

(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2018-507187

(P2018-507187A)

(43) 公表日 平成30年3月15日 (2018.3.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/12	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-538728 (P2017-538728)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ 35
(86) (22) 出願日	平成28年1月15日 (2016.1.15)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(85) 翻訳文提出日	平成29年9月20日 (2017.9.20)	(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(86) 国際出願番号	PCT/IB2016/050206	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 国際公開番号	W02016/116842	(74) 代理人	100176094 弁理士 箱田 満
(87) 国際公開日	平成28年7月28日 (2016.7.28)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(31) 優先権主張番号	62/107,040		
(32) 優先日	平成27年1月23日 (2015.1.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 改善された半減期を有する合成アペリン脂肪酸コンジュゲート

(57) 【要約】

本発明は、式 (I) : Q - R - P - R - L - C^{*} - H - K - G - P - (N1e) - C^{*} - F (I) [式中、「^{*}」で標識された2つのシステインアミノ酸は、それらの側鎖のチオール官能基の間にジスルフィド結合を形成している] の合成ポリペプチド、またはそのアミドもしくはエステル; と、から選択される脂肪酸であって、そのカルボン酸官能基のうちの1つを介して、任意選択的にポリエチレングリコールリンカーを介して、ペプチドのN末端に共有結合によって連結している、脂肪酸を含む、コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を提供する。コンジュゲートは、APJ受容体のアゴニストである。本発明はまた、本発明のコンジュゲートの製造方法、ならびに、急性代償不全心不全 (ADHF)、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病 (妊娠糖尿病を含める)、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷 (日焼けを含める

Mouse plasma exposure profiles of compounds of examples 1 and 4 following subcutaneous dosing

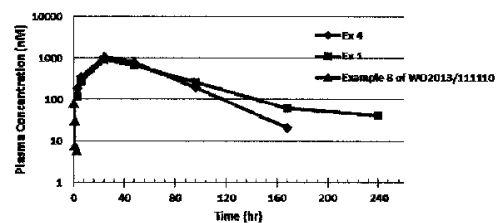
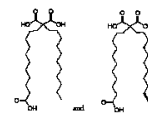


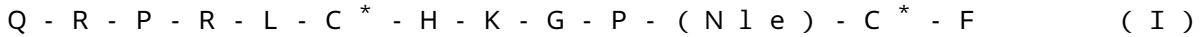
FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 以下の式 (I) :



[式中、

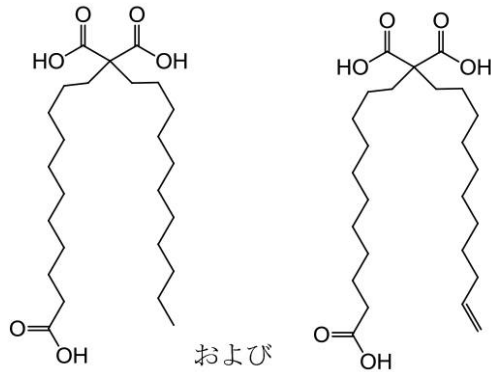
「 C^* 」で標識された 2 つのシステインアミノ酸は、それらの側鎖のチオール官能基の間にジスルフィド結合を形成している]

を有する APJ アゴニストペプチド、またはそのアミドもしくはエステルと、

b. 脂肪酸であって:

【化 1】

10



20

から選択され、そのカルボン酸官能基のうちの 1 つを介して、任意選択的にポリエチレングリコールリンカーを介して、前記ペプチドの N 末端に共有結合によって連結している、脂肪酸と

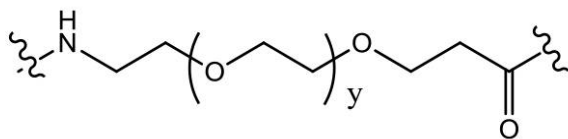
を含む、コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

ポリエチレングリコール (PEG) リンカーが存在し、式 (III) :

【化 2】

30



(III)

[式中、

y は、1 ~ 30 であり、PEG リンカーのカルボニル官能基は、式 (I) のペプチドの N 末端におけるアミノ官能基とアミド結合を形成し、PEG リンカーのアミノ官能基は、脂肪酸のカルボン酸官能基のうちの 1 つとアミド結合を形成している]

40

のものである、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

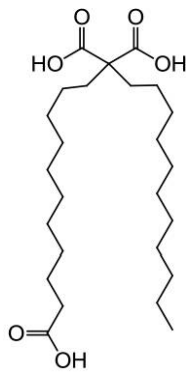
【請求項 3】

前記ポリエチレングリコールリンカーが、式 (III) のものであり、y が 2 ~ 25 である、請求項 1 または 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記脂肪酸が、

【化 3】



10

である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記脂肪酸が、そのジェミナルなカルボン酸官能基のうちの 1 つを介して、PEG リンカーのアミノ官能基に、または PEG リンカーがない場合には、前記ペプチドの N 末端のアミノ官能基に付着している、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

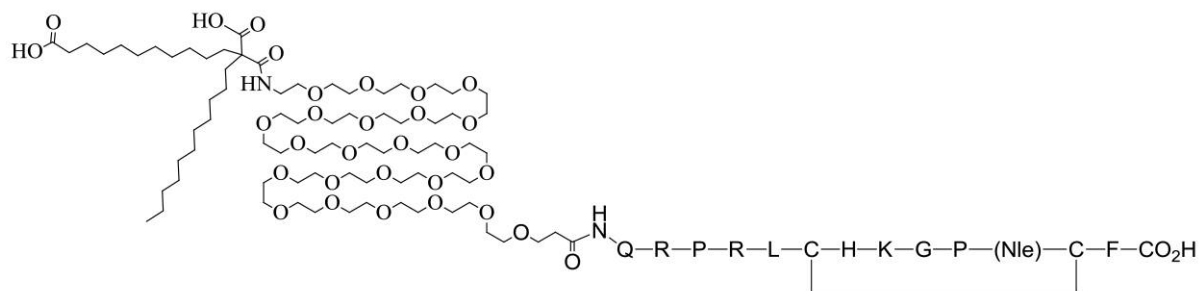
【請求項 6】

前記脂肪酸が、その末端カルボン酸官能基を介して、PEG リンカーのアミノ官能基に、または PEG リンカーがない場合には、前記ペプチドのアミノ官能基に付着している、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

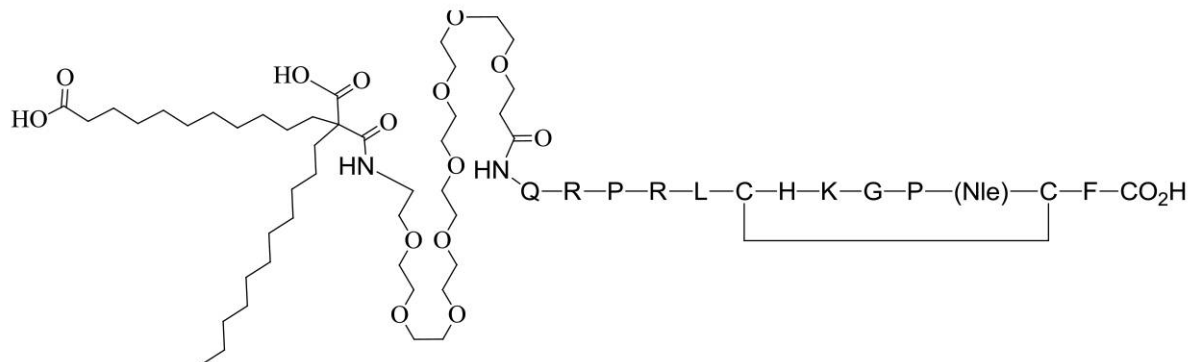
20

【化 4】



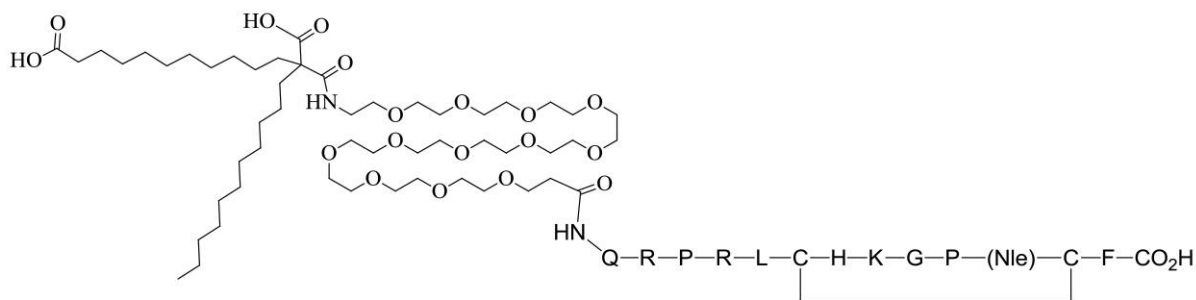
10

;



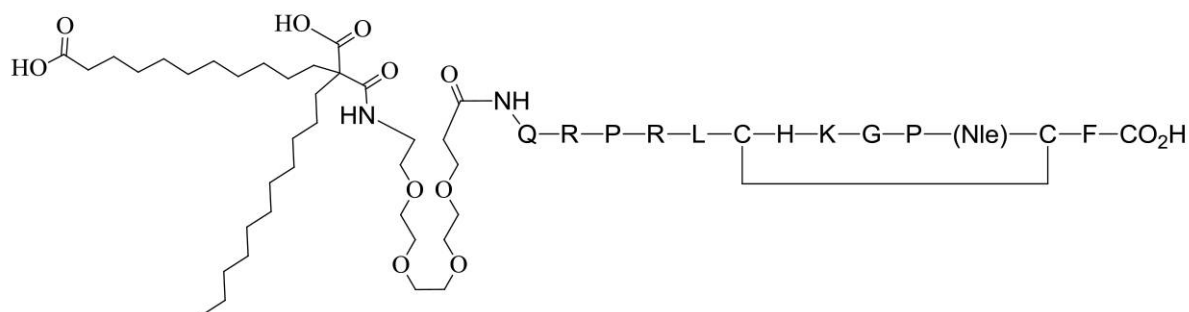
20

;



30

; および



40

から選択される、請求項 1 に記載のコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 8】

その必要のある対象において、APJ 受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または障害を治療または予防する方法であって、治療有効量の請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む方法。

【請求項 9】

50

前記疾患または障害が、急性代償不全心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a 症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含める）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含める）、および子癇前症から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

医薬として使用するための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 11】

A P J 受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または障害の治療または予防において使用するための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 12】

急性代償不全心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a 症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含める）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含める）または子癇前症の治療において使用するための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 13】

治療有効量の請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩と、治療活性のある 1 種または複数の共薬剤とを含む、組合せ。

【請求項 14】

前記共薬剤が、イノトロープ、アドレナリン受容体遮断薬、H M G - C o A 還元酵素阻害薬、アンジオテンシン I I 受容体アンタゴニスト、アンジオテンシン変換酵素（A C E）阻害薬、カルシウムチャネル遮断薬（C C B）、エンドセリンアンタゴニスト、レニン阻害薬、利尿薬、A p o A - I 模倣薬、抗糖尿病薬、抗肥満薬、アルドステロン受容体遮断薬、エンドセリン受容体遮断薬、アルドステロンシンターゼ阻害薬（A S I）、C E T P 阻害薬、抗凝血薬、リラキシン、B N P（ネシリチド）、および N E P 阻害薬から選択される、請求項 13 に記載の組合せ。

【請求項 15】

治療有効量の請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩と、1 種または複数の薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、A P J アゴニストポリペプチドと脂肪酸部分のバイオコンジュゲートである半合成生物学的分子を含む組成物に関する。特に、本発明のバイオコンジュゲートは、A P J アゴニスト活性を保持しながら、その対応する裸のポリペプチドに比べておよび／または先に記載されたアペリンバイオコンジュゲートに比べて、ペプチダーゼの作用によるタンパク質分解性分解に対する耐性がより高い。本発明はさらに、前記組成物の製造方法および前記組成物を心血管疾患治療において薬学的活性剤として使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

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

10

20

30

40

50

不全」(ADHF)での入院は、毎年約50万件である。

【0003】

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

【0004】

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

【0005】

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

【0006】

この欠点を克服するために現在使用されている一手段は、一部の治療用ペプチドが分解されるとしても、十分治療上有効なままとなるように、問題の治療用ペプチドを高い投薬量で患者に投与することである。しかし、この方法は、患者にとって快適ではない。大半の治療用ペプチドは経口投与することができないので、治療用ペプチドは、絶えず注入する、静脈内注射によって頻回注入する、または皮下注射という不便な経路によって頻回投与することのいずれかの必要があることになる。頻回投与が必要となる結果、潜在的可能性のある多くのペプチド治療薬には、許容されない非常に突出した治療コストが伴う。分解された多量のペプチドの存在は、望ましくない副作用も生じかねない。

【0007】

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

【0008】

したがって、ペプチドの半減期を延長する1つの手法は、生物学的活性を依然として維持しながら、その分解速度を緩めるように、治療用ペプチドを修飾することである。そのような合成的に修飾されたポリペプチドは、米国特許第8,673,848号明細書(代理人整理番号PAT054961-US-NP)に記載されている。別の手法としては、ペプチドを、腎臓を介したその排出を妨げ得る脂肪酸部分などの1種または複数の分子にコンジュゲートさせることにより、クリアランスの速度を減速することが挙げられる。そのような脂肪酸コンジュゲートの例は、米国仮特許出願第62/082327号明細書(PAT056274-US-PSP2)、米国特許出願第14/336,290号明細書(PAT055781-US-NP)および米国特許出願第14/336,262号明細書(PAT055418-US-NP)に記載されている。

【0009】

しかし、そのようなバイオコンジュゲートは、依然としてプロテアーゼ活性を受けやすいかまたはもはやそれらのコンジュゲートされていない類似体と同等に活性ではない場合がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

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

【課題を解決するための手段】

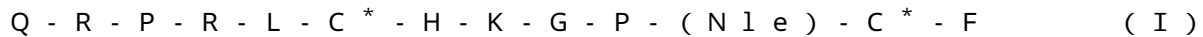
【0011】

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

【0012】

したがって、本発明の目的は、a)以下の式(I)：

a. 以下の式(I)：



[式中、

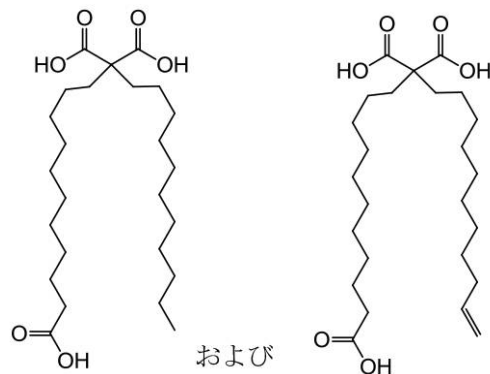
「*」で標識された2つのシステインアミノ酸は、それらの側鎖のチオール官能基の間にジスルフィド結合を形成している]

を有するAPJアゴニストペプチド、またはそのアミドもしくはエステル、またはそれと実質的に等価なペプチド；と

b. 脂肪酸であって：

【0013】

【化1】



から選択され、そのカルボン酸官能基のうちの1つを介して、任意選択的にポリエチレングリコールリンカーを介して、ペプチドのN末端に共有結合によって連結している、脂肪酸と

を含む、新規コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を提供することである。

【0014】

一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、野生型アペリンに優るおよび/または裸の(コンジュゲートされていない)アペリン類似体(たとえば、 $Q - R - P - R - L - C^* - H - K - G - P - (Nle) - C^* - F$)に優るおよび/または他の先に記載されたアペリンコンジュゲートに優る以下の改良点、すなわち、半減期の延長、投与後および/または可溶化後の分解に対するより強い免疫性、APJ受容体におけるより大きなアゴニスト活性のうちの少なくとも1つを有する。したがって、本発明のアペリンコンジュゲートは、心不全などの心血管疾患、心不全と関連する障害および状態、ならびにAPJ受容

10

20

30

40

50

体活性の活性化に反応を示す障害および状態の治療または予防に特に有用である。

【0015】

上で挙げた式 I のアミノ酸残基のいずれも、本発明のコンジュゲートが、機能活性および構造特性（たとえば、半減期の延長、分解からの保護、立体配座拘束）を依然として保持するという前提で、保存的に置換されていてもよい。許容される保存的なアミノ酸置換の原理および例は、本明細書でさらに説明する。

【0016】

半減期延長性部分である脂肪酸は、本発明のコンジュゲートの構成部分の生物学的機能を増強するように、かつ／またはその妨げとならないようにして付着させる。たとえば、脂肪酸部分を、（リンカーがないときには）そのカルボン酸官能基のうちの 1 つを介してペプチドの N 末端のアミノ官能基に付着させ、アミド結合を形成する。代わりに、脂肪酸部分を、（リンカーがあるときには）そのカルボン酸官能基のうちの 1 つを介して PEG リンカーのアミノ官能基に付着させる。

10

【0017】

一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、心不全と関連する障害もしくは状態、または A P J 受容体活性の活性化（もしくはアゴニズム）に反応を示す障害の治療または予防に特に有用である。別の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、急性代償不全心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a 症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含める）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含める）、および子癇前症の治療において特に有用である。

20

【0018】

好ましい実施形態では、本発明のアペリンコンジュゲートは、急性非代償心不全（A D H F）の治療において有用である。別の好ましい実施形態では、アペリンコンジュゲートは、慢性心不全の治療において有用である。

【0019】

別の実施形態では、本発明は、そのような治療の必要のある対象において、A P J 受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療する方法であって、対象における A P J 受容体の活性化に反応を示す障害または疾患が治療されるような有効量の本発明のコンジュゲートを対象に投与することを含む方法に関する。

30

【0020】

さらに別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のコンジュゲートを製造する方法に関する。

【0021】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明のコンジュゲートと、1 種または複数の薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。

【0022】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明のコンジュゲートと、1 種または複数の治療活性薬剤の医薬合剤とを含む組合せに関する。

40

【0023】

別の実施形態では、本発明は、その必要のある対象において A P J 受容体を活性化させる方法であって、治療有効量の本発明のコンジュゲートを対象に投与することを含む方法に関する。

【0024】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の本発明の詳細な説明において解明される。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】皮下投薬後の実施例 1 および 4 の化合物のマウス血漿中曝露量（plasma exposure）プロフィールを表す。

50

【発明を実施するための形態】

【0026】

定義

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

【0027】

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

10

【0028】

用語「APJ」（「アペリン受容体」、「アンジオテンシン様1受容体」、「アンジオテンシンII様1受容体」などとも呼ばれる）とは、380残基、7回膜貫通ドメインのGi共役型受容体を指し、その遺伝子は、ヒトの11番染色体の長腕上に位置する（NCBI参照配列：NP_005152.1、NCBI参照配列：NM_005161によってコードされる）。APJは、1993年に、変性オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ヒトゲノムDNAから初めてクローン化され（O'Dowd et al. Gene, 136:355-60、1993）、1型アンジオテンシンII受容体と有意に相同的である。しかし、この相同性にもかかわらず、アンジオテンシンIIは、APJを結合しない。この内因性リガンドは、長年の間オーファンであったが、単離され、アペリンと命名された（Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)）。

20

【0029】

本明細書で使用する時、「APJ」受容体活性の活性化」または「APJ」受容体の活性化」とは、APJ受容体活性の増大を指す。APJ受容体活性の活性化は、たとえば、本発明のコンジュゲートの投与による、APJ受容体の「アゴニズム」とも呼ぶ。

30

【0030】

用語「アペリン」は、77残基のプレタンパク質（NCBI参照配列：NP_0059109.3、NCBI参照配列：NM_017413.3によってコードされる）を指し、これがプロセッシングを受けて、生物学的活性型のアペリンペプチド、たとえば、アペリン-36、アペリン-17、アペリン-16、アペリン-13、アペリン-12になる。「アペリン-36」と呼ばれる全長成熟ペプチドは、36アミノ酸を含むが、最も強力なアイソフォームは、「Pyr-1-アペリン-13またはPyr¹-アペリン-13」と呼ばれる、ピログルタミン酸化型のアペリン13量体（アペリン-13）である。種々のアペリン型は、たとえば、米国特許第6,492,324B1号明細書に記載されている。

40

【0031】

用語「APJアゴニストペプチド」または「アペリンペプチド」は、互換的に使用され、分解を最小化し、血清安定性を高め、ならびにより良い発展性プロフィールを提供するために改変されている、上で規定したとおりの「アペリン」を含む。ある特定の実施形態では、「APJアゴニストペプチド」または「アペリンペプチド」は、式(I)のペプチドを含む。

【0032】

本明細書で使用する時、用語「ペプチド」または「ポリペプチド」は、互いに連結した2個以上のアミノ酸を指すのに、互換的に使用する。当業界で受け入れられている3文字または1文字略語を使用して、本発明のペプチドおよびポリペプチドを構成するアミノ

50

酸残基を表す。「D」が前に付く場合を除き、アミノ酸は、L - アミノ酸である。1文字略語が大文字であるとき、略語は、L - アミノ酸を指す。1文字略語が小文字であるとき、略語は、D - アミノ酸を指す。集まりまたは連なりまたはアミノ酸略語を使用して、ペプチドを表す。ペプチドは、N末端を左側にして示し、配列は、N末端からC末端に向かって記す。

【0033】

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

【0034】

ある特定の非天然アミノ酸は、Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003、Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003、Wang et al., Science 292:498-500, 2001、Zhang et al., Science 303:371-373, 2004、または米国特許第7,083,970号に記載の技術によって導入することができる。簡潔に述べると、こうした発現系の一部には、部位特異的突然変異誘発が関与して、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームに、アンバーTAGなどのナンセンスコドンが導入される。次いで、このような発現ベクターは、導入されたナンセンスコドンに特異的なtRNAを利用することのできる宿主に導入され、選択された非天然アミノ酸を積み込んでいる。

【0035】

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

【0036】

本明細書で使用する用語「アミノ酸」とは、その構造でそうした立体異性体型が可能である場合、すべて、そのDおよびL立体異性体の、自然に存在するアミノ酸、天然でないアミノ酸、アミノ酸類似体、および、自然に存在するアミノ酸と同様にして機能するアミノ酸模倣物を指す。アミノ酸は、本明細書では、その名称、一般に知られているその3文字記号、またはIUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号のいずれかで呼ぶ。

【0037】

用語「自然に存在する」とは、自然界で見出され、人の手で操作されていない材料を指す。同様に、「自然に存在しない」や「天然でない」などは、本明細書で使用するときに、自然界で見出されない、または人の手で構造が改変されもしくは合成されている材料を指す。アミノ酸に関連して使用するときに、用語「自然に存在する」とは、20種の通常のアミノ酸（すなわち、アラニン（AまたはAla）、システイン（CまたはCys）、アスパラギン酸（DまたはAsp）、グルタミン酸（EまたはGlu）、フェニルアラニン（FまたはPhe）、グリシン（GまたはGly）、ヒスチジン（HまたはHis）、イソロイシン（IまたはIle）、リシン（KまたはLys）、ロイシン（LまたはLeu）

、メチオニン（MまたはMet）、アスパラギン（NまたはAsn）、プロリン（PまたはPro）、グルタミン（QまたはGln）、アルギニン（RまたはArg）、セリン（SまたはSer）、トレオニン（TまたはThr）、バリン（VまたはVal）、トリプトファン（WまたはTrp）、およびチロシン（YまたはTyr）を指す。

【0038】

本明細書で使用する用語「非天然アミノ酸」および「天然でないアミノ酸」は、同じであろうと異なっていようと、任意の生物中で、任意の生物からの未改変または改変遺伝子を使用して、生合成によって生成することのできないアミノ酸構造を、互換的に表すものである。これら用語は、自然に存在する（野生型）アペリンタンパク質配列または本発明の配列中に存在しないアミノ酸残基を指す。これらの用語は、限定はしないが、20種の自然に存在するアミノ酸の1つ、セレノシステイン、ピロリシン（Pyl）、またはピロリン-カルボキシ-リシン（Pcl、たとえば、PCT特許公開WO2010/48582に記載のとおり）でない、改変アミノ酸および/またはアミノ酸類似体を包含する。このような非天然アミノ酸残基は、自然に存在するアミノ酸の置換によって、および/または自然に存在する（野生型）アペリンタンパク質配列もしくは本発明の配列への非天然アミノ酸の挿入によって導入することができる。非天然アミノ酸残基は、アペリン分子に所望の機能性、たとえば、機能性部分（たとえば、PEG）を連結する能力が付与されるように組み込むこともできる。アミノ酸に関連して使用するとき、記号「U」は、本明細書で使用される「非天然アミノ酸」および「天然でないアミノ酸」を意味するものとする。

10

20

【0039】

加えて、このような「天然でないアミノ酸」をタンパク質に組み込むのに、改変tRNAおよび改変tRNAシンセターゼ（RS）が必要であることも理解される。こうした「選択された」tRNA/RS直交対は、Schultzらが開発した選定方法によって、またはランダムもしくは標的突然変異によって生み出される。例として、ピロリン-カルボキシ-リシンは、ある生物から宿主細胞に移された遺伝子によって生合成で生成され、また天然のtRNAおよびtRNAシンセターゼ遺伝子を使用してタンパク質に組み込まれるので、「天然アミノ酸」であるが、p-アミノフェニルアラニン（Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9を参照されたい）は、生合成で生成されるとはいえ、「選択された」tRNA/tRNAシンセターゼ直交対によってタンパク質に組み込まれるので、「天然でないアミノ酸」である。

30

【0040】

改変コードアミノ酸としては、限定はしないが、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、O-ホスホセリン、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、beta-アラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘブタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、第三級-ブチルグリシン、2,4-ジアミノイソ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロプリオン酸、N-エチルグリシン、N-メチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン、ヒドロキシリシン、allo-ヒドロキシリシン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、allo-イソロイシン、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルペンチルグリシン、N-メチルバリン、ナフトアラニン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、ペンチルグリシン、ピペコリン酸およびチオプロリンが挙げられる。用語「アミノ酸」は、ある特定の生物における代謝産物であるが、タンパク質への組み込みについては遺伝暗号によってコードされていない、自然に存在するアミノ酸も包含する。このようなアミノ酸として、限定はしないが、オルニチン、D-オルニチン、およびD-アルギニンが挙げられる。

40

【0041】

本明細書で使用する用語「アミノ酸類似体」とは、自然に存在するアミノ酸と同じ基礎

50

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

【0042】

本明細書で使用する時、用語「アミド」とは、C 末端におけるカルボン酸基のアミド誘導体（たとえば、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NH-C_{1-6}$ アルキル、 $-C(O)NH-C_{1-2}$ アルキルフェニル、 $-C(O)NH-NHBn$ 、または $-C(O)N(C_{1-6} \text{ アルキル})_2$ ）を指す。

【0043】

用語「アミド」とは、N 末端におけるアミノ基の誘導体（たとえば、脂肪酸のカルボン酸官能基はアペリンペプチドの N 末端におけるアミノ官能基とアミド結合を形成する）も指す。

【0044】

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

【0045】

用語「コンジュゲート」と「バイオコンジュゲート」は、互換的に使用され、APJ アゴニストポリペプチドまたは式 I のポリペプチドと脂肪酸部分とが、任意選択のポリエチレングリコール (PEG) リンカーを介して共有結合によって付着した結果として生成したエンティティを指すものである。

【0046】

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

【0047】

本発明のコンジュゲート：

本発明の種々の実施形態を本明細書に記載する。各実施形態において明記する特色を、

10

20

30

40

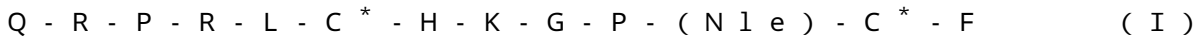
50

明記された他の特色と組み合わせて、別の実施形態としてもよいことは、認識されるであろう。

【 0 0 4 8 】

したがって、実施形態 1 では、本発明は、

a . 以下の式 (I) :



[式中、

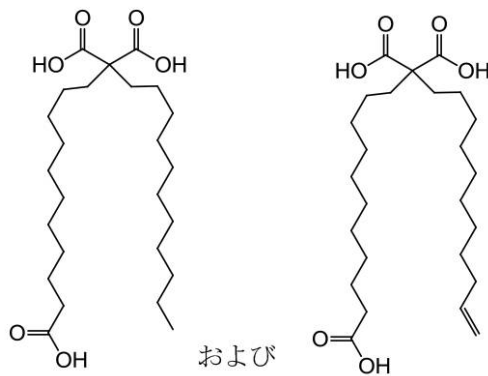
「 * 」で標識された 2 つのシステインアミノ酸は、それらの側鎖のチオール官能基の間にジスルフィド結合を形成している]

を有する A P J アゴニストペプチド、またはそのアミドもしくはエステル、またはそれと実質的に等価なペプチド; と

b . 脂肪酸であって:

【 0 0 4 9 】

【 化 2 】



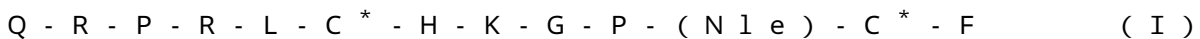
から選択され、そのカルボン酸官能基のうちの 1 つを介して、任意選択的にポリエチレングリコールリンカーを介してペプチドの N 末端に共有結合によって連結している、脂肪酸と

を含む、コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を提供する。

【 0 0 5 0 】

実施形態 1 A では、本発明は、

a . 以下の式 (I) :



[式中、

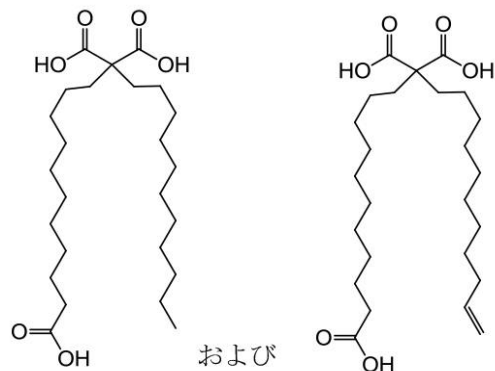
「 * 」で標識された 2 つのシステインアミノ酸は、それらの側鎖のチオール官能基の間にジスルフィド結合を形成している]

を有する A P J アゴニストペプチド; と

b . 脂肪酸であって:

【 0 0 5 1 】

【化 3】



10

から選択され、そのカルボン酸官能基のうちの 1 つを介して、任意選択的にポリエチレングリコールリンカーを介してペプチドの N 末端に共有結合によって連結している、脂肪酸と

を含む、コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩に関する。

【0052】

実施形態 1 または 1 A に記載された脂肪酸は、米国仮特許出願第 62 / 082327 号明細書 (PAT 056274 - US - PSP 2) に記載されている。

20

【0053】

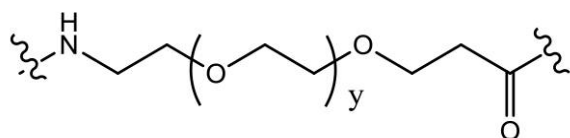
任意のポリレチレングリコールリンカー基は、任意選択である。リンカーは、ポリマーの性質のものであり、2 つの反応性基 / 官能基を含んでおり、一方が式 I のポリペプチドと、他方が脂肪酸部分と反応し得る、ポリレチレングリコール部分である。

【0054】

実施形態 2 では、本発明は、ポリエチレングリコール (PEG) リンカーが存在し、式 (III) :

【0055】

【化 4】



(III)

30

[式中、

40

y は、1 ~ 30 であり、PEG リンカーのカルボニル官能基は、式 (I) のペプチドの N 末端におけるアミノ官能基とアミド結合を形成し、PEG リンカーのアミノ官能基は、脂肪酸のカルボン酸官能基のうちの 1 つとアミド結合を形成している]
のものである、実施形態 1 または 1 A に従うコンジュゲートに関する。

【0056】

実施形態 3 では、本発明は、ポリレチレングリコールリンカーが式 (III) のものであり、y が 2 ~ 25 である、実施形態 1、1 A または 2 に従うコンジュゲートに関する。

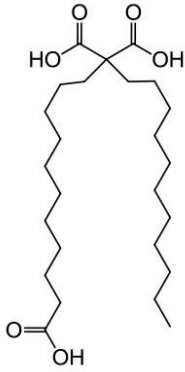
【0057】

実施形態 4 では、本発明は、脂肪酸が :

【0058】

50

【化 5】



10

である、先行する実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲートに関する。

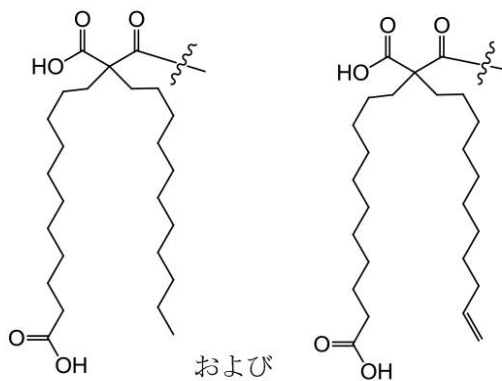
【0059】

実施形態 5 では、本発明は、脂肪酸が、そのジェミナルなカルボン酸官能基のうちの 1 つを介して、PEG リンカーのアミノ官能基に、または PEG リンカーがない場合には、ペプチドの N 末端のアミノ官能基に付着している、先行する実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲートに関する。これは、リンカーまたはペプチドの N 末端への付着点を示す、以下の式：

20

【0060】

【化 6】



30

によって表される。

【0061】

実施形態 6 では、本発明は、脂肪酸が、その末端カルボン酸官能基を介して、PEG リンカーのアミノ官能基に、または PEG リンカーがない場合には、ペプチドのアミノ官能基に付着している、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに従うコンジュゲートに関する。これは、リンカーまたはペプチドの N 末端への付着点を示す、以下の式：

40

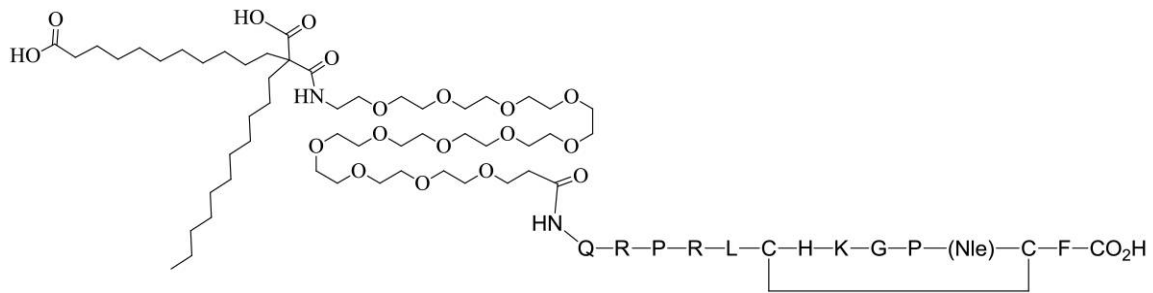
【0062】

The chemical structure shows a protein backbone with a fluorinated peptide tag (C-F-CO₂H) and a dendritic dendron. The dendron is a branched structure composed of repeating units of a dendronized polymer, specifically a dendronized poly(ether amine) or dendronized poly(ether amine) dendron. The dendron is attached to the protein backbone via a linker. The dendron has a central core with multiple branches, each ending in a hydroxyl group (HO-). The dendron is attached to the protein backbone via a linker. The dendron has a central core with multiple branches, each ending in a hydroxyl group (HO-). The dendron is attached to the protein backbone via a linker. The dendron has a central core with multiple branches, each ending in a hydroxyl group (HO-).

[illegible]

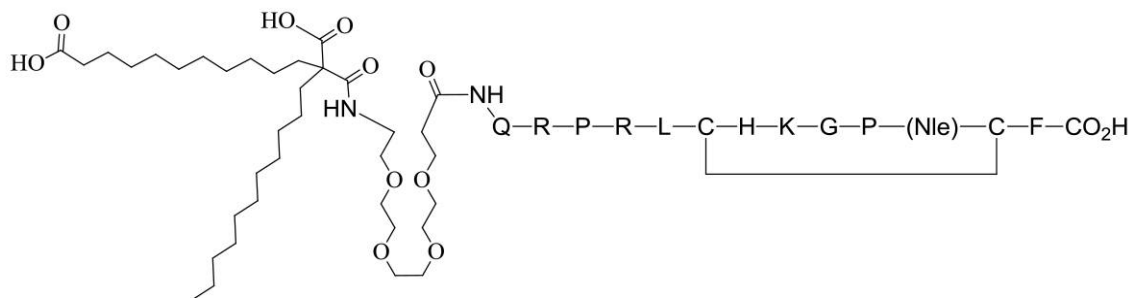
【 0 0 6 5 】

【化 8 - 2】



10

および



20

から選択される、実施形態 1 または 1 A に従うコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩に関する。

【0066】

別段指定しない限り、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、「AP」ペプチドアゴニストなどは、式 (I) のポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくは薬学的に許容される塩を指す。

【0067】

実施形態 7 A では、本発明のコンジュゲートは：1．野生型アペリン、アペリン - 13、pyr - 1 - アペリン - 13 および / または対応する裸の (コンジュゲートされていない) 式 (I) のアペリンペプチドもしくはその類似体に比べて、実質的に等価なまたは改良された活性；ならびに / あるいは 2．野生型アペリン、アペリン - 13、pyr - 1 - アペリン - 13 および / または対応する裸の (コンジュゲートされていない) 式 (I) のアペリンペプチドもしくはその類似体に比べて、実質的に同等または改善された血漿安定性を示す。

30

【0068】

実施形態 7 B では、本発明のコンジュゲートは：1．米国特許出願第 14 / 336, 293 号明細書 (PAT 055781 - US - NP) に記載されているアペリンコンジュゲートに比べておよび / または米国特許出願第 14 / 336, 262 号明細書 (PAT 055418 - US - NP) に記載されているアペリン脂肪酸コンジュゲートに比べて実質的に同等または改良された活性；ならびに / あるいは 2．アペリンコンジュゲートに比べて、より具体的には、米国特許出願第 14 / 336, 293 号明細書 (PAT 055781 - US - NP) および / または米国特許出願第 14 / 336, 262 号明細書 (PAT 055418 - US - NP) に記載されているアペリンコンジュゲートに比べて同等または改善された血漿安定性を示す。

40

【0069】

実施形態 7 A および 7 B の一態様では、血漿安定性の改善は、少なくとも 2 倍である。

【0070】

50

実施形態 7 C では、本発明の脂肪酸コンジュゲートは、血漿安定性が少なくとも 30 分である。別の実施形態では、本発明の脂肪酸コンジュゲートは、血漿安定性が少なくとも 60 分である。別の実施形態では、本発明の脂肪酸コンジュゲートは、血漿安定性が少なくとも 5 時間、好ましくは少なくとも 10 時間、より好ましくは少なくとも 12 時間である。

【0071】

実施形態 7 D では、本発明のアペリン脂肪酸コンジュゲートは、EC₅₀ が 400 nM 未満である。別の実施形態では、本発明のアペリン脂肪酸コンジュゲートは、EC₅₀ が 300 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 160 nM 未満である。さらに別の実施形態では、本発明のアペリン脂肪酸コンジュゲートは、EC₅₀ が 100 nM 未満である。

10

【0072】

本発明のアペリン脂肪酸コンジュゲートは、実質的にそれと同等なアペリン脂肪酸コンジュゲートも包含する。本発明のアペリン脂肪酸コンジュゲートは、式 I によるペプチドに対する同一性が少なくとも約 95 % であるアペリンペプチド、またはそのアミド、エステルもしくは塩を含むコンジュゲートも包含する。

【0073】

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

20

【0074】

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

30

【0075】

式 I のアミノ酸配列との同一性が約 80 ~ 99.9 %、好ましくは 90 ~ 99.9 % のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、アペリン - 13 および/または p y r - 1 - アペリン - 13 および/または対応するコンジュゲートされていないペプチドを凌ぐ血漿安定性を有するコンジュゲートは、本発明のコンジュゲートの範疇に入る。

【0076】

生物学的に活性なコンジュゲートは、アペリン - 13 および/または p y r - 1 - アペリン - 13 および/または対応するコンジュゲートされていないペプチドに比べて同様または増強された生物学的特性を有することが理想的であるにもかかわらず、それでもなお、アペリン - 13 および/または p y r - 1 - アペリン - 13 および/または対応するコンジュゲートされていないペプチドに対して活性レベルがいくらか減少した変異型コンジュゲートは、機能的かつ生物学的な変異型であるとみなされ得る。

40

【0077】

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

【0078】

本明細書に記載のポリペプチド、または 1 または複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、もしくは挿入によるその実質的同等物は、上の意味でのアミノ酸配列実質的同等物（複数

50

可)を含んだポリペプチドとして挙げることができる。本明細書に記載のポリペプチド、または1~5、好ましくは1~3、より好ましくは1もしくは2アミノ酸の天然もしくは天然でないアミノ酸での置換によるその実質的同等物は、上の意味でのアミノ酸配列実質的同等物(複数可)を含んだポリペプチドとして挙げることができる。好ましくは、ジサルファー(disulfur)架橋を形成している2つのシステインは置換されていない。さらなる修飾および変更としては、そのようなペプチドを含むコンジュゲートのAPJアゴニスト活性が維持され、血漿安定性がアペリン-13のピログルタミン酸型に比べて改善されおよび/または対応するコンジュゲートされていないペプチドに比べて改善されている限り、D-アミノ酸によるL-アミノ酸の置換、または限定はしないが、リン酸化、カルボキシル化、アルキル化などの他の変異が挙げられ得る。

10

【0079】

式Iのペプチドの調製:

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

20

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

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

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

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

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

30

【0080】

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

【0081】

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

40

50

【0082】

上述の保護されたアミノ酸の縮合には、HATU、HCTU、またはたとえばカルボジイミドなどの、ペプチド合成用の様々な活性化試薬を使用することができる。カルボジイミドとしては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、およびN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドが挙げられる。このような試薬を用いた活性化には、ラセミ化防止添加剤、たとえば、HOBTまたはOxyma Pureを使用することができる。保護されたアミノ酸は、活性化試薬およびラセミ化防止剤と共に、樹脂にそのまま加えてもよいし、または対称酸無水物、HOBTエステル、またはHOBTエステルとして予め活性化し、次いで樹脂に加えてもよい。保護されたアミノ酸の活性化または樹脂との縮合のための溶媒は、ペプチド縮合反応に有用であることがわ

10

20

【0083】

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

【0084】

出発材料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、Z、Boc、第三級アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、CI-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、またはFmocが挙げられる。使用することのできるカルボキシ保護基としては、限定はしないが、上述のC₁ ~ C₆アルキル、C₃ ~ C₈シクロアルキル、およびC₆ ~ C₁₀アリール-C₁ ~ C₂アルキル、ならびに2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド、第三級ブトキシカルボニルヒドラジド、およびトリチルヒドラジドが挙げられる。

30

【0085】

セリンおよびトレオニンのヒドロキシ基は、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。前記エステル化に適した基としては、炭素から導かれる基、たとえば、低級アルカノイル基、たとえばアセチルなど、アロイル基、たとえばベンゾイルなど、ベンジルオキシカルボニル、およびエトキシカルボニルが挙げられる。前記エーテル化に適した基としては、ベンジル、テトラヒドロピラニル、および第三級ブチルが挙げられる。チロシンのフェノール性ヒドロキシ基の保護基としては、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、および第三級ブチルが挙げられる。

40

【0086】

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

【0087】

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

50

スホルアミドが挙げられる。

【0088】

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

10

【0089】

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

【0090】

アミド型のポリペプチドを得る別の方法は、C末端アミノ酸の α -カルボキシル基を最初にアミド化するステップと、次いでペプチド鎖を所望の鎖長までN側に伸長し、次いで、C末端ペプチドの α -アミノ基、および目的ポリペプチドの残部を形成することになるアミノ酸またはペプチドの α -カルボキシ基を選択的に脱保護するステップと、 α -アミノ基および側鎖官能基が上述の適切な保護基で保護されている2つの断片を、上で挙げたものなどの混合溶媒中で縮合させるステップとを含む。この縮合反応のパラメータは、上述したのと同じものでよい。縮合によって得られた保護ペプチドから、上述の方法によってすべての保護基を除去して、その結果、所望の粗製ペプチドが得られる。この粗製ペプチドを、既知の精製手順によって精製し、主画分を凍結乾燥して、目的のアミド化ポリペプチドを得ることができる。ポリペプチドのエステルを得るには、C末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコールと縮合させて、アミノ酸エステルの得、次いで、アミド生成について上述した手順に従う。

20

30

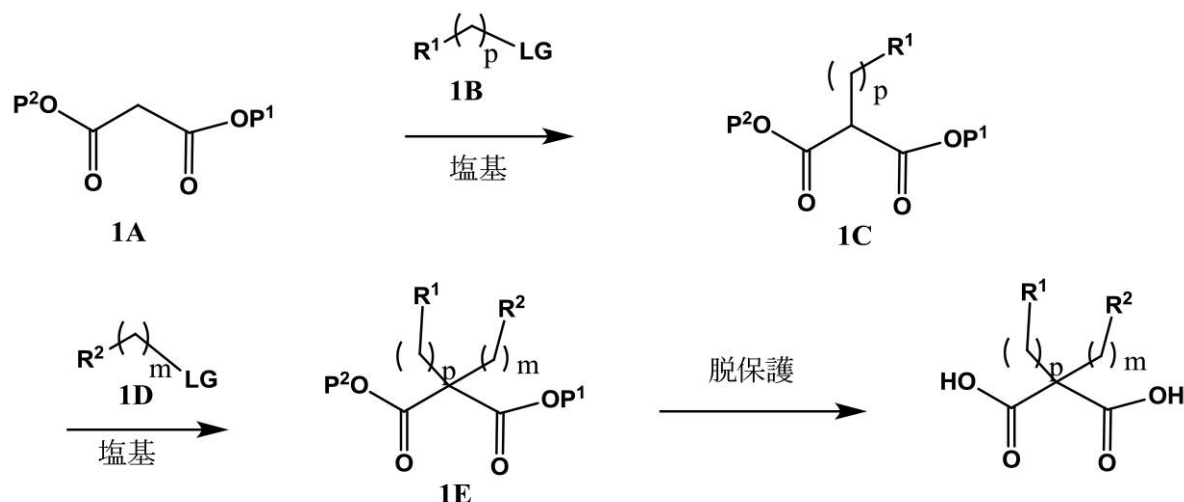
【0091】

脂肪酸部分の合成

スキーム1は、実施形態1に従う脂肪酸部分の合成を記載する。

【0092】

【化 9】



10

スキーム 1

20

式中、実施形態 1 に記載するとおり、 P^1 および P^2 は、カルボン酸保護基、たとえば、メチル、エチル、tert-ブチル、メトキシベンジル、ベンジル、ベンジルオキシ、メトキシメチル、メチルチオメチル、テトラヒドロピラニル、フェナシル、N-フタルイミド、シンナミル、トリフェニルメチル、9-アンスリルメチル、ピペロニル、トリメチルシリル、t-ブチルジメチルシリルまたは 2-アルキル 1,3-オキサゾリンであり；LG は、脱離基、たとえば、ハロ（たとえば、Br、Cl、I）またはトリフルオロメタンスルホニルオキシであり、 R^1 が CH_3 であり、かつ p が 10 であるか、または R^1 が $CH=CH_2$ であり、かつ p が 9 であり、m は、10 であり、 R^2 は、 CO_2H である。

【0093】

塩基（たとえば、水素化ナトリウム、炭酸カリウムまたは炭酸セシウム、水酸化ナトリウム、リチウムジイソプロピルアミド、ナトリウムビス（トリメチルシリル）アミド、カリウムビス（トリメチルシリル）アミド、リチウムテトラメチルピペリジド、1,8-ジアザシクロウンデカ-7-エン、N,N-ジイソプロピルエチルアミンまたは 2,6-ジtert-ブチルプトリジン（2,6-di-*t*-butylputridine））の存在下における、DMF、THF またはジメチルアセトアミドのような溶媒中での、保護されたマロン酸（1A）のアルキル化剤（1B）によるアルキル化は、保護された二酸部分（1C）を生成する。

30

【0094】

保護された二酸部分（1C）は、ジアルキル化された保護された生成物（1E）を得るために、上で記載したとおりの塩基性条件下でのアルキル化剤（1D）による第 2 のアルキル化を受ける。実施形態 1 に従う脂肪酸は、適切な脱保護方法を使用する脱保護によって得られる。中間体（1E）の加水分解には、限定はしないが、NaOH、KOH もしくは LiOH から選択される塩基、または限定はしないが、TFA、HCl もしくは BCl₃ から選択される酸を使用する標準方法を適用することができる。 P^1 または P^2 がベンジルまたはメトキシベンジルであるとき、好ましい脱保護の方法は、限定はしないが、パラジウム炭素などの触媒の存在下での水素化である。

40

【0095】

2つのアルキル化ステップの順番は、逆転してよい。加えて、 CO_2H である R^2 によって、アルキル化ステップの前にこの官能基の保護が必要である可能性がある。カルボン酸のための保護基は、当業界で既知である（たとえば、ベンジル基）。

【0096】

50

脂肪酸合成のさらなる具体例は、以下の実験の部および仮特許出願第 6 2 / 0 8 2 3 2 7 号明細書 (P A T 0 5 6 2 7 4 - U S - P S P 2) に記載されている。

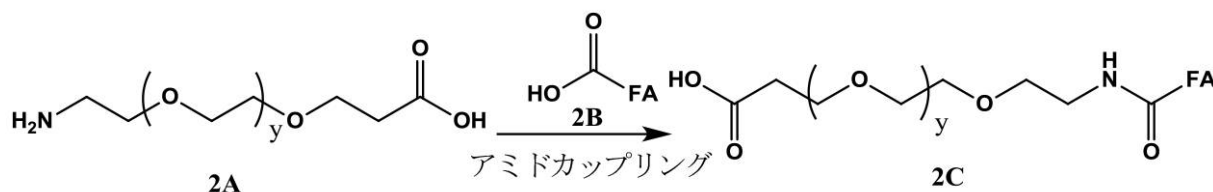
【 0 0 9 7 】

脂肪酸 (F A) - P E G リンカー構築物の合成 :

スキーム 2 は、末端 C O₂ H 官能基を有する脂肪酸 - P E G リンカー構築物の合成を記載する。

【 0 0 9 8 】

【 化 1 0 】

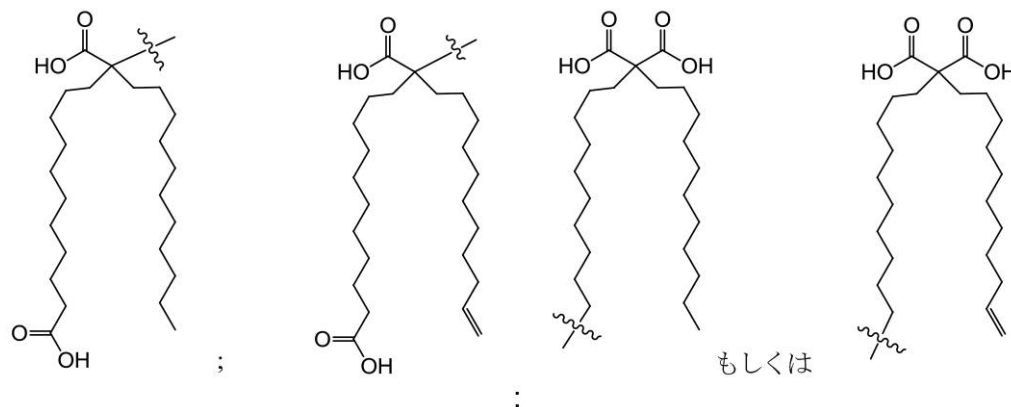


スキーム 2

式中、F A は、式 :

【 0 0 9 9 】

【 化 1 1 】



の脂肪酸またはその保護された形態であり、y は、1 ~ 3 0 である。カルボン酸のための保護基は、上でスキーム 1 に記載した。

【 0 1 0 0 】

限定はしないが、ジクロロヘキシルカルボジイミド (D C C)、ジイソピロピルカルボジイミド (D I C)、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (E D C H C l)、ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス - ピロリジノ - ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (P y B O P)、またはベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス - (ジメチルアミノ) - ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (B O P) が挙げられ得るペプチド縮合試薬を使用して、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、1 - ヒドロキシ - 7 - アザベンゾトリアゾールまたはジメチルアミノピリジンなどの試薬の存在下または不存在下で、脂肪酸 (2 B) を P E G 含有リンカー (2 A) に付着させることができる。好ましくは、(2 B) の酸官能基を、P E G リンカー (2 A) のアミノ官能基と反応させる前に、N H S 化学を使用してその活性型に変換する。

【 0 1 0 1 】

脂肪酸および P E G リンカーの両方における追加のカルボキシル官能基の存在下では、反応部位を制御するために、カップリング反応の前に保護基を導入することができる。カルボン酸のための保護基を上記スキーム 1 中に記載する。代わりに、カルボン酸の選択的

活性化は、N H S 化学を使用して達成できる。

【 0 1 0 2 】

脂肪酸 - P E G 構築物合成のさらなる具体例は、以下の実験の部および仮特許出願第 6 2 / 0 8 2 3 2 7 号明細書 (P A T 0 5 6 2 7 4 - U S - P S P 2) に記載されている。

【 0 1 0 3 】

コンジュゲートの調製

スキーム 3 は、脂肪酸または脂肪酸 - P E G 構築物の式 I のアペリンペプチドの N 末端におけるアミノ官能基へのコンジュゲーションを記載する：

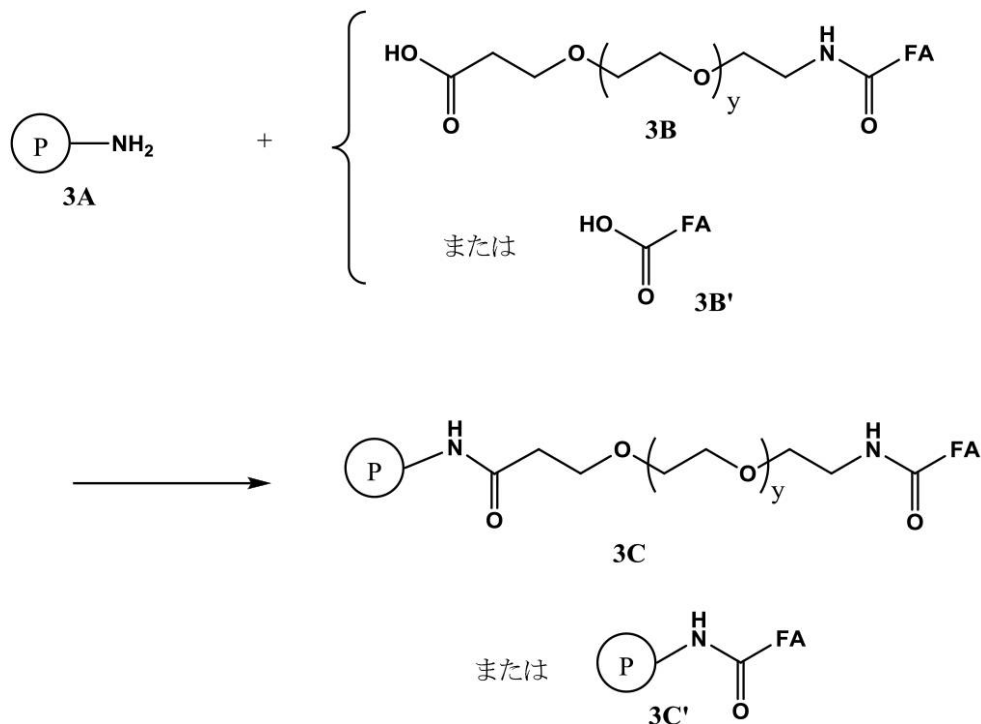
【 0 1 0 4 】

カップリング条件を使用する直接的付着によるコンジュゲーション

10

【 0 1 0 5 】

【 化 1 2 】



20

30

スキーム 3

式中、P は、式 I のアペリンペプチドであり、脂肪酸または脂肪酸 - P E G 構築物が、生体分子の N 末端に付着しており、F A は、上記スキーム 2 に定義されるとおりである。

【 0 1 0 6 】

脂肪酸 - リンカー構築物 (3 B) または脂肪酸 (3 B ') を、標準的なアミドカップリング方法を使用して、そのカルボン酸反応性基を介してペプチド (3 A) のアミノ残基 (N 末端のアミノ官能基) に付着させる。既知のカップリング方法を上記スキーム 2 に詳細に記載する。好ましくは、脂肪酸 (3 B ') または脂肪酸 - P E G 構築物 (3 B) の酸官能基を、N H S 化学を使用して活性化する。

40

【 0 1 0 7 】

より詳細な実験条件は、以下の実験の部および米国仮特許出願第 6 2 / 0 8 2 3 2 7 号 (P A T 0 5 6 2 7 4 - U S - P S P 2) に記載されている。

【 0 1 0 8 】

医薬組成物

本発明のコンジュゲートは、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、吸入、鼻腔内、経口などを始めとする様々な手段のいずれかにおいて投与することができる。本発明の特に好ましい

50

実施形態では、本発明のコンジュゲート、またはそのアミド、エステル、もしくは塩の連続的な静脈内投与を使用する。本発明の別の好ましい実施形態は、本発明のコンジュゲート、またはそのアミド、エステルもしくは塩の皮下投与を使用する。

【0109】

本発明におけるコンジュゲートは、ボラスとして、または一定期間にわたる連続注入として投与することができる。移植可能なポンプを使用してもよい。本発明のある特定の実施形態では、断続的または連続的なコンジュゲート投与を、1日～数日間（たとえば、2～3日間以上）またはより長期間、たとえば、数週間、数か月、もしくは数年間継続する。一部の実施形態では、断続的または連続的なコンジュゲート投与を少なくとも約3日間施す。別の実施形態では、断続的または連続的なコンジュゲート投与を少なくとも約1週間施す。他の実施形態では、断続的または連続的なコンジュゲート投与を少なくとも約2週間施す。投与中または複数回の投与の合間に、特定の閾値を上回る平均血漿コンジュゲート濃度を維持することが望ましい場合もある。望ましい濃度は、たとえば、対象の生理的状态、疾患重症度などに基づき決定することができる。そのような望ましい値（複数可）は、標準の臨床試験を実施して割り出すことができる。代わりに、ペプチドおよびそのコンジュゲートは、FcRn機序によって、経口的に送達することができるはずである（Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007、Nat Commun. 3;3:610, 2012、Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262-G270, 2013）。

【0110】

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

【0111】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は皮下投与用である。タンパク質/ポリペプチドの皮下投与に適した処方成分および方法は、当業界で既知である。たとえば、米国特許出願公開第2011/0044977号明細書および米国特許第8,465,739号明細書および米国特許第8,476,239号明細書を参照されたい。典型的に、皮下投与用の医薬組成物は、好適な安定剤（たとえば、メチオニンなどのアミノ酸、および/またはスクロースなどの糖）、緩衝剤および等張化剤を含む。

【0112】

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

【0113】

静脈内の投与については、適切な担体として、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（BASF、ニュージャージー州Parlisspany）、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。すべての場合において、組成物は、滅菌とすべきであり、容易な注射適用性（syringability）が存在する程度に流動的にすべきである。好ましい医薬製剤は、製造および貯蔵の条件下で安定しており、細菌や真菌などの微生物による汚染作用に対抗して保存しなければならない。一般に、妥当な担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でよい。適正な流動度は、たとえば、レシチンなどのコーティング剤の使用、分散液の場合では必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物による作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノー

ル、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって実現することができる。多くの場合、等張化剤、たとえば、糖、マンニトールなどのポリアルコール、アミノ酸、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅らせる薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンを組成物に含めることにより実現できる。

【0114】

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

10

【0115】

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

20

【0116】

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

【0117】

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

30

【0118】

薬学的に許容される酸付加塩、たとえば、酢酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、臭化物／臭化水素酸塩、炭酸水素塩／炭酸塩、硫酸水素塩／硫酸塩、カンファースルホン酸塩、塩化物／塩酸塩、クロルテオフィリン酸塩 (chlortheophyllonate)、クエン酸塩、エタンジスルホン酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、馬尿酸塩、ヨウ化水素酸塩／ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクチオン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチル硫酸塩、ナフトエ酸塩、ナブシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オクタデカン酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩／リン酸水素塩／リン酸二水素塩、ポリガラクトロン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、スルホサリチル酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、およびトリフルオロ酢酸塩は、無機酸および有機酸に対して生成することができる。

40

【0119】

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

50

塩基および有機塩基に対して生成することができる。

【0120】

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

【0121】

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

10

【0122】

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

20

【0123】

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

30

【0124】

本発明の方法：

アペリンファミリーのペプチドは、Gタンパク質共役型APJ受容体の、知られている唯一の天然リガンドファミリーである。アペリン遺伝子は、77アミノ酸のポリペプチドをコードし、このポリペプチドがプロセッシングを受けて、生物学的活性型のアペリンペプチド、たとえば、アペリン-36、アペリン-17、アペリン-16、アペリン-13、アペリン-12、およびピログルタミン酸修飾型のアペリン-13(Py¹-アペリン-13)になる。これらアペリンペプチドのいずれでも1種が、APJ受容体に結合すると、GiおよびGqタンパク質を介してシグナルを伝達する。心筋細胞では、GiまたはGqとの共役によって、細胞内pHが変化し、PLCが活性化され、IP3が産生され、それにより筋フィラメントのカルシウム感受性が増強され、最終的に心収縮性が増大する。Gi共役により、活性化型Gs、アデニリルシクラーゼ、およびcAMPの産生が抑制され、pAktレベルが上昇して、心臓保護につながる。血管内皮細胞では、Giを介したAPJ活性化、pAktによって、一酸化窒素(NO)産生が増大し、これにより平滑筋弛緩が増進される結果、全体として血管が拡張する。

40

【0125】

50

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

【0126】

実際に、ヒトにおける急性アペリン治療（5分）の結果、冠血管は拡張し、心拍出量は改善される。しかし、天然のアペリンは、*in vivo*での $t_{1/2}$ （数秒）および作用持続時間（数分）が非常に短い。本発明の強力な合成コンジュゲートA P Jアゴニストは、それぞれ天然のアペリンに比べておよび／または先に記載された合成アペリンペプチドに比べておよび／または米国特許第8,673,848号明細書（代理人整理番号P A T 0 5 4 9 6 1 - U S - N P）および米国特許出願第14/336,293号明細書（P A T 0 5 5 7 8 1 - U S - N P）に記載されたものなどの合成アペリン脂肪酸コンジュゲートに比べて、半減期が長い。

【0127】

心筋細胞におけるA P J受容体の活性化により、a) G i / G q、P L C、およびC a²⁺を介した心収縮性が向上し、b) G i、p A k t活性化を介した心臓保護が講じられるが、（他のイノトロープで見られるような）c A M Pの漸増は伴わない。加えて、内皮細胞におけるA P Jアゴニズムによって、動脈の血管は拡張され、これが、左心室の仕事量を軽減することにより、さらに心不全のためになる。まとめると、本発明のコンジュゲートは、全体としての心機能を向上させ、催不整脈を減少させ、生存利益をもたらし得る。

【0128】

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

【0129】

遊離形態または薬学的に許容される塩の形態の式Iのポリペプチドを含むコンジュゲートは、価値のある薬理学的特性、たとえば、次の部において提供されるとおりの*in vitro*および*in vivo*の試験において示され、したがって治療に適応されるものなどのA P J受容体拮抗特性を示す。

【0130】

本発明のコンジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩は、急性代償不全心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含める）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含める）、および子癇前症から選択される適応症の治療において有用となり得る。

【0131】

したがって、別の実施形態として、本発明は、A P J受容体活性と関連する疾患を治療するための、本明細書に記載のとおりコンジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩の使用を提供する。別の実施形態では、療法は、A P J受容体のアゴニズムに反応を示す疾患から選択される。別の実施形態では、疾患は、前述の一覧から選択され、急性代償不

10

20

30

40

50

全心不全が適切である。この実施形態のさらに別のサブセットにおいて、本発明は、A P J 受容体活性と関連する疾患を治療するための医薬の製造における、本明細書に記載のとおりのコジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩の使用を提供する。

【0132】

したがって、別の実施形態として、本発明は、コジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩の、療法における使用を提供する。別の実施形態では、療法は、A P J 受容体の活性化（アゴニズム）によって治療することのできる疾患から選択される。

【0133】

別の実施形態では、本発明は、治療上許容される量の実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つに従うコジュゲートのまたはその薬学的に許容される塩の投与を含む、A P J 受容体のアゴニズムに反応を示す疾患を治療する方法を提供する。さらなる実施形態では、疾患は、前述の一覧から選択され、急性代償不全心不全が適切である。

10

【0134】

この実施形態のさらに別のサブセットでは、本発明は、治療上許容される量の実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つに従うコジュゲートまたはその薬学的に許容される塩の投与を含む、A P J 受容体活性と関連する疾患を治療する方法を提供する。

【0135】

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

20

【0136】

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

30

【0137】

本発明のコジュゲートの「治療有効量」という用語は、対象の生物学的または医学的反応、たとえば、症状の改善、状態の緩和、疾患進行の緩慢化もしくは遅延、または疾患の予防などを惹起する、本発明のコジュゲートの量を指す。非限定的な一実施形態では、用語「治療有効量」は、対象に投与されたとき、(1) (i) A P J 受容体の活性化によって改善させ、(ii) A P J 受容体の活性と関連し、または (iii) A P J 受容体の異常な活性を特徴とする、状態、障害、もしくは疾患、またはその症状を少なくとも部分的に緩和し、抑制し、予防し、かつ/または改善させ、または (2) A P J 受容体を活性化するのに有効である、本発明のバイオコジュゲートの量を指す。

40

【0138】

非限定的な別の実施形態では、用語「治療有効量」とは、細胞、組織、細胞でない生物材料、または培地に投与したとき、A P J 受容体を少なくとも部分的に活性化するのに有効である、本発明のバイオコジュゲートの量を指す。当業者の認めるところとなり、特定の薬剤の、有効である絶対量は、所望の生物学的終点、送達する薬剤、ターゲット組織などの要因に応じて様々となり得る。当業者には、「治療有効量」を、単一用量として投与してもよいし、または複数回の用量の投与によって實現してもよいことは理解さ

50

れる。たとえば、心不全治療のための薬剤の場合、有効量は、患者の臨床的改善、たとえば、運動耐性／能力の向上、血圧の上昇、体液停留の減少、および／または心臓機能性、たとえば、駆出率、運動能力（消耗までの時間）などの定量試験に関する結果の改善をもたらすのに十分な量でよい。

【0139】

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

【0140】

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

【0141】

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

【0142】

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

【0143】

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

【0144】

本明細書で使用する時、本発明の文脈で（特に特許請求の範囲の文脈で）使用する用語「a」、「an」、「the」、および同様の用語は、本明細書で別段指摘しない限り、また文脈と明らかに矛盾しない限り、単数と複数の両方を包含すると解釈される。

【0145】

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

【0146】

本発明によるコンジュゲートの活性は、以下に記載する次の *in vitro* 法によって評価することができる。

【0147】

hAPJカルシウムフラックスアッセイ：

384ウェルフォーマットにおいて、25 μ l 成長培地に、Chem-5 APJ 安定細胞（Millipore # HTS068C）を10,000細胞／ウェルで播き、次い

10

20

30

40

50

で、37 の組織培養インキュベーターにおいて24時間成長させた。アッセイの1時間前に、2.5 mMのプロベネシドを含有する25 μ l / ウェルのFLIPR Calcium 4色素 (Molecular Devices R8142) を加え、37 の組織培養インキュベーターにおいて細胞を1時間インキュベートした。バイオコンジュゲートをHBSS、HEPES、および0.1% BSA緩衝液に可溶化し、三通りに50 μ Mから5 pMまで10倍ずつ連続希釈した。FLIPR Tetraを使用して、色素を有する細胞にバイオコンジュゲートを加えた(1:5、10 μ M ~ 1 pMの範囲の最終バイオコンジュゲート濃度にする)。細胞の内側のFLIPR色素は、カルシウムに結合後に蛍光を発光し、細胞の外側からの蛍光は遮蔽された。FLIPR Tetraにおいて470 ~ 495の励起波長および515 ~ 575の発光波長を使用して、蛍光を測定した。読取りは、バイオコンジュゲートを加える10秒前に開始して、合計3分間行った。最大 - 最小値を算出し、各バイオコンジュゲート濃度に対してプロットし、Graph Pad prismソフトウェアを使用して、バイオコンジュゲートによるカルシウムフラックス刺激について、曲線変曲点におけるEC₅₀値を算出した。

10

【0148】

血漿安定性アッセイ：

材料：

作業溶液：1 mg / mLの試験物をMilli-Q水中に調製する。

抽出溶液：0.1%のギ酸および400 ng / mLのグリブリドを含有するメタノール：

アセトニトリル：水(1:1:1)

20

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

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

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

30

【0149】

サンプル調製手順：(ペプチド)

試験物は、次の生物学的材料、すなわち、ヘパリン処置ラット血漿、ヘパリン処置ラット全血、または肺ホモジネートのうちの1つにおいて調製した。血漿および全血サンプルは、995 μ Lのラット血漿または全血に1 mg / mLの作業溶液5 μ Lを加えることにより、5000 ng / mLで調製した。肺ホモジネートサンプルは、肺ホモジネートをリン酸緩衝溶液(PBS)で1 mg / mLのタンパク質濃度に希釈した後、5 μ Lの作業溶液を加えて、995 μ Lの希釈された肺ホモジネートとすることにより調製した。サンプルは、水浴インキュベーターにおいて、穏やかに振盪(65 ~ 75 rpm)しながら37 でインキュベートした。0分、5分、15分、30分、60分、120分、および240分の時点で、インキュベートサンプルの25 μ Lのアリコート(96ウェルプレート)に移し、150 μ Lの抽出溶液を使用して、直ちにタンパク質を沈殿させた。インキュベート実験が完了した後、サンプルプレートを4 にて4000 rpmで10分間遠心分離した。その後、ピペット操作装置(Tecan Temo)を使用して、上清を別のプレートに移し、すべてのサンプルに50 μ Lの水を加えた。プレートは、LC-MS分析の前にボルテックスした。

40

【0150】

サンプル調製手順(コンジュゲート)

1 mg / mLの作業溶液5 μ Lをラット血漿495 μ Lに加えることにより、試験物を50,000 ng / mLで調製した。サンプルは、水浴インキュベーターにおいて、穏や

50

かに振盪（65～75rpm）しながら37℃でインキュベートした。0時間、0.5時間、1時間、2時間、4時間、6時間、および24時間の時点で、インキュベートサンプルの50μLのアリコートを経路プレートに移し、40mMのTCEP（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン）100μLを各サンプルに加えた。反応混合物を37℃で1時間インキュベートした。反応が完了した後、300μLのアセトニトリルを使用して、タンパク質を沈殿させた。サンプルプレートを4℃にて4000rpmで10分間遠心分離した。その後、ピペット操作装置（Tecan Eمو）を使用して、125μLの上清を別のプレートに移し、すべてのサンプルに50μLの水を加えた。プレートは、LC-MS分析の前にボルテックスした。

【0151】

LC-MS安定性分析のサンプル

HPLC：オートサンプラーを備えたAgilent 1290 HPLC

カラム：MAC-MOD ACE C18、3μm、30mm×内径2.1mm

移動相A：0.1%のギ酸アセトニトリル溶液

移動相B：0.1%のギ酸水溶液

【0152】

勾配プログラム：

【0153】

【表1】

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

【0154】

質量分析計：Agilent Q-TOF 6530

データ取得モード：100～1000m/zの質量範囲での完全走査

データ取得および分析ソフトウェア：MassHunter

【0155】

データ分析：

安定性アッセイ：安定性半減期（ $t_{1/2}$ ）の値は、各時点におけるピーク面積を、初期（ $t=0$ ）ピーク面積を基準とした残存パーセントに変換することにより求めた。

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

【0156】

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

【0157】

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

【0158】

代替活性ベースの血漿安定性アッセイ：

以下の変更を有する上記カルシウムフラックスプロトコールに従った。ペプチドを、5%ラット血漿（Bioreclamation # RATPLNAHP-M、Naヘパリン処

10

20

30

40

50

理)とも一緒にインキュベートした。読取りを、37 の組織培養インキュベーターにおけるインキュベーション後 t_0 および $t_{24 \text{ 時間}}$ の時点で行った。分で表したペプチド血漿半減期を、以下の:

1) $LN((t_0 \text{ における } EC_{50}) / (t_{24 \text{ 時間}} \text{ における } EC_{50}))$ 、

2) 上記値の勾配を計算する、および

3) $t_{1/2} = 0.693 / (\text{勾配}^2)$

を算出することによって推定した。

【0159】

【表2】

表 1:コンジュゲートの活性および安定性

バイオコンジュゲート	hAPJ Ca^{2+} フラックス EC_{50} [nM]	代替活性ベースの血漿安定性 $t_{1/2}$ [分]
実施例 1	111.2	>1000
実施例 2	84.8	>1000
実施例 3	115.1	>1000
実施例 4	157.9	>1000
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH (コンジュゲートされていない環状ペプチド-国際公開第 WO2013/111110 号パンフレットの実施例 8)	1.0	132
比較例:Pyr-1-アペリン-13	6.6	5.0

10

20

30

【0160】

【表 3】

表 2.血漿安定性アッセイと代替活性ベースの血漿安定性アッセイの間の相間:

コンジュゲート	血漿安定性 $t_{1/2}$ [分]	代替活性ベースの血漿 安定性 $t_{1/2}$ [分]
Pyr-1-アペリン-13	6.6	5.0
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G- P-Nle-C*-F-OH (縮合されていない環状 類似体-国際公開第 WO2013/111110 号パン フレットの実施例 8	163	132

10

20

【0161】

*in vivo*でのSC投薬を介する薬物動態評価のためのプロトコールおよびデータ
処方、投薬およびサンプル取得:

実施例1および実施例4を、30% (w/v) PEG300およびPBS中5% (w/v)
)デキストロースに溶解させ、0.1 mg/mlの濃度とした。溶解した化合物を、皮下
(SC)注射によってC57/B6マウス(約20週齢)側腹部に投薬した(化合物あたり
n=4)。注入量は10 mg/kgであった。投薬後3および6時間ならびに投薬後1
、2、4、7および10日に、伏在静脈から血液サンプルを採血した。直ちに血液サン
プルを4000×gで10分間、遠心分離した。血漿上清(10 μL)を、96ウェルプレ
ートに移し、分析まで-80℃で凍結した。

30

【0162】

国際公開第WO2013/111110号パンフレットの実施例8を、1 mg/ml濃
度で注射用滅菌水(Hospira)に溶解した。C57/B6Jマウス(約22週齢)
に、溶解した化合物をSC注射によって投薬した(n=4)。注射後15、30、60お
よび120分で、尾静脈から血液サンプルを採血した。これらを直ちに遠心分離し、次い
で血漿上清を96ウェルプレートに移し、分析まで-80℃で凍結した。

40

【0163】

生物分析用のサンプルの調製

予め量り分けた各化合物のサンプル(1~3 mg)を得て、1 mg/mlとなるようにD
MSOに溶解した。分析のための標準曲線を作成するために、これらをマウス血漿(Bi
oreclamation)中、10,000、5,000、1,000、500、100、50、10、5および1 ng/mlの最終濃度まで連続的に希釈した。

【0164】

PK研究からの血漿サンプルを融解し、マウス血漿を加えることによって全体積25 μ
Lに希釈した。

【0165】

50

各サンプルおよび標準曲線サンプルの25 μ Lアリコートをし、96ウェルプレートに配置した。内部標準としての100 ng/mLのグリブリン含有するアセトニトリル150 μ Lを各サンプルに加え、サンプルを30秒間ボルテックスした。次いで、サンプルを4000 \times gで10分間、遠心分離した。次いで、125 μ Lの上清を未使用の96ウェルプレートに移した。50 μ Lの水を加え、30秒間ボルテックスにより混合した。

【0166】

LC/MS生物分析(Agilent 1290) :
CTC PALオートサンプラーを使用して、サンプル(10 μ L)をHPLCに移した。LCカラムは、ACE C18 30 \times 2.1 mm、3.0 μ mビーズであった。水中の0.1%ギ酸からなる溶媒Aおよびアセトニトリル中の0.1%ギ酸からなる溶媒Bによる二元溶媒システムを使用した。95%の溶媒A(0~0.5分)中のカラムにサンプルを添加し、5%~50%の溶媒B(0.5~1.8分)および1.8~2.3分にわたる50%~98%の溶媒Bの勾配によって溶出した。2.3から2.9分まで、カラムを98%の溶媒Bに保持し、2.9~3.0分にわたって95%の溶媒Aに戻し、3.0から3.5分まで、95%の溶媒Aでカラムを平衡化した。溶媒の流量は700 μ L/分、カラム温度は50 $^{\circ}$ Cであった。

10

【0167】

結果 : s.c.投薬後の実施例1および4の化合物のマウス血漿への曝露プロフィールを図1に示し ; 半減期を表3に要約する ;

20

【0168】

【表4】

化合物	$t_{1/2}$ [時間]
実施例1	43
実施例4	23
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH (縮合されていない環状類似体-国際公開第 WO2013/111110号パンフレットの実施 例8)	0.52

30

表3

【0169】

本発明のコンジュゲートは、アペリン-13またはpyr-1-アペリン-13と同様のAPJ受容体効力を有することができる。一実施形態では、本発明のバイオコンジュゲートは、 EC_{50} が400 nM未満である。別の実施形態では、本発明のアペリン脂肪酸コンジュゲートは、 EC_{50} が300 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは160 nM未満である。さらに別の実施形態では、本発明のバイオコンジュゲートは、 EC_{50} が100 nM未満である。

40

【0170】

本発明のコンジュゲートは、アペリン-13またはpyr-1-アペリン-13を凌ぐおよび/またはコンジュゲートされていない類似体Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F(またはpE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH)を凌ぐおよび/または先に記載されたアペリン脂肪酸コンジュゲート(米国特許出願第14/336,290号(PAT055781-US-NP)の

50

実施例 20) を凌ぐ血漿安定性を有する。一実施形態では、血漿安定性の改善は少なくとも 2 倍である。別の実施形態では、血漿安定性の改善は少なくとも 10 倍である。一実施形態では、本発明のバイオコンジュゲートは、血漿安定性が少なくとも 30 分または少なくとも 60 分である。別の実施形態では、本発明の脂肪酸コンジュゲートは、血漿安定性が少なくとも 5 時間、好ましくは少なくとも 10 時間、より好ましくは少なくとも 12 時間である。

【0171】

本発明のコンジュゲートは、1 種または複数の他の治療薬と同時に、またはその前もしくは後のいずれかに投与されてよい。本発明のコンジュゲートは、他の薬剤と同じもしくは異なる投与経路によって別個に、または同じ医薬組成物中で一緒に投与されてよい。

10

【0172】

一実施形態では、本発明は、実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つのコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩と、少なくとも 1 種の他の治療薬とを含む、療法において同時に、別個に、または順次使用するための一体型調製物としての製品を提供する。一実施形態では、療法は、APJ 受容体の活性化に反応を示す疾患または状態の治療である。

【0173】

一体型調製物として提供される製品としては、実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つのコンジュゲートもしくはその薬学的に許容される塩と、他の治療薬（複数可）とを同じ医薬組成物中に一緒に、または実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つのコンジュゲートもしくはその薬学的に許容される塩と、他の治療薬（複数可）とを別個の形態で、たとえば、キットの形態で含む組成物が挙げられる。

20

【0174】

一実施形態では、本発明は、実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つのコンジュゲートもしくはその薬学的に許容される塩と、別の治療薬（複数可）とを含む、医薬組成物を提供する。任意選択により、医薬組成物は、上述のとりの薬学的に許容される賦形剤を含んでもよい。

【0175】

一実施形態では、本発明は、2 種以上の別個の医薬組成物を含み、その少なくとも 1 種が、実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つに従うコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を含有する、キットを提供する。一実施形態では、キットは、容器、隔てられたボトル、分包ホイルなどの、前記組成物を別個に保持する手段を含む。このようなキットの一例は、錠剤、カプセル剤などの包装に典型的に使用されるようなプリスターパックである。

30

【0176】

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

【0177】

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

40

【0178】

したがって、本発明は、医薬が別の治療薬との投与用に調製される、APJ 受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための、実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩の使用を提供する。本発明はまた、医薬が、実施形態 1 ~ 7 D のいずれか 1 つに従うコンジュゲートまたはその薬学的

50

に許容される塩とともに投与される、アペリン受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための別の治療薬の使用を提供する。

【0179】

本発明はまた、コンジュゲートが別の治療薬との投与用に調製される、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態の治療方法において使用するための、実施形態1～7Dのいずれか1つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩を提供する。本発明はまた、他の治療薬が、実施形態1～7Dのいずれか1つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩との投与用に調製される、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態の治療方法において使用するための、別の治療薬を提供する。

10

【0180】

本発明はまた、患者が、別の治療薬で（たとえば、24時間以内に）予め治療を受けている、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための、実施形態1～7Dのいずれか1つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩の使用を提供する。本発明はまた、患者が、実施形態1～7Dのいずれか1つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩で（たとえば24時間以内に）予め治療を受けている、APJ受容体のアゴニズムに反応を示す疾患または状態を治療するための、別の治療薬の使用を提供する。

【0181】

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

20

【0182】

第2の薬剤または治療と「組み合わせて」という用語は、本発明のコンジュゲート（実施形態1～7Dのいずれか1つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩、または本明細書に別な形で記載するコンジュゲート）を第2の薬剤または治療と同時投与すること、最初に本発明の化合物を投与した後、第2の薬剤または治療を投与することおよび最初に第2の薬剤または治療を投与した後、本発明のコンジュゲートを投与することを包含する。

30

【0183】

用語「第2の薬剤」は、本明細書に記載の疾患または障害、たとえば、APJ受容体の活性化に反応を示す障害または疾患、たとえば、急性代償不全心不全（ADHF）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、Brugada症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含める）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含める）、および子癇前症の症状を治

40

【0184】

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

【0185】

50

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

【0186】

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

【0187】

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

10

【0188】

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

【0189】

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

20

【0190】

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

30

【0191】

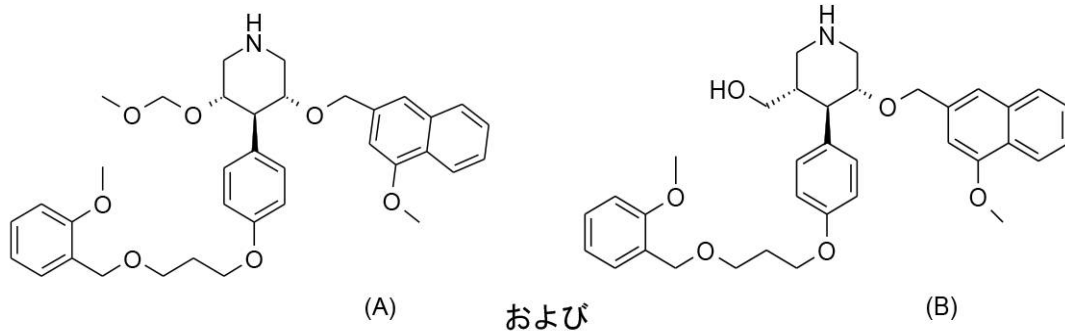
用語「レニン阻害薬」は、ジテキレン (ditekiren) (化学名: [1S - [1R*, 2R*, 4R* (1R*, 2R*)]] - 1 - [(1, 1 - ジメチルエトキシ)カルボニル] - L - プロリル - L - フェニルアラニル - N - [2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1 - (2 - メチルプロピル) - 4 - [[2 - メチル - 1 - [(2 - ピリジニルメチル)アミノ]カルボニル]ブチル]アミノ]カルボニル]ヘキシル] - N - - メチル - L - ヒスチジンアミド); テルラキレン (化学名: [R - (R*, S*)] - N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

40

50

【 0 1 9 2 】

【 化 1 3 】



10

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

【 0 1 9 3 】

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

【 0 1 9 4 】

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

20

30

【 0 1 9 5 】

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

【 0 1 9 6 】

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

【 0 1 9 7 】

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

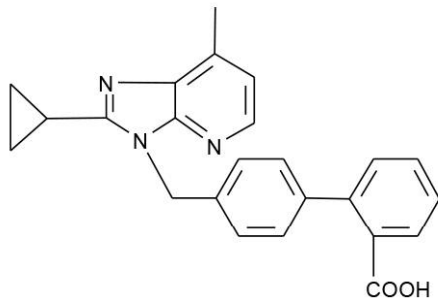
40

【 0 1 9 8 】

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

【 0 1 9 9 】

【化 1 4】

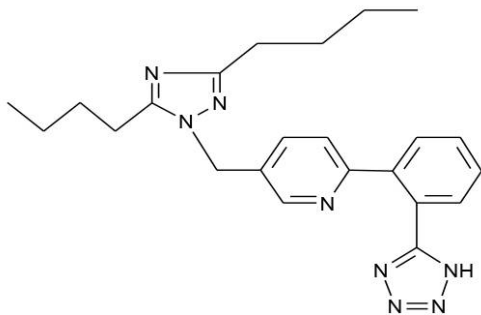


10

の E - 1 4 7 7 という呼称の化合物、次式

【 0 2 0 0】

【化 1 5】

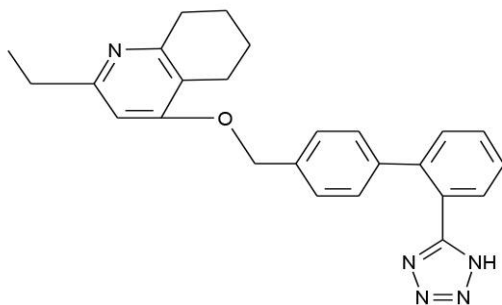


20

の S C - 5 2 4 5 8 という呼称の化合物、および次式

【 0 2 0 1】

【化 1 6】



40

の Z D - 8 7 3 1 という呼称の化合物、または、各場合において、薬学的に許容されるその塩からなる群から選択される化合物を挙げることができる。

【 0 2 0 2】

好ましい A T₁ 受容体拮抗薬は、カンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、テルミサルタン、バルサルタンである。他にも好ましいのは、市販されている薬剤であり、最も好ましいのは、バルサルタンまたは薬学的に許容されるその塩である。

50

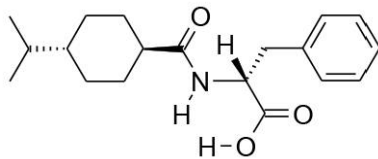
【 0 2 0 3 】

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

10

【 0 2 0 4 】

【 化 1 7 】



20

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

30

【 0 2 0 5 】

本発明のコンジュゲートと組み合わせて使用することのできる第 2 の薬剤の別の例として、DPP - IV 阻害薬、GLP - 1 および GLP - 1 アゴニストが挙げられる。

【 0 2 0 6 】

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

40

【 0 2 0 7 】

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

【 0 2 0 8 】

50

G L P - 1 (グルカゴン様ペプチド 1) は、たとえば、W.E. SchmidtらによるDiabetologia, 28, 1985, 704-707およびUS 5, 705, 483に記載されているインスリン分泌性タンパク質である。

【 0 2 0 9 】

用語「G L P - 1 アゴニスト」は、特にUS 5, 120, 712、US 5, 118666、US 5, 512, 549、WO 91 / 11457、およびC. OrskovらによるJ. Biol. Chem. 264 (1989) 12826において開示されているG L P - 1 (7 - 3 6) N H ₂ の変異体および類似体を包含する。別の例としては、化合物中G L P - 1 (7 - 3 6) N H ₂ 分子の第37位においてA r g ^{3 6} のカルボキシ末端側アミド官能基がG l y で置換されているG L P - 1 (7 - 3 7)、ならびにG L N ⁹ - G L P - 1 (7 - 3 7)、D - G L N ⁹ - G L P - 1 (7 - 3 7)、アセチルL Y S ⁹ - G L P - 1 (7 - 3 7)、L Y S ^{1 8} - G L P - 1 (7 - 3 7)、特にG L P - 1 (7 - 3 7) O H、V A L ⁸ - G L P - 1 (7 - 3 7)、G L Y ⁸ - G L P - 1 (7 - 3 7)、T H R ⁸ - G L P - 1 (7 - 3 7)、M E T ⁸ - G L P - 1 (7 - 3 7)、および4 - イミダゾプロピオニル - G L P - 1 を含めたその変異体および類似体が挙げられる。GreigらによるDiabetologia 1999, 42, 45-50に記載されているG L P アゴニスト類似体エキセンディン - 4 も、特に好まれる。

【 0 2 1 0 】

定義「抗糖尿病薬」には、損なわれたインスリン受容体機能を回復させて、インスリン抵抗性を減らし、その結果としてインスリン感受性を増強するインスリン感受性増強剤も含まれる。例としては、血糖降下性チアゾリジンジオン誘導体（たとえば、グリタゾン、
(S) - ((3 , 4 - ジヒドロ - 2 - (フェニル - メチル) - 2 H - 1 - ベンゾピラン - 6 - イル) メチル - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (エングリタゾン) 、 5 - { [4 - (3 - (5 - メチル - 2 - フェニル - 4 - オキサゾリル) - 1 - オキソプロピル) - フェニル] - メチル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (ダルグリタゾン) 、 5 - { [4 - (1 - メチル - シクロヘキシル) メトキシ) - フェニル] メチル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (シグリタゾン) 、 5 - { [4 - (2 - (1 - インドリル) エトキシ) フェニル] メチル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (D R F 2 1 8 9) 、 5 - { 4 - [2 - (5 - メチル - 2 - フェニル - 4 - オキサゾリル) - エトキシ] ベンジル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (B M - 1 3 . 1 2 4 6) 、 5 - (2 - ナフチルスルホニル) - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (A Y - 3 1 6 3 7) 、 ビス { 4 - [(2 , 4 - ジオキソ - 5 - チアゾリジニル) メチル] フェニル } メタン (Y M 2 6 8) 、 5 - { 4 - [2 - (5 - メチル - 2 - フェニル - 4 - オキサゾリル) - 2 - ヒドロキシエトキシ] ベンジル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (A D - 5 0 7 5) 、 5 - [4 - (1 - フェニル - 1 - シクロプロパンカルボニルアミノ) - ベンジル] - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (D N - 1 0 8) 5 - { [4 - (2 - (2 , 3 - ジヒドロインドール - 1 - イル) エトキシ) フェニル] メチル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン、 5 - [3 - (4 - クロロ - フェニル)] - 2 - プロピニル] - 5 - フェニルスルホニル) チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン、 5 - [3 - (4 - クロロフェニル)] - 2 - プロピニル] - 5 - (4 - フルオロフェニル - スルホニル) チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン、 5 - { [4 - (2 - (メチル - 2 - ピリジニル - アミノ) - エトキシ) フェニル] メチル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (ロシグリタゾン) 、 5 - { [4 - (2 - (5 - エチル - 2 - ピリジニル) エトキシ) フェニル] - メチル } チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (ピオグリタゾン) 、 5 - { [4 - ((3 , 4 - ジヒドロ - 6 - ヒドロキシ - 2 , 5 , 7 , 8 - テトラメチル - 2 H - 1 - ベンゾピラン - 2 - イル) メトキシ) - フェニル] - メチル } - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (トログリタゾン) 、 5 - [6 - (2 - フルオロ - ベンジルオキシ) ナフタレン - 2 - イルメチル] - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (M C C 5 5 5) 、 5 - { [2 - (2 - ナフチル) - ベンゾオキサゾール - 5 - イル] - メチル } チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (T - 1 7 4) および 5 - (2 , 4 - ジオキソチアゾリジン - 5 - イルメチル) - 2 - メトキシ - N - (4 - トリフルオロメチル - ベンジル) ベンズアミド (K R P 2 9 7)) が挙げられる。

【 0 2 1 1 】

これ以外の抗糖尿病薬としては、タンパク質チロシンホスファターゼ（PTPアーゼ）の阻害薬、抗糖尿病性非小分子模倣化合物、グルタミン・フルクトース・6・リン酸アミドトランスフェラーゼ（GFAT）の阻害薬のような、インスリンシグナル伝達経路モジュレーター；グルコース・6・ホスファターゼ（G6Pアーゼ）の阻害薬、フルクトース・1, 6・ビスホスファターゼ（F・1, 6・Bpアーゼ）の阻害薬、グリコーゲンホスホリラーゼ（GP）の阻害薬、グルカゴン受容体拮抗薬、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）の阻害薬のような、肝臓グルコース産生の調節不全に影響を及ぼす化合物；ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ（PDHK）阻害薬；胃内容排出の阻害薬；インスリン；GSK-3の阻害薬；レチノイドX受容体（RXR）アゴニスト； α -3ARのアゴニスト；脱共役タンパク質（UCP）のアゴニスト；非グリタゾン型PPARアゴニスト；PPAR α /PPAR γ 二重アゴニスト；抗糖尿病性含バナジウム化合物；グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）やGLP-1アゴニストのようなインクレチンホルモン；細胞イミダゾリン受容体アンタゴニスト；ミグリトール； α_2 -アドレナリンアンタゴニスト；ならびにこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。

【0212】

一実施形態では、本発明は、治療有効量の実施形態1～7Dのいずれか1つまたは薬学的に許容されるその塩に従うコンジュゲートと、アセプトロール、アテノロール、ベタキソロール、ピソプロロール、メトプロロール、ナドロール、プロプラノロール、ソタロール、チモロールなどの α_1 -アドレナリン受容体遮断薬；AT1遮断薬などのアンジオテンシンII受容体アンタゴニスト；DPP-IV阻害薬（たとえば、ビルダグリプチン）やGLP-1ペプチドアゴニストなどの抗糖尿病薬から選択される1種または複数の治療活性薬剤とを含む組合せ、詳細には医薬合剤を提供する。

【0213】

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

【0214】

アルドステロンシンターゼ阻害薬または薬学的に許容されるその塩は、アルドステロンの産生を抑制する特性を有する活性成分であると理解される。アルドステロンシンターゼ（CYP11B2）は、副腎皮質におけるアルドステロン産生の最後のステップ、すなわち、11-デオキシコルチコステロンのアルドステロンへの変換を触媒する、ミトコンドリアのシトクロムP450酵素である。いわゆるアルドステロンシンターゼ阻害薬によるアルドステロン産生の抑制は、低カリウム血症、高血圧、うっ血性心不全、心房細動、または腎不全の治療に奏効する変異形態であることが知られている。このようなアルドステロンシンターゼ抑制活性は、当業者によって、標準のアッセイ（たとえば、US2007/0049616）に従い、容易に見極められる。

【0215】

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

【0216】

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

【0217】

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

【0218】

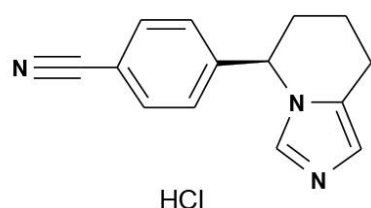
10

20

30

40

【化 18】



10

のファドロゾールの塩酸塩（米国特許 4 6 1 7 3 0 7 および 4 8 8 9 8 6 1 ）の（+）鏡像異性体、または適切な場合、薬学的に許容されるその塩である。

【0219】

前記組合せにおいて有用なアルドステロンシンターゼ阻害薬は、たとえば、US 2 0 0 7 / 0 0 4 9 6 1 6 において、特に、化合物請求項および作業実施例の最終生成物において全般かつ詳細に開示されている化合物および類似体であり、最終生成物、医薬調製物、および特許請求の範囲の主題は、この刊行物を参照することにより、本明細書に援用される。本発明における使用に適する好ましいアルドステロンシンターゼ阻害薬としては、限定はせず、4 - (6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - イル) - 3 - メチルベンゾニトリル ; 5 - (2 - クロロ - 4 - シアノフェニル) - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - カルボン酸 (4 - メトキシベンジル) メチルアミド ; 4 ' - フルオロ - 6 - (6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 5 H - イミダゾ [1 , 5 - a] アゼピン - 5 - イル) ビフェニル - 3 - カルボニトリル ; 5 - (4 - シアノ - 2 - メトキシフェニル) - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - カルボン酸ブチルエステル ; 4 - (6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - イル) - 2 - メトキシベンゾニトリル ; 5 - (2 - クロロ - 4 - シアノフェニル) - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - カルボン酸 4 - フルオロベンジルエステル ; 5 - (4 - シアノ - 2 - トリフルオロメトキシフェニル) - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - カルボン酸メチルエステル ; 5 - (4 - シアノ - 2 - メトキシフェニル) - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - カルボン酸 2 - イソプロポキシエチルエステル ; 4 - (6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - イル) - 2 - メチルベンゾニトリル ; 4 - (6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - イル) - 3 - フルオロベンゾニトリル ; 4 - (6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - イル) - 2 - メトキシベンゾニトリル ; 3 - フルオロ - 4 - (7 - メチレン - 6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - ピロロ [1 , 2 - c] イミダゾール - 5 - イル) ベンゾニトリル ; cis - 3 - フルオロ - 4 - [7 - (4 - フルオロ - ベンジル) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - イミダゾ [1 , 5 - a] ピリジン - 5 - イル] ベンゾニトリル ; 4 ' - フルオロ - 6 - (9 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 5 H - イミダゾ [1 , 5 - a] アゼピン - 5 - イル) ビフェニル - 3 - カルボニトリル ; 4 ' - フルオロ - 6 - (9 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 5 H - イミダゾ [1 , 5 - a] アゼピン - 5 - イル) ビフェニル - 3 - カルボニトリル、または各場合において、その (R) もしくは (S) 鏡像異性体、または適切な場合、薬学的に許容されるその塩が挙げられる。

20

30

40

【0220】

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

50

【 0 2 2 1 】

さらに、アルドステロンシンターゼ阻害薬は、米国特許出願 US 2 0 0 7 / 0 2 2 5 2 3 2、US 2 0 0 7 / 0 2 0 8 0 3 5、US 2 0 0 8 / 0 3 1 8 9 7 8、US 2 0 0 8 / 0 0 7 6 7 9 4、US 2 0 0 9 / 0 0 1 2 0 6 8、US 2 0 0 9 0 0 4 8 2 4 1、および PCT 出願 WO 2 0 0 6 / 0 0 5 7 2 6、WO 2 0 0 6 / 1 2 8 8 5 3、WO 2 0 0 6 1 2 8 8 5 1、WO 2 0 0 6 / 1 2 8 8 5 2、WO 2 0 0 7 0 6 5 9 4 2、WO 2 0 0 7 / 1 1 6 0 9 9、WO 2 0 0 7 / 1 1 6 9 0 8、WO 2 0 0 8 / 1 1 9 7 4 4、および欧州特許出願 EP 1 8 8 6 6 9 5 において開示されている化合物および類似体も包含する。本発明における使用に適する好ましいアルドステロンシンターゼ阻害薬として、限定はせず、Speedel が開発した 8 - (4 - フルオロフェニル) - 5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) - 2 - フルオロベンゾニトリル ; 4 - (5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) - 2 , 6 - ジフルオロベンゾニトリル ; 4 - (5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) - 2 - メトキシベンゾニトリル ; 3 - (5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) ベンゾニトリル ; 4 - (5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) フタロニトリル ; 4 - (8 - (4 - シアノフェニル) - 5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) ベンゾニトリル ; 4 - (5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) ベンゾニトリル ; 4 - (5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン - 8 - イル) ナフタレン - 1 - カルボニトリル ; 8 - [4 - (1 H - テトラゾール - 5 - イル) フェニル 1 - 5 , 6 - ジヒドロ - 8 H - イミダゾ [5 , 1 - c] [1 , 4] オキサジン、または各場合において、その (R) もしくは (S) 鏡像異性体、または適切な場合、薬学的に許容されるその塩が挙げられる。

10

20

【 0 2 2 2 】

前記組合せにおいて有用なアルドステロンシンターゼ阻害薬は、たとえば、WO 2 0 0 9 / 1 5 6 4 6 2 および WO 2 0 1 0 / 1 3 0 7 9 6 において、特に、化合物請求項および作業実施例の最終生成物において全般かつ詳細に開示されている化合物および類似体、最終生成物、医薬調製物、および特許請求の範囲の主題である。本発明における組合せに適する好ましいアルドステロンシンターゼ阻害薬としては、3 - (6 - フルオロ - 3 - メチル - 2 - ピリジン - 3 - イル - 1 H - インドール - 1 - イルメチル) - ベンゾニトリルヒドロクロリド、1 - (4 - メタンスルホニル - ベンジル) - 3 - メチル - 2 - ピリジン - 3 - イル - 1 H - インドール、2 - (5 - ベンジルオキシ - ピリジン - 3 - イル) - 6 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - インドール、5 - (3 - シアノ - 1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ニコチン酸エチルエステル、N - [5 - (6 - クロロ - 3 - シアノ - 1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピリジン - 3 - イルメチル] - エタンスルホンアミド、ピロリジン - 1 - スルホン酸 5 - (6 - クロロ - 3 - シアノ - 1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピリジン - 3 - イルエステル、N - メチル - N - [5 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピリジン - 3 - イルメチル] - メタンスルホンアミド、6 - クロロ - 1 - メチル - 2 - { 5 - [(2 - ピロリジン - 1 - イル - エチルアミノ) - メチル] - ピリジン - 3 - イル } - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル、6 - クロロ - 2 - [5 - (4 - メタンスルホニル - ビペラジン - 1 - イルメチル) - ピリジン - 3 - イル] - 1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル、6 - クロロ - 1 - メチル - 2 - { 5 - [(1 - メチル - ビペリジン - 4 - イルアミノ) - メチル] - ピリジン - 3 - イル } - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル、モルホリン - 4 - カルボン酸 [5 - (6 - クロロ - 3 - シアノ - 1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピリジン - 3 - イルメチル] - アミド、N - [5 - (6 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピリジン - 3 - イルメチル] - エタンスルホンアミド、C , C , C - トリフルオロ - N - [5 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 2 - イル) - ピ

30

40

50

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

【 0 2 2 3 】

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

【 0 2 2 4 】

用語「CETP阻害薬」とは、コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) を媒介とする、種々のコレステリルエステルおよびトリグリセリドのHDLからLDLおよびVLDLへの輸送を抑制する化合物を指す。このようなCETP抑制活性は、当業者によって、標準のアッセイ (たとえば、米国特許第6, 140, 343号) に従い、容易に見極められる。例として、米国特許第6, 140, 343号および米国特許第6, 197, 786号で開示されている化合物 (たとえば、[2 R , 4 S] 4 - [(3 , 5 - ビス - トリフルオロメチル - ベンジル) - メトキシカルボニル - アミノ] - 2 - エチル - 6 - トリフルオロメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - キノリン - 1 - カルボン酸エチルエステル (トルセトラピブ) 、米国特許第6, 723, 752号で開示されている化合物 (たとえば、(2 R) - 3 - { [3 - (4 - クロロ - 3 - エチル - フェノキシ) - フェニル] - [[3 - (1 , 1 , 2 , 2 - テトラフルオロ - エトキシ) - フェニル] - メチル] - アミノ } - 1 , 1 , 1 - トリフルオロ - 2 - プロパノール) 、米国特許出願第10 / 807, 838号で開示されている化合物、米国特許第5, 512, 548号で開示されているポリペプチド誘導体、それぞれJ. Antibiot., 49(8): 815- 816 (1996)およびBioorg. Med. Chem. Lett.; 6:1951-1954 (1996)で開示されているロセノノラクトン誘導体およびコレステリルエステルの含リン酸類似体が挙げられる。さらに、CETP阻害薬として、WO 2000 / 017165、WO 2005 / 095409、WO 2005 / 097806、WO 2007 / 128568、WO 2008 / 009435、WO 2009 / 059943、およびWO 2009 / 071509で開示されているものも挙げられる。

【 0 2 2 5 】

用語「NEP阻害薬」とは、中性エンドペプチダーゼ (NEP) EC 3 . 4 . 24 . 11を抑制する化合物を指す。例として、カンドキサトリル、カンドキサトリラート、デキセカドトリル (Dexecadotril) 、エカドトリル (Ecadotril) 、ラセカドトリル、サンパトリラート (Sampatrilat) 、ファシドトリル、オマパトリラート、ゲモパトリラート (Gemopatrilat) 、ダグルトリル (Daglutril) 、SCH - 42495、SCH - 32615、UK - 447841、AVE - 0848、PL - 37、および (2 R , 4 S) - 5 - ビフェニル - 4 - イル - 4 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 2 - メチル - ペンタン酸エチルエステル、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。NEP阻害薬には、米国特許第US 5, 155, 100号で開示されているようなホスホノ / ピアリール置換ジペプチド誘導体も含まれる。NEP阻害薬には、PCT出願第WO 2003 / 104200号で開示されているようなN - メルカプトアシルフェニルアラニン誘導体も含まれる。NEP阻害薬には、PCT出願第WO 2008 / 133896、WO 2009

10

20

30

40

50

/ 0 3 5 5 4 3、または W O 2 0 0 9 / 1 3 4 7 4 1 で開示されているような二重作用性降圧薬も含まれる。他の例としては、U S 出願第 1 2 / 7 8 8 , 7 9 4 号、第 1 2 / 7 8 8 , 7 6 6 号、および第 1 2 / 9 4 7 , 0 2 9 号で開示されている化合物が挙げられる。N E P 阻害薬として、W O 2 0 1 0 / 1 3 6 4 7 4、W O 2 0 1 0 / 1 3 6 4 9 3、W O 2 0 1 1 / 0 6 1 2 7 1、ならびに U S 仮出願第 6 1 / 4 1 4 1 7 1 号および第 6 1 / 4 1 4 1 6 3 号で開示されている化合物も挙げられる。

【 0 2 2 6 】

一実施形態では、本発明は、対象において A P J 受容体を活性化する方法であって、治療有効量の前述の実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む方法を提供する。

10

【 0 2 2 7 】

一実施形態では、本発明は、対象において、A P J 受容体の活性化に反応を示す疾患または状態を治療する方法であって、治療有効量の前述の実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む方法を提供する。

【 0 2 2 8 】

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

20

【 0 2 2 9 】

一実施形態では、本発明は、医薬として使用するための、前述の実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩を提供する。

【 0 2 3 0 】

一実施形態では、本発明は、A P J 受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療するための医薬の製造における、前述の実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、A P J 受容体の活性化に反応を示す障害または疾患を治療するための医薬の製造における、前述の実施形態のいずれか 1 つに従うコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩の使用であって、前記障害または疾患が、詳細には、急性代償不全心不全（A D H F）、慢性心不全、肺高血圧、心房細動、B r u g a d a 症候群、心室性頻拍、アテローム性動脈硬化症、高血圧、再狭窄、虚血性心血管疾患、心筋症、心臓線維症、不整脈、水分貯留、糖尿病（妊娠糖尿病を含める）、肥満、末梢動脈疾患、脳血管発作、一過性脳虚血発作、外傷性脳損傷、筋萎縮性側索硬化症、熱傷（日焼けを含める）、および子癇前症から選択される、使用を提供する。

30

【 実施例 】

【 0 2 3 1 】

40

【表 5 - 1】

略語	定義
AA	アミノ酸
Ac	アセチル
ACN	アセトニトリル
AcOH	酢酸
BSA	ウシ血清アルブミン
Boc	tert-ブチルオキシカルボニル
CAD	帯電エアロゾル検出器
DCC	ジシクロヘキシルカルボジイミド
DCM	ジクロロメタン
DIPEA または DIEA	<i>N,N</i> -ジイソプロピルエチルアミン
DMF	<i>N,N'</i> -ジメチルホルムアミド
DTT	ジチオトレイトール
ELSD	蒸発光散乱検出器
EtOAc	酢酸エチル
FA	脂肪酸
Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
HATU	2-(1 <i>H</i> -9-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート
HBSS	ハックス緩衝塩溶液
HCTU	2-(6-クロロ-1 <i>H</i> -ベンゾトリアゾール-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート
HEP	ヘプタン
HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸
HFIP	ヘキサフルオロイソプロパノール
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
LCMS	液体クロマトグラフィー質量分析
LN	Logarithmus naturali(自然対数)
MeOH	メタノール

10

20

30

40

【表 5 - 2】

MS	質量分析
Nle	ノルロイシン
NMR	核磁気共鳴
Oxyma Pure	エチル 2-シアノ-2-(ヒドロキシイミノ)アセテート
Pbf	2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル
pE	ピログルタミン酸
PEG	ポリエチレングリコール
PG	保護基
Pbf	ペンタメチル-ジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル
PBS	リン酸緩衝食塩水
Ph	フェニル
PS	ポリスチレン
POL	ポリマー支持体
rt	室温
SPPS	固相ペプチド合成
TCEP	トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
TIPS	トリイソプロピルシラン
t _R	保持時間
Trt	トリチル
UPLC	超高速液体クロマトグラフィー
UV	紫外線

10

20

30

【0 2 3 3】

方法

40

分析方法 A :

- A c q u i t y B E H 1 . 7 μ m 2 . 1 × 5 0 m m
- 溶離液 : A : 水 (0 . 1 % ギ酸) ; B : A C N (0 . 1 % ギ酸)
- 流量 : 1 m L / 分
- 勾配 : 0 分間 2 % の B ; 1 . 7 6 分間 2 % ~ 9 8 % の B ; 2 . 0 6 分間 9 8 % の B ; 2 . 1 6 分間 2 % の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I 走査範囲 1 2 0 ~ 1 6 0 0
- H P L C : w a t e r s A c q u i t y
- 温度 : 5 0

50

【 0 2 3 4 】

分析方法 B :

- A c q u i t y B E H 1 . 7 μ m 2 . 1 × 5 0 m m
- 溶離液 : A : 水 (0 . 1 % ギ酸) ; B : A C N (0 . 1 % ギ酸)
- 流量 : 1 m L / 分
- 勾配 : 0 分間 4 0 % の B ; 1 . 4 0 分間 4 0 % ~ 9 8 % の B ; 2 . 0 5 分間 9 8 % の B ; 2 . 1 分間 4 0 % の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I 走査範囲 1 2 0 ~ 1 6 0 0
- H P L C : w a t e r s A c q u i t y
- 温度 : 5 0

10

【 0 2 3 5 】

分析方法 C :

- H i l i c 2 . 1 × 1 0 0 m m
- 溶離液 ; A ; C O 2 B : M e O H
- 流量 : 2 m L / 分
- 勾配 : 0 . 1 5 分間 2 % の B 、 1 . 6 5 分間 2 % ~ 5 0 % の B 、 2 . 1 分間 5 0 % の B 、 2 . 2 5 分間 2 % の B 、 2 . 5 分間 2 % の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I
- S C F : w a t e r s A c q u i t y
- 温度 : 5 5

20

【 0 2 3 6 】

分析方法 D :

- S u n f i r e C 1 8 3 , 5 μ m 3 . 0 × 3 . 0 m m
- 溶離液 : A : 水 (0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸) ; B : A C N
- 流量 : 2 m L / 分
- 勾配 : 0 分間 5 % の B 、 4 . 3 分間 5 % ~ 8 0 % の B 、 4 . 7 0 分間 9 5 % の B , 5 . 0 0 分間 9 5 % の B 、 5 . 1 0 分間 5 % の B
- 質量分析計 : W a r t e r s m i c r o m a s s Z Q ; S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I 走査範囲 1 2 0 ~ 1 6 0 0
- H P L C : A g i l e n t 1 1 0 0 シリーズ
- 温度 : 4 0

30

【 0 2 3 7 】

分析方法 E :

- X b r i d g e C 1 8 カラム、 3 . 5 μ m 、 3 . 0 × 3 . 0 m m
- 溶離液 : A : 水 + 5 m M 水酸化アンモニウム B : A C N
- 流量 : 2 m L / 分
- 勾配 : 0 . 0 分間 2 % の B 、 1 . 7 0 分間 2 % ~ 9 5 % の B 、 2 . 0 0 分間 9 5 % の B 、 2 . 1 0 分間 5 % の B
- 質量分析計 : S i n g l e Q u a d r u p o l e E S I
- H P L C : A g i l e n t 1 1 0 0 シリーズ
- 温度 : 4 0

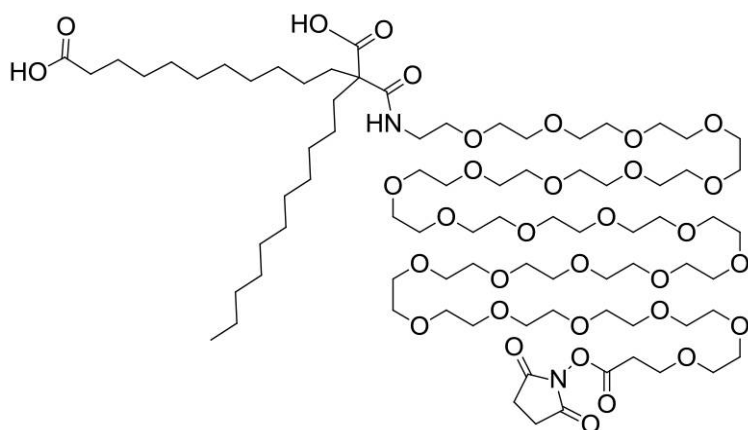
40

【 0 2 3 8 】

脂肪酸 - リンカー構築物 # 1 の調製

【 0 2 3 9 】

【化 19】



10

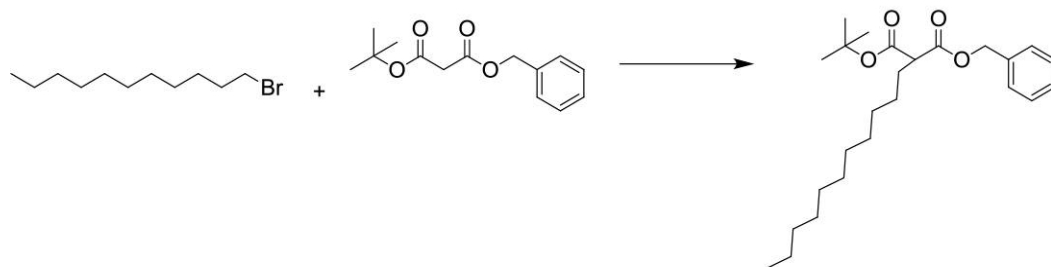
【0240】

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

【0241】

【化 20】

20



30

N_2 中にて、DMF (8 mL) 中の NaH (160 mg、4.0 mmol) の懸濁液に、0 で DMF (2 mL) 中のベンジル tert - ブチルマロネート (1.0 g、4.0 mmol) を加えた。混合物を 50 分間攪拌し、その後、DMF (2 mL) 中の 1 - ブロモウンデカンを加えた。追加の 1 時間の攪拌後、反応液を室温まで温めさせた。終夜、反応を維持した。Et₂O (100 mL) および水 (20 mL) を加えて、反応液を分配した。Et₂O (100 mL) で水性相を抽出し、合わせた有機物を Na₂SO₄ で脱水した。溶媒を蒸発させ、残渣をフラッシュカラム (C18 12 g、40 ~ 100 % ACN / 水 + 0.1 % TFA) で精製して、表題の化合物 (1.14 g、2.82 mmol、71 %) を無色の油状物として得た：LCMS 方法 B Rt = 1.58 分、M + Na 427.4 ; ¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) ppm 0.84 - 0.96 (m, 3 H) 1.28 (br. s, 12 H) 1.31 (m, J=3.90 Hz, 6 H) 1.41 (s, 9 H) 1.88 (q, J=7.38 Hz, 2 H) 3.29 (t, J=7.58 Hz, 1 H) 5.19 (q, J=12.27 Hz, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 5 H).

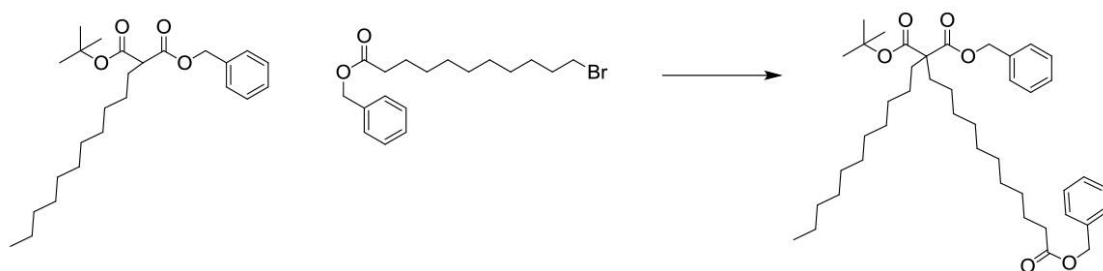
40

【0242】

ステップ2：1, 11 - ジベンジル 11 - tert - ブチルドコサン - 1, 11, 11 - トリカルボキシレート

【0243】

【化 2 1】



10

N₂ 中にて、DMF (6 mL) 中の NaH (70.7 mg、1.77 mmol) の懸濁液に、0 で DMF (1 mL) 中の 1 - ベンジル 3 - tert - ブチル 2 - ウンデシルマロネート (650 mg、1.61 mmol) の溶液をゆっくりと加えた。DMF (1 mL) 中のベンジル 11 - プロモウンデカノエート (571 mg、1.61 mmol) を加える前に、混合物を 40 分間撹拌した。添加後、反応液を室温まで温まらせ、終夜撹拌した。Et₂O (100 mL) で反応液を希釈し、水 (20 mL) で抽出した。Et₂O (100 mL) で水性相を抽出し、合わせた有機物を Na₂SO₄ で脱水した。溶媒を蒸発させた。残渣をフラッシュカラム (シリカ 80 g、0 ~ 10 % EtOAc / HEP) によって精製して、表題の化合物を無色の油状物として得た (823 mg、1.21 mmol、75%)。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) ppm 0.84 - 0.94 (m, 3 H) 1.12 (m, J=6.60 Hz, 4 H) 1.19 - 1.33 (m, 28 H) 1.35 (s, 9 H) 1.66 (五重線, J=7.40 Hz, 2 H) 1.85 (t, J=8.44 Hz, 4 H) 2.37 (t, J=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.16 (s, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 10 H)。

20

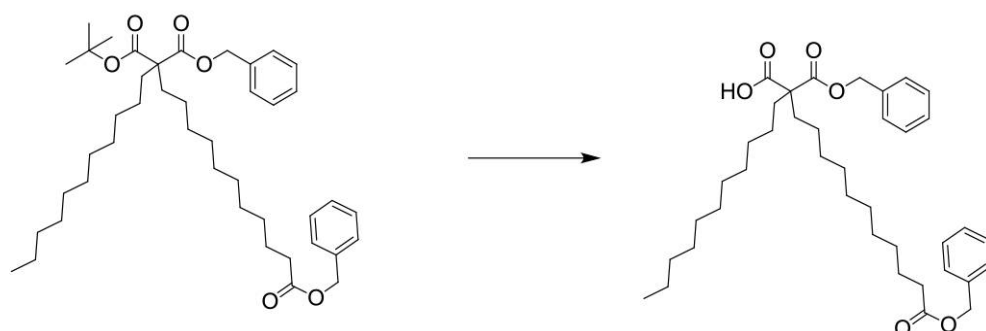
【 0 2 4 4】

ステップ 3 : 13 - (ベンジルオキシ) - 2 - ((ベンジルオキシ) カルボニル) - 13 - オキソ - 2 - ウンデシルトリデカン酸

【 0 2 4 5】

30

【化 2 2】



40

DCM (3 mL) 中のステップ 2 からの化合物 (200 mg、0.295 mmol) の溶液に、TFA (0.6 mL) を加え、室温で 3 時間、反応液を撹拌した。溶媒を蒸発させ、フラッシュカラム (シリカ 12 g、0 ~ 15 % EtOAc / HEP) によって残渣を精製して、表題の化合物 (177 mg、0.284 mmol、96%) を得た：¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (五重線, J=7.40 Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, J=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H)

50

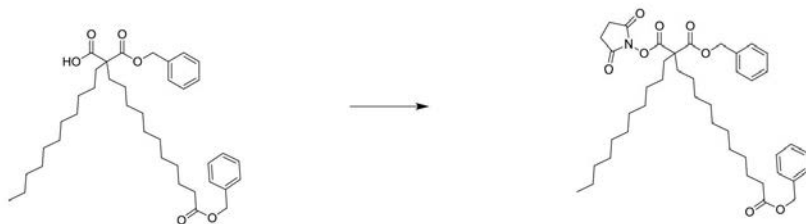
7.31 - 7.44 (m, 10 H).

【 0 2 4 6 】

ステップ 4 : 1 , 1 1 - ジベンジル - 1 1 - (2 , 5 - ジオキソシクロペンチル) ドコ
サン - 1 , 1 1 , 1 1 - トリカルボキシレート

【 0 2 4 7 】

【 化 2 3 】



10

N₂ 中にて、DCM (1 mL) 中の DCC (58.6 mg、0.284 mmol) の溶
液を、ステップ 3 から酸 (177 mg、0.284 mmol) の溶液および DCM (2
mL) 中の N - ヒドロキシスクシンイミド (32.7 mg、0.284 mmol) および
THF (0.3 mL) に加えた。室温で 4 時間、反応液を撹拌した。溶媒を蒸発させ、フ
ラッシュカラム (シリカ 12 g、0 ~ 35 % EtOAc / HEP) によって残渣を精製し
て、表題の化合物 (153 mg、0.213 mmol、75 %) を無色の油状物として得
た：¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m,
2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (五重線、J=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.
37 (t, J=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.4
7 (m, 10 H).

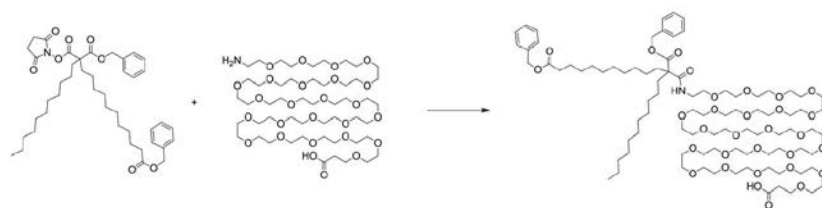
20

【 0 2 4 8 】

ステップ 5 :

【 0 2 4 9 】

【 化 2 4 】



30

THF (1.5 mL) および DCM (1.5 mL) 中のステップ 4 から中間体 (14
5 mg、0.201 mmol) の溶液を、アミノ - PEG24 - カルボン酸を入れたバイ
アルに加えた。DIPEA (88 μL、0.504 mmol) を加え、シェーカープレー
ト上で反応液を 15 時間、撹拌した。溶媒を蒸発させ、超臨界液体クロマトグラフィー (
Waters HILIC 20 x 150 mm; 15 ~ 25 % MeOH / CO₂) によ
って残渣を精製して、所望のカップリングした化合物 (151 mg、0.086 mmol
、43 %) を得た：LCMS 方法 C ; Rt = 1.30 分、[M + 2 H] + 2 876.4
;¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 0.93 - 1.04 (m, 2
H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23 - 1.37 (m, 15 H) 1.61 - 1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, J=12
.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, J=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, J=6.05
Hz, 2 H) 3.49 (dd, J=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52 - 3.59 (m, 2 H) 3.59 - 3.73 (m, 9
2 H) 3.80 (t, J=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31 - 7.42 (m, 10 H)
8.09 (t, J=5.26 Hz, 1 H).

40

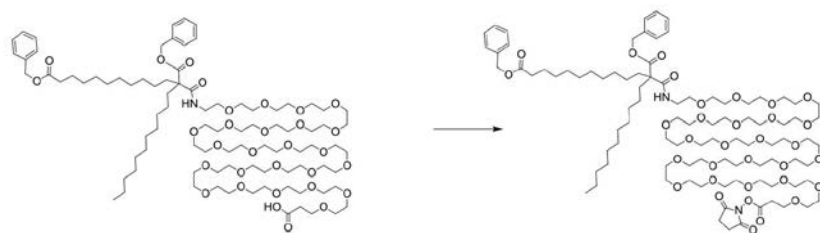
50

【 0 2 5 0 】

ステップ 6 :

【 0 2 5 1 】

【 化 2 5 】



10

DCM (0 . 2 6 5 m L) 中の DCC (2 2 m g 、 0 . 1 0 3 m m o l) を、DCM (1 . 5 m L) 中のステップ 5 からの化合物 (1 5 0 m g 、 0 . 0 8 6 m m o l) および N - ヒドロキシスクシンイミドに加えた。反応液を 1 . 5 時間、撹拌した。追加の THF (0 . 5 m L) 中の N - ヒドロキシスクシンイミド (1 0 m g) および DCM (0 . 2 6 5 m L) 中の DCC (2 2 m g) を加え、反応液を終夜撹拌した。溶媒を蒸発させ、フラッシュカラム (シリカ 1 2 g 、 0 ~ 5 % M e O H / D C M) によって残渣を精製して、活性化した NHS 化合物 (1 5 9 m g 、 定量的 (quantitative)) を白色固体として得た : L C M S 方法 B ; R t = 1 . 5 5 分、 $[M + H_3 O + H] ^ + 2 9 3 3 . 9$ 。

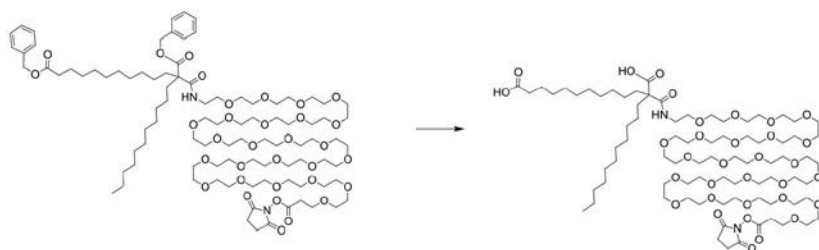
20

【 0 2 5 2 】

ステップ 7 :

【 0 2 5 3 】

【 化 2 6 】



30

THF (5 m L) 中のステップ 6 からの化合物 (1 5 9 m g 、 0 . 0 8 6 m m o l) の溶液に、THF (1 m L) 中の 1 0 % のパラジウム炭素 (4 . 6 m g 、 4 . 3 μ m o l) の懸濁液を加えた。反応液を水素中に置き、4 0 分間撹拌した。さらなるパラジウム炭素 (7 m g 、 6 . 5 μ m o l) を加え、水素中にてさらに 1 時間撹拌した。反応液をメンブレンフィルターに通過させ、ろ液を蒸発させた。HPLC (Sunfire C18 3 0 x 5 0 m m 、 4 5 ~ 7 0 % A C N / 水 + 0 . 1 % T F A) によって残渣を精製して、脱保護した化合物 (8 3 m g 、 0 . 0 4 7 m m o l 、 5 4 %) を得た : L C M S 方法 B R t = 1 . 0 3 分、 $[M + 2 H] / 2 8 3 5 . 2$; 1H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) ppm 0.84 - 0.94 (m , 3 H) 1.17 (br. s. , 2 H) 1.21 - 1.39 (m , 30 H) 1.57 - 1.68 (m , 2 H) 1.69 - 1.80 (m , 2 H) 1.97 - 2.10 (m , 2 H) 2.34 (t , J=7.21 Hz , 2 H) 2.86 (s , 4 H) 2.92 (t , J=6.48 Hz , 2 H) 3.51 - 3.73 (m , 96 H) 3.87 (t , J=6.48 Hz , 2 H) 7.45 (t , J=4.46 Hz , 1 H) .

40

【 0 2 5 4 】

アミノ - PEG 2 4 - カルボン酸を適切なアミノ - PEG n - カルボン酸で置換することによって、以下の化合物を脂肪酸 - リンカー構築物 # 1 と同様に調製した。

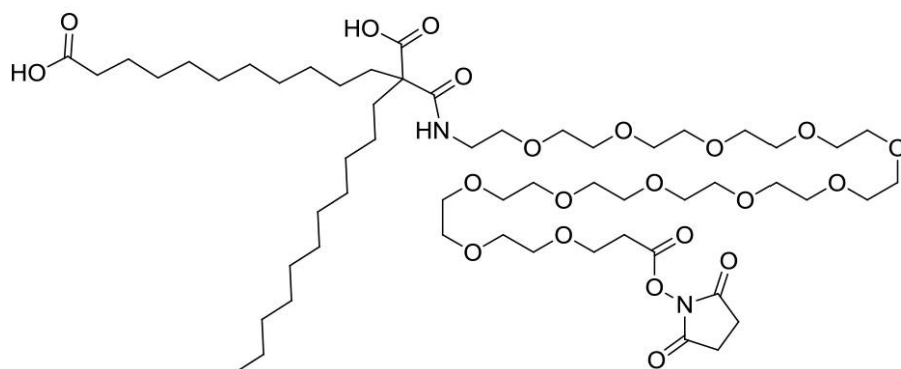
【 0 2 5 5 】

50

脂肪酸 - リンカー構築物 # 2 の調製

【 0 2 5 6 】

【 化 2 7 】



10

脂肪酸 - リンカー構築物 # 2 を、アミノ - P E G 1 2 - カルボン酸を使用して調製し、無色の油状物として単離した； L C M S : 方法 A : C A D : R t 1 . 6 4 分 M S m / z 1 1 3 8 . 0 [M - H] - ;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 7.36 (1H, br t), 3.76 (2H, t), 3.61-3.47 (46H, br m), 3.46-3.40 (2H, br m), 2.81 (2H, t), 2.74 (4H, br s), 2.24 (2H, t), 1.93 (2H, br t), 1.68-1.57 (2H, br m), 1.56-1.50 (2H, br m), 1.26-1.08 (34H, br m), 0.78 (3H, t).

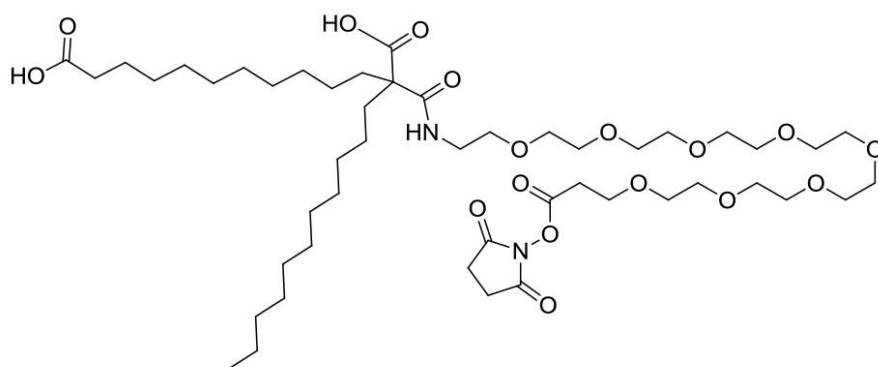
20

【 0 2 5 7 】

脂肪酸 - リンカー構築物 # 3 の調製

【 0 2 5 8 】

【 化 2 8 】



30

脂肪酸 - リンカー構築物 # 3 を、アミノ - P E G 8 - カルボン酸を試使用して調製し、それぞれがわずかに異なる不純物を含み、それぞれが無色の油状物である、2つの画分として単離した。

【 0 2 5 9 】

L C M S : 方法 A C A D : R t 1 . 6 5 分 M S m / z 9 6 3 . 8 [M + H] + ;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 7.27 (1H, br m), 3.70 (2H, t), 3.56-3.41 (30H, br m), 3.41-3.34 (2H, br m), 2.75 (2H, t), 2.69 (4H, br s), 2.19 (2H, t), 1.87 (2H, br t), 1.63-1.52 (2H, br m), 1.52-1.43 (2H, br m), 1.22-1.02 (32H, br m), 0.78 (3H, t)

40

50

, t).

【 0 2 6 0 】

L C M S : 方法 B C A D : R t 1 . 6 5 分 M S m / z 9 6 3 . 8 [M + H] + ;

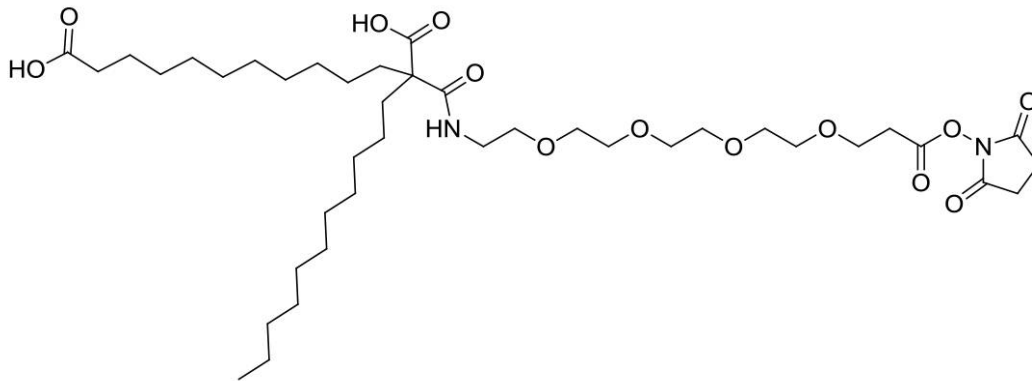
¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 7.48 (1H, m), 3.85 (2H, t), 3.71-3.56 (30H, br m), 3.56-3.49 (2H, br m), 2.90 (2H, t), 2.84 (4H, br s), 2.38-2.32 (2H, m), 2.02 (2H, br t), 1.78-1.58 (4H, br m), 1.38-1.16 (32H, m), 0.88 (3H, t).

【 0 2 6 1 】

脂肪酸 - リンカー構築物 4 の調製 :

【 0 2 6 2 】

【 化 2 9 】



脂肪酸 - リンカー構築物を、アミノ - P E G 4 - カルボン酸を使用して調製し、薄黄色の油状物として単離した ;

L C M S : 方法 A C A D : R t 1 . 6 6 分 M S m / z 7 8 7 . 6 [M + H] + ;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 7.24 (1H, br t), 3.85 (2H, t), 3.71-3.57 (14H, br m), 3.56-3.48 (2H, br m), 2.90 (2H, t), 2.84 (4H, br s), 2.35 (2H, t), 2.10-1.99 (2H, br m), 1.74-1.58 (4H, br m), 1.38-1.18 (32H, br m), 0.88 (3H, t).

【 0 2 6 3 】

H 2 N - Q (T r t) - R (P b f) - P - R (P b f) - L - C (T r t) - H (T r t) - K (B o c) - G - P - (N l e) - C (T r t) - F - C O O H の調製

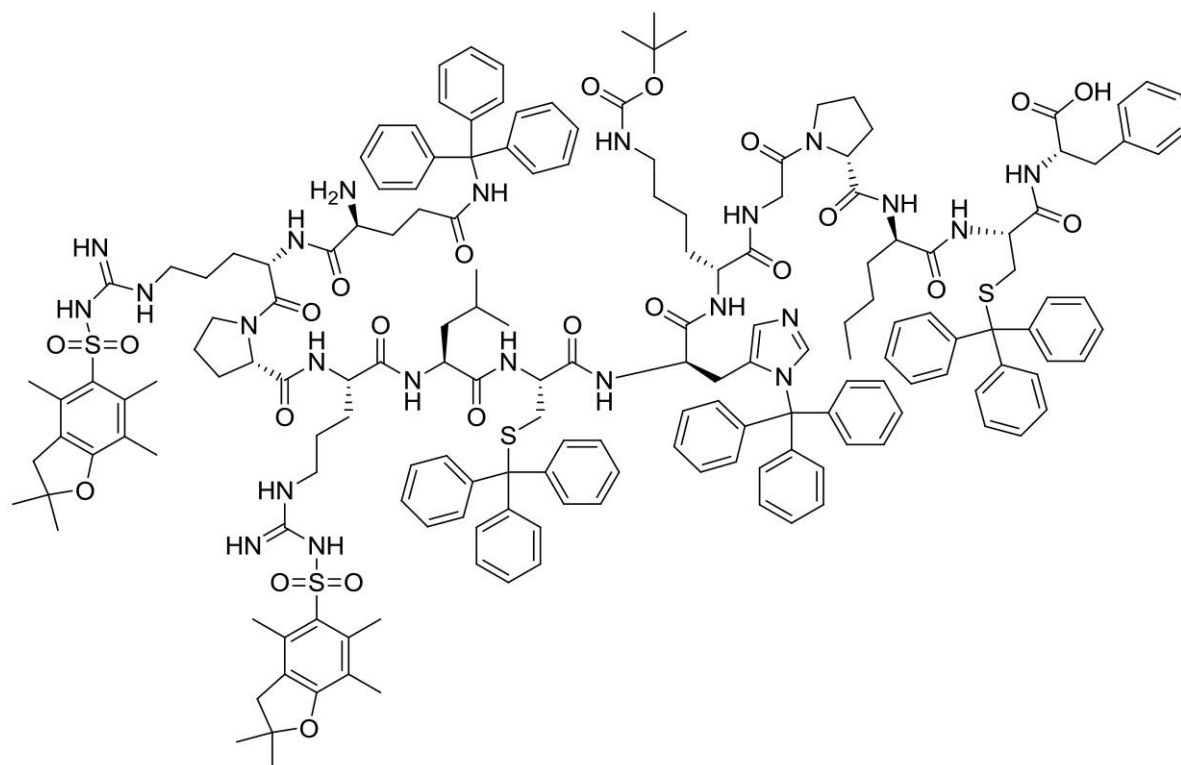
【 0 2 6 4 】

10

20

30

【化 3 0】



H-Phe-2-CITrt 樹脂

SPPS

H2N-Q(Trt)-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-(Nle)-C(Trt)-F-COO-2-ClTrt sesin (1a)

20%HFIP/DCM による切断

H2N-Q(Trt)-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-(Nle)-C(Trt)-F-COOH (1b)

ステップ 1 : 中間体 1 a の調製

H - P h e - 2 - C I T r t 樹脂 (N o v a b i o c h e m 、 3 2 4 m g 、 0 . 2 5 m m o l 、 0 . 7 3 m m o l / g) を 、 A r g 残基に 2 倍の標準 A r g を用いた、自動ペプチド合成装置 (L I B E R R T Y B L U E) での固相ペプチド合成にかけた。アミノ酸は、0 . 2 M D M F 溶液として調製した。

【 0 2 6 5 】

カップリングサイクルは、以下のとおりに定めた：

- アミノ酸カップリング：A A (4 . 0 当量)、H A T U (4 . 0 当量)、D I E A (2 5 当量)
- 洗浄：D M F (3 × 7 m L、各回 1 分)
- F m o c 脱保護：ピペリジン / D M F (1 ; 4) (7 m L、7 5 で 3 分間)
- 洗浄：D M F (3 × 7 m L、各回 1 分)

【 0 2 6 6 】

【 表 6 】

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

10

20

【 0 2 6 7 】

ペプチドを組み立てた後、樹脂をDMF (3 × 1 0 m L) 、DCM (3 × 1 0 m L) で洗淨した。ペプチド樹脂を真空中にて室温で乾燥させて、中間体 1 a (2 . 3 4 7 g 、 0 . 7 5 m m o l) を得た。

【 0 2 6 8 】

30

ステップ 2 : 中間体 1 b 、 H 2 N - Q (T r t) - R (P b f) - P - R (P b f) - L - C (T r t) - H (T r t) - K (B o c) - G - P - (N l e) - C (T r t) - F - C O O H の調製

【 0 2 6 9 】

中間体 1 a (2 . 3 4 7 g 、 0 . 7 5 m m o l) に、2 0 % H F I P / D C M の 2 4 m l の溶液を加え、得られる混合物を室温で 2 0 分間振盪し、次いでろ過し、ろ液をDCM (3 × 1 0 m L) で洗淨した。完全に切断するために、上記手順を 4 回実施した。合わせたろ液を真空中にて濃縮して、粗製中間体 1 b (2 . 0 9 g 、 6 8 %) を得て、これを精製することなく、直接次の反応ステップのために投入した。LC / MS 方法 E : 保持時間 : 1 . 7 4 分 ; MS M / 2 + 1 : 実測値 : 1 5 6 5 . 9 、計算値 : 1 5 6 4 . 4 5 8 。

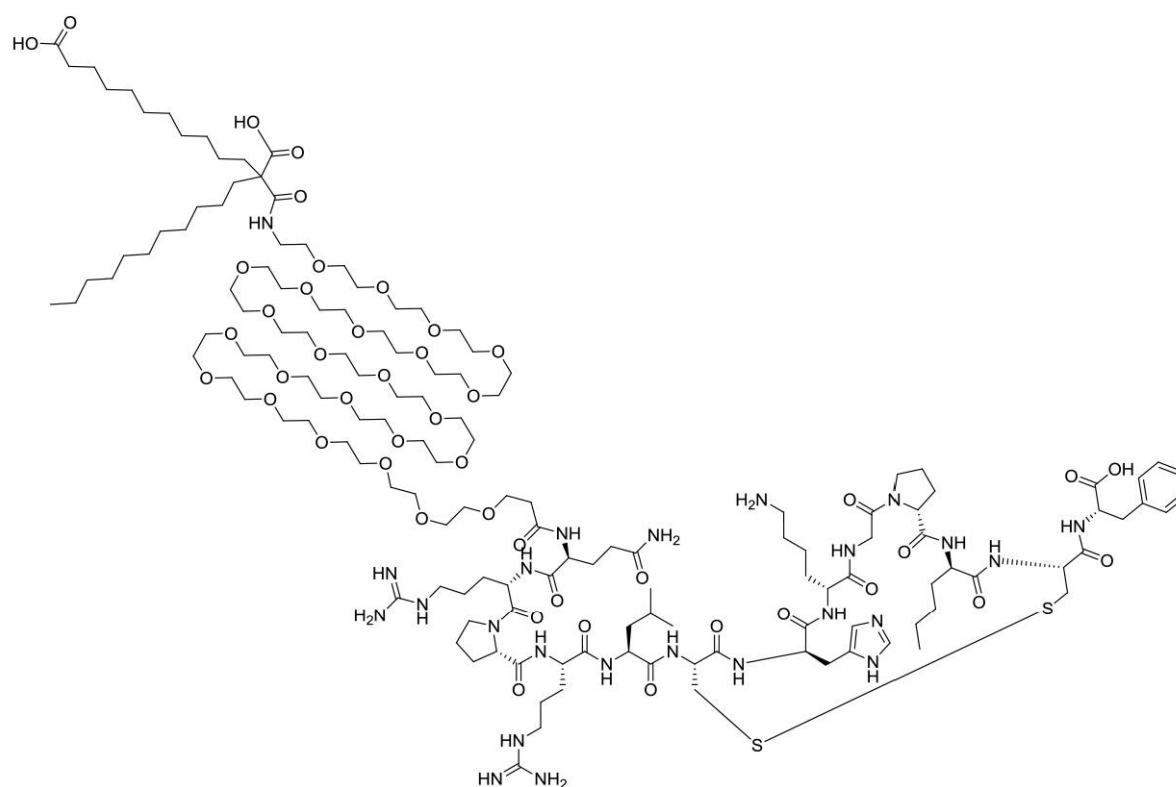
40

【 0 2 7 0 】

実施例 1 : 脂肪酸 - リンカー # 1 - Q - R - P - R - L - C * - H - K - G - P - (N l e) - C * - F (C 6 - C 1 2 ジスルフィド架橋)

【 0 2 7 1 】

【化 3 1】



10

20

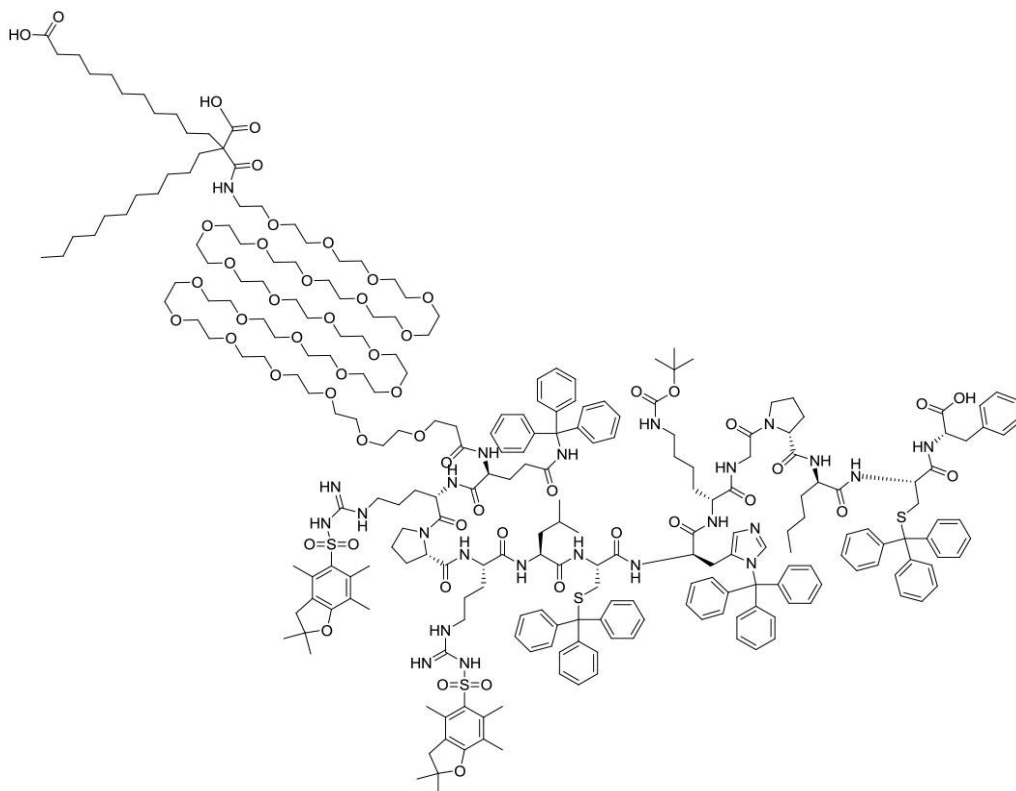
ステップ 1 :

THF (100 mL) 中の中間体 1b (300 mg、0.096 mmol) の溶液に、THF (35 mL) および水 (15 mL) 中の脂肪酸 - リンカー 構築物 # 1 (960 mg、0.575 mmol) を加えた。反応混合物を室温で撹拌した。完了後、部分真空中にて反応液を濃縮し、定量的収量と推測する粗製物 (生成物 MW : 4681.870) として次の反応ステップに送った。

30

【0272】

【化 3 2】



10

20

ステップ 2：脱保護

TFA (4.75 mL)、TIPS (0.125 mL) および水 (0.125 mL) の溶液に、DTT (296 mg、1.920 mmol) を加えた。次いで、予め混合したカクテルをステップ 1 の化合物：(449 mg、0.096 mmol) に加え、室温で撹拌した。完了後、部分真空中にて反応液を濃縮した。冷却したジエチルエーテルで残渣を処理し、濁った反応混合物を得て、これを室温で静置した。デカントしてジエチルエーテルを除き、さらなる冷却したジエチルエーテルですすぐことによって、結果として生成したゴムを単離した。ゴムを水 (最小量) に溶解し、逆相クロマトグラフィー用の 55 g の C-18 カラムに添加した。20 分間にわたる 100 % の水 (0.1 % TFA) から 100 % の ACN までの溶媒の勾配を使用して精製し、薄黄色の油状物として脱保護した化合物 (160 mg、54 % 収率) を得た。

30

LCMS：方法 D：ELSD：Rt 2.62 分 MS m/z 1555.2 [(M/2) + H]⁺;

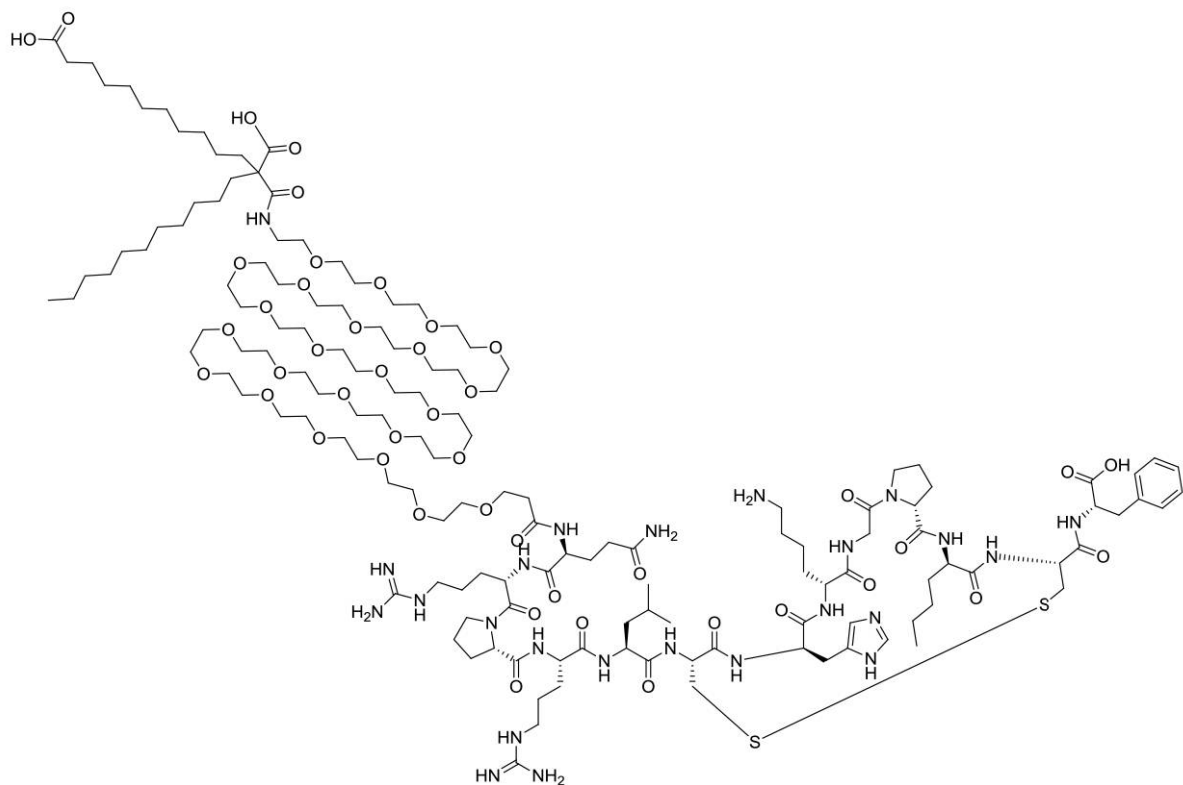
【0273】

ステップ 3：環化 - ジスルフィド結合形成

【0274】

40

【化 3 3】



10

20

水 (2 m L) 中のステップ 2 の脱保護した化合物 (1 6 0 m g 、 0 . 0 5 1 m m o l) の溶液に、ヨウ素 (A c O H 中で 5 0 m M) (1 . 3 3 9 m L 、 0 . 0 6 7 m m o l) を加えた。室温で反応混合物を撹拌した。完了後、反応混合物を逆相クロマトグラフィー用の 5 5 g の C 1 8 (5 5 μ g) カラムに直接添加した。15 分間にわたる 1 0 0 % 水 (0 . 1 % T F A) から 1 0 0 % A C N までの溶媒の勾配を使用し、L C M S による適切な画分を合わせ、溶媒を蒸発させて除去した。結果として生じた残渣を凍結乾燥させて、表題の化合物 (実施例 1) を白色固体として得た ;

30

L C M S : 方法 D : E L S D : R t 2 . 6 4 分 ; M S m / z 1 5 5 4 . 3 [(M / 2) + H] + ;

【 0 2 7 5 】

脂肪酸 - リンカー構築物 # 1 を適切な脂肪酸 - リンカー構築物 # 2 ~ # 4 で置換することによって、以下の実施例を実施例 1 と同様に調製した。

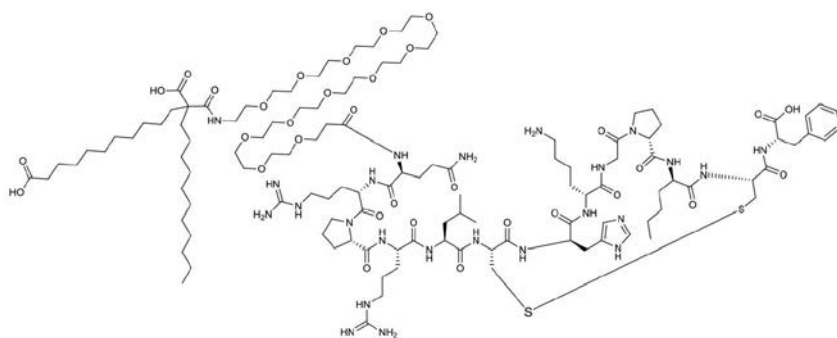
【 0 2 7 6 】

実施例 2 : 脂肪酸 - リンカー構築物 # 2 を含むコンジュゲート

【 0 2 7 7 】

40

【化 3 4】



10

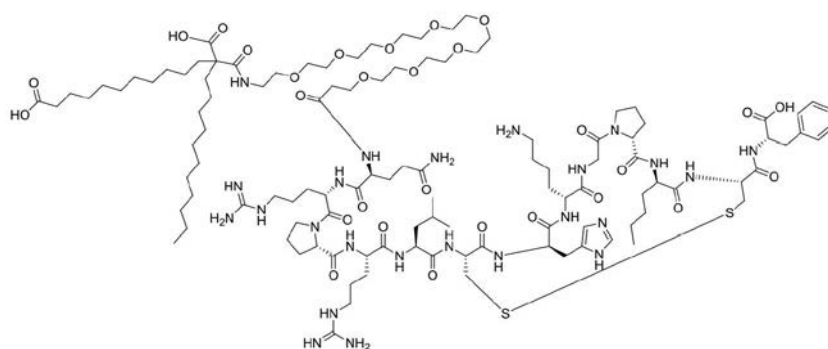
LCMS : 方法 D : ELSD : Rt 2.56 分 ; MS m/z 1289.9 [(M/2) + H] + ;

【0278】

実施例 3 : 脂肪酸 - リンカー構築物 # 3 を含むコンジュゲート

【0279】

【化 3 5】



20

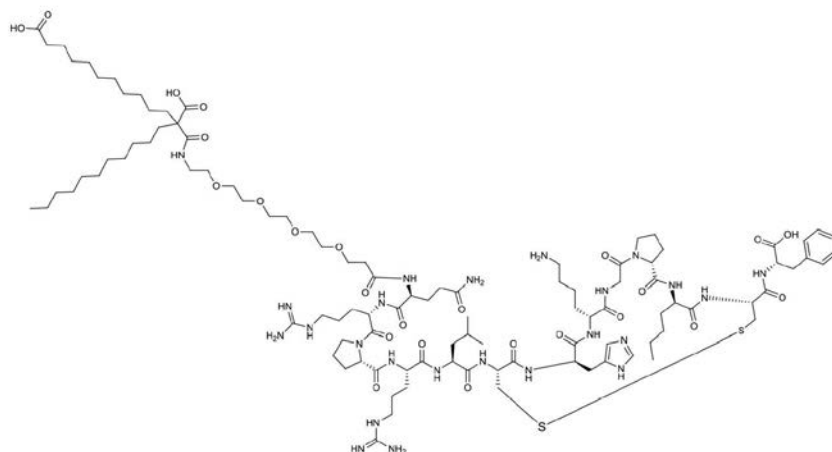
LCMS : 方法 D : ELSD : Rt 2.52 分 ; MS m/z 1201.8 [(M/2) + H] + ;

【0280】

実施例 4 : 脂肪酸 - リンカー構築物 # 4 を含むコンジュゲート

【0281】

【化 3 6】



40

50

LCMS：方法D：ELSD：Rt 2.49分；MS m/z 1113.6 [(M/2) + H]⁺；

【0282】

上記実施例におけるコンジュゲートは、APJ受容体力価についてのEC₅₀値が約0.01 nM～約1100 nMの範囲にあることがわかっている。上記実施例におけるコンジュゲートは、血漿安定性が、30分より長い、60分より長い、5時間より長い、10時間より長い、12時間より長いことがわかっている。

【0283】

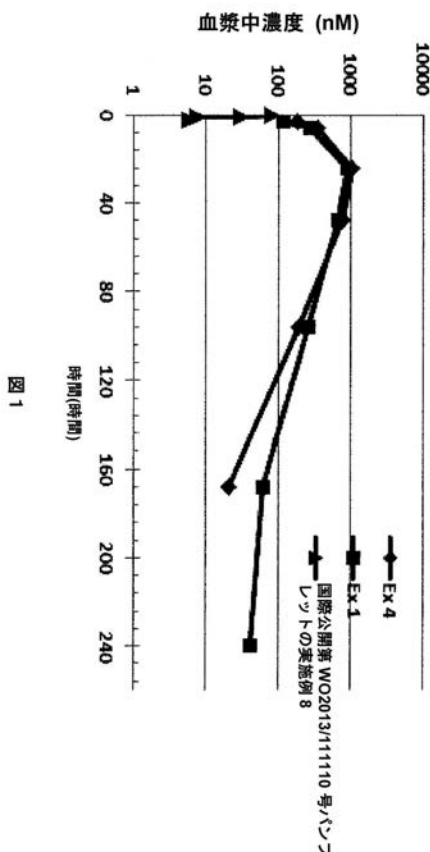
本発明のコンジュゲートは、APJ受容体のアゴニストとして有用であり、したがって、本明細書で開示する疾患などの、APJ受容体の活性化に反応を示す疾患および状態の治療において有用であるとみなすことができる。

【0284】

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

10

【図1】



皮下投与後の実施例1および4の化合物のマウス血漿中濃度プロファイル

図1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2016/050206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 A61K45/06 A61P9/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/111110 A2 (NOVARTIS AG [CH]) 1 August 2013 (2013-08-01) cited in the application claims 17,27,29-36; examples 24,25,58-60 -----	1-15
X,P	WO 2015/013169 A2 (NOVARTIS AG [CH]; CAPLAN SHARI L [US]; GOLOSOV ANDREI [US]; GROSCHKE PH) 29 January 2015 (2015-01-29) claims 1,20,26,30,31,33-39 example 20 page 32, paragraph 1 -----	1-15
X,P	WO 2015/200078 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BARNES DAVID WENINGER [US]; YAMADA KEN [US]; IBEJUNJ) 30 December 2015 (2015-12-30) examples 20,21 ----- -/-	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

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)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 April 2016

Date of mailing of the international search report

12/04/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bliem, Barbara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2016/050206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>WO 2015/013168 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BRUCE ALEXANDRA MARSHALL [US]; GROSCHE PHILIPP [CH];) 29 January 2015 (2015-01-29) claims 28,29,31-35; examples 40,41 -----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2016/050206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013111110 A2	01-08-2013	AR 089808 A1	17-09-2014
		AU 2013213265 A1	18-09-2014
		CA 2862240 A1	01-08-2013
		CL 2014001994 A1	03-11-2014
		CN 104220452 A	17-12-2014
		CO 7020879 A2	11-08-2014
		CR 20140364 A	17-11-2014
		EA 201491433 A1	30-12-2014
		EP 2807183 A2	03-12-2014
		HK 1200470 A1	07-08-2015
		JP 2015506370 A	02-03-2015
		KR 20140117603 A	07-10-2014
		NZ 627772 A	27-11-2015
		PE 21942014 A1	21-12-2014
		PH 12014501701 A1	13-10-2014
		SG 11201404369P A	28-08-2014
		TW 201335190 A	01-09-2013
		US 2013196899 A1	01-08-2013
		US 2014142022 A1	22-05-2014
		US 2015252076 A1	10-09-2015
		UY 34593 A	02-09-2013
		WO 2013111110 A2	01-08-2013
WO 2015013169 A2	29-01-2015	AU 2014293387 A1	11-02-2016
		CA 2918077 A1	29-01-2015
		SG 11201600208R A	26-02-2016
		TW 201518323 A	16-05-2015
		US 2015030594 A1	29-01-2015
		UY 35671 A	27-02-2015
		WO 2015013169 A2	29-01-2015
WO 2015200078 A1	30-12-2015	US 2016030585 A1	04-02-2016
		UY 36186 A	29-01-2016
		WO 2015200078 A1	30-12-2015
WO 2015013168 A1	29-01-2015	AU 2014293386 A1	11-02-2016
		CA 2918074 A1	29-01-2015
		SG 11201600211X A	26-02-2016
		TW 201536814 A	01-10-2015
		US 2015031604 A1	29-01-2015
		UY 35670 A	27-02-2015
		WO 2015013168 A1	29-01-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 13/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	A 6 1 K 45/00	

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

(72)発明者 カンター, アーロン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 4
0 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

(72)発明者 ウセラ, アイミー リチャードソン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1
0 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

(72)発明者 ゼッリ, フレデリック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 1
0 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレ
ーテッド

F ターム(参考) 4C076 CC01 CC11 CC16 CC17 CC19 CC21 CC41 DD42 EE23 FF63
4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA08 BA18 BA26 BA42 MA17 MA22
MA23 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA44 MA52 MA55 MA56
MA59 MA60 MA65 MA66 NA05 NA12 ZA011 ZA361 ZA421 ZA451
ZA542 ZA701 ZA811 ZA832 ZA891 ZA941 ZC202 ZC351 ZC412 ZC422
ZC751
4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA32 BA55 BA57 EA23 FA10

【要約の続き】

)、および子癰前症の治療または予防などの、その治療的使用に関する。本発明はさらに、薬理活性薬剤の組合せおよび医薬組成物を提供する。