

明 細 書

発明の名称： T S P 1 阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、TSP1 (thrombospondin 1) の機能を阻害することで血流を改善することができ、重症下肢虚血などの疾患の治療または予防に有用である環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩、PK-PD (pharmacokinetics-pharmacodynamics) プロファイルが改善された当該環状ペプチドのコンジュゲート体、それらを有効成分として含有する医薬、当該コンジュゲート体の製造方法などに関する。

背景技術

[0002] 末梢動脈疾患 (PAD) は、足の血管において動脈硬化が起こり、血流が低下することにより発症する疾患であり、疼痛などの様々な症状を引き起こし得る。重症化したPADを重症下肢虚血 (CLI) といい、PAD患者の1～3%を占める。CLIは、下肢への血流障害によって安静時疼痛が生じ、下肢末梢に潰瘍や壊死が生じた状態である。Fontaine分類ではIIIおよびIV、Rutherford分類では4-6に分類される (非特許文献1)。

[0003] CLIは予後が不良で、死亡率が高いことが問題となっており、CLI患者に対しては、虚血組織での血管再生などにより血管システムを再構築し、酸素および栄養分を虚血組織に送り届けることによって、下肢の潰瘍・壊死の進展を抑制する治療が検討されている (非特許文献2)。これまでに、血管新生を促進する増殖因子を用いた遺伝子治療も試みられているが、動物実験とは異なり、臨床試験では有効性を示すに到っていない。そのような臨床試験成績から、血管新生抑制因子にも焦点が当てられ、血管新生促進因子と血管新生抑制因子とのバランスが重要であるといった仮説が立てられている (非特許文献3および4)。

[0004] また、近年、提唱されている包括的高度慢性下肢虚血 (CLTI、chronic limb threatening ischemia) は下肢虚血、組織欠損、神経障害、感染などの肢切

断リスクを持ち、治療介入が必要な疾患の総称である。虚血に加えて、虚血以外の要素も含む、より包括的な概念である。例えば、CLTIには糖尿病性足病変も含まれる。CLTIの重症度は、WIFI分類を使用し「潰瘍 (Wound; W)」、「虚血 (Ischemia; I)」、および「感染 (foot Infection; fI)」の重症度をそれぞれGrade 0-3で評価する (非特許文献 2 2)。

[0005] 血管新生に対して抑制的に作用することが報告されている糖タンパク質 thrombospondin 1 (TSP1)は、活性化血小板から放出され、内皮細胞、平滑筋細胞、腎メサンギウム細胞、尿細管細胞、および有足細胞を含む多くの細胞で合成され、分泌されることが報告されている (非特許文献 5 ~ 7)。TSP1は末梢血管障害患者の血液およびCLI患者の下肢骨格筋中でその発現が亢進していることから、CLI患者下肢における潰瘍・壊死の進展への関与が示唆されている (非特許文献 8 および 9)。TSP1がラット下肢虚血-再灌流後の血流回復を抑制すること、TSP1欠損マウスにおいて下肢虚血後の血管新生が亢進することから、TSP1は下肢虚血後の血流回復に対して抑制的に働いていると考えられる (非特許文献 1 0 および 1 1)。また、TSP1欠損マウスでは、創傷部位での血流が増加し、創傷サイズの縮小も亢進したことから、CLI患者で認められる傷に対して、TSP1の機能を阻害することにより創傷治癒効果が期待できる (非特許文献 1 2)。

[0006] TSP1は血管新生阻害作用以外にも様々な薬理作用を示し、多くの疾患に関与していると考えられる。TSP1は血小板から分泌されて線溶系PAI-1レベルを増加させ、血栓形成を亢進させる (非特許文献 1 3)。肥満でインスリン抵抗性が生じている患者でTSP1レベルは増加し、TSP1はマクロファージに作用して、肥満により誘発される炎症反応を促進し、インスリン抵抗性を増悪させる (非特許文献 1 4 および 1 5)。TSP1は腎有足細胞のアポトーシスを促進して、細胞機能の低下を誘発する (非特許文献 1 6)。TSP1は非食細胞上のsignal-regulatory protein- α に結合してNADPH oxidaseを活性化し、血管弛緩作用を抑制することにより、腎臓での虚血再灌流傷害を誘発する (非特許文献 1 7)。これらの結果から、TSP1阻害により、心筋梗塞、肥満患者に

おける炎症反応やインスリン抵抗性、さらには虚血再灌流傷害を含む腎障害が改善される可能性がある。また、TSP1によって産生された血小板由来のマイクロパーティクルが、鎌型赤血球患者においてvaso-occlusive crisisを誘発する（非特許文献18および19）。さらには、TSP1が単核球の遊走・接着を亢進して、大動脈瘤における炎症反応が増強されることが報告されている（非特許文献20）。TSP1は、癌細胞の細胞増殖、接着、浸潤への作用を介して、癌の抑制や促進に関与している可能性が報告されている（非特許文献21）。

一方、TSP1とCD47受容体との結合を阻害する物質として、抗体（特許文献1）やポリペプチド（特許文献2）が知られている。また本出願人は、TSP1に結合し、TSP1と血管内皮細胞などの細胞との接着を阻害することができる大環状ポリペプチドを開発している（特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO 2008/060785

特許文献2：US 2014/296477

特許文献3：WO 2018/052002

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Kinlay S. Circ Cardiovasc Interv. 2016; 9: e001946.

非特許文献2：Davies MG. Methodist Debaque Cardiovasc J. 2012; 8: 20-27.

非特許文献3：Hellsten Y, Hoier B. Biochem. Soc. Trans. 2014; 42: 1616-1622.

非特許文献4：Olfert IM. Microcirculation 2016; 23: 146-156.

非特許文献5：Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Nat Med. 2000; 6: 41-48.

非特許文献6：Henkin J, Volpert OV. Expert Opin Ther Targets. 2011; 15(12): 1369-1386.

- 非特許文献7 : Murphy-Ullrich JE, Iozzo RV. *Matrix Biol.* 2012; 31(3): 152-154.
- 非特許文献8 : Smadja DM, d'Audigier C, Bieche I, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 551-559.
- 非特許文献9 : Favier J, Germain S, Emmerich J, et al. *J Pathol* 2005; 207: 358-366.
- 非特許文献10 : Isenberg JS, Romeo MJ, Abu-Asab M, et al. *Circ Res.* 2007; 100(5): 712-720.
- 非特許文献11 : Csanyi G, Yao M, Rodriguez AI, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2966-2973.
- 非特許文献12 : Soto-Pantoja DR, Shih HB, Maxhimer JB, et al. *Matrix Biol.* 2014; 37: 25-34.
- 非特許文献13 : Prakash P, Kulkarni PP, Chauhan AK. *Blood* 2015; 125(2): 399-406.
- 非特許文献14 : Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, et al. *Diabetes.* 2008; 57(2): 432-439.
- 非特許文献15 : Li Y, Tong X, Rumala C, et al. *PLoS One.* 2011; 6(10): e26656.
- 非特許文献16 : Cui W, Maimaitiyiming H, Zhou Q, et al. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(7): 1323-1333.
- 非特許文献17 : Yao M, Rogers NM, Csanyi G, et al. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(6): 1171-1186.
- 非特許文献18 : Hagag AA, Elmashad G, Abd El-Lateef AE. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014; 6(1): e2014044.
- 非特許文献19 : Camus SM, Gausseres B, Bonnin P, et al. *Blood.* 2012; 120(25): 5050-5058.
- 非特許文献20 : Liu Z, Morgan S, Ren J, et al. *Circ Res.* 2015; 117(2): 129-141.

非特許文献21 : Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D. et al., The role of thrombospondin-1 in human disease. J Surg Res. 2004;122(1):135-42.

非特許文献22 : Conte MS, Bradbury AW, et al.: Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2019; 58: S1-S109 e133.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、TSP1の機能を阻害することで血流を改善することができ、重症下肢虚血などの疾患の治療または予防に有用である新規化合物を提供することを目的とする。さらに、本発明は、TSP1の機能を阻害することで血流を改善することができる化合物であって、PK-PD (pharmacokinetics-pharmacodynamics) プロファイルが改善された化合物、例えばより少ない投与頻度で優れた薬効を示す化合物を提供することを目的とする。

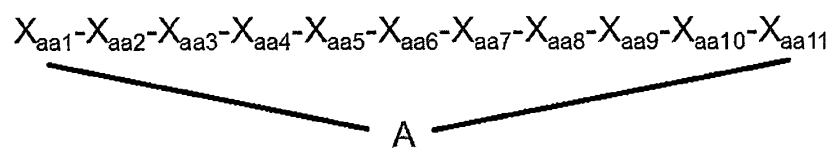
課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、特定のアミノ酸配列を有する環状ペプチドであって、環を構成するアミノ酸残基のうち2つのアミノ酸残基の側鎖が結合することにより二環性となっているもの（二環性環状ペプチド）が、TSP1に結合し、TSP1と細胞との接着を阻害することにより、TSP1の機能を阻害して血流を改善することができることを見出した。さらに、TSP1の機能を阻害して血流を改善することができる化合物を、Fc含有分子とのコンジュゲートとすることで、より少ない投与頻度で血流を改善することができることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づきさらに研究を重ねることにより、本発明を完成させた。

- [0011] すなわち、本発明は、以下を提供する。

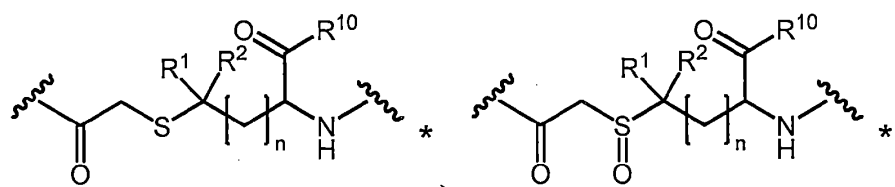
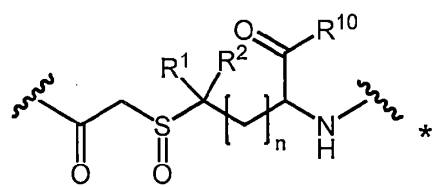
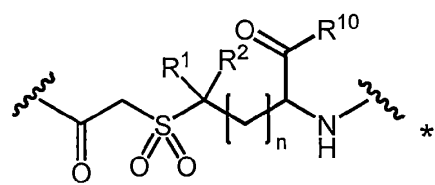
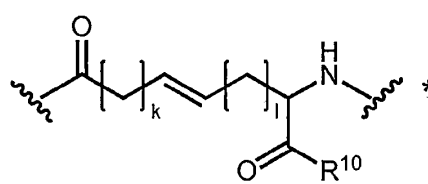
[1] 式(1)

[化1]

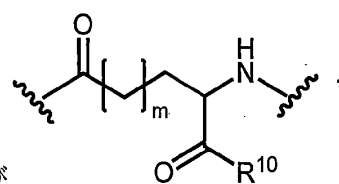


[式中、Aは、環形成基

[化2]

A₁A₂A₃A₄

、および

A₅

から選択され、

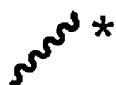
ここで、

[化3]



は、 X_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示し、

[化4]



は、 X_{aa1} のC末端カルボニル基への結合点を示し、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{10} はアミノ基またはヒドロキシ基であり、

n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、

k および l はそれぞれ独立に0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、

m は1～7の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、または7）であり

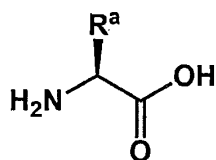
；

X_{aa1} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa2} は、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸または脂肪族アミノ酸の残基であり；

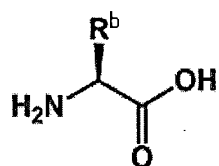
X_{aa3} および X_{aa8} は、それぞれ独立に選択される、以下の式（ⅠⅠⅠ）

[化5]



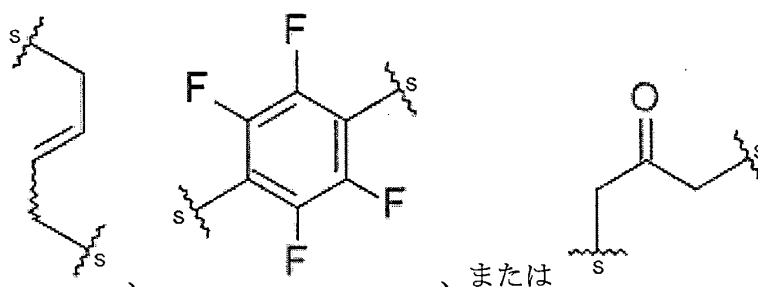
[式中、 R^a は、式 $-(CH_2)_tSH$ （式中、 t は1～3の整数（例えば、1、2、または3）である）で表される基である]、または式（ⅠⅠⅠ'）

[化5-1]



[式中、 R^b は、式 $-\text{CH}_v(\text{CH}_3)_{2-v}\text{CH}_w(\text{CH}_3)_{2-w}\text{SH}$ （式中、 v は0～2の整数であり、 v が0または1のとき、 w は2であり、 v が2のとき、 w は0または1である）、または $-\text{CH}_x(\text{CH}_3)_{2-x}\text{SH}$ （式中、 x は0または1である）で表される基である]で表されるアミノ酸の残基において、 X_{aaa} および X_{aab} のチオール基が、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、または $-\text{S}-\text{X}-\text{S}-$ （式中、 X は、

[化6]



(式中、

[化7]



は、 S への結合点を示す)から選択される)で表される結合を形成している構造であり、かつ、 X_{aaa} および X_{aab} の少なくともいずれか一方は式(1)で表されるアミノ酸の残基であり；

X_{aa4} は、中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa5} は、塩基性アミノ酸の残基であり；

X_{aa6} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

X_{aa7} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

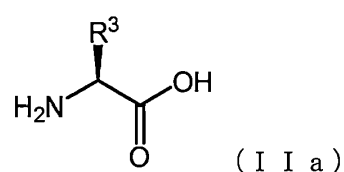
X_{aa9} は、芳香族アミノ酸、脂肪族アミノ酸または塩基性アミノ酸の残基であり；

X_{aa10} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa11} は、脂肪族アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸は、式 (I I a)

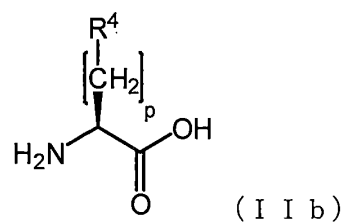
[化8]



(式中、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{3-6} シクロアルキルである) で表されるアミノ酸であり；

芳香族アミノ酸は、式 (I I b)

[化9]

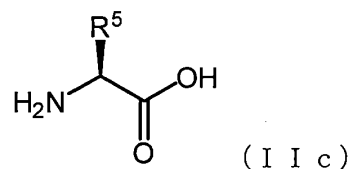


(式中、 R^4 は、フェニル、チエニル、ピリジル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、 C_{1-3} アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 C_{1-3} アルコキシからなる群より独立して選択される1以上の置換基により置換されていてよく、 p は0～3の整数(例えば、0、1、2、または3)である) で表される

アミノ酸であり；

塩基性アミノ酸は、式 (I I c)

[化10]

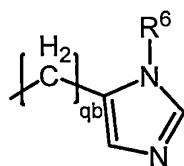


[式中、R⁵は、

式—(CH₂)_{q_a}NH₂ (式中、q_aは1～6の整数 (例えば、1、2、3、4、5、または6) である)、

式

[化11]

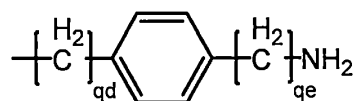


(式中、R⁶は水素原子またはC₁₋₃アルキルであり、q_bは1～6の整数 (例えば、1、2、3、4、5、または6) である)、

式—(CH₂)_{q_c}NHC(=NH)NH₂ (式中、q_cは1～6の整数 (例えば、1、2、3、4、5、または6) である)、または

式

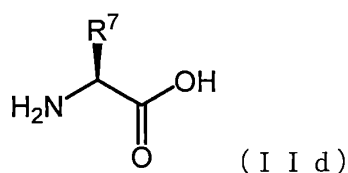
[化12]



(式中、q_dおよびq_eはそれぞれ独立して1～3の整数 (例えば、1、2、または3) である) で表される基である] で表されるアミノ酸であり；

中性アミノ酸は、式 (I I d)

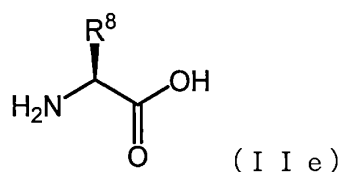
[化13]



[式中、 R^7 は、式 $-(CH_2)_{ra}NHCONH_2$ (式中、 ra は1～6の整数 (例えば、1、2、3、4、5、または6) である) または式 $-(CH_2)_{rb}SH$ (式中、 rb は1～3の整数 (例えば、1、2、または3) である) で表される基である] で表されるアミノ酸、Gly、Met、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、^mS、MS、またはThrであり；

酸性アミノ酸は、式 (I I e)

[化14]



[式中、 R^8 は、式 $-(CH_2)_sCOOH$ (式中、 s は1～6の整数 (例えば、1、2、3、4、5、または6) である) で表される基である] で表されるアミノ酸である]

で表される環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[2] X_{aa1} が2NaI残基であり、

X_{aa2} が、Arg、AGB、PHGまたはTleの残基であり、

X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、式 (I I I) または (I I I') で表されるアミノ酸の残基がHCYまたはCysの残基であり、

X_{aa4} がGly残基であり、

X_{aa5} が、ArgまたはAGBの残基であり、

X_{aa6} が、AsnまたはAspの残基であり、

X_{aa7} がTrp残基であり、

X_{aa9} が、Val、Arg、PHG、4PALまたはAGBの残基であり、

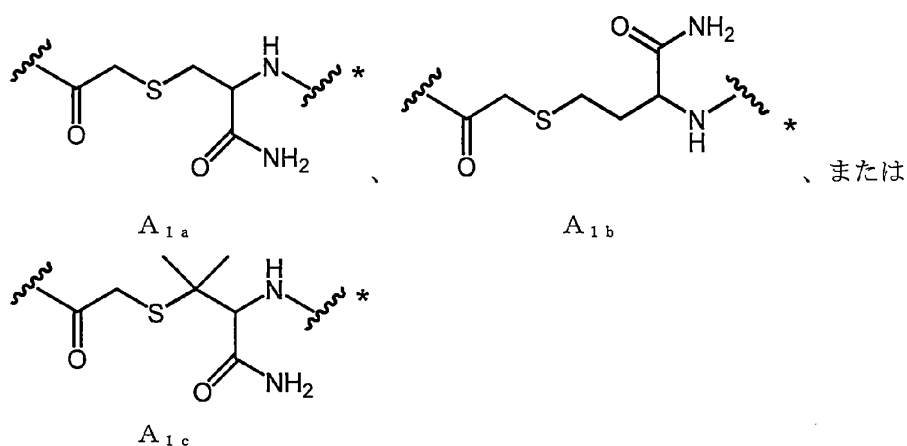
X_{aa10} がTrp残基であり、かつ

X_{aa11} が、Val、CPTG、またはCHXGの残基である、

[1] に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[3] Aが、環形成基

[化15]

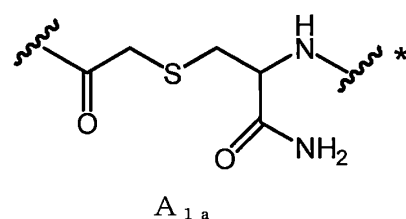


である、

[1] または [2] に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[4] Aが、環形成基

[化16]



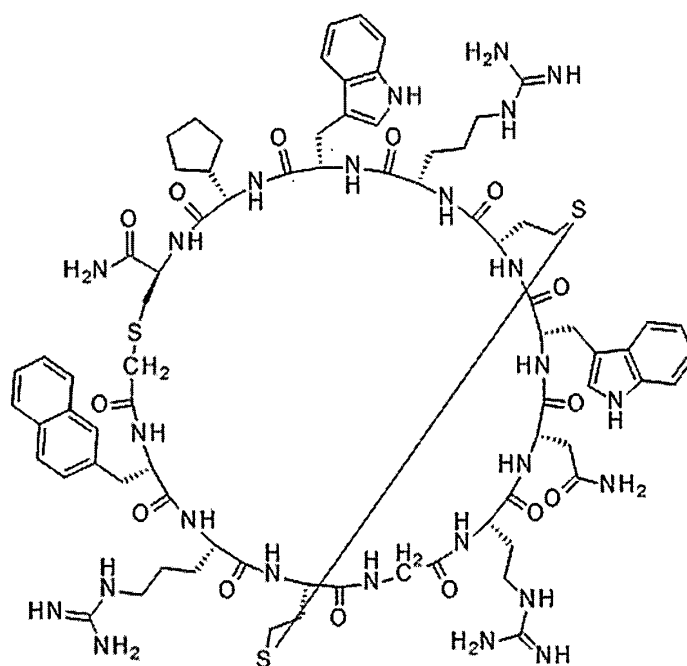
である、[3] に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[5] X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、チオール基が、 $-S-S-$ または $-S-CH_2-S-$ で表される結合を形成している、[1] ~ [4] のいずれ

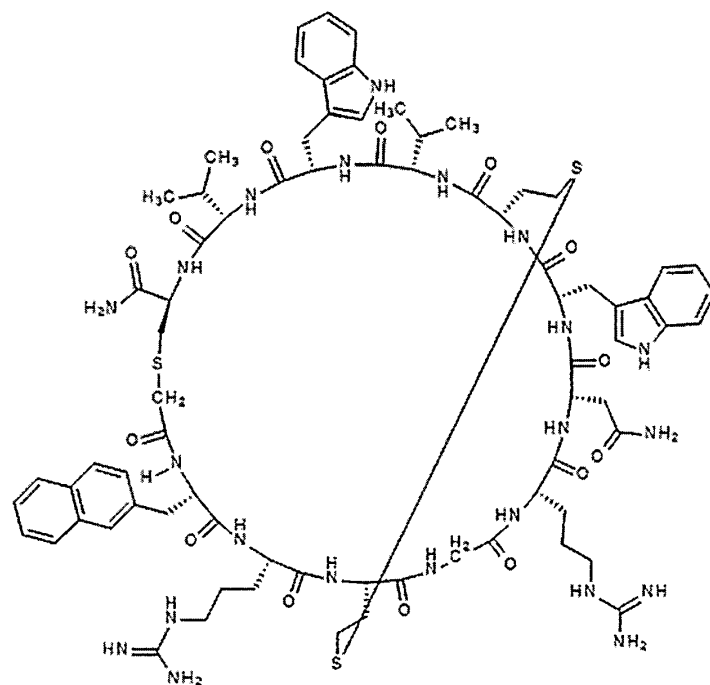
れか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[6]

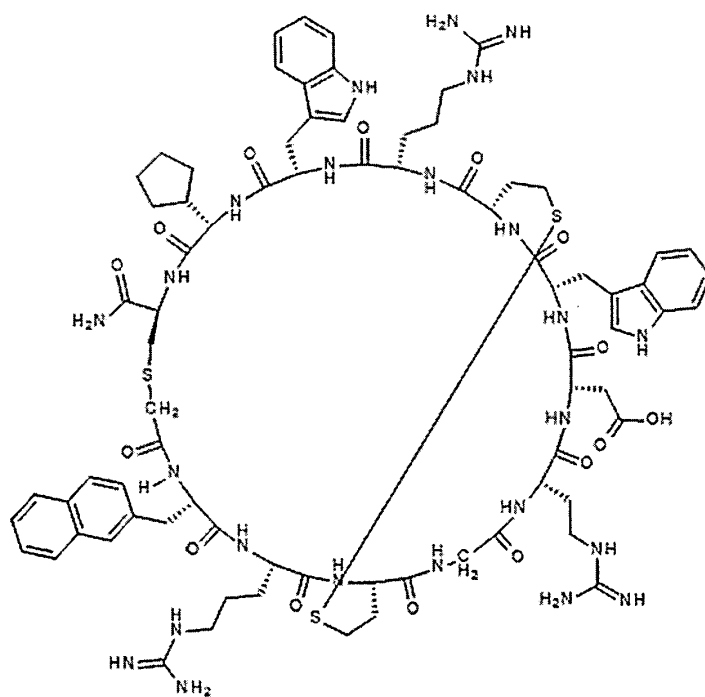
[化17]



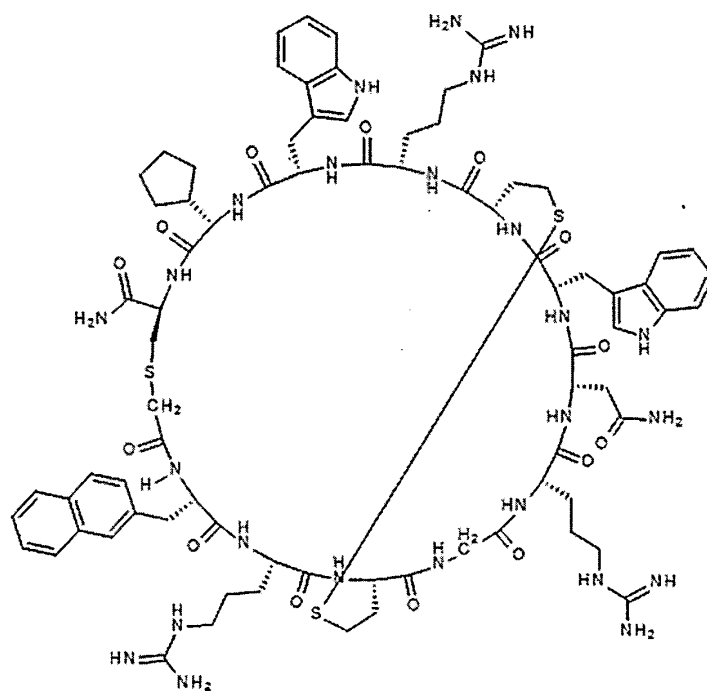
[化18]



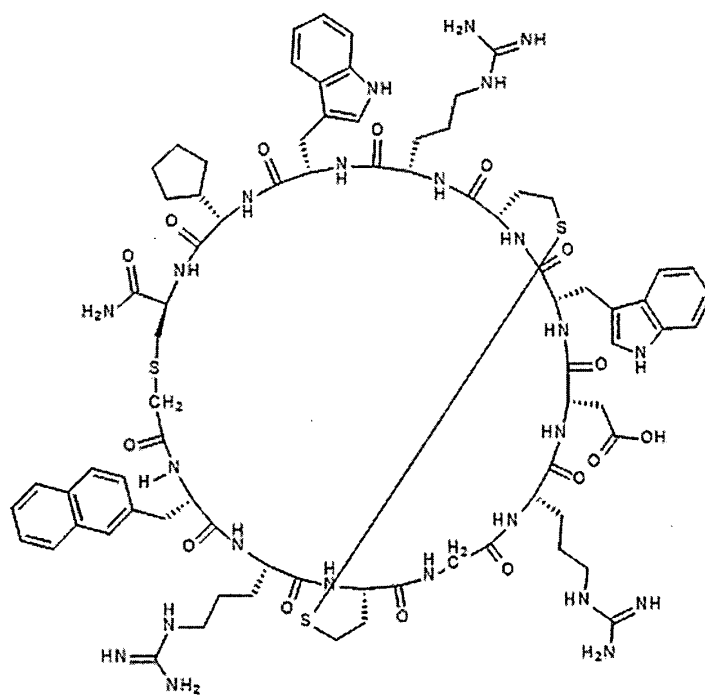
[化19]



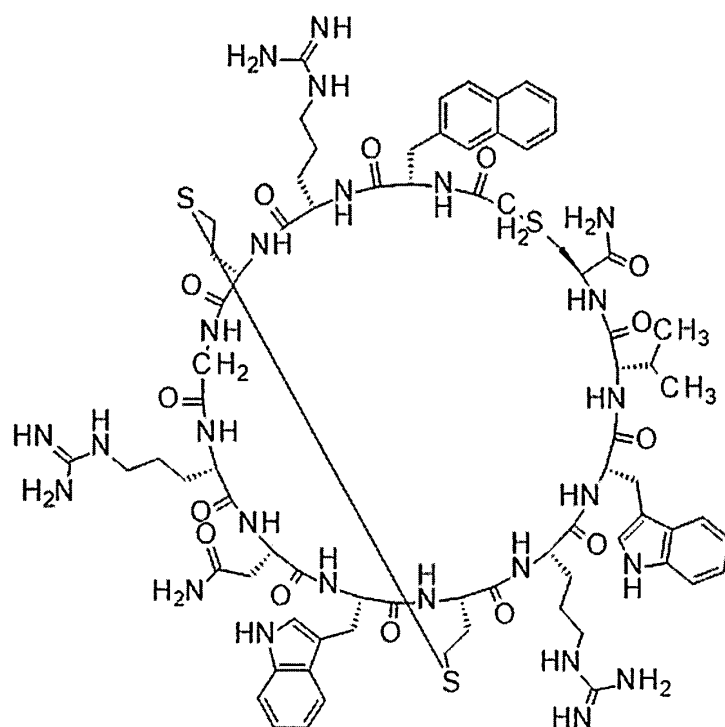
[化20]



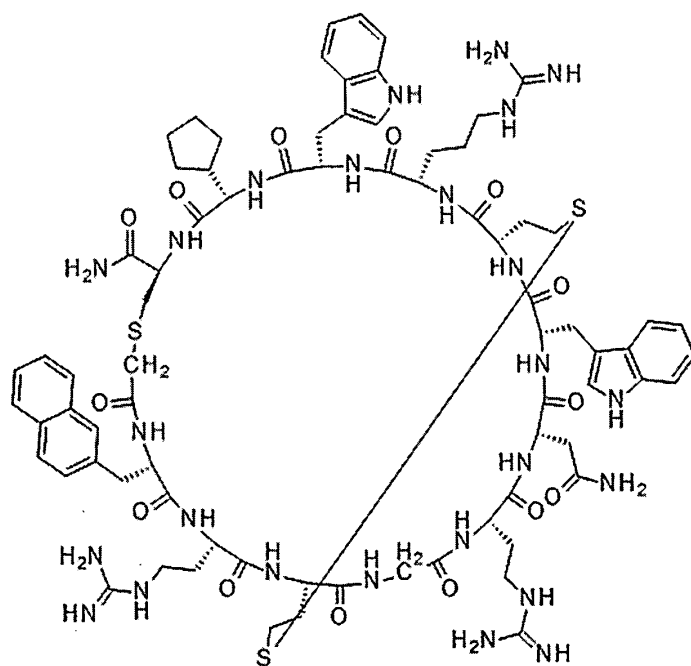
[化21]



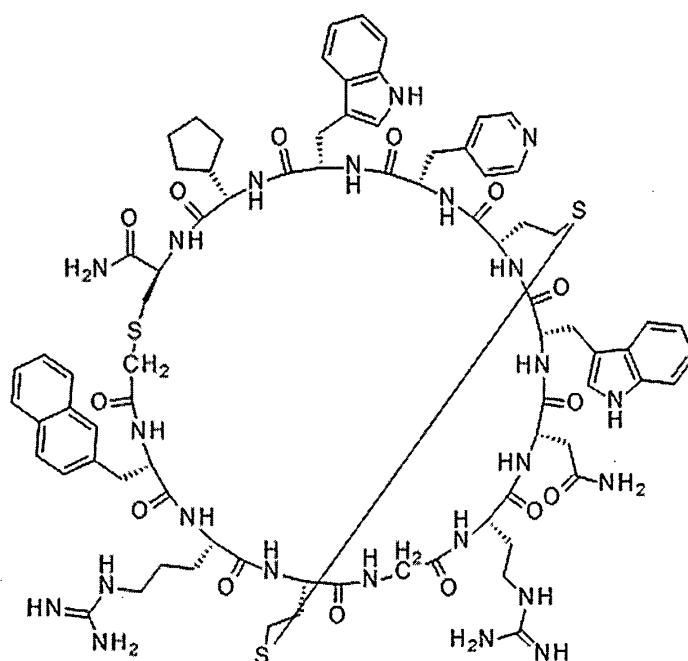
[化22]



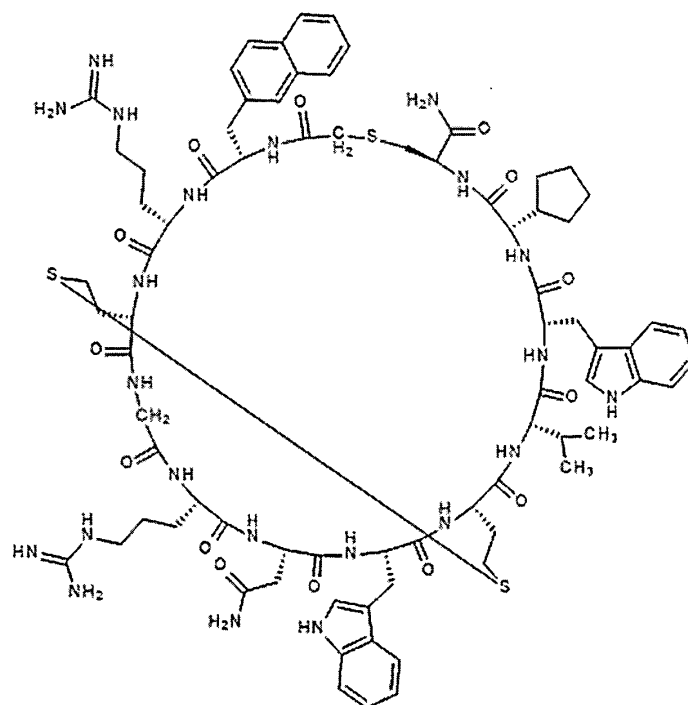
[化23]



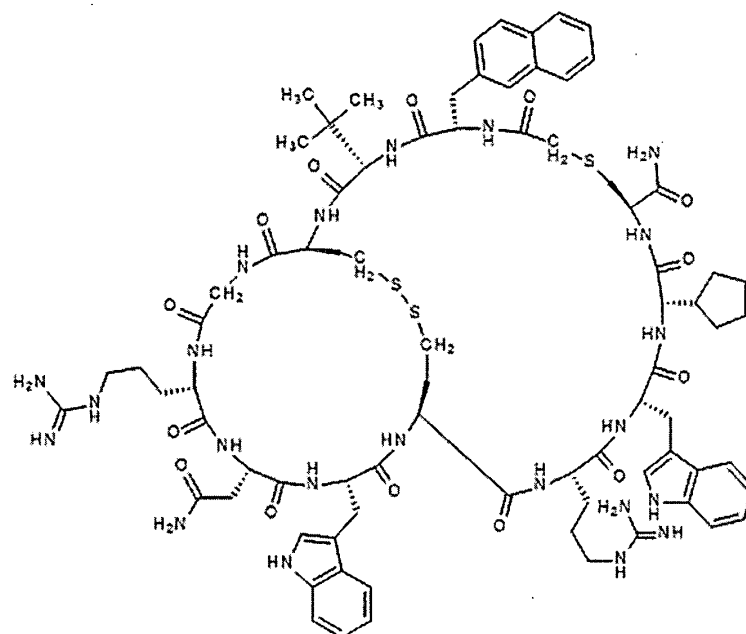
[化26]



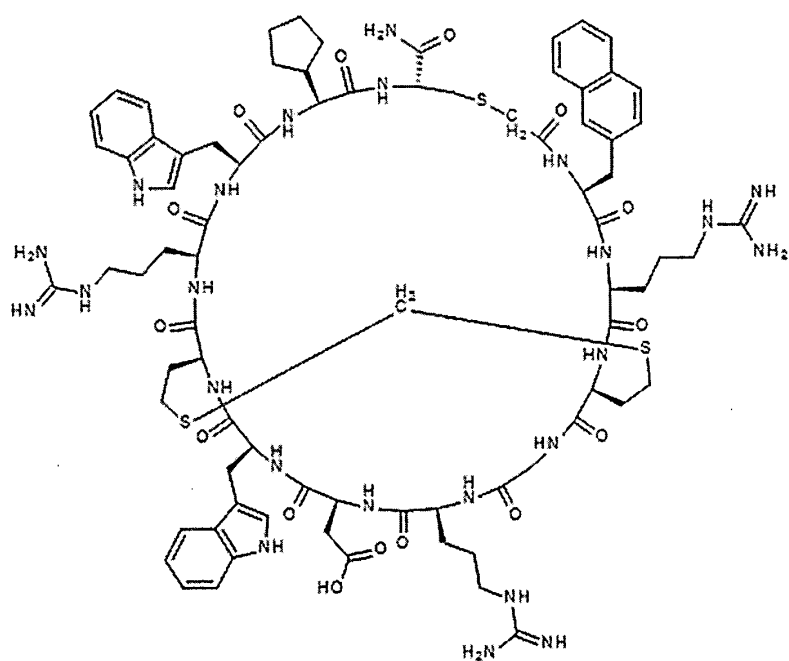
[化27]



[化28]



[化28-1]



で表される化合物からなる群より選択される、〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

〔７〕 〔１〕～〔６〕のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含む、医薬組成物。

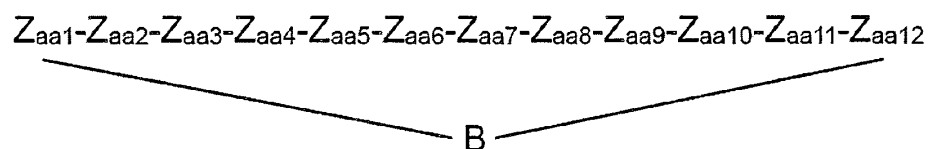
〔８〕 T S P １の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防のための、〔７〕に記載の医薬組成物。

〔９〕 重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防のための、〔８〕に記載の医薬組成物。

〔１０〕 〔１〕～〔６〕のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含む、血流改善剤。

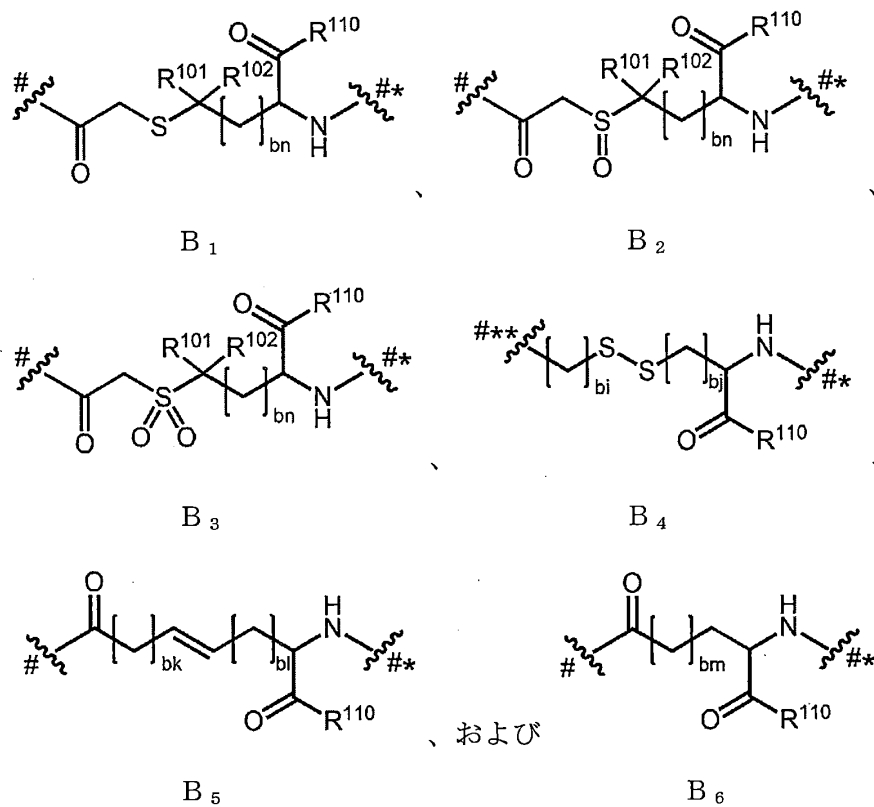
〔１１〕 〔１〕～〔６〕のいずれか一項に記載の環状ペプチド、または下記式（X）

〔化29〕



〔式中、Bは、環形成基

[化30]



から選択され、

ここで、

[化31]



は、 Z_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示すか、または Z_{aa1} が存在しない場合には Z_{aa2} のN末端アミノ基への結合点を示し、

[化32]



は、 Z_{aa12} のC末端カルボニル基への結合点を示し、

[化33]



は、 Z_{aa1} の α 炭素への結合点を示すか、または Z_{aa1} が存在しない場合には Z_{aa2} の α 炭素への結合点を示し、

R^{101} および R^{102} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{110} はアミノまたはヒドロキシであり、

b_n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、

b_i および b_j はそれぞれ独立に1～3の整数（例えば、1、2、または3）であり、

b_k および b_l はそれぞれ独立に0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、

b_m は1～7の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、または7）であり；

Z_{aa1} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在せず；

Z_{aa2} は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa3} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa4} は、Ser、Thr、Ala、または^mSであり；

Z_{aa5} は、GlyまたはSerであり；

Z_{aa6} は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa7} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa8} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

Z_{aa9} は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基であり；

Z_{aa10} は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中

性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa11} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

Z_{aa12} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、および酸性アミノ酸は、[1]において定義されたとおりである]

で表される環状ペプチドと、

キャリア分子とが結合している、コンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[12] Z_{aa1} が、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysの残基であるか、あるいは存在せず；

Z_{aa2} が、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFの残基であり；

Z_{aa3} が、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgの残基であり；

Z_{aa4} がSer残基であり；

Z_{aa5} がGly残基であり；

Z_{aa6} が、Arg、Lys、His、Ser、Cit、またはAGBの残基であり；

Z_{aa7} が、AsnまたはAspの残基であり；

Z_{aa8} が、Trpまたは2NaIの残基であり；

Z_{aa9} が、Val、Nle、Ahp、またはMetの残基であり；

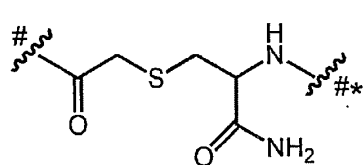
Z_{aa10} が、Arg、AGB、Lys、His、AMF、Phg、またはValの残基であり；

Z_{aa11} が、Trpまたは2NaIの残基であり；

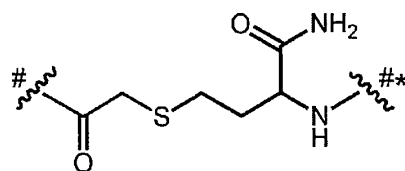
Z_{aa12} が、Val、Tle、CPTG、CHXG、またはPheの残基であり；

Bが、環形成基

[化34]

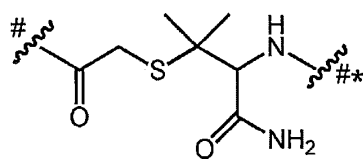


B_{1a}



B_{1b}

、または



B_{1c}

である、[11]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩
。

[13] Z_{aa1}が存在せず；

Z_{aa2}が2NaI残基であり；

Z_{aa3}が、ArgまたはTleの残基であり；

Z_{aa4}がSer残基であり；

Z_{aa5}がGly残基であり；

Z_{aa6}が、ArgまたはAGBの残基であり；

Z_{aa7}が、AsnまたはAspの残基であり；

Z_{aa8}がTrp残基であり；

Z_{aa9}が、ValまたはNleの残基であり；

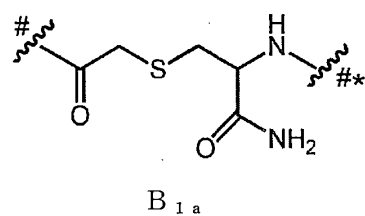
Z_{aa10}が、Arg、AGB、またはValの残基であり；

Z_{aa11}がTrp残基であり；

Z_{aa12}が、Val、CPTG、またはCHXGの残基であり；

Bが

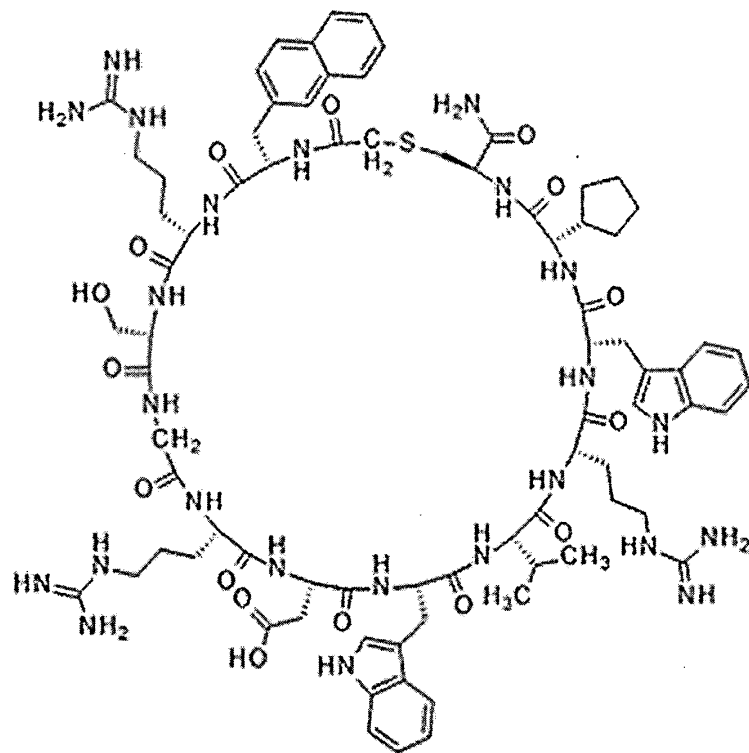
[化35]



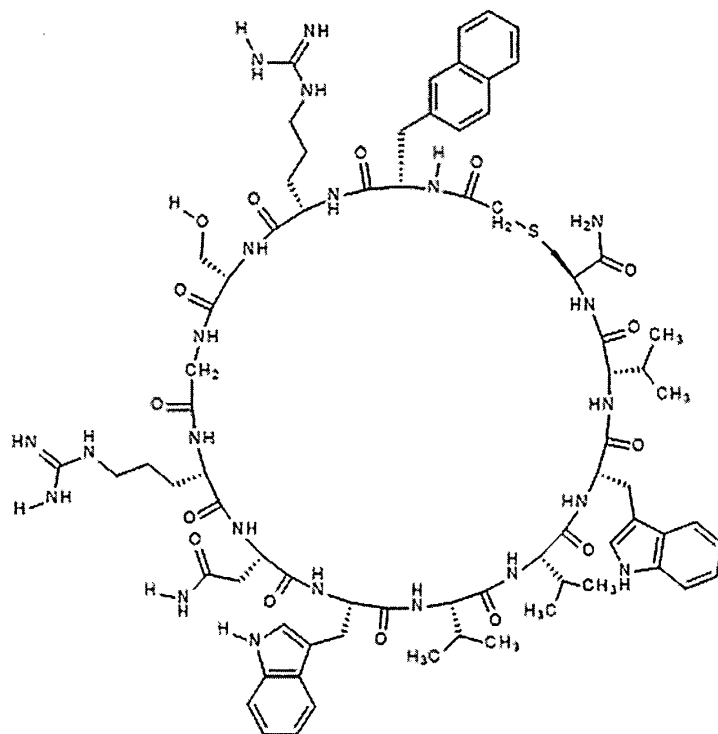
である、[12]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩

[14] 式(X)で表される環状ペプチドが、

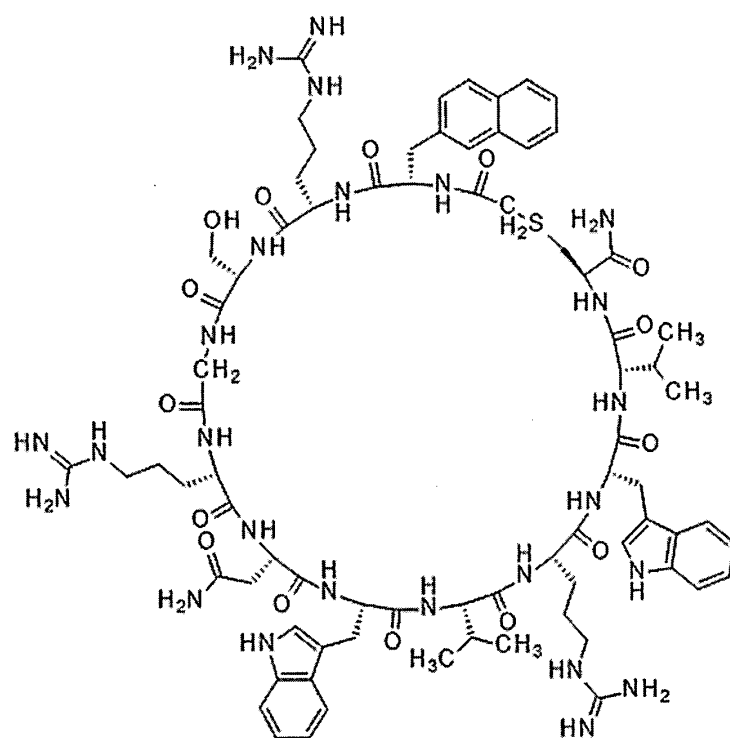
[化36]



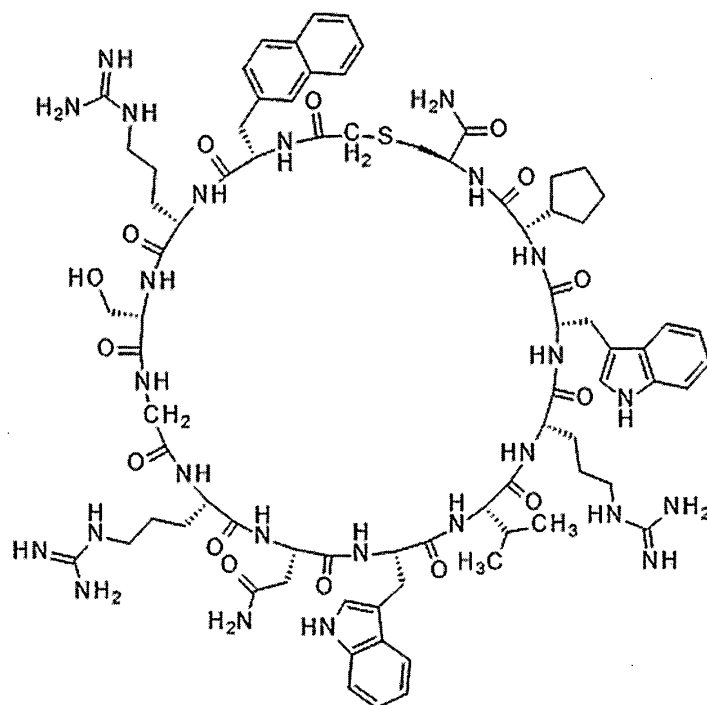
[化37]



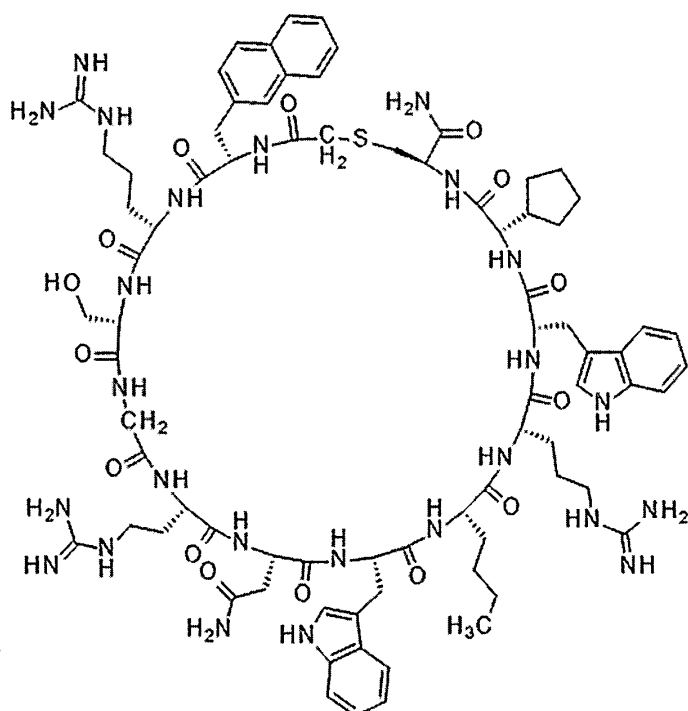
[化38]



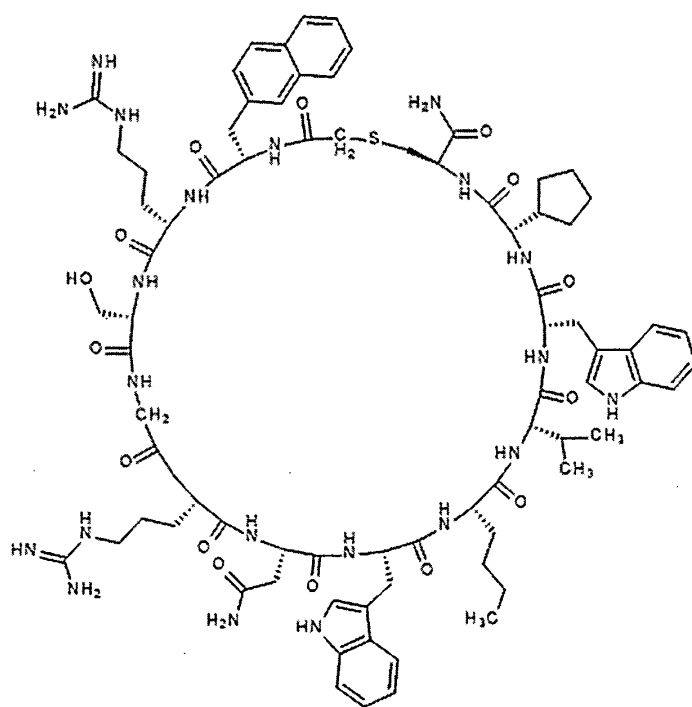
[化39]



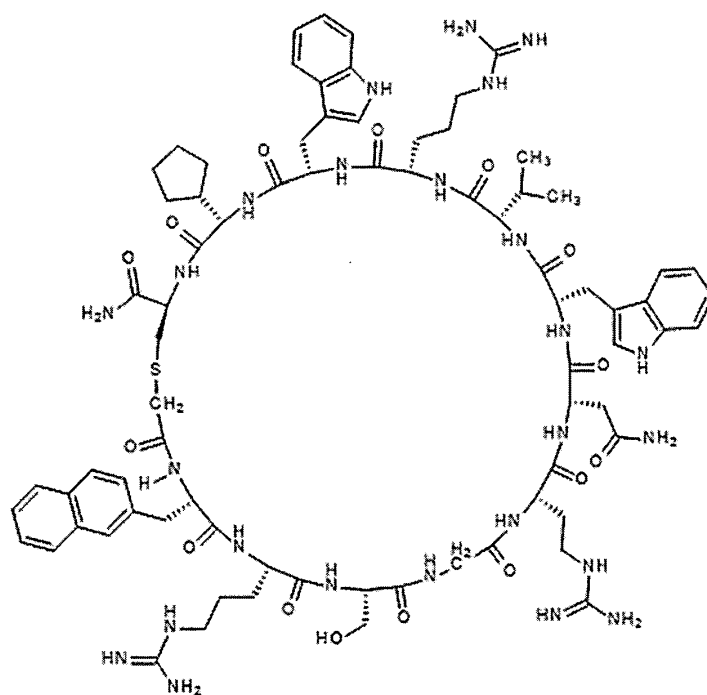
[化40]



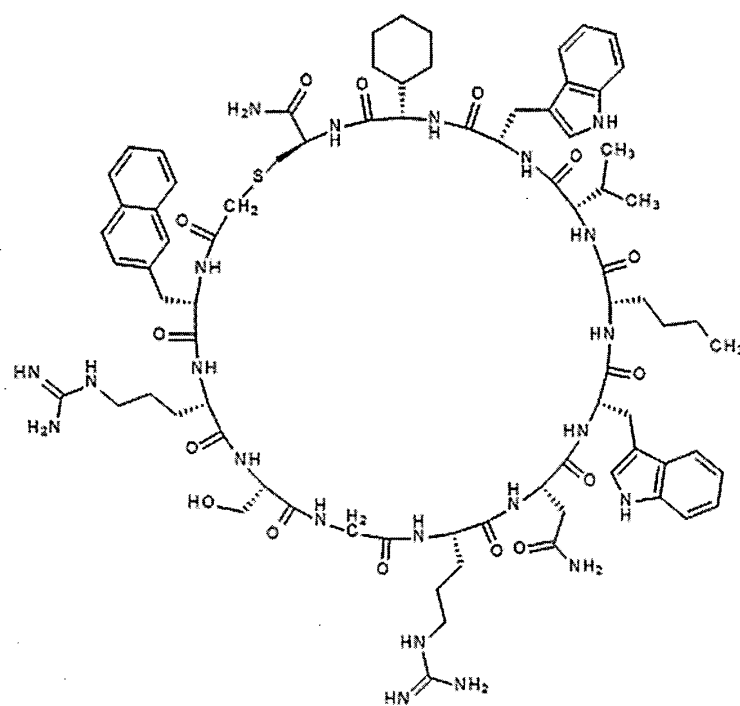
[化41]



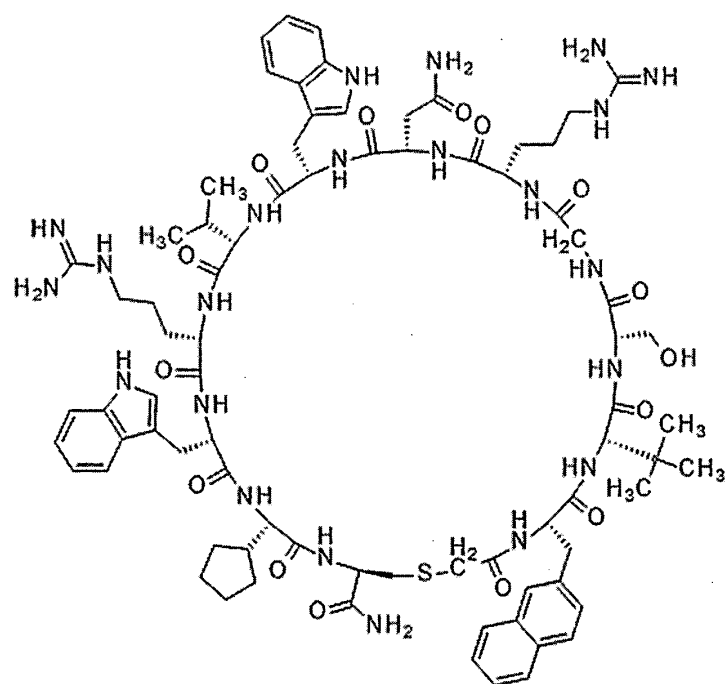
[化42]



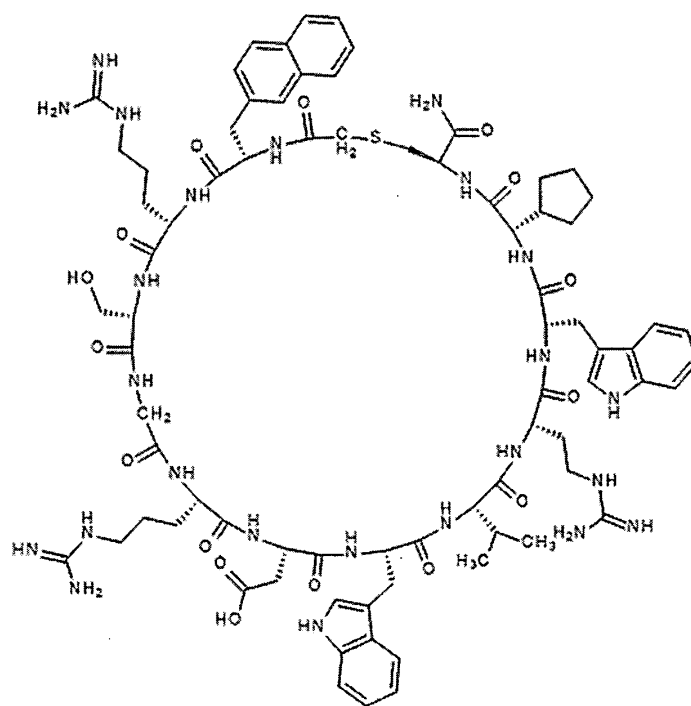
[化43]



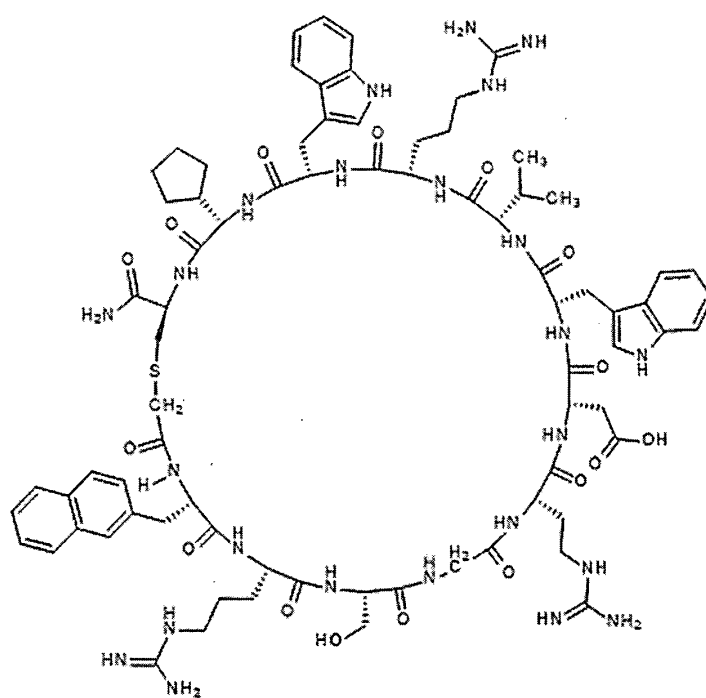
[化44]



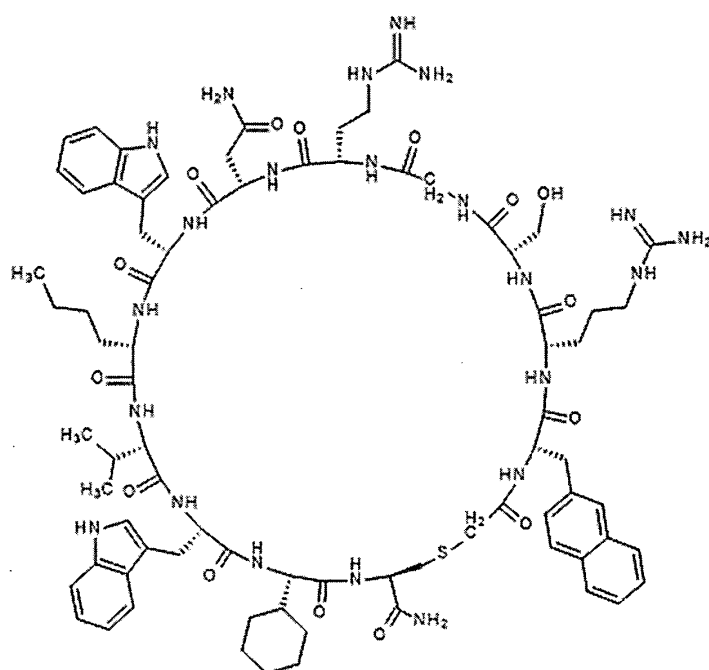
[化45]



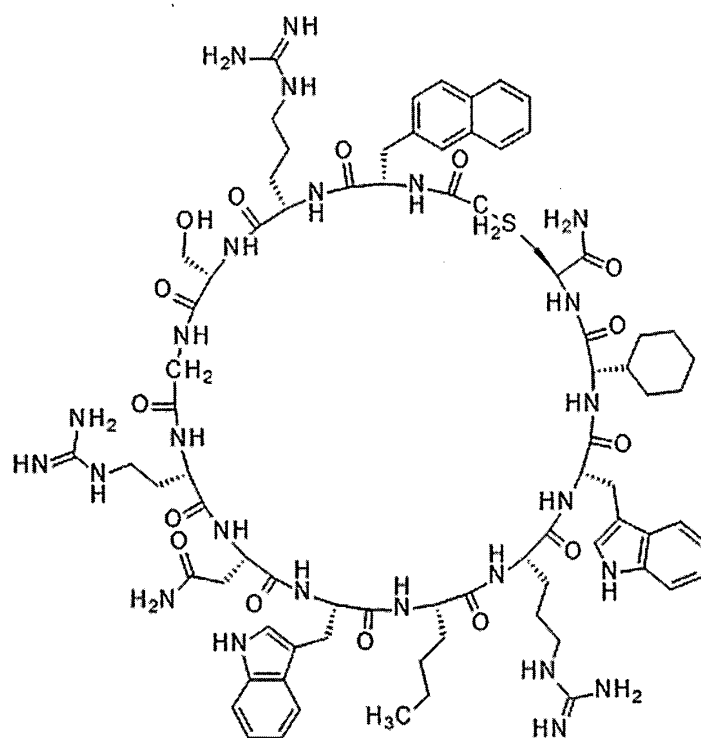
[化46]



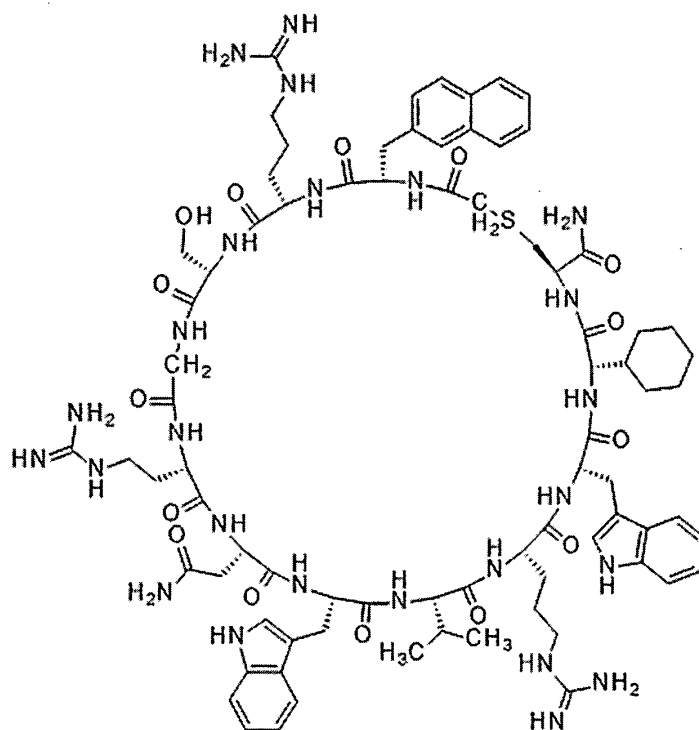
[化47]



[化48]

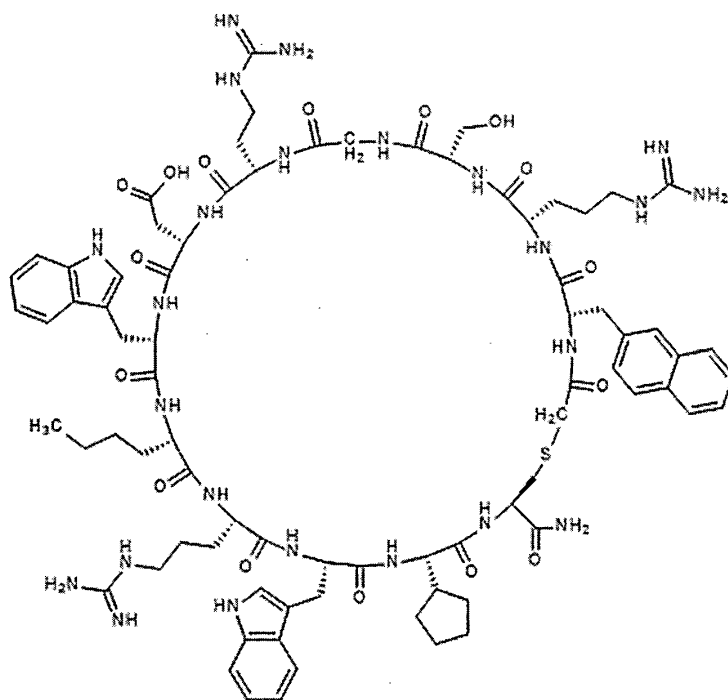


[化49]



および

[化50]



で表される化合物からなる群より選択される、[13]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[15] 前記キャリア分子が、ヒト血清アルブミンまたはその断片もしくはは改変体である、[11]～[14]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[16] 前記キャリア分子が、Fc含有分子である、[11]～[14]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[17] 前記Fc含有分子が、完全長IgG、完全長IgG重鎖、またはFc領域の全部もしくは一部を含むIgGの断片、あるいはその改変体である、[16]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩

[18] 前記Fc含有分子が、IgG重鎖の定常領域のCH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、[16]または[17]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[19] 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖におけるEuインデックス

による２２６位に相当するシステイン残基、２２９位に相当するシステイン残基、または２９７位に相当するアスパラギン残基の少なくともいずれか一つのアミノ酸残基を含む、〔１６〕～〔１８〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔２０〕 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖におけるEuインデックスによる２２１～２３０位、２２２～２３０位、２２３～２３０位、２２４～２３０位、２２５～２３０位、または２２６～２３０位に相当するアミノ酸配列を含む、〔１６〕～〔１９〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔２１〕 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖におけるEuインデックスによる２３４位に相当するロイシン残基および２３５位に相当するロイシン残基のアラニン残基への置換を含むか、または、２３４位に相当するロイシン残基、２３５位に相当するロイシン残基、および３２９位に相当するプロリン残基のアラニン残基への置換を含む、〔１６〕～〔２０〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔２２〕 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖の定常領域からなるCH、ヒトIgGの定常領域からなるCLCH、またはヒトIgGのFc領域からなる分子もしくはその断片、あるいはその改変体である、〔１６〕～〔２１〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔２３〕 前記Fc含有分子が、

配列番号１２５のアミノ酸番号２０～４７４のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号１２７のアミノ酸番号２１～２３４のアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる抗体（mAb-A）、

配列番号１２９のアミノ酸番号２０～３４９のアミノ酸配列からなるCH（CH-A）、

配列番号１３３のアミノ酸番号２０～３４９のアミノ酸配列からなるCH（CH-B）、

配列番号 1 2 9 のアミノ酸番号 2 0 ～ 3 4 9 のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 1 3 1 のアミノ酸番号 2 1 ～ 1 2 5 のアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる C L C H (CLCH-A)、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸番号 2 0 ～ 3 4 9 のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 1 3 1 のアミノ酸番号 2 1 ～ 1 2 5 のアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる C L C H (CLCH-B)、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸番号 2 1 ～ 2 4 3 のアミノ酸配列からなる Fc 断片 (Fc-B)、

配列番号 1 3 7 のアミノ酸番号 2 1 ～ 2 4 7 のアミノ酸配列からなる Fc 断片 (Fc-A)、または

配列番号 1 3 9 のアミノ酸番号 2 1 ～ 2 4 7 のアミノ酸配列からなる Fc 断片 (Fc-C)

あるいは

その改変体である、[2 2] に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[2 4] F c 含有分子が、N-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N 末のプロセッシング、C 末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N 末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化及び重鎖のカルボキシル末端における 1 又は 2 個のアミノ酸残基の欠失からなる群より選択される 1 又は 2 以上の修飾を含む、[1 6] ～ [2 3] のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[2 5] F c 含有分子の重鎖のカルボキシル末端において 1 又は 2 個のアミノ酸残基が欠失している、[2 4] に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[2 6] F c 含有分子の 2 本の重鎖の双方でカルボキシル末端において 1 個のアミノ酸残基が欠失している、[2 5] に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔27〕Fc含有分子の重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている、〔24〕～〔26〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔28〕前記環状ペプチドと前記キャリア分子とが、リンカー構造を介して結合している、〔11〕～〔27〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔29〕前記リンカー構造が、ポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸残基、および2以上のアミノ酸残基からなるオリゴペプチド鎖からなる群から選択される少なくとも1つの構造を含む、〔28〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔30〕前記リンカー構造に含まれるポリオキシアルキレン鎖が、ポリエチレングリコール（PEG）鎖である、〔29〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔31〕前記リンカー構造における主鎖に含まれるPEG鎖の合計重合度が、6～100である、〔30〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔32〕前記リンカー構造に含まれるアミノ酸残基が、Gly、N-メチルグリシン、Asp、D-Asp、Glu、D-Glu、Lys、D-Lys、 β -アラニン、Ser、D-Ser、側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸、または側鎖にSG鎖を含む非天然アミノ酸の残基である、〔29〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔33〕前記リンカー構造に含まれるオリゴペプチド鎖が、2～20個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個）のアミノ酸残基からなる、〔29〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔34〕前記リンカー構造に含まれるオリゴペプチド鎖が、Gly、N-メチルグリシン、Asp、D-Asp、Glu、D-Glu、Lys、D-Lys、 β -アラニン、Ser、D-Ser、側鎖にポリオキシアルキレン

鎖を含む非天然アミノ酸、および側鎖にS G鎖を含む非天然アミノ酸からなる群から選択される1以上のアミノ酸残基を含む、[29]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[35] 前記リンカー構造に含まれるアミノ酸残基またはオリゴペプチド鎖のN末端アミノ基と、環形成基AのR¹⁰または環形成基BのR¹¹⁰が結合しているカルボニル基とがアミド結合を形成しており、R¹⁰またはR¹¹⁰が該N末端アミノ基のNHと置換されている、[29]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[36] 前記リンカー構造が、キャリア分子と結合する連結基Cを含む、[28]から[35]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

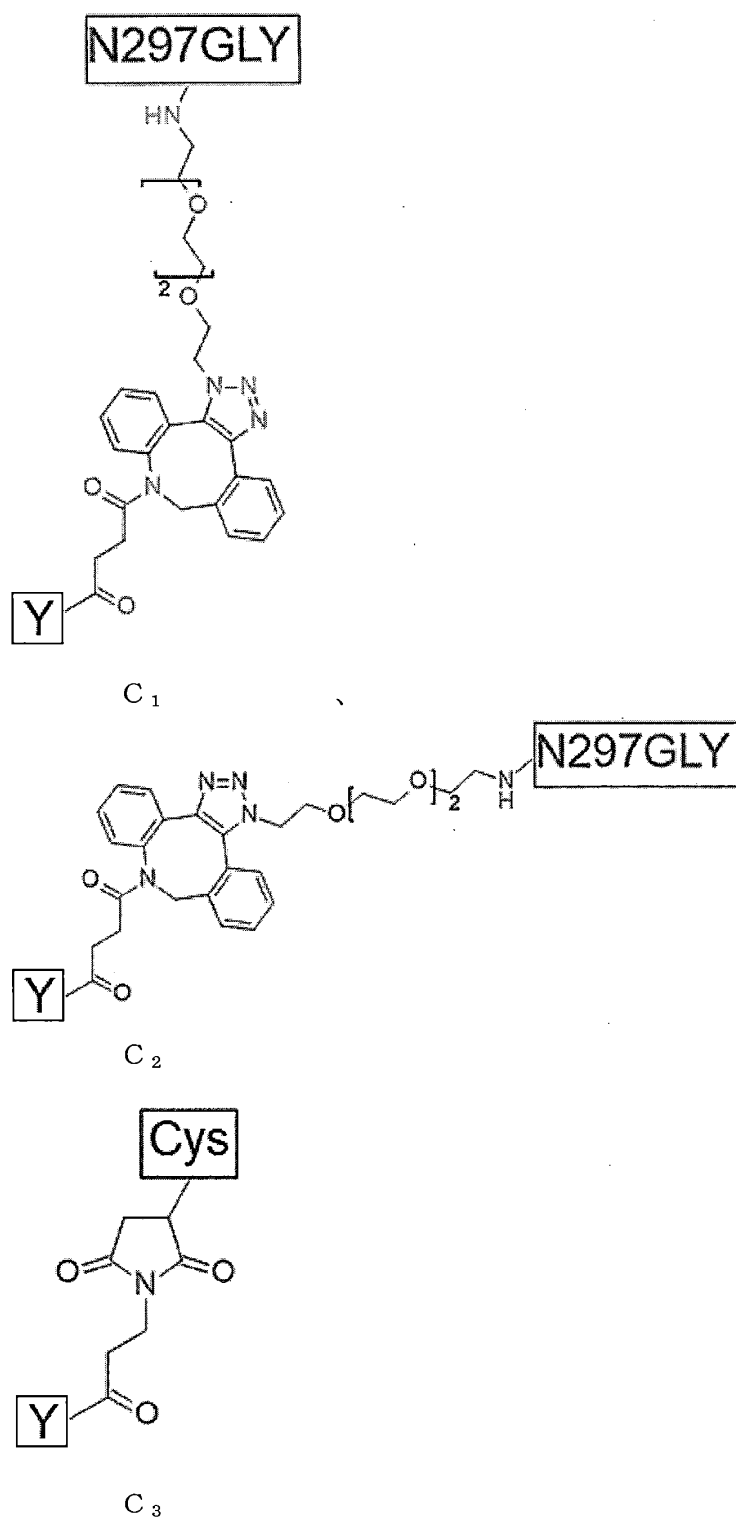
[37] 前記連結基Cが、マレイミド基とチオール基との反応により形成されるチオエーテル結合におけるマレイミド基由来の部分または1, 2, 3-トリアゾール環を含む、[36]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[38] マレイミド基とキャリア分子のシステイン残基のチオール基とが結合してチオエーテル結合が形成されている、[37]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[39] 前記キャリア分子が、Fc含有分子であり、前記連結基Cに含まれる1, 2, 3-トリアゾール環と、Fc含有分子のEuインデックスによる297位に相当するアスパラギン残基に結合している糖鎖(N297結合糖鎖)とが結合している、[37]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[40] 前記連結基Cが、以下の式

[化51]



、および

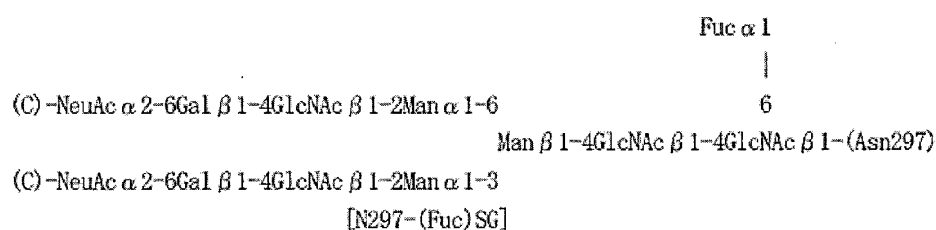
(式中、

N 2 9 7 G L Y は、F c 含有分子の N 2 9 7 結合糖鎖の非還元末端と結合していることを表し、

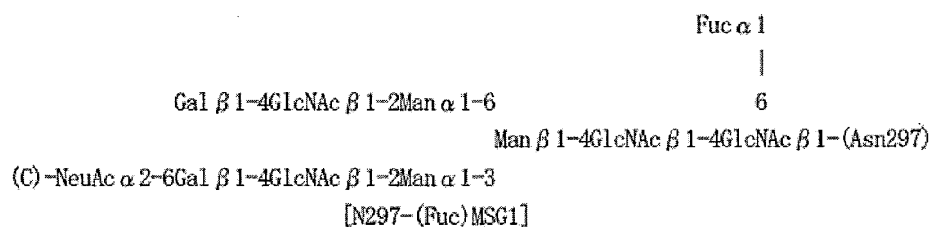
C y s は、キャリア分子のシステイン残基のチオール基と結合していることを表し、

Y は、リンカー構造における隣接するアミノ酸残基との結合点を示す) のいずれかで表される、[3 6] ~ [3 9] のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[4 1] F c 含有分子の N 2 9 7 結合糖鎖が、以下の式
[化52]

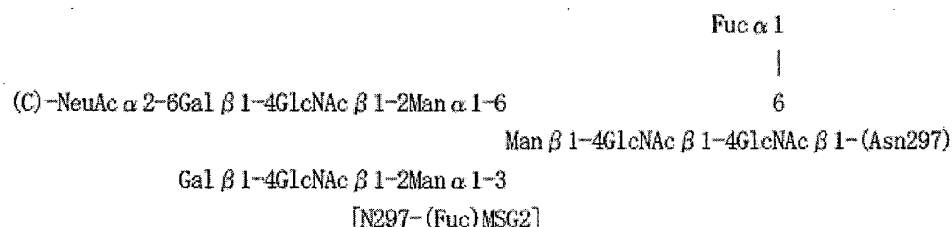


[化53]



および

[化54]



[式中、(C)は、連結基Cとの結合点を示し、(Asn297)は、Fc含有分子のE u インデックスによる297位に相当するアスパラギン残基との結合点を示す]

で表される構造を有する糖鎖N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1およびN297-(Fuc)MSG2から選択される少なくとも1つである、[39]または[40]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[42] Fc含有分子のN297結合糖鎖が、N297-(Fuc)SGである、[41]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[43] 前記リンカー構造が、下記式(XX)
-L1-L2-L3-C-

[式中、

L1は、直鎖状に結合した3～6個（例えば、3、4、5、または6個）の中性アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであり；

L2は、L2aまたはL2bであり、

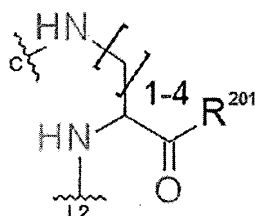
L2aは、主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基であるか、または主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであって、L2aにおける主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖の合計重合度が6～100（例えば、5～100、好ましくは6～50、より好ましくは10～50、さらにより好ましくは10～40または20～40）であるオリゴペプチドであり、

L2bは、直鎖状に結合した10～20個（例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個）の天然または非天

然の α アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであり；

L3は、

[化55]



(式中、 R^{201} は、ヒドロキシ基またはアミノ基であり、

[化56]



は、L2における隣接するアミノ酸残基との結合点を示し、

[化57]



は、連結基Cとの結合点を示す)で表されるアミノ酸残基であり；

Cは、連結基Cであり；

L1のN末端アミノ基は、環形成基Aの R^{10} または環形成基Bの R^{110} が結合しているカルボニル基とアミド結合を形成しており、 R^{10} または R^{110} は、該N末端アミノ基のNHと置換されており；

L1とL2とは、アミド結合で連結されており；かつ

L2とL3とは、アミド結合で連結されている。]

である [36] ~ [42] のいずれか一項記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[44] L1に含まれる中性アミノ酸残基が、Gly、Ser、D-Ser、N-メチルグリシン (NMeG)、および β -アラニン (bAla) からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸の残基である、[43] 記載のコ

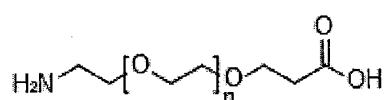
ンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[45] L2aに含まれる、主鎖のポリオキシアルキレン鎖がPEG鎖である、

[43] または [44] 記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[46] L2aに含まれる、主鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸残基が、下記式

[化58]



[式中、nは、5～40の整数（例えば、5、11、23、35など）を示す。]

で表されるアミノ酸の残基である、[45] 記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[47] 前記PEG鎖の合計重合度が10～40（例えば、12、18、24、30、36など）である、[46] 記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[48] L2bのαアミノ酸が、グリシンまたはN-メチルグリシンである、[43] または [44] 記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[49] L2bのオリゴペプチドが、N-メチルグリシンが13個連続したオリゴN-メチルグリシンである、[48] 記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[50] L2が、側鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸残基、または側鎖にSG鎖を含む非天然アミノ酸残基を含む、[43]～[49]のいずれか1項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[51] 前記側鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸が、KPEGである、[50] 記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[52] 前記側鎖にSG鎖を含む非天然アミノ酸が、KSGである、[50]記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[53] L1およびL2のオリゴペプチドの主鎖において、前記環形成基A又は環形成基Bに隣接しない1つ以上の位置に、酸性アミノ酸残基を合計で1～3個（例えば、1、2、または3個）含む、[43]～[52]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[54] 前記酸性アミノ酸残基が、Asp、D-Asp、Glu、D-Gluからなる群から選択されるアミノ酸である、[53]記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[55] L1が、
Gly-Gly-Gly-Gly、
Gly-Ser-Gly-Ser、
NMeG-NMeG-NMeG-NMeG、
bAla-bAla-bAla-bAla、または
Gly-Gly-Glu-Gly-Gly
の配列を含むかまたは当該配列からなるオリゴペプチド
である、[43]～[54]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[56] L1が、
Gly-Gly-Gly-Gly、
Gly-Ser-Gly-Ser、
NMeG-NMeG-NMeG-NMeG、または
bAla-bAla-bAla-bAla
のC末端に2個の酸性アミノ酸残基が連結された配列からなるオリゴペプチドである、[55]記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
。

[57] 前記酸性アミノ酸残基が、Asp残基である、[56]記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[58] L2が、

A s p - A s p - K P E G - P 1 2 P - P 1 2 P、

K S G - P 1 2 P - P 1 2 P、

A s p - A s p - P 1 2 P、

A s p - A s p - P 1 2 P - P 1 2 P、または

A s p - A s p - P 1 2 P - K P E G - P 1 2 P

の配列からなるオリゴペプチドである、[43]～[55]のいずれか一項記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[59] L3が、L y s 残基である、[43]～[58]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[60] 前記リンカー構造が、

L1がG l y - G l y - G l y - G l y もしくはG l y - S e r - G l y - S e r の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p - A s p - K P E G - P 1 2 P - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s 残基である構造、

L1がG l y - G l y - G l y - G l y の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがK S G - P 1 2 P - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s 残基である構造、

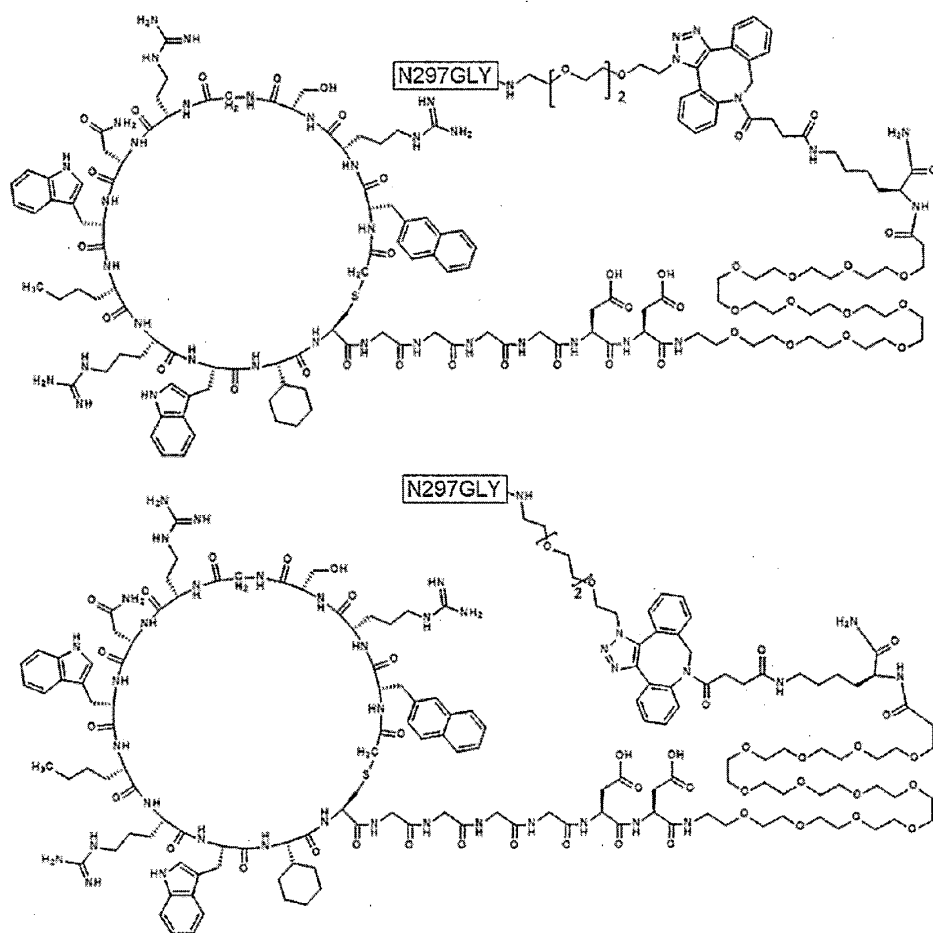
L1がG l y - G l y - G l y - G l y の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p - A s p - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s 残基である構造、

L1がG l y - S e r - G l y - S e r の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p - A s p - P 1 2 P - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s 残基である構造、または

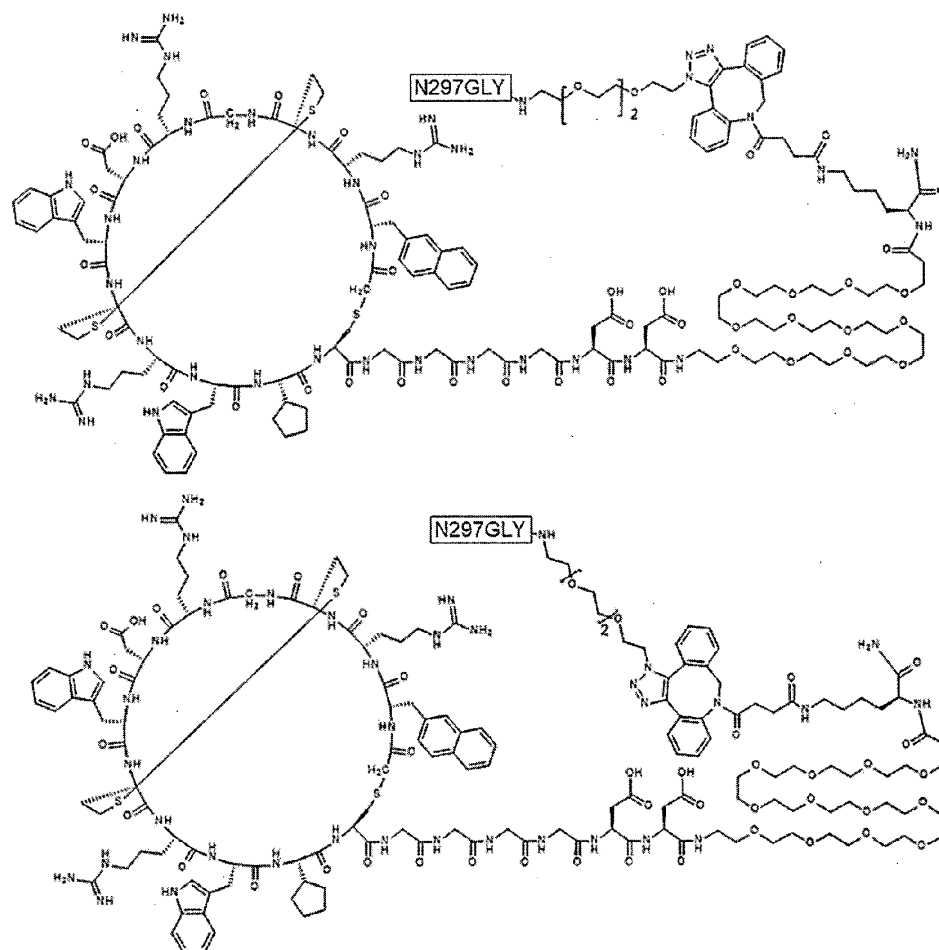
L1がG l y - G l y - G l y - G l y の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p - A s p - P 1 2 P - K P E G - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s 残基である構造、

である、[43]記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

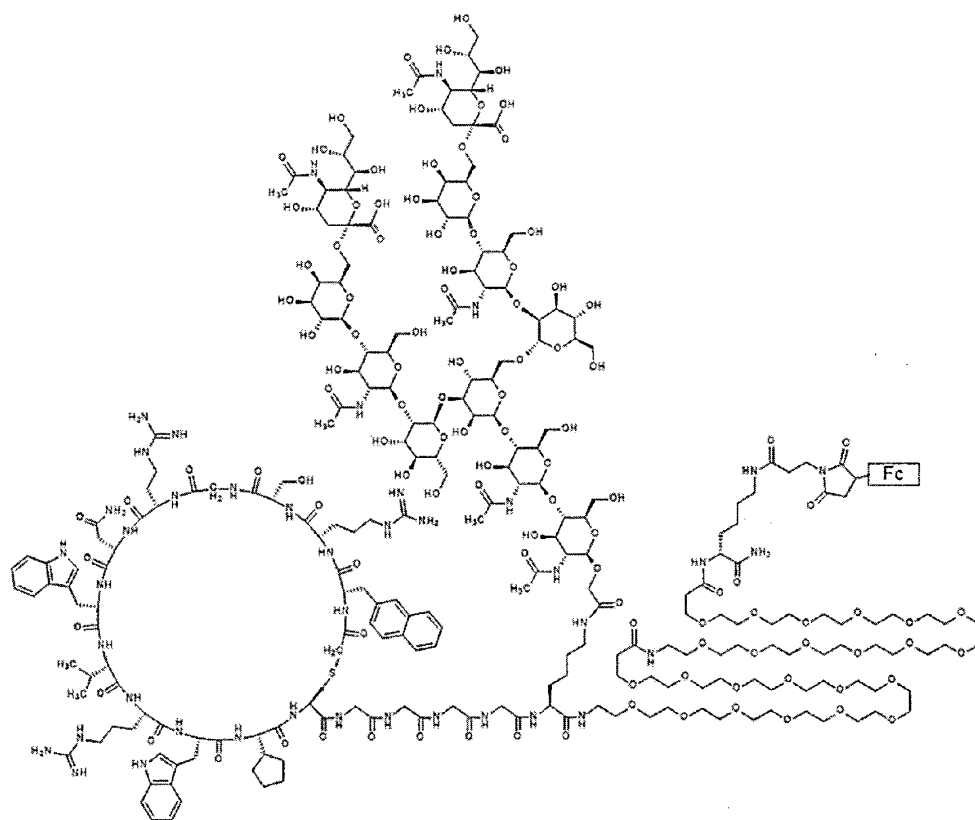
[6 1] 環状ペプチドおよびリンカー構造が、
[化59]



[化60]

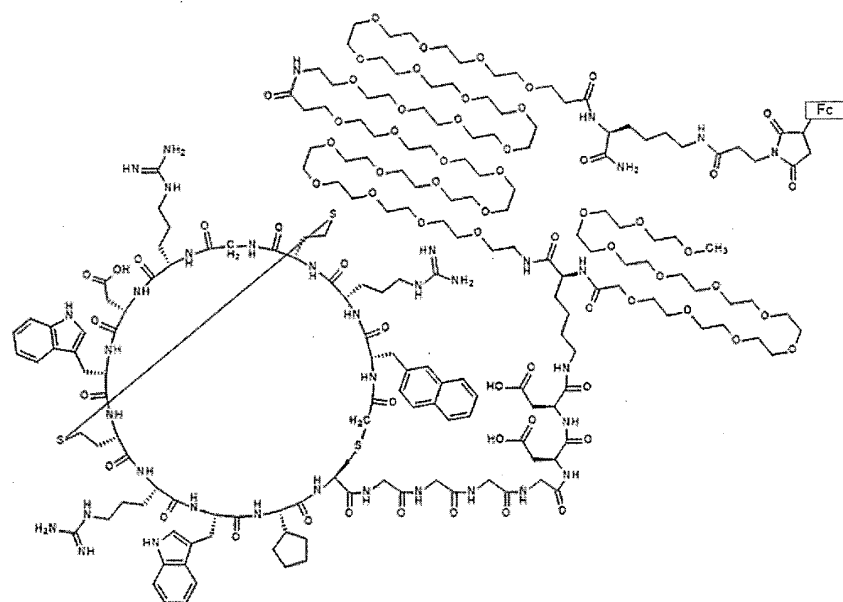


[化61]



および

[化62]



(式中、

N 2 9 7 G L Yは、連結基Cに含まれる1, 2, 3-トリアゾール環とFc含有分子のN 2 9 7結合糖鎖の非還元末端とが結合していることを表し、

Fcは、連結基Cに含まれるマレイミド基とFc含有分子のシステイン残基のチオール基とが結合していることを表す) のいずれかで表される、[11]に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[62] [11]～[61]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

[63] TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防のための、[62]に記載の医薬組成物。

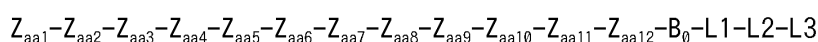
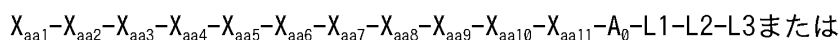
[64] 重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防のための、[63]に記載の医薬組成物。

[65] [11]～[61]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩を有効成分として含む、血流改善剤。

[66] [11]～[61]のいずれか一項に記載のコンジュゲート体ま

たはその薬学上許容される塩を製造する方法であって、

(1) 固相合成法により、以下の式



[式中、

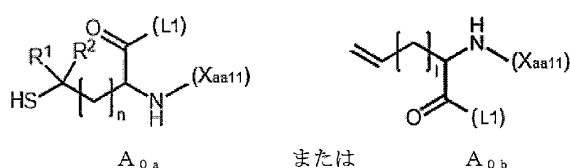
$X_{aa1} \sim X_{aa11}$ は、[1]において定義されたとおりであり（但し、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、チオール基は、結合を形成しておらず、それぞれチオール基のままである）、

$L1 \sim L3$ は、[43]において定義されたとおりであり（但し、 $L2$ が側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含む場合、該残基は、 lys 残基に置き換えられる）、

$Z_{aa1} \sim Z_{aa12}$ は、[11]において定義されたとおりであり、

A_0 は、以下の式

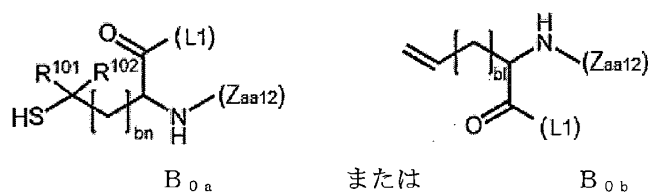
[化63]



(式中、 (X_{aa11}) は、 X_{aa11} との結合点を示し、 $(L1)$ は、 $L1$ における N 末端のアミノ酸残基との結合点を示し、 l および n は、[1]において定義されたとおりである) で表される残基であり、

B_0 は、以下の式

[化64]



(式中、 (Z_{aa12}) は、 Z_{aa12} との結合点を示し、 $(L1)$ は、 $L1$ における

るN末端のアミノ酸残基との結合点を示し、 b_1 および b_n は、 $[11]$ において定義されたとおりである)で表される残基である]で表されるオリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ を、C末端側から合成する工程、

(2)

(a) オリゴペプチド $X-A-L$ において X_{aa1} のN末端アミノ基と A_{0a} とを連結して環形成基 $A_1 \sim A_3$ (ただし、 R^{10} の位置において L_1 に連結されている)のいずれかを形成させるか、

(b) オリゴペプチド $X-A-L$ において X_{aa1} のN末端アミノ基と A_{0b} とを連結して環形成基 A_4 または A_5 (ただし、 R^{10} の位置において L_1 に連結されている)を形成させるか、

(c) オリゴペプチド $Z-B-L$ において Z_{aa1} または Z_{aa2} のN末端アミノ基と B_{0a} とを連結して環形成基 $B_1 \sim B_4$ (ただし、 R^{110} の位置において L_1 に連結されている)のいずれかを形成させるか、または

(d) オリゴペプチド $Z-B-L$ において Z_{aa1} または Z_{aa2} のN末端アミノ基と B_{0b} とを連結して環形成基 B_5 または B_6 (ただし、 R^{110} の位置において L_1 に連結されている)を形成させる

ことにより、工程(1)において合成されたオリゴペプチドを環化させ、環状ペプチドを得る工程、

(3) 工程(1)においてオリゴペプチド $X-A-L$ を合成した場合、工程(2)で環化させたオリゴペプチド $X-A-L$ の X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基において、 $-S-S-$ 、 $-S-CH_2-S-$ 、または $-S-X-S-$ (式中、 X は、 $[1]$ において定義されたとおりである)で表される結合を形成させ、二環性環状ペプチドを得る工程、

(4) L_2 が側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含み、オリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ において lys 残基に置き換えられている場合、該 lys 残基に糖鎖を導入することにより側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を形成させる工程、

(5) L_3 に、マレイミド基または1, 2, 3-トリアゾール環を形成し得る

反応基を結合させる工程、および

(6) 工程 (5) の反応基を介して、環状ペプチドとキャリア分子とを結合させる工程

を含む、前記方法。

[67] [1] ~ [6] のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩の治療または予防有効量を対象に投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法。

[68] 疾患または症状が、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患である、[67]に記載の方法。

[69] 疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血である、[68]に記載の方法。

[70] [1] ~ [6] のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩の治療または予防有効量を対象に投与することを含む、血流改善方法。

[71] 疾患または症状の治療または予防における使用のための[1] ~ [6] のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[72] 疾患または症状が、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患である、[71]に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[73] 疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血である、[72]に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[74] 血流改善における使用のための[1] ~ [6] のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[75] 疾患または症状の治療または予防のための医薬品の製造における、[1] ~ [6] のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩の使用。

[76] 疾患または症状が、TSP1の機能を阻害することにより治療また

は予防可能な疾患である、〔 7 5 〕に記載の使用。

〔 7 7 〕疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血である、〔 7 6 〕に記載の使用。

〔 7 8 〕血流改善剤の製造における、〔 1 〕～〔 6 〕のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩の使用。

〔 7 9 〕〔 1 1 〕～〔 6 1 〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩の治療または予防有効量を対象に投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法。

〔 8 0 〕疾患または症状が、T S P 1 の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患である、〔 7 9 〕に記載の方法。

〔 8 1 〕疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血である、〔 8 0 〕に記載の方法。

〔 8 2 〕〔 1 1 〕～〔 6 1 〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩の治療または予防有効量を対象に投与することを含む、血流改善方法。

〔 8 3 〕疾患または症状の治療または予防における使用のための〔 1 1 〕～〔 6 1 〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔 8 4 〕疾患または症状が、T S P 1 の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患である、〔 8 3 〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔 8 5 〕疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血である、〔 8 4 〕に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔 8 6 〕血流改善における使用のための〔 1 1 〕～〔 6 1 〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

〔 8 7 〕疾患または症状の治療または予防のための医薬品の製造における、〔 1 1 〕～〔 6 1 〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬

学上許容される塩の使用。

〔８８〕疾患または症状が、ＴＳＰ１の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患である、〔８７〕に記載の使用。

〔８９〕疾患または症状が、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血である、〔８８〕に記載の使用。

〔９０〕血流改善剤の製造における、〔１１〕～〔６１〕のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩の使用。

発明の効果

- [0012] 本発明の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩は、重症下肢虚血などの、ＴＳＰ１の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防に有用である。また本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、より少ない投与頻度で、ＴＳＰ１の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状を治療または予防する手段を提供することができる。

発明を実施するための形態

- [0013] (定義)

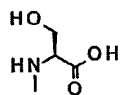
本明細書中、天然アミノ酸は、天然に存在するタンパク質中に通常見出される未修飾のアミノ酸を意味し、具体的には、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンを意味する。なお、本明細書においては、天然アミノ酸の表記には、三文字表記または一文字表記を用いる場合がある（すなわち、アラニン：ＡｌａまたはＡ；アルギニン：ＡｒｇまたはＲ；アスパラギン：ＡｓｎまたはＮ；アスパラギン酸：ＡｓｐまたはＤ；システイン：ＣｙｓまたはＣ；グルタミン酸：ＧｌｕまたはＥ；グルタミン：ＧｌｎまたはＱ；グリシン：ＧｌｙまたはＧ；ヒスチジン：ＨｉｓまたはＨ；イソロイシン：ＩｌｅまたはＩ；ロイシン：ＬｅｕまたはＬ；リジン：ＬｙｓまたはＫ；メチオニン

: M e t または M ; フェニルアラニン : P h e または F ; プロリン : P r o
または P ; セリン : S e r 又は S ; スレオニン : T h r または T ; トリプト
ファン : T r p または W ; チロシン : T y r または Y ; バリン : V a l また
は V) 。

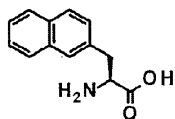
[0014] 本明細書中、非天然アミノ酸は、天然アミノ酸以外のアミノ酸を意味し、天然アミノ酸の修飾体も含まれる。本明細書中に記載する非天然アミノ酸の略語を以下に示す。なお、本明細書中、以下の略語においてアルファベットの小文字は大文字に置き換えることができる。例えば、2 N a l、N l e、P h g、T l e、および H c y は、それぞれ 2 N A L、N L E、P H G、T L E、および H C Y と同義である。

[0015]

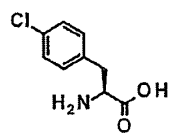
[化65-1]



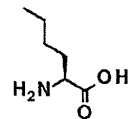
mS



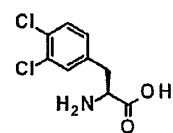
2NaI



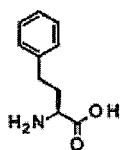
4CF



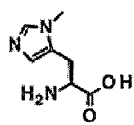
Nle



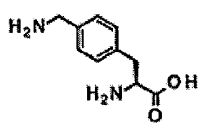
DCF



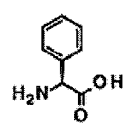
HF



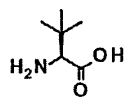
3MH



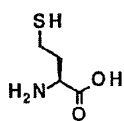
AMF



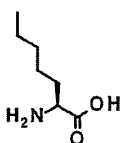
Phg



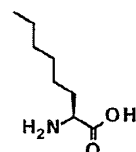
Tle



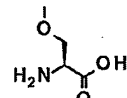
Hcy



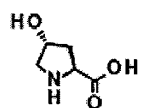
Ahp



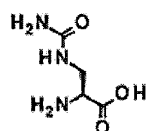
Aoc



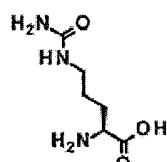
MS



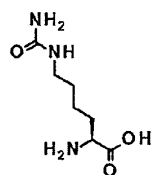
3HyP



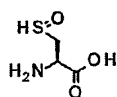
Alb



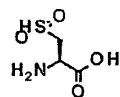
Git



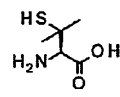
Hct



C(0)

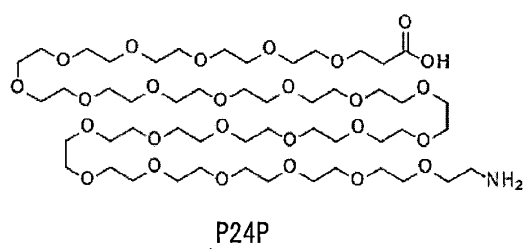
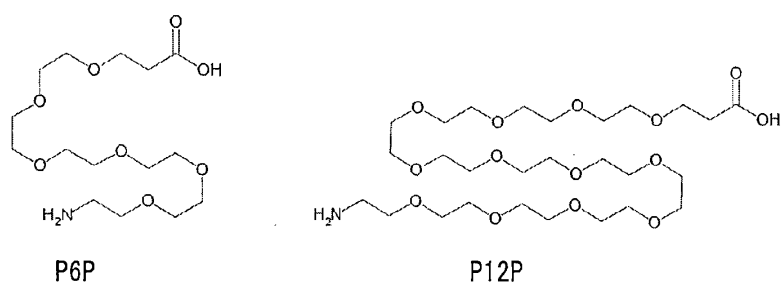
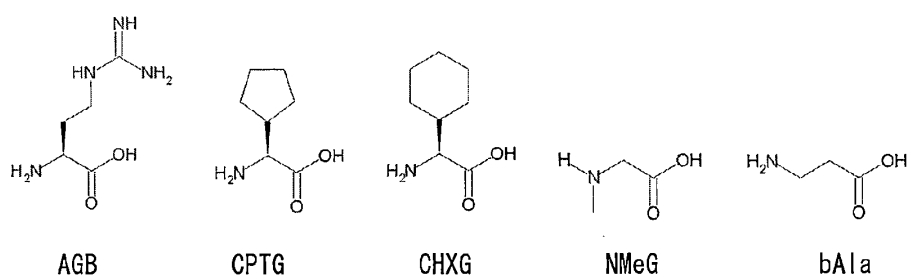
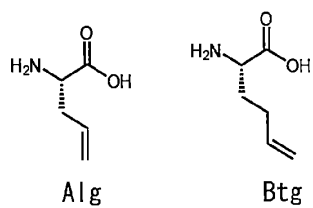


C(02)

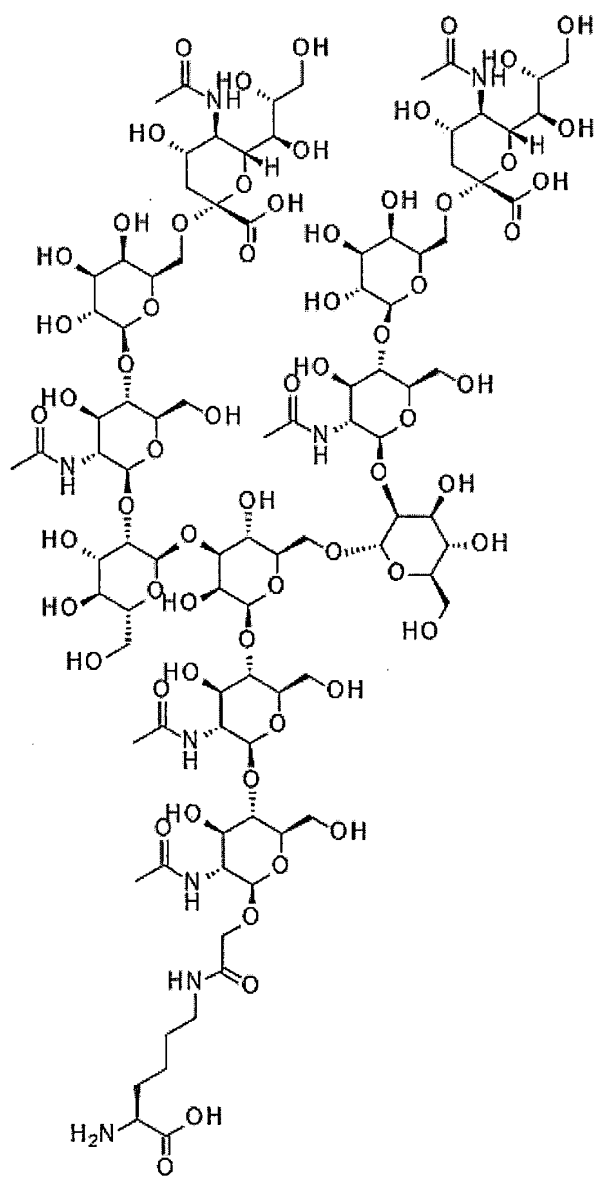


Pen

[化65-2]

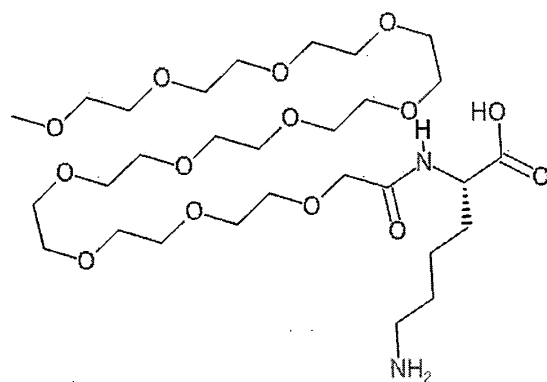


[化65-3]

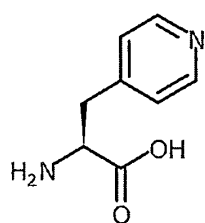


KSG

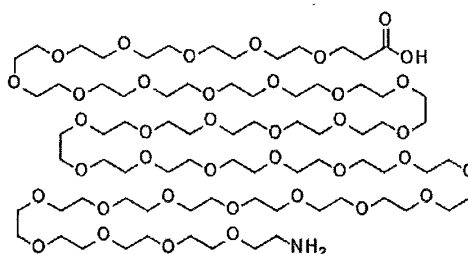
[化65-4]



KPEG



4PAL



P36P

[0016] ⁿS: N-Methyl-L-serine

2Nal: 3-(2-Naphthyl)-L-alanine

4CF: 4-Chloro-L-phenylalanine

Nle: L-Norleucine

DCF: L-3,4-Dichlorophenylalanine

HF: L-Homophenylalanine

3MH: 3-Methyl-L-histidine

AMF: L-4-Aminomethylphenylalanine

Phg: L-Phenylglycine

Tle: L-Tert-Leucine

Hcy: L-Homocysteine

Ahp: (2S)-2-Aminoheptanoic acid

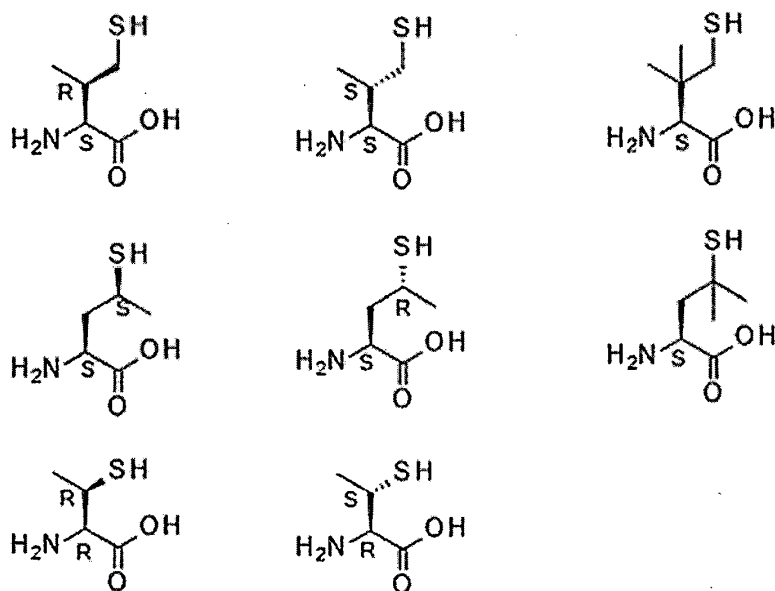
[illegible]

4PAL: L-4-Pyridylalanine

[illegible]

[0017] 本明細書中、非天然アミノ酸には、以下の構造式で表されるPEN類似化合物も含まれる。

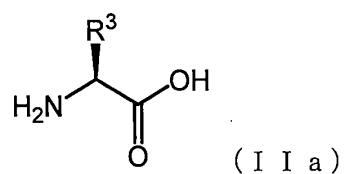
[化65-5]



[0018] なお、本明細書においてアミノ酸という場合、オリゴペプチドおよびポリペプチドの構成アミノ酸についてはアミノ酸残基を意味する。また特に明記しない限り、アミノ酸はL-アミノ酸を意味する。特定のアミノ酸についてD体であることを示す場合、アミノ酸の略号に「D-」を付加する場合がある（例えば、D-Asp、D-Glu、D-Lys、D-Serなど）。なお、本明細書中、D-Aspを「d」と表記する場合がある。

[0019] 本明細書中、脂肪族アミノ酸は、式（I I a）：

[0020] [化66]



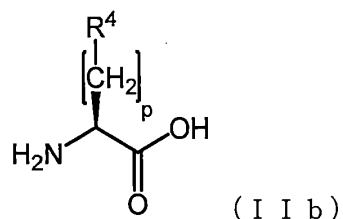
[0021] (式中、R³は、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニルまたはC₃₋₆シクロアルキルである) で表されるアミノ酸である。

[0022] 天然の脂肪族アミノ酸としては、Ala、Val、Leu、およびIle

が挙げられる。また非天然の脂肪族アミノ酸としては、N l e、T l e、A h p、A o c、A l g、B t g、C P T G、C H X Gなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0023] 本明細書中、芳香族アミノ酸は、式 (I I b)

[0024] [化67]

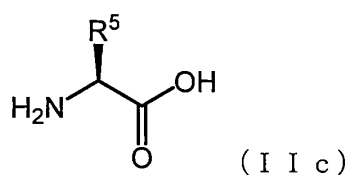


[0025] (式中、R⁴は、フェニル、チエニル、ピリジル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、C₁₋₃アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、C₁₋₃アルコキシからなる群より独立して選択される1以上の置換基により置換されていてよく、pは0～3の整数(例えば、0、1、2、または3)である)で表されるアミノ酸である。

[0026] 天然の芳香族アミノ酸としては、P h e、T y r、およびT r pが挙げられる。また非天然の芳香族アミノ酸としては、2 N a l、4 C F、D C F、H F、P h g、4 P A Lなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0027] 本明細書中、塩基性アミノ酸は、式 (I I c)

[0028] [化68]

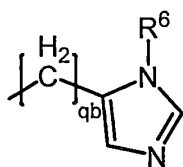


[0029] [式中、R⁵は、

式 - (CH₂)_{qa} NH₂ (式中、qaは1～6の整数(例えば、1、2、3、4、5、または6)である)、

式

[0030] [化69]

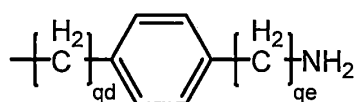


[0031] (式中、 R^6 は水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 q_b は1～6の整数(例えば、1、2、3、4、5、または6)である)、

式— $(CH_2)_{q_c}NHC(=NH)NH_2$ (式中、 q_c は1～6の整数(例えば、1、2、3、4、5、または6)である)、または

式

[0032] [化70]

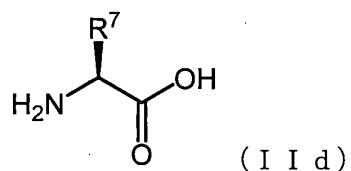


[0033] (式中、 q_d および q_e はそれぞれ独立して1～3の整数(例えば、1、2、または3)である)で表される基である]で表されるアミノ酸である。

[0034] 天然の塩基性アミノ酸としては、Lys、His、およびArgが挙げられる。また非天然の塩基性アミノ酸としては、3MH、AMF、AGBなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0035] 本明細書中、中性アミノ酸は、式(IId)

[0036] [化71]



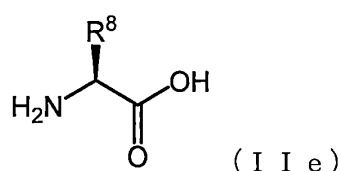
[0037] [式中、 R^7 は、式— $(CH_2)_{r_a}NHCONH_2$ (式中、 r_a は1～6の整数(例えば、1、2、3、4、5、または6)である)、または式— (CH_2)

r_b SH（式中、 r_b は1～3の整数（例えば、1、2、または3）である）で表される基である］で表されるアミノ酸、Gly、Met、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、 m S、MS、Thr、C(O)、C(O₂)、Pen、またはPen類似化合物である。

[0038] 天然の中性アミノ酸としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Met、Pro、Asn、およびGlnが挙げられる。また非天然の中性アミノ酸としては、3HyP、 m S、MS、Alb、Cit、Hct、HCY、C(O)、C(O₂)、Pen、Pen類似化合物などが挙げられるがこれらに限定されない。

[0039] 本明細書中、酸性アミノ酸は、式(I I e)

[0040] [化72]



[0041] [式中、 R^8 は、式 $-(CH_2)_sCOOH$ （式中、 s は1～6の整数（例えば、1、2、3、4、5、または6）である）で表される基である］で表されるアミノ酸である。

[0042] 天然の酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。

[0043] 本明細書中、 C_{1-3} アルキルは、1～3個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキルであり、例えば、メチル、エチル、1-プロピル、または2-プロピルである。

[0044] 本明細書中、 C_{1-6} アルキルは、1～6個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキルであり、例えば、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-ブチル、2-メチル-1-プロピル、2-メチル-2-プロピル、1-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、3-メチル-2-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-1-ペンチル、3-メチル-1-ペンチル、2-エチ

ル-1-ブチル、2,2-ジメチル-1-ブチル、または2,3-ジメチル-1-ブチルである。

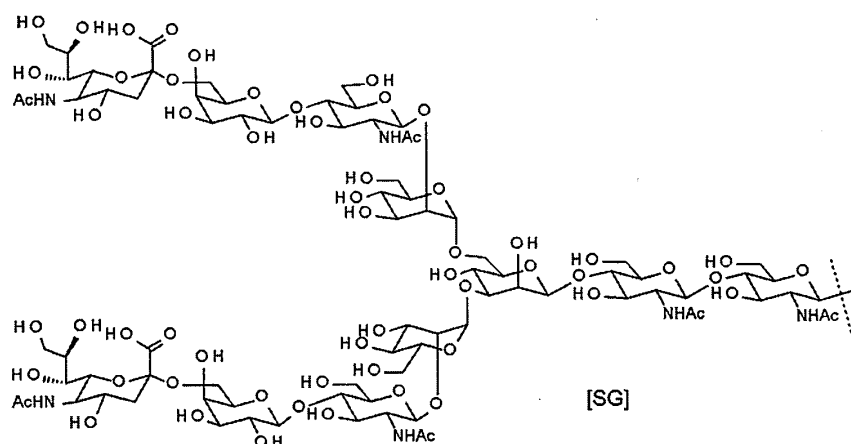
- [0045] 本明細書中、 C_{2-6} アルケニルは、2～6個の炭素原子を有し、1以上の二重結合を含む直鎖または分枝鎖アルケニルであり、例えば、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル（アリル）、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-2-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、3-メチル-2-ペンテニルなどが挙げられ、好ましくは、ビニル、2-プロペニル（アリル）、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニルである。
- [0046] 本明細書中、 C_{3-6} シクロアルキルは、3～6個の炭素原子を有する環状アルキル基であり、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、または、シクロヘキシル基である。
- [0047] 本明細書中、ハロゲン原子は、F、Cl、Br、またはIである。
- [0048] 本明細書中、 C_{1-3} アルコキシは、1個の上記 C_{1-3} アルキル基で置換されたヒドロキシル基であり、例えば、メトキシ、エトキシ、1-プロポキシ、または2-プロポキシである。
- [0049] 本明細書中、「糖鎖」とは、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。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、還元末端で別の構造単位との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、当該糖鎖を表す略号には含まれないものとして表示される。
- [0050] 本明細書中、糖鎖の基本単位となる単糖の記載は、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。

糖鎖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 (Flu)、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 (GlucA)、ノイラミニン酸 (Neu)、シアル酸/N-アセチルノイラミニン酸 (Sia/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)、イズロン酸 (IdoA)、フコース (Fuc)、アルドトリオース、グリセルアルデヒド、アルドテトロース、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、アルドロース、イドース、ケトトリオース、ジヒドロキシアセトン、ケトテトロース、エリトルロース、ケトペントース、キシルロース、リブロース、ケトヘキソース、プシコース、ソルボース、タガトース、等を挙げることができる。

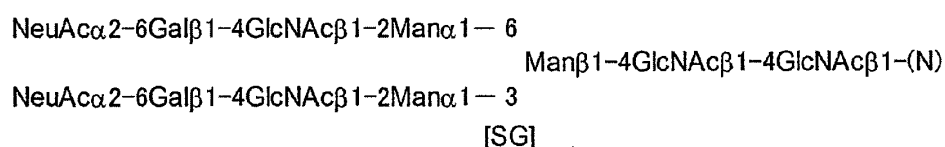
[0051] 本明細書中、糖鎖を記号（例えば、GLY、SG、GlcNAc等）として記載する場合、別に定義される場合を除き、還元末端の炭素までを、当該記号に含めるものとし、N-又はO-グリコシド結合に帰属するN又はOは、当該記号には含まれないものとする。

[0052] 本明細書中、シアリルグリカン（以下、「SG」）とは、ヒトの体内において抗原性を示さないことが知られているN結合型複合型糖鎖であって、以下の構造式および配列式で示される糖鎖をいう。

[化73]



[化74]



(式中、「-(N)」は、Asnの側鎖とNグリコシド結合することを示す。

)

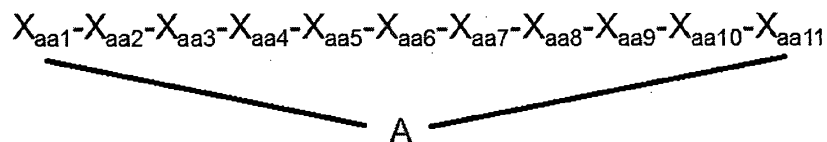
[0053] 本明細書中、TSP1阻害活性とは、血管新生阻害作用などを含むTSP1の作用の少なくとも1つを阻害する活性をいう。TSP1阻害活性は、本願の実施例に示されるヒトTSP1および血管内皮細胞を用いた細胞接着阻害アッセイにより測定される。該アッセイにおいて、被験物質の50%阻害濃度 (IC_{50}) が500 nM以下である場合、TSP1阻害活性を有すると決定される。

[0054] 1. 環状ペプチド

本発明は、TSP1阻害活性を有する新規環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩を提供する。

[0055] 一態様において、本発明に係る化合物は、式(1)

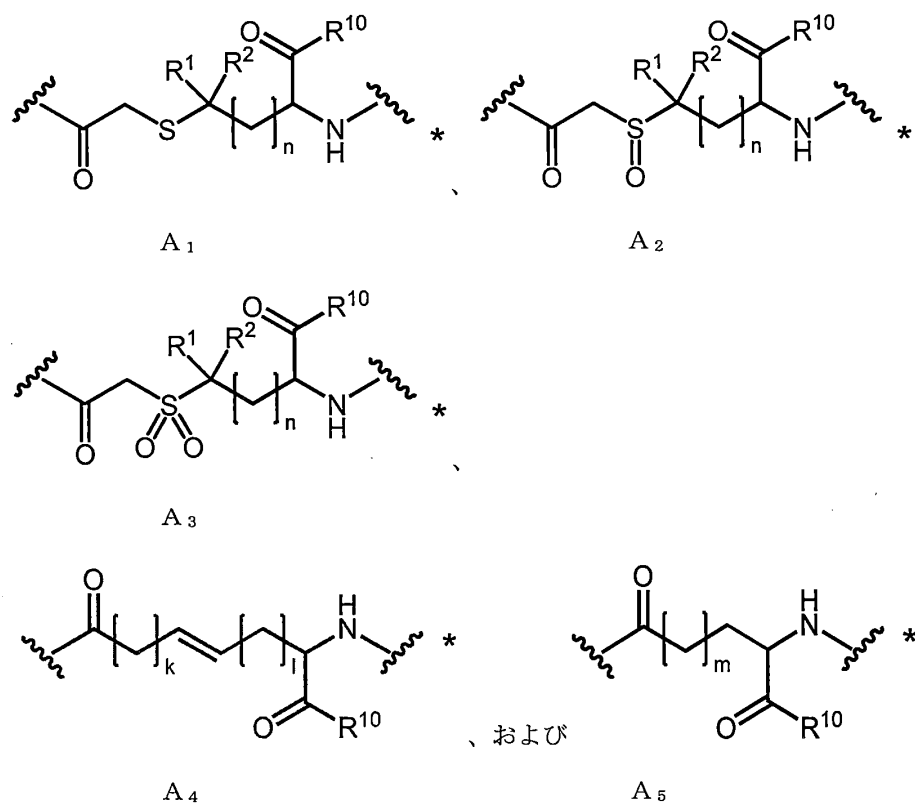
[化75]



で表される環状ペプチドである（以下、本発明の環状ペプチドⅠという）。
 本発明の環状ペプチドⅠにおいては、 $X_{aa1} \sim X_{aa11}$ のアミノ酸が、アミド結合により連結されてオリゴペプチド鎖が形成されており、N末端アミノ酸（ X_{aa1} ）とC末端アミノ酸（ X_{aa11} ）とが環形成基Aを介して連結され環状構造が形成されている。

[0056] 式（Ⅰ）において、Aは、アミノ酸構造を含む下記の環形成基 $A_1 \sim A_5$ ：

[化76]



から選択される。

[0057] Aにおいて、末端に記載されている

[化77]



は、 X_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示し、

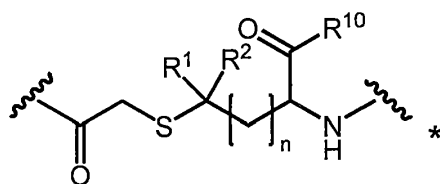
[化78]



は、 X_{aa1} のC末端カルボニル基への結合点を示す。上記環形成基に含まれるアミノ酸構造の不斉点はR体であってもS体であってもよい。

[0058] 一態様において、Aは、

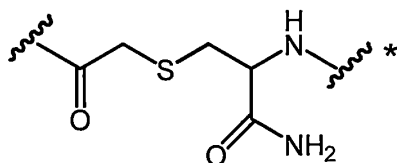
[化79]



[0059] である（以下、 A_1 という）。環形成基 A_1 において、 n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。 C_{1-3} アルキルは、好ましくはメチルである。

[0060] A_1 の好ましい態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が0である、環形成基

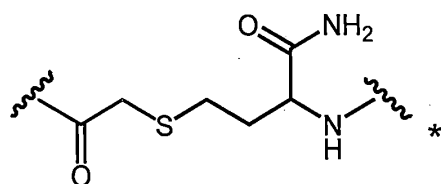
[化80]



[0061] が挙げられる（以下、 A_{1a} という）。 A_{1a} は、例えば、 X_{aa11} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の—SHを、 X_{aa1} のN末端アミノ基に結合した—COCH₂X（XはClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、CysはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、 A_{1a} において X_{aa11} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である場合の環形成基を、 A_{1a1} という。

[0062] A_1 の好ましい別の態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が1である、環形成基

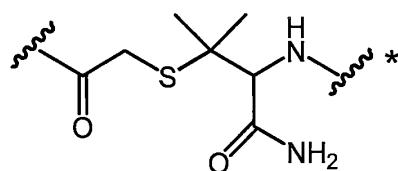
[化81]



が挙げられる（以下、 A_{1b} という）。 A_{1b} は、例えば、 X_{aa11} のC末端側にアミド結合したHCY（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の—SHを、 X_{aa1} のN末端アミノ基に結合した—COCH₂X（XはClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、HCYはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、 A_{1b} において X_{aa11} のC末端側にアミド結合したHCY（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である場合の環形成基を、 A_{1b1} という。

[0063] A_1 の好ましい別の態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれメチルであり、 R^{10} がアミノであり、 n が0である、環形成基

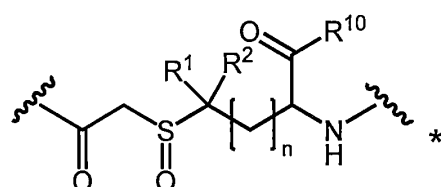
[化82]



が挙げられる（以下、 A_{1c} という）。 A_{1c} は、例えば、 X_{aa11} のC末端側にアミド結合した Pen （ただしカルボキシがアミドに変換されている）の—SHを、 X_{aa1} のN末端アミノ基に結合した—COCH₂X（XはClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、 Pen はL—アミノ酸またはD—アミノ酸であってもよい。特に、 A_{1c} において X_{aa11} のC末端側にアミド結合した Pen （ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL—アミノ酸である場合の環形成基を、 A_{1c1} という。

[0064] 別の態様において、環形成基Aは、

[化83]

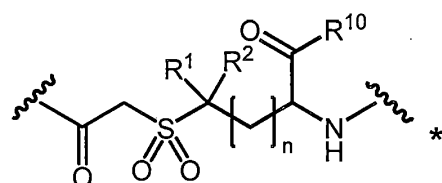


である（以下、 A_2 という）。 A_2 において、 n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。 A_2 は、例えば上記 A_1 のスルフィド基を酸化してスルホキシドとすることにより得ることができる。

[0065] A_2 の好ましい態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が0である環形成基が挙げられる（以下、 A_{2a} という）。 A_{2a} は、例えば上記 A_{1a} のスルフィド基を酸化してスルホキシドとすることにより得ることができる。特に、 A_{1a1} のスルフィド基を酸化してスルホキシドとした場合の環形成基を、 A_{2a1} という。

[0066] 別の態様において、Aは、

[化84]

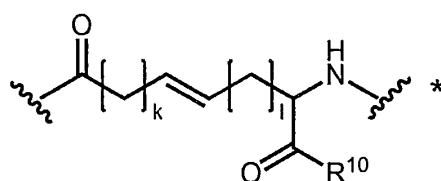


である（以下、 A_3 という）。 A_3 において、 n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。 A_3 は、例えば上記 A_1 のスルフィド基を酸化してスルホンとすることにより得ることができる。

[0067] A_3 の好ましい態様としては、 R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子であり、 R^{10} がアミノであり、 n が0である環形成基が挙げられる（以下、 A_{3a} という）。 A_{3a} は、例えば上記 A_{1a} のスルフィド基を酸化してスルホンとすることにより得ることができる。特に、 A_{1a1} のスルフィド基を酸化してスルホンとした場合の環形成基を、 A_{3a1} という。

[0068] 別の態様において、 A は、

[化85]

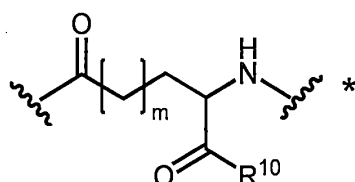


である（以下、 A_4 という）。 A_4 において、 k および l はそれぞれ独立に0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。環形成基 A_4 は、例えば、 X_{aa11} のC末端側にアミド結合した、側鎖に $-(CH_2)_lCH=CH_2$ を有するアミノ酸（カルボキシがアミドに変換されていてもよい）と、 X_{aa1} のN末端アミノ基に結合した $-CO(CH_2)_kCH=CH_2$ とのオレフィンメタセシスにより得ることができる。こ

の場合、 X_{aa1} のC末端側にアミド結合したアミノ酸はL-アミノ酸およびD-アミノ酸のいずれであってもよい。

[0069] 別の態様において、Aは、

[化86]



である（以下、 A_5 という）。 A_5 において、 m は1～7の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、または7）であり、 R^{10} はアミノまたはヒドロキシである。 A_5 は、例えば、 A_4 におけるC-C二重結合を還元することにより得ることができる。

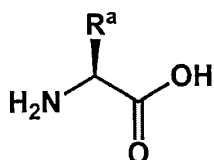
[0070] 好ましい態様において、環形成基Aは、 A_{1a} 、 A_{1b} 、または A_{1c} であり、より好ましくは、 A_{1a} である。

[0071] 式(1)において、 X_{aa1} は、芳香族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa1} は、2NaI残基である。

[0072] 式(1)において、 X_{aa2} は、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸または脂肪族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa2} は、Arg、AGB、PHG、またはTleの残基である。

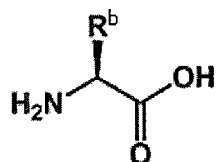
[0073] 式(1)において、 X_{aa3} および X_{aa8} は、それぞれ独立に選択される、以下の式(111)

[化87]



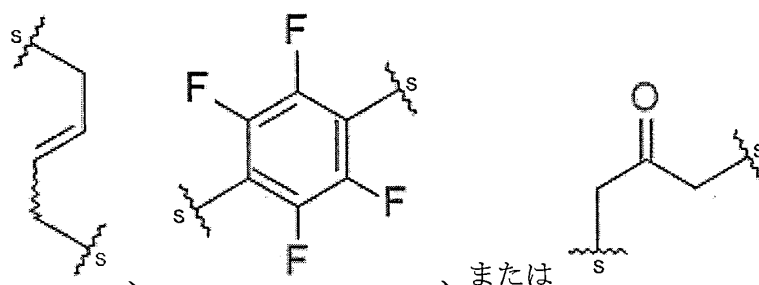
[式中、 R^a は、式 $-(CH_2)_tSH$ （式中、 t は1～3の整数（例えば、1、2、または3）である）で表される基である]、または式(111')

[化87-1]



[式中、 R^b は、式 $-\text{CH}_v(\text{CH}_3)_{2-v}\text{CH}_w(\text{CH}_3)_{2-w}\text{SH}$ （式中、 v は0～2の整数であり、 v が0または1のとき、 w は2であり、 v が2のとき、 w は0または1である）、または $-\text{CH}_x(\text{CH}_3)_{2-x}\text{SH}$ （式中、 x は0または1である）で表される基である]で表されるアミノ酸の残基において、 X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基が、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、または $-\text{S}-\text{X}-\text{S}-$ （式中、 X は、

[化88]



(式中、

[化89]



は、 S への結合点を示す)から選択される)で表される結合を形成している構造であり、かつ、 X_{aa3} および X_{aa8} の少なくともいずれか一方は式(11)で表されるアミノ酸の残基である。当該構造は、本発明の環状ペプチド1の X_{aa3} および X_{aa8} の位置に存在する2つのアミノ酸残基の側鎖のチオール

ル基が上記のように架橋された構造である。一実施形態において、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造は、 X_{aa3} 残基がH C Y残基であり、かつ、 X_{aa8} 残基がH C Y残基、C y s残基、またはP e n残基、好ましくはH C Y残基またはC y s残基、より好ましくはH C Y残基であり、 X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基が、上記のように架橋された構造、好ましくは $-S-S-$ または $-S-CH_2-S-$ で表される結合で架橋された構造、より好ましくは $-S-S-$ で表される結合（すなわちジスルフィド結合）で架橋された構造であり得る。別の実施形態において、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造は、 X_{aa3} 残基がC y s残基であり、かつ、 X_{aa8} 残基がH C Y残基、C y s残基、またはP e n残基であり、 X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基が、上記のように架橋された構造、好ましくは $-S-S-$ または $-S-CH_2-S-$ で表される結合で架橋された構造、より好ましくは $-S-S-$ で表される結合（すなわちジスルフィド結合）で架橋された構造であり得る。別の実施形態において、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造は、 X_{aa3} 残基がP e n残基であり、かつ、 X_{aa8} 残基がH C Y残基であり、 X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基が、上記のように架橋された構造であり得る。好ましい態様において、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、式（I I I）または（I I I'）で表されるアミノ酸の残基は、H C Y残基またはC y s残基である。より好ましい態様において、 X_{aa3} および X_{aa8} は、本発明の環状ペプチドIの X_{aa3} および X_{aa8} の位置に存在する2つのH C Y残基の側鎖のチオール基が上記のように架橋された構造である。なお、H C Y残基は、 $t=2$ である式（I I I）で表されるアミノ酸の残基である。

[0074] 好ましい態様において、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、チオール基は、 $-S-S-$ または $-S-CH_2-S-$ 、より好ましくは $-S-S-$ で表される結合を形成している。より好ましい態様において、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、式（I I I）または（I I I'）で表されるアミノ酸の残基は、H C Y残基であり、チオール基は、 $-S-S-$ で表される結合を形成している。

[0075] 式（I）において、 X_{aa4} は、中性アミノ酸の残基である。好ましい態様に

において、 X_{aa4} は、Gly残基である。

[0076] 式(1)において、 X_{aa5} は、塩基性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa5} は、ArgまたはAGBの残基である。

[0077] 式(1)において、 X_{aa6} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa6} は、AsnまたはAspの残基である。

[0078] 式(1)において、 X_{aa7} は、芳香族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa7} は、Trp残基である。

[0079] 式(1)において、 X_{aa9} は、芳香族アミノ酸、脂肪族アミノ酸または塩基性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa9} は、Val、Arg、PHG、4PAL、またはAGBの残基であり、より好ましくは、Val、Arg、PHG、または4PALの残基である。

[0080] 式(1)において、 X_{aa10} は、芳香族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa10} は、Trp残基である。

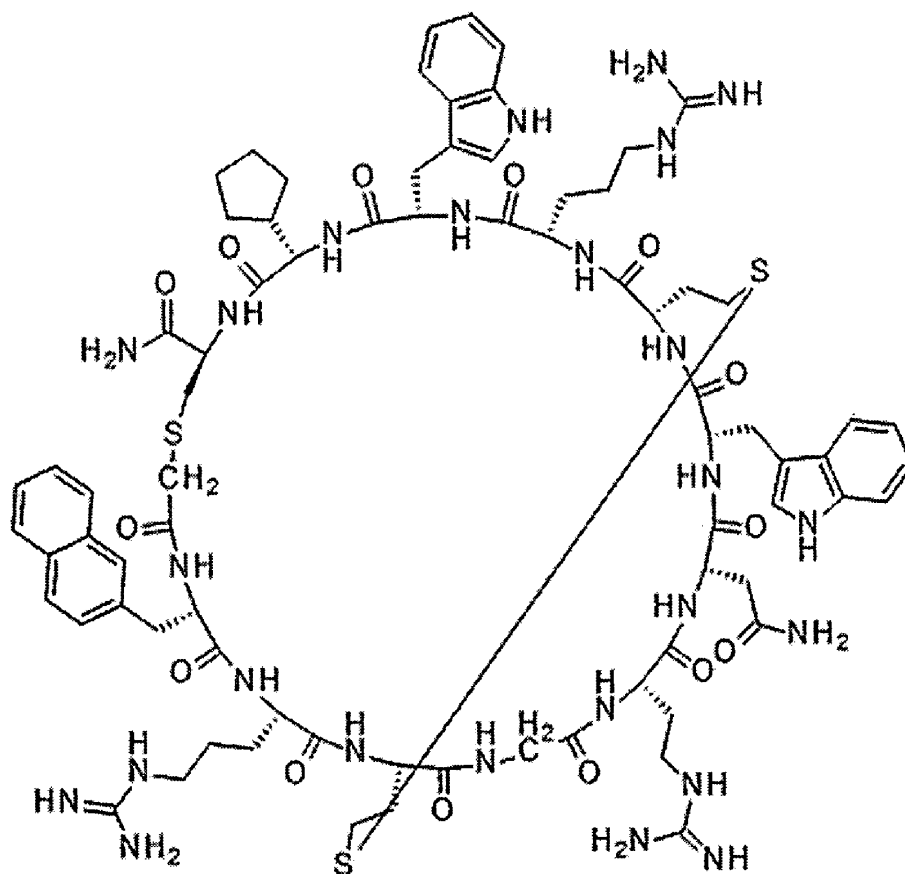
[0081] 式(1)において、 X_{aa11} は、脂肪族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 X_{aa11} は、Val、CPTG、またはCHXGの残基であり、より好ましくは、ValまたはCPTGの残基である。

[0082] 本発明の環状ペプチドIの好ましい態様としては、式(1)において、
 X_{aa1} が2NaI残基であり、
 X_{aa2} が、Arg、AGB、PHG、またはTleの残基であり、
 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、式(111)または(111')で表されるアミノ酸の残基がHCY残基またはCysであり、
 X_{aa4} がGly残基であり、
 X_{aa5} が、ArgまたはAGBの残基であり、
 X_{aa6} が、AsnまたはAspの残基であり、
 X_{aa7} がTrp残基であり、
 X_{aa9} が、Val、Arg、PHG、4PAL、またはAGBの残基であり、
、
 X_{aa10} がTrp残基であり、かつ

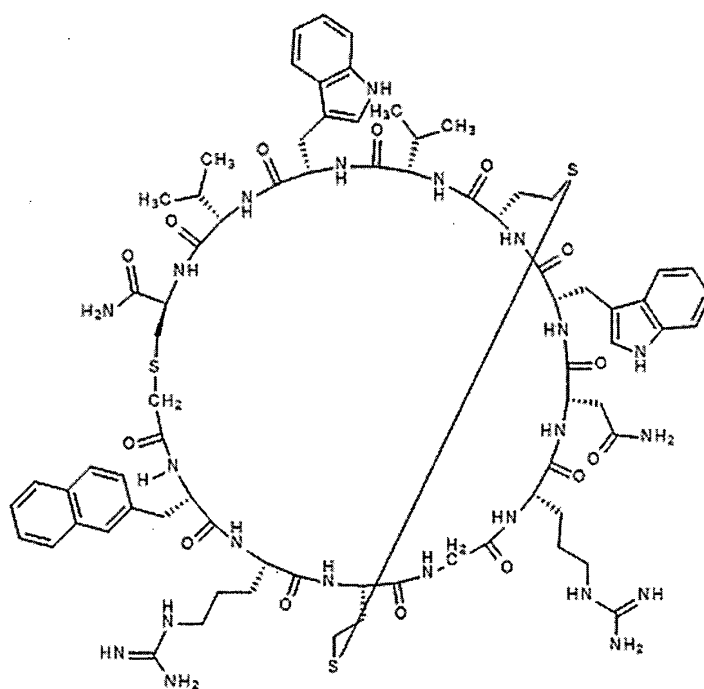
X_{aa11} が、Val、CPTG、またはCHXGの残基である、
環状ペプチドが挙げられる。

[0083] 本発明の環状ペプチドIのさらに好ましい態様としては、

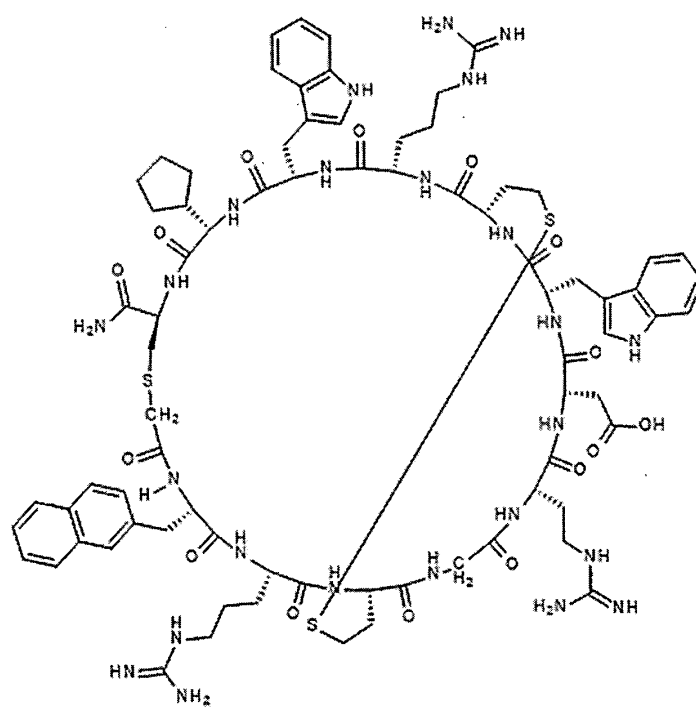
[化90]



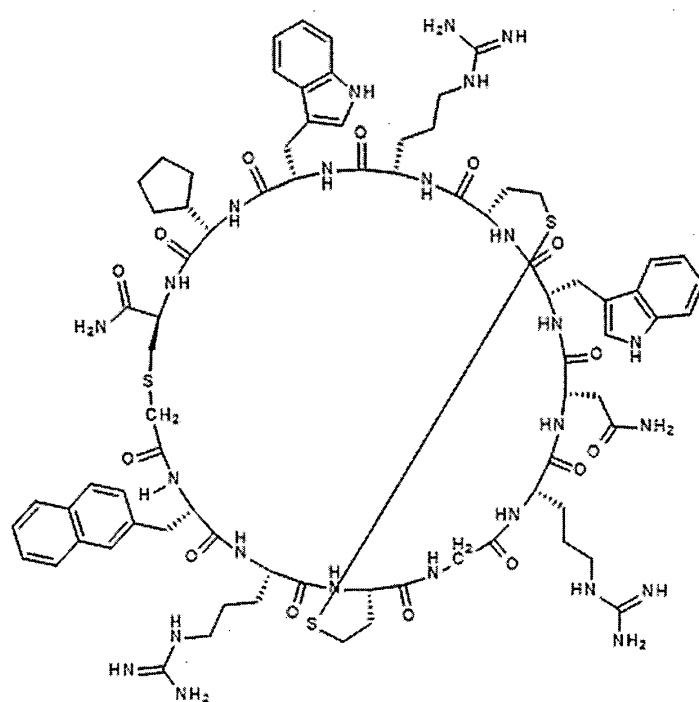
[化91]



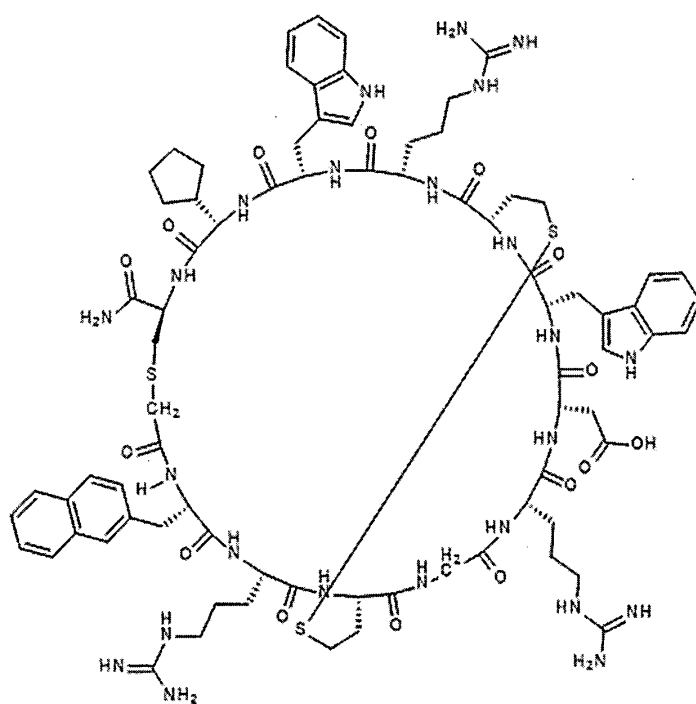
[化92]



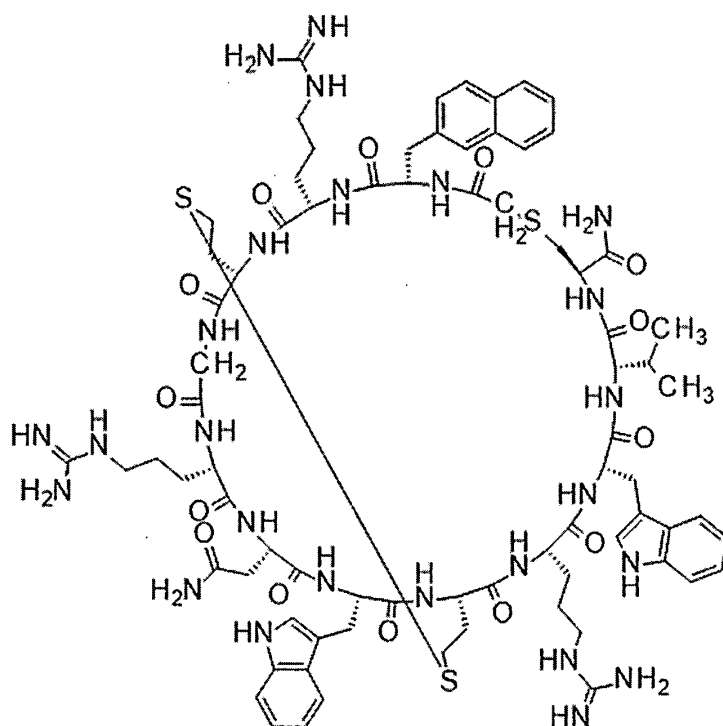
[化93]



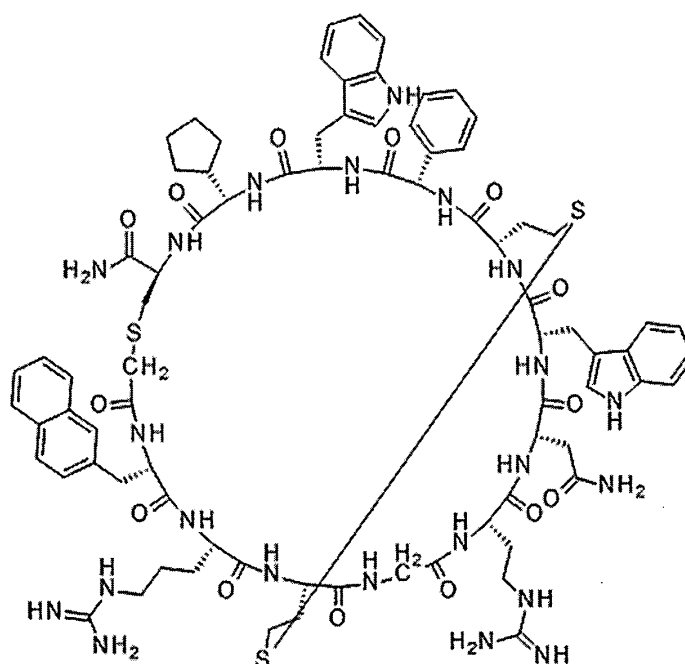
[化94]



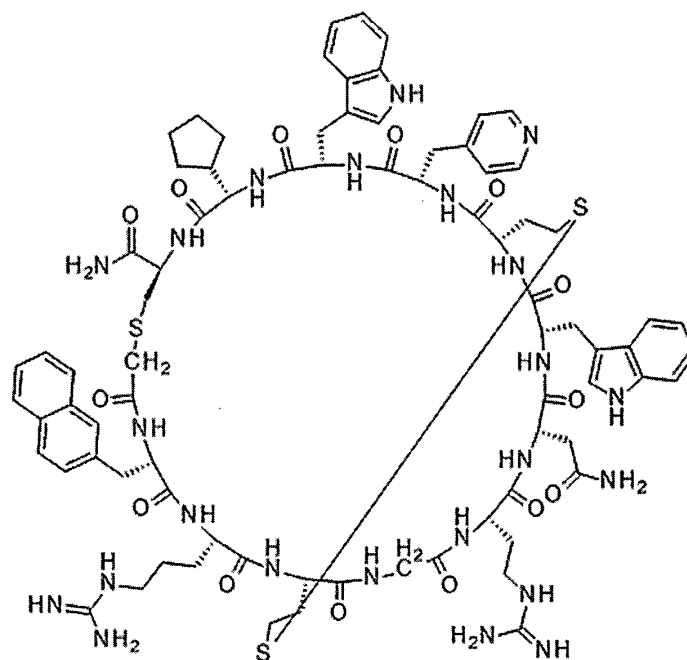
[化95]



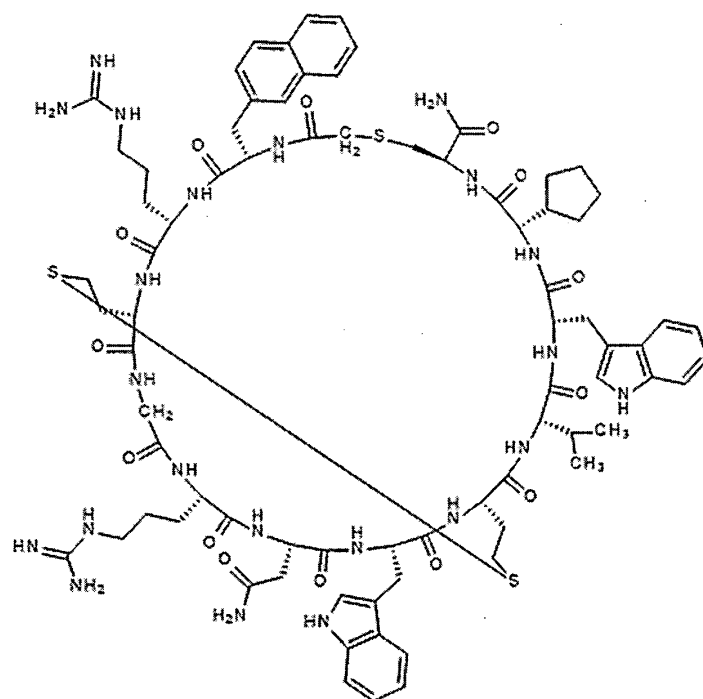
[化98]



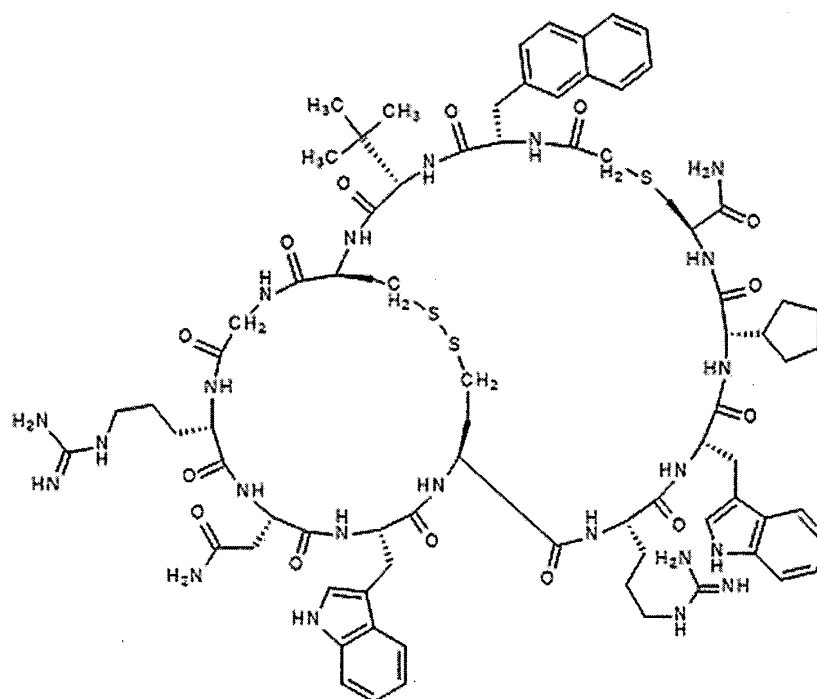
[化99]



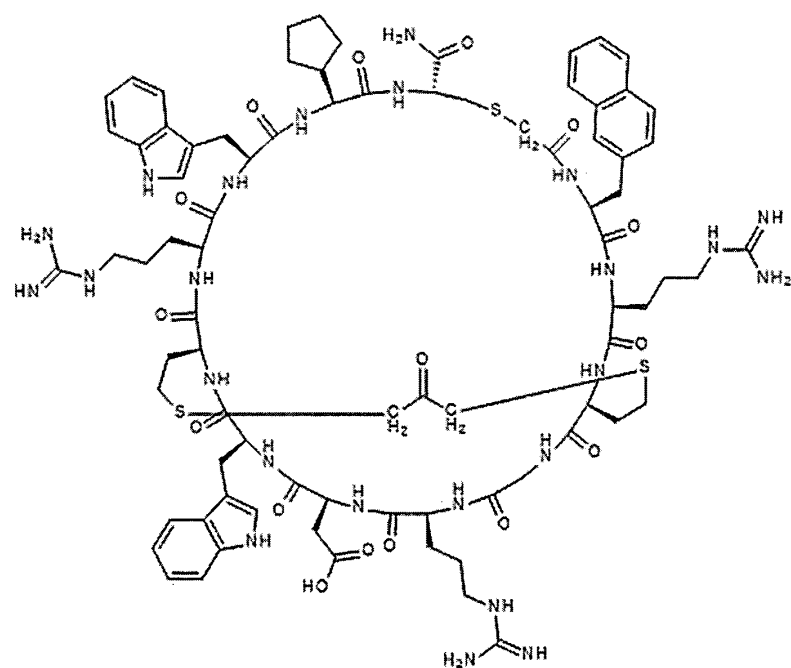
[化100]



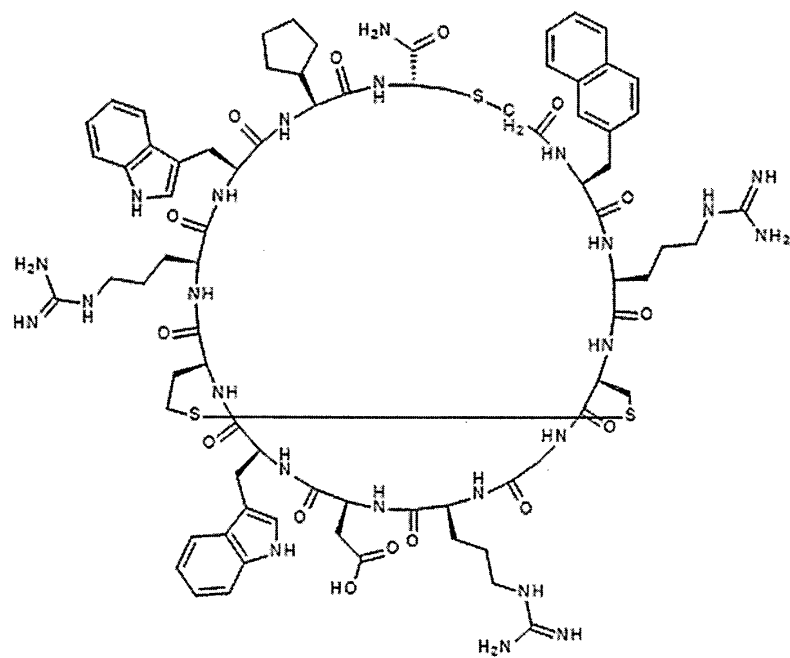
[化101]



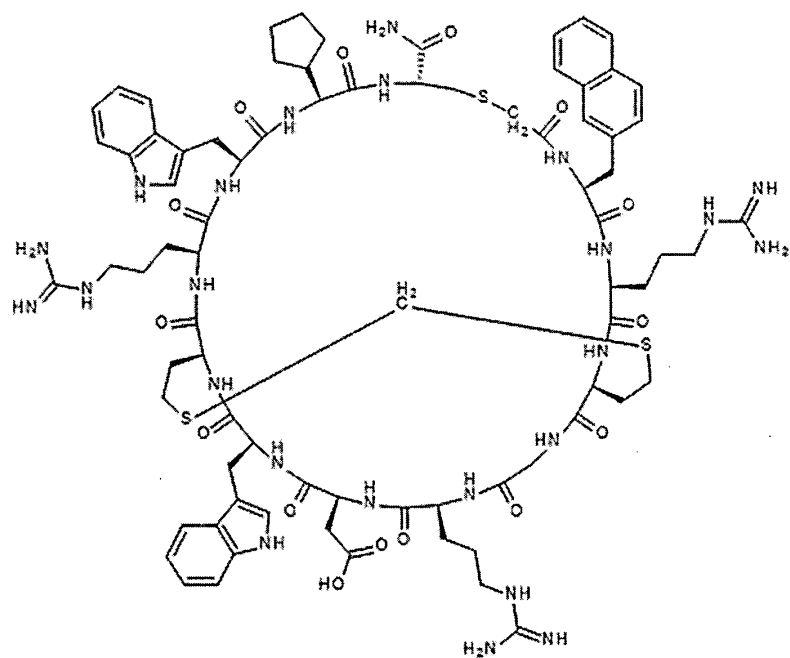
[化101-1]



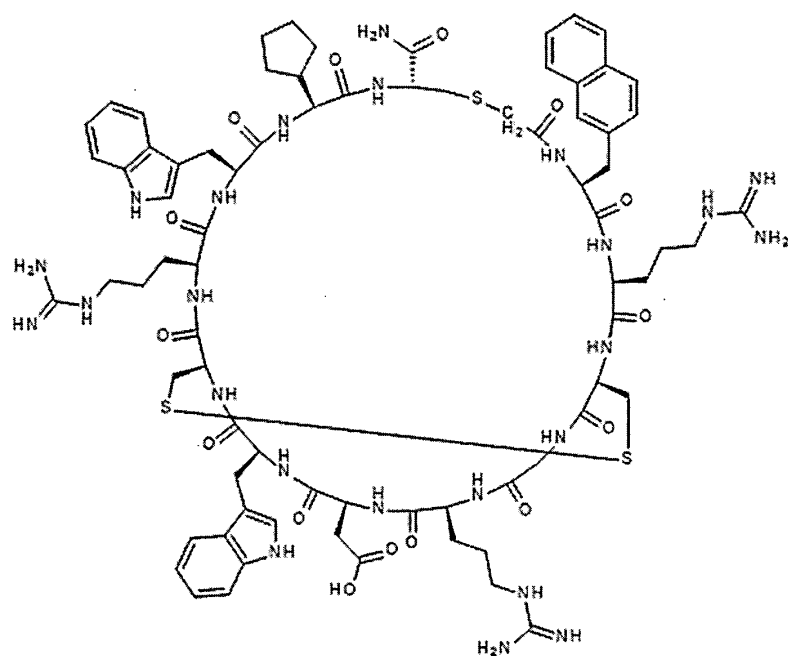
[化101-2]



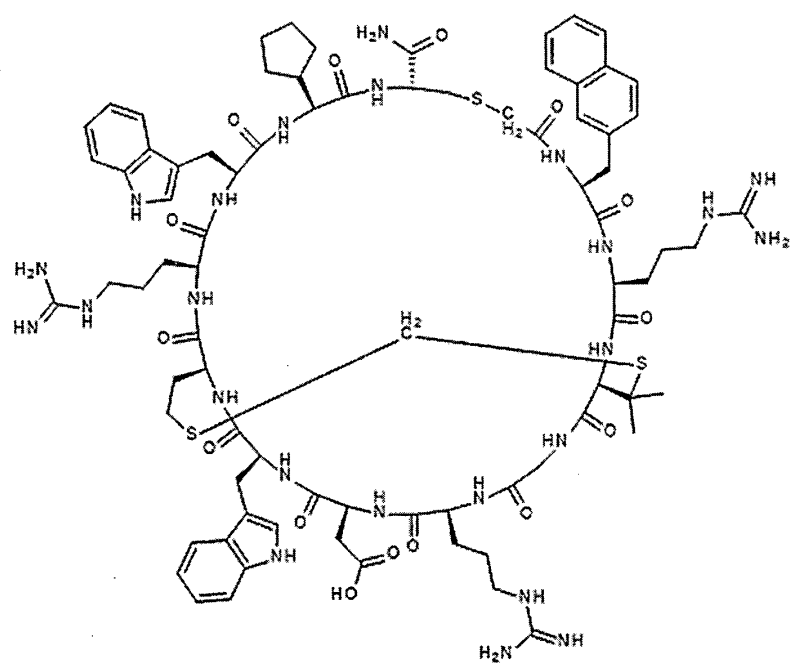
[化101-3]



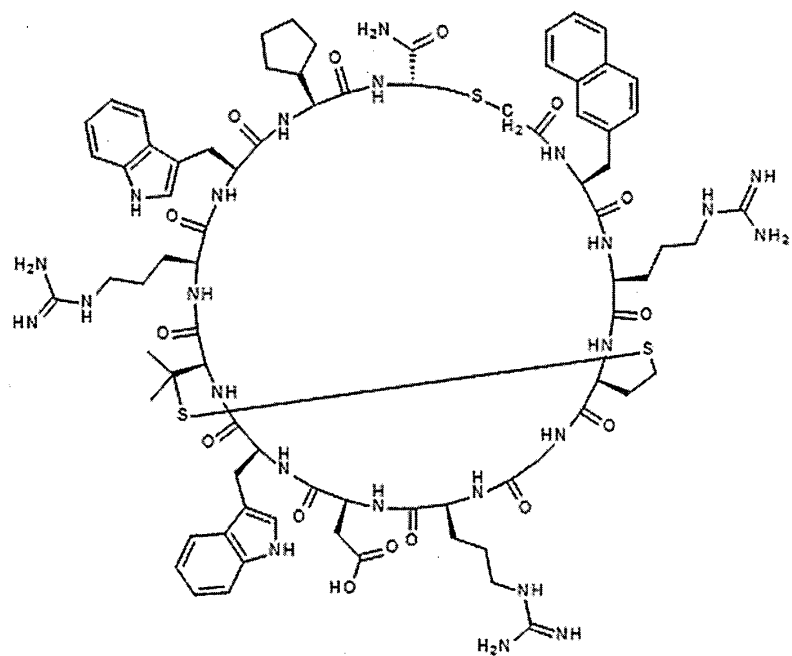
[化101-4]



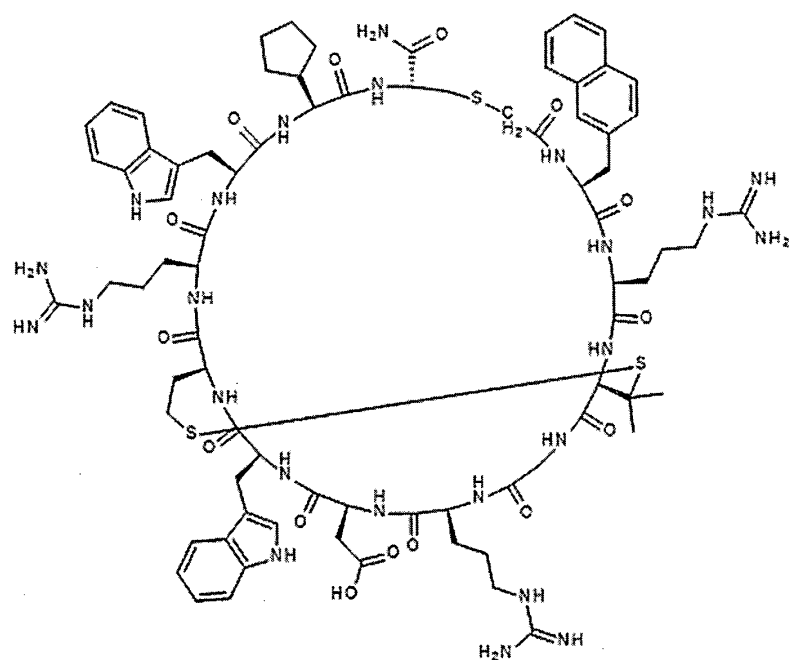
[化101-9]



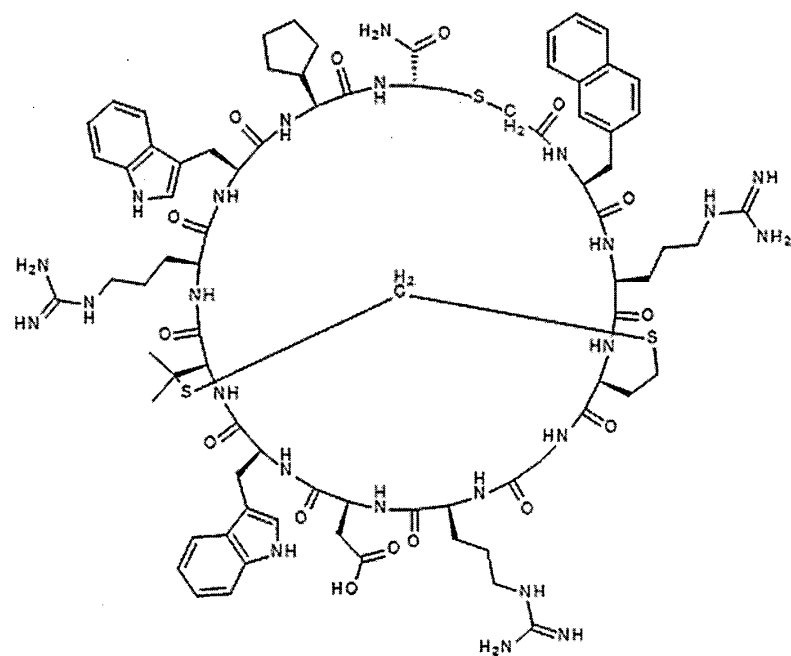
[化101-10]



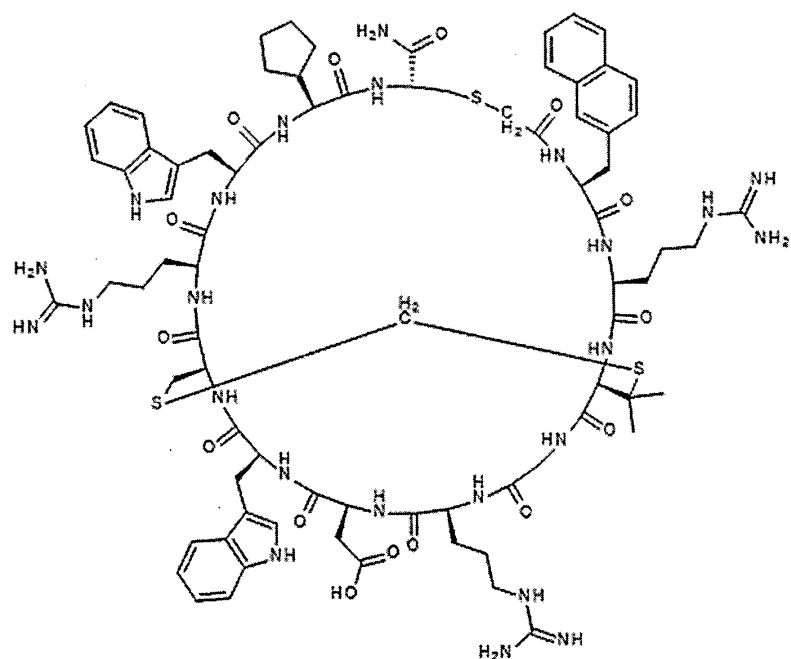
[化101-11]



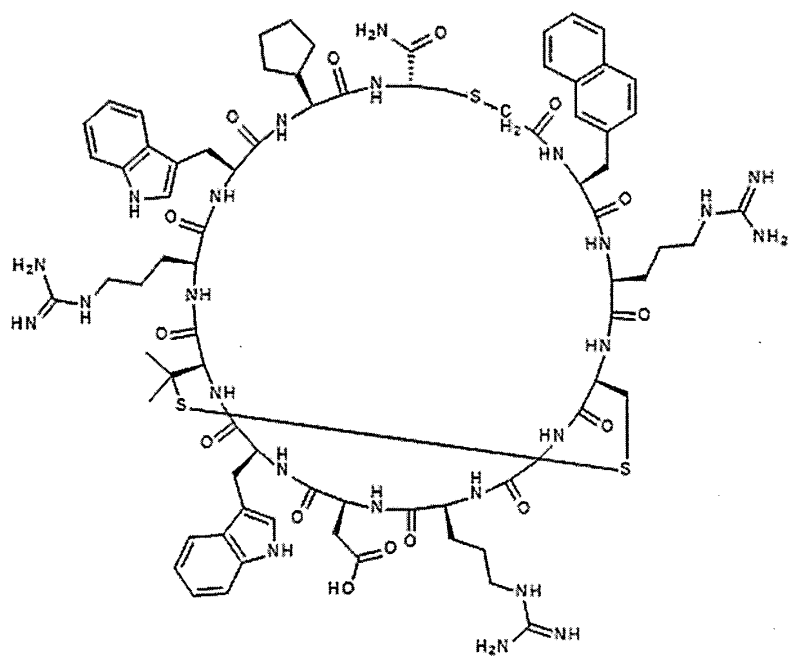
[化101-12]



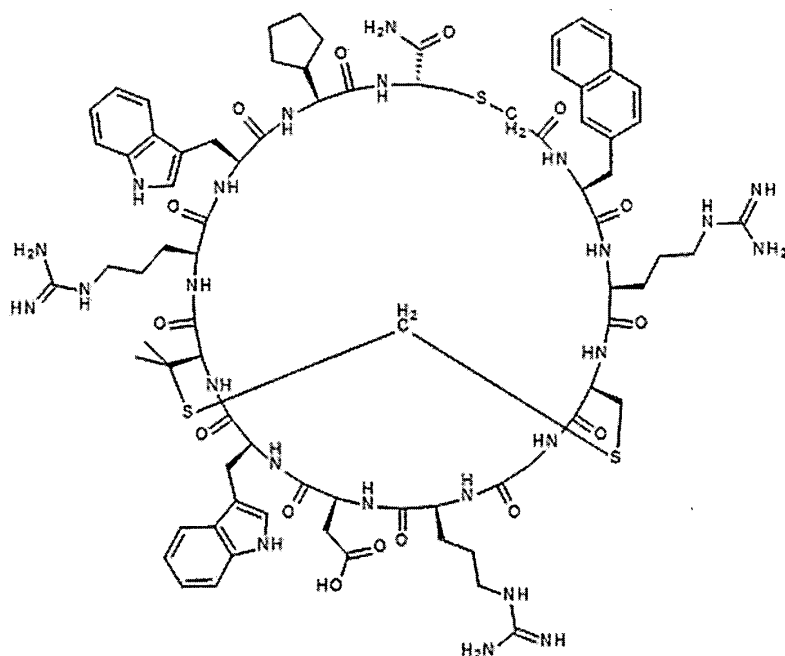
[化101-13]



[化101-14]



[化101-15]



で表される化合物からなる群より選択される環状ペプチドが挙げられる。ここに示された環状ペプチドは、後述する実施例におけるPeptide-1～Peptide-12およびPeptide-125～Peptide-139であり、環形成基AはいずれもA_{1a1}である。

[0084] 本発明の環状ペプチドIが塩基性基を有する場合、酸と組み合わせられて塩を形成することができ、これらの塩は、本発明に包含される。そのような塩としては、例えば、無機酸塩、有機酸塩、アミノ酸塩、およびスルホン酸塩が挙げられる。無機酸塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などが挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、フタル酸塩、トリフルオロ酢酸塩などが挙げられる。アミノ酸塩としては、例えば、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などが挙げられる。スルホン酸塩としては、例えば、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸塩、2,4,6-トリメチルベンゼン

スルホン酸塩、4-エチルベンゼンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩などが挙げられる。本発明の環状ペプチドⅠの薬学上許容される塩の好ましい態様としては、酢酸塩、塩酸塩、またはトリフルオロ酢酸塩であり、より好ましくは、酢酸塩である。

[0085] 本発明の環状ペプチドⅠが酸性基を有する場合、塩基と組合わされて塩を形成することができ、これらの塩は、本発明に包含される。これらの塩としては、例えば、金属塩、無機アミン塩、有機アミン塩、およびアミノ酸塩が挙げられる。金属塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などが挙げられる。無機アミン塩としては、例えば、アンモニウム塩が挙げられる。有機アミン塩としては、例えば、モルホリン塩、グルコサミン塩、エチレンジアミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、ジエタノールアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩などが挙げられる。アミノ酸塩としては、例えば、リジン塩、アルギニン塩などが挙げられる。

[0086] 本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩は、結晶の形態で使用されてもよく、該結晶は、本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩のみから形成されていても、共結晶や溶媒和物（例えば水和物）を形成していてもよい。本発明の環状ペプチドⅠおよびその薬学上許容される塩は、いずれかを単独でまたは2種以上を適宜組み合わせて用いてもよい。

[0087] 本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩は、それを構成する1個以上の原子が非天然の比率で同位体原子に置換された同位体化合物を形成することができる。同位体原子は、放射性または非放射性であり得、例えば、重水素（ ^2H ；D）、トリチウム（ ^3H ；T）、炭素-14（ ^{14}C ）、ヨウ素-125（ ^{125}I ）などである。放射性の同位体原子で標識された化合物は、疾患の治療または予防薬、研究用試薬（例えば、アッセイ用試薬）、

診断薬（例えば、画像診断薬）などとして使用され得る。本発明は、放射性または非放射性の同位体化合物を包含する。

[0088] 本発明の環状ペプチド I またはその薬学上許容される塩は、化学合成、無細胞翻訳系などの当該技術分野において知られている方法で製造することができる。例えば、本発明の環状ペプチドの化学合成は、9-フルオニルメトキシカルボニル基（Fmoc基）をアミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行うことができる。固相合成には、市販の自動合成機（例えば Syro II（Biotage Japan社）、Liberty Blue（CEM社）など）を用いることができる。

[0089] 例えば、環形成基として A₁ を有する本発明の環状ペプチド I は、以下の方法に従って得ることができる。

[0090] ペプチド自動合成機を用いて、固相支持体（例えば、Rink Amide Resin AM（Novaviochem社）、2-Chlorotriptyl chloride resin（Novaviochem社）など）に、アミノ基の保護基（例えば、Fmoc基など）で保護されたアミノ酸を C 末端側から順次連結する（C 末端アミノ酸はチオールを有するアミノ酸である）。アミノ基の脱保護は当業者に知られた方法（例えば、Fmoc基の場合は 20% ピペリジン／1-メチル-2-ピロリジノンなど）で行う。N 末端のアミノ酸を連結し、アミノ基を脱保護した後、環形成基を形成させるための基（例えば、クロロメチルカルボニル基など）を導入し（例えば、クロロ酢酸を N 末端アミノ基と反応させ）、環状ペプチドを形成する。その後、得られたペプチドをペプチドレジンから、常法（例えば、Rink Amide Resin AM を使用する場合には、トリフルオロ酢酸－エタンジチオール－トリイソプロピルシラン－水を使用する条件）により切断する。エーテル沈殿により粗ペプチドを回収したのち、常法（例えば、逆相高速液体クロマトグラフィー）により目的物を精製する。

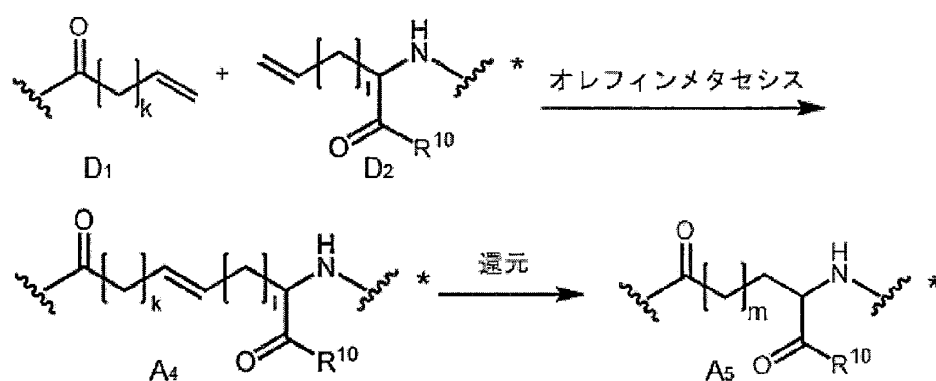
得られた環状ペプチドについて、常法（例えば、ヨウ素酸化法）により X_a_{a3} と X_a_{a8} との間のジスルフィド結合などの結合を形成させ、二環性環状ペプチドを得ることができる。

得られた目的物は常法により所望の塩に変換することができる。

[0091] 環形成基として A_2 または A_3 を有する本発明の環状ペプチド I またはその薬学上許容される塩は、例えば、 A_1 を有する本発明の環状ペプチド I またはその薬学上許容される塩を酸化剤（例えば、*m*-クロロ過安息香酸、過酸化水素水またはジメチルジオキシラン）により酸化することにより得ることができる。

[0092] 例えば、環形成基として A_4 または A_5 を有する本発明の環状ペプチド I は、例えば以下の方法に従って得ることができる。

[0093] [化102]



[0094] 末端基 D_1 および D_2 を有するオリゴペプチドは、ペプチド自動合成機を用いて、固相支持体に、アミノ基の保護基（例えば、Fmoc基など）で保護されたアミノ酸をC末端側から順次連結し（C末端アミノ酸はオレフィンを有するアミノ酸である）、N末端のアミノ酸のアミノ基を脱保護した後、環形成基を形成させるための基（例えば、2-プロペニル基など）を導入することにより調製することができる。

末端基 D_1 および D_2 を有するオリゴペプチドを調製した後に、適切な触媒（例えば、第2世代グラブス触媒）を使用してオレフィンメタセシス反応を行うことにより環形成基として A_4 を有する環状ペプチドを調製することができる。該環状ペプチドを適切な条件下（例えば、水素、ウィルキンソン触媒

）で還元反応に付すことにより、環形成基としてA₅を有する環状ペプチドを得ることができる。

[0095] 本発明の環状ペプチドIまたはその薬学上許容される塩は、TSP1阻害活性を有し、本願の実施例に示されるヒトTSP1および血管内皮細胞を用いた細胞接着阻害アッセイにより測定されるIC₅₀が、500nM以下であり、好ましくは200nM以下である。したがって、本発明の環状ペプチドIまたはその薬学上許容される塩は、TSP1と血管内皮細胞との接着を阻害することができるため、血流改善剤として有用である。

[0096] また本発明の環状ペプチドIは、二環性であることにより、単環性の環状ペプチドと比較して代謝安定性が向上している。したがって、本発明の環状ペプチドIまたはその薬学上許容される塩は、従来よりも少ない投与頻度で、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状を治療または予防する手段を提供するために有用である。

[0097] II. 本発明の環状ペプチドIまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含む医薬組成物

本発明はさらに、本発明の環状ペプチドIまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含む医薬組成物を提供する（以下、本発明の医薬組成物Iという）。本発明の医薬組成物Iは、優れたTSP1阻害活性を有しており、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状（例えば、血管新生阻害に起因し得る疾患、血栓形成亢進に起因し得る疾患、炎症性疾患、腎臓細胞機能低下に起因し得る疾患、血管弛緩作用の抑制に起因し得る疾患、虚血性疾患、癌疾患などの疾患、および鎌型赤血球病に伴う血管閉塞（vaso-occlusive crisis）、血管新生阻害、組織壊死、インスリン抵抗性、一般的な創傷などの症状）の治療または予防に有用である。血管新生阻害に起因し得る疾患としては、例えば、重症下肢虚血、末梢血管障害などが挙げられる。血栓形成亢進に起因し得る疾患としては、例えば、心筋梗塞、末梢血管障害（PAD）などが挙げられる。炎症性疾患としては、例えば、肥満により誘発され得る炎症、大動脈瘤における炎症などが挙げられる。

。腎臓細胞機能低下に起因し得る疾患としては、例えば、糖尿病性腎症、IgA腎症、慢性腎不全、急性腎不全などが挙げられる。血管弛緩作用の抑制に起因し得る疾患としては、例えば、腎障害、虚血再灌流障害などが挙げられる。虚血性疾患としては、例えば、心筋梗塞、狭心症などが挙げられる。癌疾患としては、例えば、扁平上皮がん、乳がん、すい臓がんなどが挙げられる。TSP1は、扁平上皮がん、乳がん、およびすい臓がんの進行を促進することが報告されている（例えば、前記非特許文献21、第39頁左欄、下から14行～右欄3行、およびTable 4参照）。

[0098] 本発明の医薬組成物Iは、優れたTSP1阻害活性を有しており、血流改善作用を有し得る。そのため、血流を改善することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防に有用である。例えばそのような疾患としては、包括的高度慢性下肢虚血、重症下肢虚血、末梢動脈疾患、心筋梗塞、狭心症、腎障害、虚血再灌流障害が挙げられる。また、包括的高度慢性下肢虚血としては、例えば、糖尿病性足病変が挙げられ、糖尿病性足病変としては、例えば、糖尿病性足潰瘍が挙げられる。

[0099] 好ましい態様において、本発明の医薬組成物Iは、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防に有用であり、例えば、重症下肢虚血患者における創傷治癒の促進および重症下肢虚血に対する血管内治療の予後の改善に有用である。

[0100] TSP1は、重症下肢虚血患者の下肢骨格筋中でその発現が亢進していることが知られている。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本発明の医薬組成物Iは、TSP1と血管内皮細胞との接着を阻害することにより、TSP1によって阻害されている血管新生または血管拡張を促進することができると考えられる。それにより本発明の医薬組成物Iは、重症下肢虚血患者における創傷治癒を促進することができ、またカテーテルなどによる血管内治療と組み合わせた場合に当該治療の予後を改善する（例えば、再狭窄を予防する）ことができる。

[0101] 本明細書中、疾患または症状の治療または予防には、該疾患の発症の予防

、増悪または進行の抑制または阻害、該疾患に罹患した個体が呈する一つ以上の症状の軽減または増悪もしくはは進行の抑制、二次性疾患の治療または予防などが含まれる。

[0102] 本発明の医薬組成物Ⅰは、本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩と、適宜の薬学上許容される添加剤とを混合して製剤化することができる。例えば、本発明の医薬組成物Ⅰは、錠剤、カプセル剤、顆粒剤などの製剤として経口的に、または、注射剤、経皮吸収剤などの製剤として非経口的に投与することができる。

[0103] これらの製剤は、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、乳化剤、安定剤、希釈剤、注射剤用溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤などの添加剤を用いて、周知の方法で製造される。

[0104] 賦形剤としては、例えば、有機系賦形剤または無機系賦形剤が挙げられる。有機系賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖のような糖誘導体；トウモロコシデンプン、馬鈴薯デンプンのようなデンプン誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴムなどが挙げられる。無機系賦形剤としては、例えば、硫酸カルシウムのような硫酸塩が挙げられる。

[0105] 結合剤としては、例えば、上記の賦形剤；ゼラチン；ポリビニルピロリドン；ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

[0106] 崩壊剤としては、例えば、上記の賦形剤；クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムのような化学修飾された、デンプンまたはセルロース誘導体；架橋ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

[0107] 滑沢剤としては、例えば、タルク；ステアリン酸；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイロウのようなワックス類；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；ラウリル硫酸ナトリウムのようなラウリル硫酸塩；上記の賦形剤におけるデンプン誘導体などが挙げられる。

[0108] 乳化剤としては、例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；ラウリル硫酸ナトリウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；ポリオキシエチレンアルキルエーテル

のような非イオン界面活性剤などが挙げられる。

- [0109] 安定剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラヒドロキシ安息香酸エステル類；クロロブタノールのようなアルコール類；フェノール、クレゾールのようなフェノール類などが挙げられる。
- [0110] 希釈剤としては、例えば、水、エタノール、プロピレングリコールなどが挙げられる。
- [0111] 注射剤用溶剤としては、例えば、水、エタノール、グリセリンなどが挙げられる。
- [0112] 溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。
- [0113] 懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。
- [0114] 等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。
- [0115] 緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。
- [0116] 無痛化剤としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。
- [0117] 防腐剤としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。
- [0118] 抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

[0119] 本発明の医薬組成物Ⅰが投与される対象は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

[0120] 本発明の医薬組成物Ⅰの投与経路としては、経口投与および非経口投与のいずれでもよく、対象となる疾患に応じて好適な投与経路を選択すればよい。また投与経路は、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。本発明の医薬組成物Ⅰの投与経路の好ましい態様は、静脈内投与、皮下投与、または経皮投与である。

[0121] 本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩は、治療または予防に有効な量で対象に投与される。本明細書中、「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与経路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。

[0122] 本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩の投与量は、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定され、ヒトの成人に対しては、通常、 $0.1 \sim 1000 \text{ mg/kg}$ 、好適には $0.1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ を、 $1 \sim 7$ 日間に1回、または1日2回もしくは3回以上投与することができる。

[0123] 本発明の医薬組成物Ⅰは、少なくとも1つの既知の治療剤または治療法と併用してもよい。例えば、重症下肢虚血の治療においては、カテーテルなどの血管内治療の前に、後に、または同時に、本発明の医薬組成物Ⅰを投与することができる。

本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩は、薬剤溶出性ステント（DES）によって送達することができる。薬剤溶出性ステントとは、ステント表面に薬剤を担持させ、血管内留置後、薬剤が徐々に溶出されるようにしたステントをいう。

[0124] また本発明は、本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩の

治療または予防に有効な量を、それを必要とする対象に投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法に関する。

[0125] 本発明における「対象」は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

[0126] 本発明における「投与すること」には、経口投与および非経口投与が含まれ、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。本発明における「投与すること」の好ましい態様は、静脈内投与、皮下投与、または経皮投与である。

[0127] 本発明における「疾患または症状」としては、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状が挙げられる。本発明によれば、例えば、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血を治療または予防することができる。

[0128] III. コンジュゲート体

本発明はさらに、環状ペプチドとキャリア分子とが結合している、コンジュゲート体またはその薬学上許容される塩を提供する。

[0129] 1. キャリア分子

本発明のコンジュゲート体において、キャリア分子は、環状ペプチドと結合することで体内動態を改善させるキャリアとして機能する。本発明のキャリア分子は、環状ペプチドのキャリアとして機能し、かつ、本発明のコンジュゲート体がTSP-1阻害効果を発揮し得る（すなわちTSP-1阻害活性を有する）限り、特定の分子に限定されず、例えば、種々の天然高分子、合成高分子であり得、好適には天然又は非天然のタンパク質が採用され得る。また体内動態の観点から、本発明のキャリア分子は新生児型Fc受容体（FcRn）との結合親和性を有する。FcRnとの結合親和性をもつことで、FcRnを介したリサイクリング機構を利用することができ、本発明のコンジュゲート体の血中半減期を伸ばすことができる。したがって、本発明のキャリア分

子は、環状ペプチドと結合することが可能な分子であり、かつ、FcRnとの結合親和性を有する。そのようなFcRnとの結合親和性をもつキャリア分子としてタンパク質を採用する場合、キャリア分子は、例えば、ヒト血清アルブミンまたはその断片もしくは改変体、アルブミン結合タンパク、及び後述するFc含有分子であり得る。キャリア分子は、化学合成、無細胞翻訳系、動物細胞を用いたタンパク質合成系などの公知の技術によって製造することができる。

[0130] キャリア分子がFcRnとの結合親和性をもつことは、表面プラズモン共鳴（SPR）技術などを用いて常法により測定すればよい。測定には市販の装置、例えばBiacore（GE Healthcare）などを用いることができる。本発明におけるキャリア分子は、ヒト血清アルブミン、ヒトIgGなどのFcRnと結合することが知られている分子と同程度のFcRnとの結合親和性を有していることが好ましい。

[0131] ヒト血清アルブミンは、血漿中に最も豊富に存在するタンパク質であり、相同性の高い3つのドメイン（ドメインI、ドメインII、ドメインIII）からなり、さらに各ドメインは2つのサブドメイン（A、B）から構成される。特に、ヒト血清アルブミンのドメインIIIは、ヒト血清アルブミンとFcRnとの結合に重要であることが知られている（特表2019-513724およびStructure, 2013, 21, 1966-1978）。ヒト血清アルブミンは、FcRnとの結合親和性をもち、血中半減期が約20日間と長いため、体内動態を改善するためのキャリア分子として好ましく、アルブミンを利用した技術が開発されている。ヒト血清アルブミンまたはその断片もしくは改変体と環状ペプチドとの結合方法は、環状ペプチドのキャリア分子として機能し、かつ、本発明のコンジュゲート体がTSP-1阻害効果を発揮し得る限り特に限定されず、公知の方法を用いることができる。そのような方法としては、例えば、ヒト血清アルブミンに含まれるシステイン残基を介して結合させる方法（Org. Biomol. Chem., 2019, 17, 7870-7873）、トランスグルタミナーゼによってヒト血清アルブミンに含まれるグルタミン残基を介して結合させる

方法、及びヒト血清アルブミンに含まれるリジン残基を介した結合等が挙げられる。本発明のキャリア分子として、ヒト血清アルブミンの断片または改変体を採用する場合、FcRnとの結合親和性及び環状ペプチドとの結合部位を保持している限りどのような断片または改変体であってもよいが、ヒト血清アルブミンのドメインIII及び環状ペプチドとの結合部位を含むことが好ましい。本発明のキャリア分子としては、全長ヒト血清アルブミンがより好ましい。

[0132] 本発明のFc含有分子は、環状ペプチドと結合してコンジュゲート体を形成し、血中で環状ペプチドを長時間持続させるためのキャリアとして機能する。本発明のFc含有分子は、IgGに由来するFc領域の全部又は一部を少なくとも含む分子をいう。本発明のFc含有分子としては、完全長IgG、完全長IgG重鎖、Fc領域の全部又は一部を含むIgGの断片、それらのアミノ酸配列を部分的に欠失したかもしくは改変した改変体などを挙げることができる。また、本発明のFc含有分子は、重鎖のみでも良く、重鎖の構造に対応した軽鎖を有していても良い。IgGは2本の重鎖と2本の軽鎖がジスルフィド結合と非共有結合を介して保持されたヘテロ二量体タンパク質である。重鎖と軽鎖はそれぞれ可変領域と定常領域を有し、可変領域において抗原を認識する。また、重鎖の定常領域はさらにCH1ドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含み、CH1ドメインとCH2ドメインはヒンジ部位を介して連結されている。IgGはドメイン構造を有しており、可変領域を含み抗原結合能を有するFab領域 (antigen-binding fragment) と、Fc受容体と結合するFc領域 (fragment crystallizable) とからなる。Fc領域は、IgG重鎖の一部であって、パパインによって切断を受けるヒンジ部位のN末端からC末端までの領域をいい、IgG重鎖の定常領域に由来するヒンジ部位の一部、CH2ドメイン、及びCH3ドメインからなる領域をいう。ヒトIgG1におけるFc領域に相当するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号148のアミノ酸番号1～232、2～232、3～232、4～232、5～232、6～232、7～232、8～232

、9～232、10～232、または11～232の配列 (Edelman et al., (Proc. Natl. Acad. USA, (1969) Vol. 63, pp. 78-85)において特定されているEuインデックス (Eu INDEX) では、それぞれ、216～447位、217～447位、218～447位、219～447位、220～447位、221～447位、222～447位、223～447位、224～447位、225～447位、および226～447位に相当する。)を挙げることができる。またFc領域は、FcRnとの結合親和性を有しており、FcRnとの結合を介してIgGのリサイクリング機構に関与している。このFcRnとの結合には、CH2ドメイン、及びCH3ドメインのアミノ酸残基が関与している。したがって、本発明のFc含有分子は、FcRnとの結合親和性を保持するために、CH2ドメイン及びCH3ドメインを有することが好ましい。本発明のFc含有分子について「重鎖」という場合、完全長の重鎖、Fc領域の全部又は一部を含むIgGの断片における重鎖、それらのアミノ酸配列を部分的に欠失したかもしくは改変した改変体などが含まれ得る。また本発明のFc含有分子について「軽鎖」という場合、完全長の軽鎖、そのアミノ酸配列を部分的に欠失したかもしくは改変した改変体などが含まれ得る。

[0133] Fc含有分子と環状ペプチドとの結合方法は、環状ペプチドのキャリアとして機能し、かつ、本発明のコンジュゲート体がTSP-1阻害効果を発揮し得る限り特に限定されず、公知の方法を用いることができる。そのような方法としては、例えば、Fc含有分子に含まれる糖鎖を介して結合させる方法、Fc含有分子に含まれるシステイン残基を介して結合させる方法、特定の位置のアミノ酸残基をシステイン残基に変異させ、そのシステイン残基を介して結合させる方法、トランスグルタミナーゼによってFc含有分子に含まれるグルタミン残基を介して結合させる方法、特定の位置のアミノ酸残基をグルタミン残基に変異させ、トランスグルタミナーゼによってそのグルタミン残基を介して結合させる方法等が挙げられる。好ましい態様において、本発明のFc含有分子は、IgG重鎖のFc領域においてよく保存されたN結合型糖

鎖による修飾を受けるアスパラギン残基（「Asn297」（E u インデックスの297位のA s n）という）の側鎖に結合する糖鎖（「N297結合糖鎖」という）を介して、またはI g G重鎖のF c領域のヒンジ部位においてよく保存されたCys226（E u インデックスの226位のC y s）及び／もしくはCys229（E u インデックスの229位のC y s）のチオール基を介して、環状ペプチドと連結する。そのため、本発明のF c含有分子は、少なくともAsn297に相当するヒトI g GのF c領域中のアミノ酸残基、又は、Cys226もしくはCys229に相当するヒトI g Gのヒンジ部位のアミノ酸残基を有することが好ましい。

[0134] 本発明のキャリア分子として本発明のF c含有分子を採用する場合、F c R nとの結合親和性及び環状ペプチドとの結合部位を保持している限り、その配列は特に限定されないが、C H 2ドメイン及びC H 3ドメインに相当するアミノ酸配列と、Asn297に相当するヒトI g GのF c領域中のアミノ酸残基、又は、Cys226及び／もしくはCys229に相当するヒトI g Gのヒンジ部位のアミノ酸残基とを含むことが好ましい。そのようなF c含有分子としては、例えば、完全長ヒトI g G、完全長ヒトI g G重鎖、またはF c領域の全部又は一部を含むヒトI g Gの断片、あるいはそのアミノ酸配列を部分的に欠失したかもしくは改変した改変体などを挙げることができる。また、本発明のF c含有分子は、重鎖のみでも良く、重鎖の構造に対応した軽鎖を有していても良い。

[0135] 本発明のF c含有分子には、F c含有分子が生物学的な修飾を受けた修飾体も含まれる。生物学的な修飾には、翻訳後修飾（例えば、N－結合又はO－結合への糖鎖付加、N末又はC末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによってN末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。

[0136] なお、動物細胞で生産される抗体では、その重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Journal of Chromatography A, 70

5: 129-134(1995))、また、同じく重鎖のカルボキシル末端のグリシンおよびリジンの2個のアミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている (Analytical Biochemistry, 360: 75-83(2007))。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能 (補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等) には影響を及ぼさない。したがって、本発明に係るFc含有分子には、当該修飾を受けたFc含有分子及び当該Fc含有分子の機能性断片も含まれ、重鎖のカルボキシル末端において1又は2個のアミノ酸残基が欠失した欠失体、及びカルボキシル末端のアミノ酸残基がアミド化された当該欠失体 (例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖) 等も包含される。但し、環状ペプチドのキャリアとして機能し、かつ、本発明のコンジュゲート体がTSP-1阻害効果を発揮し得る限り、本発明に係るFc含有分子の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係るFc含有分子が2本の重鎖を含む場合、それらは、カルボキシル末端に欠失を有しない重鎖及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係るFc含有分子を産生する動物細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係るFc含有分子としては、好ましくは2本の重鎖の双方でカルボキシル末端のひとつのアミノ酸残基が欠失しているものを挙げることができる。

[0137] 一態様において、本発明のFc含有分子は、N-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N末端のプロセッシング、C末端のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末端へのメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化及び重鎖のカルボキシル末端における1又は2個のアミノ酸残基の欠失からなる群より選択される1又は2以上の修飾を含み得る。

[0138] 本発明のFc含有分子の元となるIgGのサブクラスは特に限定されず、いずれのサブクラスを選択しても良いが、好ましくはIgG1、IgG2、

I g G 3 又は I g G 4 であり、より好ましくは I g G 1 であり、さらにより好ましくはヒト I g G 1 である。I g G の定常領域におけるアミノ酸配列はよく保存されており、Edelman et al., (Proc. Natl. Acad. USA, (1969) Vol . 63, pp. 78-85)においてそれぞれのアミノ酸が E u インデックス (Eu INDEX) で特定されている。例えば、F c 領域において N 結合型糖鎖が付加する Asn297 は、E u インデックスにおいて 297 位に相当し、ヒンジ部位においてリンカー構造が連結する Cys226 及び Cys229 は、E u インデックスにおいてそれぞれ 226 位及び 229 位に相当する。また、本発明の F c 含有分子に採用し得るヒト I g G 由来の F c 領域、ヒンジ部位、及び重鎖の定常領域は、それぞれ、E u インデックスにおける、216～447 位、216～230 位、及び 118～447 位のアミノ酸配列の領域に相当する。本発明の F c 含有分子に採用し得るヒト I g G 1 由来の F c 領域、ヒンジ領域、軽鎖の定常領域及び重鎖の定常領域に相当する具体的なアミノ酸配列としては、例えば、それぞれ、配列番号 129 (ヒト I g G 1 重鎖定常領域のアミノ酸配列 ; 当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は配列番号 128) のアミノ酸番号 118～349 のアミノ酸配列 (ただし N 末端はアミノ酸番号 128 まで短縮され得る)、配列番号 129 のアミノ酸番号 118～132 のアミノ酸配列、配列番号 131 (ヒト I g G 1 軽鎖定常領域のアミノ酸配列 ; 当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は配列番号 130) のアミノ酸番号 21～125 のアミノ酸配列 (アミノ酸番号 1～20 はシグナルペプチド)、及び配列番号 129 のアミノ酸番号 20～349 のアミノ酸配列 (アミノ酸番号 1～19 はシグナルペプチド) が挙げられる。分子の断片化や領域欠失によって実際のアミノ酸位置が変動した場合であっても E u インデックスで表示することによってアミノ酸が一義的に特定される。なお、本発明の F c 含有分子に採用し得るヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3 又はヒト I g G 4 の定常領域に関し、Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242 に複数のアロタイプ配列が報告されているが、いずれも本発明の F c 含有分子に採用し得る。例えば、

ヒト IgG1 の配列において、E u インデックスで示される 356 及び 358 位の アミノ酸配列にはそれぞれ D と E、及び L と M があるが、いずれも本発明の Fc 含有分子に採用し得る。

[0139] 本発明の Fc 含有分子として完全長 IgG を採用する場合、環状ペプチドのキャリアとして機能し、かつ、本発明のコンジュゲート体が TSP-1 阻害効果を発揮し得るものであればよい。一態様において、可変領域においてヒトの体内に通常存在する物質を抗原として認識しない IgG を採用し得る。非ヒト動物のタンパク質を抗原とした IgG はヒトの対応分子・関連分子が存在する場合はヒトの分子に交差反応性を示す可能性があるため、ヒトが対応分子・関連分子を持たない抗原に対するモノクローナル抗体を選択するのが好ましい。また、ヒト体内の成分を抗原として認識する恐れがある IgG であっても、当該抗原を認識することが本発明のコンジュゲート体による TSP-1 阻害効果の発揮に不利な影響がない場合にはそのような IgG を採用し得る。一方、当該抗原を認識することが本発明のコンジュゲート体による TSP-1 阻害効果の発揮に不利な影響がある場合でも、遺伝子工学的手法によって、その可変領域に変異を導入し、当該抗原認識能を減弱または欠失させた場合、それらの分子を本発明の Fc 含有分子として採用することができる。本発明の Fc 含有分子に用いられる完全長 IgG として、好ましくは、哺乳動物以外の生物に由来する分子を抗原とする IgG であり、より好ましくは、微生物由来の分子を抗原とした IgG である。そのような微生物由来の分子を抗原とした IgG としては、例えば、リポポリサッカライド (LPS) を抗原とした IgG が挙げられる。このようなモノクローナル抗体は、例えば、W02015/046505 等に記載されており、具体的には配列番号 125 のアミノ酸番号 20～474 のアミノ酸配列からなる重鎖 (アミノ酸番号 1～19 はシグナルペプチド；当該重鎖をコードするヌクレオチド配列は配列番号 124)、及び、配列番号 127 のアミノ酸番号 21～234 のアミノ酸配列からなる軽鎖 (アミノ酸番号 1～20 はシグナルペプチド；該軽鎖をコードするヌクレオチド配列は配列番号 126) の組み合わせからなる mAb-A などが挙げられる。

。

[0140] 本発明のFc含有分子としてFc領域の全部又は一部を含む抗体断片を採用する場合、環状ペプチドのキャリアとして機能し、かつ、本発明のコンジュゲート体がTSP-1阻害効果を発揮し得るものであればよい。例えば、IgGの重鎖から可変領域を欠失させた定常領域のみからなるCH、IgGのFc領域のみからなる分子、又はIgGのFc領域の一部のみからなる分子を採用し得る。

ヒトIgG1重鎖から可変領域を欠失させた定常領域のみからなるCHの具体的なアミノ酸配列としては、例えば、配列番号129のアミノ酸番号20～349のアミノ酸配列（アミノ酸番号1～19はシグナルペプチド；該CHをコードするヌクレオチド配列は配列番号128）を挙げることができる。本発明のFc含有分子としてCHを選択する場合、CHのみを採用してもよく、軽鎖の定常領域のみからなるCLと組み合わせたCLCHとして採用することもできる。IgG1軽鎖のCLの具体的なアミノ酸配列としては、例えば、配列番号131のアミノ酸番号21～125（アミノ酸番号1～20のアミノ酸はシグナルペプチド；該CLをコードするヌクレオチド配列は配列番号130）を挙げることができ、CLCHとしては、例えば、配列番号129で示されるCHと配列番号131で示されるCLとを組み合わせたCLCHが挙げられる。

ヒトIgG1のFc領域の一部からなる分子の具体的なアミノ酸配列としては、例えば、配列番号135のアミノ酸番号21～243のアミノ酸配列（アミノ酸番号1～20はシグナルペプチド；該Fc領域に相当するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は配列番号134）を挙げることができる。

[0141] 本発明のFc含有分子として、完全長IgG、完全長IgG重鎖、または、Fc領域の全部もしくは一部を含むIgGの断片、それらのアミノ酸配列を部分的に欠失したかもしくは改変した改変体を採用する場合、FcRnとの結合親和性及び環状ペプチドとの結合部位を保持しているものであればよ

い。本発明のFc含有分子の由来として、ヒト体内の成分に対する抗原認識能を保持した状態で可変領域の全部又は一部を有する抗体分子を採用する場合であって、当該抗原を認識することが本発明のコンジュゲート体によるTSP-1阻害効果の発揮に不利な影響がある場合、遺伝子工学的手法によって、その可変領域に変異を導入し、当該抗原認識能を減弱または欠失させることが好ましい。すなわち、一態様において、本発明のFc含有分子は、IgGの可変領域を欠失したか又は抗原認識能が減弱または欠失するように改変された改変体であり得る。そのような改変体として、例えば、上述した、ヒトIgG1重鎖から可変領域を欠失させた定常領域のみからなるCH、軽鎖の定常領域のみからなるCLとCHとを組み合わせたCLCH、及び、Fc領域の全部または一部を含むIgGの断片が挙げられる。本発明のFc含有分子として採用される、アミノ酸配列を部分的に改変した改変体としては、例えば、改変前のアミノ酸配列に対して高い相同性（例えば80%以上、90%以上、95%以上、または99%以上の相同性）を有するアミノ酸配列、又は1乃至数個（例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個又は10個）のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつFcRnとの結合親和性及び環状ペプチドとの結合部位を保持している分子が挙げられる。

[0142] 本発明のFc含有分子として、Fc領域の全部もしくは一部を含むIgGの断片、または、そのアミノ酸配列を部分的に欠失したかもしくは改変した改変体を採用する場合、FcRnとの結合親和性及び環状ペプチドとの結合部位を保持しているものであればよい。FcRnとの結合親和性を保持するためには、CH2ドメイン及びCH3ドメインを有することが好ましく、Fc含有分子の構造的自由度を高める観点において、さらにヒンジ部位の全部または一部を含むことが好ましい。したがって、そのようなFc含有分子としては、例えば、IgGのCH2ドメイン、CH3ドメイン、及びヒンジ部位の一部からなる断片を採用し得る。ヒンジ部位をFc含有分子と環状ペプチドとの結合部位として採用しない場合には、ヒンジ部位に相当する配列の

長さを適宜調整してFc含有分子に含めることができるが、CPPC（Euインデックスにおける226～229位に相当するアミノ酸配列；例えば配列番号129のアミノ酸番号128～131）を含むことが好ましい。本発明のFc含有分子に含まれるヒンジ部位としては、例えば、Euインデックスにおける221～230位、222～230位、223～230位、224～230位、225～230位、および226～230位に相当するヒンジ部位のアミノ酸配列が挙げられる。ヒトIgG1においてこれらの配列は、それぞれ、DKHTCPPC、KTHTCPPC、THTCPPC、HTCPPC、TCPPC、およびCPPC（それぞれ配列番号129のアミノ酸番号123～132、122～132、123～132、124～132、125～132、126～132、127～132、および128～132の配列）である。このようなヒンジ部位を含む抗体断片のうち、ヒトIgG1に由来するものの例としては、配列番号129の118位Glu～349位Lysのアミノ酸配列において、N末端から連続する1～10個のアミノ酸が欠失しても良いアミノ酸配列からなるFc含有分子又はそのアミノ酸配列が改変された改変体が挙げられ、好ましくは、配列番号129の123位Asp～349位Lys、124位Lys～349位Lys、125位Thr～349位Lys、126位His～349位Lys、127位Thr～349位Lys、又は128位Cys～349位LysからなるFc含有分子である。また、ヒトIgG1に由来する抗体断片としては、配列番号135のアミノ酸番号22～243のアミノ酸配列、配列番号137のアミノ酸番号26～247のアミノ酸配列（Euインデックスにおける234位に相当するLeu残基（Leu234）および235位に相当するLeu残基（Leu235）がAlaに置換されている）、もしくは、配列番号139のアミノ酸番号26～247のアミノ酸配列（Euインデックスにおける234位に相当するLeu残基（Leu234）および235位に相当するLeu残基（Leu235）がAlaに置換されており、329位に相当するPro残基（Pro329）がAlaに置換されている）、又はそれらのN末端に、T、HT、THT、KTHT若しくはDKTHTが付加されたアミノ酸配列からなるFc

c含有分子或いはそれらのアミノ酸配列が改変された改変体を例示することができる。好ましくは、本発明のFc含有分子は、配列番号135のアミノ酸番号21～243のアミノ酸配列からなるポリペプチド（本明細書中、Fc-Bともいう）、配列番号137のアミノ酸番号25～247のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号137のアミノ酸番号21～247のアミノ酸配列からなるポリペプチド（本明細書中、Fc-Aともいう）、配列番号139のアミノ酸番号25～247のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列番号139のアミノ酸番号21～247のアミノ酸配列からなるポリペプチド（本明細書中、Fc-Cともいう）、あるいはその改変体であり得る。これらのFc断片におけるAsn297は、配列番号135では93位のAsnであり、配列番号137では97位のAsnであり、配列番号139では97位のAsnである。これらのFc断片におけるCys226は、配列番号135では22位のCysであり、配列番号137では26位のCysであり、配列番号139では26位のCysである。これらのFc断片におけるCys229は、配列番号135では25位のCysであり、配列番号137では29位のCysであり、配列番号139では29位のCysである。

[0143] また、本発明のFc含有分子として抗体断片又は改変体を設計する場合、環状ペプチドとの結合に寄与するCys226、Cys229、又はAsn297及びその周辺のアミノ酸を保持しつつ、キャリアタンパクとしての機能を損なわない範囲で、1～数箇所（好ましくは5箇所以下、より好ましくは3、2又は1箇所）において、1～数個（改変箇所当たり、好ましくは20個以下、より好ましくは15個以下、さらに好ましくは10個以下、さらにより好ましくは7、6、5、4、3、2又は1個）のアミノ酸を、置換、欠失、挿入及び／又は付加させた改変体を採用しても良い。アミノ酸配列の改変の箇所の例として、N末端、及び、C末端においてアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加等が行われ得る。特にN末端のアミノ酸は生物工学的手法でFc含有分子を産生させる際に影響する場合があります、所望の生産系に適したアミノ酸配列へと改変させることができる。そのようなアミノ酸配列の改変体としては、例

例えば、ヒト IgG 重鎖カルボキシル末端において 1 又は 2 個のアミノ酸残基を欠失させた改変体（例えば、カルボキシル末端部位の E u インデックスによる 447 位に相当するリジン残基を欠失させた重鎖、または当該リジン残基及び E u インデックスによる 446 位に相当するグリシン残基を欠失させた重鎖）等が挙げられる。また、E u インデックスで、Leu234 - Leu235、又は Pro329 のアミノ酸は、抗体と Fc 受容体との結合による T 細胞活性化によるエフェクター活性発現に影響を与える部位であることが知られている。この Leu234 - Leu235 を Ala に置換する（得られる変異体を「LALA 体」という）、又はさらに Pro329 を Ala に置換する（得られる変異体を「LALAP 体」という）ことでこのエフェクター活性を消失させ、副作用リスクを低減させることができる場合があり（LALA 体について、米国特許公報 US588 5573）、必要に応じてこのような改変を施しても良い。CLCH-B（配列番号 133 のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域とそれに対応する配列番号 131 のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域とからなる抗体断片）は、CLCH-A（配列番号 129 のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域とそれに対応する配列番号 131 のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域とからなる抗体断片）の LALA 体であり、Fc-A は、Fc-B の LALA 体である。LALA 体は、ペプチドとのコンジュゲート体におけるキャリア分子として適切に機能することが確認されている（WO 2018/003983）。したがって、一態様において、本発明の Fc 含有分子は、ヒト IgG 重鎖における E u インデックスによる 234 位に相当するロイシン残基および 235 位に相当するロイシン残基のアラニン残基への置換を含むか、または、234 位に相当するロイシン残基、235 位に相当するロイシン残基、および 329 位に相当するプロリン残基のアラニン残基への置換を含み得る。

また、本発明の Fc 含有分子は、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N-結合又は O-結合炭水化物鎖等の化学修飾を付加させても良い。あるいは、目的分子の発現、精製効率の向上を目的として、シグナル配列、ペプチド分解酵素認識配列、GST のような Tag 配列を付加させても良い。

[0144] 一態様において、本発明のFc含有分子は、

- (a) 配列番号125のアミノ酸番号20～474のアミノ酸配列、
 - (b) (a)の配列に対して少なくとも95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列、
 - (c) (a)の配列において1乃至10個（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個）のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、および
 - (d) (a)の配列においてC末端のアミノ酸残基が1乃至3個（例えば、1個、2個、または3個）欠失しているアミノ酸配列
- からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖、ならびに
- (e) 配列番号127のアミノ酸番号21～234のアミノ酸配列、
 - (f) (e)の配列に対して少なくとも95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列、
 - (g) (e)の配列において1乃至10個（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個）のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、および
 - (h) (e)の配列においてC末端のアミノ酸残基が1乃至3個（例えば、1個、2個、または3個）欠失しているアミノ酸配列
- からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる抗体であり得る。

[0145] 一態様において、本発明のFc含有分子は、

- (a) 配列番号129のアミノ酸番号20～349のアミノ酸配列、
- (b) 配列番号133のアミノ酸番号20～349のアミノ酸配列、
- (c) (a)または(b)の配列に対して少なくとも95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列、

(d) (a) または (b) の配列において 1 乃至 10 個 (例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 10 個) のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、および

(e) (a) または (b) の配列において C 末端のアミノ酸残基が 1 乃至 3 個 (例えば、1 個、2 個、または 3 個) 欠失しているアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖、ならびに

(f) 配列番号 131 のアミノ酸番号 21～234 のアミノ酸配列、

(g) (f) の配列に対して少なくとも 95% 以上 (例えば、96% 以上、97% 以上、98% 以上、または 99% 以上) の相同性を有するアミノ酸配列、

(h) (f) の配列において 1 乃至 10 個 (例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 10 個) のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、および

(i) (f) の配列において C 末端のアミノ酸残基が 1 乃至 3 個 (例えば、1 個、2 個、または 3 個) 欠失しているアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる抗体であり得る。

[0146] 一態様において、本発明の Fc 含有分子は、

(a) 配列番号 129 のアミノ酸番号 20～349 のアミノ酸配列、

(b) 配列番号 133 のアミノ酸番号 20～349 のアミノ酸配列、

(c) (a) または (b) の配列に対して少なくとも 95% 以上 (例えば、96% 以上、97% 以上、98% 以上、または 99% 以上) の相同性を有するアミノ酸配列、

(d) (a) または (b) の配列において 1 乃至 10 個 (例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 10 個) のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、および

(e) (a) または (b) の配列において C 末端のアミノ酸残基が 1 乃至 3 個 (例えば、1 個、2 個、または 3 個) 欠失しているアミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるCHであり得る。

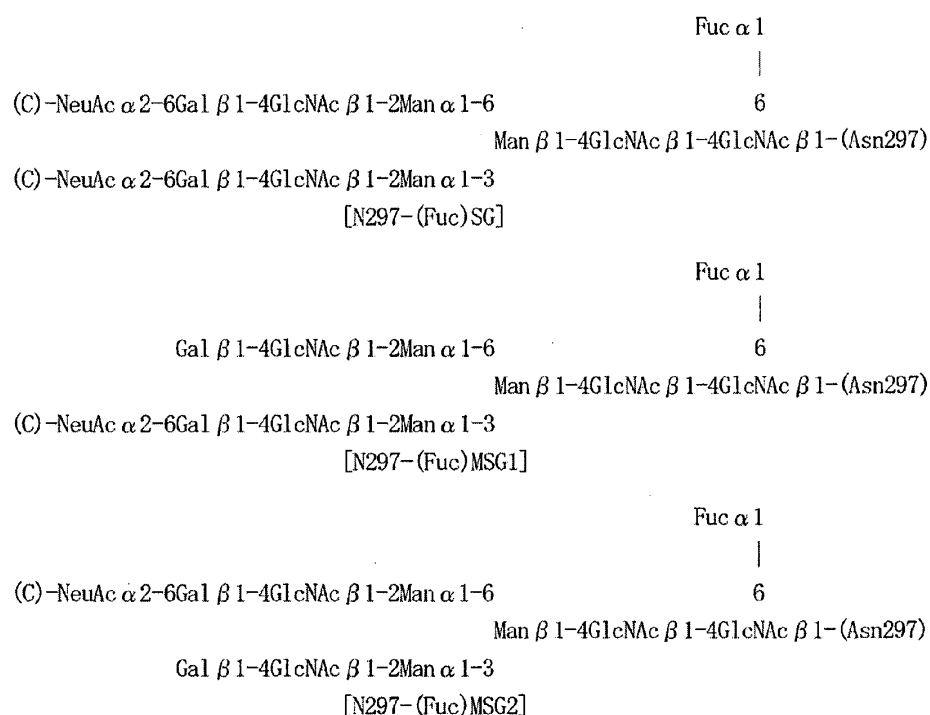
[0147] 一態様において、本発明のFc含有分子は、

- (a) 配列番号135のアミノ酸番号21～243のアミノ酸配列、
 - (b) 配列番号137のアミノ酸番号21～247のアミノ酸配列、
 - (c) 配列番号139のアミノ酸番号21～247のアミノ酸配列、
 - (d) (a)乃至(c)の配列に対して少なくとも95%以上(例えば、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上)の相同性を有するアミノ酸配列、
 - (e) (a)乃至(c)の配列において1乃至10個(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個)のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、および
 - (f) (a)乃至(c)の配列においてC末端のアミノ酸残基が1乃至3個(例えば、1個、2個、または3個)欠失しているアミノ酸配列
- からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるFc断片であり得る。

[0148] (1) N297結合糖鎖を介して環状ペプチドと結合するFc含有分子

一態様において、本発明のコンジュゲート体は、Fc含有分子のN297結合糖鎖を介して環状ペプチドと結合した化合物であり得る。本発明に用いられるFc含有分子は、動物細胞を用いて産生させた場合、その過程で翻訳後修飾を受け、Asn297に不均一な糖鎖が付加され得る。好ましい態様において、Fc含有分子は、N297結合糖鎖が以下のいずれかの構造からなるSG型糖鎖にリモデリングされたもの(SG型N297結合糖鎖)であり得る。

[化103]



(式中、(C)は、連結基Cがシアル酸の2位に結合したカルボニル基と結合することを表し、(Asn297)は、Fc含有分子のAsn297の側鎖とNグリコシド結合することを表す。)

[0149] 好ましい態様において、Fc含有分子のN297結合糖鎖は、N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1およびN297-(Fuc)MSG2から選択される少なくとも1つであり得る。より好ましくは、Fc含有分子のN297結合糖鎖は、N297-(Fuc)SGを含み、さらにより好ましくは、Fc含有分子のN297結合糖鎖は、N297-(Fuc)SGであり得る。

[0150] 通常は、動物細胞からの産生時に、二量体を構成する両方のモノマーのAsn297に糖鎖が付加し、二量体のFc含有分子当たり2つのN297結合糖鎖を有する通常体として産生される。しかし、産生条件やFc含有分子の構造によっては、一方のモノマーのみにN297結合糖鎖が付加した糖鎖欠損体（二量体のFc含有分子当たり1つのN297結合糖鎖を有する分子）が、一

定の割合で産生される場合がある。そのような、糖鎖欠損体を含むFc含有分子であっても、本発明に用いることができる。

[0151] 本発明のコンジュゲート体において、N297結合糖鎖が、N297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2である場合、Fc含有分子が二量体であり、通常両方のモノマーにN297結合糖鎖を有するため、コンジュゲート体は2つのリンカー構造及び環状ペプチドが結合された分子（2価のコンジュゲート体）となる（Fc含有分子が糖鎖欠損体の場合、一方のモノマーのみにN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2が付加し、1価のコンジュゲート体となる）。一方で、N297結合糖鎖が、N297-(Fuc)SGである場合、Fc含有分子が二量体であるため、コンジュゲート体は4つのリンカー構造及び環状ペプチドが結合された分子（4価のコンジュゲート体）となる（Fc含有分子が糖鎖欠損体の場合、一方のモノマーのみにN297-(Fuc)SGが付加し、2価のコンジュゲート体となる）。本発明のコンジュゲート体は、通常体と糖鎖欠損体との混合物（本発明において、このような混合物は、便宜上、通常体のコンジュゲート体として表記される）であってもよい。

また、本発明のコンジュゲート体は、複数種類のN297結合糖鎖を有する分子の混合物であってもよく、いずれか一つの構造からなるN297結合糖鎖を有する分子であってもよい。好ましい態様において、本発明のコンジュゲート体は、いずれか一つの構造からなるSG型N297結合糖鎖を有する分子であり、より好ましくはN297結合糖鎖としてN297-(Fuc)SGを有し、4つの環状ペプチドが結合された4価のコンジュゲート体（糖鎖欠損体では2価のコンジュゲート体）であり得る。

また、本発明のコンジュゲート体1分子に複数の環状ペプチドが含まれる場合、それらは単一の（1種類の）環状ペプチドであっても、複数種類の環状ペプチドの組み合わせであってもよい。本発明のコンジュゲート体は、単一の環状ペプチドを含むことが好ましく、単一の二環性ペプチドを含むことがより好ましい。

[0152] また、コンジュゲート体の合成反応において、SG型N297結合糖鎖の

シアル酸が未反応のまま残る場合がある。本発明のコンジュゲート体においては、1つのFc含有分子に少なくとも1つの環状ペプチドが結合している限り、上記糖鎖に未反応のシアル酸が含まれていてもよい。例えば、二量体を構成する一方のFc含有分子におけるN297-(Fuc)MSG1またはN297-(Fuc)MSG2のシアル酸が未反応のまま残り、1つの環状ペプチドが結合されたコンジュゲート体（1価のコンジュゲート体）となる場合があり得る。本発明のコンジュゲート体は、そのような1価のコンジュゲート体であってもよく、1価のコンジュゲート体と2価のコンジュゲート体との混合物であってもよい。また、例えば、二量体を構成する一方のFc含有分子におけるN297-(Fuc)SG（ジシアロ体）の一方または両方のシアル酸が未反応のまま残り、1～3個の環状ペプチドが結合されたコンジュゲート体（1～3価のコンジュゲート体）となる場合がある。本発明のコンジュゲート体は、1～4価のいずれのコンジュゲート体であってもよく、それらの混合物であってもよい。

[0153] SG型N297結合糖鎖の構造中、還元末端のフコース付加したGlcNAc(Fuc α 1,6)GlcNAcは、動物細胞で産生されたFc含有分子に由来し、それより非還元末端側の糖鎖は、SGと同様の糖鎖構造にリモデリングされたものであり得る。

[0154] このようなSG型N297結合糖鎖を有するFc含有分子は、例えばW02013/120066、W02018/003983などに記載の方法に準じて製造することができる。公知の方法に準じて、動物細胞を用いて遺伝子組み換えタンパク質としてFc含有分子を産生させた場合、N297結合糖鎖は、基本構造としてフコース付加したN結合型糖鎖構造を有するが、非還元末端の構造や構成糖に多様な修飾がされた様々な構造からなる糖鎖を有する抗体またはその断片の混合物が得られる。このように動物細胞で産生されたFc含有分子は、EndoSなどの加水分解酵素で処理することによって、還元末端のキトビオース構造のGlcNAc β 1-4GlcNAcの間のグリコシド結合が加水分解され、N297結合糖鎖として(Fuc α 1,6)GlcNAcのみを有する単一の糖鎖構造を有するFc含有分子（「(Fuc α 1,6)GlcNAc-Fc含有分子」という。）を得ることができる。

[0155] このようなN297結合糖鎖の加水分解反応に用いる酵素としては、EndoS又はその加水分解活性を保持した変異酵素などを用いることができる。上記の加水分解反応により得られた(Fuc α 1,6)GlcNAc-Fc含有分子を糖鎖アクセプター分子として、EndoS D233Q変異体のような糖転移酵素を用いてSG型糖鎖ドナー分子と反応させることによって、上述の構造からなるSG型N297結合糖鎖を有するFc含有分子を得ることができる。

[0156] 目的物が4価の環状ペプチドを有するコンジュゲート体である場合、この糖転移反応には糖鎖としてSG(10) (SGの糖鎖部分において還元末端のGlcNAcが一つ欠損した糖鎖)を有する糖鎖ドナー分子を用いることができる。このようなSG(10)糖鎖は、例えば、鶏卵の卵黄に含まれるシアリルグリコペプチド(以下、「SGP」)から加水分解等によって取得されたものを用いても良く、市販のジシアロオクタサッカリド(東京化成工業(株))のようなSG(10)糖鎖のみを用いても良い。

目的物が2価の環状ペプチドを有するコンジュゲート体である場合、糖鎖としてMSG1(9) (SG(10)の β -Manの分岐鎖の1-6糖鎖の非還元末端のシアル酸が欠失し、1-3糖鎖のみにシアル酸を有するもの)又はMSG2(9) (SG(10)の β -Manの分岐鎖の1-3糖鎖の非還元末端のシアル酸が欠失し、1-6糖鎖のみにシアル酸を有するもの)を有する糖鎖ドナー分子を用いることができる。このような糖鎖は、市販のmonosialo-Asn free (1S2G/1G2S-10NC-Asn、(株)糖鎖工学研究所)を原料にW02018/003983に記載の方法に準じて分離して採用することもできるし、分離せずに混合物として採用することもできる。

[0157] ドナー分子に含まれるSG型糖鎖の還元末端のGlcNAcは、例えば2-クロロ-1,3-ジメチル-1H-ベンズイミダゾール-3-イウム-クロライド処理によるオキサゾリン化のような形で活性化されたものを用いることが好ましいが、後述する2種類の酵素を同時に用いる場合は活性化の必要はない。

[0158] 糖鎖ドナー分子は、非還元末端にリンカー構造とFc含有分子との結合を形成するための官能基(例えばアジド基)を有していてもよい。例えば、糖鎖ドナー分子に含まれるSG型糖鎖は、その非還元末端のシアル酸に含まれ

るカルボン酸に、リンカー構造とFc含有分子との結合を形成するための官能基（例えばアジド基）を有していてもよい。

[0159] このような糖転移反応に用いる酵素としては、N297結合糖鎖に複合型糖鎖を転移させる活性を有するものであれば様々なものが採用できるが、好ましいものはEndoSの233番目のAspをGlnに置換することで加水分解反応を抑制した改変体であるEndoS D233Qである。EndoS D233Qを用いた糖転移反応については、W02013/120066などに記載されている。また、EndoS D233Qに対して、さらに変異を加えたEndoS D233Q/Q303L、EndoS D233Q/E350A、EndoS D233Q/E350Q、EndoS D233Q/E350D、EndoS D233Q/E350N、EndoS D233Q/D405Aなどのような改変体酵素を利用してもよい。このようなEndoS D233Qの改変体を用いた糖転移反応は、W02017/010559に記載されている。

[0160] Fc含有分子の糖鎖リモデリング（糖加水分解、及び糖転移反応）後のFc含有分子又はその中間体の精製操作は、通常、反応に使用した低分子化合物及び酵素との分離を目的として行われる。このような精製には、通常、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどが使用される。更にヒドロキシアパタイトカラムによる精製を行ってもよく、特に糖転移反応における効率向上の観点から、糖加水分解後の中間体の精製操作において用いることが好ましい（W02018/003983参照）。

[0161] 通常の糖転移反応は、糖鎖ドナーの還元末端が活性化されている必要があり、このような活性型ドナーの調製に時間とコストを要する。2種類の酵素を同時に用いることで、還元末端が活性化されていないSGPや(SG-)Asn（Asnの側鎖にSGが連結された構造）などを直接糖鎖ドナーとして、Fc含有分子のN297結合糖鎖へ糖転移させることができる（W02018/003983参照）。それにより、天然から取得されたか、又は、市販されている糖ペプチドなどを直接糖転移反応に使用でき、効率的な糖鎖リモデリングが可能となる。

使用する2種類のEndo酵素は、複合型糖鎖を広く基質とする酵素A（EndoM

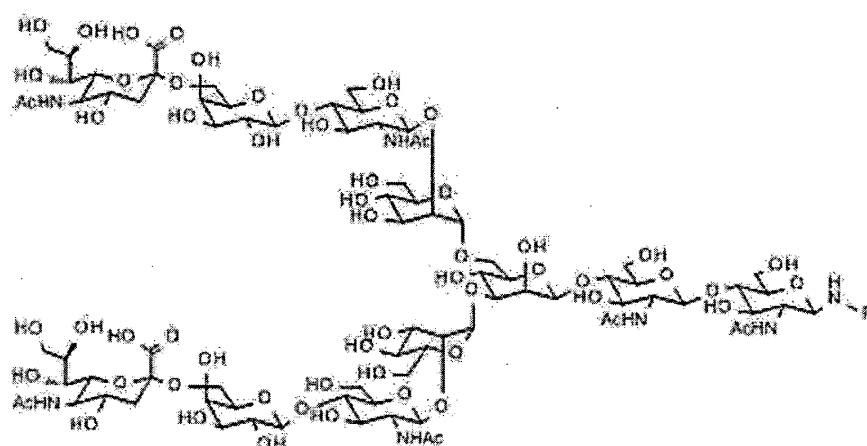
様酵素)とFc含有分子のN297結合糖鎖を基質とする酵素B(EndoS様酵素)を適切に組合せることが重要である。

酵素Aとしては、EndoM、EndoOm、EndoCCとその加水分解活性を低下させたEndoM変異体、EndoOm変異体、EndoCC変異体などを例示できる。酵素Aとして好ましいものは、EndoM N175Q、EndoCC N180H、EndoOm N194Qである。

酵素Bとしては、EndoS、EndoS2(EndoS49)及びそれらの加水分解活性を低下させたEndoS変異体、EndoS2(EndoS49)変異体などを例示できる。酵素Bとして好ましいものは、EndoS D233Q、EndoS D233Q/Q303L、EndoS D233Q/E350A、EndoS D233Q/E350Q、EndoS D233Q/E350D、EndoS D233Q/E350N、EndoS D233Q/D405Aなどである。

糖鎖ドナーの構造は、採用される酵素Aに認識される糖鎖構造を有するものであれば、特に限定されず、天然から取得されたもの、化学反応あるいは酵素反応との組み合わせで合成可能な分子など、様々なものを用いることができる。アノマー部位の置換基Rは、R=H以外、何を使用してもよい。N結合型糖鎖構造の場合(下記式参照。アノマー部位の置換基Rは下記構造式の還元末端のR)、アミド構造やアジドを例示できる。

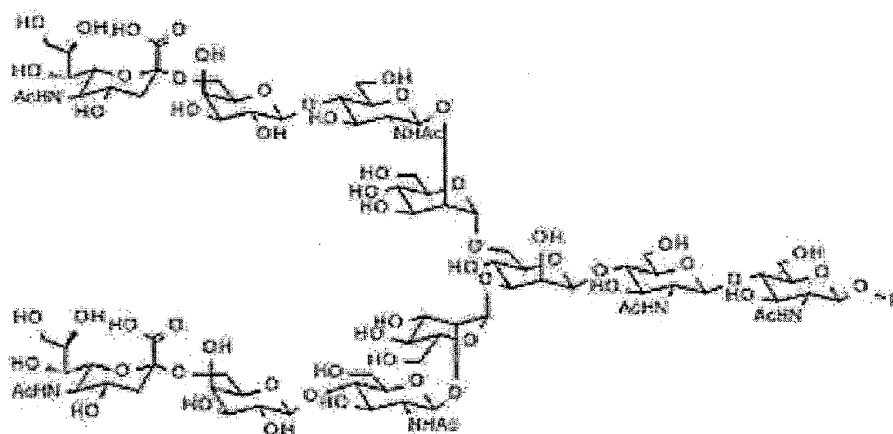
[化104]



O結合型糖鎖構造の場合(下記式参照。アノマー部位の置換基Rは下記構造式の還元末端のR)、エチレングリコール構造やグリコール酸構造、あるいは

アノマー水酸基の保護基として用いられるベンジル基、アリル基、パラニトロフェニル基などが例示できる。

[化105]



また、糖鎖ドナーの非還元末端の構造についても、酵素Aに認識されるものであれば特に限定されず、天然の糖鎖構造、天然の糖鎖構造から非還元末端糖鎖を欠失させたもの、任意の水酸基をリン酸修飾したもの、化学的にリンカー構造が結合したものなど、様々なものを使用することができる。好ましい糖鎖ドナーとしては、SGP、(SG-)Asn、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-Asn-PEG(3)-N₃などが挙げられる。

[0162] アクセプター分子としては、N297結合糖鎖を有するFc含有分子であれば特に制限なく、mAb、CLCH、Fc断片など様々なタイプのものを適宜選択して使用できる。糖転移反応における反応温度は、用いる酵素の至適温度に応じて適宜選択することができるが、通常15～50℃であり、好ましくは、25～40℃である。2種類の酵素を用いる方法では、一方の酵素の至適温度で他方の酵素が失活してしまうと、適切に転移反応が進まない場合がある。そのため、至適反応温度等の条件に近い酵素の組み合わせを選択するのが好ましい。

[0163] (2) チオール基を介して環状ペプチドと結合するFc含有分子

一態様において、本発明のコンジュゲート体は、Fc含有分子のチオール

基を介して環状ペプチドと結合した化合物であり得る。チオール基を有するFc含有分子は、当業者周知の方法で得ることができる（Hermanson, G. T, *Bioconjugate Techniques*, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)）。例えば、Traut's試薬をFc含有分子のアミノ基に作用させる；N-サクシンイミジルS-アセチルチオアルカノエート類をFc含有分子のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；N-サクシンイミジル3-（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、2-メルカプトエタノール、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP）等の還元剤をFc含有分子に作用させてFc含有分子内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元しチオール基を生成させる；などの方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。好ましい態様において、Fc含有分子のチオール基は、Fc含有分子内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元して生成させたチオール基であり得る。

一例として、還元剤としてTCEPを、Fc含有分子内ヒンジ部ジスルフィド一個当たりに対して0.3乃至3モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、Fc含有分子と反応させることで、Fc含有分子内ヒンジ部ジスルフィドが部分的もしくは完全に還元されたFc含有分子を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）やジエチレントリアミン5酢酸（DTPA）等を挙げることができる。これ等を1mM乃至20mMの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的な例において、Fc含有分子は4℃乃至37℃にて1乃至4時間TCEPと反応させることで部分的もしくは完全に還元されたチオール基を有するFc含有分子を得ることができる。得られたFc含有分子は、各種クロマトグラフィー、限外ろ過等によって適宜精製することができる。特に、環状ペプチド内のジスルフィド結合の還元を防ぐ観点から、還元剤を除去するため限

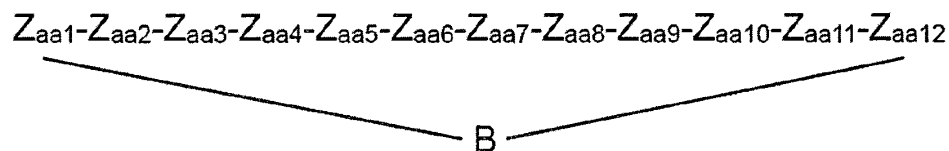
外ろ過等でFc含有分子を精製することが好ましい。

チオール基を環状ペプチドーリンカー部分に付加させる反応（例えば、マレイミド基とのマイケル付加反応など）を行うことで、チオエーテル結合によって環状ペプチドーリンカー部分を結合させることができる。

[0164] 2. 環状ペプチド

本発明のコンジュゲート体における環状ペプチドは、上記1に記載された本発明の環状ペプチドI、または下記式(X)

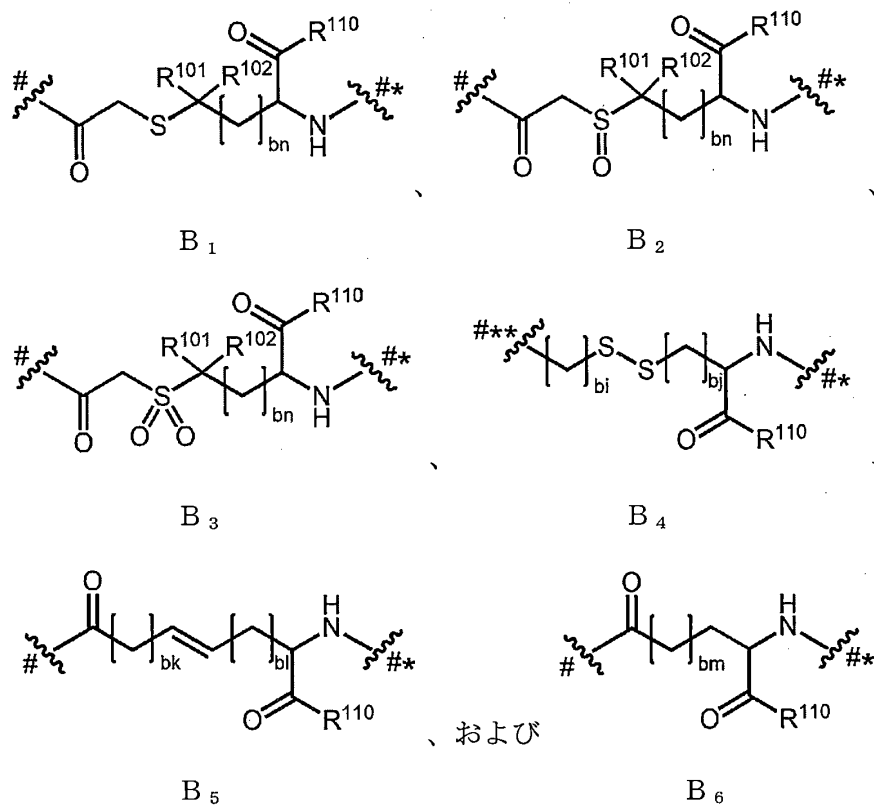
[化106]



で表される環状ペプチド（以下、本発明の環状ペプチドIIという）である。
本発明の環状ペプチドIIにおいては、 $Z_{aa1} \sim Z_{aa12}$ のアミノ酸、または Z_{aa1} が存在しない場合には $Z_{aa2} \sim Z_{aa12}$ のアミノ酸が、アミド結合により連結されてオリゴペプチド鎖が形成されており、N末端アミノ酸（ Z_{aa1} または Z_{aa2} ）とC末端アミノ酸（ Z_{aa12} ）とが環形成基Bを介して連結され環状構造が形成されている。

[0165] 式(X)において、Bは、アミノ酸構造を含む下記の環形成基 $B_1 \sim B_6$ ：

[化107]



から選択される。

[0166] Bにおいて、末端に記載されている

[化108]



は、Z_{aa1}のN末端アミノ基への結合点を示すか、またはZ_{aa1}が存在しない場合にはZ_{aa2}のN末端アミノ基への結合点を示し、

[化109]



は、Z_{aa12}のC末端カルボニル基への結合点を示し、

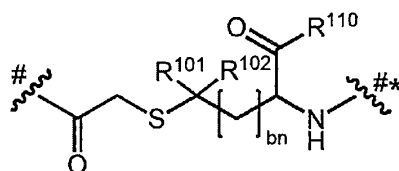
[化110]



は、 Z_{aa1} の α 炭素への結合点を示すか、または Z_{aa1} が存在しない場合には Z_{aa2} の α 炭素への結合点を示す。上記環形成基に含まれるアミノ酸構造の不斉点はR体であってもS体であってもよい。

[0167] 一態様において、Bは、

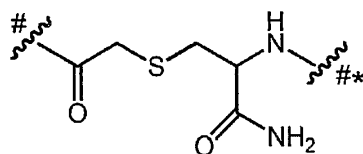
[化111]



である（以下、 B_1 という）。環形成基 B_1 において、 b_n は0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、 R^{101} および R^{102} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{110} はアミノまたはヒドロキシである。 C_{1-3} アルキルは、好ましくはメチルである。

[0168] B_1 の好ましい態様としては、 R^{101} および R^{102} がそれぞれ水素原子であり、 R^{110} がアミノであり、 b_n が0である、環形成基

[化112]

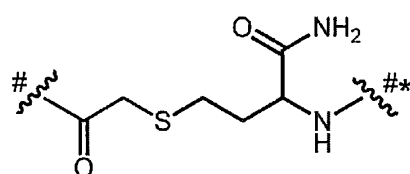


が挙げられる（以下、 B_{1a} という）。 B_{1a} は、例えば、 Z_{aa12} のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の-SHを、 Z_{aa1} または Z_{aa2} のN末端アミノ基に結合した $-COCH_2X$ （ X はClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合

、CysはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、B_{1a}においてZ_{aa12}のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である場合の環形成基を、B_{1a1}という。

[0169] B₁の好ましい別の態様としては、R¹⁰¹およびR¹⁰²がそれぞれ水素原子であり、R¹¹⁰がアミノであり、b_nが1である、環形成基

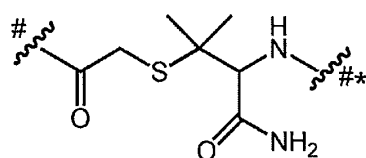
[化113]



が挙げられる（以下、B_{1b}という）。B_{1b}は、例えば、Z_{aa12}のC末端側にアミド結合したHCY（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の-SHを、Z_{aa1}またはZ_{aa2}のN末端アミノ基に結合した-COCH₂X（XはClなどの脱離基）と反応させることにより得ることができる。この場合、HCYはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、B_{1b}においてZ_{aa12}のC末端側にアミド結合したHCY（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸である場合の環形成基を、B_{1b1}という。

[0170] B₁の好ましい別の態様としては、R¹⁰¹およびR¹⁰²がそれぞれメチルであり、R¹¹⁰がアミノであり、b_nが0である、環形成基

[化114]

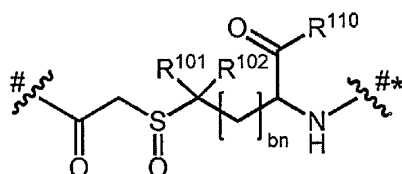


が挙げられる（以下、B_{1c}という）。B_{1c}は、例えば、Z_{aa12}のC末端側にアミド結合したPen（ただしカルボキシがアミドに変換されている）の-

S Hを、 Z_{aa1} または Z_{aa2} のN末端アミノ基に結合した $-COCH_2X$ (X はClなどの脱離基)と反応させることにより得ることができる。この場合、 Pen はL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、 B_{1c} において Z_{aa12} のC末端側にアミド結合した Pen (ただしカルボキシがアミドに変換されている)がL-アミノ酸である場合の環形成基を、 B_{1c1} という。

[0171] 別の態様において、環形成基Bは、

[化115]

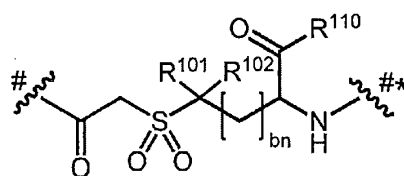


である (以下、 B_2 という)。 B_2 において、 bn は0~3の整数 (例えば、0、1、2、または3)であり、 R^{101} および R^{102} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{110} はアミノまたはヒドロキシである。

[0172] B_2 の好ましい態様としては、 R^{101} および R^{102} がそれぞれ水素原子であり、 R^{110} がアミノであり、 bn が0である環形成基が挙げられる (以下、 B_{2a} という)。 B_{2a} は、例えば上記 B_{1a} のスルフィド基を酸化してスルホキシドとすることにより得ることができる。特に、 B_{1a1} のスルフィド基を酸化してスルホキシドとした場合の環形成基を、 B_{2a1} という。

[0173] 別の態様において、Bは、

[化116]



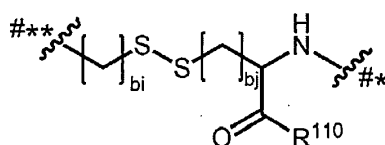
である (以下、 B_3 という)。 B_3 において、 bn は0~3の整数 (例えば、

0、1、2、または3)であり、 R^{101} および R^{102} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 R^{110} はアミノまたはヒドロキシである。

[0174] B_3 の好ましい態様としては、 R^{101} および R^{102} がそれぞれ水素原子であり、 R^{110} がアミノであり、 b_n が0である環形成基が挙げられる(以下、 B_{3a} という)。 B_{3a} は、例えば上記 B_{1a} のスルフィド基を酸化してスルホンとすることにより得ることができる。特に、 B_{1a1} のスルフィド基を酸化してスルホンとした場合の環形成基を、 B_{3a1} という。

[0175] 別の態様において、 B は、

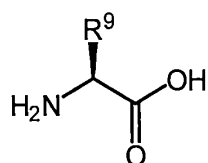
[化117]



である(以下、 B_4 という)。 B_4 において、 b_i および b_j はそれぞれ独立に1~3の整数(例えば、1、2、または3)であり、 R^{110} はアミノまたはヒドロキシである。

[0176] B が B_4 である場合、 Z_{aa1} または Z_{aa2} は、

[化118]



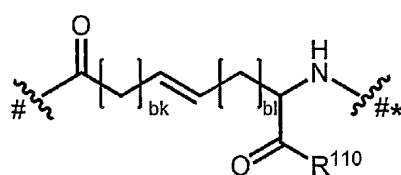
[式中、 R^9 は、式 $-(CH_2)_tSH$ (式中、 t は1~3の整数(例えば、1、2、または3)である)で表される基である]で表されるアミノ酸の残基である。

[0177] B_4 の好ましい態様において、 b_i および b_j はそれぞれ1であり、 R^{110} はアミノである(以下、 B_{4a} という)。 B_{4a} は、例えば、 Z_{aa12} のC末端側にアミド結合したCys(ただしカルボキシがアミドに変換されている)の $-SH$ を、 Z_{aa1} または Z_{aa2} の $-SH$ と反応させることにより得ることがで

きる。この場合、CysはL-アミノ酸またはD-アミノ酸であってもよい。特に、Z_{aa12}のC末端側にアミド結合したCys（ただしカルボキシがアミドに変換されている）がL-アミノ酸であるB_{4a}を、B_{4a1}という。

[0178] 別の態様において、Bは、

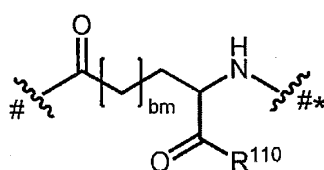
[化119]



である（以下、B₅という）。B₅において、bkおよびblはそれぞれ独立に0～3の整数（例えば、0、1、2、または3）であり、R¹¹⁰はアミノまたはヒドロキシである。環形成基B₅は、例えば、Z_{aa12}のC末端側にアミド結合した、側鎖に-(CH₂)_{bl}CH=CH₂を有するアミノ酸（カルボキシがアミドに変換されていてもよい）と、Z_{aa1}またはZ_{aa2}のN末端アミノ基に結合した-CO(CH₂)_{bk}CH=CH₂とのオレフィンメタセシスにより得ることができる。この場合、Z_{aa12}のC末端側にアミド結合したアミノ酸はL-アミノ酸およびD-アミノ酸のいずれであってもよい。

[0179] 別の態様において、Bは、

[化120]



である（以下、B₆という）。B₆において、bmは1～7の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、または7）であり、R¹¹⁰はアミノまたはヒドロキシである。B₆は、例えば、B₅におけるC-C二重結合を還元することにより得ることができる。

[0180] 式(X)において、Z_{aa1}は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性ア

ミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在しない。好ましい態様において、 Z_{aa1} は、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysの残基であるか、あるいは存在せず、より好ましくは、存在しない。

[0181] 式(X)において、 Z_{aa2} は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 Z_{aa2} は、芳香族アミノ酸の残基であり、より好ましくは、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはDCFの残基であり、さらに好ましくは、2NaI残基である。

[0182] 式(X)において、 Z_{aa3} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 Z_{aa3} は、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgの残基であり、より好ましくは、ArgまたはTleの残基である。

[0183] 式(X)において、 Z_{aa4} は、Ser、Thr、Ala、または^mSの残基である。好ましい態様において、 Z_{aa4} は、Ser残基である。

[0184] 式(X)において、 Z_{aa5} は、GlyまたはSerの残基である。好ましい態様において、 Z_{aa5} は、Gly残基である。

[0185] 式(X)において、 Z_{aa6} は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 Z_{aa6} は、Arg、Lys、His、Ser、Cit、またはAGBの残基であり、より好ましくは、ArgまたはAGBの残基である。

[0186] 式(X)において、 Z_{aa7} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 Z_{aa7} は、AsnまたはAspの残基である。

[0187] 式(X)において、 Z_{aa8} は、芳香族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 Z_{aa8} は、Trpまたは2NaIの残基であり、より好ましくは、Trp残基である。

[0188] 式(X)において、 Z_{aa9} は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸の残基である。好ましい態様において、 Z_{aa9} は、Val、Nle

、A h p、またはM e tの残基であり、より好ましくは、V a lまたはN l eの残基である。

[0189] 式(X)において、Z_{aa10}は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、Z_{aa10}は、A r g、A G B、L y s、H i s、A M F、P h g、またはV a lの残基であり、より好ましくは、A r g、A G B、またはV a lの残基である。

[0190] 式(X)において、Z_{aa11}は、芳香族アミノ酸残基である。好ましい態様において、Z_{aa11}は、T r pまたは2 N a lの残基であり、より好ましくは、T r p残基である。

[0191] 式(X)において、Z_{aa12}は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基である。好ましい態様において、Z_{aa12}は、V a l、T l e、C P T G、C H X G、またはP h eの残基であり、より好ましくは、V a l、C P T G、またはC H X Gの残基である。

[0192] 本発明の環状ペプチドIIの好ましい態様としては、式(X)において、

Bが環形成基B_{1a}、B_{1b}、またはB_{1c}であり；

Z_{aa1}が、A r g、L y s、H i s、G l y、A l a、A s n、T h r、S e r、M e t、L e u、I l e、V a l、G l n、P h e、T y r、T r p、またはC y sの残基であるか、あるいは存在せず；

Z_{aa2}が、P h e、T y r、T r p、2 N a l、4 C F、またはD C Fの残基であり；

Z_{aa3}が、I l e、L e u、N l e、T l e、T r p、2 N a l、4 C F、またはA r gの残基であり；

Z_{aa4}がS e r残基であり；

Z_{aa5}がG l y残基であり；

Z_{aa6}が、A r g、L y s、H i s、S e r、C i t、またはA G Bの残基であり；

Z_{aa7}が、A s nまたはA s pの残基であり；

Z_{aa8}が、T r pまたは2 N a lの残基であり；

Z_{aa9} が、Val、Nle、Ahp、またはMetの残基であり；

Z_{aa10} が、Arg、AGB、Lys、His、AMF、Phg、またはValの残基であり；

Z_{aa11} が、Trpまたは2NaIの残基であり；かつ

Z_{aa12} が、Val、Tle、CPTG、CHXG、またはPheの残基である；

環状ペプチドが挙げられる。

[0193] 本発明の環状ペプチドIIのより好ましい態様としては、式(X)において、

Bが環形成基 B_{1a} であり；

Z_{aa1} が、存在せず；

Z_{aa2} が、2NaI残基であり；

Z_{aa3} が、ArgまたはTleの残基であり；

Z_{aa4} が、Ser残基であり；

Z_{aa5} が、Gly残基であり；

Z_{aa6} が、ArgまたはAGBの残基であり；

Z_{aa7} が、AsnまたはAspの残基であり；

Z_{aa8} が、Trp残基であり；

Z_{aa9} が、ValまたはNleの残基であり；

Z_{aa10} が、Arg、AGB、またはValの残基であり；

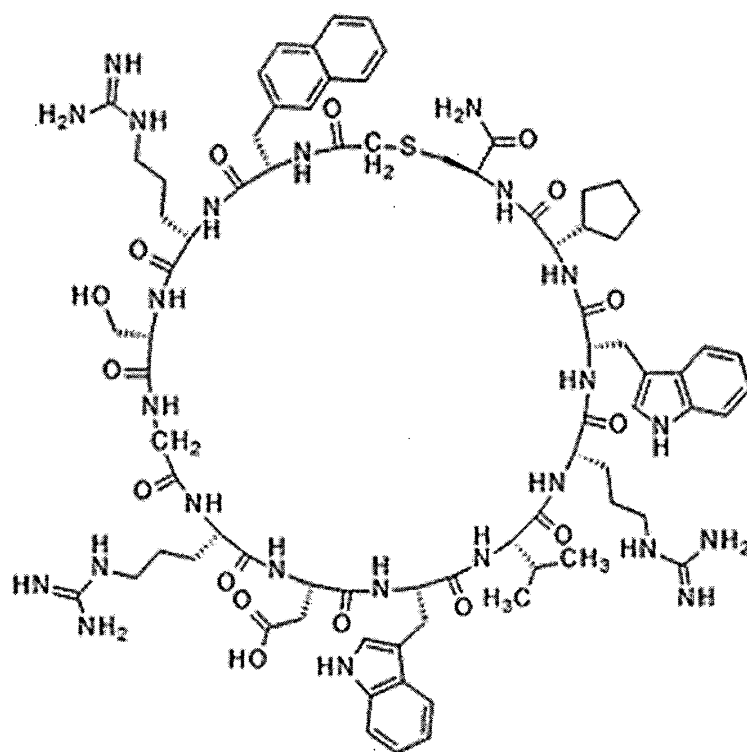
Z_{aa11} が、Trp残基であり；かつ

Z_{aa12} が、Val、CPTG、またはCHXGの残基である；

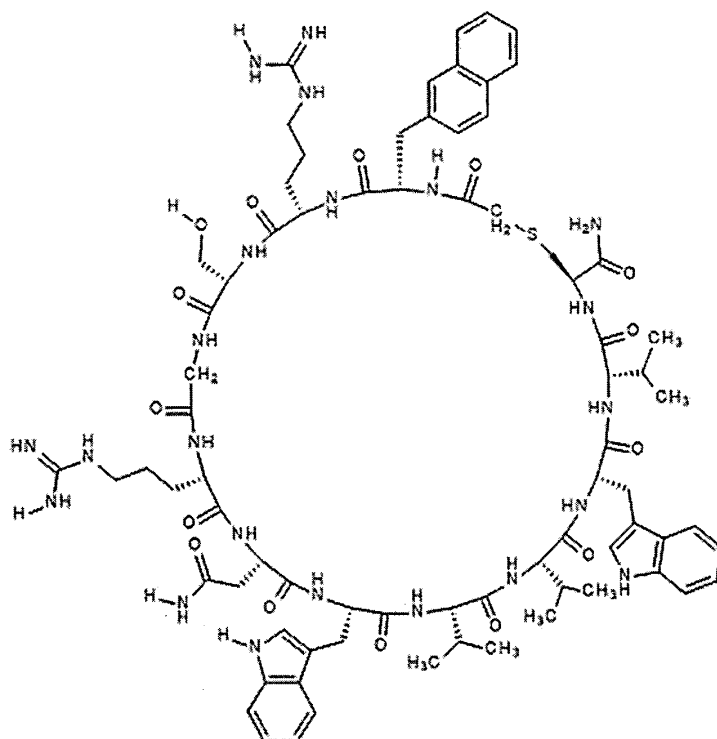
環状ペプチドが挙げられる。

[0194] 本発明の環状ペプチドIIのさらに好ましい態様としては、

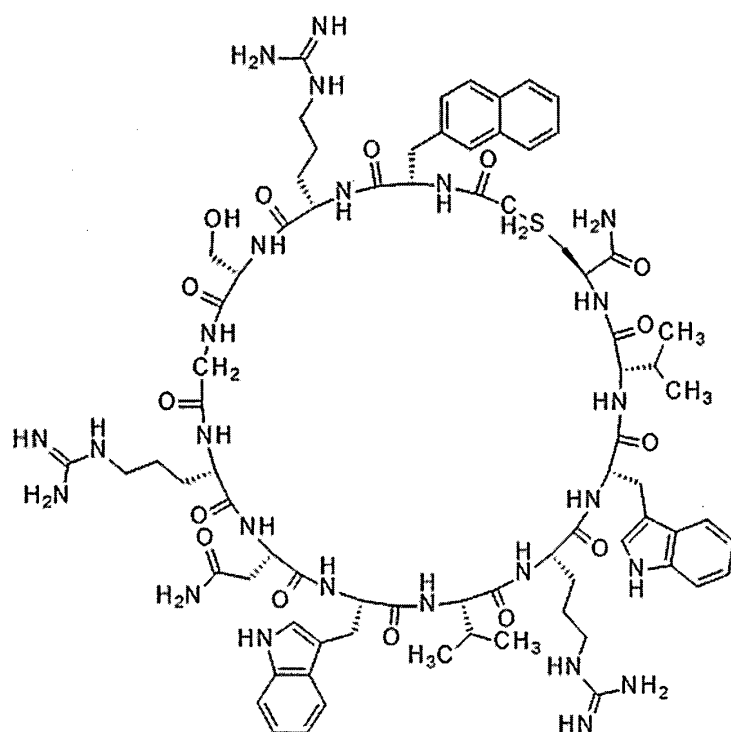
[化121]



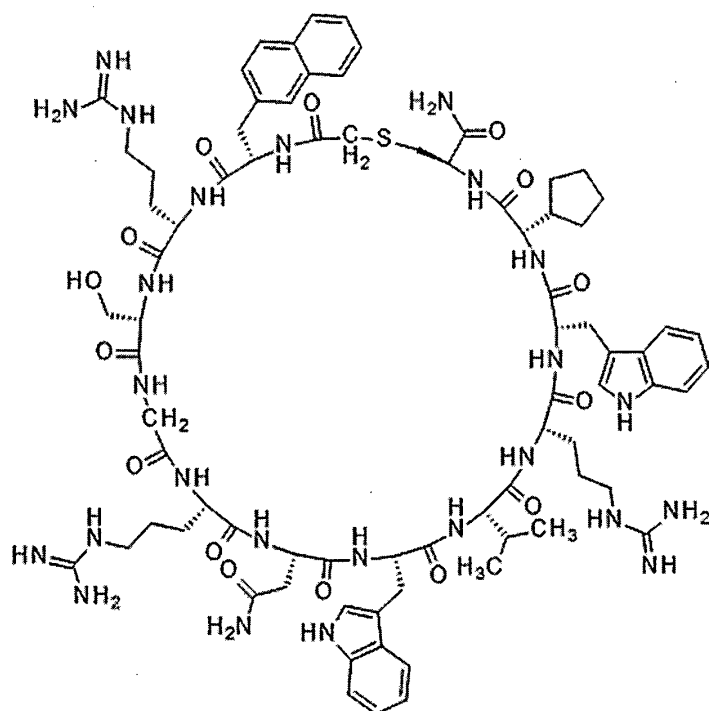
[化122]



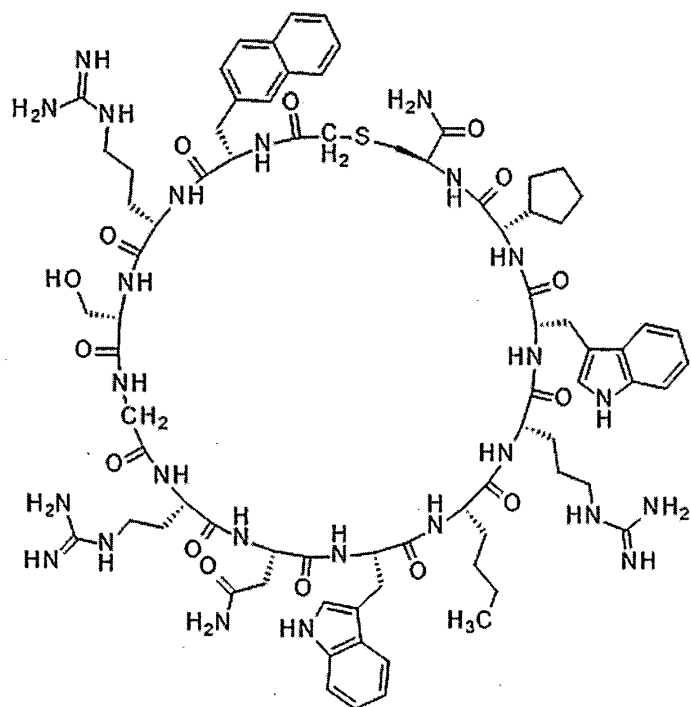
[化123]



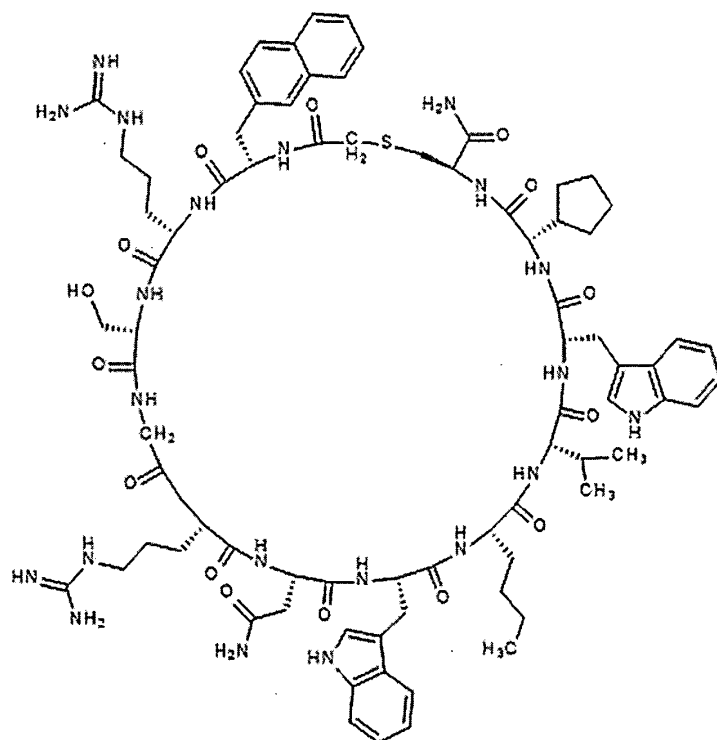
[化124]



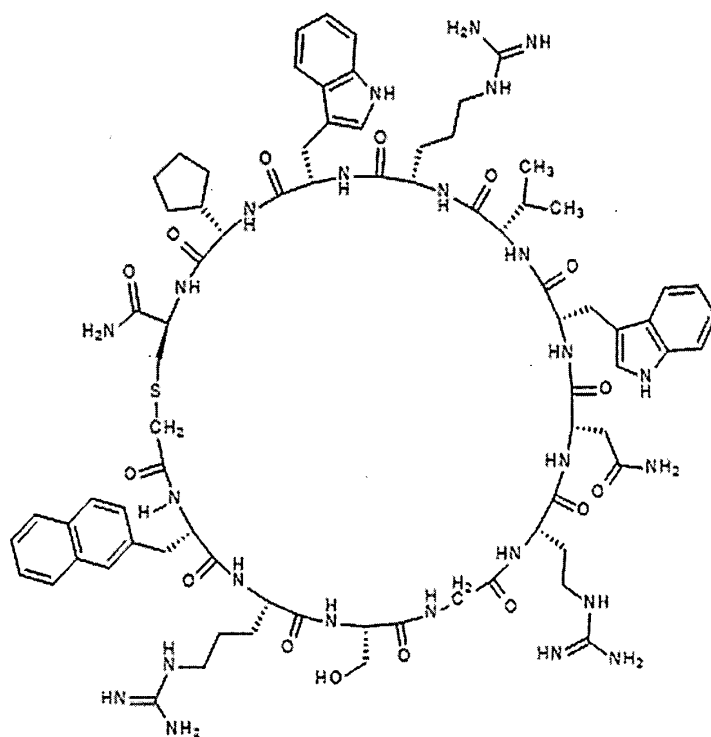
[化125]



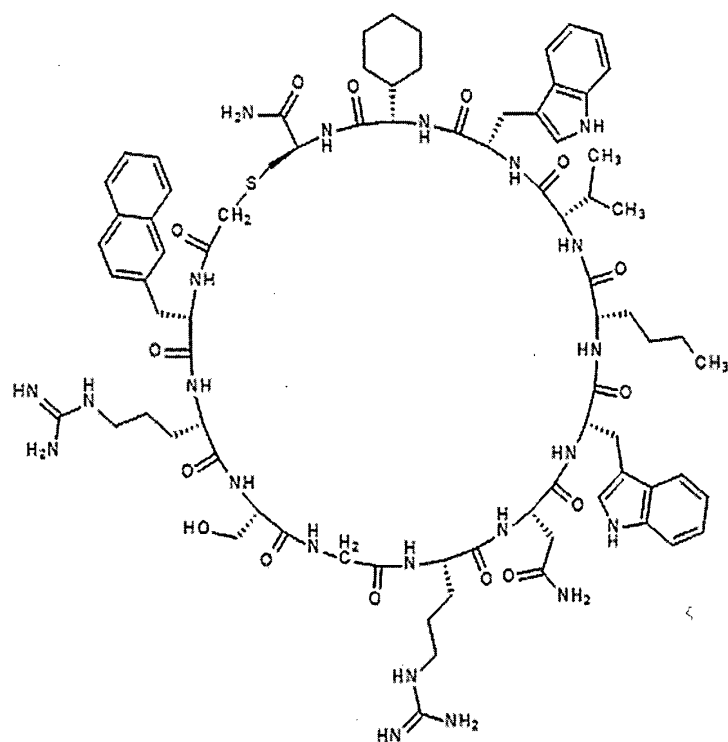
[化126]



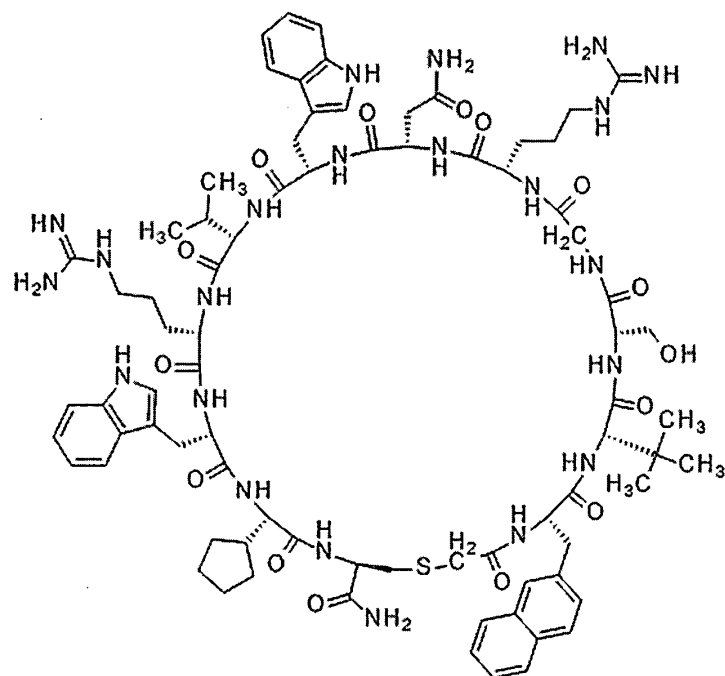
[化127]



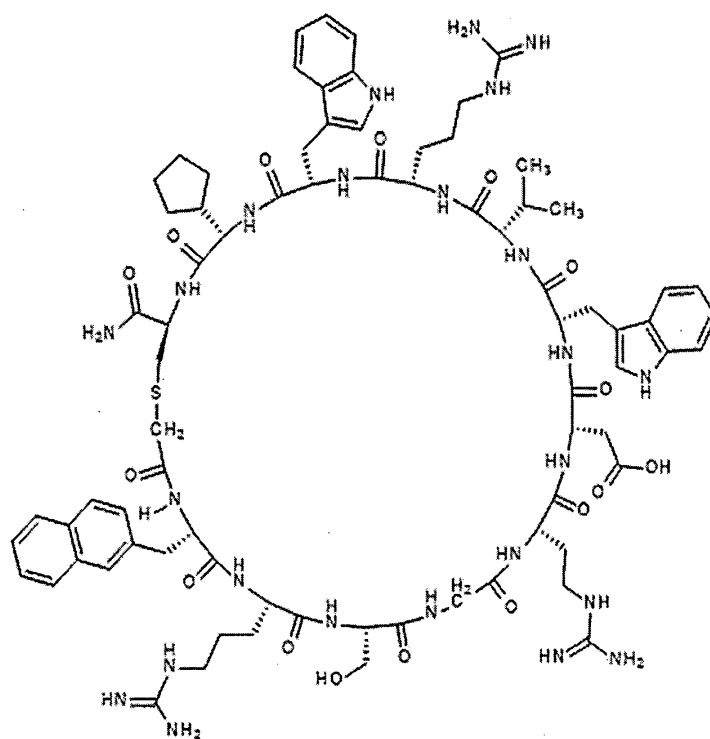
[化128]



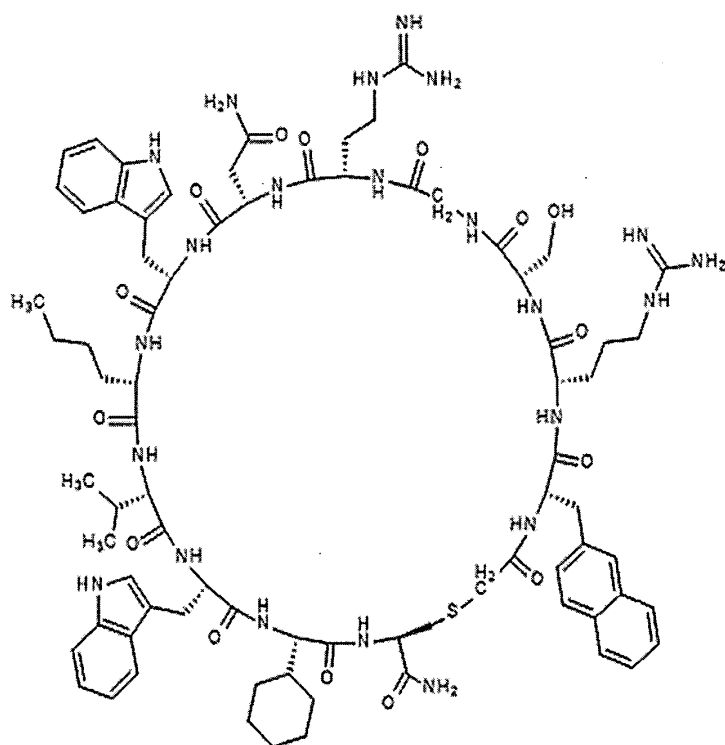
[化129]



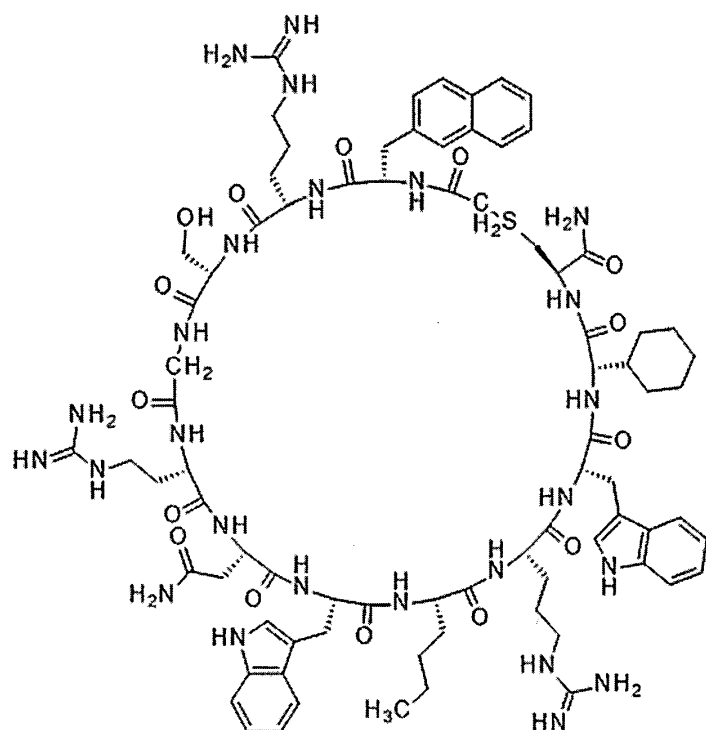
[化131]



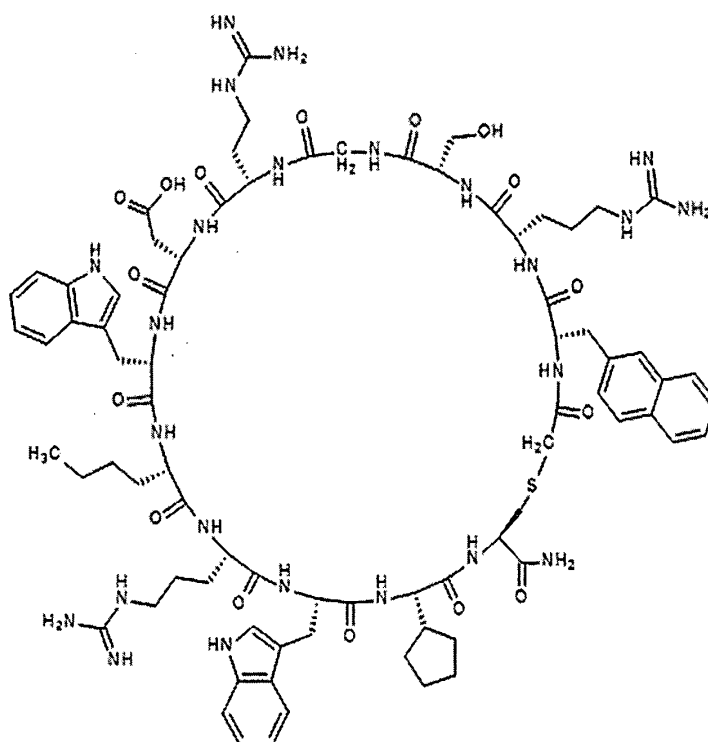
[化132]



[化133]



[化135]



で表される化合物からなる群より選択される環状ペプチドが挙げられる。ここに示されたオリゴペプチドは、後述する実施例におけるConjugate-13~Conjugate-63、Conjugate-67~Conjugate-71、Conjugate-73、Conjugate-75~Conjugate-79、Conjugate-83~Conjugate-86、Conjugate-88~Conjugate-95、及びConjugate-97における環状ペプチドであり、環形成基BはいずれもB_{1a}である。

[0195] 本発明の環状ペプチドIIは、本発明の環状ペプチドIと同様に、化学合成、無細胞翻訳系などの当該技術分野において知られている方法で製造することができる（WO 2018/052002参照）。

[0196] 好ましい態様において、本発明のコンジュゲート体における環状ペプチドは、本発明の環状ペプチドIであり得る。

[0197] 3. リンカー構造

本発明のコンジュゲート体において、環状ペプチドは、それを構成するア

ミノ酸残基の側鎖または環形成基のAのR¹⁰または環形成基BのR¹¹⁰が結合しているカルボニル基を介してキャリア分子と連結される。一態様において、環状ペプチドは、環形成基AのR¹⁰または環形成基BのR¹¹⁰が結合しているカルボニル基を介してキャリア分子と連結される。一態様において、本発明のコンジュゲート体は、前記環状ペプチドと前記キャリア分子とが、リンカー構造を介して連結された化合物であり得る。環状ペプチドとリンカー構造またはキャリア分子との結合は、常法に従って行うことができる。

[0198] リンカー構造は、本発明のコンジュゲート体がTSP-1阻害効果を発揮し得る限り、任意の構造であり得る。好ましい態様において、リンカー構造は、ポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸残基、および2以上のアミノ酸残基からなるオリゴペプチド鎖からなる群から選択される少なくとも1つの構造を含み得る。

なお、本明細書中、リンカー構造の由来となる分子を「リンカー分子」という場合がある。

またリンカー構造における「主鎖」とは、環状ペプチドとキャリア分子との連結に必須の直鎖状の部分を行い、リンカー構造における「側鎖」とは、主鎖から枝分かれした部分をいう。リンカー構造を構成する個々のアミノ酸残基についても、環状ペプチドとキャリア分子との連結に必須の結合の部分を「主鎖」といい、主鎖から枝分かれした部分を側鎖という。例えば、一般に、アミノ酸残基においては、 α 炭素に結合している基であって、 α 炭素に直接結合しているアミノ基、カルボキシル基、および水素以外の基を側鎖（ただし、グリシン残基においては水素が側鎖となる）というが、そのような側鎖の部分が、本発明のリンカー構造における「主鎖」となる場合がある（例えば、KPEGがリンカー構造に含まれる場合、KPEGの ϵ アミノ基が「主鎖」となり、 α アミノ基およびそれに結合したPEG鎖が「側鎖」となる）。

[0199] リンカー構造に含まれるポリオキシアルキレン鎖としては、薬学上許容されるものであれば特に限定されず、例えば、ポリメチレングリコール、ポリ

エチレングリコール鎖、ポリプロピレングリコール鎖、ポリブチレングリコール鎖、ポリペンチレングリコール鎖、ポリヘキシレングリコール鎖、エチレングリコール基とプロピレングリコール基がブロック又はランダム結合したポリオキシアルキレン鎖などが挙げられる。好ましい態様において、ポリオキシアルキレン鎖は、ポリエチレングリコール（PEG）鎖であり得る。

ここで、リンカー構造における主鎖（すなわち環状ペプチドとキャリア分子との連結に必須の直鎖状の部分）に含まれるポリオキシアルキレン鎖は、環状ペプチドとキャリア分子との間の距離を調節するために使用され得る。このようなリンカー構造における主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖は、P6P、P12P、P24P、P36Pなどのポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸の一部としてリンカー構造に含まれていてもよい。

リンカー構造における主鎖に含まれる各ポリオキシアルキレン鎖の重合度は、特に限定されないが、2～50、6～50、6～30、または6～12、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24または36であり得、好ましくは6、12、24、または36であり得、より好ましくは6、12、または24であり得る。また、リンカー構造における主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖の合計重合度（すなわち、1つのリンカー構造における主鎖に1つのポリオキシアルキレン鎖のみが含まれている場合にはその重合度、複数のポリオキシアルキレン鎖が含まれている場合にはそれら全ての合計重合度）は、6～100であり得、より好ましくは6～50、例えば、6、12、18、24、30、36、42、48、または50であり得る。好ましい態様において、リンカー構造における主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖はPEG鎖であり、合計重合度は6～100であり得、より好ましくは6～50、例えば、6、12、18、24、30、36、42、48、または50であり得る。

[0200] リンカー構造に含まれるアミノ酸残基は、天然アミノ酸の残基および非天然アミノ酸の残基のいずれであってもよく、D体およびL体のいずれであってもよい。好ましい態様において、リンカー構造に含まれるアミノ酸残基は

、G l y、N-メチルグリシン (N M e G)、A s p、D-A s p (d)、G l u、D-G l u、L y s、D-L y s、 β -アラニン (b A l a)、S e r、D-S e r、側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸 (すなわち、リンカー構造において側鎖となる部分にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸 ; 例えばK P E G)、または側鎖にS G鎖などの糖鎖を含む非天然アミノ酸 (すなわち、リンカー構造において側鎖となる部分に糖鎖を含む非天然アミノ酸 ; 例えばK S G) の残基であり得る。

[0201] リンカー構造に含まれるオリゴペプチド鎖を構成するアミノ酸残基は、天然アミノ酸の残基および非天然アミノ酸の残基のいずれであってもよく、D体およびL体のいずれであってもよい。オリゴペプチド鎖は、特に限定されないが、2~20個のアミノ酸残基、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸残基からなり得る。好ましい態様において、リンカー構造に含まれるオリゴペプチド鎖は、G l y、N-メチルグリシン (N M e G)、A s p、D-A s p、G l u、D-G l u、L y s、D-L y s、 β -アラニン (b A l a)、S e r、D-S e r、側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸 (すなわち、リンカー構造において側鎖となる部分にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸 ; 例えばK P E G)、および側鎖にS G鎖などの糖鎖を含む非天然アミノ酸 (すなわち、リンカー構造において側鎖となる部分に糖鎖を含む非天然アミノ酸 ; 例えばK S G) からなる群から選択される1以上のアミノ酸残基を含み得る。

[0202] リンカー構造は、環形成基AのR¹⁰または環形成基BのR¹¹⁰が結合しているカルボニル基において環状ペプチドと結合し得る。リンカー分子と環状ペプチドとの結合は、有機合成化学の分野で公知の様々な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。リンカー構造にアミノ酸残基またはオリゴペプチド鎖が含まれる場合、好ましくは、アミノ酸残基またはオリゴペプチド鎖のN末端アミノ基は、環形成基AのR¹⁰または環形成基BのR¹¹⁰が結合しているカルボニル基とアミド結合を形成しており、R¹⁰またはR¹¹⁰

は、該N末端アミノ基のNHと置換されている。

[0203] リンカー構造とキャリア分子との結合には、有機合成化学の分野で公知の様々な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。一般に、抗体-薬物コンジュゲート合成に応用されている結合法を参考にできる (Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2198-2215)。例えば、アジド基とアセチレン基のHusgen反応による環形成法として、1,2,3-トリアゾール環を形成させる付加環化反応[Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)]、アジド基とジベンジルシクロオクテン (DBCO) の反応により1,2,3-トリアゾール環を形成させる付加環化反応 [Strain-promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC)] を例示でき、ここでは、その他同様に歪んだシクロオクチン構造を有する化合物、ビスクロ [6.1.0] ノン-4-エン (BCN) (Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9422-9425) や中員環構造上にヘテロ原子を含むシクロアルキン (Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 1190-1194) などにも利用できる。別の環形成反応として、1,2,4,5-テトラジン環と歪んだアルケンとのDiels-Alder付加環化反応 (Curr. Opin. Chem. Biol., 2014, 21, 89-95) を例示できる。また、アルデヒド基とのPictet-Spengler反応型の環化縮合として、Hydrazino-Pictet-Spengler ligation (Bioconjugate Chem. 2013, 24, 846-851.) やOxyamine-based Pictet-Spengler ligation (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 46-51) が例示できる。その他、アミノ基とカルボキシル基によるアミド結合、チオール基のマレイミド基へのマイケル付加、チオール基とメチルスルフォニルフェニルオキサジアゾール基との反応 (Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 12592-6.)、チオール基とヨードアセチル基との結合、チオール基と活性化されたジスルフィドとの交差ジスルフィド形成、アルデヒド基とヒドラジドのヒドラゾン縮合、アルデヒド基とアミノオキシ基のオキシム縮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。

[0204] このような結合反応において、結合様式によっては立体異性体、光学異性

体、幾何異性体などが形成される場合がある。これらの異性体は公知の方法で分離して用いても良く、混合物として用いても良い。最終的なコンジュゲート体が巨大分子であるためこれら部分構造の異性体の構造的相違はほぼ、コンジュゲート体には影響しないものと考えられる。

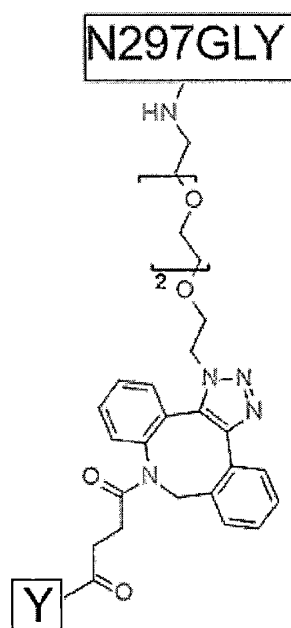
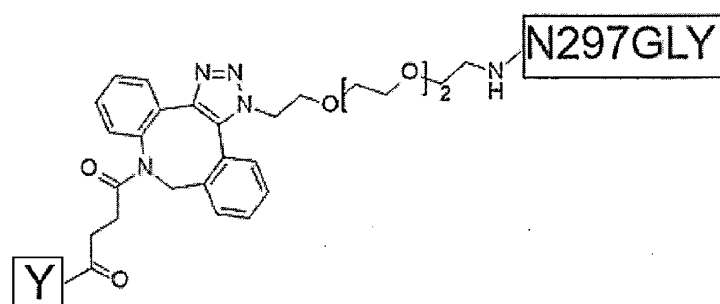
[0205] 好ましい態様において、リンカー構造は、キャリア分子と結合する連結基Cを含み、より好ましくは、連結基Cは、マレイミド基とチオール基との反応により形成されるチオエーテル結合におけるマレイミド基由来の部分または1, 2, 3-トリアゾール環を含み得る。

[0206] 連結基Cがマレイミド基由来の部分を含む場合、マレイミド基とキャリア分子のシステイン残基のチオール基とがマレイミド縮合により結合してチオエーテル結合が形成されていることが好ましい。この場合、チオール基は、Fc含有分子内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元して生成させたチオール基であることが好ましい。

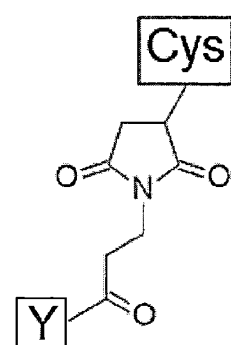
[0207] 連結基Cが1, 2, 3-トリアゾール環を含む場合、1, 2, 3-トリアゾール環は、Fc含有分子のE uインデックスによる297位に相当するアスパラギン残基に結合している糖鎖（N297結合糖鎖）と結合していることが好ましい。そのようなリンカー構造は、例えば、Fc含有分子のN297結合糖鎖に導入されたアジド基とリンカー分子に結合したDBC0基とのClick反応で形成される1,2,3-トリアゾール環を有する構造であり得る。この構造では、Fc含有分子がトリアゾール環の1位又は3位に結合した幾何異性体が形成され得る。Fc含有分子1分子当たり2～4つのアジド基で反応が起こる場合、コンジュゲート体1分子中に幾何異性構造が混在し得る。

[0208] 好ましい態様において、連結基Cは、以下の式

[化136]

C₁C₂

、および

C₃

(式中、

N 2 9 7 G L Y は、F c 含有分子の N 2 9 7 結合糖鎖の非還元末端と結合していることを表し、

C y s は、キャリア分子のシステイン残基のチオール基と結合していることを表し、

Y は、隣接するアミノ酸残基との結合点を示す)

のいずれかで表される構造であり得る。

[0209] 一態様において、リンカー構造は、下記式 (X X)

-L1-L2-L3-C-

[式中、

L1 は、直鎖状に結合した 3 ～ 6 個の中性アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであり；

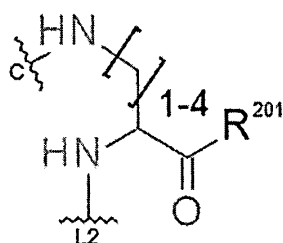
L2 は、L2a または L2b であり、

L2a は、主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基であるか、または主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであって、L2a における主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖の合計重合度が 6 ～ 1 0 0 であるオリゴペプチドであり、

L2b は、直鎖状に結合した 1 0 ～ 2 0 個（例えば、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、または 2 0 個）の天然または非天然の α アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであり；

L3 は、

[化137]



(式中、 R^{201} は、ヒドロキシ基またはアミノ基であり、

[化138]



は、L2における隣接するアミノ酸残基との結合点を示し、

[化139]



は、連結基Cとの結合点を示す) で表されるアミノ酸残基であり；

Cは、連結基Cであり；

L1のN末端アミノ基は、環形成基Aの R^{10} または環形成基Bの R^{110} が結合しているカルボニル基とアミド結合を形成しており、 R^{10} または R^{110} は、該N末端アミノ基のNHと置換されており；

L1とL2とは、アミド結合で連結されており；かつ

L2とL3とは、アミド結合で連結されている]

で表され得る。

L1とL2との間に存在するアミノ酸残基は、隣接するL1またはL2のいずれに存在すると決定されてもよいが、リンカー構造全体として上記式(X X)のリンカー構造と一致する場合には、当該リンカー構造は上記式(X X)に含まれる。

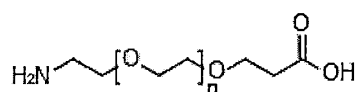
[0210] リンカー構造に関して、アミノ酸残基が「直鎖状に結合した」とは、当該アミノ酸残基が環状ペプチドとキャリア分子との連結に必須の部分を構成するように連結されていることを意味する。中性アミノ酸残基は、必ずしも連続している必要はない。

[0211] 好ましい態様において、L1に含まれる中性アミノ酸残基は、G l y、S e r、D - S e r、N - メチルグリシン (N M e G)、およびβ - アラニン (b A l a) からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸の残基であり得る。L1は、3～6個(例えば、3、4、5、または6個)のアミノ酸残基からなるオリゴペプチドであり得、4または5個のアミノ酸残基からなるオリゴ

ペプチドであることが好ましく、4個のアミノ酸残基からなるオリゴペプチドであることがより好ましい。

[0212] 好ましい態様において、L2aにおける主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖は、PEG鎖であり得る。この場合、主鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸残基は、下記式

[化140]



[式中、nは、5～40の整数（例えば、5、11、23、35など）を示す。]

で表されるアミノ酸の残基であり得る。L2aにおける主鎖に含まれるPEG鎖の合計重合度は、例えば、5～100、好ましくは6～50、より好ましくは10～50、さらにより好ましくは10～40または20～40であり得る。あるいは、L2aにおける主鎖に含まれるPEG鎖の合計重合度は、例えば、5以上であり、好ましくは6以上、より好ましくは10以上または20以上であり、また例えば、100以下であり、好ましくは50以下、より好ましくは40以下（例えば、6、12、18、24、30、36など）であり得る。L2aに含まれる、主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基は、P6P、P12P、P24P、もしくはP36Pの残基、またはこれらの非天然アミノ酸残基の組み合わせであり得る。好ましい態様において、L2aに含まれる、主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基は、P6P、P12P、もしくはP24Pの残基、またはこれらの非天然アミノ酸残基の組み合わせであり得る。

[0213] 好ましい態様において、L2bのαアミノ酸は、グリシンまたはNメチルグリシンであり得、Nメチルグリシンであることがより好ましい。L2bのオリゴペプチドは、Nメチルグリシンが10～50個、好ましくは10～20個、より好ましくは10～15個、さらにより好ましくは13個連続したオリゴN

メチルグリシン（本明細書中、NMeG13ともいう）であり得る。

- [0214] L2は、側鎖にポリオキシアルキレン鎖または糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基をさらに含んでもよい。側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸としては、例えば、KPEGなどの、リンカー構造において側鎖となる部分にPEGを含む非天然アミノ酸が挙げられ、側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸としては、例えばKSGなどの、リンカー構造において側鎖となる部分にシアリル糖鎖を含む非天然アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。L2は、側鎖にポリオキシアルキレン鎖または糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を2個以上含んでもよいが、好ましくは、側鎖にポリオキシアルキレン鎖または糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を1個含む。好ましい態様において、L2は、1個のKPEG残基またはKSG残基を含み得る。
- [0215] 好ましい態様において、L1およびL2のオリゴペプチドの主鎖において、環形成基A又は環形成基Bに隣接しない1つ以上の位置に、合計で1～3個（例えば、1、2、または3個）、より好ましくは2個の酸性アミノ酸残基をさらに含み得る。ここで「主鎖」とは、環状ペプチドとキャリア分子との連結に必須の直鎖状の部分の意味する。酸性アミノ酸残基は、必ずしも連続している必要はない。酸性アミノ酸残基の位置は、環形成基A又は環形成基Bに隣接する位置以外であれば特に限定されないが、L1とL2の間に存在するのが好ましい。L1とL2の間に酸性アミノ酸残基が存在する場合、当該酸性アミノ酸残基は、L1とL2のいずれに存在すると決定されてもよい。酸性アミノ酸残基は、Asp、D-Asp、Glu、およびD-Gluからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸の残基であり得、好ましくはAsp、D-Asp、およびGluからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸の残基であり、より好ましくはAsp残基である。2個のAsp残基がL1とL2とが隣接する位置に存在することが最も好ましい。
- [0216] L1およびL2に含まれる酸性アミノ酸残基の数は、環状ペプチド及びリンカー構造に含まれるアミノ酸残基の電荷のバランスを考慮して決定してもよい。この場合、酸性アミノ酸残基の電荷を1価であれば+1、2価であれば+

2のように規定し、塩基性アミノ酸残基の電荷を1価であれば-1、2価であれば-2のように規定する。環状ペプチド及びリンカー構造に含まれるアミノ酸残基の電荷が-4～+1、より好ましくは-2～0となるように、L1およびL2に含まれる酸性アミノ酸残基の数を決定することができる。環状ペプチド及びリンカー構造に含まれるアミノ酸残基の電荷が上記の数値範囲となる場合、優れたTSP-1阻害効果を有するコンジュゲート体となる傾向がある。

[0217] 好ましい態様において、L1は、G l y - G l y - G l y - G l y、G l y - S e r - G l y - S e r、N M e G - N M e G - N M e G - N M e G、b A l a - b A l a - b A l a - b A l a、またはG l y - G l y - G l u - G l y - G l yの配列を含むかまたは当該配列からなるオリゴペプチドであり得る。より好ましくは、L1は、G l y - G l y - G l y - G l yまたはG l y - S e r - G l y - S e rの配列を含むかまたは当該配列からなるオリゴペプチドであり、さらにより好ましくは、G l y - G l y - G l y - G l yの配列からなるオリゴペプチドである。

[0218] L1に酸性アミノ酸残基が含まれる場合、L1は、G l y - G l y - G l y - G l y、G l y - S e r - G l y - S e r、N M e G - N M e G - N M e G - N M e G、またはb A l a - b A l a - b A l a - b A l aのC末端に2個の酸性アミノ酸残基、好ましくはA s p残基が連結された配列からなるオリゴペプチドであり得る。

[0219] 好ましい態様において、L2は、A s p - A s p - K P E G - P 1 2 P - P 1 2 P、K S G - P 1 2 P - P 1 2 P、A s p - A s p - P 1 2 P、A s p - A s p - P 1 2 P - P 1 2 P、またはA s p - A s p - P 1 2 P - K P E G - P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドであり得る。より好ましくは、L2は、A s p - A s p - K P E G - P 1 2 P - P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドである。

[0220] 好ましい態様において、L3は、L y s残基であり得る。L3のL y s残基のカルボキシル基は、アミノカルボニル基であってもよい。

[0221] より好ましい態様において、リンカー構造は、

L1がG l y-G l y-G l y-G l yもしくはG l y-S e r-G l y-S e rの配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p-A s p-K P E G-P 1 2 P-P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s残基である構造、

L1がG l y-G l y-G l y-G l yの配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがK S G-P 1 2 P-P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s残基である構造、

L1がG l y-G l y-G l y-G l yの配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p-A s p-P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s残基Kである構造、

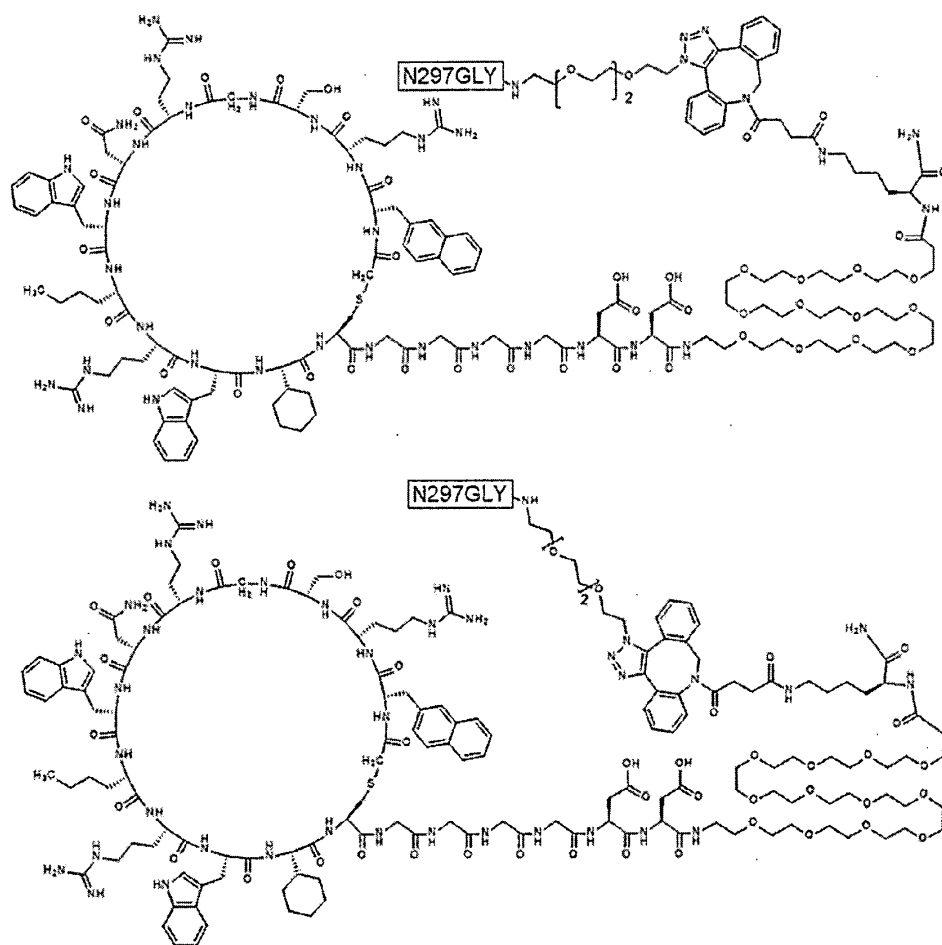
L1がG l y-S e r-G l y-S e rの配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p-A s p-P 1 2 P-P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s残基である構造、または

L1がG l y-G l y-G l y-G l yの配列からなるオリゴペプチドであり、L2aがA s p-A s p-P 1 2 P-K P E G-P 1 2 Pの配列からなるオリゴペプチドであり、L3がL y s残基である構造

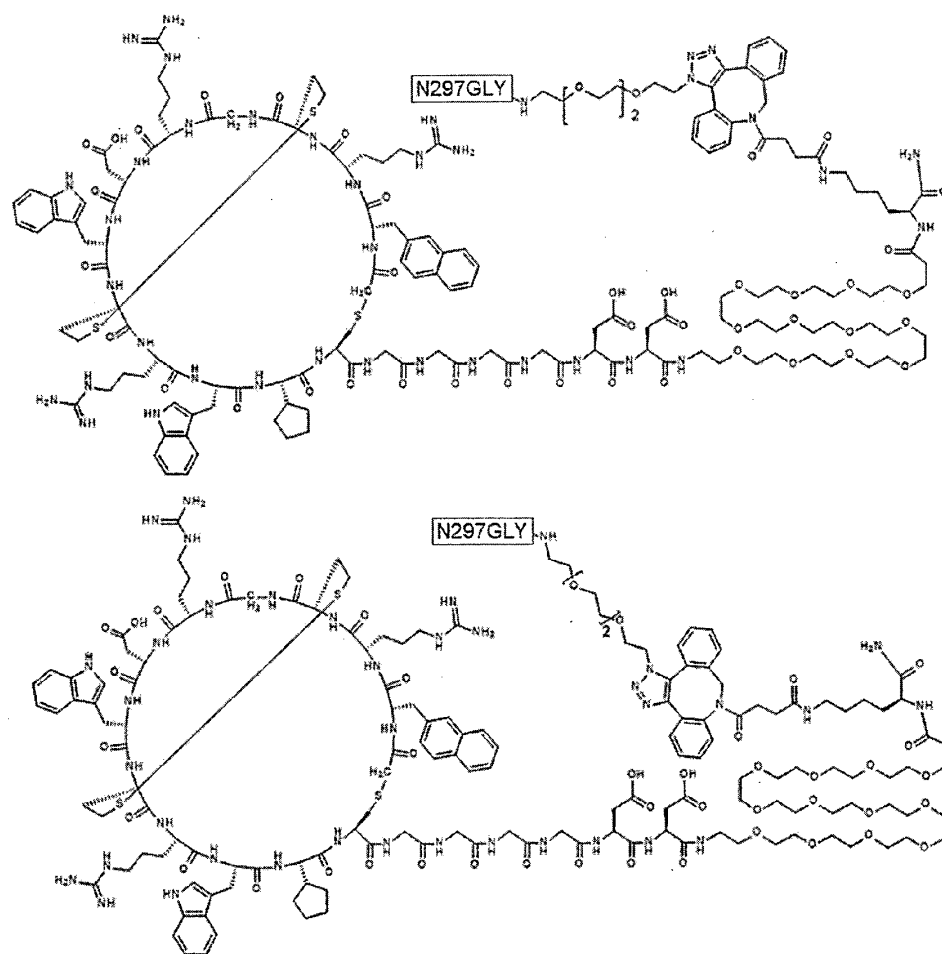
であり得る。上記構造において、L3のL y s残基のカルボキシル基は、アミノカルボニル基であってもよい。

[0222] 環状ペプチドおよびリンカー構造のさらにより好ましい態様としては、以下の式

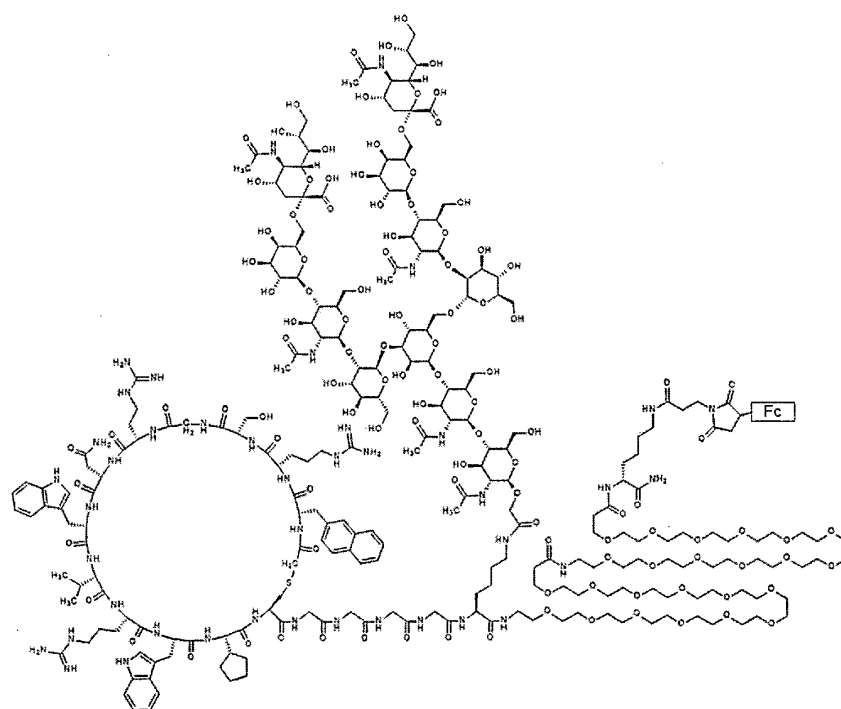
[化141]



[化142]

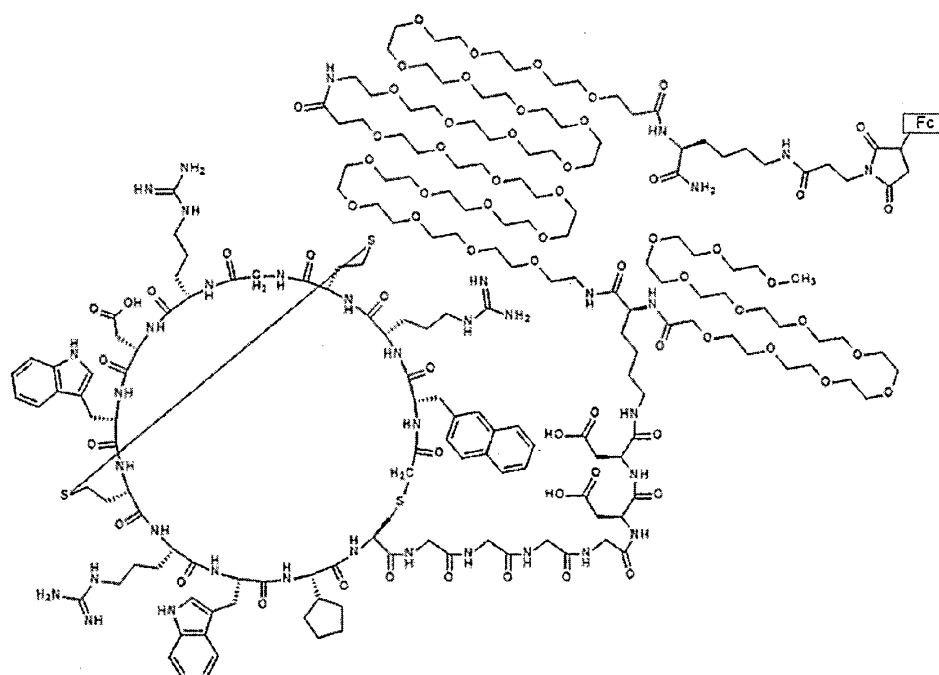


[化143]



および

[化144]



(式中、

N 2 9 7 G L Yは、F c 含有分子のN 2 9 7 結合糖鎖の非還元末端と結合していることを表し、

F cは、F c 含有分子のシステイン残基のチオール基と結合していることを表す) のいずれかで表される構造が挙げられる。ここに示された構造は、それぞれ後述する実施例におけるConjugate-67、Conjugate-64、Conjugate-56、Conjugate-4における環状ペプチドおよびリンカー構造である。

[0223] 本発明のコンジュゲート体は、上述の環状ペプチド、キャリア分子、およびリンカー構造の任意の組み合わせであり得る。好ましい態様において、環状ペプチドおよびリンカー構造は、上述の環状ペプチドおよびリンカー構造の任意の組み合わせから選択されるいずれかであり、キャリア分子は、Fc断片から選択されるいずれかであり得る。

より好ましい態様において、環状ペプチドは、実施例におけるPeptide-11、Peptide-115、またはPeptide-121であり、リンカー構造は、

G l y - G l y - G l y - G l y - A s p - A s p - K P E G - P 1 2 P -
P 1 2 P、

G l y - G l y - G l y - G l y - K S G - P 1 2 P - P 1 2 P、

G l y - G l y - G l y - G l y - A s p - A s p - P 1 2 P、

G l y - S e r - G l y - S e r - A s p - A s p - K P E G - P 1 2 P -
P 1 2 P、

G l y - S e r - G l y - S e r - A s p - A s p - P 1 2 P - P 1 2 P、

または

G l y - G l y - G l y - G l y - A s p - A s p - P 1 2 P - K P E G -
P 1 2 Pであり得る。

より好ましい態様において、環状ペプチドおよびリンカー構造は、実施例におけるPeptide-13～Peptide-109から選択されるいずれかであり、キャリア分子はFc-AまたはFc-Cであり得る。

より好ましい態様において、環状ペプチドおよびリンカー構造は、実施例におけるPeptide-39、Peptide-75、Peptide-76、およびPeptide-79から選択されるいずれかであり、キャリア分子はFc-Aであり得る。

別のより好ましい態様において、環状ペプチドおよびリンカー構造は、実施例におけるPeptide-16、Peptide-22、Peptide-46、Peptide-55、およびPeptide-68から選択されるいずれかであり、キャリア分子はFc-Cであり得る。

[0224] 本発明のコンジュゲート体が塩基性基を有する場合、酸と組み合わせられて塩を形成することができ、これらの塩は、本発明に包含される。そのような塩としては、例えば、無機酸塩、有機酸塩、アミノ酸塩、およびスルホン酸塩が挙げられる。無機酸塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などが挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、フタル酸塩、トリフルオロ酢酸塩などが挙げられる。アミノ酸塩としては、例えば、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などが挙げられる。スルホン酸塩としては、例えば、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン

酸塩、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸塩、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホン酸塩、4-エチルベンゼンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩などが挙げられる。本発明のコンジュゲート体の薬学上許容される塩の好ましい態様としては、酢酸塩、塩酸塩、またはトリフルオロ酢酸塩であり、より好ましくは、酢酸塩である。

[0225] 本発明のコンジュゲート体が酸性基を有する場合、塩基と組合わされて塩を形成することができ、これらの塩は、本発明に包含される。これらの塩としては、例えば、金属塩、無機アミン塩、有機アミン塩、およびアミノ酸塩が挙げられる。金属塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などが挙げられる。無機アミン塩としては、例えば、アンモニウム塩が挙げられる。有機アミン塩としては、例えば、モルホリン塩、グルコサミン塩、エチレンジアミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、ジエタノールアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩などが挙げられる。アミノ酸塩としては、例えば、リジン塩、アルギニン塩などが挙げられる。

[0226] 本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、結晶の形態で使用されてもよく、該結晶は、本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩のみから形成されていても、共結晶や溶媒和物（例えば水和物）を形成していてもよい。本発明のコンジュゲート体およびその薬学上許容される塩は、いずれかを単独でまたは2種以上を適宜組み合わせて用いてもよい。

[0227] 本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、それを構成する1個以上の原子が非天然の比率で同位体原子に置換された同位体化合物を形成することができる。同位体原子は、放射性または非放射性であり得、例えば、重水素 (^2H ; D)、トリチウム (^3H ; T)、炭素-14 (^{14}C)、ヨウ素-125 (^{125}I) などである。放射性の同位体原子で標識された化

化合物は、疾患の治療または予防薬、研究用試薬（例えば、アッセイ用試薬）、診断薬（例えば、画像診断薬）などとして使用され得る。本発明は、放射性または非放射性の同位体化合物を包含する。

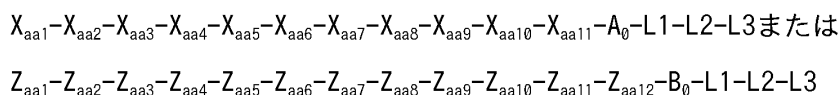
[0228] 4. コンジュゲート体の製造方法

本発明のコンジュゲート体は、上述した環状ペプチド、リンカー分子、キャリア分子等の中間体を適宜、有機合成化学分野で公知の反応を利用して結合させることで製造することができる。その製造の順序は特に限定されず、中間体や目的物の構造に合わせて、常法に従って、様々な方法を採用することができる。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、脱保護等を行ってもよい。

[0229] 各反応工程において、中間体及び最終物は、適宜分離・精製され次の反応へ供され、又は医薬品原体若しくは試薬として利用される。

[0230] 本発明のコンジュゲート体は、例えば、以下の工程（１）～（６）を含む方法により製造することができる。

（１）固相合成法により、以下の式



[式中、

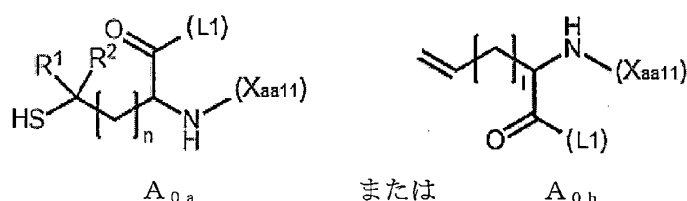
$X_{aa1} \sim X_{aa11}$ は、式（１）に関して定義されたとおりであり（但し、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、チオール基は、結合を形成しておらず、それぞれチオール基のままである）、

$L1 \sim L3$ は、式（XX）に関して定義されたとおりであり（但し、 $L2$ が側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含む場合、該残基は、 Lys 残基に置き換えられる）、

$Z_{aa1} \sim Z_{aa12}$ は、式（X）において定義されたとおりであり、

A_0 は、以下の式

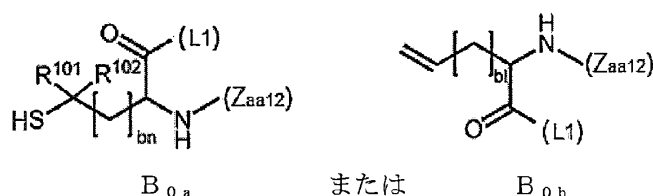
[化145]



(式中、(X_{aa11})は、X_{aa11}との結合点を示し、(L1)は、L1におけるN末端のアミノ酸残基との結合点を示し、lおよびnは、式(1)に関して定義されたとおりである)で表される残基であり、

B₀は、以下の式

[化146]



(式中、(Z_{aa12})は、Z_{aa12}との結合点を示し、(L1)は、L1におけるN末端のアミノ酸残基との結合点を示し、blおよびbnは、式(X)に関して定義されたとおりである)で表される残基である]で表されるオリゴペプチドX-A-LまたはZ-B-Lを、C末端側から合成する工程、

(2)

(a) オリゴペプチドX-A-LにおいてX_{aa1}のN末端アミノ基とA_{0a}とを連結して環形成基A₁~A₃(ただし、R¹⁰の位置においてL1に連結されている)のいずれかを形成させるか、

(b) オリゴペプチドX-A-LにおいてX_{aa1}のN末端アミノ基とA_{0b}とを連結して環形成基A₄またはA₅(ただし、R¹⁰の位置においてL1に連結されている)を形成させるか、

(c) オリゴペプチドZ-B-LにおいてZ_{aa1}またはZ_{aa2}のN末端アミノ基とB_{0a}とを連結して環形成基B₁~B₄(ただし、R¹¹⁰の位置においてL

1 に連結されている) のいずれかを形成させるか、または

(d) オリゴペプチド $Z-B-L$ において Z_{aa1} または Z_{aa2} の N 末端アミノ基と B_{ob} とを連結して環形成基 B_5 または B_6 (ただし、 R^{110} の位置において L_1 に連結されている) を形成させる

ことにより、工程 (1) において合成されたオリゴペプチドを環化させ、環状ペプチドを得る工程、

(3) 工程 (1) においてオリゴペプチド $X-A-L$ を合成した場合、工程 (2) で環化させたオリゴペプチド $X-A-L$ の X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基において、 $-S-S-$ 、 $-S-CH_2-S-$ 、または $-S-X-S-$ (式中、 X は、式 (1) に関して定義されたとおりである) で表される結合を形成させ、二環性環状ペプチドを得る工程、

(4) L_2 が側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含み、オリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ において lys 残基に置き換えられている場合、該 lys 残基に糖鎖を導入することにより側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を形成させる工程、

(5) L_3 に、マレイミド基または 1, 2, 3-トリアゾール環を含む反応基を結合させる工程、および

(6) 工程 (5) の反応基を介して、環状ペプチドとキャリア分子とを結合させる工程。

[0231] 工程 (1) では、環状ペプチドの元となるオリゴペプチドとリンカー構造の元となるオリゴペプチドとを 1 つのオリゴペプチドとして C 末端側から合成する。オリゴペプチドの合成は、例えば 9-フルオニルメトキシカルボニル基 (Fmoc 基) をアミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行うことができる。固相合成には、市販の自動合成機 (例えば Syro II (Biotage Japan 社)、Liberty Blue (CEM 社) など) を用いることができる。例えば、ペプチド自動合成機を用いて、固相支持体 (例えば、Rink Amide Resin AM (Novaviochem 社)、2-Chlorotrityl chloride resin (Novaviochem 社) など) に、アミノ基の保護基 (例えば、Fmoc 基など) で保護されたアミノ酸を C

末端側から順次連結する（C末端アミノ酸は Y_{aa10} である）。アミノ基の脱保護は当業者に知られた方法（例えば、Fmoc基の場合は20%ピペリジン／1-メチル-2-ピロリジノンなど）で行うことができる。N末端のアミノ酸まで連結し、オリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ を得る。

オリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ において L_2 が側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含む場合、当該残基の連結は、常法により行うことができる。例えば、まず、 Ly_s 残基を合成済みの部分に連結し、ポリオキシアルキレン鎖を含む化合物（例えば実施例における合成法3に記載のPEG 011Aなど）を、当該 Ly_s 残基の、リンカー構造において側鎖となる部分のアミノ基（例えば実施例における合成法3においては Ly_s 残基の α アミノ基）に結合させることにより、側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸の残基の連結を行うことができる。

[0232] 工程（2）では、環形成基 $A_1 \sim A_5$ または $B_1 \sim B_6$ を形成させることにより、工程（1）において合成されたオリゴペプチドを環化させ、環状ペプチドを得る。環形成基を形成させるためには、まずオリゴペプチドのN末端アミノ酸残基のアミノ基を脱保護した後、必要であれば環形成基を形成させるための基をアミノ基に導入し、環状ペプチドを形成させることができる。

[0233] 工程（2）（a）または（c）において、環形成基 $A_1 \sim A_3$ および $B_1 \sim B_3$ のいずれかを形成させる場合、例えば、 $-COCH_2X$ （ X は Cl などの脱離基）をN末端アミノ基に導入する。具体的には、クロロ酢酸をN末端アミノ基と反応させ、クロロメチルカルボニル基などをアミノ基に導入することができる。 $-COCH_2X$ と A_{0a} または B_{0a} のチオール基とが反応し、環形成基 A_1 または B_1 を有する環状ペプチドが得られる。さらに環形成基 A_1 または B_1 のスルフィド基を酸化することにより、環形成基 A_2 、 A_3 、 B_2 、または B_3 を有する環状ペプチドが得られる。

[0234] 工程（2）（b）において、環形成基 A_4 または A_5 を形成させる場合、例えば $-CO(CH_2)_kCH=CH_2$ をN末端アミノ基に導入する。 $-CO(CH_2)_kCH=CH_2$ と A_{0b} の側鎖 $-(CH_2)_lCH=CH_2$ とのオレフィンメ

タセシスにより環形成基 A_4 を有する環状ペプチドが得られる。さらに環形成基 A_4 におけるC-C二重結合を還元することにより、環形成基 A_5 を有する環状ペプチドが得られる。

[0235] 工程(2)(c)において、環形成基 B_4 を形成させる場合、 Z_{aa1} または Z_{aa2} のチオール基と B_{0a} のチオール基とを反応させることにより、環形成基 B_4 を有する環状ペプチドが得られる。ジスルフィド結合の形成は、常法(例えば、ヨウ素酸化法)により行うことができる。

[0236] 工程(2)(d)において、環形成基 B_5 または B_6 を形成させる場合、例えば $-CO(CH_2)_{bk}CH=CH_2$ をN末端アミノ基に導入する。 $-CO(CH_2)_{bk}CH=CH_2$ と B_{0b} の側鎖 $-(CH_2)_{bl}CH=CH_2$ とのオレフィンメタセシスにより環形成基 B_5 を有する環状ペプチドが得られる。さらに環形成基 B_5 におけるC-C二重結合を還元することにより、環形成基 B_6 を有する環状ペプチドが得られる。

[0237] その後、得られたペプチドをペプチドレジンから、常法(例えば、Rink Amide Resin AMを使用する場合には、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール-トリイソプロピルシラン-水を使用する条件)により切断する。エーテル沈殿により粗ペプチドを回収したのち、常法(例えば、逆相高速液体クロマトグラフィー)により目的物を精製することができる。

[0238] 工程(3)は、工程(1)においてオリゴペプチド $X-A-L$ を合成した場合に、二環性環状ペプチドを形成させるための工程である。工程(2)で得られた環状ペプチドについて、常法(例えば、ヨウ素酸化法)により X_{aa3} と X_{aa8} との間のジスルフィド結合などの結合を形成させ、二環性環状ペプチドを得ることができる。エーテル沈殿により粗ペプチドを回収したのち、常法(例えば、逆相高速液体クロマトグラフィー)により目的物を精製することができる。

[0239] 工程(4)は、オリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ において L_2 の側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基が lys 残基に置き換えられている場合に、側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を形成させるための工程

である。L y s 残基の変換は、糖鎖を含む化合物（例えば実施例における合成法5に記載のS G Aなど）を常法によりL y s 残基の ϵ アミノ基に結合させることにより行うことができる。反応後、常法（例えば、逆相高速液体クロマトグラフィー）により目的物を精製することができる。

[0240] 工程（5）では、オリゴペプチドX-A-LまたはZ-B-Lとキャリア分子とを結合させるためのマレイミド基または1, 2, 3-トリアゾール環を形成し得る反応基を、L 3に結合させる。マレイミド基のオリゴペプチドへの結合は、例えば3-マレイミドプロピオン酸 N-スクシンイミジルなどの試薬を用いて、常法により行うことができる。1, 2, 3-トリアゾール環を形成させるためには、例えば、C u A A C、S P A A Cなどの付加環化反応を利用することができる。利用する反応に応じて、1, 2, 3-トリアゾール環を形成し得る反応基として、アセチレン基、D B C Oを含む反応基などを選択する。好ましい態様において、S P A A Cを利用して1, 2, 3-トリアゾール環を形成させ、この場合、1, 2, 3-トリアゾール環を形成し得る反応基として、D B C Oを含む反応基を選択し得る。D B C Oを含む反応基のオリゴペプチドへの結合は、例えばジベンゾシクロオクチン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルなどの試薬を用いて、常法により行うことができる。

[0241] 工程（6）におけるキャリア分子は、上記111の「1. キャリア分子」に記載した方法にしたがって調製される。工程（5）においてオリゴペプチドに結合させた反応基に応じて、適切な反応基を有するようにキャリア分子を調製することができる。例えば、マレイミド基を有するオリゴペプチドと結合させる場合は、チオール基を有するキャリア分子を調製すればよい。1, 2, 3-トリアゾール環を形成し得る反応基を有するオリゴペプチドと結合させる場合には、例えば、糖鎖リモデリングされたF c含有分子の非還元末端のシアル酸の2位にアジド基を含む反応基を導入すればよい。N 2 9 7結合糖鎖の非還元末端にアジド基などの反応基を有する分子は、F c含有分子の糖鎖リモデリング工程で合成してもよい。例えば、非還元末端のシアル酸の2位にアジド基が結合された糖鎖ドナー分子を用いて糖鎖リモデリングを

行うことができる。

環状ペプチドとキャリア分子との結合には、上記ⅠⅠⅠの「3. リンカー構造」に記載した方法などの公知の方法を適用することができ、例えば、実施例の合成法8～10に準じて行うことができる。

[0242] 本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、TSP1阻害活性を有し、本願の実施例に示されるヒトTSP1および血管内皮細胞を用いた細胞接着阻害アッセイにより測定される IC_{50} が、500nM以下であり、好ましくは200nM以下である。したがって、本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、TSP1と血管内皮細胞との接着を阻害することができるため、血流改善剤として有用である。なお、キャリア分子が、Fc含有分子であって、2分子のFc含有分子が架橋されて1分子のコンジュゲート体（すなわち二量体）が形成されている場合、 IC_{50} の算出におけるモル濃度は、二量体の分子量を使用して算出する。キャリア分子が、Fc含有分子であって、Fc含有分子が架橋されておらず、コンジュゲート体が単量体のままである場合（例えば、Fc含有分子のヒンジ部のジスルフィド結合を還元して生成させたチオール基を介して環状ペプチドと結合している場合）、 IC_{50} の算出におけるモル濃度は、単量体の分子量を2倍した値を使用して算出する。また、キャリア分子が、Fc含有分子であって、そのヒンジ部のジスルフィド結合を還元して生成させたチオール基を介して環状ペプチドと結合したFc含有分子である場合、Fc含有分子には色々な種類の糖鎖が結合し得る。その場合、 IC_{50} の算出におけるモル濃度は、脱糖鎖体の分子量を用いて算出する。

[0243] 5. 医薬組成物

本発明はさらに、本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩を有効成分として含む医薬組成物を提供する（以下、本発明の医薬組成物ⅠⅠという。）。本発明の医薬組成物ⅠⅠは、優れたTSP1阻害活性を有しており、本願の実施例に示されるヒトTSP1および血管内皮細胞を用いた細胞接着阻害アッセイにより測定される IC_{50} が、500nM以下であり

、好ましくは200 nM以下である。したがって、本発明の医薬組成物ⅠⅠは、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状（例えば、血管新生阻害に起因し得る疾患、血栓形成亢進に起因し得る疾患、炎症性疾患、腎臓細胞機能低下に起因し得る疾患、血管弛緩作用の抑制に起因し得る疾患、虚血性疾患、癌疾患などの疾患、および鎌型赤血球病に伴う血管閉塞（vaso-occlusive crisis）、血管新生阻害、組織壊死、インスリン抵抗性、一般的な創傷などの症状）の治療または予防に有用である。上記疾患または症状の具体例は、本発明の医薬組成物Ⅰに関して記載したとおりである。

[0244] 本発明の医薬組成物ⅠⅠは、優れたTSP1阻害活性を有しており、血流改善作用を有し得る。そのため、血流を改善することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防に有用である。例えばそのような疾患としては、包括的高度慢性下肢虚血、重症下肢虚血、末梢動脈疾患、心筋梗塞、狭心症、腎障害、虚血再灌流障害が挙げられる。また、包括的高度慢性下肢虚血としては、例えば、糖尿病性足病変が挙げられ、糖尿病性足病変としては、例えば、糖尿病性足潰瘍が挙げられる。

[0245] 好ましい態様において、本発明の医薬組成物ⅠⅠは、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防に有用であり、例えば、重症下肢虚血患者における創傷治癒の促進および重症下肢虚血に対する血管内治療の予後の改善に有用である。

[0246] TSP1は、重症下肢虚血患者の下肢骨格筋中でその発現が亢進していることが知られている。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本発明の医薬組成物ⅠⅠは、TSP1と血管内皮細胞との接着を阻害することにより、TSP1によって阻害されている血管新生または血管拡張を促進することができると考えられる。それにより本発明の医薬組成物ⅠⅠは、重症下肢虚血患者における創傷治癒を促進することができ、またカテーテルなどによる血管内治療と組み合わせた場合に当該治療の予後を改善する（例えば、再狭窄を予防する）ことができる。

- [0247] 本発明の医薬組成物Ⅰは、本発明の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩と、適宜の薬学上許容される添加剤とを混合して製剤化することができる。例えば、本発明の医薬組成物Ⅰは、錠剤、カプセル剤、顆粒剤などの製剤として経口的に、または、注射剤、経皮吸収剤などの製剤として非経口的に投与することができる。
- [0248] これらの製剤は、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、乳化剤、安定剤、希釈剤、注射剤用溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤などの添加剤を用いて、周知の方法で製造される。添加剤の具体例は、本発明の医薬組成物Ⅰに関して記載したとおりである。
- [0249] 本発明の医薬組成物Ⅰが投与される対象は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。
- [0250] 本発明の医薬組成物Ⅰの投与経路としては、経口投与および非経口投与のいずれでもよく、対象となる疾患に応じて好適な投与経路を選択すればよい。また投与経路は、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。本発明の医薬組成物Ⅰの投与経路の好ましい態様は、静脈内投与、皮下投与、または経皮投与である。
- [0251] 本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、治療または予防に有効な量で対象に投与される。「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与経路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。
- [0252] 本発明の環状ペプチドⅠもしくはⅠⅠまたはその薬学上許容される塩の投与量は、対象の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定され、ヒトの成人に対しては、通常、 $0.1 \sim 1000 \text{ mg} / \text{kg}$ 、好適には $0.1 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ を、 $1 \sim 7$ 日間に1回、または1日2回もしくは3回以上投与することができる。

[0253] 本発明の医薬組成物Ⅰは、少なくとも1つの既知の治療剤または治療法と併用してもよい。例えば、重症下肢虚血の治療においては、カテーテルなどの血管内治療の前に、後に、または同時に、本発明の医薬組成物Ⅰを投与することができる。

本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、薬剤溶出性ステント（DES）によって送達することができる。薬剤溶出性ステントとは、ステント表面に薬剤を担持させ、血管内留置後、薬剤が徐々に溶出されるようにしたステントをいう。

[0254] また本発明は、本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩の治療または予防に有効な量を、それを必要とする対象に投与することを含む、疾患または症状の治療または予防のための方法に関する。

[0255] 本発明における「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患または症状、投与形態および投与径路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、対象の種、疾患または症状の種類、症状、性別、年齢、持病、その他の要素に応じて適宜決定される。

[0256] 本発明における「対象」は、例えば、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

[0257] 本発明における「投与すること」には、経口投与および非経口投与が含まれ、全身投与および局所投与のいずれであってもよい。非経口投与としては、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与などを挙げることができる。本発明における「投与すること」の好ましい態様は、静脈内投与、皮下投与、または経皮投与である。

[0258] 本発明における「疾患または症状」としては、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状が挙げられる。当該疾患または症状の具体例は、本発明の医薬組成物Ⅰに関して記載したとおりである。好ましい態様において、本発明の治療または予防方法は、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防に有用であり

、例えば、重症下肢虚血患者における創傷治癒の促進および重症下肢虚血に対する血管内治療の予後の改善に有用である。

[0259] 本発明のコンジュゲート体では、本発明の環状ペプチドⅠまたはⅠⅠと比較してPK-PDプロファイルが改善され得る。したがって、本発明の医薬組成物ⅠⅠおよび本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩による治療または予防方法によれば、より少ない投与頻度で、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状を治療または予防することができる。

[0260] 以下、実施例および試験例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲は、これらに限定されるものではない。

実施例

[0261] [合成例]

1. Peptide-1～Peptide-12の合成ならびにPeptide-115、Peptide-119およびPeptide-125～Peptide-139の合成

Peptide-1を、下記表に示すとおり、後述の合成法1（収率19%）および合成法4（収率16%）により合成した。収率は、各合成法の代表化合物における結果を示す。

Peptide-2～Peptide-12も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-115およびPeptide-119を、下記表に示すとおり、後述の合成法1により合成した。

Peptide-125を、下記表に示すとおり、後述の合成法1、合成法11および合成法14により合成した。

Peptide-126、Peptide-128、Peptide-129、Peptide-134、Peptide-135、およびPeptide-138を、下記表に示すとおり、後述の合成法1、合成法11および合成法12により合成した。

Peptide-127、Peptide-130～Peptide-133、Peptide-136、Peptide-137、およびPeptide-139を、下記表に示すとおり、後述の合成法1、合成法11および合成法13により合成した。

[表1]

Peptide-	分子量	procedure 1	procedure 2	procedure 3	LC-MS condition	MS 実測値	MS 価数	Rt (min)
1	1713.02	合成法1	合成法4		条件1	856.88	2	1.51
2	1699.00	合成法1	合成法4		条件1	849.87	2	1.52
3	1689.98	合成法1	合成法4		条件1	845.35	2	2.09
4	1689.98	合成法1	合成法4		条件1	845.35	2	1.72
5	1705.00	合成法1	合成法4		条件1	852.86	2	1.50
6	1643.96	合成法1	合成法4		条件1	822.36	2	1.55
7	1669.99	合成法1	合成法4		条件1	835.37	2	1.66
8	1684.02	合成法1	合成法4		条件1	842.38	2	1.57
9	1714.01	合成法1	合成法4		条件1	857.37	2	1.53
10	1727.05	合成法1	合成法4		条件1	863.87	2	1.52
11	1728.03	合成法1	合成法4		条件1	864.38	2	1.53
12	1701.01	合成法1	合成法4		条件1	850.88	2	2.07
125	1784.10	合成法1	合成法11	合成法14	条件1	892.39	2	1.78
126	1714.01	合成法1	合成法11	合成法12	条件1	857.37	2	1.77
127	1742.06	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	871.39	2	1.78
128	1699.98	合成法1	合成法11	合成法12	条件1	850.36	2	1.70
129	1714.01	合成法1	合成法11	合成法12	条件1	857.37	2	1.80
130	1714.01	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	857.37	2	1.74
131	1728.03	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	864.38	2	1.75
132	1728.03	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	864.38	2	1.72
133	1756.09	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	878.39	2	1.81
134	1742.06	合成法1	合成法11	合成法12	条件1	871.39	2	1.85
135	1742.06	合成法1	合成法11	合成法12	条件1	871.39	2	1.82
136	1756.09	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	878.39	2	1.83
137	1742.06	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	871.39	2	1.80
138	1728.03	合成法1	合成法11	合成法12	条件1	864.38	2	1.77
139	1742.06	合成法1	合成法11	合成法13	条件1	871.39	2	1.81
115	1666.91	合成法1			条件1	1666.91	1	1.47
119	1667.89	合成法1			条件1	834.40	2	1.48

[0262] 二環性環状ペプチドPeptide-1~Peptide-12を構成する残基を下記表に示す。なお、12番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。また3および8番目のHCY残基は、ジスルフィド結合を形成している。

Peptide-115およびPeptide-119を構成する残基を下記表に示す。なお、12番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。

二環性環状ペプチドPeptide-125を構成する残基を下記表に示す。なお、12番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。また3および8番目のHCY残基は、チオール基が $-S-CH_2-CO-CH_2-S-$ で表される結合（アセトン架橋ともいう）を形成している。

二環性環状ペプチドPeptide-126、Peptide-128、Peptide-129、Peptide-134、Peptide-135、およびPeptide-138を構成する残基を下記表に示す。なお、12番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。また3および8番目のシステイン残基、HCY残基、またはPen残基は、ジスルフィド結合を形成している。

二環性環状ペプチドPeptide-127、Peptide-130~Peptide-133、Peptide-136、Peptide-137、およびPeptide-139を構成する残基を下記表に示す。なお、12番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。また3および8番目のシステイン残基、HCY残基、またはPen残基は、チオール基が $-S-CH_2-S-$ で表される結合（メチレン架橋ともいう）を形成している。

[表2-1]

Peptide-	環形成基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	IC50 (nM)
1	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	12.6
2	A _{1a1}	2NAL	AGB	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	20.0
3	A _{1a1}	2NAL	PHG	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	29.9
4	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	PHG	W	CPTG	C	33.8
5	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	4PAL	W	CPTG	C	23.6
6	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	V	W	V	C	32.1
7	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	V	W	CPTG	C	31.1
8	A _{1a1}	2NAL	TLE	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	12.6
9	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	AGB	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	22.4
10	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	14.3
11	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	26.0
12	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	V	C	18.6
125	A _{1a1}	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	305.2
126	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	10.8

[表2-2]

127	A _{1a1}	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	11.6
128	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	8.4
129	A _{1a1}	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	43.7
130	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	7.7
131	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	14.2
132	A _{1a1}	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	7.0
133	A _{1a1}	2NAL	R	Pen	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	125.3
134	A _{1a1}	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	102.0
135	A _{1a1}	2NAL	R	Pen	G	R	D	W	H CY	R	W	CPTG	C	207.7
136	A _{1a1}	2NAL	R	H CY	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	161.6
137	A _{1a1}	2NAL	R	Pen	G	R	D	W	C	R	W	CPTG	C	80.6
138	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	92.5
139	A _{1a1}	2NAL	R	C	G	R	D	W	Pen	R	W	CPTG	C	30.9
115	B _{1a1}	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	17.5
119	B _{1a1}	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	22.0

[0263] 2. Peptide-13～Peptide-24の合成

Peptide-13を、下記表に示すとおり、後述の合成法1（収率6%）、合成法4（収率44%）、および合成法6（収率50%）により合成した。

Peptide-14も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-15を、下記表に示すとおり、後述の合成法2（収率3%）、合成法4（収率84%）、および合成法6（収率60%）により合成した。

Peptide-16を、下記表に示すとおり、後述の合成法3（収率13%）、合成法4（収率28%）、および合成法6（収率53%）により合成した。

Peptide-17～Peptide-24も同様の手法を用いて合成した。

[表3]

Peptide-	分子量	procedure 1	procedure 2	procedure 3	LC-MS condition	MS 実測 値	MS 価数	Rt (min)
13	3165.49	合成法 1	合成法 4	合成法 6	条件 1	1055.46	3	1.45
14	3051.39	合成法 1	合成法 4	合成法 6	条件 1	1017.45	3	1.51
15	2937.29	合成法 2	合成法 4	合成法 6	条件 1	1468.65	3	1.49
16	4305.88	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1435.37	3	2.10
17	4365.94	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1455.38	3	1.57
18	4305.88	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1435.37	3	1.59
19	4305.88	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1435.37	3	2.10
20	4361.99	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1454.06	3	1.92
21	4361.99	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1454.06	3	1.65
22	4365.94	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1455.37	3	1.58
23	4365.94	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1455.37	3	1.57
24	4361.99	合成法 3	合成法 4	合成法 6	条件 1	1454.05	3	1.63

[0264] リンカー構造を有する二環性環状ペプチドPeptide-13～Peptide-24を構成する残基を下記表に示す。なお、1 2 番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。環形成基は、アミノカルボニル基においてリンカー構造とアミド結合を形成しており、該アミノカルボニル基中のNH₂は、リンカー構造のN末端アミノ酸残基のN末端アミノ基のNHと置換されている。また3および8番目のHCY残基は、ジスルフィド結合を形成している。C末端のリジン残基は、合成法6によってマレイミド化され

ている。

[表4]

Peptide-	標形成	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
13	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	N	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K	
14	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
15	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	AGB	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K			
16	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
17	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	P12P	KPEG	K
18	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KPEG	K
19	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
20	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
21	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
22	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	S	G	S	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
23	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
24	A1a1	2NAL	R	Hcy	G	R	D	W	Hcy	R	W	CPTG	C	NMeG	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	P12P	KPEG	K

[0265] 3. Peptide-25～Peptide-72の合成

Peptide-25を、下記表に示すとおり、後述の合成法1（収率13%）および合成法6（収率71%）により合成した。

Peptide-26～Peptide-35、Peptide-37～Peptide-50、およびPeptide-57～Peptide-59も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-36を、下記表に示すとおり、後述の合成法2（収率6%）および合成法6（収率71%）により合成した。

Peptide-51を、下記表に示すとおり、後述の合成法3（収率9%）および合成法6（収率32%）により合成した。C末端のLysにはFmoc-Lys(Boc)-OH、それ以外のLys（KPEGに変換される）にはFmoc-Lys(ivDde)-OHを用いた。

Peptide-52～Peptide-56およびPeptide-70～Peptide-72も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-60を、下記表に示すとおり、後述の合成法1（収率15%）、合成法5（収率23%）、および合成法6（収率50%）により合成した。C末端のLysにはFmoc-Lys(ivDde)-OH、それ以外のLys（KSGに変換される）にはFmoc-Lys(Boc)-OHを用いた。

Peptide-61～Peptide-69も同様の手法を用いて合成した。

[表5-1]

Peptide-	分子量	procedure 1	procedure 2	procedure 3	LC-MS condition	MS 実測値	MS 価数	Rt (min)
25	2705.05	合成法 1	合成法 6		条件 1	1353.18	2	1.48
26	2762.11	合成法 1	合成法 6		条件 1	1381.69	2	1.42
27	3004.29	合成法 1	合成法 6		条件 1	1001.81	3	1.49
28	2774.11	合成法 1	合成法 6		条件 1	925.13	3	1.47
29	3004.29	合成法 1	合成法 6		条件 1	1001.81	3	1.47
30	3060.39	合成法 1	合成法 6		条件 1	1020.49	3	1.46
31	3004.29	合成法 1	合成法 6		条件 1	1001.81	3	1.46
32	3060.39	合成法 1	合成法 6		条件 1	1020.48	3	1.45
33	2759.14	合成法 1	合成法 6		条件 1	1379.68	2	1.69
34	2989.31	合成法 1	合成法 6		条件 1	1494.72	2	1.65
35	2890.19	合成法 1	合成法 6		条件 1	963.80	3	1.48
36	2776.08	合成法 2	合成法 6		条件 1	925.79	3	1.49
37	2745.11182	合成法 1	合成法 6		条件 1	915.4669	3	1.703
38	2975.28662	合成法 1	合成法 6		条件 1	992.1473	3	1.661
39	3032.34131	合成法 1	合成法 6		条件 1	1011.1617	3	1.565
40	2904.21216	合成法 1	合成法 6		条件 1	968.4718	3	1.533
41	3018.3147	合成法 1	合成法 6		条件 1	1006.474	3	2.081
42	2904.21216	合成法 1	合成法 6		条件 1	968.4725	3	1.532
43	3560.972	合成法 1	合成法 6		条件 1	1187.2642	3	2.097
44	3632.0499	合成法 1	合成法 6		条件 1	1210.9423	3	2.1
45	3688.1563	合成法 1	合成法 6		条件 1	1229.6301	3	1.823
46	3692.1019	合成法 1	合成法 6		条件 1	1230.9509	3	1.596
47	3660.1031	合成法 1	合成法 6		条件 1	1220.2886	3	1.598
48	3632.0499	合成法 1	合成法 6		条件 1	1210.942	3	1.591
49	3632.0499	合成法 1	合成法 6		条件 1	1210.9407	3	1.599
50	3632.0499	合成法 1	合成法 6		条件 1	1210.9404	3	1.59
51	4272.8105	合成法 3	合成法 6		条件 1	1424.4027	3	1.684
52	4272.8105	合成法 3	合成法 6		条件 1	1424.4024	3	1.68
53	4272.8105	合成法 3	合成法 6		条件 1	1424.396	3	1.685
54	4244.7573	合成法 3	合成法 6		条件 1	1415.0577	3	1.568
55	4244.7573	合成法 3	合成法 6		条件 1	1415.056	3	1.533
56	4244.7573	合成法 3	合成法 6		条件 1	1415.0559	3	1.534

[表5-2]

57	3075.3661	合成法 1	合成法 6		条件 1	1025.4912	3	1.444
58	3075.3661	合成法 1	合成法 6		条件 1	1025.4925	3	1.445
59	3075.3661	合成法 1	合成法 6		条件 1	1025.4922	3	1.443
60	6024.2405	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1506.1701	4	1.476
61	6024.2405	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1506.1697	4	1.468
62	5794.0657	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1931.2051	3	1.486
63	5794.0657	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1448.6553	4	1.489
64	5794.0657	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1931.2045	3	1.495
65	5996.1874	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1499.1625	4	2.071
66	5996.1874	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1499.1659	4	2.07
67	5996.1874	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1998.5501	3	1.408
68	5766.0126	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1441.6496	4	1.421
69	5766.0126	合成法 1	合成法 5	合成法 6	条件 1	1441.6473	4	1.412
70	4328.9168	合成法 3	合成法 6		条件 1	1443.0842	3	1.666
71	4332.8624	合成法 3	合成法 6		条件 1	1444.4025	3	1.647
72	4332.8624	合成法 3	合成法 6		条件 1	1444.4083	3	1.984

[0266] リンカー構造を有する環状ペプチドPeptide-25～Peptide-72を構成する残基を下記表に示す。なお、下記表において、Peptide-25～Peptide-72の環状ペプチドの1～11番目のアミノ酸残基は、本発明の環状ペプチドIIにおける $Z_{aa2} \sim Z_{aa12}$ に該当し、 Z_{aa1} は存在しない。12番目のシステイン残基は、環状ペプチドにおいては環形成基に変換されている。環形成基は、アミノカルボニル基においてリンカー構造とアミド結合を形成しており、該アミノカルボニル基中の NH_2 は、リンカー構造のN末端アミノ酸残基のN末端アミノ基の NH と置換されている。C末端のリジン残基は、合成法6によってマレイミド化されている。

[表6-1]

Peptide-	環形 成基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
25	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	P12P	K				
26	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	V	C	G	G	G	G	P12P	K				
27	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
28	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K				
29	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	D	D	K		
30	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	bAla	D	D	P12P	K		
31	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	d	d	P12P	k		
32	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	bAla	d	d	P12P	k		
33	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	K				
34	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
35	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K			
36	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K				
37	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	K				
38	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
39	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K		
40	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P12P	K			
41	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	D	D	K		
42	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	D	K			
43	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P24P	K		

[表6-2]

44	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	NMeG	NMeG	D	D	P12P	P12P	K	
45	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	NMeG	NMeG	D	D	P12P	P12P	D	D	P12P	K
46	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	S	G	S	D	D	P12P	P12P	K	
47	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	E	G	G	E	P12P	P12P	K	
48	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	P12P	D	P12P	K	
49	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	P12P	P12P	D	K	
50	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	D	P12P	D	K	
51	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
52	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
53	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KPEG	K
54	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
55	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
56	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KPEG	K
57	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	P6P	D	P6P	K	
58	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P6P	D	D	P6P	K	
59	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P6P	D	P6P	D	K	
60	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	KSG	P12P	P12P	K
61	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	KSG	P12P	K
62	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	KSG	P12P	P12P	K		
63	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	KSG	P12P	K		
64	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	P12P	P12P	KSG	K		
65	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	KSG	P12P	P12P	K

[表6-3]

66	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	P12P	KSG	P12P	K
67	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	P12P	P12P	KSG	K
68	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	KSG	P12P	P12P	K		
69	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	P12P	KSG	P12P	K		
70	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	NMeG	NMeG	NMeG	D	D	P12P	KPEG	P12P	K
71	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	S	G	D	D	KPEG	P12P	P12P	K
72	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	S	G	D	D	P12P	KPEG	P12P	K

[0267] 4. Peptide-73～Peptide-109の合成

Peptide-73を、下記表に示すとおり、後述の合成法1（収率13%）および合成法7（収率76%）により合成した。

Peptide-74、Peptide-75、Peptide-79～Peptide-83、Peptide-85、Peptide-87～Peptide-91、Peptide-95、Peptide-96、Peptide-98、Peptide-100～Peptide-106、およびPeptide-109も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-76を、下記表に示すとおり、後述の合成法1（収率20%）、合成法4（収率14%）、および合成法7（収率73%）により合成した。

Peptide-77、Peptide-78、Peptide-84、Peptide-86、およびPeptide-92～Peptide-94も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-97を、下記表に示すとおり、後述の合成法2（収率6%）および合成法7（収率60%）により合成した。

Peptide-107も同様の手法を用いて合成した。

Peptide-99を、下記表に示すとおり、後述の合成法2（収率20%）、合成法4（収率14%）、および合成法7（収率73%）により合成した。

Peptide-108も同様の手法を用いて合成した。

[表7]

Peptide-	分子量	procedure 1	procedure 2	procedure 3	LC-MS condition	MS 実測 値	MS 価数	Rt (min)
73	2841.24	合成法 1	合成法 7		条件 1	1421.21	2	1.90
74	2910.31	合成法 1	合成法 7		条件 1	1455.23	2	1.78
75	3140.48	合成法 1	合成法 7		条件 1	1047.17	3	1.74
76	3201.61	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1067.48	3	1.77
77	3301.68	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1100.83	3	1.75
78	3187.58	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1062.81	3	1.76
79	3168.53	合成法 1	合成法 7		条件 1	1056.51	3	1.79
80	3186.50	合成法 1	合成法 7		条件 1	1593.25	2	1.72

[表8]

Peptide-	分子量	procedure 1	procedure 2	procedure 3	LC-MS condition	MS 実測値	MS 価数	Rt (min)
81	2924.33	合成法 1	合成法 7		条件 1	975.49	3	1.74
82	3165.54	合成法 1	合成法 7		条件 1	1582.77	2	1.61
83	2911.29	合成法 1	合成法 7		条件 1	1455.72	2	1.74
84	2887.36	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1443.68	2	1.76
85	2881.30	合成法 1	合成法 7		条件 1	960.82	3	1.85
86	2956.42	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	985.80	3	1.78
87	2881.30	合成法 1	合成法 7		条件 1	960.82	3	1.78
88	3370.66	合成法 1	合成法 7		条件 1	1123.86	3	1.72
89	3255.5681	合成法 1	合成法 7		条件 1	1085.5172	3	1.727
90	3025.3933	合成法 1	合成法 7		条件 1	1008.8277	3	1.746
91	3154.5073	合成法 1	合成法 7		条件 1	1051.8421	3	1.749
92	3186.5954	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1062.481	3	1.759
93	3071.508	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1024.1387	3	1.765
94	3186.5954	合成法 1	合成法 4	合成法 7	条件 1	1062.48	3	1.747
95	3154.5073	合成法 1	合成法 7		条件 1	1051.8465	3	1.726
96	3040.4046	合成法 1	合成法 7		条件 1	1013.8938	3	1.75
97	3040.4046	合成法 2	合成法 7		条件 1	1013.8308	3	1.755
98	3182.5604	合成法 1	合成法 7		条件 1	1061.1877	3	1.732
99	3201.6067	合成法 2	合成法 4	合成法 7	条件 1	1067.4832	3	1.767
100	3140.4807	合成法 1	合成法 7		条件 1	1047.173	3	1.731
101	3196.587	合成法 1	合成法 7		条件 1	1065.8611	3	1.731
102	3140.4807	合成法 1	合成法 7		条件 1	1047.172	3	1.74
103	3196.587	合成法 1	合成法 7		条件 1	1065.8563	3	1.729
104	2895.331	合成法 1	合成法 7		条件 1	965.491	3	1.885
105	3125.5058	合成法 1	合成法 7		条件 1	1042.1788	3	1.852
106	3026.378	合成法 1	合成法 7		条件 1	1009.1514	3	1.744
107	2912.2754	合成法 2	合成法 7		条件 1	971.142	3	1.764
108	3073.4775	合成法 2	合成法 4	合成法 7	条件 1	1024.7938	3	1.778
109	3154.5073	合成法 1	合成法 7		条件 1	1051.8419	3	1.772

[0268] リンカー構造を有する環状ペプチドPeptide-73～Peptide-109を構成する残基を下記表に示す。なお、下記表において、Peptide-73～Peptide-75、Peptide-79～Peptide-83、Peptide-85、Peptide-87～Peptide-91、Peptide-95～Peptide-98、Peptide-100～Peptide-107、およびPeptide-109の環状ペプチドの1～11番目のアミノ酸残基は、本発明の環状ペプチドIIにおける $Z_{aa2} \sim Z_{aa12}$ に該当し、 Z_{aa1} は存在しない。12番目のシステイン残基は、環状ペ

プチドにおいては環形成基に変換されている。環形成基は、アミノカルボニル基においてリンカー構造とアミド結合を形成しており、該アミノカルボニル基中の NH_2 は、リンカー構造のN末端アミノ酸残基のN末端アミノ基のN H と置換されている。またPeptide-76~Peptide-78、Peptide-84、Peptide-86、Peptide-92~Peptide-94、Peptide-99、およびPeptide-108における3および8番目のH CY 残基は、ジスルフィド結合を形成している。C末端のリジン残基は、合成法7によってDBC0化されている。

[表9]

Peptide-	環形成基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
73	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	P12P	K			
74	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	P12P	K			
75	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
76	A1a1	2NAL	R	HCY	G	R	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
77	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K
78	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
79	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
80	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K

[表10-1]

Peptide-	環形成基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
81	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
82	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	V	W	V	C	G	G	G	G	G	NMG13	K			
83	B1a1	2NAL	R	S	G	R	D	W	V	AGB	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
84	A1a1	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	V	W	V	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
85	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
86	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
87	B1a1	2NAL	TLE	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	K			
88	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	D	P12P	K
89	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
90	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
91	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CHXG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
92	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
93	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	K		
94	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	D	K	
95	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
96	B1a1	2NAL	R	S	G	R	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	K		
97	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	P12P	K		
98	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	E	G	G	E	P12P	K	
99	A1a1	2NAL	R	HCY	G	R	N	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	D	D	P12P	K	
100	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	G	G	P12P	D	D	K	

[表10-2]

101	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	D	D	P12P	K	
102	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	d	d	P12P	k	
103	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	V	R	W	CPTG	C	bAla	bAla	bAla	d	d	P12P	k	
104	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	P12P	K			
105	B1a1	2NAL	R	S	G	R	N	W	NLE	V	W	CHXG	C	G	G	G	D	D	P12P	K	
106	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	P12P	K		
107	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	D	W	V	R	W	CPTG	C	G	G	G	P12P	K			
108	A1a1	2NAL	R	HCY	G	AGB	D	W	HCY	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	P12P	K		
109	B1a1	2NAL	R	S	G	AGB	N	W	NLE	R	W	CPTG	C	G	G	G	D	D	P12P	K	

[0269] 5. Fc含有分子の調製

(1) Fc-A (LALA体) の調製

Fc-AをW0 2018/003983の実施例2-5の記載に従って調製した。Fc-Aは、IgG1のFc断片からなる部分抗体分子であるFc-B (配列番号135) のLALA体であって、N末端が延長されている (配列番号137)。

(2) Fc-C (LALA-PA体) の調製

(i) Fc-C H鎖発現ベクターの構築

キャリア分子として、ヒトIgG1のFc断片からなる部分抗体であるFc-Cのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片 (配列番号138) を合成した (Thermo Fisher Scientific社)。合成したDNA断片を用いて、W0 2015/046505に記載されたベクターpCMA-LKをXbaI及びPmeIで消化後、In-Fusion HD PCRクローニングキット (Takara Bio USA社製) を用いて結合して、Fc-C発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA/Fc-C」と命名した。Fc-Cのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号165のヌクレオチド番号61~741 (ヌクレオチド番号1~60はシグナル配列をコードする配列) である。Fc-Cのアミノ酸配列は、配列番号139のアミノ酸番号21~247の配列 (アミノ酸番号1~20はシグナル配列) である。

(ii) Fc-Cの生産

FreeStyle 293F細胞 (Thermo Fisher Scientific社製) は、BCP型動物細胞培養装置 (株式会社バイオット社製) を用い、スピナーフラスコで、37℃、8%CO₂で継代、培養を行った。その後の培養は、マニュアルに従い、WAVE BIOREACTOR (GEヘルスケア社製) で実施した。対数増殖期のFreeStyle 293F細胞をFreeStyle 293 expression medium (Thermo Fisher Scientific社製) で希釈して2.0~2.4×10⁶細胞/mLに調整し、6Lを50L培養用WA

VEバック (cytiva社製) に移入した。その後、6 LのFreeStyle 293 expression mediumも移入し、37℃、8%CO₂で揺り動かして一晩培養した。37.5 mgのPolyethyleneimine (Polysciences社製) をOpti-Pro SFM培地 (Thermo Fisher Scientific社製) 400 mLに添加した。次に12.5 mgの発現ベクターpCMA/Fc-Cを400 mLのOpti-Pro SFM培地に添加した。Polyethyleneimine/Opti-Pro SFM混合液に、発現ベクター/Opti-Pro SFM混合液を加え穏やかに攪拌し、さらに5分間静置した後に全量をFreeStyle 293 F細胞を培養している50 L培養用WAVEバックに添加した。37℃、8%CO₂で揺り動かして4時間培養した後、12 LのEX-CELL VPRO培地 (SAFC Biosciences社製)、及び、43.4 g/LのBD Recharge CD (BD Biosciences社製) を500 mL添加し、37℃、8%CO₂で揺り動かして6日間培養した。得られた培養上清をデプスフィルター (孔径: 5 µm、GEヘルスケア社製) に通し、その後、カプセルカートリッジフィルター (孔径: 0.45 µm、アドバンテック東洋社製) でろ過した。

(iii) Fc-Cの精製

Fc-Cの精製は、WO 2018/003983の実施例2-4 (2-4C) に記載されたFc-Bの精製法と同様の方法で実施し、Protein Aアフィニティクロマトグラフィーとセラミックハイドロキシアパタイトの2段階工程で精製した。

[0270] 6. Conjugate-1~Conjugate-12の合成

Conjugate-1~Conjugate-12を、下記表に示すとおり、Peptide-13~Peptide-24を用いて、後述の合成法8により合成した。Conjugate-1~Conjugate-12は、それぞれPeptide-13~Peptide-24を、Fc含有分子のCys226及びCys229 (それぞれE uインデックスの226位及び229位のCys) に結合させている。なお、表11~表14において、糖鎖コンジュゲート体Conjugate-61~Conjugate-97では、環状ペプチドがコンジュゲーションしたFc含有分子

2分子がジスルフィド結合により架橋され、1分子となっているのに対し、マレイミドコンジュゲート体Conjugate-1～Conjugate-60では、Fc含有分子（単量体）同士は架橋されていない。また、マレイミドコンジュゲート体はFc含有分子に色々な種類の糖鎖が不均一に結合した混合物として存在しているが、表11～表14におけるマレイミドコンジュゲート体の分子量の算出及びLC-MSにおける測定ではFc含有分子の糖鎖を除いている。すなわち、マレイミドコンジュゲート体の分子量の算出においては糖鎖の分子量は考慮せず、またMS測定においては、LC-MS測定前に脱糖鎖処理を行っている。

[表11]

Conjugate-	前駆体	キャリア	連結基 C	分子量	procedure	LC-MS condition	MS (deconvolution)	Rt(min)	IC ₅₀ (nM)
1	Peptide-13	Fc-A	C3	31663.4	合成法 8	条件 4	31662.30	2.21	205.5
2	Peptide-14	Fc-A	C3	31435.2	合成法 8	条件 4	31434.13	2.32	207
3	Peptide-15	Fc-A	C3	31207	合成法 8	条件 4	31205.80	2.36	116
4	Peptide-16	Fc-C	C3	33949.7	合成法 8	条件 4	33949.09	2.39	20.1
5	Peptide-17	Fc-C	C3	34069.7	合成法 8	条件 4	34069.23	2.37	28.75
6	Peptide-18	Fc-C	C3	33949.7	合成法 8	条件 4	33948.96	2.39	38.15
7	Peptide-19	Fc-C	C3	33949.7	合成法 8	条件 4	33949.19	2.38	21.95
8	Peptide-20	Fc-C	C3	34061.9	合成法 8	条件 4	34061.42	2.43	38.2
9	Peptide-21	Fc-C	C3	34061.9	合成法 8	条件 4	34061.50	2.42	43.55
10	Peptide-22	Fc-C	C3	34069.7	合成法 8	条件 4	34069.45	2.36	12.75
11	Peptide-23	Fc-C	C3	34069.7	合成法 8	条件 4	34069.38	2.36	17.0
12	Peptide-24	Fc-C	C3	34061.9	合成法 8	条件 4	34061.25	2.42	44.65

[0271] 7. Conjugate-13～Conjugate-97の合成

Conjugate-13～Conjugate-97を、下記表に示すとおり、Peptide-25～Peptide-109（環状ペプチドおよびリンカー構造からなる化合物）を用いて、後述の合成法9または合成法10により合成した。Conjugate-13～Conjugate-60は、それぞれPeptide-25～Peptide-72を、Fc含有分子のCys226及びCys229（それぞれE u インデックスの226位及び229位のC y s）に結合させている。また、Conjugate-61～Conjugate-97におけるFc含有分子のN297結合糖鎖は、N297-(Fuc)SGに糖鎖リモデリングされている。なお、Conjugate-65、74、および80～82の環状ペプチド部分に相当する環状ペプチドは、Peptide-1である。Conjugate-64の環状ペプチド部分に相当する環状ペプチドは、Peptide-11である。Conjugate-66および96の環状ペプチド部分に相当する環状ペプチドは、Peptide-9である。Conjugate-72の環状ペプチド部分に相当する環状ペプチドは、Peptide-6である。Conjugate-87の環状ペプチド部分に相当する環状ペプチドは、Peptide-10である。その他のコンジュゲート体の環状ペプチド部分に相当する環状ペプチドを、以下に示すとおり、Peptide-110～124という。

Conjugate-13, 61, 68, 70: Peptide-110

Conjugate-14: Peptide-111

Conjugate-69, 83, 85, 86: Peptide-112

Conjugate-29, 97: Peptide-113

Conjugate-73: Peptide-114

Conjugate-15～20, 42～47, 53～57, 62, 63, 76～78, 88～91: Peptide-115

Conjugate-21, 22, 92, 93: Peptide-116

Conjugate-75: Peptide-117

Conjugate-71: Peptide-118

Conjugate-23, 24, 94, 95: Peptide-119

Conjugate-25, 26: Peptide-120

Conjugate-27, 31～41, 48～52, 58～60, 67: Peptide-121

Conjugate-79: Peptide-122

Conjugate-28, 30: Peptide-123

Conjugate-84: Peptide-124

[表12-1]

Conjugate-	前駆体	キャリア	連結基 C	分子量	procedure	LC-MS condition	MS (deconvolution)	Rt(min)	IC ₅₀ (nM)
13	Peptide-25	Fc-A	C3	30742.5	合成法 9	条件 4	30741.70	2.19	36.5
14	Peptide-26	Fc-A	C3	30856.6	合成法 9	条件 4	30855.70	2.06	12.8
15	Peptide-27	Fc-A	C3	31341	合成法 9	条件 4	31340.20	2.09	23.7
16	Peptide-28	Fc-A	C3	30880.6	合成法 9	条件 4	30880.00	2.11	11.7
17	Peptide-29	Fc-A	C3	31341	合成法 9	条件 4	31340.00	2.21	24.9
18	Peptide-30	Fc-A	C3	3145.3	合成法 9	条件 4	31452.00	2.2	23.5
19	Peptide-31	Fc-A	C3	31341	合成法 9	条件 4	31340.00	2.21	52.6
20	Peptide-32	Fc-A	C3	31453.2	合成法 9	条件 4	31452.60	2.18	31.9
21	Peptide-33	Fc-A	C3	30860.6	合成法 9	条件 4	30849.70	2.53	41.0
22	Peptide-34	Fc-A	C3	31311	合成法 9	条件 4	31310.20	2.5	43.8
23	Peptide-35	Fc-A	C3	31112.8	合成法 9	条件 4	31111.80	2.23	34.9
24	Peptide-36	Fc-A	C3	30884.6	合成法 9	条件 4	30883.70	2.27	56.5
25	Peptide-37	Fc-A	C3	30822.6	合成法 9	条件 4	30821.5	2.56	40.6
26	Peptide-38	Fc-A	C3	31283	合成法 9	条件 4	31282.6	2.53	115.0
27	Peptide-39	Fc-A	C3	31397	合成法 9	条件 4	31396	2.38	79.8
28	Peptide-40	Fc-A	C3	31141	合成法 9	条件 4	31140.1	2.32	97.3
29	Peptide-41	Fc-A	C3	31371	合成法 9	条件 4	31368	2.3	30.3
30	Peptide-42	Fc-A	C3	31140.8	合成法 9	条件 4	31140	2.34	36.5
31	Peptide-43	Fc-C	C3	32459.9	合成法 9	条件 4	32459.4	2.34	44.2

[表12-2]

32	Peptide-44	Fc-C	C3	32601.9	合成法 9	条件 4	32601.4	2.31	35.2
33	Peptide-45	Fc-C	C3	32713.9	合成法 9	条件 4	32713.8	2.31	27.3
34	Peptide-46	Fc-C	C3	32721.9	合成法 9	条件 4	32721.6	2.27	25.2
35	Peptide-47	Fc-C	C3	32657.9	合成法 9	条件 4	32657.5	2.28	31.2
36	Peptide-48	Fc-C	C3	32601.9	合成法 9	条件 4	32601.6	2.29	24.7
37	Peptide-49	Fc-C	C3	32601.9	合成法 9	条件 4	32601.5	2.3	22.0
38	Peptide-50	Fc-C	C3	32601.9	合成法 9	条件 4	32601.6	2.28	16.5
39	Peptide-51	Fc-C	C3	33833.5	合成法 9	条件 4	33883	2.41	31.6
40	Peptide-52	Fc-C	C3	33833.5	合成法 9	条件 4	33883	2.4	30.1
41	Peptide-53	Fc-C	C3	33833.5	合成法 9	条件 4	33883	2.41	28.6
42	Peptide-54	Fc-C	C3	33827.5	合成法 9	条件 4	33827	2.26	16.9
43	Peptide-55	Fc-C	C3	33827.5	合成法 9	条件 4	33827	2.25	15.9
44	Peptide-56	Fc-C	C3	33827.5	合成法 9	条件 4	33826.9	2.26	20.1
45	Peptide-57	Fc-C	C3	31488.7	合成法 9	条件 4	31488.1	2.05	16.2
46	Peptide-58	Fc-C	C3	31488.7	合成法 9	条件 4	31288.2	2.05	14.5
47	Peptide-59	Fc-C	C3	31488.7	合成法 9	条件 4	31488.2	2.05	11.8
48	Peptide-60	Fc-C	C3	37386.3	合成法 9	条件 4	37385.7	2.21	27.0
49	Peptide-61	Fc-C	C3	37386.3	合成法 9	条件 4	37385.7	2.21	26.9
50	Peptide-62	Fc-C	C3	36926.1	合成法 9	条件 4	36925.2	2.25	21.2
51	Peptide-63	Fc-C	C3	36926.1	合成法 9	条件 4	36925.2	2.28	15.7
52	Peptide-64	Fc-C	C3	36926.1	合成法 9	条件 4	36925.1	2.28	26.7
53	Peptide-65	Fc-C	C3	37330.3	合成法 9	条件 4	37329.5	2.09	12.2

[表12-3]

54	Peptide-66	Fc-C	C3	37330.3	合成法 9	条件 4	37329.6	2.08	11.3
55	Peptide-67	Fc-C	C3	37330.3	合成法 9	条件 4	37329.5	2.1	14.0
56	Peptide-68	Fc-C	C3	36869.9	合成法 9	条件 4	36869.2	2.12	6.4
57	Peptide-69	Fc-C	C3	36869.9	合成法 9	条件 4	36869.4	2.1	6.9
58	Peptide-70	Fc-C	C3	33995.7	合成法 9	条件 4	33995.4	2.42	23.7
59	Peptide-71	Fc-C	C3	34003.7	合成法 9	条件 4	34003.2	2.39	22.1
60	Peptide-72	Fc-C	C3	34003.7	合成法 9	条件 4	34003.2	2.38	21.9

[表13]

Conjugate-	前駆体	キャリア	連結基 C	分子量	procedure	LC-MS condition	MS (deconvolution)	Rt(min)	IC ₅₀ (nM)
61	Peptide-73	Fc-A	C1,C2	67770.8	合成法 10	条件 3	33767.81	2.17	25.1
62	Peptide-74	Fc-A	C1,C2	67804.2	合成法 10	条件 2	67804.21	2.17	7.1
63	Peptide-75	Fc-A	C1,C2	68724.9	合成法 10	条件 2	68724.88	2.17	14.0
64	Peptide-76	Fc-A	C1,C2	68970.4	合成法 10	条件 2	68968.15	2.26	15.8
65	Peptide-77	Fc-A	C1,C2	69369.8	合成法 10	条件 2	69370.16	2.25	26.3
66	Peptide-78	Fc-A	C1,C2	68914.3	合成法 10	条件 2	68912.06	2.48	36.5
67	Peptide-79	Fc-A	C1,C2	68838	合成法 10	条件 2	68837.88	2.53	44.6
68	Peptide-80	Fc-A	C1,C2	68909	合成法 10	条件 3	34459.22	2.11	451.1

[表14-1]

Conjugate-	前駆体	キャリア	連結基 C	分子量	procedure	LC-MS condition	MS (deconvolution)	Rt (min)	IC ₅₀ (nM)
69	Peptide-81	Fc-A	C1,C2	67860.2	合成法 10	条件 2	67860.70	2.17	5.1
70	Peptide-82	Fc-A	C1,C2	68825	合成法 10	条件 2	68824.60	2.19	32.1
71	Peptide-83	Fc-A	C1,C2	67809.2	合成法 10	条件 2	67807.50	2.22	9.3
72	Peptide-84	Fc-A	C1,C2	67712.6	合成法 10	条件 2	67712.80	2.36	14.3
73	Peptide-85	Fc-A	C1,C2	67688.2	合成法 10	条件 2	67688.13	2.56	13.3
74	Peptide-86	Fc-A	C1,C2	67988.6	合成法 10	条件 2	67989.11	2.35	15.8
75	Peptide-87	Fc-A	C1,C2	67688.2	合成法 10	条件 2	67689.11	2.34	11.4
76	Peptide-88	Fc-A	C1,C2	69645	合成法 10	条件 2	69646.95	2.16	14.5
77	Peptide-89	Fc-A	C1,C2	69185.4	合成法 10	条件 2	69185.945	2.18	26.9
78	Peptide-90	Fc-A	C1,C2	68725	合成法 10	条件 2	68725.5	2.17	9.2
79	Peptide-91	Fc-A	C1,C2	68781	合成法 10	条件 2	68780.859	2.2	17.1
80	Peptide-92	Fc-A	C1,C2	68909.4	合成法 10	条件 2	68908.984	2.25	11.2
81	Peptide-93	Fc-A	C1,C2	68449	合成法 10	条件 2	68449.875	2.27	10.2
82	Peptide-94	Fc-A	C1,C2	68909.4	合成法 10	条件 2	68910.289	2.25	10.2
83	Peptide-95	Fc-A	C1,C2	68782	合成法 10	条件 2	68780.68	2.08	9.5
84	Peptide-96	Fc-A	C1,C2	68326	合成法 10	条件 2	68325.148	2.15	8.1
85	Peptide-97	Fc-A	C1,C2	68326	合成法 10	条件 2	68323.922	2.16	7.1
86	Peptide-98	Fc-A	C1,C2	68894	合成法 10	条件 2	68893.117	2.1	8.5
87	Peptide-99	Fc-A	C1,C2	68970	合成法 10	条件 2	68969.18	2.26	15.7

[表14-2]

88	Peptide-100	Fc-A	C1,C2	68726	合成法 10	条件 2	68724.961	2.27	17.3
89	Peptide-101	Fc-A	C1,C2	68950.4	合成法 10	条件 2	68948.516	2.26	18.3
90	Peptide-102	Fc-A	C1,C2	68726	合成法 10	条件 2	68724.57	2.26	41.5
91	Peptide-103	Fc-A	C1,C2	68950.4	合成法 10	条件 2	68948.234	2.24	22.9
92	Peptide-104	Fc-A	C1,C2	67745.2	合成法 10	条件 2	67743.961	2.67	35.6
93	Peptide-105	Fc-A	C1,C2	68666	合成法 10	条件 2	68664.492	2.63	73.4
94	Peptide-106	Fc-A	C1,C2	68269.6	合成法 10	条件 2	68269.688	2.38	31.4
95	Peptide-107	Fc-A	C1,C2	67813.2	合成法 10	条件 2	67812.203	2.42	28.1
96	Peptide-108	Fc-A	C1,C2	68458	合成法 10	条件 2	68457.031	2.53	44.8
97	Peptide-109	Fc-A	C1,C2	68782	合成法 10	条件 2	68781.586	2.45	47.2

[0272] 合成法 1

自動合成機Syro II(Biotage Japan社)を用い、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc基) を α アミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行った。

Rink Amide Resin AM (Novaviochem社)88 μ mol相当を反応用ベッセルに加え、1-メチル-2-ピロリジノン中で、0- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N' -テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HA TU)、N, N-ジイソプロピルアミン、およびFmoc基で保護されたアミノ酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

Fmoc基の脱保護は20%ピペリジン/1-メチル-2-ピロリジノンで行った。

N末端のアミノ酸を連結し、Fmoc基を脱保護した後、1-メチル-2-ピロリジノン中で、N, N-ジイソプロピルカルボジイミド、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (H0At) 、およびクロロ酢酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

得られたペプチドレジンを1-メチル-2-ピロリジノンで3回、ジクロロメタンで3回洗浄して乾燥し、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール-トリイソプロピルシラン-水 (体積比で92.5: 2.5: 2.5: 2.5) を2mL加えて室温で3時間攪拌した。

エーテル沈殿により切断された粗ペプチドを回収し、tert-ブチルメチルエーテルで2回洗浄して乾燥した後、ジメチルスルホキシド (8mL) に溶解し、n-プロピルアミン (80 μ L) を加えて終夜静置した。酢酸 (80 μ L) を加えた後、V10 (Biotage Japan社) で反応液を濃縮し、Kinetex5u XB-C18 (150 x 2 1.2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0273] 合成法2

2-Chlorotriethyl chloride resin (100-200 mesh), 1% DVB(MERCK社)の88 μ mol相当を反応用ベッセルに加え、ジクロロメタン 2mL に懸濁させてレジンを

を膨潤させた。吸引ろ過後、レジンに担持するFmoc基で保護されたアミノ酸1.5等量のジクロロメタン溶液1.5mLを加えた後、N, N-ジイソプロピルアミン5等量を加えて攪拌した。ろ過し、ジクロロメタン/メタノール/ N, N-ジイソプロピルアミン=17/2/1 の混合溶液でレジンを洗浄した。その後のアミノ酸伸長は自動合成機Syro II(Biotage Japan社)を用い、9-フルオニルメトキシカルボニル基 (Fmoc基) を α アミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行った。1-メチル-2-ピロリジノン中で、0- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HATU)、N, N-ジイソプロピルアミン、Fmoc基で保護されたアミノ酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

Fmoc基の脱保護は20%ピペリジン/1-メチル-2-ピロリジノンで行った。

N末端のアミノ酸を連結し、Fmoc基を脱保護した後、1-メチル-2-ピロリジノン中で、N, N-ジイソプロピルカルボジイミド、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOBt) 、クロロ酢酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

得られたペプチドレジンを1-メチル-2-ピロリジノンで3回、ジクロロメタンで3回洗浄して乾燥し、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール-トリイソプロピルシラン-水 (体積比で92.5: 2.5: 2.5: 2.5) を2mL加えて室温で3時間攪拌した。

エーテル沈殿により切断された粗ペプチドを回収し、tert-ブチルメチルエーテルで2回洗浄して乾燥した後、ジメチルスルホキシド (8mL) に溶解し、n-プロピルアミン (80 μ L) を加えて終夜静置した。酢酸 (80 μ L) を加えた後、V10 (Biotage Japan社) で反応液を濃縮し、Kinetex5u XB-C18 (150 x 2.1, 2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0274] 合成法3

自動合成機Syro II(Biotage Japan社)を用い、9-フルオニルメトキシカル

ボニル基 (Fmoc基) を α アミノ基の保護基として用いる一般的な固相合成法に従って行った。

Rink Amide Resin AM (Novaviochem社) の $88\mu\text{mol}$ 相当を反応用ベッセルに加え、1-メチル-2-ピロリジノン中で、0- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N' -テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HATU)、N, N-ジイソプロピルアミン、およびFmoc基で保護されたアミノ酸またはPEG 011Aをそれぞれ3当量加えて反応させた。

Fmoc基の脱保護は20%ピペリジン/1-メチル-2-ピロリジノンで行った。

ϵ アミノ基が (4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシ-1-イリデン) -3-メチルブチル基 (ivDde基) で保護されたLysの α アミノ基に011Aを導入した後、以下の方法に従ってivDde基の脱保護を行った。

固相上でのivDde基の切断は3%ヒドラジン/ジメチルホルムアミドで行った。ペプチドレジン100mg に対し、1mL の3%ヒドラジン/ジメチルホルムアミドを加えて攪拌した。この操作を3回繰り返すことで、ivDde基を除去した。続いて、上記と同様の方法でペプチド鎖を伸長した。

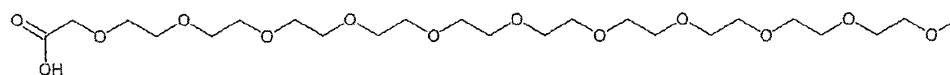
N末端のアミノ酸を連結し、Fmoc基を脱保護した後、1-メチル-2-ピロリジノン中で、N,N-ジイソプロピルカルボジイミド、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOBt)、クロロ酢酸をそれぞれ3当量加えて反応させた。

得られたペプチドレジンに1-メチル-2-ピロリジノンで3回、ジクロロメタンで3回洗浄して乾燥し、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール-トリイソプロピルシラン-水 (体積比で92.5: 2.5: 2.5: 2.5) を2mL加えて室温で3時間攪拌した。

エーテル沈殿により切断された粗ペプチドを回収し、tert-ブチルメチルエーテルで2回洗浄して乾燥した後、ジメチルスルホキシド (8mL) に溶解し、n-プロピルアミン (80 μL) を加えて終夜静置した。酢酸 (80 μL) を加えた後、V10 (Biotage Japan社) で反応液を濃縮し、Kinetex5u XB-C18 (150 x 2.1.2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリル

を用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[化147]



PEG 011A

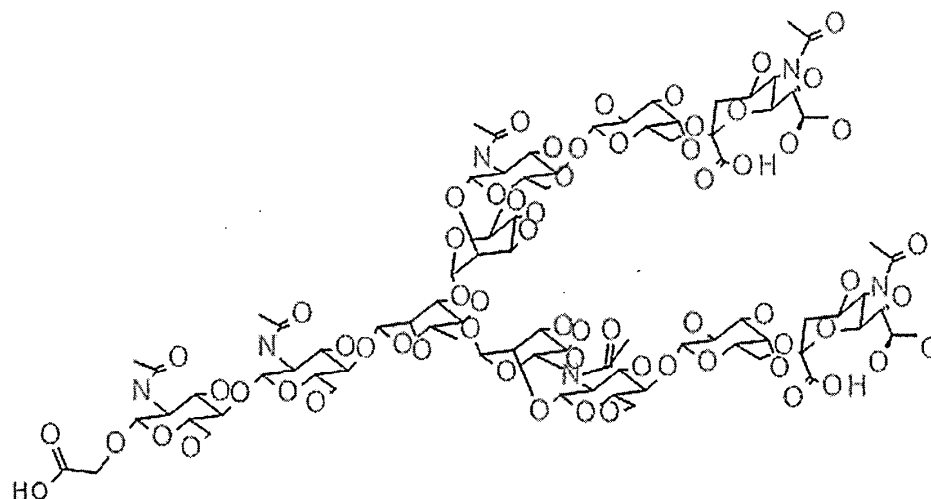
[0275] 合成法4

5 μmol のペプチドを酢酸1.4mLに溶解した。そこに25mg/mLヨウ素／酢酸溶液を300 μL 加えて攪拌した。原料の消失をHPLCで確認した後、200mg/mLアスコルビン酸水溶液を300 μL 加えて反応を停止させた。V10 (Biotage Japan社) で反応液を濃縮し、Kinetex5u XB-C18 (150 x 21.2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水－アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0276] 合成法5

SGA 1.15等量をジメチルホルムアミド300 μL に溶解し、そこへO-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロほう酸塩 1.15等量 N,N-ジイソプロピルエチルアミン4.6等量を添加して1時間攪拌した。5 μmol のペプチドをジメチルホルムアミド200 μL に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン4.6等量を添加した。そこへSGAの反応溶液を加えて攪拌した。原料の消失をHPLCで確認した後、ヒドラジーン水合物を18.5 μL 加えて攪拌した。原料の消失をHPLCで確認した後、Kinetex5u XB-C18 (150 x 21.2 mm, Phenomenex社) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水－アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[化148]



SGA

[0277] 合成法6

5 μ molのペプチドをジメチルホルムアミド250 μ Lに溶解した。次に3-マレイミドプロピオン酸 N-スクシンイミジル1.5等をジメチルホルムアミド400 μ Lに溶解し、ペプチド溶液へと加えた。最後にN,N-ジイソプロピルエチルアミン2 μ Lを加え、反応させた。原料の消失をHPLCで確認した後、Kinetex5u XB-C18 (150 x 21.2 mm, Phenomenex社)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0278] 合成法7

5 μ molのペプチドをジメチルホルムアミド250 μ Lに溶解した。次にジベンゾシクロオクチン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル1.5等をジメチルホルムアミド800 μ Lに溶解し、ペプチド溶液へと加えた。最後にN,N-ジイソプロピルエチルアミン2 μ Lを加え、反応させた。原料の消失をHPLCで確認した後、Kinetex5u XB-C18 (150 x 21.2 mm, Phenomenex社)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーで目的物を精製した。移動相として0.1%トリフル

オロ酢酸を含む水-アセトニトリルを用いた。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0279] 合成法8

10.2mg/mL Fc溶液 (5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))(1.2mL)に10mg/mLトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP) 塩酸塩溶液 (5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5)) (28 μ L) を加え、ヒンジ部分のジスルフィド結合を還元した。反応終了後、NAP25(GE ヘルスケア製)、(5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))で未反応のTCEPを取り除いた。そのあとマレイミド化ペプチド (8当量) のジメチルスルホキシド溶液を加えて、30°Cで1時間インキュベートした。反応液をNAP25(GE ヘルスケア製)、(5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))で粗精製した。反応の進行具合を下記の条件の疎水性相互作用クロマトグラフィーで確認後、アミコンウルトラ-15 (30K) (MERCK社)でバッファー交換を行い、未反応のペプチドを取り除いた。

[0280] 合成法9

10.2mg/mL Fc溶液 (5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))(1.2mL)に10mg/mLトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 (5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5)) (28 μ L) を加え、ヒンジ部分のジスルフィド結合を還元した。反応終了後、マレイミド化ペプチド (8当量) のジメチルスルホキシド溶液を加えて、30°Cで1時間インキュベートした。反応液をNAP25(GE ヘルスケア製)、(5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))で粗精製した。反応の進行具合を下記の条件の疎水性相互作用クロマトグラフィーで確認後、アミコンウルトラ-15 (30K) でバッファー交換を行い、未反応のペプチドを取り除いた。

[0281] 合成法10

W02018/003983にしたがって糖鎖リモデリングされた、SG型N297結合糖鎖 (非還元末端のシアル酸にアジド基が導入されている) が付加されたFcを含む溶液 (5.00mg/mL) (5%ソルビトール/10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))(7.74mL)に、DBC0化ペプチド (7当量) のジメチルスルホキシド溶液 (1.93mL)を加えて

、30℃で16時間インキュベートした。反応液をNAP25(GE ヘルスケア製)、(5%ソルビトール／10mM 酢酸緩衝液(pH5.5))で粗精製した。反応の進行具合を下記の条件の疎水性相互作用クロマトグラフィーで確認後、アミコンウルトラ-15 (30K) でバッファー交換を行い、未反応のペプチドを取り除いた。なお、合成方法10で得られたコンジュゲート体におけるFc含有分子のN297結合糖鎖は、N297-(Fuc)SGである。

[0282] 合成法11

44 μmol のペプチドを水29.17 mLに溶解した。そこに、酢酸銀292 mgを加えて室温で3時間攪拌した。原料の消失をLC/MSで確認した後、10 mg/mL (±)-ジチオトレイトール・0.1%トリフルオロ酢酸含有水-アセトニトリル(1:1)混合溶液40.44 mLを加えて反応を停止させた。生じた懸濁液をファルコンチューブに移し、遠心分離 (2500 rpm, 5分) した。上清を回収した後、0.1%トリフルオロ酢酸含有水-アセトニトリル(1:1)混合溶液10 mLで沈殿を再度懸濁させ、遠心分離 (2500 rpm, 5分) して上清を回収した。この洗浄・回収操作をもう一度行った。回収した上清をまとめて凍結乾燥し、得られた粗体を中圧逆相フラッシュクロマトグラフィーに供し、目的物を精製した。カラムはUniversal Column ODS-SM (50 μm , 3.0×16.5 cm, 37 g, 山善株式会社) を、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルを使用した。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0283] 合成法12

5 μmol のペプチドを水-アセトニトリル(1:1)混合溶液5.24 mLに溶解した。そこに、トリエチルアミン14.5 μL を加えて室温で2日間攪拌した。原料の消失をLC/MS、HPLCで確認した後、反応溶液をそのまま中圧逆相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。カラムはUniversal Column ODS-SM (50 μm , 3.0×16.5 cm, 37 g, 山善株式会社) を、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸含有水-アセトニトリルを使用した。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0284] 合成法13

6 μ molのペプチドを水5.95 mL、テトラヒドロフラン1.19 mLの混合溶液に溶解した。そこに、トリエチルアミン16.5 μ Lとジヨードメタン3.8 μ Lを加えて室温で7時間攪拌した。原料の消失をLC/MS、HPLCで確認した後、反応溶液を凍結乾燥した。得られた粗体を中圧逆相フラッシュクロマトグラフィーに供し、目的物を精製した。カラムはUniversal Column ODS-SM (50 μ m, 3.0 $\times$ 16.5 cm, 37 g, 山善株式会社)を、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸含有水-アセトニトリルを使用した。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0285] 合成法14

9 μ molのペプチドを50 mMの炭酸水素アンモニウム水溶液8.96 mLに溶解した。1,3-ジクロロアセトン3.4 mgをDMF 1 mLに溶解し、それをペプチド溶液に加えて室温で3時間攪拌した。原料の消失をLC/MSで確認した後、反応溶液を凍結乾燥した。得られた粗体を中圧逆相フラッシュクロマトグラフィーに供し、目的物を精製した。カラムはUniversal Column ODS-SM (50 μ m, 3.0 $\times$ 16.5 cm, 37 g, 山善株式会社)を、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸含有水-アセトニトリルを使用した。目的物のフラクションを凍結乾燥して、トリフルオロ酢酸塩として目的物を得た。

[0286] LC-MS条件1

Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technology社)を用いて測定した。

カラム : Kinetex 1.7u XB-C18(50 $\times$ 2.1 mm)

移動相 : A: 0.1% TFA-水 B: 0.1% TFA-アセトニトリル

温度 : 40°C

流速 : 0.6 mL/min

グラジエント : 0.01分 (B 10%)、0.33分 (B 10%)、0.34分 (B 20%)、0.66分 (B 20%)、0.67分 (B 30%)、0.99分 (B 30%)、1.00分 (B 40%)、1.33分 (B 40%)

、 1. 34分 (B 50%)、 1. 66分 (B 50%)、 1. 67分 (B 80%)、 2. 50分 (B 80%)

[0287] LC-MS条件2

LC: Ultimate3000 (Thermo Fisher)、MS: Q-Exactive (Thermo Fisher)
を用いて測定した。測定前に、試料溶液と等量の8M-Guanidine-HClを加え、37℃で30分反応させた後、測定した。

カラム: PLRP-S 1000A 8μm 2.1 x 50mm (Agilent)

移動相: A: H₂O (0.02% TFA、0.1% HCO₂H) B: アセトニトリル

温度: 60℃

流速: 0.6 ml/min

グラジエント: 0分 (B20%)、4分 (B50%)、4.2分 (B50%)

[0288] LC-MS条件3

LC: Ultimate3000 (Thermo Fisher)、MS: Q-Exactive (Thermo Fisher)
を用いて測定した。測定前に、試料溶液と等量の8M-Guanidine-HClおよびTCEP(終濃度10mM)を加え、37℃で30分反応させた後、測定した。

カラム: PLRP-S 1000A 8μm 2.1 x 50mm (Agilent)

移動相: A: H₂O (0.02% TFA、0.1% HCO₂H) B: アセトニトリル

温度: 60℃

流速: 0.6 ml/min

グラジエント: 0分 (B20%)、4分 (B50%)、4.2分 (B50%)

[0289] LC-MS条件4

LC: Ultimate3000 (Thermo Fisher)、MS: Q-Exactive (Thermo Fisher)
を用いて測定した。測定前に、試料溶液16μL に Rapid PNGaseF buffer(non-reducing format) 4μLを加え、90℃で3分反応させた。続いて、Rapid PNGase F 1μL を加え、50℃で10分反応させた後、測定した。

カラム: PLRP-S 1000A 8μm 2.1 x 50mm (Agilent)

移動相: A: H₂O (0.02% TFA、0.1% HCO₂H) B: アセトニトリル

温度: 60℃

流速：0.6 ml/min

グラジエント：0分（B20％）、4分（B50％）、4.2分（B50％）

[0290] 〔試験例1〕

細胞接着阻害アッセイ

1. 材料・試薬

- ・ 384-well Low Flange Black Flat Bottom Polystyrene Not Treated Micro plate (Corning, 3573)
- ・ プロテオセーブ（登録商標）SS 15mL（住友ベークライトMS-52150）
- ・ Thrombospondin human platelet (Calbiochem 605225)
- ・ HUVEC (KURABO KE-4109P10)
- ・ EGM-2 MV (Lonza, CC-3202): HUVEC継代用
- ・ Collagen coated dish (IWAKI 4020-010): HUVEC継代用
- ・ Lipidure（登録商標）-BL802（日油）5% solution
- ・ DMEM low glucose (GIBCO 11054-020)
- ・ Bovine serum albumin (BSA) solution 30% (Sigma A9205)
- ・ CellTiter-Glo 2.0 (Promega G9242)

[0291] 2. アッセイ

<Plate coat>

Thrombospondin 1 vial (25 μ g)をトリス緩衝生理食塩水（TBS）（+2mM Ca Cl₂、以下すべて同じ）に溶解し、200 μ g/ml溶液を調製し、プロテオセーブ（登録商標）15 mLチューブ中で10 μ g/mLになるようにTBSで希釈した。10 μ g/mL溶液を12 μ L/wellで384 well plateに分注し、4℃で一晩静置した。

<Plate blocking>

Lipidure（登録商標）をTBSで10倍希釈し0.5% solutionを調製した。上記<Plate coat>でコートしておいたプレートのバッファーを捨て、使用するすべてのウェルに0.5% solutionを25 μ L/wellで分注し、室温で1時間静置した。

<サンプルの希釈>

希釈バッファー (DMEM +0.5% BSA) を用いて、各サンプルについて0.2 μ M 溶液を調製した。0.2 μ M 溶液2 μ Lを希釈バッファー500 μ Lで希釈し、希釈サンプルを調製した。Vehicle controlとしてDMSOを用い、サンプルと同様に希釈した。

<サンプル分注>

上記<Plate blocking>のプレートのブロッキング液を捨て、TBS 50 μ L/wellで3回洗浄した。3回目の洗浄液を取り除き、希釈サンプルを10 μ L/well分注し、室温で15～30分間静置した。

<HUVEC播種>

ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECの維持には、EGM2-MV, collagen coated dishを使用した(10～11継代で増殖が落ちるので、そこで使用終了した)。細胞を0.05% Trypsin EDTAで分散させ、DMEM 0.5% BSAで回収し、1000 rpmで3分間遠心した。上清を除いて、細胞をDMEM bufferに再懸濁し、細胞数をカウントし、6000 cells/10 μ Lに希釈した。サンプルを分注してあるプレートに、細胞懸濁液を10 μ L/well分注し、軽く混ぜ、37°Cで2.5時間インキュベーションした。

<洗浄・検出>

培地を取り除き、30 μ L/wellのHBSS/Hepes 0.5% BSAで2回洗浄した。HBSS/Hepes 0.5% BSAで2倍希釈したCellTiter-Glo 2.0 (登録商標) を20 μ L/wellを分注し、攪拌した後、室温で15分間静置した。EnVision Xcite Multilabel Reader (Perkin Elmer社) により発光を検出した。

[0292] 3. 結果

発光の測定値から、各環状ペプチドおよびコンジュゲート体による細胞接着阻害についてIC₅₀ (nM) を算出した。なお、糖鎖コンジュゲート体Conjugate-61～Conjugate-97では、環状ペプチドがコンジュゲーションしたFc含有分子2分子がジスルフィド結合により架橋され、1分子となっているのに対し、マレイミドコンジュゲート体Conjugate-1～Conjugate-60では、Fc含有分子(単量体)同士は架橋されていない。したがって、IC₅₀ (nM) の算出に

おけるマレイミドコンジュゲート体のモル濃度には、糖鎖コンジュゲート体との比較のため、単量体の分子量を2倍した数値を使用した。また、マレイミドコンジュゲート体はFc含有分子に色々な種類の糖鎖が不均一に結合した混合物であることから、脱糖鎖体の分子量を用いて計算を行った。

得られた結果を表2および11～14に示す。上記試験結果により、Peptide-1～Peptide-12、Peptide-115、Peptide-119およびPeptide-125～Peptide-139、ならびにConjugate-1～Conjugate-97はTSP1と血管内皮細胞との接着阻害作用を有し、重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防に有用であることが示された。

[0293] [試験例2]

血流改善測定試験

6-7週齢のC57BL/6マウスを日本チャールズ・リバー株式会社より購入し、FR-2固形飼料（株式会社フナバシファーム）を供与して6日間以上馴化させた。飼育室は午後7時消灯、午前7時点灯の12時間周期の明暗切り替えを行った。イソフルラン吸入麻酔下に、マウスの左大腿部を切開し、浅大腿動脈および静脈（深部大腿動脈のすぐ下から膝窩動脈および静脈まで）を結紮し、切除した。モデル作製後、被験物質（Conjugate-4、Conjugate-10、Conjugate-27、Conjugate-34、Conjugate-43、Conjugate-56、Conjugate-63、Conjugate-64、Conjugate-67）を10 mM Acetate Buffer 5% Sorbitol (pH5.5)に溶解し、5 mL/kgの用量で単回静脈内投与した。各投与群について5匹のマウスを用いた。

[0294] (試験1)

ビヒクル投与群

Conjugate-63 (0.3、1、3 mg/kg) 投与群

試験期間： 20日

(試験2)

ビヒクル投与群

Conjugate-64 (0.3、1、3 mg/kg) 投与群

試験期間： 16日

(試験3)

ビヒクル投与群

Conjugate-67 (0.3、1 mg/kg) 投与群

試験期間： 13日

(試験4)

ビヒクル投与群

Conjugate-27 (1、3 mg/kg) 投与群

試験期間： 13日

(試験5)

ビヒクル投与群

Conjugate-34 (0.3、1 mg/kg) 投与群

Conjugate-43 (0.3、1 mg/kg) 投与群

試験期間： 15日

(試験6)

ビヒクル投与群

Conjugate-56 (0.3、1 mg/kg) 投与群

Conjugate-4 (0.3、1 mg/kg) 投与群

Conjugate-10 (0.3、1 mg/kg) 投与群

試験期間： 14日

[0295] 虚血肢（左）および非虚血肢（右）の血流を、レーザードップラー血流画像化装置（PeriScan PIM III、Moor LD12-HR）を用いて測定した。血流の改善を、非虚血肢に対する虚血肢の比で評価した。値は、5匹の測定値の平均値±標準誤差で示した。また、血流AUCを算出し、ビヒクル投与群の平均値に対する被験物質投与群の平均値の割合（%）を求めた。

マウスの血流は、手術直後で最も低値を示し、その後、経時的に回復した。本動物モデルで検討した被験物質の処置によりビヒクル処置と比較して、手術後の血流回復がより改善された。測定最終日の血流（%）および測定開始

から終了までの血流AUC (vs. ビヒクル投与群) の結果を表 15 に示す。

[表15]

		% , ischemia / nonischemia			% change AUC (vs. vehicle)
試験 1	ビヒクル投与群	19.8	±	3.2	
	Conjugate-63 投与群(0.3mg/kg)	38.3	±	9.9	201.4
	Conjugate-63 投与群(1mg/kg)	54.6	±	15.9	304.4
	Conjugate-63 投与群(3mg/kg)	89.8	±	13.9	371.4
試験 2	ビヒクル投与群	22.2	±	5.7	
	Conjugate-64 投与群(0.3mg/kg)	43.2	±	4.6	217.2
	Conjugate-64 投与群(1mg/kg)	70.5	±	3.7	319.2
	Conjugate-64 投与群(3mg/kg)	67.6	±	10.9	338.6
試験 3	ビヒクル投与群	19.1	±	4.6	
	Conjugate-67 投与群(0.3mg/kg)	86.4	±	21.3	244.4
	Conjugate-67 投与群(1mg/kg)	75.5	±	5.2	304.3
試験 4	ビヒクル投与群	20.6	±	2.5	
	Conjugate-27 投与群(1mg/kg)	23.4	±	4.4	110.2
	Conjugate-27 投与群(3mg/kg)	41.8	±	4.7	174.8
試験 5	ビヒクル投与群	20.0	±	2.5	
	Conjugate-34 投与群(0.3mg/kg)	46.3	±	4.9	199.0
	Conjugate-34 投与群(1mg/kg)	71.9	±	6.2	349.0
	Conjugate-43 投与群(0.3mg/kg)	50.5	±	4.2	227.0
	Conjugate-43 投与群(1mg/kg)	70.7	±	10.1	347.7
試験 6	ビヒクル投与群	15.2	±	3.0	
	Conjugate-56 投与群(0.3mg/kg)	40.2	±	5.6	187.6
	Conjugate-56 投与群(1mg/kg)	74.8	±	11.0	318.4
	Conjugate-4 投与群(0.3mg/kg)	54.5	±	10.2	263.9
	Conjugate-4 投与群(1mg/kg)	76.1	±	11.2	346.8
	Conjugate-10 投与群(0.3mg/kg)	42.3	±	7.2	241.8
	Conjugate-10 投与群(1mg/kg)	51.6	±	2.5	324.1

[0296] 「試験例 3」

血清安定性試験

1. 材料・試薬

・マウス血清 (BALB/c CrSlc, オス, 日本エスエルシー)

- ・サル血清（カニクイザル オス、日本エスエルシー）
- ・ヒト血清（Caucasian, 男性5名、女性5名のプール、ケー・エー・シー）
- ・Phenacetin（ナカライテスク）
- ・Niflumic acid（ナカライテスク）
- ・Furosemide（ナカライテスク）
- ・Acetonitrile（富士フイルム和光純薬）
- ・Methanol（富士フイルム和光純薬）
- ・Formic acid（富士フイルム和光純薬）
- ・Dimethyl sulfoxide (DMSO)（富士フイルム和光純薬）

[0297] 1.1. 評価

<内部標準(IS)溶液>

Phenacetin、Niflumic acidおよびFurosemideをDMSOにて、それぞれ10 μ g/ml、150 μ g/mlおよび200 μ g/ml溶液を調製した。Phenacetin 10 μ g/ml DMSO溶液、Niflumic acid 150 μ g/ml DMSO溶液、Furosemide 200 μ g/ml DMSO溶液をAcetonitrile/Methanol混液（75/25, v/v）に溶解し（終濃度：Phenacetin : 1ng/mL, Niflumic acid : 15ng/mL, Furosemide 20ng/mL）、調製した試液にギ酸を加え（終濃度：1%（v/v））、ギ酸含有IS溶液を調製した。

<被験物質溶液>

被験物質をDMSOにて、それぞれ10mMとなるように調製した。さらにDMSOにて2mMになるように希釈し、被験物質溶液とした。

<試験>

各種血清を37°Cで5分間プレインキュベーションしたのち、被験物質溶液を終濃度20 μ Mとなるように添加し、反応を開始した。被験物質添加血清を37°Cでインキュベーションし、反応開始0および4時間後に、血清の一部を抜き取り、ギ酸含有IS溶液に添加することにより反応を停止、測定試料とした。

<測定>

測定試料中の被験物質およびIS（Phenacetin、Niflumic acidおよびFurosemide）をLC-MS/MSにより測定し、被験物質とIS（Phenacetin、Niflumic acid

およびFurosemideのいずれか)のピーク面積比 (IS ratio) を算出した。なお、ISは、試験ごとに最も測定値が安定していたものを選択した。

[0298] ⅠⅠⅠ. 結果

反応開始4時間後のIS ratioの反応開始0時間後のIS ratioに対する百分率を残存率とし、血清安定性を評価した。得られた結果を表16に示す。二環性環状ペプチドPeptide-1、Peptide-9、Peptide-11、Peptide-126～Peptide-128、Peptide-130およびPeptide-131は、いずれも高い血清安定性を示した。

Peptide-115およびPeptide-119は、それぞれPeptide-1およびPeptide-9と3および8番目の残基のみが異なるアミノ酸配列を有する単環性環状ペプチドである。Peptide-1およびPeptide-9は、それぞれPeptide-115およびPeptide-119と比較して高い血清安定性を示した。これらの結果は、二環性環状ペプチドの代謝安定性が、単環性環状ペプチドと比較して向上していることを示しており、また、二環性環状ペプチドが、単環性環状ペプチドと比較して血中滞留性が高く、より持続性の高い医薬の製造に適していることを示唆している。

[0299]

[表16]

Peptide-	マウス血清中安定性 (4h 時点)	サル血清中安定性 (4h 時点)	ヒト血清中安定性 (4h 時点)
1	100.8	90.6	93.9
9	95.8	93	117.5
11	88	89.9	105.1
126	98.3	100.4	99.6
127	90	95.1	97.5
128	98.1	98.6	99
130	98	93.5	88
131	89.2	89.2	100.9
115	64.5	14.9	78.2
119	70.9	21.1	88.5

産業上の利用可能性

[0300] 本発明の環状ペプチドⅠは、TSP1に結合し、TSP1と、血管内皮細胞などの細胞との接着を阻害することができる。従って本発明の環状ペプチドⅠまたはその薬学上許容される塩は、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状の治療または予防に有用である。また本発明の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩は、血流改善剤として有用である。さらに、本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、より少ない投与頻度で、TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患または症状を治療または予防する手段を提供する点で有用である。また本発明のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩は、血流改善剤として有用である。

配列表フリーテキスト

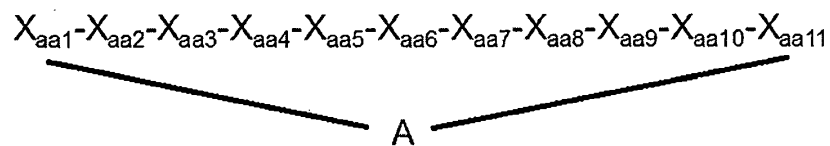
[0301] 配列番号1～123: Peptide-1～Peptide-123

- 配列番号 1 2 4 : 抗LPS mAb-Aの重鎖をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 2 6 : 抗LPS mAb-Aの軽鎖をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 2 8 : CLCH-Aの重鎖をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 3 0 : CLCH-Aの軽鎖をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 3 2 : CLCH-B (LALA体) の重鎖をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 3 4 : Fc断片 (野生型) をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 3 6 : Fc-A (LALA体) をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 3 8 : Fc-C (LALA-PA体) をコードするヌクレオチド配列を含む DNA断片
- 配列番号 1 4 0 ~ 1 4 4 : リンカー L 1
- 配列番号 1 4 5 ~ 1 4 7 : リンカー L 2 a
- 配列番号 1 4 8 : ヒト Ig G重鎖のヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインからなるポリペプチド
- 配列番号 1 4 9 : Peptide-124
- 配列番号 1 5 0 ~ 1 6 4 : Peptide-125~Peptide-139
- 配列番号 1 6 5 : Fc-C (LALA-PA体) をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 1 6 6 : Fc-C (LALA-PA体) のアミノ酸配列

請求の範囲

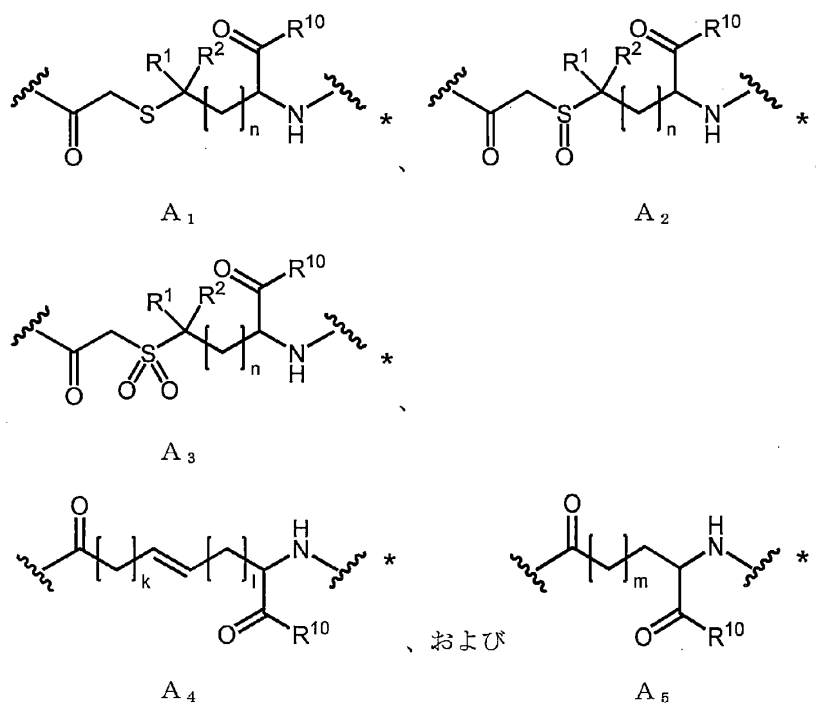
[請求項1] 式(1)

[化1]



[式中、Aは、環形成基

[化2]



から選択され、

ここで、

[化3]



は、 X_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示し、

[化4]



は、 X_{aa1} のC末端カルボニル基への結合点を示し、

R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{10} はアミノ基またはヒドロキシ基であり、

n は0～3の整数であり、

k および l はそれぞれ独立に0～3の整数であり、

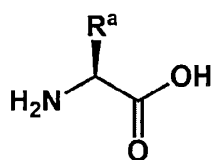
m は1～7の整数であり；

X_{aa1} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{aa2} は、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸または脂肪族アミノ酸の残基であり；

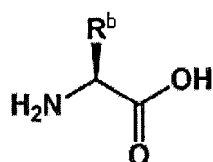
X_{aa3} および X_{aa8} は、それぞれ独立に選択される、以下の式（ⅠⅠ）

[化5]



[式中、 R^a は、式 $-(CH_2)_tSH$ （式中、 t は1～3の整数である）で表される基である]、または式（ⅠⅠⅠ'）

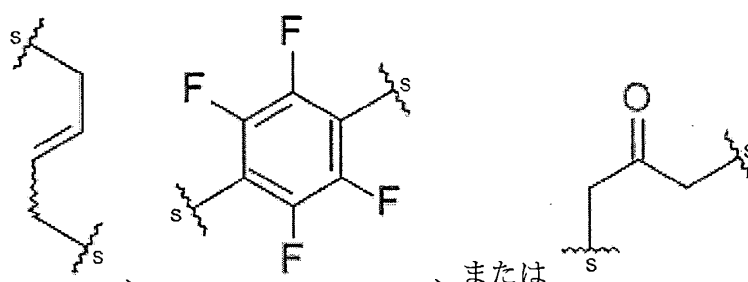
[化5-1]



[式中、 R^b は、式 $-CH_v(CH_3)_{2-v}CH_w(CH_3)_{2-w}SH$ （

式中、 v は0～2の整数であり、 v が0または1のとき、 w は2であり、 v が2のとき、 w は0または1である）、または $-\text{CH}_x(\text{CH}_3)_{2-x}\text{SH}$ （式中、 x は0または1である）で表される基である〕
 で表されるアミノ酸の残基において、 X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基が、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、または $-\text{S}-\text{X}-\text{S}-$ （式中、 X は、

[化6]



（式中、

[化7]



は、 S への結合点を示す）から選択される）で表される結合を形成している構造であり、かつ、 X_{aa3} および X_{aa8} の少なくともいずれか一方は式（ⅠⅠⅠ）で表されるアミノ酸の残基であり；

X_{aa4} は、中性アミノ酸の残基であり；

X_{aa5} は、塩基性アミノ酸の残基であり；

X_{aa6} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

X_{aa7} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

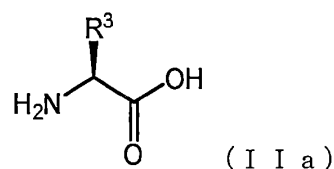
X_{aa9} は、芳香族アミノ酸、脂肪族アミノ酸または塩基性アミノ酸の残基であり；

X_{aa10} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

X_{a11} は、脂肪族アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸は、式（I I a）

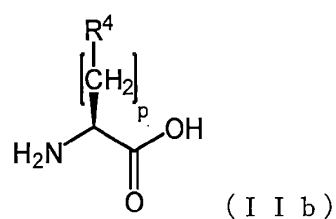
[化8]



（式中、 R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{3-6} シクロアルキルである）で表されるアミノ酸であり；

芳香族アミノ酸は、式（I I b）

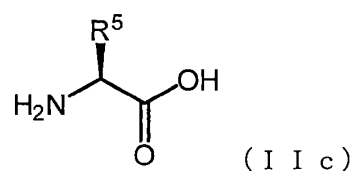
[化9]



（式中、 R^4 は、フェニル、チエニル、ピリジル、ナフチル、インドリル、ベンゾフラニル、およびベンゾチエニルから選択される芳香族基であり、該芳香族基は、 C_{1-3} アルキル、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 C_{1-3} アルコキシからなる群より独立して選択される1以上の置換基により置換されていてよく、 p は0～3の整数である）で表されるアミノ酸であり；

塩基性アミノ酸は、式（I I c）

[化10]

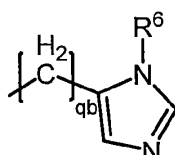


[式中、 R^5 は、

式－ $(CH_2)_{q_a}NH_2$ （式中、 q_a は1～6の整数である）、

式

[化11]

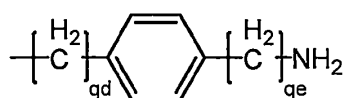


（式中、 R^6 は水素原子または C_{1-3} アルキルであり、 q_b は1～6の整数である）、

式－ $(CH_2)_{q_c}NHC(=NH)NH_2$ （式中、 q_c は1～6の整数である）、または

式

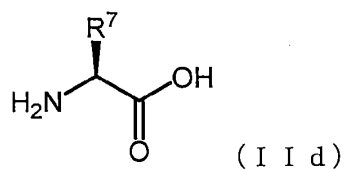
[化12]



（式中、 q_d および q_e はそれぞれ独立して1～3の整数である）で表される基である] で表されるアミノ酸であり；

中性アミノ酸は、式（I I d）

[化13]

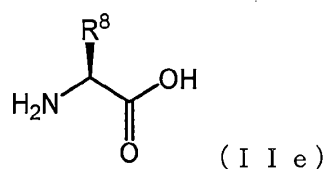


[式中、 R^7 は、式－ $(CH_2)_{r_a}NHCONH_2$ （式中、 r_a は1～6の整数である）または式－ $(CH_2)_{r_b}SH$ （式中、 r_b は1～3の整数である）で表される基である] で表されるアミノ酸、Gly、

Met、Pro、3HyP、Asn、Gln、Ser、^mS、MS、
またはThrであり；

酸性アミノ酸は、式 (I I e)

[化14]



[式中、R⁸は、式—(CH₂)_sCOOH (式中、sは1～6の整数である) で表される基である] で表されるアミノ酸である]

で表される環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[請求項2]

X_{aa1}が2NaI残基であり、

X_{aa2}が、Arg、AGB、PHGまたはTleの残基であり、

X_{aa3}およびX_{aa8}の構造において、式 (I I I) または (I I I'
) で表されるアミノ酸の残基がHCYまたはCysの残基であり、

X_{aa4}がGly残基であり、

X_{aa5}が、ArgまたはAGBの残基であり、

X_{aa6}が、AsnまたはAspの残基であり、

X_{aa7}がTrp残基であり、

X_{aa9}が、Val、Arg、PHG、4PALまたはAGBの残基
であり、

X_{aa10}がTrp残基であり、かつ

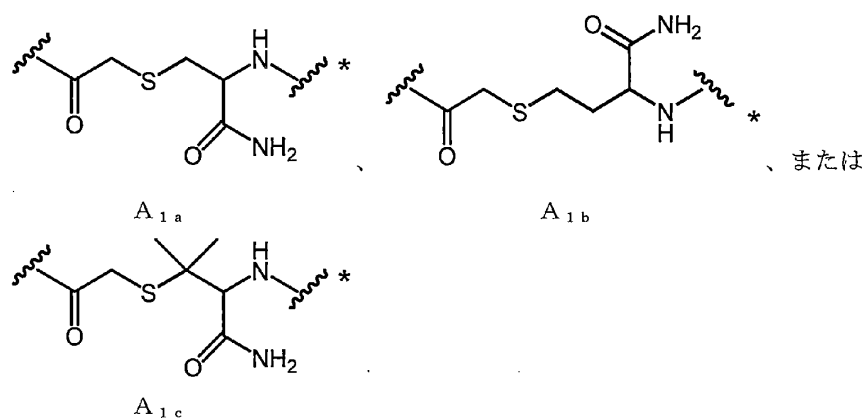
X_{aa11}が、Val、CPTG、またはCHXGの残基である、

請求項1に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[請求項3]

Aが、環形成基

[化15]



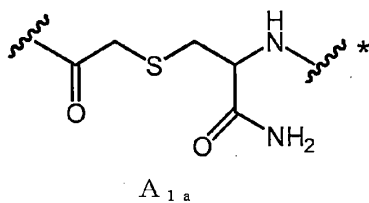
である、

請求項 1 または 2 に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[請求項4]

A が、環形成基

[化16]



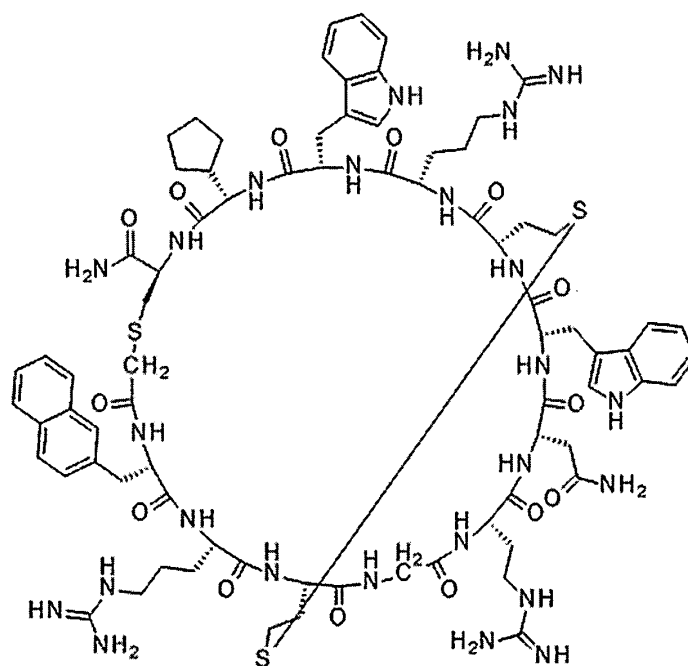
である、請求項 3 に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[請求項5]

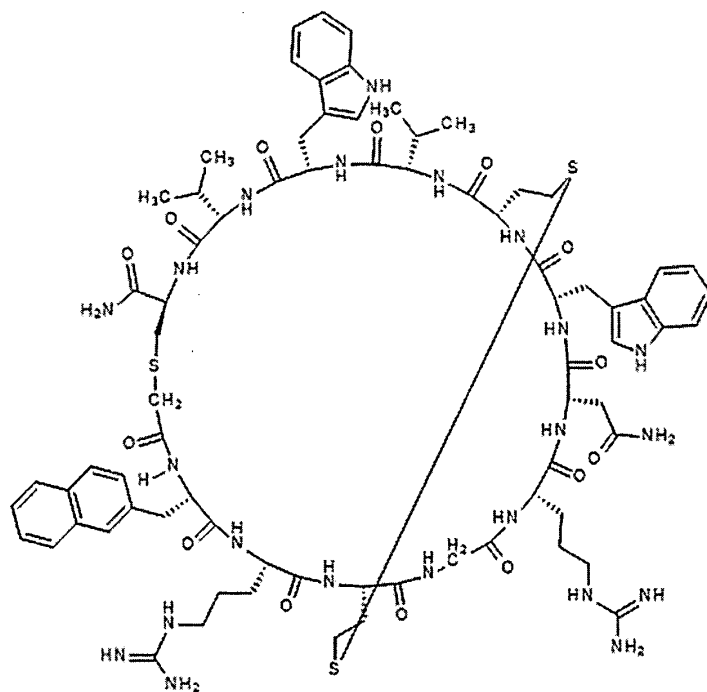
X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、チオール基が、 $-S-S-$ または $-S-CH_2-S-$ で表される結合を形成している、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[請求項6]

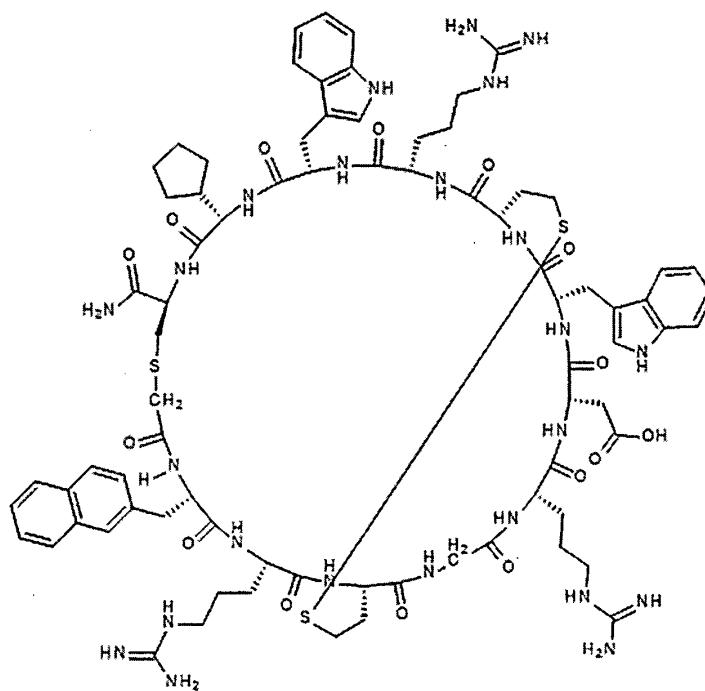
[化17]



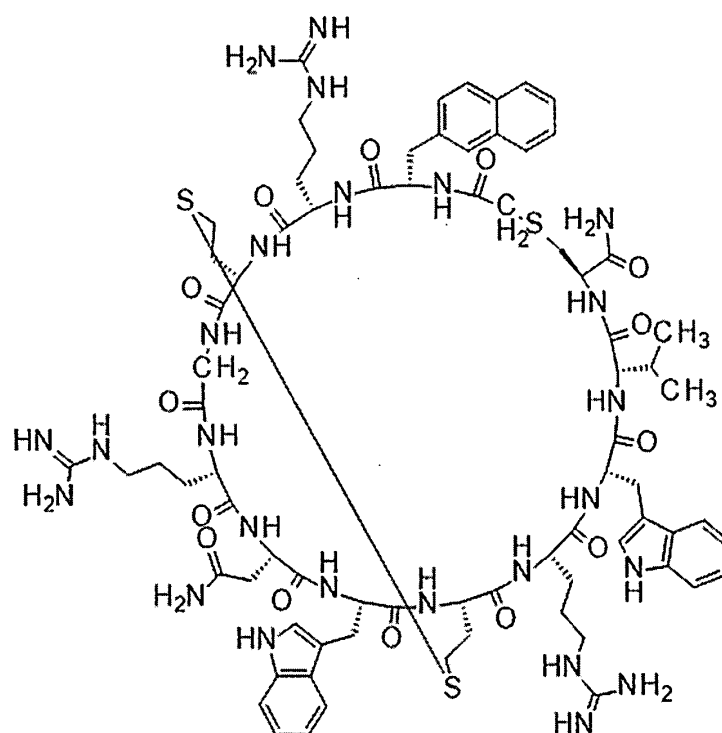
[化18]



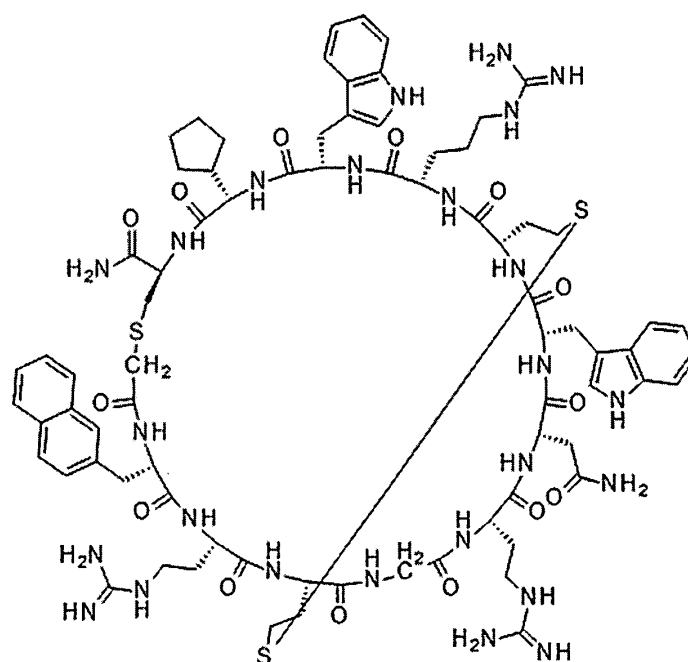
[化21]



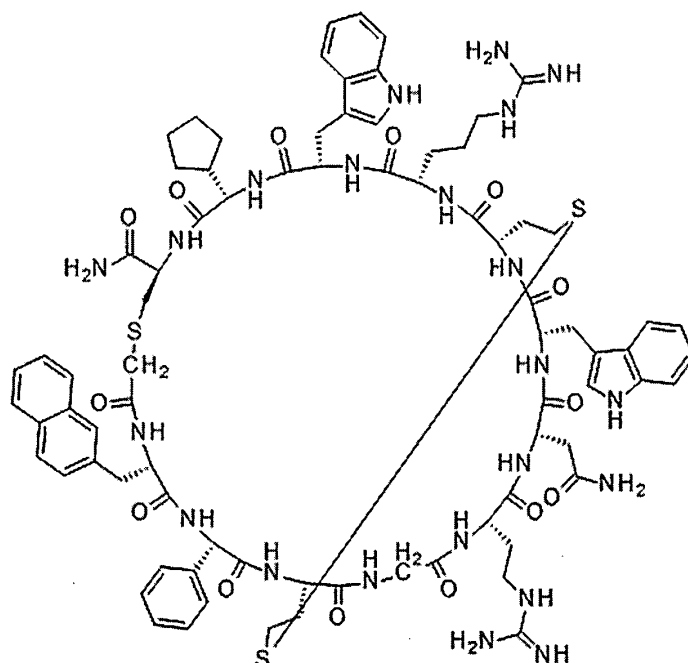
[化22]



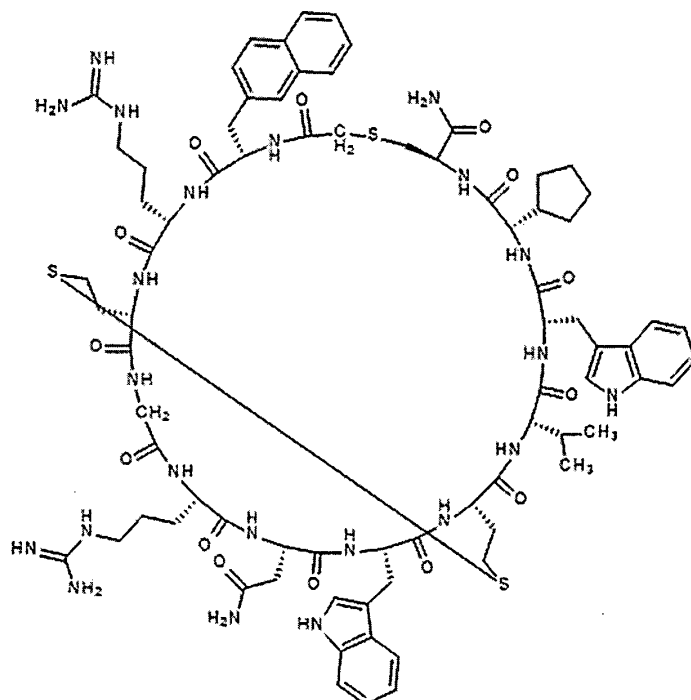
[化23]



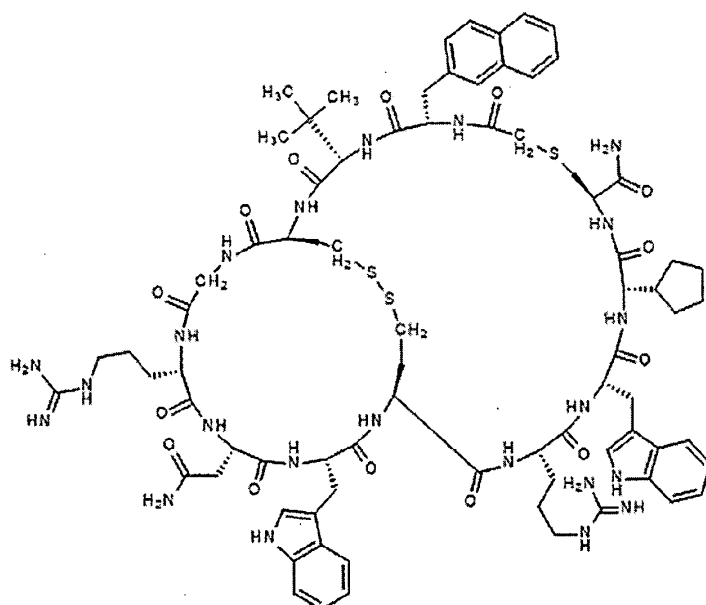
[化24]



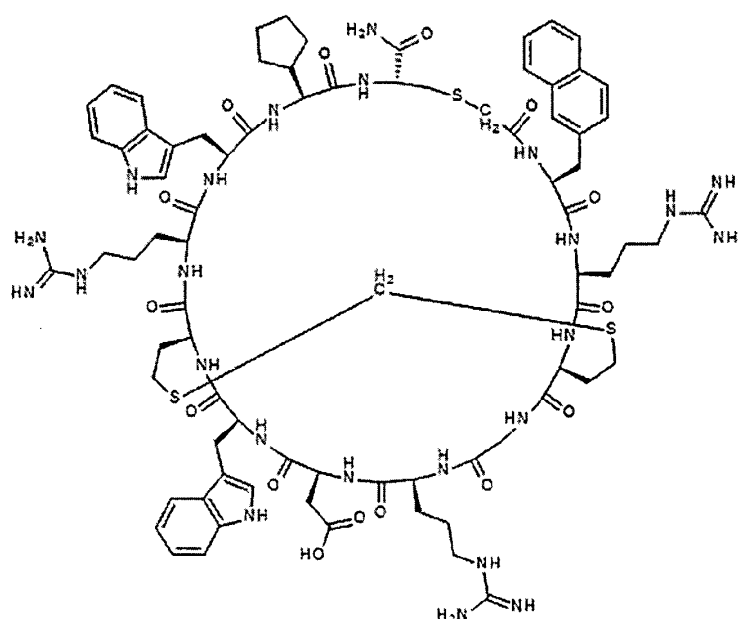
[化27]



[化28]



[化28-1]



で表される化合物からなる群より選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩。

[請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含む、医薬組成物。

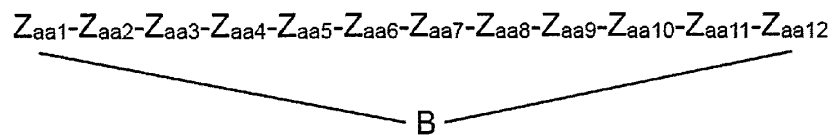
[請求項8] TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防のための、請求項7に記載の医薬組成物。

[請求項9] 重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防のための、請求項8に記載の医薬組成物。

[請求項10] 請求項1～6のいずれか一項に記載の環状ペプチドまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含む、血流改善剤。

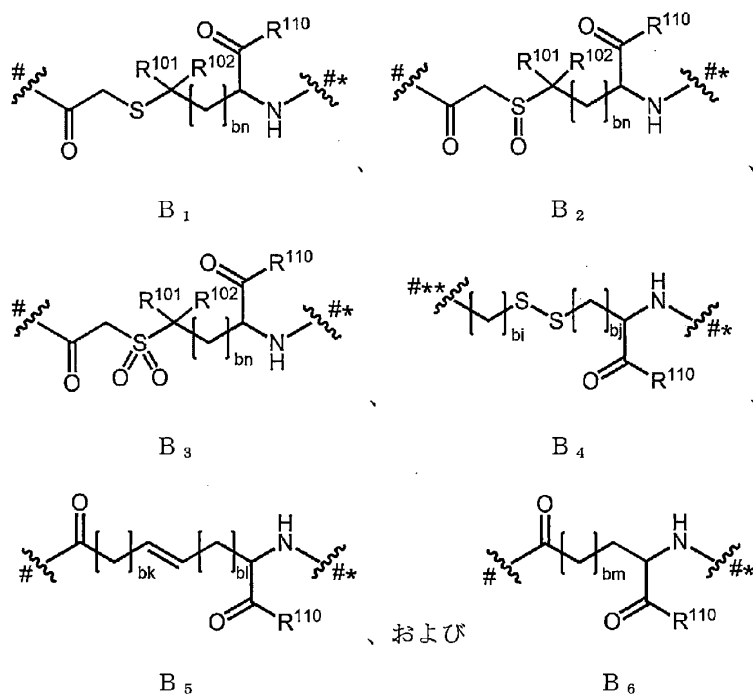
[請求項11] 請求項1～6のいずれか一項に記載の環状ペプチド、または下記式(X)

[化29]



[式中、Bは、環形成基]

[化30]



から選択され、

ここで、

[化31]



は、 Z_{aa1} のN末端アミノ基への結合点を示すか、または Z_{aa1} が存在しない場合には Z_{aa2} のN末端アミノ基への結合点を示し、

[化32]



は、 Z_{aa12} のC末端カルボニル基への結合点を示し、

[化33]



は、 Z_{aa1} の α 炭素への結合点を示すか、または Z_{aa1} が存在しない場合には Z_{aa2} の α 炭素への結合点を示し、

R^{101} および R^{102} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-3} アルキルであり、

R^{110} はアミノまたはヒドロキシであり、

b_n は0～3の整数であり、

b_i および b_j はそれぞれ独立に1～3の整数であり、

b_k および b_l はそれぞれ独立に0～3の整数であり、

b_m は1～7の整数であり；

Z_{aa1} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、または酸性アミノ酸の残基であるか、あるいは存在せず；

Z_{aa2} は、芳香族アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa3} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa4} は、Ser、Thr、Ala、または^mSであり；

Z_{aa5} は、GlyまたはSerであり；

Z_{aa6} は、塩基性アミノ酸または中性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa7} は、中性アミノ酸または酸性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa8} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

Z_{aa9} は、脂肪族アミノ酸、中性アミノ酸、または芳香族アミノ酸

の残基であり；

Z_{aa10} は、塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または中性アミノ酸の残基であり；

Z_{aa11} は、芳香族アミノ酸の残基であり；

Z_{aa12} は、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、または塩基性アミノ酸の残基であり；

ここで、脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、中性アミノ酸、および酸性アミノ酸は、請求項1において定義されたとおりである]

で表される環状ペプチドと、

キャリア分子とが結合している、コンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項12]

Z_{aa1} が、Arg、Lys、His、Gly、Ala、Asn、Thr、Ser、Met、Leu、Ile、Val、Gln、Phe、Tyr、Trp、またはCysの残基であるか、あるいは存在せず；

Z_{aa2} が、Phe、Tyr、Trp、2NaI、4CF、またはD CFの残基であり；

Z_{aa3} が、Ile、Leu、Nle、Tle、Trp、2NaI、4CF、またはArgの残基であり；

Z_{aa4} がSer残基であり；

Z_{aa5} がGly残基であり；

Z_{aa6} が、Arg、Lys、His、Ser、Cit、またはAGBの残基であり；

Z_{aa7} が、AsnまたはAspの残基であり；

Z_{aa8} が、Trpまたは2NaIの残基であり；

Z_{aa9} が、Val、Nle、Ahp、またはMetの残基であり；

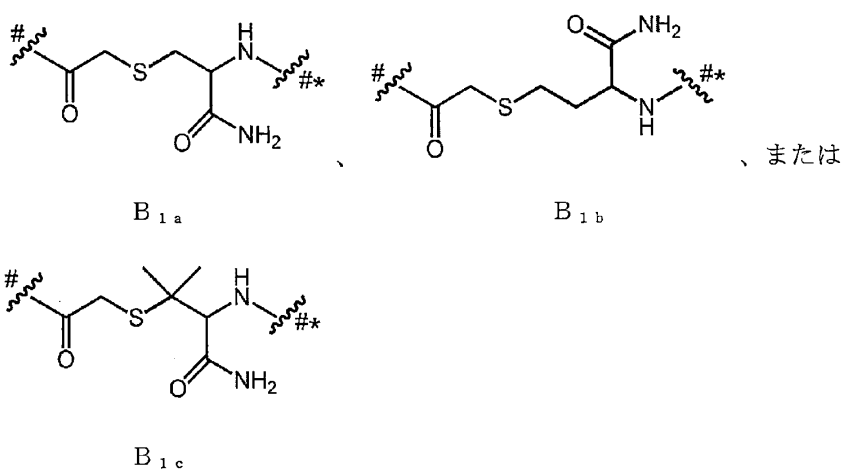
Z_{aa10} が、Arg、AGB、Lys、His、AMF、Phg、またはValの残基であり；

Z_{aa11} が、Trpまたは2NaIの残基であり；

Z_{aa12} が、Val、Tle、CPTG、CHXG、またはPheの残基であり；

Bが、環形成基

[化34]



である、請求項11に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項13]

Z_{aa1} が存在せず；

Z_{aa2} が2NaI残基であり；

Z_{aa3} が、ArgまたはTleの残基であり；

Z_{aa4} がSer残基であり；

Z_{aa5} がGly残基であり；

Z_{aa6} が、ArgまたはAGBの残基であり；

Z_{aa7} が、AsnまたはAspの残基であり；

Z_{aa8} がTrp残基であり；

Z_{aa9} が、ValまたはNleの残基であり；

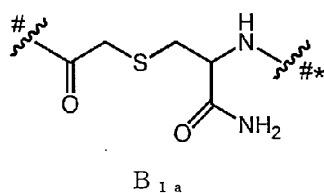
Z_{aa10} が、Arg、AGB、またはValの残基であり；

Z_{aa11} がTrp残基であり；

Z_{aa12} が、Val、CPTG、またはCHXGの残基であり；

Bが

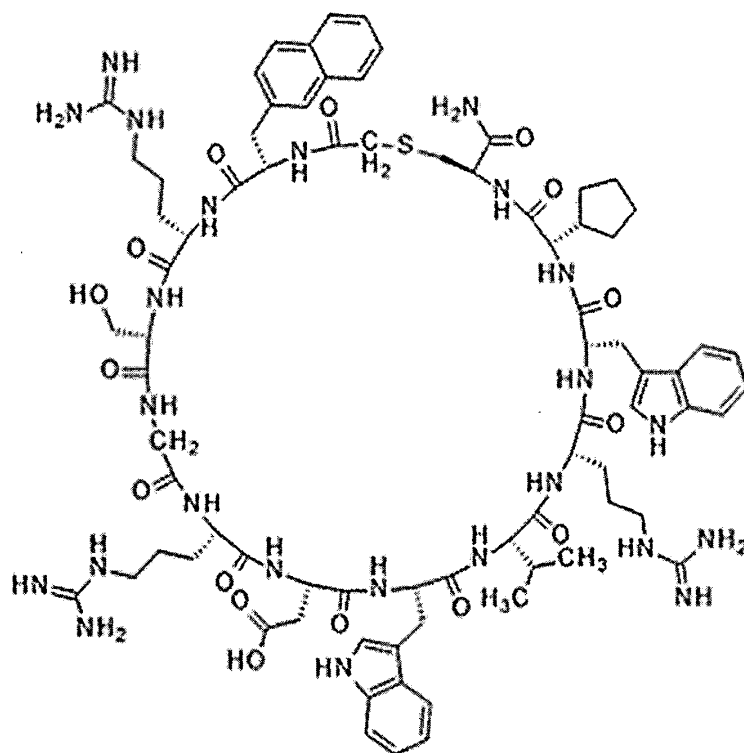
[化35]



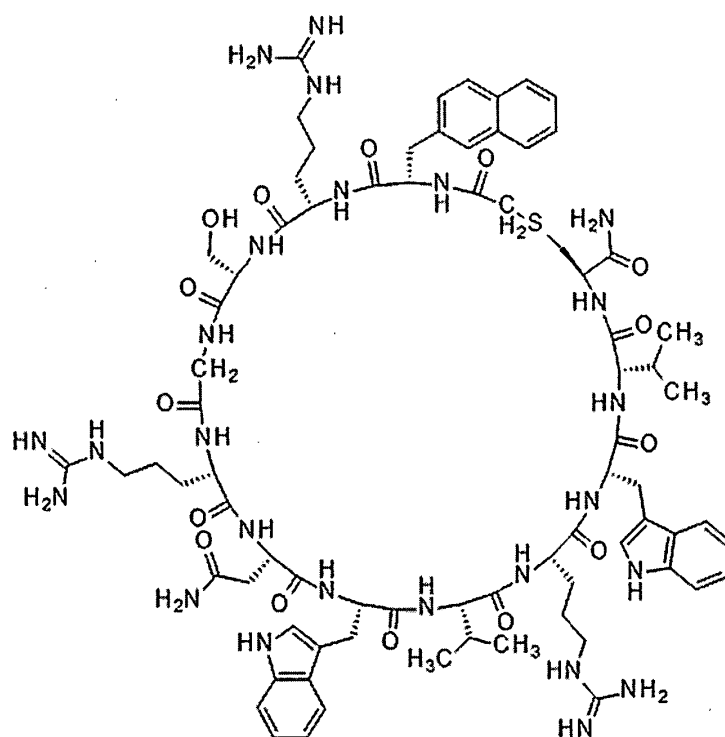
である、請求項12に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項14] 式(X)で表される環状ペプチドが、

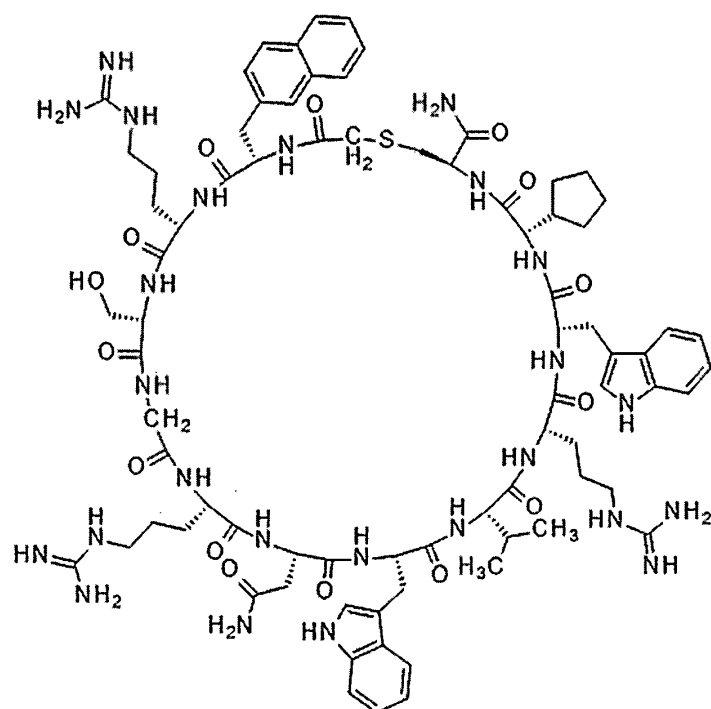
[化36]



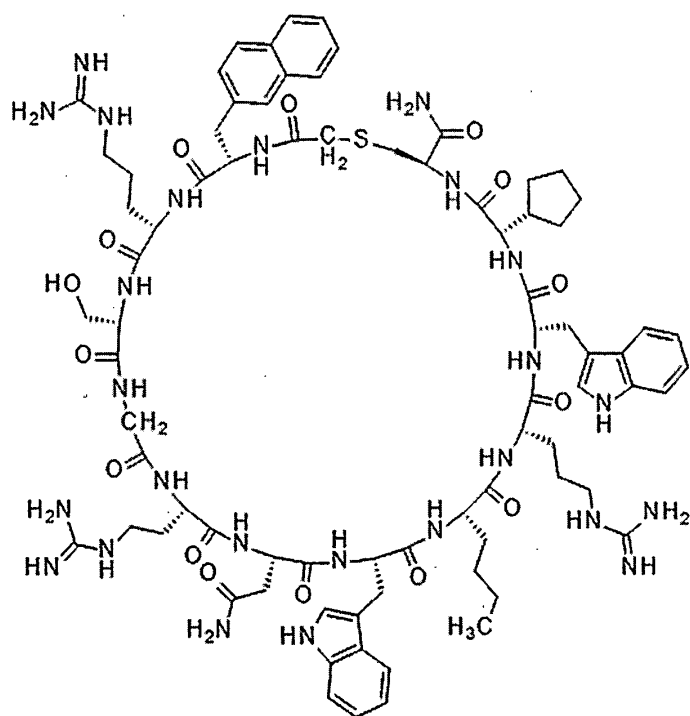
[化38]



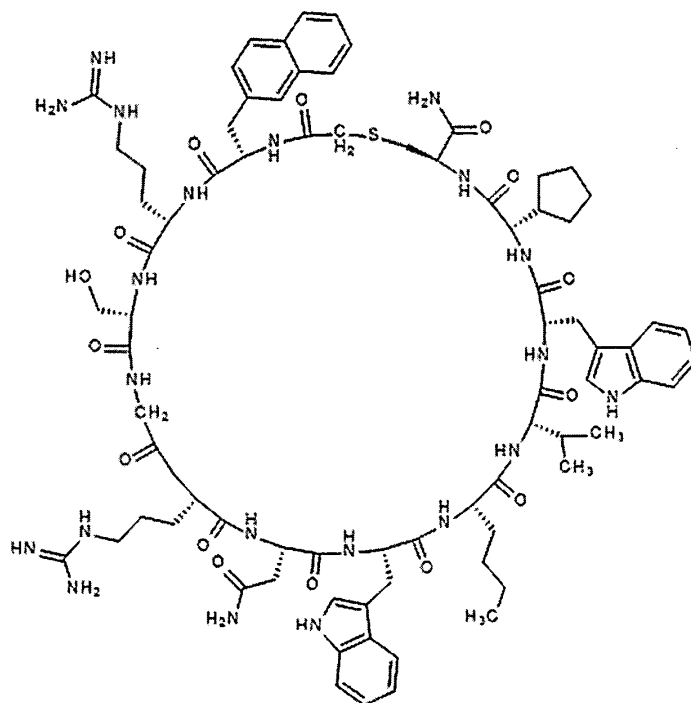
[化39]



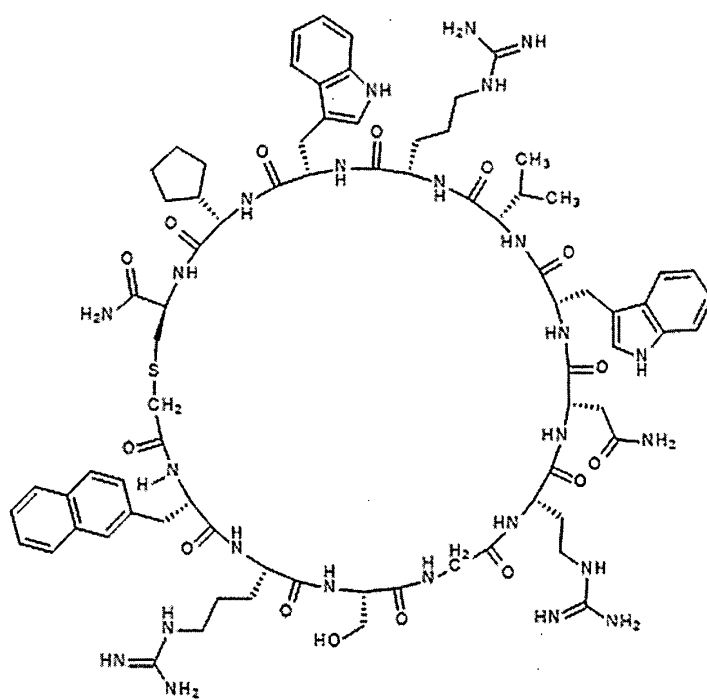
[化40]



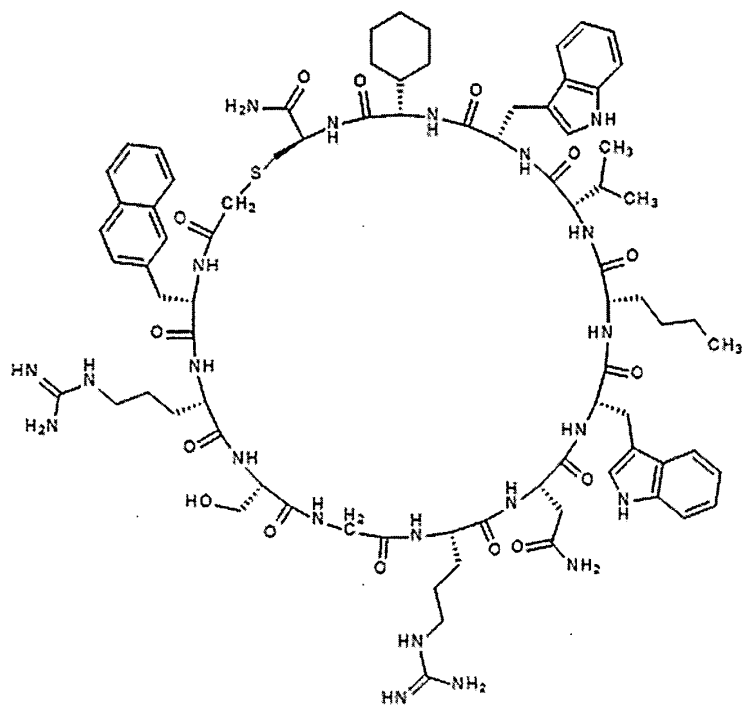
[化41]



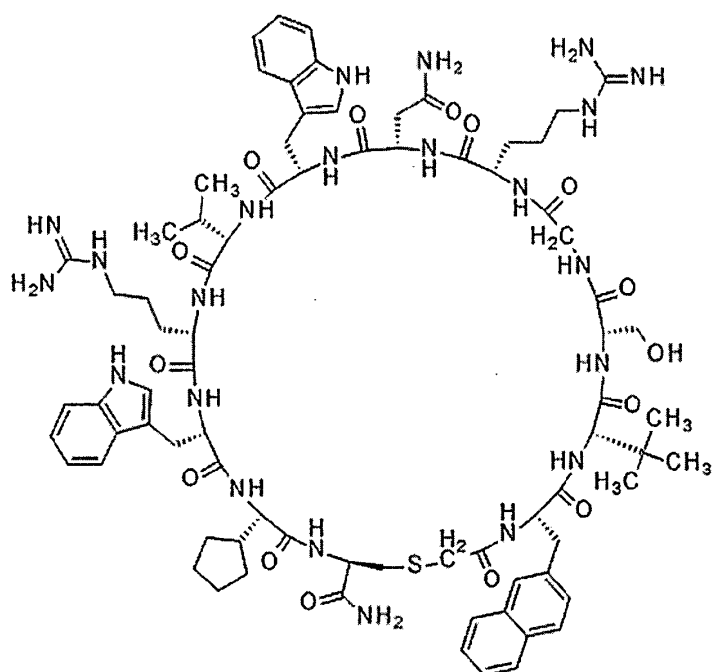
[化42]



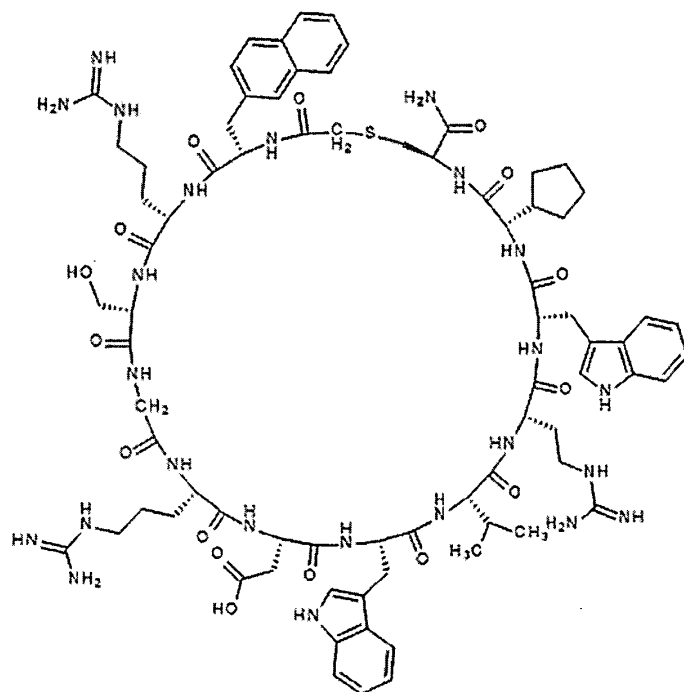
[化43]



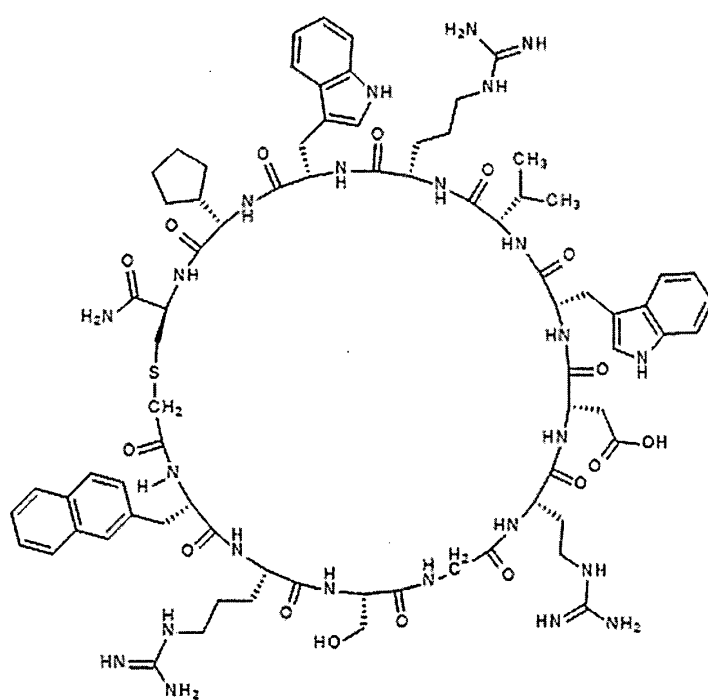
[化44]



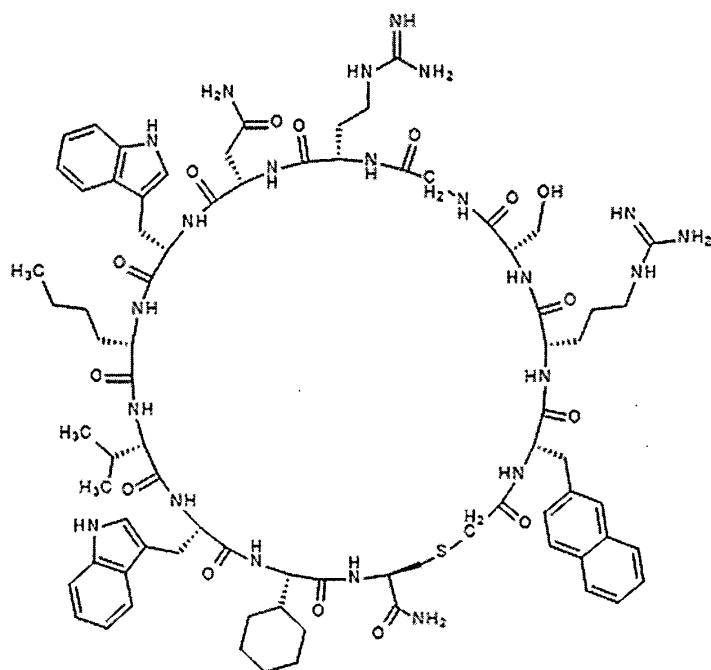
[化45]



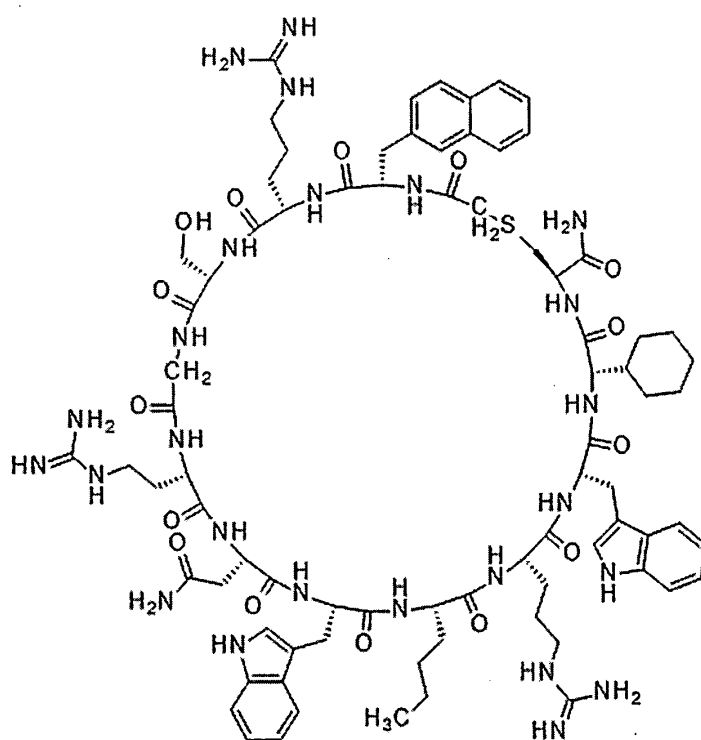
[化46]



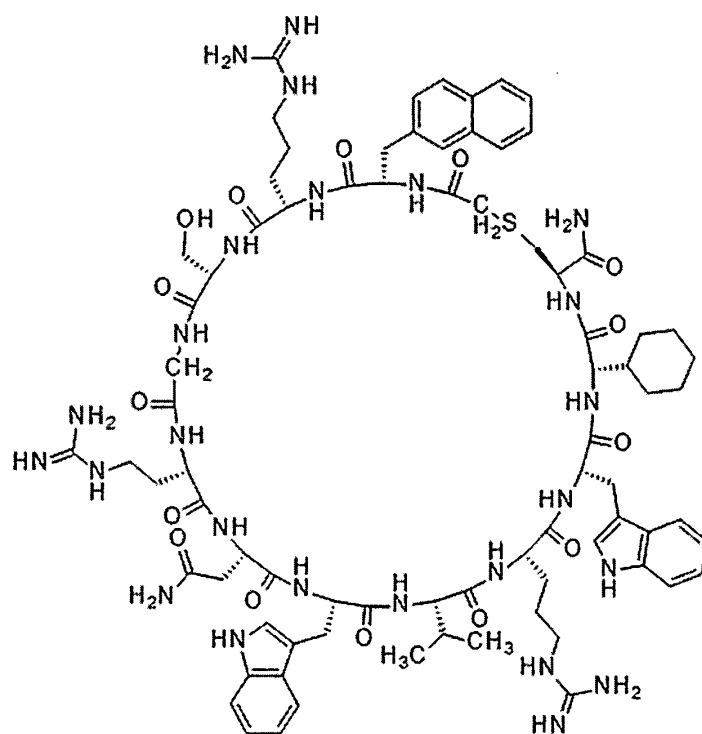
[化47]



[化48]

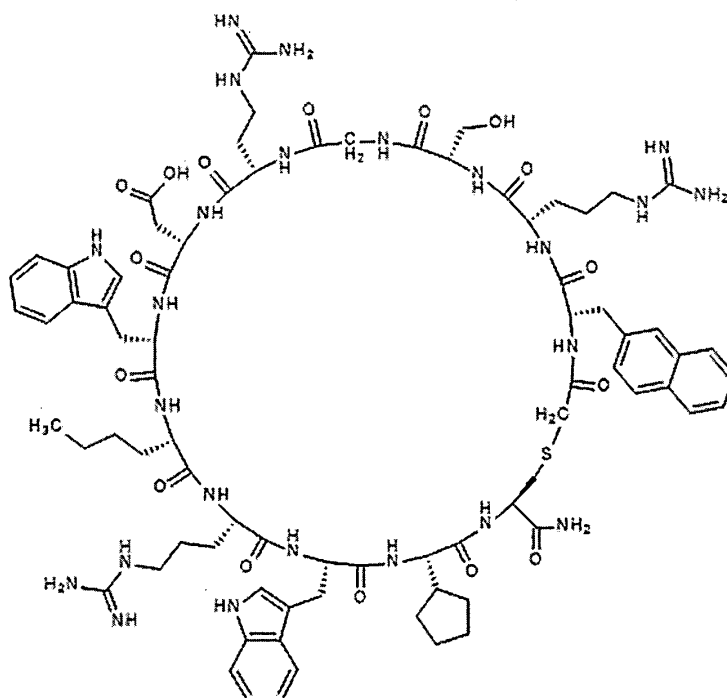


[化49]



および

[化50]



で表される化合物からなる群より選択される、請求項13に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項15] 前記キャリア分子が、ヒト血清アルブミンまたはその断片もしくは改変体である、請求項11～14のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項16] 前記キャリア分子が、Fc含有分子である、請求項11～14のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項17] 前記Fc含有分子が、完全長IgG、完全長IgG重鎖、またはFc領域の全部もしくは一部を含むIgGの断片、あるいはその改変体である、請求項16に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項18] 前記Fc含有分子が、IgG重鎖の定常領域のCH2ドメインおよ

びC H 3ドメインを含む、請求項16または17に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項19] 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖におけるEuインデックスによる226位に相当するシステイン残基、229位に相当するシステイン残基、または297位に相当するアスパラギン残基の少なくともいずれか一つのアミノ酸残基を含む、請求項16～18のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項20] 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖におけるEuインデックスによる221～230位、222～230位、223～230位、224～230位、225～230位、または226～230位に相当するアミノ酸配列を含む、請求項16～19のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項21] 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖におけるEuインデックスによる234位に相当するロイシン残基および235位に相当するロイシン残基のアラニン残基への置換を含むか、または、234位に相当するロイシン残基、235位に相当するロイシン残基、および329位に相当するプロリン残基のアラニン残基への置換を含む、請求項16～20のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項22] 前記Fc含有分子が、ヒトIgG重鎖の定常領域からなるCH、ヒトIgGの定常領域からなるCLCH、またはヒトIgGのFc領域からなる分子もしくはその断片、あるいはその改変体である、請求項16～21のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項23] 前記Fc含有分子が、
配列番号125のアミノ酸番号20～474のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号127のアミノ酸番号21～234のアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる抗体（mAb-A）、

配列番号 1 2 9 のアミノ酸番号 2 0 ～ 3 4 9 のアミノ酸配列からなる C H (CH-A) 、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸番号 2 0 ～ 3 4 9 のアミノ酸配列からなる C H (CH-B) 、

配列番号 1 2 9 のアミノ酸番号 2 0 ～ 3 4 9 のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 1 3 1 のアミノ酸番号 2 1 ～ 1 2 5 のアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる C L C H (CLCH-A) 、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸番号 2 0 ～ 3 4 9 のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 1 3 1 のアミノ酸番号 2 1 ～ 1 2 5 のアミノ酸配列からなる軽鎖の組み合わせからなる C L C H (CLCH-B) 、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸番号 2 1 ～ 2 4 3 のアミノ酸配列からなる Fc断片 (Fc-B) 、

配列番号 1 3 7 のアミノ酸番号 2 1 ～ 2 4 7 のアミノ酸配列からなる Fc断片 (Fc-A) 、または

配列番号 1 3 9 のアミノ酸番号 2 1 ～ 2 4 7 のアミノ酸配列からなる Fc断片 (Fc-C)

あるいは

その改変体である、請求項 2 2 に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項24]

F c 含有分子が、N-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N末のプロセッシング、C末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化及び重鎖のカルボキシル末端における 1 又は 2 個のアミノ酸残基の欠失からなる群より選択される 1 又は 2 以上の修飾を含む、請求項 1 6 ～ 2 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項25]

F c 含有分子の重鎖のカルボキシル末端において 1 又は 2 個のアミノ酸残基が欠失している、請求項 2 4 に記載のコンジュゲート体また

はその薬学上許容される塩。

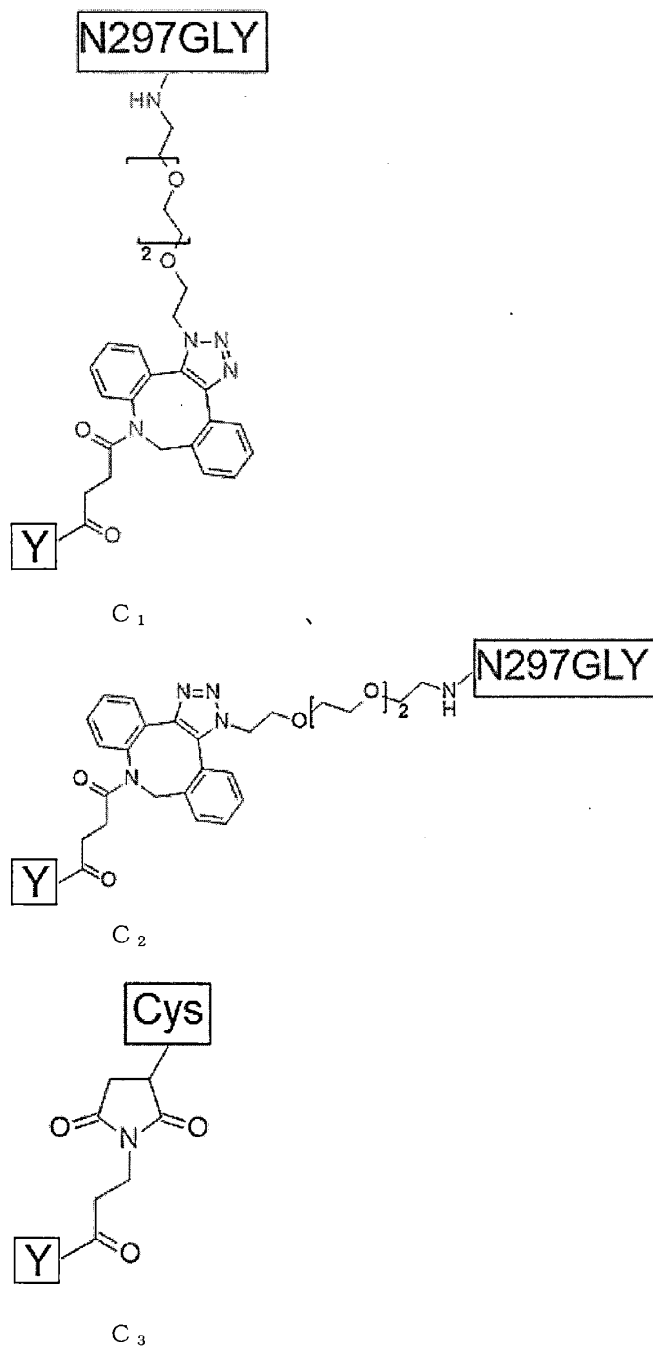
- [請求項26] F c 含有分子の2本の重鎖の双方でカルボキシル末端において1個のアミノ酸残基が欠失している、請求項25に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項27] F c 含有分子の重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている、請求項24～26のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項28] 前記環状ペプチドと前記キャリア分子とが、リンカー構造を介して結合している、請求項11～27のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項29] 前記リンカー構造が、ポリオキシアルキレン鎖、アミノ酸残基、および2以上のアミノ酸残基からなるオリゴペプチド鎖からなる群から選択される少なくとも1つの構造を含む、請求項28に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項30] 前記リンカー構造に含まれるポリオキシアルキレン鎖が、ポリエチレングリコール（PEG）鎖である、請求項29に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項31] 前記リンカー構造における主鎖に含まれるPEG鎖の合計重合度が、6～100である、請求項30に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項32] 前記リンカー構造に含まれるアミノ酸残基が、Gly、N-メチルグリシン、Asp、D-Asp、Glu、D-Glu、Lys、D-Lys、 β -アラニン、Ser、D-Ser、側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸、または側鎖にSG鎖を含む非天然アミノ酸の残基である、請求項29に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項33] 前記リンカー構造に含まれるオリゴペプチド鎖が、2～20個のアミノ酸残基からなる、請求項29に記載のコンジュゲート体またはそ

の薬学上許容される塩。

- [請求項34] 前記リンカー構造に含まれるオリゴペプチド鎖が、G l y、N-メチルグリシン、A s p、D-A s p、G l u、D-G l u、L y s、D-L y s、 β -アラニン、S e r、D-S e r、側鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸、および側鎖にS G鎖を含む非天然アミノ酸からなる群から選択される1以上のアミノ酸残基を含む、請求項29に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項35] 前記リンカー構造に含まれるアミノ酸残基またはオリゴペプチド鎖のN末端アミノ基と、環形成基AのR¹⁰または環形成基BのR¹¹⁰が結合しているカルボニル基とがアミド結合を形成しており、R¹⁰またはR¹¹⁰が該N末端アミノ基のNHと置換されている、請求項29に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項36] 前記リンカー構造が、キャリア分子と結合する連結基Cを含む、請求項28から35のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項37] 前記連結基Cが、マレイミド基とチオール基との反応により形成されるチオエーテル結合におけるマレイミド基由来の部分または1, 2, 3-トリアゾール環を含む、請求項36に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項38] マレイミド基とキャリア分子のシステイン残基のチオール基とが結合してチオエーテル結合が形成されている、請求項37に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。
- [請求項39] 前記キャリア分子が、Fc含有分子であり、前記連結基Cに含まれる1, 2, 3-トリアゾール環と、Fc含有分子のEuインデックスによる297位に相当するアスパラギン残基に結合している糖鎖(N297結合糖鎖)とが結合している、請求項37に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項40] 前記連結基Cが、以下の式

[化51]



(式中、

N 2 9 7 G L Yは、F c 含有分子のN 2 9 7 結合糖鎖の非還元末端

と結合していることを表し、

C y s は、キャリア分子のシステイン残基のチオール基と結合していることを表し、

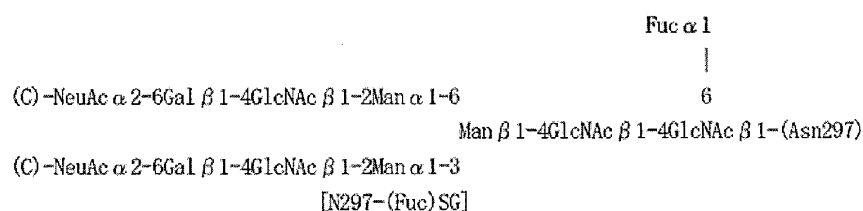
Y は、リンカー構造における隣接するアミノ酸残基との結合点を示す)

のいずれかで表される、請求項 36～39 のいずれか一項に記載のコングュゲート体またはその薬学上許容される塩。

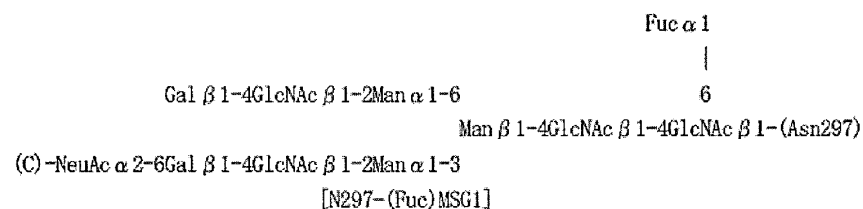
[請求項 41]

F c 含有分子の N 2 9 7 結合糖鎖が、以下の式

[化 52]

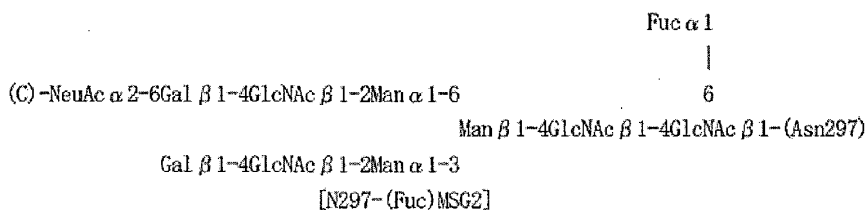


[化 53]



および

[化 54]



[式中、(C)は、連結基Cとの結合点を示し、(Asn297)は、Fc含有分子のEuインデックスによる297位に相当するアスパラギン残基との結合点を示す]

で表される構造を有する糖鎖N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1およびN297-(Fuc)MSG2から選択される少なくとも1つである、請求項39または40に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項42] Fc含有分子のN297結合糖鎖が、N297-(Fuc)SGである、請求項41に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項43] 前記リンカー構造が、下記式(XX)

-L1-L2-L3-C-

[式中、

L1は、直鎖状に結合した3～6個の中性アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであり；

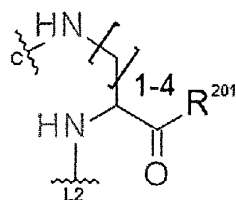
L2は、L2aまたはL2bであり、

L2aは、主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基であるか、または主鎖にポリオキシアルキレン鎖を含む非天然アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであって、L2aにおける主鎖に含まれるポリオキシアルキレン鎖の合計重合度が6～100であるオリゴペプチドであり、

L2bは、直鎖状に結合した10～20個の天然または非天然の α アミノ酸残基を含むオリゴペプチドであり；

L3は、

[化55]



(式中、 R^{201} は、ヒドロキシ基またはアミノ基であり、

[化56]



は、L2における隣接するアミノ酸残基との結合点を示し、

[化57]



は、連結基Cとの結合点を示す)で表されるアミノ酸残基であり；

Cは、連結基Cであり；

L1のN末端アミノ基は、環形成基AのR¹⁰または環形成基BのR¹¹が結合しているカルボニル基とアミド結合を形成しており、R¹⁰またはR¹¹は、該N末端アミノ基のNHと置換されており；

L1とL2とは、アミド結合で連結されており；かつ

L2とL3とは、アミド結合で連結されている。]

である請求項36～42のいずれか一項記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項44]

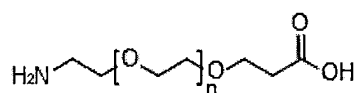
L1に含まれる中性アミノ酸残基が、Gly、Ser、D-Ser、N-メチルグリシン(NMeG)、およびβ-アラニン(bAla)からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸の残基である、請求項43記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項45]

L2aに含まれる、主鎖のポリオキシアルキレン鎖がPEG鎖である、請求項39または44記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項46]

L2aに含まれる、主鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸残基が、下記式[化58]



[式中、 n は、5～40の整数を示す。]

で表されるアミノ酸の残基である、請求項45記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項47] 前記PEG鎖の合計重合度が10～40である、請求項46記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項48] L2bの α アミノ酸が、グリシンまたはN-メチルグリシンである、請求項43または44記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項49] L2bのオリゴペプチドが、N-メチルグリシンが13個連続したオリゴN-メチルグリシンである、請求項48記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項50] L2が、側鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸残基、または側鎖にSG鎖を含む非天然アミノ酸残基を含む、請求項43～49のいずれか1項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項51] 前記側鎖にPEG鎖を含む非天然アミノ酸が、KPEGである、請求項50記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項52] 前記側鎖にSG鎖を含む非天然アミノ酸が、KSGである、請求項50記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項53] L1およびL2のオリゴペプチドの主鎖において、前記環形成基A又は環形成基Bに隣接しない1つ以上の位置に、酸性アミノ酸残基を合計で1～3個含む、請求項43～52のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項54] 前記酸性アミノ酸残基が、Asp、D-Asp、Glu、D-Gluからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項53記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項55] L1が、
Gly-Gly-Gly-Gly、
Gly-Ser-Gly-Ser、

NMeG-NMeG-NMeG-NMeG、
bAla-bAla-bAla-bAla、または
Gly-Gly-Glu-Gly-Gly
の配列を含むかまたは当該配列からなるオリゴペプチド
である、請求項43～54のいずれか一項に記載のコンジュゲート体
またはその薬学上許容される塩。

[請求項56] L1が、
Gly-Gly-Gly-Gly、
Gly-Ser-Gly-Ser、
NMeG-NMeG-NMeG-NMeG、または
bAla-bAla-bAla-bAla
のC末端に2個の酸性アミノ酸残基が連結された配列からなるオリゴ
ペプチドである、請求項55記載のコンジュゲート体またはその薬学
上許容される塩。

[請求項57] 前記酸性アミノ酸残基が、Asp残基である、請求項56記載のコ
ンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項58] L2が、
Asp-Asp-KPEG-P12P-P12P、
KSG-P12P-P12P、
Asp-Asp-P12P、
Asp-Asp-P12P-P12P、または
Asp-Asp-P12P-KPEG-P12P
の配列からなるオリゴペプチドである、請求項43～55のいずれか
一項記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項59] L3が、Lys残基である、請求項43～58のいずれか一項に記載
のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項60] 前記リンカー構造が、
L1がGly-Gly-Gly-GlyもしくはGly-Ser-G

L y - S e r の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aが A s p - A s p - K P E G - P 1 2 P - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3が L y s 残基である構造、

L1が G l y - G l y - G l y - G l y の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aが K S G - P 1 2 P - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3が L y s 残基である構造、

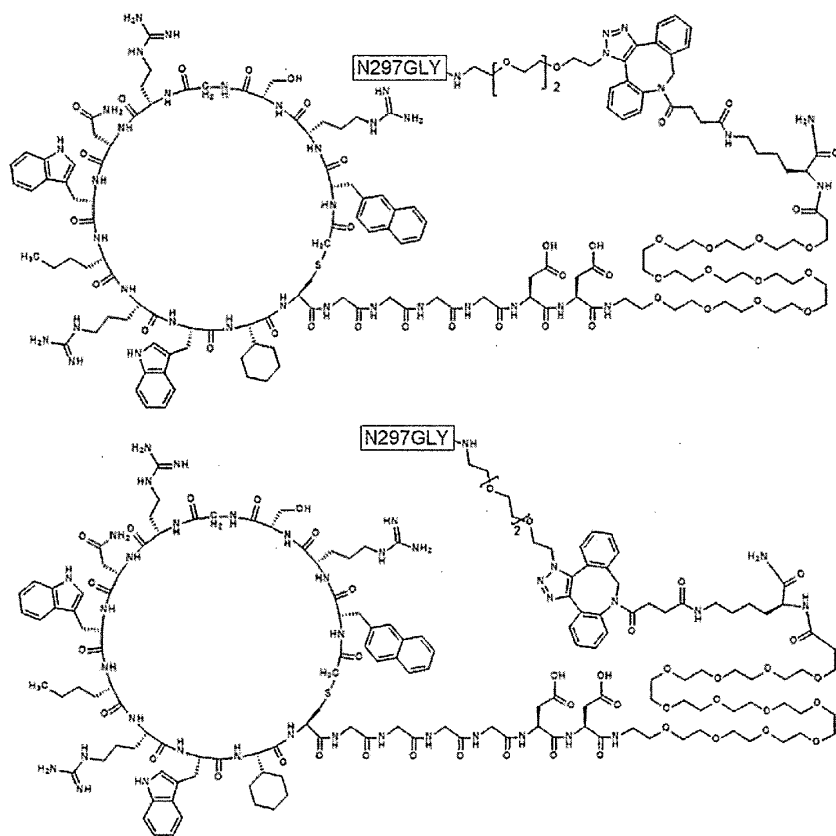
L1が G l y - G l y - G l y - G l y の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aが A s p - A s p - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3が L y s 残基である構造、

L1が G l y - S e r - G l y - S e r の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aが A s p - A s p - P 1 2 P - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3が L y s 残基である構造、または

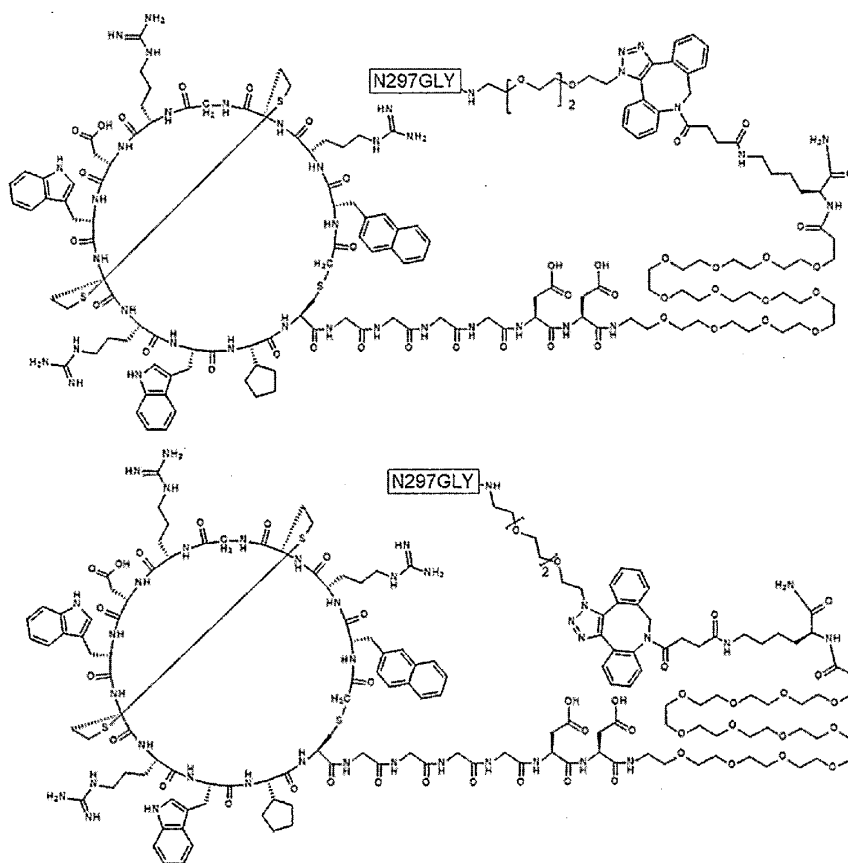
L1が G l y - G l y - G l y - G l y の配列からなるオリゴペプチドであり、L2aが A s p - A s p - P 1 2 P - K P E G - P 1 2 P の配列からなるオリゴペプチドであり、L3が L y s 残基である構造、である、請求項43記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項61] 環状ペプチドおよびリンカー構造が、

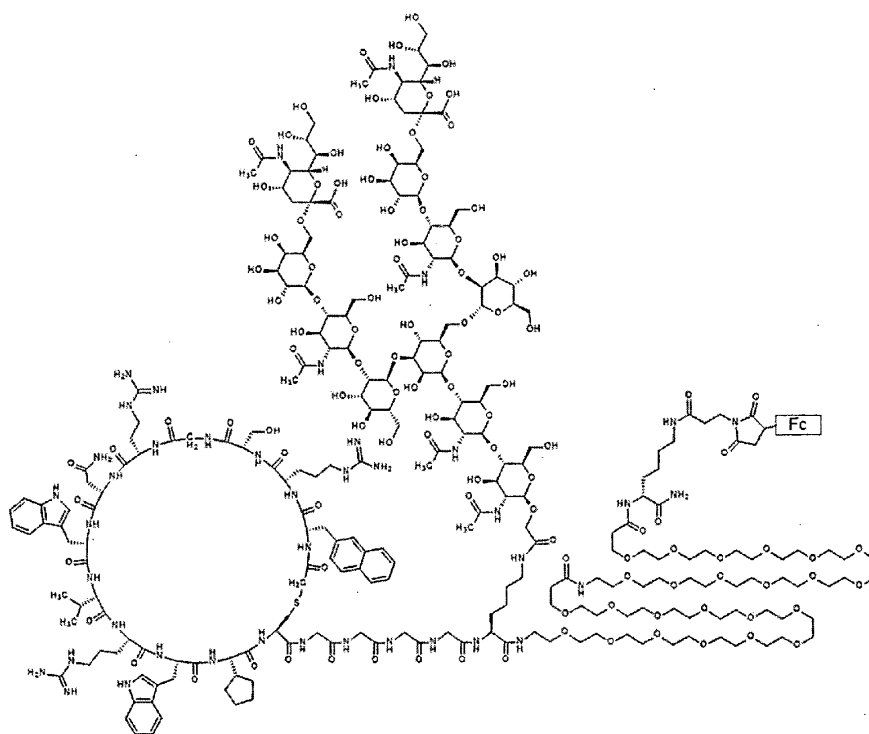
[化59]



[化60]

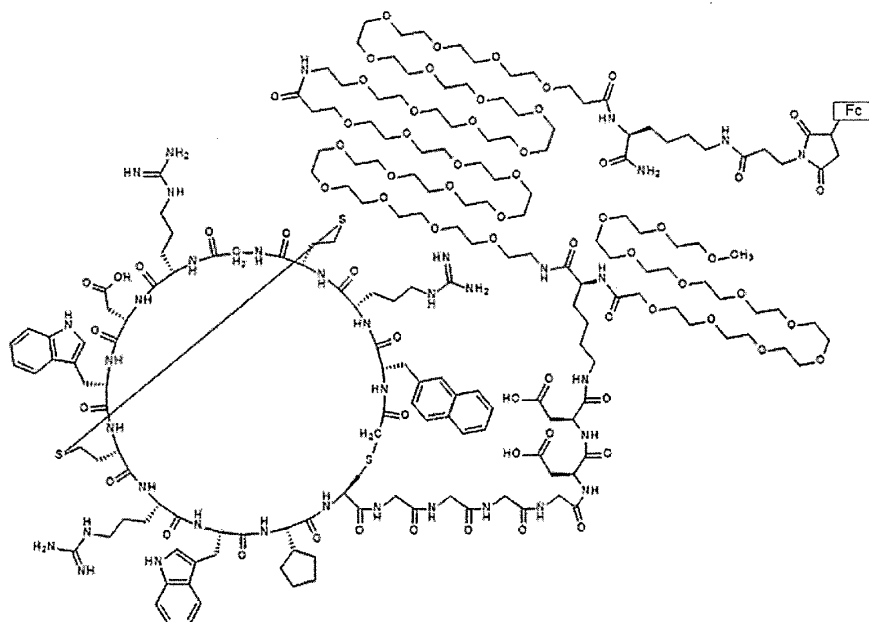


[化61]



および

[化62]



(式中、

N 2 9 7 G L Yは、連結基Cに含まれる1, 2, 3-トリアゾール環とFc含有分子のN 2 9 7結合糖鎖の非還元末端とが結合していることを表し、

Fcは、連結基Cに含まれるマレイミド基とFc含有分子のシステイン残基のチオール基とが結合していることを表す)のいずれかで表される、請求項11に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩。

[請求項62] 請求項11～61のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

[請求項63] TSP1の機能を阻害することにより治療または予防可能な疾患の治療または予防のための、請求項62に記載の医薬組成物。

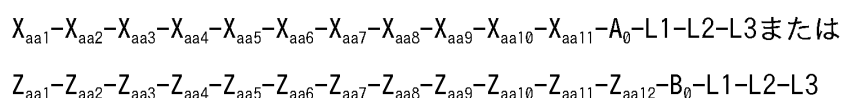
[請求項64] 重症下肢虚血、末梢動脈疾患または包括的高度慢性下肢虚血の治療または予防のための、請求項63に記載の医薬組成物。

[請求項65] 請求項11～61のいずれか一項に記載のコンジュゲート体または

その薬学上許容される塩を有効成分として含む、血流改善剤。

[請求項66] 請求項11～61のいずれか一項に記載のコンジュゲート体またはその薬学上許容される塩を製造する方法であって、

(1) 固相合成法により、以下の式



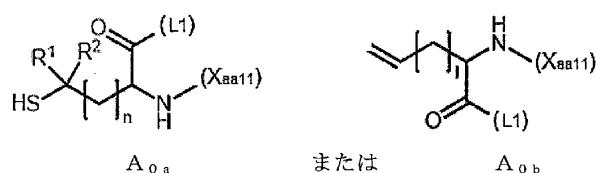
[式中、

$X_{aa1} \sim X_{aa11}$ は、請求項1において定義されたとおりであり（但し、 X_{aa3} および X_{aa8} の構造において、チオール基は、結合を形成しておらず、それぞれチオール基のままである）、

$L1 \sim L3$ は、請求項43において定義されたとおりであり（但し、 $L2$ が側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含む場合、該残基は、 lys 残基に置き換えられる）、

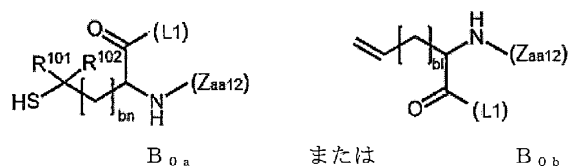
$Z_{aa1} \sim Z_{aa12}$ は、請求項11において定義されたとおりであり、 A_0 は、以下の式

[化63]



(式中、 (X_{aa11}) は、 X_{aa11} との結合点を示し、 $(L1)$ は、 $L1$ におけるN末端のアミノ酸残基との結合点を示し、 l および n は、請求項1において定義されたとおりである) で表される残基であり、 B_0 は、以下の式

[化64]



(式中、 (Z_{aa12}) は、 Z_{aa12} との結合点を示し、 $(L1)$ は、 $L1$ における N 末端のアミノ酸残基との結合点を示し、 $b1$ および b_n は、請求項 11 において定義されたとおりである) で表される残基である] で表されるオリゴペプチド $X-A-L$ または $Z-B-L$ を、C 末端側から合成する工程、

(2)

(a) オリゴペプチド $X-A-L$ において X_{aa1} の N 末端アミノ基と A_{0a} とを連結して環形成基 $A_1 \sim A_3$ (ただし、 R^{10} の位置において $L1$ に連結されている) のいずれかを形成させるか、

(b) オリゴペプチド $X-A-L$ において X_{aa1} の N 末端アミノ基と A_{0b} とを連結して環形成基 A_4 または A_5 (ただし、 R^{10} の位置において $L1$ に連結されている) を形成させるか、

(c) オリゴペプチド $Z-B-L$ において Z_{aa1} または Z_{aa2} の N 末端アミノ基と B_{0a} とを連結して環形成基 $B_1 \sim B_4$ (ただし、 R^{110} の位置において $L1$ に連結されている) のいずれかを形成させるか、または

(d) オリゴペプチド $Z-B-L$ において Z_{aa1} または Z_{aa2} の N 末端アミノ基と B_{0b} とを連結して環形成基 B_5 または B_6 (ただし、 R^{110} の位置において $L1$ に連結されている) を形成させる

ことにより、工程 (1) において合成されたオリゴペプチドを環化させ、環状ペプチドを得る工程、

(3) 工程 (1) においてオリゴペプチド $X-A-L$ を合成した場合、工程 (2) で環化させたオリゴペプチド $X-A-L$ の X_{aa3} および X_{aa8} のチオール基において、 $-S-S-$ 、 $-S-CH_2-S-$ 、または $-S-X-S-$ (式中、 X は、請求項 1 において定義されたとおりである) で表される結合を形成させ、二環性環状ペプチドを得る工程、

(4) $L2$ が側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を含み、オリゴ

ペプチドX-A-LまたはZ-B-LにおいてL y s 残基に置き換えられている場合、該L y s 残基に糖鎖を導入することにより側鎖に糖鎖を含む非天然アミノ酸の残基を形成させる工程、

(5) L 3 に、マレイミド基または1, 2, 3-トリアゾール環を形成し得る反応基を結合させる工程、および

(6) 工程(5)の反応基を介して、環状ペプチドとキャリア分子とを結合させる工程を含む、前記方法。