

明 細 書

発明の名称：ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド、当該ペプチドを含む組成物、及び当該ペプチドの利用に関する。

背景技術

[0002] ミオスタチンは増殖分化因子8（GDF-8）とも呼ばれるトランスフォーミング増殖因子 β （TGF- β ）スーパーファミリーメンバーの分泌タンパク質である。TGF- β ファミリーの他のメンバー同様、ミオスタチンは、N末端プロペプチドドメインと、活性分子であるC末端ドメインとを含有する大きな前駆体タンパク質として合成される。ミオスタチン前駆体の2つの分子は、C末端増殖因子ドメインに存在する1つのジスルフィド結合を介して共有結合している。活性な成熟型（mature）ミオスタチン（C末端増殖因子ドメインからなるジスルフィド結合ホモダイマー）は、タンパク質分解性プロセッシングの複数の工程を通して、ミオスタチン前駆体から遊離する。

[0003] ミオスタチン活性化経路の第1の工程において、N末端プロペプチドドメインとC末端増殖因子ドメインの間のペプチド結合Arg266～Asp267は、ホモダイマー前駆体の両方の鎖においてフーリン型前駆タンパク質転換酵素によって切断される。しかし、結果として得られた3つのペプチド（2つのプロペプチド及び1つの成熟型ミオスタチン（すなわち、増殖因子ドメインからなるジスルフィド結合したホモダイマー））は会合したままであり、「潜在型（latent）ミオスタチン」と呼ばれる非共有結合性の不活性な複合体を形成している。成熟型ミオスタチンは次いで、プロペプチドの分解を介して潜在型ミオスタチンから遊離することができる。メタロプロテイナーゼの骨形成タンパク質1（BMP1）ファミリーのメンバーは、ホモダイマーである活性な成熟型ミオスタチンの遊離と同時に、プロペプチ

ド内の1つのペプチド結合A r g 9 8 ~ A s p 9 9を切断する。さらに、潜在型ミオスタチンはまた、酸処理又は熱処理のいずれかで複合体を解離させることによって、インビトロで活性化され得る（非特許文献2、3）。

[0004] ミオスタチンは横紋筋で産生され、横紋筋線維の肥大を負に制御する因子である。ミオスタチンのノックアウトマウスは骨格筋の顕著な肥大が報告されている（非特許文献1）。筋肥大の負の制御はミオスタチンのみならず、同じくTGF- β スーパーファミリーに属するGDF-11（非特許文献4）やアクチビンA（非特許文献5）によっても行われている。ミオスタチンは、膜貫通セリン／トレオニンキナーゼヘテロ四量体受容体ファミリーを介してその効果を発揮する。その活性化は受容体のトランスリン酸化を亢進し、セリン／トレオニンキナーゼ活性によって行われる。活性化型のミオスタチン、GDF-11及びアクチビンA、のいずれもアクチビンII B型受容体（ActRII B）に高い親和性で結合する。次いで、アクチビン様キナーゼ4（ALK4）又はアクチビン様キナーゼ5（ALK5）といった親和性の低い受容体が動員され、そのトランスリン酸化が活性化される。続いて細胞質内でタンパク質Smad2及びSmad3がリン酸化され、これらとSmad4との複合体が形成後に核内へ移行し、標的遺伝子を発現させる（非特許文献6）。

[0005] しかし、GDF-11は若返り因子として筋機能向上作用が（非特許文献7）、アクチビンは下垂体に作用し卵胞刺激ホルモン（FSH）の産生促進作用を有することが知られている（非特許文献8）。横紋筋線維の肥大は、このように多機能を有する複数の因子によって制御されている。そのため、横紋筋の本来の機能である筋力の制御がどの因子によって制御されているかは不明である。筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症（SMA）、サルコペニア、フレイル、カケクシア、脳卒中などにおける筋力低下の改善を企図する標的分子も不明であった。

[0006] 特にGDF-11は、老化に伴い血中濃度が上昇するという報告（非特許文献9）と、低下するという報告（非特許文献7）がある。よって、GDF

ー 1 1 の筋力制御における役割は明確でなかった。

[0007] しかし今般、ミオスタチンシグナルを特異的に阻害する抗潜在型ミオスタチン抗体が、Duchenne型筋ジストロフィーモデルマウスで、GDFー 1 1 やアクチビンも阻害する抗体やタンパク質よりも強い筋力向上を示し、また、筋委縮モデルマウスに投与したGDFー 1 1 が筋力を向上させた。これら実験結果から、抗潜在型ミオスタチン抗体による筋力が低下した状況でのミオスタチンの特異的阻害が、有用な治療戦略であることが示唆された（非特許文献 1 0）。同様に、ミオスタチンシグナルを特異的に阻害する抗プロミオスタチン抗体は、SMAモデルマウスにおいて、SMN 2 遺伝子のスプライシング低分子修飾薬による筋力改善に上乗せ効果を示した。このことから、抗プロミオスタチン抗体によるミオスタチン選択的阻害が、SMAにおける筋力増加に有用であることが示された（非特許文献 1 1）。

[0008] こうした知見を元に、上記のような抗体を用いた選択的ミオスタチンシグナル阻害剤が創製されてきた。しかしながら、I g Gをはじめとする抗体は、筋の間質液への分布が非常に低いことが知られている（非特許文献 1 2、1 3）。ミオスタチンの体内作用様式はオートクライン、パラクライン及びエンドクラインのすべてによるが、多くは筋組織におけるオートクライン、パラクラインによると考えられている（非特許文献 1 6）。また、TGFーβスーパーファミリーのSmadによるシグナリングにクラスリン依存性早期エンドソームが関与することが報告されている（非特許文献 1 4、1 5）。

[0009] しかしながら、細胞外のみならず、細胞内においてもミオスタチンシグナルを阻害するような医薬組成物は、開発されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0010] 非特許文献1: McPherron et al., Nature 1997; 387 (6628): 83-90.

非特許文献2: Szlama et al., FEBS J 280 (16

) : 3822-3839 (2013)

非特許文献3: Lee, PloS One 3 (2) : e1628 (2008)

非特許文献4: Hammers et al., EMBO Mol Med. 2017; 9 (4) : 531-44.

非特許文献5: Latres et al., Nat Commun. 2017; 8 : 15153.

非特許文献6: Lee, J Clin Invest. 2021; 131 (9) : e148372.

非特許文献7: Sinha et al., Science 2014; 344 (6184) : 649-52.

非特許文献8: Bloise et al., Physiol Rev. 2019; 99 (1) : 739-80.

非特許文献9: Egerman et al., Cell Metab. 2015; 22 (1) : 164-74.

非特許文献10: Muramatsu et al., Sci Rep. 2021; 11 (1) : 2160.

非特許文献11: Long et al., Hum Mol Genet. 2019; 28 (7) : 1076-89.

非特許文献12: Jadhav et al., J Pharm Sci. 2017; 106 (9) : 2853-59.

非特許文献13: Wiig et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280 (4) : H1505-12.

非特許文献14: Derynck et al., Sci Signal. 2019; 12 (570) : 1-58.

非特許文献15: Chen et al., Cell Res. 2009; 19 : 58-70.

非特許文献16: Lee et al., J Appl Physiol (1985). 2016; 120 (6): 592-8.

非特許文献17: Bulfield et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81: 1189-92.

非特許文献18: Fukada et al., Am J Pathol. 2010; 176 (5): 2414-24.

非特許文献19: van Putten et al., FASEB J. 2019; 33 (7): 8110-24.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 細胞外のみならず細胞内においても、例えば、筋の間質液及び細胞質内の双方で、ミオスタチンシグナルを選択的に阻害できれば、抗体よりも高いミオスタチンシグナルの阻害効果が期待できる。このような作用を奏する化合物が得られれば、これまで創製された化合物や抗体よりも高い筋力向上作用を有し、期待筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症（SMA）をはじめとする筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の治療薬となるであろう、と期待される。

[0012] 本発明者らは、ミオスタチン阻害活性を有する化合物を創出することを目的として鋭意研究に努めた結果、本発明を想到した。本発明は、新規なミオスタチン阻害活性を有するペプチド、当該ペプチドを含む組成物、及び当該ペプチドの利用を提供する。

課題を解決するための手段

[0013] 非限定的に、本出願は以下の発明を含む。

[1]

以下のアミノ酸配列：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15（配列番号2）

ここにおいて、

- X 1 は、任意のアミノ酸又はペプチドであり；
- X 2 は、任意のアミノ酸であり；
- X 3 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；
- X 4 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；
- X 5 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいシクロアルキルを有するアミノ酸であり；
- X 6 は、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸であり；
- X 7 は、任意の二級アミノ酸、N-アルキルアミノ酸又はペプチドであり；
- X 8 は、任意のアミノ酸であり；
- X 9 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸であり；
- X 10 は、Rであり；
- X 11 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸であり；
- X 12 は、置換されていてもよい脂肪族アミノ酸、又は側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸であり；
- X 13 は、任意の二級アミノ酸、N-アルキルアミノ酸又はペプチドであり；
- X 14 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；
- X 15 は、任意のアミノ酸である、
- で示されるアミノ酸配列を含むペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[2]

以下の1つ又は2以上の要件を具備する、

- X 1 が、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は、アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド、である；

X 3 が、置換されていてもよい F 又は W である；

X 4 が、置換があってもよい F 又は Y、若しくはナフチルアラニンである；

X 5 が、置換があってもよい F、Y 又はナフチルアラニン、又は、置換があってもよいシクロヘキシルアラニンである；

X 6 が、それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸である；

X 8 が、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキルを有するアミノ酸である；

X 9 が、置換があってもよい F 又は Y、又は側鎖に置換されていてもよいヘテロシクロアルキル基を含むアミノ酸、又はアラニンである；

X 1 2 が、側鎖に含まれる炭素数が 3 以上である、脂肪族アミノ酸、又は、側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸である；

X 1 3 が、N-アルキルアミノ酸である；

X 1 4 が、置換があってもよい F 又は Y である；及び、

X 1 5 が、側鎖末端に硫黄（S）元素を有するアミノ酸である、

[1] に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[3]

以下の：

X 1 が、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は、アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド、である；

X 3 が、置換されていてもよい F 又は W である；

X 4 が、置換があってもよい F 又は Y、若しくはナフチルアラニンである；

X 5 が、置換があってもよい F、Y 又はナフチルアラニン、又は、置換があってもよいシクロヘキシルアラニンである；

X 6 が、それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸である；

X 8 が、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキルを有するアミノ酸である；

X 9 が、置換があってもよい F 又は Y、又は側鎖に置換されていてもよいヘテロシクロアルキル基を含むアミノ酸、又はアラニンである；

X 1 2 が、側鎖に含まれる炭素数が 3 以上である、脂肪族アミノ酸、又は、側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸である；

X 1 3 が、N-アルキルアミノ酸である；

X 1 4 が、置換があってもよい F 又は Y である；及び、

X 1 5 が、脂肪族アミノ酸であり、さらに X 1 6 として脂肪族アミノ酸又はプロリンが付加されている、

1 つ又は 2 以上の要件を具備する、[1] に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[4]

以下の：

X 1 が、A、MeA、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、N、CrmG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、KCOpipzaa、CeG、CrbG、K、KMe、Hly、E、Hgl、Orn、Dab、MeE、D 又は MeHgl である；

X 2 が、R、Dap、K、E、A、da、S、G、de、dkCOpipzaa、ddab、又は dorn である；

X 3 が、W、W7N、F44Py、Bph、W6N、F41dMeCmm4Pyz、W1Bn、W6H、W1Ph、Bph4ms、W1aa、W7Ph3C、W1Ph4OMe、W1Ph4COO、F42Py 又は W6H1Ph4COO である；

X 4 が、Y、3Py6NH₂、YBn、Yae、Nal1、Yph 又は m

Bphである；

X5が、MeF、MeY、MeF3Me、F、MeCha、MeYap、MeA1Ac4pip、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeF4OMe又はMeF4Cである；

X6が、I、Gcpe又はTMeである；

X7が、MeG、MeA、Meda、dp、EtG又はPrGである；

X8が、Y、F4COO、K、4Py、F、F3aao、F3OMe、A4paa、KCOpipzaa、Bph2C、Bph2OMe、又はpBph2aaoである；

X9が、Y、F4COO、3Py、4Py、F4aao、F4CON、F3CON、F4F又はF4OMeである；

X11が、MeF、Me4Py、Me3Py、F、Cha、MeCha、MeK、MeKMe、MeF4am、MeD、MeE、MeF4COO又はF4amである；

X12が、L、Ahp、Ano、Ado、Ade、Aoc、SPent、HseBu、AhpOMe、HsePr又はAunである；

X13が、MeA、MeE、MeKCOpipzaa、MeK、MeDap又はMeDabである；

X14が、MeF、MeF3Et、Me4Py、Me3Py又はMemBphである；及び、

X15が、C、MeC、dc、Medc、dhcy、Hcy又はdeである、

1つ又は2以上の要件を具備する、[1]に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[5]

以下の：

X1が、A、MeA、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、N、CrmG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、KCOpip

z a a、C e G、C r b G、K、K M e、H l y、E、H g l、O r n、D a b、M e E、D又はM e H g lである；

X 2が、R、D a p、K、E、A、d a、S、G、d e、d k C O p i p z a a、d d a b、又はd o r nである；

X 3が、W、W 7 N、F 4 4 P y、B p h、W 6 N、F 4 1 d M e C m m 4 P y z、W 1 B n、W 6 H、W 1 P h、B p h 4 m s、W 1 a a、W 7 P h 3 C、W 1 P h 4 O M e、F 4 2 P y、W 1 P h 4 C O O、又はW 6 H 1 P h 4 C O Oである；

X 4が、Y、3 P y 6 N H 2、Y B n、Y a e、N a l 1、Y p h又はm B p hである；

X 5が、M e F、M e Y、M e F 3 M e、F、M e C h a、M e Y a p、M e A 1 A c 4 p i p、M e m B p h、M e N a l 1、M e N a l 2、M e F 4 O M e又はM e F 4 Cである；

X 6が、I、G c p e又はT M eである；

X 7が、M e G、M e A、M e d a、d p、E t G又はP r Gである；

X 8が、Y、F 4 C O O、K、4 P y、F、F 3 a a o、F 3 O M e、A 4 p a a、K C O p i p z a a、B p h 2 C、B p h 2 O M e、又はp B p h 2 a a oである；

X 9が、Y、F 4 C O O、3 P y、4 P y、F 4 a a o、F 4 C O N、F 3 C O N、F 4 F又はF 4 O M eである；

X 1 1が、M e F、M e 4 P y、M e 3 P y、F、C h a、M e C h a、M e K、M e K M e、M e F 4 a m、M e D、M e E、M e F 4 C O O又はF 4 a mである；

X 1 2が、L、A h p、A n o、A d o、A d e、A o c、S P e n t、H s e B u、A h p O M e、H s e P r又はA u nである；

X 1 3が、M e A、M e E、M e K C O p i p z a a、M e K、M e D a p又はM e D a bである；

X 1 4が、M e F、M e F 3 E t、M e 4 P y、M e 3 P y又はM e m B

p hである；及び、

X 1 5が、A e o a c、A p e、d h g l、H g l、M e H g l、M e d h g l、M e A e o a c若しくはM e A p eであるか、あるいは、X 1 5がG、d a、A、若しくはd eであり、そして、X 1 6としてM e A、M e d a、G、d a、M e G、P又はAが付加されている、

1つ又は2以上の要件を具備する、[1]に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[6]

以下の：

X 1が、A、M e A、D a p、A p G、C r p G、C m G、M e D、N、C r m G、M e o p G、M e e G、A c a p G、A 4 p a a、K C O p i p z a a、C e G、C r b G、K、K M e、H l y、E、H g l、O r n、D a b、M e E、D、又はM e H g lである；

；及び、

X 1 5が、A e o a c、A p e、d h g l、H g l、M e H g l、M e d h g l、M e A e o a c若しくはM e A p eであるか、あるいは、X 1 5がG、d a、A、若しくはd eであり、そして、X 1 6としてM e A、M e d a、G、d a、M e G、P又はAが付加されている、

1つ又は2の要件を具備する、[1]に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[7]

配列番号2-368のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又は、からなる、[1]に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[8]

以下のアミノ酸配列：

A-R-W-Y-M e F-I-M e G-Y-Y-R-M e F-L-M e A
-M e F-C（配列番号1）

あるいは、

上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、11番目、12番目、13番目、14番目、及び15番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-14個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む、ペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[9]

前記ペプチドが、環状ペプチドである、[1] - [8] のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[10]

クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する、[1]、[2]、[4]、[6]、[7]、[8] のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[11]

前記ペプチドに含まれる1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、15番目のアミノ酸残基のカルボキシ基とが結合された環状構造を有する、[1]、[3]、[5]、[6]、[7] のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[12]

前記ペプチドに含まれる1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、16番目のアミノ酸残基のカルボキシ基とが結合された環状構造を有する、[1]、[3]、[5]、[6]、[7] のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[13]

前記ペプチド内において、さらに架橋構造を有する、[9] に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[14]

X1、X2又はX3のいずれかと、X11又はX13との間で架橋構造を

有する、〔９〕に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔１５〕

配列番号２３８－２９０、３２６－３２９、３３４－３３８、３４８－３５４、３５８－３６０、３６２－３６６、３６８のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む、又は、からなる、〔１２〕に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

〔１６〕

さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、〔１〕－〔８〕のいずれか１項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔１７〕

C末端にリンカーを含む、〔１〕－〔８〕のいずれか１項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔１８〕

〔１〕－〔８〕のいずれか１項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む、医薬組成物。

〔１９〕

ミオスタチン阻害活性を有する、〔１８〕に記載の医薬組成物。

〔２０〕

ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を予防、又は治療するための、〔１８〕に記載の医薬組成物。

〔２１〕

〔１〕－〔８〕のいずれか１項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を用いて、ミオスタチンシグナル伝達を阻害する方法。

〔２２〕

〔１〕－〔８〕のいずれか１項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を診断するための診断用組成物。

〔２３〕

ペプチド又、その薬学的に許容される塩について

- a) 溶媒への溶解度
- b) ミオスタチン阻害活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- d) 実験動物への毒性

の少なくとも1つを試験する、ペプチド又はその薬学的に許容される塩の試験方法であって、

前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩は、[1]－[8]のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩である、
前記方法。

発明の効果

[0014] 本発明に係るペプチドによれば、ミオスタチン阻害活性を有するため、筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療用の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等として有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、本発明のMyostatin__99__v145（配列番号30）（を用いた、ミオスタチン、GDF-11及びアクチビンAに対するHEK-Blue（商標）TGF- β Cellsにおけるミオスタチンシグナルのレポータージーンアッセイによるin vitro阻害活性結果を示すグラフである。Aはミオスタチン及びGDF-11に対する阻害活性結果を、BはアクチビンAに対する活性結果を示す。黒丸はミオスタチン、白丸はGDF-11を、白四角はアクチビンAの活性結果を示す。なお、横軸はペプチドの濃度（nM）を、縦軸は、無刺激状態を0%阻害、ペプチドによる阻害活性の最大値を100%阻害としたときの、阻害率を示す。

[図2-1]図2は、本発明のペプチド投与時における、野生型マウスの体重変化の推移を示すグラフである。Aにおける黒四角はMyostatin__99__Variant__07（配列番号3）を1mg/kg、黒三角は同ペプチドを3mg/kg、灰色丸はコントロールとしてPBSを、それぞれ投与し

た結果を示し、Bにおける黒四角はMyostatin__99__v145（配列番号30）を0.3mg/kg、黒三角は同ペプチドを1mg/kg、白四角は同ペプチドを3mg/kg、白三角は同ペプチドを10mg/kg、灰色丸はコントロールとしてPBSを、それぞれ投与した結果を示す。横軸は投与後の日数を、縦軸は、投与後のマウスの体重（グラム）の変化を示す。

[図2-2]図2は、本発明のペプチド投与時における、野生型マウスの体重変化の推移を示すグラフである。Cにおける黒四角はMyostatin__99__v148（配列番号31）を0.1mg/kg、黒三角は同ペプチドを0.3mg/kg、灰色丸はコントロールとしてPBSを、それぞれ投与した結果を示し、Dにおける黒四角はMyostatin__99__v194（配列番号65）を0.1mg/kg、黒三角は同ペプチドを0.3mg/kg、白四角は同ペプチドを1mg/kg、灰色丸はコントロールとしてPBSを、それぞれ投与した結果を示し、Eにおける黒四角はMyostatin__99__v200（配列番号71）を10mg/kg、灰色丸はコントロールとしてPBSを、それぞれ投与した結果を示す。横軸は投与後の日数を、縦軸は、投与後のマウスの体重（グラム）の変化を示す。

[図3]図3は、本発明のペプチド投与時における、B10mdxマウスの握力の向上及び体重変化の推移を示すグラフである。黒四角はMyostatin__99__Variant__07（配列番号3）を10mg/kg、白丸はコントロールとしてPBSを投与した結果を示す。横軸は投与後の日数を示し、縦軸は握力の変化を示す。

[図4]図4は、本発明のペプチド投与時における、B10mdxマウスの体重変化の推移を示すグラフである。黒四角はMyostatin__99__Variant__07（配列番号3）を10mg/kg、白丸はコントロールとしてPBSを投与した結果を示す。横軸は投与後の日数を示し、縦軸は体重の変化を示す。

[図5]図5は、本発明のペプチド及びGYM329-BS投与時における、D

BA/2 md x マウスの体重変化の推移を示すグラフである。白丸は Myostatin__99__v145 (配列番号30) を 1 mg/kg、白四角は同ペプチドを 3 mg/kg、黒三角は GYM329-BS を 10 mg/kg、白三角はコントロールとして PBS を投与した結果を示す。横軸はマウスの週齢を示し、縦軸は握力の変化を示す。

[図6] 図6は、本発明のペプチド及び GYM329-BS 投与時における、BA/2 md x マウスの体重変化の推移を示すグラフである。白丸は Myostatin__99__v145 (配列番号30) 3 mg/kg を皮下投与により、黒三角は同ペプチドを 65 mg/kg を経口投与により、黒逆三角は同ペプチド 200 mg/kg を経口投与した結果を示す。横軸はマウスの週齢を示し、縦軸は握力の変化を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 非限定的に本発明は、以下の態様を含む。本明細書において他に断りがない限り、本明細書で使用される技術及び科学用語は、当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に開示された物質、材料及び例は単なる例示であり、制限することを意図していない。本明細書において「一態様において」と言及する場合は、その態様に限定されない、即ち、非限定的であることを意味する。

[0017] 1. 略語

本明細書において、特に明記しない限り、以下の略語は下記の意味で使用される。

[0018] 略語 (一般)

Å : オングストローム (単位) ;

ClAc : クロロアセチル ;

Cy5SAIk : Sulfo-Cy5-alkyne ;

DCM : ジクロロメタン ;

TIPS : トリイソプロピルシリル ;

tBu : ターシャリーブチル ;

D T T : ジチオトレイトール ;
D M S O : ジメチルスルホキシド ;
T r t : トリチル ;
B o c : ターシャリーブトキシカルボニル ;
D M F : N、N-ジメチルホルムアミド ;
D I E A 又は D I P E A : N、N-ジイソプロピルエチルアミン ;
D I P C I 又は D I C : N、N'-ジイソプロピルカルボジイミド ;
O x y m a p u r e : シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル ;
D O D T : 3、6-ジオキサー1、8-オクタン-ジチオール ;
F m o c : 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル ;
g : グラム (単位) ;
H A T U : O- (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リン酸塩 ;
H O S u : N-ヒドロキシスクシンイミド ;
H P L C : 高速液体クロマトグラフィー ;
L C - M S 又は L C / M S : 液体クロマトグラフィー質量分析計 ;
m L : ミリリットル (単位) ;
M : モーラー (単位) ;
μ L : マイクロリットル (単位) ;
m M : ミリモーラー (単位) ;
μ M : マイクロモーラー (単位) ;
m m o l : ミリモル (単位) ;
m g : ミリグラム (単位) ;
M e C N もしくは C H ₃ C N : アセトニトリル ;
m i n : 分 (単位) m i n :
m m : ミリメートル (単位) ;
μ m : マイクロメートル (単位) ;
n m : ナノメートル (単位) ;

nM : ナノモラー (単位) ;

OSu : スクシンイミド ;

PEG : ポリエチレングリコール ;

rpm : 回転毎分 (単位) ;

tBu : ターシャリーブチル ;

TFA : トリフルオロ酢酸 ;

TIS : トリイソプロピルシラン ;

Trt 又は Tr : トリチル基 ;

H-PEG4Me : 2、5、8、11-テトラオキサトリデカン-13-アミン ;

H-PEG8Me : 2、5、8、11、14、17、20、23-オクタオキサペンタコサン-25-アミン ;

AA : アミノ酸 ;

PyAOP : 7-((アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸 ;

CSA : 10-カンファースルホン酸 ;

Fmoc-OSu : N-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)スクシンイミド ;

THF : テトラヒドロフラン ;

ClAcOSu : N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド ;

$\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$: トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0)-クロロホルム錯体 ;

SPhos : 2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2'、6'-ジメトキシビフェニル ;

EDCI · HCl : 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 ;

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$: テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) ;

C l A c O H : クロロ酢酸 ;

c o n c : 濃度 ;

H F I P : 1、1、1、3、3、3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール ;

P b f : 2、2、4、6、7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホン ;

A l l o c : アリルオキシカルボニル ;

B o c - N H - P E G 9 - N H 2 : ターシャリーブチル (29-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサノナコシル) カルバメート ;

B i o t i n - O S u : 2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル 5-((3a S, 4 S, 6 a R)-2-オキソヘキサヒドロ-1 H-チエノ [3, 4-d] イミダゾール-4-イル)ペンタノエート ;

T E A A : 酢酸トリエチルアンモニウム。

[0019] 略語 (非天然アミノ酸)

以下の非天然アミノ酸に関する略語は、主鎖のアミノ基が B o c 基や F m o c 基等の一般的な保護基で保護されているものも含む。

M e A : (2 S) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (C A S 3 9 1 3 - 6 7 - 5)

D a p : (2 S) - 2、3-ジアミノプロパン酸 (C A S 4 0 3 3 - 3 9 - 0)

A p G : 2 - [(3-アミノプロピル) アミノ] 酢酸 (C A S 2 8 7 5 - 4 1 - 4)

C r p G : 4 - ((カルボキシメチル) アミノ) ブタン酸 (C A S 4 3 8 6 - 0 4 - 3)

C m G : 2 - [(2-カルバモイルエチル) アミノ] 酢酸 (C A S 3 4 2 9 9 - 3 2 - 6)

M e D : (2 S) - 2 - (メチルアミノ) ブタン二酸 (C A S 4 2 2

6-18-0)

CrmG: 2, 2'-イミノジ酢酸 (CAS 142-73-4)

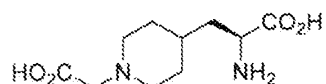
MeopG: 2-[(3-メトキシプロピル)アミノ]酢酸 (CAS 807261-81-0)

Meeg: 2-[(2-メトキシエチル)アミノ]酢酸 (CAS 205124-55-6)

AcapG: 2-[(3-アセトアミドプロピル)アミノ]酢酸 (CAS 1862908-81-3)

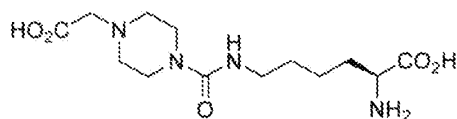
A4paa: (S)-2-アミノ-3-(1-(カルボキシメチル)ピペリジン-4-イル)プロパン酸

[0020] [化1]



KCOpipzaa: (2S)-2-amino-6-{[4-(カルボキシメチル)ピペラジン-1-カルボニル]アミノ}ヘキサン酸

[0021] [化2]



CeG: 3-((カルボキシメチル)アミノ)プロパン酸 (CAS 505-72-6)

CrbG: 5-((カルボキシメチル)アミノ)ペンタン酸 (CAS 72253-27-1)

KMe: (2S)-2-amino-6-(メチルアミノ)ヘキサン酸 (CAS 1188-07-4)

HIy: (2S)-2,7-ジアミノヘプタン酸 (CAS 37689-89-7)

H g l : (S) - 2 - アミノヘキサン二酸 (CAS 1118-90-7)

O r n : (2S) - 2, 5 - ジアミノペンタン酸 (CAS 70-26-8)

D a b : (2S) - 2, 4 - ジアミノブタン酸 (CAS 1758-80-1)

M e E : (2S) - 2 - (メチルアミノ) ペンタン二酸 (CAS 6753-62-4)

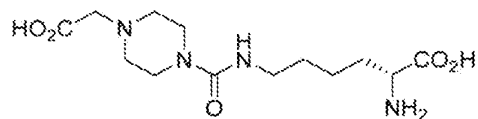
d a : D - アラニン (CAS 338-69-2)

A i b : 2 - アミノ - 2 - メチルプロパン酸 (CAS 62-57-7)

d e : D - グルタミン酸 (CAS 6893-26-1)

d k C O p i p z a a : (2R) - 2 - アミノ - 6 - { [4 - (カルボキシメチル) ピペラジン - 1 - カルボニル] アミノ } ヘキサン酸

[0022] [化3]



d d a b : (2R) - 2, 4 - ジアミノブタン酸 (CAS 26908-94-1)

d o r n : (2R) - 2, 5 - ジアミノペンタン酸 (CAS 348-66-3)

M e W : (S) - 3 - (1H-インドール-3-イル) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (CAS No. 526-31-8)

W 7 N : (S) - 2 - アミノ - 3 - (1H-ピロロ [2, 3-b] ピリジン-3-イル) プロパン酸 (CAS 49758-35-2)

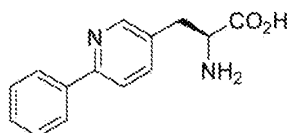
W 4 C : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4-クロロ-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (CAS 52448-14-3)

B p h : (S) - 3 - ([1, 1' - ビフェニル] - 4 - イル) - 2 - ア

ミノプロパン酸 (CAS 155760-02-4)

3Py6Ph: (S) - 2-アミノ-3- (6-フェニルピリジン-3-イル) プロパン酸

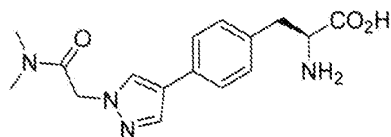
[0023] [化4]



W6N: (S) - 2-アミノ-3- (1H-ピロロ [2,3-c] ピリジン-3-イル) プロパン酸 (CAS 149704-63-2)

F41dMeCmm4Pyz: (S) - 2-アミノ-3- (4- (1- (2- (ジメチルアミノ) -2-オキソエチル) -1H-ピラゾール-4-イル) フェニル) プロパン酸

[0024] [化5]



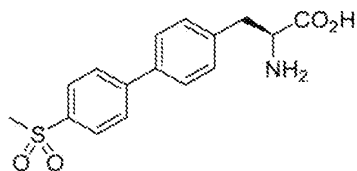
W1Bn: (2S) - 2-アミノ-3- (1-ベンジル-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (CAS 740-11-4)

W6H: (S) - 2-アミノ-3- (6-ヒドロキシ-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (CAS 13567-14-1)

Bph4ms: (S) - 2-アミノ-3- (4' - (メチルスルホニル) - [1,1'-ビフェニル] -4-イル) プロパン酸

[0025]

[化6]

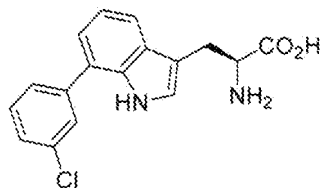


W1Ph : (2S) - 2 - アミノ - 3 - (1 - フェニル - 1H - インドール - 3 - イル) プロパン酸 (CAS 1224881-37-1)

W1aa : (2S) - 2 - アミノ - 3 - [1 - (カルボキシメチル) - 1H - インドール - 3 - イル] プロパン酸 (CAS 773823-50-0)

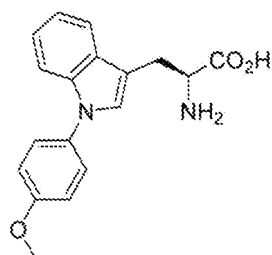
W7Ph3C : (S) - 2 - アミノ - 3 - (7 - (3 - クロロフェニル) - 1H - インドール - 3 - イル) プロパン酸

[0026] [化7]



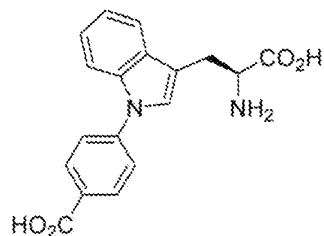
W1Ph4OMe : (2S) - 2 - アミノ - 3 - (1 - (4 - メトキシフェニル) - 1H - インドール - 3 - イル) プロパン酸

[0027] [化8]



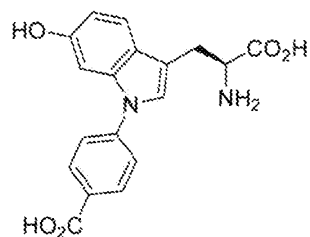
W1Ph4COO : 4 - {3 - [(2S) - 2 - アミノ - 2 - カルボキシエチル] - 1H - インドール - 1 - イル} 安息香酸

[0028] [化9]



W6H1Ph4COO : (S) - 4 - (3 - (2 - アミノ - 2 - カルボキシエチル) - 6 - ヒドロキシ - 1 H - インドール - 1 - イル) 安息香酸

[0029] [化10]



3Py6NH2 : (S) - 2 - アミノ - 3 - (6 - アミノピリジン - 3 - イル) プロパン酸 (CAS 1269968-61-7)

Yph : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - フェノキシフェニル) プロパン酸 (CAS 150351-64-7)

F4CON : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - カルバモイルフェニル) プロパン酸 (CAS 223593-04-2)

YBn : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - (ベンジロキシ) フェニル) プロパン酸 (CAS 16652-64-5)

Yae : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - (2 - アミノエトキシ) フェニル) プロパン酸 (CAS 1909283-20-0)

Na11 : (S) - 2 - アミノ - 3 - (ナフタレン - 1 - イル) プロパン酸 (CAS 55516-54-6)

mBph : (S) - 3 - ([1 , 1 ' - ビフェニル] - 3 - イル) - 2 -

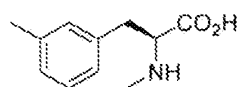
アミノプロパン酸 (CAS 164172-96-7)

MeF: (2S)-2-(メチルアミノ)-3-フェニルプロパン酸 (CAS No. 2566-30-5)

MeY: (2S)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (CAS No. 537-49-5)

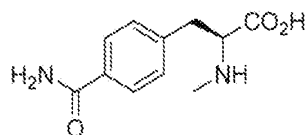
MeF3Me: (S)-2-(メチルアミノ)-3-(メタートリル)プロパン酸

[0030] [化11]



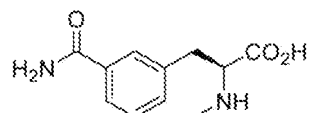
MeF4CON: (S)-3-(4-カルバモイルフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸

[0031] [化12]



MeF3CON: (S)-3-(3-カルバモイルフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸

[0032] [化13]



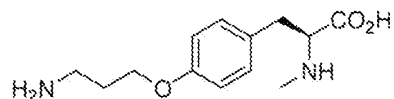
F3CON: (S)-2-アミノ-3-(3-カルバモイルフェニル)プロパン酸 (CAS 1217651-22-3)

MeCha: (S)-3-シクロヘキシル-2-(メチルアミノ)プロパ

ン酸 (CAS 2165389-05-7)

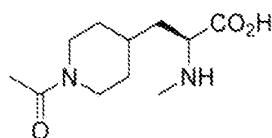
MeYap: (S)-3-(4-(3-アミノプロポキシ)フェニル)-
2-(メチルアミノ)プロパン酸

[0033] [化14]



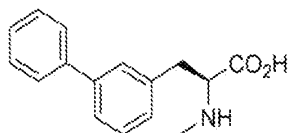
MeA1Ac4pip: (S)-3-(1-アセチルピペリジン-4-イル)-
2-(メチルアミノ)プロパン酸

[0034] [化15]



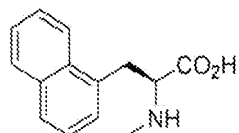
MemBph: (S)-3-([1,1'-bifenil]-3-イル)-
2-(メチルアミノ)プロパン酸

[0035] [化16]



MeNal1: (S)-2-(メチルアミノ)-3-(ナフタレン-1-
イル)プロパン酸

[0036] [化17]



MeNa12 : (S) - 2 - (メチルアミノ) - 3 - (ナフタレン - 2 -
イル) プロパン酸

[0037] [化18]



MeF4OMe : (S) - 3 - (4 - メトキシフェニル) - 2 - (メチル
アミノ) プロパン酸 (CAS 52939-33-0)

MeF4C : (S) - 3 - (4 - クロロフェニル) - 2 - (メチルアミノ)
) プロパン酸 (CAS 347851-70-1)

Eva : (S) - 2 - アミノ - 3 - エチルペンタン酸 (CAS 1432
8-49-5)

Cbg : (S) - 2 - アミノ - 2 - シクロブチル酢酸 (CAS 4960
7-08-1)

Gcpe : (S) - 2 - アミノ - 2 - シクロペンチル酢酸 (CAS 25
21-84-8)

TMe : (2S, 3R) - 2 - アミノ - 3 - メトキシブタン酸 (CAS
4144-02-9)

MeG : 2 - (メチルアミノ) 酢酸 (CAS 107-97-1)

Meda : (2R) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (CAS 294
75-64-7)

dp : D - プロリン (CAS 344-25-2)

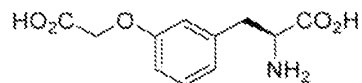
EtG : 2 - (エチルアミノ) 酢酸 (CAS 627-01-0)

PrG : 2 - (プロピルアミノ) 酢酸 (CAS 25303-14-4)

F3aa : (S) - 2 - アミノ - 3 - (3 - (カルボキシメチル) フェニ
ル) プロパン酸 (CAS 1270107-31-7)

F3aao : (S) - 2 - アミノ - 3 - (3 - (カルボキシメトキシ) フ
ェニル) プロパン酸

[0038] [化19]



F4aa: (S)-2-amino-3-(4-(carboxymethyl)phenyl)propanoic acid (CAS 142348-77-4)

F4aao: (S)-2-amino-3-(4-(carboxymethoxy)phenyl)propanoic acid (CAS 24558-63-2)

F4C: (S)-2-amino-3-(4-chlorophenyl)propanoic acid (CAS 14173-39-8)

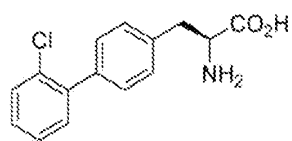
F3OMe: (S)-2-amino-3-(3-methoxyphenyl)propanoic acid (CAS 33879-32-2)

F3COO: (S)-3-(2-amino-2-carboxyethyl)anthranic acid (CAS No. 13861-02-4)

KAc: (2S)-2-amino-6-acetamidohexanoic acid (CAS 692-04-6)

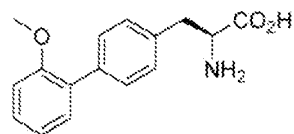
Bph2C: (S)-2-amino-3-(2'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propanoic acid

[0039] [化20]



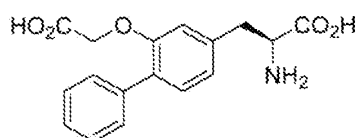
Bph2OMe: (S)-2-amino-3-(2'-methoxy-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoic acid

[0040] [化21]



p B p h 2 a a o : (S) - 2 - アミノ - 3 - (2' - (カルボキシメトキシ) - [1, 1' - ビフェニル] - 4 - イル) プロパン酸

[0041] [化22]



F 4 C O O : (S) - 4 - (2 - アミノ - 2 - カルボキシエチル) 安息香酸 (CAS 126109-42-0)

3 P y : (S) - 2 - アミノ - 3 - (ピリジン - 3 - イル) プロパン酸 (CAS 64090-98-8)

4 P y : (S) - 2 - アミノ - 3 - (ピリジン - 4 - イル) プロパン酸 (CAS 37535-49-2)

F 4 F : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロパン酸 (CAS 1132-68-9)

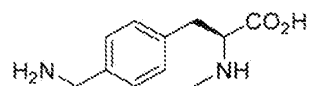
F 4 O M e : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - メトキシフェニル) プロパン酸 (CAS 6230-11-1)

C h a : (S) - 2 - アミノ - 3 - シクロヘキシルプロパン酸 (CAS 27527-05-5)

M e K M e : (2S) - 2, 6 - ビス (メチルアミノ) ヘキサン酸 (CAS 51876-34-7)

M e F 4 a m : (S) - 3 - (4 - (アミノメチル) フェニル) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸

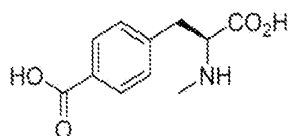
[0042] [化23]



MeDap : (S) - 3 - アミノ - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸 (CAS 904832-42-4)

MeF4COO : (S) - 4 - (2 - カルボキシ - 2 - (メチルアミノ) エチル) 安息香酸

[0043] [化24]



F4am : (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - (アミノメチル) フェニル) プロパン酸 (CAS 150338-20-8)

Ahp : (S) - 2 - アミノヘプタン酸 (CAS番号 : 1115-90-8)

Ano : (S) - 2 - アミノノナン酸 (CAS 133444-84-5)

Ado : (S) - 2 - アミノドデカン酸 (CAS 169106-34-7)

Ade : (S) - 2 - アミノデカン酸 (CAS 84277-81-6)

Aoc : (S) - 2 - アミノオクタン酸 (CAS 116783-26-7)

SPent : (2S) - 2 - アミノ - 3 - (ペンチロキシ) プロパン酸 (CAS 1502644-74-7)

HseBu : (2S) - 2 - アミノ - 4 - ブトキシブタン酸 (CAS 17673-71-1)

AhpOMe : (S) - 2 - アミノ - 7 - メトキシヘプタン酸

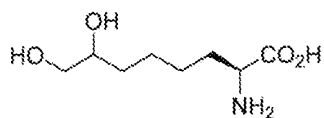
[0044]

[化25]



A o c 7 r 8 d H : (2 S) - 2 - アミノ - 7、8 - ジヒドロシオクタン酸

[0045] [化26]



H s e P r : (2 S) - 2 - アミノ - 4 - プロポキシブタン酸 (C A S 1 8 3 1 2 - 2 8 - 2)

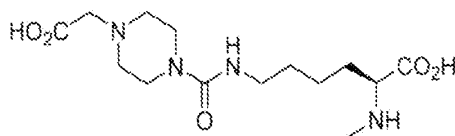
A h p O H : (S) - 2 - アミノ - 7 - ヒドロキシヘプタン酸 (C A S 2 1 3 6 9 0 8 - 2 1 - 7)

A u n : (S) - 2 - アミノウンデカン酸 (C A S 1 6 9 1 0 6 - 3 4 - 7)

M e K : (2 S) - 6 - アミノ - 2 - (メチルアミノ) ヘキサン酸 (C A S 7 4 3 1 - 8 9 - 2)

M e K C O p i p z a a : (2 S) - 6 - { [4 - (カルボキシメチル) ピペラジン - 1 - カルボニル] アミノ } - 2 - (メチルアミノ) ヘキサン酸

[0046] [化27]



M e D a b : (S) - 4 - アミノ - 2 - (メチルアミノ) ブタン酸

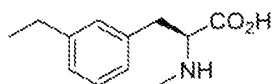
[0047]

[化28]



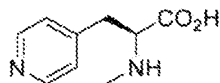
Me F 3 E t : (S) - 3 - (3 - エチルフェニル) - 2 - (メチルアミノ) プロパン酸

[0048] [化29]



Me 4 P y : (S) - 2 - (メチルアミノ) - 3 - (ピリジン - 4 - イル) プロパン酸

[0049] [化30]



Me 3 P y : (S) - 2 - (メチルアミノ) - 3 - (ピリジン - 3 - イル) プロパン酸 (CAS 2651172-69-7)

Me C : (2R) - 2 - (メチルアミノ) - 3 - スルファニルプロパン酸 (CAS 4026-48-6)

d c : D - システイン (CAS 921-01-7)

Me d c : (2S) - 2 - (メチルアミノ) - 3 - スルファニルプロパン酸 (CAS 95244-61-4)

d h c y : (2R) - 2 - アミノ - 4 - スルファニルブタン酸 (CAS 6027-14-1)

H c y : (2S) - 2 - アミノ - 4 - スルファニルブタン酸 (CAS 6027-13-0)

A e o a c : 2 - (2 - アミノエトキシ) 酢酸 (C A S 1 0 3 6 6 - 7
1 - 9)

A p e : 5 - アミノペンタン酸 (C A S 6 6 0 - 8 8 - 8)

d h g l : (R) - 2 - アミノヘキサン二酸 (C A S 7 6 2 0 - 2 8
- 2)

H g l : (S) - 2 - アミノヘキサン二酸 (C A S 1 1 1 8 - 9 0 -
7)

M e H g l : (S) - 2 - (メチルアミノ) ヘキサン二酸 (C A S 2 6
1 9 4 3 - 1 3 - 9)

M e d h g l : (R) - 2 - (メチルアミノ) ヘキサン二酸

[0050] [化31]



M e A e o a c : 2 - (2 - (メチルアミノ) エトキシ) 酢酸 (C A S
9 8 1 3 7 - 5 8 - 7)

M e A p e : 5 - (メチルアミノ) ペンタン酸 (C A S 2 1 3 8 2 - 3
0 - 9)

p i p z A c : 2 - (ピペラジン-1-イル) 酢酸 (C A S 3 7 4 7 8
- 5 8 - 3)

p i p A c : 2 - (ピペリジン-4-イル) 酢酸 (C A S 5 1 0 5 2 -
7 8 - 9)

P i p 4 m A c : 3 - (ピペリジン-4-イル) プロパン酸 (C A S 1
8 2 2 - 3 2 - 8)

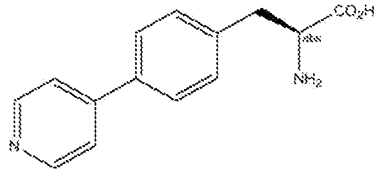
P i c 4 : ピペリジン-4-カルボン酸 (C A S 4 9 8 - 9 4 - 2)

F 4 2 P y : (2 S) - 2 - アミノ-3- [4 - (ピリジン-2-イル)
フェニル] プロパン酸 (C A S 1 3 3 6 2 0 7 - 4 7 - 6)

F 4 4 P y : (2 S) - 2 - アミノ-3- [4 - (ピリジン-4-イル)

フェニル] プロパン酸

[0051] [化32]



c C 1 4 C O O : ヘキサデカン二酸 (C A S 5 0 5 - 5 4 - 4)

c C 1 6 C O O : オクタデカン二酸 (C A S 8 7 1 - 7 0 - 5)

PEG 9 N H 2 : 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノ
ナオキサノナコサン-1, 29-ジアミン (C A S 4 7 4 0 8 2 - 3 5 -
4)

B i o t i n : 5 - ((3 a S, 4 S, 6 a R) - 2 - オキソヘキサヒド
ロ-1 H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール-4 - イル) ペンタン酸 (C A
S 5 8 - 8 5 - 5)

PEG 1 2 c : 1 - アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24
, 27, 30, 33, 36 - ドデカオキサノナトリアコンタン-39 - オイ
ック酸 (C A S 番号 : 1 4 1 5 4 0 8 - 6 9 - 3)

[0052] 2. ペプチド (A)

本発明は、ペプチド、又はその薬学的に許容される塩に関する。本明細書
において、「ペプチド」について言及する場合、特に矛盾がない限り、その
薬学的に許容される塩、又はその溶媒和物、に関する言及も含む。

[0053] 一態様において、本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

A - R - W - Y - M e F - I - M e G - Y - Y - R - M e F - L - M e A
- M e F - C (配列番号 1)

あるいは、

上記のアミノ酸配列の 1 番目、2 番目、3 番目、4 番目、5 番目、6 番目
、7 番目、8 番目、9 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、及
び 15 番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1 - 14 個の

アミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列を含む。

(ペプチド (A))

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA-MeF-C (配列番号1) は、本願明細書の実施例において、ミオスタチン阻害活性を有することが確認されたペプチドである。

[0054] 配列番号1のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、11番目、12番目、13番目、14番目、及び15番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-14個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有していてもよい。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸の数は、1個以上14個以下であればよく、その下限は1個である。その上限は14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個であり、最小1個である。好ましくは、アミノ酸の「置換」である。かかるアミノ酸の置換は、好適には保存的アミノ酸置換である。

[0055] 「保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価又は類似のアミノ酸との置換を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、当該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つ又は二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造及び機能について保存的であると考えられることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の(チオール)フォームと比較してより極性の低い、酸化型の(ジスルフィド)フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的及び機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖(トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン)はイオン-

芳香族相互作用又は陽イオン- π 相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性又は非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的及び機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン（ジスルフィド・フォーム）等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

[0056] 保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換（例えば、レーニンジャー、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73-75頁：L. Lehninger、Biochemistry、2nd edition、pp73-75、Worth Publisher、New York（1975）に記載の置換）及び典型的置換を含む。また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のように天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けたグループにおいて、あるアミノ酸が属するグループと同じグループに属するアミノ酸への置換が好ましい。

[0057] 疎水性（非極性とも言う）アミノ酸：疎水性（非極性）を示すアミノ酸であって、アラニン（「Ala」又は単に「A」とも記す）、グリシン（「Gly」又は単に「G」とも記す）、バリン（「Val」又は単に「V」とも記す）、ロイシン（「Leu」又は単に「L」とも記す）、イソロイシン（「Ile」又は単に「I」とも記す）、プロリン（「Pro」又は単に「P」とも記す）、フェニルアラニン（「Phe」又は単に「F」とも記す）、トリプトファン（「Trp」又は単に「W」とも記す）、チロシン（「Tyr」又は単に「Y」とも記す）、メチオニン（「Met」又は単に「M」とも記す）を含む。

[0058] なお、疎水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

[0059] 脂肪族アミノ酸：側鎖に脂肪酸又は水素を有するアミノ酸であって、Ala、Gly、Val、Ile、Leuを含む。

脂肪族・分岐鎖アミノ酸：側鎖に分岐型脂肪酸を有するアミノ酸であって、Val、Ile、Leuを含む。

芳香族アミノ酸：側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、T r p、T y r、P h eを含む。

親水性（極性とも言う）アミノ酸：親水性（極性）を示すアミノ酸であって、セリン（「S e r」又は単に「S」とも記す）、スレオニン（「T h r」又は単に「T」とも記す）、システイン（「C y s」又は単に「C」とも記す）、アスパラギン（「A s n」又は単に「N」とも記す）、グルタミン（「G l n」又は単に「Q」とも記す）、アスパラギン酸（「A s p」又は単に「D」とも記す）、グルタミン酸（「G l u」又は単に「E」とも記す）、リジン（リシンとも記す。「L y s」又は単に「K」とも記す）、アルギニン（「A r g」又は単に「R」とも記す）、ヒスチジン（「H i s」又は単に「H」とも記す）を含む。

[0060] なお、親水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

[0061] 酸性アミノ酸：側鎖が酸性を示すアミノ酸であって、A s p、G l uを含む。

塩基性アミノ酸：側鎖が塩基性を示すアミノ酸であって、L y s、A r g、H i sを含む。

中性アミノ酸：側鎖が中性を示すアミノ酸であって、S e r、T h r、A s n、G l n、C y sを含む。

[0062] また、G l y及びP r oについては、「主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸」に分けることもでき、側鎖に硫黄分子を含むアミノ酸、C y s及びM e tは、「含硫アミノ酸」に分けることもできる。

[0063] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のアミノ酸がN-アルキル化されたN-アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級（例えば、C 1-C 5の、好ましくは、C 1-C 3、より好ましくはC 1）のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。N-アルキルアミノ酸においては、好ましくはN-エチルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸又はN-メチルアミノ酸であり、さらに好まし

くはN-メチルアミノ酸である。また、非天然のアミノ酸には、D型アミノ酸（D-アミノ酸とも記する）、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸（例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基やアルキル基のC数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

[0064] なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加又は置換等されることで、天然のアミノ酸とは異なる性質を付与することができる。例えば、Dapはアラニンの側鎖にアミノ基を有するアミノ酸であるが、当該アミノ基が付加されたことで、非極性アミノ酸グループに属するアラニンとは異なり、塩基性を有する極性アミノ酸の性質を示す。すなわち、天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けた、前述のグループに、同様の側鎖の性質を有する非天然アミノ酸を含めることが出来る。例えば、塩基性アミノ酸に属するアルギニンの主鎖窒素原子がメチル化されたアミノ酸であるN-メチルアルギニン（MeR）は、非天然アミノ酸であるが、塩基性を示すため、塩基性アミノ酸に分類することができる。このように、あるアミノ酸と同様の側鎖の性質を示す非天然アミノ酸についても、保存的アミノ酸置換の対象として含むことができる。なお、de（D-グルタミン酸）などのD-アミノ酸は、D-アミノ酸として分類することもできるが、その側鎖の性質に従い分類することもでき、N-メチルアミノ酸については、N-アルキルアミノ酸として分類することもでき、N-メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0065] 非限定的に、非天然のアミノ酸には、N-メチルアミノ酸、MeA、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、CrmG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、KCOpipzaa、CeG、CrbG、KM

e、Hly、Hg、Orn、Dab、MeE、da、Aib、de、dkC
Opipzaa、ddab、dor、MeW、W7N、W4C、Bph、3
Py6Ph、W6N、F41dMeCmm4Pyz、W1Bn、W6H、B
ph4ms、W1Ph、W1aa、W7Ph3C、W1Ph4OMe、W1
Ph4COO、W6H1Ph4COO、3Py6NH2、Yph、F4CO
N、YBn、Yae、Na11、F42Py、mBph、MeF、MeY、
MeF3Me、MeF4CON、MeF3CON、F3CON、MeCha
、MeYap、MeA1Ac4pip、MemBph、MeNa11、Me
Na12、MeF4OMe、MeF4C、Eva、Cbg、Gcpe、TM
e、MeG、Meda、dp、EtG、PrG、F3aa、F3aao、F
4a、F4aao、F4C、F3OMe、F3COO、KAc、Bph2C
、Bph2OMe、pBph2aao、F4COO、3Py、4Py、F4
F、F4OMe、Cha、MeKMe、MeF4am、MeDap、MeF
4COO、Ahp、Ano、Ado、Ade、Aoc、SPent、Hse
Bu、AhpOMe、Aoc7r8dH、HsePr、AhpOH、Aun
、MeK、MeKCOpipzaa、MeDab、MeF3Et、Me4P
y、Me3Py、MeC、dc、Medc、dhcy、Hcy、Aeoac
、Ape、dhgl、Hgl、MeHgl、Medhgl、MeAeoac
、MeApe、pipzAc、pipAc、Pip4mAc、Pic4、
F42Py及びF44Py等を含む。

[0066] 1-14個のアミノ酸残基において置換されたペプチド(A)は、後述するペプチド(B)の範囲に含まれるペプチドであってもよい。

[0067] 本発明のペプチドは、一態様において、

以下のアミノ酸配列：

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA
-MeF-C (配列番号1)

又は、上記のアミノ酸配列において、以下の(1-i)～(1-xii)
)から選択される14つ以下のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、

ペプチドである。

[0068] (1-i) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目が任意のアミノ酸又はペプチドに置換；

(1-ii) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 2 番目が任意のアミノ酸に置換；

(1-iii) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 3 番目が側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸に置換；

(1-iv) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 4 番目が側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸に置換；

(1-v) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 5 番目が側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいシクロアルキルを有するアミノ酸に置換；

(1-vi) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 6 番目が側鎖にアルキル基を有するアミノ酸に置換；

(1-vii) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 7 番目が任意の二級アミノ酸、N-アルキルアミノ酸又はペプチドに置換；

(1-viii) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 8 番目が任意のアミノ酸に置換；

(1-ix) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 9 番目が側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸に置換；

(1-x) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 11 番目が側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸に置換；

(1-xi) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 12 番目が置換されていてもよい脂肪族アミノ酸、又は側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸に置換；

(1-xii) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 13 番目が任意の二級

アミノ酸、N-アルキルアミノ酸又はペプチドに置換；

(1-x i i) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の14番目が側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸に置換；あるいは、

(1-x i v) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の15番目が任意のアミノ酸に置換。

[0069] 非限定的に、本発明のペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、上記(1-i)～(1-x i v)から選択される14つ以下、13つ以下、12つ以下、11つ以下、10つ以下、9つ以下、8つ以下、7つ以下、6つ以下、5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下又は1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むペプチドであってよい。(1-i)～(1-x i i)の置換は、任意の組合せを含む。

[0070] 「その薬学的に許容される塩」は、いずれかのペプチドの塩を意味する。薬学的に許容される塩の例は、硫酸、塩酸、燐酸などの鉱酸との塩、酢酸、シュウ酸、乳酸、酒石酸、フマル酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩、トリメチルアミン、メチルアミンなどのアミンとの塩、又はナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンなどの金属イオンとの塩である。経時変化により、水分を含有することとなった化合物については、そのような水分も薬学的に許容される塩に含まれる。

[0071] 前記ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列に加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。「付加的なアミノ酸残基」については、「3. ペプチド(B)」で詳述する。

[0072] 前記ペプチドは、一態様において、リンカーを好ましくはC末端に含んでもよい。「リンカー」については、「3. ペプチド(B)」で詳述する。

[0073] 前記ペプチドは、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」については、「3. ペプチド(B)」で詳述する。

[0074] 前記ペプチドは、好ましくは、ミオスタチン阻害活性を有する。「ミオスタチン阻害活性を有する」については、「3. ペプチド(B)」で詳述する。

。

[0075] 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

[0076] 3. ペプチド (B)

本発明は、ペプチド、又はその薬学的に許容される塩に関する。本明細書において、「ペプチド」について言及する場合、特に矛盾がない限り、その薬学的に許容される塩に関する言及も含む。

[0077] 「2. ペプチド (A)」に記載した事項は特に問題がない限り、本項にも適用される。

[0078] 本発明のペプチドは、一態様において、以下のアミノ酸配列：

X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - X 1 1 - X 1 2 - X 1 3 - X 1 4 - X 1 5 (配列番号 2)

ここにおいて、

X 1 は、任意のアミノ酸又はペプチドであり；

X 2 は、任意のアミノ酸であり；

X 3 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；

X 4 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；

X 5 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいシクロアルキルを有するアミノ酸であり；

X 6 は、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸であり；

X 7 は、任意の二級アミノ酸、N-アルキルアミノ酸又はペプチドであり；

X 8 は、任意のアミノ酸であり；

X 9 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸であり；

X 1 0 は、Rであり；

X 1 1 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸であり；

X 1 2 は、置換されていてもよい脂肪族アミノ酸、又は側鎖に置換されて

いてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸であり；

X 1 3 は、任意の二級アミノ酸、N-アルキルアミノ酸又はペプチドであり；

X 1 4 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；

X 1 5 は、任意のアミノ酸である、を含む。

[0079] (ペプチド (B))

一態様において、本発明のペプチドは、以下の1つ又は2以上の要件を具備する。

[0080] X 1 が、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は、アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド、である；

X 3 が、置換されていてもよいF又はWである；

X 4 が、置換があってもよいF又はY、若しくはナフチルアラニンである；

X 5 が、置換があってもよいF、Y又はナフチルアラニン、又は、置換があってもよいシクロヘキシルアラニンである；

X 6 が、それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸である；

X 8 が、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキルを有するアミノ酸である；

X 9 が、置換があってもよいF又はY、又は側鎖に置換されていてもよいヘテロシクロアルキル基を含むアミノ酸、又はアラニンである；

X 1 2 が、側鎖に含まれる炭素数が3以上である、脂肪族アミノ酸、又は、側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸である；

X 1 3 が、N-アルキルアミノ酸である；

X 1 4 が、置換があってもよいF又はYである；及び、

X 1 5 が、側鎖末端に硫黄 (S) 元素を有するアミノ酸である。

[0081] (ペプチド (B) - 1)

X 1 - X 1 5 の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。非限定的に、上記の要件の、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、1 0 以上、1 1 以上、1 2 以上、1 3 以上、1 4 以上の要件を具備する。好ましくは、上記 1 5 の要件の全てを具備する。

[0082] 一態様において、本発明のペプチドは、以下の 1 つ又は 2 以上の要件を具備する。

[0083] X 1 が、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は、アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド、である；

X 3 が、置換されていてもよい F 又は W である；

X 4 が、置換があってもよい F 又は Y、若しくはナフチルアラニンである；

X 5 が、置換があってもよい F、Y 又はナフチルアラニン、又は、置換があってもよいシクロヘキシルアラニンである；

X 6 が、それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸である；

X 8 が、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキルを有するアミノ酸である；

X 9 が、置換があってもよい F 又は Y、又は側鎖に置換されていてもよいヘテロシクロアルキル基を含むアミノ酸、又はアラニンである；

X 1 2 が、側鎖に含まれる炭素数が 3 以上である、脂肪族アミノ酸、又は、側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸である；

X 1 3 が、N-アルキルアミノ酸である；

X 1 4 が、側置換があってもよい F 又は Y である；及び、

X 1 5 が、脂肪族アミノ酸であり、さらに X 1 6 として脂肪族アミノ酸又

はプロリンが付加されている。

[0084] (ペプチド (B) - 2)

X 1 - X 1 5 の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。非限定的に、上記の要件の、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、1 0 以上、1 1 以上、1 2 以上、1 3 以上、1 4 以上の要件を具備する。好ましくは、上記 1 5 の要件の全てを具備する。

[0085] ペプチド (B) - 2 は、ペプチド (B) - 1 と、X 1 5 が異なる。一態様において、本発明のペプチドは、環状構造に含まれるアミノ酸残基の数が、非限定的に、1 5 個であってもよく、1 6 個であってもよい (X 1 6 が存在する場合)。

[0086] 任意のアミノ酸とは、公知のアミノ酸であれば特に限定されない。なお、任意のアミノ酸には、限定されないが、L - / D - 体アミノ酸、N - アルキルアミノ酸、ペプチドなどを含む。

[0087] 本明細書において、「置換されていても良い」とは、無置換であるか、又は任意の数の任意の置換基で置換されていることを意味する。

[0088] 「側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸」とは、芳香族アミノ酸に属する天然のアミノ酸、又は N - アセチル化された芳香族アミノ酸のような非天然のアミノ酸や、天然の又は非天然のアミノ酸の側鎖に芳香環が付加又は置換されたアミノ酸を含み、さらに、それらが有する芳香環は複素環であってもよい。なお、複素環であってもよく、例えば、T r p の側鎖インドール環にヘテロ原子を含む環を有するものや、P h e の側鎖ベンジル基にヘテロ原子を有するものを含む。なお、当該置換は 1 つであってもよく、複数個であってもよい。

[0089] 「置換された芳香環を有するアミノ酸」とは、芳香環を構成する炭素原子や前記芳香環に結合した官能基が置換されているアミノ酸を意味する。前記側鎖に置換されていても良い芳香環は、例えばベンゼン環、インドール環やナフタレン環等の縮環構造を有し、その一部の炭素などが酸素、窒素など他

の原子へ置換されたものや、さらに他の分子や官能基を有する原子に置換されたものであってよい。なお、複素芳香環を含むものであってもよい。また、前記側鎖に置換されていても良い芳香環を有するアミノ酸は、例えば、チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されているようなアミノ酸であってもよい。置換される官能基の種類や位置は特に限定されず、アルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、水酸基、ハロゲン等任意に選択できる。前記側鎖に置換されていても良い芳香環を有するアミノ酸は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等を含む。また、前記側鎖に置換されていても良い芳香環を有するアミノ酸は、天然のアミノ酸であっても非天然のアミノ酸であってもよく、例えば、4 P y、3 P y、F 4 a a o、W 7 N、B p h、F 4 4 P y、F 4 F、F 4 C等であってもよい。

[0090] 例えば、「置換があってもよいナフチルアラニン」とは、ナフチルアラニンや、ナフチルアラニンの側鎖のナフチル基に含まれる炭素が窒素など他の原子に置換されたアミノ酸や、さらに他の分子や官能基を有する原子に置換されたアミノ酸をも含む。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0091] 「側鎖に置換されていてもよいシクロアルキルを有するアミノ酸」とは、側鎖にシクロアルキル基（環状アルキル基ともいう）、例えば、C 3－8シクロアルキル基を有するアミノ酸を含む。また、「置換されたシクロアルキル基を有するアミノ酸」とは、前記シクロアルキル基に含まれる一部の炭素原子が、酸素や窒素など他の原子や、さらに他の分子や官能基を有する原子に置換された側鎖を有するアミノ酸を含む。すなわち、「置換されたシクロアルキル基を有するアミノ酸」には、ヘテロシクロアルキル基を有するアミノ酸も含む。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0092] 「側鎖にヘテロシクロアルキル基を有するアミノ酸」とは、前記のシクロアルキル基に含まれる一部の炭素原子が、酸素や窒素など他の原子や、さらに他の分子や官能基を有する原子に置換された環を有するアミノ酸を含む。

なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。また、「置換されたヘテロシクロアルキル基を有するアミノ酸」とは、前記ヘテロシクロアルキル基に含まれる一部の分子が、他の分子や官能基に置換された側鎖、複素環を有するアミノ酸を含む。例えば、ヘテロシクロアルキル基に含まれる一部の炭素原子が、エチル基を有する窒素 ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{N}$) に置換されたアミノ酸などが含まれる。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0093] 「側鎖にアルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸、例えば、非限定的に、アラニン、プロリン、イソロイシン、ロイシン、バリン等であって、前記アルキル基は、鎖状でも環状でも良いアミノ酸を意味する。

[0094] 「側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸、例えば、非限定的に、アラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン等であって前記側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸の側鎖が、さらにアルキル基、極性基等の置換基、例えば、非限定的に、カルボキシ基、アミド基、メタンスルホニル基等で置換されているアミノ酸を意味する。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0095] 「ペプチド」とは、アミノ酸に含まれるアミド窒素に側鎖が付加されたアミノ酸を含む。側鎖は特に特定されず、公知のアミノ酸の側鎖構造であってよい。

[0096] 「アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド」とは、アミド窒素に付加された側鎖において鎖状アルキル基を有するアミノ酸の側鎖が、さらにアルキル基、極性基等の置換基、例えば、非限定的に、カルボキシ基、アミド基、メタンスルホニル基等で置換されているアミノ酸を意味する。また、「アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド」には、非限定的に、アミド窒素にC1-6アルキル基が付加されたアラニン又はグリシンをも含む。な

お、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0097] 「置換されていてもよい脂肪族アミノ酸」とは、脂肪族アミノ酸に分類されるアミノ酸や、側鎖に直鎖又は分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸において、その側鎖に有する直鎖又は分岐鎖アルキル基の一部の分子が、他の分子や官能基に置換された側鎖を有するアミノ酸を含む。例えば、アラニンの側鎖のメチル基 CH_3 がペンチル基($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$)に置換されたアミノ酸、アルキル基に含まれる炭素が酸素に置換された AhpOMe 、 Ado などのアミノ酸などが含まれる。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0098] 「側鎖の末端に硫黄元素(S)を含むアミノ酸」とは、側鎖の末端に硫黄原子を含むアミノ酸であり、非限定的に、システイン(Cys)や、N-アルキル化システインや、D型のシステインなどが含まれる。例えば、非限定的に、 C 、 MeC 、 dc 、 Medc 、 dhcy または Hcy を含む。

[0099] 「置換があってもよいF」、「置換があってもよいY」又は「置換があってもよいW」とは、 Phe の側鎖のベンゼン環や Tyr の側鎖のフェノール基、 Trp の側鎖のインドール環に置換基を含むアミノ酸や、ヘテロ原子を含む環を有するアミノ酸、並びにそれらに官能基が付加されたアミノ酸をも含む。例えば、 Trp のインドール環に含まれる炭素がさらに窒素に置換されているアミノ酸や、 Phe のベンゼン環に含まれる炭素が、さらにベンゼン環を有する炭素に置換されている、側鎖にビフェニル基を持つアミノ酸であってもよく、また当該ビフェニル基に含まれる炭素が、さらに他の原子や、又は他の官能基を有する原子に置換されているアミノ酸や、 Tyr のフェノール基に含まれる水酸基がフッ素など他の原子や、又は他の官能基を有する原子に置換されているアミノ酸をも含む。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0100] 「それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖の分岐鎖アルキル基又はシクロアルキル基に含まれる炭素原子が酸素

原子に置換されているアミノ酸を意味する。例えば、非限定的に、イソロイシンや、TMe等が含まれる。なお、当該置換は1つであってもよく、複数個であってもよい。

[0101] 「側鎖に含まれる炭素数が3以上である、脂肪族アミノ酸又は側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸」とは、脂肪族アミノ酸に分類されるアミノ酸や、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸において、その側鎖に有するアルキル基に含まれる炭素数が3以上のアミノ酸であって、さらに当該側鎖アルキル基に含まれる炭素が酸素や他の分子又は官能基に置換されたアミノ酸を含む。例えば、Ahp、Ano、AhpOMe、Ado、HsePr、SPent、Leuなどが含まれる。

[0102] 「アミド窒素にC1-6アルキル基が付加されたアラニン又はグリシン」とは、アラニン又はグリシンのアミド窒素に、さらにC1-6アルキル基、好ましくはC1-3アルキル基が付加されたアミノ酸を示す。なお、C1アルキル基がアミド窒素に付加されたアラニンは、N-メチルアラニンともいう。

[0103] また、N-アルキルアミノ酸とは、各アミノ酸又はその誘導体について、アミド窒素にN-アルキル基が結合したアミノ酸を含む。例えば、N-メチルアミノ酸が含まれる。

[0104] (ペプチド(B)-1の一態様)

一態様において、本発明のペプチドは、以下の1つ又は2以上の要件を具備する。

[0105] X1が、A、MeA、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、N、CrmG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、KCOpipzaa、CeG、CrbG、K、KMe、Hly、E、Hgl、Orn、Dab、MeE、D、又はMeHglである；

X2が、R、Dap、K、E、A、da、S、G、de、dkCOpipzaa、ddab、又はdornである；

X3が、W、W7N、F44Py、Bph、W6N、F41dMeCmm

4Pyz、W1Bn、W6H、W1Ph、Bph4ms、W1aa、W7Ph3C、W1Ph4OMe、W1Ph4COO、F42Py又はW6H1Ph4COOである；

X4が、Y、3Py6NH2、YBn、Yae、Na11、Yph又はmBphである；

X5が、MeF、MeY、MeF3Me、F、MeCha、MeYap、MeA1Ac4pip、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeF4OMe又はMeF4Cである；

X6が、I、Gcpe又はTMeである；

X7が、MeG、MeA、Meda、dp、EtG又はPrGである；

X8が、Y、F4COO、K、4Py、F、F3aao、F3OMe、A4paa、KCOpipzaa、Bph2C、Bph2OMe、又はpBph2aaoである；

X9が、Y、F4COO、3Py、4Py、F4aao、F4CON、F3CON、F4F又はF4OMeである；

X11が、MeF、Me4Py、Me3Py、F、Cha、MeCha、MeK、MeKMe、MeF4am、MeD、MeE、MeF4COO又はF4amである；

X12が、L、Ahp、Ano、Ado、Ade、Aoc、SPent、HseBu、AhpOMe、HsePr又はAunである；

X13が、MeA、MeE、MeKCOpipzaa、MeK、MeDap又はMeDabである；

X14が、MeF、MeF3Et、Me4Py、Me3Py又はMemBphである；及び、

X15が、C、MeC、dc、Medc、dhcy、又はHcyである。

[0106] (ペプチド(B) - 2の一態様)

ペプチド(B) - 2は、ペプチド(B) - 1と、X15が異なる。一態様において、本発明のペプチドは、環状構造に含まれるアミノ酸残基の数が、

15個であってもよく、16個であってもよい(X16が存在する場合)。

[0107] X1-X15の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。
非限定的に、上記の要件の、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上の要件を具備する。好ましくは、上記15の要件の全てを具備する。

[0108] 一態様において、本発明のペプチドは、以下の1つ又は2以上の要件を具備する。

[0109] 以下の：

X1が、A、MeA、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、N、CrmG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、KCOpipzaa、CeG、CrbG、K、KMe、Hly、E、Hgl、Orn、Dab、MeE、D、又はMeHgl、又はdeである；

X2が、R、Dap、K、E、A、da、S、G、de、dkCOpipzaa、ddab、又はdornである；

X3が、W、W7N、F44Py、Bph、W6N、F41dMeCmm4Pyz、W1Bn、W6H、W1Ph、Bph4ms、W1aa、W7Ph3C、W1Ph4OMe、F42Py、W1Ph4COO、又はW6H1Ph4COOである；

X4が、Y、3Py6NH2、YBn、Yae、Nal1、Yph又はmBphである；

X5が、MeF、MeY、MeF3Me、F、MeCha、MeYap、MeA1Ac4pip、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeF4OMe又はMeF4Cである；

X6が、I、Gcpe又はTMeである；

X7が、MeG、MeA、Meda、dp、EtG又はPrGである；

X8が、Y、F4COO、K、4Py、F、F3aao、F3OMe、A4paa、KCOpipzaa、Bph2C、Bph2OMe、又はpBp

h 2 a a oである；

X 9が、Y、F 4 C O O、3 P y、4 P y、F 4 a a o、F 4 C O N、F 3 C O N、F 4 F又はF 4 O M eである；

X 1 1が、M e F、M e 4 P y、M e 3 P y、F、C h a、M e C h a、M e K、M e K M e、M e F 4 a m、M e D、M e E、M e F 4 C O O又はF 4 a mである；

X 1 2が、L、A h p、A n o、A d o、A d e、A o c、S P e n t、H s e B u、A h p O M e、H s e P r又はA u nである；

X 1 3が、M e A、M e E、M e K C O p i p z a a、M e K、M e D a p又はM e D a bである；

X 1 4が、M e F、M e F 3 E t、M e 4 P y、M e 3 P y又はM e m B p hである；及び、

X 1 5が、A e o a c、A p e、d h g l、H g l、M e H g l、M e d h g l、M e A e o a c若しくはM e A p eであるか、あるいは、X 1 5がG、d a、A、若しくはd eであり、そして、X 1 6としてM e A、M e d a、G、d a、M e G、P又はAが付加されている。

[0110] 一態様において、本発明のペプチドは、以下の1つ又は2の要件を具備する。

[0111] X 1が、A、M e A、D a p、A p G、C r p G、C m G、M e D、N、C r m G、M e o p G、M e e G、A c a p G、A 4 p a a、K C O p i p z a a、C e G、C r b G、K、K M e、H l y、E、H g l、O r n、D a b、M e E、D、又はM e H g lである；

；及び、

X 1 5が、A e o a c、A p e、d h g l、H g l、M e H g l、M e d h g l、M e A e o a c若しくはM e A p eであるか、あるいは、X 1 5がG、d a、A、若しくはd eであり、そして、X 1 6としてM e A、M e d a、G、d a、M e G、P又はAが付加されている、

前記ペプチド（ペプチド（A）、ペプチド（B））は、非限定的に、C末

端に、さらにDap、de、A4paa、KCOpipzaa、pipzAc、pipAc、又はPip4mAcなどを含んでもよい。

[0112] 前記ペプチドは、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」は、ペプチド中の2つのアミノ酸が結合し、その全部又は一部が環状になっているものをいう。前記ペプチドは、ペプチド中のアミノ酸が架橋構造を形成したもの、ラクタム環形成又はマクロ環化反応により環状構造を形成したもの、ラッソペプチド状構造を有するもの等も含む。すなわち、前記環状ペプチドは、その一部が環状構造を形成するものであればよく、直鎖部を有していてもよい。

[0113] ペプチドは、一般的に生体内において代謝安定性が悪く、またサイズが大きいため細胞膜を透過しづらいという問題がある。そのような課題に対し、ペプチドを環状化させるという方法がとられてきた。ペプチドを環状化すると、プロテアーゼ耐性が向上し代謝安定性が向上し、またコンフォメーション変化にも制限が加わるため、剛直性が増して膜透過性や標的タンパク質との親和性が向上することが示唆されてきた。

[0114] 一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる15番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したN末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる15番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。「クロロアセチル化」は、他のハロゲンによる「ハロゲンアセチル化」でもよい。また、「アセチル化」は、アセチル基以外のアシル基による「アシル化」でもよい。

本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場

合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も包含する。例えば、上述したように、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合がある、このような、クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。

[0115] また、一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基；X1）と、C末端アミノ酸（15番目のアミノ酸残基；X15又は付加的なアミノ酸残基としてX16等が付加されている場合は一番C末端部分にあるアミノ酸）とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）のアミノ基と、前記ペプチドに含まれる15番目のアミノ酸のカルボキシル基とが結合された環状構造を有する。また、一態様において、15番目のアミノ酸残基にさらに付加的なアミノ酸が付加されており、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、15番目にさらに付加的なアミノ酸残基が付加され、例えば16番目、17番目のアミノ酸残基とが結合された環状構造を有していてもよい。一態様において、前記ペプチドは、前記ペプチドに含まれる1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、16番目のアミノ酸残基のカルボキシ基とが結合された環状構造を有する。

[0116] 一態様において、前記環状構造を有するペプチドは、その環状構造に含まれるアミノ酸残基間において、さらに架橋構造を有していてもよい。一態様において、その環状構造に含まれるアミノ酸残基の側鎖が、その環状構造に含まれる他のアミノ酸残基の側鎖と結合した架橋構造を有する。例えば、非限定的に、環状構造に含まれるアミノ酸残基であるKの側鎖末端のアミノ基と、同環状構造に含まれる別のアミノ酸残基であるMeEの側鎖末端のカルボキシル基と結合し、環状構造内で架橋構造を取っていてもよい。また、一態様において、N末端アミノ酸残基（1番目のアミノ酸残基；X1）、2番目（X2）又は3番目（X3）のアミノ酸残基のいずれかと、11番目（X11）又は13番目（X13）のアミノ酸残基との間で架橋構造を有する。

前記さらに架橋構造を有する環状構造を有するペプチドにおいて、架橋構造は1つであってもよく、複数あっても良い。例えば、さらに一つの架橋構造を有する環状構造を有するペプチドは、二環性ペプチドとも言う。

[0117] 一態様において、前記さらに架橋構造を有する環状構造を有するペプチドは、N末端アミノ酸残基(X1)と11番目(X11)のアミノ酸残基の側鎖が結合した架橋構造を有する。また一態様において、N末端アミノ酸残基(X1)と13番目(X13)のアミノ酸残基の側鎖が結合した架橋構造を有する。また一態様において、2番目のアミノ酸残基(X2)と11番目(X11)のアミノ酸残基の側鎖が結合した架橋構造を有する。また一態様において、3番目のアミノ酸残基(X3)と11番目(X11)のアミノ酸残基の側鎖が結合した架橋構造を有する。

[0118] 一態様において、前記さらに架橋構造を有する環状構造を有するペプチドは、非限定的に、E、D、MeE、CeG、CrpG、CrbG、K、KMe、Hly、Dap、Hgl、Orn、Dabのいずれかのアミノ酸の側鎖と、MeF4am、MeK、MeKMe、MeD、MeE、MeF4COO、F4amのいずれかのアミノ酸の側鎖が結合した架橋構造や、D、CeG、CrpG、Dap、Eのいずれかのアミノ酸の側鎖と、MeDab、MeDap、MeEのいずれかのアミノ酸の側鎖が結合した架橋構造をさらに有する、環状構造を有するペプチドであって良く、また、ddab、dorn、ddabのいずれかのアミノ酸の側鎖と、MeD又はMeEのいずれかのアミノ酸の側鎖が結合した架橋構造をさらに有する、環状構造を有するペプチドであって良く、W1aaとMeKの側鎖が結合した架橋構造をさらに有する、環状構造を有するペプチドであってよい。また、MeE、MeHgl、E、Hglのいずれかのアミノ酸の側鎖とMeF4amの側鎖が結合した架橋構造をさらに有する、環状構造を有するペプチドであって良く、CrpG、CeGのいずれかのアミノ酸の側鎖と、MeDapの側鎖が結合した架橋構造をさらに有する、環状構造を有するペプチドであっても良い。さらに、上記のアミノ酸の組み合わせであって良い。

[0119] 環内部で架橋構造を有するペプチドの例は、配列番号238-290、326-329、334-338、348-354、358-360、362-366、368である。本発明は、一態様において、配列番号238-290、326-329、334-338、348-354、358-360、362-366、368のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又は、からなる。

[0120] 前記ペプチドは、一態様において、配列番号2-314、326-368のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号2-314、326-368のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、環状ペプチドである。前記ペプチドは、配列番号2-314、326-368のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、それらから1~14個（好ましくは1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、2個又は1個）のアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドである。なお、アミノ酸残基が付加した配列については、付加部分がリンカーであれば、多くのアミノ酸残基（例えば1~14個の残基）配列がさらに付加してもよい。また、これらアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドは、例えばミオスタチン阻害活性を有するものが好ましい。

[0121] 一態様において、前記ペプチドは、配列番号3、配列番号110-140を含まない。本明細書において、「配列番号2-314」について言及する場合、配列番号3、配列番号110-140を除いた、「配列番号2、配列番号4-109、配列番号141-314」を意図する場合がある。

[0122] 一態様において、前記ペプチドは、配列番号326-354のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる。

[0123] 前記ペプチドは、さらに、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。非限定的に、前記ペプチドは、配列番号2-314、326-368に記載のアミノ酸配列に加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。

- [0124] 「付加的なアミノ酸残基」は、環状構造を成すペプチドに含まれてもよいし、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されていてもよい。ペプチド、ペプチド部位のアミド結合の数（アミノ酸の数・長さ）は特に限定されない。
- [0125] また、環状ペプチドからさらにリンカーが付加されていてもよい。リンカーとしては、例えば、前述のアミノ酸リンカー（ペプチドリリンカー）、化学リンカー、脂肪酸リンカー、核酸リンカー、糖鎖リンカーなどが挙げられ、また、例えば化学リンカーとペプチドリリンカーなどの複合体であってもよい。化学リンカーとしては、例えば、1～24個のエチレングリコール単位からなるPEGリンカーであってよい。また、リンカーは、脂肪酸から誘導される二価化学部分を含む脂肪酸リンカーでもよい。アミノ酸（ペプチド）リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸を含むリンカーであり、例えば、米国特許第7、271、149号に記載のような、配列 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n$ （式中、 n は1、2、3、4、5又は6である）を有するペプチドなどのグリシンリッチペプチドや、米国特許第5、525、491号に記載のセリンリッチペプチドリリンカーを用いることができる。また、非限定的に、配列番号315-325に記載のアミノ酸配列を含むペプチドリリンカーを用いることができる。なお、ペプチドリリンカーにおいては、アミノ酸-アミノ酸間又はアミノ酸-化学リンカー間の結合が、アミノ酸の側鎖を介して結合していても良い。非限定的に、リンカーの付加によりペプチドの物性（例えば溶解度）が変化する場合がある。
- [0126] リンカーの付加位置については、どこに付加されていても良い。例えば、C末端側に位置するアミノ酸に結合していてもよく、環状ペプチドに含まれるアミノ酸に結合していても良い。一態様において、前記ペプチドは、C末端にリンカーを含む。好ましくはC末端側に位置するCysに結合しているか、環状ペプチドに含まれるアミノ酸の側鎖に結合しているものである。
- [0127] さらに、前記ペプチドは、リンカーなどを介して多量体を形成していてもよい。多量体に含まれるペプチドの数は限定されない。一態様において、多

量体は2量体、3量体、4量体、5量体、6量体、8量体又はそれ以上である。多量体は同じペプチドを複数含むものであっても、あるいは、複数の異なるペプチドを含むものであってもよい。

[0128] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、ミオスタチン阻害活性を有する。

[0129] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、GDF-8阻害活性を有する。

[0130] ミオスタチンとは、GDF-8 (G l o w t h D i f f e r e n t a t i o n F a c t o r - 8) と呼ばれるTGF- β (T r a n s f o r m i n g G l o w t h F a c t o r - β) スーパーファミリーに属するたんぱく質である。

[0131] 本明細書でいう用語「ミオスタチン」は、特別に明示しない限り、哺乳類、好ましくはマウスなどのげっ歯類やヒトなどの霊長類が有する天然型ミオスタチンのことを示す。

なお、本明細書の「ヒトミオスタチン」は、ヒトが有する天然型ミオスタチン (例: Gene ID: 2660) を示す。なお、ヒト、マウス、ラット

のミオスタチンのアミノ酸配列はほぼ一致していることが知られている、特に明記しない限り、本明細書において「ミオスタチン」、「ヒトミオスタチン」は、プロセッシングを受けていないミオスタチンや、プロセッシング後のミオスタチン、及び変異体を含む。また、ミオスタチンはグリコシル化及びダイマー化することが知られており、活性型ミオスタチン (成熟型ミオスタチンともいう) とは、二つのC末端成長因子ドメインがジスルフィド結合しているホモダイマーである。

[0132] ミオスタチン阻害とは、ミオスタチンシグナル伝達を阻害、阻止、アンタゴナイズ又は競合阻害することを示す。ミオスタチンシグナル伝達とは、ミオスタチンがII型アクチビン受容体 (A c t R I I : G e n e I D : 92) に結合し、I型アクチビン受容体 (A c t R I : G e n e I D : 90) が複合体化し、細胞内にシグナル伝達することを示す。すなわち、ミオス

タチンシグナル伝達の阻害とは、例えば、（ペプチドが）ミオスタチン又は $ActRII$ に結合することによる $ActRII$ に対するミオスタチンの結合阻害、 $ActRI$ に結合し $ActRI-ActRII$ 複合体化の阻害、 $ActRI-ActRII$ 複合体からのシグナル伝達経路の阻害、例えば $Smad$ 、 $P13K$ 、 Ras や $TAK1$ を介したシグナル伝達経路の阻害、などを含む。なお、シグナル伝達経路の阻害とは、当該シグナル伝達のいずれかを減少、調節或いは阻害することを意味する。

[0133] 「ミオスタチン阻害活性」は、公知の方法を用いて評価することができる。例えば、本明細書の実施例に示すように、レポーター遺伝子を用いた *in vitro* ミオスタチン阻害活性系や、マウスを用いた体重や筋力評価によって評価することができる。あるいは、例えば、特開2020-011965や特開2022-101593に開示される方法によって、ミオスタチン阻害活性は評価してもよい。

[0134] 非限定的に、ミオスタチン阻害活性は、例えば、レポーター遺伝子を用いた *in vitro* ミオスタチン阻害活性評価系において、 IC_{50} であらわすことができる。

[0135] 一態様において、前記ペプチドはミオスタチン選択的（特異的）である。また、さらに好ましくは、 $GDF-11$ 活性への阻害活性が低い、ペプチドである。

[0136] ミオスタチン阻害活性を有する分子は、多くがミオスタチンすなわち $GDF-8$ だけではなく、同じ $TGF-8$ スーパーファミリーに属する $GDF-11$ の活性をも阻害することが知られている。前述の活性型ミオスタチン $GDF-11$ のアミノ酸配列とは同一性が高く、さらにミオスタチン、 $GDF-11$ 、及びアクチピンはすべて $ActR$ を介してシグナル伝達する伝達物質であるため、ミオスタチン阻害活性を有する抗体などの分子は、ミオスタチン、 $GDF-11$ 、及びアクチピンの3つすべての増殖因子の活性を阻害することが多い。しかし、 $GDF-11$ は若返り因子としての筋機能向上作用があるため、特に小児や若年層においては阻害されないことが好ましい。

一態様において、ミオスタチンのみを特異的に阻害し、ミオスタチン以外のミオスタチンシグナル伝達物質、例えばGDF-11、については阻害しないミオスタチン阻害活性剤が好ましい。なお、GDF-11についてもマウス、ヒト、ラット間で同一性が高い。本明細書において、「GDF-11」と言及する場合、好ましくは、ヒトGDF-11 (Gene ID: 10220) である。

[0137] なお、「GDF-11を阻害しない」とは、GDF-11によるシグナル伝達への阻害活性が、ミオスタチンによるシグナル伝達への阻害活性と比較して、低いことを意味する。例えば、レポーター遺伝子を用いた*in vitro* ミオスタチン阻害活性評価系において、ミオスタチンのIC50と比べGDF-11のIC50が2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、又はそれ以上高い値を示すことを意味する。

[0138] 一態様において、本発明のペプチドは、複数の種に由来するミオスタチンに対し阻害活性を有する。好ましくは、ヒト由来のミオスタチンに対し阻害活性を有する。

[0139] 本発明は、ミオスタチン阻害活性を有する新規ペプチドを提供する。ミオスタチン阻害活性を有するペプチドは、好ましくは、ミオスタチン阻害活性に比べGDF-11を阻害しないペプチドである。これは、本明細書の例えば実施例3、4で示された通り、ミオスタチンに対する阻害活性は有するが、GDF-11に対しての阻害活性はミオスタチン阻害活性と比べ大幅に低いことから示唆される。

[0140] ミオスタチン阻害活性を有するペプチドは、BMPが関与する各種疾患の治療や予防に有効である。ミオスタチン阻害活性を有するペプチドは、ミオスタチンが関与する各種疾患についての各種実験に有効である。

[0141] 本明細書において「ペプチド」は、特に言及しない限り、「2. ペプチド(A)」と、「3. ペプチド(B)」の双方を含む。

[0142] 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

[0143] 4. ペプチドの製造

本発明のペプチドは、例えば以下のような、ペプチド製造のための任意の公知の方法によって、製造することができる。

[0144] 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

[0145] 液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法；

遺伝子組み換え法、等。

[0146] 固相法は、例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 α -アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール（MSNT）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。

[0147] 次に、第一アミノ酸の α -アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第一及び第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸の α -アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第二及び第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドが合成されたら、すべての官能基を脱保護する。

[0148] 固相合成のレジンとしては、例えば、Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin（メルク社）、HMPA-PEGA resin（メルク社）等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤（ジメチルホルムアミド（DMF）、2-プロパノール、塩化メチレン等）で洗浄してから用いることができる。

- [0149] α -アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル (C b z 又は Z) 基、t e r t -ブトキシカルボニル (B o c) 基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (F m o c) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル (A l l o c) 基等が挙げられる。C b z 基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、B o c 基はトリフルオロ酢酸 (T F A) により脱保護でき、F m o c 基はピペリジン又はピロリジンによる処理で脱保護できる。
- [0150] α -カルボキシ基の保護は、例えば、メチルエステル、エチルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル、t e r t -ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いることができる。
- [0151] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C)、ジイソプロピルカルボジイミド (D I C)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (E D C あるいは W S C)、(1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (B O P)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート (H B T U) 等が挙げられる。
- [0152] レジンからのペプチド鎖の切断は、T F A、フッ化水素 (H F) 等の酸で処理することによって行うことができる。
- [0153] 遺伝子組み換え法(翻訳合成系)によるペプチドの製造は、前記ペプチドをコードする核酸を用いて行うことができる。前記ペプチドをコードする核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。
- [0154] 前記ペプチドをコードする核酸は、公知の方法又はそれに準ずる方法で調製することができる。例えば、自動合成装置によって合成することができる。得られたDNAをベクターに挿入するために制限酵素認識部位を加えてもよい。あるいは、できたペプチド鎖を酵素などで切り出すためのアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んでよい。

- [0155] 宿主由来のプロテアーゼによる分解を抑制するため、目的のペプチドを他のペプチドとのキメラペプチドとして発現させるキメラタンパク質発現法を用いることもできる。この場合、前記核酸としては、目的とするペプチドと、これに結合するペプチドとをコードする核酸が用いられる。
- [0156] 続いて、当該ペプチドをコードする核酸を用いて発現ベクターを調製する。核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加する等して、発現ベクターのプロモータの下流に挿入することができる。ベクターとしては、例えば、大腸菌由来プラスミド（pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pBlue script II等）、枯草菌由来プラスミド（pUB110、pTP5、pC1912、pTP4、pE194、pC194等）、酵母由来プラスミド（pSH19、pSH15、YE p、YRp、YIp、YAC等）、バクテリオファージ（φファージ、M13ファージ等）、ウイルス（レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、バキュロウイルス等）、コスミド等が挙げられる。
- [0157] プロモータは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、SV40（simian virus 40）由来プロモータ、CMV（cytomegalovirus）由来プロモータを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、trpプロモータ、T7プロモータ、lacプロモータ等を用いることができる。
- [0158] 発現ベクターには、例えば、DNA複製開始点（ori）、選択マーカー（抗生物質抵抗性、栄養要求性等）、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、タグ（FLAG、HA、GST、GFPなど）をコードする核酸等を組み込むこともできる。
- [0159] 次に、前記発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換する。宿主は、ベクターとの関係で適宜選択することができる。宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌、バチルス属菌、酵母、昆虫又は昆虫細胞、動物細胞等が用いられ

る。動物細胞として、例えば、HEK293T細胞、CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、HeLa細胞、Vero細胞を用いることができる。形質転換は、宿主の種類に応じ、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等、公知の方法に従って行うことができる。形質転換体を常法に従って培養することにより、目的とするペプチドが発現する。

[0160] 形質転換体の培養物からのペプチドの精製は、培養細胞を回収し、適当な緩衝液に懸濁してから超音波処理、凍結融解などの方法により細胞を破壊し、遠心分離やろ過によって粗抽出液を得る。培養液中にペプチドが分泌される場合には、上清を回収する。

[0161] 粗抽出液又は培養上清からの精製も公知の方法又はそれに準ずる方法（例えば、塩析、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、SDS-PAGE法、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、逆相高速液体クロマトグラフィー等）で行うことができる。

[0162] 得られたペプチドは、公知の方法又はそれに準ずる方法で遊離体から塩に、又は塩から遊離体に変換してもよい。

[0163] 一態様において、翻訳合成系は、無細胞翻訳系としてもよい。無細胞翻訳系によれば、一般に、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる。無細胞翻訳系は、例えば、リボソームタンパク質、アミノアシルtRNA合成酵素（ARS）、リボソームRNA、アミノ酸、rRNA、GTP、ATP、翻訳開始因子（IF）伸長因子（EF）、終結因子（RF）、及びリボソーム再生因子（RRF）、並びに翻訳に必要なその他の因子を含む。発現効率を高くするために大腸菌抽出液や小麦胚芽抽出液を加えてもよい。他に、ウサギ赤血球抽出液や昆虫細胞抽出液を加えてもよい。

[0164] これらを含む系に、透析を用いて連続的にエネルギーを供給することで、非限定的に、数100 μ gから数mg/mLのタンパク質を生産することができる。遺伝子DNAからの転写を併せて行うためにRNAポリメラーゼを含む系としてもよい。市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系

としてはロシュ・ダイアグノスティックス社のRTS-100（登録商標）、ジーンフロンティア社のPURESYSTEMやNEW ENGLAND Biolabs社のPURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit等を、小麦胚芽抽出液を用いた系としてはゾイジーン社やセルフリースサイエンス社のもの等を使用できる。

[0165] 細胞翻訳系においては、天然のアミノアシルtRNA合成酵素に合成されるアミノアシルtRNAに代えて、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸をtRNAに連結（アシル化）した人工のアミノアシルtRNAを用いてもよい。かかるアミノアシルtRNAは、人工のリボザイムを用いて合成することができる。

[0166] かかるリボザイムとしては、フレキシザイム（flexizyme）（H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; 及びWO2007/066627等）が挙げられる。フレキシザイムは、原型のフレキシザイム（Fx）、及び、これから改変されたジニトロベンジルフレキシザイム（dFx）、エンハンスドフレキシザイム（eFx）、アミノフレキシザイム（aFx）等の呼称でも知られる。

[0167] フレキシザイムによって生成された、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸が連結されたtRNAを用いることにより、所望のコドン、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸と関連付けて翻訳することができる。所望のアミノ酸としては、特殊アミノ酸を用いてもよい。例えば、上述した環状化に必要な非天然アミノ酸もこの方法により、結合ペプチドに導入することができる。

[0168] 前記ペプチドの化学合成は、例えば、段階的固相合成、配座的に支援される再ライゲーションを経るペプチドフラグメントの半合成、化学ライゲーションを含めた様々な当該技術分野において汎用される方法を使用して合成できる。前記ペプチドの合成は、例えば、K. J. Jensen, P. T. Shelton, S. L. Pedersen, Peptide Synthesis and Applications, 2nd Edition, Sp

ringer、2013などに記載されるような種々の固相技術を使用する化学合成である。好ましいストラテジーとして、 α -アミノ基を一時的に保護しかつ塩基による選択的除去を可能とするFmoc基と、側鎖官能基を一時的に保護しかつ脱Fmoc条件に安定な保護基の組み合わせに基づく。そのような一般的なペプチド側鎖の選択は前述のPeptide Synthesis and Applications、第2版やG. B. Fields、R. L. Noble、Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids、Int. J. Peptide Protein Res. 35、1990、161-214などに記載されているが、好ましいペプチド側鎖保護基としては、例えば、セリンやトレオニンのヒドロキシ基に対するベンジル基やtert-ブチル基及びトリチル(Trt)基、チロシンのヒドロキシ基に対する2-ブロモベンジルオキシカルボニル基やtert-ブチル基、リジン側鎖のアミノ基に対するBoc基、メチルテトラゾールチオール(Mtt)基、Alloc基、及びivDde基、ヒスチジンのイミダゾール基に対するTrt基やBoc基、アルギニンのグアニジル基に対する2、2、4、6、7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル基(Pbf)基、グルタミン酸やアスパラギン酸をはじめとするカルボキシル基に対するtert-ブチル基、アリル基、及び3-メチルペンタン(Mpe)基、グルタミンやアスパラギンのカルボキサミド基に対するTrt基、また、システインのチオール基に対するTrt基及びモノメトキシトリチル(Mmt)基が挙げられる。

[0169] 前記ペプチドは、前述した固相樹脂上で段階的方法において合成できる。使用するC末端アミノ酸及び合成に使用するすべてのアミノ酸やペプチドは、 α -アミノ保護基が合成過程において、選択的に除去されなければならない。好ましくは前述の固相樹脂を用い、N末端がFmoc基等により適切に保護されたペプチドのC末端カルボキシル基又はFmoc基で保護されたアミノ酸のC末端カルボキシル基を適切な試薬により活性化エステルとしたの

ち固相樹脂上のアミノ基に付加することにより開始する。引き続くペプチド鎖の伸長は、目的とするペプチドのアミノ酸配列に従って、N末端保護基（Fmoc基）の除去、次いで保護アミノ酸誘導体の縮合を順次繰り返すことにより達成することが可能である。なお、これらは目的のペプチドを最終段階で遊離させることができる。たとえば遊離させる条件として、Teixeira、W. E. Benckhuijsen、P. E. de Koning、A. R. P. M. Valentijn、J. W. Drijfhout、Protein Pept. Lett.、2002、9、379–385などに挙げられる、TFA中に捕捉剤として、水／シリルヒドリド／チオールを含むTFA溶液で遊離させることができる。典型的な例として、TFA／Water／TIS／DODT（体積比92.5：2.5：2.5：2.5）が挙げられる。

[0170] 本明細書に記載するペプチドの合成は、単又は多チャネルペプチド合成機、たとえばCEM社のLiberty Blue合成機又はBiotage社のSyro 1合成機やそれらの後継機などを使用することで実施できる。

[0171] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDCあるいはWSC）、（1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスファート（BOP）、1-[ビス（ジメチルアミノ）メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート（HBTU）等が挙げられる。

[0172] ペプチドの環化については、公知の方法に従って行うことができる。非限定的に、例えば、ペプチドに2個以上のシステイン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Gotoらの方法（Y. Goto、et al. ACS Chem.

Bio1. 3 120-129 (2008)) に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、N末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中に硫黄分子を含むシステイン残基を配置しておくことによって環状化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環状化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環状化してもよい。あるいは、ペプチド中にL-2-アミノアジピン酸残基を配置し、N末端の主鎖アミノ基との間で結合することによって、環状化してもよい。このように、公知の環状化方法であれば、特に制限されず用いることができる。

[0173] ペプチドについては、さらに環内で架橋したバイサイクリック構造をとってもよい。バイサイクリック構造の形成については、公知の方法で行うことができる。限定されるものではないが、例えば環状構造中に含まれる2つのアミノ酸の側鎖が、さらにアミノ酸等を介し、又は介さずに、結合することでバイサイクリック構造をとるペプチドを得ることができる。

[0174] 5. 組成物等

本発明はまた、本発明のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む組成物に関する。前記組成物は、非限定的に、医薬組成物（医療用組成物）、診断用組成物、治療用組成物、である。

[0175] 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

[0176] 医薬組成物

一態様において、本発明は、前記ペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物に関する。前記医薬組成物の対象となる疾患は、上述したペプチドそのものが効果を奏する疾患であれば、特に限定されない、

一態様において、前記医薬組成物は、ミオスタチン阻害活性を有する。

[0177] 一態様において、前記医薬組成物は、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を予防、又は治療するための医薬組成物である。

[0178] 「ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状」とは、

公知のミオスタチンの関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を含む。例えば、ミオパチー、筋原性筋萎縮症などの筋組織に起因する疾患や、神経原性筋萎縮症などの神経に起因する疾患がすべて含まれる。

[0179] 一態様において、「ミオスタチンの関連疾患」は、筋ジストロフィー（DMD；デュシェンヌ筋ジストロフィー、FSHD；顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、LGMD；肢帯型筋ジストロフィー、BMD；ベッカー型筋ジストロフィーなどを含む）、ミオパチー（先天性ミオパチー、炎症性ミオパチー、代謝性ミオパチー、ミトコンドリアミオパチー、内分泌性ミオパチー、筋原線維性ミオパチーや遠位型ミオパチーなどを含む）、神経原性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、筋萎縮症、脊髄性筋萎縮症（SMA）、などが挙げられる。

[0180] 一態様において、本発明の医療用組成物は、筋線維の量の低下を防止するためのものである。一態様において、筋線維の量を増加させるためのものである。一態様において、筋線維の強度を増加させるためのものである。一態様において、筋線維の壊死を抑制するものである。一態様において、筋線維の壊死後に続発する線維化及び脂肪化を抑制するためのものである。非限定的に、前記「筋機能低下を伴う疾患若しくは症状」には、筋線維の量の低下、筋線維の壊死、筋線維の壊死後に続発する線維化及び脂肪化を含む。

[0181] 一態様において、医療用組成物は、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を有する個体に投与される。「個体」は、好ましくはヒトである。

[0182] 前記医薬組成物は、前記ペプチドそのものを含んでもよいが、前記ペプチドの薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含んでもよい。本明細書において「ペプチド」は、特に明記しない限り、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含みうる。前記医薬組成物は、前記ペプチドを有効成分として有効量含むものが好ましい。

[0183] 本明細書において、医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口投与としては、例えば、筋肉内注射、静

脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膈、経直腸）投与等が上げられる。

[0184] 前記医薬組成物は、ポリペプチドが代謝及び排泄されやすい性質に鑑みて、各種の修飾を行うことができる。例えば、ポリペプチドにポリエチレングリコール（PEG）や糖鎖を付加して血中滞留時間を長くし、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸・グリコール（PLGA）などの生体内分解性の高分子化合物、多孔性ヒドロキシアパタイト、リポソーム、表面修飾リポソーム、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これにポリペプチドを内包させてもよい。経皮投与する場合、弱い電流を皮膚表面に流して角質層を透過させることもできる（イオントフォoresis法）。

[0185] 前記医薬組成物は、有効成分をそのまま用いてもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤などを適宜使用し、常法により行うことができる。

[0186] 製剤化に用いられる成分の例としては、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、トラ

ガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0187] 前記医薬組成物は、ペプチドが一般には経粘膜吸収されにくいことに鑑みて、難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤を含むことができる。かかる吸収促進剤としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、サポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸等の胆汁酸塩；EDTA、サリチル酸類等のキレート剤；カプロン酸、カプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体、N-アシルコラーゲンペプチド、N-アシルアミノ酸、シクロデキストリン類、キトサン類、一酸化窒素供与体等を用いることができる。

[0188] 前記医薬組成物が丸剤又は錠剤の場合、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆してもよい。

[0189] 前記医薬組成物が注射剤の場合、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含んでもよい。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えもよい。

[0190] また、前記医薬組成物は、ヒトだけではなく、非ヒト哺乳動物又は鳥類を対象としていてもよい。非ヒト哺乳動物の例は、ヒト以外の霊長類（サル、チンパンジー、ゴリラ等）、家畜動物（ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジなど）、あるいは、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、ウサギ等が含まれる。

[0191] 特にヒトに投与する場合の投与量は、症状、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、非限定的に、例えば、 $30\mu\text{g} \sim 100\text{g}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 500\text{mg}$ 、1

00 μg ~ 100 mg を1回又は数回に分けて投与することができる。注射投与の場合、患者の体重により、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を1回又は数回に分けて投与してもよい。

[0192] 一態様において、本発明は、本発明のペプチドを投与することによる、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を予防又は治療する方法に関する。

[0193] 一態様において、本発明は、本発明のペプチドのミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための使用、に関する。

[0194] 一態様において、本発明は、本発明のペプチドの、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための医薬組成物の製造のための使用、に関する。

[0195] 一態様において、本発明は、本発明のペプチドの、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための医薬組成物としての使用、に関する。

[0196] 一態様において、本発明は、ミオスタチン阻害活性を有する、本発明のペプチドに関する。

[0197] 一態様において、本発明は、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を予防又は治療する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0198] 一態様において、本発明は、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための医薬組成物として使用されるための、本発明のペプチド、に関する。

[0199] 一態様において、本発明は、一態様において、本発明のペプチドを用いて、ミオスタチンシグナル伝達を阻害する方法に関する。本発明の方法は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*の方法を含む。

[0200] 診断用組成物

本発明はまた、本発明のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む

、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を診断するための診断用組成物に関する。

[0201] 本発明のペプチドは、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の診断用組成物としても使用しうる。診断薬としては、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状に罹患しているか否かを診断するための検出薬であってよく、検出薬として用いる場合は、前記ペプチドは、検出可能に標識してもよい。

[0202] 前記ペプチドは、検出可能に標識してもよい。ペプチドの標識は、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³H等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体が用いられる。その他、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子で標識した抗体を検出することもできる。例えば、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状に関係するタンパク質に結合する抗体と前記ペプチドとで複合体を作成し、当該抗体又は前記ペプチドに標識した複合体を作成し、それを投与、検出することで、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の重篤度などを検出することができる。また、イムノアッセイでは、前記ペプチドをビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出することもできる。

[0203] イムノアッセイの中でも、酵素標識を用いるELISA法は、簡便且つ迅速に抗原を測定することができて好ましい。例えば、抗体を固相担体に固定し、サンプルを添加して反応させた後、標識した前記ペプチドを添加して反応させる。洗浄後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定することにより、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の重篤度などを検出することができる。固相担体に固定した抗体と試料を反応させた後、標識していない前記ペプチドを添加し、前記ペプチドに対する抗体を酵

素標識してさらに添加してもよい。抗体は固相担体の表面に固定されても、内部に固定されてもよい。

- [0204] 酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、3、3'-ジアミノベンジジン (DAB)、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン (TMB)、*o*-フェニレンジアミン (OPD) 等を用いることができ、アルカリホスファターゼの場合、*p*-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) 等を用いることができる。
- [0205] 本明細書において「固相担体」は、抗体を固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、金属製、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられ、標的物質は、これらの固相担体に公知の方法に従って固定することができる。
- [0206] 本発明は、本発明のペプチドを含む、診断用のキットに関する。前記診断用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（非限定的に、本発明のペプチド、抗体、固相担体、緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー等のいずれか又は全てを含む）を含む。
- [0207] 本発明は、本発明のペプチドを用いることによる、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を診断する方法に関する。「診断する方法」は、*in vivo*又は*in vitro*の診断方法を含む。好ましくは、*in vitro*の診断方法である。本発明はまた、本発明のペプチドを用いることによる、疾患の検出方法に関する。疾患の検出は、例えば、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業等において、医師以外の、検査技師、研究者等によって行うこともできる。一態様において、疾患の検出方法は医療行為を含まない。
- [0208] 本発明は、本発明のペプチドのミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の診断のための使用、に関する。
- [0209] 本発明は、本発明のペプチドの、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の診断のための診断用組成物の製造のための使用、に

関する。

[0210] 本発明は、本発明のペプチドの、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の診断のための診断用組成物としての使用、に関する。

[0211] 本発明は、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を診断する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0212] 本発明は、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を診断するための診断用組成物として使用されるための、本発明のペプチド、に関する。

[0213] 本発明は、本発明のペプチドを含むテスターに関する。本発明は、本発明のペプチドを含む診断用又は検出用のテスターに関する。

[0214] 研究用組成物

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、研究用組成物に関する。「研究用組成物」は、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業、病院等において、研究者、技師、学生、医師等によって使用されるものを含む。

[0215] 前記研究用組成物は、例えば、ミオスタチンの検出、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の検出のために使用することができる。

[0216] 本明細書において、ペプチドを固定化するための担体は特に限定されない、例えば、ラス製、金属性、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDフメンブレン等が挙げられる。

[0217] 本発明は、本発明のペプチドを用いた、ミオスタチンを検出する方法を含む。

[0218] 本発明はまた、本発明のペプチドのミオスタチンの検出のための使用、を含む。

[0219] 本発明は、本発明のペプチドを含む、診断用又は検出用のキットに関する。前記診断用又は検出用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（非限定

的に、本発明のペプチド、抗体、固相担体、緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー等のいずれか又は全てを含む）を含む。

[0220] 本発明はまた、ペプチド又、その薬学的に許容される塩について

- a) 溶媒への溶解度
- b) ミオスタチン阻害活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- d) 実験動物への毒性

の少なくとも1つを試験する、ペプチド又はその薬学的に許容される塩の試験方法であって、

前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩は、請求項1－7のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩である、
前記方法に関する。

[0221] 「溶媒への溶解度」は、公知の方法を用いて測定しうる。溶解度の測定にあたっては、溶媒は限定されるものではなく、目的に応じて自由に選択してよい。また、溶解度の測定方法に関しては、溶媒の種類に応じて、公知の方法を適切に選択することができる。非限定的に、水、グリセロール、PBS、DMSOなど公知の溶媒に対し、ペプチドを溶解させたときの溶解度であってよい。

[0222] 「ミオスタチン阻害活性」は、例えば、「3. ペプチド(B)」等に記載したように測定しうる。

[0223] 「細胞及び／又は組織への毒性」は、公知の方法を用いて測定しうる。例えば、細胞及び／又は組織への毒性の試験は、細胞及び／又は組織を用いた公知の毒性評価試験であってよく、*in vitro*で実施する方法であってよい。細胞や組織は、医薬品について通常、毒性評価試験を行う細胞及び／又は組織であってよく、限定されるものではない。

[0224] 「実験動物への毒性」は、公知の方法を用いて測定しうる。例えば、実験動物は、通常使用されているものであれば特に限定されないが、例として、マウス、ラット、モルモット、スナネズミ、ハムスター、フェレット、ウサ

ギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウマ、ウシ、鳥類（例えば、ニワトリ、ウズラなど）、サル、ヒトを除く霊長類（例えば、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルなど）などが挙げられる。

[0225] また、上記の毒性についての評価試験は、限定されるものではないが、医薬品の非臨床試験において通常行われる安全性に関する試験であってよく、例として、一般毒性試験（単回投与毒性試験／反復投与毒性試験）、遺伝毒性試験（Ame s試験／染色体異常試験／In vitro小核試験）、がん原性試験、生殖発生毒性試験（ICH－I、II、III）、局所刺激性試験（眼刺激性試験、皮膚刺激性試験等）、その他の毒性試験（皮膚感作性試験、光毒性試験、抗原性試験）、化学分析・生体分析（TK／PK）などが挙げられる。

[0226] 6. 併用、組合せ

本発明のペプチドは、他のミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤と併用されてもよい。一態様において、本発明は、前記ペプチドと、他のミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤との組み合わせ、に関する。

[0227] 前記ペプチドと、他のミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤は、同時に投与されても、逐次投与されてもよい。好ましくは、前記ペプチドと、他のミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤の双方の相加効果、好ましくは相乗効果が得られるように投与する。逐次投与する場合に、投与の順番は問わない。逐次投与する場合には、非限定的に、双方を2時間以内、1時間以内、30分以内、20分以内、15分以内、10分以内、5分以内に摂取するのが好ましい。

[0228] 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

実施例

[0229] 以下に本発明を、実施例により、さらに具体的に説明するが、本発明はも

とよりこれに限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。なお、以下の参考例及び実施例において示された化合物名は、必ずしもIUPAC命名法に従うものではない。なお、記載の簡略化のために略語を使用することもあるが、これらの略号は前記記載のとおりである。

[0230] 化合物の化学合成において使用した原料、ビルディングブロック、試薬、酸、塩基、固相樹脂、及び溶媒は、市販品をそのまま用いたか、もしくは別途記載がある場合には有機化学的手法を用いて合成したものである。なお、保護基を含むアミノ酸は市販品のものをそのまま用いた。

[0231] ペプチド残基の数え方として、C1Ac化されるアミノ酸残基を1残基目として数え、その後樹脂に向かって2残基目、3残基目として数えることとする。使用した一般的なアミノ酸を下記に列挙し、側鎖保護基はカッコ内に示した。

[0232] Fmoc-Phe-OH;
Fmoc-Val-OH;
Fmoc-Trp(Boc)-OH;
Fmoc-Arg(Pbf)-OH;
Fmoc-Ala-OH H₂O;
Fmoc-Gly-OH;
Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH;
Fmoc-Ile-OH;
Fmoc-Leu-OH;
Fmoc-Asn(Trt)-OH;
Fmoc-Asp(OMpe)-OH;
Fmoc-(Dmb)Gly-OH (CAS番号 166881-42-1);
Fmoc-D-Pro-OH;

Fmoc-Cys (Trt) -OH ;

Fmoc-Lys (Boc) -OH。

[0233] また、非天然アミノ酸については、以下のもの及び略語に記載のものを使用した。

[0234] Fmoc-dp-OH ;

Fmoc-de (tBu) -OH ;

Fmoc-KCOpipzaa (tBu) -OH ;

Fmoc-W4N-OH ;

Fmoc-W7N-OH ;

Fmoc-Me4Py-OH ;

Fmoc-MeE (tBu) -OH ;

Fmoc-MeF-OH ;

Fmoc-MeY (tBu) -OH ;

Fmoc-MeA-OH ;

Fmoc-MeG-OH ;

Fmoc-W4F-OH ;

Fmoc-W7F-OH ;

Fmoc-MeF2F-OH ;

Fmoc-3Py6NH2 (Boc) -OH ;

Fmoc-Kac-OH ;

Fmoc-W73Pyz1Me (Boc) -OH ;

Fmoc-W7Ph3C-OH ;

Fmoc-MeF4C-OH ;

Fmoc-PEG8c-OH ;

Fmoc-W6H (Boc) 1Ph4COO (tBu) -OH ;

Fmoc-W6H (Boc, Boc) -OH ;

Fmoc-MeDap (alloc) -OH (CAS : 2973753-13-6) ;

Fmoc-MeF4am (aliloc) -OH (CAS : 2973754-55-9) ;

Fmoc-MeHgl (allyl) -OH (2973754-77-5) ;

Fmoc-Hgl (allyl) -OH (CAS : 133464-45-6) ;

Fmoc-CeG (allyl) -OH (CAS : 174800-18-1) ;

Fmoc-Ano-OH (CAS : 1262886-65-6) ;

Fmoc-Ado-OH (CAS : 1338002-17-7) ;

Fmoc-F4COO (tBu) -OH (CAS : 183070-44-2) ;

Fmoc-F3aao (tBu) -OH (CAS : 2973753-95-4) ;

Fmoc-CrpG (tBu) -OH (CAS : 174799-90-7) ;

Fmoc-de (allyl) -OH (CAS : 204251-33-2) ;

Fmoc-da-OH (CAS : 79990-15-1) ;

Fmoc-W1Ph4COO (tBu) -OH ;

Fmoc-CrpG (allyl) -OH (CAS : 1403683-46-4) ;

Fmoc-4Py-OH (CAS : 169555-95-7) ;

Fmoc-ApG (Boc) -OH (CAS : 143192-31-8)

;

Fmoc-Dap (Boc) -OH (CAS : 162558-25-0)

;

Fmoc-F4CON-OH (CAS : 204716-17-6) ;

Fmoc-Cha-OH (CAS : 135673-97-1) ;
Fmoc-Pip4mAc-OH (CAS : 154938-68-8) ;
Fmoc-EtG-OH (CAS : 162545-29-1) ;
Fmoc-Bph-OH (CAS : 199110-64-0) ;
Fmoc-F44Py-OH (CAS : 1282042-56-1) ;
Fmoc-Ahp-OH (CAS : 1197020-22-6) ;
Fmoc-Me3Py-OH (CAS : 1979173-93-7) ;
Fmoc-Ade-OH (CAS : 193885-59-5) ;
Fmoc-F4F-OH (CAS : 169243-86-1) ;
Fmoc-PipzAc-OH (CAS : 180576-05-0) ;
Fmoc-F3CON-OH (CAS : 959573-22-9) ;
Fmoc-dkCOPipzaa (tBu) -OH (CAS : 29737
52-83-7) ;
Fmoc-MeKCOPipzaa (tBu) -OH (CAS : 2973
752-84-8) ;
Fmoc-MeC (Trt) -OH (CAS : 944797-51-7)
;
Fmoc-Medc (Trt) -OH (CAS : 1349807-46-
0) ;
Fmoc-Hcy (Trt) -OH (CAS : 167015-23-8)
;
Fmoc-dhcy (Trt) -OH (CAS : 2991226-74-
3) ;
Fmoc-Aeoac-OH (CAS : 260367-12-2) ;
Fmoc-Ape-OH (CAS : 123622-48-0) ;
Fmoc-Pic4-OH (CAS : 148928-15-8) ;
Fmoc-ddab (alloc) -OH (CAS : 387824-78
-4) ;

Fmoc-dorn(a l l o c)-OH (CAS : 2 1 4 7 5 0-7 4
-0) ;

Fmoc-KMe(a l l o c)-OH (CAS : 2 2 4 6 7 0 8-8 6
-9) ;

Fmoc-mBph-OH (CAS : 1 2 6 0 6 1 6-6 9-0) ;

Fmoc-MeE(a l l y l)-OH (CAS : 2 4 4 4 3 5 6-8 5
-6) ;

Fmoc-de-OtBu (CAS : 1 0 9 7 4 5-1 5-5) ;

Fmoc-dcaa-OtBu。

[0235] 化学合成されたペプチドの構造決定は、目的配列に従って用いたアミノ酸と必要に応じて用いたビルディングブロックを考慮し計算された分子量を、質量スペクトル分析法におけるESI-MS (+) により確認した。なお、“ESI-MS (+)” とは、正イオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は“m/z”単位表記によって報告された。なお、分子量がおおよそ1000より大きい化合物は、2価イオン又は3価イオンとして高頻度で検出された。

分析条件A

カラム ; K i n e t e x E V O C 1 8 2.6 μ m、2.1 I D x
150mm、100 Å (P h e n o m e n e x 社)

カラム温度 : 60°C

移動相A : 0.025% T F A (水中)

移動相B : 0.025% T F A (C H₃C N 中)

グラジエント : 20分かけて20-60%

流速 : 0.25 mL / 分

検出 : P D A (225 nm)

分析条件B

カラム ; K i n e t e x E V O C 1 8 2.6 μ m、2.1 I D x
150mm、100 Å (P h e n o m e n e x 社)

カラム温度：60℃

移動相A：0.025% TFA（水中）

移動相B：0.025% TFA（CH₃CN中）

グラジエント：7.2分かけて20－60%

流速：0.5 mL／分

検出：PDA（225 nm）

分析条件C

カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μm、2.1 ID x 150 mm、100 Å（Phenomenex社）

カラム温度：60℃

移動相A：0.025% TFA（水中）

移動相B：0.025% TFA（CH₃CN中）

グラジエント：7.2分かけて40－80%

流速：0.5 mL／分

検出：PDA（225 nm）

分析条件D

カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μm、2.1 ID x 150 mm、100 Å（Phenomenex社）

カラム温度：60℃

移動相A：0.025% TFA（水中）

移動相B：0.025% TFA（CH₃CN中）

グラジエント：7.2分かけて5－45%

流速：0.5 mL／分

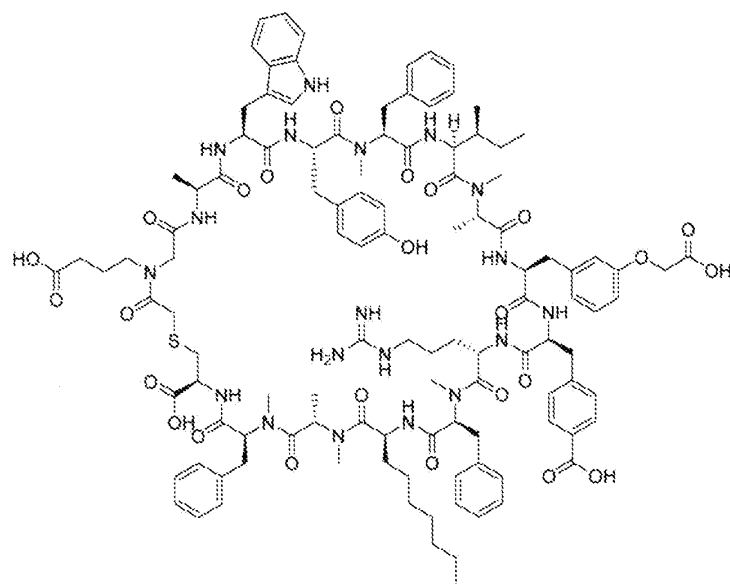
検出：PDA（225 nm）

[0236] 実施例1

本実施例では、以下のペプチド又はリンカー付与ペプチドを合成した。

[0237] 実施例1－1 Myostatin 99 v145（配列番号30）の合成

[0238] [化33]



[0239] H-dc (Trt) - Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、0.83 mmol/g、1.20 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0240] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 0.5 M HATU (DMF中) / 1 M DIEA (DMF中) (4.2当量 / 4当量 / 8当量) を用い25℃下、30分間1回反応を行った。ただし、1残基目、4残基目、10残基目、12残基目、13残基目については、25℃下、30分間2回反応を行った。6残基目については、25℃下、60分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下、5分間2回反応させることで行った。

[0241] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法でα-アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.13 M ClAcOH (DMF中) / 0.13 M HATU (DMF中) / 0.25 M DIEA (DMF中) (5.2当量 / 5当量 / 10当量) と25℃下、60分間振盪することにより行った。

- [0242] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（30 mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比90/2.5/2.5/5.0の混合物）を加え、室温で30分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂を切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。
- [0243] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO/水/アセトニトリル（2/1/1）に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で60分間攪拌し濃度が1%となるようDODTを加えることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。
- [0244] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm 50×250 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて15.4-12.2%、4.9分間かけて12.2-12.2%、2分間かけて12.2-15.4%、3分間かけて15.4-40.8%、15分間かけて40.8-45.9%、3分間かけて45.9-60%；流量：0.1分間かけて118-18 mL/min、4.9分間かけて18-18 mL/min、2分間かけて18-118 mL/min、その後118 mL/min）。凍結乾燥後、以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm 50×150 mm；移動相：A=0.1

% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中)；温度：50℃
 ；グラジエント (%B)：2分間かけて15-15%、1分間かけて15-40%、8分間かけて40-45%、1分間かけて45-60%；流量：1分間かけて20-20 mL/min、1分間かけて20-120 mL/min、その後120 mL/min)。

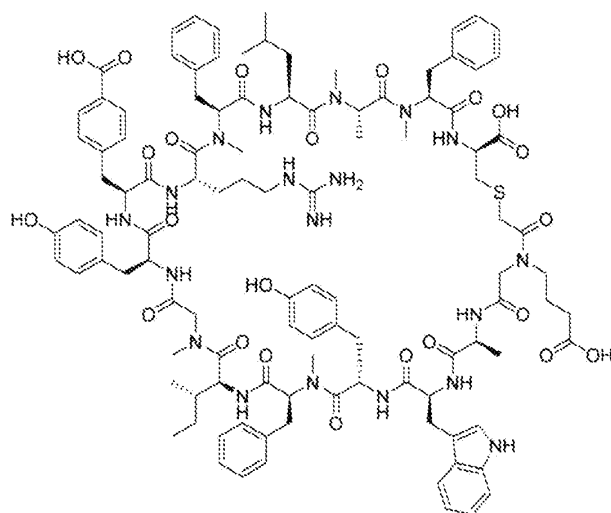
[0245] 分析条件のLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.1%であった。

[0246] 分析条件：保持時間=5.96分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN中)；温度：60℃；グラジエント (% B conc)：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1109.04$ ($M+2H$)²⁺

[0247] 実施例1-2 Myostatin 99 Variant 07 (配列番号3) の合成

[0248] [化34]



- [0249] H-dc (Trt) -Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、0.83 mmol/g、1.20 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。
- [0250] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AAin DMF/0.5 M HATU (DMF中)/1 M DIEA (DMF中) (4.2当量/4当量/8当量) を用い25℃下、30分間1回反応を行った。ただし、4残基目、6残基目、10残基目、12残基目、13残基目については、25℃下、60分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下、5分間2回反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は、前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.1 M ClAcOH (DMF中)/0.1 M HATU (DMF中)/0.2 M DIEA (DMF中) (5当量/5当量/10当量) と25℃下、30分間振盪することにより行った。
- [0251] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器2本に、それぞれ反応剤カクテル (20 mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物) を加え、室温で40分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。
- [0252] この混合物を遠心分離し (9000 rpm、0℃、2 min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体 (ペプチド) を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMと

なるように水／アセトニトリル（１／１）に溶解し、次いで、１０当量のトリエチルアミンを加えて、室温で１２０分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0253] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて33-33%、8分間かけて33-38%、1分間かけて38-60%；流量：1分間かけて20-20 mL/min、2分間かけて20-120 mL/min、その後120 mL/min）。

[0254] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、97.8%であった。

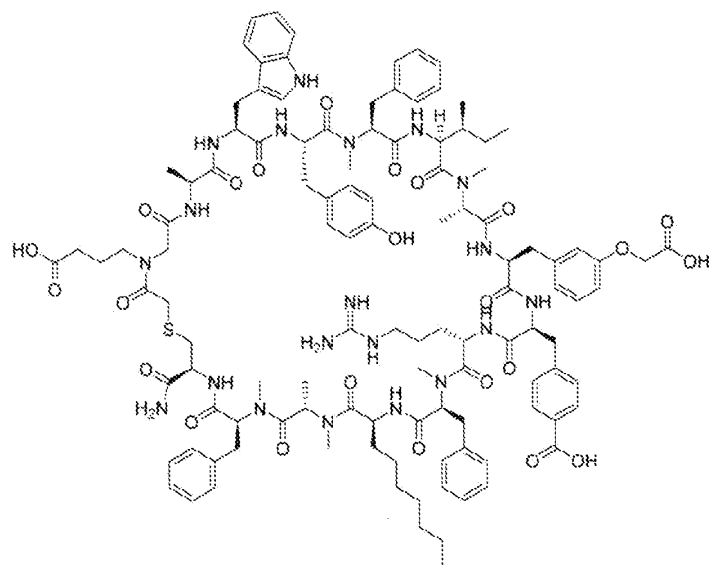
[0255] 分析条件：保持時間=5.04分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z = 1051.58 ($M+2H$)²⁺

[0256] 実施例1-3 Myostatin 99 v196（配列番号67）の合成

[0257]

[化35]



[0258] Sieber amide resin (渡辺化学、0.57 mmol / g、0.22 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社の Liberty Blue を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0259] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用い90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、4残基目、12残基目については、90℃下、10分間2回反応を行った。5残基目については、90℃下、10分間1回反応を行った。6残基目、13残基目については、75℃下、30分間2回反応を行った。10残基目については、50℃下、15分間2回反応を行った。15残基目については、50℃下、15分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と75℃下、3分間1回反応させることで行った。ただし、4残基目、6残基目、10残基目、12残基目、13残基目は25℃下、5分間2回反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固

相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.21M ClAcOH (DMF中) / 0.21M HATU (DMF中) / 0.42M DIEA (DMF中) (5当量/5当量/10当量) と25℃下、30分間振盪することにより行った。

[0260] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル (7 mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物) を加え、室温で35分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。

[0261] この混合物を遠心分離し (9000 rpm、0℃、2分min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体 (ペプチド) を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるように水/アセトニトリル (1/1) に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で21時間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0262] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 50 x 150 mm; 移動相: A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 40℃; グラジエント (%B): 2分間かけて17-17%、1分間かけて17-42%、8分間かけて42-47%、1分間かけて47-60%; 流量: 1分間かけて20-20 mL/min、1分間かけて20-120 mL/min、その後120 mL/min)。

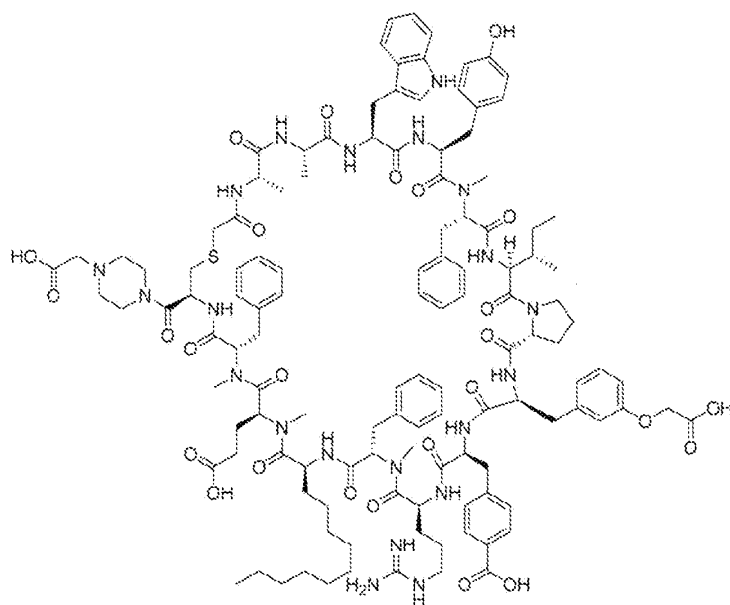
[0263] 分析条件のLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は95.0%であった。

[0264] 分析条件：保持時間=6.12分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150mm、100Å；移動相：A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN中)；温度：60℃；グラジエント (% B conc)：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS (+) 観測値m/z=1108.16 (M+2H)²⁺

[0265] 実施例1-4 Myostatin 99 v309 (配列番号94) の合成

[0266] [化36]



[0267] DCMで膨潤させたCl-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、0.79mmol/g、95mg) を2当量のFmoc-pipzAc-OH のDCM/DMF (9/1) 溶液に懸濁し、DIEAを4当量加え室温で90分間振盪した。過剰量のメタノールを加え30分間振盪した。固相樹脂を

DMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂の一部（ 0.79 mmol/g 、 0.095 g ）を用い、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage社のSyro[®] Iを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0268] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、 0.21 M Fmoc-AA（DMF中）/ 0.5 M HATU（DMF中）/ 1.05 M DIEA（DMF中）（ 4.2 当量/ 4 当量/ 8.4 当量）を用い 25°C 下、 60 分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は 20% ピペリジンのDMF溶液と 25°C 下、 5 分間反応させた後、 10 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、 10 当量のClAcOSuと 25°C 下、 60 分間振盪することにより行った。

[0269] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（ 3 mL 、TFA/ H_2O / TIS / DODT の体積比 $92.5/2.5/2.5/2.5$ の混合物）を加え、室温で 45 分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0°C に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン（ $1/1$ ）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。

[0270] この混合物を遠心分離（ 9000 rpm 、 0°C 、 2 min ）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0°C に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に 2 mM となるようにDMSO/水/アセトニトリル（ $1/1/1$ ）に溶解し、次いで、 10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 30 分間攪拌後、酢酸を加

え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0271] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて13–13%、1分間かけて13–38%、8分間かけて38–43%、1分間かけて43–60%；流量：1分間かけて20–20 mL/min、1分間かけて20–120 mL/min、その後120 mL/min）。

[0272] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、98.9%であった。

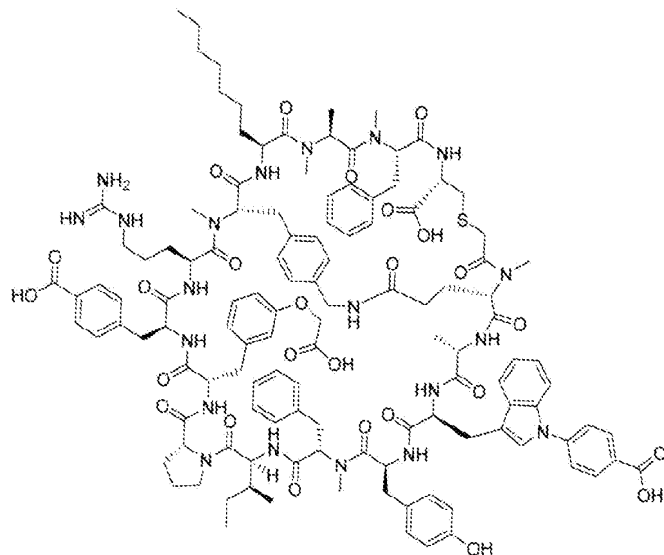
[0273] 分析条件：保持時間=5.22分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20–60%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.55分間かけて95–95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1191.89$ ($M+2H$)²⁺

[0274] 実施例1–5 Myostatin 99 v423（配列番号290）の合成

[0275]

[化37-1]



[0276] DCMで膨潤させたC I-TCP (C I) ProTide Resin (CEM、0.36 mmol/g、0.69 g) を4当量のFmoc-dc (Trt)-OHのDCM/DMF (10/1) 及び8当量のDIEAと120分間浸透した。過剰量のメタノールを加え10分間振盪後、DMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥した。得られた固相樹脂を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blue HTを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0277] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量/8当量/4当量) を用い40℃下、30分間1回反応を行った。ただし、4残基目、6残基目、7残基目、10残基目、12残基目、13残基目については、40℃下、30分間2回反応を行った。1残基目の反応はFmoc-MeE(allyl)-OHを、11残基目の反応はFmoc-MeF4am(allyl)-OHを各々用いた。また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、5分間2回反応

させることで行った。ただし、2 残基目については、25℃下、1 分間2 回反応させた。得られた固相樹脂1 当量に対し、5 当量のFmoc-Osuを60 分間反応させた後、DMFで洗浄した。得られた固相樹脂1 当量を酢酸／DCM（8 mL、2／98）に懸濁し、0.3 当量のPd（PPh₃）₄及び20 当量のフェニルシランを加え60 分間浸透後、DCMで洗浄後、DMFで洗浄した。得られた固相樹脂をDMFに懸濁し、1.2 当量のPyAOP及び5 当量のDIEAと25℃下、60 分間振盪した。DMFで洗浄後、得られた固相樹脂を10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、25 分間反応させDMFで洗浄した。

[0278] Fmoc基が除去されたペプチドが保持された固相樹脂を、0.16 M ClAcOH（DMF中）／0.16 M HATU（DMF中）／0.32 M DIEA（DMF中）（5 当量／5 当量／10 当量）と25℃下、60 分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。

[0279] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5 回と塩化メチレンで3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（14 mL、TFA／H₂O／TIS／DODTの体積比92.5／2.5／2.5／2.5の混合物）を加え、室温で40 分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル／ヘキサン（1／1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。

[0280] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に1.4 mMとなるように水／アセトニトリル（1／1）に溶解し、次いで、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で60 分間攪拌後、酢酸を加え反応をク

エンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液を Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。

[0281] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて38–38%、8分間かけて38–43%、1分間かけて43–60%；流量：1分間かけて20–20 mL/min、2分間かけて20–120 mL/min、その後120 mL/min）。

[0282] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は95.0%であった。

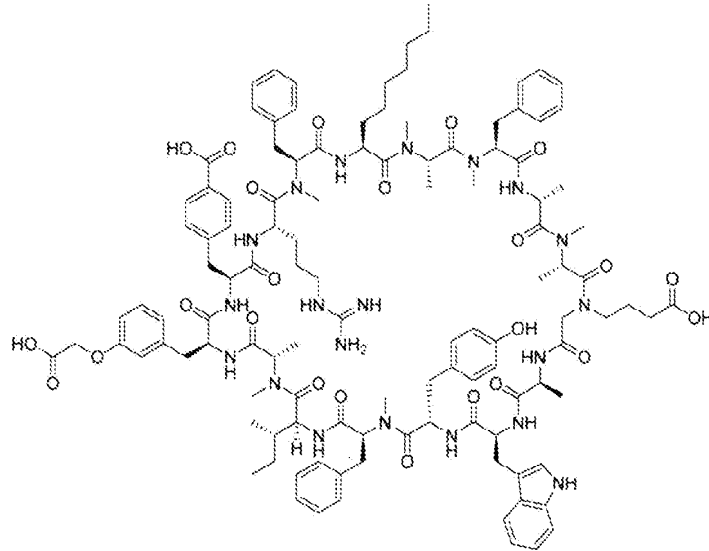
[0283] 分析条件：保持時間=5.87分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20–60%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.55分間かけて95–95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1180.10$ ($M+2H$)²⁺

[0284] 実施例1–6 Myostatin 99 v450（配列番号302）の合成

[0285]

[化37-2]



[0286] H-A-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、0.83 mmol / g、0.15 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用いた。

[0287] Fmoc基の脱保護は、10%ピロリジンのDMF溶液を用いて行った。さらに、以下の表1に記載の条件に従って、ペプチドを伸長した。

[0288]

[表1]

固相合成 導入順序	残基番号	Fmocアミノ酸	カップリング 反応条件	Fmoc脱保護条件
1	1	Fmoc-CrpG(tBu)-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
2	16	Fmoc-MeA-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
3	15	Fmoc-da-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
4	14	Fmoc-MeF-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
5	13	Fmoc-MeA-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
6	12	Fmoc-Ano-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
7	11	Fmoc-MeF-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
11	7	Fmoc-MeA-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
12	6	Fmoc-I-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
13	5	Fmoc-MeF-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50℃、15分、2回	25℃、1分、2回
15	3	Fmoc-W(Boc)-OH	50℃、15分、1回	25℃、1分、2回

[0289] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（4 mL、HFIP/DCMの体積比20/80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。

[0290] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMFに溶解し、次いで、1.2当量のHATU及び3当量のト

リエチルアミンを加えて、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-1 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0291] 得られた残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄後、ジエチルエーテルで洗浄し減圧下乾燥した。得られた残渣を反応剤カクテル（4 mL、TFA/TIS/H₂Oの体積比95/2.5/2.5の混合物）に溶かし、15分間振盪した。得られた反応液をジエチルエーテルに加え、沈殿物が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0292] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm 50×150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて18→18%、1分間かけて18→43%、8分間かけて43→48%、1分間かけて48→60%；流量：1分間かけて20→20 mL/min、1分間かけて20→120 mL/min、その後120 mL/min）。

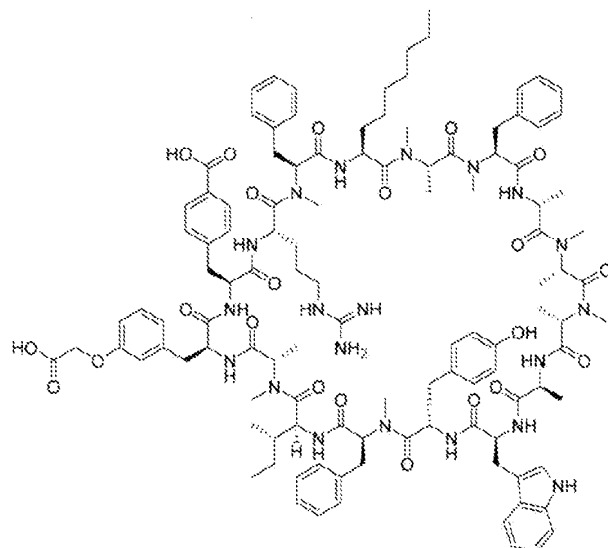
[0293] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は92.0%であった。

[0294] 分析条件：保持時間=5.88分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20→60%、その後0.3分間かけて60→95%、その後1.55分間かけて95→95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1106.21$ ($M+2H$)²⁺

[0295] 実施例1-7 Myostatin 99 v456（配列番号308）の合成

[0296] [化38]



[0297] DCMで膨潤させたC I-TCP (C I) ProTide Resin (CEM、1.08 mmol/g、0.56 g)を0.5当量のFmoc-Oda-OHのDCM/DMF (5/1)及び1.5当量のDIEAと60分間浸透した。過剰量のメタノールを加え10分間振盪後、DMF、DCM、ジエチルエーテルで順次洗浄後、減圧下乾燥した。得られた固相樹脂の一部を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量/8当量/4当量)を用いた。

[0298] Fmoc基の脱保護は、10%ピロリジンのDMF溶液を用いて行った。以下の表2の記載の条件に従って、ペプチドを伸長した。

[0299]

[表2]

固相合成 導入順序	残基番号	Fmocアミノ酸	カップリング 反応条件	Fmoc脱保護条件
1	15	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
2	14	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
3	13	Fmoc-Ano-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
4	12	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
5	11	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
6	10	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
7	9	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
8	8	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
9	7	Fmoc-I-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
10	6	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
11	5	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
12	4	Fmoc-W(Boc)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
13	3	Fmoc-A-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
14	2	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
15	1	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
16	16	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回

[0300] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（6 mL、HFIP/DCMの体積比20/80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0°Cに冷やした過剰のジイソプロピルエーテルの混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0°C、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0°Cに冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5 mMとなるようにDMFに溶解し、次いで、1当量

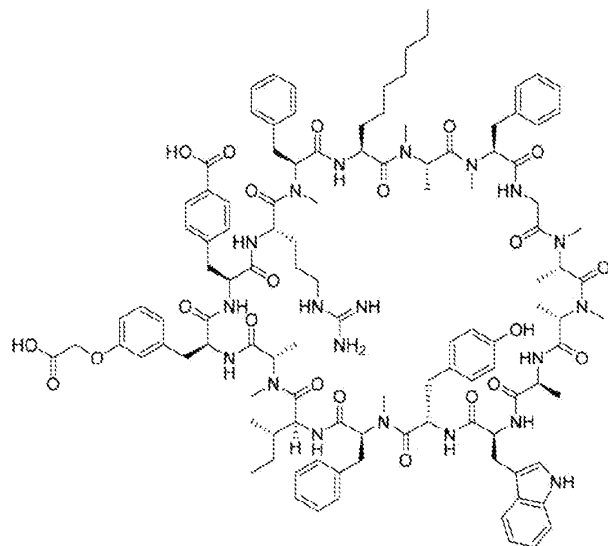
のHATU及び5当量のトリエチルアミンを加えて、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。

- [0301] 得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄し減圧下乾燥した。得られた残渣を反応剤カクテル(5 mL、TFA/TIS/H₂Oの体積比95/2.5/2.5の混合物)に溶かし、20分間振盪した。得られた反応液をジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)に加え、沈殿物が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm、0℃、2 min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。
- [0302] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した(カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μm 50×250 mm; 移動相: A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 50℃; グラジエント(%B): 0.1分間かけて22.5-20%、4.9分間かけて20-20%、2分間かけて20-22.5%、3分間かけて22.5-48%、15分間かけて48-53%、3分間かけて53-60%; 流量: 0.1分間かけて118-18 mL/min、4.9分間かけて18-118 mL/min、その後118 mL/min)。
- [0303] 分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は94.4%であった。
- [0304] 分析条件: 保持時間=7.08分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å; 移動相: A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN中); 温度: 60℃; グラジエント(% B conc): 7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min
ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1077.06$ (M+2H)²⁺

[0305] 実施例 1-8 Myostatin 99 v455 (配列番号 307)

の合成

[0306] [化39]



[0307] H-G-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、0.86 mmol / g、0.15 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 0.5 M HATU (DMF中) / 1 M DIEA (DMF中) (4.2当量 / 4当量 / 8当量) を用いた。Fmoc基の脱保護は、10%ピロリジンのDMF溶液を用いた。以下の表3の記載に従って、ペプチドを伸長した。

[0308]

[表3]

固相合成 導入順序	残基番号	Fmocアミノ酸	カップリング 反応条件	Fmoc脱保護条件
1	14	Fmoc-MeF-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
2	13	Fmoc-MeA-OH	25°C、30分、2回	25°C、1分、2回
3	12	Fmoc-Ano-OH	25°C、30分、2回	25°C、1分、2回
4	11	Fmoc-MeF-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
5	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	25°C、30分、2回	25°C、1分、2回
6	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
7	8	Fmoc-F3aap(tBu)-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
8	7	Fmoc-MeA-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
9	6	Fmoc-I-OH	25°C、30分、2回	25°C、1分、2回
10	5	Fmoc-MeF-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
11	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	25°C、30分、2回	25°C、1分、2回
12	3	Fmoc-W(Boc)-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
13	2	Fmoc-A-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
14	1	Fmoc-MeA-OH	25°C、30分、1回	25°C、1分、2回
15	16	Fmoc-MeA-OH	25°C、30分、2回	25°C、1分、2回

[0309] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（6 mL、HFIP/DCMの体積比20/80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。濾液を減圧下濃縮後、ジイソプロピルエーテルを加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0°C、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0°Cに冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5 mMとなるようにDMFに溶解後、1当量のHATU及び5当量のトリエチルアミンを加えて、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチするこ

とにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0310] 得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄し減圧下乾燥した。得られた残渣を反応剤カクテル（5 mL、TFA/TIS/H₂Oの体積比95/2.5/2.5の混合物）に溶かし、20分間振盪した。得られた反応液をジイソプロピルエーテル/ヘキサン（1/1）に加え、沈殿物が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0311] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm 50×150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて22→22%、1分間かけて22→47%、8分間かけて47→52%、1分間かけて52→60%；流量：1分間かけて20→20 mL/min、1分間かけて20→120 mL/min、その後120 mL/min）。

[0312] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は97.5%であった。

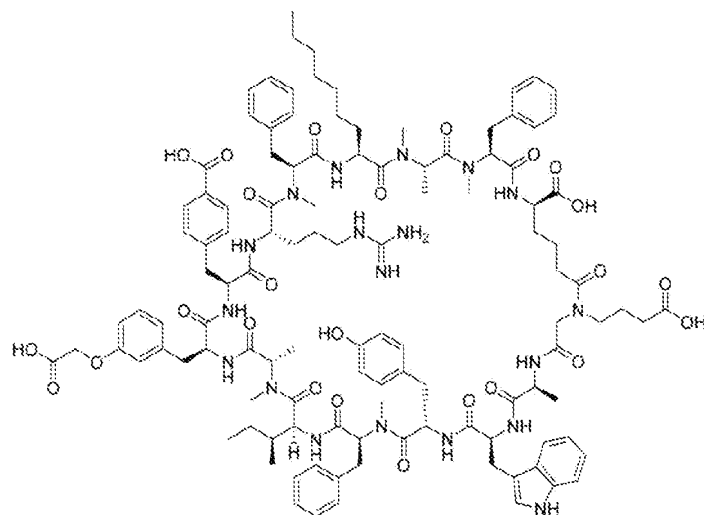
[0313] 分析条件：保持時間=3.44分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて40→80%、その後0.3分間かけて80→95%、その後1.55分間かけて95→95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1070.05$ ($M+2H$)²⁺

[0314] 実施例1-9 Myostatin 99 v434（配列番号291）の合成

[0315]

[化40-1]



[0316] DCMで膨潤させたCl-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、1.35 mmol/g、0.37 g) を4当量のFmoc-dhgl-OtBuのDCM/DMF (30 mL、4/1) 溶液に懸濁し、DIEAを8当量加え室温で180分間振盪した。過剰量のメタノールを加え30分間振盪した。固相樹脂をDMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂の一部 (0.90 mmol/g、0.27 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0317] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 0.5 M HATU (DMF中) / 1 M DIEA (DMF中) (4.2当量/4当量/8当量) を用い、25℃下、30分間1回反応を行った。ただし、4残基目、6残基目、10残基目、12残基目、13残基目については、25℃下、30分間2回反応を行った。Fmoc除去は、10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、1分間2回反応させることで行った。

[0318] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化

メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（10 mL、HFIP／DCMの体積比20／80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。濾液を減圧下濃縮後、ジイソプロピルエーテルを加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMFに溶解し、次いで、1.2当量のHATU及び6当量のトリエチルアミンを加えて、室温で20分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄し減圧下乾燥した。得られた残渣を反応剤カクテル（5 mL、TFA／H₂Oの体積比97.5／2.5の混合物）に溶かし、30分間振盪した。得られた反応液を減圧下濃縮し乾燥させた。

[0319] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm 50×250 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて16.4－13.3%、4.9分間かけて13.3－13.3%、2分間かけて13.3－16.4%、3分間かけて16.4－41.9%、15分間かけて41.9－46.9%、3分間かけて46.9－60%；流量：0.1分間かけて118－18 mL/min、4.9分間かけて18－18 mL/min、2分間かけて18－118 mL/min、その後118 mL/min）。

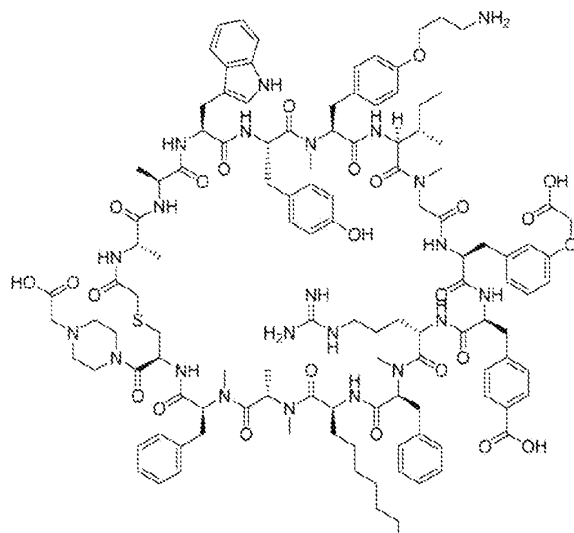
[0320] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は97.7%であった。

[0321] 分析条件：保持時間＝5.82分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A＝0.025% TFA（水中）、B＝0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%、その後0.3分間かけて60－95%、その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z ＝1099.58（ $M+2H$ ）²⁺

[0322] 実施例1-10 Myostatin 99 v302（配列番号195）の合成

[0323] [化40-2]



[0324] DCMで膨潤させたCl-Trt（2-Cl）resin（渡辺化学、0.79 mmol/g、4.1 g）を2当量のFmoc-pipzAc-OHのDCM/DMF（9/1）溶液に懸濁し、DIEAを4当量加え室温で90分間振盪した。過剰量のメタノールを加え30分間振盪した。固相樹脂をDMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂の一部（0.79 mmol/g、0.095 g）を用い、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage社のSyro 1を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

- [0325] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA (DMF中) / 0.5M HATU (DMF中) / 1.1M DIEA (DMF中) (4.2当量 / 4当量 / 8.4当量) を用い、25℃下、60分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下、5分間反応させた後、10分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、10当量のClAcOSuと25℃下、60分間振盪することにより行った。
- [0326] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル (3 mL、TFA / H₂O / TIS / DODTの体積比92.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5の混合物) を加え、室温で45分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジソプロピルエーテル / ヘキサン (1 / 1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。
- [0327] この混合物を遠心分離し (9000 rpm、0℃、2 min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体 (ペプチド) を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に2 mMとなるようにDMSO / 水 / アセトニトリル (1 / 1 / 1) に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。得られた残渣をDMF (5 mL) に溶解し、0.05当量のPd (PPh₃)₄、0.1 mLのピペリジン、20当量のジメチルアミンボラン (CAS 74-94-2)

を加え室温で150分間振盪した。

[0328] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） C18 5 μ m 19 x 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（%B）：3分間かけて5-30%、8分間かけて30-35%、1分間かけて35-60%；流量：17 mL/min）。

[0329] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は99.6%であった。

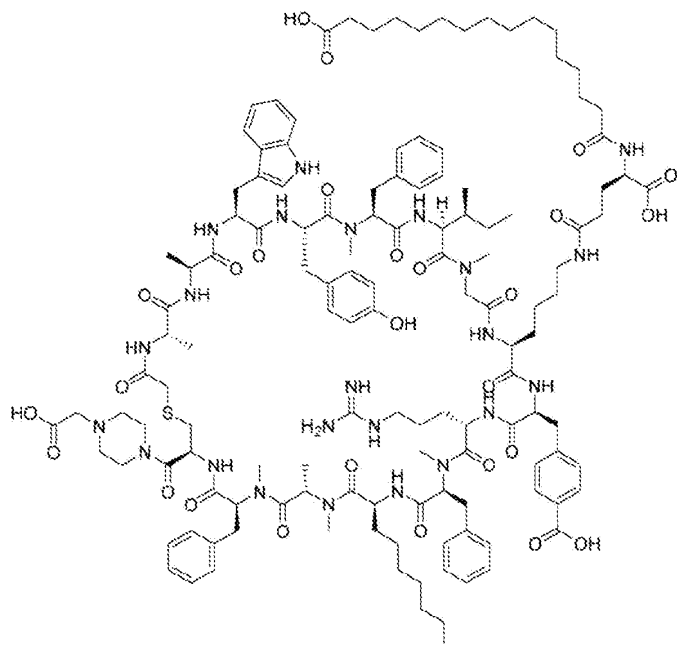
[0330] 分析条件：保持時間=3.90分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 777.2$ ($M+3H$)³⁺

[0331] 実施例1-11 Myostatin 99 v292（配列番号189）の合成

[0332]

[化41]



[0333] DCMで膨潤させたHMPB-MBHA resin (Novabiochem、0.92mmol/g、0.14g)を4当量のFmoc-pipzAc-OH及び0.4当量のDCM/DMF (9/1)溶液に懸濁し、DICを4当量加え室温で60分間振盪した。固相樹脂を1% DIEA含有DMF、DMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLivity Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0334] 15残基目から8残基目までの各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA (DMF中) / 1M DIC (DMF中) / 0.5M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量)を用い、90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、10残基目、15残基目については、50℃下、15分間2回反応を行った。12残基目については、75℃下、30分間2回反応を行った。13残基目、14残基目に

については、90℃下、10分間2回反応を行った。8残基目の反応には、 AlloC-K(Fmoc)-OH を用いた。8残基目の側鎖からの伸長反応については、90℃下、10分間1回反応させた。 Fmoc-de-OtBu を導入した後、Fmoc基の除去後、 HO-cC14COO-tBu を導入した。また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、1分間2回反応させることで行った。得られた固相樹脂を1%HFIP含有ジクロロメタンに懸濁し、0.2当量のPd(PPh₃)₄及び10当量のフェニルシランを加え、室温で60分間振盪後、ジクロロメタン、DMFで洗浄した。

[0335] 得られた固相樹脂に対し、7残基目から1残基目までの各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA (DMF中) / 1M DIC (DMF中) / 0.5M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用い90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、4残基目については、90℃下、10分間2回反応を行った。6残基目、7残基目については、75℃下、30分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、1分間2回反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、10当量のClAcOSuのDMF溶液(6mL)と25℃下、60分間振盪することにより行った。

[0336] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル(7mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で40分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル／

ヘキサン（1／1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。

[0337] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO／水／アセトニトリル（1／2／2）に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で300分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0338] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XBridge（登録商標） C18 5 μm 50×150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて18→18%、1分間かけて18→43%、8分間かけて43→48%、1分間かけて48→60%；流量：1分間かけて20→20 mL/min、1分間かけて20→120 mL/min、その後120 mL/min）。

[0339] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は97.9%であった。

[0340] 分析条件：保持時間=5.90分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20→60%、その後0.3分間かけて60→95%、その後1.55分間かけて95→95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1281.0$ ($M+2H$)²⁺

[0341] 実施例2 ペプチドの分析

上記の一般的な方法に従い、目的のペプチドを合成した。

[0342]

[0343] [表4-2]

[illegible]

[表4-3]

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0345]

での観測値を記載した。terminusはC末端の官能基（表中、「—OH」はCOOHを、「—NH₂」はCO(NH₂)を示す）を示し、記載がない場合はC末端に官能基が存在しないことを示す。また、表中の「Cyclization」について、ClAcの記載があるものはクロロアセチル基を導入した1番目のアミノ酸とC末端に存在するCysとを結合させ環状化したことを示し、「covalent」とは、1番目のアミノ酸のN末端アミノ基と15番目又は16番目のアミノ酸のC末端カルボキシル基が結合していることを示す。なお、この場合において(@)は側鎖末端官能基が1番目のアミノ酸のアミノ基と結合しているものを示す。また、表中のAdditional/Linkerは、配列番号295—310を除き、環状構造に含まれないリンカー又は付加的なアミノ酸を示し、例えばMyostatin__99__v31（配列番号4）では、X1—X15のアミノ酸配列が環状構造を取り、そのC末端X15のdcからさらにG—de—G—dkというアミノ酸配列がリンカーとして付加されていることを示す。

[0347] また、配列番号238—290のペプチドについては、(@)と記載のあるアミノ酸残基の側鎖同士が結合して架橋構造を有することを示す。

[0348] さらに、配列番号187—191については以下を示す；Myostatin__99__v288（配列番号187）については、1番目のKの側鎖末端NH₂と、deの側鎖末端カルボキシル基が結合し、さらに当該deのアミノ基からcC14COOが結合しており、その末端がOHであることを示す。Myostatin__99__v290（配列番号188）については、13番目のMeKの側鎖末端NH₂と、deの側鎖末端カルボキシル基が結合し、さらに当該deのアミノ基からcC14COOが結合しており、その末端がOHであることを示す。Myostatin__99__v292（配列番号189）については、8番目のKの側鎖末端NH₂と、deの側鎖末端カルボキシル基が結合し、さらに当該deのアミノ基からcC14COOが結合しており、その末端がOHであることを示す。Myostatin__99__v295（配列番号190）については、1番目のKの側鎖末端NH₂と、d

eの側鎖末端カルボキシル基が結合し、さらに当該d eのアミノ基からc C 1 6 C O Oが結合しており、その末端がOHであることを示す。My o s t a t i n__9 9__v 2 9 6（配列番号1 9 1）については、1 3番目のMe Kの側鎖末端NH₂と、d eの側鎖末端カルボキシル基が結合し、さらに当該d eのアミノ基からc C 1 6 C O Oが結合しており、その末端がOHであることを示す。

[0349] また、配列番号2 9 1－2 9 4については以下を示す。My o s t a t i n__9 9__v 4 3 4（配列番号2 9 1）については、1番目のC r p GのN末端アミノ基と1 5番目のd h g lの側鎖末端カルボキシ基が結合し環状構造をとり、当該1 5番目のd h g lのC末端カルボキシ基は置換されず－C O O Hのままである。同様に、配列番号2 9 2－2 9 4のペプチドについては、1番目のC r p GのN末端アミノ基と1 5番目のd h g l、H g l、M e H g l、M e d h g lのいずれかの側鎖末端カルボキシ基が結合し環状構造をとり、当該1 5番目のアミノ酸のC末端カルボキシ基は置換されず－C O O Hのままである。

[0350] また、配列番号2 9 5－3 1 0については以下を示す。My o s t a t i n__9 9__v 4 4 3（配列番号2 9 5）については、1番目のC r p GのN末端アミノ基と1 6番目のM e AのC末端カルボキシル基が結合し環状構造をとり、付加的なアミノ酸は含まれない。同様に、配列番号2 9 6－3 1 0のペプチドについては、1番目のC r p G又はM e AのN末端アミノ基と、1 6番目のM e d a、G、d a、M e G、M e A、P、AのC末端のカルボキシ基が結合し環状構造をとる。

[0351] また、配列番号3 1 0－3 1 4については以下を示す。My o s t a t i n__9 9__v 4 5 9（配列番号3 1 1）1番目のC r p GのN末端アミノ基と1 5番目のA e o a cのC末端カルボキシル基が結合し環状構造をとり、付加的なアミノ酸は含まれない。同様に、配列番号3 1 1－3 1 4のペプチドについては、1番目のC r p GのN末端アミノ基と、1 5番目のA e o a c、A p e、M e A e o a c、M e A p eのC末端のカルボキシ基が結合し

環状構造をとる。

[0352] 実施例3 Hep G2細胞株におけるミオスタチンシグナルのレポーター
ジーンアッセイによる *in vitro* 活性評価

本実施例では、Hep G2細胞株におけるミオスタチンシグナルのレポータージーンアッセイを用いて、実施例1及び2で合成したペプチドについて、*in vitro*のミオスタチン阻害効果を評価した。

[0353] 評価方法(1)

96ウェルプレート(167008、Thermo)で10%FBS(10270106、Gibco)及びゲンタマイシン50 μ g/mL(11980-14、Nacalai Tesque)を含有するEMEM(055-08975、Wako Industries)で培養したHep G2細胞株(HB-8065、ATCC)を2.0 $\times$ 10⁴細胞/ウェルで播種し、CO₂インキュベーター(37℃、5%CO₂)で24時間培養した。これに、CAGAリピートを12個連結したプロモータ配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpGL3ベクター(E1751、Promega)であるpGL3(CAGA)₁₂-Lucプラスミドを、トランスフェクション試薬(X-treamGENE9 DNA Transfection Reagent、6365809001、Roche)とともに、0.04 μ g/ウェルの濃度で添加した。細胞株を、CO₂インキュベーター(37℃、5%CO₂)で24時間培養し、トランスフェクションを行った。培地を廃棄し、50 μ L/ウェルの0.1%ウシ血清アルブミン(A7030、Sigma)、ゲンタマイシン50 μ g/mLを含有するEMEMに交換し、CO₂インキュベーター(37℃、5%CO₂)で2時間培養した。

[0354] ミオスタチン(788-G8/C、R&D systems)又はGDF-11(1958-GD-G8/CF、R&D systems)を、最終濃度が表5に記載の濃度になるように添加した。

[0355]

[表5]

	ミオスタチン	GDF-11
Method A	10 ng/mL	10 ng/mL
Method B	1 ng/mL	1 ng/mL
Method C	1.5 ng/mL	1 ng/mL
Method D	1.5 ng/mL	1.5 ng/mL

- [0356] 実施例1及び2で合成した各種ペプチドを0.006-100nmol/L (myostatin阻害)及び0.12-2000nmol/L (GDF-11阻害)となるよう4倍段階希釈系列を添加した。このときミオスタチン、GDF-11及びペプチドのいずれも添加しないブランクウェルも用意し、20-24時間CO₂インキュベーター(37℃、5%CO₂)で培養した。
- [0357] 細胞の培地を除去し、PBS(14190144、Thermo)と発色基質One-Glo Luciferase Assay System(E6120、Promega)を1:1で混和した液を100μL/ウェルで各ウェルに添加した。これを、プレートシェーカーで5分間攪拌し、384ウェルプレート(3570、Corning)に20μL/ウェルの量で移した。
- [0358] 1,000×gで1分間遠心しプレートリーダー(Envision 2104、PerkinElmer)で発光シグナル(700nm luminescence)を測定した。測定値に基づき、ソフトウェアを用いてペプチドのIC₅₀値を算出した(Prism 9、GraphPad)。結果を表6に示す。
- [0359]

[表6-1]

SEQ ID No	Peptide Name	IC50 (Luciferase) Myostatin HepG2 (nM)	IC50 (Luciferase) GDF-11 HepG2 (nM)	Selectivity	Method
3	Myostatin_99_Variant_07	26.2	1047	40	A
4	Myostatin_99_v31	54.7	1342	25	A
5	Myostatin_99_v41	63.7	1631	26	A
6	Myostatin_99_v43	33.2	1993	60	A
7	Myostatin_99_v44	8.4	810	96	A
8	Myostatin_99_v45	12.8	332	26	A
9	Myostatin_99_v46	43.2	1536	36	A
10	Myostatin_99_Variant_20-OH	44.8	2014	45	A
11	Myostatin_99_Variant_21-OH	106.1	4316	41	A
12	Myostatin_99_v83	20.9	3011	144	A
13	Myostatin_99_v84	27.3	3046	112	A
14	Myostatin_99_v85	13.5	3374	250	A
15	Myostatin_99_v86	10.4	1651	159	A
16	Myostatin_99_v91	72.3	7378	102	A
17	Myostatin_99_v92	76.1	3663	50	A
18	Myostatin_99_v96	88.8	26259	296	A
19	Myostatin_99_v107	2.8	466	166	A
20	Myostatin_99_v108	3.6	374	104	A
21	Myostatin_99_v109	25.6	3842	150	A
22	Myostatin_99_v110	9.5	1695	178	A
23	Myostatin_99_v116	5.4	1993	364	A
24	Myostatin_99_v117	1.7	713	419	A
25	Myostatin_99_v118	23.1	4034	175	A
26	Myostatin_99_v123	36.1	7394	194	A
27	Myostatin_99_v124	17.1	2268	133	A
28	Myostatin_99_v135	22.6	3286	145	A
29	Myostatin_99_v144	16.3	2759	169	A
30	Myostatin_99_v145	1.6	414	259	A
31	Myostatin_99_v148	1.5	439	293	A
32	Myostatin_99_v150	1.7	395	232	A
33	Myostatin_99_v153	1.2	267	222	A
34	Myostatin_99_v156	69.0	4811	70	A
35	Myostatin_99_v158	62.0	6456	104	A
36	Myostatin_99_v159	3.9	404	104	A
37	Myostatin_99_v160	3.2	350	109	A
38	Myostatin_99_v161	8.2	1241	151	A
39	Myostatin_99_v162	6.1	90	15	A
40	Myostatin_99_v163	3.6	1004	279	A
41	Myostatin_99_v164	4.2	1343	320	A
42	Myostatin_99_v165	14.0	1240	89	A
43	Myostatin_99_v166	3.5	951	272	A
44	Myostatin_99_v167	4.5	214	48	A

[0360]

[表6-2]

45	Myostatin_99_v166	2.1	119	57	A
46	Myostatin_99_v169	1.2	372	310	A
47	Myostatin_99_v170	3.3	215	65	A
48	Myostatin_99_v171	44.7	909	20	A
49	Myostatin_99_v172	5.1	173	34	A
50	Myostatin_99_v173	5.5	232	42	A
51	Myostatin_99_v174	1.7	226	133	A
52	Myostatin_99_v175	16.4	399	24	A
53	Myostatin_99_v176	17.3	377	22	A
54	Myostatin_99_v178	12.1	250	21	A
55	Myostatin_99_v179	1.5	163	108	A
56	Myostatin_99_v181	4.5	194	43	A
57	Myostatin_99_v182	53.0	1356	26	A
58	Myostatin_99_v184	14.2	1834	129	A
59	Myostatin_99_v186	43.2	935	22	A
60	Myostatin_99_v188	55.4	911	16	A
61	Myostatin_99_v189	6.9	234	34	A
62	Myostatin_99_v191	8.1	283	35	A
63	Myostatin_99_v192	12.1	2060	170	A
64	Myostatin_99_v193	1.0	57	57	A
65	Myostatin_99_v194	1.2	139	116	A
66	Myostatin_99_v195	1.3	255	196	A
67	Myostatin_99_v196	3.4	603	177	A
68	Myostatin_99_v197	3.4	438	129	A
69	Myostatin_99_v198	0.7	90	123	A
70	Myostatin_99_v199	1.2	159	133	A
71	Myostatin_99_v200	1.0	233	233	A
72	Myostatin_99_v201	8.6	2257	262	A
73	Myostatin_99_v207	3.5	270	77	A
74	Myostatin_99_v209	5.4	794	147	A
75	Myostatin_99_v211	1.1	232	211	A
76	Myostatin_99_v212	3.3	278	84	A
77	Myostatin_99_v214	6.6	1324	201	A
78	Myostatin_99_v215	1.9	202	106	A
79	Myostatin_99_v217	3.0	696	232	A
80	Myostatin_99_v219	2.7	313	116	A
81	Myostatin_99_v226	10.2	3992	391	A
82	Myostatin_99_v227	20.8	583	33	A
83	Myostatin_99_v230	57.1	8375	147	A
84	Myostatin_99_v244	17.7	13647	771	A
85	Myostatin_99_v248	21.5	3525	164	A
86	Myostatin_99_v249	0.5	119	237	A
87	Myostatin_99_v253	5.7	2439	428	A

[0361]

[表6-3]

88	Myostatin_99_v254	3.6	3314	921	A
89	Myostatin_99_v255	1.6	191	119	A
3	Myostatin_99_Variant_07	26.2	1047	40	A
30	Myostatin_99_v145	1.6	414	259	A
90	Myostatin_99_v221	0.9	72	80	A
91	Myostatin_99_v261	0.16	29.00	181	B
92	Myostatin_99_v265	0.10	5.30	55	B
93	Myostatin_99_v298	0.11	6.80	62	B
94	Myostatin_99_v309	0.09	25.00	287	B
95	Myostatin_99_v315	0.10	56.81	541.6	B
96	Myostatin_99_v316	0.37	89.70	239.8	B
97	Myostatin_99_v335	0.32	46.65	145.0	B
98	Myostatin_99_v338	0.38	114.30	299.8	B
99	Myostatin_99_v339	0.89	128.20	144.7	B
100	Myostatin_99_v341	0.76	131.90	173.9	B
101	Myostatin_99_v344	0.08	62.30	812.6	C
102	Myostatin_99_v346	0.09	19.49	116.0	C
103	Myostatin_99_v343	0.10	14.29	137.1	C
104	Myostatin_99_v372	0.09	7.08	76.611	D
105	Myostatin_99_v381	0.05	0.74	16.294	D
106	Myostatin_99_v382	0.04	29.56	711.775	D
107	Myostatin_99_v383	0.18	40.45	220.797	D
108	Myostatin_99_v384	0.04	32.75	805.658	D
109	Myostatin_99_v385	0.17	42.52	251.449	D
238	Myostatin_99_v358	0.17	52.83	310.4	D
239	Myostatin_99_v367	0.15	116.60	757.1	D
240	Myostatin_99_v386	0.19	55.05	294.1	D
241	Myostatin_99_v393	0.12	20.84	181.1	D
242	Myostatin_99_v394	0.06	2.51	43.0	D
243	Myostatin_99_v395	0.34	49.20	144.7	D
244	Myostatin_Myostatin-00002930	2.19	194.00	98.7	D
245	Myostatin_Myostatin-00002934	0.15	23.99	164.2	D
246	Myostatin_99_v407	0.05	2.84	51.8	D
247	Myostatin_99_v411	0.05	5.30	100.0	D
248	Myostatin_99_v413	0.09	9.42	105.1	D
249	Myostatin_99_v415	0.05	2.03	37.3	D
250	Myostatin_99_v417	0.08	6.42	82.2	D
251	Myostatin_99_v418	0.22	29.62	136.2	D
252	Myostatin_99_v419	0.06	22.24	384.0	D
253	Myostatin_99_v421	0.07	5.08	72.9	D
254	Myostatin_99_v422	0.06	30.87	482.9	D
255	Myostatin_99_v424	0.04	15.23	422.5	D
256	Myostatin_99_v425	0.02	4.10	166.3	D
257	Myostatin_99_v426	0.05	8.28	163.5	D
258	Myostatin_99_v383	0.15	57.79	385.0	D

[0362] 評価方法（２） ２濃度アッセイによる評価

CAGAリピートを12個連結したプロモータ配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpGL3ベクター（E1751、Promega）であるpGL3（CAGA）₁₂-Lucプラスミドを、HepG2細胞株（H B-8065、ATCC）にトランスフェクションした。HepG2細胞株

(HB-8065、ATCC)の培養については、評価方法(1)と同様に行った。

[0363] ミオスタチン(788-G8/CF、R&D systems)又はGDF-11(1958-GD-G8/CF、R&D systems)を、最終濃度10 ng/mLで添加し、実施例1及び2で合成した各種ペプチドを、myostatin阻害測定用及びGDF-11阻害測定用に、30 nmol/L又は100 nmol/L()となるように添加した。このときミオスタチン、GDF-11及びペプチドのいずれも添加しないブランクウェルも用意し、20-24時間、CO₂インキュベーター(37℃、5%CO₂)で培養した。

[0364] 細胞の培地を除去し、PBS(14190144、Thermo)と発色基質One-Glo Luciferase Assay System(E6120、Promega)を1:1で混和した液を100 µL/ウェルで各ウェルに添加した。これを、プレートシェーカーで5分間攪拌し、384ウェルプレート(3570、Corning)に20 µL/ウェルの量で移した。

[0365] 1,000×gで1分間遠心しプレートリーダー(Envision 2104、PerkinElmer)で発光シグナル(700 nm luminescence)を測定した。その測定結果に基づき、各ペプチド濃度での阻害率を算出した。結果を表7に示す。

[0366]

[表7-1]

SEQ ID No.	Peptide Name	Myostatin Inhibition		GDF11 Inhibition	
		30nM	100nM	30nM	100nM
110	Myostatin_Myostatin_000099	56%	87%	0%	19%
111	Myostatin_000099_01meA	55%	82%	0%	0%
112	Myostatin_000099_15meC	50%	75%	0%	4%
113	Myostatin_000099_15dc	69%	89%	0%	12%
114	Myostatin_000099_16Dap	56%	83%	0%	11%
115	Myostatin_000099_02Dap	50%	82%	0%	2%
116	Myostatin_000099_16de	50%	82%	0%	3%
117	Myostatin_000099_02K	35%	73%	0%	0%
118	Myostatin_000099_02E	58%	83%	0%	9%
119	Myostatin_000099_01Dap	18%	62%	0%	0%
120	Myostatin_000099_01ApG	19%	65%	0%	0%
121	Myostatin_000099_02A	64%	89%	0%	5%
122	Myostatin_99_2da_15dc_NH2	94%	98%	15%	48%
123	Myostatin_99_Variant_06	40%	65%	0%	0%
124	Myostatin_99_Variant_08	72%	92%	7%	22%
125	Myostatin_99_Variant_09	65%	90%	0%	11%
126	Myostatin_99_Variant_10	60%	89%	11%	29%
127	Myostatin_99_Variant_11	75%	94%	22%	26%
128	Myostatin_99_Variant_13	51%	76%	8%	12%
129	Myostatin_99_Variant_14	41%	73%	0%	1%
130	Myostatin_99_Variant_15	54%	84%	0%	0%
131	Myostatin_99_Variant_16	34%	75%	0%	4%
132	Myostatin_99_Variant_17	37%	72%	0%	14%
133	Myostatin_99_Variant_18	56%	80%	0%	0%
134	Myostatin_99_Variant_20	62%	89%	0%	0%
135	Myostatin_99_Variant_21	40%	76%	0%	0%
136	Myostatin_99_Variant_22	45%	72%	0%	0%
137	Myostatin_99_Variant_23	32%	71%	0%	0%
138	Myostatin_99_Variant_24	1%	54%	0%	0%
139	Myostatin_99_Variant_25	20%	50%	0%	0%
140	Myostatin_99_Variant_26	26%	50%	0%	0%
141	Myostatin_99_v27	24%	54%	0%	0%
142	Myostatin_99_v28	69%	92%	0%	20%
143	Myostatin_99_v29	57%	81%	0%	0%
144	Myostatin_99_v30	31%	60%	0%	0%
145	Myostatin_99_v34	65%	89%	0%	32%
146	Myostatin_99_v35	95%	100%	13%	36%
147	Myostatin_99_v36	92%	98%	2%	18%
148	Myostatin_99_v37	69%	88%	0%	0%
149	Myostatin_99_v38	40%	80%	0%	11%
150	Myostatin_99_v39	39%	79%	0%	11%
151	Myostatin_99_v40	39%	67%	0%	0%
152	Myostatin_99_v60	25%	51%	7%	5%
153	Myostatin_99_v102	60%	81%	0%	0%
154	Myostatin_99_v113	36%	70%	0%	0%

[0367]

[表7-2]

155	Myostatin 99 v119	46%	70%	0%	0%
156	Myostatin 99 v126	28%	68%	0%	0%
157	Myostatin 99 v127	31%	57%	0%	0%
158	Myostatin 99 v205	37%	69%	6%	1%
159	Myostatin 99 v206	68%	97%	0%	0%
160	Myostatin 99 v208	98%	100%	0%	20%
161	Myostatin 99 v210	95%	99%	0%	7%
162	Myostatin 99 v213	90%	98%	0%	0%
163	Myostatin 99 v218	44%	74%	0%	0%
164	Myostatin 99 v220	95%	99%	0%	5%
165	Myostatin 99 v222	93%	99%	0%	8%
166	Myostatin 99 v223	94%	99%	0%	28%
167	Myostatin 99 v224	96%	99%	0%	0%
168	Myostatin 99 v225	94%	99%	0%	3%
169	Myostatin 99 v228	19%	60%	4%	0%
170	Myostatin 99 v232	58%	84%	0%	0%
171	Myostatin 99 v233	50%	85%	8%	0%
172	Myostatin 99 v235	91%	99%	0%	0%
173	Myostatin 99 v240	69%	91%	0%	0%
174	Myostatin 99 v242	18%	58%	0%	0%
175	Myostatin 99 v247	68%	94%	0%	6%
176	Myostatin 99 v256	57%	88%	0%	4%
177	Myostatin 99 v258	21%	61%	0%	0%
178	Myostatin 99 v259	100%	100%	0%	28%
179	Myostatin 99 v260	100%	100%	37%	75%
91	Myostatin 99 v261	28%	72%		
180	Myostatin 99 v262	99%	100%	0%	24%
181	Myostatin 99 v263	100%	100%	8%	56%
182	Myostatin 99 v264	100%	100%	24%	72%
92	Myostatin 99 v265	91%	98%		
183	Myostatin 99 v267	100%	100%	24%	64%
184	Myostatin 99 v268	100%	100%	65%	92%
185	Myostatin 99 v269	100%	100%	3%	59%
186	Myostatin 99 v270	100%	100%	5%	68%
187	Myostatin 99 v288	100%	100%	56%	93%
188	Myostatin 99 v290	100%	100%	66%	94%
189	Myostatin 99 v292	95%	100%	3%	2%
190	Myostatin 99 v295	50%	84%		
191	Myostatin 99 v296	41%	83%		
93	Myostatin 99 v298	100%	100%	12%	55%
192	Myostatin 99 v299	93%	99%	0%	0%
193	Myostatin 99 v300	81%	97%	0%	0%
194	Myostatin 99 v301	93%	99%	0%	0%
195	Myostatin 99 v302	99%	100%	0%	0%
196	Myostatin 99 v303	100%	100%	39%	67%
197	Myostatin 99 v304	74%	88%	0%	0%
198	Myostatin 99 v305	100%	100%	0%	24%

[0368]

[表7-3]

199	Myostatin 99 v306	80%	94%	0%	0%
200	Myostatin 99 v307	89%	98%	0%	12%
201	Myostatin 99 v308	87%	97%	0%	3%
202	Myostatin 99 v311	99%	100%	0%	5%
203	Myostatin 99 v312	98%	100%	0%	6%
204	Myostatin 99 v313	100%	100%	12%	40%
205	Myostatin 99 v314	100%	100%	2%	51%
206	Myostatin 99 v318	100%	100%	0%	18%
207	Myostatin 99 v321	58%	91%	0%	0%
208	Myostatin 99 v323	97%	99%	0%	0%
209	Myostatin 99 v325	100%	100%	49%	86%
210	Myostatin 99 v330	100%	100%	0%	0%
211	Myostatin 99 v331	100%	100%	0%	0%
212	Myostatin 99 v332	100%	100%	0%	0%
213	Myostatin 99 v333	100%	100%	0%	34%
214	Myostatin 99 v334	90%	99%	0%	0%
215	Myostatin 99 v336	99%	100%	0%	0%
216	Myostatin 99 v337	82%	96%	0%	0%
217	Myostatin 99 v340	95%	100%	0%	0%
218	Myostatin 99 v342	100%	100%	0%	47%
219	Myostatin 99 v345	100%	100%	7%	70%
220	Myostatin 99 v347	100%	100%	0%	8%
259	Myostatin 99 v348	61%	88%	0%	0%
260	Myostatin 99 v349	87%	92%	0%	0%
261	Myostatin 99 v350	45%	85%	2%	0%
262	Myostatin 99 v351	90%	98%	0%	0%
263	Myostatin 99 v352	99%	100%	0%	0%
264	Myostatin 99 v353	98%	100%	0%	0%
265	Myostatin 99 v354	98%	100%	0%	0%
266	Myostatin 99 v355	59%	88%	0%	0%
267	Myostatin 99 v356	99%	100%	0%	0%
268	Myostatin 99 v357	98%	100%	0%	0%
269	Myostatin 99 v359	99%	100%	0%	0%
270	Myostatin 99 v360	94%	98%	0%	0%
271	Myostatin 99 v361	96%	99%	0%	0%
272	Myostatin 99 v364	93%	97%	0%	0%
273	Myostatin 99 v365	94%	99%	0%	0%
274	Myostatin 99 v366	99%	100%	0%	0%
275	Myostatin 99 v368	95%	99%	0%	0%
276	Myostatin 99 v369	75%	95%	0%	0%
221	Myostatin 99 v370	100%	100%	0%	0%
222	Myostatin 99 v371	100%	100%	0%	0%
223	Myostatin 99 v373	100%	100%	0%	47%
224	Myostatin 99 v378	99%	100%	0%	0%
225	Myostatin 99 v379	100%	100%	0%	0%
226	Myostatin 99 v380	100%	100%	0%	0%
277	Myostatin 99 v387	100%	100%	0%	0%

[0369]

[表7-4]

278	Myostatin 99 v388	100%	100%	0%	0%
279	Myostatin 99 v389	100%	100%	0%	0%
280	Myostatin 99 v390	99%	100%	0%	0%
281	Myostatin 99 v391	100%	100%	0%	0%
282	Myostatin 99 v392	99%	100%	0%	0%
283	Myostatin Myostatin-00002929	100%	100%	0%	0%
284	Myostatin Myostatin-00002931	99%	100%	0%	0%
285	Myostatin 99 v402	99%	100%	0%	0%
286	Myostatin 99 v403	100%	100%	0%	0%
287	Myostatin 99 v404	100%	100%	0%	0%
288	Myostatin 99 v414	100%	100%	0%	44%
289	Myostatin 99 v420	100%	100%	0%	25%
290	Myostatin 99 v423	100%	100%	0%	0%
227	Myostatin 99 v427	98%	100%	0%	0%
228	Myostatin 99 v428	96%	99%	0%	0%
229	Myostatin 99 v429	100%	100%	0%	0%
230	Myostatin 99 v430	100%	100%	0%	0%
231	Myostatin 99 v431	100%	100%	0%	0%
232	Myostatin 99 v432	100%	100%	0%	0%
233	Myostatin 99 v433	100%	100%	0%	0%
291	Myostatin 99 v434	98%	100%	0%	0%
292	Myostatin 99 v435	99%	100%	0%	0%
293	Myostatin 99 v437	100%	100%	0%	9%
294	Myostatin 99 v438	100%	100%	0%	10%
234	Myostatin 99 v439	100%	100%	2%	36%
235	Myostatin 99 v440	99%	100%	0%	9%
236	Myostatin 99 v441	100%	100%	0%	0%
237	Myostatin 99 v442	100%	100%	0%	0%
295	Myostatin 99 v443	98%	100%	0%	0%
296	Myostatin 99 v444	96%	99%	0%	0%
297	Myostatin 99 v445	99%	100%	0%	0%
298	Myostatin 99 v446	76%	95%	6%	0%
299	Myostatin 99 v447	89%	98%	0%	0%
300	Myostatin 99 v448	100%	100%	0%	0%
301	Myostatin 99 v449	95%	99%	0%	0%
302	Myostatin 99 v450	100%	100%	0%	0%
303	Myostatin 99 v451	99%	100%	0%	0%
304	Myostatin 99 v452	94%	99%	0%	0%
305	Myostatin 99 v453	18%	57%	1%	0%
306	Myostatin 99 v454	100%	100%	0%	0%
307	Myostatin 99 v455	99%	100%	1%	0%
308	Myostatin 99 v456	100%	100%	1%	13%
309	Myostatin 99 v457	100%	100%	0%	5%
310	Myostatin 99 v458	100%	100%	0%	3%
311	Myostatin 99 v459	97%	100%	0%	0%
312	Myostatin 99 v460	94%	100%	0%	0%
313	Myostatin 99 v461	100%	100%	0%	0%
314	Myostatin 99 v462	100%	100%	0%	0%

[0370] 表6及び表7の通り、本発明のペプチドは全て、ミオスタチンに対する阻害活性を示した。また、本発明のペプチドのG D F - 1 1 阻害活性はミオスタチン阻害活性と比べ低いことが示された。

[0371] 実施例4 H E K - B l u e (商 標) T G F - β C e l l s における

ミオスタチンシグナルのレポータージーンアッセイによる *in vitro*
活性評価

本実施例では、Myostatin__99__v145（配列番号30）ペプチドの、ミオスタチンシグナルのレポータージーンアッセイによる *in vitro* 活性評価を行った。

[0372] 10% FBS (Heat-inactivated FBS QUALIFIED、10270-106、Gibco)、Normocin 50 mg/mL (ant-nr-05、InvivoGen)、Zeocin 100 mg/mL (ant-zn-05、InvivoGen) 及び Gentamicin 50 μ g/mL (11980-14、Nacalai Tesque) を含有する DMEM High glucose GlutaMax (10569010、Thermo) で、HEK-Blue (商標) TGF- β Cells (hkb-tgfbv2、InvivoGen) を培養した。培養された HEK-Blue (商標) TGF- β Cells を、DMEM High glucose GlutaMax、Gentamicin 50 μ g/mL、1% ウシ血清アルブミン (A7030、Sigma) の Assay 用培地に懸濁した。これを、 4×10^4 細胞s/ウェルで BioCoat poly-D-lysine multiwell plate 96 ウェルプレート (356461、Corning) に播種し、30 分間静置した。

[0373] 実施例1に従い合成した Myostatin__99__v145（配列番号30）ペプチドを、ミオスタチン阻害活性試験については、最終濃度 0.1 μ mol/L を最高濃度とする 0.006 nmol/L までの4倍希釈系列を、MicroPlate 96well U-bottom Non-Binding (650901、Greiner) に添加した。GDF-11 とアクチビンA阻害活性試験については、最終濃度 2 μ mol/L を最高濃度とする 0.12 nmol/L までの4倍希釈系列を、MicroPlate 96well U-bottom Non-Binding (650

901、Greiner) に添加した。

[0374] その後、ミオスタチン (788-G8/CF、R&D systems)、GDF-11 (1958-GD-G8/CF、R&D systems) 又はアクチビンA (338-AC-010/CF、R&D systems) をそれぞれ最終濃度3 ng/mLで添加した。これを、パラフィルムでシールしCO₂インキュベーター (37℃、5%CO₂) で30分インキュベートし、HEK-Blue (商標) TGF-β Cellsのプレートに50 μL/ウェルで添加し、CO₂インキュベーター (37℃、5%CO₂) で24時間培養した。

[0375] UV-Star μClear 96-well (655801、Greiner) の各ウェルに、180 μLのDetection buffer (QUANTI-Blue buffer180 μL、QUANTI-Blue solution 180 μLを17.64 mLの蒸留水で希釈) を分注した。培養培地の上清のうち20 μLを上記のDetection bufferにトランスファーし、シェーカーで1分攪拌した。プレートに蓋をして、CO₂インキュベーターで3～5時間インキュベートし、吸光度を測定した (Envision 2104、PerkinElmer、620 nm/bp 40 nm)。吸光度をもとにペプチドのIC₅₀値を算出した (Prism 9、GraphPad)。結果を表8及び図1に示す。

[0376] [表8]

ペプチドv145のミオスタチン、GDF11およびアクチビンAに対するIC₅₀、IC₉₀

	IC50 (nmol/L)	IC90 (nmol/L)
Myostatin	0.23	0.64
GDF11	61.18	701.73
Activin A	>20,000	>20,000
Selectivity (GDF11/myostatin)	270	1,088

[0377] 表8及び図1の結果より、本発明のペプチドはミオスタチン阻害活性を示し、GDF-11阻害活性はミオスタチン阻害活性と比べ低いことが示され

た。

[0378] 実施例5 ペプチドの骨格筋への分布

本実施例では、Myostatin__99__Variant__07（配列番号3）ペプチドの骨格筋への分布を調べた。

[0379] 実施例1に従い合成したMyostatin__99__Variant__07（配列番号3）ペプチドを10mg/kgで6－8週令の雄性CD1マウスの皮下に投与した。投与後24、48、72時間での血漿及び大腿四頭筋中濃度を測定した。表9に結果を示した。

[0380] [表9]

Myostatin__99__Variant__07ペプチドの血漿および筋組織内投与

投与後時間(hr)	血漿中濃度 (ng/mL)	筋中濃度 (ng/mL)
24	232	283
48	55	190
72	40	74

[0381] ペプチドはいずれの時点においても血漿中よりも高い濃度を示し、筋組織に分布することが明らかになった。なお、血液は遠心分離により血漿を分離し、組織は25%ホモジネートを調製し、5%ギ酸含有アセトニトリルによる除蛋白処理を行い、LC/MS/MSシステム（LCMS-8060、島津製作所）を用いて薬物濃度を測定した。

[0382] 実施例6 野生型マウスにおけるin vivoミオスタチン阻害効果

本実施例では、実施例1又は2に従い合成した各種ペプチドのin vivoでのミオスタチンシグナル阻害効果を評価した。

[0383] 4週令のDBA/2NCrl雄性マウス（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社）を用いた。マウスの飼育は5匹/ケージの群飼育とし、給餌（CRF-1、オリエンタル酵母工業（株））、給水（水道水）ともに自由摂取させた。表10のとおりペプチドを14日間連日皮下投与し、各群のマウスの体重を測定した。体重測定は電子天秤を用いて、投与前日から毎日実施した。

[0384]

[表10]

群構成

群	被験物質	用量 [mg/kg]	容量 [mL/kg]	経路	投与頻度	投与回数	例数
1	PBS	—	10	皮下	1日1回	14	5
2	Myostatin_99_Variant_07	1					5
3	Myostatin_99_Variant_07	3					5
4	Myostatin_99_v194	0.1					5
5	Myostatin_99_v194	0.3					5
6	Myostatin_99_v194	1					5
7	Myostatin_99_v145	0.3					5
8	Myostatin_99_v145	1					5
9	Myostatin_99_v145	3					5
10	Myostatin_99_v145	10					5
11	Myostatin_99_v148	0.1					5
12	Myostatin_99_v148	0.3					5
13	Myostatin_99_v200	10					5

[0385] 体重変化の推移を図2に示した。なお、平均値±標準誤差*： $P<0.05$ 、**： $P<0.01$ vs. PBS、Student t-testを示す。

[0386] 図2中のv07はMyostatin_99_Variant_07（配列番号3）を、v194はMyostatin_99_v194（配列番号65）を、v145はMyostatin_99_v145（配列番号30）を、v148はMyostatin_99_v148（配列番号31）を、v200はMyostatin_99_v200（配列番号71）の評価結果を示す。

[0387] 図2に示されるように、1用量のみのv200を除く、いずれのペプチドも用量依存的な体重増加が認められた。本発明のペプチドの*in vivo*でのミオスタチン阻害効果が確認された。

[0388] 実施例7 B10 mdxマウスにおけるペプチドの筋力向上及び筋壊死抑制効果

本実施例では、実施例1に従い合成したMyostatin__99__Variant__07（配列番号3）ペプチドの、DMDモデルマウスにおける筋力向上効果を、B10 mdxモデルマウス（非特許文献17）を用いて評価した。

[0389] 5週令の雄性C57BL／10—mdx／Jcl（日本クレア）マウスに、表11のとおり、ペプチド又は溶媒対照（Vehicle）のPBSを、皮下に、週3回又は連日5週間投与した。

[0390] [表11]

群構成							
群	被験物質	用量 [mg/kg]	容量 [mL/kg]	経路	投与頻度	投与回数	例数
1	PBS	—	5	皮下	1日1回	21	10
2	Myostatin__99__Variant__07	10			週3回	9	10

[0391] スマート型ラット・マウス用握力測定装置（MK—380V：室町機械）を用いて、予備飼育終了日（群分け日）、Day7、14、21、27、33に測定者にマウスの試験条件が分からないよう個体番号をブラインドして、四肢握力の測定及び体重測定を行った。握力の計測は7回連続して行い、最高値と最低値の2点を除いた5点の平均値を個体データとした。体重測定は電子天秤を用いて行った。

[0392] 図3に握力変化の推移を示した。なお、図中のv07はMyostatin__99__Variant__07の評価結果を示し、平均値±標準誤差*：
P<0.05、**：P<0.01 vs. PBS、Student t-testを示す。Myostatin__99__Variant__07ペプチドを投与した群ではPBSを投与したVehicle群に対し

て継続的な握力増加が認められた。

- [0393] 図4に体重変化の推移を示した。なお、平均値±標準誤差*： $P<0.05$ 、vs. PBS、Student t-testを示す。Myostatin__99__Variant__07ペプチドの投与によって体重は継続的にVehicle群に対して継続的な体重増加が認められた。
- [0394] また、安楽死処置したDay35における血清中クレアチンキナーゼ（CK）濃度（平均値±SEM）も調べたところ、対照のVehicle群が3,836±754 IU/L、v07群は3,247±558 IU/Lであった。このように、v07投与によるCK濃度の低化傾向が認められ、骨格筋の壊死抑制作用が示唆された。

[0395] 実施例8 DBA/2 md xマウスにおける皮下投与ペプチドの筋力向上効果

本実施例では、Myostatin__99__v145（配列番号30）ペプチドのDMDモデルマウスにおける筋力向上効果を評価した。本実施例では、実施例7で資料したB10 md xマウスよりも重篤な筋機能低下を示すDBA/2 md xモデルマウス（非特許文献18、19）を用いた。

- [0396] 20週令の雌性DBA/2 N-md xマウス（実験動物中央研究所）に、表12のとおりMyostatin__99__v145、溶媒対照（PBS）を、皮下に週1回4週間投与した。比較例として、抗潜在型マイオスタチン抗体（GYM329-BS）を静脈内単回投与した。

[0397] [表12]

群構成							
群	被験物質	用量 [mg/kg]	容量 [mL/kg]	経路	投与頻度	投与回数	例数
1	PBS	—	5	皮下	週1回	4	9
2	Myostatin__99	1					8
3	v145	3					8
4	GYM329-BS	10	1.3	静脈内	月1回	1	8

- [0398] スマート型ラット・マウス用握力測定装置（MK-380V：室町機械）を用いて、予備飼育終了日（群分け日）、Day7、14、21、26に測

定者にマウスの試験条件が分からないよう個体番号をブラインドして、四肢握力を測定した。握力の計測は7回連続して行い、最高値と最低値の2点を除いた5点の平均値を個体データとした。

[0399] 図5に握力変化の推移を示した。なお、平平均値±標準誤差*： $P<0.05$ 、**： $P<0.01$ vs. PBS、Student t-testを示す。Myostatin_99_v145投与群は、PBSを投与したVehicle群と比較して、継続的な握力増加が用量依存的に認められた。また、Myostatin_99_v145の最大効果は、GYM329-B5よりも高かった。

[0400] 実施例9 B10-mdxマウスにおける経口投与ペプチドの筋力向上効果

本実施例では、Myostatin_99_v145（配列番号30）ペプチドをDMDモデルマウスに経口投与した場合の筋力向上効果を評価した。

[0401] DMDモデルマウスとしてB10-mdxマウスを用いた。5週令の雌性C57BL/10-mdx/Jclマウス（日本クレア、非特許文献17）に、皮下投与として、ペプチド、又は溶媒対照（Vehicle）のPBSを、週1回4週間皮下投与した。加えて、経口投与として、ペプチド、又は溶媒対照の30% Labrasol/PBSを、DMDモデルマウスに、週1回絶食後に4回投与した。

[0402] [表13]

群構成							
群	被験物質	用量 [mg/kg]	容量 [mL/kg]	経路	投与頻度	投与回数	例数
1	Vehicle	---	5 (SC) 10 (PO)	経口 および 皮下	週 1回	4	13
2	Myostatin_99_v 145	3					12
3		65					12
4		200					13

[0403] スマート型ラット・マウス用握力測定装置（MK-380V：室町機械）を用いて、予備飼育終了日（群分け日、5週令）、Day7（6週令）、1

4（7週令）、20（8週令）、27（9週令）に測定者にマウスの試験条件が分からないよう個体番号をブラインドして、四肢握力を測定した。握力の計測は7回連続して行い、最高値と最低値の2点を除いた5点の平均値を個体データとした。

[0404] 図6に握力変化の推移を示した。なお、平均値±標準誤差*： $P<0.05$ 、**： $P<0.01$ vs. PBS、Student t-testを示す。経口投与の場合でも、Myostatin₉₉₋₁₄₅投与群はPBSを投与したVehicle群に対して継続的な握力増加が用量依存的に認められた。

[0405] 実施例で用いたリンカー又は付加的なアミノ酸に含まれるアミノ酸配列のみを表14に示す。

[0406] [表14]

SEQ ID No.	SEQ
315	G de G dk
316	pipzAc
317	pipAc
318	Pip4mAc
319	Dap
320	de
321	Dap Dap
322	ds ds ds dk
323	A4paa
324	KCOpipzaa
325	Pic4

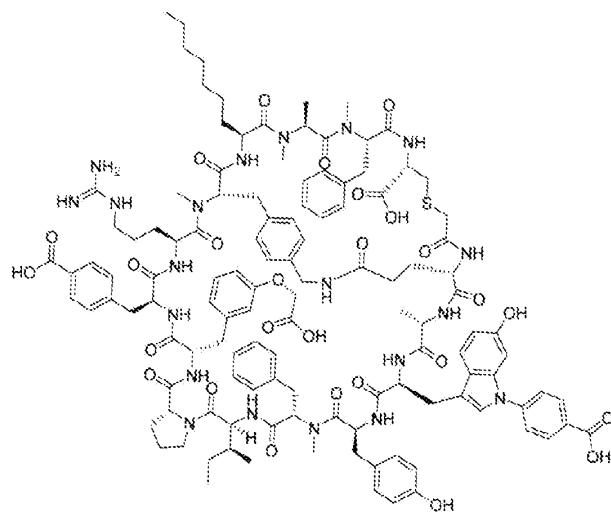
[0407] 実施例10

本実施例では、以下のペプチド又はリンカー付与ペプチドを合成した。

[0408] 実施例10-1 Myostatin₉₉₋₁₄₅ v424（配列番号255）の合成

[0409]

[化42]



[0410] DCMで膨潤させた1当量のCl-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、0.79 mmol/g、5.7 g) に0.66当量のFmoc-dca-OtBuのDCM溶液、1.7当量のDIEAを加え室温で60分間振盪した。過剰量のメタノールを加え10分間振盪した。固相樹脂をDMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂の一部(0.79 mmol/g、1.04 g)を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (5.1当量 / 9.8当量 / 4.9当量)を用い40℃下、30分間1回反応を行った。ただし、4残基目、6残基目、7残基目、10残基目、12残基目、13残基目については、40℃下、30分間2回反応を行った。1残基目の反応はFmoc-E(allyl)-OHを、11残基目の反応はFmoc-MeF4am(alloc)-OHを各々用いた。3残基目は、0.15 M Fmoc-W6H(Boc)1Ph4COO(tBu)-OH (NMP中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (3.6当量 / 9.8当量 / 4.9当量)を用い40℃下、30分間1回反応を行った。

量)を40℃下、30分間1回反応を行った後、DMFで樹脂を洗浄した。

また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、5分間2回反応させることで行った。

[0411] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル(40mL、HFIP/DCMの体積比20/80の混合物)を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。得られた濾液をGenevac EZ-II Eliteを用いて減圧濃縮した後、ジソプロピルエーテルを加えると白色沈殿が生じた。

[0412] この混合物を遠心分離し(9000rpm、0℃、2min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体(ペプチド)を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に1.5mMとなるようにDMFに溶解し、1.1当量のHATU及び5当量のDIEAを加え、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチした。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0413] 得られた混合物を3%HFIP含有DMFに溶かし、0.02当量のPd(PPh₃)₄及び20当量のフェニルシランを加え60分間振盪後、ジソプロピルエーテルを加えた。生じた沈殿物を遠心分離し(9000rpm、0℃、2min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0414] 得られた固体(ペプチド)を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に1.5mMとなるようにDMFに溶解し、1.1当量のHATU及び5当量のDIEAを加え、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチした。反応溶液Genevac EZ-II Eliteを用いて減圧濃縮した後、ジソプロピルエーテルを加えると白色沈

殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0415] 得られた固体を氷冷した反応剤カクテル（20 mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物）に溶かし、0℃下20分間振盪した。ジエチルエーテルを加え生じた白色沈殿を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0416] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Agela Claricep Spherical AQ C18 20-35 μm 100 Å 120 g；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：25℃；グラジエント（%B）：1分間かけて32-32%、24分間かけて32-47%、10分間かけて47-95%、5分間かけて95-95%；流量：1分間かけて10-50 mL/min、その後50 mL/min）。凍結乾燥後、以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） CSH C18 5 μm OBD 50 x 250 mm；移動相：A=1.0% AcOH（水中）、B=1.0% AcOH（MeCN中）、C=0.2 M TEAA（水中）、D=アセトニトリル；温度：50℃；グラジエント（%A）：5分間かけて0.1-0.1%、0.1分間かけて0.1-66.7%、その後100-%B；グラジエント（%B）：5分間かけて0-0%、0.1分間かけて0-33.3%、その後1.9分間かけて33.3-34.7%、その後3分間かけて34.7-34.7%、その後15.5分かけて34.7-39.8%、その後1.5分間かけて39.8-60%、その後4分間かけて60-90%；グラジエント（%C）：5分間かけて66.6-66.6%、0.1分間かけて66.6-0%、その後0%；グラジエント（%D）：5分間かけて33.3-33.3%、0.1分間かけて33.3

－0%、その後0%；流量：5.1分間かけて20－20mL/min、1.9分間かけて20－120mL/min、その後120mL/min）。

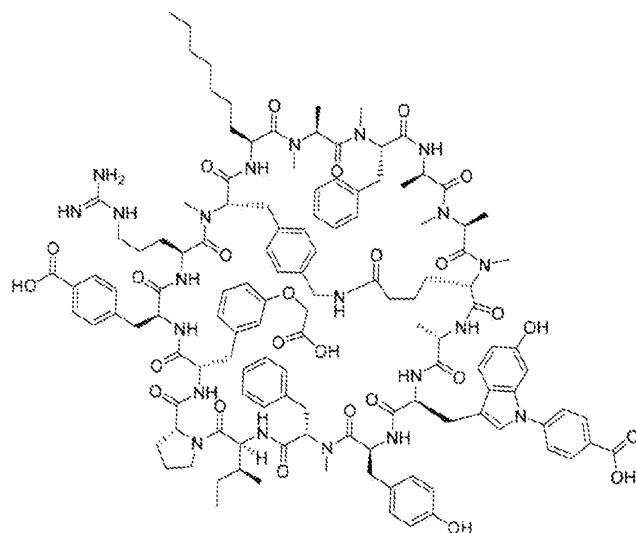
[0417] 分析条件のLC/MS（UV波長 225nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、95.3%であった。

[0418] 分析条件：保持時間＝5.07分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6μm 2.1×150mm、100Å；移動相：A＝0.025% TFA（水中）、B＝0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%、その後0.3分間かけて60－95%、その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z＝1181.18（M+2H）²⁺

[0419] 実施例10-2 Myostatin 99 v490（配列番号349）の合成

[0420] [化43]



[0421] DCMで膨潤させた1当量のCl-Trt（2-Cl）resin（渡辺化学、1.15mmol/g、2.2g）に0.4当量のFmoc-dar-OHのDCM溶液、1.4当量のDIEAを加え室温で60分間振盪した。

過剰量のメタノールを加え10分間振盪した。固相樹脂をDMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂の一部（0.46 mmol/g、0.22 g）を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

- [0422] 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA（DMF中）／1 M DIC（DMF中）／0.5 M Oxyma pure（DMF中）（4.2当量／8当量／4当量）を用い50℃下、15分間1回反応を行った。ただし、4残基目、6残基目、10残基目、12残基目、13残基目については、50℃下、15分間2回反応を行った。1残基目の反応はFmoc-MeHgl（allyl）-OH、11残基目の反応はFmoc-MeF4am（alloyl）-OHを各々用いた。Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下1分間2回反応させることで行った。16残基目は、0.21 M Fmoc-MeA-OH（DMF中）／0.5 M HATU（DMF中）／1 M DIEA（DMF中）（4.2当量／4当量／8当量）を用い25℃下、30分間1回反応を行った後、DMFで樹脂を洗浄した。
- [0423] 得られた樹脂を1%HFIP含有DCMに懸濁し、0.2当量のPd（PPh₃）₄及び10当量のフェニルシランを加え25℃下60分間振盪後、ジクロロメタン、DMFで順次洗浄した。得られた樹脂をDMFに懸濁し、1.2当量のPyAOP及び3当量のDIEAを加え室温で30分間振盪した。DMFで洗浄後、10%ピロリジンのDMF溶液と室温で3分間振盪することでFmoc基を除去した。
- [0424] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（14 mL、HFIP／DCMの体積比20／80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用

カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。得られた濾液を減圧濃縮した後、ジエチルエーテル／ヘキサン（１／１）を加えると白色沈殿が生じた。生じた沈殿物を遠心分離し（９０００rpm、０℃、２min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度０℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0425] 得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に１．５mMとなるようにDMFに溶解し、１当量のHATU及び５当量のDIEAを加え、室温で３０分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチした。反応溶液Genevac EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。得られた混合物を氷冷した反応剤カクテル（１５mL、TFA／H₂O／TIS／DODT／チオアニソールの体積比７２／４／２／２／２０の混合物）に溶かし、２５℃下２０分間振盪した。ジエチルエーテル／ヘキサン（１／１）を加え生じた白色沈殿を遠心分離し（９０００rpm、０℃、２min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度０℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0426] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） CSH Prep C18 ５μm ３０×１５０mm；移動相：A＝５０mM TEAA（水中）、B＝アセトニトリル；温度：５０℃；グラジエント（％B）：０．１分間かけて１２．１－８．８％、４．９分間かけて８．８－８．８％、１分間かけて８．８－１２．１％、３分間かけて１２．１－３７．７％、９分間かけて３７．７－４２．８％、１分間かけて４２．８－６０％；流量：０．１分間かけて４４－９mL/min、４．９分間かけて９－９mL/min、１分間かけて９－４４mL/min、その後４４mL/min）。凍結乾燥後、０．１TFA含有水／アセトニトリル（体積比５０／５０の混合物）に溶かし、再度凍結乾燥を行った。

[0427] 分析条件のLC／MS（UV波長 ２２５nm）クロマトグラムの面積比

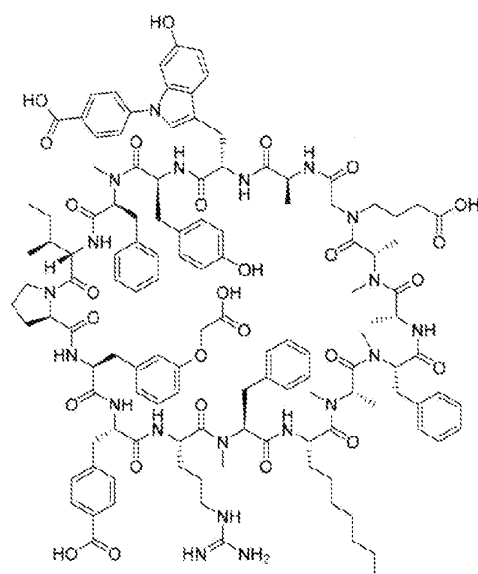
から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、92.9%であった。

[0428] 分析条件：保持時間＝6.04分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm、100 $\text{\AA}$ ；移動相：A＝0.025% TFA（水中）、B＝0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%、その後0.3分間かけて60－95%、その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z ＝1192.71（ $M+2H$ ）²⁺

[0429] 実施例10-3 Myostatin 99 v482（配列番号341）の合成

[0430] [化44]



[0431] H-A-Trt（2-Cl）resin（渡辺化学、1.08 mmol/g、0.23 g）を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA（DMF中）/1 M DIC（DMF中）/0.5 M Oxyma pure（DMF中）（4.2当量/8当量/4当量）を用

いた。

[0432] Fmoc基の脱保護は、10%ピロリジンのDMF溶液を用いて行った。

さらに、以下の表15に記載の条件に従って、ペプチドを伸長した。

[0433] [表15]

固相合成 導入順序	残基 番号	Fmocアミノ酸	カップリング反応条件	Fmoc脱保護条件
1	1	Fmoc-CrpG(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
3	15	Fmoc-da-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
5	13	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
11	7	Fmoc-dp-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
12	6	Fmoc-I-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
15	3	Fmoc-W6H(Boc)-1 Ph4COO(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、5分、2回

[0434] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（10mL、HFIP/DCMの体積比20/80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を減圧下濃縮後得られた混合物にジエチルエーテルを加えると

白濁沈殿が生じた。

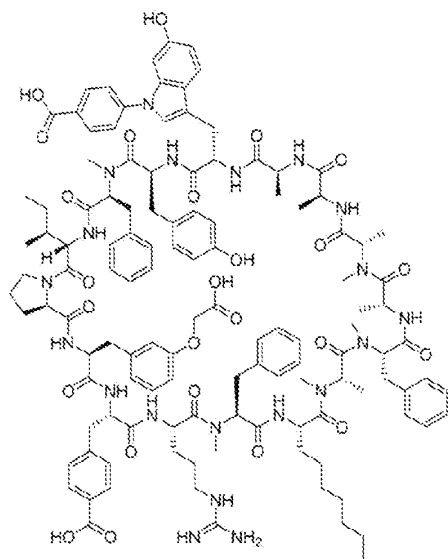
- [0435] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に7 mMとなるようにDMFに溶解し、次いで、1.1当量のHATU及び5当量のDIEAを加えて、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。
- [0436] 得られた残渣を反応剤カクテルD（4 mL、TFA/TIS/H₂O/チオアニソールの体積比70/2.5/2.5/25の混合物）に溶かし、室温で55分間振盪した。得られた反応液をジエチルエーテルに加え、沈殿物が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。
- [0437] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm 50×150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて16→16%、1分間かけて16→41%、8分間かけて41→46%、1分間かけて46→60%；流量：1分間かけて20→20 mL/min、1分間かけて20→120 mL/min、その後120 mL/min）。
- [0438] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は95.0%であった。
- [0439] 分析条件：保持時間=5.90分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20→

60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1180.16$ ($M+2H$)²⁺

[0440] 実施例10-4 Myostatin 99 v483 (配列番号342)
の合成

[0441] [化45]



[0442] H-A-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、1.08 mmol/g、0.23 g) を用い、目的のペプチドを合成した。Myostatin 99 v482 と同様な方法でペプチド伸長、樹脂からの切り出し、環化反応及び脱保護を実施した。

得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μm 50 × 150 mm；移動相：A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中)；温度：40℃；グラジエント (%B)：2分間かけて19-19%、1分間かけて19-44%、8分間かけて44-49%、1分間かけて49-60%；流量：1分間かけて20-20 mL/min、1分間かけて20-120 mL/min、その後120 mL/min)。

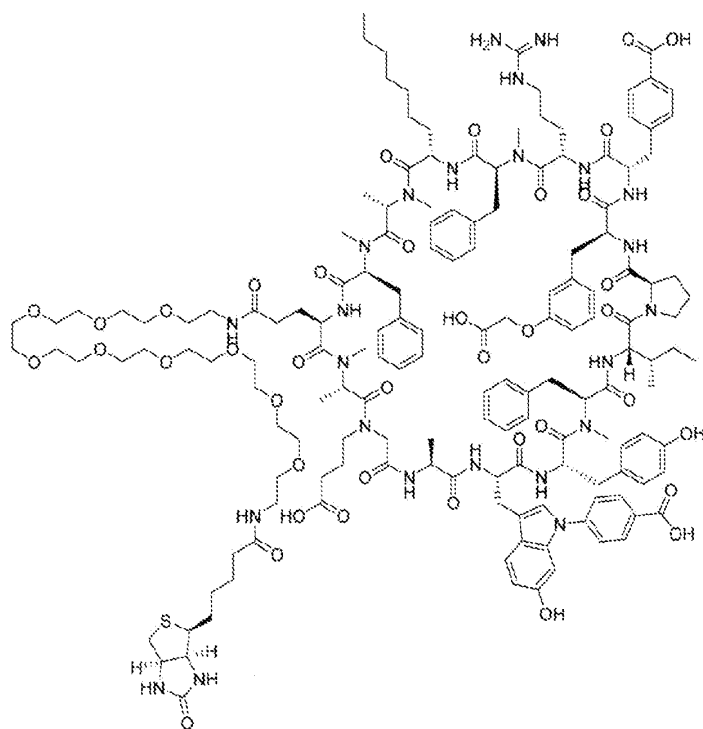
[0443] 分析条件のLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は96.0%であった。

[0444] 分析条件：保持時間=6.13分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150mm、100Å；移動相：A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN中)；温度：60℃；グラジエント (% B conc)：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z =1144.14 ($M+2H$)²⁺

[0445] 実施例10-5 Myostatin 99 v482-biotin (配列番号364) の合成

[0446] [化46]



[0447] H-A-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、1.08mmol/g、0.12g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社

の Liberty Blue を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂 1 当量に対し、0.2 M Fmoc-AA (DMF 中) / 1 M DIC (DMF 中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF 中) (4.2 当量 / 8 当量 / 4 当量) を用いた。

[0448] Fmoc 基の脱保護は、10%ピロリジンの DMF 溶液を用いて行った。

さらに、以下の表 16 に記載の条件に従って、ペプチドを伸長した。

[0449] [表16]

固相合成 導入順序	残基 番号	Fmocアミノ酸	カップリング反応条件	Fmoc脱保護条件
1	1	Fmoc-CrpG(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
3	15	Fmoc-de(allyl)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
5	13	Fmoc-MeA-OH	50°C、30分、2回	25°C、1分、2回
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C、30分、2回	25°C、1分、2回
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
11	7	Fmoc-dp-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
12	6	Fmoc-I-OH	50°C、30分、2回	25°C、1分、2回
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C、15分、1回	25°C、1分、2回
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C、15分、2回	25°C、1分、2回
15	3	Fmoc-W6H(Boc)1Ph 4COO(tBu)-OH	50°C、15分、1回	—

[0450] 得られた固相樹脂を DCM に懸濁後、5 当量の Fmoc-OSu を加え 25°C で 1 時間振盪し、DMF で洗浄した。得られた混合物を DCM に懸濁し、0.2 当量の Pd(PPh₃)₄ 及び 10 当量のフェニルシランを加え 25°C で 60 分間振盪後、DMF、DCM で順次洗浄した。得られた固相樹脂

をDMFに懸濁し、3当量のBoc-NH-PEG9-NH₂、6当量のDIC、3当量のOxyma pureを加え室温で60分振盪した。Fmoc基の脱保護のため得られた樹脂をDMFで洗浄後、10%ピロリジンのDMF溶液と25℃で10分間振盪した。

[0451] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（5 mL、HFIP/DCMの体積比20/80の混合物）を加え、25℃で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を減圧下濃縮後得られた混合物にジイソプロピルエーテルを加えると白濁沈殿が生じた。

[0452] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMFに溶解し、次いで、1.2当量のHATU及び3当量のDIEAを加えて、25℃で60分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac EZ-1 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0453] 得られた残渣を反応剤カクテル（4 mL、TFA/TIS/H₂Oの体積比95/2.5/2.5の混合物）に溶かし、25℃で60分間振盪した。得られた反応液をジイソプロピルエーテルに加え、沈殿物が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた混合物をその終濃度が固相樹脂のモル数を基に25 mMとなるようにDMSOに溶解し1.1当量のBiotin-OSu及び5当量のDIEAを加えて25℃で60分間攪拌後、酢酸を

加えクエンチした。

[0454] 得られた混合物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 19 x 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：3分間かけて13-38%、8分間かけて38-43%、1分間かけて43-60%；流量：17 mL/min）。

[0455] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は92.9%であった。

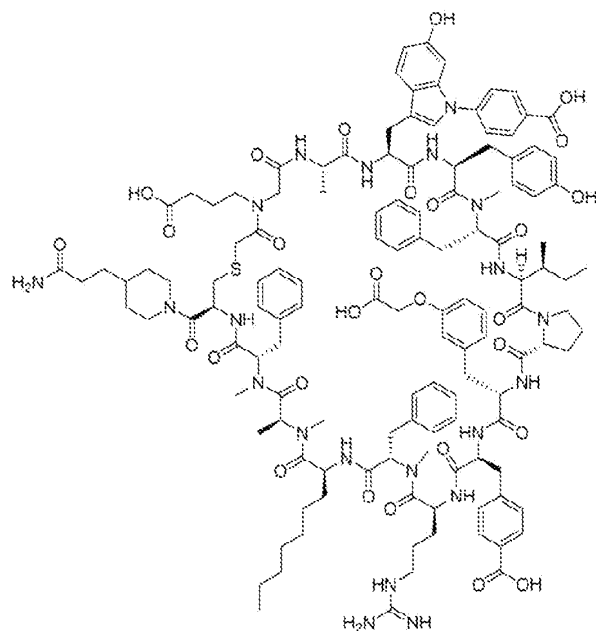
[0456] 分析条件：保持時間=5.59分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1028.11$ ($M+3H$)³⁺

[0457] 実施例10-6 Myostatin 99 v488（配列番号347）の合成

[0458]

[化47]



[0459] DCMで膨潤させた1当量のSieber amide resin (渡辺化学, 1 mmol/g, 0.70 g) に4.2当量のFmoc-Pip4mAc-OHのDMF溶液、4当量のHATU、8当量のDIEAを加え室温で60分間振盪した。固相樹脂をDMF、DCM、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固相樹脂の一部(0.60 mmol/g, 0.42 g)を用い、前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 0.5 M HATU (DMF中) / 1 M DIEA (DMF中) (4.2当量 / 4当量 / 8当量)を用いた。90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、4残基目、13残基目については、90℃下、10分間2回反応を行った。10残基目、15残基目については、50℃下、15分間2回反応を行った。12残基目については、75℃下、30分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分

間1回反応させることで行った。ただし、4残基目、6残基目、10残基目、12残基目、13残基目、15残基目については25℃下1分間2回反応させることで行った。

- [0460] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、DMFに懸濁し、5当量のクロロ酢酸、5当量のHATU、8当量のDIEAと25℃下30分間振盪しクロロアセチル基を導入した。
- [0461] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルD（15 mL、TFA/H₂O/TIS/チオアニソールの体積比70/2.5/2.5/25の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。
- [0462] この混合物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5 mMとなるように水/アセトニトリル（1/1）に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で4時間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。
- [0463] 得られた混合物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） CSH Prep C18 5 μ m 30 x 150 mm；移動相：A=50 mM TEAA（水中）、B=アセトニトリル；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて6.0-2.

2%、4.9分間かけて2.2-2.2%、1分間かけて2.2-6.0%、3分間かけて6.0-31.6%、9分間かけて31.6-36.7%、1分間かけて36.7-60%；流量：0.1分間かけて44-9 mL/min、4.9分間かけて9-9 mL/min、1分間かけて9-44 mL/min、その後44 mL/min）。凍結乾燥後、再度同条件で精製を行った。凍結乾燥後、0.1 TFA含有水/アセトニトリル（体積比50/50の混合物）に溶かし、再度凍結乾燥を行った。

[0464] 分析条件のLC/MS（UV波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、98.3%であった。

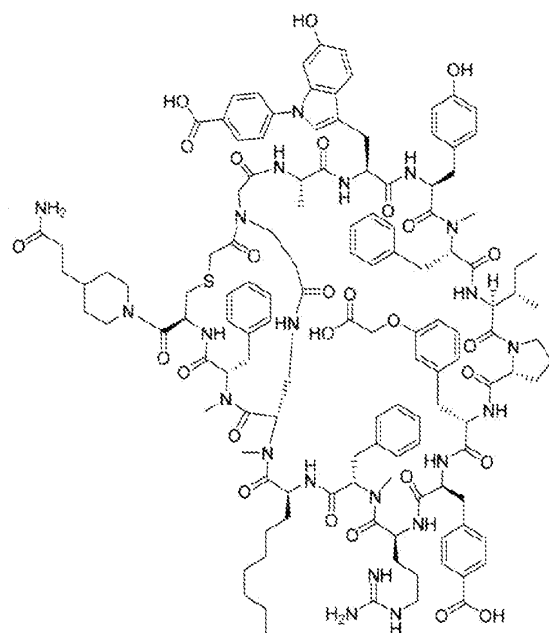
[0465] 分析条件：保持時間=5.32分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1251.85$ ($M+2H$)²⁺

[0466] 実施例10-7 Myostatin 99 v478（配列番号337）の合成

[0467]

[化48]



[0468] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.60 mmol/g, 0.42 g) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社の Liberty Blue を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用いた。90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、4残基目、6残基目については、90℃下、10分間2回反応を行った。10残基目、15残基目については、50℃下、15分間2回反応を行った。12残基目、13残基目については、75℃下、30分間2回反応を行った。1残基目の反応は Fmoc-CeG (allyl) -OH を、13残基目の反応は Fmoc-MeDap (alloc) -OH を各々用いた。また、Fmoc 除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分間1回反応させることで行った。ただし、4残基目、6残基目、10残基目、12残基目、13残基目、15残基目については25℃下

1 分間 2 回反応させることで行った。得られた固相樹脂を DCM に懸濁後、5 当量の Fmoc-Osu を加え 25℃ で 1 時間振盪し、DMF で洗浄した。

[0469] 得られた樹脂を 2% HFIP 含有 DCM に懸濁し、0.2 当量の Pd (PPh₃)₄ 及び 10 当量のフェニルシランを加え 25℃ で 60 分間振盪後、DCM、DMF で順次洗浄した。得られた樹脂をその終濃度が固相樹脂のモル数を基に 25 mM となるように DMF に懸濁し、1.2 当量の PyAOP 及び 5 当量の DIEA を加え室温で 60 分間振盪した。DMF で洗浄後、10% ピロリジンの DMF 溶液と室温で 10 分間振盪することで Fmoc 基を除去した。得られた樹脂を DMF に懸濁し、5.2 当量のクロロ酢酸、5 当量の HATU、10 当量の DIEA と 25℃ 下 30 分間振盪しクロロアセチル基を導入した。

[0470] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル (15 mL、TFA/H₂O/TIS/DODT/チオアニソールの体積比 70/2.5/2.5/5/20 の混合物) を加え、室温で 60 分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。

[0471] この混合物を遠心分離し (9000 rpm、0℃、2 min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃ に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体 (ペプチド) を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように水/アセトニトリル (1/1) に溶解し、次いで、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 60 分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチすることにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液を Geneva

c EZ-11 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0472] 得られた混合物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） C18 5 μ m 19 x 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて36-36%、8分間かけて36-41%、1分間かけて41-60%；流量：1分間かけて20-20 mL/min、2分間かけて20-120 mL/min、その後120 mL/min）。

[0473] 分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は98.7%であった。

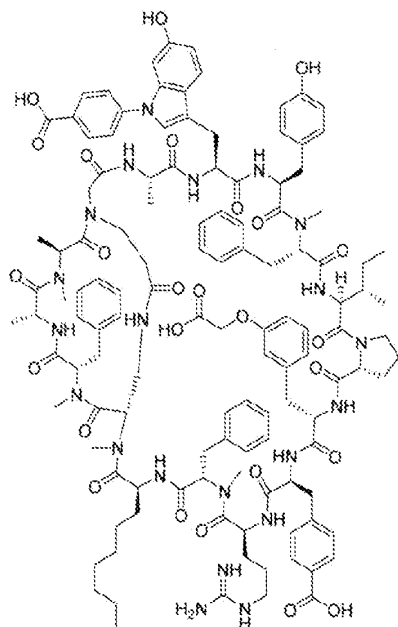
[0474] 分析条件：保持時間=5.18分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1243.60$ ($M+2H$)²⁺

[0475] 実施例10-8 Myostatin 99 v489（配列番号348）の合成

[0476]

[化49]



[0477] H-A-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学、1.08 mmol / g、0.12 g) を用い、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21 M Fmoc-AA (DMF中) / 1 M DIC (DMF中) / 0.5 M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用いた。

[0478] Fmoc基の脱保護は、10%ピロリジンのDMF溶液を用いて行った。さらに、以下の表17に記載の条件に従って、ペプチドを伸長した。

[0479]

[表17]

固相合成 導入順序	残基 番号	Fmocアミノ酸	カップリング反応条件	Fmoc脱保護条件
1	1	Fmoc-CeG(allyl)-OH	50°C、20分、1回	25°C、5分、2回
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
3	15	Fmoc-da-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C、20分、1回	25°C、5分、2回
5	13	Fmoc-MeDap(allo c)-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C、20分、1回	25°C、5分、2回
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
9	9	Fmoc-F4COO(tBu) -OH	50°C、20分、1回	25°C、5分、2回
10	8	Fmoc-F3aac(tBu) -OH	50°C、20分、1回	25°C、5分、2回
11	7	Fmoc-dp-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
12	6	Fmoc-l-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C、20分、1回	25°C、5分、2回
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C、20分、2回	25°C、5分、2回
15	3	Fmoc-W6H(Boc)1 Ph4COO(tBu)-OH	50°C、20分、1回	---

[0480] 得られた固相樹脂をDCMに懸濁後、5当量のFmoc-OSuを加え25°Cで1時間振盪し、DMFで洗浄した。得られた樹脂をDCMに懸濁し、0.2当量のPd(PPh₃)₄及び20当量のフェニルシランを加え25°Cで60分間振盪後、DCM、DMFで順次洗浄した。得られた樹脂をその終濃度が固相樹脂のモル数を基に3.5 mMとなるようにDMFに懸濁し、1.01当量のPyAOP及び5当量のDIEAを加え室温で20分間振盪した。DMFで洗浄後、10%ピロリジンのDMF溶液と室温で30分間振盪することでFmoc基を除去した。

[0481] 固相樹脂からの切り出しのため、まず得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続

いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル（10 mL、HFIP／DCMの体積比20／80の混合物）を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。得られた濾液を減圧濃縮した後、ジエチルエーテルを加えると白色沈殿が生じた。生じた沈殿物を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0482] 得られた固体（ペプチド）を次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に7 mMとなるようにDMFに溶解し、1.1当量のHATU及び5当量のDIEAを加え、室温で30分間攪拌後、酢酸を加え反応をクエンチした。反応溶液Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。得られた混合物を氷冷した反応剤カクテル（12 mL、TFA／H₂O／TIS／チオアニソールの体積比70／2.5／2.5／25の混合物）に溶かし、25℃下35分間振盪した。ジエチルエーテルを加え生じた白色沈殿を遠心分離し（9000 rpm、0℃、2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

[0483] 得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect（登録商標） CSH Prep C18 5 μm 30 × 150 mm；移動相：A=50 mM TEAA（水中）、B=アセトニトリル；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて11.1－7.8%、4.9分間かけて7.8－7.8%、1分間かけて7.8－11.1%、3分間かけて11.1－36.7%、9分間かけて36.7－41.8%、1分間かけて41.8－60%；流量：0.1分間かけて44－9 mL/min、4.9分間かけて9－9 mL/min、1分間かけて9－44 mL/min、その後44 mL/min）。凍結乾燥後、0.1 TFA含有水／アセトニトリル（体積比50／50の混合物）に溶かし、再度凍結乾

燥を行った。

[0484] 分析条件のLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、94.1%であった。

[0485] 分析条件：保持時間=5.77分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN中)；温度：60℃；グラジエント (% B conc)：7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1171.75$ ($M+2H$)²⁺

[0486] 実施例 11 ペプチドの分析

上記の一般的な方法及び実施例1、2、10の方法に従い、目的のペプチドを合成した。

[0487]

[表18]

[illegible]

[0488] 表18に、目的物のペプチド、分析条件及び保持時間、ESI-MS (+)での観測値を記載した。terminusはC末端の官能基(表中、「-OH」または「OH」はCOOHを、「-NH₂」または「NH₂」はCO(NH₂)を示す)を示し、記載がない場合はC末端に官能基が存在しないことを示す。また、表中の「Cyclization」について、CIACの記載があるものはクロロアセチル基を導入した1番目のアミノ酸とC末端に存在するCysとを結合させ環状化したことを示し、「covalent」とは、1番目のアミノ酸のN末端アミノ基と15番目又は16番目のアミノ酸のC末端カルボキシル基が結合していることを示す。また、表中のAdditional/Linkerは、環状構造に含まれない、リンカー又は付加的なアミノ酸を示し、例えばMyostatin_99_v31(配列番号4)では、X1-X15のアミノ酸配列が環状構造をとり、そのC末端X15のdcからさらにG-de-G-dkというアミノ酸配列がリンカーとして付加されていることを示す。

[0489] また、配列番号326-329、334-338、348-354、358-360、362-366、368のペプチドについては、(@)、(@R1)と記載のあるアミノ酸残基の側鎖同士が結合して架橋構造を有することを示し、また、@と記載のあるアミノ酸残基のN末端アミノ基とC末端カルボキシ基が結合して環状構造を取ることを示す。例えば、Myostatin_99_v463(配列番号326)では、1番目のMeEのN末端アミノ基(@MeE)と16番目のMeAのC末端カルボキシ基(MeA@)が結合し環状構造をとり、さらに当該1番目のMeEの側鎖カルボキシ基(MeE(@R1))と11番目のMeF4amの側鎖アミド基(MeF4am(@R1))が結合して架橋構造を有することを示す。また、Myostatin_99_v475(配列番号334)では、1番目のEと15番目のdcが結合し環状構造をとり、さらに当該1番目のEの側鎖アミド基(E(@))と11番目のMeF4amの側鎖アミド基(MeF4am(@))が結合して架橋構造を有することを示す。

[0490] さらに、配列番号355-368については以下を示す。Myostat in__99__v382-PEG12K Bio（配列番号355）については、1番目のAと15番目のdcが結合し環状構造をとり、さらに15番目のdcの側鎖から付加的なリンカー（Additional/Linker）であるPip4mcAc-PEG12c-Kが結合しており、さらに当該末端Kの側鎖末端NH₂と、ビオチンのカルボキシ基が結合しており、さらに当該末端Kのカルボキシ基のOHがNH₂に置換（CONH₂）されていることを示す。

[0491] 実施例12 HepG2細胞株におけるミオスタチンシグナルのレポータージーンアッセイによるin vitro活性評価

本実施例では、実施例10及び11で合成したペプチドについて、実施例3評価方法（1）に従ってin vitroのミオスタチン阻害効果を評価した。

結果を表19に示す。

[0492]

[表19]

SEQ ID No	Peptide Name	IC50 (Luciferase) Myostatin HepG2 (nM)	IC50 (Luciferase) GDP-11 HepG2 (nM)	Selectivity	Method
326	Myostatin_99_v463	0.05	2.15	39.4	D
327	Myostatin_99_v464	0.04	2.99	82.1	D
328	Myostatin_99_v465	0.03	31.02	1121.1	D
329	Myostatin_99_v466	0.07	32.66	501.9	D
330	Myostatin_99_v471	0.09	15.24	169.1	D
331	Myostatin_99_v472	1.51	83.83	55.4	D
332	Myostatin_99_v473	0.37	108.80	290.7	D
333	Myostatin_99_v474	1.23	120.30	98.1	D
334	Myostatin_99_v475	0.04	1.78	44.9	D
335	Myostatin_99_v476	0.22	25.31	114.3	D
336	Myostatin_99_v477	0.14	25.69	181.8	D
337	Myostatin_99_v478	0.04	25.52	575.7	D
338	Myostatin_99_v479	0.88	47.49	54.1	D
339	Myostatin_99_v480	0.36	172.20	472.7	D
340	Myostatin_99_v481	0.58	64.04	110.8	D
341	Myostatin_99_v482	0.11	90.17	814.5	D
342	Myostatin_99_v483	0.14	59.94	424.2	D
343	Myostatin_99_v484	0.43	240.40	560.2	D
344	Myostatin_99_v485	2.11	123.90	58.6	D
345	Myostatin_99_v486	0.14	70.82	516.6	D
346	Myostatin_99_v487	0.48	123.90	259.9	D
347	Myostatin_99_v488	0.18	53.16	294.4	D
348	Myostatin_99_v489	0.12	45.41	365.6	D
349	Myostatin_99_v490	0.70	112.00	160.4	D
350	Myostatin_99_v491	0.77	82.22	106.9	D
351	Myostatin_99_v492	0.42	76.61	187.6	D
352	Myostatin_99_v493	0.46	84.09	184.0	D
353	Myostatin_99_v494	0.46	63.86	139.7	D
354	Myostatin_99_v495	0.32	246.60	774.3	D

[0493] 表 1 9 の通り、本実施例で調べたペプチドは全て、ミオスタチンに対する阻害活性を示した。また、本実施例で調べたペプチドの G D F − 1 1 阻害活性は、ミオスタチン阻害活性と比べ低いことが示された。

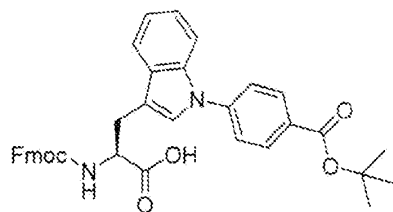
[0494] 参考例 新規非天然アミノ酸の合成

本参考例は、各種非天然アミノ酸の合成例を示す。

[0495] 参考例 1 F m o c − W 1 P h 4 C O O (t B u) − O H の合成

[0496]

[化50]



- [0497] 4-ヨード安息香酸ターシャリーブチル (25.0 g、82.2 mmol、CAS: 120363-13-5) をDMF (82 mL) に溶かし、1H-インドール (10.6 g、90.4 mmol、CAS: 120-72-9)、ヨウ化銅 (I) (3.1 g、16.4 mmol、CAS: 7681-65-4)、炭酸セシウム (40.3 g、123 mmol、CAS: 534-17-8) を室温に加え、120℃で1時間攪拌した。混合物を0.1 M塩酸水溶液で希釈し、酢酸エチルで2回抽出した。混合した有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (石油エーテル/酢酸エチル=100/50-0/100)。
- [0498] 室温下、得られた生成物の一部 (20.5 g、69.9 mmol) をDMF (233 mL) に溶かし、N-ヨードスクシンイミド (18.9 g、83.9 mmol、CAS: 516-12-1) を加え、10分間攪拌した。反応混合物を氷冷し、チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで2回抽出した。混合した有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し (石油エーテル/酢酸エチル=90/10-80/20)、tert-ブチル 4-(3-ヨード-1H-インドール-1-イル)-ベンゾエートを得た。
- [0499] 室温下、亜鉛 (1.30 g、19.9 mmol、CAS: 7440-66-6) をDMF (13 mL) に懸濁し、1,2-ジブロモエタン (0.057 mL、0.665 mmol、CAS: 106-93-4) トリメチルシ

リルクロリド (0.088 mL、0.665 mmol、CAS: 75-77-4) を加え、50℃で30分攪拌した。反応混合物を室温に冷却後、メチル(R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヨードプロパノエート (3.00 g、6.65 mmol、CAS: 156017-42-4) を加え、室温で1時間攪拌し有機亜鉛試薬を調製した。

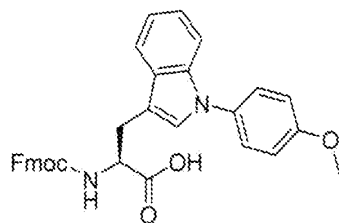
[0500] tert-ブチル4-(3-ヨード-1H-インドール-1-イル)-ベンゾエート (2.79 g、6.65 mmol) のDMF (13 mL) 溶液に、Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.344 g、0.332 mmol、CAS: 52522-40-4)、SPhos (0.546 g、1.33 mmol、CAS: 657408-07-6) を室温に加えた後、調製した有機亜鉛試薬を加えた。60℃で2時間攪拌した後に、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、0℃下で飽和重曹水を加えた。固体をろ過した後に、濾液を酢酸エチルで2回抽出した。混合した有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (石油エーテル/酢酸エチル=97/3-20/80)。

[0501] 得られた生成物の一部 (2.01 g、3.26 mmol) をイソプロパノール (48.9 mL) に溶かし、氷冷下塩化カルシウム (5.79 g、52.1 mmol、CAS: 10043-52-4) を加えた。次いで、水酸化リチウム (0.312 g、13.0 mmol、CAS: 1310-65-2) 水溶液 (16.3 mL) を滴下して加えた。滴下終了後、反応混合物を室温で16時間攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、1 M塩酸水溶液を加え pH=4 に調節し、酢酸エチルで抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ジクロロメタン/メタノール=95/5-80/20)。表記物質を得た。

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 603.3 (M+H)⁺

[0502] 参考例2 Fmoc-W1Ph4OMe-OHの合成

[0503] [化51]

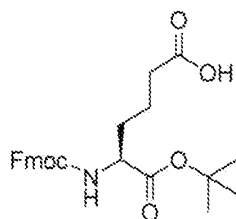


[0504] 参考例1のW1Ph4COO(tBu)と同様に合成を行うことで、W1Ph4OMeを得た。ただし、4-ヨード安息香酸tert-ブチルの代わりに1-ヨード-4-メトキシベンゼンを出発原料に用いた。

ESI-MS(+) 観測値 $m/z = 533.2$ (M+H)⁺

[0505] 参考例3 Fmoc-Hgl-OtBuの合成

[0506] [化52]



[0507] (S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-オキソヘキサン酸(2.00g、4.72mmol、CAS:133464-45-6)をジクロロメタン(47.2mL)、THF(4.72mL)に溶かし、tert-ブチル2,2,2-トリクロロアセチミデート(2.06g、9.45mmol、CAS:98946-18-0)を室温に加えた。反応混合物を室温で12時間攪拌後、45℃で20時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮後、固体をろ過し、ジクロロメタン(50mL)で洗浄した。ろ液を減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した(石油エーテル/酢酸エチル=80/20)。

[0508] 得られた6-アリル1-(tert-ブチル)(S)-2-(((9H

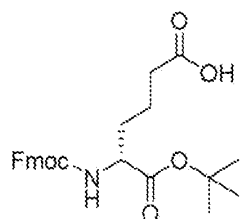
ーフルオレンー9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)ヘキサンジオエート(2.26g、4.72mmol)をジクロロメタン(23.6mL)、THF(23.6mL)に溶かした。次いで、フェニルシラン(1.16mL、9.44mmol、CAS:694-53-1)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0.273g、0.236mmol、CAS:14221-01-3)を0℃で加えた。

[0509] 反応混合物を0℃で1時間攪拌した後に、室温で24時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した(石油エーテル/酢酸エチル=100/0 to 80/20-30/70)。表記物質を得た。

ESI-MS(+) 観測値 $m/z = 384.3$ ($M+H-C_4H_8$) +

[0510] 参考例4 Fmoc-dhgl-OtBuの合成

[0511] [化53]



[0512] D- α -アミノアジピン酸(CAS:7620-28-2)を出発原料に用い、Angew. Chem. Int. Ed., 2016, 55, 1192-1195に記載の方法で(R)-2-(((9H-フルオレンー9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-オキソヘキサン酸を得た。

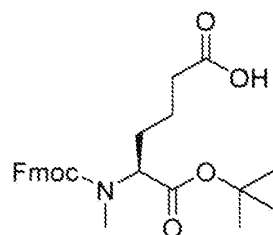
[0513] Hgl-O(tBu)と同様に合成を行うことで、dhgl-O(tBu)を得た。ただし、(S)-2-(((9H-フルオレンー9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-オキソヘキサン酸の代わりに、上記で得られた(R)-2-(((9H-フルオレンー9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-

オキソヘキサン酸を用いた。

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 384.1$ (M + H - C₄H₈)⁺

[0514] 参考例 5 Fmoc-MeHgl-OtBuの合成

[0515] [化54]

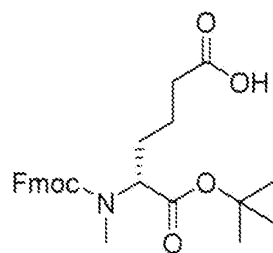


[0516] Hgl-O(tBu)と同様に合成を行うことで、MeHgl-O(tBu)を得た。ただし、(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-オキソヘキサン酸の代わりに、(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-オキソヘキサン酸を出発原料に用いた。

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 398.3$ (M + H - C₄H₈)⁺

[0517] 参考例 6 Fmoc-Medhgl-OtBuの合成

[0518] [化55]



[0519] US 18/109702に記載の方法で(R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-6-(アリルオキシ)-6-オキソヘキサン酸を得た。ただし、(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-(

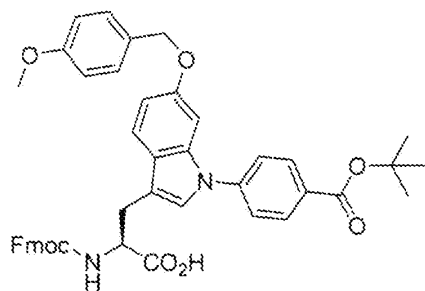
アリルオキシ) - 6 - オキソヘキサン酸の代わりに (R) - 2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 6 - (アリルオキシ) - 6 - オキソヘキサン酸を出発原料に用いた。

[0520] HgI - O (tBu) と同様に合成を行うことで Me dhgI - O (tBu) を得た。ただし、(S) - 2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 6 - (アリルオキシ) - 6 - オキソヘキサン酸の代わりに、上記で得られた (R) - 2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) (メチル) アミノ) - 6 - (アリルオキシ) - 6 - オキソヘキサン酸を用いた。

ESI - MS (+) 観測値 $m/z = 398.1$ ($M+H-C_4H_8$)

[0521] 参考例 7 Fmoc - W6H (PMB) 1Ph4COO (tBu) - OH
の合成

[0522] [化56]



[0523] 1H - インドール - 6 - オール (15.0 g、113 mmol、CAS : 2380 - 86 - 1) のDMF溶液 (225 mL) に炭酸セシウム (73.4 g、225 mmol、CAS : 534 - 17 - 8)、4 - メトキシベンジルクロリド (16.9 mL、124 mmol、CAS : 824 - 94 - 2) を加え、室温で24時間攪拌した。反応液を酢酸エチル及び飽和食塩水で希釈し、固体をろ過した。濾液を酢酸エチルで2回抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で3回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた固体をジクロロメタンに懸濁し、ろ取した。

[0524] 得られた生成物の一部 (3.7 g、14.5 mmol) のDMF (13 m

L) 溶液に、4-ヨード安息香酸ターシャリーブチルエステル (4.0 g、13.2 mmol、CAS: 120363-13-5)、炭酸セシウム (6.5 g、19.8 mmol) 及びヨウ化銅 (0.50 g、2.6 mmol、CAS: 7681-65-4) を加え、120℃で7時間攪拌した。反応液を酢酸エチル及び飽和食塩水で希釈し、セライトろ過した。濾液を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で2回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ヘプタン/酢酸エチル=97/3-80/20)。

[0525] 得られた生成物の一部 (5.6 g、12.9 mmol) をDMF (431 mL) に溶解し、N-ヨードスクシンイミド (2.9 g、12.8 mmol、CAS: 516-12-1) を加え室温で3時間攪拌した。反応液を氷冷し、チオ硫酸ナトリウム水溶液でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し (ヘプタン/酢酸エチル=90/10-50/50)、4-(3-ヨード-6-((4-メトキシベンジル) オキシ)-1H-インドール-1-イル) 安息香酸ターシャリーブチルエステルを得た。

[0526] 室温下、亜鉛 (2.0 g、31 mmol、CAS: 7440-66-6) をDMF (26 mL) に懸濁し、ヨウ素 (2.6 g、10.4 mmol、CAS: 7790-99-0) を加え、室温下20分間攪拌した。反応液にメチル(R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) アミノ)-3-ヨードプロパノエート (5.6 g、12.5 mmol、CAS: 156017-42-4) を加え室温で3時間攪拌し、有機亜鉛試薬を調製した。

[0527] 4-(3-ヨード-6-((4-メトキシベンジル) オキシ)-1H-インドール-1-イル) 安息香酸ターシャリーブチルエステル (5.7 g、10.4 mmol) のDMF溶液 (26 mL) にPd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.54 g、0.52 mmol、CAS: 52522-40-4)、S

Phos (0.85 g、2.1 mmol、CAS: 657408-07-6) を室温に加えた後、調製した有機亜鉛試薬を加えた。反応液を70℃で3時間攪拌した。反応液を酢酸エチル及び飽和食塩水で希釈し、セライトろ過した。濾液を酢酸エチルで抽出後、得られた有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘキサン／酢酸エチル＝85／15－45／55）。

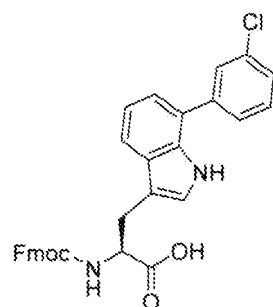
- [0528] 得られた生成物の一部（5.0 g、6.7 mmol）をテトラヒドロフラン（34 mL）及びイソプロパノール（16.7 mL）に溶かし、氷冷下塩化カルシウム（11.9 g、107 mmol、CAS: 10043-52-4）水溶液（11.7 mL）を加えた後、水酸化リチウム（0.64 g、26.8 mmol、CAS: 1310-65-2）水溶液（5.0 mL）を滴下し加えた。滴下終了後、反応混合物を室温で2日間攪拌した。1 M塩酸を加えpH＝3に調節した。反応液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘプタン／酢酸エチル＝65／35－0／100、その後ジクロロメタン／メタノール＝100／0－90／10）。目的物を含むフラクションを濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／メタノール＝100／0－90／10）。表記物質を得た。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 739.3$ (M+H)⁺

- [0529] 参考例 8 Fmoc-W7Ph3C-OHの合成

- [0530]

[化57]



[0531] 7-ブロモ-1H-インドール (19.6 g、100 mmol、CAS : 51417-51-7)、(3-クロロフェニル) ボロン酸 (18.8 g、120 mmol、CAS : 63503-60-6)、Pd (PPh₃)₄ (5.8 g、5.0 mmol、CAS : 14221-01-3)、リン酸三カリウム (63.7 g、300 mmol、CAS : 7778-53-2) を、1,4-ジオキサン (450 mL) 及び水 (50 mL) に溶かし、100℃ 下75分攪拌した。反応液を水で希釈し、酢酸エチルで2回抽出した。混合した有機層を水で洗浄し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ヘキサン/酢酸エチル=90/10-70/30)

得られた生成物の一部 (6.8 g、30 mmol) のDMF (80 mL) 溶液に水酸化カリウム (4.2 g、75 mmol) を加えた後、氷冷下ヨウ素 (7.6 g、30 mmol、CAS : 7553-56-2) のDMF溶液 (20 mL) を加え、室温で30分攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し (ヘプタン/酢酸エチル=90/10-80/20)、7-(3-クロロフェニル)-3-ヨード-1H-インドールを得た。

[0532] 室温下、亜鉛 (3.9 g、60 mmol) をDMF (50 mL) に懸濁し、ヨウ素 (1.5 g、6.0 mmol) を加え60℃下30分間攪拌した。反応液にメチル (R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル) メトキ

シ) カルボニル) アミノ) -3-ヨードプロパノエート (10.8 g、24.0 mmol、CAS: 156017-42-4) を加え室温で90分間攪拌し、有機亜鉛試薬を調製した。

[0533] 7-(3-クロロフェニル)-3-ヨード-1H-インドール (7.1 g、20 mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (1.0 g、1.0 mmol、CAS: 52522-40-4)、SPhos (1.6 g、4.0 mmol、CAS: 657408-07-6) を室温に加え、60℃で30分攪拌した後、調製した有機亜鉛試薬を加え、60℃で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、氷冷下0.5 M塩酸を加えクエンチした。氷冷下5分攪拌した後、セライトろ過し、酢酸エチルで洗浄した。濾液を酢酸エチルで抽出後、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ヘキサン/酢酸エチル=90/10-40/60)。

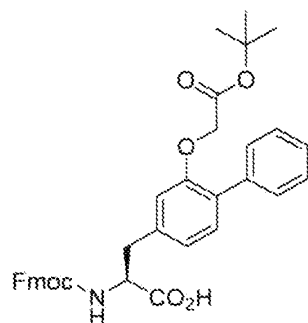
[0534] 得られた生成物の一部 (4.4 g、8.0 mmol) をイソプロパノール (120 mL) に溶かし0℃で塩化カルシウム (14.2 g、128 mmol、CAS: 10043-52-4) を加えた後、水酸化リチウム (0.77 g、31.9 mmol、CAS: 1310-65-2) 水溶液 (40 mL) を滴下して加えた。滴下終了後、反応混合物を室温で30分間攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、1 M 塩酸 (30 mL) を加え、 $\text{pH}=3-4$ に調節した。反応液を酢酸エチルで3回抽出した。混合した有機層を水で洗浄後、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ヘプタン/酢酸エチル=30/70-80/20)。表記物質を得た。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 537.2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺

[0535] 参考例9 Fmoc-pBph2aao (tBu)-OHの合成

[0536]

[化58]



[0537] 4-ブロモ-[1, 1'-ビフェニル]-2-オール (4.5 g、18.0 mmol、CAS: 1679324-76-5) をアセトン (90 mL) に溶かし、炭酸セシウム (8.8 g、27.0 mmol、CAS: 534-17-8) 及びターシャリーブチル 2-ブロモアセテート (4.0 mL、27.0 mmol、CAS: 5292-43-3) を加え、室温で19時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮し、飽和重曹水でクエンチした。混合物を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し (ヘプタン/酢酸エチル=97/3-90/10)、ターシャリーブチル 2-((4-ブロモ-[1, 1'-ビフェニル]-2-イル)オキシ)アセテートを得た。

[0538] 室温下、亜鉛 (3.6 g、55 mmol) を DMF (45 mL) に懸濁し、ヨウ素 (4.6 g、18.2 mmol) を加え室温下30分間攪拌した。反応液にメチル (R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヨードプロパノエート (5.6 g、12.5 mmol、CAS: 156017-42-4) を加え室温で3.5時間攪拌し、有機亜鉛試薬を調製した。ターシャリーブチル 2-((4-ブロモ-[1, 1'-ビフェニル]-2-イル)オキシ)アセテート (6.6 g、18.2 mmol) の DMF 溶液 (45 mL) に $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (0.94 g、0.91 mmol、CAS: 52522-40-4) 及び

SPhos (1.5 g、3.6 mmol、CAS: 657408-07-6) を室温に加えた後、調製した有機亜鉛試薬を加えた。反応液を70℃で3時間攪拌した。反応液を酢酸エチル及び飽和食塩水で希釈し、セライトろ過した。濾液を酢酸エチルで抽出後、得られた有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘキサン／酢酸エチル＝90／10－40／60）。

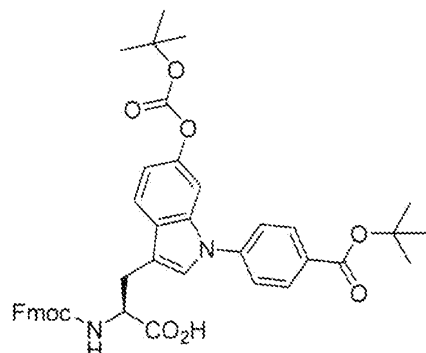
[0539] 得られた生成物の一部 (2.9 g、4.7 mmol) をテトラヒドロフラン (24 mL) 及びイソプロパノール (11.9 mL) に溶かし、氷冷下塩化カルシウム (6.3 g、56.9 mmol、CAS: 10043-52-4) 水溶液 (8.3 mL) を加えた後、水酸化リチウム (0.34 g、14.2 mmol、CAS: 1310-65-2) 水溶液 (3.6 mL) を滴下し加えた。滴下終了後、反応混合物を室温で16時間攪拌した。1 M塩酸を加え pH = 3 に調節した。反応液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘプタン／酢酸エチル＝80／20－60／40、その後ジクロロメタン／メタノール＝95／5－80／20）。表記物質を得た。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 538.3$ (M+H)⁺

[0540] 参考例 10 Fmoc-W6H(Boc)1Ph4COO(tBu)-OH の合成

[0541]

[化59]



[0542] 1H-インドール-6-オール (35.0 g、263 mmol、CAS : 2380-86-1) のDMSO溶液 (700 mL) に4-ヨード安息香酸ターシャリーブチル (88 g、289 mmol、CAS : 120363-13-5)、臭化銅 (I) (1.9 g、13.1 mmol、CAS : 7787-70-4)、炭酸カリウム (109 g、789 mmol、CAS : 534-17-8)、 α -D-ガラクトuron酸水和物 (5.6 g、26.3 mmol、CAS : 91510-62-2) を室温に加え、100℃で終夜攪拌した。混合物をろ過し、固体を酢酸エチルで洗浄した。濾液を混合し、飽和塩化アンモニウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。

[0543] 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (石油エーテル/酢酸エチル=80/20)。得られた生成物の一部 (13.7 g、44.3 mmol) をアセトニトリル (140 mL) に溶解後、DMAP (0.54 g、4.43 mmol)、Boc₂O (9.7 g、44.3 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応を水でクエンチ後、酢酸エチルで抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。

[0544] 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (石油エーテル/酢酸エチル=83/17)。得られた混合物の一部 (16.2 g、39.6 mmol) をDMF (160 mL) に溶かし、氷冷下N-ヨードス

クシンイミド (9.8 g、43.5 mmol、CAS: 516-12-1) を加え2時間攪拌した。氷冷下、飽和重曹水でクエンチし、水で希釈した。得られた混合物を酢酸エチルで抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(石油エーテル/酢酸エチル=95/5)、ターシャリーブチル4-(6-((ターシャリーブトキシカルボニル)オキシ)-3-ヨードインドール-1-イル-ベンゾエートを得た。

[0545] 室温下、亜鉛 (7.0 g、106 mmol、CAS: 7440-66-6) をDMF (400 mL) に懸濁し、ヨウ素 (2.7 g、10.6 mmol、CAS: 7790-99-0) を加え、室温下20分間攪拌した。反応液にメチル(R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヨードプロパノエート (19 g、42.6 mmol、CAS: 156017-42-4) を加え室温で1時間攪拌した。

[0546] 得られた混合物にターシャリーブチル4-(6-((ターシャリーブトキシカルボニル)オキシ)-3-ヨードインドール-1-イル-ベンゾエート (19 g、36 mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (1.82 g、1.8 mmol、CAS: 52522-40-4)、SPhos (2.91 g、7.1 mmol、CAS: 657408-07-6) を室温で加えた後、50℃で3時間攪拌した。反応液を室温に戻し、反応を水でクエンチした。混合物をろ過し、固体を酢酸エチルで洗浄した。

[0547] 得られた濾液を混合し、酢酸エチルで抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した(石油エーテル/酢酸エチル=67/33)。

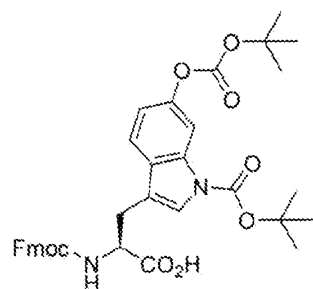
[0548] 得られた生成物の一部と別ロットとの混合物 (40 g、55 mmol) をイソプロパノール (900 mL) に溶かし、氷冷下塩化カルシウム (96.9 g、873 mmol、CAS: 10043-52-4) 水溶液 (240 mL)

L)を加えた後、水酸化リチウム (5.24 g、218 mmol、CAS : 1310-65-2) 水溶液 (60 mL) を滴下し加えた。滴下終了後、反応混合物を室温で終夜攪拌した。リン酸二水素ナトリウム水溶液を加え pH = 4 に調節した。反応液を酢酸エチルで抽出し、混合した有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し、減圧下濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (C18、グラジエント : 40 分間かけて 10 mM 炭酸水素アンモニウム含有 H₂O / アセトニトリル = 95 / 5 - 0 / 100)。表記物質を得た。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 741.4$ ($M + Na$)⁺

[0549] 参考例 11 Fmoc-W6H (Boc, Boc) -OH の合成

[0550] [化60]



[0551] ターシャリーブチル (1H-インドール-6-イル) カーボネート (4.6 g、19.5 mmol、CAS : 873779-75-0) の DMF 溶液 (65 mL) に N-ヨードスクシンイミド (4.4 g、19.5 mmol、CAS : 516-12-1) を加え 25℃ 下 2 時間攪拌した。氷冷し、チオ硫酸ナトリウム水溶液でクエンチし、酢酸エチルで 2 回抽出した。混合した有機層を炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した (20% ジクロロメタン含有ヘプタン / 20% ジクロロメタン含有酢酸エチル = 100 / 0 - 70 / 30)。

[0552] 得られた生成物の一部 (5.2 g、14.5 mmol) の DMF 溶液 (48 mL) に二炭酸ジターシャリーブチル (3.8 g、17.3 mmol、C

AS : 24424-99-5) 及び4-ジメチルアミノピリジン (0.18 g、1.45 mmol、CAS : 1122-58-3) を加え25℃下3時間攪拌した。混合物を飽和食塩水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し (ヘプタン/酢酸エチル=95/5-80/20)、ターシャリーブチル-6-((ターシャリーブトキシカルボニル)オキシ)-3-ヨード-1H-インドール-1-カルボキシレートを得た。

[0553] 亜鉛 (2.9 g、43.8 mmol、CAS : 7440-66-6) をDMF (37 mL) に懸濁し、ヨウ素 (3.7 g、14.6 mmol、CAS : 7553-56-2) を加え25℃で30分間攪拌した。懸濁液にメチル(R)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヨードプロパノエート (7.9 g、17.5 mmol、CAS : 156017-42-4) を加え、25℃下、2時間攪拌し、有機亜鉛試薬を調製した。

[0554] 25℃下、ターシャリーブチル-6-((ターシャリーブトキシカルボニル)オキシ)-3-ヨード-1H-インドール-1-カルボキシレート (6.7 g、14.6 mmol) のDMF溶液に、Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.76 g、0.73 mmol、CAS : 52522-40-4)、SPhos (1.2 g、2.9 mmol、CAS : 657408-07-6) を加えた後、調製した有機亜鉛試薬を加え、70℃下2時間攪拌した。室温に戻し、酢酸エチル及び飽和食塩水で希釈後、セライトろ過した。濾液を酢酸エチルで抽出し、炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した (ヘプタン/酢酸エチル=90/10-60/40)。

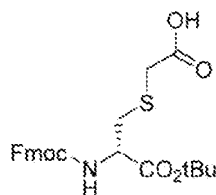
[0555] 得られた生成物の一部 (8.3 g、12.7 mmol) のTHF/2-プロパノール溶液 (95 mL、2/1) に氷冷下、塩化カルシウム (16.9

g、152 mmol、CAS：10043-52-4）の水溶液（22 mL）を加えた後、水酸化リチウム（0.91 g、38.1 mmol、CAS：1310-65-2）の水溶液（9.5 mL）を加え、25℃下終夜攪拌した。反応液に1 N塩酸（38 mL）を加えた後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した（ジクロロメタン／メタノール＝95／5－90／10）。表記物質を得た。

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 531.2$ ($M-C_8H_{16}+H$) +

[0556] 参考例 12 Fmoc-dcaa-OtBuの合成

[0557] [化61]



[0558] ((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル-D-システイン（14.0 g、40.8 mmol、CAS：157355-80-1）のTHF溶液に氷冷下炭酸水素ナトリウム（6.9 g、82.0 mmol）の水溶液（102 mL）及びアリル2-クロロアセテート（5.2 mL、44.9 mmol、CAS：2916-14-5）を加え、25℃下4時間攪拌した。1 M塩酸を加えpH＝4に調節し酢酸エチルで2回抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で洗浄後、ろ過し減圧下濃縮した。

[0559] 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘプタン／酢酸エチル＝90／10－20／80）。得られた生成物の一部（9.0 g、20.4 mmol）のジクロロメタン溶液（102 mL）に氷冷下、オーターシャリーブチル-N,N'-ジイソプロピルイソ尿素（20.4 g、102 mmol、CAS：71432-55-8）を加えた後、40℃下

6時間攪拌した。生じた固体を濾別し、酢酸エチルで洗浄した。濾液を飽和重曹水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮した。

[0560] 得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘキサン／酢酸エチル＝80／20－30／70）。得られた生成物の一部（4.4 g、8.8 mmol）のジクロロメタン溶液（44 mL）に氷冷下、フェニルシラン（2.2 mL、17.7 mmol）、Pd(PPh₃)₄（2.0 g、1.8 mmol）を加え25℃下4時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ヘプタン／酢酸エチル＝90／10－40／60）。表記物質を得た。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 402.0$ (M-C₄H₈+H)

+

請求の範囲

[請求項1]

以下のアミノ酸配列：

X 1－X 2－X 3－X 4－X 5－X 6－X 7－X 8－X 9－X 1 0
－X 1 1－X 1 2－X 1 3－X 1 4－X 1 5（配列番号2）

ここにおいて、

X 1 は、任意のアミノ酸又はペプチドであり；

X 2 は、任意のアミノ酸であり；

X 3 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；

X 4 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；

X 5 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいシクロアルキルを有するアミノ酸であり；

X 6 は、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸であり；

X 7 は、任意の二級アミノ酸、N－アルキルアミノ酸又はペプチドであり；

X 8 は、任意のアミノ酸であり；

X 9 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸であり；

X 1 0 は、Rであり；

X 1 1 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキル基を含むアミノ酸であり；

X 1 2 は、置換されていてもよい脂肪族アミノ酸、又は側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸であり；

X 1 3 は、任意の二級アミノ酸、N－アルキルアミノ酸又はペプチドであり；

X 1 4 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり；

X 1 5 は、任意のアミノ酸である、
で示されるアミノ酸配列を含むペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項2]

以下の1つ又は2以上の要件を具備する、

X 1 が、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は、アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド、である；

X 3 が、置換されていてもよいF又はWである；

X 4 が、置換があってもよいF又はY、若しくはナフチルアラニンである；

X 5 が、置換があってもよいF、Y又はナフチルアラニン、又は、置換があってもよいシクロヘキシルアラニンである；

X 6 が、それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸である；

X 8 が、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキルを有するアミノ酸である；

X 9 が、置換があってもよいF又はY、又は側鎖に置換されていてもよいヘテロシクロアルキル基を含むアミノ酸、又はアラニンである；

X 1 2 が、側鎖に含まれる炭素数が3以上である、脂肪族アミノ酸、又は、側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸である；

X 1 3 が、N-アルキルアミノ酸である；

X 1 4 が、置換があってもよいF又はYである；及び、

X 1 5 が、側鎖末端に硫黄（S）元素を有するアミノ酸である、
請求項1に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項3]

以下の：

X 1 が、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は、アミド窒素に付加された側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するペプチド、である；

X 3 が、置換されていてもよい F 又は W である；

X 4 が、置換があってもよい F 又は Y、若しくはナフチルアラニンである；

X 5 が、置換があってもよい F、Y 又はナフチルアラニン、又は、置換があってもよいシクロヘキシルアラニンである；

X 6 が、それに含まれる炭素原子が酸素原子に置換されていてもよい、分岐鎖アルキル基を有するアミノ酸、又はシクロアルキル基を有するアミノ酸である；

X 8 が、側鎖に置換されていてもよい芳香環、又は置換されていてもよいアルキル基又はシクロアルキルを有するアミノ酸である；

X 9 が、置換があってもよい F 又は Y、又は側鎖に置換されていてもよいヘテロシクロアルキル基を含むアミノ酸、又はアラニンである；

X 1 2 が、側鎖に含まれる炭素数が 3 以上である、脂肪族アミノ酸、又は、側鎖に置換されていてもよいアルキル鎖を有するアミノ酸である；

X 1 3 が、N-アルキルアミノ酸である；

X 1 4 が、置換があってもよい F 又は Y である；及び、

X 1 5 が、脂肪族アミノ酸であり、さらに X 1 6 として脂肪族アミノ酸又はプロリンが付加されている、
1 つ又は 2 以上の要件を具備する、請求項 1 に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項 4]

以下の：

X 1 が、A、Me A、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、N、CrmG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、

KCOpipzaa、CeG、CrbG、K、KMe、Hly、E、Hgl、Orn、Dab、MeE、D又はMeHglである；

X2が、R、Dap、K、E、A、da、S、G、de、dkCOpipzaa、ddab、又はdornである；

X3が、W、W7N、F44Py、Bph、W6N、F41dMeCmm4Pyz、W1Bn、W6H、W1Ph、Bph4ms、W1aa、W7Ph3C、W1Ph4OMe、W1Ph4COO、F42Py又はW6H1Ph4COOである；

X4が、Y、3Py6NH2、YBn、Yae、Na11、Yph又はmBphである；

X5が、MeF、MeY、MeF3Me、F、MeCha、MeYap、MeA1Ac4pip、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeF4OMe又はMeF4Cである；

X6が、I、Gcpe又はTMeである；

X7が、MeG、MeA、Meda、dp、EtG又はPrGである；

X8が、Y、F4COO、K、4Py、F、F3aaO、F3OMe、A4paa、KCOpipzaa、Bph2C、Bph2OMe、又はpBph2aaOである；

X9が、Y、F4COO、3Py、4Py、F4aaO、F4CON、F3CON、F4F又はF4OMeである；

X11が、MeF、Me4Py、Me3Py、F、Cha、MeCha、MeK、MeKMe、MeF4am、MeD、MeE、MeF4COO又はF4amである；

X12が、L、Ahp、Ano、Ado、Ade、Aoc、SPent、HseBu、AhpOMe、HsePr又はAunである；

X13が、MeA、MeE、MeKCOpipzaa、MeK、MeDap又はMeDabである；

X14が、MeF、MeF3Et、Me4Py、Me3Py又はMemBphである；及び、

X15が、C、MeC、dc、Medc、dhcy、Hcy又はdeである、

1つ又は2以上の要件を具備する、請求項1に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項5]

以下の：

X1が、A、MeA、Dap、ApG、CrpG、CmG、MeD、N、CrnG、MeopG、MeeG、AcapG、A4paa、KCOpipzaa、CeG、CrbG、K、KMe、Hly、E、Hgl、Orn、Dab、MeE、D又はMeHglである；

X2が、R、Dap、K、E、A、da、S、G、de、dkCOpipzaa、ddab、又はdornである；

X3が、W、W7N、F44Py、Bph、W6N、F41dMeCmm4Pyz、W1Bn、W6H、W1Ph、Bph4ms、W1aa、W7Ph3C、W1Ph4OMe、F42Py、W1Ph4COO、又はW6H1Ph4COOである；

X4が、Y、3Py6NH2、YBn、Yae、Na11、Yph又はmBphである；

X5が、MeF、MeY、MeF3Me、F、MeCha、MeYap、MeA1Ac4pip、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeF4OMe又はMeF4Cである；

X6が、I、Gcpe又はTMeである；

X7が、MeG、MeA、Meda、dp、EtG又はPrGである；

X8が、Y、F4COO、K、4Py、F、F3aao、F3OMe、A4paa、KCOpipzaa、Bph2C、Bph2OMe、又はpBph2aaoである；

X 9 が、Y、F 4 C O O、3 P y、4 P y、F 4 a a o、F 4 C O N、F 3 C O N、F 4 F 又は F 4 O M e である；

X 1 1 が、M e F、M e 4 P y、M e 3 P y、F、C h a、M e C h a、M e K、M e K M e、M e F 4 a m、M e D、M e E、M e F 4 C O O 又は F 4 a m である；

X 1 2 が、L、A h p、A n o、A d o、A d e、A o c、S P e n t、H s e B u、A h p O M e、H s e P r 又は A u n である；

X 1 3 が、M e A、M e E、M e K C O p i p z a a、M e K、M e D a p 又は M e D a b である；

X 1 4 が、M e F、M e F 3 E t、M e 4 P y、M e 3 P y 又は M e m B p h である；及び、

X 1 5 が、A e o a c、A p e、d h g l、H g l、M e H g l、M e d h g l、M e A e o a c 若しくは M e A p e であるか、あるいは、X 1 5 が G、d a、A、若しくは d e であり、そして、X 1 6 として M e A、M e d a、G、d a、M e G、P 又は A が付加されている、

1 つ又は 2 以上の要件を具備する、請求項 1 に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項6]

以下の：

X 1 が、A、M e A、D a p、A p G、C r p G、C m G、M e D、N、C r m G、M e o p G、M e e G、A c a p G、A 4 p a a、K C O p i p z a a、C e G、C r b G、K、K M e、H l y、E、H g l、O r n、D a b、M e E、D、又は M e H g l である；
；及び、

X 1 5 が、A e o a c、A p e、d h g l、H g l、M e H g l、M e d h g l、M e A e o a c 若しくは M e A p e であるか、あるいは、X 1 5 が G、d a、A、若しくは d e であり、そして、X 1 6 として M e A、M e d a、G、d a、M e G、P 又は A が付加されている

る、

1つ又は2の要件を具備する、請求項1に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項7] 配列番号2-368のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又は、からなる、請求項1に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。

[請求項8] 以下のアミノ酸配列：

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA-MeF-C（配列番号1）

あるいは、

上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、11番目、12番目、13番目、14番目、及び15番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-14個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む、ペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項9] 前記ペプチドが、環状ペプチドである、請求項1-8のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項10] クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する、請求項1、2、4、6、7、8のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項11] 前記ペプチドに含まれる1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、15番目のアミノ酸残基のカルボキシ基とが結合された環状構造を有する、請求項1、3、5、6、7のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項12] 前記ペプチドに含まれる1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、16番目のアミノ酸残基のカルボキシ基とが結合された環状構造を有する

- 、請求項 1、3、5、6、7 のいずれか 1 項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項13] 前記ペプチド内において、さらに架橋構造を有する、請求項 9 に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項14] X 1、X 2 又は X 3 のいずれかと、X 1 1 又は X 1 3 との間で架橋構造を有する、請求項 9 に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項15] 配列番号 2 3 8－2 9 0、3 2 6－3 2 9、3 3 4－3 3 8、3 4 8－3 5 4、3 5 8－3 6 0、3 6 2－3 6 6、3 6 8 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、又は、からなる、請求項 1 2 に記載のペプチド、又は、その薬学的に許容される塩。
- [請求項16] さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項17] C 末端にリンカーを含む、請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項18] 請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む、医薬組成物。
- [請求項19] ミオスタチン阻害活性を有する、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。
- [請求項20] ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を予防、又は治療するための、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。
- [請求項21] 請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を用いて、ミオスタチンシグナル伝達を阻害する方法。
- [請求項22] 請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩を含む、ミオスタチン関連疾患又は筋機能低下を伴う疾患若しくは症状を診断するための診断用組成物。
- [請求項23] ペプチド又、その薬学的に許容される塩について
- a) 溶媒への溶解度
 - b) ミオスタチン阻害活性

c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、

d) 実験動物への毒性

の少なくとも1つを試験する、ペプチド又はその薬学的に許容される塩の試験方法であって、

前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩は、請求項1－8のいずれか1項に記載のペプチド、又はその薬学的に許容される塩である

、

前記方法。