(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-525348
(P2012-525348A)
(43)公表日　平成24年10月22日(2012.10.22)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/605	(2006.01)	C07K	14/605	ZNA	4H045
C07K 1/02	(2006.01)	C07K	1/02		

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 62 頁）

(21)出願番号　特願2012-507718 (P2012-507718)
(86)(22)出願日　平成22年4月28日 (2010.4.28)
(85)翻訳文提出日　平成23年12月28日 (2011.12.28)
(86)国際出願番号　PCT/EP2010/055662
(87)国際公開番号　WO2010/125079
(87)国際公開日　平成22年11月4日 (2010.11.4)
(31)優先権主張番号　61/174,662
(32)優先日　平成21年5月1日 (2009.5.1)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　591003013
エフ．ホフマン－ラ　ロシュ　アーゲー
F．HOFFMANN－LA ROCHE AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100119079
弁理士　伊藤　佐保子
(74)代理人　100135873
弁理士　小澤　圭子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】固相及び溶液相の組み合わせ技術を用いたインスリン分泌促進ペプチド合成

(57)【要約】
本発明は、固相及び溶液相（「ハイブリッド」）アプローチを用いた、（配列番号９）：Ｚ－ＨＸ^{8}ＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＸ^{35}Ｒ－ＮＨ$_{2}$（式中、Ｚは、Ｈ－であり；そして、Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である）のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドの調製に関する。一般的に、本アプローチは、固相化学を用いて３つの異なるペプチド中間フラグメントを合成することを包含する。次に、溶液相化学を用いて、第二のフラグメントと第一のフラグメントをカップリングさせる。あるいは、異なる第二のフラグメントを、固相において第一のフラグメントにカップリングさせる。次に、溶液相化学を用いて、第三のフラグメントに付加させ、それによって、第三のフラグメントを、溶液相において、カップリングした第一及び第二のフラグメントにカップリングさせる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号５）：
【化６８】

$$Z\text{-}QAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号６）：
【化６９】

$$Z\text{-}SYLEG$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｃ）（配列番号７）：
【化７０】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得るために、溶液中、第一のペプチドフラグメントを第二のペプチドフラグメントにカップリングさせる工程、
ｄ）第三のペプチドフラグメントのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号７）：
【化７１】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、
ｅ）（配列番号８）：
【化７２】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
X^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；

Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第五のペプチドフラグメントを第四のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化７３】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化７４】

$$Z\text{-}HX^{8}EX^{10}TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｇ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化７５】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程を含む、前記製造方法。
【請求項２】
工程ｈ）から得られる脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化７６】

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR

を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号８）：
【化７７】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
X^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号６）：
【化７８】

$$Z\text{-}SYLEG\text{-}B'$$

[式中、
Ｂ’は、固相樹脂であり；
Ｚは、Ｈ－であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｃ）（配列番号１１）：
【化７９】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEG\text{-}B'$$

[式中、
Ｂ’は、固相樹脂であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得るために、第一のペプチドフラグメントを第二のペプチドフラグメントにカップリングさせる工程、
ｄ）固相樹脂から第三のペプチドフラグメントを除去して、（配列番号１１）：
【化８０】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEG\text{-}B'$$

[式中、
Ｂ’は、－ＯＨであり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、
ｅ）（配列番号５）：
【化８１】

$$Z\text{-}QAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；

Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第四のペプチドフラグメントを第五のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化８２】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化８３】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｇ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化８４】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程を含む、前記製造方法。
【請求項４】
脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化８５】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

を有する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号１２）：

【化８６】

Z-SYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｂ’は、固相樹脂である]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号８）：
【化８７】

Z-HX^{8}EGTFTSDVS-B’

[式中、
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｃ）第二のペプチドフラグメントを第一のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号１３）：
【化８８】

Z-HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、固相樹脂であり；
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得る工程、
ｄ）固相樹脂から第三のペプチドフラグメントを除去して、（配列番号１３）：
【化８９】

Z-HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、及び
ｅ）（配列番号１４）：
【化９０】

Z-FIAWLVKX^{35}R-NH_2

[式中、
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]

のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第四のペプチドフラグメントを第五のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化９１】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
X^{8}及びX^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化９２】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
X^{8}及びX^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｇ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化９３】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
X^{8}及びX^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程を含む、前記製造方法。
【請求項６】
脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化９４】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

を有する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号１４）：
【化９５】

$$Z\text{-}FIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号１２）：
【化９６】

Z-SYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｃ）溶液中、第一のペプチドフラグメントを第二のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号７）：
【化９７】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得る工程、
ｄ）第三のペプチドフラグメントのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号７）：
【化９８】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、
ｅ）（配列番号８）：
【化９９】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B’$$

[式中、
Ｘ８は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第五のペプチドフラグメントを第四のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：

【化１００】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化１０１】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｈ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化１０２】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程を含む、前記製造方法。
【請求項８】
脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化１０３】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

を有する、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
請求項１、３、５及び７に記載される方法から選択される、（配列番号９）：
【化１０４】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]

のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを調製するための方法。
【請求項１０】
アミノ酸配列（配列番号５）：
【化１０５】

$$Z\text{-}QAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１１】
アミノ酸配列（配列番号７）：
【化１０６】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１２】
アミノ酸配列（配列番号８）：
【化１０７】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
X^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１３】
アミノ酸配列（配列番号１１）：
【化１０８】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEG\text{-}B'$$

[式中、
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂であり；
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１４】
アミノ酸配列（配列番号１２）：

【化１０９】

Z-SYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；そして
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂である]
のペプチド。
【請求項１５】
アミノ酸配列（配列番号１３）：
【化１１０】

Z-HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂であり；
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１６】
アミノ酸配列（配列番号７）：
【化１１１】

Z-SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R-NH_2

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１７】
アミノ酸配列（配列番号１４）：
【化１１２】

Z-FIAWLVKX^{35}R-NH_2

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチド。
【請求項１８】
ＺがＦｍｏｃである、請求項１０～１７のいずれか一項に記載のペプチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、固相及び溶液相プロセスを用いて、インスリン分泌促進ペプチド、特に、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）及びその対応物を調製するための方法に関するものである。本発明は、さらに、これらの方法で使用することができる中間ペプチドフラグ

メントに関する。

【背景技術】

【０００２】

ペプチド合成のための多くの方法が、これまでに文献に記載されている（例えば、米国特許第6,015,881号；Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4005-4008; Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4009-4012; Kamber et al. (eds), Peptides, Chemistry and Biology, ESCOM, Leiden (1992) 525-526; Riniker et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:9307-9320; Lloyd-Williams et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:11065-11133; 及びAndersson et al. (2000) Biopolymers 55:227-250を参照）。合成の様々な方法が、合成が行われる相の物理的状態、即ち、液相又は固相により分類される。

【０００３】

固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）では、アミノ酸又はペプチド基を、固体支持体樹脂に結合させる。次に、連続的にアミノ酸又はペプチド基を、対象のペプチド材料が形成されるまで支持体結合ペプチドに結合させる。次に、支持体結合ペプチドは、典型的には、支持体から切断して、さらなるプロセシング及び／又は精製に付す。一部の場合では、固相合成は、成熟ペプチド生成物を生成する；他の場合では、支持体から切断されたペプチド（即ち、「ペプチド中間フラグメント」）を、より大きな成熟ペプチド生成物の調製に使用する。

【０００４】

固相プロセスから生成されるペプチド中間フラグメントを、固相又は液相合成プロセス（本明細書においては、「溶液相合成」と呼ぶ）で一緒にカップリングさせることができる。溶液相合成は、固相による有用な成熟ペプチドの合成が不可能又は実施できない場合に、特に有用であることができる。例えば、固相合成において、より長いペプチドが最終的に、固体支持体に結合されたままで不規則な立体配置をとる可能性があり、これにより、追加のアミノ酸又はペプチド材料を伸長鎖へ付加させることが困難となる。ペプチド鎖が、支持体樹脂上で長くなるほど、カップリング及び脱保護などのプロセス工程の効率が低下する可能性がある。これは、結果として、活性可能なアミノ酸、共試薬及び溶媒などの出発物質を増分することができないことに加え、これらの問題を補うためにプロセシング時間が延長されることとなる。これらの問題は、ペプチドの長さが増加する従って増加しうる。

【０００５】

従って、固相手順だけを用いて３０アミノ酸長より大きな成熟ペプチドが単一フラグメントで合成されることを見出すことは比較的珍しい。代わりに、個々のフラグメントを、固相上で別々に合成し、次いで、固相及び／又は溶液相でカップリングさせ、所望のペプチド生成物を構築することができる。このアプローチは、フラグメント候補を慎重に選択する必要がある。一部の一般原理によりフラグメントを選択することができるが、フラグメント候補の経験的な試験が必要とされることが非常に多い。ある状況では可能なフラグメント戦略が、他の場合では実施できない可能性がある。適当なフラグメント候補が明らかとなっている場合においてさえも、市販の適当な条件下で実施するための合成戦略のプロセスイノベーションが依然必要とされている。従って、ハイブリッドスキームを用いたペプチド合成は困難であり、そして、多くの場合では、実際に合成が行われるまで、合成スキームにおいてどんな問題があるか予測することは困難である。

【０００６】

溶液相カップリングでは、２つのペプチド中間フラグメント又はペプチド中間フラグメント及び反応アミノ酸が、適切な溶媒中、通常、カップリング反応の効率及び精度を促進する追加の試薬の存在下でカップリングされる。ペプチド中間フラグメントは反応するように配置され、１つのフラグメントのＮ－末端が、他のフラグメントのＣ－末端にカップリングする（又はその逆も同様）。さらに、固相合成中に存在する側鎖保護基は、溶液相カップリング中に、通常フラグメント上に保持され、フラグメントの末端の特定の反応性

が確保される。これらの側鎖保護基は、典型的には、成熟ペプチドが形成されるまで除去されない。

【０００７】

全合成スキームの１以上の工程における適度な改良が、成熟ペプチドの調製における重要な改良に相当する可能性がある。このような改良により、時間や試薬の非常に大きな節約が可能となり、そして、また、最終生成物の純度や収量を大幅に改善することができる。

【０００８】

ハイブリッド合成における改良の重要性の考察を、これらの手順を用いて生成される任意の種類のペプチドに適合させることが可能であるが、これは、治療的に有用で、商業的な医学用途スケールで製造されるペプチドに関しては、特に重要である。より大きな生体分子医薬品、例えば、治療用ペプチドなどの合成は、非常に高価となりうる。試薬コスト、合成時間、多くの合成工程、さらに他の要因のために、これらのより大きな生体分子医薬品の合成プロセスでは非常に小さな改良でも、このような医薬品を産生することが経済的にも実行可能であるか否かに有意な影響を有しうる。より大きな生体分子医薬品の生産コストが高いことからこのような改良は不可欠であるが、これは、多くの場合で、これらの種類のより大きな生体分子医薬品の適切な治療代替品が、あったとしても、わずかであるという事実により裏付けられている。

【０００９】

これは、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）及びその対応物の場合に、明らかであるように思われる。これらのペプチドは、２型非インスリン依存性糖尿病並びに肥満などの関連する代謝障害の処置のための可能な治療薬剤として関係づけられた（Gutniak, M.K., et al., Diabetes Care 1994:17:1039-44）。

【００１０】

Lopez等は、天然ＧＬＰ－１が３７アミノ酸残基長であることを決定した（Lopez, L. C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80:5485-5489 (1983)）。この決定は、Uttenthal, L. O.等の研究により確認された（J. Clin. Endocrinal. Metabol., 61:472-479 (1985)）。天然ＧＬＰ－１は、表記ＧＬＰ－１（１－３７）として示すことができる。この表記は、ペプチドが１（Ｎ－末端）～３７（Ｃ－末端）の全てのアミノ酸を有することを示す。天然ＧＬＰ－１（１－３７）は、配列番号１：

【化１】

HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

のアミノ酸配列を有する。

【００１１】

天然ＧＬＰ－１（１－３７）は、通常、インスリン生合成に介在することができないが、このペプチドの生物学的に重要なフラグメントは、インスリン分泌促進性を有することが報告された。例えば、配列番号２：

【００１２】

【化２】

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

の天然の３１アミノ酸長のペプチドＧＬＰ－１（７－３７）は、インスリン分泌促進性を示し、天然ＧＬＰ－１の７（Ｎ－末端）～３７（Ｃ－末端）位のアミノ酸を有する。ＧＬＰ－１（７－３７）は末端グリシンを有する。このグリシンが存在しない場合でも、得られるペプチドは依然インシュリン分泌活性を示し、配列番号３：

【化３】

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

のＧＬＰ－１（７－３６）と呼ばれる。

【００１３】

ＧＬＰ－１（７－３６）は、Ｃ－末端アルギニンを有するアミド化形態で存在することが多く、この形態は表記ＧＬＰ－１（７－３６）－NH_2で示すことができる。

【００１４】

配列番号１～３の天然ＧＬＰ－１（１－３７）及び天然でインシュリン分泌活性なその対応物は代謝的に不安定であり、in vivoでわずか１～２分の血漿半減期を有する。外部から投与したＧＬＰ－１も急速に分解される。この代謝的な不安定さにより、天然ＧＬＰ－１及びその天然フラグメントの治療効力が制限されてきた。

【００１５】

改良された安定性を有するＧＬＰ－１ペプチドの合成対応物が開発された。例えば、配列番号４：

【化４】

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR

のペプチドが、EP 1137667 B1に記載される。

【００１６】

このペプチドは、α－アミノイソ酪酸（略語Ａｉｂで模式的に示される）のアキラル残基が８及び３５位に、これらの位置で対応する天然アミノ酸の代わりに現れる以外は、天然ＧＬＰ－１（７－３６）と類似している。アキラルなα－アミノイソ酪酸は、また、メチルアラニンとしても知られている。このペプチドは、式（$Aib^{8,35}$）ＧＬＰ－１（７－３６）、又は、アミド化形態の（$Aib^{8,35}$）ＧＬＰ－１（７－３６）－NH_2で示すことができる。

【００１７】

EP 1137667 B1には、配列番号４のペプチド及びその対応物が、固相技術を用いて、単一フラグメントとして構築することができることが記載されている。EP 1137667 B1で示される単一フラグメントの合成アプローチには問題がある。上述するように、配列番号４のペプチドを合成するための改良された戦略は、このペプチド及びその対応物を、商業的に許容可能な収率、純度及び量で製造するために必要とされる。

【００１８】

本願は、固相及び溶液相（「ハイブリッド」）アプローチを用いて合成されるインスリン分泌促進ペプチドの調製に関する。一つの方法において、本アプローチは、固相化学を用いて、３つの異なるペプチド中間フラグメントを合成することを包含する。次に、溶液相化学を用いて、追加のアミノ酸材料をフラグメントの一つに付加させる。次に、フラグメントを、溶液相で一緒にカップリングさせる。本発明は、インスリン分泌促進ペプチド、例えば、ＧＬＰ－１、ＧＬＰ－１（７－３６）並びにこれらの天然及び非天然の対応物、特に、ＧＬＰ－１（７－３６）並びにその天然及び非天然の対応物の形成に非常に有用である。

【００１９】

特に、本願は、本明細書で後述される方法から選択される、（配列番号９）：

【化５】

$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$

[式中、

Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを調製するための方法を提供する。
【００２０】
本願は、インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号５）：
【化６】

$$Z\text{-}QAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号６）：
【化７】

$$Z\text{-}SYLEG$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｃ）（配列番号７）：
【化８】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得るために、溶液中、第一のペプチドフラグメントを第二のペプチドフラグメントにカップリングさせる工程、
ｄ）第三のペプチドフラグメントのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号７）：
【化９】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、
ｅ）（配列番号８）：

【化１０】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、及び
ｆ）溶液中、第五のペプチドフラグメントを第四のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化１１】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程を含む、製造方法を提供する。
【００２１】
本願は、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化１２】

$$Z\text{-}HX^{8}EX^{10}TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｇ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化１３】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程をさらに含む、上記方法を提供する。
【００２２】

本願は、工程ｈ）から得られる脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：

【化１４】

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR

を有する、上記方法を提供する。

【００２３】

本願は、また、インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、

ａ）（配列番号８）：

【化１５】

Z-HX^{8}EGTFTSDVS-B’

[式中、
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、

ｂ）（配列番号６）：

【化１６】

Z-SYLEG-B’

[式中、
Ｂ’は、固相樹脂であり；
Ｚは、Ｈ－であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、

ｃ）（配列番号１１）：

【化１７】

Z-HX^{8}EGTFTSDVSSYLEG-B’

[式中、
Ｂ’は、固相樹脂であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得るために、第一のペプチドフラグメントを第二のペプチドフラグメントにカップリングさせる工程、

ｄ）固相樹脂から第三のペプチドフラグメントを除去して、（配列番号１１）：

【化１８】

Z-HX^{8}EGTFTSDVSSYLEG-B’

[式中、
Ｂ’は、－ＯＨであり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]

のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、
ｅ）（配列番号５）：
【化１９】

$$Z\text{-}QAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第四のペプチドフラグメントを第五のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化２０】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程を含む、製造方法を提供する。
【００２４】
本願は、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化２１】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｇ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化２２】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程をさらに含む、上記方法を提供する。

【００２５】
本願は、脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化２３】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

を有する、上記方法を提供する。
【００２６】
本願は、また、インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号１２）：
【化２４】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKE\text{-}B'$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｂ’は、固相樹脂である]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号８）：
【化２５】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
X^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｃ）第二のペプチドフラグメントを第一のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号１３）：
【化２６】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKE\text{-}B'$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、固相樹脂であり；
X^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得る工程を含む、製造方法を提供する。
【００２７】
本願は、
ｄ）固相樹脂から第三のペプチドフラグメントを除去して、（配列番号１３）：
【化２７】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKE\text{-}B'$$

[式中、

Ｚは、Ｈ－であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、及び
ｅ）（配列番号１４）：
【化２８】

$$Z\text{-}FIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第四のペプチドフラグメントを第五のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化２９】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化３０】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｇ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化３１】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程をさらに含む、上記方法を提供する。

【００２８】
本願は、脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化３２】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

を有する、上記方法を提供する。
【００２９】
本願は、さらに、インスリン分泌促進ペプチドの製造方法であって、
ａ）（配列番号１４）：
【化３３】

$$Z\text{-}FIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第一のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｂ）（配列番号１２）：
【化３４】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKE\text{-}B'$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第二のペプチドフラグメントを準備する工程、及び
ｃ）溶液中、第一のペプチドフラグメントを第二のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号７）：
【化３５】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第三のペプチドフラグメントを得る工程を含む、製造方法を提供する。
【００３０】
本願は、
ｄ）第三のペプチドフラグメントのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号７）：
【化３６】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；

Ｘ３５は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第四のペプチドフラグメントを得る工程、
ｅ）（配列番号８）：
【化３７】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
Ｘ８は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含む第五のペプチドフラグメントを準備する工程、
ｆ）溶液中、第五のペプチドフラグメントを第四のペプチドフラグメントにカップリングさせ、（配列番号９）：
【化３８】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｎ－末端保護基であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、
ｇ）工程ｆ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドのＮ－末端保護基を除去し、（配列番号９）：
【化３９】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のアミノ酸配列を含むインスリン分泌促進ペプチドを得る工程、及び
ｈ）アミノ酸側鎖を脱保護するために、工程ｈ）から得られるインスリン分泌促進ペプチドを酸と接触させ、（配列番号９）：
【化４０】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であり；そして
Ｘ８及びＸ３５は、互いに独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基である]
のアミノ酸配列を含む脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドを得る工程をさらに含む、上記方法を提供する。
【００３１】

本願は、脱保護されたインスリン分泌促進ペプチドが、アミノ酸配列（配列番号４）：
【化４１】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

を有する、上記方法を提供する。
【００３２】
本願は、アミノ酸配列（配列番号５）：
【化４２】

$$Z\text{-}QAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチドを提供する。
【００３３】
本願は、アミノ酸配列（配列番号７）：
【化４３】

$$Z\text{-}SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
X^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチドを提供する。
【００３４】
本願は、アミノ酸配列（配列番号８）：
【化４４】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVS\text{-}B'$$

[式中、
X^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチドを提供する。
【００３５】
本願は、アミノ酸配列（配列番号１１）：
【化４５】

$$Z\text{-}HX^{8}EGTFTSDVSSYLEG\text{-}B'$$

[式中、
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂であり；
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]

のペプチドを提供する。
【００３６】
本願は、アミノ酸配列（配列番号１２）：
【化４６】

Z-SYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；そして
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂である]
のペプチドを提供する。
【００３７】
本願は、アミノ酸配列（配列番号１３）：
【化４７】

Z-HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKE-B’

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｂ’は、－ＯＨであるか、又は、固相樹脂であり；
Ｘ^{8}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチドを提供する。
【００３８】
本願は、アミノ酸配列（配列番号７）：
【化４８】

Z-SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R-NH$_2$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチドを提供する。
【００３９】
本願は、アミノ酸配列（配列番号１４）：
【化４９】

Z-FIAWLVKX^{35}R-NH$_2$

[式中、
Ｚは、Ｈ－であるか、又は、Ｎ－末端保護基であり；
Ｘ^{35}は、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基であり；そして
配列の１以上の残基は、場合により側鎖保護を含む]
のペプチドを提供する。
【００４０】
本願は、さらに、ＺがＦｍｏｃである、任意の上記ペプチドを提供する。
【００４１】
「Ｎ－末端保護基」は、Ｂｚ（ベンゾイル）、Ａｃ（アセチル）、Ｔｒｔ（トリチル）

、Ｂｏｃ（ｔ－ブチルオキシカルボニル）、ＣＢｚ（ベンジルオキシカルボニル又はＺ）、Ｄｔｓ（ジチアスクシノイル）、Ｒｄｔｃ（Ｒ＝アルキル又はアリール、ｄｔｃ＝ジチオカルバメート）、ＤＢＦｍｏｃ（２，７－ジ－ｔ－ブチルＦｍｏｃ又は１，７－ジ－ｔ－ブチルフルオレン－９－イルメトキシカルボニル）、Ａｌｌｏｃ（アリルオキシカルボニル）、ｐＮＺ（ｐ－ニトロベンジルオキシカルボニル）、Ｎｓｃ（［［２－［（４－ニトロフェニル）スルホニル］－エトキシ］カルボニル］）、Ｍｓｃ（２－メチルスルホニルエトキシカルボニル）、ＭＢｚ（４－メトキシＣＢｚ）、Ｐｏｃ（２－フェニルプロピル（２）－オキシカルボニル）、Ｂｐｏｃ［（１－［１，１’－ビフェニル］－４－イル－１－メチルエトキシ）カルボニル］、Ｂｎｐｅｏｃ［［２，２－ビス（４－ニトロフェニル）－エトキシ］カルボニル］、ＣＢｚ［（フェニルメトキシ）カルボニル］、Ａｏｃ［（１，１－ジメチルプロポキシ）カルボニル］及びＭｏｚ［［（４－メトキシフェニル）メトキシ］カルボニル］からなる群より選択される基を意味する。好ましいＮ－末端保護基は、Ｆｍｏｃ、Ｂｐｏｃ、Ｔｒｔ、Ｐｏｃ及びＢｏｃである。

【００４２】

一態様においては、上記方法のいずれかは、Ｆｍｏｃ（９－フルオレニルメトキシカルボニル）、Ｂｏｃ（ｔ－ブチルオキシカルボニル）、ＣＢｚ（ベンジルオキシカルボニル又はＺ）、Ｄｔｓ（ジチアスクシノイル）、Ｒｄｔｃ（Ｒ＝アルキル又はアリール、ｄｔｃ＝ジチオカルバメート）、ＤＢＦｍｏｃ（２，７－ジ－ｔ－ブチルＦｍｏｃ又は１，７－ジ－ｔ－ブチルフルオレン－９－イルメトキシカルボニル）、Ａｌｌｏｃ（アリルオキシカルボニル）、ｐＮＺ（ｐ－ニトロベンジルオキシカルボニル）、Ｎｓｃ（［［２－［（４－ニトロフェニル）スルホニル］エトキシ］カルボニル］）、Ｍｓｃ（２－メチルスルホニルエトキシカルボニル）、ＭＢｚ（４－メトキシＣＢｚ）、Ｂｐｏｃ［（１－［１，１’－ビフェニル］－４－イル－１－メチルエトキシ）カルボニル］、Ｂｎｐｅｏｃ［［２，２－ビス（４－ニトロフェニル）エトキシ］カルボニル］、ＣＢｚ［（フェニルメトキシ）カルボニル］、Ａｏｃ［（１，１－ジメチルプロポキシ）カルボニル］及びＭｏｚ［［（４－メトキシフェニル）メトキシ］カルボニル］からなる群より選択されるＮ－末端ヒスチジン保護基（Ｎ－末端保護基）を用いることができる。ここで、Ｎ－末端ヒスチジン保護基が、酸を使用した全体的な側鎖の脱保護工程で除去することができる場合、その前にＮ－末端ヒスチジン保護基の除去を必要としない。

【００４３】

「アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基」は、天然のアキラルなグリシン又は別のアキラルなアミノ酸から誘導することができるアミノ酸である。好ましくは、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基は、グリシン（Ｇ）、２－メチルアラニン（Ａｉｂ）及び２－フェニルメチル－フェニルアラニンからなる群より選択される。最も好ましくは、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基は、Ｇ又はＡｉｂから選択される。

【００４４】

本発明は、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）並びに天然及び非天然のインシュリン分泌活性なその対応物などのペプチドを、固相及び／又は溶液相技術を使用して製造するための合成方法に関する。本発明のペプチド分子は、保護、未保護又は部分保護されていてもよい。保護は、Ｎ－末端保護、側鎖保護及び／又はＣ－末端保護を含む。本発明が一般的に、これらのグルカゴン様ペプチド、その対応物、これらのフラグメント及びその対応物並びに融合生成物及びその対応物の合成に関するが、本明細書における発明の教示は、また、他のペプチド、特に、固相及び溶液相アプローチの組み合わせを用いて合成されるペプチドの合成に適用することができる。本発明は、また、不純物、特に、ピログルタミン酸不純物を含むペプチド中間フラグメントの合成に適用することができる。本発明の実施に有用な好ましいＧＬＰ－１分子は、天然及び非天然ＧＬＰ－１（７－３６）及びその対応物を含む。

【００４５】

本明細書で使用される、用語「アミノ酸配列を含む」は、好ましくは、「アミノ酸配列

を有する」を意味する。

【００４６】

本明細書で使用される、「対応物」は、ペプチドの天然及び非天然類似体、誘導体、融合化合物、塩などを指す。本明細書で使用される、ペプチド類似体は、一般的に、別のペプチド又はペプチド対応物と比較して、１以上のアミノ酸置換、欠失、逆位及び／又は付加などにより修飾されたアミノ酸配列を有するペプチドを指す。置換は、１以上の天然又は非天然アミノ酸が関与する。置換は、好ましくは、保存的又は高度に保存的であることができる。保存的置換は、アミノ酸と、一般的に同じ正味電荷並びに一般的に同じサイズ及び形状を有する別のアミノ酸との置換を指す。例えば、脂肪族又は置換脂肪族アミノ酸側鎖を有するアミノ酸は、その側鎖の炭素及びヘテロ原子の総数が約４個以下で異なる場合、ほぼ同じサイズである。これらは、その側鎖の分岐数が約１又は２個以下で異なる場合、ほぼ同じ形状を有する。その側鎖にフェニル又は置換フェニル基を有するアミノ酸は、ほぼ同じサイズ及び形状を有すると考えられる。下記に、アミノ酸の５つのグループを列挙する。化合物のアミノ酸を同じグループの別のアミノ酸で置換すると、一般的に、保存的置換となる。

【００４７】

グループＩ：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン及びC_1－C_4脂肪族又はC_1－C_4ヒドロキシル置換脂肪族側鎖（直鎖又は単一分岐）を有する非天然アミノ酸

【００４８】

グループＩＩ：グルタミン酸、アスパラギン酸及びカルボン酸置換C_1－C_4脂肪族側鎖（非分岐又は一分岐点）を有する非天然アミノ酸

【００４９】

グループＩＩＩ：リシン、オルニチン、アルギニン及びアミン又はグアニジノ置換C_1－C_4脂肪族側鎖（非分岐又は一分岐点）を有する非天然アミノ酸

【００５０】

グループＩＶ：グルタミン、アスパラギン及びアミド置換C_1－C_4脂肪族側鎖（非分岐又は一分岐点）を有する非天然アミノ酸

【００５１】

グループＶ：フェニルアラニン、フェニルグリシン、チロシン及びトリプトファン

【００５２】

本明細書で使用される、用語「対応物」は、より好ましくは、ペプチドの塩又はＣ－末端でアミド化されたその誘導体を指す。

【００５３】

「高度に保存的な置換」は、側鎖に同じ官能基並びにほぼ同じサイズ及び形状を有する別のアミノ酸を用いたアミノ酸の置換である。脂肪族又は置換脂肪族アミノ酸側鎖を有するアミノ酸は、その側鎖の炭素及びヘテロ原子の総数が２個以下で異なる場合、ほぼ同じサイズを有する。これらは、その側鎖の分岐数が同じである場合、ほぼ同じ形状を有する。高度に保存的な置換の例は、ロイシンに対するバリン、セリンに対するスレオニン、グルタミン酸に対するアスパラギン酸及びフェニルアラニンに対するフェニルグリシンの置換を含む。

【００５４】

「ペプチド誘導体」は、一般的に、側鎖基、α炭素原子、末端アミノ基及び／又は末端カルボキシル酸基の１以上の化学修飾を有するペプチド、ペプチド類似体又は他のペプチド対応物を指す。例として、化学修飾には、化学部分の付加、新たな結合形成及び／又は化学部分の除去が挙げられるが、これらに限定されない。アミノ酸側鎖基の修飾には、リシンｅ－アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジン又はリシンのＮ－アルキル化、グルタミン酸又はアスパラギン酸カルボン酸基のアルキル化及びグルタミン又はアスパラギンの脱アミド化が挙げられるが、これらに限定されない。末端アミノ基の修飾には、デスアミノ、Ｎ－低級アルキル、Ｎ－ジ－低級アルキル及びＮ－アシル（例えば、－ＣＯ－低

級アルキル）の修飾が挙げられるが、これらに限定されない。末端カルボキシ基の修飾には、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド及び低級アルキルエステルの修飾が挙げられるが、これらに限定されない。このように、部分的に又は全体的に保護されたペプチドがペプチド誘導体を構成する。

【００５５】

本発明の実施において、化合物がホルモンインシュリンの合成又は発現を刺激する、あるいは、刺激を起こす、あるいは、刺激を起こすように作用することができる場合、その化合物は「インシュリン分泌」活性を有する。好ましい実施方法において、インシュリン分泌活性は、米国特許第6,887,849号及び6,703,365号に記載されるアッセイに従って実証することができる。

【００５６】

好ましい実施態様においては、本発明は、下記式（配列番号９）：

【化５０】

$$HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、８及び３５位の記号Ｘのそれぞれは、独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基を示す]

を有する合成（Ｘ^{8}，Ｘ^{35}）ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド及びその対応物を合成するための方法を提供する。Ｘ^{8}及び／又はＸ^{35}残基のいずれかが、場合により側鎖保護基を含んでもよい。この式に記載のペプチドは、少なくともアキラルな、場合により立体障害のＸ^{8}及びＸ^{35}残基が、８及び３５位において、天然アミノ酸残基と置換されている点で天然ＧＬＰ－１（７－３６）とは異なる。アキラルなＸ^{8}及びＸ^{35}アミノ酸の使用は、得られるペプチドの安定化を助けるだけでなく、さらに、構成要素のリンカーとしてこれらのアミノ酸を使用することにより、スキーム１に示され、以下でさらに記載される本発明の合成経路を促進することが発見された。

【００５７】

本発明の原理に従って合成することができる（Ｘ^{8}，Ｘ^{35}）ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの特に好ましい実施態様は、式（配列番号４）：

【化５１】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

のペプチド及びその対応物（好ましくは、（示されるように）Ｃ－末端でアミド化されている）を含む。このペプチドは、α－アミノイソ酪酸（略語Ａｉｂで模式的に示される）のアキラル残基をＸ^{8}及びＸ^{35}の両方として使用し、好ましくは、Ｃ－末端にアミドを有し、１０位に天然Ｇの残基を使用し、そして、式（Ａｉｂ^{8,35}）ＧＬＰ－１（７－３６）－ＮＨ$_2$として示すことができる。この表記は、アミノ酸「Ａｉｂ」に相当するアミノ酸残基が、天然アラニンの代わりに８及び３５位に現れることを示す。アキラルなα－アミノイソ酪酸は、また、メチルアラニンとしても知られている。配列番号４のペプチドは、EP 1137667 B1に記載される。８及び３５位にＡｉｂ残基が存在すると、体内の代謝による分解がゆっくりとなり、このペプチドが天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドより体内でさらに安定となる。

【００５８】

本発明は、（Ａｉｂ^{8,35}）ＧＬＰ－１（７－３６）－ＮＨ$_2$などのＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドを製造するための改良された方法を提供する。例えば、スキーム１及びスキーム２は、ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド及びその対応物を合成する例示的スキームを示す。スキーム１及びスキーム２は、ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドのスケールアップ合成に特に適していると考えられる。スケールアップ手順は、典型的には、商業的流通に有用なペプチド量を提供するために実施される。例えば、スケールアップ手順のペプ

チド量は、バッチあたり５００ｇ又は１ｋｇ、さらに典型的には、バッチあたり数十ｋｇ～数百ｋｇ又はそれ以上であることができる。好ましい実施態様においては、本発明の方法は、プロセシング（合成）時間の減少、生成物の収量の改善、生成物純度の改善及び／又は必要な試薬及び出発物質の量の削減などの改良を提供することができる。

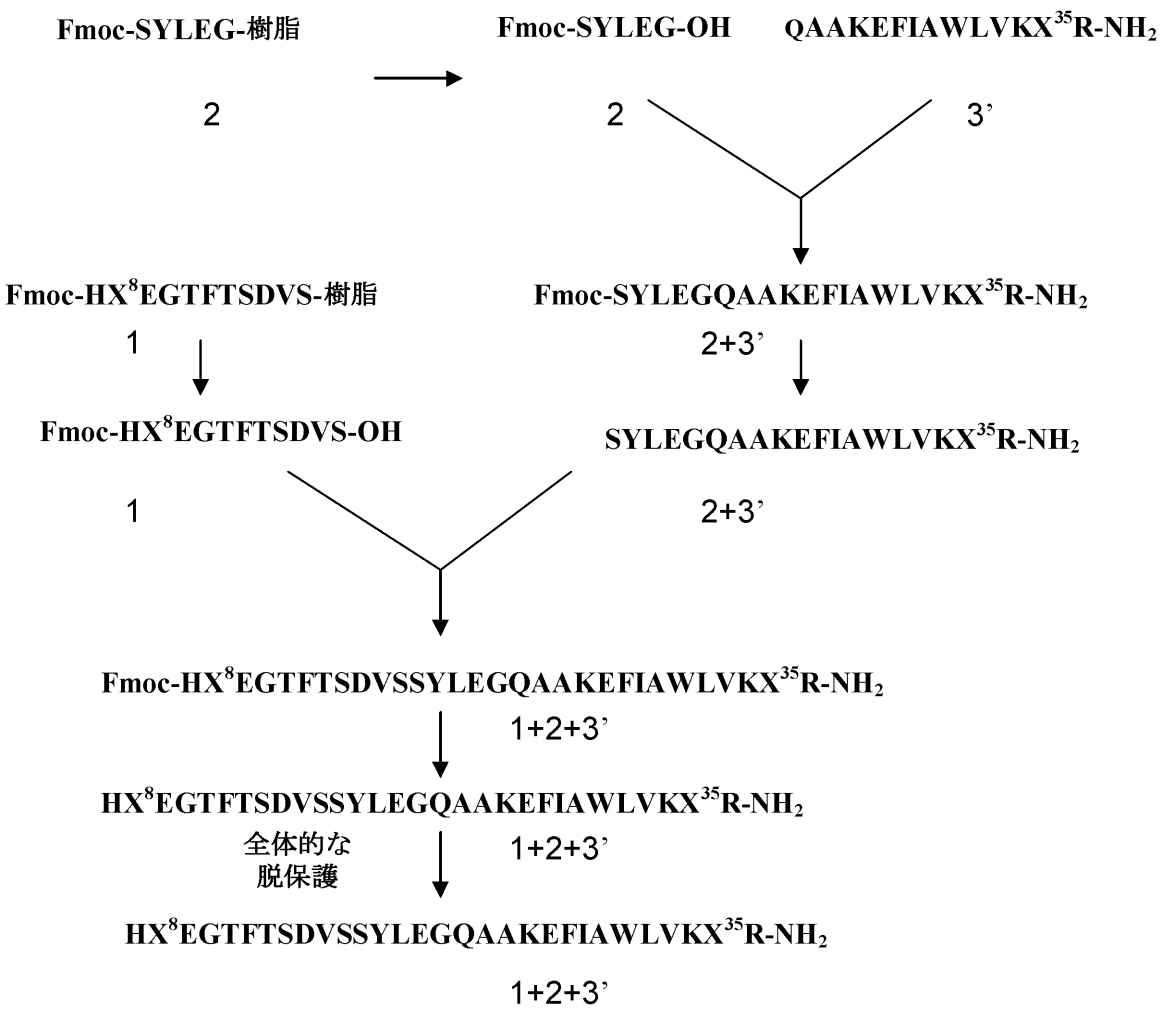
【００５９】

スキーム１に示される合成では、固相及び溶液相技術の組み合わせを用いて、ペプチド生成物を調製する。

【００６０】

【化５２】

スキーム１



【００６１】

示されるように、スキーム１は、ペプチド中間フラグメント１、２及び３を固相で合成することを包含する。フラグメント１は、配列番号８：

【化５３】

$HX^8EGTFTSDVS$

[式中、X^8は、上記で定義されるとおりである]

のアミノ酸残基を含むペプチドフラグメント又はX^8残基を含むその対応物である。１以上のアミノ酸残基は、従来の実施に従って側鎖保護基を含むことができる。一部の実施態様においては、ペプチドフラグメント１は、Ｃ－末端を介して結合した樹脂であることができる。このフラグメントは、場合により、Ｎ－末端及び／又はＣ－末端保護基を有する

ことができる。Ｆｍｏｃは、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、特に有用なＮ－末端ヒスチジン保護基であることが見出された。Ｔｒｔ（トリチル）も、また、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、特に有用なＮ－末端ヒスチジン保護基であることが見出された。Ｂｏｃ、ＣＢｚ、ＤＴＳ、Ｒｄｔｃ（Ｒ＝アルキル又はアリール）、ＤＢＦｍｏｃ（２，７－ジ－ｔ－ブチルＦｍｏｃ）、Ａｌｌｏｃ、ｐＮＺ（ｐ－ニトロベンジルエステル）、Ｎｓｃ（［［２－［（４－ニトロフェニル）スルホニル］エトキシ］カルボニル］－）、Ｍｓｃ（２－メチルスルホニルエトキシカルボニル）及びＭＢｚ（４－メトキシＣＢｚ）もまた、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、特に有用なＮ－末端ヒスチジン保護基である。［（１－［１，１’－ビフェニル］－４－イル－１－メチルエトキシ）カルボニル］、［［２，２－ビス（４－ニトロフェニル）エトキシ］カルボニル］、［（フェニルメトキシ）カルボニル］、［（１，１－ジメチルプロポキシ）カルボニル］及び［［（４－メトキシフェニル）メトキシ］カルボニル］は、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、特に有用なＮ－末端ヒスチジン保護基である。

【００６２】

フラグメント１は、天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの７～１７位におけるアミノ酸に対応する１１アミノ酸残基を含み、そのため、表記（Ｘ^{8}）ＧＬＰ－１（７－１７）で示すことができる。好ましい実施態様においては、Ｘ^{8}は、Ａｉｂであるか、又は、１０位にＡｉｂ残基を含むその対応物である。配列番号８のペプチドフラグメントは、天然ＧＬＰ－１（７－３６）の８位の天然アラニンにおけるＡｉｂの置換を示すように、表記（Ａｉｂ^{8}）ＧＬＰ－１（７－１７）で示すことができる。

【００６３】

固相合成は、一般的に、フラグメント１のＣ－末端からＮ－末端の方向で行われる。従って、フラグメントのＣ－末端部分に存在するＳ^{17}アミノ酸は、固相樹脂支持体にカップリングされる第一のアミノ酸残基である。固相合成は、次に、所望の配列に対応するように、アミノ酸残基を連続して付加させることにより進行する。ペプチド中間フラグメントの合成は、Ｎ－末端残基の後で終了するが、これは、例えば、Ｎ－末端ヒスチジン残基（Ｈ）が新生ペプチド鎖に付加されている。

【００６４】

フラグメント２は、配列番号６：

【化５４】

SYLEG

のアミノ酸残基を含むペプチドフラグメントである。

【００６５】

フラグメント２は、一般的に、天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの１８～２２位におけるアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を含む。

【００６６】

フラグメント２の１以上のアミノ酸残基は、従来の実施に従って側鎖保護基を含むことができる。一部の実施態様においては、ペプチドフラグメント２は、Ｃ－末端を介して結合した樹脂であることができる。このフラグメントは、場合により、Ｎ－末端及び／又はＣ－末端保護基を有することができる。Ｆｍｏｃは、ペプチドフラグメントの固相合成に関して、特に有用なＮ－末端保護基であることが見出された。配列番号６のペプチドフラグメントは、表記ＧＬＰ－１（１８－２２）と呼ぶことができる。

【００６７】

固相合成は、一般的に、フラグメント１のＣ－末端からＮ－末端の方向で行われる。従って、フラグメントのＣ－末端部分に存在するＧアミノ酸は、固相樹脂支持体にカップリングされる第一のアミノ酸残基である。固相合成は、次に、所望の配列に対応するように

、アミノ酸残基を連続して付加させることにより進行する。ペプチド中間フラグメントの合成は、Ｎ－末端残基の後で終了するが、これは、例えば、Ｎ－末端セリン残基（Ｓ）が新生ペプチド鎖に付加されている。

【００６８】

フラグメント３’は、配列番号５：

【化５５】

$$QAAKEFIAWLVKX^{35}R$$

[式中、X^{35}は、上記で定義されるとおりである]

のアミノ酸残基を含むペプチドフラグメント若しくはその対応物であるか、又は、X^{35}残基を含むその対応物である。１以上のアミノ酸残基は、従来の実施に従って側鎖保護基を含有することができる。フラグメント３’は、天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの２３～３６位におけるアミノ酸に対応するアミノ酸残基を含む（X^{35}が３５位の天然アミノ酸の代わりにその位置にあることを除く）。フラグメント３’は、表記（X^{35}）ＧＬＰ－１（２３－３６）で示すことができる。

【００６９】

フラグメント３’は、フラグメント３（配列番号１０）：

【化５６】

$$QAAKEFIAWLVKX^{35}$$

から調製されるのが好都合である。

【００７０】

フラグメント３は、固相合成により、標準的なカップリングプロトコールを用いて、Ｆｍｏｃ－Ａｉｂ^{35}－Ｏ－２ＣＴから調製される。リシン及びトリプトファン側鎖は、Ｂｏｃで保護した。グルタミン酸側鎖はtert－Ｂｕエステルで保護し、グルタミン側鎖はトリチル基で保護した。フラグメント３を樹脂から切断し、Ｈ－Ａｒｇ（２ＨＣｌ）－NH_2とカップリングさせた。フラグメント３は、天然ＧＬＰ－１（７－３６）の２３～３５位におけるアミノ酸に対応するアミノ酸残基を含む（X^{35}がＡｉｂであることを除く）。

【００７１】

一部の実施態様においては、ペプチドフラグメント３は、Ｃ－末端を介して結合した樹脂であることができる。このフラグメントは、場合により、側鎖、Ｎ－末端及び／又はＣ－末端保護基を有していてもよい。Ｆｍｏｃは、ペプチドフラグメントの固相合成に関して、特に有用なＮ－末端保護基であることが見出された。好ましい実施態様においては、X^{35}はＡｉｂであるか、又は、３５位にＡｉｂを含むその対応物であり、天然ＧＬＰ－１（７－３６）の３５位の天然アミノ酸におけるＡｉｂの置換を示すように、表記（Ａｉｂ^{35}）ＧＬＰ－１（２３－３５）で示すことができる。

【００７２】

X^{35}－添加支持体樹脂の近位の大きな立体障害のために、リシン（３４）及びバリン（３３）のペプチド鎖へのカップリングが問題となる可能性がある。過剰のアミノ酸を用いた場合でさえ、これらのカップリング反応を完了させることは困難である。溶媒の選択及び／又はエンドキャッピングにより、この問題を解消できる可能性がある。カップリング溶媒の性質が、カップリングの完了度合いに影響を与える可能性があることが見出された。一組の実験において、例えば、カップリング反応を、３：１のＮＭＰ／ＤＣＭ、１：１のＮＭＰ／ＤＣＭ、１：１のＤＭＦ／ＤＣＭ及び３：１のＤＭＦ／ＤＣＭで行った。これらの溶媒の組み合わせの比率は、容積ベースである。ＮＭＰは、Ｎ－メチルピロリドンを指し、ＤＣＭはジクロロメタンを指し、そして、ＤＭＦはジメチルホルムアミドを指す。１：１のＤＭＦ／ＤＣＭを使用した場合に、カップリング反応がさらに進行し完了した

ことが見出された。

【００７３】

また、各リシン及びバリンカップリングの後にエンドキャッピングを用いて、未反応の樹脂－支持体材料のさらなるカップリング反応の進行を防ぐことができる。エンドキャッピングされた材料は、所望であれば、精製過程においてさらに容易に除去される。従来のエンドキャッピング技術を使用することができる。

【００７４】

引き続きスキーム１を参照して、フラグメント１、２、及び３’を構築し、所望のペプチドを完成させる。

【００７５】

スキーム１は、フラグメント２をフラグメント３’に付加して、配列番号７：

【化５７】

$$SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、X^{35}は、上記で定義されるとおりであり、好ましくは、上記で定義されるＡｉｂである]

のアミノ酸残基を含むより大きな中間フラグメントを生成することを示す。中間フラグメントは、表記（X^{35}）ＧＬＰ－１（１８－３６）で示すことができる。アミノ酸が側鎖保護を有する限り、この保護は、望ましくは、この工程を通して維持される。

【００７６】

スキーム１は、次に、フラグメント１が、溶液中、この中間フラグメントに付加され、所望のペプチド（配列番号９）：

【化５８】

$$HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

を生成することをさらに示す。

【００７７】

また好ましい実施態様においては、本発明は、下記式（配列番号９）：

【化５９】

$$HX^{8}EX^{10}TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、８及び３５位の記号Ｘのそれぞれは、独立して、アキラルな、場合により立体障害のアミノ酸残基を示す]

を有する合成（X^{8}，X^{35}）ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド及びその対応物を合成するための方法を提供する。X^{8}及び／又はX^{35}残基のいずれかが、場合により側鎖保護基を含んでもよい。この式のペプチドは、少なくともアキラルな、場合により立体障害のX^{8}及びX^{35}残基が、８及び３５位において、天然アミノ酸残基と置換されている点で天然ＧＬＰ－１（７－３６）とは異なる。ここで、アキラルなX^{8}及びX^{35}アミノ酸の使用は、得られるペプチドの安定化を助けるだけでなく、さらに、構成要素としてこれらのアミノ酸を使用することにより、スキーム１に示され、以下でさらに記載される本発明の合成経路を促進することが発見された。

【００７８】

本発明の原理に従って合成することができる（X^{8}，X^{35}）ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの特に好ましい実施態様は、式（配列番号４）：

【化６０】

$$HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR\text{-}NH_2$$

のペプチド及びその対応物を含む（好ましくは、（示されるように）Ｃ－末端でアミド化されている）。このペプチドは、α－アミノイソ酪酸（略語Ａｉｂで模式的に示される）のアキラル残基をＸ^{8}及びＸ^{35}の両方として使用し、好ましくは、Ｃ－末端にアミドを有し、そして、式（Ａｉｂ^{8,35}）ＧＬＰ－１（７－３６）－ＮＨ$_{2}$として示すことができる。この表記は、アミノ酸「Ａｉｂ」に相当するアミノ酸残基が、天然アラニンの代わりに８及び３５位に現れることを示す。アキラルなα－アミノイソ酪酸は、また、メチルアラニンとしても知られている。配列番号４のペプチドは、EP 1137667 B1に記載される。８及び３５位にＡｉｂ残基が存在すると、体内の代謝による分解がゆっくりとなり、このペプチドが天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドより体内でさらに安定となる。

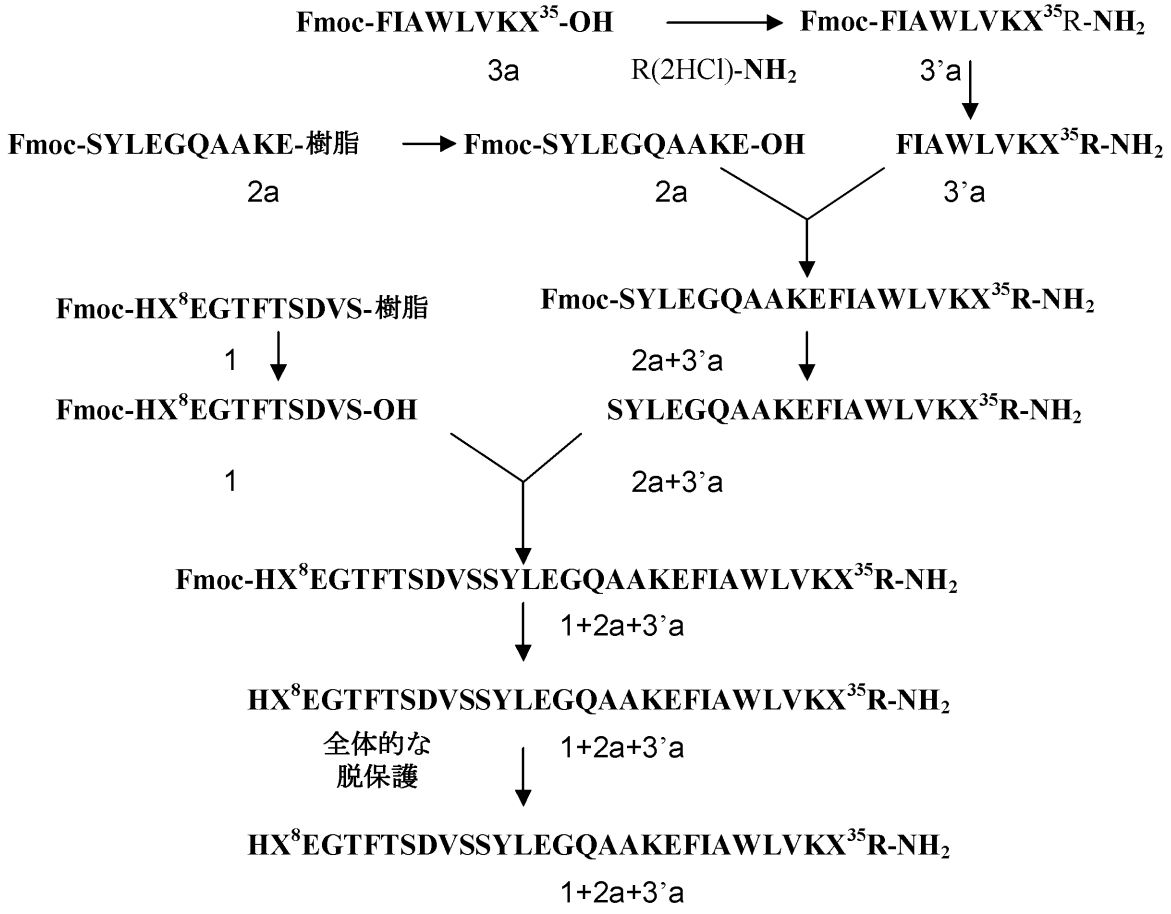
【００７９】

スキーム２で示される合成では、固相及び溶液相技術の組み合わせを用いてペプチド生成物を調製する。

【００８０】

【化６１】

スキーム２



【００８１】

示されるように、スキーム２は、ペプチド中間フラグメント１及び２を固相で合成することを包含する。フラグメント１は、配列番号８：

【化６２】

$HX^{8}EGTFTSDVS$

[式中、X^8は、上記で定義されるとおりである]
のアミノ酸残基を含むペプチドフラグメント又はX^8残基を含むその対応物である。１以上のアミノ酸残基は、従来の実施に従って側鎖保護基を含むことができる。一部の実施態様においては、ペプチドフラグメント１は、Ｃ－末端を介して結合した樹脂であることができる。このフラグメントは、場合により、Ｎ－末端及び／又はＣ－末端保護基を有することができる。Ｆｍｏｃは、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、有用なＮ－末端ヒスチジン保護基である。Ｔｒｔ（トリチル）は、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、有用なＮ－末端ヒスチジン保護基である。Ｂｏｃ（ｔ－ブチルオキシカルボニル）、ＣＢｚ（ベンジルオキシカルボニル又はＺ）、Ｄｔｓ（ジチアスクシノイル）、Ｒｄｔｃ（Ｒ＝アルキル又はアリール、ｄｔｃ＝ジチオカルバメート）、ＤＢＦｍｏｃ（２，７－ジ－ｔ－ブチルＦｍｏｃ又は１，７－ジ－ｔ－ブチルフルオレン－９－イルメトキシカルボニル）、Ａｌｌｏｃ（アリルオキシカルボニル）、ｐＮＺ（ｐ－ニトロベンジルオキシカルボニル）、Ｎｓｃ（［［２－［（４－ニトロフェニル）スルホニル］エトキシ］カルボニル］）、Ｍｓｃ（２－メチルスルホニルエトキシカルボニル）及びＭＢｚ（４－メトキシＣＢｚ）もまた、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、有用なＮ－末端ヒスチジン保護基である。Ｂｐｏｃ［（１－［１，１’－ビフェニル］－４－イル－１－メチルエトキシ）カルボニル］、Ｂｎｐｅｏｃ［［２，２－ビス（４－ニトロフェニル）エトキシ］カルボニル］、ＣＢｚ［（フェニルメトキシ）カルボニル］、Ａｏｃ［（１，１－ジメチルプロポキシ）カルボニル］及びＭｏｚ［［（４－メトキシフェニル）メトキシ］カルボニル］は、ペプチドフラグメントの固相合成及び溶液相又は固相カップリングに関して、有用なＮ－末端ヒスチジン保護基である。
【００８２】
フラグメント２ａは、天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの１８～２７位におけるアミノ酸に対応する１０アミノ酸残基を含み、そのため、表記ＧＬＰ－１（１８－２７）で示すことができ、そして、配列番号１２：
【化６３】

SYLEGQAAKE

のフラグメントである。
【００８３】
固相合成は、一般的に、フラグメント２ａのＣ－末端からＮ－末端の方向で行われる。従って、フラグメントのＣ－末端部分に存在するE^{27}アミノ酸は、固相樹脂支持体にカップリングされる第一のアミノ酸残基である。固相合成は、次に、所望の配列に対応するように、アミノ酸残基を連続して付加させることにより進行する。ペプチド中間フラグメントの合成は、Ｎ－末端残基の後で終了するが、これは、例えば、Ｎ－末端セリン残基（Ｓ）が新生ペプチド鎖に付加されている。
【００８４】
フラグメント３’ａは、配列番号１４：
【化６４】

FIAWLVKX^{35}R

[式中、X^{35}は上記で定義されるとおりである]
のアミノ酸残基を含むペプチドフラグメント若しくはその対応物であるか、又はX^{35}残基を含むその対応物である。１以上のアミノ酸残基は、従来の実施に従って側鎖保護基を含むことができる。フラグメント３’ａは、天然ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチドの２８～３６位におけるアミノ酸に対応するアミノ酸残基を含む（X^{35}が３５位の天然アミノ酸の代わりにその位置にあることを除く）。フラグメント３’は、表記（X^{35}）ＧＬＰ

－１（２３－３６）で示すことができる。フラグメント３’は、フラグメント３ａ（配列番号１５）：

【化６５】

$$FIAWLVKX^{35}$$

から調製されるのが好都合である。

【００８５】

フラグメント３ａは、固相合成により、標準的なカップリングプロトコールを用いて、Ｆｍｏｃ－Ａｉｂ^{35}－Ｏ－２ＣＴから調製される。リシン及びトリプトファン側鎖は、Ｂｏｃで保護した。グルタミン酸側鎖はtert－Ｂｕエステルで保護し、グルタミン側鎖はトリチル基で保護した。フラグメント３ａを樹脂から切断し、Ｈ－Ａｒｇ（２ＨＣｌ）－NH_2とカップリングさせた。フラグメント３ａは、天然ＧＬＰ－１（７－３６）の２８～３５位におけるアミノ酸に対応するアミノ酸残基を含む（Ｘ^{35}がＡｉｂであることを除く）。

【００８６】

一部の実施態様においては、ペプチドフラグメント３ａは、Ｃ－末端を介して結合した樹脂であることができる。このフラグメントは、場合により、側鎖、Ｎ－末端及び／又はＣ－末端保護基を有していてもよい。Ｆｍｏｃは、ペプチドフラグメントの固相合成に関して、特に有用なＮ－末端保護基であることが見出された。好ましい実施態様においては、Ｘ^{35}はＡｉｂであるか、又は、３５位にＡｉｂを含むその対応物であり、天然ＧＬＰ－１（７－３５）の３５位の天然アミノ酸におけるＡｉｂの置換を示すように、表記（Ａｉｂ^{35}）ＧＬＰ－１（２８－３５）で示すことができる。

【００８７】

Ｘ^{35}－添加支持体樹脂の近位の大きな立体障害のために、リシン（３４）及びバリン（３３）の伸長ペプチド鎖へのカップリングが問題となる可能性がある。過剰のアミノ酸を用いた場合でさえ、これらのカップリング反応を完了させることは困難である。溶媒の選択及び／又はエンドキャッピングにより、この問題を解消できる可能性がある。カップリング溶媒の性質が、カップリングの完了度合いに影響を与える可能性があることが見出された。一組の実験において、例えば、カップリング反応を、３：１のＮＭＰ／ＤＣＭ、１：１のＮＭＰ／ＤＣＭ、１：１のＤＭＦ／ＤＣＭ及び３：１のＤＭＦ／ＤＣＭで行った。これらの溶媒の組み合わせの比率は、容積ベースである。ＮＭＰは、Ｎ－メチルピロリドンを指し、ＤＣＭはジクロロメタンを指し、そして、ＤＭＦはジメチルホルムアミドを指す。１：１のＤＭＦ／ＤＣＭを使用した場合に、カップリング反応がさらに進行し完了したことが見出された。

【００８８】

また、各リシン及びバリンカップリングの後にエンドキャッピングを用いて、未反応の樹脂－支持体材料のさらなるカップリング反応の進行を防ぐことができる。エンドキャッピングされた材料は、所望であれば、精製過程においてさらに容易に除去される。従来のエンドキャッピング技術を使用することができる。

【００８９】

引き続きスキーム２を参照して、フラグメント１、２ａ及び３’ａを構築し、所望のペプチドを完成させる。

【００９０】

フラグメント２ａ及び３’ａは、溶液中、最初にカップリングされ、フラグメント２ａ＋３’ａを形成し、それは、表記（Ｘ^{35}）ＧＬＰ－１（１８－３６）で示すことができる配列番号７：

【化６６】

$$SYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

である。フラグメント２ａ＋３’ａは、次に、溶液相でフラグメント１とカップリングする。他のアミノ酸が側鎖保護を有する限り、この保護は、望ましくはこの工程を通して維持される。配列番号９：

【００９１】

【化６７】

$$HX^{8}EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX^{35}R\text{-}NH_2$$

[式中、好ましい実施態様においては、Ｘ^{8}及びＸ^{35}は、上記で定義されるＡｉｂである]

のフラグメント１＋２ａ＋３’ａを含む所望のペプチドが、次に形成される。

【００９２】

スキーム１及び２の反応スキームの実施において、固相及び溶液相合成は、当工業分野で公知の標準的な方法により行うことができる。代表的な実施方法では、ペプチドは、アミノ酸がＣ－末端からＮ－末端に付加される化学を用いて、固相で合成される。従って、特定のフラグメントのＣ－末端に隣接するアミノ酸又はペプチド基が、最初に樹脂に付加される。これは、アミノ酸又はペプチド基のＣ－末端官能基を樹脂支持体上の相補的な官能基と反応させることにより生じる。アミノ酸又はペプチド基のＮ－末端側を、マスキングすることで望まない副反応を防ぐ。アミノ酸又はペプチド基は、また、側鎖保護を含むことが望ましい。次に、連続するアミノ酸又はペプチド基を、対象のペプチドが形成されるまで支持体結合ペプチド材料に結合させる。これらの多くは、また、従来の実施に従って側鎖保護を含む。各々の連続カップリングを用いて、樹脂結合ペプチド材料のＮ－末端のマスキング基が除去される。その後、これを、Ｎ－末端がマスキングされた次のアミノ酸又はペプチド基のＣ－末端と反応させる。従って、固相合成の生成物は、樹脂支持体に結合したペプチドである。

【００９３】

固相ペプチド合成の実施に適切な任意の種類の支持体を使用することができる。好ましい実施態様においては、支持体は、１以上のポリマー、コポリマー又はポリアミド、ポリスルファミド、置換ポリエチレン、ポリエチレングリコール、フェノール樹脂、ポリサッカライド若しくはポリスチレンなどのポリマーの組み合わせからなる樹脂を含む。ポリマー支持体は、また、ペプチド合成で使用される溶媒に十分に不溶であり、且つ、不活性な任意の固体であってもよい。固体支持体は、典型的には、合成中に伸長ペプチドをカップリングさせ、そして、所望の条件下で切断して、ペプチドを支持体から遊離させることができる連結部分を含む。適切な固体支持体は、光切断可能、ＴＦＡ切断可能、ＨＦ切断可能、フッ化物イオン切断可能、還元切断可能；Ｐｄ（Ｏ）切断可能；求核切断可能；又はラジカル切断可能なリンカーを有することができる。好ましい連結部分は、切断されるペプチドの側鎖基が、依然実質的に全体的に保護されるような条件下で切断可能である。

【００９４】

一つの好ましい合成方法においては、ペプチド中間フラグメントを、トリチル基を含む酸感受性固体支持体上で、より好ましくは、張り出した塩素基を有するトリチル基を含む樹脂、例えば、２－クロロトリチルクロリド（２－ＣＴＣ）樹脂上で合成した（Barlos et al. (1989) Tetrahedron Letters 30(30):3943-3946）。例として、また、トリチルクロリド樹脂、４－メチルトリチルクロリド樹脂、４－メトキシトリチルクロリド樹脂が挙げられる。一部の好ましい固体支持体には、ジビニルベンゼンとコポリマー化させ、反応性基が固定された支持材料を形成することができるポリスチレンが挙げられる。

【００９５】

固相合成で使用される他の樹脂には、４－ヒドロキシメチルフェニルオキシメチルアンカー基を有するスチレンとジビニルベンゼンのコポリマーを含む「Ｗａｎｇ」樹脂（Wang, S.S. 1973, J. Am. Chem. Soc.）及び４－ヒドロキシメチル－３－メトキシフェノキシ酪酸樹脂（Richter et al. (1994), Tetrahedron Letters 35(27):4705-4706）が挙げられる。Ｗａｎｇ、２－クロロトリチルクロリド及び４－ヒドロキシメチル－３－メトキシフェノキシ酪酸樹脂は、例えば、Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, Californiaから購入することができる。

【００９６】

固相合成のための樹脂を調製するために、樹脂を適切な溶媒で予め洗浄することができる。例えば、２－ＣＴＣ樹脂などの固相樹脂をペプチドチャンバーに添加し、適切な溶媒で予め洗浄する。予め洗浄するための溶媒は、カップリング反応で使用される溶媒（又は溶媒の混合物）の種類に基づいて選択することができるが、その逆も可能である。洗浄、さらに、その後のカップリング反応にも適切な溶媒には、ジクロロメタン（ＤＣＭ）、ジクロロエタン（ＤＣＥ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）など、及びこれらの試薬の混合物が挙げられる。他の有用な溶媒には、ＤＭＳＯ、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、Ｎ－メチルピロリドン及びその混合物が挙げられる。一部の場合においては、カップリングを、二成分溶媒系、例えば、ＤＭＦとＤＣＭの混合物（９：１～１：９、より一般的には、４：１～１：４の容積比で）で行うことができる。

【００９７】

本発明の合成は、好ましくは、特に記載しない限り適切な保護基の存在下で行われる。保護基の性質及び使用は、当技術分野で公知である。一般的に、適切な保護基は、それが結合している原子又は部分、例えば、酸素又は窒素が、プロセシング及び合成過程において望まない反応に関与することを防ぐように作用する任意の種類の基である。保護基には、側鎖保護基及びアミノ又はＮ－末端保護基が挙げられる。保護基は、また、カルボン酸、チオールなどの反応又は結合を防ぐことができる。

【００９８】

側鎖保護基は、側鎖の一部を、ペプチド合成、プロセシングなどの工程で使用される化学物質との反応から保護するように作用する、アミノ酸の側鎖（即ち、アミノ酸一般式：$H_2N-C(R)(H)-COOH$のＲ基）に結合した化学部分を指す。側鎖保護基の選択は、様々な要素、例えば、実施される合成の種類、ペプチドが受けるプロセシング及び所望の中間生成物又は最終生成物に依存する。側鎖保護基の性質は、また、アミノ酸自体の性質にも依存する。一般的に、固相合成過程のα－アミノ基の脱保護中に除去されない側鎖保護基が選択される。従って、α－アミノ保護基及び側鎖保護基は、典型的には同じではない。

【００９９】

一部の場合においては、そして、固相合成及び他のペプチドプロセシングで使用される試薬の種類によっては、アミノ酸に側鎖保護基が存在してなくてもよい。このようなアミノ酸は、典型的には、反応性の酸素、窒素又は他の反応性部分を側鎖に含まない。

【０１００】

側鎖保護基の例には、アセチル（Ａｃ）、ベンゾイル（Ｂｚ）、tert－ブチル、トリフェニルメチル（トリチル）、テトラヒドロピラニル、ベンジルエーテル（Ｂｚｌ）及び２，６－ジクロロベンジル（ＤＣＢ）、ｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）、ニトロ、ｐ－トルエンスルホニル（Ｔｏｓ）、アダマンチルオキシカルボニル、キサンチル（Ｘａｎ）、ベンジル、２，６－ジクロロベンジル、メチル、エチル及びｔ－ブチルエステル、ベンジルオキシカルボニル（ｃＢｚ又はＺ）、２－クロロベンジルオキシカルボニル（２－Ｃｌ－Ｚ）、ｔ－アミルオキシカルボニル（Ａｏｃ）、並びに、芳香族又は脂肪族ウレタン型保護基、ニトロ－ベラトリルオキシカルボニル（ＮＶＯＣ）などの光解離性基；２－トリメチルシリルエトキシカルボニル（ＴＥＯＣ）などのフッ化物感受性基が挙げられる。

【０１０１】

本発明の実施において、ＧＬＰ－１ペプチドを合成するために通常使用されるアミノ酸のための好ましい側鎖保護基を、以下の表Ａに示す：

【０１０２】

【表１】

表Ａ

アミノ酸	側鎖保護基
Aib	なし
Ala	なし
Arg	なし
Asp	t-ブチルエステル (OtBu)
Gln	トリチル (trt)
Glu	OtBu
Gly	なし
His	トリチル (trt)
Ile	なし
Leu	なし
Lys	t-ブチルオキシカルボニル (Boc)
Phe	なし
Ser	t-ブチル (tBu)
Thr	tBu
Trp	Boc
Tyr	tBu
Val	なし

【０１０３】

アミノ末端保護基は、アミノ酸のαアミノ基に結合した化学部分を含む。典型的には、アミノ末端保護基は、ペプチド鎖を伸長するために付加される次のアミノ酸の付加の前に脱保護反応で除去されるが、ペプチドが支持体から切断される時に、維持させることができる。アミノ末端保護基の選択は、様々な要素、例えば、実施される合成の種類及び所望の中間生成物又は最終生成物に依存する。

【０１０４】

アミノ末端保護基の例には、（１）アシル型保護基、例えば、ホルミル、アクリリル（Ａｃｒ）、ベンゾイル（Ｂｚ）及びアセチル（Ａｃ）；（２）芳香族ウレタン型保護基、例えば、ベンジルオキシカルボニル（Ｚ）及び置換Ｚ、例えば、ｐ－クロロ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、ｐ－ブロモ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；（３）脂肪族ウレタン保護基、例えば、ｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）、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、アリルオキシカルボニル；（４）シクロアルキルウレタン型保護基、例えば、９－フルオレニル－メチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）、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及びシクロヘキシルオキシカルボニル；並びに（５）チオウレタン型保護基、例えば、フェニルチオカルボニルが挙げられる。好ましい保護基には、９－フルオレニル－メチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）、２－（４－ビフェニリル）－プロピル（２）オキシカルボニル（Ｂｐｏｃ）、２－フェニルプロピル（２）－オキシカルボニル（Ｐｏｃ）及びｔ－ブチルオキシカ

ルボニル（Ｂｏｃ）が挙げられる。

【０１０５】

Ｆｍｏｃ又はＦｍｏｃ様化学は、固相ペプチド合成に非常に好ましく用いられる。その理由としては、得られる保護状態のペプチドが、弱酸性の切断試薬を使用して比較的容易に切断されるからである。この種類の切断反応は、得られる副生成物、不純物などが比較的少なく、技術的にも経済的にも、膨張及び収縮洗浄の両方からペプチドを大規模ベースで回収することが可能となり、収率が向上する。ペプチド合成に関して本明細書で使用される「大規模」は、一般的に、バッチあたり少なくとも５００ｇ、より好ましくは、少なくとも２ｋｇの範囲でのペプチドの合成を含む。大規模合成は、典型的には、試薬、例えば、樹脂、溶媒、アミノ酸、カップリング及び脱保護反応用の化学物質の量に対応することができように、そして、キログラム～メートルトン範囲でペプチド製造を可能とするサイズである、スチール反応容器などの大きな反応容器で行われる。

【０１０６】

さらに、Ｆｍｏｃ保護基は、側鎖保護基に比べ、ペプチドから選択的に切断することができるため、Ｆｍｏｃが切断される時に側鎖保護がそのまま残る。この種類の選択性は、側鎖反応を最小限にするために、アミノ酸カップリング過程において重要である。さらに、側鎖保護基を選択的に切断し、Ｆｍｏｃに対し側鎖保護基を除去することで、Ｆｍｏｃをそのまま残すことができる。この後者の選択性は、さらに後述される精製スキーム過程に極めて有利に働く。

【０１０７】

固相カップリング反応は、カップリング反応を増強又は向上する１以上の化合物の存在下で行うことができる。反応速度を増加し、副反応速度を減少することができる化合物には、第三級塩基、例えば、ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）及びトリエチルアミン（ＴＥＡ）の存在下、保護されたアミノ酸を活性種（例えば、ＨＯＢｔエステルを生成するＢＯＰ、ＰｙＢＯＰ、ＨＢＴＵ及びＴＢＴＵ並びにＨＯＯＢｔエステルを生成するＤＥＰＢＴ）に変換することができるホスホニウム塩及びウロニウム塩が挙げられる。他の試薬は、保護試薬によりもたらされるラセミ化を防ぐように作用する。これらの試薬には、カルボジイミド（例えば、ＤＣＣ又はＷＳＣＤＩ）が挙げられ、一緒に補助求核剤（例えば、１－ヒドロキシ－ベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、１－ヒドロキシ－アザベンゾトリアゾール（ＨＯＡｔ）又はＨＯＳｕ）を添加する。補助求核剤を添加又は非添加の、クロロギ酸イソブチルを使用する混合酸無水物法も、また、それが関連するラセミ化が起こりにくいことから、アジド方法と同様に利用することができる。これらの種類の化合物は、また、カルボジイミド介在性カップリングの速度を増加することができ、さらに、Ａｓｎ及びＧｌｎ残基の脱水を防ぐことができる。

【０１０８】

カップリングが終了したことが決定された後、カップリング反応混合物を溶媒で洗浄し、ペプチド材料の後続のアミノ酸残基のそれぞれについてカップリングサイクルを繰り返す。次のアミノ酸をカップリングさせるために、樹脂結合材料からのＮ－末端保護基（例えば、Ｆｍｏｃ基）の除去は、典型的には、Ｎ－メチルピロリドン（ＮＭＰ）又はジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）などの溶媒中に１０～５０％（重量ベース）ピペリジンを含む試薬で処理することにより達成される。Ｆｍｏｃ保護基を除去した後、典型的には、数回の洗浄を行って、残留ピペリジン及びＦｍｏｃ副生成物（ジベンゾフルベン及びそのピペリジン付加体など）を除去する。

【０１０９】

後続のアミノ酸を、樹脂支持体上のペプチド材料の添加率に関して、過剰の化学量論量のアミノ酸で使用することができる。一般的に、カップリング工程で使用するアミノ酸の量は、樹脂上の第一のアミノ酸の添加率と少なくとも当量である（１当量以上）。好ましくは、カップリング工程で使用するアミノ酸の量は、１．７～２．０当量である。

【０１１０】

最終カップリングサイクルの後、樹脂をＮＭＰなどの溶媒で洗浄し、次に、ＤＣＭなど

の不活性な第二の溶媒で洗浄する。合成されたペプチド材料を樹脂から除去するために、切断処理を、切断されるペプチド材料が、依然十分な側鎖及び末端保護基を有するように行う。その場所に保護基を残すことにより、樹脂切断の間又はその後のペプチドフラグメントの望まないカップリング又は他の望まない反応を防ぐことができる。Ｆｍｏｃ又は類似の化学を用いてペプチドを合成する場合、保護された切断は、任意の所望の様式、例えば、酢酸又は希釈ＴＦＡなどの比較的弱い酸試薬を使用し、ＤＣＭなどの溶媒中で達成することができる。典型的には、ＤＣＭ中、０．５～１０重量パーセント、好ましくは、１～３重量パーセントのＴＦＡを使用する。例えば、米国特許第6,281,335号を参照されたい。

【０１１１】

固相樹脂からペプチド中間フラグメントを切断する工程は、下記のような典型的なプロセスラインに沿って進めることができる。また、ペプチド中間フラグメントを樹脂から効果的に切断する任意の適切なプロセスを使用することができる。例えば、約５～２０、好ましくは、約１０容積の酸性切断試薬を含有する溶媒を、樹脂結合ペプチド材料を含有する容器に添加する。樹脂は、典型的にはビーズ形状であり、結果として試薬中に浸漬する。切断反応は、液体内容物を適切な温度で適切な時間撹拌することにより生じる。撹拌により、ビーズが塊になるのを防ぐことができる。適切な時間及び温度条件は、使用する酸試薬、ペプチドの性質、樹脂の性質などの要素に依存する。一般的なガイドラインとして、約－１５℃～約５℃、好ましくは、約－１０℃～約０℃で、約５分間～２時間、好ましくは、約２５分間～約４５分間の撹拌が適切であろう。切断時間は、約１０分間～約２時間又はさらに１日であってもよい。切断は、望ましくは、このような冷却温度範囲で行うことにより、反応中に典型的に生じる発熱反応に適応させる。さらに、低い温度での切断反応を行うと、ｔｒｔ基などの酸感受性の側鎖保護基がこの段階で除去されるのを防ぐ。

【０１１２】

切断処理の終了時に、反応をクエンチする。これは、例えば、切断試薬を適切な塩基、例えば、ピリジンなどと混合して、さらに５分間～２時間、好ましくは、約２０分間～約４０分間追加でかき混ぜ及び撹拌を続けて達成することができる。塩基の添加及び続けてかき混ぜを行うと、容器内容物の温度が上昇する。かき混ぜの終了時に、容器内容物の温度が、約０℃～約１５℃、好ましくは、約５℃～約１０℃であるのがよい。

【０１１３】

ペプチド回収の態様を改善するために、樹脂を膨張及び収縮させるなどの要素を、場合により、合成プロセス全体に組み込むことができる。これらの技術は、例えば、米国特許出願第2005/0164912 A1号に記載されている。

【０１１４】

一部の態様においては、切断されたペプチドフラグメントを、他のペプチドフラグメント及び／又はアミノ酸への溶液相カップリング用に調製することができる。溶液相におけるペプチドカップリング反応は、例えば、New Trends in Peptide Coupling Reagents; Albericio, Fernando; Chinchilla, Rafeal; Dodsworth, David J.; and Najera, Armen; Organic Preparations and Procedures International (2003), 33(3), 203-303に概説されいている。

【０１１５】

溶液相におけるペプチド中間フラグメントの他のフラグメント又はアミノ酸へのカップリングは、in situカップリング試薬、例えば、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リン酸（ＢＯＰ）、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（ＰｙＢＯＰ）、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リン酸（ＨＢＴＵ）、Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホウ酸（ＨＡＴＵ）、Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムテトラフルオロリン酸（ＴＡＴＵ），Ｏ－（１Ｈ－６－クロロ－ベンゾトリアゾ

ール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸（ＨＣＴＵ）、Ｏ－（１Ｈ－６－クロロ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸（ＴＣＴＵ）、Ｏ－（ベンゾトリアゾール－１－イル）オキシビオス（oxybios）－（ピロリジノ）－ウロニウムヘキサフルオロリン酸（ＨＡＰｙＵ）、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、３－（ジエトキシホスホリルオキシ）－１，２，３－ベンゾトリアジン－４（３Ｈ）－オン（ＤＥＰＢＴ）、水溶性カルボジイミド（ＷＳＣＤＩ）、Ｏ－（シアノ－エトキシカルボニル－メチレンアミノ）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ”－テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸（ＴＯＴＵ）又は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テトラフルオロホウ酸（ＴＢＴＵ）を使用して行うことができる。他のカップリング技術は、ヒドロキシスクシンイミド（ＨＯＳｕ）及びｐ－ニトロフェノール（ＨＯＮｐ）エステルなどの事前に形成された活性エステル；事前に形成された対称無水物；非対称無水物、例えば、Ｎ－カルボン酸無水物（ＮＣＡ）；又はフッ化アシル並びに塩化アシルなどの酸ハロゲン化物を使用する。

【０１１６】

適切なカップリング溶媒を、溶液相カップリング反応で使用することができる。使用するカップリング溶媒が、形成されるペプチド結合のラセミ化の程度；ペプチド及び／又はペプチドフラグメントの溶解度；並びにカップリング反応速度に影響を与えうることが理解される。一部の実施態様においては、カップリング溶媒は、１以上の水混和性試薬を含む。水混和性溶媒の例には、例えば、ＤＭＳＯ、ピリジン、クロロホルム、ジオキサン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、Ｎ－メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジオキサン又はその混合物が挙げられる。

【０１１７】

他の実施態様においては、カップリング反応は、１以上の非水混和性試薬を含んでもよい。非水混和性溶媒の典型例は、塩化メチレンである。これらの実施態様においては、非水混和性溶媒は、脱保護反応に適合することが好ましい；例えば、非水混和性溶媒を使用する場合、脱保護反応に悪影響を及ぼさないことが好ましい。

【０１１８】

配列番号９のペプチドを形成した後、生成物を、脱保護、精製、凍結乾燥、追加のプロセシング（例えば、他のペプチドと反応させて、融合タンパク質を形成する）、これらの組み合わせ及び／又その同類のものに、適宜付すことができる。

【０１１９】

例えば、本発明によれば、側鎖保護基は、典型的には、固相合成を通して、並びに、また、溶液相カップリング反応へ向けて及び溶液相カップリング反応を通してペプチド中間フラグメントに保持される。一般的に、溶液相工程が終了した後、１以上の脱保護工程を行って、ペプチドから１以上の保護基を除去することができる。全体的な脱保護による側鎖保護基の除去は、典型的には、酸分解試薬を含む脱保護溶液を使用して側鎖保護基を切断する。全体的な脱保護に通常使用される酸分解試薬には、原液のトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、ＨＣｌ、BF_3Et_2O又はMe_3SiBrなどのルイス酸、液体のフッ化水素酸（ＨＦ）、臭化水素（ＨＢｒ）、トリフルオロメタンスルホン酸及びその組み合わせが挙げられる。脱保護溶液には、また、１以上の適切なカチオンスカベンジャー、例えば、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、アニソール、ｐ－クレゾール、エタンジチオール又は硫化ジメチルが挙げられる。脱保護溶液は、また、水を含むことができる。本明細書で使用されるように、脱保護組成物に存在する試薬量は、典型的には、比率で表され、ここで、個々の成分量は、分子は、「重量部」又は「容積部」などの「部」として表され、分母は、組成物の全部分である。例えば、ＴＦＡ：H_2O：ＤＴＴを９０：５：５（重量／重量／重量）の比率で含有する脱保護溶液は、ＴＦＡを９０／１００重量部、H_2Oを５／１００重量部及びＤＴＴを５／１００重量部で有する。

【０１２０】

析出は、典型的には、エーテル、例えば、ジエチルエーテル又はＭＴＢＥ（メチルtert

－Ｂｕエーテル）を使用して行われる。析出後、ペプチドは、単離及び乾燥させた後に、他の成分との混合、凍結乾燥、パッケージング、保存、追加のプロセシング及び／又は他の処理を行うことが望ましい。これは、任意の適切な方法により達成することができる。一つの適切なアプローチによれば、ペプチドを濾取し、十分なＭＴＢＥ洗浄液で洗浄し、最終塩含量を適切なレベルにまで低下させた後、乾燥させる。

【０１２１】

本発明は、また、ＧＬＰ－１ペプチド及びその対応物を含む広範なペプチドを精製するための有用な技術を提供する。

【０１２２】

特に好ましい精製プロセスは、クロマトグラフ媒体による少なくとも２つの精製通過工程を含み、ここで、少なくとも第一の通過工程が第一のｐＨで起こり、少なくとも第二の通過工程が第二のｐＨで起こる。より具体的には、第一の通過工程が酸性ｐＨで起こり、一方で、第二の通過工程が塩基性のｐＨで起こる。好ましい実施態様においては、酸性条件下での少なくとも１回の通過工程が、塩基性条件下で起こる通過工程の前に起こる。この精製アプローチを実施する例示的な方法は、完全に保護されたペプチド１１を精製する例示的状況で説明することができる。最初に、ペプチドで全体的な脱保護を行う。Ｎ－末端及び側鎖保護基の両方を切断する。第一のクロマトグラフィー通過工程は、水／ＡＣＮグラジエントで、ｐＨ約１～５、好ましくは約２にするために十分なＴＦＡを使用して行われる。次に、第二の通過工程は、水／ＡＣＮグラジエントで、ｐＨ約８～９、好ましくは８．５～８．９にするために少量のアンモニア及び／又は酢酸アンモニウムなどを使用して行われる。

【０１２３】

ｐＨ値は、酸又は塩基に関わらず、均一なイオン種が各場合で存在するように均一性を促進する。従って、酸性ｐＨは、ペプチド材料の実質的に全てのアミノ酸残基がプロトン化されるように十分に低いことが望ましい。塩基性ｐＨは、ペプチド材料の実質的に全てのアミノ酸残基が脱プロトン化されるように十分に高いことが望ましい。酸性及び塩基性クロマトグラフィーは、任意の順序で行うことができる。ペプチド酢酸塩が所望の生成物である場合は、最後に塩基性クロマトグラフィーを行うことが都合がよい。その理由としては、酢酸塩がクロマトグラフィーの生成物である可能性があるためである。

【０１２４】

通常使用される略語は以下を含む：アセチル（Ａｃ）、アゾビスイソブチリルニトリル（ＡＩＢＮ）、大気圧（Ａｔｍ）、９－ボラビシクロ［３．３．１］ノナン（９－ＢＢＮ又はＢＢＮ）、tert－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）、ピロ炭酸ジ－tert－ブチル又はＢｏｃ無水物（BOC_2O）、ベンジル（Ｂｎ）、ブチル（Ｂｕ）、ケミカルアブストラクト登録番号（ＣＡＳＲＮ）、ベンジルオキシカルボニル（ＣＢＺ又はＺ）、カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）、１，４－ジアザビシクロ［２．２．２］オクタン（ＤＡＢＣＯ）、三フッ化ジエチルアミノ硫黄（ＤＡＳＴ）、ジベンジリデンアセトン（ｄｂａ）、１，５－ジアザビシクロ［４．３．０］ノナ－５－エン（ＤＢＮ）、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］ウンデカ－７－エン（ＤＢＵ）、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、１，２－ジクロロエタン（ＤＣＥ）、ジクロロメタン（ＤＣＭ）、アゾジカルボン酸ジエチル（ＤＥＡＤ）、（３－（ジエトキシホスホリルオキシ）－１，２，３－ベンゾトリアジン－４（３Ｈ）－オン）（ＤＥＰＢＴ）、アゾジカルボン酸ジイソプロピル（ＤＩＡＤ）、水素化ジイソブチルアルミニウム（ＤＩＢＡＬ又はＤＩＢＡＬ－Ｈ）、ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、４－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）、エチレングリコールジメチルエーテル（ＤＭＥ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、１，１’－ビス－（ジフェニルホスフィノ）エタン（ｄｐｐｅ）、１，１’－ビス－（ジフェニルホスフィノ）フェロセン（ｄｐｐｆ）、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（ＥＤＣＩ）、エチル（Ｅｔ）、酢酸エチル（ＥｔＯＡｃ）、エタノール（ＥｔＯＨ）、２－エトキシ－２Ｈ－キノリン－１－

カルボン酸エチルエステル（ＥＥＤＱ）、ジエチルエーテル（Et_2O）、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（ＨＡＴＵ）、酢酸（ＨＯＡｃ）、１－Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、イソプロパノール（ＩＰＡ）、リチウムヘキサメチルジシラザン（ＬｉＨＭＤＳ）、メタノール（ＭｅＯＨ）、融点（ｍｐ）、$MeSO_2$－（メシル又はＭｓ）、メチル（Ｍｅ）、アセトニトリル（ＭｅＣＮ）、ｍ－クロロ過安息香酸（ＭＣＰＢＡ）、質量スペクトル（ｍｓ）、メチルｔ－ブチルエーテル（ＭＴＢＥ）、Ｎ－ブロモスクシンイミド（ＮＢＳ）、Ｎ－カルボン酸無水物（ＮＣＡ）、Ｎ－クロロスクシンイミド（ＮＣＳ）、Ｎ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）、Ｎ－メチルピロリドン（ＮＭＰ）、クロロクロム酸ピリジニウム（ＰＣＣ）、二クロム酸ピリジニウム（ＰＤＣ）、フェニル（Ｐｈ）、プロピル（Ｐｒ）、イソプロピル（ｉ－Ｐｒ）、ポンド／平方インチ（ｐｓｉ）、ピリジン（ｐｙｒ）、（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（ＰｙＢＯＰ）、室温（ｒｔ又はＲＴ）、tert－ブチルジメチルシリル又はｔ－$BuMe_2Si$（ＴＢＤＭＳ）、トリエチルアミン（ＴＥＡ又はEt_3N）、２，２，６，６－テトラメチルピペリジン１－オキシル（ＴＥＭＰＯ）、トリフラート又はCF_3SO_2－（Ｔｆ）、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、１，１’－ビス－２，２，６，６－テトラメチルヘプタン－２，６－ジオン（ＴＭＨＤ）、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テトラフルオロホウ酸（ＴＢＴＵ）、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、トリメチルシリル又はMe_3Si（ＴＭＳ）、ｐ－トルエンスルホン酸一水和物（ＴｓＯＨ又はｐＴｓＯＨ）、$4-Me-C_6H_4SO_2$－又はトシル（Ｔｓ）、Ｎ－ウレタン－Ｎ－カルボン酸無水物（ＵＮＣＡ）。接頭語ノルマル（ｎ）、イソ（ｉ－）、第二級（sec－）、第三級（tert－）及びネオを含む従来の命名は、アルキル部分で使用される場合、通常の意味を有する（J. Rigaudy and D. P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979Pergamon Press, Oxford.）。

【０１２５】

ここで、本発明の原理は、以下の例示的な実施例に関してさらに説明される。以下の全てのパーセンテージ及び比率は、明示的に別段の定めをした場合を除き容積で示される。

【０１２６】

実施例

ＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨのＧＬＰ－１固相合成

Ｆｍｏｃ－Ｈｉｓ（ｔｒｔ）－Ａｉｂ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ

【０１２７】

実施例１

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－Ｏ－２ＣＴ２ＣＴの固相合成

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨの固相合成を、０．５５mmol/gで添加した１５．０ｇのＨ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－２－ＣＴ樹脂（Peptides International;Lot#601511）から開始した。樹脂を、ＤＣＭ（１５０mL）中、２５℃で３０分間膨張させた。ＤＣＭ溶媒を排液し、樹脂をＮＭＰで３回洗浄した（各洗浄に９０mL）。

【０１２８】

カップリング溶液を調製するために、アミノ酸（２．０当量）及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ、２．０当量）を計量し、４３．３mLのＤＭＦに溶解させた後、ＨＢＴＵ（２．０当量）のＤＭＦ溶液（濃度：２０５．７６g/L；３１．４mL）と混合し、次に、ＤＩＥＡ（３．５当量）を０～５℃で添加することで活性化させた。得られた溶液を、樹脂を含有する反応容器に添加し、アクチベーションフラスコ（activation flask）を、２４．５mLのＤＣＭでリンスしてリアクターに入れ、その後、２５℃で４～６時間撹拌した。カップリング反応混合物を４時間撹拌した後、カップリング溶液を排液し、樹脂をＤＭＦで４回洗浄した（各洗浄に９０mL）。次に、樹脂を２０％ピペリジン

／ＤＭＦで２回処理し（各処理に９０mL）、Ｆｍｏｃ保護基を除去した。二回目の２０％ピペリジン／ＤＭＦ処理を行った後、樹脂をＤＭＦで９回洗浄した（各洗浄に９０mL）。フラグメントの残りのアミノ酸に対して、Ｆｍｏｃ保護基の除去及びカップリング反応サイクルを繰り返した（即ち、Ｖａｌ→Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）→Ｓｅｒ（ｔＢｕ）→Ｔｈｒ（ｔＢｕ）→Ｐｈｅ→Ｔｈｒ（ｔＢｕ）→Ｇｌｙ→Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）→Ａｉｂ→Ｈｉｓ（ｔｒｔ）の順で）。最後のＨｉｓ（ｔｒｔ）カップリング反応の溶媒を、ＤＭＦから０．１ＭＬｉＢｒ－ＴＨＦ／ＮＭＰ（３：１）に置換した。そして、最後のＨｉｓカップリング反応のカップリング試薬は、ＤＥＰＢＴのＤＭＦ溶液（濃度：１６２．３３g/L；３１．４mL）を使用した。そして、Ｈｉｓをもう一度再カップリングして、カップリングを確実に完了させた。

【０１２９】

この実施例で使用する全ての試薬を以下の表に列挙する：

【０１３０】

【表２】

GPA Fmoc-AA(7-17)-OH のカップリング反応　実施例 1								
アミノ酸	g	HOBT H_2O (g)	DIEA (mL)	DMF (mL)	HBTU (g)	DMF (mL)	DCM (mL)	カップリング時間 (分)
Val	5.62	2.53	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Asp(OtBu)	6.81	2.51	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Ser(OtBu)	6.35	2.52	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Thr(tBu)	6.56	2.53	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Phe	6.41	2.52	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Thr(tBu)	6.59	2.53	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Gly	4.95	2.52	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Glu(OtBu)	7.36	2.52	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
Aib	5.40	2.53	5.0	43.3	5.10	25.2	24.5	300
				THF/NMP (3:1) 中 0.1 M LiBr	DEPBT	THF/NMP (3:1) 中 0.1 M LiBr		
His(trt)	10.26	2.52	5.0	42.0	6.46	26.5	24.5	240
His(trt)	10.22	2.52	5.0	42.0	6.46	26.5	24.5	300

【０１３１】

構築した樹脂を、ＮＭＰ（９０mL）で４回、そして、ＤＣＭ（９０mL）で７回洗浄した。

【０１３２】

構築した樹脂からのＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨの切断

上記の構築した樹脂を、最後のＤＣＭ洗浄液で－５℃に冷却した。ＤＣＭを排液し、１％v/vＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（１５０mL、－５～－１０℃）を添加して、０℃で撹拌した。ピリジン（４．０mL）を切断レシーバーに添加して、ＴＦＡを中和した。構築した樹脂を０℃で１５分間処理した後、切断溶液を切断レシーバーに回収した。別の１％ＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（１５０mL、－５～－１０℃）を添加し、０℃で１５分間撹拌した後、

切断レシーバーに排液した。第三の１％ＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（１５０mL、－５～－１０℃）を添加し、０℃で３０分間撹拌した後、ピリジン（２．０mL）を切断容器に添加してＴＦＡを中和し、そして、また、最後の切断溶液を切断レシーバーに排液した。容器を２５℃まで温めながら、樹脂をＤＣＭ（９０mL）で５回洗浄し、切断溶液レシーバーに排液した。集めたＤＣＭ切断及び洗浄溶液を９０mLまで濃縮した後、水（９０mL）と混合した。ＤＣＭを、減圧下で激しく撹拌しながら蒸留した（２５℃で、３５０～５０torr）。ＤＣＭが除去された時、フラグメントが水混合物から析出した。次に、生成物を濾過し、水で洗浄し、３５℃で真空乾燥させた。合計１４．３７１ｇのＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨを、純度９５．７％ＡＮ、収率９０．７％で得た。

【０１３３】

ＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－ＯＨのＧＬＰ－１固相合成

Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－ＯＨ

実施例２

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－Ｏ－２ＣＴ２ＣＴの固相合成

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１１－２２）－ＯＨの固相合成を、０．５１mmol/gで添加した２０．０ｇのＨ－Ｇｌｙ－２－ＣＴ樹脂（Patras;Lot#2592）から開始した。樹脂を、ＤＣＭ（２００mL）中、２５℃で３０分間膨張させた。ＤＣＭ溶媒を排液し、樹脂をＮＭＰ（１２０mL）で３回洗浄した。

【０１３４】

カップリング溶液を調製するために、アミノ酸（２．０当量）及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ・H_2O；０．１６ｇ；０．１当量）を計量し、２９．８mLのＮＭＰに溶解させた後、ＨＢＴＵのＮＭＰ溶液（濃度：１７２．４g/L；４３．８mL；１．９５当量）と混合し、次に、ＤＩＥＡ（３．９mL；２．２当量）を０～５℃で添加することで活性化させた。得られた溶液を、樹脂を含有する反応容器に添加し、アクチベーションフラスコ（activation flask）を、２３．７mLのＤＣＭでリンスしてリアクターに入れ、その後、２２℃で撹拌した。カップリング反応混合物を５．０～６．５時間撹拌した後、カップリング溶液を排液し、樹脂をＮＭＰ（１２０mL）で４回洗浄した。次に、樹脂を２０％ピペリジン／ＮＭＰ（１２０mL）で２回処理し、Ｆｍｏｃ保護基を除去した。二回目の２０％ピペリジン／ＮＭＰ処理を行った後、樹脂をＮＭＰ（１２０mL）で９回洗浄した。フラグメントの残りのアミノ酸に対して、Ｆｍｏｃ保護基の除去及びカップリング反応サイクルを繰り返した（即ち、Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）→Ｌｅｕ→Ｔｙｒ（ｔＢｕ）→Ｓｅｒ（ｔＢｕ）の順で）。

【０１３５】

この実施例で使用する全ての試薬を以下の表に列挙する：

【０１３６】

【表３】

GPA Fmoc-AA(18-22)-OH のカップリング反応　実施例２								
アミノ酸	g	HOBT H_2O (g)	DIEA (mL)	NMP (mL)	HBTU (g)	NMP (mL)	DCM (mL)	カップリング時間 (分)
Glu(OtBu)	9.06	0.18	3.9	29.8	7.55	36.2	23.7	390
Leu	7.24	0.17	3.9	29.8	7.55	36.2	23.7	300
Tyr(tBu)	9.38	0.17	3.9	29.8	7.55	36.2	23.7	300
Ser(tBu)	7.84	0.16	3.9	29.8	7.55	36.2	23.7	360

【０１３７】

構築した樹脂をＮＭＰ（１２０mL）で４回、そして、ＤＣＭ（１２０mL）で７回洗浄した。

【０１３８】

構築した樹脂からのＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－ＯＨの切断

上記の構築した樹脂を、最後のＤＣＭ洗浄液で－５℃に冷却した。ＤＣＭを排液し、１％v/vＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（１６０mL、－５～－１０℃）を添加して、０℃で撹拌した。ピリジン（２．０mL）を切断レシーバーに添加し、最初の切断溶液のＴＦＡを中和した。３０分間撹拌した後、切断溶液を切断レシーバーに回収した。次に、別の１％ＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（１６０mL、－５～－１０℃）を添加し、０℃で３０分間撹拌した。ピリジン（２．１mL）を切断容器に添加して、ＴＦＡを中和した。第二の切断溶液を切断レシーバーに排液した後、容器を２５℃まで温め、樹脂をＤＣＭ（１２０mL）で６回洗浄して、切断溶液レシーバーに排液した。集めたＤＣＭ切断及び洗浄溶液を容積１５０mLまで濃縮した後、水（１５０mL）と混合した。ＤＣＭを、減圧下で激しく撹拌しながら蒸留した（２５℃で、３５０～５０torr）。ＤＣＭが除去された時、フラグメントが水混合物から析出した。フラグメントを水で洗浄し、３０～３５℃で真空乾燥させた。合計８．７６ｇのＧＬＰ－１　Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－ＯＨを、純度９８．６％ＡＮ、収率８９．６％で得た。

【０１３９】

ＧＬＰ－１フラグメントＨ－ＡＡ（１８－３６）－NH_2の溶液相合成

Ｈ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ（ｔｒｔ）－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ａｉｂ－Ａｒｇ－NH_2

実施例３

ＧＰＡフラグメント３’Ｈ－ＡＡ（２３－３６）－NH_2（２．７６ｇ）、フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－ＯＨ（０．９９ｇ）及びＨＯＢＴ水和物（０．１６ｇ）をＤＭＦ（１４mL）に溶解させた。この溶液に、ＢＯＰ（０．５６ｇ）のＤＭＦ（１５mL）溶液及びＤＩＥＡ（０．２９）を、ＤＭＦリンス（１０mL）と共に加えた。反応物を２０℃で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。４時間後、カップリング反応は未完了であった。フラグメントの追加フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－ＯＨ（０．０２ｇ）、ＢＯＰ（０．０７当量）のＤＭＦ（１mL）溶液及びＤＩＥＡ（０．０７．）のキッカーを、ＤＭＦリンス（１mL）と共に添加した。反応は一晩撹拌した後に完了した。ピペリジン（０．３８ｇ）を反応混合物に加えた。Ｆｍｏｃ除去を３８℃で１時間後に行った。２５℃に冷却した後、反応混合物を、周囲温度において水（１００mL）でクエンチした。クエンチした混合物をＤＣＭ（１００mL）で抽出した。ＤＣＭ層を水（２×１００mL）で洗浄して、～２０ｇに濃縮した。濃縮ＤＣＭ溶液を撹拌したヘプタンに注ぎ、生成物を析出させた。次に、析出混合物中のＤＣＭを、２０～２５℃、減圧下で留去し（３５０～５０mmHg）、その後、ＭＴＢＥ（１００mL）を加えて、２５℃で一晩撹拌した。固体を濾過し、ＭＴＢＥ／ヘプタン（１：１、各５０mL）で２回洗浄した。フィルターケーキを０．５時間風乾させた後、３５～４０℃で真空乾燥させた。合計３．３７ｇを実収率９６．６％、純度８１．９％ＡＮで得た。

【０１４０】

実施例４

ＧＰＡフラグメント３’Ｈ－ＡＡ（２３－３６）－NH_2（一般的に、U.S.S.N. 12/316,309の手順に従って合成した）（合計２．８３ｇ）を、ＤＭＦ（２４mL）及びメチル－ＴＨＦ（5mL）に３５～４０℃で3時間溶解させた後、０～５℃に冷却した。次に、ＤＭＦ（2mL）及びＭｅ－ＴＨＦ（２４mL）混合溶媒に溶かしたフラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２２）－ＯＨ（１．１５４ｇ）及びＨＯＢＴ水和物（０．０１８ｇ）の冷却溶液（０～５℃）を、ＤＭＦリンス（5mL）と共に加えた。この得られた溶液に、ＢＯＰ（０．６９ｇ）のＤＭＦ（2mL）溶液及びＤＩＥＡ（０．２１ｇ）を、ＤＭＦリンス（１０mL

）と共に加えた。反応物を０℃で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。１５．５時間後、カップリング反応は未完了であった。フラグメントの追加フラグメント３’（０．１７２ｇ）、ＢＯＰ（０．１６ｇ）のＤＭＦ（２mL）溶液及びＤＩＥＡ（０．１５．）のキッカーを、ＤＭＦリンス（１mL）と共に添加した。反応は２０℃で一晩撹拌した後に完了した。ピペリジン（０．４４ｇ）を反応混合物に加えた。Ｆｍｏｃ除去を３８℃で１時間後に行った。２５℃に冷却した後、反応混合物を、周囲温度において水（７５mL）及びＭｅ－ＴＨＦ（３０mL）でクエンチした。相分離した後、Ｍｅ－ＴＨＦ（１５mL）を使用して下の水層の逆抽出を行った。集めたＭｅ－ＴＨＦ層をロータリーエバポレーターで濃縮し、次に、新たなＭｅ－ＴＨＦ（３０mL）を加えて残渣を溶解させた。濃縮、Ｍｅ－ＴＨＦ（３０mL）に再溶解、そして、濃縮の操作を再度繰り返した。残渣を最後に、Ｍｅ－ＴＨＦ（１５mL）に溶解させ、撹拌したヘプタン（１２０mL）にＭｅ－ＴＨＦリンス（３mL）と共に注いだ。析出した固体を濾過し、ヘプタン（各２５mL）で洗浄した。フィルターケーキを０．５時間風乾させた後、３５～４０℃で真空乾燥させた。合計３．６６ｇを、実収率９５．５％、純度８５．１％ＡＮで得た。

【０１４１】

スキーム１に従った粗ＧＬＰ－１の溶液相合成

実施例５

ＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨ（０．８４３ｇ）をＴＨＦ（２０mL）に溶解させた。次に、この溶液とフラグメントＨ－ＡＡ（１８－３６）－NH_2（１．４３３ｇ）を混合し、撹拌して固体を全て溶解させた。この溶液に、６－Ｃｌ－ＨＯＢｔ（０．１０１ｇ）、ＤＥＰＢＴ（０．１９９ｇ）、そして、次に、ＤＩＥＡ（０．１３２mL）を、ＴＨＦリンス（３mL）と共に加えた。反応物を室温（１８～２２℃）で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。２日後、反応の完了をチェックしたが、反応は未完了であった（１１％の過剰フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨ）。フラグメントＨ－ＡＡ（１８－３６）－NH_2（０．１２３ｇ）、ＤＥＰＢＴ（０．０３９ｇ）及びＤＩＥＡ（０．０４３mL）のキッカーを添加し、室温で撹拌を続けた。１９．５時間後、ＨＰＬＣ分析により反応が完了したことが分かった。ピペリジン（０．２６７ｇ）を加え、得られた反応混合物を室温で撹拌した。７．５時間撹拌した後、脱保護反応を行った。次に、反応混合物中のＴＨＦを減圧下（１３０mmHg減圧下、３５℃）、ＤＣＭ（２×１５mL）で置換した。残渣をＤＣＭ（５．６mL）に溶解させ、ＤＴＴ（１．１１ｇ）、水（１．０９ｇ）及びＴＦＡ（１９mL）の溶液と１４℃で混合した。１５℃で６時間撹拌した後、反応混合物に冷却した（－５℃）ＭＴＢＥ（８９mL）を加えてクエンチした。クエンチした反応混合物を１５℃で３０分間静置した。固体生成物を濾過し、ＭＴＢＥ（３×１９mL）で洗浄して、３５℃、減圧下で一晩乾燥させた。１．９１ｇの粗ＧＰＡ（３４．３％wt/wt）を、純度６３．４％ＡＮ、収率４５．６％で得た。

【０１４２】

ＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１９－２７）－ＯＨのＧＬＰ－１固相合成

Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ（ｔｒｔ）－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ

実施例６

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１９－２７）－Ｏ－２ＣＴ２ＣＴの固相合成

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１９－２７）－ＯＨの固相合成を、０．５８mmol/gで添加した２０．０ｇのＦｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－２－ＣＴＣ樹脂から開始した。樹脂を、ＤＣＭ（２００mL）中、２５℃で３０分間膨張させた。ＤＣＭ溶媒を排液し、樹脂をＤＭＦ（１２０mL）で３回洗浄した。Ｆｍｏｃ保護基の除去を、膨張した樹脂を２０％ピペリジン／ＤＭＦ（１２０mL）で２回処理することにより達成した。二回目の２０％ピペリジン／ＤＭＦ処理を行った後、樹脂をＤＭＦ（１２０mL）で９回洗浄した。

【０１４３】

カップリング溶液を調製するために、アミノ酸（２．０当量）及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ・H_2O；３．５５ｇ；２．０当量）を計量し、６０．

０mLのＤＭＦに溶解させた後、ＨＢＴＵのＤＭＦ溶液（濃度：２０５．７６g/L；４２．８mL；２．０当量）と混合し、次に、ＤＩＥＡ（９．１mL；４．５当量）を０～５℃で添加することで活性化させた。得られた溶液を、樹脂を含有する反応容器に添加し、アクチベーションフラスコ（activation flask）を、３４．３mLのＤＣＭでリンスしてリアクターに入れ、その後、２５℃で撹拌した。カップリング反応混合物を５．０時間撹拌した後、カップリング溶液を排液し、樹脂をＤＭＦ（１２０mL）で４回洗浄した。次に、樹脂を２０％ピペリジン／ＤＭＦ（１２０mL）で２回処理し、Ｆｍｏｃ保護基を除去した。二回目の２０％ピペリジン／ＤＭＦ処理を行った後、樹脂をＤＭＦ（１２０mL）で９回洗浄した。フラグメントの残りのアミノ酸に対して、Ｆｍｏｃ保護基の除去及びカップリング反応サイクルを繰り返した（即ち、Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）→Ａｌａ→Ａｌａ→Ｇｌｎ（ｔｒｔ）→Ｇｌｙ→Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）→Ｌｅｕ→Ｔｙｒ（ｔＢｕ）の順で）

【０１４４】

この実施例で使用する全ての試薬を以下の表に列挙する：

【０１４５】

【表４】

GPA Fmoc-AA(19-27)-O-2CT のカップリング反応　実施例６								
アミノ酸	g	HOBT H_2O (g)	DIEA (mL)	DMF (mL)	HBTU (g)	DMF (mL)	DCM (mL)	カップリング時間 (分)
Lys(Boc)	10.89	3.55	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300
Ala	7.65	3.53	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300
Ala	7.65	3.55	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300
Gln(trt)	14.20	3.54	9.1	60.0		34.0	34.3	300
Gly	6.93	3.54	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300
Glu(OtBu)	9.90	3.53	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300
Leu	8.19	3.56	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300
Tyr(tBu)	10.68	3.56	9.1	60.0	8.8	34.0	34.3	300

【０１４６】

構築した樹脂をＤＭＦ（１２０mL）で４回、ＤＣＭ（１２０mL）で８回、そして、ＩＰＡ（１２０mL）で４回順次洗浄した。次に、構築した樹脂を、３５℃で真空乾燥させて、３２．７５ｇのＦｍｏｃ－（１９－２７）－Ｏ－２ＣＴ樹脂を得た。収率８３．６％は樹脂の増量に基づく。

【０１４７】

実施例７

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－Ｏ－２ＣＴ２ＣＴの固相合成

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－ＯＨの固相合成を、１６．３８ｇの上記Ｆｍｏｃ－ＡＡ（１９－２７）－Ｏ－２－ＣＴＣ樹脂で行った。樹脂を、ＤＣＭ（１００mL）中、２５℃で３０分間膨張させた。ＤＣＭ溶媒を排液し、樹脂をＤＭＦ（６０mL）で３回洗浄した。Ｆｍｏｃ保護基の除去は、膨張した樹脂を２０％ピペリジン／ＤＭＦ（６０mL）で２回処理することにより達成した。二回目の２０％ピペリジン／ＤＭＦ処理を行った後、樹脂をＤＭＦ（６０mL）で９回洗浄した。

【０１４８】

カップリング溶液を調製するために、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）（４．４８ｇ、２．０当量、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｏ－２ＣＴ樹脂に基づく）及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ・H_2O；１．７８ｇ；２．０当量、Ｆｍｏｃ－

Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｏ－２ＣＴ樹脂に基づく）を計量し、３０．０mLのＤＭＦに溶解させた後、ＨＢＴＵのＤＭＦ溶液（濃度：２０５．７６g/L；２１．４mL；２．０当量、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｏ－２ＣＴ樹脂に基づく）と混合し、次に、ＤＩＥＡ（４．５mL；４．５当量、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－Ｏ－２ＣＴ樹脂に基づく）を０～５℃で添加することで活性化させた。得られた溶液を、樹脂を含有する反応容器に添加し、アクチベーションフラスコ（activation flask）を、１８．７mLのＤＣＭでリンスしてリアクターに入れ、その後、２５℃で撹拌した。カップリング反応混合物を６．０時間撹拌した後、カップリング溶液を排液し、樹脂をＤＭＦ（１２０mL）で４回洗浄した。

【０１４９】

この実施例で使用する全ての試薬を以下の表に列挙する：

【０１５０】

【表５】

GPA Fmoc-AA(19-27)-O-2CT のカップリング反応　実施例 7								
アミノ酸	g	HOBT H_2O (g)	DIEA (mL)	DMF (mL)	HBTU (g)	DMF (mL)	DCM (mL)	カップリング時間 (分)
Ser(OtBu)	4.48	1.78	4.5	30.0	4.4	17.0	18.7	360

【０１５１】

構築した樹脂を、ＤＭＦ（１２０mL）で４回、ＤＣＭ（１２０mL）で８回、そして、ＩＰＡ（１２０mL）で４回順次洗浄した。

【０１５２】

実施例８

構築した樹脂からのＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－ＯＨの切断

構築した樹脂を、ＤＣＭ（２００mL）で３０分間膨張させて、次に－５℃に冷却した。ＤＣＭを排液し、１％v/vＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（２００mL、－５～－１０℃）を添加して、０℃で撹拌した。ピリジン（６．５mL）を切断レシーバーに添加し、切断溶液のＴＦＡを中和した。３０分間撹拌した後、切断溶液を切断レシーバーに回収した。次に、別の１％ＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（２００mL、－５～－１０℃）を添加し、０℃で３０分間撹拌した。第二の切断溶液を切断レシーバーに排液した後、ＩＰＡ（２０mL）を切断レシーバーに加え、ゲル形成を回避した。切断容器を２５℃まで温めて、樹脂をＤＣＭ（２００mL）で６回洗浄し、切断溶液レシーバーに排液した。集めた切断及び洗浄溶液を、容積２００mL未満まで濃縮した後、水（２００mL）と混合した。ＤＣＭを、減圧下で激しく撹拌しながら蒸留した（２５℃で、３５０～５０torr）。ＤＣＭが除去された時、フラグメントが水混合物から析出した。フラグメントを濾過し、水で洗浄し、３０～３５℃で真空乾燥させた。合計１８．０９ｇのＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－ＯＨを、純度８９．０％ＡＮ、収率８２．７％で得た。

【０１５３】

ＧＬＰ－１フラグメント３ａ、Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨの固相合成

Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ａｉｂ－ＯＨ

実施例９

ＧＬＰ－１代替フラグメント３ａ、Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－Ｏ－２ＣＴの固相合成

Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ａｉｂ－２－ＣＴＣ

Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－Ｏ－２ＣＴの固相合成を、Ｒｏｃｈｅのペプチドシンセサイザーで行った。添加係数０．３６mmol/gで１５．０２ｇのＦｍｏｃ－Ａｉｂ－２－

ＣＴＣ樹脂を反応容器に入れ、ＤＣＭ（１５０mL）中、２５℃で３０分間膨張させた。ＤＣＭ溶媒を排液し、樹脂をＤＭＦで３回洗浄した（各洗浄に６容積）。樹脂を２０％ピペリジン／ＤＭＦ（各処理に６容積）で２回処理することにより、全ての樹脂の脱保護を行い、Ｆｍｏｃ保護基を除去した。二回目の２０％ピペリジン／ＤＭＦ処理を行った後、樹脂をＤＭＦで９回洗浄した（各洗浄に６．７容積）。

【０１５４】

カップリング溶液を調製するために、アミノ酸及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ・H_2O）を計量し、ＤＭＦに溶解させた後、ＨＢＴＵのＤＭＦ溶液（０．５０３mmol/mL）及びＤＩＥＡと０～５℃で順次混合した。得られた溶液を反応容器に添加し、フラスコをＤＣＭでリアクター中にリンスし、樹脂と２５℃で４～１６時間撹拌した。試料をKaiserテスト又はＨＰＬＣ分析用に取り、反応の完了をチェックした。カップリング反応が完了した後、カップリング溶液を排液し、樹脂をＮＭＰで４回洗浄した（各洗浄に６．７容積）。次に、フラグメントの残りのアミノ酸に対して、Ｆｍｏｃ基の脱保護及びカップリング反応サイクルを繰り返した（即ち、Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）→Ｖａｌ→Ｌｅｕ→Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）→Ａｌａ→Ｉｌｅ→Ｐｈｅの順に）

【０１５５】

２－メチルアラニン（Ａｉｂ）と２－ＣＴＣ樹脂間の作用が強いことから、最初の２つのアミノ酸カップリング反応（Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－３４及びＶａｌ－３３）を完了させることは非常に困難である。Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－３４及びＶａｌ－３３のカップリング条件を変更して（アミノ酸及びＨＯＢＴ水和物の両方の使用量を１．７当量から２．３５当量に、そして、ＤＩＥＡの使用量を４．０当量から５．０当量に増加）、カップリング反応を完了させた。また、この実施例においては、酢酸無水物を使用して、Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－３４及びＶａｌ－３３のカップリング反応後の、樹脂上の任意の未反応ペプチドフラグメント又はアミノ酸をエンドキャッピングした。これにより、クロマトグラフィー精製において、不純物が所望の生成物から離れて移動することで精製工程の効率が改善した。

【０１５６】

この実施例で使用する全ての試薬を以下の表に列挙する：

【０１５７】

【表６】

物質	AA wt (g)/ 当量	HOBT. H_2O (g/当量)	DMF (mL)	DIEA (mL/当量)	HBTU (mL/当量)	DCM (mL)	カップリング時間 (分)
Lys(Boc)	5.97 / 2.35	1.94 / 2.35	36.8	4.7 / 5.0	25.2 / 2.35	21.4	960
無水酢酸	2.81/ 5.0	-	-	9.4 / 10.0	-	-	180
Val	4.31 / 2.35	1.97 / 2.35	36.8	4.7 / 5.0	25.2 / 2.35	21.4	960
無水酢酸	2.79/ 5.0	-	-	9.4 / 10.0	-	-	180
Leu	3.26 / 1.7	1.42 / 1.7	-	3.8 / 4.0	18.2 / 1.7	21.4	240
Trp(Boc)	4.83 / 1.7	1.42 / 1.7	-	3.8 / 4.0	18.2 / 1.7	21.4	240
Ala	3.05 / 1.7	1.42 / 1.7	-	3.8 / 4.0	18.2 / 1.7	21.4	240
Ile	3.27 / 1.7	1.43 / 1.7	-	3.8 / 4.0	18.2 / 1.7	21.4	240
Phe	3.57 / 1.7	1.43 / 1.7	-	3.8 / 4.0	18.2 / 1.7	21.4	240

【０１５８】

固相合成の完了後、樹脂をＤＭＦ（４×６．７容積）、ＤＣＭ（７×６．７）及びイソプロパノール（３×６．７容積）で洗浄した。構築した樹脂を真空乾燥させて、切断のために保持した。

【０１５９】

実施例１０
構築した樹脂からのＧＬＰ－１中間フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨの切断
上記の構築した樹脂を、ＤＣＭ（１０容積）中、２５℃で３０分間膨張させた。次に、ポット混合物を－５℃に冷却した。ＤＣＭを排液し、樹脂を２％ＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（２×７．５容積）で、０℃で３０分間撹拌して２回処理した。切断溶液を、ピリジン（全ＴＦＡの１．３当量）を含有するフラスコに回収した。容器を２５℃まで温めながら、樹脂をＤＣＭ（１０容積）で６回洗浄し、ＤＣＭ洗浄液に排液した。ＤＣＭ溶液を集めて、濃縮し、水（１０容積）と混合した。得られた混合物を減圧下で蒸留し、ＤＣＭを除去した（２５℃で、３５０～５０torr）。ＤＣＭが除去された時、フラグメントが水から析出した。フラグメントを濾過し、洗浄して、３０～３５℃で真空乾燥させた。ＧＬＰ－１Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨを、収率９２．７％、純度９５．２％ＡＮで得た。

【０１６０】
実施例１１
ＧＬＰ－１フラグメント３ａ、Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－Ｏ－２ＣＴの固相合成
Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ａｉｂ－２－ＣＴＣ
Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－Ｏ－２ＣＴの固相合成を、Ｒｏｃｈｅのペプチドシンセサイザーで行った。０．５９mmol/gの添加係数で２５．０１ｇのＨ－Ａｉｂ－２－ＣＴＣ樹脂を反応容器に入れ、ＤＣＭ（２５０mL）中、２５℃で３０分間膨張させた。ＤＣＭ溶媒を排液し、樹脂をＮＭＰで３回洗浄した（各洗浄に６容積）。

【０１６１】
樹脂を２０％ピペリジン／ＮＭＰ（各処理に５．６容積）で２回処理することにより全ての樹脂の脱保護を行い、Ｆｍｏｃ保護基を除去した。二回目の２０％ピペリジン／ＤＭＦ処理を行った後、樹脂をＮＭＰで９回洗浄した（各洗浄に５．６容積）。

【０１６２】
カップリング溶液を調製するために、アミノ酸及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ・H_2O）を計量し、ＮＭＰに溶解させた後、ＨＢＴＵのＮＭＰ溶液（０．４６mmol/mL）及びＤＩＥＡと０～５℃で順次混合した。得られた溶液を反応容器に添加し、フラスコをＮＭＰでリアクター中にリンスし、樹脂と２５℃で４～１６時間撹拌した。試料をKaiserテスト又はＨＰＬＣ分析用に取り、反応の完了をチェックした。カップリング反応が完了した後、カップリング溶液を排液し、樹脂をＮＭＰで４回洗浄した（各洗浄に６．７容積）。次に、フラグメントの残りのアミノ酸に対して、Ｆｍｏｃ基の脱保護及びカップリング反応サイクルを繰り返した（即ち、Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）→Ｖａｌ→Ｌｅｕ→Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）→Ａｌａ→Ｉｌｅ→Ｐｈｅの順に）。

【０１６３】
Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－３４及びＶａｌ－３３のカップリング条件を変更して（アミノ酸及びＨＯＢＴ水和物の両方の使用量を１．７当量から２．０当量に、そして、ＤＩＥＡの使用量を２．１３当量から２．５当量に増加）、カップリング反応を完了させた。また、この実施例においては、酢酸無水物／ＤＣＭを使用して、Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－３４及びＶａｌ－３３のカップリング反応後の、樹脂上の任意の未反応ペプチドフラグメント又はアミノ酸をエンドキャッピングした。

【０１６４】
この実施例で使用する全ての試薬を以下の表に列挙する：

【０１６５】

【表７】

物質	AA wt (g)/ 当量	HOBT. H_2O (g/当量)	NMP (mL)	DCM (mL)	DIEA (mL/ 当量)	HBTU (mL/ 当量)	NMP 樹脂 (mL)	DCM リンス (mL)	カップリング時間 (分)
Lys(Boc)	13.86 /2.0	0.24/ 0.1	50.5	-	6.4/ 2.5	64.2/ 2.0	37.5	-	720
無水酢酸	4.62/ 3.0	-	-	75.0	12.8/ 5.0	-	-	37.5	120
Val	4.31/ 2.35	0.26/ 0.1	50.5	-	6.4/ 2.5	64.2/ 2.0	37.5	-	720
無水酢酸	4.60/ 3.0	-	-	75.0	12.8/ 5.0	-	-	37.5	120
Leu	8.85/ 1.7	0.22/ 0.085	58.4	-	5.5/ 2.13	54.6/ 1.7	37.5	-	240
Trp(Boc)	13.22 /1.7	0.21/ 0.085	58.4	-	5.5/ 2.13	54.6/ 1.7	37.5	-	240
Ala	8.28/ 1.7	0.21/ 0.085	58.4	-	5.5/ 2.13	54.6/ 1.7	37.5	-	240
Ile	8.85/ 1.7	0.19/ 0.085	58.4	-	5.5/ 2.13	54.6/ 1.7	37.5	-	240
Phe	9.73/ 1.7	0.21/ 0.085	58.4	-	5.5/ 2.13	54.6/ 1.7	37.5	-	240

【０１６６】

固相合成の完了後、樹脂をＮＭＰ（４×６．０容積）、ＤＣＭ（７×６．０容積）で洗浄した。

【０１６７】

構築した樹脂からのＧＬＰ－１中間フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨの切断

上記の構築した樹脂を、ＤＣＭ（６容積）中、３０分間－５℃に冷却した。次に、ＤＣＭを排液し、樹脂を２％ＴＦＡ／ＤＣＭ冷却溶液（２×１０容積）で、０℃で３０分間撹拌して２回処理した。切断溶液を、ピリジン（全ＴＦＡの１．３当量）を含有するフラスコに回収した。容器を２５℃まで温めながら、樹脂をＤＣＭ（１０容積）で６回洗浄し、ＤＣＭ洗浄液に排液した。ＤＣＭ溶液を集め、濃縮し、水（６容積）と混合した。得られた混合物を減圧下で蒸留し、ＤＣＭを除去した（２５℃で、３５０～５０torr）。ＤＣＭが除去された時、フラグメントが水から析出した。フラグメントを濾過し、洗浄して、３０～３５℃で真空乾燥させた。Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨを、収率９６．９％、純度９６．１％ＡＮで得た。

【０１６８】

ＧＬＰ－１フラグメント３’ａ、Ｈ－ＡＡ（２８－３６）－$ＮＨ_2$の溶液相合成

Ｈ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ａｉｂ－Ａｒｇ－$ＮＨ_2$

実施例１２

代替フラグメント３ａ（Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨ、６．１１ｇ、４．４２mmol）及びアルギニンアミド二塩酸塩（Ｈ－Ａｒｇ（２ＨＣｌ）－$ＮＨ_2$、２．１８ｇ、８．８４mmol、２当量）をＤＭＦ（４２mL）に溶解させた。この溶液に、ＨＯＢＴ・$Ｈ_2Ｏ$（０．６７ｇ、１当量）及びＨＢＴＵ（３．３８ｇ、２当量）のＤＭＦ（４２mL）溶液、ＤＩＥＡ（３．４４mL、４当量）を、１５mLのＤＭＦと共に順次加えた。反応物を２５℃で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。２時間後、反応は完了していなかった。反応を一晩行った（２１時間）。次に、ピペリジン（２．２６ｇ、６当量）を反応混合物に添加した。Ｆｍｏｃ除去は、３５℃で１時間撹拌した後も完了していなかった。追加のピペリジン（２．３３ｇ、６．２当量）を添加して、さらに１．７５時間撹拌した。反応混合物を水（２４０mL）でクエンチした。ピリジン塩酸塩（８．３３ｇ、１６．３当量）を析出したポット混合物に加え、ピペリジンを中和した。生じた白色固体を濾過し、水（４００mL）で洗浄して、一晩かけてある程度乾燥させた。フィルターケーキを、１００mLのＭＴＢＥ／ｎ－ヘプタン（１：１＝容積：容積）で再度スラリーにして、濾過し、ＭＴＢＥ／ｎ－ヘプタン（１：１＝容積：容積；２×２５mL）で洗浄して、真空乾燥させて、ＧＬＰ－１代替フラグメント３’Ｈ－ＡＡ（２８－３６）－$ＮＨ_2$（６．２２ｇ、重量収率１０６．９％）を得た。ＨＰＬＣ分析により、純度は８７％ＡＮであった。

【０１６９】

実施例１３

代替フラグメント３ａ（Ｆｍｏｃ－ＡＡ（２８－３５）－ＯＨ、６．１２ｇ、４．４２mmol）及びアルギニンアミド二塩酸塩（Ｈ－Ａｒｇ（２ＨＣｌ）－$ＮＨ_2$、２．１９ｇ、８．８４mmol、２当量）をＤＭＦ（４２mL）に溶解させた。この溶液に、ＨＯＢＴ・$Ｈ_2Ｏ$（０．６７ｇ、１当量）及びＨＢＴＵ（３．３８ｇ、２当量）のＤＭＦ（４２mL）溶液、ＤＩＥＡ（３．４４mL、４当量）を、１５mLのＤＭＦと共に順次加えた。反応物を２５℃で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。反応を一晩行った（１６．３時間）。次に、ピペリジン（４．５２ｇ、１２当量）を反応混合物に添加した。Ｆｍｏｃ除去は、２５℃で３５分間撹拌した後に完了した。反応混合物を水（２００mL）でクエンチした。１８０mLのＤＣＭを加え、析出した生成物を抽出した。下のＤＣＭ層を水で２回洗浄し（２×１００mL）、容積５０mLに濃縮した。この濃縮ＤＣＭ溶液を、滴下して、生成物を析出させた。ＤＣＭを減圧下で蒸留した。ＭＴＢＥを析出混合物に加えた。生じた白色固体を濾過し、ＭＴＢＥ／ｎ－ヘプタン（１：１＝容積：容積；２×５０mL）で洗浄し、真空乾燥させて、ＧＬＰ－１代替フラグメント３’ａ、Ｈ－ＡＡ（２８－３６）－$ＮＨ_2$（６．５４ｇ、重量収率１１２．４％）を得た。ＨＰＬＣ分析より、純度は９２．１％ＡＮであった。

【０１７０】

スキーム２に従った粗ＧＬＰ－１の溶液相合成

実施例１４

ＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－ＯＨ（１．８７ｇ）を、２－Ｍｅ－ＴＨＦ（２０mL）及びＤＭＳＯ（５mL）と２２℃で混合した。次に、この溶液を、フラグメントＨ－ＡＡ（２８－３６）－$ＮＨ_2$（１．３０ｇ、１．０当量）と混合し、撹拌した。この濁った懸濁液に、ＤＥＰＢＴ（０．４１ｇ、１．３当量）、そして、次にＤＩＥＡ（０．４０mL、２．３当量）を、Ｍｅ－ＴＨＦリンス（５mL）と共に加えた。反応物を室温（２２℃）で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。４．５時間後、反応の完了をチェックしたが、反応は完了していなかった（１６．８％の過剰フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－ＯＨ）。フラグメントＨ－ＡＡ（２８－３６）－$ＮＨ_2$（０．４３ｇ）、ＤＥＰＢＴ（０．１３ｇ）及びＤＩＥＡ（０．０８mL）のキッカーチャージを添加した。室温で一晩撹拌した後、ＨＰＬＣ分析から、反応が完了したことが分かった。ピペリジン（０．３０mL、３当量）を加え、得られた反応混合物を室温で撹拌した。１時間撹拌した後、脱Ｆｍｏｃの完了をチェックしたが、反応は未完了であった。ピペリジン（０．３０mL）のキッカーチャージを添加した。一晩撹拌した後の試料では、脱保護反応が終了していた。水（３５mL）を加え、反応をクエンチし、有機層を抽出した。相分離した後、Ｍｅ－ＴＨＦ（２０mL）を逆抽出のために水層に添加した。集めた有機相を減圧下で蒸留し（

９５torr、３７℃浴）、油状物を得て、Ｍｅ－ＴＨＦ（３０mL）に再度溶解させた後、再び蒸留して油状物を得た。油状物をＭｅ－ＴＨＦ（３０mL）に再度溶解させ、得られた混合物（Ｍｅ－ＴＨＦ（１０mL）リンスと共に）を、ｎ－ヘプタン（６０mL）を含有する反応容器に１５℃で注いだ。３０分間静置した後、析出生成物を濾過し、ｎ－ヘプタン（２０mL）で洗浄した後、一晩乾燥させて、２．７８ｇの生成物を、純度５５．２％ＡＮ、収率９４．１％で得た（フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（１８－２７）－ＯＨに基づく）。

【０１７１】

実施例１５

ＧＬＰ－１フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨ（１．００ｇ）を、２２℃でＴＨＦ（２０mL）に溶解させた。次に、この溶液をフラグメントＨ－ＡＡ（１８－３６）－NH_2（１．８１ｇ、１．２当量）と混合し、撹拌して固体を全て溶解させた。この溶液に、ＤＥＰＢＴ（０．１８１ｇ、１．２当量）、そして、次に、ＤＩＥＡ（０．２２mL、２．４当量）を、ＴＨＦリンス（５mL）と共に加えた。反応物を室温（２２℃）で撹拌し、ＨＰＬＣで観測した。２．５時間後、反応の完了をチェックが、反応は未完了であった（２１．９％の過剰フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨ）。フラグメントＨ－ＡＡ（１８－３６）－NH_2（０．８０ｇ）、ＤＥＰＢＴ（０．１０ｇ）及びＤＩＥＡ（０．１１mL）のキッカーチャージを添加した。室温で一晩撹拌した後、ＨＰＬＣ分析から、反応が完了したことが分かった。ピペリジン（０．３０mL、６当量）を加え、得られた反応混合物を室温で撹拌した。５時間撹拌した後、脱保護反応を行った。次に、反応混合物中のＴＨＦを、減圧下、ＤＣＭ（１３mL）で置換した（５０mmHg減圧下、３５℃）。残渣をＤＣＭ（１０mL）に溶解させ、ＤＣＭリンス（２mL）を添加したＤＴＴ（２．０４ｇ）、水（２．０ｇ）及びＴＦＡ（４０mL）の溶液と１５℃で混合した。１５℃で６時間撹拌した後、反応混合物を－３℃に冷却し、冷却した（－２０℃）ＭＴＢＥ（１８０mL）を加えてクエンチした。クエンチした反応混合物を１５℃で３０分間静置した。固体生成物を濾過し、ＭＴＢＥ（３×５０mL）で洗浄して、一晩乾燥させた。２．７８ｇの粗ＧＰＡ（２１．０%wt/wt）を、純度３８．９％ＡＮ、収率１６３．６％で得た（フラグメントＦｍｏｃ－ＡＡ（７－１７）－ＯＨに基づく）。

【０１７２】

特定の形態又は開示された機能を実施するための手段に関して表現される、前述の記載又は以下の特許請求の範囲において開示され特徴、あるいは、開示される結果を達成するための方法もしくはプロセスは、適宜、別々に、又は、これらの特徴を任意に組み合わせて、本発明をその多様な形態で実現するために利用することができる。

【０１７３】

前述の発明は、明瞭に、且つ、理解するために例示及び実施例によりある程度詳細に記載されている。添付の特許請求の範囲内で変更及び改変を実施することができることは、当業者には明らかであろう。従って、上記記載が例示を意図するものであり制限するものではないことを理解されたい。本発明の範囲は、従って、上記記載を基準にして決定されるのではなく、以下の添付の特許請求の範囲、さらには、このような請求の範囲が与える等価物の全ての範囲を基準にして決定されるべきである。

【配列表】

2012525348000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/055662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/605
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/147816 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; CHEN LIN [US]; HAN YEUN-KWEI [US]; ROBERTS CHR) 27 December 2007 (2007-12-27) claims 4, 28 sequences 4, 12 page 19, lines 29-31	1-11, 16-18
X	WO 00/34331 A2 (SOD CONSEILS RECH APPLIC [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 15 June 2000 (2000-06-15) claim 9	1-9
X	WO 2004/074315 A2 (SOD CONSEILS RECH APPLIC [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 2 September 2004 (2004-09-02) the whole document	1-9

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 January 2011	14/02/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Herrmann, Klaus

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/055662

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/090496 A1 (LONZA AG [CH]; WERBITZKY OLEG [CH]; VARRAY STEPHANE [CH]; GIRAUD MATTH) 16 August 2007 (2007-08-16) page 13, lines 1-6 page 2, line 28 -----	11,16,18
X	WO 2007/017892 A2 (CADILA HEALTHCARE LTD [IN]; LOHRAY BRAJ BHUSHAN [IN]; LOHRAY VIDYA BHU) 15 February 2007 (2007-02-15) page 7, line 20; sequence 5 page 7, line 23; sequence 10 page 7, line 25; sequence 15 page 9, lines 5-9 -----	12-15,18
X,P	WO 2009/074483 A2 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; CHEN LIN [US]; HAN YEUN-KWEI [US]; ROBERTS CHR) 18 June 2009 (2009-06-18) claim 2b; sequence 6 page 104, lines 2-4 sequence 17 -----	10,15, 17,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/055662

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/055662

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2010/ 055662

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 9(partially)

   A method of making an insulinotropic peptide, comprising the steps defined in claim 1.

   ---

2. claims: 3, 4(completely); 9(partially)

   A method of making an insulinotropic peptide, comprising the steps defined in claim 3.

   ---

3. claims: 5, 6(completely); 9(partially)

   A method of making an insulinotropic peptide, comprising the steps defined in claim 5.

   ---

4. claims: 7, 8(completely); 9(partially)

   A method of making an insulinotropic peptide, comprising the steps defined in claim 7.

   ---

5. claims: 10(completely); 18(partially)

   A peptide of the amino acid sequence (SEQ ID NO. 5) wherein Z is H- or an N-terminal protecting group; X 35 is an achiral, optionally sterically hindered amino acid residue; and one or more residues of the sequence optionally includes side chain protection.

   ---

6. claims: 11, 16(completely); 18(partially)

   A peptide of the amino acid sequence (SEQ ID NO. 7) wherein Z is H- or an N-terminal protecting group; X 35 is an achiral, optionally sterically hindered amino acid residue; and one or more residues of the sequence optionally includes side chain protection.

   ---

7. claims: 12(completely); 18(partially)

   A peptide of the amino acid sequence (SEQ ID NO. 8) wherein X 8 is an achiral, optionally sterically hindered amino acid residues; Z is H- or an N-terminal protecting group; B' is -OH or a solid phase resin; and one or more residues of the sequence optionally includes side chain protection.

   ---

8. claims: 13(completely); 18(partially)

International Application No. PCT/ EP2010/ 055662

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A peptide of the amino acid sequence (SEQ ID NO. 11) wherein B' is -OH or a solid phase resin; Z is H- or an N-terminal protecting group; and one or more residues of the sequence optionally includes side chain protection.

---

9. claims: 14(completely); 18(partially)

A peptide of the amino acid sequence (SEQ ID NO. 12) wherein Z is H- or an N-terminal protecting group; and B' is -OH or a solid phase resin.

---

10. claims: 15(completely); 18(partially)

A peptide of the amino acid sequence (SEQ ID NO. 13) wherein Z is H- or an N-terminal protecting group; B' is -OH or a solid phase resin; X 8 is an achiral, optionally sterically hindered amino acid residues; and one or more residues of the sequence optionally includes side chain protection.

---

11. claims: 17(completely); 18(partially)

A peptide of the amino acid sequence (SEQ. ID NO. 14) wherein Z is H- or an N-terminal protecting group; X 35 is an achiral, optionally sterically hindered amino acid residues; and one or more residues of the sequence optionally includes side chain protection.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/055662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007147816 A1	27-12-2007	AR 061604 A1	10-09-2008
		AT 466881 T	15-05-2010
		AU 2007263043 A1	27-12-2007
		CA 2654610 A1	27-12-2007
		CL 18352007 A1	14-03-2008
		CN 101563364 A	21-10-2009
		DK 2035451 T3	07-06-2010
		EC SP088999 A	30-01-2009
		EP 2035451 A1	18-03-2009
		ES 2341588 T3	22-06-2010
		HR 20100302 T1	30-06-2010
		JP 4537495 B2	01-09-2010
		JP 2009541257 T	26-11-2009
		KR 20090023619 A	05-03-2009
		PT 2035451 E	09-06-2010
		RU 2009101969 A	27-07-2010
		SI 2035451 T1	30-06-2010
		US 2008004429 A1	03-01-2008
		ZA 200810072 A	30-12-2009
WO 0034331 A2	15-06-2000	AT 282635 T	15-12-2004
		AU 762012 B2	19-06-2003
		AU 1973600 A	26-06-2000
		BR 9915961 A	21-08-2001
		CA 2353574 A1	15-06-2000
		CN 1495198 A	12-05-2004
		CN 1329620 A	02-01-2002
		CZ 20011748 A3	13-02-2002
		CZ 295044 B6	18-05-2005
		CZ 295889 B6	16-11-2005
		CZ 295768 B6	12-10-2005
		CZ 295890 B6	16-11-2005
		CZ 295891 B6	16-11-2005
		DE 69922043 D1	23-12-2004
		DE 69922043 T2	24-11-2005
		EP 1137667 A2	04-10-2001
		ES 2230912 T3	01-05-2005
		HK 1037196 A1	24-03-2005
		HU 0104574 A2	29-04-2002
		JP 3702181 B2	05-10-2005
		JP 2002531578 T	24-09-2002
		JP 3934092 B2	20-06-2007
		JP 2004131473 A	30-04-2004
		JP 2005132845 A	26-05-2005
		JP 4386887 B2	16-12-2009
		JP 2006151988 A	15-06-2006
WO 0034331 A2		JP 2008001710 A	10-01-2008
		KR 20050037004 A	20-04-2005
		NO 20012786 A	20-07-2001
		NO 20032093 A	20-07-2001
		NZ 511931 A	30-01-2004
		NZ 527241 A	24-12-2004
		PL 349468 A1	29-07-2002
		PT 1137667 E	28-02-2005
		RU 2214418 C2	20-10-2003
		RU 2288232 C2	27-11-2006
		SG 125915 A1	30-10-2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/055662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		TW 593338 B	21-06-2004
		TW 255271 B	21-05-2006
		US 6903186 B1	07-06-2005
WO 2004074315 A2	02-09-2004	AR 043365 A1	27-07-2005
		AT 455555 T	15-02-2010
		CA 2513307 A1	02-09-2004
		CN 1750842 A	22-03-2006
		EP 1594529 A2	16-11-2005
		EP 2067483 A1	10-06-2009
		ES 2336563 T3	14-04-2010
		HK 1083762 A1	16-04-2010
		JP 2007524579 T	30-08-2007
		TW 283684 B	11-07-2007
WO 2007090496 A1	16-08-2007	AU 2007214088 A1	16-08-2007
		CA 2641053 A1	16-08-2007
		CN 101379075 A	04-03-2009
		EP 1987052 A1	05-11-2008
		JP 2009525997 T	16-07-2009
		KR 20080100448 A	18-11-2008
		US 2009292106 A1	26-11-2009
		ZA 200806690 A	29-07-2009
WO 2007017892 A2	15-02-2007	AU 2006277557 A1	15-02-2007
		CA 2606894 A1	15-02-2007
		EA 200702419 A1	28-04-2008
		EP 1891106 A2	27-02-2008
		JP 2008540402 T	20-11-2008
		KR 20080021636 A	07-03-2008
WO 2009074483 A2	18-06-2009	AR 069608 A1	03-02-2010
		AU 2008334783 A1	18-06-2009
		CA 2707132 A1	18-06-2009
		CN 101903400 A	01-12-2010
WO 2009074483 A2		EP 2222695 A2	01-09-2010
		KR 20100102652 A	24-09-2010
		PE 12142009 A1	14-08-2009
		US 2009292108 A1	26-11-2009

フロントページの続き

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

(72)発明者 チェン, リン
アメリカ合衆国、コロラド ８００２７、スペリオル、ブランカ・ピーク・ドライブ ３６４２
(72)発明者 ハン, ユン－クウェイ
アメリカ合衆国、コロラド ８００２７、ルイスビル、パインハースト・コート ８１６
(72)発明者 ロバーツ, クリストファー・アール
アメリカ合衆国、コロラド ８０５１３、バーサウド、エヌ・カウンティ・ロード ７２１、２７イー

Ｆターム(参考) 4H045 AA10 AA20 DA30 EA20 FA30 FA33