトリチルクロリド樹脂などの固相ペプチド合成に有用な固体担体にＦｍｏｃ－ＮＨ－ＰＥＧ－CH_2CH_2ＣＯＯＨを担持させることから始める。

【００８３】

しかるべき溶媒（例えば、ＤＭＦ、ＤＣＭ、ＡＣＮ、ＴＨＦ）に溶かした塩基（例えば、ピペリジン、ジメチルアミン、モルホリン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン、ＤＭＡＰ）によりＦｍｏｃ基を除去し得る。

【００８４】

塩基（例えば、ＤＩＰＥＡ、ＤＢＵ、コリジン、ＮＭＭ）およびしかるべき溶媒（例えば、ＴＨＦ、ＤＣＭ）を用いて、オルト－ニトロベンゼンスルホニルクロリドと遊離アミンとをカップリングして、Ｎｓ－ＮＨ－ＰＥＧ－CH_2CH_2ＣＯＯ－樹脂が得られる。

【００８５】

光延化学反応を用いることにより、リンカー生成物の第二の部分と、樹脂に結合したリンカー部分とを連結し得る。樹脂をトリフェニルホスフィン、ＨＯ－ＰＥＧ－CH_2CH_2ＣＯＯｔＢｕ、溶媒およびアゾジカルボン酸のエステルまたはアミド試薬（例えば、ジイソプロピルアゾジカルボキシラート、ＤＩＡＤ；ジエチルアゾジカルボキシラート、ＤＥＡＤ；１，１’－（アゾジカルボニル）－ジピペリジン、ＡＤＤＰ）で処理する。

【００８６】

樹脂をトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）などの酸で処理することにより、最終的なＮｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカーが得られる。

【００８７】

液相法は、トリフェニルホスフィンおよびＤＩＡＤ、ＤＥＡＤもしくはＡＤＤＰまたはこれと同様の試薬、ＨＯ－ＰＥＧ－CH_2CH_2ＣＯＯｔＢｕおよびしかるべき溶媒（ＴＨＦ、ＤＣＭ）を用いて、ＮｓによるＮH_2－ＰＥＧ－CH_2CH_2ＣＯＯｔＢｕのアミン基の保護、次いで光延化学反応を溶液中で行うことにより実施することができる。次いでＴＦＡなどの酸で処理することにより、最終的なＮｓ保護ＮＰＥＧ－リンカーが得られる。

【００８８】

ペプチド合成：２－クロロトリチルクロリド樹脂またはＷａｎｇ樹脂などの固体担体、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸、塩基、カップリング試薬（例えば、ＨＢＴＵ［Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）ウロニウムヘキサフルオロホスファート］，Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート［ＨＡＴＵ］、ＰｙＢＯＢ、ＤＩＣ／ＨＯＢｔ）および溶媒を用いて、Ｆｍｏｃベースの固相ペプチド合成によりペプ

チド配列を合成する。カップリング試薬の代わりにＦｍｏｃ保護アミノ酸の活性エステル（例えば、ペンタフルオロフェニル、スクシンイミド）を用いてもよい。

【００８９】

二量体化：樹脂を化学量論量未満（例えば、６分の１）のＮｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカー、塩基、カップリング試薬およびしかるべき溶媒（例えば、ＤＭＦ、ＤＣＭ、ＴＨＦ）で繰り返し処理する樹脂上での二量体化工程により、Ｆｍｏｃ脱保護した樹脂結合ペプチドをｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカーで二量体化する。カップリング試薬の代わりにＮｓ－ＮＰＥＧリンカーの活性エステルを用いてもよい。

【００９０】

このほか、Ｎｓ－ＮＰＥＧリンカーの活性エステル（例えば、ペンタフルオロフェニル、スクシンイミド）を、１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）またはヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）およびしかるべき側鎖保護ペプチド（例えば　ｔｅｒｔ－ブチル）とともに溶媒（例えば、ＡＣＮ、ＤＭＦ、ＤＣＭ、ＴＨＦ）中で用いて、溶液中で二量体化工程を形成してもよい。このほか、Ｎｓ－ＮＰＥＧ二酸リンカー、カップリング試薬（例えば、ＨＢＴＵ、ＨＡＴＵなど）、塩基および溶媒を用いて溶液中での二量体化を実施してもよい。

【００９１】

Ｎｓ基はメルカプトエタノールおよび１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］ウンデカ－７－エン（ＤＢＵ）によって、またはナトリウムチオフェノラートによって除去する。

【００９２】

リンカーと脂肪酸の結合：活性化のためのカップリング試薬および塩基を用いてＦｍｏｃ保護リンカー（例えば、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ－ＯｔＢｕ、Ｆｍｏｃ－ＧＡＢＡ、Ｆｍｏｃ－５－Ａｖａ－ＯＨ）を連続的にカップリングすることにより、アミノ酸リンカーと、ＮＰＥＧと二量体化し樹脂に結合したペプチドの遊離窒素とをカップリングすることができる。カップリング試薬の代わりにＦｍｏｃ保護アミノ酸リンカーの活性エステルを用いてもよい。次いで、脱保護法によりＦｍｏｃ基を除去する。

【００９３】

活性化のためのカップリング試薬および塩基を用いて、脂肪酸とリンカー－二量体とを結合させる。あるいは、活性エステルとしてカップリングする。脂肪酸が、リンカー－二量体結合体のアミンと反応するカルボキシル基のほかにもカルボキシル基を含む場合、これらのカルボキシル基をエステル、例えばメチルエステルとして保護することができる。

【００９４】

脂肪酸と連結した二量体リガンドを、ＴＦＡまたはＨＣｌなどの酸を用いる側鎖の同時脱保護により樹脂から切断し得る。

【００９５】

切断された生成物を塩基（例えば、ＮａＯＨ、ＬｉＯＨ）およびアセトニトリルの水溶液中で攪拌した後、ＴＦＡまたはＨＣｌで酸性化することにより、エステル保護基を除去し得る。

【００９６】

凍結乾燥およびＨＰＬＣまたはこれ同様のクロマトグラフィー法による精製によって、本発明の最終化合物が得られる。

【００９７】

さらなる実施形態では、実施例１に明記する通りに本発明の化合物の合成を実施する。

【実施例】

【００９８】

実施例１：合成

樹脂結合ＮＰＥＧ４　ＩＥＴＡＶ（配列番号３）二量体リガンド（Ｉ１）を既に記載されている通りに合成した（Ｂａｃｈら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，２０１２，１０９，３３１７－３３２２）。このリガンドから、ＨＡＴＵをカップリング試薬として用いた続く２回のカップリングにより、しかるべく保護されたリンカー（それぞれＦｍｏｃ－ＧＡＢＡ－Ｏ

Ｈ、Ｆｍｏｃ－（Ｌ）－Ｇｌｕ－ＯｔＢｕおよびＦｍｏｃ－５－Ａｖａ）とＮＰＥＧ４リンカーの窒素とを結合させた後、ピペリジン／ＤＭＦで脱保護して中間体Ｉ２～４を得た（図６）。固相ペプチド合成条件を用いて、脂肪酸（ＦＡ１～４、図６）とリンカーの遊離窒素とを容易に結合させ、側鎖保護基の同時脱保護により樹脂から切断した。次いで、切断された生成物をけん化した後、酸性化することにより、モノ保護ＦＡ構成単位（ドデカン二酸メチルエステルおよびオクタデカン二酸メチルエステル、ＦＡ２およびＦＡ４）の末端メチル保護基を除去した（図６）。凍結乾燥後、粗生成物を１００％ＤＭＳＯに溶かし、大規模Ｃ１８　ＲＰ－ＨＰＬＣにより精製した。半純粋画分（純度５０～９０％）を凍結乾燥させ、ＤＭＳＯ／ＡＣＮ／H_2Oに再び溶かし、分取Ｃ４　ＲＰ－ＨＰＬＣにより精製した（純度９５％超）。

【００９９】

図６はＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）の合成を示している。スキーム１の反応条件は以下の通りであった：（ａ）Ｆｍｏｃ－ＧＡＢＡ－ＯＨ／Ｆｍｏｃ－（Ｌ）－Ｇｌｕ－ＯｔＢｕ／Ｆｍｏｃ－５－Ａｖａ、ＨＡＴＵ、コリジン、ＤＭＦ（１時間×２）、次いでＤＭＦに溶かした２０％ピペリジン；（ｂ）ＦＡ１／ＦＡ２／ＦＡ３／ＦＡ４、ＨＢＴＵ、ＤＩＰＥＡ、ＤＭＦ／ＤＣＭ、４５分、次いでＴＦＡ／ＴＩＰＳ／H_2O（９０／５／５）；（ｃ）０．５Ｍ　ＬｉＯＨ、H_2O／ＡＣＮ（７５／２５）、３０分、次いでＴＦＡによりｐＨ２未満にする。三角形は、ＥおよびＴの側鎖が保護されている（ｔｅｒｔ－ブチル）ことを表す。

【０１００】

オクタデカン二酸モノメチルエステル（ＦＡ４）は市販されておらず、既に記載されている通りに、対応するジメチルエステルを１当量のＮａＯＨでモノけん化することにより合成した（Ｊｏｎａｓｓｅｎら，Ｐｈａｒｍ　Ｒｅｓ，２０１２，２９，２１０４－２１１４）（図７）。

【０１０１】

結論を述べれば、実施例１は、本発明の化合物を合成して純粋な形態で得ることが可能であることを示している。

【０１０２】

実施例２：ＨＳＡに対する親和性を決定する方法

Ｔｒａｎｓｉｌ^{XL}　ＨＳＡ結合アッセイキット（Ｓｏｖｉｃｅｌｌ社、ライプツィヒ、ドイツ）を用いて、合成したＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）のＨＳＡ親和性を評価した。比較のため、二量体リガンドＵＣＣＢ０１－１２５（Ｂａｃｈら，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ，Ｉｎｔ．Ｅｄ，２００９，４８，９６８５－９６８９）およびＵＣＣＢ０１－１４４（Ｂａｃｈら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，２０１２，１０９，３３１７－３３２２）についても試験した（表１、図１）。

【０１０３】

アッセイキットは、固定化したＨＳＡを予め濃度を漸増させて満たしたウェルおよびＨＳＡを含まない２つの対照ウェルから構成されていた。ＨＳＡは、ＨＳＡ上のあらゆる結合部位が利用されるようにランダムに固定化しておいた。アッセイを実施するため、ウェルを既知の濃度の被験化合物とインキュベートし、分析ＲＰ－ＨＰＬＣ（Ｃ８カラム）を用いてみ結合の化合物の量を定量化した。ＲＰ－ＨＰＬＣのデータから、ＨＳＡを含まない対照試料との比較により各データポイントの未結合薬物の割合（f_u）を算出した。次いで、各データポイントの未結合薬物に対するＨＳＡ結合薬物の比（$f_b = 1 - f_u$）をウェルの総ＨＳＡ濃度（c_{HSA}）に対してプロットし、方程式１により与えられる線形モデルに当てはめて、$1/K_D$を近似曲線のとして求めた。

【０１０４】

【数１】

方程式１：$$\frac{f_b}{f_u} = \frac{1}{K_D} c_{HSA}$$

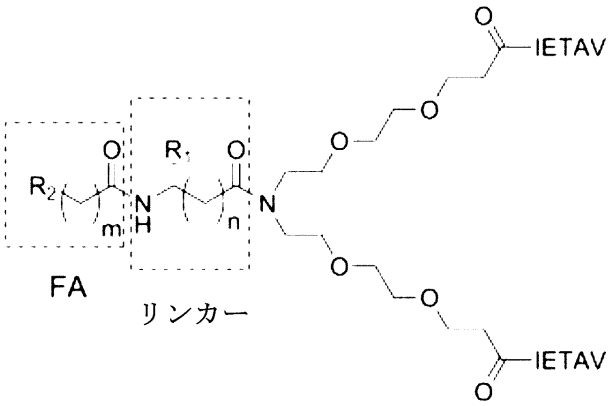
【０１０５】
方程式１では、薬物結合ＨＳＡの濃度（［ＨＳＡ－Ｄ］）がウェルの総ＨＳＡ濃度よりもはるかに低い（［ＨＳＡ－Ｄ］＜＜c_{HSA}）ものと仮定されている。アッセイキットは、この仮定がf_u＞１％となる化合物に対して有効であるよう設計されている。算出したK_D値を方程式２に用いて、生理的濃度のＨＳＡ（５８８μＭ）におけるf_bを算出した。
【０１０６】
【数２】
方程式２：

$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + \frac{C_{HSA}}{K_D^{HSA}}}$$

【０１０７】
結論を述べれば、実施例３は、本発明の化合物がヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）と結合することのほか、その結合量を明らかにすることが可能であることを示している。
【０１０８】
実施例３：ＨＳＡに対する親和性
ＦＡを含まない二量体リガンドＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４は、それぞれ１５４．３μＭおよび３１７．５μＭのＨＳＡ親和性を示し、この値はそれぞれＨＳＡ結合の割合（f_b）７５％および６５％に相当するものであった（表１）。しかし、ＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）はいずれも、ＨＳＡに対する親和性がＦＡを含まないリガンドよりもはるかに高く、したがって、f_bも高い値を示した（図１）。したがって、このことは、二量体リガンドにＦＡを結合させることにより、ＨＳＡ結合が大幅に増強されることを明あらかに示している。
【０１０９】
一般に、長い５－Ａｖａリンカーを含む化合物の方が短いリンカー（ＧＡＢＡ、γＧｌｕ）を有する化合物よりもＨＳＡに対する親和性がわずかに低い（表１、図２）。γＧｌｕリンカーの酸付加部分（Ｒ１）は、本明細書で合成したＦＡ連結二量体リガンドのＨＳＡに対する親和性に何ら影響を及ぼすものではないと思われる（表１、図２）。このことは、ほかのタンパク質－リガンド系に観察されたこと（Ｈａｃｋｅｔｔら，Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ，２０１３，６５，１３３１－１３３９）とは対照的なものであり、γＧｌｕリンカーの遊離カルボン酸が本発明の化合物とＨＳＡとの結合に不可欠な特徴ではないことを示している。
【０１１０】
長いＦＡ（ｍ＝１６）と連結した二量体リガンドは、これより短いＦＡ（ｍ＝１０）と連結した二量体リガンドよりも優れたＨＳＡ親和性を示し（表１）；末端のカルボキシル基（Ｒ２）はＨＳＡ親和性に悪影響を及ぼす（表１および図２）。
【０１１１】

【表４】

表１：ＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）ならびに二量体リガンドＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４[a]のＨＳＡ結合ならびに算出された結合化合物の割合



化合物	リンカー	FA	m	R_2	K_D(HSA) (μM)	f_b (%)
1	GABA, n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	26.6 ± 1.1	95.7 ± 0.2
2		C11:0-COOH	10	COOH	49.3 ± 4.7	92.3 ± 0.7
3		C18:0	16	CH_3	4.8 ± 1.1	99.2 ± 0.2
4		C17:0-COOH	16	COOH	19.4 ± 3.6	96.5 ± 0.6
5	γGlu, n=2, R_1=COOH	C12:0	10	CH_3	25.8 ± 3.2	95.8 ± 0.5
6		C11:0-COOH	10	COOH	64.6 ± 9.3	90.1 ± 1.3
7		C18:0	16	CH_3	6.8 ± 1.2	98.9 ± 0.2
8		C17:0-COOH	16	COOH	34.3 ± 0.3	94.5 ± 0.1
9	5-Ava, n=3, R_1=H	C12:0	10	CH_3	55.7 ± 5.2	91.4 ± 0.7
10		C11:0-COOH	10	COOH	240.0 ± 11	71.0 ± 1.0
11		C18:0	16	CH_3	12.7 ± 0.9	97.9 ± 0.2
12		C17:0-COOH	16	COOH	23.5 ± 3.9	96.2 ± 0.6
UCCB01-125	-	-	-	-	154.3 ± 15.8	77.6 ± 1.8
UCCB01-144	-	-	-	-	317.5 ± 38.6	65.3 ± 2.9

[a]データは平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）で示されている。

【０１１２】

結論を述べれば、実施例３は、本発明の化合物のＨＳＡに対する親和性が非ＦＡ誘導体化二量体参照ペプチドに比して増大していることを示している。

【０１１３】

実施例４：ＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２に対する親和性を決定する方法：

Ｂａｃｈら（ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，２０１２，１０９，３３１７－３３２２）により記載されているｉｎ　ｖｉｔｒｏ蛍光偏光（ＦＰ）アッセイを用いて、ＰＳＤ－９５に対する親和性を測定した。まず、二量体蛍光プローブとＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２との間の相互作用について、飽和結合曲線を取得してK_D値を求めた。一定濃度（０．５ｎＭ）のプローブにＰＤＺ１～２の濃度を漸増させて加えた。励起／発光波長の６３５／６７０ｎｍで試料の蛍光偏光を測定し、プログラムＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて、ＦＰ値を単一部位結合モデルに当てはめた。次いで、異種競合結合アッセイで一定濃度の二量体プローブ（０．５ｎＭ）およびＰＤＺ１～２（４ｎＭ）にリガンドの濃度を漸増させて加え、非蛍光二量体リガンドとＰＤＺ１～２との間の親和性を決定した。ＧｒａｐｈＰａｄ　ＰｒｉｓｍでＦＰ値を単一部位競合（可変勾配）モデルに当てはめた。得られたIC_{50}を記載されている通りに競合阻害定数K_i値に変換した（Ｎｉｋｏｌｏｖｓｋａ－Ｃｏｌｅｓｋａら，Ａｎａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ，２００４，３３２，２６１－２７３）。アッ

セイに１％ＨＳＡを用いて、修正ＦＰアッセイを上記の通りに実施した。

【０１１４】

結論を述べれば、実施例４は、本発明の化合物とＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２との結合を試験する方法を示している。

【０１１５】

実施例５：ＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２に対する親和性：

ＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する合成したＦＡ連結二量体リガンドの親和性をＦＰアッセイで評価した。参照化合物としてＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４（Ｂａｃｈら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，２０１２，１０９，３３１７－３３２２）を用いた（表２、図３）。まず、トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）緩衝液のみを用いて親和性を測定した（表２、図３Ａ）が、ＦＡ連結二量体がＰＳＤ９５のＰＤＺ１～２と結合する能力にＨＳＡの影響がみられた場合、アッセイ緩衝液中に存在するＨＳＡを用いてＦＰアッセイを実施することによりさらに検討した（表２、図３Ｂ）。プローブが結合するＨＳＡの濃度が高かったため、ここでは、ＨＳＡの濃度を生理的血中濃度の推定値（５２０～８３０μＭ）（Ｋｒａｇｈ－Ｈａｎｓｅｎら，Ｂｉｏｌ　Ｐｈａｒｍ　Ｂｕｌｌ　２００２，２５，６９５－７０４）の約４分の１に相当する１％（約１５０μＭ）に設定した。

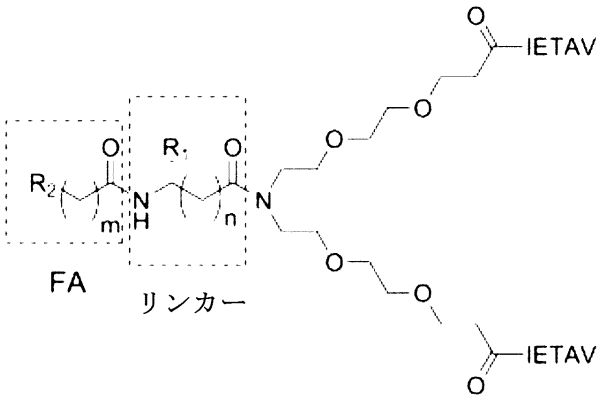
【０１１６】

従来の小分子薬物は一般に、未結合分の薬物が膜を横断して自由に拡散し、その標的と相互作用することにより生理的作用を発揮するものと考えられている（Ｂｅｒｅｚｈｋｏｖｓｋｉｙら，Ｊ　Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ　２００７，９６，２４９－２５７）。すなわち、薬物が別の分子と結合した場合、同時にその標的と相互作用することはできないということである。これを相殺するため、ＨＳＡ濃度１５０μＭにおける未結合薬物の割合（ｆｕ）を方程式２（ｆｕ＝１－ｆｂ）から算出し、この算出したｆｕに対してＦＰアッセイのデータ（ＴＢＳ＋ＨＳＡ）を補正した（表２、図３Ｃ）。

【０１１７】

【表５】

表２：ＦＰにより決定されたＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対するＦＡ連結二量体リガンド（１～１２）および二量体リガンド（ＵＣＣＢ０１－１２５およびＵＣＣＢ０１－１４４）の親和性[a]、算出された未結合薬物の割合（f_u）[b]、f_uに対して補正したＦＰデータ[a]およびＲＰ－ＨＰＬＣ（Ｃ８カラム）により決定された化合物の保持時間（R_t）[c]。



化合物	リンカー	FA	m	R_2	K_i(PSD95) (nM)	K_i(PSD95) + HAS (nM)	f_u (%)	K_i(PSD95)、遊離リガンド (nM)	R_t (分)
1	GABA n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	13.6 ± 0.6	27.2 ± 2.9	15.1	3.2 ± 1.0	46
2		C11:0-COOH	10	COOH	15.4 ± 1.2	27.9 ± 2.7	24.7	5.5 ± 0.7	38
3		C18:0	16	CH_3	11.1 ± 0.6	1889 ± 155	3.1	57.2 ± 4.9	61
4		C17:0-COOH	16	COOH	11.4 ± 0.6	5717 ± 298	11.5	654 ± 34	48
5	γGlu, n=2, R_1=COOH	C12:0	10	CH_3	30.2 ± 4.2	24.0 ± 0.6	14.7	2.4 ± 0.1	46
6		C11:0-COOH	10	COOH	33.7 ± 1.6	26.4 ± 2.6	30.1	7.0 ± 0.9	37
7		C18:0	16	CH_3	17.0 ± 0.6	1391 ± 184	4.3	59.1 ± 7.8	59
8		C17:0-COOH	16	COOH	9.2 ± 1.6	3594 ± 132	18.6	669 ± 25	47
9	5-Ava, n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	20.5 ± 1.1	13.4 ± 1.4	27.1	2.6 ± 0.5	48
10		C11:0-COOH	10	COOH	13.9 ± 2.1	18.5 ± 0.6	61.5	10.9 ± 0.4	38
11		C18:0	16	CH_3	26.5 ± 0.2	1889 ± 100	7.8	16.8 ± 3.3	61
12		C17:0-COOH	16	COOH	11.5 ± 1.2	2926 ± 335	8.3	250 ± 37	49
UCCB01-125	-	-	-	-	14.3 ± 1.1	9.7 ± 1.0	50.7	4.1 ± 0.5	28
UCCB01-144	-	-	-	-	4.3 ± 0.1	10.5 ± 0.9	67.9	6.7 ± 0.6	24

[a] ＦＰのデータはＴＢＳおよび１％ＨＳＡを含むＴＢＳで記録されたものである。データは平均±ＳＥＭ（ｎ≧３）で示されている。
[b] F_uは方程式２、$f_b = 1 - f_u$によって算出した。[c] ｎ＝１。

【０１１８】
ＴＢＳでのＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する親和性については、いずれのＦＡ連結二量体リガンドにもＵＣＣＢ０１－１２５との差はみられず（表２、図３Ａ）、ＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する親和性がＦＡ誘導体化による影響を受けないことを示していた。

【０１１９】

１％ＨＳＡを含むＴＢＳでのＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する親和性については、化合物間に有意な差が規則的に認められた（表２、図３Ｂ）。一般に、長いＦＡ（Ｃ１８：０またはＣ１７：０－ＣＯＯＨ）と連結した二量体リガンドの方が短いＦＡ（Ｃ１２：０またはＣ１１：０－ＣＯＯＨ）と連結した二量体リガンドよりもＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する親和性が低く、見かけ上、５０倍超の開きがあった。

【０１２０】

ＦＰのデータをｆｕに対して補正したところ（表２、図３Ｃ）、各リンカー系列内でＰＳＤ－９５　ＰＤＺ１～２に対する親和性に規則的な順位があることが明らかになった。Ｃ１２：０連結二量体リガンド（１、５、９）が最も親和性が高く、Ｃ１１：０－ＣＯＯＨ（２、６、１０）、Ｃ１８：０（３、７、１１）およびＣ１７：０－ＣＯＯＨ（４、８、１２）がこれに次ぐ形となった。

【０１２１】

Ｆｕに対して補正したＦＰのデータからほかにも、ＴＢＳ＋ＨＳＡでＦＰ測定を実施した場合にＣ１８：０連結二量体リガンド３、７および１１の親和性が５０倍低下することが観察されたのは、主として、３および７のＰＳＤ－９５に対する親和性がＴＢＳで記録されたＦＰのデータの４～５分の１に低下した（３：K_i＝５７．２ｎＭ対１１．１ｎＭ；７：K_i＝５９．１ｎＭ対１７．０ｎＭ、表２）ものの、化合物とＨＳＡが高い割合で結合したことに起因することがわかった。ＴＢＳでは親和性の低下がみられなかったことから、この場合、親和性の低下はＨＳＡに依存するものであった。

【０１２２】

２つの５－Ａｖａ連結二量体リガンド１１および１２では、対応するＧＡＢＡ連結二量体リガンドおよびγＧｌｕ連結二量体リガンド（３、４、７および８）よりもＨＳＡによる影響は少なかった。

【０１２３】

結論を述べれば、実施例５は、本発明の化合物がＰＳＤ－９５のＰＤＺ１～２と結合することを示している。

【０１２４】

実施例６：ＦＡ連結二量体リガンドの疎水性

ＨＳＡに対する親和性が最も高い化合物（３、７、１１）は、分析ＲＰ－ＨＰＬＣにより決定された保持時間（R_t）から判断して、合成した化合物の中で最も疎水性の高い化合物でもあった（表２）。これらの化合物の親水性、ひいては溶解性を増大させる試みとして、Ａｓｐ（Ｄ）部分による追加の電荷の導入が二量体の親水性を増大させ得ることから、ペプチド配列がＩＥＴＡＶ（配列番号３）の代わりにＩＥＴＤＶ（配列番号４）に置き換わった３および７の類似体を作製した（１３、１５；表３）。このほか、ＨＳＡ親和性が最も高い化合物のＩＥＴＤＶ類似体で末端酸部分を含むもの（４）を合成し、比較のために試験した（１４）。しかるべきペプチド配列（ＩＥＴＤＶ）を出発点に用いて、１～１２（図６）に類似するようこれらのＦＡ連結二量体を合成した。

【０１２５】

ＨＰＬＣ分析により、ＩＥＴＤＶベースの化合物（１３～１５）のR_t値ひいては疎水性の低下はＩＥＴＡＶベースの化合物（３、４、７）に比して少ないか、あるいは全く見られないことが明らかになったが、ＨＳＡ親和性の規則的な低下がみられた（表３）。例えば、分析ＲＰ－ＨＰＬＣでは、１３はＩＥＴＡＶ類似体よりも３分早く溶出した（１３：５８分、３：６１分、表３）が、ＨＳＡ親和性は低下した（１３：K_D＝８３．０μＭ、３：K_D＝４．８μＭ、表３）。

【０１２６】

【表６】

表３：様々なペプチド配列を有するＦＡ連結二量体類似体の比較。３、４および７のペプチド配列はＩＥＴＡＶ（配列番号３）であり；１３、１４および１５のペプチド配列はＩＥＴＤＶ（配列番号４）である。

化合物	リンカー	FA	K_D(HSA) (μM)	K_i(PSD-95) (nM)	K_i(PSD-95) + HSA (nM)	f_u (%)	K_i(PSD-95)、遊離リガンド (nM)	R_t (分)
3	GABA	C18:0	4.8 ± 1.1	11.1 ±0.6	1889 ± 155	3.1	57.2 ± 4.9	61
4	GABA	C17:0-COOH	19.4 ± 3.6	11.4 ± 0.6	5717 ± 298	11.5	654 ± 34	48
7	γGlu	C18:0	6.8 ± 1.2	17.0 ± 0.6	1391 ± 184	4.3	59.1 ± 7.8	59
13	GABA	C18:0	83.0 ± 11.0	8.0 ± 0.8	2514 ± 149	35.6	896 ± 53	58
14	GABA	C17:0-COOH	116.0 ± 7.6	29.3 ± 0.7	770 ± 27	43.6	1097 ± 65	47
15	γGlu	C18:0	55.0 ± 3.4	6.7 ± 0.6	3806 ± 287	26.8	1022 ± 77	59

【０１２７】

結論を述べれば、実施例６は、ＨＳＡに対する親和性が選択する脂肪酸のみならず、選択するペプチド配列にも左右されることを示している。

【０１２８】

実施例７：化合物１、４、７および１３の血漿中安定性

修正したｉｎ　ｖｉｔｒｏ血漿中安定性アッセイ（Ｂａｃｈら，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ，Ｉｎｔ．Ｅｄ，２００９，４８，９６８５－９６８９）で１、４、７および１３の血漿中安定性を評価した。修正前の方法では、検討する化合物をヒト血漿中でインキュベートした。次いで、しかるべき時点で試料を取り出し、トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）で沈殿させることにより血清タンパク質を除去した後、ＲＰ－ＨＰＬＣにより上清を分析した。得られたピーク面積をT_0の量に対して正規化し、一次崩壊モデルに当てはめて半減期を算出した。この方法をＦＡ連結二量体リガンドに適用したところ、試料回収率が低いものとなった（５％未満）。これは、ＴＣＡ沈殿時にＦＡ連結二量体リガンドをＨＳＡ結合複合体として除去したことが原因であった。そこで、ＴＣＡ沈殿の前に、試料を固体塩酸グアニジン（ＧｎＨＣｌ）に最終濃度６Ｍまで溶解させる操作を実施した。この操作の目的は、試料中のＨＳＡの折畳み構造をほどき、ＦＡ連結二量体リガンドを放出させることにあった。

【０１２９】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ血漿中安定性アッセイでは、いずれのＦＡ連結二量体リガンドも、ＵＣＣＢ０１－１２５より安定であった（図４）。理論に束縛されるものではないが、これは化合物とＨＳＡとの結合性が高く、酵素によって消化される化合物の遊離濃度が低くなったことに起因するものと思われる。短いＣ１２：０　ＦＡを含む化合物（１）の方が、長いＣ１８：０またはＣ１７：０－ＣＯＯＨ　ＦＡを含む極めて安定な化合物（４、７、１３）よりも短時間で分解された。この長時間の安定性は、ＨＳＡに対する親和性が増大しプロテアーゼによる二量体ペプチドベースの化合物の切断が妨げられることのほか、ＦＡが仲介する立体障害によって説明される。

【０１３０】

結論を述べれば、実施例７は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの血漿中安定性を評価する方法と、本発明のＦＡ連結二量体化合物の血漿中安定性および半減期が非ＦＡ連結参照化合物に比して増大していることを示している。

【０１３１】

実施例８：ｉｎ　ｖｉｖｏ薬物動態試験

ＦＡ連結化合物の薬物動態特性を明らかにするため、選択した化合物を雄Ｗｉｓｔａｒラットに単回皮下（ｓ．ｃ．）ボーラス注射した後、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによりその血中濃度を測定した（図５）。この測定から、いずれのＦＡ連結二量体リガンドも、ＦＡを含まない二量体リガンド（ＵＣＣＢ０１－１２５）より$T_{1/2}$が長く、T_{max}が大きいことが明らかになった（表４および図５）。その効果は１では比較的小さいものであったが、８時間を上回る$T_{1/2}$を示した４、７および１３では顕著であり、その増加はＵＣＣＢ０１－１２５の１６倍超に相当するものであった。このT_{max}の増大は注射部位からの吸収時間が長くなったことによって説明される。全体としてみれば、このような特性によって、ｓ．ｃ．蓄積注射による投与が可能になり、その結果、化合物を血中に緩徐に一定量放出することが可能になり、薬学的に適切な血中濃度を維持するのに必要な投与回数が少なくなる。

【０１３２】

【表７】

表４：ラットにｓ．ｃ．注射した後のＦＡ連結二量体リガンドの薬物動態パラメータ[a]

化合物	リンカー	FA	ペプチド配列	投与量 (mg/kg)	$T_{½}$ (時間)[a]	T_{max} (時間)[a]
UCCB01-125	-	-	IETAV	3	0.561 ± 0.101	0.5 ± 0
				30	0.450 ± 0.068	0.5 ± 0
1	GABA	C12	IETAV	15	0.768 ± 0.045	0.833 ± 0.167
4	GABA	C17:0-COOH	IETAV	15	8.13 ± 0.50	4.67 ± 0.66
7	γGlu	C18:0	IETAV	10	10.7 ± 0.58	6.00 ± 1.15
13	GABA	C18:0	IETDV	10	16.3 ± 2.81	8.00 ± 0

[a]データは平均±ＳＥＭ（ｎ＝３）で示されている。

【０１３３】

実施例９：配列

配列番号１

$X_4X_3X_2X_1$

式中、

X_4は、Ｅ、Ｑ、Ａ、ＮおよびＳから選択されるアミノ酸残基であり、

X_3は、ＳおよびＴから選択されるアミノ酸残基であり、

X_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、Ｖ、Ｎ－Ｍｅ－Ａ、Ｎ－Ｍｅ－Ｄ、Ｎ－Ｍｅ－Ｅ、Ｎ－Ｍｅ－Ｑ、Ｎ－Ｍｅ－Ｎ、Ｎ－Ｍｅ－ＳおよびＮ－Ｍｅ－Ｖから選択されるアミノ酸残基であり、

X_1は、Ｉ、ＬおよびＶから選択されるアミノ酸残基である。

配列番号２

$Z_4Z_3Z_2Z_1$

式中、

Z_4は、Ｅ、Ｑ、Ａ、ＮおよびＳから選択されるアミノ酸残基であり、

Z_3は、ＳおよびＴから選択されるアミノ酸残基であり、

Z_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、Ｖ、Ｎ－Ｍｅ－Ａ、Ｎ－Ｍｅ－Ｄ、Ｎ－Ｍｅ－Ｅ、Ｎ－Ｍｅ－Ｑ、Ｎ－Ｍｅ－Ｎ、Ｎ－Ｍｅ－ＳおよびＮ－Ｍｅ－Ｖから選択されるアミノ酸残基であり、

Z_1は、Ｉ、ＬおよびＶから選択されるアミノ酸残基である。

配列番号３

ＩＥＴＡＶ

配列番号４
ＩＥＴＤＶ

配列番号５
$X_5X_4X_3X_2X_1$
式中、
X_5は、任意のアミノ酸残基であり、
X_4は、Ｅ、Ｑ、Ａ、ＮおよびＳから選択されるアミノ酸残基であり、
X_3は、ＳおよびＴから選択されるアミノ酸残基であり、
X_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、Ｖ、Ｎ－Ｍｅ－Ａ、Ｎ－Ｍｅ－Ｄ、Ｎ－Ｍｅ－Ｅ、Ｎ－Ｍｅ－Ｑ、Ｎ－Ｍｅ－Ｎ、Ｎ－Ｍｅ－ＳおよびＮ－Ｍｅ－Ｖから選択されるアミノ酸残基であり、
X_1は、Ｉ、ＬおよびＶから選択されるアミノ酸残基である。

配列番号６
$Z_5Z_4Z_3Z_2Z_1$
式中、
Z_5は、任意のアミノ酸残基であり、
Z_4は、Ｅ、Ｑ、Ａ、ＮおよびＳから選択されるアミノ酸残基であり、
Z_3は、ＳおよびＴから選択されるアミノ酸残基であり、
Z_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、Ｖ、Ｎ－Ｍｅ－Ａ、Ｎ－Ｍｅ－Ｄ、Ｎ－Ｍｅ－Ｅ、Ｎ－Ｍｅ－Ｑ、Ｎ－Ｍｅ－Ｎ、Ｎ－Ｍｅ－ＳおよびＮ－Ｍｅ－Ｖから選択されるアミノ酸残基であり、
Z_1は、Ｉ、ＬおよびＶから選択されるアミノ酸残基である。

【図１】

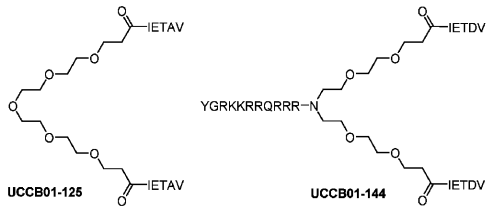
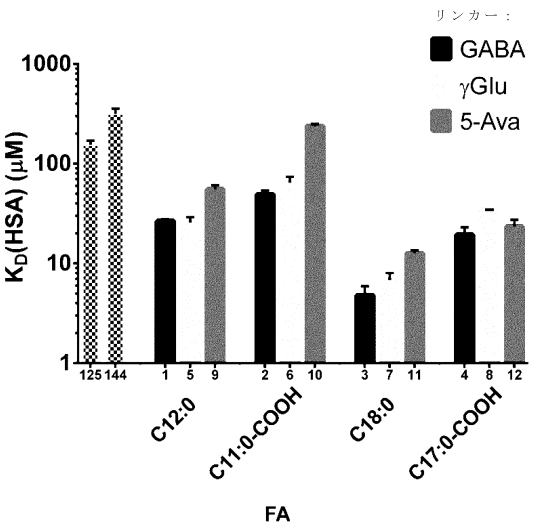
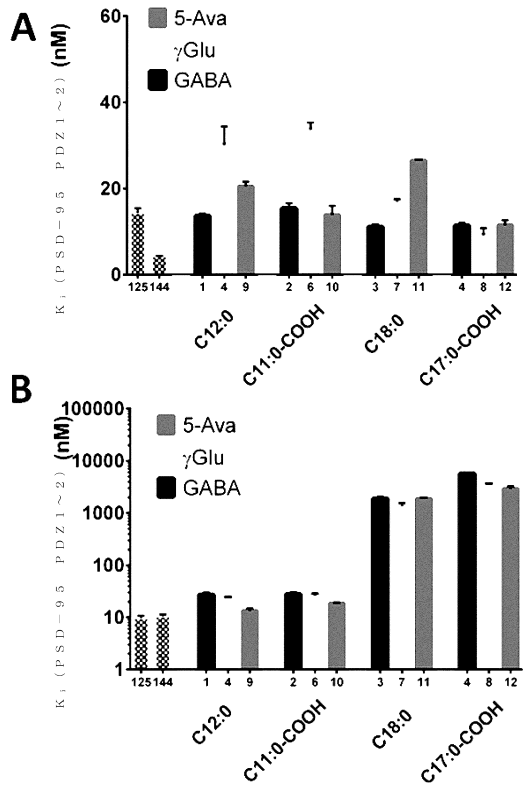


Fig. 1

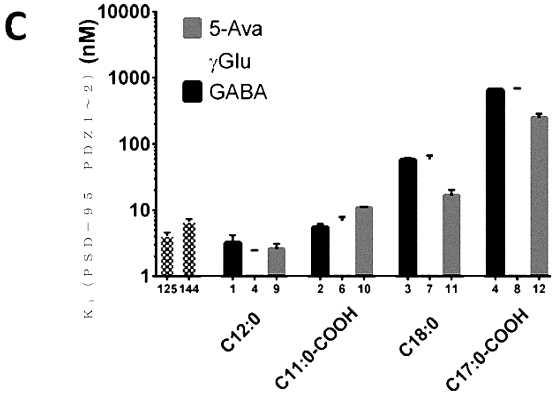
【図２】



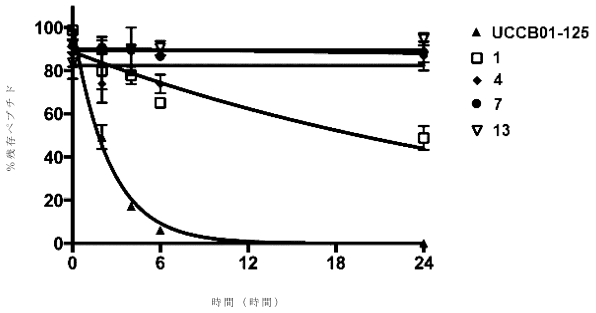
【図３】



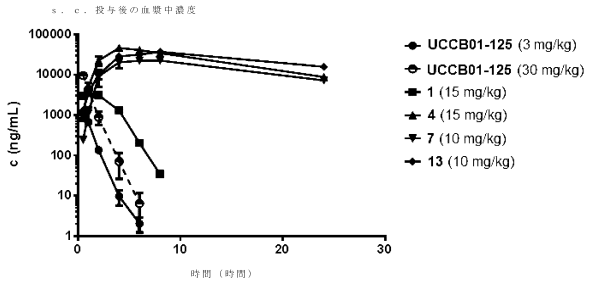
【図３－２】



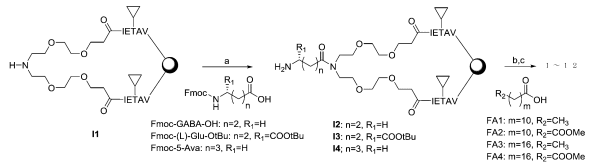
【図４】



【図５】



【図６】



【図７】

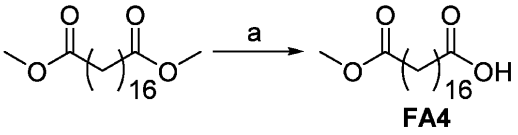


Fig. 7

【配列表】

0006633523000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ａ６１Ｐ 25/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 25/00

(72)発明者 ニッセン，クラウス ベルトラム
デンマーク国，ディーケー－５７９２ アルスレフ，ステーションズヴァイ ４０

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第２０１３／０８８３８２（WO，Ａ１）
CHI，C.N. et al.，J. BIOL. CHEM.，２０１０年 ９月 ３日，Vol.285，No.36，pp.28252-28260，doi：10.1074/jbc.M110.124040
BACH，A. et al.，PROC. NATL. ACAD. SCI. USA，２０１２年 ２月２８日，Vol.109，No.9，pp.3317-3322，doi：10.1073/pnas.1113761109

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ