

(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 I

C O 7 K 7/08 (2006.01)

C O 7 K 7/08 Z N A

C O 7 K 7/06 (2006.01)

C O 7 K 7/06

C O 7 K 14/76 (2006.01)

C O 7 K 14/76

A 6 1 K 38/08 (2019.01)

A 6 1 K 38/08

A 6 1 K 38/10 (2006.01)

A 6 1 K 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) 国際出願番号 PCT/US2014/047377  
 (87) 国際公開番号 W02015/013168  
 (87) 国際公開日 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 リヒトシュトラッセ  
 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、

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、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C、c、hCまたはD-hC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C、c、hCまたはD-hC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C、c、hCまたはD-hC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



II

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。

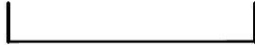
#### 【請求項3】

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、

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、 10

X 7 は、C、c、h C、または D - h C であり；ここで、X 7 の C、c、h C または D - h C の側鎖は、X 1 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、 20

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 ]

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 I V ( 配列番号 5 ) :

## 【化 4】

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



IV

.

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、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；

X 7 は、C、c、h C、または D - h C であり；ここで、X 7 の C、c、h C または D - h C 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、 40

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 ( N - M e ) F、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 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、- 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、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 10 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】

30

X 11 が N l e または D - N l e 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。

【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;	
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-OH;	20
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);	30
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】

30

前記共薬剤が、イノトロブ、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、アルドステロンシンターゼ阻害薬 (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。

## 【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

50

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求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期間が非常に短い。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

30

#### 【0006】

この欠点を克服するために現在使用されている一手段は、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-naphathaline) 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。

【 0 0 1 6 】

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。

【 0 0 1 7 】

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。

【 0 0 1 8 】

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～Ⅴ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、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。

【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～Ⅴ）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てもよい。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。

【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～Ⅴ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～Ⅴ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。

【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、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。

## 【 0 0 2 5 】

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 ~ I V 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。

## 【 0 0 2 6 】

さらに別の実施形態では、本発明は、式 I ~ I V 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

## 【 0 0 2 7 】

さらに別の実施形態では、本発明は、式 I ~ I V 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。

## 【 0 0 2 8 】

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 ~ I V 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】

## 【 0 0 2 9 】

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。

## 【 0 0 3 0 】

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、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）、および子癇前症を包含する。

30

## 【 0 0 3 1 】

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

## 【 0 0 3 2 】

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もよい。

## 【 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, 0 8 3, 9 7 0 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プ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。

## 【 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、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、リンカーなどの化学的エンティティを付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。

## 【 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。

## 【 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。

## 【 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

- 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 - Phe、para - アジド - Phe) 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種類を超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位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、ジアミノプロピオン酸、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。

【 0 0 4 6 】

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「天然でない」などは、本明細書で使用するときに、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に、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。

【 0 0 4 7 】

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）アペリントンタ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WO2010/48582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）アペリントンタ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に、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。

【 0 0 4 8 】

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):935-9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。

【 0 0 4 9 】

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、 $\gamma$  - 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

酪酸、デスモシン、2, 2' - ジアミノピメリン酸、2, 3 - ジアミノプロプリオン酸、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、イソデスモシン、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 - メチルペンチルグリシン、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、ペンチルグリシン、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。

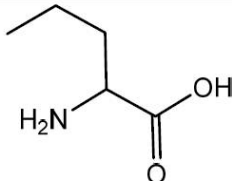
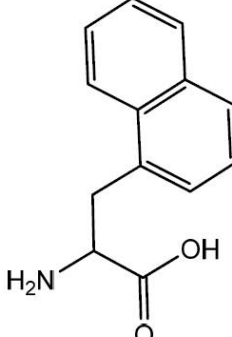
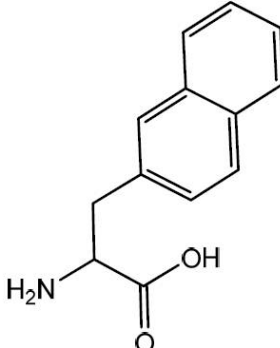
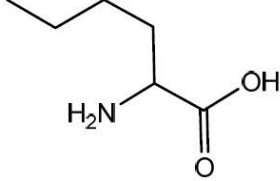
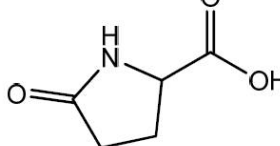
20

**【0051】**

## 【表 1 - 1】

表 1: 本発明において述べる

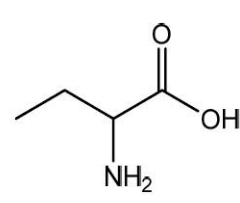
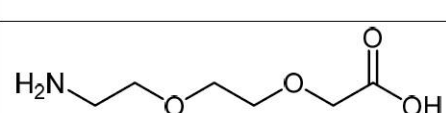
天然でないまたは非天然(un-natural or non-natural)アミノ酸

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	
1-Nal	1-ナフチルアラニン	
2-Nal	2-ナフチルアラニン	
Nle または nle(D-Nle)	L-ノルロイシンまたは D-ノルロイシン	
pE	ピログルタミン酸	

【 0 0 5 2 】



【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	

10

Na1 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時、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、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NH-C_{1-6}$  アルキル、 $-C(O)NH-C_{1-2}$  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  $-C(O)N(C_{1-6} \text{ アルキル})_2$ ）を指す。

## 【0054】

20

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、 $-NHC(O)C_{1-6}$  アルキル、 $-NHC(O)(CH_2)_nPh$ （ $n$  は、1 ~ 6 の整数である）、 $-NHC(O)(CH_2)_2CO_2H$ 、4 - Cl - Ph -  $(CH_2)_3C(O)NH-$ 、 $C_{1-1}H_{2-3}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $C_{1-3}H_{2-7}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $C_{1-5}H_{2-7}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)NH-$ 、Ph -  $CH_2CH_2NHC(O)-NH-$ 、または  $CH_3(OCH_2CH_2)_mC(O)NH-$ （ $m$  は、1 ~ 12 の整数である）も指す。

## 【0055】

本明細書で使用する時、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  $C_{1-6}$  アルキル基、シクロペンチルやシクロヘキシルなどの  $C_{3-8}$  シクロアルキル基、フェニルや  $n$  - ナフチルなどの  $C_{6-10}$  アリール基、 $C_{6-10}$  アリール -  $C_{1-6}$  アルキル基、たとえば、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル -  $C_{1-2}$  アルキル基、および  $n$  - ナフチルメチルなどの  $n$  - ナフチル -  $C_{1-2}$  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。そ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。

30

40

## 【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

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アルを包含する。二環式ヘテロアリアル系について、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（部分的に不飽和）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、飽和単環を表す。

#### 【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Gi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から初めてクローン化され（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的である。しかし、この相同性にもかかわらず、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、「Pyr-1-アペリン-13またはPyr<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

10

20

30

40

50

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、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、改変された生物学的活性分子（たとえば、アペリン 13）の、その非改変型（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め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、改変された分子（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。改変された分子（たとえば、コンジュゲートした分子）の血清半減期を、非改変分子（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る。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

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

|

[ 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、

40

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、もしくは 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、

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 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 ]

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 ( I I ) 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 l e、M、N l 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 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。

【 0 0 7 0 】

したがって、実施形態 2 A において、本発明は、式 ( I I ) 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。

10

【 0 0 7 2 】

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

【 0 0 7 3 】

【 化 3 】

20

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。

30

【 0 0 7 4 】

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 I I 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。

40

【 0 0 7 5 】

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：

【 0 0 7 6 】

【 化 4 】

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



IV

50

[ 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。

【 0 0 7 7 】

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：

【 0 0 7 8 】

【 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

、

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。

【 0 0 7 9 】

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。

【 0 0 8 0 】

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、

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。

【0081】

実施形態6において、本発明は、X1が存在しない、実施形態1、2、4、および4A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。

【0082】

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。

【0083】

実施形態8において、本発明は、N末端が、式-NHR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-C1-Ph-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)-、またはPh-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(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。

【0084】

実施形態8Aにおいて、本発明は、N末端が、式NHR<sub>1</sub>のアミドであり、R<sub>1</sub>がCH<sub>3</sub>C(O)-、CH<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-、パルミトイル(O<sub>2</sub>O<sub>c</sub>)<sub>p</sub>、ミリストイル(O<sub>2</sub>O<sub>c</sub>)<sub>p</sub>、ラウロイル(O<sub>2</sub>O<sub>c</sub>)<sub>p</sub>、またはPh-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(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<sub>2</sub>O<sub>c</sub>)は、C<sub>11</sub>H<sub>23</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)-であり、

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

パルミトイル(O<sub>2</sub>O<sub>c</sub>)は、C<sub>15</sub>H<sub>31</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)-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PAT054961-US-PSP)に記載されている。

【0085】

実施形態9において、本発明は、X13がFまたはfである、実施形態1～8A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。

【0086】

実施形態10において、本発明は、X13が存在しない、実施形態1～8A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。

【0087】

実施形態11において、本発明は、X12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。

【0088】

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。

【0089】

実施形態13において、本発明は、C末端が、式-C(O)-R<sub>2</sub>のアミドであり、R<sub>2</sub>が、-NH<sub>2</sub>、-NH-Me、-NH-NHBn、-N(CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph、または-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph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。

【0090】

10

20

30

40

50

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。

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 - フェネチルアミン、(D - N1e) - フェネチルアミン、N1e - P - f、D - N1e - 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態様では、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。

【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。

【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。

【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、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】

10

20

30

40

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、ⅠⅠⅠ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 p y r - 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、ⅠⅠⅠ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時、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（アラインメント（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 p y r - 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、ⅠⅠⅠ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。

【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。

【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-1sn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。

【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改変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： $-[GGGS]_n-$ 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。

【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改変Fcドメインである、実施形態22または

10

20

30

40

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-PSPO2）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。

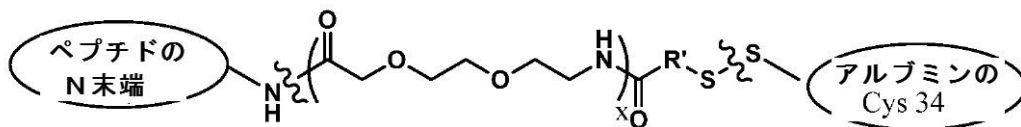
【0116】

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1つのポリペプチドのN末端に、次式のリンカー：

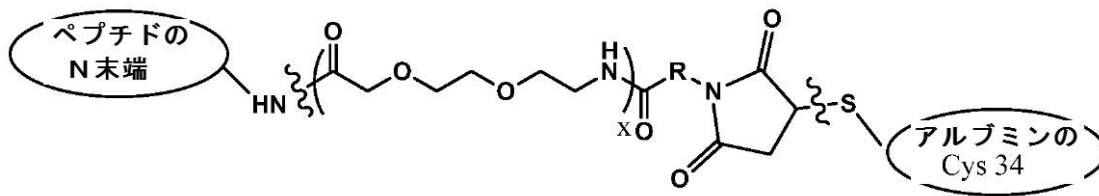
10

【0117】

【化6】



20



〔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〕

30

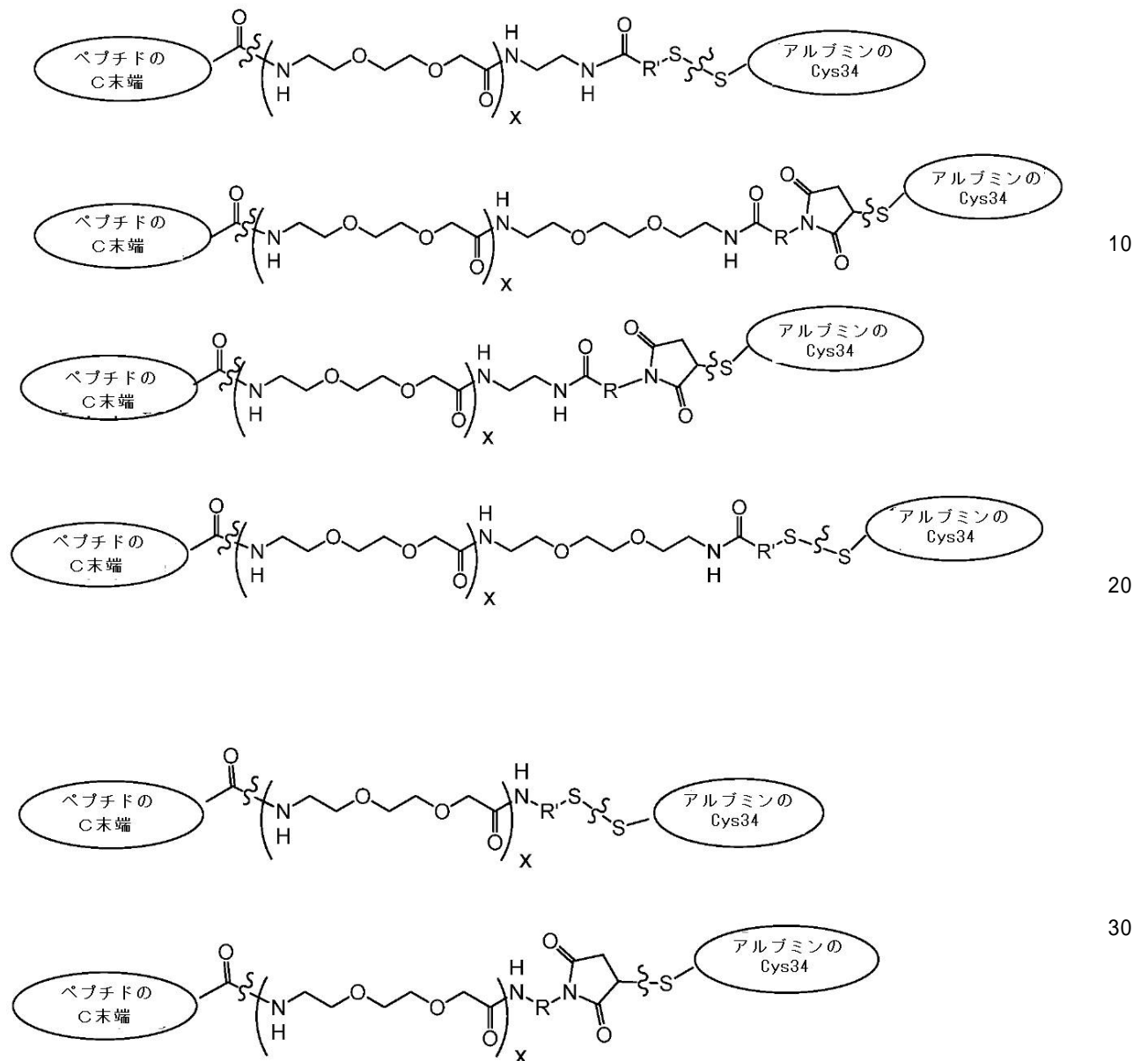
を介して化学的に連結する、実施形態24に従うバイオコンジュゲートに関する。

【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1つのポリペプチドのC末端に、次式のリンカー：

【0119】

## 【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、ヘテロアリーのアルキル、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】

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】

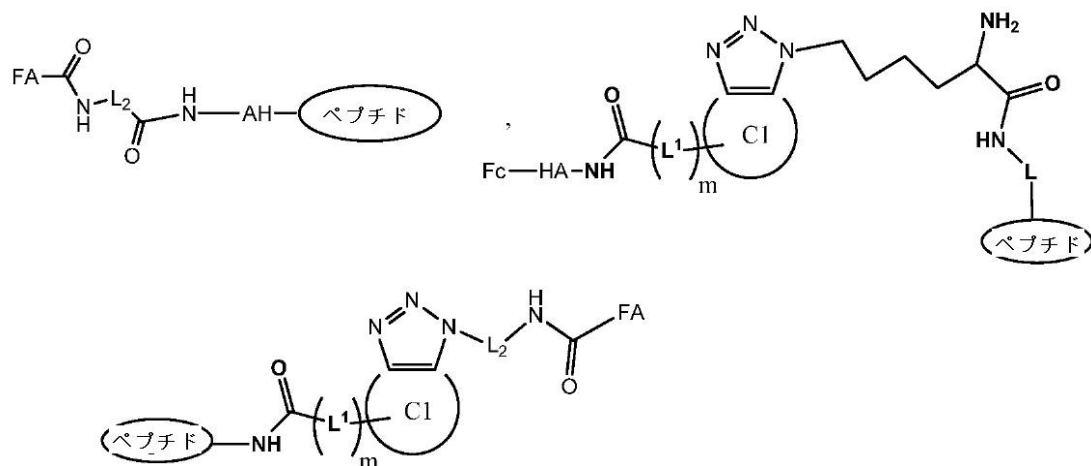
10

20

30

40

## 【化 8】



10

または



20

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であり、ここで、アルキレン鎖は、オキシ(=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。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。

30

40

## 【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を介して、つながれることが優先される。

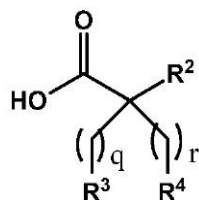
50

## 【 0 1 2 4 】

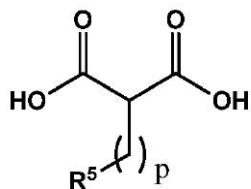
半減期延長性部分は、それぞれが、少なくとも1つのカルボン酸（たとえば、1、2、3または4つのCO<sub>2</sub>H）で置換され、ヒドロキシル基で場合によりさらに置換されている、C<sub>6</sub>～70アルキル、C<sub>6</sub>～70アルケニル、またはC<sub>6</sub>～70アルキニル鎖であると定義することのできる、脂肪酸を包含する。脂肪酸の例は、式A1、A2、およびA3：

## 【 0 1 2 5 】

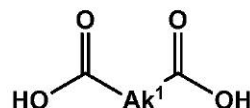
## 【 化 9 】



A1



A2



または A3

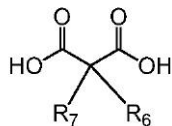
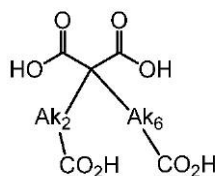
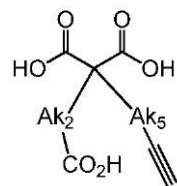
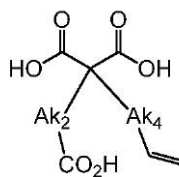
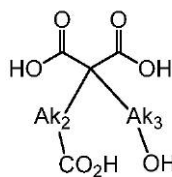
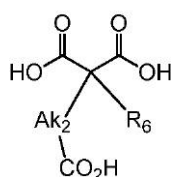
[ R<sup>2</sup> は、CO<sub>2</sub>H、Hであり、  
R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、およびR<sup>5</sup> は、互いに独立して、H、OH、CO<sub>2</sub>H、-CH=CH<sub>2</sub>、または-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>であり、  
Ak<sup>1</sup> は、分枝状C<sub>6</sub>～C<sub>30</sub>アルキレンであり、  
q、r、およびp は、互いに独立して、6～30の間の整数である ] またはこれらのアミド、エステル、もしくは薬学的に許容される塩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

## 【 0 1 2 6 】

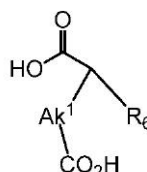
脂肪酸の例は、

## 【 0 1 2 7 】

## 【 化 1 0 】



および



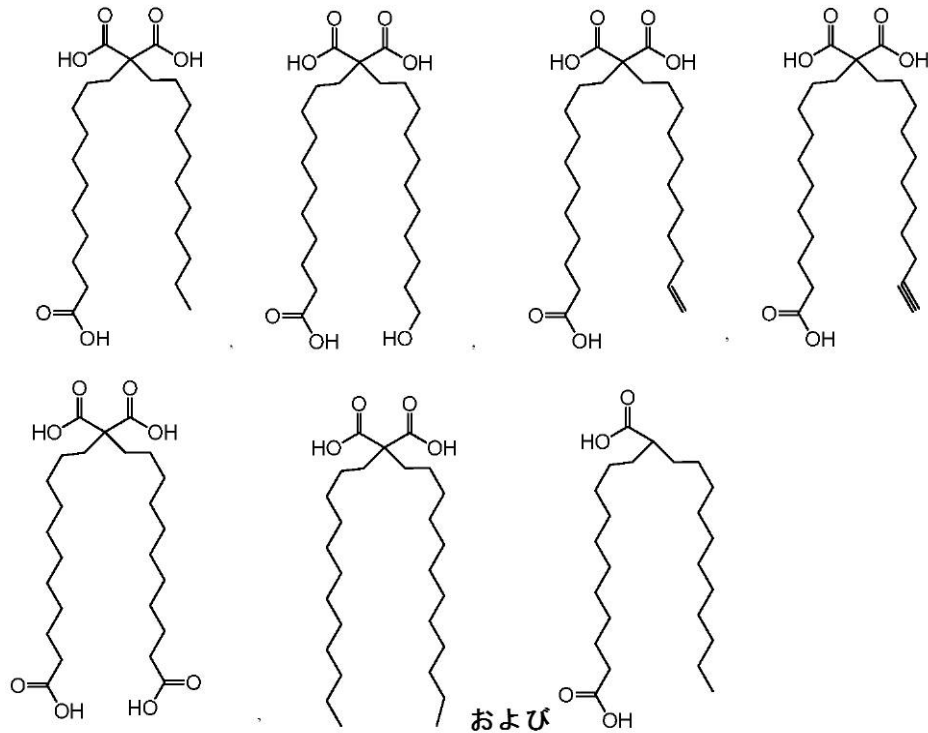
[ 式中、Ak<sup>2</sup>、Ak<sup>3</sup>、Ak<sup>4</sup>、Ak<sup>5</sup>、およびAk<sup>6</sup> は、独立して、(C<sub>8</sub>～20)アルキレンであり、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup> は、独立して、(C<sub>8</sub>～20)アルキルである ] から選択される。

## 【 0 1 2 8 】

より詳細には、脂肪酸は、

## 【 0 1 2 9 】

## 【化 1 1】



10

20

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-PPS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もよい。未変性Fcのもと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IgGA2）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。

30

40

## 【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、参照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な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

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、そうした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 6 2 / 0 1 5 8 6 2 号：P A T 0 5 6 2 7 4 - U S - P S P および米国仮出願第 6 2 / 0 1 5 8 6 8 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。

【 0 1 4 0 】

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。

【 0 1 4 1 】

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）

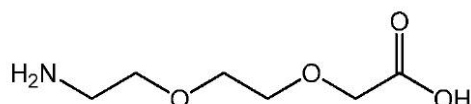
【 0 1 4 2 】

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 ~ 2 0 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 ~ 1 5 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：

【 0 1 4 3 】

【 化 1 2 】



30

またはその繰返し単位である。

【 0 1 4 4 】

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。非ペプチドリリンカーも、本発明によって企図される。

【 0 1 4 5 】

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、- N H - ( C H 2 ) z - C ( O ) -、- S - ( C H 2 ) z - C ( O ) - または - O - ( C H 2 ) z - C ( O ) - [ 式中、z は、2 ~ 2 0 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、C 1 ~ C 6）、低級アシル、ハロゲン（たとえば、C l、B r）、C N、N H 2、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よい。

40

【 0 1 4 6 】

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

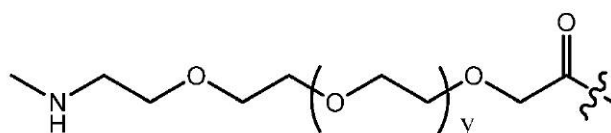
50

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( PEG )、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

10

【 0 1 4 7 】

【 化 1 3 】



[ 式中、y は、リンカーが 1 0 0 ~ 5 0 0 0 k D、たとえば、1 0 0 ~ 5 0 0 k D の分子量を有するようなものである ]

20

【 0 1 4 8 】

連結部分は、たとえば( O 2 O c ) 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 - イルジスルファニルであることが好ましい。

30

【 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 - リンカー構築物の調製：

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。

40

( 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、

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もよいし、または対称酸無水物、HOBTエステル、またはHOBTエステルとして予め活性化し、次いで樹脂に加えてもよい。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。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、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、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。

#### 【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。

#### 【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。

#### 【0161】

アミド型のポリペプチドを得る別の方法は、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

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 $\alpha$ -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、HepG2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓腫、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。

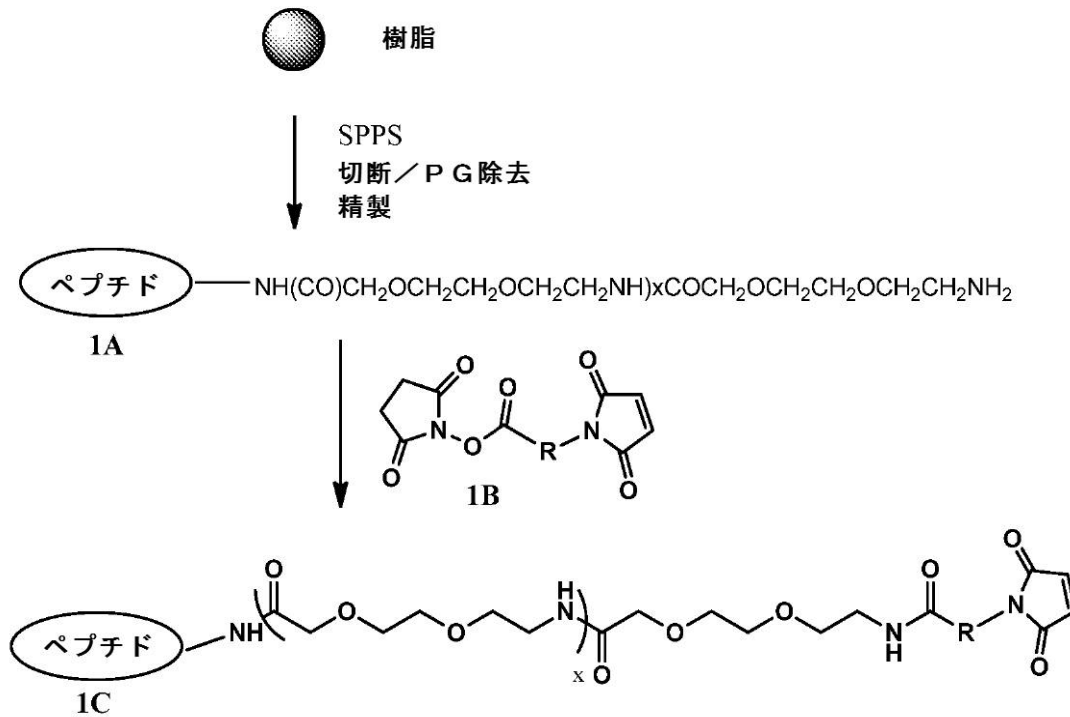
#### 【0166】

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 1 4】



スキーム 1

【 0 1 6 8 】

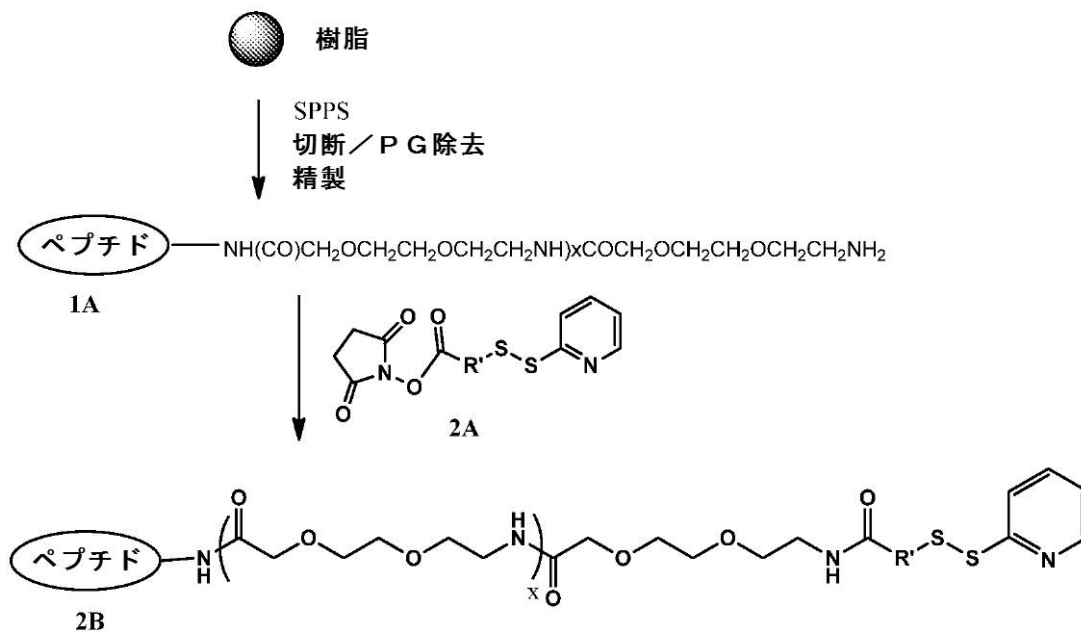
ペプチドのN末端を、十分に確立されたアミドカップリング化学に従って、1つまたは複数のO2Ocアミノ酸単位（xは、1～20、好ましくは1～10、より好ましくは3～6である）とカップリングさせて、（1A）を生成する。（1A）の末端アミノ官能基を、活性化型の酸（1B）〔式中、Rは、線状または分枝状のアルキレン、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはこれらの組合せである〕と反応させて、ペプチド-マレイミドを含んでいるリンカー構築物（1C）を生成する。活性化型の酸（1B）は、市販品として入手可能であり、またはその対応するカルボン酸から、当業者に知られている技術に従って容易に入手可能である。Rは、線状アルキレンであることが好ましく、Rは、 $-CH_2-CH_2-$ 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。

【 0 1 6 9 】

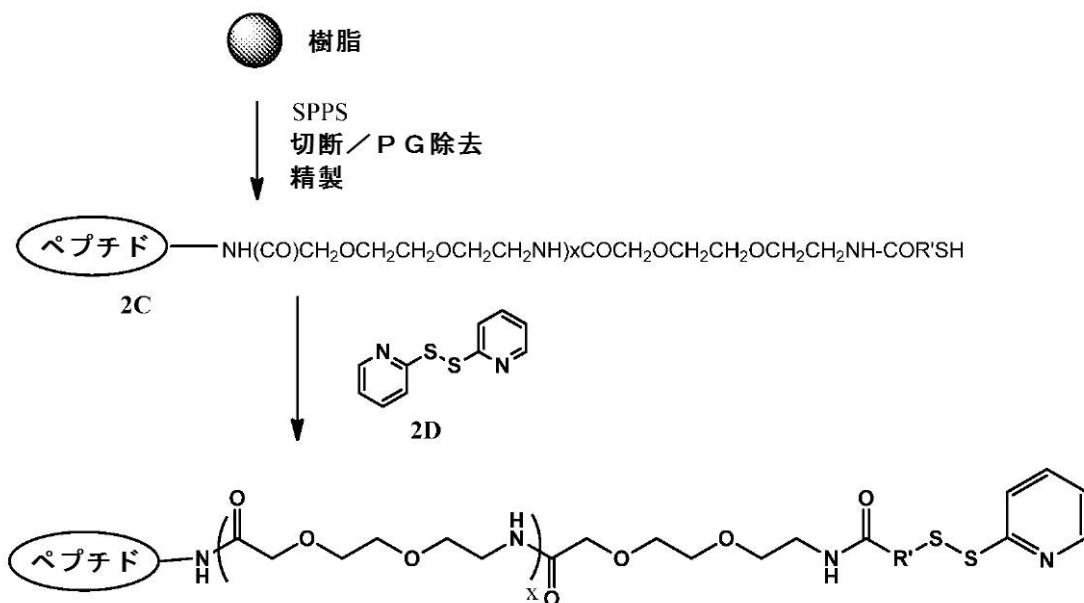
スキーム 2 A および 2 B に、式 I から I V のいずれか 1 つに従うポリペプチドの N 末端に付着したリンカーを含んでいるピリジン - 2 - イル - ジスルファニルの合成を記載する。

【 0 1 7 0 】

【化 15】



スキーム 2A



スキーム 2B

【0171】

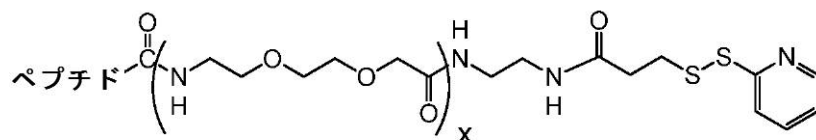
ペプチド-リンカー構築物(1A)を、スキーム1に記載のとおり調製し、活性化した式(2A)の酸[式中、R'は、線状または分枝状アルキレンである]とさらに反応させて、ペプチド-ピリジン-2-イル-ジスルファニルを含んでいるリンカー構築物(2B)を生成する。活性化型の酸(2A)は、市販品として入手可能であり、またはその対応するカルボン酸から、当業者に知られている技術に従って容易に入手可能である。R'は、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であることが好ましい。代わりに、ペプチド-リンカー構築物(2C)を、HO<sub>2</sub>C-R'-SH、またはその保護された形態(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

## 【 0 1 7 2 】

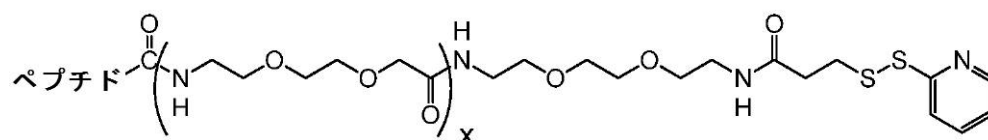
ペプチドのC末端にも、たとえば  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$  または  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$  などのジアミノ単位を使用して、同様の反応性基を、スキーム 1、2 A、および 2 B に記載したのと同様にして付着させる。このようなペプチド-リンカー構築物の非限定的な例は、以下である。

## 【 0 1 7 3 】

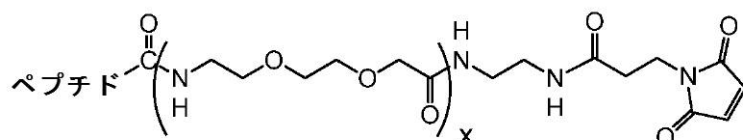
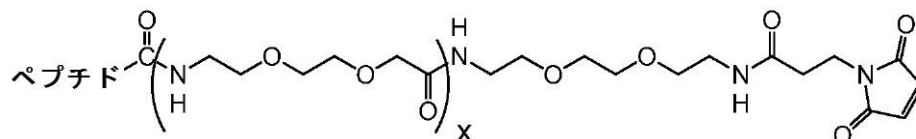
## 【 化 1 6 】



10



20



30

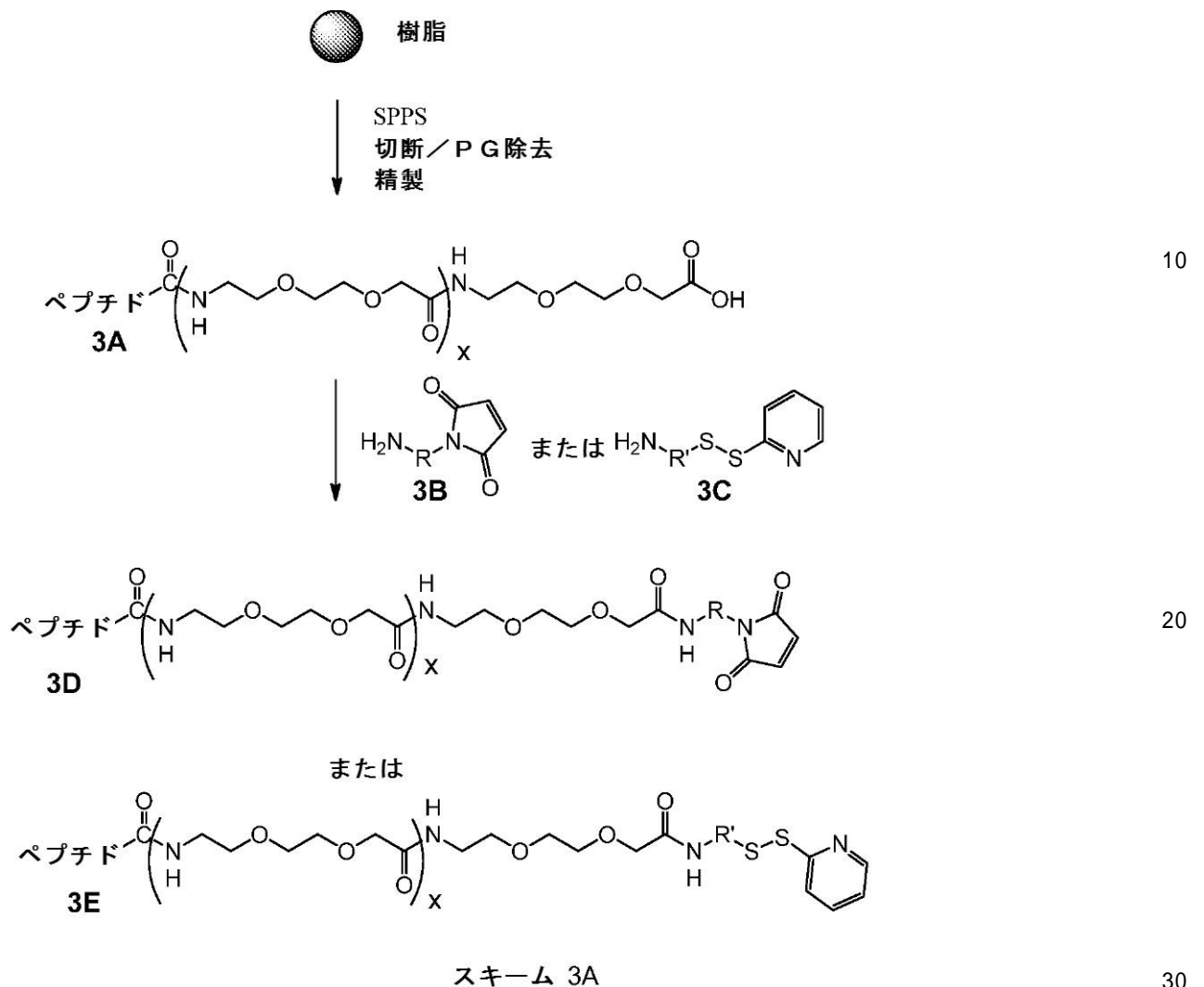
## 【 0 1 7 4 】

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 3 A、3 B、および 3 C に従って付着させることができる。

## 【 0 1 7 5 】



【化 1 7】

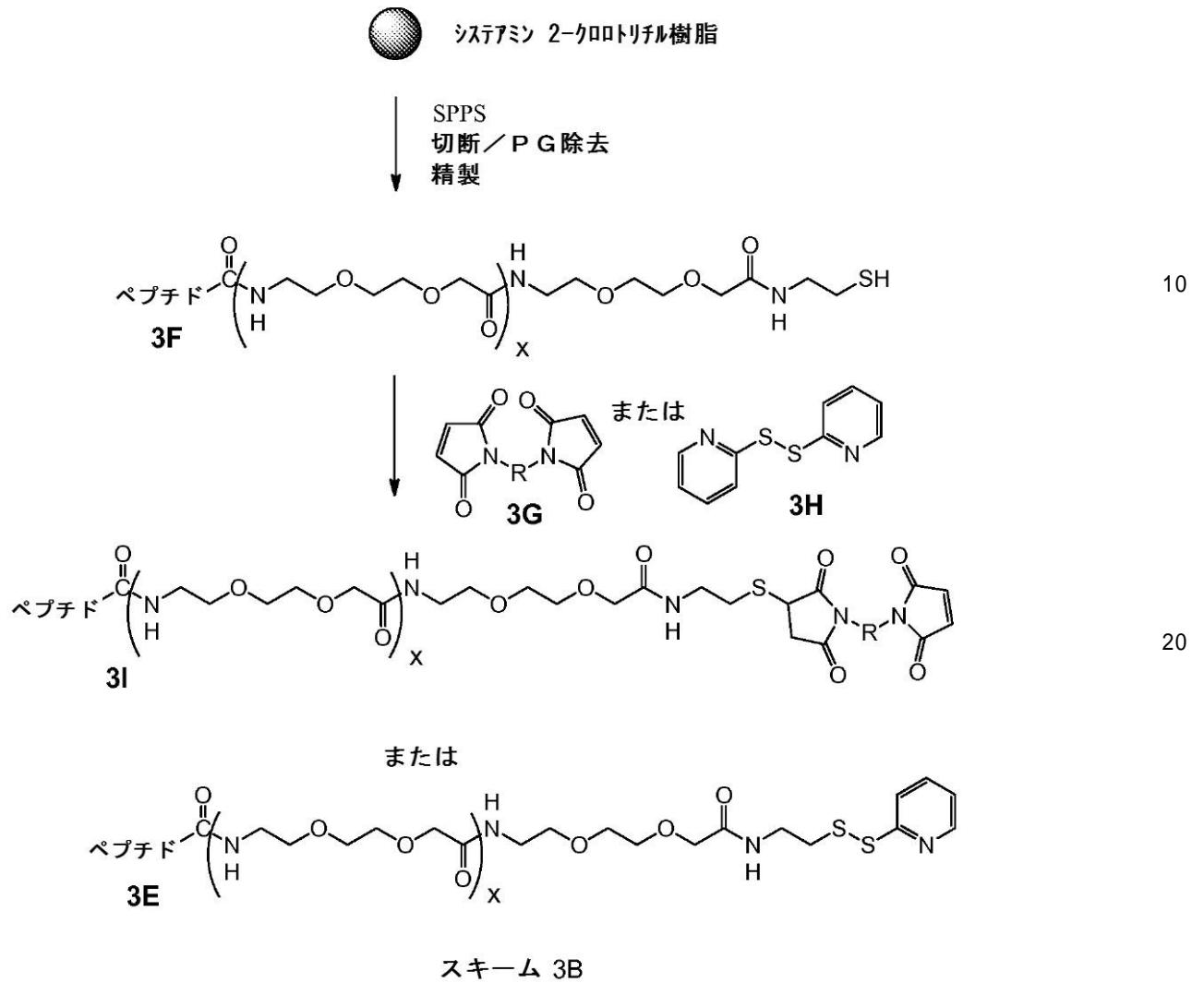


【0 1 7 6】

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O2Ocアミノ酸単位と結合させて、(3A)を生成する。末端カルボン酸官能基は、(3B)または(3C)〔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(3D)または(3E)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。

【0 1 7 7】

【化 18】



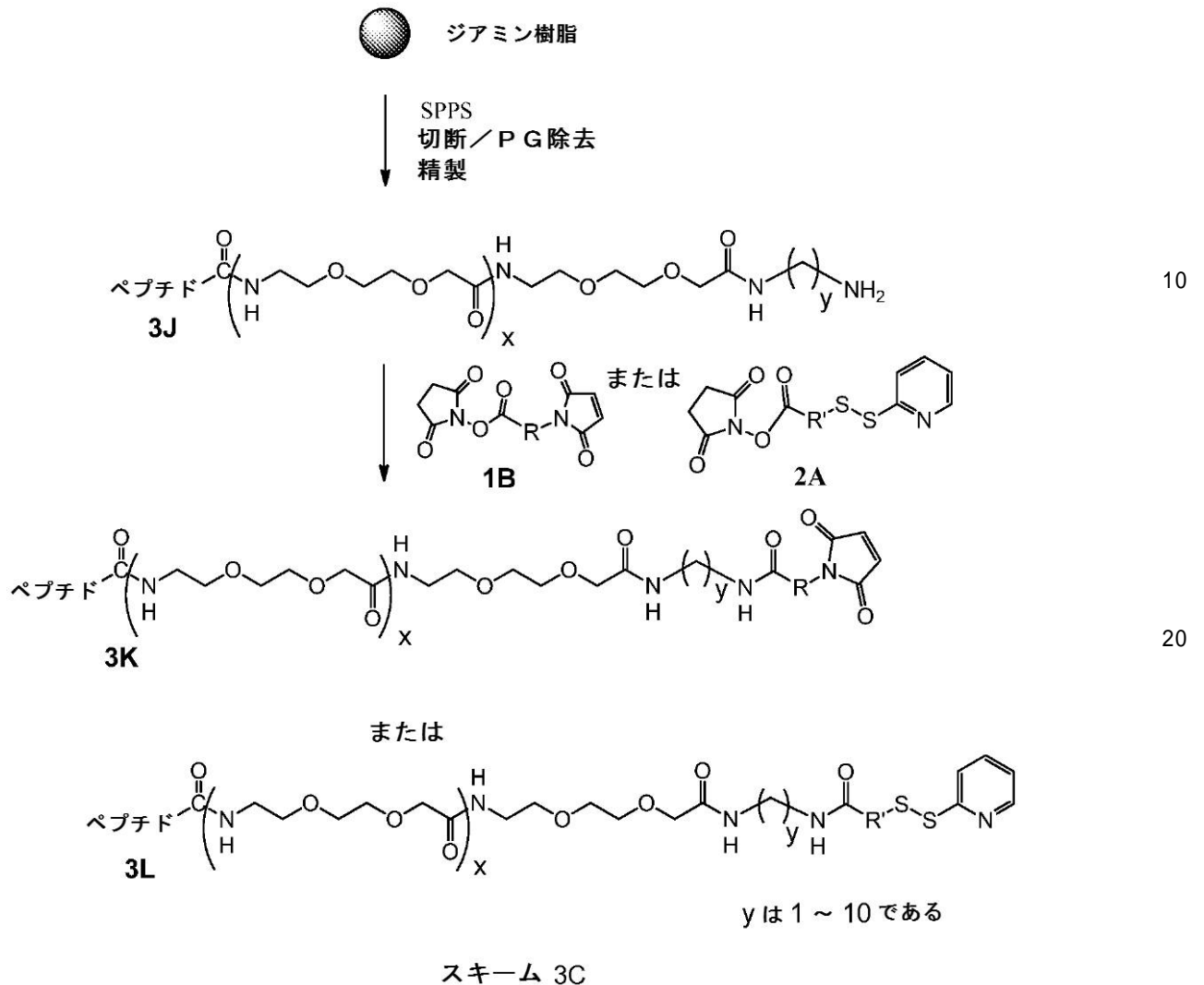
30

【0178】

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 3F を得、次いで 3G または 3H と反応させると、ペプチド-リンカー構築物 3I または 3E をそれぞれ生成することができる。

【0179】

【化 19】



【0180】

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。

【0181】

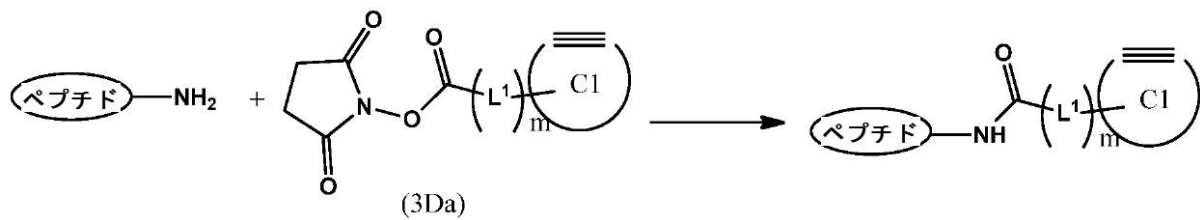
スキーム1～3Cには、より詳細には、アルブミンとのバイオコンジュゲートの調製において使用される、ペプチド・リンカー構築物を記載している。マレイミド反応性基およびピリジン-2-イル-ジスルファニル反応性基は、アルブミンのシステイン34の-SH官能基と反応する。

【0182】

スキーム3Dおよび3E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。

【0183】

【化 20】

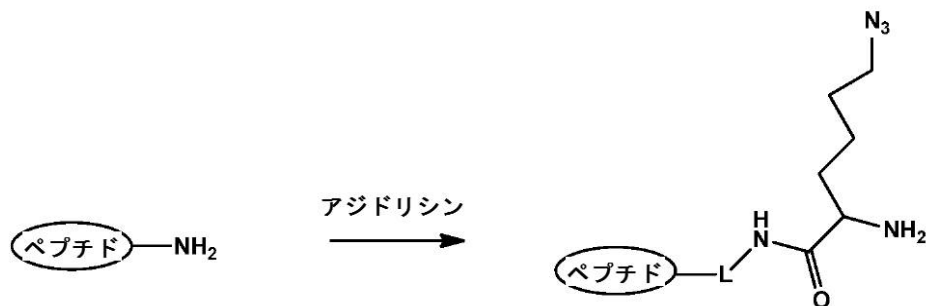


スキーム 3D

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、 $L^1$ は、 $C1 \sim C20$ 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US2009/0068738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。

【0184】

【化 21】



スキーム 3E

【0185】

スキーム3Eには、場合によりリンカー $L$ (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PAT055418-US-PP2)に記載されている。

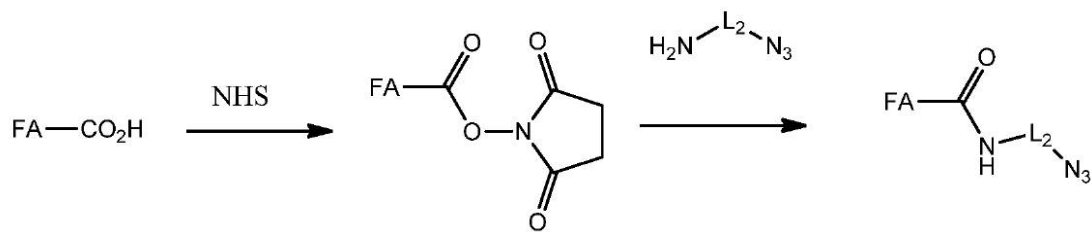
【0186】

半減期延長性部分 - リンカー構築物の調製:

スキーム3Fおよび3Gに、脂肪酸 - リンカー構築物の調製を記載する。

【0187】

【化 2 2】



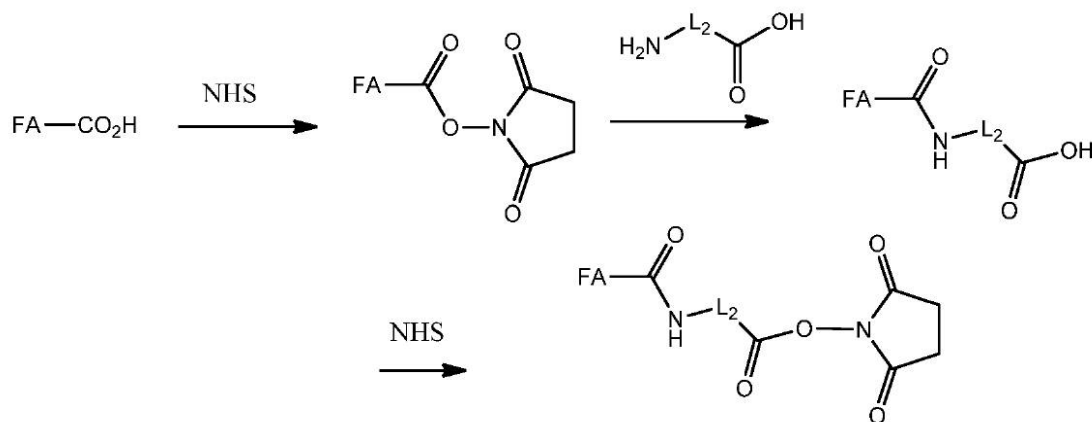
10

スキーム 3F

式中、FAは、脂肪酸であり、L2は、連結部分（たとえば、PEG）であり、NHSは、N-ヒドロキシスクシンイミドである。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 2 3】



20

30

スキーム 3G

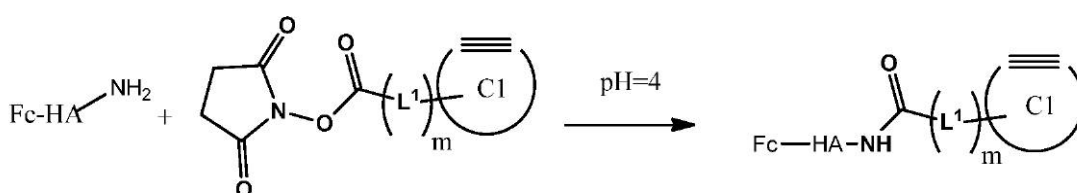
式中、FA、NHS、およびL2は、上でスキーム3Fにおいて規定している。このような脂肪酸構築物は、ペプチド上、好ましくはN末端上のアミノ官能基とのコンジュゲーションに使用される。

【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 2 4】



40

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P A T 0 5 6 2 7 5 - U S - P S Pおよび米国仮出願第62/015862：P A T 0 5 6 2 7 4 - U S - P S P）で開示されている。したがって、クリックハンドルは、F c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、F c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（L P X T G / A）を導入する。このようなF c - 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、F c - [ G G G G ] n - L P E T G G L E V L F Q G Pであり、G G L E V L F Q G Pは、ソルターゼ処理の際に切り詰められる。

10

#### 【0193】

F c 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F c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、F c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F c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F c融合タンパク質も包含する。たとえば、F c融合タンパク質は、F c R n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F c融合タンパク質の例は、参

20

#### 【0194】

本発明のF c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F cドメインを有する「改変」F c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】

F c - [ G G G G S ]、F c - [ G G G G S ] 2、F c - [ G G G G S ] 3、F c - G G、F c - G SなどのF c - リンカー構築物については、実験の部で後述する。[ G G G G S ]、[ G G G G S ] 2、[ G G G G S ] 3、G S、およびG Gリンカーは、F cドメインのC末端またはF cドメインのN末端のいずれかに付着しており、F cは、未変性F cまたはその変異体である。F c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F cが挙げられる。このようなF c変異体は、同時出願の出願（代理人整理番号P A T 0 5 5 7 8 1 - U S - P S P 0 2）に記載されている。

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I g GのF c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、「F a b」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關与する、「F c」として知られる定常ドメインとを含む。F cは、長い血清半減期を有するのに対し、F a bは、短命である（Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31）。治療用ペプチドまたはバ

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、ポリエチレングリコール (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、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：- [GGGS]<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\*<sub>1</sub>LSC\*<sub>1</sub>KGPMPF、C\*<sub>1</sub>RPR<sub>1</sub>LSC\*<sub>1</sub>KGPMPF、およびQRC\*<sub>1</sub>RLSC\*<sub>1</sub>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、FcLLALA) 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】

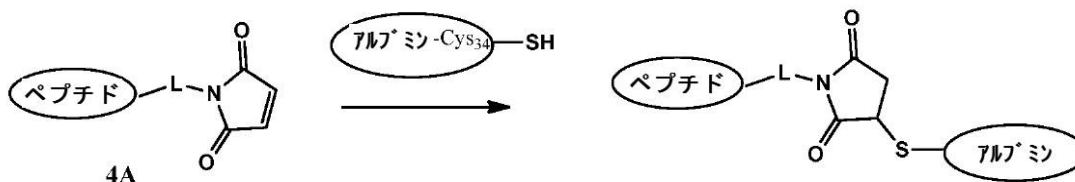
10

20

30

40

【化 2 5】



スキーム 4

10

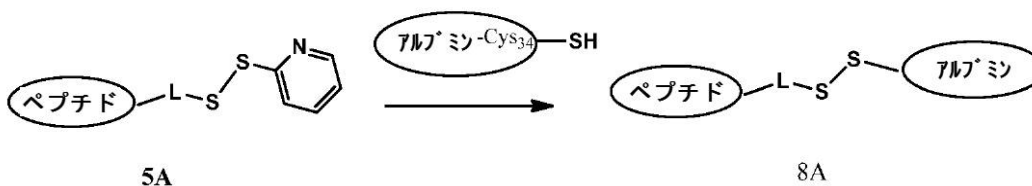
式中、Lは、ペプチドとマレイミド官能基間の連結部分を表す。詳細な実施形態では、Lは、スキーム1、3A、3B、または3Cに開示のとりの連結部分である。

【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 2 6】



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。

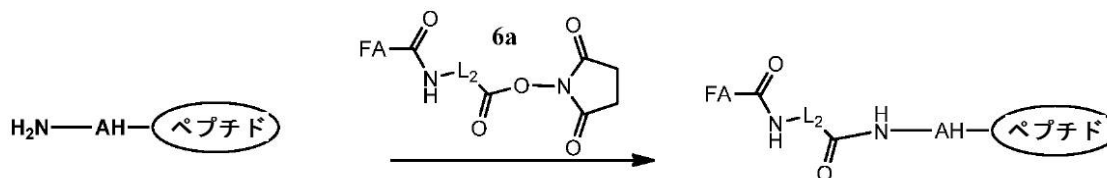
【0210】

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。そうした方法として、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 2 7】



40

スキーム 6

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、脂肪酸リンカー構築物6a（スキーム3Gに示したとりに調製したもの）は、ペプチド上に、N末端において選択的に導入される。

50



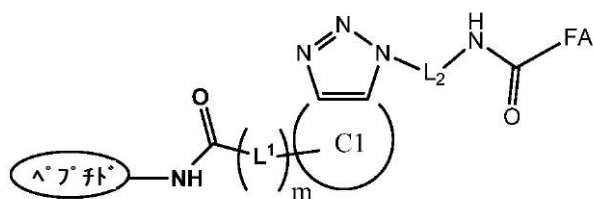
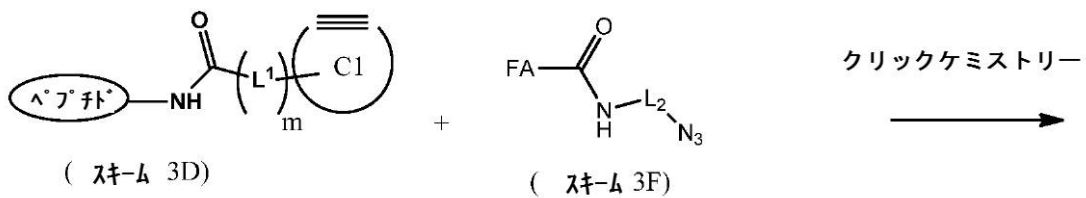
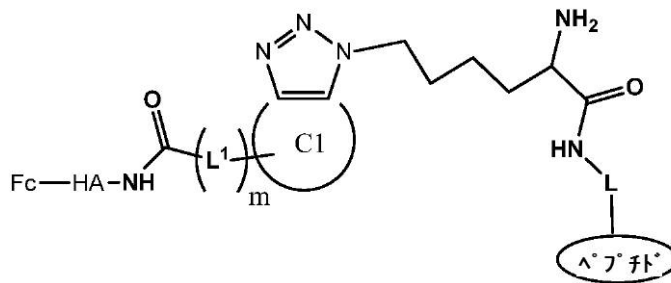
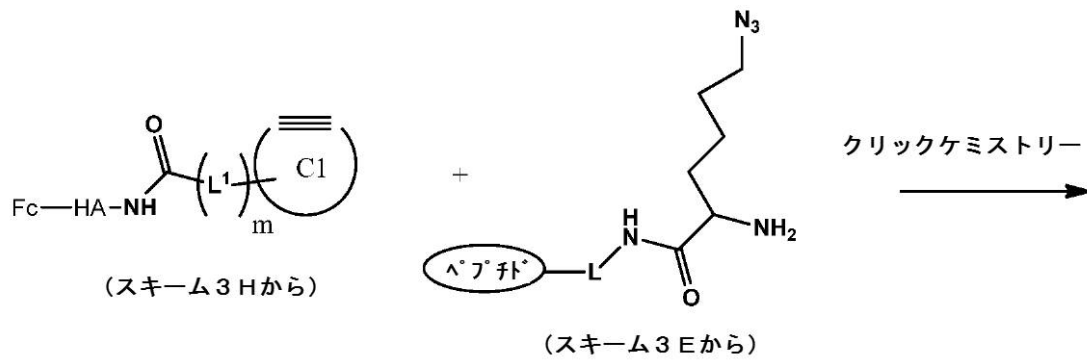
このような方法は、同時出願の特許出願（米国仮出願第 62 / 015868 号：代理人整理番号 PAT 056275 - US - PSP および米国仮出願第 62 / 015848 号 PAT 055781 - US - PSP 02）に記載されている。

【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】



【0214】

10

20

30

40

50

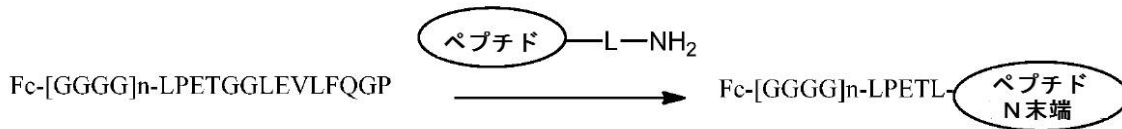
スキーム 1 ～ 5 に記載のとおりコンジュゲートおよびペプチド・リンカー構築物の作製方法については、参照により本明細書に援用される、同時出願の US 出願（米国仮出願第 61/858251 号；代理人整理番号：PAT055326-US-PP3 および米国仮出願第 61/858303 号；PAT055781-US-PP）においても記載および例示されている。

【0215】

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

【0216】

【化29】



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。

【0217】

医薬組成物

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。本発明の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つ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、FcRn 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）。

【0218】

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。

【0219】

10

20

30

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 Parsippany)、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、コーンスターチなどの崩壊剤、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。

40

【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

50

気体を含有する加圧容器もしくは計量分配装置、またはネブライザーから、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同して、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同して送達する。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】

20

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。

【0229】

本明細書で使用する時、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、もしくはネブ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時、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 (chlorotheophyllonate)、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、トシル酸塩、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～ⅩⅠⅠ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。

【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。

20

【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Werthmuth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時、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：

アベ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。アベリン遺伝子は、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、およびピログルタミン酸改変型のアペリン - 13 (Pyr<sup>1</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、GiおよびGqタンパク質を介してシグナルを伝達する。心筋細胞では、GiまたはGqとの共役によって、細胞内pHが変化し、PLCが活性化され、IP3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。Gi共役により、活性化型Gs、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、Gi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。

10

#### 【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求に対処するものである。

20

#### 【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 $t_{1/2}$ (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) Gi/Gq、PLC、およびCa<sup>2+</sup>を介した心収縮性が向上し、b) Gi、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。

30

#### 【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た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込みを改善することによって血糖レベルを下げ、2) 膵臓細胞をERストレスおよび後続のアポ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。

40

#### 【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

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、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適応症の治療において有用となり得る。

【 0 2 4 5 】

したがって、別の実施形態として、本発明は、A P J 受容体活性と関連する疾患を治療するための、式 I ~ I V 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、A P J 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、A P J 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 ~ I V 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

【 0 2 4 6 】

したがって、別の実施形態として、本発明は、式 I ~ I V 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、A P J 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。

【 0 2 4 7 】

20

別の実施形態では、本発明は、治療上許容される量の式 I ~ I V 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、A P J 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。

【 0 2 4 8 】

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 ~ I V 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、A P J 受容体の活性と関連する疾患の治療方法を提供する。

【 0 2 4 9 】

30

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。それに従って、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  $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  から約  $100 \text{mg} / \text{kg}$  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、 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  から約  $100 \text{mg} / \text{kg}$  まで、または  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$  から約  $100 \text{mg} / \text{kg}$  までの範囲となり得る。

【 0 2 5 0 】

40

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。

【 0 2 5 1 】

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）ＡＰＪ受容体の活性化によって改善され、（ｉｉ）ＡＰＪ受容体の活性と関連し、または（ｉｉｉ）ＡＰＪ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）ＡＰＪ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、ＡＰＪ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。

【0261】

hAPJカルシウムフラックスアッセイ：

384ウェルフォーマットにおいて、25  $\mu$ l 成長培地に、Chem-5 APJ安定細胞 (Millipore # HTS068C) を10,000細胞/ウェルで播き、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  $\mu$ l /ウェルの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  $\mu$ Mから5 pM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  $\mu$ M ~ 1 pM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 nmの励起波長および515 ~ 575 nmの発光波長を使用して、蛍光を測定した。読取りは、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。

【0262】

血漿安定性アッセイ：

材料：

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。

【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  $\mu$ Lのラット血漿または全血に1 mg / mLの作業溶液5  $\mu$ 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  $\mu$ Lの作業溶

10

20

30

40

50

液を加えて、995  $\mu$ L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  $\mu$ Lのアリコートを経路96ウェルプレートに移し、150  $\mu$ L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  $\mu$ L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  $\mu$ Lをラット血漿495  $\mu$ L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  $\mu$ Lのアリコートを経路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  $\mu$ L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  $\mu$ L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  $\mu$ Lの上清を別のプレートに移し、すべてのサンプルに50  $\mu$ L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：オートサンプラーを備えたAgilent 1290 HPLC

カラム：MAC-MOD ACE C18、3  $\mu$ m、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】

#### 勾配プログラム：

30

#### 【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（ $t_{1/2}$ ）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 (\text{ $t = 0$  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 °C 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)  $\text{LN}((t_0 \text{ 時点の } EC_{50}) / (t_{24 \text{ 時間 時点の } EC_{50}}))$

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
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
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
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
実施例 26	2292	52
実施例 27	86.5	82
実施例 28	3.1	13

【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

【 0 2 7 6 】

【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 t1/2[分]	代替活性ベースの血 漿安定性 t1/2[分]
Pyr-1-アペリン 13	6.6	5.0
実施例 32	377	>1000

30

40

【 0 2 7 7 】

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 と同様の A P J 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、E C<sub>50</sub> が 100 nM 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、E C<sub>50</sub> が 50 nM 未満、好ましくは 25 nM 未満、より好ましくは 15 nM 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、E C<sub>50</sub> が 10 nM 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。

10

## 【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】

20

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）を含む医薬組成物を提供する。場合により、医薬組成物は、上述のとおり薬学的に許容される賦形剤を含んでもよい。

30

## 【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ターパックである。

## 【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。

40

## 【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。

50

## 【 0 2 8 6 】

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 ~ I V 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 ~ I V 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、アベ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。

## 【 0 2 8 7 】

本発明はまた、式 I ~ I V 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 ~ I V 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 ~ I V 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 ~ I V 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 ~ I V 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 ~ I V 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。

## 【 0 2 8 8 】

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 ~ I V 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 ~ I V 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。

## 【 0 2 8 9 】

一実施形態では、他の治療薬は、イソトローブ、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 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、アルドステロンシンターゼ阻害薬 (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 N E P 阻害薬から選択される。

## 【 0 2 9 0 】

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 ~ I V 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。

## 【 0 2 9 1 】

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、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）、および子癰前症の症状を治療、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。

#### 【 0 2 9 2 】

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、H M G - C o A 還元酵素阻害薬、アンジオテンシン I I 受容体拮抗薬、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）、エンドセリン拮抗薬、レニン阻 10  
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、アルドステロンシンターゼ阻害薬（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 阻害薬が挙げられる。

#### 【 0 2 9 3 】

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（amirinone）、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。

#### 【 0 2 9 4 】

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、アセブトロール、アテノロール、ベタキソロール、ピソプロロール、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

#### 【 0 2 9 5 】

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。

#### 【 0 2 9 6 】

用語「H M G - C o A 還元酵素阻害薬」（ - ヒドロキシ - - メチルグルタリル - 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 30  
タチン（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。

#### 【 0 2 9 7 】

用語「A C E 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 I I 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、アラセプリル、ベナゼプリル、ベナゼプリラート、カプトプリル、セロナプリル（ce 40  
ronapril）、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナプリラート（enaprilat）、ホシノプリル、イミダプリル、リシノプリル、モエキシプリル、モベルトプリル（move ltopril）、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、テモカプリル、およびトランドラプリル、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。

#### 【 0 2 9 8 】

用語「エンドセリン拮抗薬」は、ボセンタン（E P 5 2 6 7 0 8 A を参照のこと）、テゾセンタン（W O 9 6 / 1 9 4 5 9 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。

#### 【 0 2 9 9 】

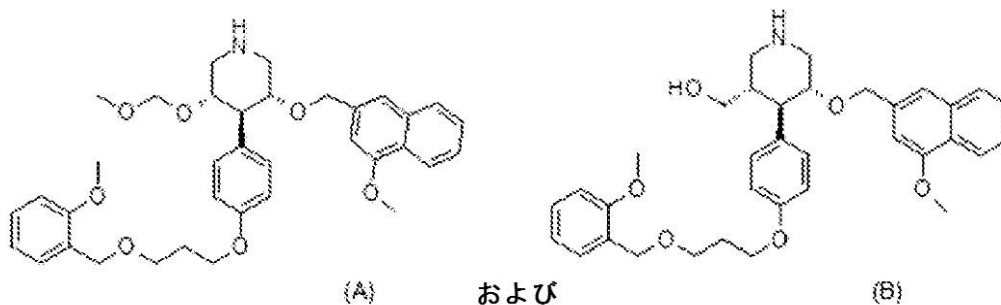
用語「レニン阻害薬」は、ジテキレン（ditekiren）（化学名：[ 1 S - [ 1 R \* , 2 R \* , 4 R \* ( 1 R \* , 2 R \* ) ] ] - 1 - [ ( 1 , 1 - ジメチルエトキシ ) カルボニル 50



]-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:(2S, 4S, 5S, 7S)-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:[1S-[1R\*[R\*(R\*)], 2S\*, 3R\*]]-N-[1-(シクロヘキシルメチル)-2, 3-ジヒドロキシ-5-メチルヘキシル]-[[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Speedelが開発したSPP630、SPP635、およびSPP800、または式(A)および(B):

【0300】

【化30】



のRO66-1132およびRO66-1168、またはこれらの薬学的に許容される塩を包含する。

【0301】

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。

【0302】

用語「カルシウムチャネル遮断薬(CCB)」は、ジヒドロピリジン(DHP)および非DHP(たとえば、ジルチアゼム型およびベラパミル型CCB)を包含する。例としては、アムロジピン、ベプリジル、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DHPであることが好ましい。CCB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。

【0303】

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、メチルクロチアジド(methylclothiazide)、およびクロロタリドン(chlorothalidon))を包含する。

【0304】

用語「ApoA-I模倣薬」は、D4F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。

【0305】

10

20

30

40

50

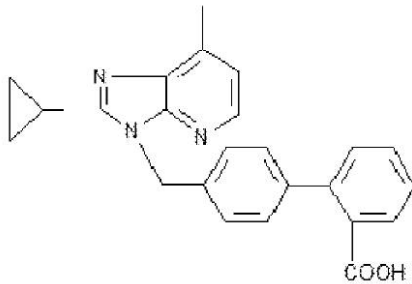
アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬または薬学的に許容されるその塩は、アンジオテンシンⅡ受容体のAT<sub>1</sub>受容体サブタイプに結合するが、結果として受容体を活性化しない活性成分であると理解される。AT<sub>1</sub>受容体が抑制される結果として、こうした拮抗薬は、たとえば、降圧薬として、またはうっ血性心不全の治療に用いることができる。

【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】

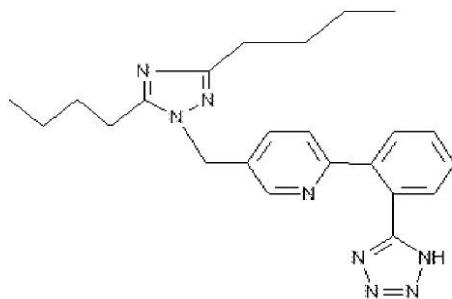
【化31】



のE-1477という呼称の化合物、次式

【0308】

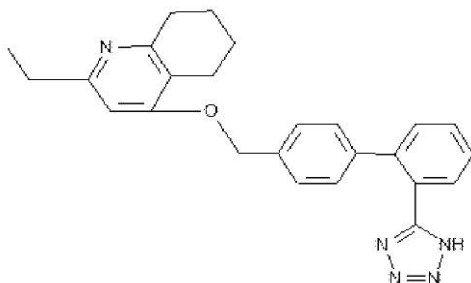
【化32】



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

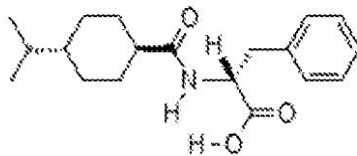
50

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、ピグアナイド誘導体（たとえば、メトホルミン）、スルホニル尿素（SU）（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]-ベンゼンスルホンアミド（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-ブチル-3-メタニリル尿素、カルブタミド（carbutamide）、グリボヌリド（glibonuride）、グリピジド、グリキドン、グリソキセピド、グリブチアゾール（glybutthiazole）、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

10

【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〕（EP196222およびEP526171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〕ブチル〕アミノ〕-2-オキシエチル〕安息香酸〕（EP589874、EP147850A2、詳細には、61頁の実施例11、およびEP207331A1を参照のこと）、カルシウム（2S）-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（EP507534を参照のこと））、およびグリメピリド（EP31058を参照のこと）が挙げられる。

20

【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。

30

【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、WO98/19998、DE19616486A1、WO00/34241、およびWO95/15309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、WO98/19998の実施例3およびWO00/34241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。

40

【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US5,705,483に記載されているインスリン分泌性タンパク質である。

50

## 【0317】

用語「GLP-1アゴニスト」は、特にUS5,120,712、US5,118,666、US5,512,549、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>36</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-ヒドロキシアエトキシ]}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-シクロプ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-ピリジニル)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

ュレーター；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； $\gamma$  - 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； $\beta_2$  - 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

**【 0 3 2 0 】**

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、アセプトロール、アテノロール、ベタキソロール、ピソプロロール、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  $\beta$  - 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 II 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

**【 0 3 2 1 】**

用語「抗肥満薬」は、リパーゼ阻害薬（たとえば、オーリスタット）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。

**【 0 3 2 2 】**

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、アルドステロンの産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産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産生の抑制は、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

**【 0 3 2 3 】**

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。

**【 0 3 2 4 】**

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。

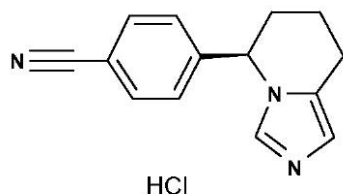
**【 0 3 2 5 】**

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

**【 0 3 2 6 】**

## 【化 3 5】



のファドロゾールの塩酸塩（米国特許 4 6 1 7 3 0 7 および 4 8 8 9 8 6 1 ）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

## 【0 3 2 7】

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、US 2 0 0 7 / 0 0 4 9 6 1 6 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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 - 5 H - 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。

20

30

40

## 【0 3 2 8】

用語アルドステロンシンターゼ阻害薬は、WO 2 0 0 8 / 0 7 6 8 6 0、WO 2 0 0 8 / 0 7 6 3 3 6、WO 2 0 0 8 / 0 7 6 8 6 2、WO 2 0 0 8 / 0 2 7 2 8 4、WO 2 0 0 4 / 0 4 6 1 4 5、WO 2 0 0 4 / 0 1 4 9 1 4、WO 2 0 0 1 / 0 7 6 5 7 4 で開示されている化合物および類似体も包含する。

## 【0 3 2 9】

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 US 2 0 0 7 / 0 2 2 5 2 3 2、US 2 0 0 7 / 0 2 0 8 0 3 5、US 2 0 0 8 / 0 3 1 8 9 7 8、US 2 0 0 8 /

50

0076794、US2009/0012068、US20090048241、およびPCT出願WO2006/005726、WO2006/128853、WO2006128851、WO2006/128852、WO2007065942、WO2007/116099、WO2007/116908、WO2008/119744、および欧州特許出願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ン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-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)ナフタレン-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。

#### 【0330】

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、WO2009/156462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ン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-メチル-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)-メチル]-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-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、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-

10

20

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プリセンタンを包含する。

## 【 0 3 3 2 】

用語「CETP 阻害薬」とは、コレステリルエステル転送タンパク質 ( CETP ) 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HDLからLDLおよびVLDLへの輸送を抑制する化合物を指す。このようなCETP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, 140, 343号) に従い、容易に見極められる。例として、米国特許第6, 140, 343号および米国特許第6, 197, 786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, 723, 752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 - プロパノール ) 、米国特許出願第10 / 807, 838号で開示されている化合物、米国特許第5, 512, 548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)で開示されているロ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、CETP阻害薬として、WO 2000 / 017165、WO 2005 / 095409、WO 2005 / 097806、WO 2007 / 128568、WO 2008 / 009435、WO 2009 / 059943、およびWO 2009 / 071509で開示されているものも挙げられる。

20

30

## 【 0 3 3 3 】

用語「NEP 阻害薬」とは、中性エンドペプチダーゼ ( NEP ) EC 3 . 4 . 24 . 11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 ( Sapatrilat ) 、ファシドトリル、オマパトリラート、ゲモパトリラート ( Gemopatrilat ) 、ダグルトリル ( Daglutril ) 、SCH - 42495、SCH - 32615、UK - 447841、AVE - 0848、PL - 37、および( 2 R , 4 S ) - 5 - ビフェニル - 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。NEP阻害薬には、米国特許第US 5, 155, 100号で開示されているようなホスホノ / ビアリール置換ジペプチド誘導体も含まれる。NEP阻害薬には、PCT出願第WO 2003 / 104200号で開示されているようなN - メルカプトアシルフェニルアラニン誘導体も含まれる。NEP阻害薬には、PCT出願第WO 2008 / 133896、WO 2009 / 035543、またはWO 2009 / 134741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、US出願第12 / 788, 794号、第12 / 788, 766号、および第12 / 947, 029号で開示されている化合物が挙げられる。

40

50



NEP阻害薬として、WO2010/136474、WO2010/136493、WO2011/061271、ならびにUS仮出願第61/414171号および第61/414163号で開示されている化合物も挙げられる。

【0334】

一実施形態では、本発明は、対象においてAPJ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。

【0335】

一実施形態では、本発明は、対象において、APJ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

【0336】

一実施形態では、本発明は、対象において、APJ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（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）、および子癇前症から選択される方法を提供する。

20

【0337】

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。

【0338】

一実施形態では、本発明は、APJ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、APJ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（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）、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】

【0339】

本発明の例示：ペプチドおよびポリペプチド合成

40

【0340】

【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
$\varepsilon$ -Ahx	$\varepsilon$ -アミノヘキサン酸
AM	アミノメチル
BAL	主鎖(backbone)アミドリinker
BSA	ウシ血清アルブミン
Boc	<i>tert</i> -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	<i>N,N'</i> -ジイソプロピルカルボジイミド
DIPEA	<i>N,N'</i> -ジイソプロピルエチルアミン
DMA	<i>N,N'</i> -ジメチルアセトアミド
DMF	<i>N,N'</i> -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	脂肪酸
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
HBSS	ハanks緩衝塩溶液
HCTU	2-(6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-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
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 naturalis(自然対数)

10

20

30

40

【 0 3 4 1 】

【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	<i>tert</i> -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
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -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
<i>t</i> <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 Fmoc 化学によって合成した。ペプチドは、Prelude (商標) ペプチド合成装置 (Protein Technologies, Inc., 米国トゥーソン) および Liberty マイクロ波ペプチド合成装置 (CEM Corporation, 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 - PS - 樹脂 (ABCR、ドイツ国カールスルーエ、または AnaSpec, Inc., 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、Fmoc 保護された Rink - Amide - AM - PS 樹脂 (Merck、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 BAL - AM - PS 樹脂 (EMC Microcollections, 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 HPLC によって精製した。次のカラムを使用した。

- Waters SunFire Prep C18 OBD 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  $\mu$ m、30  $\times$  150 mm、部品番号 186003703

- Waters SunFire Prep C18 OBD カラム、5  $\mu$ m、30  $\times$  50 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、 $\lambda = 214 \text{ nm}$  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-P-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

20

30

【0348】

【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
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
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
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

10

20

30

「\*」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) HPLC - 分析方法 A

- カラム: Waters X Bridge (商標) C18 (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 ACN 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) HPLC - 分析方法 B

10

- カラム: X Bridge BEH300 C18 (100 × 4.6 mm)、3.0 μm、部品番号: 186003612
- 溶離液 A: 0.1% TFA 水溶液 / 溶離液 B: 0.1% TFA ACN 溶液
- 流量: 1.0 ml / 分
- 温度: 40
- 勾配:

## 【0351】

【表 8】

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

20

## 【0352】

2 a) UPLC - MS - 分析方法 C

- カラム: Acquity UPLC (登録商標) BEH300 C18 (50 × 2.1 mm)、1.7 μm、部品番号: 186003685
- 溶離液 A: 0.05% TFA 水溶液 / 溶離液 B: 0.04% TFA ACN 溶液
- 流量: 1.0 ml / 分
- 温度: 80
- 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) UPLC - HRMS - 分析方法 D

- Waters Acquity UPLC (登録商標) BEH C18、1.7 μm、2.1 × 50 mm、部品番号: 186002350
- 溶離液 A: 0.05% FA + 3.75 mM の酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B: 0.04% FA ACN 溶液
- 流量: 1.0 ml / 分

50

- 温度：50
- 勾配：4.4分で2～98%

## 【0355】

## 3) 分析方法E:

- XBridge C18カラム、3.5  $\mu$ m、3.0  $\times$  30 mm
- 溶離液：A：水(0.1%ギ酸)、B：CAN
- 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：Single Quadrupole ESI 走査範囲150～1600 10

- HPLC：Agilent 1100シリーズ
- 温度：40 C

## 【0356】

## 3) 分析方法F:

- Acquity BEH 1.7  $\mu$ m 2.1  $\times$  50 mm
- 溶離液：A：水(0.1%ギ酸)、B：ACN(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：Single Quadrupole ESI 走査範囲120～1600 20

- HPLC：waters Acquity
- 温度：50 C

## 【0357】

## 3) 分析方法G:

- Acquity BEH 1.7  $\mu$ m 2.1  $\times$  50 mm
- 溶離液：A：水(0.1%ギ酸)、B：ACN(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：Single Quadrupole ESI 走査範囲120～1600 30

- HPLC：waters Acquity
- 温度：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				
	$t_R$ [min]	方法 Meth.	$[M+2H]^{2+}$ (測定値) (measured)	$[M+3H]^{3+}$ (測定値)	方法	$[M+2H]^{2+}$ (計算値) (calc.)	$[M+3H]^{3+}$ (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

10

20

30

【 0 3 6 0 】



【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
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
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
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
実施例 26	7.58	B	754.368	503.247	D	754.361	503.241

10

20

30

40

【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DIPEA(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/DIPEA(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12×10mL)と共に繰り返し振盪し、DMA(最初の樹脂1グラムあたり2×10mL)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250mLとした。この溶液の2mLのアリコート(V<sub>a</sub>)をMeOHでさらに希釈して250mL(V<sub>t</sub>)とした。UV吸収を、MeOHを基準として299.8nmで測定して、吸収A

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、mgの樹脂を得た。

#### 【0363】

樹脂への導入量は、式：

$$\text{導入量 [mol/g]} = (A \times V_t \times V) / (d \times V_a \times m)$$

(d: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

#### 2a) 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DIPEA(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、カップリングを行った。樹脂をDMAで洗浄した。

#### 【0365】

20

#### 2a) 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DIPEA(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、カップリングを行った。樹脂をDMAで洗浄した。

30

#### 【0366】

#### 2b) 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、カップリングを行った。樹脂をDMAで洗浄した。

#### 【0367】

#### 2c) 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DIPEA(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

#### 3a) 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) 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 HFIP / 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 HFIP / 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。

【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 ~ 25 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。

【0373】

以下では、代表的な実施例の合成について記載する。

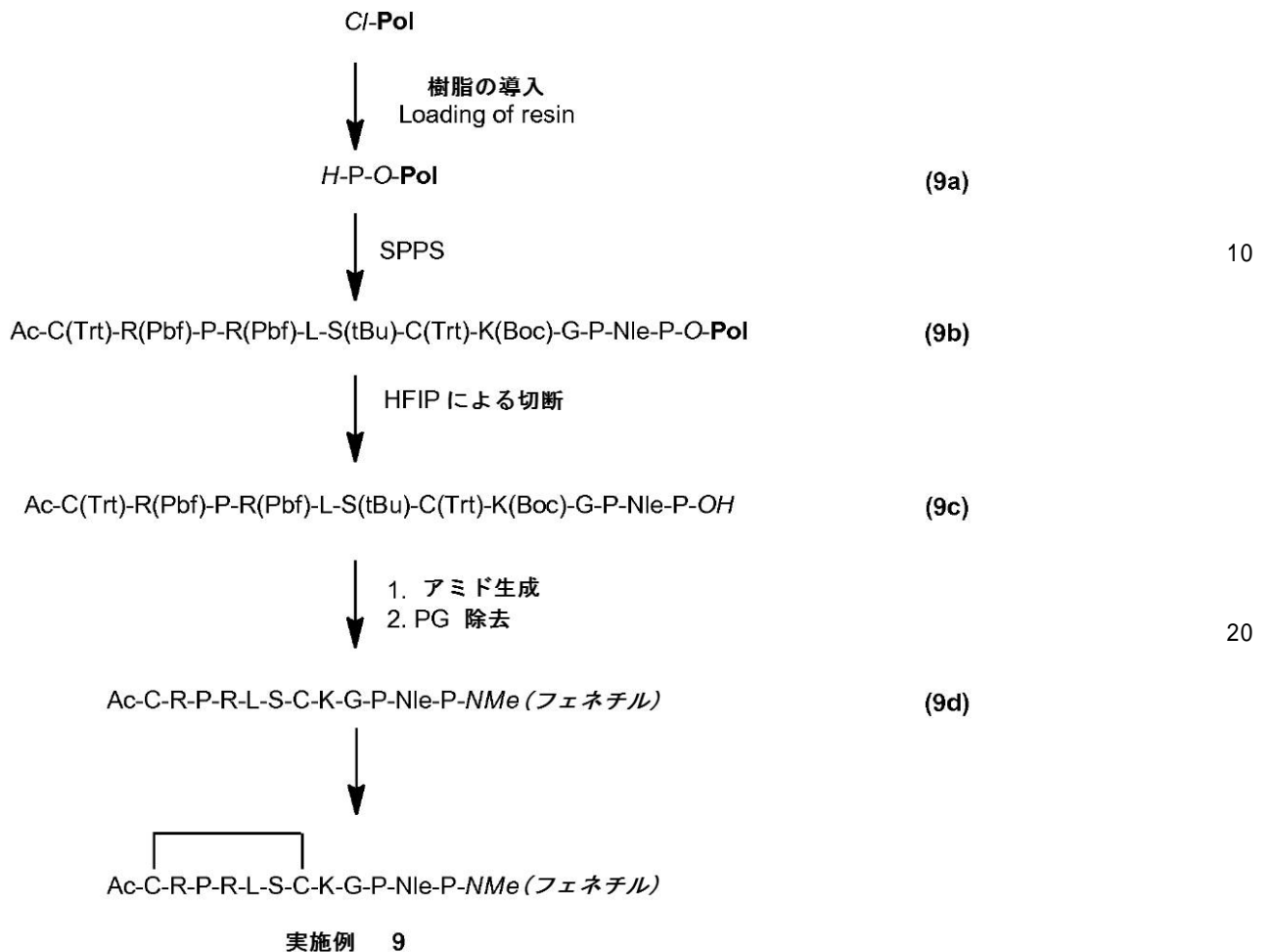
[実施例 9]

【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

【0375】

## 【化 3 6】



## 【0376】

- 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】

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 2 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。

【 0 3 8 0 】

【表 1 1】

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 x 1 時間	B
2	P	2 x 30 分	B
3	G	2 x 1 時間	B
4	K(Boc)	2 x 30 分	B
5	C(Trt)	2 x 30 分	B
6	S(tBu)	2 x 30 分	B
7	L	2 x 30 分	B
8	R(Pbf)	4 x 1 時間	B
9	P	2 x 1 時間	B
10	R(Pbf)	4 x 1 時間	B
11	C(Trt)	2 x 1 時間	B
12	Ac	1 x 10 分	C

10

20

【 0 3 8 1 】

- 中間体 9 c の調製

(樹脂からの HFIP 切断)

中間体 9 b ( 0 . 1 0 0 m m o l ) に HFIP / DCM ( 1 : 3 ) ( 3 m L ) を加え、懸濁液を室温で 2 0 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 HFIP / DCM ( 1 : 3 ) ( 1 m L ) 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 から凍結乾燥して、中間体 9 c ( 3 7 . 2 m g 、 1 4 . 8 μ m o l ) を白色の固体として得た。

【 0 3 8 2 】

- 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 ( 3 7 . 0 m g 、 = 1 4 . 7 μ m o l ) および TBTU ( 7 . 1 m g 、 2 2 . 1 μ m o l ) を DCM ( 5 m L ) に溶解させた。DIPEA ( 5 . 1 μ l 、 2 9 . 4 μ m o l ) 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 μ l 、 2 2 . 1 μ m o l ) を加え、反応液を室温で 1 時間 4 0 分攪拌し、次いで EtOAc / n - ブタノール ( 9 : 1 ) ( 5 0 m L ) と 5 % NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 ( 5 m L ) とに分配した。有機層を 5 % NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 ( 5 m L ) 、ブライン ( 5 m L ) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮乾燥した。

【 0 3 8 3 】

残渣を 9 5 % TFA / TIS / EDT ( 9 5 : 2 . 5 : 2 . 5 ) 水溶液 ( 5 m L ) 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 ) ( 3 5 m L ) 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 ) ( 1 0 m L ) で 2 回洗浄し、次いで真空中で乾燥させて、中間体 9 d ( 2 7 . 0 m g 、 1 4 . 7 μ m o l ) 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。

【 0 3 8 4 】

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 ( 2 6 . 9 m g 、 1 4 . 7 μ m o l ) を H<sub>2</sub>O ( 3 . 7 m L ) に溶解させた

30

40

50

(溶液は、わずかに濁っていた)。50 mMの $I_2$  AcOH溶液(0.353 mL、 $17.6 \mu\text{mol}$ )を加え、混合物を室温で30分間撹拌した。0.5 Mのアスコルビン酸 $H_2O$ 溶液(0.044 mL、 $22.1 \mu\text{mol}$ )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、 $3.7 \mu\text{mol}$ )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、 $t_R = 3.75$ 分)およびUPLC-MS(分析方法C、測定値： $[M+3]^{3+} = 495.3$ 、計算値： $[M+3]^{3+} = 495.3$ )によって分析した。

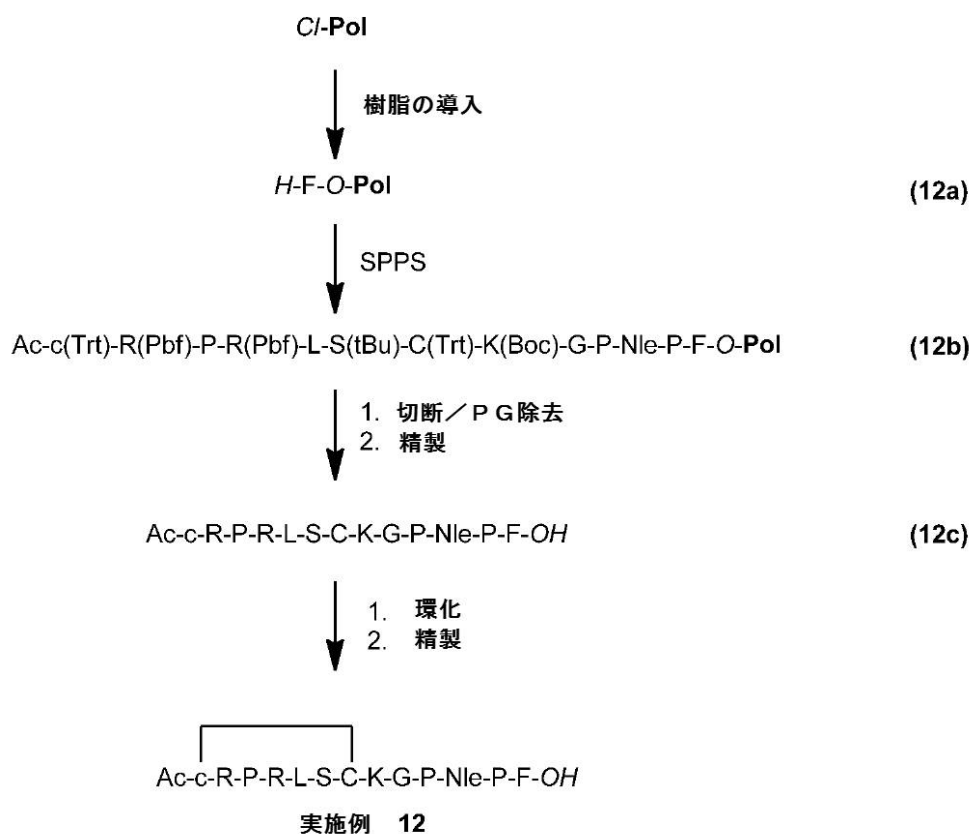
[実施例12]

【0386】

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

【0387】

【化37】



【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、 $16.0 \text{ mmol}$ )をDCM(3回)で洗浄した。Fmoc-F-OH(12.4 g、 $32.0 \text{ mmol}$ )をDCM(100 mL)およびDIPEA(11.2 mL、 $64.0 \text{ mmol}$ )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/DIPEA(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

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）。

【 0 3 9 0 】

樹脂を D C M（ 3 回）、D M A（ 3 回）、D C M（ 3 回）で十分に洗浄し、真空中で乾燥させて、中間体 1 2 a（ 1 2 . 8 g、導入量 = 0 . 7 9 m m o l / g ）を得た。

【 0 3 9 1 】

- 中間体 1 2 b の調製

（線状ペプチドの組み立て）

中間体 1 2 a（ 1 2 7 m g、0 . 1 0 m m o l ）を P r e l u d e（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。

【 0 3 9 2 】

【表 1 2】

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

【 0 3 9 3 】

- 中間体 1 2 c 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 1 2 b（ 0 . 1 0 m m o l ）を D C M（ 4 回）で慎重に洗浄した。9 5 %の T F A / E D T / T I S（ 9 5 : 2 . 5 : 2 . 5 ）水溶液の混合物（ 2 m L ）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（ 2 m L ）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（ 2 m L ）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（ 3 0 m L ）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 ）（ 1 0 m L ）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 H P L C によって精製し、凍結乾燥して、中間体 1 2 c（ 5 3 m g、0 . 0 2 9 m m o l ）を得た。

【 0 3 9 4 】

- 実施例 1 2 の調製

（環化および精製）

中間体 1 2 c（ 5 3 m g、0 . 0 2 9 m m o l ）を H<sub>2</sub>O / D M S O（ 9 : 1 ）（ 1 8 m L ）に溶解させた。反応混合物を室温で 4 0 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 H P L C によって精製し、凍結乾燥して、実施例 1 2 を白色の固体（ 2 7 . 4 m g、0 . 0 1 4 m m o l ）として得た。

【 0 3 9 5 】



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

【実施例18】

【0396】

Ac - (D - hC) \* - R - P - R - L - S - (hC) \* - K - G - P - f - a - f - OH (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：0.66 mmol / 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。0.3 mmol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：215 nm）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1 mg / 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0.1 M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）、1 M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（215 nmで検出）、TFA緩衝液（緩衝液A、0.1%の水中TFA（A.C.S.グレード、Nu Generation 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%を超える画分を集め、凍結乾燥によって乾燥させた。

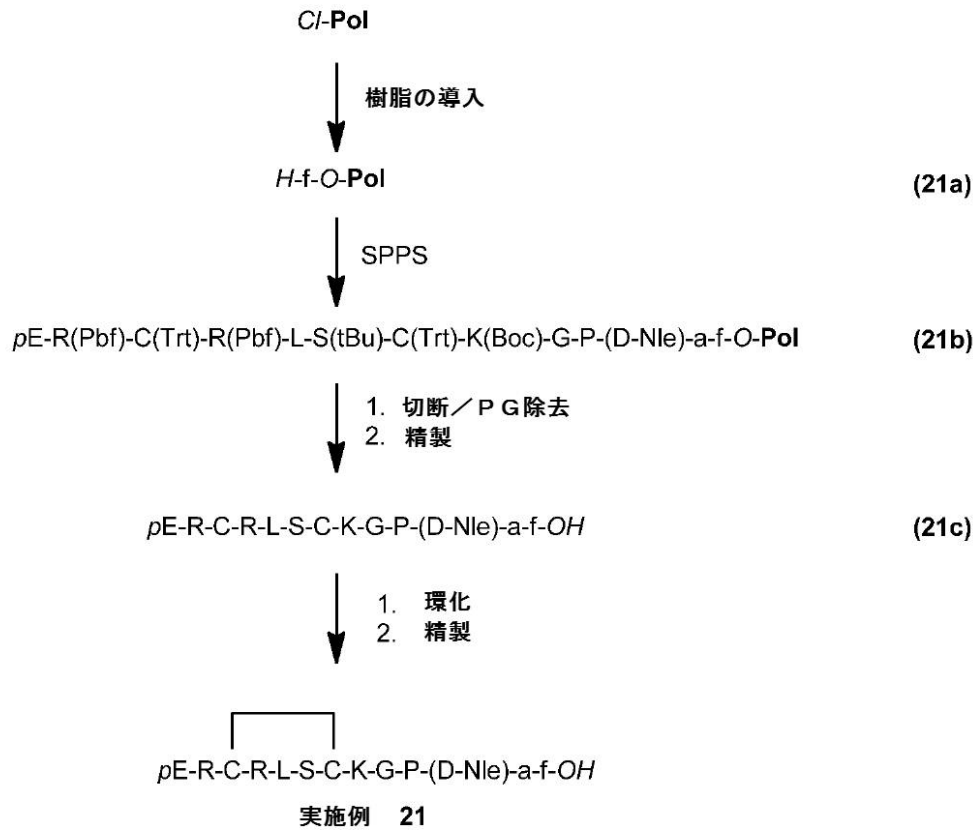
【実施例21】

【0400】

pE - R - C \* - R - L - S - C \* - 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 3 8】



10

20

## 【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 (5.0 g、8.01 mmol) を、Fmoc-f-OH (3.10 g、8.01 mmol) を DCM (50 mL) および DIPEA (5.59 mL、32.0 mmol) 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 (5.87 g、導入量 = 0.897 mmol / g) を得た。

30

## 【0403】

- 中間体 21b の調製

(鎖状ペプチドの組み立て)

中間体 21a (0.100 mmol) 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℃	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 (0.1 mmol) に 95% TFA / EDT / DTT (95 : 2.5 : 2.5) 水溶液の混合物 (2 mL) 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 (2 mL) 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 (11 mL) 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 (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。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 (55 mg, 0.030 mmol) を得た。

30

## 【0406】

- 実施例 21 の調製

(環化および精製)

中間体 21c (18 mg, 9.97 μmol) を H<sub>2</sub>O (1.0 mL) に溶解させた。攪拌した溶液に、50 mM の I<sub>2</sub> AcOH 溶液 (0.24 mL, 12 μmol) 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。0.5 M のアスコルビン酸 H<sub>2</sub>O 溶液 (24 μmol, 12 μmol) 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 (12 mg, 6.32 μmol) として得た。

40

## 【0407】

純粋な生成物を、分析 HPLC (分析方法 B、t<sub>R</sub> = 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]

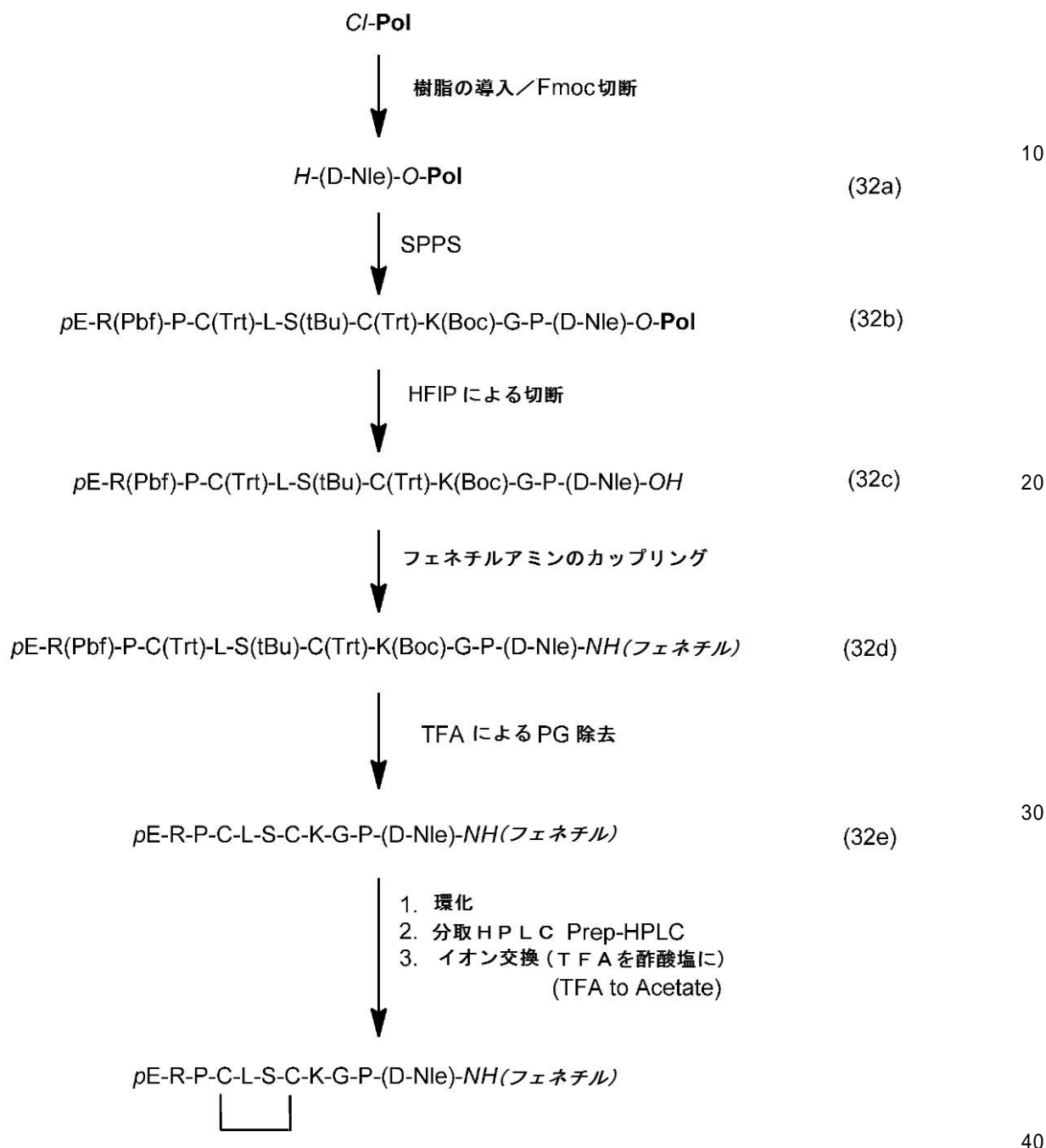
## 【0408】

50

p E - R - P - C<sup>\*</sup> - L - S - C<sup>\*</sup> - 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 Fmoc - D - N l e - O H 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 ( 50 . 0 g 、 85 . 0 m m o l ) を の D C M ( 400 m L ) に懸濁させ、懸濁液を 10 分間攪拌し、次いで溶媒を排出し、樹脂を D C M ( 3 × 200 m L ) で洗浄した。次いで、樹脂に、Fmoc - D - N l e - O H ( 24 . 0 g 、 68 . 0 m m o l ) および D I P E A ( 96 . 5 m l 、 552 . 5 m m o l ) を D C

M ( 1 2 0 . 0 m L ) 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 ( 2 2 . 7 m l 、 1 2 7 . 5 m m o l ) を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。

【 0 4 1 1 】

反応混合物を排出し、樹脂を D C M ( 3 × 2 5 0 m L ) 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 ( 7 0 : 1 5 : 1 5 ) 混合物 ( 2 × 2 5 0 m L ) で各回 1 0 分間かけて失活させた。

【 0 4 1 2 】

樹脂をピペリジン / D M F ( 1 : 3 ) ( 1 × 3 0 0 m L ) で 5 分間処理することにより、Fmoc 基を切断した。樹脂を排出し、次いで ( 1 × 3 0 0 m L ) 1 5 分間、続いて洗浄ステップ：D M F ( 6 × 2 5 0 m L 、各回 2 分)、イソプロパノール ( 2 × 2 5 0 m L 、各回 2 分)、および T B M E ( 6 × 2 5 0 m L 、各回 2 分)。樹脂を真空中にて 3 5 で 2 4 時間乾燥させて、中間体 3 2 a ( 5 7 . 8 g 、導入量 = 1 . 0 8 m m o l / g ) を得た。

【 0 4 1 3 】

- 中間体 3 2 b の調製

( 線状ペプチドの組み立て )

中間体 3 2 a ( 1 8 . 5 g 、 2 0 . 0 m m o l ) を、自動ペプチド合成装置 ( C S B I O 5 3 6 ( 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 × 1 5 0 m L 、各回 2 分 )
- Fmoc 脱保護：ピペリジン / D M F ( 1 : 3 ) ( 1 5 0 m L で 5 分間、次いで 1 5 0 m L で 1 5 分間 )
- 洗浄：D M F ( 6 × 1 5 0 m L 、各回 2 分 )

【 0 4 1 4 】

【表 1 4 】

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

【 0 4 1 5 】

ペプチドを組み立てた後、樹脂を、D M F ( 6 × 1 5 0 m L 、各回 2 分)、イソプロパノール ( 6 × 1 5 0 m L 、各回 2 分)、および T B M E ( 6 × 1 5 0 m L 、各回 2 分) で洗浄した。ペプチド樹脂を高真空中にて 3 5 で終夜乾燥させて、中間体 3 2 b ( 5 7 . 6 g 、 2 0 . 0 m m o l ) を得た。

【 0 4 1 6 】

- 中間体 3 2 c の調製

( 樹脂からの H F I P 切断 )

中間体 3 2 b の一部 ( 2 7 g、9 . 3 7 m m o l ) を D C M ( 3 0 0 m L ) に懸濁させ、1 5 分間攪拌した。樹脂を排出し、次いで H F I P / D C M ( 3 : 7 ) ( 3 × 2 7 0 m L、各回 1 5 分 ) で処理した。切断溶液を濾別し、集めた。樹脂を D C M ( 3 × 3 0 0 m L ) 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 3 5 ° で終夜乾燥させて、中間体 3 2 c - バッチ 1 ( 2 3 . 5 g、9 . 3 7 m m o l ) を得た。

【 0 4 1 7 】

別の分の中間体 3 2 b ( 2 8 . 0 g、9 . 7 2 m m o l ) で、上で言及した手順を繰り返して、中間体 3 2 c - バッチ 2 ( 2 6 . 1 g、9 . 7 2 m m o l ) を得た。

【 0 4 1 8 】

- 中間体 3 2 d の調製

( フェネチルアミンの溶液相カップリング )

中間体 3 2 c - バッチ 2 ( 2 0 . 0 g、7 . 4 4 m m o l、1 . 0 当量 ) および H A T U ( 5 . 2 3 g、1 3 . 8 m m o l、1 . 8 5 当量 ) を D M F ( 4 0 0 m L ) に溶解させた。フェネチルアミン ( 1 . 6 7 g、1 3 . 8 m m o l、1 . 8 5 当量 ) および D I P E A ( 3 . 5 6 g、2 7 . 6 m m o l、3 . 7 1 当量 ) を D M F ( 6 0 m L ) に溶かした溶液を加えた。

【 0 4 1 9 】

反応混合物を室温で 3 0 分間攪拌し、次いで 0 ° に冷却し、次いでブライン ( 4 6 0 m L ) を加えた。懸濁液を 1 0 分間攪拌し、次いで生成物を濾過によって単離した。濾過ケーキを H<sub>2</sub>O ( 3 0 0 m L ) で洗浄し、次いでこれを慎重に取り出し、次いで D C M ( 3 0 0 m L ) に溶解させた。溶液を M g S O<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 : D C M および D C M / i P r O H ( 8 : 2 ) ) にかけて、中間体 3 2 d - バッチ 1 ( 1 4 . 4 g、6 . 6 m m o l ) を得た。

【 0 4 2 0 】

中間体 3 2 c - バッチ 1 ( 2 3 . 4 g、9 . 3 7 m m o l ) 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 3 2 d - バッチ 2 ( 2 8 . 0 g、9 . 3 7 m m o l ) を得た。

【 0 4 2 1 】

- 中間体 3 2 e の調製

( 保護基除去 )

中間体 3 2 d - バッチ 2 ( 2 8 . 0 g、9 . 3 7 m m o l ) を T F A / D C M / E D T / T I S ( 9 0 : 5 : 2 . 5 : 2 . 5 ) ( 2 9 0 m L ) に溶解させ、反応液を室温で 2 時間攪拌した。

【 0 4 2 2 】

切断溶液を濾別し、冷 T B M E ( 3 L ) ( 0 ~ 4 ° ) 上に注いだ。濁った懸濁液を氷水浴中で 3 0 分間攪拌し、次いで p o r e 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 T B M E ( 2 × 1 0 0 m L ) で洗浄し、次いで真空中にて 3 5 ° で終夜乾燥させて、中間体 3 2 e - バッチ 1 ( 8 . 9 g、5 . 9 m m o l ) を得た。

【 0 4 2 3 】

中間体 3 2 d - バッチ 1 ( 1 4 . 4 g、6 . 6 m m o l ) で同じ手順を繰り返して、中間体 3 2 e - バッチ 2 ( 9 . 6 g、6 . 3 m m o l ) を得た。

【 0 4 2 4 】

- 実施例 3 2 の調製

1 ) 環化

中間体 3 2 e ( 5 . 0 g、3 . 3 m m o l ) を水 ( 5 0 0 m L ) に溶解させた。ヨウ素 ( 1 . 1 8 g、4 . 6 6 m m o l、1 . 4 1 当量 ) の酢酸 ( 9 3 m L ) 溶液を一度に加えた。反応混合物を室温で 1 0 分間攪拌した。アスコルビン酸 ( 1 . 0 3 g、5 . 8 3 m m o l、1 . 7 7 当量 ) の水 ( 5 . 8 m L ) 溶液を加え、反応混合物を 1 0 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 x 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 スポットティングによって、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\*-L-S-C\*-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 1x 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(30K MWCO)で洗浄した。フィルターを4K g で40分間スピンにかけ、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(14K g で10分間スピンにかけ)、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20 mL）に溶解させた。溶液を50 mLのFalconチューブに移し、凍結乾燥して、結晶質の粉末（500 mg）を得た。

【0434】

純粋な生成物をUPLC-MSによって分析した（分析方法F、測定値：66439.0、予想値：66437）。

【0435】

- 脱キャッピングされたHSA中の遊離チオール基の数の算定

2 mLチューブに入った、この脱キャッピングされたHSA（2 mg）を400  $\mu$ LのPBS pH 7.4に溶かした溶液に、6-マレイミドヘキサノ酸（13  $\mu$ 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。UPLC-MS（分析方法G）によ

10

【0436】

- DTT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（400 mg、Aldrich、ヒト血清からの凍結乾燥粉末）を5 mLのPBS 1 $\times$ 緩衝液に溶かした溶液に、DTTの溶液（0.232  $\mu$ L、生物学グレード精製水中2 mg/mL）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、20本のAmicon Ultra-0.5遠心式フィルター（10 K MWCO）で洗浄した。フィルターを14 K gで10分間スピ

20

【0437】

純粋な生成物をUPLC-MSによって分析した（分析方法G、測定値：66438.5、予想値：66437）。

【0438】

- 脱キャッピングされたHSA中の遊離チオール基の数の算定

2 mLチューブに入った、この脱キャッピングされたHSA（3 mg）を400  $\mu$ LのPBS pH 7.4に溶かした溶液に、3-マレイミドプロピオン酸（25  $\mu$ 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。UPLC-MS（分析方法G）によ

30

【0439】

- システインによる脱キャッピング

2 mLチューブに入った、アルブミン（120 mg、Aldrich、ヒト血清からの凍結乾燥粉末）を1 mLの50 mM PBS緩衝液 pH 8.0に溶かした溶液に、システイン（10.94 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-0.5遠心式フィルター（10 K MWCO）で洗浄した。フィルターを14 K gで10分間スピ

40

【0440】

純粋な生成物をUPLC-MSによって分析した（分析方法G、測定値：66439、予想値：66437）。

【0441】

- 脱キャッピングされたHSA中の遊離チオール基の数の算定

2 mLチューブに入った、この脱キャッピングされたHSA（3 mg）を500  $\mu$ LのPBS pH 7.4に溶かした溶液に、3-マレイミドプロピオン酸（15  $\mu$ 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。UPLC-MS（分析方法G）によ

50



って、単一付加物の生成だけが示された。測定値：66608.0、予想値：66606。

【0442】

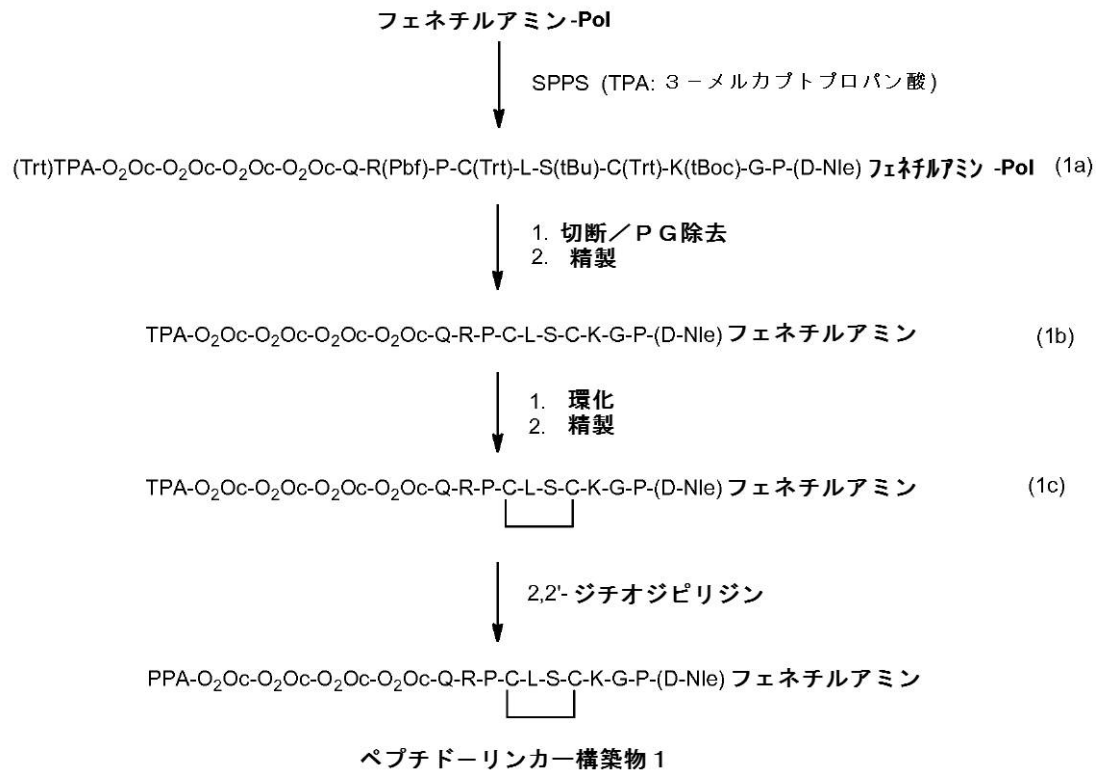
ステップ2：

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-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 [ 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】

10



20

30

【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-AMEB樹脂 (Aldrich, 0.25 mmol) 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 ℃	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 - リンカー構築物 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 °C 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 - リンカー構築物 1 を得る。

## 【0449】

### 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

脱キャッピングされたHSA(100mg)をPBS緩衝液(6mL)に溶かした溶液を、PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C\*-L-S-C\*-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13K gで10分間スピンのかけ、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(13K gで10分間スピンのかけ)、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]

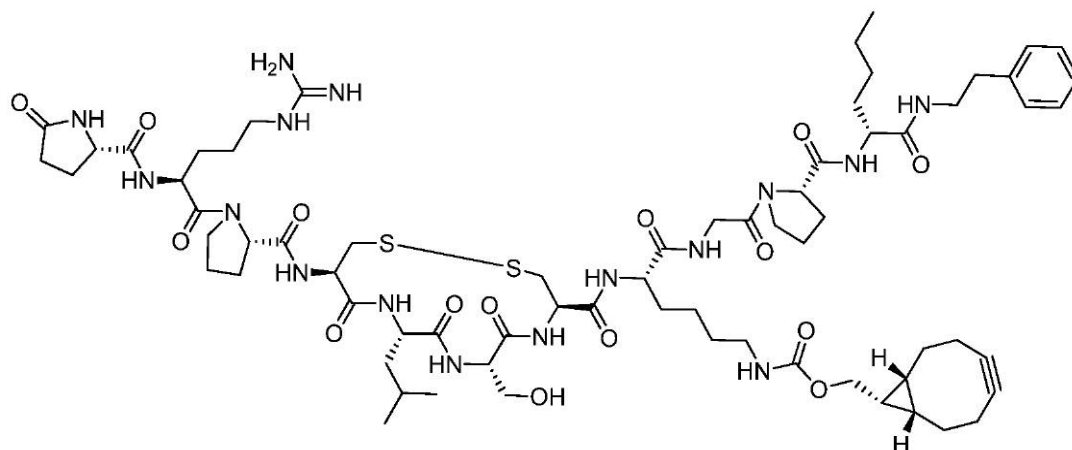
【0450】

BCN-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-BCN構築物の調製：pE-R-P-C\*-L-S-CP-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



30

pE-R-P-C\*-L-S-C\*-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)トリアセート[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(83μL)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。

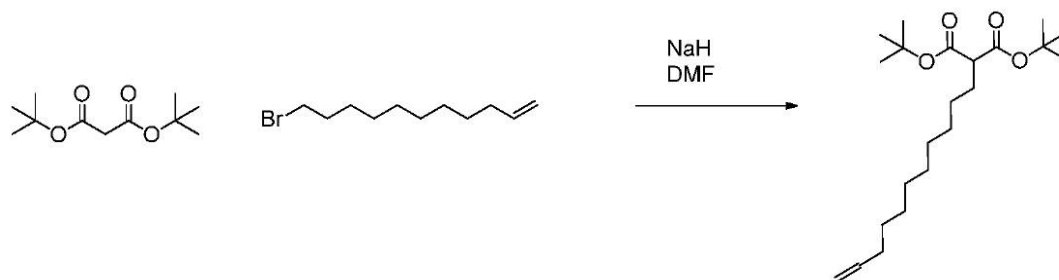
40

【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】

## 【化 4 2】



$N_2$  中にて、マロン酸ジ - *tert* - ブチル (800 mg、3.70 mmol) を DMF (9 mL) に 0 で溶解させ、NaH (148 mg、3.70 mmol) を加える。反応液を 0 で 30 分攪拌し、11 - ブロモ - 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 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 EtOAc (75 mL) に溶かし、 $H_2O$  (25 mL) で洗浄する。水性層を EtOAc (75 mL) で抽出し、合わせた有機層を  $Na_2SO_4$  で乾燥させ、濾過し、濃縮する。混合物をフラッシュカラム (12 g シリカカートリッジ、0 ~ 20 % の EtOAc / ヘプタン) で精製し、画分を濃縮して、所望の生成物を得る。

10

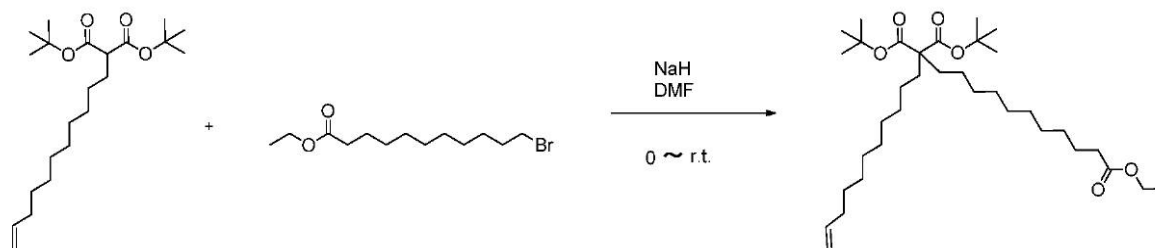
## 【0 4 5 4】

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

20

## 【0 4 5 5】

## 【化 4 3】



30

ステップ 2 からの化合物 (0.442 mmol) を 0 で DMF (2 mL) に溶解させ、NaH (21.23 mg、0.531 mmol) を加える。反応液を 0 で 15 分間攪拌し、エチル 11 - ブロムウンデカノエート (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 EtOAc (40 mL) で希釈し、 $H_2O$  (20 mL) で 1 回洗浄する。水性層を EtOAc (40 mL) で 1 回抽出し、有機層を合わせ、 $Na_2SO_4$  で乾燥させ、濾過し、濃縮する。サンプルを 1 mL の DCM に溶解させ、フラッシュカラム (12 g シリカカラム、0 ~ 20 % の EtOAc / 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。

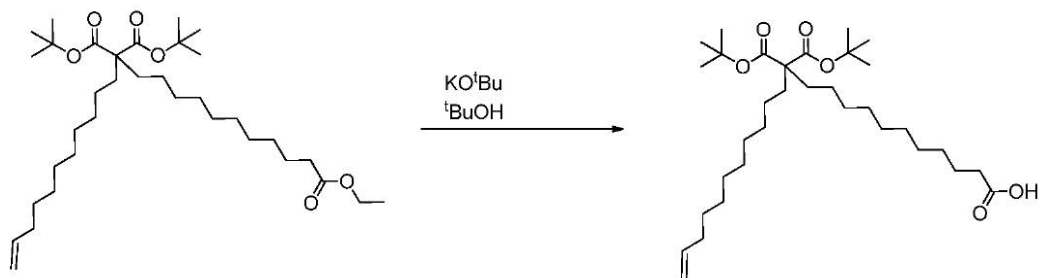
40

## 【0 4 5 6】

ステップ 4 : 12, 12 - ビス ( *tert* - ブトキシカルボニル ) トリコサ - 22 - エン酸

## 【0 4 5 7】

## 【化44】



$N_2$  中にて、ステップ3からの化合物 ( $0.037\text{ mmol}$ ) の  $t\text{BuOH}$  ( $1\text{ mL}$ ) 溶液に、30 で  $\text{KO}t\text{Bu}$  ( $114\text{ mg}$ 、 $1.012\text{ mmol}$ ) の  $t\text{BuOH}$  ( $2\text{ mL}$ ) 溶液を加える。混合物を室温で攪拌し、TLC ( $1:1$  の  $\text{EtOAc}$  / ヘキサン、 $\text{KMnO}_4$ 、還流) によってモニターする。反応が完了した後、 $1\text{ M HCl}$  ( $20\text{ mL}$ ) で反応混合物を失活させ、 $\text{EtOAc}$  ( $25\text{ mL}$ ) で2回抽出する。有機層を合わせ、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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。

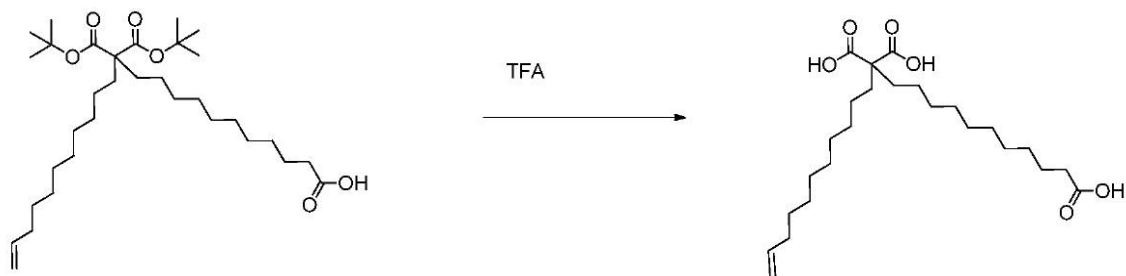
10

## 【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 ( $0.022\text{ mmol}$ ) に  $\text{TFA}$  ( $2\text{ mL}$ ) を加え、反応液を室温で1時間攪拌する。混合物を  $\text{DCM}$  ( $10\text{ mL}$ ) で希釈し、濃縮する。材料を  $\text{EtOAc}$  ( $10\text{ mL}$ ) に溶かし、 $\text{H}_2\text{O}$  ( $20\text{ mL}$ ) で洗浄する。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、濾過し、濃縮する。粗製材料を  $1\text{ mL}$  の  $\text{MeOH}$  に溶解させ、MS起動式HPLC ( $\text{MS-triggered HPLC}$ ) ( $\text{Sunfire } 30 \times 50\text{ mm } 5\text{ }\mu\text{m}$  カラム  $0.1\%$   $\text{TFA}$  含有  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$   $75\text{ mL}/\text{分}$ 、 $1.5\text{ mL}$  注入、 $3.5$  分かけて  $45 \sim 70\%$  の  $\text{ACN}$ ) で精製する。

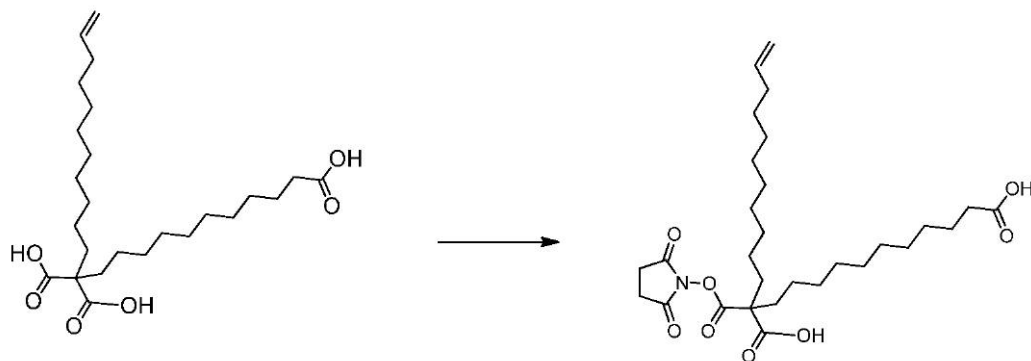
30

## 【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 ( 9 9 m g 、 0 . 8 6 2 m m o l ) およびドコサ - 2 1 - エン - 1 , 1 1 , 1 1 - トリカルボン酸 ( 中間体 4 5 : 4 0 0 m g 、 0 . 9 0 8 m m o l ) を D C M ( 7 m L ) および T H F ( 0 . 7 m L ) に溶かした溶液に、 D C M ( 2 m L ) 中 D C C ( 1 8 7 m g 、 0 . 9 0 8 m m o l ) 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 H P L C ( S u n f i r e C 1 8 3 0 ~ 5 0 m m 、 5 5 ~ 8 0 % の A C N / 水 + 0 . 1 % T F A ) によって精製して、表題化合物 ( 1 5 5 m g 、 0 . 2 8 8 m m o l 、 3 2 % ) を得た。L C M S 方法 E による。R t = 1 . 5 1 分、M + H 5 3 8 . 3 ;

【数 1】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)  $\delta$  ppm 1.16 -

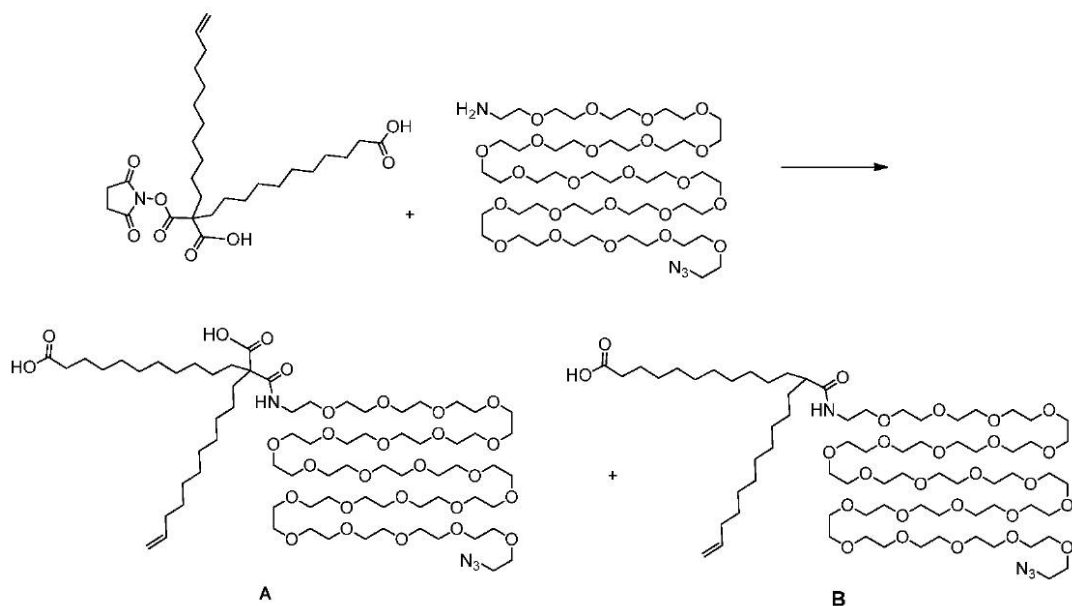
1.46 (m, 28 H) 1.60 - 1.87 (m, 3 H) 1.91 - 2.17 (m, 5 H) 2.38 (t,  $J=7.03$  Hz, 2 H) 2.86 (br. s., 4 H) 3.68 (dd,  $J=11.25, 7.34$  Hz, 1 H) 3.78 (dd,  $J=11.31, 5.20$  Hz, 1 H) 3.99 - 4.10 (m, 1 H).

【0462】

ステップ 7 : 脂肪酸 - P E G リンカー

【0463】

【化 4 7】



アジド - d P E G 2 3 - アミン ( Q u a n t a B i o d e s i g n : 1 6 4 m g 、 0 . 1 4 9 m m o l ) およびステップ 6 から化合物 ( 8 0 m g 、 0 . 1 4 9 m m o l ) を T H F ( 2 . 5 m L ) に溶解させた。D I P E A ( 3 9  $\mu$  L 、 0 . 2 3 3 m m o l ) を加え、反応液を終夜攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣を H P L C ( S u n f i r e C 1 8 3 0  $\times$  5 0 m m 、 4 5 ~ 7 0 % の A C N / 水 + 0 . 1 % T F A ) によって精製して、化合物 A ( 9 7 m g 、 0 . 0 6 1 m m o l 、 4 1 % ) および B ( 3 2 m g 、 0 . 0 2 1 m m o l 、 1 4 % ) を得た。L C M S Z Q 1 方法 E R t = 1 . 3 5 分、[ M + 2 H ] <sup>+</sup> 2 7 6 1 . 9 ;

## 【数 2】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, ACETONITRILE- $d_3$ )  $\delta$  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,  $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$  739.9;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, ACETONITRILE- $d_3$ ) 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).

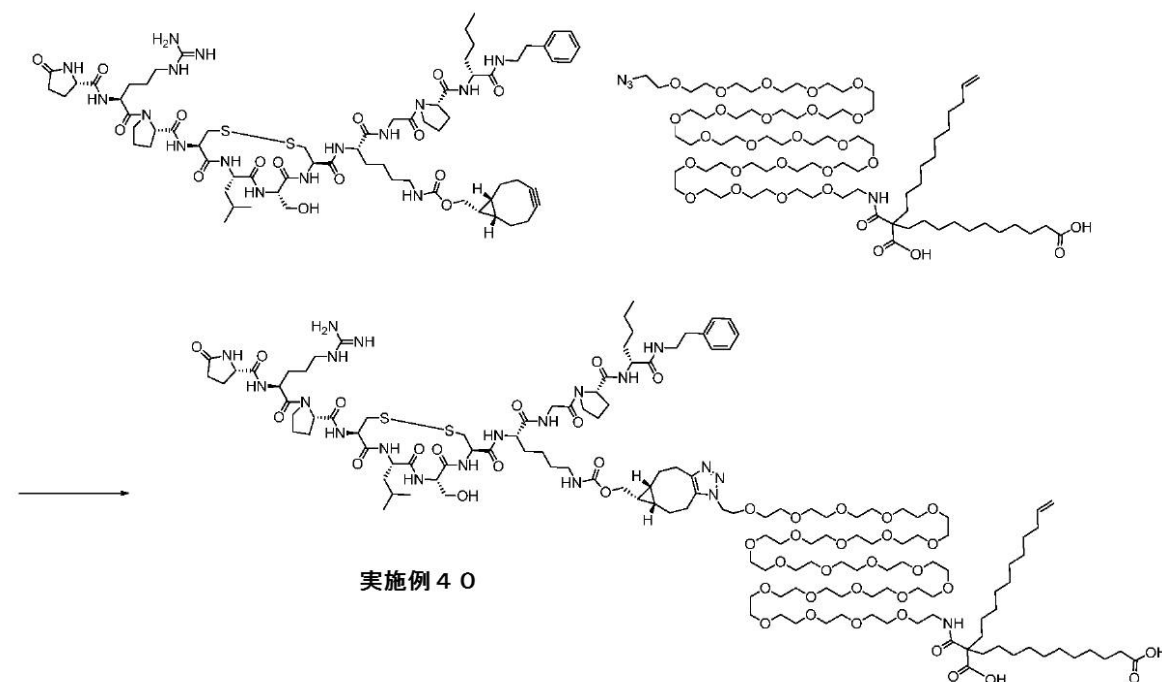
10

## 【0464】

ステップ 8 : 実施例 40 の調製 :

## 【0465】

## 【化 48】



20

30

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 l 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 40 の生成物 50 mg、0.034 mmol ) とステップ 7 から化合物 A ( 268  $\mu$ L の水中に 52 mg ) の混合物を、室温で約 3 時間撹拌した。次いで、反応混合物を分取 HPLC ( Sunfire 30  $\times$  50 mm 5  $\mu$ m 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 Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1  $\times$  50 mm、50、溶離液 A : 水 + 0.1% 酢酸、溶離液 B : アセトニトリル + 0.1% 酢酸、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】

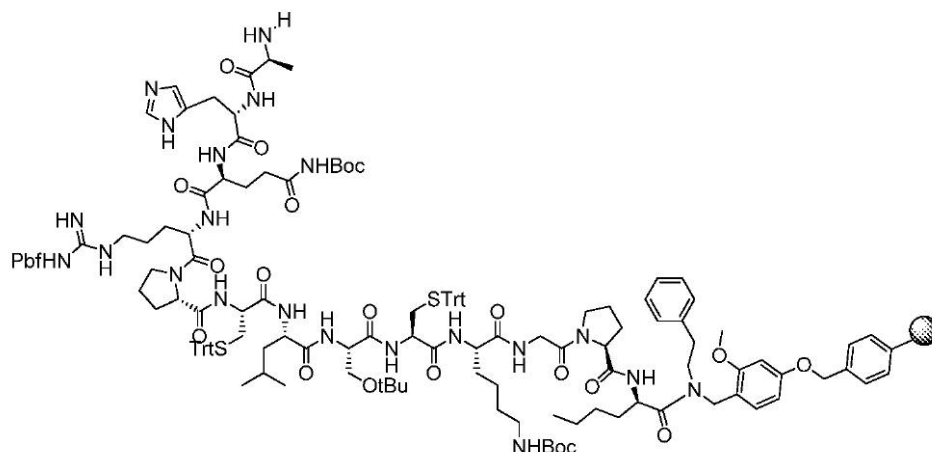
50

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 4 1 a の合成

【 0 4 6 7 】

【 化 4 9 】



10

フェネチルアミン - A M E B A 樹脂 ( S i g m a A l d r i c h 、 0 . 1 m m o l 、  
1 . 0 m m o l / g ) を、A r g 残基に 2 倍の標準 A r g を使い、D N l e 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 ( C E M L i b e r t y B l u e M  
i c r o w a v e ) での固相ペプチド合成にかけた。アミノ酸は、0 . 2 M D M F 溶液  
として調製した。標準カップリングサイクルは、次のとおり定めた。

20

- アミノ酸カップリング：A A ( 5 当量 )、H A T U ( 5 当量 )、D I E A ( 2 5 当  
量 )
- 洗浄：D M F ( 3 × 7 m L )
- F m o c 脱保護：2 0 % ピペリジン / 0 . 1 M H O B t ( 2 × 7 m L )
- 洗浄：D M F ( 4 × 7 m L 、次いで 1 × 5 m L )

【 0 4 6 8 】

【 表 1 6 】

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℃)	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-His-OH	1×5 分 (70℃)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1×5 分 (70℃)	DIEA/HATU

40

【 0 4 6 9 】

ペプチドを組み立てた後、樹脂を D M F ( 2 × 5 0 m L ) および D C M ( 2 × 5 0 m L  
) で洗浄し、次いで真空中で乾燥させて、中間体 4 1 a ( 2 7 6 m g 、 0 . 1 m m o l )

50



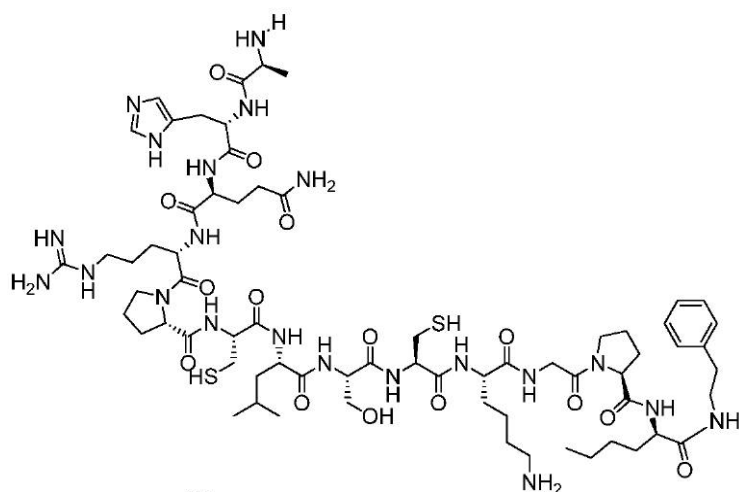
を得た。

【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】



41b

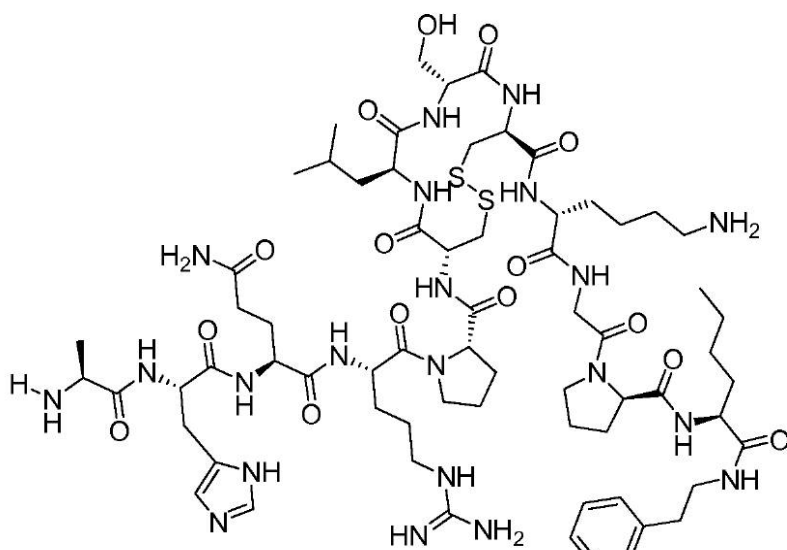
中間体41a（276mg、0.1mmol）を4mLのTFA溶液（37mLのTFA、1mLのH<sub>2</sub>O、1mLのTIPS、3.06gのDTT）と合わせ、室温で3時間振盪した。溶液を樹脂から取り去り、40mLの冷Et<sub>2</sub>O中に沈殿させた。溶液をボルトックスし、氷上で10分間静置した後、4000rpmで5分間遠心分離した。溶媒を除去し、白色の固体を冷Et<sub>2</sub>O（各回40mL）でもう2回洗浄し、遠心分離（各回5分）し、デカントした。固体を真空中で終夜乾燥させて、中間体41b - バッチ1（17.4mg、0.012mmol）を得た。LCMS（SQ2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



41c

中間体 41b - バッチ 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 ( 50 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  $\mu$ mol、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、1.7  $\mu$ m、2.1 mm  $\times$  50 mm、50 ) : Rt = 0.90 分、MS [ M + H ] 1511.8。

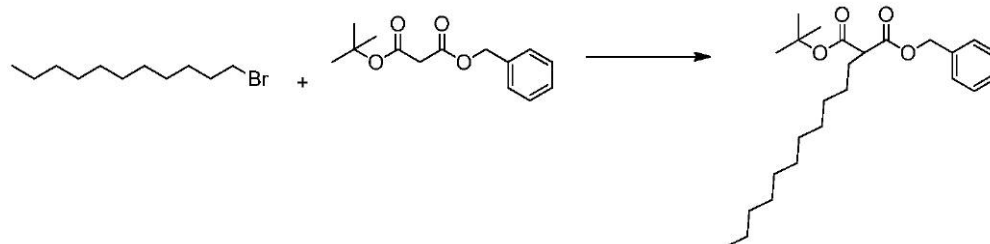
10

【 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

$N_2$  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 - ブ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 ;

30

【 数 3 】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d)  $\delta$  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).

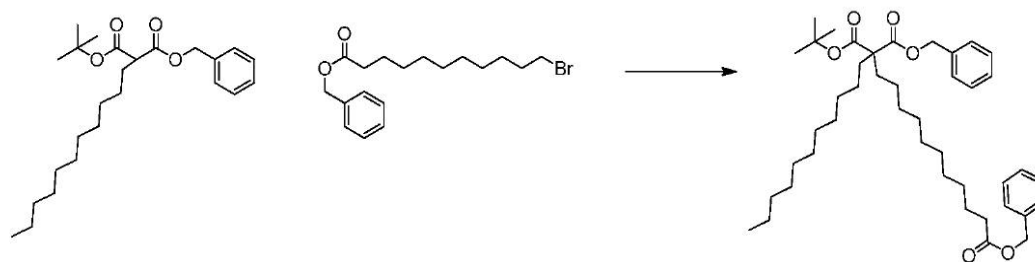
【 0476 】

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

40

【 0477 】

## 【化 5 3】



表題化合物は、ステップ 4 からの化合物 ( 1 7 7 m g 、 0 . 2 8 4 m m o l ) を出発材料として使用し、実施例 4 0 のステップ 3 と同様の要領で合成して、無色の油状物 ( 1 5 3 m g 、 0 . 2 1 3 m m o l 、 7 5 % ) を得た：

## 【数 4】

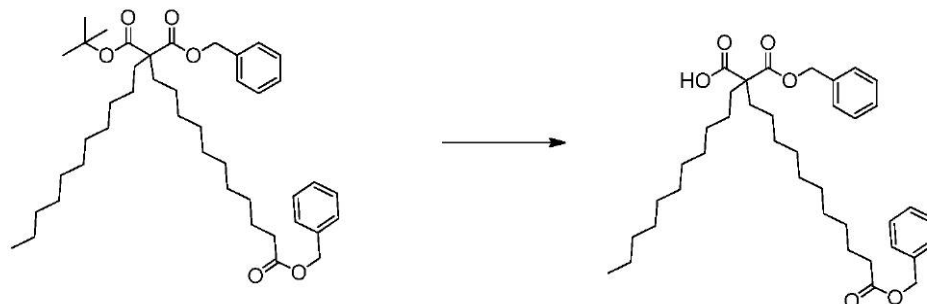
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)  $\delta$  ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin,  $J=7.40$  Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t,  $J=7.58$  Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

## 【 0 4 7 8 】

ステップ 6 : 1 3 - ( ベンジルオキシ ) - 2 - ( ( ベンジルオキシ ) カルボニル ) - 1 3 - オキソ - 2 - ウンデシルトリデカン酸

## 【 0 4 7 9 】

## 【化 5 4】



ステップ 5 からの化合物 ( 2 0 0 m g 、 0 . 2 9 5 m m o l ) の D C M ( 3 m L ) 溶液に、T F A ( 0 . 6 m L ) 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 1 2 g 、 0 ~ 1 5 % の E t O A c / H E P ) によって精製して、表題化合物 ( 1 7 7 m g 、 0 . 2 8 4 m m o l 、 9 6 % ) を得た：

## 【数 5】

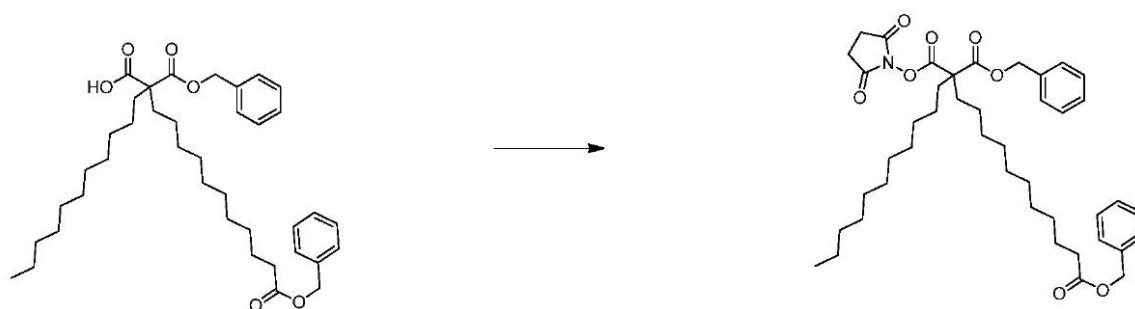
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)  $\delta$  ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin,  $J=7.40$  Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t,  $J=7.52$  Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31 - 7.44 (m, 10 H).

## 【 0 4 8 0 】

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

## 【 0 4 8 1 】

## 【化 5 5】



10

表題化合物は、ステップ 6 からの化合物 ( 1 7 7 m g 、 0 . 2 8 4 m m o l ) を出発材料として使用し、実施例 4 0 のステップ 6 と同様の要領で合成して、無色の油状物 ( 1 5 3 m g 、 0 . 2 1 3 m m o l 、 7 5 % ) を得た：

## 【数 6】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)  $\delta$  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).

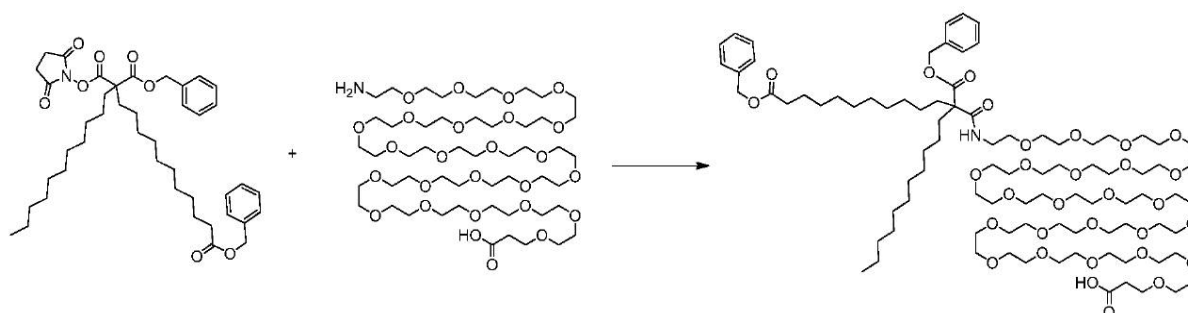
20

## 【 0 4 8 2】

ステップ 8：

## 【 0 4 8 3】

## 【化 5 6】



30

アミノ - PEG 24 - 酸を装入したバイアルに、中間体 3 4 ( 1 4 5 m g 、 0 . 2 0 1 m m o l ) を T H F ( 1 . 5 m L ) および D C M ( 1 . 5 m L ) に溶かした溶液を加えた。D I P E A ( 8 8  $\mu$  L 、 0 . 5 0 4 m m o l ) を加え、反応液をシェーカープレート上で 1 5 時間撹拌した。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  $\times$  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 ( 1 5 1 m g 、 0 . 0 8 6 m m o l 、 4 3 % ) を得た。L C M S 方法 E R t = 1 . 3 0 分、[ M + 2 H ] + 2 8 7 6 . 4 ；

40

## 【数 7】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)  $\delta$  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).

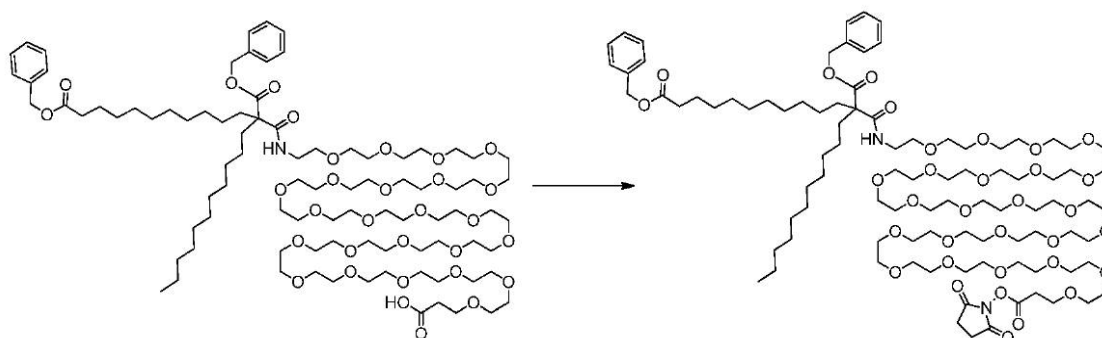
## 【 0 4 8 4】

ステップ 9：

50

【 0 4 8 5 】

【 化 5 7 】



10

中間体 35 (150 mg、0.086 mmol) および N - ヒドロキシスクシンイミドを DCM (1.5 mL) に溶かした溶液に、DCM (0.265 mL) 中 DCC (22 mg、0.103 mmol) を加えた。反応液を 1.5 時間撹拌した。追加の THF (0.5 mL) 中 N - ヒドロキシスクシンイミド (10 mg) および DCM (0.265 mL) 中 DCC (22 mg) を加え、反応液を終夜撹拌した。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 (159 mg、定量的) を白色の固体として得た。LCMS 方法 G  $R_t = 1.55$  分、 $[M + H_3O + H]^+ 933.9$ 。

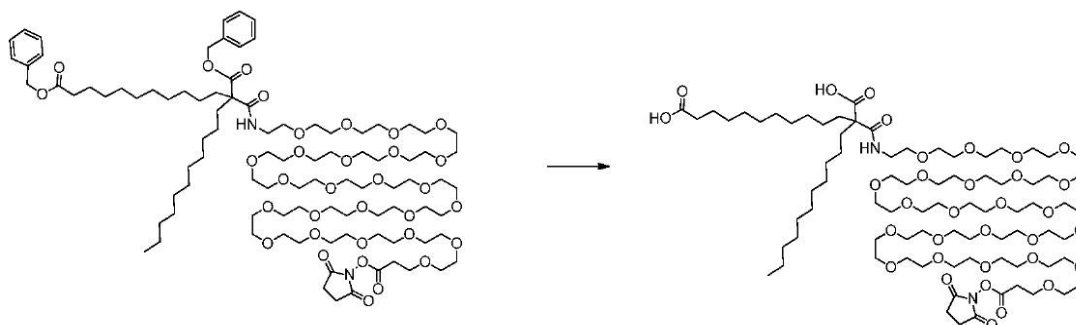
20

【 0 4 8 6 】

ステップ 10 :

【 0 4 8 7 】

【 化 5 8 】



30

ステップ 9 からの化合物 (159 mg、0.086 mmol) の THF (5 mL) 溶液に、10 % Pd 炭素 (4.6 mg、4.3 mmol) の THF (1 mL) 懸濁液を加えた。反応液を水素中に置き、40 分間撹拌した。さらに Pd 炭素 (7 mg、6.5  $\mu$ mol) を加え、水素中でもう 1 時間撹拌した。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 x 50 mm、45 ~ 70 % の ACN / 水 + 0.1 % TFA) によって精製して、表題化合物 (83 mg、0.047 mmol、54 %) を得た。LCMS 方法 G  $R_t = 1.03$  分、 $[M + 2H]^+ 835.2$  ;

40

【 数 8 】

 $^1\text{H}$  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)

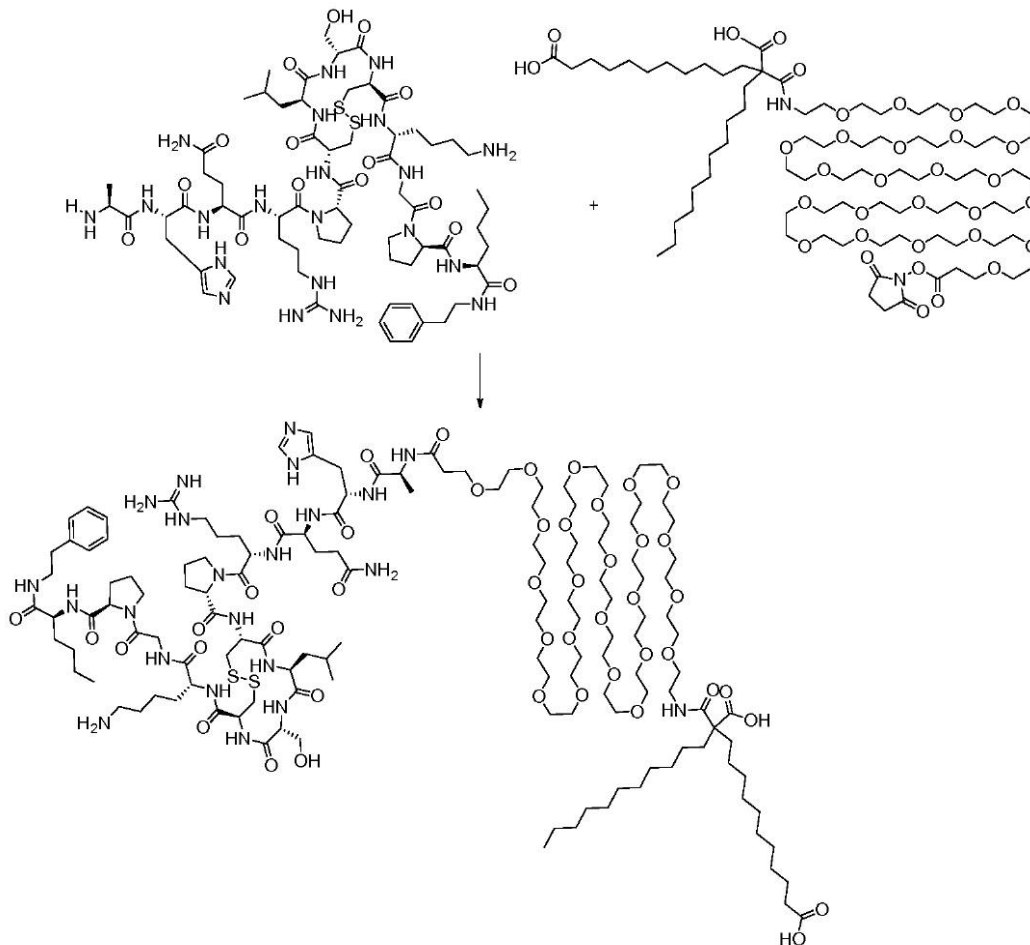
50

## 【 0 4 8 8 】

ステップ 4 : アペリン構築物 A - H - Q - R - P - C - L - S - C - K - G - P - D N 1  
e - フェネチルアミンと脂肪酸 - P E G 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 4 1 の調製

## 【 0 4 8 9 】

## 【 化 5 9 】



10 mg / mL の NHS - 脂肪酸 ( 実施例 4 0 のステップ 7 からの生成物 A ) の溶液を、 $H_2O$  中に調製した。中間体 4 1 c ( 1 . 5 mg 、 0 . 9 9 3  $\mu\text{mol}$  ) を 30 mM の pH 4 NaOAc 緩衝液 ( 6 7 2  $\mu\text{L}$  ) に溶解させ、NHS - 脂肪酸 ( 0 . 8 5 0 mL 、 5 . 1 0  $\mu\text{mol}$  ) を加えた。反応液を室温で 1 6 時間混合し、その時点で、追加の 1 . 5 mg の NHS - 脂肪酸 (  $H_2O$  中 10 mg / mL ) を加え、反応液を室温で 1 6 時間混合した。8 mg の NHS - 脂肪酸 (  $H_2O$  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 (  $H_2O$  中 10 mg / mL ) を加えた。混合物を室温で 1 6 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 . 5 1 0  $\mu\text{mol}$  、 5 1 % ) として得た。LCMS ( SQ 2 生成物分析 - 酸性 - ペプチド - 極性、Acquity UPLC BEH C18 カラム、130 、 1 . 7  $\mu\text{m}$  、 2 . 1 mm  $\times$  50 mm 、 50 ) :  $R_t$  = 3 . 8 7 分、MS [  $M + H + 2 / 2$  ] 1533 . 1 、 [  $M + H + 3 / 3$  ] 1022 . 9 。

## 【 実施例 4 2 】

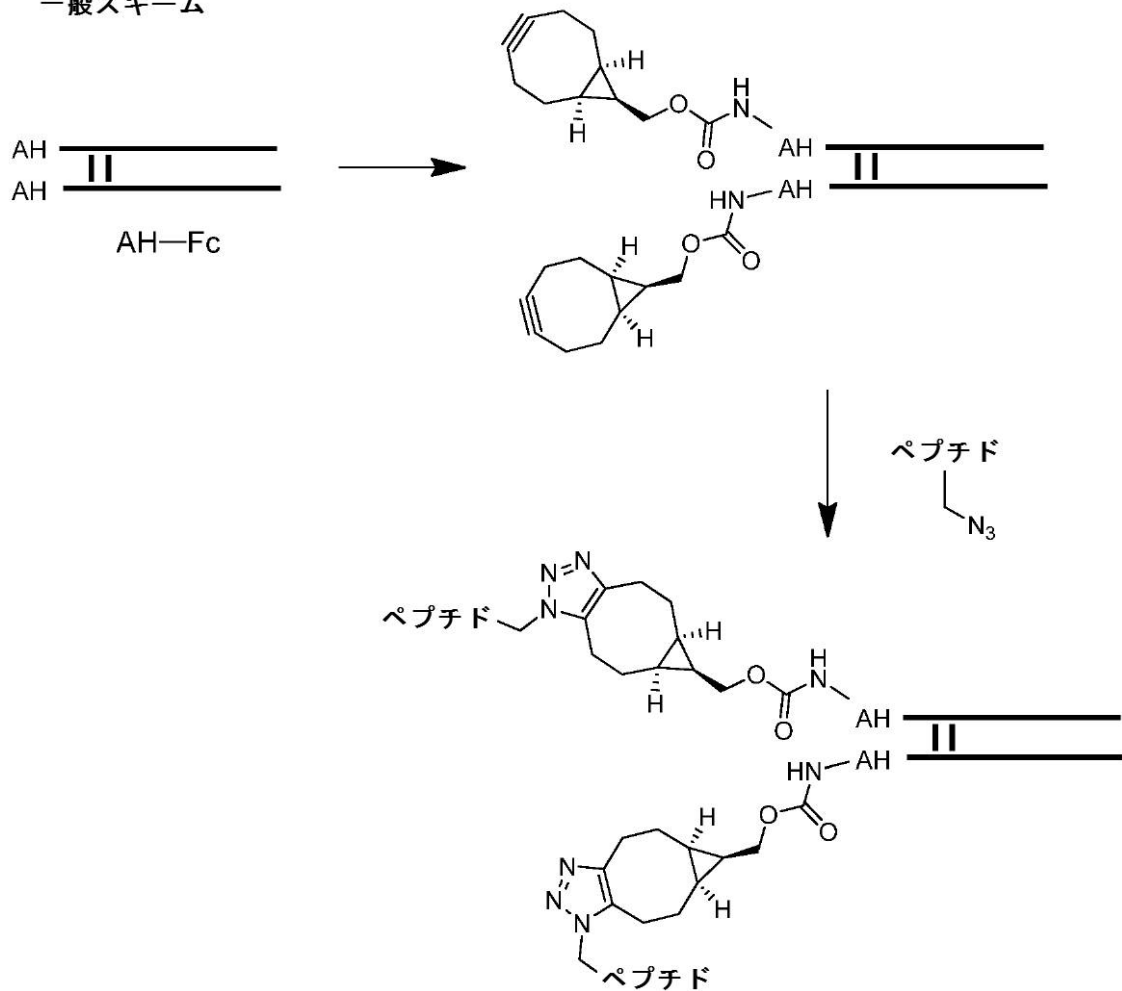
## 【 0 4 9 0 】

AH - Fc のアペリン環状ペプチドとのコンジュゲーション

## 【 0 4 9 1 】

## 【化 6 0】

一般スキーム



## 【 0 4 9 2】

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 I g 鎖シグナルペプチドに続いてヒト F c および短いビス - アミノ酸配列 ( A H ) を含んでいる DNA 断片を、 5 ' - N h e I および 3 ' - E c o R I 制限部位を用いた遺伝子合成 ( G e n e A r t ) によってコドン最適化した。得られる配列を、 N h e I および E c o R I の両方を用いて制限消化し、 C M V プロモーターの下流で、ベクター p P L 1 1 4 6 の N h e I および E c o R I 部位に連結した。連結を大腸菌 ( E c o l i ) D H 5 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。

。

## 【 0 4 9 3】

30

40

## 【化 6 1】

AH-Fc

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCT  
 GGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGG  
 CAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATC  
 TCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCTGTTGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAG  
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGA  
 GAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCTGTTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGG  
 ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCA  
 ATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCCAGGTGTACACTCT  
 GCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTGAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAG  
 GCTTCTACCCCTCCGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAAT  
 TACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCT  
 GACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCAC  
 GAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGA  
 ATTC

10

20

A H - F c 構築物の配列：

【 0 4 9 4 】

## 【化 6 2】

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

30

【 0 4 9 5 】

A H - F c 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、A H - F c 発現プラスミド DNA を H E K 2 9 3 T 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 F r e e S t y l e 2 9 3 M e d i u m ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) において 37 °C で 4 日間成長させた。

【 0 4 9 6 】

A H - F c 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 H i T r a p M a b S e l e c t S u R e カラム ( G E L i f e S c i e n c e s ) に流した。0.1% の T r i t o n X - 1 1 4 を含有する 20 カラム体積の P B S でカラムを洗浄し、次いで、A H - F c タンパク質を 0.1 M のグリシン ( p H 2.7 ) で溶離させ、1 M の T r i s - H C l ( p H 9 ) で中和し、P B S 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、C h a r l e s R i v e r E N D O S A F E P T S 試験によって測定したとき、1 E U / m g を下回った。

40

【 0 4 9 7 】

A H - F c タンパク質の品質管理：

A H - F c タンパク質の L C / M S : 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 k D a 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 F c 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-アペリントタンパク質は、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。

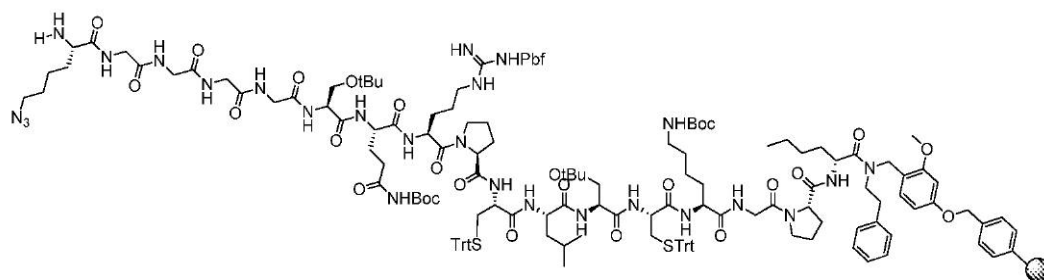
10

## 【0501】

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

## 【0502】

## 【化63】



20

フェネチルアミン-AMBEA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 17】

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

10

20

## 【0504】

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42a (770 mg、0.250 mmol) を得た。

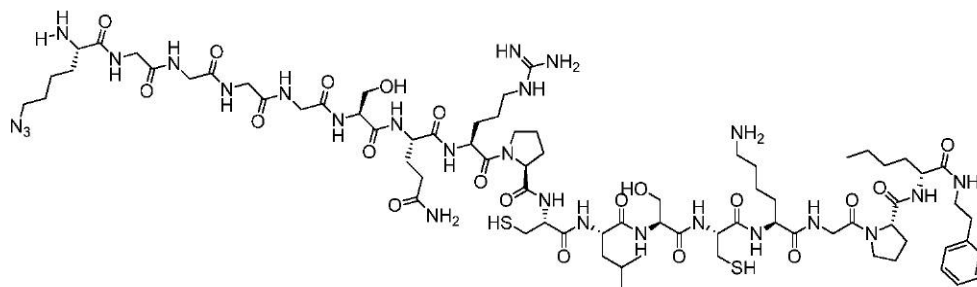
## 【0505】

ステップ3：中間体42bの調製（樹脂からのペプチドの切断）

## 【0506】

## 【化64】

30



中間体42a (770 mg、0.250 mmol) を半分に分け、各サンプルを6 mL のTFA溶液 (37 mLのTFA、1 mLのH<sub>2</sub>O、1 mLのTIPS、2.569 g (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、40 mLの冷Et<sub>2</sub>O中に沈殿させた。溶液をバルテックスし、氷上で10分間静置した後、4000 rpm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40 mL) 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 overnight 乾燥させ、M起動式HPLCで精製して、中間体43bを白色の粉末 (80 mg、0.045 mmol、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、1.7 μm、2.1 mm×50 mm、50) : Rt = 2.32分、MS [M+H+2/2] 888.0。

40

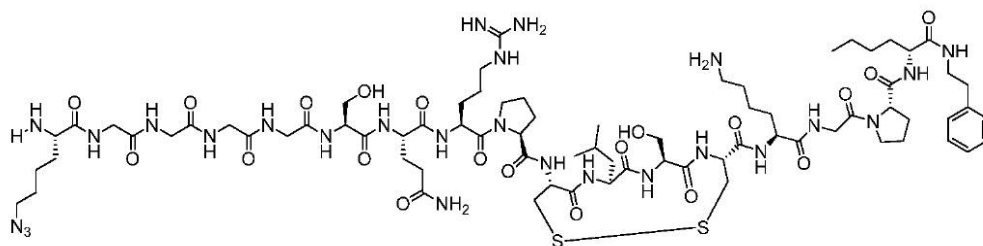
## 【0507】

ステップ4：中間体42cの調製（システイン残基の環化）

50

【 0 5 0 8 】

【 化 6 5 】



10

中間体 4 2 b ( 8 0 m g 、 0 . 0 4 5 m m o l ) を水 ( 1 . 2 5 m L ) に溶解させ、ヨウ素 ( 5 0 m M H O A c 溶液、 1 . 8 0 4 m L 、 0 . 0 9 0 m m o l ) 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 L C M S 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 M S 起動式 H P L C で精製した。プールされた画分を凍結乾燥すると、 2 0 . 1 m g の所望の生成物が白色の粉末 ( 0 . 0 4 5 m m o l 、 2 5 % ) として得られた。L C M S ( S Q 2 生成物分析 - 酸性 - ペプチド - 極性、 A c q u i t y U P L C B E H C 1 8 カラム、 1 3 0 、 1 . 7 μ m 、 2 . 1 m m × 5 0 m m 、 5 0 ) : R t = 2 . 1 7 分、 M S [ M + H + 2 / 2 ] 8 8 6 . 8 。

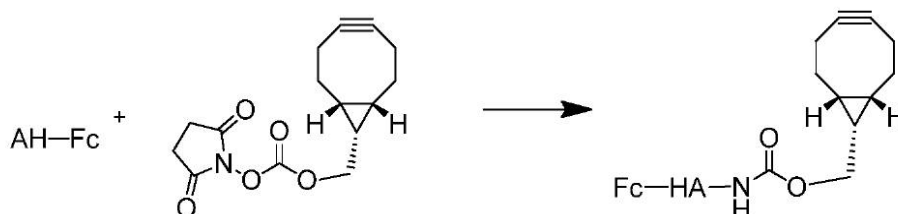
【 0 5 0 9 】

20

ステップ 5 : F c - A H B C N の調製 ( A H - F c N 末端上でのクリックハンドルの取り付け )

【 0 5 1 0 】

【 化 6 6 】



30

F c - A H ( ステップ 1 より : 1 m L 、 3 m g / m L 、 0 . 1 1 7 μ m o l ) を 3 0 m M の N a O A c p H 4 . 0 ( 4 . 3 m L ) に溶解させ、 1 0 m g / m L の ( 1 R , 8 S , 9 s ) - 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 ( B C N ) の D M S O ( 0 . 7 0 m L ) 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。B C N ( 0 . 2 5 m L ) を加え、反応液を室温で 3 日間混合した。B C N ( 0 . 7 0 m L ) を加え、反応液を室温で 1 6 時間混合した。溶液は、 1 0 k D a M W C O A m i c o n 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、 3 0 m M の N a O A c p H 4 . 0 に換えて、体積を 9 0 0 μ L とした。溶液を遠心分離し、上清を除去した。濃度は、 A 2 8 0 によって 1 . 7 3 m g / m L ( 1 . 5 6 m g 、 2 6 % ) と測定された。L C M S ( Q T 2 、タンパク質 2 0 ~ 7 0 k D a 3 分、 P r o s w i f t M o n o l i t h 4 . 6 × 5 0 m m 、 5 0 、 溶離液 A : 水 + 0 . 1 % ギ酸、溶離液 B : C A N + 0 . 1 % ギ酸、 2 分かけて 2 ~ 9 8 % ) R t = 1 . 5 8 分。

40

【 0 5 1 1 】

【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

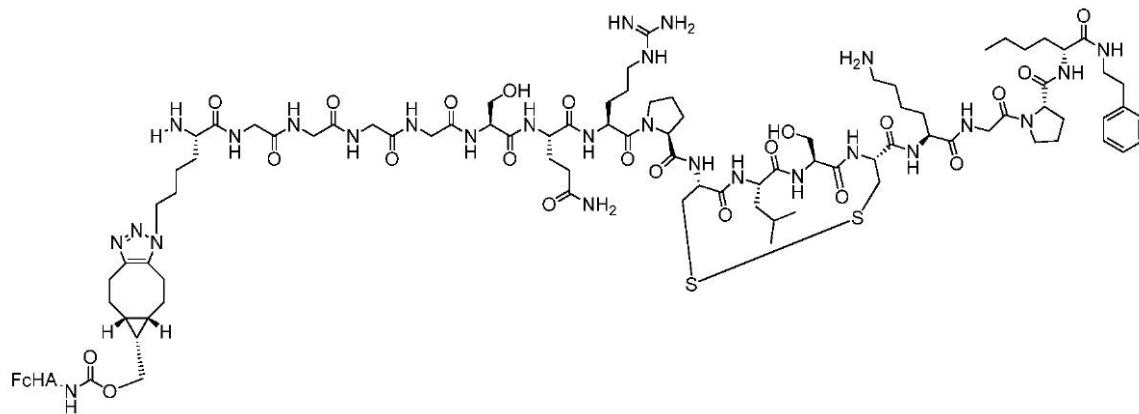
【0512】

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

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 pH4.0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 pH4.0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(QT2、タンパク質35~70 kDa)3分、Proswift 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

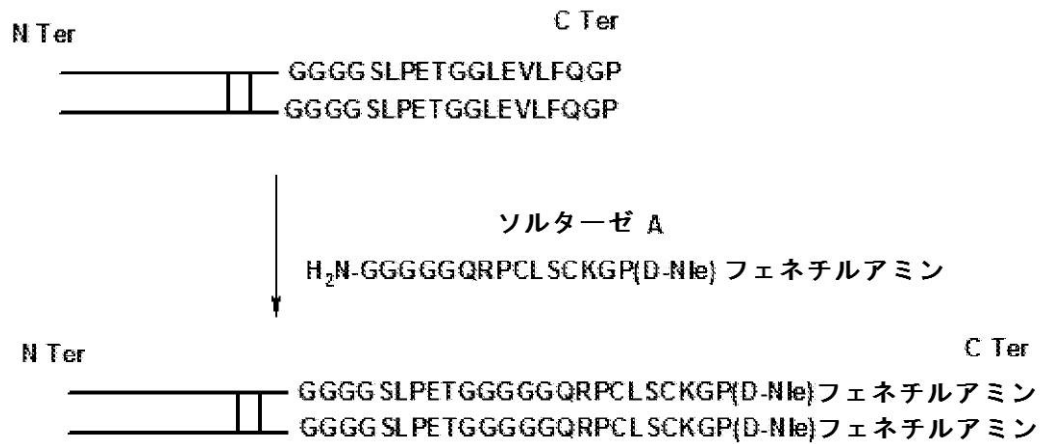
【実施例43】

【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】



10

## 【 0 5 1 6 】

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 h e I および 3 ' - E c o R I 制限部位を用いた遺伝子合成 ( G e n e A r t ) によってコドン最適化した。得られる配列を、 N h e I および E c o R I の両方を用いて制限消化し、 C M V プロモーターの下流で、ベクター p P L 1 1 4 6 の N h e I および E c o R I 部位に連結した。連結を大腸菌 ( E c o l i ) D H 5 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。

20

## 【 0 5 1 7 】

## 【化 6 9】

## Fc-ソルターゼ

GCTAGCCACCATGGAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA  
 GGCAGCACCGGCGGATAAGACCCACACCTGTCTCCCTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTG  
 GCGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG  
 GACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAA  
 GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG  
 GAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT  
 GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCAT  
 CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTACACACT  
 GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAG  
 GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA  
 ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAA  
 GCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT  
 GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAA  
 GGCGGCGGAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCC  
 TAAGAATTC

10

20

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT  
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY  
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT  
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS  
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG  
 251 *GSLPETGGLEVLFGGP*

30

## 【0 5 1 8】

## 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HEK 293 T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Free Style 293 Medium (Life Technologies)において37℃で4日間成長させた。

## 【0 5 1 9】

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 Mab Select 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、Fc-ソルターゼタンパク質を、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。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

## 【0 5 2 0】

## 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

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除：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】

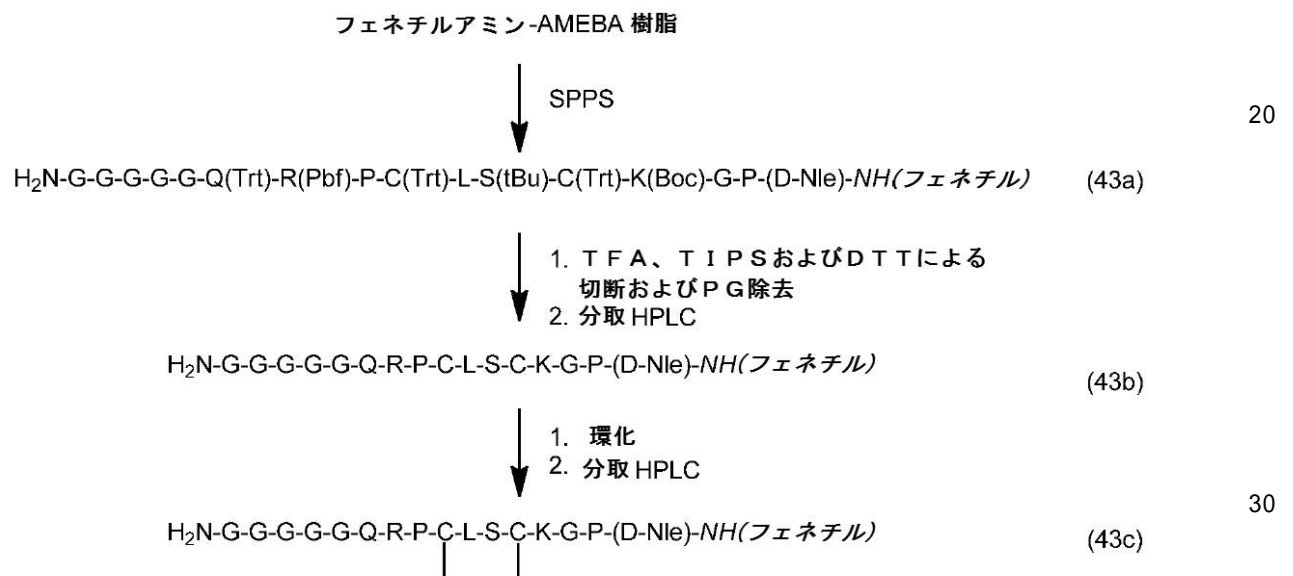
還元SDS/PAGE：タンパク質は、主に、予想されたサイズのモノマーとして移動した。

【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-GGGGGQRPC\*LSCKGP(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、0.25g、0.25mmol、1.0mmol/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(CEMLIBERTY)での固相ペプチド合成にかけた。アミノ酸は、0.2M DMF溶液として調製した。カップリングサイクルは、次のとおり定めた。

- アミノ酸カップリング：AA(4.0当量)、HATU(4.0当量)、DIEA(25当量)
- 洗浄：DMF(3×10mL、各回1分)
- Fmoc脱保護：ピペリジン/DMF(1:4)(10mL、75℃で1分間、次いで10mL、75℃で3分間)
- 洗浄：DMF(4×10mL、各回1分)

【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

10

20

## 【0528】

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

## 【0529】

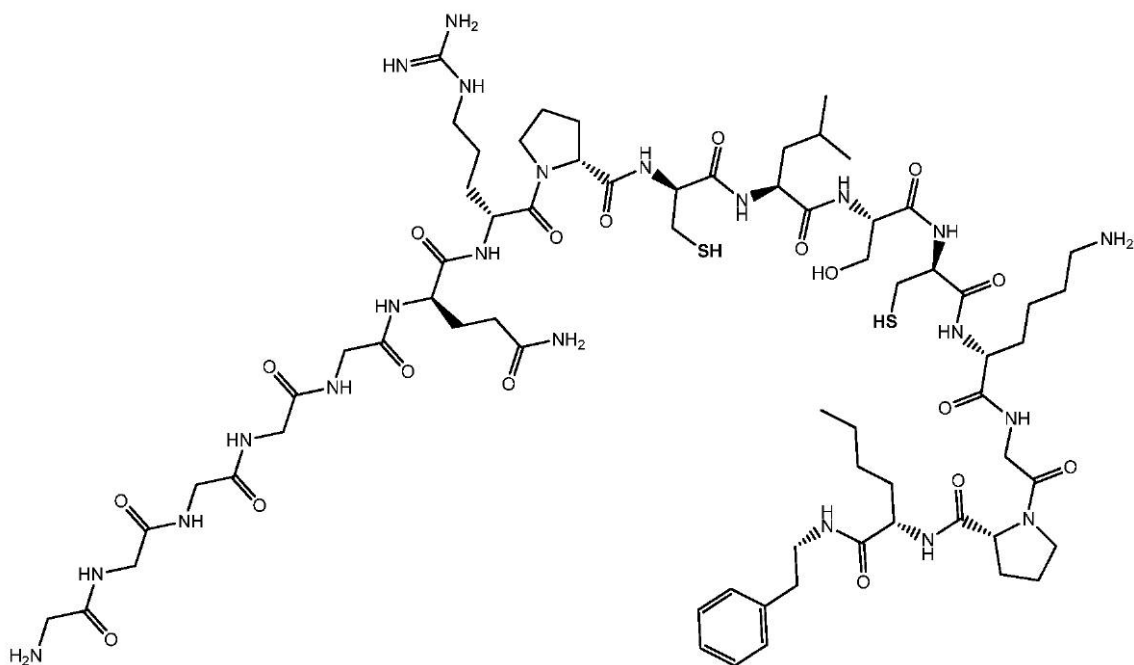
ステップ2b: 中間体42b、H<sub>2</sub>N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(フェネチル)の調製

30

## 【0530】



## 【化 7 1】



10

20

## 1) 切断および保護基の除去

中間体 43a (0.622 g、0.25 mmol) に、95% TFA / 2.5% H<sub>2</sub>O / 2.5% TIPS の 3 mL の溶液および DTT (771 mg、5.00 mmol) 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 40 mL の冷エーテルに滴下し、次いで 4000 rpm 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 × 40 mL) 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 °C 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 × 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) によって精製した。生成物画分を凍結乾燥して、中間体 43b を TFA 塩 (44 mg、11%) として得た。

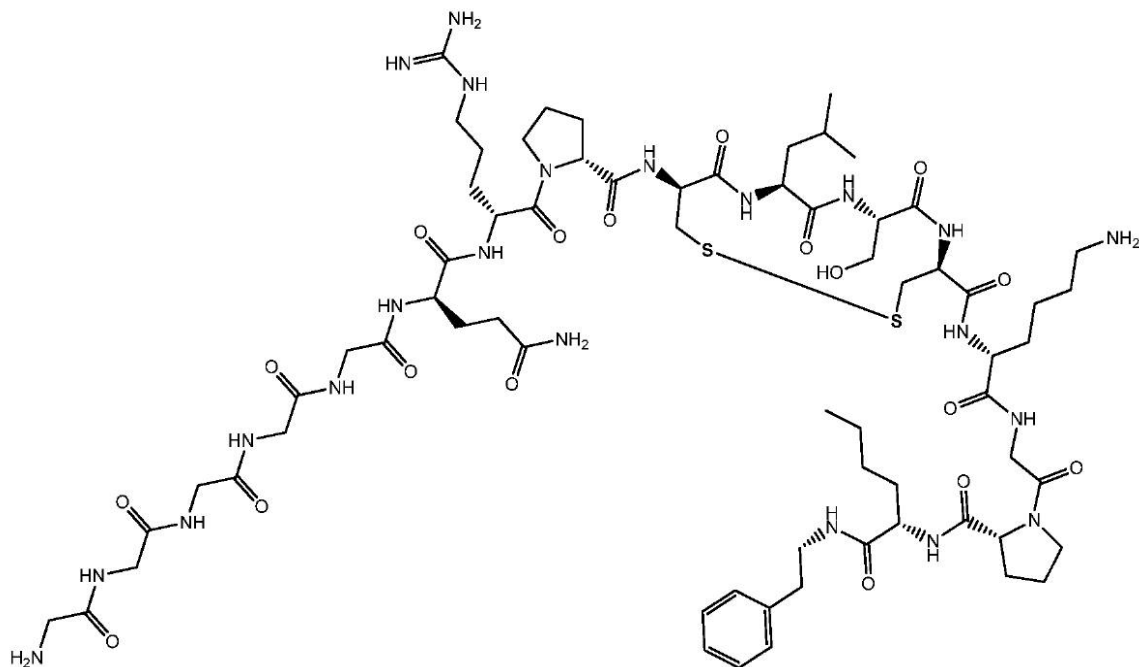
30

## 【0532】

ステップ 3: 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) (ジスルフィド C<sup>9</sup> - C<sup>12</sup>)、中間体 43c の調製

## 【0533】

## 【化 7 2】



10

20

0.9 mL の  $H_2O$  中の中間体 43b (44 mg、0.028 mmol) に、 $I_2$  (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/ $H_2O$  = 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/ $H_2O$  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、 $H_2N$ -G-G-G-G-G-Q-R-P-C\* - L-S-C\* - 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。LC/MS (QT2、生成物分析 - HRMS - 酸性、Waters Acquity 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% ~ 98% 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。

30

## 【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、 $H_2N$ -G-G-G-G-G-Q-R-P-C\* - L-S-C\* - 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 - Cl 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。

40

## 【0535】

## 2) 精製および脱塩

上記溶液を、ATTA X PRESS 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

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 Sping 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 x 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):  $R_t = 1.55$  分、MS [M+H] 58845.0000。

【0536】

10

実施例 43 の配列:

【0537】

【化 73】

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT  
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY  
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT  
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS  
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH E ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG  
251 *GSLPETGGGGGQRPC\*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 - N l e ) 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、 $EC_{50}$  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】

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。

30

【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 7 4】

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、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、

10

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、

20

X 9 は、G、A、a であり、または存在せず、

X 1 0 は、P であり、または存在せず、

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

X 1 2 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 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 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、

30

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

D - N v a は、D - ノルバリリンであり、

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、またはこれらと実質的に同等なポリペプチド。

[ 2 ]

式 I I :

【化 7 5】

40

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 の側鎖は、X 4 の側鎖とジ

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 1 0 は、P であり、または存在せず、

X 1 1 は、D - N l e、N l e、M、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 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

20

[ 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 1 0 は、P であり、または存在せず、

X 1 1 は、D - N l e、N l e、M、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 ( 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



IV

30

40

[ 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 20】

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	10
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-P-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	20
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-P-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	

10

20

30

40

50



〔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改変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\* KGPM PF、C\* RPRLSC\* KGPM PF、およびQRC\* RLSC\* KGPM PF（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られた改変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〕

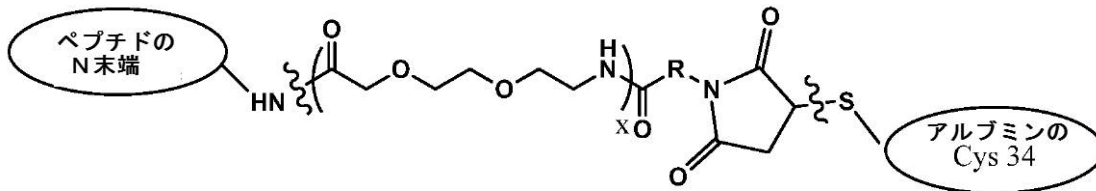
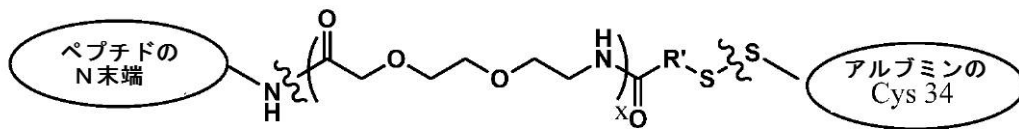
前記半減期延長性部分がヒト血清アルブミンである、上記〔19〕または〔20〕に記載のバイオコンジュゲートまたはその多量体。

〔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 7 8】



10

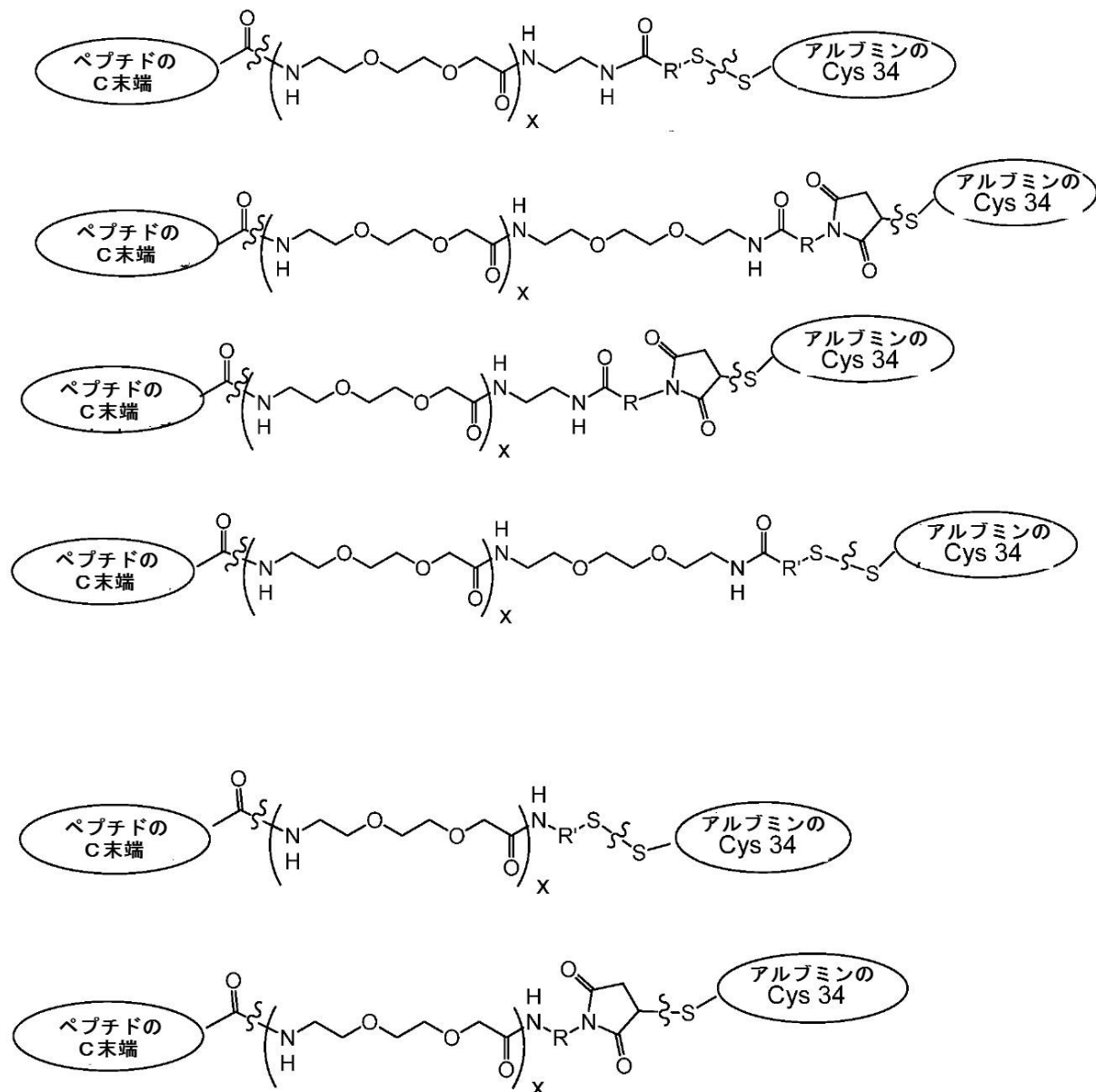
[ 式中、 $x$  は、 $1 \sim 20$  であり、 $R$  は、線状もしくは分枝状アルキレン、シクロアルキル、ヘテロアリールのアリール、またはこれらの組合せであり、 $R'$  は、線状もしくは分枝状アルキレン、アリール、もしくはシクロアルキル、またはこれらの組合せである ]  
を介して化学的に連結される、上記 [ 25 ] に記載のバイオコンジュゲート。

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 7 9】



[ 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 [ 19 ] または [ 20 ] に記載のバイオコンジュゲート。

## [ 28 ]

前記半減期延長性部分が脂肪酸である、上記 [ 19 ] に記載のバイオコンジュゲート。

## [ 29 ]

前記脂肪酸が、

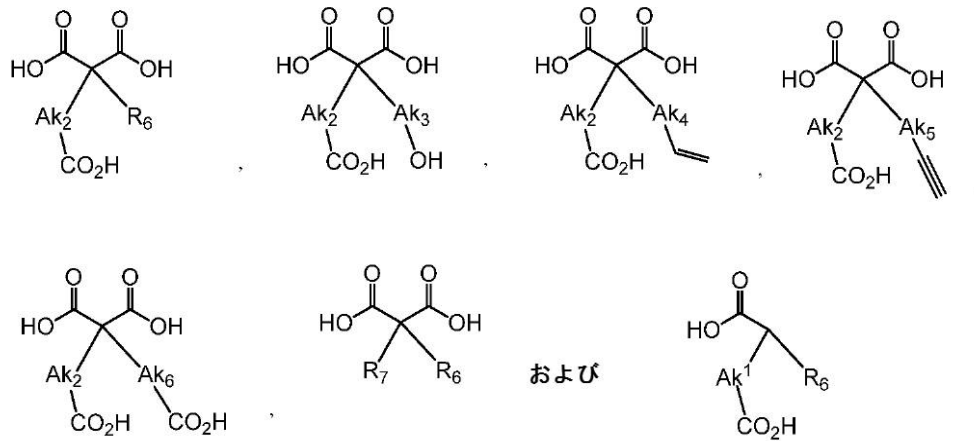
10

20

30

40

## 【化 8 0】



10

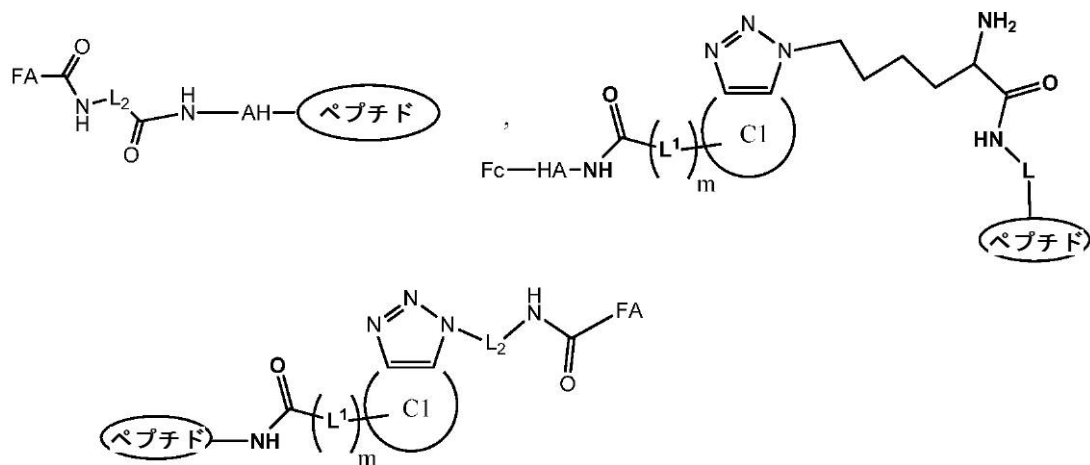
[ 式中、 $Ak^2$ 、 $Ak^3$ 、 $Ak^4$ 、 $Ak^5$ 、および  $Ak^6$  は、独立して、( $C_{8 \sim 20}$ ) アルキレンであり、 $R^6$  および  $R^7$  は、独立して、( $C_{8 \sim 20}$ ) アルキルである ] から選択される、上記 [ 28 ] に記載のバイオコンジュゲート。

## [ 30 ]

次式：

20

## 【化 8 1】



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、 $L^2$  は、リンカーであり、 $C^1$  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、 $L^1$  は、 $C^1 \sim C^{20}$  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 [ 3 0 ] 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。

[ 3 2 ]

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 [ 3 1 ] に記載の方法。

10

[ 3 3 ]

医薬として使用するための、上記 [ 1 ] から [ 3 0 ] 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。

[ 3 4 ]

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 [ 3 0 ] 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。

[ 3 5 ]

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 [ 3 0 ] 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

[ 3 6 ]

治療有効量の上記 [ 1 ] から [ 3 0 ] 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

[ 3 7 ]

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、アルドステロンシンターゼ阻害薬 ( 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 [ 3 6 ] に記載の組合せ。

[ 3 8 ]

治療有効量の上記 [ 1 ] から [ 3 0 ] 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	1 0 1
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	1 2 1

- (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 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1  
0 0, ノバルティス インスティテューツ 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
- (72)発明者 グロッシュェ, フィリップ  
スイス国 ツェーハー - 4 0 0 2 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, カラ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1  
0 0, ノバルティス インスティテューツ 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
- (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 0 2 1 4 3, サマービル, プラストー アベニュー 2 0
- (72)発明者 ロウ, チャンガン  
アメリカ合衆国 ミシガン州 4 9 0 2 4, ポーテージ, ファウン コーブ レーン 3 6 8 1,  
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 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1  
0 0, ノバルティス インスティテューツ 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
- (72)発明者 八十島 佳代  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1  
0 0, ノバルティス インスティテューツ 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
- (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 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 4  
0 0, ノバルティス インスティテューツ 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
- (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 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1  
0 0, ノバルティス インスティテューツ 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
- (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 インスティテューツ 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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS  
(STN)