(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2005-255689
(P2005-255689A)
(43)公開日　平成17年9月22日(2005.9.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C07K 14/435	C07K 14/435	ZNA	4C084
A61K 35/14	A61K 35/14		4C087
A61K 35/16	A61K 35/16		4H045
A61K 38/28	A61P 3/10		
A61P 3/10	C07K 14/765		

審査請求 有　請求項の数 14　ＯＬ　（全 54 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2005-151458 (P2005-151458)
(22)出願日　平成17年5月24日 (2005.5.24)
(62)分割の表示　特願2000-618327 (P2000-618327)の分割
原出願日　平成12年5月17日 (2000.5.17)
(31)優先権主張番号　60/134,406
(32)優先日　平成11年5月17日 (1999.5.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/159,783
(32)優先日　平成11年10月15日 (1999.10.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500209099
コンジュケム，インコーポレーテッド
カナダ国　エイチ２エックス　３ワイ８　ケベック，モントリオール，　プレジデント－ケネディ　アベニュー　２２５，スイート　３９５０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】長時間持続するエキセンジン－４

(57)【要約】
【課題】　それらの低い毒性および治療上の利点を維持しながら、インビボでより長期間持続する作用を提供するように、ＧＬＰ－１、エキセンジン３、エキセンジン４、および他のインシュリン向性ペプチドを改変することが提供された。
【解決手段】　エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－NH_2からなる、改変されたインシュリン向性ペプチド、エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2からなる、改変されたインシュリン向性ペプチド、血液成分に共有結合した、上述の改変されたインシュリン向性ペプチドを含む、結合体、上記の血液成分が、血清アルブミンである、結合体。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$からなる、改変されたインシュリン向性ペプチド。
【請求項２】
エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$からなる、改変されたインシュリン向性ペプチド。
【請求項３】
血液成分に共有結合した、請求項１に記載の改変されたインシュリン向性ペプチドを含む、結合体。
【請求項４】
前記血液成分が、血清アルブミンである、請求項３に記載の結合体。
【請求項５】
血液成分に共有結合した、請求項２に記載の改変されたインシュリン向性ペプチドを含む、結合体。
【請求項６】
前記血液成分が、血清アルブミンである、請求項５に記載の結合体。
【請求項７】
薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、請求項１または２に記載の改変されたインシュリン向性ペプチドを含む、薬学的組成物。
【請求項８】
薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、請求項３、４、５または６に記載の結合体を含む、薬学的組成物。
【請求項９】
患者の糖尿病を処置する方法であって、有効量の請求項１または２に記載の改変されたインシュリン向性ペプチドを、該患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項１０】
患者の糖尿病を処置する方法であって、有効量の請求項３、４、５または６に記載の結合体を、該患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項１１】
患者の糖尿病を処置する方法であって、請求項７または８に記載の薬学的組成物を、該患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項１２】
患者におけるインシュリンの発現を増強する方法であって、有効量の請求項１または２に記載の改変されたインシュリン向性ペプチドを、該患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項１３】
患者におけるインシュリンの発現を増強する方法であって、有効量の請求項３、４、５または６に記載の結合体を、該患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項１４】
患者におけるインシュリンの発現を増強する方法であって、請求項７または８に記載の薬学的組成物を、該患者に投与する工程を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、改変されたインシュリン向性ペプチドに関する。詳細には、本発明は、グルカゴンのレベルに関連する、糖尿病ならびに他のインシュリン向性ペプチドに関連する疾患、消化管の機能および活性の処置のための長期間の作用を有する、改変されたグルカゴン様ペプチドおよびエキセンジンペプチドに関する。

【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
インシュリン向性ペプチドホルモングルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ－１）は、２型のインシュリン非依存性真性糖尿病、ならびに関連する代謝障害（例えば、肥満）の管理のための、可能性のある治療薬として関係している。他の有用なインシュリン向性ペプチドとして、エキセンジン３およびエキセンジン４が挙げられる。有用であるが、ＧＬＰ－１、エキセンジン３、およびエキセンジン４は、主に迅速な血清のクリアランスおよびタンパク質分解性分解に起因して、インビボでの短い血漿半減期に関連する作用の限定された持続期間に苦しむ。ＧＬＰ－１の分解の原因である酵素ジペプチジルペプチダーゼＩＶが同定されている。このペプチダーゼを阻害するため、または。なお生物学的な活性を維持しながらその分解を鈍化させるような様式でＧＬＰ－１を改変するための、広範囲の研究が行われている。これらの広範囲にわたる努力にもかかわらず、長期間持続する活性なＧＬＰ－１は産生されていない。このように、糖尿病の集団は、改良されたＧＬＰ－１ペプチド、エキセンジン３ペプチド、およびエキセンジン４ペプチドについての相当の必要性を有している。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
従って、それらの低い毒性および治療上の利点を維持しながら、インビボでより長期間持続する作用を提供するように、ＧＬＰ－１、エキセンジン３、エキセンジン４、および他のインシュリン向性ペプチドを改変することが必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
（項目１）　血液成分上のアミノ基、ヒドロキシル基、またはチオール基と反応して、安定な共有結合を形成する反応性基を含む、改変されたインシュリン向性ペプチドまたはその誘導体。
（項目２）　前記反応性基が、スクシンイミジル基およびマレイミド基からなる群より選択される、項目１に記載のペプチド。
（項目３）　前記誘導体が、血液タンパク質上のチオール基と反応性である、項目２に記載のペプチド。
（項目４）　前記ペプチドが、配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５からなる群より選択される、項目１に記載のペプチド。
（項目５）　前記ペプチドが、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、および配列番号２２からなる群より選択される、項目１に記載のペプチド。
（項目６）　インシュリン向性ペプチドまたはそのアナログの誘導体を含む組成物であって、該誘導体が、血液成分上のアミノ基、ヒドロキシル基、またはチオール基と反応して、安定な共有結合を形成する反応性基を含み、ここで、該反応性基は、スクシンイミジル基およびマレイミド基からなる群より選択される、ヒトの糖尿病を処置する方法における使用のための、組成物。
（項目７）　前記誘導体が血液成分と反応性である、項目６に記載の組成物。
（項目８）　前記ペプチドが、配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５からなる群より選択される、項目６に記載の組成物。
（項目９）　前記ペプチドが、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、および配列番号２２からなる群より選択される、項目６に記載の組成物。
（項目１０）　インシュリン向性ペプチドの誘導体であって、該誘導体が、ヒト血清アルブミン上のチオール基と反応して共有結合を形成するマレイミド基を含む、誘導体。

（項目１１）　前記ペプチドが、配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５からなる群より選択される、項目１０に記載の誘導体。
（項目１２）　前記ペプチドが、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、および配列番号２２からなる群より選択される、項目１０に記載の誘導体。
（項目１３）　インシュリン向性ペプチドの誘導体を含む組成物であって、該誘導体が、ヒト血清アルブミン上のチオール基と反応して共有結合を形成するマレイミド基を含む、ヒトの糖尿病の処置方法における使用のための、組成物。
（項目１４）　前記ペプチドが、配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５からなる群より選択される、項目１３に記載の組成物。
（項目１５）　前記ペプチドが、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、および配列番号２２からなる群より選択される、項目１３に記載の組成物。
（項目１６）　糖尿病の患者においてインシュリン向性ペプチドのインビボでの半減期を長期化する医薬品の製造のための組成物の使用であって、該組成物は、インシュリン向性ペプチドまたはそのアナログの誘導体を含み、該誘導体は、血液成分上のアミノ基、ヒドロキソ基、またはチオール基と反応して、安定な共有結合を形成する反応性基を含み、ここで、該反応性基が、スクシンイミジル基およびマレイミド基からなる群より選択される、組成物の使用。
（項目１７）　前記誘導体が血液タンパク質と反応する、項目１６に記載の組成物の使用。
（項目１８）　前記ペプチドが、配列番号２、配列番号３、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１４、および配列番号１５からなる群より選択される、項目１６に記載の組成物の使用。
（項目１９）　以下からなる群より選択される、インシュリン向性ペプチド：ＧＬＰ－１（１－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2、ＧＬＰ－１（１－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2、ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2、ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2、Ｄ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2、Ｄ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH^2、エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－NH_2、エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2、エキセンジン－３（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－NH_2、およびエキセンジン－３（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）。
（項目２０）　以下の式のＤ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2：
Ｈｉｓ－（Ｄ－Ａｌａ）－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＭＰＡ）－NH_2；および
以下の式のＤ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2：
Ｈｉｓ－Ｄ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2、
からなる群より選択される、化合物。
（項目２１）　Ｄ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2で

ある、項目２０に記載の化合物。
（項目２２）　Ｄ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2である、項目２０に記載の化合物。
（項目２３）　薬学的に受容可能なキャリアと組合せて、項目２０に記載の化合物を含む、組成物。
（項目２４）　薬学的に受容可能なキャリアと組合せて、項目２１に記載の化合物を含む、組成物。
（項目２５）　薬学的に受容可能なキャリアと組合せて、項目２２に記載の化合物を含む、組成物。
（項目２６）　糖尿病を処置するため、または患者におけるインシュリンの発現を増強させるための、項目２０に記載の化合物の使用。
（項目２７）　糖尿病を処置するため、または患者におけるインシュリンの発現を増強させるための、項目２１に記載の化合物の使用。
（項目２８）　糖尿病を処置するため、または患者におけるインシュリンの発現を増強させるための、項目２２に記載の化合物の使用。
（項目２９）　血液タンパク質に対して共有結合した項目２０に記載の化合物を含む、結合体。
（項目３０）　前記血液タンパク質がアルブミンである、項目２９に記載の結合体。
（項目３１）　血液タンパク質に対して共有結合した項目２１に記載の化合物を含む、結合体。
（項目３２）　前記血液タンパク質がアルブミンである、項目３１に記載の結合体。
（項目３３）　血液タンパク質に対して共有結合した項目２２に記載の化合物を含む、結合体。
（項目３４）　前記血液タンパク質がアルブミンである、項目３３に記載の結合体。
【０００５】
（発明の要旨）
これらの要件を満たすために、本発明は、改変されたインシュリン向性ペプチド（ＩＴＰ）に関する。本発明は、共有結合を形成するように流動的な血液のタンパク質を含む細胞性のキャリア上の利用可能な官能基と反応し得る、新規の化学的に反応性であるインシュリン向性ペプチドの誘導体に関する。詳細には、本発明は、共有結合を形成するように流動的な血液のタンパク質上の利用可能な官能基と反応し得る、グルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ）およびエキセンジン３およびエキセンジン４のような、インシュリン向性ペプチドの新規の化学的に反応性の誘導体に関する。本発明はまた、共有結合を形成するように流動性の血液のタンパク質上の利用可能な官能基と反応し得る、インシュリン向性ペプチドの新規の化学的に反応性の誘導体またはアナログに関する。
【０００６】
本発明は、安定な共有結合を形成するように血液の化合物上の、アミノ基、ヒドロキシル基、またはチオール基と反応する反応性基を含有している、改変されたインシュリン向性ペプチドに関する。
【０００７】
本発明は、ＧＬＰ－１およびその誘導体の改変されたフラグメント、詳細には、ＧＬＰ－１（７－３６）アミドを含有している、インシュリン向性ホルモンに関する。本発明はさらに、このような化合物の治療的な使用に関し、そして特に、成人発症型真性糖尿病（ＩＩ型糖尿病）の処置のための、改変されたＧＬＰ－１（７－３６）アミドの使用に関する。
【０００８】
本発明はさらに、改変されたエキセンジン３フラグメントおよびエキセンジン４フラグメント、ならびにこのような化合物の治療的な使用に関する。
【０００９】
詳細には、本発明は、ＧＬＰ－１（１－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2；Ｇ

ＬＰ－１（１－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＡＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；Ｄ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；エキセンジン－３（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；エキセンジン－３（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$；Ｌｙｓ^{26}（ε－ＭＰＡ）ＧＬＰ－１（７－３６）－ＮＨ$_2$；ＧＬＰ－１（７－３６）－ＥＤＡ－ＭＰＡ、およびエキセンジン－４（１－３９）－ＥＤＡ－ＭＰＡに関する。

【００１０】

本発明はさらに、インシュリン向性ペプチドの誘導体を含有している組成物、およびヒトの糖尿病の処置のためのその組成物の使用に関する。

【００１１】

本発明はさらに、インシュリンの発現を増強するための方法に関する。この方法は、上記に開示された改変された有効量のインシュリン向性ペプチドを哺乳動物の膵臓のβ型島細胞に提供する工程を包含する。

【００１２】

本発明はさらに、成人発症型真性糖尿病を処置するための方法に関する。この方法は、このような処置を必要としている患者に対する有効量の上記の有効量のインシュリン向性ペプチドの投与を含む。

【００１３】

本発明はさらに、本発明の改変されたインシュリン向性ペプチドを用いる、他のインシュリン向性ペプチドに関連する疾患および状態の処置に関する。

【００１４】

（発明の効果）

本発明によって、それらの低い毒性および治療上の利点を維持しながら、インビボでより長期間持続する作用を提供するように、ＧＬＰ－１、エキセンジン３、エキセンジン４、および他のインシュリン向性ペプチドを改変することが提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１５】

（発明の詳細な説明）

（定義）

本発明の完全な理解を確実にするために、以下の定義が提供される：

インシュリン向性（Ｉｎｓｕｌｉｎｏｔｒｏｐｉｃ）ペプチド：インシュリン向性ペプチド（ＩＴＰ）は、インシュリン向性活性を有するペプチドである。インシュリン向性ペプチドは、ホルモンであるインシュリンの合成または発現を刺激するか、またはその合成の刺激を引き起こす。このようなペプチドとして、グルカゴン様ペプチド、エキセンジン３、およびエキセンジン４、ならびにインシュリン向性活性を有する他のペプチドのようなペプチドの、前駆体、アナログ、フラグメントが挙げられる。

【００１６】

グルカゴン様ペプチド：グルカゴン様ペペプチド（ＧＬＰ）およびＧＬＰ誘導体は、一般的には、高血糖の間にインシュリンの分泌を刺激し、グルカゴンの分泌を抑制し、（プロ）インシュリンの生合成ををを刺激し、そして胃を空にすることおよび酸の分泌を減速させる、腸のホルモンである。いくつかのＧＬＰおよびＧＬＰ誘導体は、米国特許第５，５７４，００８号（これは、本明細書中で参考として援用されている）に開示されているように、細胞によるグルコースの取り込みを促進するが、インシュリンの発現は刺激しない。

【００１７】

エキセンジン３ペプチドおよびエキセンジン４ペプチド：エキセンジン３およびエキセンジン４のペプチドおよびペプチド誘導体は、ＧＬＰ－１に対して約５３％相同でありそ

してインシュリン向性活性を有する、３９アミノ酸のペプチドである。

【００１８】

反応性基：反応性基は、共有結合を形成し得る化学的な基である。このような反応性の試薬は、改変されたインシュリン向性ペプチドを形成するように、目的のインシュリン向性ペプチドに対してカップリングされるかまたは結合される。反応性基は、一般的には、水性の環境において安定であり、そして通常は、カルボキシ、ホスホリル、または好都合には、エステルまたは混合無水物のいずれかとしてのアシル基、またはイミデートであり、それによって、流動性の血液成分上の標的部位で、アミノ基、ヒドロキシ、またはチオールのような官能基と共有結合を形成し得る。大部分については、エステルとして、フェノール化合物またはチオールエステル、アルキルエステル、リン酸エステルなどが挙げられる。反応性基として、スクシンイミジル基およびマレイミド基が挙げられる。

【００１９】

官能基：官能基は、血液成分上の基であり、それに対して、改変されたインシュリン向性ペプチド上の反応性基が共有結合を形成するように反応する。官能基として、エステル反応物質に結合するためのヒドロキシル基；マレミド（Ｍｌｅｍｉｄｅ）基およびマレイミド基、イミデート基、ならびにチオエステル基に結合するためのチオール基；反応物質上のカルボキシ基、ホスホリル基、またはアシル基に結合するためのアシル基、ならびにアミノ基に結合するためのカルボキシル基があげられる。このような血液成分として、血液のタンパク質が挙げられる。

【００２０】

結合基：結合基は化学的な部分であり、これは、ＩＴＰに反応性基を連結（ｌｉｎｋ）するかまたは結合（ｃｏｎｎｅｃｔ）する。結合基は、１つ以上のアルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基など）、アルコキシ基、アルケニル基、アルキニル基、またはアルキル基で置換されたアミノ基、シクロアルキル基、多環式基、アリール基、ポリアリール基、置換されたアリール基、複素環式基、および置換された複素環式基を含み得る。結合基はまた、ＡＥＡ（（２－アミノ）エトキシ酢酸）のようなポリエトキシアミノ酸、または好ましくは、結合基ＡＥＥＡ（［２－（２－アミノ）エトキシ］エトキシ酢酸）を含み得る。

【００２１】

血液成分：血液成分は、固定されているかまたは流動性のいずれかであり得る。固定された血液成分は、流動性ではない血液成分であり、そして組織、膜レセプター、間質タンパク質、フィブリンタンパク質、コラーゲン、血小板、内皮細胞、上皮細胞、ならびにそれらに関連する膜および膜状のレセプター、体細胞、骨格筋細胞および平滑筋細胞、神経成分、骨細胞および破骨細胞、ならびに全ての体組織であり、特に、循環系およびリンパ系に関連しているものである。流動性の血液成分は、いかなる延長された期間の間も、一般的には、５分以上、より通常は１分以上は、固定された位置を有さない、血液成分である。これらの血液成分は、膜には会合せず、そして長期間の間血液中に存在し、そして少なくとも０．１μｇ／ｍｌの最少濃度で存在する。流動性の血液成分として、血清アルブミン、トランスフェリン、フェリチンおよび免疫グロブリン（例えば、ＩｇＭおよびＩｇＧ）が挙げられる。流動性の血液成分の半減期は、少なくとも約１２時間である。

【００２２】

保護基：保護基は、ペプチド誘導体自体との反応からそのペプチド誘導体を保護するために利用される化学的な部分である。種々の保護基が、本明細書中、および米国特許第５，４９３，００７号（これは、本明細書中で参考として援用されている）に開示されている。このような保護基として、アセチル基、フルオレニルメチルオキシカルボニル（ＦＭＯＣ）基、ｔ－ブチルオキシカルボニル（ＢＯＣ）基、ベンジルオキシカルボニル（ＣＢＺ）基などがあげられる。特定の保護されたアミノ酸が、表１に示される。

【００２３】

【表１】

表1

天然のアミノ酸およびそれらの略号

名称	3文字の略号	1文字の略号	保護されたアミノ酸
アラニン	Ala	A	Fmoc-Ala-OH
アルギニン	Arg	R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
アスパラギン	Asn	N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
アスパラギン酸	Asp	D	Asp(tBu)-OH
システイン	Cys	C	Fmoc-Cys(Trt)
グルタミン酸	Glu	E	Fmoc-Glu(tBu)-OH
グルタミン	Gln	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
グリシン	Gly	G	Fmoc-Gly-OH
ヒスチジン	His	H	Fmoc-His(Trt)-OH
イソロイシン	Ile	I	Fmoc-Ile-OH
ロイシン	Leu	L	Fmoc-Leu-OH
リジン	Lys	K	Fmoc-Lys(Mtt)-OH
メチオニン	Met	M	Fmoc-Met-OH
フェニルアラニン	Phe	F	Fmoc-Phe-OH
プロリン	Pro	P	Fmoc-Pro-OH
セリン	Ser	S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
スレオニン	Thr	T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
トリプトファン	Trp	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH
チロシン	Tyr	Y	Boc-Tyr(tBu)-OH
バリン	Val	V	Fmoc-Val-OH

【００２４】

敏感な官能基：敏感な官能基は、ＩＴＰペプチド上の可能な反応部位を示す原子の基である。存在する場合には、敏感な官能基は、リンカー反応性基の改変のための結合点として選択され得る。敏感な官能基として、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、およびヒドロキシル基があげられるが、これらに限定されない。

【００２５】

改変されたペプチド：改変されたＩＴＰは、反応性基を結合することによって改変されているペプチドであり、そして血液成分に対する結合を通じてペプチダーゼによって安定化されるペプチドを形成し得る。反応性基は、結合基を通じてかまたは選択的に結合基を伴わずにかのいずれかで、治療用のペプチドに対して結合させられ得る。１つ以上のさらなるアミノ酸が、反応性基の結合を容易にするために治療用のペプチドに対して付加され得ることもまた意図される。改変されたペプチドは、血液成分との結合がインビボで生じるようにインビボで投与され得るか、または改変されたペプチドは、まず血液成分とインビトロで結合され得そして得られるペプチダーゼによって安定化されるペプチド（下記に定義されるような）がインビボで投与され得る。用語「改変された治療用のペプチド」および「改変されたペプチド」は、本出願において互換的に使用され得る。

【００２６】

ペプチダーゼによって安定化されるＩＴＰ：ペプチダーゼによって安定化されるＩＴＰは、改変されたペプチドの反応性基と血液成分の官能基との間で、結合基を伴ってかまたはそれを伴わずに形成される共有結合を介して血液成分に対して結合されている、改変されたペプチドである。ペプチダーゼによって安定化されるペプチドは、安定化されていな

いペプチドよりもインビボでペプチダーゼの存在下で安定である。ペプチダーゼによって安定化される治療用のペプチドは、一般的には、同一の配列の安定化されていないペプチドと比較して、少なくとも１０～５０％の増大した半減期を有する。ペプチダーゼ安定性は、血清または血液中の改変された対応の治療用のペプチドの半減期に対して、血清または血液中の改変されていないＩＴＰの半減期を比較することによって決定される。半減期は、改変されたペプチドかまたは改変されていないペプチドの投与後に血清または血液をサンプリングすること、およびペプチドの活性を決定することによって、決定される。活性を決定することに加えて、ＩＴＰの長さはまた、ＨＰＬＣおよび質量スペクトル分析によって測定され得る。

【００２７】

（発明の詳細な説明）

これらの定義を考慮すると、本発明の焦点は、それらの顕著な治療上の特性を改変することなく、バイオアベイラビリティを改善するように、半減期を延長するように、およびタンパク質キャリア上での選択的な結合を通じての分布を広げるように、インシュリン向性ペプチドを改変することである。本発明のための（限定的ではない）選り抜きのキャリアは、マレイミド部分を用いて誘導体化されたインシュリン向性のペプチドによって、その遊離チオールを介して結合されたアルブミンである。

【００２８】

（１．インシュリン向性ペプチド）

（Ａ．ＧＬＰ－１およびその誘導体）

ホルモンであるグルカゴンは、高分子量の前駆体分子として合成されることが公知である。これは続いて以下の３つのペプチドへとタンパク質分解的に切断される：グルカゴン、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）、およびグルカゴン様ペプチド２（ＧＬＰ－２）。ＧＬＰ－１は、配列番号１に示されるように、そのプロセシングされていない形態においては３７アミノ酸を有する。プロセシングされていないＧＬＰ－１は、インシュリンの生合成の誘導を媒介することは本質的には不可能である。しかし、プロセシングされていないＧＬＰ－１ペプチドは、天然においては、配列番号２のＧＬＰ－１のアミノ酸７－３７（「ＧＬＰ－１（７－３７）」）を有する３１アミノ酸の長いペプチド（７－３７ペプチド）に転換される。ＧＬＰ－１（７－３７）はまた、ＧＬＰ－１（７－３６）を生じるようにＣ末端のグリシンのタンパク質分解性除去によるさらなるプロセシングを受け得る。ＧＬＰ－１（７－３６）はまた、Ｃ末端残基であるアルギニンがアミド化された形態であるアルギニンアミドであるＧＬＰ－１（７－３６）アミドとして、優勢に存在する。このプロセシングは、腸において、そして膵臓においてははるかに少ない程度で生じ、そしてＧＬＰ－１（７－３７）のインシュリン向性活性を有するポリペプチドを生じる。

【００２９】

化合物は、ホルモンであるインシュリンを刺激することが可能であるか、またはインシュリンの合成もしくは発現を刺激することが可能である場合には、「インシュリン向性活性」を有すると言われる。ＧＬＰ－１（７－３７）およびＧＬＰ－１（７－３６）のホルモンの活性は、膵臓のβ細胞について特異的であるようであり、ここではこれは、インシュリンの生合成を誘導するようである。本発明のグルカゴン様ペプチドホルモンは、成人発症型真性糖尿病（インシュリンの分泌の動態が異常である高血糖によって特徴付けられる状態）の病因の研究において有用である。さらに、グルカゴン様ペプチドは、この疾患の治療および処置において、そして高血糖の治療および処置において有用である。

【００３０】

ヒトのＧＬＰ－１の決定されたアミノ酸配列から選択されたペプチド部分（フラグメント）は、本発明を含む開発の開始点を構成する。互換的な用語「ペプチドフラグメント」および「ペプチド部分」は、天然に存在するアミノ酸配列から誘導することが可能な、合成のアミノ酸配列および天然に存在するアミノ酸配列の両方を意味する。

【００３１】

ＧＬＰ－１のアミノ酸配列は、いく人かの研究者らによって報告されている（Ｌｏｐｅ

ｚ，Ｌ．Ｃ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：５４８５－５４８９（１９８３）；Ｂｅｌｌ，Ｇ．Ｉ．ら、Ｎａｔｕｒｅ ３０２：７１６－７１８（１９８３）；Ｈｅｉｎｒｉｃｈ，Ｇ．ら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１１５：２１７６－２１８１（１９８４））。プレプログルカゴンｍＲＮＡおよびその対応するアミノ酸配列の構造は周知である。グルカゴンおよび２つのインシュリン向性ペプチドへの、前駆体遺伝子産物であるプログルカゴンのタンパク質分解性プロセシングが、特徴付けられている。本明細書中で使用される場合は、ＧＬＰ－１（１－３７）の表記は、１（Ｎ末端）から３７（Ｃ末端）までの全てのアミノ酸を有するＧＬＰ－１ポリペプチドをいう。同様に、ＧＬＰ－１（７－３７）は、７（Ｎ末端）から３７（Ｃ末端）までの全てのアミノ酸を有するＧＬＰ－１ポリペプチドをいう。同様に、ＧＬＰ－１（７－３６）は、７番目（Ｎ末端）から３６番目（Ｃ末端）までの全てのアミノ酸を有するＧＬＰ－１ポリペプチドをいう。

【００３２】

１つの実施形態においては、ＧＬＰ－１（７－３６）およびそのペプチドフラグメントは、以下に詳細に記載されるような従来の手段によって、例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ｍ．（Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９（１９６２））、ならびに、ＳｔｅｗａｒｔおよびＹｏｕｎｇ（Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｓｔｈｅｓｉｓ（Ｆｒｅｅｍａｎ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，１９６９）、２７－６６頁（これらは、本明細書中で参考として援用されている））によって記載されている周知の固相ペプチド合成によって、合成される。しかし、例えば、タンパク質分解性酵素を使用して天然に存在するアミノ酸配列を断片化することによって、プログルカゴンポリペプチドのフラグメント、ＧＬＰ－１のフラグメントを得ることもまた、可能である。さらに、Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．ら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８２）（これは、本明細書中で参考として援用されている）によって開示されているような、組換えＤＮＡ技術の使用を通じて、プログルカゴンペプチドの所望のフラグメントまたはＧＬＰ－１の所望のフラグメントを得ることが可能である。

【００３３】

本発明は、ＧＬＰ－１（１－３７）およびＧＬＰ－１（７－３６）のような、ＧＬＰ－１から誘導することが可能であるペプチドを含む。ペプチドは、それが天然に存在する配列を断片化することによって得られ得るか、またはそれが天然に存在するアミノ酸配列の配列の知見またはその配列をコードする遺伝物質（ＤＮＡまたはＲＮＡ）の配列の知見に基づいて合成され得る場合には、「天然に存在するアミノ酸配列から誘導することが可能である」と言われる。

【００３４】

ＧＬＰ－１（１－３７）および特に、ＧＬＰ－１（７－３６）のような、ＧＬＰ－１の「誘導体」と言われる分子もまた、本発明の範囲に含まれる。このような「誘導体」は、以下の特徴を有する：（１）ＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１の同様の大きさのフラグメントと実質的な相同性を共有する；（２）インシュリン向性ホルモンとして機能し得る；および（３）本明細書中に提供されるアッセイの少なくとも１つを使用して、その誘導体は以下のいずれかを有する：（ｉ）ＧＬＰ－１のインシュリン向性活性を上回るインシュリン向性活性、またはより好ましくは、（ｉｉ）誘導体が10^{-10}Ｍの濃度で存在する場合にもなお検出され得るインシュリン向性活性、または最も好ましくは、（ｉｉｉ）誘導体が10^{-11}Ｍの濃度で存在する場合にもなお検出され得るインシュリン向性活性。

【００３５】

ＧＬＰ－１の誘導体は、誘導体のアミノ酸配列が、ＧＬＰ－１（１－３７）のアミノ酸配列と、少なくとも８０％、そしてより好ましくは、少なくとも９０％、そして最も好ましくは、少なくとも９５％同一である場合には、ＧＬＰ－１と「実質的な相同性」を共有すると言われる。

【００３６】

本発明の誘導体として、天然に存在するＧＬＰ－１ペプチドの配列に対して実質的に相同である配列を含有することに加えて、それらのアミノ末端および／またはそれらのカルボキシ末端で１つ以上のさらなるアミノ酸を含有し得る、ＧＬＰ－１フラグメントが挙げられる。従って、本発明は、このようなポリペプチドが、ＧＬＰ－１のインシュリン向性活性を超えるインシュリン向性活性を有する限りにおいては、天然に存在するＧＬＰ－１配列中には存在しない１つ以上のアミノ酸を含み得るＧＬＰ－１のポリペプチドフラグメントに関する。さらなるアミノ酸は、Ｄ－アミノ酸またはＬ－アミノ酸、あるいはそれらの組合せであり得る。

【００３７】

本発明はまた、天然に存在するＧＬＰ－１ペプチドの配列に対して実質的に相同である配列を含有しているが、ＧＬＰ－１ペプチド上で天然に見出されるそれらのアミノ末端および／またはカルボキシ末端で１つ以上のさらなるアミノ酸を欠失し得る、ＧＬＰ－１フラグメントを含む。従って、本発明は、このようなポリペプチドがＧＬＰ－１のインシュリン向性活性を上回るインシュリン向性活性を有する限りは、天然に存在するＧＬＰ－１配列中に通常は存在する１つ以上のアミノ酸を欠失し得るＧＬＰ－１のポリペプチドフラグメントに関する。

【００３８】

本発明はまた、そのような改変体が上記のＧＬＰ－１誘導体の活性と実質的に同一のインシュリン向性活性を有する限りにおいては、重要でないアミノ酸置換を有する（そして従って、天然の配列のものとは異なるアミノ酸配列を有する）上記のフラグメントの明らかなまたは平凡な改変体を含む。明らかなまたは平凡な置換の例として、別の残基に代えての１つの塩基性アミノ酸での置換（例えば、Ｌｙｓに代わってＡｒｇ）、別の残基に代えての１つの疎水性残基での置換（例えば、Ｉｌｅに代えてのＬｅｕ）、または別の残基に代えての１つの芳香族残基での置換（例えば、Ｔｙｒに代えてのＰｈｅ）などが挙げられる。

【００３９】

インシュリン向性活性を有するＧＬＰ－１誘導体に加えて、細胞によるグルコースの取り込みを刺激するがインシュリンの発現または分泌は刺激しない、ＧＬＰ－１誘導体が、本発明の範囲内である。このようなＧＬＰ－１誘導体は、米国特許第５，５７４，００８号に記載されている。

【００４０】

本発明での使用が見出される、細胞によるグルコースの取り込みを刺激するがインシュリンの発現または分泌は刺激しないＧＬＰ－１誘導体として、以下が挙げられる：

R_1－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｘａａ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－R_2（配列番号３）（ここでは、R_1は、ａ）H_2N；ｂ）H_2N－Ｓｅｒ；ｃ）H_2N－Ｖａｌ－Ｓｅｒ；ｄ）H_2N－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ；ｅ）H_2N－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号４）；ｆ）H_2N－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号５）；ｇ）H_2N－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号６）；ｈ）H_2N－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号７）；ｉ）H_2N－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号８）；ｊ）H_2N－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号９）；またはｋ）H_2N－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（配列番号１０）から選択される）。このペプチド中で、Ｘは、ＬｙｓまたはＡｒｇから選択され、そしてR_2は、NH_2、ＯＨ、Ｇｌｙ－NH_2、またはＧｌｙ－ＯＨから選択される。これらのペプチドは、Ｃ末端のＧＬＰ－１フラグメントであり、これは、米国特許第５，５７４，００８号に記載されているように、インシュリン向性活性は有さないが、それにもかかわらず、糖尿病および高血糖の状態を処置するために有用である。

【００４１】

（Ｂ．エキセンジン３ペプチドおよびエキセンジン４ペプチド）

エキセンジン３およびエキセンジン４は、３９アミノ酸のペプチドである（残基２および残基３で異なる）。これらは、ＧＬＰ－１に対して約５３％相同であり、そしてインシュリン向性試薬としての使用を見出されている。

【００４２】

エキセンジン－３（配列番号１１）の配列は、ＨＳＤＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳであり、そしてエキセンジン－４（配列番号１２）の配列は、ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳである。

【００４３】

本発明はまた、以下のアミノ酸配列を含有しているエキセンジン－４のインシュリン向性のフラグメントを含む：エキセンジン－４（１－３１）（配列番号１３)ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＹ、およびエキセンジン－４（１－３１）（配列番号１４）ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＹ。

【００４４】

本発明はまた、以下のアミノ酸配列を含有しているエキセンジン－４の阻害フラグメントを含む：

エキセンジン－４（９－３９）（配列番号１５）

ＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳ。

【００４５】

実施例に示される他のインシュリン向性ペプチドが、配列番号１６～２２として示される。

【００４６】

本発明は、天然に存在するエキセンジン３ペプチドおよびエキセンジン４ペプチドから誘導することが可能であるペプチドを含む。ペプチドは、それが天然に存在する配列を断片化することによって得られ得るか、またはそれが天然に存在するアミノ酸配列の配列の知見またはその配列をコードする遺伝物質（ＤＮＡまたはＲＮＡ）の配列の知見に基づいて合成され得る場合には、「天然に存在するアミノ酸配列から誘導することが可能である」と言われる。

【００４７】

エキセンジン３およびエキセンジン４の「誘導体」と呼ばれる分子が、本発明の範囲に含まれる。このような「誘導体」は、以下の特徴を有する：（１）エキセンジン３もしくはエキセンジン４と同様のフラグメントと実質的な相同性を共有するか、またはエキセンジン３もしくはエキセンジン４と同様の大きさのフラグメントを共有する；（２）インシュリン向性ホルモンとして機能し得る；および（３）本明細書中に提供されるアッセイの少なくとも１つを使用して、その誘導体は、以下のいずれかを有する：（ｉ）エキセンジン３もしくはエキセンジン４のいずれかのインシュリン向性活性を上回るインシュリン向性活性、またはより好ましくは、（ｉｉ）誘導体が10^{-10}Ｍの濃度で存在する場合にもなお検出され得るインシュリン向性活性、または最も好ましくは、（ｉｉｉ）誘導体が10^{-11}Ｍの濃度で存在する場合にもなお検出され得るインシュリン向性活性。

【００４８】

エキセンジン３およびエキセンジン４の誘導体は、誘導体のアミノ酸配列が、少なくとも８０％、およびより好ましくは、少なくとも９０％、そして最も好ましくは少なくとも９５％が、エキセンジン３もしくはエキセンジン４のいずれかのアミノ酸配列または誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するエキセンジン３もしくはエキセンジン４のフラグメントのアミノ酸配列と同じである場合に、エキセンジン３およびエキセンジン４と「実質的な相同性」を共有すると言われる。

【００４９】

本発明の誘導体は、天然に存在するエキセンジン３ペプチドまたはエキセンジン４ペプ

チドの配列と実質的に相同な配列を含むことに加えて、そのアミノ末端および／またはカルボキシ末端に１つ以上のさらなるアミノ酸を含み得る、エキセンジン３フラグメントまたはエキセンジン４フラグメントを含む。従って、本発明は、このようなポリペプチドが、エキセンジン３またはエキセンジン４のものを超えるインシュリン向性活性を有する限りにおいては、天然に存在するエキセンジン３配列またはエキセンジン４配列中には存在しないかもしれない１つ以上のアミノ酸を含み得る、エキセンジン３またはエキセンジン４のポリペプチドフラグメントに関する。

【００５０】

同様に、本発明は、天然に存在するエキセンジン３ペプチドまたはエキセンジン４ペプチドの配列に対して実質的に相同である配列を含有しているが、エキセンジン３ペプチドまたはエキセンジン４ペプチド上で天然に見出されるそれらのアミノ末端および／またはカルボキシ末端で１つ以上のさらなるアミノ酸を欠失し得る、エキセンジン３フラグメントまたはエキセンジン４フラグメントを含む。従って、本発明は、このようなポリペプチドがエキセンジン３またはエキセンジン４のものを上回るインシュリン向性活性を有する限りは、天然に存在するエキセンジン３配列またはエキセンジン４配列中に通常は存在する１つ以上のアミノ酸を欠失し得る、エキセンジン３またはエキセンジン４のポリペプチドフラグメントに関する。

【００５１】

本発明はまた、そのような改変体が上記のエキセンジン３誘導体またはエキセンジン４誘導体の活性と実質的に同一のインシュリン向性活性を有する限りにおいては、重要でないアミノ酸置換を有する（そして従って、天然の配列のものとは異なるアミノ酸配列を有する）上記のフラグメントの明らかなまたは平凡な改変体を含む。明らかなまたは平凡な置換の例として、別の残基に代わる１つの塩基性アミノ酸での置換（例えば、ＬｙｓにかえてのＡｒｇ）、別の残基に代えての１つの疎水性残基での置換（例えば、ＩｌｅにかえてのＬｅｕ）、または別の残基に代えての１つの芳香族残基での置換（例えば、ＴｙｒにかえてのＰｈｅ）などが挙げられる。

【００５２】

（２．改変されたインシュリン向性ペプチド）

本発明は、改変されたインシュリン向性ペプチドおよびそれらの誘導体に関する。本発明の改変されたインシュリン向性ペプチドとして、共有結合を形成するように血液成分上の利用可能な反応性の官能基と反応し得る反応性基が挙げられる。本発明はまた、そのような改変、血液成分とのそのような組合せ、およびそれらの使用のための方法に関する。これらの方法は、改変されたインシュリン向性ペプチドのインビボでの有効な治療上の半減期を延長させることを含む。

【００５３】

タンパク質上の官能基と共有結合を形成するために、当業者は、化学的に反応性基（反応部分）として、広範な種々の活性なカルボキシル基を、ヒドロキシル部分がインシュリン向性ペプチドを改変するために必要とされるレベルで生理学的に受容可能である場合には、特に、エステルを、使用し得る。多数の異なるヒドロキシル基が、これらの結合剤として使用され得、最も便利なものは、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、Ｎ－ヒドロキシ－スルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）、マレイミド－ベンゾイル－スクシンイミド（ＭＢＳ）、γ－マレイミド－ブチルオキシスクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）、およびマレイミドプロピオン酸（ＭＰＡ）である。

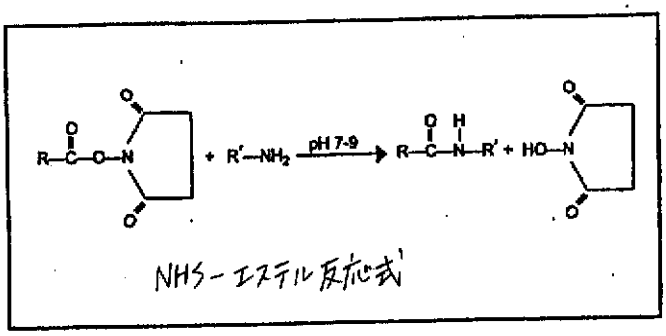
【００５４】

第１級アミンが、以下に模式的に示されるように、ＮＨＳエステルの主な標的である。タンパク質のＮ末端上に存在する接近可能なα－アミン基が、ＮＨＳエステルと反応する。しかし、タンパク質上のα－アミノ基は、ＮＨＳのカップリングのためには所望されないかもしれないし、または利用可能ではないかもしれない。５個のアミノ酸がそれらの側鎖上に窒素を有するが、リジンのε－アミンだけがＮＨＳエステルと有意に反応する。アミド結合は、ＮＨＳエステル結合反応が、以下に模式的に示されるように第１級のアミン

と反応してＮ－ヒドロキシスクシンイミドを放出する場合に、形成される。反応性基を含有しているこれらのスクシンイミドは、スクシンイミジル基と本明細書中で呼ばれる。

【００５５】

【化１】



【００５６】

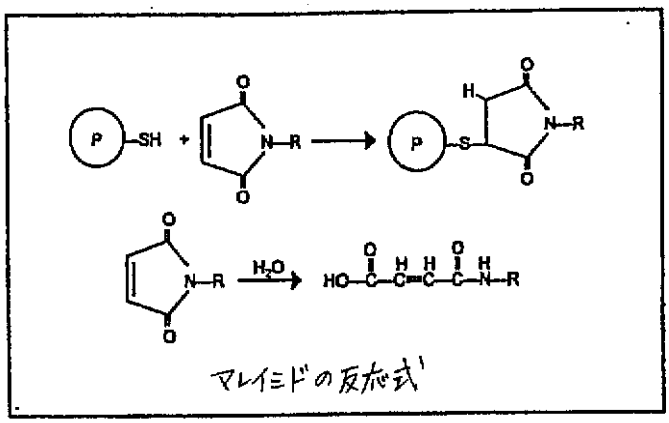
本発明の好ましい実施形態においては、タンパク質上の官能基は、チオール基であり、そして化学的に反応性基は、例えば、（ＧＭＢＡまたはＭＰＡ）のようなマレイミドを含有している基である。ＧＭＢＡはγ－マレイミド－ブチルアミドの代表である。このようなマレイミドを含有している基は、マレイミド基と本明細書中で呼ばれる。

【００５７】

マレイミド基は、反応混合物のｐＨが６．５と７．４との間で維持される場合には、ペプチド上のスルフヒドリル基について最も選択的である。ｐＨ７．０において、スルフヒドリルとのマレイミド基の反応速度は、アミンとの反応速度よりも１０００倍速い。マレイミド基とスルフヒドリルとの間での安定なチオエーテル結合が、形成される。これは、生理学的な条件下では切断され得ない。

【００５８】

【化２】



【００５９】

本発明のインシュリン向性ペプチドおよびペプチド誘導体は、血液成分の特異的な標識および非特異的な標識について改変され得る。

【００６０】

（Ａ．特異的な標識）

好ましくは、本発明の改変されたインシュリン向性ペプチド（ＩＴＰ）は、流動性の血液のタンパク質上のチオール基と特異的に反応するように設計される。このような反応は、好ましくは、血清アルブミンまたはＩｇＧのような流動性の血液のタンパク質上のチオール基へのマレイミド結合（例えば、ＧＭＢＳ，ＭＰＡ、または他のマレイミドから調製される）を用いて改変された治療用のペプチドの共有結合によって確立される。

【００６１】
特定の環境下では、マレイミドでの特異的な標識は、ＮＨＳおよびスルホ－ＮＨＳのような基での流動性のタンパク質の非特異的な標識を上回るいくつかの利点を与える。チオール基は、アミノ基よりもインビボでは豊富ではない。従って、本発明のマレイミド誘導体は、より少ないタンパク質に共有結合する。例えば、アルブミン（最も豊富な血液のタンパク質）中には、単一のチオール基のみが存在する。従って、ＩＴＰ－マレイミド－アルブミン結合体は、アルブミンに対して約１：１のモル比のＩＰを含む傾向にある。アルブミンに加えて、ＩｇＧ分子（クラスＩＩ）もまた、遊離チオールを有する。ＩｇＧ分子および血清アルブミンが血液中の可溶性のタンパク質の大部分を構成するので、これらはまた、マレイミドによって改変されたＩＴＰに共有結合するために利用可能な血液中の遊離チオール基の大部分を構成する。

【００６２】
さらに、遊離チオールを含有している血液のタンパク質の中でも、マレイミドでの特異的な標識は、アルブミン自体の特有の特徴に起因して、ＩＴＰ－マレイミド－アルブミン結合体の優先的な形成を導く。種間で高度に保存されたアルブミンの単一の遊離チオール基は、アミノ酸残基３４（Cys^{34}）に位置する。アルブミンのCys^{34}が、他の遊離チオールを含有しているタンパク質上の遊離チオールと比較して増大した反応性を有することが、最近実証されている。このことは、アルブミンのCys^{34}についての５．５という非常に低いｐＫ値に一部起因する。これは、一般的なシステイン残基についての典型的なｐＫ値（代表的には、約８）よりもはるかに低い。この低いｐＫに起因して、通常の生理学的条件下ではアルブミンのCys^{34}は、主にイオン化された形態であり、これは、報告されているように、その反応性を劇的に増大させる。Cys^{34}の低いｐＫ値に加えて、Cys^{34}の反応性を増強する別の因子がその位置にあり、これは、アルブミンの領域Ｖの１つのループの表面付近の裂け目にある。この位置は、Cys^{34}を全ての種のリガンドに対して非常に有用にし、そしてフリーラジカルのトラップおよび遊離チオールの捕捉剤としてのCys^{34}の生物学的な役割において重要な因子である。これらの特性は、Cys^{34}をＩＴＰ－マレイミドと高く反応性にし、そして反応速度の加速は、他の遊離チオールを含有しているタンパク質とのＴＰ－マレイミドの反応の速度と比較して、１０００倍程度高くし得る。

【００６３】
ＩＴＰ－マレイミド－アルブミン結合体の別の利点は、特にCys^{34}でのアルブミンへのペプチドの１：１のローディングに関連する再現性である。他の技術（例えば、グルタルアルデヒド、ＤＣＣ、ＥＤＣ）、および他の（例えば、遊離アミン）の化学的活性化は、この選択性を欠いている。例えば、アルブミンは、５２個のリジン残基を含有し、そのうちの２５～３０個が、アルブミンの表面上に位置し、そして結合のために接近可能である。これらのリジン残基を活性化すること、あるいはこれらのリジン残基を通じてカップリングするようにペプチドを改変することによって、結合体の不均質の集団を生じる。アルブミンに対して１：１のモル比のペプチドが使用される場合にもなお、収量は、複数の結合産物からなり、いくつかは、１つのアルブミンあたり０、１、２、またはそれ以上のペプチドを含有し、それらのそれぞれが、２５～３０個の利用可能なリジン部位のいずれか１つでランダムにカップリングされたペプチドを有する。多数の組合せが可能である場合は、各群の正確な組成物および性質の特徴付けは困難になり、そして群間での再現性がほとんど不可能である。このことは、このような結合体を治療薬としてより所望されなくする。さらに、アルブミンのリジン残基を介しての結合は１つのアルブミン分子当たりにより多い治療薬を送達する利点を少なくとも有するようであるが、複数の研究が、アルブミンに対して１：１の比の治療薬が好ましいことを示した。Ｓｔｅｈｌｅら、「Ｔｈｅ Ｌｏａｄｉｎｇ Ｒａｔｅ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｅｓ Ｔｕｍｏｒ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ－Ａｌｂｕｍｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｉｎ Ｒａｔｓ」、Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇｓ、第８巻、６７７－６８５頁（１９７７）（その全体において本明細書中で参考として援用されている）に

よる記事においては、編者らは、グルタルアルデヒドを介して結合したアルブミンに対して１：１の比の抗ガンメトトレキセートが最も見込みのある結果を生じたことを報告する。これらの結合体は、腫瘍細胞によって取り込まれるが、結合体（５：１から２０：１のメトトレキセート分子を保有している）は、変化したＨＰＬＣプロフィールを有し、そしてインビボで肝臓によって迅速に取りこまれた。これらのより高い比では、アルブミンに対する立体構造的な変化は、治療用のキャリアとしてのその有効性を減少させると想定される。

【００６４】

インビボでのマレイミド－ＩＴＰの制御された投与を通じて、当業者は、インビボでのアルブミンおよびＩｇＧの特異的な標識を制御し得る。代表的な投与においては、投与されたマレイミド－ＩＴＰの８０～９０％が、アルブミンを標識し、そして５％未満がＩｇＧを標識する。遊離チオール（例えば、グルタチオン）の微量の標識もまた生じる。このような特異的な標識は、投与された試薬の推測半減期の正確な計算を可能にするので、インビボでの使用に好ましい。

【００６５】

制御された特異的なインビボでの標識を提供することに加えて、マレイミド－ＴＰは、エキソビボでの血清アルブミンおよびＩｇＧの特異的な標識を提供し得る。このようなエキソビボでの標識は、血清アルブミンおよび／またはＩｇＧを含有している血液、血清、または生理食塩溶液に対するマレイミド－ＩＴＰの添加を含む。一旦、マレイミド－ＴＰを用いてエキソビボで改変すると、血液、血清、または生理食塩溶液は、インビボでの処置のために血液に再投与され得る。

【００６６】

ＮＨＳ－ペプチドとは対照的に、マレイミド－ＩＴＰは、一般的には、水性溶液の存在下、および遊離アミンの存在下では極めて安定である。マレイミド－ＩＴＰが遊離チオールとのみ反応するので、保護基は、一般的には、マレイミド－ＩＴＰをそれ自体との反応から防ぐためには必須ではない。さらに、ペプチドの増大した安定性は、インビボでの使用に適切な高度に精製された生成物を調製するための、ＨＰＬＣのようなさらなる精製工程の使用を可能にする。最後に、増大した化学的な安定性は、より長い有効期間を有する生成物を提供する。

【００６７】

（Ｂ．非特異的な標識）

本発明のＩＴＰはまた、血液成分の非特異的な標識のために改変され得る。アミノ基への結合が、一般的には使用され、特に、非特異的な標識のためのアミド結合の形成が使用される。このような結合を形成するために、ＩＴＰに対してカップリングされる化学的に反応性の基として、広範な種々の活性なカルボキシル基（ヒドロキシル部分が、必要とされるレベルで生理学的に受容可能である場合には、特に、エステル）を使用し得る。多数の異なるヒドロキシル基が、これらの結合剤中で使用され得るが、最も都合の良いものは、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）およびＮ－ヒドロキシ－スルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）である。

【００６８】

利用され得る他の結合剤が、米国特許第５，６１２，０３４号に記載されており、これは、本明細書中で本明細書により援用されている。

【００６９】

非特異的なＩＴＰの化学的に反応性の基がインビボで反応し得る種々の部位として、細胞（特に、赤血球細胞（赤血球）および血小板）、ならびにタンパク質（例えば、免疫グロブリン（ＩｇＧおよびＩｇＭ、血清アルブミン、フェリチン、ステロイド結合タンパク質、トランスフェリン、チロキシン結合タンパク質、α－２－マクログロブリンなどを含む）が挙げられる。寿命が長くない誘導されたＩＴＰと反応するこれらのレセプターは、一般的には、およそ３日以内にヒト宿主から排除される。上記に示されるタンパク質（細胞のタンパク質を含む）は、少なくとも３日、血流中に留まり、そして特に、血液中での

濃度に基づく半減期に関しては、５日以上留まり得る（通常は、６０日を越えない、より通常は、３０日を越えない）。

【００７０】

大部分については、反応は、血液中の流動性の成分とであり、特に、血液タンパク質および細胞、より詳細には、血液タンパク質および赤血球である。「流動性」によって、任意の延長された期間の間（一般的には、５分を超えない、より通常は１分以上を超えない）固定された位置を有さない成分が意図されるが、いくつかの血液成分は、延長された期間の間相対的に不動である場合があり得る。最初に、標識されたタンパク質および細胞の比較的均質な集団が存在する。しかし、大部分については、投与後数日以内の集団は、血流中の標識されたタンパク質の半減期に依存して最初の集団から実質的に変化する。従って、通常はおよそ3日よりも長い間に、ＩｇＧは、血流中の優先的に標識されたタンパク質となる。

【００７１】

通常は、投与後5日までに、ＩｇＧ、血清アルブミン、および赤血球が、ＩｇＧ、ＩｇＭを有する（実質的にはより少ない程度で）血液中の結合した成分の、少なくとも約６０モル％、通常は少なくとも約７５モル％であり、そして、血清アルブミンは非細胞性の結合した成分の、少なくとも約５０モル％であり、通常は少なくとも約７５モル％であり、より通常は少なくとも約８０モル％である。

【００７２】

血液成分に対して非特異的なＩＴＰの所望の結合体は、患者（ヒトまたは他の哺乳動物であり得る）に対する直接的なＩＴＰの投与によってインビボで調製され得る。投与は、大量瞬時投与の形態で行われ得るか、またはメーターで測定される流れなどを使用する注入によってゆっくりと経時的に導入され得る。

【００７３】

所望される場合は、被検結合体はまた、本発明の誘導体化されたＩＴＰと血液を混合することによってエキソビボで調製され得る。このことによって、血液成分上の反応性の官能基への改変されたＩＴＰの共有結合が可能となり、次いで、宿主へ結合した血液を戻すことまたは投与することが可能となる。さらに、上記はまた、個々の血液成分、または限定された数の成分（例えば、赤血球細胞、イムノグロブリン、血清アルブミンなど）を最初に精製し、そして成分を化学的に反応性のＩＴＰとエキソビボで混合することによってもまた、達成され得る。次いで、標識された血液または血液成分は、被検物の治療的に有効な結合体をインビボで提供するように、宿主に戻され得る。血液はまた、エキソビボでの取扱いの間の凝固を防ぐために処理され得る。

【００７４】

（３．改変ＩＴＰの合成）

（Ａ．ＩＴＰ合成）

ＩＴＰフラグメントは、当業者に公知の固相ペプチド化学の標準的な方法によって合成され得る。例えば、ＩＴＰフラグメントは、ＳｔｅｗａｒｔおよびＹｏｕｎｇ（Ｓｔｅｗａｒｔ，Ｊ．Ｍ．およびＹｏｕｎｇ，Ｊ．Ｄ．、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｓｔｈｅｓｉｓ、第２版、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＩＩ、（１９８４））によって記載されている手順に従って、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ

ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒを使用して、固相化学技術によって合成され得る。同様に、複数のフラグメントが合成され得、次いでより大きなフラグメントを形成するように互いに連結され得る。これらの合成のペプチドフラグメントはまた、特異的な位置でのアミノ酸置換を伴って作成され得る。

【００７５】

固相ペプチド合成については、多くの技術の要旨が、Ｊ．Ｍ．Ｓｔｅｗａｒｔ，およびＪ．Ｄ．Ｙｏｕｎｇ、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｓｔｈｅｓｉｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、１９６３、ならびに

Ｊ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，Ｈｏｒｍｏｎａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ、第２巻、４６頁、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）、１９７３に見出され得る。伝統的な溶液合成については、Ｇ．Ｓｃｈｒｏｄｅｒおよび Ｋ．Ｌｕｐｋｅ、Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ、第１巻、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）を参照のこと。一般的には、これらの方法は、１つ以上のアミノ酸または適切に保護されたアミノ酸の、成長しつつあるペプチド鎖への連続的な付加を含む。通常は、最初のアミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基のいずれかが、適切な保護基によって保護される。次いで、保護されたかまたは誘導体化されたアミノ酸は、不活性な固体支持体に対して付着させられるか、または適切に保護された相補（アミノまたはカルボキシル）基を有する配列中に次のアミノ酸を付加し、そしてアミド結合を形成するために適切な条件下で付加することによって、溶液中で利用されるかのいずれかである。次いで、保護基が、この新しく付加されたアミノ酸残基から除去され、そして次のアミノ酸（適切に保護された）が付加され、そしてこれが続く。

【００７６】

所望されるアミノ酸の全てが適切な配列に連結された後、任意の残存している保護基（および任意の固体支持体）が連続的に除去されるか、または同時に最後のポリペプチドを与える。この一般的な手順の単純な改変によって、例えば、脱保護の後にペンタペプチドを形成するように適切に保護されたジペプチドを有する保護されたトリペプチドをカップリングさせる（キメラ中心をラセミ化しない条件下で）ことによって、成長しつつある鎖に同時に１つ以上のアミノ酸を付加することが可能である。

【００７７】

本発明の化合物を調製する特に好ましい方法は、固相ペプチド合成を含む。ここでは、アミノ酸のα－Ｎ末端が、酸性または塩基性の敏感な基によって保護される。このような保護基は、ペプチド結合の形成の条件に対して安定である特性を有するはずであるが、成長しつつあるペプチド鎖の崩壊または本明細書中に含まれる任意のキメラ中心のラセミ化を伴わずに、容易に除去可能である。安定な保護基は、以下である：９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）、ｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）、ベンジルオキシカルボニル（Ｃｂｚ）、ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル、ｔ－アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、α，α－ジメチル－３，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、ｏ－ニトロフェニルスルフェニル、２－シアノ－ｔ－ブチルオキシカルボニルなど。９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）保護基が、ＩＴＰフラグメントの合成のためには特に好ましい。他の好ましい側鎖保護基は、側鎖のアミノ基（リジンおよびアルギニンのような）については、２，２，５，７，８－ペンタメチルクロマン－６－スルホニル（ｐｍｃ）、ニトロ、ｐ－トルエンスルホニル、４－メトキシベンゼンスルホニル、Ｃｂｚ、Ｂｏｃ、およびアダマンチルオキシカルボニル；チロシンについては、ベンジル、ｏ－ブロモベンジルオキシカルボニル、２，６－ジクロロベンジル、イソプロピル、ｔ－ブチル（ｔ－Ｂｕ）、シクロヘキシル、シクロペニル、およびアセチル（Ａｃ）；セリンについては、ｔ－ブチル、ベンジル、およびテトラヒドロピラニル；ヒスチジンについては、トリチル、ベンジル、Ｃｂｚ、ｐ－トルエンスルホニル、および２，４－ジニトロフェニル；トリプトファンについては、ホルミル；アスパラギン酸およびグルタミン酸については、ベンジルおよびｔ－ブチル、そしてシステインについては、トリフェニルメチル（トリチル）である。

【００７８】

固相ペプチド合成方法においては、α－Ｃ末端のアミノ酸が、適切な固体支持体または樹脂に対して結合させられる。上記の合成に有用な適切な固体支持体は、段階的な濃縮－脱保護反応の試薬および反応条件に対して不活性であり、そして使用される媒体中に不溶性であるような材料である。α－Ｃ末端のカルボキシペプチドの合成のための好ましい固相支持体は、４－ヒドロキシメチルフェノキシメチル－コポリ（スチレン－１％ジビニルベンゼン）である。α－Ｃ末端のアミドペプチドについての好ましい固相支持体は、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆ．）から入手

可能な４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）フェノキシアセトアミドエチル樹脂である。α－Ｃ末端のアミノ酸は、ジクロロメタンまたはＤＭＦのような溶媒中で１０°と５０℃との間の温度で約１時間から約２４時間までの、４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢＴ）、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ－トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウム－ヘキサフルオロホスフェート（ＢＯＰ）、またはビス（２－オキソ－３－オキサゾリジニル）ホスフィンクロライド（ＢＯＰＣＩ）によって媒介されるカップリングを伴うかまたはそれを伴わない、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、またはＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’、Ｎ’－テトラメチルウロニウム－ヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）の手段によって、樹脂にヘカップリングされる。

【００７９】

固体支持体が４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）フェノキシ－アセトアミドエチル樹脂である場合には、Ｆｍｏｃ基は、上記のようなα－Ｃ末端アミノ酸とのカップリングの前に、二級アミン（好ましくは、ピペリジン）で切断される。脱保護された４－（２’、４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）フェノキシ－アセトアミドエチル樹脂に対するカップリングのための好ましい方法は、ＤＭＦ中のＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロ－ホスフェート（ＨＢＴＵ、１等量）および１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢＴ、１等量）である。良好に保護されたアミノ酸のカップリングは、当該分野で周知であるように、自動ポリペプチド合成装置中で行われ得る。好ましい実施形態においては、成長しつつあるポリペプチド鎖のα－Ｎ末端のアミノ酸は、Ｆｍｏｃで保護される。成長しつつあるペプチドのα－Ｎ末端の側鎖からのＦｍｏｃ保護基の除去は、二級アミン（好ましくは、ピペリジン）での処理によって達成される。次いで、それぞれの保護されたアミノ酸は、約３モル過剰で導入され、そしてカップリングは、好ましくはＤＭＦ中で行われる。カップリング剤は、通常は、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ，１等量）および１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢＴ、１等量）である。

【００８０】

固相合成の最後に、ポリペプチドは、連続してまたは一回の操作のいずれかで、樹脂から除去され、そして脱保護される。ポリペプチドの除去および脱保護は、チアニソール（ｔｈｉａｎｉｓｏｌｅ）、水、エタンジチオール、およびトリフルオロ酢酸を含有している切断試薬で樹脂に結合したポリペプチドを処理することによって、１回の操作で達成され得る。ポリペプチドのα－Ｃ末端がアルキルアミドである場合は、樹脂は、アルキルアミンでのアミノ分解によって切断される。あるいは、ペプチドは、例えば、メタノールでのトランスエステル化、それに続くアミノ分解または直接的なトランスアミド化によって取り出され得る。保護されたペプチドは、この時点で精製され得るか、または次の工程に直接引き継がれる。側鎖保護基の除去は、上記の切断反応混液を使用して達成される。完全に脱保護されたペプチドは、以下の型の任意のものまたは全てを使用してクロマトグラフィーによる工程の並びによって精製される：弱い塩基性の樹脂（酢酸塩の形態）イオン交換クロマトグラフィー；誘導体化されていないポリスチレン－ジビニルベンゼン（例えば、Ａｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＸＡＤ）上での疎水性吸着クロマトグラフィー；シリカゲル吸着クロマトグラフィー；カルボキシメチルセルロース上でのイオン交換クロマトグラフィー；分配クロマトグラフィー（例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５、ＬＨ－２０、または向流分配上での）；高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）（特に、オクチル－またはオクタデシルシリル－シリカ結合相カラムパッキング上での逆相ＨＰＬＣ）。

【００８１】

これらのＩＴＰの分子量は、Ｆａｓｔ　Ａｔｏｍ　Ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ（ＦＡＢ）質量スペクトル分析を使用して決定される。

【００８２】

本発明のＩＴＰは、プロドラッグとしての使用のために、Ｎ末端およびＣ末端保護基を用いて合成され得る。

【００８３】

（１．Ｎ末端保護基）

上記で議論されるように、用語「Ｎ保護基」は、アミノ酸もしくはペプチドのα－Ｎ末端を保護するか、またはそうでなければ、合成手順の間の所望されない反応に対してアミノ酸もしくはペプチドのアミノ基を保護するために意図されるこれらの基をいう。一般的に使用されるＮ保護基は、Ｇｒｅｅｎｅ、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ Ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｓｔｈｅｓｉｓ」、（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８１））（これは、本明細書により参考として援用される）において開示されている。さらに、保護基は、インビボで容易に切断されて（例えば、酵素による加水分解によって）生物学的に活性な親物質を放出する、プロドラッグとして使用され得る。α－Ｎ保護基は、以下を含む：ホルミル、アセチル（「Ａｃ」）、プロピオニル、ピバロイル、ｔ－ブチルアセチルなどのような低級アルカノイル基；２－クロロアセチル、２－ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、ｏ－ニトロフェノキシアセチル、－クロロブチリル、ベンゾイル、４－クロロベンゾイル、４－ブロモベンゾイル、４－ニトロベンゾイルなどが挙げられる、他のアシル基；ベンゼンスルホニル、ｐ－トルエンスルホニルなどのようなスルホニル基；ベンジルオキシカルボニル、ｐ－クロロベンジルオキシカルボニル、ｐ－メトキシベンジルオキシカルボニル、ｐ－ニトロベンジルオキシカルボニル、２－ニトロベンジルオキシカルボニル、ｐ－ブロモベンジルオキシカルボニル、３，４－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、３，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、２，４－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、４－エトキシベンジルオキシカルボニル、２－ニトロ－４，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、３，４，５－トリメトキシベンジルオキシカルボニル、１－（ｐ－ジフェニルイル）－１－メチルエトキシカルボニル、α，α－ジメチル－３，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドリルオキシカルボニル、ｔ－ブチルオキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、２，２，２，－トリクロロエトキシカルボニル、フェノキシカルボニル、４－ニトロフェノキシカルボニル、フルオレニル－９－メトキシカルボニル、シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、フェニルチオカルボニルなどのような、カルバメートを形成する基；ベンジル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシメチル、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）などのようなアリールアルキル基、ならびにトリメチルシリルなどのようなシリル基。

【００８４】

（２．カルボキシ保護基）

上記に議論されるように、用語「カルボキシ保護基」は、カルボン酸の官能基をブロックするかまたは保護するために使用される、カルボン酸保護エステル基またはアミド基をいうが、化合物の他の機能的な部位を含む反応基が好ましい。カルボキシ保護基は、Ｇｒｅｅｎｅ、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」、１５２～１８６頁（１９８１）に開示される。これは、本明細書により参考として援用される。さらに、カルボキシ保護基は、プロドラッグとして使用され得、それによって、カルボキシ保護基は、例えば、酵素による加水分解によって、生物学的に活性な親物質を放出するようにインビボで容易に切断され得る。このようなカルボキシ保護基は、当業者に周知であり、米国特許第３，８４０，５５６号および同第３，７１９，６６７号（それらの開示は本明細書中で参考として援用されている）に記載されているように、ペニシリンおよびセファロスポリン領域中のカルボキシル基の保護において広範に使用されている。代表的なカルボキシ保護基は、以下である：C_1～C_8低級アルキル（例えば、メチル、エチル、またはｔ－ブチルなど）；フェネチルまたはベンジル、およびそれらの置換された誘導体（例えば、アルコキシベンジルまたはニトロベンジル基）などのよう

なアリールアルキル；フェニルエテニルなどのようなアリールアルケニル；アリルおよびそれらの置換された誘導体（例えば、５－インダニル（５－ｉｎｄａｎｙｌ）など）；ジメチルアミノエチルなどのようなジアルキルアミノアルキル；アセトオキシメチル、ブチルオキシメチル、バレリルオキシメチル、イソブチルオキシメチル、イソバレリルオキシメチル、１－（プロピニルオキシ）－１－エチル、１－（ピバロイルオキシル）－１－エチル、１－メチル－１－（プロピオニルオキシ）－１－エチル、ピバロイルオキシメチル、プロピオニルオキシメチルなどのようなアルカノイルオキシアルキル基；シクロプロピルカルボニルオキシメチル、シクロブチルカルボニルオキシメチル、シクロペンチルカルボニルオキシメチル、シクロヘキシルカルボニルオキシメチルなどのようなシクロアルカノイルオキシアルキル基；ベンゾイルオキシメチル、ベンゾイルオキシエチルなどようなアロイルオキシアルキル；ベンジルカルボニルオキシメチル、２－ベンジルカルボニルオキシエチルなどのような、アリールアルキルカルボニルオキシアルキル；メトキシカルボニルメチル、シクロヘキシルオキシカルボニルメチル、１－メトキシカルボニル－１－エチルなどのような、アルコキシカルボニルアルキルまたはシクロアルキルオキシカルボニルアルキル；メトキシカルボニルオキシメチル、ｔ－ブチルオキシカルボニルオキシメチル、１－エトキシカルボニルオキシ－１－エチル、１－シクロヘキシルオキシカルボニルオキシ－１－エチルなどのようなアルコキシカルボニルオキシアルキルまたはシクロアルキルオキシカルボニルオキシアルキル；２－（フェノキシカルボニルオキシ）エチル、２－（５－インダニルオキシカルボニルオキシ）エチルなどのようなアリールオキシカルボニルオキシアルキル；２－（１－メトキシ－２－メチルプロパン－２－オイルオキシ）エチルなどのようなアルコキシアルキルカルボニルオキシアルキル；２－（ベンジルオキシカルボニルオキシ）エチルなどのようなアリールアルキルオキシカルボニルオキシアルキル；２－（３－フェニルプロペン－２－イルオキシカルボニルオキシ）エチルなどのようなアリールアルケニルオキシカルボニルオキシアルキル；ｔ－ブチルオキシカルボニルアミノメチルなどのようなアルコキシカルボニルアミノアルキル；メチルアミノカルボニルアミノメチルなどのようなアルキルアミノカルボニルアミノアルキル；アセチルアミノメチルなどのようなアルカノイルアミノアルキル；４－メチルピペラジニルカルボニルオキシメチルなどのような複素環式カルボニルオキシアルキル；ジメチルアミノカルボニルメチル、ジエチルアミノカルボニルメチルなどのようなジアルキルアミノカルボニルアルキル；（５－ｔ－ブチル－２－オキソ－１，３－ジオキソレン－４－イル）メチルなどのような（５－（低級アルキル）－２－オキソ－１，３－ジオキソレン－４－イル）アルキル；ならびに（５－フェニル－２－オキソ－１，３－ジオキソレン－４－イル）メチルなどのような（５－フェニル－２－オキソ－１，３－ジオキソレン－４－イル）アルキル。

【００８５】

代表的なアミドカルボキシ保護基は、アミノカルボニルおよび低級アルキルアミノカルボニル基である。

【００８６】

本発明の好ましいカルボキシ保護化合物は、保護されたカルボキシ基が、低級アルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルエステル（例えば、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、イソプロピルエステル、ブチルエステル、ｓｅｃ－ブチルエステル、イソブチルエステル、アミルエステル、イソアミルエステル、オクチルエステル、シクロヘキシルエステル、フェニルエチルエステルなど）、あるいはアルカノイルオキシアルキル、シクロアルカノイルオキシアルキル、アロイルオキシアルキル、またはアリールアルキルカルボニルオキシアルキルエステルである化合物である。好ましいアミドカルボキシ保護基は、低級アルキルアミノカルボニル基である。例えば、アスパラギン酸は、酸不安定性の基（例えば、ｔ－ブチル）によってα－Ｃ末端で保護され得、そして水素化不安定性の基（例えば、ベンジル）によってβ－Ｃ末端で保護され得、次いで合成の間に選択的に脱保護され得る。

【００８７】

（Ｂ．ＩＴＰの改変）

本発明の改変されたＩＴＰを産生する様式は、ＩＴＰを含有している種々のエレメントの性質に依存して、広範に変化する。合成手順は、単純に、高い収量を提供し、そして高度に精製された生成物を可能にするように、選択される。通常は、化学的に反応性の基は、合成の最後の段階で、例えば、活性なエステルを形成するためのカルボキシル基のエステル化を用いて作成される。本発明の改変されたＩＴＰの産生のための特異的な方法は、以下に記載されている。

【００８８】

リンカーおよび反応性の試薬での改変を受けるために選択されるそれぞれのＩＴＰは、以下の基準に従って改変される：カルボキシル基（薬理学的な活性の保持には重要でない）が最初のＩＴＰについて利用可能であるが、他の反応性の官能基がＩＴＰ上には存在しない場合は、カルボン酸が、リンカー－反応性の物質の改変のための結合点として選択される。カルボン酸が利用可能ではない場合は、薬理学的な活性の保持には必須ではない他の官能基が、リンカー－反応性の物質の改変のための結合点として選択される。いくつかの官能基がＩＴＰ上で利用可能である場合は、保護基の組合せが、リンカー／反応性物質の付加および全ての保護された官能基の脱保護後に、薬理学的な活性の保持がなお得られるような方式で使用される。利用可能な反応性の官能基がＩＴＰ上に存在しない場合は、合成の試みによって、生物学的な活性の保持およびレセプターまたは標的の特異性の保持が得られるような様式で、最初のＩＴＰの改変が可能である。

【００８９】

化学的に反応性の物質は、ＩＴＰが血液成分に対して結合される場合には、ＩＴＰが改変されていないＩＴＰの活性の実質的な割合を保持するように、１つの部位に配置される。

【００９０】

さらにより詳細には、リンカーおよび反応性の物質での誘導を受けるように選択されるそれぞれのＩＴＰは、以下の基準に従って改変される：末端のカルボキシル基が治療用のペプチド上で利用可能であり、そして薬理学的な活性の保持のためには重要ではなく、そして他の敏感な官能基がＩＴＰ上に存在しない場合は、カルボン酸が、リンカー－反応性物質の改変のための結合点として選択される。末端のカルボキシル基が薬理学的な活性に関与する場合、または利用可能なカルボン酸が存在しない場合は、薬理学的な活性の保持には重要ではない任意の他の敏感な官能基が、リンカー－反応性物質の改変のための結合点として選択される。いくつかの敏感な官能基がＩＴＰ上で利用可能である場合には、保護基の組合せが、リンカー／反応性物質の付加、および全ての保護された敏感な官能基の脱保護後に、薬理学的な活性の保持がなお得られるような方式で使用される。敏感な官能基が治療用のペプチド上で利用可能でない場合は、合成の試みによって、生物学的な活性の保持およびレセプターまたは標的の特異性の保持が得られるような様式で、最初のペプチドの改変が可能である。この場合においては、改変は、ペプチドの反対側の末端で生じる。

【００９１】

ＮＨＳ誘導体が、治療用のペプチドの他の敏感な官能基の非存在下でカルボン酸から合成され得る。詳細には、このような治療用のペプチドは、無水のCH_2Cl_2およびＥＤＣ中のＮ－ヒドロキシスクシンイミドと反応させられ、そして生成物は、クロマトグラフィーによって精製されるか、またはＮＨＳ誘導体を生じるように、適切な溶媒系から再結晶化される。

【００９２】

あるいは、ＮＨＳ誘導体は、アミノ基および／またはチオール基、ならびにカルボン酸を含有しているＩＴＰから合成され得る。遊離アミノ基または遊離チオール基が分子中に存在する場合は、ＮＨＳ誘導体の付加を行う前に、これらの敏感な官能基を保護することが好ましい。例えば、分子が遊離アミノ基を含む場合は、Ｆｍｏｃまたは好ましくはｔＢｏｃで保護されたアミンへのアミンの形質転換が、上記の化学反応を行う前に必要である。アミンの官能基は、ＮＨＳ誘導体の調製の後では脱保護されない。従って、この方法は

、それらのアミノ基が薬理学的に所望される影響を誘導することを除かれる必要がない化合物に対してのみ適用する。さらに、ＮＨＳ誘導体は、アミノ基またはチオール基を含有しているが、カルボン酸を含有していない治療用のペプチドから合成され得る。選択された分子がカルボン酸を含有してない場合は、二官能性のリンカーの並びが、分子を反応性のＮＨＳ誘導体に転換するために使用され得る。例えば、ＤＭＦ中に溶解させられ、そして遊離アミンを含有している分子に対して添加されたエチレングリコールービス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）およびトリエチルアミン（ＥＧＳの１０：１の比が好ましい）が、モノＮＨＳ誘導体を提供する。チオールで誘導された分子からＮＨＳ誘導体を産生するために、当業者は、ＤＭＦ中のＮ－［－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）およびトリエチルアミンを使用し得る。マレイミド基は、遊離チオールと反応し、そしてＮＨＳ誘導体は、シリカ上でのクロマトグラフィーまたはＨＰＬＣによって反応混合物から精製される。

【００９３】

ＮＨＳ誘導体はまた、複数の敏感な官能基を含有しているＩＴＰから合成され得る。それぞれの場合が、異なる様式で分析され、そして説明されなければならない。しかし、市販の保護基および二官能性のリンカーの大きなアレイのおかげで、本発明は、好ましくは、ＩＴＰを誘導するためにわずかに１つの化学的な工程を用いて、または敏感な基を最初に保護することによる２工程を用いて、または３工程（保護、活性化、および脱保護）を用いて、任意の治療用のペプチドに対して適用することが可能である。実験の環境下だけでは、当業者は、治療用のペプチドを活性なＮＨＳまたはマレイミド誘導体に形質転換するために、複数の合成工程（３工程を超える）を使用することを必要とする。

【００９４】

マレイミド誘導体はまた、遊離アミノ基および遊離カルボン酸を含有しているＩＴＰから合成され得る。アミノ誘導された分子からマレイミド誘導体を産生するために、当業者は、ＤＭＦ中のＮ－［－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）およびトリエチルアミンを使用し得る。スクシンイミドエステル基は、遊離アミノと反応し、そしてマレイミド誘導体が、結晶化によって、またはシリカ上でのクロマトグラフィーによって、またはＨＰＬＣによって反応混合物から精製される。

【００９５】

最後に、マレイミド誘導体は、複数の他の敏感な官能基を含有しており、そして遊離カルボン酸を含有していない治療用のペプチドから合成され得る。選択された分子がカルボン酸を含まない場合は、二官能性の架橋剤のアレイが、分子を反応性のＮＨＳ誘導体に転換するために使用され得る。例えば、マレイミドプロピオン酸（ＭＰＡ）が、遊離アミンに対してカップリングされ得て、ＤＭＦ中のＨＢＴＵ／ＨＯＢｔ／ＤＩＥＡ活性を使用してＭＰＡのカルボキシル基を有する遊離アミンとの反応を通じてマレイミド誘導体を産生する。

【００９６】

あるいは、多くの他の市販のヘテロ二官能性の架橋剤が、必要とされる場合には、使用され得る。多数の二官能性の化合物が、物質を架橋するために利用可能である。例示的な試薬として、以下が挙げられる：アジドベンゾイルヒドラジド、Ｎ－［４－（ｐ－アジドサリチルアミノ）ブチル］－３’－［２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド］、ビス－スルホスクシンイミジルスベリン酸、ジメチルアジピン酸、ジスクシンイミジル酒石酸、Ｎ－ｙ－マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート、Ｎ－スクシンイミジル［４－アジドフェニル］－１，３’－ジチオプロピオネート、Ｎ－スクシンイミジル［４－ヨードアセチル］アミノベンゾエート、グルタルアルデヒド、およびスクシンイミジル４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシレート。

【００９７】

（４．改変されたＩＴＰの使用）

本発明の改変されたＩＴＰは、糖尿病の処置、鎮静剤、神経系の障害の処置、ＣＮＳに

対する抗不安効果を誘導するための使用、ＣＮＳを活性化するための使用、外科手術後およびインシュリン耐性の処置としての使用を含む、複数の用途が見出されている。

【００９８】

（Ａ．糖尿病の処置）

本発明の改変されたＩＴＰは、一般的には、グルコース依存性、インシュリン依存性、およびインシュリン非依存性の機構による高血糖を正常にする。このように、改変されたＩＴＰは、ＩＩ型の真性糖尿病の処置のための最初の試薬として、そしてＩ型の真性糖尿病の処置のための付加的な試薬として、有用である。

【００９９】

真性糖尿病の処置としての有効量の改変されたＩＴＰの使用は、改変されていないＩＴＰよりも強力な利点を有する。改変されたＩＴＰは、インビボでより安定であるので、より少量の分子が、有効な処置のために投与され得る。本発明は、ペプチドの作用が、血液のグルコース濃度に依存し、従って、高血糖の副作用の危険性が、現行の処置方法を使用するリスクよりも大きく低減されるという点で、糖尿病（Ｉ型およびＩＩ型の両方）を有する患者の処置に特に適している。

【０１００】

本発明はまた、個体の真性糖尿病を処置するための方法を提供する。ここでは、上記の方法は、糖尿病を処置するために十分な量の改変されたＩＴＰを提供する工程を包含する。ここでは、組成物は、改変されたＩＴＰを含有する。

【０１０１】

（Ｂ．神経系の障害の処置）

本発明の改変されたＩＴＰは、鎮静剤としての使用をもまた見出されている。本発明の１つの局面においては、異常を有する哺乳動物の被験体を鎮静する方法が提供される。これによって、本発明の改変されたＩＴＰを使用して中枢または抹消神経系の増大した活性を生じる。この方法は、被験体に対して鎮静効果または抗不安効果を生じるために十分な量で、被験体に改変されたＩＴＰを投与する工程を包含する。改変されたＩＴＰは、脳室内で、経口的に、皮下で、筋肉内で、または静脈内で投与され得る。このような方法は、不安症、運動障害、攻撃性、精神病、発作、パニック発作、病的興奮、および睡眠障害のような神経系の状態を処置または緩和するために有用である。

【０１０２】

関連する局面においては、本発明は、哺乳動物の被験体の活性を増大させる方法を含む。この方法は、被験体に対して活性化の影響を生じるために十分な量で被験体に対して改変されたＩＴＰを投与する工程を包含する。好ましくは、被験体は、中枢神経系または末梢神経系の低下した活性化を生じる状態を有する。改変されたＩＴＰは、鬱状態、ｓｃｈｉｚｏａｆｆｅｃｔｉｖｅ障害、睡眠無呼吸、低い集中力を伴う注意欠乏症候群、記憶力の欠失、健忘症、および中枢神経系の覚醒が有利であり得るいくつかの状態に対してまさしく命名される、ナルコレプシー症の処置または緩和における特定の用途を見出されている。

【０１０３】

本発明の改変されたＩＴＰは、鬱状態、ｓｃｈｉｚｏａｆｆｅｃｔｉｖｅ障害、睡眠無呼吸、低い集中力を伴う注意欠乏症候群、記憶力の欠失、健忘症、およびナルコレプシー症の処置または緩和のための覚醒を誘導するために使用され得る。改変されたＩＴＰでの処置の治療効率は、生理学的／神経学的試験によって、またはこれらの状態に関連する症状の緩和によって、それらの条件を評価するための患者のインタビューによってモニターされ得る。例えば、ナルコレプシー症の処置は、ナルコレプシー症の攻撃の出現をモニターすることによって評価され得る。別の例として、集中または記憶能力についての被験体の能力に対する改変されたＩＴＰの影響は、当業者に周知の任意の多数の診断試験を使用して試験され得る。

【０１０４】

（Ｃ．外科手術後の処置）

本発明の改変されたＩＴＰは、外科手術後の処置のために利用され得る。本発明の改変されたＩＴＰを必要としている患者は、外科手術の約１～１６時間前に患者に対して、患者に対して外科手術の間に、そして患者の外科手術の後で、約５日間を超えない期間に行われ得る。

【０１０５】

本発明の改変されたＩＴＰは、外科手術の開始の約１６時間から約１時間までに投与される。本発明において使用される化合物が、異化の影響およびインシュリン耐性を低下させるために投与されるはずである場合には、外科手術の前の時間の長さは、因子の数に依存する。これらの因子は、当該分野の医師に一般的には公知であり、そして最も重要には、患者がグルコースインシュリンもしくは飲料、または外科手術の前の準備期間の間の食事のいくつかの他の形態の物質で食事を与えられるかまたは供給されるかどうかを含む。他の重要な因子として、患者の性別、体重、および年齢、血液のグルコースを調節することの任意の不能性の重篤度、血液のグルコースを調節することの任意の不能性の根底にある原因、外科手術によって引き起こされる外傷の予想される重篤度、投与および生体利用能力の経路、体内での残存率、処方、ならびに投与される化合物の効力が挙げられる。本発明において使用される改変されたＩＴＰの投与を開始するための好ましい時間の間隔は、外科手術の前の約１時間から約１０時間である。投与を開始するための最も好ましい間隔は、外科手術の前の２時間から８時間の間である。

【０１０６】

特定の型の外科手術、選択的な腹式の外科手術の後のインシュリン耐性は、手術後の最初の日、遅くとも少なくとも５日後に最も重大であり、そして正常になるまでに３週間を要し得る。従って、手術後の患者は、当業者の医師が理解しそして決定する因子に依存する、外科手術の外傷後の期間の間に、本発明で使用される改変されたＩＴＰの投与を必要とし得る。これらの因子の中でも、患者がグルコースの注入もしくは飲料、または外科手術後の食物のいくつかの他の形態で食事を与えられるかまたは供給されるかどうか、および限定的ではないが、患者の性別、体重、および年齢、、血液のグルコースを調節することの任意の不能性の重篤度、血液のグルコースを調節することの任意の不能性の根底にある原因、外科手術によって引き起こされる外傷の実際の重篤度、投与および生体利用能力の経路、体内での残存率、処方、および投与される化合物の効力である。本発明において使用される化合物の投与の好ましい投与時間は、外科手術後５日を超えない。

【０１０７】

（Ｄ．インシュリン耐性の処置）

本発明の改変されたＩＴＰは、外科手術後の処置におけるそれらの使用とは独立して、インシュリン耐性を処置するために利用され得る。インシュリン耐性は、細胞表面レセプターに対するインシュリンの結合における減少、または細胞内での代謝における変更に起因し得る。最初のタイプは、インシュリン感受性における低下として特徴付けられ、これは、代表的には、増大したインシュリン濃度によって克服され得る。第２のタイプは、インシュリン反応における減少として特徴付けられ、これは、大量のインシュリンによっては克服され得ない。外傷後のインシュリン耐性は、インシュリン耐性の程度に比例しするインシュリンの用量によって克服され得、従って、明らかにインシュリン感受性における低下によって引き起こされる。

【０１０８】

患者の血液グルコースレベルを正常化するために有効な改変されたＩＴＰの用量は、多数の因子に依存する。中でも、これは、以下を含むが、これらに限定されない：患者の性別、体重、および年齢、、血液のグルコースを調節することの任意の不能性の重篤度、血液のグルコースを調節することの任意の不能性の根底にある原因、グルコースまたは別の炭水化物の供給源が同時に投与されるかどうか、投与および生体利用能力の経路、体内での残存率、処方、および効力。

【０１０９】

（５．改変されたＩＴＰの投与）

改変されたＩＴＰは、生理学的に受容可能な媒体（例えば、脱イオン水、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）、生理食塩水、水性のエタノールもしくは他のアルコール）、血漿、タンパク質性の溶液、マンニトール、水性のグルコース
アルコール、植物油など中で投与される。含まれ得る他の添加剤として、緩衝液（媒体が一般的には、約５から１０の範囲のｐＨで緩衝化されており、緩衝液は一般的には、約５０から２５０ｍＭの範囲の濃度である）、塩（塩濃度は一般的には、約５から５００ｍＭの範囲である）、生理学的に受容可能な安定剤などが挙げられる。組成物は、便利な保存および輸送のために凍結乾燥させられ得る。

【０１１０】

改変されたＩＴＰは、大部分については、経口、非経口的に（例えば、静脈内（ＩＶ）、動脈内（ＩＡ）、筋肉内（ＩＭ）、皮下（ＳＣ）など）で投与される。投与は、適切な状況下では、注入により得る。官能基の反応は比較的ゆっくりであるいくつかの例においては、投与は、経口、鼻腔内、直腸、経皮、またはエアゾールであり得る。ここでは、結合体の性質が、血管系への導入を可能にする。通常は、１回の注入が使用されるが、所望される場合には１回以上の注入が使用され得る。改変されたＩＴＰは、任意の便利な手段（注射器、トロカール、カテーテルなどを含む）によって投与され得る。特定の投与の様式は、単回の追加投与または持続的な投与などにはかかわらず、投与される量に依存して変化する。好ましくは、投与は、静脈内であり、ここでは、導入部位は、本発明にとっては重要ではない。好ましくは、迅速な血流が存在する部位である（例えば、静脈内、抹消静脈または中枢動脈）。他の投与が徐放技術または保護マトリックスと組み合わされる使用を見出し得る。血液成分と反応することが可能であるように、ＩＴＰが血液中に効率良く分布されることが、意図される。結合体の濃度は、一般的には、約１ｐｇ／ｍｌから５０ｍｇ／ｍｌまでの範囲で広範に変化する。静脈内に投与される全量は、一般的には、約０．１ｍｇ／ｍｌから約１０ｍｇ／ｍｌまでの範囲、より通常は、約１ｍｇ／ｍｌから約５ｍｇ／ｍｌまでの範囲である。

【０１１１】

長期間生存する血液成分（例えば、イムノグロブリン、血清アルブミン、赤血球、および血小板）に対して結合させることによって、多数の利点が結果として生じる。改変されたＩＴＰの活性は、数日から数週間の間延長される。１回の投与のみが、この期間の間に与えられることが必要である。より大きな特異性が達成され得る。なぜなら、活性な化合物は、大きな分子に対して主に結合するからである。ここでは、他の生理学的なプロセスを妨害するように細胞内に取り込まれる可能性は恐らく低い。

【０１１２】

血液成分との間での共有結合の形成が、インビボまたはエキソビボで生じ得る。エキソビボでの共有結合の形成については、改変されたＩＴＰが、ヒトの血清アルブミンまたはＩｇＧを含有している血液、血清、生理食塩溶液に対して添加されて、改変されたＩＴＰと血液成分との間での共有結合の形成が可能となる。好ましい形式においては、ＩＴＰは、マレイミドを用いて改変され、そしてこれは、生理食塩溶液中のヒトの血清アルブミンと反応させられる。一旦改変されたＩＴＰが血液成分と反応すると、ＩＴＰタンパク質結合体が形成され、この結合体は、患者に投与され得る。

【０１１３】

あるいは、改変されたＩＴＰは、インビボで改変されたＩＴＰと血液成分との間で共有結合が形成されるように、患者に対して直接投与され得る。

【０１１４】

（６．改変されたＩＴＰの存在のモニタリング）

哺乳動物宿主の血液が、ＩＴＰの活性および／または改変されたＩＴＰの存在についてモニターされ得る。種々の時間で宿主の血液の一部またはサンプルを採取することによって、当業者は、ＩＴＰが、長期間生存する血液成分に対して治療的に活性であるに十分な量で結合するかどうかを決定し得、その後、血液中のＩＴＰ化合物のレベルを決定し得る。所望される場合、当業者はまた、どの血液成分に対してＩＴＰ分子が結合するかを決定

し得る。このことは、非特異的なＩＴＰを使用する場合には特に重要である。特異的なマレイミド－ＩＴＰについては、血清アルブミンおよびＩｇＧの半減期を計算することは、はるかに簡単である。

【０１１５】

改変されたＧＬＰは、インシュリン向性活性、ＨＰＬＣ－ＭＳ、またはＩＴＰに対して指向された抗体のアッセイを使用してモニタリングされ得る。

【０１１６】

（Ａ．インシュリン向性活性のアッセイ）

本発明は、改変されていないＩＴＰのインシュリン向性活性を上回るかまたはそれと同等であるインシュリン向性活性を有する、改変されたＩＴＰ誘導体に関する。化合物のインシュリン向性特性は、その化合物を動物細胞に対して提供するか、またはその化合物を動物中に注射し、そして免疫反応性のインシュリン（ＩＲＩ）の、媒体または動物の循環系への放出をそれぞれモニターすることによって、決定され得る。ＩＲＩの存在は、インシュリンを特異的に検出し得るラジオイムノアッセイの使用を通じて検出される。

【０１１７】

ＩＲＩの存在を検出することが可能である任意のラジオイムノアッセイが使用され得るが、Ａｌｂａｎｏ，Ｊ．Ｄ．Ｍ．ら（Ａｃｔａ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．７０：４８７－５０９（１９７２））のアッセイ方法の改変を使用することが好ましい。この改変においては、ｐＨ７．４を有するリン酸塩／アルブミン緩衝液が使用される。インキュベーションは、５００μｌのリン酸緩衝液、５０μｌの潅流液サンプル、または灌流液中のラットのインシュリン標準、１００μｌの抗インシュリン抗血清（Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；１：４０，０００稀釈）、および１００μｌの［^{125}Ｉ］インシュリンの連続的な条件を用いて準備され、１０×７５ｍｍの使い捨てのガラスチューブ中に７５０μｌの総容量を生じる。４℃で２～３日間のインキュベーション後、遊離インシュリンが、チャコール分離によって抗体に結合したインシュリンから分離される。アッセイの感受性は、一般的には、１～２μｌＵ／ｍｌである。ＩＲＩの、組織培養物中で増殖した細胞の細胞培養培地中への放出を測定するために、当業者は、好ましくは、プロインシュリン中に放射活性標識を取りこむ。ポリペプチドを標識することが可能な任意の放射活性標識が使用され得るが、プロインシュリンの標識を得るために^{3}Ｈロイシンを使用することが好ましい。標識は、検出可能に標識されたプロインシュリン分子のプールの形成を可能にするために十分な任意の時間行われ得る；しかし、６０分の時間、放射活性標識の存在下で細胞をインキュベートすることが好ましい。インシュリンを発現し得る任意の細胞株が、化合物がインシュリン向性の影響を有するかどうかを決定するために使用され得るが、ラットのインシュリノーマ細胞、そして特に、ＲＩＮ－３８ラットインシュリノーマ細胞を使用することが好ましい。このような細胞は、任意の適切な培地中で増殖され得る；しかし、０．１％のＢＳＡおよび２５ｍＭのグルコースを含有しているＤＭＥ培地を使用することが、好ましい。

【０１１８】

改変されたＩＴＰのインシュリン向性特性もまた、膵臓の注入によって決定され得る。インサイチュで単離された潅流されたラットの膵臓の調製物は、Ｐｅｎｈｏｓ，Ｊ．Ｃ．，ら（Ｄｉａｂｅｔｅｓ　１８：７３３－７３８（１９６９））の方法の改変である。このような方法に従って、断食させたラット（好ましくは、雄性のＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ株白皮症ラット）（体重３５０から６００ｇ）が、Ａｍｙｔａｌ　Ｓｏｄｉｕｍ（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ　ａｎｄ　Ｃｏ．，１６０ｎｇ／ｋｇ）の腹腔内注射を用いて麻酔される。腎臓、副腎、胃、および低部結腸の血管が連結される。十二指腸の約４ｃｍおよびその下の結腸および直腸を除いて、腸全体が切除される。従って、この腸のごく小さな部分が潅流され、従って、インシュリン向性の免疫反応性を有する腸物質によって可能な妨害を最小にする。潅流液は、好ましくは、４％のデキストランＴ７０および０．２％のウシ血清アルブミン（第Ｖ画分）を有する改変されたＫｒｅｂｓ－Ｒｉｎｇｅｒの重炭酸緩衝液である。そして好ましくは、９５％のO_2および５％のCO_2で泡立てられている。非拍

動性流の４流路ローラーを保有するポンプ（Ｂｕｃｈｌｅｒ ｐｏｌｙｓｔａｔｉｃ、Ｂｕｃｈｌｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｎｕｃｌｅａｒ－Ｃｈｉｃａｇｏ Ｃｏｒｐ．）が好ましくは使用され、そして１つの潅流液供給源から別の潅流液供給源へのスイッチが、好ましくは、３方向ストップコックをスイッチすることによって達成される。潅流が行われる様式は、好ましくは、Ｗｅｉｒ，Ｇ．Ｃ．ら、（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔ．５４：１４０３－１４１２（１９７４））（これは、本明細書中で参考として援用されている）の方法に従って、改変され、そして分析される。

【０１１９】

（Ｂ．ＨＰＬＣ－ＭＳ）

質量スペクトル分析（ＭＳ）と組合せられたＨＰＬＣが、当業者に周知であるように、ペプチドおよび改変されたペプチドの存在をアッセイするために利用され得る。代表的には、２つの移動相が利用される：０．１％のＴＦＡ／水、および０．１％のＴＦＡ／アセトニトリル。カラムの温度は、勾配条件と同様に変更され得る。特定の詳細は、以下の実施例の節に概説される。

【０１２０】

（Ｃ．抗体）

本発明の別の局面は、ＩＴＰに対して特異的な抗体を使用して生物学的なサンプル（例えば、血液）中のＩＴＰまたはそれらの結合体の濃度を決定するための方法に関し、そしてこのようなＩＴＰまたは結合体と会合する可能性のある毒性の処置としての、このような抗体の使用に関する。患者中でのインビボでのＩＴＰの増大した安定性および寿命が処置の間の新規の問題（増大した毒性の可能性を含む）を導き得るので、これは有利である。特定のＩＴＰについて特異性を有する抗ＩＴＰ抗体の使用（モノクローナルまたはポリクローナルのいずれか）は、任意のこのような問題を調停することを補助し得る。抗体は、特定の改変されたＩＴＰ、または試薬の免疫原性のフラグメント、または試薬の抗原決定基に対応する合成された免疫原で免疫された宿主から、生成され得るかまたは誘導され得る。好ましい抗体は、改変されたＩＴＰの天然の形態、誘導された形態、および結合された形態に対して高い特異性および親和性を有する。このような抗体はまた、酵素、蛍光色素、または放射性標識を用いて標識され得る。

【０１２１】

改変されたＩＴＰについて特異的な抗体は、誘導されたＩＴＰ特異的抗体の誘導のために精製されたＩＴＰを使用することによって産生され得る。抗体の誘導によって、動物中への注射による免疫応答の刺激だけではなく、組換えのイムノグロブリンライブラリーのスクリーニングのような、合成の抗体または他の特定の結合分子の産生における同様の工程もまた、意図される。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方が、当該分野で周知の手順によって産生され得る。

【０１２２】

抗体は、血流中のＩＴＰペプチドの存在をモニターするために使用され得る。血液および／または血清サンプルは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタンブロッティングによって分析され得る。このような技術は、血液成分に対する改変されたＩＴＰの結合を決定するための、血液または血清の分析を可能にする。

【０１２３】

抗治療薬抗体もまた、改変されたＩＴＰの投与によって誘導される毒性を処置するために使用され得、そしてエキソビボまたはインビボで使用され得る。エキソビボの方法としては、固体支持体に対して固定された抗治療薬抗体を使用する毒性の免疫透析処置が挙げられる。インビボの方法としては、抗体－試薬複合体のクリアランスを誘導するために有効な量での抗治療薬抗体の投与が挙げられる。

【０１２４】

抗体は、改変されたＩＴＰおよびその結合体の、患者の血液からの除去のために、滅菌条件下で抗体と血液とを接触させることによってエキソビボで使用され得る。例えば、抗体は、カラムマトリックス上で固定され（ｆｉｘｅｄ）得るかまたはそうでなければ動け

なくされ（ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ）得、そして患者の血液は、患者から取り出されそしてマトリックス上を通過させられ得る。改変されたＩＴＰは、抗体に対して結合し、次いで低濃度のＩＴＰを含有している血液が、患者の循環系に戻され得る。除去される改変されたＩＴＰの量は、圧力および流速を調節することによって制御され得る。患者の血液の血漿成分からの改変されたＩＴＰの優先的な除去は、例えば、半透膜の使用によって、そうでなければ、抗治療性抗体を含有するマトリックスの上に血漿成分を通過させる前に、まず当該分野で公知の方法によって細胞性の成分から血漿成分を分離することによって、達成され得る。あるいは、赤血球を含むＩＴＰと結合体化した血液細胞の優先的な除去は、患者の血液中の血液細胞を回収しそして濃縮し、そしてこれらの細胞を、患者の血液の血清成分の排除のために固定された抗－ＩＴＰ抗体と接触させることによって、達成され得る。

【０１２５】

抗－ＩＴＰ抗体は、処置のために、改変されたＩＴＰまたは結合体を受容した患者に対して、インビボで非経口的に投与され得る。抗体は、ＩＴＰ化合物および結合体に結合する。一旦結合すると、ＩＴＰ活性は、完全にはブロックされなくても妨げられ、それによって患者の血流中のＩＴＰ化合物の生物学的に有効な濃度を低下させ、そして有害な副作用を最小にする。さらに、結合した抗体－ＩＴＰ複合体は、患者の血流からのＩＴＰ化合物および結合体のクリアランスを容易にする。

【０１２６】

完全に記載されてきた本発明は、ここで以下の限定的ではない実施例によって例示される。

【０１２７】

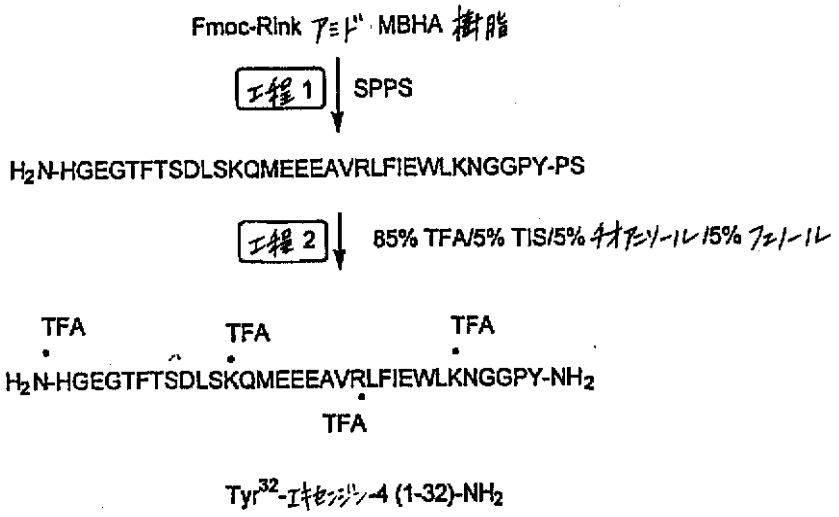
（実施例）

（概略）

１００μモルのスケールでのインシュリン向性ペプチドの固相ペプチド合成を、以下を使用して行った：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ、Ｆｍｏｃで保護されたアミノ酸、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液中のＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）、およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）での活性化、およびＦｍｏｃ基のピペリジン脱保護（工程１）。必要とされる場合には、Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を、手作業によって行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$；ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$の溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。いくつかの例においては、次いで、この合成を、１つのＡＥＥＡ（アミノエトキシエトキシ酢酸）基の付加、酢酸の付加、または３－マレイミドプロピオン酸（ＭＰＡ）の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いて乾燥－氷冷Ｅｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配ニ成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ　１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびに、２１４および２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分での１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ$_2$Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ$_3$ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））の勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製した。純度を、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光光度計を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって、そして電子放射イオン化を使用して、９５％と決定した。

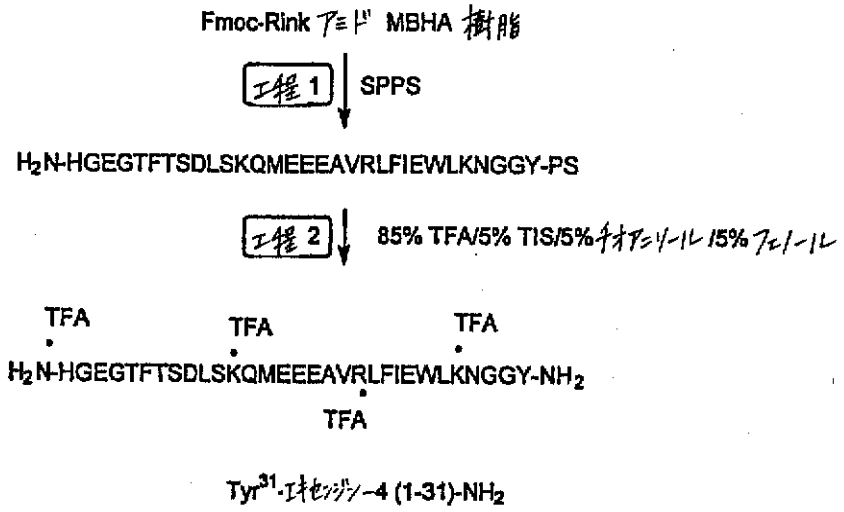
【０１２８】

（実施例１）
Ｔｙｒ^{32}－エキセンジン４（１－３２）－NH_2
Ｈｉｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｔｙｒ－アミドの調製
【０１２９】
【化３】



【０１３０】
１００μモルのスケールでのアナログの固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ、Ｆｍｏｃで保護されたアミノ酸、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液中のＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）、およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）での活性化、およびＦｍｏｃ基のピペリジン脱保護（工程１）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いて乾燥－氷冷Et_2Oによって沈殿させる（工程２）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配ニ成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分での１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））の勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製して、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合に、所望されるペプチドを＞９５％の純度で得る。
【０１３１】
（実施例２）
Ｔｙｒ^{31}－エキセンジン４（１－３１）
Ｈｉｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｔｙｒ－アミドの調製
【０１３２】

【化４】



【０１３３】

１００μモルのスケールでのアナログの固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ、Ｆｍｏｃで保護されたアミノ酸、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液中のＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）、およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）での活性化、およびＦｍｏｃ基のピペリジン脱保護（工程１）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いて乾燥－氷冷Et_2Oによって沈殿させる（工程２）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配ニ成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ

１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分での１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦ（Ｂ））の勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製して、所望のペプチドを、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合に＞９５％の純度で得る。

【０１３４】

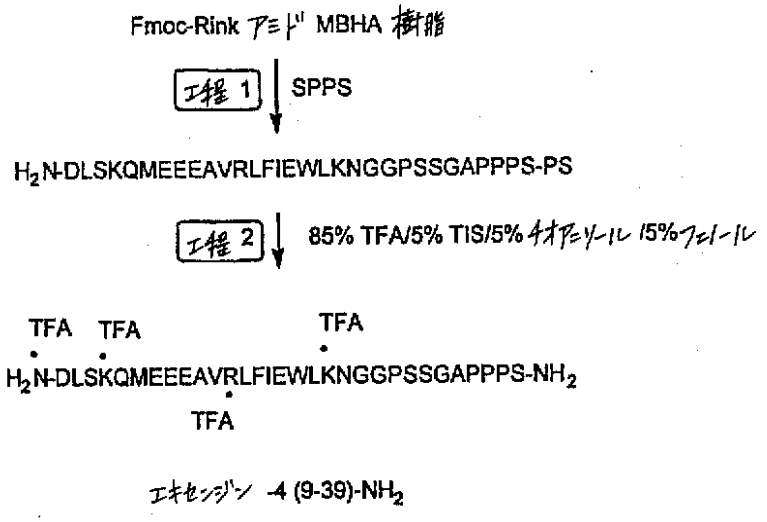
（実施例３）

エキセンジン４－（９－３９）－NH_2

Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌｙ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－アミドの調製

【０１３５】

【化５】



【０１３６】

１００μモルのスケールでのアナログの固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ、Ｆｍｏｃで保護されたアミノ酸、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液中のＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）、およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）での活性化、およびＦｍｏｃ基のピペリジン脱保護（工程１）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いて乾燥－氷冷Et_2Oによって沈殿させる（工程２）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配ニ成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ

１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分での１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））の勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製して、所望ペプチドを、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合に＞９５％の純度で得る。

【０１３７】

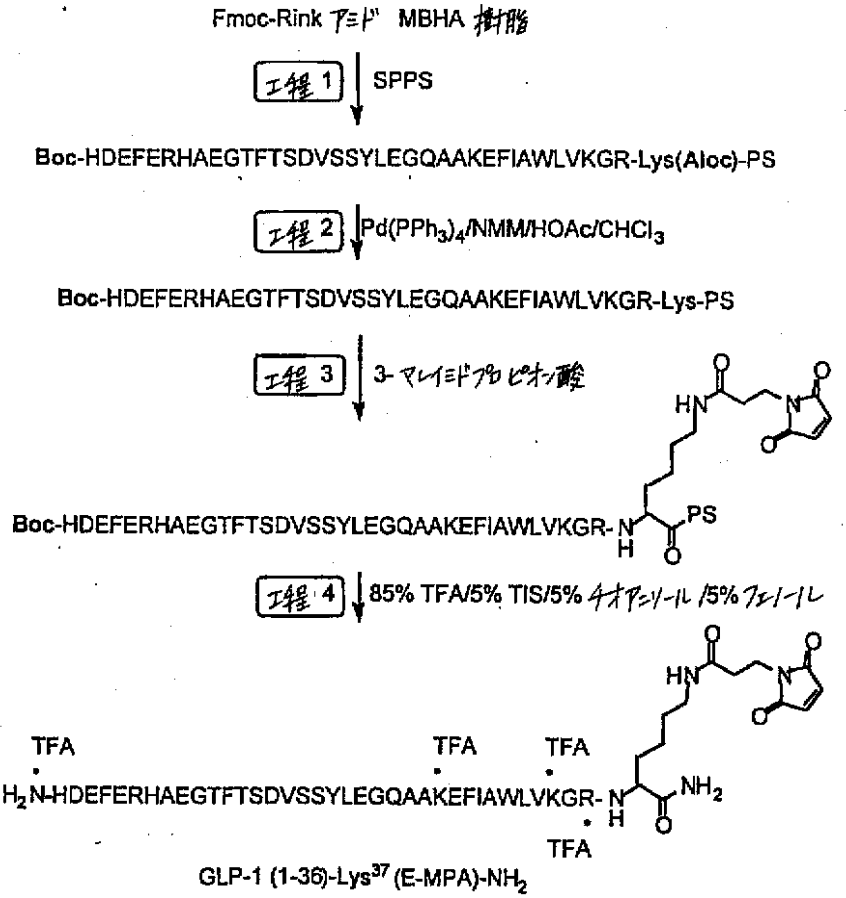
（実施例４）

ＧＬＰ－１（１－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH^2－５ＴＦＡ；
Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＭＰＡ）－NH_2－５ＴＦＡの調製

改変されたＧＬＰ－１ペプチドを、以下の模式図に示すように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のアミノ基の連結をはずすことによって合成する。

【０１３８】

【化６】



【０１３９】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に付加した；Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１４０】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$の溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、この樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５

％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いて乾燥－氷冷Et_2Oによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配ニ成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ　１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分での１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））の勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光光度計を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって、そして電子放射イオン化を使用して決定した場合には、＞９５％の純度を有した。

【０１４１】

（実施例５）

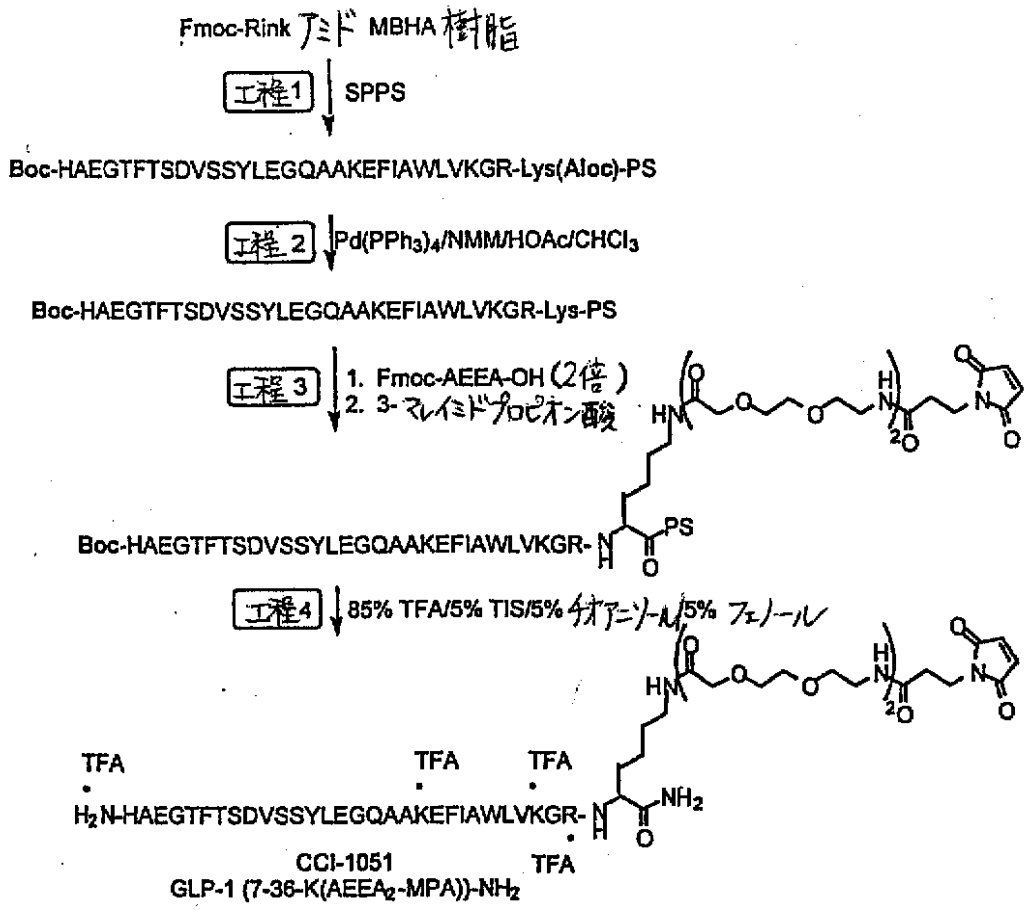
ＧＬＰ－１（１－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH^2－５ＴＦＡ；

Ｈｉｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2－５ＴＦＡの調製

改変されたＧＬＰ－１ペプチドを、以下の模式図に示すように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のアミノ基の連結をはずすことによって合成する。

【０１４２】

【化７】



【０１４３】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して付加した；Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１４４】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬの$CHCl_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量の$Pd(PPh_3)_4$溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、$CHCl_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、２つのＡＥＥＡ（アミノエトキシエトキシ酢酸）基および３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したEt_2Oによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分取二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合、＞９５％の純度を有した。$C_{174}H_{265}N_{44}O_{56}$（$MH^+$）についてのＥＳＩ－ＭＳ ｍ／ｚを、３８６８と計算し、$[M+H_2]^{2+}$１９３４、$[M+H_3]^{3+}$１２９０、$[M+H_4]^{4+}$９６７を見出した。

【０１４５】

（実施例６）

ＧＬＰ－１（７－３６）－Lys^{37}（ε－ＭＰＡ）－NH_2．４ＴＦＡ；Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＭＰＡ）－NH_2－４ＴＦＡの調製

改変されたＧＬＰ－１ペプチドを、以下に記載するように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１４６】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して付加した：Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－

ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１４７】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分取二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ２Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ３ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合、＞９５％の純度を有した。

【０１４８】

（実施例７）

ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$．４ＴＦＡ；

Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$－４ＴＦＡの調製

改変されたＧＬＰ－１ペプチドを、以下に記載するように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１４９】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して付加した：Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈ

ｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１５０】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、２つのＡＥＥＡ（アミノエトキシエトキシ酢酸）基および３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分取二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ　１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ$_2$Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ$_3$ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合、＞９５％の純度を有した。

【０１５１】

（実施例８）

Ｄ－Ａｌａ^2　ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$．４ＴＦＡ；Ｈｉｓ－Ｄ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＭＰＡ）－ＮＨＨ$_2$－４ＴＦＡの調製

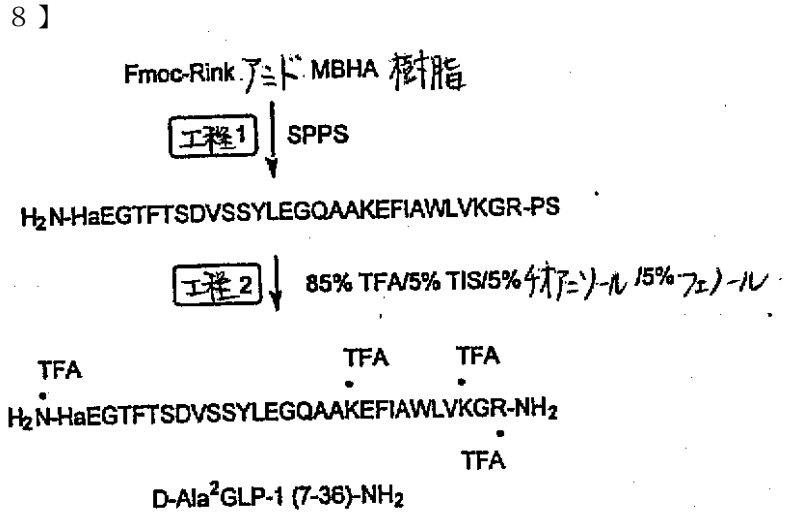
Ｄ－Ａｌａ^{2}ＧＬＰ－１（７－３６）アミドを、以下の模式図に示すように、合成した。

【０１５２】

Ａ．Ｄ－Ａｌａ^2－ＧＬＰ－１（７－３６）アミドの調製

【０１５３】

【化８】



【０１５４】

１００μモルのスケールでのＧＬＰ－１アナログの固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ

ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ、Ｆｍｏｃで保護されたアミノ酸、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）溶液中のＯ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）での活性化、ならびにＦｍｏｃ基のピペラジン脱保護（工程１）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したEt_2Oによって沈殿させる（工程２）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分取二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ　１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分取逆相ＨＰＬＣによって精製して、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合、所望されるペプチドを＞９５％の純度で得る。

【０１５５】

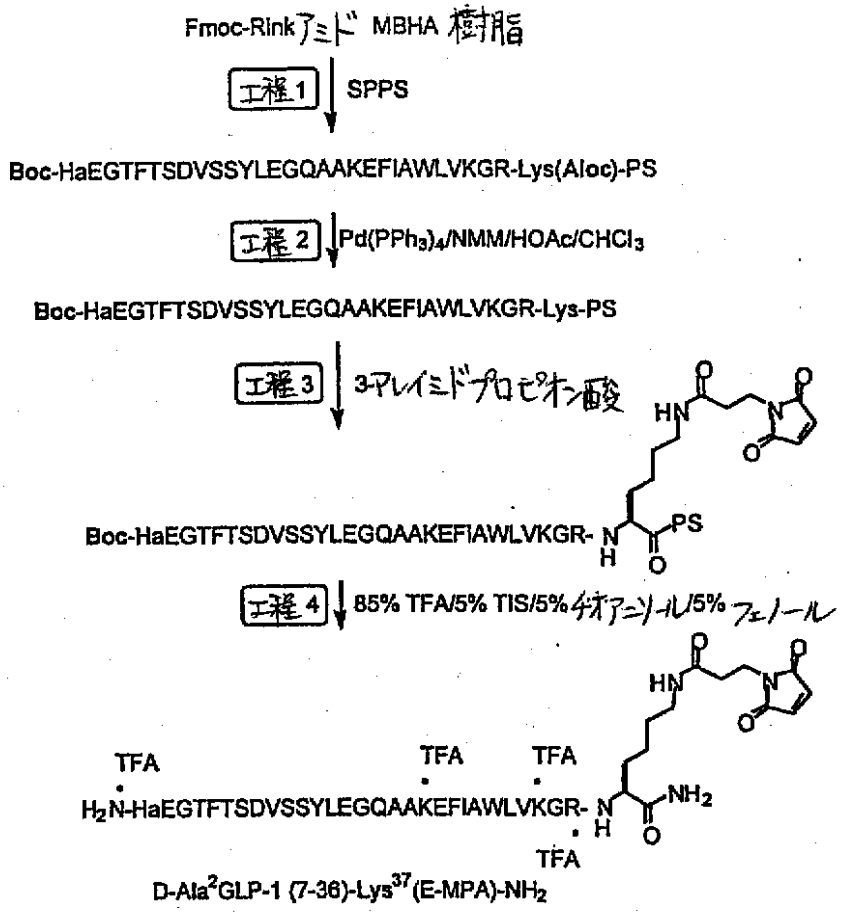
改変されたＧＬＰ－１ペプチドを、以下の模式図に示すように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１５６】

Ｂ．Ｄ－Ａｌａ^{2}－ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（Ｅ－ＭＰＡ）アミドの調製

【０１５７】

【化９】



【０１５８】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｇ　Ａｍｉｄｅ　ＭＢＨＡ樹脂に対して付加した：Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢ

ｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ｄ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１５９】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分取二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ$_2$Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ$_3$ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合、＞９５％の純度を有した。

【０１６０】

（実施例９）

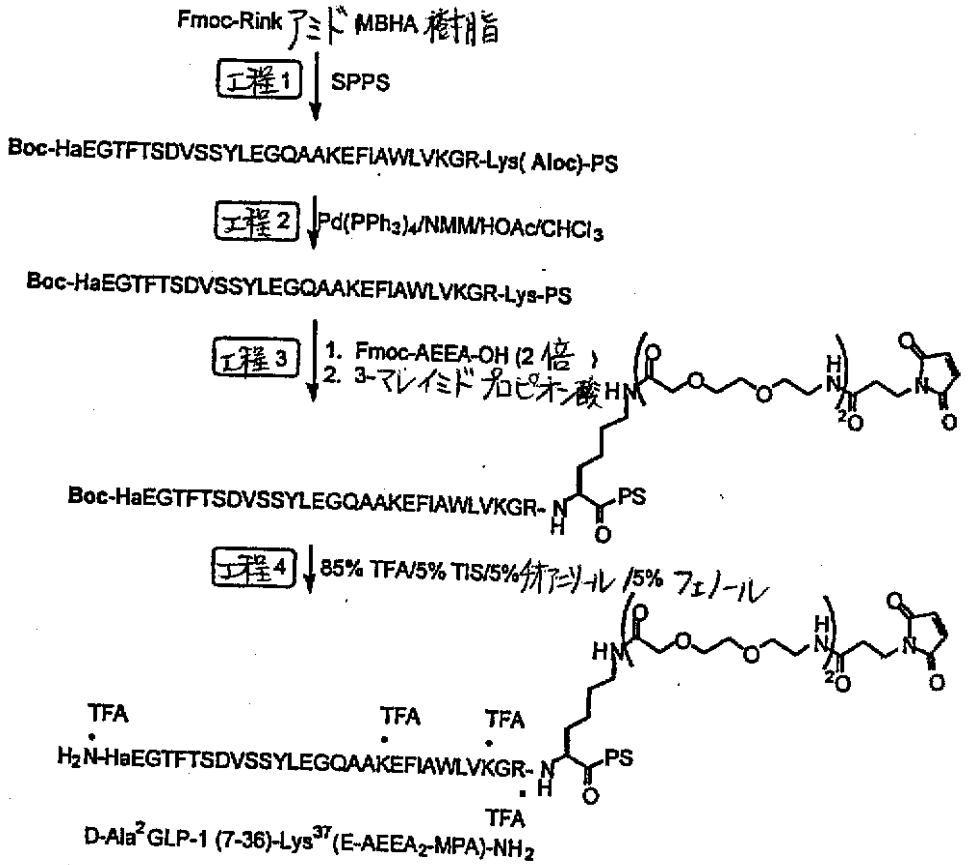
Ｄ－Ａｌａ^2 ＧＬＰ－１（７－３６）－Ｌｙｓ^{37}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$．４ＴＦＡ；

Ｈｉｓ－Ｄ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$－４ＴＦＡの調製

改変されたＧＬＰ－１ペプチドを、以下の模式図に示すように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基の －Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１６１】

【化１０】



【０１６２】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して付加した：Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｔＢｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－ｄ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｎ－Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１６３】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３等量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$溶液で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、２つのＡＥＥＡ（アミノエトキシエトキシ酢酸）基および３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却した

Et_2Oによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分取二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ　１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分取逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合、＞９５％の純度を有した。

【０１６４】

（実施例１０）

エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－NH_2；
Ｈｉｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ（ε－ＭＰＡ）－NH_2－５ＴＦＡの調製

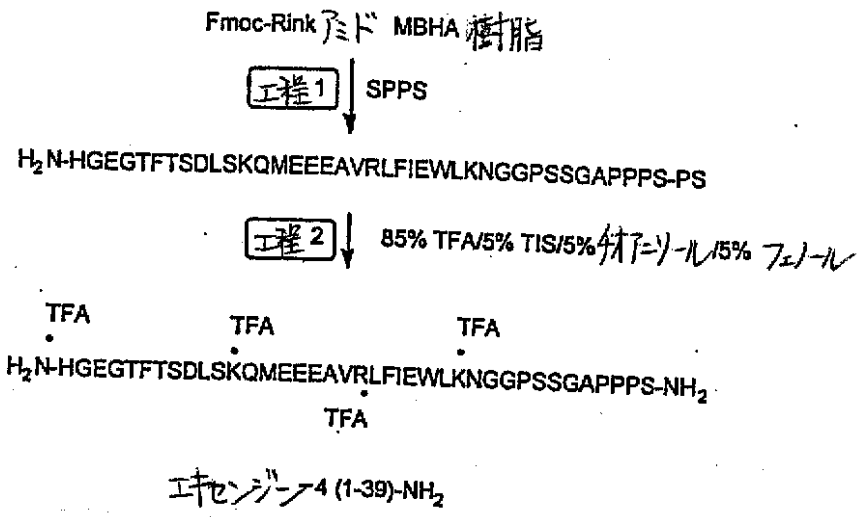
エキセンジン－４（Ｅｘｅｎｄｉｎ－４）を、以下の模式図に示すように、合成した。

【０１６５】

Ａ．エキセンジン－４の調製

【０１６６】

【化１１】



【０１６７】

１００μモルのスケールでのエキセンジン－４の固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ。以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　ＭＢＨＡ樹脂に対して付加する；Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－

Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ。これらを、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中に溶解させ、そして配列に従って、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）を使用して活性化する。Ｆｍｏｃ保護基の除去を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の２０％（ｖ／ｖ）のピペリジンの溶液を使用して、２０分間で達成する（工程１）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したEt_2Oによって沈殿させる（工程２）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム：３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））でのＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｌｕｎａ　１０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラムならびに２１４ｎｍおよび２５４ｎｍのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を使用して、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製して、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合には、所望されるペプチドを＞９５％の純度で得る。

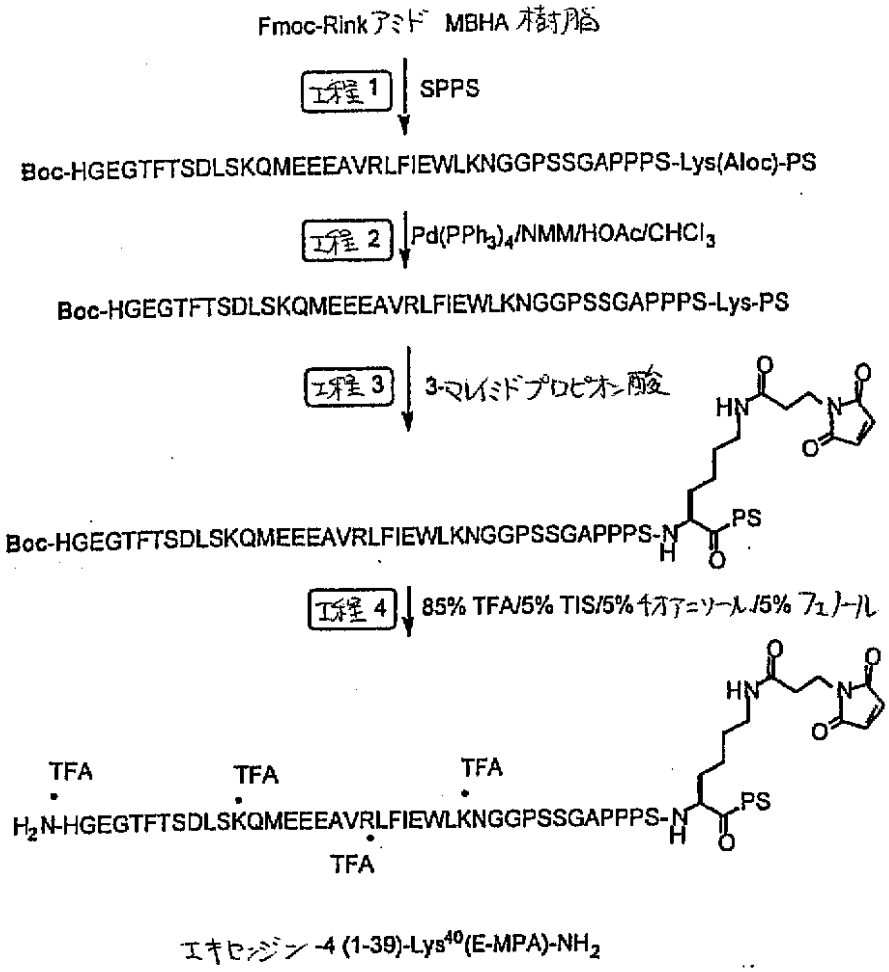
【０１６８】

Ｂ．改変されたエキセンジン４の調製（配列番号１８）

改変されたエキセンジン－４ペプチドを、以下の模式図に示すように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１６９】

【化１２】



【０１７０】

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して連続的に付加した；Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｂｐｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）、Ｆｍｏｃ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１７１】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３当量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×

５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したEt_2Oによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光光度計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって、決定した場合には、＞９５％の純度を有した。

【０１７２】

（実施例１１）

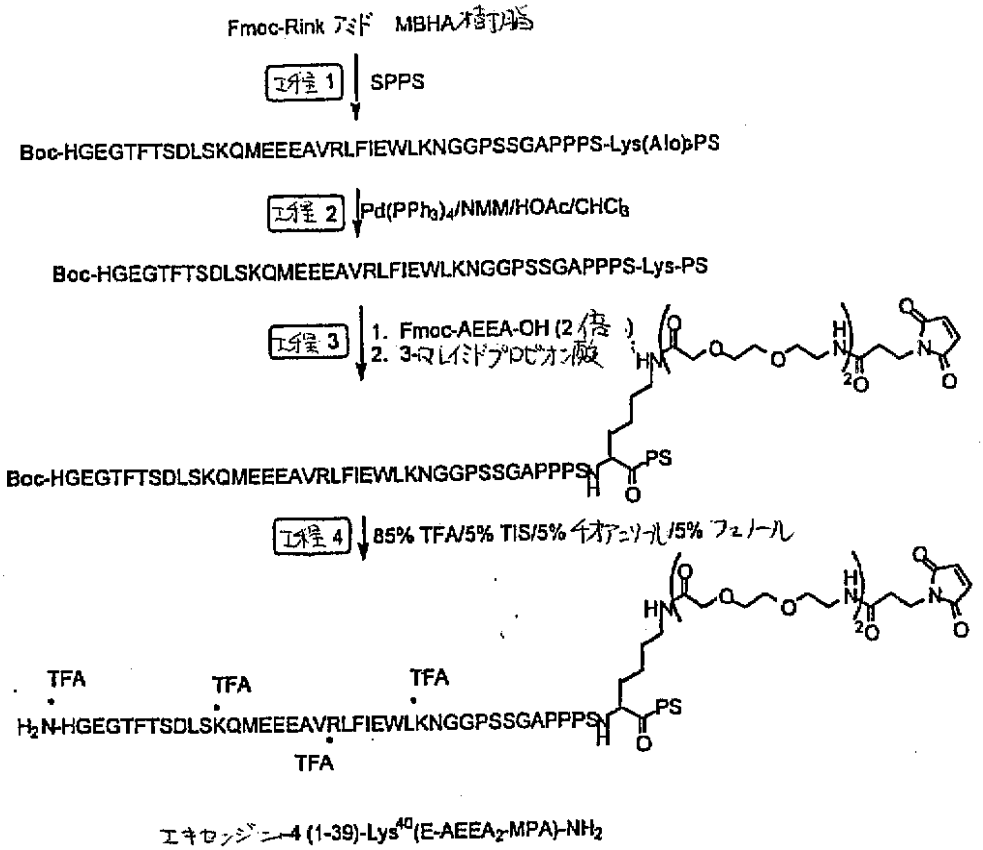
改変エキセンジン－４（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2・５ＴＦＡ；

Ｈｉｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－NH_2－５ＴＦＡの調製

改変されたエキセンジン－４ペプチドを、以下の模式図に示すように、付加したリジン（Ｌｙｓ）残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１７３】

【化１３】



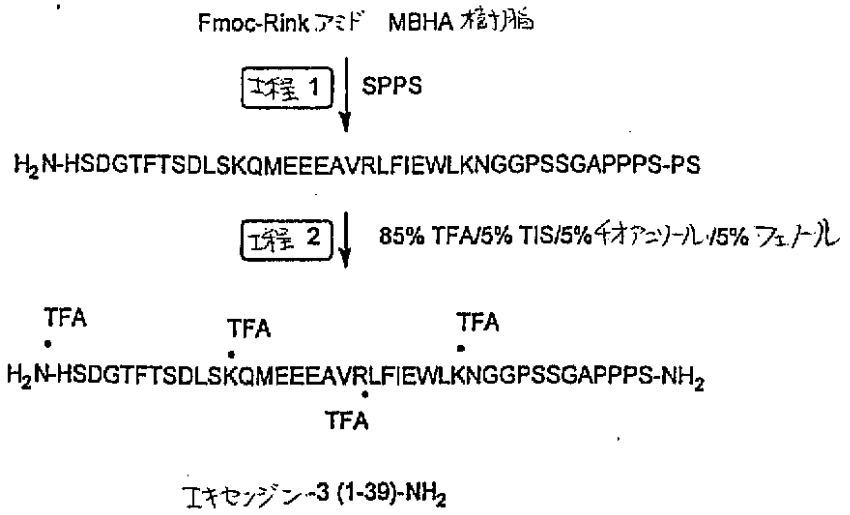
【０１７４】
自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して連続的に付加した；Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｂｐｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１７５】
Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３当量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、２つのＡＥＥＡ（アミノエトキシエトキシ酢酸）基および３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ$_2$Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ$_3$ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光光度計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合には、＞９５％の純度を有した。

【０１７６】
（実施例１２）
エキセンジン－３（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$・５ＴＦＡ；
Ｈｉｓ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ（ε－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$－５ＴＦＡの調製
Ａ．エキセンジン３の調製
エキセンジン－３ペプチドを、最初に、以下の模式図に示すように、合成する。

【０１７７】

【化１４】



【０１７８】

１００μモルのスケールでのエキセンジン３の固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ。以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して付加する；Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－Ｏｈ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ。これらを、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中に溶解させ、そして配列に従って、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）を使用して活性化する。Ｆｍｏｃ保護基の除去を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の２０％（ｖ／ｖ）のピペリジンの溶液を使用して、２０分間で達成する（工程１）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したEt_2Oによって沈殿させる（工程２）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム：３０～５５％のＢ（H_2O中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびCH_3CN中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））でのＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラムならびに２１４ｎｍおよび２５４ｎｍのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用して、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製して、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合には、所望さ

れるペプチドを＞９５％の純度で得る。

【０１７９】

Ｂ．改変されたエキセンジン３の調製

自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して連続的に付加した；Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｂｐｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。改変されたエキセンジン－３を、付加されたリジン残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

【０１８０】

Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３当量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ$_2$Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ$_3$ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光光度計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合には、＞９５％の純度を有した。

【０１８１】

（実施例１３）

エキセンジン－３（１－３９）－Ｌｙｓ^{40}（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$・５ＴＦＡ；
Ｈｉｓ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｍｅｔ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ（ε－ＡＥＥＡ－ＡＥＥＡ－ＭＰＡ）－ＮＨ$_2$－５ＴＦＡの調製

改変されたエキセンジン－３ペプチドを、以下に記載するように、付加されたリジン（Ｌｙｓ）残基のε－Ｎ末端の連結をはずすことによって合成する。

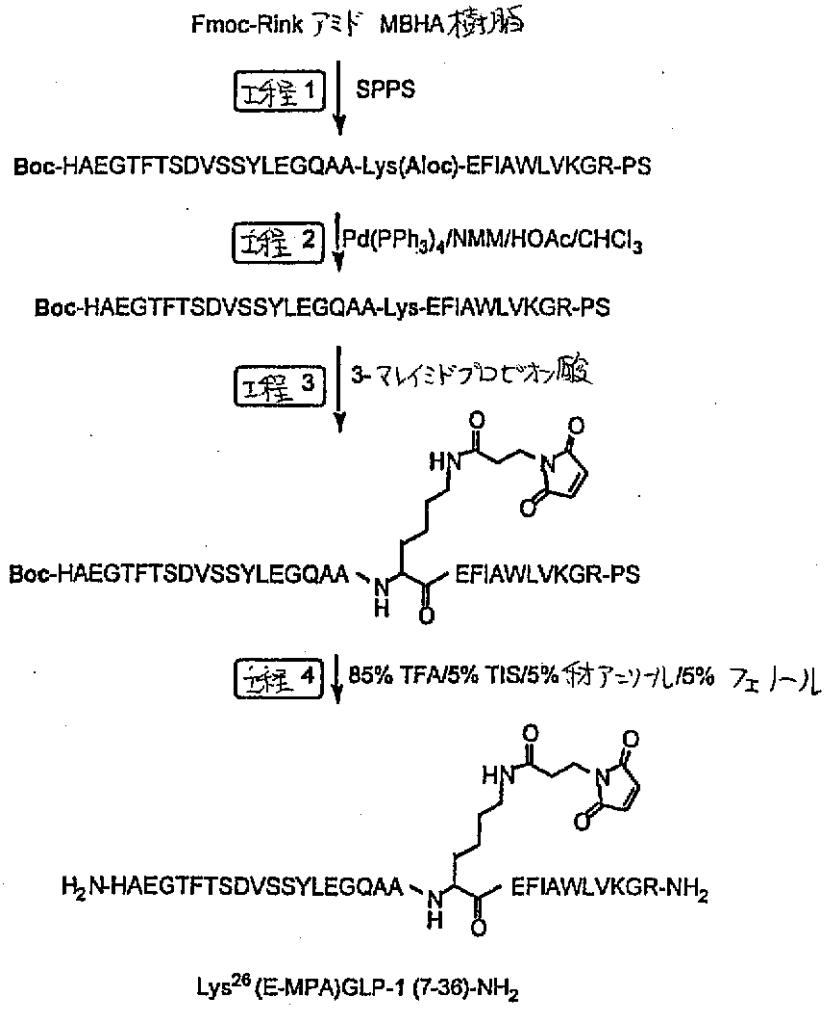
【０１８２】
自動化されたペプチド合成を使用して、以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して連続的に付加した；Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｂｐｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ（工程１）。

【０１８３】
Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的な脱保護を手作業で行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）中に溶解させた３当量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$で２時間樹脂を処理することによって達成した（工程２）。次いで、樹脂を、ＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ中の２０％のＨＯＡｃ（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、合成を、２つのＡＥＥＡ（アミノエトキシエトキシ酢酸）基および３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８５％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のチオアニソール、および５％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させた（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ １０μフェニルヘキシル、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム、ならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍでＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ Ｄｙｎａｍａｘ ＵＶＤ ＩＩ）を使用する、９．５ｍＬ／分で１８０分にわたる３０～５５％のＢ（Ｈ$_2$Ｏ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ａ）およびＣＨ$_3$ＣＮ中の０．０４５％のＴＦＡ（Ｂ））での勾配溶出を使用して、分配逆相ＨＰＬＣによって精製した。生成物は、ダイオードアレイ検出器を備えたＨｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ＬＣＭＳ－１１００シリーズ分光光度計および電子放射イオン化を使用するＲＰ－ＨＰＬＣ質量スペクトル分析によって決定した場合には、＞９５％の純度を有した。

【０１８４】
（実施例１４）
Ｌｙｓ^{26}（ε－ＭＰＡ）ＧＬＰ－１（７－３６）－ＮＨ$_2$の調製

【０１８５】

【化１５】



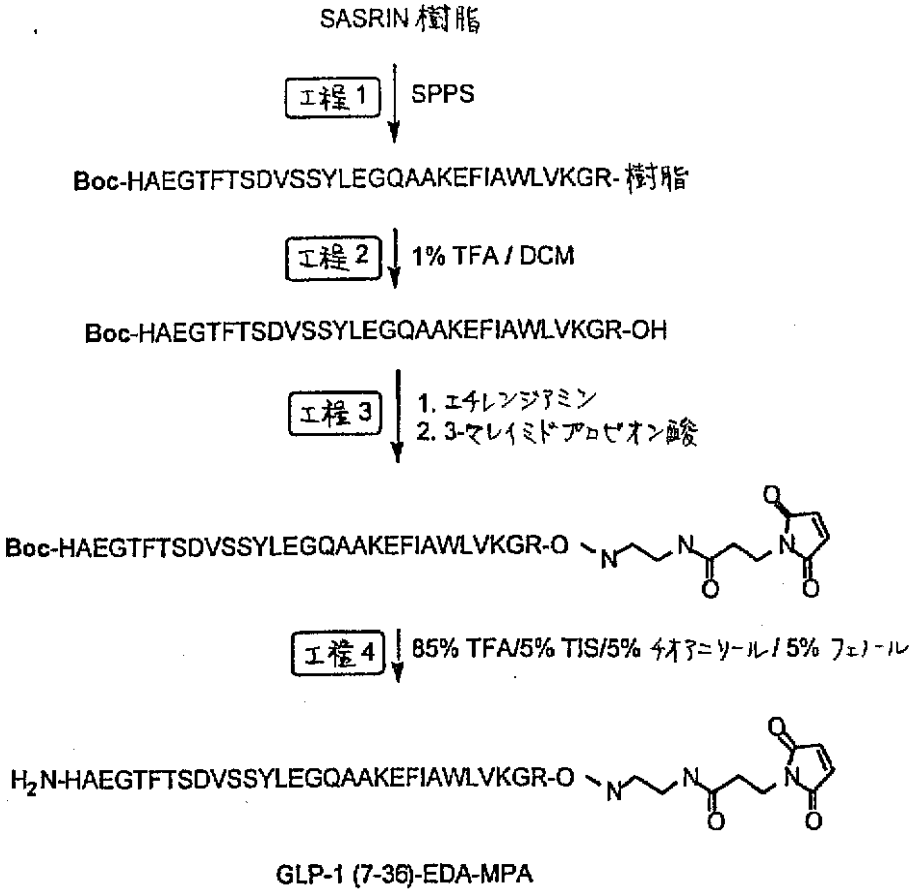
【０１８６】

１００μモルのスケールでのＤＡＣ：ＧＬＰ－１アナログの固相ペプチド合成を、以下を使用して行う：手作業による固相合成、ならびにＦｍｏｃで保護されたＲｉｎｋ ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂を使用するＳｙｍｐｈｏｎｙ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ。以下の保護されたアミノ酸を連続的にＲｉｎｋ Ａｍｉｄｅ ＭＢＨＡ樹脂に対して付加する；Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ。これらを、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中に溶解させ、そして配列に従って、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）を使用して活性化する。Ｆｍｏｃ保護基の除去を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の２０％（ｖ／ｖ）のピペリジンの溶液を使用して、２０

分間で達成する（工程１）。Ｌｙｓ（Ａｌｏｃ）基の選択的脱保護を手作業により行い、そして５ｍＬのＣＨＣｌ$_3$：ＮＭＭ：ＨＯＡｃ（１８：１：０．５）に溶解した３当量のＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$の溶液で樹脂を２時間処理することによって達成した（工程２）。次いで、この樹脂をＣＨＣｌ$_3$（６×５ｍＬ）、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）中の２０％ＨＯＡｃ、ＤＣＭ（６×５ｍＬ）、およびＤＭＦ（６×５ｍＬ）で洗浄した。次いで、この合成を、３－マレイミドプロピオン酸の付加のために再度自動化した（工程３）。樹脂の切断および生成物の単離を、８６％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％の水／２％のチオアニソール、および２％のフェノールを使用して行い、続いてドライアイスで冷却したＥｔ$_2$Ｏによって沈殿させる（工程４）。生成物を、Ｖａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）の分配二成分ＨＰＬＣシステム（ＤｙｎａｍａｘＣ$_{18}$、６０Å、８μｍ、２１ｍｍ×２５ｃｍカラムを使用、ＤｙｎａｍａｘＣ$_{18}$、６０Å、８μｍガードモジュール、２１ｍｍ×２５ｃｍカラムならびにλ２１４ｎｍおよび２５４ｎｍのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶ　ＩＩ）を装着）を使用して、所望のＤＡＣを、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定した場合には、＞９５％の純度で得る。

【０１８７】

【化１６】



【０１８８】

（実施例１５）

（ＧＬＰ－１（７－３６）ＥＤＡ－ＭＰＡの調製）

１００μモルのスケールでの改変されたＧＬＰ－１アナログの固相ペプチド合成を、手作業によって、およびＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ　ＳＡＳＲＩＮ（超酸感受性樹脂（ｓｕｐｅｒ　ａｃｉｄ　ｓｅｎｅｉｔｉｖｅ　ｒｅｓｉｎ））上で行う。以下の保護されたアミノ酸を連続的に樹脂に対して付加する：

【０１８９】

【化１７】

Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmco-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-His(Trt)-OH.

【０１９０】

これらを、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中に溶解させ、そして配列に従って、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）を使用して活性化する。Ｆｍｏｃ保護基の除去を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の２０％（ｖ／ｖ）のピペリジンの溶液を使用して、２０分間で達成する（工程１）。１％のＴＦＡ／ＤＣＭでの処理によって、完全に保護されたペプチドを樹脂から切断する（工程２）。次いで、エチレンジアミンおよび３－マレイミドプロピオン酸を、フリーのＣ末端に連続して付加する（工程３）。次いで、保護基を切断し、そして生成物を、８６％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のH_2O／２％のチオアニソール、および２％のフェノールを使用して単離し、続いて乾燥－氷冷Et_2Oによって沈殿させる（工程４）。生成物を、Ｄｙｎａｍａｘ　C_{18}、６０Å、８μｍ、２１ｍｍ×２５ｃｍカラム（Ｄｙｎａｍａｘ　Ｃ１８、６０Å、８μｍのガードモジュール、２１ｍｍ×２５ｃｍのカラムを備えている）ならびにλ２１４および２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を用いるＶａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）分取用バイナリＨＰＬＣシステムを用いて、分取用逆相ＨＰＬＣによって精製して、所望されるＤＡＣをＲＰ－ＨＰＬＣによって決定されるように、＞９５％の純度で得る。

【０１９１】

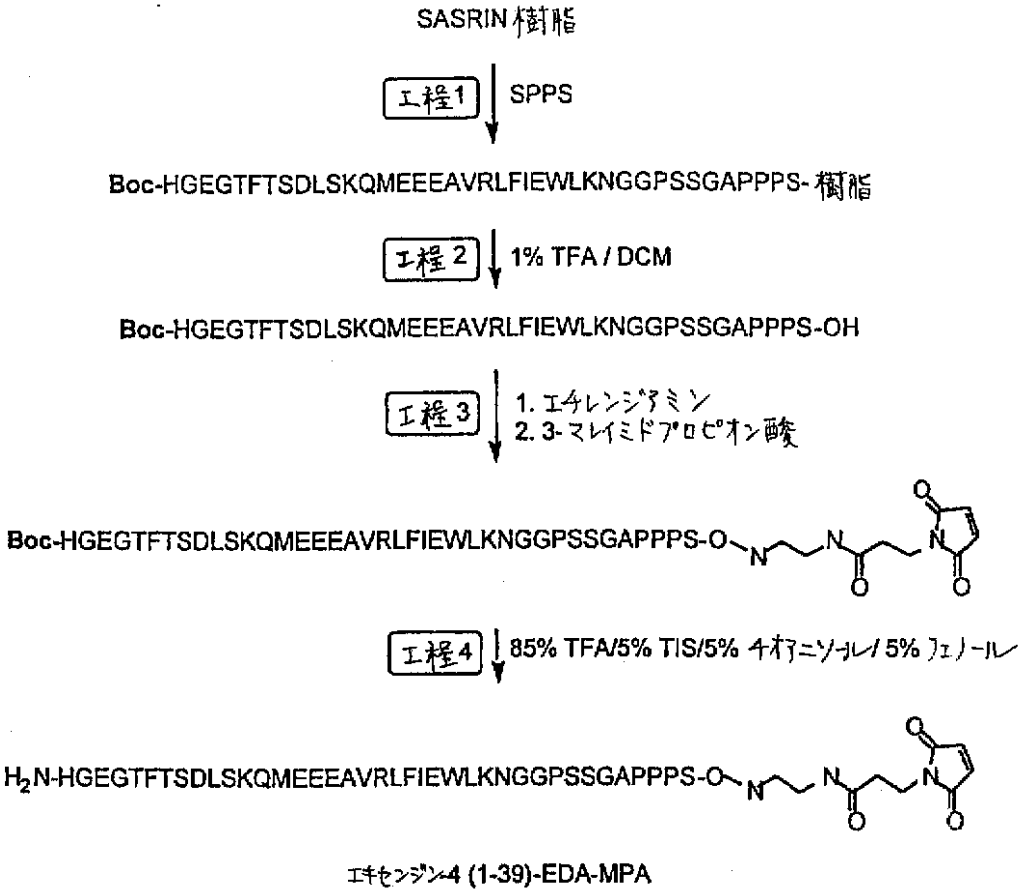
（実施例１６）

（エキセンジン－４（１－３９）－ＥＤＡ－ＭＰの調製）

以下の模式図は、エキセンジン－４（１－３９）－ＥＤＡ－ＭＰＡの合成を示す。

【０１９２】

【化１８】



【０１９３】

１００μモルのスケールでの改変されたエキセンジン－４アナログの固相ペプチド合成を、手作業によって、およびＳｙｍｐｈｏｎｙ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ　ＳＡＳＲＩＮ（超酸感受性樹脂）上で行う。以下の保護されたアミノ酸を連続的に樹脂に対して付加する：

【０１９４】

【化１９】

Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc--Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-His(Trt)-OH.

【０１９５】

そして配列に従って、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）およびジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）を使用して活性化する。Ｆｍｏｃ保護基の除去を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の２０％（ｖ／ｖ）のピペリジンの溶液を使用して、２０分間で達成する（工程１）。完全に保護されたペプチドを、１％のＴＦＡ／ＤＣＭでの処理によって樹脂から切断する（工程２）。次いで、エチレンジアミンおよび３－マレイミドプロピオン酸を、遊離Ｃ末端に連続して付加する（工程３）。次いで、保護基を切断し、そして生成物を、８６％のＴＦＡ／５％のＴＩＳ／５％のH_2O／２％のチオアニソール、および２％のフェノールを使用して単離し、続いて乾燥－氷冷Et_2Oによって沈殿させる（工程４）。生成物を、Ｄｙｎａｍａｘ　C_{18}、６０Å、８μｍ、２１ｍｍ×２５６ｃｍのカラム（Ｄｙｎａｍａｘ　Ｃ１８、６０Å、８μｍのガードモジュール、２１ｍｍ×２５ｃｍカラムを備えている）ならびにλ２１４および２５４ｎｍでのＵＶ検出器（Ｖａｒｉａｎ　Ｄｙｎａｍａｘ　ＵＶＤ　ＩＩ）を用いるＶａｒｉａｎ（Ｒａｉｎｉｎ）分取用バイナリＨＰＬＣシステムを用いて、分取用逆相ＨＰＬＣによって精製して、ＲＰ－ＨＰＬＣによって決定されるように、所望されるＤＡＣを＞９５％の純度で得る。

【配列表】

2005255689000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ 14/765	Ｃ０７Ｋ 19/00	
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ａ６１Ｋ 37/26	
// Ｃ０７Ｋ 5/103	Ｃ０７Ｋ 5/103	
Ｃ０７Ｋ 7/06	Ｃ０７Ｋ 7/06	
Ｃ０７Ｋ 7/08	Ｃ０７Ｋ 7/08	

(72)発明者 ドミニク ピー. ブライドン
カナダ国 エイチ２ブイ ２ビー２ ケベック, アウトレモント, セイント－キャサリーン, ケミン コート ２４３
(72)発明者 ベノイット ラーチェベック
カナダ国 エイチ７エイチ ２エックス１ ケベック, ラバル, ペロキン ５８７５
(72)発明者 アラン エム. エズリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５５６, モラガ, カンタス レーン １１０
(72)発明者 ダレン エル. ホルメス
カナダ国 エイチ３ジー １ティー３ ケベック, モントリオール, ドラムモンド ストリート ３４５０
(72)発明者 アノウク レブランク
カナダ国 エイチ２エックス ３ワイ８ ケベック, モントリオール, スイート ３９５０, サード フロア, プレジデント ケネディ アベニュー ウエスト ２２５, コンジュケム, インコーポレーテッド
(72)発明者 サージ セント ピエール
カナダ国 エイチ９イー １ケイ８ ケベック, イレ ビザード, プレイス ジーン－イブス ４７

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 BA44 DB34 MA02 NA05 NA14 ZC35
4C087 AA01 AA02 BB34 BB35 MA02 NA03 NA05 ZC35
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA15 BA17 BA18 BA19 BA41 CA53
DA37 EA20 FA33