

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-532385

(P2009-532385A)

(43) 公表日 平成21年9月10日 (2009.9.10)

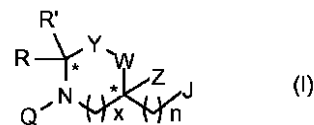
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 14/58 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/58 Z N A	4 C O 8 4
<b>C 0 7 K 7/08 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/08	4 H O 4 5
<b>A 6 1 K 38/22 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/24	
<b>A 6 1 P 13/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/00	
<b>A 6 1 P 9/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-503313 (P2009-503313)	(71) 出願人	506392850 パラティン・テクノロジーズ・インコーポ レーテッド アメリカ合衆国・ニュージャージー・08 5 1 2・クランバリー・シーダー・ブルッ ク・コーポレート・センター・シーダー・ ブルック・ドライブ・4-C
(86) (22) 出願日	平成19年3月30日 (2007.3.30)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成20年11月20日 (2008.11.20)	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/065656	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02007/115182	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成19年10月11日 (2007.10.11)		
(31) 優先権主張番号	60/743, 963		
(32) 優先日	平成18年3月30日 (2006.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/743, 964		
(32) 優先日	平成18年3月30日 (2006.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 線状ナトリウム利尿ペプチド構築物

## (57) 【要約】

ナトリウム利尿ペプチド受容体に結合し、複数のアミノ酸残基および式I(ここで、R、R'、Q、Y、W、Z、J、xおよびnは本明細書に記載の通りである)の少なくとも1つのアミノ酸代用物、ならびに場合によって、少なくとも1つの該アミノ酸残基または代用物の反応性基に共有結合した少なくとも1つの補欠分子族を含む、N末端およびC末端を有する線状構築物、このような線状構築物を含む医薬組成物、ならびに抗高血圧、心臓血管、腎臓または内分泌の作用の誘発が望ましい鬱血性心不全または他の状態、症候群もしくは疾患を治療する方法。

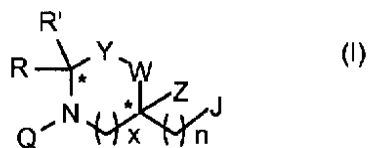


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ナトリウム利尿ペプチド受容体に結合し、複数のアミノ酸残基および少なくとも1つの式I:

## 【化 1】



10

のアミノ酸代用物を含む、N-末端およびC-末端を有する線状ペプチド構築物であって、前記少なくとも1つの式Iの代用物が、前記複数のアミノ酸残基の少なくとも1つに共有結合している構築物

(式中、

RおよびR'は、それぞれ独立に、Hあるいは天然もしくは非天然のアミノ酸側鎖部分またはアミノ酸側鎖部分の誘導体であり；

xは1または2であり；

YはCH<sub>2</sub>またはC=Oであり；

Wは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり；

ZはHまたはCH<sub>3</sub>であり；

20

Jは、前記代用物が前記構築物のC-末端位置にない場合、-C(=O)-であり、ある場合、Jは、-H、-OH、-C(=O)-OH、-C(=O)-NH<sub>2</sub>、またはC-末端キャッピング基であり；

Qは、前記代用物が前記構築物のN-末端位置にない場合、結合であり、ある場合、Qは、-Hまたはアミンキャッピング基であり；

R'''は、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、C<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族、またはC<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族アシルであり；

nは、0、1または2であり；

アスタリスクで印した炭素原子は任意の立体化学配置を有することができる)。

30

## 【請求項 2】

前記アミノ酸残基の少なくとも1つの側鎖もしくは末端基における反応性基、前記代用物が前記構築物のN-末端位置にあるアミンキャッピング基におけるアミン基もしくは反応性基、または前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあるC-末端キャッピング基におけるカルボキシル基、アミン基もしくは反応性基に共有結合した少なくとも1つの補欠分子族をさらに含む、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 3】

前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあり、Jが、

-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OH、

-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>)、

-C(=O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>)、

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OH、

-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、

-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>)、

-C(=O)-N-((CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>))<sub>2</sub>、

-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>)、

-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-C(=O)-CH(N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>))((CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>))、または

-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>))-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>1</sub>)(v<sub>2</sub>)

40

(前記の全ての(R)または(S)配置を含み、ここで、v<sub>1</sub>およびv<sub>2</sub>は、それぞれ独立に、Hまた

50

は $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖であり、 $m$ は、それぞれの場合に、独立に0～17である)

からなるC-末端キャッピング基である、請求項1に記載の構築物。

【請求項4】

前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあり、Jが、オメガアミノ脂肪族、末端アリアル基もしくはアラルキル基または任意の単一の天然もしくは非天然の-アミノ酸、-アミノ酸、-、-二置換アミノ酸、N-置換アミノ酸(前記の全ての(R)または(S)配置を含み、場合によって請求項2に定義された通りのC-末端キャッピング基と併用して)からなるC-末端キャッピング基である、請求項1に記載の構築物。

【請求項5】

前記代用物が前記構築物のN-末端位置にあり、Qが、

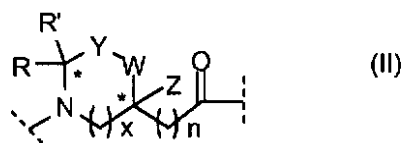
- $(CH_2)_m-N(v_3)(v_4)$ 、
- $(CH_2)_m-CH_3$ 、
- $(CH_2)_m-O(v_3)$ 、
- $(CH_2)_m-C(=O)-(v_3)$ 、
- $(CH_2)_m-C(=O)-O-(v_3)$ 、
- $(CH_2)_m-S(v_3)$ 、
- $C(=O)-(CH_2)_m-CH_3$ 、
- $C(=O)-(CH_2)_m-N(v_3)(v_4)$ 、
- $C(=O)-(CH_2)_m-C(=O)-(v_3)$ 、
- $C(=O)-(CH_2)_m-O(v_3)$ 、または
- $C(=O)-(CH_2)_m-S(v_3)$

[ここで、 $v_3$ および $v_4$ は、それぞれ独立に、H、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖または $C_2 \sim C_{19}$ 直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖であり( $v_3$ または $v_4$ の一方がアルキルアシル鎖である場合、 $v_3$ または $v_4$ の他方はHであることを条件とする)、 $m$ は0～17である]からなるアミンキャッピング基である、請求項1に記載の構築物。

【請求項6】

前記構築物が、少なくとも1つの式II:

【化2】

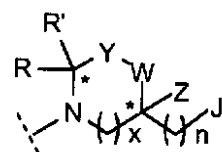


の代用物を含み、前記代用物がN-末端またはC-末端以外の任意の位置にあり、破線はペプチド結合を示す、請求項1に記載の構築物。

【請求項7】

少なくとも1つの式Iの代用物が、前記構築物のC-末端にあり、ペプチド結合によってそれに共有結合しており、前記代用物が式:

【化3】



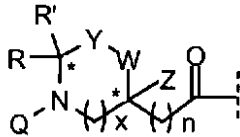
(式中、破線はペプチド結合を示す)

を有する、請求項1に記載の構築物。

【請求項8】

少なくとも1つの式Iの代用物が、前記構築物のN-末端にあり、1つのペプチド結合によってそれに共有結合しており、前記代用物が、式:

## 【化 4】



(式中、破線はペプチド結合を示す)  
を有する、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 9】

少なくとも1つの式Iの代用物が前記構築物のC-末端にあり、Qが結合であり、そのRおよびR'が、それぞれ独立に、Hあるいは天然もしくは非天然のアミノ酸側鎖部分または少なくとも1個の窒素原子を含むヘテロ原子基を有するアミノ酸側鎖部分の誘導体である(RおよびR'の少なくとも一方はHでないことを条件とする)、請求項1に記載の構築物。 10

## 【請求項 10】

少なくとも1個の窒素原子を含むヘテロ原子基を有するRおよびR'の少なくとも一方が式 $-(CH_2)_y-R''$ (式中、yは1~5であり、R''は少なくとも1個の窒素原子を含むヘテロ原子基である)を有する、請求項9に記載の構築物。

## 【請求項 11】

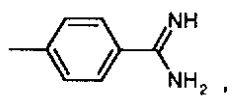
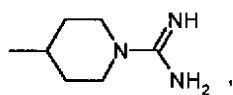
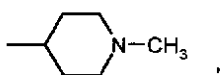
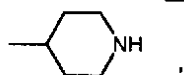
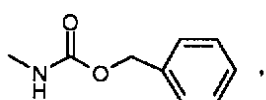
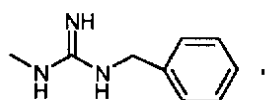
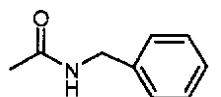
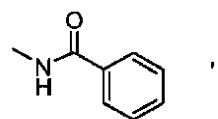
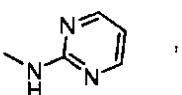
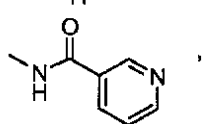
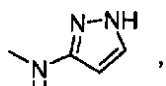
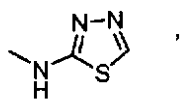
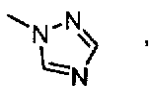
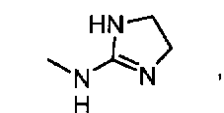
R'が、

- NH<sub>2</sub>、
- NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、
- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、
- NH-C(=O)-NH<sub>2</sub>、
- C(=O)-NH<sub>2</sub>、
- C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、
- C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、
- NH-C(=NH)-NH-Me、
- NH-C(=NH)-NH-Et、
- NH-C(=NH)-NH-Pr、
- NH-C(=NH)-NH-Pr-i、
- NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、
- NH-C(=O)-O-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=N-C(=O))-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、
- N(C(=O))-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C(=NH)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、

20

30

## 【化 5 A】



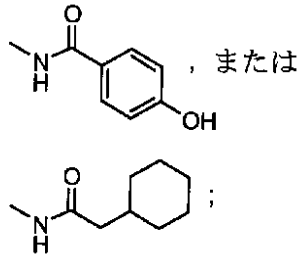
10

20

30

40

## 【化 5 B】



(式中、yは1～5である)

である、請求項10に記載の構築物。

## 【請求項 1 2】

前記ナトリウム利尿ペプチド受容体が、ANP、BNP、CNP、sCP、DNP、TNP-a、TNP-bまたはTNP-cに対する受容体である、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 1 3】

前記複数のアミノ酸残基が、天然もしくは非天然の - アミノ酸、 - アミノ酸、 , - 二置換アミノ酸、N-置換アミノ酸(置換基が異なる , - 二置換アミノ酸の全ての(R)または(S)配置を含む)、または前記の組合せを含む、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 1 4】

前記複数のアミノ酸残基の少なくとも2つが非ペプチド結合によって連結されている、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 1 5】

前記少なくとも1つの非ペプチド結合が、-CH<sub>2</sub>-NH-、-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>-O-、もしくは-C(=O)-CH<sub>2</sub>-、前記の任意の等配電子体、または-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-もしくは-CH=CH-である、請求項14に記載の構築物。

## 【請求項 1 6】

12～15のアミノ酸残基および1つの式Iの代用物を含む、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 1 7】

11～14のアミノ酸残基および2つの式Iの代用物を含む、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 1 8】

11～14のアミノ酸残基、N-末端またはC-末端のいずれかでの1つの式IIの代用物およびN-末端またはC-末端のいずれかでの1つの式Iの代用物を含む、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 1 9】

少なくとも1つの代用物について、RおよびR'の一方がHであり、xが1であり、YがC=Oであり、WがNHであり、ZがHであり、nが0である、請求項1に記載の構築物。

## 【請求項 2 0】

前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあり、Jが、-C(=O)-NH<sub>2</sub>、-C(=O)-OH、-CH<sub>2</sub>-OH、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>、または-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>である、請求項3に記載の構築物。

## 【請求項 2 1】

前記補欠分子族が、炭素原子および水素原子を含む繰返し単位を含む少なくとも1つのポリマー配列を含む、請求項2に記載の構築物。

## 【請求項 2 2】

前記繰返し単位が、追加の原子をさらに含む、請求項21に記載の構築物。

## 【請求項 2 3】

前記繰返し単位が、酸素原子をさらに含む、請求項21に記載の構築物。

## 【請求項 2 4】

前記ポリマー配列が、水溶性ポリマー配列である、請求項21に記載の構築物。

## 【請求項 2 5】

前記ポリマー配列が、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルア

10

20

30

40

50

ルコール、ポリオキサゾリンまたはポリアクリロイルモルホリンである、請求項21に記載の構築物。

【請求項 26】

前記ポリアルキレンオキシドが、ポリエチレングリコール(PEG)である、請求項25に記載の構築物。

【請求項 27】

PEGを含む前記補欠分子族が、結合基で誘導体化されている、請求項26に記載の構築物。

【請求項 28】

前記PEGが、約200MW～約40,000MWの分子量範囲を有する、請求項26に記載の構築物。

10

【請求項 29】

前記補欠分子族が、アミン反応性基を含む、請求項2に記載の構築物。

【請求項 30】

前記補欠分子族が、前記アミノ酸残基の少なくとも1つの側鎖における反応性アミンに共有結合している、請求項29に記載の構築物。

【請求項 31】

前記補欠分子族が、前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあるC-末端キャッピング基における反応性アミンに共有結合している、請求項29に記載の構築物。

【請求項 32】

前記補欠分子族が、前記代用物が前記構築物のN-末端位置にあるアミンキャッピング基における反応性アミンに共有結合している、請求項29に記載の構築物。

20

【請求項 33】

前記補欠分子族が、前記代用物が前記構築物のN-末端位置にある前記代用物のアミン基における反応性アミンに共有結合している、請求項29に記載の構築物。

【請求項 34】

前記補欠分子族が、カルボキシル反応性基を含む、請求項2に記載の構築物。

【請求項 35】

前記補欠分子族が、前記アミノ酸残基の少なくとも1つの側鎖における反応性カルボキシルに共有結合している、請求項34に記載の構築物。

【請求項 36】

前記補欠分子族が、前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあるC-末端キャッピング基における反応性カルボキシルに共有結合している、請求項34に記載の構築物。

30

【請求項 37】

前記補欠分子族が、チオール反応性基を含む、請求項2に記載の構築物。

【請求項 38】

前記補欠分子族が、前記アミノ酸残基の少なくとも1つの側鎖における反応性チオールに共有結合している、請求項37に記載の構築物。

【請求項 39】

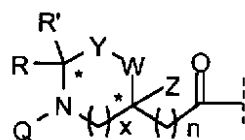
前記補欠分子族が、前記代用物が前記構築物のN-末端位置にあるアミンキャッピング基における反応性チオールに共有結合している、請求項37に記載の構築物。

40

【請求項 40】

11～13のアミノ酸残基ならびに以下の式：

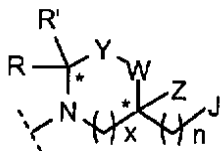
【化 6】



(式中、Q、R、R'、Y、W、Z、xおよびnは、式Iについて請求項1に定義された通りである)のC-末端位置以外の任意の位置にある少なくとも1つのアミノ酸代用物、および以下の式：

50

## 【化 7】



[式中、C-末端位置にある前記アミノ酸代用物について、Y、W、Zおよびxは、式Iについて請求項1に定義された通りであり、Jは、請求項3または4に定義された通りであり、少なくとも1個の窒素原子を含むヘテロ原子基を有するRおよびR'の少なくとも1つは、式(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-R''(式中、yは1~5であり、R''は請求項11に定義された通りである)を有する] のC-末端位置にある1つのアミノ酸代用物を含む線状ペプチド構築物。

10

## 【請求項 4 1】

式III:

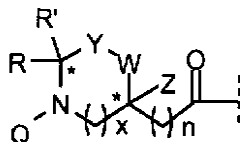
Aaa<sup>1</sup>-Aaa<sup>2</sup>-Aaa<sup>3</sup>-Aaa<sup>4</sup>-Aaa<sup>5</sup>-Aaa<sup>6</sup>-Aaa<sup>7</sup>-Aaa<sup>8</sup>-Aaa<sup>9</sup>-Aaa<sup>10</sup>-Aaa<sup>11</sup>-Aaa<sup>12</sup>-Aaa<sup>13</sup>-Aaa<sup>14</sup>-Aaa<sup>15</sup>(III)

[式中、

Aaa<sup>1</sup>は、Nle、Ala、Leu、Ile、Val、Arg、Phe、Lys、Tyr、Asp、Nva、Met、Met(O)、もしくはMet(O<sub>2</sub>)を含むまたはそれらから誘導される -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはNle、Ala、Leu、Ile、Val、Arg、Phe、Lys、Tyr、Asp、Val、Nva、Met、Met(O)、もしくはMet(O<sub>2</sub>)から誘導される -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>1</sup>は、アシルであり、ここで、該有機基は、C<sub>2</sub>~C<sub>18</sub>直鎖アルキル、C<sub>3</sub>~C<sub>17</sub>分岐アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>18</sub>直鎖アルケニルもしくはアルキニルまたはC<sub>3</sub>~C<sub>18</sub>分岐アルケニルもしくはアルキニルであるか、あるいはAaa<sup>1</sup>は、構造:

20

## 【化 8】



30

(式中、破線は、ペプチド結合を示し;RおよびR'は、独立に、H、直鎖もしくは分岐のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>脂肪族鎖、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(=O)-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(O<sub>2</sub>)-CH<sub>3</sub>、結合およびシクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、もしくはシクロヘキサン環、またはC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>脂肪族鎖およびシクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、もしくはシクロヘキサン環であり;xは1または2であり;YはCH<sub>2</sub>またはC=Oであり;Wは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり;ZはHまたはCH<sub>3</sub>であり;Qは、-H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>3</sub>)(v<sub>4</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O(v<sub>3</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(v<sub>3</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-O-(v<sub>3</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S(v<sub>3</sub>)、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>3</sub>)(v<sub>4</sub>)、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(v<sub>3</sub>)、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O(v<sub>3</sub>)、または-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S(v<sub>3</sub>)であり;R'''は、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、C<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族、またはC<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族アシルであり;nは、0、1または2であり;mは0~17であり;yは1~5であり;v<sub>3</sub>およびv<sub>4</sub>は、それぞれ独立に、H、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖またはC<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖であり(v<sub>3</sub>またはv<sub>4</sub>の一方がアルキルアシル鎖である場合、v<sub>3</sub>またはv<sub>4</sub>の他方はHであることを条件とする);アスタリスクで印した炭素原子は、任意の立体化学配置を有することができる)のアミノ酸代用物であり;

40

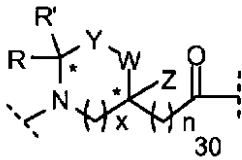
Aaa<sup>2</sup>は、Gly、Sar、(Ala、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる -二置換アミノ酸の全ての(R)

50



もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>2</sup>は、構造:

【化 9】



(式中、RおよびR'は、独立に、H、あるいはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体であり;xは1または2であり;YはC<sub>H2</sub>またはC=Oであり;Wは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり;ZはHまたはCH<sub>3</sub>であり;R'''は、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、C<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族、またはC<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族アシルであり;nは、0、1または2である)

のアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>3</sup>は、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、DapもしくはDabを含むまたはそれらから誘導される -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはHis、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Dap、もしくはDabから誘導される、 -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>3</sup>は、(RおよびR'が、独立に、HあるいはHis、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、DapもしくはDabのアミノ酸側鎖部分であるか、またはHis、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、DapもしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>4</sup>は、(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleを含むあるいはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、または置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleから誘導される、 -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>4</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleのアミノ酸側鎖部分、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>5</sup>は、Gly、Sar、(Alaを含むもしくはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAibであるか、あるいはAaa<sup>5</sup>は、RおよびR'が、独立に、Hまたは-CH<sub>3</sub>であるAaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>6</sup>は、Gly、Sar、(Alaを含むもしくはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAibであるか、あるいはAaa<sup>6</sup>は、RおよびR'が、独立に、Hまたは-CH<sub>3</sub>であるAaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>7</sup>は、Arg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Cit、Abu、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはArg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Cit、Abu、Dap、もしくはDabから誘導される、 -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>7</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはArg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Abu、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはArg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Abu、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>8</sup>は、Gly、(Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>))、もしくはTleを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異

10

20

30

40

50

性体、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、もしくはTleから誘導される、-二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>8</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

Aaa<sup>9</sup>は、Asp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される-アミノ酸もしくは-アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAsp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される、-二置換アミノ酸(置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいは、Aaa<sup>9</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはAsp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはAsp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

Aaa<sup>10</sup>は、Arg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Cit、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される-アミノ酸もしくは-アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはArg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Cit、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される、-二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>10</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはArg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはArg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

Aaa<sup>11</sup>は、Gly、または(Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleを含むまたはそれらから誘導される)-アミノ酸もしくは-アミノ酸のD-もしくはL-異性体、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleから誘導される、-二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>11</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

Aaa<sup>12</sup>は、Gly、(Ser、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleを含むまたはそれらから誘導される)-アミノ酸もしくは-アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはSer、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleから誘導される、-二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>12</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはSer、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分、またはSer、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

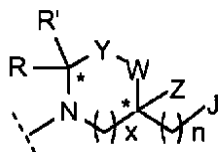
Aaa<sup>13</sup>は、Gly、Sar、(Ala、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される)-アミノ酸もしくは-アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される、-二置換アミノ酸(前記置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>13</sup>は、(RおよびR'は、独立に、H、あるいはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのような式IIの構造のアミノ酸代用物であり；

Aaa<sup>14</sup>は、(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleを含むあるいはそれらから誘導される) -アミノ酸または -アミノ酸のL-またはD-異性体、または(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleから誘導される) , -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる , -二置換アミノ酸の全ての(R)または(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>14</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのような式IIの構造のアミノ酸代用物であり;

10

Aaa<sup>15</sup>は、Arg、Orn、Lys、Ala、Dap、Dab、HArg、もしくはHLysを含むまたはそれらから誘導される -アミノ酸もしくは -アミノ酸のD-もしくはL-異性体、またはArg、Orn、Lys、Ala、Dap、Dab、HArg、もしくはHLysから誘導される , -二置換アミノ酸(前記置換基が異なる , -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>15</sup>は、構造:

【化 10】



20

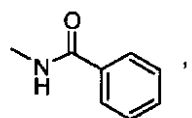
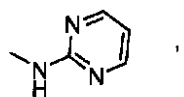
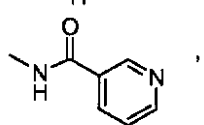
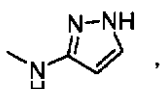
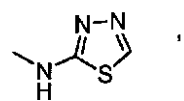
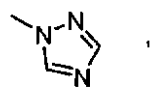
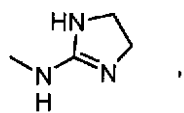
[式中、破線は、ペプチド結合を示し;RおよびR'の少なくとも一方は、(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-R''であり、一方がそうであれば、RおよびR'の残りは、Hであり、ここで、R''は、

- NH<sub>2</sub>、
- NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、
- NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、
- NH-C(=O)-NH<sub>2</sub>、
- C(=O)-NH<sub>2</sub>、
- C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、
- C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、
- NH-C(=NH)-NH-Me、
- NH-C(=NH)-NH-Et、
- NH-C(=NH)-NH-Pr、
- NH-C(=NH)-NH-Pr-i、
- NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、
- NH-C(=O)-O-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=N-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、
- NH(C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)-C(=NH)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、

30

40

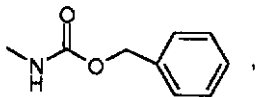
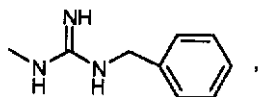
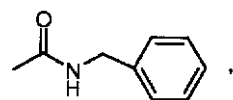
## 【化 1 1 A】



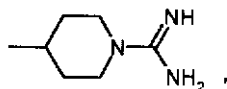
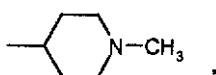
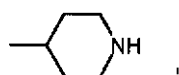
10

20

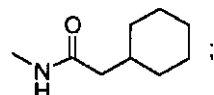
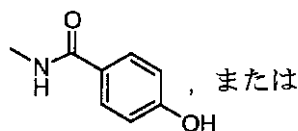
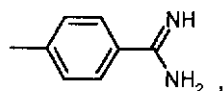
## 【化 1 1 B】



10



20



30

( $x$ は1または2であり; $Y$ は $CH_2$ または $C=O$ であり; $W$ は、 $CH_2$ 、 $NH$ または $NR'''$ であり; $Z$ は $H$ または $CH_3$ であり; $J$ は、 $-H$ 、 $-(CH_2)_m-OH$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-OH$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-O-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-O-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-O-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-O-(CH_2)_m-OH$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-N-((CH_2)_m-N(v_1)(v_2))_2$ 、 $-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-OH)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-NH-C(=O)-CH(N(v_1)(v_2))((CH_2)_m-N(v_1)(v_2))$ 、 $-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-N(v_1)(v_2))-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、オメガアミノ脂肪酸、末端アリール基またはアラルキル基、 $J$ を定義する前記の基の1個との組合せの任意の単一の天然または非天然の  $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸または  $\gamma$ -アミノ酸、あるいは任意の単一の天然または非天然の  $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸または  $\gamma$ -アミノ酸(前記の任意の全ての( $R$ )および( $S$ )配置を含む)であり; $R'''$ は、アシル、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、 $C_2 \sim C_{19}$ 直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪酸、または $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪酸アシルであり; $v_1$ および $v_2$ は、それぞれ独立に、 $H$ 、または $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖であり; $n$ は、0、1または2であり; $m$ は0~17であり; $y$ は1~5であり;アスタリスクで印した炭素原子は、任意の立体化学配置を有することができる)である]

40

のアミノ酸代用物であり;

Aaa<sup>1</sup>からAaa<sup>15</sup>の少なくとも1つは、アミノ酸代用物であることを条件とする]

の線状ペプチド構築物。

50

## 【請求項 4 2】

Aaa<sup>1</sup>からAaa<sup>15</sup>までの1つが、アミノ酸代用物である、請求項41に記載の構築物。

## 【請求項 4 3】

Aaa<sup>1</sup>からAaa<sup>15</sup>までの2つが、アミノ酸代用物である、請求項41に記載の構築物。

## 【請求項 4 4】

Aaa<sup>1</sup>からAaa<sup>15</sup>までの3つ以上が、アミノ酸代用物である、請求項41に記載の構築物。

## 【請求項 4 5】

Aaa<sup>3</sup>、Aaa<sup>5</sup>、Aaa<sup>6</sup>、Aaa<sup>7</sup>、Aaa<sup>9</sup>、Aaa<sup>10</sup>、またはAaa<sup>12</sup>の少なくとも1つが、AlaのL-またはD-異性体である、請求項41に記載の構築物。

## 【請求項 4 6】

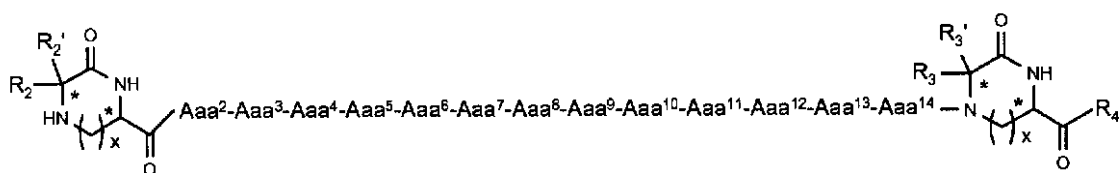
10

前記アミノ酸残基の少なくとも1つの側鎖もしくは末端基における反応性基、前記代用物が前記構築物のN-末端位置にあるアミンキャッピング基におけるアミン基もしくは反応性基、または前記代用物が前記構築物のC-末端位置にあるC-末端キャッピング基におけるカルボキシル基、アミン基もしくは反応性基に共有結合した少なくとも1つの補欠分子族をさらに含む、請求項41に記載の構築物。

## 【請求項 4 7】

式IV:

## 【化 1 2】



20

(IV)

の線状ペプチド構築物

(式中、

Aaa<sup>2</sup>、Aaa<sup>3</sup>、Aaa<sup>4</sup>、Aaa<sup>5</sup>、Aaa<sup>6</sup>、Aaa<sup>7</sup>、Aaa<sup>8</sup>、Aaa<sup>9</sup>、Aaa<sup>10</sup>、Aaa<sup>11</sup>、Aaa<sup>12</sup>、Aaa<sup>13</sup>、およびAaa<sup>14</sup>は、請求項41に定義された通りの -アミノ酸、 -アミノ酸または、 -二置換アミノ酸であり；

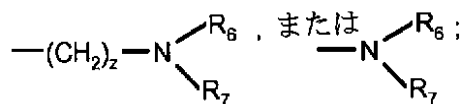
30

R<sub>2</sub>およびR<sub>2</sub>'の一方は、Hであり、他方は、Hあるいは直鎖もしくは分岐のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>脂肪族鎖、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(=O)-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(O<sub>2</sub>)-CH<sub>3</sub>、結合と(シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、もしくはシクロヘキサン環)、またはC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>脂肪族鎖と(シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、もしくはシクロヘキサン環)であり；

R<sub>3</sub>およびR<sub>3</sub>'の一方は、Hであり、他方は、(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-R<sub>5</sub>であり；

R<sub>4</sub>は、OH、

## 【化 1 3】



40

であり；

R<sub>5</sub>は、-NH<sub>2</sub>、

-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、

-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、

-NH-C(=O)-NH<sub>2</sub>、

-C(=O)-NH<sub>2</sub>、

-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、

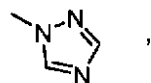
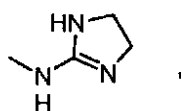
-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、

50

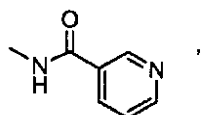
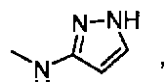
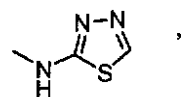
- NH-C(=NH)-NH-Me、
- NH-C(=NH)-NH-Et、
- NH-C(=NH)-NH-Pr、
- NH-C(=NH)-NH-Pr-i、
- NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、
- NH-C(=O)-O-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、
- NH-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、
- NH-C(=N-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、
- N(C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)-C(=NH)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、

10

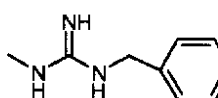
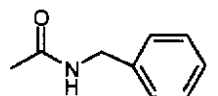
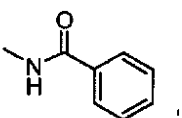
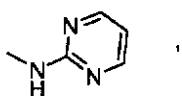
## 【化 1 4 A】



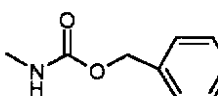
20



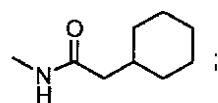
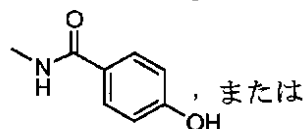
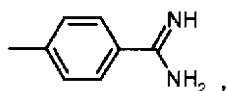
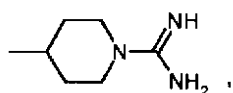
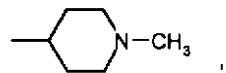
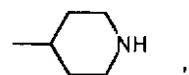
30



40



【化 1 4 B】



10

20

であり；

R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、それぞれ独立に、H、C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、またはC<sub>1</sub>~C<sub>7</sub>直鎖オメガミノアルキル鎖であり；

$x$ は、それぞれの場合において、独立に1または2であり;

$y$  は  $1 \sim 5$  であり ;

$z$  は  $1 \sim 7$  であり;

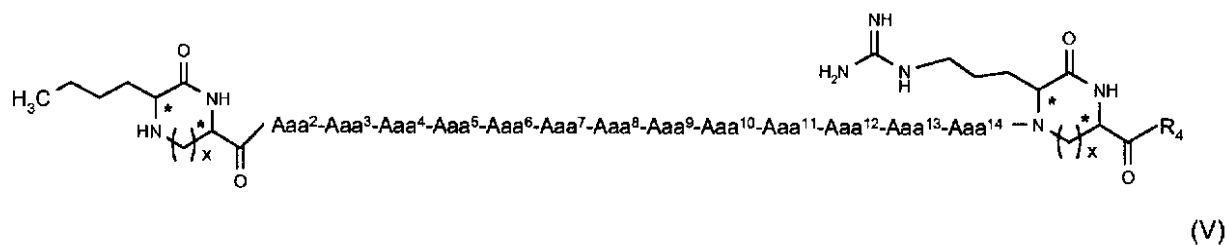
ここで、アスタリスクで印した炭素原子は、任意の立体化学配置を有し得る)。

【請求項 48】

式V:

30

【化 1 5】



## の線状ペプチド構築物

(式中、 $Aaa^2$ から $Aaa^{14}$ までのそれぞれおよび $x$ は、請求項41に定義された通りであり、 $R_4$ はOHまたは $NH_2$ である)。

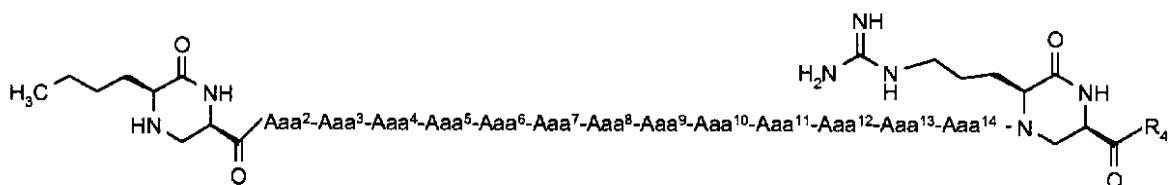
【請求項 49】

式VI:

40



## 【化 1 6】



(VI)

10

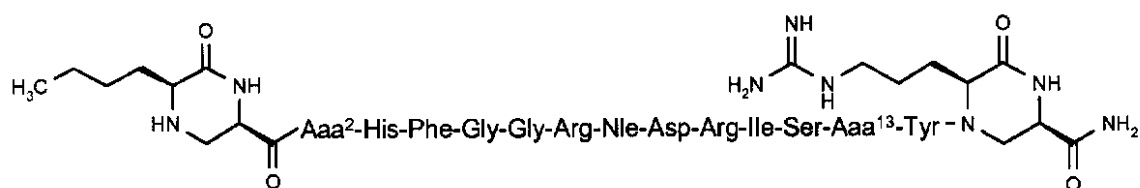
の線状ペプチド構築物

(式中、Aaa<sup>2</sup>からAaa<sup>14</sup>までのそれぞれは、請求項41に定義された通りであり、R<sub>4</sub>はOHまたはNH<sub>2</sub>である)。

## 【請求項 5 0】

式VIIまたは式VIII:

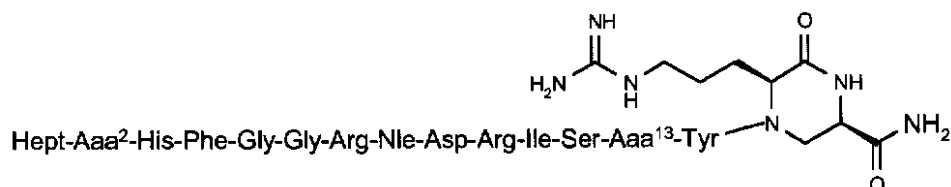
## 【化 1 7】



(VII)

20

または



(VIII)

30

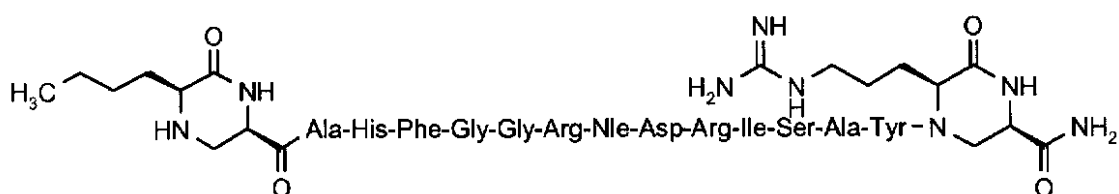
の線状ペプチド構築物

(式中、Aaa<sup>2</sup>およびAaa<sup>13</sup>は、それぞれ独立に、 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸または $\gamma$ -アミノ酸、 $\delta$ -アミノ酸または $\epsilon$ -アミノ酸の任意の天然または非天然のL-またはD-異性体である)。

## 【請求項 5 1】

式IXまたは式X:

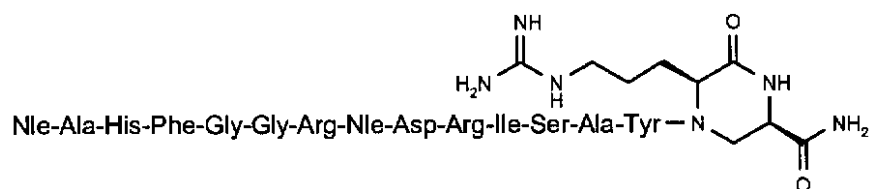
## 【化 1 8】



(IX)

40

または



(X)

50

【化 1 9】



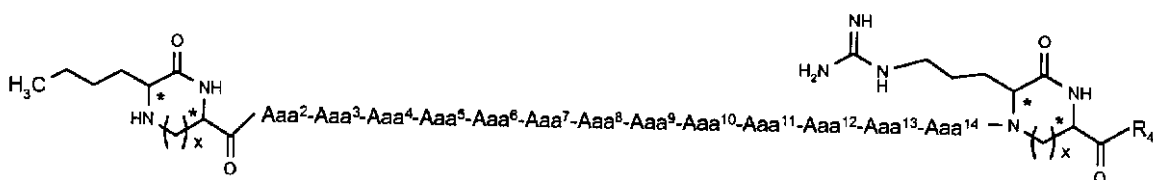
10

[illegible]

(XII)

20

【化 2 0】



(V)

30

【 0 0 0 1 】

40

【 0 0 0 2 】

【 0 0 0 3 】

50

る。

【背景技術】

【0004】

1984年にヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)配列および遺伝子構造の同定がされて以来、ナトリウム利尿ペプチド系は、広範に探求されてきた。ANPは、時に、「ANF」、すなわち心房性ナトリウム利尿因子とも呼ばれる。ANPはナトリウム利尿ペプチド系の一部であり、ヒトにおいてはANP遺伝子(これは翻訳後の処理の相違によってANPおよびウロジラチンの両方を生じる)、BNP、すなわち脳性ナトリウム利尿ペプチドを産生する遺伝子、CNP、すなわちC型ナトリウム利尿ペプチドを産生する遺伝子を含む。ANP、ウロジラチン、BNPおよびCNPは、それぞれ環構造であり、システイン-システインジスルフィド結合によって形成された17アミノ酸ループを有する。ANP、ウロジラチン、BNPおよびCNPは、密接に関連しており、環内で一部の5個または6個のアミノ酸が異なるが、N-およびC-末端尾部は実質的に異なっている。

10

【0005】

ANP、BNPおよびCNPは、別個の受容体、ナトリウムペプチド受容体A、BおよびC(NPRA、NPRBおよびNPRC)にそれぞれ特異的である。NPRAおよびNPRBは、グアニリルシクラーゼに結合しており、NPRCは、G-タンパク質に結合したクリアランス受容体である。ANP、BNPおよびCNPは、今日までに同定された、主要な内因性哺乳動物ナトリウム利尿ペプチドである。しかし、同定され、かつ哺乳動物において治療用途を有し得る多数の非哺乳動物ナトリウム利尿ペプチドが存在する。これらには、サケナトリウム利尿すなわち心臓ペプチド(sCP)、心室ナトリウム利尿ペプチド(VNP)、ウナギおよび様々な魚において同定された心臓ナトリウム利尿ペプチド、デンドロアスピスナトリウム利尿ペプチド(DNP)、マンバヘビ毒において同定されたナトリウム利尿ペプチド、およびタイパンヘビ毒から単離された3つのナトリウム利尿様ペプチド(TNP-a、TNP-b、およびTNP-c)が含まれる。全体として、Tervonen V、Ruskoaho H、Lecklin T、Ilves M、Vuolteenaho O. *Salmon cardiac natriuretic peptide is a volume-regulating hormone*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E353~61頁(2002年); Takei Y、Fukuzawa A、Itahara Y、Watanabe TX、Yoshizawa K、umagaye K、Nakajima K、Yasuda A、Smith MP、Duff DW、Olson KR. *A new natriuretic peptide isolated from cardiac atria of trout, Oncorhynchus mykiss*. *FEBS Lett.* 414:377~80頁(1997年); Schweitz H、Vigne P、Moinier D、Frelin C、Lazdunski M. *A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba(Dendroaspis angusticeps)*. *J. Biol. Chem.* 267:13928~32頁(1992年); Lisy O、Jougasaki M、Heublein DM、Schirger JA、Chen HH、Wennberg PW、Burnett JC. *Renal actions of synthetic dendroaspis natriuretic peptide*. *Kidney Int.* 56:502~8頁(1999年); およびFry BG、Wickramaratana JC、Lemme S、Beuve A、Garbers D、Hodgson WC、Alwood P. *Novel natriuretic peptides from the venom of the inland(Oxyuranus microlepidotus); isolation, chemical and biological characterisation*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 327: 1011~1015頁(2005年)を参照されたい。

20

30

【0006】

ANPは、心房圧増加に反応して優位に内因性に分泌されるが、サイトカイン受容体刺激を含む他の因子が内因性分泌に寄与し得る。一旦放出されると、ANPは血圧、ナトリウムおよび体液ホメオスタシスのホルモン調節因子であり、血管緊張低下作用を与え、心臓血管再造形に影響する、などする。したがって、内因性ANPを含むANPは、慢性的に活性化されたレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に対して防御を与えることによって部分的に、鬱血性心不全および他の心臓血管疾患に有効である。循環ANPは、2つの機構によって循環から迅速に取り除かれ、ナトリウムペプチド受容体に結合し、酵素的に分解する。

40

【0007】

ヒトANPは、野生型ヒトANP、hANP、ANP(1-28)およびANP(99-126)(後者はproANP(1-126)内の関連配列と称されており、分泌中にC-末端領域のArg<sup>98</sup>-Ser<sup>99</sup>で通常切断される)ともいわれる。以降、ヒトANPは、「hANP」と称されることもある。

50

## 【 0 0 0 8 】

一般に、ナトリウム利尿ペプチドおよびその変異体は、鬱血性心不全、腎臓高血圧、急性腎不全および関連状態、ならびに利尿、ナトリウム利尿および/または血管拡張反応が治療または予防効果を有するであろう任意の状態、疾患または症候群の治療に利用性を有すると考えられている。ANPを含むナトリウム利尿ペプチド、および心不全におけるそのナトリウム利尿系の利用について記載する1つの総論は、Schmitt M.、Cockcroft J.R.、およびFrenneaux M.P. Modulation of the natriuretic peptide system in heart failure: from bench to bedside? Clinical Science 105:141 ~ 160頁(2003年)である。

## 【 0 0 0 9 】

多数のANP模倣体および変異体が作られてきており、それらの一部は大きさがANPから実質的に減少している。ANPについて、大きさが減少しているが、生物学的に活性であるバージョンは、Li B.、Tom JY.、Oare D.、Yen R.、Fairbrother WJ.、Wells JA.、Cunningham BC. Minimization of a polypeptide hormone. Science 270:1657 ~ 60頁(1995年)に記載されるような15-merジスフフィド環状ペプチドH-Met-cyclo(Cys-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Cys)-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>(配列番号1)である。この15-merペプチドは、通常「mini-ANP」と称される。

## 【 0 0 1 0 】

1つまたは複数の要因に基づいて野生型ナトリウム利尿ペプチドよりも優れていると主張されて、ナトリウム利尿ペプチドの異なる合成類似体について多くの特許および特許出願が出願された。これらには、以下の米国特許第4496544号;同第4609725号;同第4656158号;同第4673732号;同第4716147号;同第4757048号;同第4764504号;同第4804650号;同第4816443号;同第4824937号;同第4861755号;同第4904763号;同第4935492号;同第4952561号;同第5047397号;同第5057495号;同第5057603号;同第5091366号;同第5095004号;同第5106834号;同第5114923号;同第5159061号;同第5204328号;同第5212286号;同第5352587号;同第5376635号;同第5418219号;同第5665704号;同第5846932号;同第5583108号;同第5965533号;同第6028055号;同第6083982号;同第6124430号;同第6150402号;同第6407211号;同第6525022号;同第6586396号および同第6818619号;ならびに以下の米国特許出願公開第2004/0002458号;同第2004/0063630号;同第2004/0077537号;同第2005/0113286号;同第2005/0176641号;同第2006/0030004号に開示された構築物が含まれる。さらに、様々な非米国特許および特許出願が構築物について開示しており、これらには、国際公開第85/04870号;同第85/04872号;同第88/03537号;同第88/06596号;同第89/10935号;同第89/05654号;同第90/01940号;同第90/14362号;同第92/06998号;同第95/13296号;同第99/08510号;同第99/12576号;同第01/016295号;同第2004/047871号;同第2005/072055号;EP00291999号;同0323740号;同0341603号;同0350318号;同0356124号;同0385476号;同0497368号;および同0542863号が含まれる。キメラナトリウム利尿ペプチド、例えば、「バソナトリンペプチド」と呼ばれるペプチドならびにANPおよびCNPのキメラとして記載されるペプチドは、米国特許第5583108号、または、デンドロアスピスのキメラペプチドを開示する米国特許第6407211号および同第6818619号におけるように記載されている。上記の特許および特許出願のそれぞれの教示は、あたかも全て述べられたように参照により組み込まれる。

## 【 0 0 1 1 】

米国における食品医薬品局によって認可された1つのナトリウム利尿ペプチド製品があり、一般名ネシリチドおよび商標Natrecor(登録商標)(Scios Inc.)のもとに販売されている。これは、組換えDNA技術を用いて大腸菌(E.coli)から製造されたヒトB型ナトリウム利尿ペプチドである。この製品は、安静時呼吸困難または最小活動度を伴う急性非代償性鬱血性心不全を有する患者の治療に対する静脈内注射のためのみに認められている。有効であるが、ネシリチドの薬物動態学および半減期は、この製品が静脈内注射によってのみ利用することができるようなものであり、これは病院または熟練医療センター環境へのこの薬剤の使用を制限する。

【特許文献1】米国仮特許出願第60/743963号

【特許文献2】米国仮特許出願第60/743964号

10

20

30

40

50

【特許文献 3】	国際特許出願第PCT/US07/65632号	
【特許文献 4】	米国特許第4496544号	
【特許文献 5】	米国特許第4609725号	
【特許文献 6】	米国特許第4656158号	
【特許文献 7】	米国特許第4673732号	
【特許文献 8】	米国特許第4716147号	
【特許文献 9】	米国特許第4757048号	
【特許文献 10】	米国特許第4764504号	
【特許文献 11】	米国特許第4804650号	
【特許文献 12】	米国特許第4816443号	10
【特許文献 13】	米国特許第4824937号	
【特許文献 14】	米国特許第4861755号	
【特許文献 15】	米国特許第4904763号	
【特許文献 16】	米国特許第4935492号	
【特許文献 17】	米国特許第4952561号	
【特許文献 18】	米国特許第5047397号	
【特許文献 19】	米国特許第5057495号	
【特許文献 20】	米国特許第5057603号	
【特許文献 21】	米国特許第5091366号	
【特許文献 22】	米国特許第5095004号	20
【特許文献 23】	米国特許第5106834号	
【特許文献 24】	米国特許第5114923号	
【特許文献 25】	米国特許第5159061号	
【特許文献 26】	米国特許第5204328号	
【特許文献 27】	米国特許第5212286号	
【特許文献 28】	米国特許第5352587号	
【特許文献 29】	米国特許第5376635号	
【特許文献 30】	米国特許第5418219号	
【特許文献 31】	米国特許第5665704号	
【特許文献 32】	米国特許第5846932号	30
【特許文献 33】	米国特許第5583108号	
【特許文献 34】	米国特許第5965533号	
【特許文献 35】	米国特許第6028055号	
【特許文献 36】	米国特許第6083982号	
【特許文献 37】	米国特許第6124430号	
【特許文献 38】	米国特許第6150402号	
【特許文献 39】	米国特許第6407211号	
【特許文献 40】	米国特許第6525022号	
【特許文献 41】	米国特許第6586396号	
【特許文献 42】	米国特許第6818619号	40
【特許文献 43】	米国特許出願公開第2004/0002458号	
【特許文献 44】	米国特許出願公開第2004/0063630号	
【特許文献 45】	米国特許出願公開第2004/0077537号	
【特許文献 46】	米国特許出願公開第2005/0113286号	
【特許文献 47】	米国特許出願公開第2005/0176641号	
【特許文献 48】	米国特許出願公開第2006/0030004号	
【特許文献 49】	国際公開第85/04870号	
【特許文献 50】	国際公開第85/04872号	
【特許文献 51】	国際公開第88/03537号	
【特許文献 52】	国際公開第88/06596号	50

- 【特許文献 5 3】国際公開第89/10935号
- 【特許文献 5 4】国際公開第89/05654号
- 【特許文献 5 5】国際公開第90/01940号
- 【特許文献 5 6】国際公開第90/14362号
- 【特許文献 5 7】国際公開第92/06998号
- 【特許文献 5 8】国際公開第95/13296号
- 【特許文献 5 9】国際公開第99/08510号
- 【特許文献 6 0】国際公開第99/12576号
- 【特許文献 6 1】国際公開第01/016295号
- 【特許文献 6 2】国際公開第2004/047871号 10
- 【特許文献 6 3】国際公開第2005/072055号
- 【特許文献 6 4】EP00291999号
- 【特許文献 6 5】EP00323740号
- 【特許文献 6 6】EP00341603号
- 【特許文献 6 7】EP00350318号
- 【特許文献 6 8】EP00356124号
- 【特許文献 6 9】EP00385476号
- 【特許文献 7 0】EP00497368号
- 【特許文献 7 1】EP00524863号
- 【特許文献 7 2】米国特許第5583108号 20
- 【特許文献 7 3】米国特許第6407211号
- 【特許文献 7 4】米国特許第6818619号
- 【特許文献 7 5】米国特許第5672662号
- 【特許文献 7 6】米国特許第6737505号
- 【特許文献 7 7】米国特許出願公開第2004/0235734号
- 【特許文献 7 8】米国特許第5567662号
- 【特許文献 7 9】米国特許第5932462号
- 【特許文献 8 0】米国特許第5359030号
- 【特許文献 8 1】米国特許第5681811号
- 【特許文献 8 2】米国特許第6309633号 30
- 【特許文献 8 3】米国特許第6858580号
- 【特許文献 8 4】米国公開特許出願第2004/0203081号
- 【特許文献 8 5】米国特許第5693608号
- 【特許文献 8 6】米国特許第5977070号
- 【特許文献 8 7】米国特許第5908825号
- 【特許文献 8 8】米国特許第4938763号
- 【特許文献 8 9】米国特許第6432438号
- 【特許文献 9 0】米国特許第6673767号
- 【特許文献 9 1】国際公開第2003/079979号
- 【特許文献 9 2】米国特許出願公開第2006/0019890号 40
- 【特許文献 9 3】米国特許出願公開第2006/0034903号
- 【特許文献 9 4】国際公開第00/18422号
- 【非特許文献 1】Tervonen V、Ruskoaho H、Lecklin T、Ilves M、Vuolteenaho O. Salmo n cardiac natriuretic peptide is a volume-regulating hormone. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283:E353 ~ 61頁(2002年)
- 【非特許文献 2】Takei Y、Fukuzawa A、Itahara Y、Watanabe TX、Yoshizawa Kumagaye K、Nakajima K、Yasuda A、Smith MP、Duff DW、Olson KR. A new natriuretic peptide isolated from cardiac atria of trout, *Oncorhynchus mykiss*. FEBS Lett. 414:377 ~ 80 頁(1997年)
- 【非特許文献 3】Schweitz H、Vigne P、Moinier D、Frelin C、Lazdunski M. A new mem 50

ber of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J. Biol. Chem.* 267:13928 ~ 32頁(1992年)

【非特許文献 4】Lisy O、Jougasaki M、Heublein DM、Schirger JA、Chen HH、Wennberg PW、Burnett JC. Renal actions of synthetic dendroaspis natriuretic peptide, *Kidney Int.* 56:502 ~ 8頁(1999年)

【非特許文献 5】Fry BG、Wickramaratana JC、Lemme S、Beuve A、Garbers D、Hodgson WC、Alewood P. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland (*Oxyuranus microlepidotus*); isolation, chemical and biological characterization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 327:1011 ~ 1015頁(2005年)

【非特許文献 6】Schmitt M、Cockcroft J.R、およびFrenneaux M.P. Modulation of the natriuretic peptide system in heart failure: from bench to bedside? *Clinical Science*、105:141 ~ 160頁(2003年) 10

【非特許文献 7】Li B、Tom JY、Oare D、Yen R、Fairbrother WJ、Wells JA、Cunningham BC、Minimization of a polypeptide hormone. *Science* 270:1657 ~ 60頁(1995年)

【非特許文献 8】Veronese FMおよびPasut G. PEGylation、successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* 10:1451 ~ 1458頁(2005年)

【非特許文献 9】*Synthetic Peptides :A User's Guide*、G.A.Grant編、W.H.Freeman & Co.、New York(1992年)

【非特許文献 10】Hruby V. J.、Al-obeidi F.、Kazmierski W.、*Biochem. J.* 268:249 ~ 262頁(1990年) 20

【非特許文献 11】Toniolo C.、*Int. J. Peptide Protein Res.* 35:287 ~ 300頁(1990年)

【非特許文献 12】*Manual of Patent Examining Procedure*、第8版の2400章

【非特許文献 13】Cheng Y.、Prusoff W.H.、*Biochem. Pharmacol.* 22:3099 ~ 3108頁(1973年)

【非特許文献 14】Merrifield R.B.、Solid phase synthesis(Nobel lecture)、*Angew. Chem.* 24:799 ~ 810頁(1985年)

【非特許文献 15】Baranyら、*The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology*、Vol.2、Gross E. およびMeienhofer J.編、Academic Press、1 ~ 284頁(1980年)

【非特許文献 16】Clark J.S.およびMiddleton M.D.: Synthesis of novel alpha-substituted and alpha,alpha-disubstituted amino acids by rearrangement of ammonium ylides generated from metal carbenoids. *Org. Lett.* 4(5):765-8(2002) 30

【非特許文献 17】Guino M.、Hii K.K.: Wang-aldehyde resin as a recyclable support for the synthesis of alpha,alpha-disubstituted amino acid derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 3(17):3188-93(2005)

【非特許文献 18】Kotha S.、Behera M.: Synthesis and modification of dibenzylglycine derivatives via the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction. *J. Pept. Res.* 64(2):72-85(2004)

【非特許文献 19】Barn D.R.、Morphy J.R.、Rees D.C. Synthesis of an array of amides by aluminum chloride assisted cleavage of resin-bound esters. *Tetrahedron Lett.* 37、3213 ~ 3216頁(1996年) 40

【非特許文献 20】DeGrado W.F. Kaiser E.T. Solid-phase synthesis of protected peptides on a polymer bound oxime: Preparation of segments comprising the sequence of a cytotoxic 26-peptide analogue. *J. Org. Chem.* 47:3258 ~ 3261頁(1982年)

【非特許文献 21】*Data Sciences International's Multiplus TL Series Device Surgical Manual* 2000:3.1 ~ 3.10頁

【非特許文献 22】Flaim, S.F.、W.J. Minter、S.H. Nellis、およびD.P. Clark:Chronic arteriovenous shunt:evaluation of a model for heart failure in rat、*Am.J.Physiol.* 236:H698 ~ H704頁(1979年)

【非特許文献 23】Garcia, R.およびS. Diebold:Simple, rapid and effective method of producing aortocaval shunts in the rat *Cardiovasc. Res.* 24:430 ~ 432頁(1990年) 50

【非特許文献 2 4】Clemens, L.E., R.G. Almirez, K.A.Baudouin, E.B. GrossbardおよびA.A. Protter:Human brain natriuretic peptide reduces blood pressure in normotensive and acute norepinephrine-induced hypertensive rabbits、Am. J. Hypertens. 10:654 ~ 661頁(1997年)

【非特許文献 2 5】Abassi, Z.A., J.R. Powell, E. Golomb, およびH.R. Keiser:Renal and systemic effects of urodilatin in rats with high-output heart failure、Am.J. Physiol. 262:F615 ~ F621頁(1992年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

10

開発されてきた多くの化合物にもかかわらず、市販化されているか、または活発な臨床開発にあるものは事実上存在しない。1種または複数の治療適応に有効であり、かつ好ましくは外来患者基準で投与し得る、改善された効能、半減期、投与方式、バイオアベイラビリティまたは作用の長期持続を含む改善された特性を有する製品への実質的な必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

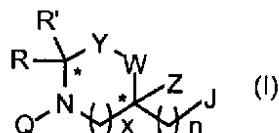
【0013】

1つの態様において、本発明では、限定されないが、ANP、BNP、CNP、sCP、DNP、TNP-a、TNP-bまたはTNP-cに対する受容体を含む、ナトリウム利尿ペプチドに対する受容体に結合する線状構築物が提供され、ここで、このような構築物には、複数のアミノ酸残基および一般式I:

20

【0014】

【化1】



【0015】

(式中、RおよびR'は、それぞれ独立に、Hあるいは天然もしくは非天然のアミノ酸側鎖部分またはアミノ酸側鎖部分の誘導体であり;xは、1または2であり;Yは、CH<sub>2</sub>またはC=Oであり;Xは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり;Zは、HまたはCH<sub>3</sub>であり;nは、0、1または2であり;代用物が構築物のC-末端位置にない場合、Jは、-C(=O)-であり、ある場合、Jは、-H、-OH、-C(=O)-OH、-C(=O)-NH<sub>2</sub>またはC-末端キャッピング基であり;代用物が構築物のN-末端位置にない場合、Qは結合であり、ある場合、Qは、-Hもしくはアミンキャッピング基であり;R'''は、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、C<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪酸族、またはC<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪酸族アシルであり;場合によって、アミノ残基の少なくとも1個の側鎖の反応基、代用物が構築物のN-末端位置にあるアミンキャッピング基、または代用物が構築物のC-末端位置にあるC-末端キャッピング基に共有結合した少なくとも1つの補欠分子族を含み;アスタリスクで印した炭素原子は任意の立体化学配置を有し得る)の少なくとも1つのアミノ酸代用物が含まれる。

30

40

【0016】

場合による補欠分子族(複数可)には、1個または複数の炭素原子および水素原子、ならびに場合によって、酸素を含む他の原子を含む繰返し単位を含むポリマー基が含まれる。このようなポリマー基は、好ましくは、水溶性ポリマーであり、好ましくは、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリオキサゾリンまたはポリアクリロイルモルホリンである。好ましいポリアルキレンオキシドは、場合によって結合基で誘導体化されている、ポリエチレングリコール(PEG)である。

【0017】

50



1つの態様において、Jは、

- $(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2)$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ 、  
 - $\text{O}-(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ 、  
 - $\text{O}-(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2)$ 、  
 - $\text{O}-(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})\text{-NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})\text{-NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2)$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})\text{-N}-((\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2))_2$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})\text{-NH-CH}(\text{-C}(=\text{O})\text{-OH})-(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2)$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})\text{-NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(=\text{O})\text{-CH}(\text{N}(v_1)(v_2))((\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2))$ 、または  
 - $\text{C}(=\text{O})\text{-NH-CH}(\text{-C}(=\text{O})\text{-N}(v_1)(v_2))-(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_1)(v_2)$

10

(これらは、前記の全ての(R)または(S)配置を含み、ここで、 $v_1$ および $v_2$ は、それぞれ独立に、Hまたは $\text{C}_1 \sim \text{C}_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖であり、 $m$ は、それぞれの場合に、独立に0~17である)

から選択されるC-末端キャッピング基である。

#### 【0018】

該アミノ酸代用物が該構築物のC-末端位置にあるもう1つの態様において、Jは、場合によって上記に定義された通りのC-末端キャッピング基と組み合わせて、オメガアミノ脂肪酸族、末端アリール基もしくはアラルキル基、あるいは任意の単一の天然もしくは非天然の-アミノ酸、-アミノ酸、または、-二置換アミノ酸(該置換基が異なる、-二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)からなるC-末端キャッピング基である。

20

#### 【0019】

もう1つの態様において、Qは、

- $(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_3)(v_4)$ 、  
 - $(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ 、  
 - $(\text{CH}_2)_m\text{-O}(v_3)$ 、  
 - $(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})-(v_3)$ 、  
 - $(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})-\text{O}-(v_3)$ 、  
 - $(\text{CH}_2)_m\text{-S}(v_3)$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-CH}_3$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-N}(v_3)(v_4)$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-C}(=\text{O})-(v_3)$ 、  
 - $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-O}(v_3)$ 、または  
 - $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-S}(v_3)$

30

(ここで、 $v_3$ および $v_4$ は、それぞれ独立に、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖または $\text{C}_2 \sim \text{C}_{19}$ 直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖であり(ただし、 $v_3$ または $v_4$ の一方がアルキルアシル鎖である場合、 $v_3$ または $v_4$ の他方はHであることを条件とする)、 $m$ は0~17である)

40

から選択されるアミンキャッピング基である。

#### 【0020】

1つの関連する態様において、式Iのアミノ酸代用物は該構築物のC末端位置にあり、RおよびR'の少なくとも一方は、天然もしくは非天然のアミノ酸側鎖部分または少なくとも1個の窒素原子を含むヘテロ原子基を有するアミノ酸側鎖部分の誘導体であり、RおよびR'の残りの一方は、Hあるいは天然もしくは非天然のアミノ酸側鎖部分またはアミノ酸側鎖部分の誘導体である。

#### 【0021】

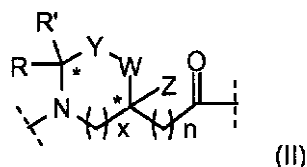
1つの関連する実施形態において、本発明では、限定されないが、ANP、BNP、CNP、sCP、DNP、TNP-a、TNP-bまたはTNP-cに対する受容体を含むナトリウム利尿ペプチドに対する

50

受容体に結合する構築物が提供され、ここで、このような構築物には、複数のアミノ酸残基およびC-末端位置またはN-末端位置以外の任意の位置にあり、2つのペプチド結合によって共有結合され、式II:

【0022】

【化2】



10

【0023】

(式中、RおよびR'は、それぞれ独立に、Hあるいは天然もしくは非天然のアミノ酸側鎖部分またはアミノ酸側鎖部分の誘導体であり;xは1または2であり;YはCH<sub>2</sub>またはC=Oであり;Wは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり;ZはHまたはCH<sub>3</sub>であり;R'''は、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、C<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖または分岐のアルキルアシル鎖、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族、またはC<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>の直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族アシルであり;nは、0、1または2であり;アスタリスクで印した炭素原子は、任意の立体化学配置を有することができ;破線は、ペプチド結合を形成する結合を示す)の少なくとも1つのアミノ酸代用物が含まれる。

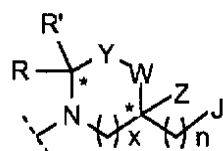
20

【0024】

式Iの代用物が構築物のC-末端にある場合、代用物が式:

【0025】

【化3】



30

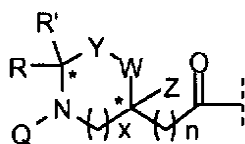
【0026】

(式中、破線はペプチド結合を形成する結合を示す)

を有するように、単一のペプチド結合によってそれに共有結合される。代用物が構築物のN-末端にある場合は、好ましくは式Iのものであり、代用物が式:

【0027】

【化4】



40

【0028】

(式中、破線はペプチド結合を形成する結合を示す)

を有するように、単一のペプチド結合によってそれに共有結合される。しかし、代用物が構築物のN-末端またはC-末端以外にある場合は、好ましくは式IIのものであり、2つのペプチド結合によって構築物に共有結合される。

【0029】

本発明の異なる実施形態において、1つのアミノ酸代用物を本発明の構築物に用いてもよく、2つのアミノ酸代用物を本発明の構築物に用いてもよく、または3つ以上のアミノ酸代用物を本発明の構築物に用いてもよい。

【0030】

もう1つの好ましい実施形態において、本発明では、アミノ酸残基間の1つまたは複数の

50

ペプチド結合が非ペプチド結合で置換される構築物が提供される。

【0031】

本発明の第1の目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

【0032】

本発明のもう1つの目的は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、環-拘束アミノ酸代用物によって置換されるナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

【0033】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、哺乳類に投与後、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列に比べて1つまたは複数の利点を示し、該利点は、酵素的分解に対する耐性増加、循環半減期増加、バイオアベイラビリティ増加、効果増加、作用の長期持続および前記の組合せからなる群から選択される。

10

【0034】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の同じ濃度の最大cGMP刺激活性の少なくとも10%を有する。

【0035】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の同じ濃度の最大cGMP刺激活性の少なくとも50%を有する。

20

【0036】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の同じ濃度の最大cGMP刺激活性の少なくとも100%を有する。

【0037】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の同じ濃度の最大cGMP刺激活性の100%を超える刺激活性を有する。

【0038】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、 $K_i$  (nM) 値で測定して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の $K_i$  (nM) 値に比べて2の対数次数以下の平衡受容体結合親和性を有する。

30

【0039】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、 $K_i$  (nM) 値で測定して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の $K_i$  (nM) 値に比べて3倍以下の平衡受容体結合親和性を有する。

【0040】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、 $K_i$  (nM) 値で測定して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の $K_i$  (nM) 値に比べて等しいか、またはそれ未満の平衡受容体結合親和性を有する。

40

【0041】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、 $K_i$  (nM) 値で測定して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の $K_i$  (nM) 値未満の平衡受容体結合親和性を有する。

【0042】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、ナトリウム利尿ペプチド受容体に関して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の受容体結合親和性を超える受容体結合親和性を有する。

【0043】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり

50

、ここで、該構築物は、ある期間にわたる血圧低下または尿量増加によって測定して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の同じ用量に比べて少なくとも同様に効果があるか、またはより効果がある生物学的効果を有する。

【0044】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、該構築物は、ある期間にわたる血圧低下または尿量増加によって測定して、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列の同じ用量に比べて少なくとも同様に効果があるか、またはより効果がある生物学的効果を有する。

【0045】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、ナトリウム利尿ペプチドの配列と少なくとも約60%の相同性を有する。

10

【0046】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、ナトリウム利尿ペプチドの配列と少なくとも約80%の相同性を有する。

【0047】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、ANP、BNP、CNP、sCP、DNP、TNP-a、TNP-bまたはTNP-cに対する受容体に結合するペプチドの配列と少なくとも約60%の相同性を有する。

20

【0048】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、ANP、BNP、CNP、sCP、DNP、TNP-a、TNP-bまたはTNP-cに対する受容体に結合するペプチドの配列と少なくとも約80%の相同性を有する。

【0049】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することがであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、配列H-Met-Xaa-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Xaa-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>(配列番号2)(ここで、Xaaは、それぞれ独立に、任意のアミノ酸残基である)と少なくとも約60%の相同性を有する。

30

【0050】

本発明のもう1つの目的は、ナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することがであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、配列H-Met-Xaa-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Xaa-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>(配列番号2)(ここで、Xaaは、それぞれ独立に、任意のアミノ酸残基である)と少なくとも約80%の相同性を有する。

【0051】

本発明のもう1つの目的は、本明細書において定義された通りの代用物を含むナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、ANPに対する受容体に結合するペプチドである。

40

【0052】

本発明のもう1つの目的は、本明細書において定義された通りの代用物を含むナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することであり、ここで、アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、BNPに対する受容体に結合するペプチドである。

【0053】

本発明のもう1つの目的は、ANPまたはBNPの天然または組換え形態より大きいバイオアベイラビリティおよび半減期を有するナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

【0054】

本発明のもう1つの目的は、鬱血性心不全を有する患者に投与し得るナトリウム受容体-

50

特異的構築物を提供することである。

【0055】

本発明のもう1つの目的は、静脈内投与に加えて少なくとも1の経路の投与によって投与し得るナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

【0056】

本発明のもう1つの目的は、皮下または筋内注射によって患者に投与し得るナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

【0057】

本発明のもう1つの目的は、分解に対する増加した耐性を有するが、受容体に対して顕著に高い結合親和性を有するナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

10

【0058】

本発明のもう1つの目的は、持続放出配合のナトリウム利尿受容体-特異的構築物を提供することである。

【0059】

本発明の他の目的、利点および新規な特徴、ならびにさらなる利用性の範囲は、一部は以下に続く詳細な説明において記載され、一部は、以下の実験後当業者に明らかになり、または本発明の実施によって知ることができる。本発明の目的および利点は、特に添付の請求項で指摘される手段および組合せによって実現および達成することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0060】

本発明では、複数のアミノ酸残基および少なくとも1つの環-拘束アミノ酸代用物から構成されるナトリウム利尿受容体-特異的構築物が提供される。本発明に用いられる環-拘束アミノ酸代用物は、好ましくは、それらをFmocなどの保護基を用いる従来のアミノ保護N-末端、および反応性カルボキシルC-末端で作製できるようなものであり、したがって、従来のペプチド合成法で用いることができ、アミノ酸代用物が構築物のC-末端位置にある場合、カルボキシル末端以外のものがこのような代用物で用いることができることが理解される。したがって、好ましい実施形態において、本発明では、必要に応じて改変されたペプチド合成法を用いて合成され、複数のアミノ酸残基および少なくとも1つの環-拘束アミノ酸代用物を含む合成的に作製された構築物が提供される。

30

【0061】

構築物は、1つまたは複数の補欠分子族を場合によって含んでもよい。好ましい補欠分子族には、1個または複数の炭素原子および水素原子、ならびに場合によって、酸素を含む他の原子を含む繰返し単位を含むポリマー基が含まれる。このようなポリマー基は、好ましくは、水溶性ポリマー、および、好ましくはポリアルキレンオキシド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリオキサゾリンまたはポリアクリロイルモルホリンである。好ましいポリアルキレンオキシドは、場合によって結合基で誘導体化されたポリエチレングリコール(PEG)である。

【0062】

1つの態様において、本発明では、ANPもしくはBNPなどの知られたナトリウム利尿ペプチドのホモログ、またはナトリウム利尿ペプチドの任意の知られたペプチド変異体のホモログであるアミノ酸配列を有する構築物が提供され、ここで、該構築物には、式IまたはI'の少なくとも1つのアミノ酸代用物が含まれる。アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列は、知られたナトリウム利尿ペプチドまたは知られたペプチド変異体と同一であってもよく、それらと相同性であってもよく、例えば、少なくとも60%相同性であるか、またはより好ましくは少なくとも約80%相同性である対応するアミノ酸配列である。本明細書において用いられるように、語句「アミノ酸代用物を含まない対応するアミノ酸配列」は、ナトリウム利尿ペプチドに対する受容体に結合し、かつ代用物を含まない知られたアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を意味する。このような知られたアミノ酸配列は、該アミノ酸配列が1つまたは複数のアミノ酸代用物による置換または付加を除いて同じである

40

50

場合、構築物と同一である。同様に、1つまたは複数のアミノ酸代用物による置換または付加を除いて構築物と知られたアミノ酸配列の同一性に対して照合することによって、相同性を決定する。

#### 【0063】

もう1つの態様において、本発明では、ナトリウム利尿ペプチドに対する受容体に結合するが、1つまたは複数のアミノ酸代用物、例えば、知られたペプチドに含まれる1つまたは複数のアミノ酸残基の代りに置換されているか、または知られたペプチドを含む配列に加えられている代用物を含む知られたペプチドをモデルに作られる構築物が提供される。該知られたペプチドは、当該技術分野で知られた任意のナトリウム利尿ペプチドであることができ、これらには、限定されないが、米国特許第4496544号；同第4609725号；同第4656158号；同第4673732号；同第4716147号；同第4757048号；同第4764504号；同第4804650号；同第4816443号；同第4824937号；同第4861755号；同第4904763号；同第4935492号；同第4952561号；同第5047397号；同第5057495号；同第5057603号；同第5091366号；同第5095004号；同第5106834号；同第5114923号；同第5159061号；同第5204328号；同第5212286号；同第5352587号；同第5376635号；同第5418219号；同第5665704号；同第5846932号；同第5583108号；同第5965533号；同第6028055号；同第6083982号；同第6124430号；同第6150402号；同第6407211号；同第6525022号；同第6586396号もしくは同第6818619号；米国特許出願公開第2004/0002458号；同第2004/0063630号；同第2004/0077537号；同第2005/01132860号；同第2005/0176641号；もしくは同第2006/0030004号；または国際公開第85/04870号；同第85/04872号；同第88/03537号；同第88/06596号；同第89/10935号；同第89/05654号；同第90/01940号；同第90/14362号；同第92/06998号；同第95/13296号；同第99/08510号；同第99/12576号；同第01/016295号；同第2004/047871号；同第2005/072055号；EP00291999号；同0323740号；同0341603号；同0350318号；同0356124号；同0385476号；同0497368号；または同052863号を含む様々な非米国特許および特許出願に開示されたナトリウム利尿ペプチドを含む、限定されないが、本明細書に引用される任意の刊行物、特許、出願または参考文献に開示されたものが含まれる。1つの態様において、該知られたペプチドは、米国特許第4656158号、同第4824937号、同第4935492号、同第5159061号、同第5204328号、同第5376635号、同第5665704号、同第5846932号、同第6028055号、同第6407211号、同第6525022号、同第6586396号、もしくは同第6818619号、米国特許出願公開第2004/0002458号、同第2004/0063630号、もしくは同第2005/0176641号、または国際特許出願公開第2004/047871号もしくは同第2005/072055号に開示されたペプチドまたはそれらのホモログである。前記の特許および特許出願のそれぞれの教示は、全部記載されたように参照により組み込まれる。

#### 【0064】

1つの特に好ましい実施形態において、本発明では、ナトリウム利尿ペプチド受容体に結合するアミノ酸配列を含む構築物が提供され、ここで、ナトリウム利尿ペプチド受容体に結合するこのようなアミノ酸配列における1つまたは複数のアミノ酸残基は、式Iのアミノ酸代用物で置換されている。1つの態様において、ナトリウム利尿ペプチド受容体に結合するアミノ酸配列は、置換前に、H-Met-Xaa-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Xaa-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub> (配列番号2)であり、ここで、Xaaは、それぞれ独立に、任意のアミノ酸残基である。

#### 【0065】

さらにもう1つの態様において、本発明では、ANPまたはBNPに対する受容体を含むナトリウム利尿ペプチドに対する受容体に結合し、式IまたはIIの少なくとも1つのアミノ酸代用物を含む構築物が提供されるが、しかしこの構築物は、ナトリウム利尿ペプチドに対する受容体に結合する任意の知られたペプチドと相同ではない。

#### 【0066】

1つの実施形態において、本発明では、式III:

Aaa<sup>1</sup>-Aaa<sup>2</sup>-Aaa<sup>3</sup>-Aaa<sup>4</sup>-Aaa<sup>5</sup>-Aaa<sup>6</sup>-Aaa<sup>7</sup>-Aaa<sup>8</sup>-Aaa<sup>9</sup>-Aaa<sup>10</sup>-Aaa<sup>11</sup>-Aaa<sup>12</sup>-Aaa<sup>13</sup>-Aaa<sup>14</sup>-Aaa<sup>15</sup>(III)

[式中、Aaa<sup>1</sup>は、任意の -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、または

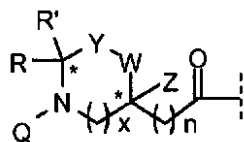
任意の  $\alpha$ 、 $\beta$ -二置換アミノ酸であり、Aaa<sup>1</sup>が、(Nle、Ala、Arg、Phe、Lys、Tyr、Asp、Leu、Ile、Val、Nva、Met、Met(O)、もしくはMet(O<sub>2</sub>))を含むまたはそれらから誘導される)

$\alpha$ -アミノ酸もしくは  $\beta$ -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはNle、Ala、Arg、Phe、Lys、Tyr、Asp、Leu、Ile、Val、Nva、Met、Met(O)、もしくはMet(O<sub>2</sub>)から誘導される任意の  $\alpha$ 、 $\beta$ -二置換アミノ酸(該置換基が異なる  $\alpha$ 、 $\beta$ -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)である場合を含み、あるいはAaa<sup>1</sup>は、アシルであり、ここで、該有機基は、C<sub>2</sub>~C<sub>18</sub>直鎖アルキル、C<sub>3</sub>~C<sub>17</sub>分岐アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>18</sub>直鎖アルケニルもしくはアルキニルまたはC<sub>3</sub>~C<sub>18</sub>分岐アルケニルもしくはアルキニルであるか、あるいは、Aaa<sup>1</sup>は、構造:

【0067】

【化5】

10



【0068】

(式中、破線は、ペプチド結合を示し;RおよびR'は、独立に、H、直鎖もしくは分岐のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>脂肪族鎖、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(=O)-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(O<sub>2</sub>)-CH<sub>3</sub>、結合と(シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、またはシクロヘキサン環)、またはC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>脂肪族鎖と(シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、もしくはシクロヘキサン環)であり;xは1または2であり;YはCH<sub>2</sub>またはC=Oであり;Wは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり;ZはHまたはCH<sub>3</sub>であり;Qは、-H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>3</sub>)(v<sub>4</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O(v<sub>3</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(v<sub>3</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-O-(v<sub>3</sub>)、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S(v<sub>3</sub>)、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(v<sub>3</sub>)(v<sub>4</sub>)、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(v<sub>3</sub>)、-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O(v<sub>3</sub>)、または-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S(v<sub>3</sub>)であり;R'''は、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、C<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族、またはC<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族アシルであり;nは、0、1または2であり;mは0~17であり;yは1~5であり;v<sub>3</sub>およびv<sub>4</sub>は、それぞれ独立に、H、C<sub>1</sub>~C<sub>17</sub>直鎖もしくは分岐のアルキル鎖またはC<sub>2</sub>~C<sub>19</sub>直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖であり(v<sub>3</sub>またはv<sub>4</sub>の一方が、アルキルアシル鎖である場合、v<sub>3</sub>またはv<sub>4</sub>の他方はHであることを条件とする);アスタリスクで印した炭素原子は、任意の立体化学配置を有することができる)

20

30

のアミノ酸代用物である場合も含み;

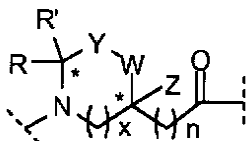
【0069】

Aaa<sup>2</sup>は、Gly、Sar、(Ala、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される)  $\alpha$ -アミノ酸もしくは  $\beta$ -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される  $\alpha$ 、 $\beta$ -二置換アミノ酸(該置換基が異なる  $\alpha$ 、 $\beta$ -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>2</sup>は、構造:

【0070】

【化6】

40



【0071】

(式中、RおよびR'は、独立に、H、あるいはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘导体であり;xは1または2であり;YはCH<sub>2</sub>またはC=Oであり;Wは、CH<sub>2</sub>、NHまたはNR'''であり;ZはHまたはCH<sub>3</sub>であり;R'''は、アシ

50

ル、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、 $C_2 \sim C_{19}$ 直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族、または $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪族アシルであり； $n$ は、0、1または2である）

のアミノ酸代用物であり；

【0072】

Aaa<sup>3</sup>は、(His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、DapもしくはDabを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはHis、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Dap、もしくはDabから誘導された、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>3</sup>は、(RおよびR'が、独立に、HあるいはHis、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、DapもしくはDabのアミノ酸側鎖部分であるか、またはHis、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、DapもしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

10

【0073】

Aaa<sup>4</sup>は、(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、または(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleから誘導される)、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>4</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、または置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Nle、NvaもしくはTleのアミノ酸側鎖部分、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Nle、NvaもしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

20

【0074】

Aaa<sup>5</sup>は、Gly、Sar、(Alaを含むもしくはそれから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAlaから誘導される、 -二置換アミノ酸であるAibであるか、あるいはAaa<sup>5</sup>は、(RおよびR'は、独立に、Hまたは-CH<sub>3</sub>である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

30

【0075】

Aaa<sup>6</sup>は、Gly、Sar、(Alaを含むもしくはそれから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAibであるか、あるいはAaa<sup>6</sup>は、(RおよびR'が、独立に、Hまたは-CH<sub>3</sub>である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

【0076】

Aaa<sup>7</sup>は、(Arg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Cit、Abu、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはArg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Cit、Abu、Dap、もしくはDabから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>7</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはArg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Abu、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはArg、His、Ala、Ser、HSer、Thr、Lys、HLys、Orn、Cys、HCys、Abu、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

40

【0077】

Aaa<sup>8</sup>は、Gly、(Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>))、もしくはTleを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>))、もしくはTleから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>8</sup>は、(RおよびR'は、独立に、H、あるいはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>))、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分、

50



またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

【 0 0 7 8 】

Aaa<sup>9</sup>は、(Asp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAsp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいは、Aaa<sup>9</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはAsp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはAsp、Glu、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Met(O<sub>2</sub>)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

10

【 0 0 7 9 】

Aaa<sup>10</sup>は、(Arg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Cit、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはArg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>10</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはArg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Cit、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、またはArg、His、Ala、Ser、Thr、Lys、HLys、Cys、HCys、Met(O)、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

20

【 0 0 8 0 】

Aaa<sup>11</sup>は、Gly、または(Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>11</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分、またはNle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

30

【 0 0 8 1 】

Aaa<sup>12</sup>は、Gly、(Ser、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはSer、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>12</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはSer、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分、またはSer、Nle、Ile、Leu、Val、Phe、Ala、Nva、Arg、Lys、Orn、Cys、HCys、AbuもしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのようなアミノ酸代用物であり；

40

【 0 0 8 2 】

Aaa<sup>13</sup>は、Gly、Sar、(Ala、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のL-もしくはD-異性体、またはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabから誘導される、 -二置換アミノ酸(該置換基が異なる、 -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>13</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいはAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、もしくはDabのアミノ酸側鎖部分、あるいは置換または非置換のAla、Nle、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Orn、Dap、も

50

しくはDabのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのような式IIの構造のアミノ酸代用物であり;

【0083】

Aaa<sup>14</sup>は、(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleを含むあるいはそれらから誘導される) -アミノ酸または -アミノ酸のL-またはD-異性体、または(置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleから誘導される) , -二置換アミノ酸(該置換基が異なる , -二置換アミノ酸の全ての(R)または(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>14</sup>は、(RおよびR'が、独立に、H、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分、あるいは置換または非置換のPhe、HPheもしくはPgl、またはTyr、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Orn、Nle、Nva、もしくはTleのアミノ酸側鎖部分の誘導体である)Aaa<sup>2</sup>についてのような式IIの構造のアミノ酸代用物であり;

10

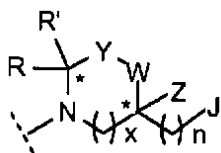
【0084】

Aaa<sup>15</sup>は、(Arg、Orn、Lys、Ala、Dap、Dab、HArg、もしくはHLysを含むまたはそれらから誘導される) -アミノ酸もしくは -アミノ酸のD-もしくはL-異性体、またはArg、Orn、Lys、Ala、Dap、Dab、HArg、もしくはHLysから誘導される , -二置換アミノ酸(該置換基が異なる , -二置換アミノ酸の全ての(R)もしくは(S)配置を含む)であるか、あるいはAaa<sup>15</sup>は、構造:

20

【0085】

【化7】



【0086】

(式中、破線は、ペプチド結合を示し;RおよびR'の少なくとも一方は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-R''であり、一方がそうであれば、RおよびR'の残りは、Hであり;ここで、R''は、

30

-NH<sub>2</sub>、

-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、

-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、

-NH-C(=O)-NH<sub>2</sub>、

-C(=O)-NH<sub>2</sub>、

-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、

-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-NH<sub>2</sub>、

-NH-C(=NH)-NH-Me、

-NH-C(=NH)-NH-Et、

-NH-C(=NH)-NH-Pr、

-NH-C(=NH)-NH-Pr-i、

40

-NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>、

-NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、

-NH-C(=O)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、

-NH-C(=O)-O-CH<sub>3</sub>、

-NH-C(=O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、

-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、

-NH-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>、

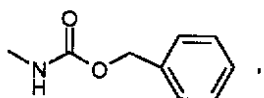
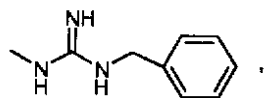
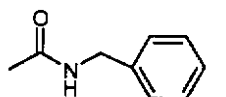
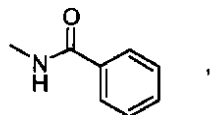
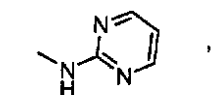
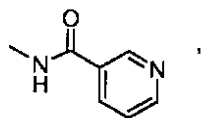
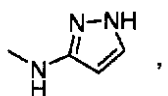
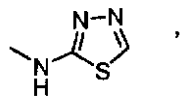
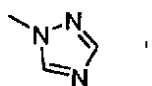
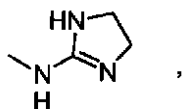
-NH-C(=N-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、

-N(C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)-C(=NH)-NH-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、

【0087】

50

【化 8 A】



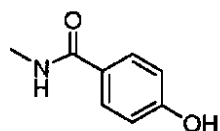
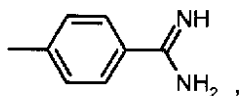
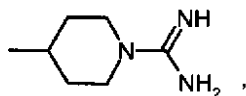
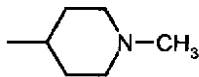
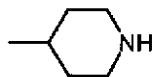
【 0 0 8 8 】

10

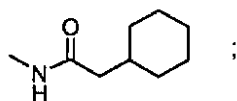
20

30

## 【化 8 B】



または



10

20

## 【0089】

( $x$ は1または2であり; $Y$ は $CH_2$ または $C=O$ であり; $W$ は、 $CH_2$ 、 $NH$ または $NR''''$ であり; $Z$ は $H$ または $CH_3$ であり; $J$ は、 $-H$ 、 $-(CH_2)_m-OH$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-OH$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-O-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-O-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-O-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-O-(CH_2)_m-OH$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-N-((CH_2)_m-N(v_1)(v_2))_2$ 、 $-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-OH)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-NH-C(=O)-CH(N(v_1)(v_2))((CH_2)_m-N(v_1)(v_2))$ 、 $-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-N(v_1)(v_2))-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、オメガアミノ脂肪酸族、末端アリール基またはアラルキル基、 $J$ を定義する前記の基の1個との組合せの任意の単一の天然または非天然の  $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸または  $\gamma$ -アミノ酸、あるいは前記の任意の全ての(R)および(S)配置を含む任意の単一の天然または非天然の  $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸または  $\gamma$ -アミノ酸であり; $R''''$ は、アシル、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、 $C_2 \sim C_{19}$ 直鎖もしくは分岐のアルキルアシル鎖、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪酸族、または $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のオメガアミノ脂肪酸アシルであり; $v_1$ および $v_2$ は、それぞれ独立に、 $H$ 、または $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖であり; $n$ は、0、1または2であり; $m$ は0~17であり; $y$ は1~5であり;アスタリスクで印した炭素原子は、任意の立体化学配置を有することができる)

30

の  $\alpha$ -アミノ酸代用物であり;

$Aaa^1$ から $Aaa^{15}$ の少なくとも1つが、 $\alpha$ -アミノ酸代用物であることを条件とする]の構築物が提供される。

40

## 【0090】

関連する実施形態において、本発明では、少なくとも1つの補欠分子族を有する式IIIの構築物が提供され、ここで、 $Aaa^1 \sim Aaa^{15}$ の1つまたは複数は、上記に定義した通りの  $\alpha$ -アミノ酸代用物であり、以後定義されるように、補欠分子族は、 $Aaa^1$ 、 $Aaa^3 \sim Aaa^{12}$ 、 $Aaa^{14}$ もしくは $Aaa^{15}$ の1つまたは複数における  $\alpha$ -アミノ酸残基側鎖の反応性基、 $Aaa^3 \sim Aaa^{12}$ もしくは $Aaa^{14}$ における  $\alpha$ -アミノ酸代用物の反応性R基またはR'基、直接またはQ基を介して $Aaa^1$ における  $\alpha$ -アミノ酸代用物の末端アミン、 $Aaa^{15}$ における  $\alpha$ -アミノ酸代用物の反応性末端カルボキシル、あるいは $Aaa^{15}$ における  $\alpha$ -アミノ酸代用物のJの一部を形成する反応性基に結合する。該1つまたは複数の補欠分子族への反応性基は、共有結合され、第一級アミン、第二級

50

アミン、カルボキシル基、チオール基またはヒドロキシル基であり得る。1つの態様において、該補欠分子族は、位置Aaa<sup>1</sup>、Aaa<sup>3</sup>、Aaa<sup>7</sup>、Aaa<sup>10</sup>、Aaa<sup>12</sup>、もしくはAaa<sup>15</sup>における反応性アミン、または前記の組合せにおける反応性アミンに共有結合している。もう1つの態様において、該補欠分子族は、位置Aaa<sup>9</sup>もしくはAaa<sup>15</sup>、または両方における反応性カルボキシルに共有結合している。もう1つの態様において、該補欠分子族は、位置Aaa<sup>3</sup>、Aaa<sup>7</sup>、Aaa<sup>9</sup>、Aaa<sup>10</sup>、Aaa<sup>11</sup>、もしくはAaa<sup>12</sup>、または前記の組合せにおける反応性チオールに共有結合している。

#### 【0091】

式IIIの構築物の好ましい実施形態において、Aaa<sup>1</sup>~Aaa<sup>15</sup>の1つ、2つまたは3つは、前記の式の1つのアミノ酸代用物である。第1の特に好ましい態様において、Aaa<sup>1</sup>、Aaa<sup>5</sup>およびAaa<sup>15</sup>の1つは、アミノ酸代用物である。第2の特に好ましい態様において、Aaa<sup>1</sup>、Aaa<sup>5</sup>およびAaa<sup>15</sup>の2つは、アミノ酸代用物である。第3の特に好ましい態様において、Aaa<sup>1</sup>、Aaa<sup>5</sup>およびAaa<sup>15</sup>のそれぞれは、アミノ酸代用物である。もう1つの特に好ましい態様において、Aaa<sup>1</sup>、Aaa<sup>5</sup>およびAaa<sup>15</sup>の1つ、2つおよび3つは、アミノ酸代用物である。もう1つの特に好ましい態様において、Aaa<sup>1</sup>~Aaa<sup>15</sup>の2つ以上がアミノ酸代用物である場合、該アミノ酸代用物は隣接しておらず、すなわち、それぞれのアミノ酸代用物は、一次配列において間に挿入されている少なくとも1つのアミノ酸残基によって互いに他のアミノ酸代用物から離れている。

#### 【0092】

さらにもう1つの好ましい実施形態において、式IIIの構築物において、Aaa<sup>3</sup>、Aaa<sup>5</sup>、Aaa<sup>6</sup>、Aaa<sup>7</sup>、Aaa<sup>9</sup>、Aaa<sup>10</sup>、またはAaa<sup>12</sup>の少なくとも1つは、AlaのL-またはD-異性体、好ましくは、AlaのL-異性体である。

#### 【0093】

さらにもう1つの実施形態において、本発明では、1つまたは複数の非ペプチド結合をさらに含む式IIIの構築物が提供される。それぞれLysまたはArg残基の前の未変性ペプチド結合を非ペプチド結合、例えば、アミドの等配電子体、置換アミドまたはペプチド類似結合で置き換えることによってトリプシン様プロテアーゼに向けての構築物の生体内安定性を改善するなどの分解に対する本発明の構築物の感受性を低下させるために、非ペプチド結合は用いることができる。1つの特定の実施形態において、未変性のペプチド結合は、逆の極性を有するペプチド結合で置き換えることができる。一般に、任意の非ペプチド結合は、任意の2つの残基間で用いる、または利用することができる。非ペプチド結合には、2つの残基間の結合に参与する炭素原子がカルボニル炭素からメチレン炭素、例えば、非ペプチド結合-CH<sub>2</sub>-NH-またはその等配電子体-NH-CH<sub>2</sub>-、あるいは他の結合の使用、例えば、-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>-O-、もしくは-C(=O)-CH<sub>2</sub>-または前記の任意の等配電子体、あるいは-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-または-CH=CH-に還元される結合が含まれる。一般に、非ペプチド結合には、イミノ、エステル、ヒドラジン、セミカルバジド、オキシム、またはアゾ結合が含まれる。

#### 【0094】

上記に定義された通りの構築物には、1つまたは複数の補欠分子族が含まれ得る。補欠分子族は、循環における滞留時間を調節する、バイオアベイラビリティーを調節する、構築物の免疫原性を調節する、などのために用いることができる。一般に、補欠分子族は、場合によって、滞留時間、バイオアベイラビリティーなどを増加させることによって調節するが、補欠分子族は、滞留時間、バイオアベイラビリティーなどを場合によって減少させ得る。したがって、「補欠分子族」には、該構築物の薬物動態学特性または薬力学特性を改善する目的で構築物についての任意の式の構築物に、例えば、共有結合によって結合された任意の化合物が含まれる。好ましい補欠分子族は、1個または複数の炭素原子および水素原子、ならびに場合によって、酸素原子を含む他の原子を順々に含む繰返し単位を含むポリマー基である。このようなポリマー基は、好ましくは、水溶性ポリマーであり、好ましくは、ポリアルキレンオキシド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリオキサゾリンまたはポリアクリロイルモルホリンである。好ましいポリアルキレンオキシドは、ポリエチレングリコール(PEG)である。PEGに加えて、他のポリアルキレングリ

コールポリマー、例えば、ポリプロピレングリコールおよびポリブチレングリコールを用いることができる。

【0095】

1つの実施形態において、該補欠分子族には、構築物上の反応性基に共有結合した1つまたは複数のPEGポリマーが含まれる。該PEGポリマー、または、他の補欠分子族は、1つまたは複数のアミノ酸残基の側鎖上の反応性基に共有結合してもよいし、アミノ酸代用物上の反応性基に共有結合してもよい。アミノ酸代用物上のこのような反応性基は、QまたはJに直接にまたは1つもしくは複数の中間体を介して共有結合した基を含んでもよいし、あるいは、RまたはR'の一部を形成する反応性基を含んでもよい。

【0096】

PEGが補欠分子族として用いられる場合、該PEGポリマーは、約200MWから約50000MWの分子量を有し得る。該PEGポリマーは、線状であってもよく、線状である場合は、単官能性(一端に反応性基および他端に非反応性基を有する)、同一二官能性(それぞれの端に同一の反応性基を有する)、または異種二官能性(それぞれの端に異なる反応性基を有する)であることができる。他に、該PEGポリマーは、分岐であることができ、一般に「Y」形配置、多枝、例えば、2つ、3つ、4つまたは8つの枝、あるいは当該技術分野で知られた他の配置を有する。該PEGポリマーは、好ましくは、式IIIからXIIIの任意の構築物上の1つまたは複数の規定された基に、好ましくは共有結合によって結合するための少なくとも1個の誘導化反応性基を有する。誘導体化反応性基は、アミノ酸残基の末端基上、アミノ酸残基の側鎖上、代用物のQ基上、代用物のJ基上、または代用物のRもしくはR'基上を含む、構築物上の、例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール、またはカルボキシルに結合することができる。

【0097】

該PEGポリマーは、好ましくは、一端において、末端封止基、例えば、ヒドロキシル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケノキシ、置換アルケノキシ、アルキノキシ、置換アルキノキシ、アリアルオキシまたは置換アリアルオキシを有する。該PEGポリマーは、さらに好ましくは、少なくとも1つの他端において誘導体化反応性基を有する。1つの実施形態において、該PEGポリマーは、末端ヒドロキシル基を有する線状または分岐のポリエーテル、例えば、モノメトキシPEGであり、これは、結合基、例えば、アミン、マレイミドまたはカルボン酸を用いて誘導体化されている。該構築物上で利用可能な反応性基は、該PEGポリマー上で用いられる誘導体化結合基を決定づける。したがって、1つの実施形態において、該構築物のN-末端アミンが用いられ、カルボン酸誘導体化PEGを使用する。もう1つの実施形態において、該構築物のC-末端アミンが用いられ、再度カルボン酸誘導体化PEGを使用する。さらにもう1つの実施形態において、Lys残基またはそのホモログが該構築物に存在する場合、その または アミノ基を用いることができ、再度カルボン酸誘導体化PEGを使用する。マレイミド誘導体化PEGは、該構築物上の反応性チオール基またはヒドロキシル基のいずれかと共に用いることができる。同様に、アミン誘導体化PEGは、任意の末端基もしくはアミノ酸残基の側鎖上、代用物のQ基上、代用物のJ基上、または代用物のRもしくはR'基上の反応性カルボキシル基と共に用いることができる。

【0098】

したがって、1つの態様において、PEGは、1個または複数の電子求引性基で活性化され、側鎖の アミノ基またはN-末端もしくはC-末端アミンへのカップリングを含む、該構築物のアミノ基へのカップリングのために用いることができる。代表的な電子求引性反応性基には、米国特許第5672662号および同第6737505号に開示されるようなスクシンイミジル-メチルブタン酸エステルおよび他の -メチル酪酸エステルが含まれ、米国特許出願公開第2004/0235734号に開示されるようなタンパク質と共に用いることができる。他に、スクシンイミジルプロピオン酸エステルは、米国特許第5567662号に開示されるような反応性基として用いることができ、またはN-ヒドロキシスクシンイミドは、米国特許第5932462号に開示されるような分岐のPEGと共に用いることができる。前述の特許および特許出願のそれぞれの教示は、全部が記載されたように参照により組み込まれる。

## 【0099】

もう1つの態様において、PEGポリマーは、1個または複数の反応性アルデヒド基を備え、末端第一級アミン、例えば、N-末端またはC-末端アミンにカップリングさせるために用いられる。もう1つの態様において、PEGポリマーは、1個または複数のチオール反応性基、例えば、マレイミド、オルト-ピリジルジスルフィド、またはチオール基を備え、該構築物における反応性チオール、例えば、システイン側鎖における反応性チオールまたは構築物のQ基における反応性チオールにカップリングさせるために用いられる。

## 【0100】

1つの態様において、国際公開第2004/047871号に開示されるような任意の方法、結合体、もしくはスキーム、またはそれらに引用された任意の参考文献は、本発明の構築物と共に用いることができる。前述の特許出願の教示は、全部が記載されたように参照により組み込まれる。

10

## 【0101】

一般に、化学的修飾の一部の形態は、反応性基を有する活性PEG誘導体を作製するために用いられる。該反応性基は、活性炭酸エステル、活性エステル、アルデヒド、またはトレスレートであり得る。1つには、該PEGの反応性基は、該PEG誘導体が結合しているアミノ酸末端基または側鎖部分を決定する。一般に、1つには得られる構築物が均一であり、生物学的活性の喪失を最小化し、免疫原性を減少させるので、部位特異的ペグ化が好ましい。

## 【0102】

20

1つの実施形態において、該PEGは、約200MW～約50,000MW、より好ましくは約2,000MW～約20,000MWの分子量である。もう1つの実施形態において、例えば、式 $\text{CH}_3\text{-O}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ または $\text{CH}_3\text{-O}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-H}$ (ここで、 $n$ は、2～約1200の任意の整数である)のモノメトキシPEGは、好ましくは、アミン、マレイミドまたはカルボン酸結合基で誘導体化されて用いられる。

## 【0103】

もう1つの実施形態において、該補欠分子族、例えば、PEGは、Veronese FMおよびPasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. Drug Discovery Today 10:1451～1458頁(2005年)に記載されるような酵素的に不安定なリンカーによって構築物に結合され、そこに開示された方法は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【0104】

もう1つの実施形態において、用いられる該補欠分子族は、米国特許第5359030号および同第5681811号に開示されるように、脂肪親和性部分および親水性ポリマー部分の両方を有するポリマーである。関連する実施形態において、用いられる該補欠分子族は、米国特許第6309633号に開示されるように、加水分解可能な結合、例えば、エステル結合によって結合された、親水性成分、例えば、PEGポリマー、および脂肪親和性成分、例えば、分岐の脂肪酸またはアルキル鎖を有するオリゴマー結合体である。もう1つの関連する実施形態において、用いられる該補欠分子族は、米国特許第6858580号に開示されるように、ポリプロピレングリコール、および好ましくは、少なくとも2つのポリプロピレングリコールサブユニットを含むオリゴマーである。前述の特許および特許出願のそれぞれの教示は、全て記載されたように参照により組み込まれる。

40

## 【0105】

さらにもう1つの実施形態において、米国公開特許出願第2004/0203081号の教示が参照により本明細書に組み込まれ、これには、このような出願において、特に、様々なナトリウム利尿化合物に結合した「修飾部分」と称される補欠分子族、および特に、様々な長さおよび配置を有するオリゴマー構造に関連する教示が含まれる。関連する実施形態において、国際公開第2004/047871号の教示は参照により組み込まれ、これには、NPRAに結合するナトリウム利尿分子への「修飾部分結合部位」によって結合された「修飾部分」に関連する教示が含まれ、同様な方法が、他のナトリウム利尿受容体に結合しているナトリウム利尿分子と共に用いられ得ることが理解される。

50

## 【0106】

明細書および特許請求の範囲を通して使用される特定の用語は、以下に規定される。

## 【0107】

本発明の「構築物」および「アミノ酸残基配列」は、a)天然に存在する、b)化学合成によって生成する、c)組換えDNA技術によって生成する、d)比較的大きい分子の生化学的または酵素的断片化によって生成する、e)上記方法a)からd)の組合せから得られる方法によって生成する、またはf)ペプチドもしくはアミノ酸配列を生成する任意の他の方法によって生成することができる。

## 【0108】

生成の好ましい手段である化学合成を用いることによって、天然に存在しない様々なアミノ酸を該構築物に導入する、N-末端またはC-末端を修飾するなどが可能であり、それにより、改善された安定性および配合、プロテアーゼ分解抵抗性などを与え、該構築物中に1つまたは複数のアミノ酸代用物を導入する。

## 【0109】

本明細書および特許請求の範囲を通して用いられるような用語「ペプチド」は、アミノ酸の化学的修飾および誘導体を含む2つ以上のアミノ酸を含む任意の構造を含むことが意図される。ペプチドの全てまたは一部を形成する該アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸、このようなアミノ酸の立体異性体および修飾体、非タンパク質アミノ酸、翻訳後修飾アミノ酸、酵素修飾アミノ酸などであることができる。用語「ペプチド」には、ペプチドのダイマーまたはマルチマーも含まれる。「製造された」ペプチドには、化学合成、組換えDNA技術、比較的大きい分子の生化学的もしくは酵素的断片化、前記の組合せによって生成された、または一般に、任意の他の方法によって作られたペプチドが含まれる。

## 【0110】

本明細書および特許請求の範囲に用いられるようなものを含む、本発明に用いられる用語「アミノ酸側鎖部分」には、用語「アミノ酸」が本明細書において定義されるような任意のアミノ酸の任意の側鎖が含まれる。したがって、これには、天然に存在するアミノ酸に存在する側鎖部分が含まれる。それには、修飾された天然に存在するアミノ酸、例えば、グリコシル化アミノ酸中の側鎖部分がさらに含まれる。それには、天然に存在するタンパク質アミノ酸、非タンパク質アミノ酸、翻訳後修飾アミノ酸、酵素的に合成されたアミノ酸、誘導体化アミノ酸、アミノ酸を模倣するべく設計された構築物または構造など立体異性体および修飾体の側鎖部分がさらに含まれる。例えば、本明細書において開示される任意のアミノ酸の側鎖部分は、本定義内に含まれる。後に定義されるような「アミノ酸側鎖部分の誘導体」は、アミノ酸側鎖部分の本定義内に含まれる。

## 【0111】

「アミノ酸側鎖部分の誘導体」は、任意のアミノ酸側鎖部分への修飾またはそれにおける変形であり、これには、天然に存在するまたは非天然のアミノ酸側鎖部分のいずれかへの修飾またはそれにおける変形が含まれ、ここで、該修飾または変形には、(a)既存のアルキル、アリール、またはアラルキル鎖に1個または複数の飽和または不飽和炭素原子を付加すること;(b)側鎖中の炭素を別の原子、好ましくは酸素または窒素に置換すること;(c) (メチル(-CH<sub>3</sub>)、メトキシ(-OCH<sub>3</sub>)、ニトロ(-NO<sub>2</sub>)、ヒドロキシル(-OH)、またはシアノ(-C≡N)を含む)側鎖の炭素原子に末端基を付加すること;(d)ヒドロキシ、チオールまたはアミノ基を含む側鎖部分について、好適なヒドロキシ、チオールまたはアミノ保護基を付加すること;あるいは、(e)環構造を含む側鎖部分について、1個または複数の置換基(ヒドロキシル、ハロゲン、アルキル、または直接もしくはエーテル結合を介して結合したアリール基を含む)を付加することが含まれる。アミノ基について、好適なアミノ保護基には、限定されないが、Z、Fmoc、Boc、Pbf、Pmcなどが含まれる。

## 【0112】

本発明の実施形態に用いられる「アミノ酸」、および本明細書および特許請求の範囲に用いられるような該用語には、知られた天然に存在するタンパク質アミノ酸が含まれ、これらは、それらの一般の三文字略語および一文字略語の両方によって言及される。Synthe

10

20

30

40

50



10

203040

本発明による構築物のリストにおいて、従来のアミノ酸残基は、Manual of Patent Examining Procedure、第8版の2400章に与えられるような従来の意味を有する。したがって、「Nle」は、ノルロイシンであり；「Asp」は、アルパラギン酸であり；「His」は、ヒスチジンであり；「Arg」は、アルギニンであり；「Trp」は、トリプトファンであり；「Lys」は、リシンであり；「Gly」は、グリシンであり；「Pro」は、プロリンであり；「Tyr」は、チロシンであり；「Ser」は、セリンであるなどである。全ての残基は、D-アラニンについて「D-Ala」におけるようにD-異性体が特定されない限り、L-異性体配置にある。

#### 【0114】

天然に存在するタンパク質アミノ酸、非タンパク質アミノ酸、翻訳後修飾アミノ酸、酵素的に合成されたアミノ酸、誘導体化アミノ酸、前記の任意から誘導された、 $\alpha$ -二置換アミノ酸(すなわち、少なくとも1つの側鎖がそれが誘導された残基の側鎖と同じである、 $\alpha$ -二置換アミノ酸)、前述の任意から誘導された  $\beta$ -アミノ酸(すなわち、 $\beta$ -炭素の存在を除いて、ほかの点ではそれが誘導化される残基と同じである  $\beta$ -アミノ酸)等、および前記の全てを含む立体異性体および修飾体を含む単一のアミノ酸は、本明細書において「残基」と称されることもある。

10

#### 【0115】

「 $\alpha$ -二置換アミノ酸」には、 $\alpha$ -位置にさらなる置換基を有する任意の  $\alpha$ -アミノ酸が含まれ、この置換基は、 $\alpha$ -アミノ酸の側鎖部分と同じであってもよいし、異なってもよい。 $\alpha$ -アミノ酸の側鎖部分に加えて、好適な置換基には、 $C_1 \sim C_6$ 直鎖または分岐のアルキルが含まれる。Aibは、 $\alpha$ -二置換アミノ酸の一例である。 $\beta$ -二置換アミノ酸は、従来のL-およびD-異性体対照標準を用いて言及することができる一方、このような対照標準は便宜のためであり、 $\beta$ -位置における置換基が異なる場合、このようなアミノ酸は、必要に応じて、指定されたアミノ酸側鎖部分を有する残基のL-またはD-異性体から誘導される  $\beta$ -二置換アミノ酸と同義的に称し得る。したがって、(S)-2-アミノ-2-メチル-ヘキサノ酸は、L-Nleから誘導された  $\beta$ -二置換アミノ酸またはD-Alaから誘導された  $\beta$ -二置換アミノ酸のいずれかと称し得る。同様に、Aibは、Alaから誘導された  $\beta$ -二置換アミノ酸と称し得る。 $\beta$ -二置換アミノ酸が提供される場合はいつも、その全ての(R)および(S)配置を含むとして理解されるべきである。

20

#### 【0116】

「N-置換アミノ酸」には、アミノ酸側鎖部分が骨格アミノ酸に共有結合され、場合によって、 $\alpha$ -炭素位置におけるH以外の置換基が存在しない、任意のアミノ酸が含まれる。サルコシンは、N-置換アミノ酸の一例である。一例として、サルコシンは、AlaのN-置換アミノ酸誘導体と称することができ、ここで、サルコシンのアミノ酸側鎖部分とAlaとは、同じであり、メチルである。

30

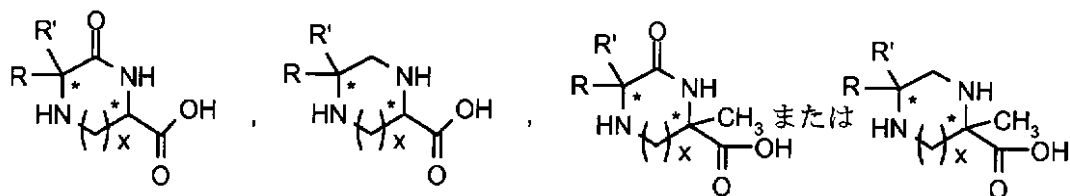
#### 【0117】

用語「アミノ酸代用物」には、残基の模倣物である本明細書に開示される分子が含まれ、限定されないが、ピペラジンコア分子、ケト-ピペラジンコア分子およびジアゼピンコア分子が含まれる。他に特記されない限り、アミノ酸代用物は、カルボキシル基とアミノ基の両方、およびアミノ酸側鎖に対応する基を含む、またはグリシンのアミノ酸代用物の場合には、水素以外の側鎖を含まないと理解される。したがって、アミノ酸代用物には、上記式IまたはIIの一般式の分子が含まれる。アミノ酸代用物には、任意の以下の構造の分子がさらに含まれ、便宜のために、このような構造は、その単離された代用物として与えられ、それは、いかなる保護基も含まず、かつ本発明の構築物の一部を形成する1つまたは2つのアミノ酸残基に1つまたは2つのペプチド結合によって結合されていないと理解される：

40

#### 【0118】

## 【化9】



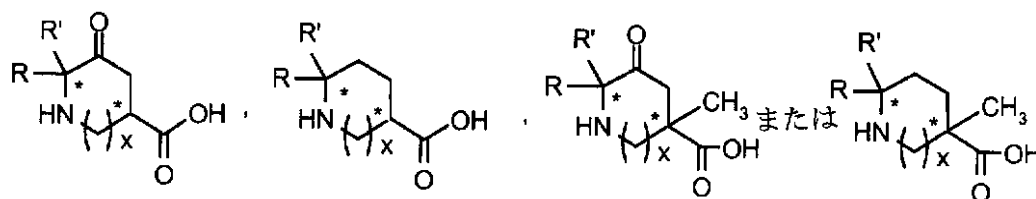
## 【0119】

(式中、R、R'、xおよびアスタリスクは、式Iの代用物について定義された通りである)。アミノ酸代用物には、任意の以下の構造の分子がさらに含まれ、再度、便宜のために、このような構造は、その単離された代用物として与えられ、それは、いかなる保護基も含まず、かつ本発明の構築物の一部を形成する1つまたは2つのアミノ酸残基に1つまたは2つのペプチド結合によって結合されていないと理解される：

10

## 【0120】

## 【化10】



20

## 【0121】

(式中、R、R'、xおよびアスタリスクは、式Iの代用物について定義された通りである)。合成のために、任意のアミノ酸代用物のカルボキシル基またはアミノ基のいずれかは、好ましくは、保護基によって保護され、保護基が存在する間、反応性でないようにし、同様に、RまたはR'の一部を形成する任意の反応性基は、同様に、保護基によって保護されてもよい。本発明の代用物は、2つ以上の不斉中心を有し、したがって、2つ以上の立体異性形態で存在することができる。該化合物の一部は、幾何異性体および回転異性体として存在してもよい。さらに、本発明の一部の化合物は、アトロプ異性体を生じる立体配座軸性キラリティーを有してもよい。本発明は、これらの形態のそれぞれに個別に、およびラセミ体を含むその混合物に及ぶ。1つの態様において、代用物異性体は、クロマトグラフィー法によって、または分割剤を用いて従来から分離することができる。もう1つの態様において、個別の代用物異性体、すなわち光学異性体的に純粋な代用物は、合成スキーム、例えば、キラル中間体、試薬または触媒を使用する不斉合成を用いて、本明細書において開示される合成スキーム、またはこのようなスキームの変形によって調製される。

30

## 【0122】

用語「C-末端キャッピング基」には、構築物のC-末端の末端環炭素原子、または与えられる場合、末端カルボキシル基を介して結合した任意の末端基が含まれる。該末端環炭素原子、または与えられる場合、末端カルボキシル基は、残基の一部を形成してもよく、またはアミノ酸代用物の一部を形成してもよい。好ましい態様において、該C-末端キャッピング基は、該構築物のC-末端位置にあるアミノ酸代用物の一部を形成する。該C-末端キャッピング基には、限定されないが、 $-(CH_2)_n-OH$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-OH$ 、 $-(CH_2)_m-OH$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-N(v_1)(v_2)$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-N((CH_2)_m-N(v_1)(v_2))_2$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-OH)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_m-NH-C(=O)-CH(N(v_1)(v_2))((CH_2)_m-N(v_1)(v_2))$ 、もしくは $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-NH_2)-(CH_2)_m-N(v_1)(v_2)$ (前記の全ての(R)または(S)配置を含み、ここで、 $v_1$ および $v_2$ は、それぞれ独立に、H、 $C_1 \sim C_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖、mは0~17、nは0~2である)；または任意のオメガアミノ脂肪族、末端アリールもしくはアラールキル(例えば、メチル、ジメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル、

40

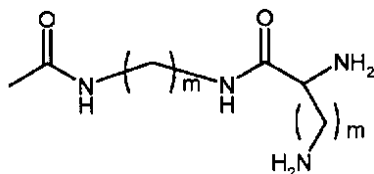
50

アリル、シクロプロパンメチル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、アセチル、プロピオノイル、ブタノイル、フェニルアセチル、シクロヘキシルアセチル、ナフチルアセチル、シンナモイル、フェニル、ベンジル、ベンゾイル、12-Ado、7'-アミノヘプタノイル、6-Ahx、Amcまたは8-Aocを含む)、あるいは任意の単一の天然もしくは非天然の  $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸または  $\gamma$ - $\delta$ -二置換アミノ酸(前記の全ての(R)または(S)配置を含む)、場合によって、任意の前記の非アミノ酸カップリング基と組み合わせたものが含まれる。前記において、例えば、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{N}(\nu_1)(\nu_2))((\text{CH}_2)_m-\text{N}(\nu_1)(\nu_2))$ は、以下であることが理解されるべきである:

【0123】

【化11】

10



【0124】

用語「N-末端カップリング基」には、構築物のN-末端の末端アミンを介して結合した任意の末端基が含まれる。該末端アミンは、残基の一部を形成してもよいし、またはアミノ酸代用物の一部を形成してもよい。好ましい態様において、N-末端カップリング基は、該構築物のN-末端位置にあるアミノ酸代用物の一部を形成する。該N-末端カップリング基には、限定されないが、任意のオメガアミノ脂肪族、アシル基または末端アリールもしくはアラルキル(例えば、メチル、ジメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル、アリル、シクロプロパンメチル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、アセチル、プロピオノイル、ブタノイル、フェニルアセチル、シクロヘキシルアセチル、ナフチルアセチル、シンナモイル、フェニル、ベンジル、ベンゾイル、12-Ado、7'-アミノヘプタノイル、6-Ahx、Amcまたは8-Aocの基を含む)が含まれ、または他に、N-末端カップリング基は、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}(\nu_3)$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}(\nu_3)$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-(\nu_4)$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-(\nu_4)$ 、 $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{O}(\nu_3)$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}(\nu_3)$ 、 $\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{S}(\nu_3)$ 、もしくは $-(\text{CH}_2)_m-\text{S}(\nu_3)$ であり、ここで、 $\nu_3$ は、Hまたは $\text{C}_1 \sim \text{C}_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖であり、 $\nu_4$ は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{17}$ 直鎖もしくは分岐のアルキル鎖であり、mは0~17である。

20

30

【0125】

フェニル環に、ヒドロキシル、ハロゲン、アルキル、または直接もしくはエーテル結合を介して結合したアリール基を独立に含む1個または複数の置換基が含まれる場合、フェニル環は「置換されて」いる。フェニル環がそのように置換されている場合、そのアミノ酸残基は、置換Phe、置換HPheまたは置換Pglにおけるように置換されていると称し得る。

【0126】

用語「アルケン」には、1個または複数の炭素-炭素二重結合を含む不飽和炭化水素が含まれる。アルケン基の例には、エチレン、プロペン、などがある。

40

【0127】

用語「アルケニル」には、少なくとも1個の二重結合を含む、2~6個の炭素原子の直鎖一価炭化水素基または3~6個の炭素原子の分岐一価炭化水素基が含まれ;その例には、エテニル、2-プロペニル、などがある。

【0128】

本明細書において特定される「アルキル」基には、一直線または分岐の配置のいずれかの指定長さのそれらのアルキル基が含まれる。アルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、イソヘキシルなどがある。

【0129】

50

用語「アルキニル」には、少なくとも1つの三重結合を含む、2～6個の炭素原子の直鎖一価炭化水素基または3～6個の炭素原子の分岐一価炭素原子基が含まれ;それらの例には、エチニル、プロピニル、ブチニルなどがある。

【0130】

用語「アリール」には、6～12環原子の単環式または二環式芳香族炭化水素基(場合によって、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルキルチオ、ハロ、ニトロ、アシル、シアノ、アミノ、一置換アミノ、二置換アミノ、ヒドロキシ、カルボキシ、またはアルコキシ-カルボニルから選択された1個または複数の置換基で独立に置換されている)が含まれる。アリール基の例には、フェニル、ピフェニル、ナフチル、1-ナフチル、および2-ナフチル、それらの誘導体などがある。

10

【0131】

用語「アラルキル」には、基- $R^aR^b$ が含まれ、ここで、 $R^a$ は、アルキレン(二価アルキル)基であり、 $R^b$ は、上記に定義された通りのアリール基である。アラルキル基の例には、ベンジル、フェニルエチル、3-(3-クロロフェニル)-2-メチルフェニルなどがある。

【0132】

用語「脂肪族」には、炭化水素鎖、例えば、アルカン、アルケン、アルキン、およびそれらの誘導体などを有する化合物が含まれる。

【0133】

用語「アシル」には、基 $R-C(=O)-$ が含まれ、ここで、 $R$ は有機基である。一例は、アセチル基 $CH_3-C(=O)-$ であり、本明細書において「Ac」と称する。

20

【0134】

上記に定義された通りのアリール、アルキルまたは置換アルキル基が、1個または複数のカルボニル $\{-C(=O)-\}$ 基を介して結合されている場合、ペプチドまたは脂肪族部分は、「アシル化」されている。ペプチドは、N-末端で最も普通にアシル化される。

【0135】

「オメガアミノ脂肪族」には、末端アミノ基を有する脂肪族部分が含まれる。オメガアミノ脂肪族の例には、7'-アミノ-ヘプタノイルならびにオルニチンおよびリシンのアミノ酸側鎖部分がある。

【0136】

用語「ヘテロアリール」には、窒素、酸素および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を含む単環式および二環式芳香族環が含まれる。5-または6-員ヘテロアリールは、単環式ヘテロ芳香族環であり;その例には、チアゾール、オキサゾール、チオフェン、フラン、ピロール、イミダゾール、イソオキサゾール、ピラゾール、トリアゾール、チアジアゾール、テトラゾール、オキサジアゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、などがある。二環式ヘテロ芳香族環には、限定されないが、ベンゾチアジアゾール、インドール、ベンゾチオフェン、ベンゾフラン、ベンズイミダゾール、ベンズイソオキサゾール、ベンゾチアゾール、キノリン、ベンゾトリアゾール、ベンズオキサゾール、イソキノリン、プリン、フロピリジンおよびチエノピリジンなどがある。

30

【0137】

「アミド」には、カルボニル基 $\{-C(=O)-NH_2\}$ 、例えば、メチルアミド、エチルアミド、プロピルアミドなどに結合した三価窒素を有する化合物が含まれる。

40

【0138】

「イミド」には、イミド基 $\{-C(=O)-NH-C(=O)-\}$ を含む化合物が含まれる。

【0139】

「アミン」には、アミノ基 $\{-NH_2\}$ を含む化合物が含まれる。

【0140】

「ニトリル」には、カルボン酸誘導体であり、有機基に結合した $\{-CN\}$ 基を含む化合物が含まれる。

【0141】

用語「ハロゲン」は、ハロゲン原子フッ素、塩素、臭素およびヨウ素、ならびに1個ま

50

たは複数のハロゲン原子、例えば、 $-\text{CF}_3$ などを含む基を含むことを意図する。

【0142】

医薬組成物におけるように、用語「組成物」は、活性化合物(複数可)、およびその担体を構成する不活性成分(複数可)、ならびに任意の2種以上の成分の組合せ、錯化もしくは凝集、または1種もしくは複数の成分の解離、または1種もしくは複数の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から、直接または間接に生じる任意の生成物を含む生成物を包含することを意図する。したがって、本発明の医薬組成物は、本発明の構築物と医薬的に許容される担体とを混合することによって作製される任意の組成物を包含する。

【0143】

用語「 $\text{EC}_{50}$ 」は、そのアゴニストに対する最大可能反応の50%を生じたアゴニストのモル濃度を含むことを意図する。一例として、cGMPアッセイにおいて測定して、濃度72nMでその構築物に対する最大可能反応の50%を生じる構築物は、72nMの $\text{EC}_{50}$ を有する。別に特記されない限り、 $\text{EC}_{50}$ 測定と関連するモル濃度は、ナノモル(nM)においてである。

10

【0144】

用語「 $\text{K}_i$ (nM)」は、拮抗剤不在における平衡での受容体の結合部位の半分に結合する拮抗化合物のモル濃度を表す平衡受容体結合親和性を含むことを意図する。一般に、 $\text{K}_i$ は、 $\text{K}_i$ が低い場合、その親和性が高くなるように、受容体に対する化合物の親和性と逆相関している。 $\text{K}_i$ は、ChengおよびPrusoffの式(Cheng Y., Prusoff W.H., Biochem. Pharmacol., 22:3099~3108頁(1973年)):

20

【0145】

【数1】

$$\text{K}_i = \frac{\text{EC}_{50}}{1 + \frac{[\text{リガンド}]}{\text{K}_d}}$$

【0146】

(式中、「リガンド」は、放射性リガンドであってもよいリガンドの濃度であり、 $\text{K}_d$ は、50%受容体占有を生じる受容体親和性の逆測定値である)を用いて、決定することができる。別に特記されない限り、 $\text{K}_i$ 決定に関連するモル濃度は、nMである。

【0147】

本明細書において用いられる化学命名規則および構造図は、ChemDrawプログラム(Cambridge software Corp., Cambridge, Mass.から入手可能)によって利用されるような化学命名特徴を用いるか、またはそれに依存する。特に、特定の化合物の名称は、Chemdraw UltraまたはISISベース(MDL Corp.)によって利用されるようなAutonomプログラムを用いて該構造から導かれる。一般に、構造図には、末端基および他の特別の状況における以外、炭素原子と結合した水素原子は描かない。

30

【0148】

表1および表2に含まれるものなどの本明細書における特定の構造図および図面は、構造図によって識別される代用物および三文字略語によって識別されるアミノ酸残基を用いて、アミノ酸代用物およびアミノ酸残基から構成される構築物を描く。別に特記されない限り、代用物と残基との間の結合、または残基と代用物との間の結合、またはそのN-末端およびC-末端の両側上の代用物と残基との間の結合は、従来のペプチド結合、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ であるか、またはペプチド結合が代用物のN-末端上の環窒素への結合である場合、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-$ である。一般に、このような結合の描写において、アミノ酸代用物の原子は、描かれるが(例えば、 $-\text{C}(=\text{O})-$ または $-\text{N}$ )、アミノ酸残基の原子は描かれない。

40

【0149】

配合および利用性

本明細書に開示される構築物は、医療用途および動物畜産または獣医用途の両方に用いることができる。通常、該構築物、または該構築物を含む医薬組成物は、ヒトに用いられるが、他の哺乳動物にも用いることができる。用語「患者」は、哺乳類個体を意味することを意図し、本明細書を通しておよび特許請求の範囲においてそのように用いられる。本

50

発明の主な適用にヒト患者が含まれるが、本発明は、実験室、農場、動物園、野生生物、ペット、スポーツまたは他の動物に適用することもできる。

【0150】

本明細書に開示される構築物は、抗高血圧、心臓血管、腎臓、および/または内分泌作用の誘発が望まれる任意の状態、症候群または疾患の治療に用いることができる。これには特に、未変性ナトリウム利尿ペプチドが用いられ得る任意の状態、症候群または疾患が含まれる。したがって、本明細書に開示される構築物は、患者における望ましいナトリウム利尿、利尿作用および/または血管拡張を起こすために用いることができる。

【0151】

1つの態様において、本明細書に開示される構築物は、早期、例えば、クラス1の鬱血性心不全の治療に用いられる。もう1つの態様において、本明細書に開示される構築物は、慢性または非代償性鬱血性心不全の治療に用いられる。もう1つの態様において、本明細書に開示される構築物は、安静時呼吸困難または最小活動度を有する患者の急性非代償性鬱血性心不全を含む急性鬱血性心不全の治療に用いられる。

【0152】

構築物の塩形態。本発明の構築物は、任意の医薬的に許容される塩の形態であることができる。用語「医薬的に許容される塩」は、無機または有機の塩基と無機または有機の酸とを含む医薬的に許容される非毒性塩基または酸から調製される塩をいう。無機塩基から誘導される塩には、アルミニウム、アンモニウム、カルシウム、銅、第二鉄、第一鉄、リチウム、マグネシウム、第二マンガン、第一マンガン、カリウム、ナトリウム、亜鉛などの塩などがある。アンモニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、およびナトリウムの塩が特に好ましい。医薬的に許容される有機非毒性塩基由来の塩には、第一級、第二級、および第三級アミン、天然に存在する置換アミンを含む置換アミン、環状アミン、ならびに塩基性イオン交換樹脂(例えば、アルギニン)、ペタイン、カフェイン、コリン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、ジエチルアミン、2-ジエチルアミノエタノール、2-ジメチルアミノエタノール、エタノールアミン、エチレンジアミン、N-エチルモルホリン、N-エチルピペリジン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラバミン、イロプロピルアミン、リシン、メチルグルカミン、モルホリン、ピペラジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン、テオブロミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリプロピルアミン、トロメタミンなどがある。

【0153】

本発明の構築物が塩基性である場合、酸付加塩は、無機酸および有機酸を含む医薬的に許容される非毒性酸から調製され得る。このような酸には、酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、カルボン酸、クエン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、グルコン酸、グルタミン酸、臭化水素酸、塩酸、イセチオン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、マロン酸、粘液酸、硝酸、パモン酸、パントテン酸、リン酸、プロピオン酸、コハク酸、硫酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸などがある。本発明の構築物の酸付加塩は、好適な溶媒中で構築物と過剰の酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸またはメタンスルホン酸とから調製される。酢酸塩形態が特に有用である。本発明の実施形態の構築物が酸性部分を含む場合、好適な医薬的に許容される塩には、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウム塩またはカリウム塩、あるいはアルカリ土類金属塩、例えば、カルシウム塩またはマグネシウム塩が含まれ得る。

【0154】

さらに、パモン酸塩、オクタン酸塩、デカン酸塩、オレイン酸塩、ステアリン酸塩、タンニン酸ナトリウムおよびパルミチン酸塩形態を含む、本発明のペプチド構築物の特定の塩形態が、一部の症例で対応する酢酸塩形態に対して2倍の循環半減期増加を示すことを出願人らは有利に発見した。これらの塩形態は、比較的長い半減期の結果として達成することができる投与頻度減少により、特に長期にわたる治療のために皮下注射または筋肉注射による投与に、特に適切である。理論によって制限されないが、半減期増加は、酢酸塩形

態に比べての溶解度の減少に関係していることが考えられる。本発明のペプチド構築物の半減期増加の塩形態は、例えば、イオン交換、構築物の酢酸塩形態溶液とパモン酸二ナトリウムとを混合してパモン酸塩懸濁液を形成すること、または構築物の製造における最終精製工程(複数可)の間の所望の塩の使用を含む任意の方法によって製造することができる。

#### 【0155】

医薬組成物。本発明のもう1つの実施形態では、本発明の構築物と医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。該担体は、液体配合物であることができ、好ましくは、緩衝された等張性水溶液である。医薬的に許容される担体には、このあとに記載されるような、賦形剤、例えば、希釈剤、担体など、および、添加剤、例えば、安定剤、保存剤、可溶化剤、緩衝剤なども含まれる。

10

#### 【0156】

本発明のいくつかの実施形態の構築物は、賦形剤、例えば、希釈剤、担体など、および添加剤、例えば、安定剤、保存剤、可溶化剤、緩衝剤などを必要に応じて含む1種または複数の医薬的に許容される担体と一緒に少なくとも1種の本発明の構築物を含む医薬組成物に配合または合成することができる。配合賦形剤には、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、ヒドロキシセルロース、アカシア、ポリエチレングリコール、マンニトール、塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウムが含まれ得る。注射または他の液体投与配合物として、少なくとも1種または複数の緩衝成分を含む水が好ましく、安定剤、保存剤および可溶化剤も用いることができる。固体投与配合物として、任意の様々な増粘剤、充填剤、膨張性薬剤および担体添加剤、例えば、デンプン、糖、脂肪酸などを用いることができる。局所投与配合物として、任意の様々なクリーム、軟膏、ゲル、ローションなどを用いることができる。大部分の医薬配合物について、非活性成分は、重量または容量で、調製物の比較的大きい部分を構成する。医薬配合物として、本発明の構築物の送達が長時間にわたって有効であるように投薬量を配合することができるよう、任意の様々な計られた放出、遅延放出または持続放出の配合物および添加剤を用いることができることも企図される。特に、皮下および筋肉内注射による投与のための、持続放出または遅延放出の配合物を提供するために、例えば、ゼラチン、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび/または他のセルロース賦形剤を含むことができる。

20

#### 【0157】

一般に、患者に投与される構築物の実際の量は、投与方式、用いられる配合物、および所望される反応に依存してかなり広範にわたって変化する。

30

#### 【0158】

実際の使用において、該構築物は、従来の医薬混合技術に従って医薬担体と混合した活性成分として組み合わせることができる。担体は、投与、例えば、経口、非経口(静脈内を含む)、尿道、膣、鼻、皮膚、経皮、肺、深肺、吸入、口腔、舌下などに望まれる調製物の形態に依存して広範で様々な形態を取り得る。経口剤形の組成物を調製するにおいて、任意の通常の医薬媒体、例えば、水、グリコール、油、アルコール、風味剤、保存剤、着色剤など、および経口液体調製物の場合には、例えば、懸濁液、エリキシル剤および溶液など;または担体、例えば、デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤など、ならびに経口固体調製物の場合には、例えば、粉末、硬いカプセルと軟かいカプセル、および錠剤を用いることができる。

40

#### 【0159】

投与の容易性のために、錠剤およびカプセルは、有利な経口投薬単位形態を示す。必要に応じて、本発明の構築物を含む組成物は、標準的な水性または非水性技術によってコーティングすることができる。このように治療的に有用な組成物における活性構築物の量は、有効な投薬量が得られるような量である。もう1つの有利な投薬単位形態において、舌下医薬組成物は、例えば、シート、ウエハー、錠剤または同様のものを用いることができる。該活性構築物は、例えば、液体滴下またはスプレーのように鼻内に投与することもできる。

50



## 【0160】

錠剤、丸薬、カプセルなどは、結合剤、例えば、ガムトラガカント、アカシア、トウモロコシデンプンまたはゼラチン；賦形剤、例えば、リン酸二カルシウム；崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプンまたはアルギニン酸；潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム；および甘味剤、例えば、蔗糖、乳糖またはサッカリンを含んでもよい。投薬単位形態がカプセルである場合、上記種類の物質に加えて、脂肪油などの液体担体を含むことができる。

## 【0161】

様々な他の物質は、コーティング剤として用いることができるか、または投薬単位の物理形態を変更するために用いることができる。例えば、錠剤は、シェラック、糖または両方でコーティングすることができる。シロップまたはエリキシル剤は、活性成分に加えて、甘味剤として蔗糖、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、染料および風味剤、例えば、チェリーまたはオレンジ風味を含んでもよい。

10

## 【0162】

構築物は非経口投与することもできる。これらの活性ペプチドの溶液または懸濁液は、界面活性剤、例えば、ヒドロキシ-プロピルセルロースと好適に混合された水中で調製することができる。分散剤も、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよび油中のこれらの混合物中で調製することができる。これらの調製物は、微生物の増殖を抑制するために保存剤を場合によって含んでもよい。投与直前に、例えば、生理食塩水と一緒に戻す凍結乾燥された単回単位配合物も利用することもでき、したがって、保存剤を要しない。

20

## 【0163】

注射用使用に好適な医薬形態には、例えば、滅菌水溶液または分散液、および滅菌粉末、例えば、滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための凍結乾燥配合物が含まれる。全ての場合に、該形態は滅菌でなければならず、注射器によって投与できる程度に流動性でなければならない。該形態は、製造および保管条件下で安定でなければならず、細菌および菌類などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールまたは液体ポリエチレングリコール）、それらの好適な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であることができる。

## 【0164】

本明細書において開示されるような構築物は、経鼻投与によって治療的に適用することができる。「経鼻投与」は、本発明の任意の構築物の鼻内投与の任意の形態を意味する。該構築物は、水溶液、例えば、生理的食塩水、クエン酸塩または他の通常の賦形剤もしくは保存剤を含む水溶液中にあってもよい。該構築物は、乾燥または粉末配合物中にあってもよい。

30

## 【0165】

1つの代替の実施形態において、構築物は肺中に直接投与することができる。肺内投与は、計量用量吸入器、吸気中に患者により作動される場合、本発明の構築物の計量ボラスの自己投与を可能にする装置によって行うことができる。乾燥粉末吸入および噴霧エアロゾルの両方を用いることができる。

40

## 【0166】

本発明のもう1つの実施形態によれば、本発明の構築物は、ペプチド薬剤を含む薬剤の有効鼻吸収を増加させる任意の様々な薬剤と一緒に配合することができる。これらの薬剤は、粘膜に許容されない損傷を有しないで鼻吸収を増加させなければならない。とりわけ、米国特許第5693608号、同5977070号および同5908825号は、吸収促進薬を含んで用いることのできるいくつかの医薬組成物を教示しており、それぞれの前述の教示およびそれらに引用された全ての参考文献および特許は、参照により組み込まれる。

## 【0167】

水溶液中である場合、本発明の特定の構築物は、生理食塩水、酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩または他の緩衝剤によって適切に緩衝させることができ、これは、生理学

50

的に許容される任意のpH、一般に約pH4～約pH7であり得る。緩衝剤の組合せも用いることができ、例えば、リン酸塩緩衝生理食塩水、生理食塩水と酢酸塩緩衝剤などを用いることができる。生理的食塩水の場合、0.9%の生理食塩水溶液を用いることができる。酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩などの場合、50mM溶液を用いることができる。緩衝剤に加えて、細菌および他の微生物の増殖を抑制または制限するために好適な保存剤を用いることができる。用いることのできるこのような保存剤の1つは、0.05%の塩化ベンザルコニウムである。

#### 【0168】

構築物は、乾燥形態または粒状形態であり得ることも可能であり、かつ企図される。1つの好ましい実施形態において、粒子は、肺表面に定着して、吐き出されないために十分な質量を有するが、肺に達する前に気道の表面に堆積しないように十分小さいように、約0.5～6.0 $\mu$ mである。限定されないが、ミクロ製粉、スプレー乾燥および迅速冷凍エアロゾルに続けての凍結乾燥を含む様々な異なる任意の技術が、乾燥粉末微粒子を作製するために使用され得る。微粒子に関して、構築物は、肺深部に堆積することがあり、それにより血流への迅速かつ効率的な吸収を与える。さらに、時に、このような手法をもってすれば、経皮、鼻または口粘膜送達経路における場合のように、透過促進剤は不要である。推進剤系エアロゾル、噴霧器、単回用量乾燥粉末吸入器および多用量乾燥粉末吸入器を含む様々な任意の吸入器を用いることができる。現在用いられている通常の装置には、計量用量吸入器が含まれ、これは、喘息、慢性閉塞性肺疾患などの治療用の薬剤を送達するために使用される。好ましい装置には、常に約6.0 $\mu$ m未満である粒径を有する細かい粉末の霧またはエアロゾルを形成するように設計された乾燥粉末吸入器が含まれる。

#### 【0169】

平均粒度分布を含む微粒子粒度は、作製する方法によって調節することができる。ミクロ製粉について、ミリングヘッドの寸法、ローターの速度、処理時間などにより微粒子粒度を調節する。スプレー乾燥について、ノズル寸法、流量、乾燥機熱などにより微粒子粒度を調節する。迅速冷凍エアロゾルに続けて凍結乾燥によって作製することについて、ノズル寸法、流量、エアロゾル化溶液の濃度などにより微粒子粒度を調節する。これらのパラメータおよびその他は、微粒子粒度を調節するために用いることができる。

#### 【0170】

本発明の構築物は、持続放出注射可能配合物の注射、典型的には、例えば、臀部または三角筋におけるような深部筋内注射によって治療的に投与することができる。1つの実施形態において、本発明の構築物は、PEG、例えば、ポリエチレングリコール3350、および場合によって、限定されないが、賦形剤、例えば、塩、ポリソルベート80、pHを調整するための水酸化ナトリウムまたは塩酸を含む1種または複数の追加的な賦形剤および保存剤と一緒に配合される。もう1つの実施形態において、本発明の構築物は、ポリオルトエステル(これは、ポリマー骨格における任意の変化し得るパーセントの乳酸と一緒に自己触媒ポリオルトエステルであり得る)、および場合によって1種または複数の追加的な賦形剤と一緒に配合される。1つの実施形態において、ポリ(D,L-ラクチド-co-グリコリド)ポリマー(PLGAポリマー)、好ましくは、親水性末端基を有するPLGAポリマー、例えば、Boehringer Ingelheim社(Ingelheim、独国)製のPLGA RG502Hが用いられる。例えば、好適な溶媒、例えば、メタノール中での本発明の構築物を塩化メチレン中のPLGAの溶液と混合し、反応器内の好適な混合条件下でポリビニルアルコールの連続相溶液をそれに加えることによって、このような配合物を作製することができる。一般に、好ましくは接着性ポリマーでもある任意のいくつかの注射可能かつ生分解性ポリマーを、持続放出注射可能な配合物に用いることができる。米国特許第4938763号、同6432438号、および同6673767号の教示ならびにそれに関連された生分解性ポリマーおよび配合の方法は、参照により本明細書に組み込まれる。配合物は、構築物の濃度および量、ポリマーの生分解速度、ならびに当業者に知られた他の要因に依存して、注射が、週1回、月1回または他の期間基準で必要である注射などであることができる。

#### 【0171】

投与経路。注射によって投与される場合、注射は、静脈内、皮下、筋内、腹腔内または当該技術分野で知られた任意の手段であることができる。本発明の構築物は、限定されないが、錠剤、カプセル、カプレット、懸濁液、粉末、凍結乾燥調剤、坐薬、点眼薬、皮膚パッチ、口可溶性配合物、スプレー、エアロゾルなどの配合物を含む当該技術分野で知られた任意の手段によって配合できるか、または緩衝剤、結合剤、賦形剤、安定剤、酸化防止剤および当該技術分野で知られた他の剤と一緒に混合および配合することができる。一般に、本発明の構築物が細胞の表皮層を通して導入される任意の投与経路を用いることができる。したがって、投与手段には、粘膜を通る投与、口腔投与、経口投与、経皮投与、吸入投与、肺投与、経鼻投与、尿道投与、膣投与などが含まれ得る。

【0172】

10

1つの態様において、本発明の構築物は、持続放出注射可能な配合物、例えば、PEG、ポリオルトエステルまたはPLGAポリマーと一緒に配合物における本発明の構築物によって投与される。もう1つの態様において、本発明の構築物は、連続的または断続的のいずれかの皮下送達を与える自動送達装置によって投与される。任意の前述の方法および配合物は、慢性鬱血性心不全および特に慢性非代償性鬱血性心不全を含む慢性状態または症候群の治療に特に適用できる。

【0173】

1つの態様において、本発明の任意の構築物は、米国特許第6586396号に開示される全ての方法を含む皮下投与によって投与することができる。もう1つの態様において、患者、特に、比較的代償性である患者または外来患者環境における鬱血性心不全を有する患者である患者は、米国特許出願公開第2004/0077537号および国際公開第2003/079979号に開示されるような方法および用量によって本発明の構築物が投与される。もう1つの態様において、患者は米国特許出願公開第2005/0113286号に開示されているような方法によって本発明の構築物が投与されてよい。さらにもう1つの態様において、心筋障害を経験した患者は、米国特許出願公開第2006/0019890号に開示されるような方法によって心臓再造形のために治療され得る。

20

【0174】

本発明の構築物は、米国特許出願公開第2006/0034903号に開示されるような装置を含む送達系および方法によることを含む経皮投与によって投与することもできる。同様に、それに開示されたヒドロゲル配合物および固体状態配合物は、本発明の構築物と一緒に使用に適應させることができる。

30

【0175】

治療有効量。一般に、患者に投与される本発明の構築物の実際の量は、投与方式、使用される配合物、および所望の反応に依存してかなり広範囲に変化する。治療のための投薬量は、所望の治療効果をもたらすに十分な量の、任意の前述の手段または当該技術分野で知られた任意の他の手段による投与である。したがって、治療有効量には、特に抗高血圧、心臓血管、腎臓および/または内分泌作用を含む所望の作用を誘発するのに十分である本発明の構築物もしくは医薬組成物の量が含まれる。1つの態様において、治療有効量は、所望のナトリウム利尿、利尿および/または血管拡張をもたらす量である。

【0176】

40

一般に、本発明の構築物は、高度に活性である。例えば、選択された特定の構築物、所望の治療反応、投与経路、配合物および当業者に知られた他の要因に依存して、構築物は、約0.001、0.01、0.05、0.1、0.5、1.5、10、50、または100  $\mu\text{g/kg}$  体重で投与することができる。

【0177】

併用療法

本発明のいくつかの実施形態による構築物は、他の薬剤または剤と併用して、特に鬱血性心不全の治療に使用することも可能であり、かつ企図される。

【0178】

本発明のもう1つの態様によれば、鬱血性心不全を治療するための方法が提供される。

50

該方法には、鬱血性心不全鬱を有する患者に、鬱血性心不全の治療に有用である治療有効量の別の化合物、または患者において本発明の構築物のバイオアベイラビリティを拡張するのに有用である治療有効量の代替物と併用して本明細書に開示されるような治療有効量の構築物を投与することが含まれる。1つの態様において、患者に、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2004/0063630号に開示されたような方法および利尿薬によって、利尿薬と併用して本発明の構築物を投与することができる。併用に用いられ得る利尿薬には、限定することなしに、利尿薬、例えば、ヒドロクロロチアジド(Hydrodiuril(登録商標))、クロルサリンドン、フロセミド(Lasix(登録商標))、スピロノラクトン(Aldactone(登録商標))およびトリウムテレンを含むチアジド系利尿薬、ループ利尿薬およびカリウム保持性利尿薬が含まれる。

10

#### 【0179】

本発明のもう1つの態様において、利尿薬以外の治療有効量の抗高血圧薬と併用して本明細書に開示されるような治療有効量の構築物を投与することによる鬱血性心不全を治療する方法が提供される。このような抗高血圧薬には、一般にカルシウムチャネル遮断薬(ジヒドロピリジンおよび非ジヒドロピリジンを含む)、交感神経遮断薬、非特異的アドレナリン遮断薬、 $\alpha$ -アドレナリンアンタゴニスト(非選択的および選択的 $\alpha_1$ -遮断薬を含む)、 $\beta$ -遮断薬(非選択的ならびに選択的遮断薬および内因性交感神経様作用活性を有するものを含む)、血管拡張薬(抵抗性および緊急高血圧の治療用)、アンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシンIIアンタゴニストが含まれる。併用に用いられ得る抗高血圧薬には、混合 $\alpha/\beta$ -遮断薬および $\alpha_1$ -アンタゴニスト、例えば、ラベトロール(Normodyne(登録商標));血管拡張薬、例えば、ヒドララジン(Apresoline(登録商標))、ミノキシジル(Loniten(登録商標))、ニトロプルシド(Nipride(登録商標))、またはジアゾキシド(Hyperstat IV(登録商標));カルシウム遮断薬、例えば、ニフェジピン(Adalat(登録商標))、ジルチアゼム(Cardizem(登録商標))、またはベラパミル(Calan(登録商標));交感神経遮断薬、例えば、クロニジン(Catapres(登録商標))、メチルドーパ(Aldomet(登録商標))、レセルピン(Serpasil(登録商標))、またはグアナネチジン(イスメリン(登録商標));ACE阻害薬、例えば、カプトプリル(Capoten(登録商標))、エナラプリル(Vasotec(登録商標))またはリシノプリル(Prinivil(登録商標)); $\alpha$ -アドレナリンアンタゴニスト、例えば、フェントールアミン(Regitine(登録商標))またはブラゾシン(Minipress(登録商標));アンギオテンシンIIアンタゴニスト、例えば、ロサルタン(Cozaar(登録商標));あるいは、 $\beta$ -アドレナリンアンタゴニスト、例えば、プロプラノロール(Inderal(登録商標))、ナドロール(Corgard(登録商標))、メトプロロール(Lopressor(登録商標))またはピンドールなどがある。

20

30

40

#### 【0180】

##### 他の適応

本発明の構築物の主な使用は、鬱血性心不全、急性腎不全および腎臓高血圧の症状の治療および改善においてである一方、本発明の構築物は、ナトリウム利尿薬、利尿薬および/または血管拡張薬の化合物が治療有用性を与える任意の治療計画または様式に用いることができる。したがって、1つの態様において、本発明の構築物は、米国特許第5965533号に開示されるような腹腔内透析溶液への添加剤として用いることができる。もう1つの態様において、本発明の構築物は、国際公開第00/18422号に開示されるような眼科用途に用いることができる。

#### 【0181】

##### アミノ酸代用物の合成方法

本発明のアミノ酸代用物の合成方法の以下の例は例示を意図しており、当業者は、これに変更を加え得ること、およびそのような変更は本明細書に含まれることが意図されることを理解されたい。

#### 【0182】

官能化R側鎖を有さないアミノ酸を模倣するケトピペラジン骨格の合成(方法AおよびB)  
この構築物は、方法AおよびBで記載した通りの様々な方法によって調製した。

#### 【0183】

50

10

【化 1 2】



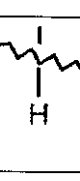
## 20



40

【 0 1 8 6 】

【表 1】

R	化合物(3)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.43 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 3.0-3.18 (2 組の dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 3.50-3.57 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.68 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.87-3.96 (br. d, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.23-4.33 (br. m, 1H, CHN), 4.45-4.57 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.80-4.88 (m, 1H, CHN), 5.30-5.37 (m, 1H, NH), 7.0-7.38 (一連の m, 10H, Ph), 収率=96%, $t_R$ = 6.88 分, $(M^+ + 1) = 456.99$
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.81-0.96 (一連の m, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.00-1.16 (m, 1H, $\text{CH}_2$ ), 1.30-1.45 (m, 1H, $\text{CH}_2$ ), 1.45 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.80-1.96 (m, 1H, CH), 3.54-3.64 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.82-3.96 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.28-4.40 (m, 1H, CHN), 4.51-4.61 (m, および s, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 5.51-5.61 (br. d, 1H, NH), 7.12-7.37 (br. m, 5H, Ph), 収率=定量的, $t_R$ = 6.93 分, $(M^+ + 1) = 423.25$
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.45 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 3.73 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.84-3.90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.01-4.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.32-4.38 (br. m, 1H, CHN), 4.54-4.58 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.46-5.57 (d, 1H, NH), 7.05-7.12 (br. m, 1H, Ph), 7.24-7.40 (m, 4H, Ph), 収率=定量的, $t_R$ = 5.51 分, $(M^+ + 1) = 367.07$

10

## 【 0 1 8 7 】



20

ジ-Boc-2-置換-(2-アミノ-3-ベンジルオキシ-プロピル-アミノ)-エタノール(4)の合成: 窒素下で室温に維持した35mmolの(3)の乾燥テトラヒドロフラン50mL溶液にテトラヒドロフラン中の1Nジボラン溶液200mLを加えた。溶液を室温で終夜攪拌し、次いで1N塩酸溶液200mLの氷冷溶液にゆっくりと注いだ。次いで、この二相溶液を固体の水酸化ナトリウムで中和した。重炭酸ナトリウムの飽和溶液140mL、次いでジ-tert-ブチル-ジカーボネート70mmolを加え、混合物を2日間室温で攪拌し、酢酸エチル200mLで希釈し、層を分離した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。生成物(4)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

## 【 0 1 8 8 】

30

【表 2】

R	化合物(4)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.42 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.48 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.48-3.02 (一連の m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 3.1-3.48 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.25-3.48 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.50-3.75 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.80-3.97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 4.25 (br. m, 1H, CHN), 4.45 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.9 (br. s, 1H, OH), 5.3 (br. s, 1H, NH), 7.1-7.4 (m, 10H, Ph), 収率=76%, $t_R$ = 8.04 分, $(M^+ + 1) = 515.25$
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.84-0.96 (m, CH, $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$ ), 1.42 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.45 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.42-1.44 (m, 1H, CH), 2.88-3.11 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.42-3.57 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.62-4.10 (2 つの m, 4H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 4.51 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.27-7.38 (m, 5H, Ph), 収率=80%, $t_R$ = 8.19 分, $(M^+ + 1) = 481.26$
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.35-1.43 (m, 18H, $^t\text{Bu}$ ), 3.20-3.32 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.55-3.84 (一連の m, 8H, $\text{CH}_2\text{N}$ , $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.90-4.05 (m, 1H, CHN), 4.45 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.9-5.02 (m, 1H, NH), 7.2-7.35 (m, 5H, Ph), 収率=56%, $t_R$ = 6.40 分, $(M^+ + 1) = 425.21$

40

## 【 0 1 8 9 】


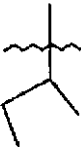
1,4-ジ-Boc-6-ベンジルオキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(5)の合成: 70mmolの(4)およびニクロム酸ピリジニウム400mmolの乾燥ジメチルホルムアミド300mL溶液を48 で窒素下において6時間攪拌し、室温まで冷却し、水1500mLに注ぎ、4 x 500mLのエチルエーテルで抽出した。エーテル層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。生成物(5

50

)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0190】

【表3】

R	化合物(5)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.4 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.5 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 3.05-3.58 (一連の m, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ , および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.1-4.32 (一連の m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.47 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.78-4.86 (br. m, 1H, CHN), 7.12-7.42 (m, 10H, Ph), 収率= 42%, $t_R$ = 8.65 分, $(M^+ + 1) = 511.05$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.82-1.56 (4 つの s, および 4 つの m, 27H, $^t\text{Bu}$ , CH, $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 3.20-3.52 (一連の m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.60-3.88 (一連の m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.20- 4.60 (一連の m, 1 つの s, 4H, $\text{CH}_2\text{O}$ , CHN), 7.21-7.37 (m, 5H, Ph), 収率= 24%, $t_R$ = 9.23 分, $(M^+ + 1) = 477.32$ .

10


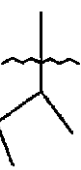
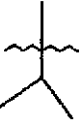
【0191】

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(6)の合成: 19mmolの(5)および10%炭素上パラジウム2gのエタノール200mL懸濁液を室温および大気圧で終夜水素化した。この懸濁液をセライトで濾過し、濃縮した。残渣をジクロロメタン中の50%トリフルオロ酢酸40mLに再溶解した。溶液を室温で2時間攪拌し、次いで濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン60mL/水40mLに再溶解し、固体の重炭酸ナトリウムで中和し、次いで固体の重炭酸ナトリウム40mmolおよびFmocクロリド20mmolを加えた。次いで混合物を室温で2時間攪拌し、酢酸エチル300mLで希釈し、層を分離した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

20

【0192】

【表4】

R	化合物(6)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.15-2.32 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2.70-2.81 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 3.0-3.32 (br. m, 3H, CHN, および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.47-3.65 (br. m, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 3.95-4.22 (2 つの m, 2H, CH, および CHN), 4.32-4.48 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.84- 4.92 (br. m, 1H, NH), 6.73-6.83 (br. m, 1H, Ph), 6.92-7.01 (br. m, 1H, Ph), 7.08- 7.82 (一連の m, 11H, Ph, およびフルベン), 収率= 65%, $t_R$ = 5.78 分, $(M^+ + 1) = 443.07$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.6-1.15 (br. ピーク, 7H, $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.42 (br. m, 1H, $\text{CH}_2$ ), 1.72-2.02 (2 つの br. ピーク, 1H, CH), 2.74-2.86 (t, 1/2H, CHN), 2.74-3.74 (一連の br. ピーク, 5H, $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ , および CHN), 4.16-4.22 (br. m, 1H, CH), 4.52-4.74 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.24-7.82 (一連の m, 8 H, フルベン), 収率= 34%, $t_R$ = 5.72 分, $(M^+ + 1) = 408.95$
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.73-1.00 (m, 7H, $\text{CH}_3$ ), 2.2-2.3 (br. m, 0.5H, CH), 2.74-4.62 (一連の br. ピーク, 12H, $\text{CH}_2\text{N}$ , $\text{CH}_2\text{O}$ および CHN), 3.68 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 7.26- 7.77 (m, 9 H, フルベン), 収率= 45% (3 ステップ), $t_R$ = 5.34 分, $(M^+ + 1) = 394.93$

30

40

【0193】

4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(7)の合成: 化合物(7)はいくつかの方法で調製した。

【0194】

(a)0 に冷却したアセトニトリル180mL、四塩化炭素180mLおよび水240mL中の10mmolの(6)の二相溶液に、固体の過ヨウ素酸ナトリウム112mmol、次いで塩化ルテニウム340mgを加えた。反応を室温まで加温させ、2時間攪拌し、次いでセライトで濾過した。層を分離し

50

、水層を2×75mLの酢酸エチルで再抽出した。有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。

【0195】

(b)12mmolの(6)および59mmolのPDCの乾燥ジメチルホルムアミド60mL溶液を48で窒素下において約5時間攪拌し、室温に冷却し、水600mLに注ぎ、3×200mLのジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。

【0196】

(c)室温で維持した17mmolの(6)のアセトン350mL溶液にジョーンズ試薬(クロム酸8.0g、水17.4mLおよび濃硫酸6.9mLから調製)25mLを加えた。この混合物を1時間攪拌し、イソプロパノール150mLを加え、混合物をセライトで濾過した。セライトは酢酸エチルで洗浄した。有機層を合わせ、濃縮した。残渣を酢酸エチル250mLに溶解し、2×50mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。

10

【0197】

(d)室温で維持した81mmolのアルコール(6)のアセトニトリル810mL溶液にリン酸バッファー溶液(水295mL中の一塩基リン酸ナトリウム7.2gおよび二塩基リン酸ナトリウム14.3gから調製)を加え、次いで3.3g(20.7mmol)のTEMPOおよび亜塩素酸ナトリウム18.6g(164.4mmol)を加え、この二相溶液を43に維持した油浴に入れ、次いで次亜塩素酸ナトリウム溶液(10~13%次亜塩素酸ナトリウム溶液19.3mLおよび水24mLを混合することによって調製)43.3mL(25.9mmol)の溶液をゆっくりと加えた。反応を43で4時間攪拌した。溶液を室温に冷却し、10%亜硫酸水素ナトリウム溶液200mLの溶液を加え、10分間攪拌し、酢酸エチル500mLで希釈し、層を分離した。有機層を1×100mLのブライン、1×160mLの1N塩酸溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。



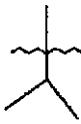
20

【0198】

生成物(7)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0199】

【表5】

R	化合物(7)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.36-2.45 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2.62-2.76 (m, 1/2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2.82-2.98 (m, 1/2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 3.13-3.25 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.98-4.64 (一連の m, 6H, $\text{CHN}$ , $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}$ ), 4.87 (br. m, 1/2H, $\text{NH}$ ), 6.85 (br. s, 1H, $\text{Ph}$ ), 7.0-7.40 (一連の m, 12H, $\text{Ph}$ および $\text{フルベン}$ ), 9.18-9.40 (br. d, 1H, $\text{CO}_2\text{H}$ ), $t_R = 5.91$ 分, $(M^+ + 1) = 457.37$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.64-1.02 (重複 t, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.02-1.68 (3つの br. m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 1.96-2.16 (br. m, 1H, $\text{CH}$ ), 2.88-3.18 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.85-4.12 (3つの m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ , および $\text{CHN}$ ), 4.18-4.35 (m, 1H, $\text{CH}$ ), 4.55-4.72 (m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 4.75-4.86 (br. m, 1H, $\text{NH}$ ), 7.28-7.82 (一連の m, 8H, $\text{フルベン}$ ), 9.1-9.26 (2つの br. s, 1H, $\text{CO}_2\text{H}$ ), $t_R = 5.86$ 分, $(M^+ + 1) = 423.20$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.62-1.03 (m, 7H, $\text{CH}_3$ ), 1.90-2.05 (br. m, 1H, $\text{CH}$ ), 2.87-4.60 (一連の br. ピーク, 8H, $\text{CH}_2\text{N}$ , $\text{CH}_2\text{O}$ および $\text{CHN}$ および $\text{CH}$ ), 7.29-7.80 (m, 9 H, $\text{フルベン}$ ), 収率= 61%, $t_R = 5.52$ 分, $(M^+ + 1) = 409.11$

30

40

【0200】

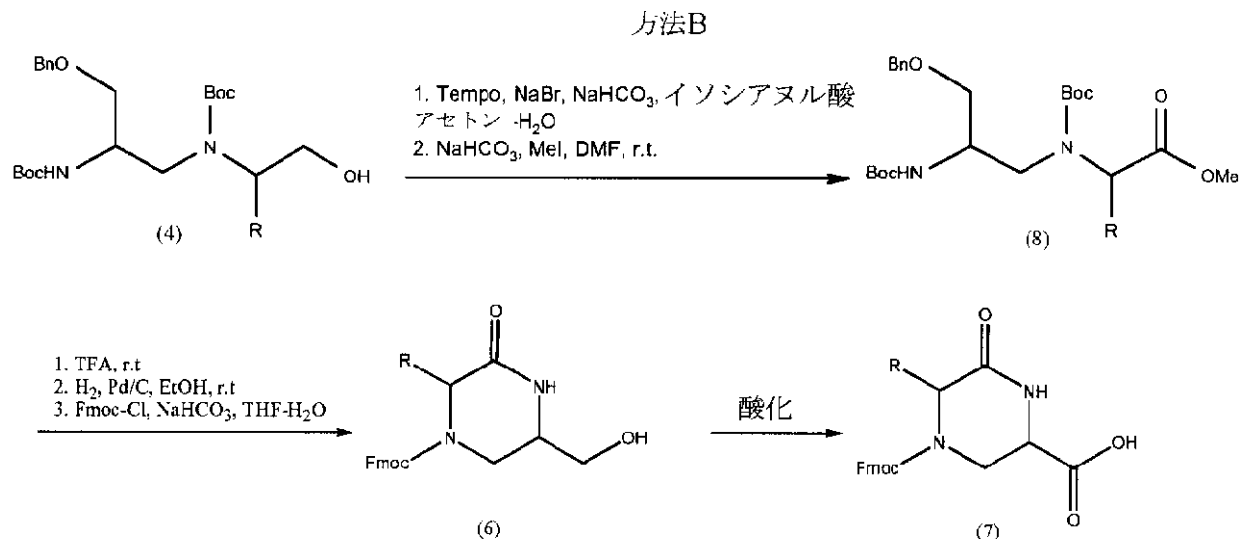
方法B:方法Aで記載した通りに調製した中間体ジ-Boc-2-置換-(2-アミノ-3-ベンジルオキシ-プロピル-アミノ)-エタノール(4)を、TEMPO/イソシアヌル酸試薬を使用して酸化して酸にし、次いでヨードメタンでエステル化して完全に保護された還元ジペプチド類似体(8)を得た。Boc基およびベンジルエーテルを脱保護して3-置換5-ヒドロキシメチル-ピペラジン-2-オンを得、これをFmoc誘導体として保護して(6)を得、これを方法Aで記載した通りに酸化して最終生成物にした。

【0201】

50



## 【化 1 3】



10

## 【 0 2 0 2】

ジ-Boc-(2-アミノ-3-ベンジルオキシ-プロピルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(8)の合成:0 に維持した76mmolの(4)のアセトン680mL懸濁液、および飽和重炭酸ナトリウム溶液210mLに固体の臭化ナトリウム21mmolおよび2.9mmolのTEMPOを加え、次いでトリクロロイソシアヌル酸156mmolをゆっくりと加えた。反応を30分間0、次いで室温で終夜撹拌し、1N塩酸溶液で酸性化し、2×300mLの酢酸エチルで抽出した。有機層を3×50mLの1N塩酸で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣を乾燥ジメチルホルムアミド40mLおよび固体の重炭酸ナトリウム95mmolに再溶解し、ヨードメタン112mmolを加え、室温で窒素下においてHPLCが反応の完了を示すまで混合物を撹拌し、次いでエチルエーテル200mLで溶液を希釈し、2×100mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。生成物(8)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

20

## 【 0 2 0 3】

## 【表 6】

R	化合物(8)の分析データ
	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.41 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 1.46 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.44-2.58 (d, 1/2H, CH <sub>2</sub> -Ph), 2.66-2.88 (d, 1/2H, CH <sub>2</sub> -Ph), 3.16-3.46 (3組の m, 5H, CH <sub>2</sub> -Ph, CH <sub>2</sub> N, および CH <sub>2</sub> O), 3.72 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.75-4.05 (2つの m, 1H, CHN), 4.42 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 4.95-5.10 (d, 1/2H, NH), 5.30-5.38 (d, 1/2H, NH), 7.10-7.38 (m, 10H, Ph), 収率= 62%, t <sub>R</sub> = 7.75 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 529.03.
	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.41 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 1.42 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 3.30-3.60 (br. m, 4H, CH <sub>2</sub> N, CH <sub>2</sub> O), 3.70 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.75-3.95 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 4.51 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.0-5.08 (br. s, 1H, NH), 7.25-7.37 (m, 5H, Ph), 収率= 47% t <sub>R</sub> = 7.28 分, (M <sup>+</sup> + 1)=453.17.

30

40

## 【 0 2 0 4】

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(6)の合成:ジクロロメタン中の50%トリフルオロ酢酸40mL中の36mmolの(8)の溶液を室温で2時間撹拌し、次いで飽和重炭酸ナトリウム溶液200mLに注いだ。層を分離し、有機層を濃縮した。残渣を酢酸エチル100mLに再溶解し、2×50mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をエタノール100mLに再溶解し、10%炭素上パラジウム5gおよび1N塩酸溶液35mLを加え、HPLCが反応の完了を示すまで室温および大気圧で混合物を水素化し、次いで溶液をセライトで濾過し、濃縮した。酢酸エチル80mLに残渣を再溶解し、水30mL中の重炭酸ナトリウム70mmolを加え、混合物を室温で終夜撹拌した。酢酸エチルを除去し、テトラヒドロフラン100mL

50

、次いで固体の重炭酸ナトリウム178mmolおよびFmocクロリド43mmolを加え、HPLCがその完了を示すまで混合物を攪拌し、酢酸エチル300mLで希釈し、層を分離した。有機層を2×50mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。生成物(6)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0205】

4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(7)の合成:化合物(7)を方法Aで記載した通りに調製した。

【0206】

官能化R側鎖を有するまたは有さない化合物に適用可能なケトピペラジン骨格の調製のための一般汎用合成スキーム(方法C、E、F)

10

方法C: (2-Fmoc-アミノ-3-R'-O-プロピルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(10)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、 $\alpha$ -アミノエステル(2)でFmoc O-保護セリナル(9)を還元的アミノ化することによって調製した。還元的アミノ化に必要なFmoc O-保護セリナル(9)は、方法Dに従って、エステル(12)を水素化ジイソブチルアルミニウムで還元すること、Fmoc O-保護セリノール(13)をDess-Martinペルヨージナンで酸化すること、またはFmoc O-保護セリンワインレブアミド(14)を水素化アルミニウムリチウムで還元することのいずれかで調製した。Fmoc O-保護セリナル(9)を調製する好ましい方法は、ワインレブアミド類似体の還元だった。次いで(2-Fmoc-アミノ-3-R'-O-プロピルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(10)をNおよびO脱保護し、環化し、Fmoc保護して3-置換6-ヒドロキシメチル-ピペラジン-2-オン(6)を得、次いでこれを方法Aで記載した通りに酸化して最終生成物にした。

20

【0207】

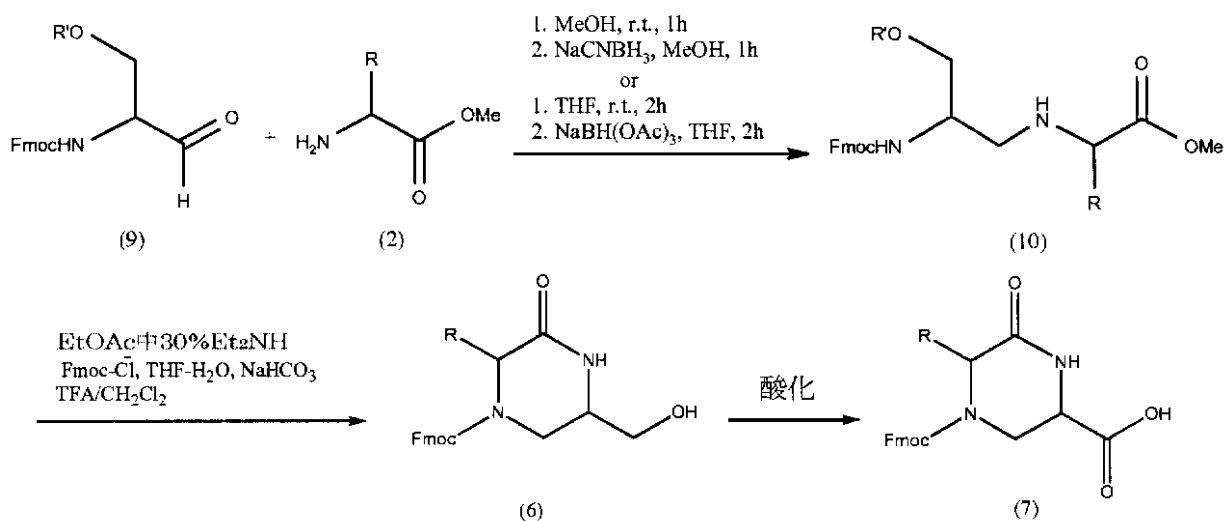
合成に使用したFmoc-O-保護セリナル(9)のヒドロキシル基上の保護基(R')は、アミノエステルの側鎖Rの性質に依存する。Rが官能基を含まない場合、Fmocセリンの側鎖は<sup>t</sup>Buエーテルとして保護された。Rが官能基を含む場合、Fmocセリンの側鎖はトリチルエーテルとして保護された。

【0208】

【化14】

### 方法C

30

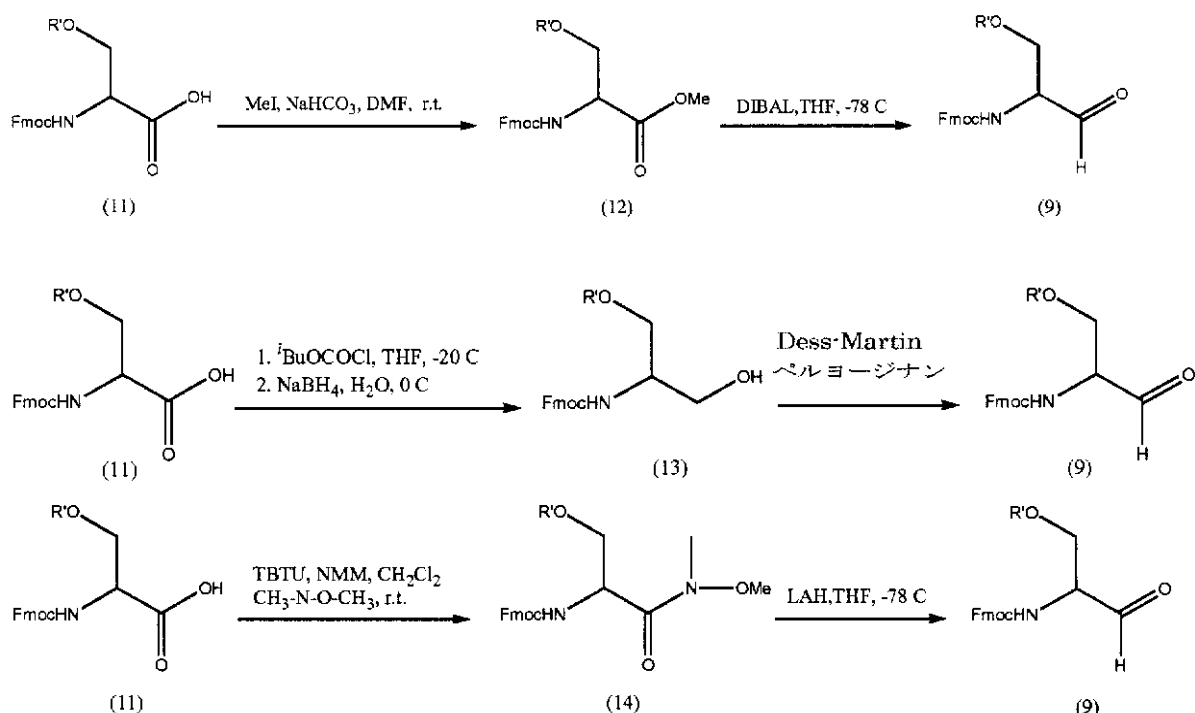


40

【0209】

## 【化 1 5】

## 方法D



10

20

## 【 0 2 1 0】

方法D: 種々のFmoc-O-保護セリナール(9)の合成。Fmoc-O-R'セリンメチルエステル(12)の合成: 窒素下で維持した乾燥ジメチルホルムアミド80mL中のFmoc O-R'セリン(11)80mmol、固体重炭酸ナトリウム10.0g(120mmol)、およびヨードメタン10.0mL(160mmol)の微懸濁液を室温で終夜撹拌した。次いで反応混合物を水500mLに注ぎ、固体を濾過した。固体を酢酸エチル800mLに再溶解し、1×200mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。精製は必要なかった。

## 【 0 2 1 1】

30

## 【表 7】

R'	化合物(12)の分析データ
<sup>t</sup> Bu	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.14 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 3.57-3.70 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -O), 3.75 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ), 3.79-3.83 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -O), 4.01-4.50 (一連の多重線, 4H), 5.64-5.68 (d, 1H, NH), 7.28-7.78 (8H, フルベン), 収率=93% t <sub>R</sub> 7.8 分.
Trt	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 3.42-3.48 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -O), 3.59-3.66 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -O), 3.81 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -O), 4.10-4.18 (m, 1H, CH), 4.36-4.42 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -O), 4.50-4.57 (m, 1H, CH-N), 5.73-5.78 (d, 1H, NH), 7.22-7.82 (8H, フルベン), 収率=定量的, t <sub>R</sub> = 9.04 分.

40

## 【 0 2 1 2】

Fmoc-O-R'セリノール(13)の合成: 窒素下で-20℃に維持した10.0mmolのFmoc O-R'セリン(11)の乾燥テトラヒドロフラン50mL溶液にトリエチルアミン1.77mL(12.7mmol)を加え、次いでクロロギ酸イソブチル1.57mL(12.0mmol)をゆっくりと加えた。混合物を30分間撹拌し、次いで温度を5℃未満に維持しながら水素化ホウ素ナトリウム3.77g(99.6mmol)の水10mL氷冷溶液にゆっくりと注いだ。反応を0℃で15分間撹拌し、次いで1N塩酸溶液でクエンチした。反応混合物を酢酸エチル100mLで希釈し、層を分離した。有機層を2×25mLの1N塩酸溶液、2×25mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

## 【 0 2 1 3】

50

【表 8】

R'	化合物(13)の分析データ
<sup>t</sup> Bu	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.14 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.90-2.95 (d, 1/2H, CH <sub>2</sub> -O), 3.63 (d, 2H, CH <sub>2</sub> -O), 3.65-3.93 (m, 3H, CH <sub>2</sub> -O), 4.20-4.35 (t, 1H, CH), 4.35-4.45 (d, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.50-5.57 (d, 1H, NH), 7.26-7.8 (8H, フルベン), 収率=85%, t <sub>R</sub> =6.42分.
Trt	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 3.24-3.32 (br. d, 1H, CH <sub>2</sub> -O), 3.30-3.45 (br. m, 1H, CH <sub>2</sub> -O), 3.60-3.987 (br. m, 3H, CH <sub>2</sub> -O, および CH-N), 4.13-4.22 (br. m, 1H, CH), 4.32-4.40 (br. d, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.24-5.32 (br. d, 1H, NH), 7.16-7.76 (23H, フルベン, および Trt), 収率=92%, t <sub>R</sub> =8.39分.

10

## 【0214】

Fmoc-O-R'セリンワインレブアミド(14)の合成: 20.2mmolのFmoc O-R'セリン(11)、6.98g(21.6mmol)の2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)、およびN-メチル-モルホリン2.5mL(22.7mmol)の乾燥ジクロロメタン80mL懸濁液を室温で窒素下において20分間攪拌し、次いでN,O-ジ-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩3.02g(31mmol)およびN-メチル-モルホリン3.3mL(30mmol)を加え、この懸濁液を室温で終夜攪拌した。次いで形成した溶液を濃縮乾固し、酢酸エチル200mLと水100mLとの間に再分配し、2×40mLの1N塩酸溶液、次いで2×40mLの飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。精製は必要なかった。

20

## 【0215】

【表 9】

R'	化合物(14)の分析データ
<sup>t</sup> Bu	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 3.30 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -N), 3.55-3.7 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -O), 3.76 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -O), 4.19-4.26 (m, 1H, CH), 4.30-4.38 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -O), 4.82-4.91 (広幅 m, 1H, CHN), 5.68-5.75 (d, 1H, NH), 7.2-7.8 (8H, フルベン), 収率=定量的, t <sub>R</sub> =6.59分.
Trt	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 3.24 (s, 3H, CH <sub>3</sub> N), 3.34-3.46 (m 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 4.15-4.37 (2つの m, CH <sub>2</sub> , CH), 4.86-4.98 (m 1H, CHN), 5.80-5.86 (d, 1H, NH), 7.18-7.8 (一連の m, 23H, Trt およびフルベン), 収率=定量的, t <sub>R</sub> =8.0分.

30

## 【0216】

エステル(12)からのFmoc-O-R'セリナール(9)の合成: -78℃で窒素下において維持した3.5mmolの(12)のテトラヒドロフラン5mL溶液に1N水素化ジイソブチルアルミニウム(DIBAL)溶液10mLをゆっくりと加え、15分間攪拌し、酒石酸ナトリウムおよびカリウムの飽和溶液をゆっくりと加えることによってクエンチした。反応を室温まで加温させ、酢酸エチル50mLで希釈し、酒石酸ナトリウムおよびカリウムの飽和溶液50mLを加えた。層を分離し、水層を1×50mLの酢酸エチルで再抽出した。有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。化合物(9)をさらに精製することなく次のステップで使用した。

40

## 【0217】

【表 10】

R'	化合物(9)の分析データ
<sup>t</sup> Bu	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.16 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 3.59-3.66 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> O), 3.90-3.98 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> O), 4.20-4.27 (t, 1H, CH), 4.32-4.45 (2つの m, 3H, CHN, および CH <sub>2</sub> O), 5.64-5.74 (br. d, 1H, NH), 7.28-7.35 (m, 2H, フルベン), 7.36-7.44 (m, 2H, フルベン), 7.58-7.65 (d, 2H, フルベン), 7.73-7.78 (d, 2H, フルベン), 9.62 (s, 1H, CHO).
Trt	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 3.53-3.61 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> O), 3.66-3.75 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> O), 4.33-4.47 (2つの m, 4H, CHN, CH, および CH <sub>2</sub> ), 5.66-5.75 (d, 1H, NH), 7.20-7.81 (一連の m, 23H, Trt, およびフルベン), 9.6 (s, 1H, CHO).

10

## 【0218】

アルコール(13)からのFmoc-O-R'セリナール(9)の合成: 窒素下で室温に維持した80mmolのFmoc-O-R'セリノール(13)の乾燥ジクロロメタン200mL溶液にDess-Martinペルヨージナン88mmolを加え、反応を2.5時間攪拌し、10%チオ硫酸ナトリウム水溶液400mLを加えることによってクエンチした。層を分離し、有機層を濃縮し、エチルエーテル300mLで希釈し、10%チオ硫酸ナトリウムを含有する飽和重炭酸塩水溶液で3回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。

20

## 【0219】

ワインレブアミド(14)からのFmoc-O-R'セリナール(9)の合成: 窒素下で-78℃に冷却した8.8g(20.2mmol)の粗製Fmoc-O-R'セリンワインレブアミド中間体(14)の乾燥テトラヒドロフラン60mL溶液に、テトラヒドロフラン中の1N水素化アルミニウムリチウム溶液30mLを加えた。溶液を15分間攪拌し、次いで硫酸水素カリウムの1.4N溶液30mLをゆっくりと加えることによってクエンチした。室温まで加温した後、固体を濾過し、濾液を濃縮乾固した。残渣を酢酸エチル50mLと1N塩酸溶液25mLとの間に再分配した。層を分離し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮した。

30

## 【0220】

(2-Fmoc-アミノ-3-R'-O-プロピルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(10)の合成: シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドを還元剤として使用する還元的アミノ化によって化合物(10)を調製した。

## 【0221】

シアノ水素化ホウ素ナトリウム法: 窒素下で室温に維持した8.5mmolの(2)塩酸塩のメタノール20mL溶液に固体の水酸化カリウム2.3mmolを加え、混合物を25分間攪拌した。Fmoc-O-R'セリナール(9)のメタノール10mL溶液を上記懸濁液に加え、反応混合物を1時間攪拌した。1Nシアノ水素化ホウ素ナトリウム8.5mLのテトラヒドロフラン溶液をゆっくりと加え、反応をさらに1時間攪拌し、濾過し、濃縮した。残渣を酢酸エチルと水との間に分配し、有機層を1×20mLの飽和重炭酸ナトリウムで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。

40

## 【0222】

ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド法: 21mmolの(2)塩酸塩およびトリエチルアミン2.9mL(21mmol)の乾燥テトラヒドロフラン50mL懸濁液を室温で45分間攪拌し、次いで約20mmolの粗製Fmoc-(O-R')-セリナール(9)のテトラヒドロフラン30mL溶液、次いで4A粉末モレキュラーシーブ1.7gを加え、この懸濁液をさらに2時間攪拌した。固体のナトリウムトリアセトキシボロヒドリド6.4g(30mmol)を加え、この懸濁液を室温で終夜攪拌した。懸濁液をメタノールで希釈し、モレキュラーシーブ濾過し、濾液を濃縮した。残渣を酢酸エチル100mLと水50mLとの間に分配した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮した。





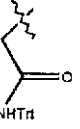
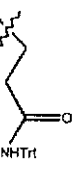

## 【0223】

化合物(10)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

50

【 0 2 2 4 】

【 表 1 1 A 】

R'	R	化合物(10)の分析データ
<sup>t</sup> Bu		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.17 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 1.26-1.32 (d, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.68-2.80 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.32-3.56 (2 つの br. m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.72 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.66-3.82 (m, 1H, CHN), 4.18-4.28 (t, 1H, CH), 4.30-4.46 (d, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.34-5.44 (br. d, 1H, NH), 7.25-7.44 (2 つの m, 4H, フルベン), 7.59-7.64 (d, 2H, フルベン), 7.74-7.79 (d, 2H, フルベン), 収率= 57%, t <sub>R</sub> = 4.93 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 455.67.
<sup>t</sup> Bu		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 0.88-0.98 (br. t, 6H CH <sub>3</sub> ), 1.21 (s 9H, <sup>t</sup> Bu), 1.26-1.34 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1.44-1.54 (m, 1H, CH), 2.58-2.86 (2 つの m, 1H, CH <sub>2</sub> N), 3.25-3.35 (m, 1H, CH <sub>2</sub> N), 3.37-3.58 (2 つの m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.72-3.80 (br. m, 1H, CHN), 4.14-4.31 (m, 1H, CH), 4.32-4.45 (br. d, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.34-5.44 (br. d, 1H, NH), 7.30-7.84 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 50%, t <sub>R</sub> = 5.66 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 511.67.
<sup>t</sup> Bu		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.17 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.68-2.78 (m, 1H, CH <sub>2</sub> N), 2.82-2.92 (m, 1H, CH <sub>2</sub> N), 3.35-3.55 (m, 4H, CH <sub>2</sub> N, および CH <sub>2</sub> O), 3.73 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.75-3.85 (m, 1H, CHN), 4.20-4.28 (m, 1H, CH), 4.32-4.48 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.40-5.50 (d, 1H, NH), 7.28-7.8 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 44%, t <sub>R</sub> = 5.02 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 441.50.
<sup>t</sup> Bu		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 0.84-0.92 (br. t, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.17 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 1.28-1.35 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 1.48-1.84 (2 つの m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.62-2.82 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.20-3.33 (m, 1H, CHN), 3.35-3.54 (2 つの m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.72 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.64-3.80 (m, 1H, CHN), 4.20-4.28 (t, 1H, CH), 4.32-4.42 (m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.34-5.44 (br. d, 1H, NH), 7.25-7.79 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 65%, t <sub>R</sub> = 5.85 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 441.27.
Trt		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 2.36-2.63 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> CO), 2.65-2.90 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.05-3.20 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.50-3.64 (br. m, 1H, CHN), 3.68 & 3.69 (2 つの s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.82-3.94 (br. m, 1H, CHN), 4.12-4.21 (br. m, 1H, CH), 4.24-4.43 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 4.90-4.98 (br. d, 1H, NH), 7.15-7.80 (一連の m, 23H, フルベンおよび Trt), 収率= 39%, t <sub>R</sub> = 8.13 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 926.99.
Trt		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.68-1.82 (m, 1H, CH <sub>2</sub> ), 1.85-1.99 (m, 1H, CH <sub>2</sub> ), 2.12-2.37 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CO), 2.58-2.96 (一連の 4 つの m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.08-3.28 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.66 & 3.67 (2 つの s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.76-3.89 (br. m, 1 H, CHN), 4.15-4.24 (br. m, 1H, CH), 4.28-4.41 (br. d, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.10-5.22 (br. d, 1/2H, NH), 5.28-5.35 (br. d, 1/2H, NH), 7.15-7.80 (一連の m, 23H, フルベン, および Trt), 収率= 43%, t <sub>R</sub> = 8.10 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 940.97.
Trt		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.43 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.46-1.56 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.06 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.50 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.57 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.75-2.80 (m, 1H, CH <sub>2</sub> N), 2.91 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.12-3.32 (3 つの br. m, 4H, CH <sub>2</sub> N), 3.68 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 4.13-4.21 (t, 1H, CH), 4.28-4.38 (d, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.12-5.23 (br. d, 1H, NH), 5.80-6.12 (2 つの br. m, 2H, NH), 7.18-7.80 (一連の m, 23H, フルベン, および Trt), 収率= 68%, t <sub>R</sub> = 7.52 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 997.91.

10

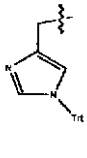
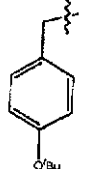
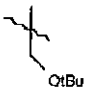

20

30

40

【 0 2 2 5 】

【表 1 1 B】

R'	R	化合物(10)の分析データ
Trt		$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.75-2.98 (2つの m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.06-3.18 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.22-3.33 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.57 & 3.60 (2つの s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.80-3.92 (m, 1H, $\text{CHN}$ ), 4.00-4.08 (m, 1H, CH), 4.18-4.30 (br. d, 2H, $\text{CH}_2$ ), 7.00-7.80 (一連の m, 25H, フルベン, Trt, および イミダゾール), 収率= 57%, $t_R$ = 7.59 分, $(M^+ + 1) = 949.79$ .
Trt		$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.26 & 1.27 (2つの s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.50-2.61 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2.76-2.86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ , および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.92-3.20 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.92-3.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.32-3.46 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.59 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.79-3.88 (m, 1H, $\text{CHN}$ ), 4.18-4.28 (m, 1H, CH), 4.30-4.37 (br. d, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.18-5.26 (br. d, 1H, NH), 6.80-6.88 (d, 2H, Ph), 6.96-7.02 (d, 2H, Ph), 7.18-7.80 (一連の m, 23H, フルベン, および Trt), 収率= 23%.
Trt		$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.11 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.54-2.74 (2つの m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.02-3.58 (6つの m, 6H, $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ , および $\text{CHN}$ ), 3.70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3.83-3.93 (m, 1H, $\text{CHN}$ ), 4.15-4.29 (m, 1H, CH), 4.34-4.37 (d, 2H, $\text{CH}_2$ ), 5.46-5.53 (br. d, 1H, NH), 7.18-7.79 (一連の m, 23H, フルベン, および Trt), 収率= 45%, $(M^+ + 1) = 713.42$ .
$^t\text{Trt}$		$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.80-0.92 (m, 7H, $\text{CH}_3$ ), 1.75-1.90 (br. m, 1H, CH), 2.6-4.36 (一連の m, 9H, $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ , $\text{CHN}$ ), 3.68 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}$ ), 5.5 (d, 0.5H, CH), 7.23-7.77 (m, 24H, フルベンおよび Trt), 収率= 72% (3 ステップ), $t_R$ = 6.86 分, $(M^+ + 1) = 669.10$ .

10

20

## 【0 2 2 6】

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(6)の合成:化合物(6)の調製には、3つのステップが必要だった:(a)同時環化を伴うFmoc脱保護、(b)Fmoc保護、および(c)ヒドロキシル基脱保護。

## 【0 2 2 7】

Fmoc基の除去および環化:酢酸エチル溶液中の30%ジエチルアミン30mL中の環式化合物10mmolの溶液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮乾固した。

## 【0 2 2 8】

(a)Fmoc保護:テトラヒドロフラン20mLおよび水10mL中の化合物10mmolの二相溶液に、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)、次いで3.36g(13mmol)のFmoc-Clを加えた。混合物を3時間攪拌し、酢酸エチルで希釈し、層を分離し、有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。

## 【0 2 2 9】

(b)ヒドロキシル基脱保護: $^t\text{Bu}$ エーテル保護基含有化合物について:90%トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液で化合物を1~2時間脱保護し、次いで濃縮乾固した。残渣を酢酸エチルに溶解し、重炭酸ナトリウムの飽和溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、次いで濃縮した。Trtエーテル保護基を含有する化合物について:2~10%トリ-イソプロピルシランを含有するジクロロメタン中の1~10%トリフルオロ酢酸の溶液を加えることによって化合物を脱保護した。反応は瞬間的だった。次いで、重炭酸ナトリウムの飽和溶液に注ぐことによって溶液を中和した。層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。

30

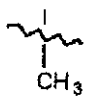
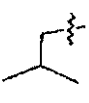
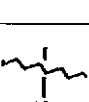


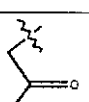
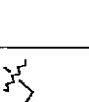
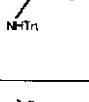
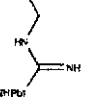
40

## 【0 2 3 0】

化合物(6)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

## 【0 2 3 1】

【表 1 2 A】

R	化合物(6)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.17-1.35 (br. m, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.64-2.82 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.2-3.8 (2 つの br. m, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.18-4.44 (br. t, 1H, CH), 4.64-4.90 (br. d, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.70-6.86 (br. s, 1H, NH), 7.22-7.82 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 72%, $t_R$ = 4.64 分, $(M^+ + 1) = 367.32$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.64-1.02 (m, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.45-1.63 (m, 3H, $\text{CH}_2$ , および CH), 2.65-2.84 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.89-3.76 (一連の br. m, 5H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 4.17-4.28 (br. m, 1H, CH), 4.48-4.82 (3 つの br. m, $\text{CH}_2\text{O}$ , NH, および OH), 6.95- 7.82 (一連の br. m, 8H, フルベン), 収率= 51%, $t_R$ = 5.43 分, $(M^+ + 1) = 409.08$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.17-3.78 (一連の br. m, 5H, $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ , および CHN), 4.21-4.27 (t, 1H, CH), 4.42-4.68 (br. ピーク, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.62 (br. s, 1H, NH), 7.28-7.81 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 67%, $t_R$ = 4.50 分, $(M^+ + 1) = 353.45$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.72-0.90 (br. ピーク, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1.0-1.40 (br. ピーク, 4H, $\text{CH}_2$ ), 1.48-1.90 (3 つの br. ピーク, 2H, $\text{CH}_2$ ), 2.68-2.80 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.10-3.70 (4 つの br. ピーク, 4H, $\text{CH}_2\text{O}$ , CHN, および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.15-4.25 (br. ピーク, 1H, CH), 4.54-4.62 (br. d, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.25-7.80 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 72%, $t_R$ = 5.77 分, $(M^+ + 1) = 408.95$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.50-3.38 (4 つの重複 br.m, 7H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ , $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 3.42-3.64 (m, 1/2 H, CHN), 3.70-3.88 (m, 1/2H, CHN), 4.16-4.23 (br. d, 1H, CH), 4.48-4.68 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.94-5.05 (br. d, 1H, NH), 6.95-7.80 (一連の m, 23H, フルベンおよび Trt), 収率= 83%, $t_R$ = 7.04 分, $(M^+ + 1) = 652.61$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.67-1.78 (br. m, 1H, $\text{CH}_2$ ), 1.81-2.0 (br. m, 1H, $\text{CH}_2$ ), 2.10- 2.43 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.58-2.81 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.02-3.66 (一連の br. m, 4H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 4.17-4.23 (br. m, 1H, CH), 4.40-4.80 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.15-7.80 (一連の m, 23H, フルベン, および Trt), 収率= 80%, $t_R$ = 7.04 分, $(M^+ + 1) = 666.66$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.43 (s, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.50-1.60 (br. m, 4H, $\text{CH}_2$ ), 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.48 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.55 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.92 (s, 2H, $\text{CH}_2$ ), 3.08-3.47 (2 つの m, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.57-3.97 (一連の m, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 4.15-4.25 (br. m, 1H, CH), 4.44-4.74 (br. m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 7.20-7.80 (一連の br. m, 8H, フルベン), 収率= 91%, $t_R$ = 6.05 分, $(M^+ + 1) = 704.71$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.14-2.56 (2 つの m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Im}$ ), 2.90-3.90 (一連の m, 4H, $\text{CH}_2\text{N}$ , および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.0-4.74 (一連の m, 4H, CHN, CH, $\text{CH}_2$ ), 7.0-7.80 (一連の多重線, 25H, フルベン, Im, および Trt), 収率= 64%, $t_R$ = 5.27 分, $(M^+ + 1) = 675.08$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.29 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.47-2.74 (一連の m, 2H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.90-3.04 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.06-3.45 (3 つの m, 6H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.89-4.29 (3 つの m, 2H, CH, および CHN), 4.32-4.42 (m, 1H, CHN), 4.56-4.66 (m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 6.81-7.80 (一連の m, 12 H, フルベン, および Ph), 収率= 71%, $(M^+ + 1) = 515.81$ .

10

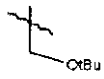
20

30

40



【表 1 2 B】

R	化合物(6)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.00 & 1.10 (2つの s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 3.0-3.74 (4つの br. m, 7H, $\text{CH}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ , および CHN), 3.86-4.26 (一連の m, 2H, CHN, および CH), 4.42-4.68 (br. d, 2H, $\text{CH}_2$ ), 7.26-7.80 (一連の br.m, 8H, フルベン), 収率 = 55%, ( $\text{M}^+ + 1$ ) = 439.08.






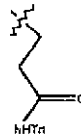
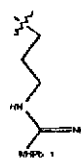
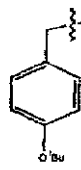

## 【 0 2 3 3 】

4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(7)の合成:化合物(7)を方法Aで記載した通りに調製した。化合物(7)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

10

## 【 0 2 3 4 】

【表 1 3】

R	化合物(7)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.08-1.20 (br. ピーク, 1.5H, $\text{CH}_3$ ), 1.30-1.38 (br. ピーク, 1.5H, $\text{CH}_3$ ), 2.86-3.07 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.83-3.97 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.18-4.37 (一連の br. ピーク, 2H, CH および CHN), 4.40-4.74 (2 つの br. ピーク, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 7.28-7.82 (一連の m, 8H, フルベン), 8.92-9.10 (br. s, 1H, $\text{CO}_2\text{H}$ ), 収率= 51%, $t_R$ = 4.80 分, $(M^+ + 1) = 381.57$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.40-1.60 (一連の br. ピーク, 9H, CH, $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 2.81-3.09 (br. ピーク, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.68-3.80 (br. ピーク, 2H, CHN), 3.96-4.32 (br. ピーク s, 2H, CH, および CNH), 4.48-4.68 (br. ピーク, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.26-7.84 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 50%, $t_R$ = 5.57 分, $(M^+ + 1) = 423.15$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.77-3.99 (m, 1H, CHN), 3.90-4.35 (一連の m, 5H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CH), 4.44-4.57 (d, 2H, $\text{CH}_2$ ), 7.3-7.82 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 48%, $t_R$ = 4.58 分, $(M^+ + 1) = 367.30$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.69-1.90 (一連の br. ピーク, $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 2.85-3.05 (br. ピーク, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.65-3.95 (2 つの br. ピーク, 1H, CHN), 4.00-4.40 (2 つの br. ピーク, $\text{CH}_2\text{N}$ , および CH), 4.41-4.74 (br. ピーク, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CHN), 7.20-7.80 (一連の br. m, 8H, フルベン), 収率= 70%, $t_R$ = 5.93 分, $(M^+ + 1) = 423.42$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.51-3.06 (一連の m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.85-4.86 (一連の m, 7H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN, CH, および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.0-7.78 (一連の br. m, 23H, フルベン および Trt), 収率= 30%, $t_R$ = 7.04 分, $(M^+ + 1) = 666.79$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.74-2.46 (一連の br. m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ , および $\text{CH}_2$ ), 3.78- 4.06 (2 つの m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.16-4.68 (一連の br. m, 5H, CHN, CH, および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.14-7.82 (一連の br. m, 23H, フルベン, および Trt), 収率= 47%, $t_R$ = 7.11 分, $(M^+ + 1) = 680.33$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.08-1.60 (一連の br. ピーク, 8H, $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.48 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.57 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.92 (s, 2H, $\text{CH}_3$ ), 3.10-3.25 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.82-4.28 (一連の br. m, 4H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN, CH), 4.40-4.70 (br. m, 3H, CHN, および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.20-7.80 (一連の br. m, 8H, フルベン), 収率= 42%, $t_R$ = 6.15 分, $(M^+ + 1) = 718.69$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.28 & 1.34 (2 つの s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.42-3.64 (一連の br. m, 5H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN, および $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.0-4.76 (一連の br. m, 4H, CHN, CH, および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.60-6.96 (br. m, 4H, Ph), 7.20-7.80 (一連の br. m, 8H, フルベン), 収率= 67%, $(M^+ + 1) = 529.17$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.96- & 1.10 (2 つの s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 3.04-3.18 (br. m, 0.5H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.30-3.94 (4 つの br. m, 3.5H, $\text{CH}_2\text{N}$ , および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.98-4.32 (br. m, 2H, CH, および CHN), 4.33-4.74 (2 つの br. m, 3H, CHN, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.28-7.80 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 60%, $(M^+ + 1) = 453.37$ .

## 【 0 2 3 5 】

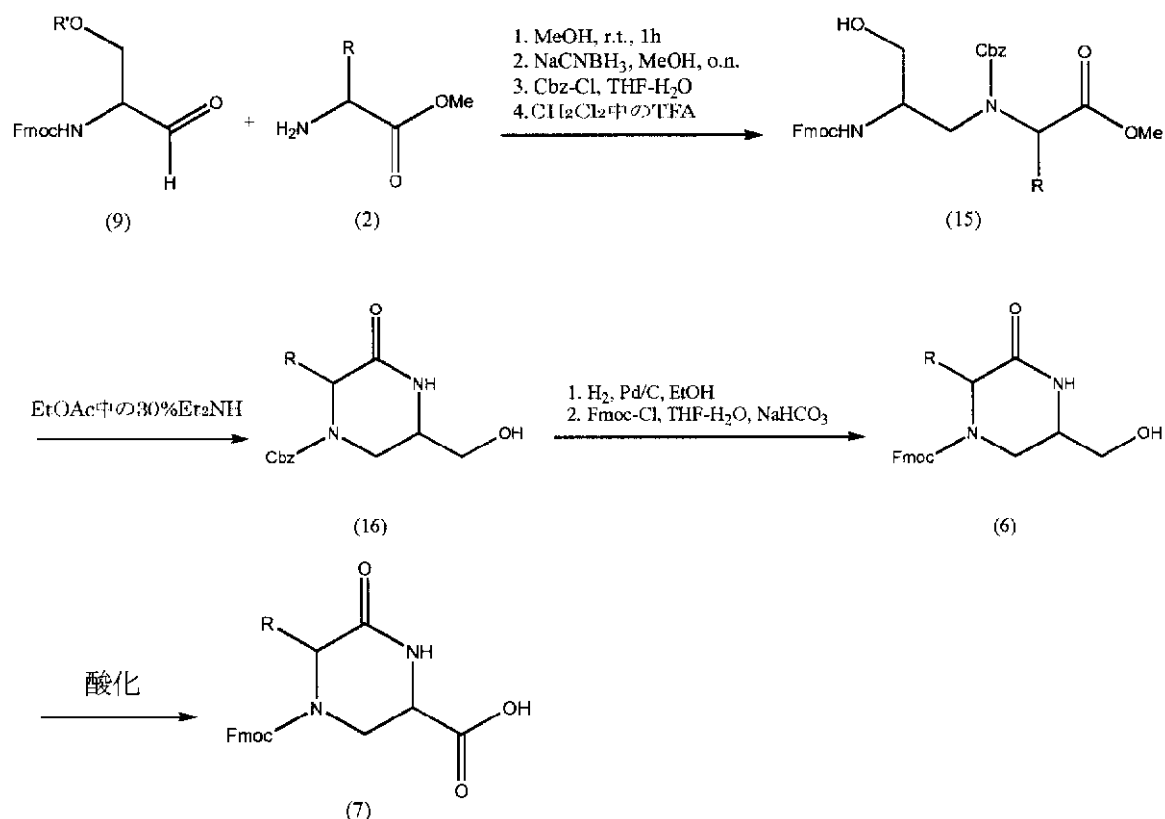
方法E: (2-Fmoc-アミノ-3-ヒドロキシ-プロピル-Cbz-アミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(15)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドライドのいずれかを還元剤として使用して、アミノエステル(2)でFmocセリナール( $\text{OR}'$ )(9)を還元的アミノ化することによって調製した。第二級アミンをクロロギ酸ベンジルで保護し、次いでヒドロキシル基をトリフルオロ酢酸溶液で脱保護した。次いで、化合物(15)をFmoc脱保護した。アミノエステル中間体が即座に環化して4-Cbz-3-置換6-ヒドロキシメチル

-ピペラジン-2-オン(16)が形成した。Fmoc3-置換6-ヒドロキシメチル-ピペラジン-2-オン(6)を保護基交換によって調製し、次いで方法Aで記載した通りに酸化して所望の生成物(7)にした。

【0236】

【化16】

# 方法E

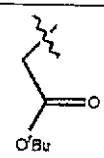


【0237】

(2-Fmoc-アミノ-3-ヒドロキシ-プロピル-Cbz-アミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(15)の合成:メタノール80mL中の67mmolのアミノエステル塩酸塩(2)および固体の水酸化カリウム20.9mmolの懸濁液を室温で25分間攪拌し、次いで(9)のメタノール250mL懸濁液に加えた。反応混合物を1.5時間攪拌し、次いでテトラヒドロフラン中の1Nシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液70mLをゆっくりと加えた。反応を終夜攪拌し、次いで濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン300mLと1N塩酸溶液50mLとの間に分配した。層を分離し、有機層を重炭酸ナトリウム239mmolの水50mL溶液で中和し、次いでクロロギ酸ベンジル66mmolをゆっくりと加え、反応を3時間攪拌し、酢酸エチル200mLで希釈し、層を分離した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をトリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液に溶解し、室温で2時間攪拌した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液200mLに注いだ。層を分離し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。化合物(15)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0238】

【表 1 4】

R	化合物(15)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.38-1.45 (d, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.68-2.78 (m, 1/2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.0-3.20 (m と s が共存, 3.5H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ , $\text{CH}_2\text{-O}$ , および $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3.52-3.60 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3.96-4.40 (一連の多重線, 4H), 4.96-5.10 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 5.77-5.83 (m, 1/2H, NH), 7.14-7.79, (一連の m, 23H, Trt およびフルベン), 収率= 70%, $t_R = 9.82$ 分.

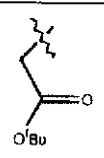
【 0 2 3 9 】

10

4-Cbz-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(16)の合成: 酢酸エチル中の30%ジエチルアミン100mL中の24mmolの(15)の溶液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮乾固した。化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【 0 2 4 0 】

【表 1 5】

R	化合物(16)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.36 (d, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.60-2.90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.94-3.20 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ , 3.38-3.50 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.86-4.20 (m, 1H, $\text{CH-N}$ ), 4.74-4.84 (br, 1H, OH), 5.10-5.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 7.26-7.36 (s, 5H, Ph), 7.87-7.95 (s, 1H, NH), 収率= 70%, $t_R = 4.66$ 分, $(M^+ + 1) = 379.41$ .

20

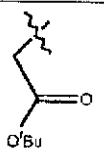
【 0 2 4 1 】

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(6)の合成: 15mmolの(16)および10%炭素上パラジウム1.8gのエタノール50mL懸濁液を室温および大気圧でHPLCが反応の完了を示すまで水素化した。次いで混合物をセライトで濾過し、濃縮し、残渣をテトラヒドロフラン35mLおよび水10mLに溶解し、次いで固体の重炭酸ナトリウム62mmol、次いで16mmolのFmoc-Clを加え、混合物を3時間攪拌し、酢酸エチル100mLおよび水10mLで希釈した。層を分離し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。化合物(6)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

30

【 0 2 4 2 】

【表 1 6】

R	化合物(6)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.41 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.20-2.40 (m, 1/2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.64-2.96 (m, 1.5H, $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.98-3.16 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.2-3.8 (一連の br. m, 4H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.20-4.38 (2つの m, $\text{CHN}$ , および $\text{CH}$ ), 4.5-4.67 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.70-4.83 (br. m, 1/2H, NH), 7.27-7.84 (一連の m, 8H, フルベン), 収率= 77%, $t_R = 5.78$ 分, $(M^+ + 1) = 467.82$ .

40

【 0 2 4 3 】

4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(7)の合成: 化合物(7)を方法Aで記載した通りに調製し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【 0 2 4 4 】



7.38 (m, 10H, Ph); HPLC  $t_R$  = 5.33分、( $M^+$  +  $Na^+$ ) = 337.64。

【0248】

Cbzセリナル(OBn) (19)の合成:化合物(19)は化合物(9)について記載した通りに調製した。窒素下で室温に維持した乾燥ジクロロメタン200mL中の80mmolのCbz-O-Bnセリノール(18)の溶液にDess-Martinペルヨージナン88mmolを加え、反応を2.5時間攪拌し、次いで10%チオ硫酸ナトリウム水溶液400mLを加えることによってクエンチした。層を分離し、有機層を濃縮し、エチルエーテル300mLで希釈し、10%チオ硫酸ナトリウムを含有する飽和重炭酸塩水溶液で3回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。化合物(19)を粗製収率9%で得、さらに精製することなく使用した。 $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ) 3.69~3.78 (dd, 1H,  $CH_2O$ )、3.99~4.06 (dd, 1H,  $CH_2O$ )、4.37~4.46 (m, 1H, CHN)、4.47~4.52 (d, 2H,  $CH_2O$ )、5.14 (s, 2H,  $CH_2O$ )、5.65~5.75 (br. d, 1H, NH)、7.14~7.48 (一連のm, 9H, Ph)、7.98~8.08 (dd, 1H, Ph)、9.63 (s, 1H, CHO)。

10

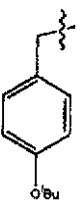
【0249】

(2-Cbz-アミノ-3-ベンジルオキシ-プロピルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(20)の合成:化合物(20)は、化合物(10)について記載した通りに調製したが、Cbzセリナル(19)をアルデヒドとして使用した。化合物(20)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0250】

【表18】

20

R	化合物(20)の分析データ
	$^1H$ NMR $\delta$ ( $CDCl_3$ ): 1.30 (s, 9H, 'Bu), 2.50-2.96 (m, 3H, $CH_2Ph$ , および $CH_2N$ ), 3.28-3.54 (m, 3H, $CH_2N$ , および $CH_2O$ ), 3.59 および 3.61 (2つのs, 3H, $CH_3O$ ), 3.68-3.86 (m, 1H, CHN), 4.41-4.45 (d, 2H, $CH_2O$ ), 5.08 (s, 2H, $CH_2O$ ), 5.25-5.37 (br. t, 1H, NH), 6.84-6.88 (d, 2H, Ph), 6.98-7.04 (d, 2H, Ph), 7.24-7.37 (m, 10H, Ph), 収率= 50%, ( $M^+$ + 1) = 549.35.

【0251】

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(6)の合成:エタノール160mL、1N塩酸38mLおよび10%炭素上パラジウム20g中の38mmolの(20)の懸濁液を室温および大気圧でHPLCが反応の完了を示すまで水素化した。次いで混合物をセライトで濾過し、濃縮乾固した。残渣をテトラヒドロフラン75mLで希釈し、飽和重炭酸ナトリウム溶液で中和した。固体の重炭酸ナトリウム106mmolおよびFmocクロリド53mmolを加え、反応を室温でHPLCが反応の完了を示すまで攪拌し、酢酸エチル300mLおよびブライン300mLで希釈した。層を分離し、有機層をブラインで2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。生成物(6)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

30

【0252】

4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(7)の合成:化合物(7)を方法Aで記載した通りに調製した。

40

【0253】

官能化側鎖を有さないアミノ酸を模倣する2,2-二置換ケトピペラジン骨格の合成(方法G)

官能化側鎖を有さないアミノ酸を模倣する4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-メチル-2-カルボン酸骨格の合成は方法Gを使用して実施した。2-Boc-アミノ-3-メトキシカルボニル-1-置換-メチルアミノ-2-メチル-プロピオン酸tert-ブチルエステル(23)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、-アミノエステル(2)で2-Boc-アミノ-2-メチル-3-オキソ-プロピオン酸メチルエステル(22)を還元的アミノ化することによって調製した。還元的アミノ化に必要な化合物(22)は、-メチル-Bocセリンtert-ブチルエステル(21)をDess-Martinペ

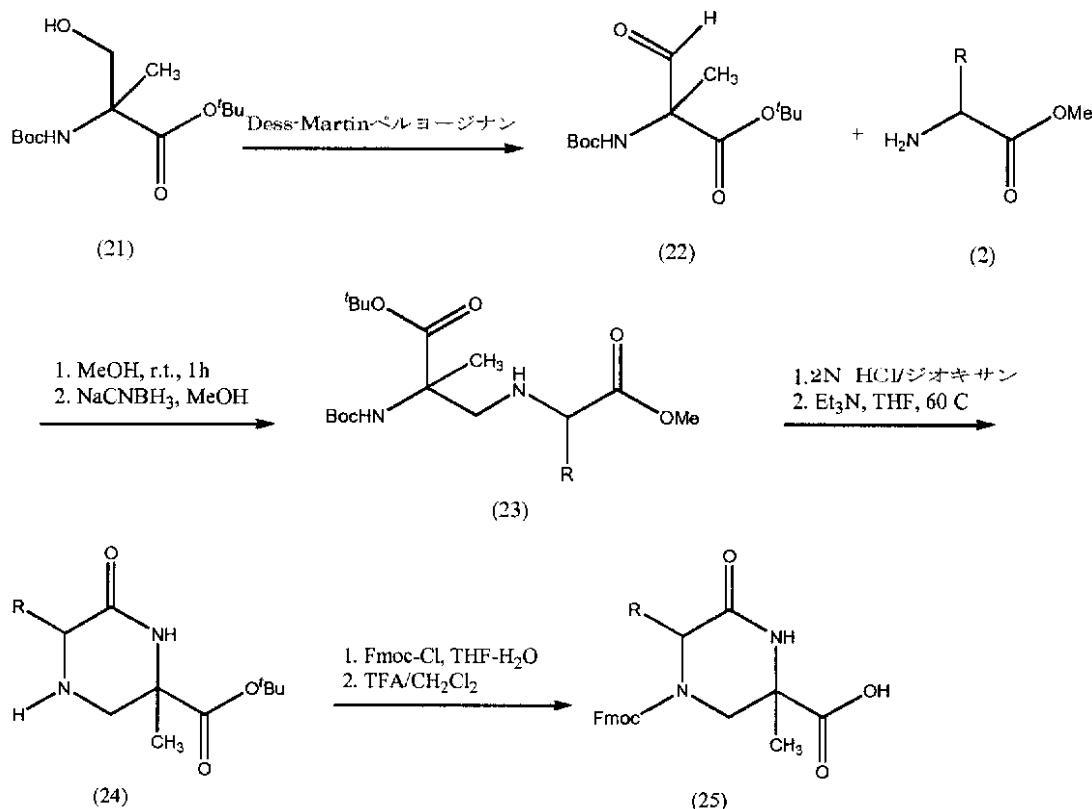
50

ルヨージナンで酸化することによって得た。(23)のBoc基をジオキサン中の2N塩化水素で除去し、アミノエステルを環化して保護されていない5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-メチル-2-カルボン酸tert-ブチルエステル(24)を得、これをFmocクロリドで保護して4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-メチル-2-カルボン酸tert-ブチルエステルを得、これをトリフルオロ酢酸で脱保護して最終生成物(25)を得た。

【 0 2 5 4 】

【 化 1 8 】

### 方法G



10

20

30

【 0 2 5 5 】

2-Boc-アミノ-2-メチル-3-オキソ-プロピオン酸tert-ブチルエステル(22)の合成: Boc-メチルセリンtert-ブチルエステル(21)の酸化はDess-Martinペルヨージナンを使用し記載した通りに実施して、所望の生成物(22)を粗製収率96%で得た。この化合物はさらに精製することなく次のステップで使用した。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.44 (s, 18H,  $^t\text{Bu}$ )、1.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )、5.63~5.70 (br. s, 1H, NH)、9.5 (s, 1H, CHO)

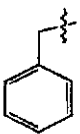
【 0 2 5 6 】

2-Boc-アミノ-3-メトキシカルボニル-1-置換-メチルアミノ-2-メチル-プロピオン酸tert-ブチルエステル(23)の合成: 化合物(23)は、化合物(10)について記載したものと同様の手順を使用して、しかしアルデヒドとして化合物(22)を使用して調製した。化合物(23)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

40

【 0 2 5 7 】

【表 19】

R	化合物(23)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.40-1.46 (2つの s, 21H, $\text{CH}_3$ および $^t\text{Bu}$ ), 2.60-2.72 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.82-3.00 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ , および $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.32-3.43 (t, 1H, $\text{CHN}$ ), 3.65 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 5.62 (br. s, 1H, $\text{NH}$ ), 7.13-7.32 (m, 5H, $\text{Ph}$ ), 収率= 69%, ( $\text{M}^+ + 1$ ) = 436.98.

## 【0258】

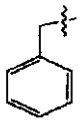
2-メチル-6-オキソ-5-置換-ピペラジン-2-カルボン酸(25)の合成: ジオキサン中の2N塩化水素8mL中の4mmolの(23)の溶液を室温で5時間攪拌し、次いで濃縮乾固した。残渣をテトラヒドロフラン20mLに懸濁し、トリエチルアミン10mmolで中和し、60 で2日間攪拌した。次いでこれを濃縮乾固し、テトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに再懸濁し、固体の重炭酸ナトリウムを加えてpHを調整して塩基性にし、次いで固体のFmocクロリド5.6mmolを加え、反応混合物を終夜室温で攪拌し、pHを1N塩酸溶液で1に調整し、酢酸エチル100mLで希釈し、層を分離した。有機層を2×100mLのブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をジクロロメタン中の50%トリフルオロ酢酸10mLに溶解し、溶液を室温で3時間攪拌した。溶媒を濃縮し、生成物(25)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

10

## 【0259】

20

【表 20】

R	化合物(25)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.12 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.50-2.62 (m, 0.5H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.96-3.38 (3つの m, 1.5H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.86-4.52 (一連の m, 6H, $\text{CHN}$ , $\text{CH}$ , および $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.80-7.80 (一連の m, 13H, フルベンおよび $\text{Ph}$ ), 収率= 22%, ( $\text{M}^+ + 1$ ) = 471.47

## 【0260】

30

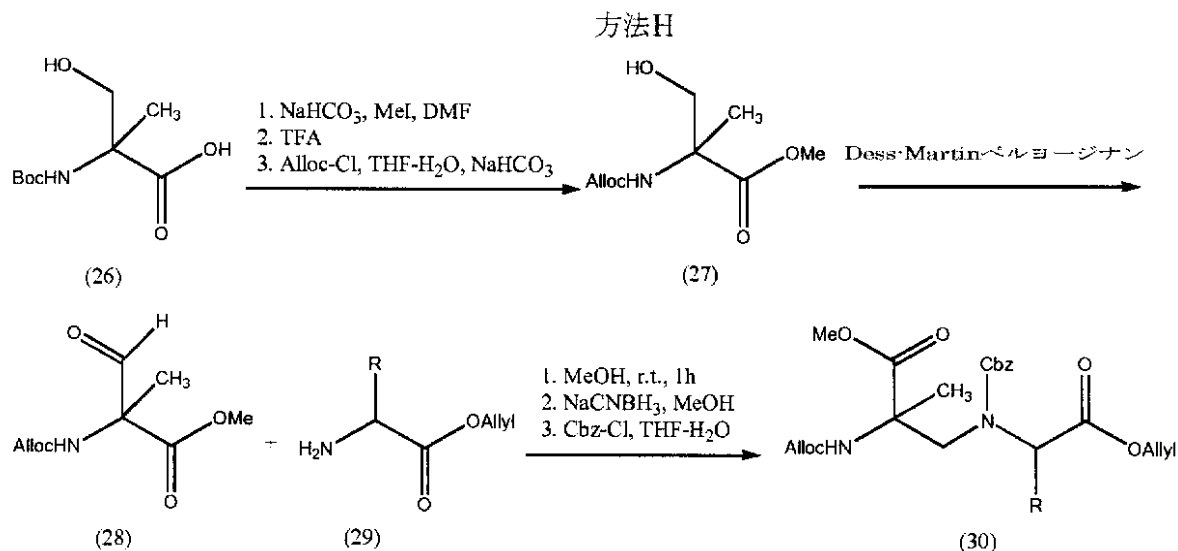
官能化側鎖を有するアミノ酸を模倣する2,2-二置換ケトピペラジン骨格の合成(方法H)  
官能化側鎖を有するアミノ酸を模倣する4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-メチル-2-カルボン酸骨格の合成は方法Hを使用して実施する。2-Alloc-アミノ-3-メトキシカルボニル-1-置換-メチルアミノ-2-メチル-プロピオン酸メチルエステル(30)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、-アミノアリルエステル(29)で2-Alloc-アミノ-2-メチル-3-オキソ-プロピオン酸メチルエステル(28)を還元的アミノ化し、次いで第二級アミンをクロロギ酸ベンジルで保護することによって調製する。還元的アミノ化に必要な化合物(28)は、(27)をDesse-Martinペルヨージナンで酸化することによって得る。類似体(30)のアリルエステルおよびAlloc基はテトラキスフェニルホスフィンパラジウム(0)を使用して除去し、このアミノ酸をペプチドカップリング試薬と反応させることによって環化して5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-メチル-2-カルボン酸メチルエステル(31)を得る。4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-メチル-2-カルボン酸(25)は、メチルエステルの鹸化、それに次ぐ保護基交換で得る。

40

## 【0261】



## 【化 19】



10

## 【0262】

Alloc-メチルセリンメチルエステル(27)の合成: 窒素下で維持した乾燥ジメチルホルムアミド8mL中の8mmolのBoc-メチルセリン(26)、固体の重炭酸ナトリウム1.0g(12mmol)、およびヨードメタン1.0mL(16mmol)の溶液を終夜撹拌する。次いで反応混合物を水50mLに注ぎ、ジエチルエーテル50mLで抽出し、1×20mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。残渣をジクロロメタン中の90%トリフルオロ酢酸20mLに溶解し、溶液を室温で3時間撹拌し、次いで濃縮乾固する。残渣をテトラヒドロフラン35mLおよび水10mLに溶解し、次いで固体の重炭酸ナトリウム30mmolを加え、クロロギ酸アリル12mmolをゆっくりと加える。混合物を室温で2時間撹拌し、酢酸エチル50mLで希釈し、層を分離する。次いで有機層を1×10mLの飽和重炭酸ナトリウム、および1×10mLの1N塩酸、および1×10mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。化合物(27)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

20

## 【0263】

2-Alloc-アミノ-2-メチル-3-オキソ-プロピオン酸メチルエステル(28)の合成: Alloc-メチルセリンメチルエステル(27)をDess-Martinペルヨージナンを使用して上記の通りに酸化して、所望の生成物(28)を得る。

30

## 【0264】

2-Alloc-アミノ-3-メトキシカルボニル-1-置換-メチル-Cbz-アミノ-2-メチルプロピオン酸アリルエステル(30)の合成: 化合物(30)は、化合物(15)について記載したものと同様の手順を使用して、しかしアルデヒドとして化合物(28)を使用して調製する。

## 【0265】

4-Cbz-2-メチル-6-オキソ-5-置換-ピペラジン-2-カルボン酸メチルエステル(31)の合成: 窒素下で室温に維持した10mmolの化合物(30)のジクロロメタン30mL溶液に、2当量のフェニルシランおよび0.3当量のテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)を加え、この溶液を2時間撹拌し、次いで11mmolのTBTUおよびN-メチルモルホリン14mmolを加え、この溶液を室温で2時間撹拌し、次いで濃縮乾固する。

40

## 【0266】

4-Fmoc-2-メチル-6-オキソ-5-置換-ピペラジン-2-カルボン酸(25)の合成: 窒素下で室温に維持した10mmolの化合物(31)のメタノール25mL溶液に、1N水酸化ナトリウム溶液11mmolをゆっくりと加え、反応を室温で終夜撹拌し、1N塩酸溶液21mLで中和し、10%炭素上パラジウム1gを加え、この懸濁液を室温および大気圧で3時間水素化する。この懸濁液をセライトで濾過し、濃縮する。残渣をテトラヒドロフラン25mLおよび水10mLに再溶解し、次いで固体の重炭酸ナトリウム30mmol、および10mmolのFmocクロリドを加え、反応を室温で窒

50

素下において2時間撹拌する。次いで反応を酢酸エチル50mLで希釈し、1N塩酸溶液で酸性化する。次いで層を分離し、有機層を1×20mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。化合物(25)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

【0267】

(5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-酢酸骨格の合成(方法I、J、K)

(5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-酢酸骨格の合成をいくつかの方法で実施した。

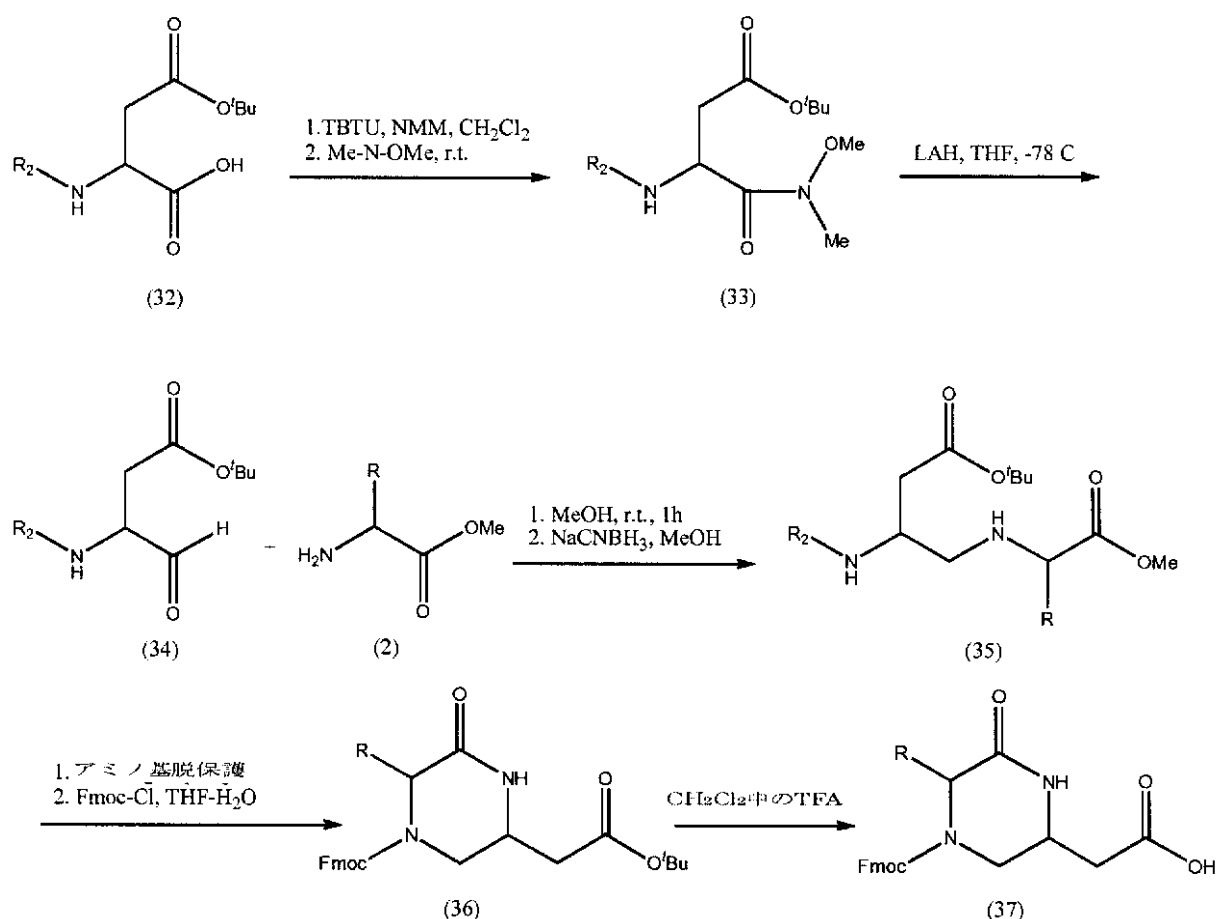
【0268】

方法I: (tert-ブチル3-保護-アミノ-4-(メトキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(35)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、-アミノエステル(2)でtert-ブチル3-保護-アミノ-4-オキソ-ブチレート(34)を還元的アミノ化することによって調製した。還元的アミノ化に必要なtert-ブチル3-保護-アミノ-4-オキソ-ブチレート(34)は、ワインレブアミド誘導体(33)の水素化アルミニウムリチウム(LAH)還元によって調製した。次いでtert-ブチル(3-保護-アミノ-4-(メトキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート類似体(35)を脱保護し、環化し、Fmoc保護して、tert-ブチル(5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-アセテート(36)を得、次いでこれを脱保護して最終生成物(37)を得た。

10

20

方法I



30

40

【0270】

アミノ保護Asp-(O<sup>t</sup>Bu)ワインレブアミド(33)の合成: 化合物(33)は、化合物(14)について記載したものと同様の手順を使用して調製した。

【0271】

50

【表 2 1】

R <sub>2</sub>	化合物(33)の分析データ
Cbz	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.40 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.47-2.59 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> CO), 3.20 (s, 3H, CH <sub>2</sub> N), 3.77 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 4.96-5.05 (br. m, 1H, CHN), 5.05-5.12 (br. d, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.58-5.66 (br. d, 1H, NH), 7.30-7.36 (br. m, 5H, Ph), 収率= 90%
Fmoc	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.55-2.64 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> CO), 2.69-2.80 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> O), 3.60 (s, 3H, CH <sub>3</sub> N), 3.79 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 4.18-4.26 (t, 1H, CH), 4.32-4.40 (d, 2H, CH <sub>2</sub> O), 4.98-5.19 (m, 1H, CHN), 5.70-5.76 (br. d, 1H, NH), 7.35-7.80 (一連の m, 8H, フルベン), 収率=定量的.

10

## 【 0 2 7 2 】

tert-ブチル3-アミノ保護-アミノ-4-オキソ-ブチレート(34)の合成:化合物(34)は、化合物(9)について記載したものと同様の手順を使用して調製した。

## 【 0 2 7 3 】

【表 2 2】

R <sub>2</sub>	化合物(34)の分析データ
Cbz	<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.40 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.69-2.81 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> CO), 2.89-3.01 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> CO), 4.33-4.42 (m 1H, CHN), 5.12 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.83-5.88 (br. d, 1H, NH), 7.31-7.39 (br. m, 5H, Ph), 9.64 (s, 1H, CHO)
Fmoc	<sup>1</sup> H NMRδ(CDCl <sub>3</sub> ): 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.58-3.02 (一連の m, 2H, CH <sub>2</sub> CO), 4.20-4.28 (t, 1H, CH), 4.35-4.49 (m, 3H, CH <sub>2</sub> O, および CHN), 5.85-5.92 (br. d, 1H, NH), 7.27-7.80 (一連の m, 8H, フルベン), 9.65 (s, 1 H, CHO)

20

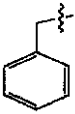


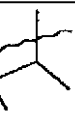
## 【 0 2 7 4 】

tert-ブチル3-保護-アミノ-4-(メトキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(35)の合成:化合物(35)は、化合物(10)について記載したものと同様の手順を使用して、しかしアルデヒドとして化合物(34)を使用して調製した。

## 【 0 2 7 5 】

30

【表 2 3】

R <sub>2</sub>	R	化合物(35)の分析データ
Cbz		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.40 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.27-3.02 (一連の m, 6H, CH <sub>2</sub> CO, CH <sub>2</sub> Ph, および CH <sub>2</sub> N), 3.43-3.52 (t, 1H, CHN), 3.65 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.84-3.98 (m, 1H, CHN), 5.08 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.33-5.44 (br. d, 1H, NH), 7.11-7.42 (一連の m, 10H, Ph), 収率=60%, t <sub>R</sub> = 4.79 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 471.20.
Cbz		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.55 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.42-2.68 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 2.74-2.92 (2 つの dd, 2H, CH <sub>2</sub> O), 3.46-3.50 (d, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.78 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 4.02-4.14 (m, 1H, CHN), 5.15 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 7.40-7.45 (m, 5H, Ph), t <sub>R</sub> = 3.82, (M <sup>+</sup> + 1) = 381.28
Cbz		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 1.25-1.30 (d, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.44 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 2.38-2.65 (一連の m, 2H, CH <sub>2</sub> CO), 2.66-2.85 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.60-3.70 (m, 1H, CHN), 3.7 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.9-4.1 (m, 1H, CHN), 5.1 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 5.4-5.6 (br. t, 1H, NH), 7.28-7.4 (m, 5H, Ph), t <sub>R</sub> = 3.81 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 395.25.
Cbz		<sup>1</sup> H NMR δ (CDCl <sub>3</sub> ): 0.84-0.91 (m, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.08-1.30 (m, 1H, CH), 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup> Bu), 1.45-1.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.39-2.60 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CO, CH <sub>2</sub> N), 2.74-2.86 (dd, 1H, CH <sub>2</sub> N), 2.98-3.16 (dd, 1H, CHN), 3.7 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.92-4.08 (br. m, 1H, CHN), 5.1 (s, 2H, CH <sub>2</sub> O), 7.26-7.45 (m, 5H, Ph), t <sub>R</sub> = 4.56 分, (M <sup>+</sup> + 1) = 437.31.

10

20

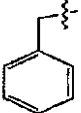


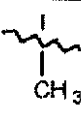
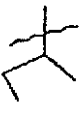
## 【 0 2 7 6 】

tert-ブチル(4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-アセテート(36)の合成:Fmocアミノ保護基を含有する化合物について、酢酸エチル溶液中の30%ジエチルアミン30mL中の10mmolの化合物(35)の溶液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮乾固した。Cbzアミノ保護基を含有する化合物について、10mmolの化合物(35)のエタノール30mL溶液を室温および大気圧で2時間水素化し、セライトで濾過し、濃縮乾固した。Fmoc保護について、残渣をテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)を加え、次いで3.3g(13mmol)のFmoc-Clを加えた。混合物を3時間攪拌し、酢酸エチルで希釈した。層を分離し、有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。化合物(36)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

30

## 【 0 2 7 7 】

【表 2 4】

R	化合物(36)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.44 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.71-2.10 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.10-2.30 (br. d, 1H, CHN), 2.62-2.82 (br. d, 1H, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.90-3.74 (一連の br. m, 3H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN), 3.80-4.07 (br. d, 1H, CHN), 4.10-4.50 (br. m, 3H, $\text{CH}_2\text{O}$ , および CH), 6.74-7.80 (一連の m, 23H, フルベン, および Ph), 収率= 75%, $t_R$ = 7.15 分, $(M^+ + 1) = 527.20$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.77-1.94 (一連の m, および 2 つの s, 18H, $^t\text{Bu}$ , $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 2.07-2.76 (3 つの m, 3H, $\text{CH}_2\text{CO}$ , および CHN), 2.86-3.80 (4 つの m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.16-4.27 (m, 1H, CH), 4.30-4.43 (m, 1H, CHN), 4.50-4.70 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.26-7.79 (一連の m, 8H, フルベン), 収率=3 ステップで 40%, $t_R$ = 7.31 分, $(M^+ + 1) = 493.47$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.45 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 1.9-2.5 (m 2H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.02-4.7 (一連の m, 8 H, CH, $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_2\text{N}$ ), 7.25-7.78 (3 つの m, 8H, フルベン), $t_R$ = 6.42 分, $(M^+ + 1) = 431.31$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.20-1.35 (br. m, 3H, $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 9H, $^t\text{Bu}$ ), 2.1-2.80 (3 つの m, 3H, $\text{CH}_2\text{CO}$ , $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.1-4.1 (4 つの m, 3H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN), 4.18-4.26 (br. t, 1H, CH), 4.28-4.46 (br. m, 1H, CHN), 4.50-4.68 (br. m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 7.28-7.8 (3 つの m, 8H, フルベン), $t_R$ = 6.29 分, $(M^+ + 1) = 451.24$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.20-1.60 (br. m, および s, 15H, $\text{CH}_3$ , $^t\text{Bu}$ ), 2.21-2.80 (3 br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.0-3.9 (4 つの br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.18-4.26 (br. m, 2H, CH, CHN), 4.38-4.86 (br. m, 3H, $\text{CH}_2$ , CHN), 7.26-7.86 (一連の m, 8 H, フルベン), $t_R$ = 6.90 分, $(M^+ + 1) = 493.31$ .

10

20

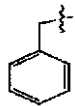



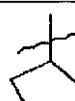
## 【 0 2 7 8 】

(4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-アセテート(37)の合成: 化合物(36)をジクロロメタン中の90%トリフルオロ酢酸溶液で3時間脱保護し、次いで濃縮乾固した。最終生成物(37)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

## 【 0 2 7 9 】

30

【表 2 5】

R	化合物(37)の分析データ
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.82-2.13 (br. t, 1H, CHN), 2.32-2.53 (br. d, 1H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.63-2.81 (br. d, 1H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.90-3.29 (2 つの br. m, $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.38-3.59 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.66-3.85 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.95-4.24 (2 つの重複 br. ピーク, 2H, CHN, CH), 4.30-4.93 (br. d, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.84-7.82 (一連の m, 13H, フルベン, および Ph), 8.08-8.25 (br. d, 1H, $\text{CO}_2\text{H}$ ), 収率=定量的, $t_R = 5.57$ 分, $(M^+ + 1) = 471.07$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.72-1.92 (5 つの br. m, 9H, $\text{CH}_2$ , および $\text{CH}_3$ ), 2.14-2.70 (2 つの br. m, 3H, $\text{CH}_2\text{CO}$ , および CHN), 3.26-3.62 (2 つの br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.70-3.90 (br. m, 1H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.03-4.30 (2 つの m, 2H, CHN, および CH), 4.42-4.82 (br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.28-7.82 (一連の m, 8H, フルベン), 7.97 (s, 1H, $\text{CO}_2\text{H}$ ), 収率= 90%, $t_R = 5.61$ 分, $(M^+ + 1) = 437.76$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.10-2.66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.2-3.92 (4 つの m, 3H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN), 3.97-4.06 (m, 1H, CH), 4.2-4.3 (m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 4.48-4.62 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}$ ), 7.24-7.81 (一連の m, 8H, フルベン), $t_R = 4.74$ 分, $(M^+ + 1) = 381.13$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.15-1.37 (br. m, 3H, $\text{CH}_3$ ), 2.22-2.78 (3 つの br. m, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.0-4.10 (5 つの br. m, 3H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN), 4.15-4.40 (m, 1H, CH), 4.45-4.7 (br. m, 3H, $\text{CH}_2$ , CHN), 7.26-8.10 (一連の m, 8H, フルベン), $t_R = 4.66$ 分, $(M^+ + 1) = 395.32$ .
	$^1\text{H NMR } \delta$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.6-1.2 (m, 6H, $\text{CH}_3$ ), 1.22-2.8 (4 つの m, 4H, $\text{CH}_2\text{CO}$ , $\text{CH}_2$ ), 3.1-4.0 (5 つの m, 3H, $\text{CH}_2\text{N}$ , CHN), 4.18-4.32 (m, 1H, CH), 4.41-4.84 (m, 3H, $\text{CH}_2$ , CHN), 7.26-8.2 (一連の m, 8H, フルベン), $t_R = 5.46$ 分, $(M^+ + 1) = 437.37$ .

10

20

## 【0280】

方法J: ジフェニルメチル3-Fmoc-アミノ-4-(メトキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(41)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、 $\alpha$ -アミノエステル(2)でジフェニルメチル3-Fmoc-アミノ-4-オキソ-ブチレート(40)を還元的アミノ化することによって調製した。

30

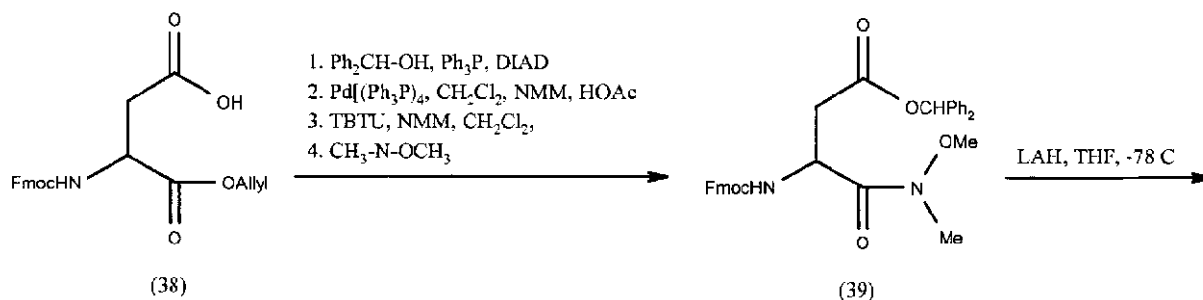
還元的アミノ化に必要なジフェニルメチル3-Fmoc-アミノ-4-オキソ-ブチレート(40)は、 $\alpha$ -エステルをMitsunobu条件下で保護することにより市販のFmoc-アスパラギン酸 $\alpha$ -アリルエステル誘導体(38)から形成したワインレブアミド誘導体(39)を水素化アルミニウムリチウム還元することによって調製した。パラジウム(0)触媒を使用してアリルエステルを除去し、次いでTBTUをカップリング剤として使用してワインレブアミドを形成した。次いでジフェニルメチル3-Fmoc-アミノ-4-(メトキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(41)をFmoc脱保護し、環化し、ジフェニルメチルエステルを水素化で除去し、次いでFmoc保護して、最終生成物(4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-酢酸(37)を得た。

40

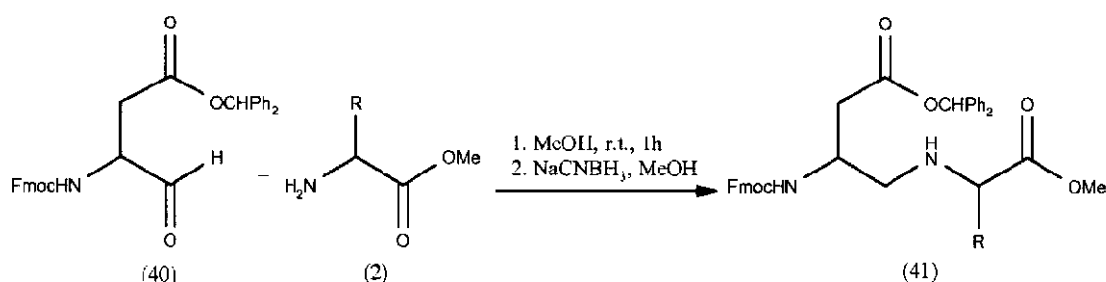
## 【0281】

## 【化 2 1】

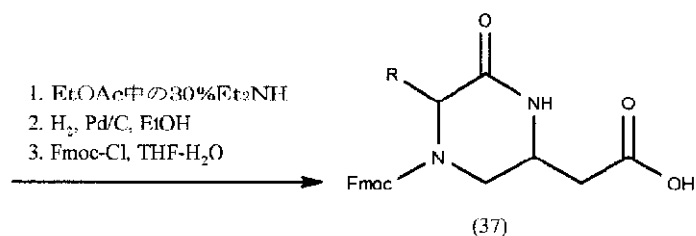
## 方法J



10



20



## 【 0 2 8 2 】

Fmoc-Asp-(OCHPh<sub>2</sub>)ワインレブアミド(39)の合成: 窒素下で0℃に維持したトリフェニルホスフィン3.4g(13mmol)およびジフェニルメタノール2.41g(13.1mmol)を含有する5.1g(13.0mmol)のFmoc-アスパラギン酸-アリルエステル(38)の乾燥テトラヒドロフラン30mL溶液にアゾジカルボン酸ジイソプロピル2.6mL(13.4mmol)をゆっくりと加えた。氷浴を除去し、反応を室温で終夜攪拌し、濃縮乾固し、次いでシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 2.96~3.06 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>CO)、3.15~3.26 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>CO)、4.18~4.76 (一連のm, 3H, CH, CH<sub>2</sub>)、5.14~5.32 (m, 1H, CHN)、5.76~5.86 (m, 1H, CHO)、7.20~7.80 (一連のm, 18H, フルベン, およびPh); HPLC t<sub>R</sub> = 7.68分、(M<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup>) = 583.90。

30

## 【 0 2 8 3 】

次いで、1.5g(1.3mmol)のテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)を含有する37:2:1のジクロロメタン:酢酸:N-メチルモルホリン溶液40mLに生成物(9.8mmol)を溶解し、溶液を室温で終夜攪拌し、濃縮乾固し、酢酸エチル100mLと水30mLとの間に分配した。層を分離し、有機層を1×50mLの水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。残渣を乾燥ジクロロメタン20mLに懸濁し、N-メチルモルホリン1.65mL(15mmol)および4.07g(12.7mmol)のTBTUを加え、懸濁液を室温で20分間攪拌し、次いでN-メチルモルホリン1.65mL(15mmol)およびN,O-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩1.52g(15.6mmol)を加えた。懸濁液を室温で2時間攪拌し、濃縮し、酢酸エチル100mLと水50mLとの間に分配した。有機層を1×30mLの水、1×30mLの飽和重炭酸ナトリウム溶液および1×30mLの1N塩酸溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 2.76~2.88 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>CO)、2.89~3.00 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>CO)

40

50

、3.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N)、3.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O)、4.14~4.22 (dd, 1H, CH)、4.28~4.40 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)、5.07~5.16 (dd, 1H, CHN)、5.69~5.76 (d, 1H, CHO)、7.24~7.8 (一連の m, 18H, フルベン, および Ph); HPLC  $t_R$  = 7.08、( $M^+$  +  $Na^+$ ) = 587.03。

【0284】

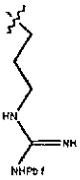
ジフェニルメチル3-Fmoc-アミノ-4-オキソ-ブチレート(40)の合成:化合物(40)は、化合物(9)について記載したものと同様の手順を使用して調製する。

【0285】

ジフェニルメチル3-Fmoc-アミノ-4-(メトキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(41)の合成:化合物(41)は、化合物(10)について記載したものと同様の手順を使用して、しかしアルデヒドとして化合物(40)を使用して調製した。

【0286】

【表26】

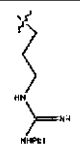
R	化合物(41)の分析データ
	<sup>1</sup> H NMR $\delta$ (CDCl <sub>3</sub> ) 1.2-1.7 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 1.42 (s, 3H, CH <sub>3</sub> Ph), 1.60 (s, 6H, CH <sub>3</sub> -Ph), 2.07 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.52 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -Ph), 2.58 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -Ph), 2.08-2.80 (一連の m, 2H, CH <sub>2</sub> CO), 3.0-3.2 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N), 3.64 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O), 3.96-4.10 (m, 1H, CHN), 4.20-4.28 (m, 1H, CH), 4.28-4.40 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.82-6.18 (m, 1H, CHO), 7.24-7.80 (一連の m, 18H, フルベン, および Ph), HPLC $t_R$ = 6.53, ( $M^+$ + 1) = 930.56.

【0287】

(4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-酢酸(37)の合成:酢酸エチル中の30%ジエチルアミン30mL中の10mmolの化合物(41)の溶液を室温で3時間撹拌した。次いで溶液を濃縮乾固し、2×30mLの酢酸エチルに再溶解し、再濃縮した。残渣をエタノール50mLおよび1N塩酸溶液20mLに溶解し、室温および大気圧で終夜水素化し、セライトで濾過し、濃縮乾固した。残渣をテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)を加え、次いで3.3g(13mmol)のFmoc-Clを加えた。混合物を3時間撹拌し、酢酸エチル100mLで希釈し、層を分離し、有機層を2×50mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0288】

【表27】

R	化合物(37)の分析データ
	<sup>1</sup> H NMR $\delta$ (CDCl <sub>3</sub> ) 1.2-1.6 (m, および s, 7H, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Ph), 2.10 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.46 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -Ph), 2.56 (s, 3H, CH <sub>3</sub> -Ph), 2.46-2.63 (br. m, 2H, CH <sub>2</sub> CO), 3.0-3.95 (3 br. m, 5H, CH <sub>2</sub> N, CHN), 4.10-4.30 (br. m, 1H, CH), 4.40-4.80 (br. m, 3H, CHN, CH <sub>2</sub> ), 7.22-7.80 (一連の m, 8H, フルベン), HPLC $t_R$ = 5.73, ( $M^+$ + 1) 732.24.

【0289】

方法K:(5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル)-酢酸骨格は、市販のFmoc-アスパラギン酸 tert-ブチルエステル(42)から出発して合成する。Fmoc-アスパラギン酸 tert-ブチルエステルを水素化ホウ素ナトリウムで混合無水物を介してFmoc-ホモセリン tert-ブチルエステルに還元し、次いでアルコールを臭化ベンジルで保護してFmoc-ホモセリンベンジルエーテル tert-ブチルエステル(43)を得る。次いでtert-ブチルエステルをトリフルオロ酢酸で除去し、この酸を水素化ホウ素ナトリウムで混合無水物を介してアルコールに還元して2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-1-ブタノール(44)を得る。次いで上述の通りにDess-Martinペルヨージナンを使用してアルコール(44)を2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシブタノール(45)に変換する。2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシブタノール(45)および-アミノエステル(2)を還元的アミノ化することによって(2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオ

10

20

30

40

50



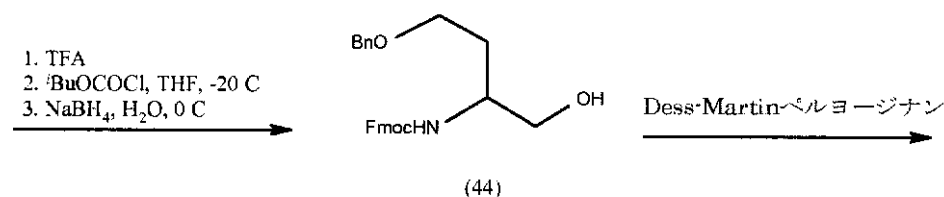
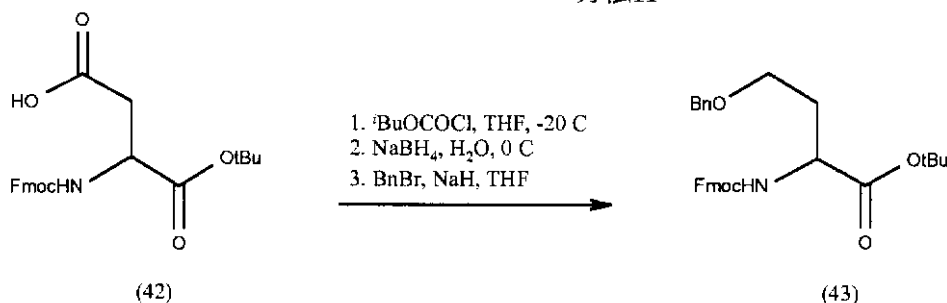
キシ-ブチルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(46)を得る。ジエチルアミンでFmoc脱保護することによって遊離の第一級アミンを得、これは自然に環化させて6-ベンジルオキシエチル-3-置換-ピペラジン-2-オンになる。ベンジルーエテルを水素化で除去し、第二級アミンをそのFmoc誘導体として保護して4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(47)を得る。最後に、第一級アルコールを酸化して酸にして、方法Aで記載した通りに最終生成物(48)を得る。

【 0 2 9 0 】

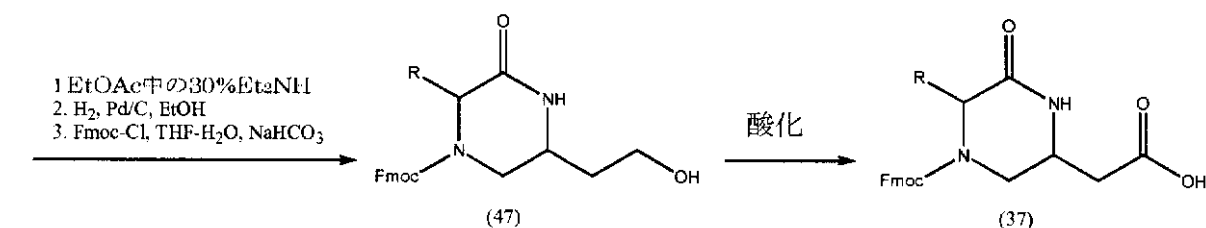
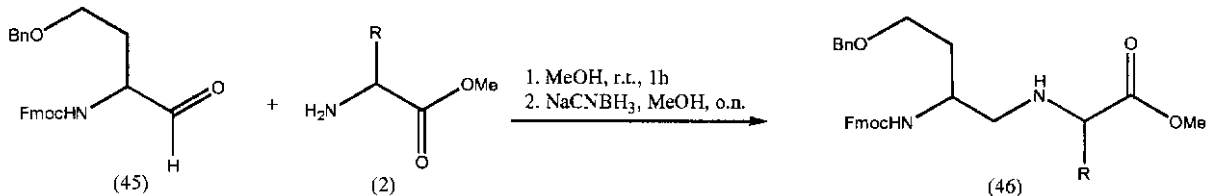
【 化 2 2 】

# 方法K

10



20



30



酸化

【 0 2 9 1 】

Fmoc-ホモセリン(OBn) tert-ブチルエステル(43)の合成:窒素下で $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に維持した10.0mmolのFmoc Asp-O<sup>t</sup>Bu(42)の乾燥テトラヒドロフラン50mL溶液にトリエチルアミン1.77mL(12.7mmol)を加え、次いでクロロギ酸イソブチル1.57mL(12.0mmol)をゆっくりと加える。温度を $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 未満に維持しながら、混合物を30分間攪拌し、次いで水素化ホウ素ナトリウム3.77g(99.6mmol)の水10mL冷溶液にゆっくりと注ぐ。反応を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で15分間攪拌し、次いで1N塩酸溶液でクエンチする。反応混合物を酢酸エチル100mLで希釈し、層を分離する。有機層を $2\times 25\text{mL}$ の1N塩酸溶液、 $2\times 25\text{mL}$ の水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。次いで精製した化合物をテトラヒドロフラン30mLに溶解し、鉱油中の60%水素化ナトリウム分散液12mmol、次いでヨウ化テトラブチルアンモニウム0.2mmolおよび臭化ベンジル12mmolを加え、混合物を終夜攪拌し、重炭酸ナトリウム飽和水溶液50mLでクエンチし、酢酸エチル100mLで抽出する。次いで化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

40

【 0 2 9 2 】

50

2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-1-ブタノール(44)の合成:方法Iの化合物(37)について記載した通りに90%トリフルオロ酢酸を使用してtert-ブチルエステルを脱保護し、次いでこの酸を化合物(13)について記載した通りに水素化ホウ素ナトリウムで混合無水物中間体を介してアルコールに還元する。

【0293】

2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-ブタノール(45)の合成:(9)の合成について記載した通りにDess-Martinペルヨージナンを使用して2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-1-ブタノール(44)を酸化してアルデヒドにする。

【0294】

(2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-ブチルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(46)の合成:(10)の合成について記載した通りにシアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して2-アミノエステル(2)で2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-ブタノール(45)を還元的アミノ化する。

10

【0295】

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(47)の合成:(2-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-ブチルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(46)を同時環化を伴ってFmoc脱保護し、次いで方法Jで化合物(37)について記載した通りに脱ベンジル化およびFmoc再保護する。

【0296】

4-Fmoc-5-置換-6-オキソ-ピペラジン-2-イル-酢酸(37)の合成:方法Aで記載した通りに4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(47)を酸化して酸にする。使用した酸化剤の選択は5位の基の性質に基づく。

20

【0297】

2-置換3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸骨格の合成(方法L、M、N)

いくつかの方法を使用して2-置換3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸骨格の合成を実施する。

【0298】

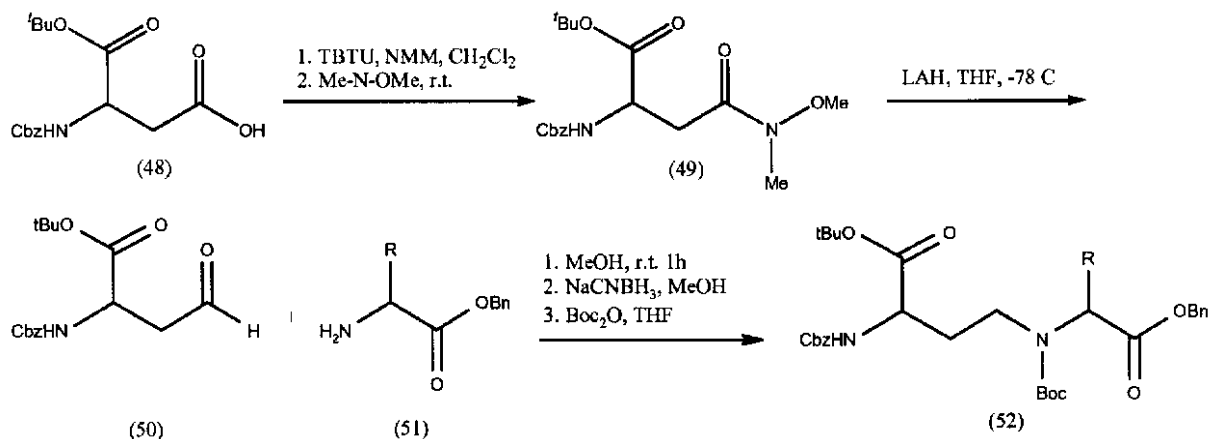
方法L:tert-ブチル2-Cbz-アミノ-4-(ベンジルオキシカルボニル-置換-メチル-Bocアミノ)-ブチレート(52)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、アミノエステル(51)でtert-ブチルCbz-2-アミノ-4-オキソ-ブチレート(50)を還元的アミノ化し、次いで第二級アミンをBoc保護することによって調製する。還元的アミノ化に必要なtert-ブチルCbz-2-アミノ-4-オキソ-ブチレート(50)は、ワインレブアミド誘導体(49)の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製する。ジアゼパン環は、保護基を除去し、次いでペプチド形成試薬で環化して(53)を得ることによって形成する。最後に、4-Fmoc-2-置換3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸(54)は保護基交換によって形成する。

30

【0299】

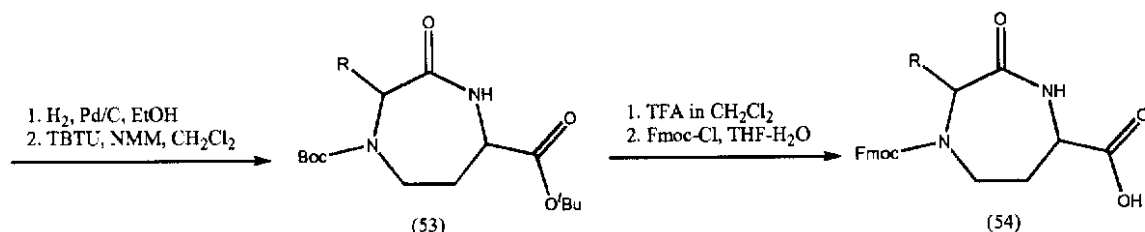
## 【化 2 3 A】

## 方法L



10

## 【化 2 3 B】



20

## 【0 3 0 0】

Cbz-Asp-(ワインレブアミド)-O<sup>t</sup>Bu(49)の合成:化合物(49)は、化合物(14)について記載したものと同様の手順を使用して調製する。

## 【0 3 0 1】

tert-ブチル3-Cbz-アミノ-4-オキソ-ブチレート(50)の合成:化合物(50)は、化合物(9)について記載したものと同様の手順を使用して調製する。

30

## 【0 3 0 2】

tert-ブチル2-Cbz-アミノ-4-(ベンジルオキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(52)の合成:還元的アミノ化は、化合物(10)について記載したものと同様の手順で行う。第二級アミンは、粗製混合物を2当量のBocジカーボネートとテトラヒドロフラン中で反応させることによって保護する。

## 【0 3 0 3】

tert-ブチル1-Boc2-置換-3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボキシレート(53)の合成:10mmolの化合物(52)のエタノール30mL溶液を室温および大気圧で2時間水素化し、セライトで濾過し、濃縮乾固する。残渣をジクロロメタン100mLおよび1.2当量のTBTUに溶解し、2.6当量のN-メチル-モルホリンを加える。溶液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮する。残渣を酢酸エチル50mLと1N塩酸溶液25mLとの間に分配し、1×20mLの飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。

40

## 【0 3 0 4】

1-Fmoc2-置換-3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸(54)の合成:ジクロロメタン中の90%トリフルオロ酢酸10mL中の10mmolの化合物(53)の溶液を室温で2時間攪拌し、次いで溶液を濃縮乾固する。残渣をテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)を加え、次いで3.36g(13mmol)のFmoc-Clを加える。混合物を3時間攪拌し、次いで酢酸エチルで希釈する。層を分離し、有機層を2×50mLの水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。

50

## 【 0 3 0 5 】

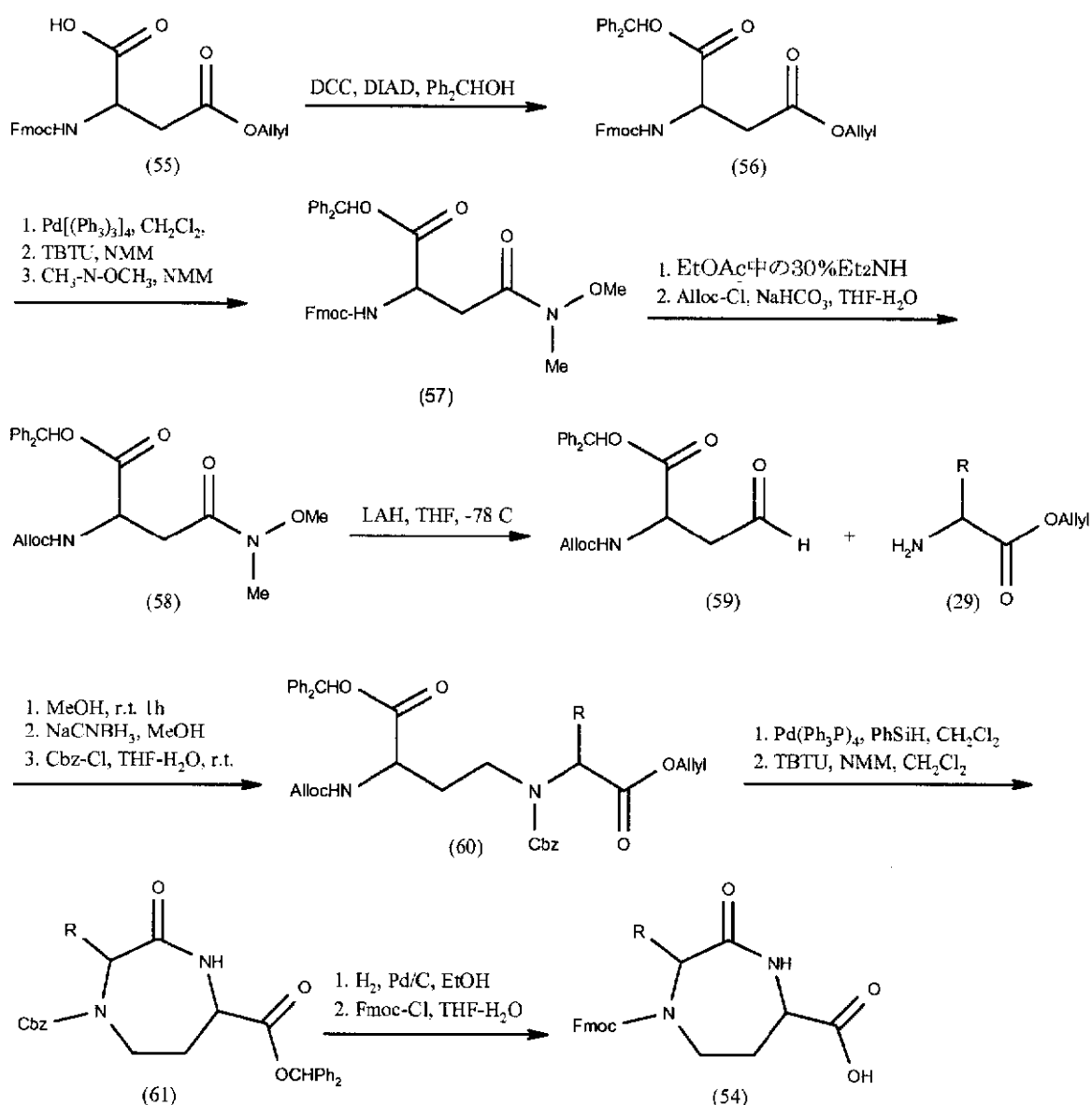
方法M:還元ジペプチド類似体(60)は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して、アミノエステル(29)でジフェニルメチルAlloc-2-アミノ-4-オキソ-ブチレート(59)を還元的アミノ化し、次いで第二級アミンをCbz保護することによって調製する。還元的アミノ化に必要なジフェニルメチルAlloc-2-アミノ-4-オキソ-ブチレート(59)は、ワインレブアミド誘導体(58)を水素化アルミニウムリチウム還元することによって調製し、ワインレブアミド誘導体(58)はワインレブアミド誘導体(57)の保護基交換によって調製する。次いで、ジアゼパン環は、アリルおよびAlloc基の除去、次いでペプチド形成試薬の存在下で閉環することによって形成する。2-置換3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸骨格(54)は保護基交換によって形成する。

10

## 【 0 3 0 6 】

## 【 化 2 4 】

## 方法M



20

30

40

## 【 0 3 0 7 】

Fmoc-Asp-(ワインレブアミド)-OCHPh<sub>2</sub>(57)の合成:化合物(57)は、化合物(39)について記載したものと同様の手順を使用して調製する。

50

## 【0308】

Alloc-Asp-(ワインレブアミド)-OCHPh<sub>2</sub>(58)の合成:酢酸エチル中の30%ジエチルアミン20mL中の10mmolの化合物(56)の溶液を2時間攪拌し、濃縮乾固する。残渣をテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)を加え、次いで13mmolのAlloc-Clを加える。混合物を3時間攪拌し、次いで酢酸エチルで希釈する。層を分離し、有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。化合物(58)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

## 【0309】

ジフェニルメチル3-Alloc-アミノ-4-オキシ-ブチレート(59)の合成:化合物(59)は、化合物(9)について記載したものと同様の手順を使用して調製する。

10

## 【0310】

ジフェニルメチル2-Alloc-アミノ-4-(アリルオキシカルボニル-置換-メチルアミノ)-ブチレート(60)の合成:化合物60は、化合物(15)について記載したものと同様の手順を使用し、しかしアルデヒドとして化合物(59)を使用する還元的アミノ化によって調製する。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

## 【0311】

ジフェニルメチル1-Cbz2-置換-3-オキシ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボキシレート(61)の合成:窒素下で室温に維持した10mmolの化合物(60)のジクロロメタン30mL溶液に2当量のフェニルシランおよび0.3当量のテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)を加え、この溶液を2時間攪拌し、次いで1.2当量のTBTUおよび1.3当量のN-メチル-モルホリンを加える。溶液を室温で終夜攪拌し、濃縮する。残渣を酢酸エチル50mLと1N塩酸溶液25mLとの間に分配し、1×20mLの飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。

20

## 【0312】

1-Fmoc2-置換-3-オキシ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸(54)の合成:10mmolの化合物(61)のエタノール30mL溶液を室温で2時間水素化し、セライトで濾過し、次いで溶液を濃縮乾固する。残渣をテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)を加え、次いで3.36g(13mmol)のFmoc-Clを加える。混合物を3時間攪拌し、次いで酢酸エチルで希釈する。層を分離し、有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。

30

## 【0313】

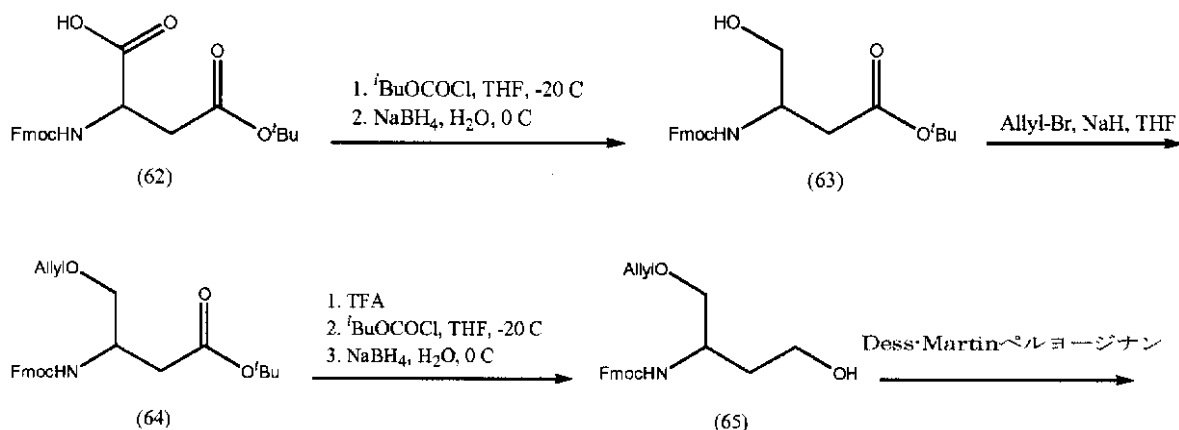
方法N:Fmoc-アスパラギン酸 tert-ブチルエステルを水素化ホウ素ナトリウムで混合無水物を介してFmoc-アスパルタノール tert-ブチルエステル(63)に還元し、次いでアルコールを臭化アリルで保護してFmoc-アスパルタノールアリルエーテル tert-ブチルエステル(64)を得る。次いで、tert-ブチルエステルをトリフルオロ酢酸で除去し、酸を水素化ホウ素ナトリウムで混合無水物を介してアルコールに還元して3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-1-ブタノール(65)を得る。次いで上述の通りにDess-Martinペルヨージナンを使用してアルコール(65)を3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシブタノール(66)に変換する。3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシブタノール(66)および アミノエステル(51)を還元的アミノ化し、次いで第二級アミンをalloc保護して、(3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-ブチル-alloc-アミノ)-2-置換酢酸ベンジルエステル(67)を得る。Alloc7-アリルオキシメチル-3-置換-[1,4]-ジアゼパン-2-オン(68)は、ベンジルエステルを鹸化し、次いでジエチルアミンでFmoc脱保護して遊離の第一級アミンを得、これをTBTUなどのペプチド形成試薬を使用して環化することによって形成する。最終生成物(54)は保護基交換によって形成し、アリルエーテルおよびallocはパラジウム(0)で除去し、第二級アミンはそのFmoc誘導体として保護して4-Fmoc-7-ベンジルオキシメチル-3-置換-[1,4]-ジアゼパン-2-オンを得、次いで第一級アルコールで酸化して酸にして最終生成物(54)を得る。使用した酸化剤の選択は2位の基の性質に基づく。

40

## 【0314】

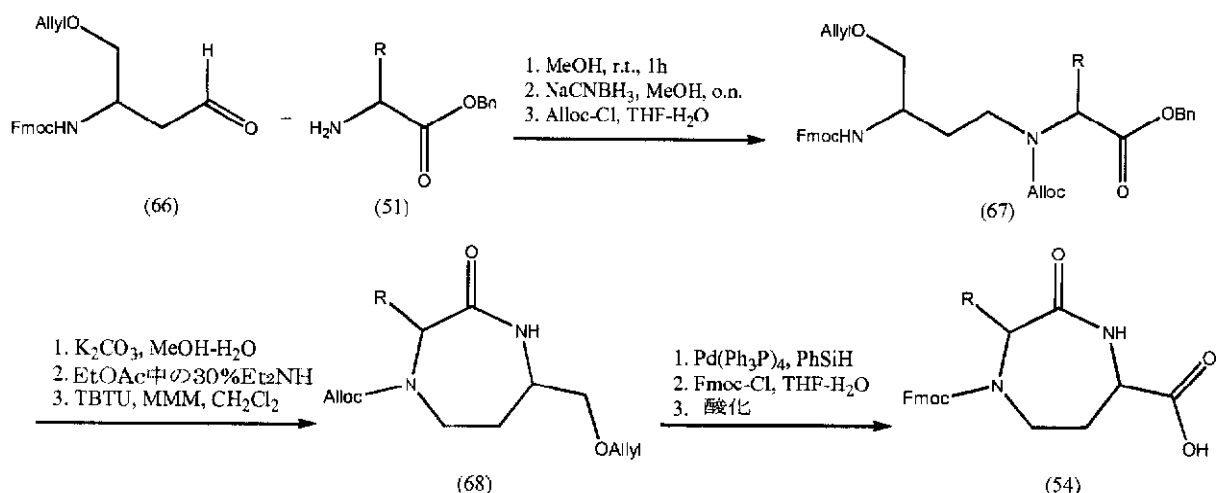
## 【化 2 5 A】

## 方法N



10

## 【化 2 5 B】



20

## 【0 3 1 5】

30

Fmoc-アスパルタノール tert-ブチルエステル(63)の合成: 化合物(63)は、Fmoc-アスパラギン酸 tert-ブチルエステル(62)を出発物質として使用して化合物(13)の合成について記載した通りに調製する。

## 【0 3 1 6】

3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-酪酸tert-ブチルエステル(64)の合成: 窒素下で室温に維持した10mmolの(63)のテトラヒドロフラン30mL溶液に、鉍油中の60%水素化ナトリウム分散液12mmol、ヨウ化テトラブチルアンモニウム2mmolおよび臭化アリル13mmolを加え、混合物を終夜攪拌し、重炭酸ナトリウム飽和水溶液10mLでクエンチし、酢酸エチル50mLで抽出する。

## 【0 3 1 7】

40

3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-1-ブタノール(65)の合成: 化合物(65)は、化合物(44)の合成について記載した通りに調製する。

## 【0 3 1 8】

3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-ブタノール(66)の合成: 3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-1-ブタノール(65)は、(9)の合成について記載した通りにDess-Martinペルヨージナンを使用して酸化してアルデヒドにする。

## 【0 3 1 9】

(3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-ブチル-alloc-アミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(67)の合成: 化合物(10)について記載した通りにシアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリドのいずれかを還元剤として使用して -アミノエステル(

50

51)で3-Fmoc-アミノ-4-ベンジルオキシ-ブタナール(66)を還元的アミノ化し、次いで第二級アミンをalloc誘導体として保護することを、化合物(15)について記載した通りに、しかしクロロギ酸ベンジルの代わりにクロロギ酸アリルを使用して行う。

【0320】

4-Alloc-7-アリルオキシメチル-3-置換-[1,4]-ジアゼパン-2-オン(68)の合成:メタノール20mLおよび水10mL中の10mmolの(3-Fmoc-アミノ-4-アリルオキシ-ブチル-alloc-アミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(67)、炭酸カリウム20mmolの溶液を室温で3時間攪拌し、1N塩酸溶液21mLで中和し、次いで濃縮乾固する。残渣を酢酸エチル中の30%ジエチルアミン20mLに溶解し、3時間攪拌し、次いで濃縮乾固する。残渣をジクロロメタン100mLに溶解し、12mmolのTBTUおよびN-メチルモルホリン24mmolを加え、この溶液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮乾固する。残渣を酢酸エチル30mLと1N塩酸溶液30mLとの間に分配し、次いで層を分離する。有機層を飽和重炭酸ナトリウム溶液30mLで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

10

【0321】

4-Fmoc-2-置換-3-オキソ-[1,4]-ジアゼパン-5-カルボン酸(54)の合成:窒素下で室温に維持した10mmolの化合物(68)のジクロロメタン30mL溶液に2当量のフェニルシランおよび0.3当量のテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)を加え、次いで溶液を2時間攪拌し、濃縮乾固する。第二級アミンをテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、次いで固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)および1.2当量のFmoc-Clを加え、この二相溶液を室温で2時間攪拌し、酢酸エチル30mLで希釈し、層を分離する。方法Aで記載した通りに4-Fmoc-7-ヒドロキシメチル-3-置換-[1,4]-ジアゼパン-2-オンを酸化して最終生成物(54)にする。方法Aでの(6)から(7)への変換と同様に、使用した酸化剤の選択は2位の基の性質に基づく。

20

【0322】

6-置換-5-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸骨格の合成(方法0)

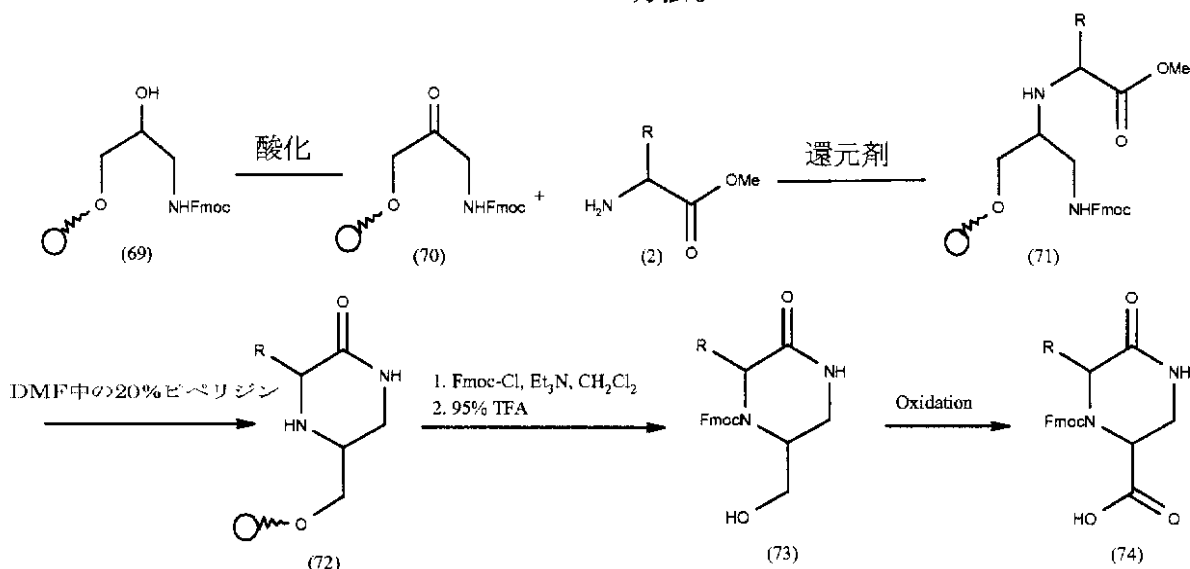
6位に非官能化側鎖を含有する6-置換-5-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸骨格は、方法0で概略を述べた通りに市販の3-Fmoc-アミノ-1,2-プロパン-ジオール1-クロロ-トリチル樹脂(69)から出発して合成し、これはDess-Martinペルヨージナンを使用して酸化してケトン(70)にする。ケトン(70)をアミノエステル(2)で還元的アミノ化して樹脂結合型の(1-アミノメチル-2-クロロ-トリチルオキシ-エチルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(71)を得、これをアミンを脱保護した後に環化して5-クロロトリチルオキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(72)にする。第二級アミンを再保護し、次いで樹脂から切断してFmoc-5-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(73)を得、これを方法Aで記載した手順のいずれかを使用して酸化して6-置換-5-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(74)を得る。

30

【0323】

## 【化 2 6】

## 方法O



10

## 【 0 3 2 4】

1-アミノ-3-クロロトリチルオキシ-プロパン-2-オン(70)の合成:樹脂結合型のアルコール(69)を、三酸化硫黄酸化、NMO/TPAP(N-メチルモルホリン-N-オキシド/過レンニウム酸テトラプロピルアンモニウム)酸化、またはPDC酸化によって酸化する。三酸化硫黄酸化では、Parikh, J. R.およびDoering, W. V., J. Am. Chem. Soc. 89:5505 ~ 5507(1967)で記載のものと同様の手順を使用する。NMO/TPAP酸化では、樹脂結合型のアルコール0.3mmolにN-メチルモルホリンN-オキシド3mmolの乾燥ジメチルホルムアミド10mL溶液を加え、次いで過ルテニウム酸テトラプロピルアンモニウム(TPAP)0.06mmolを樹脂懸濁液に加える。反応を80分間振とうする。溶媒を排液し、樹脂をテトラヒドロフランおよびジクロロメタンで洗浄し、次いで真空乾燥する。PDC酸化では、ジメチルホルムアミド中の0.2M重クロム酸ピリジニウム中の樹脂結合型のアルコールの懸濁液を37℃で4時間振とうし、溶媒を排液し、樹脂をジメチルホルムアミド、テトラヒドロフランおよびジクロロメタンで洗浄する。

20

30

## 【 0 3 2 5】

(1-アミノメチル-2-クロロ-トリチルオキシ-エチルアミノ)-2-置換酢酸メチルエステル(71)の合成:樹脂結合型のケトン(70)を2つの異なる方法の1つによってアミノエステルで還元的アミノ化する。1つの方法では、ジメチルホルムアミド中の1%酢酸20mL中の2.6mmolのアミノエステル(2)の溶液にナトリウムトリアセトキシボロヒドリド2.6mmolを加え、次いで即座に0.5mmolのケトン由来型の樹脂(70)を加え、混合物を60分間振とうし、メタノール、10%ジ-イソプロピルエチルアミン、ジメチルホルムアミドおよびメタノールですすぐ。第2の方法では、0.05Mシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含有するメタノール中の0.05mmolのケトン由来型の樹脂(70)および2.0M アミノエステル塩酸塩(2)の懸濁液を室温で5時間振とうし、排液し、洗浄する。

40

## 【 0 3 2 6】

5-クロロトリチルオキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(72)の合成:ジメチルホルムアミド中の20%ピペリジン10mL中の樹脂0.05mmolの懸濁液を室温で2時間振とうする。

## 【 0 3 2 7】

Fmoc-5-ヒドロキシメチル-3-置換-ピペラジン-2-オン(73)の合成:0.25mmolのFmoc-Clおよびトリエチルアミン0.25mmolを含有する0.05mmolの(72)のジクロロメタン10mL懸濁液を室温で6時間攪拌し、排液し、ジクロロメタンで洗浄する。樹脂をジクロロメタン中の95%トリフルオロ酢酸10mLに再懸濁し、懸濁液を2時間振とうし、濾過し、濾液を濃縮する。

## 【 0 3 2 8】

Fmoc-6-置換-5-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(74)の合成:方法Aについて記載した手

50



順のいずれかによって(73)を酸化して所望の生成物にする。

【0329】

、-二置換アミノ酸の合成(方法PおよびQ)

本発明の構築物の特定のものでは、置換基が同じか異なる、-二置換アミノ酸などの二置換アミノ酸残基を用いることが可能であり、企図される。一態様では、-二置換アミノ酸をAaa<sup>1</sup>またはAaa<sup>8</sup>位置のいずれかで用い、ここで、-二置換アミノ酸の側鎖の少なくとも1つは、Nle、Ala、Leu、Ile、Val、Nva、Met(O)またはMet(O<sub>2</sub>)の側鎖である。以下の合成方法PおよびQは、-ジ-n-ブチルグリシン(2-アミノ-2-ブチル-ヘキサン酸)の作製を記載しており、ここで、側鎖のそれぞれは-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>であり、したがってそれぞれはNleの側鎖と同じである。しかし、同様の方法およびスキームは、置換基が同じか異なるその他の、-二置換アミノ酸の作製で用い得ることは理解されよう。さらに、-二置換アミノ酸を作製する任意の方法は、本発明の実施で用いてよく、本発明の実施は以下の合成スキームの方法に限定されない。よって、-二置換アミノ酸の合成について当技術分野で知られている任意の方法は、本発明の実施で用いてよい。以下のものは、-二置換アミノ酸を作製するための代替方法を教示している:Clark J.S.およびMiddleton M.D.: Synthesis of novel alpha-substituted and alpha,alpha-disubstituted amino acids by rearrangement of ammonium ylides generated from metal carbenoids. Org. Lett. 4(5):765-8(2002); Guino M., Hii K.K.: Wang-aldehyde resin as a recyclable support for the synthesis of alpha,alpha-disubstituted amino acid derivatives. Org. Biomol. Chem. 3(17):3188-93(2005);およびKotha S., Behera M.: Synthesis and modification of dibenzylglycine derivatives via the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction. J. Pept. Res. 64(2):72-85(2004).

10

20

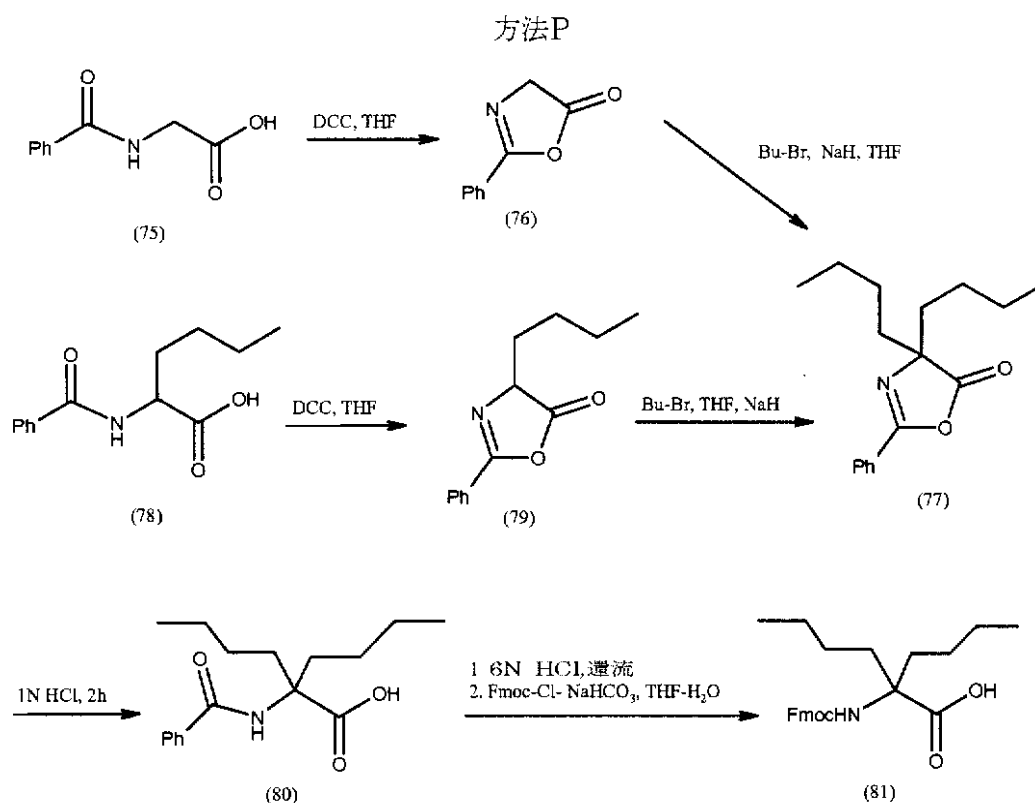
30

40

50

【0330】

【化27】



【0331】

ベンゾイルジ-n-ブチルグリシン(80)の合成:窒素下で0 に維持した10mmolのベンゾイルグリシン(75)のジクロロメタン20mL溶液に、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)12mmolをゆっくりと加え、反応を2時間攪拌して、化合物(76)を得る。固体を濾別し、

濾液を濃縮する。残渣をテトラヒドロフラン15mLに溶解し、0℃に冷却し、次いで水素化ナトリウム24mmol、次いで臭化n-ブチル30mmolを加える。この懸濁液を0℃で2時間攪拌し、次いで室温まで加温させ、溶液を濃縮乾固して化合物(77)を得る。別法として、化合物(77)はまた、水素化ナトリウム12mmolおよび臭化n-ブチル15mmolを使用すること以外は同様に、ベンゾイルノルロイシン(78)から調製できる。化合物(77)をメタノールに溶解し、1N塩酸溶液50mLを加え、溶液を2時間攪拌し、濃縮する。化合物(80)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

#### 【0332】

Fmocジ-n-ブチルグリシン(81)の合成:10mmolの化合物(80)をジオキサン30mLに溶解し、6N塩酸溶液10mLを加え、その溶液を終夜還流する。反応を室温まで冷却し、濃縮乾固し、テトラヒドロフラン30mLに再溶解し、水10mLおよび重炭酸ナトリウム30mmol、次いで15mmolのFmoc-Clを加える。この二相溶液を1時間攪拌し、テトラヒドロフランを真空除去する。水溶液を1×50mLのジエチルエーテルで抽出し、1N塩酸溶液で酸性化し、2×50mLの酢酸エチルで抽出する。酢酸エチル層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮する。化合物(81)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

10

#### 【0333】

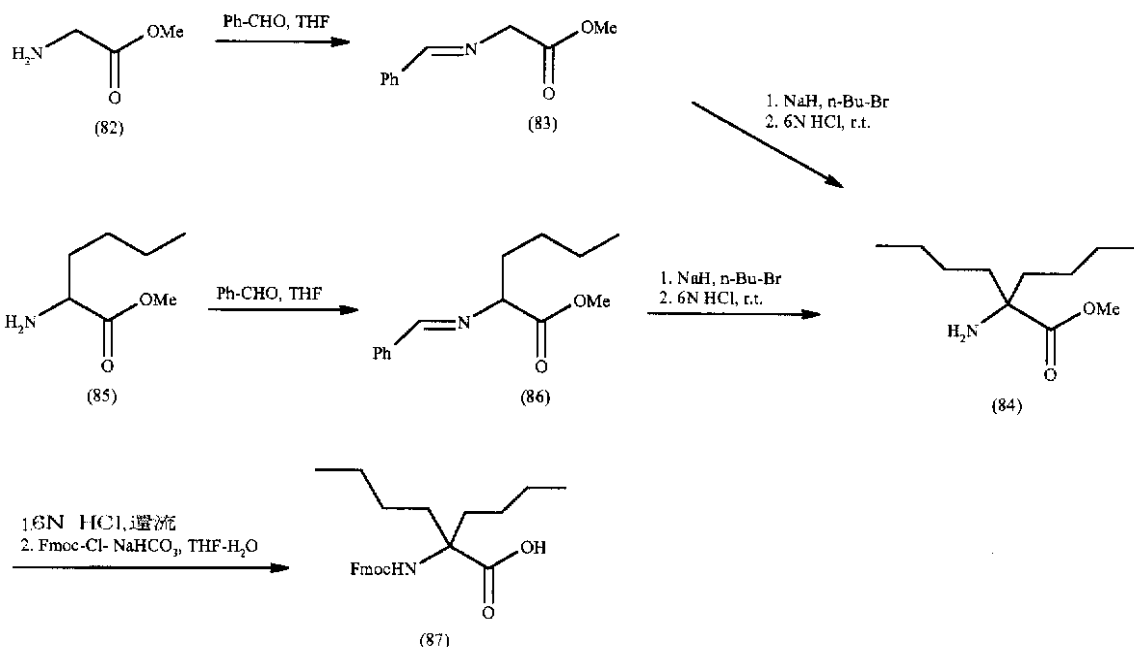
任意の適切なアミノ酸誘導体(化合物78と同様の)で出発することによって、および適切なアルキルブチル、アリールブチル、またはアラルキルブチル試薬を使用することによって、同様の方法を用いてよい。このスキームにより、RとR'が異なる種々の二置換(R,R')アミノ酸代用物が得られる。

20

#### 【0334】

#### 【化28】

#### 方法Q



30

40

#### 【0335】

Fmoc-ジ-n-ブチルグリシン(87)の合成:室温で維持した20mmolのグリシンメチルエステル塩酸塩(82)および粉末モレキュラーシーブ2gの乾燥テトラヒドロフラン40mL懸濁液に、水酸化カリウム24mmol、次いでベンズアルデヒド22mmolを加える。この懸濁液を2時間攪拌し、濾過し、濾液を濃縮する。残渣を乾燥トルエン40mLに再溶解し、次いで水素化ナトリウム60mmolのトルエン懸濁液に加え、次いで臭化n-ブチル60mmolを加える。この懸濁液を12時間攪拌し、次いで6N塩酸の溶液30mLを加え、室温で2時間攪拌し、次いで層を

50

分離する。このように得た(84)の塩酸塩をin situで使用して(87)を調製する。(84)を塩酸塩として単離するために水層を濃縮乾固し、生成物を乾燥メタノール-エーテルから結晶化する。

【0336】

別法として、化合物(84)は、ノルロイシンメチルエステル塩酸塩から、(86)から(84)への変換に水素化ナトリウム30mmolおよび臭化n-ブチル30mmolを使用する以外は同様の合成手順を使用して調製できる。

【0337】

上記で得た化合物(84)の塩酸塩形態の水性混合物を1時間加熱還流し、次いで室温に冷却する。それを固体の水酸化ナトリウムで中和し、次いでテトラヒドロフラン30mLで希釈する。重炭酸ナトリウム(30mmol)、次いで15mmolのFmoc-Clを加える。この二相溶液を1時間攪拌し、テトラヒドロフランを真空除去する。水溶液を1×50mLのジエチルエーテルで抽出し、1N塩酸溶液で酸性化し、2×50mLの酢酸エチルで抽出する。酢酸エチル層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮する。化合物(87)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

10

【0338】

任意の適切なアミノ酸誘導体(化合物85と同様の)で出発することによって、および適切なアルキルブチル、アリールブチル、またはアラルキルブチル試薬を使用することによって、同様の方法を用いてよい。このスキームにより、RとR'が異なる種々の二置換(R,R')アミノ酸代用物が得られる。

20

【0339】

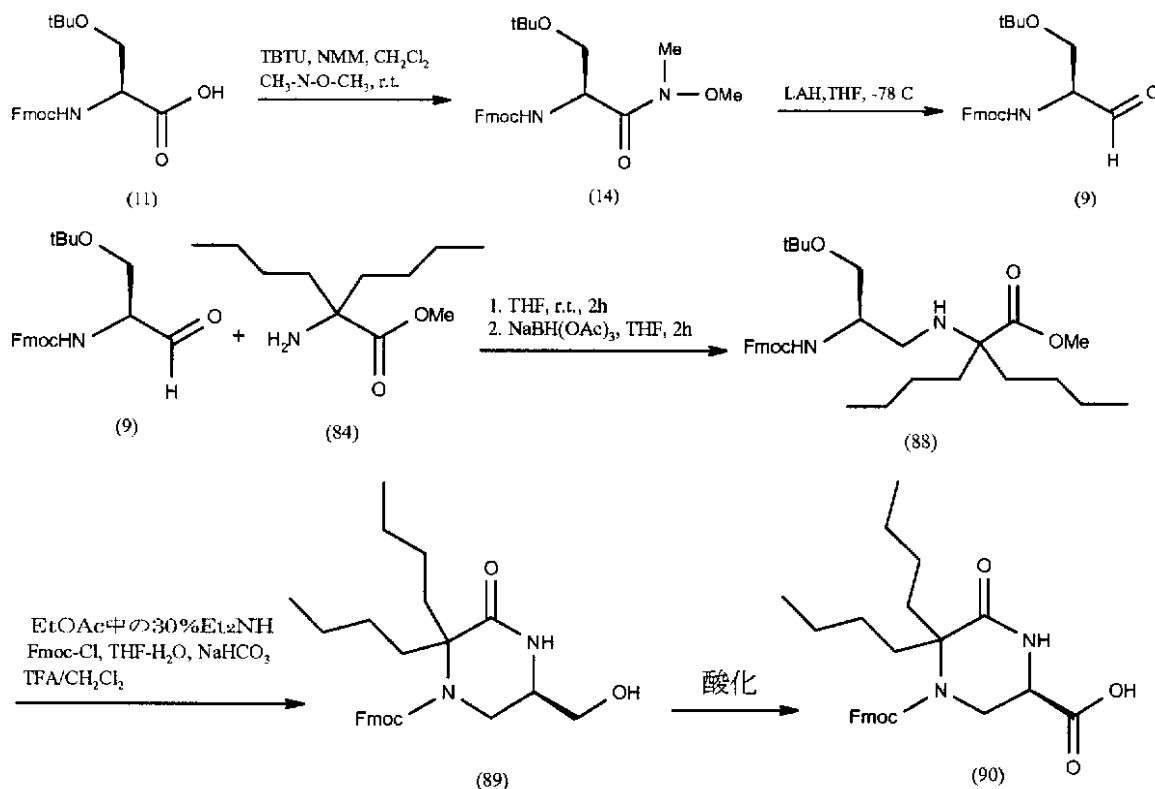
二置換(R,R')骨格の合成(方法R)

本発明は、2つのR基、RおよびR'を有するアミノ酸代用物が用いられる構築物をさらに提供する。以下の方法は、RおよびR'がそれぞれノルロイシン側鎖部分に対応する基であるFmoc保護(R)-5,5-ジブチル-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸の合成を説明する。以下の方法を部分的に上述の方法に基づいて変更して同様の二置換(R,R')アミノ酸代用物を生成し得ることは分かるであろう。任意の適切なアミノ酸誘導体(化合物(84)と同様の化合物)で出発する同様の方法を用いてもよい。そのスキームにより、RとR'が異なる種々の二置換(R,R')アミノ酸代用物を得ることができる。

30

【0340】

## 方法R



(2-Fmoc-アミノ-3-tert-ブトキシ-プロピルアミノ)-2,2,ジ-n-ブチル酢酸メチルエステル(88)の合成:21mmolの(84、スキームQ)、およびトリエチルアミン2.9mL(21mmol)の乾燥テトラヒドロフラン50mL懸濁液を室温で45分間攪拌し、次いで、約20mmolの粗製Fmoc-(O-tert-ブチル)-セリナール(9、スキームD)のテトラヒドロフラン30mL溶液、次いで1.7gの4粉末モレキュラーシーブを加え、この懸濁液をさらに2時間攪拌する。固体のナトリウムトリアセトキシボロヒドリド6.4g(30mmol)を加え、この懸濁液を室温で終夜攪拌する。この懸濁液をメタノールで希釈し、モレキュラーシーブ濾過し、濾液を濃縮する。残渣を酢酸エチル100mLと水50mLとの間に分配する。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮する。化合物(88)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

4-Fmoc-6-ヒドロキシメチル-3,3-ジ-n-ブチル-ピペラジン-2-オン(89)の合成: 酢酸エチル中の30%ジエチルアミン30mL中の10mmolの化合物(88)の溶液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮乾固する。残渣をテトラヒドロフラン20mLおよび水10mLに溶解し、固体の重炭酸ナトリウム2.52g(30mmol)、次いで3.36g(13mmol)のFmoc-Clを加える。混合物を3時間攪拌し、酢酸エチル50mLで希釈し、層を分離し、有機層を水30mLで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。粗製混合物を90%トリフルオロ酢酸10mLのジクロロメタン溶液に溶解し、2時間攪拌し、次いで濃縮乾固する。残渣を酢酸エチルに溶解し、重炭酸ナトリウムの飽和溶液50mLで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮する。化合物(89)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

4-Fmoc-5,5-ジ-n-ブチル-6-オキソ-ピペラジン-2-カルボン酸(90)の合成:室温で維持した8mmolのアルコール(89)のアセトニトリル81mL溶液に、リン酸バッファー溶液(水29.5mL中の一塩基リン酸ナトリウム0.72gおよび二塩基リン酸ナトリウム1.43gで調製)を加え、次いで0.33g(2.1mmol)のTEMPO、および亜塩素酸ナトリウム1.86g(16.5mmol)を加え、この二相溶液を、43℃で維持した油浴中に置く。4.3mL(2.6mmol)の次亜塩素酸ナトリウム溶液

(10～13%次亜塩素酸ナトリウム溶液1.9mLおよび水2.4mLを混合することによって調製)をゆっくりと加える。反応を43 で4時間攪拌し、室温まで冷却し、10%亜硫酸水素ナトリウム20mLを加え、10分間攪拌し、酢酸エチル50mLで希釈し、層を分離する。有機層を1×10mLのブライン、1×10mLの1N塩酸溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮する。化合物(90)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製する。

#### 【0344】

##### 本発明の構築物の合成

本発明のいくつかの実施形態に開示されるような構築物は、アミノ酸間のペプチド結合の形成のための任意の知られた従来の操作によって容易に合成することができる。このような従来の操作には、例えば、カルボキシ基もしくは保護された他の反応性基を有するアミノ酸残基の遊離のアルファアミノ基と、アミノ基もしくは保護された他の反応性基を有するもう1つのアミノ酸残基の遊離の一次カルボキシ基との間の縮合を可能とする任意の溶液相操作が含まれる。好ましい従来の操作において、本発明の構築物は、固相合成によって合成して、当該技術分野で知られた方法によって精製することができる。本発明のアミノ酸代用物は、残基で用いられるものと実質的に同様または同一の方法によって本発明の構築物中に取り込むことができる。様々な樹脂および試薬を用いる任意のいくつかの良く知られた操作を用いて、本発明の構築物を調製することができる。

10

#### 【0345】

所望の配列のそれぞれのアミノ酸もしくはアミノ酸代用物が、別のアミノ酸残基もしくはアミノ酸代用物に相次いで1つずつ添加される操作、または1つもしくは複数のアミノ酸代用物を含み得る所望のアミノ酸配列を有するペプチド断片を最初に従来通り合成し、次いで、縮合して所望の構築物を得る操作によって、構築物を合成する処理を行うことができる。

20

#### 【0346】

固相ペプチド合成法は、当該技術分野において良く知られ、かつ実施されている。このような方法において、本発明の構築物の合成は、固相法の一般原理に従って成長するペプチド鎖の中に1つずつ所望のアミノ酸残基またはアミノ酸代用物を逐次的に取り込ませることによって行うことができる。これらの方法は、Merrifield R.B., Solid phase synthesis (Nobel lecture). Angew. Chem. 24:799～810頁(1985年)およびBaranyら、The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology, Vol.2, Gross E. およびMeienhofer J.編、Academic Press、1～284頁(1980年)を含む多数の参考文献に開示されている。

30

#### 【0347】

構築物の化学合成において、様々なアミノ酸残基またはアミノ酸代用物の反応性側鎖基は、好適な保護基で保護され、これにより保護基が除かれるまでその部位に化学反応が起こることを防止する。アミノ酸残基またはアミノ酸代用物のアルファアミノ基の保護も一般的でもあるが、その実体は、カルボキシ基と反応し、その後、アルファアミノ保護基を選択的に除去し、その後の反応がその部位に起こることを可能にする。特定の保護基が開示され、固相合成法および液相合成法において知られている。

#### 【0348】

アルファアミノ基は、好適な保護基によって保護することができ、これには、ウレタン型保護基、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)および置換ベンジルオキシカルボニル、例えば、p-クロロベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、p-プロモベンジルオキシカルボニル、p-ビフェニルイソプロポキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)およびp-メトキシベンジルオキシカルボニル(Moz);脂肪族ウレタン型保護基、例えば、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、およびアリルオキシカルボニルなどがある。Fmocは、アルファアミノ保護に好ましい。

40

#### 【0349】

グアニジノ基は、好適な保護基、例えば、ニトロ、p-トルエンスルホニル(Tos)、Z、ペンタメチルクロマンスルホニル(Pmc)、アダマンチルオキシカルボニル、ペンタメチルジ

50

ヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、FmocおよびBocによって保護することができる。Pbfは、Argにとっての1つの好ましい保護基である。他の好ましい保護基には、Z、Fmoc、およびBocがある。特に、グアニジノ保護基は、合成処理中に切断および除去されてもよく、他に、切断または除去されなくてもよく、この事象において、保護基を有する側鎖は、本明細書において定義された通りのアミノ酸側鎖部分の誘導体を形成する。特に、保護基が不安定であり、患者に投与後インビボである機構によって除去し得る場合、構築物は、「プロドラッグ」、すなわち、患者への投与後、ある化学的または生理学的処理を介してインビボで所望の薬剤に変換される薬剤前駆体である構築物となる(例えば、生理学的pHにされている、または酵素作用によるプロドラッグは、所望の薬剤形態に変換される)。

10

#### 【0350】

本明細書に記載される本発明の構築物は、手動で、または製造業者によって与えられたプログラミングモジュールを用い、製造業者によって述べられたプロトコルに従うかもしくはは困難なカップリングの収率を改善するために製造業者のプロトコルを修正することによる自動ペプチド合成機によってのいずれかで、固相合成を用いて調製することができる。

#### 【0351】

固相合成は、保護された  $\alpha$ -アミノ酸、 $\alpha$ -アミノ酸代用物または  $\alpha$ -アミノアルコール模倣物を好適な樹脂にカップリングさせることによって構築物のC-末端から開始される。このような出発物質は、 $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸または  $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸代用物をp-ベンシルオキシベンジルアルコール(Wang)樹脂もしくはは2-クロロトリチルクロライド樹脂ヘエステル結合により結合させることによって、Fmoc-リンカー、例えば、p-[(R,S)-1-(9H-フルオル-エン-9-イル)-メトキシホルムアミド]-2,4-ジメチルオキシベンジル]-フェノキシ酢酸(Rinkリンカー)のベンズヒドリルアミン(BHA)樹脂に対する間のアミド結合によって、または当該技術分野で良く知られた他の手段、例えば、 $\alpha$ -アミノ保護アルコール模倣物を、クロロメチルポリスチレン樹脂に結合した3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-2イル-メタノールリンカーに結合させることによって調製される。Fmoc-リンカー-BHA樹脂支持体は、市販されており、可能な場合に一般的に使用される。アミノ酸を順次付加するために必要なら反復サイクルを介して樹脂に担持する。アルファアミノFmoc保護基は、塩基性条件下で除かれる。N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中ピペリジン、ピペラジン、ジエチルアミン、またはモルホリン(20~40%v/v)をこの目的に用いることができる。

20

30

#### 【0352】

アルファアミノ保護基の除去に続けて、その後の保護アミノ酸またはアミノ酸代用物は、中間体の保護ペプチド-樹脂を得るために所望の順序で段階的に結合される。ペプチドの固相合成におけるアミノ酸のカップリングに用いられる活性化剤は、当該技術分野でよく知られている。構築物が合成された後、必要ならば、構築物のさらなる誘導体化のために当該技術分野でよく知られた方法を用いて、直交して保護された側鎖保護基を除去することができる。

#### 【0353】

構築物における反応性基は、固相合成の間または樹脂からの除去後のいずれかで、選択的に修飾することができる。例えば、構築物は修飾して、N-末端修飾、例えば、樹脂上にある間にアセチル化を得るために修飾することができるか、または切断剤を用いて樹脂から除去し、次いで修飾することができる。N-末端修飾、例えば、アセチル化、またはC-末端修飾、例えば、N-アセチル基のアミド化もしくは導入の方法は、当該技術分野において知られている。同様に、アミノ酸の側鎖を修飾する方法は、ペプチド合成の当業者によく知られている。構築物上に存在する反応性基になされる修飾の選択は、1つには構築物に望まれる特性によって決定される。

40

#### 【0354】

合成に次いで固相からの構築物の切断に続けて、構築物は、いくつかの方法、例えば、C<sub>18</sub>カラムなどの好適なカラムを用いる逆相高性能液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)によ

50

って精製することができる。分離または精製の他の方法、例えば、構築物の大きさまたは電荷に基づく方法も用いることができる。精製されると直ちに、構築物はいくつかの方法、例えば、高性能液体クロマトグラフ(HPLC)、アミノ酸分析、質量分析法などによって特性決定することができる。

#### 【0355】

置換アミド誘導C-末端、典型的にはN-アルキル基を有する本発明の構築物は、保護されたアルファアミノ酸またはアミノ酸代用物を好適な樹脂に結合させることによって構築物のC-末端から開始される固相合成によって調製される。固相上の置換アミド誘導体を調製するためのこのような方法は、当該技術分野において記載されている。例えば、Barn D.R.、Morphy J.R.、Rees D.C.、Synthesis of an array of amides by aluminum chloride assisted cleavage of resin-bound esters. Tetrahedron Lett. 37、3213~3216頁(1996年); DeGrado W.F. Kaiser E.T. Solid-phase synthesis of protected peptides on a polymer bound oxime: Preparation of segments comprising the sequences of a cytotoxic 26-peptide analogue. J. Org. Chem. 47:3258~3261頁(1982年)を参照されたい。このような出発物質は、よく知られた手段によって、アルファアミノ保護アミノ酸またはアミノ酸代用物をP-ベンジルオキシベンジルアルコール(Wang)樹脂にエステル結合によって結合させることによって調製することができる。ペプチド鎖は、アミノ酸もしくはアミノ酸代用物の所望の配列ならびにジクロロメタン中で適切なアミンおよび塩化アルミニウム(例えば、メチルアミン、ジメチルアミン、エチルアミンなど)の溶液で処理された樹脂を有して成長させる。得られたアミド誘導体構築物は、溶液中で樹脂から放出される。この樹脂をろ過し、アミド誘導体構築物を溶媒の濃度によって回収し、その後エーテルで沈殿させる。この粗構築物を乾燥し、残存するアミノ酸側鎖保護基を水および1,2-エタンジチオール(EDT)の存在下でトリフルオロ酢酸(TFA)を用いて切断する。最終生成物を冷エーテルを添加することによって沈殿させ、ろ過によって収集する。最終精製は、C<sub>18</sub>カラムを用いるRP-HPLCによる。

10

20

#### 【0356】

1つの好ましい方法において、実施例1の構築物は以下の方法によって合成した。それぞれの構築物は、ケト-ピペラジン構造に基づく1つまたは2つのアミノ酸代用物を有した。このアミノ酸代用物は上記の通り合成した。構築物をFmoc化学を用いて合成した。ケト-ピペラジンアミノ酸代用物の取込み直前および直後のカップリングに手操作の合成手法を用いた。

30

#### 【0357】

例えば、ケト-ピペラジンアミノ酸代用物が末端位置にあった場合、ケト-ピペラジンアミノ酸代用物を樹脂に結合させるために以下のプロトコルを用いた。Rinkアミド樹脂(0.3ミリモル/gで充填、Advanced Chem Tech)をDMF中で30分間膨潤させた。該樹脂のFmoc脱保護を20%ピペリジン/DMFを20分間用いて達成した。樹脂と選択されたFmoc-保護ケト-ピペラジンアミノ酸代用物(2当量)とのカップリングをPyBop(2当量)およびDIEA(4当量)と一緒にDMF中で一晩のインキュベーションによって達成した。カイザー試験後に陽性結果が得られた場合、カップリング反応は2回目に行った。アセチル化は、DMF中Ac<sub>2</sub>O(10当量)およびピリジン(20当量)を用いて行った。

40

#### 【0358】

以下のプロトコルを用いて、ケト-ピペラジンアミノ酸代用物をペプチド-樹脂に結合した。カップリングは、DMF中でFmoc-保護ケトピペラジンアミノ酸代用物(2当量)、TBTU(2当量)およびDIEA(4当量)を混合することによって行い、一晩インキュベートさせ、陽性のカイザー試験が得られた場合は、再度カップリング反応を繰り返した。アセチル化は、DMF中Ac<sub>2</sub>O(10当量)およびピリジン(20当量)を使用して行った。

#### 【0359】

Fmoc-保護アミノ酸を固相上でケト-ピペラジンアミノ酸代用物にカップリングさせるために以下のプロトコルを用いた。ほとんどの場合に、少なくとも2回のカップリングサイクルを必要とし、しばしば3回のサイクルを用いた。典型的なサイクルにおいて、Fmoc-保

50

護アミノ酸(4当量)をDMF中HOAt(4当量)およびDIC(4当量)と30分間混合した。次いで、得られた混合物を樹脂に直接または中間体を介して結合したケト-ピペラジンアミノ酸代用物とSPEチューブ中で一晩混合した。

【0360】

配列においてケト-ピペラジンアミノ酸代用物に直接隣接していないアミノ酸間のカップリングは、固相ペプチド合成のための標準プロトコルを用いて行った。次の保護基を用いた:LysおよびOrnに対してBoc、TyrおよびSerに対してt-ブチル、CysおよびHisに対してトリチル、Aspに対してO-t-ブチルおよびArgに対してPbf。

【0361】

TFA/チオアニソール/フェノール/H<sub>2</sub>O/EDT(87.5/2.5/2.5/5/2.5)(5mL)の混合物を用いて線状ペプチドを樹脂から3時間で切断した。得られた物質をろ過し、凍結条件下で冷エーテルから1時間で沈殿させた。

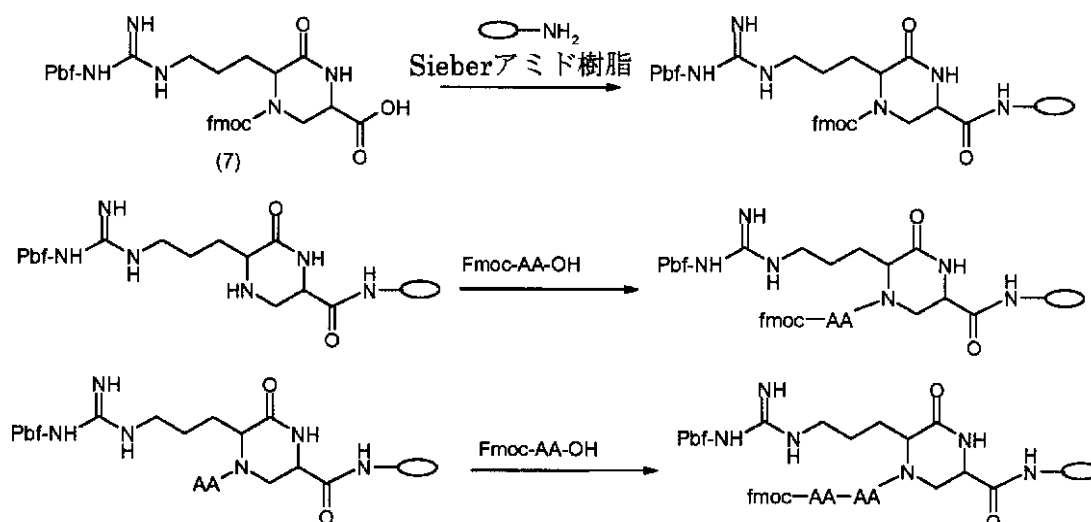
10

【0362】

式Iの代用物が樹脂または他のペプチド固体支持体に結合しており、かつC-末端位置にある場合、本発明の特定の化合物は、以下のスキームによって合成することができる。

【0363】

【化30】



20

30

【0364】

代用物(7)は、上記方法Aまたは任意の他の方法のスキームによって調製する。Fmoc保護Sieberアミド樹脂を、ジメチルホルムアミドとジクロロメタンの1:1混合物中で45分間膨潤させることによって処理し、その後ろ過し、ジメチルホルムアミドで洗浄した。次いで、洗浄した樹脂を、ジメチルホルムアミド中20%ピペリジンを用いて15分間脱保護し、ろ過して、ジメチルホルムアミドで洗浄した。

【0365】

ジメチルホルムアミド中Fmoc-保護代用物(7)の溶液を上記に調製した脱保護Sieberアミド樹脂に加え、その後固体PyBopおよびジイソプロピルエチルアミン、その後追加のジメチルホルムアミドを加えた。混合物を窒素バブリングで一晩攪拌した。この樹脂をろ過し、ジメチルホルムアミドで洗浄して、ジメチルホルムアミド:無水酢酸:ピリジンの3:2:1溶液からなるカップリング溶液で30分間カップリングし、ろ過して、ジメチルホルムアミドで洗浄し、樹脂に複合化した代用物(7)を得た。

40

【0366】

得られた樹脂に複合化したFmoc-保護代用物(7)をジメチルホルムアミド中20%ピペリジンで15分間脱保護し、ろ過して、ジメチルホルムアミドで洗浄し、樹脂に複合化した代用物(7)を得た。ジメチルホルムアミド中所望のFmoc-AA-OH(4当量、AAが任意の所望のアミノ酸である場合)の溶液を、樹脂に複合化した代用物(7)に加え、次いで、DMF中HCTU(60ミ

50



リモル、4当量)およびジイソプロピルエチルアミン(120ミリモル、8当量)の溶液を加え、窒素パブリックで一晩カップリングさせた。得られたFmoc-AA-代用物(7)-樹脂をろ過によって単離し、ジメチルホルムアミドで洗浄した。完全なカップリングを確実にするために、該生成物を上記のようなFmoc-AA-OHの溶液で窒素パブリックを用いて一晩再度処理した。得られた樹脂をろ過し、ジメチルホルムアミドで洗浄した。

#### 【0367】

次いで、得られたFmoc-AA-代用物(7)-樹脂を、上記のようなカップリング溶液を用いて30分間カップリングした。次いで、この樹脂をろ過し、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、MeOH、およびジエチルエーテルで洗浄し、次いで、真空下で乾燥した。

#### 【0368】

その後、従来のペプチドカップリング法を用いて、それぞれ後続のアミノ酸を結合させた。

#### 【0369】

本発明のペプチド構築物の場合によるペグ化を任意の方法、例えば、下記方法で行うことができる。

#### 【0370】

反応性アミン基、例えば、リシンもしくはオルニチンの側鎖、位置Aaa<sup>1</sup>のオメガアミノ脂肪酸族、またはAaa<sup>15</sup>におけるアミノ酸代用物のJにおけるアミン基のペグ化は、ジメチルスルホキシド2mLに0.005ミリモルの精製構築物を溶解させ、その後、55.5mg(0.011ミリモル、2当量)のPEG-5K-OSu(スクシンイミジルプロピオネート反応性基を有する5,000Da MW  
メトキシ-PEG)を添加し、次いで、17.7μL(0.13ミリモル、20当量)のトリエチルアミンを添加し、わずかに曇った溶液を室温で3時間攪拌することによって達成した。7μL(0.111  
ミリモル、10当量)のエタノールアミンを添加することによって過剰のPEG-5K-OSuをクエンチし、この反応液を一晩攪拌した。

#### 【0371】

反応性カルボキシル基、例えば、AspもしくはGlu側鎖または残基もしくは代用物のいずれかの上のAaa<sup>15</sup>における末端カルボキシルのペグ化は、PEG-NH<sub>2</sub>(PEG-アミン)をAspもしくはGluの側鎖またはC-末端におけるカルボン酸基を含む構築物にカップリングさせることによって達成する。このペプチド構築物(0.005ミリモル)をDMSO(2mL)中に溶解し、その後55.5mg(0.011ミリモル、2当量)のPEG-NH<sub>2</sub>およびHOBt(0.01ミリモル)を添加した。0.005  
5ミリモルのカップリング試薬N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDAC)を添加することによって、カップリングを開始する。わずかに曇った溶液を室温で一晩攪拌した。次いで、ペグ化されたペプチド構築物をHPLCで精製する。

#### 【0372】

反応性チオール基、例えば、CysもしくはHcys側鎖またはAaa<sup>1</sup>におけるアミノ酸代用物のQにおけるチオール基のペグ化は、DMSO中でペプチド構築物をPEG-メチル-マレイミド試薬(SunBio、Orinda、California)で一晩処理することによって達成する。次いで、ペグ化ペプチド構築物は、HPLCによって精製する。

#### 【0373】

ペグ化後、次いで、得られた粗混合物をHPLCによって精製し、1つまたは複数のアミノ酸代用物を含むPEG誘導体化構築物を得た。

#### 【0374】

インビトロおよびインビボ試験系

選択した構築物を、結合および機能状態を決定するためにアッセイで試験した。以下のアッセイを用いた。

#### 【0375】

細胞培養液。ヒトナトリウム利尿ペプチド受容体A(NPRA)についてコードするcDNAクローンをBio S&T社(Montreal、Quebec)から購入した。このcDNAクローンを哺乳動物発現ベクター-pcDNA3.1(Invitrogen)中に挿入し、HEK-293細胞にトランスフェクトした。安定クローンをG418硫酸塩の存在下で細胞の培養によって選択した。NPRAの発現を[<sup>125</sup>I]-心房

10

20

30

40

50

ナトリウム利尿ペプチド( $[^{125}\text{I}]\text{-ANP}$ )を、クローン細胞系から調製した膜ホモジェネートに結合させることによって調べた。10%FBS、G418硫酸塩(300  $\mu\text{g/mL}$ )、グルタミン酸ナトリウム(0.29mg/mL)、ペニシリン(100単位/mL)およびストレプトマイシン(100  $\mu\text{g/mL}$ )で補充したDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)中で5% $\text{CO}_2$ において37℃で培養液中にHEK-hNPRA細胞を維持した。

#### 【0376】

競合結合アッセイ。競合阻止結合アッセイを、HEK-hNPRA細胞から調製した粗膜ホモジェネートを用いて行った。膜ホモジェネートを調製するために、細胞をリン酸緩衝生理食塩水ですすぎ洗いし、低張溶解緩衝液(10mM トリス、pH7.4+5mM EDTA)中、4℃で15分間インキュベートした。細胞をプレートからポリプロピレンチューブに移し、均質化した。ホモジェネートを25,000  $\times g$ で20分間遠心分離した。ペレットを50mMトリス(pH7.4)および1mM EDTAからなる緩衝液中で再懸濁し、均質化して、25,000  $\times g$ で20分間遠心分離した。ペレットを100mMトリス(pH7.4)および10mM  $\text{MgCl}_2$ からなる緩衝液中で再懸濁し、必要とされるまで-80℃で保存した。アッセイの当日にホモジェネートを解凍して、均質化した。25mMのHepes(pH7.4)、100mMのNaCl、2mMの $\text{CaCl}_2$ 、5mMの $\text{MgCl}_2$ 、0.1%BSAおよび1mMの1,10-フェナントロリンを含む緩衝液中で、 $[^{125}\text{I}]\text{-ANP}$ の結合を行った。 $[^{125}\text{I}]\text{-ANP}$ (25~30pM)およびMilliporeフィルタープレート中の競合リガンドの濃度を増加させつつ4℃で120分間インキュベートした。アッセイを冷洗浄緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水)の添加によって止めて、その後真空マニホールドを用いてろ過した。結合放射活性を、ガンマカウンターを用いて測定した。非特異的結合は、 $[^{125}\text{I}]\text{-hANP}$ の非トランスフェクト化HEK293膜への結合によって規定した。データを、GraphPad Prism(登録商標)曲線適合ソフトウェアを用いて分析した。

#### 【0377】

$\text{EC}_{50}$ の測定のための一般方法。組換えhNPRAを発現するHEK-293細胞における細胞内cGMPの蓄積を測定することによって、構築物の機能評価を行った。HEK-NPRA細胞を洗浄およびCell Dissociation Buffer(Gibco、Life Technologies)中での遠心分離によって採集した。ペレット化された細胞を、10mMのHepes(pH7.4)、5mMの $\text{MgCl}_2$ 、200mMのL-グルタミン、1mMの1,10-フェナントロリンおよびBSA(0.5mg/mL)を含むハンス平衡塩溶液(HBSS)中に再懸濁した。遠心分離に続けて、細胞を0.5mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX)で補充した上記緩衝液中に再懸濁した。細胞(約 $2 \times 10^5$ 個/ウェル)を96-ウェルプレートのそれぞれのウェルに加え、37℃で15分間インキュベートした。ブレインキュベーション期間に続けて、増加する濃度の構築物の存在下で細胞をさらなる15分間インキュベートした。反応を、温度ショックで細胞を溶解させることによって終了させた。この反応プレートをドライアイス/エタノール浴中で15分間インキュベートし、その後90℃で10分間インキュベートした。cGMPの蓄積を、cGMPフラッシュプレートRIA(Perkin-Elmer)を用いて測定した。GraphPad Prism(登録商標)ソフトウェアでの非線形回帰分析を用いることによって、データ分析して、 $\text{EC}_{50}$ 値を決定した。

#### 【0378】

質量および核磁気共鳴分析の測定。マトリックスとしてアルファ-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(CHCA)を用いるMALDI-TOF質量分析法(陽イオンモード)によって、PEG結合構築物の質量値を分析した。構築物対マトリックス比1:10、1:20および1:30の試料調製にメタノールを用いた。他に、他のマトリックス、例えば、シナピン酸(SA)および2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)、ならびに溶媒、例えば、アセトニトリル-0.1%TFA水溶液を試料調製に用いることができる。質量値の他の測定は、陽性モードを用いるWaters MicroMass ZQ装置を用いて行った。別に特記されない限り、ペグ化されなかった構築物について、質量測定値は計算値と比較し、質量プラス2を2で割る $(M+2)/2$ の形式で表した。

#### 【0379】

プロトンNMRデータを、Bruker300MHz分光計を用いて得た。重水素化溶媒、例えば、クロロホルム、DMSO、または必要に応じて、メタノールに構築物を溶解した後にスペクトルを得た。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 8 0 】

YMC Pack Pro C-18カラム(4.6×50mm、3μ)を備えたWaters Alliance HTを用いてステップワイズ法で1mL/分で溶出させて、HPLC測定を行った。溶媒A(0.1%トリフルオロ酢酸を含む水v/v)および溶媒B(0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルv/v)を移動相として用いた。ケトピペラジン中間体の分析について、カラムを10%Bで平衡化し、次いで、Bを8分の期間をかけて90%に高めた。ペプチドの分析について、カラムを2%Bで平衡化し、次いで、Bを8分の期間をかけて90%に高めた。

## 【 0 3 8 1 】

動物モデル-- 血圧トランスデューサ移植。ラットを、イソフルランを用いて麻酔の外科手術面に誘導し、加熱パッド上に保持した。腹部を剃り、70%アルコールおよびベタジン溶液で洗い落とす。無菌法を用いて、下行大動脈および大静脈を暴露するために正中腹部切開を行う。腹部の内容物を湿った滅菌ガーゼおよび開創器を用いて穏やかに納める。製造業者の説明書(Data Sciences International's Multiplus TL Series Device Surgical Manual 2000:3.1~3.10頁に記載)に基づいて、腹大動脈を周囲脂肪および結合組織から慎重に切断し、血圧トランスデューサのカテーテルを挿入する。トランスデューサのカテーテルは、外科手術用糊を用いて所定の位置に固定し、トランスデューサの本体を腹壁に縫合することによって安定化する(4-0絹縫合系)。操作中止血メカニズムが維持され、血流が損なわれない(例えば、大動脈は一度に3分を超えて閉塞しない)ことを確保するために注意をする。トランスデューサ設置をテレメトリー無線信号を用いて確認する。トランスデューサ設置後、ガーゼスポンジを取り除き、腹腔を滅菌生理食塩水で洗い流す。次いで、腹部切開を単純断続パターンで非吸収性縫合系(4-0絹縫合系)を用いて縫合して閉じる。皮膚を吸収性縫合系(4-0 vicryl)を用いて閉じる。最後に、この動物をイソフルランから外し、温かい環境に置いて完全に覚醒するまで監視する。

## 【 0 3 8 2 】

鬱血性心不全の外科的誘発(容量負荷)

この操作において、テレメトリー装置のための移植操作におけるのと同じ方法で下行大動脈と大静脈を暴露する。腎臓と腸骨分岐部との間の血管へ接近すると直ちに、1.8mmの針(外径)で下行大動脈に穿刺した。針を下大静脈中に進めて、引き出す。下行大動脈における腹側穿刺部位を組織接着剤で密封する。大静脈の膨れおよび静脈血と動脈血との混合によって、大動脈と大静脈との間の分流の持続を目視で確認する。圧力トランスデューサも移植する場合、2つの操作を同時に行う。Flaim, S.F., W.J. Minter, S.H. Nellis, およびD.P. Clark:Chronic arteriovenous shunt:evaluation of a model for heart failure in rat, Am.J.Physiol., 236:H698~H704頁(1979年)ならびにGarcia, R.およびS. Diebold:Simple, rapid and effective method of producing aortocaval shunts in the rat., Cardiovasc. Res., 24:430~432頁(1990年)に記載された一般的な方法は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 3 8 3 】

血圧モニタリング。血圧トランスデューサ(model TA11PA-C40、Data Sciences International、St Paul、MN)からのテレメトリー信号を集め、Dataquest A.R.T. Gold software version 3.0(Data Sciences International)を用いて分析する。ラットは、毎日ほぼ同じ時間に観察した。ホームケージ中のそれぞれのラットは観察室の受信部上に置き、30分間場所の変化に対して順応させた。ベースライン記録を投与直前30分間取り、治療記録をIV投与直後135分間およびSC投与後210分間取った。参照により本明細書に組み込まれる、Clemens, L.E., R.G. Almirez, K.A.Baudouin, E.B. GrossbardおよびA.A. Protter:Human brain natriuretic peptide reduces blood pressure in normotensive and acute nor epine phrine-induced hypertensive rabbits., Am. J. Hypertens., 10:654~661頁(1997年)に以前に発表された方法と同様の方法で、データを生理食塩水投与後の結果と比較した。

## 【 0 3 8 4 】

利尿およびナトリウム利尿。ラットをペントバルビタールナトリウムを用いて麻酔の外

10

20

30

40

50

科手術面に誘導し、加熱パッド上に保持する。腹部を剃り、70%アルコールおよびベタジン溶液で洗い落とす。無菌法を用いて、膀胱を暴露するために正中腹部切開を行う。膀胱の腹側表面に巾着縫合を導入し、小切開を縫合領域内で行う。カテーテルの張り出し端部を開口部に挿入し、その周りに巾着縫合を強く締めて所定の場所に固定する。参照により本明細書に組み込まれる、Abassi, Z.A., J.R. Powell, E. Golomb、およびH.R. Keiser: Renal and systemic effects of urodilatin in rats with high-output heart failure、Am. J. Physiol., 262:F615~F621頁(1992年)に発表された方法と同様の方法で投与前および後の種々の時間間隔で予め重量を量ったミクロ遠心分離管中に尿を集める。

【実施例 1】

【0385】

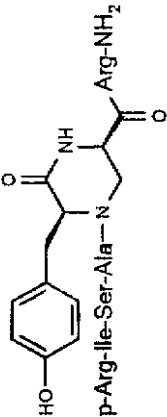
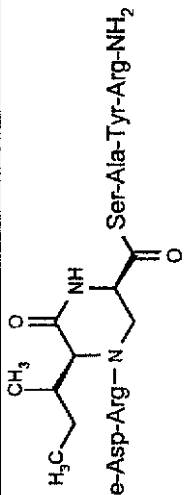
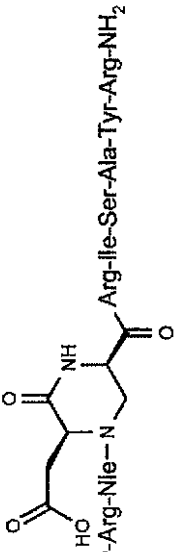
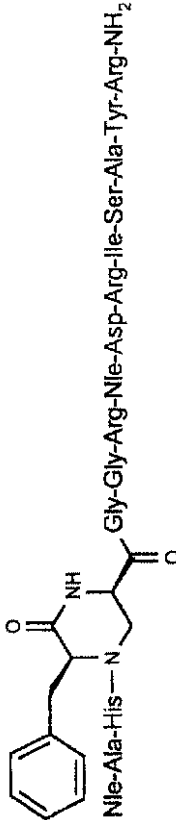
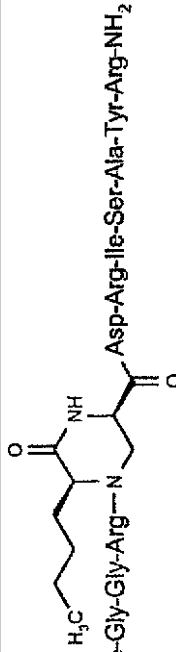
10

1つまたは複数の前記方法のアミノ酸代用物を用いて、以下の構築物を合成して、精製し、質量を測定した。結果は、下の表1に示すようであった：

【0386】

【表 2 8 A】

表1

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-1	901.4	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-N-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-2	900.9	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-N-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-3	901.4	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Arg-Nle-N-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-4	901.4	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-5	901.1	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>

【 0 3 8 7 】

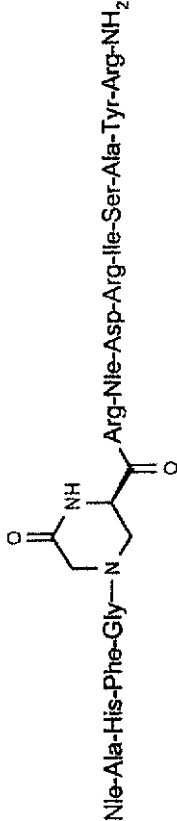

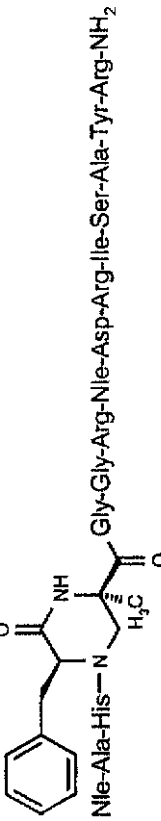

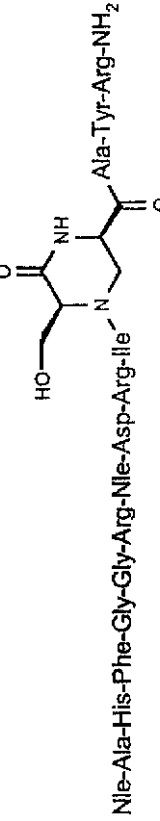
10

20

30

40

【表 2 8 B】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-6	901.1	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-7	901.1	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-8	908.1	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-9	901.0	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-10	901.8	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>

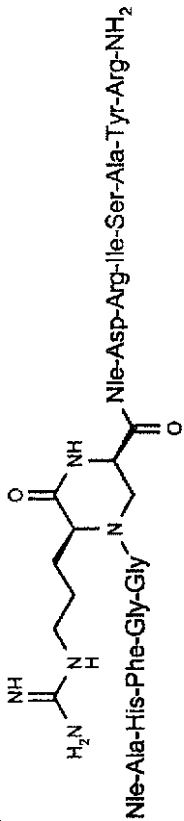
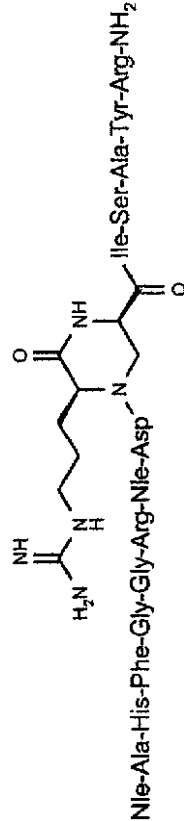
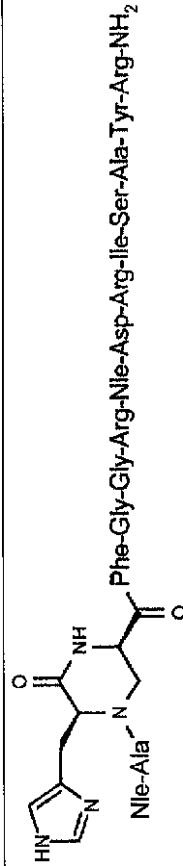
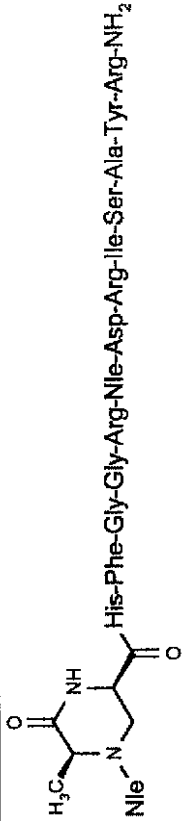
10

20

30

40

【表 2 8 C】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-11	901.9	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-12	901.8	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-13	902.0	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-14	901.1	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>

10

20

30

40

【表 2 8 D】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-15	901.1	<p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-16	901.1	<p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-17	901.0	<p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-18	900.9	<p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-19	901.0	<p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>

【 0 3 9 0 】

10


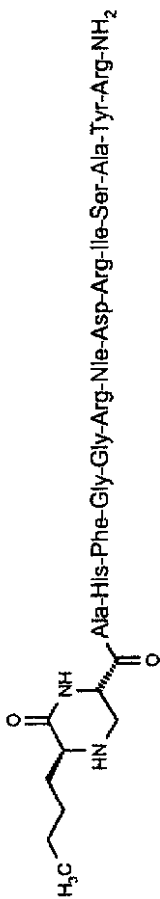
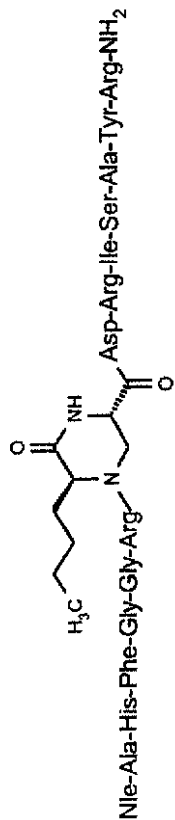

20

30

40



【表 2 8 E】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-20	900.4	 <p>Nle-Ala-His-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-21	900.6	 <p>Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-22	900.6	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-23	900.6	 <p>Nle-Ala-His-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>

【 0 3 9 1 】

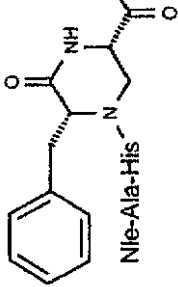
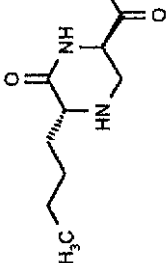
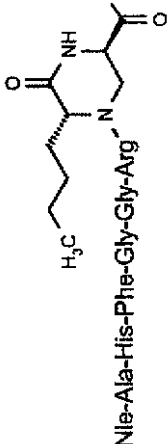
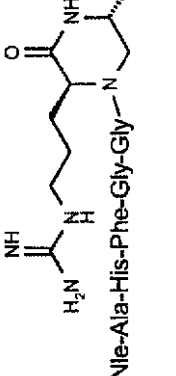
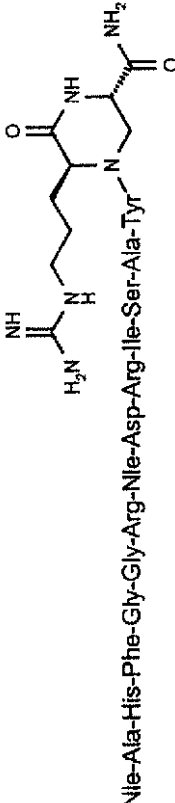
10

20

30

40

【表 2 8 F】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-24	900.7	 <p>Nle-Ala-His-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-25	900.6	 <p>Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-26	900.6	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-27	900.6	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-28	900.6	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>

【 0 3 9 2 】

10

20

30

40

【表 2 8 G】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-29	931.4	
1-30	935.3	
1-31	935.3	
1-32	935.0	

【 0 3 9 3 】

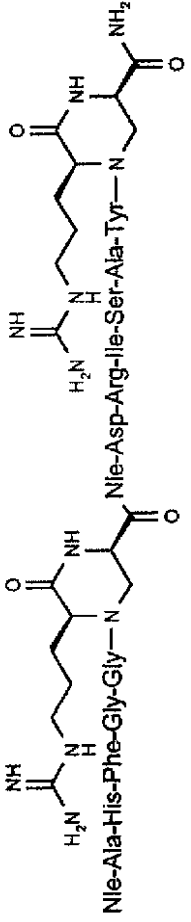
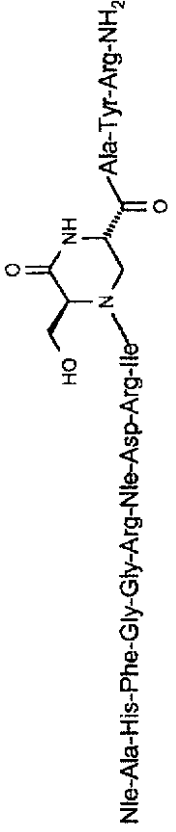
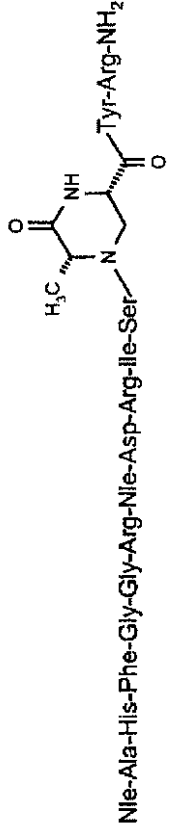

10

20

30

40

【表 2 8 H】

構築物	(M <sup>+</sup> 2)/2	構造
1-33	935.4	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Ala-Tyr-NH<sub>2</sub></p>
1-34	900.3	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ala-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-35	900.3	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>
1-36	948.8	 <p>Nle-Ala-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-His-Phe-Gly-Gly-Arg-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub></p>



【表 2 8 J】

構築物	(M <sup>2</sup> )/2	構造
1-41	942.3	
1-42	921.7	
1-43	956.2	
1-44	964.2	

【 0 3 9 6 】

10


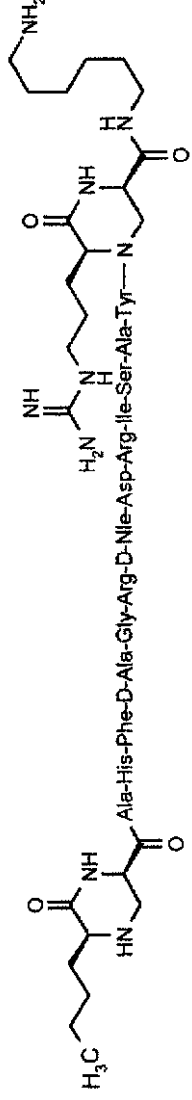
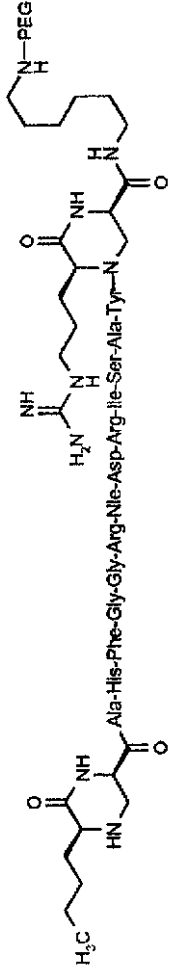
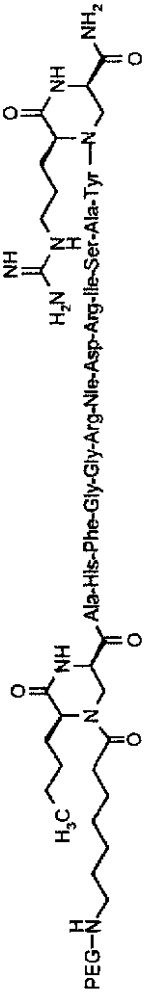
20

30

40



【表 2 8 L】

構築物	(M+2)/2	構造
1-50	998.4	
1-51	992.2	
1-52	6506-8580 (M+1)	
1-53	6476-8077 (M+1)	

## 【実施例 2】

## 【0398】

1つまたは複数の前記方法のアミノ酸代用物を用いて、以下の表2の構築物を合成して、精製し、質量を測定した：

10

20

30

40

50



【 0 3 9 9 】

【表 2 9 A】

表2

構築物	構造
2-1	
2-2	
2-3	
2-4	
2-5	
2-6	
2-7	
2-8	
2-9	

10

20

30

40

50

【 0 4 0 0 】

【 表 2 9 B 】

構築物	構造
2-10	
2-11	
2-12	
2-13	
2-14	
2-15	
2-16	
2-17	
2-18	

10

20

30

40

【 0 4 0 1 】

10

20

30

40

【表 29D】

構築物	構造
2-28	
2-29	
2-30	
2-31	
2-32	
2-33	
2-34	
2-35	

10

20

30

40

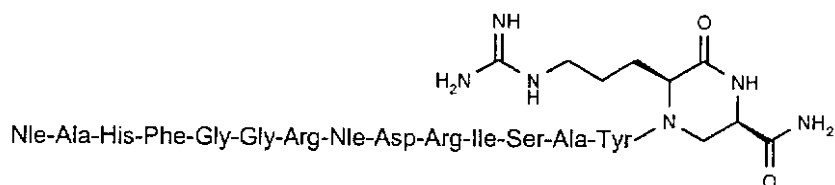
## 【実施例 3】

## 【0403】

以下の構造を有する構築物1-16を上記のように試験した。

## 【0404】

## 【化 3 1】



## 【 0 4 0 5 】

受容体結合研究において、この構築物は、hANPが0.05nMのKiを有し、ミニ-ANPが0.6nMのKiを有したアッセイ系において88.5nMの平均Kiを有した。構築物1-16は、hANPが0.6nMのEC<sub>50</sub>を有し、ミニ-ANPが3.3nMのEC<sub>50</sub>を有したアッセイ系において340nMのEC<sub>50</sub>を有した。

10

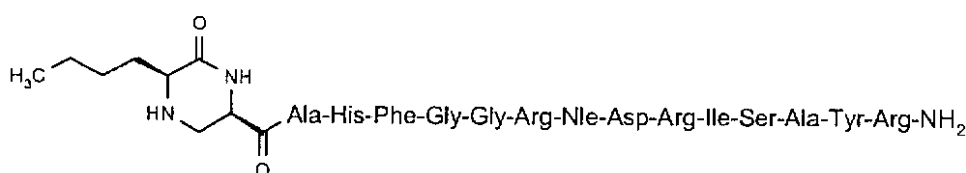
## 【実施例 4】

## 【 0 4 0 6 】

以下の構造を有する構築物1-9を上記のように試験した。

## 【 0 4 0 7 】

## 【化 3 2】



20

## 【 0 4 0 8 】

受容体結合研究において、この構築物は、hANPが0.05nMのKiを有し、ミニ-ANPが0.6nMのKiを有したアッセイ系において14.5nMの平均Kiを有した。構築物1-9は、hANPが0.6nMのEC<sub>50</sub>を有し、ミニ-ANPが3.3nMのEC<sub>50</sub>を有したアッセイ系において550nMのEC<sub>50</sub>を有した。

## 【実施例 5】

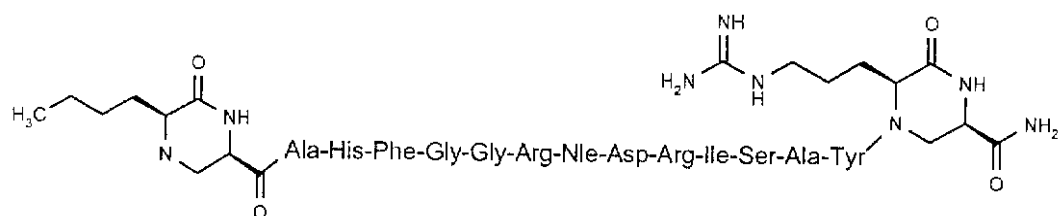
## 【 0 4 0 9 】

以下の構造を有する構築物1-30を上記のように試験した。

30

## 【 0 4 1 0 】

## 【化 3 3】



## 【 0 4 1 1 】

受容体結合研究において、この構築物は、hANPが0.05nMのKiを有し、ミニ-ANPが0.6nMのKiを有したアッセイ系において8.7nMの平均Kiを有した。構築物1-30は、hANPが0.6nMのEC<sub>50</sub>を有し、ミニ-ANPが3.3nMのEC<sub>50</sub>を有したアッセイ系において80.5nMのEC<sub>50</sub>を有した。

40

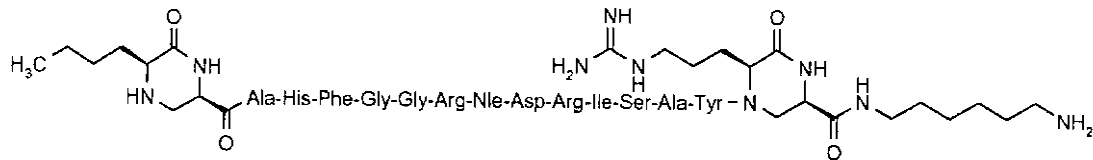
## 【実施例 6】

## 【 0 4 1 2 】

以下の構造を有する構築物1-49を上記のように試験した。

## 【 0 4 1 3 】

## 【化 3 4】



## 【 0 4 1 4】

受容体結合研究において、この構築物は、hANPが0.05nMのKiを有し、ミニ-ANPが0.6nMのKiを有したアッセイ系において0.2nMの平均Kiを有した。構築物1-49は、hANPが0.6nMのEC<sub>50</sub>を有し、ミニ-ANPが3.3nMのEC<sub>50</sub>を有したアッセイ系において約12nMのEC<sub>50</sub>を有した。

10

## 【実施例 7】

## 【 0 4 1 5】

構築物を、ラットおよびヒトの血漿の両方で安定性について試験し、そのT<sub>1/2</sub>を37℃で測定した。構築物をIVおよび皮下経路でラットに投与し、そのインビボT<sub>1/2</sub>を測定する。

## 【実施例 8】

## 【 0 4 1 6】

「動物モデル-血圧トランスデューサ移植」の題のもとで記載したようにラットに血圧トランスデューサを移植した。「血圧モニタリング」の題のもとで記載したように研究を行った。研究には、本発明の構築物の投与後の生理食塩水と比較した、最大血圧における変化の測定も含まれる。

20

## 【実施例 9】

## 【 0 4 1 7】

ラットの総尿排出量を、「利尿およびナトリウム利尿」の題のもとで記載したように測定する。4匹の動物の群は、IV経路によって構築物を投与され、動物は、0.03mg/kg体重～1.0mg/kg体重の範囲にわたる段階的に増加する用量を受けた。投与後30分にわたる総尿排出量を測定し、結果を決定した。

## 【実施例 10】

## 【 0 4 1 8】

表3に要約したような静脈内(IV)投与後の雄Sprague-Dawley ラットにおいて、構築物1-30の薬物動態学を研究した。

30

## 【 0 4 1 9】

構築物1-30をTFA塩として調製し、IVおよびSC投与経路の両方について1mL/kgで生理食塩水に溶解した。IV用量を目標用量0.3および2mg/kgで大腿動脈カニューレを介して投与した。頸静脈に前に移植したカニューレから所定間隔でEDTA二カリウムを含む容器中に血液を収集した。血漿をこの血液の遠心分離によって得て、分析まで-70℃で保存した。

## 【 0 4 2 0】

データ分析は、100 μL注入ループ、2つのShimadzu PumpおよびSciex API4000質量分析計を備えたLeap Technologies HTS-PAL自動試料採取器を含むLC-MS/MSシステムを利用した。分析物のクロマトグラフィー分離は、ステップワイズ法で1mL/分で溶出させたLuna C<sub>18</sub> カラム(4.6×100mm;3 μm)上で達成した。溶媒A(0.1%ギ酸を含む水v/v)および溶媒B(0.1%ギ酸を含むアセトニトリルv/v)を移動相として使用した。最初に、カラムを5%Bで平衡化し、そして試料注入2分後に、Bを0.5分の期間にわたって60%に増加させ、この濃度で1.1分間保持した。Bの組成を1.4分で80%に増加させ、0.3分保持した。Bの組成を0.2分で5%に戻した。総実験時間は6分であった。陽イオンモードで操作されたTurboイオンスプレーインターフェースを用いて、分析物の質量分析検出を達成した。プロトン化前駆体イオンの選択生成物イオンへの遷移の多反応モニタリング(MRM)によって、分析物の反応を測定した。

40

## 【 0 4 2 1】

血漿のアリコート(100 μL)を内部標準(IS)と混合して、96ウェル様式のC<sub>8</sub>カートリッジ

50

を用いて固相抽出した。水中1mLのメタノールおよび1mLの2%水酸化アンモニウムでC<sub>8</sub>カートリッジを予備調整後、血漿試料をカートリッジに入れた。カートリッジを40%メタノール中2%水酸化アンモニウムで洗浄後、構築物を60%メタノール中1mLの2%酢酸でカートリッジから溶出させた。溶出物を清浄プレートに移し、N<sub>2</sub>気流下で蒸発させ、残渣をLC-MS/MS分析前に20mMの酢酸アンモニウムおよびアセトニトリル(6:4、v:v)100 μL中に再懸濁させた。種々の濃度の構築物およびそのそれぞれのISを100 μLの未処理ラット血漿に添加することによって同様の方法で、校正標準(2~1000ng/mL)を調製した。同様に、構築物1-30およびISを構築物の3つの異なる濃度(3.5、75および750ng/mL)で100 μLの対照血漿に添加することによって品質管理試料を調製した。

#### 【0422】

データを取得して、Sciex Analyst 1.4.1ソフトウェアによって処理した。構築物対ISのピーク面積比を、構築物の名目濃度の関数としてプロットした。1/xの重み付け因子を用いる線形回帰を用いて血漿試料中の構築物の濃度を計算した。このアッセイについて定量の下限(LLOQ)は、典型的に2または5ng/mLであった。

#### 【0423】

薬物動態学パラメータを、確立された非区画法(WinNonlin version2.1;Consulting Inc., Palo Alto, CA)によって計算した。血漿濃度対時間曲線下面積(AUC)を、上向き勾配の線形台形補間法および下向き勾配の対数台形補間法を用いて決定した。最後の測定可能な濃度から無限大のAUC部分は、式Ct/Kelから推定したが、ここで、Ctは最後の測定可能な濃度を表し、Kelは消失速度定数である。後者は、片対数プロットの終末段階における線形回帰によって濃度対時間曲線から決定した。

#### 【0424】

#### 【表30】

表3  
IV投与後のSDラットにおける構築物の薬物動態学パラメータの要約

構築物	PKパラメータ				
	Dose (mg/kg)	AUC (nM.hr)	Vdss (L/kg)	Cl (mL/min/kg)	T <sub>1/2</sub> (hr)
1-30	2	139	0.6	131	0.1

#### 【実施例11】

#### 【0425】

限定することなしに、表1または表2の構築物を含む本発明の任意の構築物は、持続放出注射のために配合することができる。任意の構築物は、PEG、例えば、ポリエチレングリコール3350、ならびに場合によって、限定されないが、賦形剤、例えば、塩、ポリソルベート80、pHを調整するための水酸化ナトリウムまたは塩酸などを含む1種または複数の追加の賦形剤および保存剤と一緒に配合することができる。他に、任意の構築物は、例えば、ポリマー骨格における任意の可変割合の乳酸を有する自己触媒ポリオルトエステルを含むポリオルトエステル、および場合によって1種または複数の追加の賦形剤と一緒に配合することができる。ポリ(D,L-ラクチド-co-グリコリド)ポリマー(PLGAポリマー)、好ましくは親水性末端基を有するPLGAポリマーを用いることができる。

#### 【実施例12】

#### 【0426】

鬱血性心不全、例えば、安静時呼吸困難または最小活動度を有する急性非代償性鬱血性心不全を有する患者に、皮下注射によって表1または表2の1種または複数の任意の構築物を含む配合物を投与する。

#### 【実施例13】

#### 【0427】

慢性鬱血性心不全を有する患者に、注射、例えば、深い筋内注射(例えば、殿筋または

三角筋における)によって実施例11の持続放出注射可能な配合物を投与する。

【0428】

本発明の一般的もしくは特に記載された反応物質および/または操作条件を前の実施例に用いられたものに置き換えることによって、前の実施例を同様に首尾よく繰り返すことができる。

【0429】

本発明について、これらの好ましい実施形態に特に関連して詳細に述べてきたが、他の実施形態も同様の結果を達成することができる。本発明の変形および変更は当業者に明らかであり、全てのこのような変更物および均等物に及ぶことを意図する。上記に引用された、および/または添付書類における全ての参考文献、出願、特許、および刊行物、なら

10

びに対応する出願(複数可)の全体の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【配列表】

2009532385000001.app



## 【国際調査報告】

60900070023



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/65656

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: <b>A61K 38/10(2006.01)</b>  USPC: <b>514/14;530/326</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/14;530/326  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Registry, CAPLUS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	DUTTA, A. s., Journal of Peptide Science, 2000, Vol 6, pages 321-341, especially pages 326.	1-4, 6, 7, 9, 10 --- 5, 8, 12-47
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 27 August 2008 (27.08.2008)		Date of mailing of the international search report <b>29 SEP 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer SATYANARAYANA R. GUDIBANDE Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

09.2.2009

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/65656

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-53

- Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US07/65656

## BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This International Search Authority has found 100 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are too numerous to recite individually, where exemplary species are those of formulae (IX)-(XII) (claims 51 and 52).

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

Claims 1-50 and 53 are generic to a plurality of species, including the specifically recited species of claims 51 and 52, formulae (IX)-(XII).

The first specifically defined species are those of claims 51 and 52 for which claims 1-53 will be searched."

1. This International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US07/63656

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Annex B, Part I(f) of the Administrative Instructions under PCT states that, "wherein a single claim defines alternatives (chemical or non-chemical)... the requirement of a technical interrelationship and the same or corresponding Special technical features as defined in Rule 13.2, shall be considered to be met when the alternatives are of a similar nature."

The alternatives must comply with subsections (i)(A) and one of either (i)(B)(I) or (i)(B)(2), which requires that, "all alternatives have a common property or activity" and "a common structure is present, i.e., a significant structural element is shared by all of the alternatives" (B)(1) or "in cases where the common structure cannot be the unifying criteria, all alternatives belong to a recognized class of chemical compounds in the art to which the invention pertains." (B)(2).

In the instant case, the compounds are required to have the same activity/function (binding a natriuretic peptide receptor), satisfying requirement (A). However, the claim fails to satisfy either 03)(1) or 03)(2). Claim 1 recites no structure of the peptide, thus failing to meet the requirements of 03)(1), and provides no specific structure for the amino acid surrogate, describing it with a generic structure.

Further, in looking to subsection (f)(iii), it is stated that 'recognized class of chemical compounds' means that, "there is an expectation from the knowledge in the art that members of the class will behave in the same way in the context of the claimed invention. In other words, each member could be substituted one for the other, with the expectation that the same intended result would be achieved." One of skill in the art would not recognize these divergent compounds, or other compounds asserted to have said activity/function, as required, to function in the context of the instantly claimed invention. Thus, the claim fails to meet the requirement of 03)(2).

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
<b>A 6 1 P 9/04 (2006.01)</b>		A 6 1 P 9/04		

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

(72)発明者 シュブ・ディー・シャルマ

アメリカ合衆国・ニュージャージー・0 8 5 1 2・クランバリー・ペティー・ロード・6

(72)発明者 マルガリータ・バストス

アメリカ合衆国・ニュージャージー・0 8 5 3 6・ブレーンズボロ・クライズデル・コート・8

(72)発明者 ウェイ・ヤン

アメリカ合衆国・ニュージャージー・0 8 8 2 0・エディソン・デルウッド・ロード・1 0 2

(72)発明者 フイ・ツァイ・チャイ

アメリカ合衆国・ニュージャージー・0 8 8 1 6・イースト・ブランズウィック・アップルトウリー・レーン・1 4

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA23 CA59 DB02 NA12 ZA372 ZA422 ZA832

ZC032

4H045 AA10 BA17 BA51 BA56 BA57 CA44 DA32 EA23 FA33 FA51

FA58