

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4677095号
(P4677095)

(45) 発行日 平成23年4月27日(2011.4.27)

(24) 登録日 平成23年2月4日(2011.2.4)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	Z N A
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/12	(2006.01)	A 6 1 P 3/12	
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 13/02	(2006.01)	A 6 1 P 13/02	

請求項の数 8 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-531064 (P2000-531064)
(86) (22) 出願日	平成11年2月5日(1999.2.5)
(65) 公表番号	特表2002-509078 (P2002-509078A)
(43) 公表日	平成14年3月26日(2002.3.26)
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/002554
(87) 国際公開番号	W01999/040788
(87) 国際公開日	平成11年8月19日(1999.8.19)
審査請求日	平成17年12月7日(2005.12.7)
(31) 優先権主張番号	60/075, 122
(32) 優先日	平成10年2月13日(1998.2.13)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	598133654 アミリン・ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サンディエゴ, タウン センター ドライブ 9360 9360 Towne Centre Drive, San Diego, CA 92121 USA
-----------	---

(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(74) 代理人	100106231 弁理士 矢野 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エキセンジンおよびGLP-1の変力および利尿効果

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) エキセンジン-4 [配列番号 2], および

(b) GLP-1 よりなる群から選択される化合物を含む、個体における毒性血液量増加症に関連する容態または障害を治療、予防または緩和するための医薬組成物であって、ここに、該化合物は末梢投与に用いられ、

該容態または障害は、腎不全、うっ血性心不全、ネフローゼ症候群、肺水腫、全身性水腫、硬変、高血圧、妊娠前子癇症または子癇症のうちのいずれか 1 以上である該組成物。

【請求項 2】

該医薬が、個体における尿流量を増加させる請求項 1 記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

該医薬が、個体において、ナトリウム排出を増加させる、カリウム排出を減少させるか、または尿中カリウム排出を増加させない請求項 1 または 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

該医薬が、個体における心収縮性を増加させる請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

毒性血液量増加症に関連する該容態または障害の予防が、外科的処置前に該個体を治療することを含む請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

該外科的処置が、眼科外科的処置または神経外科的処置である請求項 5 記載の医薬組成

20

物。

【請求項 7】

該化合物が、皮下、頬側、鼻腔内、肺内、経口、静脈内、眼内、経腸または経皮投与に用いられる請求項 1 ~ 6 いずれか 1 記載の医薬組成物。

【請求項 8】

該 G L P - 1 が、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む請求項 1 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は有効量のグルカゴン様ペプチド - 1 [7 - 3 6] アミド (「 G L P - [7 - 3 6] N H ₂ 」 または単に 「 G L P - 1 」 と省略される) 、エキセンジン、またはエキセンジンもしくは G L P - 1 のアゴニストを投与することを含む尿流量を増加させる方法に関する。尿中ナトリウム排出を増加させ、尿中カリウム濃度を減少させる方法も開示する。該方法は、腎不全、うっ血性心不全、ネフローゼ症候群、硬変、肺水腫および高血圧のごとき毒性血液増加症に関連する容態または障害を治療するのに有用である。本発明の方法に使用するための医薬組成物も開示する。

10

本発明は、有効量のエキセンジン、G L P - 1、またはエキセンジンもしくは G L P - 1 のアゴニストを投与することを含む変力性反応を引起す方法にも関する。これらの方法は、うっ血性心不全のごとき、心収縮性の増加によって緩和し得る容態または障害を治療するのに有用である。

20

以下の説明は本発明に関連する情報を要約する。それは、本明細書で供されるいかなる情報も現在特許請求されている発明の先行技術であるという承認ではなく、特別にまたは暗に引用されたいずれの刊行物も本発明の先行技術であるという承認でもない。

【0002】

【従来の技術】

G L P - 1

グルカゴン様ペプチド - 1 [7 - 3 6] アミド (G L P - 1 [7 - 3 6] N H ₂ または G L P - 1 ともいう) はグルカゴン遺伝子の産物である。それは主に内臓から血漿中に分泌され、膵臓および胃腸機能に関連する種々の生物学的効果を生じる。親ペプチド (プログルカゴン (P G)) は、膵臓中のグルカゴン (P G [3 2 - 6 2]) および G L P - 1 [7 - 3 6] N H ₂ (P G [7 2 - 1 0 7]) および、G L P - 1 [7 - 3 7] N H ₂ (7 8 - 1 0 7 P G) が主要産物である腸の L 細胞中の G L P - 1 [7 - 3 7] (P G [7 8 - 1 0 8]) および G L P - 1 [7 - 3 6] N H ₂ (P G [7 8 - 1 0 7]) を含む起源の組織に依存する他のペプチド産物を産生する多数の切断サイトを有する。

30

【0003】

G L P - 1 [7 8 - 3 6] N H ₂ (プログルカゴン [7 8 - 1 0 7] または、本明細書で用いるごとく、普通は、単に 「 G L P - 1 」 としても知れている) は、インスリン変力性効果を有し、膵臓__細胞からのインスリン分泌を刺激する ; G L P - 1 は膵臓__細胞からのグルカゴン分泌を阻害もする [Orskov, et al., Diabetes, 42:658-61, 1993; D'Alessio, et al., J. Clin. Invest., 97:133-38, 1996]。G L P - 1 は胃を空にすることを阻害し [Williams B, et al., J. Clin Endocrinol Metab 81(1):327-32, 1996; Wettergren A, et al., Dig Dis Sci 38(4):665-73, 1993]、胃酸分泌を阻害する [Schjoldager BT, et al., Dig Dis Sci 34(5):703-8, 1989; O'Halloran DJ, et al., J Endocrinol 126(1):169-73, 1990; Wettergren A, et al., Dig Dis Sci 38(4):665-73, 1993] と報告されている。G L P - 1 の脳室内投与の利尿、抗口渴効果が報告されているが、この報告は G L P - 1 の末梢、腹膜組織内注射はこの効果を有しないと主張する [Tand-Christensen et al., Am. J. Physiol., 271:R848-56, 1996]。そのカルボキシ末端にさらなるグリシン残基を有する G L P - 1 [7 - 3 7] もヒトにおけるインスリン分泌を刺激する [Orskov, et al., Diabetes, 42:658-61, 1993]。G L P - 1 のインスリン変力性効果の要因であると信じられている輸送膜 G タンパク質アデニル酸シクラーゼ結合受容

40

50

体は、__ - 細胞株からクローン化されている [Thorens, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:8641-45, 1992]。

【 0 0 0 4 】

グルカゴンおよびグルカゴン様ペプチドが様々な心血管効果を有することは明らかである。グルカゴンは正の変力性および変時性効果を有し、正常の個体において動脈血圧をわずかに上昇させ、局所的血液循環に影響することが報告されている。G L P - 1 は収縮期および拡張期血圧の両方を適度に上昇させることが分っているが、G L P - 2 はそれらのパラメータに対して何の影響も有しない。頸静脈経由で投与された G L P - 1 は収縮期および拡張期血圧および心拍数の増加をもたらすことが報告されている [Reviewed in Barragan, J.M., et al., Regul. Peptides, 67:63-68, 1996]。

10

【 0 0 0 5 】

エキセンジン

エキセンジンは、アリゾナに内生するトカゲであるアメリカドクトカゲおよびメキシコドクトカゲの毒中に見出されるペプチドである。エキセンジン - 3 はヘロデルマ=ホリダム (Heloderma horridum) の毒中に存在し、エキセンジン - 4 はヘロデルマ=サスペクタム (Heloderma suspectum) の毒中に存在する [Eng, J., et al., J. Biol. Chem., 265:20259-62, 1990; Eng, J., et al., J. Biol. Chem., 267:7402-05, 1992]。該エキセンジンはグルカゴン様ペプチドファミリーのいくつかのメンバーに、G L P - 1 に対して最高相同性 5 3 % で類似するいくつかの配列を有する [Goke, et al., J. Biol. Chem., 268:19650-55, 1993]。

20

【 0 0 0 6 】

エキセンジン - 4 は、インスリン - 分泌__ T C 1 細胞上の G L P - 1 受容体にて、モルモット膵臓からの分散された腺房細胞にて、および胃壁細胞にて効力のあるアゴニストであり；該ペプチドは、単離した胃において、ソマトスタチン放出を刺激し、ガストリン放出を阻害する [Goke, et al., J. Biol. Chem., 268:19650-55, 1993; Schepp, et al., Eur. J. Pharmacol., 69:183-91, 1994; Eissele, et al., Life Sci., 55:629-34, 1994]。エキセンジン - 3 およびエキセンジン - 4 は、膵臓腺房細胞における c A M P 産生、およびそれからのアミラーゼ放出を刺激することにおいて、G L P - 1 アゴニストであることが分った [Malhotra, R., et al., Regulatory Peptides, 41:149-56, 1992; Raufman, et al., J. Biol. Chem. 267:21432-37, 1992; Singh, et al., Regul. Pept. 53:47-59, 1994]。糖尿病治療および高脂血症の予防にエキセンジン - 3 およびエキセンジン - 4 のインスリン変力性活性を使用することが提案されている [Eng, 米国特許第 5, 4 2 4, 2 8 6 号]。

30

【 0 0 0 7 】

エキセンジン [9 - 3 9]、カルボキシアミド化された分子、およびフラグメント 3 - 3 9 ないし 9 - 3 9 のごとき切り出されたエキセンジンペプチドは、G L P - 1 の効力がある選択性アゴニストであると報告されている [Goke, et al., J. Biol. Chem., 268:19650-55, 1993; Raufman, J.P., et al., J. Biol. Chem. 266:2897-902, 1991; Schepp, W., et al., Eur. J. Pharm. 269:183-91, 1994; Montrose-Rafizadeh, et al., Diabetes, 45(Suppl. 2):152A, 1996]。エキセンジン [9 - 3 9] は、in vivo で内因性 G L P - 1 をブロックし、低減されたインスリン分泌をもたらす [Wang et al., J. Clin. Invest., 95:417-21, 1995; D'Alessio, et al., J. Clin. Invest., 97:133-38, 1996]。G L P - 1 のインスリン変力性効果の明らかな要因である受容体はラットの膵島細胞からクローン化されている [Thorens, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8641-8645, 1992]。エキセンジンおよびエキセンジン [9 - 3 9] は該クローン化された G L P - 1 受容体に結合する (ラット膵臓__細胞 G L P - 1 受容体 : Fehmann HC, et al., Peptides 15(3) :453-6, 1994; ヒト G L P - 1 受容体 : Thorens B, et al., Diabetes 42(11):1678-82, 1993)。該クローン化された G L P - 1 受容体で感染された細胞において、エキセンジン - 4 はアゴニストであり、すなわち、それは c A M P を増加させ、一方、エキセンジン [9 - 3 9] はアンタゴニストであり、すなわち、それはエキセンジン - 4 および G L P -

40

50

1の刺激性作用をブロックする[同上]。

【0008】

エキセジン[9-39]は完全長エキセジンのアンタゴニストとしても作用し、エキセジン-3およびエキセジン-4によって膵臓腺房細胞の刺激を阻害する[Raufman, et al., J. Biol. Chem., 266:2897-902, 1991; Raufman, et al., J. Biol. Chem., 266:21432-37, 1992]。エキセジン[9-39]は、エキセジン-4による血漿中インスリンレベルの刺激を阻害し、エキセジン-4およびGLP-1のソマトスタチン放出刺激およびガストリン放出阻害の活性を阻害する[Kolligs, F., et al., Diabetes, 44:16-19, 1995; Eissele, et al., Life Sciences, 55:629-34, 1994]。頸静脈経由で投与されたエキセジン-4は、収縮期、拡張期および平均動脈血圧および心拍数の増加を引起すことが報告されている[Barrangan, et al., Regul. Pep. 67:63-68, 1996]。

10

【0009】

近年、エキセジンが胃を空にすることを阻害することが分った[1996年8月8日に出願され、本発明と同一所有権者を享受し、出典明示して本明細書に含まれる米国特許出願第08/694,954号]。エキセジン[9-39]は食物摂取の制御における中央GLP-1の生理学的関連性を調査するのに用いられている[Turton, M. D. et al., Nature, 379:69-72, 1996]。脳室内(ICV)注射によって投与されたGLP-1は、ラットにおいて、食物摂取を阻害した。脳室内注射によって与えられたGLP-1の飽食誘発効果はエキセジン[9-39]のICV注射によって阻害されたと報告されている[Turton, 上記]。しかしながら、GLP-1は末梢注射によって投与された場合、マウスにおいて食物摂取を阻害しないと報告されている[Turton, M.D., Nature 379:69-72, 1996; Bhavsar, S.P., Soc. Neurosci. Abstr. 21:460(188.8), 1995]。近年、エキセジンおよびエキセジンアゴニストの投与も食物摂取を低減させることが明らかとなった[1997年1月7日に出願され、本発明と同一所有権者を享受し、出典明示して本明細書に含まれる米国仮出願第60/034,905号]。

20

【0010】

利尿剤

尿流量を増加させる剤、すなわち利尿剤は毒性血液増加状態に関連する容態または障害を治療するのに有用である。そのような容態または障害は、腎不全、うっ血性心不全、ネフローゼ症候群、硬変、肺水腫、および高血圧を含む。利尿剤は前子癇症および子癇症のごとき、妊娠における容態を治療するのに用いられる。利尿剤のさらなる使用は、眼科外科および神経外科のごときいくらかの外科的処置前に体積を減少させるためのそれらの使用を含む。

30

チアジド、係蹄利尿剤、カルボニックアンヒドラーゼインヒビターおよび浸透圧利尿剤のごとき多くの利尿剤が直面するひとつの困難は、それらはナトリウム排出を増加させるために使用されるであろうが、それらが尿中カリウム損失の増加ももたらすことである。カリウム損失の影響の例は、筋力低下、(呼吸筋の麻痺を含む)麻痺、心電図異常、心不整および心停止を含む。

いくつかの利尿剤が直面するもうひとつの困難はそれらの低速作動であり、緊急事態におけるそれらの使用は役に立たない。

40

かくして、患者においてカリウム濃度を激減させず、急速モードの作動を有する尿流量を増加させる方法の必要性がある。従って、そのような方法、およびそれに有用な化合物および組成が発明され、記載され、ここに特許請求される。

【0011】

変力性化合物

変力性効果(例えば、心収縮性の増加)を誘発する化合物は、例えば、うっ血性心不全の治療に有用であると理解されていた。うっ血性心不全は、工業国における死亡および身体障害の最も一般的な要因であり、5年間で約50%の死亡率を有する[Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed. McGraw Hill, New York, pp.809-838]。現在臨床的に使用される変力性剤はジギタリス、交感神経作用アミンお

50

よびアムリノンを含む [Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th, Edition, 1991, McGraw Hill, New York, pp.894-899]。

【0012】

ジゴトキシン（強心配糖体、古いが有効な心不全療法）は、当初、ジギタリス葉（*Digitalis purpurea*および*Digitalis lanata*）から得られた。強心配糖体は細胞膜を横断するナトリウムおよびカリウムイオンの能動性輸送の効力のある高選択性インヒビターである [Goodman and Gilman, 上記]。強心配糖体は心筋を縮める速度を増加させ、心室機能の向上をもたらすことが報告され；この効果は、筋節収縮の速度および程度の増加のための収縮期中のサイトゾル Ca^{2+} の収縮性タンパク質と相互作用する可能性における増加のためであると報告されている。 [Goodman and Gilman, 上記]。

10

ジゴトキシンおよび関連する強心配糖体（例えば、ジゴトキシン）は、主に腎臓によるそれらの排出が1.5～5日間の血漿中 $t_{1/2}$ をもたらずので、有用な作動継続時間を有する。しかし、これらの薬剤の治療指数は非常に低く、毒性：最小有効用量比が2：1であり、致死量：最小有効用量比が5：1ないし10：1である。チアジドおよび係蹄利尿剤の使用による尿中カリウム損失は、心不整脈の疑いを含むジギタリス中毒の危険性を深刻に促進し、カリウム節約利尿剤がしばしば必要である。強心配糖体の緩慢な排泄はジギタリス中毒の危険性の期間を延長し得、これらの薬剤に関して病院患者の20%に起ると報告されている。ウアバインを除く全ての強心配糖体に関する吸収および作動の開始は、幾分長引き、これは緊急な心臓容態において不利であろう。

【0013】

20

交換神経作用アミンは、通常、エピネフリン、イソプロテレノール、ドーパミンおよびドブタミンを含み、心筋収縮を刺激する急速事態に有用であり得るが、それらは、普通、定常的血管内注入および該患者の連続的集中的監視を必要とする。それらは、典型的に、明らかに受容体下降調節（downregulation）のため、～8時間後に効力を失活する。

アムリノン（非カテコールアミン、非配糖体剤）も連続的静脈内投与を必要とする。

可能性のある変力性剤のこの説明は、（1）変力性であり、（2）作動の急速開始、（3）作動の長期持続時間（タキフィラキシーのない持続効果を含む）、（4）低毒性（毒性対治療用量の高い比）、（5）急速かつ深い利尿効果、（6）尿中カリウム損失の抑制、および（7）簡便な（非静脈内）経路の投与を持つ治療の必要性および要望を例示する。本発明者らは、これらの基準を満たすエキセジンおよびGLP-1を見出した。

30

【0014】

発明の要約

本発明は、エキセジン、GLP-1およびそれらの化合物のアゴニストが急速変力性および利尿効果を有するという驚くべき発見に関わる。GLP-1は、末梢的に投与された場合には利尿効果はないと報告されていたが、本発明者らは、驚くべきことに、GLP-1は、実際は、末梢投与後に利尿効果を有することを見出した。エキセジン、GLP-1、およびエキセジンとGLP-1とのアゴニストのこの利尿効果は尿中ナトリウム濃度の増加を伴う。この利尿効果は、多くの利尿剤が尿中カリウム濃度の大きいなる増加を生じることが分かっていることからの予想に反して、尿中カリウム濃度の減少を伴う。

【0015】

40

本発明は、例えば、エキセジン-3 [配列番号1: His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH₂]、またはエキセジン-4 [配列番号2: His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH₂]、またはそこでエキセジンが尿流量を増加させるその作用を働かせる受容体に効果的に結合する他の化合物（エキセジンアゴニスト）のようなエキセジンの投与を含む尿流量を増加させる新規な方法に向けられる。本発明は、また、GLP-1 [配列番号3: 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-NH₂] またはそこでGLP-1が尿流量を増加

50

させるその作用を働かせる受容体に効果的に結合する他の化合物（GLP-1アゴニスト）の投与を含む新規な方法に向けられる。

【0016】

第1の局面において、本発明は、治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを含む、個体における尿流量を増加させる方法の特徴とする。一つの好ましい局面において、該エキセジンはエキセジン-3である。より好ましくは、該エキセジンはエキセジン-4である。エキセジンアゴニストとは、当該受容体またはエキセジンがこの効果を生じる受容体に結合することによって、エキセジンの効果を模倣して、尿流量を増加させ、ナトリウム排出を増加させ、および/または尿中カリウム濃度、（排出された尿中のカリウム濃度）を減少させる化合物を意味する。ある種の新規エキセジンアゴニスト化合物は1997年8月8日に出願され、本発明と同一所有権者を享受し、出典明示して本明細書に含まれる米国仮特許出願第60/055,404号に記載される。ある種の新規エキセジンアゴニスト化合物は、両方とも1997年11月14日に申請され、本発明と同一所有権者を享受し、出典明示して本明細書に含まれる米国仮特許出願第60/066,029および60/065,442号に記載される。好ましいエキセジンアゴニスト化合物は、米国仮特許出願第60/066,029および60/065,442号に記載されるものを含む。

10

【0017】

一つの好ましい局面において、本発明の方法に用いるエキセジンまたはエキセジンアゴニストはエキセジン-4である。もう一つの好ましい局面において、該エキセジンはエキセジン-3である。他の好ましい局面において、該エキセジンまたはエキセジンアゴニストは式(I) [配列番号4]：

20

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Gly Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀
 Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Ala Xaa₁₉ Xaa₂₀
 Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃ Xaa₂₄ Xaa₂₅ Xaa₂₆ Xaa₂₇ Xaa₂₈-Z₁；

[式中、Xaa₁ はHis、ArgまたはTyr；

Xaa₂ はSer、Gly、AlaまたはThr；

Xaa₃ はAspまたはGlu；

Xaa₅ はAlaまたはThr；

Xaa₆ はAla、Phe、Tyrまたはナフチルアラニン；

30

Xaa₇ はThrまたはSer；

Xaa₈ はAla、SerまたはThr；

Xaa₉ はAspまたはGlu；

Xaa₁₀ はAla、Leu、Ile、Val、ペンチルグリシンまたはMet；

Xaa₁₁ はAlaまたはSer；

Xaa₁₂ はAlaまたはLys；

Xaa₁₃ はAlaまたはGln；

Xaa₁₄ はAla、Leu、Ile、ペンチルグリシン、ValまたはMet；

Xaa₁₅ はAlaまたはGlu；

Xaa₁₆ はAlaまたはGlu；

40

Xaa₁₇ はAlaまたはGlu；

Xaa₁₉ はAlaまたはVal；

Xaa₂₀ はAlaまたはArg；

Xaa₂₁ はAla またはLeu；

Xaa₂₂ はPhe、Tyrまたはナフチルアラニン；

Xaa₂₃ はIle、Val、Leu、ペンチルグリシン、tert-ブチルグリシンまたはMet；

Xaa₂₄ はAla、GluまたはAsp；

Xaa₂₅ はAla、Trp、Phe、Tyrまたはナフチルアラニン；

Xaa₂₆ はAlaまたはLeu；

Xaa₂₇ はAlaまたはLys；

50

Xaa₂₈はAlaまたはAsn；

Z₁は-OH、

-NH₂、

Gly-Z₂、

Gly Gly-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂、または

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈ Xaa₃₉-Z₂；

ここに、Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈は、独立して、Pro、ホモプロリン、3Hyp、4Hyp、チオプロリン、N-アルキルグリシン、N-アルキルペンチルグリシンおよびN-アルキルアラニンよりなる群から選択され；

Xaa₃₉はSer、ThrまたはTyr；および

Z₂は-OHまたは-NH₂；

ただし、Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₈、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂、Xaa₁₃、Xaa₁₄、Xaa₁₅、Xaa₁₆、Xaa₁₇、Xaa₁₉、Xaa₂₀、Xaa₂₁、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₆、Xaa₂₇、およびXaa₂₈のうちの3つを超えてAlaではなく、当該化合物はエキセジン - 3 [配列番号 1] またはエキセジン - 4 [配列番号 2] ではない

で表される化合物である。本発明の他の局面において、尿流量の増加は該個体におけるナトリウム排出の増加を伴う。最も好ましい局面において、尿流量の増加は該個体における尿中カリウム濃度を増加させない。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の具体例において、治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における尿中のカリウムの濃度を減少させる方法を提供する。

さらにもう一つの具体例において、治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における毒性血液量増加症に関連する容態または障害を予防するか、または緩和する方法を提供する。

毒性血液量増加症に関連する容態または障害とは、比較的高い細胞外容積によって引起されるか、悪化されるか、または重篤化される対象におけるいずれの容態または障害をも意味する。そのような容態または障害は、限定されないが、腎不全、うっ血性心不全、ネフローゼ症候群、肺水腫、硬変、および高血圧を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明は、治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における急速利尿を誘発する方法を提供する。本発明の一つの好ましい使用は、いくらかの眼科外科的処置またはいくらかの神経外科的処置におけるごとく、細胞外体積の低減が所望される外科的処置のための患者の準備である。かくして、本発明は治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを特徴とする、外科的処置のために個体を準備する方法も提供する。好ましくは、該エキセジンまたはエキセジンアゴニストは該外科的処置前に個体に投与する。

もう一つの好ましい局面において、治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における腎血漿流量および糸球体濾過速度を増加させる方法を提供する。

さらにもう一つの好ましい局面において、治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における妊娠前子癇症または子癇症

10

20

30

40

50

を治療する方法を提供する。

該エキセジンまたはエキセジンアゴニスト投与の好ましい態様は、末梢（皮下または静脈内）投与である。好ましくは、該エキセジンまたはエキセジンアゴニストを皮下投与する。好ましくは、約 $1 \mu\text{g} \sim 30 \mu\text{g}$ ないし約 $10 \sim 20 \text{mg}$ のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを用量当たり投与する。より好ましくは、約 $30 \mu\text{g}$ ないし約 10mg 、または約 $300 \mu\text{g}$ ないし約 5mg のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを用量当たり投与する。最も好ましくは、約 $30 \mu\text{g}$ ないし約 1mg のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを用量あたり投与する。

他の好ましい局面において、該末梢投与は、頬側、鼻腔内、肺内、経口、眼内、経腸、および経皮投与よりなる群から選択される。

10

【0020】

本発明は、医薬上許容される担体と一緒に治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを投与することを含む、血液量増加症に関連する容態または障害を治療するのに用いる医薬組成物も提供する。

さらにもう一つの局面において、本発明は、医薬上許容される担体と一緒に治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストを投与することを含む、個体における尿流量を増加させるのに用いる医薬組成物を提供する。

好ましくは、これらの医薬組成物はエキセジン - 3 を含む。より好ましくは、これらの医薬組成物はエキセジン - 4 を含む。

好ましくは、これらの医薬組成物は式 I [配列番号 4] のエキセジンアゴニストを含む。

20

【0021】

本発明は GLP - 1 の投与を含む尿流量を増加させる新規な方法にも向けられる。

一つの具体例において、本発明は治療上有効量の GLP - 1 または GLP - 1 アゴニストを個体に投与することを含む、個体における尿流量を増加させる方法を特徴とする。GLP - 1 アゴニストとは、当該受容体または GLP - 1 がこの効果を生じる受容体に結合することによって、GLP - 1 の効果を模倣して、尿流量を増加させ、ナトリウム排出を増加させ、および/または尿中カリウム濃度を減少させる化合物を意味する。ある種の GLP - 1 アゴニストは、1996年4月30日に出願され、Glucagon-Like Insulinotropic Peptide Analogs, Compositions and Methods of Use と題される、Chenらの米国特許第 5,512,549号に記載される。他の GLP - 1 アゴニストは1996年11月12日に出願され、Biologically Active Fragments of Glucagon-Like Insulinotropic Peptide と題される、Johnsonらの米国特許第 5,547,008号に記載される。さらに他の GLP - 1 アゴニストは1996年8月13日に出願され、GLP-1 Analogs Useful for Diabetes Treatment と題される、Buckleyらの米国特許第 5,545,618号に記載される。3つの引用された米国特許の全ては、出典明示して本明細書に含まれる。

30

本発明の他の局面において、尿流量の増加は該個体におけるナトリウム排出の増加を伴う。最も好ましい局面において、尿流量の増加は該個体における尿中カリウム濃度を増加させない。

【0022】

本発明の他の具体例において、治療上有効量の GLP - 1 または GLP - 1 アゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における尿中のカリウム濃度を減少させる方法を提供する。

40

本発明のさらにもう一つの局面において、治療上有効量の GLP - 1 または GLP - 1 アゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における毒性血液量増加症に関連する容態または障害を予防するか、または緩和する方法を提供する。

本発明は、治療上有効量の GLP - 1 または GLP - 1 アゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における急速利尿を誘発する方法を提供する。本発明の一つの好ましい使用は、いくつかの眼科外科的処置およびいくつかの神経外科的処置におけるごとく、細胞外体積の低減が所望される外科的処置のための患者の準備におけるものである。かくして、本発明は、治療上有効量の GLP - 1 または GLP - 1 アゴニストを個体に投与す

50

ることを特徴とする、外科的処置のために個体を準備する方法を提供する。好ましくは、該GLP-1またはGLP-1アゴニストは該外科的処置前に該個体に投与する。他の好ましい局面において、治療上有効量のGLP-1またはGLP-1アゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における腎血漿流量および糸球体濾過速度を増加させる方法を提供する。

【0023】

さらに他の好ましい局面において、治療上有効量のGLP-1またはGLP-1アゴニストを個体に投与することを特徴とする、個体における妊娠前子癩症または子癩症を治療する方法を提供する。該GLP-1またはGLP-1アゴニスト投与の好ましい態様は、末梢投与による。好ましくは、該GLP-1またはGLP-1アゴニストを皮下または静脈内投与する。好ましくは、約 $1\ \mu\text{g}$ ~ $30\ \mu\text{g}$ ないし約 10 ~ $20\ \text{mg}$ のGLP-1またはGLP-1アゴニストを用量当たり投与する。より好ましくは、約 $30\ \mu\text{g}$ ないし約 $10\ \text{mg}$ 、または約 $300\ \mu\text{g}$ ないし約 $5\ \text{mg}$ のGLP-1またはGLP-1アゴニストを用量当たり投与する。最も好ましくは、約 $30\ \mu\text{g}$ ないし約 $1\ \text{mg}$ のGLP-1またはGLP-1アゴニストを用量当たり投与する。

他の好ましい局面において、該末梢投与は、頬側、鼻腔内、肺内、経口、経腸、および経皮投与よりなる群から選択される。

【0024】

本発明は、医薬上許容される担体と一緒に治療上有効量のGLP-1またはGLP-1アゴニストを含む、血液量増加症に関連する容態または障害の治療に用いる医薬組成物も提供する。

さらに他の局面において、医薬上許容される担体と一緒に治療上有効量のGLP-1またはGLP-1アゴニストを含む、個体における尿流量を増加させるのに用いる医薬組成物を提供する。

さらなる局面において、本発明は、医薬上許容される担体と一緒に治療上有効量のGLP-1またはGLP-1アゴニストを含む、個体における妊娠前子癩症または子癩症を治療するのに用いる医薬組成物を提供する。

本発明は、治療上有効量のエキセジンもしくはエキセジンアゴニスト、またはGLP-1もしくはGLP-1アゴニストを投与することを含む、個体における変力性効果を誘発する方法も特徴とする。かくして、一つの局面において、治療上有効量のエキセジン、エキセジンアゴニスト、GLP-1またはGLP-1アゴニストを投与することを特徴とする、個体における心収縮性を増加させる方法を提供する。

【0025】

関連する局面において、治療上有効用のエキセジン、エキセジンアゴニスト、GLP-1またはGLP-1アゴニストを投与することを特徴とする、個体における心収縮性を増加させることによって緩和し得る容態または障害を治療する方法を提供する。そのような容態または障害は、うっ血性心不全、肺および全身性水腫、および腎不全を含む。好ましくは、該容態または障害はうっ血性心不全である。

好ましくは、それらの方法に用いられるエキセジンはエキセジン-3である。より好ましくは、該エキセジンはエキセジン-4である。

好ましくは、それらの方法で用いられるエキセジンアゴニストは式(I) [配列番号4]のエキセジンアゴニストである。

【0026】

好ましい局面において、これらの方法で用いられるべきエキセジン、エキセジンアゴニスト、GLP-1またはGLP-1アゴニストは、本明細書に記載された用量を用いて末梢投与する。

好ましくは、該末梢投与は、頬側、鼻腔内、肺内、経口、経腸、および経皮投与よりなる群から選択される。

もう一つの好ましい局面において、該エキセジン、エキセジンアゴニスト、GLP-1またはGLP-1アゴニストを皮下または静脈内投与する。本発明において、医薬上許容さ

10

20

30

40

50

れる担体と一緒に治療上有効量のエキセジン、エキセジンアゴニスト、GLP-1またはGLP-1アゴニストを含む、心収縮性を増加させることによって緩和し得る容態または障害を治療するのに用いる医薬組成物も提供する。好ましくは、該エキセンジンはエキセンジン-3である。より好ましくは、該エキセンジンはエキセンジン-4である。好ましくは、これらの医薬組成物は式I [配列番号4]のエキセジンアゴニストを含む。

【0027】

発明の詳細な説明

本発明のエキセンジン、GLP-1、ならびにそれらのアナログおよびアゴニストは、それらの医薬特性の観点から有用である。エキセンジンもしくはGLP-1のアナログまたはアゴニストとしての活性は、以下に示すアッセイにおける活性によって示し得る。エキセンジンもしくはGLP-1のそれらのアゴニストの食物摂取を低減することへの効果は、以下の実施例に記載された方法または尿流量、またはナトリウムもしくはカリウム排出への効果を測定する当業者に知られた方法を用いて、確認し、評価し、またはスクリーニングし得る。

10

【0028】

エキセンジン-4は、血圧を調節する剤と共に投与した場合、高血圧効果を有することが分かっているが、利尿効果は依然として明白であり、エキセンジン-4の利尿効果は、完全には、その高血圧効果に帰するものではない。

【0029】

エキセジンアゴニスト化合物

20

エキセジンアゴニスト化合物は、米国仮特許出願第60/055,404; 60/066,029; および60/065,442号に記載されたものを含む。好ましいエキセジンアゴニスト化合物は、式(I) [配列番号4] :

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Gly Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀
 Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Ala Xaa₁₉ Xaa₂₀
 Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃ Xaa₂₄ Xaa₂₅ Xaa₂₆ Xaa₂₇ Xaa₂₈-Z₁ ;

[式中、Xaa₁ はHis、ArgまたはTyr ;

Xaa₂ はSer、Gly、AlaまたはThr ;

Xaa₃ はAspまたはGlu ;

Xaa₅ はAlaまたはThr ;

30

Xaa₆ はAla、Phe、Tyrまたはナフチルアラニン ;

Xaa₇ はThrまたはSer ;

Xaa₈ はAla、SerまたはThr ;

Xaa₉ はAspまたはGlu ;

Xaa₁₀ はAla、Leu、Ile、Val、ペンチルグリシンまたはMet ;

Xaa₁₁ はAlaまたはSer ;

Xaa₁₂ はAlaまたはLys ;

Xaa₁₃ はAlaまたはGln ;

Xaa₁₄ はAla、Leu、Ile、ペンチルグリシン、ValまたはMet ;

Xaa₁₅ はAlaまたはGlu ;

40

Xaa₁₆ はAlaまたはGlu ;

Xaa₁₇ はAlaまたはGlu ;

Xaa₁₉ はAlaまたはVal ;

Xaa₂₀ はAlaまたはArg ;

Xaa₂₁ はAla またはLeu ;

Xaa₂₂ はPhe、Tyrまたはナフチルアラニン ;

Xaa₂₃ はIle、Val、Leu、ペンチルグリシン、tert-ブチルグリシンまたはMet ;

Xaa₂₄ はAla、GluまたはAsp ;

Xaa₂₅ はAla、Trp、Phe、Tyrまたはナフチルアラニン ;

Xaa₂₆ はAlaまたはLeu ;

50

Xaa₂₇はAlaまたはLys；

Xaa₂₈はAlaまたはAsn；

Z₁は-OH、

-NH₂、

Gly-Z₂、

Gly Gly-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂、

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂、または

Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈ Xaa₃₉-Z₂；

ここに、Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈は、独立して、Pro、ホモプロリン、3Hyp、4Hyp、チオプロリン、N-アルキルグリシン、N-アルキルペンチルグリシンおよびN-アルキルアラニンよりなる群から選択され；

Xaa₃₉はSer、ThrまたはTyr；および

Z₂は-OHまたは-NH₂；

ただし、Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₈、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂、Xaa₁₃、Xaa₁₄、Xaa₁₅、Xaa₁₆、Xaa₁₇、Xaa₁₉、Xaa₂₀、Xaa₂₁、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₆、Xaa₂₇、およびXaa₂₈のうちの3つを超えてAlaではなく、当該化合物はエキセンジン - 3 [配列番号 1] またはエキセンジン - 4 [配列番号 2] ではない]

で表されるペプチド化合物を含む。

【 0 0 3 0 】

N-アルキルグリシン、N-アルキルペンチルグリシンおよびN-アルキルアラニンの好ましいN-アルキル基は、好ましくは1ないし約6個の炭素原子、より好ましくは1ないし4個の炭素原子の低級アルキル基を含む。適当な化合物は、実施例4～64 [配列番号5ないし65] で識別されるものならび実施例65および66で識別されるそれらの化合物を含む。

好ましいエキセンジンアゴニスト化合物は、Xaa₁がHisまたはTyrであるものを含む。より好ましくは、Xaa₁はHisである。

Xaa₂がGlyであるそれらの化合物が好まれる。

Xaa₄がLeu、ペンチルグリシンまたはMetであるそれらの化合物が好まれる。

好ましい化合物は、Xaa₅がTrpまたはPheであるものである。

好ましい化合物は、Xaa₆がPheまたはナフチルアラニンであり；Xaa₂₂がPheまたはナフチルアラニンであって；Xaa₂₃がIleまたはValであるものである。

Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈が、独立して、Pro、ホモプロリン、チオプロリンおよびN-アルキルアラニンから選択される化合物が好まれる。

好ましくは、Z₁は-NH₂である。

好ましくは、Z₂は-NH₂である。

一つの局面によれば、Xaa₁がHisまたはTyr、より好ましくはHisであり；Xaa₂がGlyであり；Xaa₆がPheまたはナフチルアラニンであり；Xaa₁₄がLeu、ペンチルグリシンまたはMetであり；Xaa₂₂がPheまたはナフチルアラニンであり；Xaa₂₃がIleまたはValであって；Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈は、独立して、Pro、ホモプロリン、チオプロリンおよびN-アルキルアラニンから選択される式(I)の化合物が好まれる。より好ましくは、Z₁は-NH₂である。

【 0 0 3 1 】

特に好まれる局面によれば、特に好まれる化合物は式(I)のものを含み、ここに、Xaa₁

10

20

30

40

50

はHisまたはArgであり；Xaa₂はGlyまたはAlaであり；Xaa₃はAspまたはGluであり；Xaa₅はAlaまたはThrであり；Xaa₆はAla、Pheまたはナフチルアラニンであり；Xaa₇はThrまたはSerであり；Xaa₈はAla、SerまたはThrであり；Xaa₉はAspまたはGluであり；Xaa₁₀はAla、Leuまたはペンチルグリシンであり；Xaa₁₁はAlaまたはSerであり；Xaa₁₂はAlaまたはLysであり；Xaa₁₃はAlaまたはGlnであり；Xaa₁₄はAla、Leuまたはペンチルグリシンであり；Xaa₁₅はAlaまたはGluであり；Xaa₁₆はAlaまたはGluであり；Xaa₁₇はAlaまたはGluであり；Xaa₁₉はAlaまたはValであり；Xaa₂₀はAlaまたはArgであり；Xaa₂₁はAlaまたはLeuであり；Xaa₂₂はPheまたはナフチルアラニンであり；Xaa₂₃はIle、Valまたはter-ブチルグリシンであり；Xaa₂₄はAla、GluまたはAspであり；Xaa₂₅はAla、TrpまたはPheであり；Xaa₂₆はAlaまたはLeuであり；Xaa₂₇はAlaまたはLysであり；Xaa₂₈はAlaまたはAsnであり；Z₁は-OH、-NH₂、Gly-Z₂、Gly G1y-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂、Gly G1y Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂、またはGly G1y Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈ Xaa₃₉-Z₂であり；Xaa₃₁、Xaa₃₆、Xaa₃₇およびXaa₃₈は、独立して、Pro、ホモプロリン、チオプロリンまたはN-メチルアラニンであって；Z₂は-OHまたは-NH₂であり；ただし、Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₈、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂、Xaa₁₃、Xaa₁₄、Xaa₁₅、Xaa₁₆、Xaa₁₇、Xaa₁₉、Xaa₂₀、Xaa₂₁、Xaa₂₄、Xaa₂₅、Xaa₂₆、Xaa₂₇およびXaa₂₈のうち3つを超えてAlaではない。特に好まれる化合物は配列番号6～27のアミノ酸配列を有するものを含む。

特に好まれる局面によれば、Xaa₁₄がLeu、Ile、Valまたはペンチグリシン、より好ましくはLeuまたはペンチルグリシンであって、Xaa₂₅がPhe、Tyrまたはナフチルアラニン、より好ましくはPheまたはナフチルアラニンである化合物を提供する。これらの化合物は、in vitroおよびin vivoの両方で、ならびに該化合物の合成中において、酸化劣化に対してより影響され難いであろう。

【0032】

定義

本発明と一致し、かつ本明細書で用いるごとく、特記しない限り、以下の語は以下の意味を有するものと定義される。

「アミノ酸」なる語は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、およびアミノ酸アナログをいい、もしそれらの構造が当該立体異性体を許すならば、DおよびL立体異性体の全てである。天然アミノ酸は、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、アスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、システイン(Cys)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、リジン(Lys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、プロリン(Pro)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)およびバリン(Val)を含む。非天然アミノ酸は、限定されないが、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、ベータ-アラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、第三級ブチルグリシン、2,4-ジアミノイソ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン、ヒドロキシリジン、アロ-ヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルペンチルグリシン、N-メチルバリン、ナフトアラニン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、ペンチルグリシン、ピペコリン酸およびチオプロリンを含む。アミノ酸アナログは、可逆的または非可逆的に化学的にブロックされているか、またはそれらのN-末端またはそれらの側鎖が修飾されている天然または非天然アミノ酸を含み、例えば、メチオニンスルホキシド、メチオニンスルホン、S-(カルボキシメチル)-システイン、S-(カルボキシメチル)-システインスルホキシドおよびS-(カル

ボキシメチル) - システインスルホンである。

【0033】

「アミノ酸アナログ」なる語は、C - 末端カルボキシ基、N - 末端アミノ基または側鎖官能基のいずれかが化学的に別の官能基に修飾されているアミノ酸をいう。例えば、アスパラギン酸 - (ベータ - メチルエステル) はアスパラギン酸のアミノ酸アナログであり；N - エチルグリシンはグリシンのアミノ酸アナログであり；またはアラニンカルボキサミドはアラニンのアミノ酸アナログである。

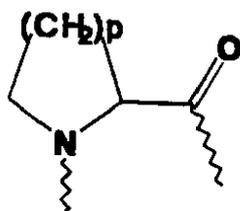
【0034】

「アミノ酸残基」なる語は、(1) - C(O) - R - NH - [式中、Rは典型的に - C H(R') -、R'はアミノ酸側鎖であり、典型的に、Hまたは置換基を含む炭素]；または(2)

10

【0035】

【化1】



20

【0036】

[式中、pは1、2または3であり、それぞれ、アゼチジンカルボン酸、プロリンまたはピペコリン酸を表す]

で表される構造を有する遊離基をいう。

【0037】

アルキル基のごとき有機遊離基と共に本明細書で言及される「低級」なる語は、約6以下、好ましくは、4以下、および有利には1または2の炭素原子を持つそのような基と定義する。そのような基は、直鎖または分枝鎖であることができる。

「医薬上許容される塩」は、当該化合物および有機または無機酸の組合せから誘導される本明細書に記載される化合物の塩を含む。実際には、塩形態の使用は塩基形態の使用となる。該化合物は遊離塩基形態および塩形態の両方において有用である。

30

【0038】

さらに、以下の略は以下を表す：

「ACN」または「CH₃CN」は、アセトニトリルをいう。

「Boc」、「tBoc」または「Tboc」は、t - ブトキシカルボニルをいう。

「DCC」は、N,N' - ジシクロヘキサカルボジイミドをいう。

「Fmoc」は、フルオレニルメトキシカルボニルをいう。

「HBTU」は、ヘキサフルオロリン酸2 - (1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1,1,3,3 - テトラメチルウロニウムをいう。

「HOBT」は、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール - 水合物をいう。

40

「homop」または「hPro」は、ホモプロリンをいう。

「MeAla」または「Nme」は、N - メチルアラニンをいう。

「naph」は、ナフチルアラニンをいう。

「pG」または「pGly」は、ペンチルグリシンをいう。

「tBuG」は、第三級ブチルグリシンをいう。

「ThioP」または「tPro」は、チオプロリンをいう。

「3Hyp」は、3 - ヒドロキシプロリンをいう。

「4Hyp」は、4 - ヒドロキシプロリンをいう。

「NAG」は、N - アルキルグリシンをいう。

「NAPG」は、N - アルキルペンチルグリシンをいう。

50

「Norval」は、ノルバリンをいう。

「Norleu」は、ノルロイシンをいう。

【0039】

化合物の調製

本明細書に記載されたエキセジンおよびエキセジンアゴニストのごとき化合物は、標準固相ペプチド合成技術および好ましくは自動化または半自動化ペプチド合成機を用いて調製することができる。典型的には、そのような技術を用いて、-N-カルバモイル保護されたアミノ酸と樹脂上の成長ペプチド鎖に結合したアミノ酸とを室温にてジメチルホルムアミド、N-メチルピロリジノンまたは塩化メチレンのごとき不活性溶媒中、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび1-ヒドロキシトリアゾールのごときカップリング剤の存在下、ジイソプロピルエチルアミンのごとき塩基の存在下で連結する。得られたペプチド-樹脂からトリフルオロ酢酸またはピペリジンのごとき試薬を用いて、該N-カルバモイル保護基を除去し、該ペプチド鎖に付加すべき次なる所望するN-保護されたアミノ酸と共にカップリング反応を繰り返す。適当なN-保護基は当該分野でよく知られており、t-ブチロキシカルボニル(tBoc)フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)が本明細書では好まれる。

10

【0040】

ペプチド合成機で用いる溶媒、アミノ酸誘導体および4-メチルベンズヒドリル-アミン樹脂はApplied Biosystems Inc. (Foster City, CA)から購入することができる。以下の側鎖が保護されたアミノ酸はApplied Biosystems, Inc. (Foster City, CA)から購入することができる: Boc-Arg(Mts)、Fmoc-Arg(Pmc)、Boc-Thr(Bzl)、Fmoc-Thr(t-Bu)、Boc-Ser(Bzl)、Fmoc-Ser(t-Bu)、Boc-Tyr(BrZ)、Fmoc-Tyr(t-Bu)、Boc-Lys(Cl-Z)、Fmoc-Lys(Boc)、Boc-Glu(Bzl)、Fmoc-Glu(t-Bu)、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Asn(Trt)およびFmoc-Gln(Trt)。Boc-His(BOM)はApplied Biosystems, Inc.またはBachem Inc. (Torrance, CA)から購入することができる。アニソール、ジメチルスルフィド、フェノール、エタンジチオール、およびチオアニソールはAldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)から得ることができる。Air Products and Chemicals (Allentown, PA)がHFを供給する。エチルエーテル、酢酸およびメタノールはFischer Scientific (Pittsburgh, PA)から購入することができる。

20

【0041】

自動ペプチド合成機 (Model 430A, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) で、NMP/HOBt系 (オプション1) およびtBocまたはFmoc化学を用い、キャップをして、固相ペプチド合成を行なうことができる ([Applied Biosystems User's Manual for the ABI 430A Peptide Synthesizer, Version 1.3B July 1, 1988, section 6, pp.49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA] を参照) Boc-ペプチド-樹脂をHFで切断することができる (-5ないし0、1時間)。該ペプチドを水および酢酸を交換することで抽出し、濾液を凍結乾燥する。該Fmoc-ペプチド樹脂は標準方法 [Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, pp.6-12] を用いて切断することができる。Advanced Chem Tech Synthesizer (Model MPS 350, Louisville, Kentucky)を用いて、ペプチドを組立てることもできる。

30

40

【0042】

Waters Delta Prep 3000 systemを用いるRP-HPLC (分取用および分析用) によって、ペプチドを精製することができる。C4、C8またはC18分取用カラム (10 μ 、2.2 \times 25cm; Vydac, Hesperia, CA) を用いてペプチドを単離することができ、C4、C8またはC18分析用カラム (5 μ 、0.46 \times 25cm; Vydac) を用いて純度を測定することができる。溶媒 (A = 0.1% THF/水およびB = 0.1% TFA/CH₃CN) を1.0ml/分の流速にて分析用カラムに、15ml/分の流速にて分取用カラムに送り込むことができる。アミノ酸解析はWater Pico Tag Systemで行ない、Maxima programを用いて処理することができる。ペプチドを気相酸加水分解法によって加水分解することができる (115、20~24時間)。加水分解物を標準方法によって誘導体

50

化し、分析することができる [Cohen, et al., The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, pp.11-52, Millipore Corporation, Milford, MA (1989)]。高速原子衝突分析法をM-Scan, Incorporated (West Chester, PA)によって行なうことができる。質量補正をヨウ化セシウムまたはヨウ化セシウム/グリセロールを用いて実行することができる。飛行時間検出を用いるプラズマ脱離イオン化法をApplied Biosystems Bio-Ion 20 質量分析装置で行なうことができる。エレクトロスプレー質量分析をVG-Trio装置で行なうことができる。

本発明に有用なペプチド化合物は、今や当該分野で知られている方法を用いる組換えDNA技術を用いて調製することができる(例えば、[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor (1989)]を参照)。本発明に有用な非ペプチド化合物は当該分野で知られている技術によって調製することができる。例えば、ホスフェート含有アミノ酸およびそのようなアミノ酸を含有するペプチドを当該分野で知られている方法を用いて調製することができる(例えば、[Bartlett and Landen, Bioorg. Chem. 14:356-377 (1986)]を参照)。

【0043】

エキセンジンもしくはGLP-1のアゴニスト、アナログまたは誘導体は本発明の方法に含まれる。アナログまたは誘導体は、同様のアミノ酸配列を有し、尿流量の増加、ナトリウム排出の増加および/またはカリウム排出の減少、関連するエキセンジンまたはGLP-1またはそれらに対するアゴニストの活性をある程度保持するエキセンジンまたはGLP-1の機能性変異体である。機能性変異体とは、特定のエキセンジンまたはGLP-1またはそれらに対するアゴニストの複数の活性の代りとなる活性を有する誘導体を意味する。好まれる機能性変異体は、特定のエキセンジンまたはGLP-1またはそれらに対するアゴニストの活性全てを保持するが、該機能性変異体は、例えば、本明細書に記載されたものごとき機能検定で測定されたように、定量測定した場合、より強いかより弱い活性を有するであろう。好まれる機能性変異体は、関連するエキセンジン、GLP-1またはそれらに対するアゴニストの活性の約1%ないし約10,000%以内、より好ましくは約10%ないし約1000%の間、より好ましくは約50%ないし約500%の間の活性を有する。誘導体は、該関連するエキセンジン、GLP-1またはそれらに対するアゴニストに対して、少なくとも約50%の配列類似性、好ましくは約70%、より好ましくは約90%、さらにより好ましくは約95%配列類似性を有する。「配列類似性」とは、ポリペプチド起源に関わらず2つの異なるポリペプチド間で観察された「相同性」をいう。

【0044】

いくらかの活性を保持する該誘導体の能力は、本明細書に記載された方法を用いて測定し得る。誘導体は、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの結合によって変換する間またはその後には生じる修飾を含む([Ferguson et al., Annu. Rev. Biochem. 57:285-320, 1988]を参照)。

誘導体は標準化学技術および組換え核酸分子技術を用いて生成し得る。特定のポリペプチドへの修飾は、固相合成の間にサイト指向された突然変異誘発およびアミノ酸置換によるように意図されたものか、あるいは、該ポリペプチドを産生する宿主中で突然変異によるごとく偶発的なものでよい。誘導体を含むポリペプチドは、[Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]に記載されたものごとき標準技術を用いて得られる。

【0045】

上記の化合物は種々の無機および有機の酸ならびに塩基と共に塩を形成する。そのような塩は、例えば、HCl、HBr、H₂SO₄、H₃PO₄、トリフルオロ酢酸、酢酸、ギ酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、マレイン酸、フマル酸およびカンフルスルホン酸などの有機および無機酸と共に調製された塩を含む。塩基と共に調製された塩は、アンモニア塩、アルカリ金属塩(例えば、ナトリウムおよびカリウム塩)、およびアルカリ土類塩(例えば、カルシウムおよびマグネシウム塩)を含む。該塩は、該塩が溶解しない溶

10

20

30

40

50

媒または媒体中で、あるいは、次いで、真空または凍結乾燥によって、または適当なイオン交換樹脂上で存在する塩のイオンを別のイオンに交換することによって除去される水のごとき溶媒中で該生成物の遊離した酸または塩基の形態を適当な塩基または酸の複数の相同物と反応させることによるような常法手段によって形成することができる。

【 0 0 4 6 】

特許請求された組成物は医薬上許容される塩（例えば、酸付加塩）および/またはそれらの錯体として調剤することも可能である。医薬上許容される塩は、それらが投与される濃度にて非毒性塩である。そのような塩の調製は、該組成物がその生理学的効果を働かせることを妨害することなく該組成物の物理化学的特徴を変化させることによって薬理学的使用を可能にし得る。物理的特性の有用な変化の例は、経粘膜投与を可能にするために融点を低下させることおよびより高い濃度の薬剤の投与を可能にするために溶解性を増加させることを含む。

医薬上許容される塩は、硫酸塩、塩酸塩、リン酸塩、スルファミン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、石炭酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、シクロヘキシルスルファミン酸塩およびキニン酸塩を含有するもののごとき酸付加塩を含む。医薬上許容される塩は、塩酸、硫酸、リン酸、スルファミン酸、酢酸、クエン酸、乳酸、石炭酸、マロン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、シクロヘキシルスルファミン酸、およびキニン酸から得ることが可能である。そのような塩は、例えば、該塩が溶解しない溶媒または媒体中で、あるいは、次いで、真空または凍結乾燥によって、または適当なイオン交換樹脂上で存在する塩のイオンを別のイオンに交換することによって除去される水のごとき溶媒中で該生成物の遊離した酸または塩基の形態を適当な塩基または酸の複数の相同物と反応させることによって調製することができる。

上記の化合物はそれらの薬理学的特性の観点で有用である。特に、本発明の化合物は、尿流量を増加させ、ナトリウム排出を増加させかつカリウム排出を低下させ、および高毒性血液増加症に関連する容態または障害を緩和する剤としての活性を所有する。

【 0 0 4 7 】

本発明に有用な組成は（静脈内、筋肉内および皮下を含む）非経口または鼻腔内または経口投与に適した調剤の形態で簡便に供給することができる。いくらかの場合、エキセジンまたはエキセジンアゴニストおよび、アミリン、アミリンアゴニスト、CCK、またはレプチンのごとき別の食物摂取低減、血漿中グルコース低減または血漿中脂質低減剤を単一組成物または一緒に投与するための溶液で供給することが簡便である。他の場合、該エキセジンまたはエキセジンアゴニストとは別にさらなる剤を投与することがより有利であろう。最も良くは、適当な投与フォーマットは各患者に対して個別に開業医によって決定することができる。適当な医薬上許容される担体およびそれらの調剤は標準調剤専門書に記載される（例えば、[Remington's Pharmaceutical Sciences by E.W. Martin]。[Wang, Y.J. and Hanson, M.A. "Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers", Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No.10, Supp. 42:2S (1988)]も参照）。

【 0 0 4 8 】

本発明に有用な化合物は注射または注入用非経口組成物として供給することができる。それらは、例えば、不活性油、適当にはゴマ、ピーナッツ、オリーブ油のごとき植物油、または他の許容される担体に懸濁させ得る。好ましくは、それらは、例えば、約3.0ないし8.0のpH、好ましくは約3.5ないし5.0のpHにての等張バッファー溶液のごとき水性担体に懸濁させる。これらの組成物は在来の滅菌技術によって滅菌するか、または滅菌濾過することができる。該組成物は、pH緩衝剤のごとき、生理状態に近付けるのに要求される医薬上許容される補助物質を含有することができる。有用なバッファーは、例えば、酢酸ナトリウム/酢酸バッファーを含む。貯蔵または「デポー」徐放性製剤の形態を用いて、治療上有効量の製剤が経皮注射または運搬に続いて何時間または何日にもわたって血流に運搬されるようにすることができる。

所望する等張性は塩化ナトリウムまたは、デキストロース、ホウ酸、石炭酸ナトリウム、プロピレングリコール、(マンニトールおよびソルビトールのごとき)ポリオールのごとき医薬上許容される剤、または他の無機または有機溶質を用いて達成することができる。担体または補形剤も該化合物の投与を可能にするのに用い得る。担体または補形剤の例は、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、グルコースまたはスクロースのごとき種々の糖類、またはデンプンのタイプ、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコールおよび生理学上許容される溶媒を含む。

【0049】

所望すれば、上記組成物の溶液をメチルセルロースのごとき増粘剤で増粘させることができる。それらは、油中水または水中油のいずれかの乳化形態で調製することができる。例えば、アカシアパウダー、(Tweenのごとき)非イオン性表面活性剤、または(アルカリポリエーテルアルコール硫酸エステルまたはスルホン酸エステル(例えば、Triton)のごとき)イオン性表面活性剤を含む広範囲にわたるいずれの医薬上許容される乳化剤も用いることができる。

本発明に有用な組成物は、一般に許容される方法に準じて成分を混合することによって調製する。例えば、選択した成分を単にブレンダーまたは他の標準装置中で混合して濃縮混合物を生成することができ、次いで、それを水または増粘剤およびおそらくpHを制御するバッファーまたは等張性を制御するさらなる溶質の添加によって最終濃度および粘度に調整することができる。

【0050】

医者による使用のため、該組成物は、例えば、エキセジン - 3、および/またはエキセジン - 4などのエキセジンまたはエキセジンアゴニストのある量を含む用量単位形態で供給する。尿流量を増加させるのに使用するための治療上有効量のエキセジンまたはエキセジンアゴニストは所望する速度およびレベルにて尿流量を増加させるものである。当業者によって理解されるように、治療剤の有効量は、患者の年齢および体重、患者の体調および他の要因を含む多くの要因で変化する。

【0051】

該化合物の有効用量は、典型的には、1 ~ 30 μ g ないし約10 ~ 20 mg、好ましくは約30 μ g ないし10 mg、およびより好ましくは約300 μ g ないし5 mg、最も好ましくは30 μ g ないし約1 mgの範囲にある。投与されるべき正確な用量は担当する臨床医によって決定され、例えば、上記の範囲内で特定の化合物があるところに依存する。投与は、利尿効果が所望される時はいつでも、例えば、腎不全、うっ血性心不全、ネフローゼ症候群、肺水腫、硬変、高血圧、子癇症または前子癇症の初期徴候が表れたとき、または診断された直後に始めるべきである。投与は注射によって、好ましくは皮下または静脈内によることができる。経口的に活性な化合物は経口摂取することができるが、用量は5 ~ 10倍増加させるべきである。

【0052】

本出願の化合物の最適な調剤および患者への投与の態様は、特定の疾病または障害、所望する効果および患者のタイプのごとき当業者に知られた要因に依存する。該化合物は、典型的には、ヒト対象を治療するのに用いるが、他の霊長類、ブタ、ウシおよびニワトリのごとき家畜動物、およびウマ、イヌおよびネコのごとき競技動物およびペットのごとき他の脊椎動物における同様のまたは同一の疾病を治療するのに用いることもできる。

【0053】

【発明の実施の形態】

本発明の理解を助けるために、以下の実施例を含ませる。本発明に関する実験は、もちろん、本発明を特別に限定するものと理解されるべきではないし、今や知られ後で開発される本発明の当該変形は、当業者の理解の範囲にあり、本明細書に記載されおよび以下に特許請求される本発明の範疇にあるとみなされる。

【0054】

【実施例】

実施例 1 : G L P - 1 またはエキセジン投与の利尿効果

物質 : G L P - 1 およびエキセジン - 4 は、Bachem, Inc., Torrance, CA から購入するか、または本明細に記載するように Amylin Pharmaceuticals, Inc. にて合成した。血圧トランスデューサー/トランスミッターは Data Sciences, Inc. から購入した。

麻酔したラットにおける *in vivo* 実験 : 雄のハーラン=スプラグ=ドーリーラット (Harlan Sprague Dawley rats) を 23 ± 1 にて 12 : 12 時間明 : 暗サイクル中で飼育し (実験は明サイクル中に実行した)、自由に餌と水とを与えた (Diet LM-485, Teklad, Madison, WI)。325 ~ 375 グラムの体重の動物を実験に先駆けて ~ 20 時間絶食させた。

【 0 0 5 5 】

外科準備 : ここで用いた準備は、片側尿管カニューレ挿入を加えたことによる修飾以外は、[Young et al., Drug Dev Res. 37:231-248, 1996] に記載されたものであった。麻酔は 5 % ハロセンで誘発し、外科手術の間 2 % ハロセン、その後 0.7 ないし 1 % に維持した。気管切開術ならびに大腿動脈、伏在静脈および単一尿管のカニューレ挿入を行なった。ヘパリン化食塩水 (2 U/ml) で注入した動脈ラインを血液採取および血圧測定に用いた (Spectramed P23XL transducer, Model 13-4615-58 amplifier, Gould, Cleveland, OH)。静脈ラインを薬剤投与に用いた。総食塩水注入速度を 4 mL/時間に保った。サーミスタープローブ/コントローラー (Model 73A, YSI, Yellow Springs, OH) および加熱した手術台を用いて、結腸温度を測定し、制御した。平均動脈圧の信号を 12 ビットの精度で 1 Hz にて周期的にサンプリングし (Data Translation DT2801A)、記録した (Labtech Notebook)。

計算方法 : 用量 - 反応曲線を 4 - 変数ロジスティック関数にフィットさせ、Prism (v2.0, GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて EC_{50} を導いた。観測値は、ペプチドまたはビヒクルの注入に先駆けて 30 分間行なった測定の平均で規定するベースラインのパーセントで表した。データを平均値 \pm SEM ($n = 5 \sim 6$) で表す。

測定 : 動脈血の試料 (160 μ l) を周期的に収集し、尿試料を 15 分毎に収集した。血漿中および尿中ナトリウムおよびカリウム濃度は、Ciba/Corning 614 Na/K アナライザー (Ciba/Corning, Inc., Medfield, MA) を用いるイオン選択性電極によって測定した。片側尿流量をカニューレ挿入した尿管からの 15 分間アウトプットを計量することによって測定した。総尿流量をこの量を 2 倍して評価した。

【 0 0 5 6 】

処置 : 用量 - 反応を得るために、ペプチドを 0.15 M NaCl に溶解し、0.1 ml ボーラスとして投与した。G L P - 1 の投与は尿流量を増加させることに対して強い効果を有していた ($ED_{50} = 0.71 \mu\text{g} \pm 0.26 \log$ 単位)。用量前尿流量のパーセントとしての最大反応は、16.5 μg 用量につき 15 分間で $176.4 \pm 28.1\%$ であった (図 3 A ~ B)。G L P - 1 の投与はナトリウム排出も増加させた (図 4 A ~ B)。しかしながら、G L P - 1 は著しくカリウム排出を減少させた (図 5 A ~ B) (1.65 μg 用量にて用量前濃度の $13.9 \pm 1.7\%$ までの最大降下を伴い、 $ED_{50} = 0.25 \mu\text{g} \pm 3.4 \log$ 単位)。エキセジン - 4 の投与も尿流量を増加させた (図 8 A ~ B)。 ED_{50} は 0.12 $\mu\text{g} \pm 0.18 \log$ 単位であり、前用量尿流量のパーセントとしての最大反応は 21 μg 用量につき 15 分間に $216.0 \pm 47.0\%$ であった。エキセジンの投与はナトリウム排出も増加させた (図 9 A ~ B)。しかしながら、カリウムの排出は減少した (図 10 A ~ B)。 ED_{50} は、21 μg の用量にて前用量濃度の $9.6 \pm 1.4\%$ までの降下を伴い、0.07 $\mu\text{g} \pm 0.26 \log$ 単位であった。

【 0 0 5 7 】

実施例 2 : G L P - 1 またはエキセジン - 4 の投与後の遠隔計測による意識のあるラットにおける動脈血圧および dP/dt の測定

トランスデューサーの挿入 : 雄のハーラン=スプラグ=ドーリーラットをハロセンで麻酔し、開腹術後に腹大動脈を露出させた。Data Sciences Inc. からの "Pressure Telemetry" マニュアルに詳細に記載された手順に準じて、カテーテル先端が分岐部の ~ 2 mm 上部の腹大動脈中で、圧力トランスデューサー/トランスミッターを腹壁上に固定した。閉腹後、

次いで、少なくとも7日間の安定した記録できるように、該動物を回復させた。ベースラインデータを外科手術後、7+日間収集した。

血圧および dP/dt の測定：安定したベースラインが得られた後、ラットは、GLP-1、エキセンジンまたはピヒクル単独(NaCl)の腹腔内(ip)注射を受けた。変換した信号を遠隔計測により記録し、パーソナルコンピュータに記憶した。圧変化速度(dP/dt)は、Data Sciencesによって供給されたソフトウェアによって計算した。

【0058】

GLP-1：動物は食塩水またはGLP-1(100 μ l)の単一腹腔内(ip)注射を受けた($n=7\sim 8$)。図1A~BはGLP-1投与後の平均動脈圧の増加を示す。図2はGLP-1投与後の心収縮性の増加を示す。

エキセンジン-4：エキセンジン-4または食塩水(250 μ l)を5日間、ip注射によって1日2回(bid)与えた(食塩水について $n=8$ 、該エキセンジン群について $n=5\sim 6$)。図6A~Bはエキセンジン-4投与後の平均動脈圧の増加を示す。図7はエキセンジン-4投与後の心収縮性の増加を示す。

【0059】

実施例3

麻酔したラットにおいて遷音速流プローブを用いて測定したエキセンジン-4またはGLP-1の心血管作用：

物質、動物飼育および麻酔下でのカニューレ挿入：物質、動物飼育および麻酔下でのカニューレ挿入は実施例1に記載したものであった。ハロセンで麻酔した雄のスプラグ=ドーリーラット(350g~450g)を(ペプチド注射のため)伏在静脈および(動脈圧測定のため)大腿動脈を通してカニューレ挿入した。

外科手術：通過時間フロープローブ(2mm、2SB、Transonic Systems Inc., Ithaca New York)を腎、腸間膜および腸骨動脈枝から隔たった腹大動脈の辺りに固定した。

測定：該フロープローブをTransonic TS-206 デュアルチャンネルフローメータに接続して腹大動脈血液流量を測定した。心拍数を標準ECG電極を用いて記録した。ペプチドまたはピヒクル(食塩水)を1~2分間かけて100 μ Lの総体積を静脈内注射した。平均動脈圧(MAP)、心拍数(HR)および平均大動脈血液流量を実験期間中Labtek Notebook データ収集ソフトウェアも用いて毎秒記録した。次いで、大動脈コンダクタンス(流量/MAP; mL/分/mmHg)および心拍血液量(流量/HR; ビート/分当たりのmL/分=mL)を導いた。

処置：20分間の制御期間の後、エキセンジン-4を0.021、0.21、2.1および21 μ gの用量にて注射し、GLP-1を0.0165、0.165、1.65および16.5 μ gの用量にて注射した。

【0060】

結果：

GLP-1：16.5 μ gの用量にてGLP-1は、投与の5分以内に平均動脈圧を22mmHg増加させた。GLP-1投与から2分以内に、大動脈血液流量は14から22mL/分まで57%増加し、心拍数は、360から420ビート/分まで17%増加し、心拍血液量は37から51 μ Lまで38%増加し、大動脈コンダクタンスは、0.12から0.18mL/分/mmHgまで50%増加した。効果は約10分間続いた。

エキセンジン-4：効果が30~60分間持続した以外は、0.21 μ g用量のエキセンジン-4で同様のパターンの効果が観察された(血圧において~30mmHgの増加；大動脈血液流量において60%の増加；心拍数において40%の増加；心拍血液量において60%の増加；大動脈コンダクタンスにおいて35%の増加)。大動脈血液流量に大きな変化があって、血圧に比較的少ない変化があるこれらの反応は、GLP-1およびエキセンジン-4が変力性(心増刺激性)および血管拡張特性を有することと一致する。

【0061】

実施例4

配列番号5を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly-NH₂ [配列番号5]

Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立てた。一般に、合成を通して、単一カップリングサイクルを用い、高速Moc (HBTU活性化) 化学を利用した。成長ペプチド鎖の脱保護 (Fmoc基除去) はピペリジンを用いて達成した。完了したペプチド樹脂の最終脱保護は、標準方法 (Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc.) に準じて、トリエチルシラン (0.2 mL)、エタンジチオール (0.2 mL)、アニソール (0.2 mL)、水 (0.2 mL) およびトリフルオロ酢酸 (1.5 mL) の混合物を用いて達成した。該ペプチドをエーテル/水 (50 mL) 中で沈殿させ、遠心した。該沈殿物を氷酢酸中で復元し、凍結乾燥した。凍結乾燥したペプチドを水に溶解させた。粗純度は約75%であった。

精製ステップおよび分析には、溶媒A (水中0.1% TFA) および溶媒B (ACN中0.1% TFA) を用いた。ペプチドを含有する溶液を分取用C-8カラムに加え、精製した (40分間にわたる溶媒A中10%ないし40%溶媒B)。画分の純度はC-18分析用カラムを用いて無勾配で測定した。純粋画分をプールして、上記ペプチドを得た。該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC (30分間にわたる溶媒A中の30%ないし50%溶媒Bの勾配) は、18.9分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3408.0 ;
実測値 3408.9。

【0062】

実施例5

配列番号6を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号6]

実施例4と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒A (水中0.1% TFA) および溶媒B (ACN中0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC (30分間にわたる溶媒A中の30%ないし40%溶媒Bの勾配) は、17.9分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3294.7 ;
実測値 3294.8。

【0063】

実施例6

配列番号7を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号7]

実施例4と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒A (水中0.1% TFA) および溶媒B (ACN中0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC (30分間にわたる溶媒A中の29%ないし36%溶媒Bの勾配) は、20.7分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3237.6 ;
実測値 3240。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

実施例 7

配列番号 8 を有するペプチドの調製

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 8]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 36% ないし 46% 溶媒 B の勾配) は、15.2 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3251.6 ;

実測値 3251.5。

【 0 0 6 5 】

実施例 8

配列番号 9 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Ala Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 9]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 36% ないし 46% 溶媒 B の勾配) は、13.1 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3207.6 ;

実測値 3208.3。

【 0 0 6 6 】

実施例 9

配列番号 10 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Ala Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 10]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 35% ないし 45% 溶媒 B の勾配) は、12.8 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3161.5 ;

実測値 3163。

【 0 0 6 7 】

実施例 10

配列番号 11 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ala Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 11]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.5

10

20

30

40

50

5 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 36% ないし 46% 溶媒 B の勾配) は、15.2 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3221.6 ;

実測値 3222.7。

【0068】

実施例 11

配列番号 12 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 12]

10

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 34% ないし 44% 溶媒 B の勾配) は、14.3 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3195.5 ;

実測値 3199.4。

20

【0069】

実施例 12

配列番号 13 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ala Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 13]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 38% ないし 48% 溶媒 B の勾配) は、15.7 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

30

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3221.6 ;

実測値 3221.6。

【0070】

実施例 13

配列番号 14 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ala Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 14]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 38% ないし 48% 溶媒 B の勾配) は、18.1 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

40

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3180.5 ;

実測値 3180.9。

【0071】

実施例 14

50

配列番号 15 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Ala Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 15]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 36% ないし 46% 溶媒 B の勾配) は、17.0 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。 10

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3180.6 ;
実測値 3182.8。

【0072】

実施例 15

配列番号 16 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Ala Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 16]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 32% ないし 42% 溶媒 B の勾配) は、14.9 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。 20

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3195.5 ;
実測値 3195.9。

【0073】

実施例 16

配列番号 17 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Ala Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 17]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 37% ないし 47% 溶媒 B の勾配) は、17.9 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。 30

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3179.6 ;
実測値 3179.0。 40

【0074】

実施例 17

配列番号 18 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Ala Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 18]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結 50

乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 7 % ないし 4 7 % 溶媒 B の勾配) は、 1 4 . 3 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 1 7 9 . 6 ;

実測値 3 1 8 0 . 0 。

【 0 0 7 5 】

実施例 1 8

配列番号 1 9 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Ala Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 1 9]

実施例 4 と同様の方法で、 F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチ
ル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、 0 . 5 5 m m o
l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水
中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いた。該凍結乾燥した
ペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 7 % ないし 4 7 % 溶媒
B の勾配) は、 1 3 . 7 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 1 7 9 . 6 ;

実測値 3 1 7 9 . 0 。

【 0 0 7 6 】

実施例 1 9

配列番号 2 0 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Ala Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 2 0]

実施例 4 と同様の方法で、 F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c ア
ミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、 0 . 5
5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶
媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いた。該凍結
乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 5 % ないし 4
5 % 溶媒 B の勾配) は、 1 4 . 0 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 2 0 9 . 6 ;

実測値 3 1 2 1 . 8 。

【 0 0 7 7 】

実施例 2 0

配列番号 2 1 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Ala
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 2 1]

実施例 4 と同様の方法で、 F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c ア
ミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、 0 . 5
5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶
媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いた。該凍結
乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 8 % ないし 4
8 % 溶媒 B の勾配) は、 1 4 . 3 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 1 5 2 . 5 ;

実測値 3 1 5 3 . 5 。

【 0 0 7 8 】

実施例 2 1

配列番号 2 2 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg

10

20

30

40

50

Ala Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 2 2]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 35% ないし 45% 溶媒 B の勾配) は、12.1 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3195.5 ; 実測値 3197.7。

10

【 0 0 7 9 】

実施例 2 2

配列番号 2 3 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 2 3]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 38% ないし 48% 溶媒 B の勾配) は、10.9 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3179.6 ; 実測値 3180.5。

20

【 0 0 8 0 】

実施例 2 3

配列番号 2 4 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Ala Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 2 4]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 32% ないし 42% 溶媒 B の勾配) は、17.5 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3161.5 ; 実測値 3163.0。

30

【 0 0 8 1 】

実施例 2 4

配列番号 2 5 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Ala Lys Asn-NH₂ [配列番号 2 5]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 32% ないし 42% 溶媒 B の勾配) は、19.5 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

40

50

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3195.5 ;
 実測値 3199。

【0082】

実施例 25

配列番号 26 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Ala Asn-NH₂ [配列番号 26]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
 を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocア
 ミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.5
 5 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶
 媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結
 乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 38% ないし 4
 8% 溶媒 B の勾配) は、14.5 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3180.5 ;

実測値 3183.7。

【0083】

実施例 26

配列番号 27 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Ala-NH₂ [配列番号 27]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
 を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocア
 ミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.5
 5 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製した。分析には、溶
 媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いた。該凍結
 乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 34% ないし 4
 4% 溶媒 B の勾配) は、22.8 分の観測保持時間を有する生成物ペプチドを与えた。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3194.6 ;

実測値 3197.6。

【0084】

実施例 27

配列番号 28 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro-NH₂ [配
 列番号 28]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
 を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocア
 ミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.5
 5 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶
 媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで
 、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30%
 ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 4099.6。

【0085】

実施例 28

配列番号 29 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro-NH₂ [配
 列番号 29]

10

20

30

40

50

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 4042.5。

【0086】

実施例 29

10

配列番号 30 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro-NH₂ [配列番号 30]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

20

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 4002.4。

【0087】

実施例 30

配列番号 31 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro-NH₂ [配列番号 31]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

30

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3945.4。

【0088】

実施例 31

配列番号 32 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro-NH₂ [配列番号 32]

40

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3905.3。

50

【 0 0 8 9 】

実施例 3 2

配列番号 3 3 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro-NH₂ [配列番号 3
3]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc
アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5
5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶
媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで
、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30 %
ないし 60 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 8 4 8 . 2。

10

【 0 0 9 0 】

実施例 3 3

配列番号 3 4 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala-NH₂ [配列番号 3 4]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc
アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5
5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶
媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで
、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30 %
ないし 60 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 8 0 8 . 2。

20

【 0 0 9 1 】

実施例 3 4

配列番号 3 5 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala-NH₂ [配列番号 3 5]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc
アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5
5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶
媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで
、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30 %
ないし 60 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 7 5 1 . 1。

30

40

【 0 0 9 2 】

実施例 3 5

配列番号 3 6 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly-NH₂ [配列番号 3 6]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)
を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc
アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5
5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶
媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで

50

、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 7 3 7 . 1 。

【 0 0 9 3 】

実施例 3 6

配列番号 3 7 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly-NH₂ [配列番号 3 7]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 6 8 0 . 1 。

【 0 0 9 4 】

実施例 3 7

配列番号 3 8 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser-NH₂ [配列番号 3 8]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 6 8 0 . 1 。

【 0 0 9 5 】

実施例 3 8

配列番号 3 9 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser-NH₂ [配列番号 3 9]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 6 2 3 . 0 。

【 0 0 9 6 】

実施例 3 9

配列番号 4 0 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser-NH₂ [配列番号 4 0]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2 ' - 4 ' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5

10

20

30

40

50

5 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
 エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3593.0。

【0097】

実施例 40

配列番号 41 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro-Ser-NH₂ [配列番号 41]

10

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。3535.9。

【0098】

実施例 41

20

配列番号 42 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro-NH₂ [配列番号 42]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

30

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3505.9。

【0099】

実施例 42

配列番号 43 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro-NH₂ [配列番号 43]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

40

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3448.8。

【0100】

実施例 43

配列番号 44 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly-NH₂ [配列番号 44]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)

50

を用いて、上記ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 3 5 1 . 7。

【 0 1 0 1 】

実施例 4 4

配列番号 4 5 を有するペプチドの調製

10

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly-NH₂ [配列番号 4 5]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 3 5 1 . 8。

20

【 0 1 0 2 】

実施例 4 5

配列番号 4 6 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly-NH₂ [配列番号 4 6]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

30

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 2 9 4 . 7。

【 0 1 0 3 】

実施例 4 6

配列番号 4 7 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly tPro Ser Ser Gly Ala tPro tPro tPro-NH₂
[配列番号 4 7]

実施例 4 と同様の方法で、F m o c - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - F m o c アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン M B H A 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 m m o l e / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基 3 7、3 6 および 3 1 にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % T F A) および溶媒 B (A C N 中 0 . 1 % T F A) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

40

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 4 1 9 7 . 1。

【 0 1 0 4 】

実施例 4 7

50

配列番号 48 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala tPro tPro tPro-NH₂ [配列番号 47]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基 37、36 および 31 にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 4179.1。

【0105】

実施例 48

配列番号 49 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly NMeala Ser Ser Gly Ala Pro Pro-NH₂ [配列番号 49]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基 36 および 31 にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3948.3。

【0106】

実施例 49

配列番号 50 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly NMeala Ser Ser Gly Ala NMeala Nmeala-NH₂ [配列番号 50]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基 36 および 31 にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。
エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3840.1。

【0107】

実施例 50

配列番号 51 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly hPro Ser Ser Gly Ala hPro hPro-NH₂ [配列番号 51]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.)

10

20

30

40

50

を用いて、上記アミド化ペプチドを4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂(Novabiochem、0.55mmole/g)上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基36および31にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒A(水中0.1%TFA)および溶媒B(ACN中0.1%TFA)を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC(30分間にわたる溶媒A中の30%ないし60%溶媒Bの勾配)を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析(M):計算値 4050.1。

【0108】

実施例51

配列番号52を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly hPro Ser Ser Gly Ala hPro-NH₂ [配列番号52]

実施例4と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸(Applied Biosystems, Inc.)を用いて、上記アミド化ペプチドを4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂(Novabiochem、0.55mmole/g)上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基31にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒A(水中0.1%TFA)および溶媒B(ACN中0.1%TFA)を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC(30分間にわたる溶媒A中の30%ないし60%溶媒Bの勾配)を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析(M):計算値 3937.1。

【0109】

実施例52

配列番号53を有するペプチドの調製

Arg Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala-NH₂ [配列番号53]

実施例4と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸(Applied Biosystems, Inc.)を用いて、上記アミド化ペプチドを4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂(Novabiochem、0.55mmole/g)上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒A(水中0.1%TFA)および溶媒B(ACN中0.1%TFA)を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC(30分間にわたる溶媒A中の30%ないし60%溶媒Bの勾配)を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析(M):計算値 3827.2。

【0110】

実施例53

配列番号54を有するペプチドの調製

His Gly Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly-NH₂ [配列番号54]

実施例4と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸(Applied Biosystems, Inc.)を用いて、上記アミド化ペプチドを4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシンMBHA樹脂(Novabiochem、0.55mmole/g)上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒A(水中0.1%TFA)および溶媒B(ACN中0.1%TFA)を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC(30分間にわたる溶媒A中の30%ないし60%溶媒Bの勾配)を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析(M):計算値 3394.8。

【0111】

10

20

30

40

50

実施例 5 4

配列番号 5 5 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Naphthylala Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 5 5]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。10
 エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3289.5。

【 0 1 1 2 】

実施例 5 5

配列番号 5 6 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Ser Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 5 5]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。20
 エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3280.7。

【 0 1 1 3 】

実施例 5 6

配列番号 5 7 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Ser Thr Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 5 7]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。30
 エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3294.7。

【 0 1 1 4 】

実施例 5 7

配列番号 5 8 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Leu Ser Lys Gln Met Ala Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 5 8]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc - 保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmoc アミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP - HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。40
 50

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3250.7。

【0115】

実施例 58

配列番号 59 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp pentylgly Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 59]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

10

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3253.5。

【0116】

実施例 59

配列番号 60 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Naphthylala Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 60]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

20

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3289.5。

【0117】

実施例 60

配列番号 61 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe tButylgly Glu Trp Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 61]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 RP-HPLC (30 分間にわたる溶媒 A 中の 30% ないし 60% 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

30

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3183.4。

40

【0118】

実施例 61

配列番号 62 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Asp Phe Leu Lys Asn-NH₂ [配列番号 62]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4-(2'-4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0.55 mmol/g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0.1% TFA) および溶媒 B (ACN 中 0.1% TFA) を用いる。次いで

50

、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 2 3 7 . 6 。

【 0 1 1 9 】

実施例 6 2

配列番号 6 3 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser-NH₂ [配列番号 6 3]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 6 3 7 . 9 。

【 0 1 2 0 】

実施例 6 3

配列番号 6 4 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly-NH₂ [配列番号 6 4]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 3 0 9 . 7 。

【 0 1 2 1 】

実施例 6 4

配列番号 6 5 を有するペプチドの調製

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg
Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly hPro Ser Ser Gly Ala hPro hPro-NH₂ [配列番号 6 5]

実施例 4 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、上記アミド化ペプチドを 4 - (2' - 4' - ジメトキシフェニル) - Fmocアミノメチル=フェノキシ=アセトアミド=ノルロイシン s MBHA 樹脂 (Novabiochem、0 . 5 5 mmol / g) 上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。残基 3 6 および 3 1 にて、二重カップリングが必要である。分析には、溶媒 A (水中 0 . 1 % TFA) および溶媒 B (ACN 中 0 . 1 % TFA) を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用 R P - H P L C (3 0 分間にわたる溶媒 A 中の 3 0 % ないし 6 0 % 溶媒 B の勾配) を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。

エレクトロスプレー質量分析 (M) : 計算値 3 7 1 1 . 1 。

【 0 1 2 2 】

実施例 6 5

配列番号 5 ~ 2 7、3 4 ~ 4 1、4 4 ~ 4 6 および 5 3 ~ 6 4 の

上記 C - 末端アミド配列に対応する C - 末端カルボン酸ペプチドの調製

化合物 1 と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸 (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、配列番号 5 ~ 2 7、3 4 ~ 4 1、4 4 ~ 4 6 および 5 2 ~ 6 4 の配列を有する

10

20

30

40

50

ペプチドを、いわゆる、Wang樹脂（p-アルコキシベンジルアルコール樹脂（Bachem、0.54 mmol/g））上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒A（水中0.1% TFA）および溶媒B（ACN中0.1% TFA）を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC（30分間にわたる溶媒A中の30%ないし60%溶媒Bの勾配）を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。エレクトロスプレー質量分析は実験的測定（M）を与えた。

【0123】

実施例66

配列番号28~33、42、43、47~52および65の

上記C-末端アミド配列に対応するC-末端カルボン酸ペプチドの調製

化合物1と同様の方法で、Fmoc-保護されたアミノ酸（Applied Biosystems, Inc.）を用いて、配列番号28~33、42、43、47~52および65の配列を有するペプチドを塩化2-クロロトリチル樹脂（200~400メッシュ）、2% DVB（Novabiochem、0.4~1.0 mmol/g）上で組立て、該樹脂から切離し、脱保護し、精製する。分析には、溶媒A（水中0.1% TFA）および溶媒B（ACN中0.1% TFA）を用いる。次いで、該凍結乾燥したペプチドの分析用RP-HPLC（30分間にわたる溶媒A中の30%ないし60%溶媒Bの勾配）を行なって、該生成物ペプチドの保持時間を測定する。エレクトロスプレー質量分析は実験的測定（M）を与える。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1（A~B）は、GLP-1に対する平均動脈圧（MAP）の応答を示すグラフ表記である。（A）MAPは、薬剤投与に先駆けて30分間かけて測定した前用量値の%で表される；（B）MAPへのGLP-1の効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答は、ボラス用量後0ないし2時間の曲線下の増分面積である。

【図2】 図2は、GLP-1に対する変力性応答を示すグラフ表記である。血圧の変化速度（ dP/dt ）は心収縮性を示し、意識のあるラットに与えられたGLP-1の皮下注射に対する反応において増加した。

【図3】 図3（A~B）は、GLP-1の静脈内ボラス用量に対する尿流量の応答を示すグラフ表記である。（A）尿流量は15分間隔で測定され、薬剤投与に先駆けて30分間かけて測定した前用量値の%で表される；（B）尿流量へのGLP-1の効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答は、投与前30分間の流量と比較したボラス用量後の0ないし15分間流量におけるパーセント変化である。

【図4】 図4（A~B）は、GLP-1の静脈内ボラス用量に対するナトリウム排出の応答を示すグラフ表記である。（A）ナトリウム排出は15分間隔で測定され、薬剤投与に先駆けて30分間かけて測定した前用量値の%で表される；（B）尿中カリウム濃度へのGLP-1の効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答は、投与前30分間の排出と比較したボラス用量後の0ないし15分間ナトリウム排出におけるパーセント変化である。

【図5】 図5（A~B）は、GLP-1の静脈内ボラス用量に対する尿中カリウム濃度の応答を示すグラフ表記である。（A）尿中カリウム濃度は15分間隔で測定され、薬剤投与に先駆けて30分間かけて測定した前用量値の%で表される；（B）尿中カリウム濃度へのGLP-1の効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答は、投与前30分間の尿中カリウム濃度に対するボラス用量後の0ないし15分間の尿中カリウム濃度におけるパーセント変化である。

【図6】 図6（A~B）は、エキセジン-4に対する平均動脈圧（MAP）の応答を示すグラフ表記である。（A）MAPは、薬剤投与に先駆けて、30分間かけて測定した前用量値の%で表される；（B）MAPへのエキセジンの効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答はボラス用量後0ないし2時間の曲線下の増分面積である。

【図7】 図7は、エキセジン-4に対する変力性応答を示すグラフ表記である。血圧の変化速度（ dP/dt ）は心収縮性を示し、意識のあるラットに与えたエキセジン-4の皮下注射に対する反応において増加した。

10

20

30

40

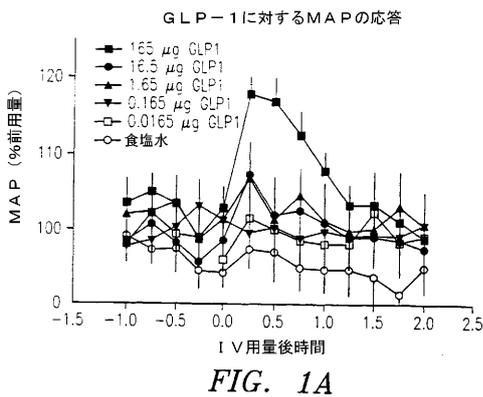
50

【図8】 図8(A~B)は、エキセンジン-4の静脈内ボラス用量に対する尿流量の応答を示すグラフ表記である。(A)尿流量は15分間隔で測定された；(B)尿流量に対するエキセンジン-4の効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答はボラス用量後0ないし15分間の尿流量である。

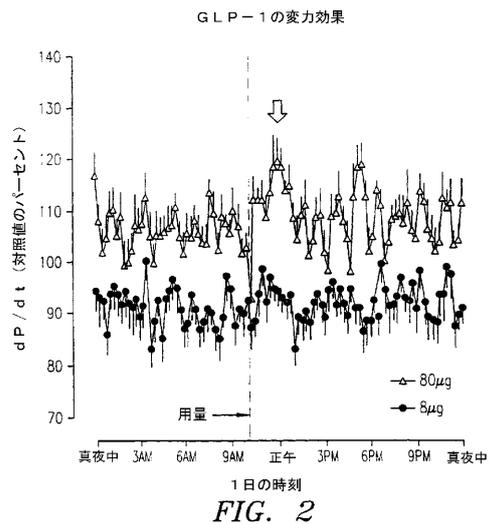
【図9】 図9(A~B)は、エキセンジン-4の静脈内ボラス用量に対するナトリウム排出の応答を示すグラフ表記である。(A)ナトリウム排出は15分間隔で測定され、薬剤投与に先駆けて30分間かけて測定した前用量値の%で表される；(B)ナトリウム排出に対するエキセンジン-4の効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答は、投与前30分間の排出に対するボラス用量後0ないし15分間のナトリウム排出におけるパーセント変化である。

【図10】 図10(A~B)は、エキセンジン-4の静脈内ボラス用量に対する尿中カリウム濃度の応答を示すグラフ表記である。(A)尿中カリウム濃度は15分間隔で測定され、エキセンジン-4投与に先駆け30分間かけて測定された前用量値の%で表される；(B)尿中カリウム濃度へのエキセンジンの効果に関する用量反応曲線。プロットされた応答は、ボラス用量後0ないし2時間の曲線下の増分面積である。

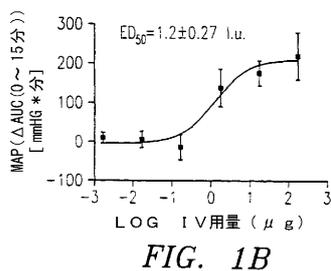
【図1】



【図2】



用量-反応曲線：GLP-1に対するMAP



【 図 3 】

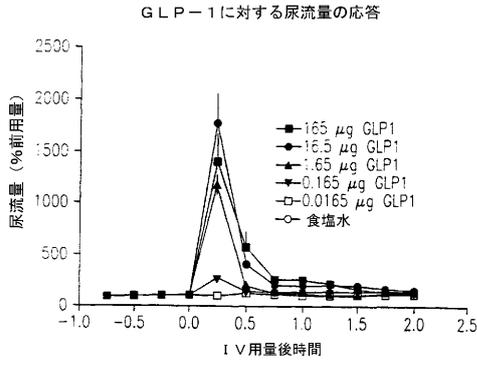


FIG. 3A

用量-反応曲線: GLP-1に対する尿流量

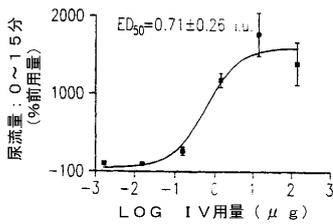


FIG. 3B

【 図 4 】

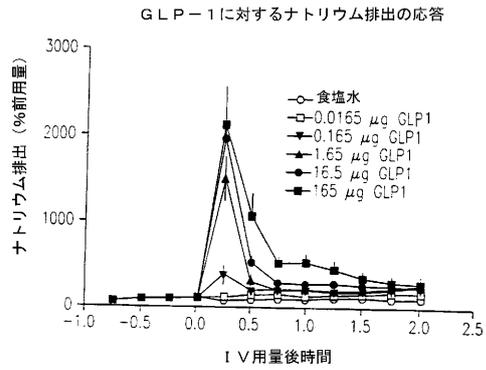


FIG. 4A

用量-反応曲線: GLP-1に対するナトリウム排出

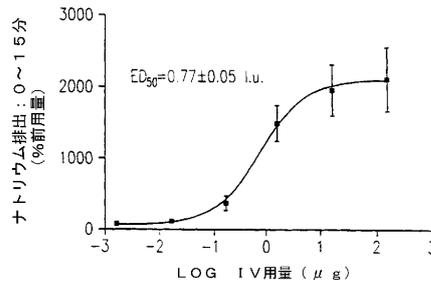


FIG. 4B

【 図 5 】

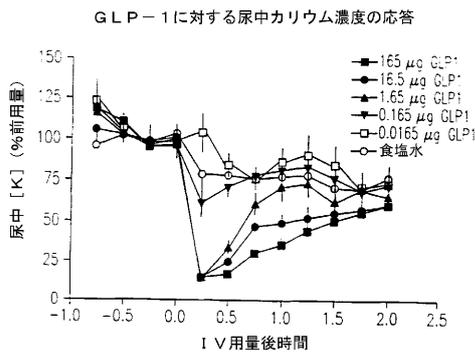


FIG. 5A

用量-反応曲線: GLP-1に対する尿中カリウム濃度

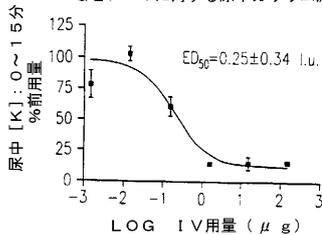


FIG. 5B

【 図 6 】

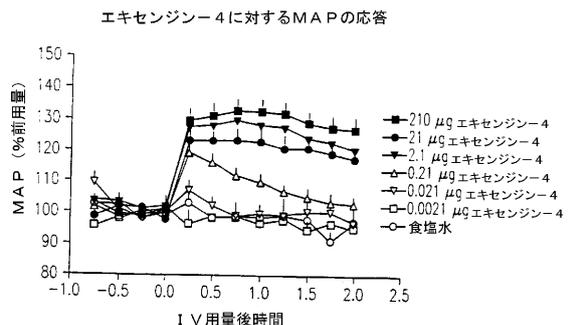


FIG. 6A

用量-反応曲線: エキセシン-4に対するMAP

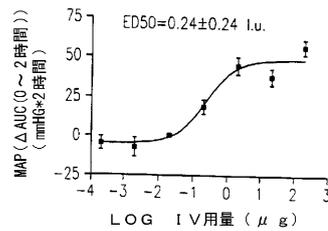


FIG. 6B

【 図 7 】

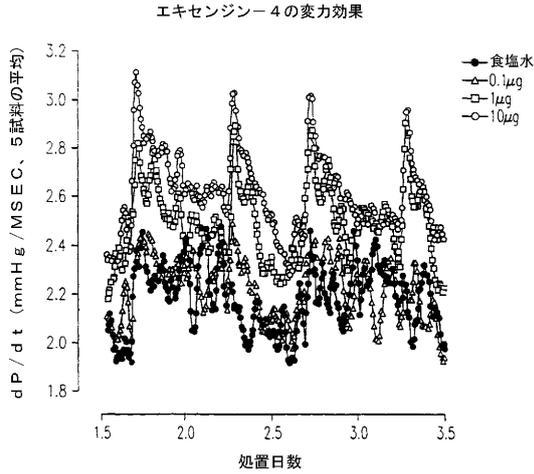


FIG. 7

【 図 8 】

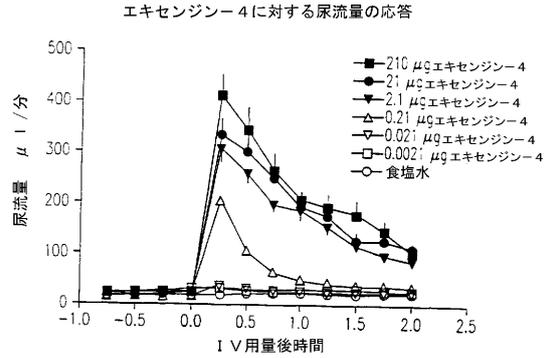


FIG. 8A

用量-反応曲線：エキセンジン-4に対する尿流量

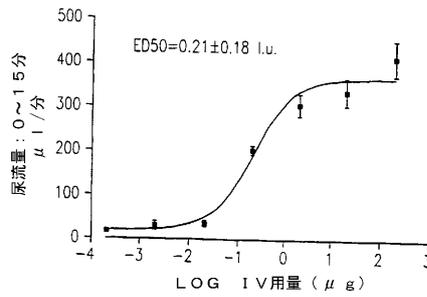


FIG. 8B

【 図 9 】

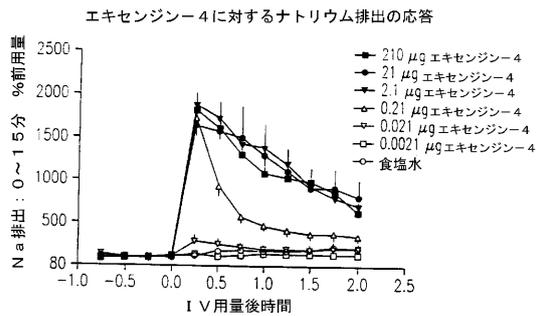


FIG. 9A

用量-反応曲線：エキセンジン-4に対するナトリウム排出

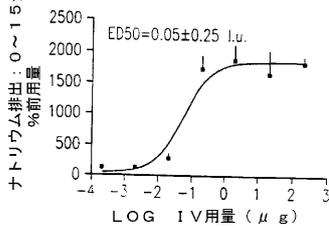


FIG. 9B

【 図 10 】

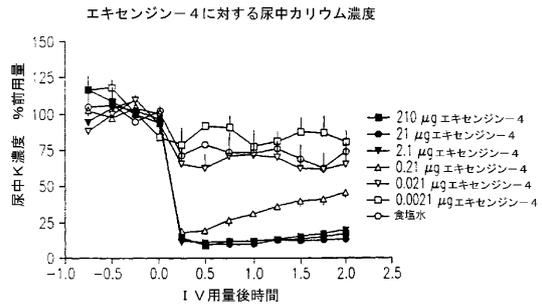


FIG. 10A

用量-反応曲線：エキセンジン-4に対する尿中カリウム濃度

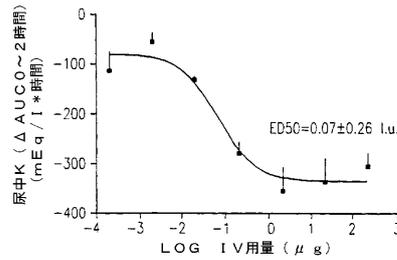


FIG. 10B

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 15/00 (2006.01) A 6 1 P 15/00

- (72)発明者 アンドリュー・エイ・ヤング
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、イースター・ウェイ 9 5 1 4 番
- (72)発明者 ウィル・バイン
アメリカ合衆国 9 2 0 6 4 カリフォルニア州ポーウェイ、クレストライン・ドライブ 1 4 5 3 7 番
- (72)発明者 ナイジェル・アール・エイ・ビーリー
アメリカ合衆国 9 2 0 7 5 カリフォルニア州ソラナ・ビーチ、ロマ・コルタ・ドライブ 2 2 7 番
- (72)発明者 キャスリン・ブリケット
アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州サンディエゴ、トレイルブラッシュ・テラス 7 6 1 2 番

審査官 中尾 忍

- (56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 0 5 3 5 1 (WO , A 1)
Mads Tang-Christensen , Am. J. Physiol. , 1 9 9 6 年 , Vol.271 , R848-R856
Jose M. Barragan , Regulatory Peptides , 1 9 9 6 年 , Vol.67 , Pages 63-68

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A61K 38/00
A61K 45/00
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)