

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-545145

(P2024-545145A)

(43)公表日 令和6年12月5日(2024.12.5)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 1/02 (2006.01)	C 0 7 K 1/02	4 C 0 8 4
C 0 7 K 2/00 (2006.01)	C 0 7 K 2/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
C 0 7 K 14/575 (2006.01)	C 0 7 K 14/575	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全49頁)

(21)出願番号	特願2024-534351(P2024-534351)	(71)出願人	509091848 ノヴォ ノルディスク アー／エス デンマーク、バウスヴェア ディーケー ー 2 8 8 0、ノヴォ アレー 1
(86)(22)出願日	令和4年12月9日(2022.12.9)		
(85)翻訳文提出日	令和6年6月7日(2024.6.7)		
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/085255		
(87)国際公開番号	WO2023/105074	(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87)国際公開日	令和5年6月15日(2023.6.15)		
(31)優先権主張番号	63/288,071	(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(32)優先日	令和3年12月10日(2021.12.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(31)優先権主張番号	22152378.0	(72)発明者	マイケル・リチャード・ハリス
(32)優先日	令和4年1月20日(2022.1.20)		アメリカ合衆国・ワシントン・9 8 1 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		9・シアトル・フェアビュー・アベニュー・ノース・5 3 0・ノヴォ・ノルディスク・リサーチ・センター・シアトル・
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C末端A-アミド化への光化学的アプローチ

(57)【要約】

本発明は、全ての生体関連ペプチドホルモンの最大で半分に相当する化合物のクラスであるC末端α-アミドを製造するための光化学のプロセスに関する。本発明により、大規模製造に好適な、易しく、対象範囲が広く、経済効率の良いプロセスが得られる。

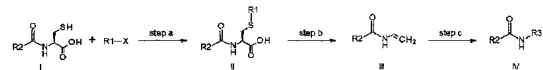


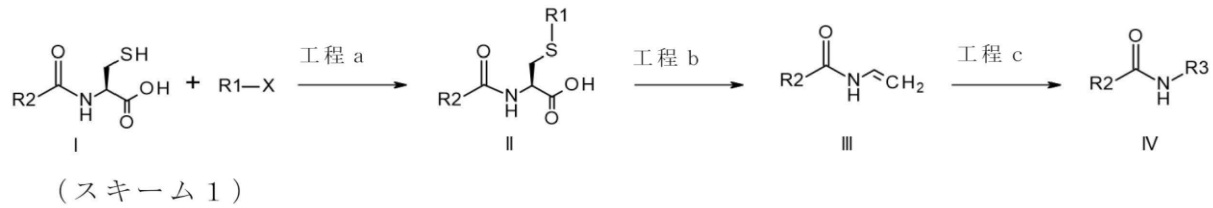
Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スキーム 1 に従って、式 I V の C 末端 α - アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化 1】



10

(式中、R 2 は、ポリペプチドであり、

R 1 - X は、光標識剤であり、R 1 は、光標識であり、X は、脱離基であり、

R 3 は、水素、メチル、およびエチルから成る群から選択される)

工程 (a) . 式 I の C 末端システインアミド化タグを含むペプチドまたはタンパク質を、前記光標識 (R 1) とカップリングして、式 II のペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

工程 (b) . 前記式 II のペプチド-光標識コンジュゲートを照射して、光化学的変換により式 III の C 末端エナミドを得る工程と、

工程 (c) . 得られた前記式 III の C 末端エナミドを切断して、前記式 IV の C 末端 α - アミドを得る工程と、を含む、方法。

20

【請求項 2】

R 3 が、水素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

R 2 が、配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

R 2 が、配列番号 3 ~ 14 および 16 ~ 17 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記光標識剤 (R 1 - X) が、3 - ブロモ - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン、4 - クロロ - 7 - ニトロベンゾフラザン、2 - ブロモ - 1, 4 - ナフトキノン、1 - フルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン、および 4 - フルオロ - 7 - スルファモイルベンゾフラザンから成る群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

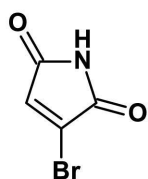
【請求項 6】

前記光標識剤 (R 1 - X) が、3 - ブロモ - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン (化学式 1) または 4 - クロロ - 7 - ニトロベンゾフラザン (化学式 2) :

化学式 1 :

40

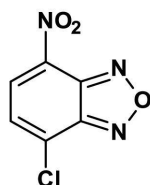
【化 2】



化学式 2 :

50

【化 3】



である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

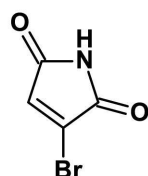
【請求項 7】

前記光標識剤が、3-ブロモ-1H-ピロール-2,5-ジオン（化学式 1）：

10

化学式 1：

【化 4】



である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

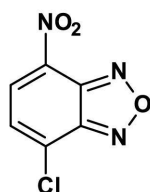
【請求項 8】

20

前記光標識剤が、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン（化学式 2）：

化学式 2：

【化 5】



30

である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法の工程（a）が、水性反応緩衝液中で行われ、前記水性緩衝液が、ビス-トリスメタン、トリス、トリエタノールアミン、およびホスフェートから成る群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、365～500 nm の波長を有する、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法の少なくとも一部が、流通式反応器で実施される、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

工程（b）の前に、前記ペプチド R2 のシステインを前記光標識 R1 とカップリングして、光標識で保護されたシステインを形成する工程と、

工程（b）の後に、前記光標識で保護されたシステインを前記ペプチド R2 から放出する工程と、をさらに含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

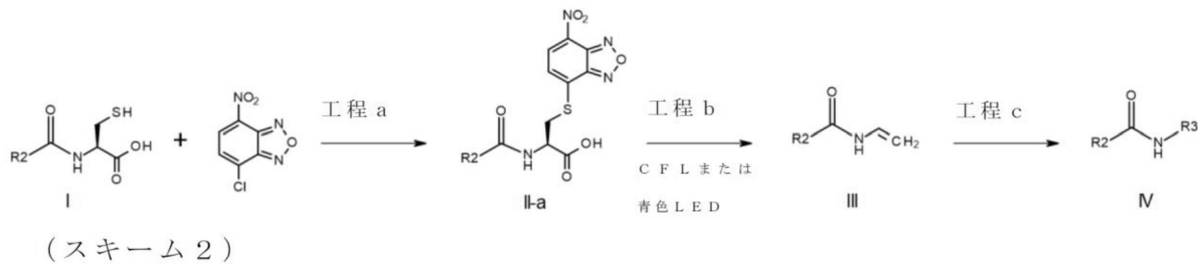
求核性硫化物および酸化パートナーが提供される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

スキーム 2 に従って、式 IV の C 末端 α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生

50

成するための方法であって、
【化 6】



10

(式中、R2は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、R3は、水素である)

工程(a)．式IのC末端システインアミド化タグを含むペプチドまたはタンパク質を、4-クロロ-7-ニトロベンゾフルパザンとカップリングして、式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

工程(b)．式II-aの前記ペプチド-光標識コンジュゲートを、400～450nmの波長を有する光で照射して、光化学的変換により式IIIのC末端エナミドを得る工程と、

工程(c)．式IIIの前記C末端エナミドを切断して、前記式IVのC末端α-アミドを得る工程と、を含む、方法。

20

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項の記載による、医薬組成物を生成する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C末端α-アミドを製造するための光化学的プロセスに関し、より具体的には、光化学的プロセスを用いてC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成する方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

C末端α-アミド化は、全ての生物学的に活性なペプチドホルモンおよび神経ペプチドの半分超で発生し、しばしば完全な生物活性に必要とされる、一般的な翻訳後修飾である。

【0003】

化学的C末端α-アミド化は、C末端の選択的な官能基化を必要とする。アミド化ペプチドの生成は、完全合成アプローチ(非特許文献1)および組み換え発現させたC末端グリシン延長前駆体のインビトロ酵素酸化(非特許文献2)による。しかしながら、これらのアプローチは複雑かつ高価である。例えば、ペプチジルグリシンα-アミド化モノオキシゲナーゼ(PAM)および関連するアミド化酵素は、基質特異的であるだけでなく、哺乳動物培養物中で発現されなければならない、これは製造プロセスにコストを上乗せする。

40

【0004】

Baker et al. は、プロモレイミドを用いたシステインの選択的修飾のための方法を提供し、システインレイミドコンジュゲートの光分解修飾のための方法を開示することを趣旨としている(非特許文献3および非特許文献4)。

【0005】

光分解工程を含む、選択的C末端官能基化およびα-アミド化への酵素的アプローチは、特許文献1および非特許文献5でさらに提示されている。Malins et al. は、その主張によれば、選択的C末端修飾およびα-アミド化への電気化学的アプローチを開示する(非特許文献6)。

50

【0006】

それでも、C末端α-アミドを含むペプチドの製造規模の調製に適合する、低コストかつ選択的であり、拡張可能なプロセスを提供することには、依然として課題がある。常に改善の余地がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】US5580751

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Enzyme Microb. Technol. 16, 450-456 (1994)

【非特許文献2】Nat. Biotechnol. 11, 64-70 (1993)

【非特許文献3】Baker et al., Chem. Commun. 6583-6585 (2009)

【非特許文献4】Baker et al., Org. Biomol. Chem. 14, 455-459 (2016)

【非特許文献5】Int. J. Peptide Protein Res. 41, 169-180 (1993)

【非特許文献6】Malins et al., J. Am. Chem. Soc. 143, 11811-11819 (2021)

【発明の概要】

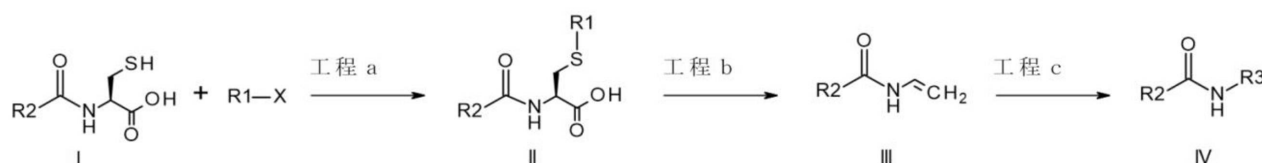
【0009】

本研究の1つの目的は、C末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質の生成のための光化学的プロセスを提供することである。従来のアミド化方法の欠点のうちの少なくともいくつかを克服しながら、様々なペプチドに適用することができる選択的で低コストのC末端ペプチドおよびタンパク質アミド化プロセスを提供することが目的である。

【0010】

総合的な光化学反応を以下のスキーム1に示し、さらに図1に示す。スキーム1に従って、式IVのC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化1】



(式中、R2は、ポリペプチドであり、

R1-Xは、光標識剤であり、R1は、光標識であり、Xは、脱離基であり、

R3は、水素、メチル、およびエチルから成る群から選択される)

工程(a)．C末端システインアミド化タグ(式I)を含むペプチドまたはタンパク質を光標識(R1)とカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲート(式II)を得る工程と、

工程(b)．ペプチド-光標識コンジュゲート(式II)を照射して、光化学的変換によりC末端エナミド(式III)を得る工程と、

工程(c)．C末端エナミド(式III)を切断して、C末端α-アミド(式IV)を得る工程と、を含む、方法が本明細書に開示される。

【0011】

本発明の第 1 の態様では、式 I V の C 末端 α - アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するためのスキーム 1 に従う方法が提供される。これは、C 末端システインアミド化タグ（式 I として示される）を含むペプチドまたはタンパク質から開始し、それを光標識剤（R 1 - X として示される）と反応させて、ペプチド-光標識コンジュゲート（式 I I）を得ることによって達成される。続いて、ペプチド-光標識コンジュゲートを光に曝し、光化学的変換を受けさせて、ペプチドまたはタンパク質エナミド（式 I I I）を得た後、結果として得られる C 末端 α - アミド（式 I V）に変換する。

【0012】

C 末端 α - アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法は、3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオン、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン、2-ブロモ-1, 4-ナフトキノン、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン、および 4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザンから成る群から選択される光標識剤（R 1 - X）を含んでもよい。C 末端 α - アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法は、トリフルオロ酢酸（TFA）、塩酸（HCl）、硫酸（H₂SO₄）、トシル酸（TsOH）、リン酸（H₃PO₄）、シュウ酸、3, 6-ジフェニル-1, 2, 4, 5-テトラジン、および 6, 6' - (1, 2, 4, 5-テトラジン-3, 6-ジイル) ジニコチン酸から成る群から選択される切断試薬の使用を含んでもよい。

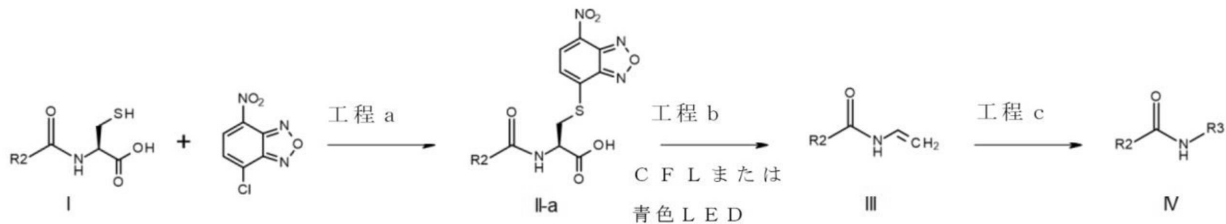
【0013】

C 末端 α - アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法は、配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、または 17 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド R 2 を含んでもよい。

【0014】

以下に見られ、さらに図 2 に示されるスキーム 2 に従う、C 末端 α - アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化 2】



（式中、R 2 は、ポリペプチドであり、

R 3 は、水素である）

工程（a）．C 末端システインアミド化タグ（式 I）を含むペプチドまたはタンパク質を、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンとカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲート（式 I I - a）を得る工程と、

工程（b）．ペプチド-光標識コンジュゲート（式 I I - a）を照射して、光化学的変換により C 末端エナミド（式 I I I）を得る工程と、

工程（c）．C 末端エナミド（式 I I I）を切断して、C 末端 α - アミド（式 I V）を得る工程と、を含む、方法。

【0015】

第 2 の態様による本発明は、式 I の C 末端システインを含むペプチドまたはタンパク質を光標識剤としての 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンと反応させて、式 I I - a のペプチド-光標識コンジュゲートを得ることによって行われる。続いて、コンジュゲートを光化学反応によって式 I I I のエナミドに変換し、これを切断によって式 I V の所望の C 末端 α - アミドに変換する。

【0016】

C末端 α -アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法は、照射（工程（b））前にペプチドR2のシステインを光標識R1とカップリングして光標識で保護されたシステインを形成する工程と、照射（工程（b））後に光標識で保護されたシステインをペプチドR2から放出する工程と、をさらに含んでもよい。本方法は、光標識で保護されたシステインをペプチドR2から放出するために、求核性硫化物を加える工程をさらに含んでもよい。

【0017】

本光化学的アミド化法は、易しく、対象範囲が広く、経済効率が良く、大規模な製造に好適である。本発明は、例示的な実施形態の開示から明らかとなるさらなる問題も解決し得る。

【0018】

配列表

配列番号1は、C末端システインの直前のR2（スキーム1または2）として提供され得る非限定的で例示的なペプチドのアミノ酸配列を表し、光アミド化プロセス（すなわち、スキーム1および2の式I）の前のペプチドの最後から二番目のアミノ酸（ポリペプチドのN末端からC末端）は、変化し得、

配列番号2は、R2（スキーム1または2）を形成することができるペプチドの例示的な実施形態のアミノ酸配列を表し、

配列番号3は、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）ペプチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号4は、パンクレアスタチン（PST）阻害剤、より具体的には、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8（PSTi8）ペプチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号5は、胰pYY（3-36）ペプチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号6は、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）作動薬を生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号7は、ガストリン放出ペプチド（GRP）ペプチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号8は、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、より具体的には、コシントロピンを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号9は、QRF-アミドペプチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号10は、GLP-1受容体-神経ペプチドY受容体2共作動薬EP45を生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号11は、侵入阻害剤、より具体的には、ブレビルチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号12は、オステオクリン（OSTN）ペプチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号13は、抗レトロウイルス薬剤、より具体的には、エンフビルチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号14は、アミリン受容体作動薬、より具体的には、プラムリンチドを生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号15は、R2（スキーム1または2）として提供され得る非限定的で例示的なペプチドのアミノ酸配列を表し、これについて、ジスルフィド結合がその中に所望され、

配列番号16は、GLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬を生成するための出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

配列番号17は、GLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬を生成するための、アミド化およびN末端延長部用のペプチドから成る出発材料のペプチド部分（R2）のアミノ酸配列を表し、

10

20

30

40

50

配列番号 18 は、ペプチド部分 (R2) の一部を形成し得る例示的な N 末端延長部のアミノ酸配列を表す。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、C末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を製造するための光化学的プロセスの総合的な反応 (スキーム1) を示す。

【図2】図2は、C末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を製造するための光化学的プロセスの反応 (スキーム2) の実施形態を示し、クロロ-7-ニトロベンゾフラゼンが光標識剤として使用される。

【発明を実施するための形態】

【0020】

治療用製品、例えば、アミリンペプチド (Cooper et al., G. J. S. Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9662-9666 (1989))、NPY (Rivier et al., Synthesis and hypertensive activity of neuropeptide Y fragments and analogues with modified N- or C-termini or D-substitutions. J. Med. Chem. 32, 597-601 (1989))、および他のもの (Nuss et al., The current state of peptide drug discovery: back to the future? J. Med. Chem. 61, 1382-1414 (2018)) の構造活性研究により、C末端アミド化が完全な生物活性にしばしば必要とされることが明らかとなった。しかしながら、C末端α-アミドを含むペプチドの製造規模の調製は、特に困難である。このため、C末端アミドを含むペプチドを製造するための選択的かつ低コストであり、拡張可能な半組み換え技術が必要とされている。

【0021】

本発明は、C末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を製造するための光化学的プロセスに関する。本方法は、C末端α-アミドを有する多種多様な生物学的に活性なペプチドを生成するために利用され得るように、対象範囲が広いという利点を提供する。明らかとなるように、本明細書に開示のC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を製造するためのプロセスは、タンパク質の特定のペプチド (R2) に縛られず、光化学的プロセスにおけるその目的を考慮して、本明細書ではC末端システインアミド化タグと呼ばれ得るC末端システインを介した広範なペプチドまたはタンパク質のアミド化のための方法を提供する。本方法は、ペプチドおよびタンパク質のC末端アミド化を、ペプチドおよびタンパク質がその中に2つ以上のシステイン (すなわち、C末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質の製造に使用するC末端システインアミド化タグに加えた、ペプチドR2内のシステイン) を含む場合でも可能にするのに十分に特異的である。同様に、または代替として、本発明の別の利点は、本方法が、容易にかつ商業的に入手可能な出発材料および単純な反応セットアップに起因して、経済効率が良いことであり、これにより、プロセスが、バッチ製造または流通製造に好適となり、大規模製造の役に立つようになる。

【0022】

本発明は、C末端システイン残基 (式I) を含むペプチドまたはタンパク質から開始し、それを光標識剤 (R1-X) と反応させてペプチド-光標識コンジュゲート (式II) を得た後、ペプチド-光標識コンジュゲートを光に曝露してペプチドまたはタンパク質エナミド (式III) を得て、次いで得られたエナミドをC末端α-アミド (式IV) に変換することによって、スキーム1 (図1) に示されるように行われる。

【0023】

10

20

30

40

50

上記の光化学的アミド化反応は、3つの一般的な反応工程：

工程（a）：C末端システイン残基（式I）を含むペプチドまたはタンパク質を光標識剤（R1-X）とカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲート（式II）を得る工程と、

工程（b）：得られたペプチド-光標識コンジュゲート（式II）を光化学的に変換して、C末端エナミド（式III）を得る工程と、

工程（c）：C末端エナミド（式III）を切断して、C末端α-アミド（式IV）を得る工程と、に分けられる。

【0024】

これらの工程（a）、（b）、および（c）はまた、スキーム1に、およびスキーム2の例示的な実施形態内に概して示される。各工程は、以下に定義されるように、それ自体の反応物質および条件を特徴とし得る。

【0025】

本明細書に開示のC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を製造するためのプロセスは、生物学的に活性なペプチドの合成の様々な戦略的時点で実施され得ることが理解される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示のC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を製造するためのプロセスは、例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）濾過などの濾過工程の前に、追加のライゲーション工程の前に、および／またはペプチド延長部の切断の前に、前駆体を含むがこれらに限定されない中間生成物に対して使用することができる。ここでの延長部という用語は、例えば前駆体の場合にあり得るような、所望のペプチドのN末端から延長する少なくとも1つのアミノ酸を指す。こうしたペプチドR2は、以下の構造を有してもよい。

【0026】

（延長部）-（所望のペプチド）

こうした実施形態では、組み合わせられた延長部と所望のペプチドとは、本開示の光化学的プロセス中にペプチドR2の一部を形成し、延長部は、後続の工程でペプチドR2から切断されることを意味し得る。

【0027】

生物学的に活性なペプチドの合成の早い段階で光化学的アミド化プロセスを進めることは有利であると考えられ得る。本明細書に記載の光化学方法による大規模なC末端アミド化は、最終活性医薬成分に辿り着くために必要なプロセス工程の完了を必要とするかなり前に行うことができ、合成のプロセスにおいて使用された材料および／または投資された労働力の観点から、よりコストがかかり得る下流中間生成物の損失を最小化することができる。

【0028】

本光化学的アミド化反応は、例示的な実施形態の開示から明らかになるさらなる問題も解決し得る。

【0029】

以下において、ギリシャ文字は、それらの記号または対応する記述名称によって表されてもよく、例えば、αはアルファであり、βはベータであり、εはイプシロンであり、γはガンマであり、ωはオメガであるといった具合である。また、μのギリシャ文字は「u」によって表されてもよく、例えば、μLはuLであるか、またはμMはuMである。

【0030】

一般的な反応工程

工程（a）-C末端システイン残基（式I）を含むペプチドまたはタンパク質を光標識剤（R1-X）とカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲート（式II）を得る

光化学的アミド化反応の第1の工程（工程（a））は、C末端システイン残基（式Iとも呼ばれる）を含むペプチドまたはタンパク質を光標識（R1）とカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲート（式IIとも呼ばれる）を得ることと呼ばれてもよい。

【0031】

10

20

30

40

50

C末端システイン残基（式I）

式Iは、ポリペプチド部分（R2）およびC末端システイン（Cys）残基を含むペプチドまたはタンパク質である。ポリペプチド部分R2はまた、タンパク質またはペプチドとも呼ばれる場合がある。式Iの化合物は、C末端システイン（Cys）アミド化タグを有するペプチドと呼ばれてもよい。式Iの化合物はまた、ポリペプチド、またはC末端システイン（Cys）残基を含むポリペプチドとも呼ばれる場合がある。C末端システイン残基は、対応するペプチドまたはタンパク質のC末端で置換されたアミノ酸システインの残基であってもよい。

【0032】

R2に言及するとき、これは、C末端システインアミド化タグを含まず、最終的に本方法による式IVに従ってC末端アミドが提供されることになる、式Iのペプチドまたはタンパク質のポリペプチド部分として理解される。

【0033】

本明細書に開示の光化学反応は、最後から二番目のアミノ酸が異なるペプチドに対して試験されている（実施例3、表4、エントリー1～20）。この目的で、最後から二番目のアミノ酸が異なる配列IWTKDHEEVYEX（配列番号1）を有する例示的なペプチドR2（配列番号1のR2がスキーム1の式Iの一部を形成するとき、C末端はシステインアミド化タグである）を提供した。一実施形態では、XはAlaである。一実施形態では、XはAspである。一実施形態では、XはGluである。一実施形態では、XはPheである。一実施形態では、XはGlyである。一実施形態では、XはHisである。一実施形態では、XはIleである。一実施形態では、XはLysである。一実施形態では、XはLeuである。一実施形態では、XはMetである。一実施形態では、XはAsnである。一実施形態では、XはProである。一実施形態では、XはGlnである。一実施形態では、XはArgである。一実施形態では、XはSerである。一実施形態では、XはThrである。一実施形態では、XはValである。一実施形態では、XはTrpである。一実施形態では、XはTyrである。例えば、IWTKDHEEVYEX（配列番号1）のXがアラニン（Ala）である場合、得られるペプチドR2は、IWTKDHEEVYEA（配列番号2）であり、本出願の光化学的アミド化反応を受けた後にアミドと同じアミノ酸配列を有するペプチドを形成する。

【0034】

光化学的アミド化反応は、生物学的に活性なペプチドの異なる中間体（実施例5、表5、エントリー1～12に示されるとおり）、より具体的には、所与の生物学的に活性なペプチドのアミド化された前駆体を調製するためにさらに使用されている。いくつかの実施形態では、R2は、配列番号3～14および16～17のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、R2は、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、および17のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列であってもよい。いくつかの実施形態では、R2は、配列番号3、4、5、16、および17のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列であってもよい。いくつかの実施形態では、R2は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0035】

いくつかの実施形態では、本光化学的アミド化反応を使用して、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）ペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、プラムリンチド（Symlin（商標）中の活性医薬成分）などのアミン受容体作動薬またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（GIP）ペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、チルゼパチドなどのGIPおよびGLP-1受容体共作動薬またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、ウロコルチン-2（UCN2）ペプチドなどのコルチコトロピン放出因

10

20

30

40

50

子（CFR）ペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、膵pYY（3-36）ペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8（PSTi8）ペプチドなどのパンクレアスタチン（PST）阻害剤またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）作動薬またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、ガストリン放出ペプチド（GRP）ペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、コシントロピン（Cortrosyn（商標）の活性医薬成分）などの副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、QRF-アミドペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、EP45などのGLP-1受容体-神経ペプチドY受容体2共作動薬またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、プレビルチド（Hepcludex（商標）の活性医薬成分）などの侵入阻害剤またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、オステオクリン（OSTN）などのナトリウム利尿ペプチドまたはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、エンフビルチドなどの抗レトロウイルス薬剤またはその前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、GLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬またはその前駆体、例えば、配列番号16または17によって表されるものを調製してもよい。

10

20

30

40

50

【0036】

本光化学的アミド化反応を使用して、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）ペプチド、プラムリンチド（Symlin（商標）の活性医薬成分）などのアミリン受容体作動薬、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（GIP）ペプチド、チルゼパチドなどのGLP-1受容体共作動薬、ウロコルチン-2（UCN2）ペプチドなどのコルチコトリピン放出因子（CFR）ペプチド、膵pYY（3-36）ペプチド、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8（PSTi8）ペプチドなどのパンクレアスタチン（PST）阻害剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）作動薬、ガストリン放出ペプチド（GRP）ペプチド、コシントロピン（Cortrosyn（商標）の活性医薬成分）などの副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、QRF-アミドペプチド、EP45などのGLP-1受容体-神経ペプチドY受容体2共作動薬、プレビルチド（Hepcludex（商標）の活性医薬成分）などの侵入阻害剤、オステオクリン（OSTN）ペプチドなどのナトリウム利尿ペプチド、エンフビルチドなどの抗レトロウイルス薬剤、および配列番号16のアミノ酸配列を含むものなどのGLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬、またはその前駆体を調製してもよい。

【0037】

本光化学的アミド化反応を使用して、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）ペプチド、プラムリンチド（Symlin（商標）の活性医薬成分）などのアミリン受容体作動薬、膵pYY（3-36）ペプチド、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8（PSTi8）ペプチドなどのパンクレアスタチン（PST）阻害剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）作動薬および拮抗薬、ガストリン放出ペプチド（GRP）ペプチド、コシントロピン（Cortrosyn（商標）の活性医薬成分）などの副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、QRF-アミドペプチド、EP45などのGLP-1受容体-神経ペプチドY受容体2共作動薬、プレビルチド（Hepcludex（商標）の活性医薬成分）などの侵入阻害剤、オステオクリン、エンフビルチドなどの抗レトロウイルス薬剤、ならびに配列番号16のアミノ酸配列を含むものなどのGLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬、またはその前駆体を調製してもよい。

【0038】

本光化学的アミド化反応を使用して、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）ペプチド、膵pYY（3-36）ペプチド、パンクレアスタチン阻害剤（PST）、例えば、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8（PSTi8）ペプチド、GLP-1受容体-アミ

リン受容体共作動薬、例えば、配列番号 16 のアミノ酸配列を含むもの、またはその前駆体を調製してもよい。

【0039】

本光化学的アミド化反応を使用して、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ペプチド、膵 pYY (3-36) ペプチド、および GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬、例えば、配列番号 16 のアミノ酸配列を含むもの、またはその前駆体を調製してもよい。

【0040】

本明細書に開示の GLP-1 ペプチドの調製には、天然のヒト GLP-1 (7-36) -アミド (例えば、開始ペプチド R2 は、GLP-1 (7-36)、配列番号 3 であってもよい) およびその類似体 (GLP-1 類似体) が含まれる。本光化学的アミド化反応を使用して、GLP-1 (7-36) -アミドを調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬を調製してもよい。本明細書に開示の GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬の調製は、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む共作動薬の調製を含む。

【0041】

本光化学的アミド化反応のいくつかの実施形態では、R2 は、GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬またはアミリン受容体共作動薬などの生物活性ペプチド生成物の前駆体に対応する配列を含んでもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列から成る GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬前駆体を調製してもよい。本光化学的アミド化反応を使用して、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列から成る GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬前駆体を調製してもよい。

【0042】

本光化学的アミド化反応のいくつかの実施形態では、R2 は、N 末端延長部を有するペプチドであってもよい。延長部は、アミノ酸のいずれの組み合わせであってもよい。延長部は、1~60 アミノ酸であってもよい。延長部は、1~50 アミノ酸であってもよい。延長部は、1~40 アミノ酸であってもよい。延長部は、1~20 アミノ酸であってもよい。延長部は、1~15 アミノ酸であってもよい。延長部は、5~15 アミノ酸であってもよい。延長部は、14 アミノ酸であってもよい。

【0043】

いくつかの実施形態では、光化学的アミド化反応を使用して、N 末端延長部を有する GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬前駆体を調製してもよい。いくつかの実施形態では、R2 は、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と、任意のタイプの N 末端延長部とを有するペプチドであってもよい。R2 は、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有する任意のタイプの N 末端延長部を有するペプチドであってもよい。R2 は、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有する N 末端延長部とを有するペプチドであってもよい。R2 は、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。

【0044】

光化学的アミド化反応のいくつかの実施形態では、R2 は、配列番号 3~14、16~17 のいずれか 1 つのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含んでもよい。R2 は、配列番号 3~14、16 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列と、N 末端延長部とを含んでもよい。R2 は、配列番号 3~14、16~17 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列であってもよい。R2 は、配列番号 3~14、16 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列と、N 末端延長部と、であってもよい。

【0045】

光化学的アミド化反応のいくつかの実施形態では、C 末端システイン残基 (式 I) を含むペプチドまたはタンパク質は、光標識剤 (R1-X) と反応してもよい。別の実施形態

10

20

30

40

50

では、式 I の化合物は、光標識 (R 1) にカップリングされてもよい。

【0046】

光標識剤 (R 1 - X)

光標識剤 (本明細書では R 1 - X としても特定される) は、光励起性部分を含み、ペプチドにカップリングすることができる化合物として定義されてもよい。光標識剤 (R 1 - X) は、光化学反応を受けることができる化合物として定義されてもよい。

【0047】

光標識剤 (R 1 - X) は、R 1 として本明細書で定義される光標識、および X として本明細書で定義される脱離基を含む。本明細書では、光標識 (R 1) は、本明細書に記載の条件下でペプチドまたはタンパク質を光標識剤 (R 1 - X) と反応させることによって、C 末端システイン (式 I) を含むペプチドまたはタンパク質にカップリングされてもよい。

10

【0048】

光化学的アミド化反応の一実施形態では、光標識剤 (R 1 - X) は、3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオン、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン、2-ブロモ-1, 4-ナフトキノン、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン、および 4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザンから成る群から選択されてもよい。

【0049】

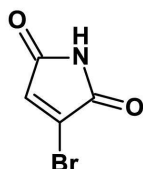
3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオンはまた、2-ブロモマレイミドとも呼ばれる場合があり、化学式 1 として定義されてもよい。

20

【0050】

化学式 1 :

【化 3】



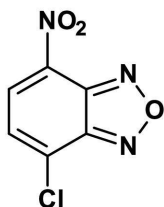
4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンはまた、NBD-CI と呼ばれる場合があり、化学式 2 として定義されてもよい。

30

【0051】

化学式 2 :

【化 4】



40

いくつかの実施形態では、光標識剤 (R 1 - X) は、3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオン (化学式 1) または 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン (化学式 2) であってもよい。光標識剤 (R 1 - X) は、3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオン (化学式 1) であってもよい。光標識剤 (R 1 - X) は、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン (化学式 2) であってもよい。

【0052】

いくつかの実施形態では、ペプチド (式 I) に対して 1 ~ 5 当量の光標識剤 (R 1 - X) が提供されてもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド (式 I) に対して 1 ~ 3 当量の光標識剤 (R 1 - X) が提供されてもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド (式 I

50

）に対して 1.5 ～ 2.5 当量の光標識剤（R1-X）が提供されてもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド（式 I）に対して 1.8 ～ 2.2 当量の光標識剤（R1-X）が提供されてもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド（式 I）に対して約 2 当量の光標識剤（R1-X）が提供されてもよい。

【0053】

C 末端システイン残基を含むペプチドまたはタンパク質の光標識剤との反応条件

本光化学的アミド化反応の工程（a）は、水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応は、ビスートリスメタン（ビスートリスと呼ばれてもよい）、トリス、トリエタノールアミン、およびホスフェートから成る群から選択される水性緩衝液などの水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 4 ～ 9 の水性緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 4 ～ 9 の水性緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 6 ～ 8 の水性緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 6 ～ 8 のビスートリスメタンを含む水性緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 6 ～ 7 の水性緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 6 ～ 7 のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、pH 6.3 ～ 7 の水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 6.3 ～ 7 のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 6.4 の水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 6.4 のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 6.3 のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 7 のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 6.4 の約 25 mM のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 pH 6.3 の 25 mM のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。

10

20

【0054】

本光化学的アミド化反応の工程（a）は、グリシンを有する水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 50 mM のグリシンを有する水性反応緩衝液中で行われてもよい。

30

【0055】

別の実施形態では、本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 50 mM のグリシンを有する約 pH 6.4 の約 25 mM のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 50 mM のグリシンを有する約 pH 6.3 の約 25 mM のビスートリスメタンを含む水性反応緩衝液中で行われてもよい。

【0056】

いくつかの実施形態では、本光化学的アミド化反応の工程（a）は、本明細書では 15 ～ 25 °C と定義される室温で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、4 ～ 80 °C の温度で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、10 ～ 60 °C の温度で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、10 ～ 40 °C の温度で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、10 ～ 30 °C の温度で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、15 ～ 30 °C の温度で行われてもよい。本光化学的アミド化反応の工程（a）は、約 20 °C の温度で行われてもよい。

40

【0057】

界面活性剤は、光化学的変換の前に反応緩衝液に加えられてもよい（以下の工程（b）で説明する）。この界面活性剤は、光標識中間体の溶解度を改善するために使用されてもよい。例えば、ジスルフィド含有ペプチドとの反応に関して以下で考察するように、界面活性剤は、NBD-C1 光標識剤を使用してペプチド（R2）内の全てのシステインを全体的にアルキル化する場合、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン（NBD-C1、化

50

学式 2) アルキル化中間体の溶解度を改善し得る。

【0058】

いくつかの実施形態では、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、デスオキシコール酸ナトリウム (SDC)、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート (CHAPS)、オクチルフェノールエトキシレート (Triton (商標) X-100、ThermoFisher Scientific カタログ番号 28314、85111、85112)、ポリソルベート 20 (Tween-20、ThermoFisher Scientific カタログ番号 28320、85113、85115)、水酸化テトラプロピルアンモニウム (TAPH-40)、およびオクタン酸ナトリウムから成る群から選択される界面活性剤を、反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、デスオキシコール酸ナトリウム (SDC) を反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート (CHAPS) を反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、オクタン酸ナトリウムを反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、オクチルフェノールエトキシレート (Triton (商標) X-100、ThermoFisher Scientific カタログ番号 28314、85111、85112) を反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、ポリソルベート 20 (Tween-20、ThermoFisher Scientific カタログ番号 28320、85113、85115) を反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、水酸化テトラプロピルアンモニウム (TAPH-40) を反応緩衝液に加えてもよい。

10

20

【0059】

界面活性剤は、40~80 mM の濃度で反応緩衝液に加えてもよい。界面活性剤は、50~70 mM の濃度で反応緩衝液に加えてもよい。界面活性剤は、55~65 mM の濃度で反応緩衝液に加えてもよい。界面活性剤は、約 60 mM の濃度で反応緩衝液に加えてもよい。いくつかの実施形態では、界面活性剤を反応緩衝液に加えない場合がある。

【0060】

工程 (b) - 得られたペプチド-光標識コンジュゲート (式 II) を光化学的に変換して、C 末端エナミド (式 III) を得る

30

反応の第 2 の工程 (工程 (b)) は、コンジュゲート (式 II と呼ばれる) の C 末端エナミド (式 III と呼ばれる) への光化学的変換と呼ばれてもよい。工程 (b) はまた、C 末端エナミドを得るためのペプチド-光標識コンジュゲートの変換とも呼ばれる場合がある。いくつかの実施形態では、ペプチド-光標識コンジュゲートは、コンジュゲートと呼ばれてもよい。

【0061】

工程 (b) の光化学的変換は、式 II のペプチド-光標識コンジュゲートを光に供することによって得られてもよい。別様に述べると、工程 (b) の光化学的変換は、ペプチド-光標識コンジュゲートを照射することによって得られてもよい。式 II のコンジュゲート上に照らされた光は、光標識によって吸収され、本明細書では概して光化学的変換と呼ばれ得る光によって促進される化学反応をもたらす、最終的に式 III の C 末端エナミドを形成し得る。工程 (b) の光化学的変換は、C 末端のラジカル脱炭酸による光分解切断と呼ばれてもよい。式 III のエナミドは、一置換であると言える。

40

【0062】

この光化学的変換の有効波長は、a 部において C 末端システイン残基 (式 I) にカップリングされた光標識 R1 に基づいて変化し得ることが理解される。さらに、光化学的反応を起こすのに望ましい光スペクトルを生成するために、様々な光源を使用できることが理解される。光源は、蛍光灯、発光ダイオード、水銀ランプ、レーザーなどから選択されてもよい。いくつかの実施形態では、光源は、日光によって提供される光などの周囲光であってもよい。いくつかの実施形態では、光源は、電球型蛍光灯 (CFL) であっ

50

てもよい。光源は、発光ダイオード（LED）であってもよい。LEDは、単色LEDであってもよい。いくつかの実施形態では、式IIのコンジュゲートを均一に光に照射するために、2つ以上の光源を使用してもよい。光源は、2つ以上のCLFであってもよい。光源は、2つ以上のLEDであってもよい。光源は、コンジュゲートを照射するように均一に配設された一連のLEDであってもよい。光源は、LEDのアレイであってもよく、これは、一列に配設された場合、LEDのストリップと呼ばれ得る。

【0063】

提供される光は、白色光であってもよい。提供される光の波長は、可視光スペクトル内であってもよい。提供される光の波長は、300～700nmであってもよい。提供される光の波長は、365～550nmであってもよい。提供される光の波長は、365～500nmであってもよい。提供される光の波長は、365～450nmであってもよい。提供される光の波長は、約365nmであってもよい。提供される光の波長は、400～500nmであってもよい。提供される光の波長は、400～470nmであってもよい。提供される光の波長は、400～450nmであってもよい。提供される光の波長は、405～430nmであってもよい。提供される光の波長は、365nmであってもよい。提供される光の波長は、405nmであってもよい。提供される光の波長は、430nmであってもよい。提供される光の波長は、450nmであってもよい。光源は、365nmの波長を有する光を提供するLEDであってもよい。光源は、白色光を提供するCFLであってもよい。光源は、405nmの波長を有する光を提供するLEDであってもよい。光源は、430nmの波長を有する光を提供するLEDであってもよい。光源は、450nmの波長を有する光を提供するLEDであってもよい。光源は、365nmの波長を有する光を提供する単色LEDのアレイであってもよい。光源は、405nmの波長を有する光を提供する単色LEDのアレイであってもよい。光源は、430nmの波長を有する光を提供する単色LEDのアレイであってもよい。光源は、450nmの波長を有する光を提供する単色LEDのアレイであってもよい。

【0064】

当然のことながら、単一の波長が本明細書で言及されるとき、当該波長を概して中心とするスペクトル幅を有する光のスペクトルに対する言及がなされる。例えば、光源によって提供される光が405nmの波長である場合、これは、405nmの波長の光に厳密に限定されるものとして解釈されるべきではなく、405nmの波長を包含する所与の幅を有するスペクトルに向けられることが理解される。405nmの波長を有する光の場合、および例えば50nmの半値全幅（FWHM）については、コンジュゲートを照射する有効波長は、380～430nmに延びることが理解される。

【0065】

光源は、光源の一部を形成するとみなされ得る、高域フィルター、低域フィルター、および／またはバンドギャップフィルターなどのスペクトルフィルターと組み合わせられてもよく、コンジュゲートを照射するスペクトル範囲をさらに制限してもよい。

【0066】

いくつかの実施形態では、光のスペクトル幅は、50nmのFWHMを有してもよい。光のスペクトル幅は、40nmのFWHMを有してもよい。光のスペクトル幅は、30nmのFWHMを有してもよい。光のスペクトル幅は、20nmのFWHMを有してもよい。光のスペクトル幅は、10nmのFWHMを有してもよい。

【0067】

ペプチド-光標識コンジュゲート（式II）を光化学的に変換してC末端エナミド（式III）を得るための反応条件は、上記工程（a）でC末端システイン残基（式I）を含むペプチドまたはタンパク質を光標識剤（R1-X）とカップリングしてペプチド-光標識コンジュゲート（式II）を得るために提供される条件に対応してもよい。例えば、工程（b）は、工程（a）と同じ水性反応緩衝液中で行われてもよい。同様に、工程（b）は、工程（a）の温度に対応する温度で行われてもよい。

【0068】

工程 (c) - C 末端エナミド (式 I I I) を切断して、C 末端 α -アミド (式 I V) を得る

反応の三番目であり最後の工程 (工程 (c)) は、C 末端 α -アミド (式 I V と呼ばれる) を得るための得られた C 末端エナミド (式 I I I と呼ばれる) の切断と呼ばれてもよい。いくつかの実施形態では、切断は、C 末端エナミドの変換と呼ばれてもよい。C 末端エナミドは、エナミドと呼ばれてもよい。C 末端 α -アミドは、C 末端アミドと呼ばれてもよい。

【0069】

エナミドの C 末端 α -アミドへの切断は、異なる切断方法を使用してもよい。切断は、酸分解を使用してもよい。いくつかの実施形態では、切断は、強酸として分類され得る酸を用いた酸分解を使用してもよく、ここで、強酸は、 pK_a が 4 以下の酸として定義される。いくつかの実施形態では、切断試薬は、 pK_a が 4 以下であってもよい。いくつかの実施形態では、切断試薬は、 pK_a が 3 以下であってもよい。いくつかの実施形態では、切断は、弱酸 (すなわち、 pK_a が 4 超の酸) を用いた酸分解を使用して、酸分解を加速させるためにルイス酸を加えて行われてもよい。

【0070】

切断は、逆電子要請型 *Diels-Alder* (IEDDA) を使用してもよい。いくつかの実施形態では、エナミドは、酸媒介性加水分解によって切断されてもよい。エナミドは水素化されてもよい。エナミドは、酸触媒性加水分解、酸化剤媒介性加水分解によって、または逆電子要請型 *Diels-Alder* 反応によって切断されてもよい。エナミドは、酸触媒性加水分解によって、または酸化剤媒介性加水分解によって切断されてもよい。エナミドは、酸化剤媒介性加水分解によって切断されてもよい。エナミドは、逆電子要請型 *Diels-Alder* 反応によって切断されてもよい。

【0071】

いくつかの実施形態では、ビニルアミドが、N-エチルアミドに還元されてもよい。いくつかの実施形態では、ビニルアミドは、チオール-エン反応などのコンジュゲーションに使用され得る。

【0072】

いくつかの実施形態では、添加剤が工程に加えられてもよい。添加剤は、メチオニン、インドール、またはカフェイン酸から成る群から選択されてもよいが、これらに限定されない。

【0073】

エナミド切断の反応条件

上で示したように、異なる切断方法は、異なる切断試薬および温度などの異なる反応条件を必要とし得る。いくつかの実施形態では、切断試薬は、式 I I I の中間体との反応に加えられる。

【0074】

反応条件のいくつかの変数は、工程 (a)、(b)、および (c) 全体を通して一定に保たれ得ることが理解される。例えば、いくつかの実施形態では、光化学的アミド化反応は、一定の温度で行われる。他の実施形態では、温度は、工程 (a)、(b)、および/または (c) の間で変化してもよい。他の実施形態では、工程 (a)、(b)、および/または (c) での光化学的反応の条件は、互いに異なってもよい。

【0075】

いくつかの実施形態では、切断試薬は、トリフルオロ酢酸 (TFA)、塩酸 (HCl)、硫酸 (H_2SO_4)、トシル酸 (TsOH)、リン酸 (H_3PO_4)、シュウ酸、3, 6-ジフェニル-1, 2, 4, 5-テトラジン、および 6, 6'-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3, 6-ジイル) ジニコチン酸から成る群から選択されてもよい。切断試薬は、トリフルオロ酢酸 (TFA)、塩酸 (HCl)、硫酸 (H_2SO_4)、トシル酸 (TsOH)、リン酸 (H_3PO_4)、シュウ酸、および 6, 6'-(1, 2, 4, 5-テトラ

10

20

30

40

50

ジン-3, 6-ジイル) ジニコチン酸から成る群から選択されてもよい。切断試薬は、トリフルオロ酢酸 (TFA)、塩酸 (HCl)、硫酸 (H_2SO_4)、トシル酸 (TsOH)、および6, 6'-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3, 6-ジイル) ジニコチン酸から成る群から選択されてもよい。切断試薬は、トリフルオロ酢酸 (TFA) であってもよい。切断試薬は、塩酸 (HCl) であってもよい。切断試薬は、硫酸 (H_2SO_4) であってもよい。切断試薬は、リン酸 (H_3PO_4) であってもよい。切断試薬は、トシル酸 (TsOH) であってもよい。切断試薬は、6, 6'-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3, 6-ジイル) ジニコチン酸であってもよい。

【0076】

いくつかの実施形態では、切断試薬は、2~8% v/vのトリフルオロ酢酸 (TFA) であってもよい。切断試薬は、4~6% v/vのトリフルオロ酢酸 (TFA) であってもよい。切断試薬は、5% v/vのトリフルオロ酢酸 (TFA) であってもよい。

10

【0077】

いくつかの実施形態では、切断試薬は、0.5~2Mのリン酸 (H_3PO_4) であってもよい。切断試薬は、0.5~1.5Mのリン酸 (H_3PO_4) であってもよい。切断試薬は、0.7~1.3Mのリン酸 (H_3PO_4) であってもよい。切断試薬は、0.8~1.2Mのリン酸 (H_3PO_4) であってもよい。切断試薬は、約1Mのリン酸 (H_3PO_4) であってもよい。

【0078】

いくつかの実施形態では、エナミド切断は、0~80℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、20~60℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、20~40℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、30~40℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、37℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、20~26℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、20~23℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、約20℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、約23℃の温度で実施されてもよい。エナミド切断は、室温で実施されてもよく、室温は、周囲温度とも呼ばれる場合がある。

20

【0079】

反応条件は、反応が行われる手順に応じて変化し得る。

【0080】

30

バッチ手順

本明細書に記載の光化学的アミド化反応は、バッチ手順で実施されてもよい。バッチ手順は、バッチスケール反応とも呼ばれる場合がある。いくつかの実施形態では、光化学的アミド化プロセスは、同じ反応容器内で実施されてもよく、これは「シングルポット」反応と呼ばれてもよい。当然のことながら、反応は単一の反応容器内で起こり得るが、それにおける反応条件が一定に保たれるべきであると述べていると解釈されるべきではない。例えば、本明細書に記載の光化学的アミド化反応の工程(a)および(b)は、反応容器中、室温で起こってもよい一方で、工程(c)について、温度は、例えば約37℃に調整されてもよく、それにもかかわらず、同じ反応容器内で起こってもよい。

【0081】

40

他の実施形態では、工程(a)、(b)、および/または(c)は、異なる反応容器中で実施されてもよい。反応条件は、上記のように、光標識剤(R1-X)および使用される切断試薬に応じて変化し得る。

【0082】

フォトフロー手順

光化学的アミド化反応は、フォトフロー手順で実施されてもよく、この手順では、溶液が、光源によって照射されている間に回路を通してポンプ注入される。反応は、これらの条件を提供する流通式反応器中で実施されてもよい。流通式反応器は、フォトフロー反応器、光化学反応器、またはより一般的には反応器と呼ばれてもよい。

【0083】

50

いくつかの実施形態では、流通式反応器中で実施される反応は、フォトフロープロセスまたは反応とも呼ばれる場合がある。いくつかの実施形態では、流通式反応器中で実施される反応は、フォトフロー手順とも呼ばれる場合がある。

【0084】

流通式反応器は、10～100℃の温度で動作してもよい。流通式反応器は、20～60℃の温度で動作してもよい。流通式反応器は、20～40℃の温度で動作してもよい。流通式反応器は、20～30℃の温度で動作してもよい。流通式反応器は、25～30℃の温度で動作してもよい。流通式反応器は、約26℃の温度で動作してもよい。

【0085】

光化学的アミド化反応は、異なる流量で実施されてもよい。ここでの流量は、時間単位当たりのシステムを通過する流体の体積として定義され得る体積流量を指す。 10

【0086】

流量は、0.200～50.00mL／分であってもよい。流量は、1.00～25.00mL／分であってもよい。流量は、5.00～10.00mL／分であってもよい。流量は、6.00～9.00mL／分であってもよい。流量は、約8.00mL／分であってもよい。流量は約10mL／分であってもよい。流量は約20mL／分であってもよい。

【0087】

流通式反応器体積は、1～10mLであってもよい。流通式反応器体積は、2～5mLであってもよい。流通式反応器体積は、約2mLであってもよい。流通式反応器体積は、約2.7mLであってもよい。ここでの流通式反応器体積は、流通式反応器の光源による任意の所与の時間での照射に供され得る体積とみなされてもよい。 20

【0088】

反応はまた、異なる滞留時間を使用して行われてもよい。ここでの滞留時間は、流体が流通式反応器中にどのくらい長く留まるかの尺度として定義され得る。別様に述べると、これは、溶液が流通式反応器に入り、流通式反応器体積の一部を形成し、流通式反応器によって照射されることができるようになった瞬間と、溶液が流通式反応器を出て、流通式反応器体積の一部を形成しなくなり、それ以上流通式反応器によって照射されなくなる瞬間との間の時間の測定値である。これはまた、流通式反応器体積と全体流量との比によって与えられてもよい。 30

【0089】

流通式反応器中の滞留時間は、0.04～50分であってもよい。流通式反応器中の滞留時間は、0.1～10分であってもよい。流通式反応器中の滞留時間は、0.1～1分であってもよい。流通式反応器中の滞留時間は、0.1～0.5分であってもよい。流通式反応器中の滞留時間は、約0.25分であってもよい。

【0090】

流通式反応器は、Vapourtec UV-150光化学反応器であってもよい。流通式反応器は、Corning（登録商標）Lab Photo Reactorであってもよい。当然のことながら、工程（b）に記載されるように、光化学的変換の目的で循環溶液の照射を可能にする任意の同等の光化学反応器が、本開示から逸脱することなく使用されてもよい。 40

【0091】

いくつかの実施形態では、流通式反応器光源は、300nm～700nmの波長で照射してもよい。流通式反応器光源は、365～525nmの波長で照射する一連のLEDであってもよい。流通式反応器光源は、400～450nmの波長で照射する一連の単色LEDであってもよい。流通式反応器光源は、430nmの波長で照射する一連の単色LEDであってもよい。流通式反応器光源は、390～420nmの波長で照射する一連の単色LEDであってもよい。流通式反応器光源は、405nmの波長で照射する一連の単色LEDであってもよい。

【0092】

いくつかの実施形態では、流通式反応器光源は、3～150ワットの放射力で照射してもよい。流通式反応器光源は、5～100ワットの放射力で照射してもよい。流通式反応器光源は、10～80ワットの放射力で照射してもよい。反応器光源は、9～24ワットの放射力で照射してもよい。

【0093】

バッチーフोटフローハイブリッド手順

光化学的アミド化反応は、バッチーフोटフローハイブリッド手順で実施されてもよく、この手順では、光化学的アミド化反応の一部のみが、フロー手順を介して完了され得る。別様に述べると、いくつかの実施形態では、反応の工程の一部のみが流通式反応器中で生じ、残りの工程は、例えば反応容器中の、バッチ手順で生じてよい。光化学的アミド化反応の単一の工程のみまたは一部の工程のみがフロー反応器中で生じる場合、反応は、概して、ハイブリッド手順で完了すると言及され得る。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、反応のC末端エナミドを得るためのペプチド-光標識コンジュゲートの光化学的変換は、流通式反応器中で実施されてもよい。いくつかの実施形態では、C末端システイン残基を含むペプチドを光標識とカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲートを得ること、および反応のC末端エナミドを得るためのペプチド-光標識コンジュゲートの光化学的変換を、流通式反応器中で実施してもよい。いくつかの実施形態では、C末端エナミドを得るためのペプチド-光標識コンジュゲートの光化学的変換、および反応のC末端α-アミドを得るためのC末端エナミドの切断を、流通式反応器中で実施してもよい。いくつかの実施形態では、反応のC末端エナミドを得るためのペプチド-光標識コンジュゲートの光化学的変換のみを、流通式反応器中で実施してもよい。いくつかの実施形態では、流通式反応器中で実施されない光化学的アミド化反応工程は、バッチ手順を介して実施されてもよい。いくつかの実施形態では、流通式反応器中で実施されない光化学的アミド化反応工程は、反応器中のバッチ手順を介して実施されてもよい。

20

【0095】

ジスルフィド結合含有ペプチドの光化学的反応

本出願の光化学的アミド化反応は、中にシステイン残基を含有するペプチドR2を用いて行われてもよい。言い換えれば、スキーム1または2の式Iは、光化学的アミド化反応のためのC末端システイン(Cys)残基に加えて、少なくとも1つのシステイン(Cys)残基を含むペプチドを含有する。ペプチドR2内のシステインは、ジスルフィド結合を形成し得る。

30

【0096】

こうした実施形態では、光化学的アミド化プロセスは、概して上記したように進行し、同時に以下のものにさらに供されてもよい。

【0097】

光標識剤の全体的なカップリング

光標識剤(R1-X)は、上の工程(a)に記載したように、C末端システイン残基、およびペプチドR2に存在する追加のシステイン残基にカップリングされてもよい。これは、システインの全体的なカップリングと呼ばれてもよい。光標識R1とカップリングされたペプチドR2の一部を形成するシステインは、概して、光標識で保護されたシステインと呼ばれてもよい。

40

【0098】

光標識剤は、光標識剤とカップリングされるシステインの量に比例する様式で加えられてもよい。光標識剤の当量は、アミド化ペプチド内に形成されるジスルフィド結合の数に比例して増加してもよい。

【0099】

いくつかの実施形態では、ペプチド(式I)に対して0.5～3追加当量の光標識剤(R1-X)が、ペプチド(R2)中に形成される各ジスルフィド結合について提供されてもよい。ペプチド(式I)に対して1～2.5追加当量の光標識剤(R1-X)が、ペプ

50

チド（R 2）中に形成される各ジスルフィド結合について提供されてもよい。ペプチド（式 I）に対して 1.5 ～ 2.5 追加当量の光標識剤（R 1-X）が、ペプチド（R 2）中に形成される各ジスルフィド結合について提供されてもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド（式 I）に対して約 2 追加当量の光標識剤（R 1-X）が、ペプチド（R 2）中に形成される各ジスルフィド結合について提供されてもよい。本明細書における追加という用語は、ペプチド R 2 が形成されるジスルフィド結合を有しない場合、工程（a）の一般的反応で提供され得る光標識剤当量に合算される光標識剤当量を指す。

【0100】

いくつかの実施形態では、ペプチド（式 I）に対して 3 ～ 5 合計当量の光標識剤（R 1-X）が、工程 a のために提供されてもよい。ペプチド（式 I）に対して 3.5 ～ 4.5 合計当量の光標識剤（R 1-X）が、工程 a のために提供されてもよい。ペプチド（式 I）に対して 3.8 ～ 4.2 合計当量の光標識剤（R 1-X）が、工程 a のために提供されてもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド（式 I）に対して約 4 合計当量の光標識剤（R 1-X）が、工程 a のために提供されてもよい。合計という用語は、光化学的アミド化反応の工程（a）の間に反応において提供される、光標識当量の得られた量を指す。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、ペプチドに対して約 4 合計当量の 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン（NBD-Cl）が、工程 a のために提供されてもよい。

【0102】

選択的 C 末端光化学的変換

20

ペプチド-光標識コンジュゲートは、工程 b で概して開示される様式で照射されてもよい。コンジュゲートの C 末端に見られる光標識は、C 末端エナミドを得るように、光化学的変換を経てもよく、一方、残りのシステインカップリングされた光標識は、影響を受けないままであってもよい。

【0103】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の光化学的変換工程（b）は、ペプチド-光標識コンジュゲートの C 末端に対して選択的であると言うことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の光化学的変換工程（b）は、光標識とカップリングされたペプチドの C 末端システインに対して選択的であると言うことができる。

【0104】

30

放出および酸化

C 末端エナミドを切断して C 末端 α -アミドを得ることは、工程（c）に記載のように行ってもよい。

【0105】

さらに、ペプチド R 2 の光標識で保護されたシステインにおける光標識の放出を行ってもよい。ペプチド R 2 中の光標識で保護されたシステインの放出は、工程（c）で C 末端エナミドを切断して C 末端 α -アミドを得る前に行ってもよい。ペプチド R 2 中の光標識で保護されたシステインの放出は、工程（c）で C 末端エナミドを切断して C 末端 α -アミドを得ると同時に行ってもよい。

【0106】

40

求核性硫化物を提供して、光標識で保護されたペプチドシステインから光標識を放出させてもよい。いくつかの実施形態では、システアミン、システイン、ジチオスレイトール（DTT）、3,6-ジオキサ-1,8-オクタンジチオール（DOT）、2-メルカプトエタノール、グルタチオン（GSH）、およびアセチルシステインから成る群から選択される求核性硫化物が提供されてもよい。いくつかの実施形態では、システアミンは、求核性硫化物として提供されてもよい。

【0107】

いくつかの実施形態では、酸化パートナーをさらに提供して、ジスルフィド酸化をもたらしてもよい。シスタミングルタチオンジスルフィド（GS SG）およびシスチンから成る群から選択される酸化パートナーが提供されてもよい。いくつかの実施形態では、シス

50

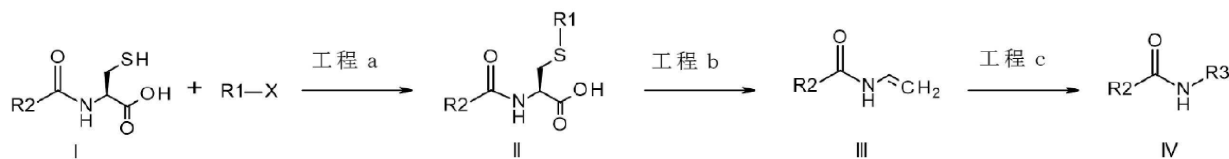
タミングルタチオンジスルフィド（GSSG）が、酸化パートナーとして提供されてもよい。

【0108】

総合的な反応

本発明の第1の態様では、上記の定義に従い、スキーム1に従って式IVのC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化5】



10

スキーム1（図1）

（式中、R2は、ポリペプチドであり、

R1-Xは、光標識剤であり、R1は、光標識であり、Xは、脱離基であり、

R3は、水素、メチル、およびエチルから成る群から選択される）

工程（a）：式IのC末端システインを含むペプチドまたはタンパク質を、光標識（R1）とカップリングして、式IIのペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

工程（b）：得られた式IIのペプチド-光標識コンジュゲートを光化学的に変換して、式IIIのC末端エナミドを得る工程と、

工程（c）：得られた式IIIのC末端エナミドを切断して、式IVのC末端αアミドを得る工程と、

を含む方法が提供されてもよい。

20

【0109】

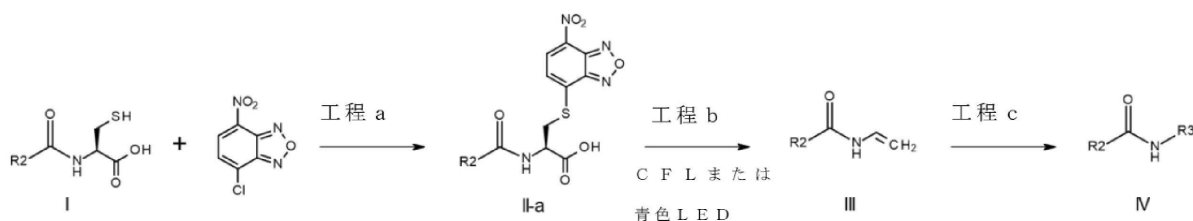
いくつかの実施形態では、R3は、水素およびエチルから成る群から選択されてもよい。別の実施形態では、R3は、水素であってもよい。

【0110】

同様に、または代替として、本発明の第2の態様では、スキーム2に従って、式IVのC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

30

【化6】



スキーム2（図2）

（式中、R2は、ポリペプチドであり、

R3は、水素である）

工程（a）：式IのC末端システインを含むペプチドまたはタンパク質を、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン（化学式2）とカップリングして、式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

工程（b）：得られた式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを光化学的に変換して、式IIIのC末端エナミドを得る工程と、

工程（c）：得られた式IIIのC末端エナミドを切断して、式IVのC末端αアミドを得る工程と、

を含む方法が提供されてもよい。

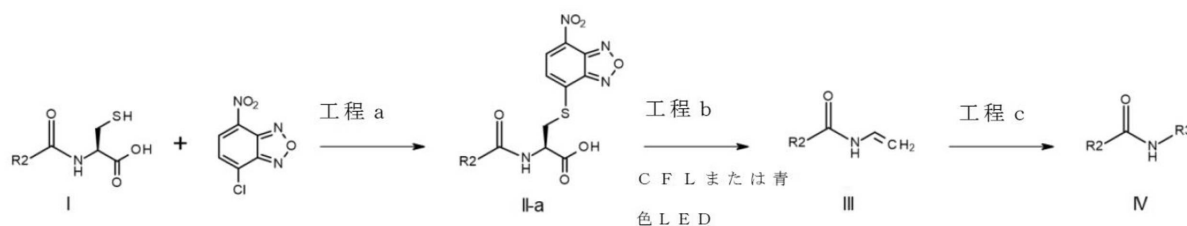
40

【0111】

50

さらに別の態様では、スキーム 2 に従って、式 I V の C 末端 α アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化 7】



10

(式中、R 2 は、配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、R 3 は、水素である)

工程 (a) . C 末端システインアミド化タグ (式 I) を含むペプチドまたはタンパク質を、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンとカップリングして、ペプチド-光標識コンジュゲート (式 I I - a) を得る工程と、

工程 (b) . ペプチド-光標識コンジュゲート (式 I I - a) を、400~450 nm の波長を有する光で照射して、光化学的変換により C 末端エナミド (式 I I I) を得る工程と、

工程 (c) . C 末端エナミド (式 I I I) を切断して、C 末端 α -アミド (式 I V) を得る工程と、を含む、方法。

20

【0112】

精製および特性評価

C 末端 α -アミドの精製は、バッチ手順で実施されてもよい。精製は、連続析出によって実施されてもよい。

【0113】

反応は、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) によってモニターされてもよい。

【0114】

C 末端 α -アミドの精製は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) または限外濾過ダイアフィルトレーション (UFDF) を介して実施されてもよい。C 末端 α -アミドの精製は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を介して実施されてもよい。C 末端 α -アミドの精製は、限外濾過ダイアフィルトレーション (UFDF) を介して実施されてもよい。

30

【0115】

反応試料は、UPLC-MS 分析によって分析されてもよい。いくつかの実施形態では、反応試料は、抽出イオンクロマトグラフィーを使用して分析されてもよい。いくつかの実施形態では、反応は、LC-MS によってモニターされてもよい。

【0116】

別段の指示がない限り、本明細書において単数形で示される用語は、複数の場合も含む。

40

【0117】

「化合物」という用語は、分子実体を指すために本明細書で使用され、それ故に「化合物」は、各化合物または化合物の群に対して定義される最小限の要素以外の異なる構造的要素を有してもよい。

【0118】

本明細書にはまた、化合物および方法が記載されており、これにおいて、「含む (comprises)」および「含む (comprising)」のような非限定的な用語と、「から成る (consists of)」、「から成る (consisting of)

50

）」およびこれに類するものなどの限定的な用語とが使用され得る。

【0119】

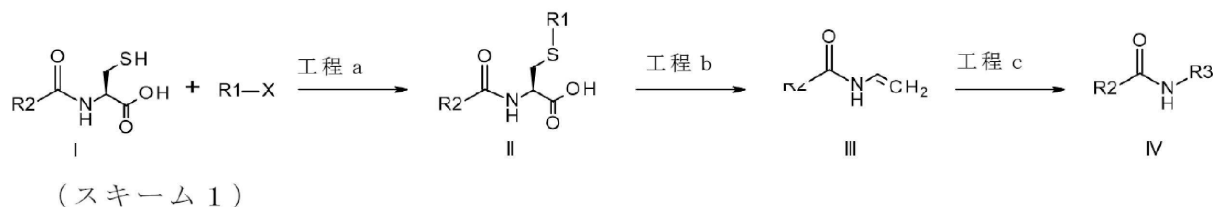
複数形が化合物、出発材料、中間体、塩およびこれに類するものに使用される場合、1つ（好ましい）またはそれ以上の単一の化合物、塩、中間体などを意味することを意図し、単数形または不定冠詞（「a」、「an」）が使用される場合、これは、複数形を排除することを意図せず、「1つ」を意味することが好ましいに過ぎない。

【0120】

特定の実施形態

1. スキーム1に従って、式IVのC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化8】



（式中、R2は、ポリペプチドであり、

R1-Xは、光標識剤であり、R1は、光標識であり、Xは、脱離基であり、

R3は、水素、メチル、およびエチルから成る群から選択される）

工程（a）．式IのC末端システインアミド化タグを含むペプチドまたはタンパク質を、光標識（R1）とカップリングして、式IIのペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

工程（b）．式IIのペプチド-光標識コンジュゲートを照射して、光化学的変換を介して式IIIのC末端エナミドを得る工程と、

工程（c）．式IIIのC末端エナミドを切断して、式IVのC末端αアミドを得る工程と、を含む、方法。

2. R3が、水素およびエチルから成る群から選択される、実施形態1に記載の方法。

3. R3が、水素である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

4. R2が、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

5. R2が、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列から成る、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

6. R2が、配列番号3～14および16～17のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

7. R2が、配列番号3、4、5、16、17のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

8. R2が、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

9. R2が、N末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10. R2が、1～60アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

11. R2が、1～50アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

12. R2が、1～40アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

13. R2が、1～20アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形

態のいずれかに記載の方法。

14. R2が、1～15アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

15. R2が、5～15アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

16. R2が、14アミノ酸を有するN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

17. R2が、配列番号18に従うN末端延長部をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

18. R2が、配列番号17に示されるアミノ酸配列である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

19. 方法が、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ペプチドの調製に使用される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

20. 方法が、アミリン受容体作動薬の調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

21. アミリン受容体作動薬が、プラムリンチドである、実施形態20に記載の方法。

22. 方法が、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) ペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

23. 方法が、GIPおよびGLP-1受容体共作動薬の調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

24. GIPおよびGLP-1受容体共作動薬が、チルゼパチドである、実施形態23に記載の方法。

25. 方法が、ウロコルチン-2 (UCN2) ペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

26. 方法が、膵pYY (3-36) ペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

27. 方法が、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8 (PSTi8) ペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

28. 方法が、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) 作動薬の調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

29. 方法が、ガストリン放出ペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

30. 方法が、コシントロピンの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

31. 方法が、QRF-アミドペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

32. 方法が、GLP-1受容体-神経ペプチドY受容体2共作動薬の調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

33. GLP-1受容体-神経ペプチドY受容体2共作動薬が、EP45である、実施形態32に記載の方法。

34. 方法が、プレビルチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

35. 方法が、オステオクリン (OSTN) ペプチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

36. 方法が、エンフビルチドの調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

37. 方法が、GLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬の調製に使用される、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

38. 方法が、GLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬の調製に使用され、GLP-1受容体-アミリン受容体共作動薬が、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む、

10

20

30

40

50

実施形態 1～18 および 37 のいずれか 1 つに記載の方法。

39. GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬が、配列番号 16 によって表される、実施形態 1～18 および 37～38 のいずれか 1 つに記載の方法。

40. 方法が、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ペプチド、プラムリンチドなどのアミリン受容体作動薬、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) ペプチド、チルゼパチドなどの GLP-1 受容体共作動薬、ウロコルチン-2 (UCN2) ペプチド、膵 pYY (3-36) ペプチド、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8 (PSTi8) ペプチド、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) 作動薬、ガストリン放出ペプチド (GRP) ペプチド、コシントロピンなどの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、QRF-アミドペプチド、EP45 などの GLP-1 受容体-神経ペプチド Y 受容体 2 共作動薬、ブレビルチドなどの侵入阻害剤、オステオクリン (OSTN) ペプチドなどのナトリウム利尿ペプチド、エンフビルチドなどの抗レトロウイルス薬剤、または配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬などの GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬の調製に使用される、実施形態 1～18 のいずれか 1 つに記載の方法。

41. 方法が、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ペプチド、膵 pYY (3-36) ペプチド、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8 (PSTi8) ペプチド、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH)、ガストリン放出ペプチド (GRP) ペプチド、コシントロピン、QRF-アミドペプチド、GLP-1 受容体-神経ペプチド Y 受容体 2 共作動薬 EP45、ブレビルチド、オステオクリン (OSTN) ペプチド、エンフビルチド、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬、またはプラムリンチドなどのアミリン受容体作動薬の調製に使用される、実施形態 1～18 および 40 のいずれか 1 つに記載の方法。

42. 方法が、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ペプチド、膵 pYY (3-36) ペプチド、パンクレアスタチン阻害剤ペプチド-8 (PSTi8) ペプチド、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬、またはプラムリンチドなどのアミリン受容体作動薬の調製に使用される、実施形態 1～18 および 40～41 のいずれか 1 つに記載の方法。

43. 方法が、プラムリンチドの調製に使用される、先行する実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

44. 方法が、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬の調製に使用される、実施形態 1～18 および 40～42 のいずれか 1 つに記載の方法。

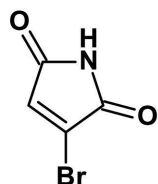
45. 方法が、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む前駆体 GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬の調製に使用される、実施形態 1～18 および 40～42 のいずれか 1 つに記載の方法。

46. 光標識剤 (R1-X) が、3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオン、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン、2-ブロモ-1, 4-ナフトキノン、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン、および 4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザンから成る群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

47. 光標識剤 (R1-X) が、3-ブロモ-1H-ピロール-2, 5-ジオン (化学式 1) または 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン (化学式 2) :

化学式 1 :

【化 9】



10

20

30

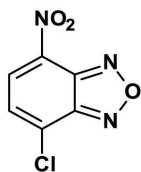
40

50

である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

化学式 2 :

【化 1 0】



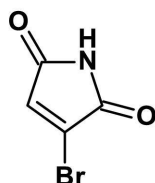
から成る群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

48. 光標識剤が、3-ブロモ-1H-ピロール-2,5-ジオン (化学式 1) :

化学式 1 :

【化 1 1】



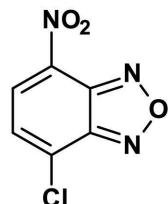
である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

20

49. 光標識剤が、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン (化学式 2) :

化学式 2 :

【化 1 2】



30

である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

50. 方法が、水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

51. 方法の工程 (a) が、水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

52. 方法の工程 (a) が、水性反応緩衝液中で行われ、水性緩衝液が、ビスートリスメタン、トリス、トリエタノールアミン、およびホスフェートから成る群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

53. 方法の工程 (a) が、ビスートリスメタンの水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

40

54. 方法の工程 (a) が、約 25 mM のビスートリスメタンの水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

55. 方法の工程 (a) が、トリスの水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

56. 方法の工程 (a) が、トリエタノールアミンの水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

57. 方法の工程 (a) が、ホスフェートの水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

58. 方法の工程 (a) が、pH 4 ～ 9 の水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

50

59. 方法の工程 (a) が、pH 6～8 の水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

60. 方法の工程 (a) が、pH 6～7 の水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

61. 方法の工程 (a) が、pH 6.3～7 の水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

62. 方法の工程 (a) が、pH 6.3～6.4 の水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

63. 方法の工程 (a) が、約 pH 6.4 の水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

64. 方法の工程 (a) が、約 pH 6.3 の水性反応緩衝液中で行われる、実施形態 1～42 のいずれか 1 つに記載の方法。

65. 方法の工程 (a) が、約 pH 7 の水性反応緩衝液中で行われる、実施形態 1～41 のいずれか 1 つに記載の方法。

66. 方法の工程 (a) が、グリシンを有する水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

67. 方法の工程のうちの工程 (a) が、約 50 mM のグリシンを有する水性反応緩衝液中で行われる、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

68. 工程 (a) のペプチドに対して 1～5 当量の光標識が提供される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

69. 工程 (a) のペプチドに対して 1～3 当量の光標識が提供される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

70. 工程 (a) のペプチドに対して 1.5～2.5 当量の光標識が提供される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

71. 工程 (a) のペプチドに対して 1.8～2.2 当量の光標識が提供される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

72. 工程 (a) のペプチドに対して 2 当量の光標識が提供される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

73. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、電球型蛍光ランプ (CFL) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

74. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、少なくとも 1 つの発光ダイオード (LED) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

75. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、複数の発光ダイオード (LED) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

76. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、単色 LED である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

77. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、白色光を提供する波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

78. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、300～700 nm の波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

79. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、365～550 nm の波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

80. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、365～500 nm の波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

81. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、365～450 nm の波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

82. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、365 nm の波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

83. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、400～500 nm の波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

84. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、400～450 nmの波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

85. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、約405 nmの波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

86. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、約430 nmの波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

87. ペプチド-光標識コンジュゲートを照射するための光源が、約450 nmの波長を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

88. エナミドが、酸媒介性加水分解によって切断される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

89. エナミドが、水素化される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

90. エナミドが、酸触媒性加水分解、酸化剤媒介性加水分解によって、または逆電子要請型Diels-Alder反応によって切断される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

91. エナミドが、酸触媒性加水分解によって、または酸化剤媒介性加水分解によって切断される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

92. エナミドが、酸触媒性加水分解によって切断される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

93. エナミドが、酸化剤媒介性加水分解によって切断される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

20

94. エナミドが、逆電子要請型Diels-Alder反応によって切断される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

95. エナミドを切断するための切断試薬を加える工程をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

96. エナミドを切断するための切断試薬を加える工程をさらに含み、切断試薬が、トリフルオロ酢酸(TFA)、塩酸(HCl)、硫酸(H₂SO₄)、トシル酸(TsOH)、リン酸(H₃PO₄)、シュウ酸、6,6'- (1,2,4,5-テトラジン-3,6-ジイル)ジニコチン酸から成る群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

97. 切断試薬が、トリフルオロ酢酸(TFA)、塩酸(HCl)、硫酸(H₂SO₄)、トシル酸(TsOH)、リン酸(H₃PO₄)、シュウ酸、および6,6'- (1,2,4,5-テトラジン-3,6-ジイル)ジニコチン酸から成る群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

30

98. 切断試薬が、トリフルオロ酢酸(TFA)、塩酸(HCl)、硫酸(H₂SO₄)、トシル酸(TsOH)、リン酸(H₃PO₄)、および6,6'- (1,2,4,5-テトラジン-3,6-ジイル)ジニコチン酸から成る群から選択される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

99. 切断試薬が、トリフルオロ酢酸(TFA)である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

100. 切断試薬が、2～8% v/vのトリフルオロ酢酸(TFA)である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

40

101. 切断試薬が、4～6% v/vのトリフルオロ酢酸(TFA)である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

102. 切断試薬が、5% v/vのトリフルオロ酢酸(TFA)である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

103. 切断試薬が、塩酸(HCl)である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

104. 切断試薬が、硫酸(H₂SO₄)である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

105. 切断試薬が、リン酸(H₃PO₄)である、先行する実施形態のいずれかに記

50

載の方法。

106. 切断試薬が、0.5～2 Mのリン酸 (H_3PO_4) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

107. 切断試薬が、0.5～1.5 Mのリン酸 (H_3PO_4) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

108. 切断試薬が、0.7～1.3 Mのリン酸 (H_3PO_4) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

109. 切断試薬が、0.8～1.2 Mのリン酸 (H_3PO_4) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

110. 切断試薬が、約1 Mのリン酸 (H_3PO_4) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

111. 切断試薬が、トシル酸 (TsOH) である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

112. 切断試薬が、6,6'- (1,2,4,5-テトラジン-3,6-ジイル) ジニコチン酸である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

113. 方法の少なくとも一部が、バッチ手順で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

114. エナミド切断が、摂氏0～80度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

115. エナミド切断が、摂氏20～60度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

116. エナミド切断が、摂氏20～40度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

117. エナミド切断が、摂氏20～26度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

118. エナミド切断が、摂氏20～23度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

119. エナミド切断が、摂氏20度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

120. エナミド切断が、摂氏23度の温度で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

121. エナミド切断が、室温で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

122. エナミド切断が、摂氏30～40度の温度で実施される、実施形態1～116のいずれか1つに記載の方法。

123. エナミド切断が、摂氏約37度の温度で実施される、実施形態1～116および122のいずれか1つに記載の方法。

124. 方法の少なくとも一部が、流通式反応器で実施される、先行する実施形態のいずれか1つに記載の方法。

125. 照射工程が、流通式反応器で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

126. 照射工程のみが、流通式反応器で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

127. 流通式反応器の温度が、摂氏20～60度である、実施形態124～126のいずれか1つに記載の方法。

128. 流通式反応器の温度が、摂氏20～40度である、実施形態124～127のいずれか1つに記載の方法。

129. 流通式反応器の温度が、摂氏20～30度である、実施形態124～128のいずれか1つに記載の方法。

130. 流通式反応器の温度が、摂氏25～30度である、実施形態124～129の

10

20

30

40

50

いずれか 1 つに記載の方法。

131. 流通式反応器の温度が、摂氏約 26 度である、実施形態 124～130 のいずれか 1 つに記載の方法。

132. 流通式反応器の流量が、0.200～50.00 mL / 分である、実施形態 124～131 のいずれか 1 つに記載の方法。

133. 流通式反応器の流量が、1.00～25.00 mL / 分である、実施形態 124～132 のいずれか 1 つに記載の方法。

134. 流通式反応器の流量が、5.00～10.00 mL / 分である、実施形態 124～133 のいずれか 1 つに記載の方法。

135. 流通式反応器の流量が、6.00～9.00 mL / 分である、実施形態 124～134 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

136. 流通式反応器の流量が、約 8.00 mL / 分である、実施形態 124～135 のいずれか 1 つに記載の方法。

137. 流通式反応器の反応器体積が、1～10 mL である、実施形態 124～136 のいずれか 1 つに記載の方法。

138. 流通式反応器の反応器体積が、2～5 mL である、実施形態 124～137 のいずれか 1 つに記載の方法。

139. 流通式反応器の反応器体積が、1～3 mL である、実施形態 124～138 のいずれか 1 つに記載の方法。

140. 流通式反応器の反応器体積が、約 2 mL である、実施形態 124～139 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

141. 流通式反応器の反応器体積が、約 2.7 mL である、実施形態 124～140 のいずれか 1 つに記載の方法。

142. 流通式反応器中の滞留時間が、0.04～50 分である、実施形態 124～141 のいずれか 1 つに記載の方法。

143. 流通式反応器中の滞留時間が、0.1～10 分である、実施形態 124～142 のいずれか 1 つに記載の方法。

144. 流通式反応器中の滞留時間が、0.1～1 分である、実施形態 124～143 のいずれか 1 つに記載の方法。

145. 流通式反応器中の滞留時間が、0.1～0.5 分である、実施形態 124～144 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

146. 流通式反応器中の滞留時間が、約 0.25 分である、実施形態 124～145 のいずれか 1 つに記載の方法。

147. 流通式反応器が、Vapourtec UV-150 光化学反応器である、実施形態 124～146 のいずれか 1 つに記載の方法。

148. 流通式反応器が、Corning (登録商標) Lab Photo Reactor である、実施形態 124～146 のいずれか 1 つに記載の方法。

149. 光源が、3～150 ワットの放射力で照射する、実施形態 124～148 のいずれか 1 つに記載の方法。

150. 光源が、5～100 ワットの放射力で照射する、実施形態 124～149 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

151. 光源が、10～80 ワットの放射力で照射する、実施形態 124～150 のいずれか 1 つに記載の方法。

152. 光源が、9～24 ワットの放射力で照射する、実施形態 124～151 のいずれか 1 つに記載の方法。

153. 反応が、単一の反応容器中で実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

154. 界面活性剤を加えることをさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

155. ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、デスオキシコール酸ナトリウム (SDC 50

）、３－〔（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕－１－プロパンスルホネート（CHAPS）、Triton（商標）X－１００、Tween－２０、水酸化テトラプロピルアンモニウム（TAPH－４０）、およびオクタン酸ナトリウムから成る群から選択される界面活性剤を加えることをさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１５６．界面活性剤を加えることをさらに含み、界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム（SDS）である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１５７．界面活性剤を加えることをさらに含み、界面活性剤が３－〔（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕－１－プロパンスルホネート（CHAPS）である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

１５８．界面活性剤を加えることをさらに含み、界面活性剤がオクタン酸ナトリウムである、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１５９．４０～８０ｍＭの界面活性剤を加えることをさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１６０．５０～７０ｍＭの界面活性剤を加えることをさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１６１．５５～６５ｍＭの界面活性剤を加えることをさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１６２．約６０ｍＭの界面活性剤を加えることをさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

20

１６３．工程（ｂ）の前に、ペプチドＲ２のシステインを光標識Ｒ１とカップリングして、光標識で保護されたシステインを形成する工程と、

工程（ｂ）の後に、光標識で保護されたシステインをペプチドＲ２から放出する工程と、をさらに含む、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

１６４．求核性硫化物および酸化パートナーが提供される、実施形態１６３に記載の方法。

１６５．光標識で保護されたシステインをペプチドＲ２から放出するために、求核性硫化物を加えることをさらに含む、実施形態１６３～１６４のいずれか１つに記載の方法。

１６６．光標識で保護されたシステインをペプチドＲ２から放出するために、求核性硫化物を加えることをさらに含み、求核性硫化物が、システアミン、システイン、ジチオスレイトール（DTT）、３，６－ジオキサ－１，８－オクタンジチオール（DOT）、２－メルカプトエタノール、グルタチオン（GSH）、およびアセチルシステインから成る群から選択される、実施形態１６３～１６５のいずれか１つに記載の方法。

30

１６７．光標識で保護されたシステインをペプチドＲ２から放出するために、求核性硫化物を加えることをさらに含み、求核性硫化物がシステアミンである、実施形態１６３～１６６のいずれか１つに記載の方法。

１６８．光標識で保護されたシステインを放出した後に、ジスルフィド結合をペプチドＲ２中で形成することをさらに含む、実施形態１６３～１６７のいずれか１つに記載の方法。

１６９．酸化パートナーを加えることをさらに含む、実施形態１６３～１６８のいずれか１つに記載の方法。

40

１７０．シスタミングルタチオンジスルフィド（GS SG）およびシステインから成る群から選択される酸化パートナーを加えることをさらに含む、実施形態１６３～１６９のいずれか１つに記載の方法。

１７１．シスタミングルタチオンジスルフィド（GS SG）およびシステインから成る群から選択される酸化パートナーを加えることをさらに含む、実施形態１６３～１７０のいずれか１つに記載の方法。

１７２．形成される各ジスルフィド結合について、工程（ａ）でペプチドに対して０．５～３追加当量の光標識を加えることをさらに含む、実施形態１６３～１７１のいずれか１つに記載の方法。

50

173. 形成される各ジスルフィド結合について、工程（a）でペプチドに対して1～2.5追加当量の光標識を加えることをさらに含む、実施形態163～172のいずれか1つに記載の方法。

174. 形成される各ジスルフィド結合について、工程（a）でペプチドに対して1.5～2.5追加当量の光標識を加えることをさらに含む、実施形態163～173のいずれか1つに記載の方法。

175. 形成される各ジスルフィド結合について、工程（a）でペプチドに対して約2追加当量の光標識を加えることをさらに含む、実施形態163～174のいずれか1つに記載の方法。

176. C末端α-アミドを精製する工程をさらに含み、C末端α-アミドの精製が、バッチ手順で、または連続析出によって実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

177. C末端α-アミドを精製する工程をさらに含み、C末端α-アミドの精製が、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または限外濾過ダイアフィルトレーション（UFDF）を介して実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

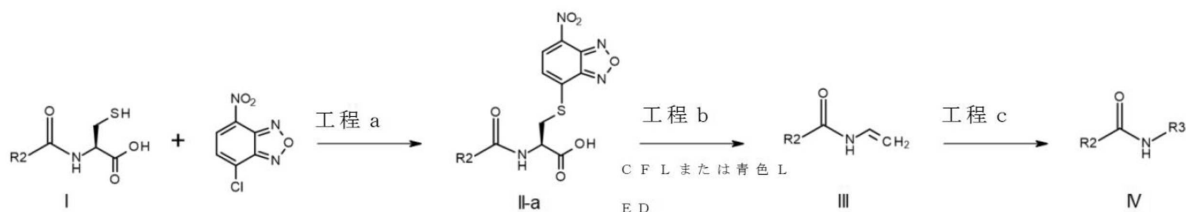
178. C末端α-アミドを精製する工程をさらに含み、C末端α-アミドの精製が、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を介して実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

179. C末端α-アミドを精製する工程をさらに含み、C末端α-アミドの精製が、限外濾過ダイアフィルトレーション（UFDF）を介して実施される、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

20

180. スキーム2に従って、式IVのC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化13】



30

（式中、R2は、ポリペプチドであり、
R3は、水素である）

工程（a）. 式IのC末端システインアミド化タグを含むペプチドまたはタンパク質を、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンとカップリングして、式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

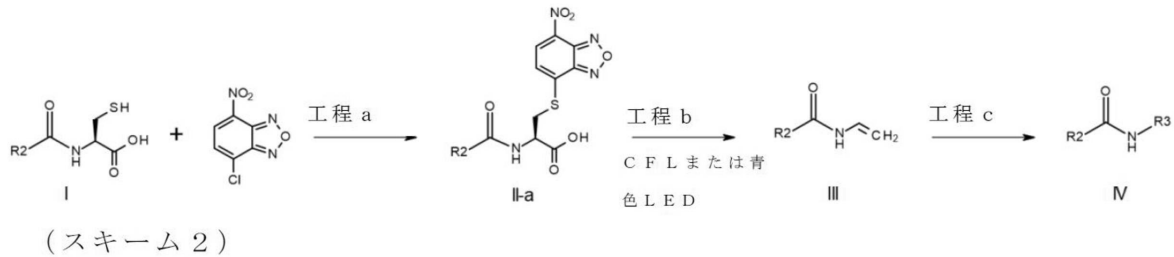
工程（b）. 式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを照射して、光化学的変換を介して式IIIのC末端エナミドを得る工程と、

40

工程（c）. 前記式IIIのC末端エナミドを切断して、前記式IVのC末端α-アミドを得る工程と、を含む、方法。

181. スキーム2に従って、式IVのC末端α-アミドを含むペプチドまたはタンパク質を生成するための方法であって、

【化 1 4】



(式中、R₂は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、R₃は、水素である)

工程(a)．式IのC末端システインアミド化タグを含むペプチドまたはタンパク質を、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンとカップリングして、式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを得る工程と、

工程(b)．式II-aのペプチド-光標識コンジュゲートを、400～450nmの波長を有する光で照射して、光化学的変換により式IIIのC末端エナミドを得る工程と、

工程(c)．前記式IIIのC末端エナミドを切断して、前記式IVのC末端α-アミドを得る工程と、を含む、方法。

182．実施形態1～181のいずれかに記載の医薬組成物を生成する方法。

183．医薬組成物を生成する方法であって、

a．実施形態1～181のいずれかに従い、式IVの化合物を生成する工程と、

b．該医薬組成物を、aで得られた式IVの化合物を使用して調製する工程と、を含む、方法。

【0121】

方法および実施例

略語リスト

Aq．、aq． 水性

Ac アセチル

CFL 電球型蛍光ランプ

CLND 化学発光窒素検出

DIC ジイソプロピル-カルボジイミド

DODT 3, 6-ジオキサ-1, 8-オクタンジチオール

DMF N, N-ジメチルホルムアミド

DMSO ジメチルスルホキシド

EIC 抽出イオンクロマトグラム

Et エチル

Eq． 当量

Fmoc フルオレニルメトキシカルボニル保護基

h 時間

HRMS 高分解能質量分析

HPLC 高速液体クロマトグラフィー

HCl 塩酸

i-Pr イソプロピル

IEDDA 逆電子要請型Diels-Alder

LCMS 液体クロマトグラフィー質量分析

LED 発光ダイオード

Me メチル

Min 分

MWCO 分子量カットオフ

10

20

30

40

50

NBD-CL 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン

NHS N-ヒドロキシスクシミド

NMP N-メチル-2-ピロリドン

RP-HPLC 逆相高速液体クロマトグラフィー

SPPS 固相ペプチド合成

TFA トリフルオロ酢酸

TIPS トリイソプロピルシラン

UPLC 超高速液体クロマトグラフィー

UPLC-MS 超高速液体クロマトグラフィー質量分析

実施例において、化合物1などの化合物の番号は、単に系列的に明確にするための（I）または（II）などの本明細書および特許請求の範囲の化合物を表す番号とは異なることに留意されたい。 10

【0122】

一般的な調製方法

α -アミド化ペプチドの合成を、スクリーニングスケール手順、バッチ手順、または連続フォトリフロープロセスのいずれかを介して、3つの異なる方法で実施した。

【0123】

試薬

全ての試薬および溶媒を商業的に購入し、供給時のまま使用した。直交保護されたFmoc-アミノ酸を、予め計量されたカートリッジとしてIris Biotechから購入し、SPPS樹脂は、NovaBioChemから購入した。 20

【0124】

自動SPPSの一般的な方法

自動SPPSを、Symphony Xペプチド合成器（Gyros Biotechnologies）上で行った。ペプチドを、予め充填されたFmoc-アミノ酸Wang樹脂（約0.34 mmol/g 充填）上で、標準的なFmoc化学を使用して合成した。DMF中の5当量のFmocアミノ酸、10当量のジイソプロピルカルボジイミド（DIC）、5当量の2, 4, 6-コリジン、および5当量のシアノヒドロキシーイミノ酢酸エチル（オキシマ）を使用して、カップリングを行った。カップリング反応は、混合のためにN₂をバブリングしながら室温で1.5～4時間進行させた。DMF中20%のピペリジンを使用して、Fmoc脱保護を実施した。 30

【0125】

切断の一般的な方法

ペプチド切断を、TFA／トリイソプロピルシラン（TIPS）／水／チオアニソール／3, 6-ジオキサ-1, 8-オクタンジチオール（DODT）の90／2.5／2.5／2.5溶液中で行った。溶出した切断溶液を氷冷したジエチルエーテル中で析出させた。遠心分離を使用してペプチド析出物をペレット化し、ペレットを追加の氷冷したエーテルで洗浄した。

【0126】

精製および定量的ための一般的な方法

洗浄したペプチドペレットを、1：1のアセトニトリル／水または純粋なDMSOのいずれかに再溶解させた後、0.2 μ mフィルターを通して濾過した。得られた溶液を、分取RP-HPLCシステム、Waters Prep 150 LCシステムまたはAgilent 1290 Infinity II Autoscaleのいずれかに充填した。分取LC／MSDシステム。両方のシステムに、20 mL／分の流量のWaters XSelect CSH C18カラム（19×250 mm、5 μ m）を装備した〔緩衝液A：0.1%のTFAを含む89.9%の水／10%のアセトニトリル、緩衝液B：0.1%のTFAを含む89.9%のアセトニトリル／10%の水〕。ペプチドを、適切な溶媒勾配を使用して分解させた。純粋な画分をプールし、純度／同一性についてはUPLC／LCMSによって、ペプチド含有量については化学発光窒素検出（CLND）に 50

よって評価し、凍結乾燥粉末にした。

【0127】

検出および特性評価の一般的な方法

分析用UPLCを、0.4 mL／分の流量のWaters BEH C18カラム（2.1×150 mm、1.7 μm）を装備したWaters Acquity UPLCシステムで行った〔緩衝液A：0.05%のTFAを含む99.95%の水、緩衝液B：0.05%のTFAを含む99.95%のアセトニトリル、勾配：95／5 A：Bで0.5分間保持し、16分かけて95／5 A：Bから5／95 A：Bに勾配、続いて洗浄および再平衡化〕。UV吸光度を214 nmで測定した。LCMSおよびHRMS分析のために、Waters Xevo G2-XS QToF質量分光計をESI+モードで使用して、MS検出を得た。

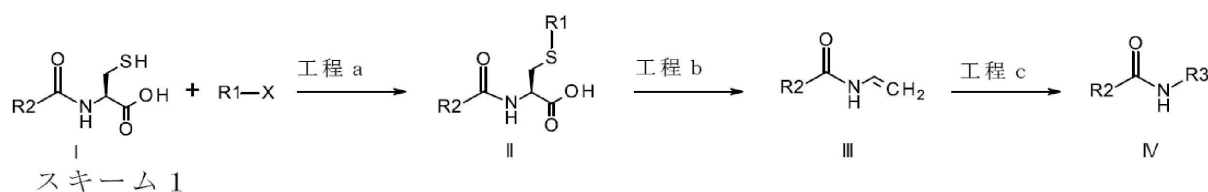
10

【0128】

C末端α-アミド化の一般的反応プロトコル

本発明で実施される反応は、概して、以下に示すスキーム1に従う。

【化15】



20

上記の式における可変置換基の意味は、スキーム（1）と同じである。

【0129】

本発明のα-アミド化反応は、3つの異なるプロトコルである、スクリーニングスケール、バッチスケール、およびフロー手順に従って行った。これらについては、以下でさらに詳細に説明する。

【0130】

スクリーニングスケール反応の一般的プロトコル：

反応を、まず、スキーム1に従ってスクリーニングスケールで行った。個々の工程（（a）、（b）、および（c））の手順を以下でさらに詳細に説明する。

30

【0131】

工程（a）-C末端システイン残基を含むペプチドまたはタンパク質の光標識とのカップリング

非特異的酸化を最小限に抑えるために、50 mMのグリシンを有する25 mMのピストリスメタンpH 6.4を含有する水性反応緩衝液を、窒素ガスで15分間バブリングすることによって脱気した。C末端Cys修飾ペプチドを反応緩衝液中に溶解させて、1 mMストック溶液を生成した。25 μLの1 mMストックを、65 μLの追加のアッセイ緩衝液とともに、96ウェルV底アッセイプレートのウェルに加えた。2-ブロモマレイミド（3-ブロモ-1H-ピロール-2,5-ジオン、CAS：98026-79-0）またはNBD塩化物（4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン、CAS：10199-89-0）のいずれかをアセトニトリルに溶解させて、5 mMストック溶液を得た。10 μLの5 mM光コンジュゲート試薬をウェルに加え（500 μMの最終濃度、2当量）、振盪しながら室温で1時間インキュベートさせた。所望の場合、LC-MSによって変換をモニターしてもよい。

40

【0132】

工程（b）-得られたペプチド-光標識コンジュゲートを光化学的に変換して、C末端エナミドを得る：

1時間後、プレートを、C末端エナミドを生成するために利用した光アリアル基に従って照射した。2-ブロモマレイミドについては、365 nmのLEDの1.5メートルのストリップを照射源として用い、変換を4時間進行させた。冷却ファンを使用して、反応

50

混合物を室温で維持した。NBD塩化物については、手持ち式の白色CFLランプまたは450nmのLEDのストリップを用いて照射を行ってもよい。変換を1時間室温で進行させた。所望の場合、LC-MSによって変換をモニターしてもよい。

【0133】

工程(c)ー得られたC末端エナミドを切断して、C末端α-アミドを得る：

エナミドからC末端α-アミド生成物への酸分解：

様々な強酸を使用して、エナミドの酸分解を進行させた(表2)。概して、酸を10倍の水溶性ストック溶液からの反応混合物に加えた。試験条件の大部分にトリフルオロ酢酸を使用した。TFAについては、10μLのTFA/水の50/50溶液を反応ウェルに加え(5%の最終TFA濃度は)、プレートを室温で最大24時間振盪した。メチオニン、インドール、またはカフェイン酸などの添加剤を利用したときは、酸を加える前に、添加剤試薬を50倍または100倍のストック溶液から反応物にスパイクした。変換をLC-MSによってモニターした。

10

【0134】

逆電子要請型Diels-Alder(IEDDA)を使用したエナミド切断

エナミドは、ジピリジル-テトラジン(3,6-ジ-2-ピリジル-1,2,4,5-テトラジン、CAS:1671-87-0)を用いたIEDDA化学を使用して切断することもできる。ジピリジル-テトラジンを、80%のアセトニトリルと20%の125mMの水溶性HClとの混合物に溶解させて、12.5mMのストック溶液(HClの最終濃度=25mM、テトラジン濃度に基づいて2当量)を得た。ジピリジル-テトラジンの溶解度はアセトニトリル単独では不良であり、ピリジル基をプロトン化し、溶解度を改善するためには酸を加える必要があった。このストック溶液10μLを反応ウェルに加え(1.25mMの最終テトラジン濃度、ペプチド濃度に基づいて5当量)、反応物を37℃で24時間インキュベートした。変換をLC-MSによってモニターした。

20

【0135】

UPLC-MSによる変換の分析

反応試料を、UPLC-MS分析によって直接分析した(勾配:95/5 A/Bで0.5分間保持し、7分かけて95/5 A/Bから55/45 A/Bに勾配、続いて洗浄および再平衡化)。いくつかの事例では、214nmでの積分UVデータを使用して変換を定量化するのに十分なクロマトグラフィー分解能を達成することはできなかった。変換を定量化するために、全てのペプチド出発材料、中間体、副生成物、および所望の生成物の計算された質量を入力して、抽出イオンクロマトグラム(EIC)を生成した。これらのEICの積分ピークを合計し、100%に対して正規化し、正規化した積分に基づいて所望の生成物への変換を計算した。

30

【0136】

バッチスケール反応のプロトコル：

攪拌棒または12.5mL容量の比色計キュベット(カタログ番号76016-356)を装備したバイアル内で、C末端システイン残基を含む1.0当量のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを、ビス-トリスメタン緩衝液(25mM、pH6.3)に溶解させ、最終ペプチド濃度を250μMとした。(3-ブロモ-1H-ピロール-2,5-ジオン、CAS:98026-79-0)またはNBDクロリド(4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン、CAS:10199-89-0)のストック溶液を、1:1のH₂O:MeCN中で調製し、システインカップリングのために、ペプチドに対して2当量を反応容器に加えた。反応物を、1時間、またはLC/MSによる反応完了まで攪拌させた。次いで、反応容器を、365nmのLED、手持ち式白色CFL作業灯、または450nmの青色LEDのストリップで0.25~4時間にわたって照射した。冷却ファンを使用して、反応混合物を室温で維持した。LC/MSによって反応が完了したら、トリフルオロ酢酸(TFA)を加え(5%の最終TFA濃度)、反応物を周囲温度で12~24時間攪拌させた。あるいは、5当量のジピリジル-テトラジン(3,6-ジ-2-ピリジル-1,2,4,5-テトラジン、CAS:1671-87-0)をストック溶液から加え

40

50

、1.25 mMのテトラジン（2.5 mMのHCl、80：20のMeCN：H₂Oに溶解）の最終濃度を得て、反応物を37℃で24時間インキュベートした。C末端α-アミドへの変換をLC-MSによってモニターした。

【0137】

ジスルフィド結合を含有するペプチドのバッチスケール反応のプロトコル：

攪拌棒または12.5 mL容量の比色計キュベット（カタログ番号76016-356）を装備したバイアル内で、C末端システイン残基を含む1.0当量のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを、ビスートリスメタン緩衝液（25 mM、pH 6.3）に溶解させ、最終ペプチド濃度を250 μMとした。界面活性剤を溶液に加えて、中間体の溶解度を改善してもよい。60 mMの界面活性剤の濃度が好ましい場合がある。NBD塩化物（4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン、CAS：10199-89-0）のストック溶液を、1：1のH₂O：MeCN中で調製し、全体的システインカップリングのために、ペプチドに対して4当量を反応容器に加えた。反応物を、2時間、またはLC/MSによる反応完了まで攪拌させた。次いで、反応容器を、手持ち式白色CFL作業灯、または450 nmの青色LEDのストリップで0.25～4時間にわたって照射した。冷却ファンを使用して、反応混合物を室温で維持した。LC/MSによって反応が完了したら、H₂O中の求核性硫化物、例えば、システアミン（8当量）およびシステアミン（1.2当量）の溶液を加え、周囲温度で2時間攪拌させて、骨格システインチオールを遊離させ、ジスルフィドに酸化させる。トリフルオロ酢酸（TFA）を加え（5%の最終TFA濃度）、反応物を周囲温度で12～24時間攪拌させた。あるいは、5当量のジピリジル-テトラジン（3,6-ジ-2-ピリジル-1,2,4,5-テトラジン、CAS：1671-87-0）をストック溶液から加え、1.25 mMのテトラジン（2.5 mMのHCl、80：20のMeCN：H₂Oに溶解）の最終濃度を得てもよく、反応物を37℃で24時間インキュベートし得る。C末端α-アミドへの変換をLC-MSによってモニターした。

【実施例】

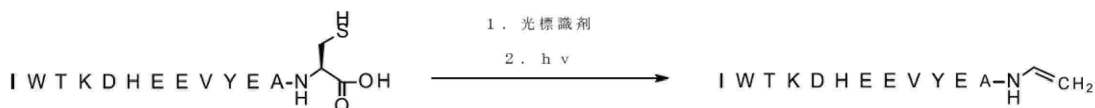
【0138】

【実施例1：光標識実験】

バッチスケールα-アミド化について概説した一般的な手順に従って、様々な化学骨格および吸収波長を網羅する様々な光標識を評価した。反応を、光標識コンジュゲーションおよび適切な光源を用いた照射後に、C末端エナミドへの変換について上で概説したように、UPLC-MSによって直接分析した。結果を表1に提示する。

【表1】

表1. 光標識剤とのポリペプチドのカップリングおよびエナミドへの光化学的変換（工程（a）および（b））



光標識剤	光源	エナミド収率[%]
3-ブromo-1H-ピロロ-2,5-ジオン	365nmのLED	89
4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン	CFL	94
2-ブromo-1,4-ナフトキノ	CFL	58
1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン	365nmのLED	41
4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン	CFL	81

10

20

30

40

50

【 0 1 3 9 】

C末端システインを含む配列番号2に示されるアミノ酸配列のR2を有するペプチドのC末端エナミドへの光標識および変換について、変換が観察された。構造的に多様な光標識剤を用いて反応を実施し、光標識コンジュゲートの変換を、365nmで、可視光を使用して達成した。

【 0 1 4 0 】

【実施例2：エナミド切断実験】

スクリーニングスケールα-アミド化の一般的なプロトコルに従って、対応するC末端α-アミドへのエナミドの切断（工程（c））について、広範な酸およびテトラジンを評価した。結果を表2に提示する。

【表2】

表2. 酸またはテトラジンをを用いたエナミドからC末端α-アミドへの切断（工程c）

CH₃

I W T K D H E E V Y E - N H

O

H

CH₂

切断試薬

24時間温度

CH₃

I W T K D H E E V Y E - N H

O

NH₂

エントリー	エナミド切断試薬	温度[℃]	収率[%]
1	TFA (5%v/v)	23	64
2	HCl (500mM)	23	65
3	H ₂ SO ₄ (500mM)	23	65
4	TsOH (5%w/v)	23	67
5	H ₃ PO ₄ (500mM)	23	37
6	シュウ酸 (5%w/v)	23	51
7	3,6-ジ-2-ピリジル-1,2,4,5-テトラジン	37	79
8	6,6'-(1,2,4,5-テトラジン-3,6-ジイル)ジニコチン酸	37	80

【 0 1 4 1 】

エナミドからC末端α-アミドへの酸分解を、様々な酸について達成した。反応は、強酸で効率的であることが示された。IEDDA反応によるエナミドの切断は、ジ-2-ピリジル置換テトラジンでさらに効率的であり、C末端α-アミドを高い収率で提供した。

【 0 1 4 2 】

【実施例3：最後から二番目のAA位置に変動がある場合の反応性能】

例示的なペプチドの最後から二番目のAA位置に関する反応の性能を、4セットの条件について調査した。スクリーニングスケールα-アミド化について概説した一般的なプロトコルを、これらの実験に使用した。

【 0 1 4 3 】

反応における詳細な分析のために、3-ブロモ-1H-ピロール-2,5-ジオン（化学式1）および4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン（化学式2）の2つの光標識剤を選択し、これらは、典型的には、それぞれUV源および可視光源下で、コスト、高いコンジュゲーション収率、および容易な光分解の最良の組み合わせを提供するものであった。最終のエナミド切断工程を、酸分解経路については5%v/vのTFAを用いて、IEDDA媒介性エナミド切断については3,6-ジ-2-ピリジル-1,2,4,5-テトラジンをを用いて実施した。一般的な反応条件および結果を以下の表3および4に提示する。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. 反応条件 A、B、C、および D

条件	光標識剤	光源	エナミド切断試薬
A	3-ブ ロ モ-1H-ピ ロ ール -2, 5-ジ オン (化学式1)	365nmの UV 光	5%v/vの TFA
B	3-ブ ロ モ-1H-ピ ロ ール -2, 5-ジ オン (化学式1)	365nmの UV 光	3, 6-ジ-2-ピ リ ジル -1, 2, 4, 5-テ ト ラ ジ ン
C	4-ク ロ ロ-7-ニ ト ロ ベ ン ゾ フ ラ ザ ン (化学式2)	CFL または 450nmの LED	5%v/vの TFA
D	4-ク ロ ロ-7-ニ ト ロ ベ ン ゾ フ ラ ザ ン (化学式2)	CFL または 450nmの LED	3, 6-ジ-2-ピ リ ジル -1, 2, 4, 5-テ ト ラ ジ ン

10

20

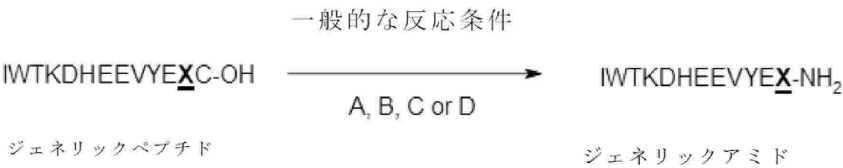
30

40

50

【表 4】

表 4．条件 A～D 下での、最後から二番目のアミノ酸 X が異なるジェネリックペプチドの反応性の調査。R 2 のアミノ酸配列（すなわち、C 末端システインアミド化タグを除くペプチドの配列）、「ジェネリックペプチド」の I W T K D H E E V Y E X を、配列番号 1 として配列表に示す。



エントリー	アミノ酸 X	条件 A、収率 [%]	条件 B、収率 [%]	条件 C、収率 [%]	条件 D、収率 [%]
1	Ala	65	77	68	79
2	Asp	62	59	52	61
3	Glu	61	78	61	79
4	Phe	64	77	64	86
5	Gly	63	76	61	79
6	His	64	75	70	83
7	Ile	69	76	72	81
8	Lys	70	77	70	86
9	Leu	68	77	73	86
10	Met	60	66	66	80
11	Asn	72	76	72	82
12	Pro	78	74	83	86
13	Gln	60	79	58	83
14	Arg	69	76	71	85
15	Ser	54	78	57	83
16	Thr	44	77	48	78
17	Val	66	77	70	81
18	Trp	56	77	27	72
19	Tyr	59	77	56	84
20	Ala*	78	79	75	79

* エントリー 20 の出発材料配列は、ジェネリックペプチドの配列とは異なり、配列番号 3 として配列表に示し、この反応の生成物の配列は、配列番号 4 である。

【0144】

C 末端 α-アミド化反応の範囲を、ジェネリックペプチドの最後から二番目のアミノ酸位置に関して調査した。反応は、最後から二番目の位置にあるいずれのアミノ酸についても良好から優良な収率で進行し、この位置での側鎖官能基に対する広範な耐性が示される。2-ブロモマレイミドまたは NBD-C1 のいずれかを光標識工程で利用する場合、反応は高効率で進行する。エナミドが酸性分解によってまたは IEADDA 反応によって切断されるときに、C 末端 α-アミドの高収率が観察され、酸性または中性条件下でそれぞれ実施することができる 2 つの相補的反応の選択が可能になる。

【0145】

[実施例 4：ジスルフィド含有ペプチド]

本発明を、ジスルフィド結合を含有する C 末端 α-アミドを有するペプチドの調製に使用した。上で特定したジスルフィド結合を含有するペプチドのバッチスケール反応のプロトコルを、界面活性剤を使用しなかったことを除いて、スキーム 1 に概して示される反応の後でこの実験に使用した。H₂O 中のシステアミンの求核性硫化物（8 当量）およびシスタミンの酸化パートナー（1.2 当量）を使用した。システインリッチ骨格を、第 1 の工程において光標識で全体的にアルキル化した。C 末端アルキル化システインの選択的光分解が、光への曝露時に発生した。残りのアルキル化システインを求核性硫化物で除去し、酸化させてシステイン硫化物を遊離させ、ジスルフィド結合を含有する所望のペプチドを形成した。次に、反応を、TFA を用いたエナミド切断について概説した条件に従って進行させて、以下の表 5 に示される結果を得た。

【表 5】

表 5. 光化学的アプローチの対象となるジスルフィド含有ペプチドの C 末端アミド化収率

出発材料のポリペプチド部分 (R2)	アミド収率 [%]
IECTKSEGCEEVYEADHGEP (配列番号 15)	60

【0146】

アミド化状態でジスルフィド結合を含有するモデルペプチド（IECTKSEGCEEVYEADHGEP、配列番号 15）の効率的なアミド化は、骨格システインを含有するペプチドが、所望の C 末端 α-アミドへの選択的転換を容易に受けることを示す。

【0147】

[実施例 5：生物学的に活性なペプチドの調製]

本発明を使用して、生体関連ペプチドおよび市販のペプチド治療薬を合成した。スクリーニングスケール α-アミド化について概説したプロトコルをこれらの実験に使用し、反応は、概して、表 3 に概説したスキーム 1 および条件 C または D に従った。結果を表 6 に提示する。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6．本発明による生物学的に活性なペプチドの調製

エン トリ ー	出発材料のポリペプチド部分 (R2)	生物活性 ペプチド	アミド 収率 [%] 条件C	アミド収率 [%] 条件D
1	HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR (配 列番号3)	GLP-1	53	70
2	PEGKGEQEHS QQKEEEEMAV (配列番号4)	PSTi8	69	72
3	IKPEAPGEDA SPEELNRYYA SLRHYLNLVT RQRY (配列番号5)	pYY (3-36)	不検出	70
4	Pyr-HWSYGLRPG (配列番号6)	LHRH	不検出	78
5	VPLPAGGGTV LTKMYPRGNH WAVGHLM (配列 番号7)	ガストリ ン放出ペ プチド	48	68
6	SYSMEHFRWG KPVGKKRRPV KVYP (配列番号 8)	コシント ロピン	不検出	63
7	QDEGSEATGF LPAAGEKTSR PLGNLAEELN GYSRKKGGFS FRF (配列番号9)	QRF-アミ ド	不検出	73
8	HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSRHYLNLV TRQRY (配列番号10)	EP45	56	49
9	ミリスチン酸-GTNLSVPNPLG FFPDHLDP A FGANSNPDW DFNPKNKHWP EANKVG (配列番 号11)	ブレビル チド	不検出	78
10	SFSGFGSPLD RLSAGSVDHK GKQRKVVDHP KRRFGIPMDR IGRNRLSNSR (配列番号12)	オステク リン	57	66
11	Ac-YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE QELLELDKWA SLWNWF (配列番号13)	エンフビ ルチド	38	49
12	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGS NTY (配列番号14)	ブラムリ ンチド	28	不検出

【0148】

生物学的に活性なペプチドおよび市販のペプチド治療薬のC末端システイン延長前駆体を調製し、C末端α-アミド化プロセスに供した。全ての実施例で、対応する生体関連C末端α-アミドの良好な収率が得られ、本発明の易しい反応条件および広い対象範囲が浮き彫りとなった。C末端α-アミド化プロセスは、ペプチドのサイズおよび組成にかかわらず良好に実施し、いずれのペプチドまたはタンパク質に対しても化学作用の適用性が実証された。

【0149】

【実施例 6：GLP-1 受容体-アミリン受容体共作動薬中間体のアップスケール調製】

本発明を、以下で詳細に説明するハイブリッドバッチ-フロー手順を使用して、より大きな規模で適用した。

【0150】

本実施例は、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有する N 末端延長部とを含む、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を有するペプチド R2 に対して行った。

【0151】

0.2～0.3 mM の水性 TCEP (780 ml、pH 7) 中の C 末端システインアミド化タグ (12.4 g、1.44 mmol) を有する配列番号 17 によるペプチド R2 の溶液を含む、窒素雰囲気下にあるアルミ箔で包んだ 1 リットルのガラス反応器に、MeC

N (5 . 2 m l) 中の N B D - C l (5 1 9 m g 、 2 . 6 m m o l) の溶液を加えた。周囲温度で 8 0 分間攪拌した後、H P L C 分析により反応完了が示された。

【 0 1 5 2 】

得られた溶液を、C o r n i n g (商 標) L a b P h o t o R e a c t o r (2 . 7 m L の流体モジュール体積、1 0 m L / 分の流量、2 0 ° C の反応器熱交換温度) 中で 4 0 5 n m (青色 L E D 、 6 1 W の入力電力) で照射し、反応器を、追加の 5 0 m l の水でフラッシュした。H P L C 分析により、出発材料の少なくとも 8 0 % の消費が示した。

【 0 1 5 3 】

6 M のリン酸 (H ₃ P O ₄ 、 1 6 0 m L) を、得られた溶液に加えた。1 6 時間攪拌した後、L - ヒスチジン (7 . 4 5 g) を加え、混合物を周囲温度で 1 0 分間攪拌した。次に、温度を 4 0 ° C 未満に維持しながら溶液が p H 8 . 5 に達するまで、6 M の水性 K O H を慎重に加えた。得られた混合物を、限外濾過 (M W C O 5 k D a) によって 1 . 0 L に濃縮し、一定残余体積 (連続モード) を 0 . 8 ~ 1 L に維持しながら、3 . 0 L の 2 0 m M トリス緩衝液 p H 8 でダイアフィルトレーション (M W C O 5 k D a) した。最終混合物 (8 0 0 m L) を H P L C によって分析した。変換結果を以下に示す。

【表 7】

表 7 . N 末端延長部を有するペプチドのスケールアップ手順の C 末端アミド化収率

出発材料のポリペプチド部分 (R2)	アミド収率 [%]
DVKPGQPLEDEGDREGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWLVRGRKGGGGEASELST AALGRLSAELHELATLPRTETGSGSP (配列番号 17)	78

【 0 1 5 4 】

反応試料を 1 : 1 v / v の M e C N / 水で 1 0 倍希釈し、R P - H P L C 分析によって分析した (K i n e t e x 1 , 7 μ m C 1 8 1 0 0 Å 1 0 0 × 2 , 1 m m 、溶離液 A : 水中の 1 0 % の M e C N + 0 . 1 % の T F A 、溶離液 B : 水中の 9 0 % の M e C N + 0 . 1 % の T F A 。勾配 : 1 2 分で 2 0 ~ 5 0 % の B 、 2 1 4 n m および 4 2 0 n m の両方で U V 検出。変換収率を、外部 H P L C 標準を使用して計算した。

【 0 1 5 5 】

本実施例は、C 末端アミドを有するペプチドのより大規模な生成を示し、それぞれのペプチドアミドは、光化学的 C 末端 α - アミド化法を使用して高収率で生成された。加えて、本実施例により、本光化学法は、光化学的変換工程 (スキーム 1 または 2 の工程 (b)) のみをフローセットアップで実施したハイブリッドセットアップで完了できることが示される。実施例により、概して、本方法の堅牢性およびスケーラビリティが浮き彫りになる。

【 0 1 5 6 】

本発明のある特定の特徴を本明細書に例証し記載してきたところで、多くの修正、置換、変更、および均等物が当業者には想到されるであろう。したがって、当然のことながら、添付の実施形態が、本発明の真の趣旨の範囲内に含まれる全ての修正および変更を包含するよう意図されている。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

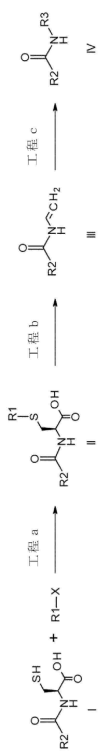


図 1

【図 2】

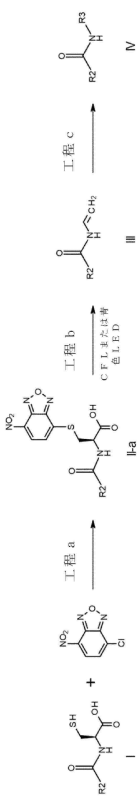


図 2

【配列表】

2024545145000001.xml

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K1/00 C07K1/12 C07K1/13 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TEDALDI L M ET AL: "Bromomaleimides: new reagents for the selective and reversible modification of cysteine", CHEMICAL COMMUNICATIONS, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, UK, no. 43, 21 November 2009 (2009-11-21), pages 6583-6585, XP002601597, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/B915136B [retrieved on 2009-09-16]	1-4, 9, 11, 12, 15
A	scheme 6 ----- -/-	5-8, 10, 13, 14
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent 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 17 April 2023		Date of mailing of the international search report 26/04/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jetter, Sonya

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/085255

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMESH SUHAS ET AL: "Highly chemoselective ligation of thiol- and amino-peptides on a bromomaleimide core", CHEMICAL COMMUNICATIONS , vol. 52, no. 11 1 January 2016 (2016-01-01), pages 2334-2337, XP055936700, UK ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/C5CC09457G Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2016/cc/c5cc09457g figures 4, 5 -----	1-15
A	DANIEL A. RICHARDS ET AL: "Photochemically re-bridging disulfide bonds and the discovery of a thiomaleimide mediated photodecarboxylation of C-terminal cysteines", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 14, no. 2, 25 November 2015 (2015-11-25), pages 455-459, XP055367263, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/C5OB02120X scheme 5, scheme 6 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/085255

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

インコーポレイテッド

(72)発明者 シドニー・ウォン

アメリカ合衆国・ワシントン・98109・シアトル・フェアビュー・アベニュー・ノース・53
0・ノヴォ・ノルディスク・リサーチ・センター・シアトル・インコーポレイテッド

(72)発明者 デヴィッド・トーマス・ヒメル

アメリカ合衆国・ワシントン・98109・シアトル・フェアビュー・アベニュー・ノース・53
0・ノヴォ・ノルディスク・リサーチ・センター・シアトル・インコーポレイテッド

(72)発明者 ヴォウター・フレデリク・ヨハン・ホーゲンドルフ

デンマーク・2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・1

(72)発明者 フェリックス・ヴォイチク

デンマーク・2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・1

(72)発明者 ニコラス・レイモンド・コックス

アメリカ合衆国・ワシントン・98109・シアトル・フェアビュー・アベニュー・ノース・53
0・ノヴォ・ノルディスク・リサーチ・センター・シアトル・インコーポレイテッド

(72)発明者 ベンジャミン・マシュー・ウィリアムズ

デンマーク・2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・1

(72)発明者 アスムス・リングルビョーグ・モートゥンスン

デンマーク・2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・1

F ターム (参考) 4C084 AA06 BA01 CA59 ZC80

4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20 BA50 CA40

DA45 DA47 EA20 FA10 FA61