

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第3部門第2区分
【発行日】平成24年7月5日(2012.7.5)

【公表番号】特表2011-520844(P2011-520844A)
【公表日】平成23年7月21日(2011.7.21)
【年通号数】公開・登録公報2011-029
【出願番号】特願2011-508936(P2011-508936)
【国際特許分類】

C 0 7 K 1/16 (2006.01)

C 0 7 K 14/605 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 1/16 Z N A

C 0 7 K 14/605

【手続補正書】
【提出日】平成24年5月14日(2012.5.14)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【発明の名称】固相合成法により調製されたペプチドの精製
【技術分野】
【0001】

本発明は、固相ペプチド合成により調製されたペプチドを精製する方法、該方法用の試薬を含むキット、及び該方法により得られた精製ペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

ポリペプチドは、全ての主要な治療分野において、病気を処置するための医薬として、ますます使用されている。治療用途のポリペプチドは、患者への適用において、確実に有害事象を引き起こさないよう、また有効性のあるものとするために、高度に精製される。

治療用ペプチドを得るための一方法は固相ペプチド合成である。固相ペプチド合成の生成物は、不溶性の支持体に結合したペプチドである。ついで、この方法で合成されたペプチドは樹脂から切断され、切断されたペプチドが単離される。

【0003】

固相ペプチド合成中の副反応を回避するために、カップリング反応中、アミン基は、アミノ酸のアルファアミノ基に主としてカップリングする化学部分を含むアミノ末端保護基(N末端保護基とも称される)でマスクされる。典型的には、アミノ末端保護基は、次のアミノ酸が成長ペプチド鎖に付加される前に脱保護反応において除去されるが、ペプチドが固相合成中に支持体から切断された場合は、保持されている。アミノ末端基は、さらにペプチドの洗浄又はプロセシング工程中にも保持可能である。

固相ペプチド合成からの粗ペプチド混合物は、多量の有機溶媒、試薬、及びプロセスに関連する不純物を含む。多くの場合、ペプチド混合物は、クロマトグラフィーコントロール中、インラインUV測定に干渉する、高UV吸収を示す。さらに、多くの不純物はイオン交換の能力を低下させ、完全な除去が困難になる。従って、典型的には、所定レベルの不純物が精製後も存在する。

【0004】

9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)は、好ましいN末端保護基の一例

である。Fmocは、塩基によりアミノ酸から脱カップリング可能な、塩基過敏性N末端保護基である。

ジベンゾフルベン(dibenzofulvene)(DBF)は、保護基、例えばFmocの切断中に生じ、続く、除去は困難で高価なものであることが知られている。よって、固相ペプチド合成の後の効果的な精製方法が、かなり必要とされている

【発明の概要】

【0005】

本発明の第1の態様は、固体支持体と、固相ペプチド合成により調製されたペプチドの粗抽出物とを接触させる工程を含む、固相ペプチド合成により調製されたペプチドを精製する方法を提供する。

本発明の第2の態様は、固相ペプチド合成キットであって、固相ペプチド合成用の試薬、ここに記載の固体支持体、及びここに記載の方法に従い、該キットを使用するための使用説明書を含むキットを提供する。

本発明の第3の態様は、ここに記載の方法により得られたペプチドを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、固相合成法により調製されたペプチドのコントロール精製により得られたクロマトグラムを表す。

【図2】図2は、ポリエチレンを含有する容器に、固相合成法により調製されたペプチドを保管した後に得られたクロマトグラムを表す。

【図3】図3は、100%エタノールの存在下、固相合成法により調製されたペプチドをクロマトグラフ分離した後に得られたクロマトグラムを表す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

(発明の記述)

以下は、明細書に使用される用語の詳細な定義である。

ここで使用される場合「バッファー」なる用語は、クロマトグラフィー用溶液等の溶液のpHが経時的に変化する傾向を低減する化学化合物を称する。バッファーには、次の非限定的例：酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、グリシルグリシン、グリシン、ヒスチジン、リジン、リン酸ナトリウム、ボラート、トリスヒドロキシメチル-アミノメタン、エタノールアミン、及びその混合物が含まれる。

【0008】

ここで交換可能に使用される場合、「ポリペプチド」又は「ペプチド」なる用語は、ペプチド結合により結合した、少なくとも5つの構成アミノ酸からなる化合物を意味する。構成アミノ酸は遺伝暗号によりコードされるアミノ酸の群からのものであってよく、また遺伝暗号によりコードされない天然アミノ酸、並びに合成アミノ酸であってもよい。22のコード化(タンパク新生とも称される)アミノ酸は：アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンである。遺伝暗号によりコードされないが、ペプチド結合を介してペプチドに導入可能な天然アミノ酸は、天然の非タンパク質新生アミノ酸と称され、例えば γ -カルボキシグルタマート、オルニチン、ホスホセリン、D-アラニン及びD-グルタミンである。合成の非タンパク質新生アミノ酸には、化学合成により製造されたアミノ酸、すなわち遺伝暗号によりコードされるアミノ酸のD-異性体、例えばD-アラニン及びD-ロイシン、Aib(α -アミノイソ酪酸)、Abu(α -アミノ酪酸)、Tle(tert-ブチルグリシン)、3-アミノメチル安息香酸、アントラニル酸、アミノ酸のベータアナログ、例えば β -アラニン等、D-ヒスチジン、デス-アミノ(desamino)-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N^α-アセチル-ヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジン、 α -メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン又は4-ピリジル

アラニン、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、(1-アミノシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸、又は(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸が含まれる。

【0009】

ポリペプチドは、単一のペプチド鎖を含むものであってもよく、1以上のペプチド鎖、例えば、2つの鎖がジスルフィド結合により結合しているヒトインスリンを含むものであってもよい。

【0010】

ここで使用される場合「グルカゴン様ペプチド」なる用語は、エキセンディン類、例えばエキセンディン-3及びエキセンディン-4、並びにプレプログルカゴン遺伝子から誘導されたグルカゴン、すなわちグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)、グルカゴン様ペプチド2(GLP-2)及びオキシントモジュリン(OXM)、並びにそのアナログ及び誘導体に加えて、ホモログペプチドも称する。アメリカドグトカゲに見出されるエキセンディンは、GLP-1に相同であり、さらにインスリン分泌効果に働きかける。エキセンディン類の例は、エキセンディン-4及びエキセンディン-3である。グルカゴン様ペプチドは、配列番号：1-6に示される配列を有する。

グルカゴン(配列番号：1)

GLP-1(配列番号：2)

GLP-2(配列番号：3)

エキセンディン-4(配列番号：4)

エキセンディン-3(配列番号：5)及び

OXM(配列番号：6)

【0011】

ペプチドを称する際にここで使用される場合、「アナログ」なる用語は、修飾されたペプチドを意味し、ペプチドの一又は複数のアミノ酸残基は、他のアミノ酸残基で置換されており、及び／又は一又は複数のアミノ酸残基はペプチドから欠失しており、又は一又は複数のアミノ酸残基はペプチドに付加されている。アミノ酸残基のこのような付加又は欠失は、ペプチドのN末端及び／又はペプチドのC末端で生じる可能性がある。多くの場合、アナログを記載するための2つの異なる簡単なシステムが使用される：例えばArg³⁴-GLP-1(7-37)又はK34R-GLP-1(7-37)は、GLP-1アナログと命名され、ここでは、34位で自然に生じたりジンはアルギニンで置換されている(アミノ酸の標準的な1文字又は3文字略語を、IUPAC-IUB命名法に従い使用)。光学異性体が記載されない全てのアミノ酸は、L-異性体を意味すると理解される。

【0012】

本発明の一実施態様において、最大17のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大15のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大10のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大8のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大7のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大6のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大5のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大4のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大3のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、最大2のアミノ酸が修飾されている。本発明の一実施態様において、1のアミノ酸が修飾されている。

【0013】

ペプチドに関してここで使用される場合、「誘導体」なる用語は、化学的に修飾されたペプチド又はそのアナログを意味し、ここで少なくとも一の置換基がその未修飾のペプチド又はアナログ中に存在していない、すなわち共有結合的に修飾されたペプチドである。典型的な修飾は、アミド、炭水化物、アルキル基、アシル基、エステル、ペグ化等である。GLP-1(7-37)の誘導体の例は、N^ε26-((4S)-4-(ヘキサデカノイルアミノ)

-カルボキシ-ブタノイル)[Arg³⁴, Lys²⁶]GLP-1-(7-37)である。

【0014】

ペプチドに関してここで使用される場合、「そのフラグメント」なる用語は、親ペプチドのアミノ酸の少なくとも20%を有する、ペプチドの任意のフラグメントを意味する。よって、ヒト血清アルブミンにおいて、ヒト血清アルブミンが585のアミノ酸を有しているならば、フラグメントは少なくとも117のアミノ酸を有する。一実施態様において、フラグメントは親ペプチドのアミノ酸の少なくとも35%を有する。他の実施態様において、フラグメントは親ペプチドのアミノ酸の少なくとも50%を有する。他の実施態様において、フラグメントは親ペプチドのアミノ酸の少なくとも75%を有する。

【0015】

ペプチドに関してここで使用される場合、「変異体」なる用語は、親ペプチドのアナログ、親ペプチドの誘導体、又は親ペプチドのアナログの誘導体である、修飾されたペプチドを意味する。

ここで使用される場合「GLP-1ペプチド」なる用語は、GLP-1(7-37)、GLP-1(7-37)のアナログ、GLP-1(7-37)の誘導体、又はGLP-1(7-37)アナログの誘導体を意味する。

ここで使用される場合「GLP-2ペプチド」なる用語は、GLP-2(1-33)、GLP-2のアナログ、GLP-2(1-33)の誘導体、又はGLP-2(1-33)アナログの誘導体を意味する。

ここで使用される場合「エキセンディン-4ペプチド」なる用語は、エキセンディン-4(1-39)、エキセンディン-4アナログ、エキセンディン-4誘導体、又はエキセンディン-4アナログの誘導体を意味する。

【0016】

ここで使用される場合、「血漿安定した」グルカゴン様ペプチドなる用語、例えばGLP-1、GLP-2、グルカゴン、エキセンディン-3又はエキセンディン-4は、化学的に修飾されたグルカゴン様ペプチド、すなわち、以下の方法により測定されるように、ヒトにおいて少なくとも10時間のインビボ血漿排出半減期を示す、GLP-1、GLP-2、グルカゴン、エキセンディン-3又はエキセンディン-4等のアナログ又は誘導体を意味する。ヒトにおけるグルカゴン様ペプチドの血漿排出半減期を測定する方法は次の通りである：本化合物を、等張バッファー、pH7.4、PBS、又は任意の他の適切なバッファーに溶解させる。所定量を、末梢的に好ましくは腹腔又は上部大腿に注射する。活性化化合物を測定するための血液サンプルを、頻繁な間隔、かつ、末端の排出部位を覆うのに十分な持続時間(例えば、投与前、投与後1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24(2日)、36(2日)、48(3日)、60(3日)、72(4日)及び84(4日)時間)で取り出す。活性化化合物の濃度の測定は、Wilkenら、Diabetologia 43(51):A143, 2000に記載されたようにして実施される。得られた薬物動態パラメータを、商業的に入手可能なソフトウェアWinNonlin Version 2.1 (Pharsight, Cary, NC, USA)を用いる、非コンパートメントモデルの使用により、個々の被験者に対する濃度-時間のデータから算出する。末端排出速度定数を、濃度-時間曲線の末端の対数線形部分における回帰から算出し、排出半減期を算出するのに使用する。

【0017】

ここで使用される場合「インスリン分泌性剤」なる用語は、ヒトGLP-1レセプターのアゴニストである化合物、すなわち、ヒトGLP-1レセプターを含有する適切な媒体(このような媒体の一つは以下に開示される)において、cAMPの形成を刺激する化合物を意味する。インスリン分泌性剤の効力は、以下に記載されるように、用量反応曲線から、EC₅₀値を算出することにより決定される。

【0018】

クローンされたヒトGLP-1レセプターを発現するベビーハムスター腎臓(BHK)細胞(BHK-467-12A)を、100IU/mLのペニシリン、100µg/mLのストレプトマイシン、5%のウシ胎仔血清及び0.5mg/mLのジェネテシンG-418(Li

fe Technologies)が添加されたDME M培地で増殖させた。細胞を、リン酸緩衝食塩水で2回洗浄し、ヴェルセンを用いて収集した。バッファー1(20 mMのHEPES-Na、10 mMのEDTA、pH 7.4)において、ウルトラトラックス(Ultratrax)を用いてホモジナイズすることにより、細胞から細胞膜を調製した。ホモジネートを、4℃で15分、48000 x gの遠心分離にかけた。バッファー2(20 mMのHEPES-Na、0.1 mMのEDTA、pH 7.4)においてホモジナイズすることにより、ペレットを懸濁させ、ついで、4℃で15分、48000 x gの遠心分離にかけた。洗浄手順を1回以上繰り返した。最終ペレットをバッファー2に懸濁させ、直ちにアッセイに使用するか、又は-80℃で保管した。

【0019】

機能的レセプターアッセイを、インスリン分泌性剤による刺激に対する反応として、環状AMP(cAMP)を測定することにより実施した。形成したcAMPを、アルファスクリーン(AlphaScreen)TM cAMPキット(Perkin Elmer Life Sciences)により定量した。次の添加物：1 mMのATP、1 μMのGTP、0.5 mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX)、0.01%のトゥイーン(Tween)-20、0.1%のBSA、6 μgの膜調製物、15 μg/mLのアセプタービーズ、20 μg/mLのドナービーズで、6 nMのビオチニル-cAMPとプレインキュベートされたものと共に、全用量50 μLのバッファー3(50 mMのトリス-HCl、5 mMのHEPES、10 mMのMgCl₂、pH 7.4)内の、半領域の96-ウェルマイクロタイタープレートにおいてインキュベートを実施した。アゴニスト活性についてテストされた化合物を、バッファー3に溶解し、希釈した。各実験について、GTPを新たに調製した。室温で3時間、ゆっくりと攪拌しつつ、暗所でプレートをインキュベートし、続いてフュージョン(Fusion)TM 機器(Perkin Elmer Life Sciences)において計測した。個々の化合物について、濃度-反応曲線をプロットし、プリズム(Prism)バージョン4.0(GraphPad, Carlsbad, CA)を用いた、4つのパラメーターのロジスティックモデルを使用し、EC₅₀値を算出した。

【0020】

ここで使用される場合、「DPP-IV保護されたグルカゴン様ペプチド」なる用語は、血漿ペプチダーゼジペプチジルアミノペプチダーゼ-4(DPP-IV)に対して耐性のある前記グルカゴン様ペプチドとするために、天然ペプチドに対して、化学的に修飾されたグルカゴン様ペプチドを意味する。

【0021】

ジペプチジルアミノペプチダーゼIVによる分解に対するペプチドの耐性は、以下の分解アッセイにより測定される：

ペプチドのアリコート(5 nmol)を、5 mUの酵素活性に相当する1 μLの精製されたジペプチジルアミノペプチダーゼIVと共に、10-180分、100 μLの0.1 M トリエチルアミン-HCl バッファー、pH 7.4において、37℃でインキュベートする。10%のトリフルオロ酢酸を5 μL添加することにより、酵素反応を終了させ、ペプチド分解生成物を分離し、HPLC分析を使用して定量する。この分析を実施するための一方法は次の通りである：

混合物をVydac C18ワイドポア(widepore)(30 nmの孔、5 μmの粒子)250 x 4.6 mmのカラムに適用し、Siegelら、Regul. Pept. 1999 ; 79 ; 93-102及びMentleinら、Eur. J. Biochem. 1993 ; 214 : 829-35に従い、0.1%のトリフルオロ酢酸に直線段階的勾配をつけてアセトニトリルが入ったもの(3分間は0%のアセトニトリル、17分間は0-24%のアセトニトリル、1分間は24-48%のアセトニトリル)を、1 mL/分の流量で溶出させる。ペプチドとその分解生成物は、220 nm(ペプチド結合)又は280 nm(芳香族アミノ酸)の吸光度をモニターし、標準体に対するそれらのピーク領域を積分することにより定量してよい。ジペプチジルアミノペプチダーゼIVによるペプチドの加水分解速度は、10%未満のペプチドが加水分解されるインキュベート時間で概算される。

【0022】

ここで使用される場合「免疫調節されたエキセンディン-4化合物」なる用語は、エキセンディン-4(1-39)と比較して、ヒトにおいて低減した免疫応答性を有するエキセンディン-4(1-39)のアナログ又は誘導体である、エキセンディン-4ペプチドを意味する。免疫応答を評価する方法は、患者の処置の4週間後に、エキセンディン-4化合物に反応する抗体の濃度を測定することである。

【0023】

ここで使用される場合「インスリンペプチド」なる用語は、ヒトインスリン、ヒトインスリンアナログ又は化学的に修飾されたヒトインスリン、すなわちヒトインスリンの誘導体又はヒトインスリンアナログのいずれかであるペプチドを意味する。

【0024】

ここで使用される場合、「ヒトインスリン」なる用語は、その構造及び特性がよく知られているヒトホルモンを意味する。ヒトインスリンは、システイン残基の間のジスルフィド架橋により結合した2つのポリペプチド鎖、すなわちA鎖及びB鎖を有する。A鎖は21のアミノ酸のペプチドであり、B鎖は30のアミノ酸のペプチドであり、2つの鎖は3つのジスルフィド架橋で結合しており：第1はA鎖の6及び11位にあるシステインの間、第2はA鎖の7位にあるシステインとB鎖の7位にあるシステインとの間、第3はA鎖の20位にあるシステインとB鎖の19位にあるシステインの間にある。

【0025】

ここで使用される場合、「ポリペプチド生成物」なる用語は、製薬用組成物の製造に使用される精製されたペプチド生成物を意味する。よって、ポリペプチド生成物は、通常は、最終的な精製、乾燥又はコンディショニング工程から、生成物として得られる。生成物は、結晶、沈殿物、溶液又は懸濁液であってよい。また、ポリペプチド生成物は製剤原料、すなわち製薬用の活性成分として、当該技術で公知である。

【0026】

ここで使用される場合、「等電点」なる用語は、ポリペプチド等の高分子の全体的な正味荷電が0であるpH値を意味する。ポリペプチドには多くの荷電基が存在してよく、等電点においては、これら全ての荷電の合計が0になる。等電点を越えたpHでは、ポリペプチドの全体的な正味荷電は負であるのに対し、等電点以下のpH値では、ポリペプチドの全体的な正味荷電は正となるであろう。

【0027】

ここで使用される場合「製薬的に許容可能な」なる用語は、通常の製薬用途に適していること、すなわち患者に有害事象を引き起こさないことを意味している。

ここで使用される場合「賦形剤」なる用語は、製薬用組成物に通常添加される化学化合物、例えばバッファー、等張剤、防腐剤等を意味する。

ここで使用される場合「有効量」なる用語は、処置しない場合と比較して、患者を処置するのに十分有効な投与量を意味する。

【0028】

ここで使用される場合「製薬用組成物」なる用語は、製薬用賦形剤、例えばバッファー、防腐剤、場合によっては浸透圧調節剤及び／又は安定剤と共に、活性化合物又はその塩を含有する生成物を意味する。よって、製薬用組成物は、製薬用処方物としても、当該技術で公知である。

ここで使用される場合「病気の処置」なる用語は、病気、病状又は疾患を発症した患者の管理及びケアを意味する。処置の目的は、病気、病状又は疾患に抗することである。処置には、病気、病状又は疾患の除去又は制御、並びに病気、病状又は疾患に関連する症候群又は合併症を緩和するために、活性化合物を投与することを含む。

【0029】

固相ペプチド合成が当業者によく知られていることは理解されているであろう。さらに、カップリング、後続するペプチドからの保護基の脱保護工程も、当業者にはよく知られている。

一実施態様において、固相ペプチド合成では、アミノ末端保護基としてのFmocの使用

用を含む。さらなる実施態様において、本発明の精製方法は、粗ペプチド抽出物からジベンゾフルベンを除去する方法を含む。

一実施態様において、固相ペプチド合成生成物の脱保護工程は、塩基の使用を含む。さらなる実施態様において、塩基は第2級アミン及び／又は水素化分解可能な試薬から選択される。さらなる実施態様において、塩基は、ピペリジン、ジエチルアミン及びピペラジンから選択される。

【0030】

一実施態様において、固相ペプチド合成生成物の脱保護工程は、溶媒、例えばN-メチルピロリドン(NMP)、ジメチルホルムアミド(DMF)及びジクロロメタン(DCM)において実施される。

一実施態様において、脱保護工程後に得られる粗ペプチド抽出物の精製は、固体支持体に粗ペプチド抽出物を適用し、そこから精製された生成物を溶出させることを含む。

【0031】

一実施態様において、固体支持体はイオン交換クロマトグラフィーカラムを含む。さらなる実施態様において、固体支持体はアニオン性樹脂又はカチオン性樹脂を含む。さらなる実施態様において、固体状樹脂は、ソース(Source) 30Q、ポロス(Poros) 50HQ、QセファローズHP、Qセラミック・ハイパー(Hyper) DFからなる群から選択される樹脂を含む。さらなる実施態様において、固体支持体はアニオン性樹脂(例えば、ソース30Q等の第4級アンモニウム樹脂)を含む。

【0032】

本発明の一実施態様において、固体支持体がイオン交換クロマトグラフィーカラムを含む場合、本発明の精製工程は、次の：

- (a) 標準的なクロマトグラフィー条件下、固相合成から得られた粗ペプチド抽出物を、イオン交換クロマトグラフィーカラムに充填し；
 - (b) アルコールを用いて溶出工程を実施し；及び
 - (c) 一又は複数のバッファーを用いてクロマトグラフ分離を実施する；
- 工程を含む。

【0033】

一実施態様において、工程(b)のアルコールはC₁ - C₅アルコール、すなわち1～5の炭素原子を有するアルコールである。他の実施態様において、アルコールはC₁ - C₃アルコールである。一実施態様において、アルコールは：メタノール、エタノール、1-プロパノール(プロパノール)、2-プロパノール(イソプロピルアルコール)、2-メチル-1-プロパノール(イソブチルアルコール)、2-メチル-2-プロパノール(tert-ブチルアルコール)、1-ブタノール(ブタノール)、2-ブタノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール、2-メチル-2-ブタノール、3-メチル-2-ブタノール、1-ペンタノール(ペンタノール)、2-ペンタノール及び3-ペンタノールからなる群から選択される非分枝状又は分枝状アルコールである。さらなる実施態様において、アルコールはエタノール及びプロパノールからなる群から選択される。一実施態様において、工程(b)のアルコールは：70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール(水中にて)及び100%エタノールからなる群から選択される。一実施態様において、工程(b)のアルコールは100%エタノールである。

【0034】

本発明のこの実施態様では、溶出工程(工程(b))にて、イオン交換カラムから不純物が効率よく除去されるという利点が提供される。例えば、ペプチド合成中、FmocがN末端保護基として使用される場合、驚くべきことに、この工程ではジベンゾフルベンが選択的に溶出されるということが見出された。その後、クロマトグラフ分離工程(工程(c))にて、ここに示したような任意の残留不純物(例えば、ジベンゾフルベン)の不在下、精製されたペプチドが分離される。

【0035】

工程(c)で使用され得るバッファーの例には、トリス(トリス(ヒドロキシメチル)メチ

ルアミン)、T A P S (3 - { [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アミノ } プロパンスルホン酸)、ビシン (Bicine) (N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) グリシン)、トリシン (Tricine) (N - トリス (ヒドロキシメチル) メチルグリシン)、H E P E S (4 - 2 - ヒドロキシエチル - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸)、T E S (2 - { [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] アミノ } エタンスルホン酸)、M O P S (3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸)、P I P E S (ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸))、カコジル酸 (ジメチルアルシン酸)、M E S (2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸) 又はアセテートが含まれる。一実施態様において、工程 (c) で使用されるバッファーにはトリスバッファー (例えば、0. 02 mol / kg のトリスで pH 8. 0 に緩衝) が含まれる。

【0036】

工程 (c) において、バッファーは、場合によっては、一又は複数の溶媒 (例えばエタノール、特に 50 % (w / w) エタノール) の存在下で使用されてよいことは理解されている。また、分離工程 (c) の条件は、典型的には、当業者に公知のものであると理解される。例えば、第 1 のバッファーを用いて平衡にした後、第 1 のバッファーから第 2 のバッファー (一又は複数の塩 (例えば塩化ナトリウム、特に 0. 0625 mol / kg の塩化ナトリウム) が存在する以外は、第 1 のバッファーと典型的には同じ) への直線的勾配を適用して溶出させる。

【0037】

一実施態様において、固体支持体は、熱可塑性ポリマー、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン又は類似の物質を含有するフィルター支持体、粒子、ペレット、容器等の充填材を含む。他の実施態様において、固体支持体は、ポリエチレン、ポリプロピレン又はポリスチレンを含有するフィルター支持体、粒子、ペレット、容器等の充填材を含む。さらなる他の実施態様において、固体支持体は、ポリエチレンを含有するフィルター支持体、粒子、ペレット、容器等の充填材を含む。

ここで使用される場合「容器」なる用語は、精製の前後で、精製されたペプチドを収容するのに使用される任意の手段を意味する。

【0038】

本発明の実施態様において、固体支持体が熱可塑性ポリマーを含有する充填材を含む場合、本発明の精製工程は、次の：

- (a) 充填材に、固相合成で得られた粗ペプチド抽出物を添加し；
 - (b) 充填材において抽出物をインキュベートし；
 - (c) 充填材から抽出物を除去し；及び
 - (d) 抽出物を標準的なペプチド分離にかける；
- 工程を含む。

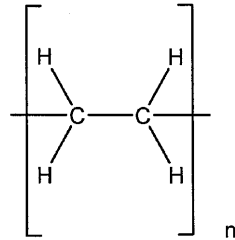
【0039】

ここで使用される場合、「標準的なペプチド分離」なる用語は、不純物からペプチドを分離するのに適した、当該技術で公知の任意の分離方法、例えばクロマトグラフ分離 (例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、又は逆相 H P ペプチド L C (高速液体クロマトグラフィー))、限外濾過 (U F)、等電沈殿、又は任意の他の適切な分離方法を意味する。

一実施態様において、工程 (d) における標準的なペプチド分離は、イオン交換クロマトグラフィー、例えばアニオン交換クロマトグラフィーである。

【0040】

「ポリエチレン」、「ポリプロピレン」等に対する参照には、エチレン (I U P A C 名、エテン)、プロピレン (I U P A C 名、プロテン) 等の複数 (すなわち 1 以上) のモノマー単位からなるポリマーに対する参照が含まれる。例として、ポリエチレンの一般構造を、式 (I) の化合物として、以下に示し、ここで n は整数である：



(I)

【0041】

ポリエチレンは、高密度ポリエチレン(HDPE)又は低密度ポリエチレン(LDPE)の形態であってよい。一実施態様において、ポリエチレンは高密度ポリエチレン(HDPE)である。HDPEは分枝度が低く、よって分子間力及び引っ張り強さがより強力であり、 0.941 g/cm^3 以上の密度であると定義される。LDPEは $0.910 - 0.940 \text{ g/cm}^3$ の範囲の密度で定められる。

ポリプロピレンは、高密度ポリプロピレン(HDPP)又は低密度ポリプロピレン(LDPP)の形態であってよい。一実施態様において、ポリプロピレンは高密度ポリプロピレン(HDPP)である。

【0042】

本発明のこの実施態様では、定められた充填材に粗ペプチド抽出物を添加することで、充填材の表面に不純物が付着するという利点を提供される。よって、本方法では、粗ペプチド抽出物から不純物が効率よく除去される。例えば、ペプチド合成中、FmocがN末端保護基として使用される場合、驚くべきことに、この工程ではジベンゾフルベンが、ここに示されるようなポリエチレン充填材の表面に、選択的に付着することが見出された。

【0043】

一実施態様において、インキュベート工程(b)は、典型的には2分～10時間の持続時間、周囲温度(例えば、室温)でインキュベートすることを含む。他の実施態様において、持続時間は2分～2時間である。またさらなる実施態様において、持続時間は2分～30分である。

一実施態様において、工程(b)は抽出物の攪拌をさらに含んでよい。

【0044】

一実施態様において、工程(d)は、典型的には、バッチ吸収、充填カラム又はフィルターを含んでよい公知の手順に従い、クロマトグラフ分離を含む。

一実施態様において、工程(d)はクロマトグラフ分離を含み、ここでは、充填カラム又はフィルターが使用され、滞留時間は少なくとも0.1分である。他の実施態様において、滞留時間は少なくとも1分である。さらなる他の実施態様において、滞留時間は0.1分～60分である。またさらなる他の実施態様において、滞留時間は1分～10分である。

ここで使用される場合、「滞留時間」なる用語は、ペプチドが充填材と接触する平均時間、すなわちペプチドが、どのくらいの速さで充填材を移動するかと理解される。

【0045】

本発明の一実施態様において、ポリペプチドはグルカゴン様ペプチドである。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドはDPP-IV保護されたグルカゴン様ペプチドである。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは血漿安定したグルカゴン様ペプチドである。

【0046】

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドはリジン残基、例えば1つのリジン残基を有しており、ここで場合によっては、脂質親和性置換基は、スパーサーを介して、該リジン残基のイプシロンアミノ基に結合している。

一実施態様において、脂質親和性置換基はアシル基を含む。アシル基は式 $R(C=O)-$ を有する。

本発明の一実施態様において、脂質親和性置換基は 8～40 の炭素原子、好ましくは 8～24 の炭素原子、例えば 12～18 の炭素原子を有する。

【0047】

一実施態様において、本発明は脂質親和性置換基を有するグルカゴン様ペプチドの誘導体を提供し、ここで脂質親和性置換基は、直鎖状又は分枝状のアルカン α, ω -ジカルボン酸を含む。

一実施態様において、本発明は上述した実施態様のグルカゴン様ペプチドを提供し、ここで脂質親和性置換基は、 $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_m-R-CO-$ 、 $(NH_2-CO)-(CH_2)_n-CO-$ 及び $HO-(CH_2)_n-CO-$ からなる群から選択される部分であるか又は含み；ここで R はシクロペンチル、シクロヘキシル及びシクロヘプチルからなる群から選択されるシクロアルキルであり、 $4 \leq n \leq 38$ 及び $0 \leq m \leq 4$ である。

一実施態様において、 $12 \leq n \leq 36$ である。一実施態様において、 $12 \leq m \leq 20$ である。

【0048】

一実施態様において、脂質親和性置換基は、 $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_m-R-CO-$ 、 $(NH_2-CO)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $HO-(CH_2)_n-CO-$ からなる群から選択され；ここで R はシクロペンチル、シクロヘキシル及びシクロヘプチルからなる群から選択されるシクロアルキルであり、 $4 \leq n \leq 38$ 及び $1 \leq m \leq 4$ である。

一実施態様において、脂質親和性置換基は、 $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_m-R-CO-$ 、 $(NH_2-CO)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $HO-(CH_2)_n-CO-$ からなる群から選択され；ここで R はシクロヘキシルであり、 $12 \leq n \leq 20$ 及び $1 \leq m \leq 2$ である。

【0049】

一又は複数の脂質親和性置換基は、直接又は適切なスペーサーを介して、活性成分に結合していてもよい。一実施態様において、脂質親和性成分は適切なスペーサーを介して結合している。

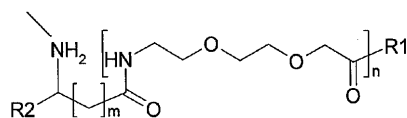
一実施態様において、スペーサーが存在しており、少なくとも 1 のアミノ酸残基を含有する。

本発明の一実施態様において、スペーサーが存在しており、アミノ酸、例えばベータ-Ala、L-Glu 又はアミノブチロイルから選択される。

一実施態様において、スペーサーが存在しており、 γ -又は α -グルタミルリンカー、 β -又は α -アスパルチルリンカー、 α -アミノ- γ -グルタミルリンカー、又は α -アミド- β -アスパルチルリンカー、又はその組合せからなる群から選択される。

【0050】

一実施態様において、スペーサーは一般式 I



式 I

[上式中、

n は 0-4 であり；

m は 1-2 であり；

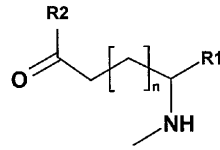
R1 は活性成分への結合部位を指定し；

R2 は COR3 又は H であり；及び

R³は、OH、NH₂又はC₁ - C₁₂アルキル、及びベンジルである]
のものである。

【0051】

一実施態様において、スペーサーは一般式 I I



式 I I

[上式中、

nは0-8であり；

R¹はCOOR³であり；

R²は活性成分への結合部位を指定し；及び

R³は、水素、C₁ - C₁₂アルキル及びベンジルから選択される]

のものである。

【0052】

本発明の一実施態様において、ポリペプチドは、グルカゴン、グルカゴンアナログ、グルカゴンの誘導体、又はグルカゴンアナログの誘導体である。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドはGLP-1、GLP-1アナログ、GLP-1の誘導体又はGLP-1アナログの誘導体である。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは、22～40のアミノ酸残基、好ましくは26～36のアミノ酸残基、より好ましくは29～33のアミノ酸残基を有するGLP-1ペプチドである。

【0053】

本発明の一実施態様において、GLP-1ペプチドはGLP-1アナログである。

本発明の一実施態様において、GLP-1アナログはArg³⁴-GLP-1(7-37)、Gly⁸-GLP-1(7-36)-アミド、Gly⁸-GLP-1(7-37)、Val⁸-GLP-1(7-36)-アミド、Val⁸-GLP-1(7-37)、Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-アミド、Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-アミド、Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-アミド、Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-アミド、Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37)、Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-アミド、Val⁸His²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37)、Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37)、Aib⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37)、Aib^{8,22}Arg³⁴-GLP-1(7-37)、[3-(4-イミダゾリル)プロピオニル]⁷Arg³⁴GLP-1-(7-37)、Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37)、Aib⁸Arg³⁴Pro³⁷-GLP-1(7-37)、Aib^{8,22,27,30,35}Arg³⁴Pro³⁷-GLP-1(7-37)アミド、デスアミノHis⁷Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1(7-37)、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1-(7-37)アミド、デスアミノHis⁷Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Phe(m-CF₃)²⁸-GLP-1-(

7-37)アミド、 $\text{Aib}^8\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Lys}^{3,0}\text{-GLP-1-(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^8\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Lys}^{3,1}\text{-GLP-1-(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^8\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Lys}^{3,1}\text{Arg}^{3,4}\text{-GLP-1-(7-37)}$ 、デスアミノ $\text{His}^7\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Glu}^{3,0}\text{Arg}^{3,4}\text{Lys}^{3,7}\text{-GLP-1-(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^8\text{Lys}^{2,0}\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Glu}^{3,0}\text{Pro}^{3,7}\text{-GLP-1-(7-37)}$ アミド、 $\text{Aib}^8\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Glu}^{3,0}\text{Pro}^{3,7}\text{-GLP-1-(7-37)}$ 、デスアミノ $\text{His}^7\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Glu}^{3,0}\text{Arg}^{3,4}\text{Lys}^{3,7}\text{-GLP-1-(7-37)}$ アミド、デスアミノ $\text{His}^7\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Arg}^{3,4}\text{Lys}^{3,7}\text{-GLP-1-(7-37)}$ アミド、 $\text{Aib}^8\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Glu}^{3,0}\text{Lys}^{3,6}\text{-GLP-1-(7-37)}$ Glu -アミド、 $\text{Aib}^8\text{Glu}^{2,2}\text{Arg}^{2,6}\text{Lys}^{3,1}\text{GLP-1-(7-37)}$ 、そのアナログ、及びこれらの任意のものの誘導体からなる群から選択される。

【0054】

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは、リジン残基を有する GLP-1 の誘導体、又は GLP-1 アナログの誘導体であり、ここで脂質親和性置換基は、スペーサーを介して、該リジン残基のイプシロンアミノ基に結合している。

【0055】

一実施態様において、 GLP-1 アナログ又は誘導体は、 GLP-1(7-37) ペプチド又はそのアナログの7及び8位にある少なくとも1のアミノ酸残基で修飾されており、該 GLP-1 アナログの26位にあるリジン残基において、スペーサーを介してイプシロンアミノ基に結合している脂質親和性置換基を有する。

本発明の一実施態様において、脂質親和性置換基は8～40の炭素原子、好ましくは8～24の炭素原子、例えば12～18の炭素原子を有する。

【0056】

実施態様において、本発明は脂質親和性置換基を有する GLP-1 ペプチドの誘導体を提供し、ここで脂質親和性置換基は、直鎖状又は分枝状のアルカン α, ω -ジカルボン酸を含む。

一実施態様において、本発明は、脂質親和性置換基を有する上述した実施態様の GLP-1 ペプチドを提供し、ここで脂質親和性置換基は、 $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{(COOH)-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{(COOH)-(CH}_2)_n\text{-CO-NH-(CH}_2)_m\text{-R-CO-}$ 、 $\text{(NH}_2\text{-CO)-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 及び $\text{HO-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ からなる群から選択される部分であるか又は含み；ここでRはシクロペンチル、シクロヘキシル及びシクロヘプチルからなる群から選択されるシクロアルキルであり、 $4 \leq n \leq 38$ 及び $0 \leq m \leq 4$ である。

一実施態様において、 $12 \leq n \leq 36$ である。一実施態様において、 $12 \leq m \leq 20$ である。

【0057】

一実施態様において、脂質親和性置換基は、 $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{(COOH)-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{(COOH)-(CH}_2)_n\text{-CO-NH-(CH}_2)_m\text{-R-CO-}$ 、 $\text{(NH}_2\text{-CO)-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{HO-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ からなる群から選択され；ここでRはシクロペンチル、シクロヘキシル及びシクロヘプチルからなる群から選択されるシクロアルキルであり、 $4 \leq n \leq 38$ 及び $1 \leq m \leq 4$ である。

一実施態様において、脂質親和性置換基は、 $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{(COOH)-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{(COOH)-(CH}_2)_n\text{-CO-NH-(CH}_2)_m\text{-R-CO-}$ 、 $\text{(NH}_2\text{-CO)-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ 、 $\text{HO-(CH}_2)_n\text{-CO-}$ からなる群から選択され；ここでRはシクロヘキシルであり、 $12 \leq n \leq 20$ 及び $1 \leq m \leq 2$ である。

【0058】

一又は複数の脂質親和性置換基は、直接又は適切なスペーサーを介して、活性成分に結合していてもよい。一実施態様において、脂質親和性成分は適切なスペーサーを介して結合している。

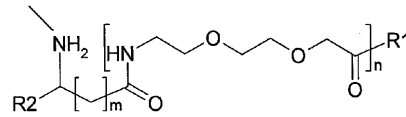
一実施態様において、スペーサーが存在しており、少なくとも1のアミノ酸残基を含有する。

本発明の一実施態様において、スペーサーが存在しており、アミノ酸、例えばベータ-Ala、L-Glu又はアミノブチロイルから選択される。

一実施態様において、スペーサーが存在しており、 γ -又は α -グルタミルリンカー、 β -又は α -アスパルチルリンカー、 α -アミノ- γ -グルタミルリンカー、又は α -アミド- β -アスパルチルリンカー、又はその組合せからなる群から選択される。

【0059】

一実施態様において、スペーサーは一般式 I



式 I

[上式中、

n は 0 - 4 であり；

m は 1 - 2 であり；

R 1 は活性成分への結合部位を指定し；

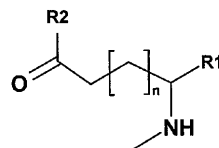
R 2 は C O R 3 又は H であり；及び

R 3 は、OH、NH₂ 又は C₁ - C₁₂ アルキル、及びベンジルである]

のものである。

【0060】

一実施態様において、スペーサーは一般式 I I



式 I I

[上式中、

n は 0 - 8 であり；

R 1 は C O O R 3 であり；

R 2 は活性成分への結合部位を指定し；及び

R 3 は、水素、C₁ - C₁₂ アルキル及びベンジルから選択される]

のものである。

【0061】

本発明の一実施態様において、GLP-1 ペプチドは DPP-IV 保護された GLP-1 ペプチドである。

本発明の一実施態様において、GLP-1 ペプチドは血漿安定した GLP-1 ペプチドである。

【0062】

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは：Arg³⁴Ly s²⁶(N^ε-(γ -Glu(N^α-ヘキサデカノイル))-GLP-1(7-37)、N- ϵ ²⁶-(17-カルボキシヘプタデカノイル)-[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-ペプチド、N- ϵ ²⁶-(19-カルボキシノナデカノイル)-[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-ペプチド、N- ϵ ²⁶-(4-{[N-(2-カルボキシエチル)-N-(15-カルボキシペンタデカノイル)アミノ]メチル}ベンゾイル)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)、N- ϵ ²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)-4(S)-カルボキシブチリルアミノ]エトキシ)エトキシ]アセチルアミノ)エトキシ]アセチル)[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)ペプチド、

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは、エキセンディン-4、エキセ

ンディン-4アナログ、エキセンディン-4の誘導体、又はエキセンディン-4アナログの誘導体である。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドはエキセンディン-4である。

本発明の一実施態様において、エキセンディン-4の誘導体又はエキセンディン-4アナログの誘導体は、アシル化ペプチド又はペグ化ペプチドである。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは安定したエキセンディン-4化合物である。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドはDPP-IV保護されたエキセンディン-4化合物である。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは免疫調節されたエキセンディン-4化合物である。

【0066】

本発明の一実施態様において、エキセンディン-4の誘導体又はエキセンディン-4アナログの誘導体はリジン残基、例えば1つのリジン残基を有しており、ここで場合によっては、脂質親和性置換基は、スパーサーを介して、該リジン残基のイプシロンアミノ基に結合している。

本発明の一実施態様において、脂質親和性置換基は8～40の炭素原子、好ましくは8～24の炭素原子、例えば12～18の炭素原子を有する。

本発明の一実施態様において、スパーサーが存在しており、アミノ酸、例えばベータ-Ala、L-Glu又はアミノブチロイルから選択される。

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは、30～48のアミノ酸残基、33～45のアミノ酸残基、好ましくは35～43のアミノ酸残基、さらに好ましくは37～41のアミノ酸残基を有するエキセンディン-4ペプチドである。

【0067】

本発明の一実施態様において、GLP-2ペプチドは：

K30R-GLP-2(1-33); S5K-GLP-2(1-33); S7K-GLP-2(1-33); D8K-GLP-2(1-33); E9K-GLP-2(1-33); M10K-GLP-2(1-33); N11K-GLP-2(1-33); T12K-GLP-2(1-33); I13K-GLP-2(1-33); L14K-GLP-2(1-33); D15K-GLP-2(1-33); N16K-GLP-2(1-33); L17K-GLP-2(1-33); A18K-GLP-2(1-33); D21K-GLP-2(1-33); N24K-GLP-2(1-33); Q28K-GLP-2(1-33); S5K/K30R-GLP-2(1-33); S7K/K30R-GLP-2(1-33); D8K/K30R-GLP-2(1-33); E9K/K30R-GLP-2(1-33); M10K/K30R-GLP-2(1-33); N11K/K30R-GLP-2(1-33); T12K/K30R-GLP-2(1-33); I13K/K30R-GLP-2(1-33); L14K/K30R-GLP-2(1-33); D15K/K30R-GLP-2(1-33); N16K/K30R-GLP-2(1-33); L17K/K30R-GLP-2(1-33); A18K/K30R-GLP-2(1-33); D21K/K30R-GLP-2(1-33); N24K/K30R-GLP-2(1-33); Q28K/K30R-GLP-2(1-33); K30R/D33K-GLP-2(1-33); D3E/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S5K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S7K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D8K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/E9K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/M10K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N11K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/T12K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/I13K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L14K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D15K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N16K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L17K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/A18K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D21K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N

2 4 K / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ; D 3 E / Q 2 8 K / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ; 及びその誘導体からなるリストから選択される。

【 0 0 6 8 】

本発明の一実施態様において、G L P - 2 誘導体は

S 5 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 S 7 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 D 8 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 E 9 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 M 1 0 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 N 1 1 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 T 1 2 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 I 1 3 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 4 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 D 1 5 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 N 1 6 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (オクタノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ノナノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (デカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ウンデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ドデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (トリデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (テトラデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ペンタデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ヘプタデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (オクタデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (ノナデカノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K (3 - (エイコサノイルアミノ) プロピオニル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (オクタノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ノナノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (デカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 ;
 L 1 7 K ((S) 4 - カルボキシ - 4 - (ウンデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ 4 - (ドデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 1 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (トリデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S ~ - カルボキシ 4 - (テトラデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ペンタデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ヘキサデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ヘプタデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;
 L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (オクタデカノイルアミノ) ブタノイル) - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ノナデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(エイコサノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(オクタノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ノナノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(デカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ウンデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ドデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(トリデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(テトラデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ペンタデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ヘキサデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ヘプタデカノイルアミノ(amirlo))ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(オクタデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(ノナデカノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (4-(エイコサノイルアミノ)ブタノイル)-GLP-2(1-33);
 A 1 8 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)-GLP-2(1-33);
 D 2 1 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)-GLP-2(1-33);
 N 2 4 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)-GLP-2(1-33);
 Q 2 8 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)-GLP-2(1-33);
 S 5 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 S 7 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 D 8 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 E 9 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 M 1 0 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 N 1 1 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 T 1 2 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 I 1 3 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 4 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 D 1 5 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 N 1 6 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(オクタノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ノナノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(デカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ウンデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ドデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(トリデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(テトラデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ペンタデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ヘプタデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(オクタデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(ノナデカノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K (3-(エイコサノイルアミノ)プロピオニル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K ((S)-カルボキシ-4-(オクタノイルアミノ)ブタノイル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ノナノイルアミノ)ブタノイル)/K 3 0 R-GLP-2(1-33);
 L 1 7 K ((S)-カルボキシ-4-(デカノイルアミノ)ブタノイル)/K 3 0 R-GLP-2(1-

3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ウンデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-カルボキシ-4-(ドデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(トリデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(テトラデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G
L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ペンタデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G
L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ヘキサデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G
L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G
L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(オクタデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G
L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(ノナデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K ((S)-4-カルボキシ-4-(エイコサノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(オクタノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ノナノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(デカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ウンデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ドデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(トリデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(テトラデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ペンタデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ヘキサデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(オクタデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(ノナデカノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

L 1 7 K (4-(エイコサノイルアミノ)ブタノイル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

A 1 8 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 2 1 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

N 2 4 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

Q 2 8 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / S 5 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / S 7 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / D 8 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / E 9 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / M 1 0 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G
L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / N 1 1 K (3-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル) / K 3 0 / D 3 3 E - G L
P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / T 1 2 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / I 1 3 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 4 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / D 1 5 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / N 1 6 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (オクタノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ノナノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (デカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ウンデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ドデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (トリデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (テトラデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ペンタデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ヘキサデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ヘプタデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (オクタデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (ノナデカノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K (3 - (エイコサノイルアミノ) プロピオニル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (オクタノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ノナノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (デカノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ウンデカノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (ドデカノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (トリデカノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

D 3 E / L 1 7 K ((S) - 4 - カルボキシ - 4 - (テトラデカノイルアミノ) ブタノイル) / K 3 0 R / D 3 3 E - G L P - 2 (1 - 3 3) ;

$D3E/L17K((S)-4\text{-カルボキシ-4-(ペンタデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K((S)-4\text{-カルボキシ-4-(ヘキサデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K((S)-4\text{-カルボキシ-4-(ヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30E/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K((S)-4\text{-カルボキシ-4-(オクタデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30E/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K((S)-4\text{-カルボキシ-4-(ノナデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K((S)-4\text{-カルボキシ-4-(エイコサノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(オクタノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ノナノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(デカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ウンデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ドデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(トリデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(テトラデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ペンタデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ヘキサデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(オクタデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(ノナデカノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/L17K(4\text{-(エイコサノイルアミノ)ブタノイル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/A18K(3\text{-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/D21K(3\text{-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$
 $D3E/N24K(3\text{-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$ 及び
 $D3E/Q28K(3\text{-(ヘキサデカノイルアミノ)プロピオニル})/K30R/D33E-GLP-2(1-33);$

からなる群から選択される。

【0069】

G L P - 2、そのアナログ、並びに G L P - 2 誘導体を調製する方法は、W O 99/43361 及び W O 00/55119 に見いだすことができる。

【0070】

本発明のさらなる実施態様において、グルカゴン様ペプチドは、エキセンディン-4(1-39)のインスリン分泌性アナログ、例えばSer²Asp³-エキセンディン-4(1-39)であり、2及び3位のアミノ酸残基は、それぞれセリン及びアスパラギン酸で置き換えられている(この特定のアナログは当該技術でエキセンディン-3としても公知)。

本発明のさらなる実施態様において、グルカゴン様ペプチドはエキセンディン-4誘導体であり、ここで、導入される置換基は、アミド類、炭水化物、アルキル基、エステル及び脂質親和性置換基から選択される。エキセンディン-4(1-39)及びそのアナログのインスリン分泌性誘導体は、Tyr³¹-エキセンディン4(1-31)-アミドである。

【0071】

本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは安定したエキセンディン-4化合物である。本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドはDPP-IV保護されたエキセンディン-4化合物である。本発明の一実施態様において、グルカゴン様ペプチドは免疫調節されたエキセンディン-4化合物である。

エキセンディン-4、そのアナログ、並びにエキセンディン-4誘導体を調製する方法は、例えばWO 99/43708、WO 00/41546及びWO 00/55119に見いだすことができる。

【0072】

本発明の精製されたグルカゴン様ペプチドを含有する製薬用組成物は、典型的には、種々の製薬用賦形剤、例えば防腐剤、等張剤及び界面活性剤を含有する。製薬用組成物の調製法は当業者によく知られている。便宜的な参照として、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th版, 1995が挙げられる。

本発明の精製されたグルカゴン様ペプチドを含有する製薬用組成物は、このような処置を必要とする患者に、非経口的に投与されてよい。非経口投与は、シリンジ、場合によってはペン様シリンジにより、皮下注射、筋肉内注射、又は静脈内注射で実施されてよい。また投与は、例えば注入ポンプを使用する、注入により実施されてもよい。

【0073】

以下、本発明の実施態様の列挙である。

1. 固体支持体と、固相ペプチド合成により調製されたペプチドの粗抽出物とを接触させる工程を含む、固相ペプチド合成により調製されたペプチドを精製する方法。
2. 固相ペプチド合成が、アミノ末端保護基としてFmocを使用することを含む、実施態様1の方法。
3. 前記方法が粗ペプチド抽出物からジベンゾフルベンを除去する方法を含む、実施態様1又は2の方法。

【0074】

4. 固体支持体が熱可塑性ポリマーを含有する充填材を含む、実施態様1ないし3のいずれかの方法。
5. 固体支持体が、容器、ペレット、粒子、及びフィルター支持体からなる群から選択される、実施態様4の方法。
6. 熱可塑性ポリマーがポリエチレン又はポリプロピレンである、実施態様4又は5の方法。
7. 熱可塑性ポリマーがポリエチレンである、実施態様6の方法。

【0075】

8. 次の:
 - (a) 充填材に、固相合成で得られた粗ペプチド抽出物を添加し;
 - (b) 充填材において抽出物をインキュベートし;
 - (c) 充填材から抽出物を除去し; 及び
 - (d) 抽出物を標準的なペプチド分離にかける;工程を含む、実施態様4ないし7のいずれかの方法。
9. ポリエチレンが高密度ポリエチレン(HDPE)である、実施態様8の方法。
10. インキュベート工程(b)が、2分~10時間の持続時間、周囲温度でインキュベ-

トすることを含む、実施態様 8 又は 9 の方法。

1 1. インキュベート工程 (b) が、室温でインキュベートすることを含む、実施態様 8 ないし 1 0 のいずれかの方法。

1 2. 工程 (b) が抽出物の攪拌をさらに含む、実施態様 8 ないし 1 1 のいずれかの方法。

【0076】

1 3. 工程 (d) における標準的なペプチド分離が、バッチ吸収、充填カラム又はフィルターを含むクロマトグラフ分離を含む、実施態様 8 ないし 1 2 のいずれかの方法。

1 4. 工程 (d) における標準的なペプチド分離がクロマトグラフ分離を含み、ここで、充填カラム又はフィルターが使用され、滞留時間が少なくとも 0. 1 分である、実施態様 8 ないし 1 3 のいずれかの方法。

1 5. 工程 (d) における標準的なペプチド分離が、イオン交換クロマトグラフィーである、実施態様 8 ないし 1 4 のいずれかの方法。

【0077】

1 6. 固体支持体がイオン交換クロマトグラフィーカラムを含む、実施態様 1 ないし 3 のいずれかの方法。

1 7. 固体支持体がアニオン性樹脂を含む、実施態様 1 6 の方法。

1 8. アニオン性樹脂が第 4 級アンモニウム樹脂である、実施態様 1 7 の方法。

【0078】

1 9. 次の：

(a) 標準的なクロマトグラフィー条件下、固相合成から得られた粗ペプチド抽出物、又は実施態様 8 の方法の工程 (a) ないし (c) から得られたペプチドを、イオン交換クロマトグラフィーカラムに充填し；

(b) アルコールを用いて第 1 の溶出工程を実施し；及び

(c) 一又は複数のバッファーを用いて第 2 の溶出工程を実施する；

工程を含む、実施態様 1 6 ないし 1 8 のいずれかの方法。

【0079】

2 0. 工程 (c) で使用され得るバッファーに、トリス(トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン)、TAPS(3-{[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}プロパンスルホン酸)、ピシン(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン)、トリシン(N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン)、HEPES(4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸)、TES(2-{[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}エタンスルホン酸)、MOPS(3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、PIPES(ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸))、カコジル酸(ジメチルアルシン酸)、MES(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)又はアセテートが含まれる、実施態様 1 9 の方法。

2 1. 工程 (c) で使用されるバッファーがトリスバッファーである、実施態様 2 0 の方法。

【0080】

2 2. 工程 (b) で使用されるアルコールが C₁ - C₅ アルコールである、実施態様 1 9 ないし 2 1 のいずれかの方法。

2 3. 工程 (b) で使用されるアルコールが：メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、2-メチル-1-プロパノール、2-メチル-2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール、2-メチル-2-ブタノール、3-メチル-2-ブタノール、1-ペンタノール、2-ペンタノール及び 3-ペンタノールからなる群から選択される非分枝状又は分枝状アルコールである、実施態様 1 9 ないし 2 2 のいずれかの方法。

2 4. 工程 (b) で使用されるアルコールがエタノール又はプロパノールである、実施態様 1 9 ないし 2 3 のいずれかの方法。

2 5. 工程 (b) で使用されるアルコールが、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール又は 100%エタノールからなる群から選択される、実施態様 1 9 又は 2 4 のいずれかの方法。

26. 工程(b)で使用されるアルコールが100%エタノールである、実施態様19又は25のいずれかの方法。

【0081】

27. ポリペプチドがグルカゴン様ペプチドである、上述した実施態様のいずれかの方法。

28. ポリペプチドが、グルカゴン、グルカゴンアナログ、グルカゴンの誘導体、又はグルカゴンアナログの誘導体である、実施態様27の方法。

29. グルカゴン様ペプチドが、GLP-1、GLP-1アナログ、GLP-1の誘導体又はGLP-1アナログの誘導体である、実施態様27の方法。

【0082】

30. 固相ペプチド合成キットであって、固相ペプチド合成用の試薬、実施態様1ないし29のいずれかの固体支持体、及び実施態様1ないし29のいずれかの方法に従い、該キットを使用するための使用説明書を含むキット。

31. 実施態様1ないし29のいずれかの方法により得られたペプチド。

【0083】

ここに引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての文献は、各文献が、出典明示により個々にかつ特に援用され、その全内容がここに記載されているかの如く、出典明示によりここに援用される。

全ての表題及び副題は、ここでは便宜的にのみ使用されており、いかなる方法であっても、本発明を限定するものとは解釈すべきでない。

その全ての可能性のある変形例における、上述した要素の任意の組合せは、ここで他に示されず、又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、本発明に含まれる。

【0084】

本発明で記載されて使用されている「a」及び「an」及び「the」及び類似指示対象なる用語は、ここで他に示されず、又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、単数形及び複数形の双方をカバーすると解釈される。

ここで他に示されない限りは、ここでの値の範囲の記述は、単に、範囲内に入るそれぞれ別個の値を個々に称する省略方法として提供することを意図しているものであって、ここで個々に列挙されているかのように、それぞれの別個の値が明細書に導入される。特に示さない限り、ここで提供される全ての正確な値は、対応する近似値の代表例である(例えば、特定の要因又は測定値に関して提供される全ての正確な例示的値は、適切な場合は、「約」により修飾される、対応する近似測定値を提供するとみなすことができる)。

ここに記載されている全ての方法は、ここで他に示されず、又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、任意の適切な順番で実施することができる。

ここに提供される任意かつ全ての実施例、又は例示的言語(例えば、「等」)の使用は、単に本発明をより例証することを意図しており、他に示されない限り、本発明の範囲に限定をもたらすものではない。明確に記載していない限りは、明細書中の如何なる語句も、任意の要素が本発明の実施に必須であることを示しているものと解すべきではない。

【0085】

ここでの特許文献の引用及び援用は単に便宜上なされているもので、そのような特許文献の有効性、特許性、及び／又は権利行使性についての見解を反映させるものではない。

特に明記せず、文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、成分又は成分類に関して、「含有する」、「有する」、「含む」又は「含める」等の用語を使用する、本発明の任意の側面又は実施態様のここでの記載は、特定の成分又は成分類「からなる」、「本質的になる」、又は「実質的に含有する」といった本発明の類似した側面又は実施態様を支持することを意図したものである(例えば、特定の成分を含有するここに記載の処方物は、特に明記しない又は文脈においてははっきりと矛盾していない限りは、その成分からなる処方物を記載すると理解されるべきである)。

この発明は、適用される法律に容認される最大範囲まで、ここに提供される態様又は請求項に列挙された主題事項の全ての修正点及び等価物を含む。

【0086】

本発明を以下の実施例によりさらに例証するが、何らの方法によっても、保護の範囲を限定することを意図したものではない。上述の記載及び以下の実施例に開示されている特徴は、双方とも別個に、またその任意の組合せにおいて、様々な形態で本発明を実践するための構成要素でありうる。

【実施例】

【0087】

装置：

室温でAKTAエクスペローラー100

バッファー：

バッファーA：50%(w/w)のEtOH、0.02mol/kgのトリス、pH8.0

バッファーB：50%(w/w)のEtOH、0.02mol/kgのトリス、
0.0625mol/kgのNaCl、pH8.0

再生1：1MのNaOH

再生2：2MのNaCl、50mMのCH₃COOH、pH3.0

エタノール：100%エタノール

樹脂：

ソース30Q

出発物質：

固相合成及びアシル化により生成された、N-イプシロン26-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)-4(S)-カルボキシブチリルアミノ]エトキシ)エトキシ]アセチルアミノ)エトキシ]エトキシ)アセチル][Aib8,Arg34]GLP-1-[7-37]。

【0088】

実施例1

コントロール精製手順

出発物質の調製

出発物質を1+9にH₂O(WFI)を用いて希釈し、0.6/0.2μmのフィルターを通して濾過した。

出発物質の保管

出発物質を充填前にガラス容器に保管した。

方法：

カラム：HR10/10(3.5・1.0cm)2.8mL

流量：15CV/h(0.7mL/分)

【0089】

セグメント	体積及びバッファー
平衡	10CV バッファー A
充填	2 CV (5.6 ml) ~ 2 g N-ε ²⁶ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)-4(S)-カルボキシブチルアミノ]エトキシ)エトキシ]アセチルアミノ)エトキシ]エトキシ)アセチル][Aib ⁸ ,Arg ³⁴]GLP-1-(7-37)ペプチド / L 樹脂
洗浄	7 CV バッファー A
溶出 1	20CV での 100%バッファーA 及び 0%バッファーB から 50%バッファーA 及び 50%バッファーB への線形勾配
溶出 2	5CV バッファーB
再生 1	5CV 再生 1
再生 2	5CV 再生 2

【0090】

標準的分離の結果を、図1のクロマトグラムに示し、ここで、クロマトグラムには280nmでの吸光度、254nmでの吸光度、理論的勾配及び伝導率を示す。図1の結果には、DBFピークが生成物の前に溶出するが、生成物下には「痕跡」があり、よって移動が困難であることが示されている。

【0091】

実施例2

PE処理後のアニオン交換による精製(PE-容器からのDBFの溶出を含む)

出発物質の調製

出発物質を実施例に記載したようにして調製した。

出発物質の保管

出発物質を、充填前にHDPE(高密度ポリエチレン)容器(Emballatorから得られた「Mellerud容器」)に保管した。

【0092】

方法：

本方法を実施例1に記載したように実施し、結果を図2に示し、ここで、クロマトグラムには280nmでの吸光度、254nmでの吸光度、理論的勾配及び伝導率を示す。図1の結果には、DBFピークが生成物の前に溶出するが、生成物下には「痕跡」があり、よって移動が困難であることが示されている。サンプルの保管条件を除けば、実施例1と同一の実験であるという事実に鑑み、充填前にHDPE容器に出発物質を保管すると、DBFピークが存在しなくなることが明らかとなった。

DBFはPEに対して疎水的に結合しており、よって疎水性の液体でDBFを除去可能であると推測されるため、出発物質を除去した後、Mellerud容器を100%エタノールで洗浄した。洗浄溶液の吸光度測定で、DBFが容器に結合し、100%エタノールにより、容器から脱着又は「溶出」可能であることが、明確に示された。

【0093】

実施例3

充填後にエタノール洗浄を用いたアニオン交換精製

出発物質の調製

H₂Oにおいて10倍希釈(10gの出発物質から1gの出発物質)し、NaOHを用いてpH6~pH8.0にpH調整。ついで、出発物質を0.22μmのフィルターを使用して濾過した。

出発物質の保管

出発物質を充填前にガラス容器に保管した。

方法：

カラム：15・1.0 cm) 11.8 mL

流量：15 CV/h (0.7 mL/分)

【0094】

セグメント	体積及びバッファー
平衡	3CV バッファーA
充填	3CV (5.6 ml) ~ 2.5 g N-ε ²⁶ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)-4(S)-カルボキシブチリルアミノ]エトキシ)エトキシ]アセチルアミノ)エトキシ]エトキシ]アセチル][Aib ⁸ ,Arg ³⁴]GLP-1-(7-37)ペプチド /L 樹脂
洗浄1	2CV バッファーA
洗浄2	3CV エタノール
洗浄3	2CV バッファーA
溶出1	16CV での 100%バッファーA 及び 0%バッファーB から 60% バッファーA 及び 40%バッファーB への線形勾配
溶出2	2CV での 60%バッファーA 及び 40%バッファーB から 0%バッファーA 及び 100%バッファーB への線形勾配
溶出3	10CV バッファーB
再生1	3CV 再生1
再生2	3CV 再生2

【0095】

結果を図3に示し、ここで、クロマトグラムには280nmでの吸光度、254nmでの吸光度、理論的勾配及び伝導率を示す。結果には、DBFピークがエタノール洗浄中に溶出することが示されている。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

固相ペプチド合成により調製されたペプチドを精製する方法において、固相ペプチド合成により調製されたペプチドの粗抽出物を固体支持体と接触させる工程を含む方法。

【請求項2】

固相ペプチド合成が、アミノ末端保護基としてFmocを使用することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

方法が粗ペプチド抽出物からジベンゾフルベンを除去する方法を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

固体支持体が熱可塑性ポリマーを含有する充填材を含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

固体支持体が、容器、ペレット、粒子、及びフィルター支持体からなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

熱可塑性ポリマーがポリエチレン又はポリプロピレンである、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

熱可塑性ポリマーがポリエチレンである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) 固相合成で得られた粗ペプチド抽出物を充填材に加える工程；
(b) 充填材中の抽出物をインキュベートする工程；
(c) 充填材から抽出物を除去する工程；及び
(d) 抽出物に標準的なペプチド分離を施す工程
を含む、請求項 4 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ポリエチレンが高密度ポリエチレン(HDPE)である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

インキュベート工程 (b) が、2 分～10 時間の期間、周囲温度でインキュベートすることを含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

インキュベート工程 (b) が、室温でインキュベートすることを含む、請求項 8 ないし 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

工程 (b) が抽出物の攪拌をさらに含む、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

工程 (d) における標準的なペプチド分離が、バッチ吸収、充填カラム又はフィルターを含むクロマトグラフ分離を含む、請求項 8 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

工程 (d) における標準的なペプチド分離がクロマトグラフ分離を含み、ここで、充填カラム又はフィルターが使用され、滞留時間が少なくとも 0.1 分である、請求項 8 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

工程 (d) における標準的なペプチド分離が、イオン交換クロマトグラフィーである、請求項 8 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

固体支持体がイオン交換クロマトグラフィーカラムを含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

固体支持体がアニオン性樹脂を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

アニオン性樹脂が第 4 級アンモニウム樹脂である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

(a) 標準的なクロマトグラフィー条件下、固相合成から得られた粗ペプチド抽出物、又は請求項 8 の方法の工程 (a) から (c) から得られたペプチドを、イオン交換クロマトグラフィーカラムに充填し；
(b) アルコールを用いて第 1 の溶出工程を実施し；及び
(c) 一又は複数のバッファーを用いて第 2 の溶出工程を実施する；
工程を含む、請求項 16 から 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

工程 (c) で使用されるバッファーが、トリス (トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン)、TAPS (3-{[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}プロパンスルホン酸)、ピシン (N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン)、トリシン (N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン)、HEPES (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエ

タンスルホン酸)、TES (2-{[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}エタンスルホン酸)、MOPS (3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、PIPES (ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸))、カコジル酸(ジメチルアルシン酸)、MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)又はアセテートを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

工程(c)で**使用されるバッファーがトリスバッファーである、請求項20に記載の方法**。

【請求項22】

工程(b)で**使用されるアルコールがC₁-₅アルコールである、請求項19から21のいずれかに記載の方法**。

【請求項23】

工程(b)で**使用されるアルコールが、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、2-メチル-1-プロパノール、2-メチル-2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール、2-メチル-2-ブタノール、3-メチル-2-ブタノール、1-ペンタノール、2-ペンタノール及び3-ペンタノールからなる群から選択される非分枝状又は分枝状アルコールである、請求項19から22のいずれかに記載の方法**。

【請求項24】

工程(b)で**使用されるアルコールがエタノール又はプロパノールである、請求項19から23のいずれかに記載の方法**。

【請求項25】

工程(b)で**使用されるアルコールが、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール又は100%エタノールからなる群から選択される、請求項19又は24のいずれかに記載の方法**。

【請求項26】

工程(b)で**使用されるアルコールが100%エタノールである、請求項19又は25のいずれかに記載の方法**。

【請求項27】

ポリペプチドが**グルカゴン様ペプチドである、請求項1から16のいずれかに記載の方法**。

【請求項28】

ポリペプチドが、**グルカゴン、グルカゴンアナログ、グルカゴンの誘導体、又はグルカゴンアナログの誘導体である、請求項27に記載の方法**。

【請求項29】

グルカゴン様ペプチドが、GLP-1、GLP-1アナログ、GLP-1の誘導体又はGLP-1アナログの誘導体である、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

固相ペプチド合成キットであって、固相ペプチド合成用の試薬、請求項1から29のいずれかに記載の固体支持体、及び請求項1から29のいずれかに記載の方法に従って該キットを使用するための使用説明書を含むキット。

【請求項31】

請求項1から29のいずれかに**記載の方法により得られたペプチド**。