(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-503000
(P2011-503000A)
(43)公表日　平成23年1月27日(2011.1.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	ZNA	4C076
A61K 38/26	(2006.01)	A61K	37/28		4C084
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48		4H045
A61K 47/42	(2006.01)	A61K	47/42		
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 45 頁）

(21)出願番号　特願2010-532313 (P2010-532313)
(86)(22)出願日　平成20年11月3日 (2008.11.3)
(85)翻訳文提出日　平成22年6月2日 (2010.6.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/082209
(87)国際公開番号　WO2009/059278
(87)国際公開日　平成21年5月7日 (2009.5.7)
(31)優先権主張番号　60/984,862
(32)優先日　平成19年11月2日 (2007.11.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509087759
セントコア・オーソ・バイオテツク・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０４４ホーシヤム・リツジビユードライブ８００／８５０
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(72)発明者　ヘブナー，ジヨージ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０８７ラドナー・キングオブプラシヤロード１４５

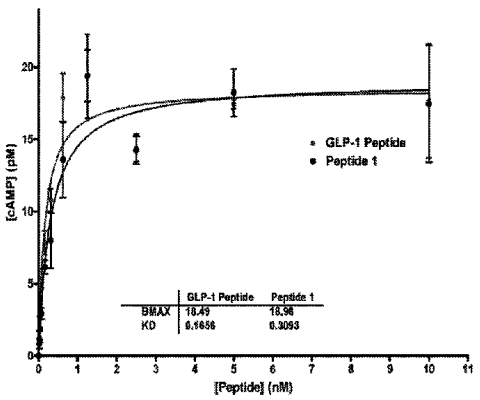
Ｆターム(参考)　4C076 AA94　CC21　EE41　FF31

最終頁に続く

(54)【発明の名称】半合成ＧＬＰ－１ペプチド－Ｆｃ融合コンストラクト、その方法及び使用

(57)【要約】
本発明は、ＧＬＰ－１ペプチドとヒト多量体タンパク質又はタンパク質断片、例えば非ペプチド結合で結合された抗体Ｆｃとの共役物である、半合成生物分子に関する。コストラクトは、生物活性を示し、かつ血糖コントロールの欠如を特徴とする糖尿病の処置に使用するための治療用組成物及び治療用製剤の製造に有用である。

FIG. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
医薬組成物の調製に有用な免疫グロブリン融合タンパク質であって、次の一般式を有する、前記タンパク質。
Ｂ－（Ｌ）$_n$－（Ｆ）　　（Ｉ）
式中、Ｂは、少なくとも１つの生物活性ＧＬＰ－１ペプチド、変異体又は誘導体を表し、Ｆは、構造（Ｘ）$_m$－（Ｄ）$_p$－ＣＨ２－ＣＨ３を含む抗体Ｆｃ（Ｘは、標準的な分子生物工学的技法で組み込まれて産生され得る任意の天然型アミノ酸を表し、ｍは、０～２０までの整数であり、Ｄは、多量体形成又は二量体形成ドメインであり、ｐは、０又は１の整数であり、及びＣＨ２は、免疫グロブリンＣＨ３定常部の少なくとも一部と結合した免疫グロブリンＣＨ２定常部の少なくとも一部を表す）であって、Ｌは、実質的に非免疫原生でありかつ生物活性部分とＦとの間に柔軟な結合を付与するポリマー構造を含むリンカーを表し、ｎは、０又は１の整数であって、ｎが０の場合、ＢとＦとの間の結合は非ペプチド性共有結合であり、また、ｎが１である場合、ＬとＦとの間の結合は、非ペプチド結合である。
【請求項２】
式Ｂ－Ｆ及びその多量体の請求項１に記載のタンパク質であって、ＢのＣ－末端がＦのＮ－末端と結合しているか、又はＢのＮ－末端がＦのＮ－末端に結合してＦが二量体形成ドメインを有しない、前記タンパク質。
【請求項３】
式Ｂ－Ｌ－Ｆ及びその多量体の請求項１に記載のタンパク質であって、Ｆが、二量体形成ドメインを有しないＦｃドメインでありかつＮ－末端でＬと結合しており、Ｌが更に、代替部位でＢのＣ－末端に結合しているか、あるいはＦが、Ｆｃドメインを形成することができるポリペプチドでありかつＮ－末端でＬと結合しており、Ｌが更に、代替部位でＢのＮ－末端と結合している、前記タンパク質。
【請求項４】
式Ｂ^1－Ｆ－Ｂ^2（ＩＶ）の請求項１に記載のタンパク質であって、Ｂ^{1}及びＢ^{2}が同一又は異なる前記ＧＬＰ－１類であるかあるいは同じＧＬＰ－１上の代替部位を介して前記Ｆと結合しており、並びに前記Ｆが、二量体形成ドメインを有している、前記タンパク質。
【請求項５】
式Ｂ^1－Ｌ^1－Ｆ－Ｌ^2－Ｂ^2（Ｖ）の請求項１に記載のタンパク質であって、Ｂ^{1}及びＢ^{2}が、同一又は異なるＧＬＰ－１類であるか、あるいはＬ^{1}及びＬ^{2}それぞれとＢ１及びＢ２上の代替部位を介して結合しており、並びにＦが二量体形成ドメインを有している、前記タンパク質。
【請求項６】
ＢとＦとの間の結合又はＬとＦとの間の結合が、ヒドラジン基及び炭化水素基から選択される、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項７】
前記ヒドラジン結合が、ヒドラジン又はヒドラジド官能性を有する活性化ＧＬＰ－１ペプチドと反応して、Ｆｃ構造のＮ－末端の片方又は両方でヒドラゾンを形成し、該ヒドラゾンが更に還元されると前記ヒドラジン結合を形成することもできる、グリオキシリル－ＦＣ（ＨＣＯ－ＣＯ－Ｆｃ）、ケト－Ｆｃ、又は単純アルデヒド－Ｆｃ（ＨＣＯ－Ｆｃ）の反応によって形成される、請求項６に記載のタンパク質の調製方法。
【請求項８】
前記グリオキシリル－Ｆｃが、前記ＧＬＰ－１ペプチドと予め結合しているリンカーと反応し、該リンカーが、ヒドラジン部分及びヒドラジド部分からなる群より選択される求核基を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記グリオキシリル－Ｆｃが、リンカー（Ｌ）上のヒドラジンと反応し、該リンカーが、ヒドラジン以外の第２の反応基を更に含んでいる、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】
前記リンカーが、エチレングリコール単位を少なくとも１つ含む、請求項１～６のいずれかに記載のたんぱく質。
【請求項１１】
前記ポリペプチドＢがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２の配列を有する、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項１２】
Ｂが、ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．１のＧＬＰ－１（７－３６）又はその類縁体からなる群より選択されるペプチドを含む、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項１３】
Ｄが、免疫グロブリンヒンジ領域の少なくとも一部である、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項１４】
請求項１～６のいずれか一項に記載のタンパク質を、製薬上許容できる担体と組み合わせて含む、医薬組成物。
【請求項１５】
処置を必要としている患者の代謝疾患を処置する方法であって、請求項１に記載のタンパク質を含む医薬組成物の治療的に有効な量を投与することを含む、方法。
【請求項１６】
前記疾患が、血糖コントロールの欠如を特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記疾患が、１型糖尿病、前糖尿病状態及び２型糖尿病からなる群より選択される、請求項１４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、免疫グロブリンＦｃタンパク質と化学的に結合した生理活性ペプチドを含む組成物に関する。更に具体的には、本発明は、ＧＬＰ－１ペプチドと抗体Ｆｃに化学的に結合された修飾ペプチド類縁体とのコンストラクトを含む、特異的インスリン分泌性組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
（関連技術の説明）
遺伝子組み換えタンパク質は、治療薬の新たな分野である。そうした遺伝子組み換え治療薬は、タンパク質製剤と化学修飾とに進歩をもたらした。そのような修飾は、半減期を高める（例えば、それがタンパク質分解酵素へ暴露するのを防ぐ）か、生物活性を高めるか、又は不必要な副作用を軽減することによって、治療用タンパク質の治療的有用性を潜在的に高めることができる。そのような修飾の１つは、エンテラセプト（enteracept）等の、受容タンパク質と融合した免疫グロブリンの使用である。治療用タンパク質はまた、Ｆｃドメインを用いて構築することで、より長い半減期を付与するか又はＦｃ受容体結合、タンパク質Ａ結合及び相補体結合等の機能を組み込むことを試みてきた。
【０００３】
糖尿病は、効果的な薬剤的治療法が解決されなければ、２０２５年までに３億超の人が発症すると推定される、広まりつつある流行病である。全症例の９０～９５％を２型糖尿病が占めている。持続性の高血漿グルコース値によってもたらされる合併症としては、心臓血管疾患、腎症、神経障害、及び網膜症が挙げられる。更には、膵臓のβ細胞が死ぬと、その結果、２型糖尿病後期においてインスリンが分泌されなくなる。現在の糖尿病治療は、低血糖及び体重増加を包含する様々な有害な副作用を伴う。加えて、現在の２型糖尿病の治療は、病気を治療するのではなく、患者がインスリン治療を必要とするまでの時間を単に引き伸ばすものである。

【０００４】
ペプチド－１（ＧＬＰ－１）と同種のグルカゴンは、グルコース経口チャレンジ後に腸のＬ細胞から分泌される、３７のアミノ酸のペプチドである。６番目と７番目の間でその後生じる内因性開裂によって、生物学的に活性なＧＬＰ－１（７－３７）ペプチドが産生される。ＧＬＰ－１（７－３７）ペプチド配列は、２つの構造ドメインに分けることができる。ペプチドのアミノ末端ドメインは、シグナル伝達に関与しているが、残りのペプチドは、ヘリカル構造のＧＬＰ－１受容体の細胞外ループと結合していると考えられる。グルコースに反応して、活性なＧＬＰ－１は、膵臓でＧＬＰ－１受容体と結合して、インスリン分泌を増大させる（インスリン分泌促進作用）。更に、ＧＬＰ－１は、胃内容物排出を軽減し、血液循環に排出されて食物摂取を低下させるかもしれないグルコースボーラスを低下させることが分かっている。これら作用の組み合わせによって、血糖値が低下する。ＧＬＰ－１はまた、アポトーシスを抑制して、膵臓でのβ細胞の増殖を高めることも分かっている。したがって、ＧＬＰ－１は、血糖を下げて、糖尿病患者の膵臓のβ細胞を保護する、魅力的な治療薬である。更に、ＧＬＰ－１活性は、血糖値で制御される。血糖値が一定の閾値まで下がると、ＧＬＰ－１は活性でなくなる。したがって、ＧＬＰ－１を用いた治療に伴う低血糖の危険性は全くない。

【０００５】
ＧＬＰ－１療法の生存率は、病院で立証されている。２型糖尿病患者では、６週間のＧＬＰ－１注入によって、空腹時及び８時間後の平均血漿グルコース値が効果的に低下した。ＧＬＰ－１療法はまた、β細胞の機能向上をももたらした。エクセナチドは、現在治験中のＧＬＰ－１類縁体である。エクセナチドは、ドクトカゲの唾液中で最初見出されたものであり、ＧＬＰ－１と５３％同一である。エクセナチドは、ＧＬＰ－１受容体と結合して、ＧＬＰ－１（７－３７）に起因していた非常に多くの活動に関与するシグナル伝達カスケードを開始することができる。現時点では、２型糖尿病患者のＨｂＡ１ｃ値と血中フルクトサミン値とを低下させることが分かっている。更にそれは、健常人では胃内容物排出を遅延させて、食物摂取を抑制した。

【０００６】
しかしながら、ＧＬＰ－１は、プロテアーゼであるジペプチジルペプチターゼＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）によって生体内で急速に不活性化される。そのため、ＧＬＰ－１ペプチドを用いた治療の有効性は、その急速なクリアランスと短い半減期によって制限されていた。例えば、ＧＬＰ－１（７－３７）の血清半減期は、ほんの３～５分である。ＧＬＰ－１（７－３６）アミドの時間作用は、皮下投与の場合、約５０分である。内因性プロテアーゼ開裂に抵抗性のある類縁体や誘導体でさえ、２４時間に亘る連続投与を避ける程長い半減期は有しない。例えば、エクセナチドは、ＤＰＰ－ＩＶ耐性を有するにもかかわらず、半減期が短くかつインビボ薬物動態学上かなり変動するために一日２回食前投与する必要がある。現在治験中の別の化合物であるＮＮ２２１１は、脂質化ＧＬＰ－１類縁体である。これは、１日１回の投与が見込まれている。

【０００７】
治療薬の急速な消滅は、薬剤の高い血中濃度を長期間維持することが望ましい場合には、その後連続投与する必要があるため、不都合である。その上、長時間作用型の化合物は、過去の治療レジメンによって経口薬のみを服用する必要があった糖尿病患者らにとって特に重要である。こうした患者らは、多くの場合、薬剤を複数回注射する必要があるレジメンへ移行するのに非常に苦労している。半減期が長いＧＬＰ－１療法は、開発中の他のＧＬＰ－１ペプチド類及び化合物類よりも有意な利点があるということになる。

【０００８】
様々な位置に置換、欠失及び修飾を有する多数のＧＬＰ－１類縁体が開示されてきた。例えば、Ｄ．Ｉ．バックリー（Buckley, D.I.）、Ｊ．Ｆ．ハバナー（Habener, J.F.）、Ｊ．Ｂ．マロリー（Mallory, J.B.）及びＳ．モイソフ（Mojsov, S.）、糖尿病治療に有用なＤＬＰ－１類縁体（GLP-1 analogs useful for diabetes treatment）、ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９１／１１４５７を参照のこと。これに加えて、多数のハイブリッドペプチ

ド類も調製されてきた。ＧＬＰ－１と、グルカゴンと、ドクトカゲ（アメリカドクトカゲ）の唾液腺から単離された、ＧＬＰ－１と５３％の相同性を有する高親和性ＧＬＰ－１受容体作用物質であるエキセンディン－４とのセグメントを含有するハイブリッドペプチド類が、多重受容体結合のために調製されている。Ｎ末端でのグルカゴン配列の付加により、ＤＰＰ－ＩＶ開裂が防げる。導入されたシステインによるＣ末端のペグ化では、活性損失が生じなかった。

【０００９】

改善された半減期を有するＧＬＰ－１変種は、マレイミド基をトリエチレングリコールを介して、Ｃ末端に付加されたリジンのε－アミノ基と結合することによって調製された。生体内では、これはアルブミンと結びついて、アルブミンシステインと共有結合を形成する。

【００１０】

半減期を延長させようという意図で、ＧＬＰ－１又はその類縁体を含む融合タンパク質が、ペプチドのＣ末端カルボン酸基をＩｇＧ４のＮ末端アミノ酸とＧｌｙ－Ｓｅｒ－リッチなリンカーによって融合する遺伝子組み換え技術によって調製されている。アルブミン及びＦｃ融合コンストラクトはどちらも、ＧＬＰ－１及びその類縁体と共に開示されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

したがって、当該技術分野では、ＧＬＰ－１活性を有し、長い血清半減期を有する、Ｔ２Ｄ治療用組成物が必要とされている。天然ＧＬＰ－１ペプチド配列系分子を生み出すためのいくつかの取り組みとしては、プロテアーゼ耐性を有する類縁体類及び誘導体類、又は脂質やＰＥＧ等の親水性ポリマーを組み込んだ共役物類、あるいは前述の免疫グロブリン融合コンストラクトが包含される。

【００１２】

そのため、ＧＬＰ－１ペプチド又はその類縁体を免疫グロブリンＦｃと融合する取り組みは、ペプチドの半減期を延ばす１つの方法である。しかしながら、そのような融合タンパク質は、遺伝子組み換え技術によって発現するため、天然の哺乳類アミノ酸を２０個含有するものに限られる。遺伝子コードの操作によって非天然型アミノ酸をタンパク質に組み込むことが可能な技術も存在するが、これらの方法はＮα－Ｌ－アミノ酸の使用に限られている。Ｄ－アミノ酸、Ｎβ－アミノ酸又はより高次の同族体、非アミノ酸部分及び環状ペプチドを、非システイン側鎖を用いて含有する、生物学的に活性なペプチド類縁体は多数存在する。更に、一部の生物学的に活性なペプチドは、活性のために遊離カルボン酸基をも必要とする。これらの構造物はいずれも、遺伝子組み換え技術によって産生されるものを使用して融合タンパク質に組み込むことができない。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

本発明は、遺伝子組み換え技術では入手できないＧＬＰ－１類縁体ペプチドの上述の変種をいずれも組み込むことが可能な、ＧＬＰ－１ペプチド半合成免疫グロブリンＦｃ融合タンパク質類に関する。活性ＧＬＰ－１ペプチド類が保有する生物学的活性だけでなく、免疫グロブリンＦｃ骨格上の２つのペプチドの特異的な表示によっても、ＧＬＰ－１の構造－活性関係についての現時点での理解では予測又は説明されない生物学的活性を表すことができる。

【００１４】

したがって、一態様において、本発明は、抗体Ｆｃ断片との非ペプチジル結合によって結合されたＧＬＰ－１ペプチド又はその類縁体を含む、医学的用途のための生物活性共役物に関する。この生物活性治療薬は、その反応性カルボニルがアルデヒド又はケトンであり、抗体Ｆｃの酸化アミノ酸部分との共有結合によって抗体Ｆｃ断片と直接又は間接的に結合している。別の態様の生物活性共役物では、ＧＬＰ－１ペプチドをＦｃと直接的又は

間接的に結合している共有結合は、一級アミン、ヒドラジン、アシルヒドラジド、カルバジド、セミカルバジド及びチオカルバジドからなる群より選択される求核基と、Ｆｃの反応性カルボニル含有部分との反応によって形成される。

【００１５】

本発明は更に、次の一般式の組成物に関する。

Ｂ－（Ｌ）$_n$－（Ｆ）　　（Ｉ）

式中、Ｂは、少なくとも１つの生物活性なＧＬＰ－１ペプチド、その変異体若しくは誘導体を表しており、Ｆは、構造Ｆ（Ｘ）$_m$－（Ｄ）$_p$－ＣＨ２－ＣＨ３から構成される抗体Ｆｃを表しており、式中、Ｘは、標準的な分子生物工学技術によって組み込まれて産生され得るいずれかの天然型アミノ酸を表し、ｍは、０～２０までの整数であり、Ｄは多量体形成又は二量体形成ドメイン、例えば免疫グロブリンのヒンジ領域の少なくとも一部であり、ｐは０か１の整数であり、及びＣＨ２は、免疫グロブリンＣＨ３定常部の少なくとも一部と結合した免疫グロブリンＣＨ２定常部の少なくとも一部を表している。Ｌは、実質的に非免疫原性でありかつ生物活性部分とＦとの間に柔軟な結合を付与する、ポリマー構造を含むリンカーであって、コンストラクトに代替の配向性を持たせることができるリンカーを表しており、式中、ｎは、０又は１の整数であり得る。ｎが０の場合、ＢとＦとの結合は、非ペプチジル共有結合である。ｎが１の場合、ＬとＦとの結合は、非ペプチジル結合である。一実施態様では、Ｌは、ポリエチレングリコール等のポリ（アルキレンオキシド）残基から構成される。結果として得られるコンストラクトを更に、所望により、同一の又は他のポリペプチド類、ポリマー類、標識類、放射性同位体類若しくは活性物質類と、限定されないがＣｙｓ－Ｃｙｓジスルフィド結合等の会合又は共有結合によって結合することも可能である。

【００１６】

特定の実施形態では、本発明には、次の式の化合物類を含む式Ｉの共役物も包含される。

Ｂ－Ｆ（ＩＩ）及びその多量体であって、ＢのＣ末端がＦのＮ末端に結合しているか又はＢのＮ末端がＦのＮ末端に結合しており、かつＦが二量体形成ドメインを有しないもの、

Ｂ－Ｌ－Ｆ（ＩＩＩ）及びその多量体であって、Ｆが二量体形成ドメインを持たないＦｃドメインであってかつＮ末端でＬに結合しており、Ｌが更に代替部位でＢのＣ末端にも結合しているもの、あるいはＦが、Ｆｃドメインを形成することが可能な前述のポリペプチドでありかつ更にはＮ末端でＬに結合しており、Ｌが更に、代替部位でＢのＮ末端にも結合しているもの、及び

Ｂ^1－Ｆ－Ｂ^2（ＩＶ）であって、Ｂ^{1}及びＢ^{2}が、同一又は異なるＧＬＰ－１ペプチドであるか、あるいは同一ＧＬＰ－１上の代替部位を介してＦと結合しており、また、Ｆが二量体形成ドメインを有しているもの、並びに

Ｂ^1－Ｌ^1－Ｆ－Ｌ^2－Ｂ^2（Ｖ）であって、Ｂ^{1}及びＢ^{2}が、同一又は異なるＧＬＰ－１ペプチドであるかあるいはそれぞれがＢ１及びＢ２上の代替部位を介してＬ^{1}及びＬ^{2}と結合しており、並びにＦが二量体形成ドメインを有しているもの。いずれの場合にも、ＢとＦとの結合又はＬとＦとの結合は、非ペプチジル結合である。

【００１７】

ＧＬＰ－１共役物がＧＬＰ－１と結合していない免疫グロブリン重鎖と多量化している組成物類もまた、当該組成物に包含される。一価の組成物等のそうした組成物類は、式Ｉ～Ｖの共役物と遊離重鎖との、共有又は非共有結合的な会合、あるいは予備成形されたＦｃ領域内でのように既に会合した重鎖の一価の結合による、結合の結果であり得る。

【００１８】

一実施形態では、本発明は、ＧＬＰ－１ペプチドを化学修飾して、部位特異的な方法で、分子の生物活性を低下させずに、その血清半減期を増大させる方法に関する。本発明の方法は、抗体ＦｃのＮ末端で反応性カルボニルを形成して、それとＧＬＰ－１ペプチドとを非ペプチジル結合によって結合する工程を含んでいる。一実施形態では、その方法は、

ＧＬＰ－１ペプチドを、ＰＥＧポリマーのように第１及び第２結合部位を有するポリマーと結合することであって、ＧＬＰ－１ペプチドは、第１部位と結合させることと、求核性官能基を有するＰＥＧの第２結合部位を抗体Ｆｃ上に存在するアルデヒドとＮ末端で結合することを包含しており、アルデヒドは、遺伝子組み換えタンパク質技術によって発現するようなＮ末端セリン又はトレオニン残基の酸化的開裂によって生じる。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】ＧＬＰ－１受容体結合性の誘導ｃＡＭＰを試験物品と接触したＩＮＳ－１Ｅ細胞内で測定する生物化学アッセイにおいて、生物活性ＧＬＰ－１ペプチド１の活性を野生型ＧＬＰ－１ペプチドと比較して表すグラフが図示されている。

【図２】図２のようなｃＡＭＰアッセイにおいて野生型ＧＬＰ－１ペプチドと比較したときの、ペプチド３の相対的なｃＡＭＰ誘導活性を表すグラフ。

【図３】ｃＡＭＰアッセイで測定したときの、ＧＬＰ－１ペプチド－Ｆｃ共役物のいくつかの変種の活性を表すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

略語

ＦＭＯＣ：９－フルオレニルメトキシカルボニル、Ｂｏｃ、ｔ－ブトキシカルボニル、ＧＬＰ－１グルカゴンと同種のペプチド－１；

【００２１】

定義

「共役物」という用語は、分子、例えば生物学的に活性なペプチドと抗体Ｆｃとの、Ｆｃ上の反応性カルボニルとの反応によって形成されたヒドラジン又はセミカルバゾン結合による共役結合であって、分子と抗体Ｆｃとの間にポリ（エチレングリコール）等の合成ポリマー分子を組み込ませることによって成されてもよくかつ存在する場合は、Ｆｃ上の反応性カルボニルとの反応によって形成されたヒドラゾン又はセミカルバゾン結合によってポリマーをＦｃに結合させる、共有結合の結果として形成されるもの全てを指すものとする。

【００２２】

本明細書で使用するとき、「Ｆｃ」、「Ｆｃ含有タンパク質」又は「Ｆｃ含有分子」という用語は、少なくとも免疫グロブリンＣＨ２及びＣＨ３ドメインを有する単量体、二量体、又はヘテロ二量体タンパク質を指す。ＣＨ２及びＣＨ３ドメインは、抗体ヒンジ領域等の二量体形成又は多量体形成ドメインに機能的に結合されると、タンパク質分子（例えば、抗体）の二量体領域の少なくとも一部を形成することができる。抗体分子のＦｃ部分（結晶化可能な断片又は相補体結合する断片）は、様々なペプチダーゼ（この場合はペプシン）による抗体の消化によって産生される断片と十分に特徴付けられたもののうち１つを示す。様々な抗体断片が正常な抗体の消化の点から見て定義されているが、当業者には、このようなＦｃ断片が、化学的に又は組み換えＤＮＡ方法論、ペプチド表示等のいずれかによって新たに合成される可能性があることが自明であろう。ＣＨ２－及びＣＨ３ドメインは、ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ２００５／００５６０４に開示されているように、ヒト生殖系配列由来であることが好ましい。

【００２３】

本明細書で使用するとき、「ペプチド」と「タンパク質」は、ペプチド結合によって互いに結合されたアミノ酸残基のポリマーを指すのに互換的に使用される。用語は、あらゆる大きさ、構造又は機能のタンパク質、ポリペプチド及びペプチドを包含するものとする。しかしながら、典型的には、ペプチドはアミノ酸少なくとも６個分の長さであり、タンパク質はアミノ酸少なくとも５０個分の長さである。ペプチドの分子量は、典型的に約１０，０００Ｄａまである一方で、それを超える分子量のペプチドは通常、タンパク質と呼ばれる。グリコシル化、ヒドロキシル化等に加えて、ペプチド側鎖の修飾が存在する場合もある。更に、脂質及び小さな薬剤分子を包含する他の非ペプチド性分子が、ポリペプチ

ドに結合していてもよい。タンパク質は、天然、遺伝子組み換え、又は合成であっても、あるいはこれらのいずれかの組み合わせであってもよい。ペプチドはまた、天然型タンパク質又はペプチドの断片であってもよい。タンパク質は、単一分子であっても、複数の分子の複合体であってもよい。タンパク質という用語は、１つ以上のアミノ酸残基が対応する天然型アミノ酸の人工的な化学的類縁体である、アミノ酸ポリマーにも適用され得る。１つ以上のアミノ酸残基が「非天然」アミノ酸であるアミノ酸ポリマーであって、いかなる天然型アミノ酸にも対応していないものは更に、本明細書中の「ペプチド」及び「タンパク質」という用語を用いることによっても包含される。

【００２４】

「血清半減期の増加」又は「増大した$t_{1/2}$」とは、修飾された生物活性分子の、その非修飾形に対する循環半減期の正の変化を表す。血清半減期は、生物学的に活性な分子を投与した後のあらゆる時点で血液試料を採取し、そして各試料中の分子の濃度を測定することによって測定される。血清濃度の変化を経時的に測定することにより、血清半減期を算出することができる。修飾された分子、例えば結合した分子の血清半減期を非修飾分子と比較することで、血清半減期又は$t_{1/2}$の相対的な増加を求めることもできる。増加は、少なくとも約２倍であることが望ましいが、より小さな増加が有用な場合もある。

【００２５】

「融合タンパク質」という用語は、２つ以上のポリペプチドから構成されたタンパク質であって、一般にその天然状態では非結合であるが、ペプチド結合を介してそのアミノ末端及びカルボキシル末端それぞれで結合されて単一の連続ポリペプチドを形成しているものを指す。２つ以上のポリペプチド構成成分は、スペーサとして役立ちかつ柔軟性を付与し得る１つ以上のアミノ酸の配列を介して直接結合できるか又は間接的に結合できるかが分かる。

【００２６】

「官能基」、「活性部分」、「反応性部位」、「化学反応性基」及び「化学反応性部分」は、当該技術分野において使用され、また、本明細書では、分子の明確に限定できる部分又は単位を指すために使用される。これらの用語は、化学技術分野ではある程度同義であり、また、本明細書では、一部の機能又は活性を実行しかつ他の分子と反応する分子の部分を指すために用いられる。「活性」という用語は、官能基と併用される場合、反応するために強い触媒又は極めて非現実的な反応条件を必要とする基（すなわち、「非反応性」又は「不活性」基）とは対照的に、他の分子上の電子吸引基又は求核基と容易に反応する官能基を包含するものとする。例えば、当該技術分野で理解されているように、「活性エステル」という用語には、アミン類等の求核基と容易に反応するエステルが包含される。代表的な活性エステル類としては、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル類又は１－ベンゾトリアゾリルエステル類が挙げられる。一般に活性エステルは水性媒体中でアミンと短時間で反応するが、メチルエステル又はエチルエステル等の特定のエステル類は、求核基と反応するために強い触媒を必要とする。本明細書で使用するとき、「官能基」という用語には、保護された官能基が包含される。

【００２７】

「保護された官能基」又は「保護基」若しくは「保護用の基」とは、特定の反応条件下での分子中の特別な化学反応性官能基の反応を抑制又は阻害する部分（すなわち、保護基）の存在を指す。保護基は、保護される化学反応性基の種類だけでなく、使用される反応条件や、存在する場合は分子中の追加の反応性基又は保護基の存在に応じても異なる。当該技術分野において既知の保護基は、Ｔ．Ｗ．グリーン（Greene, T. W.）ら、有機合成における保護基（Protective Groups In Organic Synthesis）、第３版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ（John Wiley & Sons）、ニューヨーク州ニューヨーク（１９９９年）に見出すことができる。

【００２８】

「結合」又は「リンカー」（Ｌ）という用語は、好ましくは１つ以上の共有結合によって結合するのに用いられる原子又は原子群、２つのポリマー断片又はポリマー末端等の相

互接続部分、及びポリペプチドのように生物活性剤上に存在する反応性官能基を指す。

【００２９】

「残基」とは、１つ以上の分子との反応後に残留している分子の一部を表す。例えば、ポリペプチド鎖内のアミノ酸残基は、隣接するアミノ酸残基と共にペプチド結合を形成した後に残留しているアミノ酸の一部である。グリオキシリル官能基は、ポリペプチド上のＮ－末端セリン又はトレオニンを過ヨード酸塩処理することによって形成される残基である。

【００３０】

本明細書で使用するとき、「ＧＬＰ－１ペプチド」又は「ＧＬＰ－１ペプチド、変異体又は誘導体」は、ＧＬＰ－１ペプチド、ＧＬＰ－１断片、ＧＬＰ－１同族体、ＧＬＰ－１類縁体又はＧＬＰ－１誘導体のうち少なくとも１つであり得る。ＧＬＰ－１ペプチドは、膵臓でβ細胞上のＧＬＰ－１受容体と結合することによってインスリン分泌促進作用を発現するように天然ＧＬＰ－１（７－３７）と十分な相同性を有する約２５～約４５の天然型又は非天然型アミノ酸を有する。ＧＬＰ－１（７－３７）のアミノ酸配列は、ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧである（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）である。

【００３１】

ＧＬＰ－１断片は、ＧＬＰ－１（７－３７）のＮ末端及び／又はＣ末端からの１つ以上のアミノ酸のトランケーション後に得られるポリペプチド又はその類縁体若しくは誘導体である。ＧＬＰ－１同族体は、ＧＬＰ－１（７－３７）のＮ末端及び／又はＣ末端に１つ以上のアミノ酸が付加されたペプチド、又はその断片若しくは類縁体である。ＧＬＰ－１類縁体は、ＧＬＰ－１（７－３７）の１つ以上のアミノ酸が修飾及び／又は置換されたペプチドである。ＧＬＰ－１類縁体は、この類縁体がインスリン分泌促進作用を有するようにＧＬＰ－１（７－３７）又はＧＬＰ－１（７－３７）断片と十分な相同性を有する。ＧＬＰ－１誘導体は、ＧＬＰ－１ペプチド、ＧＬＰ－１同族体又はＧＬＰ－１類縁体のアミノ酸配列を有する分子と定義されるが、それに加えて、そのアミノ酸側基、α－炭素原子、末端アミノ基又は末端カルボン酸基のうち１つ以上の化学修飾をも有する分子とも定義される。

【００３２】

ＧＬＰ－１ペプチド類

多数の活性ＧＬＰ－１断片、類縁体及び誘導体が当該技術分野において既知であり、任意のこれらの類縁体及び誘導体は、本発明のＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）の一部でもあり得る。当該技術分野において既知の一部のＧＬＰ－１類縁体及びＧＬＰ－１断片は、米国特許第５，１１８，６６６号、同第５，９７７，０７１号及び同第５，５４５，６１８号、並びにエーデルホースト（Adelhorst）ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、第２６９巻、６２７５頁（１９９４年）に開示されている。例としては、ＧＬＰ－１（７－３４）、ＧＬＰ－１（７－３５）、ＧＬＰ－１（７－３６）、Ｇｌｎ９－ＧＬＰ－１（７－３７）、Ｄ－Ｇｌｎ９－ＧＬＰ－１（７－３７）、Ｔｈｒ１６－Ｌｙｓ１８－ＧＬＰ－１（７－３７）及びＬｙｓ１８－ＧＬＰ－１（７－３７）が挙げられるが、これらに限定されない。任意のＧＬＰ－１化合物は、そのＧＬＰ－１化合物自体がＧＬＰ－１受容体を介して結合してシグナル伝達を生じさせることができるのであれば、本発明の非相同の融合タンパク質の一部であることができる。ＧＬＰ－１受容体結合及びシグナル伝達は、欧州特許第６１９，３２２号及び米国特許第５，１２０，７１２号にそれぞれ記載されているようなインビトロアッセイを用いて評価することができる。

【００３３】

多数の活性ＧＬＰ－１断片、類縁体及び誘導体は、当該技術分野において既知であり、これら類縁体及び誘導体のうちいずれかは更に、本発明の非相同の融合タンパク質の一部でもあり得る。新規ＧＬＰ－１類縁体並びに当該技術分野において既知のＧＬＰ－１類縁体及び誘導体についてのいくつかの例を本明細書に提示する。

【００３４】
ＤＰＰ－ＩＶによる分解及び不活性化を抑制するために、Ｎα－メチル－Ｈｉｓ[1]を包含する多数のＧＬＰ－１類縁体が調製されており、α－メチル－Ｈｉｓ[1]、デサミノ－Ｈｉｓ[1]及びイミダゾール－乳酸－ＧＬＰ－１が調製された（サロウステ・デ・メンティエール（Sarrauste de Menthiere）ら、２００４年、欧州医化学会誌（Eur. Med. Chem.）、３９巻、４７３～４８０頁）。α－ＭｅｔｉｒｕＨｉｓ[1]－ＧＬＰ－１以外の類縁体は全て、生体外ではＤＰＰ－ＩＶの存在下で安定であった。これらはいずれも、ＲＩＮｍ５Ｆ細胞内の天然ＧＬＰ－１に相当する受容体親和性及びインビトロ生物活性を示した。デサミノ－Ｈｉｓ[1]－ＧＬＰ－１のみが、天然ＧＬＰ－１よりも１５倍低い受容体親和性を示した。類縁体はいずれも、ＧＬＰ－１に匹敵する濃度において、ＲＩＮｍ５Ｆ細胞内で細胞内ｃＡＭＰ産生を誘導した。

【００３５】
ＤＰＰ－ＩＶによる分解を抑制する別の取り組みは、天然ＧＬＰ－１配列中の選択されたアミノ酸残基を修飾又は置換することである。別の例では、ＤＰＰ－ＩＶによる認識及び開裂を抑制するためにＮ－末端アミノ基をアシル化、例えばアセチル化してもよい。

【００３６】
本発明の好適なＧＬＰ－１ペプチド、変異体及び誘導体の非限定的な例は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２：Ｈｉｓ－Ｘａａ２－Ｘａａ３－Ｇｌｙ－Ｘａａ５－Ｘａａ６－Ｘａａ７－Ｘａａ８－Ｘａａ９－Ｘａａ１０－Ｘａａ１１－Ｘａａ１２－Ｘａａ１３－Ｘａａ１４－Ｘａａ１５－Ｘａａ１６－Ｘａａ１７－Ｘａａ１８－Ｘａａ１９－Ｘａａ２０－Ｘａａ２１－Ｐｈｅ－Ｘａａ２３－Ｘａａ２４－Ｘａａ２５－Ｘａａ２６－Ｘａａ２７－Ｘａａ２８－Ｘａａ２９－Ｘａａ３０－Ｘａａ３１で表示され、式中、Ｘａａ２は、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ３は、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ５は、Ｔｈｒ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ６は、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｔｒｐ又はＴｙｒであり、Ｘａａ７は、Ｔｈｒ又はＡｓｎであり、Ｘａａ８は、Ｓｅｒ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ９は、Ａｓｐ又はＧｌｕであり、Ｘａａ１０は、Ｖａｌ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｍｅｔ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１１は、Ｓｅｒ、Ｖａｌ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１２は、Ｓｅｒ、Ｖａｌ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１３は、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１４は、Ｌｅｕ、Ａｌａ、Ｍｅｔ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１５は、Ｇｌｕ、Ａｌａ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ、Ｇｌｎ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１６は、Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｃｙｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１７は、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙであり、Ｘａａ１８は、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ａｒｇ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１９は、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２０は、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｇｌｎ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｇｌｕ又はＡｓｐであり、Ｘａａ２１は、Ｇｌｕ、Ｌｅｕ、Ａｌａ、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ａｒｇ、Ｇｌｎ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２３は、Ｉｌｅ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ又はＧｌｕであり、Ｘａａ２４は、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２５は、Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２６は、Ｌｅｕ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２７は、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｉｌｅ、Ａｒｇ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２８は、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｇ

ｌｕ又はＡｓｐであり、Ｘａａ２９は、Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ａｒｇ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、Ｘａａ３０は、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ又はＬｙｓであり、及びＸａａ３１は、Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ａｒｇ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、Ｌｙｓである。

【００３７】

ＧＬＰ－１ペプチド、変異体又は誘導体の別の好ましい基は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３：Ｈｉｓ－Ｘａａ２－Ｘａａ３－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｘａａ６－Ｘａａ７－Ｘａａ８－Ｘａａ９－Ｘａａ１０－Ｓｅｒ－Ｘａａ１２－Ｔｙｒ－Ｘａａ１４－Ｇｌｕ－Ｘａａ１６－Ｘａａ１７－Ｘａａ１８－Ｘａａ１９－Ｌｙｓ－Ｘａａ２１－Ｐｈｅ－Ｘａａ２３－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｘａａ２７－Ｘａａ２８－Ｇｌｙ－Ｘａａ３０で例示され、式中、Ｘａａ２は、Ａｌａ、Ｇｌｙ又はＳｅｒであり、Ｘａａ３は、Ｇｌｕ又はＡｓｐであり、Ｘａａ６は、Ｐｈｅ又はＴｙｒであり、Ｘａａ７は、Ｔｈｒ又はＡｓｎであり、Ｘａａ８は、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ又はＡｌａであり、Ｘａａ９は、Ａｓｐ又はＧｌｕであり、Ｘａａ１０は、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ又はＩｌｅであり、Ｘａａ１２は、Ｓｅｒ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１４は、Ｌｅｕ、Ａｌａ又はＭｅｔであり、Ｘａａ１６は、Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｇｌｕ又はＡｓｐであり、Ｘａａ１７は、Ｇｌｎ又はＧｌｕであり、Ｘａａ１８は、Ａｌａ又はＬｙｓであり、Ｘａａ１９は、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ又はＭｅｔであり、Ｘａａ２１は、Ｇｌｕ又はＬｅｕであり、Ｘａａ２３は、Ｉｌｅ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ又はＧｌｕであり、Ｘａａ２７は、Ｖａｌ又はＬｙｓであり、Ｘａａ２８は、Ｌｙｓ又はＡｓｎであり、及びＸａａ３０は、Ａｒｇ又はＧｌｕである。

【００３８】

エクセンディン－４ペプチドの基は、米国特許第７２２３７２５号に開示されているように、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の式Ｈｉｓ　Ｘａａ２　Ｘａａ３　Ｇｌｙ　Ｔｈｒ　Ｐｈｅ　Ｔｈｒ　Ｘａａ８　Ａｓｐ　Ｘａａ１０　Ｓｅｒ　Ｌｙｓ　Ｇｌｎ　Ｘａａ１４　Ｇｌｕ　Ｇｌｕ　Ｇｌｕ　Ａｌａ　Ｖａｌ　Ａｒｇ　Ｌｅｕ　Ｘａａ２２　Ｘａａ２３　Ｇｌｕ　Ｘａａ２５　Ｌｅｕ　Ｌｙｓ　Ｘａａ２８　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｐｒｏ　Ｓｅｒ　Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ａｌａ　Ｐｒｏ　Ｐｒｏ　Ｐｒｏ－Ｚで示され、式中、Ｘａａ２は、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ又はＴｈｒであり、Ｘａａ３は、Ａｓｐ又はＧｌｕであり、Ｘａａ８は、Ａｌａ、Ｓｅｒ又はＴｈｒであり、Ｘａａ１０は、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、ペンチルグリシン又はＭｅｔであり、Ｘａａ１４は、Ａｌａ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、ペンチルグリシン、Ｖａｌであり、Ｘａａ２２は、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ又はナフチルアラニンであり、Ｘａａ２３は、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、ペンチルグリシン、ｔｅｒｔ－ブチルグリシン又はＭｅｔであり、Ｘａａ２５は、Ａｌａ、Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ又はナフチルアラニンであり、Ｘａａ２８は、Ａｌａ又はＡｓｎであり、及びＺは、－ＯＨ又はＮＨ２である。

【００３９】

これらペプチドは、開示された方法及び／又は当該技術分野において既知の方法によって調製可能である。配列中（及び本明細書全体を通じて）Ｘａａｓには、（特定の場合における別段の記載がない限り、）特定のアミノ酸残基、その誘導体又は修飾アミノ酸が包含される。酵素であるジペプチジル－ペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）が、投与されたＧＬＰ－１の観察された急速なインビボ不活性化に関与する場合があるため、ＧＬＰ－１ペプチド、同族体、類縁体及び誘導体は、ＤＰＰ－ＩＶの活性から保護されていることが好ましい。

【００４０】

ペプチドは更に、それらのアミノ酸配列に置換若しくは追加された、修飾された、非天然型異常アミノ酸を含む場合がある。代表的な修飾された、非天然型異常アミノ酸の一覧を以下に記す。

【００４１】

【表１】

修飾された(異常)アミノ酸	記号
２－アミノアジピン酸	Aad
３－アミノアジピン酸	Baad
β－アラニン、β－アミノプロピオン酸	bAla
２－アミノ酪酸	Abu
４－アミノ酪酸、ピペリジン酸	4Abu
６－アミノカプロン酸	Acp
２－アミノヘプタン酸	Ahe
２－アミノイソ酪酸	Aib
３－アミノイソ酪酸	BAib
２－アミノピメリン酸	Apm
２，４－ジアミノ酪産	Dbu
デスモジン	Des
２，２’－ジアミノピメリン酸	Dpm
２，３－ジアミノプロピオン酸	Dpr
Ｎ－エチルグリシン	EtGly
Ｎ－エチルアスパラギン	EtAsn
ヒドロキシリジン	Hyl
アロ－ヒドロキシリジン	AHyl
３－ヒドロキシプロリン	3Hyp
４－ヒドロキシプロリン	4Hyp
イソデスモジン	Ide
アロ－イソロイシン	AIle
Ｎ－メチルグリシン、サルコシン	MeGly
Ｎ－メチルイソロイシン	MeIle
６－Ｎ－メチルリジン	MeLys
Ｎ－メチルバリン	MeVal
ノルバリン	Nva
ノルロイシン	Nle
オルチニン	Orn

【００４２】

ポリペプチド内の機能上不可欠なアミノ酸は、部位特異的突然変異誘発又はアラニン走査突然変異誘発等の、当該技術分野において既知の方法で同定可能である（例えば、上記のオースベル（Ausubel）、第８章、１５頁、及びカニンガム（Cunningham）及びウェルズ（Wells）、サイエンス（Science）、第２４４巻、１０８１～１０８５頁（１９８９年））。後者の手順によれば、分子内の全ての残基に単一アラニン突然変異が導入される。次に、結果として得られた変異分子の生物活性、例えば、同族受容体を有する細胞がポリペプチドと接触しているときにシグナル伝達を生じさせる能力を試験する。

【００４３】

そのような変異体は、代替アミノ酸配列を有しており、作用物質（模倣物質）として又は拮抗物質として機能し得る。変異体は、変異誘発により、例えば離散点突然変異又はトランケーションにより生じる可能性がある。作用物質は、天然型タンパク質の生物学的活性を実質上そのまま保持するか又はその一部を保持することができる。タンパク質の拮抗物質は、例えば、対象タンパク質を包含する細胞のシグナル伝達カスケードの上流又は下流部材と競合的に結合することによって、天然型タンパク質の活性の１つ以上を抑制することができる。このようにして、特異的な生物学的効果は、限られた機能の変異体で処理

することによって導き出すことができる。天然型タンパク質の生物活性の一部を有する変異体で被験者を処置することにより、天然型タンパク質で処理することに比べて、被験者に副作用をほとんど発症させない可能性がある。

【００４４】

融合タンパク質の一部であるＧＬＰ－１化合物が、ＧＬＰ－１（７－３７）、ＧＬＰ－１（７－３６）又はエキセンディン－４中の対応アミノ酸とは異なる６個以下のアミノ酸を有することが一般に好ましい。

【００４５】

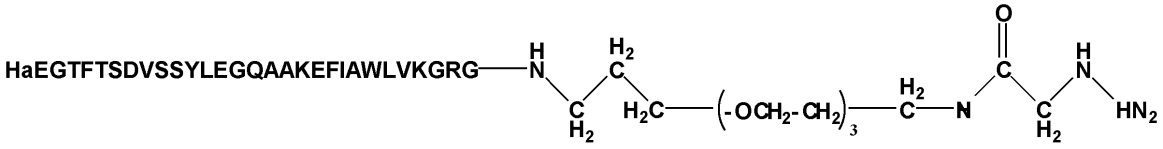
Ｆｃの代替鎖と結合されて、所望によりその間にリンカー部分を有する生物活性ペプチド類は、同一であっても異なってもよい。生物活性ペプチド類は、最終共役物が所望の生物活性を示すのであれば、介在するリンカーと又はペプチド上のいずれかの残基から生じるＦｃと結合していてもよい。生物活性は、例えば、結合活性についてはインビトロアッセイにより、又は動物の疾病モデルでのようにインビボ活性により、あるいは共役物を投与した後の被験者の反応により、測定することができる。

【００４６】

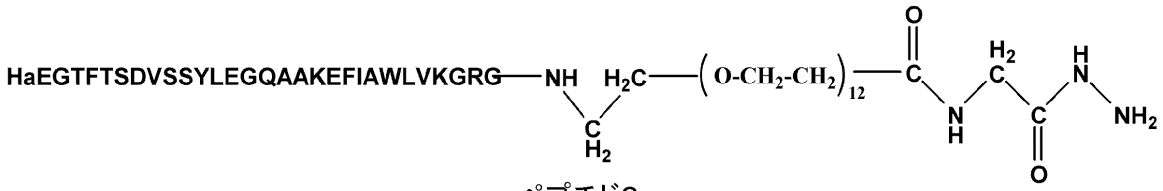
好ましい実施形態では、遺伝子組み換え技術では組み込むことができない基を含有するＧＬＰ－１ペプチドを合成することができる。例えば、以下の活性化ペプチド－リンカー１及び２は、ＧＬＰ－１ペプチドの第２位にＤ－アミノ酸を含有している。この修飾は、Ｎ－末端ペプチドを開裂させてＧＬＰ－１を不活性化するＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼＩＶ）の作用に対してペプチドを安定化させるのに用いられている。３種のペプチドにはいずれも、Ｆｃからペプチドを分離するためのスペーサとして機能する短鎖ポリエチレングリコール基が含有されている。

【００４７】

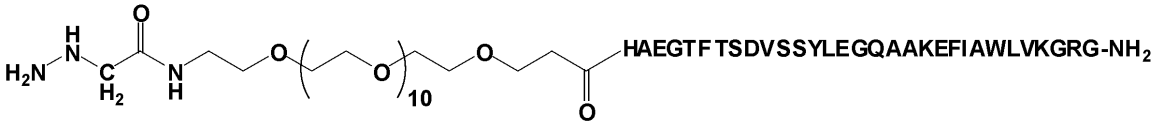
【化１】



ペプチド1



ペプチド2



ペプチド3

【００４８】

抗体Ｆｃ

本発明では、コンストラクトの抗体Ｆｃ部分は、無傷で天然型の単離された抗体から、又は単離されたモノクローナル抗体から得ることができるか、あるいは遺伝子組み換え技術によって若しくは化学的に又はこれら方法の組み合わせによって新たに合成することができる。抗体Ｆｃ領域は、無傷の抗体、好ましくはヒト抗体又はヒト定常部を含む抗体か

ら、重鎖のタンパク質分解開裂によって都合よく調製される。植物酵素であるパパインは、システイン等の還元剤の存在下で、重鎖のＣＨ１領域とＣＨ２領域の間（ＨｉｓとＴｈｒの間）のヒトＩｇＧ１分子を開裂することで、Ｎ－末端残基としてトレオニンを残す。パパインの消化がｃ７Ｅ３として既知の抗体においてシステインの存在下で実行される場合、ヒスチジン残基はアブシキシマブのＣ－末端位にある。長期治療又は過剰量のパパインによって、一般には、Ｆｃの過剰消化が生じるが、ＦａｂドメインⅡは多くの場合、パパインによる分解に対して抵抗性を維持する。そのため、無傷のＦｃ－領域の回復が望ましい場合は、条件を注意深く制御する必要がある。Ｆｃ領域は、タンパク質Ａとの結合能力を保持しており、タンパク質Ａ親和性クロマトグラフィを用いて精製することができる。共同出願された特許出願（ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ２００７／０２４７４３）には、グリコシル化ＡｂｓのＦｃが、脱グリコシル化又は非グリコシル化又は無グリコシル化Ａｂｓよりもパパイン消化に対して高い抵抗性を有することが開示されている。そのため、Ｆｃ領域を脱グリコシル化しようとする場合、パパインの消化後に工程を行う必要がある。

【００４９】

別の実施形態では、Ｆｃ－は（Fc-may）、遺伝子組み換え法によって合成されて、要望通りの任意のヒトクラス／サブクラス又は別の種を代表する場合もある。ヒト及び／又は動物免疫グロブリンの配列は、一般には刊行物、例えば、カバット（Kabat）ら、免疫学的に関心のアルタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）は、米国保健福祉省（U.S. Dept. Health）（１９８３年）において入手し易く、又はオンラインでも入手可能である。ヒト生殖細胞系列の情報から得られる配列、並びに既知の有用な治療用ヒト抗体配列及びその変種は、ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ２００５００５６０４にまとめられており、この公報を本明細書中に参照として組み込む。特に、ヒト抗体Ｆｃ領域の合成についての情報源を提示しているＰＣＴ国際公開特許ＷＯ２００５００５６０４の図３２～４０についての欄に示されかつＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２～４０に列挙されたヒト免疫グロブリンクラスＩｇＡ$_1$、ＩｇＡ$_2$、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ２$_1$、ＩｇＧ３$_1$、ＩｇＧ２４及びＩｇＭ重鎖の配列及び変種が挙げられる。

【００５０】

抗体のＦｃ－領域又はドメインは、抗体に対し、「エフェクター機能」と呼ばれる非抗原性結合作用、例えば相補体結合、抗体依存性細胞障害（ＡＤＣＣ）、及びこの二量体構造の小領域と、免疫細胞表面の受容体であるＦｃ－受容体との結合によって媒介される他の作用を付与する。代替のエフェクター機能を有するＦｃ－領域ポリペプチド配列の特定の天然及び合成変異体としては、サブクラス変異体、例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ２$_1$、ＩｇＧ３$_1$、ＩｇＧ２４、並びに例えば米国特許第５６２４８２１号、同第６５２８６２４号、同第６７３７３５６号、同第７１８３３８７号、及びＰＣＴ国際公開特許ＷＯ０４０９９２４９Ａ２に記載されているような変異ポリペプチドが挙げられる。

【００５１】

これらの機能は主に、対象の（抗原表示）細胞を崩壊することによって抗体の中和能を生じさせるが、これら機能はまた、ＣＨ２ドメイン内のＦｃに結合したグリカン類にも左右される（例えば、ジェフリーズ（Jefferis）及びランド（Lund）、２００２年、免疫学会誌レター（Immunology Letters）、第８２巻（第１～２号）、５７～６５頁、２００２年を参照のこと）。そのため、Ｆｃがグリカン類を除去すると、キラー機能がなくなる。Ｆｃは、細菌の宿主細胞内で遺伝子組み換え技術によって発現される場合は自然に産生することができ、又は必要に応じて、グリコシダーゼ酵素を用いて酵素的に除去することも可能である。

【００５２】

Ｘ$_m$－Ｄ－ＣＨ２－ＣＨ３を含むＦｃを使用する場合、Ｘの天然型アミノ酸類は、融合タンパク質に別の配向及び結合特性を持たせることによって構造柔軟性を付与する。

【００５３】

リンカー類

リンカーは、好ましくは、ペプチド結合によって互いに結合したアミノ酸から構成され

ている。そのため、好ましい実施形態では、リンカーは、ペプチド結合によって結合された１～２０のアミノ酸から構成されており、ここで、アミノ酸は、２０の天然型アミノ酸から選択される。これらのアミノ酸の一部は、当業者にはよく理解されているように、グリコシル化され得る。更に好ましい実施形態では、その１～２０のアミノ酸は、グリシン、アラニン、セリン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリジンから選択される。なお更に好ましくは、リンカーは、グリシンやアラニンのように立体障害のない大部分のアミノ酸から構成されている。それゆえ、好ましいリンカーは、ポリ（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）、ポリグリシン類（特に$(Gly)_4$、$(Gly)_5$）、ポリ（Ｇｌｙ－Ａｌａ）、及びポリアラニン類である。リンカーの他の具体的な例は、$(Gly)_3Lys(Gly)_4$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、$(Gly)_3AsnGlySer(Gly)_2$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、

$(Gly)_3Cys(Gly)_4$（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、及びＧｌｙＰｒｏＡｓｎＧｌｙＧｌｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）である。

【００５４】

前述の用語を説明するために、例えば、$(Gly)_3Lys(Gly)_4$は、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙを表す。ＧｌｙとＡｌａの組み合わせも好ましい。本明細書で示すリンカーは例示であって、本発明の範疇のリンカー類は更に長くてもよく、また、他の残基を包含してもよい。

【００５５】

非ペプチドリンカー類も利用できる。例えば、$-NH-(CH_2)_s-C(O)-$等のアルキルリンカー類を使用することができ、式中、ｓ＝２～２０が使用され得る。これらのアルキルリンカー類は更に、低級アルキル（例えば、C_1～C_6）低級アシル、ハロゲン（例えば、Ｃｌ、Ｂｒ）、ＣＮ、ＮＨ２、フェニル等のような非立体障害性基で置換されていてもよい。代表的な非ペプチドリンカーは、分子量が１００～５０００ｋＤ，好ましくは１００～５００ｋＤのＰＥＧリンカーである。ペプチドリンカー類を変化させて、前述と同様の方法で誘導体類を形成することもできる。

【００５６】

リンカーは、好ましくはポリマーである。好適なポリマーとしては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥ）、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアミノ酸類、無水マレイン酸ジビニルエーテル、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）－メタクリルアミド、デキストラン、硫酸デキストランを包含するデキストラン誘導体、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリン、ヘパリン断片、多糖類、セルロース、メチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを包含するセルロース誘導体、デンプン及びデンプン誘導体、ポリアルキレングリコール及びその誘導体、ポリアルキレングリコール類のコポリマー及びその誘導体、ポリビニルエチルエーテル類、並びにα，β－ポリ［（２－ヒドロキシエチル）－ＤＬ－アスパルタミド等、又はこれらの混合物が挙げられる。本発明の一態様では、ポリマーは定義された化学組成及び分子量範囲のものである。好ましい実施形態であるポリマーはＰＥＧである。

【００５７】

リンカー類は、１～２０のアミノ酸からなるペプチド、１～５０のエチレンオキシ単位から構成されており及び場合により末端アミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基及び／又はカルボキシ基で誘導体化されたポリエチレングリコール、分子量３００～４０，０００で、場合により末端アミノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基及び／又はカルボキシ基で誘導体化された多分散性ポリエチレングリコール類、場合により末端ヒドロキシル基、アミノ基及び／又はカルボキシ基で誘導体化された$C_{2\sim20}$アルキル、並びに場合により末端ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基及び／又はカルボキシ基で誘導体化された置換$C_{2\sim20}$アルキルからなる群より選択される１つ以上の部分から構成されていてよい。前述のように好適な反応性求核試薬から構成された連結部分はまた、ＧＬＰ－１ペプチドと結合する前に、Ｎ－末端においてコンストラクトの生物学的に生成された担体分子、例えば抗体Ｆｃに結合されていてもよい。

【００５８】
リンカー（Ｌ）は、式Ｉの共役物中に存在する場合、生物学上安定な又は生分解性のポリマー鎖又は単位を包含していてよい。例えば、反復結合を有するポリマーは、結合の不安定性に応じて、生理学的条件下での安定度を変化させることができる。そのような結合を有するポリマーは、低分子量類縁体類の既知の加水分解速度に基づく生理学的条件下でのその相対的な加水分解速度で分類することができ、例えば、不安定なものからより安定なものまででであって、ポリカーボネート類（－－Ｏ－－Ｃ（Ｏ）－－Ｏ－－）＞ポリエステル類（－－Ｃ（Ｏ）－－Ｏ－－）＞ポリウレタン類（－－ＮＨ－－Ｃ（Ｏ）－－Ｏ－－）＞ポリオルトステル類（－－Ｏ－－Ｃ（（ＯＲ）（Ｒ’））－－Ｏ－－）＞ポリアミド類（－－Ｃ（Ｏ）－－ＮＨ－－）であり得る。同様に、水溶性ポリマーを対象分子に結合させる結合系、例えば、より不安定なものからより安定なもの順でカーボネート（－－Ｏ－－Ｃ（Ｏ）－－Ｏ－－）＞エステル（－－Ｃ（Ｏ）－－Ｏ－－）＞ウレタン（－－ＮＨ－－Ｃ（Ｏ）－－Ｏ－－）＞オルトエステル（－－Ｏ－－Ｃ（（ＯＲ）（Ｒ’））－－Ｏ－－）＞アミド（－－Ｃ（Ｏ）－－ＮＨ－－）は、生物学的に安定又は生分解性であってよい。これらの結合は、例示した方法で付与されるものであって、本発明の水溶性ポリマーのポリマー鎖又はリンカー中に用いることができる結合の種類を制限するものではない。

【００５９】
共役物の調製方法
本発明の組成物は、当該技術分野において既知の手段又は未発見の手段のいずれかで調製することができるが、本明細書では、組成物の生成に特に適した特定のプロセスを提供する。

【００６０】
Ｆｃタンパク質の調製及び結合のための準備
生物学的に生成された多量体担体分子、例えばヒンジとして既知のシステイン含有領域のうち少なくとも一部を含む抗体Ｆｃは、多量体（二量体）形態で分泌された、遺伝子組み換え技術によって発現したタンパク質生成物から調製される。ヒト宿主細胞を用いてタンパク質を発現する場合、最終産物はグリコシル化されていてよい。原核生物の宿主細胞、例えば大腸菌を用いてタンパク質を発現するとき、グリコシル化は通常生じない。

【００６１】
タンパク質がＮ－又はＯ－結合グリコシル基を含有する場合、炭化水素は、用いられる酸化剤によって酸化を生じ易く、Ｎ－末端グリオキサル基の形成に影響を及ぼして、追加の反応性カルボニル種を生成する。炭化水素は、ＰＮＧアーゼを用いて化学結合する前に除去され、続いて、疎水性相互作用ＨＰＬＣで精製することができる。

【００６２】
ＦｃードメインのＮ－末端残基は、Ｆｃードメインの少なくとも１つの重鎖をＮ－末端で第１ペプチド結合するよりも前に残基中に反応性（電子求引性）カルボニルを生成することによって結合反応に対応できるように準備されている。本発明のコンストラクト調製方法に適した電子吸引分子として包含される反応性カルボニル構造としては、アルデヒド及びケトンが挙げられる。ケトンを形成する場合、末端ラジカルは、炭素数１～６の直鎖又は分枝低級アルキル、炭素数１～６の置換された直鎖又は分枝低級アルキル、アリール、あるいは置換アリールから選択される。

【００６３】
抗体Ｆｃは、必然的にセリン又はトレオニンを含んでいてよく、当該技術分野において周知の方法によって操作されてもよく、あるいはＮ－末端にセリン又はトレオニンを表示するように化学的に変化されていてもよい。

【００６４】
本発明の方法の態様の１つでは、抗体Ｆｃは、Ｎ－末端Ｔｈｒを有するヒトＩｇＧ１－Ｆｃであり、Ｎ－末端Ｔｈｒは、パパインによるいずれかの全長ヒトＩｇＧ１抗体調製法からの開裂生成物である。植物由来酵素であるパパイン（Ｅ．Ｃ．４．３．２２．２）は

、Ｆｃ－領域を形成する２つ以上の鎖と、ＨｉｓとＴｈｒの間とを連結するヒンジ領域（側のＮ－末端）上方の抗体の重鎖を開裂し、その結果、ＴｈｒをＮ－末端残基として残す。本発明の別の態様では、プロテアーゼは、プラスミン、ペプシン、ＭＭＰ－７を包含するマトリックスメタロプロテナーゼ、好中球エラスターゼ（ＨＮＥ）、ストロメリシン（ＭＭＰ－３）、マクロファージエラスターゼ（ＭＭＰ－１２）、トリプシン、及びキモトリプシン、並びにフィシン（ＥＣ．３．４．２２．３）及びブロモライン（Ｅ．Ｃ．３．４．４．２４）等の他の植物酵素からなる群より選択される。他のタンパク質分解酵素を用いる場合、ヒンジドメイン上で開裂するもの、例えばプラスミン、ＨＮＥ又はパパインを選択することが好ましい。

【００６５】

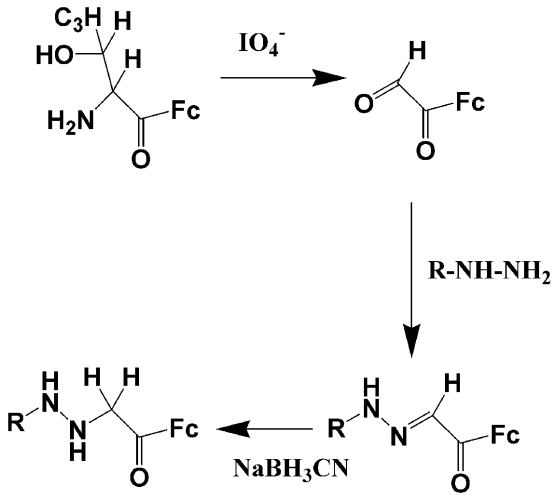
一態様では、ＧＬＰ－１ペプチド半合成免疫グロブリンＦｃ融合タンパク質は、抗体ＦｃのＮ－末端アミノ酸を過ヨウ素酸で選択的化学酸化することにより調製して、Ｎ－末端グリオキシル酸を生成することができる（スキームＩ）。グリオキシル酸は、標準状態ではアミノ基と反応しない。しかしながら、それは、ヒドラジン類、カルボヒドラゾン類及びオキシム類と迅速にかつ選択的に反応して、シッフ塩基（すなわち、－Ｃ＝Ｎ－）を生成する。この基は、加水分解には適度に安定であって、ペプチドを放出させるが、ＮａＢＨ$_3$ＣＮ等の試薬を用いて穏やかに還元することによって完全に安定にすることも可能である。

【００６６】

スキームＩ：ＦＣとＮ－末端トレオニンとの酸化及び結合。

【００６７】

【化２】

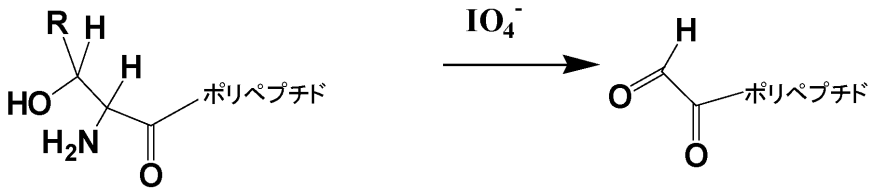


【００６８】

そのため、生物学的に生成された成熟ポリペプチドのＮ－末端がセリン又はトレオニンである具体的な実施形態では、特に有用な方法は、過ヨウ素酸での選択的化学酸化を利用してＮ－末端グリオキシル酸を生成するものである（ゴーガン（Geoghegan）及びストロー（Stroh）、１９９２年、バイオコンジュゲート・ケム（Bioconjugate Chem）、第３巻、１３８～１４６頁、及び米国特許第５３６２８５２号（ガンター（Garnter）ら、１９９６年、バイオコンジュゲート・ケム、第７巻、３８～４４頁及びＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９８／０５３６３（１９９８年２月１２日））。２－アミノアルコール構造物－ＣＨ（ＮＨ２）ＣＨ（ＯＨ）－は、タンパク質及びペプチドのＮ－末端ＳｅｒまたはＴｈｒ中及びヒドロキシリジン中に存在する。ｐＨ７において過ヨウ素酸でのその極めて迅速な酸化によって、Ｎ－末端にアルデヒドが生成される。したがって、部位特異的結合のための反応性カルボニルの過ヨウ素酸調製法は、Ｎ－末端位に特有なものであって、以下のスキームＩＩに従う。

【００６９】

【化３】



R＝Hである場合、Ser
R＝CH_3である場合、Thr

グリキシリルーポリペプチド

（ＩＩ）

【００７０】

Ｎ－末端トレオニン又はセリンを含有するタンパク質のみを過ヨウ素酸で酸化することで、Ｎ－末端グリオキシル酸誘導体を生成することができるが、Ｆｍｏｃ－保護されたα、α’－ジアミノ酢酸誘導体（Ｆｍｏｃ－NH_2CHCO_2H）を利用するグリオキシリルペプチド類の合成は報告されている（ファー（Far）及びメルニク（Melnyk）、２００５年、ジャーナル・オブ・ペプチド・サイエンス（J Peptide Sci）、第１１巻（第７号）、４２４～４３０頁）。タンパク質のＮ－末端グリシル残基は、例えばグリオキシレートを用いた比較的穏やかな条件下での、アミノ基転移によってアルデヒドに変換され得る（Ｈ．Ｂ．Ｆ．ジオキソン（Dixon, H.B.F.）及びＲ．フィールズ（Fields, R.）、１９７９年、メソッズ・エンザイモロジー（Methods Enzymol.）、第２５巻、４０９～４１９頁）。アミノ酸残基を添加するもう１つの方法は、ローズ（Rose）（ローズら、１９８３年、バイオケミストリー・ジャーナル（Biochem J.）、第２１１巻、６７１～６７６頁）に記載されているように、トリプシン、カルボキシペプチダーゼＹ等のタンパク質分解酵素を用いた逆タンパク質分解によるものである。

【００７１】

アルデヒド又はケトンのカルボニル基は、水性条件において還元剤の存在下でアミノ基と反応させると、アミドを生成する場合がある。アルデヒド又はケトンは、穏やかな条件でヒドラジン類、ヒドラジド類及びＯ－アルキルヒドロキシルアミン類等の求核基と迅速かつ選択的に反応することで、シッフ塩基（すなわち、－Ｃ＝Ｎ－）、アゾメチン類、ヒドラゾン類及びオキシム類を生成し、$NaBH_3CN$等の試薬で還元することによって完全に安定にさせることもできる。

【００７２】

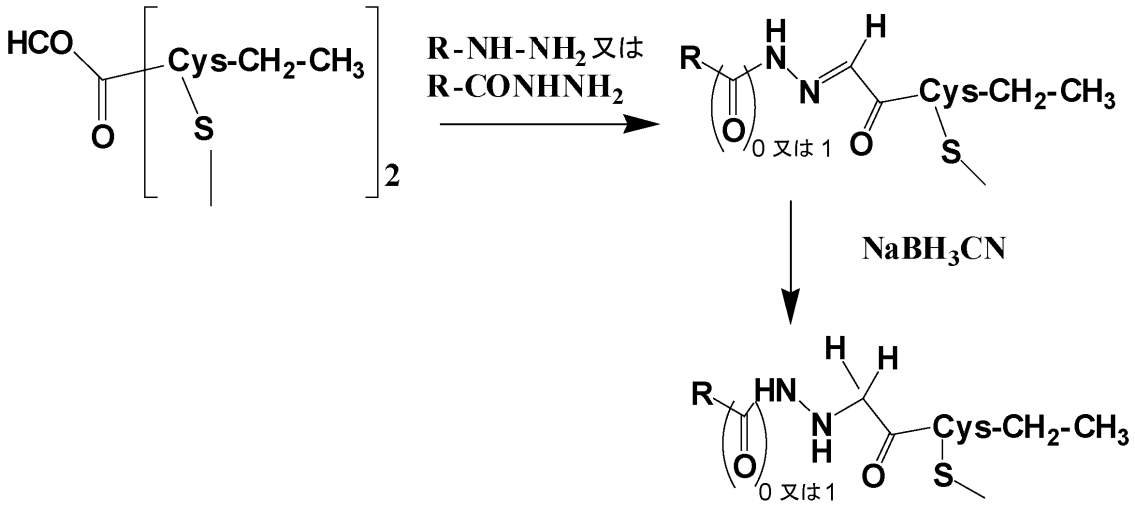
グリオキシリルーＦｃ、アルデヒドーＦｃ又はケトーＦｃは生成すると直ぐに、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、又は他の分子上のセミカルバジド基からなる群より選択される求核部分と反応して結合される可能性もある（フィールズ（Fields）及びディクソン（Dixon）、（１９６８年）、バイオケミストリー・ジャーナル（Biochem. J.）、第１０８巻、８８３～８８７頁；ゲートナー（Gaertner）ら、（１９９２年）、バイオコンジュゲート・ケミストリー（Bioconjugate Chem.）、第３巻、２６２～２６８頁；ゴーガン（Geoghegan）及びストロー（Stroh）、（１９９２年）、バイオコンジュゲート・ケミストリー、第３巻、１３８～１４６頁；ゲートナーら、（１９９４年）、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、第２６９巻、７２２４～７２３０頁）。「ヒドラジン」という用語には、ヒドラジンのヒドロカルビル誘導体（H_2NNH_2）も包含される。１つ以上の置換基がアシル基である場合、化合物はヒドラジドである。Ｎ－アルキリデン誘導体類は、構造$R_2C＝NNR_2$を有するヒドロラゾン類である。ヒドラゾン類は形式上、＝Ｏを＝ＮＮＨ２（又は置換類縁体）で置き換えることによってアルデヒド類又はケトンから生成される。グルオキシリル基とヒドラジンとの反応によって、ヒドロラゾンが形成される。

【００７３】

そのため、本発明では、グリオキシリル－Ｆｃ（ＨＣＯ－ＣＯ－Ｆｃ）、ケト－Ｆｃ又は単純アルデヒド－Ｆｃ（ＨＣＯ－Ｆｃ）を、ヒドラジン又はヒドラジド官能基を有する活性化ＧＬＰ－１ペプチドと反応させて、Ｆｃ構造物のＮ－末端の片方又は両方にヒドラゾンを形成することもでき、それを更には、次のスキーム（ＩＩＩ）に従ってヒドラジン化合物へと還元することもできる。

【００７４】

【化４】



（ＩＩＩ）

【００７５】

グリオキシリルを包含する限定されるものではないこれに限定されないアルデヒド、又はケトンによる二番目の反応は、ウィッティヒ反応として知られている。ウィッティヒ反応は、アルデヒド又はケトンとトリフェニルホスホニウムイリド（しばしばウィッティヒ試薬と呼ばれる）とのあるいはトリ－ｎ－ブチルホスフィンとの化学反応であって、アルケン及びトリアルキルホスフィンオキシドが生成される（Ｇ．ウィッティヒ（Wittig, G.）、Ｕ．Ｂｅｒ．シェルコフ（Schollkopf, U. Ber.）、１９５４年、第８７巻、１３１８頁、Ｇ．ウィッティヒ、Ｗ．Ｂｅｒ．ハーグ（Haag, W. Ber.）、１９５５年、第８８巻、１６５４年）。

【００７６】

遺伝子組み換え又は天然の単離された多量体タンパク質、例えばＦｃを用いる場合、結合は、生理活性ペプチドに対して多価の任意のコンストラクトをもたらし、更にタンパク質の複数のＮ－末端に結合したペプチドに対してはヘテロマー的でもあり得ることが分かるであろう。抗体Ｆｃを担体分子として使用する実施例では、生理活性ペプチドをＦｃ－二量体のＮ－末端の両方に結合することができる。別の実施形態では、生理活性ペプチド１つのみを抗体ＦｃのＮ－末端の片方に結合する。更に別の実施形態では、２つの別個の生理活性ペプチドを、抗体ＦｃのＮ－末端に結合して、「二元的な生物活性」を有し得る「二重特異性」共役物を構築する。

【００７７】

ペプチドをＮ－末端を介して結合する実施形態では、ペプチドは、標準的な固相化学を利用して合成することができる。ペプチドを樹脂へアセンブリしてＮ－末端保護基を外した後で、好適に保護された２官能性リンカーを脱保護されたＮ－末端アミノ基に結合させる。

【００７８】

Ｎ－末端結合ペプチドの別の実施形態では、樹脂上での最終結合によって、アルデヒド基又はケトン基と選択的に反応し得るリンカーを組み込むことができ、リンカー－ペプチドを樹脂から引き離して残留保護基を外すことにより、結合に好適なペプチド組成物が得られる。あるいは、ペプチドとの結合後に、リンカーの残りの官能基を更に誘導体化する

ことで、アルデヒド基又はケトン基と反応し得る官能価を生成することもできる。液相を利用する同様の方法を用いて、同様のペプチド組成物を生成することも可能である。

【００７９】

Ｃ－末端を介したペプチドの結合を目的とする実施形態では、ペプチドを固相化学によって合成し、ヒドラジン又はヒドラジン誘導体によって樹脂から開裂した後で保護基を外すことにより、好適に官能化されたペプチドを得てもよい。リンカーをＣ－末端で結合させようとする場合、リンカーは、樹脂に直接結合させてから、ペプチドをアセンブリしてもよい。ペプチド－リンカーは、ヒドラジン又はヒドラジン誘導体によって樹脂から切り離した後、保護基を外すことで、適度に官能化されたペプチド－リンカーを得ることもできる。あるいは、ペプチドは、ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂（ノババイオケム（Novabiochem）製）等の樹脂上に調製されてもよい。ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂上のＭｍｔ基を外して、遊離アミノ基を得ることもできる。このアミノ基を誘導体化して、アルデヒド基又はケトン基と反応する官能基を得ることも可能である。あるいは、好適に保護された２官能リンカーをアミノ基に結合する。液相化学を利用する同様の方法を用いて、同様のペプチド組成物を生成することも可能である。

【００８０】

ＧＬＰ－１ペプチド及びペプチドリンカーコンストラクトの調製

当該組成物のＧＬＰ－１ペプチドは、合成化学法又は遺伝子組み換え法のいずれか、あるいはこれら両方の方法の組み合わせによって生成することができる。ＧＬＰ－１ペプチドは、全長ポリマーとして調製されても、非全長の断片として合成されたものを結合してもよい。ペプチドの化学合成は、固相若しくは液相ペプチド合成のいずれかにおいて、当業者に周知の、定常的に行われる方法である。固相ペプチド合成では、ポリアミド又はポリスチレン樹脂上のＮ－末端保護基に関する、いわゆるｔ－Ｂｏｃ（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）及びＦｍｏｃ（フルオレニル－メトキシ－カルボニル）化学が常套法となっている（それぞれ、ＲＢ．メリフィールド（Merrifield, RB.）、１９６３年、及びＲＣ．シェパード（Sheppard, RC.）、１９７１年）。リボソームタンパク質の合成とは異なり、固相ペプチド合成は、Ｃ－末端からＮ－末端に向かって進行する。アミノ酸モノマー類のＮ－末端は、これら２つの基で保護されて、脱保護されたアミノ酸鎖に付加される。ｔ－Ｂｏｃの脱保護にはトリフルオロ酢酸等の強酸が、及びＦｍｏｃの脱保護にはピペリジン等の塩基が必要である。アミノ酸類を順に少しずつ結合していく逐次延長は、２～１００のアミノ酸残基を含有する小さなペプチドに適している。

【００８１】

非天然型残基は、ＧＬＰ－１ペプチド又はタンパク質に組み込まれる。本発明に従って利用してかつ更にペプチド主鎖を形成し得る、非リボソーム性に導入されたアミノ酸類の例としては、Ｄ－アミノ酸類、β－アミノ酸類、擬似グルタメート、γ－アミノブチレート、オルニチン、ホモシステイン、Ｎ－置換アミノ酸類（Ｒ．サイモン（R. Simon）ら、米国科学アカデミー紀要（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）（１９９２年）第８９巻、９３６７～７１頁、ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９１１９７３５（バートレット（Bartlett）ら）、米国特許第５，６４６，２８５号（ベインダー（Baindur））、α－アミノメチレンオキシ酢酸類（アミノ酸－Ｇｌｙジペプチド等量式）、及びα－アミノオキシ酸類、並びに非遺伝的に符号化された側鎖官能基を有する他のアミノ酸誘導体類等が挙げられる。チオアミド、ビニル性アミド、ヒドラジノ、メチレンオキシ、チオメチレン、ホスホアミド、オキシアミド、ヒドロキシエチレン、還元アミド、及び置換還元アミド等量式、並びにβ－スルホンアミド（類）を含有するペプチド類縁体を利用してもよい。

【００８２】

別のプロセスでは、非天然型アミノ酸は、遺伝祖組み換え技術により生成されたタンパク質にコドン抑制法によって導入されていた。一態様では、コドン抑制法の利用は、アルデヒド又はケトン官能基あるいは任意の他の官能基をいずれかの好適な位置で結合のためのポリペプチド鎖内に導入するように構成することも可能である（例えば、アンブルクス

（Ambrx）、ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ２００６／１３２９６９を参照のこと）。

【００８３】

あるいは、遺伝子組み換え生成法が特に有用である。宿主細胞（ペプチド配列をコード化する核酸を含むように合成操作された細胞であって、ペプチドを転写及び翻訳して、所望によりペプチドを細胞増殖培地へ分泌するもの）を用いた遺伝子組み換えタンパク質の生成は、当該技術分野では定常的に使用される。遺伝子組み換え製造法では、ペプチドのアミノ酸配列のコード化する核酸は、一般に、従来法で合成されて、発現ベクターに組み込まれる。そのような方法は、追加のポリペプチド配列に融合されたペプチドあるいは他のタンパク質又はタンパク質断片若しくはドメインを含むポリペプチド組成物の製造において特に好ましい。宿主細胞は所望により、大腸菌ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－７、ＨＥＫ２９３、ＢＨＫ２１、ＣＨＯ、ＢＳＣ－１、Ｈｅｐ　Ｇ２，６５３、ＳＰ２／０，２９３、ＨｅＬａ、骨髄腫、リンパ腫、酵母、昆虫若しくは植物細胞、又はそれらの任意の誘導体、不死化細胞若しくは形質編幹細胞から選択される少なくとも１つであり得る。少なくとも１つのペプチドを産生する方法であって、ペプチドが検出可能な又は回収可能な量で発現するようにインビトロ、インビボ又はインサイツ条件下で核酸をコード化するペプチドを翻訳することを含んでなる方法もまた提供される。当該技術分野において周知の技術は、例えば次のものを参照のこと：オーサベル（Ausubel）ら、分子生物学における現在のプロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社（John Wiley & Sons, Inc.）、ニューヨーク州ニューヨーク（NY, NY）（１９８７～２００１年）；サンブロック（Sambrook）ら、分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）第２版、コールド・スプリング・ハーバー（Cold Spring Harbor）、ニューヨーク（１９８９年）。

【００８４】

共役物の調整

Ｎ－末端アルデヒド又はケトンを含むＦｃポリペプチドが単離された時点で、好適な求核基を含むＧＬＰ－１分子をＦｃ－領域と水性条件下で反応させて、共役物を単離する。そのため、ＧＬＰ－１分子は、本明細書に定義されたようなリンカーＬを含んでいてよい。代替法では、式Ｉのリンカー－Ｌとして機能する部分は、水性条件下でアルデヒド又はケトンと反応し得る求核試薬を含んでおり、Ｆｃ－領域に結合されてもよく、共役物は、その後、当該技術分野において既知のいずれかの好適な方法でＧＬＰ－１分子と結合する。

【００８５】

本発明の方法の一実施形態において、本発明の方法で見込まれるようなタンパク質又はペプチドの一般的な結合方法には、次の工程が包含される：（１）ＧＬＰ－１部分上に第１の反応基を組み込む工程、（２）ＧＬＰ－１部分とポリマーとを反応させて、ＧＬＰ－１部分上の第１反応構成成分と共有結合を形成する工程、（３）ポリマーを、酸化された抗体Ｆｃと反応させて、共有結合したＧＬＰ－１－Ｆｃ共役物を形成する工程、及び（４）ＧＬＰ－１－Ｆｃ共役物を精製する工程。ＧＬＰ－１ペプチドの場合にＧＬＰ－１部分上に第１の反応基を組み込む場所は、残留ペプチド内に存する反応基、例えば、遊離カルボキシル基、Ｎ－末端の遊離α－アミノ基、又はペプチド鎖内の残基の反応性側基であってよい。

【００８６】

リンカーと先に合成された本発明の全長ＧＬＰ－１ペプチドとの結合は、当該技術分野において教示されるいずれかの方法で進めることができる。Ｆｃ－ドメインへの結合のためのＧＬＰ－１ペプチドの活性化は、ヒドラジン誘導体化ペプチドを生成するために樹脂から開裂させる前の、最終残基にトリ－Ｂｏｃ－ヒドラジノ酢酸を用いた固相合成プロセス中に好都合に達成することができるか、あるいはＧＬＰ－１ペプチドを前述のリンカーと結合する場合もあり、リンカーは、Ｆｃの反応性カルボニルと反応し得る官能基を含んでいる。

【００８７】

ＰＥＧを部位特異的又は選択的に結合させるいくつかの方法は記載されている。例えば

、ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９９／４５０２６には、Ｎ－末端セリン残基を化学修飾して、末端にヒドラジド又はセミカルバジド官能基を有するポリマーとの反応に好適なアルデヒド官能基を形成することが示唆されている。米国特許第５，８２４，７８４号及び同第５，９８５，２６５号には、還元性アルキル化条件下及びＮ－末端での選択的攻撃を促進するｐＨでカルボニル基を有するポリマーとタンパク質のアミノ末端とを反応させることが示唆されている。ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９９／０３８８７及び米国特許第５，２０６，３４４号及び同第５，７６６，８９７号は、タンパク質のアミノ酸配列中に操作されたシステイン残基（システイン添加変異体）の部位特異的なペグ化に関する。これらの方法は、ポリマーとペプチドの官能部からの残留末端部とを戦略的に結合することによってＧＬＰ－１ペプチドのドメイン及び構造を保存することができるので、非特異的結合よりも優れた利点をもたらす。あるいは、反応基をペプチドに、好ましくはペプチドの生理活性を保存する部位に導入した後、遺伝子組み換え又は化学合成法のいずれかによってペプチドを調製してもよい。

【００８８】

「反応基」又は「官能基」は、好適な条件下で第２化学官能基と反応することで、第１官能基を表す種と第２官能基を表す種との間に共有結合を生じさせることができる原子の配置である。例えば、アミン（－NR_2）と反応する活性化基としては、トシレート、メシレート、ハロゲン（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）、Ｎ－ヒドロキシスクシニミジルエステル類（ＮＨＳ）等の求電子性基が挙げられる。チオール類と反応可能な活性化基としては、例えば、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ピリジルジスルフィド、５－チオール－２－ニトロ安息香酸チオール（ＴＮＢ－チオール）等が挙げられる。アルデヒド官能基は、アミン－又はヒドラジド－含有分子と結合することができ、また、アジド基は、三価リン基と反応してホスホルアミデート又はホスホルイミド結合を形成することができる。分子中に活性化基を導入するのに適切な方法は、当該技術分野において既知である（例えば、Ｇ．Ｔ．ハーマソン（Hermanson, G. T.）、バイオコンジュゲート・テクニクス（Bioconjugate Techniques）、アカデミック・プレス（Academic Press）、カルフォルニア州サンディエゴ（１９９６年））。

【００８９】

化学反応性官能基は、一級又は二級アミン、ヒドロキシ、チオール、カルボキシル、アルデヒド及びケトンからなる群より選択される。

【００９０】

組成物の試験法

本発明の共役物は、任意のインビトロ若しくはインビボによってあるいは当該技術分野において適切でかつ当業者に既知の任意の代理マーカー又は対応によって試験、アッセイ又は測定することが可能な、所望の生物活性を保持又は表示する。例えば、典型的に望ましい生物活性は、タンパク質－タンパク質相互作用、例えば、配位子結合又は標的結合であって、ＥＬＩＳＡ等の固相捕捉アッセイ類によって容易に測定されるものである。その他の場合、生物活性は、Ｃａ２＋遊離又は細胞内ｃＡＭＰ濃度のように細胞内プロセスに及ぼす作用で定量され得る受容体活性化を測定することによる等の、共役物を標的タンパク質又は細胞と接触させることによって測定される。なお更に複雑な共役物試験法では、細胞、臓器又は動物への下流作用を観察することもできる。

【００９１】

本発明の半合成ＧＬＰ－１類縁体共役物の場合、天然又は「野生型」ＧＬＰ－１に関するあらゆる作用を用いて、共役物の生物活性を解明することができる。そのような測定値には、ＧＬＰ－１受容体結合、細胞内ｃＡＭＰで示されるようなＧＬＰ－１受容体活性化、例えば単離された膵島若しくは全膵臓でのインスリン分泌量又はその変化の程度、あるいは共役物の投与後に動物の血清中で測定されるようなインスリン分泌量又はその変化の程度が挙げられる。ＧＬＰ－１受容体は、他の「Ｂ族」受容体と配列同一性を共有するＧタンパク質結合受容体（ＧＰＣＲ）であって、例えば、セクレチン、グルカゴン及び血管活性腸管ペプチド等である。ＧＬＰ－１生物活性をモニターする別の方法は、（リュー（

Liu）ら、２００４年、セル・バイオロジー・インターナショナル（Cell Biol. Internat.）、第２８巻、６９～７３頁）に教示されているような膵管細胞分化アッセイである。

【００９２】

医薬品及び製品

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の半合成ＧＬＰ－１　Ｆｃ融合コンストラクトであって、有機部分を共有結合することによって修飾されたものに関する。そのような修飾によって、高い薬物動態学特性（例えば、延長されたインビボ血清半減期）を有するＧＬＰ－１タンパク質を生成することができる。有機部分は、直線状又は分枝鎖親水性ポリマー基、脂肪酸基、又は脂肪酸エステル基であり得る。特定の実施形態では、親水性ポリマー基は、分子量が約８００～約１２０，０００ダルトンであって、ポリアルカングリコール（例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ））、炭水化物ポリマー、アミノ酸ポリマー又はポリビニルピロリドンである可能性もあり、また、脂肪酸基又は脂肪酸エステル基の炭素原子数は、約８～約４０であり得る。

【００９３】

本発明の修飾された模倣物質（mimetibodies）及び配位子結合断片は、ＧＬＰ－１模倣物質（mimetibodies）又は特定のタンパク質若しくは変異体と直接又は間接的に共有結合した１つ以上の有機部分を含むことができる。本発明のＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）又は配位子結合断片と結合している有機部分はそれぞれ独立して、親水性ポリマー基、脂肪酸基又は脂肪酸エステル基であり得る。本明細書で使用するとき、「脂肪酸」という用語は、モノカルボン酸類及びジカルボン酸類を包含する。本明細書で使用するとき、「親水性ポリマー基」という用語は、オクタンよりも水に対する溶解度が高い有機ポリマーを意味する。例えば、ポリリシンは、オクタンよりも水に対する溶解度が高い。そのため、ポリリシンを共有結合することによって修飾されたＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）は、本発明に包含される。本発明の模倣物質（mimetibodies）を修飾するのに適した親水性ポリマー類は、直鎖又は分枝鎖であることができ、例えば、ポリアルカングリコール（例えば、ＰＥＧ、モノメトキシ－ポリエチレングリコール（ｍＰＥＧ）、ＰＰＧ等）、炭水化物（例えば、デキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖類等）、親水性アミノ酸のポリマー類（例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパルテート等）、ポリアルカンオキシド類（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド等）、並びにポリビニルピロリドンを挙げることができる。好ましくは、本発明のＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）を修飾する親水性ポリマーは、個別の分子的実体として、約８００～約１５０，０００ダルトンの分子量を有する。例えば、PEG_{2500}、PEG_{5000}、PEG_{7500}、PEG_{9000}、PEG_{10000}、PEG_{12500}、PEG_{15000}、及び$PEG_{20,000}$を使用することができ、ここで下付き文字は当該ポリマーの平均分子量（ダルトン）である。

【００９４】

親水性ポリマー基は、１～約６個のアルキル基、脂肪酸基又は脂肪酸エステル基で置換することができる。脂肪酸又は脂肪酸エステル基で置換された親水性ポリマー類は、適切な方法を利用することによって調製することができる。例えば、アミン基を含むポリマーは、脂肪酸又は脂肪酸エステルのカルボキシレートとカップリングさせることができ、脂肪酸又は脂肪酸エステル上の活性化カルボキシレート（例えば、Ｎ，Ｎ－カルボニルジイミダゾールで活性化されたもの）は、ポリマー上のヒドロキシル基とカップリングさせることができる。

【００９５】

本発明の模倣物質（mimetibodies）類を修飾するのに適した脂肪酸及び脂肪酸エステルは、飽和状態であり得るか、又は１個以上の不飽和単位を含有し得る。本発明の模倣物質（mimetibodies）類を修飾するのに適した脂肪酸類としては、例えば、ｎ－ドデカノエート（C_{12}、ラウレート）、ｎ－テトラデノエート（C_{14}、ミリステート）、ｎ－オクタデカノエート（C_{18}、ステアレート）、ｎ－エイコサノエート（C_{20}、アラキデート）、ｎ－ドコサノエート（C_{22}、ベヘネート）、ｎ－トリアコンタノエート（C_{30}）、ｎ－テトラコンタノエート（C_{40}）、ｃｉｓ－Δ９－オクタデカノエート（C_{18}、オレエート）、

全てのｃｉｓ－Δ５，８，１１，１４－エイコサテトラエノエート（C_{20}、アラキドネート）、オクタンジオン酸、テトラデカンジオン酸、オクタデカンジオン酸、ドコサンジオン酸等が挙げられる。適切な脂肪酸エステル類には、直鎖又は分枝鎖低級アルキル基を含むジカルボン酸のモノエステルが包含される。低級アルキル基は、１～約１２個、好ましくは１～約６個の炭素原子を含むことができる。

【００９６】

本発明のＧＬＰ－１タンパク質組成物類は更に、任意の適切な助剤のうち少なくとも１つ、例えば希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存料、アジュバント等を含むことができるが、これらに限定されない。製薬上許容できる助剤が好ましい。かかる滅菌溶液を調製する方法及びその非限定例は、当該技術分野において周知であり、例えばジェナーロ（Gennaro）編、レミントンの薬学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、第１８版、マーク・パブリッシング社（Mack Publishing Co.）（ペンシルバニア州イーストン（Easton））、１９９０年が挙げられるが、これに限定されない。製薬上許容できる担体類は、ＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）の投与方法、溶解性及び／又は安定性に適したものが、当該技術分野において周知の如く又は本明細書に記載されている通り通常選択することができる。

【００９７】

本発明の組成物で有用な医薬賦形剤及び添加剤には、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、及び炭水化物（例えば、糖であって、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類及びオリゴ糖、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖等の誘導化糖類、並びに多糖類又は糖ポリマーが挙げられる）が包含されるが、これらに限定されず、これらは、単独で又は組み合わせて存在することができ、単独で又は１～９９．９９重量％又は体積％での組み合わせを含んでいる。代表的なタンパク質賦形剤には、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）等の血清アルブミン、組換えヒトアルブミン（ｒＨＡ）、ゼラチン、カゼイン等が挙げられる。代表的なアミノ酸／ＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）又は特定部分若しくは異なる成分であって、緩衝能でも機能し得るものには、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等が含まれる。好ましいアミノ酸の１つはグリシンである。

【００９８】

本発明での使用に適した炭水化物賦形剤には、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、Ｄ－マンノース、ソルボース等の単糖類、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース等の二糖類、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等の多糖類、及びマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトール等のアルジトール類が挙げられる。本発明で使用するのに好ましい炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロース及びラフィノースである。

【００９９】

ＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）組成物は、緩衝液又はｐＨ調整剤を包含することも可能であり、典型的に、緩衝液は有機酸又は塩基から調製された塩である。代表的な緩衝剤には、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸又はフタル酸の塩等の有機酸塩、トリス、塩酸トロメタミン又はリン酸緩衝剤が挙げられる。本発明の組成物で使用するのに好ましい緩衝剤は、クエン酸塩等の有機酸塩である。

【０１００】

更に、本発明のＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）若しくは特定部分又は変異組成物には、ポリビニルピロリドン、フィコール（ポリマー糖）、デキストレート（dextrates）（例えば、２－ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等のシクロデキストリン）、ポリエチレングリコール、着香剤、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、帯電防止剤、界面活性剤（例えば、「ＴＷＥＥＮ　２０」及び「ＴＷＥＥＮ　８０」等のポリソルベート）、脂質（例えば、リン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、及びキレー

ト剤（例えば、ＥＤＴＡ）等のようなポリマー賦形剤／添加剤を挙げることができる。

【０１０１】

本発明によるＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）組成物での使用に適するこれら及び追加の既知の医薬賦形剤及び／又は添加剤は、当該技術分野では既知であって、例えば、「レミントン：薬学の科学と実務（Remington:The Science & Practice of Pharmacy）」、第１９版、ウィリアムズ・アンド・ウィリアムズ（Williams & Williams）、（１９９５年）、及び「医師用の卓上参考書（Physician's Desk Reference）」、第５２版、メディカル・エコノミクス（Medical Economics）、ニュージャージー州モントベール（Montvale）に列挙されている通りであり、開示内容を全て参照により本明細書に組み込む。好ましい担体又は賦形剤材料は、炭水化物（例えば、単糖類及びアルジトール類）並びに緩衝剤（例えばクエン酸）又は高分子試薬である。

【０１０２】

上述の通り、本発明は、安定な製剤を提供するものであって、製剤には、好ましくは生理食塩水又は選択された塩を含む好適な緩衝剤だけでなく、保存料を含有する任意に保存加工された溶液及び製剤、並びに薬学的用途又は家畜への使用に適した多目的の保存加工された製剤を包含することができ、製薬上許容できる製剤には少なくとも１つのＧＬＰ－１模倣物質（mimetibody）若しくは特定部分又は変異体が含まれている。保存加工された製剤は、少なくとも１つの既知の保存料あるいは所望により、少なくとも１のフェノール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例えば、六水和物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、及びチメロサール、又は水性希釈剤中のこれらの混合物からなる群より選択されるものを含有する。当該技術分野において既知の、任意の好適な濃度又は混合物、例えば０．００１～５％、あるいはいずれかの範囲若しくはその中の値、例えば限定されないが、０．００１、０．００３、０．００５、０．００９、０．０１、０．０２、０．０３、０．０５、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．３、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、又はいずれかの範囲若しくはその中の値を使用することができる。非限定例としては、保存料を全く含まないもの、０．１～２％のｍ－クレゾール（例えば、０．２、０．３、０．４、０．５、０．９、１．０％）、０．１～３％のベンジルアルコール（例えば、０．５、０．９、１．１、１．５、１．９、２．０、２．５％）、０．００１～０．５％のチメロサール（例えば、０．００５、０．０１）、０．００１～２．０％のフェノール（例えば、０．０５、０．２５、０．２８、０．５、０．９、１．０％）、０．０００５～１．０％のアルキルパラベン（類）（例えば、０．０００７５、０．０００９、０．００１、０．００２、０．００５、０．００７５、０．００９、０．０１、０．０２、０．０５、０．０７５、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．５、０．７５、０．９、１．０％）等が挙げられる。

【０１０３】

所望により、１つ以上の製薬上許容できる抗菌剤も添加してよい。メタークレゾール及びフェノールは、好ましい製薬上許容できる抗菌剤である。１つ以上の製薬上許容できる塩類を加えて、イオン強度又は張度を調節することもできる。１つ以上の賦形剤を加えて、製剤の等張性を更に調節することもできる。グリセリンは、等張性調節用賦形剤の一例である。製薬上許容できるとは、ヒト又は他の動物への投与に好適であることを表しており、そのため、毒性成分又は望ましくない汚染物質を含有せず、また、その中の活性化合物の活性をも妨げない。

【０１０４】

本発明では、本発明のＧＬＰ－１融合タンパク質の許容される塩の形態を使用してもよい。酸付加塩を形成するのに通常用いられる酸類は、例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等、及び有機酸類、例えば、ｐ－トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、ｐ－ブロモフェニルスルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等である。好ましい酸付加塩は、塩酸及び臭化水素酸のような鉱酸から形成されるものである。塩基付加塩には、無機塩基から生成されるもの、例えば、アンモニウム又はアルカリ若しくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等が包含される。本発明の塩基を調製するのに有用なそのような塩基には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、炭酸カリウム等が挙げられる。

【０１０５】

薬学的用途及び投与方法

投与は、通常の技量を持った医師によって有効であることが分かっている任意の経路によるものであってよい。末梢性の非経口的（投与）は、そのような方法の１つである。非経口的投与は、医療文献では、滅菌注射器又はいくつかの他の機械装置、例えば輸液ポンプによって体内へ剤形を注入することとして、一般には理解されている。末梢性の非経口的経路には、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内の投与経路を挙げることができる。

【０１０６】

本発明の異種融合タンパク質は更に、経口、直腸、鼻、又は下気道経路であって、非経口ではない経路による投与にも適している場合がある。これらの非経口ではない経路のうち、下気道経路と経口経路が好ましい。

【０１０７】

本発明の融合タンパク質を用いて、多種多様な疾病及び状態を処置することができる。本発明の融合タンパク質は主に、その生物学的効果を、「ＧＬＰ－１受容体」と呼ばれる受容体に作用することによって発揮する。したがって、ＧＬＰ－１受容体刺激作用に又はＧＬＰ－１化合物類の投与に好ましい効果を示す疾患及び／又は状態を有する被験者らを、本発明のＧＬＰ－１融合タンパク質で処置することができる。これらの被験者らは、「ＧＬＰ－１化合物での処置を必要としている」又は「ＧＬＰ－１受容体刺激作用を必要としている」と考えられる。インスリン非依存性糖尿病、インスリン依存性糖尿病、脳卒中（ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ００／１６７９７参照）、心筋梗塞（ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９８／０８５３１参照）、肥満症（ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９８／１９６９８参照）、術後の代謝の変化（米国特許第６，００６，７５３号参照）、機能性胃腸症及び／又は過敏性腸症候群（ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ９９／６４０６０参照）を有する被験者らが包含される。更には、ＧＬＰ－１化合物での予防処置を必要とする被験者ら、例えば、インスリン非依存性糖尿病発症する危険のある被験者ら（ＰＣＴ国際公開特許ＷＯ００／０７６１７参照）も包含される。耐糖能異常又は空腹時血糖異常のある被験者ら、体重が、被験者の身長と体質に関する標準体重から約２５％超過している被験者ら、膵部分切除を受けた被験者ら、インスリン非依存性糖尿病の親を１人以上有する被験者ら、妊娠性糖尿病を患ったことのある被験者ら、及び急性又は慢性膵炎を患ったことのある被験者らは、インスリン非依存性糖尿病を発症するリスクがある。

【０１０８】

ＧＬＰ－１化合物の「有効量」とは、ＧＬＰ－１受容体刺激作用を必要とする被験者に投与した場合に、許容できない副作用を生じさせずに所望の治療効果及び／又は予防効果をもたらす量である。「所望の治療効果」には、次の１つ以上の効果が包含される：１）疾病又は状態に関わりのある症状の回復、２）疾患又は状態に関わりのある症状の発症の遅延、３）処置を受けていない場合に比べて長寿命であること、及び４）処置を受けていない場合と比べて生活の質が高いこと。例えば、糖尿病の治療におけるＧＬＰ－１化合物の「有効量」は、処置を受けていない場合よりも優れた血糖値制御を生じさせ、その結果、網膜症、神経障害、腎臓病等の糖尿病性合併症の発症を遅延する量である。糖尿病の予防におけるＧＬＰ－１化合物の「有効量」は、処置を受けていない場合と比べて、スルホニル尿素類、チアゾリジンジオン類、インスリン及び／又はビスグアニジン類等の血糖降

下薬による治療が必要な高血糖値の発症を遅延させる量である。

【０１０９】

被験者の血糖を正常値へ戻すのに有効な融合タンパク質の投与量は多数の要因に依存しており、要因としては、限定されないが、被験者の性別、体重及び年齢、血糖制御不能の重症度、投与経路及び生物学的利用能、融合タンパク質の薬物動態学上の特性並びにその有効性及び処方が挙げられる。

【０１１０】

本発明を一般的な用語で説明してきたが、本発明の実施形態を、以下の実施例で更に明らかにするものとする。

【実施例】

【０１１１】

実施例１：活性化ＧＬＰ－１ペプチドＳの調製

実施例１Ａ

（Ｈｉｓ－［Ｄ－Ａｌａ］－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－　Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－（Ｎ－３－アミノプロピル）－ＰＥＧ３－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－ＮＨ－NH_2）。

【０１１２】

前述（シーゲル（Siegel）ら、１９９９年、規制ペプチド（Regulatory Peptides）、第７９巻、９３～１０２頁）の第２残基にＤ－Ａｌａ置換基を含むＧＬＰ－１（７－３６、NH_2）類縁体ペプチドを合成して活性化した（ペプチド１）。

【０１１３】

ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク（Monitoring Previous Peak）ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト（SynthAssist）バージョン２．０を用いて調製した。ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂（５４９ｍｇ、２５２ミリモル）を合成に用いた。配列の第６及び第７アミノ酸位置ではＦｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ＹＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨを用いた。配列の第１１及び第１２アミノ酸位置ではＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｂｕｔ）－Ｓｅｒ（ＹＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨを用いた。当該樹脂の最終重量は１．１８ｇであった。

【０１１４】

その樹脂に、エタノールで２分洗浄を３回、そして塩化メチレンで２分洗浄を３回行った。ペンダントＭｍｔ基を除去するために、ＨＯＢｔ－水和物（９．１８６グラム、０．６Ｍ）を塩化メチレン／２，２，２－トリフルオロエタノール１００ｍＬに溶解し、２５ｍＬをこの樹脂に加えて穏やかに１時間混合させた。溶媒を濾過で除去し、その順序を３回繰り返した。その樹脂に、塩化メチレンで２分洗浄を３回、Ｎ－メチルピロリドン中塩化メチレンで２分洗浄を１回、そしてＮ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回行った。その樹脂に、トリ－Ｂｏｃ－ヒドラジノ酢酸（９１１．０ｍｇ、２．３３ｍＭ）と、ＨＢＴＵ（８８４．３ｍｇ、２．３８ｍＭ）と、ＨＯＢｔ／Ｎ－メチルピロリドン（２．３３ｍＬ、１Ｍ）と、Ｎ－メチルピロリドン２．３ｍＬとを加えて、成分が全て溶解するまで混合し、４－メチルモルホリン（０．７６９ｍＬ、３ｍＭ）を加えて、湿式試験紙法でｐＨを調べて（ｐＨ８．５）、周囲温度において１９時間攪拌した。

【０１１５】

次にその樹脂に、Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を、塩化メチレン／Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を１回、塩化メチレンで２分洗浄を３回、メタノールで２分洗浄を３回、エチルエーテルで２分洗浄を１回行い、減圧下で２時間乾燥させた。樹脂の重量は１．１４ｇであった。

【０１１６】

ペプチドは、トリフルオロ酢酸（３０ｍＬ）とフェノール（２．２５ｇ）とジチオトリ

エトール（１．５ｇ）とチオアニソール（１．５ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．５ｍＬ）と水（１．５ｍＬ）との開裂混合物２０ｍＬを用いてシンチレーションバイアル瓶内で周囲温度において２時間攪拌することによって、樹脂から開裂させた。その樹脂を濾過によって除去し、予め冷却したエチルエーテル（６００ｍＬ）を加えることでペプチドを沈殿させた。得られた固体は、濾過で単離して、エチルエーテルで洗浄した。粗ペプチドを減圧下において乾燥させることで、５３５ｍｇが生成した。

【０１１７】

粗ペプチドは、ヴァイダック（Vydac）Ｃ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本において、０～４０％までのグラジエント（８０％アセトニトリル／０．１％水中トリフルオロ酢酸）を５分間用いて、４０～６０％までのグラジエント（８０％アセトニトリル／０．１％水中トリフルオロ酢酸）に流量６ｍＬ／分で６０分間溶出させて精製した。画分を回収し、ＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、白色生成物５４．０ｍｇが得られた。キャピラリー電気泳動法によって９３％を超えるピーク面積が示された。（分子量：計算値３，６３０．１、モノアイソトピックＭＷ３，６２７．９）測定値：ＬＣ－ＭＳ：３，６３０．８Ｄａ［Ｍ＋Ｈ］＋、ＳＥＬＤＩ－ＭＳ：３，６２７．５Ｄａ［Ｍ＋Ｈ］＋、３，７２４／８Ｄａ［Ｍ＋９７］＋

【０１１８】

実施例１Ｂ

（Ｈｉｓ－［Ｄ－Ａｌａ］－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－　Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－ＮＨ－ＣＨ２－ＣＨ２－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_{12}$－ＣＯ－Ｇｌｙ－ＮＨ－ＮＨ２）。

【０１１９】

上記のように２つのＤ－Ａｌａを含有するＧＬＰ－１（７－３６、ＮＨ２）類縁体ペプチドを用いて、代替の活性化試薬であるペプチド２を調製した。

【０１２０】

そのペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ　０．１ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製した。合成には、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＳＡＳＲＩＮ樹脂（１３９ｍｇ、１１０ミリモル）を用いた。配列の第６及び第７アミノ酸位置では、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ＹＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨを用いた。配列の第１１及び第１２アミノ酸位置では、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｂｕｔ）－　Ｓｅｒ（ＹＭｅ，Ｍｅｐｒｏ）－ＯＨを用いた。

【０１２１】

結合部分の場合、配列の第３２アミノ酸位置ではＯ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－０’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコールを用いた。樹脂をエタノールで洗浄して、減圧下で一晩乾燥させた。樹脂の最終重量は０．４８０ｇであった。

【０１２２】

樹脂（１８９ｍｇ）をジメチルホルムアミド中１０％ヒドラジン（無水物）５ｍＬと混合して、周囲温度で２時間攪拌した。樹脂を濾別して、ジメチルホルムアミド１ｍＬで洗浄して、この濾液に温水（７０℃）１００ｍＬを加えた。濾液を周囲温度まで１時間冷却させた後、１０℃の冷蔵庫に２時間保存した。白色沈殿物をろ過し、水（２０ｍＬで３回）及びエチルエーテル（４０ｍＬで３回）で洗浄した後、減圧下で乾燥させることで、白色固体１２６ｍｇを得た。保護されたペプチド（１２０ｍｇ）をトリフルオロ酢酸（２０ｍＬ）とフェノール（１．５ｇ）とジチオトレイトール（１．０ｇ）とチオアニソール（１．０ｍＬ）とＴＩＳ（１．０ｍＬ）と水（１．０ｍＬ）との開裂混合物１５ｍＬを用い、周囲温度において２時間で脱保護した。樹脂を濾過によって除去して、予め冷却させたエチルエーテル（４００ｍＬ）を加えることによってペプチドを沈殿させ、濾過で単離し

て、エチルエーテルで洗浄した。粗ペプチドを減圧下で乾燥させて、白色固体９５ｍｇが得られた。

【０１２３】

粗ペプチドは、ヴァイダック（Vydac）Ｃ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）に２回注入して、０～３０％までのグラジエント（８０％アセトニトリル／０．１％水中トリフルオロ酢酸）を５分間用いて、３０～６０％までのグラジエント（８０％アセトニトリル／０．１％水中トリフルオロ酢酸）に流量６ｍＬ／分で６０分間溶出させて精製した。画分を回収してＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、白色生成物２３ｍｇが得られた。キャピラリー電気泳動法によって９４％を超えるピーク面積が示された。（分子量：計算値４，０２６．５、モノアイソトピック４，０２４．１）。測定値：ＬＣ－ＭＳ：４，０２８．０Ｄａ［Ｍ＋Ｈ］＋。

【０１２４】

実施例１Ｃ

（NH_2－NH－CH_2－CO－NH－CH_2－CH_2－O－（CH_2－CH_2－O）$_{10}$－CH_2－CH_2－O－CH_2－CH_2-CO－ Ｈｉｓ－［Ｄ－Ａｌａ］－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－ Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－ＮＨ２）。

【０１２５】

上記の通り２つのＤ－Ａｌａを含有するＧＬＰ－１（７－３６、ＮＨ２）類縁体ペプチドを用いて、代替の活性化試薬であるペプチド３を調製した。

【０１２６】

ペプチドは、ＡＢＩ ４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ ０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピークソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製した。合成にはリンク（Rink）樹脂（８３３ｍｇ、２５０ミリモル）を用いた。第２１位置、第２３位置及び第２４位置では、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ＹＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ＹＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ＹＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ使用した。第２９位置では、Ｏ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－Ｏ’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコールを第２８位置で、また、トリ－Ｂｏｃ－ヒドラジノ酢酸を使用した。樹脂の最終重量は１．７４ｇであった。ペプチドを、フェノール１．５ｇとエタンジオール３ｍＬとチオアニソール０．５ｍＬと水０．５ｍＬとＴＦＡ １０ｍＬとの混合液を用いて周囲温度において４時間で脱保護と樹脂からの除去を同時に行った。樹脂を濾過によって除去して、ジエチルエーテルを添加することでペプチドを沈殿させた。固体を遠心分離で単離し、エーテルで十分に乾燥させて、減圧下で乾燥させた。

【０１２７】

材料は、ヴァイダック（Vydac）Ｃ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本を用い、４０～９０％までのグラジエント（８０％アセトニトリル／０．１％水中トリフルオロ酢酸）を用いて流量６ｍＬ／分で９０分間精製した。画分を回収してＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、ペプチドが白色生成物として得られた。分子量：計算値：４０２８．５、モノアイソトピック４０２６．１。測定値：４０２７．２［Ｍ＋Ｈ］＋。

【０１２８】

実施例１Ｄ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジド（NH_2－NH－CH_2－CO－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－NH_2）の調製。

【０１２９】
ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピークソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製した。合成にはリンク（Rink）樹脂を用いた。Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｇｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒ配列で使用した。

【０１３０】
ＧＬＰ－１配列のＨｉｓ[1]を添加した後、Boc_3－ヒドラジノ酢酸を樹脂ペプチドにカップリングする。ペプチドを、フェノール１．５ｇとエタンジオール３ｍＬとチオアニソール０．５ｍＬと水０．５ｍＬとＴＦＡ　１０ｍＬとの混合液を用いて周囲温度において４時間で脱保護と樹脂からの除去とを同時に行う。樹脂を濾過によって除去して、ジエチルエーテルを添加することでペプチドを沈殿させた。固体を遠心分離で単離し、エーテルで十分に乾燥させて、減圧下で乾燥させた。

【０１３１】
材料は、ヴァイダックＣ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本を用い、０．１％トリフルオロ酢酸水溶液中８０％アセトニトリルの４０～９０％までのグラジエントを用いて流量６ｍＬ／分で９０分間精製した。画分を回収してＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、所望のペプチドヒドラジンが白色生成物として得られた。

【０１３２】
実施例１Ｅ
ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（NH_2－ＮＨ－CH_2－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_{12}$－ＣＯ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－NH_2）の調製。

【０１３３】
ＡＢＩ　４３３シンセサイザをＦａｓｔＭｏｃ化学（０．２５ｍミリモル規模）と共に用いた。擬似プロリンジペプチド類Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、ジペプチドであるＧｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒで使用した。使用した保護基は、Ｎ－末端Ｆｍｏｃ、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｕ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｓｅｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）Ａｓｐ（Ｏ－ｔ－ブチル）Ｔｙｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（ＢＯＣ）及びＴｒｐ（ＢＯＣ）であった。０．５３ｍｅｑ／ｇのリンク・アミド・ケムマトリクス（Rink Amide ChemMatrix）樹脂０．２０ｇを合成で使用した。Ｈｉｓ[1]を樹脂とカップリングした後、Ｏ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－Ｏ’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコール（Ｆｍｏｃ－PEG_{12}－CO_2H）を、ペプチド樹脂とカップリングし、次いでBoc_3－ヒドラジノ酢酸をカップリングした。ペプチド樹脂の最終重量は０．６７７ｇである。

【０１３４】
ペプチドを、ＴＦＡ　１０ｍＬとエタンジチオール３ｍＬとフェノール１．５ｇと水０．５ｍＬとチオアニソール０．５ｍＬとの混合液を用いて周囲温度において４時間で脱保護と樹脂からの除去を同時に行う。樹脂を濾過によって除去し、濾液を、冷ジエチルエーテル２５０ｍＬに直接流し込む。得られた固体は、遠心分離で単離し、エーテルに懸濁させて遠心分離することによってジエチルエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥させることで、白色固体４００ｍｇが得られる。

【０１３５】

粗ペプチドを、縦一列に並べたヴァイダックＣ－１８カラム（４．６×２５０ｍｍ、１０ｍ）２本にアリコート状で注入し、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの３０～６０％までの線形グラジエントを用いて流量５ｍＬ／分において９０分間で溶出させる。カラムは２１４ｎｍでモニターする。画分を分析して、正確な生成物を含有するものをプールして凍結乾燥させることで、所望の生成物を白色固体として得た。（分子量：$C_{180}H_{286}N_{44}O_{60}$の計算値４，０２６．５５、測定値４，０２６．９０）

【０１３６】

実施例１Ｆ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー（NH_2－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－ＣＯ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－NH_2）の調製。

【０１３７】

ＡＢＩ　４３３シンセサイザを、ＦａｓｔＭｏｃ化学（０．２５ミリモル規模）と共に使用する。擬似プロリンジペプチド類Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、ジペプチド類Ｇｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒに使用した。使用した保護基は、Ｎ－末端Ｆｍｏｃ，Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｕ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｓｅｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ａｓｐ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｔｙｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（ＢＯＣ）及びＴｒｐ（ＢＯＣ）であった。０．５３ｍｅｑ／ｇリンク・アミド・ケムマトリクス（Rink Amide ChemMatrix）樹脂０．２０ｇを合成に使用した。$Ｈｉｓ^{1}$を樹脂にカップリングした後、ブタンジオン酸モノメチルエステルをペプチド樹脂とカップリングする。得られたペプチド樹脂を、Ｎ－メチルピロリドン及びエタノールで洗浄し、減圧下で一定重量まで乾燥させる。

【０１３８】

ペプチド樹脂は、ジメチルホルムアミド中１０％ヒドラジン（無水物）５ｍＬと混合して、周囲温度において２時間攪拌する。樹脂を濾別して、ジメチルホルムアミド１ｍＬで洗浄し、温水（７０℃）１００ｍＬを濾液に添加する。濾液を４℃において２４時間冷蔵保存した。得られた固体を濾過し、水（２０ｍＬで３回）及びエチルエーテル（４０ｍＬで３回）で洗浄した後、減圧下で乾燥させることで、白色固体が得られる。保護されたペプチドは、トリフルオロ酢酸（２０ｍＬ）とフェノール（１．５ｇ）とジチオトレイトール（１．０ｇ）とチオアニソール（１．０ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．０ｍＬ）と水（１．０ｍＬ）との開裂混合物１５ｍＬを用い、周囲温度において２時間で脱保護する。樹脂を濾過により除去して、冷エチルエーテル（４００ｍＬ）を添加することでペプチドを沈殿させて、濾過で単離し、エチルエーテルで洗浄して、減圧下で乾燥させる。

【０１３９】

粗ペプチドを、縦一列に並べたヴァイダックＣ－１８カラム（４．６×２５０ｍｍ、１０ｍ）２本にアリコート状で注入し、０．１％　ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの２０～７０％までの線形グラジエントを用いて流量５ｍＬ／分で９０分間で溶出させる。カラムは２１４ｎｍでモニターする。画分を分析して、正確な生成物を含有するものをプールして凍結乾燥させることで、所望のペプチドヒドラジドを白色固体として得た。

【０１４０】

実施例１Ｇ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（NH_2－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－CH_2－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_{12}$－ＣＯ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－NH_2

）の調製。

【０１４１】

ＡＢＩ　４３３シンセサイザを、ＦａｓｔＭｏｃ化学（０．２５ミリモル規模）と共に使用する。擬似プロリンジペプチド類Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｇｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒに使用した。使用した保護基は、Ｎ－末端Ｆｍｏｃ、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｕ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｓｅｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ａｓｐ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｔｙｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（ＢＯＣ）及びＴｒｐ（ＢＯＣ）であった。０．５３ｍｅｑ／ｇリンク・アミド・ケムマトリクス（Rink Amide ChemMatrix）０．１７５ｇを合成で使用した。$Ｈｉｓ^{1}$を樹脂とカップリングした後、Ｏ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－Ｏ’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコール（$Ｆｍｏｃ－ＰＥＧ_{12}－ＣＯ_{2}Ｈ$）をペプチド樹脂とカップリングし、次いでブタンジオン酸モノメチルエステルをカップリングする。

【０１４２】

得られたペプチドを、ジメチルホルムアミド中１０％ヒドラジン（無水物）５ｍＬと混合して、周囲温度で２時間攪拌する。樹脂を濾別し、ジメチルホルムアミド１ｍＬで洗浄し、この濾液に温水（７０℃）１００ｍＬを添加する。濾液を４℃で一晩冷蔵保存する。得られた沈殿物をろ過し、水（２０ｍＬで３回）及びエチルエーテル（４０ｍＬで３回）で洗浄した後、減圧下で乾燥させて、白色固体が得られた。保護基は、トリフルオロ酢酸（２０ｍＬ）とフェノール（１．５ｇ）とジチオトレイトール（１．０ｇ）とチオアニソール（１．０ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．０ｍＬ）と水（１．０ｍＬ）との開裂混合物１５ｍＬを用い、周囲温度において２時間でペプチドから除去した。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（４００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させて、濾過で単離し、エチルエーテルで洗浄して、減圧下で乾燥させた。

【０１４３】

粗ペプチドを、縦一列に並べたヴァイダックＣ－１８カラム（４．６×２５０ｍｍ、１０ｍ）２本にアリコート状で注入し、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの２０～７０％までの線形グラジエントを用いて流量５ｍＬ／分で９０分間で溶出させる。カラムは、２１４ｎｍでモニターする。画分を分析して、正確な生成物を含有するものをプールして凍結乾燥させることで、所望のペプチドヒドラジドを白色生成物として得た。

【０１４４】

実施例１Ｈ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－ヒドラジン（Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－ＮＨ－$ＮＨ_{2}$）の調製。

【０１４５】

ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ　０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製する。合成ではリンク樹脂を使用する。Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｇｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒを使用した。

【０１４６】

得られたペプチド樹脂を、１０％ヒドラジン（無水物）５ｍＬと混合して、周囲温度で２時間攪拌する。樹脂を濾別し、ジメチルホルムアミド１ｍＬで洗浄し、この濾液に温水（７０℃）１２５ｍＬを添加する。濾液を４℃で一晩冷蔵保存する。得られた沈殿物をろ過し、水（２０ｍＬで３回）及びエチルエーテル（４０ｍＬで３回）で洗浄した後、減圧下で乾燥させると白色固体が得られる。保護ペプチドは、トリフルオロ酢酸（２０ｍＬ）

とフェノール（１．５ｇ）とジチオトレイトール（１．０ｇ）とチオアニソール（１．０ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．０ｍＬ）と水（１．０ｍＬ）との開裂混合物１５ｍＬを用い、周囲温度において２時間で脱保護する。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（４００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させて、濾過で単離し、エチルエーテルで洗浄して、減圧下で乾燥させた。

【０１４７】

粗ペプチドを、縦一列に並べたヴァイダックＣ－１８カラム（４．６×２５０ｍｍ、１０ｍ）２本にアリコート状で注入し、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの２０～７０％までの線形グラジエントを用いて流量５ｍＬ／分で９０分間で溶出させる。カラムを２１４ｎｍでモニターする。画分を分析して、正確な生成物を含有するものをプールして凍結乾燥させることで、所望のペプチドヒドラジドを白色固体として得た。

【０１４８】

実施例１Ｉ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド誘導体－リンカー－ヒドラジン（Ｈｉｓ－［Ｄ－Ａｌａ］－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_{12}$－ＣＯ－Ｇｌｙ－ＮＨ－NH_2）の調製。

【０１４９】

ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ　０．１ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製した。合成ではＦｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＳＡＳＲＩＮ樹脂を使用する。Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔ－Ｂｕ）－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＳｅｒ－Ｓｅｒで使用した。

【０１５０】

Ｏ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－０’－（２－カルボキシル）－ウンデカエチレングリコール（Ｆｍｏｃ－PEG_{12}－CO_2H）を樹脂とカップリングし、次いで個々のアミノ酸をカップリングすることで、保護されたペプチド－リンカー－樹脂が得られる。その樹脂を、エタノールで洗浄して、減圧下で一晩乾燥させる。

【０１５１】

ペプチド樹脂は、ジメチルホルムアミド中１０％ヒドラジン（無水物）５ｍＬと混合して、周囲温度で２時間攪拌する。樹脂を濾別し、ジメチルホルムアミド１ｍＬで洗浄して、この濾液に温水（７０℃）１００ｍＬを加える。濾液を周囲温度まで１時間で冷却した後、４℃で２２時間冷蔵保存した。白色沈殿物をろ過し、水（２０ｍＬで３回）及びエチルエーテル（４０ｍＬで３回）洗浄し、次いで減圧下で乾燥させることで、白色固体を得る。保護されたペプチドは、トリフルオロ酢酸（２０ｍＬ）とフェノール（１．５ｇ）とジチオトレイトール（１．０ｇ）とチオアニソール（１．０ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．０ｍＬ）と水（１．０ｍＬ）との開裂混合物１５ｍＬを用い、周囲温度において２時間で脱保護する。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（４００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させて、濾過で単離して、エチルエーテルで洗浄する。粗ペプチドを減圧下で乾燥させる。

【０１５２】

粗ペプチドを、ヴァイダックＣ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本にアリコート状で注入し、０．１％トリフルオロ酢酸水溶液中８０％アセトニトリルの３０～７０％までのグラジエントを用いて流量６ｍＬ／分で６０分間で精製する。画分を回収し、ＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、白色生成物２３ｍｇを得た。キャピラリー電気泳動法によって９４％を超えるピーク面積が示された。（分子量：計算値４，０２６．５、モノアイソトピック４，０２４．１）。測定値：ＬＣ－ＭＳ：４，０２８．０Ｄａ［Ｍ＋Ｈ］＋。

【０１５３】
実施例１Ｊ
ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド誘導体－リンカー－ヒドラジン（Ｈｉｓ－［Ｄ－Ａｌａ］－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－ＰＥＧ$_3$－ＣＯ－ＣＨ$_2$－ＮＨ－ＮＨ$_2$）の調製。
【０１５４】
ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ　０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製する。ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂（５４９ｍｇ、２５２ミリモル）を合成に用いた。Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｂｕｔ）－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｐｈｅ－Ｔｈｅ及びＳｅｒ－Ｓｅｒ配列に使用した。樹脂の最終重量は１．１８ｇであった。
【０１５５】
その樹脂に、エタノールで２分洗浄を３回及び塩化メチレンで２分洗浄を３回行う。Ｍｍｔ基を除去するために、ＨＯＢｔ－水和物（９．１８６ｇｍ、０．６Ｍ）を塩化メチレン／２，２，２－トリフルオロエタノール１００ｍＬに溶解し、その２５ｍＬを樹脂に添加して、穏やかに１時間混合する。溶媒を濾過により除去して、その順序を３回繰り返す。その樹脂に、塩化メチレンで２分洗浄を３回、Ｎ－メチルピロリドン中の塩化メチレンで２分洗浄を１回、及びＮ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回行う。樹脂に、Ｂｏｃ$_3$－ヒドラジノ酢酸（９１１．０ｍｇ、２．３３ｍＭ）、ＨＢＴＵ（８８４．３ｍｇ、２．３８ｍＭ）、Ｎ－メチルピロリドン中のＨＯＢｔ（２．３３ｍＬ、１Ｍ）及びＮ－メチルピロリドン２．３ｍＬを加えて、成分が全て溶解するまで十分に混合する。Ｎ－メチルピロリドン（０．７６９ｍＬ、３ｍＭ）を加えて、ｐＨを湿式ペーパーストリップで調べて（ｐＨ８．５）、周囲温度で１９時間攪拌する。
【０１５６】
次にその樹脂に、Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回、塩化メチレン／Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を１回、塩化メチレンで２分洗浄を３回、メタノールで２分洗浄を３回、エチルエーテルで２分洗浄を１回行い、減圧下で２時間乾燥させる。樹脂の重量は１．１４ｇである。
【０１５７】
ペプチドは、トリフルオロ酢酸（３０ｍＬ）とフェノール（２．２５ｇ）とジチオトリエトール（１．５ｇ）とチオアニソール（１．５ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．５ｍＬ）と水（１．５ｍＬ）との開裂混合物２０ｍＬを用いてシンチレーションバイアル瓶内で周囲温度において２時間攪拌することによって、樹脂（０．３７１ｇ）から開裂させた。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（６００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させる。得られた固体を、濾過で単離し、エチルエーテルで洗浄する。粗ペプチドを減圧下で乾燥させることで、５３５ｍｇ得られる。
【０１５８】
粗ペプチドを、ヴァイダックＣ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本において、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの４０～６０％までのグラジエントを用いて流量６ｍＬ／分で６０分間で精製する。画分を回収し、ＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、白色生成物５４．０ｍｇを得た。キャピラリー電気泳動法によって９３％を超えるピーク面積が示された（分子量：計算値３，６３０．１、モノアイソトピックＭＷ３，６２７．９）測定値：ＬＣ－ＭＳ：３，６３０．８Ｄａ［Ｍ＋Ｈ］＋ＳＥＬＤＩ－ＭＳ：３，６２７．５Ｄａ［Ｍ＋Ｈ］＋３，７２４／８Ｄａ［Ｍ＋９７］＋。
【０１５９】

実施例１Ｋ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－$ＰＥＧ_3$－ＣＯ－（$ＣＨ_2$－$ＣＨ_2$－Ｏ）$_{12}$－$ＣＨ_2$－$ＣＨ_2$－ＮＨ－ＣＯ－$ＣＨ_2$－$ＣＨ_2$－ＣＯ－ＮＨ－$ＮＨ_2$）の調製。

【０１６０】

ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製する。ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂（５４９ｍｇ、２５２ミリモル）を合成に用いた。Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｂｕｔ）－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｐｈｅ－Ｔｈｅ及びＳｅｒ－Ｓｅｒ配列に使用した。樹脂の最終重量は１．１８ｇである。

【０１６１】

その樹脂に、エタノールで２分洗浄を３回及び塩化メチレンで２分洗浄を３回行う。Ｍｍｔ基を除去するために、ＨＯＢｔ－水和物（９．１８６ｇｍ、０．６Ｍ）を塩化メチレン／２，２，２－トリフルオロエタノール１００ｍＬに溶解し、その２５ｍＬを樹脂に添加して、穏やかに１時間混合する。溶媒を濾過により除去し、その順序を３回繰り返す。その樹脂に、塩化メチレンで２分洗浄を３回、Ｎ－メチルピロリドン中の塩化メチレンで２分洗浄を１回、及びＮ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回行う。ペプチド樹脂の遊離アミノ基に、Ｏ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－０’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコール（Ｆｍｏｃ－$ＰＥＧ_{12}$－$ＣＯ_2Ｈ$）を加え、次いでブタンジオン酸モノメチルエステルをＨＢＴＵ及びＮ－メチルピロリドン中ＨＯＢｔを用いて加える。

【０１６２】

その樹脂に、Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回、塩化メチレン／Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を１回、塩化メチレンで２分洗浄を３回、メタノールで２分洗浄を３回、エチルエーテルで２分洗浄を１回行い、減圧下で２時間乾燥させる。

【０１６３】

ペプチドを、ジメチルホルムアミド中１０％ヒドラジン（無水物）２５ｍＬと混合し、周囲温度で２時間攪拌する。樹脂を濾別し、ジメチルホルムアミド１ｍＬで洗浄して、この濾液に温水（７０℃）２５０ｍＬを加える。濾液を周囲温度まで１時間冷却させた後、４℃で１６時間冷蔵保存する。白色沈殿物を濾過し、水（２０ｍＬで３回）及びエチルエーテル（４０ｍＬで３回）で洗浄した後、減圧下で乾燥させることで、白色固体が得られる。保護されたペプチドは、トリフルオロ酢酸（２０ｍＬ）とフェノール（１．５ｇ）とジチオトリエトール（１．０ｇ）とチオアニソール（１．０ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．０ｍＬ）と水（１．０ｍＬ）との開裂混合物を用いて周囲温度において２時間で脱保護する。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（４００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させて、濾過で単離して、エチルエーテルで洗浄する。粗ペプチドを減圧下で乾燥させる。

【０１６４】

粗ペプチドを、ヴァイダックＣ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本において、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの４０～８０％までのグラジエントを用いて流量６ｍＬ／分で６０分間で精製する。画分を回収し、ＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、所望のペプチド誘導体を得た。

【０１６５】

実施例１Ｌ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－

Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－PEG_3－ＣＯ－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_{12}$－CH_2－CH_2－ＮＨ－ＣＯ－CH_2－ＮＨ－NH_2）の調製。

【０１６６】

ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製する。ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂を合成に用いた。Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｂｕｔ）－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｐｈｅ－Ｔｈｅ及びＳｅｒ－Ｓｅｒ配列に使用した。

【０１６７】

その樹脂に、エタノールで２分洗浄を３回及び塩化メチレンで２分洗浄を３回行う。Ｍｍｔ基を除去するために、ＨＯＢｔ－水和物（９．１８６ｇｍ、０．６Ｍ）を塩化メチレン／２，２，２－トリフルオロエタノール１００ｍＬに溶解し、その２５ｍＬを樹脂に添加して、穏やかに１時間混合する。溶媒を濾過により除去し、その順序を３回繰り返す。その樹脂に、塩化メチレンで２分洗浄を３回、Ｎ－メチルピロリドン中の塩化メチレンで２分洗浄を１回、及びＮ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回行う。ペプチド樹脂の遊離アミノ基に、Ｏ－（Ｎ－Ｆｍｏｃ－２－アミノエチル）－０’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコール（Ｆｍｏｃ－PEG_{12}－CO_2H）を添加し、次いでBoc_3－ヒドラジノ酢酸をＨＢＴＵ及びＮ－メチルピロリドン中のＨＯＢｔを用いて添加する。

【０１６８】

その樹脂に、Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回、塩化メチレン／Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を１回、塩化メチレンで２分洗浄を３回、メタノールで２分洗浄を３回、エチルエーテルで２分洗浄を１回行い、減圧下で２時間乾燥させる。

【０１６９】

ペプチドは、トリフルオロ酢酸（３０ｍＬ）とフェノール（２．２５ｇ）とジチオトリエトール（１．５ｇ）とチオアニソール（１．５ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．５ｍＬ）と水（１．５ｍＬ）との開裂混合物を用いて周囲温度において２時間で樹脂から開裂させる。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（６００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させる。得られた固体を濾過で単離して、エチルエーテルで洗浄する。粗ペプチドを減圧下で乾燥させて、白色固体を得る。

【０１７０】

粗ペプチドをアリコート状で、ヴァイダックＣ－１８カラム（１０ｍｍ、２．５×２５ｃｍ）２本において、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの２０～７０％までのグラジエントを用いて流量６ｍＬ／分で６０分間で精製する。画分を回収し、ＨＰＬＣで分析し、純粋な画分をプールして凍結乾燥させることで、所望のペプチド誘導体を得た。

【０１７１】

実施例１Ｍ

アミド化ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（NH_2－ＮＨ－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_{12}$－ＣＯ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－NH_2）の調製。

【０１７２】

ＡＢＩ　４３３シンセサイザを、ＦａｓｔＭｏｃ化学（０．２５ミリモル規模）と共に使用する。擬似プロリンジペプチド類Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ

－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、ジペプチド類Ｇｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒに使用した。使用した保護基は、Ｎ－末端Ｆｍｏｃ、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｕ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｓｅｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ａｓｐ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｔｙｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（ＢＯＣ）及びＴｒｐ（ＢＯＣ）であった。合成では０．５３ｍｅｑ／ｇのリンク・アミド・ケムマトリクス（Rink Amide ChemMatrix）樹脂（resincwas）０．２０ｇを使用した。$Ｈｉｓ^{1}$を樹脂にカップリングした後、Ｏ－（$Ｂｏｃ_{3}$－２－ヒドラジノエチル）－０’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコール（$Ｂｏｃ_{3}$－ヒドラジノ－$ＰＥＧ_{12}$－$ＣＯ_{2}Ｈ$）をペプチド樹脂にカップリングする。

【０１７３】

ペプチドは、ＴＦＡ１０ｍＬとエタンジオール３ｍＬとフェノール１．５ｇと水０．５ｍＬとチオアニソール０．５ｍＬとの混合物を用いて周囲温度において４時間で脱保護と樹脂からの開裂を同時に行う。樹脂を濾過によって除去して、濾液を冷ジエチルエーテル２５０ｍＬへ直接流し込む。得られた固体を、濾過で単離して、エーテル中で懸濁して遠心分離することによってジエチルエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥させることで白色固体４００ｍｇが得られた。

【０１７４】

粗ペプチドを、縦に並べたヴァイダックＣ－１８カラム（４．６×２５０ｍｍ、１０ｍ）２本にアリコート状で注入して、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの２０～７０％までの線形グラジエントを用いて流量５ｍＬ／分で９０分間溶出させる。カラムは２１４ｎｍでモニターする。画分を分析して、正確な生成物を含有するものをプールして凍結乾燥させることで、所望の生成物を白色生成物として得た。

【０１７５】

実施例１Ｎ

ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－$ＰＥＧ_{3}$－ＣＯ－（$ＣＨ_{2}$－$ＣＨ_{2}$－Ｏ）$_{12}$－$ＣＨ_{2}$－$ＣＨ_{2}$－ＮＨ－$ＮＨ_{2}$）の調製。

【０１７６】

ペプチドは、ＡＢＩ　４３３Ａペプチド・シンセサイザにおいて、Ｆａｓｔｍｏｃ０．２５ｍＭモニタリング・プレビアス・ピーク・ソフトウェアによるＦｍｏｃ／ＨＢＴＵ化学用シンスアシスト・バージョン２．０を用いて調製する。ユニバーサルＰＥＧノバタグ（Universal PEG NovaTag）樹脂を合成に用いた。Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（Ｂｕｔ）－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、Ｐｈｅ－Ｔｈｅ及びＳｅｒ－Ｓｅｒ配列で使用した。

【０１７７】

その樹脂に、エタノールで２分洗浄を３回及び塩化メチレンで２分洗浄を３回行う。Ｍｍｔ基を除去するために、ＨＯＢｔ－水和物を塩化メチレン／２，２，２－トリフルオロエタノール１００ｍＬに溶解し、その２５ｍＬを樹脂に添加して、穏やかに１時間混合する。溶媒を濾過により除去し、その順序を３回繰り返す。その樹脂に、塩化メチレンで２分洗浄を３回、Ｎ－メチルピロリドン中塩化メチレンで２分洗浄を１回、及びＮ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回行う。ペプチド樹脂の遊離アミノ基に、Ｏ－（$Ｂｏｃ_{3}$－２－ヒドラジノエチル）－０’－（２－カルボキシエチル）－ウンデカエチレングリコール（$Ｂｏｃ_{3}$－ヒドラジノ－$ＰＥＧ_{12}$－$ＣＯ_{2}Ｈ$）を、ＨＢＴＵ及びＮ－メチルピロリドン中ＨＯＢｔを用いて添加する。

【０１７８】

次にその樹脂に、Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を３回、塩化メチレン／Ｎ－メチルピロリドンで２分洗浄を１回、塩化メチレンで２分洗浄を３回、メタノールで２分洗浄を３回、エチルエーテルで２分洗浄を１回行い、減圧下で２時間乾燥させる。

【０１７９】
ペプチドは、トリフルオロ酢酸（３０ｍＬ）とフェノール（２．５ｇ）とジチオトリエトール（１．５ｇ）とチオアニソール（１．５ｍＬ）とトリイソプロピルシラン（１．５ｍＬ）と水（１．５ｍＬ）との開裂混合物を用いて周囲温度において２時間で樹脂から開裂させる。樹脂を濾過により除去し、予め冷却させたエチルエーテル（６００ｍＬ）を加えることによりペプチドを沈殿させる。得られた固体を、濾過で単離して、エチルエーテルで洗浄する。粗ペプチドを、減圧下で乾燥させることで、白色固体が得られる。
【０１８０】
粗ペプチドをアリコート状で、ヴァイダックＣ－１８カラム（１０ｍ、２．５×２５ｃｍ、１０ｍ）２本に、０．１％トリフルオロ酢酸水溶液中８０％アセトニトリルの２０～７０％までのグラジエントを用いて流量６ｍＬ／分において６０分間で精製する。画分を回収して、ＨＰＬＣで分析した。純粋な画分をプールして、凍結乾燥させることで、所望のペプチド誘導体が得られた。
【０１８１】
実施例１Ｏ
アミド化ＧＬＰ－１（７－３６）ペプチド－リンカー－ヒドラジン（NH_2－ＮＨ－CH_2－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－CH_2－CH_2－（Ｏ－CH_2－CH_2）$_2$－Ｏ－CH_2－CH_2－CH_2－ＮＨ－CH_2－Ｏ－CH_2－ＣＯ－Ｈｉｓ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－NH_2）の調製。
【０１８２】
ＡＢＩ　４３３シンセサイザを、Ｆａｓｔｍｏｃ化学（０．２５ミリモル規模）と共に使用する。擬似プロリンジペプチド類Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｖａｌ－Ｓｅｒ（ΨＭｅ，ＭｅＰｒｏ）－ＯＨをそれぞれ、ジペプチド類Ｇｌｙ－Ｔｈｒ、Ｐｈｅ－Ｔｈｒ及びＶａｌ－Ｓｅｒに使用した。使用した保護基は、Ｎ－末端Ｆｍｏｃ、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｕ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｓｅｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ａｓｐ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｔｙｒ（Ｏ－ｔ－ブチル）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（ＢＯＣ）及びＴｒｐ（ＢＯＣ）であった。リンク・アミド・ケムマトリクス（Rink Amide ChemMatrix）樹脂を合成で使用した。Ｈｉｓ[1]を樹脂にカップリングした後、｛３－［２－（２－｛２－［３－（９Ｈ－フローレン－９－イルオキシカルボニルアミノ）－プロポキシ］－エトキシ｝－エトキシ）－エチルアミノ］－１－メチル－２－オキソ－プロポキシ｝－酢酸（Ｆｍｏｃ－PEG_2－CO_2H）をペプチド樹脂にカップリングし、次いでBoc_3－ヒドラジノ酢酸をカップリングする。
【０１８３】
ペプチドは、ＴＦＡとエタンジオール３ｍＬとフェノール１．５ｇと水０．５ｍＬとチオアニソール０．５ｍＬとの混合物を用いて、周囲温度において４時間で脱保護と樹脂からの開裂を同時に行う。樹脂を濾過によって除去して、濾液を冷ジエチルエーテル２５０ｍＬへ直接流し込む。得られた固体を、遠心分離で単離して、エーテルに懸濁して遠心分離することによってジエチルエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥させることで、粗ペプチドが白色固体として得られる。
【０１８４】
粗ペプチドを、縦に並べたヴァイダックＣ－１８カラム（４．６×２５０ｍｍ、１０ｍ）２本にアリコート状で注入して、０．１％ＴＦＡ水溶液中８０％アセトニトリルの３０～６０％までの線形グラジエントを用いて流量５ｍＬ／分で９０分間溶出させる。カラムを２１４ｎｍでモニターする。画分を分析して、正確な生成物を含有するものをプールして凍結乾燥させることで、所望の生成物を白色固体として得た。
【０１８５】
実施例２：グリオキシリル－Ｆｃの調製

ＩｇＧ１クラス／サブクラスのヒト抗体は、パパインによって、Ｎ－末端トレイニンを有するＦｃ断片を生成する重鎖上の部位で開裂可能である。本研究では、ＩｇＧ４抗体のヒト定常部７Ｅ３を含むマウス－ヒトキメラをＦｃとして使用する（コームラ（Kohmura）ら、１９９３年、動脈硬化トロンビン（Arterioscler Thromb.）、第１３巻、１８３７～４２頁、欧州特許第４１８３１６号）。

【０１８６】

７Ｅ３　ＩｇＧ　Ｆｃの脱グリコシル化

ＦＣ１３５ｍＬ（５ｍｇ／ｍＬ）をｐＨ７．５のトリス１０ｍＭに透析する。透析するために、ＰＮＧアーゼＦ（５００，０００ｕ／ｍＬ）１００ｍＬを加えて、得られる溶液を３７°で３日間インキュベートする。脱グリコシル化されたＦｃを、ＴｏｓｏＨａａｓフェニル５ＰＷカラム（５．５×２００ｍｍ、１０ｍ）において０～５０％Ｂのグラジエントで流量１１ｍＬ／分で溶出して精製する。（緩衝液Ａ：０．１Ｍリン酸ナトリウム、１Ｍ硫酸アンモニウム、ｐＨ６．５；緩衝液Ｂ：０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ　６．５）。分子量：計算値４９，８６４．４、測定値４９，８６８．４。

【０１８７】

脱グリコシル化Ｆｃの酸化

脱グリコシル化Ｆｃ（実験番号２０５から８．９ｍｇ／ｍＬ）５５ｍＬをｐＨ８．４の１％　ＮａＨＣＯ３に透析することで、８．６ｍｇ／ｍＬが５６．３ｍＬ得られる。これを、ｐＨ８．４の１％ＮａＨＣＯ３を４０．６ｍＬ加えることによって、５．１ｍｇ／ｍＬに調節する（タンパク質／ｍＬ　１０－４ミリモルミリモル、これは、Ｎ－末端トレオニン／ｍＬ　２×１０－４ミリモルに相当する）１％　ＮａＨＣＯ３中メチオニン１２．５ｍｇ／ｍＬの溶液（ｐＨ８．４）を調製し、この１１．９ｍＬをＦｃ溶液に加える。

【０１８８】

２０ｍｇ／ｍＬのＮａＩＯ４水溶液を調製する。この２．１２ｍＬ（４２．４ｍｇ）をＦｃに加える。反応混合物を、周囲温度で１５分間穏やかに攪拌する。エチレングリコール（２．８ｇ、２．３ｍＬ）を加えて、反応物を更に２０分間穏やかに攪拌する。この溶液を０．１Ｍ　ＮａＯＡｃ（ｐＨ４．５）に透析して、４．０ｍｇ／ｍＬを１２０ｍＬ得る。この溶液は、２．５ｍＬのアリコートに分けて、－２０℃に冷凍して、それ以上精製せずに使用する。

【０１８９】

実施例３：ペプチド－Ｆｃ共役物の調製

実施例１Ａのペプチド１の利用：

グリオキシリル－Ｆｃ（２．５ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ）に、活性化ＧＬＰ－１類縁体であるペプチド１Ａ　１２ｍＬを加える。試験管を４℃の冷蔵庫内で２４時間保存する。ＮａＢＨ$_3$ＣＮの１ｍｇ／ｍＬ溶液の溶液を調製し、その１００ｍＬを反応物に加えて、反応物を冷蔵庫に戻して一晩保存する。この試料に、硫酸アンモニウム１００ｍｇを加える。試料をＴｏｓｏＨａａｓフェニル５ＰＷカラム（５．５×２００ｍｍ、１０ｍ）に注入して、０～１００％Ｂまでのグラジエントにより、流量１１ｍＬ／分で溶出させる（緩衝液Ａ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、硫酸アンモニウム１Ｍ、ｐＨ６．５；緩衝液Ｂ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、ｐＨ６．５）。画分をプールして、約８ｍＬまで濃縮して、ＰＢＳに透析する。分子量：計算値５７，００５．８、モノアイソトピック５６，９７０．４、測定値５７，００４．３。

【０１９０】

実施例１Ｂのペプチド２の利用：

グリオキシリル－Ｆｃ（２．５ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ）に、活性化ＧＬＰ－１類縁体であるペプチド１Ｂを１０ｍｇ加える。試験管を４℃の冷蔵庫内で２４時間保存する。ＮａＢＨ$_3$ＣＮの１ｍｇ／ｍＬ溶液の溶液を調製し、その１００ｍＬを反応物に加えて、反応物を冷蔵庫に戻して一晩保存する。この試料に、硫酸アンモニウム１００ｍｇを加える。試料をＴｏｓｏＨａａｓフェニル５ＰＷカラム（５．５×２００ｍｍ、１０ｍ）に注入して、０～１００％Ｂまでのグラジエントにより、流量１１ｍＬ／分で溶出させる（緩衝液Ａ

：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、硫酸アンモニウム１Ｍ、ｐＨ６．５；緩衝液Ｂ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、ｐＨ６．５）。画分をプールして、約８ｍＬまで濃縮して、ＰＢＳに透析する。分子量：計算値５７，８８３．８、モノアイソトピック５７，８５０．９。測定値５７，７９６．５。

【０１９１】

実施例１Ｃのペプチド３の利用。

【０１９２】

グリオキシリル－Ｆｃ（２．５ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ）に、ペプチド１Ｃを８ｍｇ加える。試験管を４℃の冷蔵庫内で２４時間保存する。$NaBH_3CN$の１ｍｇ／ｍＬ溶液の溶液を調製し、その１００ｍＬを反応物に加えて、反応物を冷蔵庫に戻して一晩保存する。この試料に、硫酸アンモニウム１００ｍｇを加える。試料をＴｏｓｏＨａａｓフェニル５ＰＷカラム（５．５×２００ｍｍ、１０ｍ）に注入して、０～１００％Ｂまでのグラジエントにより、流量１１ｍＬ／分で溶出させる（緩衝液Ａ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、硫酸アンモニウム１Ｍ、ｐＨ６．５；緩衝液Ｂ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、ｐＨ６．５）。画分をプールして、約８ｍＬまで濃縮して、ＰＢＳに透析する。分子量：計算値５７，８０２．６、モノアイソトピック５７，７６６．８。計算値５７，８１１．１。

【０１９３】

ペプチド３からの一価のコンストラクト：

グリオキシルアルデヒド－Ｆｃ（２．５ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ）にペプチド３を１．５ｍｇ加える。試験管を４℃の冷蔵庫内で２４時間保存する。$NaBH_3CN$の１ｍｇ／ｍＬ溶液の溶液を調製し、その１００ｍＬを反応物に加えて、反応物を冷蔵庫に戻して一晩保存する。この試料に、硫酸アンモニウム１００ｍｇを加える。試料をＴｏｓｏＨａａｓフェニル５ＰＷカラム（５．５×２００ｍｍ、１０ｍ）に注入して、５０～１００％Ｂまでのグラジエントにより、流量１１ｍＬ／分で溶出させる（緩衝液Ａ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、硫酸アンモニウム１Ｍ、ｐＨ６．５；緩衝液Ｂ：リン酸ナトリウム０．１Ｍ、ｐＨ６．５）。画分をプールして、約８ｍＬまで濃縮して、ＰＢＳに透析する。分子量：計算値５３，７９２．２、モノアイソトピック５３，７５８．５。測定値５３，８０３．７。

【０１９４】

実施例４：ペプチド－Ｆｃ共役物の生物活性

ペプチド－共役物の活性を、ＧＰＣＲ類によってアデニリルシクラーゼ活性を調整した時に産生されるｃＡＭＰを測定する、ｃＡＭＰアッセイを用いて試験した。

【０１９５】

ｃＡＭＰアッセイ　ランス（商標）（LANCE）ｃＡＭＰアッセイ（Ｉ．ヘミラ（Hemmila I.）、１９９９、ランス（商標）：ＨＴＳのための均一系アッセイ基盤（Homogeneous Assay Platform for HTS）、ジャーナル・オブ・バイオモレキュラー・スクリーニング（J Biomol Screen.）、第４巻（第６号）、３０３～３０８頁）は、同次時間分解蛍光共鳴エネルギー転移（ＴＲ－ＦＲＥＴ）イムノアッセイである。アッセイは、染料アレクサ・フルール（登録商標）（Alexa Fluor）６４７で標識されたｃＡＭＰ－特異性抗体上の結合部位におけるユーロピウム標識されたｃＡＭＰトレーサと試料ｃＡＭＰとの競合に基づいている。ユーロピウム標識されたトレーサ錯体は、ビオチンｃＡＭＰと、ユーロピウム－Ｗ８０４４キレートで標識されたストレプチアビジンとの強い相互作用によって形成されている。抗体がＥｕ－ＳＡ／ｂ－ｃＡＭＰに結合すると、光パルス３４０ｎｍがトレーサのＥｕ－キレート分子を励起する。Ｅｕ－キレートが発するエネルギーは、抗体上のアレクサ（Alexa）分子へと移動し、その結果、６６５ｎｍで発光する。６６５ｎｍでの蛍光強度測度は、試験試料からのｃＡＭＰ存在下で低下し、その結果、得られるシグナルは、試料のｃＡＭＰ濃度と反比例する（ランス（LANCE）ｃＡＭＰマニュアル）。

【０１９６】

細胞及びアッセイ。ＩＮＳ－１Ｅ細胞（スイス・ジュネーブのクレス・ヴォルハイム（Claes Wollheim）、内分泌学（Endocrinology）、１９９２年、第１３０巻（第１号）、

１６７～１７８頁）をＲＰＭＩ　１６４０／１０％　ＦＢＳ／１％　Ｌ－グルタミン／１％ピルビン酸ナトリウム／１％非必須アミノ酸／５０μＭ　β－メルカプトエタノール中で培養して、５％CO_2を含む加湿インキュベータにおいて３７℃に保持した。細胞は、トリプシン処理に通して、７日ごとに継代培養した。

【０１９７】

アッセイでは、ＩＮＳ－１Ｅ細胞を９６穴プレート（コスター（Costar）３６１０）にコンフルエンスで配置し、適正な成長培地で４日間回復させた。培地を穴から吸引して、アレクサ・フルール（登録行表）６４７抗ｃＡＭＰ抗体２４μＬ（ランスｃＡＭＰキット（LANCE cAMP Kit）、マサチューセッツ州ボストンのパーキン・エルマー（Perkin Elmer））を加え、次いで（ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡ／０．５ｍＭ　ＩＢＭＸ中の）一連の試験物品の希釈液２４μＬを加えた。細胞を室温で７分間刺激した後、Ｅｕ－ＳＡ／ｂ－ｃＡＭＰトレーサを含む緩衝液に溶解させた。プレートは、室温で１時間インキュベートした後、６６５ｎｍでの蛍光強度を測定した。サイクリックＡＭＰ濃度は、標準曲線と対照して求めた。

【０１９８】

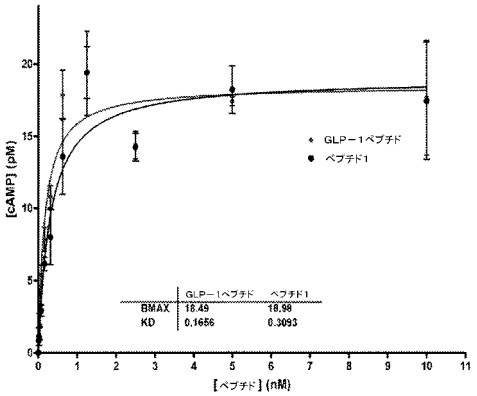
結果

図１に示すような及び実施例１Ａで調製した通りのペプチド１の、ＩＮＳ－１Ｅ細胞内の誘導ｃＡＭＰを、野生型ＧＬＰ－１と比較した。図２のグラフに示す結果は、修飾ペプチドの生物活性は低下しなかったことを実証している。

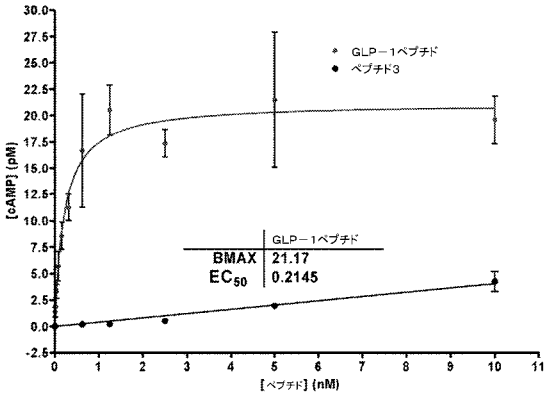
【０１９９】

実施例３で説明したヒトＦｃ－領域に結合した修飾ＧＬＰ－１ペプチドの、ＩＮＳ－１Ｅ細胞内の誘導ｃＡＭＰに対する能力を、図４のグラフに示すように比較した。図から分かるように、コンストラクトはいずれも活性を発現した。Ｎ－末端結合したＧＬＰ－１類縁体（ペプチド３）の活性は、２個のアミノ酸によるＧＬＰ－１のＮ－末端のトランケーションが弱い作用物質活性を生じ、及び８個のアミノ酸によるＮ－末端トランケーションがペプチドを不活性化することは予め確認されたので、予想外であった（モントローズ－ラフィザデー（Montrose-Rafizadeh）ら、１９９７年、バイオロジカル・ケミストリー（Biol. Chem.）、第２７２巻、２１２０１～２１２０６頁）。しかしながら、ペプチド３の一価共役物を同じアッセイで調べたとき、アッセイにおいて１００ｎＭまでの濃度を使用した場合には活性が検出できなかった。

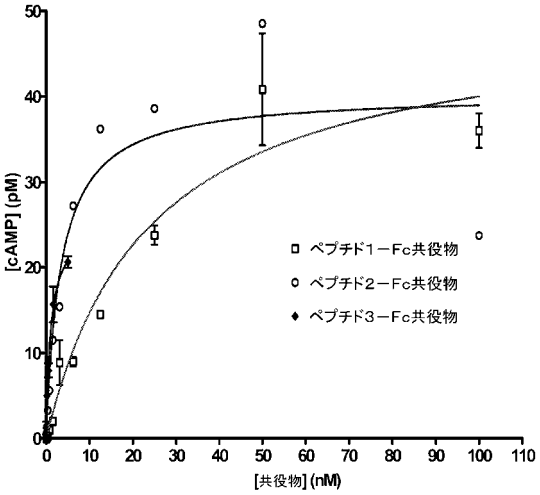
【図１】



【図２】



【図３】



【配列表】

2011503000000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/82209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/00 (2009.01)
USPC - 424/134.1
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)
USPC: 424/134.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 424/134.1, 178.1, 183.1, 192.1, 809; 530/387.3
(text search)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed
Search terms: GLP-1, Fc, linker, non-peptidyl, multimer, dimer, hinge, conjugate, polymer, glyoxylyl, hydrazine, hydrazone

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0053370 A1 (GLAESNER et al.) 18 March 2004 (18.03.2004) abstract; para [0021]-[0027], [0229], [0235], [0277], [0281], [0305], [0309]-[0313]	1-10, 13-17
Y	US 2005/0176108 A1 (KIM et al.) 11 August 2005 (11.08.2005) abstract; para [0014], [0026], [0028], [0032], [0034]-[0038], [0042]-[0043]	1-10, 13-17
Y	US 2007/0122408 A1 (BARBAS) 31 May 2007 (31.05.2007) para [0099]-[0102], [0104], [0106], [0113], [0150], [0157]	6-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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	Date of mailing of the international search report
16 February 2009 (16.02.2009)	27 FEB 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/82209

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 11-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11-12 are unsearchable because they recite sequences; however, no valid CRF, as required by Annex C of the Administrative Instructions, was filed in response to the ISA/225 mailed on 14 November 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

Ｆターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA09 BA19 BA23 BA41 NA12
ZC351
4H045 AA10 AA20 AA30 BA18 BA41 BA51 BA57 DA30 DA76 EA30
FA20