

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6501775号  
(P6501775)

(45) 発行日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(24) 登録日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08	Z N A
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	
C07K 14/76	(2006.01)	C07K	14/76	
A61K 38/08	(2019.01)	A61K	38/08	
A61K 38/10	(2006.01)	A61K	38/10	

請求項の数 23 (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-529807 (P2016-529807)
(86) (22) 出願日	平成26年7月21日 (2014.7.21)
(65) 公表番号	特表2016-532681 (P2016-532681A)
(43) 公表日	平成28年10月20日 (2016.10.20)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/047377
(87) 國際公開番号	W02015/013168
(87) 國際公開日	平成27年1月29日 (2015.1.29)
審査請求日	平成29年7月21日 (2017.7.21)
(31) 優先権主張番号	61/858, 263
(32) 優先日	平成25年7月25日 (2013.7.25)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	62/015, 854
(32) 優先日	平成26年6月23日 (2014.6.23)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	504389991 ノバルティス アーゲー スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】心不全治療用の環状ポリペプチド

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次式 I (配列番号 1 ) からなる環状ポリペプチド：

## 【化 1】

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

[式中、

X 1 は、ポリペプチドの N 末端であり、かつ、存在しない、Q、A、もしくは p E のいずれかであり、または X 1 は、C、c、h C、および D - h C から選択され；ここで、C、c、h C、または D - h C の側鎖は、X 7 の C、c、h C または D - h C の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 3 は、P であり、または X 3 は、C、c、h C、および D - h C から選択され；ここで、C、c、h C、または D - h C の側鎖は、X 7 の C、c、h C または D - h C の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 4 は、R であり、または X 4 は、C、c、h C、および D - h C から選択され；ここで、C、c、h C、または D - h C の側鎖は、X 7 の C、c、h C または D - h C の側鎖

とジスルフィド結合を形成し、ここで、X 1、X 3、およびX 4の1つだけは、C、c、h C、およびD - h Cから選択される含硫アミノ酸であり、

X 7は、C、c、h C、またはD - h Cであり；かつ、X 7の側鎖は、X 1、X 3、またはX 4のうちの1つのC、c、h C、またはD - h Cの側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8は、KまたはFであり、

X 9は、G、A、aであり、または存在せず、

X 10は、Pであり、または存在せず、

X 11は、D - N l e、N l e、M、またはfであり、かつ、

X 12は、存在しない、またはP、f、a、D - N v a、もしくはD - A b uであり、  
かつ

X 13は、C末端であり、かつ、存在しないか、または(N - M e) F、F、f、a、y、およびN a lから選択され；ここで、

N l eは、L - ノルロイシンであり、

D - N l eは、D - ノルロイシンであり、

D - h Cは、D - ホモシステインであり、

h Cは、L - ホモシステインであり、

N a lは、L - ナファタリン(L-naphthaline)であり、

D - N v aは、D - ノルバリンであり、

D - A b uは、D - 2 - アミノ酪酸であり、

p Eは、L - ピログルタミン酸である]

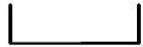
または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

【請求項2】

式 I I (配列番号2) :

【化2】

X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



||

30

[式中、

X 1は、ポリペプチドのN末端であり、かつ、存在しないか、またはQ、A、およびp Eから選択されるかのいずれかであり、

X 4は、C、c、h C、またはD - h Cであり、

X 7は、C、c、h C、またはD - h Cであり；かつ、X 7のC、c、h CまたはD - h Cの側鎖は、X 4のC、c、h CまたはD - h Cの側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8は、KまたはFであり、

X 9は、G、A、aであり、または存在せず、

X 10は、Pであり、または存在せず、

X 11は、D - N l e、N l e、M、またはfであり、かつ、

X 12は、存在しないか、またはP、f、a、D - N v a、およびD - A b uから選択され、かつ、

X 13は、C末端であり、かつ、存在しないか、またはF、(N - M e) F、f、a、y、およびN a lから選択される]

からなる、請求項1に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

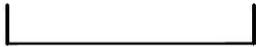
【請求項3】

式 I I I (配列番号4) :

50

## 【化3】

X1-R-P-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



III

-

[式中、

X1は、ポリペプチドのN末端であり、かつ、C、c、hC、およびD-hCから選択され、10

X7は、C、c、hC、またはD-hCであり；ここで、X7のC、c、hCまたはD-hCの側鎖は、X1のC、c、hCまたはD-hCの側鎖とジスルフィド結合を形成し、-

X8は、KまたはFであり、

X9は、G、A、aであり、または存在せず、

X10は、Pであり、または存在せず、

X11は、D-Nle、Nle、M、またはfであり、、

X12は、存在しないか、またはP、f、a、D-Nva、およびD-Abuから選択され、かつ、20

X13は、C末端であり、かつ、存在しないか、または(N-Me)F、F、f、a、y、およびNa1から選択される]、

からなる、請求項1に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

## 【請求項4】

式IV(配列番号5)：

## 【化4】

X1-R-X3-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



30

IV

-

[式中、

X1は、ポリペプチドのN末端であり、かつ、存在しない、Q、A、またはpEのいずれかであり、、

X3は、C、c、hC、またはD-hCであり、；

X7は、C、c、hC、またはD-hCであり；ここで、X7のC、c、hCまたはD-hCの側鎖は、X3のC、c、hC、またはD-hCの側鎖とジスルフィド結合を形成し、40

X8は、KまたはFであり、

X9は、G、A、aであり、または存在せず、

X10は、Pであり、または存在せず、

X11は、D-Nle、Nle、M、またはfであり、、

X12は、存在しないか、またはP、f、a、D-Nva、およびD-Abuから選択され、かつ、、

X13は、C末端であり、かつ、存在しないか、または(N-Me)F、F、f、a、y、およびNa1から選択される]、

からなる、請求項1に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、

50

、もしくは塩。

**【請求項 5】**

X 1 が p E である、請求項 1、2、および 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

**【請求項 6】**

X 1 3 が F または f である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

**【請求項 7】**

X 1 3 が存在しない、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。 10

**【請求項 8】**

X 1 2 が存在しない、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、およびエステル、もしくは塩。

**【請求項 9】**

C 末端がアミドである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドの塩。

**【請求項 10】**

C 末端が、式 - C ( O ) - R 2 のアミドであり、R 2 が、- NH<sub>2</sub>、- NH - Me、- NH - NH Bn、または - NH - ( CH<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - Ph である、請求項 9 に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドの塩。 20

**【請求項 11】**

X 8 が K である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

**【請求項 12】**

X 9 が G である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

**【請求項 13】**

X 1 0 が P である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

**【請求項 14】**

X 1 1 が Nle または D - Nle である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。 30

**【請求項 15】**

**【化 5】**

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH;	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(フェネチル);	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH;	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH <sub>2</sub> ;	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-OH;	
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH;	
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH;	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-OH;	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(フェネチル);	40

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-OH;
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(フェネチル);
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH; 10
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-OH;
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH;
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH;
pE-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH;
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-OH; 20
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-OH;
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH <sub>2</sub> ;
pE-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-OH;
pE-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-OH;
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH;
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH;
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(フェネチル); 30
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(フェネチル);
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル);
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH;
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-OH;
pE-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH;
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-OH;
pE-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-OH;
pE-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-OH; および 40
pE-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-OH;

[ 表において、「\*」で印を付けた 2 つのアミノ酸は、ジスルフィドを形成しているアミノ酸を表す ]

から選択される（出現する順に、それぞれ、配列番号 19 ~ 57）、請求項 1 に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

#### 【請求項 16】

a . 請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩と、

**b . 半減期延長性部分と**

を含むバイオコンジュゲートまたはその多量体であって、前記ポリペプチドと半減期延長性部分は、場合によりリンカーを介して、共有結合によって連結または融合される、バイオコンジュゲートまたはその多量体。

**【請求項 17】**

前記半減期延長性部分が、IgG定常ドメインもしくはその断片またはヒト血清アルブミンである、請求項16に記載のバイオコンジュゲートまたはその多量体。

**【請求項 18】**

医薬として使用するための、請求項1から17のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはバイオコンジュゲートもしくはその多量体を含む、医薬組成物。10

**【請求項 19】**

APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または障害を治療または予防するための医薬組成物であって、請求項1から17のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはバイオコンジュゲートもしくはその多量体を含む、医薬組成物。

**【請求項 20】**

急性非代償性心不全(ADHF)、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病(妊娠糖尿病を含む)、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷(日焼けを含む)、または子癇前症を治療するための医薬組成物であって、請求項1から17のいずれか一項に記載のポリペプチド、そのアミド、エステル、もしくは塩、またはバイオコンジュゲートもしくはその多量体を含む、医薬組成物。20

**【請求項 21】**

治療有効量の請求項1から17のいずれか一項に記載のポリペプチド、そのアミド、エステル、もしくは塩、またはバイオコンジュゲートもしくはその多量体を含む医薬組成物であって、前記医薬組成物は、1種または複数の治療活性のある共薬剤(co-agent)と組合せて使用される、医薬組成物。

**【請求項 22】**

前記共薬剤が、イノトロープ、アドレナリン受容体遮断薬、HMG-CoA還元酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬、カルシウムチャネル遮断薬(CCB)、エンドセリンアンタゴニスト、レニン阻害薬、利尿薬、APOA-I模倣薬、抗糖尿病薬、抗肥満薬、アルドステロン受容体遮断薬、エンドセリン受容体遮断薬、アルドステロンシルバーゼ阻害薬(ASI)、CETP阻害薬、抗凝血薬、リラキシン、BNP(ネシリチド)、および/またはNEP阻害薬から選択される、請求項21に記載の医薬組成物。30

**【請求項 23】**

治療有効量の請求項1から17のいずれか一項に記載のポリペプチド、そのアミド、エステル、もしくは塩、またはバイオコンジュゲートもしくはその多量体と、1種または複数の薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****発明の分野**

本発明は、投与を受ける対象において心血管疾患が治療されるように設計され、その野生型の対応物より高い耐分解性、およびそれと同等以上の生物活性を示す、改変ペプチドおよびポリペプチド配列を含む新規組成物に関する。本発明はまた、前記組成物の製造方法、および前記組成物を心血管疾患治療のために薬学的活性剤として使用する方法に関する

る。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

###### 発明の背景

西欧諸国における心不全の発生率は、65才を過ぎた成人のおよそ100人に1人である。最も一般的な病態は、心収縮性、したがって、心拍出量、すなわち、どちらかの心室によって排出される有効血液量が徐々に慢性的に不足することである。慢性心不全の患者は、代償不全、すなわち、心臓が十分な血液循環を維持できないという急性エピソードを伴う場合があり、その場合、心収縮性はさらに低下する。米国だけで、「急性非代償性心不全」(ADHF)での入院は、毎年約50万件である。

10

##### 【0003】

ADHFの現行の療法としては、利尿薬、血管拡張薬、およびイノトロープが挙げられ、これらは、心収縮性を直接増大させる。現用の静脈内イノトロープ(ドブタミン、ドーパミン、ミルリノン、レボシメンダン)は、不整脈などの有害事象および長期死亡率の増大と関連付けられているにもかかわらず、急性の状況で使用される。こうした傾向があることは、これらを慢性心不全に適用する妨げとなっている。ジゴキシンは、経口イノトロープ(oral inotrope)であるが、狭い治療指数、潜在的な催不整脈性の増大、および腎不全における禁忌による制約がある。

##### 【0004】

催不整脈性または死亡の傾向なしに心収縮性を増大させる心不全の療法は、ADHF用に差し迫って求められてはいるが、慢性心不全における未対応の膨大な医学的要因にも対処できるはずである。

20

##### 【0005】

アペリンは、アペリン受容体、アンジオテンシン様1受容体、アンジオテンシンII様1受容体などとも呼ばれる、以前はオーファンであったGタンパク質共役型受容体(GPCR)APJの、内因性リガンドである。アペリン/APJ経路は、心血管系において広く発現され、アペリンは、前臨床モデルにおいて、有益な主要な心血管効果を示している。ヒトにおける急性アペリン投与は、末梢および冠動脈の血管拡張を引き起こし、心拍出量を増加させる(Circulation. 2010; 121:1818-1827)。結果として、APJアゴニズムは、心不全患者にとっての重要な治療ターゲットとして浮上している。アペリン受容体APJの活性化は、現行の療法の傾向を伴わずに、心収縮性を増大させ、心臓保護になると考えられている。しかし、自然のアペリンは、in vivoでの半減期および作用持続時間が非常に短い。非常に短い半減期は、急速な血清クリアランス、およびペプチダーゼの作用によるタンパク質分解性分解を原因とする、このような治療用内因性ペプチド送達の、広く認められている主要な難題である。

30

##### 【0006】

この欠点を克服するために現在使用されている手段は、一部の治療用ペプチドが分解されるとしても、十分治療上有効なままとなるように、問題の治療用ペプチドを高い投薬量(dosage)で患者に投与することである。しかし、この方法は、患者にとって快適ではない。大半の治療用ペプチドは経口投与することができないので、治療用ペプチドは、絶えず注入する、静脈内注射によって頻回注入する、または皮下注射という不便な経路によって頻回投与することのいずれかの必要があることになる。頻回投与が必要となる結果、潜在的可能性のある多くのペプチド治療薬には、許容されない非常に突出した治療コストが伴う。分解された多量のペプチドが存在することは、望ましくない副作用も生じる可能性がある。

40

##### 【0007】

投与の苦痛および高いコストは、魅力的な生物活性プロファイルを有する大半の治療用ペプチドが、薬物候補として開発され得ない、2つの理由である。

##### 【0008】

したがって、ペプチドの半減期を延長する1つの手法は、生物学的活性を依然として維

50

持しながら、その分解の速度を緩めるように、治療用ペプチドを改変することである。

#### 【0009】

したがって、アペリンの機能を模倣するが、半減期が延長されており、自然に存在するアペリンと同等またはそれを超える生物活性を示す、ペプチドおよびポリペプチドを特定することが望ましい。さらに、立体配座の拘束、すなわち、ペプチドおよびポリペプチドが、追加のフォールディングまたは再配置 (repositioning) の必要なしに、その受容体および/または他の経路ターゲットと相互作用し得るような活性立体配座状態を実現および維持する能力の増大を示す、アペリン類似体ペプチドおよびポリペプチドを特定することが望ましい。追加の手法としては、ペプチドを、腎臓を介したその排出を妨げる分子にコンジュゲートさせることにより、クリアランスの速度を減速することが挙げられる。

10

#### 【0010】

したがって、改変ペプチドの治療上の利点を依然として保持しつつ低い毒性を維持しながら、*in vivo*での作用持続時間をより長くするために半減期が延長されている、改変された治療用ペプチドが求められている。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

#### 発明の要旨

本発明は、問題の治療用ペプチドまたはポリペプチド、すなわち、APJアゴニストを改変することにより、身体内でのペプチド分解の問題を克服することを対象とする。

20

#### 【0012】

本発明の目的は、APJアゴニストとして有用であり、また、野生型アペリンおよび他の既知のアペリン類似体に優る次の改良点、すなわち、半減期の延長、投与後および/または可溶化後の分解に対するより強い免疫性、ならびに立体配座拘束の増強のうちの少なくとも1つを、すべて、野生型アペリンと同等またはそれを超える生物学的活性を示しながら保持する、新規のペプチドおよびポリペプチド、またはそのバイオコンジュゲートを提供することである。したがって、本発明のペプチドおよびポリペプチド、またはそのバイオコンジュゲートは、心不全などの心血管疾患、心不全と関連する障害および状態、ならびにAPJ受容体活性の活性化に反応を示す障害および状態の治療または予防に特に有用である。

30

#### 【0013】

一実施形態では、本発明のペプチドおよびポリペプチド、またはそのバイオコンジュゲートは、心不全と関連する障害もしくは状態、またはAPJ受容体活性の活性化（もしくはアゴニズム）に反応を示す障害の治療または予防に特に有用である。別の実施形態では、本発明のペプチドおよびポリペプチド、またはそのバイオコンジュゲートは、急性非代償性心不全（ADHF）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作（cerebrovascular accident）、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症の治療において特に有用である。

40

#### 【0014】

本発明は、本明細書に記載するとおりの、ペプチドおよびポリペプチド、またはそのバイオコンジュゲート、医薬組成物、ならびにその製造および使用の方法に関する。本発明のペプチドおよびポリペプチドの例としては、式I～IVのいずれか1つに従うペプチドおよびポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、ならびに、限定はしないが実験実施例を始めとする、本明細書において詳細に列挙するいずれかのペプチドまたはポリペプチド、およびそのバイオコンジュゲートが挙げられる。

#### 【0015】

したがって、本発明は、ペプチドまたはポリペプチド式(I)：

X1 - R - X3 - X4 - L - S - X7 - X8 - X9 - X10 - X11 - X12 - X13

50

I

## [式中、

X 1 は、ポリペプチドのN末端であり、かつ、存在しないか、またはQ、A、もしくはp Eのいずれかであり、あるいはX 1 は、C、c、h C、D - h Cから選択され；ここで、C、c、h C、またはD - h Cの側鎖は、X 7 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 3 は、Pであり、またはX 3 は、C、c、h C、およびD - h Cから選択され；ここで、C、c、h C、またはD - h Cの側鎖は、X 7 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 4 は、Rであり、またはX 4 は、C、c、h C、およびD - h Cから選択され；ここで、C、c、h C、またはD - h Cの側鎖は、X 7 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、ここで、X 1 、X 3 、およびX 4 の1つだけは、C、c、h C、およびD - h Cから選択される含硫アミノ酸 (sulfur contain amino-acid) であり、

X 7 は、C、c、h C、またはD - h Cであり；かつ、X 7 の側鎖は、X 1 、X 3 、またはX 4 いずれかのC、c、h C、またはD - h Cの側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、KまたはFであり、

X 9 は、G、A、aであり、または存在せず、

X 10 は、Pであり、または存在せず、

X 11 は、D - N l e 、N l e 、M、またはfであり、

X 12 は、存在しない、またはP、f、a、D - N v a 、もしくはD - A b u であり、

X 13 は、C末端であり、かつ、存在しないか、または(N - M e ) F 、F 、f 、a 、y 、およびN a l から選択され；ここで、

N l e は、L - ノルロイシンであり、

D - N l e は、D - ノルロイシンであり、

D - h C は、D - ホモシステインであり、

h C は、L - ホモシステインであり、

N a l は、L - ナファタリン (L-naphthaline) であり、

D - N v a は、D - ノルバリンであり、

D - A b u は、D - 2 - アミノ酪酸であり、

p E は、L - ピログルタミン酸である]

またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩、またはこれらと実質的に同等なポリペプチドを提供する。

## 【0016】

本明細書においてさらに説明するとおり、本発明のペプチドおよびポリペプチドを構成するアミノ酸残基を表すのには、当業界で受け入れられている3文字または1文字略語を使用する。「D」が前に付く場合を除き、アミノ酸は、L - アミノ酸である。1文字略語が大文字であるとき、略語はL - アミノ酸を指す。1文字略語が小文字であるとき、略語はD - アミノ酸を指す。代わりに、D - アミノ酸は、略語文字の直前にDの文字を添えて表す場合もあり、すなわち、「D」が前に付いているとき、そのアミノ酸は、D - アミノ酸である。

## 【0017】

上で挙げた式Iのアミノ酸残基のいずれか、または本明細書に記載のその関連式、たとえば、式I ~ I V は、本発明のペプチドまたはポリペプチドが、機能活性および構造特性（たとえば、半減期の延長、分解からの保護、立体配座拘束）を依然として保持するという前提で、保存的な様式で置換されていてもよい。許容される保存的なアミノ酸置換の原理および例は、本明細書でさらに説明する。

## 【0018】

本発明はさらに、

a . 式I ~ I V のいずれか1つのペプチドまたはポリペプチド、

b . 半減期延長性部分 (half-life extending moiety)

を含み、

前記ペプチドまたはポリペプチドと前記半減期は、場合によりリンカーを介して、共有結

10

20

30

40

50

合によって連結または融合する、  
バイオコンジュゲートまたはその多量体を提供する。

【0019】

「場合によりリンカーを介して」とは、式I～IVによるポリペプチドのペプチドが、直接（すなわち、リンカーなしで）半減期延長性部分に共有結合によって連結し、もしくは融合し、またはリンカーを介して半減期延長性部分に共有結合によって連結し、もしくは融合することを意味する。

【0020】

本発明の半減期延長性部分は、ペプチドまたはポリペプチド類似体に、共有結合によって融合、付着、連結、またはコンジュゲートしていくよい。半減期延長性部分は、たとえば、ポリエチレングリコール（PEG）などのポリマー、コレステロール基、炭水化物、もしくはオリゴ糖、脂肪酸、またはサルベージ受容体に結合するいずれかの天然もしくは合成タンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドでよい。半減期延長性部分は、血清半減期の長い血漿タンパク質（アルブミンおよび免疫グロブリン）に、場合によりリンカーを介して共有結合によって連結することが好ましい。他の実施形態では、半減期延長性部分は、アルブミン結合性残基である。本明細書で使用する「アルブミン結合性残基」とは、ヒト血清アルブミンに、非共有結合的に結合する残基を意味する。一実施形態では、アルブミン結合性残基は、親油性残基である。別の実施形態では、アルブミン結合性残基は、生理的pHで負電荷を有する。アルブミン結合性残基は、通常、負電荷を有しうるカルボン酸を含む。アルブミン結合性残基の例としては、脂肪酸が挙げられる。他の実施形態では、半減期延長性部分は、IgG定常ドメインもしくはその断片（たとえば、Fc領域）、ヒト血清アルブミン（HSA）、またはアルブミン結合性ポリペプチドもしくは残基、たとえば脂肪酸である。バイオコンジュゲートの半減期延長性部分の部分は、ヒト血清アルブミンまたはFc領域であることが好ましい。バイオコンジュゲートの半減期延長性部分の部分は、Fc領域であることが最も好ましい。

10

20

【0021】

半減期延長性部分は、本発明のバイオコンジュゲートの構成部分、たとえば、本発明のペプチドまたはポリペプチド（式I～IV）の生物学的機能を増強するように、かつ／またはその妨げとならないようにして付着している。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、半減期延長性部分に、場合によりリンカーを介して融合していくよい。半減期延長性部分は、IgG定常ドメインもしくはその断片（たとえば、Fc領域）、ヒト血清アルブミン（HSA）などのタンパク質、またはアルブミン結合性ポリペプチドもしくは残基（たとえば脂肪酸）でよい。本明細書で開示するこのようなタンパク質は、多量体を形成してもよい。

30

【0022】

一部の実施形態では、半減期延長性部分（たとえば、HSA、Fc、脂肪酸など）は、式I～IVのいずれか1つのペプチドまたはポリペプチドのN末端に、共有結合によって連結または融合する。他の実施形態では、半減期延長性部分（たとえば、HSA、Fc、脂肪酸など）は、本発明の式I～IVのいずれか1つのペプチドまたはポリペプチドのC末端に、共有結合によって連結または融合する。

40

【0023】

本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、APJ受容体の活性化を介して、急性非代償性心不全（ADHF）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Bradycardia症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症の治療において有用である。

【0024】

好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド、またはそのバイオコンジュゲートは、急性非代償性心不全（ADHF）の治療において有用である。

50

## 【0025】

別の実施形態では、本発明は、そのような治療の必要のある対象において、A P J受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療する方法であって、対象におけるA P J受容体の活性化に反応を示す障害または疾患が治療されるような有効量の式I～IVのいずれか1つに従うポリペプチドまたはそのアミド、塩のエステル(an ester of a salt)、またはそのバイオコンジュゲートを対象に投与する工程を含む方法に関する。

## 【0026】

さらに別の実施形態では、本発明は、式I～IVのいずれか1つに従うポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと、1種または複数の薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。

10

## 【0027】

さらに別の実施形態では、本発明は、式I～IVのいずれか1つに従うポリペプチド、またはそのアミド、エステルもしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと、1種または複数の治療活性薬剤の医薬的組合せ(pharmaceutical combination)とを含む組合せに関する。

## 【0028】

別の実施形態では、本発明は、その必要のある対象においてA P J受容体を活性化させる方法であって、治療有効量の式I～IVのいずれか1つに従うポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを対象に投与する工程を含む方法に関する。

20

## 【発明を実施するための形態】

## 【0029】

## 発明の詳細な説明

本出願を説明する目的のために、別段指定しない限り、また相応しい場合は常に、以下の定義が適用され、単数形で使用する用語は、複数形の語も包含し、逆の場合も同様である。

## 【0030】

本明細書で使用するとき、「A P J受容体の変調に反応を示す障害または疾患」、「A P Jの変調に反応を示す障害および状態」、「A P J受容体活性の変調に反応を示す障害および状態」、「A P J受容体活性の活性化(またはアゴニズム)に反応を示す障害」および同様の用語は、急性非代償性心不全(A D H F)、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病(妊娠糖尿病を含む)、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷(日焼けを含む)、および子癇前症を包含する。

30

## 【0031】

本明細書で使用するとき、「A P J受容体活性の活性化」または「A P J受容体の活性化」とは、A P J受容体活性の増大を指す。A P J受容体活性の活性化は、たとえば、本発明のペプチドおよびポリペプチドの投与による、A P J受容体の「アゴニズム」とも呼ぶ。

40

## 【0032】

本明細書で使用するとき、用語「ポリペプチド」および「ペプチド」は、互いに連結した2個以上のアミノ酸を指すのに、互換的に使用する。以下で表1に示す、珍しいまたは自然でないアミノ酸の略語を除き、当業界で受け入れられている3文字または1文字略語を使用して、本発明のペプチドおよびポリペプチドを構成するアミノ酸残基を表す。「D」が前に付く場合を除き、アミノ酸は、L-アミノ酸である。1文字略語が大文字であるとき、略語は、L-アミノ酸を指す。1文字略語が小文字であるとき、略語は、D-アミノ酸を指す。集まりまたは連なりまたはアミノ酸略語を使用して、ペプチドを表す。ペプチドは、N末端を左側にして示し、配列は、N末端からC末端に向かって記す。

50

**【 0 0 3 3 】**

本発明のペプチドは、非天然アミノ酸（すなわち、自然界では発生しない化合物）を含んでおり、当業界で知られているような他のアミノ酸類似体をその代わりとして用いてよい。

**【 0 0 3 4 】**

ある特定の非天然アミノ酸は、Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003、Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003、Wang et al., Science 292:498-500, 2001、Zhang et al., Science 303:371-373, 2004、または米国特許第7,083,970号に記載の技術によって導入することができる。簡潔に述べると、こうした発現系の一部には、部位特異的突然変異誘発が関与して、本発明のポリペプチドをコードするオーブンリーディングフレームに、アンバー T A Gなどのナンセンスコドンが導入される。次いで、このような発現ベクターは、導入されたナンセンスコドンに特異的な t R N A を利用することのできる宿主に導入され、選択された非天然アミノ酸を積み込んでいる。本発明のポリペプチドに諸部分をコンジュゲートさせる目的で有益な特定の非天然アミノ酸として、アセチレン側鎖およびアジド側鎖を有するものが挙げられる。10

**【 0 0 3 5 】**

本発明のペプチド中の天然または天然でないアミノ酸の1つまたは複数は、コンジュゲーション、機能付与、または他の改変などのために、たとえば、炭水化物基、ホスフェート基、ファルネシリル基、イソファルネシリル基、脂肪酸基、リンカーなどの化学的エンティティを附加して改変してもよい。前記改変は、部位特異的に行っても、または部位特異的でなく行ってもよい。好ましい実施形態では、ペプチドの改変により、より安定したペプチド（たとえば、より長い i n v i v o 半減期を示すもの）が得られる。こうした改変として、追加の D - アミノ酸の組み込みなどを挙げることができる。いかなる改変も、ペプチドの所望の生物学的活性の実質的妨げとなるべきでなく、このような改変により、ペプチドに対して、望ましい特性、たとえば、生物学的活性の増強を付与することができる。20

**【 0 0 3 6 】**

前記改変は、本発明のタンパク質の生物学的特性を、野生型タンパク質に比べて強化するだけでなく、場合によっては、たとえば、標識およびタンパク質半減期延長剤用に、また前記変異体を固体支持体の表面に固定する目的で、付着点として役立つ。30

**【 0 0 3 7 】**

ある特定の実施形態では、たとえば、半減期を延長し、または前記ポリペプチドおよび / またはペプチドの生物学的特性を別な形で改善する目的で、このような改変、たとえば、部位特異的な改変を使用して、本発明のポリペプチドおよび / またはペプチドに、コンジュゲート、たとえば、P E G 基を付着させる。前記技術については、本明細書でさらに記載する。

**【 0 0 3 8 】**

他の実施形態では、このような改変、たとえば、部位特異的改変を使用して、本発明のポリペプチドの半減期を延長する他のポリマー、小分子、および組換え型タンパク質配列を付着させる。このような一実施形態として、ポリペプチドおよび / またはペプチドに、脂肪酸または特定のアルブミン結合化合物を付着させるものが挙げられる。他の実施形態では、改変は、特定のアミノ酸タイプにおいてなされ、ポリペプチド上の1つまたは複数の部位において付着させることができる。40

**【 0 0 3 9 】**

他の実施形態では、このような改変、たとえば、部位特異的改変を、野生型および / または変異体の多量体、たとえば、二量体（ホモ二量体またはヘテロ二量体）、三量体、または四量体を生成するための付着手段として使用する。こうした多量体タンパク質分子は、アミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにおいて、F c、ヒト血清アルブミン（H S A）などの他のタンパク質に付着または縮合した、P E G、糖、および / またはP E G 50

- コレステロールコンジュゲートなどの基をさらに有する場合もある。

**【0040】**

他の実施形態では、このような部位特異的改変を使用して、部位特異的に組み込まれたピロリシンもしくはピロリシン類似体または自然に存在しないアミノ酸 ( para - アセチル - Ph e, para - アジド - Ph e ) の位置により、配向の制御および固体支持体表面へのそのようなタンパク質、ポリペプチドおよび / またはペプチドの付着、またはPEG、糖、および / もしくはPEG - コレステロールコンジュゲートなどの基を付着させることが可能になる、タンパク質、ポリペプチド、および / またはペプチドを生成する。

**【0041】**

他の実施形態では、このような部位特異的改変を使用して、タンパク質、ポリペプチド、および / またはペプチドを部位特異的に架橋し、それによって、限定はしないが、ヘテロ二量体およびヘテロ三量体を始めとするヘテロオリゴマーを生成する。他の実施形態では、このような部位特異的改変を使用して、タンパク質、ポリペプチド、および / またはペプチドを部位特異的に架橋し、それによって、タンパク質 - タンパク質コンジュゲート、タンパク質 - ポリペプチドコンジュゲート、タンパク質 - ペプチドコンジュゲート、ポリペプチド - ポリペプチドコンジュゲート、ポリペプチド - ペプチドコンジュゲート、またはペプチド - ペプチドコンジュゲートを生成する。他の実施形態では、部位特異的な改変として、1種類を越えるタイプの分子が、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの単一部位において付着するのを可能にする分岐点を挙げることができる。

**【0042】**

他の実施形態では、本明細書で列挙する改変は、部位特異的でなく行われ、本発明のタンパク質 - タンパク質コンジュゲート、タンパク質 - ポリペプチドコンジュゲート、タンパク質 - ペプチドコンジュゲート、ポリペプチド - ポリペプチドコンジュゲート、ポリペプチド - ペプチドコンジュゲート、またはペプチド - ペプチドコンジュゲートを得ることができる。

**【0043】**

一部の実施形態では、本発明は、本明細書で開示するペプチドまたはポリペプチドを特異的に結合する抗体などの抗体に結合した、式I ~ IVのいずれか1つの少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドを含む複合体を提供する。

**【0044】**

当業者なら、本明細書に記載のポリペプチドのいずれかの配列において、その活性を必然的に低下させることなく、種々のアミノ酸置換、たとえば、保存的アミノ酸置換がなされてもよいことは理解されよう。本明細書で使用するとき、「その置換基として一般に使用されるアミノ酸」は、保存的置換（すなわち、化学的特徴が同等であるアミノ酸での置換）を包含する。保存的置換の目的で、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられる。極性（親水性）天然アミノ酸としては、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが挙げられる。正電荷を有する（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リシン、およびヒスチジンが挙げられる。負電荷を有する（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。アミノ酸置換の例としては、その対応するD - アミノ酸の代わりにL - アミノ酸を用いるもの、ホモシステインもしくは含チオール側鎖を有する他の非天然アミノ酸の代わりにシステインを用いるもの、ホモリシン、ジアミノ酪酸、ジアミノプロピオ酸、オルニチン、もしくは含アミノ側鎖を有する他の非天然アミノ酸の代わりにリシンを用いるもの、またはノルバリンの代わりにアラニンを用いるものなどが挙げられる。

**【0045】**

本明細書で使用する用語「アミノ酸」とは、その構造でそうした立体異性体型が可能である場合、すべて、そのDおよびL立体異性体の、自然に存在するアミノ酸、天然でないアミノ酸、アミノ酸類似体、および、自然に存在するアミノ酸と同様にして機能するアミノ酸模倣物を指す。アミノ酸は、本明細書では、その名称、一般に知られているその3文

10

20

30

40

50

字記号、または IUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commission が推奨する 1 文字記号のいずれかで呼ぶ。

#### 【0046】

用語「自然に存在する」とは、自然界で見出され、人の手で操作されていない材料を指す。同様に、「自然に存在しない」や「自然でない」などは、本明細書で使用するとき、自然界で見出されない、または人の手で構造が改変されもしくは合成されている材料を指す。アミノ酸に関連して使用するとき、用語「自然に存在する」とは、20種の通常のアミノ酸（すなわち、アラニン（AまたはAla）、システイン（CまたはCys）、アスパラギン酸（DまたはAsp）、グルタミン酸（EまたはGlu）、フェニルアラニン（FまたはPhe）、グリシン（GまたはGly）、ヒスチジン（HまたはHis）、イソロイシン（IまたはIle）、リシン（KまたはLys）、ロイシン（LまたはLeu）、メチオニン（MまたはMet）、アスパラギン（NまたはAsn）、プロリン（PまたはPro）、グルタミン（QまたはGln）、アルギニン（RまたはArg）、セリン（SまたはSer）、トレオニン（TまたはThr）、バリン（VまたはVal）、トリプトファン（WまたはTrp）、およびチロシン（YまたはTyr）を指す。  
10

#### 【0047】

本明細書で使用する用語「非天然（non-natural）アミノ酸」および「天然でない（unnatural）アミノ酸」は、同じであろうと異なっていようと、任意の生物中で、任意の生物からの未改変または改変遺伝子を使用して、生合成によって生成することのできないアミノ酸構造を、互換的に表すものである。これら用語は、自然に存在する（野生型）アペリントンパク質配列または本発明の配列中に存在しないアミノ酸残基を指す。これらの用語は、限定はしないが、20種の自然に存在するアミノ酸の1つ、セレノシステイン、ピロリシン（Pyl）、またはピロリン・カルボキシ・リシン（Pcl、たとえば、PCT特許公開WO 2010 / 48582に記載のとおり）でない、改変アミノ酸および/またはアミノ酸類似体を包含する。このような非天然アミノ酸残基は、自然に存在するアミノ酸の置換によって、および/または自然に存在する（野生型）アペリントンパク質配列もしくは本発明の配列への非天然アミノ酸の挿入によって導入することができる。非天然アミノ酸残基は、アペリントン分子に所望の機能性、たとえば、機能性部分（たとえば、PEG）を連結する能力が付与されるように組み込むこともできる。アミノ酸に関連して使用するとき、記号「U」は、本明細書で使用される「非天然アミノ酸」および「天然でないアミノ酸」を意味するものとする。  
20  
30

#### 【0048】

加えて、このような「天然でないアミノ酸」をタンパク質に組み込むのに、改変 tRNA および改変 tRNA シンセターゼ（RS）が必要であることも理解される。こうした「選択された」tRNA / RS 直交対は、Schultz らが開発した選定方法によって、またはランダムもしくは標的変異によって生み出される。例として、ピロリン・カルボキシ・リシンは、ある生物から宿主細胞に移された遺伝子によって生合成で生成され、また天然の tRNA および tRNA シンセターゼ遺伝子を使用してタンパク質に組み込まれるので、「天然アミノ酸」であるが、p-アミノフェニルアラニン（Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):93 5-9を参照されたい）は、生合成で生成されるとはいえ、「選択された」tRNA / tRNA シンセターゼ直交対によってタンパク質に組み込まれるので、「天然でないアミノ酸」である。  
40

#### 【0049】

改変コードアミノ酸としては、限定はしないが、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、O-ホスホセリン、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、beta-アラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、第三級-ブチルグリシン、2,4-ジアミノイソ  
50

酪酸、デスマシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロトリオニン酸、N-エチルグリシン、N-メチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン、ヒドロキシリシン、allo-ヒドロキシリシン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスマシン、allo-イソロイシン、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルペニチルグリシン、N-メチルバリン、ナフチルアラニン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、ペニチルグリシン、ピペコリン酸およびチオプロリンが挙げられる。用語「アミノ酸」は、ある特定の生物における代謝産物であるが、タンパク質への組み込みについては遺伝暗号によってコードされていない、自然に存在するアミノ酸も包含する。このようなアミノ酸として、限定はしないが、オルニチン、D-オルニチン、およびD-アルギニンが挙げられる。

10

#### 【0050】

本明細書で使用する用語「アミノ酸類似体」とは、自然に存在するアミノ酸と同じ基礎化学構造、すなわち、単なる例として、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合した - 炭素を有する化合物を指す。アミノ酸類似体には、可逆的もしくは不可逆的に化学的ブロックがなされ、またはそのC末端カルボキシ基、そのN末端アミノ基、および/もしくはその側鎖官能基が化学的に改変されている、天然および天然でないアミノ酸が含まれる。そのような類似体として、限定はしないが、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホン、S-(カルボキシメチル)-システイン、S-(カルボキシメチル)-システインスルホキシド、S-(カルボキシメチル)-システインスルホン、アスパラギン酸-( - メチルエステル)、N-エチルグリシン、アラニンカルボキサミド、ホモセリン、ノルロイシン、およびメチオニンメチルスルホニウムが挙げられる。

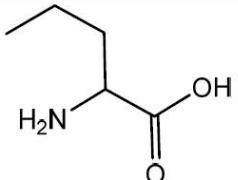
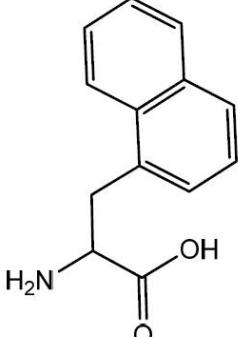
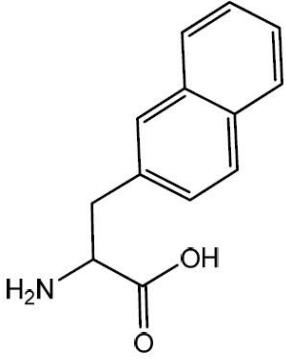
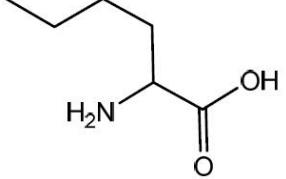
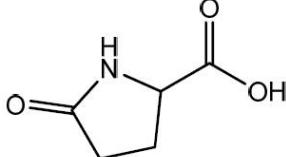
20

#### 【0051】

## 【表1 - 1】

表1: 本発明において述べる

天然でないまたは非天然(un-natural or non-natural)アミノ酸

記号	名称	構造	
Nva または nva(D-Nva)	L-ノルバリンまたはD-ノルバ リン		10
1-Nal	1-ナフチルアラニン		20
2-Nal	2-ナフチルアラニン		30
Nle または nle(D-Nle)	L-ノルロイシンまたはD-ノル ロイシン		40
pE	ピログルタミン酸		

【0052】

【表1-2】

Abu または abu(D-Abu)	2-アミノ-酪酸	
O2Oc	8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン 酸	

N a 1 は、1 - ナフチルアラニンと2 - ナフチルアラニンの両方、好ましくは2 - ナフチルアラニンを指す。

## 【0053】

本明細書で使用するとき、用語「アミド」とは、C末端におけるカルボン酸基のアミド誘導体（たとえば、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NH-C<sub>1~6</sub>アルキル、-C(O)NH-C<sub>1~2</sub>アルキルフェニル、-C(O)NH-NHBn、-C(O)-4フェノキシピペリジン、または-C(O)N(C<sub>1~6</sub>アルキル)<sub>2</sub>）を指す。

## 【0054】

用語「アミド」は、N末端におけるアミノ基の誘導体（たとえば、-NH-C(O)C<sub>1~6</sub>アルキル、-NH-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Ph（nは、1~6の整数である）、-NH-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、4-Cl-Ph-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)NH-、C<sub>1~15</sub>H<sub>2~7</sub>C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-、C<sub>1~5</sub>H<sub>2~7</sub>C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-、Ph-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-NH-、またはCH<sub>3</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)NH-（mは、1~12の整数である）も指す。

## 【0055】

本明細書で使用するとき、用語「エステル」とは、C末端におけるカルボン酸基のエステル誘導体（たとえば、-COOR）形態を指し、エステルのRは、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1~6</sub>アルキル基、シクロペンチルやシクロヘキシルなどのC<sub>3~8</sub>シクロアルキル基、フェニルや-ナフチルなどのC<sub>6~10</sub>アリール基、C<sub>6~10</sub>アリール-C<sub>1~6</sub>アルキル基、たとえば、ベンジル、フェニル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1~2</sub>アルキル基、および-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C<sub>1~2</sub>アルキル基などを指す。経口投与用のエステルとして一般に使用されるピバロイルオキシメチルエステルなども挙げることができる。本発明のポリペプチドが、C末端以外の位置に追加のカルボキシル基またはカルボキシレート基を有するとき、こうした基がアミド化またはエステル化されているポリペプチドも、本発明のポリペプチドの範疇に入る。こうした場合において、エステルは、たとえば、上述のC末端エステルと同じ種類のエステルでよい。

## 【0056】

用語アルキルとは、1~20個の炭素原子を含む完全不飽和の分枝状または非分枝状（または直鎖状もしくは線状）炭化水素部分を指す。アルキルは、1~7個の炭素原子、より好ましくは1~4個の炭素原子を含むことが好ましい。

## 【0057】

用語アリールとは、環部分に6~10個の炭素原子を有する、単環式または二環式の芳香族炭化水素基を指す。アリールの代表例は、フェニルまたはナフチルである。

## 【0058】

用語ヘテロアリールは、炭素原子および1~5個のヘテロ原子から選択される5~10

10

20

30

40

50

の環員を含んでおり、各ヘテロ原子は、O、NまたはSから独立して選択され、SおよびNは、種々の酸化状態に酸化されていてもよい、単環式または二環式ヘテロアリールを包含する。二環式ヘテロアリール系について、系は、完全に芳香族である（すなわち、すべての環が芳香族である）。

#### 【0059】

用語シクロアルキルとは、3～12個の炭素原子、好ましくは3～8個、または3～7個の炭素原子の、飽和または不飽和であるが非芳香族の単環式、二環式、または三環式炭化水素基を指す。二環式および三環式シクロアルキル系については、すべての環が非芳香族である。

#### 【0060】

用語ヘテロシクリルとは、4-、5-、6-、または7員の単環式であり、O、SおよびNから選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含んでおり、NおよびSは、種々の酸化状態に場合により酸化されていてもよい、飽和または不飽和非芳香族（部分的不飽和）環を指す。一実施形態では、ヘテロシクリル部分は、5～7個の環原子を含んでおり、O、SまたはNから選択されるさらなるヘテロ原子も場合により含んでいる、飽和单環を表す。

#### 【0061】

用語「APJ」（「アペリン受容体」、「アンジオテンシン様1受容体」、「アンジオテンシンII様1受容体」などとも呼ばれる）とは、380残基、7回膜貫通ドメインのG<sub>i</sub>共役型受容体を指し、その遺伝子は、ヒトの11番染色体の長腕上に位置する（NCBI参照配列：NP\_005152.1、NCBI参照配列：NM\_005161によってコードされる）。APJは、1993年に、変性オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ヒトゲノムDNAから初めてクローニングされ（O'Dowd et al. Gene, 136:355-60、1993）、1型アンジオテンシンII受容体と有意に相同意である。しかし、この相同意にもかかわらず、アンジオテンシンIIは、APJを結合しない。この内因性リガンドは、長年の間オーファンであったが、単離され、アペリンと命名された（Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)）。

#### 【0062】

用語「アペリン」は、77残基のプレタンパク質（NCBI参照配列：NP\_0059109.3、NCBI参照配列：NM\_017413.3によってコードされる）を指し、これがプロセッシングを受けて、生物学的活性型のアペリンペプチド、たとえば、アペリン-36、アペリン-17、アペリン-16、アペリン-13、アペリン-12になる。「アペリン-36」と呼ばれる全長成熟ペプチドは、36アミノ酸を含むが、最も強力なアイソフォームは、「Pyrr-1-アペリン-13またはPyrr<sup>1</sup>-アペリン-13」と呼ばれる、ピログルタミン酸化型のアペリン13量体（アペリン-13）である。種々のアペリン型は、たとえば、米国特許6,492,324B1に記載されている。

#### 【0063】

用語「コンジュゲート」と「バイオコンジュゲート」は、互換的に使用され、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドと半減期延長性部分とが、場合によりリンカーを介して共有結合によって付着した結果として生成したエンティティを指すものである。用語「コンジュゲート」または「バイオコンジュゲート」はまた、APJアゴニストポリペプチドまたは式I、II、IIIもしくはIVのポリペプチドと半減期延長性部分とが融合した結果として生成したエンティティも包含するものである。

#### 【0064】

用語半減期延長性部分は、ペプチドまたはポリペプチド類似体に、共有結合によって連結／付着または融合していてよい。半減期延長性部分は、たとえば、ポリエチレンギリコール（PEG）などのポリマー、脂肪酸、コレステロール基、炭水化物、もしくはオリゴ糖、またはサルベージ受容体に結合するいずれかの天然もしくは合成タンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドでよい。他の実施形態では、半減期延長性部分は、アルブミン結合性残基である。本明細書で使用する「アルブミン結合性残基」とは、ヒト血清アルブ

ミンに、非共有結合的に結合する残基を意味する。一実施形態では、アルブミン結合性残基は、親油性残基である。別の実施形態では、アルブミン結合性残基は、生理的 pH で負電荷を有する。アルブミン結合性残基は、通常、負電荷を有するカルボン酸を含む。アルブミン結合性残基の例としては、脂肪酸が挙げられる。他の実施形態では、半減期延長性部分は、血清半減期の長い血漿タンパク質（アルブミンおよび免疫グロブリン）に、場合によりリンカーを介して、共有結合によって連結する。たとえば、半減期延長性部分は、IgG 定常ドメインもしくはその断片（たとえば、Fc 領域）、ヒト血清アルブミン（HSA）、またはアルブミン結合性ポリペプチドもしくは残基（たとえば脂肪酸）である。バイオコンジュゲートの半減期延長性部分の部分は、Fc 領域であることが最も好ましい。

10

#### 【0065】

用語「半減期の延長」または「血清半減期を延長する」または「半減期を延長すること」とは、改变された生物学的活性分子（たとえば、アペリン 13）の、その非改变型（または裸の形態のペプチド）と比べた、循環半減期の肯定的な変化の意味である。血清半減期は、生物学的活性分子が投与された後の様々な時点で血液サンプルを採取し、各サンプル中のその分子の濃度を求ることにより測定される。血清濃度の変化を経時的に測定することで、改变された分子（たとえば、コンジュゲートした分子）の血清半減期の算出が可能になる。改变された分子（たとえば、コンジュゲートした分子）の血清半減期を、非改变分子（たとえば、アペリン 13）と比較することにより、血清半減期または  $t_{1/2}$  の相対的な延長を明らかにすることができます。延長は、少なくとも 2 倍であることが望ましいが、より短い延長も有用となり得る。

20

#### 【0066】

本発明のポリペプチド：

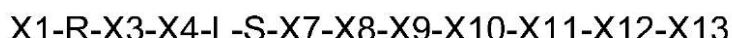
本発明の種々の実施形態を本明細書に記載する。各実施形態において明記する特色を、明記された他の特色と組み合わせて、別の実施形態としてもよいことは、認識されるであろう。

#### 【0067】

したがって、実施形態 1 において、本発明は、ペプチドまたはポリペプチド式（I）：

【化 0】

30



|

[式中、

X 1 は、ポリペプチドの N 末端であり、かつ、存在しない、Q、A、もしくは pE のいずれかであり、または X 1 は、C、c、hC、D - hC から選択され；ここで、C、c、hC、または D - hC の側鎖は、X 7 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 3 は、P であり、または X 3 は、C、c、hC、および D - hC から選択され；ここで、C、c、hC、または D - hC の側鎖は、X 7 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 4 は、R であり、または X 4 は、C、c、hC、および D - hC から選択され；ここで、C、c、hC、または D - hC の側鎖は、X 7 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

ここで、X 1、X 3、および X 4 の 1 つだけは、C、c、hC、および D - hC から選択される含硫アミノ酸であり、

X 7 は、C、c、hC、または D - hC であり；かつ、X 7 の側鎖は、X 1、X 3、または X 4 いずれかの C、c、hC、または D - hC の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、K または F であり、

X 9 は、G、A、もしくは a であり、または存在せず、

X 10 は、P であり、または存在せず、

X 11 は、D - Nle、Nle、M、または f であり、かつ、

X 12 は、存在しない、または P、f、a、D - Nva、もしくは D - Abu であり、

40

50

X 1 3 は、 C 末端であり、かつ、存在しないか、または ( N - M e ) F 、 F 、 f 、 a 、 y 、および N a 1 から選択され；ここで、

N 1 e は、 L - ノルロイシンであり、

D - N 1 e は、 D - ノルロイシンであり、

D - h C は、 D - ホモシステインであり、

h C は、 L - ホモシステインであり、

N a 1 は、 L - ナファタリン (L-naphthaline) であり、

D - N v a は、 D - ノルバリンであり、

D - A b u は、 D - 2 - アミノ酪酸であり、

p E は、 L - ピログルタミン酸である ]

10

またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩、またはこれらと実質的に同等なポリペプチドを提供する。

【 0 0 6 8 】

したがって、実施形態 2 において、本発明は、式 ( II ) のペプチドまたはポリペプチド：

【 0 0 6 9 】

【 化 1 】

X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



20

II

[ 式中、

X 1 は、ポリペプチドの N 末端であり、かつ、存在しない、Q 、 A 、または p E のいずれかであり、

X 4 は、 C 、 c 、 h C 、または D - h C であり、

X 7 は、 C 、 c 、 h C 、または D - h C であり；かつ、 X 7 の側鎖は、 X 4 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、 K または F であり、

X 9 は、 G 、 A 、 a であり、または存在せず、

30

X 1 0 は、 P であり、または存在せず、

X 1 1 は、 D - N 1 e 、 M 、 N 1 e 、または f であり、かつ、

X 1 2 は、存在しないか、または P 、 f 、 a 、 D - N v a 、および D - A b u から選択され、

X 1 3 は、 C 末端であり、かつ、存在しないか、または F 、 ( N - M e ) F 、 f 、 a 、 y 、および N a 1 から選択される ]

またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩、またはこれらと実質的に同等なポリペプチドを提供する。

【 0 0 7 0 】

したがって、実施形態 2 A において、本発明は、式 ( II ) のペプチドまたはポリペプチド：

40

【 0 0 7 1 】

【 化 2 】

X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



II

[ 式中、

X 1 は、ポリペプチドの N 末端であり、かつ、存在しないまたは p E のいずれかであり

50

X 4 は、 C、 c、 h C、 または D - h C であり、  
 X 7 は、 C、 c、 h C、 または D - h C であり；かつ、 X 7 の側鎖は、 X 4 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、 K または F であり、

X 9 は、 G、 A、 a であり、 または存在せず、

X 10 は、 P であり、 または存在せず、

X 11 は、 D - N l e、 N l e、 または f であり、 かつ、

X 12 は、 存在しないか、 または P、 f、 a、 D - N v a、 および D - A b u から選択され、

X 13 は、 C 末端であり、 かつ、 存在しないか、 または F、 ( N - M e ) F、 f、 a、 y、 および N a l から選択される】

またはこのポリペプチドのアミド、 エステル、 もしくは塩、 またはこれらと実質的に同等なポリペプチドを提供する。

#### 【0072】

したがって、 実施形態 3 において、 本発明は、 式 I II のペプチドまたはポリペプチド：

#### 【0073】

#### 【化3】

X1-R-P-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



III

#### [式中、

X 1 は、 ポリペプチドの N 末端であり、 かつ、 C、 c、 h C、 および D - h C から選択され、

X 7 は、 C、 c、 h C、 または D - h C であり； ここで、 X 7 の側鎖は、 X 1 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、 K または F であり、

X 9 は、 G、 A、 a であり、 または存在せず、

X 10 は、 P であり、 または存在せず、

X 11 は、 D - N l e、 N l e、 M、 または f であり、 かつ、

X 12 は、 存在しないか、 または P、 f、 a、 D - N v a、 および D - A b u から選択され、

X 13 は、 C 末端であり、 かつ、 存在しないか、 または ( N - M e ) F、 F、 f、 a、 y、 および N a l から選択される】

またはこのポリペプチドのアミド、 エステル、 もしくは塩を提供する。

#### 【0074】

実施形態 3 A において、 本発明は、 X 11 が、 D - N l e、 N l e、 または f である式 I II のポリペプチドまたはそのアミド、 エステル、 もしくは塩に関する。

#### 【0075】

したがって、 実施形態 4 において、 本発明は、 式 I V のペプチドまたはポリペプチド：

#### 【0076】

#### 【化4】

X1-R-X3-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



IV

[式中、

X 1 は、ポリペプチドの N 末端であり、かつ、存在しない、Q、A、または p E のいずれかであり、

X 3 は、C、c、h C、またはD - h C であり；C、c、h C、またはD - h C の側鎖 (wherein the side chain of C, c, hC or D-hC)、

X 7 は、C、c、h C、またはD - h C であり；かつ、X 7 の側鎖は、X 3 の C、c、h C、またはD - h C の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、K または F であり、

X 9 は、G、A、a であり、または存在せず、

X 10 は、P であり、または存在せず、

X 11 は、D - N l e、N l e、M、または f であり、かつ、

X 12 は、存在しないか、または P、f、a、D - N v a、および D - A b u から選択され、

X 13 は、C 末端であり、かつ、存在しないか、または (N - M e) F、F、f、a、y、および N a l から選択される]

またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩を提供する。

【0077】

したがって、実施形態 4 Aにおいて、本発明は、式 I V のペプチドまたはポリペプチド：

【0078】

【化5】

X1-R-X3-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



IV

[式中、

X 1 は、ポリペプチドの N 末端であり、かつ、存在しないまたは p E のいずれかであり、

X 3 は、C、c、h C、またはD - h C であり；C、c、h C、またはD - h C の側鎖

30

X 7 は、C、c、h C、またはD - h C であり；かつ、X 7 の側鎖は、X 3 の C、c、h C、またはD - h C の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、K または F であり、

X 9 は、G、A、a であり、または存在せず、

X 10 は、P であり、または存在せず、

X 11 は、D - N l e、N l e、または f であり、かつ、

X 12 は、存在しないか、または P、f、a、D - N v a、および D - A b u から選択され、

X 13 は、C 末端であり、かつ、存在しないか、または (N - M e) F、F、f、a、y、および N a l から選択される]

またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩を提供する。

【0079】

実施形態 5 において、本発明は、X 1 が p E である、実施形態 1、2、および 4 のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

【0080】

実施形態 5 A において、本発明は、X 1 が A または Q である、実施形態 1、2、および 4 のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。この実施形態の特定の態様では、ペプチドは、半減期延長性部分に、

50

その A または Q N 末端を介して、化学的に連結または融合する。

**【 0 0 8 1 】**

実施形態 6において、本発明は、X 1が存在しない、実施形態 1、2、4、および 4 A のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

**【 0 0 8 2 】**

実施形態 7において、本発明は、N 末端がアミドである、実施形態 1 ~ 4 および 6 のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドの塩に関する。

**【 0 0 8 3 】**

実施形態 8において、本発明は、N 末端が、式 - N H R のアミドであり、R が、アセチル、ベンゾイル、フェナシル、スクシニル、オクタノイル、4 - フェニルブタノイル、4 - C 1 - P h - ( C H<sub>2</sub> )<sub>3</sub> C ( O ) - 、または P h - C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> N H C ( O ) - である、実施形態 7 に従うポリペプチド、またはこのポリペプチドの塩に関する。 10

**【 0 0 8 4 】**

実施形態 8 Aにおいて、本発明は、N 末端が、式 N H R 1 のアミドであり、R 1 が C H<sub>3</sub> C ( O ) - 、 C H<sub>3</sub> - ( O - C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> )<sub>m</sub> - C ( O ) - 、パルミトイール ( O 2 O c )<sub>p</sub> 、ミリストイル ( O 2 O c )<sub>p</sub> 、ラウロイル ( O 2 O c )<sub>p</sub> 、または P h - C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> N H C ( O ) - であり；ここで、

p は、1 ~ 4 の整数であり、

m は、1 ~ 12 の整数であり、

ラウロイル ( O 2 O c ) は、 C<sub>11</sub> H<sub>23</sub> C ( O ) N H - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - であり、

ミリストイル ( O 2 O c ) は、 C<sub>13</sub> H<sub>27</sub> C ( O ) N H - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - であり、

パルミトイール ( O 2 O c ) は、 C<sub>15</sub> H<sub>31</sub> C ( O ) N H - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - である、実施形態 1 ~ 4 および 7 のいずれか 1 つに従うポリペプチドまたはこのポリペプチドの塩に関する。N 末端アミドの例は、参照により本明細書に援用される、2012年1月27日出願の米国仮出願第 61 / 591,557 号（代理人整理番号 P A T 0 5 4 9 6 1 - U S - P S P ）に記載されている。 20

**【 0 0 8 5 】**

実施形態 9において、本発明は、X 13 が F または f である、実施形態 1 ~ 8 A のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

**【 0 0 8 6 】**

実施形態 10において、本発明は、X 13 が存在しない、実施形態 1 ~ 8 A のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

**【 0 0 8 7 】**

実施形態 11において、本発明は、X 12 が存在しない、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、およびエステル、もしくは塩に関する。 40

**【 0 0 8 8 】**

実施形態 12において、本発明は、C 末端がアミドである、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドの塩に関する。

**【 0 0 8 9 】**

実施形態 13において、本発明は、C 末端が、式 - C ( O ) - R 2 のアミドであり、R 2 が、- N H<sub>2</sub> 、- N H - M e 、- N H - N H B n 、- N ( C H<sub>3</sub> ) - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - P h 、または - N H - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - P h である、実施形態 12 に従うポリペプチドまたはこのポリペプチドの塩に関する。

**【 0 0 9 0 】**

実施形態 14において、本発明は、X8がKである、実施形態1～13のいずれか1つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

#### 【0091】

実施形態15において、本発明は、X9がGである、実施形態1～14のいずれか1つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

#### 【0092】

実施形態16において、本発明は、X10がPである、実施形態1～15のいずれか1つに従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。 10

19.

#### 【0093】

実施形態17において、本発明は、X11がN1eまたはD-N1eである、請求項1から16のいずれか一項に従うポリペプチド、またはこのポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩に関する。

#### 【0094】

実施形態17Aにおいて、本発明は、X11-X12-X13部分からなるC末端が、N1e-P-フェネチルアミン、N1e-P-(N-Me)F、N1e-P-NH2、N1e-P-a-f、(D-N1e)-NH2、(D-N1e)-f、(D-N1e)-a-d、(D-N1e)-a-y、(D-N1e)-(D-Nva)-f、N1e-P-F、N1e-P-a、N1e-P-NaI、および(D-N1e)-(D-Abu)-fから選択される、実施形態1～17のいずれか1つに従うポリペプチドまたはこのポリペプチドの塩に関する。この実施形態の特定の一様では、本発明は、X11-X12-X13部分からなるC末端が、(D-N1e)-フェネチルアミン、(D-N1e)-a-f、およびf-a-fから選択される、実施形態17Aに従うポリペプチドまたはこのポリペプチドの塩に関する。 20

#### 【0095】

一実施形態17Bにおいて、本発明は、アミノ酸X1、X3、X4、およびX7～X13の少なくとも2つが、Pyr-1-アペリン-13に存在する対応するアミノ酸と異なる、実施形態1～17のいずれか1つのペプチドまたはポリペプチドに関する。別の実施形態において、本発明は、アミノ酸X1、X3、X4、およびX7～X13の少なくとも3つが、Pyr-1-アペリン-13に存在する対応するアミノ酸と異なる、実施形態1～18のいずれか1つのペプチドまたはポリペプチドに関する。さらに別の実施形態において、本発明は、アミノ酸X1、X3、X4、およびX7～X13の少なくとも4つが、Pyr-1-アペリン-13に存在する対応するアミノ酸と異なる、実施形態1～18のいずれか1つのペプチドまたはポリペプチドに関する。 30

#### 【0096】

別の実施形態において、X1、X3、X4、およびX7～X13アミノ酸は、以下の実施例の部におけるX1、X3、X4、およびX7～X13アミノ酸によって規定されるものである。 40

#### 【0097】

別の実施形態において、本発明による個々のポリペプチドは、以下の実施例の部において挙げるものの、またはそれらの薬学的に許容される塩である。

#### 【0098】

別段指定しない限り、用語「本発明のポリペプチド」とは、式(I)およびその下位式(式II、IIIまたはIV)のポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩を指す。

#### 【0099】

50

別段指定しない限り、用語「本発明のポリペプチド」、「本発明のペプチド」、「アペリンペプチドアゴニスト」などは、式Ⅰおよびその下位式（式Ⅱ、ⅢⅢまたはⅣ）のペプチドおよびポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩を指す。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、限定はしないが、野生型アペリン、アペリン-13、およびpyr-1-アペリン-13を含めた、本明細書に記載の既知のアペリンペプチドおよびポリペプチドと比べて、実質的に同等または改善された活性および／または血漿安定性を示す。

#### 【0100】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、式Ⅰ、Ⅱ、ⅢⅢまたはⅣのいずれか1つに従うペプチドおよびポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、ならびに、限定はしないが実験実施例を含めた、本明細書において詳細に列挙するいずれかのペプチドまたはポリペプチドに対する同一性が少なくとも約95%であるペプチドおよびポリペプチドも包含する。10

#### 【0101】

本明細書で使用するとき、語句「相同アミノ酸配列」またはその変形形態は、アミノ酸レベルでの相同性が少なくとも指定されたパーセンテージであることを特徴とする配列を指し、「配列同一性」と互換的に使用する。相同アミノ酸配列には、保存的アミノ酸置換を含み、かつ、そのポリペプチドが、同じ結合および／または活性を有する、アミノ酸配列が含まれる。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、比較配列との同一性が、99%までの少なくとも60%以上であれば、相同である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、比較配列と、60までの1以上のアミノ酸置換、付加、または欠失が共通していれば、相同である。一部の実施形態では、相同アミノ酸配列は、5以下または3以下の保存的アミノ酸置換を有する。20

#### 【0102】

相同性は、ポリペプチドレベルでもよい。本発明のペプチドもしくはポリペプチドまたはその一部分と、異なるアミノ酸配列との同一性の程度またはパーセンテージは、2つの配列の配列比較（アライメント(alignment)）における正確な一致の数を、「発明配列」または「外来配列」のいずれか短い方の長さで割ったものとして算出される。結果は、同一性パーセントとして示す。

#### 【0103】

詳細な実施例に記載するアミノ酸配列との相同性が約80～99.9%、好ましくは90～99.9%であり、アペリン-13またはpyr-1-アペリン-13を凌ぐ血漿安定性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドは、本発明のポリペプチドの範疇に入る。一実施形態では、血漿安定性の改善は、少なくとも2倍である。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、血漿安定性が少なくとも30分である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、血漿安定性が少なくとも60分、または少なくとも80分、好ましくは少なくとも100分、より好ましくは少なくとも150分である。30

#### 【0104】

用語「実質的に同等」とは、受容体結合活性やシグナル伝達活性などの性質が同等であることを意味する。したがって、受容体結合活性の強度やポリペプチドの分子量などの度合いに差が存在しても差し支えない。40

#### 【0105】

本明細書に記載のポリペプチド、または1または複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、もしくは挿入によるその実質的同等物は、上の意味でのアミノ酸配列実質的同等物（複数可）を含むポリペプチドとして挙げることができる。本明細書に記載のポリペプチド、または1～5、好ましくは1～3、より好ましくは1もしくは2アミノ酸の天然もしくは天然でないアミノ酸での置換によるその実質的同等物は、上の意味でのアミノ酸配列実質的同等物（複数可）を含むポリペプチドとして挙げることができる。さらなる改変および変更として、式Ⅰ、Ⅱ、ⅢⅢまたはⅣのペプチドまたはポリペプチドのアペリンアゴニスト活性が維持され、血漿安定性がピログルタミン酸化型(pyroglutamated form)の50

アペリン - 13 より改善されている限り、L - アミノ酸のD - アミノ酸での置き換え、または、限定はしないが、リン酸化、カルボキシル化、アルキル化などを含めた他の変形形態を挙げることができる。

#### 【0106】

実施形態19において、本発明はさらに、

a . 前述の実施形態のいずれかに従う、式I、II、III、もしくはIVのペプチドもしくはポリペプチド、そのアミド、塩、またはエステル、

b . 半減期延長性部分

を含み、

前記ペプチドまたはポリペプチドと、前記半減期延長性部分とは、場合によりリンカーを介して、共有結合によって連結または融合する、

バイオコンジュゲートまたはその多量体に関する。 10

#### 【0107】

実施形態19Aにおいて、半減期延長性部分は、式I、II、III、またはIVのペプチドのN末端に、場合によりリンカー部分を介して、付着する。

#### 【0108】

実施形態19Bにおいて、半減期延長性部分は、式I、II、III、またはIVのペプチドのC末端に、場合によりリンカー部分を介して、共有結合によって連結または融合する。 20

#### 【0109】

実施形態19Cにおいて、半減期延長性部分は、式I、II、III、またはIVのペプチドの側鎖に、共有結合によって連結または融合する、たとえば、半減期(half-life)は、K、Orn、Dab、Dap、hK、または4 - アミノ - 1 s n の側鎖にあるアミノ基に、場合によりリンカー部分を介して、共有結合によって連結または融合する。半減期延長性部分は、式I、II、III、またはIVのペプチドのN末端に、場合によりリンカー部分を介して付着することが好ましい。

#### 【0110】

実施形態20において、本発明は、半減期延長性部分が、IgG定常ドメインもしくはその断片、脂肪酸、またはヒト血清アルブミンである、実施形態19に従うバイオコンジュゲートまたはその多量体に関する。 30

#### 【0111】

実施形態21において、本発明は、半減期延長性部分が、LALA変異(L234A、L235A)を有するFcLALA変異Fc断片である、実施形態19または20に従うバイオコンジュゲートに関する。

#### 【0112】

実施形態22において、本発明は、半減期延長性部分が、式I、II、III、またはIVのポリペプチドに、リンカーを介して、融合または共有結合によって連結するFcドメインであり、このリンカーは、次式：-[GGGGS]<sub>n</sub>-を有し、nは、1、2もしくは3であり、またはこのリンカーは、GGもしくはGSであり、式I、II、III、またはIVのポリペプチドは、自然に存在するアミノ酸を含む、実施形態21に従うバイオコンジュゲートに関する。 40

#### 【0113】

実施形態23において、本発明は、ポリペプチドが、QRPC\*LSC\*KGPMPF、C\*RPRLSC\*KGPMPF、およびQRC\*RLSC\*KGPMPF(「\*」で印を付けた2つのアミノ酸は、その側鎖を介してジスルフィド結合またはアミド結合を形成しているアミノ酸を表す)から選択される式Iのポリペプチドである、実施形態22に従うバイオコンジュゲートに関する。

#### 【0114】

実施形態23Aにおいて、本発明は、半減期延長性部分が、C末端リシンが欠失している、またはアラニンで置き換えられている変異Fcドメインである、実施形態22または 50

23に従うバイオコンジュゲートに関する。このようなFc変異体は、同時出願の出願(米国仮出願第62/015848号:代理人整理番号PAT055781-US-PSPI)に記載されており、アペリンペプチド/ポリペプチドと、より安定した融合タンパク質を生じている。

**【0115】**

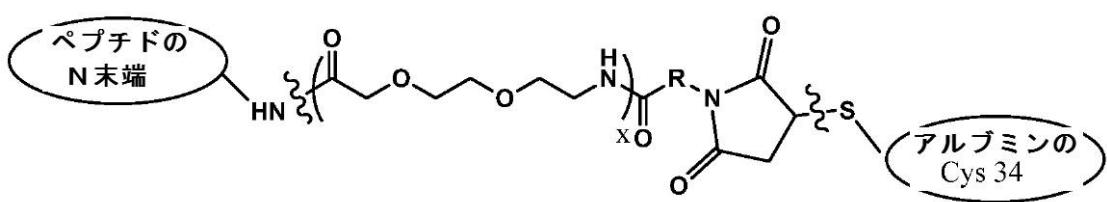
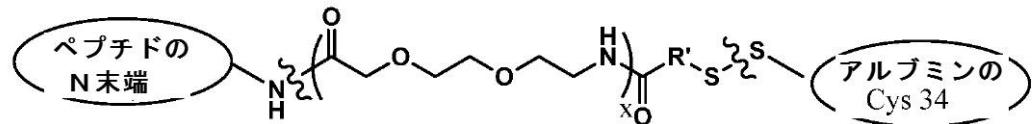
実施形態24において、本発明は、半減期延長性部分がヒト血清アルブミンである、実施形態19または20に従うバイオコンジュゲートまたはその多量体に関する。

**【0116】**

実施形態25において、本発明は、ヒト血清アルブミンが、式I~IVのいずれか一つのポリペプチドのN末端に、次式のリンカー:

**【0117】**

**【化6】**



[式中、xは、1~20であり、Rは、線状もしくは分枝状アルキレン、シクロアルキル、ヘテロアリールのアリール(aryl of heteroaryl)、またはこれらの組合せであり、R'は、線状または分枝状アルキレン、アリール、もしくはシクロアルキル、またはこれらの組合せである]

を介して化学的に連結する、実施形態24に従うバイオコンジュゲートに関する。

**【0118】**

実施形態26において、本発明は、ヒト血清アルブミンが、式I~IVのいずれか一つのポリペプチドのC末端に、次式のリンカー:

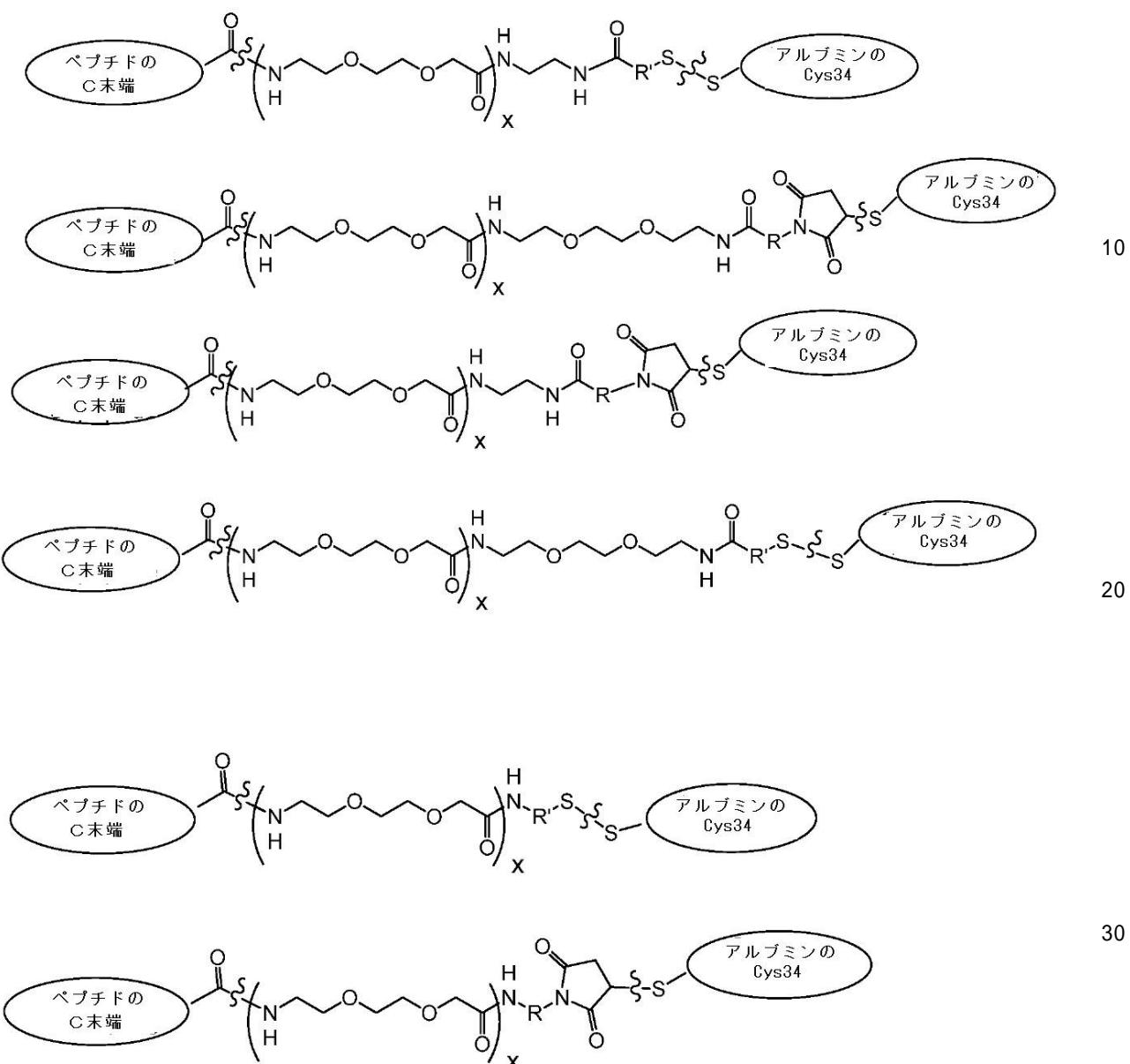
**【0119】**

10

20

30

【化7】



[式中、Xは、1～20であり、Rは、線状または分枝状アルキレン、シクロアルキル、ヘテロアリールのアリール、またはこれらの組合せであり、R'は、線状または分枝状アルキレン、アリール、もしくはシクロアルキル、またはこれらの組合せである]を介して、化学的に連結する、実施形態19または20に従うバイオコンジュゲートに関する。

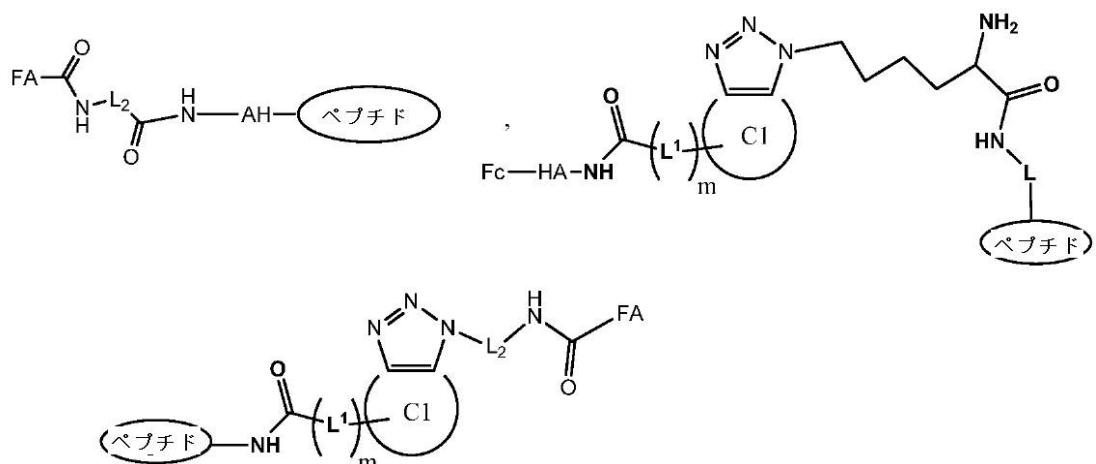
【0120】

40

他の実施形態では、本発明のバイオコンジュゲートは、次式を有する。

【0121】

## 【化 8】



または



式中、ペプチドは、ペプチドのN末端であり、Aは、アラニンであり、Hは、ヒスチジンであり、nは、1、2または3であり、mは、0または1であり、LおよびL<sub>2</sub>は、リンカーリーであり、C<sub>1</sub>は、フッ素で場合により置換されている単環式、二環式、または三環式の炭素環系またはヘテロ環系であり、L<sup>1</sup>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレンリンカーリーであり、ここで、アルキレン鎖は、オキソ(=O)で場合により置換されており、1個または複数の炭素は、OまたはNHで置き換えられている。この実施形態の特定の態様では、LおよびL<sub>2</sub>は、PEGリンカーリーである。

## 【0122】

## 半減期延長性部分

本発明の半減期延長性部分は、ペプチドまたはポリペプチド類似体に共有結合によって付着、連結、コンジュゲートまたは融合しててよい。半減期延長性部分は、たとえば、ポリエチレングリコール(PEG)などのポリマー、脂肪酸、コレステロール基、炭水化物、もしくはオリゴ糖、またはサルベージ受容体に結合するいづれかの天然もしくは合成タンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドでよい。半減期延長性部分は、血清半減期の長い血漿タンパク質(アルブミンおよび免疫グロブリン)に、場合によりリンカーリーを介して、共有結合によって連結することが好ましい。たとえば、半減期延長性部分は、IgG定常ドメインもしくはその断片(たとえば、Fc領域)、ヒト血清アルブミン(HSA)、またはアルブミン結合性ポリペプチドもしくは残基(たとえば脂肪酸)である。バイオコンジュゲートの半減期延長性部分の部分は、ヒト血清アルブミン、脂肪酸またはFc領域であることが好ましい。

## 【0123】

半減期延長性部分は、分子量が、出所の種に応じて、その単量体の形で、およそ65～67キロダルトンの間である、血漿において最も豊富なタンパク質を指す、アルブミンを包含する。用語「アルブミン」は、「血清アルブミン」と互換的に使用され、本発明の改変ペプチドとコンジュゲートを形成するアルブミンの供給源を定義することにはならない。したがって、本明細書で使用する用語「アルブミン」は、血液や漿液などの自然供給源から精製されたアルブミンを指すこともあり、または化学合成もしくは組換え生成されたアルブミンを指すこともある。本発明の改変ペプチドまたはポリペプチドは、アルブミン表面上のシステイン-34の遊離チオール基に、場合によりリンカーリーを介して、つながれることが優先される。

10

20

30

40

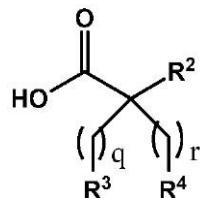
50

## 【0124】

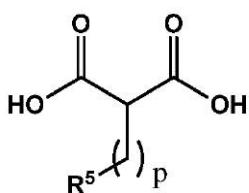
半減期延長性部分は、それぞれが、少なくとも1つのカルボン酸（たとえば、1、2、3または4つのCO<sub>2</sub>H）で置換され、ヒドロキシリル基で場合によりさらに置換されている、C<sub>6</sub>～70アルキル、C<sub>6</sub>～70アルケニル、またはC<sub>6</sub>～70アルキニル鎖であると定義することのできる、脂肪酸を包含する。脂肪酸の例は、式A1、A2、およびA3：

## 【0125】

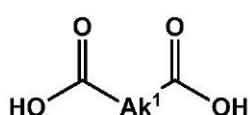
## 【化9】



A1



A2



または A3

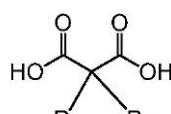
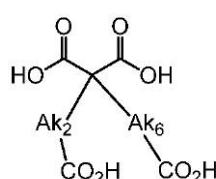
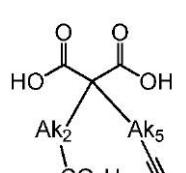
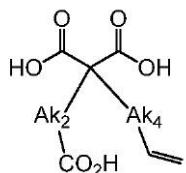
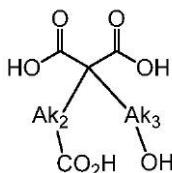
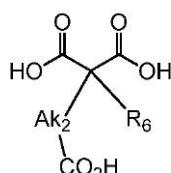
[R<sup>2</sup>は、CO<sub>2</sub>H、Hであり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、およびR<sup>5</sup>は、互いに独立して、H、OH、CO<sub>2</sub>H、-CH=CH<sub>2</sub>、または-C≡CHであり、Ak<sup>1</sup>は、分枝状C<sub>6</sub>～C<sub>30</sub>アルキレンであり、q、r、およびpは、互いに独立して、6～30の間の整数である]またはこれらのアミド、エステル、もしくは薬学的に許容される塩]によって規定される。

## 【0126】

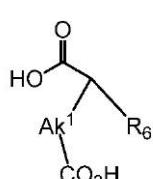
脂肪酸の例は、

## 【0127】

## 【化10】



および



[式中、Ak<sup>2</sup>、Ak<sup>3</sup>、Ak<sup>4</sup>、Ak<sup>5</sup>、およびAk<sup>6</sup>は、独立して、(C<sub>8</sub>～<sub>20</sub>)アルキレンであり、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、独立して、(C<sub>8</sub>～<sub>20</sub>)アルキルである]から選択される。

## 【0128】

より詳細には、脂肪酸は、

## 【0129】

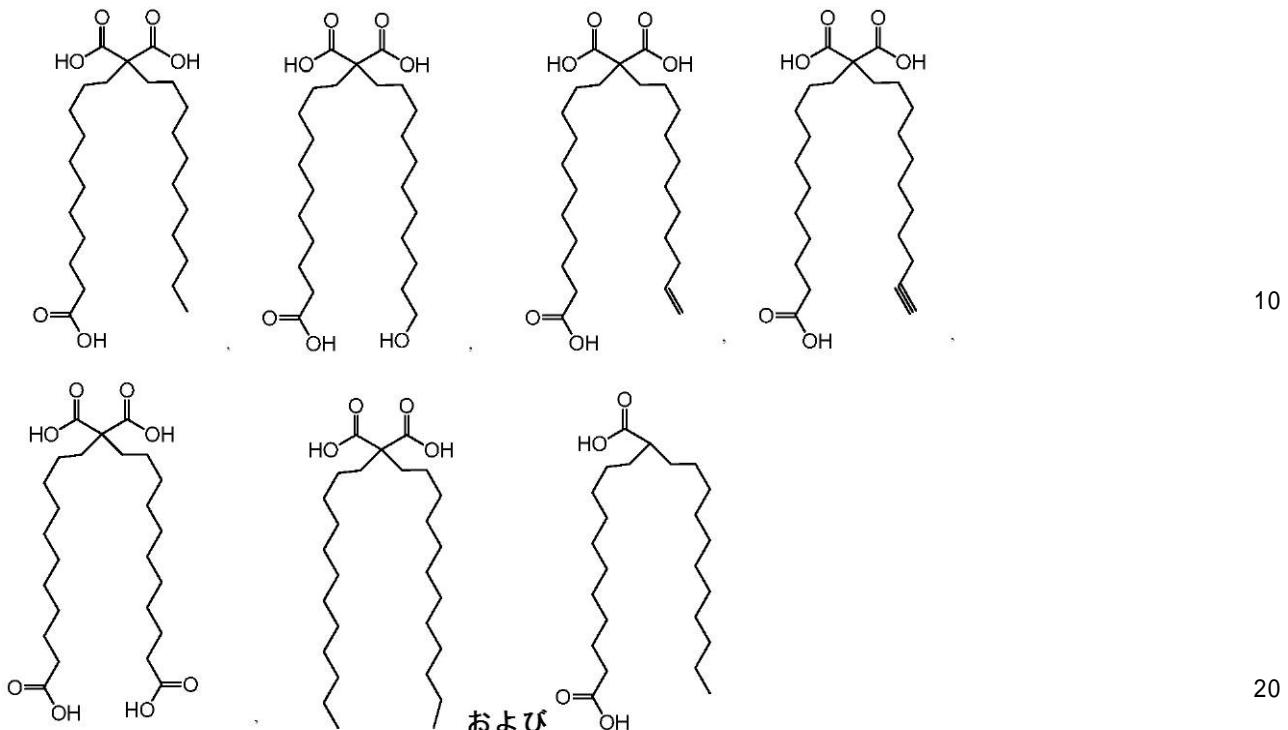
10

20

30

40

## 【化11】



から選択される。

## 【0130】

これらの脂肪酸部分は、同時出願の出願である米国仮出願第62/015862号代理人整理番号PAT056274-US-PSPに記載されている。

## 【0131】

半減期延長性部分は、単量体の形であろうと多量体の形であろうと、全抗体の消化によって得られる、または他の手段によって生成された、非抗原結合性断片の配列を含む分子または配列を指す、「未変性Fc」を包含し、ヒンジ領域を含んでいてもよい。未変性Fcのもともとの免疫グロブリン供給源は、ヒト起源であることが好ましく、免疫グロブリンのいずれでもよいが、IgG1およびIgG2が好ましい。未変性Fc分子は、共有結合性（すなわち、ジスルフィド結合）および非共有結合性の連係によって、二量体または多量体の形に連結されうる単量体ポリペプチドで構成されている。未変性Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（たとえば、IgG、IgA、およびIgE）またはサブクラス（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、およびIgG4）に応じて、1～4の範囲である。未変性Fcの一例は、IgGのパパイン消化によって得られる、ジスルフィド結合型の二量体である（Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9を参照されたい）。本明細書で使用する用語「未変性Fc」は、単量体、二量体、および多量体形態に対して総称的である。

## 【0132】

半減期延長性部分は、未変性（native）Fcから改変されてはいるが、サルベージ受容体、すなわちFcRn（新生児Fc受容体）に対する結合部位を依然として含む分子または配列を指す、「Fc変異体」を包含する。国際公開第WO97/34631号およびWO96/32478号は、典型的なFc変異体、ならびにサルベージ受容体との相互作用について記載しており、参考により本明細書に援用される。したがって、用語「Fc変異体」は、非ヒト化未変性Fcからヒト化された分子または配列を含みうる。さらに、未変性Fcは、本発明のバイオコンジュゲートに必要とならない構造上の特色または生物学的活性をもたらすので除去してよい領域を含む。したがって、用語「Fc変異体」は、（1）ジスルフィド結合形成、（2）選択された宿主細胞との不適合、（3）選択された宿主

30

40

50

細胞において発現された後のN末端不均一性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、または(7)抗体依存的な細胞傷害活性(ADCC)、に影響を及ぼす、またはこれらに関与する、1つまたは複数の未変性Fc部位もしくは残基を欠いている、または1つまたは複数のFc部位もしくは残基が改変されている分子または配列を包含する。Fc変異体については、以下でさらに詳細に述べる。

#### 【0133】

半減期延長性部分は、C末端リシンが欠失している、またはアラニンで置き換えられている、Fc変異体を包含する。

#### 【0134】

半減期延長性部分とは、上で規定したとおりの未変性FcならびにFc変異体および配列を包含する「Fcドメイン」を指す。Fc変異体および未変性Fc分子のように、用語「Fcドメイン」は、全抗体から消化されていようが、他の手段によって生成されていようが、単量体または多量体の形の分子を包含する。本発明の一部の実施形態では、Fcドメインは、式I'、または式I～IVのいずれかのポリペプチドに、たとえば、Fcドメインとペプチド配列間の共有結合を介して、コンジュゲートさせることができる。このようなFcタンパク質は、Fcドメインの連係によって多量体を形成することができ、こうしたFcタンパク質およびその多量体は両方とも、本発明の態様である。

#### 【0135】

半減期延長性部分は、改変配列を含む、抗体のFc断片を意味するものとされる、「改変Fc断片」を包含する。Fc断片は、CH2、CH3、およびヒンジ領域の一部を含む、抗体の一部分である。改変Fc断片は、たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から導くことができる。FcLALAは、LALA変異(L234A、L235A)を有する改変Fc断片であり、低下した効率でADCCを誘発し、ヒト補体を弱く結合および活性化する。Hessell et al. 2007 Nature 449:101-104。Fc断片への追加の改変については、たとえば、米国特許第7,217,798号に記載されている。

#### 【0136】

Fcドメイン、またはFcドメインを含む分子に適用される用語「多量体」とは、共有結合性に連係した2つ以上のポリペプチド鎖を有する分子を指す。たとえば、IgG分子は、通常は二量体を形成し、したがって、二量体IgG分子を含むバイオコンジュゲートは、2本の式I、IA、II、III、またはIVのポリペプチド鎖に融合することになる。

#### 【0137】

##### リンカー

リンカー基は、任意選択である。存在するとき、リンカー基は、主としてスペーサーとして働くので、その化学構造は肝要でない。

#### 【0138】

リンカーは、2つの反応性基/官能基を含んでおり、その一方がポリペプチドと、他方が半減期延長性部分と反応しうる、化学的部分である。リンカーの2つの反応性基は、連結基を介して連結され、その構造は、リンカーのペプチドおよび半減期延長性部分とのカップリングの妨げとならない限り、肝要でない。

#### 【0139】

リンカーは、ペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸で構成されたものでよい。本発明の一部の実施形態では、リンカーは、ペプチド結合によって連結された1～20個のアミノ酸で構成され、アミノ酸は、20種の自然に存在するアミノ酸から選択される。種々の実施形態において、1～20個のアミノ酸は、アミノ酸のグリシン、セリン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、システイン、およびリシンから選択される。一部の実施形態では、リンカーは、グリシンやアラニンなどの、立体障害のない大多数のアミノ酸で構成される。一部の実施形態では、リンカーは、ポリグリシン、ポリアラニン、グリシンとアラニンの組合せ(ポリ(Gly-Ala)など)、またはグリシンと

10

20

30

40

50

セリンの組合せ（ポリ（G l y - S e r）など）である。一部の実施形態では、リンカーは、ヒスチジン、アラニン、メチオニン、グルタミン、アスパラギン、およびグリシンから選択される、大多数のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、リンカーは、ポリヒスチジン部分を含む。リンカーの例は、A H、M H A、またはA H Aのモチーフを含むリンカーである。このようなモチーフは、同時係属出願および同時出願の出願である、代理人整理番号米国仮出願第62/015862号：P A T 0 5 6 2 7 4 - U S - P S P および米国仮出願第62/015868号：P A T 0 5 6 2 7 5 - U S - P S P に、ペプチドまたはポリペプチドのN末端における選択的なコンジュゲーションに有益であると記載されている。

## 【0140】

10

リンカーの他の例は、G G G G S G G G G S G G G G S、G G G G S G G G G S、G G G G S、G S、またはG G のモチーフを含む。

## 【0141】

他の一部の実施形態では、リンカーは、酵素のための認識モチーフを含む。一例は、C末端において含めることのできるL P X T G / Aモチーフであり、Xは、いずれかのアミノ酸、最も一般にはE：グルタミン酸である。（L：ロイシン、P：プロリン、T：トレオニン、G：グリシン、A：アラニン）。（Carla P. Guimaraes et al.: "Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions", Nature protocols, vol 8, No 9, 2013, 1787-1799）

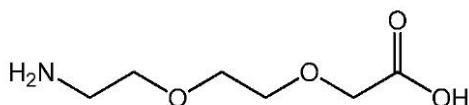
## 【0142】

20

他の実施形態では、リンカーは、非天然アミノ酸から選択される1～20個のアミノ酸を含む。半減期延長性部分とコンジュゲートさせるには、3～15個のアミノ酸残基のリンカーが好ましいが、本発明は、いずれの長さまたは組成のリンカーも企図する。好ましいアミノ酸リンカーは、次式のO 2 O c：

## 【0143】

## 【化12】



30

またはその繰返し単位である。

## 【0144】

本明細書に記載のリンカーは、例示的なものであり、はるかに長い、また他の残基を含むリンカーが、本発明によって企図される。非ペプチドリンカーも、本発明によって企図される。

## 【0145】

リンカーの連結部分は、1つまたは複数のアルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、およびヘテロ環基、またはこれらの組合せを含んでよい。たとえば、アルキルリンカー、たとえば、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)-、-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)-または-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)-[式中、zは、2～20である]を使用することができる。こうしたアルキルリンカーは、限定はしないが、低級アルキル（たとえば、C1～C6）、低級アシル、ハロゲン（たとえば、Cl、Br）、CN、NH<sub>2</sub>、またはフェニルを含めた、いずれかの非立体障害性基でさらに置換されていてもよい。

40

## 【0146】

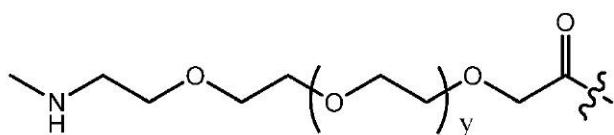
リンカーは、ポリマーの性質のものでもよい。リンカーは、生物学的に安定または生分解性であるポリマー鎖または単位を含んでよい。連結が繰り返されているポリマーは、結合不安定性に応じて、生理的条件下で様々な程度の安定性を備えうる。ポリマーは、ポリカルボネート(-O-C(O)-O-)、ポリエステル(-C(O)-O-)、ポリウレ

50

タン( - NH - C( O ) - O - )、ポリアミド( - C( O ) - NH - )などの結合を含んでいてよい。こうした結合は、例として示しており、本発明のポリマー鎖またはリンカーにおいて用いることのできる結合のタイプを限定するものではない。適切なポリマーとしては、たとえば、ポリエチレングリコール( P E G )、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアミノ酸、ジビニルエーテルマレイン酸無水物、N - ( 2 - ヒドロキシプロピル ) - メタクリルアミド、デキストラン、デキストラン誘導体、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリン、ヘパリン断片、多糖、セルロースおよびセルロース誘導体、デンプンおよびデンプン誘導体、ポリアルキレングリコールおよびその誘導体、ポリアルキレングリコールおよびその誘導体のコポリマー、ポリビニルエチルエーテルなど、およびこれらの混合物が挙げられる。ポリマー-リンカーは、たとえば、P E Gである。典型的な非ペプチドリンカーは、ポリエチレングリコールリンカー：

【 0 1 4 7 】

【 化 1 3 】



[ 式中、y は、リンカーが 100 ~ 5000 kD、たとえば、100 ~ 500 kD の分子量を有するようなものである ]  
である。

【 0 1 4 8 】

連結部分は、たとえば( O2Oc )単位などの1つまたは複数のアミノ酸部分、またはグリシンもしくはセリン、C<sub>1</sub> ~ 4アルキレン-C( O )-、C<sub>1</sub> ~ 4アルキレン、-NH-C<sub>2</sub> ~ 6アルキレン-NH-もしくは-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-ジアミノ単位、またはこれらの組合せと、2つの反応性基または官能基を連結した連結部分とを含むことが好ましい。

【 0 1 4 9 】

反応性基または官能基は、マレイミド、チオール、またはピリジン-2-イルジスルフアニルであることが好ましい。

【 0 1 5 0 】

半減期延長性部分に付着させる、ペプチドまたはポリペプチド、およびペプチド-リンカ-構築物の調製：

本発明のアペリンペプチド、およびポリペプチドおよび/またはペプチド-リンカー構築物は、合成化学的方法もしくは組換え法のいずれかによって、または両方の方法を組み合わせて生成することができる。アペリンペプチドおよび/またはペプチド-リンカー構築物は、全長として調製してもよいし、または全長でない断片として合成し、つないでもよい。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、ペプチド合成のための、それ自体が知られている手順によって生成することができる。ペプチド合成の方法は、固相合成および液相合成のいずれかのものでよい。すなわち、問題のペプチドおよびポリペプチドは、タンパク質を構成し得る部分的なペプチドまたはアミノ酸をその残部と縮合させ、生成物が保護基を有するとき、保護基を外し、その後、所望のペプチドを製造することができる。縮合および脱保護の既知の方法としては、以下の文献( 1 ) ~ ( 5 )に記載の手順が挙げられる。

( 1 ) M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966.

( 2 ) Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965.

( 3 ) Nobuo Izumiya et al. Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis, Maruzen, 1975.

10

20

40

50

(4) Haruaki Yajima and Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977、および

(5) Haruaki Yajima (ed.), Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten

#### 【0151】

反応後、ペプチドは、溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などの従来の精製技術を組み合わせて、精製および単離することができる。上述のように単離したペプチドが遊離化合物である場合、既知の方法によってペプチドを適切な塩に変換することができる。逆に、単離された生成物が塩である場合、既知の方法によってペプチドを遊離ペプチドに変換することができる。

10

#### 【0152】

ポリペプチドのアミドは、アミド化に適した、ペプチド合成用の樹脂を使用して得ることができる。樹脂としては、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)フェノキシ樹脂、塩化2-クロロトリチル樹脂などが挙げられる。このような樹脂を使用して、-アミノ基および側鎖の官能基が適切に保護されているアミノ酸を、目的のペプチドの配列に従い、それ自体が知られている種々の縮合技術によって樹脂上で縮合させる。一連の反応の終盤に、ペプチドまたは保護されたペプチドを樹脂から外し、必要に応じて保護基を除去し、ジスルフィド結合を形成させて、目的のポリペプチドを得る。

20

#### 【0153】

上述の保護されたアミノ酸の縮合には、HATU、HCTU、またはたとえばカルボジイミドなどの、ペプチド合成用の様々な活性化試薬を使用することができる。カルボジイミドとしては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、およびN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドが挙げられる。このような試薬を用いた活性化には、ラセミ化防止添加剤、たとえば、HOBTまたはOxyma Pureを使用することができる。保護されたアミノ酸は、活性化試薬およびラセミ化防止剤と共に、樹脂にそのまま加えてよいし、または対称酸無水物、HOBTエステル、またはHOOBtエステルとして予め活性化し、次いで樹脂に加えてよい。保護されたアミノ酸の活性化または樹脂との縮合のための溶媒は、ペプチド縮合反応に有用であることがわかっている溶媒の中から適正に選択することができる。たとえば、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、クロロホルム、トリフルオロエタノール、ジメチルスルホキシド、DMF、ピリジン、ジオキサン、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、酢酸エチル、またはこれらの適切な混合物を挙げることができる。

30

#### 【0154】

反応温度は、ペプチド結合形成に有用であることがこれまでにわかっている範囲から選択することができ、普通は、約-20~50の範囲から選択する。活性化型アミノ酸誘導体は、一般に、1.5~4倍過剰の割合で使用する。ニンヒドリン反応を利用した試験によって、縮合が不十分であるとわかったなら、十分な縮合を実現するために、保護基を除去せずに、縮合反応を繰り返すことができる。繰り返した縮合によって、それでも十分な程度の縮合がなされない場合、未反応のアミノ基を、無水酢酸またはアセチルイミダゾールでアセチル化することができる。

40

#### 【0155】

出発材料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、Z、Boc、第三級アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、CI-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、またはFm

50

o c が挙げられる。使用することのできるカルボキシ保護基としては、限定はしないが、上述の C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキル、および C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> アリール - C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub> アルキル、ならびに 2 - アダマンチル、4 - ニトロベンジル、4 - メトキシベンジル、4 - クロロベンジル、フェナシル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド、第三級ブトキシカルボニルヒドラジド、およびトリチルヒドラジドが挙げられる。

#### 【0156】

セリンおよびトレオニンのヒドロキシ基は、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。前記エステル化に適した基としては、炭素から導かれる基、たとえば、低級アルカノイル基、たとえばアセチルなど、アロイル基、たとえばベンゾイルなど、ベンジルオキシカルボニル、およびエトキシカルボニルが挙げられる。前記エーテル化に適した基としては、ベンジル、テトラヒドロピラニル、および第三級ブチルが挙げられる。<sup>10</sup> チロシンのフェノール性ヒドロキシル基の保護基としては、Bz1、C1<sub>2</sub> - Bz1、2 - ニトロベンジル、Br - Z、および第三級ブチルが挙げられる。

#### 【0157】

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4 - メトキシ - 2 , 3 , 6 - トリエチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、およびFmoc が挙げられる。

#### 【0158】

出発アミノ酸の活性化型カルボキシル基には、対応する酸無水物、アジ化物、および活性エステル、たとえば、ペンタクロロフェノール、2 , 4 , 5 - トリクロロフェノール、2 , 4 - ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、p - ニトロフェノール、HONB、N - ヒドロキシスクシンイミド、N - ヒドロキシフタルイミド、HOBTなどのアルコールとのエステルなどが含まれる。出発アミノ酸の活性化型アミノ基には、対応するホスホルアミドが挙げられる。<sup>20</sup>

#### 【0159】

保護基の脱離方法としては、パラジウムブラックやパラジウム炭素などの触媒の存在下で水素ガスを使用する触媒還元、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、またはこうした酸の混合物での酸処理、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンでの塩基処理、液体アンモニア中でのナトリウム金属による還元が挙げられる。上述の酸処理による脱離反応は、一般に、-20 ~ 40 の温度で実施され、アニソール、フェノール、チオアニソール、m - クレゾール、p - クレゾール、硫化ジメチル、1 , 4 - ブタンジチオール、1 , 2 - エタンジチオールなどのカチオンアクセプターを加えて、有利に行うことができる。ヒスチジンのイミダゾール基の保護に使用した2 , 4 - ジニトロフェニル基は、チオフェノールでの処理によって脱離させることができ、トリプトファンのインドール基の保護に使用したホルミル基は、希水酸化ナトリウム溶液または希アンモニア水溶液でのアルカリ処理、ならびに1 , 2 - エタンジチオール、1 , 4 - ブタンジチオール存在下での上述の酸処理によって脱離させることができる。<sup>30</sup>

#### 【0160】

出発材料の反応に関与すべきでない官能基の保護方法、使用することのできる保護基、保護基の除去方法、および反応に関与すべき官能基を活性化する方法は、すべて、既知の基および方法の中から公正に選択することができる。<sup>40</sup>

#### 【0161】

アミド型のポリペプチドを得る別のある方法は、C末端アミノ酸の - カルボキシル基を最初にアミド化するステップと、次いでペプチド鎖を所望の鎖長までN側に伸長し、次いで、C末端ペプチドの - アミノ基、および目的ポリペプチドの残部を形成することになるアミノ酸またはペプチドの - カルボキシ基を選択的に脱保護するステップと、 - アミノ基および側鎖官能基が上述の適切な保護基で保護されている2つの断片を、上で挙げたものなどの混合溶媒中で縮合させるステップとを含む。この縮合反応のパラメータは、上述したのと同じものでよい。縮合によって得られた保護ペプチドから、上述の方法によつ<sup>50</sup>

てすべての保護基を除去して、その結果、所望の粗製ペプチドが得られる。この粗製ペプチドを、既知の精製手順によって精製し、主画分を凍結乾燥して、目的のアミド化ポリペプチドを得ることができる。ポリペプチドのエステルを得るには、C末端アミノ酸のa-カルボキシル基を所望のアルコールと縮合させて、アミノ酸エステルを得、次いで、アミド生成について上述した手順に従う。

#### 【0162】

代わりに、組換え発現法が特に有用である。宿主細胞（ペプチドの配列をコードする核酸を含むように人工的に操作されており、転写および翻訳を行い、場合によりペプチドを細胞成長培地に分泌する細胞）を使用する組換えタンパク質発現は、当業界で日常的に使用される。組換え生成法については、通常、ペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸が、従来の方法によって合成され、発現ベクターに組み込まれることになる。このような方法は、追加のペプチド配列または他のタンパク質もしくはタンパク質断片もしくはドメインに融合したペプチドを含むポリペプチド組成物の製造に特に好ましい。宿主細胞は、場合により、大腸菌 (E.Coli)、COS-1、COS-7、HEK293、BHT21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髄腫、リンパ腫、酵母、昆虫、もしくは植物細胞、またはこれらのいずれかの派生、不死化、もしくは形質転換細胞から選択される少なくとも1種でよい。

10

#### 【0163】

改変された治療用ペプチドもしくはポリペプチドおよび/またはペプチド-リンカー構築物は、半減期延長性部分上の利用可能な反応性官能基と反応して、共有結合を形成することのできる反応性基を含む。反応性基は、共有結合を形成しうる化学基である。反応性基は、一般に、カルボキシ、ホスホリル、アシル基、エステル、または混合無水物、マレイミド、イミデート、ピリジン-2-イル-ジスルファニルでよく、そのため、アルブミンまたはFcドメインのターゲット部位において、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシ基、またはチオール基のような官能基と共有結合を形成しうる。アルブミンとの連結に関して特に重要な反応性基として、マレイミド含有基およびピリジン-2-イル-ジスルファニル含有基が挙げられる。

20

#### 【0164】

官能基は、アルブミンまたはFcドメイン上の基であり、改変ペプチドまたはポリペプチド上の反応性基がこれと反応して、共有結合を形成しうる。官能基としては、エステル反応性エンティティと結合するヒドロキシル基、マレイミド、マレイミド含有基またはピリジン-2-イルジスルファニル、イミデート、およびチオエステル基と反応するチオール基、カルボン酸、ホスホリル基、アシル基に結合するアミノ基、ならびにヒドラジン、ヒドラジド、またはヒドロキシルアミンと反応するカルボキシ基が挙げられる。

30

#### 【0165】

スキーム1～3は、ペプチドが、式I～IVのいずれか1つに従うペプチドである、ペプチド-リンカー構築物の合成を記載するものである。

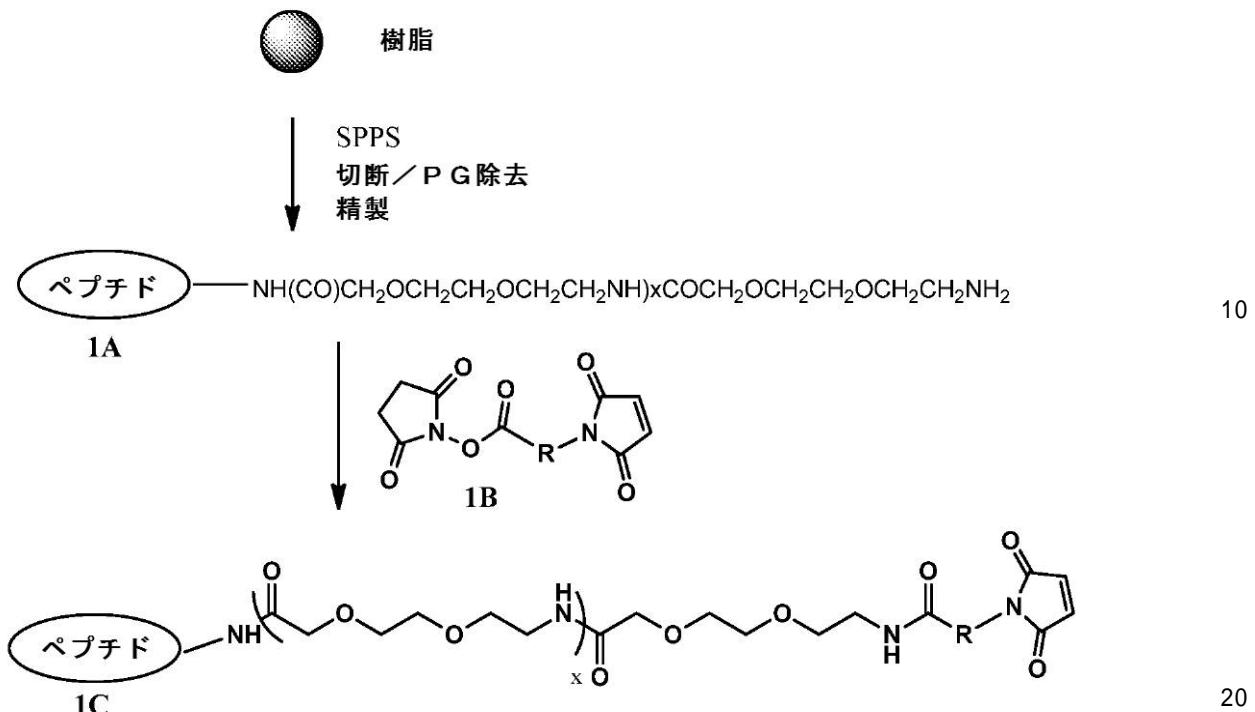
#### 【0166】

スキーム1に、式I～IVのポリペプチドのN末端に付着したリンカーを含んでいるマレイミドの合成を記載する。

40

#### 【0167】

【化14】



スキーム 1

【0168】

ペプチドのN末端を、十分に確立されたアミドカップリング化学に従って、1つまたは複数のO<sub>2</sub>Ocアミノ酸単位（xは、1～20、好ましくは1～10、より好ましくは3～6である）とカップリングさせて、（1A）を生成する。（1A）の末端アミノ官能基を、活性化型の酸（1B）[式中、Rは、線状または分枝状のアルキレン、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはこれらの組合せである]と反応させて、ペプチド-マレイミドを含んでいるリンカー構築物（1C）を生成する。活性化型の酸（1B）は、市販品として入手可能であり、またはその対応するカルボン酸から、当業者に知られている技術に従って容易に入手可能である。Rは、線状アルキレンであることが好ましく、Rは、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であることがより好ましい。代わりに、側鎖にアミノ官能基を含んでいるペプチド（たとえば、リシンを含んでいるペプチド）については、カップリング反応の前に、アロックなどの直交保護基（orthogonal protecting group）が必要となり、続いて追加の脱保護ステップを経て、（1C）を得る。

【0169】

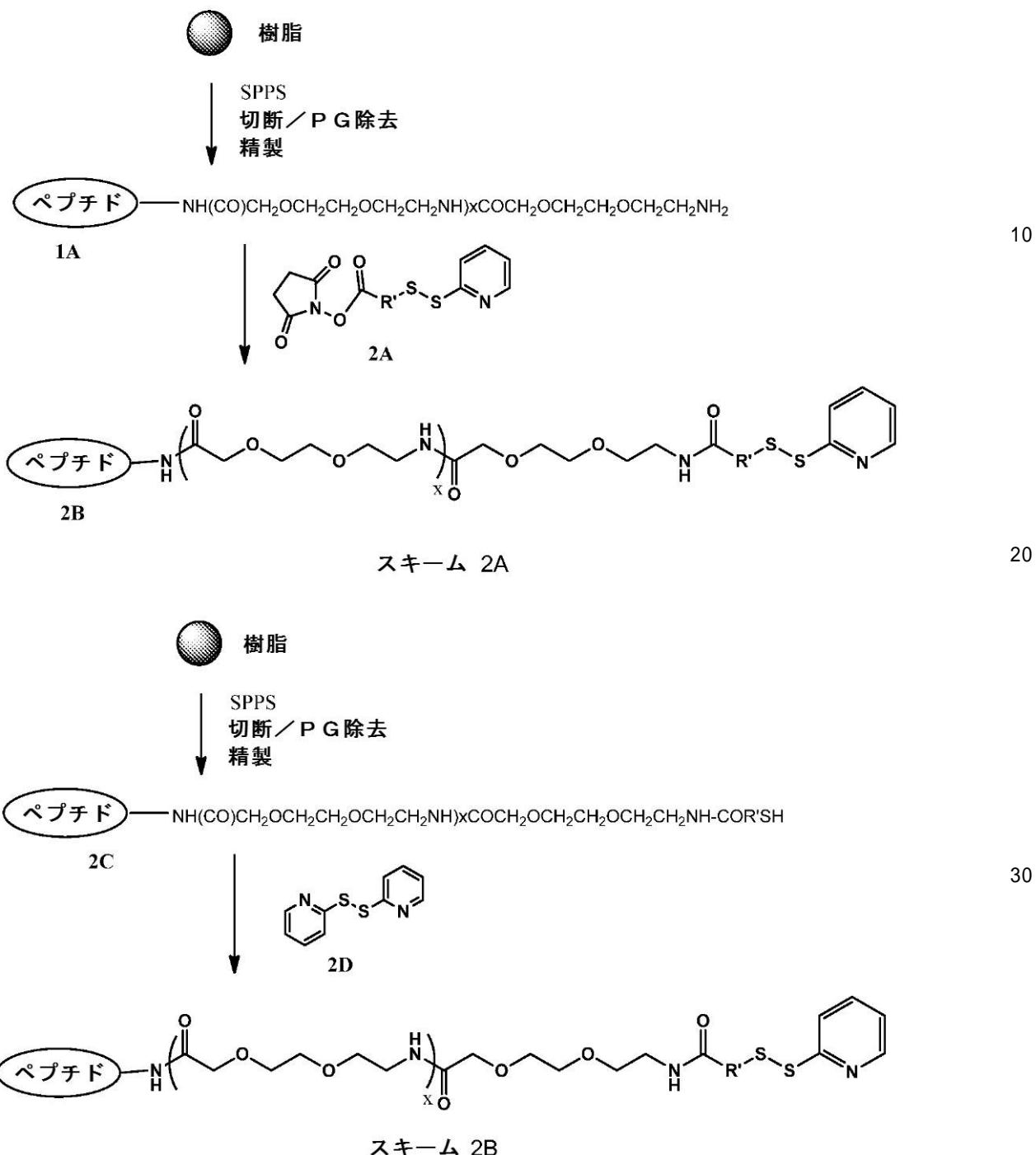
スキーム2Aおよび2Bに、式IからIVのいずれか1つに従うポリペプチドのN末端に付着したリンカーを含んでいるピリジン-2-イル-ジスルファニルの合成を記載する。

【0170】

30

40

【化15】



【0171】

40

ペプチド-リンカー構築物(1A)を、スキーム1に記載のとおりに調製し、活性化した式(2A)の酸[式中、R'は、線状または分枝状アルキレンである]とさらに反応させて、ペプチド-ピリジン-2-イル-ジスルファニルを含んでいるリンカー構築物(2B)を生成する。活性化型の酸(2A)は、市販品として入手可能であり、またはその対応するカルボン酸から、当業者に知られている技術に従って容易に入手可能である。R'は、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であることが好ましい。代わりに、ペプチド-リンカー構築物(2C)を、HO<sub>2</sub>C-R'-SH、またはその保護された形態(たとえば、トリチルまたはAc基、追加の脱保護ステップが必要となる)を使用して調製し、さらに(2D)と反応させて、ペプチド-ピリジン-2-イル-ジスルファニルを含んでいるリンカー構築物(2B)を生成することができる。

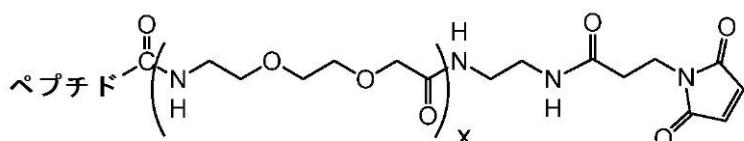
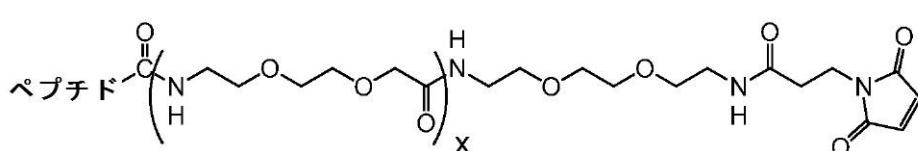
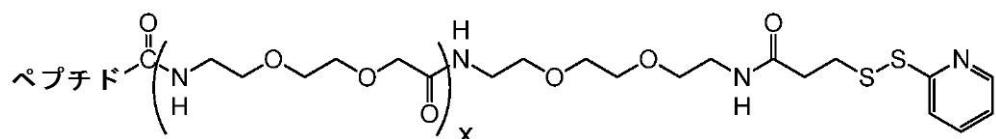
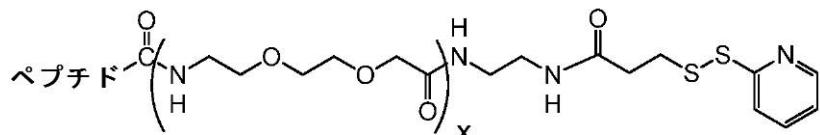
50

## 【0172】

ペプチドのC末端にも、たとえば-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-または-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-などのジアミノ単位を使用して、同様の反応性基を、スキーム1、2A、および2Bに記載したのと同様にして付着させる。このようなペプチド-リンカー構築物の非限定的な例は、以下である。

## 【0173】

## 【化16】

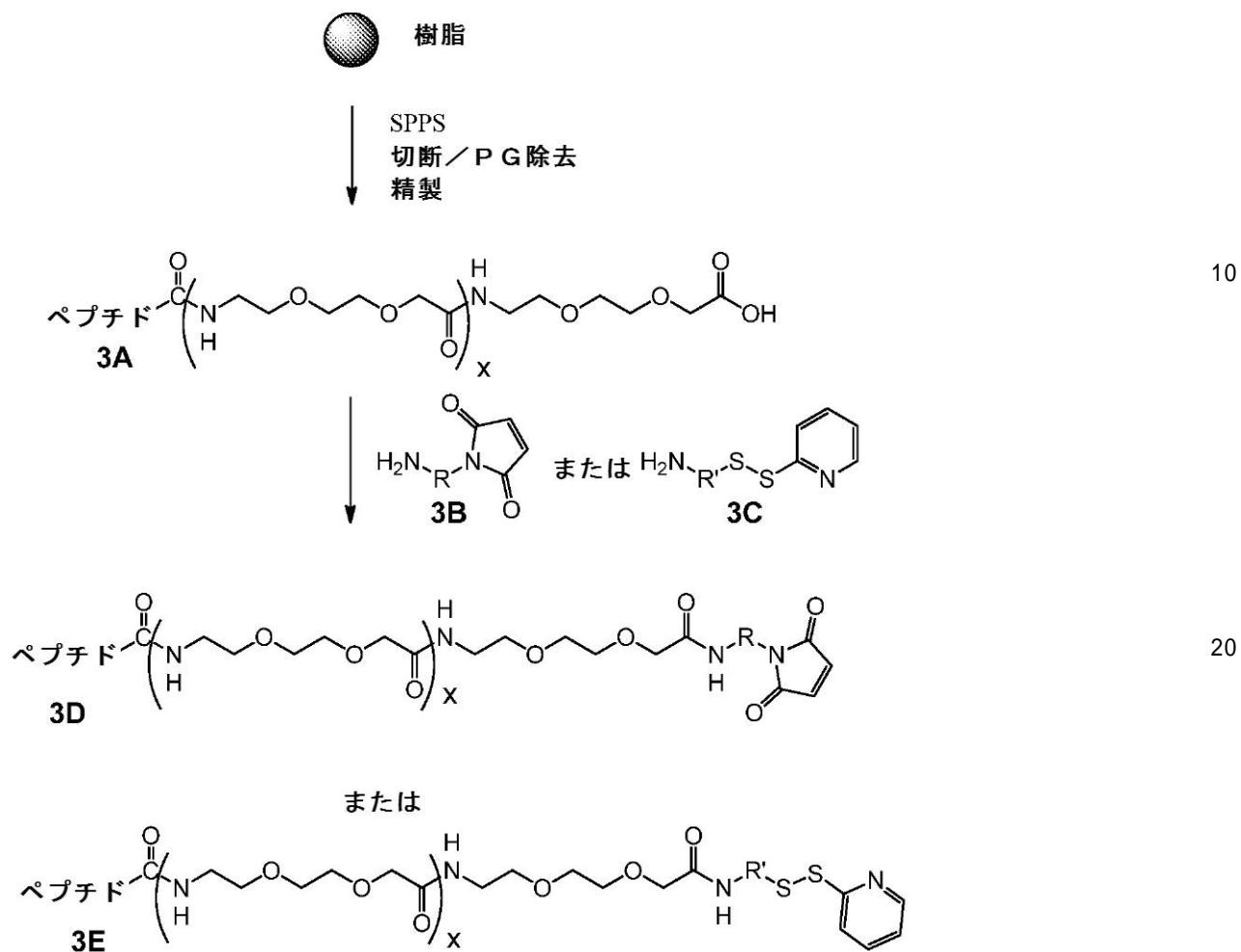


## 【0174】

代わりに、マレイミドまたはピリジン-2-イル-ジスルファニル反応性基は、式I～IVのいずれか1つに従うポリペプチドに、スキーム3A、3B、および3Cに従って付着させることができる。

## 【0175】

【化17】



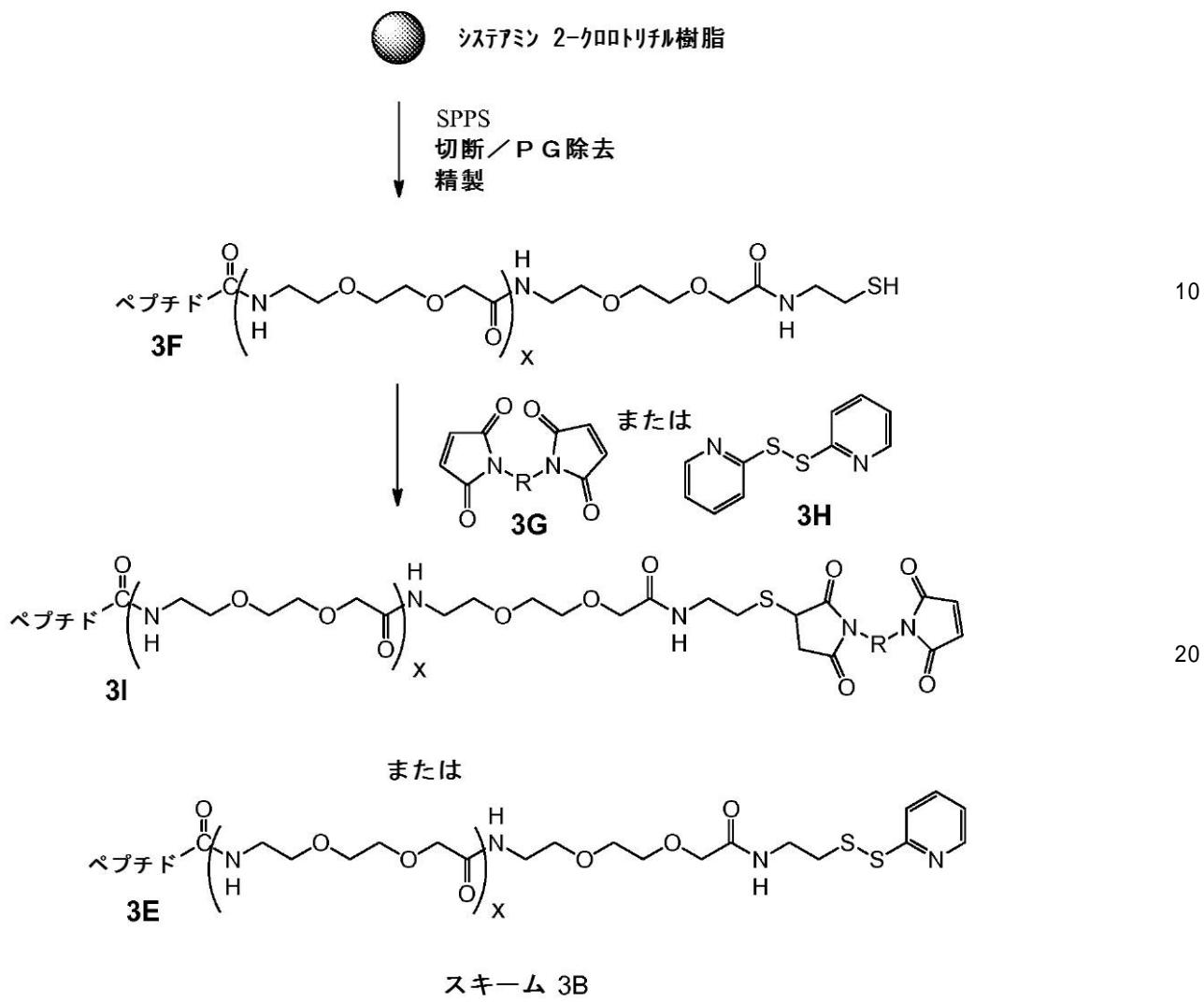
スキーム 3A

【0176】

ペプチドの C 末端にあるカルボン酸基を、標準のアミドカップリング条件を使用して、1つまたは複数の O 2 O c アミノ酸単位と結合させて、(3 A) を生成する。末端カルボン酸官能基は、(3 B) または (3 C) [式中、R および R' は、上で規定したとおりである] のアミノ基と反応して、活性化型のペプチド - リンカー構築物 (3 D) または (3 E) が生成される。加えて、ペプチドがカルボキシ官能基側鎖 (たとえば、Glu または Asp) を含むとき、直交保護基 (たとえば、O - アリル) および追加の脱保護ステップが必要となる。

【0177】

【化 1 8】

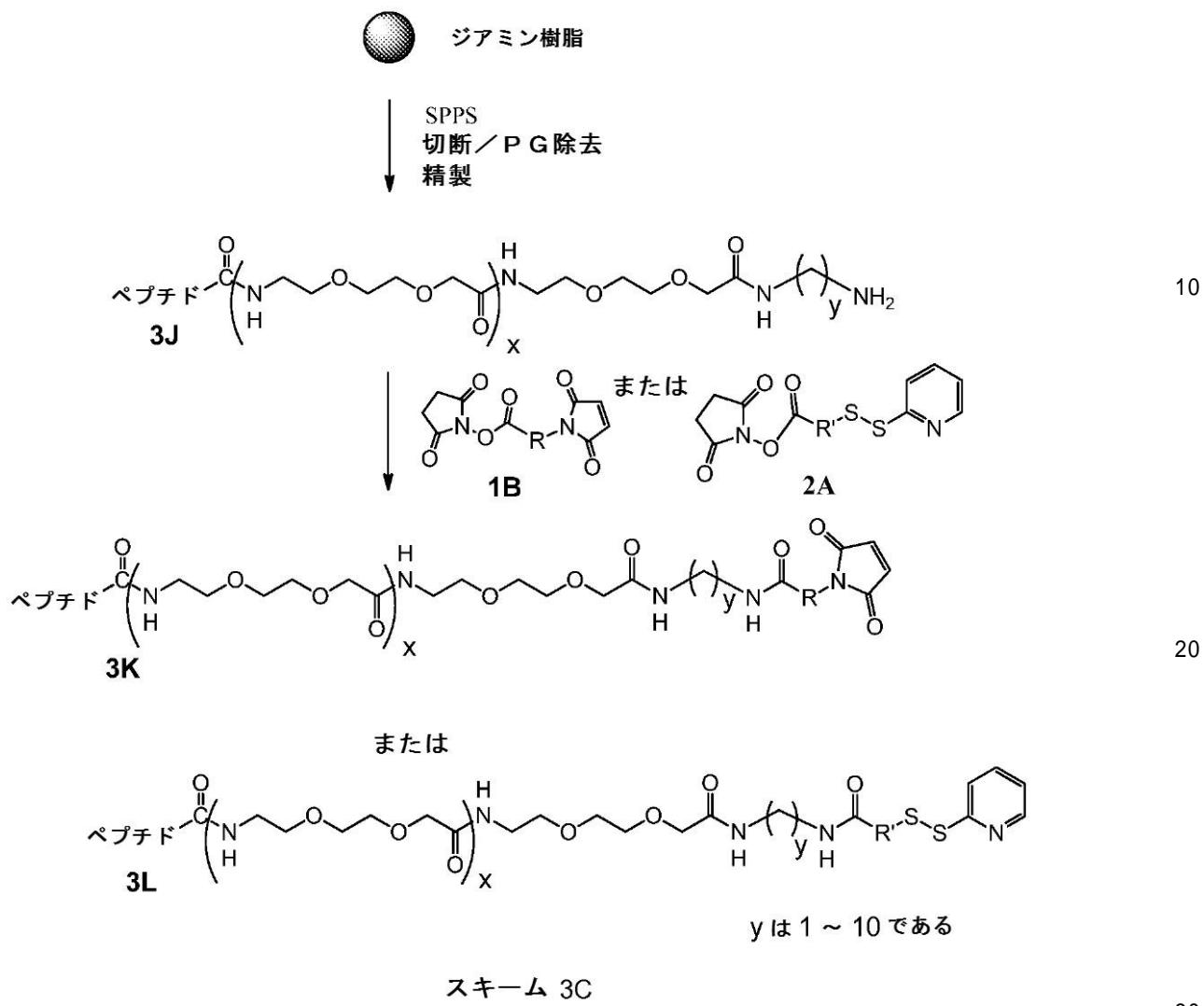


〔 0 1 7 8 〕

システアミン 2 - クロロトリチル樹脂を使用して、ペプチド - リンカー構築物 3 Fを得、次いで 3 G または 3 H と反応させると、ペプチド - リンカー構築物 3 I または 3 E をそれぞれ生成することができる。

( 0 1 7 9 )

【化 1 9】



[ 0 1 8 0 ]

ペプチド-リンカー構築物(3J)は、ジアミン樹脂から得ることができ、(1B)または(2A)とさらに反応させて、式(3K)または(3L)のペプチド-リンカー構築物をそれぞれ生成する。

( 0 1 8 1 )

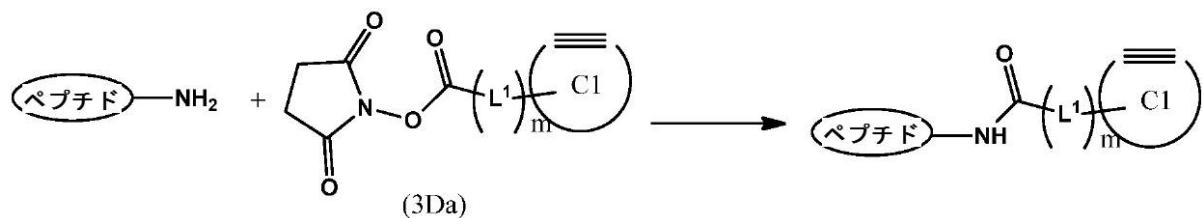
スキーム 1 ~ 3 C には、より詳細には、アルブミンとのバイオコンジュゲートの調製において使用される、ペプチド - リンカー構築物を記載している。マレイミド反応性基およびピリジン - 2 - イル - ジスルファニル反応性基は、アルブミンのシステイン 34 の - SH 官能基と反応する。

〔 0 1 8 2 〕

スキーム 3 D および 3 E に、より一般にはクリックケミストリーとして知られるアジド-アルキン Huisgen 付加環化における使用について、ペプチド-リンカー構築物の調製を記載する。

( 0 1 8 3 )

【化 2 0】



3D

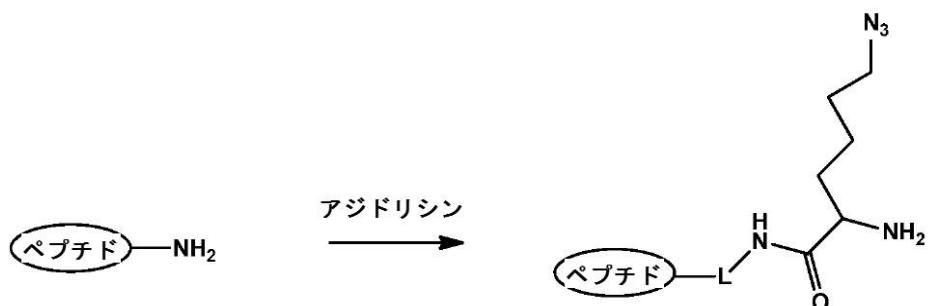
10

式中、mは、0または1であり、C1は、フッ素で場合により置換されている単環式、二環式、または三環式の炭素環またはヘテロ環系であり、L<sup>1</sup>は、C1～C20アルキレンリンカーであり、アルキレン鎖は、オキソ(=O)で場合により置換されており、1個または複数の炭素は、OまたはNHで置き換えられている。シクロアルキン部分(3Da)は、市販品供給元から容易に入手可能である。加えて、タンパク質標識のためのクリックケミストリーにおける環式アルキンは、参照により本明細書に援用されるU.S.2009/0068738に記載されている。詳細な例は、以下(実施例20)に記載している。クリックハンドルは、ペプチドのN末端において、またはリシン残基側鎖上に導入することができる。

20

【 0 1 8 4 】

【化 2 1】



スキーム 3E

30

【 0 1 8 5 】

スキーム3Eには、場合によりリンカーリ（たとえば、グリシンおよびセリンから選択される1つまたは複数のアミノ酸など）を介した、アペリンペプチドのN末端におけるアジドリシン残基の導入を記載している。アジド官能基は、クリックケミストリーのためのハンドルとして働く。詳細な例は、同時出願の出願（代理人整理番号P A T 0 5 5 4 1 8 - U S - P S P 2）に記載されている。

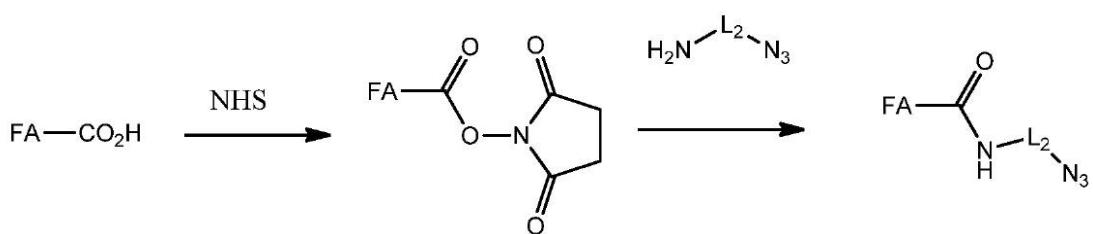
40

## 半減期延長性部分 - リンカ - 構築物の調製 :

3キニル3Eおよび3Gに 脂肪酸-リンカ-構築物の調製を記載する

[ 0 1 8 7 ]

【化22】

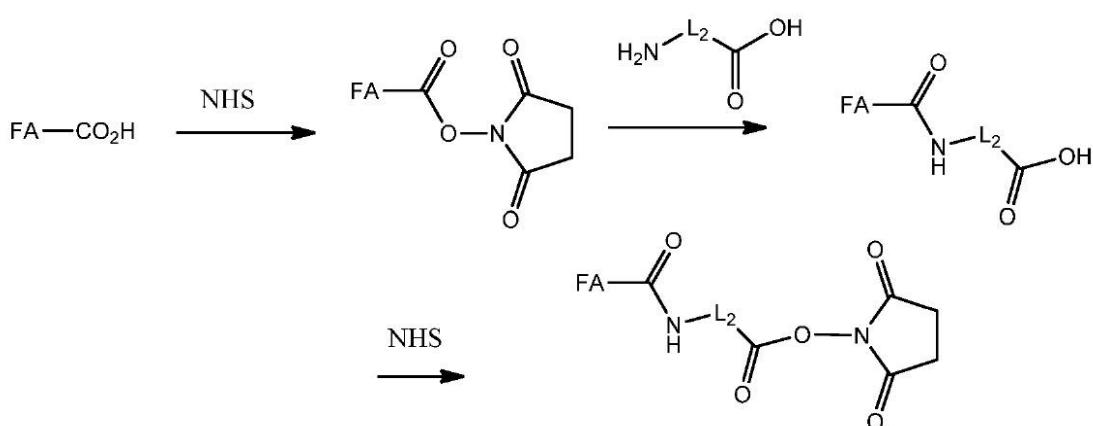


スキーム 3F

式中、FAは、脂肪酸であり、L<sub>2</sub>は、連結部分（たとえば、PEG）であり、NHSは、N-ヒドロキシスукシンイミドである。このような脂肪酸-リンカー構築物は、クリックケミストリーを使用するコンジュゲーションに使用される。脂肪酸が、ヒドロキシルや追加のカルボン酸などの官能基を含む事例では、そのような官能基の保護が必要となる場合もある。

【0188】

【化23】



スキーム 3G

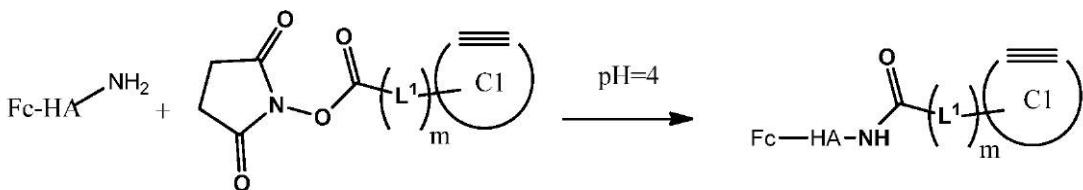
式中、FA、NHS、およびL<sub>2</sub>は、上でスキーム3Fにおいて規定している。このような脂肪酸構築物は、ペプチド上、好ましくはN末端上のアミノ官能基とのコンジュゲーションに使用される。

【0189】

スキーム3Hに、Fc-リンカー構築物の調製を記載する。

【0190】

【化24】



スキーム 3H

【0191】

AH-Fcは、FcのN末端に配列AH-を含んでいる構築物である。この構築物は、

50

組換え法を使用して調製される。A H - 配列によって、低いp HでN末端の選択的な改変が可能になる。このような選択的改変は、同時出願の出願（米国仮出願第62/015868：代理人整理番号PAT056275-US-PSPおよび米国仮出願第62/015862：PAT056274-US-PSP）で開示されている。したがって、クリックハンドルは、Fc構築物のN末端において導入される。

#### 【0192】

さらに別の実施形態では、Fc構築物をC末端において改変して、小さいソルターゼ(Sortase)認識モチーフ(LPXTG/A)を導入する。このようなFc-認識モチーフは、組換え法を使用して調製される。このような構築物の例は、Fc-[GGGG]<sub>n</sub>-LPETGGLEVLFQGPであり、GGLEVLFQGPは、ソルターゼ処理の際に切り詰められる。10

#### 【0193】

##### Fc A P Jペプチド融合タンパク質の調製

生物学的に作製された多量体化分子、たとえば、ヒンジとして知られる含システイン領域の少なくとも一部を含む抗体Fcは、多量体化された(たとえば、二量体の)形で分泌された、組換え発現させたタンパク質産物から調製することができる。本発明は、Fc領域のアミノ酸配列が、自然に存在する抗体において見られるFcまたは定常領域のアミノ酸配列と比べて変更されている改変Fc融合タンパク質も包含する。たとえば、Fc融合タンパク質は、FcRn結合親和性/または血清半減期の所望の特徴を得るために、変異によって操作(すなわち、改変)されていてもよい。改変Fc融合タンパク質の例は、参考により援用される米国特許第7,217,798号で開示されている。20

#### 【0194】

本発明のFc融合タンパク質は、たとえば、リンカー部分とペプチドまたはポリペプチド部分とを付着させることにより、合成的に変更されてもよい。加えて、組換え抗体由来のFcドメインを有する「改変」Fc融合タンパク質は、原核生物と真核生物両方の発現系を含めたいずれかの発現系において、またはファージディスプレイ法を使用して作製することができる。

#### 【0195】

Fc-[GGGGS]、Fc-[GGGGS]2、Fc-[GGGGS]3、Fc-GG、Fc-GSなどのFc-リンカー構築物については、実験の部で後述する。[GGGS]、[GGGGS]2、[GGGGS]3、GS、およびGGリンカーは、FcドメインのC末端またはFcドメインのN末端のいずれかに付着しており、Fcは、未変性Fcまたはその変異体である。Fc変異体の例としては、C末端リシンが欠失している、またはアラニンで置き換えられているFcが挙げられる。このようなFc変異体は、同時出願の出願(代理人整理番号PAT055781-US-PSP02)に記載されている。30

#### 【0196】

##### バイオコンジュゲート

本発明の一実施形態では、式I～IVのいずれか1つに従うペプチドまたはポリペプチドを、アルブミンのシステイン34のチオール官能基にコンジュゲートさせる(化学的/共有結合性に付着させる)。この実施形態の一態様では、アルブミン-ペプチドは、アルブミンがペプチドのN末端にコンジュゲート(化学的に連結)している、バイオコンジュゲートを指す。さらに別の実施形態では、アルブミン-ペプチドは、アルブミンがペプチドのC末端にコンジュゲート(化学的に連結)している、バイオコンジュゲートを指す。40

#### 【0197】

本発明の別の実施形態では、式I～IVのいずれか1つに従うペプチドまたはポリペプチドを、ヒトIgGのFc領域の1つまたは複数のドメインに融合させる。抗体は、機能の独立した2つの部分、すなわち、抗原を結合する、「Fab」として知られる可変ドメインと、補体活性化や食細胞による攻撃などのエフェクター機能に関与する、「Fc」として知られる定常ドメインとを含む。Fcは、長い血清半減期を有するのに対し、Fabは、短命である(Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31)。治療用ペプチドまたはボ50

リペプチドとつなぎ合わせたとき、Fcドメインが、より長い半減期をもたらす（C. Huang, Curr. Opin. Biotechnol., 2009, 20, 692-699）。

#### 【0198】

一実施形態では、Fc - ペプチドは、Fc配列が、式I～IVのいずれか1つに従うペプチドのN末端に融合する、バイオコンジュゲートを指す。別の実施形態では、ペプチド - Fcは、Fc配列がペプチドのC末端に融合するバイオコンジュゲートを指す。

#### 【0199】

Fc領域は、自然に存在するFc領域でもよいし、または治療の質、循環時間、凝集の減少などの、ある特定の品質を向上させるために改変されていてもよい。

#### 【0200】

抗体の「Fc」ドメインと融合させることによる、タンパク質治療薬の有用な改変は、PCT公開第WO00/024782号に詳細に記載されている。この文書では、ポリエチレンギリコール（PEG）、デキストラン、Fc領域などの「ビヒクル」への連結が論じられている。

#### 【0201】

本発明の好ましい実施形態は、前述の実施形態のいずれか1つに従うペプチドまたはポリペプチドと半減期延長性部分とを含み、半減期延長性部分は、式I、II、III、IV、またはVのポリペプチドに、リンカーを介して融合するFcドメインである、バイオコンジュゲートである。本発明の一態様では、リンカーは、次式：- [GGGGGS]<sub>n</sub>-を有し、nは、1、2もしくは3であり、またはリンカーは、GGもしくはGSであり、式I、II、III、またはIVのポリペプチドは、自然に存在するアミノ酸を含む。Fcドメインとの融合に適する式I、II、III、またはIVのポリペプチドの例は、QRPC<sup>\*</sup>LSC<sup>\*</sup>KGPMPF、C<sup>\*</sup>RPRLSC<sup>\*</sup>KGPMPF、およびQRC<sup>\*</sup>R<sub>1</sub>LSC<sup>\*</sup>KGPMPFである。この実施形態の好ましい一態様は、改変Fc断片（たとえば、Fc-LALA）と、本明細書で規定するとおりの式I～IVのいずれか1つのペプチドまたはポリペプチドとを含む、上で規定したとおりのFc - ペプチド融合バイオコンジュゲートである。

#### 【0202】

さらに別の実施形態では、本発明は、半減期延長性部分が、C末端リシンが欠失している、またはアラニンで置き換えられている改変Fcドメインである、前述の実施形態のいずれか1つに従うバイオコンジュゲートに関する。

#### 【0203】

Fc領域に融合したペプチドは、融合していない対応物より、in vivoで実質的により長い半減期を示すことがわかっている。また、Fc領域への融合によって、ポリペプチドの二量体化 / 多量体化が可能になる。

#### 【0204】

本発明の別の実施形態は、式I～IVのいずれか1つに従うペプチドまたはポリペプチドと、半減期延長性部分とを含み、半減期延長性部分は、ポリペプチドに化学的に連結されるFcドメインである、バイオコンジュゲートである。

#### 【0205】

コンジュゲートの調製：

スキーム4および5は、APJアゴニストペプチド、または式I～IVのいずれか1つに従うペプチドと、Fcドメインやアルブミンなどの半減期延長性部分とをコンジュゲートさせる化学反応を説明するものである。

#### 【0206】

スキーム4では、式4Aのペプチド - リンカーの、アルブミンのシステイン34とのコンジュゲーションを図解する。

#### 【0207】

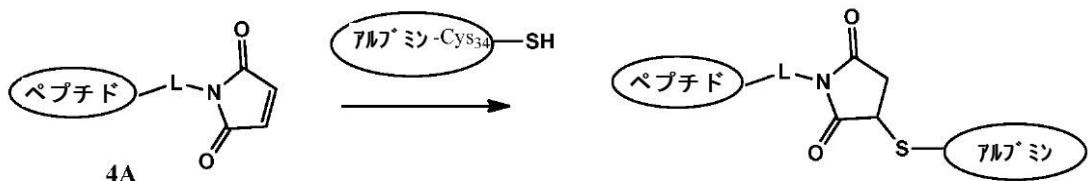
10

20

30

40

## 【化25】



10

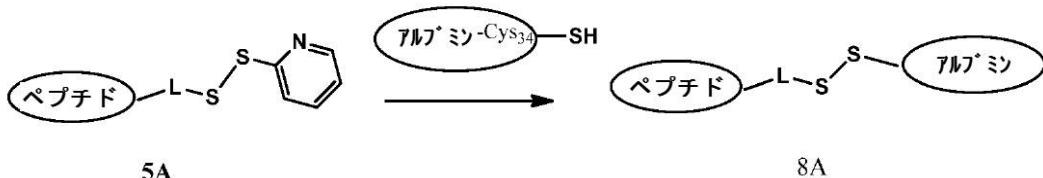
式中、Lは、ペプチドとマレイミド官能基間の連結部分を表す。詳細な実施形態では、Lは、スキーム1、3A、3B、または3Cに開示のとおりの連結部分である。

## 【0208】

スキーム5では、式8Aのペプチド-リンカー構築物の、アルブミンのシステイン34とのコンジュゲーションを図解する。

## 【0209】

## 【化26】



20

スキーム 5

式中、Lは、ペプチドと-S-S-ピリジン官能基間の連結部分を表す。詳細な実施形態では、Lは、スキーム2、3A、3B、または3Cに開示のとおりの連結部分である。

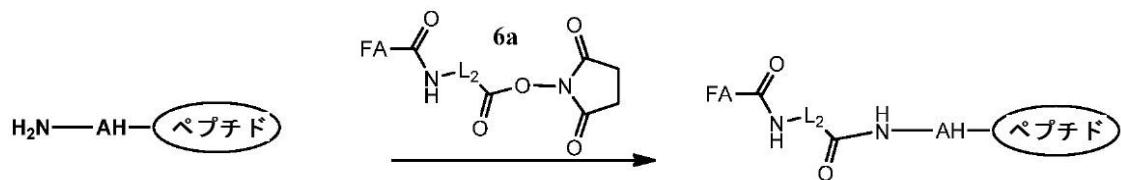
## 【0210】

他のコンジュゲーション方法は、同時係属および同時出願の出願（米国仮出願第62/015862号：代理人整理番号PAT056274-US-PSP、米国仮出願第62/015868号：PAT056275-US-PSP、および米国仮出願第62/015848号PAT055781-US-PSP02）に記載されている。こうした方法として、ペプチドの選択的なN-アシル化が挙げられ、スキーム6に要約される。

30

## 【0211】

## 【化27】



40

式中、AH-は、N末端での反応を促進するためにペプチドのN末端上に導入されたリンカーハーであり、Hは、ヒスチジンであり、Aは、アラニンであり、FAは、上述のとおりの脂肪酸、たとえば、式A1～A3の脂肪酸であり、Lは、連結部分（たとえば、PEG連結部分）である。低pH条件を使用すると、脂肪酸リンカーハー構築物6a（スキーム3Gに示したとおりに調製したもの）は、ペプチド上に、N末端において選択的に導入される。

50

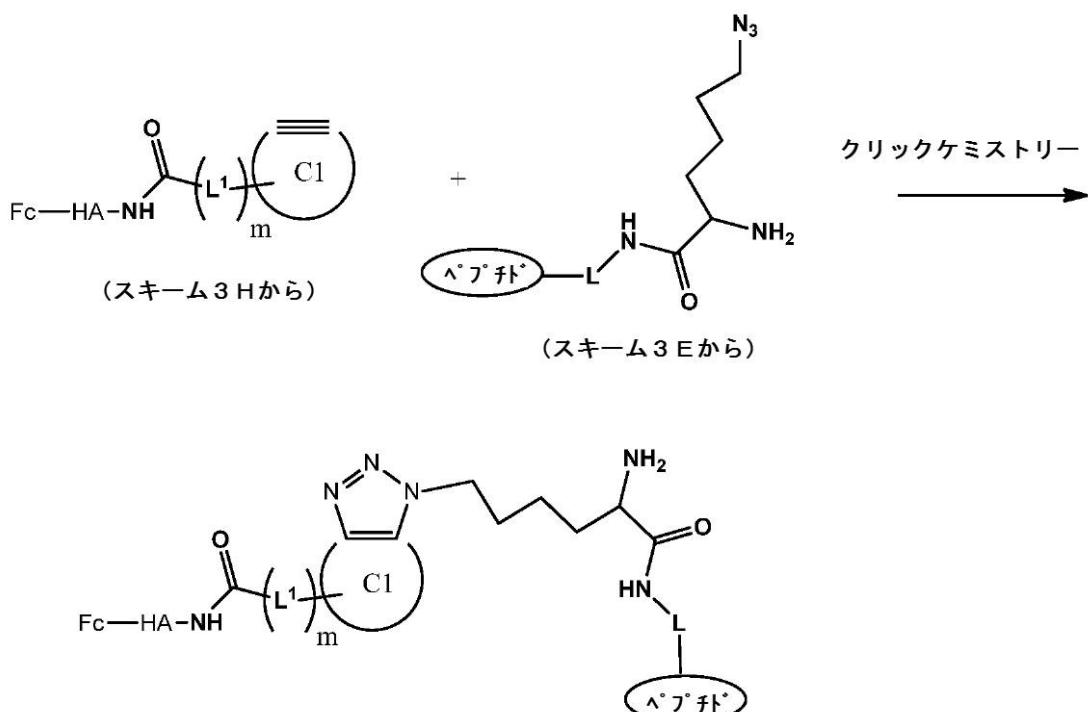
このような方法は、同時出願の特許出願（米国仮出願第62/015868号：代理人整理番号P A T 0 5 6 2 7 5 - U S - P S P および米国仮出願第62/015848号P A T 0 5 5 7 8 1 - U S - P S P 0 2）に記載されている。

## 【0212】

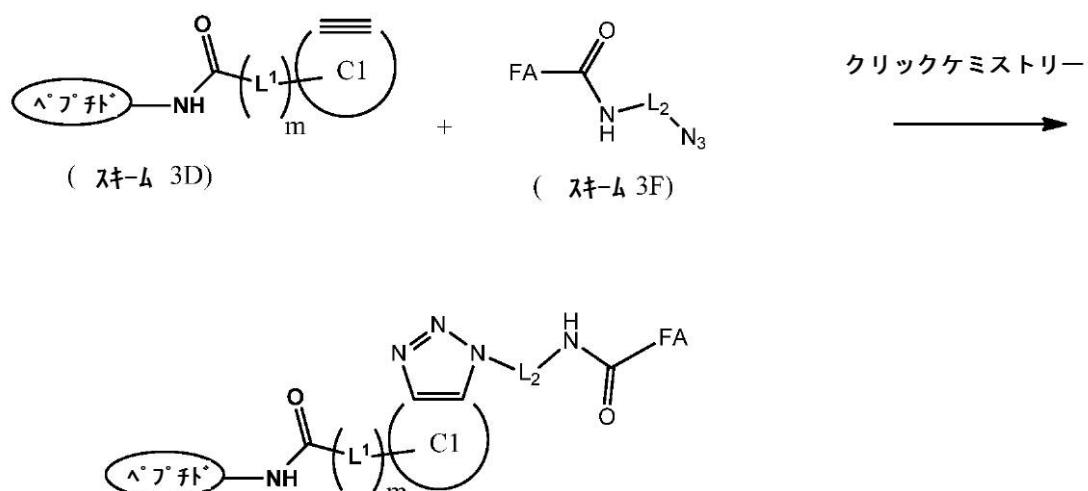
スキーム7および8は、クリックケミストリーを使用する本発明に従うコンジュゲートの生成を記載するものである。

## 【0213】

## 【化28】



スキーム7



スキーム8

## 【0214】

スキーム 1～5 に記載のとおりのコンジュゲートおよびペプチド・リンカー構築物の作製方法については、参照により本明細書に援用される、同時出願の U S 出願（米国仮出願第 61 / 858251 号：代理人整理番号：P A T 0 5 5 3 2 6 - U S - P S P 3 および米国仮出願第 61 / 858303 号：P A T 0 5 5 7 8 1 - U S - P S P ）においても記載および例示されている。

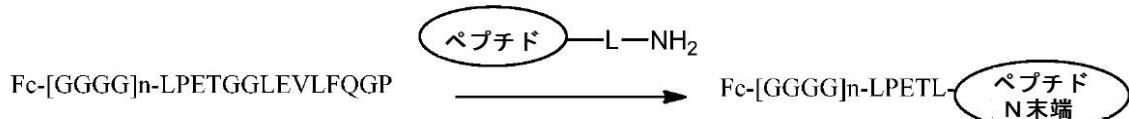
【 0 2 1 5 】

スキーム 9 は、ソルターゼ酵素を使用する、A P J ペプチドの F c 構築物とのコンジュゲーションを記載するものである。

【 0 2 1 6 】

【 化 2 9 】

10



式中、n は、1、2 または 3 であり、L は、任意選択のリンカー（たとえば、ポリグリシンリンカー）である。

【 0 2 1 7 】

医薬組成物

20

本発明のポリペプチド、またはそのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲートは、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、吸入、経口などを始めとする様々な手段のいずれかにおいて投与することができる。本発明特に好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの連続的な静脈内投与を用いる。本発明におけるポリペプチドまたはバイオコンジュゲートは、ボーラスとして、または一定期間にわたる連続注入として投与することができる。移植可能なポンプを使用してもよい。本発明のある特定の実施形態では、断続的または連続的なポリペプチドもしくはバイオコンジュゲート投与を、1日～数日間（たとえば、2～3日間以上）またはより長期間、たとえば、数週間、数か月、もしくは数年間継続する。一部の実施形態では、断続的または連続的なポリペプチド投与を少なくとも約3日間施す。他の実施形態では、断続的または連続的なポリペプチドもしくはバイオコンジュゲート投与を少なくとも約1週間施す。他の実施形態では、断続的または連続的なポリペプチドもしくはバイオコンジュゲート投与を少なくとも約2週間施す。投与中または複数回の投与の合間に、特定の閾値を上回る平均血漿ポリペプチド濃度を維持することが望ましい場合もある。望ましい濃度は、たとえば、対象の生理的状態、疾患重症度などに基づき決定することができる。そのような望ましい値（複数可）は、標準の臨床試験を実施して割り出すことができる。代わりに、ペプチドおよびそのコンジュゲートは、F c R n 機序によって、経口的に送達することができるはずである（Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007、Nat Commun. 3;3:610, 2012、Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262-G270, 2013）。

30

【 0 2 1 8 】

別の態様では、本発明は、本発明のポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと、1種または複数の薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は、経口投与、非経口投与、直腸投与などの特定の投与経路用に製剤化することができる。加えて、本発明の医薬組成物は、固体形態（限定はせず、カプセル剤、錠剤、丸剤、顆粒、粉末、または坐剤を含む）、または液体形態（限定はせず、溶液、懸濁液、または乳濁液を含む）に仕立てることができる。医薬組成物は、滅菌などの従来の製薬業務にかけることができ、かつ／または、従来の不活性希釈剤、滑沢剤、または緩衝剤、ならびに保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝液などの佐剤を含有してよい。

【 0 2 1 9 】

40

50

注射用途に適する医薬組成物は、通常、滅菌注射溶液または分散液を即座に調製するための、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液と滅菌粉末を含む。

#### 【0220】

静脈内の投与については、適切な担体として、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM (BASF、ニュージャージー州Parisippany)、またはリン酸緩衝食塩水 (PBS) が挙げられる。すべての場合において、組成物は、滅菌とすべきであり、容易な注射適用性 (syringability) が存在する程度に流動的にすべきである。好ましい医薬製剤は、製造および貯蔵の条件下で安定しており、細菌や真菌などの微生物による汚染作用に対抗して保存しなければならない。一般に、妥当な担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でよい。適正な流動度は、たとえば、レシチンなどのコーティング剤の使用、分散液の場合では必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物による作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって実現することができる。多くの場合、等張化剤、たとえば、糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅らせる薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンを組成物に含めることにより実現できる。

#### 【0221】

ある特定の注射用組成物は、水性の等張性溶液または懸濁液であり、坐剤は、脂肪質の乳濁液または懸濁液から調製することが有利である。前記組成物は、滅菌され、かつ／または保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、溶解促進剤 (solution promoter)、浸透圧調節用の塩、および／または緩衝液などの佐剤を含有するものでよい。加えて、前記組成物は、治療上価値のある他の物質も含有してよい。前記組成物は、従来の混合、造粒、またはコーティング法に従って調製され、それぞれ、約0.1～75%、または約1～50%の活性成分を含有する。

#### 【0222】

滅菌注射溶液は、必要に応じて、上で列挙した成分の1つまたは組合せを含有する適切な溶媒に、必要な量の活性化合物を混ぜた後、濾過滅菌することにより調製できる。分散液は、一般に、基礎の分散媒、および上で列挙したものからの他の必要な成分を含有する滅菌ビヒクルに、活性化合物を混ぜることにより調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であるが、この方法では、活性成分の粉末と、所望の任意の追加成分が、予め滅菌濾過されたその溶液から得られる。

#### 【0223】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または可食担体を含む。治療的経口投与の目的では、活性化合物は、賦形剤と混ぜ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤、たとえばゼラチンカプセル剤の形で使用することができる。経口組成物は、含嗽液として使用するために流動性担体を使用して調製することもできる。薬学的に適合する結合剤、および／または佐剤材料を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、次の成分、すなわち、微結晶性セルロース、トラガカントゴム、ゼラチンなどの結合剤、デンプンやラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel、コーンスタークなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムやsterotesなどの滑沢剤、コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤、スクロースやサッカリンなどの甘味剤、またはハッカ、サリチル酸メチル、オレンジ香料などの着香剤のいずれか、または同様の性質の化合物を含有してよい。経口送達用の製剤は、消化管内での安定性を向上させ、かつ／または吸収を強化するための薬剤が組み込まれていると有利な場合もある。

#### 【0224】

吸入による投与について、発明治療薬は、適切な噴射剤、たとえば、二酸化炭素などの

10

20

30

40

50

気体を含有する加圧容器もしくは計量分配装置、またはネプライザーから、エアロゾルスプレーの形で送達することが好ましい。治療薬の全身送達のために、肺が広い表面積を備えていることは注目される。

#### 【0225】

薬剤は、たとえば、米国公開20040096403に記載のものなどのポリマー系微小粒子に、または当業界で知られている他の広範な薬物送達ビヒクルのいずれかと共にして、カプセル封入することができる。本発明の他の実施形態では、たとえば、米国公開20040062718に記載されているように、薬剤を荷電脂質と共にして送達する。後者の系は、治療用ポリペプチドであるインスリンの投与に使用されており、ペプチド剤の投与についてこの系の実益を示していることが注目される。

10

#### 【0226】

全身投与は、経粘膜的または経皮的手段によるものでもよい。

#### 【0227】

経皮的適用に適する組成物は、有効量の本発明のポリペプチドを適切な担体と共に含む。経皮送達に適する担体として、ホストの皮膚を介した透過を手助けする薬理学的に許容される被吸収性溶媒が挙げられる。経皮的デバイスは、たとえば、裏部材と、化合物を場合により担体と共に含有するレザバーと、場合により、ホストの皮膚の化合物を、長期間にわたって、制御され、予め決められた速度で送達するための速度制御バリアと、デバイスを皮膚に固定するための手段とを備えた絆創膏の形態である。

#### 【0228】

たとえば皮膚および眼への局所適用に適する組成物には、水溶液、懸濁液、軟膏、クリーム、ゲル、または、たとえばエアロゾルなどによる送達のためのスプレー製剤が含まれる。このような局所送達系は、特に、皮膚への適用に相応しくなる。すなわち、こうした局所送達系は、当業界でよく知られている美容製剤を含めた局所的使用に特に適する。このような組成物は、可溶化剤、安定剤、張性増強剤 (tonicity enhancing agent)、緩衝剤、および保存剤を含有してもよい。

20

#### 【0229】

本明細書で使用するとき、局所適用は、吸入または鼻腔内適用にも関連することがある。こうした適用は、乾燥粉末吸入器から乾燥粉末（単独、混合物、たとえばラクトースとの乾燥ブレンドとして、またはたとえばリン脂質との混合型要素粒子としてのいずれか）の形で、または加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー、もしくはネプライザーからエアロゾルスプレー体裁の形で、適切な噴射剤を使用しまたは使用せずに、好都合に送達することができる。

30

#### 【0230】

本発明はさらに、活性成分としての本発明の化合物が分解する速度を減速する1種または複数の薬剤を含む医薬組成物および剤形を提供する。本明細書では「安定剤」と呼ぶ、そのような薬剤として、限定はしないが、アスコルビン酸などの酸化防止剤、pH緩衝液、または塩緩衝液などが挙げられる。

#### 【0231】

本明細書で使用するとき、用語「薬学的に許容される塩」とは、本発明のポリペプチドの生物学的有効性および特性を保持し、通常は生物学的または別な意味で望ましい塩を指す。多くの場合、本発明のポリペプチドは、アミノ基および／もしくはカルボキシル基またはそれと同様の基が存在するおかげで、酸および／または塩基の塩を形成することができる。

40

#### 【0232】

薬学的に許容される酸付加塩、たとえば、酢酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、臭化物／臭化水素酸塩、炭酸水素塩／炭酸塩、硫酸水素塩／硫酸塩、カンファースルホン酸塩、塩化物／塩酸塩、クロルテオフィリン酸塩(chlortheophyllonate)、クエン酸塩、エタンジスルホン酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、馬尿酸塩、ヨウ化水素酸塩／ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビ

50

オン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチル硫酸塩、ナフトエ酸塩、ナプシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オクタデカン酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩／リン酸水素塩／リン酸二水素塩、ポリガラクトロン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、スルホサリチル酸塩、酒石酸塩、トシリ酸塩、およびトリフルオロ酢酸塩は、無機酸および有機酸に対して生成することができる。

#### 【0233】

塩を導くことのできる無機酸としては、たとえば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などが挙げられる。塩を導くことのできる有機酸としては、たとえば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、スルホサリチル酸などが挙げられる。薬学的に許容される塩基付加塩は、無機塩基および有機塩基に対して生成することができる。10

#### 【0234】

塩を導くことのできる無機塩基としては、たとえば、アンモニウム塩、および周期表のI～XI列の金属が挙げられる。ある特定の実施形態では、塩は、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、銀、亜鉛、および銅から導かれ、特に適切な塩として、アンモニウム、カリウム、ナトリウム、カルシウム、およびマグネシウム塩が挙げられる。20

#### 【0235】

塩を導くことのできる有機塩基としては、たとえば、第一級、第二級、および第三級アミン、自然に存在する置換アミンを始めとする置換アミン、環状アミン、塩基性イオン交換樹脂などが挙げられる。ある特定の有機アミンとして、イソプロピルアミン、ベンザチン、コリネート(cholinate)、ジエタノールアミン、ジエチルアミン、リシン、メグルミン、ピペラジン、およびトロメタミンが挙げられる。30

#### 【0236】

本発明の薬学的に許容される塩は、従来の化学的方法によって、親化合物、塩基性または酸性部分から合成することができる。一般に、そのような塩は、遊離酸形態のこうした化合物を化学量論量の相応しい塩基(Na、Ca、Mg、またはKの水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩など)と反応させる、または遊離塩基形態のこうした化合物を化学量論量の相応しい酸と反応させることにより調製できる。こうした反応は通常、水もしくは有機溶媒中または二者の混合物中で実施される。一般に、実用可能な場合、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルのような非水性媒質の使用が望ましい。追加の適切な塩の一覧は、たとえば、“Remington's Pharmaceutical Sciences”, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)ならびにStahlおよびWerthによる“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use”(Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)で見ることができる。30

#### 【0237】

本明細書で使用するとき、用語「薬学的に許容される担体」は、当業者に知られているであろうが、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、界面活性剤、酸化防止剤、保存剤(たとえば、抗菌剤、抗真菌剤)、等張化剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、着香剤、色素など、およびこれらの組合せを包含する(たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329を参照されたい)。従来のいかなる担体も、活性成分と相容れない範囲にあるものを除き、治療組成物または医薬組成物におけるその使用を企図する。40

#### 【0238】

本発明の方法：

アペリンファミリーのペプチドは、Gタンパク質共役型APJ受容体の、知られている唯一の天然リガンドファミリーである。アペリン遺伝子は、77アミノ酸のポリペプチド50

をコードし、このポリペプチドがプロセシングを受けて、生物学的活性型のアペリンペプチド、たとえば、アペリン-36、アペリン-17、アペリン-16、アペリン-13、アペリン-12、およびピログルタミン酸改変型のアペリン-13 (Py<sup>r1</sup>-アペリン-13) になる。これらアペリンペプチドのいずれでも1種が、APJ受容体に結合すると、G<sub>i</sub>およびG<sub>q</sub>タンパク質を介してシグナルを伝達する。心筋細胞では、G<sub>i</sub>またはG<sub>q</sub>との共役によって、細胞内pHが変化し、PLCが活性化され、IP<sub>3</sub>が産生され、それにより筋フィラメントのカルシウム感受性が増強され、最終的に心収縮性が増大する。G<sub>i</sub>共役により、活性化型G<sub>s</sub>、アデニリルシクラーゼ、およびcAMPの産生が抑制され、pAktレベルが上昇して、心臓保護につながる。血管内皮細胞では、G<sub>i</sub>を介したAPJ活性化、pAktによって、一酸化窒素(NO)産生が増大し、これにより平滑筋弛緩が増進される結果、全体として血管が拡張する。

#### 【0239】

慢性安定心不全の患者は、心収縮性がさらに低下し、症状が悪化する、不定期の急性代償不全エピソードを伴う。こうした増悪は、急性非代償性心不全(ADHF)と呼ばれる。ADHFの現行の療法としては、利尿薬、血管拡張薬、およびイノトロープが挙げられ、これらは、心収縮性を直接増大させる。現用の静脈内イノトロープ(ドブタミン、ドーパミン、ミルリノン、レボシメンダン)は、不整脈などの有害事象を伴い、長期死亡率を増大させることでよく知られている。本発明の合成アペリンポリペプチド類似体またはそのバイオコンジュゲートは、催不整脈性または死亡の傾向なしに心収縮性を増大させるADHF療法となり、慢性心不全における未対応の膨大な医学的要要求に対処するものである。

#### 【0240】

実際に、ヒトにおける急性アペリン治療(5分)の結果、冠血管は拡張し、心拍出量は改善される。しかし、天然のアペリンは、in vivoでのt<sub>1/2</sub>(秒)および作用持続時間(数分)が非常に短い。本発明の強力な合成アペリンペプチドアゴニスト、またはそのバイオコンジュゲートは、天然のアペリンに比べて半減期が長い。

#### 【0241】

心筋細胞におけるAPJ受容体の活性化により、a) G<sub>i</sub>/G<sub>q</sub>、PLC、およびCa<sup>2+</sup>を介した心収縮性が向上し、b) G<sub>i</sub>、pAkt活性化を介した心臓保護が講じられるが、(他のイノトロープで見られるような)cAMPの漸増は伴わない。加えて、内皮細胞におけるAPJアゴニズムによって、動脈の血管は拡張され、これが、左心室の仕事量を軽減することにより、さらに心不全のためになる。まとめると、合成アペリンポリペプチド類似体は、全体としての心機能を向上させ、催不整脈を減少させ、生存利益をもたらし得る。

#### 【0242】

より最近では、アペリンの糖尿病およびインスリン抵抗性への潜在的な関与に焦点を当てる前臨床研究がいくつか発表されている。アペリンは、1)筋肉、脂肪、および心臓におけるグルコースの取り込みを改善することによって血糖レベルを下げ、2)脾臓細胞をERストレスおよび後続のアポプトーシスから保護し、3)細胞におけるインスリン分泌を減少させ、4)脂肪組織において、カテコールアミンによって誘発される脂肪分解を調節することが示されている。pAkt経路の活性化は、こうした過程と関連付けられている。

#### 【0243】

式I~IVのいずれか1つに従うポリペプチドまたは薬学的に許容されるその塩は、遊離の形態または薬学的に許容される塩の形態、またはそのバイオコンジュゲートで、たとえば次の部で示すとおりのin vitroおよびin vivo試験において示されるような、価値のある薬理学的特性、たとえば、APJ受容体アゴニズム特性を示し、したがって、療法に必要となる。

#### 【0244】

本発明のポリペプチドまたは薬学的に許容されるその塩、またはそのバイオコンジュゲ

10

20

30

40

50

ートは、急性非代償性心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症から選択される適応症の治療において有用となり得る。

#### 【0245】

したがって、別の実施形態として、本発明は、APJ受容体活性と関連する疾患を治療するための、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの使用を提供する。別の実施形態では、療法は、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患から選択される。別の実施形態では、疾患は、前述の一覧から選択され、急性非代償性心不全が適切である。この実施形態のさらに別のサブセットにおいて、本発明は、APJ受容体活性と関連する疾患を治療するための医薬の製造における、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの使用を提供する。10

#### 【0246】

したがって、別の実施形態として、本発明は、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの、療法における使用を提供する。別の実施形態では、療法は、APJ受容体の活性化（アゴニズム）によって治療することのできる疾患から選択される。20

#### 【0247】

別の実施形態では、本発明は、治療上許容される量の式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲートの投与を含む、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患の治療方法を提供する。別の実施形態では、疾患は、上述の一覧から選択され、急性非代償性心不全が適切である。20

#### 【0248】

この実施形態のさらに別のサブセットにおいて、本発明は、治療上許容される量の式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの投与を含む、APJ受容体の活性と関連する疾患の治療方法を提供する。

#### 【0249】

治療に用いることになる、本発明の医薬組成物または組合せの有効量は、たとえば、治療の状況および目的に左右される。当業者には、したがって、治療に相応しい投薬量レベルが、幾分、送達される分子、融合タンパク質変異体を使用する適応症、投与経路、ならびに患者の大きさ（体重、体表面、または臓器サイズ）および状態（年齢および全般的健康状態）に応じて様々となることは理解されよう。それに応じて、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を設定し、投与経路を変更することができる。典型的な投薬量は、上述の要因に応じて、約0.1μg/kgから約100mg/kgまでの範囲またはそれ以上となり得る。他の実施形態では、投薬量は、0.1μg/kgから約100mg/kgまで、または1μg/kgから約100mg/kgまでの範囲となり得る。30

#### 【0250】

投薬の頻度は、使用する製剤中の二重機能タンパク質の薬動学的パラメータに応じて決まる。通常、臨床医は、所望の効果を実現する投薬量に到達するまで組成物を投与する。したがって、組成物は、単一用量として、一定期間にわたる（同量の所望の分子を含有するかどうかは定かでない）2回以上の用量として、または移植デバイスもしくはカテーテルによる連続的な注入として、投与することができる。適切な投薬量のさらなる微調整は、当業者によって型通りになされ、当業者によって型通りに行われる作業領域の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量反応データを使用して突き止めることができる。40

#### 【0251】

本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートの「治療有効量」という用語は、対象の生物学的または医学的反応、たとえば、症状の改善、状態の緩和、疾患進行の緩50

慢化もしくは遅延、または疾患の予防などを惹起する、本発明のポリペプチド（またはバイオコンジュゲート）の量を指す。非限定的な一実施形態では、用語「治療有効量」は、対象に投与されたとき、(1)(i) A P J 受容体の活性化によって改善され、(ii) A P J 受容体の活性と関連し、または(iii) A P J 受容体の異常な活性を特徴とする状態、障害、もしくは疾患、またはその症状を少なくとも部分的に緩和し、抑制し、予防し、かつ／または改善させ、または(2) A P J 受容体を活性化するのに有効である、本発明のポリペプチドの量を指す。

#### 【0252】

非限定的な別の実施形態では、用語「治療有効量」は、細胞、組織、非細胞生物材料、または培地に投与されたとき、A P J 受容体を少なくとも部分的に活性化するのに有効である、本発明のポリペプチドの量を指す。当業者の認めるところとなるとおり、特定の薬剤の、有効である絶対量は、所望の生物学的終点、送達する薬剤、ターゲット組織などの要因に応じて様々となり得る。当業者には、「治療有効量」を、単一用量にして投与してもよいし、または複数回の用量の投与によって実現してもよいことは理解される。たとえば、心不全治療のための薬剤の場合、有効量は、患者の臨床的改善、たとえば、運動耐性／能力の向上、血圧の上昇、体液停留の減少、および／または心臓機能性、たとえば、駆出率、運動能力（消耗までの時間）などの定量試験に関する結果の改善をもたらすのに十分な量でよい。

#### 【0253】

本明細書で使用するとき、用語「対象」とは、動物を指す。通常、動物は哺乳動物である。対象は、たとえば、霊長類（たとえば、ヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、魚、鳥なども指す。ある特定の実施形態では、対象は霊長類である。さらに他の実施形態では、対象はヒトである。

#### 【0254】

本明細書で使用するとき、用語「抑制する」、「抑制」、または「抑制すること」とは、所与の状態、症状、障害、もしくは疾患の軽減もしくは抑止、または生物学的活性もしくは過程のベースライン活性の有意な低下をいう。

#### 【0255】

本明細書で使用するとき、任意の疾患または障害を「治療する」、「治療すること」、またはその「治療」という用語は、一実施形態では、疾患または障害を改善させる（すなわち、疾患またはその臨床症状の少なくとも1つの発生を緩慢にし、阻止し、または軽減する）ことをいう。別の実施形態では、「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、患者によって識別されない場合があるものを含めて、少なくとも1つの身体的パラメータを緩和し、または改善させることをいう。さらに別の実施形態では、「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、疾患または障害を、身体的に（たとえば、識別可能な症状の安定化）、生理的に（たとえば、身体的パラメータの安定化）、または両方ににおいて、変調することをいう。さらに別の実施形態では、「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、疾患または障害の発症、発生、または進行を防ぎ、または遅らせることをいう。

#### 【0256】

本明細書で使用するとき、用語「予防する」、「予防すること」、および「予防」とは、療法（たとえば、治療薬）の投与または療法の組合せ（たとえば、治療薬の組合せ）の投与の結果として生じる、対象における障害の1つまたは複数の症状の再発、発症、または発生の予防をいう。

#### 【0257】

本明細書で使用するとき、対象が、生物学的に、医学的に、または生活の質において治療の恩恵を受けることになる場合、その対象は、そのような治療の「必要がある」。

#### 【0258】

本明細書で使用するとき、本発明の文脈で（特に特許請求の範囲の文脈で）使用する用語「a」、「an」、「the」、および同様の用語は、本明細書で別段指摘しない限り

10

20

30

40

50

、また文脈と明らかに矛盾しない限り、単数と複数の両方を包含すると解釈される。

**【0259】**

本明細書に記載の方法はすべて、本明細書で別段指摘しない限り、またはそうでなくとも文脈と明らかに矛盾しない限り、適切などんな順序で実施してもよい。本明細書において提供される、ありとあらゆる例または例示的な言い回し（たとえば、「など」）の使用は、単に本発明をより明解にするためのものであり、別途特許請求する本発明の範囲を限定するものでない。

**【0260】**

本発明によるポリペプチドの活性は、以下に記載する次の *in vitro* 法によって評価することができる。

10

**【0261】**

h A P J カルシウムフラックスアッセイ：

384 ウエルフォーマットにおいて、25 u l 成長培地に、Chem - 5 A P J 安定細胞 (Millipore # HTS068C) を 10,000 細胞 / ウエルで播き、次いで、37 の組織培養インキュベーターにおいて 24 時間成長させた。アッセイの 1 時間前に、2.5 mM のプロベネシドを含有する 25 u l / ウエルの FLIPR Calcium 4 色素 (Molecular Devices R8142) を加え、37 の組織培養インキュベーターにおいて細胞を 1 時間インキュベートした。ペプチドを HBSS 、HEPES 、および 0.1% BSA 緩衝液に可溶化し、三通りに 50 u M から 5 p M まで 10 倍ずつ連続希釈した。FLIPR Tetra を使用して、色素を有する細胞にペプチドを加えた (1:5、10 u M ~ 1 p M の範囲の最終ペプチド濃度にする)。細胞の内側の FLIPR 色素は、カルシウムに結合後に蛍光を発光し、細胞の外側からの蛍光は遮蔽された。FLIPR Tetra において 470 ~ 495 の励起波長および 515 ~ 575 の発光波長を使用して、蛍光を測定した。読み取りは、ペプチドを加える 10 秒前に開始して、合計 3 分間行った。最大 - 最小値を算出し、各ペプチド濃度に対してプロットし、GraphPad prism ソフトウェアを使用して、ペプチドによるカルシウムフラックス刺激について、曲線変曲点における EC<sub>50</sub> 値を算出した。

20

**【0262】**

血漿安定性アッセイ：

材料：

30

作業溶液：1 mg / mL の試験物を Milli-Q 水中に調製する。

抽出溶液：0.1% のギ酸および 400 ng / mL のグリブリドを含有するメタノール：アセトニトリル：水 (1:1:1)

血漿：Bioreclamation LLC (ニューヨーク州 Liverpool) から購入した雄の Sprague-Dawley ラット血漿 (ヘパリンナトリウム添加)

全血：Bioreclamation LLC (ニューヨーク州 Liverpool) から購入した雄 Sprague Dawley 全血 (ヘパリンナトリウム添加)

肺ホモジネート：Bioreclamation LLC (ニューヨーク州 Liverpool) から雄の Sprague Dawley ラットの肺を購入した。肺は、5 倍体積の 1 倍 PBS を加えた後、ポリトロンホモジナイザーを使用してホモジナイズした。ホモジネートを 4 にて 9000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を 3000 rpm で 30 分間再び遠心分離して、澄んだ上清を作った。タンパク質濃度は、市販のキット ( Pierce, Thermo Scientific) を使用して求めた。

40

**【0263】**

サンプル調製手順：(ペプチド)

試験物は、次の生物学的材料、すなわち、ヘパリン処置ラット血漿、ヘパリン処置ラット全血、または肺ホモジネートのうちの 1 つにおいて調製した。血漿および全血サンプルは、995 u L のラット血漿または全血に 1 mg / mL の作業溶液 5 u L を加えることにより、5000 ng / mL で調製した。肺ホモジネートサンプルは、肺ホモジネートをリン酸緩衝溶液 (PBS) で 1 mg / mL のタンパク質濃度に希釈した後、5 u L の作業溶

50

液を加えて、995 uLの希釈された肺ホモジネートとすることにより調製した。サンプルは、水浴インキュベーターにおいて、穏やかに振盪(65~75 rpm)しながら37でインキュベートした。0分、5分、15分、30分、60分、120分、および240分の時点で、インキュベートサンプルの25 uLのアリコートを96ウェルプレートに移し、150 uLの抽出溶液を使用して、直ちにタンパク質を沈殿させた。インキュベート実験が完了した後、サンプルプレートを4にて4000 rpmで10分間遠心分離した。その後、ピペット操作装置(Tecan Temo)を使用して、上清を別のプレートに移し、すべてのサンプルに50 uLの水を加えた。プレートは、LC-MS分析の前にボルテックスした。

## 【0264】

10

## サンプル調製手順(コンジュゲート)

1 mg / mLの作業溶液5 uLをラット血漿495 uLに加えることにより、試験物を50,000 ng / mLで調製する。サンプルは、水浴インキュベーターにおいて、穏やかに振盪(65~75 rpm)しながら37でインキュベートする。0時間、0.5時間、1時間、2時間、4時間、6時間、および24時間の時点で、インキュベートサンプルの50 uLのアリコートを96ウェルプレートに移し、40 mMのTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン)100 uLを各サンプルに加える。反応混合物を37で1時間インキュベートする。反応が完了した後、300 uLのアセトニトリルを使用して、タンパク質を沈殿させる。サンプルプレートを4にて4000 rpmで10分間遠心分離する。その後、ピペット操作装置(Tecan Temo)を使用して、125 uLの上清を別のプレートに移し、すべてのサンプルに50 uLの水を加える。プレートは、LC-MS分析の前にボルテックスする。

20

## 【0265】

## LC-MS安定性分析のサンプル

HPLC: オートサンプラーアドバイス Agilent 1290 HPLC

カラム: MAC-MOD ACE C18、3 μm、30 mm × 内径2.1 mm

移動相A: 0.1%のギ酸アセトニトリル溶液

移動相B: 0.1%のギ酸水溶液

## 【0266】

30

勾配プログラム:

## 【0267】

## 【表2】

時間(分)	流量(mL)	移動相A(%)	移動相B(%)
0	0.4	95	5
0.5	0.4	95	5
1.5	0.4	5	95
4.1	0.4	5	95
4.2	0.4	95	5
5	0.4	95	5

40

## 【0268】

質量分析計: Agilent Q-TOF 6530

データ取得モード: 100~1000 m/z の質量範囲での完全走査

データ取得および分析ソフトウェア: MassHunter

## 【0269】

データ分析:

安定性アッセイ: 安定性半減期(t1/2)の値は、各時点におけるピーク面積を、初期

50

( $t = 0$ ) ピーク面積を基準とした残存パーセントに変換することにより求めた。

残存パーセント =  $100 \times (\text{サンプルピーク面積}) \div (t = 0 \text{ ピーク面積})$

**【0270】**

残存パーセント値の自然対数を算出し、サンプル時間に対してプロットした (Microsoft Excel)。この直線の傾き  $k$  を、線形回帰によって求めた (Microsoft Excel)。

**【0271】**

次いで、安定性半減期を、式  $t_{1/2} = 0.693 \div k$  によって算出した。

**【0272】**

代替活性ベースの血漿安定性アッセイ :

10

次の変更を加えて、上述のカルシウムフラックスプロトコールに従った。ペプチドは、ここでも 5 % ラット血漿 (Bioreclamation # RATPLNAHP-M、ヘパリン Na 処置したもの) と共にインキュベートした。37 の組織培養インキュベーターでインキュベートした後、 $t_0$  および  $t_{24}$  時間の時点で読み取った。分単位のペプチド血漿半減期を、次の計算によって推定した。

$$1) \ln((t_0 \text{ 時点の } EC_{50}) / (t_{24} \text{ 時間 時点の } EC_{50}))$$

2) 上の値の傾きを算出

$$3) t_{1/2} = 0.693 / (\text{傾き}^2)$$

**【0273】**

(上述のとおりの) 試験アッセイを使用すると、本発明のポリペプチドは、以下に示す表 2 および表 3 に従う有効性および安定性を示した。

20

**【0274】**

【表3-1】

表2:ポリペプチドの活性および安定性

ペプチド	hAPJ Ca <sup>2+</sup> フラックス EC <sub>50</sub> [nM]	代替活性ベース (surrogate activity-based) の血漿安定性 t1/2[分]	
実施例 1	9.4	8	10
実施例 2	3.2	39	
実施例 3	64.5	n.d.	
実施例 4	74.6	506	
実施例 5	1.6	5.0	
実施例 6	21.4	5	
実施例 7	11.8	9	
実施例 8	13.1	662.5	20
実施例 9	23.4	109.2	
実施例 10	46.9	57.4	
実施例 11	32.2	32.8	
実施例 12	21.4	10	
実施例 13	12.2	10	
実施例 14	48.7	7.5	
実施例 15	193.5	17.7	
実施例 16	14.1	7	30
実施例 17	410.3	11.4	
実施例 18	174	50	
実施例 19	79.3	50	
実施例 20	1.0	11.9	
実施例 21	2.9	>1000	
実施例 22	3.3	>1000	
実施例 23	72.2	3157	
実施例 24	85.8	1699	
実施例 25	227	>1000	40
実施例 26	2292	52	
実施例 27	86.5	82	
実施例 28	3.1	13	

【0275】

【表3-2】

実施例 29	4.2	705.0
実施例 30	0.4	660.7
実施例 31	0.5	43.1
実施例 32	3.0	>1000
実施例 33	1.9	>1000
実施例 34	0.6	>1000
実施例 35	2.0	155.0
実施例 35	66.7	8
実施例 36	4.2	34
実施例 37	937	47
実施例 38	175	41
実施例 40	2479	>1000
実施例 41	839	>1000
実施例 42	16.3	>1000
実施例 43	28.9	>1000
比較実施例: Pyr1-アペリン-13	1.8	5.0

10

20

30

【0276】

【表4】

表3: 血漿安定性アッセイと代替活性ベースの血漿安定性アッセイ  
との間の相関:

ペプチド	血漿安定性 t <sub>1/2</sub> [分]	代替活性ベースの血漿安定性 t <sub>1/2</sub> [分]
Pyr-1-アペリン 13	6.6	5.0
実施例 32	377	>1000

40

【0277】

本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、アペリン-13またはPyr-1-アペリン-13と同様のAPJ受容体効力を備え得る。一実施形態では、本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、EC<sub>50</sub>が100nM未満である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、EC<sub>50</sub>が50nM未満、好ましくは25nM未満、より好ましくは15nM未満である。さらに別の実施形態では、本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、EC<sub>50</sub>が10nM未満である。

50

## 【0278】

本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、アペリン-13またはp y r-1-アペリン-13に優る血漿安定性を有することもある。一実施形態では、血漿安定性の改善は、少なくとも2倍である。一実施形態では、本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、血漿安定性が少なくとも30分である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、血漿安定性が、少なくとも60分、または少なくとも80分、好ましくは少なくとも100分、より好ましくは少なくとも150分である。

## 【0279】

本発明のポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートは、他の1種または複数の治療薬と同時に投与してもよいし、またはその前もしくは後に投与してもよい。本発明のポリペプチドまたはバイオコンジュゲートは、同じもしくは異なる投与経路で別々に投与してもよいし、または他の薬剤と同じ医薬組成物にして一緒に投与してもよい。

## 【0280】

一実施形態では、本発明は、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲートと、少なくとも1種の他の治療薬とを含む、療法において同時、別個、または順次使用するための一体型調製物としての製品を提供する。一実施形態では、療法は、APJ受容体の活性化に反応を示す疾患または状態の治療である。

## 【0281】

一体型調製物として提供される製品としては、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲートと、他の治療薬（複数可）とを同じ医薬組成物中に一緒に、または式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと、他の治療薬（複数可）とを別個の形態で、たとえば、キットの形で含む組成物が挙げられる。

## 【0282】

一実施形態では、本発明は、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと、別の治療薬（複数可）とを含む医薬組成物を提供する。場合により、医薬組成物は、上述のとおりの薬学的に許容される賦形剤を含んでもよい。

## 【0283】

一実施形態では、本発明は、2種以上の別個の医薬組成物を含み、その少なくとも1種が、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを含有する、キットを提供する。一実施形態では、キットは、容器、隔てられたボトル、分包ホイルなどの、前記組成物を別個に保持する手段を含む。このようなキットの一例は、錠剤、カプセル剤などの包装に一般に使用されるようなブリストーパックである。

## 【0284】

本発明のキットは、たとえば経口と非経口の、異なる剤形を投与する、別個の組成物を異なる投薬間隔で投与する、または別個の組成物を互いに合わせて漸増するのに使用することもできる。服薬遵守を支援するために、本発明のキットは通常、投与の説明書を含む。

## 【0285】

本発明の併用療法では、本発明のペプチドまたはバイオコンジュゲートと他の治療薬は、同じまたは異なる製造業者によって製造および/または製剤化されたものでよい。さらに、本発明のペプチドまたはバイオコンジュゲートと他の治療薬は、(i)（たとえば、本発明の化合物と他の治療薬を含むキットの場合において）組合せ製品が医師に渡る前に、(ii)投与のすぐ前に医師自身によって（または医師の指導のもとで）、(iii)たとえば、本発明のポリペプチドまたはバイオコンジュゲートと他の治療薬が順次投与される際、患者自身で、併用療法に一体化されるものでよい。

10

20

30

40

50

## 【0286】

したがって、本発明は、医薬が別の治療薬との投与用に調製される、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの使用を提供する。本発明はまた、医薬が、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと投与される、アペリン受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための別の治療薬の使用も提供する。

## 【0287】

本発明はまた、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートが、別の治療薬との投与用に調製される、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態の治療方法において使用するための、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたは薬学的に許容されるその塩、またはそのバイオコンジュゲートを提供する。本発明はまた、他の治療薬が、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートとの投与用に調製される、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態の治療方法において使用するための、別の治療薬を提供する。本発明はまた、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを別の治療薬と投与する、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態の治療方法において使用するための、式I～IVのいずれか1つのポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを提供する。本発明はまた、他の治療薬を式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと投与する、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態の治療方法において使用するための、別の治療薬を提供する。

## 【0288】

本発明はまた、患者が、別の治療薬で（たとえば、24時間以内に）予め治療を受けている、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの使用を提供する。本発明はまた、患者が、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートで（たとえば、24時間以内に）予め治療を受けている、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための、別の治療薬の使用を提供する。

## 【0289】

一実施形態では、他の治療薬は、イノトロープ、アドレナリン性受容体遮断薬、H M G - C o A還元酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬、カルシウムチャネル遮断薬（CCB）、エンドセリン拮抗薬、レニン阻害薬、利尿薬、A p o A - I模倣薬、抗糖尿病薬、抗肥満薬（obesity-reducing agent）、アルドステロン受容体遮断薬、エンドセリン受容体遮断薬、アルドステロンシルバー阻害薬（ASI）、C E T P阻害薬、抗凝血薬、リラキシン、BNP（ネシリチド）、およびN E P阻害薬から選択される。

## 【0290】

第2の薬剤または治療と「組み合わせて」という用語は、本発明のポリペプチドまたはバイオコンジュゲート（たとえば、式I～IVのいずれか1つに従うポリペプチド、または本明細書に別な形で記載するポリペプチド）を第2の薬剤または治療と同時投与すること、最初に本発明の化合物を投与した後、第2の薬剤または治療を投与すること、および最初に第2の薬剤または治療を投与した後、本発明のペプチドからバイオコンジュゲートを投与することを包含する。

## 【0291】

用語「第2の薬剤」は、本明細書に記載の疾患または障害、たとえば、A P J受容体の

10

20

30

40

50

活性化に反応を示す障害または疾患、たとえば、急性非代償性心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症の症状を治療、予防、または軽減することが当業界で知られている任意の薬剤を包含する。

#### 【0292】

第2の薬剤の例としては、イノトロープ、アドレナリン性受容体遮断薬、HMG-CoA還元酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬、カルシウムチャネル遮断薬（CCB）、エンドセリン拮抗薬、レニン阻害薬、利尿薬、ApoA-I模倣薬、抗糖尿病薬、抗肥満薬、アルドステロン受容体遮断薬、エンドセリン受容体遮断薬、アルドステロンシルバー阻害薬（ASI）、CETP阻害薬、抗凝血薬、リラキシン、BNP（ネシリチド）、および/またはNEP阻害薬が挙げられる。10

#### 【0293】

本明細書で使用するイノトロープとしては、たとえば、ドブタミン、イソプロテレノール、ミルリノン、アミリノン（amrinone）、レボシメンダン、エピネフリン、ノルエピネフリン、イソプロテレノール、およびジゴキシンが挙げられる。

#### 【0294】

本明細書で使用するアドレナリン性受容体遮断薬としては、たとえば、アセプトロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソプロロール、カルテオロール、メトプロロール、ナドロール、プロプラノロール、ソタロール、およびチモロールが挙げられる。20

#### 【0295】

本明細書で使用する抗凝血薬としては、ダルテパリン、ダナパロイド、エノキサパリン、ヘパリン、チンザパリン、ワルファリンが挙げられる。

#### 【0296】

用語「HMG-CoA還元酵素阻害薬」（-ヒドロキシ-メチルグルタルリル-補酵素A還元酵素阻害薬とも呼ばれる）は、血中コレステロールを始めとする脂質レベルを下げるのに使用することのできる活性薬剤を包含する。例としては、アトルバスタチン、セリバスタチン、コンパクチン、ダルバスタチン、ジヒドロコンパクチン、フルインドストatin（fluindostatin）、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、メバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、リバスタチン（rivastatin）、シンバスタチン、およびベロスタチン（velostatin）、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。30

#### 【0297】

用語「ACE阻害薬」（アンジオテンシン変換酵素阻害薬とも呼ばれる）は、アンジオテンシンIをアンジオテンシンIIにする酵素的分解を妨げる分子を包含する。このような化合物は、血圧の調節およびうっ血性心不全の治療に使用することができる。例としては、アラセブリル、ベナゼブリル、ベナゼブリラート、カブトブリル、セロナブリル（ceronapril）、シラザブリル、デラブリル、エナラブリル、エナブリラート（enaprilat）、ホシノブリル、イミダブリル、リシノブリル、モエキシブリル、モベルトブリル（mavilopril）、ペリンドブリル、キナブリル、ラミブリル、スピラブリル、テモカブリル、およびトランドラブリル、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。40

#### 【0298】

用語「エンドセリン拮抗薬」は、ボセンタン（EP526708Aを参照のこと）、テゾセンタン（WO96/19459を参照のこと）、またはこれらの薬学的に許容される塩を包含する。

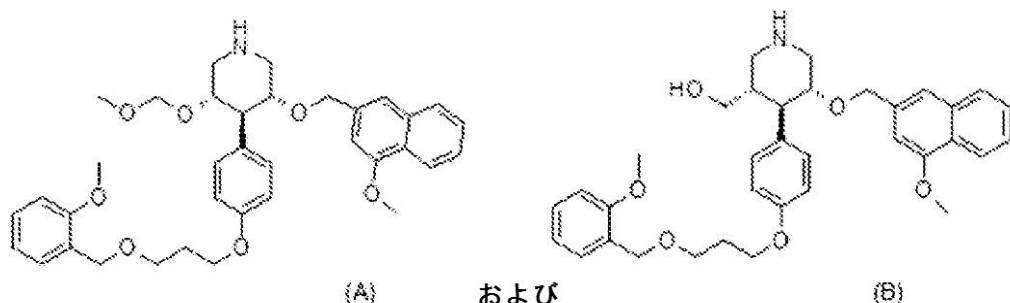
#### 【0299】

用語「レニン阻害薬」は、ジテキレン（ditekiren）（化学名：[1S-[1R\*,2R\*,4R\*](1R\*,2R\*)]-1-[（1,1-ジメチルエトキシ）カルボニル

] - L - プロリル - L - フェニルアラニル - N - [ 2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1 - ( 2 - メチルプロピル ) - 4 - [ [ [ 2 - メチル - 1 - [ [ ( 2 - ピリジニルメチル ) アミノ ] カルボニル ] ブチル ] アミノ ] カルボニル ] ヘキシリル ] - N - - メチル - L - ヒスチジンアミド ) ; テルラキレン ( 化学名 : [ R - ( R \* , S \* ) ] - N - ( 4 - モルホリニルカルボニル ) - L - フェニルアラニル - N - [ 1 - ( シクロヘキシリルメチル ) - 2 - ヒドロキシ - 3 - ( 1 - メチルエトキシ ) - 3 - オキソプロピル ] - S - メチル - L - システイネアミド ) ; アリスキレン ( 化学名 : ( 2 S , 4 S , 5 S , 7 S ) - 5 - アミノ - N - ( 2 - カルバモイル - 2 , 2 - ジメチルエチル ) - 4 - ヒドロキシ - 7 - { [ 4 - メトキシ - 3 - ( 3 - メトキシプロポキシ ) フェニル ] メチル } - 8 - メチル - 2 - ( プロパン - 2 - イル ) ノナンアミド ) およびザンキレン ( 化学名 : [ 1 S - [ 1 R \* [ R \* ( R \* ) ] , 2 S \* , 3 R \* ] ] - N - [ 1 - ( シクロヘキシリルメチル ) - 2 , 3 - ジヒドロキシ - 5 - メチルヘキシリル ] - - [ [ 2 - [ [ ( 4 - メチル - 1 - ピペラジニル ) スルホニル ] メチル ] - 1 - オキソ - 3 - フェニルプロピル ] - アミノ ] - 4 - チアゾールプロパンアミド ) 、もしくはこれらの塩酸塩、または Speede1 が開発した SPP630 、 SPP635 、および SPP800 、または式 ( A ) および ( B ) :

〔 0 3 0 0 〕

【化 3 0】



の R O 6 6 - 1 1 3 2 および R O 6 6 - 1 1 6 8 、またはこれらの薬学的に許容される塩を包含する。

[ 0 3 0 1 ]

用語「アリスキレン」は、詳細に定義しない場合、遊離塩基とその塩の両方、特に薬学的に許容されるその塩、最も好ましくはその半フマル酸塩であると理解される。

【 0 3 0 2 】

用語「カルシウムチャネル遮断薬（C C B）」は、ジヒドロピリジン（D H P）および非D H P（たとえば、ジルチアゼム型およびベラパミル型C C B）を包含する。例としては、アムロジピン、ペプリジル、ジルチアゼム、フェロジピン、リオシジン（ryosidine）、イスラジピン、ラシジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニグルジピン、ニルジピン（niludipine）、ニモジピン、ニソルジピン、ニトレングジピン、ベラパミル、およびニバルジピン（nivaldipine）が挙げられ、フルナリジン、プレニラミン、ジルチアゼム、フェンジリン、ガロパミル、ミベフラジル、アニパミル（anipamil）、チアパミル、およびベラパミル、またはこれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される代表的非D H Pであることが好ましい。C C Bは、降圧薬、抗狭心症薬、または抗不整脈薬として使用することができる。

【 0 3 0 3 】

用語「利尿薬」は、チアジド誘導体（たとえば、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、メチルクロロチアジド (methylclothiazide)、およびクロロタリドン (chlorothalidone)）を包含する。

【 0 3 0 4 】

用語「A p o A - I 模倣薬」は、D 4 F ペプチド（たとえば、式 D - W - F - K - A - F - Y - D - K - V - A - E - K - F - K - E - A - F）を包含する。

【 0 3 0 5 】

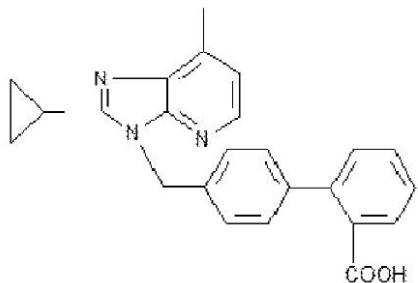
アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬または薬学的に許容されるその塩は、アンジオテンシンⅡ受容体のAT<sub>1</sub>受容体サブタイプに結合するが、結果として受容体を活性化しない活性成分であると理解される。AT<sub>1</sub>受容体が抑制される結果として、こうした拮抗薬は、たとえば、降圧薬として、またはうっ血性心不全の治療に用いることができる。

## 【0306】

AT<sub>1</sub>受容体拮抗薬のクラスは、構造上の特色が異なっている化合物を含み、実用上好ましいのは、非ペプチド性化合物である。たとえば、バルサルタン、ロサルタン、カンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、サプリサルタン(saprisartan)、タソサルタン、テルミサルタン、次式

## 【0307】

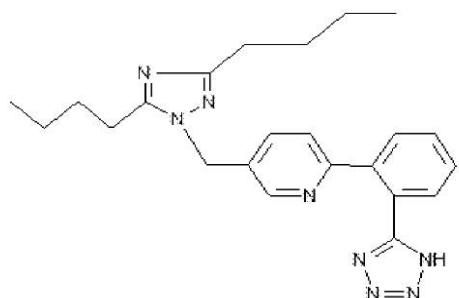
## 【化31】



のE-1477という呼称の化合物、次式

## 【0308】

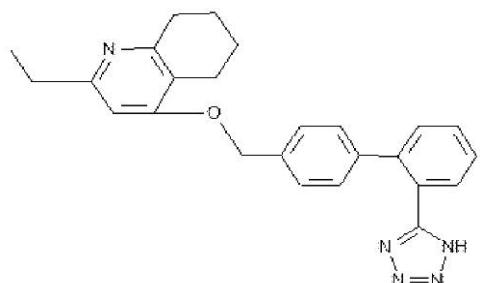
## 【化32】



のSC-52458という呼称の化合物、および次式

## 【0309】

## 【化33】



のZD-8731という呼称の化合物、または、各場合において、薬学的に許容されるその塩からなる群から選択される化合物を挙げることができる。

## 【0310】

好ましいAT<sub>1</sub>受容体拮抗薬は、カンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、テルミサルタン、バルサルタンである。他にも好ましいのは、市販されている薬剤であり、最も好ましいのは、バルサルタンまたは薬学的に許容されるその塩である。

## 【0311】

10

20

30

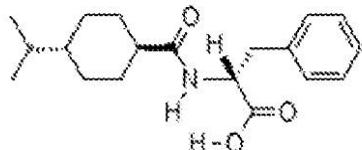
40

50

用語「抗糖尿病薬」は、膵臓細胞からのインスリンの分泌を促進するインスリン分泌増強剤を包含する。例としては、ビゲアナイド誘導体（たとえば、メトホルミン）、スルホニル尿素（S U）（たとえば、トルブタミド、クロルプロパミド、トラザミド、アセトヘキサミド、4 - クロロ - N - [ ( 1 - ピロリジニルアミノ ) カルボニル ] - ベンゼンスルホニアミド（グリコピルアミド（glycopyramide））、グリベンクラミド（グリブリド）、グリクラジド、1 - プチル - 3 - メタニリル尿素、カルブタミド（carbutamide）、グリボヌリド（glibonuride）、グリビジド、グリキドン、グリソキセピド、グリブチアゾール（glybuthiazole）、グリブゾール（glibuzole）、グリヘキサミド（glyhexamide）、グリミジン、グリピンアミド（glypinamide）、フェンブタニド（phenbutanide）、およびトリルシクラミド（tolylcyclamide））、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。別の例としては、フェニルアラニン誘導体（たとえば、式

【0312】

【化34】



のナテグリニド [ N - ( trans - 4 - イソプロピルシクロヘキシルカルボニル ) - D - フェニルアラニン ] ( E P 1 9 6 2 2 2 および E P 5 2 6 1 7 1 を参照のこと)、レバグリニド [ ( S ) - 2 - エトキシ - 4 - { 2 - [ [ 3 - メチル - 1 - [ 2 - ( 1 - ピペリジニル ) フェニル ] プチル ] アミノ ] - 2 - オキソエチル } 安息香酸 ] ( E P 5 8 9 8 7 4、E P 1 4 7 8 5 0 A 2、詳細には、61頁の実施例11、および E P 2 0 7 3 3 1 A 1 を参照のこと)、カルシウム ( 2 S ) - 2 - ベンジル - 3 - ( cis - ヘキサヒドロ - 2 - イソインドリンリカルボニル ) - プロピオネート二水和物（たとえば、ミチグリニド（E P 5 0 7 5 3 4 を参照のこと））、およびグリメピリド（E P 3 1 0 5 8 を参照のこと）が挙げられる。

【0313】

本発明のペプチドおよびポリペプチドと組み合わせて使用することのできる第2の薬剤の別の例として、DPP - IV 阻害薬、GLP - 1 および GLP - 1 アゴニストが挙げられる。

【0314】

DPP - IV は、GLP - 1 の不活性化を担う。より詳細には、DPP - IV は、GLP - 1 受容体アンタゴニストを発生させ、それによって GLP - 1 に対する生理的反応が短縮される。GLP - 1 は、膵臓のインスリン分泌の主要な刺激物質であり、グルコース処理に直接有益な影響を及ぼす。

【0315】

DPP - IV (ジペプチジルペプチダーゼIV) 阻害薬は、ペプチド性でも、または好ましくは、非ペプチド性でもよい。DPP - IV 阻害薬は、各場合につき、たとえば、W O 9 8 / 1 9 9 9 8、D E 1 9 6 1 6 4 8 6 A 1、W O 0 0 / 3 4 2 4 1、および W O 9 5 / 1 5 3 0 9 において、各場合につき、特に、化合物請求項および作業実施例の最終生成物において全般かつ詳細に開示されており、最終生成物、医薬調製物、および特許請求の範囲の主題は、これら刊行物を参照することにより、本明細書に援用される。好ましいのは、それぞれ、W O 9 8 / 1 9 9 9 8 の実施例3およびW O 0 0 / 3 4 2 4 1 の実施例1において詳細に開示されている化合物である。

【0316】

GLP - 1 (グルカゴン様ペプチド1) は、たとえば、W.E. SchmidtらによるDiabetologia, 28, 1985, 704-707およびU S 5, 7 0 5, 4 8 3 に記載されているインスリン分泌性タンパク質である。

10

20

30

40

50

## 【0317】

用語「GLP-1アゴニスト」は、特にUSS<sub>5</sub>, 120, 712、USS<sub>5</sub>, 118666、USS<sub>5</sub>, 512, 549、WO91/11457、およびC. OrskovらによるJ. Biol. Chem. 264 (1989) 12826において開示されているGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>の変異体および類似体を包含する。別の例としては、化合物中GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>分子の第37位においてArg<sup>3</sup><sup>6</sup>のカルボキシ末端側アミド官能基がGlyで置換されているGLP-1(7-37)、ならびにGLN<sup>9</sup>-GLP-1(7-37)、D-GLN<sup>9</sup>-GLP-1(7-37)、アセチルLYS<sup>9</sup>-GLP-1(7-37)、LYS<sup>18</sup>-GLP-1(7-37)、特にGLP-1(7-37)OH、VAL<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)、GLY<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)、THR<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)、MET<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)、および4-イミダゾプロピオニル-GLP-1を含めたその変異体および類似体が挙げられる。GreigらによるDiabetologia 1999, 42, 45-50に記載されているGLPアゴニスト類似体エキセンディン-4も、特に好まれる。  
10

## 【0318】

定義「抗糖尿病薬」には、損なわれたインスリン受容体機能を回復させて、インスリン抵抗性を減らし、その結果としてインスリン感受性を増強するインスリン感受性増強剤も含まれる。例としては、血糖降下性チアゾリジンジオン誘導体（たとえば、グリタゾン、(S)-((3,4-ジヒドロ-2-(フェニル-メチル)-2H-1-ベンゾピラン-6-イル)メチル-チアゾリジン-2,4-ジオン（エングリタゾン）、5-[4-(3-(5-メチル-2-フェニル-4-オキサゾリル)-1-オキソプロピル)-フェニル]-メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン（ダルグリタゾン）、5-[4-(1-メチル-シクロヘキシリル)メトキシ]-フェニル]メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン（シグリタゾン）、5-[4-(2-(1-インドリル)エトキシ)フェニル]メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(DRF2189)、5-[4-[2-(5-メチル-2-フェニル-4-オキサゾリル)-エトキシ]ベンジル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(BM-13.1246)、5-(2-ナフチルスルホニル)-チアゾリジン-2,4-ジオン(AY-31637)、ビス{4-[2,4-ジオキソ-5-チアゾリジニル]メチル}フェニル}メタン(YM268)、5-[4-[2-(5-メチル-2-フェニル-4-オキサゾリル)-2-ヒドロキシエトキシ]ベンジル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(AD-5075)、5-[4-(1-フェニル-1-シクロブロパンカルボニルアミノ)-ベンジル]-チアゾリジン-2,4-ジオン(DN-108)、5-[4-(2-(2,3-ジヒドロインドール-1-イル)エトキシ)フェニル]メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン、5-[3-(4-クロロ-フェニル)]-2-プロピニル]-5-フェニルスルホニル)チアゾリジン-2,4-ジオン、5-[3-(4-クロロフェニル)]-2-プロピニル]-5-(4-フルオロフェニル-スルホニル)チアゾリジン-2,4-ジオン、5-[4-(2-(メチル-2-ピリジニル-アミノ)-エトキシ)フェニル]メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(ロシグリタゾン)、5-[4-(2-(5-エチル-2-ピリジル)エトキシ)フェニル]メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(ピオグリタゾン)、5-[4-(3,4-ジヒドロ-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル-2H-1-ベンゾピラン-2-イル)メトキシ]-フェニル}メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(トログリタゾン)、5-[6-(2-フルオロ-ベンジルオキシ)ナフタレン-2-イルメチル]-チアゾリジン-2,4-ジオン(MCC555)、5-[2-(2-ナフチル)-ベンゾオキサゾール-5-イル]メチル}-チアゾリジン-2,4-ジオン(T-174)および5-(2,4-ジオキソチアゾリジン-5-イルメチル)-2-メトキシ-N-(4-トリフルオロメチル-ベンジル)ベンズアミド(KRP297)）が挙げられる。  
20  
30  
40

## 【0319】

これ以外の抗糖尿病薬としては、タンパク質チロシンホスファターゼ(PTPアーゼ)の阻害薬、抗糖尿病性非小分子模倣化合物、グルタミン-フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼ(GFAT)の阻害薬のような、インスリンシグナル伝達経路モジ  
50

ユレーター；グルコース - 6 - ホスファターゼ (G 6 P アーゼ) の阻害薬、フルクトース - 1 , 6 - ビスホスファターゼ (F - 1 , 6 - B p アーゼ) の阻害薬、グリコーゲンホスホリラーゼ (G P ) の阻害薬、グルカゴン受容体拮抗薬、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (P E P C K ) の阻害薬のような、肝臓グルコース産生の調節不全に影響を及ぼす化合物；ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (P D H K ) 阻害薬；胃内容排出の阻害薬；インスリン；G S K - 3 の阻害薬；レチノイドX受容体 (R X R ) アゴニスト；- 3 A R のアゴニスト；脱共役タンパク質 (U C P ) のアゴニスト；非グリタゾン型 P P A R アゴニスト；P P A R / P P A R 二重アゴニスト；抗糖尿病性含バナジウム化合物；グルカゴン様ペプチド 1 (G L P - 1 ) や G L P - 1 アゴニストのようなインクレチンホルモン；細胞イミダゾリン受容体アンタゴニスト；ミグリトール；<sub>2</sub>-アドレナリンアンタゴニスト；ならびにこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。  
10

## 【0320】

一実施形態では、本発明は、治療有効量の式 I ~ I V のいずれか 1 つの定義に従うポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートと、アセブトロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソプロロール、メトプロロール、ナドロール、プロプラノロール、ソタロール、チモロールなどの - アドレナリン受容体遮断薬；A T 1 遮断薬などのアンジオテンシン I I 受容体アンタゴニスト；D P P I V 阻害薬（たとえば、ビルダグリプチン）や G L P 1 ペプチドアゴニストなどの抗糖尿病薬から選択される 1 種または複数の治療活性薬剤とを含む組合せ、詳細には医薬的組合せを提供する。  
20

## 【0321】

用語「抗肥満薬」は、リパーゼ阻害薬（たとえば、オーリスタッフ）および食欲抑制薬（たとえば、シブトラミンおよびフェンテルミン）を包含する。

## 【0322】

アルドステロンシンターゼ阻害薬または薬学的に許容されるその塩は、アルドステロンの產生を抑制する特性を有する活性成分であると理解される。アルドステロンシンターゼ (C Y P 1 1 B 2 ) は、副腎皮質におけるアルドステロン產生の最後のステップ、すなわち、1 1 - デオキシコルチコステロンのアルドステロンへの変換を触媒する、ミトコンドリアのシトクロム P 4 5 0 酵素である。いわゆるアルドステロンシンターゼ阻害薬によるアルドステロン產生の抑制は、低カリウム血症、高血圧、うっ血性心不全、心房細動、または腎不全の治療に奏効する変異形態であることが知られている。このようなアルドステロンシンターゼ抑制活性は、当業者によって、標準のアッセイ（たとえば、U S 2 0 0 7 / 0 0 4 9 6 1 6 ）に従い、容易に見極められる。  
30

## 【0323】

アルドステロンシンターゼ阻害薬のクラスは、ステロイド性および非ステロイド性両方のアルドステロンシンターゼ阻害薬を含み、後者が最も好ましい。

## 【0324】

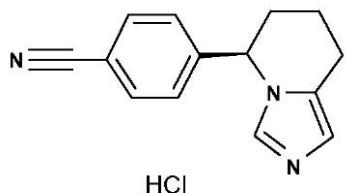
市販品として入手可能なアルドステロンシンターゼ阻害薬または保健当局によって承認されているアルドステロンシンターゼ阻害薬が好ましい。

## 【0325】

アルドステロンシンターゼ阻害薬のクラスは、構造上の特色が異なっている化合物を含む。非ステロイド性アルドステロンシンターゼ阻害薬の例は、式  
40

## 【0326】

## 【化35】



のファドロゾールの塩酸塩（米国特許4617307および4889861）の（+）鏡像異性体、または適切な場合、薬学的に許容されるその塩である。 10

## 【0327】

前記組合せにおいて有用なアルドステロンシンターゼ阻害薬は、たとえば、U.S. 2,007,004,961において、特に、化合物請求項および作業実施例の最終生成物において全般かつ詳細に開示されている化合物および類似体であり、最終生成物、医薬調製物、および特許請求の範囲の主題は、この刊行物を参照することにより、本明細書に援用される。本発明における使用に適する好ましいアルドステロンシンターゼ阻害薬としては、限定はせず、4-（6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-イル）-3-メチルベンゾニトリル；5-（2-クロロ-4-シアノフェニル）-6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-カルボン酸（4-メトキシベンジル）メチルアミド；4'-フルオロ-6-（6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-イミダゾ[1,5-a]アゼピン-5-イル）ビフェニル-3-カルボニトリル；5-（4-シアノ-2-メトキシフェニル）-6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-カルボン酸ブチルエステル；4-（6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-イル）-2-メトキシベンゾニトリル；5-（2-クロロ-4-シアノフェニル）-6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-カルボン酸4-フルオロベンジルエステル；5-（4-シアノ-2-トリフルオロメトキシフェニル）-6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-カルボン酸メチルエステル；5-（4-シアノ-2-メトキシフェニル）-6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-カルボン酸2-イソプロポキシエチルエステル；4-（6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-イル）-2-メチルベンゾニトリル；4-（6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-イル）-3-フルオロベンゾニトリル；4-（6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-イル）-2-メトキシベンゾニトリル；3-フルオロ-4-（7-メチレン-6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[1,2-c]イミダゾール-5-イル）ベンゾニトリル；c i s - 3-フルオロ-4-（7-（4-フルオロ-ベンジル）-5,6,7,8-テトラヒドロ-イミダゾ[1,5-a]ピリジン-5-イル）ベンゾニトリル；4'-フルオロ-6-（9-メチル-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-イミダゾ[1,5-a]アゼピン-5-イル）ビフェニル-3-カルボニトリル；4'-フルオロ-6-（9-メチル-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-イミダゾ[1,5-a]アゼピン-5-イル）ビフェニル-3-カルボニトリル、または各場合において、その（R）もしくは（S）鏡像異性体、または適切な場合、薬学的に許容されるその塩が挙げられる。 40

## 【0328】

用語アルドステロンシンターゼ阻害薬は、WO 2008/076860、WO 2008/076336、WO 2008/076862、WO 2008/027284、WO 2004/046145、WO 2004/014914、WO 2001/076574で開示されている化合物および類似体も包含する。

## 【0329】

さらに、アルドステロンシンターゼ阻害薬は、米国特許出願U.S. 2007/0225232、U.S. 2007/0208035、U.S. 2008/0318978、U.S. 2008/ 50

0076794、U.S.2009/0012068、U.S.20090048241、および  
 PCT出願WO2006/005726、WO2006/128853、WO20061  
 28851、WO2006/128852、WO2007065942、WO2007/  
 116099、WO2007/116908、WO2008/119744、および欧洲  
 特許出願EP1886695において開示されている化合物および類似体も包含する。本  
 発明における使用に適する好ましいアルドステロンシターゼ阻害薬として、限定はせず  
 、Speedelが開発した8-(4-フルオロフェニル)-5,6-ジヒドロ-8H-  
 イミダゾ[5,1-c][1,4]オキサジン；4-(5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ  
 [5,1-c][1,4]オキサジン-8-イル)-2-フルオロベンゾニトリル；4-  
 (5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1,4]オキサジン-8-イル)  
 -2,6-ジフルオロベンゾニトリル；4-(5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,  
 1-c][1,4]オキサジン-8-イル)-2-メトキシベンゾニトリル；3-(5,  
 6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1,4]オキサジン-8-イル)ベン  
 ゾニトリル；4-(5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1,4]オキサ  
 ジン-8-イル)フタロニトリル；4-(8-(4-シアノフェニル)-5,6-ジヒド  
 ロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1,4]オキサジン-8-イル)ベンゾニトリル；  
 4-(5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1,4]オキサジン-8-イル)  
 ベンゾニトリル；4-(5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1,4]  
 ]オキサジン-8-イル)ナフトレン-1-カルボニトリル；8-[4-(1H-テトラ  
 ゾール-5-イル)フェニル]-5,6-ジヒドロ-8H-イミダゾ[5,1-c][1  
 ,4]オキサジン、または各場合において、その(R)もしくは(S)鏡像異性体、または  
 適切な場合、薬学的に許容されるその塩が挙げられる。  
 10  
 20  
 20

### 【0330】

前記組合せにおいて有用なアルドステロンシターゼ阻害薬は、たとえば、WO200  
 9/156462およびWO2010/130796において、特に、化合物請求項およ  
 び作業実施例の最終生成物において全般かつ詳細に開示されている化合物および類似体、  
 最終生成物、医薬調製物、および特許請求の範囲の主題である。本発明における組合せに  
 適する好ましいアルドステロンシターゼ阻害薬としては、3-(6-フルオロ-3-メ  
 チル-2-ピリジン-3-イル-1H-インドール-1-イルメチル)-ベンゾニトリル  
 ヒドロクロリド、1-(4-メタンスルホニル-ベンジル)-3-メチル-2-ピリジン  
 -3-イル-1H-インドール、2-(5-ベンジルオキシ-ピリジン-3-イル)-6  
 -クロロ-1-メチル-1H-インドール、5-(3-シアノ-1-メチル-1H-イン  
 ドール-2-イル)-ニコチン酸エチルエステル、N-[5-(6-クロロ-3-シアノ  
 -1-メチル-1H-インドール-2-イル)-ピリジン-3-イルメチル]-エタンス  
 ルホンアミド、ピロリジン-1-スルホン酸 5-(6-クロロ-3-シアノ-1-メチ  
 尔-1H-インドール-2-イル)-ピリジン-3-イルエステル、N-メチル-N-[  
 5-(1-メチル-1H-インドール-2-イル)-ピリジン-3-イルメチル]-メタ  
 ンスルホンアミド、6-クロロ-1-メチル-2-{5-[2-ピロリジン-1-イル  
 -エチルアミノ)-メチル]-ピリジン-3-イル}-1H-インドール-3-カルボニ  
 トリル、6-クロロ-2-[5-(4-メタンスルホニル-ピペラジン-1-イルメチル  
 )-ピリジン-3-イル]-1-メチル-1H-インドール-3-カルボニトリル、6-  
 クロロ-1-メチル-2-{5-[1-メチル-ピペリジン-4-イルアミノ)-メチ  
 尔]-ピリジン-3-イル}-1H-インドール-3-カルボニトリル、モルホリン-4  
 -カルボン酸[5-(6-クロロ-3-シアノ-1-メチル-1H-インドール-2-イル)-  
 ピリジン-3-イルメチル]-アミド、N-[5-(6-クロロ-1-メチル-1  
 H-インドール-2-イル)-ピリジン-3-イルメチル]-エタンスルホンアミド、C  
 , C, C-トリフルオロ-N-[5-(1-メチル-1H-インドール-2-イル)-ピ  
 リジン-3-イルメチル]-メタンスルホンアミド、N-[5-(3-クロロ-4-シア  
 ノ-フェニル)-ピリジン-3-イル]-4-トリフルオロメチル-ベンゼンスルホンア  
 ミド、N-[5-(3-クロロ-4-シアノ-フェニル)-ピリジン-3-イル]-1-  
 30  
 40  
 50

フェニル - メタンスルホンアミド、N - ( 5 - ( 3 - クロロ - 4 - シアノフェニル ) ピリジン - 3 - イル ) ブタン - 1 - スルホンアミド、N - ( 1 - ( 5 - ( 4 - シアノ - 3 - メトキシフェニル ) ピリジン - 3 - イル ) エチル ) エタンスルホンアミド、N - ( ( 5 - ( 3 - クロロ - 4 - シアノフェニル ) ピリジン - 3 - イル ) ( シクロプロピル ) メチル ) エタンスルホンアミド、N - ( シクロプロピル ( 5 - ( 1 H - インドール - 5 - イル ) ピリジン - 3 - イル ) メチル ) エタンスルホンアミド、N - ( シクロプロピル ( 5 - ナフタレン - 1 - イル - ピリジン - 3 - イル ) メチル ) エタンスルホンアミド、エタンスルホン酸 [ 5 - ( 6 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - ピロロ [ 2 , 3 - b ] ピリジン - 2 - イル ) - ピリジン - 3 - イルメチル ] - アミドおよびエタンスルホン酸 { [ 5 - ( 3 - クロロ - 4 - シアノ - フェニル ) - ピリジン - 3 - イル ] - シクロプロピル - メチル } - エチル - アミドが挙げられる。 10

### 【 0 3 3 1 】

用語「エンドセリン受容体遮断薬」は、ボセンタンおよびアンブリセンタンを包含する。 。

### 【 0 3 3 2 】

用語「C E T P 阻害薬」とは、コレステリルエステル転送タンパク質 ( C E T P ) を媒介とする、種々のコレステリルエステルおよびトリグリセリドのH D L からL D L およびV L D Lへの輸送を抑制する化合物を指す。このようなC E T P 抑制活性は、当業者によって、標準のアッセイ(たとえば、米国特許第6 , 1 4 0 , 3 4 3号)に従い、容易に見極められる。例として、米国特許第6 , 1 4 0 , 3 4 3号および米国特許第6 , 1 9 7 , 7 8 6号で開示されている化合物(たとえば、[ 2 R , 4 S ] 4 - [ ( 3 , 5 - ビス - トリフォルオロメチル - ベンジル ) - メトキシカルボニル - アミノ ] - 2 - エチル - 6 - トリフォルオロメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - キノリン - 1 - カルボン酸エチルエステル(トルセトラピブ)、米国特許第6 , 7 2 3 , 7 5 2号で開示されている化合物(たとえば、( 2 R ) - 3 - { [ 3 - ( 4 - クロロ - 3 - エチル - フェノキシ ) - フェニル ] - [ [ 3 - ( 1 , 1 , 2 , 2 - テトラフルオロ - エトキシ ) - フェニル ] - メチル ] - アミノ } - 1 , 1 , 1 - トリフルオロ - 2 - プロパンオール)、米国特許出願第1 0 / 8 0 7 , 8 3 8号で開示されている化合物、米国特許第5 , 5 1 2 , 5 4 8号で開示されているポリペプチド誘導体、それぞれJ. Antibiot., 49(8): 815- 816 (1996)およびBioorg. Med. Chem. Lett.; 6:1951-1954 (1996)で開示されている口セノノラクトン誘導体およびコレステリルエステルの含リン酸類似体が挙げられる。さらに、C E T P 阻害薬として、W O 2 0 0 0 / 0 1 7 1 6 5、W O 2 0 0 5 / 0 9 5 4 0 9、W O 2 0 0 5 / 0 9 7 8 0 6、W O 2 0 0 7 / 1 2 8 5 6 8、W O 2 0 0 8 / 0 0 9 4 3 5、W O 2 0 0 9 / 0 5 9 9 4 3、およびW O 2 0 0 9 / 0 7 1 5 0 9で開示されているものも挙げられる。 20

### 【 0 3 3 3 】

用語「N E P 阻害薬」とは、中性エンドペプチダーゼ ( N E P ) E C 3 . 4 . 2 4 . 1 1を抑制する化合物を指す。例として、カンドキサトリル、カンドキサトリラート、デキセカドトリル ( Dexecadotril ) 、エカドトリル ( Ecadotril ) 、ラセカドトリル、サンパトリラート ( Sampatrilat ) 、ファシドトリル、オマパトリラート、ゲモパトリラート ( G emopatrilat ) 、ダグルトリル ( Daglutril ) 、S C H - 4 2 4 9 5、S C H - 3 2 6 1 5、U K - 4 4 7 8 4 1、A V E - 0 8 4 8、P L - 3 7、および( 2 R , 4 S ) - 5 - ピフェニル - 4 - イル - 4 - ( 3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ ) - 2 - メチル - ペンタン酸エチルエステル、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。N E P 阻害薬には、米国特許第U S 5 , 1 5 5 , 1 0 0号で開示されているようなホスホノ / ピアリール置換ジペプチド誘導体も含まれる。N E P 阻害薬には、P C T 出願第W O 2 0 0 3 / 1 0 4 2 0 0号で開示されているようなN - メルカプトアシリルフェニルアラニン誘導体も含まれる。N E P 阻害薬には、P C T 出願第W O 2 0 0 8 / 1 3 3 8 9 6、W O 2 0 0 9 / 0 3 5 5 4 3、またはW O 2 0 0 9 / 1 3 4 7 4 1で開示されているような二重作用性降圧薬も含まれる。他の例としては、U S 出願第1 2 / 7 8 8 , 7 9 4号、第1 2 / 7 8 8 , 7 6 6号、および第1 2 / 9 4 7 , 0 2 9号で開示されている化合物が挙げられる。 40

N E P 阻害薬として、W O 2 0 1 0 / 1 3 6 4 7 4、W O 2 0 1 0 / 1 3 6 4 9 3、W O 2 0 1 1 / 0 6 1 2 7 1、ならびにU S 仮出願第6 1 / 4 1 4 1 7 1号および第6 1 / 4 1 4 1 6 3号で開示されている化合物も挙げられる。

#### 【 0 3 3 4 】

一実施形態では、本発明は、対象においてA P J受容体を活性化する方法であって、治療有効量の、式I～IVのいずれか1つの定義に従うポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを対象に投与する工程を含む方法を提供する。

#### 【 0 3 3 5 】

一実施形態では、本発明は、対象において、A P J受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療する方法であって、治療有効量の、式I～IVのいずれか1つの定義に従うポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを対象に投与する工程を含む方法を提供する。 10

#### 【 0 3 3 6 】

一実施形態では、本発明は、対象において、A P J受容体の活性化（アゴニズム）に反応を示す障害または疾患を治療する方法であって、障害または疾患が、急性非代償性心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症から選択される方法を提供する。 20

#### 【 0 3 3 7 】

一実施形態では、本発明は、医薬として使用するための、式I～IVのいずれか1つの定義に従うポリペプチドまたはそのバイオコンジュゲートを提供する。

#### 【 0 3 3 8 】

一実施形態では、本発明は、A P J受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療するための医薬の製造における、式I～IVのいずれか1つの定義に従うポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、A P J受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療するための医薬の製造における、式I～IVのいずれか1つの定義に従うポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートの使用であって、前記障害または疾患が、詳細には、急性非代償性心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症から選択される、使用を提供する。 30

#### 【 実施例 】

#### 【 0 3 3 9 】

本発明の例示：ペプチドおよびポリペプチド合成

#### 【 0 3 4 0 】

40

【表5-1】

略語	定義	
AA	アミノ酸	
Ac	アセチル	
Acm	アセトアミドメチル	
ACN	アセトニトリル	
AcOH	酢酸	
Ac <sub>2</sub> O	無水酢酸	
ε-Ahx	ε-アミノヘキサン酸	10
AM	アミノメチル	
BAL	主鎖(backbone)アミドリンカー	
BSA	ウシ血清アルブミン	
Boc	tert-ブチルオキシカルボニル	
Bzl	ベンジル	
DCM	ジクロロメタン	
DIC	N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド	
DIPEA	N,N'-ジイソプロピルエチルアミン	
DMA	N,N'-ジメチルアセトアミド	20
DMF	N,N'-ジメチルホルムアミド	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
DTT	ジチオトレイトール	
DVB	ジビニルベンゼン	
EDT	エタンジチオール	
FA	ギ酸	
Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル	
HATU	2-(1H-9-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート	30
HBSS	ハンクス緩衝塩溶液	
HCTU	2-(6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート	
HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸	
HFIP	ヘキサフルオロイソプロパノール	
HOAt	1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール	
HSA	ヒト血清アルブミン	
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	
HRMS	高分解能質量分析	40
ivDde	(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)-3-メチルブチル	
LN	Logarithmus naturali(自然対数)	

【0341】

【表 5 - 2】

MeOH	メタノール
MS	質量分析
Nal	2-ナフチルアラニン
Nle	ノルロイシン
NMP	N-メチルピロリジン
Oxyma Pure	エチル 2-シアノ-2-(ヒドロキシイミノ)アセテート
Pbf	2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル
pE	ピログルタミン酸
PG	保護基
PBS	リン酸緩衝食塩水
Ph	フェニル
PhP	フェニルプロリン
Pip	ピペコリン酸
Pol	ポリマー支持体
PS	ポリスチレン
rt	室温
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
SPPS	固相ペプチド合成
TBME	tert-ブチルメチルエーテル
TCEP	トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン
tBuOH	tert-ブタノール
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
TIS、TIPS	トリイソプロピルシラン
t <sub>R</sub>	保持時間
Trt	トリチル
UPLC	超高速液体クロマトグラフィー
UV	紫外線

## 【0342】

ペプチドは、標準の固相 F m o c 化学によって合成した。ペプチドは、P r e l u d e (商標)ペプチド合成装置 ( P r o t e i n T e c h n o l o g i e s , I n c . 、米国トゥーソン) および L i b e r t y マイクロ波ペプチド合成装置 ( C E M C o r p o r a t i o n 、米国ノースカロライナ) において組み立てた。C 末端上に遊離カルボン酸、またはC 末端上にN, N - 二置換カルボキサミドを有するペプチドは、2 - クロロトリチルクロリド - P S - 樹脂 ( A B C R 、ドイツ国カールスルーエ、またはA n a S p e c , I n c . 、米国カリフォルニア州) から合成した。C 末端上に非置換カルボキサミドを有するペプチドは、F m o c 保護されたR i n k - A m i d e - A M - P S 樹脂 ( M e r c k 、ドイツ国ダルムシュタット) から合成した。C 末端上にNで一置換されているカルボキサミドを有するペプチドは、アミンが導入されたB A L - A M - P S 樹脂 ( E M C M i c r o c o l l e c t i o n s 、ドイツ国チュービンゲン) から合成した。

## 【0343】

ペプチドは、分取逆相 H P L C によって精製した。次のカラムを使用した。  
- Waters SunFire Prep C 18 O B D カラム、5 μm、30 × 100 mm、部品番号 186002572 ( カラム 1 本または連続したカラム 2 本 )

- Waters Atlantis Prep OBD T3カラム、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、30  
 $\times 150\text{ mm}$ 、部品番号 186003703

- Waters SunFire Prep C18 OBDカラム、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、30  
 $\times 50\text{ mm}$ 、部品番号 186002572

**【0344】**

移動相は、溶離液 A (0.1% TFA  $\text{H}_2\text{O}$  水溶液) と溶離液 B (ACN) からなるものとした。勾配は、分離の問題の特定の要件に基づき設計した。純粋な生成物を ACN /  $\text{H}_2\text{O}$  から凍結乾燥した。

**【0345】**

生成物は、 $= 214\text{ nm}$ でのUV検出を使用する分析HPLCおよびエレクトロスプレーイオン化を使用するUPLC-MSによって分析した。10

**【0346】**

表4において例示するペプチドは、以下に記載する一般手順を使用して合成した。非置換のN末端またはC末端は、それぞれ、イタリック体のH - または - OHで示す。

**【0347】**

**【表6-1】**

表 4

実施例	配列
実施例 1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH
実施例 2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(フェネチル)
実施例 3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH
実施例 4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH <sub>2</sub>
実施例 5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-OH
実施例 6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH
実施例 7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH
実施例 8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-OH
実施例 9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(フェネチル)
実施例 10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-OH
実施例 11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(フェネチル)
実施例 12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH
実施例 13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH

**【0348】**

20

30

【表 6 - 2】

実施例 14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
実施例 15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
実施例 16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
実施例 17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
実施例 18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-OH	
実施例 19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	10
実施例 20	pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
実施例 21	pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
実施例 22	pE-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
実施例 23	pE-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-OH	
実施例 24	pE-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-OH	
実施例 25	pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH <sub>2</sub>	
実施例 26	pE-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-OH	
実施例 27	pE-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-OH	
実施例 28	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH	20
実施例 29	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH	
実施例 30	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(フェネチル)	
実施例 31	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(フェネチル)	
実施例 32	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)	
実施例 33	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
実施例 34	pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-OH	
実施例 35	pE-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
実施例 35	H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-OH	30
実施例 36	pE-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-OH	
実施例 37	pE-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-OH	
実施例 38	pE-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-OH	

「\*」で印を付けた 2 つのアミノ酸は、その側鎖を介してジスルフィド結合またはアミド結合を形成しているアミノ酸を表す

#### 分析方法

##### 1 a ) H P L C - 分析方法 A

- カラム : Waters X Bridge (商標) C 18 (50 × 4.0 mm)、3.5 μm、部品番号 : 186003031
- 溶離液 A : 0.07% TFA 水溶液 / 溶離液 B : 0.1% TFA A C N 溶液
- 流量 : 1.5 ml / 分
- 温度 : 40
- 勾配 :

【0349】

【表7】

時間[分]	A [%]	B [%]
0.0	95	5
10.0	0	100
12.0	0	100
12.2	95	5

## 【0350】

1 b ) H P L C - 分析方法B

10

- カラム : X B r i d g e B E H 3 0 0 C 1 8 ( 1 0 0 × 4 . 6 m m ) 、 3 . 0 μm、部品番号 : 1 8 6 0 0 3 6 1 2
- 溶離液 A : 0 . 1 % T F A 水溶液 / 溶離液 B : 0 . 1 % T F A A C N 溶液
- 流量 : 1 . 0 m l / 分
- 温度 : 4 0
- 勾配 :

## 【0351】

【表8】

時間[分]	A[%]	B[%]
0.0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

## 【0352】

2 a ) U P L C - M S - 分析方法C

20

- カラム : A c q u i t y U P L C ( 登録商標 ) B E H 3 0 0 C 1 8 ( 5 0 × 2 . 1 m m ) 、 1 . 7 μm、部品番号 : 1 8 6 0 0 3 6 8 5
- 溶離液 A : 0 . 0 5 % T F A 水溶液 / 溶離液 B : 0 . 0 4 % T F A A C N 溶液
- 流量 : 1 . 0 m l / 分
- 温度 : 8 0
- 勾配 :

30

## 【0353】

【表9】

時間[分]	A [%]	B [%]
0.0	100	0
0.2	100	0
4.4	2	98
4.8	2	98
4.9	100	0
5.0	100	0

40

## 【0354】

2 b ) U P L C - H R M S - 分析方法D

- Waters A c q u i t y U P L C ( 登録商標 ) B E H C 1 8 、 1 . 7 μm、 2 . 1 × 5 0 m m 、 部品番号 : 1 8 6 0 0 2 3 5 0
- 溶離液 A : 0 . 0 5 % F A + 3 . 7 5 m M の酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B : 0 . 0 4 % F A A C N 溶液
- 流量 : 1 . 0 m l / 分

50

- 溫度 : 50
- 勾配 : 4.4 分で 2 ~ 98%

### 【0355】

#### 3) 分析方法 E :

- X B r i d g e C 18 カラム、3.5 μm、3.0 × 30 mm
- 溶離液 : A : 水 (0.1% ギ酸)、B : C A N
- 流速 : 2 mL / 分
- 勾配 : 0 分間 40% の B、1.70 分で 40% ~ 95% の B、2.0 分間 95% の B、2.1 分間 40% の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I 走査範囲 150 ~ 1000
- H P L C : A g i l e n t 1100 シリーズ
- 溫度 : 40°C

### 【0356】

#### 3) 分析方法 F :

- A c q u i t y B E H 1.7 μm 2.1 × 50 mm
- 溶離液 : A : 水 (0.1% ギ酸)、B : A C N (0.1% ギ酸)
- 流速 : 1 mL / 分
- 勾配 : 0 分間 2% の B、1.7 分で 2% ~ 98% の B、2.06 分間 98% の B、2.16 分間 2% の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I 走査範囲 120 ~ 1600
- H P L C : w a t e r s A c q u i t y
- 溫度 : 50°C

### 【0357】

#### 3) 分析方法 G :

- A c q u i t y B E H 1.7 μm 2.1 × 50 mm
- 溶離液 : A : 水 (0.1% ギ酸)、B : A C N (0.1% ギ酸)
- 流速 : 1 mL / 分
- 勾配 : 0 分間 40% の B、1.40 分で 40% ~ 98% の B、2.05 分間 98% の B、2.1 分間 40% の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I 走査範囲 120 ~ 1600
- H P L C : w a t e r s A c q u i t y
- 溫度 : 50°C

### 【0358】

実施例 1 ~ 38 のペプチドの分析データは、表 5 にまとめて示すが、上述の分析方法を使用して生成したものである。

### 【0359】

【表 10 - 1】

表 5

ペプチド	HPLC		質量分析				
	t <sub>R</sub> [min]	方法 Meth.	[M+2H] <sup>2+</sup> (測定値) (measured)	[M+3H] <sup>3+</sup> (測定値)	方法	[M+2H] <sup>2+</sup> (計算値) (calc.)	[M+3H] <sup>3+</sup> (計算値)
実施例 1	3.48	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
実施例 2	3.66	A	735.4	490.6	C	735.4	490.6
実施例 3	3.60	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
実施例 4	2.65	A	683.4	455.9	C	683.4	455.9
実施例 5	3.95	A	782.4	521.9	C	782.4	521.9
実施例 6	3.49	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
実施例 7	3.55	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
実施例 8	2.85	A	719.3	479.9	C	719.4	479.9
実施例 9	3.75	A	742.4	495.3	C	742.4	495.3

【0360】

10

20

30

【表 10 - 2】

実施例 10	3.55	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3	
実施例 11	3.57	A	686.9	458.3	C	686.9	458.2	10
実施例 12	3.51	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3	
実施例 13	3.54	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9	
実施例 14	3.46	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3	
実施例 15	3.44	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3	
実施例 16	3.59	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6	
実施例 17	3.61	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6	20
実施例 18	7.60	B	775.391	517.263	D	775.385	517.256	
実施例 19	7.40	B	751.392	501.263	D	751.385	501.256	
実施例 20	3.41	A	743.4	495.9	C	743.4	495.9	
実施例 21	7.35	B	730.355	487.239	D	730.361	487.241	30
実施例 22	8.62	B	739.877	493.587	D	739.856	493.573	
実施例 23	7.32	B	737.374	491.918	D	737.377	491.921	
実施例 24	7.35	B	737.375	491.919	D	737.377	491.921	
実施例 25	5.63	B	620.822	414.217	D	620.825	414.219	40
実施例 26	7.58	B	754.368	503.247	D	754.361	503.241	

【表10-3】

実施例 27	7.36	B	737.374	491.918	D	737.369	491.913
実施例 28	3.63	A	713.9	476.2	C	713.8	476.2
実施例 29	3.78	A	720.9	480.9	C	720.9	480.9
実施例 30	3.82	A	691.9	461.6	C	691.8	461.6
実施例 31	3.74	A	643.3	429.2	C	643.3	429.2
実施例 32	8.01	B	643.328	429.222	D	643.324	429.252
実施例 33	7.73	B	700.832	467.557	D	700.845	467.566
実施例 34	7.17	B	609.809	406.875	D	609.810	406.876
実施例 35	8.99	B	710.351		D	710.332	473.890
実施例 35	6.89	B	568.289	379.196	D	568.292	379.197
実施例 36	7.69	B	724.843	483.564	D	724.837	483.558
実施例 37	6.62	B	715.848	477.568	D	715.843	477.562
実施例 38	8.28	B	728.873		D	728.869	

## 【0361】

## 一般合成手順

1) 最初のアミノ酸の2-クロロトリチルクロリド樹脂への導入およびFmoc除去

2-クロロトリチルクロリド樹脂(1当量、1.0~1.6mmol/g)をDCMで十分に洗浄した。所望のアミノ酸(通常、1.6mmol/gの導入を考えて、樹脂に対して0.5~2当量)を、DCM(樹脂1グラムあたり約10mL)およびDIPPEA(1.6mmol/gの導入を考えて、樹脂に対して4当量)に溶解させた。溶液を樹脂に加え、懸濁液を室温で3~16時間振盪した。樹脂を排出し、次いで、DCM/MeOH/DIPPEA(17:2:1)、DCM、DMA、DCMで順次、十分に洗浄した。

## 【0362】

Fmoc除去および導入量の算定については、樹脂をピペリジン/DMA(1:4)または4-メチルピペリジン/DMA(1:4)(最初の樹脂1グラムあたり $12 \times 10\text{ mL}$ )と共に繰り返し振盪し、DMA(最初の樹脂1グラムあたり $2 \times 10\text{ mL}$ )で洗浄した。合わせた溶液をMeOHで希釈して、体積Vを最初の樹脂1グラムあたり $250\text{ mL}$ とした。この溶液の2mLのアリコート( $V_a$ )をMeOHでさらに希釈して $250\text{ mL}$ ( $V_t$ )とした。UV吸収を、MeOHを基準として $299.8\text{ nm}$ で測定して、吸収A

10

20

30

40

50

を得た。樹脂を、順次 DMA、DCM、DMA、DCMで十分に洗浄し、高真空中にて40で乾燥させて、m gの樹脂を得た。

### 【0363】

樹脂への導入量は、式：

$$\text{導入量 [ mol / g ]} = ( A \times V_t \times V ) / ( d \times \quad \times V_a \times m ) \\ ( d : \text{セルの幅、} = 7800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} )$$

に従って算出した。

### 【0364】

#### 2) 固相ペプチド合成

##### 2 a) Prelude (商標) 合成装置における合成サイクルA

10

樹脂をDMAで洗浄した。ピペリジン/DMA(1:4)または4-メチルピペリジン/DMA(1:4)で繰り返し処理して、Fmocを除去した。樹脂をDMAで洗浄した。Fmoc-アミノ酸(3当量、0.3M NMP溶液)、HCTU(3当量、0.3M NMP溶液)、およびDIP EA(4.5当量、0.9M NMP溶液)を加えた後、懸濁液を、窒素中にて、特定の要件に応じて通常は15分~4時間、室温で混合することにより、カップリングを行った。DMAで洗浄した後、カップリングステップを、特定の要件に応じて通常は1~3回繰り返した。DMAで洗浄した後、Ac<sub>2</sub>O/ピリジン/DMA(1:1:8)の混合物を加え、引き続いて懸濁液を室温で混合することにより、キャッピングを行った。樹脂をDMAで洗浄した。

### 【0365】

20

##### 2 a) Prelude (商標) 合成装置における合成サイクルB

樹脂をDMAで洗浄した。4-メチルピペリジン/DMA(1:4)で繰り返し処理して、Fmocを除去した。樹脂をDMAで洗浄した。Fmoc-アミノ酸(3当量、0.2M NMP溶液)、HCTU(3当量、0.3M NMP溶液)、およびDIP EA(3.3当量、0.66M NMP溶液)を加えた後、懸濁液を、窒素中にて、特定の要件に応じて通常は15分~4時間、室温で混合することにより、カップリングを行った。DMAで洗浄した後、カップリングステップを、特定の要件に応じて通常は1~3回繰り返した。DMAで洗浄した後、Ac<sub>2</sub>O/ピリジン/DMA(1:1:8)の混合物を加え、引き続いて懸濁液を室温で混合することにより、キャッピングを行った。樹脂をDMAで洗浄した。

30

### 【0366】

##### 2 b) Prelude (商標) 合成装置での合成サイクルC

樹脂をDMAで洗浄した。ピペリジン/DMA(1:4)または4-メチルピペリジン/DMA(1:4)で繰り返し処理して、Fmocを除去した。樹脂をDMAで洗浄した。Ac<sub>2</sub>O/ピリジン/DMA(1:1:8)の混合物を加え、引き続いて懸濁液を室温で混合することにより、キャッピングを行った。樹脂をDMAで洗浄した。

### 【0367】

##### 2 c) Liberty (商標) 合成装置における合成サイクルD

樹脂をDMFおよびDCMで洗浄した。20%ピペリジン/DMFでの処理(通常、0.1mmolあたり7ml 2回)によって、Fmocを除去した。樹脂をDMFおよびDCMで洗浄した。Fmoc-アミノ酸(5当量、0.2M DMF溶液)、HCTU(5当量、0.5M DMF溶液)、およびDIP EA(10当量、2M NMP溶液)を加えた後、0~20ワットのマイクロ波電力を用い、懸濁液を、窒素中にて、特定の要件に応じて通常は5~50分間、75または50で混合することにより、カップリングを行った。DMFで洗浄した後、カップリングステップを、特定の要件に応じて1回繰り返してもよいであろう。樹脂をDMFで洗浄した。

40

### 【0368】

#### 3) 保護基の除去を伴うまたは伴わない樹脂からの切断

##### 3 a) 切断方法A

樹脂(0.1mmol)を、95%のTFA/EDT/TIS(95:2.5:2.5)

50

) 水溶液 (3 mL) と共に室温で2時間振盪した。切断溶液を濾別し、新鮮な溶液を加えた (3 mL)。懸濁液を室温で1時間振盪し、次いで切断溶液を濾別した。新鮮な溶液を加え (3 mL)、懸濁液を室温で1時間振盪した。切断溶液を濾別した。合わせた切断溶液を、冷ヘプタン / ジエチルエーテル (1 : 1) の混合物 (35 mL) 上にゆっくりと注いで、沈殿を得た。懸濁液を遠心分離し、上清を廃棄した。残渣を冷ヘプタン / ジエチルエーテル (1 : 1) (10 ~ 20 mL) で洗浄し、懸濁液を遠心分離し、上清を廃棄した。このステップを1 ~ 2回行った。固体を高真空中で乾燥させた。

#### 【0369】

##### 3 b ) 切断方法 B

樹脂 (0.1 mmol) を 95% TFA // TIS / DTT (95 : 2.5 : 2.5) 10 水溶液 (3 mL) と共に室温で3時間振盪した。切断溶液を濾別した。樹脂を 95% TFA 水溶液 (1 mL) で1回すすいだ。合わせた切断および洗浄溶液を、冷ヘプタン / ジエチルエーテル (1 : 1) の混合物 (10 ~ 15 mL) 上へゆっくりと注いで、沈殿を得た。懸濁液を遠心分離し、上清を廃棄した。残渣にジエチルエーテル (10 mL) を加え、懸濁液を3分間ボルテックスし、遠心分離し、上清を廃棄した。洗浄過程を2回繰り返した。固体を高真空中で乾燥させた。

#### 【0370】

##### 3 c ) 切断方法 C

樹脂 (0.1 mmol) に HPIP / DCM (1 : 3) (3 mL) を加え、懸濁液を室温で20分間振盪した。切断溶液を濾別し、集めた。この手順を2回繰り返した。最後に、樹脂を HPIP / DCM (1 : 3) (1 mL) で1回洗浄した。合わせた切断および洗浄溶液を真空中で濃縮乾燥した。粗生成物を ACN / H<sub>2</sub>O から凍結乾燥した。 20

#### 【0371】

##### 4 ) ジスルフィド生成

##### 4 a ) 環化方法 A

完全に脱保護された線状前駆体ペプチドを、H<sub>2</sub>O / DMSO (9 : 1) または (4 : 1) に溶解させて、通常は 0.5 ~ 7 mM の濃度とした。次いで、反応混合物を、要件に応じて通常は 16 ~ 96 時間、室温で攪拌し、次いで高真空中で濃縮乾燥した。

#### 【0372】

##### 4 b ) 環化方法 B

完全に脱保護された線状前駆体ペプチド (1 当量) を H<sub>2</sub>O に溶解させて、通常は約 1 ~ 2.5 mM の濃度とした。50 mM の I<sub>2</sub> / AcOH 溶液 (1 ~ 2 当量) を加え、完全な変換が実現されるまで、混合物を室温で攪拌した。0.5 M のアスコルビン酸 H<sub>2</sub>O 溶液を加えて、過剰の I<sub>2</sub> を失活させた。 30

#### 【0373】

以下では、代表的な実施例の合成について記載する。

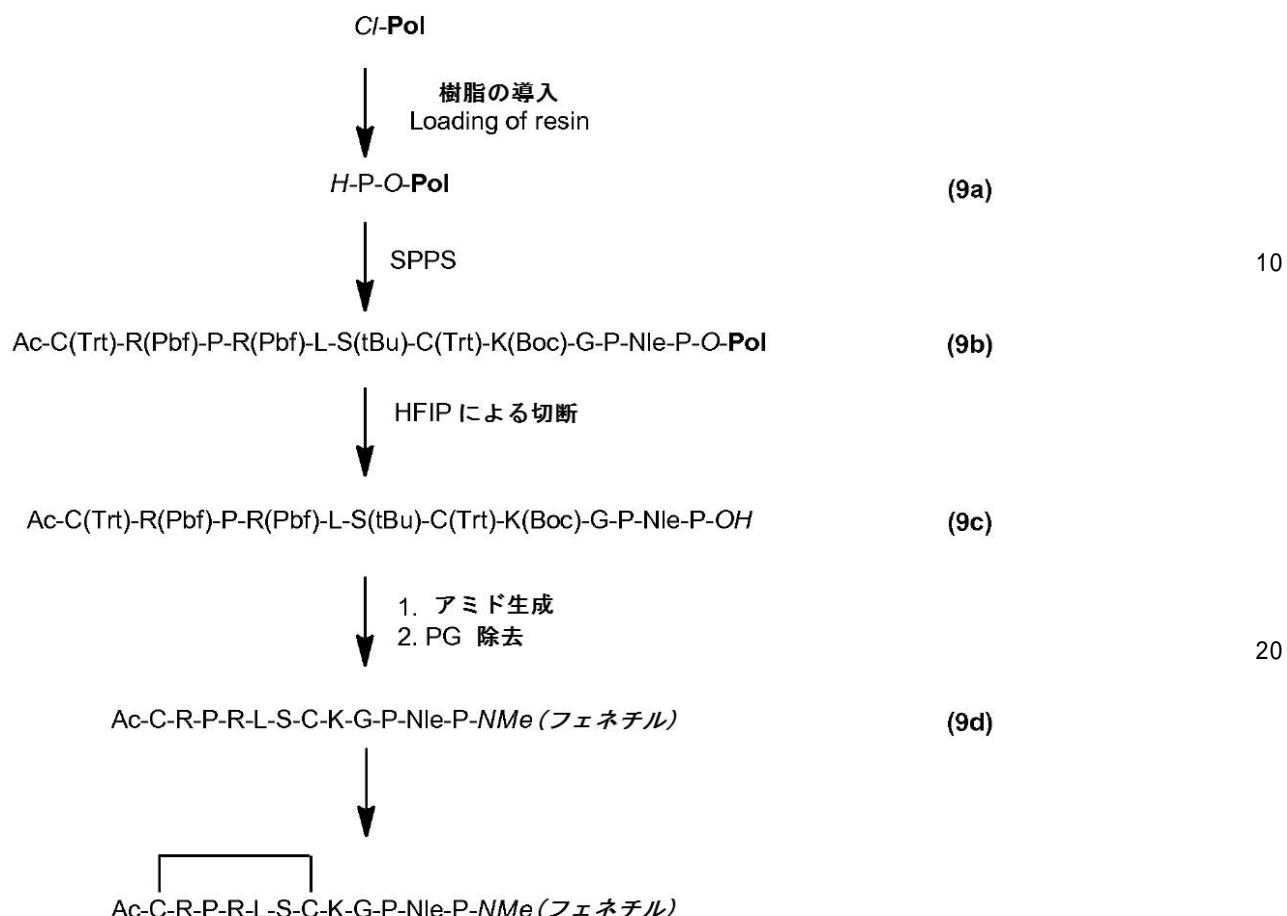
##### [実施例 9]

#### 【0374】

Ac - C<sup>\*</sup> - R - P - R - L - S - C<sup>\*</sup> - K - G - P - Nle - P - NMe (フェネチル) (ジスルフィド C<sup>1</sup> - C<sup>7</sup>) の合成 40

#### 【0375】

## 【化 3 6】



## 実施例 9

## 【0376】

30

## - 中間体 9 a の調製

(2 - クロロトリチルクロリド樹脂への Fmoc - P - OH の導入、Fmoc 除去、および樹脂への導入量の算定)

2 - クロロトリチルクロリド樹脂 (2.00 g, 3.20 mmol) を DCM (3回) で洗浄した。Fmoc - P - OH (1.08 g, 3.20 mmol) を DCM (20 mL) および DIPEA (2.24 mL, 12.8 mmol) に溶かした溶液を加え、懸濁液を室温で3時間振盪した。樹脂を DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1) (3回)、DCM (3回)、DMA (3回)、DCM (3回) で十分に洗浄した。

## 【0377】

40

次いで、樹脂をピペリジン / DMA (1:4) の混合物 (各回 12 mL) で2分間、1回処理した。ピペリジン / DMA 溶液を集めて、樹脂への導入量を算定した (一般手順を参照されたい)。

## 【0378】

樹脂を DCM (3回)、DMA (3回)、DCM (3回) で十分に洗浄し、真空中で乾燥させて、中間体 9 a (2.25 g、導入量 = 1.12 mmol/g) を得た。

## 【0379】

## - 中間体 9 b の調製

(線状ペプチドの組み立て)

中間体 9 a (89 mg, 0.10 mmol) を、Prelude (商標) ペプチド合成装置での固相ペプチド合成にかけた。カップリングを以下のとおりに実施した。

50

## 【0380】

## 【表11】

カップリング	AA	カップリングの数 ×反応時間	合成サイクル	
1	Nle	2 × 1 時間	B	10
2	P	2 × 30 分	B	
3	G	2 × 1 時間	B	
4	K(Boc)	2 × 30 分	B	
5	C(Trt)	2 × 30 分	B	
6	S(tBu)	2 × 30 分	B	
7	L	2 × 30 分	B	
8	R(Pbf)	4 × 1 時間	B	
9	P	2 × 1 時間	B	
10	R(Pbf)	4 × 1 時間	B	
11	C(Trt)	2 × 1 時間	B	
12	Ac	1 × 10 分	C	20

## 【0381】

## - 中間体 9 c の調製

## (樹脂からの H F I P 切断)

中間体 9 b (0.100 mmol) に H F I P / D C M (1 : 3) (3 mL) を加え、懸濁液を室温で 20 分間振盪した。切断溶液を濾別し、集めた。この手順を 2 回繰り返した。最後に、樹脂を H F I P / D C M (1 : 3) (1 mL) で 1 回洗浄した。合わせた切断および洗浄溶液を真空中で濃縮乾燥した。粗生成物を A C N / H<sub>2</sub>O から凍結乾燥して、中間体 9 c (37.2 mg、14.8 μmol) を白色の固体として得た。

## 【0382】

## - 中間体 9 d の調製

## (アミド生成および保護基の除去)

中間体 9 c (37.0 mg、= 14.7 μmol) および T B T U (7.1 mg、22.1 μmol) を D C M (5 mL) に溶解させた。D I P E A (5.1 μl、29.4 μmol) を加え、溶液を室温で 2 分間攪拌した。N - メチル - フェネチルアミン (3.2 μl、22.1 μmol) を加え、反応液を室温で 1 時間 40 分攪拌し、次いで E t O A c / n - ブタノール (9 : 1) (50 mL) と 5% Na H C O<sub>3</sub> 水溶液 (5 mL) とに分配した。有機層を 5% Na H C O<sub>3</sub> 水溶液 (5 mL)、ブライン (5 mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮乾燥した。

## 【0383】

残渣を 95% T F A / T I S / E D T (95 : 2.5 : 2.5) 水溶液 (5 mL) に溶解させた。反応混合物を室温で 3 時間攪拌し、次いで、冷ヘプタン / エーテル (1 : 1) (35 mL) 上へ注いだ。懸濁液を遠心分離し、溶媒をデカントした。残渣を冷ジエチルエーテル / ヘプタン (1 : 1) (10 mL) で 2 回洗浄し、次いで真空中で乾燥させて、中間体 9 d (27.0 mg、14.7 μmol) をベージュ色の固体として得た。生成物は、精製せずに次のステップにかけた。

## 【0384】

## 実施例 9 の調製

## (ジスルフィド生成および精製)

中間体 9 d (26.9 mg、14.7 μmol) を H<sub>2</sub>O (3.7 mL) に溶解させた

30

40

50

(溶液は、わずかに濁っていた)。50 mMのI<sub>2</sub>AcOH溶液(0.353 mL、17.6 μmol)を加え、混合物を室温で30分間攪拌した。0.5 Mのアスコルビン酸H<sub>2</sub>O溶液(0.044 mL、22.1 μmol)を加えて、過剰のヨウ素を失活させた。溶液を約3.5 mLに濃縮し、次いで分取逆相HPLCにかけた。画分を凍結乾燥して、実施例9(6.8 mg、3.7 μmol)を白色の固体として得た。

### 【0385】

純粋な生成物を、分析HPLC(分析方法A、t<sub>R</sub> = 3.75分)およびUPLC-MS(分析方法C、測定値：[M + 3]<sup>3+</sup> = 495.3、計算値：[M + 3]<sup>3+</sup> = 495.3)によって分析した。

### 【実施例12】

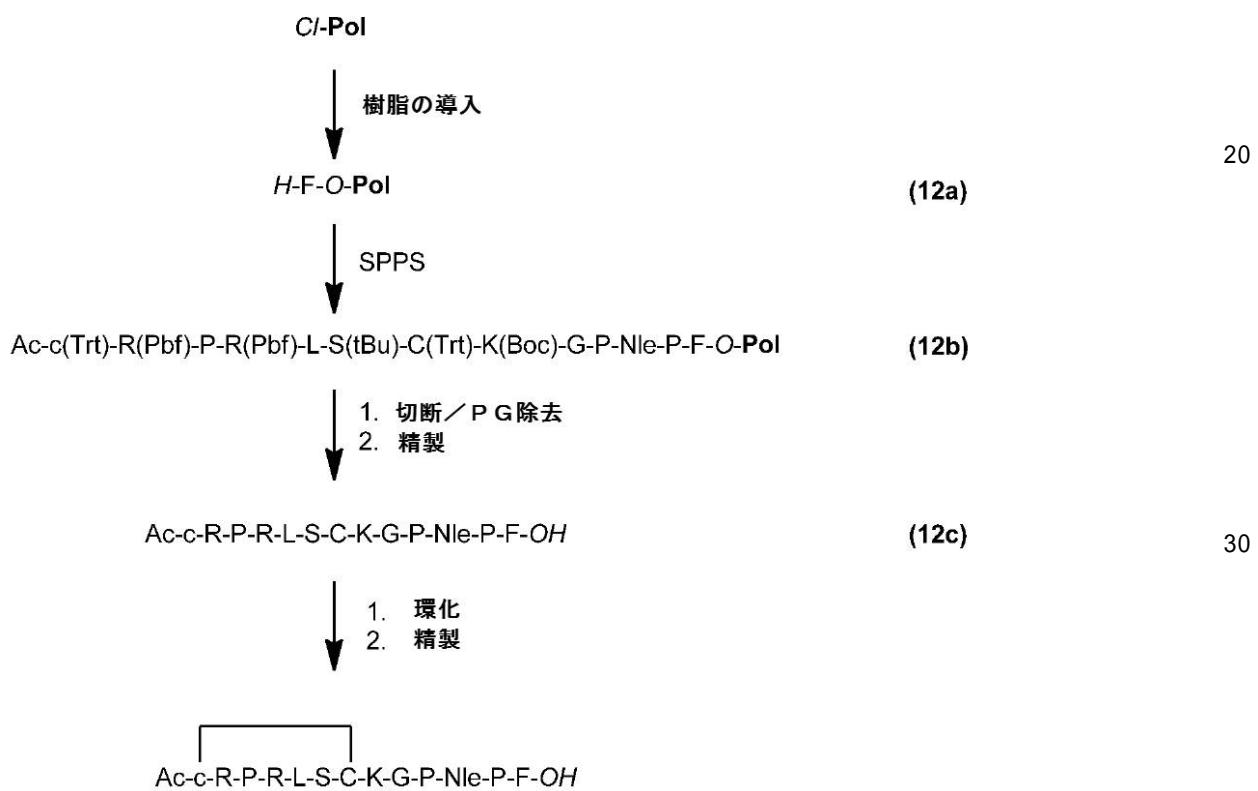
10

### 【0386】

Ac-c<sup>\*</sup>-R-P-R-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-Nle-P-F-OH(ジスルフイドC<sup>1</sup>-C<sup>7</sup>)の合成

### 【0387】

### 【化37】



### 実施例 12

### 【0388】

#### - 中間体12aの調製

(2-クロロトリチルクロリド樹脂へのFmoc-F-OHの導入、Fmoc除去、および樹脂への導入量の算定)

2-クロロトリチルクロリド樹脂(10.0 g、16.0 mmol)をDCM(3回)で洗浄した。Fmoc-F-OH(12.4 g、32.0 mmol)をDCM(100 mL)およびDIPPEA(11.2 mL、64.0 mmol)に溶かした溶液を加え、懸濁液を室温で5時間振盪した。樹脂をDCM/MeOH/DIPPEA(17:2:1)(3回)、DCM(3回)、DMA(3回)、DCM(3回)で十分に洗浄した。

### 【0389】

次いで、樹脂をピペリジン/DMA(1:4)の混合物(各回50 mL)で2分間、12回処理した後、DMA(2回)で洗浄した。ピペリジン/DMA溶液およびDMA洗浄

50

溶液を集めて、樹脂への導入量を算定した（一般手順を参照されたい）。

#### 【0390】

樹脂を DCM (3回)、DMA (3回)、DCM (3回)で十分に洗浄し、真空中で乾燥させて、中間体12a (12.8g、導入量 = 0.79mmol/g)を得た。

#### 【0391】

- 中間体12bの調製

(線状ペプチドの組み立て)

中間体12a (127mg、0.10mmol)をPrelude (商標)ペプチド合成装置での固相ペプチド合成にかけた。カップリングを以下のとおりに実施した。

#### 【0392】

【表12】

カップリング	AA	カップリングの数 ×反応時間	合成サイクル
1	P	2×1時間	A
2	Nle	2×1時間	A
3	P	2×1時間	A
4	G	2×2時間	A
5	K(Boc)	2×1時間	A
6	C(Trt)	1×3時間	A
7	S(tBu)	2×1時間	A
8	L	2×1時間	A
9	R(Pbf)	4×3時間	A
10	P	2×2時間	A
11	R(Pbf)	4×3時間	A
12	c(Trt)	1×3時間	A
13	Ac	1×20分	C

#### 【0393】

10

- 中間体12cの調製

(保護基の除去を伴う樹脂からの切断、および精製)

中間体12b (0.10mmol)をDCM (4回)で慎重に洗浄した。95%のTFA / EDT / TIS (95:2.5:2.5)水溶液の混合物 (2mL)を加え、懸濁液を室温で2時間振盪した。切断溶液を濾別し、新鮮な切断溶液 (2mL)を加えた。懸濁液を室温で1時間振盪し、次いで切断溶液を濾別した。新鮮な溶液 (2mL)を加え、懸濁液を室温で1時間振盪した。切断溶液を濾別した。合わせた切断溶液を、冷ヘプタン/ジエチルエーテル (1:1)の混合物 (30mL)上に注いで、沈殿を得た。混合物を遠心分離し、上清を廃棄した。固体を冷ヘプタン/ジエチルエーテル (1:1) (10mL)で再び洗浄し、混合物を遠心分離し、上清を廃棄した。固体を真空中で乾燥させた。粗生成物を分取HPLCによって精製し、凍結乾燥して、中間体12c (53mg、0.029mmol)を得た。

20

#### 【0394】

40

- 実施例12の調製

(環化および精製)

中間体12c (53mg、0.029mmol)をH<sub>2</sub>O / DMSO (9:1) (18mL)に溶解させた。反応混合物を室温で40時間攪拌し、次いで真空中で濃縮乾燥した。粗生成物を分取HPLCによって精製し、凍結乾燥して、実施例12を白色の固体 (27.4mg、0.014mmol)として得た。

#### 【0395】

50

純粋な生成物を、分析HPLC（分析方法A、 $t_R = 3.51$ 分）およびUPLC-MS（分析方法C、測定値：[M+3]<sup>3+</sup> = 505.3、計算値：[M+3]<sup>3+</sup> = 505.3）によって分析した。

[実施例18]

【0396】

A c - ( D - h C ) \* - R - P - R - L - S - ( h C ) \* - K - G - P - f - a - f - O H (ジスルフィドC<sup>1</sup>-C<sup>7</sup>)の合成

固体支持体上での線状ペプチド合成：

Fmoc-D-Phe-Wang樹脂（置換率：0.66mmol/g）を、標準のFmoc化学によるマニュアル固相ペプチド合成にかけた。0.3mmolの樹脂をDMF中で30分間膨潤させ、DMFを排出し、樹脂を20%のDMF中ピペリジンで30分間処理して、Fmoc基を除去した。樹脂をDMFで3回洗浄し、予め活性化させたFmocアミノ酸溶液（Fmocアミノ酸/HBTU/HOBt/NMM=3:3:3:6当量）で2時間カップリングさせた。各カップリングの後にニンヒドリン試験を実施して、カップリング効率を確認した。

【0397】

N末端まで、Fmoc保護基の除去および保護されたアミノ酸のカップリングを繰り返すことにより、樹脂上にペプチド鎖を組み立てた。

【0398】

最後のアミノ酸をカップリングさせた後、ペプチド樹脂をDMFおよびエチルエーテルで洗浄し、真空中で乾燥させた。乾燥させたペプチド樹脂を、TFA切断カクテル（TFA/チオールアニソール/フェノール/EDT/H<sub>2</sub>O=87.5:5:2.5:2.5:2.5:v/v）で処理して、側鎖保護基を切断および除去した。粗製ペプチドを冷エーテルから沈殿させ、濾取し、高真空中で乾燥させた。粗製ペプチドをHPLC（カラム：2インチDelta Pak C18、波長：215nm）で精製して、所望の生成物を得た。

【0399】

環化：

粗製ペプチドそれぞれを水-アセトニトリル（A.C.S.試薬、Fisher）に1mg/mLの濃度で溶解させ（およそ80%:20%、水：アセトニトリル、V:V）、溶液に、I<sub>2</sub>（A.C.S.試薬、Sigma Aldrich）を50%のAcOH（A.C.S.試薬、Fisher）/H<sub>2</sub>Oに溶かした0.1M溶液を、I<sub>2</sub>の色が消えずに残るまで、激しく攪拌しながら滴下添加した。酸化が完了したら（分析HPLCおよび質量分析によってモニターした）、1MのL-アスコルビン酸（A.C.S.試薬、Sigma Aldrich）水溶液を、溶液が無色になるまで、継続的に攪拌しながら滴下添加して、過剰のI<sub>2</sub>を還元した。濾過した後、上記溶液を2インチC18カラムにかけ（215nmで検出）、TFA緩衝液（緩衝液A、0.1%の水中TFA（A.C.S.グレード、NuGeneration Technology, LLC）；緩衝液B、100%のアセトニトリル）を使用して精製し、純度が95%を越える画分を集め、凍結乾燥によって乾燥させた。

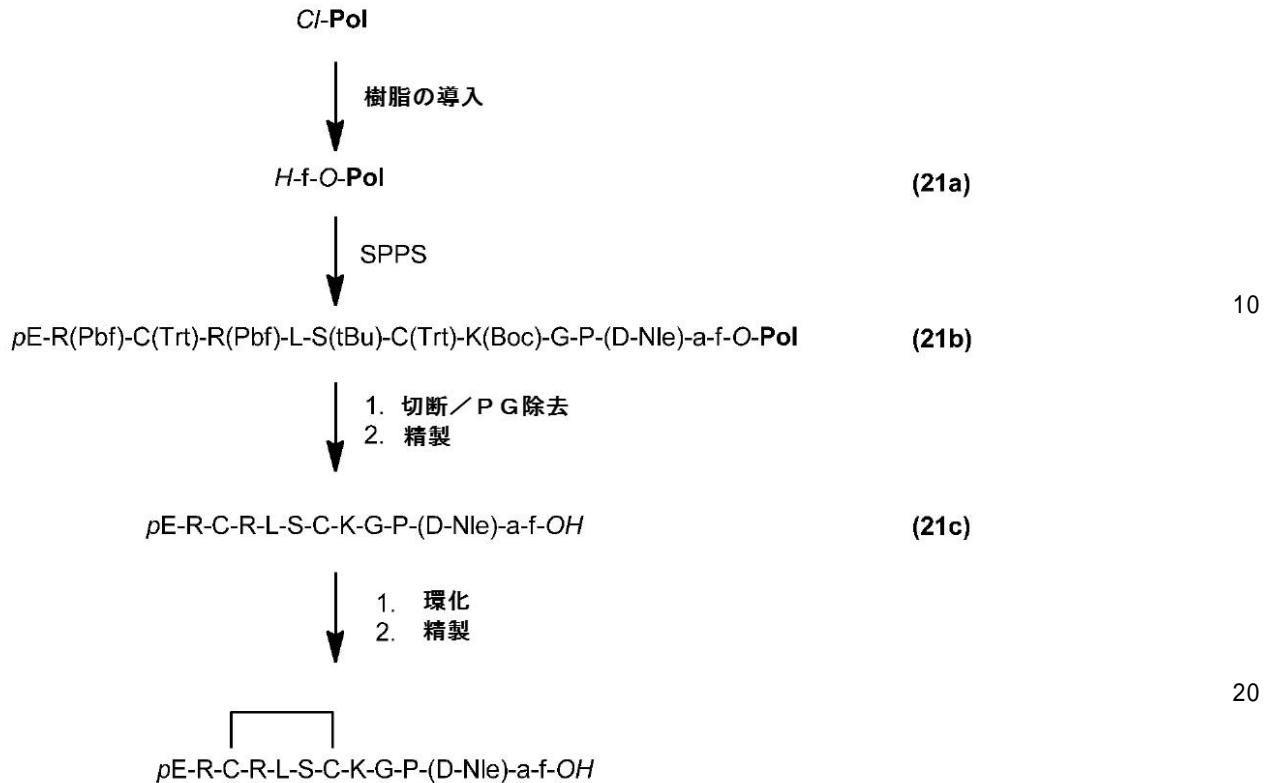
[実施例21]

【0400】

pE-R-C<sup>\*</sup>-R-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH (ジスルフィドC<sup>3</sup>-C<sup>7</sup>)の合成

【0401】

## 【化38】



## 【0402】

- 中間体21aの調製  
(2-クロロトリチルクロリド樹脂へのFmoc-f-OHの導入、Fmoc除去、および樹脂への導入量の算定)

2-クロロトリチルクロリド樹脂(5.0g、8.01mmol)を、Fmoc-f-OH(3.10g、8.01mmol)をDCM(50mL)およびDIPEA(5.59mL、32.0mmol)に溶かした溶液と、上述の一般手順と同様に反応させて、中間体21a(5.87g、導入量=0.897mmol/g)を得た。

## 【0403】

- 中間体21bの調製  
(鎖状ペプチドの組み立て)  
中間体21a(0.100mmol)をLiberty(商標)マイクロ波ペプチド合成装置での固相ペプチド合成にかけた。カップリングを次のとおりに実施した。

## 【0404】

【表13】

カップリング	AA	カップリングの数 ×反応時間	温度°C	マイクロ波 電力	合成サイ クル
1	a	1×7.5分	50	20	D
2	D-Nle	1×7.5分	50	20	D
3	P	1×7.5分	50	20	D
4	G	1×7.5分	50	20	D
5	K(Boc)	1×7.5分	50	20	D
6	C(Trt)	1×2分	50	0	D
		1×4分	50	25	
7	S	1×7.5分	50	25	D
8	L	1×7.5分	50	25	D
9	R(Pbf)	2×42分	50	0	D
		2×7.5分	50	25	
10	C(Trt)	1×2分	50	0	D
		1×4分	50	25	
11	R(Pbf)	2×42分	50	0	D
		2×7.5分	50	25	
12	pE	1×7.5分	50	25	D

10

20

## 【0405】

## - 中間体21cの調製

(保護基の除去を伴う樹脂からの切断、次いで精製)

中間体21b(0.1mmol)に95%TFA/EDT/DTT(95:2.5:2.5)水溶液の混合物(2mL)を加えた。懸濁液を室温で2時間振盪し、次いで切断溶液を濾別した。次いで、樹脂を95%TFA/EDT/TIS(95:2.5:2.5)水溶液(2mL)で再び処理し、室温で1時間振盪し、濾過した。合わせた切断および洗浄溶液を冷ヘプタン/ジエチルエーテル(1:1)の混合物(11mL)上へ注いで、沈殿を得た。懸濁液を遠心分離し、上清を廃棄した。残渣にジエチルエーテル(10mL)を加え、懸濁液を3分間ボルテックスし、遠心分離し、上清を廃棄した。洗浄過程を2回繰り返した。固体を高真空中で乾燥させた。粗生成物を分取HPLCによって精製し、ACN/H<sub>2</sub>Oから凍結乾燥して、中間体21c(55mg、0.030mmol)を得た。

30

## 【0406】

## - 実施例21の調製

(環化および精製)

中間体21c(18mg、9.97μmol)をH<sub>2</sub>O(1.0mL)に溶解させた。攪拌した溶液に、50mMのI<sub>2</sub>-AcOH溶液(0.24mL、12μmol)を一度で加え、LCMSによって反応の完了が示されるまで、溶液を室温で終夜攪拌した。0.5Mのアスコルビン酸H<sub>2</sub>O溶液(24μmol、12μmol)を加えて、過剰のI<sub>2</sub>を失活させた。粗生成物を分取HPLCによって精製し、ACN/H<sub>2</sub>Oから凍結乾燥して、実施例21を白色の固体(12mg、6.32μmol)として得た。

40

## 【0407】

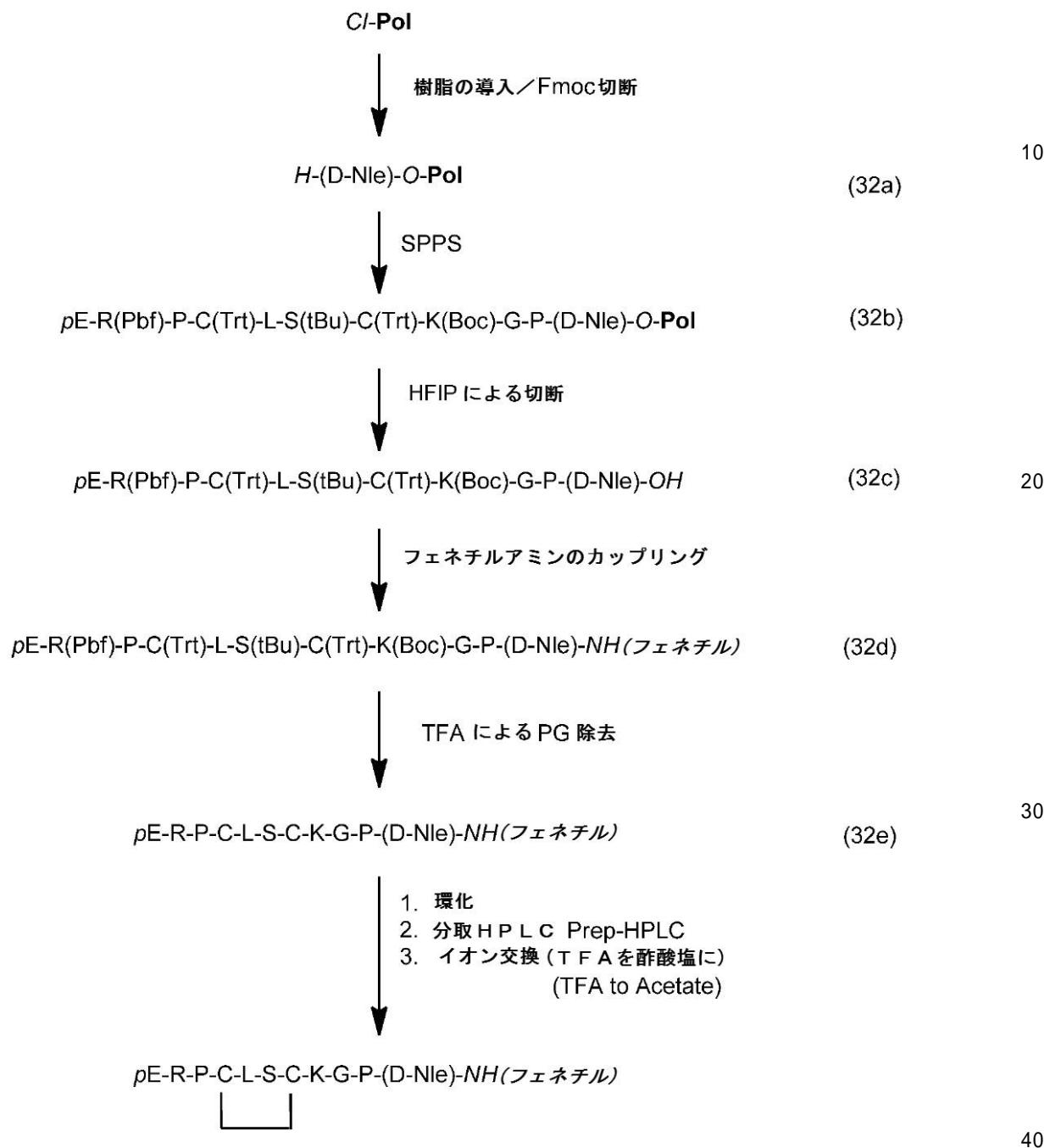
純粋な生成物を、分析HPLC(分析方法B、 $t_R = 7.35$ 分)およびUPLC-HRMS(分析方法D、測定値: [M+2H]<sup>2+</sup> = 730.355、計算値: [M+2H]<sup>2+</sup> = 730.361)によって分析した。

## [実施例32]

## 【0408】

50

p E - R - P - C \* - L - S - C \* - K - G - P - ( D - N l e ) - N H ( フ ェ ネ チ ル )  
 (ジスルフィド C <sup>4</sup> - C <sup>7</sup> ) アセテートの合成  
 【 0 4 0 9 】  
 【 化 3 9 】



### 実施例 32

#### 【 0 4 1 0 】

- 中間体 32 a の調製  
 (2 - クロロトリチルクロリド樹脂への F m o c - D - N l e - O H の導入、 F m o c 除去、 および樹脂への導入量の算定 )

2 - クロロトリチルクロリド樹脂 ( 5 0 . 0 g, 8 5 . 0 m m o l ) を の D C M ( 4 0 0 m L ) に懸濁させ、懸濁液を 1 0 分間攪拌し、次いで溶媒を排出し、樹脂を D C M ( 3 × 2 0 0 m L ) で洗浄した。次いで、樹脂に、 F m o c - D - N l e - O H ( 2 4 . 0 g, 6 8 . 0 m m o l ) および D I P E A ( 9 6 . 5 m l, 5 5 2 . 5 m m o l ) を D C 50

M ( 120 . 0 mL ) に溶かした溶液を加え、懸濁液を窒素でフラッシュし、室温で 5 分間攪拌した。別の分の D I P E A ( 22 . 7 mL, 127 . 5 mmol ) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。

#### 【 0411 】

反応混合物を排出し、樹脂を D C M ( 3 × 250 mL ) で各回 2 分間洗浄した。樹脂を D C M / M e O H / D I P E A ( 70 : 15 : 15 ) 混合物 ( 2 × 250 mL ) で各回 10 0 分間かけて失活させた。

#### 【 0412 】

樹脂をピペリジン / D M F ( 1 : 3 ) ( 1 × 300 mL ) で 5 分間処理することにより、F m o c 基を切断した。樹脂を排出し、次いで ( 1 × 300 mL ) 15 分間、続いて洗浄ステップ：D M F ( 6 × 250 mL, 各回 2 分 ) 、イソプロパノール ( 2 × 250 mL 、各回 2 分 ) 、および T B M E ( 6 × 250 mL, 各回 2 分 ) 。樹脂を真空中にて 35 で 24 時間乾燥させて、中間体 32a ( 57 . 8 g, 導入量 = 1 . 08 mmol / g ) を得た。

#### 【 0413 】

- 中間体 32b の調製

( 線状ペプチドの組み立て )

中間体 32a ( 18 . 5 g, 20 . 0 mmol ) を、自動ペプチド合成装置 ( C S B I O 536 ( 商標 ) ) での固相ペプチド合成にかけた。カップリングサイクルは、次のとおりに定めた。

- アミノ酸カップリング：A A ( 3 . 0 当量 ) 、 D I C ( 3 . 0 当量 ) 、 H O B t ( 3 . 0 当量 ) 、 D M F ( 以下の表を参照されたい )
- 洗浄：D M F ( 4 × 150 mL, 各回 2 分 )
- F m o c 脱保護：ピペリジン / D M F ( 1 : 3 ) ( 150 mL で 5 分間、次いで 150 mL で 15 分間 )
- 洗浄：D M F ( 6 × 150 mL, 各回 2 分 )

#### 【 0414 】

##### 【表 14】

カップリング	AA	カップリングの数×反応時間	カップリング方法
1	Fmoc-L-Pro-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 × 120 分	DIC/HOBt

#### 【 0415 】

ペプチドを組み立てた後、樹脂を、D M F ( 6 × 150 mL, 各回 2 分 ) 、イソプロパノール ( 6 × 150 mL, 各回 2 分 ) 、および T B M E ( 6 × 150 mL, 各回 2 分 ) で洗浄した。ペプチド樹脂を高真空中にて 35 で終夜乾燥させて、中間体 32b ( 57 . 6 g, 20 . 0 mmol ) を得た。

#### 【 0416 】

- 中間体 32c の調製

( 樹脂からの H F I P 切断 )

10

20

30

40

50

中間体32bの一部(27g、9.37mmol)をDCM(300mL)に懸濁させ、15分間攪拌した。樹脂を排出し、次いでHFIPI/DCM(3:7)(3×270mL、各回15分)で処理した。切断溶液を濾別し、集めた。樹脂をDCM(3×300mL)で洗浄した。合わせた切断および洗浄溶液を真空中で濃縮乾燥した。白色の粉末を真空中にて35℃で終夜乾燥させて、中間体32c-バッチ1(23.5g、9.37mmol)を得た。

## 【0417】

別の分の中間体32b(28.0g、9.72mmol)で、上で言及した手順を繰り返して、中間体32c-バッチ2(26.1g、9.72mmol)を得た。

## 【0418】

## - 中間体32dの調製

## (フェネチルアミンの溶液相カップリング)

中間体32c-バッチ2(20.0g、7.44mmol、1.0当量)およびHATU(5.23g、13.8mmol、1.85当量)をDMF(400mL)に溶解させた。フェネチルアミン(1.67g、13.8mmol、1.85当量)およびDIPPEA(3.56g、27.6mmol、3.71当量)をDMF(60mL)に溶かした溶液を加えた。

## 【0419】

反応混合物を室温で30分間攪拌し、次いで0℃に冷却し、次いでブライン(460mL)を加えた。懸濁液を10分間攪拌し、次いで生成物を濾過によって単離した。濾過ケークをH<sub>2</sub>O(300mL)で洗浄し、次いでこれを慎重に取り出し、次いでDCM(300mL)に溶解させた。溶液をMgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、次いで真空中で濃縮乾燥した。粗生成物をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー(溶離液: DCMおよびDCM/iPrOH(8:2))にかけて、中間体32d-バッチ1(14.4g、6.6mmol)を得た。

## 【0420】

中間体32c-バッチ1(23.4g、9.37mmol)で、フラッシュクロマトグラフィーを除外して同じ手順を繰り返して、中間体32d-バッチ2(28.0g、9.37mmol)を得た。

## 【0421】

## - 中間体32eの調製

## (保護基除去)

中間体32d-バッチ2(28.0g、9.37mmol)をTFA/DCM/EDT/TIS(90:5:2.5:2.5)(290mL)に溶解させ、反応液を室温で2時間攪拌した。

## 【0422】

切断溶液を濾別し、冷TBME(3L)(0~4℃)上に注いだ。濁った懸濁液を氷水浴中で30分間攪拌し、次いでpore 4ガラスフィルターで濾過した。こうして得られた白色の固体をTBME(2×100mL)で洗浄し、次いで真空中にて35℃で終夜乾燥させて、中間体32e-バッチ1(8.9g、5.9mmol)を得た。

## 【0423】

中間体32d-バッチ1(14.4g、6.6mmol)で同じ手順を繰り返して、中間体32e-バッチ2(9.6g、6.3mmol)を得た。

## 【0424】

## - 実施例32の調製

## 1) 環化

中間体32e(5.0g、3.3mmol)を水(500mL)に溶解させた。ヨウ素(1.18g、4.66mmol、1.41当量)の酢酸(93mL)溶液を一度に加えた。反応混合物を室温で10分間攪拌した。アスコルビン酸(1.03g、5.83mmol、1.77当量)の水(5.8mL)溶液を加え、反応混合物を10分間攪拌し、濾

10

20

30

40

50

過し、精製まで 4 で保管した。

**【0425】**

18.3 g (12.1 mmol) の中間体 32e が処理されるまで、同じ環化手順を繰り返した。

**【0426】**

2) 精製

環式ペプチドの溶液を、注入 1 回あたりペプチド 0.5 ~ 5.0 g ずつとして、分取 HPLC にかけた。純度が 95 % より高い画分をプールし、凍結乾燥して、4.89 g (3.2 mmol) の合計量の精製ペプチド (TFA 塩) を得た。

**【0427】**

3) イオン交換による酢酸塩生成

OH<sup>-</sup> 型の強陰イオン交換樹脂 (Ion exchanger III, Merck) 75 g (100 mL) を焼結ガラスフィルター (空孔率 3) に入れ、次いで酢酸 / 水 (1 : 3) の溶液 (300 mL) を加え、懸濁液を 2 分間手作業で攪拌し、次いで樹脂を排出した。別の分の酢酸 / 水 (1 : 3) (300 mL) で、この過程を繰り返した。中性の排液が観察されるまで、樹脂を脱イオン水で洗浄した。次いで、樹脂を、焼結ガラスフィルター (空孔率 3) を備えた 4 × 20 cm カラムに移した。

**【0428】**

4.8 g の精製ペプチドを脱イオン水 (50 mL) に溶解させ、カラムに加えた。生成物を脱イオン水 (200 mL) で溶離させた。 TLC スポッティングによって、生成物の溶離を制御し、豊富な画分をプールし、凍結乾燥して、実施例 32 (4.1 g, 2.9 mmol) を得た。

**【0429】**

純粋な生成物を、分析 HPLC (分析方法 B,  $t_R = 8.01$  分) および UPLC - HRMS (分析方法 D、測定値:  $[M + 2H]^{2+} = 643.328$ 、計算値:  $[M + 2H]^{2+} = 643.324$ ) によって分析した。酢酸含有量は 7.99 ~ 8.27 % であり、含水量は 1.94 ~ 1.96 % であった。

**【0430】**

他の実施例は、似たようにして合成した。

- 実施例 1 ~ 8、10、11、13 ~ 17、20、28 ~ 31 は、実施例 12 と同様に合成した。

- 実施例 19、26、27、36 ~ 38 は、実施例 18 と同様に合成した。

- 実施例 22 ~ 25、33 ~ 35 は、実施例 21 と同様に合成した。

**【0431】**

バイオコンジュゲート実施例 :

**[実施例 39]**

**【0432】**

アルブミン - PPA - O2Oc - O2Oc - O2Oc - O2Oc - Q - R - P - C<sup>\*</sup> - L - S - C<sup>\*</sup> - K - G - P - (D - Nle) フェネチルアミン [PPA は、3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロパン酸である]

**【0433】**

ステップ 1 : アルブミン脱キャッピング

- TCEP による脱キャッピング

15 mL チューブに入った、アルブミン (500 mg, Aldrich、ヒト血清からの凍結乾燥粉末) を 10 mL の PBS 1 × 緩衝液に溶かした溶液に、TCEP 塩酸塩の溶液 (生物学グレード精製水中 1.074 mg) を一度に加えた。得られた溶液を室温で 1 時間振盪し、次いで脱塩し、2 本の Amicon Ultra-4 遠心式フィルター (30 K MWCO) で洗浄した。フィルターを 4 K g で 40 分間スピinnにかけ、濾液を廃棄した。各フィルターに 3 mL の生物学グレード精製水を加えてそれぞれ洗浄し (14 K g で 10 分間スピinnにかけ)、洗浄過程を 3 回繰り返した。脱キャッピングされた H

10

20

30

40

50

S A を水（合計約 2 0 m L）に溶解させた。溶液を 5 0 m L の F a l c o n チューブに移し、凍結乾燥して、結晶質の粉末（5 0 0 m g）を得た。

#### 【 0 4 3 4 】

純粋な生成物を U P L C - M S によって分析した（分析方法 F、測定値：6 6 4 3 9 . 0、予想値：6 6 4 3 7）。

#### 【 0 4 3 5 】

- 脱キヤッピングされた H S A 中の遊離チオール基の数の算定

2 m L チューブに入った、この脱キヤッピングされた H S A（2 m g）を 4 0 0 μ L の P B S pH 7 . 4 に溶かした溶液に、3 - マレイミドヘキサン酸（1 3 μ g）の水溶液を加えた。得られた溶液を室温で 2 時間振盪した。U P L C - M S（分析方法 G）によって、单一付加物の生成だけが示された。測定値：6 6 6 4 9 . 0、予想値：6 6 6 4 8。  
10

#### 【 0 4 3 6 】

- D T T による脱キヤッピング

1 5 m L チューブに入った、アルブミン（4 0 0 m g、A l d r i c h、ヒト血清からの凍結乾燥粉末）を 5 m L の P B S 1 × 緩衝液に溶かした溶液に、D T T の溶液（0 . 2 3 2 μ l、生物学グレード精製水中 2 m g / m L）を一度に加えた。得られた溶液を室温で 2 時間振盪し、次いで脱塩し、2 0 本の A m i c o n U l t r a - 0 . 5 遠心式フィルター（1 0 K M W C O）で洗浄した。フィルターを 1 4 K g で 1 0 分間スピンにかけ、濾液を廃棄した。各フィルターの頂部に生物学グレード精製水を加えてそれぞれ洗浄し（1 4 K g で 1 0 分間スピンにかけ）、洗浄過程を 6 回繰り返した。脱キヤッピングされた H S A を水（合計約 2 0 m L）に溶解させた。溶液を 5 0 m L の F a l c o n チューブに移し、凍結乾燥して、結晶質の粉末（3 7 6 m g）を得た。  
20

#### 【 0 4 3 7 】

純粋な生成物を U P L C - M S によって分析した（分析方法 G、測定値：6 6 4 3 8 . 5、予想値：6 6 4 3 7）。

#### 【 0 4 3 8 】

- 脱キヤッピングされた H S A 中の遊離チオール基の数の算定

2 m L チューブに入った、この脱キヤッピングされた H S A（3 m g）を 4 0 0 μ L の P B S pH 7 . 4 に溶かした溶液に、3 - マレイミドプロピオン酸（2 5 μ g）の水溶液を加えた。得られた溶液を室温で終夜振盪した。U P L C - M S（分析方法 G）によって、单一付加物の生成だけが示された。測定値：6 6 6 0 8 . 0、予想値：6 6 6 0 6。  
30

#### 【 0 4 3 9 】

- システインによる脱キヤッピング

2 m L チューブに入った、アルブミン（1 2 0 m g、A l d r i c h、ヒト血清からの凍結乾燥粉末）を 1 m L の 5 0 mM P B S 緩衝液 pH 8 . 0 に溶かした溶液に、システイン（1 0 . 9 4 m g）を一度に加えた。得られた溶液を室温で 1 時間振盪し、次いで脱塩し、2 本の A m i c o n U l t r a - 0 . 5 遠心式フィルター（1 0 K M W C O）で洗浄した。フィルターを 1 4 K g で 1 0 分間スピンにかけ、濾液を廃棄した。各フィルターの頂部に生物学グレード精製水を加えてそれぞれ洗浄し（1 4 K g で 1 0 分間スピンにかけ）、洗浄過程を 5 回繰り返した。脱キヤッピングされた H S A を、水（合計 4 m L）に溶解させた。溶液を 1 5 m L の F a l c o n チューブに移し、凍結乾燥して、結晶質の粉末（1 0 8 m g）を得た。  
40

#### 【 0 4 4 0 】

純粋な生成物を U P L C - M S によって分析した（分析方法 G、測定値：6 6 4 3 9、予想値：6 6 4 3 7）。

#### 【 0 4 4 1 】

- 脱キヤッピングされた H S A 中の遊離チオール基の数の算定

2 m L チューブに入った、この脱キヤッピングされた H S A（3 m g）を 5 0 0 μ L の P B S pH 7 . 4 に溶かした溶液に、3 - マレイミドプロピオン酸（1 5 μ g）の水溶液を加えた。得られた溶液を室温で 1 時間振盪した。U P L C - M S（分析方法 G）によ  
50

つて、单一付加物の生成だけが示された。測定値：66608.0、予想値：66606。

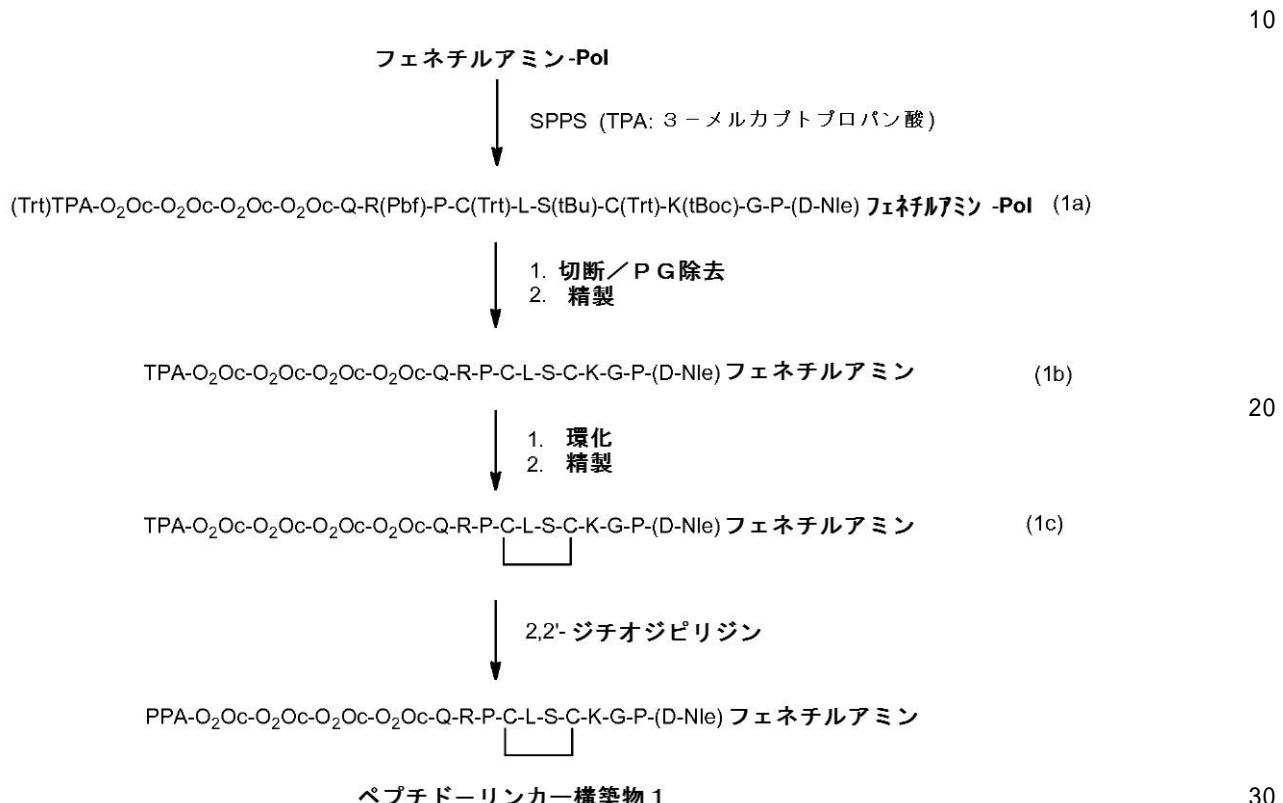
【0442】

ステップ2：

ペプチド-リンカー構築物1：PPA-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-Q-R(Pbf)-P-C(Trt)-L-S(tBu)-C(Trt)-K(tBoc)-G-P-(D-Nle)フェネチルアミン [PPAは、3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロパン酸である] の合成

【0443】

【化40】



【0444】

- 中間体1aの調製

(線状ペプチドの組み立て) O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-Q-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)フェネチルアミン

- フェネチルアミン-AMEBA樹脂 (Aldrich, 0.25mmol) を Liberty (商標)マイクロ波ペプチド合成装置での固相ペプチド合成にかける。カップリングを以下のとおりに実施する。

【0445】

【表 15】

カップリング	AA	カップリングの 数×反応時間	温度 °C	マイクロ波電 力
1	D-Nle	1×7.5 分	50	20
2	P	1×7.5 分	50	20
3	G	1×7.5 分	50	20
4	K(tBoc)	1×7.5 分	50	20
5	C(Trt)	1×2 分	50	0
		1×4 分	50	25
6	S(tBu)	1×7.5 分	50	20
7	L	1×7.5 分	50	25
8	C(Trt)	1×2 分	50	0
		1×4 分	50	25
9	P	1×7.5 分	50	25
10	R(Pbf)	2×42 分	50	0
		2×7.5 分	50	25
11	Q(Trt)	1×7.5 分	50	25
12	O2Oc	1×7.5 分	50	25
13	O2Oc	1×7.5 分	50	25
14	O2Oc	1×7.5 分	50	25
15	O2Oc	1×7.5 分	50	25
16	TPA(Trt)	1×7.5 分	50	25

## 【0446】

## - 中間体 1 b の調製

(保護基の除去を伴う樹脂からの切断、次いで精製)

6 mL の TFA / TIPS / 水 (95 : 2.5 : 2.5) 中の 1.54 g の DTT および 0.75 mL のチオアニソールでできた溶液を、中間体 1 a (0.25 mmol) に加え、懸濁液を室温で 5 時間振盪する。切断溶液を濾別し、樹脂を 95% TFA 水溶液で洗浄する。合わせた切断および洗浄溶液を冷ジエチルエーテル上に注いで、沈殿を得る。懸濁液を遠心分離し、上清を廃棄する。残渣にジエチルエーテルを加え、懸濁液を 3 分間ボルテックスし、遠心分離し、上清を廃棄する。洗浄過程を 3 回繰り返す。固体を高真空中で乾燥させる。粗生成物を分取 HPLC によって精製し、ACN / H<sub>2</sub>O から凍結乾燥して、中間体 1 b を得る。

## 【0447】

## - 中間体 1 c の調製

(環化および精製)

中間体 1 b を H<sub>2</sub>O (2.0 mL) に溶解させる。攪拌した溶液に、50 mM の I<sub>2</sub> ACOH 溶液 (1.3 当量) を一度に加え、溶液を室温で終夜攪拌し、LC / MS によって、反応の完了が示される。0.5 M のアスコルビン酸 H<sub>2</sub>O 溶液を加えて、過剰の I<sub>2</sub> を失活させる。粗生成物を分取 HPLC によって精製し、ACN / H<sub>2</sub>O から凍結乾燥して、中間体 1 c を得る。

## 【0448】

## - ペプチド - リンカーモチブ 1 中間体 1 c の調製

中間体 1 c、2,2'-ジチオジピリジン (3 当量) の ACN 中混合物を、25℃ で 1 時間振盪する。反応混合物を MeOH で希釈し、濾過する。溶液を分取 HPLC によって精製し、ACN / H<sub>2</sub>O から凍結乾燥して、ペプチド - リンカーモチブ 1 を得る。

## 【0449】

10

20

30

40

50

ステップ3：ペプチド-リンカー構築物／アルブミンコンジュゲーション

脱キヤッピングされたHSA(100mg)をPBS緩衝液(6mL)に溶かした溶液を、PPA-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-Q-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)フェネチルアミン(水中に2当量)の溶液で処理する。得られた溶液を室温で1時間振盪し、次いで脱塩し、4本のAmicon Ultra-0.5遠心式フィルター(10K MWCO)で洗浄する。フィルターを13Kgで10分間スピンにかけ、濾液を廃棄する。各フィルターの頂部に生物学グレード精製水を加えてそれぞれ洗浄し(13Kgで10分間スピンにかけ)、洗浄過程を6回繰り返す。コンジュゲートを水(合計4mL)に溶解させる。溶液を15mLのFalconチューブに移し、凍結乾燥して、実施例39を得る。

10

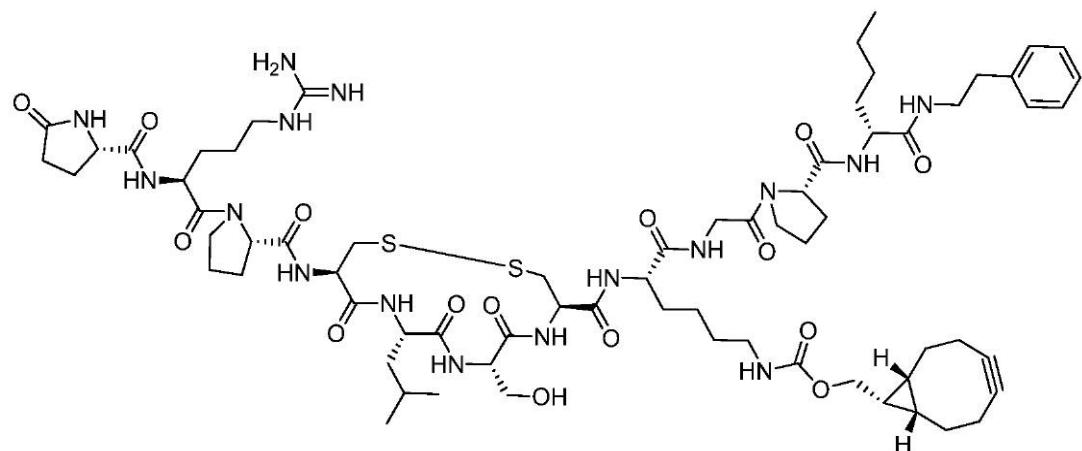
[実施例40]

【0450】

B-CN-PEGリンカーを介して脂肪酸にコンジュゲートさせたアペリン環状ペプチド：ステップ1：アペリン環状ペプチド-B-CN構築物の調製：pE-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-N<sup>6</sup>-[(1,8,9)-ビシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメトキシ]カルボニル]-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)[ジスルフィドC4-C7]の調製

【0451】

【化41】



20

pE-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)トリアセテート[ジスルフィドC4-C7](実施例32: 100mg, 0.068mmol)、炭酸水素ナトリウム(38mg, 0.452mmol)、および水(83uL)をDMF(1mL)に混ぜた混合物を、室温で10分間攪拌し、次いで、(1R, 8S)-ビシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチルスクシンイミジルカーボネート(Berry & associates, 20mg, 0.068mmol)を加えた。反応混合物を室温で90分間攪拌した。混合物に1mLの水を加え、得られた溶液を凍結乾燥して粉末を得、これをそれ以上精製せずに次のステップに使用した。

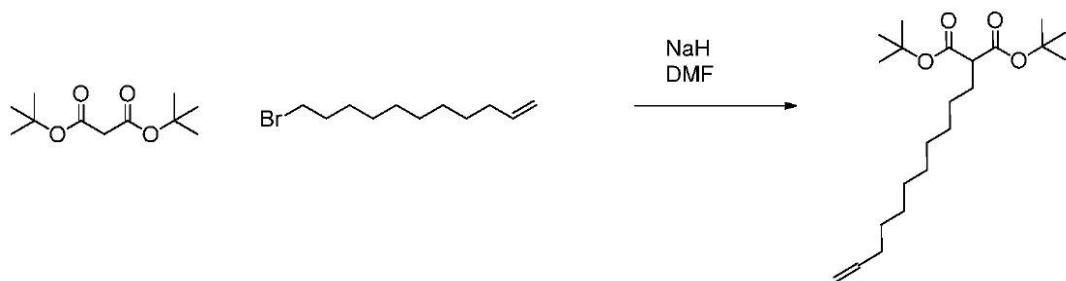
30

【0452】

ステップ2：ジ-tert-ブチル2-(ウンデカ-10-イン-1-イル)マロネート  
【0453】

40

## 【化42】



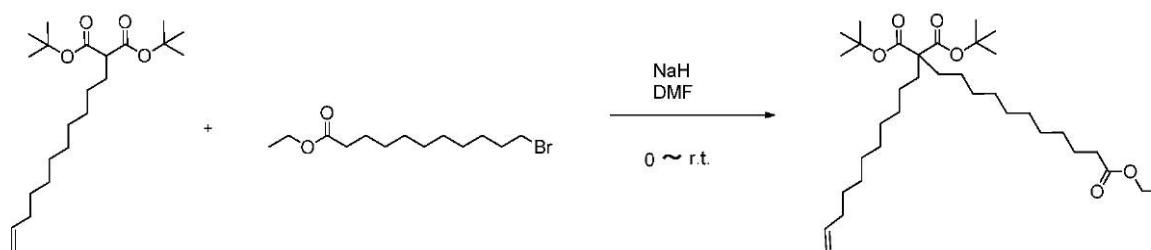
$N_2$  中にて、マロン酸ジ - t e r t - ブチル (800 mg、3.70 mmol) を D M F (9 mL) に 0  $^\circ$  で溶解させ、NaH (148 mg、3.70 mmol) を加える。反応液を 0  $^\circ$  で 30 分攪拌し、11 - プロモ - デカ - 1 - エン (3.33 mmol) をゆっくりと滴下添加して、黄色の溶液を得る。反応液を 0  $^\circ$  で 2 時間攪拌し、次いで室温に温め、16 時間攪拌する。混合物を E t O A c (75 mL) に溶かし、H<sub>2</sub>O (25 mL) で洗浄する。水性層を E t O A c (75 mL) で抽出し、合わせた有機層を N a<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濃縮する。混合物をフラッショカラム (12 g シリカカラム、0 ~ 20 % の E t O A c / ヘプタン) で精製し、画分を濃縮して、所望の生成物を得る。

## 【0454】

ステップ3：11, 11 - ジ - t e r t - ブチル 1 - エチルドコサ - 21 - エン - 1, 1  
1, 11 - トリカルボキシレート

## 【0455】

## 【化43】



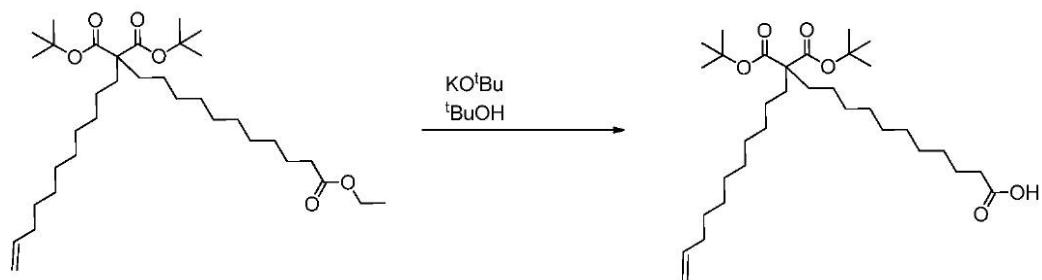
ステップ2からの化合物 (0.442 mmol) を 0  $^\circ$  で D M F (2 mL) に溶解させ、NaH (21.23 mg、0.531 mmol) を加える。反応液を 0  $^\circ$  で 15 分間攪拌し、エチル 11 - プロモウニデカノエート (143 mg、0.486 mmol) をゆっくりと滴下添加する。反応液を室温に温め、16 時間攪拌する。混合物を E t O A c (40 mL) で希釈し、H<sub>2</sub>O (20 mL) で 1 回洗浄する。水性層を E t O A c (40 mL) で 1 回抽出し、有機層を合わせ、N a<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、濃縮する。サンプルを 1 mL の D C M に溶解させ、フラッショカラム (12 g シリカカラム、0 ~ 20 % の E t O A c / ヘプタン、15 分) で精製する。画分を合わせ、濃縮して、所望の生成物を得る。

## 【0456】

ステップ4：12, 12 - ビス ( t e r t - ブトキカルボニル ) トリコサ - 22 - エン酸

## 【0457】

## 【化44】



$N_2$  中にて、ステップ3からの化合物 (0.037 mmol) の  $t\text{BuOH}$  (1 mL) 溶液に、30で  $KOtBu$  (114 mg, 1.012 mmol) の  $t\text{BuOH}$  (2 mL) 溶液を加える。混合物を室温で攪拌し、TLC (1:1のEtOAc/ヘキサン、KMnO<sub>4</sub>、還流) によってモニターする。反応が完了した後、1M HCl (20 mL) で反応混合物を失活させ、EtOAc (25 mL) で2回抽出する。有機層を合わせ、 $Na_2SO_4$  で乾燥させ、濾過し、濃縮する。材料をそれ以上精製せずに持ち越した。

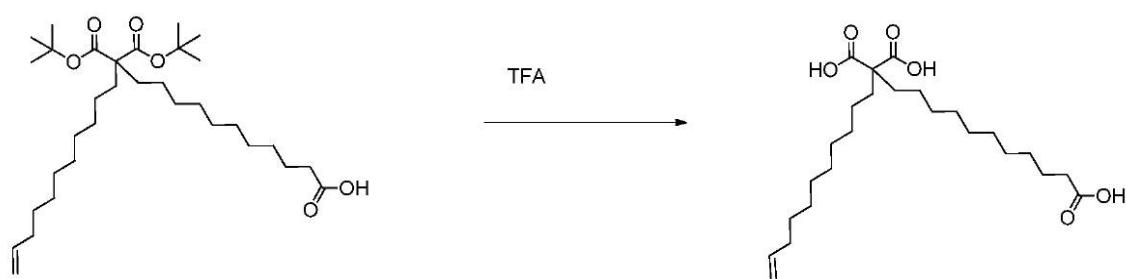
10

## 【0458】

ステップ5：ドコサ-21-エン-1,11,11-トリカルボン酸

## 【0459】

## 【化45】



20

ステップ4からの化合物 (0.022 mmol) に TFA (2 mL) を加え、反応液を室温で1時間攪拌する。混合物を DCM (10 mL) で希釈し、濃縮する。材料を EtOAc (10 mL) に溶かし、 $H_2O$  (20 mL) で洗浄する。有機層を  $Na_2SO_4$  で乾燥させ、濾過し、濃縮する。粗製材料を 1 mL の MeOH に溶解させ、MS起動式HPLC (MS-triggered HPLC) (Sunfire 30 × 50 mm 5 μm カラム 0.1% TFA 含有 ACN/ $H_2O$  75 mL/分、1.5 mL 注入、3.5 分かけて 45 ~ 70 % の ACN) で精製する。

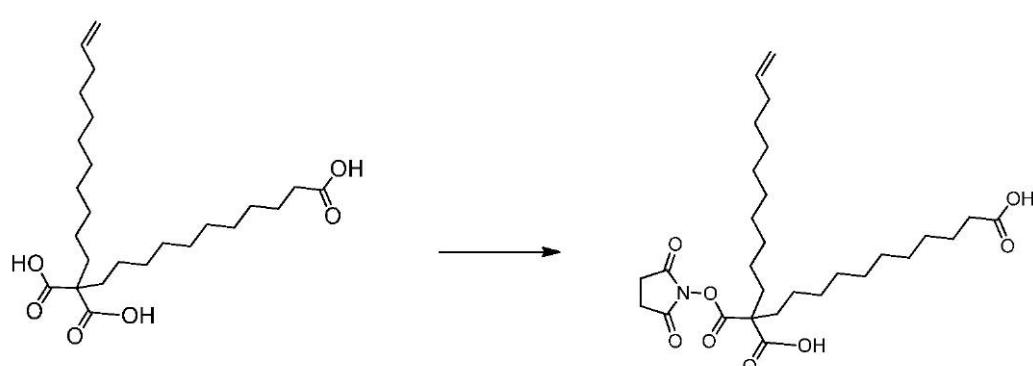
30

## 【0460】

ステップ6：2-(((2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)カルボニル)-2-(ウンデカ-10-エン-1-イル)トリデカン二酸

## 【0461】

## 【化46】



40

50

N - ヒドロキシスクシンイミド (99 mg、0.862 mmol) およびドコサ - 21 - エン - 1,11,11 - トリカルボン酸 (中間体 45: 400 mg、0.908 mmol) を DCM (7 mL) および THF (0.7 mL) に溶かした溶液に、DCM (2 mL) 中 DCC (187 mg、0.908 mmol) を加えた。反応液を終夜攪拌した後、溶媒を蒸発させた。残渣を HPLC (Sunfire C18 30 × 50 mm、55 ~ 80% の ACN / 水 + 0.1% TFA) によって精製して、表題化合物 (155 mg、0.288 mmol、32%) を得た。LCMS 方法 E による。Rt = 1.51 分、M + H 538.3;

## 【数1】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1.16 - 1.46 (m, 28 H) 1.60 - 1.87 (m, 3 H) 1.91 - 2.17 (m, 5 H) 2.38 (t, J=7.03 Hz, 2 H) 2.86 (br. s., 4 H) 3.68 (dd, J=11.25, 7.34 Hz, 1 H) 3.78 (dd, J=11.31, 5.20 Hz, 1 H) 3.99 - 4.10 (m, 1 H).

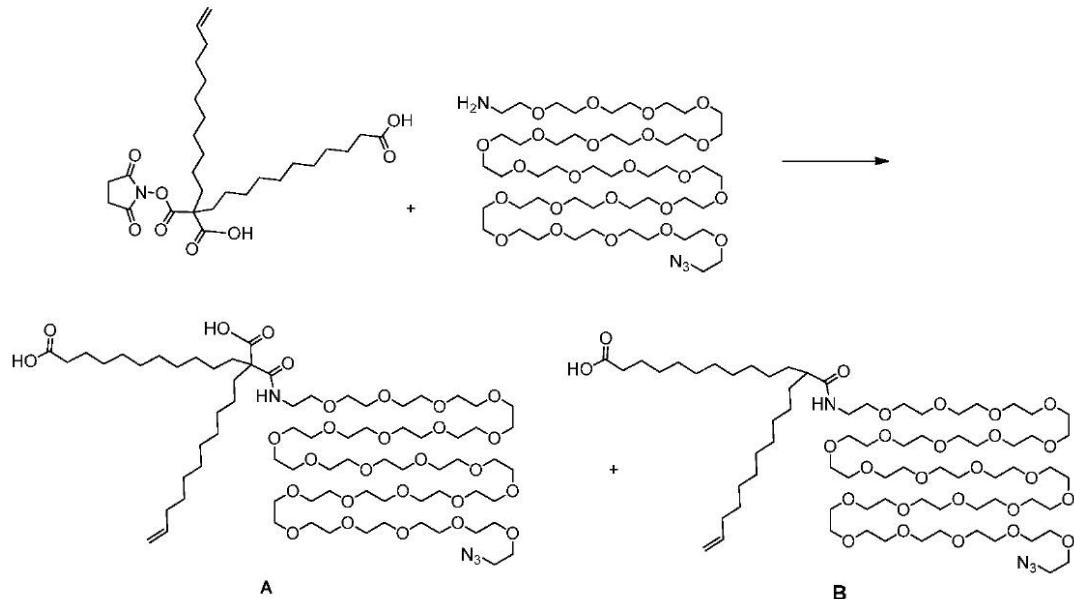
10

## 【0462】

ステップ7：脂肪酸 - PEG リンカー

## 【0463】

## 【化47】



20

アジド - dPEG23 - アミン (Quanta Biodesign: 164 mg、0.149 mmol) およびステップ6からの化合物 (80 mg、0.149 mmol) を THF (2.5 mL) に溶解させた。DIPPEA (39 μL、0.233 mmol) を加え、反応液を終夜攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣を HPLC (Sunfire C18 30 × 50 mm、45 ~ 70% の ACN / 水 + 0.1% TFA) によって精製して、化合物 A (97 mg、0.061 mmol、41%) および B (32 mg、0.021 mmol、14%) を得た。LCMS ZQ1 方法 E Rt = 1.35 分、[M + 2H]<sup>+</sup> 761.9;

30

40

## 【数2】

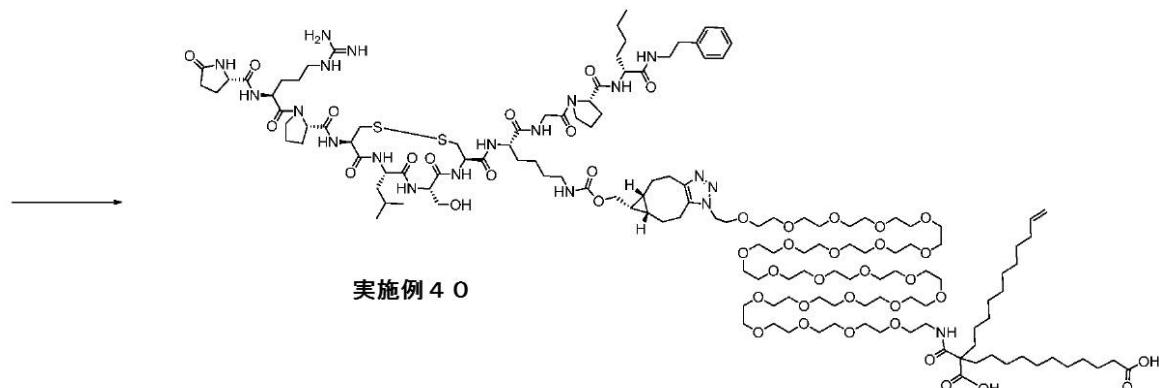
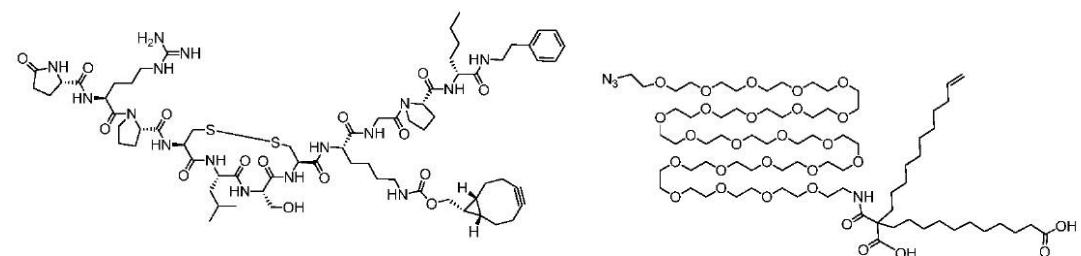
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, ACETONITRILE-d3) δ ppm 1.05 - 1.18 (m, 3 H) 1.19 - 1.32 (m, 20 H) 1.36 (t, J=7.15 Hz, 1 H) 1.48 - 1.59 (m, 2 H) 1.65 - 1.75 (m, 2 H) 2.01 - 2.06 (m, 2 H) 2.25 (t, J=7.46 Hz, 2 H) 3.33 - 3.39 (m, 2 H) 3.39 - 3.44 (m, 2 H) 3.50 - 3.67 (m, 98 H) 4.84 - 4.95 (m, 1 H) 4.95 - 5.06 (m, 1 H) 5.83 (ddt, J=17.07, 10.29, 6.68, 6.68 Hz, 1 H) 7.31 (t, J=5.44 Hz, 1 H); LCMS 方法 E Rt = 1.50 分, [M+2H]<sup>+2</sup> 739.9; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, ACETONITRILE-d3) δ ppm 1.16 - 1.42 (m, 30 H) 1.42 - 1.63 (m, 5 H) 2.00 - 2.07 (m, 2 H) 2.22 - 2.28 (m, 2 H) 2.40 - 2.52 (m, 2 H) 3.25 - 3.33 (m, 2 H) 3.33 - 3.42 (m, 2 H) 3.42 - 3.50 (m, 2 H) 3.50 - 3.68 (m, 88 H) 4.86 - 5.06 (m, 2 H) 5.83 (ddt, J=17.04, 10.26, 6.71, 6.71 Hz, 1 H) 6.40 - 6.74 (m, 1 H). 10

## 【0464】

ステップ8：実施例40の調製：

## 【0465】

## 【化48】



p E - R - P - C \* - L - S - C \* - N<sup>6</sup> - [ [ ( 1 , 8 , 9 ) - ビシクロ [ 6 . 1 . 0 ] ノナ - 4 - イン - 9 - イルメトキシ ] カルボニル ] - K - G - P - ( D - N 1 e ) - NH ( フェネチル ) [ ジスルフィド C 4 - C 7 ] ( 1 mL の水中にステップ1からの生成物 50 mg、0.034 mmol ) とステップ7からの化合物 A ( 268 uL の水中に 52 mg ) の混合物を、室温で約3時間攪拌した。次いで、反応混合物を分取 HPLC ( Sunfire 30 × 50 mm 5 um カラム 0.1% TFA 含有 ACN / H<sub>2</sub>O 75 ml / 分、5分で 15 ~ 40 % の ACN の勾配 ) によって精製した。生成物画分を凍結乾燥して、表題生成物を TFA 塩 ( 24 mg、21 % ) として得た。LCMS ( Waters Acuity UPLC BEH C18 1.7 um 2.1 × 50 mm、50 、溶離液 A : 水 + 0.1% ギ酸、溶離液 B : アセトニトリル + 0.1% ギ酸、勾配 5.15 分かけて 2% ~ 98% の B / A ) : 保持時間 : 2.77 分、MS [ M + 2 ]<sup>2+</sup> : 実測値 : 1491.8808 、計算値 : 1491.8560。 40

## 【実施例41】

## 【0466】

10

20

30

40

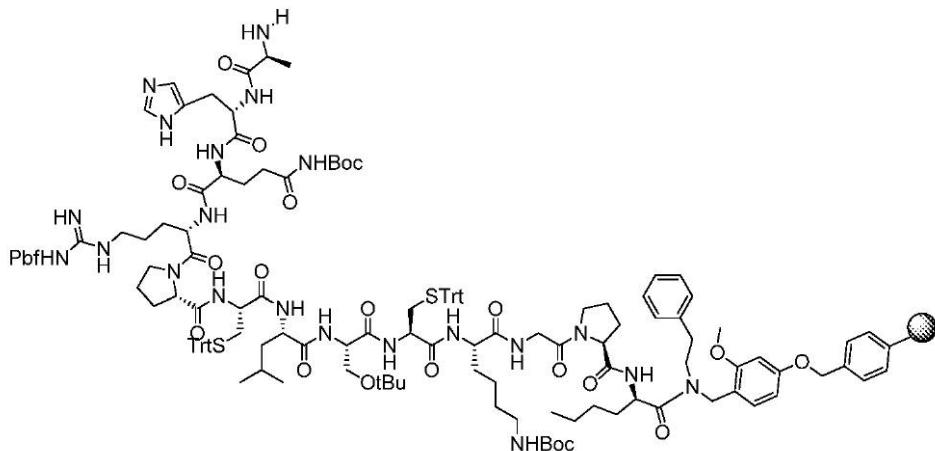
50

## N末端における脂肪酸とのアペリン環状ペプチドコンジュゲート

ステップ1：A - H - Q - R - P - C - L - S - C - K - G - P - D N l e - フェネチル  
アミン中間体41aの合成

【0467】

【化49】



10

フェネチルアミン - A M E B A 樹脂 (Sigma Aldrich, 0.1 mmol, 1.0 mmol/g) を、Arg 残基に2倍の標準 Arg を用い、DNle が2倍テンポでカップリングされる、自動ペプチド合成装置 (CEM Liberty Blue Micro wave) での固相ペプチド合成にかけた。アミノ酸は、0.2 M DMF 溶液として調製した。標準カップリングサイクルは、次のとおりに定めた。

20

- アミノ酸カップリング：AA (5当量)、HATU (5当量)、DIEA (25当量)
- 洗浄：DMF (3×7 mL)
- Fmoc 脱保護：20% ピペリジン / 0.1 M HOBT (2×7 mL)
- 洗浄：DMF (4×7 mL、次いで1×5 mL)

【0468】

【表16】

30

カップリング	AA	カップリングの数×反応時間(温度)	カップリング方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1×10分 (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2×25分 (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1×5分 (70°C)	DIEA/HATU

40

【0469】

ペプチドを組み立てた後、樹脂を DMF (2×50 mL) および DCM (2×50 mL) で洗浄し、次いで真空中で乾燥させて、中間体41a (276 mg, 0.1 mmol)

50

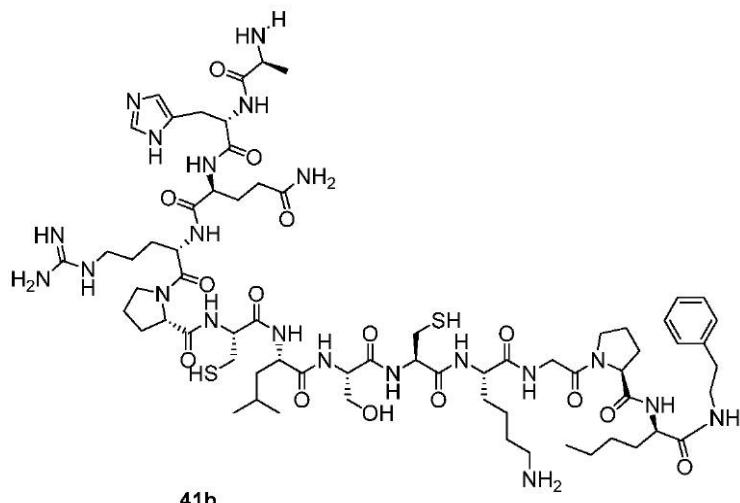
を得た。

【0470】

ステップ2：中間体41bの調製（樹脂からのペプチドの切断）

【0471】

【化50】



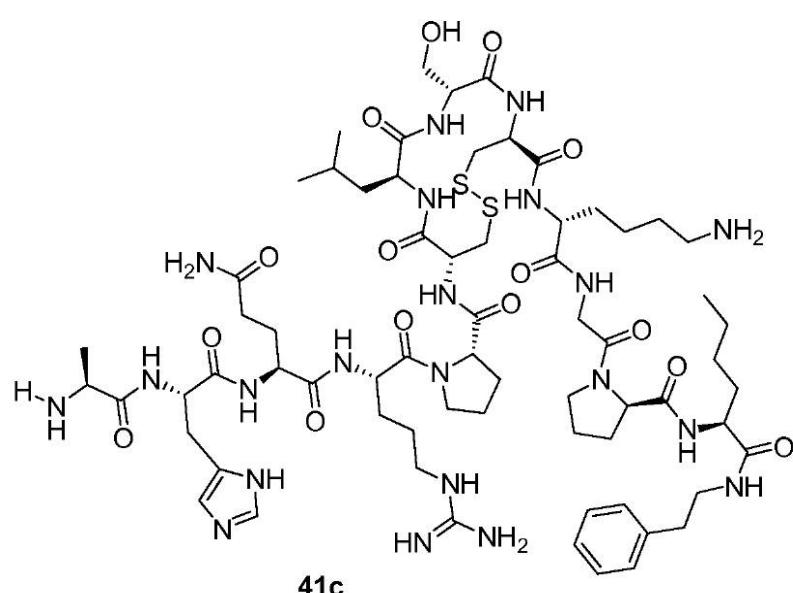
中間体41a(276mg、0.1mmol)を4mLのTFA溶液(37mLのTFA、1mLのH<sub>2</sub>O、1mLのTIPS、3.06gのDTT)と合わせ、室温で3時間振盪した。溶液を樹脂から取り去り、40mLの冷Et<sub>2</sub>O中に沈殿させた。溶液をボルテックスし、氷上で10分間静置した後、4000rpmで5分間遠心分離した。溶媒を除去し、白色の固体を冷Et<sub>2</sub>O(各回40mL)でもう2回洗浄し、遠心分離(各回5分)し、デカントした。固体を真空中で終夜乾燥させて、中間体41b-バッチ1(17.4mg、0.012mmol)を得た。LCMS(SQ2生成物分析-酸性-ペプチド-極性、Acquity UPLC BEH C18カラム、130、1.7μm、2.1mm×50mm、50)：Rt = 1.83分、MS [M+H] 1513.5。

【0472】

ステップ3：中間体41cの調製（システイン残基の環化）

【0473】

【化51】



中間体 41 b - バッヂ 1 および 2 ( 29.6 mg、0.020 mmol ) を、水 ( 3 mL ) および 10 滴の DMSO に溶解させて、わずかに濁った溶液を得た。ヨウ素 ( 5.0 mM HOAc 溶液、0.783 mL、0.039 mmol ) をゆっくりと滴下添加し、反応液を室温で終夜混合した。粗反応液の LCMS 分析によって、出発材料の完全な変換が示された。色が消失するまで、0.5 M のアスコルビン酸を滴下添加した。材料を MS 起動式 HPLC で精製した。プールされた画分を凍結乾燥すると、7 mg の所望の生成物が白色の粉末 ( 4.63 μmol、24% ) として得られた。LCMS ( SQ2 生成物分析 - 酸性 - ペプチド、Acquity UPLC BEH C18 カラム、130 °C、1.7 μm、2.1 mm × 50 mm、50 ) : Rt = 0.90 分、MS [M + H] 1511.8。

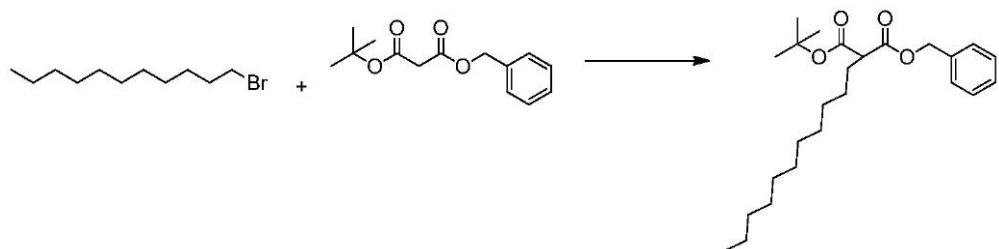
10

## 【0474】

ステップ 4 : 1 - ベンジル 3 - tert - ブチル 2 - ウンデシルマロネート

## 【0475】

## 【化 52】



20

N<sub>2</sub> 中の 0 の NaH ( 160 mg、4.0 mmol ) DMF ( 8 mL ) 懸濁液に、DMF ( 2 mL ) 中ベンジル tert - ブチルマロネート ( 1.0 g、4.0 mmol ) を加えた。混合物を 50 分間攪拌し、その後、DMF ( 2 mL ) 中 1 - プロモウンデカンを加えた。さらに 1 時間攪拌した後、反応液を室温に温めた。反応を終夜持続させた。Et<sub>2</sub>O ( 100 mL ) と水 ( 20 mL ) を加えて、反応液を分配した。水性相を Et<sub>2</sub>O ( 100 mL ) で抽出し、合わせた有機材料を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、残渣をフラッシュカラム ( C18 12 g、40 ~ 100% の ACN / 水 + 0.1% TFA ) によって精製して、表題化合物を無色の油状物 ( 1.14 g、2.82 mmol、71% ) として得た。LCMS 方法 F Rt = 1.58 分、M + Na 427.4；

## 【数 3】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm

0.84 - 0.96 (m, 3 H) 1.28 (br. s, 12 H) 1.31 (m, J=3.90 Hz, 6 H) 1.41 (s, 9 H) 1.88 (q, J=7.38 Hz, 2 H) 3.29 (t, J=7.58 Hz, 1 H) 5.19 (q, J=12.27 Hz, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 5 H).

## 【0476】

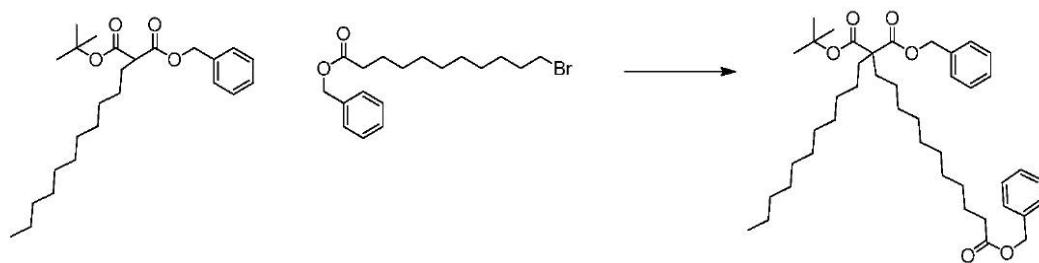
ステップ 5 : 1,11 - ジベンジル 11 - tert - ブチルドコサン - 1,11,11 - トリカルボキシレート

## 【0477】

30

40

## 【化 5 3】



表題化合物は、ステップ4からの化合物(177mg、0.284mmol)を出発材料として使用し、実施例40のステップ3と同様の要領で合成して、無色の油状物(153mg、0.213mmol、75%)を得た：

## 【数4】

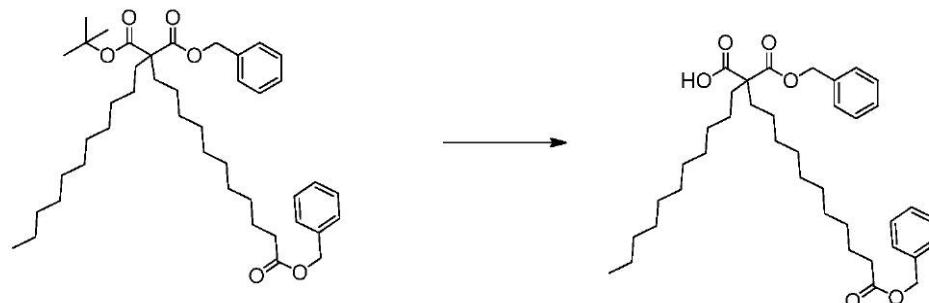
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (*t*, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

## 【0478】

ステップ6：13-(ベンジルオキシ)-2-((ベンジルオキシ)カルボニル)-13-オキソ-2-ウンデシリトリデカン酸

## 【0479】

## 【化54】



ステップ5からの化合物(200mg、0.295mmol)のDCM(3mL)溶液に、TFA(0.6mL)を加え、反応液を室温で3時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣をフラッシュカラム(シリカ12g、0~15%のEtOAc/HEP)によって精製して、表題化合物(177mg、0.284mmol、96%)を得た：

## 【数5】

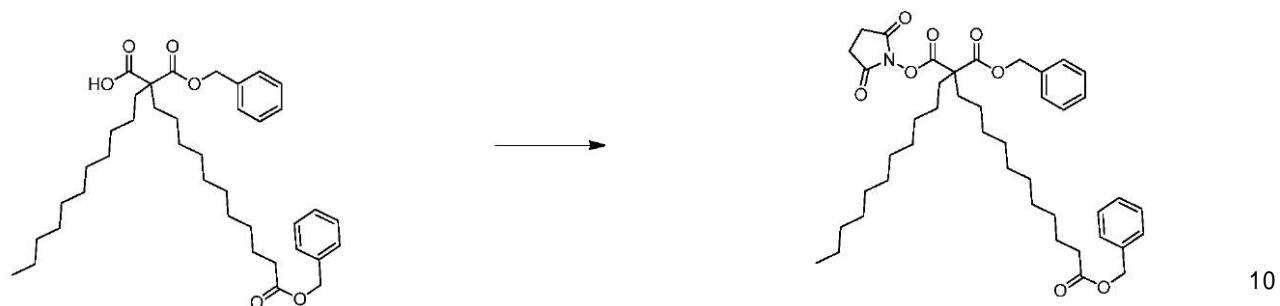
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (*t*, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31 - 7.44 (m, 10 H).

## 【0480】

ステップ7：1,11-ジベンジル11-(2,5-ジオキソシクロペンチル)ドコサン-1,11,11-トリカルボキシレート

## 【0481】

## 【化 5 5】



表題化合物は、ステップ 6 からの化合物 (177 mg、0.284 mmol) を出発材料として使用し、実施例 40 のステップ 6 と同様の要領で合成して、無色の油状物 (153 mg、0.213 mmol、75%) を得た：

## 【数 6】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

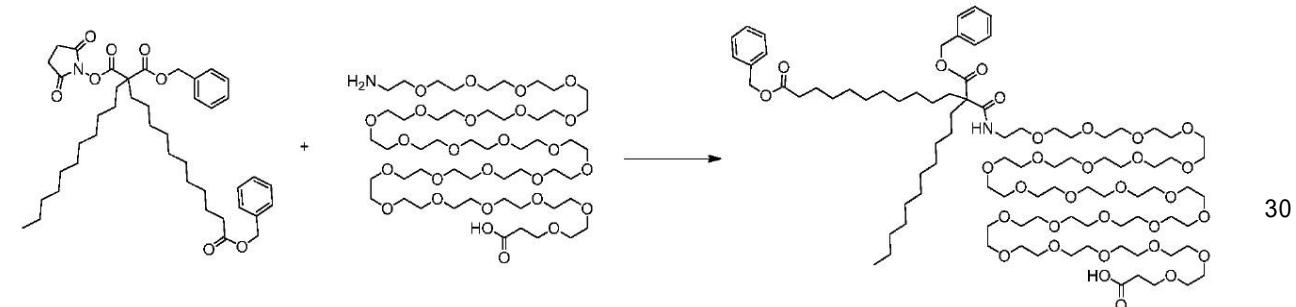
20

## 【0482】

ステップ 8：

## 【0483】

## 【化 5 6】



アミノ - P E G 2 4 - 酸を装入したバイアルに、中間体 3 4 (145 mg、0.201 mmol) を T H F (1.5 mL) および D C M (1.5 mL) に溶かした溶液を加えた。D I P E A (88 μL、0.504 mmol) を加え、反応液をシェーカープレート上で 15 時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣を超臨界流体クロマトグラフィー (W a t e r s H I L I C 2 0 × 1 5 0 m m, 1 5 ~ 2 5 % の M e O H / C O<sub>2</sub>) によって精製して、中間体 3 5 (151 mg、0.086 mmol、43%) を得た。L C M S 方法 E R t = 1.30 分、[M + 2 H] + 2 8 7 6 . 4 ;

40

## 【数 7】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 0.93 - 1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23 - 1.37 (m, 15 H) 1.61 - 1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52 - 3.59 (m, 2 H) 3.59 - 3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31 - 7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H).

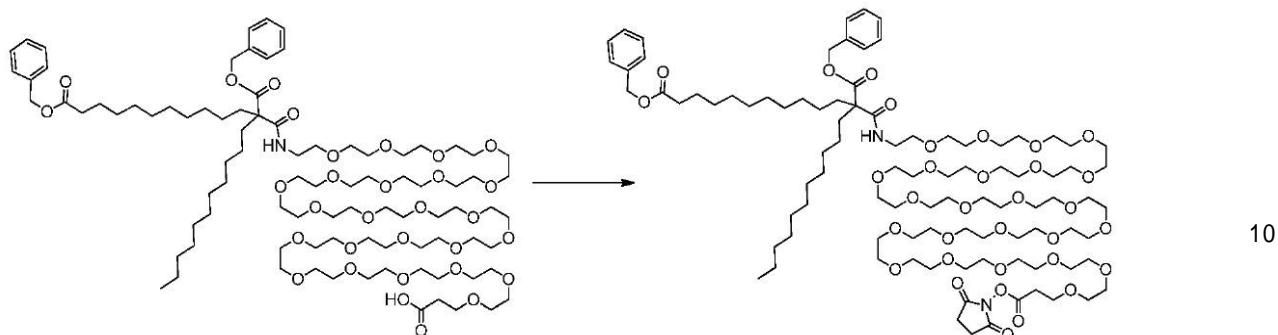
## 【0484】

ステップ 9：

50

【0485】

【化57】



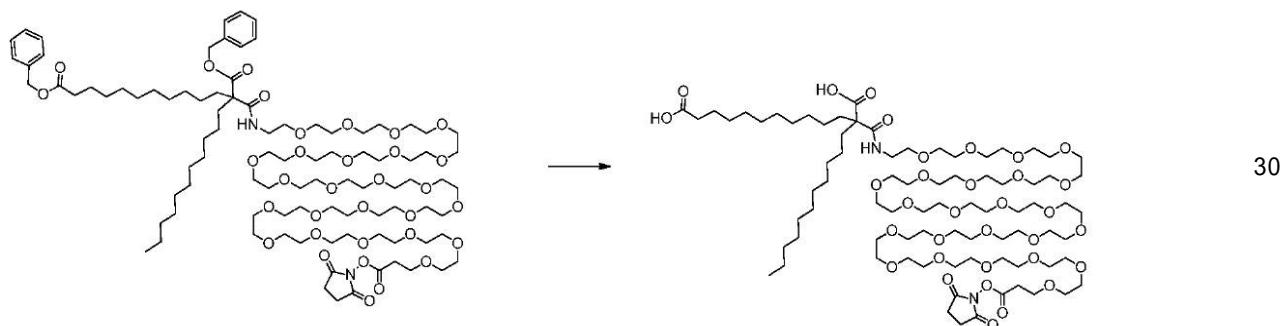
中間体35(150mg、0.086mmol)およびN-ヒドロキシスクシンイミドをDCM(1.5mL)に溶かした溶液に、DCM(0.265mL)中DCC(22mg、0.103mmol)を加えた。反応液を1.5時間攪拌した。追加のTHF(0.5mL)中N-ヒドロキシスクシンイミド(10mg)およびDCM(0.265mL)中DCC(22mg)を加え、反応液を終夜攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣をフラッシュカラム(シリカ12、0~5%のMeOH/DCM)によって精製して、中間体36(159mg、定量的)を白色の固体として得た。LCMS方法G R<sub>t</sub>=1.55分、[M+H<sub>3</sub>O+H]<sup>+2</sup> 933.9。

【0486】

ステップ10：

【0487】

【化58】



ステップ9からの化合物(159mg、0.086mmol)のTHF(5mL)溶液に、10%Pd炭素(4.6mg、4.3mol)のTHF(1mL)懸濁液を加えた。反応液を水素中に置き、40分間攪拌した。さらにPd炭素(7mg、6.5μmol)を加え、水素中でもう1時間攪拌した。反応液をメンブランフィルターに通し、濾液を蒸発にかけた。残渣をHPLC(Sunfire C18 30×50mm、45~70%のACN/水+0.1%TFA)によって精製して、表題化合物(83mg、0.047mmol、54%)を得た。LCMS方法G R<sub>t</sub>=1.03分、[M+2H]<sub>+</sub> 2835.2；

【数8】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) ppm

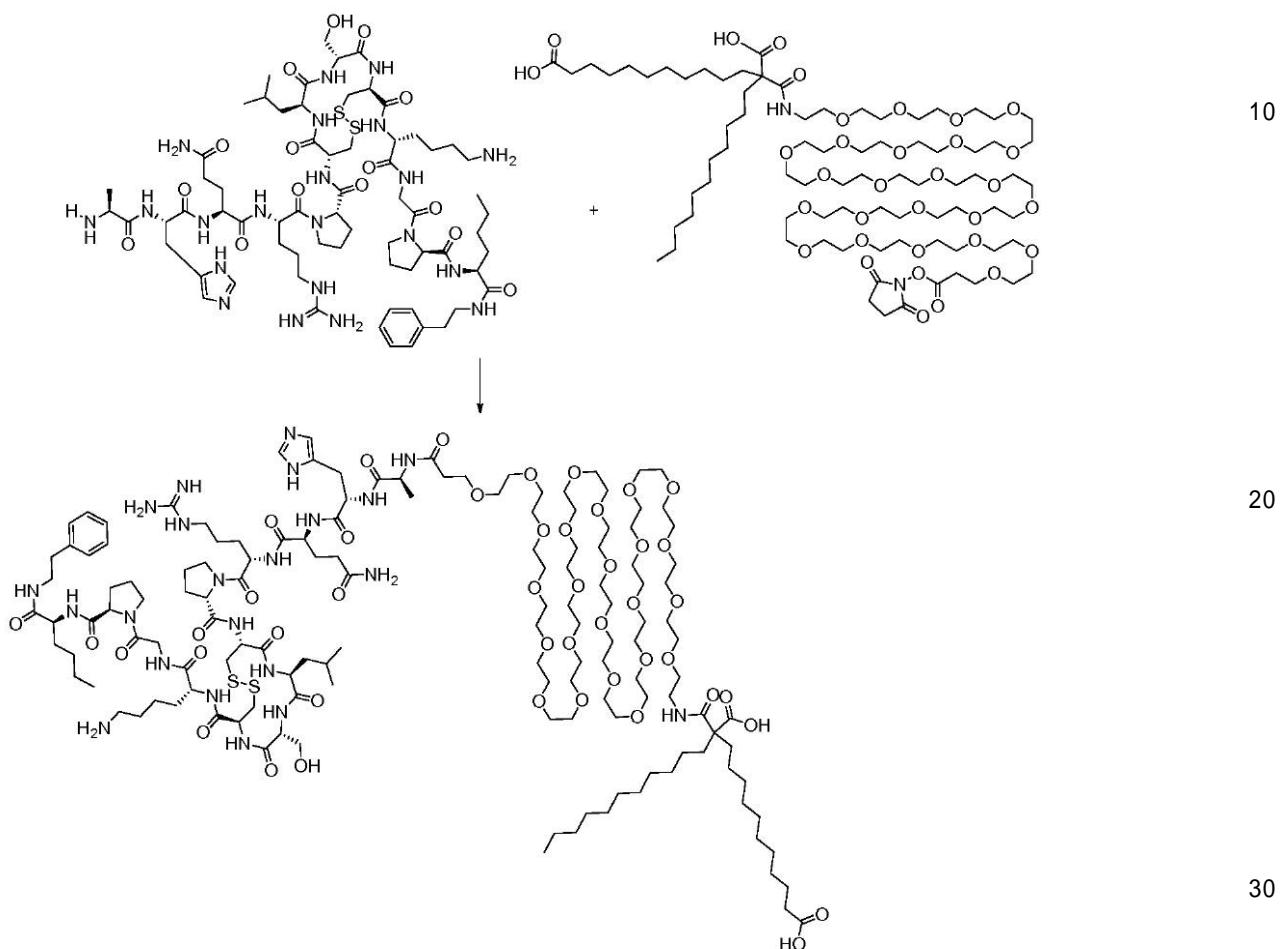
0.84 - 0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21 - 1.39 (m, 30 H) 1.57 - 1.68 (m, 2 H) 1.69 - 1.80 (m, 2 H) 1.97 - 2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, J=7.21 Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, J=6.48 Hz, 2 H) 3.51 - 3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, J=6.48 Hz, 2 H) 7.45 (t, J=4.46 Hz, 1 H)

## 【0488】

ステップ4：アペリン構築物A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DN1  
e-フェネチルアミンと脂肪酸-P EG構築物とを含むコンジュゲート（N末端コンジュゲーション）-実施例41の調製

## 【0489】

## 【化59】



10 mg / mL の N H S - 脂肪酸（実施例40のステップ7からの生成物A）の溶液を、H<sub>2</sub>O中に調製した。中間体41c（1.5 mg、0.993 μmol）を30 mMのpH 4 NaOAc緩衝液（672 μL）に溶解させ、NHS-脂肪酸（0.850 mL、5.10 μmol）を加えた。反応液を室温で16時間混合し、その時点で、追加の1.5 mgのNHS-脂肪酸（H<sub>2</sub>O中10 mg / mL）を加え、反応液を室温で16時間混合した。8 mgのNHS-脂肪酸（H<sub>2</sub>O中10 mg / mL）を加え、反応液を室温で3日間混合し、1.7 mgのNHS-脂肪酸（H<sub>2</sub>O中10 mg / mL）を加えた。混合物を室温で16時間振盪し、M作動式HPLCで精製して、1.7 mgの表題化合物を白色の粉末（0.510 μmol、51%）として得た。LCMS（SQ2生成物分析 - 酸性 - ペプチド - 極性、Acquity UPLC BEH C18カラム、130 °C、1.7 μm、2.1 mm × 50 mm、50 °C）：Rt = 3.87分、MS [M + H + 2 / 2] 1533.1、[M + H + 3 / 3] 1022.9。

## 【実施例42】

## 【0490】

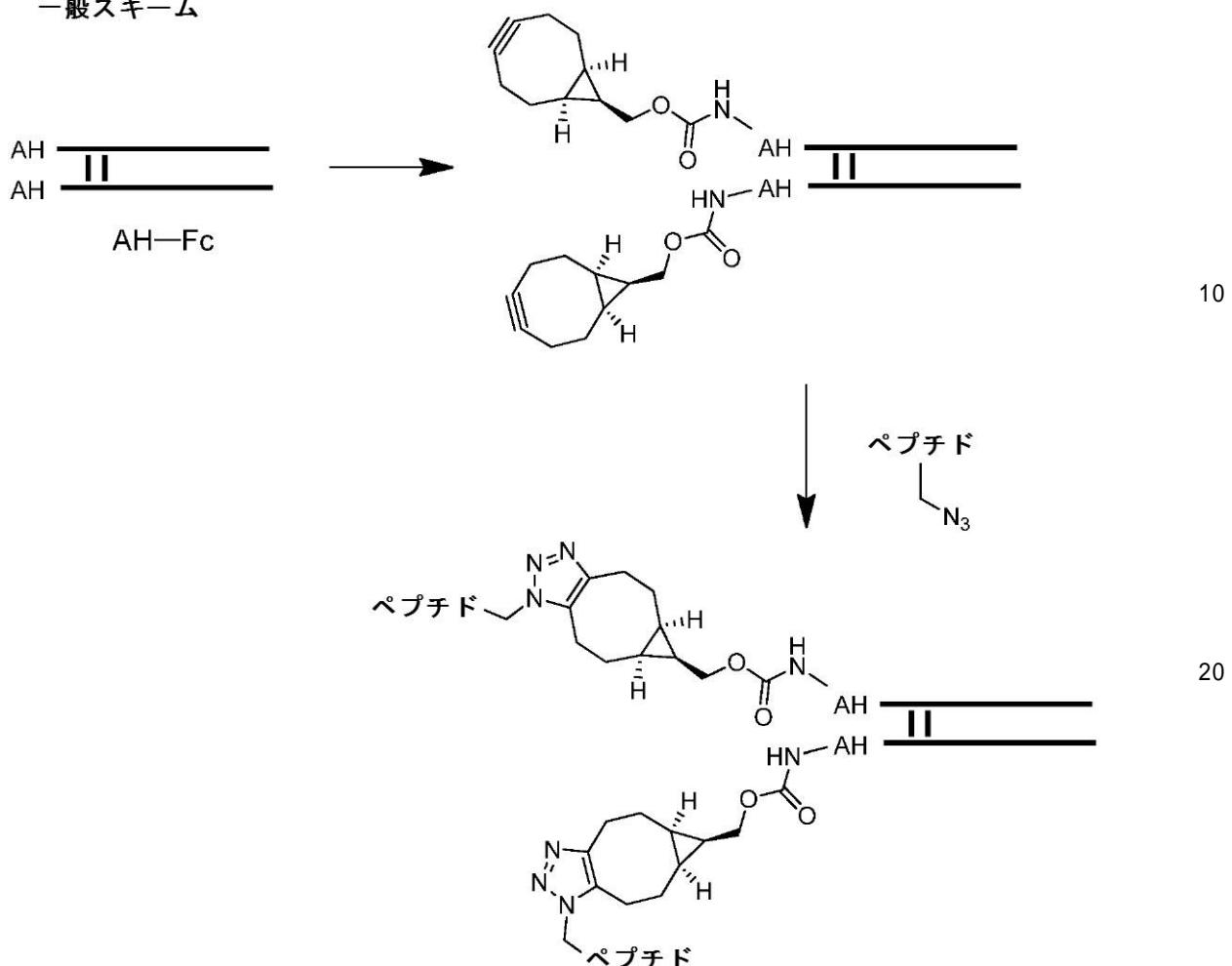
A H - F c のアペリン環状ペプチドとのコンジュゲーション

## 【0491】

40

## 【化 6 0】

一般スキーム



## 【0492】

ステップ1：A H - F c 構築物の調製：

構築物クローン化：

マウス Ig 鎖シグナルペプチドに続いてヒト Fc および短いビス - アミノ酸配列 (AH) を含んでいる DNA 断片を、5' - Nhe I および 3' - Eco RI 制限部位を用いた遺伝子合成 (GeneArt) によってコドン最適化した。得られる配列を、Nhe I および Eco RI の両方を用いて制限消化し、CMV プロモーターの下流で、ベクター pPL1146 の Nhe I および Eco RI 部位に連結した。連結を大腸菌 (E. coli) DH5 細胞に形質転換し、適正な挿入物を含んでいるコロニーを、DNA 配列決定によって鑑別した。示す配列は、センス鎖についてのものであり、5' から 3' 方向に伸びている。

## 【0493】

## 【化61】

AH-Fc

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCCTGCTGCTGTGGTCCTGCTGCTGTGGTGCCT  
 GGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGG  
 CAGCTGGAGGACCAAGCGTGTCCCTGTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATC  
 TCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCGAAG  
 TCAAGTTCACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCGA  
 GAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGG  
 ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCA  
 ATCGAGAAAACAATTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCAGGTGTACACTCT  
 GCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAAGAACAGGTCACTGACTTGTCTGGTCAAAG  
 GCTTCTACCCCTCCGACATCGCAGTGGAGTGGAAATCTAATGCCAGCCTGAAAACAAT  
 TACAAGACACACCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTTTCTGTATTCTAAGCT  
 GACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTATGCAC  
 GAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTTGAGTCCAGGCAAATGAGA  
 ATTC

10

20

AH - Fc 構築物の配列 :

## 【0494】

## 【化62】

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG AHDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
 51 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
 101 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
 151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVVL  
 201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

30

## 【0495】

AH - Fc タンパク質発現および精製 :

標準のポリエチレンイミン法を使用して、1 mlあたり $1 \times 10^6$  細胞の密度で、AH - Fc 発現プラスミドDNAをHEK293T細胞に形質移入した。次いで、500 mlの培養物を、3 L フラスコ中のFreeStyle 293 Medium (Life Technologies)において37℃で4日間成長させた。

## 【0496】

AH - Fc タンパク質を、清澄化した条件培地から精製した。簡潔に述べると、500 mlの条件培地を、4 ml/分で、5 mlのHiTrap MabSelect Sureカラム (GE Life Sciences) に流した。0.1%の Triton X - 114 を含有する20カラム体積のPBSでカラムを洗浄し、次いで、AH - Fc タンパク質を0.1Mのグリシン (pH 2.7) で溶離させ、1MのTris - HCl (pH 9) で中和し、PBSに対して透析した。タンパク質収量は、条件培地500 mlあたり10~20 mgであり、エンドトキシンレベルは、Charles River ENDOSAFE PTS 試験によって測定したとき、1 EU/mgを下回った。

40

## 【0497】

AH - Fc タンパク質の品質管理 :

AH - Fc タンパク質のLC/MS : ピークは、不均一であり、二量体について予想されるより約3 kDa 大きかった。これは、N - 連結型グリコシル化コンセンサス部位を有するFcについて予想されるN - 連結型グリコシル化の特性を示している。

50

## 【0498】

還元されたN-脱グリコシルAH-Fcタンパク質のLC/MS：鋭利なピークを示す。AH-Fcの分子量は、予想どおりであった。C末端のシステインは、タンパク質を切断から保護すると思われる。

## 【0499】

Superdex 200での分析的サイズ排斥：Fc-アペリンタンパク質は、89%～100%の間の二量体、0～10%の四量体、および0～1%の凝集体を有する。

## 【0500】

還元SDS/PAGE：すべてのタンパク質が、主に、予想されたサイズのモノマーとして移動した。

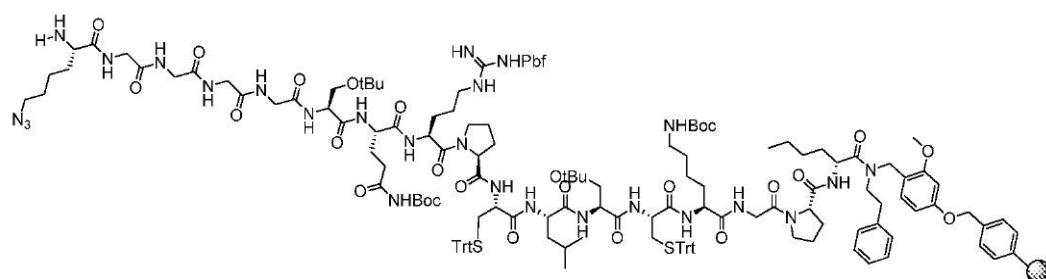
10

## 【0501】

ステップ2：NH<sub>2</sub>-アジドLys-GGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-フェネチルアミンの合成

## 【0502】

## 【化63】



20

フェネチルアミン-AMEBA樹脂(Sigma Aldrich, 0.25 mmol、1.0 mmol/g)を、Arg残基に2倍の標準Argを用い、D-Nleおよびアジドリシンが2倍テンポでカップリングされる、自動ペプチド合成装置(CEM Liberty Blue Microwave)での固相ペプチド合成にかけた。アミノ酸は、0.2 M DMF溶液として調製した。標準カップリングサイクルは、次のとおりに定めた。

- アミノ酸カップリング：AA(5当量)、HATU(5当量)、DIEA(25当量)
- 洗浄：DMF(3×7 mL)
- Fmoc脱保護：20%ピペリジン/0.1 M HOBt(2×7 mL)
- 洗浄：DMF(4×7 mL、次いで1×5 mL)

30

## 【0503】

【表 1 7】

カップリング	AA	カップリングの数×反応時間(温度)	カップリング方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1×10分(70℃)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2×25分(25℃)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1×5分(70℃)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1×10分(70℃)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-アジド Lys-OH	1×10分(70℃)	DIEA/HATU

[ 0 5 0 4 ]

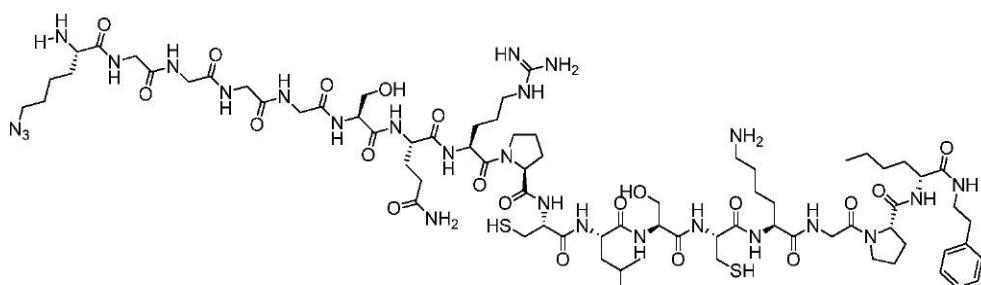
ペプチドを組み立てた後、樹脂を D M F (  $2 \times 50$  mL ) および D C M (  $2 \times 50$  mL ) で洗浄し、次いで真空中で乾燥させて、中間体 42a ( 770 mg, 0.250 mmol ) を得た。

[ 0 5 0 5 ]

### ステップ3：中間体42bの調製（樹脂からのペプチドの切断）

( 0 5 0 6 )

【化 6 4】



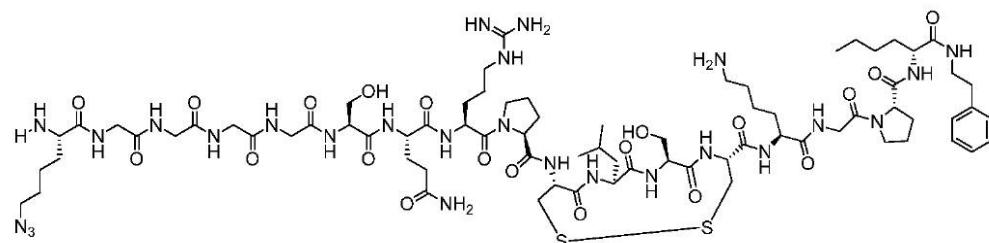
中間体42a(770mg、0.250mmol)を半分に分け、各サンプルを6mLのTFA溶液(37mLのTFA、1mLのH<sub>2</sub>O、1mLのTIPS、2.569g(20当量)のDTT)と合わせ、室温で3時間振盪した。溶液を樹脂から取り去り、40mLの冷Et<sub>2</sub>O中に沈殿させた。溶液をボルテックスし、氷上で10分間静置した後、4000rpmで5分間遠心分離した。溶媒を除去し、白色の固体を冷Et<sub>2</sub>O(各回40mL)でもう2回洗浄し、遠心分離(各回5分)し、デカントした。固体を真空中で終夜乾燥させ、M起動式HPLCで精製して、中間体43bを白色の粉末(80mg、0.045mmol、80%)として得た。LCMS(SQ2生成物分析-酸性-ペプチド-極性、Acquity UPLC BEH C18カラム、130、1.7μm、2.1mm×50mm、5.0)：Rt=2.32分、MS [M+H]<sup>+</sup> 218.88、0.

( 0 5 0 7 )

#### ステップ4：中間体42cの調製（システイン残基の環化）

【0508】

【化65】



10

中間体 42b (80 mg、0.045 mmol) を水 (1.25 mL) に溶解させ、ヨウ素 (50 mM HOAc 溶液、1.804 mL、0.090 mmol) をゆっくりと滴下添加し、反応液を室温で3時間混合した。粗反応液のLCMS分析によって、出発材料の完全な変換が示された。色が消失するまで、0.5 M のアスコルビン酸を滴下添加した。材料をMS起動式HPLCで精製した。プールされた画分を凍結乾燥すると、20.1 mg の所望の生成物が白色の粉末 (0.045 mmol、25%) として得られた。LCMS (SQ2 生成物分析 - 酸性 - ペプチド - 極性、Acquity UPLC BEH C18 カラム、130 °C、1.7 μm、2.1 mm × 50 mm、50 °C) : Rt = 2.17 分、MS [M + H + 2 / 2] 886.8。

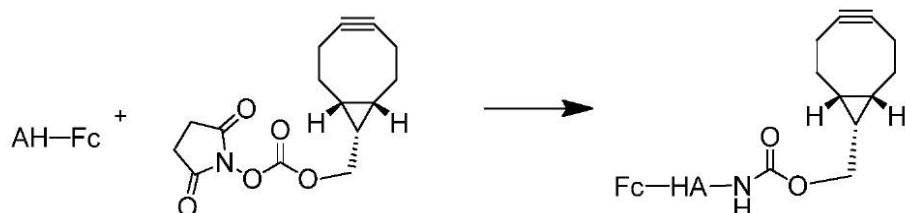
【0509】

20

ステップ5：Fc-AH BCN の調製 (AH-Fc N末端上でのクリックハンドルの取り付け)

【0510】

【化66】



30

Fc-AH (ステップ1より：1 mL、3 mg/mL、0.117 μmol) を30 mM のNaOAc pH 4.0 (4.3 mL) に溶解させ、10 mg/mL の(1R, 8S, 9S)-ビシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル (2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カーボネート (BCN) のDMSO (0.70 mL) 保存液をゆっくりと加え、反応液を室温で3日間、シェーカープレートに載せた。BCN (0.25 mL) を加え、反応液を室温で3日間混合した。BCN (0.70 mL) を加え、反応液を室温で16時間混合した。溶液は、10 kDa MWCO Amicon 遠心フィルターを使用し、反応液を5回希釈および濃縮することにより、30 mM のNaOAc pH 4.0 に換えて、体積を900 μLとした。溶液を遠心分離し、上清を除去した。濃度は、A280 によって 1.73 mg/mL (1.56 mg、26%) と測定された。LCMS (QTR2、タンパク質 20 ~ 70 kDa 3分、Proswift Monolith 4.6 × 50 mm、50 °C、溶離液A：水 + 0.1% ギ酸、溶離液B：CAN + 0.1% ギ酸、2分かけて 2 ~ 98% ) Rt = 1.58 分。

40

【0511】

【表 18】

標識の度合い	計算値	実測値	% TIC (MS+) 強度
AH-Fc	51141	51141.5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

## 【0512】

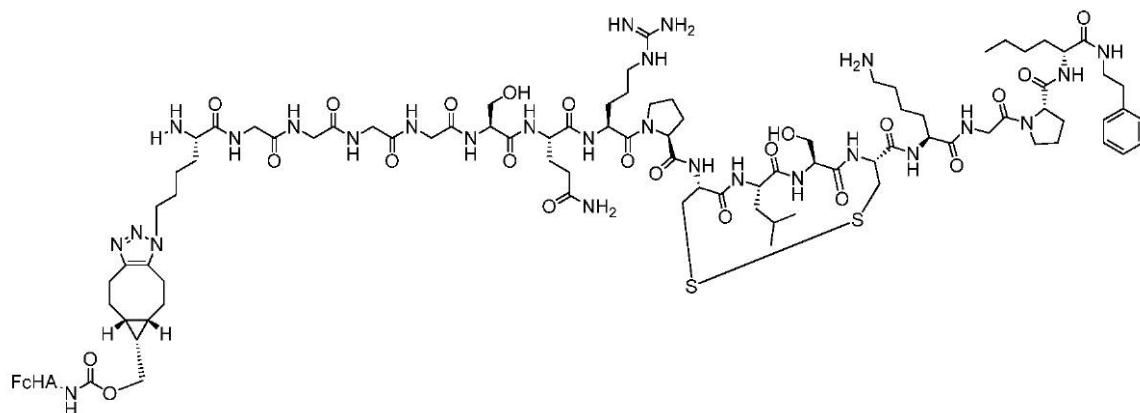
ステップ6：実施例42の調製：中間体43cにコンジュゲートさせたFc-HA-BCN

N

10

## 【0513】

## 【化67】



20

50 mg / mL の中間体42cのH<sub>2</sub>O保存液を調製した。（ステップ5からの）Fc-HA-BCNの30 mM NaOAc pH 4.0保存液（1.73 mg / mL、1.56 mg、0.030 μmol）に、中間体43c（53.7 μL、1.515 μmol）を加え、反応液を室温で16時間混合した。溶液は、50 kDa MWCO Amicon遠心フィルターを使用し、反応液を5回希釈および濃縮することにより、30 mMのNaOAc pH 4.0に換えて、体積を250 μLとした。濃度は、A280によって3.32 mg / mL（830 μg、50%）と測定された。LCMS (Q T2、タンパク質\_35 ~ 70 kDa\_3分、Proswif t Monolith 4.6 × 50 mm、50、溶離液A：水 + 0.1% ギ酸、溶離液B：CAN + 0.1% ギ酸、2分かけて10 ~ 80%のB) R<sub>t</sub> = 1.43分、MS [M (グリコシル化) + H] 54524.5。

30

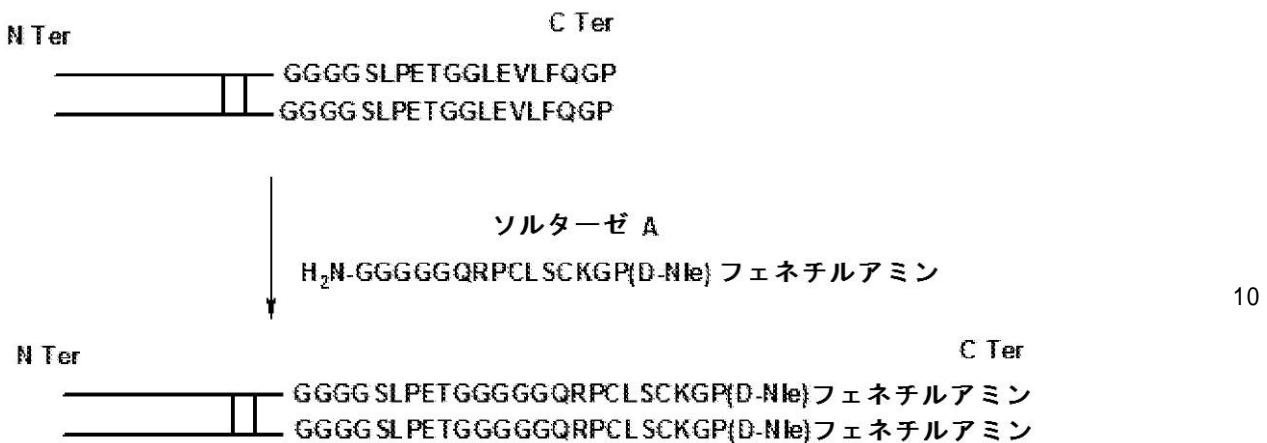
## 【実施例43】

## 【0514】

ソルターゼを使用してのFc-アペリンコンジュゲート：

## 【0515】

## 【化 6 8】



## 【0516】

ステップ1：F c - ソルターゼ構築物の調製：

構築物クローン化：

マウス Ig 鎖シグナルペプチドに続いてヒト F c およびソルターゼ認識配列 (L P X T G) を含んでいるDNA断片を、5' - N he I および 3' - E c o R I 制限部位を用いた遺伝子合成 (Gene Art) によってコドン最適化した。得られる配列を、N he I および E c o R I の両方を用いて制限消化し、CMVプロモーターの下流で、ベクター pPL1146 の N he I および E c o R I 部位に連結した。連結を大腸菌 (E coli) DH5 細胞に形質転換し、適正な挿入物を含んでいるコロニーを、DNA配列決定によって鑑別した。示す配列は、センス鎖についてのものであり、5' から 3' 方向に伸びている。

## 【0517】

20

## 【化69】

Fc-ソルターゼ

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGTGGGTGCCA  
 GGCAGCACCGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCTGAAGCTGCTG  
 GCGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGGCCAAGGACACCCGTATGATCAGCCG  
 GACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGATGTGTCACGAGGACCCGTGAAGTGAA  
 GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGGCCAGAGAG  
 GAACAGTACAACACGACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT 10  
 GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGGCCCTGCCAGCCCCAT  
 CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCCGCAACCCCAGGTGTACACACT  
 GCCCCCTAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAG  
 GGCTTCTACCCCTCCGATATGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGCCAGCCCAGAACAA  
 ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTATTCTCCTGTACAGCAA  
 GCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT  
 GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAA  
 GGCGGCGGAGGCTCTGCCTGAAACAGGGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCC 20  
 TAAGAATTCA

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT  
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY  
 101 RVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT  
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD  
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKG  
 251 GSLPETGGLEVLFQGP 30

## 【0518】

タンパク質発現および精製：

標準のポリエチレンイミン法を使用して、1 mlあたり $1 \times 10^6$ 細胞の密度で、Fc-ソルターゼ発現プラスミドDNAをHEK293T細胞に形質移入した。次いで、500 mlの培養物を、3 Lフラスコ中のFreeStyle 293 Medium (Life Technologies)において37℃で4日間成長させた。

## 【0519】

Fc-ソルターゼタンパク質を、清澄化した条件培地から精製した。簡潔に述べると、500 mlの条件培地を、4 ml/分で、5 mlのHiTrap MabSelect Sureカラム (GE Life Sciences) に流した。0.1%のTrition X-114を含有する20カラム体積のPBSでカラムを洗浄し、次いで、Fc-ソルターゼタンパク質を、0.1Mのグリシン (pH 2.7) で溶離させ、1 MのTriis-HCl (pH 9) で中和し、PBSに対して透析した。タンパク質収量は、条件培地500 mlあたり10~20 mgであり、エンドトキシンレベルは、Charles River ENDOSAFE PTS試験によって測定したとき、1 EU/mgを下回った。

## 【0520】

Fc-ソルターゼタンパク質の品質管理

未変性Fc-ソルターゼタンパク質のLC/MS：ピークは、不均一であり、二量体について予想されるより約3 kDa大きかった。これは、N-連結型グリコシル化コンセン

10

20

30

40

50

サス部位を有する Fc について予想される N-連結型グリコシル化の特性を示している。

【0521】

還元された N-脱グリコシル Fc - ソルターゼの LC / MS : ピークは鋭利であった。分子量は、おそらくはシステイン 2 個分の還元のために、理論上より 2 ダルトン小さかった。

【0522】

Superdex 200 での分析的サイズ排斥 : Fc - ソルターゼタンパク質は、89 % ~ 100 % の間の二量体、0 ~ 10 % の四量体、および 0 ~ 1 % の凝集体を有する。

【0523】

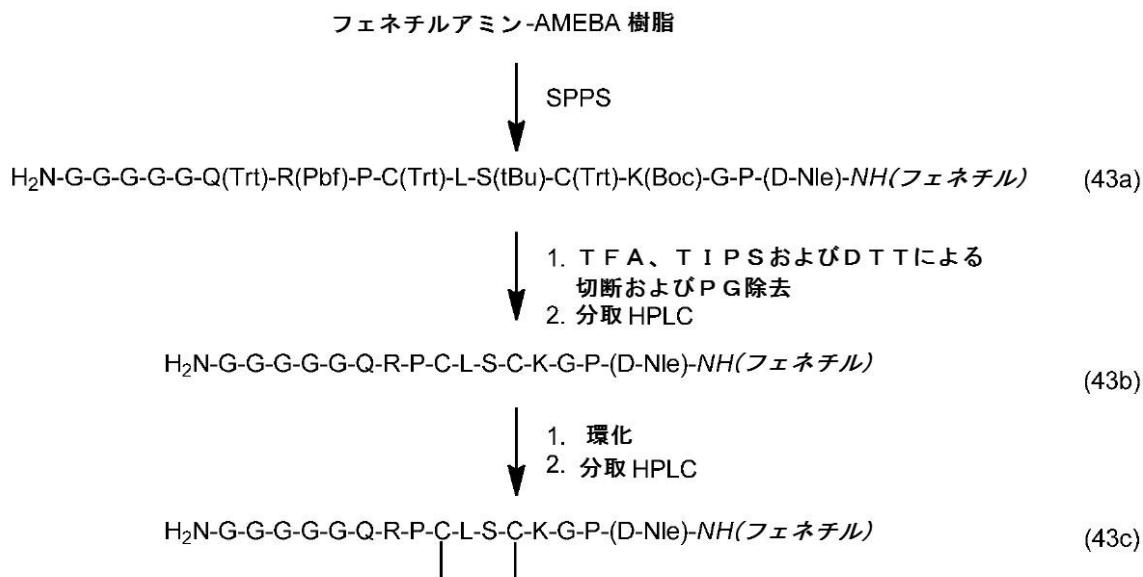
還元 SDS / PAGE : タンパク質は、主に、予想されたサイズのモノマーとして移動した。 10

【0524】

ステップ 2 : ソルターゼコンジュゲーション用のアペリンペプチド (H<sub>2</sub>N - G G G G G Q R P C \* L S C \* K G P (D-Nle) フェネチルアミン) の調製

【0525】

【化70】



【0526】

ステップ 2a : 中間体 43a の調製

フェネチルアミン - AMEBA 樹脂 (Sigma Aldrich, 0.25 g, 0.25 mmol, 1.0 mmol/g) を、Arg 残基に 2 倍の標準 Arg を用いた、自動ペプチド合成装置 (CEM LIBERTY) での固相ペプチド合成にかけた。アミノ酸は、0.2 M DMF 溶液として調製した。カップリングサイクルは、次のとおりに定めた。

- アミノ酸カップリング : AA (4.0 当量)、HATU (4.0 当量)、DIEA (2.5 当量)
  - 洗浄 : DMF (3 × 10 mL、各回 1 分)
  - Fmoc 脱保護 : ビペリジン / DMF (1 : 4) (10 mL、75 °C で 1 分間、次いで 10 mL、75 °C で 3 分間)
  - 洗浄 : DMF (4 × 10 mL、各回 1 分)
- 40

【0527】

【表19】

カップリング	AA	カップリングの数 ×反応時間	反応温度
1	Fmoc-D-Nle-OH	1×5分	75°C
2	Fmoc-L-Pro-OH	1×5分	75°C
3	Fmoc-Gly-OH	1×5分	75°C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1×5分	75°C
5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×6分	25°Cで2分 50°Cで4分
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1×5分	75°C
7	Fmoc-L-Leu-OH	1×5分	75°C
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×6分	25°Cで2分 50°Cで4分
9	Fmoc-L-Pro-OH	1×5分	75
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2×30分	25°Cで25分 75°Cで5分
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1×5分	75°C
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1×5分	75°C
13	Fmoc-Gly-OH	1×5分	75°C
14	Fmoc-Gly-OH	1×5分	75°C

## 【0528】

ペプチドを組み立てた後、樹脂をDMF (3×10mL)、DCM (3×10mL)で洗浄した。ペプチド樹脂を真空中にて室温で乾燥させて、中間体43a (0.622g、0.25mmol)を得た。

## 【0529】

ステップ2b：中間体42b、H<sub>2</sub>N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH (フェネチル)の調製

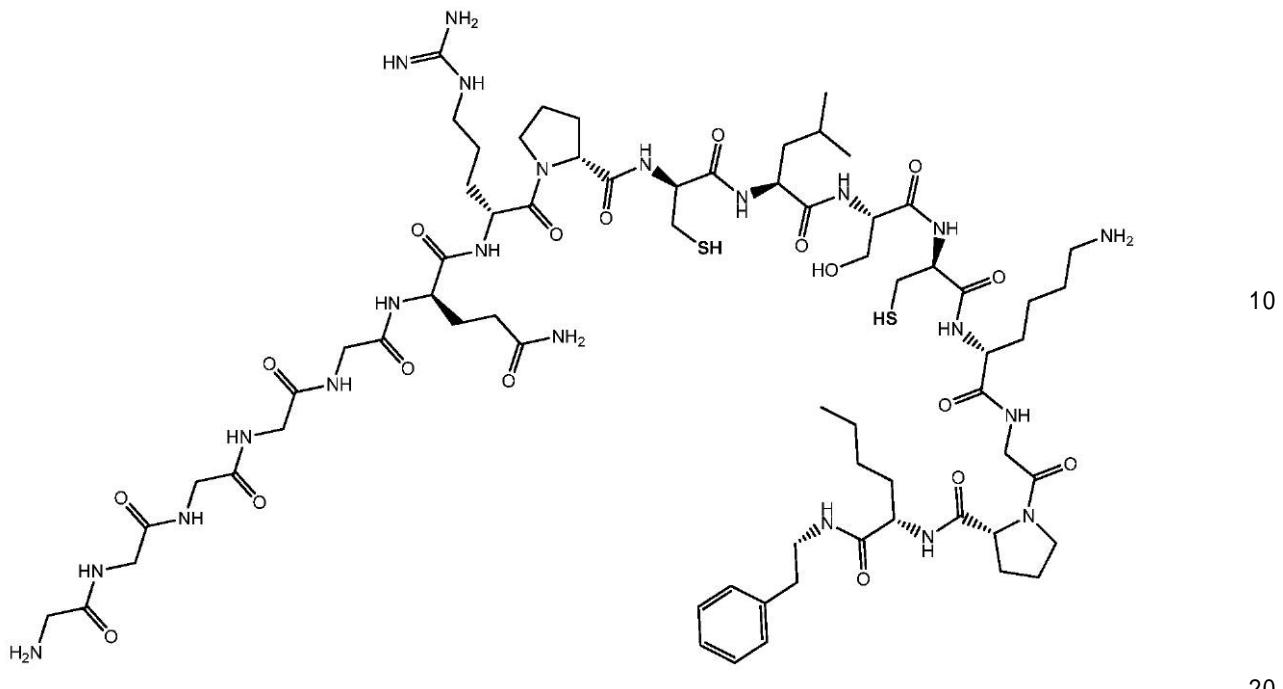
## 【0530】

10

20

30

## 【化71】



## 1) 切断および保護基の除去

中間体43a(0.622g、0.25mmol)に、95%TFA/2.5%H<sub>2</sub>O/2.5%TIPSの3mLの溶液およびDTT(771mg、5.00mmol)を加え、得られる混合物を室温で3時間振盪し、次いで濾過した。濾液を40mLの冷エーテルに滴下し、次いで4000rpmで5分間遠心分離した。溶媒を除去し、白色の固体をエーテル(3×40mL)で洗浄し、ボルテックスし、遠心分離した。固体を高真空中にて25℃で1時間乾燥させた。

## 【0531】

## 2) 精製

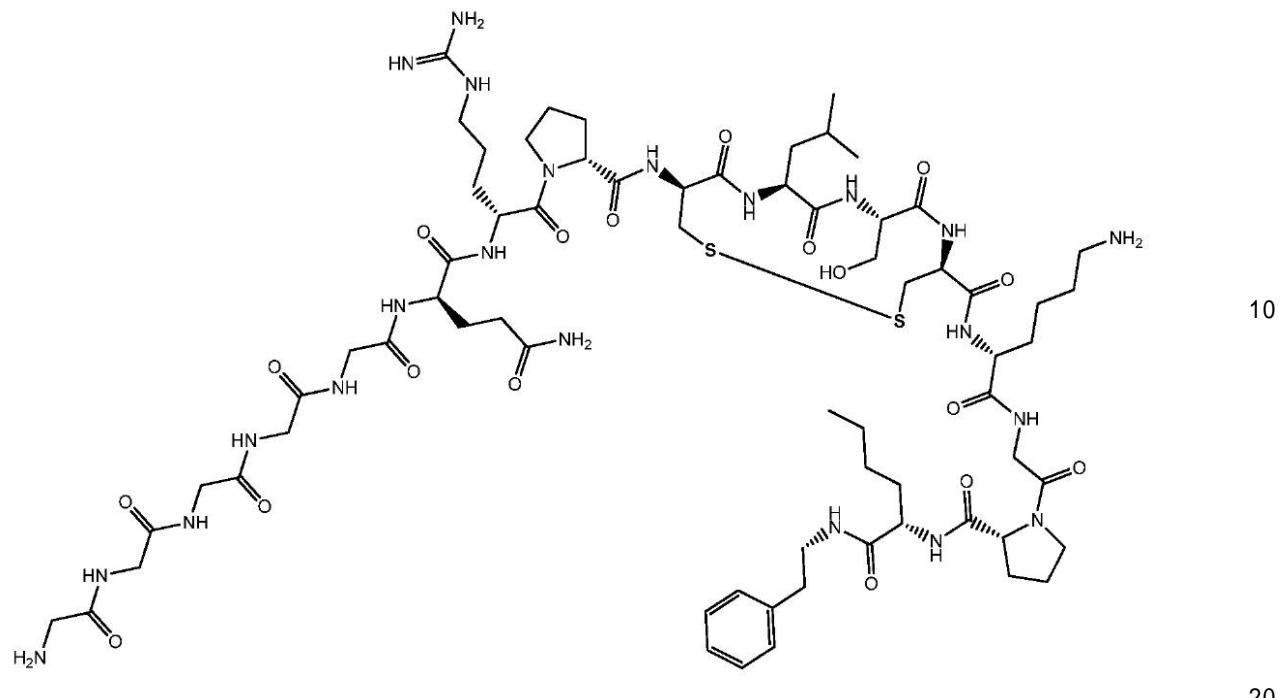
次いで、上記の白色の固体を分取HPLC(Sunfire(商標)Prep C18 OBD(商標)30×50mm 5μmカラム 0.1%TFA含有ACN/H<sub>2</sub>O 75mL/分、8分で10~30%のACNの勾配)によって精製した。生成物画分を凍結乾燥して、中間体43bをTFA塩(44mg、11%)として得た。

## 【0532】

ステップ3: H<sub>2</sub>N-G-G-G-G-Q-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)(ジスルフィドC<sup>9</sup>-C<sup>12</sup>)、中間体43cの調製

## 【0533】

## 【化72】



20

0.9 mLのH<sub>2</sub>Oの中間体43b(44 mg、0.028 mmol)に、I<sub>2</sub>(50 mMのAcOH溶液、1.1 mL 0.055 mmol)を滴下添加した。混合物を室温で終夜振盪した。LC/MSによって、反応が完了したことが示された。反応混合物に、溶液の色が消失するまで、0.5 Mのアスコルビン酸溶液(MeOH/H<sub>2</sub>O = 1/1)を数滴加えた。混合物を、HPLC精製に向けてMeOHで希釈した。分取HPLC(Sunfire(商標)Prep C18 OBD(商標)30 × 50 mm 5 μmカラム 0.1% TFA含有ACN/H<sub>2</sub>O 75 mL/分、8分で10~30%のACNの勾配)によって精製を行った。生成物画分を凍結乾燥して、H<sub>2</sub>N-G-G-G-G-Q-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)(ジスルフィドC<sup>9</sup>-C<sup>12</sup>)中間体43cをTFA塩(13 mg、30%)として得た。

30

LC/MS(QT2、生成物分析-HRMS-酸性、Waters Acuity UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 × 50 mm、50、溶離液A:水+0.1% ギ酸、溶離液B:アセトニトリル+0.1% ギ酸、勾配 5.15分かけて2%~9.8%のB/A):保持時間:0.98分、MS [M+2]<sup>2+</sup>:実測値:1587.7993、計算値:1587.868。

## 【0534】

ステップ3: Fc-ソルターゼと中間体43cのソルターゼコンジュゲーション

## 1) 化学酵素的ソルターゼコンジュゲーション

氷浴上で、PBS(pH 7.4)緩衝液中のFc-ソルターゼ(698 μl、0.040 μmol、3.15 mg/mL)に、H<sub>2</sub>N-G-G-G-G-Q-R-P-C<sup>\*</sup>-L-S-C<sup>\*</sup>-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)(ジスルフィドC<sup>9</sup>-C<sup>12</sup>)(64.1 μL、2.018 μmol、50 mg/mL)をTris-8.0緩衝液に溶かした溶液に続いて、520 μMのソルターゼA(78 μL、0.040 μmol)の50 mM Tris-C1 pH 7.4溶液、150 mMのNaClを加えた。混合物を室温で終夜振盪した。LC/MSによって、反応が完了したことが示された。

## 【0535】

## 2) 精製および脱塩

上記溶液を、ATTAX EXPRESSにおいて、4 mL/分で、5 mLのHiTrap Mab Select Sureカラム(GE Lifesciences #11-0034-95)に流した。カラム上で、実施例43を20カラム体積(CV)のPBS

40

50

+ 0 . 1 % Triton 114で洗浄し、0 . 1 Mのグリシン(pH 2 . 7)で溶離させ、1 MのTris-HCl(pH 9)で中和し、PBSに対して透析した。精製された溶液を、Zeba Spin Desalting Column, 5 mL(89891)を使用して脱塩して、1 . 5 mLの目的の溶液を得、平均濃度は、0 . 598 mg / mLであり、回収率は、90%であった。LCMS(QT2、タンパク質\_20~70 kDa\_3分、AcQuity ProSwift RP-3U 4 . 6 × 50 mm、1 . 0 mL / 分、溶離液A：水+0 . 1 % ギ酸、溶離液B：アセトニトリル+0 . 1 % ギ酸、勾配 3分かけて2 % ~ 98 %のB / A) : R<sub>t</sub> = 1 . 55分、MS [M + H] 58845 . 0000。

【0536】

10

実施例43の配列：

【0537】

【化73】

1 METDTLLWV LLLWVPGSTG DKTHCPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKD  
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY  
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT  
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLD  
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKG  
 251 GSLPETGGGGQRPC\*LSC\*KGP(D-Nle) フェネチルアミン

20

[ L S L S P G K G G G G S L P E T G G G G G は、リンカーを表し、Q R P C \* L S C \* K G P (D - Nle) フェネチルアミンは、ポリペプチドを表す。 ]

【0538】

下の実施例のポリペプチドは、APJ受容体効力について、EC<sub>50</sub>値が約0 . 01 nM ~ 約1100 nMの範囲にあることがわかった。以下の実施例のポリペプチドは、血漿安定性が2分より長い、5分より長い、10分より長い、20分より長い、50分より長い、60分より長いことがわかった。

【0539】

30

本発明のポリペプチドは、APJ受容体のアゴニストとして有用であり、したがって、本明細書で開示する疾患などの、APJ受容体の活性化に反応を示す疾患および状態の治療において有用であるとみなすことができる。

【0540】

さらに、こうしたペプチドの半減期は、ヒト血清アルブミンまたはFcドメインなどの半減期延長性部分を有する、式I ~ IVのいずれか1つに従うペプチドまたはポリペプチドを含むバイオコンジュゲートの生成によって、さらに延長され得る。

【0541】

こうして本発明の例示的な実施形態について述べてきたが、当業者は、内部の開示が例示的なものに過ぎないこと、ならびに本発明の範囲内で他の種々の代替形態、改造形態、および変更形態を案出してもよいことを留意すべきである。したがって、本発明は、本明細書で例示するような詳細な実施形態に限定されない。

40

本発明は、以下の態様を包含し得る。

[1]

次式Iを有する環状ポリペプチド：

## 【化74】

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

## [式中、]

X1は、ポリペプチドのN末端であり、かつ、存在しない、Q、A、もしくはpEのいずれかであり、またはX1は、C、c、hC、D-hCから選択され；ここで、C、c、hC、またはD-hCの側鎖は、X7の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X3は、Pであり、またはX3は、C、c、hC、およびD-hCから選択され；ここで、C、c、hC、またはD-hCの側鎖は、X7の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X4は、Rであり、またはX4は、C、c、hC、およびD-hCから選択され；ここで、C、c、hC、またはD-hCの側鎖は、X7の側鎖とジスルフィド結合を形成し、ここで、X1、X3、およびX4の1つだけは、C、c、hC、およびD-hCから選択される含硫アミノ酸であり、

X7は、C、c、hC、またはD-hCであり；かつ、X7の側鎖は、X1、X3、またはX4いずれかのC、c、hC、またはD-hCの側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X8は、KまたはFであり、

X9は、G、A、aであり、または存在せず、

X10は、Pであり、または存在せず、

X11は、D-Nle、Nle、M、またはfであり、かつ、

X12は、存在しない、またはP、f、a、D-Nva、もしくはD-Abuであり、

X13は、C末端であり、かつ、存在しないか、または(N-Me)F、F、f、a、y、およびNa1から選択され；ここで、

Nleは、L-ノルロイシンであり、

D-Nleは、D-ノルロイシンであり、

D-hCは、D-ホモシステインであり、

hCは、L-ホモシステインであり、

Na1は、L-ナファタリン(L-naphthaline)であり、

D-Nvaは、D-ノルバリンであり、

D-Abuは、D-2-アミノ酪酸であり、

pEは、L-ピログルタミン酸である】

または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩、またはこれらと実質的に同等なポリペプチド。

[2]

式II：

## 【化75】

X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

II

## [式中、]

X1は、ポリペプチドのN末端であり、かつ、存在しないか、またはQ、A、およびpEから選択されるかのいずれかであり、

X4は、C、c、hC、またはD-hCであり、

X7は、C、c、hC、またはD-hCであり；かつ、X7の側鎖は、X4の側鎖とジ

10

20

30

40

50

スルフィド結合を形成し、

X 8 は、 K または F であり、

X 9 は、 G、 A、 a であり、 または存在せず、

X 10 は、 P であり、 または存在せず、

X 11 は、 D - N l e、 N l e、 M、 または f であり、 かつ、

X 12 は、 存在しないか、 または P、 f、 a、 D - N v a、 および D - A b u から選択され、

X 13 は、 C 末端であり、 かつ、 存在しないか、 または F、 ( N - M e ) F、 f、 a、 y、 および N a l から選択される ]

を有する、 上記 [ 1 ] に記載のポリペプチド、 または前記ポリペプチドのアミド、 エステル、 もしくは塩。

[ 3 ]

式 I I I :

【化 7 6 】

X1-R-P-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



III

10

[ 式中、

X 1 は、 ポリペプチドの N 末端であり、 かつ、 C、 c、 h C、 および D - h C から選択され、

X 7 は、 C、 c、 h C、 または D - h C であり； ここで、 X 7 の側鎖は、 X 1 の側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、 K または F であり、

X 9 は、 G、 A、 a であり、 または存在せず、

X 10 は、 P であり、 または存在せず、

X 11 は、 D - N l e、 N l e、 M、 または f であり、 かつ、

X 12 は、 存在しないか、 または P、 f、 a、 D - N v a、 および D - A b u から選択され、

X 13 は、 C 末端であり、 かつ、 存在しないか、 または ( N - M e ) F、 F、 f、 a、 y、 および N a l から選択される ]

を有する、 上記 [ 1 ] に記載のポリペプチド、 または前記ポリペプチドのアミド、 エステル、 もしくは塩。

[ 4 ]

式 I V :

【化 7 7 】

X1-R-X3-R-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13



30

40

IV

[ 式中、

X 1 は、 ポリペプチドの N 末端であり、 かつ、 存在しない、 Q、 A、 または p E のいずれかであり、

X 3 は、 C、 c、 h C、 または D - h C であり； ここで、 C、 c、 h C、 または D - h C の側鎖、

X 7 は、 C、 c、 h C、 または D - h C であり； かつ、 X 7 の側鎖は、 X 3 の C、 c、

50

h C、またはD - h Cの側鎖とジスルフィド結合を形成し、

X 8 は、KまたはFであり、

X 9 は、G、A、aであり、または存在せず、

X 10 は、Pであり、または存在せず、

X 11 は、D - N l e、N l e、M、またはfであり、かつ、

X 12 は、存在しないか、またはP、f、a、D - N v a、およびD - A b u から選択され、

X 13 は、C末端であり、かつ、存在しないか、または(N - M e) F、F、f、a、y、およびN a l から選択される】

を有する、上記[1]に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[5]

X 1 が p E である、上記[1]、[2]、および[4]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[6]

X 1 が存在しない、上記[1]、[2]、および[4]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[7]

N末端がアミドである、上記[1]から[4]および[6]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドの塩。

[8]

N末端が、式 - N H R のアミドであり、Rが、アセチル、ベンゾイル、フェナシル、スクシニル、オクタノイル、4 - フェニルブタノイル、4 - C l - P h - (C H<sub>2</sub>)<sub>3</sub> C (O) -、またはP h - C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> N H C (O) - である、上記[7]に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドの塩。

[9]

X 13 が F または f である、上記[1]から[8]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[10]

X 13 が存在しない、上記[1]から[8]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[11]

X 12 が存在しない、上記[1]から[10]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、およびエステル、もしくは塩。

[12]

C末端がアミドである、上記[1]から[11]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドの塩。

[13]

C末端が、式 - C (O) - R 2 のアミドであり、R 2 が、- N H<sub>2</sub>、- N H - M e、- N H - N H B n、または- N H - (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - P h である、上記[12]に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドの塩。

[14]

X 8 が K である、上記[1]から[13]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[15]

X 9 が G である、上記[1]から[14]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[16]

X 10 が P である、上記[1]から[15]のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

10

20

30

40

50

[ 1 7 ]

X 1 1 が N l e または D - N l e である、上記 [ 1 ] から [ 1 6 ] のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[ 1 8 ]

【表 2 0】

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(フェネチル)	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH <sub>2</sub>	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH	10
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(フェネチル)	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(フェネチル)	
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH	20
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-OH	
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
pE-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-OH	
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-OH	30
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH <sub>2</sub>	
pE-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-OH	
pE-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-OH	
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH	
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH	
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(フェネチル)	
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(フェネチル)	
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)	40
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-OH	
pE-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH	
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-OH	
pE-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-OH	
pE-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-OH	
pE-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-OH	

[表において、「\*」で印を付けた2つのアミノ酸は、ジスルフィドを形成しているアミノ酸を表す]

から選択される、上記[1]に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドのアミド、エステル、もしくは塩。

[19]

a. 上記[1]から[18]のいずれか一項に記載のペプチドもしくはポリペプチド、またはそのアミド、エステル、もしくは塩と、

b. 半減期延長性部分と

を含むバイオコンジュゲートまたはその多量体であって、前記ペプチドまたはポリペプチドと半減期延長性部分は、場合によりリンカーを介して、共有結合によって連結または融合される、バイオコンジュゲートまたはその多量体。

10

[20]

前記半減期延長性部分が、IgG定常ドメインもしくはその断片またはヒト血清アルブミンである、上記[19]に記載のバイオコンジュゲートまたはその多量体。

[21]

前記半減期延長性部分が、LALA変異(L234A、L235A)を有するFcLALA改变Fc断片である、上記[19]または[20]に記載のバイオコンジュゲート。

[22]

前記半減期延長性部分が、式I、II、III、またはIVのポリペプチドに、リンカーを介して融合されるFcドメインであり、ここで、前記リンカーは、次式：

20

- [GGGGS]n -

を有し、nは、1、2または3であるか、または前記リンカーは、GSまたはGGであり、前記の式I、II、III、またはIVのポリペプチドは、自然に存在するアミノ酸を含む、上記[21]に記載のバイオコンジュゲート。

[23]

前記ポリペプチドが、QRPC\*LSC\*KGPMPE、C\*RPRLSC\*KGPMPE、およびQRC\*RLSC\*KGPMPE(ここで「\*」で印を付けた2つのアミノ酸は、その側鎖を介してジスルフィド結合またはアミド結合を形成しているアミノ酸を表す)から選択される式Iのポリペプチドである、上記[22]に記載のバイオコンジュゲート。

30

[24]

前記半減期延長性部分が、C末端リシンが欠失している、またはアラニンで置き換えた改变Fcドメインである、上記[22]または[23]に記載のバイオコンジュゲート。

[25]

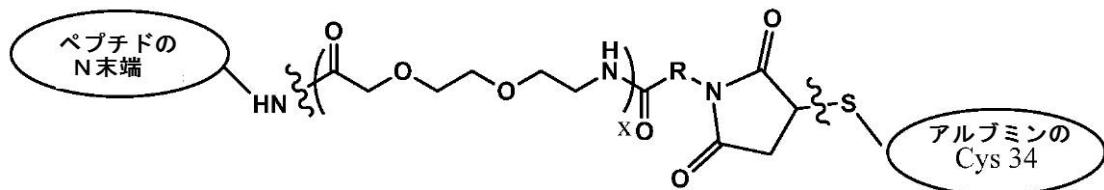
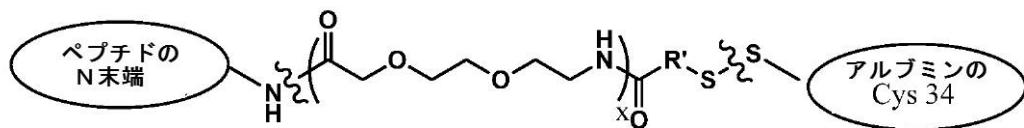
前記半減期延長性部分がヒト血清アルブミンである、上記[19]または[20]に記載のバイオコンジュゲートまたはその多量体。

[26]

前記ヒト血清アルブミンが、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドのN末端に、次式のリンカー：

40

【化78】



10

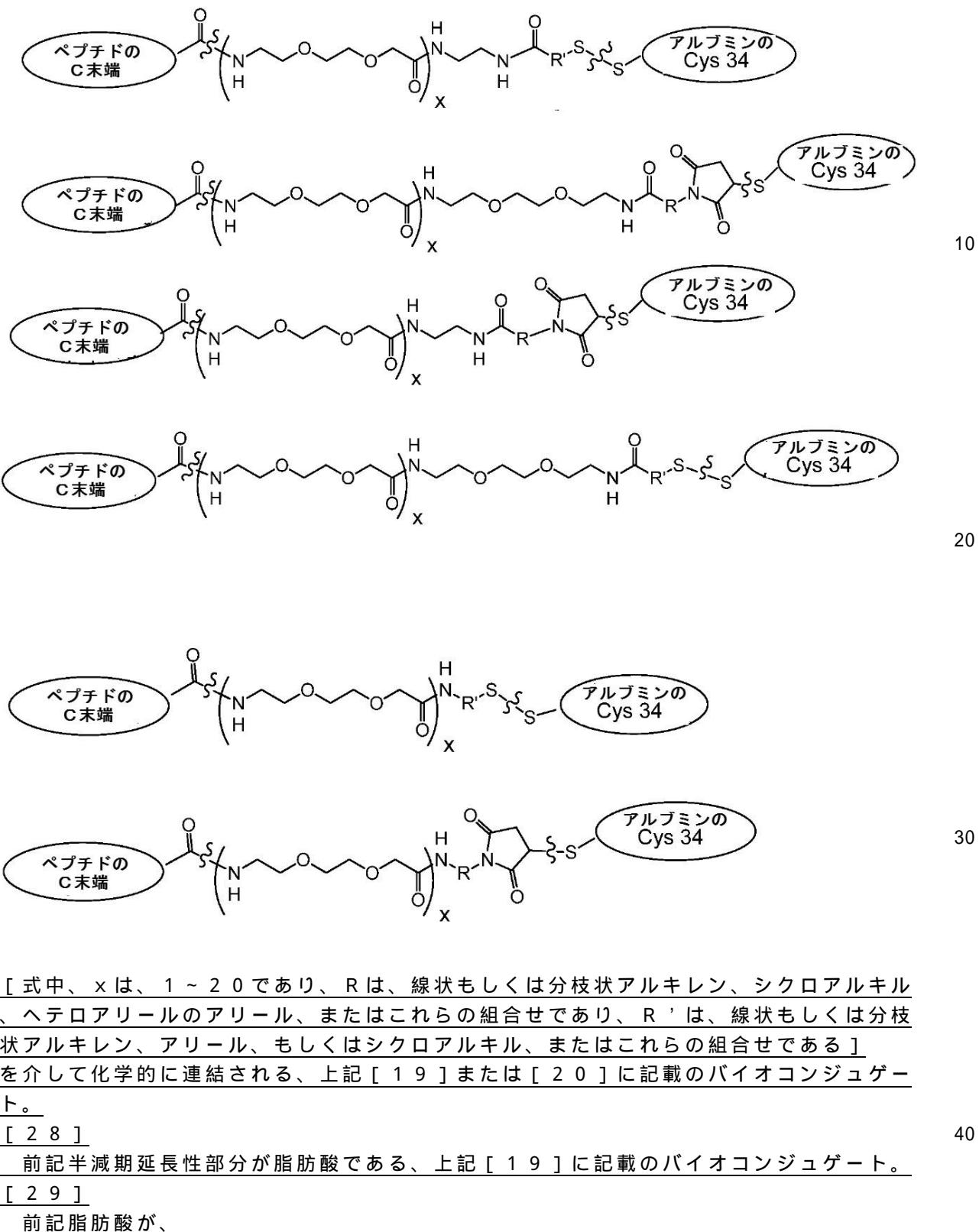
[式中、xは、1～20であり、Rは、線状もしくは分枝状アルキレン、シクロアルキル、ヘテロアリールのアリール、またはこれらの組合せであり、R'は、線状もしくは分枝状アルキレン、アリール、もしくはシクロアルキル、またはこれらの組合せである]を介して化学的に連結される、上記[25]に記載のバイオコンジュゲート。

20

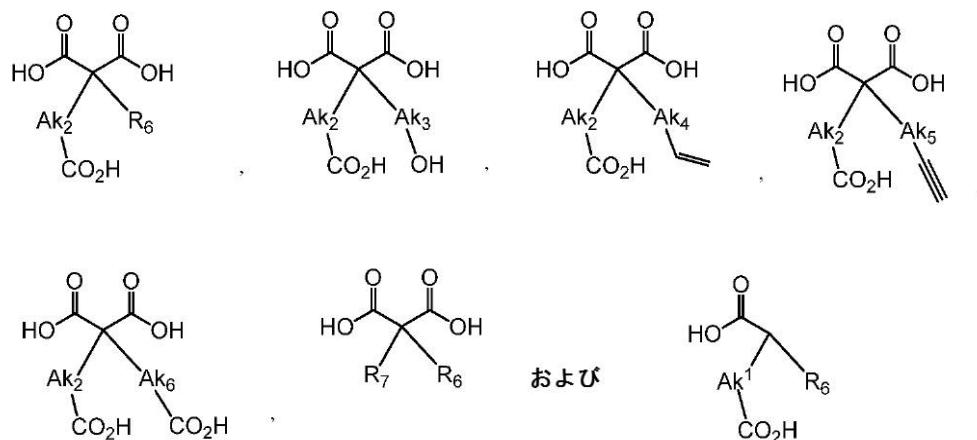
[27]

前記ヒト血清アルブミンが、式I～IVのいずれか1つのポリペプチドのC末端に、次式のリンカー：

【化79】



## 【化 8 0】



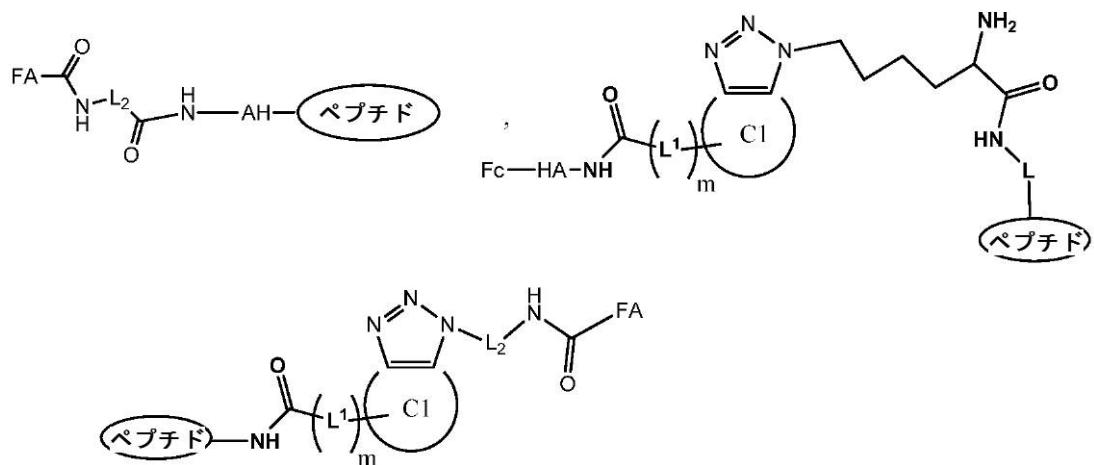
10

[式中、Ak<sup>2</sup>、Ak<sup>3</sup>、Ak<sup>4</sup>、Ak<sup>5</sup>、およびAk<sup>6</sup>は、独立して、(C<sub>8</sub>~<sub>20</sub>)アルキレンであり、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、独立して、(C<sub>8</sub>~<sub>20</sub>)アルキルである]から選択される、上記[28]に記載のバイオコンジュゲート。

[30]

次式：

## 【化 8 1】



20

30

または



40

[式中、ペプチドは、ペプチドのN末端であり、nは、1、2または3であり、mは、0または1であり、Aは、アラニンであり、Hは、ヒスチジンであり、L<sub>2</sub>は、リンカーであり、C<sub>1</sub>は、フッ素で場合により置換されている单環式、二環式、または三環式の炭素環系またはヘテロ環系であり、L<sup>1</sup>は、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキレンリンカーであり、ここで、アルキレン鎖は、オキソ(=O)で場合により置換されており、かつ、ここで1個または複数の炭素は、OまたはNHで置き換えられる]を有する、上記[19]、[28]、または[29]に記載のバイオコンジュゲート。

[31]

その必要のある対象において、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または障害

50

を治療または予防する方法であって、

治療有効量の上記 [ 1 ] から [ 30 ] のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲートを前記対象に投与する工程を含む、方法。

[ 32 ]

前記疾患または障害が、急性非代償性心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a 症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、および子癇前症から選択される、上記 [ 31 ] に記載の方法。

10

[ 33 ]

医薬として使用するための、上記 [ 1 ] から [ 30 ] のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲート。

[ 34 ]

A P J 受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または障害の治療または予防において使用するための、上記 [ 1 ] から [ 30 ] のいずれか一項に記載のポリペプチドまたはそのアミド、エステル、もしくは塩、またはそのバイオコンジュゲート。

[ 35 ]

急性非代償性心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a 症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含む）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含む）、または子癇前症の治療において使用するための、上記 [ 1 ] から [ 30 ] のいずれか一項に記載のポリペプチド、そのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲート。

20

[ 36 ]

治療有効量の上記 [ 1 ] から [ 30 ] のいずれか一項に記載のポリペプチド、そのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲートと、1種または複数の治療活性のある共薬剤（co-agent）とを含む、組合せ。

30

[ 37 ]

前記共薬剤が、イノトロープ、アドレナリン受容体遮断薬、H M G - C o A 還元酵素阻害薬、アンジオテンシン I I 受容体アンタゴニスト、アンジオテンシン変換酵素（A C E）阻害薬、カルシウムチャネル遮断薬（C C B）、エンドセリンアンタゴニスト、レニン阻害薬、利尿薬、A p o A - I 模倣薬、抗糖尿病薬、抗肥満薬、アルドステロン受容体遮断薬、エンドセリン受容体遮断薬、アルドステロンシターゼ阻害薬（A S I）、C E T P 阻害薬、抗凝血薬、リラキシン、B N P（ネシリチド）、および／またはN E P 阻害薬から選択される、上記 [ 36 ] に記載の組合せ。

[ 38 ]

治療有効量の上記 [ 1 ] から [ 30 ] のいずれか一項に記載のポリペプチド、そのアミド、塩のエステル、またはそのバイオコンジュゲートと、1種または複数の薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

40

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 101
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 121

(72)発明者 ブルース , アレクサンドラ マーシャル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 , ケンブリッジ , テクノロジー スクエア 1  
 00 , ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコ-ボ  
 レイテッド

(72)発明者 グロッシェ , フィリップ

スイス国 ツェーハー - 4002 バーゼル , ポストファハ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 ギマラエス , カーラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 , ケンブリッジ , テクノロジー スクエア 1  
 00 , ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコ-ボ  
 レイテッド

(72)発明者 カンター , アーロン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02143 , サマービル , ブラストー アベニュー 20

(72)発明者 ロウ , チャンガン

アメリカ合衆国 ミシガン州 49024 , ポーテージ , ファウン コープ レーン 3681 ,  
 アパートメント 1

(72)発明者 ウセラ , エイミー リチャードソン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 , ケンブリッジ , テクノロジー スクエア 1  
 00 , ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコ-ボ  
 レイテッド

(72)発明者 ハト島 佳代

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 , ケンブリッジ , テクノロジー スクエア 1  
 00 , ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコ-ボ  
 レイテッド

(72)発明者 ユアン , ジュン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 , ケンブリッジ , テクノロジー スクエア 4  
 00 , ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコ-ボ  
 レイテッド

(72)発明者 ゼクリ , フレデリック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 , ケンブリッジ , テクノロジー スクエア 1  
 00 , ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコ-ボ  
 レイテッド

(72)発明者 チャオ , ホンジュアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー  
- 250, ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ, イン  
コーポレイテッド

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 国際公開第2012/126441 (WO, A1)

特表2011-525491 (JP, A)

特表2009-509535 (JP, A)

国際公開第2013/007563 (WO, A1)

国際公開第2012/125408 (WO, A1)

特表2015-537045 (JP, A)

特表2015-506370 (JP, A)

ChemMedChem, 2012年, Vol.7, p.318-325

Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2012年, Vol.38, No.1, p.30-40

International Journal of Molecular Medicine, 2008年, Vol.22, p.547-552

ChemMedChem, 2011年, Vol.6, p.1017-1023

ChemMedChem, 2010年, Vol.5, p.1247-1253

Peptides, 2012年, Vol.38, p.181-188

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 7/08

C07K 7/06

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / REGISTRY / WPIIDS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS  
(STN)