

明 細 書

発明の名称：糖鎖修飾心房性ナトリウム利尿ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖が結合し、血中での持続性が改善された、糖鎖修飾心房性ナトリウム利尿ペプチド、それを有効成分として含有する医薬等に関する。

背景技術

[0002] 心房性ナトリウムペプチドは、血管拡張作用、利尿作用細胞増殖抑制作用、静脈灌流量の低下作用、交感神経活性抑制作用を有する生理活性ペプチドである。天然型のhANPは、血中の中性エンドペプチダーゼ（NEP）により切断されることで活性を失うため、血中半減期が短いため、現在の臨床では、点滴などによる連続投与が必要である。

[0003] 血中半減期が短い生理活性ペプチドの血中半減期を延長する試みとしては、徐放化製剤の適用、アミノ酸の置換や修飾、アルブミン、免疫グロブリンFc部分等を連結させた融合ペプチド、PEG等の高分子を付加させた修飾ペプチド、など様々な方法が挙げられる。生理活性ペプチドの生理活性を利用した医薬に適用するには、当該ペプチドが有する生理活性を薬理上必要なレベルで保持したまま、血中半減期を延長する必要がある。このように血中半減期を延長した生理活性ペプチドを医薬に適用しようという試みは、多くのペプチドに対して行われている。

[0004] 非特許文献1（Procc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 12544-12548）、非特許文献2（Bioconjugate Chem. 2008, 19, 342-348）には、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）にPEGを結合させた修飾ペプチドが開示されている。

特許文献1（W02006/076471 A2）には、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）にPEGを結合させた修飾ペプチドが開示されている。

[0005] 特許文献2（W02008/154226 A1）、非特許文献3（Bioconjugate Chem. 2012, 23, 518-526）には、ANPに免疫グロブリンFc部位を結合させた融合タン

パク質が記載されている。

[0006] 特許文献3 (W02004/047871 (A2, A3)、特許文献4 (W02009/142307 A1) には、ANPのアミノ酸配列を改変した変異体が開示されている。

[0007] しかしながら、必ずしも成功するものではない。特に、十分な血中滞留時間と、薬理効果に必要な活性の保持を両立できるか否かは実際に多くの試験を行ってみなければ予測できないものである。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際特許公開公報W02006/076471

特許文献2：国際特許公開公報W02008/154226

特許文献3：国際特許公開公報W02004/047871

特許文献4：国際特許公開公報W02009/142307

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Procc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 12544-12548,

非特許文献2：Bioconjugate Chem. 2008, 19, 342-348)

非特許文献3：Bioconjugate Chem. 2012, 23, 518-526

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、天然型のヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (hANP) と比較して、血中持続時間が延長され、且つ、cGMP上昇活性を保持した改良ペプチドを見出すことを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者等は、血中持続時間が延長され、且つ、cGMP上昇活性を保持したhANPの修飾について鋭意検討した結果、hANPに糖鎖を様々な方法で結合させた修飾ペプチドが、GC-A受容体発現細胞に対して細胞内cGMP濃度を上昇させたこと、マウスに投与した際の血中持続時間が延長されたこと、このとき、修飾ペプチドの投与後60分以降においても持続的に血中のcGMP濃度が上昇し

ていたこと等を見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] 本発明は、以下を提供するものである。

(1) 少なくとも一つの糖物質が、直接グリコシド結合により連結、又は、リンカー構造を介して、少なくとも一つのhANPペプチドと連結された修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(2) 糖物質が、hANPペプチドの、N末端、C末端、及び、ペプチドを構成する少なくとも一つのアミノ酸の側鎖、の少なくとも一箇所において、直接グリコシド結合により連結、又は、リンカー構造を介して連結していることを特徴とする(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(3) hANPペプチドが、hANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)又はhANP(3-27)である(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

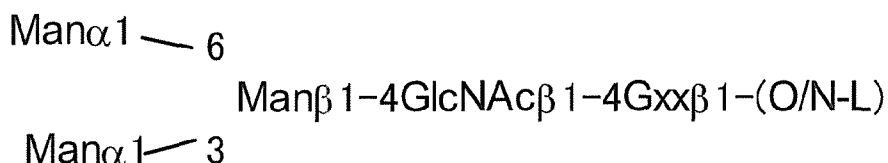
(4) 糖物質が、少なくとも一種類の単糖類、二糖類、三糖類、及び、4個以上の単糖類がグリコシド結合してなる糖鎖、から選択され、一分子中に複数の糖物質が含まれる場合、それらが同じであっても、互いに異なっても良い、(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(5) 糖物質が、4個以上の単糖類がグリコシド結合した糖鎖であることを特徴とする、(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(6) 糖物質が、糖タンパク質に由来する、N結合型糖鎖、O結合型糖鎖、又はそれらの改変糖鎖であることを特徴とする、(5)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(7) 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む、N結合型糖鎖又はその還元末端改変糖鎖であることを特徴とする、(6)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

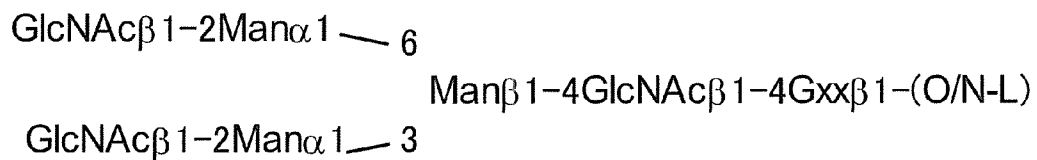
[0013] [化1]



[0014] (式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はManであり(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「AG(5)」、「AG(5-Glc)」,及び、「AG(5-Man)」という。)、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

(8) 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む糖鎖である、(7)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

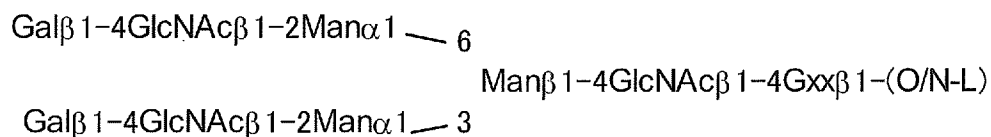
[0015] [化2]



[0016] (式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はMan(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「AG(7)」、「AG(7-Glc)」,及び、「AG(7-Man)」という。)であり、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

(9) 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む糖鎖である、(8)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0017] [化3]

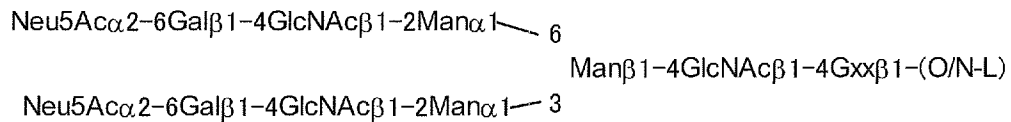


[0018] (式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はManであり(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「AG(9)」、「AG(9-Glc)」,及び、「AG(9-Man)」という。)、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

(10) 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む糖鎖である、(9)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0019]

[化4]



[0020] (式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はManであり(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「SG」、「SG(Glc)」,及び、「SG(Man)」という。)、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

(11) 糖物質において、GxxがGlcNAcである、(7)～(10)の何れかの修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(12) 糖物質がSGである、(11)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(13) 1つのhANPペプチドに対して、10個以下の糖物質が連結していることを特徴とする、(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(14) 1つのhANPペプチドに対して、1個、2個、又は、3個の糖物質が連結していることを特徴とする、(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(15) 1分子中に、2個以上のhANPペプチドを含有する、(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(16) hANPペプチドと糖物質が、リンカー構造を介して連結しており、リンカー構造が、3原子以上の連結鎖を有し、少なくとも一箇所で糖物質の還元末端とグリコシド結合し、かつ、少なくとも一箇所でhANPペプチドと結合する化学構造である(3)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(17) 糖物質が、hANPペプチドのN末端、C末端の何れか一方、又は、その両方に、リンカー構造を介して連結している(16)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(18) リンカー構造が、15原子以下の連結鎖を有する構造である(17)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(19) SG-hANP(1-28)(化合物2-1)、hANP(1-28)-SG(化合物2-2)、SG-hANP(1-28)-SG(化合物2-7)、AG(9)-hANP(1-28)(化合物2-10)、SG-triazole-hANP(1-28)(化合物2-12)、SG-thioacetamide-hANP(1-28)(化合物2-25)、AG(5)-hANP(1-28)(化合物2-26)、
又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(18)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(20) リンカー構造が、ポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸、及び、2以上のアミノ酸からなるオリゴペプチド鎖のうち、少なくとも一つの構造を含むことを特徴とする、(16)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(21) リンカー構造に含まれるポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸及び／又はオリゴペプチド鎖が、hANPペプチドのN末端及び／又はC末端とアミド結合していることを特徴とする(20)の修飾ペプチド。

(22) ポリオキシアルキレン鎖が、PEGである(21)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

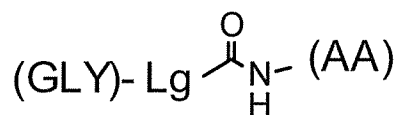
(23) SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28)(化合物2-16)、AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28)(化合物2-21)、AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28)(化合物2-22)、SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG(化合物2-24)、SG-(SG-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28)(化合物2-27)、SG-(SG-)Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28)(化合物2-28)、SG-PEG(3)-hANP(1-28)(化合物2-29)、SG-PEG(11)-hANP(1-28)(化合物2-30)、SG-*(SG-)Gln-Mal-PEG(3)-hANP(1-28)(化合物2-31) SG-(SG-)Gln-PEG(3)-Ma

l-hANP(1-28) (化合物 2-32)、SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (化合物 2-36) SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (化合物 2-37)、
 又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(21)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(24) リンカー構造が、アミノ基側鎖アミノ酸、SH側鎖アミノ酸、カルボキシル基側鎖アミノ酸、水酸基側鎖アミノ酸又はフェノール側鎖アミノ酸の少なくとも一つの官能基側鎖アミノ酸を含み、当該官能基側鎖アミノ酸の側鎖において、糖物質又はhANPペプチドと連結していることを特徴とする(20)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(25) リンカー構造が、少なくとも一つのアミノ基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式(C)の構造を有することを特徴とする(24)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0021] [化5]



[0022] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。N-(AA)はアミノ基側鎖アミノ酸の側鎖のアミノ基に由来する窒素原子を示す。)

(26) アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖アミノ基及びαアミノ基が、別のアミノ酸のαカルボキシル基とアミド結合を形成していることを特徴とする(

25) の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

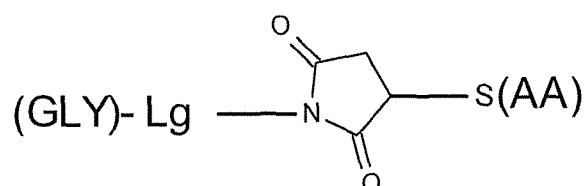
(27) アミノ基側鎖アミノ酸がLysである(25)又は(26)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(28) SG-(SG-)Lys-Gly-hANP(1-28) (化合物 2-14)、[(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (化合物 2-15)、SG-Mal- (SG-Mal-)Lys-[SG-Mal- (SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-19)、[SG₂-Mal- (SG₂-Mal-)Lys-[SG₂-Mal- (SG₂-Mal-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-20)、SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-hANP(1-28) (化合物 2-33)、SG-thioacetamide-(SG-thioacetamide-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (化合物 2-34)、SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-35)、

又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(27)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(29) リンカー構造が、少なくとも一つのSH基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式の構造を有することを特徴とする(24)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0023] [化6]



[0024] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができ

る。SはSH基側鎖アミノ酸の側鎖SH基に由来する硫黄原子を示す)。

(30) SH基側鎖アミノ酸がCysである(29)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

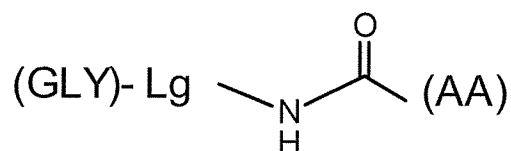
(31) [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28)(化合物2-17)、[(SG₂-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28)(化合物2-18)、

SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28)(化合物2-23)、

又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(30)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(32) リンカー構造が、少なくとも一つのカルボキシル基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該カルボン酸側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式の構造を有することを特徴とする(24)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0025] [化7]



[0026] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。COはカルボン酸側鎖アミノ酸の側鎖に由来するCOを示す)。

(33) 糖物質が、カルボキシル基側鎖アミノ酸の、側鎖カルボキシル基及びαカルボキシル基の両方に、Nグリコシド結合しており、αアミノ基を介して別のリンカー構造又はhANPペプチドと結合していることを特徴とする

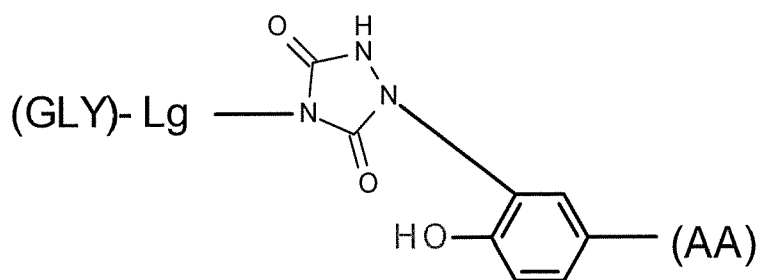
(32) の修飾ペプチド。

(34) カルボン酸基側鎖アミノ酸がGlu、Gln、Asp又はAsnである(32)又は(33)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(35) (SG-)Asn-hANP(1-28)(化合物2-3)、(SG-)Asn-hANP(2-28)(化合物2-4)、(SG-)Asn-hANP(3-28)(化合物2-8)、SG-(SG-)Asn-hANP(1-28)(化合物2-9)、SG-(SG-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28)(化合物2-13)又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(34)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(36) リンカー構造が、少なくとも一つのフェノール側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該フェノール側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式の構造を有することを特徴とする(24)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0027] [化8]



[0028] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。フェノール基はフェノール基側鎖アミノ酸の側鎖に由来するフェノール基を示す)。

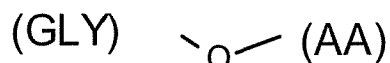
(37) フェノール基側鎖アミノ酸がTyrである(36)の修飾ペプチド、

または、その薬学上許容される塩。

(38) hANP(1-27)-(SG-)Tyr (化合物2-6) 又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(37)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(39) リンカー構造が、少なくとも一つの水酸基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該水酸基側鎖アミノ酸の側鎖にO-グリコシド結合している、以下の一般式の構造を有することを特徴とする(24)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0029] [化9]



[0030] (式中、GLYは糖物質を示し、Oは水酸基側鎖アミノ酸の側鎖水酸基に由来する酸素原子を示す)。

(40) 水酸基側鎖アミノ酸がSerである(39)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(41) (SG-)Ser-hANP(2-28) (化合物2-5)

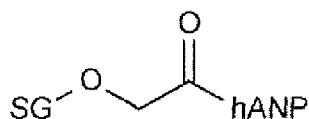
又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである(40)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(42) 糖物質として1又は2つのSG、hANPペプチドとして1つのhANP(1-28) (配列番号1)を有し、SGがhANP(1-28)のN末端に、10原子以下の連結鎖を有するリンカー構造を介して連結している、(16)～(41)の何れ

かの修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。また、ここで、本発明の修飾ペプチドの薬学上許容される塩として、好ましくは、トリフルオロ酢酸塩又は酢酸塩である。

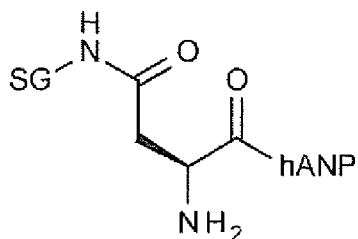
(43) 下記の化合物 2-1、2-3、2-10、2-11、2-12、2-13、2-14、2-15、2-16、2-25、2-26、2-27、2-29、又は、2-30 の式で表される構造からなる (1) の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩、

[0031] [化10]



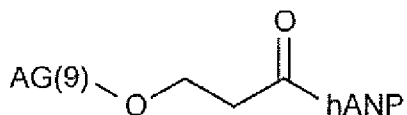
(化合物 2-1)

[0032] [化11]



(化合物 2-3)

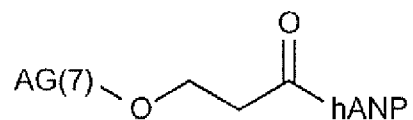
[0033] [化12]



(化合物 2-10)

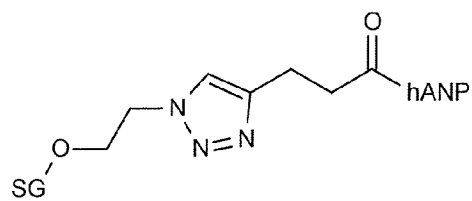
[0034]

[化13]



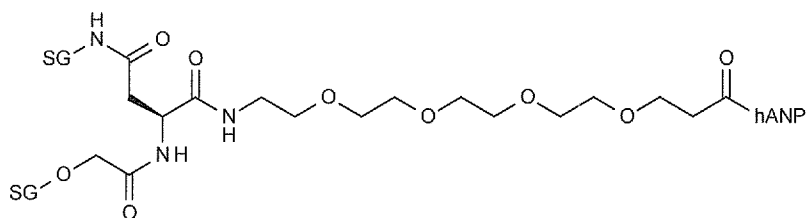
(化合物 2 - 1 1)

[0035] [化14]



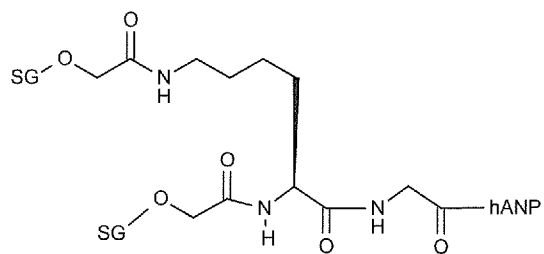
(化合物 2 - 1 2)

[0036] [化15]



(化合物 2 - 1 3)

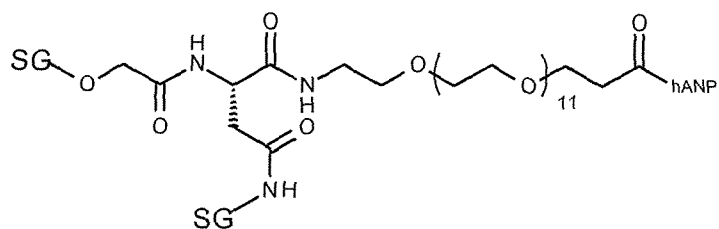
[0037] [化16]



(化合物 2 - 1 4)

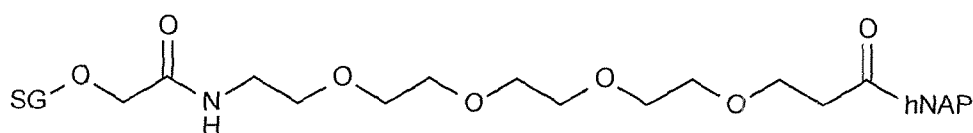
[0038]

[化21]



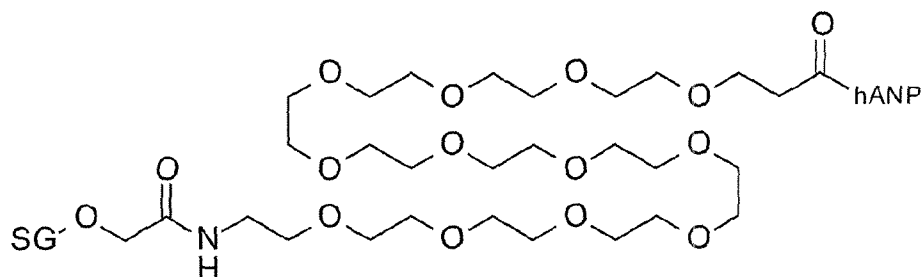
(化合物 2 - 2 7)

[0043] [化22]



(化合物 2 - 2 9)

[0044] [化23]



(化合物 2 - 3 0)

[0045] (上記式において、hANPは、配列番号1のアミノ酸配列からなるhANP(1-28)であり、当該アミノ酸配列のN末端において、リンカー構造とアミド結合している。)

(44) 薬学上許容される塩が、トリフルオロ酢酸塩若しくは酢酸塩である(1)～(43)の何れか、好ましくは、(42)又は(43)の修飾ペプチドの塩。

(45) 糖物質がhANPペプチドのアミノ酸側鎖に連結しており、当該連結されたアミノ酸がhANPペプチドに含まれる配列番号1のアミノ酸番号7～23のアミノ酸以外のアミノ酸であることをとを特徴とする、(3)の修飾ペ

プチド、または、その薬学上許容される塩。

(46) 修飾されていないhANP(1-28)と比較して延長された血中持続時間を示し、且つ、cGMP上昇活性を保持することを特徴とする(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(47) 中性エンドペプチダーゼによるhANPペプチドの分解に対して抵抗性を有することを特徴とする(1)に記載の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(48) 修飾されていないhANP(1-28)と比較して、3倍以上の水溶性を示すことを特徴とする(1)の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。

(49) (1)～(48)の何れかに記載の修飾ペプチド又はその薬学上許容される塩を含有する医薬。

(50) 循環器疾患の治療剤又は軽減剤である(49)の医薬。

(51) 有効量の(1)～(48)の何れかの修飾ペプチド又はその薬学上許容される塩を投与することを含む、循環器疾患を治療又は軽減させる方法。

(52) hANPペプチド、糖物質、及び必要に応じてリンカー分子、被転移化合物を連結させる工程を含む、(1)～(48)の何れかに記載の修飾ペプチド、又は、その薬学上許容される塩の製造方法。

(53) Endo-M又はその変異酵素を用いて、GlcNAc化合物、Glc化合物又はMan化合物に糖鎖を転移させる工程を含むことを特徴とする(52)の方法。

発明の効果

[0046] 本発明の修飾ペプチドは、修飾されていないhANP(1-28)（以下、「天然型hANP」ともいう）よりも血中持続時間が延長され、且つ、cGMP上昇活性を保持しているため、臨床において、非連続投与による薬効発現や天然型では治療効果が得られなかった疾患への適用が可能となる。また、本修飾ペプチドは、天然型hANPと比較して優れた水溶解性を示すため、製剤の高用量化や高濃度化などによる多様な投与方法への適用が可能となる。そのため、本修飾ペ

チドにより、天然型hANPでは達成できなかった、多様な医療ニーズに対応することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]図1は、SG-oxa／化合物1－12AのNMRチャートを示す。

発明を実施するための形態

[0048] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0049] 本発明は、少なくとも一つの糖物質が、直接グリコシド結合により、又は、リンカー構造を介して、少なくとも一つのhANPペプチドと連結された修飾ペプチドを提供する。本発明の修飾ペプチドは、修飾を受けないhANP(1-28)と比較して延長された血中持続時間を示し、且つ、hANP(1-28)の有するcGMP上昇活性を保持するものである。本発明の修飾ペプチドは、自然界から分離され、人工的に製造工程を管理して製造された、その構造が実質的に均一な修飾ペプチドである。本発明の修飾ペプチドには、天然に存在しうる、生体内又は培養細胞内において生理的に産生されたペプチドは含まれず、このような天然に存在する物質自体は、本発明の範囲から明確に排除される。

[0050] 本発明において、複数の構造単位（例えば、hANPペプチド、糖物質、リンカー構造など）が「連結された」とは、それぞれの構造単位が直接共有結合により結合しているか、又は、リンカー構造を介して間接的に結合されることで、同一分子中に存在していることを意味する。構造単位間を連結する化学構造は特に限定されない。直鎖状の構造で連結された場合、それぞれの構造単位を一分子に一つ含むことになる。分岐した構造により連結された場合、一分子中に何れか一方、又は、両方の構造単位を複数含んでも良い。リンカー構造とそれぞれの構造単位の間での結合様式は、特に限定されず、連結される構造単位の種類に応じた結合様式が選択される。

[0051] <hANPペプチド>

本発明において、「hANPペプチド」とは、28個のアミノ酸からなる生理活性ペプチドであるヒト型心房性ナトリウム利尿ペプチド(human Atrial Natriuretic Peptide: 配列番号1、以下hANP、又は、hANP(1-28))のアミノ

酸配列において、少なくとも7位から27位のアミノ酸を含むアミノ酸配列からなるペプチドを意味する。hANPは、細胞表面に発現するGC-A受容体（Chinkers M, et al., Nature 338;78-83, 1989）に結合し、その受容体の細胞内ドメインに存在するグアニレートサイクレースを活性化させ、細胞内のcGMP濃度を上昇させることにより、その生理活性を発揮する。天然型のhANPは、Biochem. Biophys. Res. Commun., 118巻, 131頁, 1984年に記載の α -hANPが、一般名カルペリチド（carperitide）として、日本において製造販売承認を取得し、販売（商品名：ハンプ、HANP）されている。 α -hANPは、一般的にはHuman pro-ANP [99-126]としても知られている。

[0052] hANPは、配列番号1の7位と23位のCys残基同士がジスルフィド結合し、分子内リング構造を形成する。hANPによるGC-A受容体の活性化には、このリング構造と、そのC末端側27位Arg残基までのアミノ酸が重要であることが知られている（Silver, MA, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. (2006), 15, p14-21, A. Calderone, Minerva Endocrinol. (2004), 29, p.113-127）。そのため、このリング構造からなるhANP(7-27)は、GC-Aを活性化させる最小単位であると考えられる。本発明のhANPペプチドとしては、配列番号1)において、N末端側から連続する1乃至6個のアミノ酸、及び／又は28位のアミノ酸が欠失していても良いアミノ酸配列からなるペプチドであり、好ましくは、配列番号1の1位、1位及び2位、並びに、28位のアミノ酸の少なくとも一箇所が欠失していても良いペプチドであり、より好ましくは配列番号1の1位、並びに、1位及び2位のアミノ酸が欠失しても良いアミノ酸配列からなるペプチド（hANP(2-28)、hANP(3-28)等）であり、最も好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド（hANP(1-28)）である。

[0053] 本発明の修飾ペプチドにおいて、hANPペプチドと糖物質が、リンカー構造を介さず、直接結合した修飾ペプチドの例としては、例えば、配列番号1の1位、5位、6位、25位のSer並びに、28位のTyrの側鎖の水酸基の何れか一つ又は複数、糖物質と直接O-グリコシド結合したもの、配列番号1

の26位のAsnの側鎖のアミド基と糖物質が直接N-グリコシド結合したもの（製造においては、当該箇所のアミノ酸をAspとし、還元末端をアジド化した糖物質と反応させることでアミド結合を形成することもできる）などを例示することができる。

[0054] 本発明の修飾ペプチドにおいて、hANPペプチドと糖物質がリンカー構造を介して連結する場合、以下に詳述するように多様なリンカー構造を採用して、hANPペプチドを構成するアミノ酸の側鎖の官能基、N末端及び／又はC末端連結させることができる。糖物質を連結させるhANPペプチド上の箇所として、好ましくはN末端及び／又はC末端であり、より好ましくはN末端である。

[0055] 本発明の修飾ペプチドは、一分子中に、一つのhANPペプチドを含んでいても良いし、2つ以上のhANPペプチドを含む、多価のhANP修飾ペプチドであっても良い。多価のhANP修飾ペプチドは、リンカー構造に対して複数のhANP分子が連結できるように、hANPペプチドと結合しうる官能基を複数有するリンカー分子を選択することで、適宜製造することができる。

[0056] <糖物質>

本発明において、「糖物質」とは、一つの単糖からなる構造単位、又は、2つ以上の単糖がグリコシド結合により結合された構造単位を意味する。本発明において、糖物質は“GLY”と表記することもある。また、具体的な単糖や糖鎖を、例えば、“GlcNAc-”、“SG-”のように、略号として標記することがある。構造式中でこれらの略号で記載した場合、別に定めのある場合を除き、還元末端である1位炭素原子において、リンカー構造又はhANPペプチドとO-又はN-グリコシド結合しており、当該グリコシド結合に帰属する酸素原子又は窒素原子は、特別な定義がある場合を除き、当該糖物質を表す略号には含まれないものとして標記される。

[0057] 本明細書において、糖物質の基本単位となる単糖の記載においては、別に定める場合を除き、便宜上、その環構造において、環を構成する酸素原子に結合し、且つ、水酸基（又はグリコシド結合に帰属する酸素原子）と直接結

合した炭素原子を1位（シアル酸においてのみ2位）として表記する。実施例化合物の名称は、化学構造全体として付されたものであり、このルールは必ずしも適用されない。

[0058] 糖物質に含まれる単糖としては、糖の基本構造を有するものであれば特に

限定されず、6員糖、5員糖、など様々なものを用いることができる。また、天然に存在する糖であっても、人工的に合成された糖であっても良いが、天然に存在する糖が好ましい。単糖としては、例えば、グルコース (Glu)、

フルクトース (Fru)、マンノース (Man)、ガラクトース (Gal)、グルコサミン (

Glc)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、グルクロン酸 (GluA)、ノイ

ラミニン酸 (Neu)、シアル酸/N-アセチルノイラミニン酸 (NeuNAc/Neu5Ac)

、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、キシロース (Xyl

)、イドロン酸 (IdoA)、フコース (Fuc)、アルクトリオース、グリセルア

ルヂヒト、アルドトロース、エリトロース、トレオース、アルドペント

ース、リボース、リキソース、アラビノース、アルドヘキソース、アロース、

タロース、グロース、アルブロース、イブース、クトリオース、ジヒドロ

キシアセトン、クトトロース、エリトルロース、クトペントース、キシル

ロース、リブロース、クトヘキソース、フスコース、ソルボース、タガト

ース、等を挙げることができる。

[0059] 本発明の糖物質としては、単糖が複数グリコシド結合したオリゴ糖や多糖

を用いることもできる。オリゴ糖としては、所望の数の単糖がグリコシド結

合したものであれば特に限定されないが、例えば、二糖類としては、スクロ

ース、マルトース、ラクトース、トレハロースなど、三糖類としてはマルト

トリオース、メレジトース、ラフィノース等、四糖類としてはニストース、

ニグロチトラオース、スタキオース等を挙げることができる。また、多糖と

しては、例えば、アミロース、グリコーゲン、セルロース、キチン、キトサ

ン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、デキストラン、

デキストラン硫酸、などを例示することができる。

[0060] 本発明の糖物質は、糖鎖であってもよい。「糖鎖」とは、生物内で産生さ

れ、又は、代謝により生成される、2以上の単糖がグリコシド結合した天然糖鎖、又は、天然糖鎖の構造を参考に人工的な改変を加えた改変糖鎖であっても良い。天然糖鎖は、動物、植物、微生物等に糖鎖（糖質）として、又は糖タンパク質、糖脂質として存在しており、これらから単離、精製することで取得することができる。改変糖鎖は、天然糖鎖の糖鎖構造を人工的に改変した糖鎖であり、改変の方法としては、天然由来の糖鎖において、一つ以上の単糖が、合成化学的、又は、酵素化学的に、付加、置換、及び／又は、欠失させることができ、好ましくは非還元末端の糖に応じたグリコシダーゼを用いて、非還元末端の糖を欠失させる改変である。糖鎖に含まれる単糖の数は2つ以上であれば、特に限定されないが、例えば約50個以下、約40個以下、約30個以下などで任意の数を選択することができるが、好ましくは約25個以下であり、より好ましくは約20個以下であり、さらに好ましくは約15個以下であり、さらにより好ましくは11個以下である。

[0061] 本発明の糖鎖は、直鎖型であっても分岐型であっても良い。直鎖型糖鎖とは、糖鎖に含まれる非還元末端以外の単糖の全てが、その環構造において1位炭素原子の他に一つの炭素原子のみで、直接又は置換基を介して、別の単糖の1位（シアル酸では2位）炭素原子とグリコシド結合することで直鎖状に連結した糖鎖である。

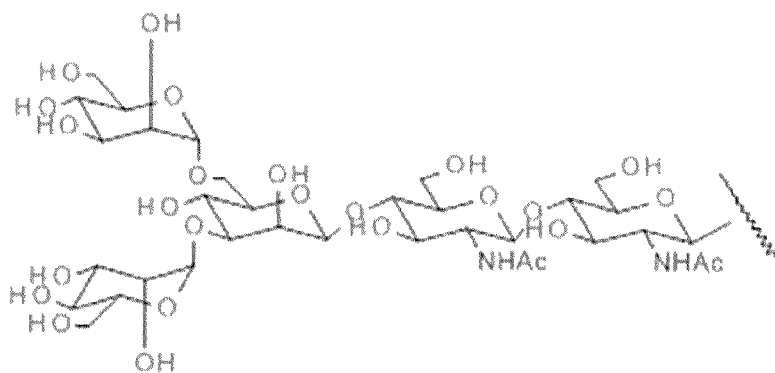
[0062] 一方、分岐型糖鎖とは、糖鎖に含まれる一つ以上の単糖が、その環構造において1位炭素原子の他に、2つ以上の炭素原子において、直接又は置換基を介して、別の単糖の1位（シアル酸では2位）炭素とグリコシド結合することで分岐した糖鎖である。糖鎖において、直鎖型でも、分岐型でも、環構造の1位炭素側の末端（還元末端）は一つの単糖であり、当該還元末端の糖の1位（シアル酸では2位）炭素は、リンカー構造又はhANPペプチドとO－又はN－グリコシド結合している。

[0063] 一方で、糖鎖の非還元末端の単糖は、1位（シアル酸では2位）の炭素以外では他の糖とグリコシド結合していない。糖鎖には、分岐の数と同数の非還元末端が存在し、糖鎖の改変は主にこの非還元末端で行われる。

[0064] 天然の糖タンパク質に含まれる糖鎖には、糖タンパク質のアスパラギンに結合しているN結合型糖鎖と、セリン又はトレオニンに結合しているO結合型糖鎖に大別され、それぞれに特徴的な基本構造を有する。天然においては、N結合型糖鎖はNグリコシド結合、O結合型糖鎖はOグリコシド結合により、タンパク質のアミノ酸側鎖と結合しているが、人工的には、いずれのグリコシド結合によっても他の化合物と結合させることができる。そのため、グリコシド結合の様式を限定するものではない。例えば、糖物質の還元末端をアジド化し、当該アジド化された糖物質とカルボキシル基を有する化合物をトリフェニルホスフィン存在下反応させることにより、糖物質に所望の構造を有する化合物をN-グリコシド結合により結合させることができる。また、糖物質をアルコールのような水酸基を有する化合物と反応させることで、所望の化合物と糖物質をO-グリコシド結合で結合させることができる。

[0065] N結合型糖鎖の基本構造は、以下の式（構造式（I））、配列式（II）で表され、この糖鎖構造からなる糖鎖をAG(5)と呼ぶものとする。

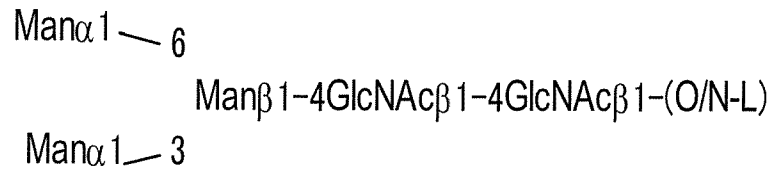
[0066] [化24]



(I)

[0067]

[化25]



(II)

[0068] (式中、“O/N-L”は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造と結合することを示す。上記式において還元末端のGlcNAcをGlc又はManに置き換えた還元末端改変糖鎖を、それぞれAG(5-Glc)、AG(5-Man)と表記する。)

N結合型糖鎖の多くは、この基本構造を有しており、その非還元末端や分岐糖においてさらに糖鎖が結合していても良い。

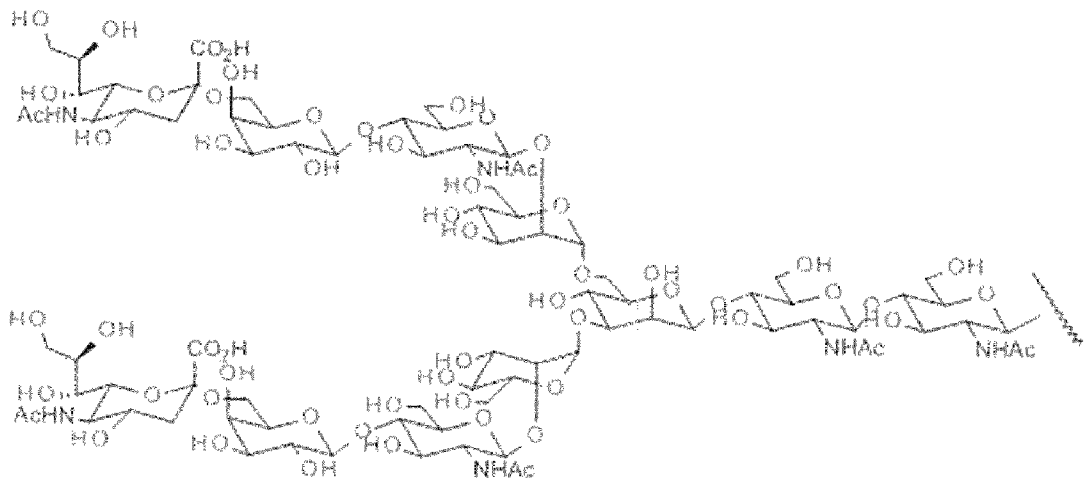
[0069] ヒト型糖鎖、又は、ヒト適合型糖鎖とは、ヒトの体内で抗原性を示さないことが知られている糖鎖であり、N結合型糖鎖では、高マンノース型、複合(コンプレックス)型、混成型などが知られている。高マンノース型は、N型基本構造の非還元末端に、複数のマンノースが連続したマンノースリッチ構造を有する糖鎖である。複合型とは、N結合型基本構造の非還元末端に、Gal β 1-4GlcNAcのモチーフ構造を有する糖鎖である。混成型糖鎖とは、N結合型基本構造の非還元末端に、Gal1 β -4GlcNAcモチーフ構造を有し、且つ、複数のマンノースからなるマンノースリッチな構造を有する糖鎖である。

[0070] <SG, AG(n)>

N結合型複合型糖鎖の代表的なものとしては、鶏卵の卵黄に含まれるシアリルグリコペプチド(Sialyl GlycoPeptide: 以下、「SGP」という)に含まれる糖鎖であり、以下の構造式(III)及び配列式(IV)で示される構造からなるシアリルグリカン(Sialyl Glycan、以下、「SG」という)を例示することができる。

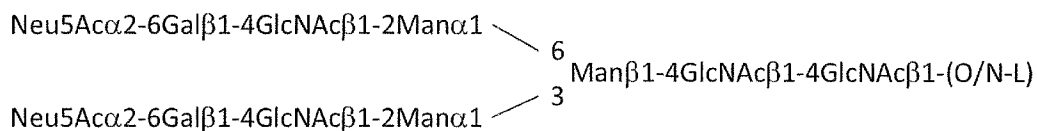
[0071]

[化26]



(III)

[0072] [化27]



(IV)

[0073] (式中、“O/N-L”は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造と結合することを示す。また、上記式において還元末端のGlcNAcをGlc又はManに置き換えた還元末端改変糖鎖を、それぞれSG(Glc)、SG(Man)と表記する。)

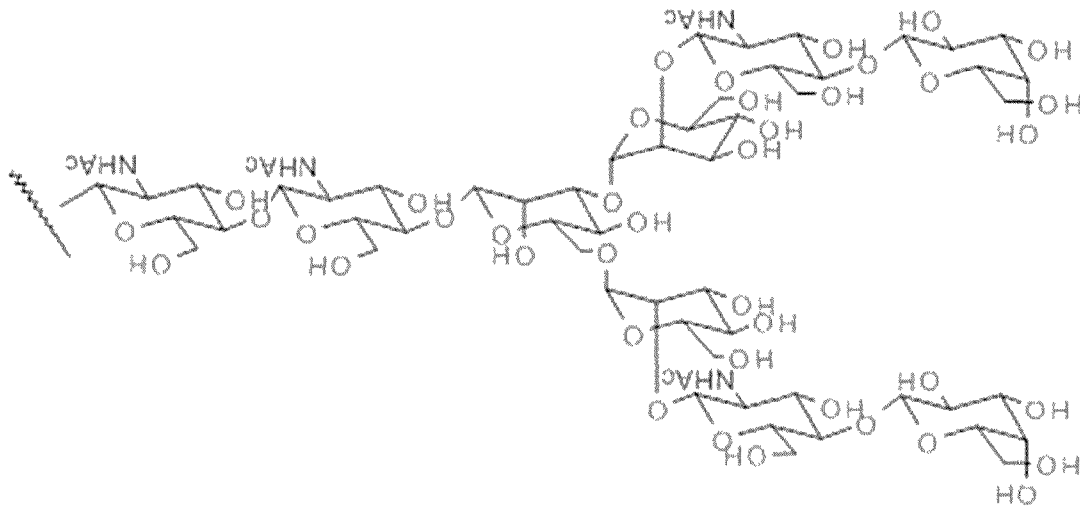
[0074] S Gは、S G Pを、後述の通り、公知の方法で酵素（Endo M、その変異体等）と反応させて、加水分解により切り出す、又は、所望の化合物に転移させて取り出すことができる。S G Pは、鶏卵の卵黄から、常法例えば、W02011/0278681に記載の方法に従って単離、精製することができる。また、S G Pの精製品が市販（東京化成（株）、（株）伏見製薬所）されており、購入することができる。

[0075] また、SGの還元末端のGlcNAcを別の糖に置き換えた、還元末端改変糖鎖を後述の糖転移反応を利用して作製することができる。SGの還元末端のGlcNAcをGlcに置き換えた還元末端改変糖鎖をSG(Glc)、Manに置き換えた還元末端改

変糖鎖をSg(Man)、とそれぞれ表記するものとする。

[0076] 本発明の糖物質として用いることができる改変糖鎖の具体例として、Sgをノイラミニダーゼ処理し、2つの非還元末端のNeu5Acを欠失させたAg(9) (以下の構造式(V)及び配列式(VI)、Ag(9)をガラクトシダーゼ処理し、2つの非還元末端のGalを欠失させたAg(7) (以下構造式(VII)及び配列式(VIII))、Ag(7)をさらにN-アセチルグルコサミニダーゼ処理し、2つの非還元末端のGlcNAcを欠失させたAg(5) (上記、N結合型基本構造からなる糖鎖)、などを例示することができる。また、上記において、Sgに代えてSgの還元末端改変糖鎖 (例えばSg(Glc)、Sg(Man)など) を採用して同様に処理すること、で、Ag(9)、Ag(7)及びAg(5)の還元末端改変糖鎖 (例えばAg(9)の還元末端のGlcNAcがGlcに置き換えられたAg(9-Glc)、Ag(9)の還元末端のGlcNAcがManに置き換えられたAg(9-Man)など) も、本発明の糖物質として採用することができる。

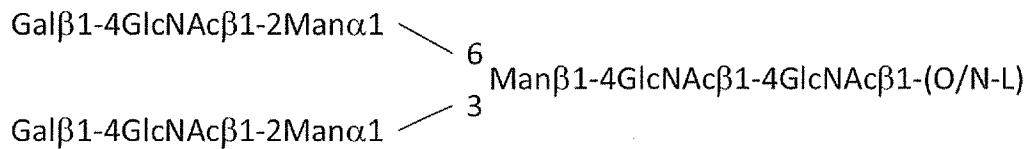
[0077] [化28]



(V)

[0078]

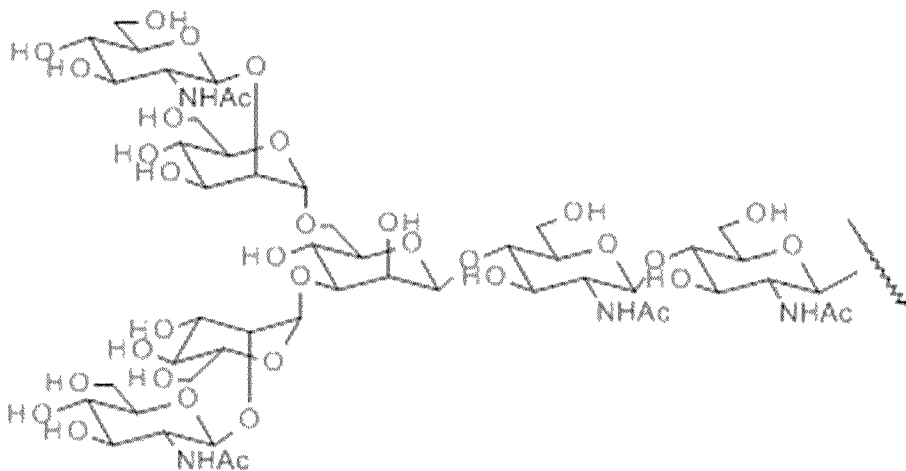
[化29]



(VI)

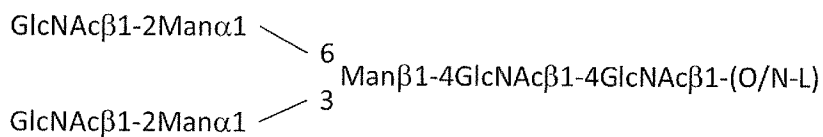
[0079] (式中、“O/N-L”は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造と結合することを示す。また、上記式において還元末端のGlcNAcをGlc又はManに置き換えた還元末端改変糖鎖を、それぞれAG(9-Glc)、AG(9-Man)と表記する。)

[0080] [化30]



(VII)

[0081] [化31]



(VIII)

[0082] (式中、“O/N-L”は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造と結合することを示す。また、上記式において還元末端のGlcNAcをGlc又はManに置き換えた還元末端改変糖鎖を、それぞれAG(7-Glc)、AG(7-Man)と表記する。)

[0083] 本発明の修飾ペプチドにおいて、一分子中に少なくとも一つの糖物質がhAN Pペプチドに連結されていれば良く、糖物質の個数の上限はないが、例えば20個以下であり、より好ましくは15個以下であり、さらにより好ましくは12個以下であり、さらにより好ましくは10個以下であり、さらにより好ましくは5個以下であり、さらにより好ましくは1個、2個、3個又は4個であり、最も好ましくは、1個又は2個である。一分子中に含まれる糖物質は、同一の構造のものであっても異なる構造の糖物質が混在いても良いが、全て同一の糖物質であることが好ましい。

[0084] 本発明において、糖物質として、天然に存在する糖タンパク質又は糖脂質に由来する糖鎖を用いる場合、当該糖鎖は、酵素を用いて、切断・単離され、又は、糖転移により所望の化合物（被転移化合物）へ転移させて、用いることができる。このような反応に用いる酵素としては、用いる糖鎖の構造に合わせて、公知の多様な酵素から選択することができる（Endo-A: Li, B., et al, J. Am. Chem. Soc. 127(2005), pp.9692-9693、Endo-F: Wei Huang., et al, ChemBioChem 12(2011), pp.932-941、Endo-D: Shu-Quan Fan, et al, J. Biol. Chem. 287(2012), pp.11272-11281、Endo-S: Wei Huang, et al, J. Am. Chem. Soc. 134(2012), pp.12308-12318.）。このような酵素の例として、例えば、エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、キトビオース構造の β グリコシド結合を加水分解する一連の酵素ファミリーとして知られており、その由来に応じて、Endo-A, Endo-D, Endo-F, Endo-M, Endo-S等が知られている。

[0085] このうち、Mucor Hiemalisに由来するEndo-Mは、N結合型基本構造を有する糖鎖において、還元末端側のGlcNAc-GlcNAcの間のグリコシド結合を加水分解する活性を有する。さらに、当該酵素は、この加水分解により切り出された、N結合型糖鎖基本構造における還元末端から2番目のGlcNAcを含む非還元末端側の糖鎖を、GlcNAc部位を有する別の被転移化合物のGlcNAcの4位に転移結合させる活性をも有する（Y. Tomabechi, et al, Bioorg. Med. Chem., 18(2010), pp.1259-1264、など参照）。さらに、EndoMを用いた同様の糖転

移反応において、被転移化合物として、GlcNAcに代えて別の糖単位（例えば、Glc、Man等）の構造を有する化合物を用いた場合にも、当該糖単位において、GlcNAcの4位に対応する位置において、同様の転移反応が進行することが知られている（Endoglycosidases - Biochemistry, Biotechnology, Application, Masahiko Endo et al. Kodansha, Tokyo(2006)）。

[0086] Endo-Mの基質となる糖鎖構造は、N結合型基本糖鎖構造を有するものであれば、高マンノース型、複合型、混成型など、多様な糖鎖を基質とすることができ、AG(5)、AG(7)、AG(9)及びSGもEndo-Mの基質となる。また、Endo-Mの変異体であるEndo-M N175Qは、Endo-Mの基質特異性、及び、糖転移活性を維持しつつ、加水分解活性を低減させた変異体であり、特に糖鎖転移反応により所望の化合物に糖鎖を結合させる場合には、Endo-M N175Qが好ましい。Endo-M N175Qを用いる場合、糖鎖供給源としては、例えば、SG-0xaのような糖鎖部分が切り出されたものを用いることもできるし、SGPのような糖ペプチド、糖タンパク質を用いても良い（Midori Umekawa et al. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 285, 2010, pp. 511-521（他の変異体の報告例も記載あり）Endo-M及びその変異酵素は、公知の方法により遺伝子工学的に製造することができる。また、Endo-M及びEndo-M N175Qは、市販の試薬として購入（販売：東京化成工業（株））することもできる。

[0087] 加水分解酵素により糖鎖を切り出して用いる場合、基質と加水分解酵素を、適切な温度、時間で反応させ、得られた反応液から糖鎖を単離することができる。

[0088] 切り出された糖鎖は、糖鎖自体として用いても良いし、その還元末端を修飾して用いても良い。例えば、還元末端にGlcNAcを有する糖鎖の場合、当該糖鎖をDMCで処理することによりGlcNAcの環構造の1位炭素原子に結合した水酸基と2位炭素原子に結合したN-アセチル基の間でオキサゾリン環を形成させた、GLY(GlcNAc)-oxa（具体的にはSG-0xaとして、単離することができる。このように切り出された糖鎖は、リンカー分子（GlcNAc化合物）への転移反応の基質として用いることで、所望の化合物に結合させることができ

る。

[0089] また、糖転移酵素により糖鎖を所望の化合物に転移させる場合、基質（糖鎖供与物質）、被転移化合物及び糖転移酵素を、適切な温度、時間で反応させ、得られた反応液から目的とする糖鎖が被転移化合物に転移・結合した糖鎖結合化合物を単離することで得られる。例えば、基質としてSGP、被転移化合物としてGlcNAc-化合物、糖転移酵素としてEndo-M N175Qを用いた場合、適量のGlcNAc化合物、当該GlcNAc化合物に含まれるGlcNAc価数に応じた用量のSGPをEndo-M-N175Q、所望により適量のDMSO存在下、20～40℃（好ましくは、20～30℃、より好ましくは22～27℃、最適には25℃）、1～10時間（好ましくは2～8時間、より好ましくは3～6時間）で振とうし、逆相HPLC（ODS, 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液として使用）を用いて精製することができる。

[0090] このような転移反応を利用して、後述する様々なGlcNAc化合物を利用して、糖鎖の還元末端に対して、アミノ基（SG-NH₂等）、カルボキシ基（SG-A等）アジド基（SG-N₃等）、マレイミド基（SG-M）、 α -ヨウ化アセチルアミド基（SG-I）などの官能基を結合させることができ、これによって、糖鎖を所望のリンカー構造と連結させることができる。

[0091] このようにして得られた糖鎖結合化合物は、直接hANPペプチドと結合させることもできるし、別のリンカー分子を介してhANPペプチドと連結させることもできる。

[0092] ここで、「被転移化合物」としては、1位炭素におけるグリコシド結合以外に修飾を受けていない糖を含み、上記糖転移反応の糖受容体として機能する化合物であれば特に限定されない。被転移化合物として、好ましくは、前記糖としてGlcNAcを含む「GlcNAc-化合物」（後で詳述する）、糖としてGlcを含む「Glc-化合物」、糖としてManを含む「Man-化合物」、などを用いることができ、最も好ましくはGlcNAc-化合物である。

[0093] <リンカー構造>

本発明においてリンカー構造とは、本発明の修飾ペプチドにおいてhANPペ

プチドと糖物質の連結を仲介する化学構造を意味する。リンカー構造は、少なくとも一箇所でhANPペプチドと結合し、少なくとも一箇所で糖物質とグリコシド結合している。

[0094] hANPペプチドとリンカー構造の結合においては、hANPペプチドのN末端のアミノ基、C末端のカルボキシル基、それぞれの構成アミノ酸の少なくとも一つの側鎖、のいずれの位置で結合しても良く、結合箇所は、一箇所でも、複数箇所でも良い。アミノ酸側鎖に結合する場合、配列番号1の1位、5位、6位、25位のSer並びに、28位のTyrの側鎖の水酸基、26位のAsnの側鎖のアミド基などに、それぞれの官能基に応じた官能基を有する所望の化合物を結合させることができる。

[0095] 本発明の修飾ペプチド又はその部分構造の表記において、アミノ酸又はペプチドは、特別な記載がない限り、左側にN末端（アミノ基）、右側にC末端（カルボキシル基）となるように表記する。アミノ酸又はペプチドの右に“*”を付けて記載する場合（例えば、Gln*）、前記のルールを逆転させ、左側にC末端、右側にN末端となることを示すものとする。

[0096] また、アミノ酸について標記する場合、中心となる炭素原子（ α 炭素）に直接結合した、アミノ酸として必須の構造である、アミノ基及びカルボキシル基を、それぞれ「 α アミノ基」及び「 α カルボキシル基」と表記するものとする。

[0097] hANPペプチドのN末端（アミノ基）又はC末端（カルボキシル基）の少なくとも一方で糖物質と連結する場合、hANPペプチドとリンカー構造はアミド結合する。hANPペプチドのN末端において糖物質とリンカー構造を介して連結した修飾ペプチドは、以下のように表記するものとする。

[0098] GLY-L-hANP (A)

（式中、GLYは糖物質を示し、Lは、直鎖又は2つ以上に分岐したリンカー構造を示し、hANPはhANPペプチドを示す。Lは、GLYとO-又はN-グリコシド結合しており、Lが分岐している場合分岐末端と同数のGLYが連結することができる。Lは、hANPペプチドのN末端とアミド結合している。）

[0099] 本明細書において、修飾ペプチド又はその部分構造の表記において、アミノ酸又はペプチドがそのN末端のアミノ基において他のリンカーと連結する場合、連結される構造単位を表す記号は当該ペプチド又はアミノ酸を表す記号の左側に、ハイフンを付けて、括弧を付けずに記載され、この場合のハイフンはペプチド又はアミノ酸のアミノ基とリンカー構造の有するカルボキシル基の間で形成されるアミド結合を表すものとする。例えば、Asnのアミノ基にSGが連結した構造は、”SG-Asn”として表記される。

また、hANPペプチドのC末端においてリンカー構造を介して糖物質と連結した修飾ペプチドは、以下のように表記するものとする。

[0100] hANP-L-GLY (B)

(式中、GLYは糖物質を示し、Lは、直鎖又は2つ以上に分岐したリンカー構造を示し、hANPはhANPペプチドを示す。Lは、GLYとO-又はN-グリコシド結合しており、Lが分岐している場合分岐末端と同数のGLYが連結することができる。Lは、hANPペプチドのC末端とアミド結合している。)

[0101] すなわち、本明細書における修飾ペプチド又はその部分構造の表記において、アミノ酸又はペプチドがそのC末端のカルボキシル基において別の構造単位と連結する場合、連結される構造単位を表す記号は、当該アミノ酸又はペプチドを表す記号の右側にハイフンを付けて、括弧を付けずに記載され、この場合のハイフンはペプチド又はアミノ酸のC末端カルボキシル基とリンカー構造の有するアミノ基（又はアジド基）の間で形成されるアミド結合を表すものとする。例えば、Tyrのカルボキシル基にSGが連結した構造は、”Tyr-SG”として表記される。

[0102] また、本発明において、hANPペプチドのN末端及びC末端の両方に糖物質が連結した修飾ペプチドは、上記のルールに従い、以下の式Cのように表記される。

[0103] GLY-L1-hANP-L2-GLY (C)

(式中、GLYは糖物質を示し、L1及びL2は、同一でも、異なっても良く、直鎖又は2つ以上に分岐したリンカー構造を示し、hANPはhANPペプチドを示

す。L1及びL2は、GLYとO-又はN-グリコシド結合しており、L1又はL2が分岐している場合分岐末端と同数のGLYが連結することができる。L1及びL2は、hANPペプチドのN末端及びC末端の両方とアミド結合している。)

[0104] さらに、本発明の修飾ペプチド又はその部分構造において、アミノ酸の側鎖において糖物質と連結した場合の部分構造は、以下の式Dのように表記するものとする。

[0105] (GLY-)AA (D)

(式中、GLYは糖物質を示し、A.Aは任意のアミノ酸を示し、当該アミノ酸の側鎖は、直接又はリンカー構造を介して、GLYとO-又はN-グリコシド結合している。)

[0106] すなわち、本明細書における修飾ペプチド又はその部分構造の表記において、アミノ酸又はペプチドが側鎖の官能基において別の構造単位と連結する場合、連結される構造単位を表す記号は、連結されるアミノ酸を表す記号の左側にハイフン及び括弧を付けて記載される。この場合のハイフンは糖物質の還元末端におけるグリコシド結合を含む化学構造を示す。この場合の連結が、リンカー構造を介する場合、当該リンカー構造に特徴的な構造を明記する場合もある(例えば、(SG-PEG(3)-)Asnなど)が、特徴的な構造を有しない場合又はリンカー構造を特定して記載しない場合には省略して(例えば、(SG-)Lys等)記載する場合もある。なお、実施例化合物の名称は、併記されている構造式からなる具体的な化合物を表すものである。

[0107] このようなルールに従い、Lysの側鎖アミノ基と α アミノ基の両方にSGが連結した部分構造は、"SG-(SG-)Lys"のように表記される。また、同様にGluの側鎖カルボキシル基と α カルボキシル基の両方にSGが連結した部分構造は、"(SG-)Gln-SG"又は"SG-(SG-)Gln*" (Asp及びGluは、側鎖のカルボキシル基がアミド結合を形成した場合、Asn/Glnと同じ構造となる。Gln*は、左側がカルボキシル基、右側がアミノ基であることを示す)として表記される。

[0108] また、一分子中にhANPペプチドが複数含まれる場合には、個別の表記方法

を採用する。例えば、Lysの α カルボキシル基に糖物質が連結し、 α アミノ基と側鎖アミノ基の両方に、それぞれ、PEGリンカーを介してhANPペプチドのN末端が連結している場合、”GLY-Lys*(-PEG-hANP)₂”のように表記するものとする。

[0109] 糖物質とリンカー構造は、糖物質の還元末端の1位炭素において、N-又はO-グリコシド結合で結合される。このときのグリコシド結合の立体配置は α 位及び β 位のいずれを選択しても良く、公知の方法に従い (Tomoya Ogawa, et al, Agric. Biol. Chem. 47(1983), pp.281-285., Mamoru Mizuno, et al, 121(1999), pp.284-290.)、いずれかの結合様式を選択的に合成することができる。天然の糖タンパク質に由来する糖鎖を用いる場合、当該糖鎖の天然型での結合様式と同じ様式を選択することが望ましく、例えば、糖物質がSG又はその改変糖鎖である場合、リンカー構造とのグリコシド結合には β 位を選択することが望ましい。

[0110] 本明細書において、糖物質を記号（例えば、GLY、SG、GlcNAc等）として記載する場合、別に定義される場合を除き、還元末端の炭素までを、当該記号に含めるものとし、N-又はO-グリコシド結合に帰属するN又はOは、当該記号には含まれないものとする。また、同様に、hANPペプチドを記号（例えば、hANP、hANP(1-28)など）として表記する場合は、原則としてN末端のNH、及び、C末端のC=Oは、当該記号に含まれるものとして表記される。また、特に断りが無い限り左側がN末端、右側がC末端として表記される。すなわち、修飾を受けないhANPペプチドは、H-hANP-OHとして表記される。

[0111] 本発明の修飾ペプチドに含まれるリンカー構造の化学構造は、少なくとも一つの糖物質とグリコシド結合する酸素原子又は窒素原子、及び、少なくとも一つのhANPペプチドと結合する部分構造（アミド結合で結合する場合、NH又はC=O、hANPペプチドの側鎖に連結する場合各側鎖の構造に応じた構造（後述））を有する。それ以外の構造は限定されず、単一の分子に由来するものであっても良く、複数の分子を結合させた、複数の部分構造からなる

ものであっても良い。このような、リンカー構造の由来となる分子を「リンカー分子」という。複数の部分構造を含む場合、それらの部分構造を、当該部分構造に合わせて“Lx”のように記載することがある。例えば、糖物質と直接結合する部分構造は、“Lg”と表記され、当該部分構造は、hANPペプチドと直接結合する構造を含まないが、それ以外の点においてはリンカー構造に適用される定義を全て充足するものである。また、hANPペプチドと直接結合する部分構造は、“Lp”と表記され、糖物質とのグリコシド結合に帰属する構造を除き、リンカー構造に適用される全ての定義を充足するものである。

[0112] 本発明のリンカー構造において、グリコシド結合に帰属するN又はOとhANPペプチドと直接結合する原子（アミド結合する場合、当該アミド結合に帰属するN又はC）を最短でつなぐ原子鎖を「連結鎖」という。連結鎖には、上記結合に帰属するそれぞれの原子を含む。例えば、(GLY)-O-CH₂-C(=O)-(N term hANP)で表される修飾ペプチドでは、3原子の連結鎖からなるリンカー構造を有する。また、(GLY)-NH-C(=O)-CH₂-CH₂-NH-(C term hANP)で表される修飾ペプチドは、5原子の連結鎖からなるリンカー構造を有することになる。本発明のリンカー構造は、3原子以上の連結鎖を有するものであれば特に限定されないが、例えば200原子以下の連結鎖であることができ、好ましくは約150原子以下の連結鎖であり、より好ましくは100原子以下の連結鎖であり、さらにより好ましくは70原子以下、50原子以下又は30原子以下の連結鎖であり、最も好ましくは20原子以下、15原子以下又は10原子以下の連結鎖である。このようなリンカー構造を形成するには複数のリンカー分子を用いることで複雑な、長い連結鎖のリンカー構造を作り出すことができるが、好ましくは、5個以下のリンカー分子を採用したものであり、好ましくは、4、3、2又は1つのリンカー分子を用いたリンカー構造を含む修飾ペプチドである。

[0113] 本発明のリンカー構造が、一つのリンカー分子に由来する場合、当該リンカー分子は、一分子中に、糖物質とグリコシド結合する官能基、及び、hANP

ペプチドと結合する官能基の両方を含む化合物であり、例えばアミノ酸やペプチドなどは、アミノ基とカルボキシル基を有するため好ましく、さらに側鎖にアミノ基、カルボキシル基、水酸基などを有するアミノ酸はさらに好ましい。このようなリンカー分子の具体例としては、例えば、 $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 、 $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、リジンなどを例示することができる。

[0114] 本発明のリンカー構造が、複数のリンカー分子に由来する場合、当該リンカー分子としては、少なくとも、糖物質とグリコシド結合できる官能基を含む化合物、及び、hANPペプチドと結合できる官能基を有する化合物が用いられる。この2つの化合物が直接結合できる官能基をさらに有していれば、直接結合することもできるし、さらに別の化合物を仲介して連結されていてもよい。このようなリンカー分子同士の結合には、公知の方法を適用することができ、特に限定されるものではないが、例えば、アミノ基とカルボキシル基によるアミド結合、SH基とマレイミド基の結合、SH基とヨードアセチル基との結合、フェノール基とトリアゾールジオン基の結合、(Hitoshi Ban, et al, 132(2010), 1523-1525.)。アルコールとカルボキシル基によるエステル結合、アジド基とアセチレン基のHusgen反応による結合等を例示することができる。本発明で採用されるリンカー分子としてはこれらの結合様式に合致した官能基を有するものを適宜選択して、リンカー構造の形成に用いることができる。

[0115] 本発明の修飾ペプチドは、全体として一定の親水性を示す必要があるため、リンカー構造が一定以上の大きさを有する場合、親水性の高い構造のものを採用することが好ましい。そのような構造の例として、例えば、ポリオキシアルキレン、ポリアミド《他の生物学的に適用される繰り返し構造》等が挙げられる。

[0116] ポリオキシアルキレンとしては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコール、ポリビニルアルコール(PVA)などを例示することができるが、好ましくはPEGであ

る。本明細書で、PEGを含むリンカー構造を表記する場合、エトキシの繰り返し回数をPEG(3)、PEG(11)のように記載する。このような構造を有する修飾ペプチドとしては、例えば、化合物2-13、2-27乃至2-34等を例示することができる。

[0117] また、本発明のリンカー構造には、アミノ酸、又は、2以上のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチド鎖を含んでいても良い。このようなアミノ酸、又は、オリゴペプチド鎖は、hANPペプチドのN末端又はC末端と直接アミド結合して、hANPペプチドのペプチド鎖が延長された構造をとることができる。また、hANPペプチドとは、ペプチド以外の構造を介して連結していても良く、それらの構造を両方有していても良い。

[0118] 本発明のリンカー構造に含まれるアミノ酸としては、同一の炭素に水素原子、アミノ基及びカルボキシル基が結合した、アミノ酸構造を有する限り、特に限定されず、天然型のアミノ酸であってもよく、人工のアミノ酸であっても良い。人工のアミノ酸としては、Dアミノ酸のように合成的に製造されたアミノ酸であってもよく、天然型アミノ酸の側鎖が人工的に修飾された改変アミノ酸であっても良いが、好ましくは、天然型アミノ酸、又は、改変アミノ酸であり、より好ましくは天然型アミノ酸である。本発明の修飾ペプチドが医薬の有効成分として利用される場合、リンカー構造に含まれるアミノ酸は、それ自体で固有の生物活性を有しないことが好ましく、Gly又はアミノ酸側鎖が別の構造と結合されたアミノ酸を採用することが好ましい。このようなアミノ酸を含むリンカー構造の例としては、Gly又は2以上のGlyからなるオリゴGlyを含み、N末端及びC末端でhANPペプチド及び糖物質と連結しているものを挙げることができる。このような修飾ペプチドの具体例としては、例えば、糖物質としてSG(Glc)を採用し、リンカーとしてGlyを含む化合物2-40などを挙げることが出来る。

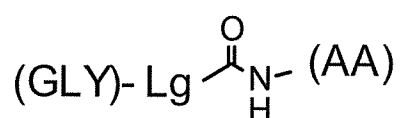
[0119] 側鎖構造を有するアミノ酸としては、例えば、Lysのように側鎖にアミノ基を有する「アミノ基側鎖アミノ酸」、Cysのように側鎖にSH基を有するSH基側鎖アミノ酸、アスパラギン酸やグルタミン酸のような側鎖にカルボキシ

ル基を有するカルボキシル基側鎖アミノ酸、セリンのように側鎖に水酸基を有する水酸基側鎖アミノ酸、チロシンのように側鎖にp-フェノール基を有するフェノール側鎖アミノ酸などを採用することができる。これらの側鎖構造を有するアミノ酸においては、 α 炭素に結合したアミノ基及びカルボキシル基並びに側鎖の官能基の3点で連結することができるため、分岐したリンカー構造を形成するためには、これら側鎖構造を有するアミノ酸を少なくとも一つ含むことが好ましい。

[0120] アミノ基側鎖アミノ酸とは、側鎖にアミノ基（アミド基を除く）を少なくとも一つ有するアミノ酸であれば特に限定されないが、天然アミノ酸としてはLysである。人工アミノ酸としては、例えば、Glu又はAspの側鎖カルボキシル基に1,2-ジアミノエタンのような2価アミンを反応させた改変アミノ酸などを例示することができる。

[0121] リンカー構造が、少なくとも一つのアミノ基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖に連結する場合、以下の一般式の部分構造を有することができる。

[0122] [化32]



[0123] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。N-(AA)はアミノ基側鎖アミノ酸の側鎖のアミノ基に由来する窒素原子を示し、(AA)は、アミノ酸基本構造及び側鎖アミノ基に連結する構造部分を含む。)

[0124] このような部分構造を有するリンカー構造は、アミノ基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、カルボキシル基に保護基を導入し、次いで“GLY-Lg-COOH”で表されるリンカー分子を反応させ、カルボキシル基を

脱保護して、hANPペプチド、又はLpと結合させることによって製造することができる。この反応において、アミノ基側鎖アミノ酸の α -アミノ基がフリーである場合、Lgは、側鎖のアミノ基と α アミノ基の両方にアミド結合することで分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。たとえば、SG-(SG-)Lysのような部分構造を有する修飾ペプチドである。このような化合物の具体例としては、化合物2-14、2-35などを例示することができる。

[0125] また、同様の製造において、Lg（-糖物質）とLp（-hANPペプチド）を入れ替えることで、アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖にhANPペプチドが連結した部分構造を有する修飾ペプチドを製造することができる。このような部分構造は、アミノ基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、カルボキシル基に保護基を導入し、次いで“Lp-COOH”で表されるリンカー分子を反応させ、カルボキシル基を脱保護して、当該カルボキシル基にLg又は糖物質を結合させることによって製造することができる。この反応において、アミノ基側鎖アミノ酸の α -アミノ基がフリーである場合、Lpは、側鎖のアミノ基と α アミノ基の両方にアミド結合することで分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。たとえば、Lp-(Lp-)Lys-Lgのような部分構造を有する修飾ペプチドである。このような化合物の具体例としては、化合物2-38、2-39などを例示することができる。さらに、他の多様な構造を有するリンカー分子と組み合わせて採用することで、一分子中に複数の糖物質及び／又は複数のhANPペプチドを含むような修飾ペプチドを、適宜製造することが可能である。

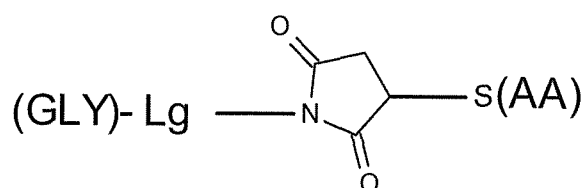
[0126] また、アミノ基側鎖アミノ酸同士を、側鎖アミノ基と α アミノ基のそれぞれに、同じアミノ基側鎖アミノ酸の α カルボキシル基とアミド結合を形成させることを繰り返すことで、多数のアミノ基を有する構造が形成され、当該構造とLgを結合させることで、アミノ基と同数の糖物質を連結させたリンカー構造を形成することが可能である。例えばこのような分岐したペプチドの複数のアミノ基に、カルボキシル基を有する糖鎖を、例えばHATUのよう

な縮合剤を用いて反応させることで、複数の糖鎖を分岐ペプチドを介して導入することが出来る。このようにして製造される修飾ペプチドとして、例えば、” SG-[SG-(SG-)Lys-]Lys”、 ” SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys-]Lys” のようなリンカー構造が挙げられる。このような修飾ペプチドの具体例としては、化合物 2-14、2-35 を例示することができる。

[0127] SH基側鎖アミノ酸とは、側鎖にSH基を少なくとも一つ有するアミノ酸であれば特に限定されないが、天然アミノ酸としてはCysである。人工アミノ酸としては、例えば、Lysの側鎖アミノ基に例えばHOOC-R-STr（トリチルスルフィド）構造を有する化合物を反応させる、又は、Glu又はAspの側鎖カルボキシル基に例えばH₂N-R-STr構造を有する化合物を反応させて得られる、SH基を有する改変アミノ酸などを例示することができる。

[0128] リンカー構造が、少なくとも一つのSH基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該SH基側鎖アミノ酸の側鎖に連結する場合、以下の一般式の部分構造を有することができる。

[0129] [化33]



[0130] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。SはSH基側鎖アミノ酸の側鎖SH基に由来する硫黄原子を示し、(AA)は、アミノ酸基本構造及び側鎖アミノ基に連結する構造部分を含む。)

[0131] このような部分構造を有するリンカー構造は、SH基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、(GLY)-Lg-N maleimideで表されるリンカー分子を反応させることによって製造することができる。この反応において、SH基側鎖アミノ酸のα-アミノ基及び／又はαカルボキシル基において

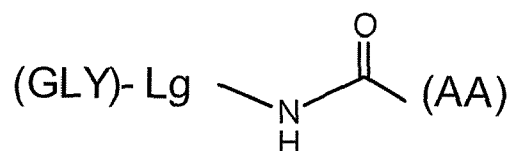
、別の糖物質と連結させることができ、それによって分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。例えばこのような分岐したペプチドの複数のアミノ基に、SH基が保護された3-メルカプトプロピオン酸を反応させ、ペプチドのC末端を脱保護しhANPペプチドに結合させた後、SH基を脱保護し、マレイミド基を有する糖鎖を0.2Mリン酸緩衝液（pH 6.75）中で反応させることで、複数の糖鎖を分岐ペプチドを介して導入することが出来る。このような化合物の具体例としては、化合物2-19、2-20、2-23等が挙げられる。

[0132] また、同様の製造において、Lg（-糖物質）とLp（-hANPペプチド）を入れ替えることで、SH基側鎖アミノ酸の側鎖にhANPペプチドが連結した部分構造を有する修飾ペプチドを製造することができる。さらに、他の多様な構造を有するリンカー分子と組み合わせてさいようすることで、一分子中に複数の糖物質及び／又は複数のhANPペプチドを含むような修飾ペプチドを、適宜製造することが可能である。

[0133] カルボキシル基側鎖アミノ酸とは、側鎖にカルボキシル基を少なくとも一つ有するアミノ酸であれば特に限定されないが、天然アミノ酸としてはAsp又はGluである。人工アミノ酸としては、例えば、Lysの側鎖アミノ基にマレイン酸のような2価カルボン酸を反応させた改変アミノ酸などを例示することができる。

[0134] リンカー構造が、少なくとも一つのカルボン酸基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該カルボン酸基側鎖アミノ酸の側鎖に連結する場合、以下の一般式の部分構造を有することができる。

[0135] [化34]



[0136] （式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合され

ており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。C Oはカルボン酸側鎖アミノ酸の側鎖に由来するC Oを示し、(A A)は、アミノ酸基本構造及び側鎖アミノ基に連結する構造部分を含む。)

[0137] このような部分構造を有するリンカー構造は、カルボキシル基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、必要に応じてアミノ基に保護基を導入し、次いで” Lg-NH₂” で表されるリンカー分子を反応させた後、アミノ基を脱保護し、L gまたはhANPペプチドのC末端と結合させることによって製造することができる。この反応において、カルボキシル基側鎖アミノ酸の α -カルボキシル基がフリーである場合、L gは、側鎖のカルボキシル基と α カルボキシル基の両方にアミド結合することで分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。例えばこのように分岐した複数のカルボキシル基を持つペプチドにトリフルオロ酢酸無水物とN-ヒドロキシスクシイミドを用いてカルボン酸を活性化し、アミノ基を持つ糖鎖(SG-NH₂等)を反応させることで複数の糖鎖を分岐ペプチドを介して導入することが出来る。このような部分構造としては、例えば、カルボキシル基側鎖アミノ酸としてGluを用いてSGと連結させた場合、” -(SG(Lg)-)Gln-(Lg) SG” で表される(Glu及びAspの側鎖がアミド結合を形成することから、この場合Gln/Asnと同じ構造となるため)。このような修飾ペプチドの具体例としては、化合物2-31, 2-32などを例示することができる。

[0138] また、同様の製造において、Lg(糖物質)とLp(hANPペプチド)を入れ替えることで、カルボキシル基側鎖アミノ酸の側鎖にhANPペプチドが連結した部分構造を有する修飾ペプチドを製造することができる。このような部分構造を有するリンカー構造は、カルボキシル基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、必要に応じてアミノ基に保護基を導入し、次いで” (hANP)-Lp-NH₂” で表されるリンカー分子を反応させた後、アミノ基を脱保護し、適切な官能基を有するLgと結合させることによって製造することができる。この反応において、カルボキシル基側鎖アミノ酸の α -カルボキシル基がフリーである場合、L pは、側鎖のカルボキシル基と α カルボキシル基の

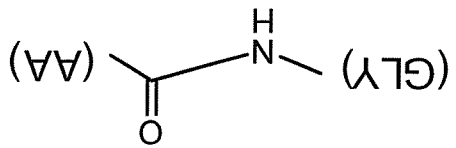
両方にアミド結合することで分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。例えばこのように分岐した複数のカルボキシル基を持つペプチドにトリフルオロ酢酸無水物とN-ヒドロキシスクシイミドを用いてカルボン酸を活性化し、アミノ基を持つLp又はhANPペプチドのN末端アミノ基を反応させることで複数のhANPペプチドを分岐ペプチドを介して導入した、多価hANPの修飾ペプチドを製造することができる。このような部分構造としては、例えば、カルボキシル基側鎖アミノ酸としてGluを用いてhANPと連結させた場合、“SG Gln-(Lp-hANP)₂”で表される(Glu及びAspの側鎖がアミド結合を形成することから、この場合Gln/Asnと同じ構造となるため)。さらに、他の多様な構造を有するリンカー分子と組み合わせることで、一分子中に複数の糖物質及び/又は複数のhANPペプチドを含むような修飾ペプチドを、適宜製造することが可能である。

[0139] また、カルボキシル基側鎖アミノ酸同士を、側鎖カルボキシル基と α カルボキシル基のそれぞれに、別のカルボキシル基側鎖アミノ酸(同じ種類でも異なっても良いが、同種類であることが好ましい)の α アミノ基とアミド結合を形成させることを繰り返すことで、多数のカルボキシル基を有する構造が形成され、当該構造とLgを上記の反応で結合させることで、カルボキシル基と同数のLgを連結させたリンカー構造を形成することが可能である。このようなリンカー構造の部分構造としては、例えば、“H-[(SG-)Gln-SG]

Gln-SG”などである。

[0140] さらに、カルボキシル基側鎖アミノ酸のカルボキシル基には、糖物質をNグリコシド結合によって直接連結させ、以下の部分構造を形成させることができる。

[0141] [化35]



[0142] (式中、GLYは糖物質を示し、NH-CO-(AA)はカルボキシル基側鎖ア

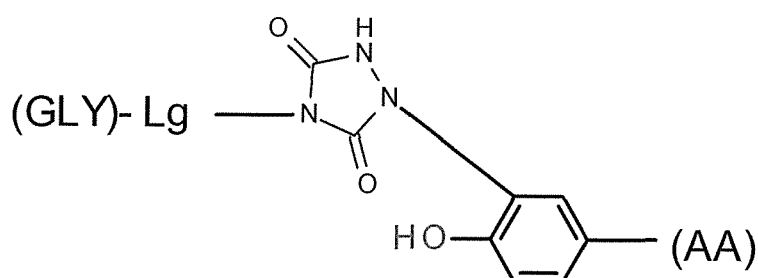
ミノ酸の側鎖に由来するアミド構造を示し、(AA)は、アミノ酸基本構造及び側鎖アミノ基に連結する構造部分を含む。)

[0143] このような部分構造は、カルボン酸側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、還元末端をアジド化した糖物質を、トリフェニルホスフィン存在下で反応させ、糖物質の還元末端と側鎖をN-グリコシド結合させることによって製造することができる。また、実施例に準じた方法によって、カルボキシル基側鎖アミノ酸の α -カルボキシル基に糖r物質を連結させた構造を有する化合物を合成することができる。糖このような修飾ペプチドの具体例としては、化合物2-3、2-4、2-8、2-9、2-13、2-21、2-22、2-27、2-28、2-38、2-39等が挙げられる。

[0144] フェノール基側鎖アミノ酸とは、側鎖にp-フェノール基を少なくとも一つ有するアミノ酸であれば特に限定されないが、天然アミノ酸としてはTyrである。人工アミノ酸としては、例えば、Glu又はAspの側鎖カルボキシル基にp-アミノフェノールを反応させた改変アミノ酸などを例示することができる。

[0145] リンカー構造が、少なくとも一つのフェノール基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ酸の側鎖に連結する場合、以下の一般式の部分構造を有することができる。

[0146] [化36]



[0147] (式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。フェノール基はフェノール側鎖アミノ酸の側鎖に由来するフェノール基

を示し、(AA)は、アミノ酸基本構造及び側鎖アミノ基に連結する構造部分を含む。)

[0148] このような部分構造を有するリンカー構造は、フェノール基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、(GLY)-Lg-N triazoledione(*)で表されるリンカー分子を反応させることによって製造することができる。この反応において、フェノール基側鎖アミノ酸の α -アミノ基及び／又は α カルボキシル基において、別の糖物質と連結させることができ、それによって分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。例えばトリアゾールジオン構造を持つGlcNAcをN-ブロモスクシイミドで活性化し、hANPと反応させることでhANPの28位にあたるTyrのフェノール側鎖にGlcNAc構造を選択的に導入でき、これを足がかりに糖鎖転位反応を行うことができる。このような化合物の具体例としては、化合物2-6等が挙げられる。

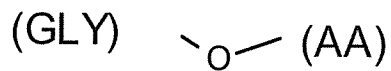
[0149] 水酸基側鎖アミノ酸とは、側鎖に水酸基を少なくとも一つ有するアミノ酸であれば特に限定されないが、天然アミノ酸としてはSer又はTyrである。人工アミノ酸としては、例えば、Asp又はGluの側鎖カルボン酸に2-アミノエタノールのようなアミノアルコールを反応させて得られる改変アミノ酸などを例示することができる。

[0150] また、同様の製造において、Lg(糖物質)とLp(hANPペプチド)を入れ替えることで、フェノール基側鎖アミノ酸の側鎖にhANPペプチドが連結した部分構造を有する修飾ペプチドを製造することができる。さらに、他の多様な構造を有するリンカー分子と組み合わせて採用することで、一分子中に複数の糖物質及び／又は複数のhANPペプチドを含むような修飾ペプチドを、適宜製造することが可能である。

[0151] リンカー構造が、少なくとも一つの水酸基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ酸の側鎖に連結する場合、以下の一般式の部分構造を有することができる。

[0152]

[化37]



[0153] (式中、GLYは糖物質を示し、Oは水酸基側鎖アミノ酸の側鎖水酸基に由来する酸素原子を示し、(AA)は、アミノ酸基本構造及び側鎖アミノ基に連結する構造部分を含む。)

[0154] このような部分構造を有するリンカー構造は、水酸基側鎖アミノ酸、又は、それを含むリンカー分子に対し、糖物質をO-グリコシド結合を形成する条件下で反応させることによって製造することができる。この反応において、水酸基側鎖アミノ酸の α -アミノ基及び／又は α カルボキシル基において、別の糖物質と連結させることができ、それによって分岐構造を有するリンカー構造を形成することができる。例えばトリクロロアセトイミデート構造を持つグルコサミン誘導体にトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル存在下、セリンの側鎖水酸基を反応させた後数工程経ることで、O-グリコシド結合を介してセリン側鎖にGlcNAcを導入でき、これを足がかりに糖鎖転位反応を行うことができる。このような修飾ペプチドの具体例としては、化合物2-5等が挙げられる。

[0155] また、同様の製造において、Lg(糖物質)とLp(hANPペプチド)を入れ替えることで、水酸基側鎖アミノ酸の側鎖にhANPペプチドが連結した部分構造を有する修飾ペプチドを製造することができる。さらに、他の多様な構造を有するリンカー分子と組み合わせて採用することで、一分子中に複数の糖物質及び／又は複数のhANPペプチドを含むような修飾ペプチドを、適宜製造することが可能である。

[0156] このような側鎖構造を有するアミノ酸を複数含むオリゴペプチドを含むリンカー分子、又は、それぞれのアミノ酸を一つ以上含む複数のリンカー分子、を用いて上記の種々の反応を行うことで、含まれる官能基側鎖と同数以上の糖物質を連結させることができる。、このようなオリゴペプチドとしては、上記の側鎖を有するアミノ酸が含まれる限り特に限定されないが、一定数

のGlyをさらに含んでいてもよく、それらが規則的に並んだ繰り返し配列であることが好ましい。例えば、側鎖を有するアミノ酸をXaaとした場合、(Xaa-Gly m)ⁿ (m、nは、互いに独立して、1以上の自然数を示す)で表されるオリゴペプチドであることが好ましい。n、mは、それぞれ特に上限は無いが、好ましくは、10以下であり、より好ましくは7以下であり、mについてはさらに3以下であることが好ましい。具体的なオリゴペプチドとしては、(Cys-Gly)³、(Cys-Gly)⁵、(Lys-Gly-Gly)³、(Tyr-Gly-Gly-Gly)³等を例示することができるが、これらに限定されない。このような構造を有する修飾ペプチドの具体例として、化合物2-15、2-17、2-18などを例示することができる。

[0157] 上記したような、各種のリンカー分子、GlcNAc-化合物を、適宜組み合わせることで結合させることにより、所望の構造に設計されたリンカー構造を合成することができる。このようなリンカー構造は、非常に多様な構造に設計することができ、また、結合させる糖物質の数を制御することが可能である。このような、設計、合成によって、バリエーションに富んだ修飾ペプチドを製造することができる。

[0158] <製造方法・GlcNAc化合物>

本発明において、糖物質とリンカー構造がO-グリコシド結合した修飾ペプチドは、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) をオキサゾリン化したGlcNAc-oxa (若しくは、そのGlcNAc部位に含まれる3つの水酸基がアセチル化により保護されたもののような関連物質) に水酸基を有するリンカー分子 (例えばグリコール酸ベンジル、セリン、チロシンのような水酸基側鎖アミノ酸など) を反応させることにより製造することができる。また、糖物質とリンカー構造がN-グリコシド結合した修飾ペプチドは、アジド基を有する糖物質とカルボキシル基を有するリンカー分子をトリフェニルホスフィン存在下反応させることにより製造することができる。

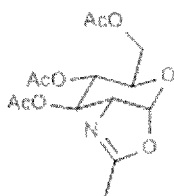
[0159] 本発明の修飾ペプチドにおいて、糖物質として糖鎖構造を有する糖物質を連結させる場合、糖鎖の還元末端を適宜修飾して、リンカー分子に結合させ

てもよく、また、特定の糖単位と所望の構造を有する被転移化合物（例えば、GlcNAc化合物）を合成し、その糖単位（例えば、GlcNAc）に糖鎖転移酵素（例えば、Endo-M N175Q）を用いて糖鎖を転移させることによっても製造することができる。

[0160] 本発明において、「GlcNAc-化合物」とは、1位炭素のグリコシド結合以外に修飾を受けていないGlcNAc、及び、他の分子と結合しうる官能基を含む、又は、hANPペプチドと連結している、化合物である。GlcNAc-化合物は、例えば、一分子中に単糖としてGlcNAcが所望の化合物、アミノ酸等とグリコシド結合した化合物、例えばAG(5)のように非還元末端にGlcNAcを有する糖鎖又はそれと結合した化合物、であっても良い。化合物とGlcNAcの間のグリコシド結合は、 α 位であっても、 β 位であっても転移反応は進行する（Endoglycosidases: Masahiko Endo, et al Biochemistry, Biotechnology, Application）が、転移後の糖鎖構造が、天然の糖鎖を参考にしたものである場合、当該天然型糖鎖と同じ様式であることが好ましい。例えば、転移後の糖結合化合物がSGを有する場合、GlcNAc化合物においても β 位であることが好ましい。

[0161] GlcNAc化合物は、公知の様々な方法に従って製造することができる。例えば、グルコサミン、4,5-ジヒドロ-2-メチルオキサゾロ[5',4':1,2]-3,4,6-トリ-O-アセチル-1,2-ジデオキシ- α -グルコピラノース（下記式、Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 485-500参照））

[0162] [化38]



[0163] などを出発物質として、所望の構造、官能基を有するように適宜合成することができる。このようなGlcNAc化合物の具体例としては、カルボキシル基を有する化合物1-2C、アミノ基を有する化合物1-7A等、トリアゾー

ルジオン基を有する化合物 1-6 D 等、を挙げることができる。また、GlcNAc にアミノ酸を連結させた GlcNAc 化合物は、アミノ基とカルボキシル基の何れかに対して選択的に保護基を付加させて合成することができる。具体例としては、Boc-(GlcNAc-)Ser (化合物 1-1 D)、Boc-(GlcNAc-)Asn (J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284-290)、(GlcNAc-)Glnなどを例示することができる。

[0164] 上記のような GlcNAc-化合物と別のリンカー分子又はペプチドを結合させることで、多様な構造、結合官能基を有する GlcNAc 化合物を合成することができる。このような多様な GlcNAc 化合物は本発明の修飾ペプチドの製造に利用することができる。例えば、アミノ基（カルボキシル基）を有する GlcNAc 化合物とカルボキシル基（アミノ基）及び所望の構造、官能基を有するリンカー分子とを結合させることで、所望の官能基を有する GlcNAc 化合物（具体例：マレイミド基を有する化合物 1-7 B 等）を合成することができる。

[0165] また、例えば、アミノ基（カルボキシル基）を有する GlcNAc 化合物とカルボキシル基（アミノ基）を有する PEG リンカー分子を結合させることで、所望の長さの PEG を有する GlcNAc 化合物（具体例：化合物 1-3 A、1-4 B、1-5 A、1-19 等）を合成することができる。また、PEG に代えて、ポリ Gly やポリ (Ser-Gly) のような、ポリアミドを用いることで、所望の長さのポリアミドリンカーを有する GlcNAc 化合物（具体例：化合物 1-21 B 等）を合成することができる。ここで、ポリアミドに含まれるアミノ酸として、側鎖に官能基を有するものを採用することによって、当該官能基に更なる GlcNAc 化合物を結合させることができる。

[0166] また、本発明に用いられる GlcNAc-化合物は、一分子中に単独の GlcNAc を複数含む化合物であっても良い。このような多価の GlcNAc 化合物は、前述したアミノ酸に 2 つの GlcNAc が N-グリコシド結合したものや、上記の GlcNAc-化合物を、リンカー分子に複数結合させたものなどが挙げられる。例えば、Lys のように側鎖にアミノ基を有するアミノ酸をリンカー分子とし、カルボキシル基を有する GlcNAc 化合物 2 当量と反応させることで、GlcNAc-(GlcNAc-)L

ys-OHのような、2つのGlcNAc及び1つのカルボキシル基を有するGlcNAc化合物を合成することができる。さらに、このGlcNAc-(GlcNAc-)Lys-OHとリジン（アミノ基側鎖アミノ酸）を反応させることで4価のGlcNAc化合物を合成することができ、この工程を繰り返すことで多数のGlcNAcを含有するGlcNAc化合物を合成することができる。また、GlcNAc化合物が複数の官能基を有する場合、その一部に保護基を導入してGlcNAcを連結させた後、脱保護して、当該脱保護した官能基に別のGlcNAc化合物を結合させることによっても多価のGlcNAc化合物を合成することができる（具体例：化合物1-5B）。このような手法を、常法に従って、適宜繰り返す、及び／または、組み合わせることによって、多様なGlcNAc化合物を合成することが可能である。

[0167] また、前記のGlcNAc-化合物の定義、形態等において、GlcNAcをGlc、Manに置き換えた化合物を、それぞれ、Glc-化合物、Man-化合物と定義し、これらも本発明の修飾ペプチドの製造のための被転移化合物として、好ましく採用される。

[0168] 本発明の修飾ペプチドの製造においては、hANP、糖物質、リンカー分子、被転移化合物等の中間体を適宜結合・転移等させることで製造することができるが、その製造の順序は特に限定されず、常法に従って、様々な方法によって製造することができる。それぞれの中間体の有する官能基は、当該製造工程に応じて、常法に従って、適宜、活性化、不活性化、保護基の付加、脱保護等を行う。

[0169] 糖物質の連結は、様々な方法を取りうる。例えば、GlcNAc、Glc等を有するリンカー分子に糖鎖を転移させ、当該糖鎖結合リンカー分子をhANPペプチドに連結することができる。また、GlcやGlcNAcとhANPペプチドを連結させた中間体を被転移化合物として、糖鎖を転移させることで、修飾ペプチドを製造しても良い。糖物質の有する水酸基は、適宜アセチル化、脱アセチル化等の工程を経ることで、不要な副反応を抑制することができる。

[0170] <機能、活性>

本発明の修飾ペプチドは、修飾されていないhANP(1-28)と比較して、延長

された血中持続時間、及び、優れた水溶性を示し、且つ、cGMP上昇活性を保持している。hANP(1-28)は、血中から速やかに消失するため、臨床では連続投与する必要があったが、本発明の修飾ペプチドは非連続投与によっても薬理効果を発揮できる。また、本発明の修飾ペプチドは、天然型hANPよりも優れた水溶性を示すため、有効成分を高濃度に含む製剤に適用することができる。このような、本発明の修飾ペプチドの特性によって、従来の天然型hANPでは達成できなかった、投与方法、投与経路、製剤技術を採用することが可能となり、急性の循環器系疾患のみならず、慢性の循環器系疾患（高血圧症や慢性心疾患など）の治療に用いることも可能となる。さらに、本発明の修飾ペプチドは生物学的研究ツールとしても有用である。天然型hANPは、長期間血中に存在した場合の組織移行性などは不明であるが、本発明の修飾ペプチドを投与することで、このような局在やhANPが長期間血中に存在することによる生体への影響を調べることが可能となる。本発明の修飾ペプチドの血中持続性は、試験例3の方法に準じて、動物への投与五後の末梢血中のcGMP濃度、及び／又は、末梢血サンプル中に含有される当該修飾ペプチドを検出することによって試験することが出来る。本発明の修飾ペプチドは、体内に投与された後、約15分後においても末梢血中のcGMP濃度を上昇させる効果を維持しており、より好ましくは投与約30分後においても当該効果を維持しており、より好ましくは投与約45分後においても当該効果を維持しており、さらにより好ましくは投与約60分後においても当該効果を維持している。また、修飾ペプチドの投与後の末梢血からの、当該修飾ペプチドの検出に関して、約30分後においても検出されることが好ましく、より好ましくは約45分後においても検出されることであり、さらに好ましくは約60分後においても検出されることであり、さらにより好ましくは約90分後においても検出されることである。

[0171] 本発明の修飾ペプチドは、糖物質が連結されていることによって、優れた水溶性を示す。この優れた水溶性は、さらにリンカー構造の化学構造によっても影響される。水1ml当りの溶解量としては、天然型hANPは32mmolで

ゲル化するのに対して、本発明の修飾ペプチドは、60mmol以上、好ましくは80mmol以上、さらに好ましくは100mmol（例えば、具体的荷は112mmol）が溶解するため、約2倍以上、好ましくは約3倍以上の水溶性を有するものである。

[0172] 本発明の修飾ペプチドの血中持続時間は、修飾ペプチドを生体に投与し、一定時間おきに血液を採取し、当該血液サンプル中に含まれる修飾ペプチドを検出することにより測定することができる。修飾ペプチドの検出方法としては、例えば、LC-MSによる検出、hANPのリング構造を特異的に認識する抗体を用いたELISA法、など、様々な方法を用いることができる。また、本発明の修飾ペプチドをcGMP上昇活性を発現する用量で投与した場合、当該血液サンプルのcGMPレベルを市販の測定キットを用いて測定し、投与開始前の血中のcGMPレベルと比較することで、血中の修飾ペプチドの持続時間を、生物活性として測定することができる。また、修飾ペプチドを放射性同位体で標識し、血液サンプルをSDS-PAGE等で分離し、放射性シグナルを検出することによって、検出することもできる。

[0173] 本発明において、「血中持続時間が延長された」とは、天然型hANPと比較して長い血中持続時間を示すことを意味する。サルへの皮下投与において、天然型hANPは投与後30分の時点で血中から検出されないため、30分の時点で検出されれば血中持続時間が延長されたとみなすことができる。又、同様のサルへの皮下投与において、血中cGMPレベルの上昇は、天然型hANPでは投与後60分で投与前と同じレベルに戻るため、投与60分の時点で投与前よりも高いcGMPレベルを示した場合、血中持続時間が延長したとみなすことができる。

[0174] また、本発明の修飾ペプチドは、NEPによるhANPペプチドの分解に対して耐性を有することが、持続時間が延長される要因の一つと考えられる。このような、NEP分解耐性は、公知の方法で測定することができる。

[0175] 本発明の修飾ペプチドのcGMP上昇活性は、GC-A受容体を発現する細胞を十分量までの濃度勾配に調整した被験物質で刺激した後、細胞を溶解してその

細胞溶解液中のcGMP濃度を測定し、最大のcGMP濃度（Emax）を同定することで測定する。本発明の修飾ペプチドが「cGMP上昇活性を保持する」とは、修飾ペプチドが示す最大cGMP濃度が、天然型hANPの最大cGMP濃度と比較して、約30%以上であることを意味し、好ましくは、約50%以上であり、より好ましくは、約70%以上である。本発明の修飾ペプチドは、天然型hANPと比較して、高濃度に製剤化することができ、且つ、延長された血中持続時間を示すため、いわゆるEC50値のような指標で活性を定義することは適切ではなく、濃度を上昇させた場合の最大の活性が、天然型の一定以上の活性を示すことができれば、臨床において、持続的、及び又は、高濃度で投与された場合に十分な薬効を得ることができる。

[0176] 本発明は、本発明の修飾ペプチドを有効成分として含有する医薬を提供する。

[0177] <医薬>

本発明に係る医薬の有効成分として用い得る物質は、上述した修飾ペプチドの薬学的に許容される塩であってもよい。すなわち、本発明においては、上述した物質の、無機酸、例えば塩酸、硫酸、リン酸、又は有機酸、例えばギ酸、酢酸、酪酸、トリフルオロ酢酸（TFA）、コハク酸、クエン酸等の酸付加塩を、有効成分として使用することもできる。あるいは、本発明においては、上述した物質の、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態を有効成分として使用することもできる。このような、本発明の修飾ペプチドの塩は、hANPペプチド部分の塩であっても良く、糖物質の構造において塩を形成していても良い。本発明の修飾ペプチドの塩として好ましくは、hANPペプチド部分で薬学上許容される塩を形成したものであり、より好ましくはhANPペプチド部分でトリフルオロ酢酸塩又は酪酸塩を形成したものであり、また、本発明に係る医薬組成物は、その有効成分に係る物質の遊離形としても、又はその薬学上許容し得る塩であってもよい。

[0178] 本発明に係る医薬の有効成分として用い得る物質又はその薬学的に許容し

得る塩は、公知の薬学的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤などと混合して医薬に一般に使用されている投与方法、即ち経口投与方法、又は、経粘膜投与、静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって個体に投与するのが好ましい。

[0179] 本発明に係る医薬の有効成分として用い得る物質の投与量は、疾患の種類、個体（患者）の年齢、体重、症状の程度及び投与経路などによっても異なるが、一般的に1日当りの投与量の上限としては、例えば約100mg/kg以下であり、好ましくは約50mg/kg以下であり、さらに好ましくは1mg/kg以下である。また、一日あたりの投与量の下限としては、例えば約0.1μg/kg以上であり、好ましくは0.5μg/kg以上であり、より好ましくは、1μg/kg以上である。

[0180] 本発明に係る医薬の投与頻度は、使用する有効成分、投与経路、および処置する特定の疾患に依存しても変動する。例えばペプチド性の物質を経口投与する場合、一日当たり4回以下の投与回数で処方することが好ましく、また非経口投与、例えば静脈内投与する場合には、通常のシリンジを用いて注射することもできるし、インフュージョンポンプ、カテーテル等を利用して持続的に投与することもできる。また、皮下注射、筋肉内注射等の経路で投与することも好ましく、その場合、通常用いられる様々な投与デバイスを利用することができる。

[0181] 本発明の医薬の有効成分を液剤として調整する場合、本発明の修飾ペプチド又はその薬学的に許容しうる塩を、水性溶媒に溶解し、必要に応じて、安定化剤、pH調整剤、界面活性剤等を添加して調整することができる。また、凍結乾燥製剤とする場合、上記のように調製した液剤を凍結乾燥し、使用時に生理食塩水、注射用水、ブドウ糖液などで溶解して用いることができる。

[0182] 本発明の医薬は、GC-Aへ作用してcGMPレベルを上昇させることにより、治療することができる疾患の患者に投与することで、当該疾患を治療する効果を有する。ここで、疾患又は症状の「治療」とはGC-Aの活性化により正常化

が期待される病的症状をの進行を遅延、軽減、緩和及び／又は抑制することで、症状を正常化に近づけることを意味する。疾患の早期又は疾患リスクが高い状態で投与を開始することで、疾患の重症化または発症を抑制する効果が期待される。また、過去に当該疾患を罹患したものは、再発、又は、慢性化に陥る危険性があるが、このような患者に対して、本発明の医薬を継続的に投与することによって、再発や慢性化のリスクを低減させることが期待できる。このような効果も、治療に含まれるものとする。

[0183] このような疾患としては、例えば、高血圧、急性心不全（急性心不全発症後における病状管理を含む）、慢性心不全、虚血性心疾患、急性腎炎（急性腎炎発症後における病状管理を含む）、慢性腎炎、急性腎不全（急性腎不全発症後における病状管理を含む）、慢性腎不全、虚血性心疾患（心筋梗塞など）、悪性腫瘍の転移、肝繊維化、肝硬変、透析における組織の癒着、繊維化、などである。

実施例

[0184] 以下、実施例を用いて、本発明を具体的に説明する。実施例に示されたものは、本発明の実施形態の一例であり、本発明はこれに限定されるものではない。

[0185] 実施例 1 は、本発明の修飾ペプチドの製造中間体である、リンカー分子、GlcNAc化合物、糖物質又はその誘導体の製造例であり、実施例2はそれら中間体を用いて修飾ペプチドの製造例である。試験例は、本発明の修飾ペプチドの特性や効果を試験した例である。

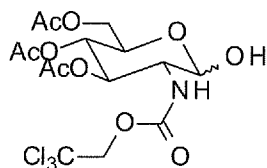
[0186] [実施例 1]

<実施例 1-1>

(1-1A) 酢酸[(2R, 3S, 4R, 5R, 6R)-3, 4-ジアセトキシ-6-ヒドロキシ-5-(2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニルアミノ)テトラヒドロピラン-2-イル]メチル（化合物 1-1A、下記式の化合物）の合成

[0187]

[化39]



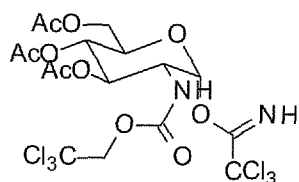
[0188] グルコサミン塩酸塩 (10.0 g, 46.38 mmol) と炭酸水素ナトリウム (11.7 g, 139 mmol) を水 (100 mL) に溶解し、室温でクロロギ酸2,2,2-トリクロロエチル (7.66 mL, 55.7 mmol) を滴下し、1時間攪拌した。反応溶液に1N塩酸を加え中和し、生じた沈殿をろ取した。水で固体を洗浄後真空ポンプで乾燥した。得られた固体をピリジン (50 mL) に溶解し、室温で無水酢酸 (24.1 mL, 255 mmol) を加え終夜攪拌した。溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 80 : 20 - 33 : 67, v/v) で精製し、中間体の粗生成物を無色油状物 (19.4 g) として得た。

[0189] 得られた中間体の粗生成物 (19.4 g) をN,N-ジメチルホルムアミド (200mL) に溶解し、室温でヒドラジン酢酸塩 (4.01 g, 44.5 mmol) を加え1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで薄め、10%食塩水で2回、飽和食塩水で1回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 80 : 20 - 25 : 75, v/v) で精製し、目的物 1 - 1 A を白色固体 (11.6 g、2 工程収率52%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.42 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 5.37-5.32 (2H, m), 5.16-5.10 (1H, m), 4.80 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 4.64 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 4.26-4.22 (2H, m), 4.17-4.12 (1H, m), 4.09-4.03 (1H, m), 3.46-3.43 (1H, m), 2.10 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.02 (3H, s).

[0190] (1 - 1 B) 酢酸[(2R,3S,4R,5R,6S)-3,4-ジアセトキシ-6-(2,2,2-トリクロロエタンイミドイル)オキシ-5-(2,2,2-トリクロロエトキシカルボニルアミノ)テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 1 - 1 B、下記式の化合物) の合成

[0191] [化40]

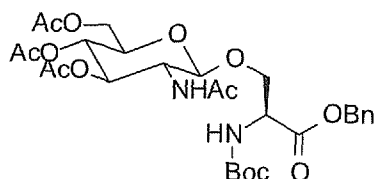


[0192] 1-1 A (5.00 g, 10.4 mmol) をジクロロメタン (35 mL) に溶解し、0℃でトリクロロアセトニトリル (10.4 mL, 104 mmol) とジアザビスクロウンデセン (0.467 mL, 3.12 mmol) を加えた。反応液を室温まで昇温し、40分攪拌した。溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=75：25 - 50：50, v/v) で精製し、目的物 1-1 B を無色油状物 (3.70 g、収率57%) として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.81 (1H, s), 6.43 (1H, d, J = 3.9 Hz), 5.37-5.34 (1H, m), 5.27-5.22 (2H, m), 4.72 (2H, dd, J = 16.2, 11.9 Hz), 4.32-4.26 (2H, m), 4.16-4.10 (2H, m), 2.09 (3H, s), 2.06 (6H, s).

[0193] (1-1 C) (2S)-3-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロパン酸ベンジル (化合物 1-1 C、下記式の化合物) の合成

[0194] [化41]



[0195] 1-1 B (2.77 g, 4.44 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、室温で(2S)-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-3-ヒドロキシプロパン酸ベンジル (1.31 g, 4.44 mmol) とトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (8.0 μL, 0.0444 mmol) を加え1時間攪拌した。トリエチルアミン (0.1 mL) を加え溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=75：25 - 33：67, v/v) で精製し

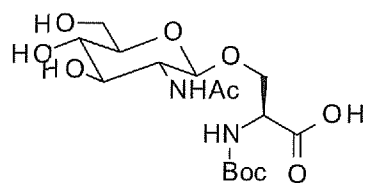
、中間体の粗生成物を白色固体 (2.01 g) として得た。

[0196] 得られた中間体の粗生成物 (2.01 g) を無水酢酸 (50 mL) に溶解し、0.1 N塩酸、メタノール、ジエチルエーテルの順に洗浄し乾燥させた亜鉛 (1.5 g, 22.9 mmol) を室温に加え、6時間攪拌した。反応液をセライトでろ過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=50：50-0：100, v/v) で2回精製し、目的物 1-1 C を無色固体 (0.846 g、2工程収率31%) として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.40-7.33 (5H, m), 5.52-5.43 (2H, m), 5.29-5.15 (3H, m), 5.04 (1H, t, J = 9.6 Hz), 4.70 (1H, d, J = 8.2 Hz), 4.49-4.46 (1H, m), 4.27-4.23 (2H, m), 4.11-4.07 (1H, m), 3.84 (1H, dd, J = 10.6, 3.5 Hz), 3.75-3.73 (1H, m), 3.64-3.62 (1H, m), 2.07 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.02 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.46 (9H, s).

[0197] (1-1 D) (2S)-3-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロパン酸 (化合物 1-1 D、下記式の化合物) の合成

[0198] [化42]



[0199] 1-1 C (846 mg, 1.35 mmol) に10%パラジウム炭素 (約50%水湿潤品) (150 mg) と酢酸エチル (5 mL) とエタノール (5 mL) を加え、水素雰囲気下室温で3時間攪拌した。反応液をろ過し溶媒を減圧留去することで、中間体の粗生成物を無色油状物 (740 mg) として得た。

[0200] 得られた中間体の粗生成物 (740 mg) をメタノール (10 mL) に溶解し、0.5 Mナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (14 mL, 7.0 mmol) を加え室温で20時間攪拌した。反応液が弱酸性になるまでDowex-50を反応液に加えた後、濾過し溶媒を減圧留去することで、目的物 1-1 D を淡褐色固体 (543 mg、2

工程収率98%)として得た。

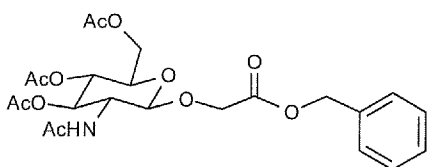
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 4.44 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 4.28–4.25 (1H, m), 4.16 (1H, dd, $J = 10.4, 4.4$ Hz), 3.87 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz), 3.80 (1H, dd, $J = 10.4, 4.4$ Hz), 3.68 (1H, dd, $J = 12.0, 5.6$ Hz), 3.62–3.58 (1H, m), 3.45 (1H, dd, $J = 10.5, 8.5$ Hz), 3.29–3.24 (2H, m), 2.00 (3H, s), 1.44 (9H, s).

FAB-MS: Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{10}$: $[\text{M}+\text{H}]^+409$, Found 409.。

[0201] <実施例 1 – 2>

(1 – 2 A) 2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸ベンジル (化合物 1 – 2 A、下記式の化合物) の合成

[0202] [化43]



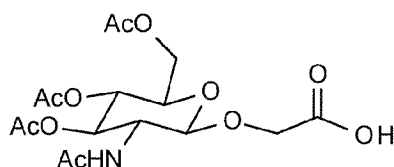
[0203] Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 485–500の記載に準じて製造した、4', 5' -ジヒドロ-2' -メチルオキサゾロ[5', 4' :1, 2]-3,4,6-トリ-O-アセチル-1,2-ジデオキシ- α -グルコピラノース (4.30g, 13.1 mmol) をジクロロエタン (50 ml) に溶解し、室温でグリコール酸ベンジル (5.56ml, 39.1 mmol)、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (1.64g, 6.53 mmol) を加え、3時間加熱還流した。反応溶液を冷却後、氷冷下、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に加え、有機物を塩化メチレンで抽出した。有機層を1 N塩酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 60 : 40 - 0 : 100, v/v) で精製し、目的物 1 – 2 A を無色固体 (3.45 g、収率53%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.37–7.34 (5H, m), 5.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 5.16–5.08 (4H, m), 4.66 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 4.33 (2H, s), 4.22 (1H, dd, $J =$

12.2, 4.4 Hz), 4.09 (1H, dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz), 4.07-4.02 (1H, m), 3.64-3.62 (1H, m), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.91 (3H, s).

[0204] (1-2 B) 2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸 (化合物 1-2 B、下記式の化合物) の合成

[0205] [化44]

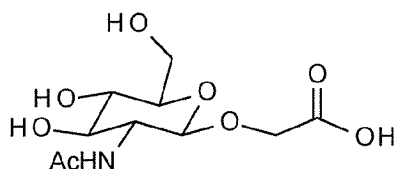


[0206] 1-2 A (3.45g, 6.96 mmol) をメタノール (54 ml) に溶解し、20%水酸化パラジウム-炭素 (690mg) を加え、水素雰囲気下室温で3.0時間攪拌した。セライトで濾過し、溶媒を減圧留去した。ジイソプロピルエーテルを加えて得られた固体をろ取し、目的物 1-2 B を無色固体 (2.72g、収率96%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.36 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 5.21-5.10 (2H, m), 4.70 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 4.39 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 4.32 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 4.28 (1H, dd, $J = 12.2, 4.9$ Hz), 4.15 (1H, dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz), 4.11-4.05 (1H, m), 3.72-3.70 (1H, m), 2.10 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (3H, s).

[0207] (1-2 C) 2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸 (化合物 1-2 C、下記式の化合物) の合成

[0208] [化45]



[0209] 1-2 B (2.72g, 6.73 mmol) をメタノール (42 ml) に溶解し、室温で5mol/Lナトリウムメトキシド-メタノール溶液(2ml, 10mmol)を加えた後、室温で一晩間攪拌した。反応終了後、蒸留水 (4ml) 加えた後に、イオン交換樹脂(Dawex50wx8)を加えてpH3にし、反応溶液を濾過し、溶媒を減圧留去した。ジイソプロピルエーテルを加えて得られた固体をろ取し、目的物 1-2 C を無色固体 (2.72g、収率96%) として得た。

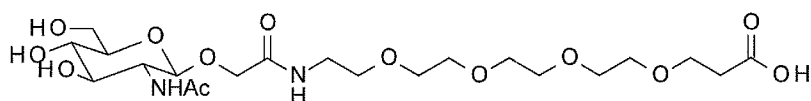
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , TMS) δ : 4.57 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 4.17 (2H, s), 3.91 (1H, dd, $J = 12.5, 1.6$ Hz), 3.77-3.72 (2H, m), 3.56-3.41 (3H, m), 2.05 (3H, s).

ESI-LC-MS: Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_8$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 280, Found 280.。

[0210] <実施例 1-3>

(1-3 A) 3-[2[2[2[2-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシアセチル]アミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (化合物 1-3 A、下記式の化合物) の合成

[0211] [化46]



[0212] 1.20 mmol/gの2-クロロトリチルクロライドレジン (694 mg, 0.833 mmol) を固相合成用のカラムに入れ、ジクロロメタン (5 mL) を加え5分しんとうした。ろ過後、3-[2[2[2[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (488 mg, 1 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (730 μL , 4.17 mmol) のジクロロメタン (5 mL) 溶液を加え、室温で2時間攪拌した。ろ過後、ジクロロメタン混合溶液 (ジクロロメタン:メタノール:N,N-ジイソプロピルエチルアミン=85:10:5, v/v) で3回、ジクロロメタンで3回、N,N-ジメチルホルムアミドで3回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (5 mL) を加え5分しんとう後ろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで3回、ジクロ

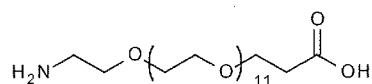
ロメタンで3回、ジエチルエーテルで3回洗浄し、真空ポンプで乾燥した。得られたレジン (800 mg) のうち、一部分 (200 mg) を固相合成用のカラムに入れ、N,N-ジメチルホルムアミド (2.5 mL)、トリエチルアミン (406 μ L, 2.92 mmol)、水 (0.5 mL) を加えた。ここに、1-2 C (174 mg, 0.625 mmol) とN,N-ジメチルホルムアミド (3 mL) とトリエチルアミン (174 μ L, 1.25 mmol) とジメチルチオホスホノイルクロリド (80 mg, 0.625 mmol) を室温で1時間攪拌した溶液を加えた。室温で2時間攪拌した後、ろ過しレジンをN,N-ジメチルホルムアミドで3回、ジクロロメタンで3回洗浄した。1%トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン溶液 (2 mL) を加え、2分しんとう後ろ液を回収する操作を、10回行った。回収した溶液を減圧留去して粗生成物を得た。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 1-3 A を白色固体 (25 mg) として得た。

ESI-LC-MS: Calcd for $C_{21}H_{38}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 526, Found 526.。

[0213] <実施例 1-4>

(1-4 A) 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ]プロパン酸 (化合物 1-4 A、下記式の化合物) の合成

[0214] [化47]



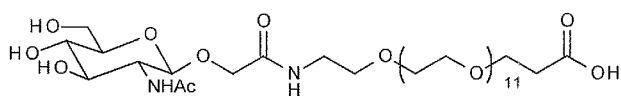
[0215] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ] エトキシ]プロパン酸 (320 mg, 0.38 mmol) をメタノール (2 mL) と蒸留水 (2 mL) に溶解し、0℃で1 N水酸化ナトリウム水溶液 (1 mL) を加え、室温で1.5時間攪拌した。0℃で1 N塩酸 (1 mL) を加え、減圧下で有機溶媒を留去した

。蒸留水（10 ml）を加え、ジクロロメタンで洗浄した後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC（GLサイエンス、Inertsil ODS-3）にて分離精製を行い、凍結乾燥して無色油状物質として目的物 1-4 A（233.5 mg, 99%）を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.63 (2H, br s), 3.79 (2H, t, J = 5.1 Hz), 3.75 (2H, t, J = 5.9 Hz), 3.70–3.68 (2H, m), 3.65–3.61 (42H, m), 3.21–3.17 (2H, m), 2.58 (2H, t, J = 5.9 Hz).

[illegible]

[0217] [化48]



[0218] 1-2 C (36.6 mg, 0.13 mmol) をジメチルホルムアミド (500 μ l) に溶解し、室温でトリエチルアミン (45.7 μ l, 0.33mmol) を加えた後、0℃でジメチルチオホスフィノイルクロリド (16.9 mg, 0.13mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (500 μ l) を加えて、0℃で0.5時間攪拌した。

[0219] 1-4 A (67.5 mg, 0.11 mmol) をジメチルホルムアミド (500 μ l) に溶解し、0℃で調製した活性エステルを加えて、室温で6時間攪拌した。蒸留水 (3 ml)、酢酸 (100 μ l) を加えて、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して無色油状物質として目的物 1-4 B (31.0 mg, 32%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.62 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.40 (1H, t, J = 5.4 Hz), 4.47 (1H, d, J = 8.3 Hz), 4.27 (1H, d, J = 16.1 Hz), 4.22 (1H, d, J = 16.1 Hz), 3.90 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 3.81 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 3.72 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 3.63 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 3.53 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 3.44 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 3.35 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 3.26 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 3.17 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 3.08 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 3.00 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 2.91 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 2.82 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 2.73 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 2.64 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 2.55 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 2.46 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 2.37 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 2.28 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 2.19 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 2.10 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 2.01 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 1.92 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 1.83 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 1.74 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 1.65 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 1.56 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 1.47 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 1.38 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 1.29 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 1.20 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 1.11 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 1.02 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 0.93 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 0.84 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 0.75 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 0.66 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 0.57 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 0.48 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 0.39 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 0.30 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 0.21 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz), 0.12 (1H, dd, J = 12.0, 3.2 Hz), 0.03 (1H, dd, J = 12.2, 4.0 Hz).

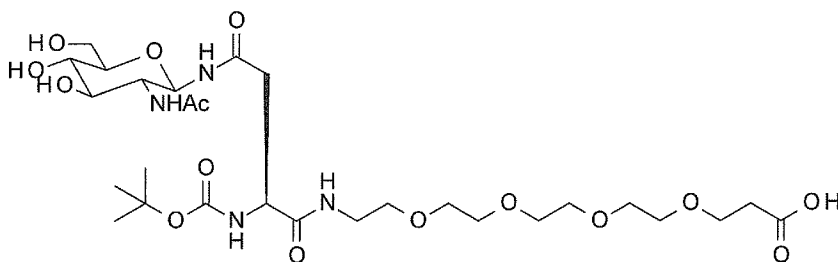
.9 Hz), 3.77 (2H, t, J = 6.1 Hz), 3.74–3.52 (54H, m), 3.39–3.34 (2H, m), 2.59 (2H, t, J = 6.1 Hz), 2.08 (3H, s).

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{37}H_{70}N_2O_{21}$: $[M+Na]^+$ 901, Found 901.。

[0220] <実施例 1 – 5>

(1 – 5 A) 3-[2-[2-[2-[2-[[[(2S)-4-[[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタンイル]アミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (化合物 1 – 5 A、下記式の化合物) の合成

[0221] [化49]



[0222] 3-[2-[2-[2-[2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (200 mg, 0.547 mmol) を4N塩酸–ジオキサン溶液 (2 mL) に溶かし、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し真空ポンプで乾燥することで、中間体の粗生成物を淡褐色油状物 (165 mg) として得た。

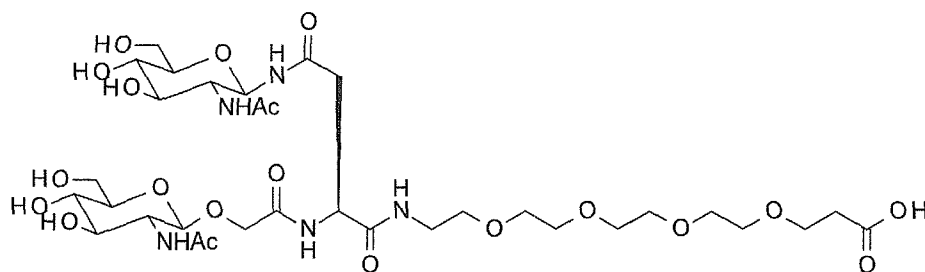
[0223] J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284–290. の手法に従って製造した(2S)-4-[[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (158 mg, 0.364 mmol) とHATU (138 mg, 0.364 mmol) 、をN,N-ジメチルホルムアミド (3 mL) に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (128 μ L, 0.728 mmol) を加え、室温で1分攪拌した。この溶液を、得られた中間体の粗生成物 (54.9 mg) に加え、さらにN,N-ジイソプロピルエチルアミン (128 μ L, 0.728 mmol) を加えて室温で0.5時間攪拌した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセ

トニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 1-5 A を白色固体 (53 mg、2工程収率43%) として得た。

ESI-LC-MS: Calcd for $C_{28}H_{50}N_4O_{15}$: $[M+H]^+$ 683, Found 683.

[0224] (1-5 B) 3-[2-[2-[2-[2-[[[(2S)-4-[[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-[[[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシアセチル]アミノ]-4-オキソブタノイル]アミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (化合物 1-5 B、下記式の化合物) の合成

[0225] [化50]



[0226] 1-5 A (53 mg, 0.0777 mmol) に30%トリフルオロ酢酸水溶液を加え、室温で7時間攪拌した。水で薄めて凍結乾燥することで、中間体の粗生成物を淡褐色油状物 (45 mg) として得た。

[0227] 1-2 C (65.1 mg, 0.233 mmol) とトリエチルアミン (65 μ L, 0.466 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、ジメチルチオホスホンイルクロリド (30 mg, 0.233 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) 溶液を0℃で加えた。室温まで昇温し、1時間攪拌した。この溶液を0℃まで冷やし、得られた中間体の粗生成物 (45 mg) とトリエチルアミン (152 μ L, 1.088 mmol) とN,N-ジメチルホルムアミド (2.5 mL) と水 (0.5 mL) の混合溶液を加えた。室温まで昇温し、8時間攪拌した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目

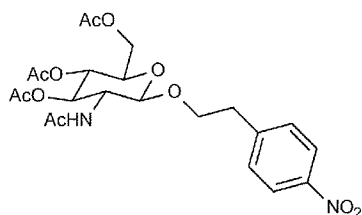
的物 1 - 5 B を白色固体 (9.25 mg、2工程収率14%) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{33}H_{57}N_5O_{20}$: $[M+H]^+844$, Found 844. 。

[0228] <実施例 1 - 6>

(1 - 6 A) 酢酸[(2R, 3S, 4R, 5R, 6R)-5-アセトアミド-3, 4-ジアセトキシ-6-[2-(4-ニトロフェニル)エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 1 - 6 A、下記式の化合物) の合成

[0229] [化51]

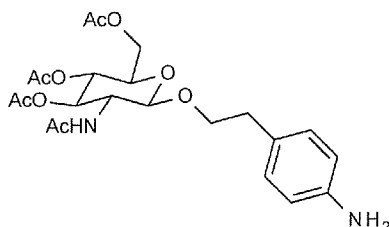


[0230] Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 485-500の記載に準じて製造した、4, 5-ジヒドロ-2-メチルオキサゾロ[5', 4':1, 2]-3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ- α -グルコピラノース (1.00 g, 3.04 mmol) をジクロロエタン (10 ml) に溶解し、室温でモレキュラーシーブス 4 A (312 mg)、2-(4-ニトロフェニル)-エタノール (2.54 g, 15.2 mmol)、(+)-カンファースルホン酸 (0.78 g, 3.34 mmol) を加え、60℃で3時間攪拌した。反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に加え、有機物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 67 : 33 - 0 : 100, v/v) で精製し、目的物 1 - 6 A を無色固体 (1.51 g、収率65%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.14 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.38 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 5.32 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 5.21 (1H, dd, $J = 10.6, 9.4$ Hz), 5.07 (1H, t, $J = 9.6$ Hz), 4.63 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 4.25 (1H, dd, $J = 12.1, 4.7$ Hz), 4.20-4.12 (2H, m), 3.88 (1H, dt, $J = 10.6, 8.6$ Hz), 3.72-3.64 (2H, m), 3.06-2.93 (2H, m), 2.09 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.03 (3H, s), 1.84 (3H, s).

[0231] (1-6B) 酢酸[(2R,3S,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-(4-アミノフェニル)エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 1-6B、下記式の化合物) の合成

[0232] [化52]

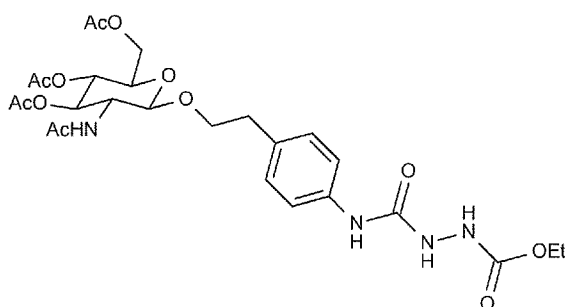


[0233] 1-6A (982.0 mg, 1.98 mmol) を酢酸エチル (12 ml) とエタノール (12 ml) に溶解し、10%パラジウム-炭素 (250 mg) を加え、水素雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。セライトで濾過し、溶媒を減圧留去して目的物 1-6B を無色固体 (758 mg、収率82%) として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6.99 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.61 (2H, d, J = 8.6 Hz), 5.32 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.24 (1H, dd, J = 10.6, 9.4 Hz), 5.06 (1H, t, J = 9.6 Hz), 4.60 (1H, d, J = 8.2 Hz), 4.26 (1H, dd, J = 12.1, 4.7 Hz), 4.15-4.04 (3H, m), 3.84 (1H, dt, J = 10.6, 8.4 Hz), 3.68-3.58 (4H, m), 2.78-2.77 (2H, m), 2.09 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.02 (3H, s), 1.88 (3H, s).

[0234] (1-6C) 酢酸[(2R,3S,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[4-[(エトキシカルボニルアミノ)カルバモイルアミノ]フェニル]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 1-6C、下記式の化合物) の合成

[0235] [化53]

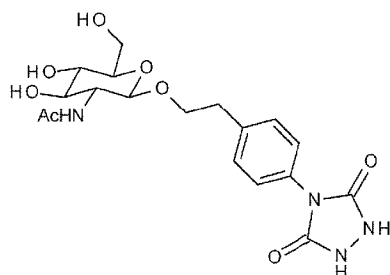


[0236] 1-6 B (568.0 mg, 1.22 mmol) をテトラヒドロフラン (22 ml) に溶解し、室温でトリエチルアミン (424 μ l, 3.04 mmol) を加えた後、 -10°C でクロロギ酸 4-ニトロフェニル (441.8 mg, 2.19 mmol) を加えて、室温で1.5時間攪拌した。室温でトリエチルアミン (424 μ l, 3.04 mmol) を加えた後カルバジン酸エチル (228.2 mg, 2.19 mmol) を加えて、室温で30分攪拌した。反応溶液を水に加え、有機物を酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン:メタノール=100:0-90:10, v/v) で精製し、目的物 1-6 C を無色泡状物質 (650.4 mg、収率90%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.88 (1H, br s), 7.24 (2H, s), 7.02 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.58 (1H, br s), 5.27 (1H, t, $J = 10.0$ Hz), 5.04 (1H, t, $J = 10.0$ Hz), 4.64 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 4.27-4.05 (5H, m), 3.90-3.81 (1H, m), 3.73-3.68 (1H, m), 3.61-3.55 (1H, m), 3.49 (2H, d, $J = 4.3$ Hz), 2.85-2.70 (2H, m), 2.07 (3H, s), 2.00 (6H, s), 1.82 (3H, s), 1.27 (3H, t, $J = 9.4$ Hz).

[0237] (1-6 D) N-[(2R, 3S, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-2-[2-[4-(3,5-ジオキソ-1,2,4-トリアゾリジン-4-イル)フェニル]エトキシ]-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-3-イル]アセトアミド (化合物 1-6 D、下記式の化合物) の合成

[0238] [化54]



[0239] 1-6 C (650.0 mg, 1.09 mmol) をメタノール (30 ml) に溶解し、室温で炭酸カリウム (451.8 mg, 3.27 mmol) を加えて 60°C で9.5時間攪拌した。

室温に冷やした後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC（GLサイエンス、Inertsil ODS-3）にて分離精製を行い、凍結乾燥し目的物1-6Dを無色固体（462.4 mg, 85%）として得た。

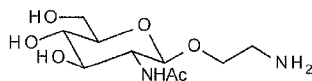
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 7.35 (4H, dd, $J = 13.1, 8.8$ Hz), 4.36 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 4.17 (1H, dt, $J = 11.0, 4.8$ Hz), 3.87 (1H, dd, $J = 11.9, 2.2$ Hz), 3.70-3.62 (3H, m), 3.39 (1H, dd, $J = 10.2, 8.6$ Hz), 3.28-3.22 (2H, m), 2.90 (2H, t, $J = 6.3$ Hz).

ESI-TOF-MS: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_8$: $[\text{M}+\text{H}]^+425$, Found 425.。

[0240] <実施例1-7>

(1-7A) 2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアミン（化合物1-7A、下記式の化合物）の合成

[0241] [化55]



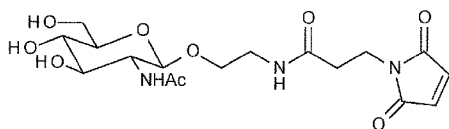
[0242] N-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアジド（500 mg, 1.72 mmol）をエタノール（20 ml）に溶解し、10%パラジウム-炭素（200mg）を加え、水素雰囲気下室温で3時間攪拌した。セライトで濾過し、溶媒を減圧留去して目的物1-7Aを無色固体（460 mg、収率quant）として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 4.38 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 3.90-3.82 (2H, m), 3.69-3.55 (2H, m), 3.46-3.40 (1H, m), 2.80-2.73 (2H, m), 1.98 (3H, s).

[0243] (1-7B) N-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチル]-3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパンアミド（化合物1-7B、下記式の化合物）の合成

[0244]

[化56]



[0245] 1-7 A (100 mg, 0.378 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル (0.126 mg, 0.473 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 1-7 B を白色固体 (93 mg、収率59%) として得た。

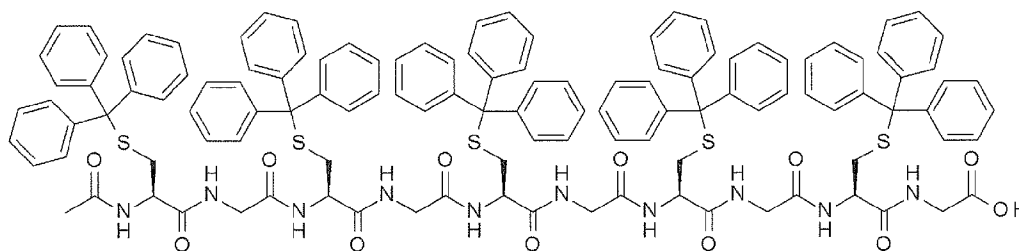
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 6.82 (2H, s), 4.38 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 3.89-3.87 (1H, m), 3.78-3.75 (3H, m), 3.66-3.62 (3H, m), 3.44-3.38 (1H, m), 2.67 (4H, s), 2.46 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.98 (3H, s).

ESI-LC-MS: Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9$: $[\text{M}+\text{H}]^+416$, Found 416. 。

[0246] <実施例 1-8>

(1-8 A) 2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-アセトアミド-3-トリチルスルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-トリチルスルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-トリチルスルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-トリチルスルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-トリチルスルファニルプロパノイル]アミノ]酢酸 (化合物 1-8 A、下記式の化合物) の合成

[0247] [化57]



[0248] 1.20 mmol/gの2-クロロトリチルクロライドレジンを (833 mg, 1.00 mmol) を固相合成用のカラムに入れ、ジクロロメタン (7.5 mL) を加え10分振とう

した。ろ過後、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (594 mg, 2 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.86 mL, 5 mmol) のジクロロメタン (7.5 mL) 溶液を加え、室温で2時間攪拌した。ろ過後、ジクロロメタン混合溶液 (ジクロロメタン : メタノール : N,N-ジイソプロピルエチルアミン = 85 : 10 : 5, v/v) で3回、ジクロロメタンで3回、ジエチルエーテルで3回洗浄した。真空ポンプで乾燥し、レジン (1.83 g) を回収した。回収したレジンの一部 (1.37 g) を固相合成用のカラムに入れた。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸 (1.32 g, 2,25 mmol) とHATU (856 mg, 2.25 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (669 mg, 2.25mmol) とHATU (856 mg, 2.25 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸 (1.32 g, 2,25 mmol) とHATU (856 mg, 2.25 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、2-(9H-フルオ

レン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (669 mg, 2.25mmol) と HATU (856 mg, 2.25 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸 (1.32 g, 2.25 mmol) と HATU (856 mg, 2.25 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (669 mg, 2.25mmol) と HATU (856 mg, 2.25 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸 (1.32 g, 2.25 mmol) と HATU (856 mg, 2.25 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (669 mg, 2.25mmol) と HATU (856 mg, 2.25 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,

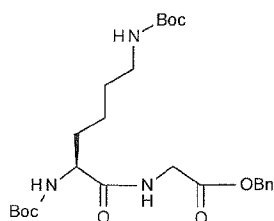
N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸 (1.32 g, 2.25 mmol) とHATU (856 mg, 2.25 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (582 μ L, 4.50 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を加え5分間振とうし、反応液をろ過する操作を4回行った。N,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄し、ジクロロメタンで4回、ジエチルエーテルで4回洗浄した。真空ポンプで乾燥し、レジンを (1.83 g) を回収した。回収したレジンの一部 (360 mg) を固相合成用のカラムに入れた。酢酸 (27 mg, 0.45 mmol) とHATU (171 mg, 0.45 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (154 μ L, 0.90 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (5 mL) を加え室温で30分振とうした。ろ過後、レジンをN,N-ジメチルホルムアミドで4回、ジクロロメタンで4回洗浄した。1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (1 mL) とジクロロメタン (3 mL) の混合溶液を加え、室温で1.5時間振とうした。ろ過してレジンを除き、ろ液を減圧下濃縮した。ジクロロメタンで3回共沸し、真空ポンプで乾燥することで、目的物 1-8 A を褐色固体 (176 mg) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{122}H_{114}N_{10}O_{12}S_5$: $[M+Na]^+$ 2094, Found 2094. 。

[0249] <実施例 1-9>

(1-9 A) 2-[[[(2S)-2,6-ビス(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ヘキサノイル]アミノ]酢酸ベンジル (化合物 1-9 A、下記式の化合物) の合成

[0250] [化58]



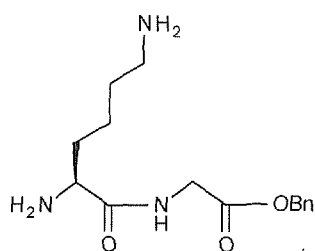
[0251] (2S)-2,6-ビス(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸 (1.70 g, 5.00 mmol)、2-アミノ酢酸ベンジル (1.00g, 5.00 mmol) およびHATU (2.90 g, 7.50 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (25 mL) に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (2.60 mL, 15.0 mmol) を加え、室温にて20時間攪拌した。反応溶液を水に加え、有機物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=90：10-0：100, v/v) で精製し、目的物1-9Aを淡黄色油状物 (2.30 g、収率93%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.40–7.33 (5H, m), 6.63 (1H, s), 5.18 (2H, s), 5.11 (1H, s), 4.63 (1H, s), 4.15–4.03 (3H, m), 3.16–3.06 (2H, m), 1.91–1.81 (1H, m), 1.70–1.59 (1H, m), 1.53–1.24 (22H, m).

MS (ESI): Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_7$: $[\text{M}+\text{H}]^+494$, Found 494.

[0252] (1-9B) 2-[[(2S)-2,6-ビス(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)ヘキサノイル]アミノ]酢酸ベンジル (物質1-9B、下記式の化合物) の合成

[0253] [化59]

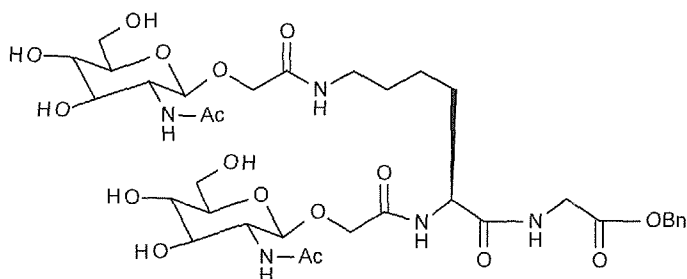


[0254] 1-9A (250 mg, 0.507 mmol) をジクロロメタン (3.0 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (1.0 mL) を加え、室温にて1時間攪拌した。溶媒を減圧留去して目的物1-9Bを淡黄色油状物 (247 mg、収率100%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.95 (1H, t, $J = 5.9$ Hz), 8.18 (2H, s), 7.71 (2H, s), 7.42–7.34 (5H, m), 5.16 (2H, d, $J = 12.5$ Hz), 4.12–3.96 (2H, m), 3.87–3.78 (1H, m), 2.78–2.66 (2H, m), 1.76–1.66 (2H, m), 1.54–1.47 (2H, m), 1.40–1.31 (2H, m).

[0255] (1-9C) 2-[[[(2S)-2,6-ビス[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシアセチル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]酢酸ベンジル (化合物1-9C、下記式の化合物) の合成

[0256] [化60]

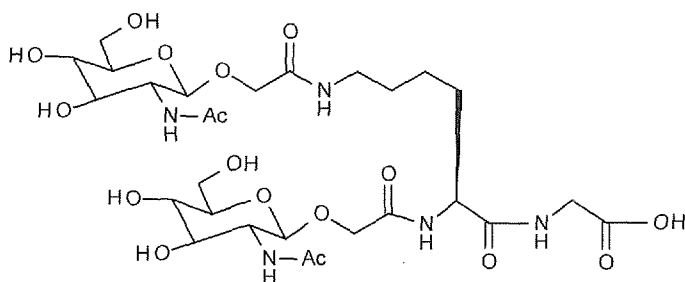


[0257] 1-9B (93.0 mg, 0.190 mmol) および 1-2C (160mg, 0.573 mmol) を用い、(1-5B) と同様の方法に従って、目的物 1-9C を無色泡状物質 (180 mg、収率88%) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 7.39–7.29 (5H, m), 5.16 (2H, s), 4.94–4.84 (2H, m), 4.46–4.39 (3H, m), 4.33–4.27 (2H, m), 4.13–4.00 (3H, m), 3.94 (1H, d, $J = 17.6$ Hz), 3.91–3.84 (2H, m), 3.78–3.66 (4H, m), 3.50–3.42 (2H, m), 3.38–3.28 (2H, m), 3.22 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 2.03 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.88–1.81 (1H, m), 1.78–1.67 (1H, m), 1.58–1.50 (2H, m), 1.48–1.35 (2H, m).

[0258] (1-9D) 2-[[[(2S)-2,6-ビス[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシアセチル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]酢酸 (化合物1-9D、下記式の化合物) の合成

[0259] [化61]



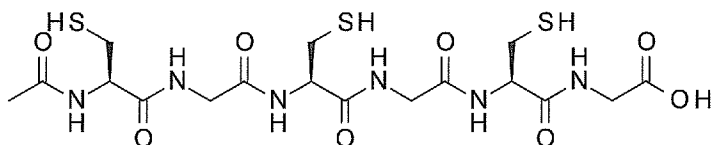
[0260] 1-9C (180 mg, 0.221 mmol) をメタノール (50 ml) に溶解し、10%パラジウム-炭素 (180 mg) を加え、水素雰囲気下室温で2時間攪拌した。セライトで濾過し、溶媒を減圧留去して目的物 1-9D を淡黄色泡状物質 (160 mg、収率100%) として得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{28}H_{48}N_5O_{17}$: $[M+H]^+$ 726, Found 726.。

[0261] <実施例 1-10>

(1-10A) 2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-アセトアミド-3-スルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-スルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-スルファニルプロパノイル]アミノ]酢酸 (化合物 1-10A、下記式の化合物) の合成

[0262] [化62]



[0263] 1.20 mmol/gの2-クロロトリチルクロライドレジンを (208 mg, 0.25 mmol) を固相合成用のカラムに入れ、ジクロロメタン (2.5 mL) を加え10分振とうした。ろ過後、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (149 mg, 0.5 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (219 μ L, 1.25 mmol) のジクロロメタン (2.5 mL) 溶液を加え、室温で2時間攪拌した。ろ過後、ジクロロメタン混合溶液 (ジクロロメタン:メタノール:N,N-ジイソプロピルエチルアミン=85:10:5, v/v) で3回、ジクロロメタンで3回、N,N-ジメチルホルムアミドで3回洗浄した。得られたレジンをApplied Biosystems社製のペプチド合成機433A Peptide Synthesizerにセットし、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合を合成機で行うことで、ペプチド鎖を伸長した。脱保護にはピペリジンとN-methylpyrrolidoneを用い、縮合反応にはHATUとN,N-ジイソプロピルエチルアミンとN-methylpyrrolidoneと各種カルボン酸を用いた。カルボン酸は(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]

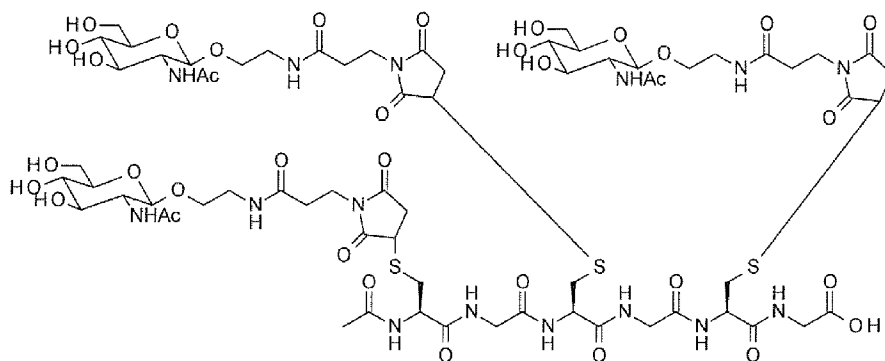
プロパン酸、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸、(2R)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-3-トリチルスルファニル]プロパン酸、酢酸の順で各縮合反応に使用した。得られたレジン (900 mg) の半量 (450 mg) を固相合成用のカラムに入れ、トリフルオロ酢酸 (2.64 mL) と水 (0.27 mL) とフェノール (0.06 g) とトリイソプロピルシラン (0.03 mL) の混合溶液を加えた。室温で2時間しんとし、トリフルオロ酢酸を留去した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 1-10A を白色固体 (11 mg、収率16%) として得た。

ESI-LC-MS: Calcd for $C_{17}H_{28}N_6O_8S_3$: $[M+H]^+$ 541, Found 541.

[0264] (1-10B) 2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-アセトアミド-3-[1-[3-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアミノ]-3-オキソプロピル]-2, 5-ジオキソピロリジン-3-イル]スルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-[1-[3-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアミノ]-3-オキソプロピル]-2, 5-ジオキソピロリジン-3-イル]スルファニルプロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-[1-[3-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアミノ]-3-オキソプロピル]-2, 5-ジオキソピロリジン-3-イル]スルファニルプロパノイル]アミノ]酢酸 (化合物 1-10B、下記式の化合物) の合成

[0265]

[化63]



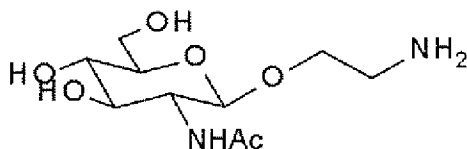
[0266] 1-10B (11 mg, 0.0203 mmol) と 1-7B (33 mg, 0.0794 mmol) をアセトニトリル (1 mL) と 0.2 M pH=6.75 のリン酸バッファー (1 mL) の混合溶液に溶かし、室温で2時間攪拌した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 1-10B を白色固体 (27 mg、収率74%) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{68}H_{103}N_{15}O_{35}S_3$: $[M-H]^+$ 1784, Found 1784.。

[0267] <実施例 1-11>

(1-11A) N-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアミン トリフルオロ酢酸塩 (化合物 1-11A、下記式の化合物) の合成

[0268] [化64]



TFA

[0269] 1-7A (120 mg) を蒸留水 (6 mL) に溶解させた後に、トリフルオロ酢酸 (48 μ l) 加え、凍結乾燥した。得られたアモルファス状の固体 1-11A は精製せずに用いた。

[0270] (1-11B) SG-NH₂ (化合物 1-11B、下記式からなる化合物) の合成

750 μ l)に、氷冷下、30mMヨード酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル-アセトン溶液(250 μ l)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液に、酢酸(1.8 μ l)を加え反応を停止させ、減圧下、有機溶媒を除去した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG-I(13.4 mg)を得た。

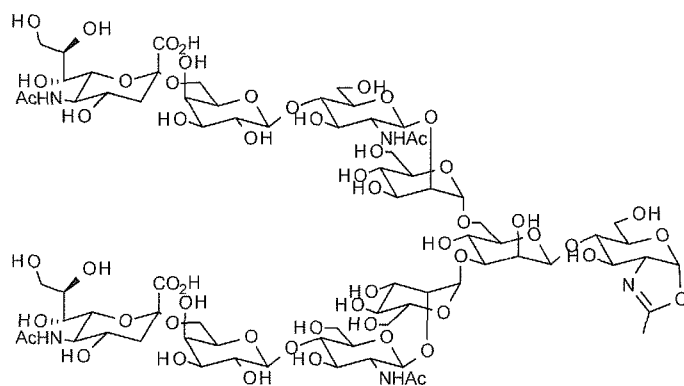
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{88}H_{144}IN_7O_{63}$: $[M+2H]^{2+}$ 1218.5(ave.), Found 1218.3

。

[0276] <実施例 1 - 1 2>

(1 - 1 2 A) SG-0xa (化合物 1 - 1 2 A、下記式からなる化合物) の合成

[0277] [化67]



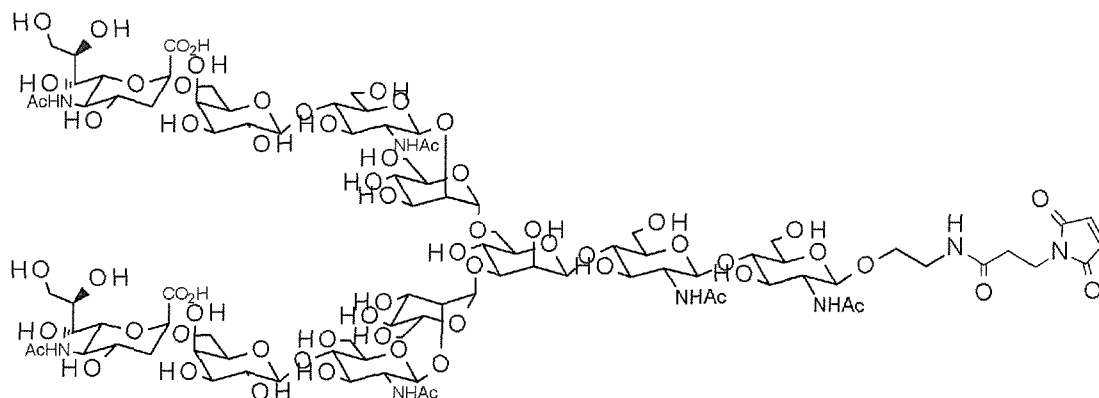
[0278] ジシアロオクタサッカリド (東京化成工業 (株) , 26.0 mg, 12.8 μ mol) を蒸留水(210 μ l)に溶解し、室温でトリエチルアミン (80.7 μ l, 579 μ mol) を加えた。0℃で2-クロロ-1, 3-ジメチルイミダゾリウムクロリド (32.6 mg, 192 μ mol) の水溶液 (52 l) を加えて、0℃で2時間攪拌した。Sephadex G15 (0.03% NH_3 水溶液) で精製し、0.1N水酸化ナトリウム水溶液 (100 μ l) を加えて凍結乾燥し、目的物SG-0xaを無色固体 (24.6 mg, 95%) として得た。

NMR(in D20) (図 1 のチャート) 。

[0279] <実施例 1 - 1 3>

(1 - 1 3 A) SG-M (化合物 1 - 1 3 A、下記式からなる化合物) の合成

[0280] [化68]



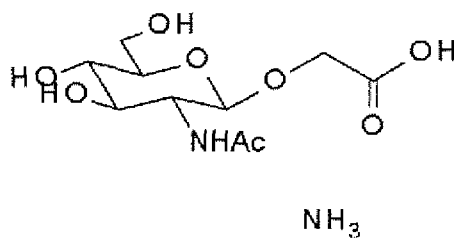
[0281] (1-11B) で製造したSG-NH₂(30.0mg)を43mM炭酸水素ナトリウム水溶液(1500ul)に溶解させ、氷冷下、13.9mM 3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル-アセトン溶液(500ul)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液に、酢酸(3.6ul)を加え反応を停止させ、減圧下、有機溶媒を除去した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3)にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG-M(29mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₉₃H₁₄₈N₈O₆₅: [M+2H]²⁺ 1209.4, Found 1209.4。

[0282] <実施例 1-14>

(1-14A) 2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酪酸 アンモニウム塩 (化合物 1-14A、下記式の化合物) の合成

[0283] [化69]

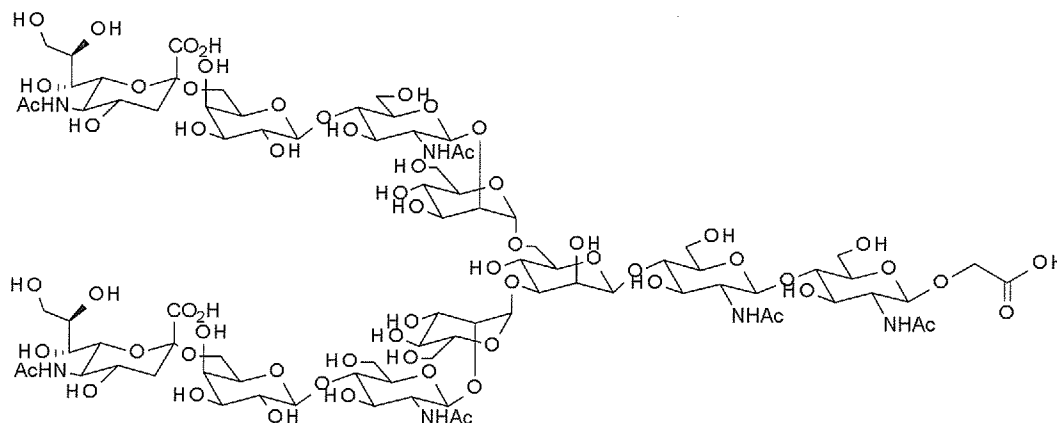


[0284] 1-2C (200 mg)を蒸留水(2 ml)に溶解させた後に、28-30%アンモニア水(100 μl)加え、凍結乾燥した。得られたアモルファス状の固体 1-14Aは精

製せずにご利用。

[0285] (1-14B) SG-A (化合物1-14B、下記式からなる化合物) の合成

[0286] [化70]



[0287] シアリルグリコペプチド(58 mg)を0.2Mリン酸緩衝溶液(pH6.25)(254 μ l)に溶解させた後に、Glycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業(株), 1 U/ml)水溶液(100 μ l)を加えた。更に、1-14A(24 mg)の0.2Mリン酸緩衝溶液(pH6.25)(152 μ l)を加え、28℃で72時間反応させた。反応液に、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(3000 μ l)加え反応を停止させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC(資生堂、Proteonavi)にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG-A(19.5 mg)を得た。

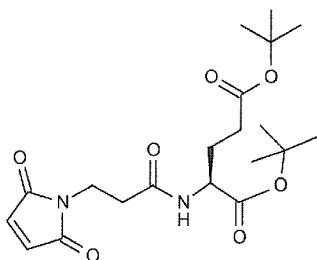
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{86}H_{140}N_6O_{64}$: $[M+2H]^{2+}$ 1142.0(ave.), Found 1141.4

[0288] <实施例 1-15>

(1-15A) (2S)-2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]ペンタンジカルボン酸ジtert-ブチル（化合物1-15A、下記式の化合物）の合成

[0289]

[化71]

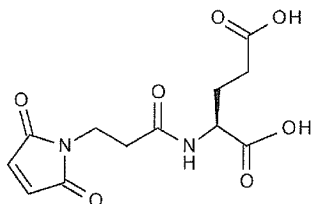


[0290] (2S)-2-アミノペンタンジカルボン酸ジtert-ブチル 塩酸塩 (295 mg, 1.00 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (5.0 mL) を0℃に冷却し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.510 mL, 3.00 mmol) および(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノエート (293 mg, 1.10 mmol) を順次加え、0℃にて1時間攪拌し、さらに室温まで昇温して、室温にて18時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチルを加え、有機層を1 M塩酸および飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル=95：5-0：100, v/v）で精製し、目的物1-15Aを淡黄色油状物（400 mg、収率98%）として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6.70 (2H, s), 6.22 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.48–4.42 (1H, m), 3.91–3.79 (2H, m), 2.60–2.52 (2H, m), 2.35–2.18 (2H, m), 2.13–2.04 (1H, m), 1.93–1.84 (1H, m), 1.46 (9H, s), 1.44 (9H, s).

[0291] (1-15B) (2S)-2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]ペンタンジカルボン酸(化合物1-15B、下記式の化合物)の合成

[0292] [化,72]

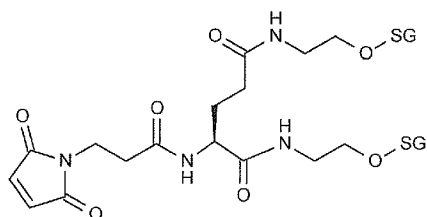


[0293] 1-15A (400 mg, 0.976 mmol) を用い、(1-9B) と同様の手法に従って目的物 1-15B (260 mg、収率89%) を得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{12}H_{15}N_2O_7$: $[M+H]^+299$, Found 299.

[0294] (1-15C) SG-(SG-Gln*)-Mal (化合物1-15C、下記式からなる化合物) の合成

[0295] [化73]



[0296] 1-15B (30.0 mg, 0.101 mmol) およびN-ヒドロキシコハク酸イミド (58.0 mg, 0.504 mmol) のジクロロメタン溶液 (0.400 mL) を 0℃ に冷却し、ピリジン (0.200 mL, 2.48 mmol) およびトリフルオロ酢酸無水物 (70.0 μ L, 0.500 mmol) を順次加え、0℃ にて 10 分間攪拌した。室温まで昇温し、室温にてさらに 30 分間攪拌した。反応溶液にジクロロメタンを加え、有機層を 1 M 塩酸で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン : 酢酸エチル = 25 : 75 - 0 : 100, v/v) で精製し、淡黄色泡状物質 (25 mg) を得た。

続いて、得られた生成物の一部 (2.00 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (200 μ L) に溶解し、(1-11B) で製造した SG-NH₂ (20.0 mg, 8.41 μ mol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (15 μ L, 88.0 μ mol) の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 (600 μ L) に加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応溶液に 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液 (2.0 mL) を加え、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 SG-(SG-Gln*)-Mal (15.0 mg、収率 76%) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₁₈₄H₂₉₉N₁₆O₁₂₉: [M+3H]³⁺ 1599.7 (ave.), Found 1599.6

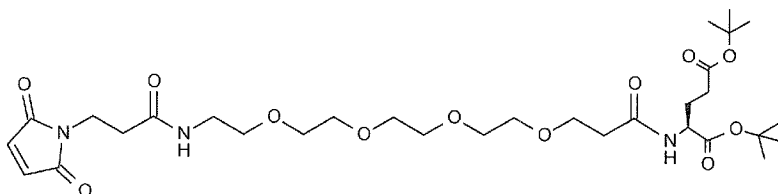
.

。

[0297] <実施例 1-16>

(1-16A) (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノイルアミノ]ペンタンジカルボン酸ジtert-ブチル (化合物1-16A、下記式の化合物) の合成

[0298] [化74]



[0299] (2S)-2-アミノペンタンジカルボン酸ジtert-ブチル塩酸塩 (58.0 mg, 0.196 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (1.0 mL) を0℃に冷却し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.100 mL, 0.588 mmol) および3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) (100 mg, 0.195 mmol) を順次加え、0℃にて1時間攪拌し、さらに室温まで昇温して、室温にて20時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチルを加え、有機層を1M塩酸および飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン：メタノール=98：2-90：10, v/v) で精製し、目的物1-16Aを淡黄色油状物 (100 mg、収率78%) として得た。

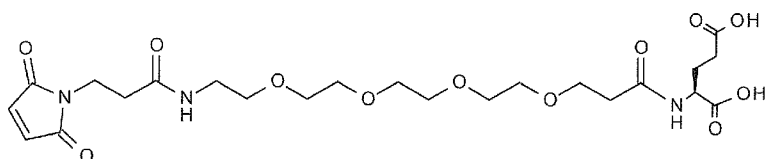
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6.84 (1H, br s), 6.70 (2H, s), 6.46 (1H, br s), 4.53-4.45 (1H, m), 3.85 (2H, t, J = 7.2 Hz), 3.80-3.71 (2H, m), 3.68-3.60 (12H, m), 3.54 (2H, t, J = 5.1 Hz), 3.42 (2H, q, J = 5.1 Hz), 2.54-2.49 (4H, m), 2.37-2.21 (2H, m), 2.16-2.07 (1H, m), 1.92-1.83 (1H, m), 1.46 (9H, s), 1.43 (9H, s).

MS (ESI): Calcd for C₃₁H₅₂N₃O₁₂: [M+H]⁺658, Found 658.

[0300] (1-16B) (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノイルアミ

ノ]ペンタンジオン酸（化合物 1-16B、下記式の化合物）の合成

[0301] [化75]

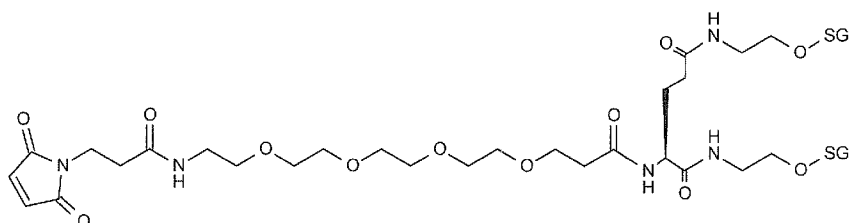


[0302] 1-16 (100 mg, 0.152 mmol) を用い、(1-9B) と同様の手法に従って目的物 1-16B (83 mg、収率100%) を得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{23}H_{36}N_3O_{12}$: $[M+H]^+$ 546, Found 546.

[0303] (1-16C) SG-(SG-Gln*)-PEG(3)-Mal (化合物 1-16C、下記式の化合物) の合成

[0304] [化76]



[0305] 1-16B (32.0 mg, 58.7 μ mol) およびN-ヒドロキシコハク酸イミド (34.0 mg, 0.295 mmol) のジクロロメタン溶液 (0.400 mL) を 0℃ に冷却し、ピリジン (0.200 mL, 2.48 mmol) およびトリフルオロ酢酸無水物 (42.0 μ L, 0.300 mmol) を順次加え、0℃ にて 30 分間攪拌した。室温まで昇温し、室温にてさらに 2 時間攪拌した。反応溶液にジクロロメタンを加え、有機層を 1 M 塩酸で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物 (35 mg) を得た。

続いて、得られた粗生成物の一部 (0.31 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (20 μ L) に溶解し、(1-11B) で製造した SG-NH₂ (2.0 mg, 0.88 μ mol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.5 μ L, 8.8 μ mol) の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 (30 μ L) に加え、室温にて 18 時間攪拌した。反応溶液に 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液 (2.0 mL) を加え、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 H

PLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG-(SG-Gln*)-PEG(3)-Mal (0.60 mg、収率28%) を得た。

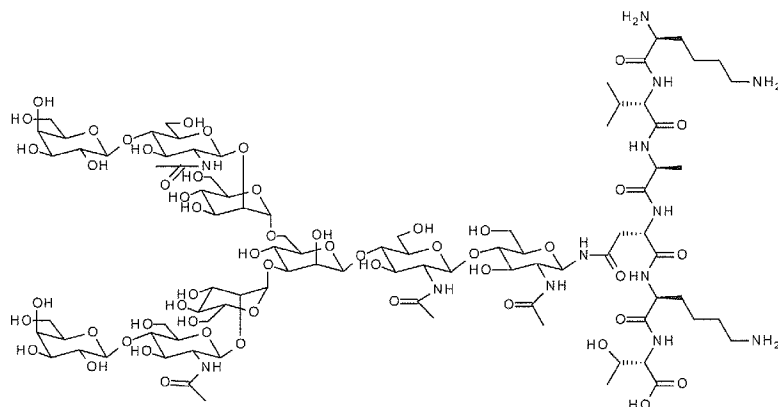
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{195}H_{320}N_{17}O_{134}$: $[M+3H]^{3+}$ 1682.2 (ave.), Found 1682.2

・ ○

[0306] <実施例 1 - 1 7>

(1 - 1 7 A) AG(9)-P (化合物 1 - 1 7 A、下記式の化合物 1) の合成

[0307] [化77]



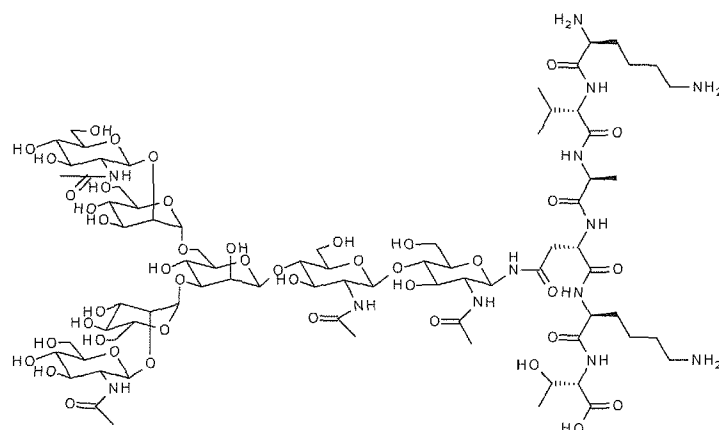
[0308] シアリルグリコペプチド(200 mg)を0.2M酢酸緩衝液(pH5.0)(1000 μ l) に溶解させた後に、ノイラミニダーゼ ([E.C.3.2.1.18], ナカライテスク, 1 U/ml)水溶液 (1000 μ l)を加え、37℃で17時間反応させた。反応終了後、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(2000 μ l)を加えた。この反応を2ロット分まとめて、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 AG(9)-P (307mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{90}H_{155}N_{13}O_{54}$: $[M+2H]^{2+}$ 1142.6(ave.), Found 1142.0

[0309] (1 - 1 7 B) AG(7)-P (化合物 1 - 1 7 B、下記式の化合物) の合成

[0310]

[化78]

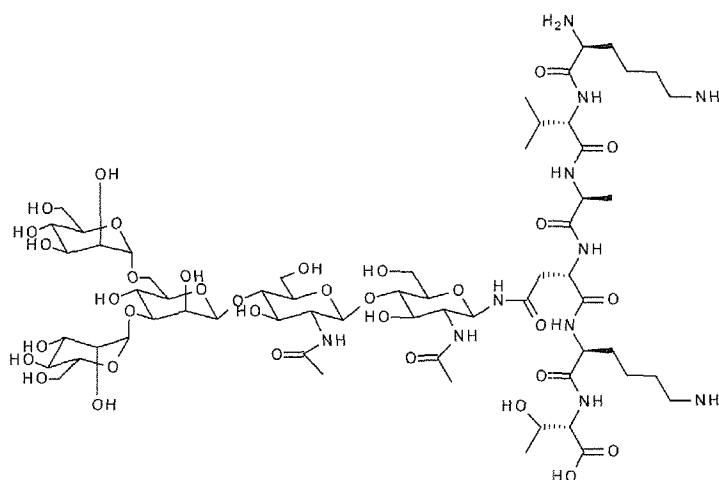


[0311] (1-17A) で製造したAG(9)-P(100mg)、硫酸マグネシウム(0.48 mg)、 β -D-ガラクトシダーゼ (WAKO, 600U/mg) (2 mg)を0.2Mリン酸緩衝液(pH7.0)(2000 μ l) に溶解させ、37℃で24時間反応させた。 β -D-ガラクトシダーゼ (WAKO, 600U/mg) (1 mg)を加え、更に24時間反応させた。反応終了後、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(2000 μ l)を加えた。この反応を2ロット分まとめて、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物AG(7)-P (158 mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $[M+H]^+$ $C_{78}H_{135}N_{13}O_{44}$ 1959.0(ave.), Found 1958.9

[0312] (1-17C) AG(5)-P (化合物1-17C、下記式の化合物) の合成

[0313] [化79]

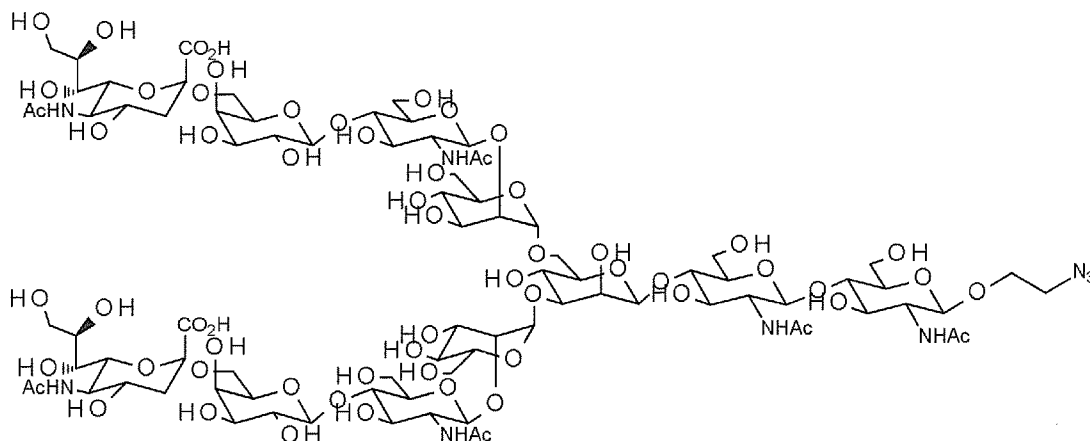


[0314] (1-17B) で製造したAG(7)-P(100 mg)を0.2Mリン酸緩衝液(pH6.25)(3150 μ l) に溶解させ、100 $\times$ BSA(New England Bio Labs)(43 μ l)、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(New England Bio Labs, 4000U/ml)(100 μ l)を加え、37 $^{\circ}$ Cで20時間反応させた。反応終了後、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(1000 μ l)を加えた。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物AG(5)-P(73.8 mg)を得た。ESI-TOF-MS: Calcd for $[M+2H]^{2+}$ C₆₂H₁₀₉N₁₁O₃₄ 777.3(ave.), Found 777.3。

[0315] <実施例1-18>

(1-18A) SG-N₃ (化合物1-18A、下記式の化合物) の合成

[0316] [化80]



[0317] シアリルグリコペプチド(76 mg)を0.2Mリン酸緩衝溶液(pH6.25)(330 μ l) に溶解させた後に、Glycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業, 1 U/ml) 水溶液 (100 μ l)を加えた。更に、N-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアジド (23 mg)の0.2Mリン酸緩衝溶液(pH6.25)(230 μ l)を加え、28 $^{\circ}$ Cで96時間反応させた。反応液に、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(3000 μ l) 加え反応を停止させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (資生堂、Proteonavi) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物を主成分として含む固体を得た。続いて

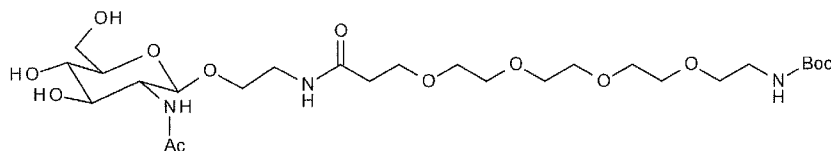
、得られた固体を蒸留水(3000 μ l)に溶解させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 SG-N₃ (34.4 mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₈₆H₁₄₁N₉O₆₂: [M+2H]²⁺ 1147.5, Found 1147.4。

[0318] <実施例 1 - 19>

(1 - 19 A) tert-ブチルN-[2-[2-[2-[2-[3-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチルアミノ]-3-オキソ-プロポキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エチル]カルバメート (化合物 1 - 19 A、下記式の化合物) の合成

[0319] [化81]

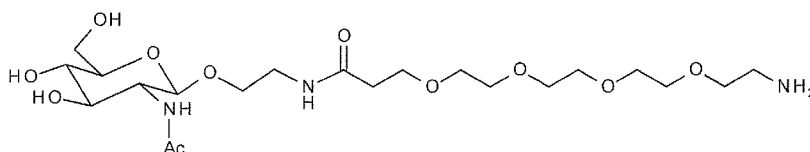


[0320] 3-[2-[2-[2-[2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (100 mg, 0.274 mmol) および 1 - 7 A (110 mg, 0.291 mmol) を用い、(1 - 9 A) と同様の方法に従って、目的物 1 - 19 A を淡黄色泡状物質 (150 mg、収率90%) として得た。

MS (ESI): Calcd for C₂₆H₄₉N₃O₁₃: [M+H]⁺ 612, Found 612.

[0321] (1 - 19 B) N-[2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシエチル]-3-[2-[2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパナミド (化合物 1 - 19 B、下記式の化合物) の合成

[0322] [化82]



[0323] 1 - 19 A (150 mg, 0.245 mmol) をジクロロメタン (2.0 ml) に溶解し、

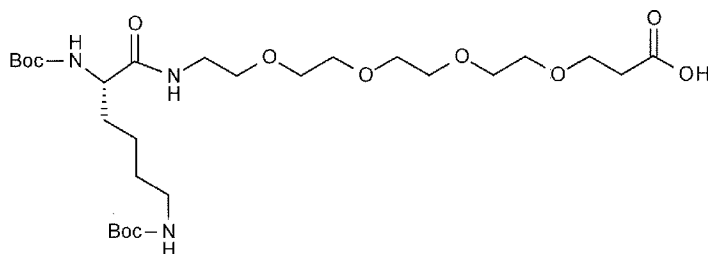
トリフルオロ酢酸 (2.0 mL) を加え、室温にて2時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil OD S-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 1-19B (70 mg, 55%) を無色油状物質として得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{21}H_{41}N_3O_{11}$: $[M+H]^+$ 512, Found 512.。

[0324] <実施例 1-20>

(1-20A) 3-[2-[2-[2-[2-[(2S)-2,6-ビス(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ヘキサノイル]アミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (化合物 1-20A、下記式の化合物) の合成

[0325] [化83]



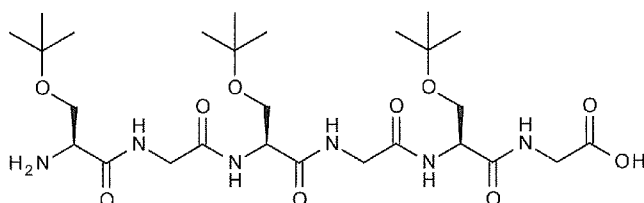
[0326] (2S)-2,6-ビス(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸 (210 mg, 607 μ mol) およびHATU (220 mg, 579 μ mol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (2.0 mL) に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.410 mL, 2.41 mmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。得られた反応溶液を、(1-5A) の手法に従って製造した3-[2-[2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (150 mg, 497 μ mol) およびN, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.260 mL, 1.53 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (0.50 mL) に加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 1-20A (240 mg, 80%) を淡黄色油状物質として得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{27}H_{52}N_3O_{11}$: $[M+H]^+594$, Found 594.。

[0327] <実施例 1 - 2 1>

(1 - 2 1 A) 2-[[[(2S)-2-[[[2-[[[(2S)-2-[[[2-[[[(2S)-2-アミノ-3-tert-ブトキシ-プロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-tert-ブトキシ-プロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-tert-ブトキシ-プロパノイル]アミノ]酢酸 (化合物 1 - 2 1 A、下記式の化合物) の合成

[0328] [化84]



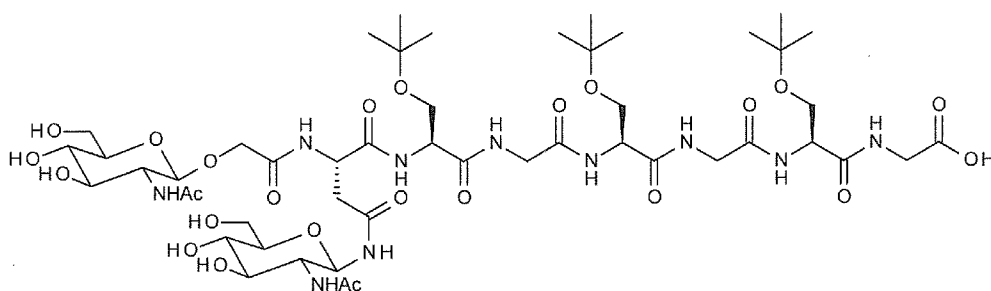
[0329] 1.20 mmol/gの2-クロロトリチルクロライドレジンを (166 mg, 0.200 mmol) を固相合成用のカラムに入れ、ジクロロメタン (3 mL) を加え10分振とうした。ろ過後、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸 (119 mg, 0.400 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (171 μ L, 1.00 mmol) のジクロロメタン (3 mL) 溶液を加え、室温で2時間攪拌した。ろ過後、ジクロロメタン混合溶液 (ジクロロメタン : メタノール : N,N-ジイソプロピルエチルアミン = 85 : 10 : 5, v/v) で3回、ジクロロメタンで3回、N,N-ジメチルホルムアミドで3回洗浄した。得られたレジンをAppliedBiosystems社製のペプチド合成機433A Peptide Synthesizerにセットし、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護、縮合、脱保護を合成機で行うことで、ペプチド鎖を伸長した。脱保護にはピペリジンとN-methylpyrrolidoneを用い、縮合反応にはHATUとN,N-ジイソプロピルエチルアミンとN-methylpyrrolidoneと各種カルボン酸を用いた。カルボン酸は(2S)-3-tert-ブトキシ-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロパン酸、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸、(2S)-3-tert-ブトキシ-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロパン酸、2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)酢酸、(2S)-3-tert-ブトキシ-2-(tert-ブトキシカルボニルアミ

ノ)プロパン酸の順で各縮合反応に使用した。得られたレジンに固相合成用のカラムに入れ、ヘキサフルオロイソプロパノール (1 mL) とジクロロメタン (3 mL) の混合溶液を加え、室温で2時間振とうした。ろ過してレジンを除き、得られたろ液を減圧下濃縮した。ジクロロメタンで6回共沸し真空ポンプで乾燥することで、目的物 1-21A を白色固体 (120 mg、収率97%) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{27}H_{50}N_6O_{10}$: $[M+H]^+619.4$, Found 619.4.

[0330] (1-21B) 2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-[[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-[[2-[[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]アセチル]アミノ]-4-オキソブタノイル]アミノ]-3-tert-ブトキシ-プロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-tert-ブトキシ-プロパノイル]アミノ]アセチル]アミノ]-3-tert-ブトキシ-プロパノイル]アミノ]酢酸 (化合物 1-21B、下記式の化合物) の合成

[0331] [化85]



[0332] J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284-290. の手法に従って製造した (2S)-4-[[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (84.5 mg, 0.194 mmol) と HATU (73.8 mg, 0.194 mmol)、を N,N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (66 μ L, 0.388 mmol) を加え、室温で3分攪拌した。この溶液を、1-21A (100 mg, 0.162 mmol) に加えて室温で0.5時間攪拌した。反応液を

水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行った。得られた化合物にトリフルオロ酢酸 (0.1 mL) と水 (0.9 mL) の混合溶液を加え、終夜攪拌した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、中間体を白色固体 (14.7 mg、10%) として得た。

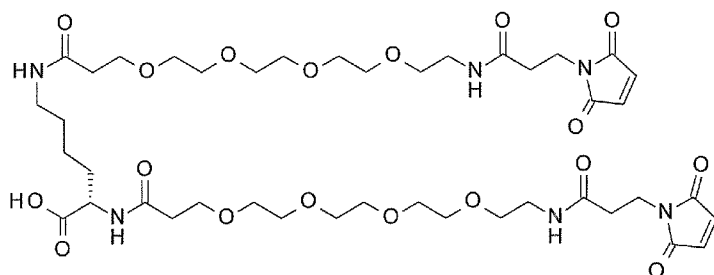
1-2 C (5.91 mg, 0.0212 mmol) と HATU (8.04 mg, 0.0212 mmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (9.05 μ L, 0.0529 mmol) を加え、室温で3分攪拌した。この溶液を、得られた中間体 (16.5 mg, 0.0176 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) 溶液に加え、室温で0.5時間攪拌した。反応液を水で薄め、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 1-2 1 B を白色固体 (14.0 mg、収率66%) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{49}H_{85}N_{11}O_{23}$: $[M+H]^+$ 1197.6, Found 1197.5.。

[0333] <実施例 1-2 2>

(1-2 2 A) (2S)-2,6-ビス[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノイルアミノ]ヘキサン酸 (化合物 1-2 2 A、下記式の化合物) の合成

[0334] [化86]



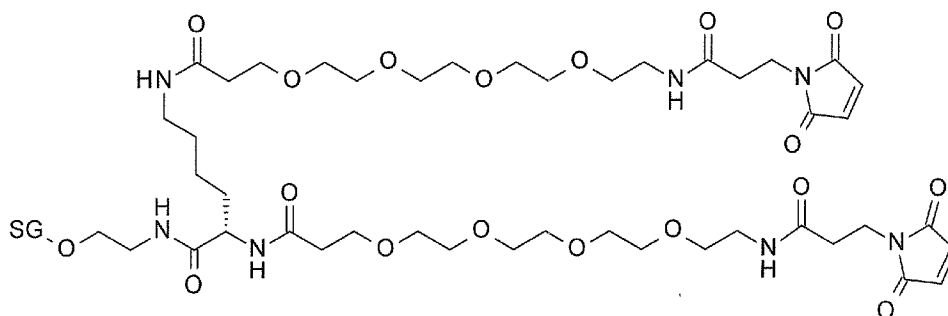
[0335] リシン (26.0 mg, 0.178 mmol) を 0.10 M リン酸バッファー (pH 7.0) (0.40 mL) に溶解し、3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイ

ルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸(2,5-ジオキソ
ピロリジン-1-イル) (200 mg, 0.390 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶
液 (0.40 mL) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応溶液に0.2%トリフルオ
ロ酢酸水溶液 (2.0 mL) を加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフ
ルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Ine
rtsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して標記目的化合物 1-22A
(106 mg、収率63%) を得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{42}H_{65}N_6O_{18}$: $[M-H]^-$ 941, Found 941.

[0336] (1-22B) SG-Lys*-[PEG(3)-Mal]₂ (化合物 1-22B、下記式の化合物)
の合成

[0337] [化87]



[0338] 上記の通り製造した化合物 1-22A (10.0 mg, 10.6 μ mol)、(1-11
B) で製造したSG-NH₂ (19.4 mg, 8.13 μ mol) およびHATU (4.00 mg, 10.6 μ m
ol) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (1.0 mL) に、N, N-ジイソプロピル
エチルアミン (8.80 μ L, 51.7 μ mol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反
応溶液を0.5%トリフルオロ酢酸水溶液 (6.0 mL) に加え、0.1%トリフルオロ
酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相H
PLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して標
記目的化合物SG-Lys*-[PEG(3)-Mal]₂ (10.0 mg、収率25%) を得た。

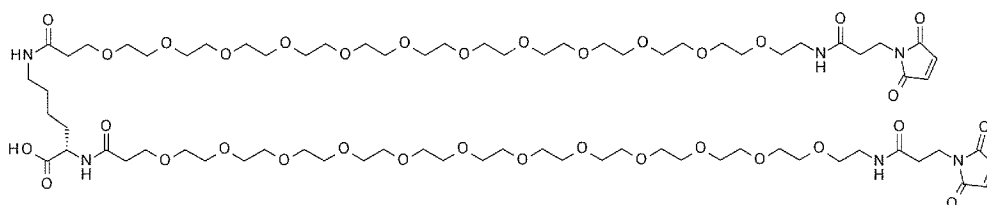
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{128}H_{205}N_{13}O_{79}$: $[M-2H]^{2-}$ 1595.0 (ave.), Found 1595.0

. .

[0339] <実施例 1-23>

(1-23A) (2S)-2,6-ビス[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノイルアミノ]ヘキサン酸 (化合物1-23A、下記式の化合物) の合成

[0340] [化88]

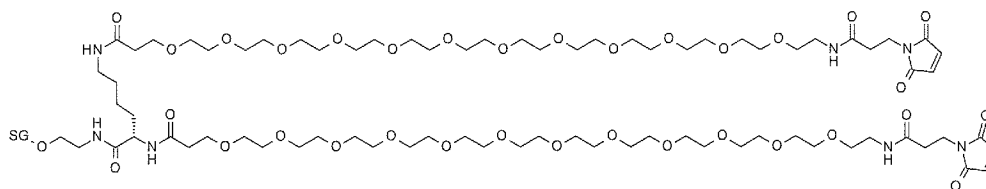


[0341] リシン (7.70 mg, 52.7 μ mol) および(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノエート(100 mg, 115 μ mol)を用い、(1-22A)と同様の方法に従って、標記目的化合物1-23Aを無色油状物(36.0 mg、収率41%)として得た。

MS (ESI): Calcd for $C_{74}H_{129}N_6O_{34}$: [M-H]⁻1645, Found 1645.

[0342] (1-23B)SG-Lys*-[PEG(11)-Mal]₂ (化合物1-23B、下記式の化合物) の合成

[0343] [化89]



[0344] 化合物1-23A(19.0 mg, 11.5 μ mol)および(1-11B)で製造したSG-NH₂(25.0 mg, 10.5 μ mol)を用い、(1-22B)と同様の方法に従って、標記目的化合物SG-Lys*-[PEG(11)-Mal]₂を無色油状物(14.0 mg、収率34%)として得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{180}H_{269}N_{13}O_{95}$: [M-2H]²⁻ 1947.4 (ave.), Found 1947.3

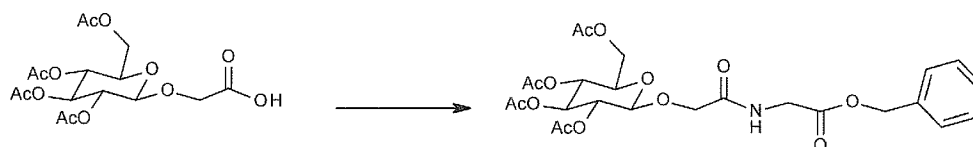
・ ○

[0345] <実施例 1 - 2 4 >

(1 - 2 4 A)

2-[[2-[(2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3, 4, 5-トリアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸]アミノ]酢酸ベンジル (化合物 1 - 2 4 A、下記式の反応産物) の合成

[0346] [化90]



[0347] 既知化合物である2-[[2-[(2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3, 4, 5-トリアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸 (Tetrahedron Asymmetry, 2008, 19, 1919-1933) (670mg)をDMF(6ml)に溶解させ、HATU(630mg)とDIPEA(0.57ml)を加え、室温で4分攪拌後、グリシンベンジルエステル塩酸塩(370mg)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで薄め、10%食塩水で2回、1規定塩酸で1回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 60 : 40 - 20 : 80, v/v) で精製し、目的化合物 1 - 2 4 A (840mg、収率62%) をアモルファスとして得た。

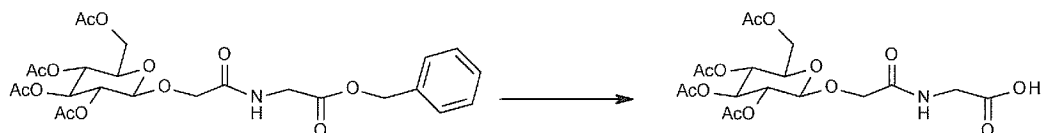
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.38-7.35 (5H, m), 6.99-6.98 (1H, br m), 5.23-5.21 (3H, m), 5.11-5.04 (2H, m), 4.56 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.34 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 4.20-4.09 (5H, m), 3.73-3.71 (1H, m), 2.08 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.03 (3H, s).

ESI-LC-MS: Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_{13}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 554, Found 554.

[0348] (1 - 2 4 B) 2-[[2-[(2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3, 4, 5-トリアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸]アミノ]酢酸 (化合物 1 - 2 4 B、下記式の反応産物) の合成

[0349]

[化91]



[0350] 化合物 1-24 A (840mg) を用いて、(1-2 B) と同様の手法の手法に従って、目的化合物 1-24 B (700mg, 収率quant.) をアモルファスとして得た。

ESI-LC-MS: Calcd for $C_{18}H_{25}NO_{13}$: $[M-H]^-$ 462, Found 462.

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7.05-7.04 (1H, br m), 5.24 (1H, t, $J = 9.5$ Hz), 5.12-5.05 (2H, m), 4.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.35 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 4.27-4.05 (6H, m), 3.76-3.75 (1H, m), 2.08-2.04 (12H, m).

[0351] (1-24 C) 2-[[2-[(2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3, 4, 5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸]アミノ]酢酸 (化合物 1-24 C、下記式の反応産物) の合成

[0352] [化92]



[0353] 化合物 1-24 B (450mg) を用いて、(1-2 C) と同様の手法の手法に従って、目的化合物 1-24 C (286mg, 収率quant.) をアモルファスとして得た。そのまま次の反応に用いた。

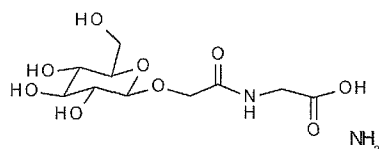
1H -NMR (D_2O , TMS) δ : 4.54 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.43 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 4.31 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 3.91-3.89 (3H, m), 3.73 (1H, dd, $J = 12.2, 5.4$ Hz), 3.53-3.37 (4H, m).

ESI-LC-MS: Calcd for $C_{10}H_{17}NO_9$: $[M-H]^-$ 294, Found 294.

[0354] (1-24 D) 2-[[2-[(2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3, 4, 5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸]アミノ]酢酸 アンモニウム塩 (化合物 1-24 D、下記式の化合物) の合成

[0355]

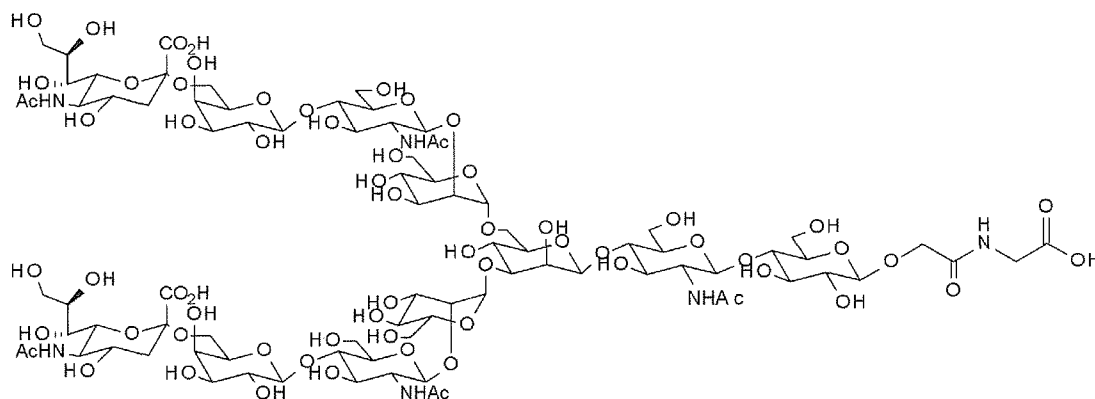
[化93]



[0356] 化合物 1-24C (286mg) を用いて、(1-14A) と同様の手法の手法に従って、目的化合物 1-24D (325mg) をアモルファスとして得た。精製せずに用いた。

[0357] (1-24E) SG(Glc)-Gly-A (化合物 1-24E、下記式からなる化合物、化合物 1-24E) の合成

[0358] [化94]



[0359] シアリルグリコペプチド(191 mg)を0.2Mリン酸緩衝溶液(pH6.25)(1000 μ l)に溶解させた後に、Glycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業(株), 1 U/ml)水溶液 (300 μ l)を加えた。更に、1-24D (125 mg)の0.2Mリン酸緩衝溶液(pH6.25)(370 μ l)を加え、28℃で72時間反応させた。反応液に、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(3000 μ l)加え反応を停止させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (Inertsil ODS-3、GLサイエンス) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG(Glc)-Gly-A(88 mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{86}H_{140}N_6O_{65}$: $[M+4H]^{4+}$ 1149.4(ave.), Found 1149.4

[0360] また、実施例1-24の反応を参考にして、化合物 1-24D の糖構造を、Glc以外の糖 (例えば、Man, Galなどに置き換えた化合物を合成することができ

、これらを被転移化合物として採用して、（１－２４Ｅ）と同様の糖転移反応を行うことで、SG (Man) -Gly、SG(Gal)-Gly等の還元末端改変糖鎖を合成することができる。

[0361] さらに、実施例１－１１、１－１２、１－１３及び１－１４の方法において、実施例１－２４の反応を参考に出発物質（被転移化合物）の糖構造を適宜、所望のものに返還して用いることで、SG-NH₂、SG-I、SG-oxa、SG-A等における還元末端改変糖鎖を、適宜合成することができる。

[0362] [実施例２]

以下において、構造式中で、単に「hANP」と表記される場合、修飾ペプチド中のhANPペプチドがhANP(1-28)であることを示す。

[0363] <実施例２－１> SG-hANP(1-28)(化合物２－１)の合成

(２－１Ａ) hANP-TFA塩（トリフルオロ酢酸塩）の調製

以下の反応に、使用するhANP-TFA塩は、下記の手順に従って、調製した。

調製法１

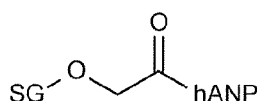
カルペリチド酢酸塩（hANP(1-28)酢酸塩）（100 mg）を蒸留水(4000 μl)に溶解させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC（GLサイエンス、Inertsil ODS-3）にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物(89.6 mg)を得た。

調製法２

カルペリチド酢酸塩（hANP(1-28)酢酸塩）（250 mg）を蒸留水(30 ml)に溶解させ、トリフルオロ酢酸(600 μl)加え、凍結乾燥し、これ以上精製せずにそのまま用いた。

[0364] (２－１Ｂ) SG-hANP(1-28)（下記式の化合物、化合物２－１）の合成

[0365] [化95]



[0366] (２－１Ｂ－１ SG-hANP(1-28)（化合物２－１）TFA塩の合成

(1-14B) で合成した SG-A (97.7 mg) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (1000 μ l) に、HATU (16.3 mg) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (1000 μ l) を加えた後に、ジイソプロピルエチルアミン (30 μ l) を加え、室温で5分攪拌し、速やかに次の反応に用いた。

(2-1A) の手順に従って調製した hANP-TFA 塩 (100 mg) を N,N-ジメチルホルムアミド (1200 μ l)、蒸留水 (320 μ l) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン (22.5 μ l) を加えた。この溶液に対して、事前に調製した活性エステルを含む N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2000 μ l) を加え、1時間攪拌した。反応終了後、氷冷下、0.2% トリフルオロ酢酸水溶液 (20 ml) に加えた。酢酸 (2 ml) を加えて、不溶物を溶解させ、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 SG-hANP (1-28) (化合物 2-1) -TFA 塩 (91.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{213}H_{341}N_{51}O_{102}S_3$: $[M+H]^+$ 5342.2, Found 5342.2

[0367] (2-1B-2) SG-hANP (1-28) (化合物 2-1) 酢酸塩の合成

(1-14B) で合成した SG-A (790mg) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (18ml) に、TSTU (0-(N-スクシンイミジル)-N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート) (104mg) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2ml) を加えた後に、ジイソプロピルエチルアミン (241 μ l) を加え、室温で60分攪拌し、次の反応に用いた。

カルペリチド酢酸塩 (hANP (1-28) 酢酸塩) (1000mg) を N,N-ジメチルホルムアミド (12ml)、蒸留水 (3.2ml) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン (241 μ l) を加えた。この溶液に対して、事前に調製した活性エステルを含む N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (20ml) を加え、1時間攪拌した。反応終了後、アセトニトリル (32ml) を加え、沈殿物をろ取した。N,N-ジメチルホルムアミド/アセトニトリル (1/1) (30ml)、及びアセトニトリル (100ml) で洗浄後、得られた固形物を減圧乾燥した。この固形物を蒸留水に溶解させ、0.1% 酢酸水溶液と 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil

ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG-hANP(1-28) (化合物 2-1) -酢酸塩 (1056mg) を得た。

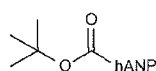
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{213}H_{341}N_{51}O_{102}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1337.1(ave.), Found 1337.0

[0368] このように、出発物質として用いるhANPペプチドの塩の種類に応じて、目的物である修飾ペプチドも対応する塩として合成される。以下の実施例では、特に指定がある場合を除き、hANPペプチドとしてはTFA塩を採用し目的物である修飾ペプチドはTFA塩として得られており、この場合塩の種類は特に明示しない。なお、(2-1B-2) に準じて合成することで、全ての目的物を酢酸塩として合成することができる。

[0369] <実施例 2-2> hANP(1-28)-SG (化合物 2-2) の合成

(2-2A) Boc-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0370] [化96]

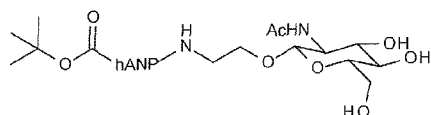


[0371] hANP(1-28)-酢酸塩 (62.5 mg) を蒸留水 (1.3 ml) に溶解し、室温で二炭酸ジ-t-ブチル (0.9 mg, 324.6 μ mol) のt-ブチルアルコール溶液 (400 μ l) を後、トリエチルアミン (13.6 μ l) の水溶液 (200 μ l) を加え、室温で3時間攪拌した。蒸留水 (6 ml)、アセトニトリル (2 ml)、酢酸 (1 ml) を加えて不溶物を溶解させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物Boc-hANP(1-28) (59.9 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{132}H_{211}N_{45}O_{41}S_3$: $[M+H]^+$ 3179.5, Found 3179.7

[0372] (2-2B) Boc-hANP(1-28)-GlcNAc (下記式の化合物) の合成

[0373] [化97]

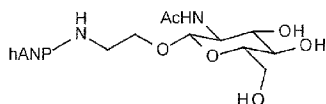


[0374] (2-2A) で製造したBoc-hANP(1-28) (59.9 mg) と化合物 1-7A (59.7 mg) を蒸留水 (0.2 ml) に溶解し、室温でHATU (35.8 mg) のジメチルホルムアミド溶液 (2.0 ml) とトリエチルアミン (15.8 μ l) を加えて、室温で2時間攪拌した。氷冷したトリフルオロ酢酸 (8.7 μ l) の水溶液 (5 ml) に反応液を加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物Boc-hANP(1-28)-GlcNAc (38.7 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{142}H_{229}N_{47}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3425.6, Found 3426.0

[0375] (2-2C) hANP(1-28)-GlcNAc(下記式の化合物)の合成

[0376] [化98]

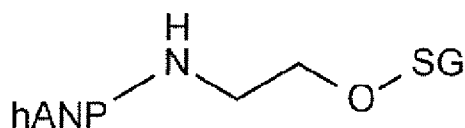


[0377] (2-2B) で製造したBoc-hANP(1-28)-GlcNAc (38.7 mg) を20%トリフルオロ酢酸水溶液 (5 ml) と酢酸 (1 ml) に溶解し、室温で7時間静置した。蒸留水 (10 ml) を加えて凍結乾燥した。粗精製物を0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物hANP(1-28)-GlcNAc (21.8 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{137}H_{221}N_{47}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3325.6, Found 3425.5

[0378] (2-2D) hANP(1-28)-SG (下記式の化合物、化合物 2-2) の合成

[0379] [化99]



[0380] (1-12A) で製造したSG-0xaの0.2 Mリン酸緩衝溶液 (60 mM, 120 μ l) に、室温でGlycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業 (株) , 1 U/ml,

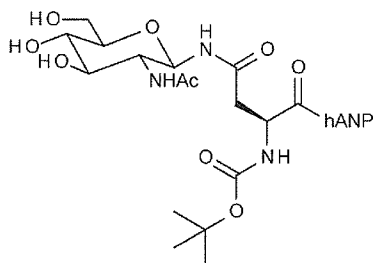
48 μ l) を加えた後、室温で (2-2 C) で製造した hANP(1-28)-GlcNAc (6.0 mg, 1.8 μ mol) のジメチルスルホキシド溶液 (72 μ l) を2回に分けて15分間隔で加え、25°Cで2時間振とうした。室温で0.2%トリフルオロ酢酸水溶液 (1.5 ml) を加えて反応を停止させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 hANP(1-28)-SG (化合物 2-2) (6.2 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{213}H_{334}N_{52}O_{100}S_3$: $[M+H]^+$ 5327.3, Found 5326.7。

[0381] <実施例 2-3> (SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物 2-3) の合成

(2-3 A) Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0382] [化100]



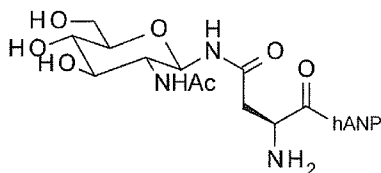
[0383] J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284-290の記載に準じて合成した (2S)-4-[[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (42.4 mg, 0.0976 mmol) と (2-1 A) の調整法 2 の方法で hANP(1-28)-酢酸塩 (31.3 mg) から調整した hANP(1-28)-TFA塩を用いて、(2-1 B) と同様の手法に従って目的物 Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (13.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{144}H_{230}N_{48}O_{48}S_3$: $[M+H]^+$ 3495.6, Found 3496.5

[0384] (2-3 B) (GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0385]

[化101]

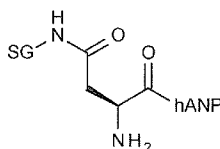


[0386] (2-3A) で製造したBoc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (13.0 mg) より (2-2C) と同様の手法に従って、目的物(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (5.83 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{139}H_{222}N_{48}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3396.6, Found 3396.6

[0387] (2-3C) (SG-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-3) の合成

[0388] [化102]



[0389] (2-3B) で製造した(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (4.90 mg) より (2-2D) と同様の手法に従って目的物(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (化合物2-3) (2.17 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{215}H_{345}N_{53}O_{102}S_3$: $[M+H]^+$ 5398.3, Found 5398.4.

[0390] <実施例2-4> (SG-)Asn-hANP(2-28)(化合物2-4) の合成

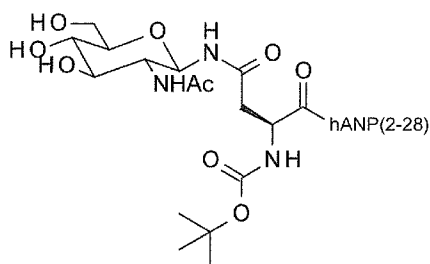
(2-4A) hANP(2-28)の調製

hANP(1-28)-酢酸塩 (100 mg) を1.5%ジメチルアリルアミン-60%ピリジン-38.5%水の混合溶液 (10.4 mL) に溶かし、室温でフェニルイソチオシアネート (1.04 mL) を加え、50℃で30分攪拌した。室温まで冷却し、水、酢酸を加えた。ベンゼンで3回洗浄し、水層を凍結乾燥した。トリフルオロ酢酸 (2.6 mL) を加え、50℃で30分攪拌した後、トリフルオロ酢酸を留去した。水、酢酸を加え、ベンゼンで3回洗浄し、水層を凍結乾燥した。水、酢酸に溶かし、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物ANP(2-28)を白色固体 (50 mg) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{124}H_{198}N_{44}O_{37}S_3$: $[M+H]^+$ 2992.4, Found 2992.0

[0391] (2-4 B) Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (下記式の化合物) の合成

[0392] [化103]

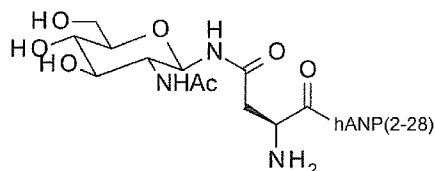


[0393] hANP(1-28)の代わりに (2-4 A) で製造したhANP(2-28) (25.0 mg) を用いて (2-3 A) と同様の手法に従って、目的物Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (13.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{141}H_{225}N_{47}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3409.6, Found 3409.5

[0394] (2-4 C) (GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (下記式の化合物) の合成

[0395] [化104]

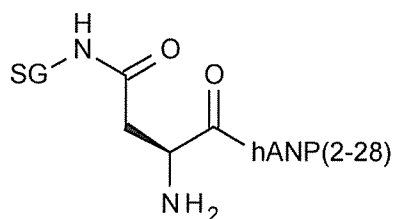


[0396] (2-4 B) で製造したBoc-(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (13.0 mg) より (2-2 C) と同様の手法に従って、目的物(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (6.86 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{136}H_{217}N_{47}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3309.5, Found 3309.5

[0397] (2-4 D) (SG-)Asn-hANP(2-28) (下記式の化合物、化合物 2-4) の合成

[0398] [化105]



[0399] (2-4 C) で製造した(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (5.75 mg) より (2-2

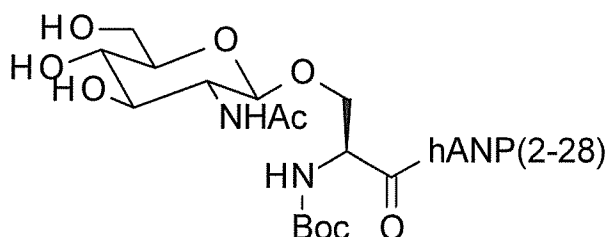
D)と同様の手法に従って目的物(SG-)Asn-hANP(2-28)(化合物2-4)(3.80 mg)を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{212}H_{340}N_{52}O_{100}S_3$: $[M+H]^+$ 5313.4(ave.), Found 5314.7。

[0400] <実施例2-5>(SG-)Ser-hANP(2-28)(化合物2-5)の合成

(2-5A) Boc-(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28)(下記式の化合物)の合成

[0401] [化106]

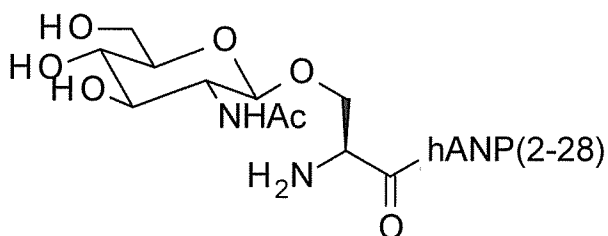


[0402] 化合物1-1D(40.8 mg)と(2-4A)で製造したhANP(2-28)(25.0 mg)を用いて、(2-3A)と同様の手法に従って、目的物Boc-(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28)(13.0 mg)を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{140}H_{224}N_{46}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3382.6, Found 3382.7

[0403] (2-5B) (GlcNAc-)Ser-hANP(2-28)(下記式の化合物)の合成

[0404] [化107]



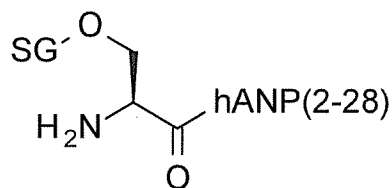
[0405] (2-5A)で製造したBoc-(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28)(13.0 mg)を用いて(2-2C)と同様の手法に従ってBocを除去し、目的物(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28)(6.36 mg)を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{135}H_{216}N_{46}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3282.5, Found 3282.6

[0406] (2-5C) (SG-Ser)-hANP(2-28)(下記式の化合物、化合物2-5)の合成

[0407]

[化108]

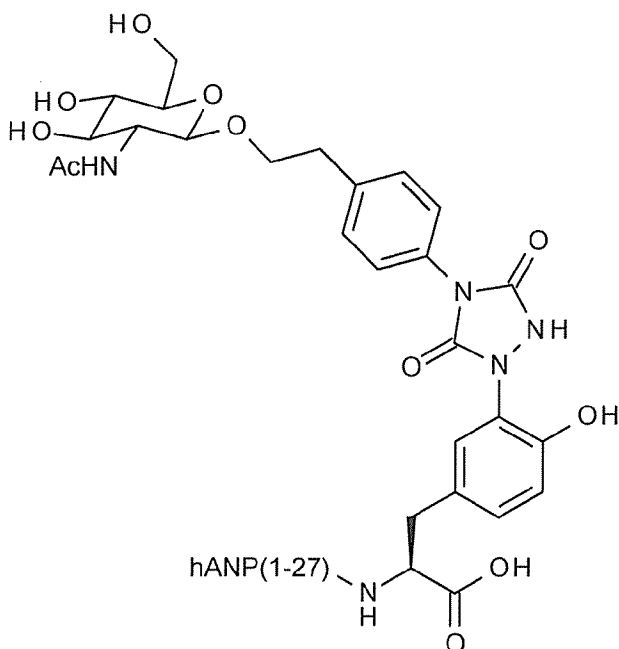


[0408] (2-5B) で製造した(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (5.47 mg) を用いて (2-2D) と同様の手法に従って目的物(SG-)Ser-hANP(2-28) (化合物2-5) (4.40 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{211}H_{339}N_{51}O_{100}S_3$: $[M+H]^+$ 5284.2, Found 5284.4。

[0409] <実施例2-6> hANP(1-27)-(SG-)Tyr (化合物2-6) の合成
(2-6A) hANP(1-27)-(GlcNAc-) Tyr (下記式の化合物) の合成

[0410] [化109]



[0411] 化合物1-6D (30.6 mg) をジメチルホルムアミド (200 μ l) に溶解し、 0°C でN-ブロモスクシイミド (11.5 mg) とピリジン (5.2 μ l) のジメチルホルムアミド溶液 (125 μ l) を加え5分攪拌した。

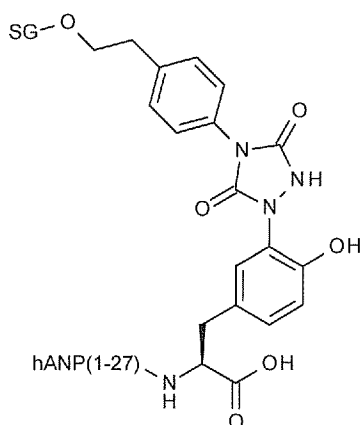
[0412] hANP(1-28)-酢酸塩 (50.0 mg) を0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0、1 ml) に溶解し、 0°C で先に調製したトリアゾールジオン誘導体のジメチルホルムアミド

溶液 (325 μ l) を加えた。室温で5時間静置後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物hANP(1-27)-(GlcNAc-)Tyr (9.8 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{145}H_{225}N_{49}O_{47}S_3$: $[M+H]^+$ 3501.6, Found 3501.6

[0413] (2-6B) hANP(1-27)-(SG-) Tyr (下記式の化合物、化合物2-6) の合成

[0414] [化110]



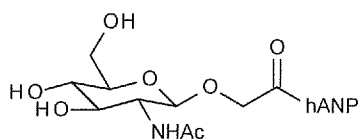
[0415] (2-6A) で製造したhANP(1-27)-(GlcNAc-) Tyr (8.3 mg) を用いて (2-2D) と同様の手法に従って目的物hANP(1-27)-(SG-)Tyr (化合物2-6) (6.3 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{221}H_{348}N_{54}O_{103}S_3$: $[M+H]^+$ 5503.3, Found 5502.8。

[0416] <実施例2-7> SG-hANP(1-28)-SG (化合物2-7) の合成

(2-7A) GlcNAc-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0417] [化111]



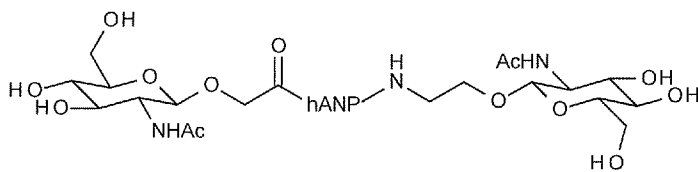
[0418] 化合物1-2C (25.0 mg) をジメチルホルムアミド (0.5 ml) に溶解し、室温でトリエチルアミン (34 ml) を加え、氷冷下、ジメチルチオホスフィノイルクロリド (12.0 mg) のジメチルホルムアミド溶液 (0.5 ml) を加えた後

、室温で1時間攪拌した。一方、hANP(1-28)-酢酸塩 (25 mg) をジメチルホルムアミド (1 ml)、蒸留水 (0.32 ml) に溶解し、室温でトリエチルアミン (25.3 μ l) を加え、氷冷下、先に調製した活性エステルのジメチルホルムアミド溶液 (433 μ l) を加えて、室温で2時間攪拌した。氷冷した0.5%トリフルオロ酢酸水溶液(5 ml)に反応液を加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 GlcNAc-hANP(1-28) (17.8 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{137}H_{218}N_{46}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3340.5, Found 3340.5

[0419] (2-7 B) GlcNAc-hANP(1-28)-GlcNAc (下記式の化合物) の合成

[0420] [化112]

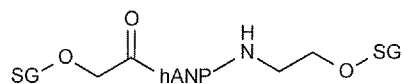


[0421] (2-7 A) で製造したGlcNAc-hANP(1-28) (30.0 mg) 及び化合物 1-7 Aを用いて、(2-2 B) と同様の手法に従って、hANPのC末端にGlcNAcを連結させ、目的物GlcNAc-hANP(1-28)-GlcNAc (10.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{147}H_{236}N_{48}O_{51}S_3$: $[M+H]^+$ 3586.7, Found 3586.7

[0422] (2-7 C) SG-hANP(1-28)-SG (下記式の化合物、化合物 2-7) の合成

[0423] [化113]



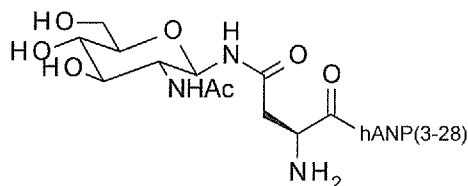
[0424] (2-7 B) で製造したGlcNAc-hANP(1-28)-GlcNAc (6.0 mg) を用いて (2-2 D) と同様の手法に従って目的物SG-hANP(1-28)-SG (化合物 2-7) (13.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{299}H_{482}N_{58}O_{163}S_3$: $[M+H]^+$ 7590.0, Found 7589.0。

[0425] <実施例 2-8> (SG-)Asn-hANP(3-28) (化合物 2-8) の合成

(2-8 A) (GlcNAc-)Asn-hANP(3-28) (下記式の化合物) の合成

[0426] [化114]

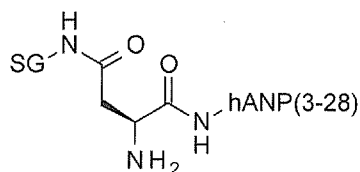


[0427] (2-4 A) で製造したhANP(2-28) (32.0 mg) を再度 (2-4 A) の方法でN末端のアミノ酸を除去しhANP(3-28)を得た。得られたhANP(3-28)をhANP(2-28)の代わりに用いて、実施例2-4と同様の手法に従って、目的物(GlcNAc-)Asn-hANP(3-28) (3.5 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{130}H_{206}N_{46}O_{43}S_3$: $[M+H]^+$ 3196.5, Found 3196.7

[0428] (2-8 B) (SG-)Asn-hANP(3-28) (下記式の化合物、化合物2-8) の合成

[0429] [化115]



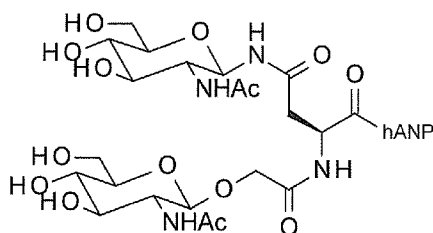
[0430] (2-8 A) で製造したGlcNAc-Asn-hANP(3-28) (3.5 mg) を用いて (2-2 D) と同様の手法に従って目的物(SG-)Asn-hANP(3-28) (化合物2-8) ((2.5 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{206}H_{329}N_{51}O_{99}S_3$: $[M+H]^+$ 5198.1, Found 5198.3。

[0431] <実施例2-9> SG-(SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物2-9) の合成

(2-9 A) GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0432] [化116]



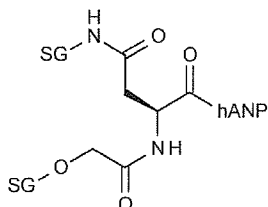
[0433] (2-3 B) で製造した(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (16.0 mg) を用いて (1-5 B) と同様の手法に従って、Aspのアミノ基にGlcNAcを連結させ、目的物

GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (6.15 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{149}H_{237}N_{49}O_{53}S_3$: $[M+H]^+$ 3657.7, Found 3658.1

[0434] (2-9B) SG-(SG-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-9) の合成

[0435] [化117]



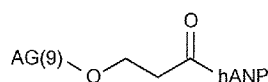
[0436] (1-12A) で製造したSG-0xaの0.2 Mリン酸緩衝溶液 (60 mM, 168 μ l)、Glycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業 (株), 1 U/ml, 67 μ l)、(2-9A) で製造したGlcNAc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (6.15 mg) を用いて、2-2Dと同様の手法で目的物SG-(SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物2-9) (6.7mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{301}H_{483}N_{59}O_{165}S_3$: $[M+H]^+$ 7661.0, Found 7660.7。

[0437] <実施例2-10> AG(9)-hANP(1-28) (化合物2-10) の合成

(2-10A) AG(9)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-10) の合成

[0438] [化118]



[0439] (2-1B) で合成したSG-hANP(1-28) (21 mg) を0.2M酢酸緩衝液 (pH5.0) (1000 μ l) に溶解させた後に、ノイラミニダーゼ ([E.C.3.2.1.18], ナカライテスク, 1 U/ml) 水溶液 (1000 μ l) を加え、37度で17時間反応させた。反応終了後、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液 (2000 μ l) を加えた。酢酸 (200 μ l) を加えて、不溶物を溶解させた。この反応を2ロット分まとめて、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結

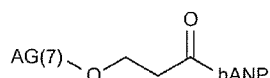
乾燥して目的物AG(9)-hANP(1-28) (化合物 2-10) (33.8 mg)を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{191}H_{307}N_{49}O_{86}S_3$: $[M+H]^+$ 4760.0, Found 4760.4。

[0440] <実施例 2-11> AG(7)-hANP(1-28)の合成

(2-11A) AG(7)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-11) の合成

[0441] [化119]



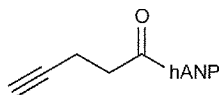
[0442] (2-10A) で合成したAG(9)-hANP(1-28) (16 mg)を蒸留水(1425 μ l)に溶解させた後に、0.2Mリン酸緩衝液(pH6.25) (1500 μ l)、 β 1-4ガラクトシダーゼ(NEW ENGLAND BioLabs, 8000U/ml)水溶液 (75 μ l)を加え、37度で24時間反応させた。反応終了後、0.2%トリフルオロ酢酸水溶液(3000ul)を加えた。酢酸(300 μ l)を加えて、不溶物を溶解させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物AG(7)-hANP(1-28) (化合物 2-11) (11.7 mg)を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{179}H_{287}N_{49}O_{76}S_3$: $[M+H]^+$ 4435.9, Found 4435.8。

[0443] <実施例 2-12> SG-triazole-hANP(1-28) (化合物 2-12) の合成

(2-12A) Pentynoyl-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0444] [化120]



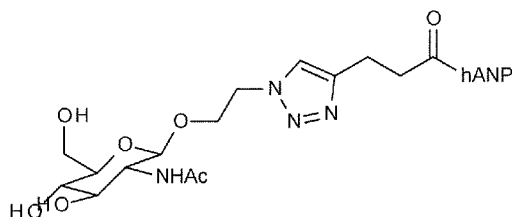
[0445] hANP(1-28)-酢酸塩 (50.0 mg) および4-ペンチン酸 (10.0 mg, 101 μ mol) を用い、(2-7A) と同様の方法に従って、目的物Pentynoyl-hANP(1-28) (26.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{132}H_{207}N_{45}O_{40}S_3$: $[M]^+$ 3158.4, Found 3158.0.

[0446] (2-12B) GlcNAC-triazole-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0447]

[化121]

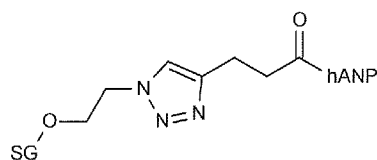


[0448] (2-12A) で製造したPentynoyl-hANP(1-28) (22.0 mg)に、30 mM N-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-2-(2-アジドエトキシ)-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-3-イル]アセトアミド水溶液 (0.37 mL, 11.1 μ mol)、30 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液(0.26 mL, 7.8 μ mol)、10mM 硫酸銅水溶液(0.15mL, 1.5 μ mol)および0.1M リン酸バッファー(pH7.0)を順次加え、室温にて4時間攪拌した。反応溶液に0.2%トリフルオロ酢酸水溶液 (12 mL) を加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 GlcNAc-triazole-hANP(1-28) (15.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{142}H_{225}N_{49}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3449.6, Found 3449.6.

[0449] (2-12C) SG-triazole-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-12) の合成

[0450] [化122]



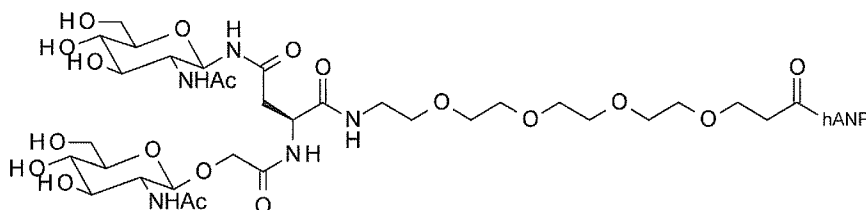
[0451] (2-12B) で製造したGlcNAc-triazole-hANP(1-28) (8.0 mg) を用い、(2-2D) と同様の手法に従って目的物 SG-triazole-hANP(1-28) (化合物2-12) (9.3 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{218}H_{348}N_{54}O_{102}S_3$: $[M+H]^+$ 5451.3, Found 5451.1.。

[0452] <実施例2-13>SG-(SG-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-13) の合成

(2-13A) GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0453] [化123]

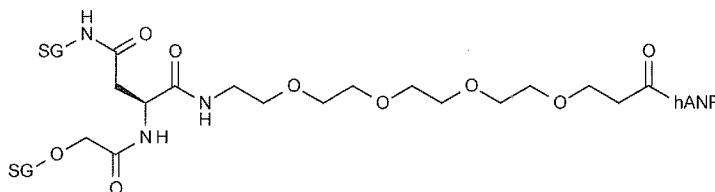


[0454] 化合物 1-5 B (9 mg) と (2-1 A) の調整法 2 の方法で調整した hANP-TF A 塩 (16.6 mg) より、(2-1 B) と同様の手法に従って、目的物 GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-PEG(3)-hANP(1-28) (12.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{160}H_{258}N_{50}O_{58}S_3$: $[M+H]^+$ 3904.8, Found 3904.5

[0455] (2-13B) SG-(SG-Asn)-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-13) の合成

[0456] [化124]



[0457] (2-13A) で製造した GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-PEG(3)-hANP(1-28) (6.00 mg) を用いて、(2-9 B) と同様の手法に従って、目的物 SG-(SG-Asn)-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-13) (6.40 mg) を得た。

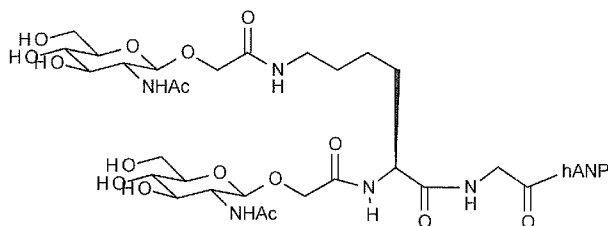
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{312}H_{504}N_{60}O_{170}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1979.0(ave.), Found 1978.5。

[0458] <実施例 2-14> SG-(SG-Lys-Gly)-hANP(1-28) (化合物 2-14) の合成

(2-14A) GlcNAc-(GlcNAc-Lys-Gly)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0459]

[化125]

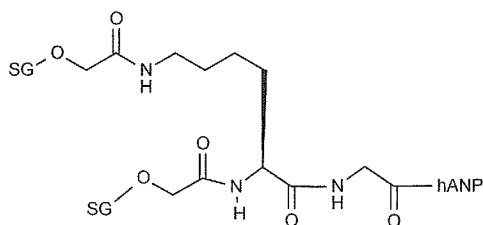


[0460] hANP(1-28)-酢酸塩 (50.0 mg) および化合物 1-9 D (29.0 mg, 40.0 μ m ol) を用い、(2-7 A) と同様の方法に従って、目的物 GlcNAc-(GlcNAc-)Lys-Gly-hANP(1-28) (14.9 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{155}H_{249}N_{50}O_{55}S_3$: $[M+H]^+$ 3786.7, Found 3786.8.

[0461] (2-14 B) SG-(SG-)Lys-Gly-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-14) の合成

[0462] [化126]



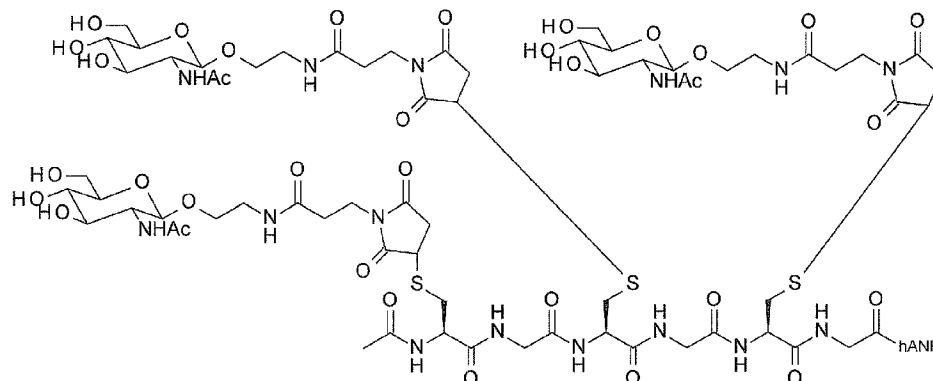
[0463] (2-14 A) で製造したGlcNAc-(GlcNAc-)Lys-Gly-hANP(1-28) (6.0 mg) を用い、(2-2 D) と同様の手法に従って目的物SG-(SG-)Lys-Gly-hANP(1-28) (化合物 2-14) (7.6 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{307}H_{498}N_{60}O_{167}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1949.4 (ave.), Found 1949.2.

[0464] <実施例 2-15> [(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (化合物 2-15) の合成
(2-15 A) [(GlcNAc-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0465]

[化127]

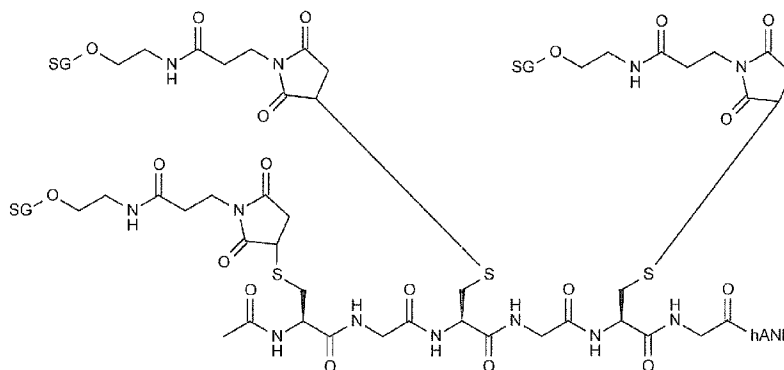


[0466] 化合物 1-10B (27 mg) を用いて、(2-1B) と同様の手法に従って、
 目的物[(GlcNAc)-Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (18.4 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₉₅H₃₀₄N₆₀O₇₃S₆: [M+H]⁺ 4847.0, Found 4847.2

[0467] (2-15B) [(SG)-Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-15) の合成

[0468] [化128]



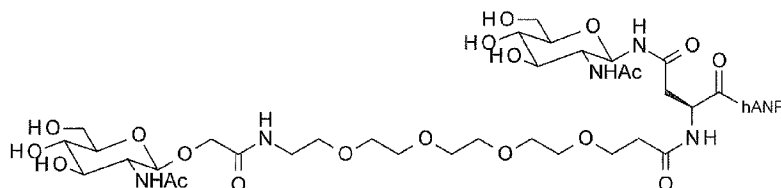
[0469] 1-12A) で製造したSG-0xaの0.2 Mリン酸緩衝溶液 (60 mM, 118 μl) に
 、Glycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業 (株) , 1 U/ml, 47 μl) 、
 (2-15A) で製造した[eを用いて、2-2Dと同様の手法で目的物[(SG
 -)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (化合物 2-15) (5.23mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₄₂₃H₆₇₃N₇₅O₂₄₁S₆: [M+5H]⁵⁺ 2172.5(ave.), Found 2172.4。

[0470] <実施例 2-16> SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物 2-16) の
 合成

(2-16A) GlcNAc-PEG(3)-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物)の合成

[0471] [化129]

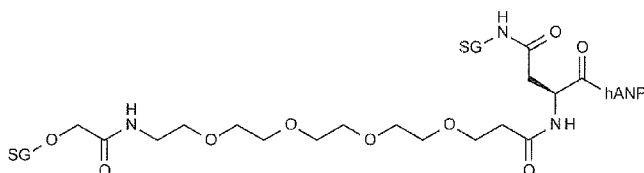


[0472] (2-3B) で製造した(GlcNAc-)Asn-hANP (19.0 mg) と化合物 1-3A (8.8 mg) より (2-7A) と同様の手法に従って、目的物GlcNAc-PEG(3)-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (9.10 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{160}H_{258}N_{50}O_{58}S_3$: $[M+H]^+$ 3904.8, Found 3904.4

[0473] (2-16B) SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-16) の合成

[0474] [化130]

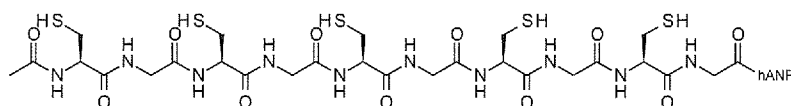


[0475] 室温で (2-16A) で製造したGlcNAc-PEG(3)-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (3.50 mg) を用いて、(2-9B) と同様の手法に従って、目的物SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物 2-16) (3.10 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{312}H_{504}N_{60}O_{170}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1978.1(ave.), Found 1978.8.

[0476] <実施例 2-17> [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (化合物 2-17) の合成
(2-17A) [Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0477] [化131]



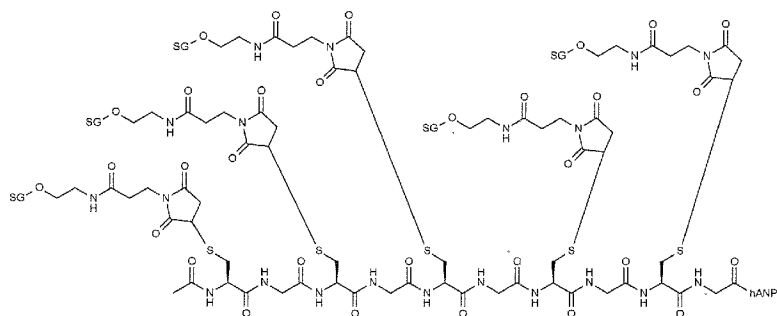
[0478] 化合物 1-8 A (50.6 mg) と (2-1 A) の調整法 2 の方法で hANP-酢酸塩 (47.0 mg) から調整した hANP-TFA 塩より、(2-1 B) と同様の手法に従って中間体 (13.0 mg) を得た。

得られた中間体 (13.0 mg) に、トリフルオロ酢酸 (1.9 mL) と水 (0.05 mL) とトリイソプロピルシラン (0.05 mL) の混合溶液を加えた。室温で 1 時間しんとうした。反応液を水で薄め、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 [Cys-Gly]₅-hANP(1-28) を白色固体 (3.2 mg) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₅₄H₂₄₅N₅₅O₅₀S₈: [M+H]⁺ 3921.6, Found 3921.9

[0479] (2-17 B) (SG-)Cys-Gly)₅-hANP(1-28) [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-17) の合成

[0480] [化132]



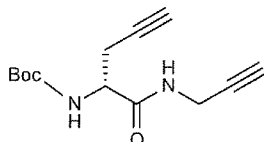
[0481] (2-17 A) で製造した [Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (3.00 mg) と (1-13 A) で製造した SG-M (9.94 mg) をアセトニトリル (0.25 mL) と 0.2 M pH=6.75 のリン酸バッファー (0.25 mL) の混合溶液に溶かし、室温で 2 時間攪拌した。反応液を水で薄め、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、目的物 [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (化合物 2-17) (8.19 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₆₁₉H₉₈₅N₉₅O₃₇₅S₈: [M+6H]⁶⁺ 2670.1(ave.), Found 2670.1。

[0482] <実施例 2-18> [(SG₂-)(Cys-Gly)₅-hANP(1-28) (化合物 2-18) の合成

(2-18A) tert-ブチル N-[(1R)-1-(プロピ-2-イニルカルバモイル)ブツ-3-イニル]カルバメート (下記式の化合物) の合成

[0483] [化133]

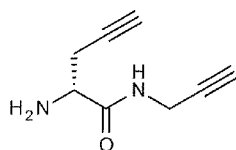


[0484] (2R)-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-ペンチン酸 (430 mg, 2.02 mmol) およびプロパルギルアミン (140 mg, 2.54 mmol) を用い、(1-9A) と同様の方法に従って、目的物を淡黄色固体 (480 mg、収率96%) として得た。

MS (ESI): Calcd for C₁₃H₁₉N₂O₃: [M+H]⁺ 251, Found 251.

[0485] (2-18B) (2R)-2-アミノ-N-プロピ-2-ニル-ペンツ-4-イナミド トリフルオロ酢酸塩 (下記式の化合物) の合成

[0486] [化134]



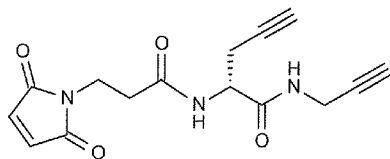
[0487] (2-18A) で得た目的物 (250 mg, 1.00 mmol) を用い、(1-9B) と同様の方法に従って、目的物を淡黄色油状物 (270 mg、収率100%) として得た。

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 4.11-3.96 (3H, m), 2.87-2.74 (2H, m), 2.68-2.65 (2H, m).

[0488] (2-18C) (2R)-2-[3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパノイルアミノ]-N-プロピ-2-イニル-ペンツ-4-イナミド (下記式の化合物) の合成

[0489]

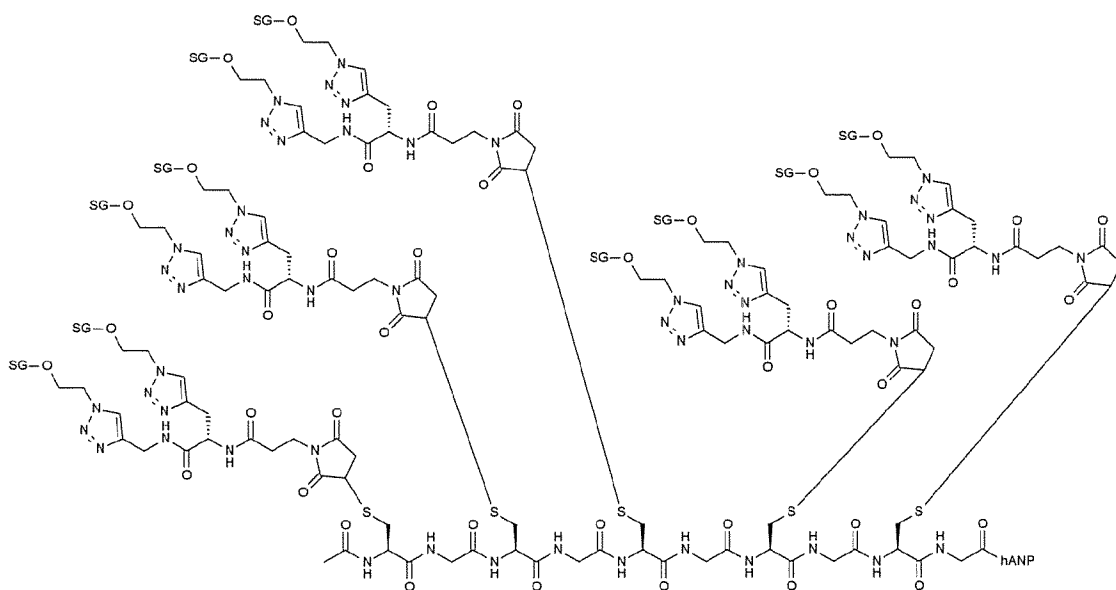
[化135]



[0490] (2-18B) で獲た目的物 (270 mg, 1.00 mmol) を用い、(1-15A) と同様の方法に従って、目的物を淡黄色固体 (220 mg、収率73%) として得た MS (ESI): Calcd for $C_{15}H_{14}N_3O_4$: $[M-H]^-$ 300, Found 300.

[0491] (2-18D) [(SG2-)Cys-Gly]5-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-18) の合成

[0492] [化136]



[0493] (1-18A) で製造したSG-N₃ (20.0 mg, 8.73 μ mol) を0.10 M リン酸バッファー(pH 8.0)(0.840 mL)に溶解し、(2-18C) で獲た目的物の3.3 mM tert-ブタノール溶液(1.06 mL, 3.50 μ mol)、50 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液(0.420 mL, 21.0 μ mol)、および10mM 硫酸銅水溶液(0.420 mL, 4.20 μ mol)を順次加え、室温にて1時間30分攪拌した。反応溶液に0.2%トリフルオロ酢酸水溶液 (12 mL) を加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (SHISEIDO、Proteonavi) にて分離精製を行い、凍結乾燥して中間体 (6.20 mg, 36%)

を得た。

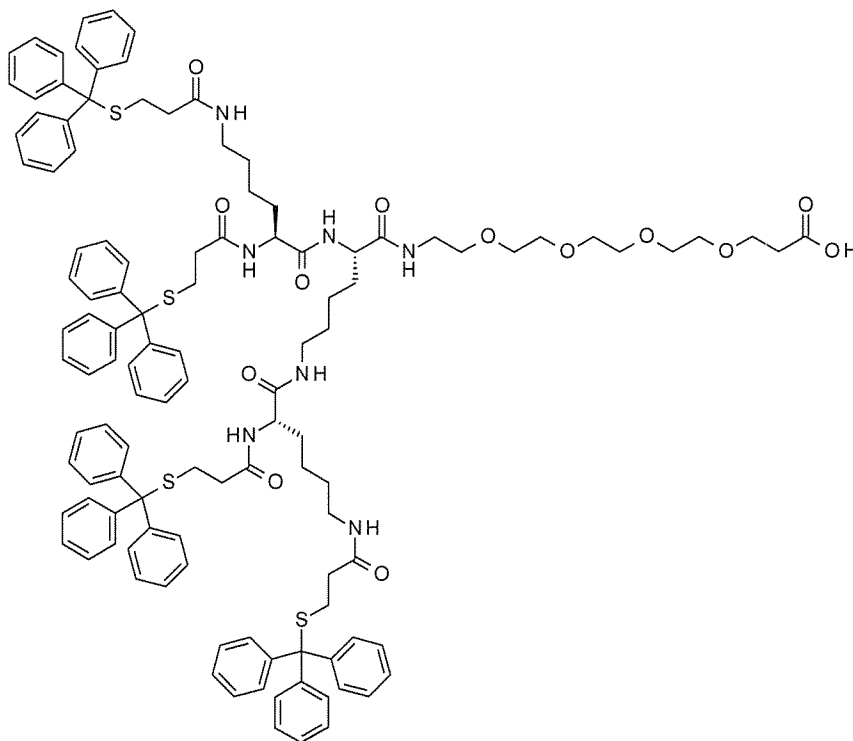
[0494] (2-17A) で製造した(Cys-Gly)₅-hANP(1-28) (1.76 mg) と合成した中間体 (10.3 mg) より、(2-17B) と同様の手法に従って目的物 [(SG₂-Cys-Gly)₅-hANP(1-28) (化合物 2-18) (8.42 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₁₀₈₉H₁₇₃₀N₁₆₀O₆₉₀S₈: [M-10H]¹⁰⁻ 2835.1(ave.), Found 2834.9。

[0495] <実施例 2-19> SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-19) の合成

(2-19A) TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(3) (下記式の化合物) の合成

[0496] [化137]



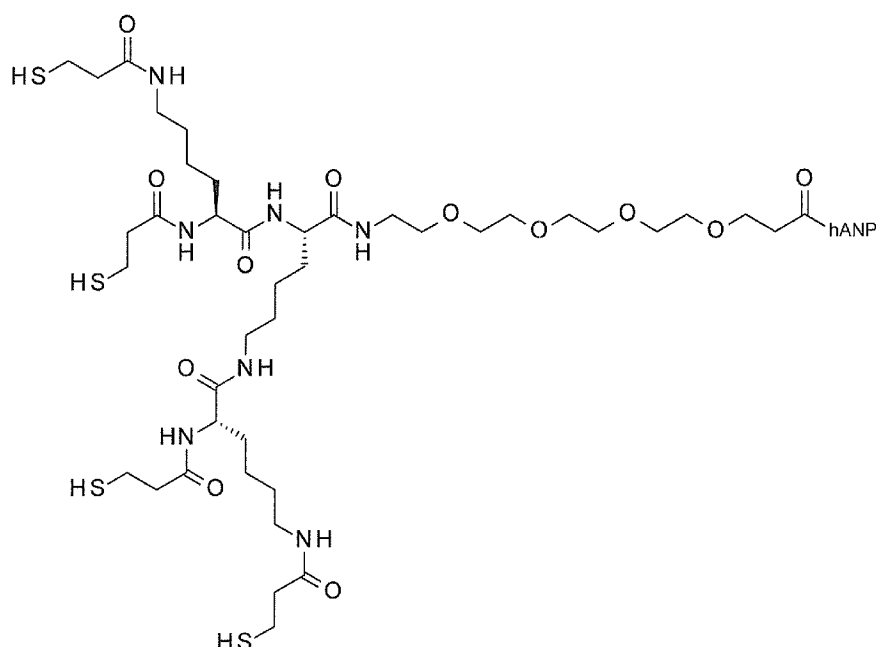
[0497] 1.20 mmol/gの2-クロロトリチルクロライドレジンを (250 mg, 0.300 mmol) を固相合成用のカラムに入れ、ジクロロメタン (5 mL) を加え10分しんとうした。ろ過後、3-[2[2[2[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロピオン酸 (175 mg, 0.360 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (257 μL, 1.50 mmol) のジクロロメ

タン (5 mL) 溶液を加え、室温で2時間攪拌した。ろ過後、ジクロロメタン混合溶液 (ジクロロメタン : メタノール : N,N-ジイソプロピルエチルアミン = 8 : 5 : 10 : 5, v/v) で3回、ジクロロメタンで3回、N,N-ジメチルホルムアミドで3回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え5分しんとう後ろ過する操作を4回行った。レジンに(2S)-2,6-ビス(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸 (532 mg, 0.900 mmol) とHATU (342 mg, 0.900 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (308 μ L, 1.80 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え室温で30分しんとうした。ろ過後レジンにN,N-ジメチルホルムアミドで3回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え5分しんとう後ろ過する操作を4回行った。レジンに(2S)-2,6-ビス(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸 (1060 mg, 1.80 mmol) とHATU (684 mg, 1.80 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (616 μ L, 3.60 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え室温で1時間しんとうした。ろ過後レジンにN,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え5分しんとう後ろ過する操作を5回行った。レジンにN,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。得られたレジンの1/3量 (0.100 mmol相当) を固相合成用のカラムに入れ、3-トリチルスルファニルプロピオン酸 (418 mg, 1.20 mmol) とHATU (456 mg, 1.20 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (411 μ L, 2.40 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え室温で1時間しんとうした。ろ過後、再び3-トリチルスルファニルプロピオン酸 (418 mg, 1.20 mmol) とHATU (456 mg, 1.20 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (411 μ L, 2.40 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を加え室温で1時間しんとうした。ろ過後レジンにN,N-ジメチルホルムアミドで4回、ジクロロメタンで3回洗浄した。1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (2.5 mL) とジクロロメタン (7.5 mL) の混合溶液を加え、室温で1.5

時間しんとうした。ろ過してレジンを除き、ろ液を減圧下濃縮した。ジクロロメタンで6回共沸し、真空ポンプで乾燥することで、目的物TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(3)を褐色固体 (170 mg) として得た。

[0498] (2-19B) HS-(HS-)Lys[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0499] [化138]



[0500] (2-19A) で製造した (66.1 mg) より、(2-17A) と同様の手法に従って、中間体 (40 mg) を得た。

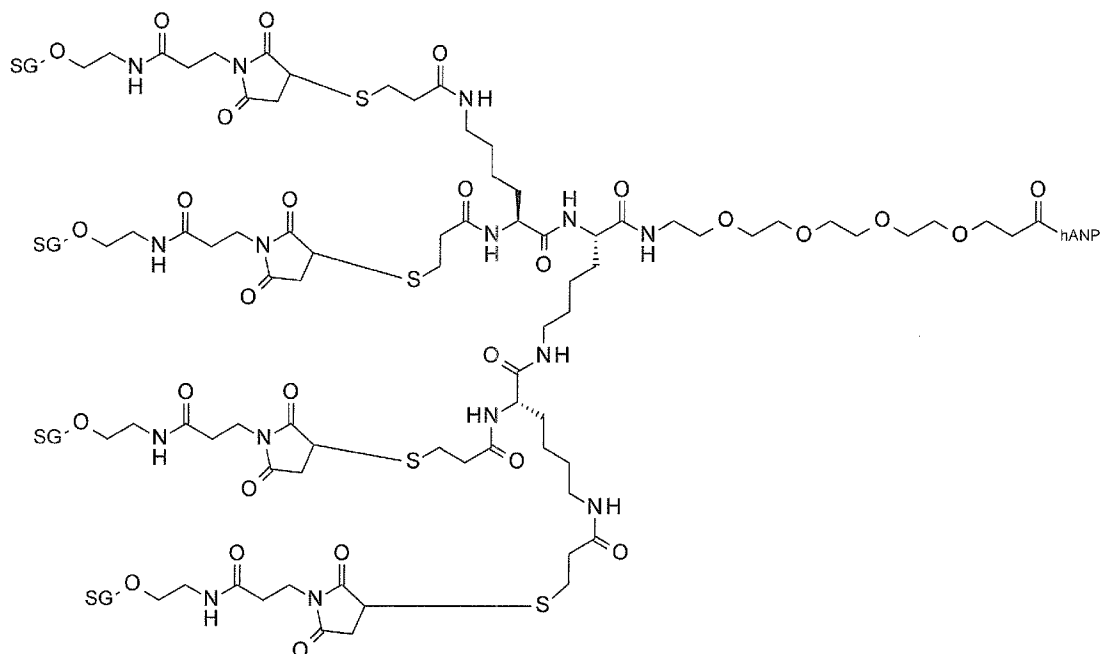
得られた中間体 (7.0 mg) より、(2-17A) と同様の手法に従って、目的物HS-(HS-)Lys[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (2.3 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{168}H_{276}N_{52}O_{51}S_7$: $[M+H]^+$ 4062.9, Found 4062.8

[0501] (2-19C) SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-19) の合成

[0502]

[化139]



[0503] (2-19B) の手法で製造したS4-Lys3-PEG3-hANP(1-28) (2.90 mg) より、(2-17B) と同様の手法に従って、目的物[SG- (SG-)Lys-[SG- (SG-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-19) (5.31 mg) を得た。

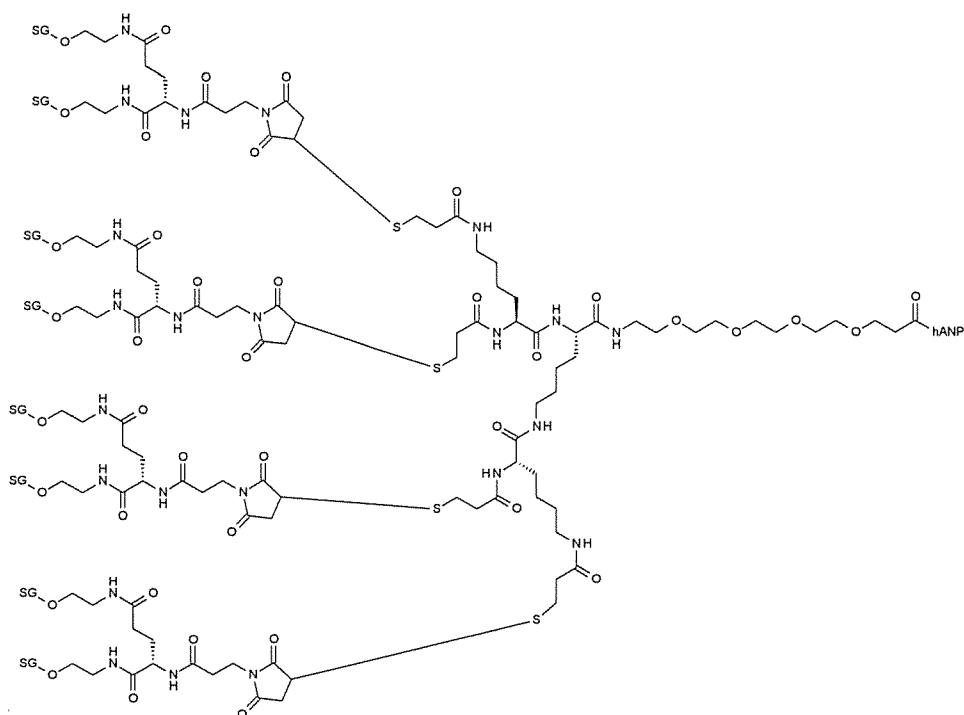
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{540}H_{868}N_{84}O_{311}S_7$: $[M+7H]^{7+}$ 1963.4(ave.), Found 1963.4。

[0504] <実施例 2-20> [SG₂- (SG₂-)Lys-[SG₂- (SG₂-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-20) の合成

(2-20A) SG₂- (SG₂-)Lys-[SG₂- (SG₂-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-20) の合成

[0505]

[化140]



[0506] (2-19B) で製造したHS(HS-)-Lys-[HS-(HS-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (2.20 mg) と (1-15C) で製造したSG-(SG-)Gln*-Mal (12.1 mg) より、(2-17B) と同様の手法に従って目的物 SG₂-(SG₂-)Lys-[SG₂-(SG₂-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-20) (4.79 mg) を得た。

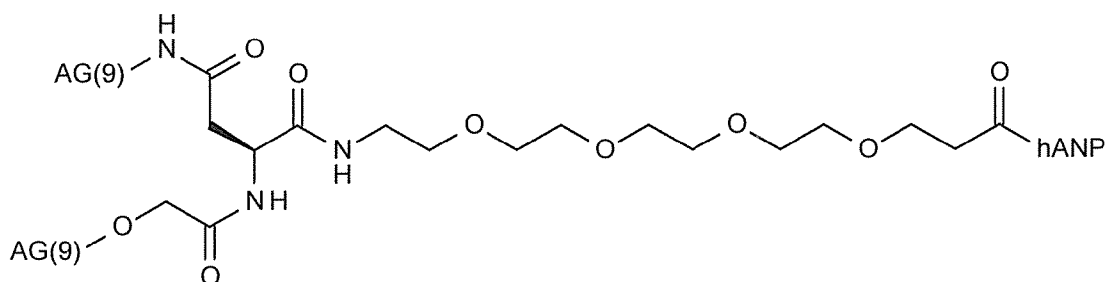
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{904}H_{1460}N_{116}O_{567}S_7$: $[M+8H]^{8+}$ 2907.3(ave.), Found 2907

■ ○

[0507] <実施例 2-21> AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-21) の合成

(2-21A) AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-21)の合成

[0508] [化141]



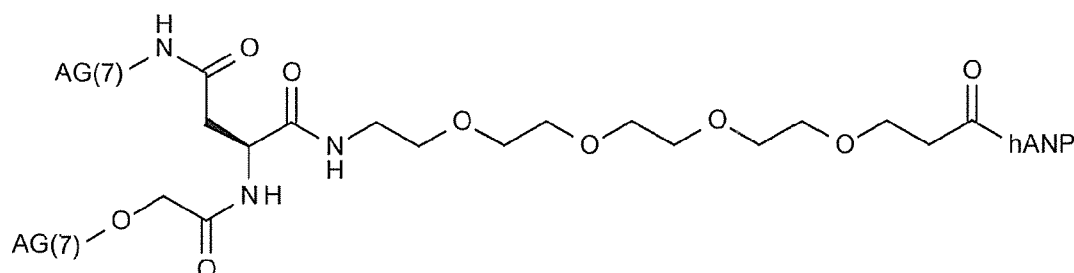
[0509] (2-13B) で合成したSG-(SG-Asn)-PEG-hANP(1-28) (16mg) を用いて、(2-10A) と同様の手法に従って目的物AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28)(化合物2-21) (8.2mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{268}H_{436}N_{56}O_{138}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1687.7, Found 1687.4。

[0510] <実施例2-22> AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-22) の合成

(2-22A) AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-22) の合成

[0511] [化142]



[0512] (2-21A) で合成したAG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (8 mg) を用いて、(2-11A) と同様の手法に従って目的物AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-22) (6.6mg) を得た。

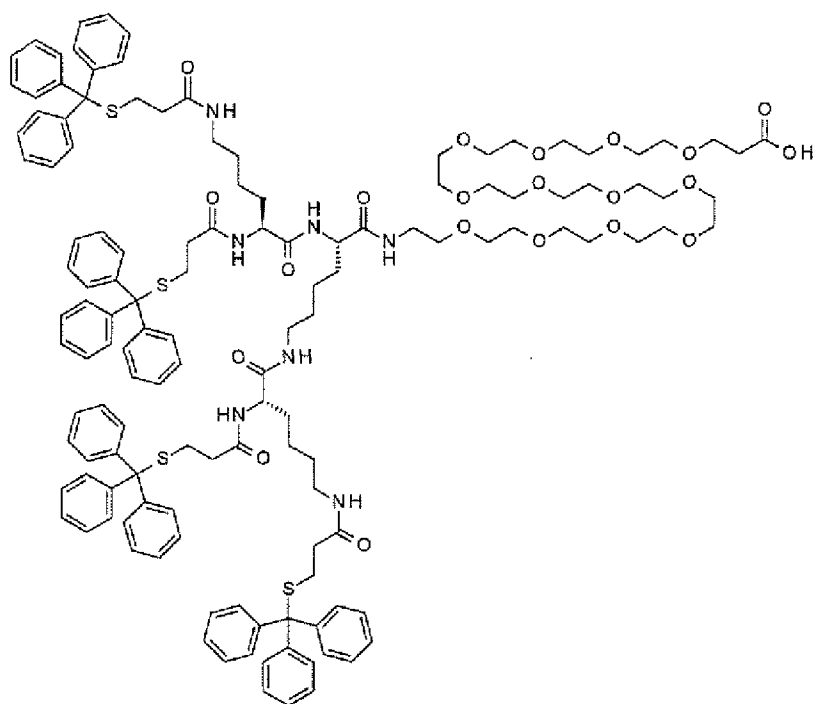
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{244}H_{396}N_{56}O_{118}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1525.6, Found 1525.4。

[0513] <実施例2-23> SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物2-23) の合成

(2-23A) TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(11)-CO₂H (下記式の化合物) の合成

[0514]

[化143]

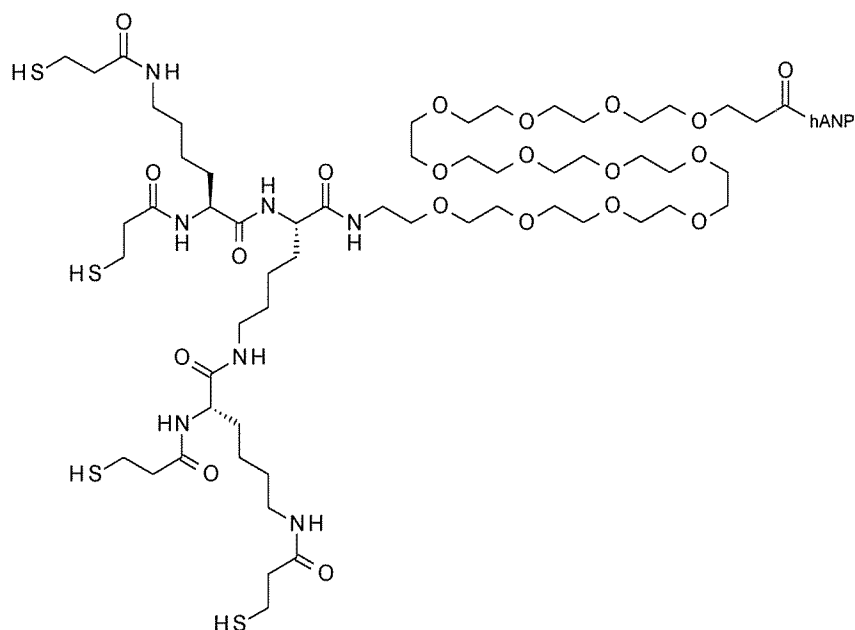


[0515] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロピオン酸 (202 mg) より、(2-19A) と同様の手法に従って、目的物TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(11)-CO₂H (135 mg) を得た。

[0516] (2-23B) HS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0517]

[化144]

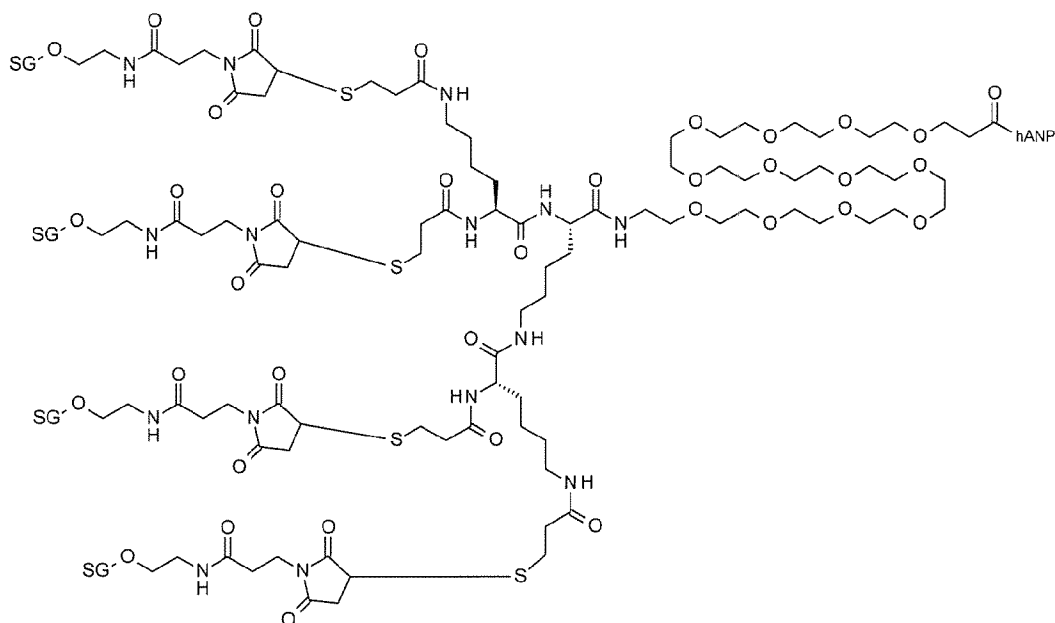


[0518] (2-23A) で製造したTrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(11)-CO₂H (45.3 mg) より、(2-17A) と同様の手法に従って、目的物HS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (12.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{184}H_{308}N_{52}O_{59}S_7$: $[M+H]^+$ 4415.1, Found 4416.1

[0519] (2-23C) SG4-Lys3-PEG11-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-23C)の合成

[0520] [化145]



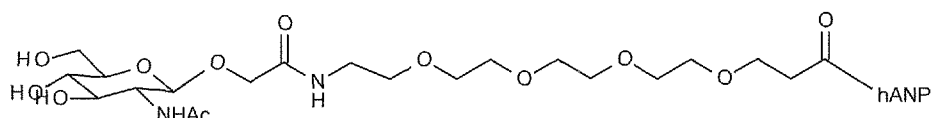
[0521] (2-23B) で製造したHS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (3.16 mg) より (2-17B) と同様の手法に従って、目的物SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物2-23) (4.40 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{556}H_{900}N_{84}O_{319}S_7$: $[M+6H]^{6+}$ 2349.3(ave.), Found 2349.2。

[0522] <実施例2-24> SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (化合物2-24) の合成

(2-24A) GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0523] [化146]

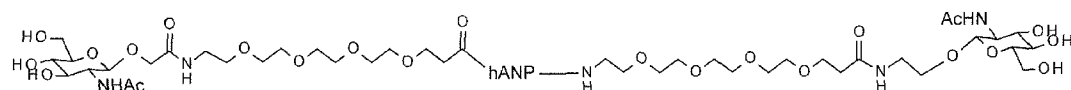


[0524] (2-1A) で製造したhANP(1-28)-TFA塩 (33.0 mg) および化合物1-3A (13.0 mg, 24.7 μ mol) を用い、(2-7A) と同様の方法に従って、目的物GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (25.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{148}H_{240}N_{47}O_{51}S_3$: $[M+H]^+$ 3587.7, Found 3587.6.

[0525] (2-24B) GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-GlcNAc (下記式の化合物) の合成

[0526] [化147]



[0527] (2-24A) で製造したGlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (21.0 mg) および化合物1-19B (46 mg, 73.6 μ mol) を用い、(2-2B) と同様の方法に従って、目的物GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-GlcNAc (3.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{169}H_{278}N_{50}O_{61}S_3$: $[M+H]^+$ 4080.9, Found 4080.9.

[0528] (2-24C) SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (下記式の化合物、化合物2-24) の合成

[0529] [化148]



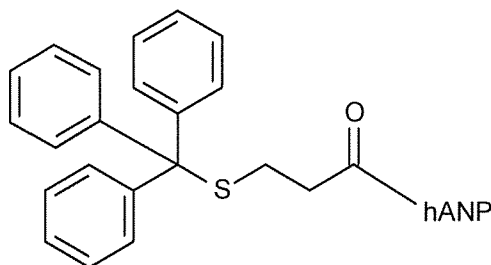
[0530] (2-24B) で製造したGlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-GlcNAc (4.0 mg) を用い、(2-2D) と同様の手法に従って目的物SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (化合物2-24) (5.5 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{321}H_{528}N_{60}O_{173}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 2023.0 (ave.), Found 2022.8.。

[0531] <実施例2-25> SG-thioacetamide-hANP(1-28) (化合物2-25) の合成

(2-25A) TrS-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0532] [化149]



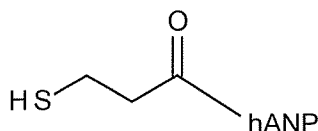
[0533] 3-トリチルスルファニルプロピオン酸 (2.24 mg, 6.43 μmol) をジメチルホルムアミド (100 μl) に溶解し、室温でトリエチルアミン (1.79 μl , 12.8 μmol) を加え、氷冷下、ジメチルチオホスフィノイルクロリド (0.83mg, 6.46 μmol) のジメチルホルムアミド溶液 (60 μl) を加えた後、室温で1時間攪拌した。一方、hANP-トリフルオロ酢酸塩 (10 mg) をジメチルホルムアミド (200 μl)、蒸留水 (60 μl) に溶解し、室温でトリエチルアミン (4.2 μl) を加え、氷冷下、先に調製した活性エステルのジメチルホルムアミド溶液 (160 μl) を加えて、室温で5時間攪拌した。氷冷した0.5%トリフルオロ酢酸水溶液(2 ml)に反応液を加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物TrS-hANP(1-28) (5.77

mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{149}H_{221}N_{45}O_{40}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1138.0(ave.), Found 1137.8

[0534] (2-25B) HS-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0535] [化150]

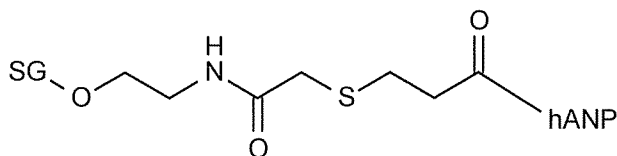


[0536] (2-25A) で合成したTrS-hANP(1-28) (5.77 mg)をトリフルオロ酢酸/蒸留水/トリイソプロピルシラン(90/5/5)溶液に溶解させ、室温で1時間攪拌した。反応終了後、蒸留水/酢酸(10/1)溶液 (3 ml) を加え、不溶物を溶解させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物HS-hANP(1-28) (2.88 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{130}H_{207}N_{45}O_{40}S_4$: $[M+H]^+$ 3167.4, Found 3167.7

[0537] (2-25C) SG-thioacetamide-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-25) の合成

[0538] [化151]



[0539] (2-25B) で合成したHS-hANP(1-28) (2.88mg)、(1-11C) で合成したSG-I(2.66 mg)をジメチルホルムアミド (300 μ l) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン(0.77 μ l)加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、蒸留水/酢酸(10/1)溶液 (3 ml) を加え、不溶物を溶解させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物SG-thioacetamide-hANP(1-28) (化合物2-25) (2.90 mg) を

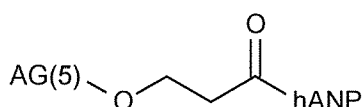
得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{218}H_{350}N_{52}O_{103}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 1369.9(ave.), Found 1369.6。

[0540] <実施例 2-26> AG(5)-hANP(1-28) (化合物 2-26) の合成

(2-26A) AG(5)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-26) の合成

[0541] [化152]



[0542] (2-7A) で合成したGlcNAc-hANP のトリフルオロ酢酸塩を、イオン交換樹脂 (Dowex 1 × 8) 用いて塩交換を行い、GlcNAc-hANP酢酸塩として次の反応に用いた。

(1-17C) で合成したAG(5)-P(18 mg)を0.2 Mリン酸緩衝溶液 (pH6.75, 160 μ l) に溶解させた後に、Glycosynthase (Endo-M-N175Q, 東京化成工業, 1 U/ml, 64 μ l)、(2-7A) で合成したhANP-GlcNAcの酢酸塩 (8.0 mg) のジメチルスルホキシド溶液 (96 μ l) を加え、25℃で3時間反応させた。室温で0.2%トリフルオロ酢酸水溶液 (1.5 ml) を加えて反応を停止させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物AG(5)-hANP(1-28) (化合物 2-26) (5.6 mg) を得た。

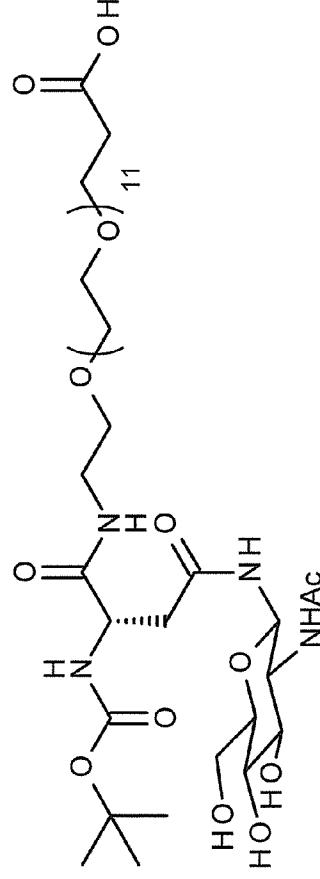
ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{163}H_{261}N_{47}O_{66}S_3$: $[M+3H]^{3+}$ 1345.1(ave.), Found 1344.6。

[0543] <実施例 2-27> SG-(SG-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物 2-27) の合成

(2-27A) Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-CO₂H (下記式の化合物) の合成

[0544]

[化153]

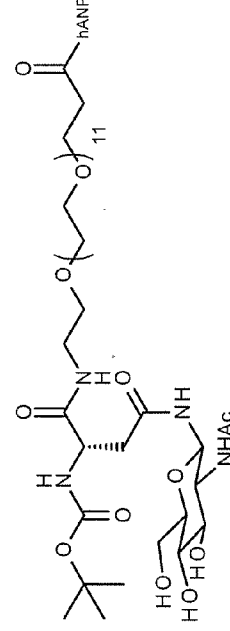


[0545] J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284-290の記載に準じて製造した(2S)-4-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (187 mg, 0.43 mmol) およびHATU (163 mg, 0.43 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (3.0 ml) に溶解し、室温でジイソプロピルエチルアミン (150 μ l, 0.86 mmol) を加えて3分間撹拌した。この反応液を(1-4 A) で製造した3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパン酸 (0.22 g, 0.36 mmol) に加えて室温で3時間撹拌した。この反応混合物を氷冷した蒸留水 (3 ml) および酢酸 (100 μ l) の混合溶媒に滴下して溶解し、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相PLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) により分離精製を行い、凍結乾燥して目的物Boc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-CO₂H (210 mg)を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₄₄H₈₂N₄O₂₃: [M+K]⁺ 1073.6, Found 1073.5

[0546] (2-27 B) Boc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-hANP (1-28) (下記式の化合物) の合成

[0547] [化154]



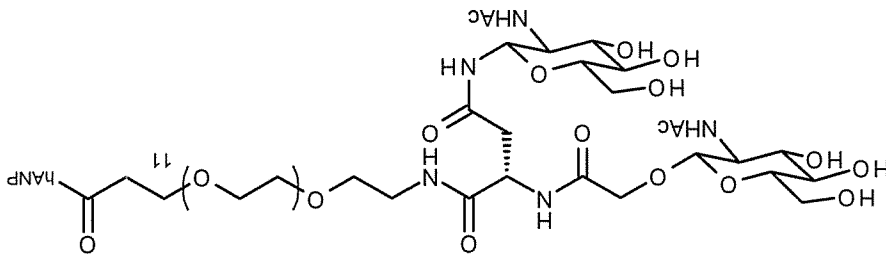
[0548] (2-27A) で製造したBoc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-CO₂H (7.3 mg, 7.1

μmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (150 μl) に溶解し、氷冷下、トリエチルアミン (5.9 μl , 43 μmol) および、ジメチルチオホスファイトクロリド (1.7 mg, 21 μmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (50 μl) を加えた。この反応液を室温まで昇温しつつ1.5時間攪拌した。この反応液を氷冷下、(2-1A) の手順に従って調製したhANP-TFA塩 (36 mg, 60w/w%, 7.1

μmol) およびトリエチルアミン (14 μl , 99 μmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1500 μl) および蒸留水 (300 μl) の混合溶媒に溶解した溶液に加え、室温まで昇温しつつ1日間攪拌した。この反応液を氷冷した0.2v/v%トリフルオロ酢酸水溶液 (8.3 ml) に加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-OH (14.8 mg) を得た。

[0549] (2-27C) GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0550] [化155]



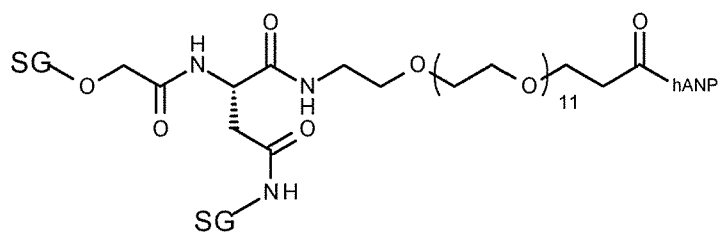
[0551] (2-27B) で製造したBoc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (14.8 mg) を3v/v%トリフルオロ酢酸水溶液 (1.0 ml) に溶解し、室温で3時間静置した。この反応液を氷冷した蒸留水 (9.5 ml) および酢酸 (0.5 ml) の混合溶媒に加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して中間体 (10.2 mg) を得た。

[0552] (1-2C) で製造した2-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル) テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸 (1.4 mg, 5.1 μmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (150 μl) に溶解し、氷冷下、トリエチルアミン (2.1 μl , 15 μmol) および、ジメチルチオホスフィノイルクロリド (0.98 mg, 7.7 μmol) を加えた。この反応液を室温まで昇温しつつ1.5時間攪拌した。この反応液を氷冷下、得られた中間体 (10 mg, 2.6 μmol) およびトリエチルアミン (5.0 μl , 36 μmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1500 μl) および蒸留水 (300 μl) の混合溶媒に溶解した溶液に加え、室温まで昇温しつつ3日間攪拌した。この反応液を氷冷した0.2v/v%トリフルオロ酢酸水溶液(8.5 ml)に加え、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (9.0 mg) を得た。

[0553] ESI-TOF-MS: Calcd for $\text{C}_{176}\text{H}_{290}\text{N}_{50}\text{O}_{66}\text{S}_3$: $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ 2128.3(ave.), Found 2128.0

[0554] (2-27D) SG-(SG-Asn)-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-27) の合成

[0555] [化156]

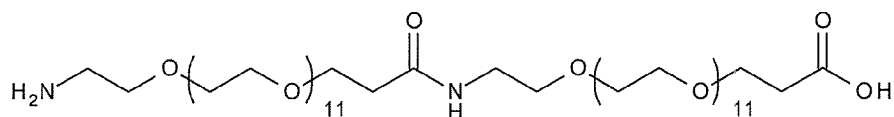


[0556] (1-12A) で製造したSG-0xaの0.2 Mリン酸緩衝溶液 (60 mM, 188 μl) に、室温でEndo-M-N175Q (1 U/ml, 100 μl) を加えた後、室温で(2-27D) で製造したhANP-GlcNAc (8.0 mg, 1.9 μmol) のジメチルスルホキシド溶液 (120 μl) を2回に分けて15分間隔で加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で1日間振とうした。室温で0.2%トリフルオロ酢酸水溶液 (4.5 ml) および酢酸 (0.5 ml) の混合溶媒を加えて反応を停止させ、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリ

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{69}H_{118}N_2O_{29}$: $[M-H]^-$ 1437.8, Found 1437.8

[0560] (2-28B) H_2N -PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (下記式の化合物) の合成

[0561] [化158]

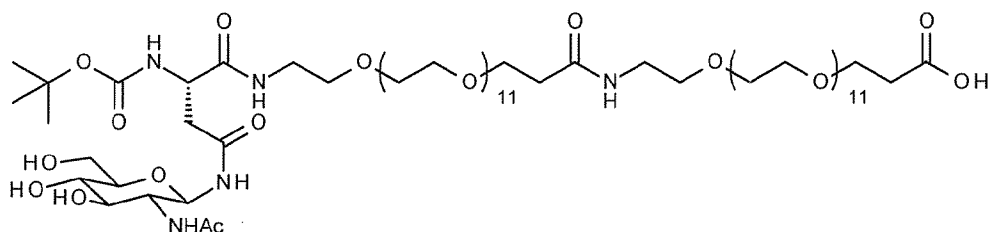


[0562] (2-28A) で製造したFmoc-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (250 mg) より (1-4A) と同様の手法に従って目的物 H_2N -PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (77 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{54}H_{108}N_2O_{27}$: $[M+H]^+$ 1217.7, Found 1217.9

[0563] (2-28C) Boc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (下記式の化合物) の合成

[0564] [化159]



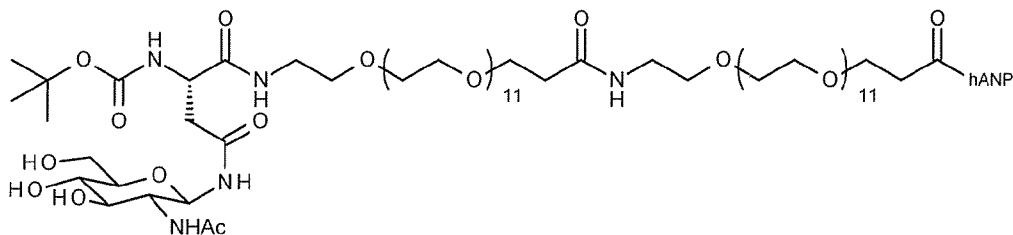
[0565] J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284-290の記載に準じて製造した(2S)-4-[(2R, 3R, 4R, 5S, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]アミノ]-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-4-オキソブタン酸 (32 mg, 74 μ mol) および (2-28B) で製造した H_2N -PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (76 mg) より (2-27A) と同様の手法に従って目的物Boc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (58 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{71}H_{135}N_5O_{36}$: $[M+K]^+$ 1673.0, Found 1672.9

[0566] (2-28D) Boc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0567]

[化160]

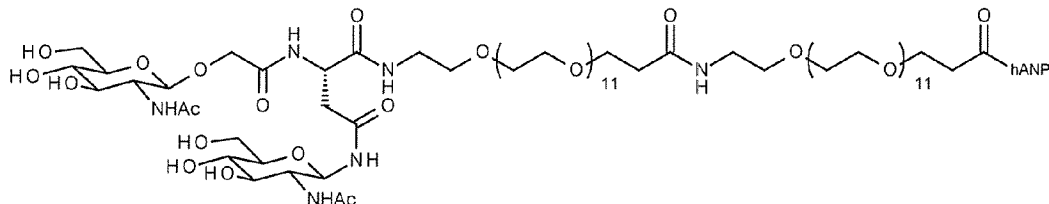


[0568] (2-28C) で製造したBoc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-COOH (29 mg, 18 μmol) および (2-1A) で製造したhANP(1-28)-TFA塩(50 mg, 60w/w%, 9.7 μmol)を用いて(2-27B)と同様の手法に従って目的物Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (35 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $\text{C}_{198}\text{H}_{336}\text{N}_{50}\text{O}_{74}\text{S}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 4695.3, Found 4697.5

[0569] (2-28E) GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0570] [化161]



[0571] (2-28D) で製造したBoc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (35 mg, 7.4 μmol) より (2-27C) と同様の手法に従って目的物GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (16 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $\text{C}_{203}\text{H}_{343}\text{N}_{51}\text{O}_{79}\text{S}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 4859.4(ave.), Found 4858.

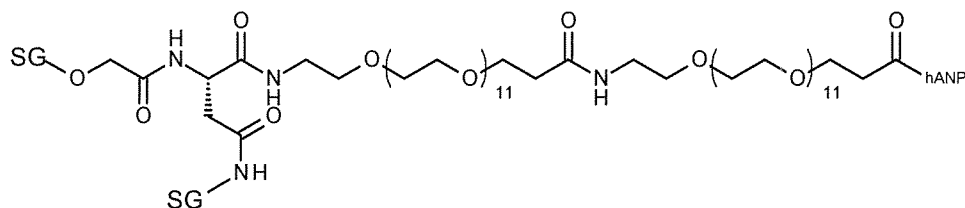
4

-TOF-MS: Calcd for $\text{C}_{203}\text{H}_{343}\text{N}_{51}\text{O}_{79}\text{S}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 4859.4(ave.), Found 4858.4

[0572] (2-28F) SG-(SG-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-28) の合成

[0573]

[化162]

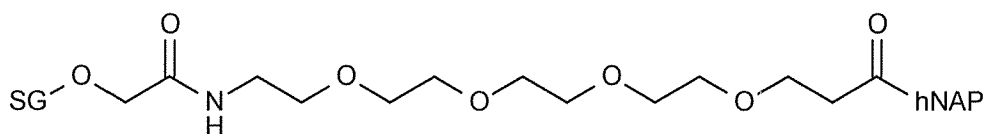


[0574] (1-12A) で製造したSG-0xaの0.2 Mリン酸緩衝溶液 (60 mM, 190 μ l) および、(2-28F) で製造したGlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (16 mg, 3.2 μ mol) より (2-27D) と同様の手法に従って目的物SG-(SG-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物2-28) (13 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{355}H_{589}N_{61}O_{191}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 2217.0(ave.), Found 2216.9.

[0575] <実施例2-29> SG-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-29) の合成
(2-29A) SG-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-29) の合成

[0576] [化163]



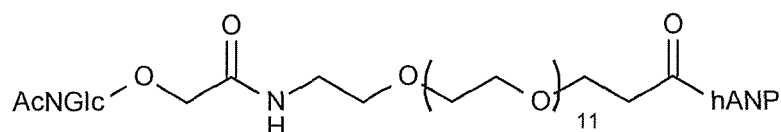
[0577] (2-24A) で製造したGlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (15.0 mg) より (1-14B) と同様の手法に従って目的物SG-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-29) (12.32 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{224}H_{362}N_{52}O_{107}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1399.0(ave.), Found 1398.3.

[0578] <実施例2-30> SG-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物2-30) の合成
(2-30A) GlcNAc-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0579]

[化164]

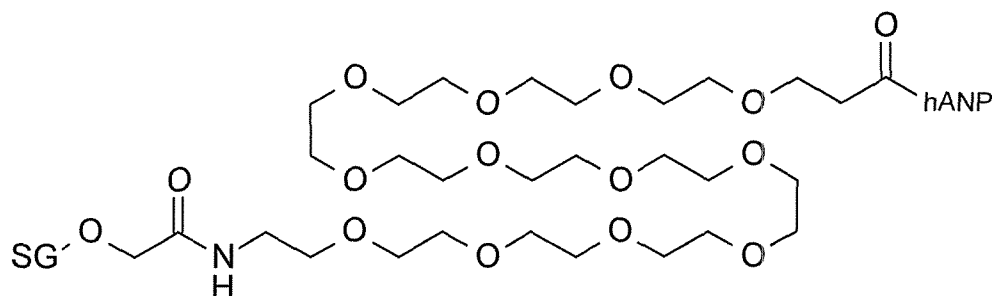


[0580] hANP(1-28)-TFA塩(43.9 mg)と化合物 1-4 B (15.0 mg) を用いて (2-7 A) と同様の手法に従って、目的物GlcNAc-PEG(11)-hANP(1-28) (33.7 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₆₄H₂₇₁N₄₇O₅₉S₃: [M+H]⁺ 3939.9, Found 3939.8

[0581] (2-30B) SG-PEG(11)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-30) の合成

[0582] [化165]



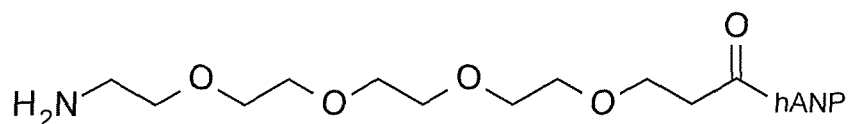
[0583] (2-30A) で製造したGlcNAc-PEG(11)-hANP(1-28) (15.0 mg) を用いて、(1-14B) と同様の手法に従って目的物SG-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物 2-30) (11.52 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₂₄₀H₃₉₄N₅₂O₁₁₅S₃: [M+5H]⁵⁺ 1189.8(ave.), Found 1189.3。

[0584] <実施例 2-31> SG-(SG-)Gln*-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-31) の合成

(2-31A) H₂N-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0585] [化166]

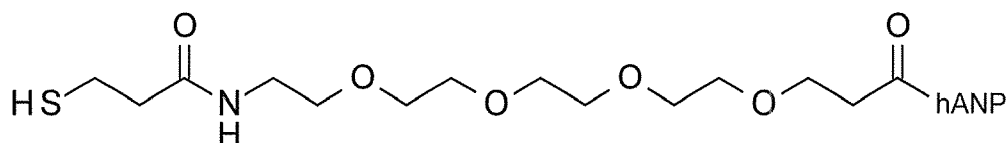


[0586] 3-[2-[2-[2-[2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロピオン酸 (11.7 mg) と (2-1 A) の調整法 2 の方法で hANP(1-28)-酢酸塩 (41.0 mg) から調整した hANP(1-28)-TFA 塩を用いて、(2-1 B) と同様の手法に従って Boc-PEG(3)-hANP(1-28) (12.7 mg) を得た。得られた Boc-PEG(3)-hANP(1-28) (12.7 mg) を用いて (2-2 C) と同様の手法に従って、目的物 H₂N-PEG(3)-hANP(1-28) (12.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₃₈H₂₂₄N₄₆O₄₄S₃: [M+H]⁺ 3326.6, Found 3326.6

[0587] (2-3 1 B) HS-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0588] [化167]

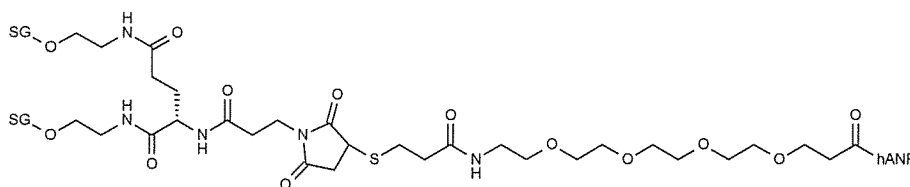


[0589] (2-3 1 A) で製造した H₂N-PEG(3)-hANP(1-28) (12.0 mg) を用いて (2-2 5 A)、(2-2 5 B) と同様の手法に従って、目的物 HS-PEG(3)-hANP(1-28) (5.00 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₄₁H₂₂₈N₄₆O₄₅S₄: [M+H]⁺ 3414.6, Found 3414.7

[0590] (2-3 1 C) SG-(SG-)Gln*-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 3-3 1) の合成

[0591] [化168]



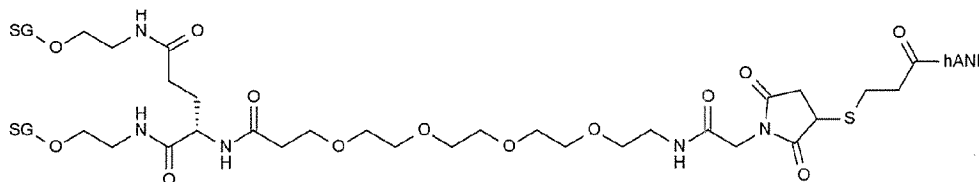
[0592] (2-3 1 C) で製造した HS-PEG(3)-hANP(1-28) (4.00 mg) と (1-1 5 C) で製造した SG-(SG-)Gln*-Mal (7.43 mg) を用いて、(2-1 7 B) と同様の手法に従って、目的物 SG-(SG-)Gln*-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-3 1) (2.09 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₃₂₅H₅₂₄N₆₂O₁₇₄S₄: [M+5H]⁵⁺ 1643.4(ave.), Found 1643.

2。

[0593] <実施例 2-32> SG-(SG-)Gln*-PEG(3)-Mal-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-32) の合成

[0594] [化169]



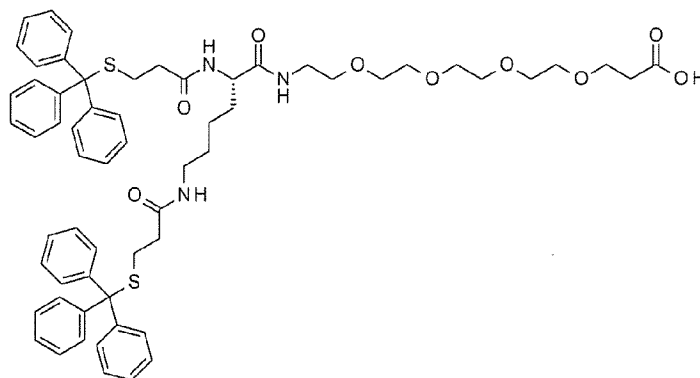
[0595] (2-25B) で製造した HS-hANP(1-28) (2.3 mg) および (1-16C) で製造した SG-(SG-)Gln*-PEG(3)-Mal (4.0 mg) を 0.2M 酢酸バッファー (pH5.0) (0.10 mL) と ジメチルスルホキシド (0.10 mL) の混合溶媒に溶解し、室温にて 5 時間攪拌した。反応溶液に 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液 (2.0 mL) を加え、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して目的物 SG-(SG-)Gln*-PEG(3)-Mal-hANP(1-28) (化合物 2-32) (3.5 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{325}H_{528}N_{62}O_{174}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 2054.0 (ave.), Found 2053.8.

[0596] <実施例 2-33> SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-hANP(1-28) (化合物 2-33) の合成

(2-33A) TrS-(TrS-)Lys-PEG(3)-CO₂H (下記式の化合物、) の合成

[0597] [化170]

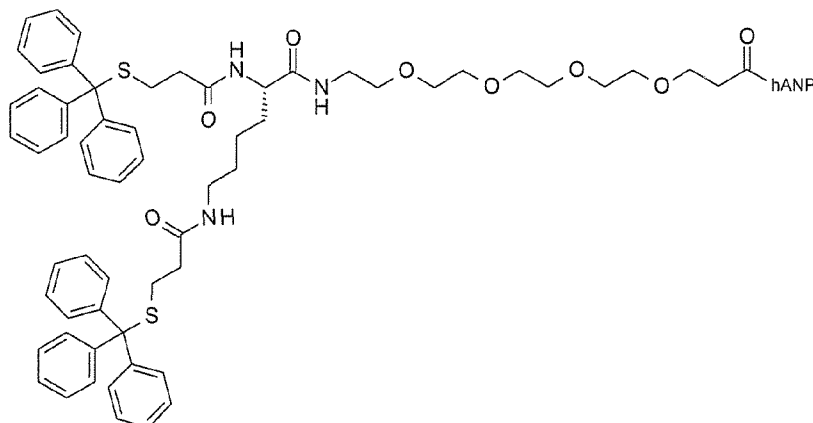


[0598] 1.20 mmol/gの2-クロロトリチルクロライドレジンを (83 mg, 0.100 mmol) を固相合成用のカラムに入れ、ジクロロメタン (2mL) を加え10分しんとうした。ろ過後、3-[2[2[2[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロピオン酸 (97.5 mg, 0.200 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (85.6 μ L, 0.500 mmol) のジクロロメタン (2 mL) 溶液を加え、室温で2時間しんとうした。ろ過後、ジクロロメタン混合溶液 (ジクロロメタン : メタノール : N,N-ジイソプロピルエチルアミン = 85 : 10 : 5, v/v) で3回、ジクロロメタンで3回、N,N-ジメチルホルムアミドで3回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2 mL) を加え5分しんとう後ろ過する操作を4回行った。レジンをN,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。レジんに(2S)-2,6-ビス(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸 (177 mg, 0.300 mmol) とHATU (114 mg, 0.300 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (103 μ L, 0.600 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2 mL) を加え室温で30分しんとうした。ろ過後レジンをN,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。20%ピペリジン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2 mL) を加え5分しんとう後ろ過する操作を4回行った。レジンをN,N-ジメチルホルムアミドで4回洗浄した。3-トリチルスルファニルプロピオン酸 (209 mg, 0.600 mmol) とHATU (228 mg, 0.600 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (205 μ L, 1.20 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (2 mL) を加え室温で1時間しんとうした。ろ過後レジンをN,N-ジメチルホルムアミドで4回、ジクロロメタンで4回洗浄した。1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (0.5 mL) とジクロロメタン (1.5 mL) の混合溶液を加え、室温で2時間しんとうした。ろ過してレジンを除き、ろ液を減圧下濃縮した。ジクロロメタンで6回共沸し、真空ポンプで乾燥することで、目的物

TrS-(TrS-)Lys-PEG(3)-CO₂Hを褐色固体 (105 mg) として得た。

[0599] (2-33B) TrS-(TrS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0600] [化171]

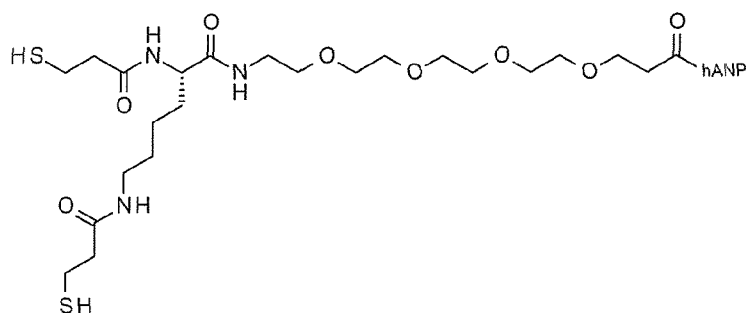


[0601] (2-33A) で製造したTrS-(TrS-)Lys-PEG(3)-CO₂H (27.4 mg) より、(2-17A) と同様の手法に従って、目的物TrS-(TrS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (30 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₈₈H₂₇₂N₄₈O₄₇S₅: [M+H]⁺ 4114.9, Found 4115.1

[0602] (2-33C) HS-(HS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0603] [化172]



[0604] (2-33B) で製造したTrS-(TrS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (30.0 mg) より、(2-17B) と同様の手法に従って、目的物HS-(HS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (15.3 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₅₀H₂₄₄N₄₈O₄₇S₅: [M+H]⁺ 3630.7, Found 3631.0

[0605] (2-33D) SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-33) の合成

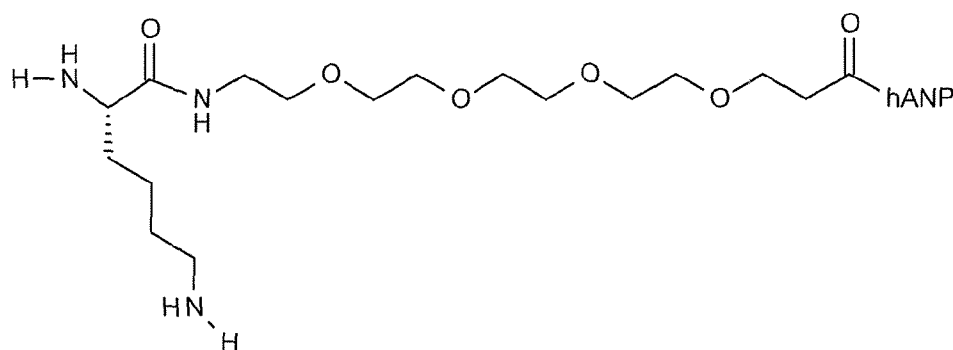
[0606]

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{326}H_{530}N_{62}O_{173}S_5$: $[M+5H]^{5+}$ 1650.3(ave.), Found 1650.2.

[0611] <実施例 2-35> SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-35) の合成

(2-35A) Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0612] [化175]



[0613] 化合物 1-20A (4.40 mg, 7.42 μ mol) および HATU (2.6 mg, 6.84 μ mol) の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 (94 μ L) に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.0 μ L, 29.4 μ mol) を加え、室温にて 3 時間攪拌した。得られた反応溶液を、hANP トリフルオロ酢酸塩 (25 mg) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (13 μ L, 76.4 μ mol) の N, N-ジメチルホルムアミド/水 (5:1, v/v) 混合溶液 (0.60 mL) に加え、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液に 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液 (3 mL) を加え、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相 HPLC (GLサイエンス、Inertsil ODS-3) にて分離精製を行い、凍結乾燥して Boc-(Boc-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (18.0 mg) を得た。

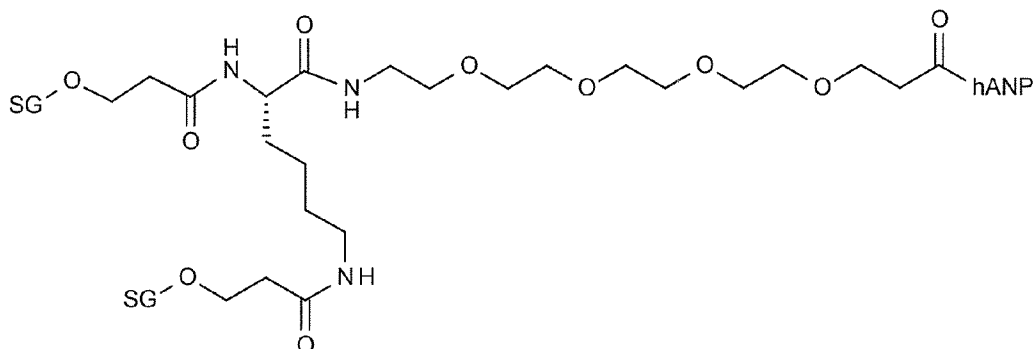
得られた Boc-(Boc-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (18.0 mg) を用い、(2-2C) と同様の手法に従って目的物 Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (12.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{144}H_{237}N_{48}O_{45}S_3$: $[M+H]^+$ 3454.7, Found 3454.7.

[0614] (2-35C) SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-35) の合成

[0615]

[化176]



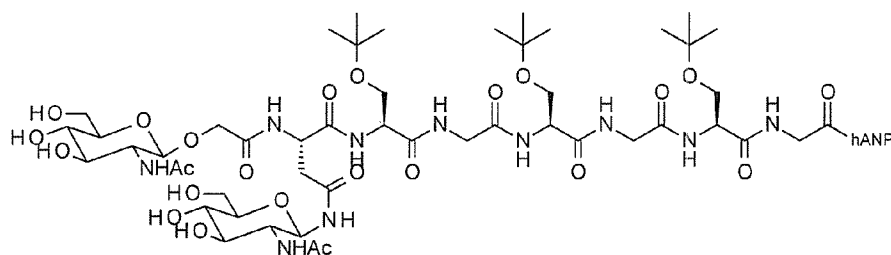
[0616] (2-35B) で製造したLys-PEG(3)-hANP(1-28) (6.0 mg) を用い、(2-1B) と同様の手法に従って目的物SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-35) (6.4 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{316}H_{507}N_{60}O_{171}S_3$: $[M-5H]^{5-}$ 1595.7 (ave.), Found 1595.6.

[0617] <実施例2-36> SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (化合物2-36) の合成

(2-36A) GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-(tBuSer-Gly)₃-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0618] [化177]



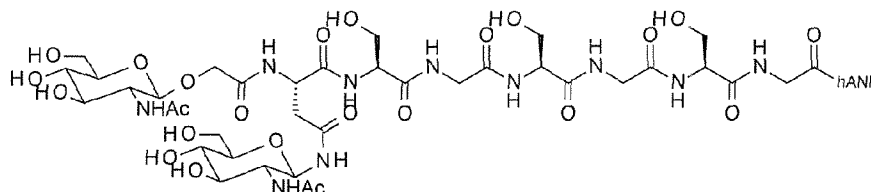
[0619] 化合物1-21B (13.8 mg) と(2-1A) の調整法2の方法でhANP-酢酸塩 (37.1 mg) から調整したhANP(1-28)-TFA塩を用いて、(2-1B) と同様の手法に従って目的物GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-(tBuSer-Gly)₃-hANP(1-28) (27.0 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{176}H_{286}N_{56}O_{61}S_3$: $[M+H]^+$ 4258.0, Found 4257.8

[0620] (2-36B) GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (下記式の化合

物) の合成

[0621] [化178]

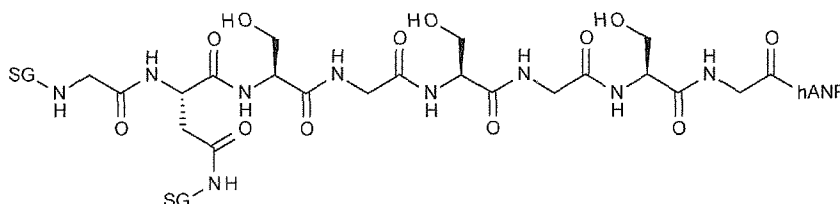


[0622] (2-36A) で製造したGlcNAc-(GlcNAc-Asn)-(tBuSer-Gly)₃-hANP(1-28) (27.0 mg) より、(2-17A) と同様の手法に従って、目的物GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (4.66 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₆₄H₂₆₂N₅₆O₆₁S₃: [M+H]⁺ 4089.8, Found 4090.1

[0623] (2-36C) SG-(SG-Asn)-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物2-36) の合成

[0624] [化179]



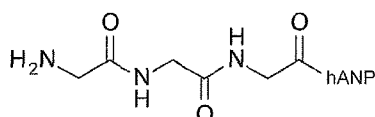
[0625] (2-36B) で製造したGlcNAc-(GlcNAc-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (3.50 mg) より (2-2D) と同様の手法に従って目的物SGc-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (化合物2-36) (3.24 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₃₁₆H₅₀₈N₆₆O₁₇₃S₃: [M+4H]⁴⁺ 2025.0(ave.), Found 2025.0.

[0626] <実施例2-37> SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (化合物2-37) の合成

(2-37A) Gly₃-hANP(1-28) (下記式の化合物の合成)

[0627] [化180]

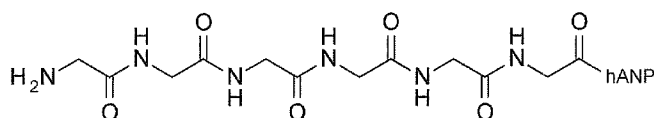


[0628] 2-[[2-[[2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)アセチル]アミノ]アセチル]アミノ]酢酸 (27.7 mg) と (2-1 A) の調整法 2 の方法で hANP-酢酸塩 (246 mg) から調整した hANP-TFA 塩を用いて、(2-1 B) と同様の手法に従って Boc-Gly₃-hANP(1-28) (196 mg) を得た。得られた Boc-Gly₃-hANP(1-28) (196 mg) より、(2-2 C) と同様の手法に従って、目的物 Gly₃-hANP(1-28) (190 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₃₃H₂₁₂N₄₈O₄₂S₃: [M+H]⁺ 3250.5, Found 3250.6

[0629] (2-37 B) Gly₆-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0630] [化181]



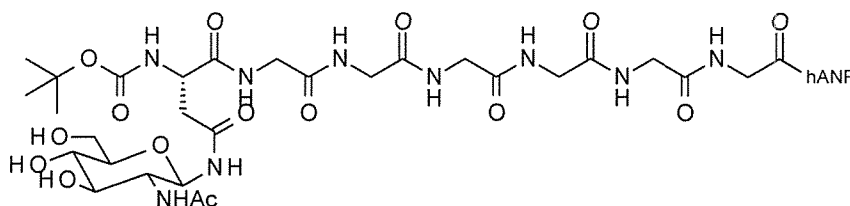
[0631] (2-37 A) で製造した Gly₃-hANP(1-28) (190 mg) と 2-[[2-[[2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)アセチル]アミノ]アセチル]アミノ]酢酸 (13.4 mg) より、(2-1 B) と同様の手法に従って、Boc-Gly₆-hANP(1-28) (115 mg) を得た。

得られた Boc-Gly₆-hANP(1-28) (115 mg) より、(2-2 C) と同様の手法に従って、目的物 Gly₆-hANP(1-28) (115 mg) を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for C₁₃₉H₂₂₁N₅₁O₄₅S₃: [M+H]⁺ 3421.6, Found 3421.5

[0632] (2-37 C) Boc-(GlcNAc)-Asn-Gly₆-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0633] [化182]



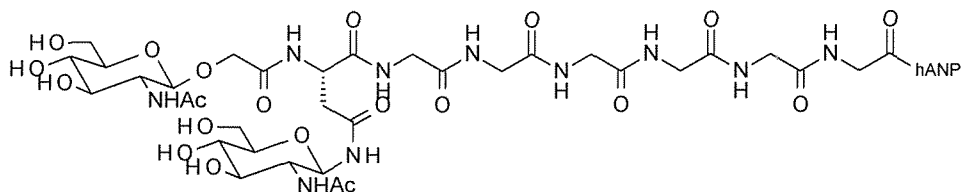
[0634] (2-37 B) で製造した Gly₆-hANP(1-28) (60.0 mg) より、(1-5 A) と同様の手法に従って、目的物 Boc-(GlcNAc)-Asn-Gly₆-hANP(1-28) (23.0 mg)

を得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{156}H_{248}N_{54}O_{54}S_3$: $[M+H]^+$ 3838.7, Found 3839.0

[0635] (2-37D) GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (下記式の化合物) の合成

[0636] [化183]

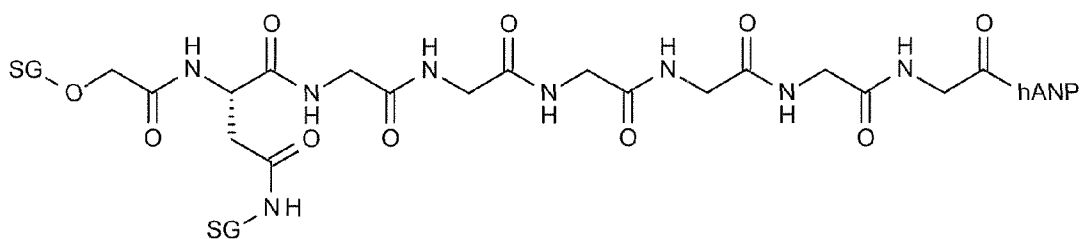


[0637] (2-37C) で製造した Boc-(GlcNAc-Asn)-Gly₆-hANP(1-28) (23.0 mg) より、(1-5B) と同様の手法に従って、目的物 GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) を白色固体 (6.77 mg) として得た。

MALDI-TOF-MS: Calcd for $C_{161}H_{255}N_{55}O_{59}S_3$: $[M+H]^+$ 3999.8, Found 4000.1

[0638] (2-37E) SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (下記式の化合物、化合物 2-37) の合成

[0639] [化184]

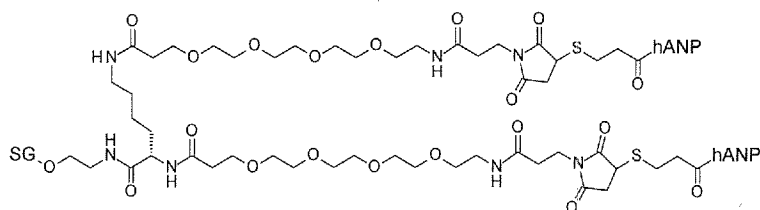


[0640] (2-37D) で製造した GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (3.40 mg) より (2-2D) と同様の手法に従って目的物 SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (化合物 2-37) (4.32 mg) を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{313}H_{501}N_{65}O_{171}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 2002.7(ave.), Found 2002.5.

[0641] <実施例 2-38> SG-Lys*-[PEG(3)-Mal-hANP(1-28)]₂ (化合物 2-38、下記式の化合物) の合成

[0642] [化185]

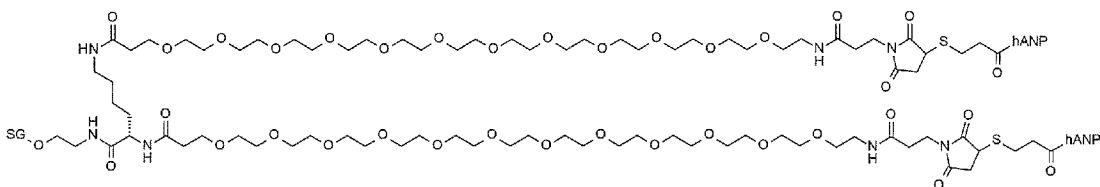


[0643] (1-22B)で製造したSG-Lys-[PEG(3)-Mal]₂ (3.0 mg, 0.94 μmol)を用い、(2-32A)と同様の方法に従って、標記目的化合物SG-Lys*-[PEG(3)-Mal-hANP(1-28)]₂ (化合物2-38) (7.0 mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₃₈₈H₆₁₆N₁₀₃O₁₅₉S₈: [M-5H]⁵⁻ 1904.8 (ave.), Found 1904.8.

[0644] <実施例2-39> SG-Lys*-[PEG(11)-Mal-hANP(1-28)]₂ (化合物2-39、下記式の化合物)の合成

[0645] [化186]

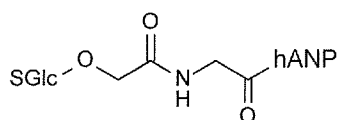


[0646] (1-23B)で製造したSG-Lys*-[PEG(11)-Mal]₂ (3.7 mg, 0.95 μmol)を用い、(2-32A)と同様の方法に従って、標記目的化合物SG-Lys*-[PEG(11)-Mal-hANP(1-28)]₂ (化合物2-39) (7.0 mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for C₄₂₀H₆₈₀N₁₀₃O₁₇₅S₈: [M-5H]⁵⁻ 2045.8 (ave.), Found 2045.8.

[0647] <実施例2-40> SG(Glc)-Gly-A-hANP(1-28) (化合物2-40、下記式の化合物)の合成

[0648] [化187]



[0649] (1-24E)で合成したSG(Glc)-Gly-A (30mg)を用いて、(2-1B)と

同様の手法に従って、目的化合物SG(Glc)-Gly-A-hANP(1-28) (化合物 2-40) (34.2mg)を得た。

ESI-TOF-MS: Calcd for $C_{213}H_{341}N_{51}O_{103}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1341.1 (ave.), Found 1341.0

また、実施例2の各種修飾hANPの製造において、実施例1-11、1-12、1-13又は1-14、及び、実施例1-24、に準じた方法で合成した、各種の還元末端改変糖鎖を用いることで、糖鎖として還元末端改変糖鎖を採用した修飾hANPを適宜製造することができる。

[0650] [試験例]

<試験例1> 糖鎖修飾ペプチドのcGMP上昇活性試験

以下の方法により、実施例2で作製した各修飾ペプチドのcGMP上昇活性を測定した。

CHO細胞にhuman GC-Aを恒常的に発現させたCHO/human GC-A細胞を α -MEM, 10%FBS, 1%Penicillin-streptomycinで 2×10^5 cells/mlに懸濁し、384 well plate (Corning, 3826)に20 μ l/wellで播種し(4×10^3 cells/well)、CO₂インキュベーター内で一晩培養した。翌日、このプレートから培地を除去した後、1.6 mM IBMX/KRB bufferを10 μ l/well添加し、プレートシェイカーで攪拌後、室温で10分間インキュベーションをした。次に、水に溶解させ、最終濃度の3倍濃度に調製した被験物質（各修飾ペプチド及び天然型hANP(1-28)（ペプチド研究所）、最終濃度濃度範囲0.01, 0.1, 1, 10, 100 nMとなるように希釈系列を調製）を5 μ l/wellずつ添加し、プレートシェイカーで攪拌後、CO₂インキュベーター内で15分間インキュベーションをした。その後、Lysis buffer (50 mM phosphate buffer, pH7.0, 1 %Triton X-100)を5 μ l 添加し、プレートシェイカーで10分間攪拌し、細胞を溶解させた。つづいて、その細胞溶解液中のcGMP量をcGMP kit (CISBIO製)を用いて測定した。すなわち、384 well plate (Greiner, 784076)にキットに添付のdiluentを5 μ l/well、細胞溶解液を5 μ l/well、cGMP-d2を5 μ l/well、anti cGMP-Cryptateを5 μ l/well添加し、プレートシェイカーで攪拌後、遮光下4°Cで一晩インキュベ

ションをした後、RubyStar (BMG LABTECH製) で均一時間分解蛍光を測定した。各濃度における被験物質の活性値 (T/C) は溶媒のみを添加したウェルの活性値を0、1 nM ANPを添加したウェルの活性値を1として算出した。各濃度におけるT/Cをプロットし、得られたシグモイド曲線からT/C=0.5の値をEC₅₀とし、測定濃度範囲における最大T/C値をE_{max}とした (表1)。

表1の結果から、全ての修飾ペプチドが、hANPの50%以上のcGMP上昇活性を示し (E_{max}>0.5)、cGMP上昇活性を保持していることが示された。化合物2-17、2-18、2-20は、E_{max}が0.6~0.7程度と若干低い傾向であったが、それ以外の修飾ペプチドはE_{max}が0.95以上であり、天然型hANPと同等のcGMP上昇作用を保持していた。

[0651] 被験物質のcGMP上昇活性

[0652] [表1]

被験物質 化合物番号	EC50(nM)	E _{max}
天然型hANP	0.022	
2-1	0.04	1.02
2-2	0.1	1.01
2-3	0.12	1.02
2-4	0.08	1.04
2-5	0.082	1.04
2-6	1.7	1.00
2-7	1.7	0.99
2-8	0.2	1.01
2-9	1.1	1.00
2-10	0.03	1.02
2-11	0.048	1.01
2-12	0.69	1.01
2-13	0.34	1.01
2-14	0.6	0.95
2-15	3.1	0.98
2-16	0.98	1.01
2-17	35	0.70
2-18	48	0.63
2-19	9.8	0.90
2-20	64	0.59

被験物質 化合物番号	EC50(nM)	E _{max}
2-21	0.097	1.02
2-22	0.08	1.02
2-23	2.4	0.98
2-24	0.54	1.01
2-25	0.054	1.02
2-26	0.024	1.01
2-27	0.26	1.02
2-28	0.31	1.01
2-29	0.1	1.01
2-30	0.12	1.01
2-31	0.31	1.00
2-32	0.41	1.00
2-33	0.4	1.01
2-34	0.53	1.01
2-35	0.31	1.00
2-36	0.39	1.00
2-37	0.4	1.00
2-38	0.016	1.01
2-39	0.0077	1.00
2-40	0.05	1.03

[0653] <試験例 2> 修飾ペプチドのNEP分解試験

以下の方法により、実施例 2 で作製した各修飾ペプチドの中性エンドペプチダーゼ（一般名：Neprilysin）による分解への耐性を調べた。

[0654] 被験物質（各種糖鎖修飾ANP及び天然型hANP(1-28)）の溶液中にNeprilysin（R&D systems）を1ug/mlとなるように添加し、37℃、30分で前処理した。

当該Neprilysin処理液を用いて被験物質のcGMP上昇活性を試験例 1 の方法で調べた。

[0655] その結果、天然型hANPは、NEP処理によって活性が消失したが、本発明の修飾ペプチドは、NEP処理後であっても試験例 1 と同程度にcGMP上昇活性を保持しており、NEPによる分解を受けにくいことが示された。

動物の血中における天然型ANPの速やかな消失の主なメカニズムは、NEPによる分解であると考えられている。本発明の修飾ペプチドは、NEP処理後もcGMP上昇活性を維持することから、動物体内においてもNEPによる分解を受けにくく、有効量が投与されれば投与後長時間にわたってcGMP上昇活性を発揮できることが示された。

[0656] <試験例 3> 修飾ペプチドのラットの血中持続性試験

以下の方法により、実施例 2 で作製した各修飾ペプチドのラットの血中における持続性（血中cGMPの持続的上昇作用及び被験物質の血中からの検出時間）を調べた。

（1）血漿サンプルの調製

イソフルラン：日本薬局方イソフルラン

採血用針およびシリンジ：テルモシリンジ 25G x 1 SR ツベルクリン用

採血用チューブ：キャピジェクト微量採血管 EDTA-2Na 500μL

サンプル保管用チューブ：MTARIX4170 サンプルトラックチューブ 0.75 mL

8週齢の雄性Slc:SDラットに対しイソフルラン吸入麻酔（（エスカイン吸入麻酔液を1-2%の濃度で維持して吸入）を行った。水に溶解させ、100uMの濃度に調製した被験物質（各修飾ペプチド及び天然型hANP(1-28)（ペプチド研究所））の溶液を、頸静脈より、100nmol/kgの用量(1mL/kg)で急速静注した。投

与前、投与後15、30、60、90、120、180及び240分の時点で、頸静脈から経時的採血（200 μ L／回）を行い、血液サンプルは速やかに氷上に置いた。

採取した血液サンプルは遠心機（Sigma 4K15、ローター: Nr12130-H）を用いて5000 rpm, 5 min, 4°Cで遠心分離し、分離した血漿サンプルをPK測定用とcGMP測定用の2本に分け測定まで-80°Cに保存した。

（2）血漿中cGMP濃度の測定

血漿中のcGMP濃度は、Amersham cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak™ (EIA) System (dual range)を用いて、添付のプロトコールに従って測定した。その結果を、縦軸にcGMP濃度、横軸に投与後の経過時間（分）としてプロットし、0分～240分までのAUC（AUC₀₋₂₄₀）と投与後60-240分のAUC（AUC₆₀₋₂₄₀）を算出した。（表2）。

[0657] （3）血漿サンプル中の被験物質の検出

（1）で調整したラット血漿サンプル50 μ Lに内部標準物質（hANPの安定同位体500nM、20 μ L）と酢酸混合溶媒（AcOH/蒸留水./DMSO=5/3/2, v/v/v）を添加後混合し、Amicon Ultra-0.5 50K（Millipore Corp., MA）に移して15°C、14000rpmで30分遠心分離した。得られた濾液をAmicon Ultra-0.5 3K（Millipore Corp., MA）に移し、前記条件で再度遠心分離した。フィルター上に残った液を取り出し、96穴ディープウェルプレートに移して、LC-MS/MS（LC : Shimadzu LC-10ADVP（島津製作所）、MS/MS : API4000QTrap（AB SCIEX））で、被験物質の含有量を測定し、血漿中の濃度を算出した。被験物質が最後に検出された時間を表2の一番右のカラムに示した。

[0658] ラットにおける血中持続時間の評価

[0659]

[表2]

	すべて積算*	すべて積算*	Pre値以上を積算**	
被験物質 化合物番号	AUC [(pmol/ml)*h] 0-240	AUC [(pmol/ml)*h] 60-240	AUC [(pmol/ml)*h] 60-240	投与後最長 検出時間 (hr)
天然型hANP	13.90	-33.86	0.00	0
2-1	488.98	188.59	191.43	3
2-3	340.97	116.61	136.00	2
2-10	735.39	323.59	323.59	1.5
2-11	874.06	397.08	399.13	2
2-12	581.28	193.48	198.16	1.5
2-13	268.64	72.88	75.73	3
2-14	179.61	35.76	43.03	1.5
2-15	47.20	7.14	36.06	1.5
2-16	173.71	33.08	8.66	2
2-25	524.33	205.83	207.18	2
2-26	245.50	13.72	60.43	2
2-27	208.58	30.24	41.71	2
2-29	430.38	143.46	156.49	2
2-30	365.22	136.33	138.87	4

[0660] *) Pre値 (0分の値) をベースラインとして、曲線の全ての点についてベースラインとの差分を積算したAUC値。曲線がベースラインより下になる点は負の値として計算した。

**) Pre値 (0分の値) をベースラインとして、曲線がベースラインより上にある点についてのみベースラインとの差分を積算したAUC値。曲線がベースラインより下になる点は無視して計算した。

[0661] 天然型hANPでは、投与により一過性にcGMPが急上昇するが、投与30分後には、投与開始前に近いレベルまで低下し、60分以降は完全にcGMPの上昇は消失したため、AUC60-240は0以下であり、血中での持続性がないことが確認された。また、血漿中の被験物質の検出においては、投与15分後の血漿サンプルにおいても天然型hANPは検出されなかった。

[0662] これに対し、実施例2の修飾ペプチドでは、AUC60-240においても高い値を示しており、被験物質の投与により上昇した血漿中cGMP濃度が、投与後60分以降 (化合物2-1、2-10では180分後、化合物2-12、2-13、2

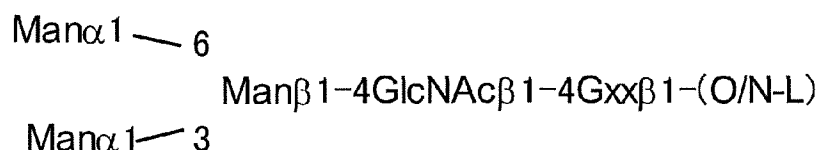
－ 1 4、 2 － 1 6 については120分後、化合物 2 － 1 1、 2 － 1 5、 2 － 1 9 については60分後) においても投与前よりも高い値を維持していた。また、被験物質自体が、投与1.5時間後以降の血漿サンプルからも検出されており、体内で長時間にわたって代謝されず、血中に留まっていることが示された。この結果から、本発明の修飾ペプチドは、血中の持続時間が延長されており、当該持続時間中cGMP上昇活性を保持していることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも一つの糖物質が、直接グリコシド結合により連結、又は、リンカー構造を介して、少なくとも一つのhANPペプチドと連結された修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。
- [請求項2] 糖物質が、hANPペプチドの、N末端、C末端、及び、ペプチドを構成する少なくとも一つのアミノ酸の側鎖、の少なくとも一箇所において、直接グリコシド結合により連結、又は、リンカー構造を介して連結していることを特徴とする請求項1の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。
- [請求項3] hANPペプチドが、hANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)又はhANP(3-27)である請求項1の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。
- [請求項4] 糖物質が、少なくとも一種類の単糖類、二糖類、三糖類、及び、4個以上の単糖類がグリコシド結合してなる糖鎖、から選択され、一分子中に複数の糖物質が含まれる場合、それらが同じであっても、互いに異なっても良い、請求項1の修飾ペプチド、または、その薬学上許容される塩。
- [請求項5] 糖物質が、4個以上の単糖類がグリコシド結合した糖鎖であることを特徴とする、請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項6] 糖物質が、糖タンパク質に由来する、N結合型糖鎖、O結合型糖鎖、又はそれらの改変糖鎖であることを特徴とする、請求項5の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

- [請求項7] 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む、N結合型糖鎖又はその還元末端改変糖鎖であることを特徴とする、請求項6の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

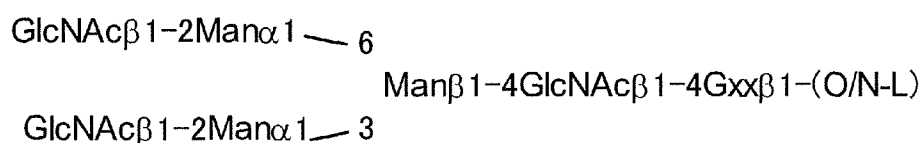
[化1]



(式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はManであり(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「AG(5)」、「AG(5-Glc)」,及び、「AG(5-Man)」という。)、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

- [請求項8] 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む糖鎖である、請求項7の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化2]

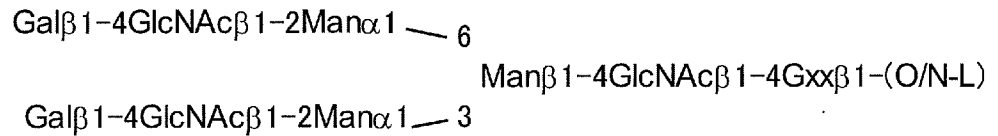


(式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はMan(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「AG(7)」、「AG(7-Glc)」,及び、「AG(7-Man)」という。)であり、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

- [請求項9] 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む糖鎖である、請求項8

の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

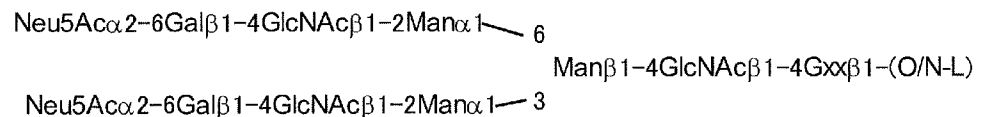
[化3]



(式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はManであり(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「AG(9)」、「AG(9-Glc)」,及び、「AG(9-Man)」という。)、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

[請求項10] 糖物質が、以下の式で表される糖鎖構造を含む糖鎖である、請求項9の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化4]



(式中、Gxxは、GlcNAc、Glc又はManであり(上記構造からなる糖鎖を、以下、GXXの種類に応じてそれぞれ「SG」、「SG(Glc)」,及び、「SG(Man)」という。)、"O/N-L"は、Oグリコシド結合又はNグリコシド結合によりリンカー構造又はhANPペプチドと結合することを示す。)

[請求項11] 糖物質において、GxxがGlcNAcである、請求項7～10の何れかの修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項12] 糖物質がSGである、請求項11の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

- [請求項13] 1つのhANPペプチドに対して、10個以下の糖物質が連結していることを特徴とする、請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項14] 1つのhANPペプチドに対して、1個、2個、又は、3個の糖物質が連結していることを特徴とする、請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項15] 1分子中に、2個以上のhANPペプチドを含有する、請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項16] hANPペプチドと糖物質が、リンカー構造を介して連結しており、リンカー構造が、3原子以上の連結鎖を有し、少なくとも一箇所で糖物質の還元末端とグリコシド結合し、かつ、少なくとも一箇所でhANPペプチドと結合する化学構造である請求項3の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項17] 糖物質が、hANPペプチドのN末端、C末端の何れか一方、又は、その両方に、リンカー構造を介して連結している請求項16の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項18] リンカー構造が、15原子以下の連結鎖を有する構造である請求項17の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項19] SG-hANP(1-28) (化合物2-1)、hANP(1-28)-SG (化合物2-2)、SG-hANP(1-28)-SG (化合物2-7)、AG(9)-hANP(1-28) (化合物2-10)、SG-triazole-hANP(1-28) (化合物2-12)、SG-thioacetamide-hANP(1-28) (化合物2-25)、AG(5)-hANP(1-28) (化

合物 2-26)、

又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項18の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項20] リンカー構造が、ポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸、及び、2以上のアミノ酸からなるオリゴペプチド鎖のうち、少なくとも一つの構造を含むことを特徴とする、請求項16の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項21] リンカー構造に含まれるポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸及び／又はオリゴペプチド鎖が、hANPペプチドのN末端及び／又はC末端とアミド結合していることを特徴とする請求項20の修飾ペプチド。

[請求項22] ポリオキシアルキレン鎖が、PEGである請求項21の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項23] SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物 2-16)、AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-21)、AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-22)、SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (化合物 2-24)、SG-(SG-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物 2-27)、SG-(SG-)Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物 2-28)、SG-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-29)、SG-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物 2-30)、SG-(SG-)Gln-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物 2-31) SG-(SG-)Gln-PEG(3)-Mal-hANP(1-28) (化合物

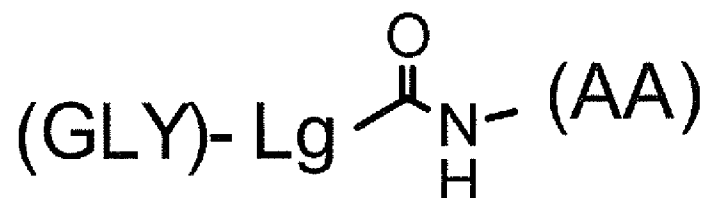
2-32)、SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (化合物2-36)
) SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (化合物2-37)、

又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項21の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項24] リンカー構造が、アミノ基側鎖アミノ酸、SH側鎖アミノ酸、カルボキシル基側鎖アミノ酸、水酸基側鎖アミノ酸又はフェノール側鎖アミノ酸の少なくとも一つの官能基側鎖アミノ酸を含み、当該官能基側鎖アミノ酸の側鎖において、糖物質又はhANPペプチドと連結していることを特徴とする請求項20の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項25] リンカー構造が、少なくとも一つのアミノ基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式(C)の構造を有することを特徴とする請求項24の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化5]



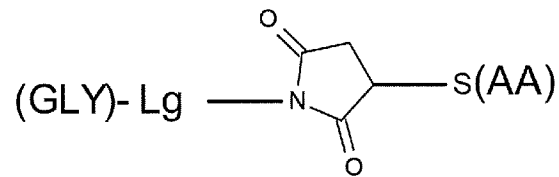
(式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数の

GLYが連結することができる。N-(AA)はアミノ基側鎖アミノ酸の側鎖のアミノ基に由来する窒素原子を示す。))。

- [請求項26] アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖アミノ基及び α アミノ基が、別のアミノ酸の α カルボキシル基とアミド結合を形成していることを特徴とする請求項25の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項27] アミノ基側鎖アミノ酸がLysである請求項25又は26の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項28] SG-(SG-)Lys-Gly-hANP(1-28) (化合物2-14)、[(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (化合物2-15)、SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-19)、[SG₂-Mal-(SG₂-Mal-)Lys-[SG₂-Mal-(SG₂-Mal-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-20)、SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-hANP(1-28) (化合物2-33)、SG-thioacetamide-(SG-thioacetamide-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-34)、SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-35)、
- 又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項27の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項29] リンカー構造が、少なくとも一つのSH基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該アミノ基側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式の構造を有することを特徴とする請求項24の修飾ペプチド、また

は、その薬理学上許容される塩、

[化6]



(式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。SはSH基側鎖アミノ酸の側鎖SH基に由来する硫黄原子を示す)。

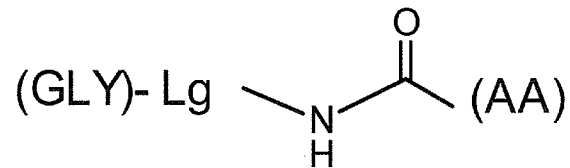
[請求項30] SH基側鎖アミノ酸がCysである請求項29の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項31] [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (化合物2-17)、[(SG₂-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (化合物2-18)、
SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (化合物2-23)、
又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項30の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項32] リンカー構造が、少なくとも一つのカルボキシル基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該カルボン酸側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、

以下の一般式の構造を有することを特徴とする請求項 24 の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化7]



(式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。C Oはカルボン酸側鎖アミノ酸の側鎖に由来するC Oを示す)。

[請求項33] 糖物質が、カルボキシル基側鎖アミノ酸の、側鎖カルボキシル基及び α カルボキシル基の両方に、Nグリコシド結合しており、 α アミノ基を介して別のリンカー構造又はhANPペプチドと結合していることを特徴とする請求項32の修飾ペプチド。

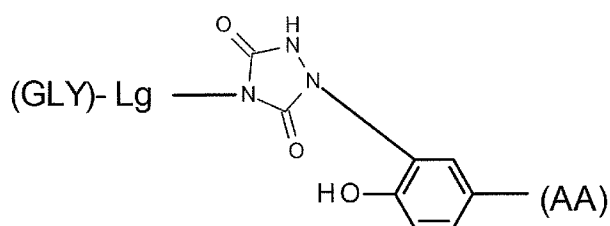
[請求項34] カルボン酸基側鎖アミノ酸がGlu、Gln、Asp又はAsnである請求項32又は33の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項35] (SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物2-3)、(SG-)Asn-hANP(2-28) (化合物2-4)、(SG-)Asn-hANP(3-28) (化合物2-8)、SG-(SG-)Asn-hANP(1-28) (化合物2-9)、SG-(SG-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (化合物2-13)又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hA

NP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項34の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項36] リンカー構造が、少なくとも一つのフェノール側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該フェノール側鎖アミノ酸の側鎖に連結しており、以下の一般式の構造を有することを特徴とする請求項24の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化8]



(式中、GLYは糖物質を示し、Lgはリンカー構造中の糖鎖側構造を示し、直鎖又は2以上に分岐してもよい。GLYとLはO-又はN-グリコシド結合で結合されており、Lgが分岐している場合、分岐末端と同数のGLYが連結することができる。フェノール基はフェノール基側鎖アミノ酸の側鎖に由来するフェノール基を示す)。

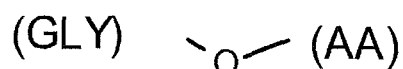
[請求項37] フェノール基側鎖アミノ酸がTyrである請求項36の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

[請求項38] hANP(1-27)-(SG-)Tyr (化合物2-6) 又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man) 或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項37の修飾ペプチド、

または、その薬理学上許容される塩。

- [請求項39] リンカー構造が、少なくとも一つの水酸基側鎖アミノ酸を含み、糖物質が、当該水酸基側鎖アミノ酸の側鎖にO-グリコシド結合している、以下の一般式の構造を有することを特徴とする請求項24の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化9]



(式中、GLYは糖物質を示し、Oは水酸基側鎖アミノ酸の側鎖水酸基に由来する酸素原子を示す)。

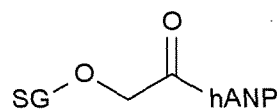
- [請求項40] 水酸基側鎖アミノ酸がSerである請求項39の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

- [請求項41] (SG-)Ser-hANP(2-28) (化合物2-5)
- 又は、これらの修飾ペプチドにおいて、糖物質がSG、SG(Glc)、SG(Man)、AG(5)、AG(5-Glc)、AG(5-Man)、AG(7)、AG(7-Glc)、AG(7-Man)、AG(9)、AG(9-Glc)、AG(9-Man)或いはGlcNAcに置き換えられ、及び／若しくは、hANPペプチドがhANP(1-28)、hANP(2-28)、hANP(3-28)、hANP(1-27)、hANP(2-27)或いはhANP(3-27)に置き換えられたものである請求項40の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

- [請求項42] 糖物質として1又は2つのSG、hANPペプチドとして1つのhANP(1-28) (配列番号1)を有し、SGがhANP(1-28)のN末端に、10原子以下の連結鎖を有するリンカー構造を介して連結している、請求項16～41の何れかの修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。

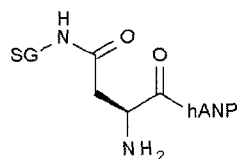
[請求項43] 下記の化合物 2-1、2-3、2-10、2-11、2-12、2-13、2-14、2-15、2-16、2-25、2-26、2-27、2-29、又は、2-30の式で表される構造からなる請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩、

[化10]



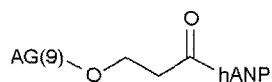
(化合物 2-1)

[化11]



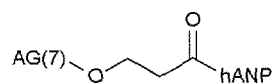
(化合物 2-3)

[化12]



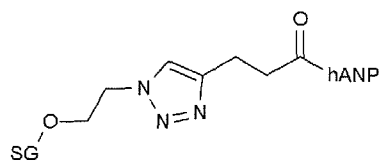
(化合物 2-10)

[化13]



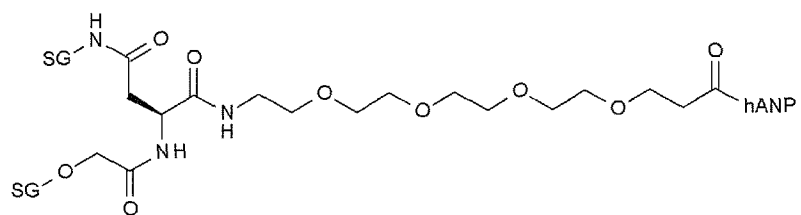
(化合物 2-11)

[化14]



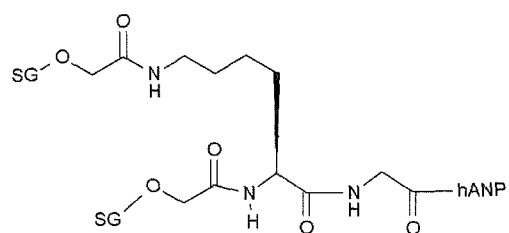
(化合物 2-12)

[化15]



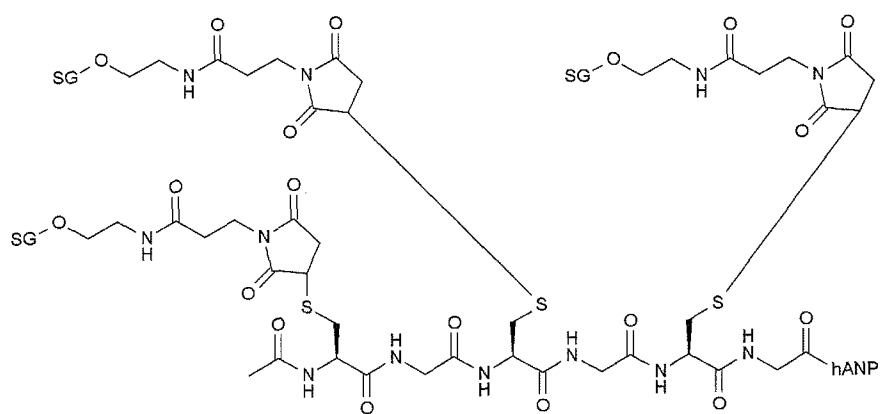
(化合物 2-13)

[化16]



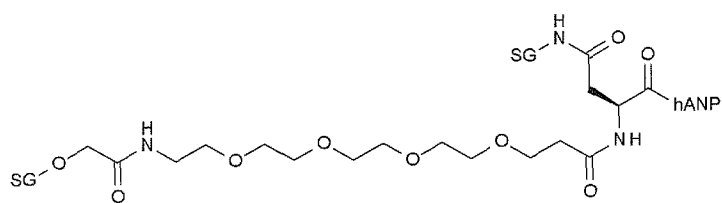
(化合物 2-14)

[化17]



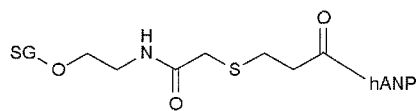
(化合物 2-15)

[化18]



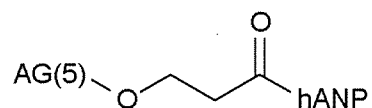
(化合物 2-16)

[化19]



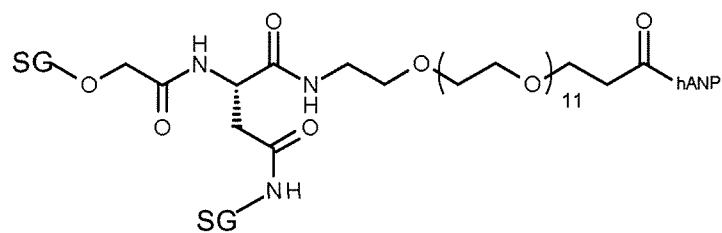
(化合物 2 - 2 5)

[化20]



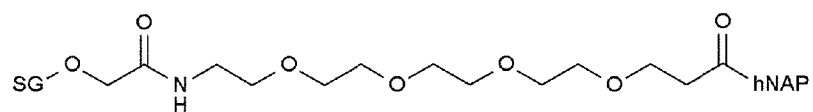
(化合物 2 - 2 6)

[化21]



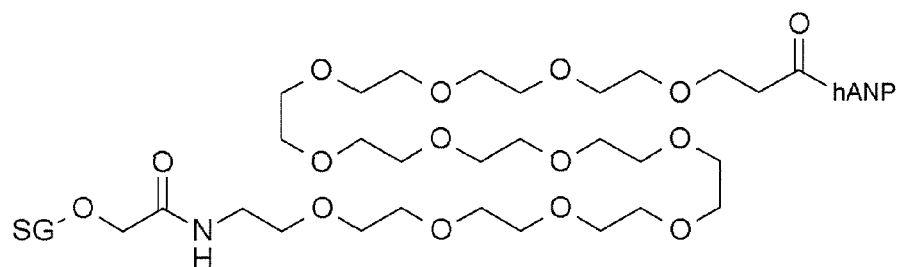
(化合物 2 - 2 7)

[化22]



(化合物 2 - 2 9)

[化23]



(化合物 2 - 3 0)

(上記式において、hANPは、配列番号1のアミノ酸配列からなるhANP(1-28)であり、当該アミノ酸配列のN末端において、リンカー構造とアミド結合している。)、

- [請求項44] 薬学上許容される塩が、トリフルオロ酢酸塩、若しくは、酢酸塩である、請求項42又は43に記載の修飾ペプチドの塩。
- [請求項45] 糖物質がhANPペプチドのアミノ酸側鎖に連結しており、当該連結されたアミノ酸がhANPペプチドに含まれる配列番号1のアミノ酸番号7～23のアミノ酸以外のアミノ酸であることをとを特徴とする、請求項3の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項46] 修飾されていないhANP(1-28)と比較して延長された血中持続時間を示し、且つ、cGMP上昇活性を保持することを特徴とする請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項47] 中性エンドペプチダーゼによるhANPペプチドの分解に対して抵抗性を有することを特徴とする請求項1に記載の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項48] 修飾されていないhANP(1-28)と比較して、3倍以上の水溶性を示すことを特徴とする請求項1の修飾ペプチド、または、その薬理学上許容される塩。
- [請求項49] 請求項1～48の何れかに記載の修飾ペプチド又はその薬学上許容される塩を含有する医薬。
- [請求項50] 循環器疾患の治療剤又は軽減剤である請求項48の医薬。

- [請求項51] 有効量の請求項1～48の何れかの修飾ペプチド又はその薬学上許容される塩を投与することを含む、循環器疾患を治療又は軽減させる方法。
- [請求項52] hANPペプチド、糖物質、及び必要に応じてリンカー分子、被転移化合物を連結させる工程を含む、請求項1～48の何れかに記載の修飾ペプチドの製造方法。
- [請求項53] Endo-M又はその変異酵素を用いて、GlcNAc化合物、Glc化合物又はMan化合物に糖鎖を転移させる工程を含むことを特徴とする請求項52の方法。