

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4401170号

(P4401170)

(45) 発行日 平成22年1月20日(2010.1.20)

(24) 登録日 平成21年11月6日(2009.11.6)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/60 (2006.01) C O 7 K 14/60 Z N A
C O 7 K 1/04 (2006.01) C O 7 K 1/04
C O 7 K 1/06 (2006.01) C O 7 K 1/06
C O 7 K 1/16 (2006.01) C O 7 K 1/16
A 6 1 K 38/22 (2006.01) A 6 1 K 37/24

請求項の数 10 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-540209 (P2003-540209)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月30日(2002.10.30)
 (65) 公表番号 特表2005-517633 (P2005-517633A)
 (43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/PL2002/000080
 (87) 国際公開番号 W02003/037928
 (87) 国際公開日 平成15年5月8日(2003.5.8)
 審査請求日 平成17年9月26日(2005.9.26)
 (31) 優先権主張番号 P-350463
 (32) 優先日 平成13年10月31日(2001.10.31)
 (33) 優先権主張国 ポーランド (PL)

(73) 特許権者 504169636
 インスティトゥート ファルマチョイッチ
 ニー
 ポーランド国 P L - O 1 - 7 9 3 ワル
 シャワ ウリツァ リディギェラ 8 イ
 デノストカ バダウェゾーローズワヨワ
 S P 7 o . o .
 (73) 特許権者 504169603
 ザクラディ ファルマチョイッチネ ポル
 ファルマ エスエイ
 ポーランド国 8 3 - 2 0 0 スタロガル
 ド グダンスキイ ウリツァ ペルプリ
 スカ 1 9
 (74) 代理人 100071755
 弁理士 斉藤 武彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ペプチドであるヒト成長ホルモン放出ホルモンの類似体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) :

D a t - A l a - A s p - A l a - I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T y r ¹
⁰ - R ^{1 1} - R ^{1 2} - V a l - L e u - A l a - G l n - L e u - S e r - A l a - R ²
⁰ - R ^{2 1} - L e u - L e u - G l n - A s p - I l e - N l e - A s p - R ^{2 9} - N H
₂ (I)

(式中: R ^{1 1} は、h A r g、G a bまたはG a pであり;R ^{1 2} は、h A r g、O r n、G a bまたはG a pであり;R ^{2 0} は、h A r g、G a bまたはG a pであり;R ^{2 1} は、h A r g、O r n、G a bまたはG a pであり;R ^{2 9} は、D - A r g、h A r g、G a bまたはG a pである)

のアミノ酸配列からなる、新規ペプチドである成長ホルモン放出ホルモン類似体およびその薬学的に許容し得る塩。

【請求項 2】

D a t - A l a - A s p - A l a - I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T y r
^{1 0} - h A r g - h A r g - V a l - L e u - A l a - G l n - L e u - S e r - A l a
 - h A r g ^{2 0} - h A r g - L e u - L e u - G l n - A s p - I l e - N l e - A s p
 - h A r g ^{2 9} - N H ₂ ;

(2) D a t - A l a - A s p - A l a - I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T

10

20

yr¹⁰ - hArg - Orn - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 a - hArg²⁰ - Orn - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp
 - hArg²⁹ - NH₂ ;

(3) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gab - Gab - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 - Gab - Gab - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gab
 - NH₂ ;

(4) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - Gab - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 a - Gab - Gab - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gab
 b - NH₂ ;

10

(5) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gab - hArg - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 a - hArg - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - D - Arg - NH₂ ;

(6) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - Gab - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 a - hArg - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - D - Arg - NH₂ ;

(7) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gap - Gap - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 - Gap - Gap - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gap
 - NH₂ ; および

20

(8) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gap - Gap - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 a - hArg - Gap - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gap
 p - NH₂ ;

からなる群より選択される請求項1記載の式(I)のペプチド。

【請求項3】

Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - hArg - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala
 - hArg²⁰ - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp
 - hArg²⁹ - NH₂ である請求項2記載のペプチド。

30

【請求項4】

Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - Orn - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala -
 hArg²⁰ - Orn - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - hArg²⁹ - NH₂ である請求項2記載のペプチド。

【請求項5】

式(I) :

40

Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - R¹¹ - R¹² - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - R²⁰
 - R²¹ - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - R²⁹ - NH₂ (I)

(式中 :

R¹¹ は、hArg、GabまたはGapであり ;

R¹² は、hArg、Orn、GabまたはGapであり ;

R²⁰ は、hArg、GabまたはGapであり ;

R²¹ は、hArg、Orn、GabまたはGapであり ;

R²⁹ は、D - Arg、hArg、GabまたはGapである)

50

のアミノ酸配列からなる、新規ペプチドである成長ホルモン放出ホルモン類似体およびその薬学的に許容し得る塩を製造する、固相合成法を用いる方法であって、リジン、2, 4 - ジアミノ酪酸または2, 3 - ジアミノプロピオン酸の適切な誘導体をポリマー支持体に結合したペプチド鎖中の適切な位置に導入し、側鎖アミノ基を脱保護し、そして遊離アミノ基を t - ブチルオキシカルボニル保護基をもつグアニジン化剤と反応させ、次いで該グアニジン化反応によって導入された t - ブチルオキシカルボニル保護基を除去し、そして該支持体から該合成ペプチドを分離させ、次いで精製し、そして場合により薬学的に許容し得る塩に該ペプチドを変換することを特徴とする方法。

【請求項 6】

ポリマー支持体として 4 - メチルベンズヒドリルアミン樹脂が使用される請求項 5 記載の方法。

10

【請求項 7】

4 - (ジメチルアミノ)ピリジンの存在下で N, N' - ビス(tert - ブチルオキシカルボニル) - S - メチルイソチオ尿素がグアニジン化剤として使用される請求項 5 または 6 記載の方法。

【請求項 8】

合成ペプチドがフッ化水素を用いて支持体から分離される請求項 5 または 6 記載の方法

。

【請求項 9】

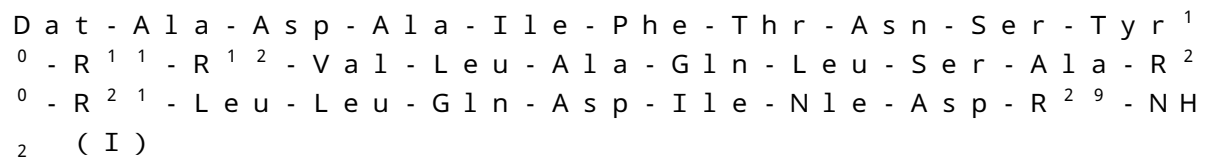
合成ペプチドが高性能液体クロマトグラフィーによって精製される請求項 5 記載の方法

。

20

【請求項 10】

活性成分、1つ以上の担体および/または1つ以上の賦形剤からなり、該活性成分が式 (I) :



(式中:

R¹¹ は、h A r g、G a b または G a p であり;

30

R¹² は、h A r g、O r n、G a b または G a p であり;

R²⁰ は、h A r g、G a b または G a p であり;

R²¹ は、h A r g、O r n、G a b または G a p であり;

R²⁹ は、D - A r g、h A r g、G a b または G a p である)

のアミノ酸配列からなる、少なくとも1つの成長ホルモン放出ホルモン類似体またはその薬学的に許容し得る塩であることを特徴とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規ペプチドであるヒト成長ホルモン放出ホルモンの類似体、該新規ペプチドの製造方法、およびこれらの治療上の用途に関する。

40

【背景技術】

【0002】

ヒト成長ホルモン (GH、ソマトトロピン) の放出および合成は、2つの相互拮抗性の視床下部ホルモン - 成長ホルモン放出抑制ホルモン (G I H、ソマトスタチン) および成長ホルモン放出ホルモンの定常性の制御下にある。ヒト成長ホルモン放出ホルモン (h G H - R H) の投与に基づく治療は、GH不全の患者の大多数に対して実施できる。44のアミノ酸残基を含む内在性 h G H - R H の全生物活性をなお保持する最も短い断片が、そのN末端類似体 h G H - R H (1 - 29) - N H₂ であることが明らかにされている。h G H - R H (1 - 29) - N H₂ ペプチドは合成によって製造することができる; セルモ

50

レリンアセテートという名前の合成 hGH-RH(1-29)-NH₂ は、小児の低身長症の治療での使用が承認されており、神経分泌障害の治療に関し、不妊女性におけるゴナドトロピン誘発排卵用のアジュバントとして、および AIDS 関連の異化障害の治療に関しても、研究中である。

【0003】

しかし、hGH-RH(1-29)-NH₂ は、酵素分解に対して比較的非耐性である。観察される主要な代謝産物は、トリプシン様酵素によって引き起こされる、Arg¹¹-Lys¹² と Lys¹²-Val¹³ との間の結合開裂を特徴とする〔(非特許文献1)〕。hGH-RH(1-29)-NH₂ の類似体のトリプシンによる分解時に、C末端アミド結合を含むすべての塩基性アミノ酸残基のカルボキシル基部位にてペプチド結合の加水分解が発生し、これに対して Orn 残基が Lys の代わりに存在するという点異なる類似体の場合は、Arg 残基に隣接する結合のみが加水分解されることが最近明らかにされた〔(非特許文献2)〕〔(非特許文献3)〕。この発見は、位置12および21に Orn を含有する類似体の例外的に高いインビボ活性に引き続き一致している〔(非特許文献4)〕。

10

【非特許文献1】L. A. Frohman, T. R. Downs, E. P. Heimer, A. M. Felix J. Clin. Invest. 1989, 83, 1533-1540

【非特許文献2】E. Witkowska, A. Orłowska, B. Sagan, M. Smoluch, J. Izdebski J. Peptide Sci. 2000, 6 (Suppl.), 189

20

【非特許文献3】E. Witkowska, A. Orłowska, B. Sagan, M. Smoluch, J. Izdebski J. Peptide Sci. 2001, 7, 166-172

【非特許文献4】J. Izdebski, J. Pinski, J. E. Horwath, G. Halmos, K. Groot, A. V. Schally, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4872-4876

【0004】

hGH-RH(1-29)-NH₂ の不安定性の問題を、特にアミノ酸配列中の位置29の Arg を Agm(4-グアニジルブチルアミン)で置換することによって〔(非特許文献5)〕、または位置1の Tyr を Dat(デアミノチロシン)で、および位置12の Lys を D-Lys、Arg または Orn で置換することによって〔(特許文献1)〕および〔(特許文献2)〕克服する試みが行われてきた。

30

【非特許文献5】Bajusz et al., Peptides 1982, Blaha and Melon, 編.; W. De Gruyter, Berlin-New York, 643-647頁

【特許文献1】国際特許出願 WO 94/11396

【特許文献2】国際特許出願 WO 94/11397

【0005】

しかしこれらの試みの結果は不満足であり、薬剤の用量減少および/またはより低頻度の投与を可能にする、成長ホルモンを放出するより高い能力と酵素分解に対するより高い耐性を併せ持つ類似体への需要はなお存在する。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

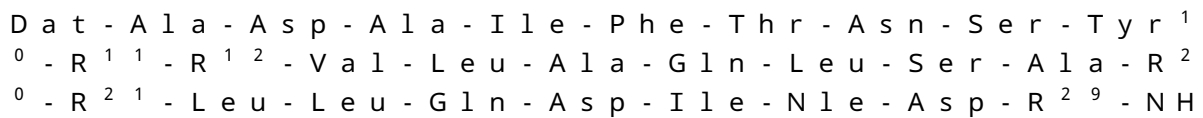
【0006】

発明者らにより今や、ヒト成長ホルモン放出ホルモン類似体への選択アミノ酸の導入は、より高い生物活性・より良好な成長ホルモン放出能力の類似体を生じるだけでなく、酵素へのペプチド活性に有益な影響も有することが見出されている。選択アミノ酸は、位置29の D-Arg、および Lys ならびに Arg により天然ペプチド中で占有されている位置の、その側鎖内にグアニジン基を含有するアミノ酸を含む。

50

【 0 0 0 7 】

本発明による新規ペプチド - 成長ホルモン放出ホルモン類似体は、式 (I) :



2

(I)

(式中 :

R^{11} は、 h A r g 、 G a b または G a p であり ;

R^{12} は、 h A r g 、 O r n 、 G a b または G a p であり ;

10

R^{20} は、 h A r g 、 G a b または G a p であり ;

R^{21} は、 h A r g 、 O r n 、 G a b または G a p であり ;

R^{29} は、 D - A r g 、 h A r g 、 G a b または G a p である。)

の amino 酸配列を持つ。

【 0 0 0 8 】

新規ペプチドは強力かつ選択性の成長ホルモン放出刺激物質であり、それらは酵素作用に対する高い耐性を示す。

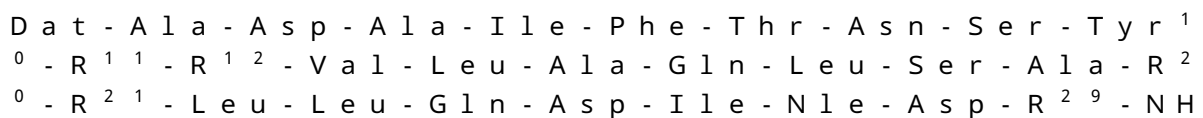
【 0 0 0 9 】

新規ペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、そのような患者にまたは医薬製剤の活性成分として投与できる。

20

【 0 0 1 0 】

それゆえ本発明は、式 (I) :



2 (I)

(式中 :

R^{11} は、 h A r g 、 G a b または G a p であり ;

R^{12} は、 h A r g 、 O r n 、 G a b または G a p であり ;

R^{20} は、 h A r g 、 G a b または G a p であり ;

30

R^{21} は、 h A r g 、 O r n 、 G a b または G a p であり ;

R^{29} は、 D - A r g 、 h A r g 、 G a b または G a p である。)

の amino 酸配列を持つ、成長ホルモン放出ホルモン類似体の少なくとも 1 つの新規ペプチドまたはその薬学的に許容される塩および少なくとも 1 つの担体および / または賦形剤を含む医薬組成物にも関する。

【 0 0 1 1 】

新規ペプチドは、 h G H - R H 欠損に関連する障害の予防および治療に有用である。

【 0 0 1 2 】

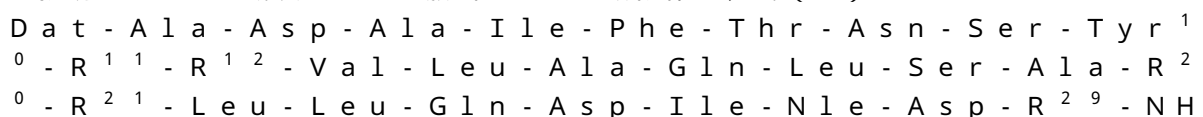
本発明はさらに、治療が必要な患者に治療有効量のペプチド - 式 (I) (式中、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{20} 、 R^{21} および R^{29} は、上で定義したとおりである) の h G H - R H 類似体を投与することを含む、ヒト成長ホルモン欠損関連障害を治療する方法を提供する。

40

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

新規ペプチド - 成長ホルモン放出ホルモン類似体は、式 (I) :



2 (I)

(式中 :

50

R^{11} は、hArg、GabまたはGapであり；
 R^{12} は、hArg、Orn、GabまたはGapであり；
 R^{20} は、hArg、GabまたはGapであり；
 R^{21} は、hArg、Orn、GabまたはGapであり；
 R^{29} は、D-Arg、hArg、GabまたはGapである。)

のアミノ酸配列を持つ。

【0014】

本発明の好ましいペプチドは：

(1) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂；

【0015】

(2) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Orn-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg²⁰-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-hArg²⁹-NH₂；

【0016】

(3) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂；

【0017】

(4) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gab-Gab-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gab-NH₂；

【0018】

(5) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gab-hArg-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-D-Arg-NH₂；

【0019】

(6) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-hArg-Gab-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-hArg-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-D-Arg-NH₂；

【0020】

(7) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Gap-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂；または

【0021】

(8) Dat-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr¹⁰-Gap-Gap-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-hArg-Gap-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-Asp-Gap-NH₂；

を含む。

【0022】

生物活性および消化酵素作用に対する耐性に関して特に好ましいペプチドは：

10

20

30

40

50

D a t - A l a - A s p - A l a - I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T y r ¹
⁰ - h A r g - h A r g - V a l - L e u - A l a - G l n - L e u - S e r - A l a -
h A r g ^{2 0} - h A r g - L e u - L e u - G l n - A s p - I l e - N l e - A s p -
h A r g ^{2 9} - N H ₂、および

D a t - A l a - A s p - A l a - I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T y r
^{1 0} - h A r g - O r n - V a l - L e u - A l a - G l n - L e u - S e r - A l a -
h A r g ^{2 0} - O r n - L e u - L e u - G l n - A s p - I l e - N l e - A s p - h
A r g ^{2 9} - N H ₂

である。

【 0 0 2 3 】

10

新規ペプチドは、ヒト成長ホルモン放出ホルモンの作用に関連する障害の予防および治療に有用であり、したがってそれらは小児低身長症、高齢関連障害の治療に、除脂肪体重ならびに骨塩含有量の増加に、創傷治癒に、皮膚火傷および骨折の治療に、慢性疾患関連脱力感における非ステロイド性タンパク同化剤として、そして診断にも使用できる。

【 0 0 2 4 】

本発明の方法により、ヒト成長ホルモン放出ホルモンの作用に関連する障害の治療において、式(I)のアミノ酸配列を持つ h G H - R H のペプチド - 類似体の治療有効量が、そのような治療を必要とする患者に投与される。

【 0 0 2 5 】

投薬レベルおよび投与計画は、特定の疾患、患者の年齢、体重および症状によって変わり、ヒト成長ホルモン放出ホルモン欠損の治療のための既知の治療的および予防的方法に基づいて、専門家が決定できる。この種の疾患の治療において、h G H - R H 類似体の適切な投薬単位は通例、投薬 1 回につき体重 1 キログラムあたり 0 . 0 1 ~ 2 μ g である。適切な一日用量は、デポー形またはインプラントなどの制御放出形態を除いて、1 日につき 1 または 2、3 の投与単位で患者に投与できる。制御放出形態は、1 5 日または 3 0 日おきに 1 回、あるいは 3 ヶ月おきに 1 回投与される。

20

【 0 0 2 6 】

本発明の新規ペプチドは通常、患者に適切な医薬製剤にて、静脈内、皮下、筋肉内、経口、経鼻または肺吸入などの許容される経路によって投与される。

【 0 0 2 7 】

30

新規ペプチドは、単独でまたは、場合により、相互の作用が悪い方向に阻害されないという条件で、ヒト成長ホルモン放出ホルモン欠損に関連する障害の治療に使用される他の治療剤と併用して投与することができる。そのような化合物は、同時に単一の製剤または別個の製剤として、または連続的に、専門家が決定した順序および間隔で投与できる。医療専門家には、選択すべき薬剤および組合せがわかるであろう。

【 0 0 2 8 】

本発明の医薬製剤は、式 I のアミノ酸配列を持つペプチド - h G H - R H 類似体である、少なくとも 1 つの活性物質またはその薬学的に許容される塩、および少なくとも 1 つの担体および / または賦形剤を含む。

【 0 0 2 9 】

40

本発明の医薬製剤は、たとえば [(非特許文献 6)] からなどの、当業者に周知の各種の医薬形態で調製できる。

【非特許文献 6】Remminton's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, 1990

【 0 0 3 0 】

注射および輸液に適切な医薬製剤は、滅菌水性、水性 - 有機および非水性の溶液、懸濁液、溶液調製用の乾燥物質および錠剤、およびインプラントを含む。担体は、液相中での活性成分を均等に分布させるために懸濁液の調製に使用され、それらはポリソルベート、レシチン、P E G - ポリプロピレングリコールコポリマー、ホスホラン、ポリホスホラン

50

およびカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゴムまたはゼラチンなどの水溶性ポリマーのクエン酸塩などの、ペプチド化剤を含む。注射用製剤は、pH調節剤、緩衝液、トニックおよび保存料などの、薬学的に許容される担体または賦形剤を含有してもよい。乾燥物質は、適切な溶媒を用いた希釈による、溶液または即席懸濁液の製剤に使用される。

【0031】

患者の便宜上、および物質放出の適切な特性を達成するために、ペプチド誘導体は、活性物質を含む、結晶性ポリマーマイクロカプセルなどの、制御放出長期活性注射用製剤として好都合に投与される。時間放出製剤の別の例は、液体組成物を形成するための、水混和性溶媒への生分解性ポリマーおよび本発明のペプチドの溶解により、調合されたポリマーベースのインプラントである。注射するときに、ポリマーはデポーを形成し、それから活性物質がゆっくりと放出される。

10

【0032】

経口経路による投与に適した医薬製剤は、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、水和ケイ酸マグネシウム、ステアリル酸、ステアリル酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、またはゴムなどの薬学的に許容される固体担体を含有する、錠剤、丸薬、粉末、顆粒、ペレットまたはカプセルを含む。錠剤または顆粒は、好ましい時間放出を行う投薬単位を実現するために、コーティングまたは別の処理をしてもよい。そのような保護層またはコーティングの形成のために、ポリマー酸およびポリマー酸とシェラック、セチルアルコールまたは酢酸セルロースなどの他の物質との混合物を含む、多数の各種物質が使用できる。

20

【0033】

ペプチドを活性成分として含む医薬製剤は、吸入用のエアゾールまたは粉末としての投与に適した形で存在する。通例のエアゾール製剤は、活性成分の水溶液に加えて、緩衝液、等張性物質、保存料、および場合により、投与用噴霧器または滴下器を利用して活性成分の投与を可能にする他の賦形剤を含有することができる。

【0034】

本発明の新規ペプチドは、古典的な溶液合成または固相合成などの、既知の化学合成方法の1つによって製造できる。

【0035】

溶液合成方法において、保護された側鎖（反応性側鎖が存在する場合）またはペプチド断片を備えたアミノ酸の適切に保護される末端N α -アミノ誘導体は、アミノ酸またはペプチド断片の適切に保護されたカルボキシル誘導体によって縮合される。 α -アミノ官能基は一般に、酸不安定性tert-ブトキシカルボニル基(Boc)、ベンジルオキシカルボニル基(Z, CBz)または置換類似体などのウレタン形で、または塩基性条件下で安定である、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)保護基の形で保護される。カルボキシル官能基はたとえば、求核塩基の存在下で不安定であるメチルエステル、酸性条件下で不安定であるtert-ブチルエステルまたは水素分解条件下で不安定であるベンジルエステルとして保護することができる。保護構造におけるカルボキシル基は、アジド法、混合無水物法、活性化エステル法、ホスホニウムまたはウロニウム塩法によって、またはカルボジイミド法によって、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールまたは3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジンなどの、ラセミ化を引き起こさずに反応を触媒する化合物を用いて、活性化される。縮合の方法、およびペプチド化学作用で一般に使用される保護基は、[(非特許文献7)]および[(非特許文献8)]で概説されている。

30

40

【非特許文献7】Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, E. Gross, J. Meienhofer, Eds. (Academic Press, New York, 1981)

【非特許文献8】Protective Groups in Organic Syn

50

thesis, Second Edition (Wiley, New York, 1991)

【0036】

Merrifield [(非特許文献9)] 固相ペプチド合成 (SPPS) 法において、第一のアミノ酸が結合する官能基を含有する、反応溶媒ポリマー支持体中の不溶物が使用される。ポリマーマトリクスは、恒久性のC末端保護基として作用する。合成は、第一のN α -保護アミノ酸のリンカー官能基への結合で開始する。アミノ官能基の脱保護の後、別の活性化保護アミノ酸が付加される。鎖伸長は、連続脱保護およびカップリングステップによって実施される。最後にN末端遊離ペプチドは、付随する側鎖官能基の脱保護とともに、樹脂から分離する。不溶性支持体はペプチド溶液から容易に濾過される。支持体相として適したポリマーは、たとえばセルロース、ポリビニルアルコール、ポリメタクリレート、クロロメチル化ジビニルベンゼン-ポリスチレンコポリマー、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂 (MBHA樹脂)、ベンズヒドリルアミン樹脂 (BHA) などである。ポリマー支持体上でのペプチドの合成は、使用されるアミノ酸誘導体を溶解し、反応条件下で中性である溶媒中で実施される。好ましいのは、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、N-メチル-2-ピロリドン、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、およびその混合物などの、さらに良好な膨潤特性を持つ溶媒である。アミノ酸がポリマー支持体から分離した後、たとえば高性能液体クロマトグラフィーを用いて精製される。

【非特許文献9】J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149)

【0037】

アミノ酸側鎖中にグアニジン基を含む、本発明の新規ペプチド-GH-RH類似体は好ましくは、リジン、2,4-ジアミノ酪酸または2,3-ジアミノプロピオン酸の適切な誘導体をポリマー支持体に結合したペプチド鎖中の適切な位置に導入し、側鎖アミノ基を脱保護し、そして遊離アミノ基をグアニジン化剤と反応させ、残りすべてのt-ブチルオキシカルボニル保護基を除去し、支持体から合成ペプチドを分離させ、次いで精製し、場合により薬学的に許容される塩に該ペプチドを変換することによって、固相合成法を用いて製造される。

【0038】

グアニジン化反応は、4-(ジメチルアミノ)ピリジンなどの反応プロモータの存在下で、N,N'-ビス(t-ブチルオキシカルボニル)-S-メチルイソチオ尿素などの過剰量のグアニジン化剤を使用して実施される。

【0039】

合成ペプチドは、医薬用途に適した高度の純度を達成するために、好ましくは高性能液体クロマトグラフィー法によって精製される。

【0040】

新規ペプチドは、各種の無機および有機酸および塩基の薬学的に許容される塩の形で、反応混合物から分離される。新規ペプチドは、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸とともに、または酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、フマル酸、マロン酸、スクシン酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、リンゴ酸、シュウ酸、桂皮酸、マンデル酸、安息香酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、および他の酸などの有機酸とともに、薬学的に許容される塩を形成する。

【0041】

塩は、ペプチドのカルボキシルグルーピングを、トリメチルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、ピペリジン、コリンなどの有機塩基と同様に、アルカリ金属、アルカリ金属の水酸化物およびアルカノアートと反応させることによって製造できる。

【0042】

塩は、塩が不溶である溶媒中または媒体中で、遊離塩基または酸の形の物質を1当量以上の適切な塩基または酸それぞれに反応させることにより、既知の方法によって製造できる。

【0043】

hGH-RHの新規ペプチド-類似体の酢酸塩は、本発明の好ましい実施形態である。

【0044】

生物活性の決定

本発明の新規ペプチドの生物活性を試験するために、ラットにおける成長ホルモンおよび他の下垂体ホルモンの血漿レベルに対するそれらの影響を調査し、対照物質としてのhGH-RH(1-29)NH₂の影響と比較した。

【0045】

調査した物質は：Sigma Chemical Co.より購入したhGH-RH(1-29)NH₂および本発明のプロセスにより合成したhGH-RHのペプチド-類似体であった。

10

【0046】

オスのウィスターラット(240~260g)を明期14時間、暗期10時間の制御光スケジュールで収容し、ラットペレットおよび水を無制限に与えた。動物を無作為に実験グループに割り当て、生理的食塩水(0.9%NaCl; 0.3ml)、体重1kgあたり50または150μgの用量のhGH-RH(1-29)NH₂、および体重1kgあたり1または3μgの用量の本発明のペプチドを与えた。ラットには、生理的食塩水0.3mlに溶解させた対照ペプチドまたは試験を行った各新規類似体の皮下(sc.)注射を1回行った。

【0047】

実験日にラットは、ケタミン(120mg/kg)の腹腔内注射によって麻酔をかけ、血液採取のために頸静脈に慢性的にカニューレ挿入した。30分後、試験物質をsc.注射した。ラットの対照グループには、生理的食塩水のみを注射した。血液(約0.6ml)を頸静脈から、試験物質のsc.投与の1分(サンプル「0」)前、15および30分後に採取した。各サンプル除去時に、同量のヘパリン処理生理的食塩水(10UI/ml)で置換した。実験の終了時に、ケタミンの麻酔過剰量によって動物を殺処分した。血液サンプルを遠心分離にかけ、血漿サンプル(約0.3ml)を分離し、RIA法によってアッセイするまで-20℃にて保管した。

20

【0048】

成長ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、および甲状腺刺激ホルモン(GH、PRL、LH、FSHおよびTSH)の血漿濃度は、Biotrak(Amersham Life Science、英国)を用いて、血漿サンプルの0.05ml分割量で決定した。ラットGH、PRL、LH、FSHおよびTSHの感度はそれぞれ0.16、0.08、0.08、0.09および0.05ng/管であった。

30

【0049】

結果の統計分析は、Statsoft Statistica PL for Windowsを用いて実施した。最初にデータの全グループを、コルモゴロフ-スミルノフ検定およびシャピロ-ウィルク検定により、正規性について試験した。グループ間の統計差は、一元配置ANOVAによって決定した。ダンカンの多重範囲検定を用いて、事後比較を行った。しかし分散が著しく不均一であることが見出された場合、グループ間の比較は、順位変動のノンパラメトリック性クラスカル-ワリス解析によって実施した。

40

【0050】

ホルモンレベルにおける個体差は、ホルモンレベルの補正によって除去し、各ラットについてホルモンの純濃度を計算した。各ホルモンのこの純濃度は、化合物注射15分後の濃度と化合物注射前のホルモンの濃度差(Δ15-0)、および化合物注射後15分ならびに30分のホルモンの濃度差(Δ15-30)として計算した。

【0051】

GH放出に対する化合物の影響は、体重1kgあたり50.0μgおよび150.0μgのhGH-RH-(1-29)NH₂の、類似体については体重1kgあたり1.0μgおよび3.0μgの注射後に、GHの平均純濃度(Δ15-0)の比較によって決定した。選択化合物(1)の結果を表1および2に示す。処置グループ間の有意差は、クラス

50

カル - ワリス検定の $Lilietor$ の修正によって決定した。

【 0 0 5 2 】

【表 1】

オスラットにおける hGH-RH ペプチドおよびその類似体の皮下投与の GH 放出への効果

化合物	用量 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	ラットの数	注射後の各種時間における血漿 GH [ng/kg]		
			0 分	15 分	30 分
生理的食塩水	50	11	21.4 $\pm$ 2.9	19.8 $\pm$ 3.9	17.8 $\pm$ 2.7
hGH-RH-(1-29)-NH ₂	50	11	24.5 $\pm$ 2.7	79.1 $\pm$ 7.9*	39.0 $\pm$ 5.9*
	150	11	27.1 $\pm$ 3.2	163 $\pm$ 18**	103 $\pm$ 15**
化合物 1	1	9	23.1 $\pm$ 2.0	99.1 $\pm$ 16**	42.5 $\pm$ 9.2*
	3	9	28.3 $\pm$ 4.1	130 $\pm$ 16**	58.4 $\pm$ 8.9**

10

【 0 0 5 3 】

結果は、平均 $\pm$ 標準誤差として表す

* $p < 0.01$ 対生理的食塩水対照

** $p < 0.001$ 対生理的食塩水対照

【 0 0 5 4 】

【表 2】

hGH-RH 類似体皮下投与後の GH 濃度の変化

化合物	用量 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	ラットの数	注射後の各種時間における GH 純濃度 [ng/kg]	
			$\Delta(15-0)\#$	$\Delta(15-30)\#$
生理的食塩水	50	11	-1.59 $\pm$ 1.5	1.97 $\pm$ 1.5
hGH-RH-(1-29)-NH ₂	50	11	54.6 $\pm$ 7.9**	40.1 $\pm$ 6.7**
	150	11	135 $\pm$ 16.9**	59.9 $\pm$ 16.6**
化合物 1	1	9	75.9 $\pm$ 16.0**	56.5 $\pm$ 14.7**
	3	9	102 $\pm$ 12.6**	72.0 $\pm$ 12.6**

30

40

【 0 0 5 5 】

結果は、平均 DGH [ng/ml] として表す。

血漿 GH の変化 (ΔGH) は、GH 純濃度として表し、各ラットについて計算した。

$\Delta(15-0)$ は、試験化合物の投与 15 分後の GH 濃度と、化合物注射前 (「0 分」) の GH 濃度との差として計算した。 $\Delta(15-30)$ は、試験化合物の投与後 15 分の GH 濃度と化合物注射 30 分後の GH 濃度との差として計算した。

** $p < 0.001$ 対生理的食塩水対照

【 0 0 5 6 】

得られた結果は、試験 hGH-RH 類似体が生理的食塩水対照と比較して、ラットにお

50

けるGH放出に刺激効果を見せることを示している。最強の刺激効果は、(1)と呼ばれる化合物によって示された。最大刺激効果は、その投与の瞬間から15分後に見られた。この効果は投与後30分間も見られた。GH純濃度に対する化合物1の影響は、50倍の用量のhGH-RH-(1-29)NH₂の注射15分後におけるこのホルモンの純濃度に匹敵した。化合物1の相対有効性は、1.0ならびに3.0μgの用量、および体重1キログラム当たりhGH-RH-(1-29)NH₂の50μgならびに150μgの用量に基づいていた。この新規類似体の相対有効性は、注射15分後のhGH-RH-(1-29)NH₂と比較して、それぞれ70および38倍高かった。

【0057】

本研究の間に、本発明の新規化合物が選択的に作用し、それらがラットの末梢血中で他の下垂体ホルモン-黄体刺激ホルモン、ルトロピン、フォルトロピンおよび甲状腺刺激ホルモンの血中濃度レベルに影響を及ぼさないことも判断された。

【0058】

調製した化合物も、トリプシン消化試験において酵素耐性について試験した。

【0059】

ペプチドサンプル(1.2mg)をpH8.5の緩衝液(2.9ml; 0.05M酢酸アンモニウム溶液)中に溶解させ、37℃で20分間インキュベートした。次にトリプシン溶液を添加した(100μl; 0.02mg/ml; Serva, 36U/mg)。生じた溶液を37℃にて60分間インキュベートした。分割量(500μl)を取出し、0.5M酢酸(1ml)で希釈し、次に凍結乾燥させた。Europher 100 C18(4.6×250mm、5ミクロン)を用いて、得られた物質をHPLCによって分析した。以下の溶媒系を使用した。A, 0.1%TFA水溶液; B, アセトニトリルのAによる80%溶液; 25~75%Bの線形勾配による; 流量1ml/分; 検出は220ナノメートルで実施した。ペプチド消化の結果を表3にまとめる。

【0060】

【表3】

RH-GH類似体のトリプシン消化

化合物番号	消化時間[分]	不変化合物%
1	30	>99
	60	>99
2	30	>99
	60	>99
3	30	86
	60	72
4	30	82
	60	67
5	30	80
	60	51
6	30	85
	60	73
7	30	75
	60	68
8	30	>99
	60	>99
対照*	30	0
	60	0

【0061】

* Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Ty

r - A r g - L y s - V a l - L e u - G l y - G l n - L e u - S e r - A l a - A r g - L y s - L e u - L e u - G l n - A s p - I l e - N l e - S e r - A r g - N H₂ (h G H - R H - (1 - 2 9) N H₂)

【 0 0 6 2 】

表 3 に示す結果は、試験した h G H - R H の新規類似体すべてが、対照標準、h G H - R H - (1 - 2 9) N H₂ よりもトリプシン消化に対してはるかに高い耐性を持つことを示している。それゆえ 3 0 分後、対照ペプチドの完全な消化を引き起こす条件下で、他のペプチドは不変のままであるか [ペプチド (1) 、 (2) および (8)] 、あるいは限定された加水分解のみを受ける。

【 0 0 6 3 】

本発明の新規ペプチドは、高い成長ホルモン放出活性を特徴とし、それらは選択的に作用して、他の下垂体ホルモン - 黄体刺激ホルモン、ルトロピン、フォリトロピンおよび甲状腺刺激ホルモンのレベルに影響を及ぼさない。特に好ましいペプチドは、アミノ酸配列 D a t - A l a - A s p - A l a - I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T y r - h A r g - h A r g - V a l - L e u - A l a - G l n - L e u - S e r - A l a - h A r g - h A r g - L e u - L e u - G l n - A s p - I l e - N l e - A s p - h A r g - N H₂ を持ち、成長ホルモン放出に対して対照ペプチド h G H - R H - (1 - 2 9) N H₂ よりも何倍もの強い効果を示し、それゆえ 1 5 分後に最大刺激効果を可能にする。同時に、本発明の新規化合物は、消化酵素作用に対して h G H - R H の既知の合成類似体よりもはるかに高い耐性を示し、そのことは新規化合物を、成長ホルモン不全関連障害の治療および予防に使用される薬学的薬剤の調製における利用で特に有用にする。

【 0 0 6 4 】

定義および表記

以下の定義および表記は、明細書および請求項の両方を含め本文書を通じて使用される用語のためのものである。

【 0 0 6 5 】

定義

アミノ酸の命名法および省略形は、一般に受入れられている I U P A C - I U B 規則、たとえば [(非特許文献 1 0)] および [(非特許文献 1 1)] にしたがう。本明細書で使用される 3 文字の省略形は、以下の意味を持つ：

A l a = アラニン

A r g = アルギニン

h A r g = ホモアルギニン (6 - グアニジン - 2 - カプロン酸)

A s n = アスパラギン

A s p = アスパラギン酸

D a t = デスアミノチロシン、3 - (4 ' - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸

G l n = グルタミン

G a b = 4 - グアニジン - 2 - アミノ酪酸

G a p = 3 - グアニジン - 2 - アミノプロピオン酸

I l e = イソロイシン

L e u = ロイシン

L y s = リジン

N l e = ノルロイシン

O r n = オルニチン

P h e = フェニルアラニン

S e r = セリン

T h r = トレオニン

T y r = チロシン

V a l = バリン

【 0 0 6 6 】

上の説明で引用したすべてのペプチド配列は、実施例および添付請求項において、N末端アミノ基が開始し、C末端アミノ基が終了する標準表記で記載されている。アミノ酸は別途明示しない限り、L型配置である。

【非特許文献10】R. M. Schultz, M. N. Liebman Proteins: Composition and Structure, Chapter 2, in: Textbook of Biochemistry, 3rd Edition, T. M. Devlin, Ed.; Wiley-Liss, New York, 1992

【非特許文献11】European J. Biochem. 138 (1984), 9-37

【0067】

10

ここで本発明を、以下の詳細な、制限しない実施例を参照して説明する。

実施例

【0068】

ペプチド合成の一般的方法

A. ペプチド鎖形成

α -アミノ官能基を保護するために、t-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基を使用した；側鎖は以下の基によって保護された：Asp-シクロヘキシルにより；Orn-ベンジルオキシカルボニル；SerおよびThr-ベンジル；Tyr-2-プロモベンジルオキシカルボニル基。

【0069】

20

hArg残基を含有する類似体を調製するために、Boc-Lys (Fmoc) 誘導体の形のリジン残基をペプチド鎖の適切な位置に導入した。

Gabおよび/またはGap残基を含有する類似体を調製するために、それぞれBoc-Dab (Fmoc) およびBoc-Dap (Fmoc) 誘導体の形の、2, 4-ジアミノ酪酸残基および2, 3-ジアミノプロピオン酸残基を適切な位置に挿入した。

【0070】

Orn残基を含有する類似体を調製するために、Boc-Orn (Z) 誘導体を合成中にペプチド鎖の適切な位置に導入した。

【0071】

MBHA樹脂 (4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、Bachem CaliforniaまたはNovabiochem、約0.5 meq./g) を、ジクロロメタン (DCM) 中で30分間膨潤させた後、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) の5% DCM溶液で処理し (1×1分、1×20分)、DCMで洗浄した (6×1分)。

30

【0072】

保護ペプチド樹脂は、以下のプロトコルにしたがって、各合成ステップの標準手順を用いて合成した：

(a) トリフルオロ酢酸 (TFA) の55% DCM溶液による、Boc基の除去 (1×1分、1×20分)；

(b) DCM洗浄 (3×1分)；

(c) 30% 1, 4-ジオキサン / DCM溶液による洗浄 (2×1分)；

40

(d) DCM洗浄 (3×1分)；

(e) 5% DIEA / DCMによる中和 (1×1分、1×5分)；

(f) DCM洗浄 (6×1分)；

(g) DCM中1.2モルのN, N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC)、保持時間：2時間を用いた、カルボジイミド法によるBoc-アミノ酸 (1.2モル) のカップリング。Boc-GlnおよびBoc-Asnの場合、1.2モルのN-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) を反応混合物に添加した；

(h) DCM洗浄 (6×1分)。

【0073】

B. グアニジン基の導入

50

Lys 残基から Fmoc 基を除去するために、保護ペプチジル樹脂を 50% ピペリジン / DMF 溶液に暴露し (1 × 10 分、1 × 2 時間)、次に樹脂をジメチルホルムアミド (DMF) (3 × 1 分)、50% DMF / DCM 溶液 (3 × 2 分)、50% メタノール / DCM 溶液、および DCM (3 × 2 分) で洗浄した。次にペプチジル樹脂を N, N' - ビス (tert - ブチルオキシカルボニル) - S - メチルイソチオ尿素 (5 倍モル過剰) と、DMF 中の 4 - (ジメチルアミノ) ピリジン (70 mg) の存在下で 4 時間反応させた。得られたペプチジル樹脂を DMF (3 × 1 分)、および DCM (3 × 1 分) で洗浄し、Boc 基を 55% TFA / DCM 溶液 (1 × 1 分、1 × 20 分、1 × 40 分) によって除去し、DMC 洗浄 (3 × 1 分)、50% DMF / DCM 洗浄 (2 × 1 分) および DCM 洗浄 (2 × 1 分) を続けた。

10

【0074】

C. 樹脂からのペプチドの分離

ペプチジル樹脂をアニソールの存在下で、液体フッ化水素 (HF) に暴露した。反応は 0 にて 1 時間実施した。その後、HF を減圧下で除去し、残留物を冷ジエチルエーテルで洗浄し、50% 酢酸溶液で抽出して、その後、凍結乾燥させた。

【0075】

ペプチドの精製

粗ペプチドは、Vertex カラム、Nucleosil - 300 C18 (8 × 200 mm、5 ミクロン) を備えた Knauer システムを使用して、高性能液体クロマトグラフィー法によって精製した。以下の溶媒系を使用した: A, TFA 0.1% 水溶液; B, MeCN の A による 80% 溶液。溶出は勾配モード 20 ~ 55% で 30 分間、次に定組成 55% B で 30 分間、流速 2 ml / 分で実施した。画分は Vertex カラム、Nucleosil 100 C18 (4 × 250 mm、5 ミクロン)、勾配モード 25 ~ 70% で 30 分間; 流速: 1 ml / 分での溶出を用いて分析した。検出は 220 nm で実施した。均質画分 (クロマトグラムで単一ピーク) をプールし、水で希釈して、凍結乾燥させ、クロマトグラフィー的に均質な生成物を得た。ペプチドの構造を決定した。ペプチドの構造は、Finnigan MAT 95S (プレーメン、ドイツ) 分光計での ESI - MS マススペクトル測定によって決定した。

20

【実施例 1】

【0076】

Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr - hArg - hArg - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - hArg - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - hArg - NH₂ [化合物 (1)] の製造

30

【0077】

MBHA 樹脂 (4 - メチルベンズヒドリルアミン樹脂、Novabiochem、0.49 meq. / g) 3.1 g は、ペプチド合成の上述の一般的方法 (A 節) による適切な保護アミノ酸誘導体の結合の後、十分に保護されたペプチジル樹脂を与えた: Dat - Ala - Asp (OCHex) - Ala - Ile - Phe - Thr (OBzl) - Asn - Ser (OBzl) - Tyr (2 - Br - Z) - Lys (Fmoc) - Lys (Fmoc) - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - Lys (Fmoc) - Lys (Fmoc) - Leu - Leu - Gln - Asp (OCHex) - Ile - Nle - Asp (OCHex) - Lys (Fmoc) - 樹脂。

40

【0078】

ペプチド合成の上述の一般的方法 (B 節) による続いての手順は、すべての保護基の除去および完全なグアニジン化の後、すべての Boc 基の脱保護が続き、ペプチジル樹脂 Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr - hArg - hArg - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - hArg - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - hArg - NH₂ - 樹脂 9.53 g を与えた。

50

【 0 0 7 9 】

ペプチド合成の上述の一般的方法（C節）にしたがって、本樹脂をアニソール（15 ml）の存在下で液体フッ化水素（200 ml HF）の作用に暴露させ、これによりHPLC決定に基づき、純度50%の粗ペプチド4.5が与えられた。

ペプチド合成の上述の一般的方法（上のD節）にしたがって、粗ペプチド（20 mg サンプル）を高性能液体クロマトグラフィー法によって精製した。これは純度92.3%（HPLCに基づく）の表題ペプチド4.3 mgを与えた；マスマスペクトル： $C_{157}H_{258}N_{47}O_{43}$ の場合、 $M = 3492.0$ ；

登録された m/z ：

$[M + 2H]^+ : \text{理論値 } 1747.0、\text{測定値 } 1747.6；$

$[M + 3H]^+ : \text{理論値 } 1165.0、\text{測定値 } 1165.4；$

$[M + 4H]^+ : \text{理論値 } 874.0、\text{測定値 } 874.0；$

$[M + 5H]^+ : \text{理論値 } 699.4、\text{測定値 } 699.4。$

10

【実施例2】

【 0 0 8 0 】

化合物（2）-（8）の製造

上述の詳細な説明に十分に類似した手順において適切に保護されたアミノ酸を用いて、以下のペプチドを合成した：

【 0 0 8 1 】

（2） Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - Orn - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - hArg²⁰ - Orn - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - hArg²⁹ - NH₂；MS： $C_{153}H_{251}N_{43}O_{43}$ の場合、 $M = 3380.9$ ；登録された m/z ：

20

$[M + 3H]^+ : \text{理論値 } 1128.0、\text{測定値 } 1127.9；$

$[M + 4H]^+ : \text{理論値 } 846.2、\text{測定値 } 846.2；$

$[M + 5H]^+ : \text{理論値 } 677.2、\text{測定値 } 676.9。$

【 0 0 8 2 】

（3） Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gab - Gab - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - Gab - Gab - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gab - NH₂；MS： $C_{147}H_{238}N_{47}O_{43}$ の場合、 $M = 3351.8$ ；登録された m/z ：

30

$[M + 3H]^+ : \text{理論値 } 1118.3、\text{測定値 } 1118.6；$

$[M + 4H]^+ : \text{理論値 } 839.0、\text{測定値 } 839.2；$

$[M + 5H]^+ : \text{理論値 } 671.4、\text{測定値 } 671.6。$

【 0 0 8 3 】

（4） Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - Gab - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - Gab - Gab - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gab - NH₂；MS： $C_{149}H_{242}N_{47}O_{43}$ の場合、 $M = 3379.8$ ；登録された m/z ：

40

$[M + 4H]^+ : \text{理論値 } 846.0、\text{測定値 } 846.3；$

$[M + 5H]^+ : \text{理論値 } 677.0、\text{測定値 } 677.2。$

【 0 0 8 4 】

（5） Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gab - hArg - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - hArg - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - D - Arg - NH₂；MS： $C_{154}H_{253}N_{47}O_{43}$ の場合、 $M = 3451.0$ ；登録された m/z ：

50

[M+3H]³⁺ : 理論値 1151.3、測定値 1152.0 ;
 [M+4H]⁴⁺ : 理論値 863.8、測定値 863.8 ;
 [M+5H]⁵⁺ : 理論値 691.2、測定値 691.6。

【0085】

(6) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - hArg - Gab - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - hArg - hArg - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - D - Arg - NH₂ ; MS : C₁₅₄H₂₅₃N₄₇O₄₃ の場合、M = 3451.0 ; 登録された m/z :

[M+3H]³⁺ : 理論値 1151.3、測定値 1151.4 ;
 [M+4H]⁴⁺ : 理論値 863.8、測定値 863.6 ;
 [M+5H]⁵⁺ : 理論値 691.2、測定値 691.3。

10

【0086】

(7) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gap - Gap - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - Gap - Gap - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gap - NH₂ ; MS : C₁₄₂H₂₂₉N₄₇O₄₃ の場合、M = 3282.7 ; 登録された m/z :

[M+3H]³⁺ : 理論値 1095.2、測定値 1095.3 ;
 [M+4H]⁴⁺ : 理論値 821.7、測定値 821.7 ;
 [M+5H]⁵⁺ : 理論値 657.5、測定値 657.8。

20

【0087】

(8) Dat - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr¹⁰ - Gap - Gap - Val - Leu - Ala - Gln - Leu - Ser - Ala - hArg - Gap - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Nle - Asp - Gap - NH₂ ; MS : C₁₄₅H₂₃₅N₄₇O₄₃ の場合、M = 3324.8 ; 登録された m/z :

[M+3H]³⁺ : 理論値 1109.3、測定値 1109.6 ;
 [M+4H]⁴⁺ : 理論値 832.2、測定値 832.2 ;
 [M+5H]⁵⁺ : 理論値 666.0、測定値 666.0。

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 5/02 (2006.01) A 6 1 P 5/02

(74)代理人 100070530

弁理士 畑 泰之

(72)発明者 イズデブスキイ, ジャン

ポーランド国 P L - 0 2 - 9 5 4 ワルシャワ ウリツァ クロロウエ マリシェンキ 3 1
 m 1 0 5

(72)発明者 クンシェ, ダヌータ

ポーランド国 P L - 0 4 - 4 9 5 ワルシャワ ウリツァ ジアリンシコフ 2

(72)発明者 オルロウスカ, アリーシャ

ポーランド国 P L - 0 4 - 3 0 2 ワルシャワ ウリツァ オソウスカ 1 0 / 1 2 m 2 5

(72)発明者 ウィトコフスカ, エヴァ

ポーランド国 P L - 0 1 - 9 1 3 ワルシャワ ウリツァ シェークスピラ 1 m 4 0

(72)発明者 セルジェフスキイ, ウィスロウ

ポーランド国 P L - 0 3 - 9 8 0 ワルシャワ ウリツァ S w パトリカ 2 m 1 5

(72)発明者 クトナー, アンドレイジ

ポーランド国 P L - 0 2 - 7 8 5 ワルシャワ ウリツァ スローイエッキエゴ 8 m 1 2

(72)発明者 バンコフスキイ, クリストフ

ポーランド国 P L - 0 1 - 9 2 2 ワルシャワ ウリツァ コンラダ 1 8 m 2 3

(72)発明者 フラキエウィッツ, エルツビエータ

ポーランド国 P L - 0 1 - 7 5 6 ワルシャワ ウリツァ ブラジニスカ 2 0 A m 6 8

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表平 1 0 - 5 1 2 8 8 1 (J P , A)

特開昭 6 1 - 2 1 0 0 9 9 (J P , A)

特開平 0 4 - 3 0 5 5 9 8 (J P , A)

特表平 0 5 - 5 0 7 9 3 9 (J P , A)

特表平 0 8 - 5 0 2 2 5 0 (J P , A)

特表平 1 1 - 5 0 3 4 5 4 (J P , A)

国際公開第 9 8 / 0 5 2 9 1 7 (W O , A 1)

国際公開第 9 9 / 0 4 6 2 8 3 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07K 14/00-14/825

C07K 1/00-1/36

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/

WPIDS/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed