

明 細 書

発明の名称：

糖鎖付加ポリペプチドおよび当該ポリペプチドを含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖付加ポリペプチド、当該ポリペプチドを含む医薬組成物に

関する。

背景技術

[0002] ソマトスタチンは、中枢神経系および周辺組織の両方に存在する環式ペプ

チドである。ソマトスタチンは、最初に、哺乳類の視床下部から単離され、

下垂体前葉から成長ホルモン分泌物の重要な阻害剤として同定された。この

ペプチドは、視床下部、膵臓、消化管等に広く分布しており、ソマトスタチ

ンレセプターへの結合を介して作用を発現する。また、ソマトスタチンは、

下垂体における成長ホルモン（GH）の分泌抑制、甲状腺刺激ホルモン（T

SH）分泌抑制をはじめ、消化管でのガストリン、セレクチン、コレシスト

キニン（CCK）、VIP（Vasoactive Intestinal

Polypeptide）、膵臓でのグルカゴン、インスリン等の種々の

ホルモン分泌を抑制することで知られている。加えて、消化管運動を抑制す

る作用を有することも知られている。

[0003] 構造式：Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-T

rp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys（配列番号1）を

有する天然のソマトスタチン（ソマトロピン放出阻害因子（SRIF）と

しても知られる）が、最初に、Guillemínおよび共同研究者によっ

て単離された。このソマトスタチンは受容体のファミリーと相互作用するこ

とによってその効果を発揮する。ソマトスタチンレセプター（SSTR）に

は、1から5までのサブタイプ（SSTR1～SSTR5）が存在し、なか

でもSSTR2はGH分泌性ヒト下垂体アデノマ、中枢神経系、下垂体前

葉、網膜、副腎髄質、胃、十二指腸粘膜、小腸、結腸の各組織、および膵臓

ランゲルハンス島のグルカゴン分泌性A細胞に分布することが知られている。また、これらの各受容体は、各種の腫瘍においても発現することが知られており、例えば、機能性下垂体腺腫においてはSSTR1とSSTR5が発現しており、胃腸腫瘍においてはSSTR2の他、SSTR1、SSTR3が発現しており、褐色細胞腫ではSSTR3が発現しており、前立腺癌においてはSSTR1およびSSTR5が発現しており、結腸直腸癌においては、SSTR5が発現していることが報告されている（非特許文献1）。また、SSTR4は、拮抗的に調節作用を持つレセプターとして機能すること、および、緑内障関連の疾患の治療において重要である可能性について報告されている（非特許文献2）。このように、ソマトスタチンおよびその類縁体は、ソマトスタチン関連疾患や様々な種類の腫瘍に対して潜在的に有用な治療薬である。

[0004] 一方で、天然に存在するソマトスタチンは、血中半減期が2～3分と短いため、生物学的利用能が小さく、作用の持続時間が短いという二つの望ましくない性質を示すので、治療剤としての使用や応用は限られる。この理由により、効力、生体安定性、作用の持続時間、または成長ホルモン、インスリンもしくはグルカゴンの放出の抑制を考慮した選択性のいずれかが優れたソマトスタチン類縁体を見い出すために様々なソマトスタチン類縁体の開発がなされてきた。

[0005] 臨床的に利用できる最初に承認されたソマトスタチン類縁体としては、オクトレオチド（Octreotide）（特許文献1および特許文献2）が報告されており、このオクトレオチドは、ソマトスタチン受容体のSSTR2、SSTR3、およびSSTR5に対して親和性を有することが知られている。

オクトレオチドは、ソマトスタチンの生物学的活性を示すのに重要な部分である4つのアミノ酸（Phe-Trp-Lys-Thr）の配列を有し、その配列の両末端にジスルフィド（S-S）結合を形成するCysを有し、さらにその両末端のCysの外側にD-PheとThr（ol）を有する8

つのアミノ酸よりなる環状ペプチドとして開発されている。このオクトレオチドは、そのアミノ酸配列により、血中半減期を向上させることで作用の持続性を得ることができ、また、ソマトスタチンに比べ、成長ホルモン（GH）に対する選択性が高く、強力な作用を持つことが可能である。

[0006] このようなオクトレオチドを含むソマトスタチン類縁体は、ホルモン分泌性およびホルモン依存性腫瘍を有する患者の治療に使用することができる。現在のところ、神経内分泌系腫瘍である転移性カルチノイド腫瘍に関連する症状（潮紅、下痢、心弁膜疾患および腹痛）ならびに血管作用性腸管ペプチド（VIP）分泌腺腫に関連する症状（水様性下痢）は、オクトレオチドによって治療される。

例えば、カルチノイドおよびVIP産生腫瘍において、オクトレオチドはその活性因子の分泌および作用の両方を阻害する。したがって多量分泌性下痢を特徴とするVIP産生腫瘍では、ソマトスタチン類縁体は、VIP分泌阻害により、また直接腸管分泌に影響を与えて、その下痢を低減させることができる。

[0007] しかしながら、一方で多くの神経内分泌腫瘍は、オクトレオチドのようなソマトスタチン類縁体に対して耐性を有していることが報告されている（非特許文献3）。また、オクトレオチドは、先端巨大症の治療に使用されるが、先端巨大症患者の約3分の1には、効果がないことも報告されている。さらに、大半のカルチノイド腫瘍患者に対して、オクトレオチドは投与初期のみ効果を発揮し、投与期間が長引くとタキフィラキシー（速成耐性、速成寛容）が起こることが報告されている。さらに、初期のクッシング病患者の副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生抑制に対してオクトレオチドは効果を示さないことが報告されている。

[0008] 上記のような課題から、複数のソマトスタチン受容体を発現する腫瘍に対しては、天然のソマトスタチンのように高い親和性で複数の受容体サブタイプに結合するソマトスタチン類縁体の開発が望まれており、また、このようなソマトスタチン受容体に対する親和性を有するソマトスタチン類縁体は、

これまでのソマトスタチン類縁体に治療効果がない患者や耐性を有する患者にも効果を有する可能性が示唆されている（非特許文献4）。

このように、天然に存在するソマトスタチンに類似した構造で、同様にソマトスタチン受容体に対して親和性を有し、かつ、ソマトスタチンに比べて血中半減期が延長したソマトスタチンアナログの開発が望まれていた。

[0009] 一方、糖鎖が生体内において様々な役割を担っていることが明らかになってきており、血中における半減期を延長するために、オクトレオチドに糖鎖を付加する方法も提案されている（例えば、特許文献3）。

しかしながら、その構造の複雑さや多様性によって研究が遅れており、糖鎖の種類や糖鎖を付加する位置が、必ずしも最適化されているとは言えず、これまでのソマトスタチン類似体の問題点を克服した糖鎖付加ポリペプチドについては報告されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：米国特許第4, 310, 518号
特許文献2：米国特許第4, 235, 886号
特許文献3：特開平03-014599号

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Current Opinion in Pharmacology, 2004, Vol. 4, pp. 608-613
非特許文献2：J. Med. Chem. 2003, Vol. 46, pp. 5587-5596
非特許文献3：Mol Endocrinol, 2010, Vol. 24 (1), pp. 240-249
非特許文献4：Molecular and Cellular Endocrinology, Vol. 286, 2008, pp. 69-74

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明の課題は、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有し、かつ、ソマトスタチンと比べて、血中安定性が向上した糖鎖付加ポリペプチドを提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、ソマトスタチン受容体に対する親和性を維持し、かつ、血中安定性が向上した糖鎖付加ポリペプチドを見出した。

即ち、本発明は、

(A) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなる S R I F 1 4 ; (B) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなる S R I F 1 4 において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド ; (C) S R I F 1 4 の類縁体 ; (D) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなる S R I F 1 4 に対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド ; (E) (A) ~ (D) において、N 個（ここで N は、1 以上 20 以下の整数）のアミノ酸を N 末端側にさらに含むポリペプチド ; および、(F) (A) ~ (D) において、M 個（ここで M は、1 以上 6 以下の整数）のアミノ酸を C 末端側にさらに含むポリペプチド ; からなる群から選ばれるポリペプチドにおいて、少なくとも 1 つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、かつ、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有することを特徴とする糖鎖付加ポリペプチドに関する。

- [0014] ここで、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加アミノ酸で置換されるアミノ酸が、S R I F 1 4 における 19 位に相当するアミノ酸であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記 (E) のポリペプチドにおいて、少なくとも 1 つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも 1 つのアミノ酸が、前記 (E) のポリペプチド

ドのN末端側の前記N個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記(F)のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記(F)のポリペプチドのC末端側の前記M個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの実施態様においては、前記糖鎖

付加ポリペプチドは、前記(E)のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、さらに、N末端側に付加される前記N個のアミノ酸の配列が、X-Yで表され、ここで、XはL個(ここでLは1以上6以下の整数)の任意のアミノ酸の配列を意味し、また、Yは、(1) Lys、(2) Arg-Lys、(3) Glu-Arg-Lys、(4) Arg-Glu-Lys、(5) Pro-Arg-Glu-Arg-Lys、(6) Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys、(7) Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys、(8) Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys、(9) Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys、(10) Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Lys、(11) Ser-Asn-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys、(12) Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Lys、(13) Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Lys、(14) Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Lys、および(15)上記配列(2)～(14)において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失

、置換若しくは付加された配列からなる群から選択される配列であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記(E)のポリペプチドのN末端側に付加される前記N個のアミノ酸の配列を表すX-Y-におけるXを意味するL個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、N末端側に付加される前記N個のアミノ酸は、リンカーを介して当該N末端側に連結していることを特徴とする。

[0015] また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの別の実施態様においては、(A) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF28；(B) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF28において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；(C) SRIF28の類縁体；(D) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF28に対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；(E) (A)～(D)において、J個（ここでJは、1以上6以下の整数）のアミノ酸をN末端側にさらに含むポリペプチド；および(F) (A)～(D)において、K個（ここでKは、1以上6以下の整数）のアミノ酸をC末端側にさらに含むポリペプチド；

からなる群から選ばれるポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、かつ、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加アミノ酸で置換されるアミノ酸が、SRIF28における1位に相当するアミノ酸、5位に相当するアミノ酸、9位に相当するアミノ酸、12位に相当するアミノ酸、13位に相当するアミノ酸、14位に相当するアミノ酸、および、19位に相当するアミノ酸からなる群より選択される少なくとも

1つのアミノ酸であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記（E）のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記（E）のポリペプチドのN末端側の前記J個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記（F）のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記（F）のポリペプチドのC末端側の前記K個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする。

[0016] また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記ソマトスタチン受容体に対する親和性が、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、および、SSTR5からなる群より選択される受容体の少なくとも2以上の受容体に対する親和性を有することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが、少なくともSSTR1およびSSTR4のいずれか1つに対して親和性を有することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが、SSTR1およびSSTR4の両方に対して親和性を有することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、および、SSTR5の全てに対して親和性を有することを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、SRIF28と比較して、増大した血中安定性を有す

ることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記各糖鎖付加アミノ酸が、糖鎖付加A s nまたは糖鎖付加C y sであることを特徴とする。

[0017] また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖とアミノ酸とがリンカーを介することなく結合していることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が4個以上の糖からなることを特徴とする。

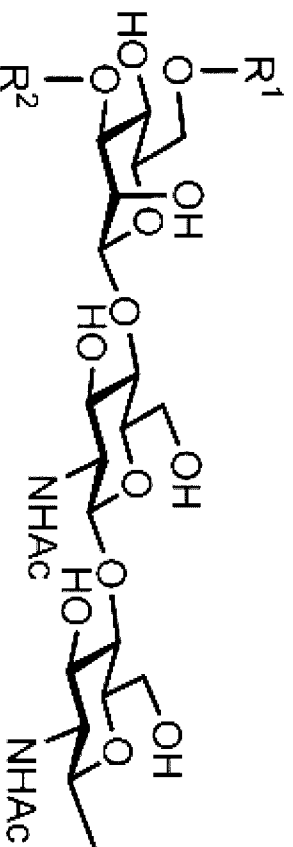
また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が2本鎖複合型糖鎖、3本鎖複合型糖鎖、または4本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が2本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記2本鎖複合型糖鎖が、ジシアロ糖鎖、モノシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナツク糖鎖、およびジマンノース糖鎖からなる群から選択される糖鎖であることを特徴とする。

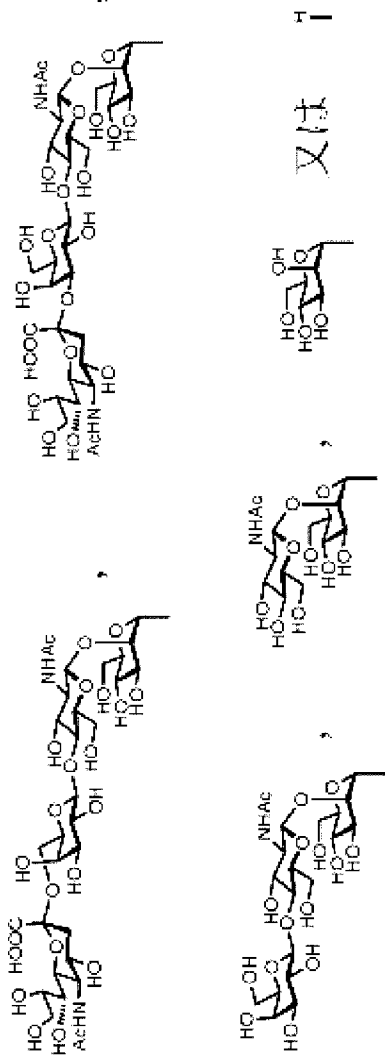
また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が、下記式：

[化1]



[式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって、

[化2]



を示し、Acは、アセチル基を示す。]

で表される糖鎖であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖が、非還元末端に少なくとも1つのシアル酸を有しており、前記シアル酸のカルボキシ基が、炭素数1～30のアルキルアミノ基、ベンジル基、アミノ基、またはアミノエチルアミノ基により修飾されていることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、複数の糖鎖付加アミノ酸を有しており、前記各糖鎖付加アミノ酸における糖鎖が、いずれも同一であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドは、SRIF28における17位のCysと28位のCysに相当するCysを有しており、さらに、これらのCysは、相互にジスルフィド結合していることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドのC末端は、アミド化されていることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドのN末端に、アジド基が導入されていることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖

付加ポリペプチドが、標識されていることを特徴とする。

[0018] また、本発明の別の態様は、(I) 上記に記載する糖鎖付加ポリペプチドおよび／または薬学的に許容されるその塩、および、(II) 薬理的に許容される担体を含むことを特徴とする医薬組成物に関する。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖が、実質的に均一であることを特徴とする。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、ソマトスタチンに関連する疾患の治療または予防のために用いられることを特徴とする。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、前記ソマトスタチンに関連する疾患が、先端巨大症、巨人症、アルツハイマー病および他の形態の認知症、癌、ホルモン産生腫瘍、内分泌腫瘍、カルチノイド、VIPオーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ、クッシング病、ホルモン分泌異常、糖尿病およびその合併症、疼痛、関節炎、下痢、胃潰瘍、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、消化管閉塞、イレウス、術後再狭窄、放射線障害、眼疾患、ドライアイ、緑内障、角膜実質の炎症、虹彩炎、白内障、ならびに、結膜炎からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする。

[0019] また、本発明の別の態様は、上記に記載の糖鎖付加ポリペプチドの有効量を投与することを特徴とする、ソマトスタチンに関連する疾患の治療または予防方法に関する。

また、本発明の治療または予防方法の一実施態様においては、前記ソマトスタチンに関連する疾患が、先端巨大症、巨人症、アルツハイマー病および他の形態の認知症、癌、ホルモン産生腫瘍、内分泌腫瘍、カルチノイド、VIPオーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ、クッシング病、ホルモン分泌異常、糖尿病およびその合併症、疼痛、関節炎、下痢、胃潰瘍、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、消化管閉塞、イレウス、術後再狭窄、放射線障害、眼疾患、ドライアイ、緑内障、角膜実質の炎症、虹彩炎、白内障、ならびに、結膜炎からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする。

発明の効果

- [0020] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有しており、また、ソマトスタチンと比べて向上した血中安定性を有する。また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、上記特徴を有することにより、ソマトスタチン関連疾患の治療に用いることができる。
- [0021] また、本発明の糖鎖付加ソマトスタチンに付加される糖鎖は、生体内で容易に分解されるので、その蓄積により生体に薬害を与えることはない。
- [0022] また、本発明の糖鎖付加ソマトスタチンに付加される糖鎖の一部または全部は、ヒトを含む哺乳類鳥類等の生体内に存在する糖鎖やその改変体であり、体内に投与しても副作用や抗原性を示す可能性が低い。アレルギー反応や、抗体産生が生じたり、それによって薬効が得られなくなったりする等の心配が少ない。
- [0023] さらに、本発明で用いられる糖鎖には、比較的短いものが多いので、複雑な製造工程を経ずに、均一な構造のものを得ることができる。従って、大規模かつ安定に医薬品レベルの高品質なソマトスタチン活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを得ることができる。

図面の簡単な説明

- [0024] [図1]図1A～図1Dは、本発明の一実施の形態における糖鎖付加ポリペプチドについての各化合物名と、当該化合物名を有する糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列情報を示した図である。また、図1Eは、SRIF14、SRIF28、および本発明の一実施の形態における糖鎖付加ポリペプチドを、ソマトスタチン受容体発現細胞に処置した際の、cAMP産生抑制作用（アゴニスト活性）についての IC_{50} の値を示すグラフである。
- [図2]図2は、SRIF28およびS1C(dissialo)-SRIF28をラットへ静脈内投与または皮下投与した際の、各ポリペプチドの血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図2中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図3]図3は、SRIF28、S1C(disialo)－SRIF28、N5C(disialo)－SRIF28、S1C(disialo)・N5C(disialo)－SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図3中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図4]図4は、SRIF28、S1C(disialo)－SRIF28、S1C(disialo)・R13C(disialo)－SRIF28、S1C(disialo)・N5C(disialo)・A9C(disialo)－SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図4中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図5]図5は、S1C(disialo)－SRIF28、N5C(disialo)－SRIF28、A9C(disialo)－SRIF28、S1C(disialo)・N5C(disialo)－SRIF28、N5C(disialo)・A9C(disialo)－SRIF28、S1C(disialo)・N5C(disialo)・A9C(disialo)－SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図5中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図6]図6は、S1C(disialo)－SRIF28、S1－2C(disialo)－SRIF28、S1－3C(disialo)－SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図6中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各

ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図7]図7は、S1C(dissialo)-SRIF28、S1C(dissialo(amide))-SRIF28、S1C(dissialo(aminoethylamide))-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図7中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図8]図8は、S1C(dissialo)-SRIF28、S1C(dissialo)-D-Trp22-SRIF28、S1C(dissialo(Bn))-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図8中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図9]図9は、S1C(dissialo)-SRIF28、R13C(dissialo)-SRIF28、K14C(dissialo)-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図9中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図10]図10は、S1C(dissialo)-SRIF28、E12C(dissialo)-SRIF28、N19C(dissialo)-SRIF28、29C(dissialo)-SRIF28、S1C(monosialo)-SRIF28、S1C(assialo)-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図10中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図11]図11は、S1C (disialo) -SRIF28、K14C (disialo) -SRIF28、C (disialo) -SRIF14をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図11中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図12]図12は、C (disialo) -SRIF14、C (disialo) -C12 linker -SRIF14、C (disialo) -PEG linker -SRIF14をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図12中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図13]図13は、SRIF28、S1C (disialo) -SRIF28、S1C (asialo) -SRIF28、S1C (diGlcNAc) -SRIF28、S1C (diMan) -SRIF28、S1C (GlcNAc) -SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図13中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図14]図14は、S1C (disialo) -SRIF28、S1C (trisialo) -SRIF28、S1C (tetrasialo) -SRIF28、S1-2C (disialo) -SRIF28、S1C (Asn (disialo)) -SRIF28ラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図14中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図15]図15は、SRIF28、S1C(disialo)-SRIF28、S1-2C(disialo)-SRIF28、S1-3C(disialo)-SRIF28、S1-4C(disialo)-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図15中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図16]図16は、SRIF14、C(disialo)-SRIF14、C(disialo)-K-SRIF14、C(disialo)-R-K-SRIF14、2C(disialo)-R-K-SRIF14、3C(disialo)-R-K-SRIF14をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図16中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図17]図17は、S1C(asialo)-SRIF28、S1-2C(asialo)-SRIF28、S1-3C(asialo)-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図17中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。

[図18]図18は、S1C(disialo)-SRIF28、S1-2C(disialo)-SRIF28、S1-2C(asialo)-SRIF28、S1-2C(disialo(amide))-SRIF28、S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28、C(disialo(aminoethylamide))-S1C(disialo)-SRIF28をラットへ静脈内投与および皮下投与した際の、血漿中の濃度の推移を示すグラフである。図18中、左のグラフが静脈内投与した際の各ポリペ

プチドの血漿中濃度の推移を示すグラフであり、右のグラフが皮下投与した
 実際の各ポリペプチドの血漿中濃度の推移を示すグラフである。
 [図19]図19は、本発明の一実施の形態における糖鎖付加ポリペプチドにつ
 いて、ラット血漿を用いた血漿中安定性試験の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0025] 本明細書において「ソラストアチン」とは、14個のアミノ酸配列からな
 るSRIF14、または、28個のアミノ酸配列からなるSRIF28を指
 す。

なお、本明細書において、SRIF28のアミノ酸配列におけるN末端の
 Serを1位とし、C末端のCysを28位とする。ここで、SRIF14
 は、SRIF28のアミノ酸配列における15位から28位のアミノ酸配列
 と完全一致している。なお、SRIF28のアミノ酸配列の15位はAla
 であるが、SRIF14のアミノ酸配列（配列番号1）におけるN末端のA
 laを、SRIF28の15位に対応させて、15位とする。なお、SRIF
 14およびSRIF28は、17位のCysと28位のCysにおいてジ
 スルフィド結合を有する。

[0026] SRIF14は下記のアミノ酸配列（配列番号1）を有する。なお、下記
 アミノ酸配列において、「Ala¹⁵」の15は、15位のAlaであることを
 を意味する。

Ala¹⁵ - Gly¹⁶ - Cys¹⁷ - Lys¹⁸ - Asn¹⁹ - Phe²⁰ - Phe²¹
 1 - Trp²² - Lys²³ - Thr²⁴ - Phe²⁵ - Thr²⁶ - Ser²⁷ - Cys²⁸

[0027] SRIF28は下記のアミノ酸配列（配列番号2）を有する。

Ser¹ - Ala² - Asn³ - Ser⁴ - Asn⁵ - Pro⁶ - Ala⁷ - Me
 t⁸ - Ala⁹ - Pro¹⁰ - Arg¹¹ - Glu¹² - Arg¹³ - Lys¹⁴ - A
 la¹⁵ - Gly¹⁶ - Cys¹⁷ - Lys¹⁸ - Asn¹⁹ - Phe²⁰ - Phe²¹
 - Trp²² - Lys²³ - Thr²⁴ - Phe²⁵ - Thr²⁶ - Ser²⁷ - Cys²⁸

[0028] 本明細書中において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸のみならずアミノ酸変異体および誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えば、天然タンパク原性L-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体および誘導体などの化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 β -アラニン、オルニチンなどの天然非タンパク原性アミノ酸；およびアミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられることを理解するであろう。非天然アミノ酸の例として、 α -メチルアミノ酸（ α -メチルアラニンなど）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチルーヒスチジンおよび α -メチルーヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）および側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）が挙げられる。ソマトスタチン受容体に対する親和性を有するソマトスタチン類縁体のいくつかは、非天然アミノ酸を含むことが知られる。好ましい態様において、本発明の化合物に含まれるアミノ酸は、天然アミノ酸のみからなる。

[0029] 本明細書中において、アミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたという場合、置換等されるアミノ酸の個数は、ソマトスタチン受容体に対する親和性を保持する限り特に限定されないが、1～9個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個程度であるかあるいは全体の長さの20%以内、好ましくは10%以内である。置換または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸またはアミノ酸アナログであり得、好ましくは天然のアミノ酸である。アミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたソマトスタチンペプチドの例としては、例えば、22位のTrpをD体のTrp（D-Trp）で置換したソマトスタチンペプチド、19位のAsnを欠失させたもの（J. Med. Chem., 2001, 44, 2238-2246）、25位のPheをTyrに

置換したもの、8位のMetをLeuに置換したもの（Endocrinology, 1982, 10:1049-1051）等が挙げられる。

[0030] 本発明において、「SRIF14またはSRIF28の類縁体」とは、ソマトスタチンと構造上類似したポリペプチドおよび／またはソマトスタチンと重複した構造を有するポリペプチド、例えば、ソマトスタチンのアミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が保存的に置換されたポリペプチド、ソマトスタチン改変体、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有するソマトスタチンのフラグメント、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有する伸長ソマトスタチンが挙げられる。

[0031] 本明細書中において、「アミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が保存的に置換された」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数および／または疎水性指数が類似している置換であって、そのような置換の前後で、ソマトスタチン受容体に対する親和性の明らかな低下または消失を生じない置換をいう。

[0032] 本明細書中において、「ソマトスタチン改変体」とは、ソマトスタチンの改変体であって、ソマトスタチンの天然に存在する変異体、またはソマトスタチンを人工的に改変した化合物を含み、そのような改変としては、例えば、ソマトスタチンの1または複数のアミノ酸残基の、アルキル化、アシル化（例えばアセチル化）、アミド化、カルボキシル化、エステル形成、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、水酸化、標識成分の結合等が挙げられる。

[0033] 本明細書中において、「ソマトスタチン受容体に対する親和性を有するソマトスタチンのフラグメント」とは、ソマトスタチンのN末端および／またはC末端から1個またはそれ以上のアミノ酸が欠失し、かつソマトスタチン受容体に対する親和性を維持したペプチドである。

[0034] 本明細書中において、「ソマトスタチン受容体に対する親和性を有する伸長ソマトスタチン」とは、SRIF28またはSRIF14のN末端および／またはC末端に1個またはそれ以上のアミノ酸が付加され、かつソマトス

タチン受容体に対する親和性を維持したペプチドである。

[0035] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；または、これらのポリペプチドの N 末端または C 末端にさらにアミノ酸が付加されたポリペプチド；であって、少なくとも 1 つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、かつ、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有する糖鎖付加ポリペプチドを含む。

配列番号 1 または配列番号 2 と相同性を有するポリペプチドは、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有する限り、好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性を有することができる。

[0036] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、上記のように、SRIF14 または SRIF28 の N 末端および／または C 末端に、さらにアミノ酸が付加されたポリペプチドも含む。

本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、SRIF14 の N 末端にさらに付加されるアミノ酸は、ソマトスタチン受容体に対する親和性を維持する限り特に制限されないが、例えば、1 以上 20 個以下のアミノ酸を付加することができる。

ここで、SRIF14 の N 末端にさらに付加されるアミノ酸は、X-Y で表すことができる。なお、Y は SRIF14 のポリペプチドにおける N 末端アミノ酸に直接結合するアミノ酸であり、Y は、以下 (1) ~ (15) のいずれかのアミノ酸配列からなる：

- (1) L y s、
- (2) A r g - L y s、
- (3) G l u - A r g - L y s、
- (4) A r g - G l u - A r g - L y s、
- (5) P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、
- (6) A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、

- (7) Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(8) Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(9) Pro - Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(10) Asn - Pro - Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(11) Ser - Asn - Pro - Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(12) Asn - Ser - Asn - Pro - Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(13) Ala - Asn - Ser - Asn - Pro - Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、
(14) Ser - Ala - Asn - Ser - Asn - Pro - Ala - Met - Ala - Pro - Arg - Glu - Arg - Lys、および、
(15) 上記配列(2)～(14)において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列

また、Xは1以上6以下の任意のアミノ酸であって、1個、2個、3個、4個、5個または、6個の任意のアミノ酸を示す。好ましくは、Xは、糖鎖付加アミノ酸であり、より好ましくは糖鎖付加Asnまたは糖鎖付加Cysである。

[0037] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、SRIF28のN末端にさらに付加されるアミノ酸は、ソマトスタチン受容体に対する親和性を維持する限り特に制限されないが、例えば、1以上6個以下の任意のアミノ酸を付加することができ、1個、2個、3個、4個、5個または、6個の任意のアミノ酸を付加することができる。SRIF28のN末端にさらに付加されるアミノ酸は、好ましくは糖鎖付加アミノ酸であり、より好ましくは糖鎖付加Asnまたは糖鎖付加Cysである。また、1以上6個以下の任意のアミノ酸は

、その全てを糖鎖付加アミノ酸とすることもできる。

[0038] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、SRIF14またはSRIF28のC末端にさらに付加されるアミノ酸は、ソマトスタチン受容体に対する親和性を維持する限り特に制限されないが、例えば、1以上6個以下の任意のアミノ酸を付加することができ、1個、2個、3個、4個、5個または、6個の任意のアミノ酸を付加することができる。SRIF14またはSRIF28のC末端にさらに付加されるアミノ酸は、好ましくは糖鎖付加アミノ酸であり、より好ましくは糖鎖付加Asnまたは糖鎖付加Cysである。また、1以上6個以下の任意のアミノ酸は、その全てを糖鎖付加アミノ酸とすることもできる。

[0039] 本明細書中において、「ソマトスタチンのN末端側（SRIF28の1位またはSRIF14の15位）にさらに、1若しくは数個のアミノ酸が付加されたペプチド」という場合、SRIF28においては、N末端である1位のSerに、さらに任意のアミノ酸または糖鎖付加アミノ酸が付加したもののいう。また、SRIF14においては、N末端である15位のAlaに、さらに任意のアミノ酸または糖鎖付加アミノ酸が付加したものをいう。

同様に、「C末端側（SRIF28またはSRIF14の28位）にさらに、1若しくは数個のアミノ酸が付加されたペプチド」という場合、SRIF28またはSRIF14の28位のCysに、さらに任意のアミノ酸または糖鎖付加アミノ酸が付加したものをいう。

[0040] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、そのN末端またはC末端に、リンカーを介してアミノ酸をさらに付加することもできる。このようなリンカーとしては、例えば、アミノ酸とペプチド結合できるように、両末端にアミノ基およびカルボキシ基を有するアルキル鎖やポリエチレングリコール鎖等を挙げることができる。このようなリンカーとしては、例えば、 $-NH-(CH_2)_n-CO-$ （式中、 n は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは1～15の整数を示す。）や $-NH-(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-CO-$ （式中、 m は整数であり、目的

とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは1～7の整数を示す。)等を挙げることができる。より具体的には、 $\text{—NH—(CH}_2\text{)}_{11}\text{—CO—(C12 linker)}$ や $\text{—NH—(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—CO—(PEG linker)}$ 等を挙げることができる。また、リンカーを介して、糖鎖付加ポリペプチドに付加されるアミノ酸は、特に限定されないが、好ましくは糖鎖付加アミノ酸である。糖鎖付加アミノ酸としては、例えば、糖鎖付加Asnまたは糖鎖付加Cysを挙げることができる。

[0041] また、本発明の一実施態様において、糖鎖付加ポリペプチドは、そのN末端に、アジド基を導入することもできる。糖鎖付加ポリペプチドのN末端をアジ化する、アジド-アルキン[3+2]環化付加反応やStaudinger反応などを利用して、様々な分子を選択的に導入できることから好ましい。糖鎖付加ポリペプチドをアジ化する方法は、特に制限されないが、例えば、固相合成中において樹脂上に合成された糖ペプチドのN末端へ、縮合剤を用いてアジド置換脂肪酸を縮合させることにより得ることができる。アジド置換脂肪酸としては、4-アジドブタン酸、5-アジドペンタン酸(5-Azido-pentanoic acid)、6-アジドヘキサン酸を挙げることができる。

[0042] また、本発明の一実施態様において、糖鎖付加ポリペプチドは、そのN末端に、標識化合物を付加させることもできる。本発明に使用される標識化合物としては、以下に限定されないが、例えば、ビオチン、蛍光色素、金属イオンキレート剤等を挙げることができる。標識化合物は、糖ペプチドのN末端と直接結合させることもできるし、リンカーを介して糖ペプチドのN末端と結合とさせることもできる。例えば、標識化合物として、ビオチンを糖ペプチドのN末端に付加させることにより、アビジンとの強い結合を利用して、研究用試薬、臨床検査薬、またはミサイル療法への応用を可能とすることができる。

なお、本発明の糖鎖付加ポリペプチドへの標識化合物の付加は、従来当業

者に周知の方法により行うことができる。例えば、固相合成中における樹脂上の糖鎖付加ポリペプチドのN末端に縮合剤を用いて標識化合物を縮合させることができる。

[0043] 本発明の「糖鎖付加ポリペプチド」は、少なくとも1個のアミノ酸が、糖鎖付加アミノ酸で置換されたことを特徴とする。

本明細書中において、「糖鎖付加ポリペプチド」には、ソマトスタチンの少なくとも1個のアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されたポリペプチド、上記ソマトスタチン類縁体において少なくとも1個のアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されたポリペプチド等が含まれ、それぞれ、さらに糖鎖付加アミノ酸以外のアミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されていても、本発明の糖鎖付加ポリペプチドに含まれる。これらのペプチドのC末端がアミド化されたペプチド（たとえば、Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-NH₂（配列番号3）のアミノ酸配列を有するSRIF14NH₂や、Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-NH₂（配列番号4）のアミノ酸配列を有するSRIF28NH₂の、少なくとも1個のアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されたペプチドも、本発明の糖鎖付加ポリペプチドに含まれる。さらに、これらのペプチドの塩も、糖鎖付加ポリペプチドに含まれる。

[0044] 本明細書中において、塩は、酸付加塩または塩基付加塩のいずれであってもよい。酸付加塩を形成するために通常用いられる酸は、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等の無機酸およびp-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-ブロモフェニルスルホン酸、カルボン酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等の有機酸である。塩基付加塩としては、水酸化アンモニウムまたはアルカリ若しくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等の無機塩基から誘導された塩が挙げられる。特に、

薬学的に許容される塩が好ましい。

[0045] 本明細書中において、「糖鎖付加アミノ酸」とは、糖鎖が結合したアミノ酸であり、ここで糖鎖とアミノ酸とは、リンカーを介して結合していてもよい。糖鎖とアミノ酸との結合部位に特に制限はないが、糖鎖の還元末端にアミノ酸が結合していることが好ましい。

糖鎖が結合するアミノ酸の種類に特に限定はなく、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のいずれを用いることもできる。糖鎖付加アミノ酸が生体内に糖ペプチド（糖たんぱく質）として存在するものと同一または類似の構造を有するという観点からは、糖鎖付加アミノ酸は、N-結合型糖鎖のような糖鎖付加A s n、O-結合型糖鎖のような糖鎖付加S e rおよび糖鎖付加T h rが好ましく、特に糖鎖付加A s nが好ましい。

[0046] また、糖鎖とアミノ酸とがリンカーを介して結合している場合、リンカーとの結合容易性という観点からは、糖鎖付加アミノ酸のアミノ酸は、アスパラギン酸やグルタミン酸等の分子内に2つ以上のカルボキシ基を持つアミノ酸、リシン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン等の分子内に2以上のアミノ基を持つアミノ酸、セリン、スレオニン、チロシン等の分子内に水酸基を持つアミノ酸、システイン等の分子内にチオール基を持つアミノ酸、アスパラギン、グルタミン等の分子内にアミド基を持つアミノ酸、が好ましい。特に、反応性の観点からは、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミンが好ましい。

[0047] なお、本発明の任意の糖鎖付加ポリペプチドについて、糖鎖構造、糖鎖以外の構造、糖鎖の付加部位および糖鎖の付加数が同一である場合に、糖鎖付加アミノ酸が、糖鎖付加A s n（リンカーを介さない）の場合と糖鎖付加C y s（リンカーを介する）の場合で、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの血中半減期に大きな違いはないと考えられる。

[0048] 糖鎖とアミノ酸とがリンカーを介して結合している場合、リンカーとしては、当該分野において用いられているものを広く使用することができるが、

例えば、 $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_a-\text{CH}_2-$ （式中、 a は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0～4の整数を示す。）、 C_{1-10} ポリメチレン、 $-\text{CH}_2-\text{R}-$ （ここで、 R は、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、アリール、置換されたアリール、炭素環基、置換された炭素環基、複素環基および置換された複素環基からなる群より選択される基から水素原子が1つ脱離して生ずる基である）、 $-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_a-(\text{CO})-$ （式中、 a は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0～4の整数を示す。）等を挙げることができる。

[0049] 糖鎖付加アミノ酸において糖鎖とソマトスタチン骨格上のアミノ酸がリンカーを介して結合している場合、リンカーが、糖鎖側の末端にアミノ酸を含むことも好ましい。アミノ酸の種類は特に限定されないが、好ましい例としては Asn を挙げることができる。

[0050] なお、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、その記載（例えば、「アミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換された糖鎖付加ポリペプチド」という記載）によって何ら製造方法が限定されるものではなく、後述のA法またはB法のいずれの方法で製造した糖鎖付加ポリペプチドであっても、「アミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換された糖鎖付加ポリペプチド」に含まれる。また、例えば、アミノ酸の結合していない糖鎖を、ペプチド上のアミノ酸に直接またはリンカーを介して結合した糖鎖付加ポリペプチド；糖鎖付加ポリペプチドにおいて、付加した糖鎖にさらに糖または糖鎖を付加することですでに付加された糖鎖を伸長させた糖鎖付加ポリペプチド；糖鎖付加アミノ酸のアミノ基および／またはカルボキシ基に1または数個のアミノ酸を結合させ、さらにこれを1または複数のソマトスタチンフラグメントと連結させた糖鎖付加ポリペプチド；アミノ酸の結合した糖鎖を、ペプチド上のアミノ酸にリンカーを介して結合した糖鎖付加ポリペプチド、なども最終的な構造が一致している限り、本発明の糖鎖付加ポリペプチドに含まれる。

[0051] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖付加アミノ酸で置換されるアミノ酸の数は、血中安定性や成長ホルモン等の分泌抑制等の生理活性、最終的な糖鎖付加ポリペプチドに存在するアミノ酸の個数や糖鎖付加前後の糖鎖付加ポリペプチドの分子量、等により適宜調節すればよい。例えば、1～10個置換することが好ましく、1～5個置換することがより好ましく、1～3個置換することがさらに好ましい。簡便性の観点からは、1個の置換で所望の活性が得られるのであれば、1個の置換を選択することが好ましい。なお、本発明の一態様においては、2個以上置換することが好ましく、例えば、2～5個置換することが好ましく、2～3個置換することがより好ましい。一般に、ソマトスタチンの1個のアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換された糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖付加アミノ酸以外のアミノ酸の1個以上をさらに糖鎖付加アミノ酸で置換した場合、血中安定性は増大し、受容体に対する親和性は減少する傾向がある。しかしながら、一方で糖鎖付加ポリペプチドの血中安定性は増大するため、減少したソマトスタチン活性を補償または増大させることが可能である。

また、糖鎖付加ポリペプチド中に複数の糖鎖を有する場合、糖鎖同士は糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列において、連続したアミノ酸に付加することもできるし、間隔をあけて、アミノ酸に付加することもできる。糖鎖を密に配置すると、急激な血漿中濃度の上昇がない点において好ましい。また、生物学的利用能の観点からは、糖鎖を付加する位置は、連続したアミノ酸に密に付加するよりも、間隔をとり複数の糖鎖を付加する方が好ましい。

[0052] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、アミノ酸を糖鎖付加アミノ酸で置換する部位は、特に、複数のソマトスタチン受容体への親和性の観点より適宜調節することができる。

[0053] 本発明の一態様において、アミノ酸を糖鎖付加アミノ酸で置換する部位は、糖鎖付加ポリペプチドのソマトスタチン受容体に対する親和性のうち、複数のSSTR1～SSTR5の受容体に対して親和性を有するという観点からは、例えば、SRIF14における19位に相当するアミノ酸、SRIF

14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側から1番目、2番目、3番目、6番目、10番目、および、14番目に付加されるアミノ酸、ならびに、SRIF14のC末端側にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側から1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸を挙げることができる。好ましくは、SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側から3番目、6番目、10番目、および、14番目に付加されるアミノ酸を挙げることができる。

また、同様に、複数のSSTR1～SSTR5の受容体に対して親和性を有するという観点からは、SRIF28における、1位、5位、9位、12位、13位、14位、および、19位に相当するアミノ酸、ならびに、SRIF28のC末端にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側から1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸を挙げることができる。好ましくはSRIF28の1位、5位、9位、および、12位に相当するアミノ酸を挙げることができる。

また、特に本発明の糖鎖付加ポリペプチドの2以上のアミノ酸を糖鎖付加アミノ酸で置換する場合の例として、糖鎖付加ポリペプチドが複数のソマトスタチン受容体に対する親和性を有するという観点からは、例えばSRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より10番目および14番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より6番目および10番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より2番目および14番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より14番目および15番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より14番目、15番目、および16番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より6番目、10番目、および14番目に付加されるアミノ酸の置換などを挙げることができる。好ましくは、SRIF14のN末端側にさ

らに付加されるアミノ酸においてN末端側より10番目および14番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より6番目および10番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より14番目および15番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より14番目、15番目、および16番目に付加されるアミノ酸；SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より6番目、10番目、および14番目に付加されるアミノ酸の置換などを挙げることができる。

また、同様に、2以上のアミノ酸を糖鎖付加アミノ酸で置換する場合の例として、糖鎖付加ポリペプチドが複数のソマトスタチン受容体に対する親和性を有するという観点からは、SRIF28における、1位と5位に相当するアミノ酸；5位と9位に相当するアミノ酸；1位と13位に相当するアミノ酸；1位に相当するアミノ酸と1位のN末端側にさらに付加するアミノ酸においてN末端側より1番目に付加されるアミノ酸；1位に相当するアミノ酸と1位のN末端側にさらに付加するアミノ酸においてN末端側より1番目および2番目に付加されるアミノ酸；1位、5位、および、9位に相当するアミノ酸の置換などを挙げることができ、好ましくは1位と5位に相当するアミノ酸の置換；5位と9位に相当するアミノ酸の置換；1位に相当するアミノ酸の置換と1位のN末端側にさらに付加するアミノ酸において1番目に付加されるアミノ酸；1位に相当するアミノ酸と1位のN末端側にさらに付加するアミノ酸においてN末端側より1番目および2番目に付加されるアミノ酸；1位、5位、および、9位に相当するアミノ酸の置換である。

[0054] 本発明の一態様において、アミノ酸を糖鎖付加アミノ酸で置換する部位は、糖鎖付加ポリペプチドの血中安定性という観点からは、例えば、SRIF14における19位に相当するアミノ酸、SRIF14のN末端にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側から1番目、2番目、3番目、6番目、10番目、14番目に付加されるアミノ酸、SRIF14のC末端側にさら

に付加されるアミノ酸においてC末端側から1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸を挙げることができる。好ましくは、SRIF14における19位に相当するアミノ酸、SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸、SRIF14のC末端側にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側より1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸を挙げることができる。より好ましくは、SRIF14における19位に相当するアミノ酸、SRIF14のN末端側にさらに付加されるアミノ酸においてN末端側より1番目に付加されるアミノ酸、ならびに、SRIF14のC末端側にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側より1番目に付加されるアミノ酸である。

また、同様に、糖鎖付加ポリペプチドの血中安定性という観点からは、例えば、SRIF28における、1位、5位、9位、12位、13位、14位、および、19位に相当するアミノ酸、ならびに、SRIF28のC末端にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側から1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸からなる群より選択される1以上のアミノ酸であり、好ましくはSRIF28における13位、14位、および、19位に相当するアミノ酸、ならびに、SRIF28のC末端にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側から1番目、および、2番目に付加されるアミノ酸からなる群より選択される1以上のアミノ酸であり、特に好ましくはSRIF28における14位、および、19位に相当するアミノ酸、ならびに、SRIF28のC末端にさらに付加されるアミノ酸においてC末端側から1番目に付加されるアミノ酸からなる群より選択される1以上のアミノ酸である。特にSRIF28のN末端から遠い部位のアミノ酸の置換も好ましい。

[0055] ここで、「特定のアミノ酸に相当するアミノ酸」とは、糖鎖ポリペプチドにおいてアミノ酸の付加、欠失等がない限り、SRIF14またはSRIF28のアミノ酸配列に対応する同一の位置のアミノ酸をいう。また、糖鎖ポリペプチドのアミノ酸配列内において、アミノ酸の付加、欠失が存在する場合には、アミノ酸の付加、欠失によるアミノ酸配列上の移動を考慮した位置

にあるアミノ酸をいう。例えば、1位から4位までに $Ser_1 - Ala_2 - Asn_3 - Ser_4 -$ の配列を有する糖鎖付加ポリペプチドにおいて、2位と3位のアミノ酸の間に1つのアミノ酸 (Trp) が付加された場合 ($Ser - Ala - Trp - Asn - Ser -$)、3位のアミノ酸 (Asn) に相当するアミノ酸とは、糖鎖付加ポリペプチドにおいて、 Trp の挿入によりC末端側に1つ移動したアミノ酸 (Asn) をいう。

[0056] 本発明の一態様において、糖鎖付加アミノ酸で置換するアミノ酸は、SRIF28における17位、21位、22位、23位、および、28位に相当するアミノ酸以外のアミノ酸から選択される1以上のアミノ酸であることが好ましく、特に、SRIF28における17位、22位、23位、および28位に相当するアミノ酸以外のアミノ酸から選択される1以上のアミノ酸であることがより好ましい。

[0057] 本発明の一態様において、2以上のアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されている場合に、アミノ酸を糖鎖付加アミノ酸で置換する部位は、上記のいずれの組み合わせも採用することができるがこれに限定されない。例えば、1の部位が上記の好ましい部位から選択され、他の部位がSRIF14またはSRIF28の任意の部位から選択される組み合わせ；1の部位が上記の好ましい部位から選択され、他の部位がソマトスタチンのN末端 (SRIF28における1位、または、SRIF14における15位) またはC末端にさらに付加された1若しくは数個のアミノ酸の任意の部位から選択される組み合わせ等もまた、本発明の好ましい一態様に含まれる。

[0058] 本発明の一態様において、糖鎖付加アミノ酸以外のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加が生ずる部位は、例えば、SRIF28における17位、22位、23位、および28位に相当するアミノ酸以外のアミノ酸から選択される1以上のアミノ酸であることが好ましい。

[0059] 本明細書中において、「糖鎖」とは、単位糖 (単糖および／またはその誘導体) が1つ以上連なってできた化合物をいう。単位糖が2つ以上連なる場合、各々の単位糖同士の間は、グリコシド結合による脱水縮合によって結合

する。このような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される単糖類および多糖類（グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、シアル酸並びにそれらの複合体および誘導体）の他、分解された多糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解または誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。糖鎖は直鎖型であっても分岐鎖型であってもよい。

[0060] また、本明細書中において、「糖鎖」には糖鎖の誘導体も含まれ、糖鎖の誘導体としては、例えば、糖鎖を構成する糖が、カルボキシ基を有する糖（例えば、C-1位が酸化されてカルボン酸となったアルドン酸（例えば、D-グルコースが酸化されたD-グルコン酸）、末端のC原子がカルボン酸となったウロン酸（D-グルコースが酸化されたD-グルクロン酸））、アミノ基またはアミノ基の誘導体（例えば、アセチル化されたアミノ基）を有する糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミンなど）、アミノ基およびカルボキシ基を両方とも有する糖（例えば、N-アセチルノイラミン酸（シアル酸）、N-アセチルムラミン酸など）、デオキシ化された糖（例えば、2-デオキシ-D-リボース）、硫酸基を含む硫酸化糖、リン酸基を含むリン酸化糖などである糖鎖が挙げられるがこれらに限定されない。

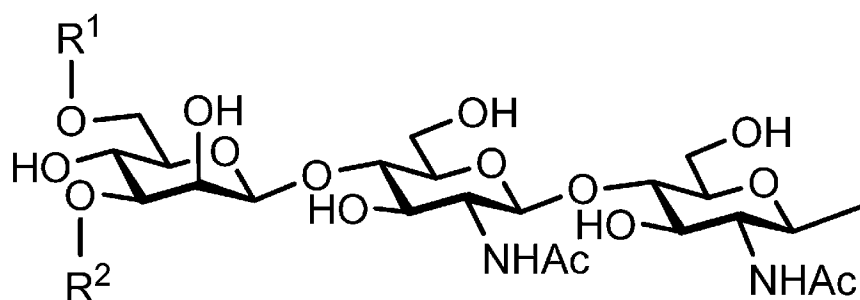
[0061] 本発明において、好ましい糖鎖は、ソマトスタチンに付加された場合（糖鎖付加アミノ酸の形でソマトスタチンのアミノ酸と置換された場合）に、ソマトスタチンの血中安定性を増大させ、かつ、ソマトスタチン受容体に対する親和性を消失させない糖鎖である。本発明のある態様において、好ましい糖鎖は、ソマトスタチンに付加された場合（糖鎖付加アミノ酸の形でソマトスタチンのアミノ酸と置換された場合）に、ソマトスタチンの複数の受容体に対する親和性を維持できる糖鎖であり、さらに好ましくは、ソマトスタチンの全ての受容体に対する親和性を維持できる糖鎖である。

[0062] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖は特に限定されず、生体内で複合糖質（糖ペプチド（または糖タンパク質）、プロテオグリカン、糖脂質等）として存在する糖鎖であってもよいし、生体内では複合糖質として存在しない糖鎖であってもよい。

[0063] 生体内で複合糖質として存在する糖鎖は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドが生体に投与されるという観点から好ましい。かかる糖鎖としては、生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）としてペプチド（またはタンパク質）に結合している糖鎖であるN-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖等が挙げられる。好ましくは、N-結合型糖鎖が用いられる。N結合型糖鎖としては、例えば、高マンノース（ハイマンノース）型、複合（コンプレックス）型、混成（ハイブリッド）型を挙げることができ、特に好ましくは、複合型が良い。

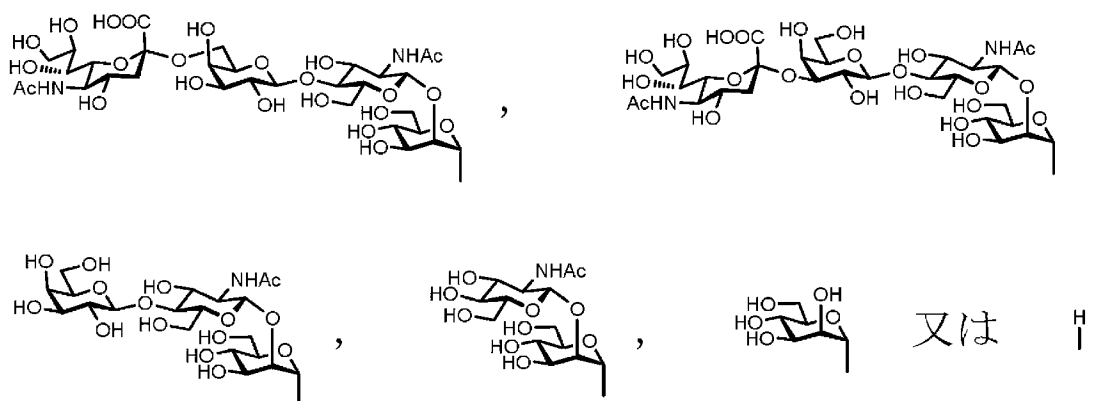
[0064] 本発明で使用する好ましい複合型糖鎖としては、例えば、下記一般式

[化3]



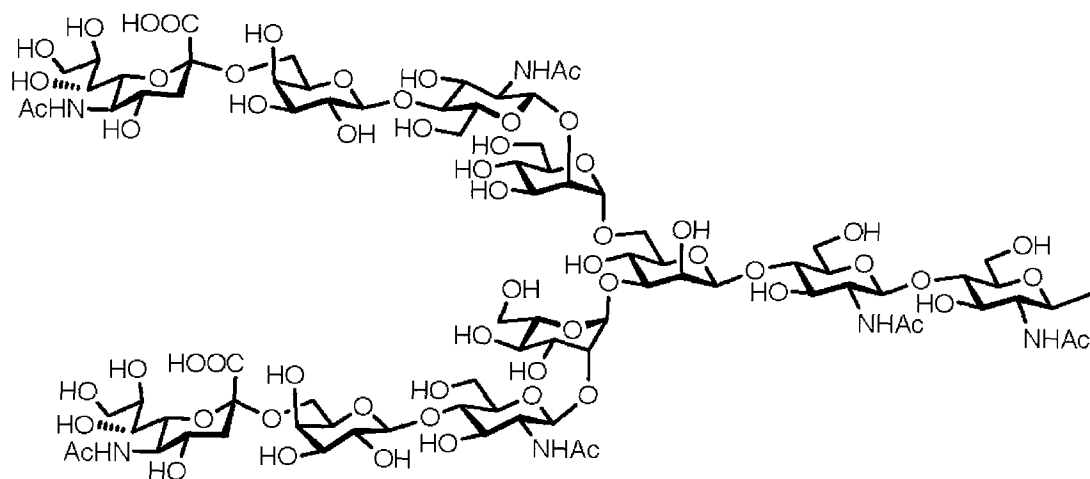
[式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって、

[化4]



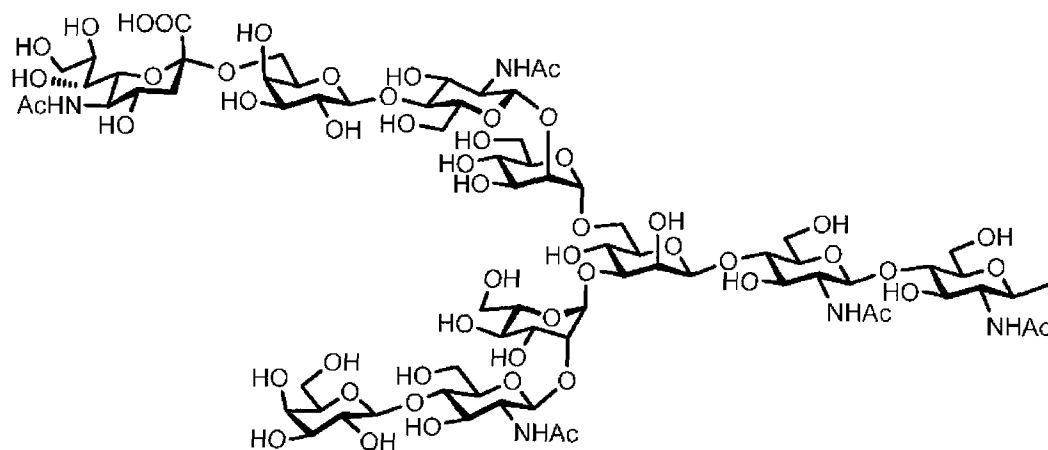
鎖としては、例えば、以下に示すジシアロ糖鎖、

[化6]

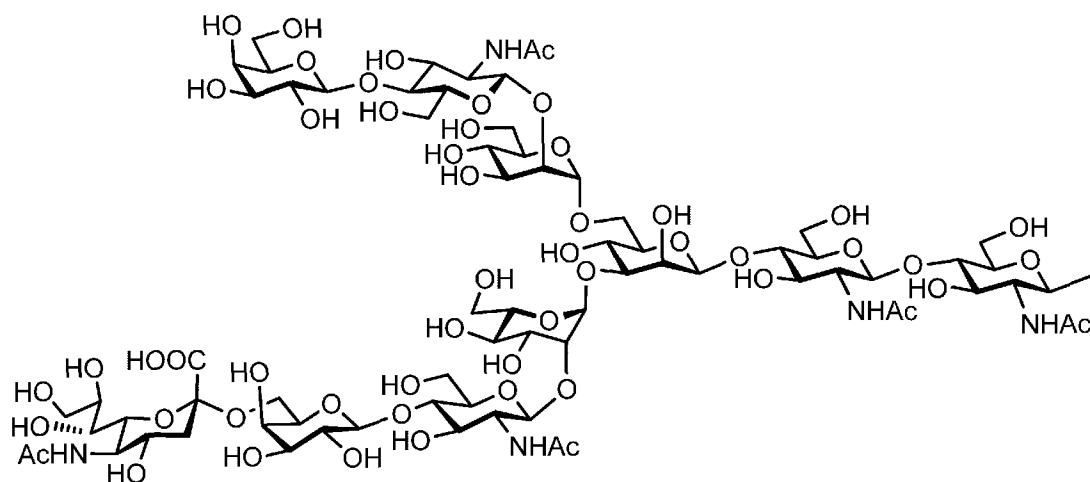


モノシアロ糖鎖、

[化7]

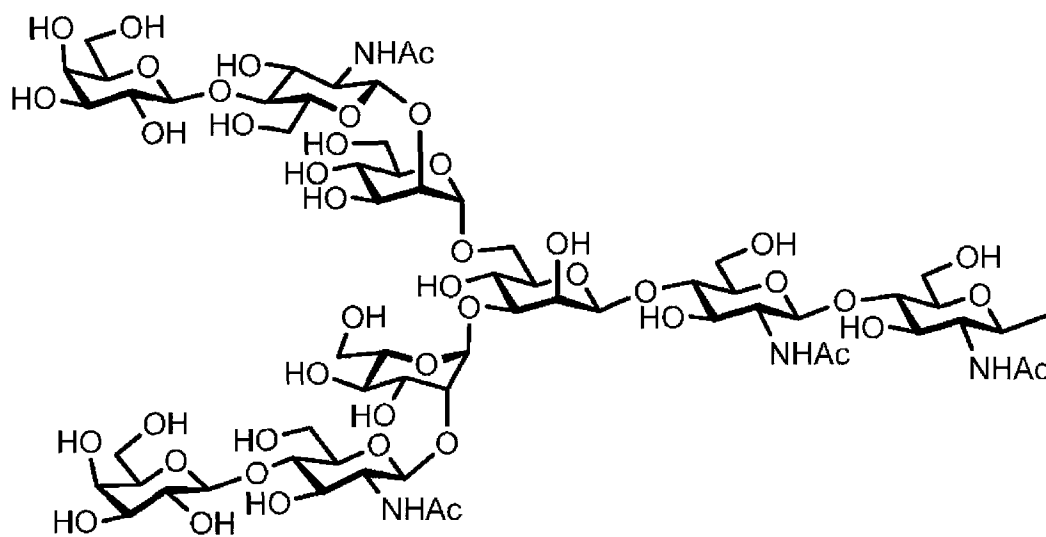


[化7A]



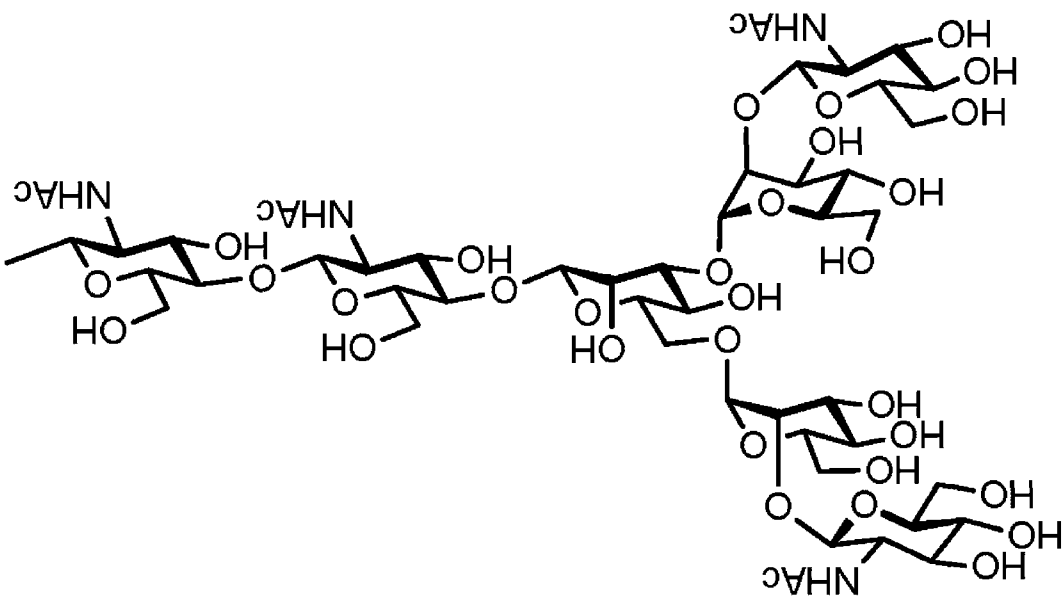
アジア口糖鎖、

[化8]



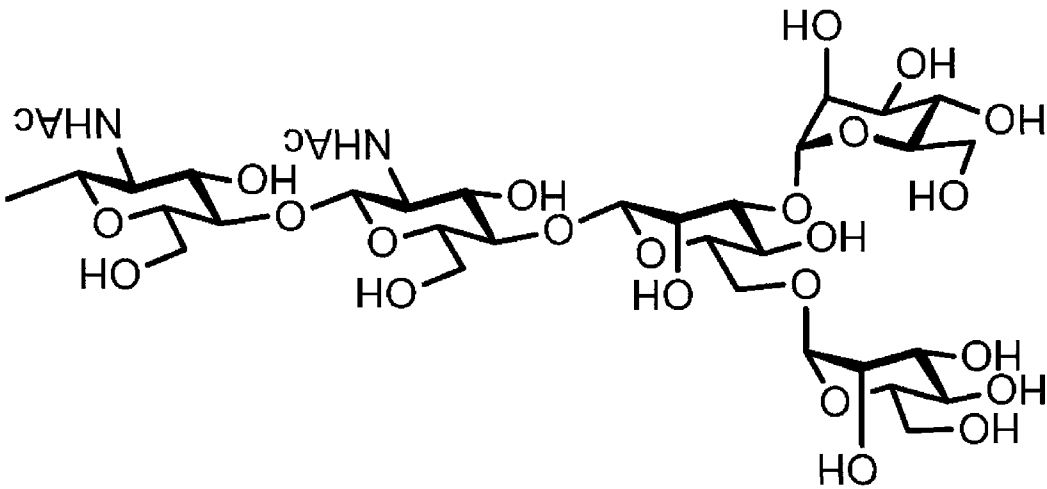
ジグルクナック糖鎖、

[化9]



ジマンノース糖鎖、

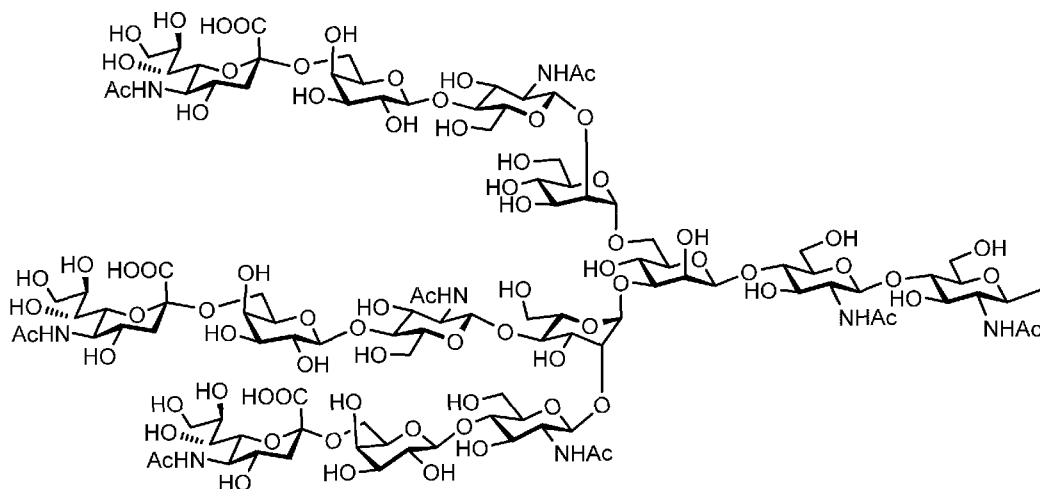
[化10]



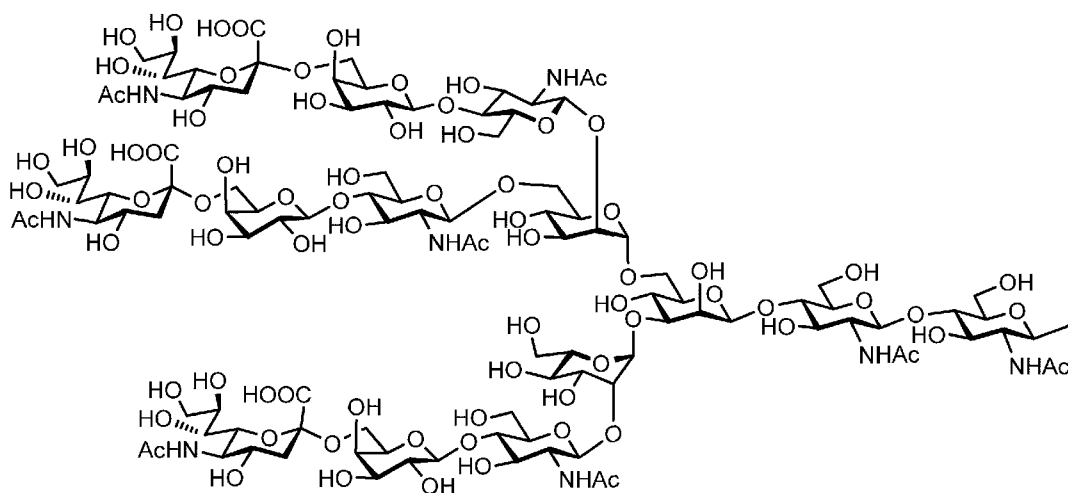
等が好ましく、より好ましくはジマンノース糖鎖である。

また、本発明の複合型糖鎖には、上記の2本鎖複合型糖鎖の他、3本鎖の複合型糖鎖（3分岐型複合型糖鎖）、4本鎖の複合型糖鎖（4分岐型複合型糖鎖）も含む。例えば、3本鎖、4本鎖の複合型糖鎖としては、以下の構造式で表わされる、トリシアロ糖鎖

[化-1]

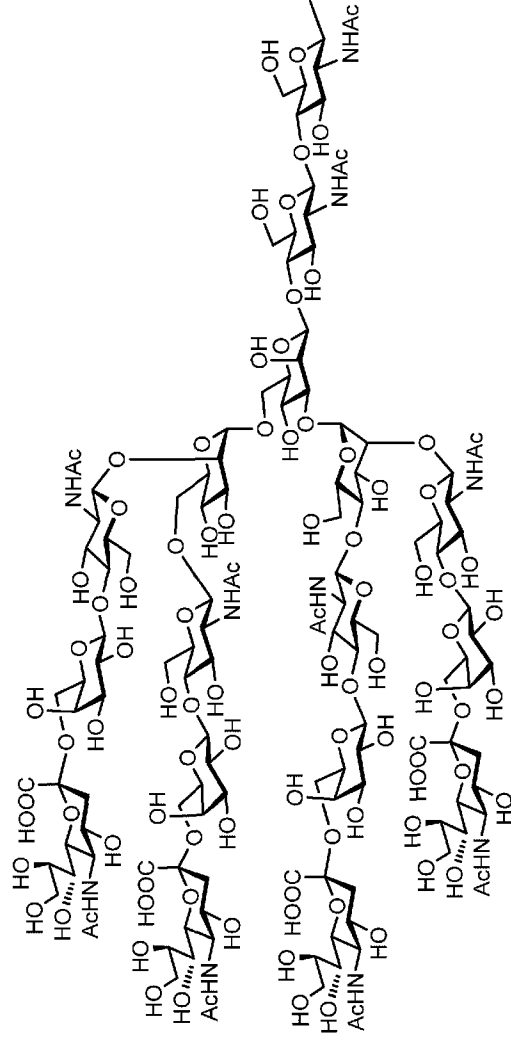


[化-2]



下記構造式で表わされるテトラシアロ糖鎖

[化-3]

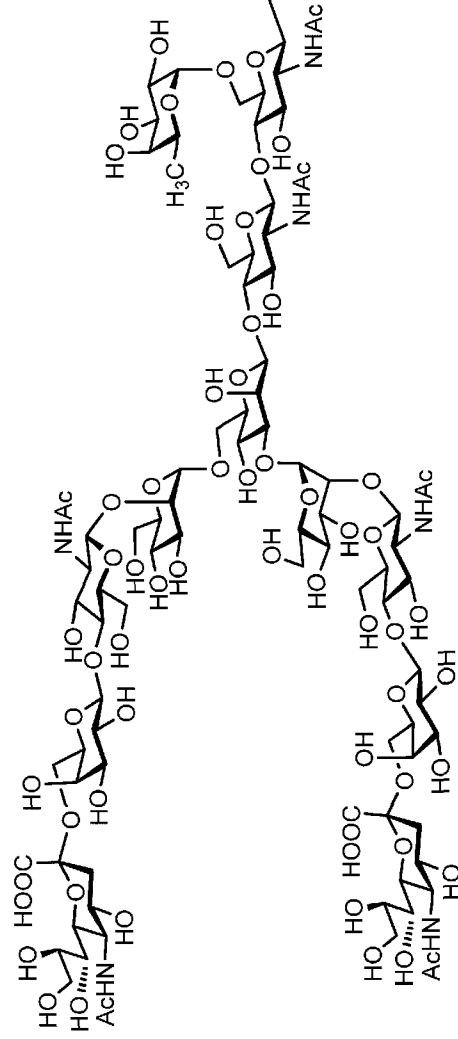


を挙げることができる。また、3本鎖複合型糖鎖および4本鎖複合型糖鎖としては、これらのトリシアロ糖鎖またはテトラシアロ糖鎖の非還元末端から1又は複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。

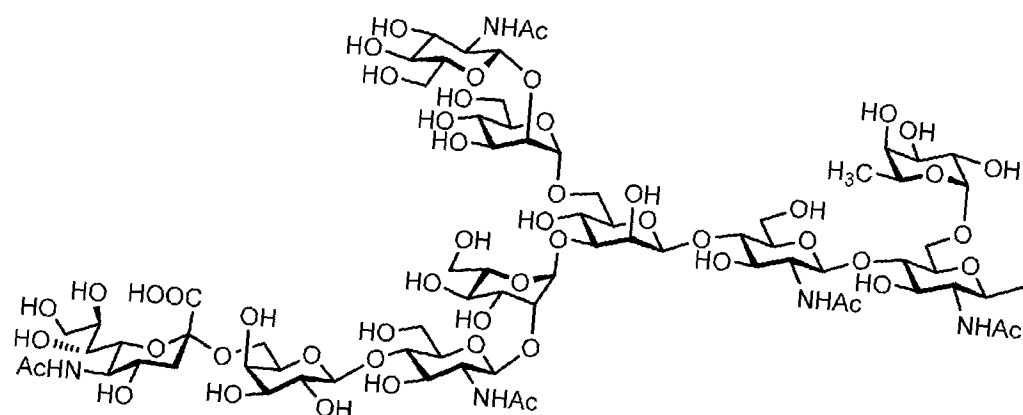
さらに、本発明の複合型糖鎖には、フコースが付いたものも含む。フコースが付いた複合型糖鎖としては、以下の構造式で表わされるフコース含有複

合型糖鎖

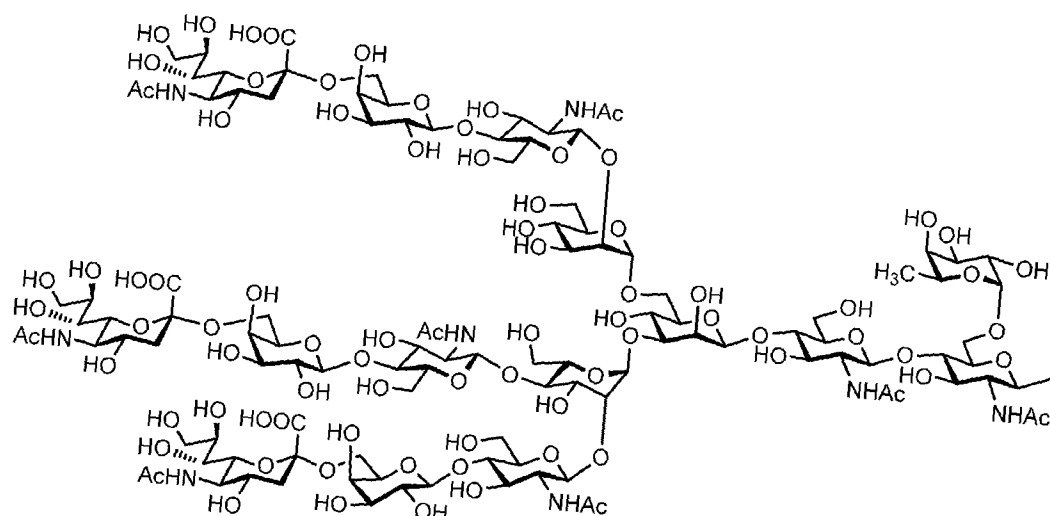
[化-4]



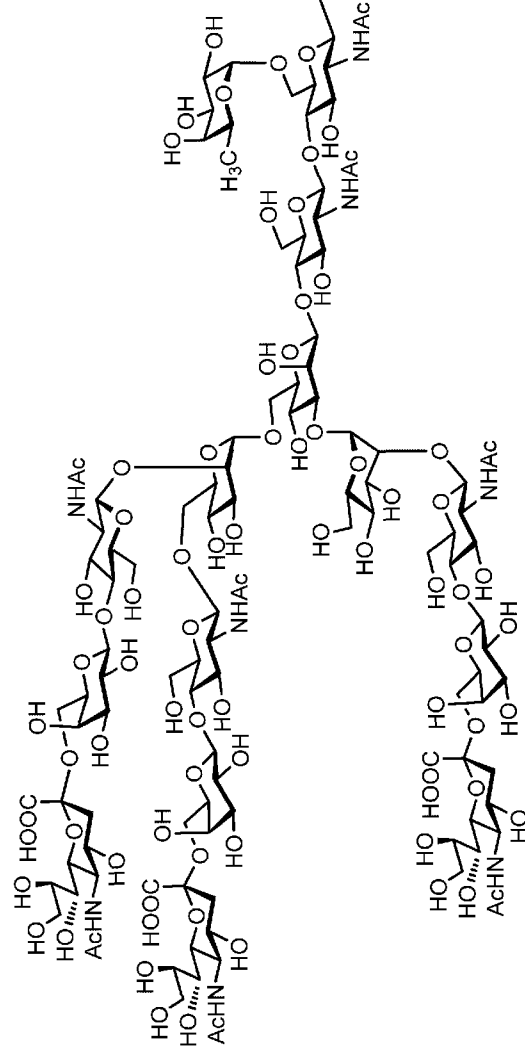
[化-5]



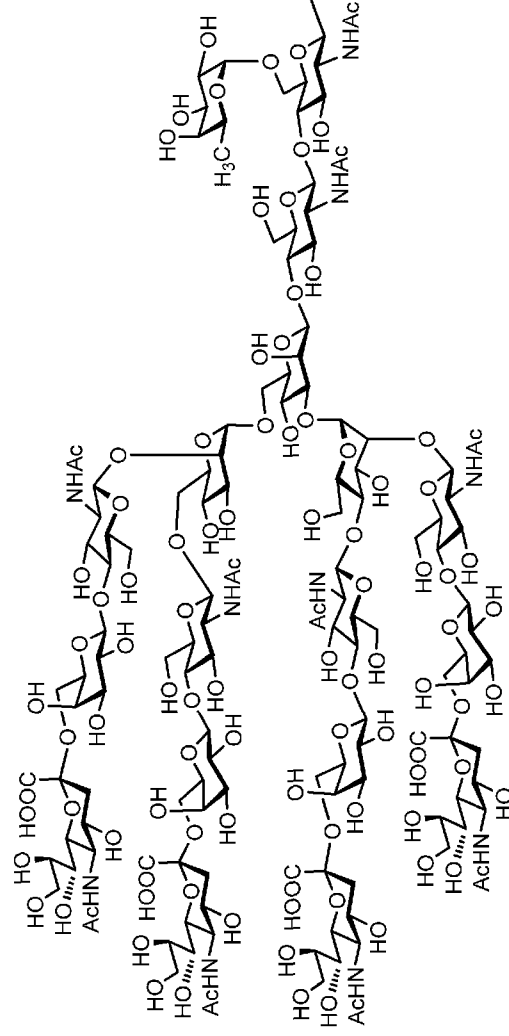
[化-6]



[化-7]



[化-8]



を挙げることができる。また、これらのフコース含有複合型糖鎖の非還元末端から 1 又は複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。

また、本明細書中において「ジシアロ糖鎖」、「モノシアロ糖鎖」、「シアロ糖鎖」、「ジグルクナック糖鎖」、「ジマンノース糖鎖」、「2 本鎖複合型糖鎖」、「3 本鎖複合型糖鎖」、「4 本鎖複合型糖鎖」、「フコース含有複合型糖鎖」には、上記化学式で示したもののほか、化学式で示した例と結合様式の異なるものも含まれ、かかる糖鎖も本発明の糖鎖として好ましく用いられる。かかる糖鎖としては、例えば、ジシアロ糖鎖またはモノシア

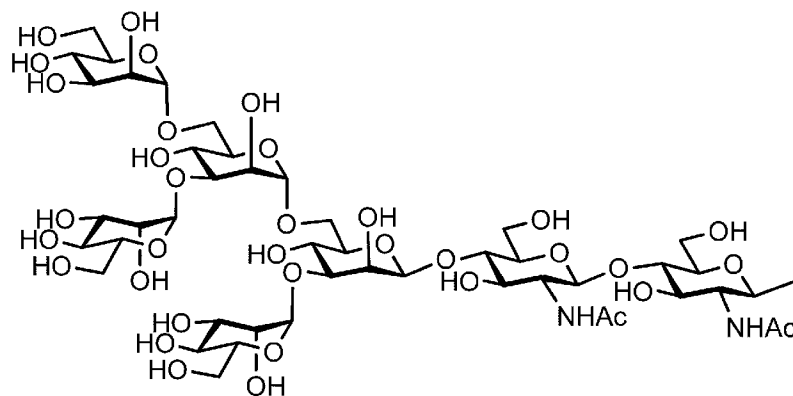
口糖鎖においてシアル酸とガラクトースが ($\alpha 2 \rightarrow 3$) 結合で結合しているもの等が挙げられる。

また、糖鎖の非還元末端にシアル酸を有する糖鎖の場合には、シアル酸のカルボキシ基が修飾された糖鎖を用いることもできる。シアル酸のカルボキシ基の修飾としては、カルボキシ基の負電荷を消失させる、または、正電荷へ変換できる基であることが好ましく、例えば、炭素数 1～30 のアルキルアミノ基、ベンジル基、アミノ基、アミノエチルアミノ基等を挙げることができる。これらの修飾基の導入により、シアル酸のカルボキシル基の負電荷を消失させる（ベンジル基、アミノ基等）、または、正電荷へ変換する（アミノエチルアミノ基等）ことで、糖鎖付加ポリペプチドの血中クリアランスや体内分布の制御を意図することができる。

[0069] また、本発明で用いられる高マンノース型糖鎖は、上述した複合型糖鎖の基本構造に、さらにマンノースが 2 個以上結合している糖鎖である。高マンノース型糖鎖は嵩高いので、ペプチドに高マンノース型糖鎖を結合させることにより血中安定性がより高くなりうる。哺乳類の高マンノース型糖鎖のように、5～9 個のマンノースを含む糖鎖が好ましいが、酵母の高マンノース型糖鎖のように、より多くのマンノースを含む糖鎖であってもよい。本発明に好ましく用いられる高マンノース型糖鎖としては、例えば、

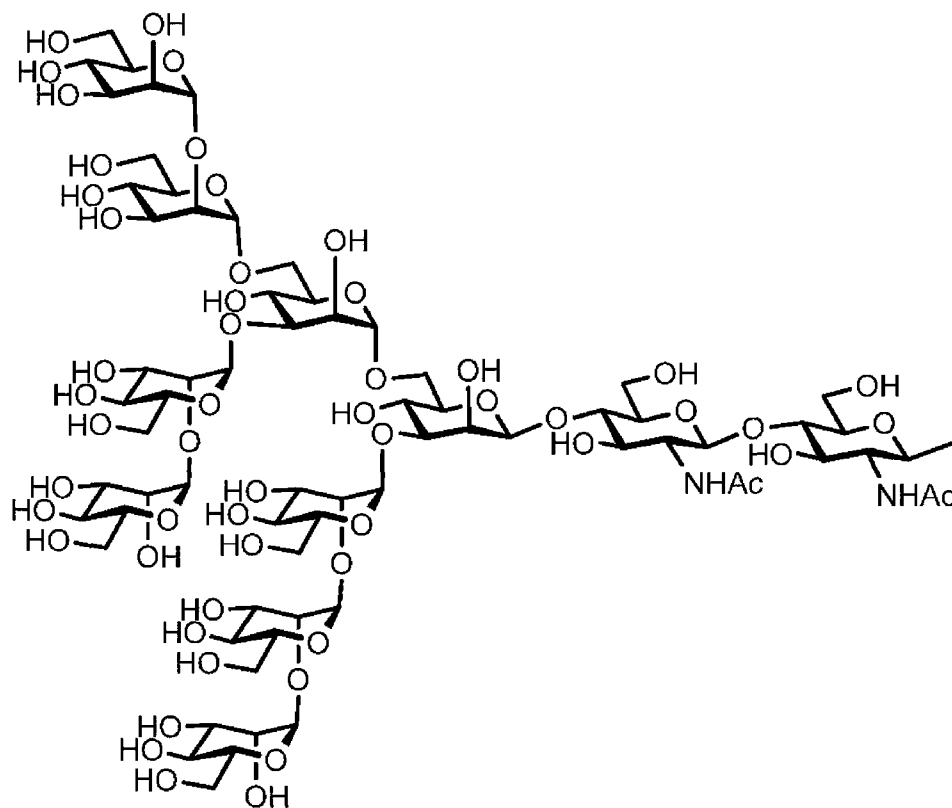
ハイマンノースー 5 (M-5)

[化11]



ハイマンノースー 9 (M-9)

[化12]

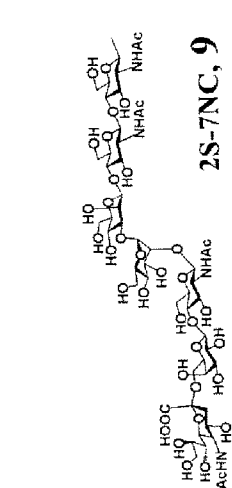
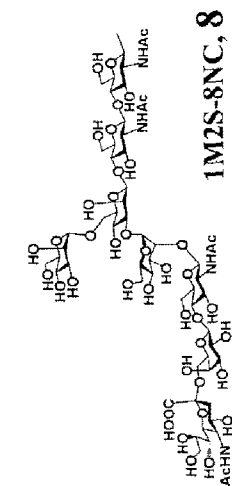
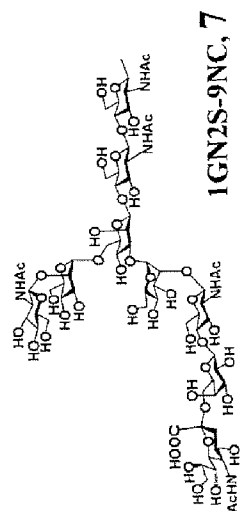
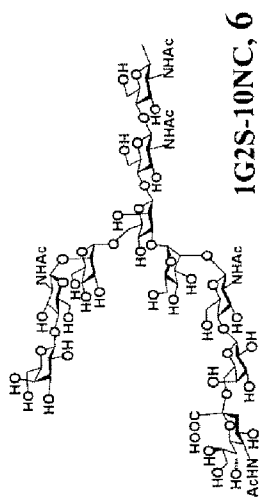
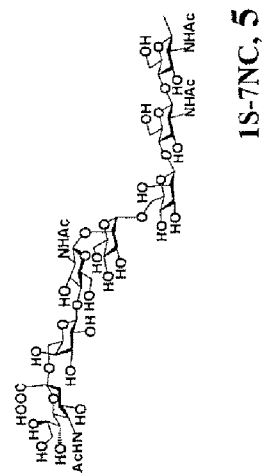
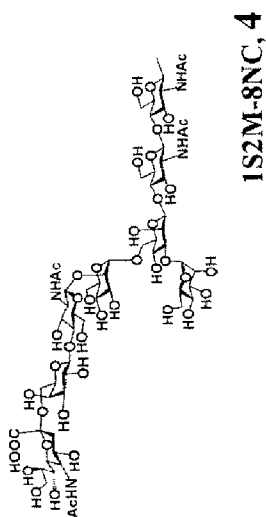
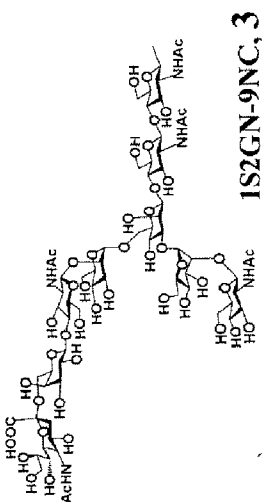
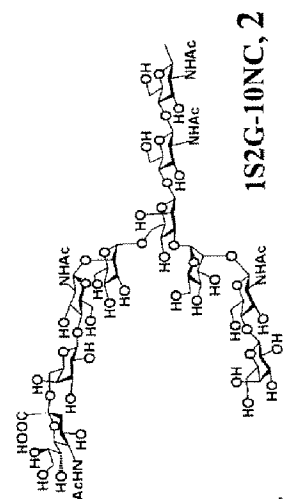
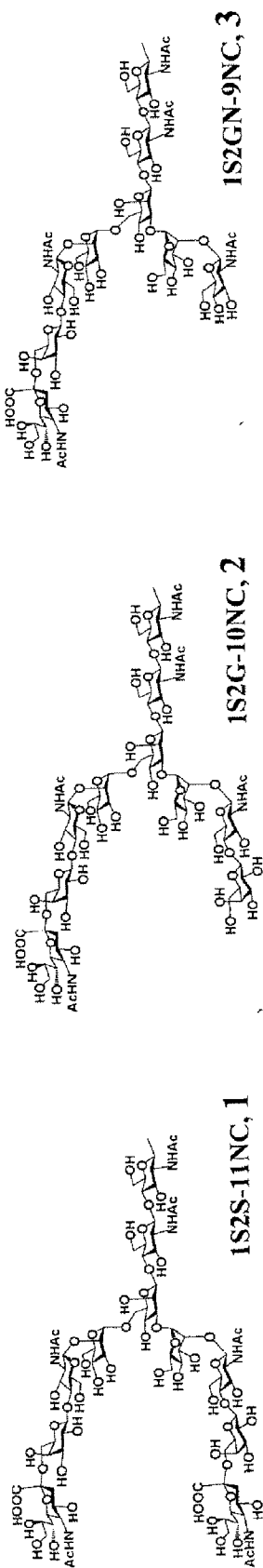


等を挙げることができる。

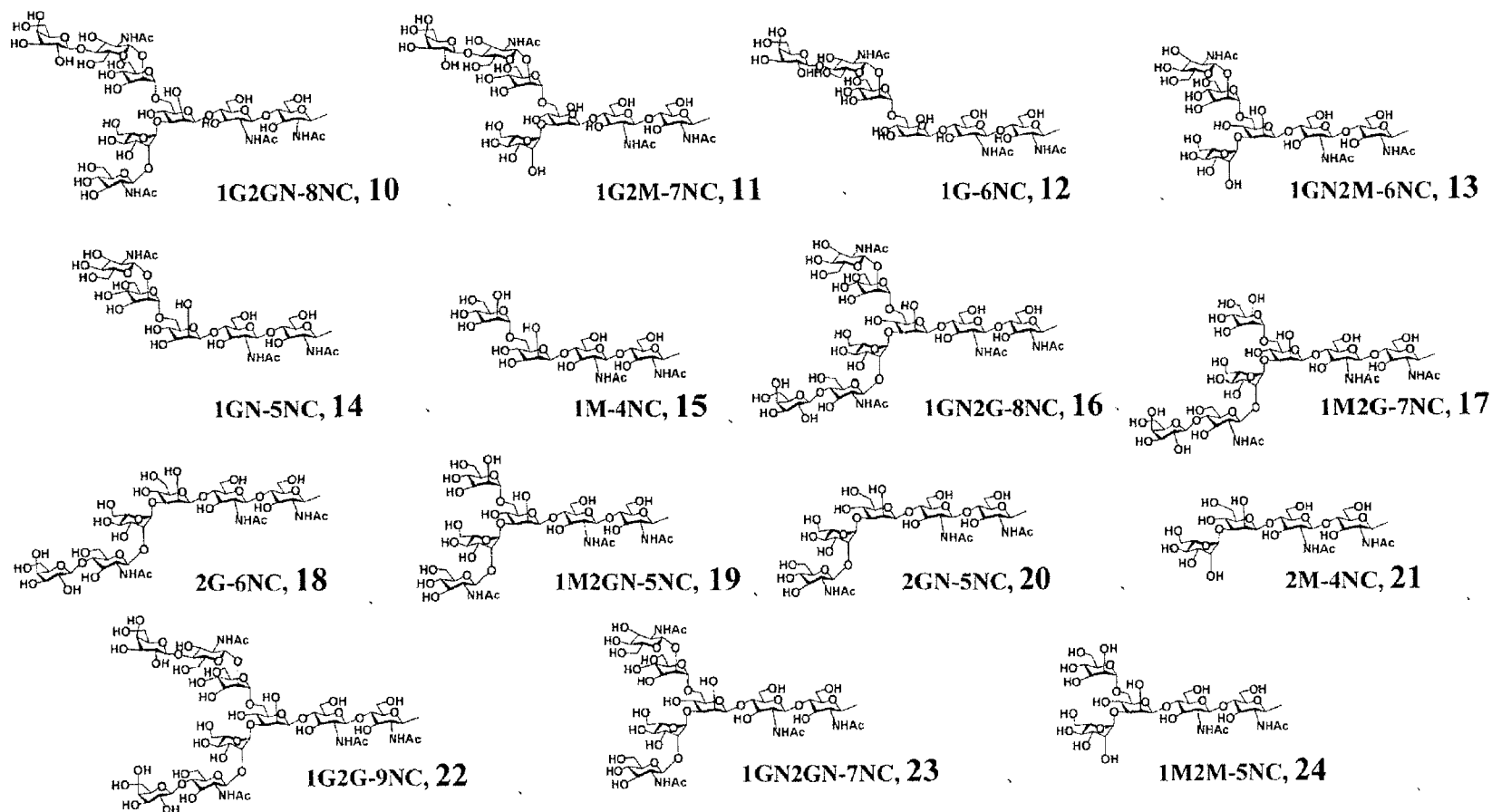
[0070] 本発明において、好ましい糖鎖としては、例えば、ヒト体内において、タンパク質と結合した糖タンパク質として存在する糖鎖（例えば、「F E B S L E T T E R S V o l . 5 0 , N o . 3 , F e b . 1 9 7 5」に記載の糖鎖）と、同一の構造を有する糖鎖（構成糖の種類およびそれらの結合様式が同一の糖鎖）またはこれの非還元末端から1または複数の糖を失った糖鎖である、下記に記載の糖鎖を挙げるすることができる。

[0071]

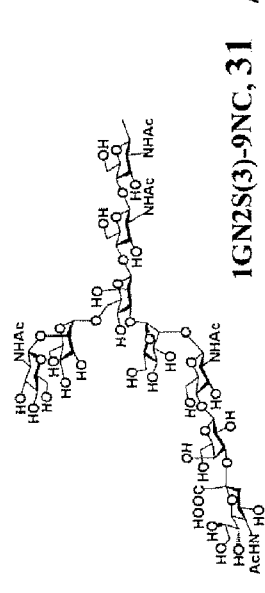
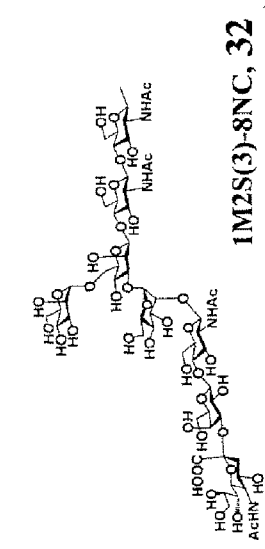
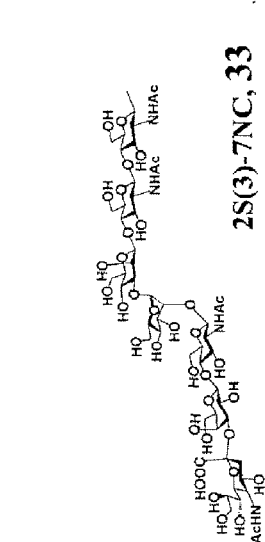
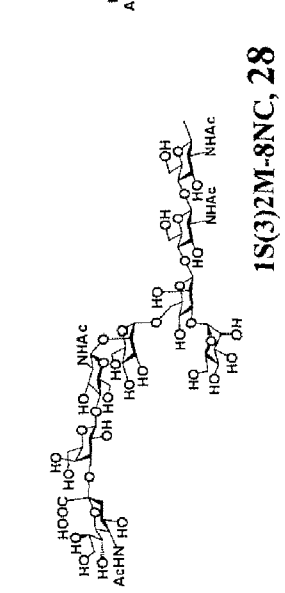
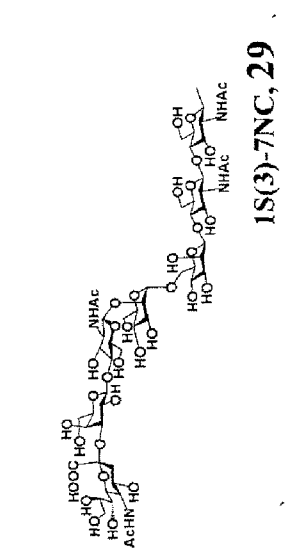
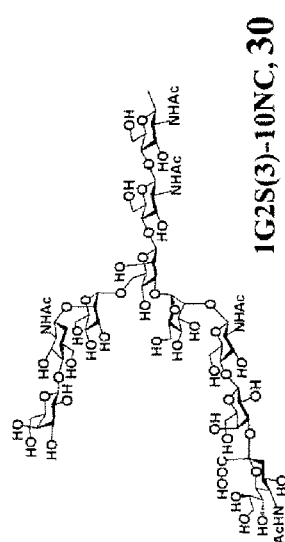
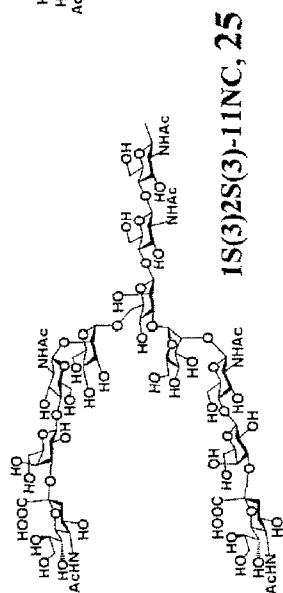
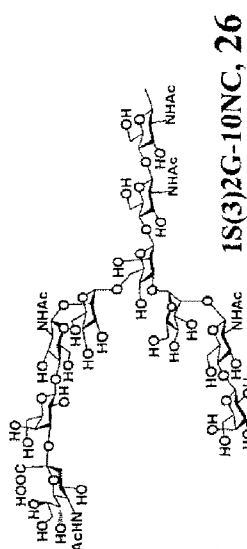
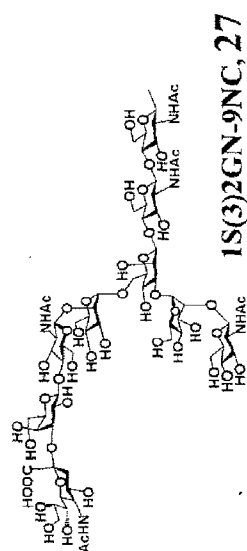
[化13]



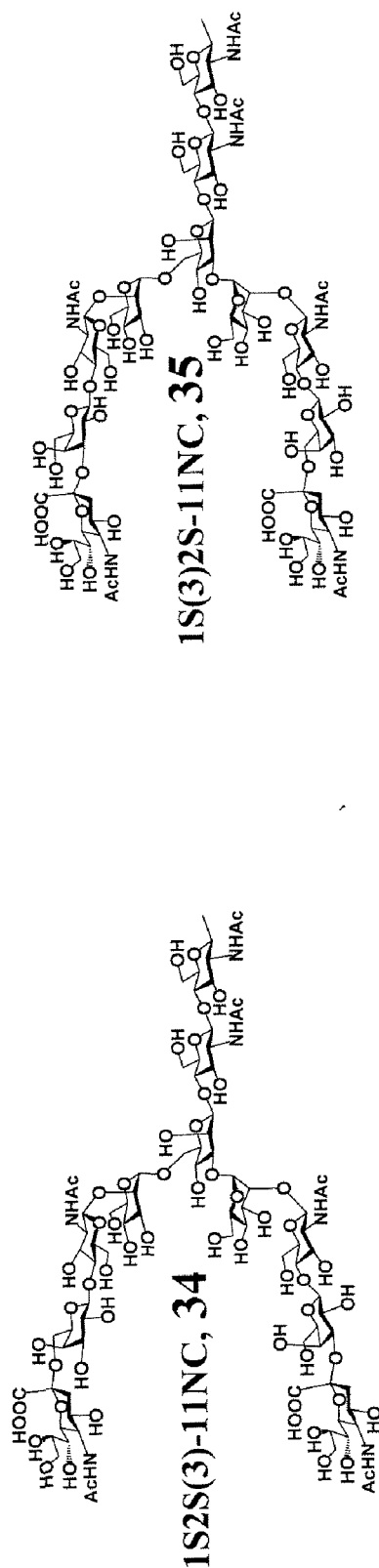
[0072] [1414]



[0073] [化15]



[0074] [化16]



[0075] 本発明の好ましい一態様において、本発明の糖鎖付加ポリペプチド中の糖

鎖付加アミノ酸における糖鎖の構造は、実質的に同一とすることもでき、または、異なる糖鎖構造を有していてもよい。糖鎖付加ポリペプチド中の糖鎖の構造を実質的に同一とする際は、例えば、90%以上同一、あるいは99%以上同一であることが好ましく、糖鎖の構造が完全に同一であることが最も好ましい。なお、本明細書中において、糖ペプチドにおける糖鎖の構造が同一であるとは、2本以上の糖鎖が付加した糖鎖付加ポリペプチドにおいて、当該糖鎖同士を比較した場合に糖鎖を構成する糖の種類、結合順序、および結合様式が糖ペプチド内において同一であることをいう。また、本発明の好ましい一態様において、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの糖鎖は、均一であることが好ましい。本明細書において、糖鎖付加ポリペプチドにおいて糖鎖が均一とは、糖鎖付加ポリペプチド間において糖鎖を比較した場合に、ペプチド中の糖鎖付加部位、糖鎖を構成する各糖の種類、結合順序、および糖間の結合様式が糖ペプチド間で同一であることをいい、少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の糖鎖の構造が均一であることを言う。特に、糖ペプチド間において糖鎖が均一である糖ペプチドを含む組成物等は、品質が一定であり、特に医薬品の製造や、アッセイなどの分野において好ましい。均一な糖鎖の割合は、例えば、HPLC、キャピラリー電気泳動、NMR、質量分析等を用いた方法によって測定することが可能である。

[0076] 本発明において、好ましい糖鎖付加ポリペプチドは、例えば、後述の実施例1～66において製造した糖鎖付加ポリペプチド（配列番号5～37、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、110、112、114、116、118、120、123～129、133～135、138～141、148、155、160）である。すなわち、以下のSRIF28のアミノ酸配列：

Ser₁-Ala₂-Asn₃-Ser₄-Asn₅-Pro₆-Ala₇-Met₈-Ala₉-Pro₁₀-Arg₁₁-Glu₁₂-Arg₁₃-Lys₁₄-Ala₁₅-Gly₁₆-Cys₁₇-Lys₁₈-Asn₁₉-Phe₂₀-Phe₂₁

- T r p₂₂ - L y s₂₃ - T h r₂₄ - P h e₂₅ - T h r₂₆ - S e r₂₇ - C y s₂₈ (配列番号 2) において：

(a 1) 1 位の S e r がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 1) (配列番号 5) ；

(a 2) 5 位の A s n がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2) (配列番号 6) ；

(a 3) 9 位の A l a がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 3) (配列番号 7) ；

(a 4) 12 位の G l u がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 4) (配列番号 8) ；

(a 5) 13 位の A r g がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 5) (配列番号 9) ；

(a 6) 14 位の L y s がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 6) (配列番号 10) ；

(a 7) 15 位の A l a がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 7) (配列番号 11) ；

(a 8) 16 位の G l y がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 8) (配列番号 12) ；

(a 9) 18 位の L y s がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 9) (配列番号 13) ；

(a 10) 19 位の A s n がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 10) (配列番号 14) ；

(a 11) 21 位の P h e がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 11) (配列番号 15) ；

(a 12) 26 位の T h r がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 12) (配列番号 16) ；

(a 13) 28 位の C y s の C 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 13) (配列番号 17) ；

(a 1 4) 2 8 位の C y s の C 末端側にさらに T h r ジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 1 4) (配列番号 1 8) ;

(a 1 5) 1 位の S e r がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換され、かつ、2 2 位の T r p が D 体の T r p に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 1 5) (配列番号 1 9) ;

(a 1 6) 9 位の A l a がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換され、かつ、2 2 位の T r p が D 体の T r p に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 1 6) (配列番号 2 0) ;

(a 1 7) 1 位の S e r がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換され、かつ、N 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s が 1 つ付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 0) (配列番号 2 1) ;

(a 1 8) 1 位の S e r および 5 位の A s n がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 1) (配列番号 2 2) ;

(a 1 9) 1 位の S e r および 1 3 位の A r g がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 2) (配列番号 2 3) ;

(a 2 0) 5 位の A s n および 9 位の A l a がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 3) (配列番号 2 4) ;

(a 2 1) 1 位の S e r がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換され、かつ、N 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s が 2 つ付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 4) (配列番号 2 5) ;

(a 2 2) 1 位の S e r、5 位の A s n、および 9 位の A l a がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 5) (配列番号 2 6) ;

(a 2 3) 1 位の S e r がモノシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 6) (配列番号 2 7) ;

(a 2 4) 1 位の S e r がアシアロ糖鎖付加 C y s に置換された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 2 7) (配列番号 2 8) ;

(a 2 5) 1 位の S e r がアシアロ糖鎖付加 C y s に置換され、かつ、N 末

端側にさらにアシアロ糖鎖付加C y sが1つ付加された糖鎖付加ポリペプチド（実施例28）（配列番号29）；

（a26）1位のS e rがアシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、N末端側にさらにアシアロ糖鎖付加C y sが2つ付加された糖鎖付加ポリペプチド（実施例29）（配列番号30）；

（a27）5位のA s nがジシアロ糖鎖付加A s nに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例30）（配列番号31）；

（a28）1位のS e rがジシアロ糖鎖付加A s nに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例31）（配列番号32）；

である。

（a29）1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、19位のA s nがG l c N A c付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例32）（配列番号33）；

（a30）1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、19位のA s nがジマンノース糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例33）（配列番号34）；

（a31）1位のS e rのN末端側にさらにジシアロ糖鎖付加C y sが付加された糖鎖付加ポリペプチド（実施例34）（配列番号89）；

（a32）11位のA r gがジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例35）（配列番号91）；

（a33）20位のP h eがジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例36）（配列番号93）；

（a34）24位のT h rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例37）（配列番号95）；

（a35）25位のP h eがジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例38）（配列番号97）；

（a36）27位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例39）（配列番号99）；

(a 3 7) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、25位のP h eがT y rによって置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例4 1）（配列番号1 0 3）；

(a 3 8) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、C末端がアミド化された糖鎖付加ポリペプチド（実施例4 2）（配列番号1 0 5）；

(a 3 9) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、当該ジシアロ糖鎖付加C y sがビオチン化されている糖鎖付加ポリペプチド（実施例4 4）（配列番号1 1 0）；

(a 4 0) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、糖がジシアロ糖鎖付加C y sが、P E Gリンカーを介してビオチン化されている糖鎖付加ポリペプチド（実施例4 5）（配列番号1 1 2）；

(a 4 1) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、当該ジシアロ糖鎖付加C y sのN末端にアジド基が導入されている糖鎖付加ポリペプチド（実施例4 6）（配列番号1 1 4）；

(a 4 2) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、12位のG l uがジシアロ糖鎖付加C y sによって置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例4 7）（配列番号1 1 6）；

(a 4 3) 1位のS e rがジグルクナック糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例5 0）（配列番号1 2 3）；

(a 4 4) 1位のS e rがジマンノース糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例5 1）（配列番号1 2 4）；

(a 4 5) 19位のA s nがジマンノース糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例5 2）（配列番号1 2 5）；

(a 4 6) 1位のS e rがN-アセチルグルコサミン付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例5 3）（配列番号1 2 6）；

(a 4 7) 19位のA s nがN-アセチルグルコサミン付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド（実施例5 4）（配列番号1 2 7）；

(a 4 8) 1位のS e rがトリシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例5 5)(配列番号1 2 8) ;

(a 4 9) 1位のS e rがテトラシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例5 6)(配列番号1 2 9) ;

(a 5 0) 1位のS e rが、アミノエチルアミノ基により修飾されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例5 7)(配列番号1 3 3) ;

(a 5 1) 1位のS e rが、アミノ基により修飾されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例5 8)(配列番号1 3 4) ;

(a 5 2) 1位のS e rが、ベンジル基により保護されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例5 9)(配列番号1 3 5) ;

(a 5 3) 1位のS e rが、ヘキサデシルアミノ基により修飾されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例6 0)(配列番号1 3 8) ;

(a 5 4) 1位のS e rが、アミノ基により修飾されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、N末端側にさらにアミノ基により修飾されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sが1つ付加された糖鎖付加ポリペプチド(実施例6 1)(配列番号1 3 9) ;

(a 5 5) 1位のS e rが、ベンジル基により保護されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sに置換され、かつ、N末端側にさらにベンジル基により保護されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加C y sが1つ付加された糖鎖付加ポリペプチド(実施例6 2)(配列番号1 4 0) ;

(a 5 6) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加A s nが付加されたC y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(実施例6 3)(配列番号1 4 1) ;

(a 5 7) 1位のS e rがジシアロ糖鎖付加A s nに置換され、かつ、1 9位のA s nがジマンノース付加C y sに置換された糖鎖付加ポリペプチド(

実施例 64) (配列番号 148) ;

(a58) 1 位の S e r がジシアロ糖鎖付加 C y s に置換され、かつ、N 末端側にさらにアミノエチルアミノ基により修飾されたジシアロ糖鎖を有するジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 65) (配列番号 155) ;

(a59) 1 位の S e r がジシアロ糖鎖付加 A s n に置換され、かつ、N 末端側にさらに 3 つのジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 66) (配列番号 160) ;

である。

また、S R I F 14 のアミノ酸配列 :

A l a₁₅ - G l y₁₆ - C y s₁₇ - L y s₁₈ - A s n₁₉ - P h e₂₀ - P h e₂₁ - T r p₂₂ - L y s₂₃ - T h r₂₄ - P h e₂₅ - T h r₂₆ - S e r₂₇ - C y s₂₈ (配列番号 1) において :

(a60) 15 位の A l a の N 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 17) (配列番号 35) ;

(a61) 15 位の A l a の N 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s - A r g - L y s - が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 18) (配列番号 36) ;

(a62) 15 位の A l a の N 末端側にさらに C 12 リンカーを介してジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 19) (配列番号 37) ;

(a63) 15 位の A l a の N 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s - L y s - が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 40) (配列番号 101) ;

(a64) 15 位の A l a の N 末端側にさらに P E G リンカーを介してジシアロ糖鎖付加 C y s が付加された糖鎖付加ポリペプチド (実施例 43) (配列番号 107) ;

(a65) 15 位の A l a の N 末端側にさらにジシアロ糖鎖付加 C y s - ジ

シアロ糖鎖付加Cys-Arg-Lys-が付加された糖鎖付加ポリペプチド（実施例48）（配列番号118）；

（a66）15位のAlaのN末端側にさらにジシアロ糖鎖付加Cys-ジシアロ糖鎖付加Cys-ジシアロ糖鎖付加Cys-Arg-Lys-が付加された糖鎖付加ポリペプチド（実施例49）（配列番号120）；
である。

[0077] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、当業者に公知のペプチド合成方法に、糖鎖付加工程を組み込むことで製造することができる。糖鎖付加に際しては、トランスグルタミナーゼに代表される、酵素を利用する方法も用いることができるが、この場合、付加する糖鎖が大量に必要なになる、最終工程後の精製が煩雑になる、糖鎖の付加位置および付加可能な糖鎖が制限される、等の問題があるため、アッセイ用等の少量の合成には用いることが可能でも、医薬品製造等の大規模な製造には実用的な方法とは言えないことがある。

[0078] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドの簡便な製造方法であって、かつ、糖鎖の構造が均一である糖鎖付加ポリペプチドの安定した製造方法の具体例として、以下、糖鎖付加アミノ酸として糖鎖付加Asnを使用し、固相合成、液相合成等の公知のペプチド合成方法を適用することにより糖鎖付加ポリペプチドを製造する方法（A法）、およびソマトスタチンの任意のアミノ酸をCysで置換したペプチドを公知のペプチド合成方法に従って製造し、その後、Cysに化学合成により糖鎖を付加し、糖鎖付加ポリペプチドを製造する方法（B法）を例示する。これらの製造方法を参考に、当業者であれば様々な糖鎖付加ポリペプチドを製造することが可能であり、得られる糖鎖付加ポリペプチドおよびその製造方法は、特に医薬品製造の分野において、非常に有用である。

[0079] また、これらのA法およびB法は、2つ以上を組み合わせることも可能である。アッセイなどに用いる少量の合成であれば、さらに、上記の方法に、転移酵素による糖鎖伸長反応を組み合わせることも可能である。なお、A法は、国際公開第2004/005330号パンフレット（US2005

222382 (A1)) に、B法は、国際公開第2005/010053号パンフレット (US2007060543 (A1)) に、それぞれ記載されており、その開示は全体として本明細書に参照により組み込まれる。また、A法およびB法において用いられる糖鎖構造が均一な糖鎖の製造に関しては、国際公開第03/008431号パンフレット (US2004181054 (A1))、国際公開第2004/058984号パンフレット (US2006228784 (A1))、国際公開第2004/058824号パンフレット (US2006009421 (A1))、国際公開第2004/070046号パンフレット (US2006205039 (A1))、国際公開第2007/011055号パンフレット等に記載されており、その開示は全体として本明細書に参照により組み込まれる。

[0080] 糖鎖付加ポリペプチドを製造する方法 (A法)

糖鎖付加ポリペプチドは、例えば、以下に概略を示す糖鎖付加 A s n を用いた固相合成によって製造することができる。

(1) 脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシ基を樹脂 (レジン) へ結合させる。この場合、アミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しているので、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、レジンとアミノ酸とが反応して結合が起こる。

(2) 得られた反応物の脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

(3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とを、アミド化反応させる。

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

(5) 上記 (3) および (4) の工程を1回以上繰り返すことにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

(6) 最後に、酸でレジンを切断することにより、所望のアミノ酸配列を有するペプチドを得ることができる。

ここで、(1)において、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加A s nを用い、当該アスパラギン部分のカルボキシ基とレジンの水酸基とを反応させれば、C末端に糖鎖付加A s nを有するペプチドを得ることができる。

また、(2)の後、または、(3)と(4)を1回以上の任意の回数繰り返した後、(3)において、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加A s nを用い、任意の箇所に糖鎖を付加することができる。

また、(1)および(3)のいずれかの工程で、2回以上、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加A s nを用い、任意の2ヶ所以上に糖鎖が付加されたペプチドを得ることができる。

糖鎖付加アミノ酸を結合させた後、脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、その直後に工程(6)を行えば、N末端に糖鎖付加A s nを有するペプチドを得ることができる。

[0081] 樹脂(レジン)としては、通常、固相合成で使用する樹脂(レジン)であればよく、例えば、塩素で官能化された2-クロロトリチルクロリド樹脂(メルク社製)や、アミノ基で官能化されたAmino-PEGALレジン(メルク社製)、水酸基を有するNovaSyn TGTアルコール樹脂(メルク社製)、Wangレジン(メルク社製)、HMPA-PEGALレジン(メルク社製)等を用いることができる。また、Amino-PEGALレジンとアミノ酸との間にリンカーを存在させてもよく、このようなリンカーとして、例えば、4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸(HMPA)、4-(4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ)-ブチル酢酸(HMPB)等を挙げることができる。C末端のアミノ酸が樹脂にあらかじめ結合したH-Cys(Trt)-Trityl NovaPEG樹脂(メルク社製)等も用いることができる。

また、C末端をアミド化する場合には、例えば、アミノ基で官能化された

R i n k - A m i d e - P E G A レジン（メルク社製）を用いることが好ましい。このレジンとペプチドを酸で切断することにより、ペプチドのC末端アミノ酸をアミド化することができる。

樹脂と脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸との結合は、例えば、水酸基を有する樹脂や塩素で官能化された樹脂を使用するには、アミノ酸のカルボキシ基を樹脂へエステル結合させる。また、アミノ基で官能化された樹脂を使用する場合には、アミノ酸のカルボキシ基を樹脂にアミド結合により結合させる。

なお、2-クロロトリチルクロリド樹脂は、固相合成においてペプチド鎖を伸長する際、末端にあるC y s のラセミ化を防止することができる点において、好ましい。

[0082] アミノ酸としては全てのアミノ酸を用いることができ、例えば、天然アミノ酸である、セリン（S e r）、アスパラギン（A s n）、バリン（V a l）、ロイシン（L e u）、イソロイシン（I l e）、アラニン（A l a）、チロシン（T y r）、グリシン（G l y）、リジン（L y s）、アルギニン（A r g）、ヒスチジン（H i s）、アスパラギン酸（A s p）、グルタミン酸（G l u）、グルタミン（G l n）、スレオニン（T h r）、システイン（C y s）、メチオニン（M e t）、フェニルアラニン（P h e）、トリプトファン（T r p）、プロリン（P r o）を挙げることができる。

また、上記天然アミノ酸のD体を使用することもできる。

[0083] 脂溶性保護基としては、例えば9-フルオレニルメトキシカルボニル（F m o c）基、t-ブチルオキシカルボニル（B o c）基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を挙げることができる。アミノ酸に脂溶性保護基を導入するには、例えばF m o c基を導入する場合には9-フルオレニルメチルーN-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入できる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。

[0084] 脂溶性保護基で保護したアミノ酸としては、市販のものも使用することが

できる。例えば、Fmoc-Ser-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys-OH、Fmoc-Arg-OH、Fmoc-His-OH、Fmoc-Asp-OH、Fmoc-Glu-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr-OH、Fmoc-Cys-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Pro-OHを挙げることができる。

また、脂溶性保護基で保護したアミノ酸であって、側鎖に保護基を導入したものである。例えば、Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Cys (StBu)-OH、Fmoc-Cys (tBu)-OH、Fmoc-Cys (Trt)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Trp (Boc)-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OHを挙げる

[0085] また、糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列中に、リンカーを付加させた場合には、固相合成の過程において、上記の脂溶性保護基で保護したアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基で保護したリンカーを使用することで、好ましい位置に、リンカーを挿入することができる。

[0086] 2-クロロトリチルクロリド樹脂を用いる場合、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、トリエチルアミン、ピリジン、2, 4, 6-トリジン等の塩基を用いることでエスチル化を行うことができる。また、水酸基を有する樹脂を用いる場合、エスチル化触媒として、例えば1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール (MSNT)、ジシクロヘ

キシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。アミノ酸と脱水縮合剤との使用割合は、前者 1 重量部に対して、後者が、通常 1～10 重量部、好ましくは 2～5 重量部である。

[0087] エステル化反応は、例えば、固相カラムにレジンを入れ、このレジンを溶剤で洗浄し、その後アミノ酸の溶液を加えることにより行うのが好ましい。洗浄用溶剤としては、例えばジメチルホルムアミド（DMF）、2-プロパノール、ジクロロメタン等を挙げることができる。アミノ酸を溶解する溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）、DMF、ジクロロメタン等を挙げることができる。エステル化反応は 0～50℃、好ましくは室温で、約 10 分～30 時間程度、好ましくは 15 分～24 時間程度行うのが良い。

[0088] この時固相上の未反応の水酸基を、無水酢酸等を用いてアセチル化してキャッピングすることも好ましい。

[0089] 脂溶性保護基の脱離は、例えば塩基で処理することにより行うことができる。塩基としては、例えばピペリジン、モルホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下で行うのが好ましい。溶媒としては、例えば DMSO、DMF、メタノール等を挙げることができる。

[0090] 遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とのアミド化反応は、活性化剤および溶媒の存在下行うのが好ましい。

[0091] 活性化剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩（WSC/HCI）、ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）、カルボニルジイミダゾール（CDI）、ジエチルシアノホスホネート（DEPC）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウム（DIPCI）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、1-ヒドロキシベ

ンゾトリアゾール (HOBt)、ヒドロキシスクシンイミド (HOSu)、ジメチルアミノピリジン (DMAP)、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt)、ヒドロキシフタルイミド (HOPht)、ペンタフルオロフェノール (Pfp-OH)、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ヘキサフルオロホスフェート (HBTU)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシド ヘキサフルオロホスフェート (HCTU)、O-(7-アザ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ヘキサフルオロホスホネート (HATU)、O-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テトラフルオロボレート (TBTU)、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロジ-4-オキサ-1,2,3-ベンゾトリアジン (Dhbt) 等を挙げるができる。

[0092] 活性化剤の使用量は、脂溶性の保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸に対して、1~20当量、好ましくは1~10当量、さらに好ましくは、1~5当量とするのが好ましい。

[0093] 溶媒としては、例えばDMSO、DMF、ジクロロメタン等を挙げるができる。反応は0~50℃、好ましくは室温で、約10~30時間程度、好ましくは15分~24時間程度行うのが良い。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

[0094] 樹脂(レジン)からペプチド鎖を切断するには酸で処理するのが好ましい。酸としては、例えばトリフルオロ酢酸(TFA)、弗化水素(HF)等を挙げることができる。

[0095] このようにして、所望の位置を糖鎖付加Asnで置換した糖鎖付加ポリペプチドを得ることができる。また、このように精製された糖鎖付加ポリペプチドは、後述するように、脱保護されたCys同士でのジスルフィド結合を形成させる。

[0096] なお、本発明の一実施態様において、固相合成に用いる糖鎖付加Asnに

おける糖鎖上の非還元末端にシアル酸を含む場合には、酸処理によりシアル酸が切断されるのを防ぐために、当該シアル酸のカルボキシ基を、保護基により保護していることが好ましい。保護基としては、例えば、ベンジル基、アリル基、ジフェニルメチル基等を挙げることができる。保護基の導入および保護基の脱離の方法は、公知の方法により行うことができる。また、保護基の脱離は、固相合成により製造された糖鎖付加ポリペプチドを樹脂から切断した後に行うことが好ましい。樹脂より切断後、糖鎖付加ポリペプチドにおいてジスルフィド結合を形成させることにより糖鎖付加ポリペプチドを環化させる場合には、保護基の脱離は、ジスルフィド結合の形成工程の前であってもよく、ジスルフィド結合の形成工程の後であってもよい。

[0097] 糖鎖付加ポリペプチドを製造する方法（B法）

糖鎖付加ポリペプチドは、まずペプチド鎖を合成し、後で合成したペプチド鎖へ糖鎖を付加する方法によっても製造することができる。具体的には、糖鎖を付加したい位置にC y sを含むペプチドを、固相合成法、液相合成法、細胞により合成する方法、天然に存在するものを分離抽出する方法等により製造する。ここで、ジスルフィド結合を形成する予定の位置にあるC y s等、糖鎖を付加しないC y sに対しては、例えばアセトアミドメチル（A c m）基で保護しておく。また、糖鎖を付加せず、かつ、ジスルフィド結合の形成にも使用しないC y sを糖鎖付加ポリペプチドに導入する場合には、糖鎖付加工程およびジスルフィド結合形成工程の間、C y sを保護基により保護しておき、その後脱保護するようにしてC y sを導入することができる。このような保護基としては、例えば、t e r t -ブチル（t B u）や4-メトキシベンジルを挙げることができる。

また、糖鎖付加ポリペプチド中のC y sに、異なる糖鎖を付加する場合には、最初に糖鎖を導入するC y sを無保護とし、次に異なる糖鎖を導入するC y sを、S t B u等により保護しておくことで、異なる糖鎖を導入することができる。具体的には、固相合成等によりペプチドを合成する際、第一の糖鎖を導入したいC y sを無保護とし、かつ、第二の糖鎖を導入したいC y

sをFmoc-Cys (StBu) -OH等を用いて、保護基を有するCysとする。その後、StBu等の保護基を保持したまま、無保護のCysへ糖鎖を導入する。次に、StBu基等を脱保護することで、無保護となったCysへ異なる糖鎖を導入することができる。なお、第一の糖鎖を導入したCysおよび第二の糖鎖を導入したいCysは、1つ又は複数個とすることができる。

なお、StBu基の脱保護は、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (TCEP)、ジチオトレイトール (DTT)、トリブチルホスフィン等の還元剤を用いて反応させることにより脱保護することができる。上記反応は、通常0～80℃、好ましくは、5～60℃、更に好ましくは10～35℃で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常30分～5時間程度である。反応終了後は、適宜、公知の方法 (例えば、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)) で精製するのが良い。

異なる糖鎖を導入する際には、Cysの脱保護工程における還元条件やHPLC等の精製工程における酸性条件に対して、より安定な糖鎖から導入することが好ましい。特に、シアル酸含有糖鎖を導入する際には、シアル酸を有さない糖鎖又はシアル酸残基数が少ない糖鎖から、先に導入することが好ましい。

また、糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列中に、リンカーを付加させた場合には、例えば固相合成の過程において、脂溶性保護基で保護したアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基で保護したリンカーを使用することで、合成したポリペプチドの好ましい位置に、リンカーを挿入することができる。

次に、ハロアセチル化複合型糖鎖誘導体を上記で得た無保護のCysを含むペプチドと反応させることにより、糖鎖を無保護のCysのチオール基と反応させ、ペプチドに結合させる。上記反応は、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはこれらの混合溶液中において、通常0～80℃、好ましくは、10～60℃、更に好ましくは15～35℃で行うのが良い。反応時間は、通常10分～24時間、好ましくは、通常30分～5

時間程度である。反応終了後は、適宜、公知の方法（例えば、HPLC）で精製するのが良い。

[0098] ハロアセチル化複合型糖鎖誘導体は、例えば、複合型アスパラギン結合型糖鎖の1位の炭素に結合している水酸基を、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}-\text{CH}_2\text{X}$ （Xはハロゲン原子、aは整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0～4の整数を示す。）で置換した化合物である。

[0099] 具体的には、ハロアセチル化複合型糖鎖誘導体とCys含有ペプチドとをリン酸緩衝液中、室温で反応させる。反応終了後、HPLCで精製することにより糖鎖付加Cysで置換した糖鎖付加ポリペプチドを得ることができる。

また、DMSO、DMF、メタノール、アセトニトリルといった有機溶媒と、上記の緩衝液との混合溶液中で反応を行うこともできる。このとき、有機溶媒の比率は、0～99%（v/v）の範囲で、上記緩衝液に添加することができる。緩衝液への溶解性が低い無保護のCysを含むペプチドは、このような有機溶媒を添加することにより反応溶液への溶解性を向上させることができ、好ましい。

また、DMSO、DMF、メタノール、アセトニトリルといった有機溶媒や、それらの混合溶液中で反応を行うこともできる。その際、塩基の存在下で行うのが好ましい。塩基としては、例えばDIPEA、トリエチルアミン、ピリジン、2，4，6-コリジン等を挙げることができる。

また、グアニジン塩酸塩や尿素を緩衝溶液に加えた混合溶液中においても反応を行うことができる。なお、グアニジン塩酸塩や尿素は、最終濃度が1M～8Mとなるように上記緩衝液に加えることができる。グアニジン塩酸塩や尿素の添加によっても、緩衝液への溶解性の低いペプチドの溶解性を向上させることができ、好ましい。

さらに、無保護のCysを含むペプチドが、ジスルフィド結合を介した2量体を形成することを防止するために、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフ

イン塩酸塩（TCEP）やジチオトレイトール（DTT）を緩衝液に添加して反応させることもできる。TCEPやDTTは、最終濃度が $10\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ となるように緩衝液に加えることができる。

[0100] また、糖鎖を目的のCysへ結合させた後、Acm等で保護されたCysの保護基を脱保護する。保護基がAcm基である場合は、水、メタノール、酢酸、またはこれらの混合溶液中において、ヨウ素、酢酸水銀（II）、硝酸銀（I）、または、酢酸銀（I）等を用いて反応させることにより脱保護することができる。

上記反応は、通常 $0\sim 80^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $5\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、更に好ましくは $10\sim 35^{\circ}\text{C}$ で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常5分～24時間程度である。反応終了後は、DTTや塩酸等により処理した後、適宜、公知の方法（例えば、HPLC）で精製するのが良い。

このようにして、所望の位置を糖鎖付加Cysで置換した糖鎖付加ポリペプチドを得ることができる。また、このように精製された糖鎖付加ポリペプチドは、後述するように、脱保護されたCys同士でのジスルフィド結合を形成させる。

[0101] また、上記A法およびB法により作製された糖鎖付加ポリペプチドは、空気および／または酸素、ヨウ素、DMSO、酸化および還元されたグルタチオンの混合物、フェリシアン酸カリウム、エルマン試薬（5，5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸））、トリフルオロ酢酸タリウム（III）、ならびに、アルキルトリクロロシランスルホキシドなどを用いた当業者に周知の方法で、Cys同士のジスルフィド結合を形成することができる。

なお、Cys-Cys間でのジスルフィド結合を形成させる際に、ジスルフィド結合することが望ましくない糖鎖付加ポリペプチド中のCysに対しては、保護基により保護しておく。このような保護基としては、Acm、tBu、4-メトキシベンジル、4-メチルベンジル等、酸化条件で安定な保護基を用いることができる。

また、B法において、ジスルフィド結合の形成は、糖鎖の導入の前に行う

ことも可能である。ただし、ジスルフィド結合させたいCysに保護基が導入されている場合には、脱保護の工程がジスルフィド結合形成の工程よりも先となる。

[0102] (活性)

本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、ソマトスタチン受容体に対する親和性を有している。本明細書において、「ソマトスタチン受容体に対する親和性を有する」とは、ソマトスタチン受容体であるSSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、およびSSTR5のうちの少なくとも1つに親和性を有することを意味する。

[0103] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、好ましくは2つ以上のソマトスタチン受容体に対する親和性を有し、より好ましくは3つ以上の受容体に対して親和性を有し、さらに好ましくは4つ以上の受容体に対して親和性を有し、最も好ましくは天然のソマトスタチン(SRIF28およびSRIF14)と同様に、SSTR1～SSTR5の5つ全ての受容体に親和性を有する。特に、少なくともSSTR1およびSSTR4のいずれか一方の親和性と、その他のSSTRとの親和性を有していることが好ましい。

このように、本発明の糖鎖付加ポリペプチドが、ソマトスタチン受容体に対して親和性を有することで、ソマトスタチン受容体に対するソマトスタチン活性(アゴニスト活性)およびアンタゴニスト活性を有する。

[0104] 例えば、各ソマトスタチン受容体に対する親和性は、実施例67-1および67-2に示すような、*in vitro*における競合的結合実験などを用いて測定することができる。

競合的結合実験による親和性の測定は、受容体に対して、標識リガンドと試験物質を競合的に結合させ、試験物質投与による標識リガンドの遊離を求めることより、試験物質の親和性(例えば、50%阻害濃度: IC_{50} 値や、結合阻害定数: K_i 値)を測定することができる。

[0105] 例えば、ソマトスタチン活性(アゴニスト活性)は、実施例67-3および67-4に示すような、ソマトスタチン受容体発現細胞を用いた *in v*

i t r oにおけるcAMP産生抑制試験により評価することができる。

cAMP産生抑制試験は、ソマトスタチン受容体発現細胞に対して、糖鎖付加ポリペプチドまたは対照化合物となるSRIF14もしくはSRIF28を処置し、一定時間培養後に、細胞内に蓄積したcAMP量を測定し、対照化合物と比較することで評価することができる。cAMP量の測定は、酵素免疫測定法（EIA）等、公知の手法により測定することができる。

[0106] 例えば、ソマトスタチン活性（アゴニスト活性）は、実施例86および実施例87に示すようなi n v i v oにおけるGH産生抑制試験により評価することができる。

GH産生抑制試験は、例えば、下記のように実施することができる。非絶食下のラットへ糖鎖付加ポリペプチドを皮下投与する。ラットは全身麻酔下でGH遊離促進剤を投与し、その後5分程度で採血を行う。採血した血液を血漿サンプルとし、酵素免疫測定法（EIA）等、公知の手法によりGH濃度を測定する。また、対照として糖鎖付加ポリペプチドを含まない生理食塩水を投与したラットより血漿サンプルを得ることで、測定されるGH濃度の比較により、ソマトスタチン活性を評価することができる。

[0107] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、たとえ、その構造への糖鎖の付加により各受容体に対するある程度の親和性の減衰を招いたとしても、血中半減期が延長されるため、結果として、糖鎖が付加されていない天然に存在するソマトスタチン（以下、「非糖鎖付加ソマトスタチン」と呼ぶことがある。）と同等のソマトスタチン活性を維持することができ、好ましくは増大したソマトスタチン活性を有することができる。この血中半減期の延長を考慮すると、例えば、実施例67-1および67-2に記載の手法により測定した場合、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの各受容体に対する K_i 値と、糖鎖を有さないSRIF14の K_i 値との比は、1000:1~0.3:1の範囲内であることが好ましく、100:1~0.3:1の範囲内であることがより好ましく、10:1~0.3:1の範囲内であることがさらに好ましい。

[0108] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドの血中安定性は、好ましくは天然に存在す

るソマトスタチン（非糖鎖付加ソマトスタチン）と同等またはそれ以上である。血中安定性は当業者に公知の手法を用いて測定することができ、例えば、血漿中における安定性や、血中半減期、AUC（薬物血漿中濃度－時間曲線下面積）等を指標に判断することができる。また、腎クリアランスや肝クリアランスの減少も血中安定性の増大に寄与する。

[0109] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、糖鎖を有さないSRIF28と比較して、血中半減期が増大しており、例えば実施例68に示す実験手法により測定した場合、その半減期は、SRIF28と比較して、4倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは20倍以上、さらに好ましくは30倍以上増大している。

[0110] また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、例えば実施例85に示す実験手法により測定した場合、SRIF28と比較して、好ましくは4倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは20倍以上の血中安定性を有する。

[0111] （医薬組成物）

次に、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物について説明する。

本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、ソマトスタチンに関連する疾患の治療または予防に有効である。上述の通り、ソマトスタチンには種々の作用が知られており、これらの作用に関連する疾患も様々である。例えば、ソマトスタチンに関連する疾患には、例えば、先端巨大症、巨人症、アルツハイマー病および他の形態の認知症、癌、ホルモン産生腫瘍、内分泌腫瘍（例えばカルチノイド、VIPオーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ）、クッシング病、ホルモン分泌異常、糖尿病およびその合併症、疼痛、関節炎、下痢、胃潰瘍、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、消化管閉塞、イレウス、術後再狭窄、放射線障害、眼疾患（例えばドライアイ、緑内障、角膜実質の炎症、虹彩炎、白内障、結膜炎）等が含まれる。本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、

上記疾患、特に先端巨大症、認知症、癌、ホルモン産生腫瘍、内分泌腫瘍、クッシング病、ホルモン分泌異常、糖尿病合併症、下痢、消化管閉塞、イレウス、放射線障害、眼疾患、ならびに、各種腫瘍あるいは腸関連疾患、ホルモン産生過剰に伴う消化器症状の治療または予防に有効である。

[0112] 上記医薬組成物は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いて、通常の医薬組成物の形態に製剤したものである。

このような医薬組成物としては、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、吸入剤、点眼剤、注射剤等が挙げられる。

[0113] 医薬組成物中に含有される本発明の糖鎖付加ポリペプチドの量は、特に限定されず広い範囲内から適宜選択することができるが、通常、医薬組成物中に本発明の糖鎖付加ポリペプチドを1～70重量%含有させるのが好ましい。

[0114] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、さらに他の有効成分を含有することもできるし、他の有効成分を含有する医薬組成物と組み合わせて用いることもできる。また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、糖鎖付加ポリペプチドを薬学的に許容可能な塩として含むこともできるし、さらに異なる1以上の本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有することもできる。また、異なる1以上の本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物と組み合わせて用いることもできる。また、医薬組成物に含有させることのできるその他の成分としては、当業者に周知の薬学的に許容される担体等を挙げることができる。

[0115] また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを使用する治療としては、たとえば放射線治療を含み得ることができ、また、身体全体にわたってSSTR1～SSTR5のいずれかを発現する細胞および組織の分布を測定するためのシンチグラフィーにおいても有用である。放射性スキャンニングまたは磁気共鳴

による体外画像化の使用は、体内での半定量的検出を可能にすることができる。

[0116] 放射性標識された糖鎖付加ポリペプチドは、例えばヒトの体内で、健常状態では実質的な量のSSTR1～SSTR5を含まない組織において、SSTR1～SSTR5のいずれかを発現する悪性腫瘍の治療的処置のために有用である。また、標識した糖鎖付加ポリペプチドを、シンチグラフィーのために、または、腫瘍を抑制するために有効な量を含む組成物として投与することができる。このような標識の例は、ヨウ素 (^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、インジウム (^{111}In)、炭素 (^{11}C)、フッ素 (^{18}F)、テクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、イットリウム (^{90}Y) などの異なる同位体、または蛍光標識である。標識は、当業者に周知の方法により実施することができ、糖鎖付加ポリペプチドへ含まれるか、直接的に結合されるか、または適当な化合物へ結合され、それが糖鎖付加ポリペプチドに結合されることが可能である。例えば、チロシンのヨード化には、クロラミン-Tを用いた方法等により標識することができる。

[0117] 本発明に係る医薬組成物の投与方法としては特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、疾患の状態、その他の条件に応じた方法で投与される。錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤の場合の投与方法としては、例えば、経口投与が挙げられる。また、注射剤の場合には、単独で、またはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して、静脈内、筋肉内、皮内、皮下または腹腔内に投与することができる。坐剤の場合には、直腸内に投与される。点眼剤の場合は、結膜嚢などの眼組織に適用する。吸入剤の場合には、気管支または肺に適用する。

[0118] 上記医薬組成物の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、例えば、体重1kgに対して本発明の糖鎖付加ポリペプチドが0.1～900nmol、好ましくは1～100nmol、より好ましくは1～10nmolとなる投与量とすることができる。

[0119] 上記医薬組成物の投与回数は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、例えば、3回／1日、2回／1日、1回／1日、さらにはその血中安定性に応じて、より頻度の少ない投与回数（例えば、1回／週、1回／月など）も選択しうる。好ましくは、上記医薬組成物の投与回数は、1回以下／1日である。

[0120] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドに付加された糖鎖は、体内の代謝系で容易に分解される。また、本発明の一態様において、該糖鎖は生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）として結合して存在する構造を有する。従って、本発明の糖鎖付加ポリペプチドおよび該ペプチドを有効成分として含む医薬組成物は、生体内に投与しても副作用や抗原性を示すことがなく、アレルギー反応や、抗体産生により薬効が得られなくなる心配が少ないなどの利点を有する。

[0121] さらに、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは安定して簡便に大量に供給することが可能であり、品質の安定した、高品質の医薬品の提供という観点からも、非常に有用である。

本発明はまた、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの有効量を投与することを特徴とする、ソマトスタチンに関連する疾患の治療または予防方法も提供する。

[0122] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

[0123] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語および科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書および関連技術分野における意味と整合的な意味を

有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、または、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0124] 本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合がある。

第一の、第二のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素は第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

[0125] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0126] なお、本明細書中における糖鎖付加ポリペプチドの表記方法について下記に説明する。

例えば、S1C(dissialo)・N5C(dissialo)－SRIF28と示した場合には、SRIF28のポリペプチドの1位のSer(S1)と5位のAsnとが、両方ともジシアロ糖鎖付加Cys(C(dissialo))によって、置換されていることを示す。

また、S1C(dissialo)－D-Trp22－SRIF28と示した場合には、SRIF28のポリペプチドの1位のSer(S1)が、ジシアロ糖鎖付加Cys(C(dissialo))によって、置換されており、さらに、22位のTrpが、D-Trpに置換されていることを示す。

また、C(dissialo)－R－K－SRIF14と示した場合には、SRIF14のN末端側に、糖鎖付加Cys－Arg－Lys－が付加したことを示す。

また、29C (disialo) -SRIF28や、30C (disialo) -SRIF28と示した場合には、SRIF28のC末端である28位のCysに、さらにジシアロ糖鎖付加Cysが1つ付加したもの(29C (disialo) -SRIF28)、または、SRIF28のC末端である28位のCysに、さらに-W-ジシアロ糖鎖付加Cys (Wは、28位のCysに結合する任意のアミノ酸を示す)が付加したもの(30C (disialo) -SRIF28)を示す。

また、S1-2C (disialo) -SRIF28と示した場合には、SRIF28のポリペプチドのN末端に存在する1位のSerが、連続する2つのジシアロ糖鎖付加Cysに置換されていることを示す。

なお、「disialo」はジシアロ糖鎖を意味し、「monosialo」はモノシアロ糖鎖を意味し、「asialo」はアシアロ糖鎖を意味し、「diGlcNAc」はジグルクナック糖鎖を意味し、「GlcNAc」はN-アセチルグルコサミンを意味し、「diMan」はジマンノース糖鎖を意味し、「trisialo」はトリシアロ糖鎖を意味し、「tetrasialo」はテトラシアロ糖鎖を意味する。また、(disialo (aminoethylamide))と示した場合には、ジシアロ糖鎖のシアル酸のカルボキシ基が、アミノエチルアミノ基により保護されていることを意味する。「aminoethylamide」の代わりに、「Bn」、「amide」、「hexadecylamide」と示されているものは、それぞれ糖鎖上のシアル酸のカルボキシ基が、ベンジル基、アミノ基、ヘキサデシルアミノ基により修飾されていることを意味する。

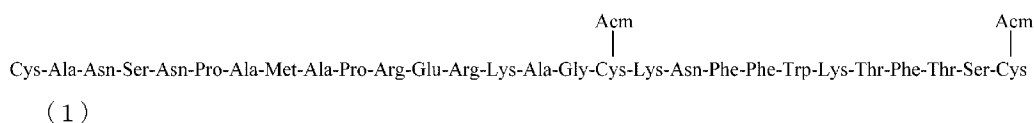
[0127] 実施例1 S1C (disialo) -SRIF28の合成

1-1 チオールの糖鎖修飾反応

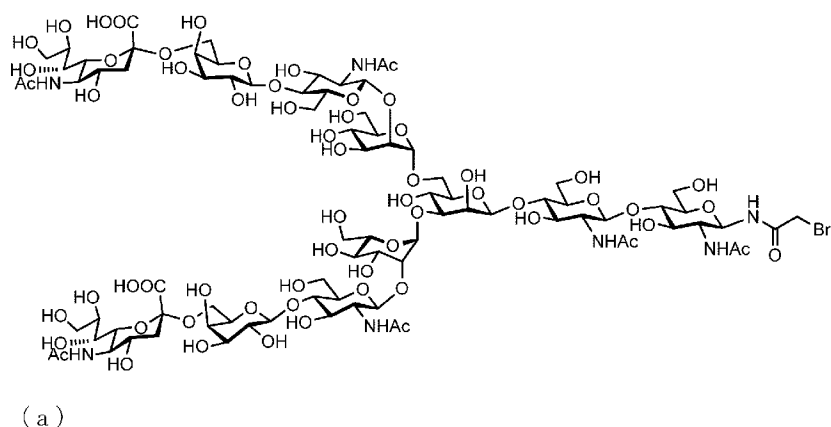
下記式(1)で表わされるペプチド1(配列番号38)(APC社製)(60.6mg、18.3 μ mol)と下記式(a)で表わされる化合物a(ブromoアセトアミド化したオリゴ糖:大塚化学株式会社製)(85.8mg、36.6 μ mol、ペプチド1に対して2.0等量)を33mMリン酸緩

衝液 (pH 7.4、5.5 mL) に溶解し、室温で30分間反応させた。

[化17]

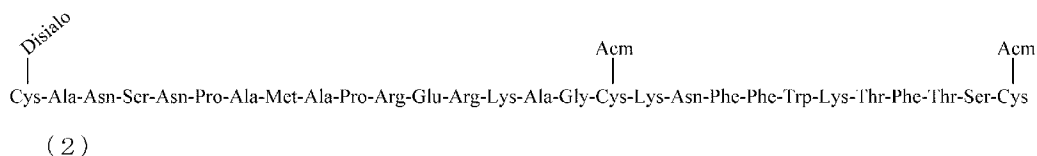


[化18]



反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 2.0 $\times$ 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1%酢酸 (AcOH) 水 B: 0.09% AcOH / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A: B = 90:10 $\rightarrow$ 75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (2) で表わされる糖ペプチド2 (配列番号39) (60.5 mg、10.9 μ mol、収率59%) を得た。

[化19]

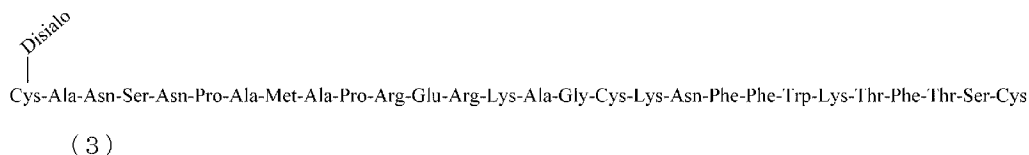


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{229}H_{358}N_{50}O_{102}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1858.3, $[M+4H]^{4+}$ 1394.0, $[M+5H]^{5+}$ 1115.4, found 1858.1, 1393.8, 1115.2。

[0128] 1-2 Acm基の脱保護

上記 1-1 に記載の方法で得られた糖ペプチド 2 (51.2 mg、9.19 μmol) に酢酸銀 (I) (18.8 mg、113 μmol) の水溶液 (3.7 mL) を添加し、室温で 40 分間反応させた。200 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4、3.7 mL) に溶解した DTT (43.6 mg、282 μmol) および 100 mM アスコルビン酸水溶液 (0.92 mL) を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液を HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 75:25 15 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (3) で表わされる糖ペプチド 3 (配列番号 40) (29.2 mg、5.38 μmol 、収率 58%) を得た。

[化 20]



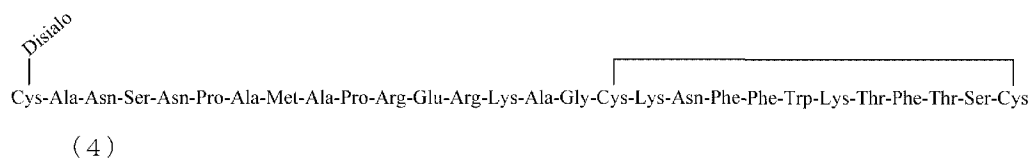
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{223}\text{H}_{348}\text{N}_{48}\text{O}_{100}\text{S}_4$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1810.9、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1358.4、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 1086.9、 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 906.0、found 1810.7、1358.3、1086.6、905.7。

[0129] 1-3 ジスルフィド結合の形成

上記 1-2 に記載の方法で得られた糖ペプチド 3 (29.2 mg、5.38 μmol) を 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、10.8 mL) に溶解し、室温で 2 日間反応させた。反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=77:23 $\rightarrow$ 64:36 17 分 直線濃度勾配溶出] を用い

て精製し、下記式（４）で表わされる化合物（S1C（disialo）－SRIF28）（配列番号５）を含む画分を得た。

[化21]



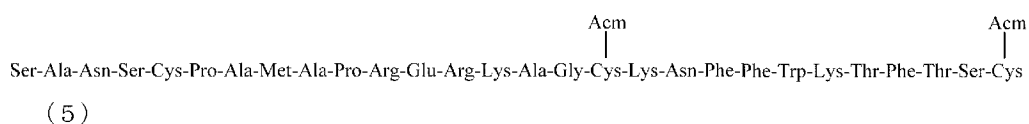
この画分を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μ m）、 ϕ 20×250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%AcOH水 B：0.09%AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=90：10→75：25 15分 直線濃度勾配 溶出] を用いてさらに精製し、S1C（disialo）－SRIF28（17.2mg、3.17 μ mol、収率59%）を得た。

ESI-MS：(m/z) calcd for $\text{C}_{223}\text{H}_{346}\text{N}_{48}\text{O}_{100}\text{S}_4$ ：[M+3H]³⁺ 1810.2、[M+4H]⁴⁺ 1357.9、[M+5H]⁵⁺ 1086.5、found 1810.0、1357.5、1086.4。

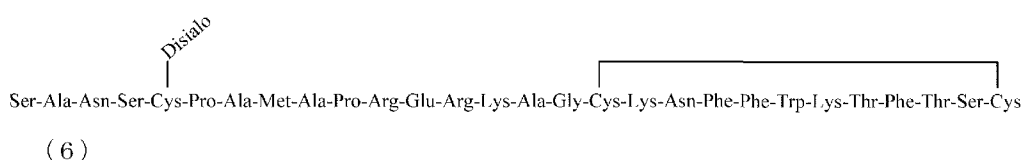
[0130] 実施例2 N5C（disialo）－SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式（５）で表わされる化合物（ペプチド５）（配列番号４１）を用いたこと以外は、実施例１と同様にして、下記式（６）で表わされる化合物（N5C（disialo）－SRIF28）（配列番号６）を合成した。

[化22]



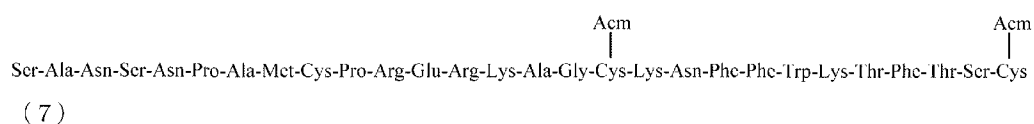
[化23]



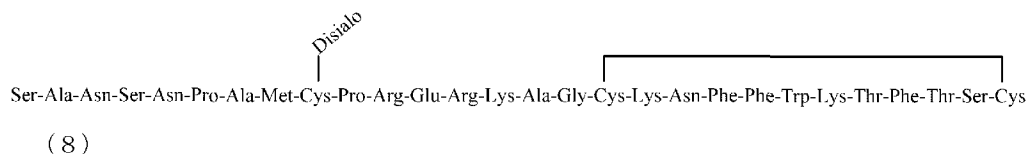
[0131] 実施例3 A9C (d i s i a l o) - S R I F 28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(7)で表わされる化合物(ペプチド7)(配列番号42)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(8)で表わされる化合物(A9C(d i s s i a l o) - S R I F 28)(配列番号7)を合成した。

[化24]



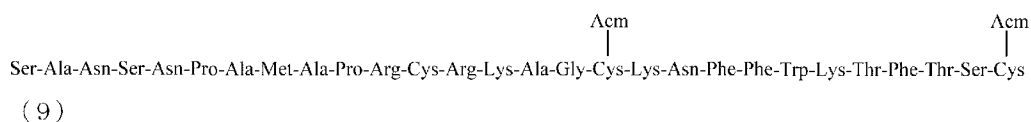
[化25]



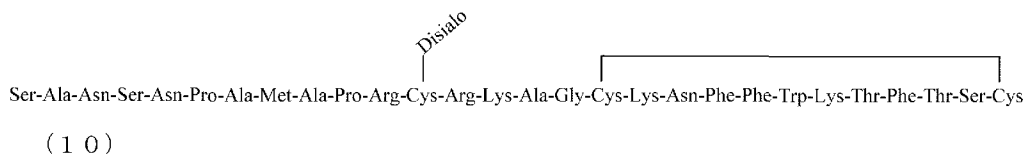
[0132] 実施例4 E12C(dissalo)-SRIF28の合成

ペプチド１の代わりに下記式（９）で表わされる化合物（ペプチド９）（配列番号４３）を用いたこと以外は、実施例１と同様にして、下記式（１０）で表わされる化合物（Ｅ１２Ｃ（ｄｉｓｓｉａｌｏ）－ＳＲＩＦ２８）（配列番号８）を合成した。

[化26]



[化27]

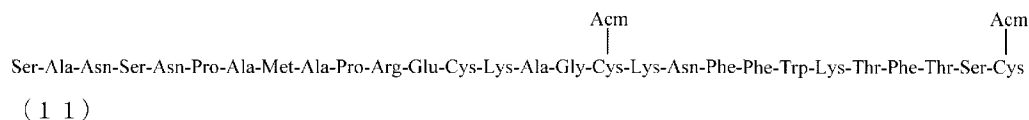


[0133] 実施例5 R13C(dissalo)-SRIF28の合成

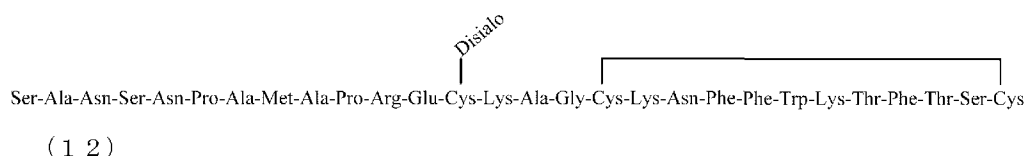
ペプチド1の代わりに下記式(11)で表わされる化合物(ペプチド11

）（配列番号４４）を用いたこと以外は、実施例１と同様にして、下記式（１２）で表わされる化合物（R１３C（disialo）-SRIF２８）（配列番号９）を合成した。

[化28]



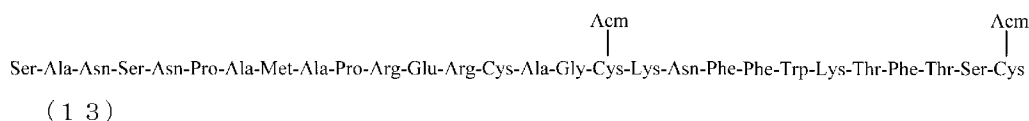
[化29]



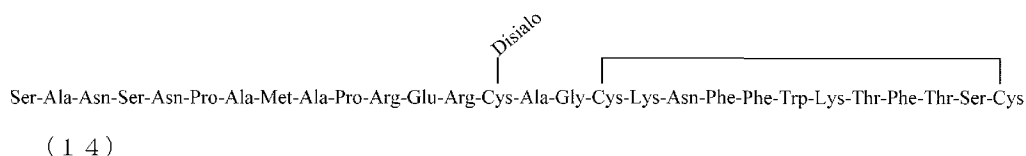
[0134] 実施例6 K14C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド 1 の代わりに下記式 (13) で表わされる化合物 (ペプチド 13) (配列番号 45) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (14) で表わされる化合物 (K14C (disialo) -SRIF28) (配列番号 10) を合成した。

[化30]



[化31]

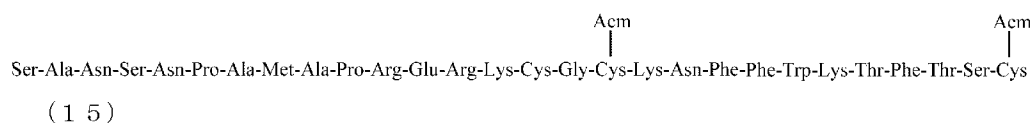


[0135] 実施例7 A15C (disialo) -SRIF28の合成

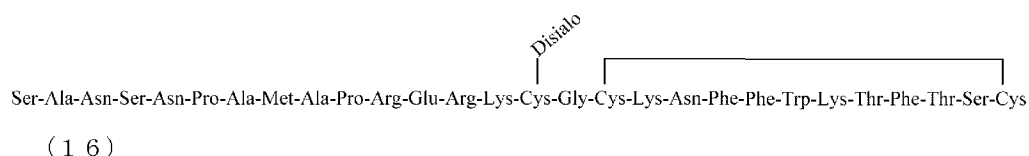
ペプチド 1 の代わりに下記式 (15) で表わされる化合物 (ペプチド 15) (配列番号 46) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (16) で表わされる化合物 (A15C (disialo) -SRIF28)

(配列番号 11) を合成した。

[化32]



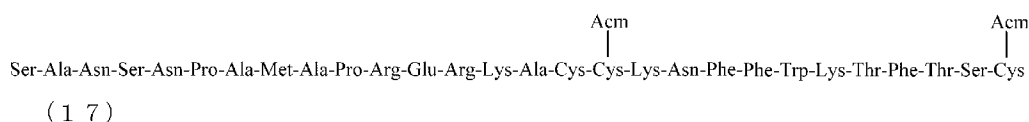
[化33]



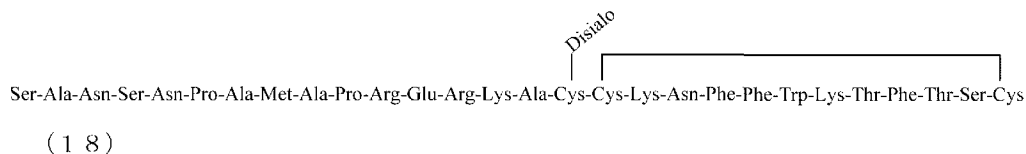
[0136] 実施例8 G16C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(17)で表わされる化合物(ペプチド17)(配列番号47)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(18)で表わされる化合物(G16C(disialo)-SRIF28)(配列番号12)を合成した。

[化34]



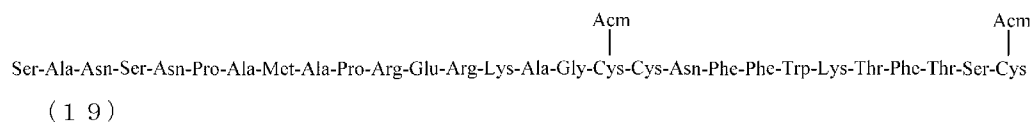
[化35]



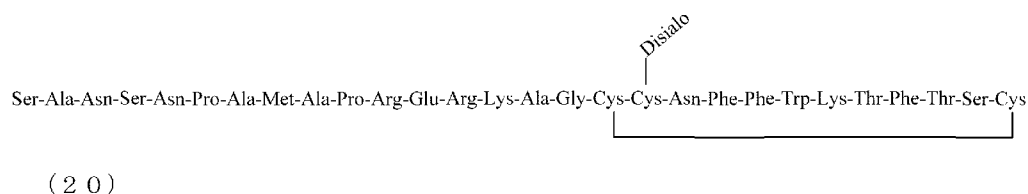
[0137] 実施例9 K18C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(19)で表わされる化合物(ペプチド19)(配列番号48)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(20)で表わされる化合物(K18C(disialo)-SRIF28)(配列番号13)を合成した。

[化36]



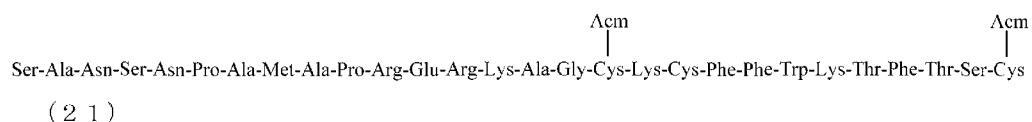
[化37]



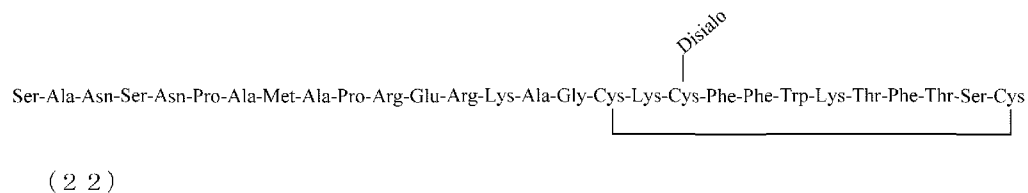
[0138] 実施例10 N19C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(21)で表わされる化合物(ペプチド21)(配列番号49)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(22)で表わされる化合物(N19C (disialo) -SRIF28)(配列番号14)を合成した。

[化38]



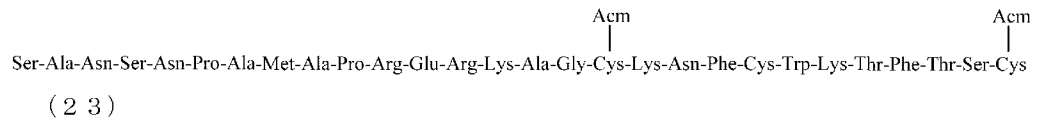
[化39]



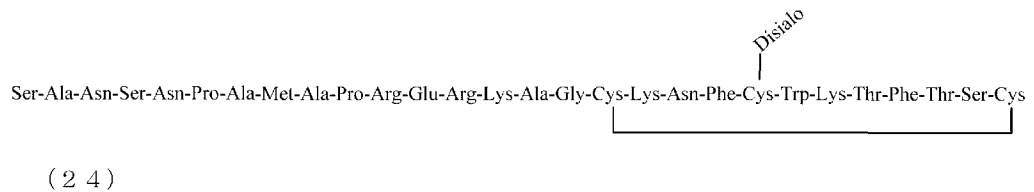
[0139] 実施例11 F21C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(23)で表わされる化合物(ペプチド23)(配列番号50)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(24)で表わされる化合物(F21C (disialo) -SRIF28)(配列番号15)を合成した。

[化40]



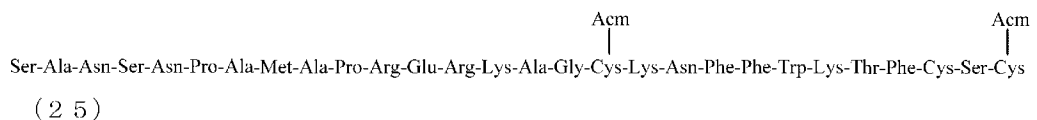
[化41]



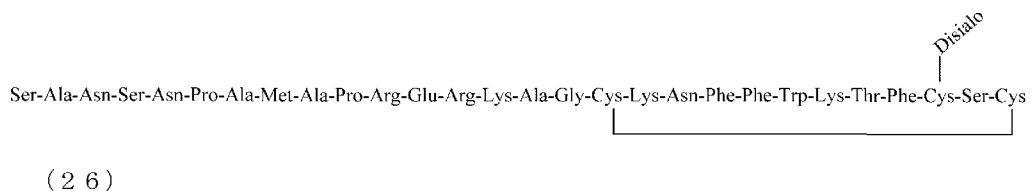
[0140] 実施例12 T26C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(25)で表わされる化合物(ペプチド25)(配列番号51)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(26)で表わされる化合物(T26C(disialo)-SRIF28)(配列番号16)を合成した。

[化42]



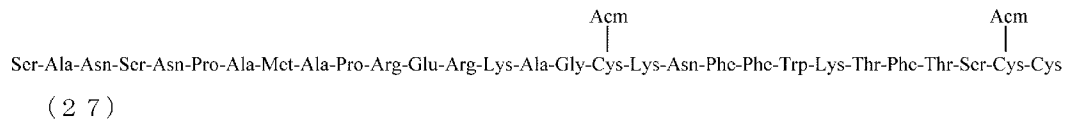
[化43]



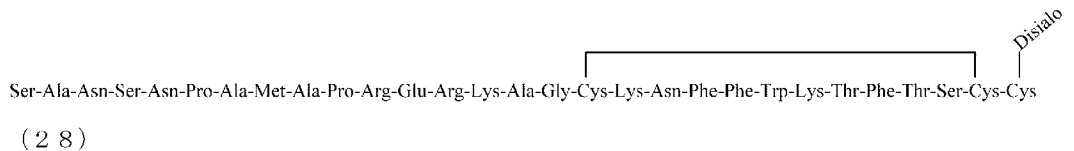
[0141] 実施例13 29C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(27)で表わされる化合物(ペプチド27)(配列番号52)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(28)で表わされる化合物(29C(disialo)-SRIF28)(配列番号17)を合成した。

[化44]



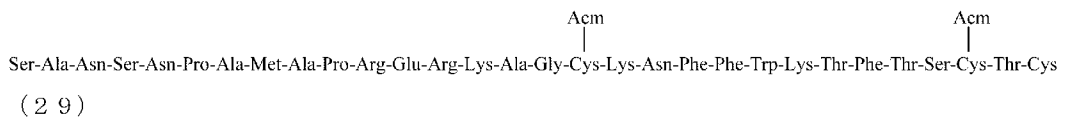
[化45]



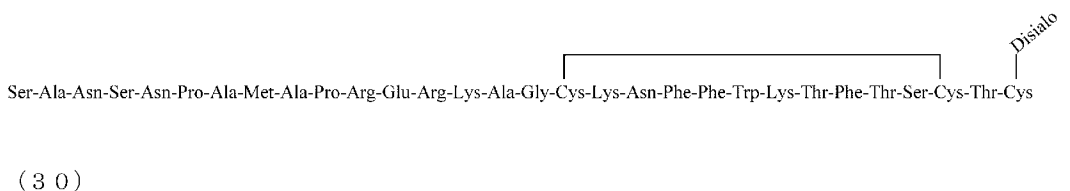
[0142] 実施例14 30C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(29)で表わされる化合物(ペプチド29)(配列番号53)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(30)で表わされる化合物(30C (disialo) -SRIF28)(配列番号18)を合成した。

[化46]



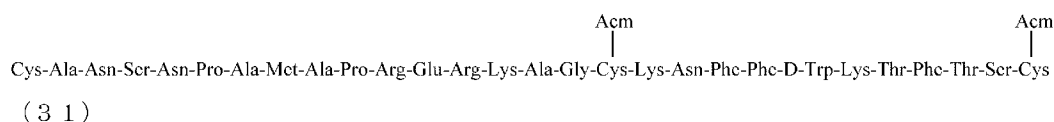
[化47]



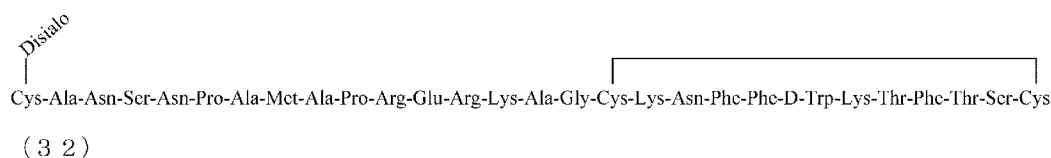
[0143] 実施例15 S1C (disialo) -D-Trp22-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(31)で表わされる化合物(ペプチド31)(配列番号54)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(32)で表わされる化合物(S1C (disialo) -D-Trp22-SRIF28)(配列番号19)を合成した。

[化48]



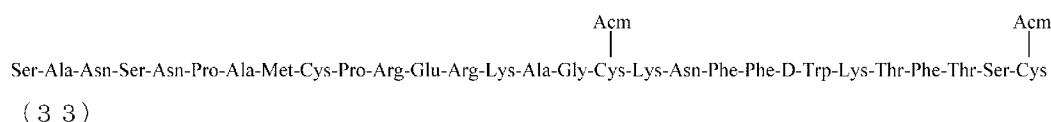
[化49]



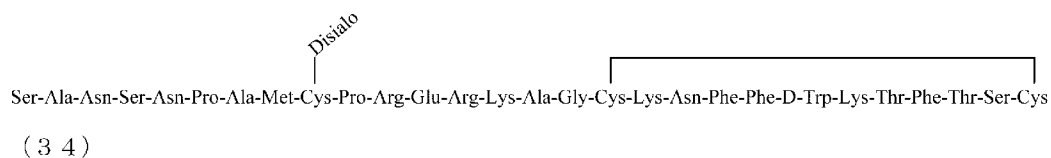
[0144] 実施例 16 A9C (d i s i a l o) - D - T r p 2 2 - S R I F 2 8
の合成

ペプチド 1 の代わりに下記式 (3 3) で表わされる化合物 (ペプチド 3 3) (配列番号 5 5) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (3 4) で表わされる化合物 (A 9 C (d i s i a l o) - D - T r p 2 2 - S R I F 2 8) (配列番号 2 0) を合成した。

[化50]



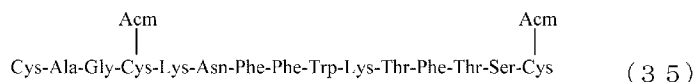
[化51]



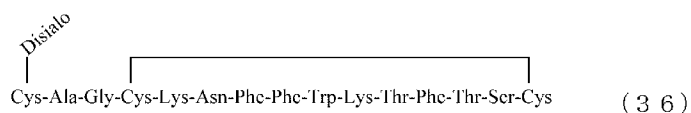
[0145] 実施例 17 C (d i s i a l o) - S R I F 1 4 の合成

ペプチド 1 の代わりに下記式 (3 5) で表わされる化合物 (ペプチド 3 5) (配列番号 5 6) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (3 6) で表わされる化合物 (C (d i s i a l o) - S R I F 1 4) (配列番号 3 5) を合成した。

[化52]



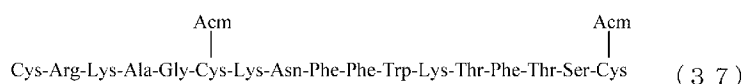
[化53]



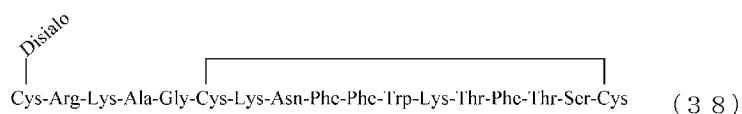
[0146] 実施例18 C(disialo)-R-K-SRIF14の合成

ペプチド1の代わりに下記式(37)で表わされる化合物(ペプチド37)(配列番号57)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(38)で表わされる化合物(C(disialo)-R-K-SRIF14)(配列番号36)を合成した。

[化54]



[化55]



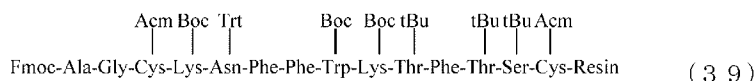
[0147] 実施例19 C(disialo)-C12linker-SRIF14の合成

19-1 ペプチドの合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂(100 μmol)を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys(Acm)-OH(49.7 mg、120 μmol)とDIPEA(104.5 μL、600 μmol)のジクロロメタン(3.0 mL)溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、

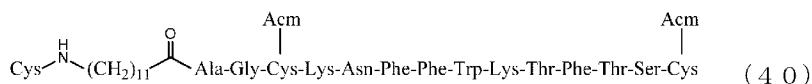
P r e l u d e (商標) ペプチド合成機を用いて、F m o c 法によるペプチド固相合成法にて、下記式 (39) で表わされる、樹脂に結合した状態にある保護されたペプチド 39 (配列番号 58) を合成した。縮合反応は、縮合剤として H C T U を使用して DMF 中で行った。

[化56]



Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、HCTUを縮合剤として用いて、Fmoc-12-アミノドデカン酸およびFmoc-Cys(Trt)-OHを順に縮合した。縮合後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール(=90：2.5：5：2.5)を加え、3時間室温で振盪した。これにより、アミノ酸側鎖の保護基(Acm基以外)を脱離させるとともに、ペプチドと樹脂とを切り離した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC[カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120(5μm)、φ20×250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A：B=60：40→36.2：63.8 20分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(40)で表わされる化合物(ペプチド40)(配列番号59)(11.2mg)を得た。

[化57]



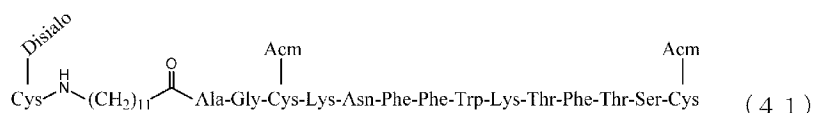
ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{97}H_{144}N_{22}O_{23}S_3$: $[M+2H]^{2+}$ 1042.3, $[M+3H]^{3+}$ 695.2, found 1042.0, 695.

O。

[0148] 19-2 チオールの糖鎖修飾反応

上記19-1に記載の方法で得られたペプチド40 (6.8 mg、3.3 μmol) と上記式(a)で表わされる化合物a (19.1 mg、8.15 μmol) を7 M グアニジン塩酸塩と330 μM TCEPを含む0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4、0.96 mL) に溶解し、室温で2時間反応させた。HPLCで原料消失を確認した後、反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH / 10%水 / 90%アセトニトリル、グラジエント A:B=80:20 $\rightarrow$ 50:50 25分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(41)で表わされる化合物(糖ペプチド41) (配列番号60) (7.1 mg、1.6 μmol 、収率50%)を得た。

[化58]



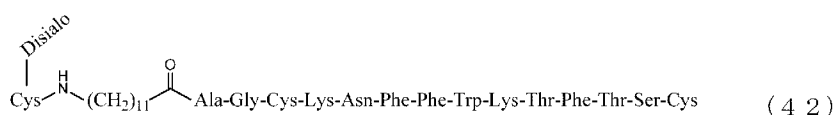
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{183}\text{H}_{283}\text{N}_{29}\text{O}_{85}\text{S}_3$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1449.5, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1087.4, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 870.1, found 1449.3, 1087.2, 870.0.

[0149] 19-3 Acm基の脱保護

上記19-2に記載の方法で得られた糖ペプチド41 (10.3 mg、2.37 μmol) に酢酸銀(I) (9.7 mg、58 μmol) の水溶液 (0.95 mL) を添加し、室温で30分間反応させた。100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4、0.95 mL) に溶解したDTT (22.3 mg、145 μmol) および100 mM アスコルビン酸水溶液 (0.95 mL) を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH / 10%水 / 90%アセトニトリル、グラジエント A:B=80:20 $\rightarrow$ 50:50 25分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(42)で表わされる化合物(糖ペプチド42) (配列番号61) (7.1 mg、1.6 μmol 、収率50%)を得た。

L／分、展開溶媒 A：0.1%AcOH水 B：0.09%AcOH／10%水／90%アセトニトリル グラジエント A：B=80：20→50：50 25分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式42で表わされる糖ペプチド42（配列番号61）（5.8mg、1.4μmol、収率59%）を得た。

[化59]

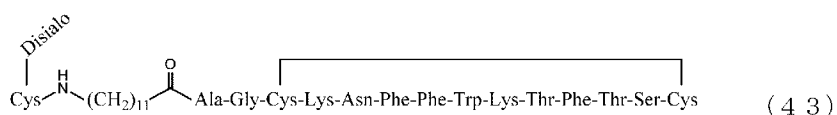


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{177}H_{273}N_{27}O_{83}S_3$: $[M+3H]^{3+}$ 1402.1, $[M+4H]^{4+}$ 1051.8, $[M+5H]^{5+}$ 841.7, found 1401.9, 1051.7, 841.5.

[0150] 19-4 ジスルフィド結合の形成

上記19-3に記載の方法で得られた糖ペプチド42（5.8mg、1.4μmol）を100mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）-DMSO（1／1、v／v、3.5mL）に溶解し、室温で30時間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5μm）、φ20×250mm、流速：7.0mL／分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA／10%水／90%アセトニトリル グラジエント A：B=70：30→50：50 25分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式43で表わされる化合物（C（disialo）-C12 linker-SRIF14）（配列番号37）を含む画分を得た。

[化60]



この画分を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5μm）、φ20×250mm、流速：7.0mL／分、展開溶媒 A：0.1%AcOH水 B：0.09%AcOH／10%水／90%アセトニトリル

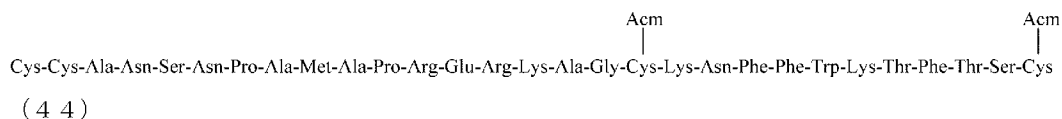
グラジエント A : B = 80 : 20 → 50 : 50 25分 直線濃度勾配
 溶出] を用いてさらに精製し、C (d i s i a l o) - C 1 2 l i n k e r
 - S R I F 1 4 (3.6 mg、0.86 μ mol、収率61%)を得た。
 ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{177}H_{271}N_{27}O_{83}S_3$: [M+3H]³⁺
 1401.5、[M+4H]⁴⁺ 1051.3、[M+5H]⁵⁺ 841.
 3、found 1401.2、1051.2、841.1。

[0151] 実施例20 S1-2C (d i s i a l o) - S R I F 2 8の合成
 20-1 ペプチドの合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂 (100 μ mol)
 を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys (Acm)
)-OH (49.7 mg、120 μ mol) とDIPEA (104.5 μ L
 、600 μ mol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間振
 盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF
 中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジク
 ロロメタンで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、F
 moc法によるペプチド固相合成法にて保護されたペプチドを樹脂上に合成
 した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより
 除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA:水:トリイソプ
 ロピルシラン:エタンジチオール (=90:2.5:5:2.5) を加え、
 3時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエー
 テルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [
 カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250mm
 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09%
 TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A: B=72:
 28→68.5:31.5 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、
 下記式 (44) で表わされるペプチド44 (配列番号62) (30.7 mg
) を得た。

[化61]

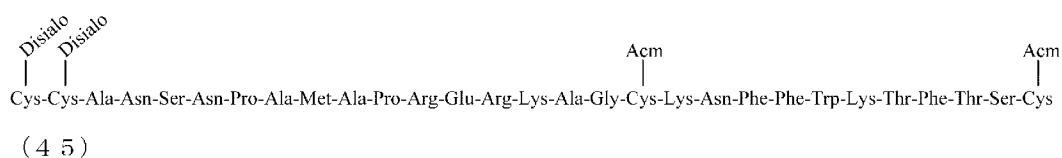


ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{146}\text{H}_{224}\text{N}_{44}\text{O}_{41}\text{S}_5$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1138.3, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 854.0, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 683.4, found 1138.2, 853.9, 683.1。

[0152] 20-2 チオールの糖鎖修飾反応

上記20-1に記載の方法で得られたペプチド44 (45.8 mg、13.4 μmol) と上記式(a)で表わされる化合物a (125.8 mg、53.7 μmol 、ペプチド44に対して4.0等量) を33 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4、4.0 mL) に溶解し、室温で30分間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 ϕ 2.0 $\times$ 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=83:17 $\rightarrow$ 72:28 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式45で表わされる糖ペプチド45 (配列番号63) (44.5 mg、5.61 μmol 、収率42%) を得た。

[化62]



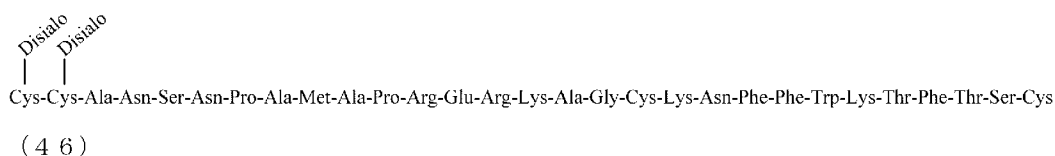
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{318}\text{H}_{502}\text{N}_{58}\text{O}_{165}\text{S}_5$: $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 1588.6, $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 1324.0, $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 1135.0, $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ 993.3, $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$ 883.0, found 1588.6, 1324.0, 1135.0, 993.2, 883.0。

[0153] 20-3 Acm基の脱保護

上記20-2に記載の方法で得られた糖ペプチド45 (44.5 mg、5

． $61 \mu\text{mol}$ ）に酢酸銀（I）（ 14.8 mg 、 $88.7 \mu\text{mol}$ ）の水溶液（ 2.2 mL ）を添加し、室温で30分間反応させた。 200 mM リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ 、 2.2 mL ）に溶解したDTT（ 33.2 mg 、 $215 \mu\text{mol}$ ）および 100 mM アスコルビン酸水溶液（ $561 \mu\text{L}$ ）を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（ $5 \mu\text{m}$ ）、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速： $7.0 \text{ mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A： $0.1\% \text{ AcOH}$ 水 B： $0.09\% \text{ AcOH}/10\% \text{ 水}/90\% \text{ アセトニトリル}$ グラジエント A：B= $83:17 \rightarrow 72:28$ 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（46）で表わされる糖ペプチド46（配列番号64）（ 34.4 mg 、 $4.41 \mu\text{mol}$ 、収率79%）を得た。

[化63]

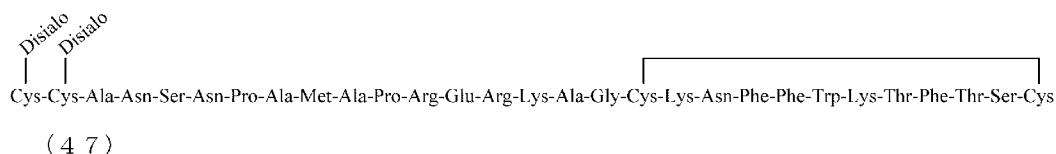


ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{312}\text{H}_{492}\text{N}_{56}\text{O}_{163}\text{S}_5$: $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1950.0, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 1560.2, $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 1300.3, found 1949.8, 1560.1, 1300.2.

[0154] 20-4 ジスルフィド結合の形成

上記20-3に記載の方法で得られた糖ペプチド46（ 34.4 mg 、 $4.41 \mu\text{mol}$ ）を 100 mM トリス-塩酸緩衝液（ $\text{pH } 8.0$ ）-DMSO（ $1/1$ 、 v/v 、 8.8 mL ）に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（ $5 \mu\text{m}$ ）、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速： $7.0 \text{ mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A： $0.1\% \text{ TFA}$ 水 B： $0.09\% \text{ TFA}/10\% \text{ 水}/90\% \text{ アセトニトリル}$ グラジエント A：B= $77:23 \rightarrow 65:35$ 16分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（47）で表わされる化合物（S1-2C（disialo）-SRIF28）（配列番号21）を含む画分を得た。

[化64]



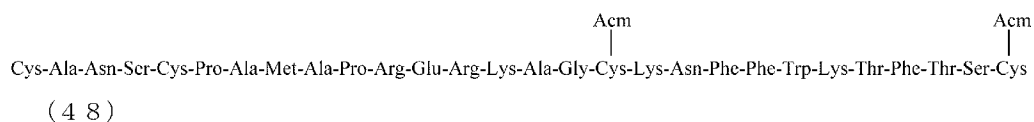
この画分を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% AcOH 水 B：0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A：B=83：17→72：28 15分 直線濃度勾配 溶出] を用いてさらに精製し、S1-2C (disialo) -SRIF28 (20.1 mg、2.58 μ mol、収率58%) を得た。

ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{312}H_{490}N_{56}O_{163}S_5$ ：[M+4H]⁴⁺ 1949.5、[M+5H]⁵⁺ 1559.8、[M+6H]⁶⁺ 1300.0、found 1949.4、1559.7、1299.9。

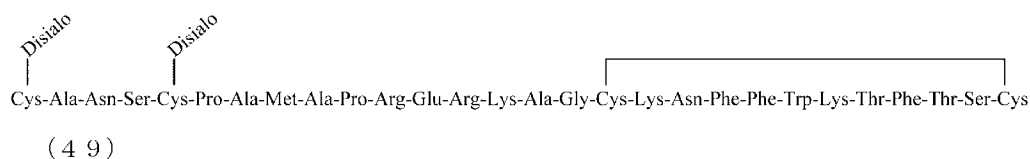
[0155] 実施例21 S1C (disialo)・N5C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド44の代わりに下記式(48)で表わされる化合物(ペプチド48)(配列番号65)を用いたこと以外は、実施例20と同様にして、下記式(49)で表わされる化合物(S1C (disialo)・N5C (disialo) -SRIF28)(配列番号22)を合成した。

[化65]



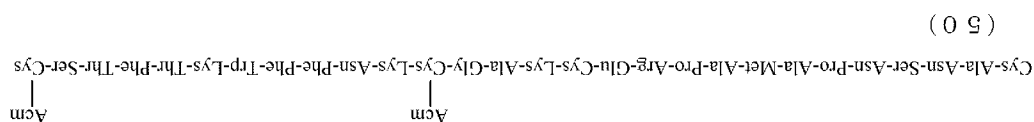
[化66]



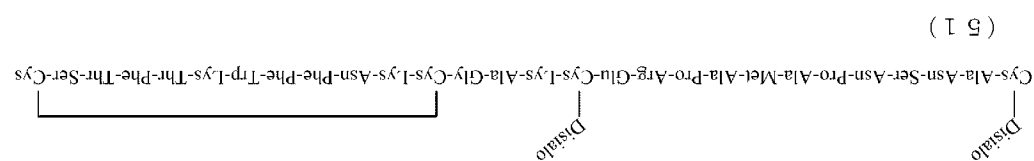
[0156] 実施例22 S1C (disialo)・R13C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド4の代わりに下記式(50)で表わされる化合物(ペプチド5
0)(配列番号66)を用いたこと以外は、実施例20と同様にして、下記
式(51)で表わされる化合物(S1C(dissiao)・R13C(d
issiao)−SRIF28)(配列番号23)を合成した。

[化67]



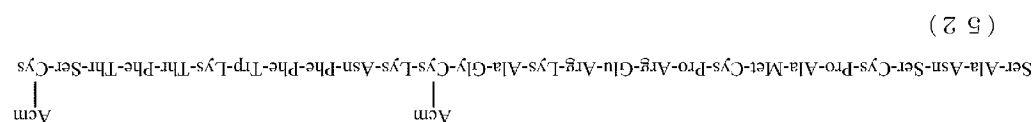
[化68]



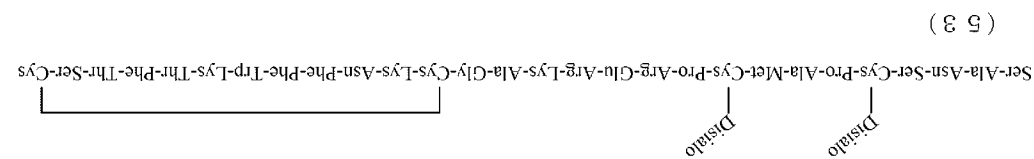
[0157] 実施例23 N5C(dissiao)・A9C(dissiao)−SRIF28の合成

ペプチド4の代わりに下記式(52)で表わされる化合物(ペプチド5
2)(配列番号67)を用いたこと以外は、実施例20と同様にして、下記
式(53)で表わされる化合物(N5C(dissiao)・A9C(d
issiao)−SRIF28)(配列番号24)を合成した。

[化69]



[化70]



[0158] 実施例24 S1−3C(dissiao)−SRIF28の合成

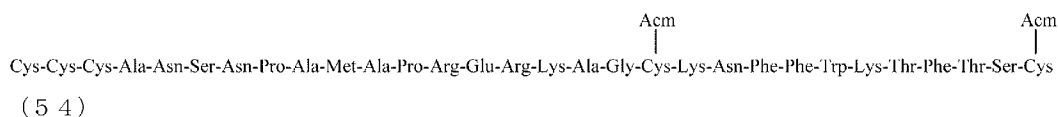
24−1 ペプチドの合成

固相合成用カラムに2−クロロトリチルクロリド樹脂(100μm o l)

を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys (Ac)
-OH (49.7 mg、120 μ mol) とDIPEA (104.5 μ L
、600 μ mol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間振
盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF
中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、
Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチ
ド固相合成法にて保護されたペプチドを樹脂上に合成した。縮合反応は、縮
合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、室温で3時間振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm）、φ50×250 mm、流速：43.7 mL／分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA／10%水／90%アセトニトリル グラジエント A：B＝73：27→65：35 14分 直線濃度勾配溶出〕を用いて精製し、下記式（54）で表わされるペプチド54（配列番号68）（41.7 mg）を得た。

[化71]



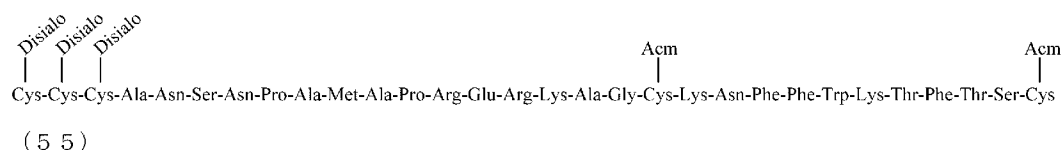
ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{149}H_{229}N_{45}O_{42}S_6$: $[M+3H]^{3+}$ 1172.7, $[M+4H]^{4+}$ 879.8, $[M+5H]^{5+}$ 704.0, found 1172.5, 879.4, 703.9.

[0159] 24-2 チオールの糖鎖修飾反応

上記 24-1 に記載の方法で得られたペプチド 54 (10.7 mg、3.04 μ mol) と上記式 (a) で表わされる化合物 a (36.6 mg、15

、 $6\mu\text{mol}$ 、ペプチド54に対して5.2等量)を $10\mu\text{M}$ TCEPを含む 33mM リン酸緩衝液($\text{pH}7.4$ 、 0.91mL)に溶解し、室温で 100 分間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: $7.0\text{mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/ 10% 水/ 90% アセトニトリル グラジエント A: B= $80:20 \rightarrow 70:30$ 5分、次いで A: B= $70:30 \rightarrow 65:35$ 12分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(55)で表わされる糖ペプチド55 (配列番号69) (11.7mg 、 $1.14\mu\text{mol}$ 、収率 38%)を得た。

[化72]



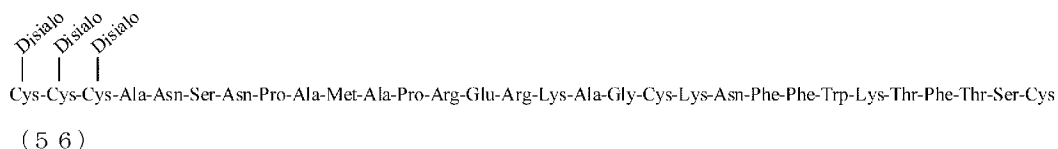
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{407}\text{H}_{646}\text{N}_{66}\text{O}_{228}\text{S}_6$: $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 2061.8 , $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 1718.4 , $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 1473.0 , $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ 1289.0 , $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$ 1145.9 , $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$ 1031.4 , found 2061.8 , 1718.2 , 1472.9 , 1289.0 , 1145.8 , 1031.3 .

[0160] 24-3 Acm基の脱保護

上記24-2に記載の方法で得られた糖ペプチド55 (11.7mg 、 $1.14\mu\text{mol}$)に酢酸銀(I) (4.7mg 、 $28\mu\text{mol}$)の水溶液(0.46mL)を添加し、室温で2時間反応させた。 200mM トリス-塩酸緩衝液($\text{pH}7.4$ 、 0.46mL)に溶解したDTT (11.3mg 、 $73\mu\text{mol}$)および 100mM アスコルビン酸水溶液(0.11mL)を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: $7.0\text{mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/ 10% 水/ 90% アセトニトリル グラジエント A: B= $80:20 \rightarrow 7$

0 : 30 5分、次いで70 : 30→55 : 45 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (56) で表わされる糖ペプチド56 (配列番号70) (7.4 mg、0.73 μ mol、収率64%) を得た。

[化73]

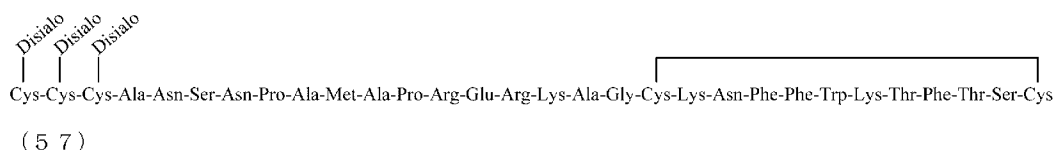


ESI-MS : (m/z) calcd for $\text{C}_{401}\text{H}_{636}\text{N}_{64}\text{O}_{226}\text{S}_6$: $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 1694.7, $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 1452.7, $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ 1271.3, $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$ 1130.1, $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$ 1017.2, found 1694.6, 1452.5, 1271.4, 1130.0, 1017.2。

[0161] 24-4 ジスルフィド結合の形成

上記24-3に記載の方法で得られた糖ペプチド56 (7.4 mg、0.73 μ mol) を100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、1.8 mL) に溶解し、室温で25時間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速 : 7.0 mL/分、展開溶媒 A : 0.1% TFA 水 B : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A : B = 80 : 20→70 : 30 5分、次いで70 : 30→69.3 : 30.7 5分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製することで、下記式 (57) で表わされる化合物 (S1-3C (disialo) -SRIF28) (配列番号25) を含む画分を得た。

[化74]



この画分を、HPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ

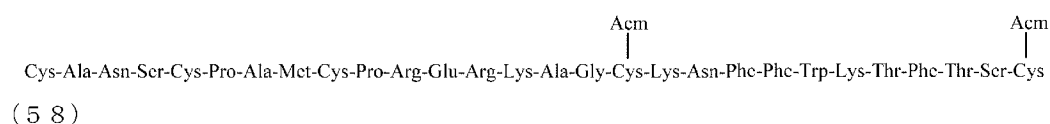
m)、 $\phi 20 \times 250$ mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% AcOH 水 B：0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル
 グラジエント A：B=80：20→40：60 20分 直線濃度勾配
 溶出] を用いてさらに精製し、S1-3C (disialo) -SRIF28 (4.7 mg、0.46 μ mol、収率63%) を得た。

ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{401}H_{634}N_{64}O_{226}S_6$ ：[M+3H]³⁺ 3387.7、[M+4H]⁴⁺ 2541.0、[M+5H]⁵⁺ 2033.0、[M+6H]⁶⁺ 1694.3、[M+7H]⁷⁺ 1452.4、found 3387.6、2540.9、2032.7、1694.2、1452.3。

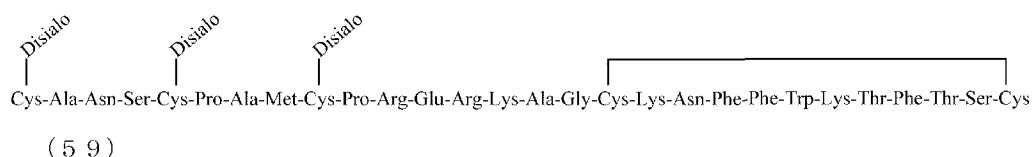
[0162] 実施例25 S1C (disialo) · N5C (disialo) · A9C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド54の代わりに下記式(58)で表わされるペプチド58(配列番号71)を用いたこと以外は、実施例24と同様にして、下記式(59)で表わされる化合物(S1C (disialo) · N5C (disialo) · A9C (disialo) -SRIF28)(配列番号26)を合成した。

[化75]



[化76]

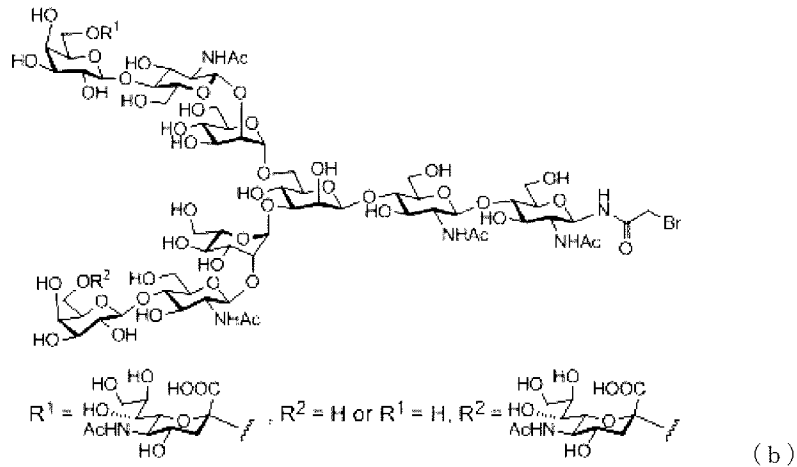


[0163] 実施例26 S1C (monosialo) -SRIF28の合成

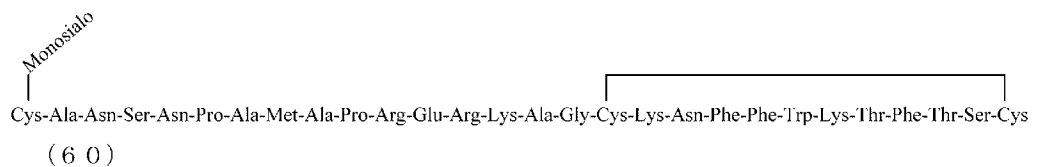
化合物aの代わりに下記式(b)で表わされる化合物b(ブロモアセトアミド化したオリゴ糖：大塚化学株式会社製)を用いたこと以外は、実施例1

と同様にして、下記式（60）で表わされる化合物（S1C（monosialo）-SRIF28）（配列番号27）を合成した。

[化77]

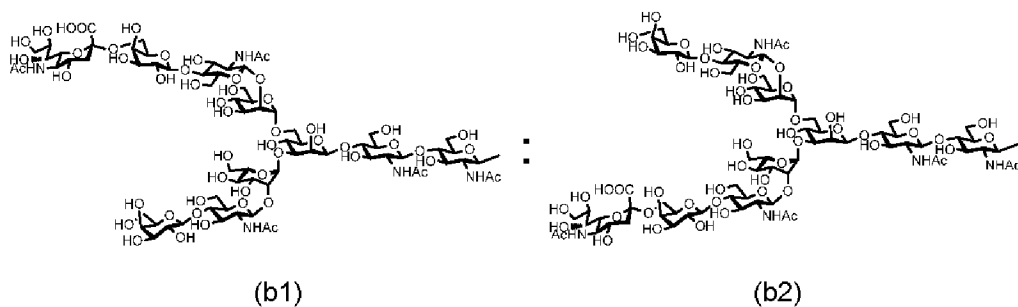


[化78]



最終生成物において、下記式b1の糖鎖を有する糖鎖ポリペプチドと、下記式b2の糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチドの比は、45：55であった。なお、構造が同一のモノシアロ糖鎖誘導体を使用することにより、実質的に均一の糖鎖構造を有する糖鎖付加ポリペプチドが製造可能である。

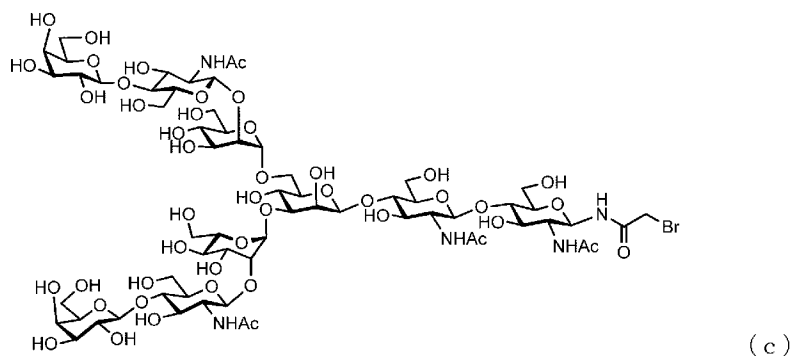
[化79]



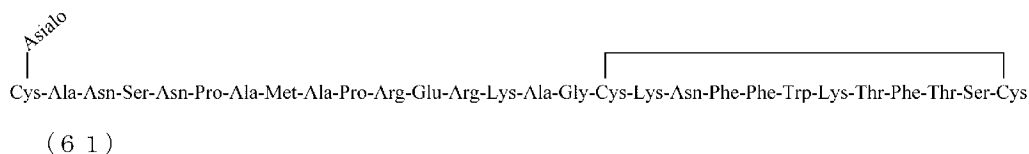
[0164] 実施例27 S1C（asialo）-SRIF28の合成

化合物 a の代わりに下記式 (c) で表わされる化合物 c (ブロモアセトアミド化したオリゴ糖：大塚化学株式会社製) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (61) で表わされる化合物 (S1C (asialo) -SRIF28) (配列番号 28) を合成した。

[化80]



[化81]

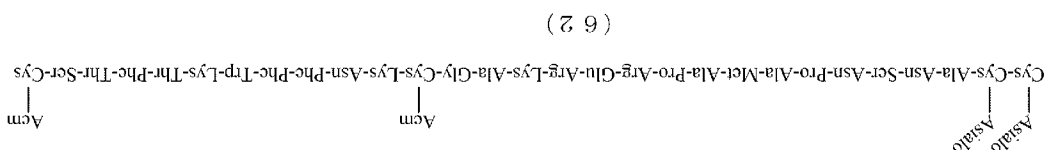


[0165] 実施例 28 S1-2C (asialo) -SRIF28 の合成

28-1 チオールの糖鎖修飾反応

上記 20-1 に記載の方法で得られたペプチド 44 (21.2 mg、6.21 μ mol) と化合物 c (44.5 mg、25.3 μ mol、ペプチド 44 に対して 4.1 等量) を 33 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4、1.9 mL) に溶解し、室温で 1 時間反応させた。反応溶液を HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA 水 B：0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A：B=77：23 $\rightarrow$ 62：38 15 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (62) で表わされる糖ペプチド 62 (配列番号 72) (24.0 mg、3.54 μ mol、収率 57%) を得た。

[化82]



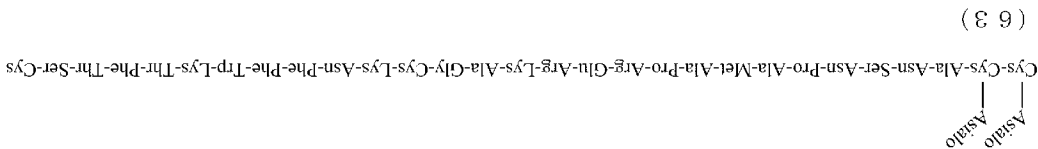
(62)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{274}H_{434}N_{54}O_{133}S_5$: [M+4H]⁴⁺ 1694.3, [M+5H]⁵⁺ 1355.6, [M+6H]⁶⁺ 1129.8, found 1694.3, 1355.6, 1130.0.

[0166] 28-2 Acm基の脱保護

上記28-1に記載の方法で得られた糖ペプチド62 (24.0 mg, 3.54 μmol) に酢酸銀 (1) (6.0 mg, 36 μmol) の水溶液 (1.4 mL) を添加し、室温で3時間反応させた。500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.57 mL) に溶解した DTT (14.0 mg, 90.8 μmol) および 100 mM アスコルビン酸水溶液 (0.35 mL) を添加し、速やかにフイルターでろ過した。ろ液を HPLC [カラム: SHISEIDO CA PCCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ 20 × 250 mm、流速: 7.0 mL / 分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A : B = 75 : 25 → 65 : 35 / 15 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (63) で表わされる糖ペプチド63 (配列番号73) (20.1 mg, 3.03 μmol、収率 86%) を得た。

[化83]



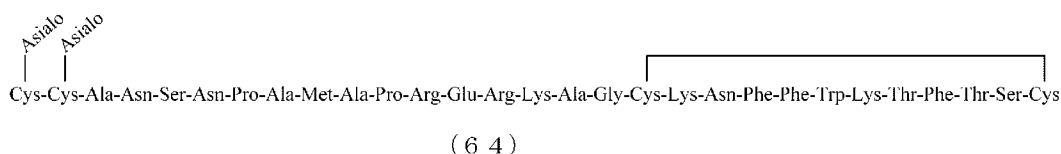
(63)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{268}H_{424}N_{52}O_{131}S_5$: [M+4H]⁴⁺ 1658.7, [M+5H]⁵⁺ 1327.2, found 1658.8, 1327.0.

[0167] 28-3 ジスルフィド結合の形成

上記28-2に記載の方法で得られた糖ペプチド63 (20.1 mg、3.03 μ mol) を100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、6.1 mL) に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B = 77:23 $\rightarrow$ 65:35 16分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(64)で表わされる化合物(S1-2C (asialo) -SRIF28) (配列番号29) を含む画分を得た。

[化84]



この画分を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B = 92:8 $\rightarrow$ 80:20 16分 直線濃度勾配溶出] を用いてさらに精製し、S1-2C (asialo) -SRIF28 (11.0 mg、1.66 μ mol、収率55%) を得た。

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{268}H_{422}N_{52}O_{131}S_5$: [M+4H]⁴⁺ 1658.2, [M+5H]⁵⁺ 1326.8, [M+6H]⁶⁺ 1105.8, [M+7H]⁷⁺ 948.0, [M+8H]⁸⁺ 829.6, found 1658.1, 1326.7, 1105.6, 947.8, 829.4。

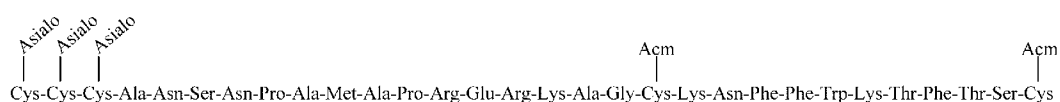
[0168] 実施例29 S1-3C (asialo) -SRIF28の合成

29-1 チオール糖鎖修飾反応

上記24-1に記載の方法で得られたペプチド54 (21.3 mg、6.06 μ mol) と化合物c (53.4 mg、30.3 μ mol、ペプチド54に対して5.0等量) を33 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4、1.8 mL

）に溶解し、室温で１時間反応させた。反応溶液をＨＰＬＣ〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（５μm）、φ２０×２５０mm、流速：７．０mL／分、展開溶媒　Ａ：０．１％ＴＦＡ水　Ｂ：０．０９％ＴＦＡ／１０％水／９０％アセトニトリル　グラジエント　Ａ：Ｂ＝７５：２５→７０：３０　２０分　直線濃度勾配溶出〕を用いて精製し、下記式（６５）で表わされる糖ペプチド６５（配列番号７４）（３９．３mg、４．５９μmol、収率７６％）を得た。

[化85]



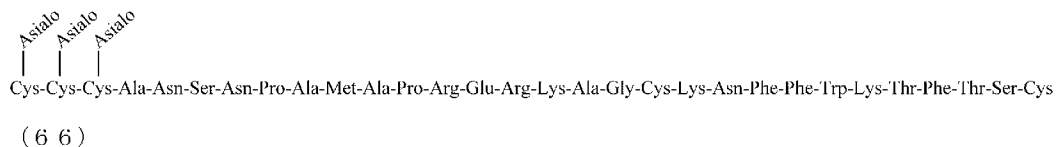
(65)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{341}H_{544}N_{60}O_{180}S_6$: $[M+4H]^{4+}$ 2140.2, $[M+5H]^{5+}$ 1712.3, $[M+6H]^{6+}$ 1427.1, found 2140.2, 1712.4, 1427.2.

[0169] 29-2 Acm基の脱保護

上記29-1に記載の方法で得られた糖ペプチド65（３９．３mg、４．５９μmol）に酢酸銀（Ⅰ）（１８．７mg、１１２μmol）の水溶液（１．８mL）を添加し、室温で９０分間反応させた。２００mMリン酸緩衝液（pH7.4、１．８mL）に溶解したDTT（４３．４mg、２８．１μmol）および１００mMアスコルビン酸水溶液（０．４６mL）を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をＨＰＬＣ〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（５μm）、φ２０×２５０mm、流速：７．０mL／分、展開溶媒　Ａ：０．１％ＴＦＡ水　Ｂ：０．０９％ＴＦＡ／１０％水／９０％アセトニトリル　グラジエント　Ａ：Ｂ＝７５：２５→６８：３２　１８分　直線濃度勾配溶出〕を用いて精製し、下記式（６６）で表わされる糖ペプチド66（配列番号75）（２７．６mg、３．２８μmol、収率７１％）を得た。

[化86]

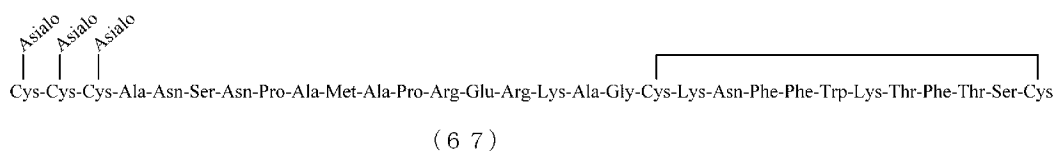


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{335}H_{534}N_{58}O_{178}S_6$: $[M+4H]^{4+}$ 2104.6, $[M+5H]^{5+}$ 1683.9, $[M+6H]^{6+}$ 1403.4, found 2104.6, 1684.0, 1403.3。

[0170] 29-3 ジスルフィド結合の形成

上記29-2に記載の方法で得られた糖ペプチド66 (27.6 mg、3.28 μ mol) を100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、8.2 mL) に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B = 72:28 $\rightarrow$ 70.5:29.5 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(67)で表わされる化合物(S1-3C (asialo) -SRIF28) (配列番号30) を含む画分を得た。

[化87]



この画分を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B = 96:4 $\rightarrow$ 82:18 20分 直線濃度勾配溶出] を用いてさらに精製し、S1-3C (asialo) -SRIF28 (14.5 mg、1.72 μ mol、収率52%) を得た。

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{335}H_{532}N_{58}O_{178}S_6$: $[M+4H]^{4+}$

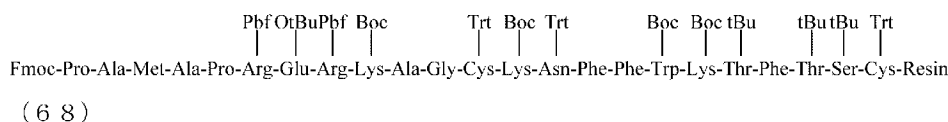
2104. 1, [M+5H]⁵⁺ 1683. 5, [M+6H]⁶⁺ 1403. 1, found 2103. 7, 1683. 3, 1403. 0。

[0171] 実施例30 N5N (d i s i a l o) -S R I F 28の合成

30-1 糖ペプチドの固相合成

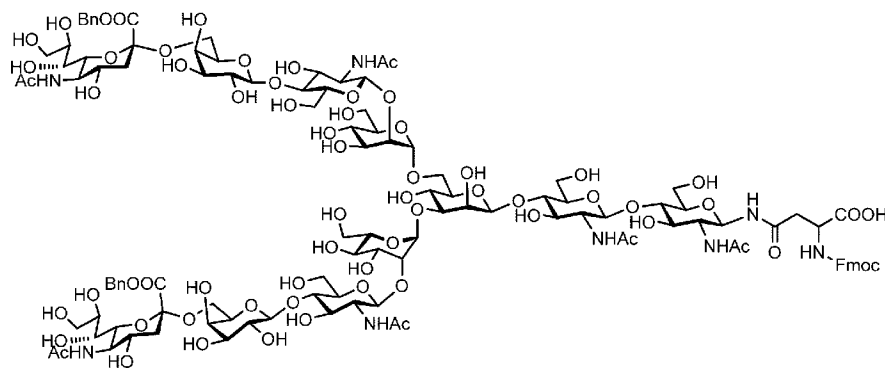
固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂 ($100\text{ }\mu\text{mol}$) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys(Trt)-OH (72.5 mg 、 $120\text{ }\mu\text{mol}$) とDIPEA ($104.6\text{ }\mu\text{L}$ 、 $600\text{ }\mu\text{mol}$) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基をDMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて、下記式 (68) で表わされる、樹脂に結合した状態にある保護されたペプチド68 (配列番号76) を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化88]



次に、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、下記式(d)で表わされる化合物d(大塚化学株式会社製)(411.9mg、150.4μmol)、DMSO-DMF(1/1、v/v、871μL)溶液、TBTU(64.2mg、200μmol)、およびDIPEA(52.3μL、300μmol)を順次樹脂に添加し、室温で3時間振盪させて縮合させた。

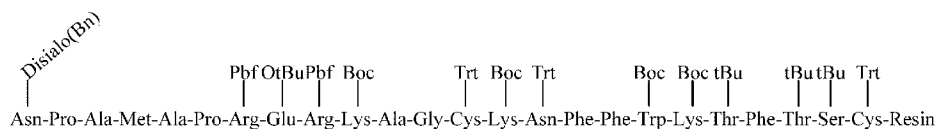
[化89]



(d)

DMFで洗浄後、この縮合操作を1回繰り返した。樹脂をDMFおよびジクロロメタンで洗浄後、DMF中の20%のピペリジンで20分間振盪しFmoc基を脱保護しDMFで樹脂を洗浄することで、保護された下記式(69)で表わされる化合物(ペプチド69)(配列番号77)を樹脂上で合成した。

[化90]

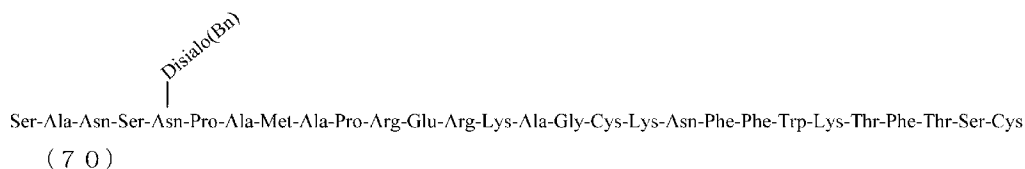


(69)

この樹脂に、HOBt/DICを縮合剤として用いて、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Ala、Fmoc-Ser(tBu)-OHを順に縮合した。縮合後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール(=90:2.5:5:2.5)を加え、室温で3時間振盪した。ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。この粗ペプチドをHPLC[カラム:SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120(5μm)、φ20×250mm、流速:7.0mL/分、展開溶媒A:0.1%TFA水 B:0.09%TFA/10%水/90%アセトニ

トリル A : B = 70 : 30] を用いて精製し、下記式 (70) で表わされる糖ペプチド70 (配列番号78) (29.1 mg、5.26 μ mol) を得た。

[化91]

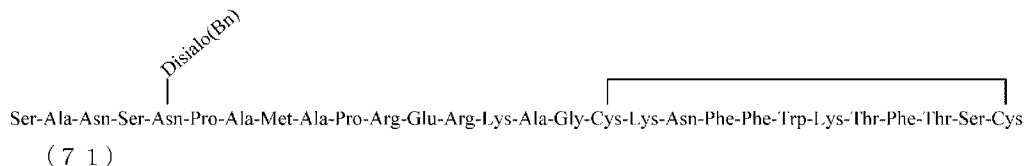


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{235}H_{357}N_{47}O_{100}S_3$: $[M+3H]^{3+}$ 1846.6, $[M+4H]^{4+}$ 1385.2, $[M+5H]^{5+}$ 1108.4, found 1846.5, 1385.1, 1108.3。

[0172] 30-2 ジスルフィド結合の形成

上記30-1に記載の方法で得られた糖ペプチド70 (12.2 mg、2.20 μ mol) を100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、5.5 mL) に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B = 80:20 $\rightarrow$ 66:35 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (71) で表わされる糖ペプチド71 (配列番号79) (8.3 mg、1.5 μ mol、収率68%) を得た。

[化92]

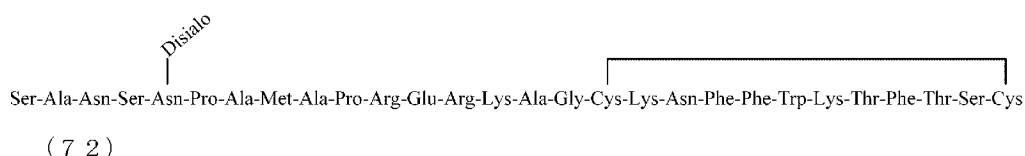


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{235}H_{355}N_{47}O_{100}S_3$: $[M+3H]^{3+}$ 1846.5, $[M+4H]^{4+}$ 1384.7, $[M+5H]^{5+}$ 1108.0, found 1846.5, 1384.7, 1108.1。

[0173] 30-3 ベンジル基の脱保護

上記30-2に記載の方法で得られた糖ペプチド71 (7.5 mg、1.4 μ mol) を50 mM水酸化ナトリウム水溶液 (20.6 mL) に溶解させ、0℃で80分間反応させた。200 mM酢酸水溶液 (5.1 mL) を加え、混合溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A: B=73:27→66.3:33.7 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(72)で表わされる化合物(N5N(dissialo)-SRIF28) (配列番号31) を含む画分を得た。

[化93]



この画分を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A: B=80:20→60:40 30分 直線濃度勾配溶出] を用いてさらに精製し、N5N(dissialo)-SRIF28 (1.4 mg、収率19%) を得た。

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{221}H_{343}N_{47}O_{100}S_3$: [M+3H]³⁺ 1785.9, [M+4H]⁴⁺ 1339.6, [M+5H]⁵⁺ 1071.9, found 1785.7, 1339.5, 1071.8。

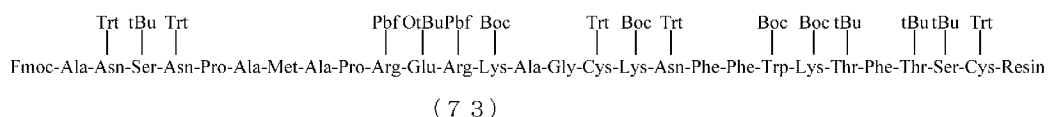
[0174] 実施例31 S1N(dissialo)-SRIF28の合成

31-1 糖ペプチドの固相合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂 (100 μ mol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys(Trt)-OH (72.5 mg、120 μ mol) とDIPEA (104.6 μ L

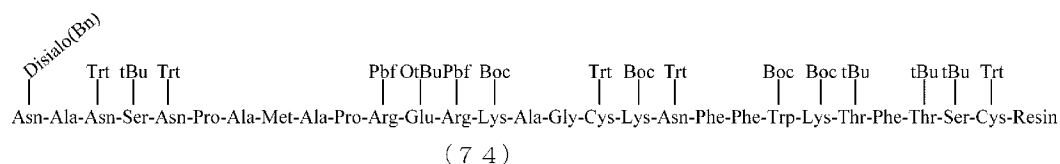
、600 μmol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基をDMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて、下記式(73)で表わされる、樹脂に結合した状態にある保護されたペプチド73 (配列番号80) を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化94]



次に、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、化合物d (420.2 mg、153.3 μmol)、DMSO-DMF (1/1、v/v、871 μL) 溶液、TB TU (64.2 mg、200 μmol)、およびDIPEA (52.3 μL、300 μmol) を順次樹脂に添加し、室温で2時間振盪させて縮合させた。DMFで洗浄後、この縮合操作を1回繰り返した。樹脂をDMFおよびジクロロメタンで洗浄後、DMF中の20%のピペリジンで20分間振盪しFmoc基を脱保護しDMFで樹脂を洗浄することで、保護された下記式(74)で表わされるペプチド74 (配列番号81) を樹脂上で合成した。

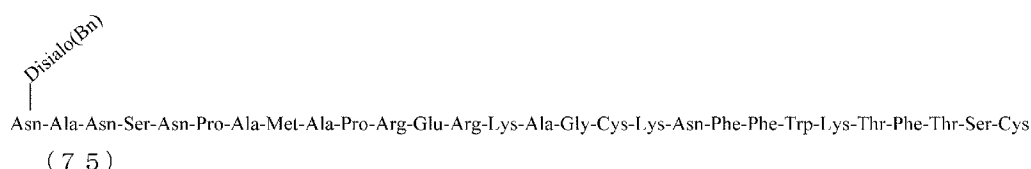
[化95]



DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、室温で3時間振盪した。ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。この粗ペプチドをHPLC〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C1

8 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA 水 B：0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル A：B = 71：29] を用いて精製し、下記式 (75) で表わされる糖ペプチド 75 (配列番号 82) (65.7 mg、11.8 μ mol) を得た。

[化96]

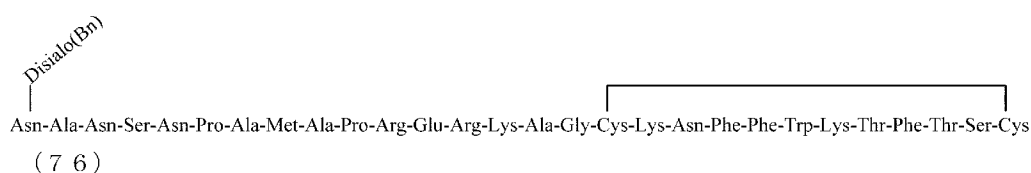


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{236}H_{358}N_{48}O_{100}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1392.0, $[M+5H]^{5+}$ 1113.8, found 1391.9, 1113.8.

[0175] 31-2 ジスルフィド結合の形成

上記 31-1 に記載の方法で得られた糖ペプチド 75 (20.3 mg、3.65 μ mol) を 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、9.0 mL) に溶解し、室温で 2 日間反応させた。反応溶液を HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA 水 B：0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A：B = 72：28 $\rightarrow$ 67：33 30 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (76) で表わされる糖ペプチド 76 (配列番号 83) (17.0 mg、3.06 μ mol、収率 84%) を得た。

[化97]



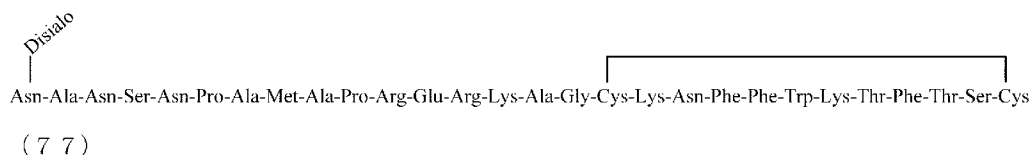
ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{236}H_{356}N_{48}O_{100}S_3$: $[M+4H]^{4+}$

1391.5、 $[M+5H]^{5+}$ 1113.4、found 1391.3、1113.2。

[0176] 31-3 ベンジル基の脱保護

上記31-2に記載の方法で得られた糖ペプチド76 (7.0 mg、1.3 μ mol) を50 mM水酸化ナトリウム水溶液 (19.1 mL) に溶解させ、0℃で1時間反応させた。200 mM酢酸水溶液 (9.6 mL) を加え、混合溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=85:15→77.5:22.5 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(77)で表わされる化合物(S1N (disialo)-SRIF28) (配列番号32) (2.7 mg、0.50 μ mol、収率40%)を得た。

[化98]



ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{222}H_{344}N_{48}O_{100}S_3$: $[M+3H]^{3+}$ 1794.9、 $[M+4H]^{4+}$ 1346.4、 $[M+5H]^{5+}$ 1077.3、 $[M+6H]^{6+}$ 897.9、found 1794.7、1346.2、1077.2、897.7。

[0177] 実施例32 S1C (disialo)·N19C (GlcNAc)-SRIF28の合成

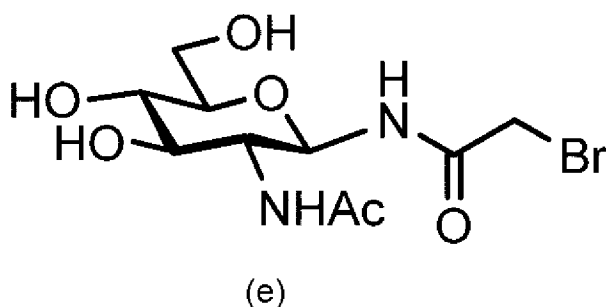
32-1 ペプチドの合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂 (100 μ mol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys (AcM)-OH (49.7 mg、120 μ mol) とDIPEA (104.5 μ L、600 μ mol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間振

上記 3 2 - 1 に記載の方法で得られたペプチド 7 8 (1 0 . 0 m g 、 2 . 9 5 μ m o l) と下記式 (e) で表わされる化合物 e (ブロモアセトアミド化した単糖 : 大塚化学株式会社製 [0]) (2 . 0 m g 、 5 . 9 0 μ m o l 、 ペプチド 7 8 に対して 2 . 0 等量) を 2 0 μ M T C E P を含む 3 3 m M リン

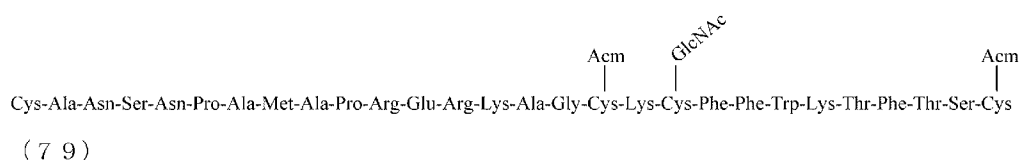
酸緩衝液（pH 7.4、0.89 mL）に溶解し、室温で2時間反応させた。

[化100]



反応後、0.1 Mリン酸緩衝液（pH 7.4、3.0 mL）に溶解したDTT（45.5 mg、295 μ mol）を添加し、室温で3時間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μ m）、 ϕ 2.0 $\times$ 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=75：25→65：35 20分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式（79）で表わされる糖ペプチド79（配列番号85）（6.8 mg、1.9 μ mol、収率64%）を得た。

[化101]



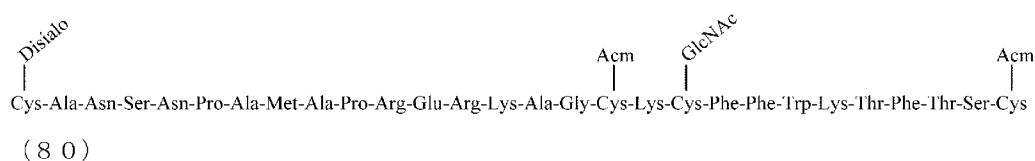
ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{152}H_{234}N_{44}O_{45}S_5$ [M+3H]³⁺ 1187.0、[M+4H]⁴⁺ 890.5、found 1187.0、890.5。

[0179] 32-3 チオールの糖鎖修飾反応

上記32-2に記載の方法で得られたペプチド79（6.8 mg、1.9 μ mol）と上記式（a）で表わされる化合物a（22.4 mg、9.56

μmol 、ペプチド79に対して5.0等量)を7.6mM DTTを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4、2.0mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=85:15 $\rightarrow$ 65:35 20分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(80)で表わされる糖ペプチド80 (配列番号86) (3.4mg、0.58 μmol 、収率31%)を得た。

[化102]



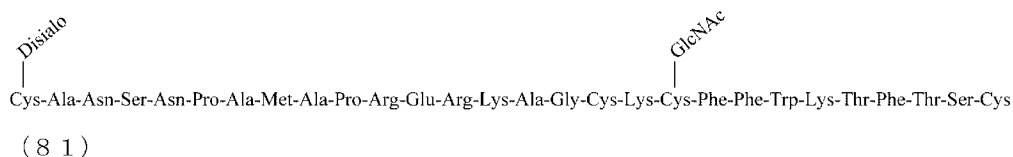
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{238}\text{H}_{373}\text{N}_{51}\text{O}_{107}\text{S}_5$: $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 1165.2、 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 971.2、 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 832.6、 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ 728.6、found 1165.2、971.1、832.6、728.6。

[0180] 32-4 Acm基の脱保護

上記32-3に記載の方法で得られた糖ペプチド80 (3.8mg、0.65 μmol)に酢酸銀(I) (2.7mg、16 μmol)の水溶液 (262 μL)を添加し、室温で1時間反応させた。100mMリン酸緩衝液(pH7.4、426 μL)に溶解したDTT (10.0mg、64.8 μmol)および100mMアスコルビン酸水溶液 (66 μL)を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 60:40 30分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(81)で表わされる糖

ペプチド 81 (配列番号 87) (2.5 mg、0.44 μ mol、収率 67%) を得た。

[化103]

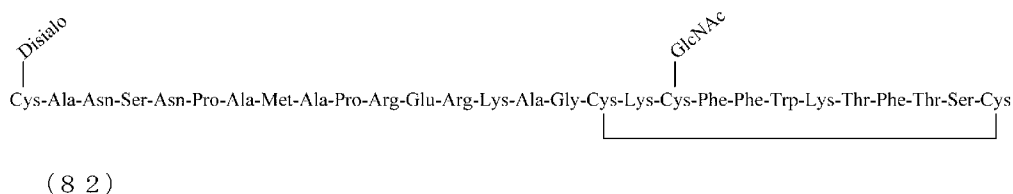


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{232}H_{363}N_{49}O_{105}S_5$: $[M+3H]^{3+}$ 1894.0, $[M+4H]^{4+}$ 1420.7, $[M+5H]^{5+}$ 1136.8, found 1893.8, 1420.6, 1136.7.

[0181] 32-4 ジスルフィド結合の形成

上記 32-3 に記載の方法で得られた糖ペプチド 81 (2.5 mg、0.44 μ mol) を 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1, v/v, 1.1 mL) に溶解し、室温で終夜反応させた。反応溶液を HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 70:30 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (82) で表わされる化合物 (S1C (disialo)) $\cdot$ N19C (GlcNAc) -SRIF28) (配列番号 33) (1.5 mg、0.26 μ mol、収率 59%) を得た。

[化104]

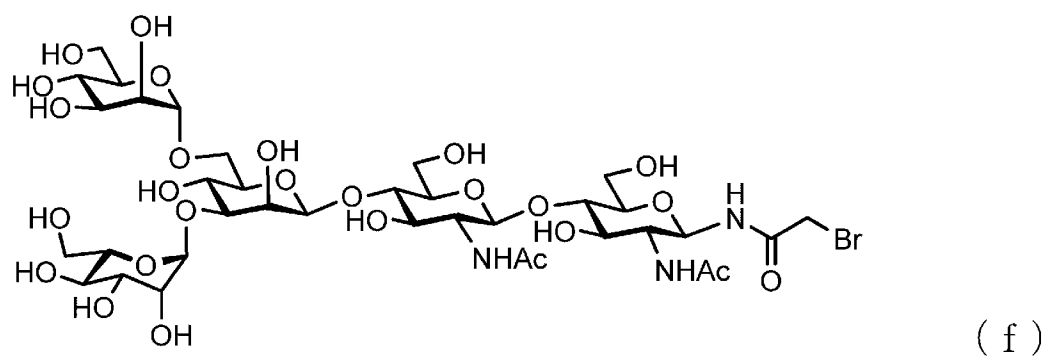


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{232}H_{361}N_{49}O_{105}S_5$: $[M+3H]^{3+}$ 1893.3, $[M+4H]^{4+}$ 1420.2, $[M+5H]^{5+}$ 1136.4, found 1893.5, 1420.1, 1136.3.

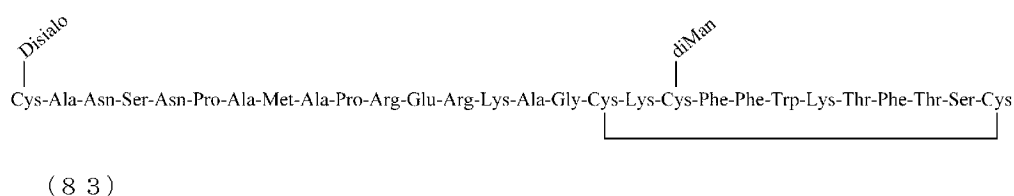
[0182] 実施例 33 S1C(dissialo)・N19C(diMan)-SRIF28 の合成

化合物 e の代わりに下記式 (f) で表わされる化合物 f (ブromoアセトアミド化したオリゴ糖：大塚化学株式会社製) を用いたこと以外は、実施例 32 と同様にして、下記式 (83) で表わされる化合物 (S1C(dissialo)・N19C(diMan)-SRIF28) (配列番号 34) を合成した。

[化105]



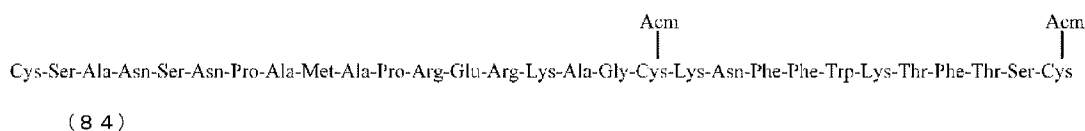
[化106]



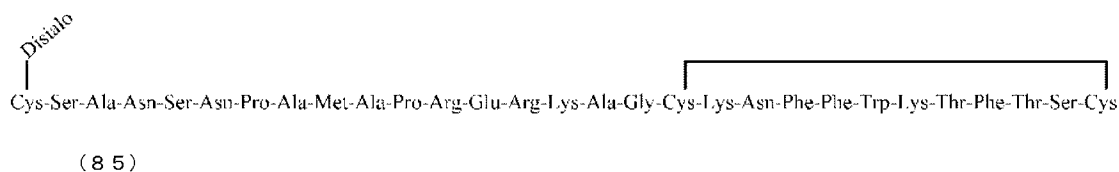
[0183] 実施例 34 C(dissialo)-SRIF28 の合成

ペプチド 1 の代わりに下記式 (84) で表わされる化合物 (ペプチド 84) (配列番号 88) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (85) で表わされる化合物 (C(dissialo)-SRIF28) (配列番号 89) を合成した。

[化107]



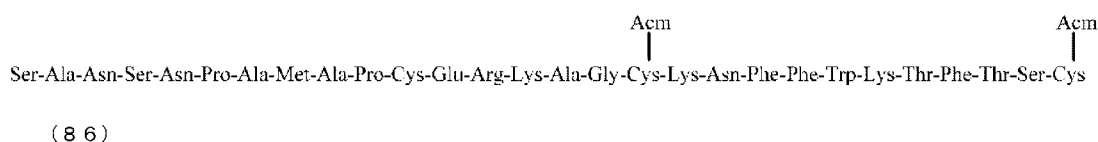
[化108]



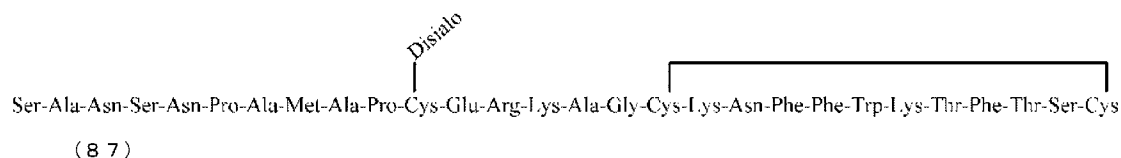
[0184] 実施例35 R11C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(86)で表わされる化合物(ペプチド86)(配列番号90)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(87)で表わされる化合物(R11C(disialo)-SRIF28)(配列番号91)を合成した。

[化109]



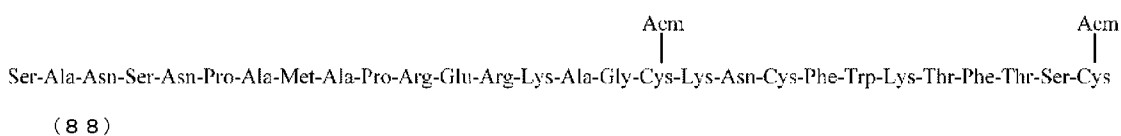
[化110]



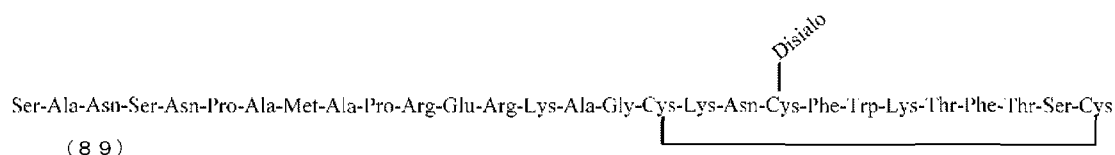
[0185] 実施例36 F20C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(88)で表わされる化合物(ペプチド88)(配列番号92)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(89)で表わされる化合物(F20C(disialo)-SRIF28)(配列番号93)を合成した。

[化111]



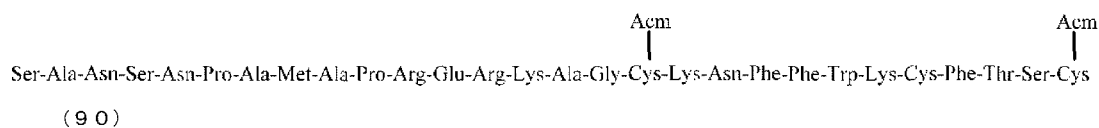
[化112]



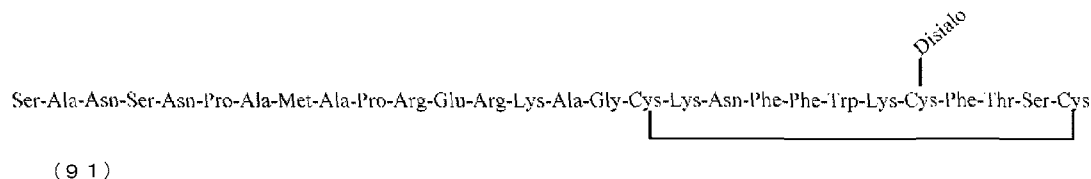
[0186] 実施例37 T24C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(90)で表わされる化合物(ペプチド90)(配列番号94)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(91)で表わされる化合物(T24C(disialo)-SRIF28)(配列番号95)を合成した。

[化113]



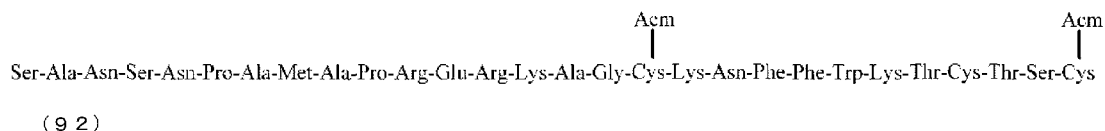
[化114]



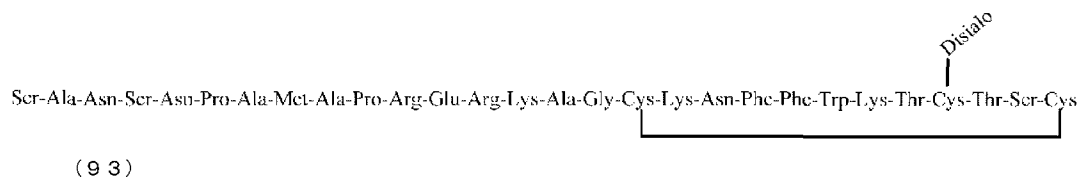
[0187] 実施例38 F25C(disialo)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(92)で表わされる化合物(ペプチド92)(配列番号96)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(93)で表わされる化合物(F25C(disialo)-SRIF28)(配列番号97)を合成した。

[化115]



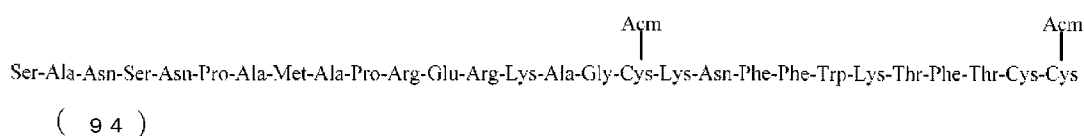
[化116]



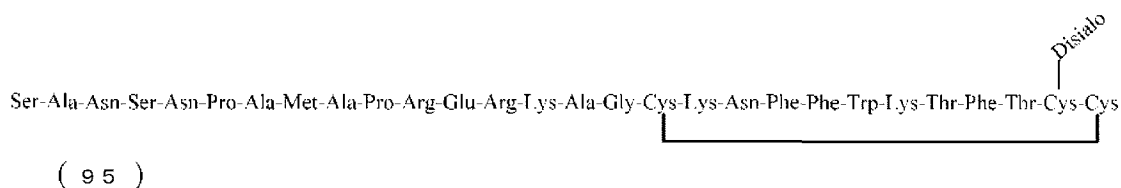
[0188] 実施例39 S27C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに下記式(94)で表わされる化合物(ペプチド94)(配列番号98)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(95)で表わされる化合物(S27C (disialo) -SRIF28)(配列番号99)を合成した。

[化117]



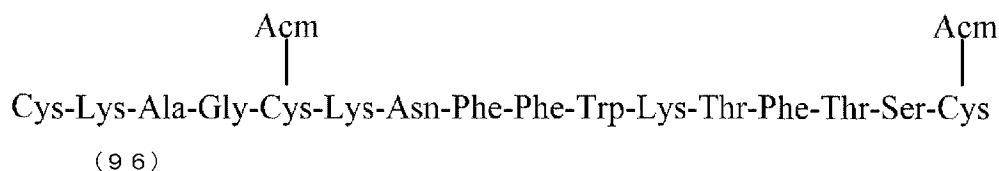
[化118]



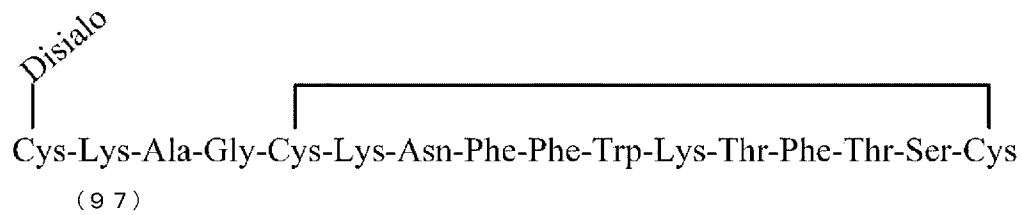
[0189] 実施例40 C (disialo) -K-SRIF14の合成

ペプチド1の代わりに下記式(96)で表わされる化合物(ペプチド96)(配列番号100)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(97)で表わされる化合物(C (disialo) -K-SRIF14)(配列番号101)を合成した。

[化119]

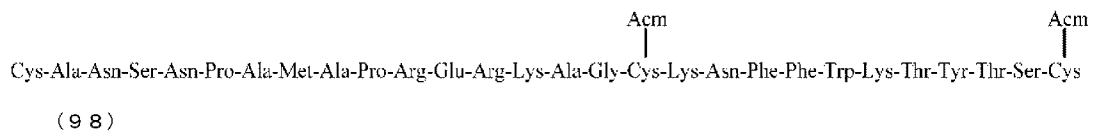


[化120]

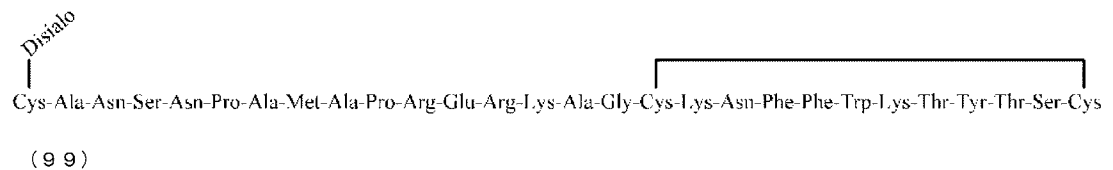


[0190] 実施例41 S1C(disialo)-F25Y-SRIF28の合成
 ペプチド1の代わりに下記式(98)で表わされる化合物(ペプチド98)
)(配列番号102)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式
 (99)で表わされる化合物(S1C(disialo)-F25Y-SRIF28)(配列番号103)を合成した。

[化121]

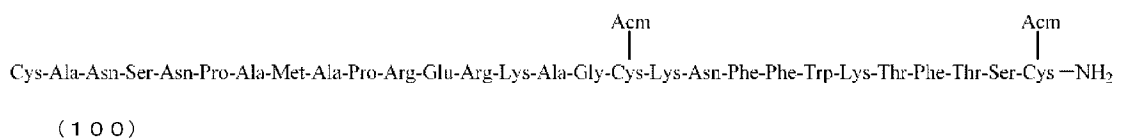


[化122]

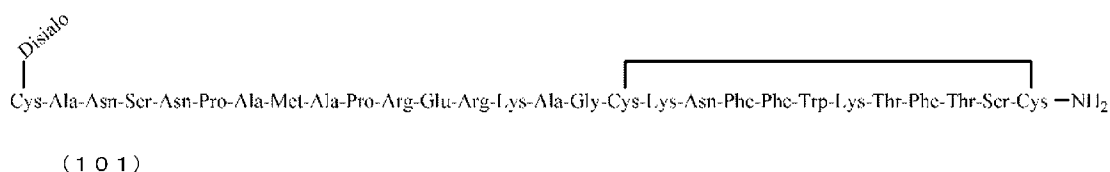


[0191] 実施例42 S1C(disialo)-SRIF28-アミドの合成
 ペプチド1の代わりに下記式(100)で表わされる化合物(ペプチド100)
)(配列番号104)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下
 記式(101)で表わされる化合物(S1C(disialo)-SRIF28-アミド)(配列番号105)を合成した。

[化123]



[化124]

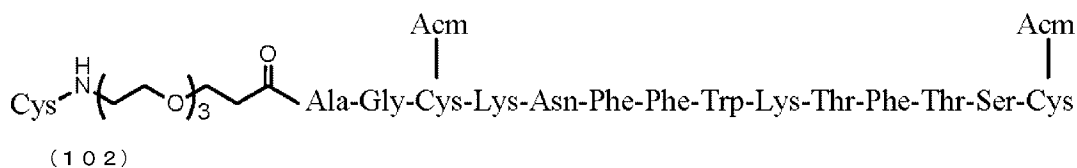


[0192] 実施例43 C(dissialo)-PEGLinker-SRIF14
の合成

43-1 ペプチドの合成

上記19-1に記載の方法で得られた、樹脂に結合している保護されたペプチド39（配列番号58）（50 μ mol）のFmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、HCTUを縮合剤として用いて、Fmoc-NH-(PEG)₂-COOH（メルク社製）およびFmoc-Cys(Trt)-OHを順に縮合した。Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（=90：2.5：5：2.5）を加え、3時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μ m）、 ϕ 20×250mm、流速：7.0 mL／分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA／10%水／90%アセトニトリル、グラジエント A：B=74：26→69：31 1分、次いで69：31→62：38 30分 直線濃度勾配溶出〕を用いて精製し、下記式（102）で表わされる化合物（ペプチド102）（配列番号106）（43.1mg）を得た。

[化125]



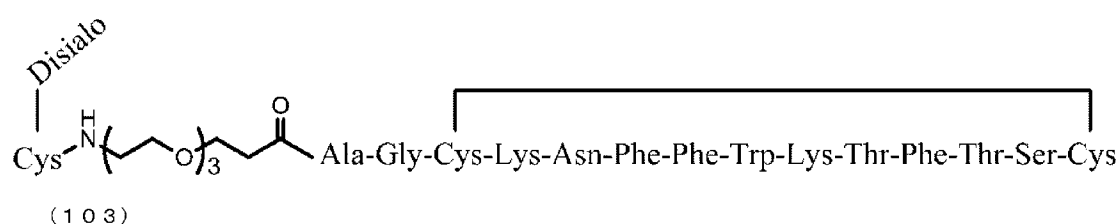
ESI-MS: (m/z) calcd for C₉₄H₁₃₈N₂₂O₂₆S₃: [M+2H]²⁺

1045. 2、 $[M+3H]^{3+}$ 697. 1、found 1045. 0、697. 0。

[0193] 43-2 C(disialo)-PEGLinker-SRIF14の合成

ペプチド1の代わりに上記43-1に記載の方法で得られたペプチド102を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(103)で表わされる化合物(C(disialo)-PEGLinker-SRIF14)(配列番号107)を合成した。

[化126]



[0194] 実施例44 Biotin-S1C(disialo)-SRIF28の合成

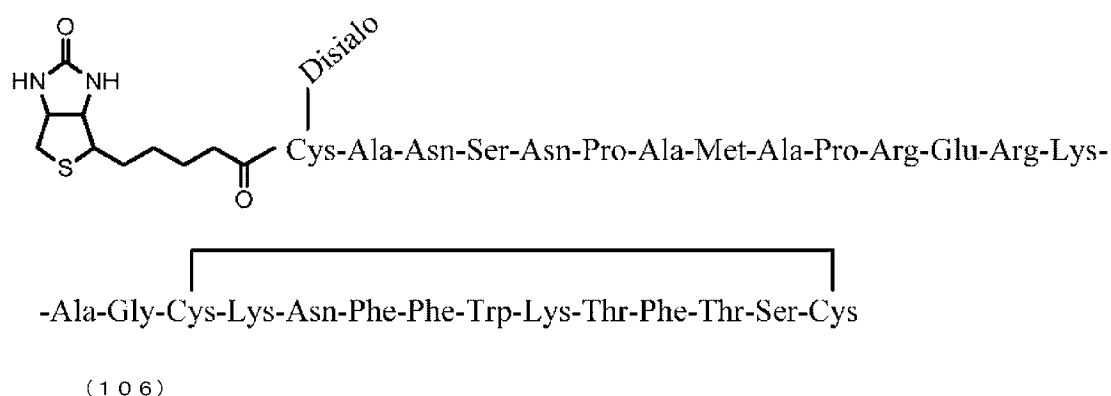
44-1 ペプチドの合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂(100 μmol)を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys(Acm)-OH(49.7 mg、120 μmol)とDIPEA(104.5 μL 、600 μmol)を含むジクロロメタン(3.0 mL)溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude(商標)ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて、下記式(104)で表わされる、樹脂に結合した状態にある保護されたペプチド104(配列番号108)を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

成

ペプチド1の代わりに上記44-1に記載の方法で得られたペプチド114を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(106)で表わされる化合物(Biotin-S1C(disialo)-SRIF28)(配列番号110)を合成した。

[化129]

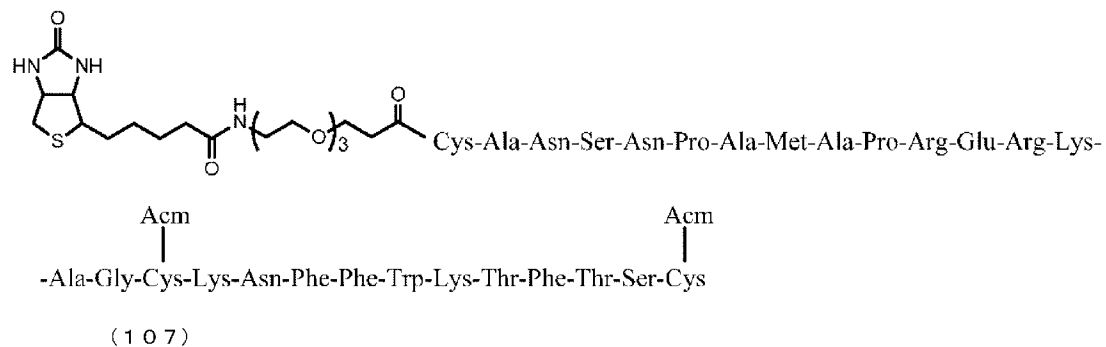


[0196] 実施例45 Biotin-PEGlinker-S1C(disialo)-SRIF28の合成

45-1 ペプチドの合成

上記44-1で得られた、樹脂に結合している保護されたペプチド104(配列番号108)のFmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、HCTUを縮合剤として用いて、Fmoc-NH-(PEG)₂-COOH(メルク社製)およびビオチンを順に縮合した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール(=90:2.5:5:2.5)を加え、室温で3時間振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドをHPLC[カラム:SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120(5μm)、φ20×250mm、流速:7.0mL/分、展開溶媒 A:0.1%TFA水 B:0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=75:25→61:39 22分 直線濃度勾配溶出]で精製し、下記式(107)で表わされるペプチド107(配列番号111)を得た。

[化130]

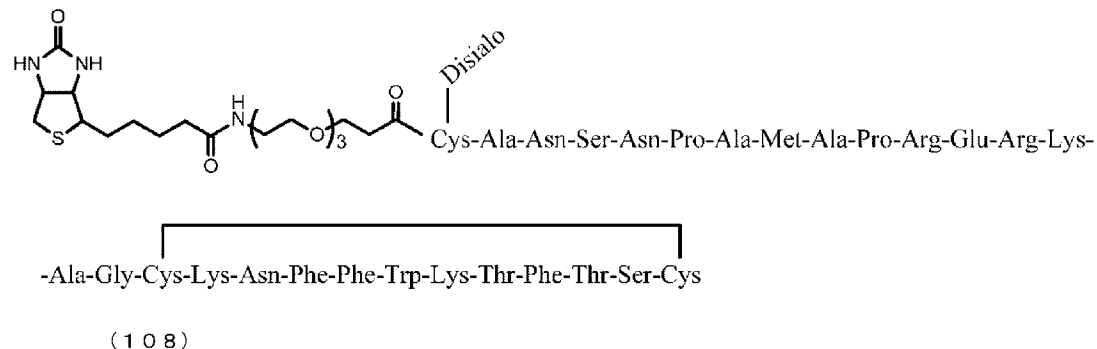


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{162}H_{250}N_{46}O_{46}S_5$: $[M+3H]^{3+}$ 1247.1, $[M+4H]^{4+}$ 935.6, $[M+5H]^{5+}$ 748.7, found 1246.9, 935.4, 748.6。

[0197] 45-2 Biotin-PEGlinker-S1C (disialo) -SRIF28の合成

ペプチド1の代わりに上記45-1に記載の方法で得られたペプチド107を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(108)で表わされる化合物(Biotin-PEGlinker-S1C (disialo) -SRIF28) (配列番号112)を合成した。

[化131]



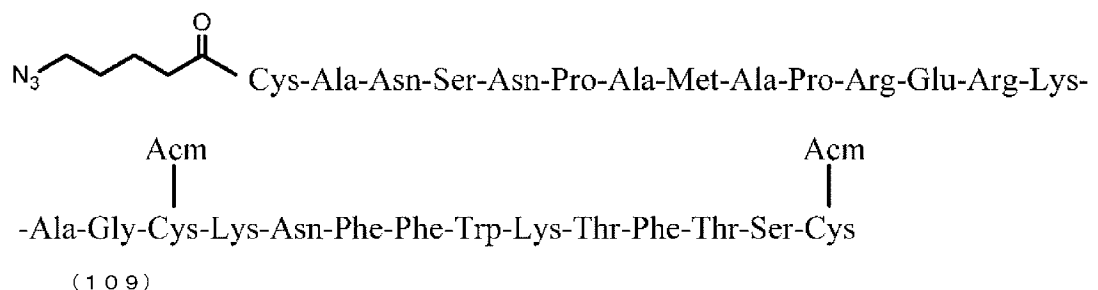
[0198] 実施例46 Azido-S1C (disialo) -SRIF28の合成

46-1 ペプチドの合成

上記44-1で得られた、樹脂に結合している保護されたペプチド104 (配列番号108) のFmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジン

で処理することにより除去した。DMFで洗浄後、HCTUを縮合剤として用いて、5-Azido-pentanoic acidを縮合した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、室温で3時間振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドをHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250mm、流速：7.0 mL／分、展開溶媒 A：0.1％TFA水 B：0.09％TFA／10％水／90％アセトニトリル グラジエント A：B＝70：30→60：40 20分 直線濃度勾配溶出] で精製し、下記式（109）で表わされるペプチド109（配列番号113）を得た。

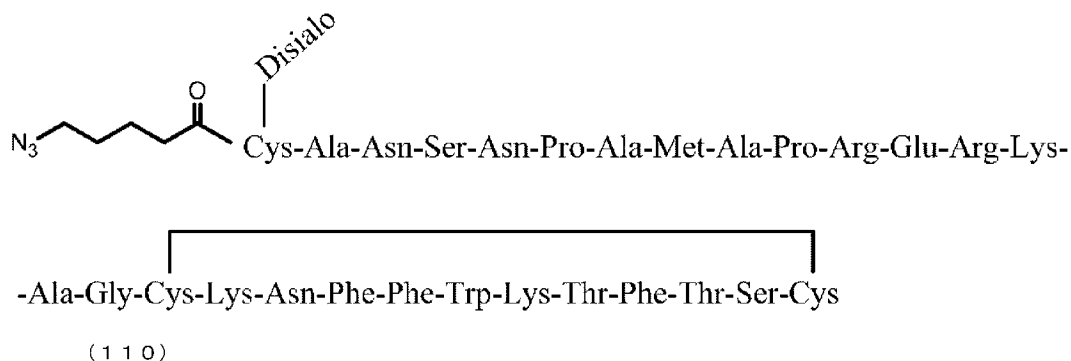
[化132]



ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{148}H_{226}N_{46}O_{41}S_4$ ：[M+3H]³⁺ 1145.6、[M+4H]⁴⁺ 859.5、[M+5H]⁵⁺ 687.8、found 1145.5、859.2、687.5。

[0199] 46-2 Azido-S1C(disialo)-SRIF28の合成
ペプチド1の代わりに上記46-1に記載の方法で得られたペプチド109を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式（110）で表わされる化合物（Azido-S1C(disialo)-SRIF28）（配列番号114）を合成した。

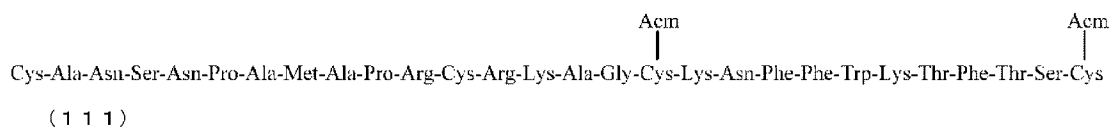
[化133]



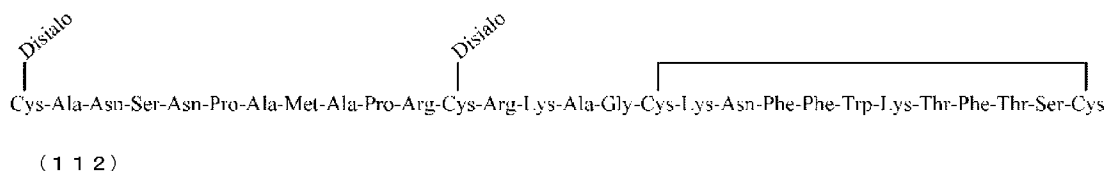
[0200] 実施例47 S1C(disialo)・E12C(disialo)－SRIF28の合成

ペプチド44の代わりに下記式(111)で表わされる化合物(ペプチド111)(配列番号115)を合成して用いたこと以外は、実施例20と同様にして、下記式(112)で表わされる化合物(S1C(disialo)・E12C(disialo)－SRIF28)(配列番号116)を合成した。

[化134]



[化135]

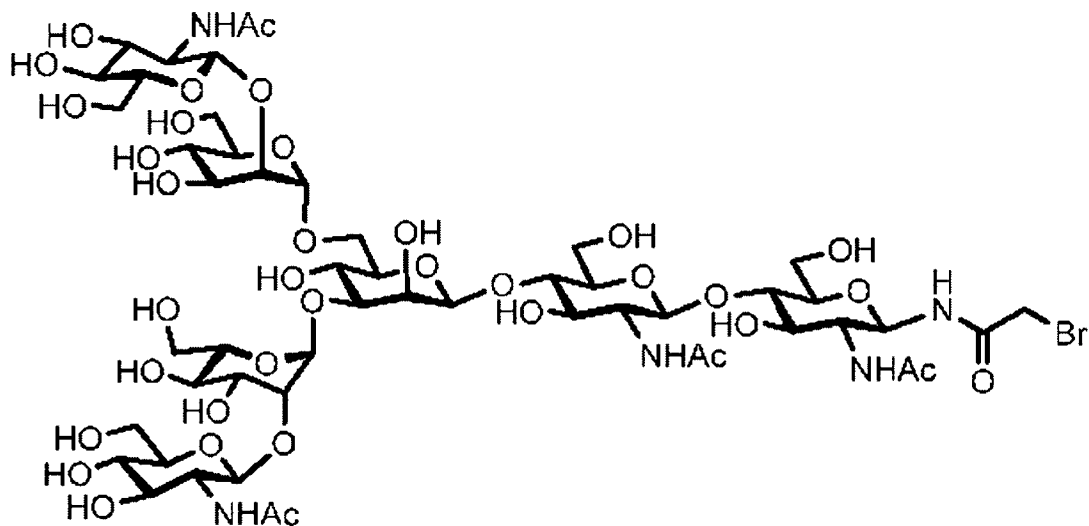


実施例48 2C(disialo)－R－K－SRIF14の合成

ペプチド44の代わりに下記式(113)で表わされる化合物(ペプチド113)(配列番号117)を合成して用いたこと以外は、実施例20と同様にして、下記式(114)で表わされる化合物(2C(disialo)－R－K－SRIF14)(配列番号118)を合成した。

オリゴ糖：大塚化学株式会社製）（15.6 mg、15.1 μmol 、ペプチド1に対して2.0等量）を33 mMリン酸緩衝液（pH 7.4、2.3 mL）に溶解し、室温で30分間反応させた。

[化140]

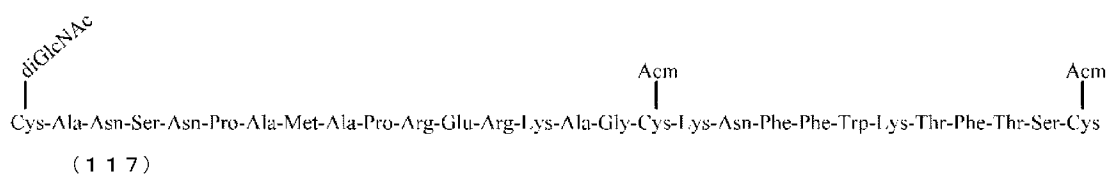


(h)

(h)

反応溶液を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル A：B=75：25→62：38 13分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(117)で表わされる糖ペプチド117（配列番号121）（25.6 mg、6.01 μmol 、収率79%）を得た。

[化141]

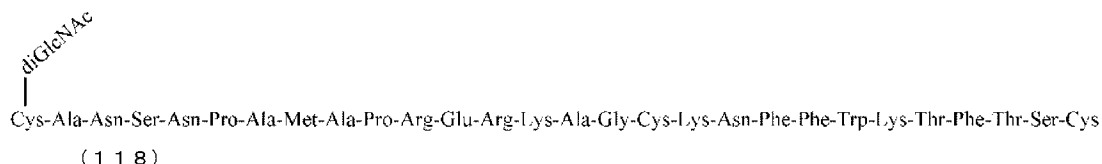


ESI-MS：(m/z) calcd for $\text{C}_{195}\text{H}_{304}\text{N}_{48}\text{O}_{76}\text{S}_4$ ：[M+3H]³⁺ 1556.0、[M+4H]⁴⁺ 1167.3、found 1555.7、1167.0。

[0203] 50-2 Ac基の脱保護

上記50-1に記載の方法で得られた糖ペプチド117 (28.3 mg、 $6.07 \mu\text{mol}$) に酢酸銀 (I) (12.5 mg、 $74.5 \mu\text{mol}$) の水溶液 (2.4 mL) を添加し、室温で30分間反応させた。200 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4、2.4 mL) に溶解した DTT (28.8 mg、 $187 \mu\text{mol}$) および 100 mM アスコルビン酸水溶液 (0.6 mL) を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液を HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5 \mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: $7.0 \text{ mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A: B = 73:27 $\rightarrow$ 60:40 13分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (118) で表わされる糖ペプチド118 (配列番号122) (19.8 mg、 $4.38 \mu\text{mol}$ 、収率72%) を得た。

[化142]



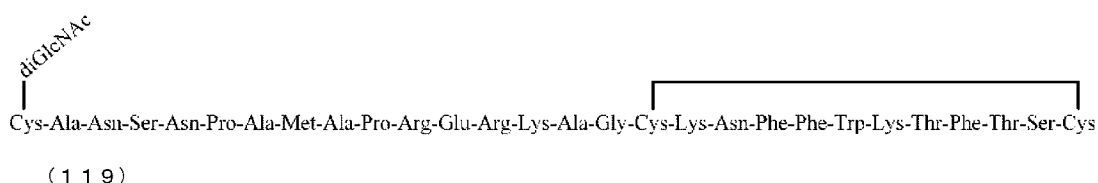
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{189}\text{H}_{294}\text{N}_{46}\text{O}_{74}\text{S}_4$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1508.6、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1131.7、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 905.6、found 1508.3、1131.5、905.4。

[0204] 50-3 ジスルフィド結合の形成

上記50-2に記載の方法で得られた糖ペプチド118 (19.8 mg、 $4.38 \mu\text{mol}$) を 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、8.8 mL) に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5 \mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: $7.0 \text{ mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A: B = 73:27 $\rightarrow$ 60:40 13分 直線濃度勾配溶出]

を用いて粗精製し、下記式(119)で表わされる化合物(S1C(diglicNAc)–SRIF28)(配列番号123)を含む画分を得た。

[化143]



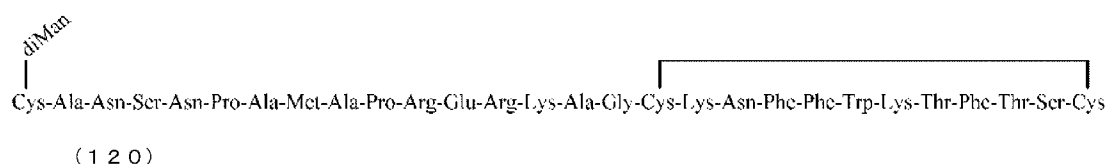
この画分を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH 水 B: 0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 78:22 12分 直線濃度勾配 溶出] を用いてさらに精製し、S1C(diglicNAc)–SRIF28 (11.9 mg、2.63 μ mol、収率60%) を得た。

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{189}H_{292}N_{46}O_{74}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1508.0、 $[M+4H]^{4+}$ 1131.2、 $[M+5H]^{5+}$ 905.2、found 1507.7、1131.0、905.0。

[0205] 実施例51 S1C(diman)–SRIF28の合成

化合物hの代わりに化合物fを用いたこと以外は、実施例50と同様にし、下記式(120)で表わされる化合物(S1C(diman)–SRIF28)(配列番号124)を合成した。

[化144]

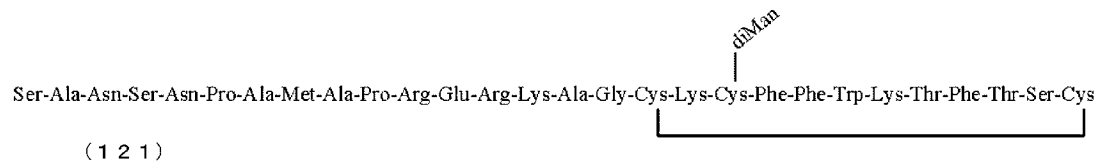


[0206] 実施例52 N19C(diman)–SRIF28の合成

ペプチド1の代わりにペプチド21を用い、化合物hの代わりに化合物fを用いたこと以外は、実施例50と同様にし、下記式(121)で表わされる化合物(N19C(diman)–SRIF28)(配列番号125)

を合成した。

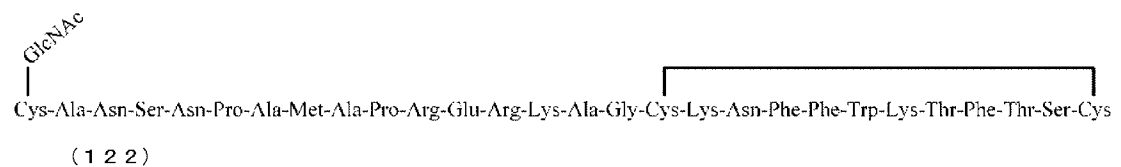
[化145]



[0207] 実施例53 S1C(GlcNAc)-SRIF28の合成

化合物hの代わりに化合物eを用いたこと以外は、実施例50と同様にし、下記式(122)で表わされる化合物(S1C(GlcNAc)-SRIF28)(配列番号126)を合成した。

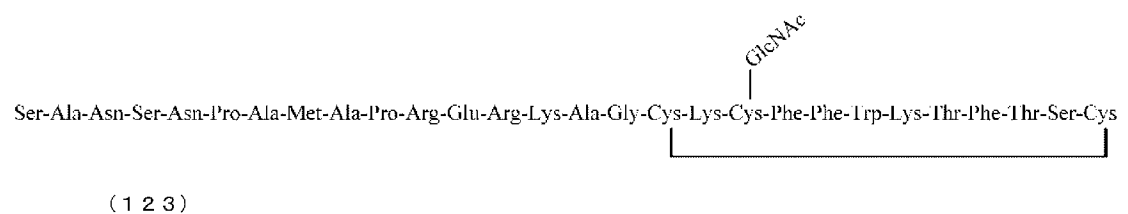
[化146]



[0208] 実施例54 N19C(GlcNAc)-SRIF28の合成

ペプチド1の代わりにペプチド21を用い、化合物hの代わりに化合物eを用いたこと以外は、実施例50と同様にし、下記式(123)で表わされる化合物(N19C(GlcNAc)-SRIF28)(配列番号127)を合成した。

[化147]

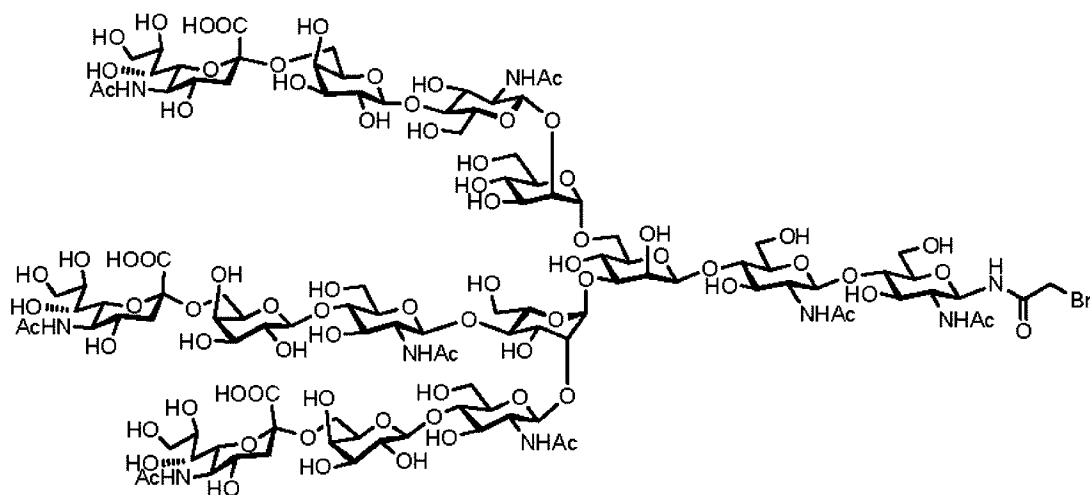


[0209] 実施例55 S1C(trisialo)-SRIF28の合成

化合物aの代わりに下記式(i)で表わされる化合物i(ブロモアセトアミド化したオリゴ糖：大塚化学株式会社製)を用いたこと以外は、実施例1と同様にし、下記式(124)で表わされる化合物(S1C(trisi

a l o) - S R I F 2 8) (配列番号 1 2 8) を合成した。

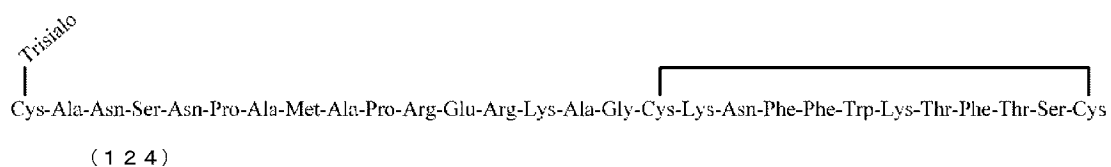
[化148]



(i)

(i)

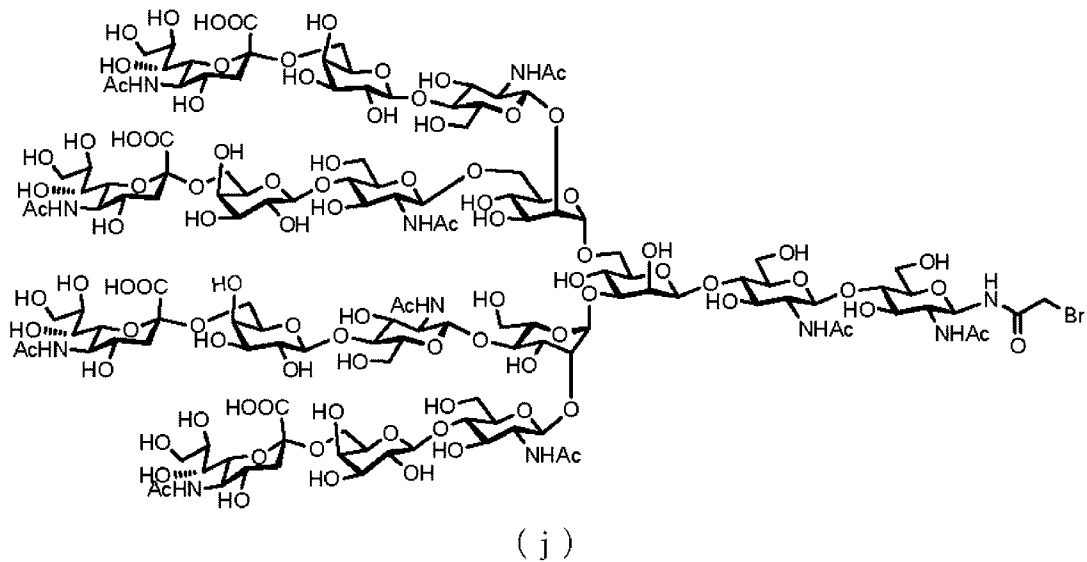
[化149]



[0210] 実施例 5 6 S 1 C (t e t r a s i a l o) - S R I F 2 8 の合成

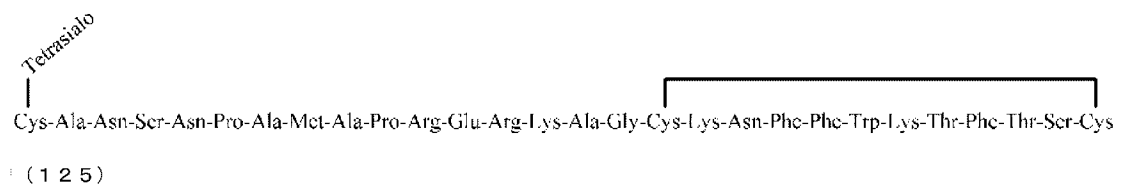
化合物 a の代わりに下記式 (j) で表わされる化合物 j (ブロモアセトアミド化したオリゴ糖 : 大塚化学株式会社製) を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (1 2 5) で表わされる化合物 (S 1 C (t e t r a s i a l o) - S R I F 2 8) (配列番号 1 2 9) を合成した。

[化150]



(j)

[化151]



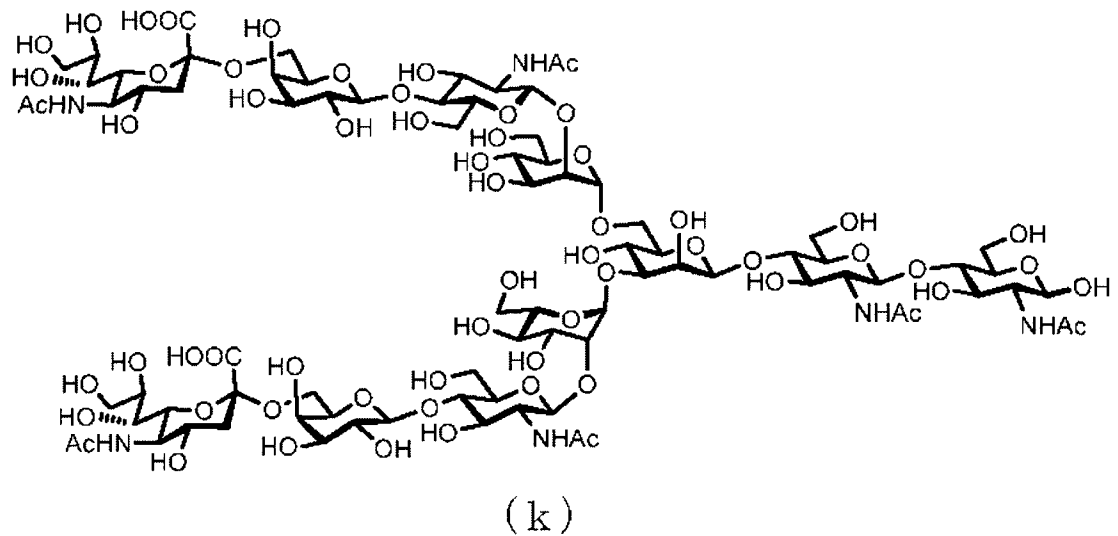
[0211] 実施例57 S1C (disialo (aminoethylamide)) -SRIF28の合成

57-1 ブロモアセトアミド化されたジシアロ糖鎖誘導体の合成

下記式 (k) で表わされる化合物 k (大塚化学株式会社製) (204.1 mg、92.1 μmol) に水 (2 mL)、tert-Butyl N-(2-Aminoethyl) carbamate (0.29 mL、0.18 mmol) を加え、室温で1時間攪拌させた。凍結乾燥後、得られた凍結乾燥物にDMF (5 mL)、HATU (349 mg、921 μmol)、DIPEA (161 μL 、921 μmol) を加え37℃で18時間反応させた。溶液にトルエン (50 mL) を加え析出した沈殿物をろ過で回収した。沈殿物をDMF (5 mL) に溶解し、ゲルろ過精製 [カラム : Sephadex G-25、 $\phi 20 \times 200 \text{ mm}$ 、流速 : 30 mL/h] を用いて精製し、目的分画を回

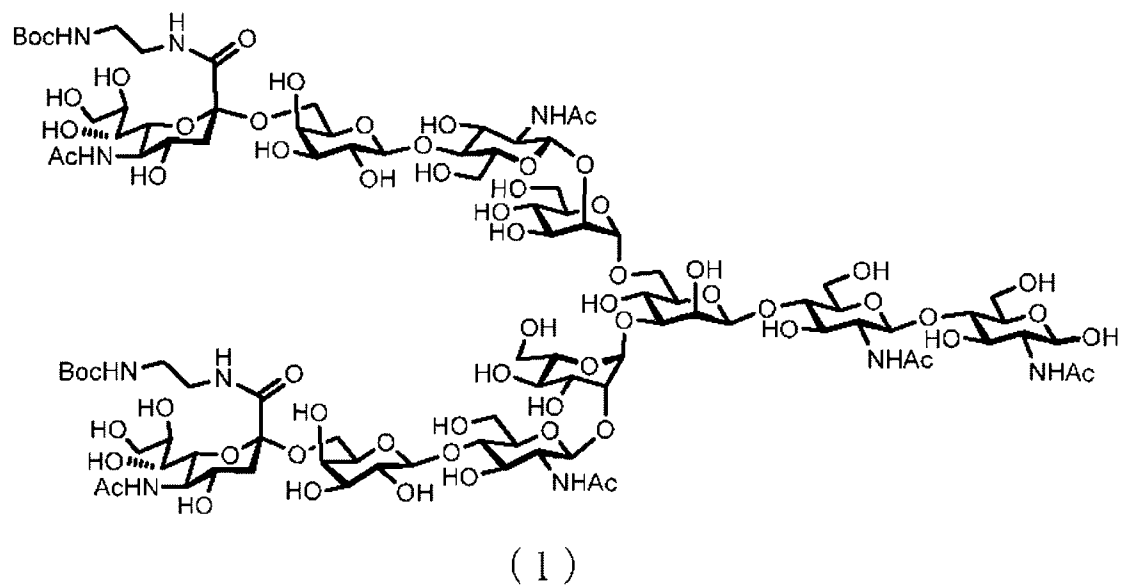
収し凍結乾燥することで、下記式 (I) で表される化合物 I (152.4 mg、60.8 μmol 、収率66%)を得た。

[化152]



(k)

[化153]



(I)

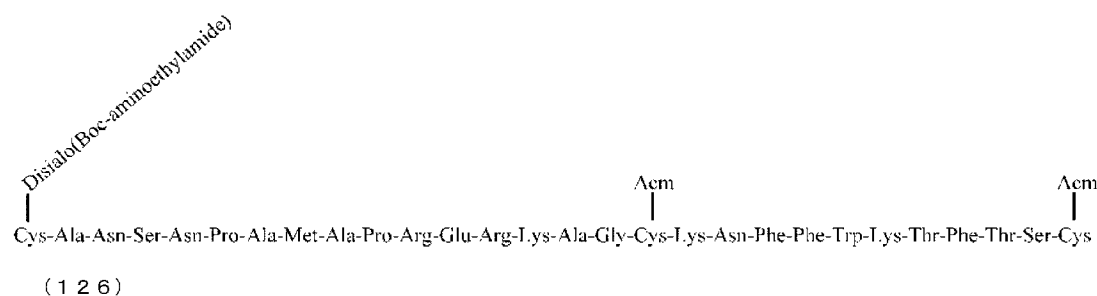
MALDI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{98}\text{H}_{166}\text{N}_{10}\text{O}_{64}$: $[\text{M} + \text{Na}]^+ 2530.0$, found 2529.4。

化合物 I (100 mg、39.8 μmol) と炭酸水素アンモニウム (3

1%酢酸 (AcOH) 水 B : 0.09%AcOH / 10%水 / 90%アセトニトリル グラジエント A : B = 86 : 14 → 82 : 18 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (126) で表わされる糖ペプチド126 (配列番号130) (13.4 mg、2.29 μmol、収率51%) を得た。

ESI-MS : (m/z) calcd for $C_{243}H_{386}N_{54}O_{104}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 1465.1、 $[M+5H]^{5+}$ 1172.2、 $[M+6H]^{6+}$ 977.0、found 1464.9、1172.1、977.1。

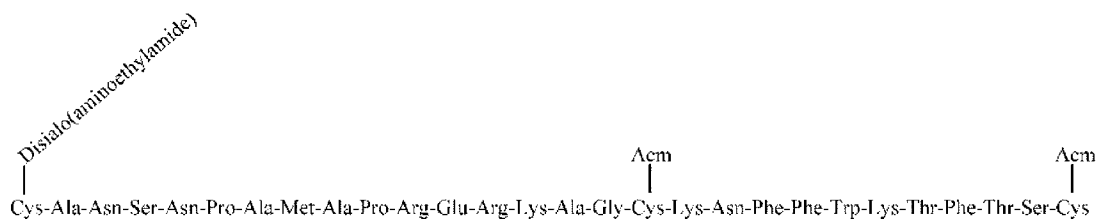
[化155]



[0213] 57-3 Boc基の脱保護

上記57-2に記載の方法で得られた糖ペプチド126 (13.4 mg、2.29 μmol) を95%TFA水溶液 (458 μL) に溶解させ、室温で5分間振盪した。50 mM酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.8、33 mL) を添加した後、反応溶液をHPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20 × 250 mm、流速 : 7.0 mL / 分、展開溶媒 A : 0.1%TFA水 B : 0.09%TFA / 10%水 / 90%アセトニトリル グラジエント A : B = 73 : 27 → 65 : 35 10分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (127) で表わされる糖ペプチド127 (配列番号131) (12.7 mg、98 μmol、収率98%) を得た。

[化156]



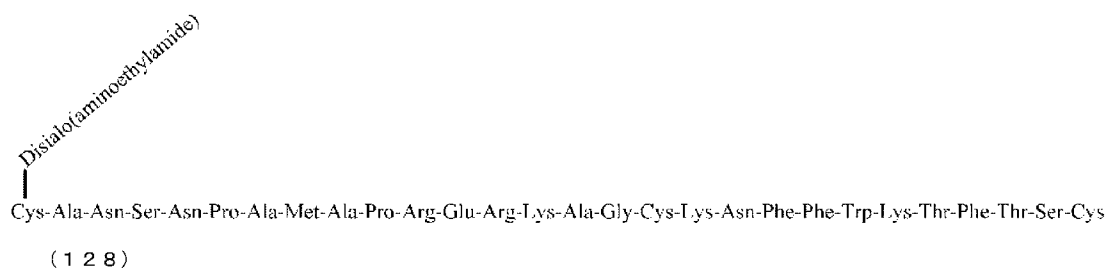
(127)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{233}H_{370}N_{54}O_{100}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 1415.1, $[M+5H]^{5+}$ 1132.2, $[M+6H]^{6+}$ 943.7, $[M+7H]^{7+}$ 809.0, found 1414.9, 1132.1, 943.6, 808.9.

[0214] 57-4 Acem基の脱保護

上記57-3に記載の方法で得られた糖ペプチド127 (12.7 mg、 $2.25 \mu\text{mol}$) に酢酸銀 (I) (9.2 mg、 $55 \mu\text{mol}$) の水溶液 (0.9 mL) を添加し、室温で30分間反応させた。その後、200 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4、0.9 mL) に溶解したDTT (21.2 mg、 $137 \mu\text{mol}$) および100 mMアスコルビン酸水溶液 (225 μL) を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=73:27→60:40 13分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (128) で表わされる糖ペプチド128 (配列番号132) (5.2 mg、 $0.94 \mu\text{mol}$ 、収率42%) を得た。

[化157]

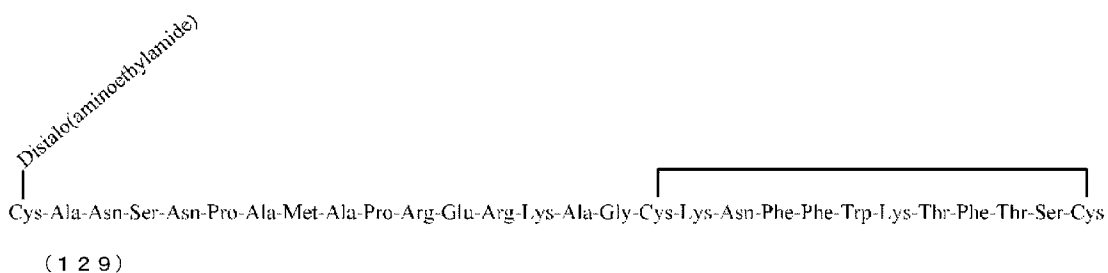


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{227}H_{360}N_{52}O_{98}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 1379.5, $[M+5H]^{5+}$ 1103.8, $[M+6H]^{6+}$ 920.0, $[M+7H]^{7+}$ 788.7, found 1379.4, 1103.7, 919.9, 788.6。

[0215] 57-5 ジスルフィド結合の形成

上記57-4に記載の方法で得られた糖ペプチド128 (5.2 mg、0.94 μ mol) を100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DMSO (1/1、v/v、1.9 mL) に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=70:30→65:35 13分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(129)で表わされる化合物(S1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28) (配列番号133)を含む画分を得た。

[化158]



この画分を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m

)、 $\phi 20 \times 250$ mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% AcOH水 B：0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル
グラジエント A：B=92：8→85：15 14分 直線濃度勾配溶出
]を用いてさらに精製し、S1C (disialo (aminoethylamide)) -SRIF28 (3.8 mg、0.69 μ mol、収率73%)を得た。

ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{227}H_{358}N_{52}O_{98}S_4$ ：[M+3H]³⁺ 1838.3、[M+4H]⁴⁺ 1379.0、[M+5H]⁵⁺ 1103.4、[M+6H]⁶⁺ 919.6、[M+7H]⁷⁺ 788.4、found 1838.0、1378.5、1103.2、919.5、788.2。

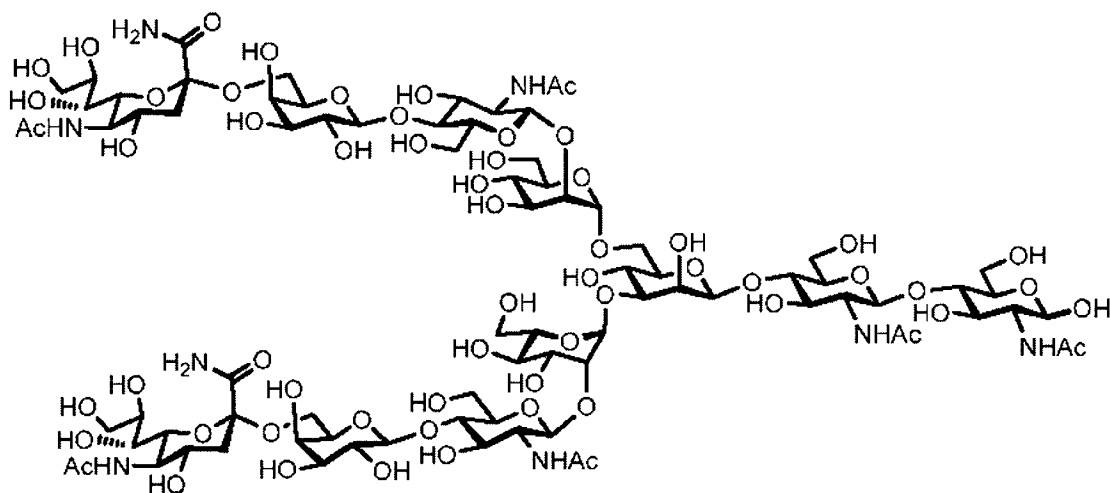
[0216] 実施例58 S1C (disialo (amide)) -SRIF28の合成

58-1 ブロモアセトアミド化されたジシアロ糖鎖誘導体の合成

化合物k (大塚化学株式会社製) (152 mg、68.6 μ mol) に DMF (1.9 mL)、臭化リチウム (357 mg、4.12 mmol)、塩化フェナシル (273 mg、1.37 mmol) を順次加え、37℃で反応させた。10時間後、水 (19 mL) を加え析出物をろ過で取り除いた。ろ液に25%アンモニウム水 (5 mL) を加え室温で18時間反応させた後、100 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4、80 mL) を加え中和した。溶液をHPLC [カラム：YMC Hydrosphere C18 (5 μ m)、 $\phi 20 \times 250$ mm、流速：8.0 mL/分、展開溶媒 0.1% TFA水：アセトニトリル=98：2→92：8 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し凍結乾燥することで下記式 (n) で表される化合物n (60.9 mg、27.4 μ mol、収率40%)を得た。

MALDI-MS：(m/z) calcd for $C_{84}H_{140}N_8O_{60}$ ：[M+Na]⁺ 2243.8、found 2243.6。

[化159]

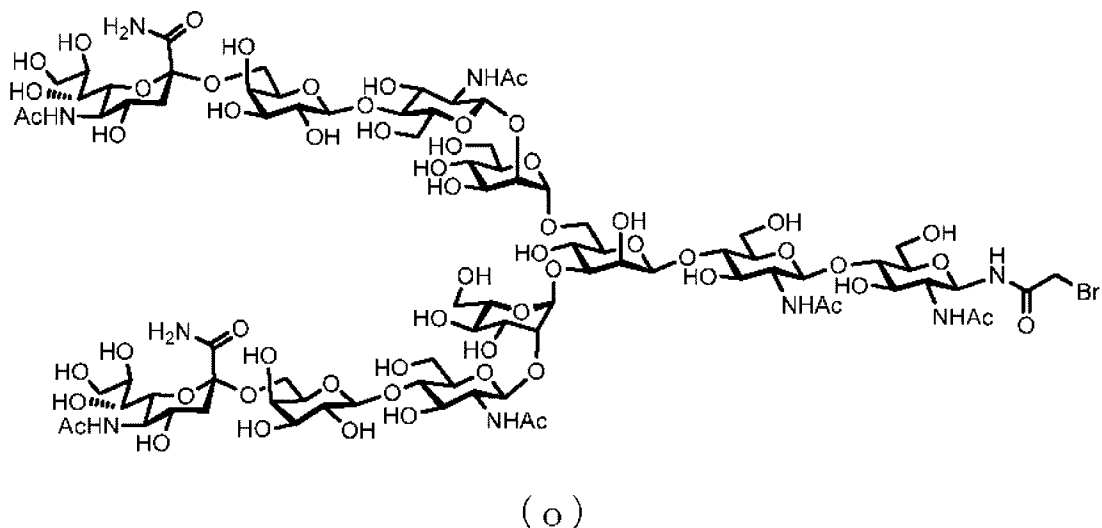


(n)

(n)

得られた中間体 n (37.3 mg、16.8 μmol) と炭酸水素アンモニウム (13.3 mg、168 μmol) を水 (0.37 mL) に溶解し室温で7日間反応させた。凍結乾燥後、得られた[0]凍結乾燥物に対し、水 (0.37 mL)、DCC (17.3 mg、84 μmol)、DMF (0.37 mL) に溶解したブromo酢酸 (11.7 mg、84 μmol) を順次加えた。氷冷下で1時間反応後の溶液をHPLC [カラム：YMC Hydrosphere C18 (5 μm)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：8.0 mL/分、展開溶媒 0.1% TFA水：アセトニトリル=98：2 $\rightarrow$ 92：8、30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (o) で表される化合物 o (ブromoアセトアミド化したジシアロ糖鎖誘導体：29.0 mg、12.4 μmol 、収率74%) を得た。

[化160]



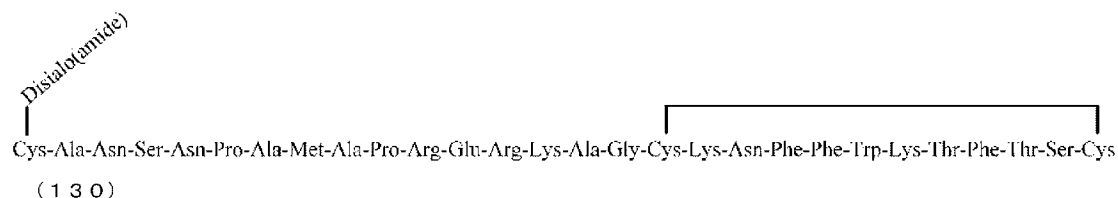
(o)

MALDI-MS : (m/z) calcd for $C_{86}H_{142}BrN_9O_{60}$: $[M+Na]^+ 2362.7$, found 2362.5.

[0217] 58-2 S1C (disialo (amide)) -SRIF28の合成

化合物 a の代わりに上記 58-1 に記載の方法で得られた化合物 o を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式 (130) で表わされる化合物 (S1C (disialo (amide)) -SRIF28) (配列番号 134) を合成した。

[化161]



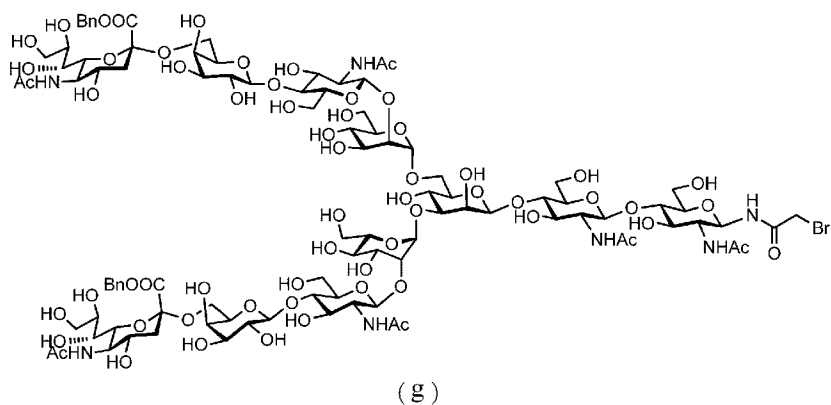
[0218] 実施例 59 S1C (disialo (Bn)) -SRIF28の合成

59-1 ブロモアセトアミド化されたベンジル保護基を持つジシアロ糖鎖の合成

化合物 a (28.9 mg, 12.3 μ mol) に DMF (0.58 mL)

、臭化リチウム（21.5 mg、248 μmol ）、臭化ベンジル（14.6 μL 、122 μmol ）を順次加え、30℃で20時間反応させた。臭化ベンジル（14.6 μL 、122 μmol ）をさらに添加して20時間反応させた。反応液にトルエン（30 mL）を加え、遠心分離（10,000 $\times$ g、10分間）の後、沈殿物を水（100 μL ）に溶解してHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm ）、 ϕ 2.0 $\times$ 250 mm、流速：8.0 mL/分、展開溶媒 水：アセトニトリル＝95：5→70：30 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（g）で表される化合物 g（ブromoアセトアミド化したジシアロ糖鎖：7.6 mg、3.0 μmol 、収率24%）を得た。

[化162]



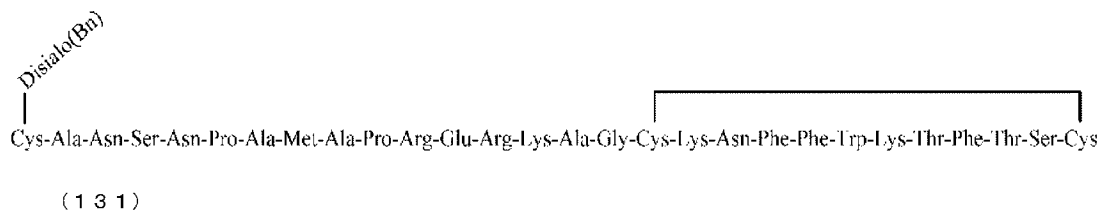
(g)

MALDI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{152}\text{BrN}_7\text{O}_{62}$: $[\text{M} + \text{Na}]^+ 2544.8$, found 2544.4.

[0219] 59-2 S1C (disialo (Bn)) -SRIF28の合成

化合物 a の代わりに化合物 g を用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして、下記式（131）で表わされる化合物（S1C (disialo (Bn)) -SRIF28）（配列番号 135）を合成した。

[化163]

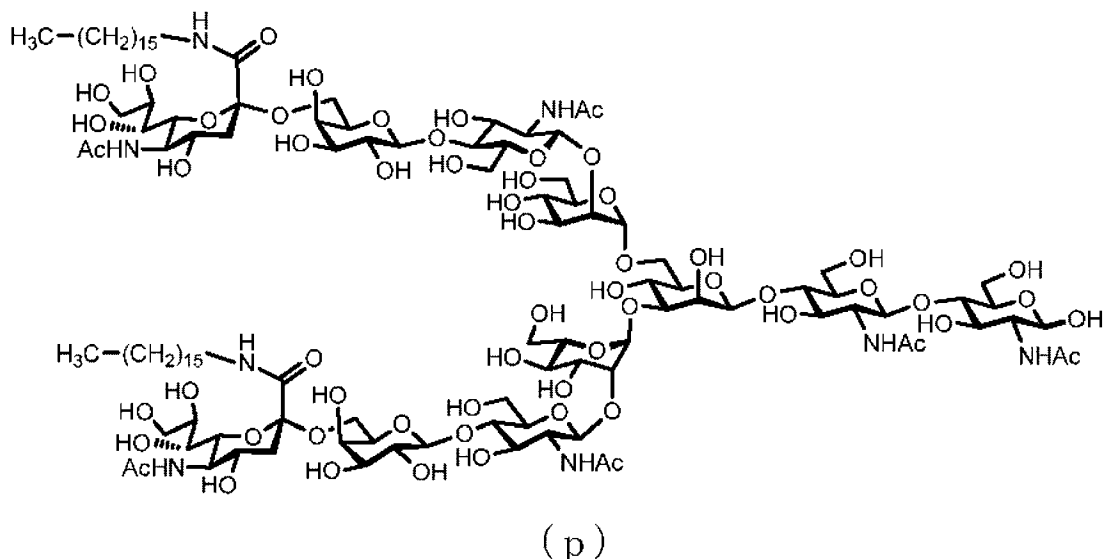


[0220] 実施例60 S1C (disialo (hexadecylamide)) -SRIF28の合成

60-1 ブロモアセトアミド化されたジシアロ糖鎖誘導体の合成

化合物k (大塚化学株式会社製) (140mg、63.0 μmol) に水 (1.5 mL)、メタノール (1.5 mL)、ヘキサデシルアミン (300mg、126 μmol) を加え、室温で1時間攪拌させた。凍結乾燥後、得られた凍結乾燥物にDMF (5 mL)、HATU (239mg、630 μmol)、DIPEA (110 μL 、630 μmol) を加え37°Cで反応させた。18時間後、溶液にジエチルエーテル (100 mL) を加え析出した沈殿物をろ過で回収した。この沈殿物をDMF (5 mL) に溶解し、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 8.0 mL/分、展開溶媒 水: アセトニトリル=40:60 $\rightarrow$ 10:90、30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製することで下記式 (p) で表される化合物p (71.1mg、26.6 μmol 、収率42%) を得た。

[化164]

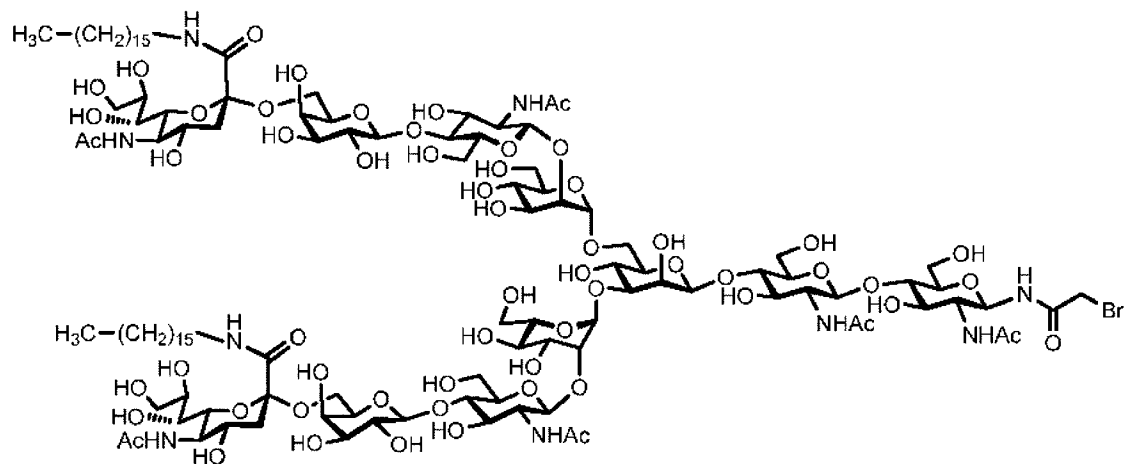


(p)

MALDI-MS: (m/z) calcd for $C_{116}H_{204}N_8O_{60}$: $[M+Na]^+ 2692.3$, found 2691.9 .

[0221] 得られた化合物 p (71.7 mg、26.6 μmol) と炭酸水素アンモニウム (21.8 mg、266 μmol) を水 (0.7 mL)、メタノール (0.7 mL) に溶解し室温で反応させた。7日後、凍結乾燥して得られた凍結乾燥物に対し、水 (0.7 mL)、メタノール (0.7 mL)、DCC (27.4 mg、133 μmol)、DMF (0.7 mL) に溶解したブromo酢酸 (18.5 mg、133 μmol) を順次加えた。氷冷下で1時間反応後、溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 2.0 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 8.0 mL/分、展開溶媒 水: アセトニトリル = 40:60 $\rightarrow$ 10:90、30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し下記式 (q) で表される化合物 q (ブromoアセトアミド化したジシアロ糖鎖: 24.9 mg、8.9 μmol 、収率33%) を得た。

[化165]



(q)

(q)

MALDI-MS: (m/z) calcd for $C_{118}H_{206}BrN_9O_{60}$: $[M+Na]^+$ 2811.2, found 2811.0.

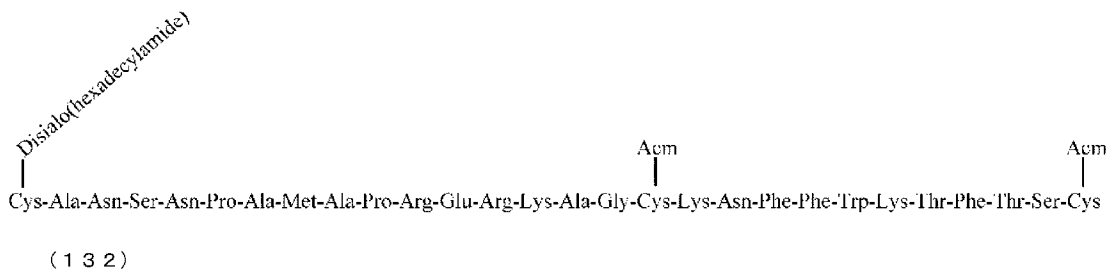
[0222] 60-2 チオールの糖鎖修飾反応

ペプチド 1 (10.4 mg、3.14 μmol) を 30 μM TCEP を含む 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4、62 μL) に溶解させた。この溶液に、上記 60-1 に記載の方法で得られた化合物 q (79.4 mg、28.5 μmol) の DMSO (3.7 mL) 溶液を添加し、室温で 20 分間反応させた。反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO Proteonavi (5 μm)、φ 2.0 × 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=50:50→22:78 14 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (132) で表わされる糖ペプチド 132 (配列番号 136) (6.4 mg、1.1 μmol、収率 35%) を得た。

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{261}H_{424}N_{52}O_{100}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 2007.2, $[M+4H]^{4+}$ 1505.7, $[M+5H]^{5+}$ 1204.7, $[M+6H]^{6+}$ 1004.1, found 2007.4, 1505.5

、 1204.8、1004.0。

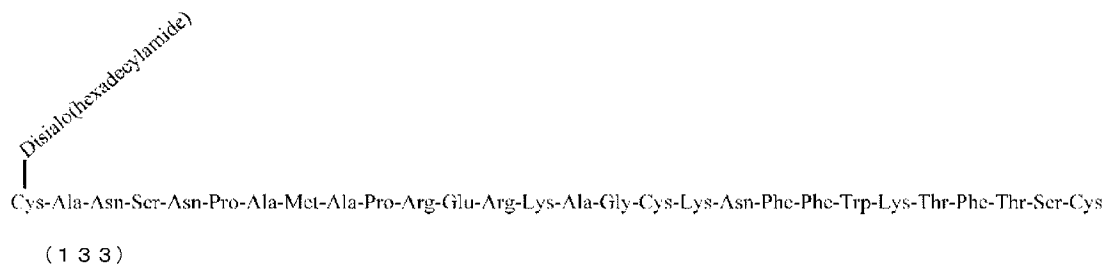
[化166]



[0223] 60-3 Ac基の脱保護

上記60-2に記載の方法で得られた糖ペプチド132 (6.4 mg、 $1.1 \mu\text{mol}$) に酢酸銀 (I) (3.8 mg、 $23 \mu\text{mol}$) の水溶液 (0.8 mL) を添加し、室温で40分間反応させた。その後、200 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4、 $377 \mu\text{L}$) に溶解したDTT (8.8 mg、 $57 \mu\text{mol}$) および100 mM アスコルビン酸水溶液 ($106 \mu\text{L}$) を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム: SHISEIDO Proteonavi ($5 \mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分 、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A: B = 48:52 $\rightarrow$ 38:62 3分、次いで38:62 $\rightarrow$ 30:70 8分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (133) で表わされる糖ペプチド133 (配列番号137) (3.2 mg、 $0.54 \mu\text{mol}$ 、収率49%) を得た。

[化167]



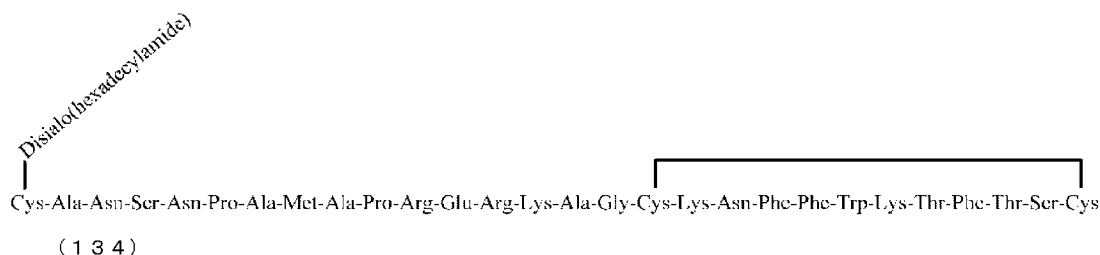
ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{255}\text{H}_{414}\text{N}_{50}\text{O}_{98}\text{S}_4$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1959.9、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1470.1、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 1117

6. 3、 $[M+6H]^{6+}$ 980. 4、found 1959. 6、1469. 9、1176. 1、980. 5。

[0224] 60-3 ジスルフィド結合の形成

上記60-2に記載の方法で得られた糖ペプチド133 (3. 2 mg、0. 54 μ mol) を100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8. 0) - DMSO (1/1、v/v、1. 1 mL) に溶解し、室温で2日間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO Proteonavi (5 μ m)、 ϕ 2. 0 x 250 mm、流速: 7. 0 mL/分、展開溶媒 A: 0. 1% TFA 水 B: 0. 09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B=48: 52 $\rightarrow$ 38: 62 3分、次いで38: 62 $\rightarrow$ 30: 70 8分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (134) で表わされる化合物 (S1C (disialo (hexadecylamide)) -SRIF28) (配列番号138) (2. 8 mg、0. 48 μ mol、収率89%) を得た。

[化168]



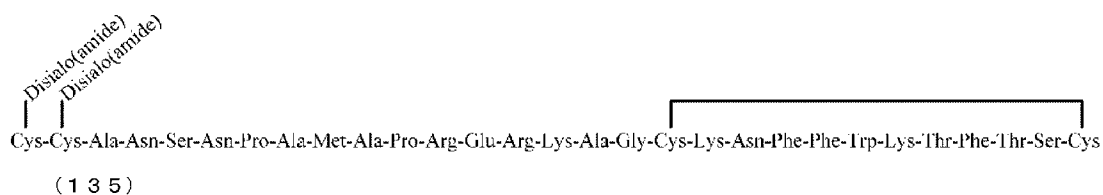
ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{255}H_{412}N_{50}O_{98}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1959. 2、 $[M+4H]^{4+}$ 1469. 6、 $[M+5H]^{5+}$ 1175. 9、 $[M+6H]^{6+}$ 980. 1、found 1958. 9、1469. 4、1175. 7、979. 9。

[0225] 実施例61 S1-2C (disialo (amide)) -SRIF28 の合成

化合物cの代わりに化合物oを用いたこと以外は、実施例28と同様にし、下記式 (135) で表わされる化合物 (S1-2C (disialo (

amide)) -SRIF28) (配列番号139) を合成した。

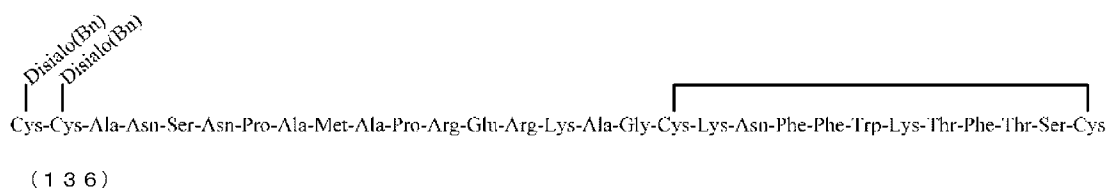
[化169]



[0226] 実施例62 S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28の合成

化合物cの代わりに化合物gを用いたこと以外は、実施例28と同様にして、下記式(136)で表わされる化合物(S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28) (配列番号140) を合成した。

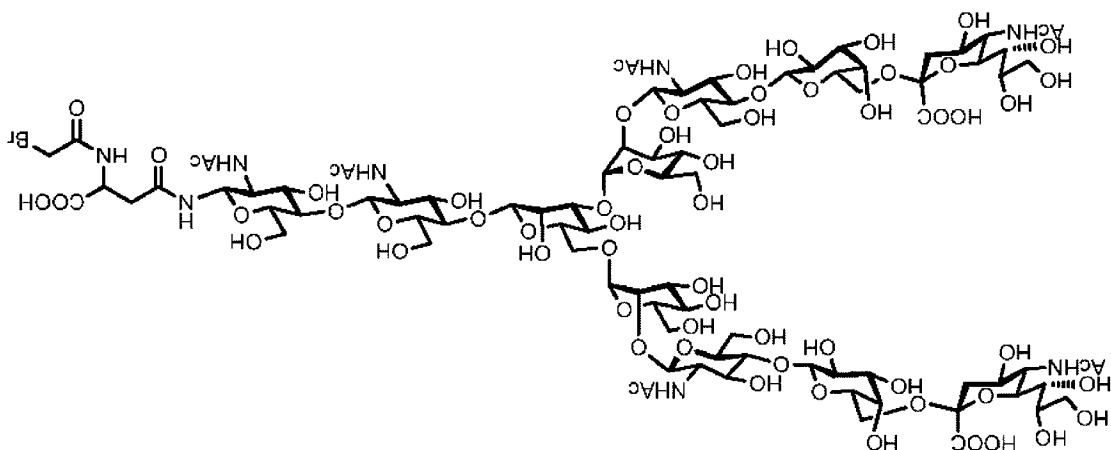
[化170]



[0227] 実施例63 S1C(Asn(disialo))-SRIF28の合成

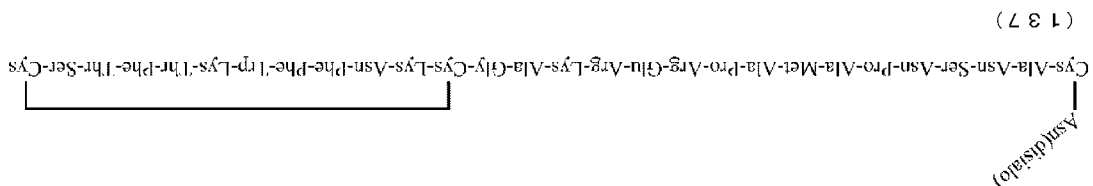
化合物aの代わりに下記式(r)で表わされる化合物r(ブロモアセチル化した糖鎖付加Asn:大塚化学株式会社製)を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、下記式(137)で表わされる化合物(S1C(Asn(disialo))-SRIF28) (配列番号141) を合成した。

[化171]



(r)

[化172]



IF28の合成

64-1 糖ペプチドの固相合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂 (100 μ m²)

を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys (Trt)

t)-OH (72.5 mg, 120 μ m²) とDIPPEA (104.6 μ L, 600 μ m²) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間

振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基をDMF

中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、

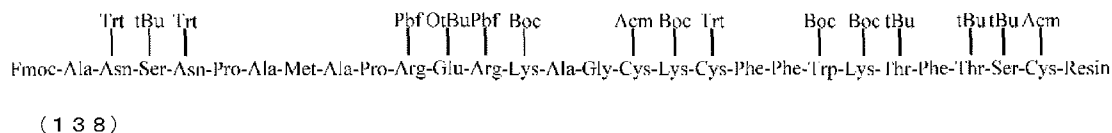
Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチ

ド固相合成法にて樹脂に結合した状態にある保護された下記式 (138) で

表わされるペプチド138 (配列番号142) を合成した。縮合反応は、縮

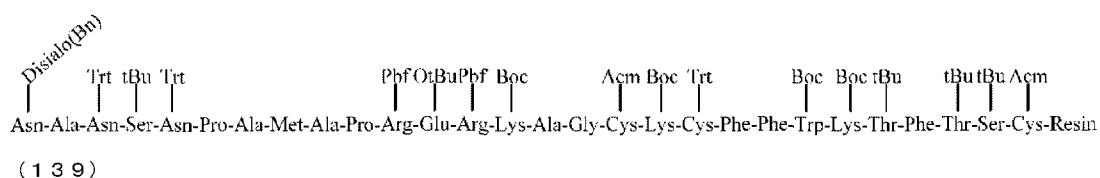
合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化173]



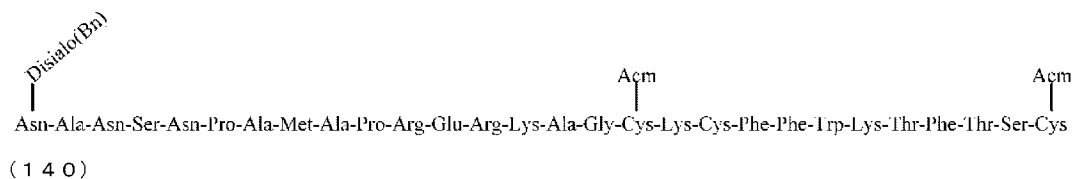
[0229] 次に、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、化合物d (141.0 mg、51.5 μ mol)、DMSO-DMF (1/1、v/v、1.1 mL) 溶液、TBTU (21.2 mg、66.0 μ mol)、およびDIPEA (17.2 μ L、98.7 μ mol) を順次樹脂に添加し、室温で4時間振盪させて縮合させた。DMFで洗浄後、この縮合操作を1回繰り返した。樹脂をDMFおよびジクロロメタンで洗浄後、DMF中の20%のピペリジンで20分間振盪しFmoc基を脱保護しDMFで樹脂を洗浄することで、下記式(139)で表わされる、樹脂に結合した状態にある保護されたペプチド139 (配列番号143) を合成した。

[化174]



DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、室温で3時間振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。この粗ペプチドをHPLC〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm）、φ20×250mm、流速：7.0mL／分、展開溶媒 A：0.1％TFA水 B：0.09％TFA／10％水／90％アセトニトリル A：B＝70：30〕を用いて精製し、下記式（140）で表わされる糖ペプチド140（配列番号144）（5.8mg、1.1 μmol）を得た。

[化175]

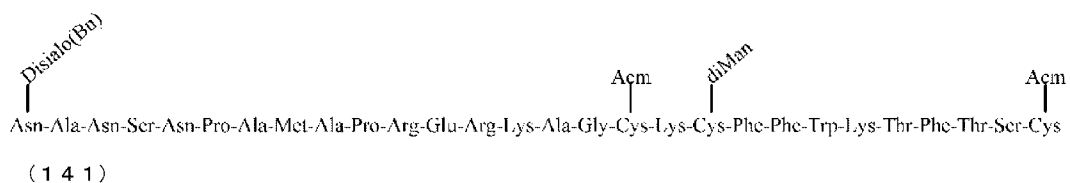


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{241}H_{367}N_{49}O_{101}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 1424.8, $[M+5H]^{5+}$ 1140.0, found 1424.6, 1139.9.

[0230] 64-2 チオール糖鎖修飾反応

上記64-1に記載の方法で得られた糖ペプチド140 (10.8 mg、 $1.90 \mu\text{mol}$) と化合物 f (5.3 mg、 $5.1 \mu\text{mol}$) を $141 \mu\text{M}$ TCEP を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4、 0.8 mL) に溶解し、室温で24時間反応させた。反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5 \mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: $7.0 \text{ mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: $0.1\% \text{ TFA}$ 水 B: $0.09\% \text{ TFA}/10\% \text{ 水}/90\% \text{ アセトニトリル}$ A:B=75:25→60:40 30分直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(141)で表わされる糖ペプチド141 (配列番号145) (4.9 mg 、 $0.74 \mu\text{mol}$ 、収率39%) を得た。

[化176]



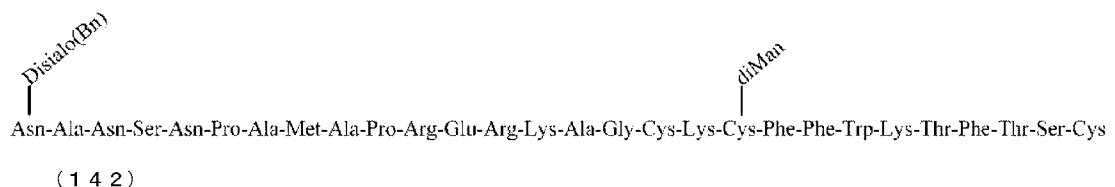
ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{277}H_{426}N_{52}O_{127}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 2216.0, $[M+4H]^{4+}$ 1662.2, $[M+5H]^{5+}$ 1330.0, found 2215.6, 1661.9, 1330.1.

[0231] 64-3 AcM基の脱保護

上記64-2に記載の方法で得られた糖ペプチド141 (4.9 mg 、 0

． 74 μmol ）に酢酸銀（I）（1.5 mg、9.0 μmol ）の水溶液（148 μL ）を添加し、室温で1.5時間反応させた。200 mMリン酸緩衝液（pH 7.4、145 μL ）に溶解したDTT（3.5 mg、23 μmol ）および100 mMアスコルビン酸水溶液（37 μL ）を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm ）、 ϕ 20 × 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B = 74：26 → 64：36 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（142）で表わされる糖ペプチド142（配列番号146）（3.7 mg、0.57 μmol 、収率77%）を得た。

[化177]

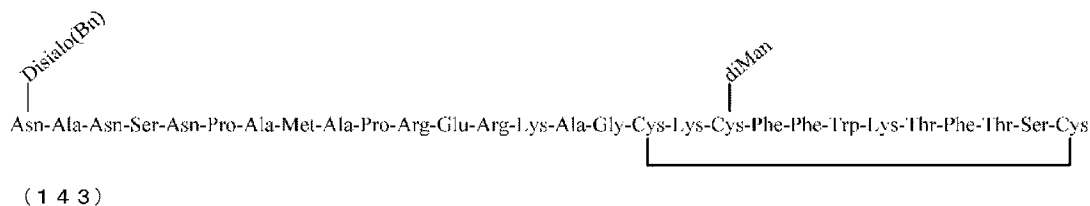


ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{271}\text{H}_{416}\text{N}_{50}\text{O}_{125}\text{S}_4$: $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 2168.6, $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 1626.7, $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$ 1301.5, found 2168.6, 1626.4, 1301.3.

[0232] 64-4 ジスルフィド結合の形成

上記64-3に記載の方法で得られた糖ペプチド142（3.7 mg、0.54 μmol ）を100 mMトリス - 塩酸緩衝液（pH 8.0） - DMSO（1/1、v/v、1.4 mL）に溶解し、室温で31時間反応させた。反応溶液を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm ）、 ϕ 20 × 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B = 75：25 → 60：40 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（143）で表わされる糖ペプチド143（配列番号147）（2.9 mg、0.45 μmol 、収率78%）を得た。

[化178]

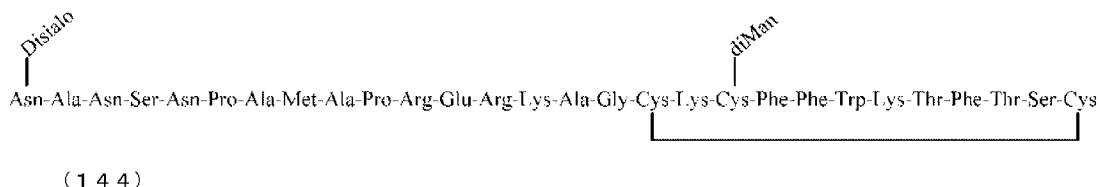


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{271}H_{414}N_{50}O_{125}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 2167.9, $[M+4H]^{4+}$ 1626.2, $[M+5H]^{5+}$ 1301.1, found 2167.9, 1626.0, 1301.2。

[0233] 64-5 ベンジル基の脱保護

上記64-4に記載の方法で得られた糖ペプチド143 (2.9 mg、0.45 μ mol) を50 mM水酸化ナトリウム水溶液 (13.6 mL) に溶解させ、0℃で1時間反応させた。200 mM酢酸水溶液 (3.4 mL) を加え、混合溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A: B=75:25→60:40 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式144で表わされる化合物 (S1N (disialo) · N19C (diMan) -SRIF28) (配列番号148) を含む画分を得た。

[化179]



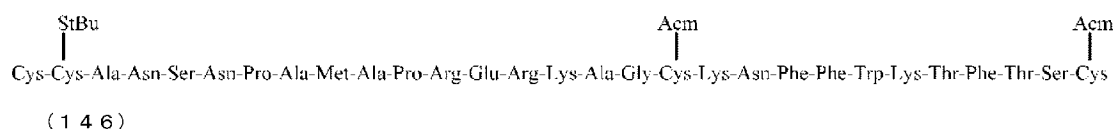
この画分を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 4.6×250 mm、流速: 0.7 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A: B=95:5→85:15 2分、次いで85:1

(145)

樹脂の一部 (50 μmol) を取り、Fmoc 保護基を、DMF 中の 20 % のピペリジンで処理することにより除去した。DMF およびジクロロメタンで洗浄後、TFA : 水 : トリイソプロピルシラン : エタンジチオール (= 90 : 2.5 : 5 : 2.5) を加え、室温で 3 時間振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として

得た。粗ペプチドをHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=73：27→63：37 30分 直線濃度勾配 溶出] で精製し、下記式(146)で表わされるペプチド146 (配列番号150) (30.4mg)を得た。

[化181]

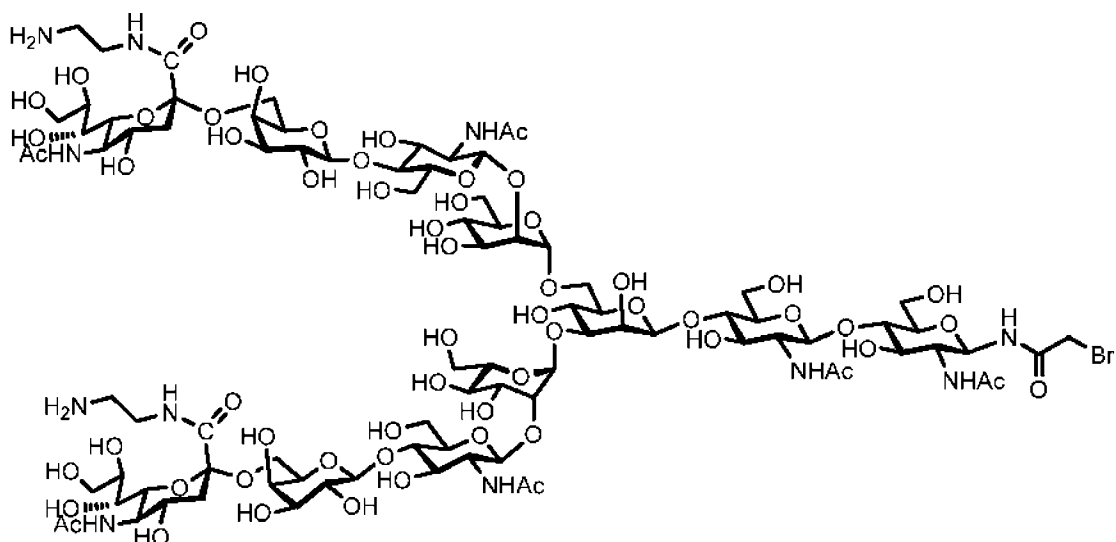


ESI-MS：(m/z) (m/z) calcd for $\text{C}_{150}\text{H}_{232}\text{N}_{44}\text{O}_{41}\text{S}_6$ ：[M+3H]³⁺ 1167.7、[M+4H]⁴⁺ 876.0、found 1167.5、875.9。

[0235] 65-2 糖鎖誘導体におけるBoc基の脱保護

化合物m (50.0mg、19.0 μ mol)を95%TFA水(2.5mL)に溶解させ、室温で振盪した。10分後、ジエチルエーテル(15mL)を加え、析出した沈殿を遠心分離(10,000×g 10分間)した。沈殿物を水に溶解して凍結乾燥することで、下記式(s)で表される化合物s (ブロモアセトアミド化したジシアロ糖鎖：46.0mg、18.9 μ mol、収率99%)を得た。

[化182]



(s)

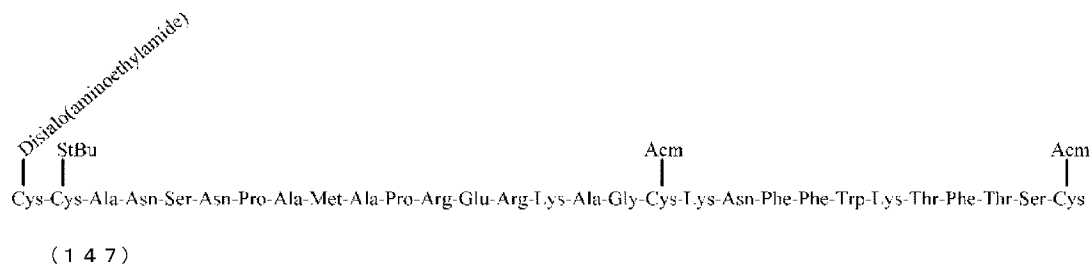
(s)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{90}H_{152}BrN_{11}O_{60}$: $[M+2H]^{2+}$ 1215.1, $[M+3H]^{3+}$ 810.4, found 1214.9, 810.3.

[0236] 65-3 チオールの糖鎖修飾

上記65-1に記載の方法で得られたペプチド146 (20.6 mg、5.89 μmol) と上記65-2に記載の方法で得られた化合物s (28.6 mg、11.8 μmol) を33 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4、1.8 mL) に溶解し、室温で30分反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: S HISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 2.0 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=74:26→64:36 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(147)で表わされる糖ペプチド147 (配列番号151) (17.1 mg、2.93 μmol 、収率50%)を得た。

[化183]

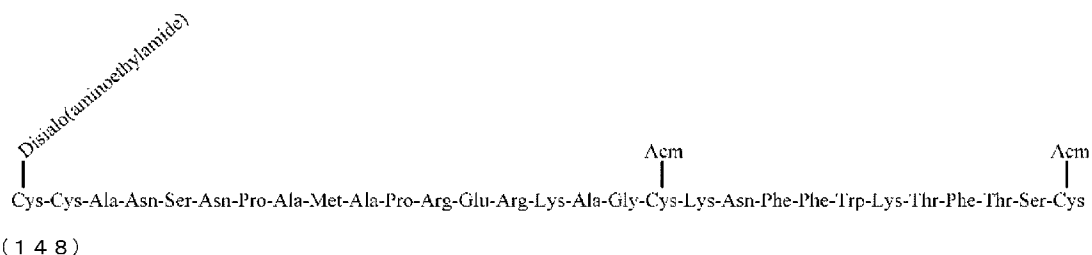


ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{240}H_{383}N_{55}O_{101}S_6$: $[M+3H]^{3+}$ 1950.1, $[M+4H]^{4+}$ 1462.8, $[M+5H]^{5+}$ 1170.5, $[M+6H]^{6+}$ 975.6, found 1949.9, 1462.6, 1170.3, 975.4.

[0237] 65-4 StBu基の脱保護

上記65-3に記載の方法で得られた糖ペプチド147 (17.1 mg、 $2.93 \mu\text{mol}$) に、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4、3.4 mL) に溶解したDTT (52.9 mg、 $343 \mu\text{mol}$) を添加し、室温で3時間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5 \mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分 、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A: B = 95:5 $\rightarrow$ 75:25 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (148) で表わされる糖ペプチド148 (配列番号152) (8.6 mg、 $1.5 \mu\text{mol}$ 、収率51%) を得た。

[化184]



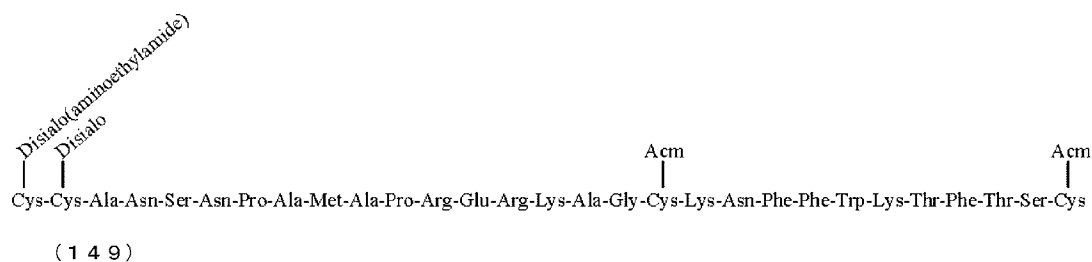
ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{236}H_{375}N_{55}O_{101}S_5$: $[M+3H]^{3+}$ 1920.7, $[M+4H]^{4+}$ 1440.8, $[M+5H]^{5+}$ 1152

. 8、 $[M+6H]^{6+}$ 960. 9、 $[M+7H]^{7+}$ 823. 7、found 1920. 5、1440. 6、1152. 7、960. 6、823. 6。

[0238] 65-5 チオール糖鎖修飾反応

上記65-4に記載の方法で得られたペプチド148 (6. 2 mg、1. 1 μ mol) と化合物a (3. 8 mg、1. 6 μ mol) を1. 6 mM DTTを含む0. 36 Mリン酸緩衝液 (pH 7. 4、339 mL) に溶解し、室温で2. 5時間反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7. 0 mL/分、展開溶媒 A: 0. 1% AcOH水 B: 0. 09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B=90: 10 $\rightarrow$ 75: 25 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (149) で表わされる糖ペプチド149 (配列番号153) (6. 4 mg、0. 80 μ mol、収率73%) を得た。

[化185]



ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{322}H_{514}N_{62}O_{163}S_5$: $[M+4H]^{4+}$ 2006. 5、 $[M+5H]^{5+}$ 1605. 4、 $[M+6H]^{6+}$ 1338. 0、found 2006. 6、1605. 3、1338. 0。

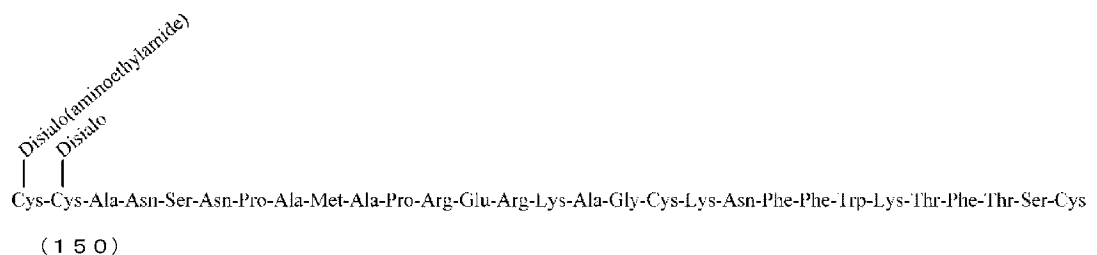
[0239] 65-6 Acm基の脱保護

上記65-5に記載の方法で得られた糖ペプチド149 (8. 2 mg、1. 0 μ mol) に酢酸銀 (I) (2. 1 mg、13 μ mol) の水溶液 (225 μ L) を添加し、室温で1時間反応させた。100 mMリン酸緩衝液 (pH 7. 4、204 μ L) に溶解したDTT (4. 8 mg、31 μ mol) および100 mMアスコルビン酸水溶液 (51 μ L) を添加し、速やかにフ

フィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒

A：0.1%AcOH水 B：0.09%AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=90：10 $\rightarrow$ 75：25 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(150)で表わされる糖ペプチド150(配列番号154)(5.5mg、0.70 μ mol、収率70%)を得た。

[化186]

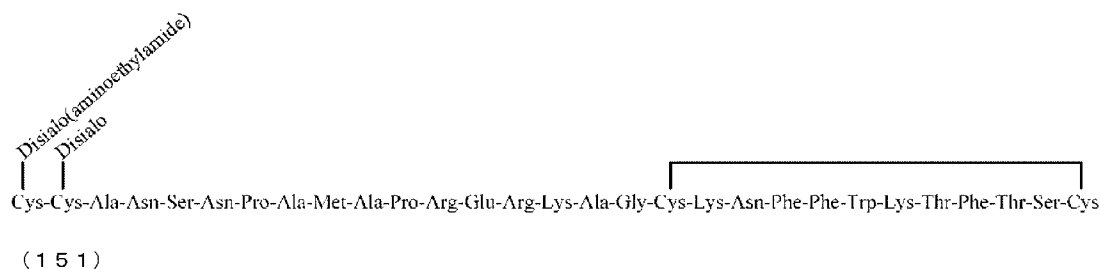


ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{316}H_{504}N_{60}O_{161}S_5$ ：[M+4H]⁴⁺ 1971.0、[M+5H]⁵⁺ 1577.0、[M+6H]⁶⁺ 1314.3、found 1970.6、1576.8、1314.2。

[0240] 65-7 ジスルフィド結合の形成

上記65-6に記載の方法で得られた糖ペプチド150(5.4mg、0.69 μ mol)を100mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)-DMSO(1/1、v/v、1.7mL)に溶解し、室温で終夜反応させた。反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=75：25 $\rightarrow$ 65：35 30分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式151で表わされる化合物(C(disialo(aminoethylamide)) $\cdot$ S1C(disialo)-SRIF28)(配列番号155)を含む画分を得た。

[化187]



この画分を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% AcOH 水 B：0.09% AcOH/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A：B=90：10 $\rightarrow$ 75：25 20分 直線濃度勾配 溶出] を用いてさらに精製し、C (disialo (aminoethylamide)) $\cdot$ S1C (disialo) -SRIF28 (3.1 mg、0.40 μ mol、収率58%) を得た。

ESI-MS: calcd for $C_{316}H_{502}N_{60}O_{161}S_5$: $[M+4H]^{4+}$ 1970.5、 $[M+5H]^{5+}$ 1576.6、 $[M+6H]^{6+}$ 1314.0、 $[M+7H]^{7+}$ 1126.4、 $[M+8H]^{8+}$ 985.8、 $[M+9H]^{9+}$ 876.3、found 1970.3、1576.4、1313.9、1126.4、985.5、876.1。

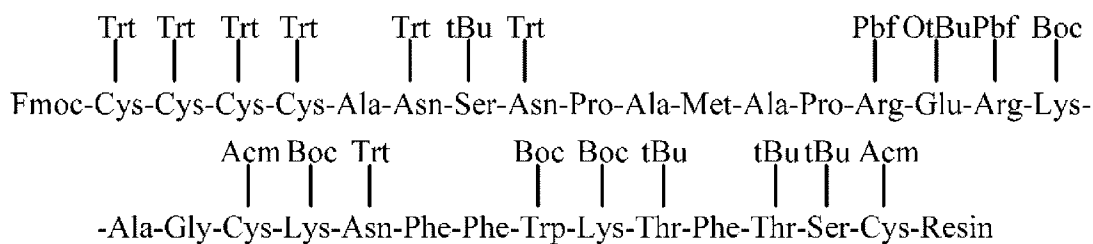
[0241] 実施例66 S1-4C (disialo) -SRIF28の合成

66-1 ペプチドの合成

固相合成用カラムに2-クロロトリチルクロリド樹脂 (100 μ mol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys (Ac m) -OH (49.7 mg、120 μ mol) とDIPEA (104.5 μ L、600 μ mol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて、下記式 (152) で表わされる、樹脂に結合した状態に

ある保護されたペプチド 152 (配列番号 156) を合成した。縮合反応は、縮合剤として HCTU を使用して DMF 中に行った。

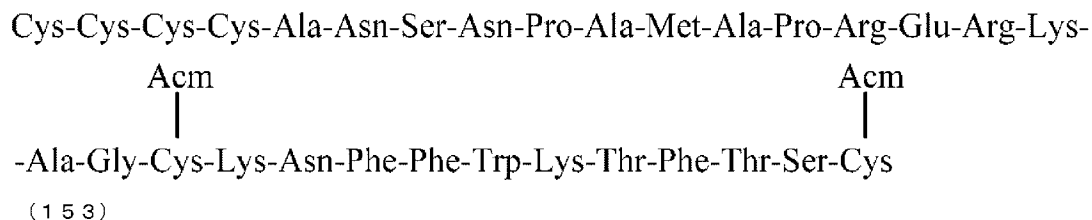
[化188]



(152)

Fmoc 保護基を、DMF 中の 20% のピペリジンで処理することにより除去した。DMF およびジクロロメタンで洗浄後、TFA : 水 : トリイソプロピルシラン : エタンジチオール (= 90 : 2.5 : 5 : 2.5) を加え、室温で 3 時間振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドを HPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ 50 × 250 mm、流速 : 43.7 mL/分、展開溶媒 A : 0.1% TFA 水 B : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル グラジエント A : B = 75 : 25 → 65 : 35 20 分 直線濃度勾配溶出] で精製し、下記式 (153) で表わされるペプチド 153 (配列番号 157) (127.2 mg) を得た。

[化189]



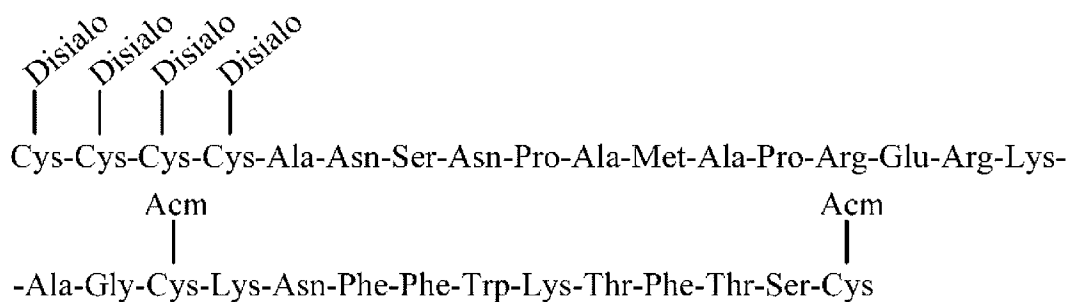
ESI-MS : (m/z) calcd for $\text{C}_{152}\text{H}_{234}\text{N}_{46}\text{O}_{43}\text{S}_7$: $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 1207.1、 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 905.6、 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$ 724.6、found 1206.9、905.1、724.5。

[0242] 66-2 チオールの糖鎖修飾反応

上記66-1に記載の方法で得られたペプチド153 (30.4 mg、8.40 μmol) と化合物a (128 mg、54.7 μmol) を33 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4、2.5 mL) に溶解し、室温で終夜反応させた。反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO Proteonavi (5 μm)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A: B = 82:18 $\rightarrow$ 71:29 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(154)で表わされる糖ペプチド154 (配列番号158) (30.9 mg、2.44 μmol 、収率29%) を得た。

ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{496}\text{H}_{790}\text{N}_{74}\text{O}_{291}\text{S}_7$: $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ 2112.7、 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ 1811.1、found 2112.8、1811.0。

[化190]



(154)

[0243] 66-3 AcM基の脱保護

上記66-2に記載の方法で得られた糖ペプチド154 (30.9 mg、2.44 μmol) に酢酸銀(I) (5.0 mg、30 μmol) の水溶液 (0.98 mL) を添加し、室温で20分間反応させた。その後、200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4、0.98 mL) に溶解したDTT (11.8 mg、76.5 μmol) および100 mM アスコルビン酸水溶液 (244 μL) を添加し、速やかにフィルターでろ過した。ろ液をHPLC [カラム: SHISEIDO Proteonavi (5 μm)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% AcOH水 B: 0.09% AcOH

／ 10%水／ 90%アセトニトリル グラジエント A : B = 82 : 18 →
70 : 30 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (155)
) で表わされる糖ペプチド 155 (配列番号 159) (20.6 mg、1.
64 μmol、収率 67%) を得た。

[化191]



Cys-Cys-Cys-Cys-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-
-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys

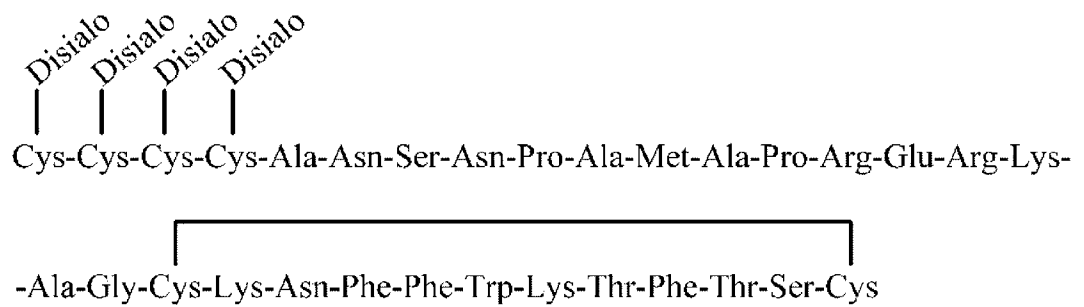
(155)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{490}H_{780}N_{72}O_{289}S_7$: $[M+5H]^{5+}$ 2506.6, $[M+6H]^{6+}$ 2089.0, $[M+7H]^{7+}$ 1790.7, found 2506.5, 2088.8, 1790.4。

[0244] 66-4 ジスルフィド結合の形成

上記 66-3 に記載の方法で得られた糖ペプチド 155 (20.6 mg、1.64 μmol) を 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) - DM
SO (1/1、v/v、2.1 mL) に溶解し、室温で 2 日間反応させた。
その後、反応溶液を HPLC [カラム: SHISEIDO Proteonavi (5 μm)、φ
20 × 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 10 mM 酢酸ア
ンモニウム水溶液 B: 10 mM 酢酸アンモニウム - アセトニトリル (1/
9、v/v) グラジエント A : B = 75 : 25 → 72 : 28 15分
直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (156) で表わされる S1-
4C (disialo) -SRIF28 (配列番号 160) (11.6 mg
、0.93 μmol、収率 57%) を得た。

[化192]



(156)

ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{490}H_{778}N_{72}O_{289}S_7$: $[M+5H]^{5+}$ 2506.2, $[M+6H]^{6+}$ 2088.7, $[M+7H]^{7+}$ 1790.5, found 2506.1, 2088.6, 1790.4。

[0245] 表1-1から表1-7に、実施例1～66に記載の方法で得られた糖鎖付加SRIFペプチドのMSスペクトルデータ（ESI-MS）を示す。分子質量は、MassLynxバージョン4.1（Waters社製）を用いて、多価タンパク質質量分析のデコンボリューションを行うことによって得た。

[0246]

[表1]

表 1 - 1

実施例	化合物	計算された 分子量	観察されたイオン (m/z)		観測された 分子量
1	S1C(disialo)-SRIF28	5427.7	$[M+3H]^{3+}$	1810.0	5427.0
			$[M+4H]^{4+}$	1357.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1086.4	
2	N5C(disialo)-SRIF28	5400.6	$[M+3H]^{3+}$	1801.0	5400.1
			$[M+4H]^{4+}$	1350.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1081.2	
3	A9C(disialo)-SRIF28	5443.7	$[M+3H]^{3+}$	1815.4	5443.1
			$[M+4H]^{4+}$	1361.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1089.6	
4	E12C(disialo)-SRIF28	5385.6	$[M+3H]^{3+}$	1796.0	5384.0
			$[M+4H]^{4+}$	1347.0	
			$[M+5H]^{5+}$	1078.0	
5	R13C(disialo)-SRIF28	5358.6	$[M+3H]^{3+}$	1787.0	5358.0
			$[M+4H]^{4+}$	1340.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1072.6	
6	K14C(disialo)-SRIF28	5386.6	$[M+3H]^{3+}$	1796.4	5386.0
			$[M+4H]^{4+}$	1347.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1078.2	
7	A15C(disialo)-SRIF28	5443.7	$[M+3H]^{3+}$	1815.4	5443.1
			$[M+4H]^{4+}$	1361.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1089.6	
8	G16C(disialo)-SRIF28	5457.7	$[M+3H]^{3+}$	1820.0	5457.1
			$[M+4H]^{4+}$	1365.3	
			$[M+5H]^{5+}$	1092.2	
9	K18C(disialo)-SRIF28	5386.6	$[M+3H]^{3+}$	1796.4	5386.1
			$[M+4H]^{4+}$	1347.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1078.2	
			$[M+6H]^{6+}$	898.7	
			$[M+7H]^{7+}$	770.5	

[表2]

表 1 - 2

実施例	化合物	計算された分子量	観察されたイオン (m/z)		観測された分子量
10	N19C(disialo)-SRIF28	5400.6	$[M+3H]^{3+}$	1801.0	5400.1
			$[M+4H]^{4+}$	1351.0	
			$[M+5H]^{5+}$	1080.8	
11	F21C(disialo)-SRIF28	5367.6	$[M+3H]^{3+}$	1790.0	5366.9
			$[M+4H]^{4+}$	1342.7	
			$[M+5H]^{5+}$	1074.4	
12	T26C(disialo)-SRIF28	5413.6	$[M+3H]^{3+}$	1354.3	5412.1
			$[M+4H]^{4+}$	1083.4	
			$[M+5H]^{5+}$	903.0	
			$[M+6H]^{6+}$	774.3	
13	29C(disialo)-SRIF28	5514.7	$[M+3H]^{3+}$	1839.1	5514.1
			$[M+4H]^{4+}$	1379.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1103.8	
14	30C(disialo)-SRIF28	5615.8	$[M+3H]^{3+}$	1872.7	5615.1
			$[M+4H]^{4+}$	1404.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1124.0	
15	S1C(disialo)-D-Trp22 -SRIF28	5427.7	$[M+3H]^{3+}$	1810.1	5427.2
			$[M+4H]^{4+}$	1357.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1086.4	
			$[M+6H]^{6+}$	905.5	
16	A9C(disialo)-D-Trp22 -SRIF28	5443.7	$[M+3H]^{3+}$	1815.4	5442.9
			$[M+4H]^{4+}$	1361.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1089.6	
17	C(disialo)-SRIF14	4004.1	$[M+2H]^{2+}$	2002.9	4003.3
			$[M+3H]^{3+}$	1335.4	
			$[M+4H]^{4+}$	1001.8	
18	C(disialo)-R-K-SRIF14	4288.4	$[M+3H]^{3+}$	1430.2	4287.5
			$[M+4H]^{4+}$	1072.9	
19	C(disialo)-C12linker-SRIF14	4201.4	$[M+3H]^{3+}$	1401.2	4200.5
			$[M+4H]^{4+}$	1051.2	
			$[M+5H]^{5+}$	841.1	

[表3]

表 1 - 3

実施例	化合物	計算された 分子量	観察されたイオン (m/z)		観測された 分子量
20	S1-2C(disialo)-SRIF28	7793.8	$[M+4H]^{4+}$	1949.4	7793.4
			$[M+5H]^{5+}$	1559.7	
			$[M+6H]^{6+}$	1299.9	
21	S1C(disialo) ・ N5C(disialo)-SRIF28	7679.7	$[M+3H]^{3+}$	1920.4	7678.7
			$[M+4H]^{4+}$	1536.8	
			$[M+5H]^{5+}$	1280.9	
22	S1C(disialo) ・ R13C(disialo)-SRIF28	7637.7	$[M+3H]^{3+}$	1910.2	7636.6
			$[M+4H]^{4+}$	1528.3	
			$[M+5H]^{5+}$	1273.8	
23	N5C(disialo) ・ A9C(disialo)-SRIF28	7695.7	$[M+5H]^{5+}$	1540.1	7695.2
			$[M+6H]^{6+}$	1283.6	
			$[M+7H]^{7+}$	1100.3	
			$[M+8H]^{8+}$	962.9	
24	S1-3C(disialo)-SRIF28	10160.0	$[M+3H]^{3+}$	3387.6	10158.2
			$[M+4H]^{4+}$	2540.9	
			$[M+5H]^{5+}$	2032.7	
			$[M+6H]^{6+}$	1694.2	
			$[M+7H]^{7+}$	1452.3	
25	S1C(disialo) ・ N5C(disialo) ・ A9C(disialo)-SRIF28	9974.8	$[M+5H]^{5+}$	1995.9	9974.3
			$[M+6H]^{6+}$	1663.2	
26	S1C(monosialo)-SRIF28	5136.4	$[M+3H]^{3+}$	1713.0	5134.9
			$[M+4H]^{4+}$	1284.7	
			$[M+5H]^{5+}$	1028.2	
			$[M+6H]^{6+}$	856.8	

[表4]

表1-4

実施例	化合物	計算された 分子量	観察されたイオン (m/z)		観測された 分子量
27	S1C(asialo)-SRIF28	4845.1	$[M+3H]^{3+}$	2615.7	4843.9
			$[M+4H]^{4+}$	1212.0	
			$[M+5H]^{5+}$	969.8	
28	S1-2C(asialo)-SRIF28	6628.8	$[M+4H]^{4+}$	1658.1	6627.2
			$[M+5H]^{5+}$	1326.7	
			$[M+6H]^{6+}$	1105.6	
			$[M+7H]^{7+}$	947.8	
			$[M+8H]^{8+}$	829.4	
29	S1-3C(asialo)-SRIF28	8412.5	$[M+4H]^{4+}$	2103.7	8411.7
			$[M+5H]^{5+}$	1683.3	
			$[M+6H]^{6+}$	1403.0	
30	N5N(disialo)-SRIF28	5354.5	$[M+3H]^{3+}$	1785.7	5354.0
			$[M+4H]^{4+}$	1339.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1071.8	
31	S1N(disialo)-SRIF28	5381.6	$[M+3H]^{3+}$	1794.7	5380.9
			$[M+4H]^{4+}$	1346.2	
			$[M+5H]^{5+}$	1077.2	
32	S1C(disialo)・ N19C(GlcNAc)-SRIF28	5676.9	$[M+3H]^{3+}$	1893.5	5676.4
			$[M+4H]^{4+}$	1420.1	
			$[M+5H]^{5+}$	1136.3	
33	S1C(disialo)・ N19C(diMan)-SRIF28	6366.6	$[M+3H]^{3+}$	2122.9	6366.7
			$[M+4H]^{4+}$	1592.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1274.4	

[表5]

表1-5

実施例	化合物	計算された 分子量	観察されたイオン(m/z)		観測された 分子量
34	C(disialo)-SRIF28	5514.7	[M+4H] ⁴⁺	1379.7	5514.6
			[M+5H] ⁵⁺	1103.9	
			[M+6H] ⁶⁺	920.1	
			[M+7H] ⁷⁺	788.8	
35	R11C(disialo)-SRIF28	5358.5	[M+3H] ³⁺	1787.4	5358.6
			[M+4H] ⁴⁺	1340.7	
			[M+5H] ⁵⁺	1072.7	
36	F20C(disialo)-SRIF28	5367.6	[M+3H] ³⁺	1790.1	5367.1
			[M+4H] ⁴⁺	1342.8	
			[M+5H] ⁵⁺	1074.4	
37	T24C(disialo)-SRIF28	5413.6	[M+3H] ³⁺	1805.7	5412.6
			[M+4H] ⁴⁺	1354.2	
			[M+5H] ⁵⁺	1083.7	
38	F25C(disialo)-SRIF28	5367.6	[M+3H] ³⁺	1790.1	5367.1
			[M+4H] ⁴⁺	1342.8	
			[M+5H] ⁵⁺	1074.4	
			[M+6H] ⁶⁺	895.4	
39	S27C(disialo)-SRIF28	5427.7	[M+3H] ³⁺	1810.1	5427.4
			[M+4H] ⁴⁺	1357.8	
40	C(disialo)-K-SRIF14	4131.2	[M+2H] ²⁺	2066.9	4131.7
			[M+3H] ³⁺	1378.2	
			[M+4H] ⁴⁺	1033.9	
41	S1C(disialo)-F25Y-SRIF28	5443.7	[M+3H] ³⁺	1815.4	5443.1
			[M+4H] ⁴⁺	1361.6	
			[M+5H] ⁵⁺	1089.6	
42	S1C(disialo)-SRIF28-amide	5426.7	[M+3H] ³⁺	1809.8	5426.2
			[M+4H] ⁴⁺	1357.6	
			[M+5H] ⁵⁺	1086.2	
			[M+6H] ⁶⁺	905.2	
43	C(disialo)-PEGlinker-SRIF14	4207.3	[M+3H] ³⁺	1403.2	4206.6
			[M+4H] ⁴⁺	1052.7	
			[M+5H] ⁵⁺	842.3	
44	Biotin-S1C(disialo)-SRIF28	5654.0	[M+3H] ³⁺	1885.4	5653.2
			[M+4H] ⁴⁺	1414.3	
			[M+5H] ⁵⁺	1131.7	
			[M+6H] ⁶⁺	943.2	
45	Biotin-PEGlinker -S1C(disialo)-SRIF28	5857.2	[M+3H] ³⁺	1953.2	5856.4
			[M+4H] ⁴⁺	1465.1	
			[M+5H] ⁵⁺	1172.1	
			[M+6H] ⁶⁺	977.1	
			[M+7H] ⁷⁺	837.6	

[表6]

表1-6

実施例	化合物	計算された 分子量	観察されたイオン(m/z)		観測された 分子量
46	Azido-S1C(disialo)-SRIF28	5552.8	$[M+3H]^{3+}$	1851.8	5552.3
			$[M+4H]^{4+}$	1389.1	
			$[M+5H]^{5+}$	1111.7	
47	S1C(disialo)・E12C(disialo) -SRIF28	7664.7	$[M+4H]^{4+}$	1917.1	7664.1
			$[M+5H]^{5+}$	1533.8	
			$[M+6H]^{6+}$	1278.4	
48	2C(disialo)-R-K-SRIF14	6654.6	$[M+3H]^{3+}$	2219.2	6653.4
			$[M+4H]^{4+}$	1664.4	
			$[M+5H]^{5+}$	1331.9	
			$[M+6H]^{6+}$	1109.9	
49	3C(disialo)-R-K-SRIF14	9020.8	$[M+4H]^{4+}$	2256.1	9020.2
			$[M+5H]^{5+}$	1805.1	
			$[M+6H]^{6+}$	1504.4	
50	S1C(diGlcNAc)-SRIF28	4520.9	$[M+3H]^{3+}$	1507.7	4519.9
			$[M+4H]^{4+}$	1131.0	
			$[M+5H]^{5+}$	905.0	
51	S1C(diMan)-SRIF28	4114.5	$[M+3H]^{3+}$	1372.3	4113.8
			$[M+4H]^{4+}$	1029.5	
			$[M+5H]^{5+}$	823.8	
52	N19C(diMan)-SRIF28	4087.5	$[M+3H]^{3+}$	1363.3	4086.8
			$[M+4H]^{4+}$	1023.0	
53	S1C(GlcNAc)-SRIF28	3424.9	$[M+2H]^{2+}$	1713.3	3424.5
			$[M+3H]^{3+}$	1142.5	
			$[M+4H]^{4+}$	856.9	
			$[M+5H]^{5+}$	686.1	
54	N19C(GlcNAc)-SRIF28	3397.8	$[M+2H]^{2+}$	1699.8	3397.5
			$[M+3H]^{3+}$	1133.5	
			$[M+4H]^{4+}$	850.4	
55	S1C(trisialo)-SRIF28	6084.2	$[M+3H]^{3+}$	2028.8	6083.4
			$[M+4H]^{4+}$	1521.9	
			$[M+5H]^{5+}$	1217.7	
			$[M+6H]^{6+}$	1014.9	
56	S1C(tetrasialo)-SRIF28	6740.8	$[M+3H]^{3+}$	2247.7	6739.6
			$[M+4H]^{4+}$	1685.9	
			$[M+5H]^{5+}$	1349.1	
			$[M+6H]^{6+}$	1124.3	
			$[M+7H]^{7+}$	963.8	
57	S1C(disialo(aminoethylamide)) -SRIF28	5511.8	$[M+3H]^{3+}$	1838.0	5511.1
			$[M+4H]^{4+}$	1378.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1103.2	
			$[M+6H]^{6+}$	919.5	
			$[M+7H]^{7+}$	788.2	

[表7]

表1-7

実施例	化合物	計算された 分子量	観察されたイオン (m/z)		観測された 分子量
58	S1C(disialo(amide))-SRIF28	5425.7	$[M+3H]^{3+}$	1809.3	5423.9
			$[M+4H]^{4+}$	1357.0	
			$[M+5H]^{5+}$	1085.8	
			$[M+6H]^{6+}$	905.2	
59	S1C(disialo(Bn))-SRIF28	5607.9	$[M+3H]^{3+}$	1870.0	5605.9
			$[M+4H]^{4+}$	1402.5	
			$[M+5H]^{5+}$	1122.2	
			$[M+6H]^{6+}$	935.5	
60	S1C(disialo(hexadecylamide))- -SRIF28	5874.5	$[M+3H]^{3+}$	1958.9	5873.6
			$[M+4H]^{4+}$	1469.4	
			$[M+5H]^{5+}$	1175.7	
			$[M+6H]^{6+}$	979.9	
61	S1-2C(disialo(amide))-SRIF28	7789.9	$[M+4H]^{4+}$	1948.2	7789.9
			$[M+5H]^{5+}$	1559.0	
			$[M+6H]^{6+}$	1299.2	
62	S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28	8154.3	$[M+4H]^{4+}$	2039.3	8153.0
			$[M+5H]^{5+}$	1631.6	
			$[M+6H]^{6+}$	1360.2	
63	S1C(Asn(disialo))-SRIF28	5542.7	$[M+3H]^{3+}$	1848.4	5542.2
			$[M+4H]^{4+}$	1386.6	
			$[M+5H]^{5+}$	1109.4	
			$[M+6H]^{6+}$	924.9	
64	S1N(disialo)・N19C(diMan)-SRIF28	6320.5	$[M+3H]^{3+}$	2107.9	6319.5
			$[M+4H]^{4+}$	1580.9	
			$[M+5H]^{5+}$	1265.1	
65	C(disialo(aminoethylamide))・ S1C(disialo)-SRIF28	7878.0	$[M+4H]^{4+}$	1970.3	7878.1
			$[M+5H]^{5+}$	1576.4	
			$[M+6H]^{6+}$	1313.9	
			$[M+7H]^{7+}$	1126.4	
			$[M+8H]^{8+}$	985.5	
			$[M+9H]^{9+}$	876.1	
66	S1-4C(disialo)-SRIF28	12526.2	$[M+5H]^{5+}$	2506.1	12525.5
			$[M+6H]^{6+}$	2088.6	
			$[M+7H]^{7+}$	1790.4	

[0247] 実施例67-1 受容体結合親和性の算出

下記の方法で競合的結合実験を行い、受容体結合親和性を算出した。

競合的結合実験に用いた試薬とその正式化学名は以下の通り。HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)、BSA (ウシ血清アルブミン)。

競合的結合実験はリセルカバイオサイエンス社に委託し、実験およびデー

タ解析を行った。用いた受容体サブタイプおよび受容体膜標品を表2に示す。各結合実験に共通して、標識リガンドとして [125 I] Tyr¹¹-Somatostatin 14 (Tyr¹¹-SRIF 14) を、非標識リガンドとして Somatostatin-14 (SRIF 14) を、バッファとして 5 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.1% BSAを含んだ 25 mM HEPES、pH 7.4 を使用した。試験物質は、0.01 nM、0.1 nM、1 nM、10 nM、100 nM、または、1000 nM の濃度で使用し、膜標品と混ぜ合わせて反応液とした。また、反応液に添加した標識リガンドおよび非標識リガンドの濃度を表2に示す。反応液のインキュベーション条件は、SSTR2では25℃で4時間、SSTR1、SSTR3、SSTR4、SSTR5では25℃で2時間とした。実験回ごとに、陽性対照としてSRIF 14を用いた。データ解析は、MathIQ™ (ID Business Solutions社、UK) を使用して非線形性最小二乗法で、結合阻害率の数値データを基に50%阻害濃度 (IC₅₀値) を求めた。結合阻害定数 (K_i値) はCheng, Yらの方法 (Biochem Pharmacol, 22, 3099-3108, 1973) により算出した。

[表8]

表2

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
標識リガンド	0.1nM	0.03nM	0.1nM	0.1nM	0.1nM
非標識リガンド	1μM	1μM	1μM	1μM	1μM
Source	Human recombinant CHO-K1 cells	Human recombinant CHO-K1 cells	Human recombinant CHO-K1 cells	Human recombinant Chem-1 cells	Human recombinant Chem-1 cells

[0248] 結合実験を実施した化合物および結合実験の結果を表3Aに示す。また、対照化合物としてオクトレオチド、SRIF 14およびSRIF 28を同様に評価した。なお、オクトレオチドについては最高濃度を100 nMとしたため、SSTR1、およびSSTR4においてIC₅₀値を算出できず、>100 nMと表記した。

なお、図1 Aおよび図1 Bは、表3 A中の化合物名に対応する糖鎖付加ペプチド（糖鎖付加体）の構造の一例を示す。

[0249] [表9]

表3A

実施例	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
	IC ₅₀ (nM)	GI (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)
1	S1C(disialo)-SRIF28	2.19	1.81	0.109	0.0576	0.480	0.164	2.30	2.07	0.442
2	N5C(disialo)-SRIF28	1.10	0.912	0.0945	0.0502	0.278	0.0950	1.30	1.17	0.458
3	A9C(disialo)-SRIF28	2.08	1.72	0.0741	0.0394	0.593	0.203	1.72	1.54	0.471
4	E12C(disialo)-SRIF28	1.70	1.40	0.112	0.0396	0.362	0.124	2.04	1.84	0.376
5	R13C(disialo)-SRIF28	16.4	13.6	0.310	0.105	2.87	0.981	6.43	5.79	3.28
6	K14C(disialo)-SRIF28	13.8	11.4	0.481	0.256	2.59	0.887	8.02	7.22	4.01
10	N19C(disialo)-SRIF28	16.1	13.3	1.21	0.675	1.47	0.503	12.2	11.0	3.69
13	29C(disialo)-SRIF28	4.43	3.67	0.738	0.392	7.00	2.39	6.11	5.50	3.73
14	30C(disialo)-SRIF28	4.21	3.48	0.517	0.275	6.91	2.36	2.53	2.28	1.86
15	S1C(disialo)-D-Trp22-SRIF28	2.23	1.85	0.0324	0.0172	0.834	0.285	5.85	5.26	0.565
16	A9C(disialo)-D-Trp22-SRIF28	6.92	5.73	0.0396	0.0210	0.256	0.0876	4.87	4.38	0.194
17	C(disialo)-SRIF14	32.3	26.7	0.336	0.179	4.62	1.58	8.24	7.41	5.70
18	C(disialo)-R-K-SRIF14	3.09	2.56	0.104	0.0551	0.231	0.0791	1.06	0.951	0.187
19	C(disialo)-C12linker-SRIF14	15.5	12.8	0.502	0.267	3.12	1.07	2.92	2.62	2.29
20	S1-2C(disialo)-SRIF28	18.8	15.5	0.338	0.179	1.28	0.439	5.61	5.05	0.607
21	S1C(disialo) · N5C(disialo)-SRIF28	6.89	5.70	0.224	0.119	1.58	0.539	4.00	3.60	0.728
22	S1C(disialo) · R13C(disialo)-SRIF28	177	147	6.28	3.33	11.0	3.77	45.0	40.5	14.7
23	N5C(disialo) · A9C(disialo)-SRIF28	30.0	24.9	0.793	0.421	4.09	1.40	14.2	12.8	1.81
24	S1-3C(disialo)-SRIF28	20.4	16.9	0.421	0.224	3.30	1.13	7.69	6.92	0.927
25	S1C(disialo) · N5C(disialo) · A9C(disialo)-SRIF28	69.2	57.3	0.985	0.523	7.93	2.71	25.2	22.7	4.14
26	S1C(monosialo)-SRIF26	1.43	1.19	0.0465	0.0247	0.322	0.110	1.14	1.03	0.372
27	S1C(asialo)-SRIF28	0.851	0.704	0.0224	0.0119	0.155	0.0531	0.627	0.504	0.460
28	S1-2C(asialo)-SRIF28	0.860	0.712	0.0632	0.0336	0.177	0.0604	0.780	0.702	0.190
29	S1-3C(asialo)-SRIF28	4.21	3.49	0.0978	0.0519	0.581	0.199	1.44	1.29	0.369
30	N5N(disialo)-SRIF28	3.02	2.50	0.0685	0.0364	0.579	0.198	2.86	2.57	0.465
31	S1N(disialo)-SRIF28	2.68	2.21	0.0754	0.0401	0.314	0.107	1.07	0.960	0.272
-	SRIF14	0.438	0.362	0.0142	0.00755	0.131	0.0450	0.303	0.273	0.576
-	Octreotide	>100	-	0.0628	0.0334	6.41	2.19	>100	-	9.39
-	SRIF28	0.353	0.292	0.0271	0.0144	0.0868	0.0297	0.294	0.265	0.423

[0250] 対照としたオクトレオチドはSSTR2、SSTR3、SSTR5の各受容体に、またSRIF14およびSRIF28は全てのSSTRに結合した。表3Aに示すように、本発明に係る化合物は、全てのSSTRに強力に結合した。陽性対照のSRIF14のSSTR1に対する結合親和性が K_i 値で 0.362 nM であったのに対し、本発明の糖鎖を1本または2本有する化合物は $0.704\sim 1.47\text{ nM}$ であり、優れた結合親和性を示した。また、本発明の糖鎖を3本有する化合物（実施例24、25、29の化合物）も、 3.49 nM 、 16.9 nM 、および、 57.3 nM を示し、優れた結合親和性を有していた。なお、その血中半減期の延長による生物学的利用能（バイオアベイラビリティ：BA）も大幅に増大するため、結合親和性の K_i 値が多少高い場合であっても、生体内において受容体に対し有効に作用することができる。同様に、SRIF14のSSTR2、SSTR3およびSSTR4に対する結合親和性が K_i 値でそれぞれ 0.00755 nM 、 0.0450 nM 、 0.273 nM であったのに対し、本発明の化合物はそれぞれ $0.0119\sim 3.33\text{ nM}$ 、 $0.0531\sim 3.77\text{ nM}$ 、 $0.564\sim 40.5\text{ nM}$ であり、いずれも優れた結合親和性を示した。また、SRIF14のSSTR5に対する結合親和性が 0.326 nM であったのに対し、本発明の化合物は 8.33 nM までの高い結合親和性を示した。

実施例1～6、10、13～19、26、27、30、および、31の化合物は、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5のすべての受容体に対し結合親和性を有する糖鎖1本修飾体であることがわかった。また、同様に、実施例20～23、および28は、SSTR1～SSTR5の全ての受容体に対する親和性を有する糖鎖2本修飾体であり、実施例24、25、および29はSSTR1～SSTR5の全ての受容体に対する親和性を有する糖鎖3本修飾体であることがわかった。

[0251] 実施例67-2 受容体結合親和性の算出-2

表3Bに示す各化合物について、実施例67-1に記載の方法で競合的結合実験を行い、受容体結合親和性を算出した。また、対照化合物としてSR

I F 1 4 および S R I F 2 8 を同様に評価した。結合実験の結果を表 3 B に示す。

なお、図 1 C および図 1 D は、表 3 B 中の化合物名に対応する糖鎖付加ペプチドの構造の一例を示す。

[表10]

表3B

実施例		SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)
1	S1C(disialo)-SRIF28	7.71	6.45	0.543	0.289	1.98	0.676	7.10	6.39	1.61	0.911
7	A15C(disialo)-SRIF28	11.4	9.43	0.938	0.498	3.49	1.19	8.18	7.36	3.84	2.17
8	G16C(disialo)-SRIF28	17.4	14.4	1.22	0.646	3.12	1.07	12.2	11.0	5.67	3.21
9	K18C(disialo)-SRIF28	45.4	37.6	12.2	6.51	14.7	5.03	62.7	56.5	160	95.0
12	T26C(disialo)-SRIF28	21.6	17.9	310	160	21.7	7.44	26.8	24.1	400	230
26	S1C(monosialo)-SRIF28	5.38	4.46	0.213	0.112	1.18	0.405	2.35	2.12	0.816	0.460
27	S1C(asialo)-SRIF28	3.97	3.29	0.200	0.105	1.02	0.349	2.98	2.68	1.04	0.588
32	S1C(disialo)-N19C(GlcNAc)-SRIF28	<10	<8.27	2.20	1.17	3.05	1.04	8.55	7.69	2.37	1.34
33	S1C(disialo)-N19C(diMan)-SRIF28	44.0	37.0	3.73	1.98	3.63	1.24	25.0	23.0	5.69	3.22
34	C(disialo)-SRIF28	5.57	4.61	0.478	0.255	2.55	0.870	8.65	7.79	2.62	1.48
35	R11C(disialo)-SRIF28	22.0	18.2	1.38	0.735	6.34	2.17	20.2	18.1	3.65	2.07
38	F25C(disialo)-SRIF28	>1000	>828	>1000	>531	>1000	>342	130	110	58.0	33.0
39	S27C(disialo)-SRIF28	28.4	23.5	0.326	0.170	6.77	2.31	33.4	30.1	4.94	2.80
40	C(disialo)-K-SRIF14	20.7	17.2	1.97	1.05	3.55	1.21	11.0	9.77	3.52	1.99
41	S1C(disialo)-F25Y-SRIF28	1.77	1.46	0.310	0.160	0.480	0.160	1.55	1.39	1.09	0.620
42	S1C(disialo)-SRIF28-amide	4.87	4.03	1.32	0.700	5.91	2.02	6.88	6.19	3.75	2.12
43	C(disialo)-PEGlinker-SRIF14	36.0	30.0	4.67	2.48	8.71	2.98	21.0	19.0	>10	>5.65
44	Biotin-S1C(disialo)-SRIF28	11.0	9.05	1.68	0.890	2.92	1.00	9.28	8.35	2.42	1.37
45	Biotin-PEGlinker-S1C(disialo)-SRIF28	9.41	7.79	1.96	1.04	3.41	1.17	9.31	8.38	2.00	1.13
46	azido-S1C(disialo)-SRIF28	8.82	7.30	1.29	0.690	3.17	1.09	5.34	4.81	0.840	0.470
47	S1C(disialo)-E12C(disialo)-SRIF28	22.0	19.0	2.70	1.44	4.62	1.58	20.0	18.0	2.11	1.19
48	2C(disialo)-RK-SRIF14	48.0	40.0	5.35	2.84	9.74	3.33	49.0	44.0	6.16	3.48
49	3C(disialo)-RK-SRIF14	270	230	32.0	17.0	40.0	14.0	>100	>90.0	41.0	23.0
50	S1C(diGlcNAc)-SRIF28	5.04	4.17	0.190	0.100	2.02	0.690	3.91	3.52	1.45	0.820
51	S1C(diMan)-SRIF28	5.06	4.18	0.140	0.0750	1.32	0.450	3.01	2.70	0.550	0.310
52	N19C(diMan)-SRIF28	6.58	5.44	1.17	0.620	1.55	0.530	8.02	7.22	2.94	1.66
53	S1C(GlcNAc)-SRIF28	5.91	4.89	0.225	0.120	1.65	0.565	2.89	2.60	1.15	0.650
54	N19C(GlcNAc)-SRIF28	2.60	2.15	0.940	0.500	<1	<0.342	2.38	2.15	1.89	1.07
55	S1C(trisialo)-SRIF28	17.0	14.0	0.780	0.410	5.59	1.91	15.0	14.0	1.95	1.10
56	S1C(tetrasialo)-SRIF28	17.3	14.2	1.12	0.597	5.63	1.93	14.3	12.6	2.12	1.20
57	S1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28	2.35	1.94	0.101	0.0536	0.766	0.264	2.24	2.01	2.08	1.18
58	S1C(disialo(amide))-SRIF28	5.09	4.21	0.207	0.110	1.53	0.522	6.12	5.50	2.60	1.47
59	S1C(disialo(Bn))-SRIF28	6.20	5.12	0.247	0.130	2.15	0.733	6.01	5.41	3.25	1.83
60	S1C(disialo(hexadexylamide))-SRIF28	5.53	4.57	1.04	0.550	11.0	3.75	26.0	24.0	37.0	21.0
61	S1-2C(disialo(amide))-SRIF28	6.92	5.73	0.830	0.440	2.06	0.710	4.76	4.28	2.67	1.51
62	S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28	6.01	4.97	0.830	0.440	2.58	0.880	8.20	7.38	2.60	1.47
63	S1C(Asn(disialo))-SRIF28	15.0	13.0	0.610	0.330	5.57	1.91	15.0	14.0	1.61	0.910
64	S1N(disialo)-N19C(diMan)-SRIF28	35.0	29.0	5.65	3.00	3.90	1.33	25.0	22.0	8.53	4.82
65	C(disialo(aminoethylamide))-S1C(disialo)-SRIF28	6.20	5.13	0.960	0.510	1.89	0.650	6.12	5.51	1.81	1.02
66	S1-4C(disialo)-SRIF28	130	100	3.76	2.00	10.0	3.43	66.0	59.0	10.0	5.82
-	SRIF28	0.533	1.80	0.0680	0.0565	0.206	0.116	0.776	1.23	0.189	0.666
-	SRIF14	1.25	2.69	0.0329	0.0993	0.0697	0.403	0.823	1.95	0.416	0.813

表3Bに示すように、対照となるSRIF14およびSRIF28はS

TR1～STR5の全ての受容体に結合した。ここで、実施例67-1と試験実施回等は異なるため、SRIF14の各受容体に対する K_i 値は異なり、2.5から13.2倍の高い数値となっている。実施例1、7、8、9、26、27、32、33、34、35、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65および66の化合物は、STR1に対する K_i 値は1.46～100 nM、同じくSTR2で0.0536～6.51 nM、STR3で0.160～7.44 nM、STR4で1.39～59.0 nM、STR5で0.310～95.0 nMであり、全ての受容体に対して高い結合親和性を示した。実施例12の化合物は、STR2およびSTR5に対する K_i 値がSRIF14の280～1600倍であったが、STR1、STR3およびSTR4に対しては17.9、7.44、24.1 nMの K_i 値であり、結合親和性を保持していると考えられた。実施例38の化合物は、STR1、STR2、STR3に対する K_i 値がSRIF14の310～5300倍と著しく親和性が低下していたが、STR4およびSTR5に対しては110、33.0 nMの K_i 値であり、結合親和性を保持していると考えられた。実施例49の化合物は、STR2およびSTR4に対する K_i 値がSRIF14の170倍および46倍以上であったが、STR1、STR3、STR5に対してはそれぞれ、270 nM、14.0 nM、23.0 nMの K_i 値であり、結合親和性を保持していると考えられた。

[0252] 実施例67-3 受容体発現細胞を用いたアゴニスト活性評価-1

ソマトスタチン受容体はGタンパク質共役受容体(GPCR)である。STR1～STR5はいずれもGタンパク質のサブファミリーである G_i / G_o を介してアデニルシクラーゼ活性を抑制し、細胞内cAMP濃度を低下させる。本実験系では、各ソマトスタチン受容体発現細胞を用い、試験物質のcAMP産生抑制作用の IC_{50} 値を算出し、アゴニスト活性を評価した。また、対照化合物としてSRIF14、SRIF28を同様に評価した。

。

本実験に用いた試薬とその正式化学名は以下の通り。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)、HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)。

SSTR2～SSTR5に対する評価は、以下の条件で実験を行った。バッファとして、0.3% BSA、0.5mM IBMXを含んだDMEMを用い、表3Cに示す受容体発現細胞を 10^4 cells/wellで播種した。試験物質は0.00001nM、0.0001nM、0.001nM、0.01nM、0.1nM、1nM、10nM、100nM、または1000nMの濃度で、 $10\mu\text{M}$ forskolinと混ぜ合わせて処置し、室温で30分反応させた。反応後、0.2N HClで細胞を溶解し、細胞内に蓄積したcAMP量をケイマン社cyclic AMP EIA kit (Cayman, 582002) を用いて測定した。

SSTR1に対する評価はセレップ社に委託し、実験を行った。バッファとして、20mM HEPES (pH7.4)、 $500\mu\text{M}$ IBMXを含んだHBSSを用い、SSTR1受容体発現細胞を 10^4 cells/wellで播種した。試験物質は0.001nM、0.01nM、0.1nM、1nM、10nM、または100nMの濃度で、 $1\mu\text{M}$ NKH477と混ぜ合わせて処置し、 37°C で20分反応をさせた。反応後、細胞内に蓄積したcAMP量をシスバイオ社cAMP dynamic 2 kit (cisbio, 62AM4PE) を用いて測定した。

[表11]

表3C

	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
販売元	Perkin Elmer社			
製品番号	ES-521-CF	ES-523-CF	ES-524-CF	ES-522-CF
由来細胞	CHO-K1細胞			

[0253] 糖鎖付加体として、実施例 1、18、27、28、57および58の化合物を用いた際の、アゴニスト活性評価試験の実験結果 (IC_{50} (nM)) を表3Dおよび図1Eに示す。対照化合物のSRIF14およびSRIF28の IC_{50} はSSTR1に対し0.83~0.89 nM、また、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5に対してそれぞれ0.0076~0.073 nM、0.029~0.21 nM、0.015~0.074 nM、0.066~0.12 nMであった。糖鎖付加体である化合物の、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5に対するアゴニスト活性の IC_{50} は1.0~2.4 nM、0.041~0.10 nM、0.12~0.30 nM、0.039~0.085 nM、0.043~0.081 nMであり、SSTR1~SSTR5の全ての受容体に対して優れたアゴニスト活性を示した。実施例67-1および実施例67-2に示した結果から、これらの化合物は受容体結合能をもっていることが明らかであり、これらの化合物は受容体に結合することによってアゴニスト活性を発揮することが明らかとなった。

[表12]

表3D

実施例		SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
-	SRIF14	0.83 ± 0.52	0.0076 ± 0.0012	0.029 ± 0.017	0.015 ± 0.006	0.12 ± 0.03
-	SRIF28	0.89 ± 0.41	0.073 ± 0.014	0.21 ± 0.08	0.074 ± 0.058	0.066 ± 0.033
1	S1C(disialo)-SRIF28	2.2 ± 1.1	0.075 ± 0.030	0.13 ± 0.06	0.065 ± 0.042	0.056 ± 0.028
18	Cys(disialo)-R-K-SRIF14	1.2 ± 0.6	0.055 ± 0.015	0.18 ± 0.10	0.050 ± 0.025	0.052 ± 0.032
27	S1C(asialo)-SRIF28	1.6 ± 0.6	0.041 ± 0.006	0.12 ± 0.05	0.039 ± 0.021	0.055 ± 0.031
28	S1-2C(asialo)-SRIF28	1.5 ± 0.6	0.079 ± 0.033	0.15 ± 0.08	0.051 ± 0.046	0.064 ± 0.029
57	S1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28	1.0 ± 0.9	0.10 ± 0.02	0.30 ± 0.15	0.085 ± 0.011	0.081 ± 0.019
58	S1C(disialo(amide))-SRIF28	2.4 ± 1.7	0.055 ± 0.013	0.14 ± 0.06	0.043 ± 0.023	0.043 ± 0.015

[0254] 実施例 67-4 受容体発現細胞を用いたアゴニスト活性評価-2

糖鎖付加体として、表 3 E に記載の各化合物を用いて、実施例 67-3 と同様にしてアゴニスト活性評価試験を実施した。実験結果を表 3 E に示す。なお、表 3 E 中、「- (ハイフン)」が記載されている欄は、未実施であることを示す。

[表13]

表 3 E (-: 未実施)

実施例		SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
-	SRIF14	0.83	0.0076	0.029	0.015	0.12
-	SRIF28	0.89	0.073	0.21	0.074	0.066
4	E12C(disialo)-SRIF28	2.3	-	-	-	-
10	N19C(disialo)-SRIF28	22	-	-	-	-
15	S1C(disialo)-D-Trp22-SRIF28	3.5	-	-	-	-
17	C(disialo)-SRIF14	-	0.029	0.18	0.10	0.23
19	C(disialo)-C12linker-SRIF14	-	-	-	0.11	-
20	S1-2C(disialo)-SRIF28	-	-	0.55	0.14	0.22
21	S1C(disialo)・N5C(disialo)-SRIF28	-	0.072	0.37	0.041	0.090
23	N5C(disialo)・A9C(disialo)-SRIF28	-	0.096	0.29	0.091	0.13
24	S1-3C(disialo)-SRIF28	7.5	0.19	0.79	0.36	0.97
25	S1C(disialo)・N5C(disialo)・A9C(disialo)-SRIF28	-	1.4	2.4	0.16	1.1
26	S1C(monosialo)-SRIF28	1.5	0.059	0.15	0.046	0.062
29	S1-3C(isialo)-SRIF28	-	0.19	-	0.10	-
31	S1N(disialo)-SRIF28	2.3	-	-	-	-
32	S1C(disialo)・N19C(GlcNAc)-SRIF28	-	0.080	0.039	0.033	0.088
40	C(disialo)-K-SRIF14	-	0.019	0.10	0.059	-
42	S1C(disialo)-SRIF28-amide	1.7	-	-	-	-
45	C(disialo)-PEG2linker-SRIF14	-	0.034	0.15	0.066	0.18
48	2C(disialo)-R-K-SRIF14	-	0.15	0.55	1.1	-
49	3C(disialo)-R-K-SRIF14	-	1.4	3.8	1.6	-
50	S1C(diGlcNAc)-SRIF28	1.2	0.045	0.14	0.050	0.033
51	S1C(diMan)-SRIF28	1.2	0.035	0.11	0.043	0.037
52	N19C(diMan)-SRIF28	-	-	-	0.11	-
53	S1C(GlcNAc)-SRIF28	1.4	0.040	0.14	0.049	0.031
54	N19C(GlcNAc)-SRIF28	-	-	-	0.092	-
55	S1C(trisialo)-SRIF28	4.9	0.11	0.38	0.092	0.096
56	S1C(tetrasialo)-SRIF28	2.8	0.13	0.25	0.081	0.11
59	S1C(disialo(Bn))-SRIF28	1.4	-	-	-	-
60	S1C(disialo(hexadecylamide))-SRIF28	1.3	-	-	-	-
63	S1C(Asn(disialo))-SRIF28	2.6	-	-	0.13	-
65	C(disialo(aminooethylamide))・S1C(disialo)-SRIF28	-	0.039	0.17	0.047	0.034

[0255] 表 3 E において、糖鎖付加体である化合物の、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5 に対するアゴニスト活性の IC_{50} はそれぞれ 1.2 ~ 22 nM、0.019 ~ 1.4 nM、0.039 ~ 3.8 nM、0.033 ~ 1.6 nM、0.031 ~ 1.1 nM であり、SSTR1 ~ SSTR5 の受容体に対してアゴニスト活性を示した。実施例 67-1 及

び実施例 67-2 に示した結果から、これらの化合物は受容体結合親和性を有しており、これらの化合物は受容体に結合することによってアゴニスト活性を発揮することが明らかとなった。

[0256] 実施例 68 ラットを用いた薬物動態試験 1

本発明の糖鎖付加ポリペプチド（糖鎖付加体）が、非糖鎖付加の SRIF 28 と比較して薬物血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）、血中半減期（ $t_{1/2}$ ）、平均滞留時間（MRT）、およびバイオアベイラビリティなど薬物動態プロファイルが改善されていることを確認するために、ラットを用いて静脈内投与および皮下投与による薬物動態解析を行った。

[0257] 68-1 投与液および試薬の調製

糖鎖付加体（S1C（disialo）-SRIF 28）を日本薬局方生理食塩液（大塚製薬工場社製）に溶解して 40 μ M 溶液を調製し、投与液とした。PBS 溶液は、Phosphate buffered saline（シグマ社製 P4417）1 錠を超純水 200 mL に溶解し、調製した。EDTA-PBS は、EDTA-2Na（和光純薬工業社製）を 2 mg/mL となるように PBS で溶解し、調製した。アプロチニン含有 EDTA-PBS 液は、アプロチニン（和光純薬工業社製 010-11834）を 0.142 mg/mL となるように EDTA-PBS で溶解して調製し、採取血液に対する抗凝固剤として用いた。

[0258] 68-2 血漿サンプルの調製

雄性の SD 系ラット（CrI:CD(SD)、日本チャールスリバー株式会社、6 週齢、 $n=3$ 、体重 161.3～239.3 g）の尾静脈もしくは背部皮下に、上記 68-1 で調製した投与液を、非絶食下 1 mL/kg の用量で注射筒および 26 G 注射針（いずれもテルモ社製）を用いて投与した（S1C（disialo）-SRIF 28 として 40 nmol/kg）。投与前、投与後 2 分、5 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間後に、ラット頸部静脈より採血を行った。採取した血液 0.2 mL を、上記 68-1 で調製したアプロチニン含有 EDTA-PBS 液 0.2 mL と速やかに混和し、氷上で 30 分以上放置した。遠心分離（1,870 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10 分

）後、上清を250 μ L採取し、血漿サンプルとした。ブランク血漿として、無処置のラット頸部静脈より採取した血液を同様に処理して得た血漿を用いた。血漿サンプルは測定に用いるまで冷凍保存した。なお、チップおよびチューブはビーエム機器社の低吸着性のものを使用した。

[0259] 68-3 血漿中濃度測定

上記68-2で得られた血漿サンプルにおけるS1C (disialo) -SRIF28の血漿中濃度測定を、フェニックスファーマシューティカルズ社ソマトスタチンEIAキット (Phoenix Pharmaceuticals Inc、EK-060-03) を用いて行った。血漿サンプルを、EIAキット付属アッセイバッファを用いて5倍、20倍、100倍、400倍、1600倍に希釈し、測定サンプルとした。検量線を作成するための標準液は、以下のように調製した。まず、上記68-2で得られたブランク血漿を、EIAキット付属アッセイバッファを用いて血漿サンプルと同様に希釈し、標準液調製用のアッセイバッファとした（例えば、血漿サンプルを100倍希釈する場合は、EIAキット付属アッセイバッファに1/100量のブランク血漿を添加して標準液調製用アッセイバッファとした）。S1C (disialo) -SRIF28をPBS溶液で希釈して100 μ M溶液を調製し、100 μ M溶液から2 μ M溶液を調製した。得られた2 μ M S1C (disialo) -SRIF28溶液を、標準液調製用アッセイバッファを用いて段階希釈し、20 nM、10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.04 nMの標準液を調製した。得られた結果に、希釈率を掛け、さらに抗凝固剤処理としてのアプロチニン含有EDTA-PBS液での希釈率2を掛けることにより、血漿中濃度を算出した。対照として、糖鎖付加体の代わりに非糖鎖付加SRIF28を用いて同様の操作を行った。得られた血漿中のS1C (disialo) -SRIF28濃度推移を図2に示す。

[0260] 68-4 薬物速度論的パラメータの算出

得られたS1C (disialo) -SRIF28濃度推移からモーメント解析手法を用い、AUCを台形法により算出した。また、外挿法により静

脈内投与時の予測初期濃度 (C_0)、さらに $t_{1/2}$ 、MRT、および皮下投与時の実測値より最高血漿中濃度 (C_{max}) を求めた。得られた薬物速度論的パラメータを表4に示す。

[表14]

表 4

	静脈内投与				皮下投与			
	$t_{1/2}$	AUC	MRT	C_0	$t_{1/2}$	AUC	MRT	C_{max}
S1C(disialo)-SRIF28	18.1	5086	20.4	780	26.0	1273	43.8	19.9
SRIF28	0.8	358	2.3	678	1.5	15	3.2	4.4

($t_{1/2}$: min, AUC : min · nM, MRT : min, C_0 : nM, C_{max} : nM)

図2および表4に示した結果から判明するように、S1C(disialo)-SRIF28は、非糖鎖付加SRIF28と比較して $t_{1/2}$ およびMRTが著しく延長し、また、AUCおよび C_{max} の増加が認められた。これらのことは、糖鎖付加体とすることにより血液中の分解活性に対し抵抗性が増したためと考えられる。糖鎖付加体は、非糖鎖付加体に比べ生体中での安定性が向上することが明らかである。また、AUCおよび C_{max} が増加したことの要因は、本発明に係るバイオアベイラビリティの向上のほかに、これら生体中での安定性向上も一因と考えられる。

[0261] 実施例69 ラットを用いた薬物動態試験2

糖鎖付加体としてS1C(disialo)-SRIF28、N5C(disialo)-SRIF28およびS1C(disialo)・N5C(disialo)-SRIF28を用いたこと以外は実施例68と同様にし、薬物動態試験を実施した。対照として、糖鎖付加体の代わりに非糖鎖付加SRIF28を用いた。得られた血漿中の化合物濃度推移を図3に示す。

[0262] 実施例70 ラットを用いた薬物動態試験3

糖鎖付加体としてS1C(disialo)-SRIF28、S1C(disialo)・R13C(disialo)-SRIF28およびS1C(disialo)・N5C(disialo)・A9C(disialo)-SRIF28を用いたこと以外は実施例68と同様にし、薬物動態試

験を実施した。対照として、糖鎖付加体の代わりに非糖鎖付加SRIF28を用いた。得られた血漿中の化合物濃度推移を図4に示す。

[0263] 実施例71 ラットを用いた薬物動態試験4

糖鎖付加体としてS1C(disialo)-SRIF28、N5C(disialo)-SRIF28、A9C(disialo)-SRIF28、S1C(disialo)・N5C(disialo)-SRIF28、N5C(disialo)・A9C(disialo)-SRIF28、およびS1C(disialo)・N5C(disialo)・A9C(disialo)-SRIF28を用いたこと以外は実施例68と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図5に示す。

[0264] 実施例72 ラットを用いた薬物動態試験5

糖鎖付加体としてS1C(disialo)-SRIF28、S1-2C(disialo)-SRIF28、およびS1-3C(disialo)-SRIF28を用いたこと以外は実施例68と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図6に示す。

[0265] 実施例69～72の薬物動態試験において得られた血漿中の化合物濃度推移から、実施例68と同様に各化合物の薬物速度論的パラメータを算出した。また、得られたパラメータを用いて、バイオアベイラビリティを以下の数式により算出した。結果を表5Aに示す。

$$BA(\%) = (AUC_{(sc)} / Dose_{(sc)}) / (AUC_{(iv)} / Dose_{(iv)})$$

$AUC_{(sc)}$: 皮下投与時のAUC (min・nM)

$Dose_{(sc)}$: 皮下投与における投与量 (nmol/kg)

$AUC_{(iv)}$: 静脈内投与時のAUC (min・nM)

$Dose_{(iv)}$: 静脈内投与における投与量 (nmol/kg)

[表15]

表5A

化合物		糖鎖本数	n 数	静脈内投与			皮下投与			BA			
				$t_{1/2}$	AUC	MRT	C_0	$t_{1/2}$	AUC		MRT	$C_{\max}$	
-	SRIF28	なし	6	1.00 ±0.20	472 ±166	2.20 ±0.11	554 ±221	2.94 ±1.59	25.5 ±13.8	4.76 ±1.80	4.47 ±1.21	5	
1	S1C(disialo)-SRIF28	1本	15	16.9 ±1.02	4855 ±1030	18.6 ±1.72	686 ±363	29.8 ±2.68	1773 ±281	47.9 ±2.68	28.9 ±3.23	37	
2	N5C(disialo)-SRIF28	1本	6	20.1 ±1.49	4421 ±1366	22.9 ±2.16	496 ±312	28.1 ±3.72	2392 ±443	51.9 ±5.92	32.4 ±4.87	54	
3	A9C(disialo)-SRIF28	1本	3	19.9 ±0.33	4083 ±515	25.2 ±0.38	547 ±211	30.3 ±2.45	2462 ±64.0	55.6 ±5.81	30.2 ±5.05	60	
		平均値			19.0	4453	22.2	576.3	29.4	2209	51.8	30.5	50
20	S1-2C(disialo)-SRIF28	2本 (密)	3	28.8 ±3.11	7306 ±625	23.3 ±2.63	1382 ±321	40.9 ±12.2	4046 ±248	67.9 ±15.0	46.3 ±9.75	55	
21	S1C(disialo)-N5C(disialo)-SRIF28 (間隔あり)	2本	6	25.8 ±3.41	4099 ±634	24.6 ±5.97	558 ±248	38.4 ±4.93	3344 ±663	67.9 ±8.39	35.5 ±6.38	82	
22	S1C(disialo)-R13C(disialo)-SRIF28 (間隔あり)	2本	3	23.4 ±0.66	4029 ±184	20.6 ±1.32	822 ±106	39.6 ±2.50	3407 ±436	67.7 ±5.39	38.7 ±8.73	85	
23	N5C(disialo)-A9C(disialo)-SRIF28 (間隔あり)	2本	3	32.4 ±1.66	4465 ±833	26.6 ±0.27	664 ±104	42.7 ±9.76	3450 ±784	75.0 ±12.4	32.5 ±7.06	77	
		平均値			27.2	4198	23.9	681.3	40.2	3400	70.2	35.6	81
24	S1-3C(disialo)-SRIF28	3本 (密)	6	38.5 ±2.83	5660 ±1354	24.0 ±3.92	1061 ±209	87.7 ±21.4	3884 ±543	126 ±31.7	27.5 ±10.8	69	
25	S1C(disialo)-N5C(disialo)- A9C(disialo)-SRIF28	3本 (間隔あり)	9	39.8 ±1.87	4402 ±999	25.8 ±2.87	938 ±145	87.4 ±17.1	4015 ±944	132 ±19.8	24.8 ±9.03	91	

($t_{1/2}$: min , AUC : min·nM , MRT : min , C_0 : nM , $C_{\max}$: nM , BA : %)

($t_{1/2}$: min , AUC : min · nM , MRT : min · nM , C_0 : nM , C_{max} : nM , BA : %)

[0266] 表5 Aに示した結果から判明するように、本発明の糖鎖付加体は、修飾糖鎖の本数が増えるにつれてそのバイオアベイラビリティが増加した。すなわ

ち、非糖鎖付加体で5%であったものが、糖鎖を1本付加した糖鎖付加ポリペプチドでは37~60%、平均で50%に、2本の糖鎖を間隔ありで付加したものでは77~85%、平均で81%に、3本の糖鎖を間隔ありで付加したものでは91%に増加していることが判明した。また、糖鎖を付加した間隔が密なものを比較すると、1本付加したものでは37%、2本付加したものでは55%、3本付加したものでは69%に増加していることが判明した（実施例1、20、および24の化合物）。これらの結果により、本発明に係る糖鎖修飾によってバイオアベイラビリティが向上することが証明された。

皮下投与時のバイオアベイラビリティが増加する要因には、様々な薬物動態学的な変動因子が存在する。そのうちの一因として、化合物の血中安定性、あるいは血中への（投与部位からの）移行性が考えられる。表5Aに示したように、皮下投与時の血中移行性を推察するための指標となる、皮下投与時のAUCは、修飾糖鎖本数の増加に伴い増大する（1本：2209 min·nM、2本（間隔あり）：3400 min·nM、3本（間隔あり）：4015 min·nM）ことが認められ、血中移行性の向上がバイオアベイラビリティの増加に寄与していることが推察された。

また、修飾糖鎖の本数が増えるにつれ、静脈内および皮下投与時の $t_{1/2}$ およびMRTの延長作用（たとえば、静脈内投与時の $t_{1/2}$ 、1本：19.0 min、2本（間隔あり）：27.2 min、3本（間隔あり）：39.8 min）が認められ、血液中での安定性が向上していることが推察された。一方で、静脈内投与時のAUCは、修飾糖鎖本数に比した増大とはなっておらず（1本：4453 min·nM、2本（間隔あり）：4198 min·nM、3本（間隔あり）：4402 min·nM）、化合物の修飾糖鎖本数増加による血中安定性増加のみがバイオアベイラビリティの増加に貢献しているものではないと考えられる。

皮下投与時の C_{max} は、非糖鎖付加体に比べ修飾糖鎖本数が2本までは増加した（0本：4.47 nM、1本：30.5 nM、2本（間隔あり）：35

、6 nM) が、3本(間隔あり)(24.8 nM)では逆に減少する結果となった。投与部位(本実施例では皮下投与)からの血中移行を考えた場合、AUCが増加する要因として、速やかな血液中への移行、あるいは緩やかでも持続的な血液中への移行の二つの様式が推測される。前者は、投与部位での分解を避けるメリットがあるが、安定性に問題がなければ、後者の様式がより血中移行性が高いと推察される。バイオアベイラビリティの高い糖鎖を3本修飾したものにおいて C_{max} が減少していたことは、急激ではなく緩やかな、かつ持続的な血中移行性を示した結果であると考えられる。これらのことから、本発明に関わる修飾糖鎖本数の増加は、急激な血漿中濃度の上昇がなく、持続的な血中移行性(一般的には吸収遅延効果とも言ってよい)を示すと考えられる。

[0267] 表5Aに示した結果から判明するように、修飾位置として、間隔をとった場合と密にした場合では、 $t_{1/2}$ およびMRTに著明な差はなかった(たとえば、静脈内投与時の $t_{1/2}$ 、2本(密):28.8 min、2本(間隔あり):27.2 min、3本(密):38.5 min、3本(間隔あり):39.8 min)。

また、AUCに関しては、静脈内投与時には糖鎖修飾が密である方が、AUCが増大した。すなわち、2本糖鎖の場合、間隔をとった化合物21、化合物22、化合物23の4029~4465 min·nMに比べ、密にした化合物20は7306 min·nMであり、3本糖鎖の場合、間隔をとった化合物25の4402 min·nMに比べ、密にした化合物24は5660 min·nMである。

一方で、バイオアベイラビリティは、糖鎖修飾位置に間隔をとった方が密である方に比べ、向上した。すなわち、2本糖鎖の場合、密にした化合物20の55%に比べ、間隔をとった化合物21、化合物22、化合物23は77~85%(平均値81%)であり、3本糖鎖の場合、密にした化合物24の69%に比べ、間隔をとった化合物25は91%である。これらのことから、本発明に関わる糖鎖修飾する位置としては、密に複数修飾するよりも、

間隔をとり複数本修飾する方が、バイオアベイラビリティの向上に寄与するものと考えられる。

[0268] 実施例 7 3 ラットを用いた薬物動態試験 7

糖鎖付加体として、S1C (disialo) -SRIF28、S1C (disialo (amide)) -SRIF28、S1C (disialo (aminoethylamide)) -SRIF28を用いたこと以外は実施例 6 8と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 7 に示す。

[0269] 実施例 7 4 ラットを用いた薬物動態試験 8

糖鎖付加体としてS1C (disialo) -SRIF28、S1C (disialo (Bn)) -SRIF28、S1C (disialo) -D-Trp22-SRIF28を用いたこと以外は実施例 6 8と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 8 に示す。

[0270] 実施例 7 5 ラットを用いた薬物動態試験 9

糖鎖付加体としてS1C (disialo) -SRIF28、R13C (disialo) -SRIF28、K14C (disialo) -SRIF28を用いたこと以外は実施例 6 8と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 9 に示す。

[0271] 実施例 7 6 ラットを用いた薬物動態試験 1 0

糖鎖付加体としてS1C (disialo) -SRIF28、E12C (disialo) -SRIF28、N19C (disialo) -SRIF28、29C (disialo) -SRIF28、S1C (monosialo) -SRIF28、S1C (asialo) -SRIF28を用いたこと以外は実施例 6 8と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 1 0 に示す。

[0272] 実施例 7 7 ラットを用いた薬物動態試験 1 1

糖鎖付加体としてS1C (disialo) -SRIF28、K14C (disialo) -SRIF28、C (disialo) -SRIF14を

用いたこと以外は実施例 68 と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 11 に示す。

[0273] 実施例 78 ラットを用いた薬物動態試験 12

糖鎖付加体として C (disialo) -SRIF14、C (disialo) -C12linker-SRIF14、C (disialo) -PEGlinker-SRIF14 を用いたこと以外は実施例 68 と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 12 に示す。

[0274] 実施例 79 ラットを用いた薬物動態試験 13

糖鎖付加体として SRIF28、S1C (disialo) -SRIF28、S1C (asialo) -SRIF28、S1C (diGlcNAc) -SRIF28、S1C (diMan) -SRIF28、S1C (GlcNAc) -SRIF28 を用いたこと以外は実施例 68 と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 13 に示す。

[0275] 実施例 80 ラットを用いた薬物動態試験 14

糖鎖付加体として S1C (disialo) -SRIF28、S1C (tetrasialo) -SRIF28、S1C (trisialo) -SRIF28、S1C (Asn (disialo)) -SRIF28、S1-2C (disialo) -SRIF28 を用いたこと以外は実施例 68 と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 14 に示す。

[0276] 実施例 81 ラットを用いた薬物動態試験 15

糖鎖付加体として SRIF28、S1C (disialo) -SRIF28、S1-2C (disialo) -SRIF28、S1-3C (disialo) -SRIF28、S1-4C (disialo) -SRIF28、を用いたこと以外は実施例 68 と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図 15 に示す。

[0277] 実施例 82 ラットを用いた薬物動態試験 16

糖鎖付加体としてSRIF14、C(disialo)-SRIF14、C(disialo)-K-SRIF14、C(disialo)-R-K-SRIF14、2C(disialo)-R-K-SRIF14、3C(disialo)-R-K-SRIF14、を用いたこと以外は実施例68と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図16に示す。

[0278] 実施例83 ラットを用いた薬物動態試験17

糖鎖付加体としてS1C(asialo)-SRIF28、S1-2C(asialo)-SRIF28、S1-3C(asialo)-SRIF28を用いたこと以外は実施例68と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図17に示す。

[0279] 実施例84 ラットを用いた薬物動態試験18

糖鎖付加体としてS1C(disialo)-SRIF28、S1-2C(disialo)-SRIF28、S1-2C(asialo)-SRIF28、C(disialo(aminoethylamide))・S1C(disialo)-SRIF28、S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28、S1-2C(disialo(amide))-SRIF28を用いたこと以外は実施例68と同様にして、薬物動態試験を実施した。得られた血漿中の化合物濃度推移を図18に示す。

[0280] 実施例73～84の薬物動態試験7～18において得られた血漿中の化合物濃度推移から、実施例68と同様にして、各化合物の薬物速度論的パラメータを算出した。得られた薬物速度論的パラメータを表5B～表5Fに示す。

[表16]

表5B

実施例		静脈内投与				皮下投与				BA
		T _{1/2}	AUC	MRT	C ₀	T _{1/2}	AUC	MRT	C _{max}	
-	SRIF14	0.500	119	2.00	819	2.30	8	4.30	1.80	7
-	SRIF28	1.32	467	2.46	518	2.38	22	4.18	4.65	5
1	S1C(disialo)-SRIF28	17.7	5190	19.1	633	31.2	1946	49.2	30.1	38
4	E12C(disialo)-SRIF28	19.5	10521	27.5	1086	38.2	2891	57.5	34.7	27
5	R13C(disialo)-SRIF28	20.3	4926	22.8	481	35.4	5528	55.9	65.9	78
6	K14C(disialo)-SRIF28	20.4	6278	20.0	884	35.1	3945	55.1	57.5	62
10	N19C(disialo)-SRIF28	18.8	3854	21.5	407	37.9	2624	55.3	41.7	56
13	29C(disialo)-SRIF28	23.7	3736	25.3	359	39.3	2176	57.6	29.4	51
15	S1C(disialo)-D-Trp-SRIF28	18.3	4924	20.6	588	31.0	2220	51.9	34.0	45
18	C(disialo)-R-K-SRIF14	18.9	6571	22.5	429	28.4	1996	45.2	32.5	30
40	C(disialo)-K-SRIF14	18.8	5277	19.4	646	26.4	2446	43.7	40.5	46
17	C(disialo)-SRIF14	16.5	5614	18.3	725	27.2	3641	40.0	73.6	66
19	C(disialo)-C12linker-SRIF14	11.0	1686	7.60	500	14.4	345	22.0	13.4	21
43	C(disialo)-PEGlinker-SRIF14	16.4	3538	18.8	412	20.7	2725	39.2	47.8	77

表5Bに示した結果から判明するように、S1C(disialo)-SRIF28、E12C(disialo)-SRIF28、R13C(disialo)-SRIF28、K14C(disialo)-SRIF28、N19C(disialo)-SRIF28、29C(disialo)-SRIF28、S1C(disialo)-D-Trp22-SRIF28は、静脈内投与において非糖鎖付加体のSRIF28に比較して、 $t_{1/2}$ が13～18倍延長し、AUCは8～23倍増加した。また、非糖鎖付加体のSRIF14に比較して、C(disialo)-SRIF14、C(disialo)-K-SRIF14、C(disialo)-R-K-SRIF14は、静脈内投与において $t_{1/2}$ が33～38倍延長し、AUCは44～55倍増加した。また、C(disialo)-C12linker-SRIF14、C(disialo)-PEGlinker-SRIF14は、非糖鎖付加体のSRIF14に比較して、 $t_{1/2}$ が22～33倍延長し、AUCは14～30倍増加した。すなわち、実施例68の場合と同様に、糖鎖修飾を行うことで血液中での安定性が向上した結果と考えられた。

[表17]

表5C

実施例		静脈内投与				皮下投与				BA
		T _{1/2}	AUC	MRT	C ₀	T _{1/2}	AUC	MRT	C _{max}	
-	SRIF28	1.32	467	2.46	518	2.38	22	4.18	4.65	5
53	S1C(GlcNAc)-SRIF28	1.80	690	3.00	666	5.90	63	7.90	7.10	9
51	S1C(diMan)-SRIF28	5.50	1445	5.20	423	9.10	124	13.9	7.30	9
50	S1C(diGlcNAc)-SRIF28	10.5	3588	12.3	495	16.5	445	25.7	13.2	12
27	S1C(asialo)-SRIF28	13.4	4602	12.5	749	19.7	710	29.0	17.2	16
26	S1C(monosialo) -SRIF28	15.9	6618	15.3	1061	24.5	995	37.8	19.4	17
1	S1C(disialo)-SRIF28	17.7	5190	19.1	633	31.2	1946	49.2	30.1	38
55	S1C(trisialo)-SRIF28	21.1	4428	22.0	423	36.6	1979	56.9	24.9	45
56	S1C(tetrasialo)-SRIF28	20.9	4851	23.0	471	40.5	2624	59.4	32.2	54
63	S1C(Asn(disialo))-SRIF28	27.9	6488	35.9	365	34.0	2935	55.3	33.9	45
57	S1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28	18.6	3473	12.1	746	27.1	284	33.2	9.60	8
58	S1C(disialo(amide))-SRIF28	18.0	5814	12.6	1048	30.0	961	42.5	19.1	17
59	S1C(disialo(Bn))-SRIF28	14.4	3708	14.5	526	45.5	1047	52.6	18.7	28

[0281] 表5Cに示した結果から判明するように、修飾する糖鎖の大きさをGlcNAc（単糖）、diMan（5糖）、diGlcNAc（7糖）、asialo（9糖）、monosialo（10糖）、disialo（11糖）、trisialo（14糖）、tetrasialo（17糖）へと変更していった場合、修飾する糖鎖の大きさ依存的に皮下投与時の $t_{1/2}$ 、AUC、バイオアベイラビリティがそれぞれ2～17倍、3～120倍、2～11倍増加した。このことから、修飾する糖鎖の大きさを変更することによって、血中安定性を向上させるだけでなく、その増加率に変化を持たせられることが明らかとなった。また、これらの糖鎖のうちジマンノース糖鎖やシアロ糖鎖などは、特定のタンパク質と相互作用することが知られているため、特定のタンパク質あるいは特定のタンパク質を有する臓器や細胞へのターゲティングにも利用可能と考えられる。また、非還元末端のシアル酸の修飾として、たとえばカルボキシ基へのaminoethylamide、amide、Bnなどの導入により電荷を変更させた糖鎖を付加した、S1C（disialo（amide））-SRIF28、S1C（disialo（aminoethylamide））-SRIF28、S1C（disialo（Bn））-SRIF28は静脈内投与において非糖鎖付加体と比較して、 $t_{1/2}$ が11～14倍延長し、AUCは7～12倍増加し、血中安定性が向上した。これらのことは、シアル酸のカルボキシ基が血中滞留性に大きな影響を与え、カルボキシ基の負電荷の消失（disialo（Bn）、disialo（amide））、あるいは正電荷への変換（disialo（aminoethylamide））により、血中クリアランスや体内分布を制御できる可能性（利用法）を示している。

[表18]

表5D

実施例		静脈内投与				皮下投与				BA
		T _{1/2}	AUC	MRT	C ₀	T _{1/2}	AUC	MRT	C _{max}	
-	SRIF14	0.500	119	2.00	819	2.30	8	4.30	1.80	7
-	SRIF28	1.32	467	2.46	518	2.38	22	4.18	4.65	5
18	C(disialo)-R-K-SRIF14	18.9	6571	22.5	429	28.4	1996	45.2	32.5	30
48	2C(disialo)R-K-SRIF14	31.7	5041	24.1	704	47.7	3310	73.4	36.7	66
49	3C(disialo)R-K-SRIF14	35.7	4288	22.2	1013	70.6	3515	112	23.5	82
1	S1C(disialo)-SRIF28	17.7	5190	19.1	633	31.2	1946	49.2	30.1	38
20	S1-2C(disialo)-SRIF28	28.2	5804	23.0	950	40.8	3091	65.3	34.6	53
24	S1-3C(disialo)-SRIF28	39.5	5834	23.8	1083	79.3	4174	115	30.7	72
66	S1-4C(disialo)-SRIF28	63.5	7070	25.2	1007	119	4554	172	22.0	64

[0282] 表5Dに示した結果から判明するように、SRIF14にdisialo糖鎖を1本修飾したC(disialo)-R-K-SRIF14、2本修飾した2C(disialo)-R-K-SRIF14、3本修飾した3C(disialo)-R-K-SRIF14は静脈内投与において非糖鎖付加体に比較して、 $t_{1/2}$ がそれぞれ38、63、71倍延長し、またAUCはそれぞれ55、42、36倍増加した。同様に、SRIF28にdisialo糖鎖を1本修飾したS1C(disialo)-SRIF28、2本修飾したS1-2C(disialo)-SRIF28、3本修飾したS1-3C(disialo)-SRIF28、4本修飾したS1-4C(disialo)-SRIF28は静脈内投与において非糖鎖付加体に比較して、 $t_{1/2}$ がそれぞれ13、21、30、48倍延長し、またAUCはそれぞれ11、12、12、15倍増加した。SRIF14およびSRIF28どちらの場合においても、修飾するdisialo糖鎖の本数に従い、血中安定性が向上することが明らかとなった。

[表19]

表5E

実施例		静脈内投与				皮下投与				BA
		T _{1/2}	AUC	MRT	C ₀	T _{1/2}	AUC	MRT	C _{max}	
-	SRIF28	1.32	467	2.46	518	2.38	22	4.18	4.65	5
27	S1C(asialo)-SRIF28	13.4	4602	12.5	749	19.7	710	29.0	17.2	16
28	S1-2C(asialo)-SRIF28	8.30	2664	9.60	741	19.2	1049	36.4	19.8	39
29	S1-3C(asialo)-SRIF28	6.60	2733	6.50	1147	26.4	885	42.1	15.0	32

[0283] 表5Eに示した結果から判明するように、SRIF28にasialo糖

鎖を1本修飾したS1C (a s i a l o) - S R I F 2 8、2本修飾したS1-2C (a s i a l o) - S R I F 2 8、3本修飾したS1-3C (a s i a l o) - S R I F 2 8は静脈内投与において非糖鎖付加体に比較して、 $t_{1/2}$ がそれぞれ10、6、5倍延長し、またAUCはそれぞれ10、6、6倍増加した。修飾する糖鎖がa s i a l o糖鎖の場合においても、血中安定性が向上することが明らかとなった。

[表20]

表5F

実施例		静脈内投与				皮下投与				BA
		T _{1/2}	AUC	MRT	C ₀	T _{1/2}	AUC	MRT	C _{max}	
-	SRIF28	1.32	467	2.46	518	2.38	22	4.18	4.65	5
1	S1C(disialo)-SRIF28	17.7	5190	19.1	633	31.2	1946	49.2	30.1	38
20	S1-2C(disialo)-SRIF28	28.2	5804	23.0	950	40.8	3091	65.3	34.6	53
28	S1-2C(asialo)-SRIF28	8.30	2664	9.60	741	19.2	1049	36.4	19.8	39
61	S1-2C(disialo(amide))-SRIF28	23.8	5268	20.5	737	33.1	1297	55.8	16.3	25
62	S1-2C(disialo(Bn))-SRIF28	25.6	5525	20.7	807	33.9	1843	59.4	21.5	33
65	C(disialo(aminoethylamide))•S1C(disialo)-SRIF28	22.5	3742	20.5	518	42.3	1289	64.7	16.2	34

[0284] 表5 Fに示した結果から判明するように、S1-2C (disialo) -SRIF28、S1-2C (asialo) -SRIF28、C (disialo (aminoethylamide)) · S1C (disialo) -SRIF28、S1-2C (disialo (Bn)) -SRIF28、S1-2C (disialo (amide)) -SRIF28は静脈内投与において、非糖鎖付加体に比較して、 $t_{1/2}$ がそれぞれ6～21倍延長し、AUCはそれぞれ6～12倍増加した。すなわち、SRIF28に糖鎖を修飾することによって、血中安定性が向上した。また、シアル酸糖鎖本数の増加に従い、静脈内投与および皮下投与とも $t_{1/2}$ 、AUC、 C_{max} 、BAが増加した。一方で、シアル酸のカルボキシ基の負電荷を消失した場合 (2C (disialo (Bn))、2C (disialo (amide)))、あるいは正電荷を隣接に追加した場合 (C (disialo (aminoethylamide)) · S1C (disialo)) には皮下投与時の $t_{1/2}$ が延長したにも関わらず、AUCや C_{max} は増加しなかった。シアル酸のカルボキシ基が血中滞留性あるいは血中移行に大きな影響を与えることから、糖鎖末端の電荷への変換により、血中クリアランスや体内分布を制御できる可能性 (利用法) を示している。

[0285] 実施例85 ラット血漿を用いた血漿中安定性試験

85-1 処置液、試薬およびラット血漿の調製

糖鎖付加体および非糖鎖付加SRIF28をPBS溶液に溶解して2 μ M溶液を調製し、処置液とした。10% TFAは、トリフルオロ酢酸 (和光純薬工業社製 208-02746) を10 v/v%となるように水で溶解し、調製した。ラット血漿は、Wistar系ラット (CrLj:Wistar、雄性、日本チャールスリバー株式会社、7週齢) からヘパリン加血漿 (ヘパリン: 日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液 (持田製薬)) として調製した。

[0286] 85-2 血漿添加サンプルの調製

ラット血漿0.27 mL ($n=3$) に対し、上記85-1で調製した糖鎖付加体処置液0.03 mLを速やかに混和して血漿添加サンプルとし、37

℃恒温槽で保温した。混和後、0分と、1～24時間までに経時的に血漿添加サンプル0.04 mLを採取し、10% TFA 0.01 mLと速やかに混和した。遠心分離（20,000 × g、4℃、10分）後、上清を0.04 mL採取し、血漿中安定性測定サンプルとした。サンプリング時間は0時間、1時間、2時間、4時間、あるいは0時間、4時間、8時間、24時間とした。ブランク血漿として、処置液としてPBS溶液を用いたこと以外は同様に処理して得た血漿を用いた。血漿サンプルは測定に用いるまで冷凍保存した。実験回ごとに、陽性対照として非糖鎖付加SRIF 28を用いた。

[0287] 85-3 サンプル中濃度測定および血漿中安定性インデックスの算出

実施例68-3の血漿中濃度測定と同様の方法で、上記85-2で得られた血漿中安定性測定サンプル中に残存する糖鎖付加体の濃度を測定した。混和後0分の糖鎖付加体濃度を100%とし、時間経過後の残存率を百分率（%）で表し、以下の指数式（1）の消失速度定数から算出式（2）を用いて、半減期を算出した。その後、実験回ごとの非糖鎖付加SRIF 28の半減期を1として、糖鎖付加体の血漿中安定性インデックス（PS index）を算出した。結果を表6および図19に示す。また、血漿中安定性インデックスが20以上のものについては、>20として表記した。なお、図19では、血漿中安定性インデックスが20を超えるものであっても、20を上限として表記している。

$$\text{残存率 (\%)} = 100 \cdot e^{-(k \cdot t)} \quad \dots (1)$$

e : 自然対数の底

k : 消失速度定数

t : 時間 (hour)

$$\text{半減期 (hour)} = 0.693 / k \quad \dots (2)$$

[表21]

表 6

実施例		PS index
1	S1C(disialo)-SRIF28	4.5
2	N5C(disialo)-SRIF28	4.7
3	A9C(disialo)-SRIF28	6.7
4	E12C(disialo)-SRIF28	6.2
5	R13C(disialo)-SRIF28	15.9
6	K14C(disialo)-SRIF28	19.1
10	N19C(disialo)-SRIF28	>20
13	29C(disialo)-SRIF28	>20
14	30C(disialo)-SRIF28	16.8
15	S1C(disialo)-D-Trp-SRIF28	12.3
16	A9C(disialo)-D-Trp-SRIF28	17.2
21	S1C(disialo)・N5C(disialo)-SRIF28	17.8
22	S1C(disialo)・R13C(disialo)-SRIF28	>20
24	S1-3C(disialo)-SRIF28	>20
25	S1C(disialo)・N5C(disialo)・A9C(disialo)-SRIF28	>20
26	S1C(monosialo)-SRIF28	3.5
27	S1C(asialo)-SRIF28	2.6
-	Octreotide	>20
-	SRIF28	1

[0288] 図19に示した結果から判明するように、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、SRIF28に比べ、血漿中安定性が増加した。すなわち、1位、5位、9位、12位に1本糖鎖を付加したもの（実施例1、2、3、4の化合物）では、SRIF28の4.5倍～6.7倍であり、13位に糖鎖を付加したもので15.9倍（実施例5の化合物）、14位に糖鎖を付加したもので19.1倍（実施例6の化合物）、30位に糖鎖を付加したもので16.8倍（実施例14の化合物）であった。また、19位、C末端側にさらに糖鎖付加アミノ酸を1つ付加したものでは20倍以上（実施例10、13の化合物）であった。糖鎖を付加する位置は、1位からC末側へ向かうにつれて、血漿中安定性が増すことが示された。

[0289] 実施例 86 ラットを用いたGH産生抑制試験

本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、実施例 67 で示すように、SSTR の各受容体に対する親和性を有していた。一方、各SSTRに対する親和性が減衰したものも見られたが、このような場合においても実施例 68～85 で示した血中半減期の延長やバイオアベイラビリティの増大などにより、生体内で受容体に対し薬理的に有効に作用を示すことを証明するために、ラットを用いたインビボ試験として、成長ホルモン（GH）産生に対する本発明の糖鎖付加ポリペプチドの投与効果を評価する試験を実施した。血液中へのGH産生量の増加は、GHのパラクライン的作用を介し、各種臓器に対し細胞の増殖や分化系、生合成系の活性化あるいは抑制を引き起こし、生体反応に影響を及ぼすと考えられる。視床下部から放出されるソマトスタチンは下垂体前葉からの血中へのGH分泌を抑制する。本実験系は、血中GH産生量を指標に、糖鎖付加体のSSTRに対する薬理作用、および、糖鎖付加体の投与後の血中残存を評価できる試験系として実施した。

[0290] 86-1 投与液および試薬の調製

糖鎖付加体としてS1C(dissialo)-SRIF28、N19C(dissialo)-SRIF28および29C(dissialo)-SRIF28を用い、日本薬局方生理食塩液（大塚製薬工場社製）に溶解して1～100 μ M溶液を調製し、投与液とした。また、GH遊離促進剤として、GRF（GH放出ホルモン、Growth hormone releasing factor）を使用した。GRFは、GRF注射液（注射用GRF住友50、Lot. 2006C、大日本住友製薬社製）を注射用水（Lot. 09H18C、扶桑薬品工業社製）1mLで溶解後、2 μ g/mLとなるように生理食塩液で25倍希釈し、調製した。採血の際に、抗凝固剤として用いるヘパリンは、日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液（Lot. B084、持田製薬社製）を原液のまま、使用した。

[0291] 86-2 血漿サンプルの調製

雄性のSD系ラット（Crl:CD(SD)、日本チャールスリバー株式会社、6週齢、n=3、体重145.2～163.9g）の背部皮下に、上記86-1

で調製した投与液を、非絶食下 $1 \text{ mL} / \text{kg}$ の用量で注射筒および 26 G 注射針（いずれもテルモ社製）を用いて投与した。対照群として、糖鎖付加ポリペプチドを含まない生理食塩液を、同様に投与した（ベヒクル群）。その後、すなわち糖鎖付加体投与後 $5 \sim 6$ 分の間に、全身麻酔剤としてペントバルビツール酸ナトリウム（ソムノペンチル、Lot. 0608101、共立製薬社製）を $50 \text{ mg} / \text{kg}$ となるように、注射筒および注射針を用い腹腔内に投与した。糖鎖付加体投与後 1 時間に、すなわち麻酔下で 50 分以上経過した状態で、 GH 遊離促進剤として GRF を尾静脈に $1 \text{ mL} / \text{kg}$ の用量で注射筒および注射針を用いて投与した。 GRF 投与後 5 分に、ラット頸部静脈よりヘパリンを入れた注射筒および注射針を用い、採血を行った。採取した血液 0.4 mL を氷上で 20 分以上放置した後、遠心分離（ $1,870 \times g$ 、 4°C 、 10 分）し、上清を $100 \mu\text{L}$ 採取し、血漿サンプルとした。ブランク血漿として、無処置のラット頸部静脈より採取した血液を同様に処理して得た血漿を用いた。血漿サンプルは測定に用いるまで冷凍保存した。

[0292] 86-3 血漿中 GH 濃度の測定

上記86-2で得られた血漿サンプルにおける GH 濃度測定を、 SPI-Bio 社ラット $\text{Growth Hormone EIA}$ キット（ SPI-Bio 、 A05104 ）を用いて行った。血漿サンプルを、 EIA キット付属アッセイバッファを用いて 20 倍、 100 倍、 500 倍に希釈し、測定サンプルとした。検量線を作成するための標準液は、添付の説明書に従い蒸留水で $40 \text{ ng} / \text{mL}$ 溶液を調製した後、アッセイバッファを用いて段階希釈し、 $20 \text{ ng} / \text{mL}$ 、 $10 \text{ ng} / \text{mL}$ 、 $5 \text{ ng} / \text{mL}$ 、 $2.5 \text{ ng} / \text{mL}$ 、 $1.25 \text{ ng} / \text{mL}$ 、 $0.63 \text{ ng} / \text{mL}$ 、 $0.31 \text{ ng} / \text{mL}$ を調製した。得られた結果に、希釈率を掛けることにより、 GH 濃度を算出した。得られた血漿サンプル中 GH 濃度を表7に示す。

[表22]

表 7

実施例		投与量	GH (ng/mL)
1	S1C(disialo)-SRIF28	1nmol/kg	490
1	S1C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	17.1
10	N19C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	563
10	N19C(disialo)-SRIF28	100nmol/kg	1.5
13	29C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	497
13	29C(disialo)-SRIF28	100nmol/kg	88.5
21	S1C(disialo)-N5C(disialo)-SRIF28	1nmol/kg	776
21	S1C(disialo)-N5C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	181
25	S1C(disialo)-N5C(disialo)-A9C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	833
25	S1C(disialo)-N5C(disialo)-A9C(disialo)-SRIF28	100nmol/kg	151
-	vehicle	-	861

[0293] 表 7 に示した結果から判明するように、本発明の糖鎖付加体は、ラットにおける GH 産生を抑制した。実施例 1、実施例 10、実施例 13 の糖鎖付加体は、実施例 67-1 の手法により測定した場合、各受容体に対する K_i 値と糖鎖を有さない SRIF14 の K_i 値との比が 100 : 1 ~ 1.3 : 1 の範囲内と示されている。また、実施例 1 の糖鎖付加体は、実施例 68 ~ 72 の手法により測定した場合、血中半減期が 10 倍以上増大していることが示されている。本実施例からは、糖鎖付加体が生体内でも薬理学的な作用を有効に発揮することが示された。

また、本発明の糖鎖付加体は、GRF 投与の 1 時間前に投与した場合であっても、GH 産生抑制作用を有していた。

また、実施例 1 と、実施例 10 および実施例 13 の糖鎖付加体では、ラット GH 産生能に対する有効な投与量が 10 倍程度異なることが示された。このことは、実施例 67-1 の手法により測定した場合、それらの受容体親和性が K_i 値で 10 倍程度の差であることと類似する。糖鎖付加体の親和性が多少減衰した場合においても、薬理学的な活性を有することが示された。

[0294] 実施例 87 ラットを用いた GH 産生抑制試験 2

実施例 86-1 ~ 86-3 と同様にして、次に示す糖鎖付加体である化合物

のラットGH産生抑制試験を実施した。糖鎖付加体としてS1C (disialo) -SRIF28、N5C (disialo) -SRIF28、A9C (disialo) -SRIF28、E12C (disialo) -SRIF28、R13C (disialo) -SRIF28、K14C (disialo) -SRIF28、S1C (disialo) -D-Trp22-SRIF28、S1C (disialo (Bn)) -SRIF28、S1C (disialo (amide)) -SRIF28、S1C (disialo (aminoethylamide)) -SRIF28、S1C (monosialo) -SRIF28、S1C (asialo) -SRIF28、C (disialo) -R-K-SRIF14、S1-2C (asialo) -SRIF28、S1C (disialo) · N5C (disialo) -SRIF28およびS1C (disialo) · N5C (disialo) · A9C (disialo) -SRIF28を用いた。得られた血漿サンプル中GH濃度を表8に示す。

[表23]

表8

実施例		投与量	GH (ng/mL)	実施回数
1	S1C(disialo)-SRIF28	1nmol/kg	787	4
		3nmol/kg	182	3
		10nmol/kg	15	5
		30nmol/kg	8	1
		100nmol/kg	7	2
2	N5C(disialo)-SRIF28	1nmol/kg	969	1
		10nmol/kg	12	1
3	A9C(disialo)-SRIF28	1nmol/kg	577	1
		10nmol/kg	20	1
4	E12C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	10	1
5	R13C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	136	1
6	K14C(disialo)-SRIF28	10nmol/kg	55	1
15	S1C(disialo)-D-Trp22-SRIF28	0.3nmol/kg	986	3
		1nmol/kg	335	3
		3nmol/kg	50	1
		10nmol/kg	6	2
		30nmol/kg	2	1
18	C(disialo)-R-K-SRIF14	1nmol/kg	912	4
		3nmol/kg	291	4
		10nmol/kg	30	4
		30nmol/kg	12	1
21	S1C(disialo)-N5C(disialo)-SRIF28	1nmol/kg	776	1
		10nmol/kg	181	1
25	S1C(disialo)-N5C(disialo)-A9C(disialo)-SRIF28	100nmol/kg	151	1
26	S1C(monosialo)-SRIF28	10nmol/kg	47	1
27	S1C(asialo)-SRIF28	1nmol/kg	879	4
		3nmol/kg	515	4
		10nmol/kg	146	4
28	S1-2C(asialo)-SRIF28	3nmol/kg	997	3
		10nmol/kg	175	3
57	S1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28	10nmol/kg	314	1
58	S1C(disialo(amide))-SRIF28	10nmol/kg	14	1
59	S1C(disialo(Bn))-SRIF28	10nmol/kg	49	1
-	vehicle	-	1012	19

[0295] 表8に示した結果から判明するように、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、ラットにおけるGH産生を抑制した。S1C(disialo)-SRIF28は本試験系において、1nmol/kgからGH産生を抑制し、3～10nmol/kgで82～99%のGH産生抑制効果を示した。これは実

施例67-1及び67-2および実施例68～85で示したように、SSTR1～SSTR5に対して親和性を持ち、血中滞留性が向上したためであると考えられる。

実施例67-1及び67-2において、S1C(disialo)-SRIF28と同等の親和性を示すN5C(disialo)-SRIF28、A9C(disialo)-SRIF28、E12C(disialo)-SRIF28、S1C(disialo)-D-Trp-SRIF28、S1C(disialo(Bn))-SRIF28およびC(disialo)-R-K-SRIF14は、10nmol/kgで95～99%のGH産生抑制効果を示し、S1C(disialo)-SRIF28と同等の効果を示した。

[0296] 実施例68～85の手法に示す結果から、S1C(monosialo)-SRIF28、S1C(asialo)-SRIF28、S1-2C(asialo)-SRIF28およびS1C(disialo(amide))-SRIF28は、皮下投与時のAUCがS1C(disialo)-SRIF28の3分の1から2分の1であり、またS1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28は7分の1であった。一方、実施例67-1及び67-2に示す手法によって、これらはいずれもS1C(disialo)-SRIF28よりも高い親和性を示した。そのため本実験系において、S1C(monosialo)-SRIF28、S1C(asialo)-SRIF28、S1-2C(asialo)-SRIF28、S1C(disialo(aminoethylamide))-SRIF28およびS1C(disialo(amide))-SRIF28は10nmol/kgで70～99%のGH産生を抑制し、S1C(disialo)-SRIF28と同等の効果を示したと考えられる。

[0297] 実施例67-1及び67-2に示す手法によって、R13C(disialo)-SRIF28、K14C(disialo)-SRIF28、S1C(disialo)・N5C(disialo)-SRIF28およびS

1C (disialo)・N5C (disialo)・A9C (disialo)－SRIF28は、S1C (disialo)－SRIF28よりも低い親和性を示した。一方、実施例68～85の手法に示す結果から、皮下投与時のAUCが、S1C (disialo)－SRIF28の1.8倍から2.8倍と向上した化合物である。本実験系において、R13C (disialo)－SRIF28、K14C (disialo)－SRIF28、S1C (disialo)・N5C (disialo)－SRIF28およびS1C (disialo)・N5C (disialo)・A9C (disialo)－SRIF28は、10もしくは100nmol/kg投与によってGH産生抑制活性を示した。これらの結果は、受容体親和性が低下した場合においても血中安定性が増大することで、ソマトスタチンの活性を補償または増大させることができたことを示す。

[0298] 実施例88 消化管閉塞モデルでの薬効試験

本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、実施例86および実施例87で示すように、ラット生体内においてもアゴニストとして有効に作用することを証明した。次に、疾患モデルにおいても有効性を示すことを証明するために、ラット消化管閉塞モデルでの評価を実施した。イレウス等の消化管閉塞では、消化管の組織障害、また水や電解質などの吸収能低下により、腹部膨満感・嘔吐・腹痛などといった消化器症状を示す。その病態は、消化管内容物の通過障害や、消化液や生理活性物質の消化管内への放出によって引き起こされることが知られている。ソマトスタチンは、消化器系に発現するSSTRを介して各種消化液の分泌抑制、あるいは水・電解質の吸収促進により消化管内容物を減少させるといった作用を示し、症状改善に有効とされる。本実験系は、腸管閉塞後の空腸における腸液重量の変化を指標として、腸液の吸収促進あるいは分泌抑制作用を評価する試験系として実施した。また、組織障害時の指標として逸脱酵素であるアミラーゼ（膵臓）、乳酸脱水素酵素（LDH、肝臓）およびクレアチンホスホキナーゼ（CPK、骨格筋、心筋等）の血液パラメータを測定した。

[0299] 実施例 88-1 消化管閉塞モデルの作成

本試験は三菱化学メディエンス社に委託し、実施した。雄性のSD系ラット (CrI:CD (SD) 日本チャールスリバー株式会社、8週齢、 $n=5$ 以上、体重 $25.1 \pm 1.1 \sim 27.8$ g) を12時間以上絶食させた。2%イソフルアン及び笑気：酸素 = 7 : 3 吸入にて麻酔導入し、手術中はこれを維持した。腹部を正中切開し、十二指腸提筋から約 10 cm のところの空腸を縫合糸に結紮した。その後、切開部を速やかに縫合し、化合物投与まで絶食とした。偽処置群は、空腸の結紮を行わず、腹部を正中切開した後に切開部を縫合する処置を行った。

[0300] 実施例 88-2 化合物の調製および投与

糖鎖付加体として $\text{S1C (disialo) -SRIF28, C (disialo) -R-K-SRIF14, S1-2C (asialo) -SRIF28}$ を用い、日本薬局方生理食塩液 (大塚製薬工場社製) に溶解して $40 \mu\text{M}$ 溶液を調製し、投与液とした。消化管閉塞手術から18時間後、 1 mL/kg の用量で注射筒および 25 G 注射針 (いずれもテルモ社製) を用いて頸背部に皮下投与した。Vehicle 群として、糖鎖付加ポリペプチドを含まない生理食塩液を、同様に投与した。また、対照としてオクトレオチドを投与した。

[0301] 実施例 88-3 腸液重量の測定

化合物投与1時間後に、吸入麻酔下にて腹部を正中切開し、腹部大静脈から血液を 1.5 mL 採取した。そして、十二指腸提筋側の結紮空腸を摘出し、空腸表面の液体および血液をペーパータオルで除去し、空腸に付いた神経・血管・脂肪を切除した後に、長さ 6 cm となるように切り取り、湿重量を測定した。その後、 36°C で24時間乾燥させ、乾重量を測定した。腸液重量 (mg) は、湿重量 - 乾重量で算出した。得られた空腸の腸液重量を表9に示す。

[表24]

表9

	腸液重量(mg)
偽処置	285 ± 27
vehicle	481 ± 31
octreotide	693 ± 48
S1C(disialo)-SRIF28	630 ± 83
C(disialo)-R-K-SRIF14	584 ± 95
S1-2C(asialo)-SRIF28	566 ± 34

[0302] 表9から明らかなように、vehicleは、偽処置と比較して腸液重量が有意に増加し、結紮による消化管閉塞に伴い腸液の分泌亢進が生じていることが認められた。ソマトスタチンやオクトレオチドは、このような消化管閉塞モデルにおいて、腸液の腸管内への分泌抑制と腸組織側への腸液吸収促進作用を有することが示されており（Scand J Gastroenterol. 1995 May;30(5):464-9.）、本実験系においてもオクトレオチドはその作用が確認された。S1C(disialo)-SRIF28、C(disialo)-R-K-SRIF14、S1-2C(asialo)-SRIF28ではいずれもvehicleと比較して、腸液重量の増加が認められ、本発明における糖鎖付加体においても、腸液の分泌抑制、水・電解質の吸収促進といった有効性を示すことが明らかとなった。また、S1-2C(asialo)-SRIF28はS1C(disialo)-SRIF28と比較して、実施例83および84において皮下投与時のAUCが2分の1となっていたが、実施例67-1においてS1C(disialo)-SRIF28よりもSSTR1～SSTR5に対する親和性が1.7～2.9倍ほど高いことが明らかとなっている。このことは、血漿中濃度が低い場合であっても受容体親和性の向上により本モデルにおける薬効が類似していることの理由と考えられる。また同様に、C(disialo)-R-K-SRIF14はS1C(disialo)-SRIF28の皮下投与時のAUCを比較すると少し低い

が、受容体親和性が0.7～2.4倍ほど高いため、薬効が類似していることの理由と考えられる。

[0303] 実施例 88-4 血液パラメータの測定

実施例 88-3 で採取した血液を用いて、アミラーゼ濃度 (IU/L)、LDH 濃度 (IU/L) および CPK 濃度 (IU/L) を自動分析装置 7170 (日立製作所) を用いて測定した。測定方法はそれぞれ、BG5B 法、UV-rate 法および JSCC 法を用いた。得られた結果を表 10 に示す。

[表25]

表10

	アミラーゼ (IU/L)	LDH (IU/L)	CPK (IU/L)
偽処置	669 ± 164	168 ± 82	353 ± 68
vehicle	1672 ± 743	341 ± 68	377 ± 57
octreotide	1732 ± 774	269 ± 141	472 ± 215
S1C(disialo)-SRIF28	1164 ± 224	338 ± 97	455 ± 202
C(disialo)-R-K-SRIF14	985 ± 238	228 ± 155	415 ± 137
S1-2C(asialo)-SRIF28	1594 ± 573	318 ± 44	728 ± 665

[0304] 表 10 から明らかなように、vehicle は偽処置と比較してアミラーゼ活性、LDH 活性が増加しており、消化管閉塞に伴い消化器系の組織障害が生じていることが推察された。S1C(disialo)-SRIF28 および C(disialo)-R-K-SRIF14 では、vehicle と比較し、アミラーゼ活性は低値であった。一方、オクトレオチドでは、アミラーゼ活性は vehicle と同等であった。実施例 67-1 及び 67-2 から明らかなように、S1C(disialo)-SRIF28、C(disialo)-R-K-SRIF14、および S1-2C(sialo)-SRIF28 は SSTR1～SSTR5 までの全ての受容体に結合親和性を有するのに対し、オクトレオチドは SSTR2、SSTR3、SSTR5 に対し特異的に親和性を有する化合物である。ラット膵臓においては、SSTR1～SSTR5 のすべての受容体が発現しているとの報告があることから (J Histochem Cytochem. 2004 Mar;52(3):391-400.)、糖鎖付加体はオクトレオチドとは異なった受容体に作用することによって、組織障害を軽減し

た可能性が考えられた。また、オクトレオチド、C (d i s i a l o) - R - K - S R I F 1 4 では、v e h i c l e と比較し、L D H 活性は低値であった。そのほか、各パラメータに対し、糖鎖付加体の投与によって悪化するものはなかった。

請求の範囲

- [請求項1] (A) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF14
 ;
 (B) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF14
 において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され
 たポリペプチド ;
 (C) SRIF14の類縁体 ;
 (D) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF14
 に対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド ;
 (E) (A) ~ (D) において、N個（ここでNは、1以上20以
 下の整数）のアミノ酸をN末端側にさらに含むポリペプチド ; および
 (F) (A) ~ (D) において、M個（ここでMは、1以上6以下
 の整数）のアミノ酸をC末端側にさらに含むポリペプチド ;
 からなる群から選ばれるポリペプチドにおいて、
 少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、か
 つ、
 ソマトスタチン受容体に対する親和性を有することを特徴とする、
 糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項2] 請求項1に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
 前記糖鎖付加アミノ酸で置換されるアミノ酸が、SRIF14にお
 ける19位に相当するアミノ酸であることを特徴とする、
 糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項3] 請求項1に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
 前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記(E)のポリペプチドにおいて
 、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、
 ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミ
 ノ酸が、前記(E)のポリペプチドのN末端側の前記N個のアミノ酸
 のいずれかに存在することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項4]

請求項1における糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記(F)のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、

ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つアミノ酸が、前記(F)のポリペプチドのC末端側の前記M個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項5]

請求項1に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記(E)のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、

さらに、N末端側に付加される前記N個のアミノ酸の配列が、X-Yで表され、

ここで、XはL個(ここでLは1以上6以下の整数)の任意のアミノ酸の配列を意味し、また、Yは、

(1) L y s、

(2) A r g - L y s、

(3) G l u - A r g - L y s、

(4) A r g - G l u - A r g - L y s、

(5) P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、

(6) A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、

(7) M e t - A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s

、

(8) A l a - M e t - A l a - P r o - A r g - G l u - A r g
- L y s、

(9) P r o - A l a - M e t - A l a - P r o - A r g - G l u
- A r g - L y s、

(10) A s n - P r o - A l a - M e t - A l a - P r o - A r

g - G l u - A r g - L y s、

(11) S e r - A s n - P r o - A l a - M e t - A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、

(12) A s n - S e r - A s n - P r o - A l a - M e t - A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、

(13) A l a - A s n - S e r - A s n - P r o - A l a - M e t - A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、

(14) S e r - A l a - A s n - S e r - A s n - P r o - A l a - M e t - A l a - P r o - A r g - G l u - A r g - L y s、および

(15) 上記配列(2)～(14)において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列

からなる群から選択される配列である

ことを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項6] 請求項5に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記(E)のポリペプチドのN末端側に付加される前記N個のアミノ酸の配列を表すX-Y-におけるXを意味するL個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項7] 請求項3に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

N末端側に付加される前記N個のアミノ酸は、リンカーを介して当該N末端側に連結していることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項8] (A) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF28 ;

(B) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるSRIF28

において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；

(C) S R I F 2 8の類縁体；

(D) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるS R I F 2 8に対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；

(E) (A)～(D)において、J個（ここでJは、1以上6以下の整数）のアミノ酸をN末端側にさらに含むポリペプチド；および

(F) (A)～(D)において、K個（ここでKは、1以上6以下の整数）のアミノ酸をC末端側にさらに含むポリペプチド；

からなる群から選ばれるポリペプチドにおいて、

少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、かつ、

ソマトスタチン受容体に対する親和性を有することを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項9]

請求項8に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加アミノ酸で置換されるアミノ酸が、S R I F 2 8における1位に相当するアミノ酸、5位に相当するアミノ酸、9位に相当するアミノ酸、12位に相当するアミノ酸、13位に相当するアミノ酸、14位に相当するアミノ酸、および、19位に相当するアミノ酸からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸であることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項10]

請求項8に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記(E)のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、

ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記(E)のポリペプチドのN末端側の前記J個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項11]

請求項8に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、前記(F)のポリペプチドにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が糖鎖付加アミノ酸で置換されており、

ここで、前記糖鎖付加アミノ酸で置換された少なくとも1つのアミノ酸が、前記(F)のポリペプチドのC末端側の前記K個のアミノ酸のいずれかに存在することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項12]

請求項1～11のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記ソマトスタチン受容体に対する親和性が、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、および、SSTR5からなる群より選択される受容体の少なくとも2以上の受容体に対する親和性を有することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項13]

請求項12に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドが、少なくともSSTR1およびSSTR4のいずれか1つに対して親和性を有することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項14]

請求項12に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドが、SSTR1およびSSTR4の両方に対して親和性を有することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項15]

請求項12に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドが、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、および、SSTR5の全てに対して親和性を有することを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

- [請求項16] 請求項1～15のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記糖鎖付加ポリペプチドは、SRIF28と比較して、増大した血中安定性を有することを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項17] 請求項1～16のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記各糖鎖付加アミノ酸が、糖鎖付加Asnまたは糖鎖付加Cysであることを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項18] 請求項1～17のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖とアミノ酸とがリンカーを介することなく結合していることを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項19] 請求項1～18のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が4個以上の糖からなることを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項20] 請求項1～19のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が2本鎖複合型糖鎖、3本鎖複合型糖鎖、または4本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項21] 請求項1～19のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が2本鎖複合型糖鎖である

ことを特徴とする、

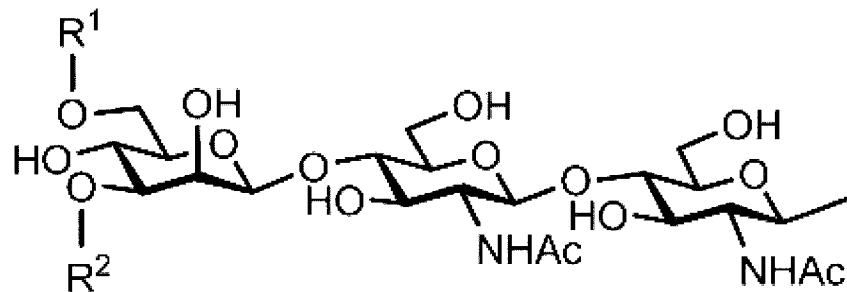
糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項22] 請求項20または21に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、
前記2本鎖複合型糖鎖が、ジシアロ糖鎖、モノシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖およびジマンノース糖鎖からなる群から選択される糖鎖であることを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項23] 請求項1～18のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

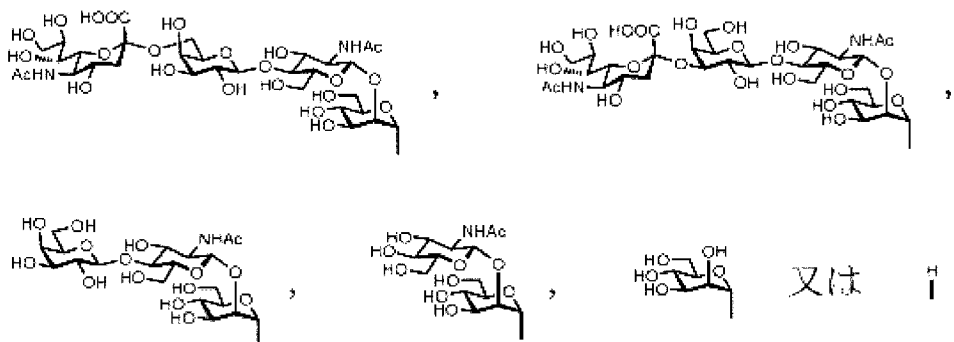
前記各糖鎖付加アミノ酸において、糖鎖が、下記式：

[化1]



[式中、R¹およびR²は、同一または異なって、

[化2]



を示し、Acは、アセチル基を示す。]

で表される糖鎖であることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項24] 請求項1～20のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖が、非還元末端に少なくとも1つのシアル酸を有しており、前記シアル酸のカルボキシ基が、炭素数1～30のアルキルアミノ基、ベンジル基、アミノ基、またはアミノエチルアミノ基により修飾されていることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項25] 請求項1～24のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、複数の糖鎖付加アミノ酸を有しており、

前記各糖鎖付加アミノ酸における糖鎖が、いずれも同一であることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項26] 請求項1～25のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、SRIF28における17位のCysと28位のCysに相当するCysを有しており、

さらに、これらのCysは、相互にジスルフィド結合していることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項27] 請求項1～26のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドのC末端は、アミド化されていることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項28] 請求項1～26のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであ

って、

前記糖鎖付加ポリペプチドのN末端にアジド基が導入されていることを特徴とする、

糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項29] 請求項1～28のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドが、標識されていることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項30] (1) 請求項1～29のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドおよび／または薬学的に許容されるその塩、および、

(11) 薬理学的に許容される担体を含むことを特徴とする、医薬組成物。

[請求項31] 請求項30に記載の医薬組成物であって、

前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖が、実質的に均一であることを特徴とする、医薬組成物。

[請求項32] 請求項30または31に記載の医薬組成物であって、

ソマトスタチンに関連する疾患の治療または予防のために用いられることを特徴とする、医薬組成物。

[請求項33] 請求項30に記載の医薬組成物であって、

前記ソマトスタチンに関連する疾患が、先端巨大症、巨人症、アルツハイマー病および他の形態の認知症、癌、ホルモン産生腫瘍、内分泌腫瘍、カルチノイド、VIPオーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ、糖尿病およびその合併症、疼痛、関節炎、下痢、胃潰瘍、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、クッシング病、ホルモン分泌異常、消化管閉塞、イレウス、術後再狭窄、放射線障害、眼疾患、ドライアイ、緑内障、角膜実質の炎症、虹彩炎、白内障、ならびに、結膜炎からな

る群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする、医薬組成物。

[請求項34] 請求項1～29のいずれか1項に記載の糖鎖付加ポリペプチドの有効量を投与することを特徴とする、ソマトスタチンに関連する疾患の治療または予防方法。

[請求項35] 請求項34に記載の治療または予防方法であって、
前記ソマトスタチンに関連する疾患が、先端巨大症、巨人症、アルツハイマー病および他の形態の認知症、癌、ホルモン産生腫瘍、内分泌腫瘍、カルチノイド、VIPオーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ、クッシング病、ホルモン分泌異常、糖尿病およびその合併症、疼痛、関節炎、下痢、胃潰瘍、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、消化管閉塞、イレウス、術後再狭窄、眼疾患、放射線障害、ドライアイ、緑内障、角膜実質の炎症、虹彩炎、白内障、ならびに、結膜炎からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする、治療または予防方法。