

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5647899号  
(P5647899)

(45) 発行日 平成27年1月7日(2015.1.7)

(24) 登録日 平成26年11月14日(2014.11.14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z C C
C O 7 K 7/04 (2006.01)	C O 7 K 7/04
C O 7 K 5/00 (2006.01)	C O 7 K 5/00
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 A

請求項の数 7 (全 176 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-542355 (P2010-542355)	(73) 特許権者	514173629
(86) (22) 出願日	平成21年1月8日(2009.1.8)		ラツィオファルム ゲーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2011-512121 (P2011-512121A)		r a t i o p h a r m G m b H
(43) 公表日	平成23年4月21日(2011.4.21)		ドイツ国、89079 ウルム、グラーフ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/030503		ーアルコーシュトラーセ 3
(87) 国際公開番号	W02009/089396	(74) 代理人	110001508
(87) 国際公開日	平成21年7月16日(2009.7.16)		特許業務法人 津国
審査請求日	平成23年8月3日(2011.8.3)	(74) 代理人	100078662
(31) 優先権主張番号	61/019,805		弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成20年1月8日(2008.1.8)	(74) 代理人	100119079
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 伊藤 佐保子
前置審査		(74) 代理人	100116528
			弁理士 三宅 俊男
		(74) 代理人	100146031
			弁理士 柴田 明夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴサッカリルトランスフェラーゼを使用するポリペプチドの複合糖質化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グリコシル化又は非グリコシル化ポリペプチドとポリマー修飾基の間の共有結合抱合体を形成する方法であって、該ポリペプチドが配列番号1及び配列番号2より選択される外因性N連結グリコシル化配列を含み：

$X^1 N X^2 X^3 X^4$  (配列番号1)；及び

$X^1 D X^2 N X^2 X^3 X^4$  (配列番号2)、

それにおいて、

Nはアスパラギンであり；

Dはアスパラギン酸であり；

$X^3$ はスレオニン(T)及びセリン(S)より選択されるメンバーであり；

$X^1$ は存在又は非存在のいずれかであり、存在する場合、アミノ酸であり；

$X^4$ は存在又は非存在のいずれかであり、存在する場合、アミノ酸であり；かつ、

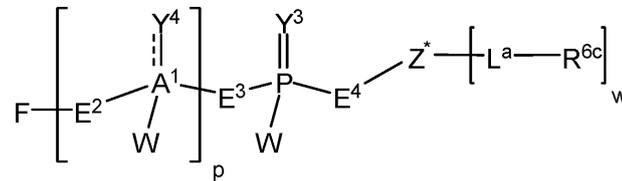
$X^2$ 及び $X^2'$ は、 $X^2$ 及び $X^2'$ がプロリン(P)ではないという条件で、アミノ酸から非依存的に選択されるメンバーであり、

それにおいて、ポリマー修飾基が、該ポリペプチドに、該N連結グリコシル化配列の該アスパラギンで、該アスパラギン及び該ポリマー修飾基の間に挿置され、そして、その両方に共有結合的に連結されたグリコシル連結基を介して共有結合的に抱合され、それにおいて該グリコシル連結基はモノサッカライド及びオリゴサッカライドより選択されるメンバーであり、それにおいて該ポリマー修飾基が、ポリ(アルキレンオキシド)、デキストラ

ン、及びポリシアル酸より選択される直鎖又は分岐水溶性ポリマーであり、  
以下の工程：

該ポリペプチド及び式 (X) の構造を有するグリコシル供与体種を、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの存在下で、オリゴサッカリルトランスフェラーゼがグリコシル成分をグリコシル供与体種から N 連結グリコシル化配列のアスパラギン残基上に転移させるために十分な条件下で接触させること、それにおいて該オリゴサッカリルトランスフェラーゼは P g l B 及び S t t 3 p ならびにそれらの可溶性変異体より選択されるメンバーであり、式 (X) は、

【化 7 4】



(X)

(式中、

w は 1 ~ 8 より選択される整数であり；

p は 0 ~ 1 より選択される整数であり；

F は脂質成分であり；

Z\* が、オリゴサッカライドであり；

各 L<sup>a</sup> は、単結合、官能基、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるリンカー成分であり；

各 R<sup>6c</sup> は、前記ポリマー修飾基であり；

A<sup>1</sup> は、P (リン) 及び C (炭素) より選択されるメンバーであり；

Y<sup>3</sup> は、酸素 (O) 及び硫黄 (S) より選択されるメンバーであり；

Y<sup>4</sup> は、O、S、SR<sup>1</sup>、OR<sup>1</sup>、OQ、CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>、及び NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> より選択されるメンバーであり；

E<sup>2</sup>、E<sup>3</sup>、及び E<sup>4</sup> は、CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>、O、S、及び NR<sup>3</sup> より非依存的に選択されるメンバーであり；及び

各 W は、SR<sup>1</sup>、OR<sup>1</sup>、OQ、NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換及び非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーであり；

それにおいて、

各 Q は、H、負電荷、及び陽イオンより非依存的に選択されるメンバーであり；及び

各 R<sup>1</sup>、各 R<sup>2</sup>、各 R<sup>3</sup>、及び各 R<sup>4</sup> は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである)

である、

を含む、方法。

【請求項 2】

外因性 N 連結グリコシル化配列が、NX<sup>2</sup>T 及び NX<sup>2</sup>S より選択されるメンバーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ポリ(アルキレンオキシド)が、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、及びその誘導体より選択されるメンバーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ポリペプチドが親ポリペプチドに対応し、該ポリペプチドが治療用ポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項5】

請求項1記載の方法であって、それにおいてポリペプチドは親ポリペプチドに対応し、それは以下より選択されるメンバーである：肝細胞増殖因子(HGF)、神経増殖因子(NGF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子1(FGF-1)、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、FGF-23、ケラチノサイト増殖因子(KGF)、巨核球増殖発達因子(MGDF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、形質転換増殖因子アルファ(TGF-アルファ)、TGF-ベータ、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、血管内皮増殖因子(VEGF)、VEGFインヒビター、骨増殖因子(BGF)、グリア増殖因子、ヘパリン結合神経突起促進因子(HBNF)、C1エステラーゼインヒビター、ヒト成長ホルモン(hGH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、副甲状腺ホルモン、ホリトロピン-アルファ、ホリトロピン-ベータ、フォリスタチン、黄体形成ホルモン(LH)、インターロイキン1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、インターフェロンアルファ(INF-アルファ)、INF-ベータ、INF-ガンマ、INF-オメガ、INF-タウ、インシュリン、グルコセレブロシダーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼ、酸性アルファ-グルコシダーゼ(酸性マルターゼ)、イズロニダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ベータ-グルコシダーゼ、アシルスルファターゼ、アスパラギナーゼ、アルファ-グルコセラミダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、プチリルコリンエステラーゼ、ウロキナーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼA、骨形成タンパク質1(BMP-1)、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-14、BMP-15、NT-3、NT-4、NT-5、エリスロポエチン(EPO)、新規赤血球生成刺激タンパク質(NESP)、増殖分化因子(GDF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ミオスタチン、神経増殖因子(NGF)、フォンビルブランド因子(vWF)、vWF切断プロテアーゼ(vWFプロテアーゼ、vWF分解プロテアーゼ)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒細胞マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン(ATT、又は $\alpha_1$ -1プロテアーゼインヒビター)、組織型プラスミノゲンアクチベーター(TPA)、ヒルジン、レプチン、ウロキナーゼ、ヒトDNase、インシュリン、B型肝炎表面抗原タンパク質(HbsAg)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、オステオポンチン、オステオプロテグリン、プロテインC、ソマトメジン-1、ソマトトロピン、ソマトロピン、キメラジフテリア毒素-IL-2、グルカゴン様ペプチド(GLP)、トロンピン、トロンボポエチン、トロンボスポンジン-2、アンチトロンピンIII(AT-III)、プロキネチシン、CD4、 $\alpha$ -CD20、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF-アルファインヒビター、TNF受容体(TNF-R)、Pセレクトリン糖タンパク質リガンド-1(PSGL-1)、補体、トランスフェリン、グリコシル化依存性細胞接着分子(GlyCAM)、神経細胞接着分子(N-CAM)、TNF受容体-IgGFc領域融合タンパク質、エクステンジン-4、BDNF、ベータ-2-ミクログロブリン、繊毛神経栄養因子(CNTF)、リンフォトキシン-ベータ受容体(LT-ベータ受容体)、フィブリノゲン、GDF-1、GDF-2、GDF-3、GDF-4、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、GDF-13、GDF-14、GDF-15、GLP-1、インシュリン様増殖因子、インシュリン様増殖因子結合タンパク質(IGF)、IGF/IBP-2、IGF/IBP-3、IGF/IBP-4、IGF/IBP-5、IGF/IBP-6、IGF/IBP-7、IGF/IBP-8、IGF/IBP-9、IGF/IBP-10、IGF/IBP-11、IGF/IBP-12、IGF/IBP

- 13、第V因子、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、フォンビルブランド因子(vWF)と第XIII因子の間の複合体、内皮増殖因子(EGF)に対する抗体、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する抗体、繊維芽細胞増殖因子(FGF)に対する抗体、抗TNF抗体、TNF受容体-IgGFc領域融合タンパク質、抗HER2抗体、呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質Fに対する抗体、TNF- $\alpha$ に対する抗体、糖タンパク質IIb/IIIaに対する抗体、CD20に対する抗体、CD4に対する抗体、アルファ-CD3に対する抗体、CD40Lに対する抗体、CD154に対する抗体、PSGL-1に対する抗体、及び癌胎児性抗原(CEA)に対する抗体。

【請求項6】

グリコシル連結基がインタクトなグリコシル連結基である、請求項1記載の方法。

10

【請求項7】

グリコシル連結基が、GlcNAc、GlcNH、バシロサミン、6-ヒドロキシバシロサミン、GalNAc、GalNH、GlcNAc-GlcNAc、GlcNAc-GlcNH、6-ヒドロキシバシロサミン-GalNAc、GalNAc-Gal-Sia、GlcNAc-GlcNAc-Gal-Sia、GlcNAc-Gal、GlcNAc-Gal-Sia、GlcNAc-GlcNAc-Man、GlcNAc-GlcNAc-Man(Man)<sub>2</sub>、及びそれらの組み合わせより選択されるメンバーである残基である、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願の相互参照

本願では、2008年1月8日に出願された米国仮特許出願第61/019,805号の利点を主張し、その内容は、参照によりその全体が全ての目的のために本明細書において組み入れられる。

【0002】

発明の属する技術分野

本発明は、グリコシル化によるポリペプチド修飾の分野に関する。特に、本発明は、短い酵素認識N連結グリコシル化配列を使用したグリコシル化ポリペプチドの調製方法に関する。

30

【0003】

発明の背景

特定の生理学的応答を生じさせるためのグリコシル化又は非グリコシル化ポリペプチドの投与は、医学的な技術分野において周知である。例えば、精製及び組換えヒト成長ホルモン(hGH)の両方が、hGH欠乏に関連する状態及び疾患(例えば、小児における小人症)を処置するために使用される。他の例は、インターフェロン(抗ウイルス活性を有する)ならびに顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF(白血球の産生を刺激する))を含む。

【0004】

野生型グリコシル化パターンを伴うポリペプチドを製造するために使用することができる発現系の欠如によって、そのようなポリペプチドの治療用薬剤としての使用が限定されてきた。不適切又は不完全にグリコシル化されたポリペプチドが免疫原性であり、ペプチドの迅速な中和及び/又はアレルギー応答の発生を導きうるということが、当技術分野において公知である。組換え産生されるグリコペプチドの他の欠乏は、最適以下の効力及び血流からの迅速なクリアランスを含む。

40

【0005】

グリコシル化されたポリペプチド治療剤の産生に特有の問題を解決する1つのアプローチは、ポリペプチドを、インビトロで、それらの発現後に修飾することであった。ポリペプチドの発現後でのインビトロ修飾が、既存のグリカン構造の修飾及びグリコシル成分の非グリコシル化アミノ酸残基への付着の両方のために使用されてきた。組換え真核生物グ

50

リコシルトランスフェラーゼの包括的選択が利用可能になっており、注文デザインされたグリコシル化パターン及びグリコシル構造を伴う哺乳動物の複合糖質のインビトロでの酵素合成を可能にする。例えば、米国特許第5,876,980号；第6,030,815号；第5,728,554号；第5,922,577号；ならびにWO/9831826；US2003180835；及びWO 03/031464を参照のこと。

【0006】

また、グリコペプチドが、1つ又は複数の非サッカライド修飾基（例えば、水溶性ポリマーなど）を用いて誘導体化されてきた。ペプチドに抱合されている例示的なポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（「PEG」）である。PEG抱合（ポリペプチドの分子サイズを増加させる）を使用し、免疫原性を低下させ、PEG抱合ポリペプチドの血中クリアランス時間を延長させてきた。例えば、米国特許第4,179,337号（Davis et al.）では、非免疫原性ポリペプチド（例えば、酵素及びポリエチレングリコール（PEG）又はポリプロピレングリコール（PPG）に共役したポリペプチドホルモンなど）が開示される。

10

【0007】

PEG及びその誘導体のポリペプチドへの付着のための主な方法は、アミノ酸残基を通じた非特異的結合を含む（例えば、米国特許第4,088,538号、米国特許第4,496,689号、米国特許第4,414,147号、米国特許第4,055,635号、及びPCT WO 87/00056を参照のこと）。PEG抱合の別の方法は、グリコペプチドのグリコシル残基の非特異的酸化を含む（例えば、WO 94/05332を参照のこと）。

20

【0008】

これらの非特異的方法において、PEGを無作為に、非特異的な方法で、ポリペプチド骨格上の反応性残基に加える。このアプローチは、有意な欠点（最終産物の均質性の欠如を含む）、及び修飾ポリペプチドの低下した生物学的活性又は酵素的活性の可能性を有する。従って、特異的に標識され、容易に特性付け可能であり、本質的に均質な産物の形成をもたらす治療用ポリペプチドの誘導体化方法が、高く望ましい。

【0009】

特異的に修飾された均質なポリペプチド治療剤を、インビトロで酵素の使用を通じて産生することができる。修飾基（例えば、合成ポリマーなど）をポリペプチドに付着させるための非特異的な方法とは異なり、酵素ベースの合成は、位置選択性及び立体選択性の利点を有する。標識ポリペプチドの合成における使用のための2つの主要なクラスの酵素は、グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、シアリルトランスフェラーゼ、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）及びグリコシダーゼである。これらの酵素を、糖（後に改変されて、修飾基を含むことができる）の特異的な付着のために使用することができる。あるいは、グリコシルトランスフェラーゼ及び修飾グリコシダーゼを使用し、修飾された糖をポリペプチド骨格に直接的に転移させることができる（例えば、米国特許第6,399,336号、ならびに米国特許出願公開第20030040037号、第20040132640号、第20040137557号、第20040126838号、及び第20040142856号を参照のこと。これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる）。化学的アプローチと酵素的アプローチの両方を合わせた方法も公知である（例えば、Yamamoto et al., Carbohydr. Res. 305: 415-422 (1998)及び米国特許出願公開第20040137557号を参照のこと。これは参照により本明細書に組み入れられる）。

30

40

【0010】

炭水化物をグリコペプチドにいくつかの方法で付着させ、その内、アスパラギンへのN連結及びセリン及びスレオニンへのO連結が、組換え糖タンパク質治療剤について最も関連する。

【0011】

全てのポリペプチドが、グリコシル化配列を、それらのアミノ酸配列の部分として含む

50

わけではない。また、既存のグリコシル化配列は、修飾基の付着に適さないことがある。そのような修飾は、例えば、修飾ポリペプチドの生物学的活性における望ましくない減少を起こしうる。このように、当技術分野において、正確で再現性のあるグリコシル化及び糖修飾の方法の必要性が存在する。本発明では、これら及び他の必要性に取り組む。

#### 【 0 0 1 2 】

##### 発明の概要

本発明は、酵素的な複合糖質化又は糖 P E G 化 (glycoPEGylation) 反応が、ポリペプチド内の特定の N 連結グリコシル化配列を特異的に標的化することができるとの発見を含む。一例において、標的化されるグリコシル化配列を、親ポリペプチド (例えば、野生型ポリペプチド) 中に、N 連結グリコシル化配列を含む突然変異ポリペプチドを作る突然変異により導入し、それにおいて N 連結グリコシル化配列は、対応する親ポリペプチド中において存在しない、又は、同じ位置には存在しない (外因性 N 連結グリコシル化配列)。そのような突然変異ポリペプチドを「シークオン (sequon) ポリペプチド」と呼ぶ。

10

#### 【 0 0 1 3 】

一局面において、本発明は、少なくとも 1 つの外因性 N 連結グリコシル化配列を含むポリペプチド及びそのようなポリペプチドを作製する方法を提供する。本発明は、また、シークオンポリペプチドのライブラリーを提供する。代表的な実施態様において、ライブラリーは複数の異なるメンバーを含み、それにおいてライブラリーの各メンバーは共通の親ポリペプチドに対応し、及び、それにおいてライブラリーの各メンバーは本発明の外因性 N 連結グリコシル化配列を含む。また、そのようなライブラリーを作製し、使用方法を提供する。

20

#### 【 0 0 1 4 】

一実施態様において、各 N 連結グリコシル化配列は、酵素 (例えばオリゴサッカリルトランスフェラーゼなど) の基質、例えば本明細書において記載するものなど例えば、P g l B 又は S t t 3) であり、それによって修飾又は非修飾グリコシル成分を、グリコシル供与体種から、N 連結グリコシル化配列のアスパラギン残基上に転移させることができる。故に、別の局面において、本発明は、グリコシル化ポリペプチドと修飾基 (例えば、ポリマー修飾基) の間の共有結合抱合体を提供し、それにおいてポリペプチドは外因性 N 連結グリコシル化配列を含む。ポリマー修飾基は、N 連結グリコシル化配列内のアスパラギン残基で、ポリペプチドとポリマー修飾基の間に挿置された、及び、その両方に共有結合的に連結されたグリコシル連結基を介して共有結合的に抱合され、それにおいてグリコシル連結基は、モノサッカライド及びオリゴサッカライドより選択されるメンバーである。本発明は、さらに、本発明のポリペプチド抱合体を含む薬学的組成物を提供する。

30

#### 【 0 0 1 5 】

本発明のポリペプチドにおける使用の例示的な N 連結グリコシル化配列は、配列番号 1 及び配列番号 2 :

$X^1 N X^2 X^3 X^4$  (配列番号 1) ; 及び

$X^1 D X^2 N X^2 X^3 X^4$  (配列番号 2) 、

(配列中、N はアスパラギンであり ; D はアスパラギン酸であり ;  $X^3$  は、スレオニン (T) 及びセリン (S) より選択されるメンバーであり ;  $X^1$  は存在又は非存在のいずれかであり、存在する場合、アミノ酸であり ;  $X^4$  は存在又非存在のいずれかであり、存在する場合、アミノ酸であり ; ならびに  $X^2$  及び  $X^2'$  は非依存的に選択されるアミノ酸である) より選択される。一実施態様において、 $X^2$  及び  $X^2'$  はプロリン (P) ではない。

40

#### 【 0 0 1 6 】

本発明は、さらに、ポリペプチド抱合体を作製及び使用方法を提供する。一例において、ポリペプチド抱合体は、無細胞インビトロ方法を使用して、ポリペプチドと修飾基 (例えば、ポリマー修飾基) の間に形成される。ポリペプチドは、アスパラギン残基を含む本発明の N 連結グリコシル化配列を含む。修飾基は、ポリペプチドに、アスパラギン残基で、ポリペプチドと修飾基の間に挿置された、及び、その両方に共有結合的に連結されたグリコシル連結基を介して共有結合的に連結される。方法は、ポリペプチド及び本発明

50

のグリコシル供与体種を、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの存在下で、オリゴサッカリルトランスフェラーゼがグリコシル成分をグリコシル供与体種からN連結グリコシル化配列のアスパラギン残基上に転移させるために十分な条件下で接触させることを含む。

【0017】

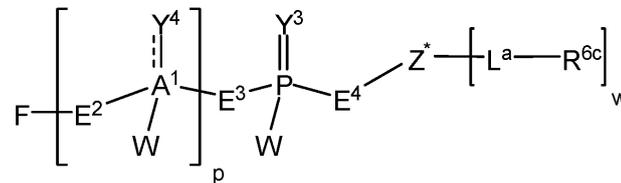
ポリペプチドと修飾基（例えば、ポリマー修飾基）の間に共有結合抱合体を形成する別の例示的な方法は、宿主細胞内での細胞内グリコシル化を含み、それにおいてポリペプチドが発現される。この方法では、内因性の及び/又は同時発現されたオリゴサッカリルトランスフェラーゼを利用する。方法は、N連結グリコシル化配列を含むポリペプチド（本発明のポリペプチド）及びグリコシル供与体種を、細胞内酵素（例えば、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ）の存在下で、酵素がグリコシル成分をグリコシル供与体種からN

10

【0018】

別の局面において、本発明は、本発明の方法において有用なグリコシル供与体種を提供する。例示的なグリコシル供与体種は、化学式（X）：

【化1】



20

(X)

（式中、wは1～20より選択される整数である）の構造を有する。一例において、wは1～8より選択される。整数pは0～1より選択される。Fは脂質成分であり；Z<sup>\*</sup>は、モノサッカライド及びオリゴサッカライドより選択されるグリコシル成分であり；各L<sup>a</sup>は、単結合、官能基、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるリンカー成分であり；各R<sup>6c</sup>は、非依存的に選択される修飾基、例えば本明細書に記載する直鎖又は分岐ポリマー修飾基など（例えば、PEG）であり；A<sup>1</sup>は、P（リン）及びC（炭素）より選択されるメンバーであり；Y<sup>3</sup>は、酸素（O）及び硫黄（S）より選択されるメンバーであり；Y<sup>4</sup>は、O、S、SR<sup>1</sup>、OR<sup>1</sup>、OQ、CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>、及びNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>より選択されるメンバーであり；E<sup>2</sup>、E<sup>3</sup>、及びE<sup>4</sup>は、CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>、O、S、及びNR<sup>3</sup>より非依存的に選択されるメンバーであり；ならびに、各Wは、SR<sup>1</sup>、OR<sup>1</sup>、OQ、NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーであり、ここで各Qは、H、単一の負電荷、及び陽イオン（例えば、Na<sup>+</sup>又はK<sup>+</sup>）より非依

30

40

【0019】

本発明の追加の局面、利点、及び目的は、続く詳細な説明から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】図1A及び図1B（それぞれ配列番号8及び配列番号9）は、各々が、第VII因子の例示的なアミノ酸配列を示す。

50

【図1B】図1A及び図1B（それぞれ配列番号8及び配列番号9）は、各々が、第VII因子の例示的なアミノ酸配列を示す。

【図2】図2は、例示的な第VII因子のアミノ酸配列であり、配列中、Bドメイン（アミノ酸残基741～1648）が除去されている（配列番号3）。本発明の例示的なポリペプチドは、欠失されたBドメインが少なくとも1つのアミノ酸残基で置換されたものを含む（Bドメイン置換配列）。一実施態様において、Arg<sup>740</sup>とGlu<sup>1649</sup>の間のBドメイン置換配列は、少なくとも1つのO連結又はN連結グリコシル化配列を含む。

【図3】図3は、Bドメインが欠失した第VII因子についての例示的なアミノ酸配列である（配列番号4）。

【図4】図4は、Bドメインが欠失した第VII因子についての例示的なアミノ酸配列である（配列番号5）。

【図5】図5は、Bドメインが欠失した第VII因子についての例示的なアミノ酸配列である（配列番号6）。

【図6A】図6は、本発明の例示的な実施態様を概説する表であり、それにおいて本発明の特定のポリペプチドを、本発明の特定のN連結グリコシル化配列と共に使用する。図6中の各列は、本発明の例示的な実施態様を表わし、それにおいてN連結グリコシル化配列を、ポリペプチド中に、ポリペプチドのアミノ酸配列内の示した位置に導入する。

【図6B】図6は、本発明の例示的な実施態様を概説する表であり、それにおいて本発明の特定のポリペプチドを、本発明の特定のN連結グリコシル化配列と共に使用する。図6中の各列は、本発明の例示的な実施態様を表わし、それにおいてN連結グリコシル化配列を、ポリペプチド中に、ポリペプチドのアミノ酸配列内の示した位置に導入する。

【図6C】図6は、本発明の例示的な実施態様を概説する表であり、それにおいて本発明の特定のポリペプチドを、本発明の特定のN連結グリコシル化配列と共に使用する。図6中の各列は、本発明の例示的な実施態様を表わし、それにおいてN連結グリコシル化配列を、ポリペプチド中に、ポリペプチドのアミノ酸配列内の示した位置に導入する。

【図6D】図6は、本発明の例示的な実施態様を概説する表であり、それにおいて本発明の特定のポリペプチドを、本発明の特定のN連結グリコシル化配列と共に使用する。図6中の各列は、本発明の例示的な実施態様を表わし、それにおいてN連結グリコシル化配列を、ポリペプチド中に、ポリペプチドのアミノ酸配列内の示した位置に導入する。

【図6E】図6は、本発明の例示的な実施態様を概説する表であり、それにおいて本発明の特定のポリペプチドを、本発明の特定のN連結グリコシル化配列と共に使用する。図6中の各列は、本発明の例示的な実施態様を表わし、それにおいてN連結グリコシル化配列を、ポリペプチド中に、ポリペプチドのアミノ酸配列内の示した位置に導入する。

【図6F】図6は、本発明の例示的な実施態様を概説する表であり、それにおいて本発明の特定のポリペプチドを、本発明の特定のN連結グリコシル化配列と共に使用する。図6中の各列は、本発明の例示的な実施態様を表わし、それにおいてN連結グリコシル化配列を、ポリペプチド中に、ポリペプチドのアミノ酸配列内の示した位置に導入する。

#### 【0021】

本発明の詳細な説明

#### I. 略語

PEG、ポリ（エチレングリコール）；m-PEG、メトキシ-ポリ（エチレングリコール）；PPG、ポリ（プロピレングリコール）；m-PPG、メトキシ-ポリ（プロピレングリコール）；Fuc、フコース又はフコシル；Gal、ガラクトース又はガラクトシル；GalNAc、N-アセチルガラクトサミン又はN-アセチルガラクトサミニル；Glc、グルコース又はグルコシル；GlcNAc、N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルグルコサミニル；Man、マンノース又はマンノシル；ManAc、マンノサミンアセテート又はマンノサミニルアセテート；Sia、シアル酸又はシアリル；及びNeuAc、N-アセチルノイラミン又はN-アセチルノイラミニル。

#### 【0022】

10

20

30

40

50

## II. 定義

別に定義しない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、通常、本発明が属する技術分野の当業者により共通して理解される同じ意味を有する。一般的に、本明細書において使用される命名法ならびに細胞培養、分子遺伝学、有機化学及び核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションにおける実験手順は、当技術分野において周知であり、通常用いられるものである。標準的技術を核酸及びペプチド合成のために使用する。技術及び手順は、一般的に、当技術分野における従来の方法及び種々の一般的な参考文献（一般的に、Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照のこと。本明細書において参照により組み入れられる）に従って実施され、それは本文書全体にわたって提供される。本明細書において使用される命名法ならびに以下に記載される分析及び合成有機化学の実験手順は、当技術分野において周知であり、通常用いられるものである。標準的な技術、又はその修飾を、化学合成及び化学分析のために使用する。

### 【0023】

本明細書において記載される全てのオリゴサッカライドは、非還元サッカライドの名称又は略語（即ち、Gal）、続いてグリコシド結合の立体配置（又は）、環状結合（1又は2）、結合に含まれる還元サッカライドの環状部分（2、3、4、6、又は8）、及び次に還元サッカライドの名称又は略語（即ち、GlcNAc）を用いて記載される。各サッカライドは、好ましくは、ピラノースである。標準的な糖鎖生物学の命名法の総説については、例えば、Essentials of Glycobiology Varki et al. eds. CSHL Press (1999)を参照のこと。オリゴサッカライドは、グリコシル模倣成分を、糖成分の1つとして含みうる。オリゴサッカライドは還元末端及び非還元末端を有すると考えられる（還元末端のサッカライドが、実際に、還元糖であるか否かを問わない）。

### 【0024】

「グリコシル成分」という用語は、糖残基に由来する任意のラジカルを意味する。「グリコシル成分」は、モノサッカライド及びオリゴサッカライドを含み、「グリコシル模倣成分」を包含する。

### 【0025】

「グリコシル模倣成分」という用語は、本明細書において使用される通り、構造的にグリコシル成分と似た成分（例えば、ヘキソース又はペントース）を指す。「グリコシル模倣成分」の例は、それらの成分を含み、それにおいてグリコシド酸素もしくはグリコシル成分の環状酸素、又は両方が、結合もしくは別の原子（例えば、硫黄）、又は別の成分、例えば炭素含有基（例えば、 $\text{CH}_2$ ）又は窒素含有基（例えば、 $\text{NH}$ ）などで置換されている。例は、置換又は非置換シクロヘキシル誘導体、環状チオエーテル、環状第2級アミン、チオグリコシド結合を含む成分などを含む。一例において、「グリコシル模倣成分」を、酵素触媒された反応において、ポリペプチドのアミノ酸残基又はグリコペプチドのグリコシル成分上に転移させる。これは、例えば、「グリコシル模倣成分」を、脱離基（例えばハロゲンなど）で活性化することにより達成することができる。

### 【0026】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形状のデオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）及びそのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然ヌクレオチドと類似の方法で代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に示されない限り、特定の核酸配列は、潜在的に、保存的に修飾されたその変異体（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補配列ならびに明確に示される配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ又は複数の選択された（又は全ての）コドンの第3の位置が、混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することにより達成されうる（Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); 及び Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)）。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、及び遺

10

20

30

40

50

伝子によりコードされる mRNA と互換的に使用される。

【 0 0 2 7 】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖の産生に關与する DNA のセグメントを意味する。それは、コード領域に先行する及び続く領域（リーダー及びトレーラー）ならびに個々のコードセグメント（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含みうる。

【 0 0 2 8 】

「単離された」という用語は、核酸又はタンパク質に適用された場合、核酸又はタンパク質が、それが天然状態で会合する他の細胞成分を実質的に含まないことを表示する。それは好ましくは均質な状態であるが、乾燥又は水溶液のいずれかでありうる。純度及び均質性は、典型的に、分析化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィーなどを使用して決定される。調製物中に存在する主な種であるタンパク質又は核酸が、実質的に精製される。特に、単離遺伝子は、遺伝子に隣接しており、目的の遺伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離される。「精製された」という用語は、核酸又はタンパク質が電気泳動ゲルにおいて本質的に 1 本のバンドを生じることを表示する。特に、それは、核酸又はタンパク質が少なくとも 8 5 % 純粋、より好ましくは少なくとも 9 5 % 純粋、最も好ましくは少なくとも 9 9 % 純粋であることを意味する。

【 0 0 2 9 】

「アミノ酸」という用語は、天然及び合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と類似の方法で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるもの、ならびに後に修飾されるアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸、及び  $\alpha$ -ホスホセリン）である。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ塩基性化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ酸、及び R 基に結合している炭素を有する化合物を指す（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチルメチオニンスルホニウム）。そのような類似体は、修飾 R 基（例えば、ノルロイシン）又は修飾ペプチド骨格を有するが、しかし、天然アミノ酸と同じ塩基性化学構造を保持する。「アミノ酸模倣体」は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、しかし、天然アミノ酸と類似の方法で機能する化学的化合物を指す。

【 0 0 3 0 】

「非荷電アミノ酸」という用語は、酸性官能基（例えば、 $-COOH$ ）又は塩基性官能基（例えば、 $-NH_2$ ）を含まないアミノ酸を指す。塩基性アミノ酸は、リジン（K）及びアルギニン（R）を含む。酸性アミノ酸は、アスパラギン酸（D）及びグルタミン酸（E）を含む。「非荷電アミノ酸」は、例えば、グリシン（G）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、フェニルアラニン（F）を含むが、しかし、また、 $-OH$  基、 $-SH$  基、又は  $-SCH_3$  基を含むアミノ酸（例えば、スレオニン（T）、セリン（S）、チロシン（Y）、システイン（C）、及びメチオニン（M））も含む。

【 0 0 3 1 】

非天然アミノ酸誘導体又は類似体のポリペプチド鎖中への部位特異的な方法での組み入れを可能にする種々の公知の方法が当技術分野において存在する（例えば、WO 0 2 / 0 8 6 0 7 5 を参照のこと）。

【 0 0 3 2 】

アミノ酸は、本明細書において、通常公知の 3 文字記号により又は IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission により推奨される 1 文字記号により呼んでよい。ヌクレオチドは、同じように、それらの通常受け入れられた 1 文字コードにより呼んでよい。

【 0 0 3 3 】

「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸配列及び核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に關して、「保存的に修飾された変異体」は、同一の又は本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を、又は、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が、任意の所

10

20

30

40

50

定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、及び G C U は全てアミノ酸アラニンをコードする。このように、アラニンがコドンにより特定されるあらゆる位置で、コドンは、コードされるポリペプチドを改変させることなく、記載される対応するコドンのいずれかに改変させることができる。そのような核酸変異は「サイレント変異」であり、保存的に修飾された変異の 1 種である。ポリペプチドをコードする本明細書におけるあらゆる核酸配列が、また、核酸のあるゆる可能なサイレント変異を記載する。当業者は、核酸中の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンである A U G 及び通常、トリプトファン（W）の唯一のコドンである T G G を除く）を修飾して、機能的に同一の分子を生じることができることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載される各配列において潜在している。

10

## 【 0 0 3 4 】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされる配列において単一のアミノ酸又は小さなパーセンテージのアミノ酸を改変、付加、又は欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質配列への個々の置換、欠失、又は付加が、「保存的に修飾された変異体」であり、ここで改変が化学的に類似のアミノ酸でのアミノ酸の置換をもたらすことを認識するであろう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である。そのような保存的に修飾された変異体は、本発明の多型変異体、種間ホモログ、及び対立遺伝子への付加であり、これらを除外しない。

## 【 0 0 3 5 】

以下の 8 群：

20

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、トレオニン (T)；及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

は、各々が、互いに保存的な置換であるアミノ酸を含む（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照のこと）。

30

## 【 0 0 3 6 】

「ペプチド」は、アミド結合を介して一緒に連結されたアミノ酸に由来するモノマーを含むポリマーを指す。本発明のペプチドは、サイズにおいて変動しうる（例えば、2 個のアミノ酸から数百個又は数千個のアミノ酸）。より大きなペプチド（例えば、少なくとも 10、少なくとも 20、少なくとも 30、又は少なくとも 50 のアミノ酸残基）は、あるいは、「ポリペプチド」又は「タンパク質」と呼ばれる。また、非天然アミノ酸、例えば、 $\beta$ -アラニン、フェニルグリシン、ホモアルギニン、及びホモフェニルアラニンも含まれる。遺伝子によりコードされないアミノ酸も本発明において使用してよい。さらに、修飾されて、反応基、グリコシル化配列、ポリマー、治療用成分、生体分子などを含むアミノ酸も本発明において使用してよい。本発明において使用されるアミノ酸の全てが、D 異性体又は L 異性体のいずれかでありうる。L 異性体が一般的に好ましい。また、他のペプチド模倣体も本発明において有用である。本明細書において使用される「ペプチド」又は「ポリペプチド」は、グリコシル化及び非グリコシル化ペプチド又は「ポリペプチド」の両方を指す。また、ポリペプチドを発現する系により完全にグリコシル化されるポリペプチドが含まれる。一般的な総説については、Spatola, A. F., CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)を参照のこと。「ポリペプチド」という用語は、また、そのポリペプチドの全ての可能な形状、例えば突然変異形状（1 つ又は複数の突然変異）、切断形状、伸長形状、ポリペプチドを含む融合タンパク質、タグ付きポリペプチド、変異体（それにおいて特定のドメインが除去又は部分的に除去されている）などを含む。「ポリペプチ

40

50

ド」という用語は、そのポリペプチドのモノマー、オリゴマー、及びポリマーを含む。例えば、「フォンビルブランド因子」(vWF)という用語は、vWFのモノマー、ダイマー、及びオリゴマーの形状を含む。

【0037】

本願において、アミノ酸残基を、ポリペプチドのN末端アミノ酸(例えば、N末端メチオニン)、「1」と番号付けられる)からのそれらの相対的位置に従って番号付けする(典型的に上付き文字で)。N末端アミノ酸はメチオニン(M)、「1」と番号付けられる)でありうる。各アミノ酸残基に関連する番号を容易に調整し、ポリペプチドのN末端がメチオニンなしで開始する場合でのN末端メチオニンの非存在を反映することができる。例示的なポリペプチドのN末端がメチオニンの有無にかかわらず開始することができることが理解される。

10

【0038】

「親ポリペプチド」という用語は、アミノ酸配列を有し、本発明の「外因性」N連結グリコシル化配列を含まない任意のポリペプチドを指す。しかし、「親ポリペプチド」は、1つ又は複数の天然(内因性)N連結グリコシル化配列を含みうる。例えば、野生型ポリペプチドは、N連結グリコシル化配列「NLT」を含みうる。「親ポリペプチド」という用語は、野生型ポリペプチド、融合ポリペプチド、合成ポリペプチド、組換えポリペプチド(治療用ポリペプチド)、ならびにその変異体(例えば、アミノ酸の1つ又は複数の置換、アミノ酸の挿入、アミノ酸の欠失などを通じて先に修飾されている)を含む任意のポリペプチドを指す(そのような修飾が本発明のN連結グリコシル化配列を形成することにならない限り)。一実施態様において、親ポリペプチドのアミノ酸配列、又は親ポリペプチドをコードする核酸配列が定義され、任意の方法で公に利用可能である。例えば、親ポリペプチドは野生型ポリペプチドであり、野生型ポリペプチドのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列は公に利用可能なタンパク質データベース(例えば、EMBL Nucleotide Sequence Database, NCBI Entrez, ExPasy, Protein Data Bankなど)の一部である。別の例において、親ポリペプチドは野生型ポリペプチドではないが、しかし、治療用ポリペプチド(即ち、承認済み薬物)として使用され、そのようなポリペプチドの配列は科学刊行物又は特許において公に利用可能である。さらに別の例において、親ポリペプチドのアミノ酸配列又は親ポリペプチドをコードする核酸配列は、本発明の時点で任意の方法で公に利用可能であった。一実施態様において、親ポリペプチドはより大きな構造の一部である。例えば、親ポリペプチドは、抗体の定常領域(Fc)又はC<sub>H</sub>2ドメインに対応し、それにおいてこれらのドメインは抗体全体の一部でありうる。一実施態様において、親ポリペプチドは未知の配列の抗体ではない。

20

30

【0039】

「突然変異ポリペプチド」又は「ポリペプチド変異体」という用語は、ポリペプチドの形状を指し、それにおいてそのアミノ酸配列は、その対応する野生型の形状、天然に存在する形状、又は任意の他の親の形状のアミノ酸配列とは異なる。突然変異ポリペプチドは、突然変異ポリペプチドをもたらす1つ又は複数の突然変異(例えば、置換、挿入、欠失など)を含みうる。

【0040】

「シークオンポリペプチド」という用語は、そのアミノ酸配列中に「外因性N連結グリコシル化配列」を含むポリペプチド変異体を指す。「シークオンポリペプチド」は、少なくとも1つの外因性N連結グリコシル化配列を含むが、しかし、1つ又は複数の内因性(例えば、天然)N連結グリコシル化配列も含みうる。

40

【0041】

「外因性N連結グリコシル化配列」という用語は、親ポリペプチド(例えば、野生型ポリペプチド)のアミノ酸配列中に導入されるN連結グリコシル化配列を指し、それにおいて親ポリペプチドは、異なる位置に、N連結グリコシル化配列を含まない、又は、N連結グリコシル化配列を含む。一例において、N連結グリコシル化配列は、N連結グリコシル化配列を有さない野生型ポリペプチド中に導入される。別の例において、野生型ポリペ

50

チドは、天然で、第1の位置に第1のN連結グリコシル化配列を含む。第2のN連結グリコシル化を、第2の位置でこの野生型ポリペプチド中に導入する。この修飾は、第2の位置に「外因性N連結グリコシル化配列」を有するポリペプチドをもたらす。外因性N連結グリコシル化配列を、突然変異により親ポリペプチド中に導入してよい。あるいは、外因性N連結グリコシル化配列を伴うポリペプチドを化学合成により作製することができる。

【0042】

「親ポリペプチドに対応する」という用語（又はこの用語の文法的バリエーション）を使用し、本発明のシークオンポリペプチドを記載し、それにおいてシークオンポリペプチドのアミノ酸配列は、対応する親ポリペプチドのアミノ酸配列とは、本発明の少なくとも1つの外因性N連結グリコシル化配列の存在だけにより異なる。典型的には、シークオンポリペプチド及び親ポリペプチドのアミノ酸配列は、高いパーセンテージの同一性を示す。一例において、「親ポリペプチドに対応する」は、シークオンポリペプチドのアミノ酸配列が、親ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約98%の同一性を有することを意味する。別の例において、シークオンポリペプチドをコードする核酸配列は、親ポリペプチドをコードする核酸配列と少なくとも約50%の同一性、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約98%の同一性を有する。

【0043】

「グリコシル化配列（例えば、N連結グリコシル化配列）を親ポリペプチド中に導入すること（又は付加すること）」という用語（又はその文法的バリエーション）、又はグリコシル化配列を含めるために「親ポリペプチドを修飾すること」（又はその文法的バリエーション）は、親ポリペプチドがそのような変換のための物理的な出発物質であることを必ずしも意味せず、しかし、むしろ、親ポリペプチドが別のポリペプチドを作製するためのガイドアミノ酸配列を提供することを意味する。一例において、「グリコシル化配列を親ポリペプチド中に導入すること」は、親ポリペプチドのための遺伝子を適切な突然変異を通じて修飾し、シークオンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を作製することを意味する。別の例において、「グリコシル化配列を親ポリペプチド中に導入すること」は、結果として得られるポリペプチドが、理論上は、親ポリペプチド配列をガイドとして使用してデザインされることを意味する。デザインされたポリペプチドは、次に、化学的手段又は他の手段により生成されうる。

【0044】

「リードポリペプチド」という用語は、例えば、本発明の方法により有効にグリコシル化及び/又は複合糖質化（例えば、糖PEG化）することができる本発明のシークオンポリペプチドを指す。本発明のシークオンポリペプチドをリードポリペプチドとして適格とするために、そのようなポリペプチドを、適した反応条件に供した場合、好ましくはグリコシル化又は複合糖質化（例えば、糖PEG化）されて、反応収率は少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは約80%、約85%、約90%、又は約95%である。最も好ましくは本発明のそれらのリードポリペプチドであり、それらはグリコシル化又は複合糖質化（例えば、糖PEG化）することができ、反応収率は80%超、85%超、90%超、又は95%超である。1つの好ましい実施態様において、リードポリペプチドは、各N連結グリコシル化配列の1つのアミノ酸残基だけがグリコシル化又は複合糖質化（例えば、糖PEG化）される（モノグリコシル化）ような様式で、グリコシル化又は糖PEG化される。種々の実施態様において、グリコシル化又は複合糖質化された単一のアミノ酸残基が、外因性N連結グリコシル化配列内に位置する。

【0045】

「ライブラリー」という用語は、異なるポリペプチドのコレクションを指し、ライブラリーの各メンバーが共通の親ポリペプチドに対応する。ライブラリー中の各ポリペプチド種は、ライブラリーの「メンバー」と呼ばれる。好ましくは、本発明のライブラリーは、

10

20

30

40

50

リードポリペプチドを同定するための集団を与えるために十分な数及び多様性のポリペプチドのコレクションである。ライブラリーは少なくとも2つの異なるポリペプチドを含む。一実施態様において、ライブラリーは約2～約10のメンバーを含む。別の実施態様において、ライブラリーは約10～約20のメンバーを含む。さらに別の実施態様において、ライブラリーは約20～約30のメンバーを含む。さらなる実施態様において、ライブラリーは約30～約50のメンバーを含む。別の実施態様において、ライブラリーは約50～約100のメンバーを含む。さらに別の実施態様において、ライブラリーは100を上回るメンバーを含む。ライブラリーのメンバーは、混合物の一部でありうる、又は、互いに単離されうる。一例において、ライブラリーのメンバーは、場合により、他の成分を含む混合物の一部である。例えば、少なくとも2つのシークオンポリペプチドが、細胞培養ブラスの容積中に存在する。別の例において、ライブラリーのメンバーは、各々が別々に発現され、場合により単離される。単離されたシークオンポリペプチドは、場合により、マルチウェル容器中に含まれてよく、それにおいて各ウェルが異なる型のシークオンポリペプチドを含む。

10

## 【0046】

本発明の「 $C_H2$ 」ドメインという用語は、免疫グロブリン重鎖定常 $C_H2$ ドメインを記載することを意味する。免疫グロブリン $C_H2$ ドメインを定義する際、一般的には免疫グロブリンを、そして具体的には、免疫グロブリンのドメイン構造を参照する(Kabat E. A. (1978) Adv. Protein Chem. 32: 1-75によりヒトIgG1に適用される通り)。

## 【0047】

「 $C_H2$ ドメインを含むポリペプチド」又は「少なくとも1つの $C_H2$ ドメインを含むポリペプチド」という用語は、全抗体分子、抗体フラグメント(例えば、Fcドメイン)、又は免疫グロブリンの $C_H2$ 領域と等価な領域を含む融合タンパク質を含むことを意図する。

20

## 【0048】

「ポリペプチド抱合体」という用語は、本発明の種を指し、それにおいてポリペプチドは、本明細書で先に記載する通りに、糖成分(例えば、修飾された糖)で複合糖質化される。代表的な例において、ポリペプチドは、外因性O連結グリコシル化配列を有するシークオンポリペプチドである。

## 【0049】

「プロリン残基に近接する」又は「プロリン残基に近接している」は、本明細書において使用される通り、プロリン残基から除去された約10未満のアミノ酸、好ましくは、プロリン残基から除去された約9、8、7、6、又は5未満のアミノ酸、より好ましくは、プロリン残基から除去された約4、3、又は2未満の残基であるアミノ酸を指す。「プロリン残基に隣接する」アミノ酸は、プロリン残基のC末端側及びN末端側にありうる。

30

## 【0050】

「シアル酸」という用語は、9炭素カルボキシル化糖のファミリーの任意のメンバーを指す。シアル酸ファミリーの最も共通のメンバーは、N-アセチル-ノイラミン酸(2-ケト-5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノヌロピラノス-1-オン酸(しばしばNeu5Ac、NeuAc、又はNANAと略される))である。ファミリーの第2のメンバーはN-グリコリル-ノイラミン酸(Neu5Gc又はNeuGc)であり、この中でNeuAcのN-アセチル基がヒドロキシル化されている。第3のシアル酸ファミリーメンバーは、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸(KDN)である(Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990))。また、9置換シアル酸、例えば9-O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル-Neu5Ac様9-O-ラクチル-Neu5Ac又は9-O-アセチル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Ac及び9-アジド-9-デオキシ-Neu5Acなどが含まれる。シアル酸ファミリーの総説については、例えば、Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992))を参照のこと。シアリル化

40

50

手順におけるシアル酸化合物の合成及び使用は、1992年10月1日に公開された国際出願WO 92/16640において開示されている。

【0051】

本明細書において使用される「修飾された糖」という用語は、天然又は非天然の炭水化物を指す。一実施態様において、「修飾された糖」は、本発明の方法を使用して、ポリペプチドのアミノ酸又はグリコシル残基上に酵素的に付加される。修飾された糖は、多くの酵素基質（限定はされないが、糖ヌクレオチド（モノ、ジ、及びトリリン酸）、活性化された糖（例えば、グリコシルハライド、グリコシルメシレート）及び活性化されておらず、またヌクレオチドでもない糖を含む）より選択される。「修飾された糖」は、「修飾基」を用いて共有結合的に官能性を持たせる。有用な修飾基は、限定はされないが、ポリマー修飾基（例えば、水溶性ポリマー）、治療用成分、診断用成分、生体分子などを含む。一実施態様において、修飾基は、天然グリコシル成分（例えば、天然ポリサッカライド）ではない。修飾基は、好ましくは、非天然である。一例において、「非天然修飾基」はポリマー修飾基であり、それにおいて少なくとも1つのポリマー成分は非天然である。別の例において、非天然修飾基は修飾された炭水化物である。修飾基を用いた官能化の位置は、それが、「修飾された糖」がポリペプチドに酵素的に付加されることを妨げないように選択される。「修飾された糖」は、また、修飾基を用いて官能性を持たせ、天然酵素又は修飾酵素（例えばグリコシルトランスフェラーゼなど）の基質である任意のグリコシル模倣成分を指す。

10

【0052】

本明細書において使用される「ポリマー修飾基」という用語は、少なくとも1つのポリマー成分（ポリマー）を含む修飾基である。一例において、ポリマー修飾基は、ポリペプチドに加えられた場合、そのようなポリペプチドの少なくとも1つの生物学的特性、例えば、そのバイオアベイラビリティ、生物学的活性、そのインビボでの半減期又は免疫原性を改変させることができる。例示的なポリマーは、水溶性及び水不溶性のポリマーを含む。ポリマー修飾基は直鎖又は分岐であり、1つ又は複数の非依存的に選択されたポリマー成分、例えばポリ（アルキレングリコール）及びその誘導体などを含みうる。一例において、ポリマーは非天然である。例示的な実施態様において、ポリマー修飾基は、水溶性ポリマー、例えば、ポリ（エチレングリコール）及びその誘導体（PEG、m-PEG）、ポリ（プロピレングリコール）及びその誘導体（PPG、m-PPG）などを含む。好ましい実施態様において、ポリ（エチレングリコール）又はポリ（プロピレングリコール）は、本質的に均一分散（homodisperse）である分子量を有する。一実施態様において、ポリマー修飾基は天然又は非天然ポリサッカライド（例えば、ポリシアル酸）である。

20

30

【0053】

「水溶性」という用語は、水中で検出可能な程度の溶解性を有する成分を指す。水溶性を検出及び/又は定量化するための方法は、当技術分野において周知である。例示的な水溶性ポリマーは、ペプチド、オリゴサッカライド及びポリサッカライド、ポリ（エーテル）、ポリ（アミン）、ポリ（カルボン酸）などを含む。ペプチドは混合配列を有しうる、又は、単一のアミノ酸[ポリ（アミノ酸）、例えば、ポリ（リジン）]で構成されうる。例示的なポリサッカライドはポリ（シアル酸）である。例示的なポリ（エーテル）はポリ（エチレングリコール）（例えば、m-PEG）である。ポリ（エチレンイミン）は例示的なポリアミンであり、ポリ（アクリル）酸は代表的なポリ（カルボン酸）である。

40

【0054】

水溶性ポリマーのポリマー骨格はポリ（エチレングリコール）（即ち、PEG）でありうる。しかし、他の関連するポリマーも本発明の実行における使用に適していること、及び、PEG又はポリ（エチレングリコール）という用語の使用がこの点において包括的であり、排他的ではないことを意図することを理解すべきである。PEGという用語は、その形状（アルコキシPEG、二官能性PEG、マルチアーム型PEG、フォーク型PEG、分岐PEG、ペンダント型PEG（即ち、ポリマー骨格に対してペンダント状の1つ又は複数の官能基を有するPEG又は関連するポリマー）、又はその中に分解可能な連結を

50

伴うPEG)のいずれかのポリ(エチレングリコール)を含む。同じように、ポリ(アルキレンオキシド)という用語は、全ての形状のそのような物質を含むことを意味し、複数の型のポリ(アルキレンオキシド)、例えばPEGとPPGの組み合わせなどを組み入れる物質を含む。

#### 【0055】

ポリマー骨格は直鎖又は分岐でありうる。分岐ポリマー骨格は、一般的に、当技術分野において公知である。典型的には、分岐ポリマーは、中心分岐コア成分及び中心分岐コアに連結した複数の直鎖ポリマー鎖を有する。PEGは、通常、種々のポリオール(例えばグリセロール、ペンタエリスリトール、及びソルビトールなど)へのエチレンオキシドの付加により調製することができる分岐形状で使用される。中心分岐成分もいくつかのアミノ酸(例えばリジン又はシステインなど)に由来しうる。一例において、分岐ポリ(エチレングリコール)は、一般的な形状 $R(-PEG-OH)_m$ で表わすことができ、式中、Rは中心成分、例えばグリセロール又はペンタエリスリトールなどを表わし、mはアームの数を表わす。マルチアーム型PEG分子、例えば米国特許第5,932,462号において記載されるものなどが、参照により本明細書においてその全体が組み入れられ、ポリマー骨格として使用することもできる。

#### 【0056】

多くの他のポリマーも本発明に適する。非ペプチド性及び水溶性であるポリマー骨格は、本発明において特に有用である。適したポリマーの例は、限定はされないが、他のポリ(アルキレングリコール)、例えばポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)、エチレングリコール及びプロピレングリコールなどのコポリマーなど、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)、ポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、例えば米国特許第5,629,384号に記載のものなど(参照により本明細書においてその全体が含まれる)、ならびにコポリマー、ターポリマー、及びその混合物を含む。ポリマー骨格の各鎖の分子量は変動しうるが、それは典型的に約100Da~約100,000Da、しばしば約5,000Da~約80,000Daの範囲にある。

#### 【0057】

本明細書において使用される「複合糖質化」という用語は、修飾された糖種の、ポリペプチド(例えば、本発明の突然変異ヒト成長ホルモン)のアミノ酸残基又はグリコシル残基への酵素的に媒介された抱合を指す。一例において、修飾された糖は、1つ又は複数の修飾基に共有結合的に付着される。「複合糖質化」の亜群は「グリコールPEG化」又は「糖PEG化」であり、それにおいて修飾された糖の修飾基はポリ(エチレングリコール)又はその誘導体、例えばアルキル誘導体(例えば、m-PEG)又は反応性官能基を伴う誘導体(例えば、 $H_2N-PEG$ 、 $HOOC-PEG$ )である。

#### 【0058】

「大規模」及び「工業規模」という用語は互換的に使用され、少なくとも約250mg、好ましくは少なくとも約500mg、より好ましくは少なくとも約1グラムの複合糖質を、単一の反応サイクルの完了時に産生する反応サイクルを指す。

#### 【0059】

「N連結グリコシル化配列」又は「シークオン」という用語は、少なくとも1つのアスパラギン(N)残基を含む任意のアミノ酸配列(例えば、約3~約9のアミノ酸、好ましくは約3~約6のアミノ酸を含む)を指す。一実施態様において、N連結グリコシル化配列は、好ましくはポリペプチドのアミノ酸配列の一部である場合、酵素、例えばオリゴサッカリルトランスフェラーゼの基質である。典型的な実施態様において、酵素は、上に記載のアスパラギン残基のアミノ基を修飾することによりグリコシル成分をN連結グリコシル化配列上に転移させ、それは「グリコシル化の部位」と呼ばれる。本発明は、野生型ポリペプチド又はその任意の他の親形状において天然であるN連結グリコシル化配列(内因性N連結グリコシル化配列)と「外因性N連結グリコシル化配列」の間を区別する。外因

10

20

30

40

50

性N連結グリコシル化配列を含むポリペプチドは、「シークオンポリペプチド」と呼ばれる。親ポリペプチドのアミノ酸配列を修飾し、組換え技術、化学合成、又は他の手段を通じて外因性N連結グリコシル化配列を含ませてよい。

【0060】

「グリコシル連結基」という用語は、本明細書において使用される通り、修飾基（例えば、PEG成分、治療用成分、生体分子）を共有結合的に付着させたグリコシル残基を指す；グリコシル連結基は、修飾基を抱合体の残部に連結させる。本発明の方法において、「グリコシル連結基」は、グリコシル化又は非グリコシル化ポリペプチドに共有結合的に付着し、それにより修飾基をポリペプチドのアミノ酸残基及び/又はグリコシル残基に連結させる。「グリコシル連結基」は、一般的に、ポリペプチドのアミノ酸残基及び/又はグリコシル残基への「修飾された糖」の酵素的付着による「修飾された糖」に由来する。グリコシル連結基は、修飾基 - 修飾された糖カセットの形成中に分解されるサッカライド由来構造でありうる（例えば、酸化 シッフ塩基形成 還元）、又は、グリコシル連結基は「インタクトなグリコシル連結基」でありうる。「グリコシル連結基」はグリコシル模倣成分を含みうる。例えば、グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、シアリルトランスフェラーゼ）は、修飾された糖をグリコシル化ポリペプチドに加えるために使用され、グリコシル模倣基質（例えば、糖成分がグリコシル模倣成分（例えば、シアリル模倣成分）である修飾された糖）に耐性を示す。修飾されたグリコシル模倣糖の転移は、グリコシル模倣成分であるグリコシル連結基を有する抱合体をもたらす。

10

【0061】

「インタクトなグリコシル連結基」という用語は、グリコシル成分に由来するグリコシル連結基を指し、それにおいて修飾基を抱合体の残部に連結するサッカライドモノマーは分解されず、例えば、を使用して化学的に酸化される。例えば、環状構造が、酸化、例えば、メタ過ヨウ素酸ナトリウムにより開環される、又はそれにおいて。本発明の例示的な「インタクトなグリコシル連結基」はシアル酸成分であり、それにおいてC - 6側鎖はインタクトである（ $\text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$ ）。

20

【0062】

「標的成分」という用語は、本明細書において使用される通り、身体の特定の組織又は部位に選択的に局在する種を指す。局在化は、分子決定基の特異的認識、標的薬剤又は抱合体の分子サイズ、イオン相互作用、疎水性相互作用などにより媒介される。薬剤を特定の組織又は部位に標的化する他の機構は、当業者に公知である。例示的な標的成分は、抗体、抗体フラグメント、トランスフェリン、HS - 糖タンパク質、凝固因子、血清タンパク質、糖タンパク質、G - CSF、GM - CSF、M - CSF、EPOなどを含む。

30

【0063】

「連結基」という用語は、2つの成分を連結する任意の化学基である。一例において、連結基は少なくとも1つのヘテロ原子を含む。例示的な連結基は、エーテル、チオエーテル、アミン、カルボキサミド、スルホンアミド、ヒドラジン、カルボニル、カルバメート、尿素、チオ尿素、エステル、及びカーボネートを含む。

【0064】

本明細書において使用される「治療用成分」は、治療のために有用な任意の薬剤（限定はされないが、抗生物質、抗炎症剤、抗腫瘍薬、細胞毒、及び放射性薬剤を含む）を意味する。「治療用成分」は、生物活性剤のプロドラッグ、複数の治療用成分が担体に結合されたコンストラクト（例えば、多価薬剤）を含む。治療用成分は、また、タンパク質及びタンパク質を含むコンストラクトを含む。例示的なタンパク質は、限定はされないが、エリスロポエチン（EPO）、顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GMCSF）、インターフェロン（例えば、インターフェロン - 、 - 、 - ）、インターロイキン（例えば、インターロイキンII）、血清タンパク質（例えば、第VII、VIIa、VIII、IX、及びX因子）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）、卵胞刺激ホルモン（FSH）及び黄体形成ホルモン（LH）、ならびに抗体融合タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）/Fcドメイン融合タ

40

50

ンパク質))を含む。

【0065】

本明細書において使用される「抗腫瘍薬」は、癌と闘うために有用な任意の薬剤（限定はされないが、細胞毒及び薬剤、例えば代謝拮抗剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗生物質、有糸分裂阻害剤、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、インターフェロン、及び放射性薬剤など）を意味する。また、「抗腫瘍薬」という用語の範囲内には、抗腫瘍活性を伴うポリペプチド（例えば、TNF- $\alpha$ ）の抱合体が包含される。抱合体は、限定はされないが、治療用タンパク質と本発明の糖タンパク質の間に形成されるものを含む。代表的な抱合体は、PSGL-1とTNF- $\alpha$ の間に形成されるものである。

10

【0066】

本明細書において使用される「細胞毒又は細胞毒薬剤」は、細胞に有害な任意の薬剤を意味する。例は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びプロマイシンならびにその類似体又はホモログを含む。他の毒素は、例えば、リシン、CC-1065及び類似体、デュオカルマイシンを含む。さらに他の毒素は、ジフテリア毒素及び蛇毒（例えば、コブラ毒）を含む。

20

【0067】

本明細書において使用される「放射性薬剤」は、腫瘍を診断又は破壊する際に有効である任意のラジオアイソトープを含む。例は、限定はされないが、インジウム-111、コバルト-60を含む。また、天然の放射性元素、例えばウラニウム、ラジウム、及びトリウムなどは、典型的に、ラジオアイソトープの混合物を表わし、放射性薬剤の適した例である。金属イオンは、典型的に、有機キレート成分を用いてキレートされる。

【0068】

多くの有用なキレート基、クラウンエーテル、クリプタンドなどが当技術分野において公知であり、本発明の化合物中に組み入れることができる（例えば、EDTA、DTPA、DOTA、NTA、HDTAなど、及びそれらのホスホネート類似体、例えばDTPP、EDTP、HDTP、NTPなど）。例えば、Pitt et al., "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload," INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D.C.1980, pp.279-312; Lindoy, THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, New York, 1989、及び本明細書に含まれる参考文献を参照のこと。

30

【0069】

また、キレート剤、クラウンエーテル、及びシクロデキストリンの他の分子への付着を可能にする多様なルートが、当業者に利用可能である。例えば、Meares et al., "Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides", MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS; Feeney, et al., Eds., American Chemical Society, Washington, D.C.1982, pp.370-387; Kasina et al., Bioconjugate Chem., 9: 108-117 (1998); Song et al., Bioconjugate Chem., 8: 249-255 (1997)を参照のこと。

40

【0070】

本明細書において使用される「薬学的に許容可能な担体」は任意の物質を含み、それは、抱合体と合わされた際に、抱合体の活性を保持し、被験者の免疫系と非反応性である。「薬学的に許容可能な担体」は、固体及び液体、例えば媒体、希釈剤、及び溶媒などを含む。例は、限定はされないが、標準的な薬学的担体（例えばリン酸緩衝生理食塩水溶液など）、水、エマルジョン（例えば油/水エマルジョンなど）、及び種々の型の湿潤剤のい

50

ずれかを含む。他の担体は、また、滅菌溶液、錠剤（コーティングされた錠剤を含む）、及びカプセルを含みうる。典型的に、そのような担体は、賦形剤、例えばデンプン、乳、糖、特定の型の粘土、ゼラチン、ステアリン酸又はその塩、マグネシウム又はステアリン酸カルシウム、タルク、植物性の脂肪又は油、ガム、グリコール、又は他の公知の賦形剤などを含む。そのような担体は、また、香料及び着色添加剤又は他の成分を含みうる。そのような担体を含む組成物は、周知の従来方法により製剤化される。

【0071】

本明細書において使用される「投与する」は、経口投与、坐剤としての投与、局所接触、静脈内、腹腔内、筋内、病巣内、又は皮下投与、吸入による投与、又は徐放デバイス（例えば、ミニ浸透圧ポンプ）の被験者への移植を意味する。投与は、非経口及び経粘膜（例えば、経口、経鼻、膣、直腸、又は経皮）を含む任意のルートによる、特に吸入による。非経口投与は、例えば、静脈内、筋内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、及び頭蓋内を含む。さらに、注入が腫瘍を処置するため、例えば、アポトーシスを誘導するためである場合、投与は、腫瘍に直接的に及び/又は腫瘍の周囲の組織中でよい。他の送達形態は、限定はされないが、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどを含む。

10

【0072】

「回復させること」又は「回復させる」という用語は、病理又は状態の処置における成功の任意の兆候（任意の客観的又は主観的なパラメーター、例えば症状の軽減、寛解、もしくは減弱又は患者の身体的もしくは精神的な幸福における改善など）を指す。症状の回復は客観的又は主観的なパラメーターに基づきうる；身体検査及び/又は精神医学的評価の結果を含む。

20

【0073】

「治療」という用語は、疾患又は状態を「処置すること」又は「処置」を指し、疾患の傾向がありうるが、しかし、まだ、疾患の症状を経験していない、又は、示さない被験者（例えば、ヒト）において、疾患又は状態が生じることを防ぐこと（予防的処置）、疾患を阻止すること（その発生を遅らせる、又は、停止させること）、疾患の症状又は副作用からの軽減を提供すること（対症処置を含む）、及び疾患を軽減すること（疾患の退行を起こすこと）を含む。

【0074】

「有効量」もしくは「に対して有効な量」もしくは「治療的有效量」という用語、又は任意の文法的に等価な用語は、動物又はヒトに対して疾患を処置するために投与された場合、その疾患の処置に効果を及ぼすために十分である。

30

【0075】

「単離された」という用語は、物質を産生するために使用される成分を実質的又は本質的に含まない物質を指す。本発明のポリペプチド抱合体では、「単離された」という用語は、ポリペプチド抱合体を調製するために使用される混合物中の物質に通常伴う成分を、実質的又は本質的に含まない物質を指す。「単離された」及び「純粋な」は互換的に使用される。典型的に、本発明の単離されたポリペプチド抱合体は、好ましくは範囲として表現される純度のレベルを有する。ポリペプチド抱合体についての純度の範囲の下端は、約60%、約70%、又は約80%であり、純度の範囲の上端は、約70%、約80%、約90%、又は約90%超である。

40

【0076】

ポリペプチド抱合体が約90%超純粋である場合、それらの純度も好ましくは範囲として表現される。純度の範囲の下端は、約90%、約92%、約94%、約96%、又は約98%である。純度の範囲の上端は、約92%、約94%、約96%、約98%、又は約100%純粋である。

【0077】

純度は、任意の当技術分野で認識されている分析方法（例えば、銀染色ゲル上でのバンド強度、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC、マススペクトロメトリー、又は類

50

似の手段)により決定される。

【0078】

「集団の実質的に各々のメンバー」は、本明細書において使用される通り、本発明のポリペプチド抱合体の集団の特徴を記載し、それにおいてポリペプチドに加えられた選択されたパーセントテージの修飾された糖が、ポリペプチド上の複数の同一受容体部位に加えられる。「集団の実質的に各々のメンバー」は、修飾された糖に抱合されたポリペプチド上の部位の「均質性」を言い、本発明の抱合体を指し、それは少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%均質である。

【0079】

「均質性」は、修飾された糖が抱合される受容体成分の集団にわたる構造的な一貫性を指す。このように、本発明のポリペプチド抱合体において(それにおいて、各々の修飾された糖成分を、あらゆる他の修飾された糖が抱合される受容体部位と同じ構造を有する受容体部位に抱合させる)、ポリペプチド抱合体は約100%均質であると言われる。均質性は、典型的に、範囲として表現される。ポリペプチド抱合体についての均質性の範囲の下端は、約50%、約60%、約70%、又は約80%であり、純度の範囲の上端は、約70%、約80%、約90%、又は約90%超である。

【0080】

ポリペプチド抱合体が約90%超又はそれと等しく均質である場合、それらの均質性も好ましくは範囲として表現される。均質性の範囲の下端は、約90%、約92%、約94%、約96%、又は約98%である。純度の範囲の上端は、約92%、約94%、約96%、約98%、又は約100%均質である。ポリペプチド抱合体の純度は、典型的に、1つ又は複数の当業者に公知の方法(例えば、液体クロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(LC-MS)、マトリックス支援レーザー脱離-飛行時間型マススペクトロメトリー(MALDI-TOF)、キャピラリー電気泳動など)により決定される。

【0081】

「実質的に均一なグリコフォーム」又は「実質的に均一なグリコシル化パターン」は、グリコペプチド種を指す場合、目的のグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GalNAcトランスフェラーゼ)によりグリコシル化される受容体成分のパーセンテージを指す。例えば、1,2フコシルトランスフェラーゼの場合、実質的に均一なフコシル化パターンが存在する(Gal1,4-GlcNAc-R及びそのシアル化類似体の実質的に全て(以下で定義する)が、本発明のペプチド抱合体においてフコシル化される場合)。出発物質がグリコシル化された受容体成分(例えば、フコシル化Gal1,4-GlcNAc-R成分)を含みうるのが当業者により理解されるであろう。このように、計算されたパーセントのグリコシル化は、本発明の方法によりグリコシル化される受容体成分、ならびに出発物質中で既にグリコシル化されている受容体成分を含む。

【0082】

「実質的に均一な」の上の定義における「実質的」という用語は、一般的に、特定のグリコシルトランスフェラーゼについて受容体成分の少なくとも約40%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも約95%がグリコシル化されることを意味する。

【0083】

置換基がそれらの従来の化学式(左から右に書かれる)により定められる場合、それらは等しく化学的に同一の置換基を包含し、それらは構造を右から左に書くことに起因する(例えば、 $-CH_2O-$ は $-OCH_2-$ も記載することを意図する)。

【0084】

「アルキル」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、別に記載しない限り、直鎖もしくは分岐鎖、又は環状(即ち、シクロアルキル)炭化水素ラジカル、又はその組み合わせを意味し、それらは十分に飽和、モノ飽和、又はポリ飽和されることがあり、指定された炭素原子数(即ち、 $C_1-C_{10}$ は1~10の炭素を意味する)を有する二価(例えば、アルキレン)及び多価ラジカルを含みうる。飽和炭化水素ラジカルの例は

10

20

30

40

50

、限定はされないが、基、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、シクロヘキシル、(シクロヘキシル)メチル、シクロプロピルメチルなど、ホモログ及び異性体(例えば、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチルなどの)を含む。不飽和アルキル基は、1つ又は複数の二重結合又は三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例は、限定はされないが、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-及び3-プロピニル、3-ブチニル及びより高級なホモログ及び異性体を含む。「アルキル」という用語は、別に記載しない限り、以下でより詳細に定義されるアルキルの誘導體、例えば「ヘテロアルキル」などを含むことも意味する。炭化水素基に限定されるアルキル基は、「ホモアルキル」と名付けられる。

10

## 【0085】

「アルキレン」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、アルカンに由来する二価ラジカルを意味し、限定はされないが、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -により例示され、「ヘテロアルキレン」として以下に記載される基をさらに含む。典型的に、アルキル(又はアルキレン)基は1~24の炭素原子を有し、10又はそれより少ない炭素原子を有するそれらの基が本発明において好ましい。「低級アルキル」又は「低級アルキレン」はより短いアルキル基又はアルキレン基であり、一般的に、8又はそれより少ない炭素原子を有する。

## 【0086】

20

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、及び「アルキルチオ」(又はチオアルコキシ)という用語は、それらの従来の意味で使用され、分子の残部に酸素原子、アミノ基、又は硫黄原子をそれぞれ介して付着されたそれらのアルキル基を指す。

## 【0087】

「ヘテロアルキル」という用語は、それ自体で又は別の用語との組み合わせで、別に記載しない限り、安定な直鎖又は分岐鎖、又は環状炭化水素ラジカル、又はその組み合わせを意味し、記載した数の炭素原子及びO、N、Si、及びSからなる群より選択される少なくとも1つのヘテロ原子からなり、それにおいて窒素原子及び硫黄原子は場合により酸化されうる、及び、窒素ヘテロ原子は場合により四級化されうる。ヘテロ原子O、N及びS、ならびにSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置に又はアルキル基が分子の残部に付着する位置に置かれてよい。例は、限定はされないが、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、及び $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ を含む。最高2つのヘテロ原子が連続的でありうる(例えば、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 及び $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ など)。同様に、「ヘテロアルキレン」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、ヘテロアルキルに由来する二価ラジカルを意味し、限定はされないが、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -及び $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2$ -により例示される。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子は、また、鎖末端のいずれか又は両方を占めうる(例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど)。さらに、アルキレン連結基及びヘテロアルキレン連結基について、連結基の配向は、連結基の化学式が書かれる方向により暗示されない。例えば、化学式 $-\text{CO}_2\text{R}'$ は $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 及び $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ の両方を表わす。

30

40

## 【0088】

「シクロアルキル」及び「ヘテロシクロアルキル」という用語は、それら自体で又は他の用語との組み合わせで、別に記載しない限り、「アルキル」及び「ヘテロアルキル」の環状バージョンをそれぞれ表わす。また、ヘテロシクロアルキルについて、ヘテロ原子は、ヘテロ環が分子の残部に付着する位置を占めうる。シクロアルキルの例は、限定はされ

50

ないが、シクロペンチル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキセニル、3 - シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどを含む。ヘテロシクロアルキルの例は、限定はされないが、1 - (1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジル)、1 - ピペリジニル、2 - ピペリジニル、3 - ピペリジニル、4 - モルホリニル、3 - モルホリニル、テトラヒドロフラン - 2 - イル、テトラヒドロフラン - 3 - イル、テトラヒドロチエノ - 2 - イル、テトラヒドロチエノ - 3 - イル、1 - ピペラジニル、2 - ピペラジニルなどを含む。

【0089】

「ハロ」又は「ハロゲン」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、別に記載しない限り、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素原子を意味する。また、例えば「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキル及びポリハロアルキルを含むことを意味する。例えば、「ハロ(C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>)アルキル」という用語は、限定はされないが、トリフルオロメチル、2, 2, 2 - トリフルオロエチル、4 - クロロブチル、3 - ブロモプロピルなどを含むことを意味する。

10

【0090】

「アリール」という用語は、別に記載しない限り、単環又は複環（好ましくは1 ~ 3環）でありうるポリ飽和された芳香族置換基を意味し、それは共に縮合される、又は、共有結合的に連結される。「ヘテロアリール」という用語は、N、O、S、Si、及びBより選択される1 ~ 4のヘテロ原子を含むアリール基（又は環）を指し、それにおいて窒素原子及び硫黄原子は場合により酸化され、窒素原子は場合により四級化される。ヘテロアリール基は、分子の残部に、ヘテロ原子を通じて付着させることができる。アリール基及びヘテロアリール基の非限定的な例は、フェニル、1 - ナフチル、2 - ナフチル、4 - ビフェニル、1 - ピロリル、2 - ピロリル、3 - ピロリル、3 - ピラゾリル、2 - イミダゾリル、4 - イミダゾリル、ピラジニル、2 - オキサゾリル、4 - オキサゾリル、2 - フェニル - 4 - オキサゾリル、5 - オキサゾリル、3 - イソオキサゾリル、4 - イソオキサゾリル、5 - イソオキサゾリル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、5 - チアゾリル、2 - フリル、3 - フリル、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - プリミジル、4 - プリミジル、5 - ベンゾチアゾリル、プリニル、2 - ベンゾイミダゾリル、5 - インドリル、1 - イソキノリル、5 - イソキノリル、2 - キノキサリニル、5 - キノキサリニル、3 - キノリル、及び6 - キノリルを含む。上に記載するアリール環系及びヘテロアリール環系の各々についての置換基は、下に記載する許容可能な置換基の群より選択される。

20

30

【0091】

簡潔さのために、「アリール」という用語は、他の用語（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）と組み合わせて使用された場合、上で定義するアリール環及びヘテロアリール環の両方を含む。このように、「アリールアルキル」という用語は、アリール基がアルキル基（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）に付着したそれらのラジカルを含むことを意味し、炭素原子（例えば、メチレン基）が、例えば、酸素原子により置換されているそれらのアルキル基を含む（例えば、フェノキシメチル、2 - ピリジルオキシメチル、3 - (1 - ナフチルオキシ)プロピルなど）。

【0092】

上の用語（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」、及び「ヘテロアリール」）の各々は、示したラジカル形状及び非置換形状の両方を含むことを意味する。ラジカル形状の各型についての好ましい置換基を以下に提供する。

40

【0093】

アルキルラジカル及びヘテロアルキルラジカル（しばしば、アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、及びヘテロシクロアルケニルと呼ばれる基を含む）のための置換基は、総称的に、「アルキル基置換基」と呼ばれ、それらは、限定はされないが、以下より選択される1つ又は複数の種々の基でありうる：置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、-OR'、=O、=NR

50

'、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')$  $=NR''''$ 、 $NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 、及び $-NO_2$ 、多くにおいて $0 \sim (2m' + 1)$ の範囲で、ここで $m'$ はそのようなラジカル中の炭素原子の総数である。 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ の各々は、非依存的に、水素、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、例えば、1-3ハロゲンで置換されたアリール、置換又は非置換アルキル、アルコキシ基もしくはチオアルコキシ基、又はアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が複数のR基を含む場合、例えば、R基の各々が、非依存的に、各 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ 基として選択される（これらの基の複数が存在する場合）。 $R'$ 及び $R''$ が同じ窒素原子に付着する場合、それらは窒素原子と合わされ、5、6、又は7員環を形成する。例えば、 $-NR'R''$ は、限定はされないが、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含むことを意味する。置換基に関する上の考察から、当業者は、「アルキル」という用語が、水素基以外の基に結合した炭素原子を含む基、例えばハロアルキルなど（例えば、 $-CF_3$ 及び $-CH_2CF_3$ ）及びアシル（例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ など）を含むことを意味することを理解するであろう。

#### 【0094】

アルキルラジカルについて記載される置換基と同様に、アリール基及びヘテロアリール基についての置換基は、総称的に、「アリール基置換基」と呼ばれる。置換基は以下より選択される。例えば：置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、 $OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')$  $=NR''''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 及び $-NO_2$ 、 $-R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ( $C_1-C_4$ )アルコキシ、及びフルオロ( $C_1-C_4$ )アルキル。多くにおいて、芳香族環系上の0から開放原子価(open valence)の総数までの範囲である；ならびに $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ は、好ましくは、非依存的に、水素、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、及び置換又は非置換ヘテロアリールより選択される。本発明の化合物が複数のR基を含む場合、例えば、R基の各々が、非依存的に、各 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ 基として選択される（これらの基の複数が存在する場合）。

#### 【0095】

アリール環又はヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つは、場合により、化学式 $-T-C(O)-(CRR')$  $q-U-$ の置換基で置換してよく、式中、T及びUは、非依存的に、 $-NR-$ 、 $-O-$ 、 $-CRR'-$ 、又は単結合であり、qは0~3の整数である。あるいは、アリール環又はヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つは、場合により、化学式 $-A-(CH_2)r-B-$ の置換基で置換してよく、式中、A及びBは、非依存的に、 $-CRR'-$ 、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'-$ 、又は単結合であり、rは0~4の整数である。そのように形成された新たな環の単結合の1つは、場合により、二重結合で置換してよい。あるいは、アリール環又はヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つは、場合により、化学式 $-(CRR')s-X-(CRR''R''')$  $d-$ の置換基で置換してよく、式中、s及びdは非依存的に0~3の整数であり、Xは $-O-$ 、 $-NR'-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、又は $-S(O)_2NR'-$ である。置換基R、 $R'$ 、 $R''$ 、及び $R''''$ は、好ましくは、水素又は置換もしくは非置換( $C_1-C_6$ )アルキルより非依存的に選択される。

10

20

30

40

50

## 【0096】

本明細書において使用される「アシル」という用語は、カルボニル残基C(O)Rを含む置換基を記載する。Rについての例示的な種は、H、ハロゲン、アルコキシ、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルを含む。

## 【0097】

本明細書において使用される「縮合環系」という用語は、少なくとも2つの環を意味し、それにおいて各環が少なくとも2つの原子を共通して別の環と共に有する。「縮合環系」は、芳香環ならびに非芳香環を含みうる。「縮合環系」の例は、ナフタレン、インドール、キノリン、クロメンなどである。

10

## 【0098】

本明細書において使用される「ヘテロ原子」という用語は、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)、ケイ素(Si)、ホウ素(B)、及びリン(P)を含む。

## 【0099】

記号「R」は、置換基を表わす一般的な略語である。例示的な置換基は、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキル基を含む。

## 【0100】

「薬学的に許容可能な塩」という用語は、本明細書において記載される化合物上で見出される特定の置換基に依存し、比較的非毒性の酸又は塩基を用いて調製される塩を含む。本発明の化合物が比較的非毒性の官能性を含む場合、塩基添加塩が、そのような化合物(例えば、それらの中性形状)を、そのまま(neat)又は適した不活性溶媒中のいずれかで、十分量の所望の塩基と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容可能な塩基添加塩の例は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、又はマグネシウム塩、又は類似の塩を含む。本発明の化合物が比較的非毒性の官能性を含む場合、酸添加塩が、そのような化合物(例えば、それらの中性形状)を、そのまま又は適した不活性溶媒中のいずれかで、十分量の所望の酸と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容可能な酸添加塩の例は、無機酸、例えば塩化水素酸、スルホン酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸、リン酸、一水素リン酸、二水素リン酸、硫酸、一水素硫酸、ヨウ化水素酸、又は亜リン酸などに由来するもの、ならびに比較的非毒性の有機酸、例えば酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などに由来する塩を含む。また、例えばアルギン酸などのアミノ酸の塩、及びグルクロン酸又はガラクトロン酸などの有機酸の塩が含まれる(例えば、Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19 (1977)を参照のこと)。本発明のある特定の化合物は、塩基性及び酸性の両方の官能性を含み、それによって化合物を塩基添加塩又は酸添加塩のいずれかに変換することが可能になる。

20

30

## 【0101】

化合物の中性形状は、好ましくは、塩を塩基又は酸と接触させ、親化合物を従来の方法で単離することにより再生される。化合物の親形状は、特定の物理的特性(例えば極性溶媒中での溶解性など)において種々の塩形状とは異なるが、しかし、別の点では、塩は、本発明の目的のための化合物の親形状と等価である。

40

## 【0102】

塩形状に加えて、本発明は、プロドラッグ形状である化合物を提供する。本明細書において記載される化合物のプロドラッグは、生理学的条件下で容易に化学変化を受け、本発明の化合物を提供するそれらの化合物である。また、プロドラッグを、化学的又は生化学的方法によりエクスピボの環境において本発明の化合物に変換することができる。例えば、プロドラッグは、適した酵素又は化学試薬を伴う経皮パッチリザーバー中に置かれた場合、本発明の化合物にゆっくりと変換させることができる。

50

## 【0103】

本発明の特定の化合物は、非溶媒和形状ならびに溶媒和形状（水和形状を含む）で存在しうる。一般的に、溶媒和形状は、非溶媒和形状と等価であり、本発明の範囲内に含まれる。本発明の特定の化合物が、複数の結晶又は非結晶の形状で存在しうる。一般的に、全ての物理的形状が、本発明により熟慮される使用において等価であり、本発明の範囲内にあることが意図される。

## 【0104】

本発明の特定の化合物は、不斉炭素原子（光学中心）又は二重結合を持つ；ラセミ体、ジアステレオマー、幾何異性体、及び個々の異性体が本発明の範囲内に包含される。

## 【0105】

本発明の化合物は、単一の異性体（例えば、鏡像異性体、シストランズ異性体、位置異性体、ジアステレオマー）又は異性体の混合物として調製してよい。好ましい実施態様において、化合物は実質的に単一の異性体として調製される。実質的に異性体として純粋である化合物を調製する方法は、当技術分野において公知である。例えば、鏡像異性的に濃縮された混合物及び純粋な鏡像異性化合物を、鏡像異性的に純粋である合成中間体を、キラル中心で立体化学を非荷電のままにする、又は、その完全な転化をもたらす反応と組み合わせるにより調製することができる。あるいは、合成ルートに沿った最終産物又は中間体を、単一の立体異性体中に分解することができる。特定の立体中心を転化する又は非荷電のままにするための技術、及び立体異性体の混合物を分解するための技術は、当技術分野において周知であり、それは、特定の状況のための適切な方法を選ぶ当業者の能力の十分に範囲内である。一般的に、Furniss et al. (eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5TH ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, pp.809-816; 及び Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990) を参照のこと。

## 【0106】

本明細書において使用されるラセミ、アンビスカレミック (ambiscalemic)、及びスカレミック (scalemic) 又は鏡像異性的に純粋な化合物のグラフ表現は、Maehr, J. Chem. Ed., 62: 114-120 (1985) から取られている：実線及び破線くさびを使用して、キラル元素の絶対的な立体配置を示す；波線は、それが表す結合が生成されうる任意の立体化学的暗示の否認を示す；太い実線及び破線は、示されるが、しかし、任意の絶対的な立体化学を暗示しない相対的な立体配置を示す幾何学的な記述語である；及びくさびは輪郭を描き、点線又は破線は、不確定な絶対的な立体配置の鏡像異性的に純粋な化合物を示す。

## 【0107】

「鏡像体過剰率」及び「ジアステレオマー過剰率」という用語は、本明細書において互換的に使用される。単一の立体中心を伴う化合物は、「鏡像体過剰率」において存在すると呼び、少なくとも2つの立体中心を伴う化合物は「ジアステレオマー過剰率」において存在すると呼ぶ。

## 【0108】

本発明の化合物は、また、非天然の割合の原子同位元素を、そのような化合物を構成する1つ又は複数の原子で含みうる。例えば、化合物は、放射性同位元素、例えばトリチウム ( $^3\text{H}$ )、ヨウ素 125 ( $^{125}\text{I}$ )、又は炭素 14 ( $^{14}\text{C}$ ) などで放射標識してよい。本発明の化合物の全ての同位元素のバリエーションは、放射活性の有無にかかわらず、本発明の範囲内に包含されることが意図される。

## 【0109】

「反応性官能基」は、本明細書において使用される通り、限定はされないが、オレフィン、アセチレン、アルコール、フェノール、エーテル、オキシド、ハライド、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、シアネート、イソシアネート、チオシアネート、イソチオシアネート、アミン、ヒドラジン、ヒドラゾン、ヒドラジド、ジアゾ、ジアゾニウム、ニトロ、ニトリル、メルカプタン、スルフィド、ジスルフィド、スルホキシド、スルホン、スルホン酸、スルフィン酸、アセタール、ケタール、無水物、硫酸、スルフ

10

20

30

40

50

エン酸、イソニトリル、アミジン、イミド、イミデート、ニトロソ、ヒドロキシルアミン、オキシム、ヒドロキサム酸、チオヒドロキサム酸、アレン、オルトエステル、亜硫酸、エナミン、イナミン、尿素、擬似尿素、セミカルバジド、カルボジイミド、カルバメート、イミン、アジド、アゾ化合物、アゾキシ化合物、及びニトロソ化合物を含む基を指す。反応性官能基は、また、バイオコンジュゲート、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、マレイミドなどを調製するために使用されるものを含む。これらの官能基の各々を調製するための方法は、当技術分野において周知であり、特定の目的のためのそれらの適用又は修飾は、当業者の能力の範囲内である（例えば、Sandler and Karo, eds. ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS, Academic Press, San Diego, 1989を参照のこと）。

10

## 【0110】

「非共有結合タンパク質結合基」は、インタクトな又は変性したポリペプチドと会合的な方法で相互作用する成分である。相互作用は、生物学的な環境において可逆的又は非可逆的のいずれかでありうる。「非共有結合タンパク質結合基」のキレート剤又は本発明の複合体への組み入れは、ポリペプチドと非共有結合的な方法で相互作用する能力を伴う薬剤又は複合体を提供する。例示的な非共有結合的な相互作用は、疎水性-疎水性相互作用及び静電的な相互作用を含む。例示的な「非共有結合タンパク質結合基」は、陰イオン基（例えば、リン酸、チオリン酸、ホスホネート、カルボキシレート、ボロン酸、硫酸、スルホン、スルホン酸、チオ硫酸、及びチオスルホン酸）を含む。

## 【0111】

「酵素切断」もしくは「切断酵素」又は文法的な変形、ならびに「ドメイン欠失酵素」又は文法的な変形は、対応する天然酵素よりも少ないアミノ酸残基を有するが、しかし、特定の酵素活性を保持する酵素を指す。任意の数のアミノ酸残基を、酵素が活性を保持する限り、欠失させることができる。一部の実施態様において、ドメイン又はドメインの部分を欠失させることができ、例えば、膜アンカードメインを欠失させて、可溶性酵素を残すことができる。一部のGalNAcT酵素、例えばGalNAc-T2などは、酵素活性を減弱させることなく欠失させることができるC末端レクチンドメインを有する。

20

## 【0112】

「リフォールディング発現系」は、酸化的な細胞内環境を伴う細菌又は他の微生物を指し、この微生物において発現される場合、ジスルフィド含有タンパク質をそれらの適切な/活性な形状でリフォールディングする能力を有する。例は、大腸菌（例えば、Origami（商標）（修飾大腸菌 *trxB* - / *gor* - ）、Origami 2（商標）など）、シュードモナス（例えば、フルオレセンス）に基づく系を含む。Origami（商標）技術に関する例示的な参照については、例えば、Lobel et al. (2001) *Endocrine* 14(2), 205-212; 及び Lobel et al. (2002) *Protein Express. Purif.* 25(1), 124-133を参照のこと。

30

## 【0113】

## III. 序論

本発明は、少なくとも1つの外因性N連結グリコシル化配列を含むポリペプチド（シークオンポリペプチド）を提供する。各ポリペプチドは親ポリペプチドに対応する。親ポリペプチドは、野生型ポリペプチド及び他のポリペプチドを含む任意のポリペプチドでありうる。それらについてアミノ酸配列又はヌクレオチド配列が公知である（例えば、薬学的薬物）。一実施態様において、親ポリペプチドはN連結グリコシル化配列を含まない。別の実施態様において、親ポリペプチド（例えば、野生型ポリペプチド）は、天然で、N連結グリコシル化配列を含む。そのような親ポリペプチドに対応するシークオンポリペプチドは、追加のN連結グリコシル化配列を異なる位置に含む。一実施態様において、親ポリペプチドは、治療用ポリペプチド、例えばヒト成長ホルモン（hGH）、エリスロポエチン（EPO）、治療用抗体、骨形成タンパク質（例えば、BMP-7）、又は血液因子（例えば、第VI因子、第VII因子、又は第IX因子）などである。したがって、本発明は、それらのアミノ酸配列内に1つ又は複数の外因性N連結グリコシル化配列を含む治療用ポリペプチド変異体を提供する。

40

50

## 【0114】

一実施態様において、N連結グリコシル化配列は酵素（例えば、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ、例えばPglBなど）の基質である。酵素は、グリコシル供与体種（例えば、脂質-ピロリン酸連結グリコシル成分）からアスパラギン（N）残基（N連結グリコシル化配列の一部である）へのグリコシル成分の転移を触媒する。グリコシル化配列に抱合することができる例示的なグリコシル成分は、GlcNAc、GlcNH、バシロサミン、6-ヒドロイバシロサミン（6-hydroxybacillosamine）、GalNAc、GalNH、GlcNAc-GlcNAc、GlcNAc-GlcNH、GlcNAc-Gal、GlcNAc-GlcNAc-Gal-Sia、GlcNAc-Gal-Sia、GlcNAc-GlcNAc-Man、及びGlcNAc-GlcNAc-Man（Man）<sub>2</sub>を含む。例示的なグリコシル供与体種を本明細書において記載する。

10

## 【0115】

したがって、本発明は、修飾又は非修飾糖成分が本発明のN連結グリコシル化配列に付着されたポリペプチド抱合体を提供する。本発明は、さらに、そのようなポリペプチド抱合体を作製する方法を提供する。代表的な実施態様において、方法は無細胞インビトロ方法であって、それにおいてポリペプチドを（反応容器中で）、グリコシル供与体種（例えば、脂質-ピロリン酸連結グリコシル成分、例えばウンデカプレニル-ピロリン酸連結グリコシル成分など）と、グリコシル供与体種が基質であるオリゴサッカリルトランスフェラーゼの存在下において接触させる。このグリコシル供与体種中のグリコシル成分は、場合により、修飾基（例えば水溶性ポリマー修飾基など）で誘導体化される。酵素によって、修飾又は非修飾グリコシル成分がポリペプチド上に転移され、それによりポリペプチド抱合体が作製される。修飾基が少なくとも1つのポリ（エチレングリコール）成分を含む場合、そのようなグリコシル化反応を糖PEG化と呼ぶ。

20

## 【0116】

別の代表的な方法において、上に記載する酵素反応は宿主細胞内で生じ、それにおいてポリペプチドが発現される。オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、宿主細胞中で内因性に存在してよく、又は、宿主細胞中で過剰発現させてよい。この方法に従った細胞内グリコシル化は、無細胞のインビトログリコシル化よりも優れた種々の利点を与える。例えば、グリコシル化前での細胞培養からポリペプチドの精製の必要性がない。また、他の内因性の又は同時発現された酵素を利用してよく、それは最初に形成されたグリコシル化ポリペプチドのさらなる修飾のために利用することができる。

30

## 【0117】

本発明の糖修飾（例えば、糖PEG化）方法を、N連結グリコシル化配列を組み入れる任意のポリペプチドで実行することができる。一実施態様において、本発明の方法は、例えば、クリアランス速度の低下、又は免疫系又は細網内皮系（RES）による取り込み速度の低下に起因して増加した治療半減期を伴うポリペプチド抱合体を提供する。別の実施態様において、本発明の方法は、ポリペプチド上の抗原決定基をマスクするための手段を提供し、それによりポリペプチドに対する宿主の免疫応答を低下又は排除する。適切な修飾された糖を使用した標的薬剤のポリペプチドへの選択的付着を使用し、特定の標的薬剤に特異的である特定の組織又は細胞表面受容体をポリペプチドの標的化することができる。また、タンパク質分解による分解に対して増強した耐性を示すポリペプチドを提供し、それは、タンパク質分解酵素により切断又は認識されるポリペプチド上の特定の部位を改変させることにより達成される結果である。一実施態様において、そのような部位は、本発明のN連結グリコシル化配列で置換又は部分的に置換される。

40

## 【0118】

また、本発明の方法を使用して、親ポリペプチドの「生物学的活性プロファイル」を調節することができる。本発明者らは、本発明の方法を使用した、修飾基、例えば水溶性ポリマー（例えば、mPEG）などの、親ポリペプチドへの共有結合的付着によって、結果として得られるポリペプチド種のバイオアベイラビリティ、薬力学的特性、免疫原性、代謝的安定性、体内分布、及び水溶性を改変させることができるだけでなく、非所望の治療

50

活性の低下又は所望の治療活性の増大をもたらすこともできることを認識している。例えば、前者は、造血剤エリスロポエチン（EPO）について観察されている。例えば、特定の化学的にPEG化されたEPO変異体は、低下した赤血球生成活性を示したが、野生型ポリペプチドの組織保護活性は維持されていた。そのような結果は、例えば、米国特許第6,531,121号；WO2004/096148、WO2006/014466、WO2006/014349、WO2005/025606、及びWO2002/053580において記載されている。例示的な細胞株は、選択されたポリペプチドの生物学的活性の差異の評価のために有用であり、表1において以下にまとめている：

【0119】

【表1】

**表1:** 種々のポリペプチドの生物学的評価のために使用した細胞系

ポリペプチド	細胞系	生物学的活性
EPO	UT7	赤血球生成
	SY5Y	神経保護
BMP-7	MG-63	骨誘導
	HK-2	腎毒性
NT-3	Neuro2	神経保護 (TrkC 結合)
	NIH3T3	神経保護 (p75 結合)

【0120】

一実施態様において、本発明のポリペプチド抱合体は、生物学的標的タンパク質（例えば、受容体）、天然リガンド、又は非天然リガンド、例えばインヒビターなどに対する低下又は増強した結合親和性を示す。例えば、特異的受容体のクラスに対する結合親和性を抑止することによって、関連する細胞シグナル伝達及び下流の生物学的事象（例えば、免疫応答）が低下又は排除されうる。故に、本発明の方法を使用して、抱合体が対応する親ポリペプチドと同一の、類似の、又は異なる治療プロファイルを有するポリペプチド抱合体を作製することができる。本発明の方法を使用して、特異的な（例えば、改善された）生物学的機能を伴う糖PEG化治療剤を同定し、任意の治療用ポリペプチド又は他の生物学的に活性なポリペプチドの治療プロファイルを「微調整」することができる。GlycoPEGylation（商標）はNeose Technologies社の商標であり、本願の権利者が所有する特許及び特許出願（例えば、WO2007/053731；WO2007/022512；WO2006/127896；WO2005/055946；WO2006/121569；及びWO2005/070138）において開示される技術を指す。

【0121】

IV. 組成

ポリペプチド

一局面において、本発明は、本発明の少なくとも1つの外因性N連結グリコシル化配列（シークオンポリペプチド）を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。N連結グリコシル化配列を本明細書において以下に記載する。一実施態様において、ポリペプチドのアミノ酸配列は、1つ又は複数の野生型、突然変異、又は切断オリゴサッカリルトランスフェラーゼの基質である外因性N連結グリコシル化配列を含む。例示的なオリゴサッカリルトランスフェラーゼが本明細書において以下に記載され、本明細書において記載されるそれらの酵素の全長又は切断バージョンを含む（例えば、配列番号102～114）。

【0122】

例示的な実施態様において、本発明のポリペプチドは、対応する親ポリペプチド（例えば、野生型ポリペプチド）のアミノ酸配列を改変させることによる組換え技術を通じて生成される。組換えポリペプチドの調製のための方法は、当業者に公知である。例示的な方

10

20

30

40

50

法を本明細書において以下に記載する。ポリペプチドのアミノ酸配列は、天然又は外因性（即ち、非天然）N連結グリコシル化配列の組み合わせを含みうる。

【0123】

本発明のポリペプチド又は親ポリペプチドは、任意のポリペプチドでありうる。種々の実施態様において、ポリペプチドは治療用ポリペプチドである。一例において、ポリペプチドは組換えポリペプチドである。ポリペプチドは、グリコペプチドでありえ、そして、任意の数のアミノ酸を有しうる。一実施態様において、本発明のポリペプチドは分子量約5 kDa～約500 kDaを有する。別の実施態様において、ポリペプチドは分子量約10 kDa～約400 kDa、約10 kDa～約350 kDa、約10 kDa～約300 kDa、約10 kDa～約250 kDa、約10 kDa～約200 kDa、又は約10 kDa～約150 kDaを有する。別の実施態様において、ポリペプチドは分子量約10 kDa～約100 kDaを有する。さらに別の実施態様において、ポリペプチドは分子量約10 kDa～約50 kDaを有する。さらなる実施態様において、ポリペプチドは分子量約10 kDa～約25 kDaを有する。

10

【0124】

例示的なポリペプチドは、野生型ポリペプチド及びそのフラグメントならびにそれらの天然対応物から（例えば、突然変異又は切断により）修飾されたポリペプチドを含む。ポリペプチドは、また、融合タンパク質でありうる。例示的な融合タンパク質は、ポリペプチドが、蛍光タンパク質（例えば、GFP）、治療用ポリペプチド、抗体、受容体リガンド、タンパク質性毒素、MBP、Hisタグなどに融合されたものを含む。

【0125】

一例において、本発明のポリペプチドは、本発明のN連結グリコシル化配列を含み、また、O連結グリコシル化配列を含む。例示的なO連結グリコシル化配列及びO連結グリコシル化配列をグリコシル化するために有用な例示的な酵素が、2007年7月23日出願された米国特許出願第11/781,885号において記載されており、本明細書において参照によりその全体が組み入れられる。GlcNAcトランスフェラーゼを使用したO連結グリコシル化技術が、米国仮特許出願第60/941,926号及び2008年6月4日出願されたPCT/US2008/065825において記載されており、その開示も本明細書においてそれらの全体が組み入れられる。

20

【0126】

一実施態様において、ポリペプチドは治療用ポリペプチド、例えば薬学的薬剤として現在使用されているものなど（即ち、承認済み薬物）である。ポリペプチドの非限定的な選択を、2006年6月8日出願された米国特許出願第10/552,896号の図28において示し、本明細書において参照により組み入れられる。

30

【0127】

例示的なポリペプチドは、増殖因子、例えば肝細胞増殖因子（HGF）、神経増殖因子（NGF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（例えば、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、FGF-15、FGF-16、FGF-17、FGF-18、FGF-19、FGF-20、FGF-21、FGF-22、及びFGF-23）、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、巨核球増殖発達因子（MGDF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、形質転換増殖因子（例えば、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3）、血管内皮増殖因子（VEGF；例えば、VEGF-2）など、VEGFインヒビター、例えばVEGF-TRAP（Aflibercept）、骨増殖因子（BGF）、グリア増殖因子、ヘパリン結合神経突起促進因子（HBNF）など、C1エステラーゼインヒビター、ホルモン、例えばヒト成長ホルモン（hGH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）及び副甲状腺ホルモン、ホリトロピン（例えば、ホリトロピン-アルファ、ホリトロピン-ベータ）、フォリスタチン、黄体形成ホルモン（LH）など、ならびにサイトカイン、例えばインターロイキン（IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11

40

50

、 I L - 1 2、 I L - 1 3、 I L - 1 4、 I L - 1 5、 I L - 1 6、 I L - 1 7、 I L - 1 8 )、 インターフェロン ( 例 えば、 I N F - アルファ、 I N F - ベータ、 I N F - ガンマ、 I N F - オメガ、 I N F - タウ )、 及びインシュリンなどを含む。

【 0 1 2 8 】

他の例示的なポリペプチドは、 酵素、 例 えばグルコセレブロシダーゼ、 アルファ - ガラクトシダーゼ ( 例 えば、 Fabrazyme ( 商 標 ) )、 酸性アルファ - グルコシダーゼ ( 酸性マルターゼ )、 イズロニダーゼ、 例 えばアルファ - L - イズロニダーゼ ( 例 えば、 Aldurazyme ( 商 標 ) )、 甲状腺ペルオキシダーゼ ( T P O )、 ベータ - グルコシダーゼ ( 例 えば、 米国特許出願第 1 0 / 4 1 1 , 0 4 4 号において記載される酵素を参照のこと )、 アリルスルファターゼ、 アスパラギナーゼ、 アルファ - グルコセラミダーゼ ( glucoceramidease ) ( 例 えば、 イミグルセラーゼ )、 スフィンゴミエリナーゼ、 プチリルコリンエステラーゼ、 ウロキナーゼ、 及びアルファ - ガラクトシダーゼ A ( 例 えば、 米国特許出願第 7 , 1 2 5 , 8 4 3 号において記載される酵素を参照のこと ) を含む。

10

【 0 1 2 9 】

他の例示的な親ポリペプチドは、 骨形成タンパク質 ( 例 えば、 B M P - 1、 B M P - 2、 B M P - 3、 B M P - 4、 B M P - 5、 B M P - 6、 B M P - 7、 B M P - 8、 B M P - 9、 B M P - 1 0、 B M P - 1 1、 B M P - 1 2、 B M P - 1 3、 B M P - 1 4、 B M P - 1 5 )、 ニューロトロフィン ( 例 えば、 N T - 3、 N T - 4、 N T - 5 )、 エリスロポエチン ( E P O )、 新規赤血球生成刺激タンパク質 ( N E S P ; 例 えば、 Aranesp )、 増殖分化因子 ( 例 えば、 G D F - 5 )、 グリア細胞株由来神経栄養因子 ( G D N F )、 脳由来神経栄養因子 ( B D N F )、 ミオスタチン、 神経増殖因子 ( N G F )、 顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F ; 例 えば、 Neupogen ( 登録商標 )、 Neulasta ( 登録商標 ) )、 顆粒細胞マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F )、 1 - アンチトリプシン ( A T T、 又は - 1 プロテアーゼインヒビター )、 組織型プラスミノゲンアクチベーター ( T P A )、 ヒルジン、 レプチン、 ウロキナーゼ、 ヒト D N a s e、 インシュリン、 B 型肝炎表面抗原タンパク質 ( H b s A g )、 ヒト絨毛性ゴナドトロピン ( h C G )、 オステオポンチン、 オステオプロテグリン、 プロテイン C、 ソマトメジン - 1、 ソマトトロピン、 ソマトロピン、 キメラジフテリア毒素 - I L - 2、 グルカゴン様ペプチド ( 例 えば、 G L P - 1 及び G L P - 2 )、 トロンピン、 トロンボポエチン、 トロンボスポンジン - 2、 アンチトロンピン I I I ( A T - I I I )、 プロキネチシン、 C D 4、 - C D 2 0、 腫瘍壊死因子 ( 例 えば、 T N F - )、 T N F - アルファインヒビター、 T N F 受容体 ( T N F - R )、 P セレクチン糖タンパク質リガンド - 1 ( P S G L - 1 )、 補体、 トランスフェリン、 グリコシル化依存性細胞接着分子 ( G l y C A M )、 神経細胞接着分子 ( N - C A M )、 T N F 受容体 - I g G F c 領域融合タンパク質、 エクステンジン ( extendin ) - 4、 B D N F、 ベータ - 2 - ミクログロブリン、 絨毛神経栄養因子 ( C N T F )、 リンフォトキシン - 受容体 ( L T - ベータ受容体 )、 フィブリノゲン、 G D F ( 例 えば、 G D F - 1、 G D F - 2、 G D F - 3、 G D F - 4、 G D F - 5、 G D F - 6、 G D F - 7、 G D F - 8、 G D F - 9、 G D F - 1 0、 G D F - 1 1、 G D F - 1 2、 G D F - 1 3、 G D F - 1 4、 G D F - 1 5 )、 G L P - 1、 インシュリン様増殖因子 ( 例 えば、 I G F 1 )、 インシュリン様増殖因子結合タンパク質 ( 例 えば、 I G B - 5 )、 I g F / I B P - 2、 I g F / I B P - 3、 I g F / I B P - 4、 I g F / I B P - 5、 I g F / I B P - 6、 I g F / I B P - 7、 I g F / I B P - 8、 I g F / I B P - 9、 I g F / I B P - 1 0、 I g F / I B P - 1 1、 I g F / I B P - 1 2、 及び I g F / I B P - 1 3 を含む。 上に列挙するポリペプチドの一部についての例示的なアミノ酸配列を、 米国特許第 7 , 2 1 4 , 6 6 0 号において記載し、 その全てが本明細書において参照により組み入れられる。

20

30

40

【 0 1 3 0 】

一例において、 ポリペプチドはフォンビルブランド因子 ( v W F ) 又は v W F の部分である。 組換え v W F が記載されている ( 例 えば、 Fischer B. E. et al., Cell. Mol. Life Sci. 1997, 53: 943-950 を参照のこと。 それは本明細書において参照により組み入れら

50

れる)別の例において、ポリペプチドはvWF切断プロテアーゼ(vWFプロテアーゼ、vWF分解プロテアーゼ)である。

【0131】

一例において、本発明のポリペプチドは血液凝固因子(血液因子)である。例示的な血液因子は、第V因子、第VII因子、第VII因子(例えば、第VII-2因子、第VII-3因子)、第IX因子、第X因子、及び第XIII因子を含む。別の例において、ポリペプチドは血液因子インヒビター(例えば、第Xa因子インヒビター)である。

【0132】

特定の例において、ポリペプチドは第VII因子である。第VII因子及び第VII因子変異体は当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,668,108号には第VII因子変異体が記載されており、それにおいて1241番目の位置のアスパラギン酸がグルタミン酸により置換されている。米国特許第5,149,637号には、C末端分画を含む、グリコシル化又は非グリコシル化第VII因子変異体が記載されており、米国特許第5,661,008号には、少なくとも3つのアミノ酸残基によりアミノ酸1649~2332に連結されたアミノ酸1~740を含む第VII因子変異体が記載されている。従って、第VII因子の変異体、誘導體、修飾、及び複合体は、当技術分野において周知であり、本発明において包含される。第VII因子の産生のための発現系も当技術分野において周知であり、米国特許第5,633,150号、第5,804,420号、及び第5,422,250号において例示される原核細胞及び真核細胞を含む。上で考察した第VII因子配列のいずれかを修飾して、外因性O連結、S連結、又はN連結グリコシル化配列を含んでよい。

【0133】

一例において、第VII因子は全長又は野生型の第VII因子ポリペプチドである。全長第VII因子ポリペプチドの例示的なアミノ酸配列を図1A及び1Bにおいて示す(配列番号8及び9)。さらに別の例において、ポリペプチドは第VII因子ポリペプチドであり、それにおいてBドメインは、野生型又は全長の第VII因子のBドメインよりも少ないアミノ酸残基を含む。それらの第VII因子ポリペプチドは、Bドメイン欠失又は部分的Bドメイン欠失第VII因子と呼ばれる。当業者は、所定の第VII因子ポリペプチド内のBドメインを同定することができるであろう。一例において、Bドメインは、2つの隣接配列IEPR(N末端側)とEITR(C末端側)の間にアミノ酸残基を含む。しかし、当業者は、これらの2つの隣接配列が存在しない、又は、例えば突然変異により修飾されることがあることを理解するであろう。第VII因子ポリペプチド内のBドメインの典型的な位置は、以下の略図において例証される：

例示的な第VII因子ポリペプチド内のBドメイン：

.....IEPR-Bドメイン-EITR....

【0134】

一例において、Bドメインが、全長の第VII因子配列のアミノ酸残基Arg<sup>740</sup>とGlu<sup>1649</sup>の間に見出される(例えば、図1Bにおいて示される配列)：

...IEPR<sup>740</sup>-Bドメイン-E<sup>1649</sup>ITR...

【0135】

一実施態様において、本発明の第VII因子ポリペプチドは、通常、Bドメインと会合する任意のアミノ酸残基を含まない(完全Bドメイン欠失)。この実施態様に従った例示的なアミノ酸配列を図2において示し、それにおいて全長の第VII因子配列のArg<sup>740</sup>とGlu<sup>1649</sup>の間の全てのアミノ酸残基(図1B)を除去する。別の実施態様において、本来のBドメインを別の配列(Bドメイン置換配列)で置換する。一例において、第VII因子ポリペプチドのBドメイン置換配列は、少なくとも2つのアミノ酸を含む。例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、又は少なくとも10のアミノ酸残基が、図2におけるArg<sup>740</sup>とGlu<sup>1649</sup>の間で見出される。置換配列は、任意の数のアミノ酸残基を含み、任意のアミノ酸配列を有しうる。

## 【0136】

一例において、Bドメインを置換する配列は、部分Bドメイン配列を含む。例えば、Bドメインを置換する配列は、約2つ、約4つ、約6つ、約8つ、約10、約12、約14、又は14を上回るBドメインのN末端アミノ酸を含む（例えば、図2におけるArg<sup>740</sup>とGlu<sup>1649</sup>の間）。例えば、置換配列は、SF SQN、SF SQNS、SF SQNSR、及びSF SQNSRHより選択される部分N末端Bドメイン配列を含みうる。別の例において、Bドメインを置換する配列は、約2つ、約4つ、約6つ、約8つ、約10、約12、約14、又は14を上回る本来のBドメインのC末端アミノ酸を含む（例えば、図2におけるArg<sup>740</sup>とGlu<sup>1649</sup>の間）。例えば、置換配列は、QR、HQ R、RHQR、KR HQ R、LKR HQ R、VLKR HQ R、及びPPVLKR HQ Rより選択される部分C末端Bドメイン配列を含みうる。さらに別の例において、Bドメインを置換するアミノ酸配列は、複数の部分配列の組み合わせを含む。例えば、置換配列は、本来のBドメインの部分C末端配列に連結された部分N末端配列を含み、それにおいてN末端及びC末端のBドメイン配列は、場合により、追加のアミノ酸残基（例えば、1つ又は複数のアルギニン残基）を介して連結される。Bドメイン欠失させた第VII因子ポリペプチドについての例示的なアミノ酸配列は、図3～5において示す配列を含む（配列番号4～6）。

10

## 【0137】

一実施態様において、Bドメイン置換配列は、天然又は非天然（例えば、外因性）N連結又はO連結グリコシル化配列を含む。一例において、本来のBドメインを切断し、O連結又はN連結グリコシル化配列の少なくとも1つをインタクトで残すようにし、それは天然で本来のBドメイン中に存在する。別の例において、上に記載する部分Bドメイン配列の組み合わせは、グリコシル化配列の形成をもたらす。例を図5において観察することができる：P<sup>749</sup>SQNP。

20

## 【0138】

さらに別の例において、Bドメイン置換配列は、天然のBドメイン中に存在しないアミノ酸配列を含み、それにおいてこの非天然配列は、外因性のO連結又はN連結グリコシル化配列（例えば、本発明のO連結グリコシル化配列）を含む。一例において、Bドメイン置換配列は、本発明の外因性O連結グリコシル化配列（例えば、

## 【表2】

PTP, PTEI, PTEIP, PTQA, PTQAP, PTINT, PTINTP, PTTVS, PTTVL,

PTQGAM, PTQGAMP, TETP, PTVL, PTVLP, PTLSP, PTDAP, PTENP, PTQDP, PTASP,

PTTVSP, PTQGA, PTSAV, PTTLYV, PTTLYVP, PSSGP 又は PSDGP

30

など）を含む。別の例において、Bドメイン置換配列は、本発明の外因性N連結グリコシル化配列（例えばNLTなど）を含む。

## 【0139】

一実施態様において、本発明は、図1A、図1B、図2、図3、図4、又は図5のアミノ酸配列を含み、さらに、N末端又は1～740（重鎖）より選択されるアミノ酸位置で前記アミノ酸配列中に導入された外因性N連結グリコシル化配列を含む第VII因子ポリペプチドを提供する。別の例示的な実施態様において、本発明は、図4のアミノ酸配列を含み、さらに、782～1,465（軽鎖）より選択されるアミノ酸位置で前記アミノ酸配列中に導入された外因性N連結グリコシル化配列を含む第VII因子ポリペプチドを提供する。別の例示的な実施態様において、本発明は、図1A、図1B、図2、図3、図4、又は図5のアミノ酸配列を含み、さらに、前記第VII因子ポリペプチドの軽鎖内のアミノ酸位置で前記アミノ酸配列中に導入された外因性N連結グリコシル化配列を含む第VII因子ポリペプチドを提供する。別の例示的な実施態様において、本発明は、図4のアミノ酸配列を含み、さらに、741～781（Bドメインフラグメント）より選択されるアミノ酸位置で前記アミノ酸配列中に導入された外因性N連結グリコシル化配列

40

50

を含む第V I I I因子ポリペプチドを提供する。別の例示的な実施態様において、本発明は、図1 A、図1 B、図2、図3、図4、又は図5のアミノ酸配列を含み、さらに、前記第V I I I因子ポリペプチドのBドメイン又はBドメインフラグメント内の前記アミノ酸配列中に導入された外因性N連結グリコシル化配列を含む第V I I I因子ポリペプチドを提供する。一例において、本発明の第V I I I因子ポリペプチドをC H O細胞中で産生させる。別の例において、第V I I I因子ポリペプチドを、当技術分野において公知の t r x B g o r 突然変異大腸菌発現系 (Origami) を使用して産生する。

【0140】

別の例において、ポリペプチドは、2つ又はそれ以上のポリペプチドの間の融合タンパク質である。別の例において、ポリペプチドは、2つ又はそれ以上のポリペプチドの間の複合体である。例示的な実施態様において、複合体は血液因子を含む。別の例示的な実施態様において、複合体は第V I I I因子を含む。この複合体中の第V I I I因子ポリペプチドは、全長のBドメイン欠失、又は部分Bドメイン欠失第V I I I因子でありうる。一例において、複合体は、第V I I I因子とフォンビルブランド因子 (v W F) の間である。

10

【0141】

また、本発明の範囲内には抗体であるポリペプチドがある。抗体という用語は、免疫グロブリン、抗体フラグメント (例えば、F cドメイン)、一本鎖抗体、ラマ抗体、ナノボディなどを含むことを意味する。また、この用語には抗体-融合タンパク質、例えばI g キメラなどが含まれる。好ましい抗体は、ヒト化モノクローナル抗体又はそのフラグメントを含む。そのような抗体の全ての公知のアイソタイプが、本発明の範囲内である。例示的な抗体は、増殖因子、例えば内皮増殖因子 (E G F)、血管内皮増殖因子 (例えば、V E G F - A に対するモノクローナル抗体、例えばラニビズマブ (Lucentis (商標))、及び線維芽細胞増殖因子 (例えばF G F - 7、F G F - 2 1、及びF G F - 2 3 など) に対する抗体ならびにそれらの各受容体に対する抗体を含む。他の例示的な抗体は、抗T N F抗体、例えば抗T N F - アルファモノクローナル抗体 (例えば、米国特許出願第1 0 / 4 1 1, 0 4 3号を参照のこと)、T N F受容体 - I g G F c領域融合タンパク質 (例えば、Enbrel (商標))、抗H E R<sup>2</sup>モノクローナル抗体 (例えば、Herceptin (商標))、呼吸器合胞体ウイルスのプロテインFに対するモノクローナル抗体 (例えば、Synagis (商標))、T N F - に対するモノクローナル抗体 (例えば、Remicade (商標))、糖タンパク質に対するモノクローナル抗体、例えばI I b / I I I a (例えば、Reopro (商標)) など、C D 2 0 (例えば、Rituxan (商標))、C D 4、アルファ - C D 3、C D 4 L、及びC D 1 5 4 (例えば、Ruplizumab) に対するモノクローナル抗体、P S G L - 1及びC E Aに対するモノクローナル抗体を含む。上に列挙したポリペプチドのいずれかの任意の修飾 (例えば、突然変異) パージョンも本発明の範囲内である。

20

30

【0142】

例示的な実施態様において、親ポリペプチドは、(配列番号7)のアミノ酸配列を含むE P Oであり、それは以下：

【表3】

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
Ala Glu Asn<sup>24</sup> Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn<sup>38</sup> Ile Thr Val Pro  
Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val  
Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn<sup>83</sup> Ser  
Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr  
Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser<sup>126</sup> Ala  
Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe  
Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp

40

50

に示される。

【0143】

例示的な実施態様において、親ポリペプチドは、塩基性アミノ酸残基（例えばアルギニン又はリジンなど）を非荷電アミノ酸（例えばグリシン又はアラニンなど）で置換する少なくとも1つの突然変異を有するアミノ酸配列を含む。別の実施態様において、EPOポリペプチドは、 $Arg^{139} Ala^{139}$ 、 $Arg^{143} Ala^{143}$ 、及び $Lys^{154} Ala^{154}$ より選択される少なくとも1つの突然変異を有するアミノ酸配列を含む。

【0144】

N連結グリコシル化配列

本発明のN連結グリコシル化配列は、任意の短いアミノ酸配列でありうる。一実施態様において、N連結グリコシル化配列は、約3～約20、好ましくは約3～約10、より好ましくは約3～約9、最も好ましくは約3～約7のアミノ酸残基を含む。本発明のN連結グリコシル化配列は、アミノ基を有する少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。一実施態様において、本発明のN連結グリコシル化配列は、少なくとも1つのアスパラギン（N）残基を含む。別の実施態様において、アスパラギン残基のアミノ基は、シークオンポリペプチドが酵素的グリコシル化又は複合糖質化反応に供される場合、グリコシル化される。この反応中、アミノ基の水素原子がグリコシル成分で置換される。グリコシル成分を受けるアミノ酸残基を、「グリコシル化の部位」又は「グリコシル化部位」と呼ぶ。

【0145】

一実施態様において、本発明のN連結グリコシル化配列は、天然では、野生型ポリペプチド中に存在する。そのような野生型ポリペプチドのポリペプチド抱合体は、本発明の範囲内である。別の実施態様において、N連結グリコシル化配列は、対応する親ポリペプチド（外因性N連結グリコシル化配列）において、存在しない、又は、同じ位置に存在しない。外因性N連結グリコシル化配列の親ポリペプチド中への導入によって、本発明のシークオンポリペプチドが生成される。N連結グリコシル化配列を、突然変異により親ポリペプチド中に導入してよい。別の例において、N連結グリコシル化配列を、シークオンポリペプチドの化学合成により親ポリペプチドのアミノ酸配列中に導入する。

【0146】

一実施態様において、本発明のN連結グリコシル化配列は、化学式（I）（配列番号1）のアミノ酸配列を含む。別の実施態様において、N連結グリコシル化配列は、化学式（II）（配列番号2）のアミノ酸配列を含む。さらに別の実施態様において、N連結グリコシル化配列は、化学式（I）のアミノ酸配列からなる。さらなる実施態様において、N連結グリコシル化配列は、化学式（II）のアミノ酸配列からなる：



【0147】

化学式（I）及び化学式（II）において、Nはアスパラギンであり、Dはアスパラギン酸である。一実施態様において、 $X^3$ はスレオニン（T）である。別の実施態様において、 $X^3$ はセリン（S）である。 $X^1$ は存在又は非存在のいずれかである。存在する場合、 $X^1$ は任意のアミノ酸でありうる。一実施態様において、 $X^1$ は、グリシン（G）、アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、フェニルアラニン（F）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン酸（E）、グルタミン（Q）、ヒスチジン（H）、リジン（K）、アルギニン（R）、セリン（S）、スレオニン（T）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）、システイン（C）、及びプロリン（P）より選択されるメンバーである。 $X^4$ は存在又は非存在のいずれかである。存在する場合、 $X^4$ は任意のアミノ酸でありうる。一実施態様において、 $X^4$ は、グリシン（G）、アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、フェニルアラニン（F）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン酸（E）、グルタミン（Q

10

20

30

40

50

)、ヒスチジン(H)、リジン(K)、アルギニン(R)、セリン(S)、スレオニン(T)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、システイン(C)、プロリン(P)より選択されるメンバーである。

【0148】

化学式(I)及び化学式(II)において、 $X^2$ は任意のアミノ酸でありうる。好ましい実施態様において、 $X^2$ はプロリン(P)ではない。 $X^{2'}$ は任意のアミノ酸でありうる。一実施態様において、 $X^{2'}$ はプロリンではない。一実施態様において、 $X^2$ 及び $X^{2'}$ は、グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、フェニルアラニン(F)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、グルタミン酸(E)、グルタミン(Q)、ヒスチジン(H)、リジン(K)、アルギニン(R)、セリン(S)、スレオニン(T)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、及びシステイン(C)より非依存的に選択されるメンバーである。N連結グリコシル化配列は、追加のC末端又はN末端アミノ酸残基を含みうる。一実施態様において、追加のアミノ酸は、グリコシル化部位に近接しているポリペプチドの三次構造を調整するための有用である。

10

【0149】

一実施態様において、化学式(I)中の $X^2$ は非荷電アミノ酸である。例示的な実施態様において、N連結グリコシル化配列は、

【表4】

$X^1\text{NGSX}^4$ ,

$X^1\text{NGTX}^4$ ,  $X^1\text{NASX}^4$ ,  $X^1\text{NATX}^4$ ,  $X^1\text{NVSX}^4$ ,  $X^1\text{NVTX}^4$ ,  $X^1\text{NLSX}^4$ ,  $X^1\text{NLTX}^4$ ,  $X^1\text{NISX}^4$ ,

$X^1\text{NITX}^4$ ,  $X^1\text{NFSX}^4$ ,  $X^1\text{NFTX}^4$ ,  $X^1\text{NSSX}^4$ ,  $X^1\text{NSTX}^4$ ,  $X^1\text{NTSX}^4$ ,  $X^1\text{NTTX}^4$ ,  $X^1\text{NCSX}^4$ ,

$X^1\text{NCTX}^4$ ,  $X^1\text{NYSX}^4$  及び  $X^1\text{NYTX}^4$

20

より選択されるメンバーであって、それにおいて $X^1$ 及び $X^4$ は上で定義される通りである。この実施態様の一例において、 $X^1$ は存在しない。別の例において、 $X^4$ は存在しない。さらに別の実施態様において、 $X^1$ 及び $X^4$ の両方が存在しない。

【0150】

したがって、別の例において、N連結グリコシル化配列は、

30

【表5】

NGS, NGT, NAS, NAT, NVS, NVT, NLS, NLT, NIS, NIT, NFS, NFT, NSS,  
NST, NTS, NTT, NCS, NCT, NYS 及び NYT

より選択されるメンバーである。

【0151】

一実施態様において、N連結グリコシル化配列は、化学式(II)の伸長されたグリコシル化配列である。別の実施態様において、伸長されたグリコシル化配列は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼが細菌由来の酵素(例えば、Pg1B)である場合に使用される。別の実施態様において、化学式(II)中の $X^2$ は非荷電アミノ酸である。この実施態様の一例において、N連結グリコシル化配列は、

40

【表6】

$X^1\text{D}X^2\text{NGSX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NGTX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NASX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NATX}^4$ ,

$X^1\text{DX}^2\text{NVSX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NVTX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NLSX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NLTX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NISX}^4$ ,

$X^1\text{DX}^2\text{NITX}^4$ ,  $X^1\text{DX}^2\text{NFSX}^4$  及び  $X^1\text{DX}^2\text{NFTX}^4$

より選択されるメンバーであって、それにおいて $X^1$ 、 $X^{2'}$ 、及び $X^4$ は上で定義され

50

る通りである。

【 0 1 5 2 】

別の例において、N連結グリコシル化配列は、

【表 7】

$DX^2$ NGS,  $DX^2$ NGT,  $DX^2$ NAS,  $DX^2$ NAT,  $DX^2$ NVS,  $DX^2$ NVT,  $DX^2$ NLS,  $DX^2$ NLT,  
 $DX^2$ NIS,  $DX^2$ NIT,  $DX^2$ NFS 及び  $DX^2$ NFT

より選択されるメンバーであって、それにおいて  $X^2$  は上で定義される通りである。別の例において、上の実施態様のいずれかにおける  $X^2$  は、非荷電アミノ酸より選択される。一例において、 $X^2$  は G である。別の例において、 $X^2$  は A である。さらに別の例において、 $X^2$  は V である。さらなる例において、 $X^2$  は L である。さらなる実施態様において、 $X^2$  は I である。別の例において、 $X^2$  は F である。

10

【 0 1 5 3 】

N連結グリコシル化配列のポジショニング

一実施態様において、N連結グリコシル化配列は、ポリペプチド（例えば、本発明のシークオンポリペプチド）の部分である場合、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ（例えば、Stt3p 又は PglB）の基質である。別の例において、グリコシル化配列は、修飾酵素、例えば欠失又は切断された膜アンカードメインを有する酵素などの基質である。本発明の各 N 連結グリコシル化配列が適切なグリコシル化反応中にグリコシル化される効率は、酵素の型及び性質に依存しうる、また、グリコシル化配列の状況、特にグリコシル化部位周辺のポリペプチドの三次元構造に依存しうる。

20

【 0 1 5 4 】

一般的に、N連結グリコシル化配列は、ポリペプチドのアミノ酸配列内の任意の位置に導入することができる。好ましい実施態様において、N連結グリコシル化配列は（使用された反応条件下で）オリゴサッカリルトランスフェラーゼに接近可能である。一例において、グリコシル化配列は、親ポリペプチドの N 末端（即ち、第 1 のアミノ酸の前又は第 1 のアミノ酸の直後）に導入される（アミノ末端突然変異体）。別の例において、N連結グリコシル化配列は、親ポリペプチドのアミノ末端近く（即ち、N末端の 10 アミノ酸残基内）に導入される。別の例において、N連結グリコシル化配列は、親ポリペプチドの C 末端で、親ポリペプチドの最後のアミノ酸の直後に位置付けられる（カルボキシ末端突然変異体）。さらに別の例において、N連結グリコシル化配列は、親ポリペプチドの C 末端近く（例えば、C末端の 10 アミノ酸残基内）に導入される。さらに別の例において、N連結グリコシル化配列は、親ポリペプチドの N 末端と C 末端の間のどこかに位置付けられる（内部突然変異体）。修飾ポリペプチドが生物学的に活性であること（たとえその生物学的活性が、対応する親ポリペプチドの生物学的活性から改変されている場合でも）が一般的に好ましい。

30

【 0 1 5 5 】

シークオンポリペプチドのグリコシル化効率に影響を及ぼす重要な因子は、グリコシル化部位（例えば、アスパラギン側鎖）へのグルコシル/サッカリルトランスフェラーゼ及び他の反応パートナー（溶媒分子を含む）の接近可能性である。グリコシル化配列がポリペプチドの内部ドメイン内に位置付けられる場合、グリコシル化は非効率的である可能性が高い。故に、一実施態様において、グリコシル化配列を、ポリペプチドの溶媒暴露表面に対応するポリペプチドの領域に導入する。例示的なポリペプチド立体構造は、グリコシル化配列の標的アミノ基が内側に向いていないものであり、ポリペプチドの他の領域と水素結合を形成するものである。別の例示的な立体構造は、アミノ基が隣接タンパク質と水素結合を形成する可能性が低いものである。

40

【 0 1 5 6 】

一例において、N連結グリコシル化配列は、親タンパク質の事前に選択された特定領域内に作製される。天然では、ポリペプチド骨格のグリコシル化は、通常、ポリペプチドの

50

ループ領域内で生じ、典型的に、ヘリカル又はベータシート構造内では生じない。従って、一実施態様において、本発明のシークオンポリペプチドは、N連結グリコシル化配列を親ポリペプチドの区域（ループドメインに対応する）中に導入することにより生成される。

**【0157】**

例えば、タンパク質BMP-7の結晶構造は、Ala<sup>72</sup>とAla<sup>86</sup>ならびにIle<sup>96</sup>とPro<sup>103</sup>の間に2つの伸長したループ領域を含む。BMP-7突然変異体（それにおいてN連結グリコシル化配列がポリペプチド配列のそれらの領域内に置かれる）を生成することによって、突然変異がポリペプチドの本来の三次構造の破壊をほとんど起こさないポリペプチドがもたらされうる。

10

**【0158】**

しかし、ベータ-シート又はアルファ-ヘリカル立体構造の範囲内に入るアミノ酸位置でのN連結グリコシル化配列の導入は、また、シークオンポリペプチドをもたらしことができ、それは新たに導入されたN連結グリコシル化配列で効率的にグリコシル化される。N連結グリコシル化配列のベータ-シート又はアルファ-ヘリカルドメイン中への導入によって、ポリペプチドに構造変化が起こされうるが、それは、次に、効率的なグリコシル化を可能にする。

**【0159】**

タンパク質の結晶構造を使用し、N連結グリコシル化配列の導入のために最も適した野生型ポリペプチド又は親ポリペプチドのドメインを同定することができ、有望な修飾部位の事前の選択を可能にしうる。

20

**【0160】**

結晶構造が利用可能ではない場合、ポリペプチドのアミノ酸配列を使用し、有望な修飾部位を事前を選択することができる（例えば、ループドメイン対アルファ-ヘリカルドメインの予測）。しかし、たとえポリペプチドの三次元構造が公知の場合でも、構造動態及び酵素/受容体相互作用が溶液中で変動する。故に、適した突然変異部位の同定ならびに適したグリコシル化配列の選択は、いくつかのシークオンポリペプチド（例えば、本発明のシークオンポリペプチドのライブラリー）の作製、及び、適切なスクリーニングプロトコル（例えば、本明細書に記載のもの）を使用した望ましい特徴についてのそれらの変異体のテストを含みうる。

30

**【0161】**

一実施態様において、親ポリペプチドは抗体又は抗体フラグメントであり、抗体又は抗体フラグメントの定常領域（例えば、C<sub>H</sub>2ドメイン）は、本発明のN連結グリコシル化配列で修飾される。一例において、N連結グリコシル化配列を、天然グリコシル化配列を置換する、又は、機能的に損なわせる様な方法で導入する。抗体の定常領域についてのアミノ酸配列及び核酸配列は、当業者に公知である。

**【0162】**

一実施態様において、シークオンスクランを、抗体（各々が本発明の外因性N連結グリコシル化配列を含む）のライブラリーを作製するC<sub>H</sub>2ドメインの選択された区域を通して実施する。さらに別の実施態様において、結果として得られるポリペプチド変異体を、グリコシル成分をグリコシル化配列に付加することを目的とする酵素的グリコシル化反応に供する。十分にグリコシル化されるそのような変異体を、それらが適した受容体（例えば、Fc受容体、例えばFcγRIIIaなど）に結合する能力について分析することができる。一実施態様において、そのようなグリコシル化抗体又は抗体フラグメントは、親抗体又はその天然グリコシル化バージョンと比較された場合、Fc受容体に対する増加した結合親和性を示す。本発明のこの局面は、2007年1月18日に出願された米国仮特許出願第60/881,130号においてさらに記載され、その開示は本明細書においてその全体が組み入れられる。記載される修飾は、抗体のエフェクター機能を変化させることができる。一実施態様において、グリコシル化された抗体変異体は、低下したエフェクター機能（例えば、ナチュラルキラー細胞の表面上又はキラーT細胞の表面上に見出され

40

50

る受容体に対する低下した結合親和性)を示す。別の例において、抗体の複合糖質化は、非修飾抗体と比較された場合、修飾抗体の薬物動態的及び/又は薬力学的特性を修飾するために有用である。例えば、複合糖質化抗体は、非修飾抗体よりも長いインビボでの半減期を有する。

#### 【0163】

N連結グリコシル化配列を含むペプチドリンカーフラグメント

別の実施態様において、N連結グリコシル化配列を親ポリペプチド配列内に導入せず、しかし、むしろ、親ポリペプチドの配列を、親ポリペプチドのN末端又はC末端のいずれかへのペプチドリンカーフラグメントの付加を通じて伸長させ、ここでペプチドリンカーフラグメントは、本発明のN連結グリコシル化配列(例えば「NLT」又は「DFNVS」など)を含む。ペプチドリンカーフラグメントは、任意の数のアミノ酸を有しうる。一実施態様において、ペプチドリンカーフラグメントは、少なくとも約5つ、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約50、又は50を上回るアミノ酸残基を含む。ペプチドリンカーフラグメントは、場合により、反応性官能基、例えばアミノ基(例えば、リジン)又はスルフヒドリル基(例えば、システイン)などを有する内部又は末端アミノ酸残基を含む。そのような反応性官能基を使用し、ポリペプチドを、別の成分(例えば別のポリペプチド、細胞毒素、小分子薬物、又は本発明の別の修飾基など)に連結してよい。本発明のこの局面は、2007年1月18日出願された米国仮特許出願第60/881,130号においてさらに記載され、その開示は本明細書においてその全体が組み入れられる。

#### 【0164】

一実施態様において、本発明のペプチドリンカーフラグメントで修飾された親ポリペプチドは、抗体又は抗体フラグメントである。この実施態様の一例において、親ポリペプチドはscFvである。本明細書において記載される方法を使用し、本発明のscFvを調製することができ、それにおいて、scFv又はリンカーは、グリコシル成分、又はグリコシル連結基を通じてペプチドに付着された修飾基を用いて修飾される。グリコシル化及び複合糖質化の例示的な方法が、例えば、PCT/US02/32263及び米国特許出願第10/411,012号において記載され、その各々が参照により本明細書においてその全体が組み入れられる。

#### 【0165】

一実施態様において、特定のアミノ酸残基がN連結グリコシル化配列中に含まれ、特定の生物(例えば大腸菌など)における突然変異ポリペプチドの発現可能性、タンパク質分解安定性、構造特徴、及び/又はポリペプチドの他の特性を調整する。

#### 【0166】

例示的なポリペプチド

本発明のN連結グリコシル化配列を任意の親ポリペプチド中に導入し、本発明のシークオンポリペプチドを作製することができる。本発明のシークオンポリペプチドは、当技術分野において公知であり、本明細書において以下に記載される方法を使用して(例えば、組換え技術又は化学合成を通じて)生成することができる。一実施態様において、N連結グリコシル化配列が親配列中に挿入され、全長及び各数のアミノ酸を親ポリペプチドのアミノ酸配列に付加するような方法で、親配列を修飾する。別の実施態様において、N連結グリコシル化配列によって親ポリペプチドの1つ又は複数のアミノ酸を置換する。別の実施態様において、N連結グリコシル化配列を、グリコシル化配列の一部となるべき既存のアミノ酸の1つ又は複数を使用して、親ポリペプチド中に導入する。例えば、親ペプチド中のアスパラギン残基を維持し、プロリン直後のそれらのアミノ酸を突然変異させて、本発明のN連結グリコシル化配列を作製する。さらに別の実施態様において、N連結グリコシル化配列を、アミノ酸の挿入及び既存のアミノ酸の置換の組み合わせを用いて作製する。

#### 【0167】

特定の実施態様において、本発明の特定の親ポリペプチドを、本発明の特定のN連結グ

リコシル化配列と共に使用する。例示的な親ポリペプチド/N連結グリコシル化配列の組み合わせを図6においてまとめる。図6における各列は、本発明の例示的な実施態様を表わす。示した組み合わせを、本発明の全ての局面（単一シークオンポリペプチド、ポリペプチドのライブラリー、ポリペプチド抱合体、及び本発明の方法を含む）において使用してよい。当業者は、示した親ポリペプチドについて図6において記載する実施態様を、本明細書において記載する他の親ポリペプチドに等しく適用することができることを理解するであろう。当業者は、また、列挙したポリペプチドを、例証した方法で、本明細書において記載する任意のグリコシル化配列と使用することができることを理解するであろう。

【0168】

ポリペプチドのライブラリー

10

グリコシル化又は複合糖質化（例えば、糖PEG化）反応に供された際に効率的に（例えば、満足できる収率で）グリコシル化又は複合糖質化されるポリペプチドの同定のための1つの戦略は、本発明のN連結グリコシル化配列を、親ポリペプチドのアミノ酸配列内の種々の異なる位置（例えば、ベータ-シートドメイン及びアルファ-ヘリカルドメインを含む）に挿入し、次に多くの結果として得られるシークオンポリペプチドを、それらがオリゴサッカリルトランスフェラーゼの効率的な基質として機能する能力についてテストすることである。

【0169】

故に、別の局面において、本発明は、複数個の異なるメンバーを含むシークオンポリペプチドのライブラリーを提供し、それにおいてライブラリーの各メンバーは共通の親ポリペプチドに対応し、本発明の少なくとも1つの非依存的に選択される外因性N連結グリコシル化配列を含む。一実施態様において、ライブラリーの各メンバーは、同じN連結グリコシル化配列を含み、各々が親ポリペプチド内の異なるアミノ酸位置にある。別の実施態様において、ライブラリーの各メンバーは、異なるN連結グリコシル化配列を、しかし、親ポリペプチド内の同じアミノ酸位置に含む。N連結グリコシル化配列は、本発明のライブラリーとの併用で有用であり、本明細書において記載される。一実施態様において、本発明のライブラリーにおいて使用されるN連結グリコシル化配列は、化学式(I)（配列番号1）のアミノ酸配列を有する。別の実施態様において、本発明のライブラリーにおいて使用されるN連結グリコシル化配列は、化学式(II)（配列番号2）のアミノ酸配列を有する。化学式(I)及び化学式(II)が本明細書において上に記載される。

20

30

【0170】

好ましい実施態様において、本発明のライブラリーと共に使用されるN連結グリコシル化配列は、以下：

【表8】

$X^1NGSX^4$ ,  $X^1NGTX^4$ ,  $X^1NASX^4$ ,  $X^1NATX^4$ ,  $X^1NVSX^4$ ,  $X^1NVTX^4$ ,  $X^1NLSX^4$ ,  $X^1NLTX^4$ ,  
 $X^1NISX^4$ ,  $X^1NITX^4$ ,  $X^1NFSX^4$  and  $X^1NFTX^4$ ,  $X^1DX^2NGSX^4$ ,  $X^1DX^2NGTX^4$ ,  
 $X^1DX^2NASX^4$ ,  $X^1DX^2NATX^4$ ,  $X^1DX^2NVSX^4$ ,  $X^1DX^2NVTX^4$ ,  $X^1DX^2NLSX^4$ ,  
 $X^1DX^2NLTX^4$ ,  $X^1DX^2NISX^4$ ,  $X^1DX^2NITX^4$ ,  $X^1DX^2NFSX^4$  及び  $X^1DX^2NFTX^4$

40

より選択されるアミノ酸配列を有し、それにおいて $X^1$ 、 $X^2$ 、及び $X^4$ は上の通りに定義される。

【0171】

一実施態様において、ライブラリーの各メンバーが共通のN連結グリコシル化配列を有し、親ポリペプチドが、「m」アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。一例において、シークオンポリペプチドのライブラリーは、(a) N連結グリコシル化配列を親ポリペプチド内の第1のアミノ酸位置(AA)<sub>n</sub>に有する第1のシークオンポリペプチド（それにおいてnは1~mより選択されるメンバーである）；及び(b)少なくとも1つの追加のシークオンポリペプチド（それにおいて、各々の追加のシークオンポリペプチドにおいて、

50

N連結グリコシル化配列が追加のアミノ酸位置に導入され、各々の追加のアミノ酸位置が  $(AA)_{n+x}$  及び  $(AA)_{n-x}$  より選択され、それにおいて  $x$  は  $1 \sim (m-n)$  より選択されるメンバーである)を含む。例えば、第1のシークオンポリペプチドが、第1のアミノ酸位置での選択されたN連結グリコシル化配列の導入を通じて生成される。後のシークオンポリペプチドを、次に、同じN連結グリコシル化配列をアミノ酸位置(親ポリペプチドのN末端又はC末端にさらに向かって位置付けられる)に導入することにより生成してよい。

【0172】

これに関連して、 $n-x$  が  $0$  ( $AA0$ ) である場合、グリコシル化配列を、親ポリペプチドのN末端アミノ酸の直前に導入する。例示的なシークオンポリペプチドは部分配列: 「NLTM<sup>1</sup>...」を有しうる。

10

【0173】

第1のアミノ酸位置  $(AA)_n$  は、親ポリペプチドのアミノ酸配列内のどこかでありうる。一実施態様において、第1のアミノ酸位置が(例えば、ループドメインの開始部で)選択される。

【0174】

各々の追加のアミノ酸位置は、親ポリペプチド内のどこかでありうる。一例において、シークオンポリペプチドのライブラリーは、N連結グリコシル化配列を、 $(AA)_{n+p}$  及び  $(AA)_{n-p}$  より選択されるアミノ酸位置に有する第2のシークオンポリペプチドを含み、それにおいて、 $p$  は、 $1 \sim$  約10、好ましくは  $1 \sim$  約8、より好ましくは  $1 \sim$  約6、さらにより好ましくは  $1 \sim$  約4、最も好ましくは  $1 \sim$  約2より選択される。一実施態様において、シークオンポリペプチドのライブラリーは、N連結グリコシル化配列をアミノ酸位置  $(AA)_n$  に有する第1のシークオンポリペプチド及びN連結グリコシル化配列をアミノ酸位置  $(AA)_{n+1}$  又は  $(AA)_{n-1}$  に有する第2のシークオンポリペプチドを含む。

20

【0175】

別の例において、追加のアミノ酸位置の各々は、先に選択されたアミノ酸位置に直接隣接している。さらに別の例において、各々の追加のアミノ酸位置は、先に選択されたアミノ酸位置より除去された正確に1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のアミノ酸である。

30

【0176】

親ポリペプチドの「所定のアミノ酸位置での」N連結グリコシル化配列の導入は、突然変異が導入され、所定のアミノ酸位置の直ぐ次から(C末端に向かって)開始することを意味する。導入は、完全挿入(任意の既存のアミノ酸を置換しない)を通じて、又は、任意の数の既存のアミノ酸を置換することにより生じうる。

【0177】

例示的な実施態様において、シークオンポリペプチドのライブラリーは、N連結グリコシル化配列を親ポリペプチドの連続アミノ酸位置に導入することにより生成され、各々が先に選択されたアミノ酸位置に直接隣接して位置付けられ、それによりグリコシル化配列を、アミノ酸鎖を通じて、所望の最終アミノ酸位置に達するまで「スキッピング」する。「直接隣接する」とは、親ポリペプチドのN末端又はC末端にさらに向かって正確に1つのアミノ酸位置を意味する。例えば、第1の突然変異体は、アミノ酸位置  $AA_n$  でのグリコシル化配列の導入により作製される。ライブラリーの第2のメンバーは、アミノ酸位置  $AA_{n+1}$  での、第3の突然変異体は  $AA_{n+2}$  での、など、グリコシル化部位の導入を通じて作製される。この手順は「シークオンスキッピング」と呼ばれている。当業者は、第1のメンバーがアミノ酸位置  $(AA)_n$  に、第2のメンバーがアミノ酸位置  $(AA)_{n+2}$  に、第3が  $(AA)_{n+4}$  に、など、グリコシル化配列を有するように、シークオンスキッピングがライブラリーをデザインすることを含みうることを理解するであろう。同じように、ライブラリーのメンバーは、グリコシル化配列の他の戦略的配置により特徴付けてよい。例えば:

40

50

A) メンバー 1 : (AA)<sub>n</sub> ; メンバー 2 : (AA)<sub>n+3</sub> ; メンバー 3 : (AA)<sub>n+6</sub> ; メンバー 4 : (AA)<sub>n+9</sub> など。

B) メンバー 1 : (AA)<sub>n</sub> ; メンバー 2 : (AA)<sub>n+4</sub> ; メンバー 3 : (AA)<sub>n+8</sub> ; メンバー 4 : (AA)<sub>n+12</sub> など。

C) メンバー 1 : (AA)<sub>n</sub> ; メンバー 2 : (AA)<sub>n+5</sub> ; メンバー 3 : (AA)<sub>n+10</sub> ; メンバー 4 : (AA)<sub>n+15</sub> など。

【0178】

一実施態様において、シークオンポリペプチドの第1のライブラリーを、本発明の選択されたN連結グリコシル化配列を親ポリペプチドの特定の領域(例えば、特定のループ領域の開始からそのループ領域の終わりまで)を通してスキャンすることにより生成する。第2のライブラリーを、次に、同じグリコシル化配列をポリペプチドの別の領域を通してスキャンすることにより生成し、第1の領域と第2の領域の間に位置付けられるそれらのアミノ酸位置を「スキッピング」する。除外されるポリペプチド鎖の一部は、例えば、生物学的活性のために重要な結合ドメイン又はグリコシル化に不適であることが公知であるポリペプチド配列の別の領域に対応しうる。任意の数の追加ライブラリーを、ポリペプチドの追加ストレッチについて「シークオンスキャンニング」を実施することにより生成することができる。例示的な実施態様において、ライブラリーは、N連結グリコシル化配列を、親ポリペプチド内の各アミノ酸位置に突然変異を導入するポリペプチド全体を通してスキャンすることにより生成される。

【0179】

一実施態様において、ライブラリーのメンバーは、ポリペプチドの混合物の一部である。例えば、細胞培養を複数の発現ベクターで感染させ、それにおいて各ベクターは本発明の異なるシークオンポリペプチドのための核酸配列を含む。発現時に、培養ブ罗斯は複数の異なるシークオンポリペプチドを含んでよく、したがってシークオンポリペプチドのライブラリーを含む。この技術は、ライブラリーのシークオンポリペプチドのいずれが、所定の発現系において最も効率的に発現されるのかを決定するために有用でありうる。

【0180】

別の実施態様において、ライブラリーのメンバーは互いに単離されて存在する。例えば、上の混合物のシークオンポリペプチドの少なくとも2つが単離されうる。一緒に、単離ポリペプチドはライブラリーを表わす。あるいは、ライブラリーの各シークオンポリペプチドは別々に発現され、シークオンポリペプチドは場合により単離される。別の例において、ライブラリーの各メンバーは化学的手段により合成され、場合により精製される。

【0181】

例示的なポリペプチド及びポリペプチドライブラリー

例示的な親ポリペプチドは組換えヒトBMP-7である。例示的な親ポリペプチドとしてのBMP-7の選択は、例証的な目的のためであり、本発明の範囲を限定することを意味しない。当業者は、任意の親ポリペプチド(例えば、本明細書において記載されるもの)が、以下の例示的な修飾のために等しく適することを理解するであろう。このようにして得られた任意のポリペプチド変異体は、本発明の範囲内にある。本発明の生物学的に活性なBMP-7変異体は、任意のBMP-7ポリペプチドを一部として又は全体で含み、それは当業者に公知である任意の適した機能アッセイにより測定される通り、その生物学的活性の実質的な又は全体の喪失を招かない少なくとも1つの修飾を含む。以下の配列(140のアミノ酸)は、全長BMP-7配列(配列S.1) :

【表9】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAFPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 10)

10

20

30

40

50

の生物学的に活性な部分を表わす。

【0182】

例示的なBMP-7変異体ポリペプチドは、上の親ポリペプチド配列に基づいており、表3-11において以下に列挙する。

【0183】

一つの例示的な実施態様において、突然変異を野生型BMP-7アミノ酸配列S.1(配列番号10)中に導入し、親配列中の対応する数のアミノ酸を置換し、親ポリペプチドと同じ数のアミノ酸残基を含むシークオンポリペプチドをもたらす。例えば、通常BMP-7中にある3つのアミノ酸をN連結グリコシル化配列「アスパラギン-ロイシン-スレオニン」(NLT)で直接的に置換し、次にポリペプチドのC末端に向かうNLT配列を連続的に移動させることによって、137のBMP-7変異体(各々がNLTを含む)が提供される。この実施態様の例示的な配列を表3において、以下に列挙する。

【0184】

表3:140のアミノ酸を含み、3つの既存のアミノ酸がN連結グリコシル化配列「NLT」で置換されているBMP-7変異体の例示的なライブラリー。

位置1での導入(3つの既存のアミノ酸を置換する)：

【表10】

M<sup>1</sup>NLTSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号11)

10

20

位置2での導入(3つの既存のアミノ酸を置換する)：

【表11】

M<sup>1</sup>SNLTKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号12)

30

位置3での導入(3つの既存のアミノ酸を置換する)：

【表12】

M<sup>1</sup>STNLTQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号13)

追加BMP-7変異体は、グリコシル化配列を上の様式で配列全体を通して「スキャン」することにより生成することができる。このようにして得られた全ての変異BMP-7配列は、本発明の範囲内にある。このようにして生成された最終シークオンポリペプチドは、以下の配列を有する：

40

位置137での導入(3つの既存のアミノ酸を置換する)：

【表13】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACNLT (配列番号14)

50

## 【 0 1 8 5 】

別の例示的な実施態様において、N連結グリコシル化配列を、野生型BMP-7アミノ酸配列S.1(配列番号10)中に、1つ又は複数のアミノ酸を親配列に加えることにより導入する。例えば、N連結グリコシル化配列NLTを親BMP-7配列に加えて、親配列中の2、1、又は0のいずれかのアミノ酸を置換する。この例において、加えられるアミノ酸残基の最高数は、挿入されるグリコシル化配列の長さに対応する。例示的な実施態様において、親配列を、正確に1個のアミノ酸だけ伸長させる。例えば、N連結グリコシル化配列NLTを親BMP-7ペプチドに加えて、BMP-7中に通常存在する2つのアミノ酸を置換する。この実施態様の例示的な配列を表4において、以下に列挙する。

## 【 0 1 8 6 】

表4：141のアミノ酸を含み、2つの既存のアミノ酸がN連結グリコシル化配列「NLT」で置換されている突然変異BMP-7ポリペプチドの例示的なライブラリー。

位置1での導入(2つのアミノ酸(ST)を置換する)：

## 【表14】

M<sup>1</sup>NLTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH(配列番号15)

10

20

位置2での導入(2つのアミノ酸(TG)を置換する)：

## 【表15】

M<sup>1</sup>SNLTSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH(配列番号16)

位置3での導入(2つのアミノ酸(GS)を置換する)：

## 【表16】

M<sup>1</sup>STNLTKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH(配列番号17)

30

位置4での導入(2つのアミノ酸(SK)を置換する)：

## 【表17】

M<sup>1</sup>STGNLTQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH(配列番号18)

40

位置5での導入(2つのアミノ酸(KQ)を置換する)：

## 【表 18】

M<sup>1</sup>STGS**N**LTRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 19)

追加の B M P - 7 変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、以下の配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる：

位置 1 3 8 での導入 ( 2 つの既存のアミノ酸 ( C H ) を置換する ) :

10

## 【表 19】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACG**NLT** (配列番号 20)

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

## 【0187】

別の例は、N 連結グリコシル化配列 ( 例えば、N L T ) の親ポリペプチド ( 例えば、B M P - 7 ) への付加を含み、親ポリペプチド中に通常存在する 1 つのアミノ酸を置換する ( 二重アミノ酸挿入 ) 。この実施態様の例示的な配列を表 5 において、以下に列挙する。

20

## 【0188】

表 5 : N L T を含む B M P - 7 突然変異の例示的なライブラリー ; 1 つの既存のアミノ酸の置換 ( 1 4 2 アミノ酸 ) 。

位置 1 での導入 ( 1 つのアミノ酸 ( S ) を置換する ) :

## 【表 20】

M<sup>1</sup>**N**LTTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 21)

30

位置 2 での導入 ( 1 つのアミノ酸 ( T ) を置換する ) :

## 【表 21】

M<sup>1</sup>**S**NLTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 22)

40

位置 3 での導入 ( 1 つのアミノ酸 ( G ) を置換する ) :

## 【表 22】

M<sup>1</sup>ST**N**LTSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 23)

位置 4 での導入 ( 1 つのアミノ酸 ( S ) を置換する ) :

50

## 【表 2 3】

M<sup>1</sup>STGNLTKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 24)

位置 5 での導入 ( 1 つのアミノ酸 ( K ) を置換する ) :

## 【表 2 4】

M<sup>1</sup>STGSNLTQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 25)

10

追加の BMP - 7 変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、以下の配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる :

位置 1 3 9 での導入 ( 1 つの既存のアミノ酸 ( H ) を置換する ) :

## 【表 2 5】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCNLT (配列番号 26)

20

このようにして得られた全ての BMP - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

## 【 0 1 8 9 】

さらに別の例は、親ポリペプチド ( 例えば、BMP - 7 ) 内の N 連結グリコシル化配列の作製を含み、親ポリペプチド中に通常存在するアミノ酸のいずれも置換せず、グリコシル化配列の全長を加える ( 例えば、NLT についてのトリプルアミノ酸挿入 ) 。この実施態様の例示的な配列を表 6 において、以下に列挙する。

30

## 【 0 1 9 0 】

表 6 : NLT を含む BMP - 7 変異体の例示的ライブラリー ; 3 つのアミノ酸の付加 ( 1 4 3 のアミノ酸 ) 。

位置 1 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加する ) :

## 【表 2 6】

M<sup>1</sup>NLTSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 27)

40

位置 2 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加する ) :

## 【表 2 7】

M<sup>1</sup>SNLTTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 28)

50

位置 3 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加する ) :

【表 2 8】

M<sup>1</sup>STNLTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 29)

位置 4 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加する ) :

【表 2 9】

M<sup>1</sup>STGNLTSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 30)

10

追加の B M P - 7 突然変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる :

位置 1 4 0 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加する ) :

【表 3 0】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCHNLT (配列番号 31)

20

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

【 0 1 9 1】

表 3 ~ 6 におけるそれらの例と類似の B M P - 7 変異体を、本発明の N 連結グリコシル化配列のいずれかを使用して生成することができる。全ての結果として得られる B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。例えば、N L T の代わりに、配列 D R N L T (配列番号 3 2 ) を使用することができる。例示的な実施態様において、D R N L T を親ポリペプチド中に導入し、B M P - 7 中に通常存在する 5 つのアミノ酸を置換する。この実施態様の例示的な配列を表 7 において、以下に列挙する。

30

【 0 1 9 2】

表 7 : D R N L T を含む B M P - 7 変異体の例示的なライブラリー ; 5 つのアミノ酸の置換 ( 1 4 0 のアミノ酸 )

## 【表 3 1】

M<sup>1</sup>**DRNLT**QRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 33)

M<sup>1</sup>**SDRNLT**RSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 34)

10

M<sup>1</sup>**STDRLNLT**SQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 35)

M<sup>1</sup>**STGDRNLT**QNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 36)

20

追加の B M P - 7 突然変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる：

## 【表 3 2】

M<sup>1</sup>**STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ**  
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVR**DRNLT** (配列番号 37)

30

このようにして得られた全ての突然変異 B M P - 7 配列は、本発明の範囲内にある。

## 【0193】

別の例において、N 連結グリコシル化配列 D R N L T を、親ポリペプチド（例えば、B M P - 7）に、親配列の N 末端又は C 末端のいずれかに、又は、その近くに加え、1 ~ 5 のアミノ酸を親ポリペプチドに加える。この実施態様の例示的な配列を表 8 において、以下に列挙する。

## 【0194】

表 8：D R N L T を含む B M P - 7 変異体の例示的なライブラリー（141 ~ 145 のアミノ酸）

アミノ末端突然変異体：

40

位置 1 での導入（5 つのアミノ酸を付加する）：

## 【表 3 3】

M<sup>1</sup>**DRNLTSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD**  
LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP  
TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 38)

位置 1 での導入（4 つのアミノ酸を付加し、1 つのアミノ酸（S）を置換する）：

## 【表 3 4】

M<sup>1</sup>**DRNLT**TGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL  
 GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPT  
 QLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 39)

位置 1 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加し、 2 つのアミノ酸 ( S T ) を置換する ) :

## 【表 3 5】

M<sup>1</sup>**DRNLT**TGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL  
 GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPT  
 QLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 40)

10

位置 1 での導入 ( 2 つのアミノ酸を付加し、 3 つのアミノ酸 ( S T G ) を置換する ) :

## 【表 3 6】

M<sup>1</sup>**DRNLT**SKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 41)

20

位置 1 での導入 ( 1 つのアミノ酸を付加し、 4 つのアミノ酸 ( S T G S ) を置換する ) :

## 【表 3 7】

M<sup>1</sup>**DRNLT**TKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 42)

30

カルボキシ末端突然変異体

位置 1 4 0 での導入 ( 5 つのアミノ酸を付加する ) :

## 【表 3 8】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**DRNLT** (配列番号 43)

40

位置 1 3 9 での導入 ( 4 つのアミノ酸を付加し、 1 つのアミノ酸 ( H ) を置換する ) :

## 【表 3 9】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACG**CDRNLT** (配列番号 44)

位置 1 3 8 での導入 ( 3 つのアミノ酸を付加し、 2 つのアミノ酸 ( C H ) を置換する ) :

## 【表 4 0】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACG**DRNLT** (配列番号 45)

位置 1 3 7 での導入 ( 2 つのアミノ酸を付加し、 3 つのアミノ酸 ( G C H ) を置換する )  
 :

## 【表 4 1】

10

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRAC**DRNLT** (配列番号 46)

位置 1 3 6 での導入 ( 1 つのアミノ酸を付加し、 4 つのアミノ酸 ( C G C H ) を置換する )  
 ) :

## 【表 4 2】

20

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVR**ADRNLT** (配列番号 47)

## 【 0 1 9 5 】

さらに別の例は、N 連結グリコシル化配列 D F N V S ( 配列番号 4 8 ) の親ポリペプチド ( 例えば、 B M P - 7 ) 中への挿入を含み、 1 ~ 5 のアミノ酸を親配列に加える。この実施態様の例示的な配列を表 9 において、以下に列挙する。

## 【 0 1 9 6 】

表 9 : D F N V S を含む B M P - 7 変異体の例示的なライブラリー  
 1 つのアミノ酸の挿入

30

## 【表 4 3】

M<sup>1</sup>**DFNVSK**QRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 49)

M<sup>1</sup>**SDFNVS**QRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 50)

40

M<sup>1</sup>ST**DFNVSR**SQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 51)

追加の B M P - 7 突然変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる :

## 【表 4 4】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRAD**FNVS** (配列番号 52)

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

2 つのアミノ酸の挿入

## 【表 4 5】

M<sup>1</sup>**DFNVSSK**QRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 53)

M<sup>1</sup>**SDFNVSK**QRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 54)

M<sup>1</sup>ST**DFNVS**QRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW  
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL  
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 55)

追加の B M P - 7 変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる：

## 【表 4 6】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRAC**DFNVS** (配列番号 56)

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

3 つのアミノ酸の挿入

10

20

30

## 【表 4 7】

M<sup>1</sup>**DFNV**SGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 57)

M<sup>1</sup>**SDFNV**SSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 58)

10

M<sup>1</sup>**STDFNV**SKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG  
 WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ  
 LNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 59)

追加の B M P - 7 変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる：

## 【表 4 8】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACG**DFNVS** (配列番号 60)

20

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

4 つのアミノ酸の挿入

## 【表 4 9】

M<sup>1</sup>**DFNV**STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL  
 GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT  
 QLNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 61)

30

M<sup>1</sup>**SDFNV**SGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL  
 GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT  
 QLNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 62)

M<sup>1</sup>**STDFNV**SSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL  
 GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT  
 QLNAISVL YFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 63)

40

追加の B M P - 7 変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる：

## 【表 5 0】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCD**DFNVS** (配列番号 64)

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

5 つのアミノ酸の挿入

## 【表 5 1】

M<sup>1</sup>**DFNVS**STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD  
 LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP  
 TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 65)

M<sup>1</sup>**SDFNV**STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD  
 LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP  
 TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 66)

M<sup>1</sup>ST**DFNVS**GSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD  
 LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP  
 TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (配列番号 67)

追加の B M P - 7 変異体を、グリコシル化配列を、配列全体を通して、上の様式で、最終配列に達するまで「スキャンすること」により生成することができる：

## 【表 5 2】

M<sup>1</sup>STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ  
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN  
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**DFNVS** (配列番号 68)

このようにして得られた全ての B M P - 7 変異体は、本発明の範囲内にある。

## 【 0 1 9 7】

一例において、N 連結グリコシル化配列（例えば、N L T 又は N V S）が、選択されたポリペプチド領域内の全ての可能なアミノ酸位置で、既存のアミノ酸の置換により及び/又は挿入により置かれる。この実施態様の例示的な配列を表 1 0 及び表 1 1 において、以下に列挙する。

## 【 0 1 9 8】

表 1 0 : A<sup>7 3</sup> と A<sup>8 2</sup> の間に N L T を含む B M P - 7 変異体の例示的なライブラリー  
 既存のアミノ酸の置換

## 【表 5 3】

- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 69) (親)
- N<sup>73</sup>LTLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 70)
- A<sup>73</sup>NLTNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 71)
- A<sup>73</sup>FNLTSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 72)
- A<sup>73</sup>FPNLTYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 73)
- A<sup>73</sup>FPLNLTMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 74)
- A<sup>73</sup>FPLNNLTNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 75)
- A<sup>73</sup>FPLNSNLTA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 76)
- A<sup>73</sup>FPLNSYNLT<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 77)

10

## 【0199】

表 1 1 : I<sup>95</sup> と P<sup>103</sup> の間に NLT を含む BMP - 7 変異体の例示的なライブラリー  
既存のアミノ酸の置換

20

## 【表 5 4】

- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFN<sup>95</sup>LTETVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 78)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NLTTVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 79)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NNLTVPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 80)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPNLTPKP<sup>103</sup>--- (配列番号 81)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPENLTKP<sup>103</sup>--- (配列番号 82)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETNLTP<sup>103</sup>--- (配列番号 83)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAIQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVNLT<sup>103</sup>--- (配列番号 84)

30

既存のアミノ酸の間での挿入 (1つのアミノ酸を付加)

## 【表 5 5】

- N<sup>73</sup>LTPLNSYMNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 85)
- A<sup>73</sup>NLTLNSYMNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 86)
- A<sup>73</sup>FNLTNSYMNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 87)
- A<sup>73</sup>FPNLTSYMNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 88)
- A<sup>73</sup>FPLNLTYMNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 89)
- A<sup>73</sup>FPLNMLTMNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 90)
- A<sup>73</sup>FPLNSNLTNA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 91)
- A<sup>73</sup>FPLNSYNLTA<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 92)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNLT<sup>83</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>96</sup>NPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 93)

既存のアミノ酸の間での挿入 (1つのアミノ酸を付加)

## 【表 5 6】

- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFN<sup>95</sup>LTPETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 94)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NLTETVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 95)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NNLTTVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 96)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NPNLTVPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 97)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NPENLTPKP<sup>104</sup>--- (配列番号 98)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NPETNLTKP<sup>104</sup>--- (配列番号 99)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVNLTTP<sup>104</sup>--- (配列番号 100)
- A<sup>73</sup>FPLNSYMNA<sup>82</sup>TNHAI VQTLVHFI<sup>95</sup>NPETVPNLT<sup>104</sup>--- (配列番号 101)

## 【0200】

上の置換及び挿入は、本発明の任意のN連結グリコシル化配列(例えば、NLTならびに配列番号32及び48)を使用して作製することができる。このようにして得られた全てのBMP-7変異体は、本発明の範囲内にある。

## 【0201】

別の例示的な実施態様において、1つ又は複数のN連結グリコシル化配列(例えば上に記載のものなど)を血液凝固因子(例えば、第VII因子、第VII因子、又は第IX因子ポリペプチド)中に挿入する。BMP-7に関連して記載される通り、N連結グリコシル化配列を、BMP-7で例示される種々のモチーフのいずれかにおいて挿入することができる。例えば、N連結グリコシル化配列を、野生型配列に固有の任意のアミノ酸を置換することなく、野生型配列中に挿入することができる。例示的な実施態様において、N連結グリコシル化配列を、ポリペプチドのN末端又はC末端に、又は、その近くに挿入する。別の例示的な実施態様において、野生型ポリペプチド配列に固有の1つ又は複数のアミノ酸残基を、N連結グリコシル化配列の挿入前に除去する。さらに別の例示的な実施態

10

20

30

40

50

様において、野生型配列に固有の1つ又は複数のアミノ酸残基は、N連結グリコシル化配列の成分であり(例えば、アスパラギン)、N連結グリコシル化配列は野生型アミノ酸を包含する。野生型アミノ酸は、N連結グリコシル化配列のいずれかの末端、又は、N連結グリコシル化配列の内部にありうる。

【0202】

さらに、任意の既存のN連結又はO連結グリコシル化配列を、本発明のN連結グリコシル化配列で置換することができる。また、N連結グリコシル化配列を、1つ又は複数のO連結グリコシル化配列に隣接して挿入することができる。一実施態様において、N連結グリコシル化配列の存在によって、O連結グリコシル化配列のグリコシル化が妨げられる。

【0203】

代表的な例において、親ポリペプチドは第V I I I因子である。この実施態様において、N連結グリコシル化配列を、上に記載するモチーフのいずれかに従いA、B、又はCドメイン中に挿入することができる。複数のN連結グリコシル化配列を、単一ドメイン又は複数のドメイン中に挿入することができる;ここでも、上のモチーフのいずれかに従う。例えば、N連結グリコシル化配列を、A、B、及びCドメイン、A及びCドメイン、A及びBドメイン、又はB及びCドメインの各々の中に挿入することができる。あるいは、N連結グリコシル化配列をA及びBドメイン又はB及びCドメインに隣接させることができる。第V I I I因子についての例示的なアミノ酸配列を、図2に提供する。

【0204】

別の例示的な実施態様において、第V I I I因子ポリペプチドは、Bドメイン欠失(B D D)第V I I I因子ポリペプチドである。この実施態様において、N連結グリコシル化配列を、第V I I I因子ヘテロダイマーの80Kdと90Kdサブユニットを連結するペプチドリンカー中に挿入することができる。あるいは、N連結グリコシル化配列は、Aドメイン及びリンカー又はCドメイン及びリンカーに隣接させることができる。BMP-7に関連して上に記載する通り、N連結グリコシル化配列を、既存のアミノ酸の置換なく挿入することができ、又は、挿入して、親ポリペプチドの1つ又は複数のアミノ酸を置換してよい。Bドメイン欠失(B D D)第V I I I因子についての例示的な配列を、図3に提供する。

【0205】

他のBドメイン欠失第V I I I因子ポリペプチドも、本発明での使用のために適しており、例えば、Sandberg et al., Seminars in Hematology 38(2): 4-12 (2000)において開示されるBドメイン欠失第V I I I因子ポリペプチドを含み、その開示は本明細書において参照により組み入れられる。

【0206】

当業者には明らかなように、本発明の複数の突然変異N連結グリコシル化配列を含むそのポリペプチドも本発明の範囲内にある。追加の突然変異を導入し、ポリペプチドの特性、例えば生物学的活性、代謝的安定性(例えば、タンパク質分解の低下)、薬物動態などの調整を可能にしうる。

【0207】

ひとたび種々の変異体が調製されれば、それらは、N連結グリコシル化又は糖P E G化の基質として機能するそれらの能力について評価することができる。成功したグリコシル化及び/又は糖P E G化を、当技術分野において公知の方法、例えばマススペクトロメトリー(例えば、M A L D I - T O F又はQ - T O F)、ゲル電気泳動(例えば、デンシトメトリーとの組み合わせで)、又はクロマトグラフィー分析(例えば、H P L C)などを使用して検出及び定量化してよい。生物学的アッセイ、例えば酵素阻害アッセイ、受容体結合アッセイ、及び/又は細胞ベースのアッセイなどを使用して、所定のポリペプチド又はポリペプチド抱合体の生物学的活性を分析することができる。評価戦略は、本明細書において、以下により詳細に記載されている(例えば、「リードポリペプチドの同定」を参照のこと)。各ポリペプチドの化学的及び生物学的評価のために有用な適切なアッセイ系を選択及び/又は開発することは、当業者の能力の範囲内でありうる。

10

20

30

40

50

## 【0208】

## ポリペプチド抱合体

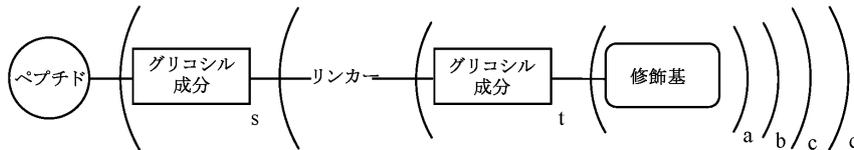
別の局面において、本発明は、ポリペプチド（例えば、シークオンポリペプチド）と選択された修飾基（例えば、ポリマー修飾基）の間の共有結合抱合体を提供し、それにおいて修飾基を、ポリペプチドに、グリコシル連結基（例えば、インタクトなグリコシル連結基）を介して抱合させる。グリコシル連結基を、ポリペプチドと修飾基の間に挿置し、その両方に共有結合的に連結させる。このポリペプチド抱合体の調製において有用である例示的な方法を、本明細書において記載する。他の有用な方法が、米国特許第5,876,980号；第6,030,815号；第5,728,554号；及び第5,922,577号、ならびにWO 98/31826；WO2003/031464；WO2005/070138；WO2004/99231；WO2004/10327；WO2006/074279；及び米国特許出願公報第2003180835号において記載されており、その全てが本明細書において参照により全ての目的のために組み入れられる。

10

## 【0209】

本発明の抱合体は、典型的に、一般的な構造：

## 【化2】



20

（式中、記号 a、b、c、d、及び s は、正の非ゼロの整数を表わし；t は 0 又は正の整数のいずれかである）に対応する。「修飾基」は、治療用薬剤、生物活性剤（例えば、毒素）、検出可能標識、ポリマー（例えば、水溶性ポリマー）、又は同様のものでありうる。リンカーは、以下の多様な連結基のいずれかでありうる。あるいは、リンカーは単結合でありうる。ポリペプチドの同一性は限定されない。

## 【0210】

例示的なポリペプチド抱合体は、N連結グリコシル化配列に、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの作用を通じて結合されているN連結GlcNAc又はGlcNH残基を含む。一実施態様において、GlcNAc又はGlcNH自体は、修飾基で誘導体化され、グリコシル連結基を表わす。別の実施態様において、追加のグリコシル残基はGlcNAc成分に結合している。例えば、別のGlcNAc、Gal、又はGal-Sia成分は、その各々を修飾基で修飾することができ、GlcNAc成分に結合されている。代表的な実施態様において、N連結サッカリル残基はGlcNAc-X\*、GlcNH-X\*、GlcNAc-GlcNAc-X\*、GlcNAc-GlcNH-X\*、GlcNAc-Gal-X\*、GlcNAc-Gal-Sia-X\*、GlcNAc-GlcNAc-Gal-Sia-X\*であって、それにおいてX\*は修飾基（例えば、水溶性ポリマー修飾基）である。

30

## 【0211】

一実施態様において、本発明は、それらの置換パターンにおいて高度に均質であるポリペプチド抱合体を提供する。本発明の方法を使用して、本発明の抱合体の集団にわたる修飾された糖成分の本質的に全てが、構造的に同一のアミノ酸又はグリコシル残基に付着されるポリペプチド抱合体を形成することが可能である。このように、例示的な実施態様において、本発明は、N連結グリコシル化配列内のアミノ酸残基（例えば、アスパラギン）に、グリコシル連結基を通じて共有結合的に結合された少なくとも1つの修飾基（例えば、水溶性ポリマー修飾基）を含むポリペプチド抱合体を提供する。一例において、それに付着したグリコシル連結基を有する各アミノ酸残基は、同じ構造を有する。別の例示的な実施態様において、修飾基（例えば、水溶性ポリマー成分）の集団の本質的に各メンバーが、グリコシル連結基を介して、ポリペプチドのグリコシル残基に結合され、グリコシル

40

50

連結基が付着しているポリペプチドの各グリコシル残基は同じ構造を有する。

【0212】

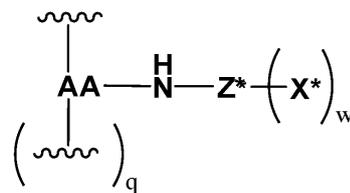
一局面において、本発明は、ポリペプチドと修飾基（例えば、ポリマー修飾基）の間の共有結合抱合体を提供し、それにおいてポリペプチドは本発明の外因性N連結グリコシル化配列を含む。典型的に、N連結グリコシル化配列はアスパラギン（N）残基を含む。ポリマー修飾基は、N連結グリコシル化配列のアスパラギン残基で、ポリペプチドとポリマー修飾基の間に挿置され、それらの両方に共有結合的に連結されたグリコシル連結基を介して、ポリペプチドに共有結合的に抱合される。グリコシル連結基は、モノサッカライド又はオリゴサッカライドでありうる。例示的なN連結グリコシル化配列が、本明細書において記載され、配列番号1又は配列番号2の構造を有しうる。例示的なポリマー修飾基、例えば水溶性ポリマー修飾基（例えば、PEG又はm-PEG）なども本明細書において記載される。

10

【0213】

一局面において、本発明は、N連結グリコシル化配列（例えば、外因性N連結グリコシル化配列）を有するシークオンポリペプチドを含む共有結合抱合体を提供する。一実施態様において、ポリペプチド抱合体は化学式（III）：

【化3】



20

(III)

の成分を含む。

【0214】

化学式（III）において、wは0～20より選択される整数である。一実施態様において、wは0～8より選択される。別の実施態様において、wは0～4より選択される。さらに別の実施態様において、wは0～1より選択される。1つの特定の例において、wは1である。wが0である場合、(X\*)<sub>w</sub>はHで置換される。X\*は修飾基（例えば、直鎖又は分岐ポリマー修飾基）である。一例において、X\*は、修飾基をZ\*に連結するリンカー成分を含む。別の例において、X\*は-L<sup>a</sup>-R<sup>6c</sup>又は-L<sup>a</sup>-R<sup>6b</sup>である。AA-NH-は、アミノ基（例えば、アスパラギン）を含む側鎖を有するN連結グリコシル化配列内のアミノ酸に由来する成分である。一実施態様において、整数qは0であり、アミノ酸はN末端又はC末端アミノ酸である。別の実施態様において、qは1であり、アミノ酸は内部アミノ酸である。

30

【0215】

化学式（III）において、Z\*はグリコシル成分であり、それはモノサッカライド及びオリゴサッカライドより選択される。Z\*はグリコシル模倣成分でありうる。wが1又はそれより大きい場合、Z\*はグリコシル連結基である。一実施態様において、Z\*は天然N連結グリカン、例えばトリマンノシル中心成分[GlcNAc-GlcNAc-Man(Man)<sub>2</sub>]などであり、それは場合によりフコース残基で置換される。一実施態様において、Z\*はモノアンテナ型グリカンである。別の実施態様において、Z\*はジアンテナ型グリカンである。さらに別の実施態様において、Z\*はトリアンテナ型グリカンである。さらなる実施態様において、Z\*はテトラアンテナ型グリカンである。Z\*グリカンの各アンテナを、非依存的に選択された修飾基に共有結合的に連結してよい。例えば、Z\*の各末端糖成分を、修飾基に共有結合的に連結してよい。

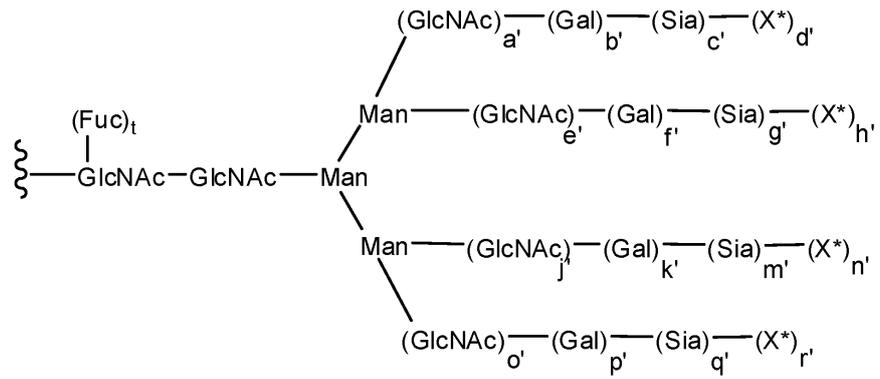
40

【0216】

一実施態様において、成分-Z\*-(X\*)<sub>w</sub>は、以下の化学式により表わされ、モノ、ジ、トリ、及びテトラアンテナ型グリカン：

50

## 【化4】



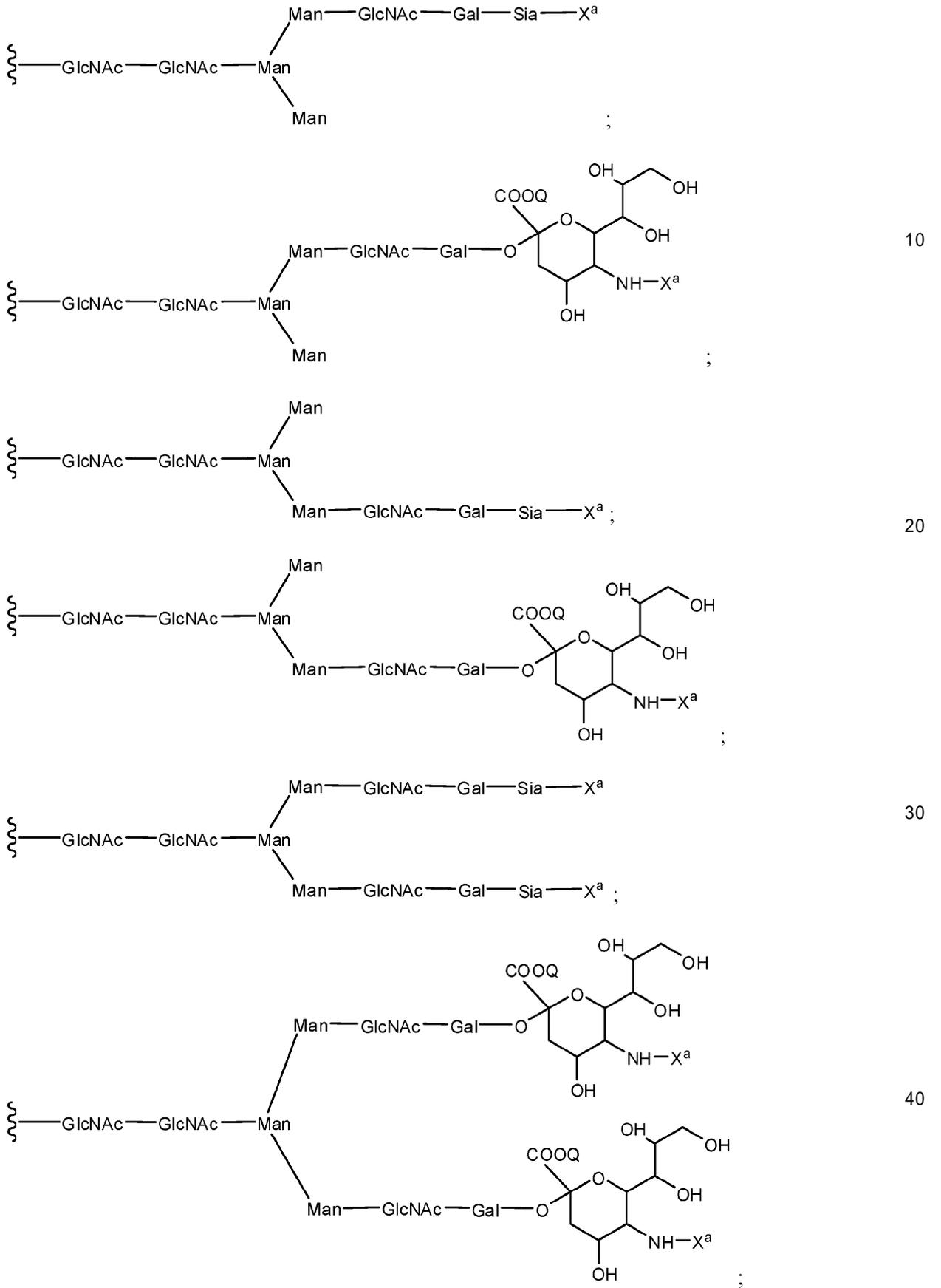
10

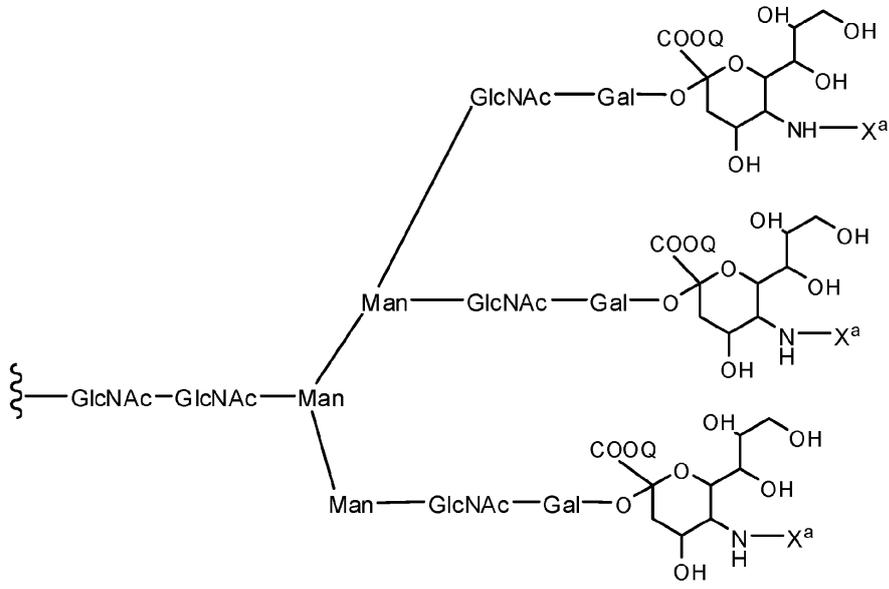
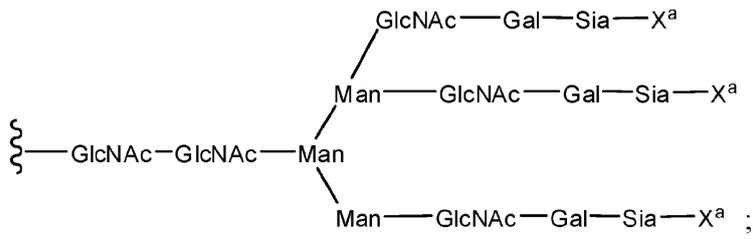
(式中、整数  $t$ 、 $a'$ 、 $b'$ 、 $c'$ 、 $d'$ 、 $e'$ 、 $f'$ 、 $g'$ 、 $h'$ 、 $j'$ 、 $k'$ 、 $l'$ 、 $m'$ 、 $n'$ 、 $o'$ 、 $p'$ 、 $q'$ 、及び  $r'$  は 0 及び 1 より非依存的に選択される整数である) を含む。好ましい実施態様において、 $t$  は 0 である。

## 【0217】

場合により修飾基に結合している例示的な N 連結グリカンを以下：

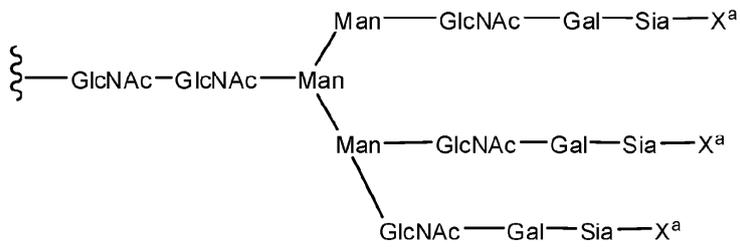
【化 5】



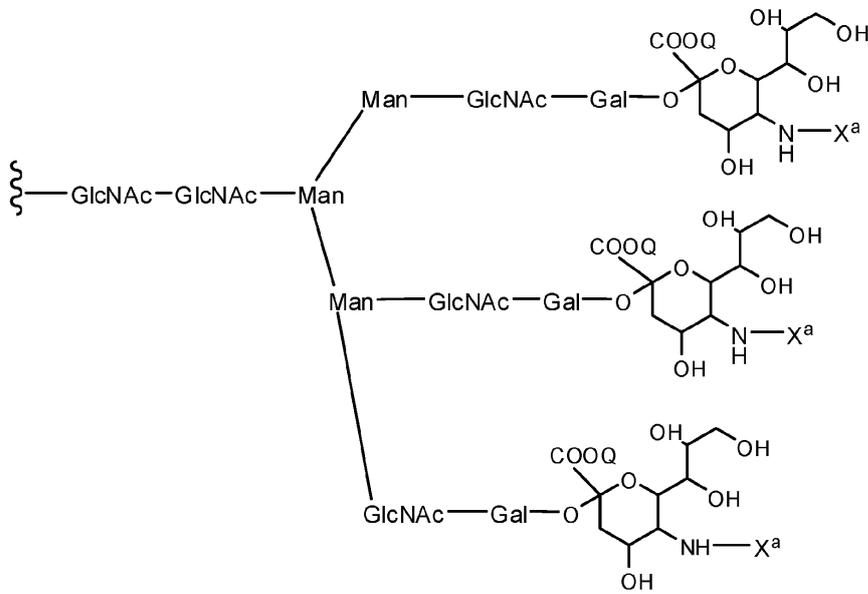


10

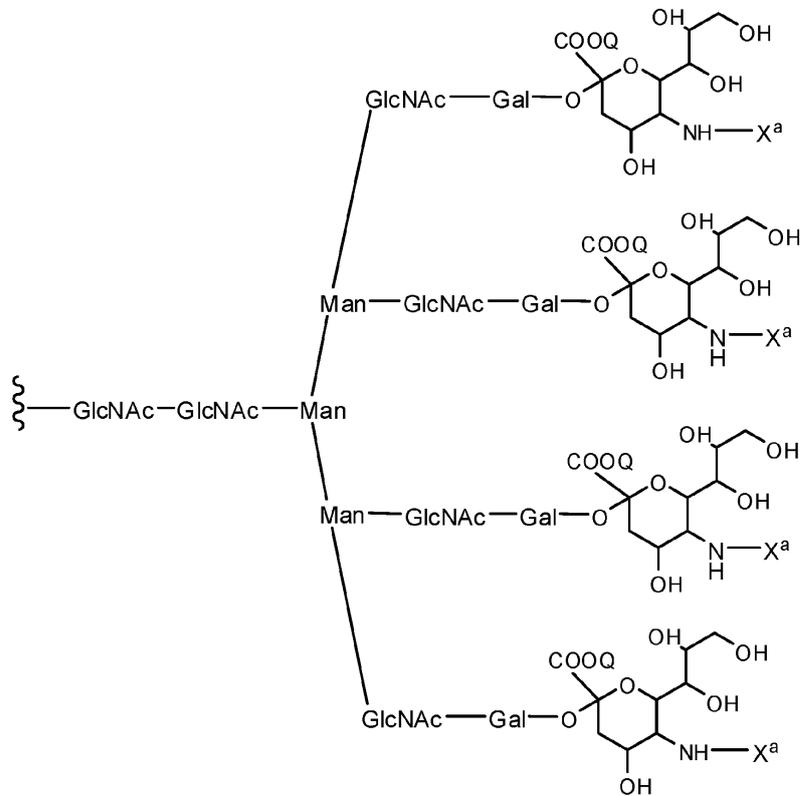
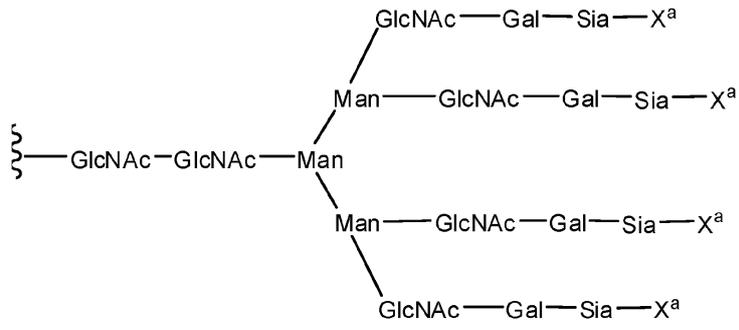
20



30



40



(式中、各Qは、H、単一の負電荷、及び陽イオン(例えば、 $\text{Na}^+$ )より非依存的に選択されるメンバーであり;及び、各 $X^a$ は、H、アルキル基、アシル基(例えば、アセチル)、及び修飾基( $X^*$ )より非依存的に選択されるメンバーである)である。例示的な実施態様において、本発明のN連結グリカンは、少なくとも1つの修飾基を含む(例えば、少なくとも1つの $X^a$ は $X^*$ である)。追加のN連結グリカンが、2002年10月9日に出願されたW003/31464及び2004年4月9日に出願されたW004/99231において開示され、その開示は本明細書において参照により全ての目的のために組み入れられる。

【0218】

例示的な実施態様において、化学式(III)中の $Z^*$ はGlcNAc成分を含む。別の例示的な実施態様において、 $Z^*$ はGlcNH成分を含む。さらに別の実施態様において、 $Z^*$ はGlcNAc又はGlcNH模倣成分を含む。さらなる実施態様において、 $Z^*$ はバシロサミン(即ち、2,4-ジアセトアミド-2,4,6-トリデオキシグルコース)成分又はその誘導体を含む。別の実施態様において、 $Z^*$ は、GlcNAc、GlcNH、Gal、Man、Glc、GalNAc、GalNH、Sia、Fuc、Xyl、及びこれらの成分の組み合わせより選択される。さらに別の実施態様において、 $Z^*$ は、GlcNAc、Man、及びGlc成分の組み合わせである。さらなる実施態様において、 $Z^*$ は、GlcNAc、Man、Gal、及びSia成分の組み合わせである。さらなる実施態様において、 $Z^*$ は、バシロサミン、GalNAc、及びGlc成分の組み合わ

10

20

30

40

50

せである。一実施態様において、Z\*はGlcNAc成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNH成分である。別の実施態様において、Z\*はMan成分である。さらに別の実施態様において、Z\*はSia成分である。別の実施態様において、Z\*はGlc成分である。別の実施態様において、Z\*はGal成分である。別の実施態様において、Z\*はGalNAc成分である。別の実施態様において、Z\*はGalNH成分である。別の実施態様において、Z\*はFuc成分である。さらに別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-GlcNAc、GlcNH-GlcNAc、GlcNAc-GlcNH、又はGlcNH-GlcNH成分である。一実施態様において、Z\*はGlcNAc-Gal又はGlcNH-Gal成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-GlcNAc-Gal、GlcNH-GlcNAc-Gal、GlcNAc-GlcNH-Gal、又はGlcNH-GlcNH-Gal成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-Gal-Sia成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-GlcNAc-Gal-Sia、GlcNH-GlcNAc-Gal-Sia、GlcNAc-GlcNH-Gal-Sia、又はGlcNH-GlcNH-Gal-Sia成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-GlcNAc-Man成分である。

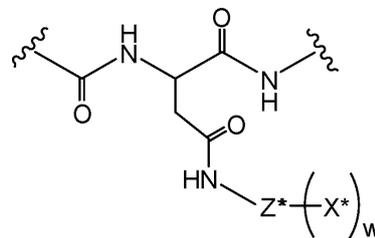
10

【0219】

一実施態様において、本発明のポリペプチド抱合体は、アスパラギン残基を有するN連結グリコシル化配列を有するポリペプチドを含む。この実施態様の一例において、ポリペプチド抱合体は、化学式(IV)：

20

【化6】



(IV)

の構造を有する成分を含む。

30

【0220】

化学式(IV)において、w、X\*、及びZ\*は、化学式(III)について上の通りに定義される。

【0221】

グリコシル連結基

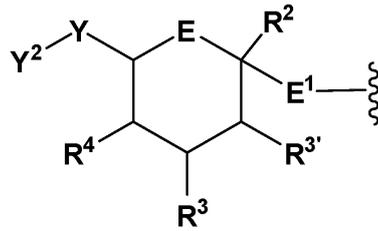
修飾された糖のサッカライド成分は、ポリペプチドと修飾基の間に挿置された場合、「グリコシル連結基」になる。例示的な実施態様において、グリコシル連結基は、適切なオリゴサッカリルトランスフェラーゼの基質である、修飾されたモノサッカライド又はオリゴサッカライド(例えば、修飾されたドリコールピロリン酸糖)に由来する。別の例示的な実施態様において、グリコシル連結基はグリコシル模倣成分を含む。本発明のポリペプチド抱合体は、一価又は多価(例えば、アンテナ構造)であるグリコシル連結基を含みうる。このように、本発明の抱合体は、修飾基が、ポリペプチドに、一価グリコシル連結基を介して付着される種を含む。また、本発明内には、複数の修飾基が、ポリペプチドに、マルチアンテナグリコシル連結基を介して付着される抱合体が含まれる。

40

【0222】

例示的な実施態様において、化学式(III)又は(IV)中の成分-Z\*-(X\*)wは、化学式(V)：

## 【化7】



(V)

の成分を含む。

10

## 【0223】

一実施態様において、化学式(V)中で、EはOである。別の実施態様において、EはSである。さらに別の実施態様において、EはNR<sup>27</sup>又はCHR<sup>28</sup>であり、それにおいてR<sup>27</sup>及びR<sup>28</sup>は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである。一実施態様において、E<sup>1</sup>はOである。別の実施態様において、E<sup>1</sup>はSである。別の実施態様において、E<sup>1</sup>はNR<sup>27</sup>(例えば、NH)である。別の実施態様において、E<sup>1</sup>は、ポリペプチドのアミノ酸残基への結合である。

## 【0224】

20

一実施態様において、化学式(V)中で、R<sup>2</sup>はHである。別の実施態様において、R<sup>2</sup>は-R<sup>1</sup>である。さらに別の実施態様において、R<sup>2</sup>は-CH<sub>2</sub>R<sup>1</sup>である。さらなる実施態様において、R<sup>2</sup>は-C(X<sup>1</sup>)R<sup>1</sup>である。これらの実施態様において、R<sup>1</sup>は、OR<sup>9</sup>、SR<sup>9</sup>、NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>、置換又は非置換アルキル及び置換又は非置換ヘテロアルキルより選択され、それにおいて、R<sup>9</sup>は、H、金属イオン、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル及びアシルより選択されるメンバーである。R<sup>10</sup>及びR<sup>11</sup>は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル及びアシルより非依存的に選択されるメンバーである。一実施態様において、X<sup>1</sup>はOである。別の実施態様において、X<sup>1</sup>は、置換又は非置換アルケニル、S及びNR<sup>8</sup>より選択されるメンバーであり、それにおいて、R<sup>8</sup>は、H、OH、置換又は非置換アルキル及び置換又は非置換ヘテロアルキルより選択されるメンバーである。特定の例において、R<sup>2</sup>はCOOQであり、それにおいてQはH、単一の負電荷、又は塩対イオン(陽イオン)である。

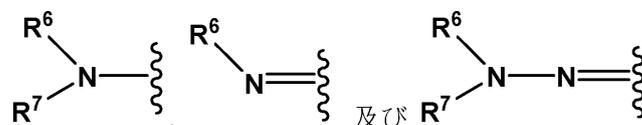
30

## 【0225】

一実施態様において、化学式(V)中で、YはCH<sub>2</sub>である。別の実施態様において、YはCH(OH)CH<sub>2</sub>である。さらに別の実施態様において、YはCH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>である。さらなる実施態様において、YはCHである。一実施態様において、YはCH(OH)CHである。別の実施態様において、YはCH(OH)CH(OH)CHである。さらに別の実施態様において、YはCH(OH)である。さらなる実施態様において、YはCH(OH)CH(OH)である。一実施態様において、YはCH(OH)CH(OH)CH(OH)である。Y<sup>2</sup>は、H、OR<sup>6</sup>、R<sup>6</sup>、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、

40

## 【化8】



(式中、R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル及び-L<sup>a</sup>-R<sup>6b</sup>より非依存的に選択されるメンバーである)より選択されるメンバーである。一例において、-L<sup>a</sup>-R<sup>6b</sup>は、C(O)R<sup>6b</sup>、C(O)-L<sup>b</sup>-R<sup>6b</sup>、

50

$C(O)NH-L^b-R^{6b}$  又は  $NHC(O)-L^b-R^{6b}$  を含む。 $R^{6b}$  は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、及び修飾基、例えば本発明の直鎖又は分岐ポリマー修飾基などより選択されるメンバーである。

【0226】

化学式(V)中で、 $R^3$ 、 $R^{3'}$ 、及び $R^4$ は、H、 $NHR^{3''}$ 、 $OR^{3''}$ 、 $SR^{3''}$ 、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル及び $-L^a-R^{6c}$ より非依存的に選択されるメンバーである。一例において、 $-L^a-R^{6c}$ は、 $-O-L^b-R^{6c}$ 、 $-C(O)-L^b-R^{6c}$ 、 $-C(O)NH-L^b-R^{6c}$ 、 $-NH-L^b-R^{6c}$ 、 $=N-L^b-R^{6c}$ 、 $-NHC(O)-L^b-R^{6c}$ 、 $-NHC(O)NH-L^b-R^{6c}$  又は  $-NHC(O)O-L^b-R^{6c}$  を含み、それにおいて、各 $R^{3''}$ は、H、置換又は非置換アルキル及び置換又は非置換ヘテロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである。各 $R^{6c}$ は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、 $NR^{13}R^{14}$ 及び修飾基より非依存的に選択されるメンバーであり、それにおいて、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ は、H、置換又は非置換アルキル、及び置換又は非置換ヘテロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである。

10

【0227】

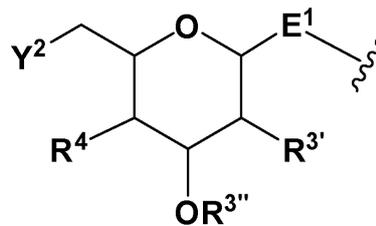
上の実施態様において、各 $L^a$ 及び各 $L^b$ は、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより選択される結合及びリンカー成分より非依存的に選択されるメンバーである。

20

【0228】

一実施態様において、化学式(V)の成分は、化学式(VI)：

【化9】



(VI)

30

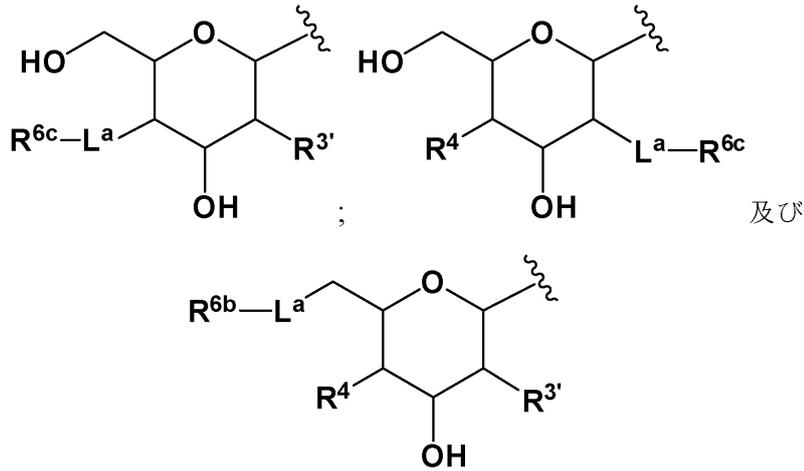
(式中、 $E^1$ 、 $R^{3'}$ 、 $R^{3''}$ 、及び $R^4$ は上の通りに定義される)の構造を有する。一実施態様において、化学式(VI)中で、 $E^1$ はOである。別の実施態様において、 $E^1$ はNHである。別の実施態様において、化学式(VI)中で、 $-OR^{3''}$ はOHである。さらに別の実施態様において、 $R^{3'}$ はNHAc又はOHである。

【0229】

一実施態様において、化学式(VI)の成分は、ポリペプチドのアミノ酸残基に直接的に結合される。この実施態様の一例において、 $E^1$ はそのアミノ酸残基への結合であり、化学式(VI)の成分は、以下：

40

【化10】



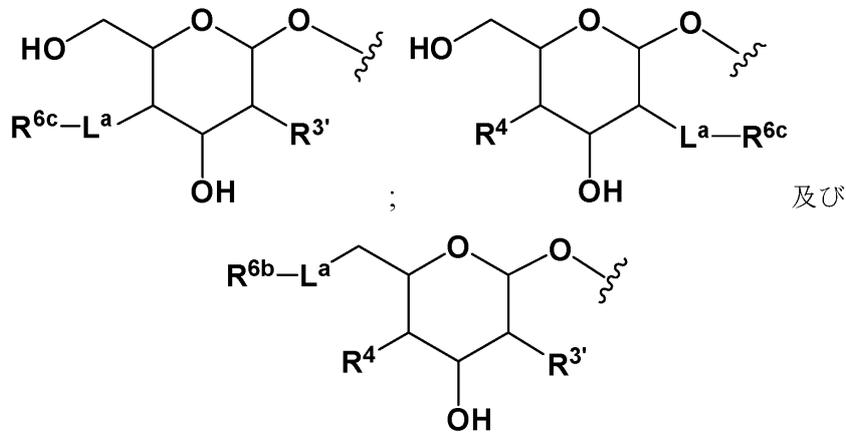
10

より選択されるメンバーである構造を有する。

【0230】

別の実施態様において、化学式(VI)の成分は、ポリペプチドに、別の糖残基を通じて結合される。例示的な実施態様において、化学式(VI)の成分は、以下：

【化11】



20

30

より選択される構造を有する。

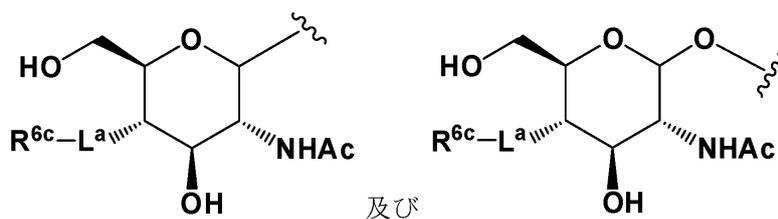
【0231】

一例において、上の実施態様のいずれかに従い、 $R^{3'}$ 及び $R^4$ は、NHAc及びOHより非依存的に選択されるメンバーである。

【0232】

上の実施態様の一例において、化学式(V)又は(VI)の成分はGlcNAc成分である。一例において、成分は、以下：

【化12】



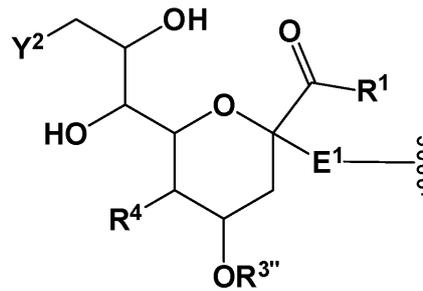
より選択される構造を有する。

50

## 【 0 2 3 3 】

別の実施態様において、化学式 ( V ) の成分は、化学式 ( V I I ) :

## 【 化 1 3 】



10

(VII)

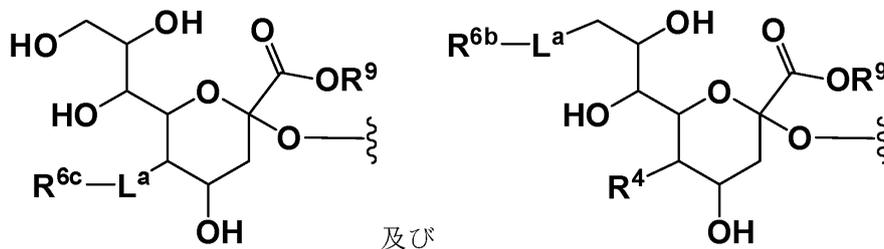
(式中、 $Y^2$ 、 $R^1$ 、 $E^1$ 、 $R^{3''}$ 、及び $R^4$ は上の通りに定義される)の構造を有する。一実施態様において、化学式 ( I V ) 中で、 $E^1$ はOである。別の実施態様において、 $E^1$ はNHである。別の実施態様において、 $E^1$ は、ポリペプチドのアミノ酸残基への結合である。一実施態様において、化学式 ( V I I ) 中で、 $R^1$ は $OR^9$ である。この実施態様の一例において、 $R^9$ はH、負電荷、又は塩対イオン(陽イオン)である。別の実施態様において、化学式 ( V I I ) 中で、 $R^{3''}$ はHである。

20

## 【 0 2 3 4 】

別の実施態様において、化学式 ( V I I ) の成分は、以下:

## 【 化 1 4 】



及び

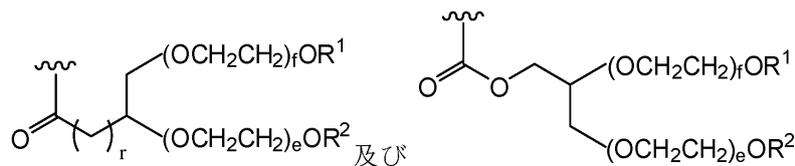
30

(式中、 $R^9$ はH、単一の負電荷、又は塩対イオンである)より選択されるメンバーである構造を有する。一例において、 $R^4$ はOH及びNHAcより選択されるメンバーである。

## 【 0 2 3 5 】

上の実施態様のいずれかの一例において(例えば、化学式 V、V I 又は化学式 V I I 中で)、 $-L^a-R^{6c}$ は、以下:

## 【 化 1 5 】



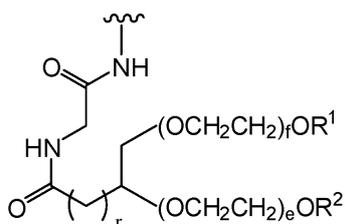
40

(式中、 $r$ は1~20より選択される整数であり、 $f$ 及び $e$ は1~5000より非依存的に選択される整数である)より選択されるメンバーである成分を含む。 $R^1$ 及び $R^2$ は、H及び $C_1-C_{10}$ 置換又は非置換アルキルより非依存的に選択されるメンバーである。一例において、 $R^1$ 及び $R^2$ は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、及びイソブチルより非依存的に選択されるメンバーである。一実施態様において、 $R^1$ 及び $R^2$ は各メチルである。

## 【 0 2 3 6 】

50

上の実施態様のいずれかの別の例において、 $-L^a - R^{6c}$  又は  $-L^a - R^{6c}$  は、  
【化 16】



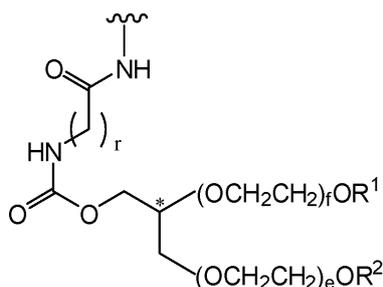
10

である。

【0237】

上の実施態様の別の例において（例えば、化学式 V、VI 又は化学式 VII 中で）、 $-L^a - R^{6c}$  又は  $-L^a - R^{6c}$  は、

【化 17】



20

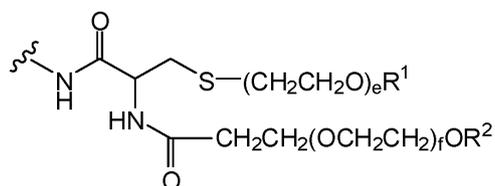
（式中、 $r$  は 1 ~ 20 より選択される整数であり、 $f$  及び  $e$  は 1 ~ 5000 より非依存的に選択される整数である）である。 $R^1$  及び  $R^2$  は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、及びイソブチルより非依存的に選択されるメンバーである。一実施態様において、 $R^1$  及び  $R^2$  は各メチルである。「\*」で示される立体中心は、ラセミ体でありうる、又は、定義できる。一実施態様において、立体中心は (S) 立体配置を有する。別の実施態様において、立体中心は (R) 立体配置を有する。

30

【0238】

上の実施態様のいずれかのさらなる別の例において（例えば、化学式 V、VI 又は化学式 VII 中で）、 $-L^a - R^{6c}$  又は  $-L^a - R^{6c}$  は、

【化 18】



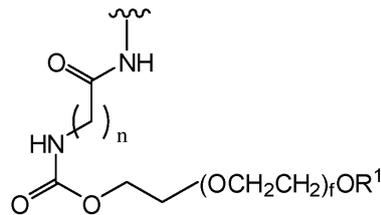
40

（式中、 $e$ 、 $f$ 、 $R^1$ 、及び  $R^2$  は上の通りに定義される）である。

【0239】

上の実施態様のいずれかのさらなる例において（例えば、化学式 V、VI 又は化学式 VII 中で）、 $-L^a - R^{6c}$  又は  $-L^a - R^{6c}$  は、

## 【化19】

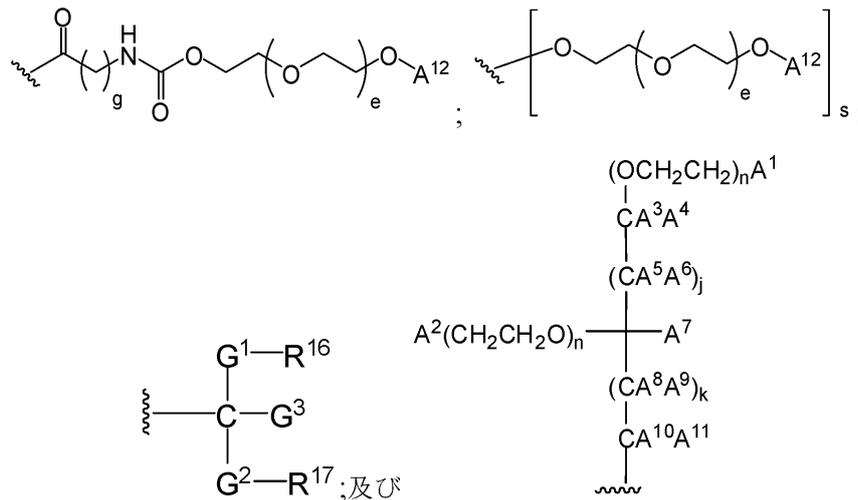


(式中、e、f、R<sup>1</sup>、及びR<sup>2</sup>は上の通りに定義される)である。

## 【0240】

さらに別の実施態様において、R<sup>6b</sup>(例えば、化学式V中)又はR<sup>6c</sup>(例えば、化学式V~VII中)の少なくとも1つは、以下：

## 【化20】



(式中、g、j、及びkは0~20より非依存的に選択される整数である)より選択されるメンバーである。各eは、0~2500より非依存的に選択される整数である。整数sは1~5より選択される。R<sup>16</sup>及びR<sup>17</sup>は、非依存的に選択されるポリマー成分である。G<sup>1</sup>及びG<sup>2</sup>は、ポリマー成分R<sup>16</sup>及びR<sup>17</sup>をCに連結する非依存的に選択された連結フラグメントである。例示的な連結フラグメントは、芳香族成分又はエステル成分のいずれも含まない。あるいは、これらの連結フラグメントは、生理学的に関連する条件下で分解するようにデザインされている1つ又は複数の成分(例えば、エステル、ジスルフィドなど)を含むことができる。

## 【0241】

G<sup>1</sup>及びG<sup>2</sup>を含む例示的な連結フラグメントは、非依存的に選択され、S、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNH及びNHC(O)O、ならびにOC(O)NH、CH<sub>2</sub>S、CH<sub>2</sub>O、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S、(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>O、(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>S、又は(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>Y'-PEGを含み、それにおいて、Y'はS、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NH、又はOであり、oは1~50からの整数である。例示的な実施態様において、連結フラグメントG<sup>1</sup>及びG<sup>2</sup>は異なる連結フラグメントである。

## 【0242】

G<sup>3</sup>は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリールより選択されるメンバーである。A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、A<sup>5</sup>、A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、A<sup>10</sup>、及びA<sup>11</sup>は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロ

10

20

30

40

50

アリール、 $-NA^{12}A^{13}$ 、 $-OA^{12}$ 、及び $-SiA^{12}A^{13}$ より非依存的に選択されるメンバーであり、それにおいて、 $A^{12}$ 及び $A^{13}$ は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、置換又は非置換アリール、及び置換又は非置換ヘテロアリールより非依存的に選択されるメンバーである。

#### 【0243】

##### 修飾基

本発明の修飾基は、任意の化学成分でありうる。例示的な修飾基を以下で考察する。修飾基は、所定のポリペプチドの特性（例えば、生物学的又は物理化学的特性）を改変するそれらの能力について選択することができる。修飾基の使用により改変されうる例示的なポリペプチドの特性は、限定はされないが、薬物動態、薬力学、代謝的安定性、体内分布、水溶性、脂溶性、組織標的化能力、及び治療活性プロファイルを含む。好ましい修飾基は、そのような修飾基で修飾されている本発明のポリペプチド抱合体の薬力学及び薬物動態を改善させるものである。他の修飾基は、診断用製品を含む、インビトロ生物学的アッセイ系における適用が見出されるポリペプチドの修飾のために有用でありうる。

#### 【0244】

例えば、治療用グリコペプチドのインビボでの半減期は、ポリエチレングリコール（PEG）成分で増強させることができる。PEGでのポリペプチドの化学的修飾（PEG化）によってそれらの分子サイズが増加し、典型的に、表面及び官能基の接近可能性が減少し、それらの各々は、ポリペプチドに付着したPEG成分の数及びサイズに依存的である。高い頻度で、この修飾は、血漿中半減期の改善及びタンパク質分解安定性、ならびに免疫原性及び肝取り込みの減少をもたらす（Chaffee et al. J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak et al. Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol. 29: 113-127 (1980)）。例えば、インターロイキン2のPEG化によって、そのインビボでの抗腫瘍効力が増加することが報告されており（Katre et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1487-1491 (1987)）、モノクローナル抗体A<sup>7</sup>に由来するF(ab')<sub>2</sub>のPEG化によってその腫瘍局在化が改善されている（Kitamura et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 1387-1394 (1990)）。このように、別の実施態様において、本発明の方法によりPEG成分で誘導体化されたポリペプチドのインビボでの半減期は、非誘導体化親ポリペプチドのインビボでの半減期と比べて増加する。

#### 【0245】

ポリペプチドのインビボでの半減期における増加は、親ポリペプチドと比べたパーセント増加の範囲として最も良く表現される。パーセント増加の範囲の下端は、約40%、約60%、約80%、約100%、約150%、又は約200%である。範囲の上端は、約60%、約80%、約100%、約150%、又は約250%超である。

##### 水溶性ポリマー修飾基

#### 【0246】

一実施態様において、修飾基は、直鎖又は分岐より選択されるポリマー修飾基である。一例において、修飾基は1つ又は複数のポリマー成分を含み、それにおいて、各ポリマー成分は非依存的に選択される。

#### 【0247】

多くの水溶性ポリマーが当業者に公知であり、本発明の実行において有用である。水溶性ポリマーという用語は、種、例えばサッカライド（例えば、デキストラン、アミロース、ヒアルロン酸、ポリ（シアル酸）、ヘパラン、ヘパリンなど）；ポリ（アミノ酸）、例えば、ポリ（アスパラギン酸）及びポリ（グルタミン酸）；核酸；合成ポリマー（例えば、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エーテル）、例えばポリ（エチレングリコール）など）；ペプチド、タンパク質などを包含する。本発明は、任意の水溶性ポリマーで実行してよく、唯一の限定として、ポリマーは、抱合体の残部を付着させることができる点を含まなければならない。

#### 【0248】

10

20

30

40

50

修飾基を1つ又は複数のポリペプチド成分に付着させるための修飾基の反応性誘導体（例えば、反応性PEG類似体）の使用は、本発明の範囲内である。本発明は、反応性類似体の同一性により限定されない。

【0249】

好ましい実施態様において、修飾基はPEG又はPEG類似体である。ポリ（エチレングリコール）の多くの活性化誘導体が市販されており、文献において記載されている。適切な活性化PEG誘導体を選び、又は、必要な場合、合成することは当業者の能力の十分に範囲内であり、それを用いて本発明において有用な基質を調製する。Abuchowski et al. *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Abuchowski et al., *J. Biol. Chem.*, 252: 3582-3586 (1977); Jackson et al., *Anal. Biochem.*, 165: 114-127 (1987); Koid e et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 111: 659-667 (1983); Nilsson et al., *Methods Enzymol.*, 104: 56-69 (1984); Delgado et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12: 119-128 (1990); N-ヒドロキシスクシンイミド由来活性エステル (Buckmann et al., *Makromol. Chem.*, 182: 1379-1384 (1981); Joppich et al., *Makromol. Chem.*, 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski et al., *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Katre et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 4: 1487-1491 (1987); Kitamura et al., *Cancer Res.*, 51: 4310-4315 (1991); Boccu et al., *Z. Naturforsch.*, 38C: 94-99 (1983)、カーボネート (Zalipsky et al., *POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*, Harris, Ed., Plenum Press, New York, 1992, pp.347-370; Zalipsky et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 100-114 (1992); Veronese et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 11: 141-152 (1985))、イミダゾリルホルメート (Beauchamp et al., *Anal. Biochem.*, 131: 25-33 (1983); Berger et al., *Blood*, 71: 1641-1647 (1988))、4-ジチオピリジン (Woghiren et al., *Bioconjugate Chem.*, 4: 314-318 (1993))、イソシアネート (Byun et al., *ASAIO Journal*, M649-M-653 (1992))、及びエポキシド (Noishiki et al., (1989)により公開された米国特許第4,806,595号)を参照のこと。他の連結基は、アミノ基と活性化PEGの間のウレタン連結を含む。Veronese, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11: 141-152 (1985)を参照のこと。

【0250】

ポリマーの活性化のための方法は、WO 94/17039、米国特許第5,324,844号、WO 94/18247、WO 94/04193、米国特許第5,219,564号、米国特許第5,122,614号、WO 90/13540、米国特許第5,281,698号、及びさらにWO 93/15189において、及び、活性化ポリマーとペプチド、例えば、凝固因子VIIII (WO 94/15625)、ヘモグロビン (WO 94/09027)、酸素運搬分子 (米国特許第4,412,989号)、リボヌクレアーゼ及びスーパーオキシドジスムターゼ (Veronese et al., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985))の間の抱合について見出すことができる。

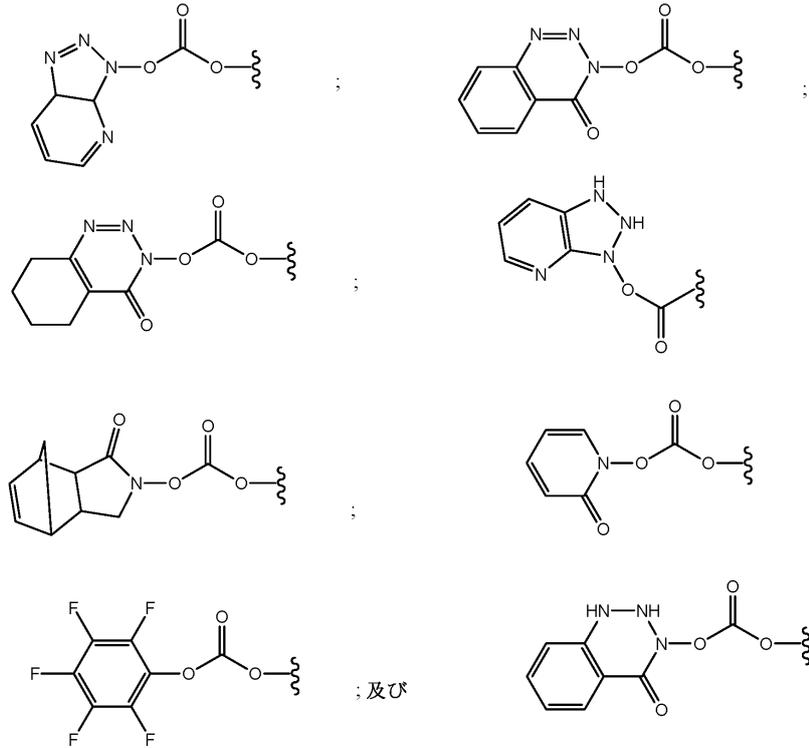
【0251】

本発明において有用な活性化PEG分子及びそれらの試薬を作製する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、WO 04/083259において記載されている。

【0252】

本明細書において記載される化合物を調製する際に使用される直鎖PEGを活性化するために適切な活性化基又は脱離基は、限定はされないが、

## 【化 2 1】



10

20

種を含む。

## 【 0 2 5 3 】

例示的な水溶性ポリマーは、ポリマーのサンプル中のポリマー分子の実質的な割合がおよそ同じ分子量のものである；そのようなポリマーは「均一分散」である。

## 【 0 2 5 4 】

本発明は、ポリ（エチレングリコール）抱合体を参照することによりさらに例証される。PEGの官能化及び抱合に関するいくつかの総説及びモノグラムを利用可能である。例えば、Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong et al., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); 及びBhadra, et al., *Pharmazie*, 57: 5-29 (2002)を参照のこと。反応性分子を使用して反応性PEG分子を調製し、抱合体を形成するためのルートは、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,672,662号には、直鎖又は分枝ポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、及びポリ（アクリロモルホリン）より選択されるポリマー酸の活性エステルの水溶性で単離可能な抱合体が開示されている。

30

## 【 0 2 5 5 】

米国特許第6,376,604号には、有機溶剤中でポリマーの末端ヒドロキシルをジ（1-ベンゾトリアゾリル）カーボネートと反応させることにより、水溶性で非ペプチド性のポリマーの水溶性1-ベンゾトリアゾリルカーボネートエステルを調製するための方法が記載されている。活性エステルを使用して、生物学的に活性な薬剤（例えばポリペプチドなど）と抱合体を形成させる。

40

## 【 0 2 5 6 】

WO 99/45964には、安定な連結を通じてポリマー骨格に連結された少なくとも1つの末端を有するポリマー骨格を含む生物学的に活性な薬剤及び活性化水溶性ポリマーを含む抱合体が記載されており、それにおいて、少なくとも1つの末端は、分岐成分に連結された近接する反応基を有する分岐成分を含み、それにおいて、生物学的に活性な薬

50

剤は、近接する反応基の少なくとも1つに連結される。他の分枝ポリ(エチレングリコール)は、国際公開第96/21469号において記載されており、米国特許第5,932,462号には、反応性の官能基を含む分枝末端を含む分枝PEG分子を用いて形成された抱合体が記載されている。遊離の反応基は、生物学的に活性な種(例えばポリペプチドなど)と反応させ、ポリ(エチレングリコール)と生物学的に活性な種の間で抱合体を形成させるために利用可能である。米国特許第5,446,090号には、二官能性PEGリンカー及びPEGリンカー末端の各々でペプチドを有する抱合体を形成する際でのその使用が記載されている。

【0257】

分解可能なPEG連結を含む抱合体は、WO 99/34833;及びWO 99/14259、ならびに米国特許第6,348,558号において記載されている。そのような分解可能な結合は、本発明において適用可能である。

【0258】

上に記載されるポリマー活性化の当技術分野で認識されている方法は、本明細書において記載される分枝ポリマーの形成において、及び、また、他の種(例えば、糖、糖ヌクレオチドなど)へのこれらの分枝ポリマーの抱合のために、本発明に関連して有用である。

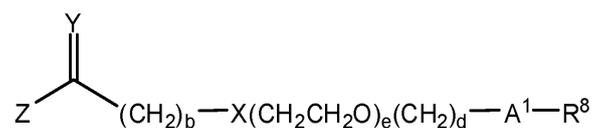
【0259】

例示的な水溶性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)、例えばPEG又はメトキシ-PEG(m-PEG)などである。本発明において使用するポリ(エチレングリコール)は、任意の特定の形状又は分子量範囲に制限されない。各々の非依存的に選択されたポリ(エチレングリコール)成分について、分子量は、好ましくは、約500Da~約100kDaである。一実施態様において、PEG成分の分子量は、約2~約80kDaである。別の実施態様において、PEG成分の分子量は、約2~約60kDa、好ましくは約5~約40kDaである。例示的な実施態様において、PEG成分は分子量約1kDa、約2kDa、約5kDa、約10kDa、約15kDa、約20kDa、約25kDa、約30kDa、約35kDa、約40kDa、約45kDa、約50kDa、約55kDa、約60kDa、約65kDa、約70kDa、約75kDa、又は約80kDaを有する。

【0260】

本発明において使用される例示的なポリ(エチレングリコール)分子は、限定はされないが、以下：

【化22】



(式中、R<sup>8</sup>は、H、OH、NH<sub>2</sub>、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、例えば、アセタール、OHC-、H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-、HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>、又は(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>C(Y)Z<sup>1</sup>である。指数「e」は、1から2500の整数を表す)の化学式を有するものを含む。指数b、d、及びqは、非依存的に0から20の整数を表す。記号Z及びZ<sup>1</sup>は、非依存的に、OH、NH<sub>2</sub>、脱離基、例えば、イミダゾール、p-ニトロフェニル、HOBT、テトラゾール、ハライド、S-R<sup>9</sup>、活性化エステルアルコール部分；-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(Y<sup>1</sup>)<sub>v</sub>又は(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>U(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>C(Y<sup>1</sup>)<sub>v</sub>を表す。記号Yは、H(2)、=O、=S、=N-R<sup>10</sup>を表す。記号X、Y、Y<sup>1</sup>、A<sup>1</sup>、及びUは、非依存的に、成分O、S、N-R<sup>11</sup>を表す。記号Vは、OH、NH<sub>2</sub>、ハロゲン、S-R<sup>12</sup>、活性化エステルアルコール成分、活性化アミドのアミン成分、糖ヌクレオチド、及びタンパク質を表す。指数p、q、s、及びvは、0~20の整数より非依存的に選択されるメンバーである。記号R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、及びR<sup>12</sup>は、非依存的に、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置

10

20

30

40

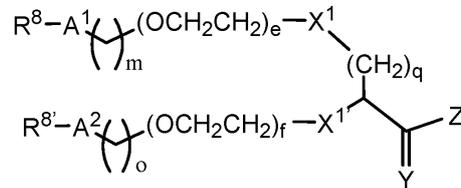
50

換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、及び置換又は非置換ヘテロアリールを表す。

【0261】

本発明の抱合体を形成する際に有用なポリ(エチレングリコール)は、直鎖又は分枝のいずれかである。本発明における使用に適した分枝ポリ(エチレングリコール)分子は、限定はされないが、以下：

【化23】



10

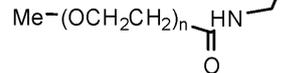
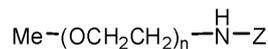
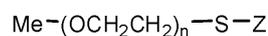
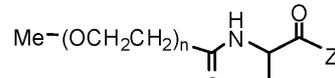
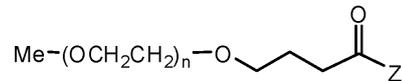
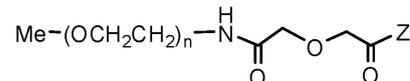
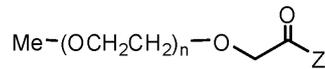
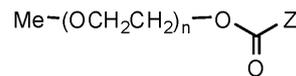
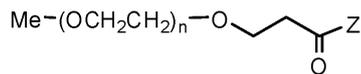
(式中、 $R^8$  及び  $R^{8'}$  は、上の  $R^8$  について定義された基より非依存的に選択されるメンバーである)の化学式により記載されるものを含む。 $A^1$  及び  $A^2$  は、上の  $A^1$  について定義された基より非依存的に選択されるメンバーである。指数  $e$ 、 $f$ 、 $o$ 、及び  $q$  は、上に記載の通りである。 $Z$  及び  $Y$  は、上に記載の通りである。 $X^1$  及び  $X^{1'}$  は、 $S$ 、 $SC(O)NH$ 、 $HNC(O)S$ 、 $SC(O)O$ 、 $O$ 、 $NH$ 、 $NHC(O)$ 、 $(O)CNH$  及び  $NHC(O)O$ 、 $OC(O)NH$  より非依存的に選択されるメンバーである。

20

【0262】

他の例示的な実施態様において、分枝PEGは、システイン、セリン、又はジリジン中心に基づく。別の例示的な実施態様において、ポリ(エチレングリコール)分子は、以下：

【化24】



30

の構造より選択される。

40

【0263】

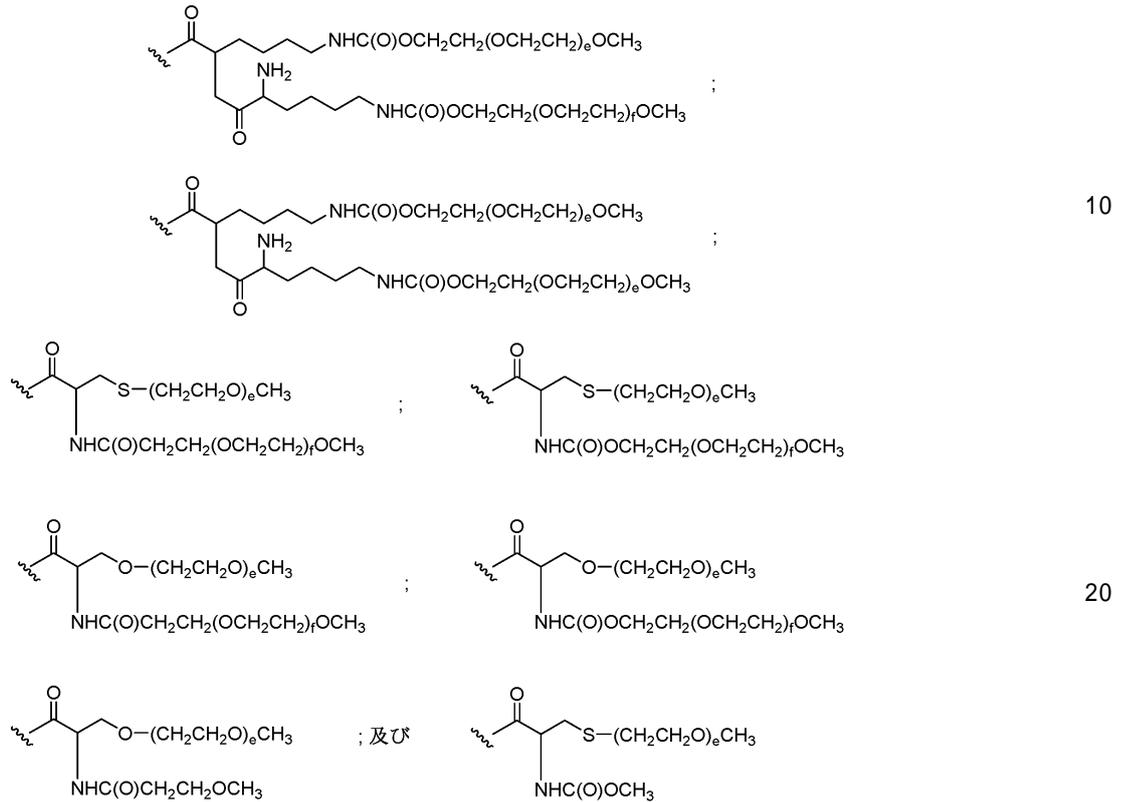
さらなる実施態様において、ポリ(エチレングリコール)は、付着した複数のPEGを有する分岐PEGである。分岐PEGの例は、米国特許第5,932,462号;米国特許第5,342,940号;米国特許第5,643,575号;米国特許第5,919,455号;米国特許第6,113,906号;米国特許第5,183,660号;WO 02/09766;Kodera Y., Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994);及びYamasaki et al., Agric. Biol. Chem., 52: 2125-2127, 1998に記載されている。好ましい実施態様において、分岐PEGの各ポリ(エチレングリコール)の分子量は、40,000 Dalton未満又はそれと等しい。

【0264】

50

代表的なポリマー修飾成分は、側鎖含有アミノ酸、例えば、セリン、システイン、リジン、及び小ペプチド（例えば、1 y s - 1 y s）に基づく構造を含む。例示的な構造は以下：

【化25】



を含む。

【0265】

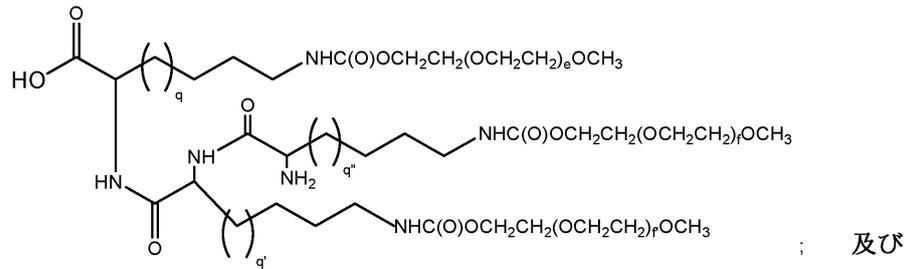
当業者は、ジリジン構造中の遊離アミンも、PEG成分とのアミド又はウレタン結合を通じてPEG化させることができることを理解するであろう。

【0266】

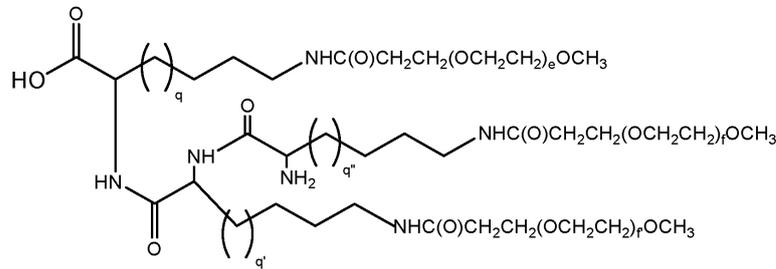
さらに別の実施態様において、ポリマー修飾成分は、トリリジンペプチドに基づく分岐PEG成分である。トリリジンは、モノ、ジ、トリ、又はテトラPEG化させることができる。この実施態様の例示的な種は、以下：

30

## 【化26】



10



(式中、指数 e、f、及び f' は、1 ~ 2500 より非依存的に選択される整数であり；  
 そして、q、q'、及び q'' は、1 ~ 20 より非依存的に選択される整数である) の化学  
 式を有する。

20

## 【0267】

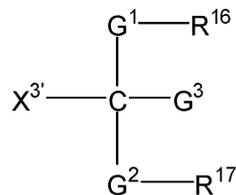
当業者に明らかな通り、本発明において使用される分岐ポリマーは、上に記載するテ  
 マに関するバリエーションを含む。例えば、上に示すジリジン PEG 抱合体は、3つのポ  
 リマーサブユニットを含みうる。第3のものは、上の構造において非修飾として示される  
 -アミンに結合している。同様に、3又は4のポリマーサブユニット(ポリマー修飾成  
 分を用いて所望の方法で標識されている)を用いて官能性を持たせたトリリジンの使用は  
 、本発明の範囲内である。

## 【0268】

1つ又は複数のポリマー成分(例えば、PEG)を含む分岐修飾基を用いてポリペプチ  
 ド抱合体を形成するために有用な例示的な前駆体は、以下：

30

## 【化27】



の化学式を有する。

40

## 【0269】

一実施態様において、この化学式 of 分岐ポリマー種は、本質的に純粋な水溶性ポリマー  
 である。X<sup>3</sup> は、イオン化可能な(例えば、OH、COOH、H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、HSO<sub>3</sub>、  
 NH<sub>2</sub>、及びその塩など)又は他の反応性官能基(例えば、以下)を含む成分である。C  
 は炭素である。G<sup>3</sup> は、非反応基(例えば、H、CH<sub>3</sub>、OHなど)である。一実施態様  
 において、G<sup>3</sup> は、好ましくは、ポリマー性成分ではない。R<sup>16</sup> 及び R<sup>17</sup> は、非反応  
 基(例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル)及びポリマーアーム(例えば  
 、PEG)より非依存的に選択される。G<sup>1</sup> 及び G<sup>2</sup> は、好ましくは、生理学的条件下で  
 本質的に非反応性である連結フラグメントである。G<sup>1</sup> 及び G<sup>2</sup> は、非依存的に選択され  
 る。例示的なリンカーは、芳香族成分又はエステル成分のいずれも含まない。あるいは、

50

これらの連結は、生理学的に関連する条件下で分解するようにデザインされている1つ又は複数の成分（例えば、エステル、ジスルフィドなど）を含み、 $G^1$  及び  $G^2$  はポリマーアーム  $R^{16}$  及び  $R^{17}$  をCに連結させる。一実施態様において、 $X^{3'}$  が、リンカー、糖、又はリンカー-糖カセット上の相補的な反応性の反応性官能基と反応する場合、 $X^{3'}$  は連結フラグメントの成分に変換される。

## 【0270】

例示的な連結フラグメント ( $G^1$  及び  $G^2$  を含む) は、非依存的に選択され、S、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNH及びNHC(O)O、ならびにOC(O)NH、 $CH_2S$ 、 $CH_2O$ 、 $CH_2CH_2O$ 、 $CH_2CH_2S$ 、 $(CH_2)_oO$ 、 $(CH_2)_oS$ 、又は $(CH_2)_oY'$ -PEGを含み、それにおいて、 $Y'$  はS、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NH、又はOであり、 $o$  は1~50の整数である。例示的な実施態様において、連結フラグメント  $G^1$  及び  $G^2$  は異なる連結フラグメントである。

10

## 【0271】

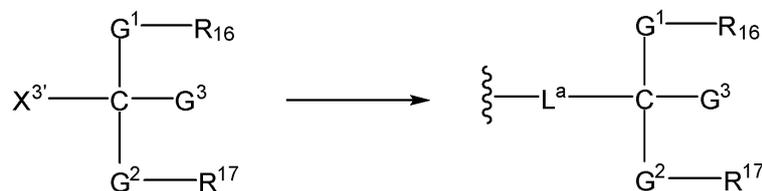
例示的な実施態様において、上の前駆体の1つ又はその活性化誘導体は、糖、活性化糖、又は糖ヌクレオチドと反応し、それにより、 $X^{3'}$  と糖成分上の相補的な反応性の基（例えば、アミン）の間での反応を通じて、それらに結合する。あるいは、 $X^{3'}$  は、反応性官能基と、リンカー  $L^a$  の前駆体上で、以下のスキーム2に従って反応する。

## 【0272】

スキーム2：

## 【化28】

20

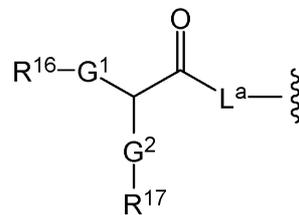


## 【0273】

例示的な実施態様において、修飾基は、天然もしくは非天然アミノ酸、アミノ酸類似体もしくはアミノ酸模倣体、又は1つ又は複数のそのような種から形成される小ペプチドに由来する。例えば、本発明の化合物中に見出される特定の分岐ポリマーは、以下：

30

## 【化29】



の化学式を有する。

40

## 【0274】

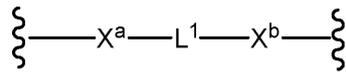
この例において、連結フラグメント  $C(O)L^a$  は、分岐ポリマー修飾成分の前駆体上の反応性官能基（例えば、 $X^{3'}$ ）及び糖成分上の反応性官能基、又はリンカーへの前駆体の反応により形成される。例えば、 $X^{3'}$  がカルボン酸である場合、それは活性化されて、アミノ-サッカライド（例えば、 $Sia$ 、 $GalNH_2$ 、 $GlcNH_2$ 、 $ManNH_2$  など）からペンダント状であるアミン基に直接的に結合することができ、アミドを形成する。追加の例示的な反応性官能基及び活性化された前駆体が、本明細書の以下において記載されている。記号は、上で考察したものと同一性を有する。

## 【0275】

別の例示的な実施態様において、 $L^a$  は以下の構造：

50

## 【化30】



(式中、 $X^a$  及び  $X^b$  は非依存的に選択される連結フラグメントであり、 $L^1$  は、結合、置換又は非置換アルキル、又は置換又は非置換ヘテロアルキルより選択される) を有する連結成分である。

## 【0276】

$X^a$  及び  $X^b$  についての例示的な種は、S、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、C(O)NH及びNH C(O)O、ならびにOC(O)NHを含む。

10

## 【0277】

別の例示的な実施態様において、 $G^2$  は  $R^{17}$  へのペプチド結合であり、それはアミノ酸、ジペプチド(例えば、Lys-Lys)又はトリペプチド(例えば、Lys-Lys-Lys)であり、それにおいてアルファ-アミン成分及び/又は側鎖ヘテロ原子はポリマー修飾成分で修飾される。

## 【0278】

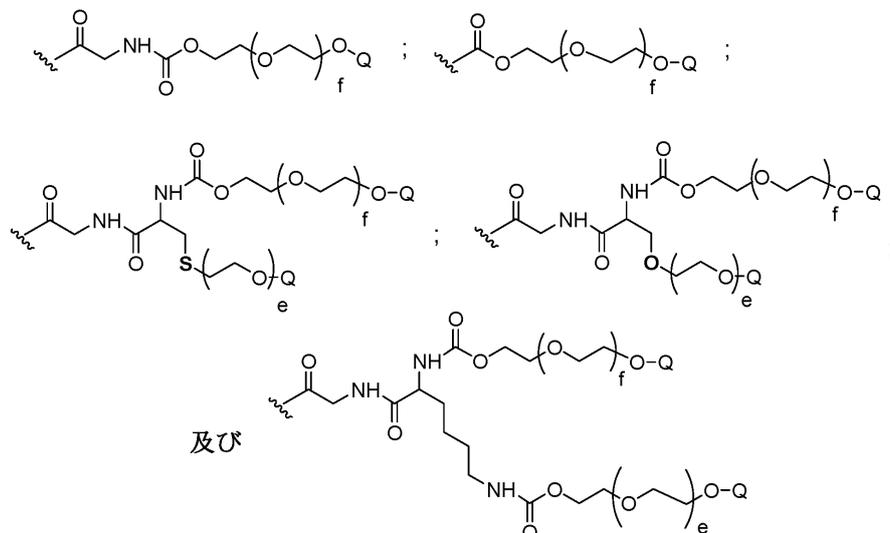
上に記載する本発明の実施態様は、ポリマーが水溶性ポリマー、特にポリ(エチレングリコール)(「PEG」)例えば、メトキシ-ポリ(エチレングリコール)である種を参照することによりさらに例示される。当業者は、続くセクションにおける焦点が、例証の明確さのためであり、PEGを例示的なポリマーとして使用して記載される種々のモチーフは、PEG以外のポリマーが利用される種に等しく適用可能であることを理解するであろう。

20

## 【0279】

他の例示的な実施態様において、ポリペプチド抱合体は、以下の群：

## 【化31】



30

40

より選択される成分を含む。

## 【0280】

上の化学式の各々において、指数  $e$  及び  $f$  は、1 ~ 2500 の整数より非依存的に選択される。さらなる例示的な実施態様において、 $e$  及び  $f$  を選択して、約 1 kDa、2 kDa、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、55 kDa、60 kDa、65 kDa、70 kDa、75 kDa、及び 80 kDa である PEG 成分を提供する。記号 Q は、置換又は非置換アルキル(例えば、 $C_1 - C_6$  アルキル、例えば

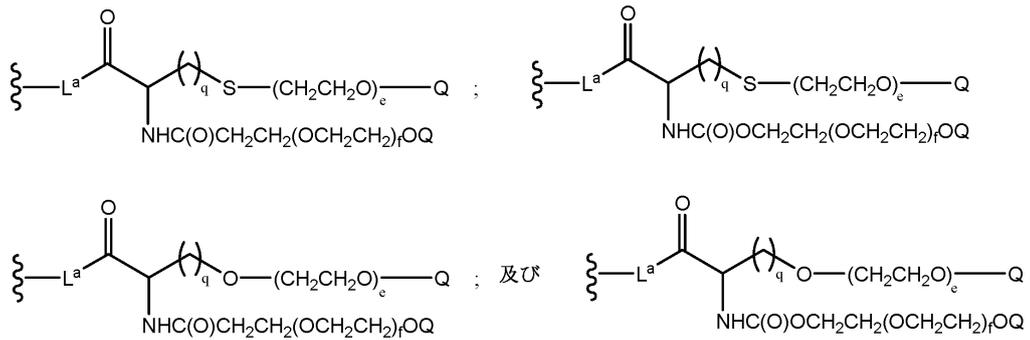
50



## 【 0 2 8 3 】

別の例示的な実施態様において、本発明の抱合体は、以下：

## 【 化 3 4 】

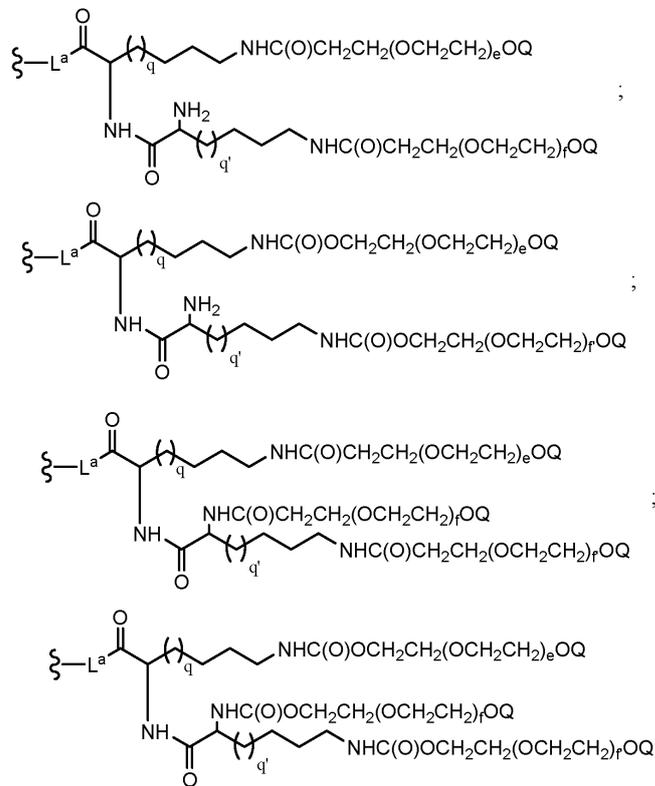


(式中、Qは、H及び置換又は非置換C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルより選択されるメンバーである)より選択されるメンバーである化学式を含む。指数e及びfは、1~2500より非依存的に選択される整数であり、指数qは、0~20より選択される整数である。

## 【 0 2 8 4 】

別の例示的な実施態様において、本発明の抱合体は、以下：

## 【 化 3 5 】

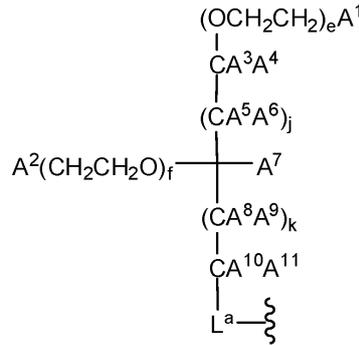


(式中、Qは、H及び置換又は非置換C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、好ましくはMeより選択されるメンバーである)より選択されるメンバーである化学式を含む。指数e、f、及びf'は、1~2500より非依存的に選択される整数であり、指数q及びq'は、1~20より非依存的に選択される整数である。

## 【 0 2 8 5 】

別の例示的な実施態様において、本発明の抱合体は、以下：

## 【化 3 6】



10

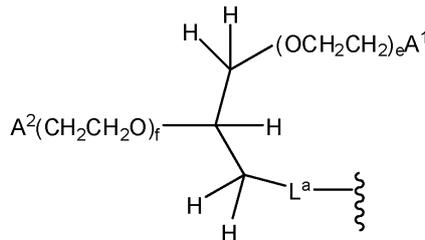
(式中、指数  $e$  及び  $f$  は  $0 \sim 2500$  より非依存的に選択される) の化学式の構造を含む。指数  $j$  及び  $k$  は、 $0 \sim 20$  より非依存的に選択される整数である。 $\text{A}^1$ 、 $\text{A}^2$ 、 $\text{A}^3$ 、 $\text{A}^4$ 、 $\text{A}^5$ 、 $\text{A}^6$ 、 $\text{A}^7$ 、 $\text{A}^8$ 、 $\text{A}^9$ 、 $\text{A}^{10}$ 、及び  $\text{A}^{11}$  は、 $\text{H}$ 、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換シクロアルキル、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、置換又は非置換ヘテロアリール、 $-\text{N}(\text{A}^{12}\text{A}^{13})_2$ 、 $-\text{O}(\text{A}^{12}\text{A}^{13})_2$ 、及び  $-\text{Si}(\text{A}^{12}\text{A}^{13})_3$  より非依存的に選択されるメンバーである。 $\text{A}^{12}$  及び  $\text{A}^{13}$  は、 $\text{H}$ 、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換シクロアルキル、置換又は非置換ヘテロシクロアルキル、置換又は非置換アリール、及び置換又は非置換ヘテロアリールより非依存的に選択されるメンバーである。

20

## 【0286】

上の化学式の一実施態様において、分岐ポリマーは、以下：

## 【化 3 7】



30

の化学式の構造を有する。

## 【0287】

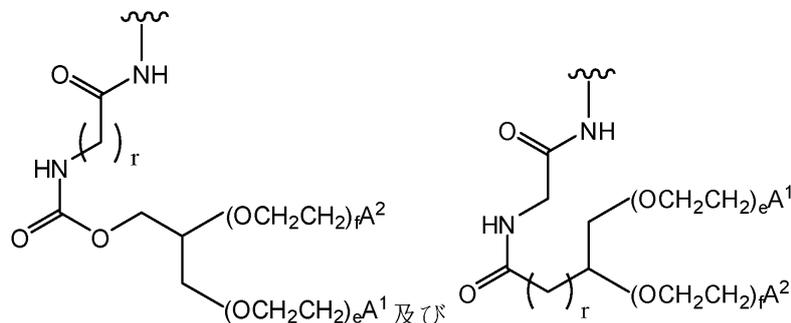
例示的な実施態様において、 $\text{A}^1$  及び  $\text{A}^2$  は、 $\text{OCH}_3$  及び  $\text{OH}$  より非依存的に選択されるメンバーである。

## 【0288】

別の例示的な実施態様において、リンカー  $\text{L}^a$  は、アミノグリシン誘導体より選択されるメンバーである。この実施態様の例示的なポリマー修飾基は、以下：

40

## 【化 3 8】



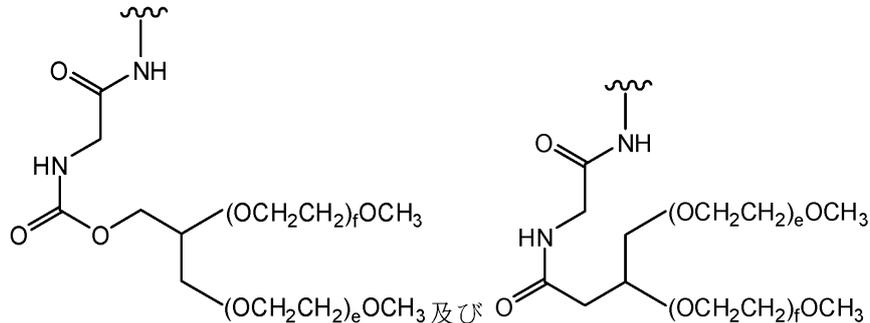
50

の化学式の構造を有する。

【0289】

一例において、 $A^1$  及び  $A^2$  は、 $OCH_3$  及び  $OH$  より非依存的に選択されるメンバーである。この例の例示的なポリマー修飾基は以下：

【化39】



10

を含む。

【0290】

上の実施態様の各々において、修飾基は立体中心（例えば、アミノ酸リンカー又はグリセロールベースのリンカーを含むもの）を含み、立体中心はラセミ体でありうる又は定義することができる。一実施態様において、そのような立体中心が定義され、それは（S）立体配置を有する。別の実施態様において、立体中心は（R）立体配置を有する。

20

【0291】

当業者は、分岐ポリマーの  $m$ -PEGアームの1つ又は複数、異なる末端（例えば、 $OH$ 、 $COOH$ 、 $NH_2$ 、 $C_2 - C_{10}$ -アルキルなど）を伴うPEG成分により置換することができることを理解するであろう。さらに、上の構造は、アルキルリンカーを、炭素原子と側鎖の官能基の間に挿入することにより（又は、炭素原子を除去することにより）容易に修飾される。このように、「ホモ」誘導体及びより高いホモログ、ならびにより低いホモログが、本発明において使用される分岐PEGのための中心の範囲内にある

30

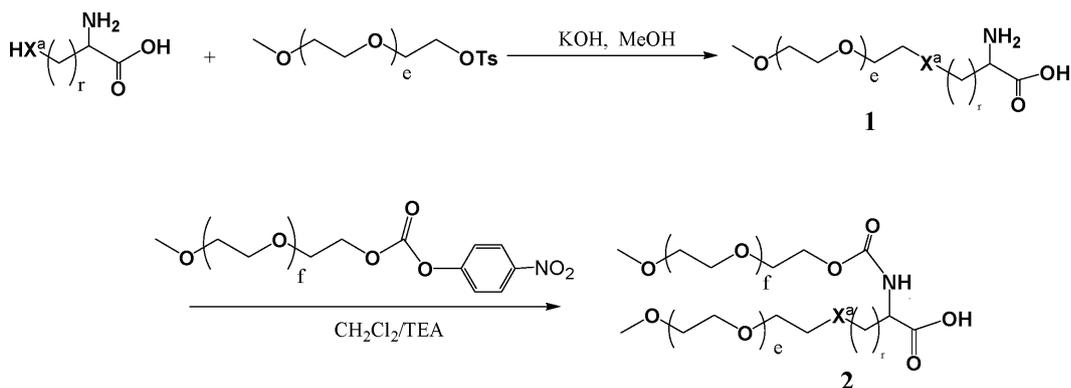
【0292】

本明細書において記載する分岐PEG種は、以下のスキーム3において記載するものなどの方法により容易に調製される：

【0293】

スキーム3：分岐PEG種の調製

【化40】



40

式中、 $X^a$  はO又はSであり、 $r$  は1～5の整数である。指数  $e$  及び  $f$  は、1～2500

50

の非依存的に選択される整数である。

【0294】

このように、スキーム3に従い、天然又は非天然アミノ酸を活性化m-PEG誘導体（この場合はトシレート）と接触させ、側鎖ヘテロ原子X<sup>a</sup>をアルキル化させることにより1を形成させる。単官能化m-PEGアミノ酸を、反応性m-PEG誘導体を伴うN-アシル化条件にかけて、それにより分岐m-PEG2を組み立てる。当業者が理解する通り、トシレート脱離基を、任意の適した脱離基（例えば、ハロゲン、メシレート、トリフレートなど）で置換することができる。同様に、アミンをアシル化するために利用される反応性カーボネートを、活性エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドなど）で置換することができ、又は、酸を、インサイチュで、脱水剤（例えばジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾールなど）を使用して活性化することができる。

10

【0295】

例示的な実施態様において、修飾基はPEG成分であるが、しかし、任意の修飾基（例えば、水溶性ポリマー、水不溶性ポリマー、治療用成分など）を、グリコシル成分中に、適切な連結を通じて組み入れることができる。修飾された糖は、酵素的手段、化学的手段、又はそれらの組み合わせにより生成され、それにより修飾された糖を産生する。例示的な実施態様において、糖は、修飾成分の付着を可能にするが、しかし、依然として、糖が、修飾された糖をG-C-S-Fポリペプチドに共役させることが可能な酵素の基質として機能することを可能にする任意の位置で、活性アミンと置換される。例示的な実施態様において、ガラクトサミンが修飾された糖である場合、アミン成分は炭素原子に6の位置で付着される。

20

【0296】

水不溶性ポリマー

別の実施態様において、上で考察したものと類似しているが、修飾された糖は、水溶性ポリマーよりむしろ、水不溶性ポリマーを含む。本発明の抱合体は、また、1つ又は複数の水不溶性ポリマーを含んでよい。本発明のこの実施態様は、媒体としての抱合体の使用により例証され、それを用いて治療用ポリペプチドを制御された方法で送達する。ポリマー薬物送達系は当技術分野において公知である。例えば、Dunn et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D. C., 1991を参照のこと。当業者は、実質的に任意の公知の薬物送達系を、本発明の抱合体に適用可能であることを認識しうる。

30

【0297】

代表的な水不溶性ポリマーは、限定はされないが、ポリホスファジン（polyphosphazines）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアクリルアミド、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン、プルロニック及びポリビニルフェノールならびにそれらのコポリマーを含む。

40

【0298】

本発明の抱合体において使用される合成的に修飾された天然ポリマーは、限定はされないが、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、及びニトロセルロースを含む。広範なクラスの合成的に修飾された天然ポリマーの特に好ましいメンバーは、限定はされないが、メチルセルロース、エチルセル

50

ローズ、ヒドロキシプロピルセルローズ、ヒドロキシプロピルメチルセルローズ、ヒドロキシブチルメチルセルローズ、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシメチルセルローズ、セルローストリアセテート、セルローススルフェートナトリウム塩、アクリルエステル及びメタクリルエステルのポリマー、ならびにアルギン酸を含む。

【0299】

これら及び本明細書において考察する他のポリマーは、商業的な供給源、例えばSigma Chemical Co. (St. Louis, MO.)、Polysciences (Warrenton, PA.)、Aldrich (Milwaukee, WI.)、Fluka (Ronkonkoma, NY)、及びBioRad (Richmond, CA) などから容易に得ることができる、又は、これらの供給源から得られるモノマーから、標準的な技術を使用して合成することができる。

10

【0300】

本発明の抱合体において使用される代表的な生物分解性ポリマーは、限定はされないが、ポリラクチド、ポリグリコリド及びそのコポリマー、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(酪酸)、ポリ(バレリアン酸)、ポリ(ラクチド-コカプロラクトン)、ポリ(ラクチド-コグリコリド)、多無水物、ポリオルトエステル、それらの混合物及びコポリマーを含む。特に使用されるのは、ゲルを形成する組成物、例えばコラーゲン、プルロニック等を含むものである。

【0301】

本発明において使用されるポリマーは、それらの構造の少なくとも部分内に生物吸収性分子を有する水不溶性物質を含む「ハイブリッド」ポリマーを含む。そのようなポリマーの例は、水不溶性コポリマーを含むものであり、それは生物吸収性領域、親水性領域、及び1ポリマー鎖当たり複数の架橋性官能基を有する。

20

【0302】

本発明の目的のために、「水不溶性物質」は、水中で又は水含有環境において実質的に不溶性である物質を含む。このように、コポリマーの特定の領域又はセグメントは親水性又はさらに水溶性でありうるが、ポリマー分子は、全体として、任意の実質的な測定で、水に溶解しない。

【0303】

本発明の目的のために、「生物吸収性分子」という用語は、身体により、代謝又は分解され、そして再吸収及び/又は通常の排泄ルートを通じて排除されることができる領域を含む。そのような代謝産物又は分解産物は、好ましくは、実質的に、身体に無毒性である。

30

【0304】

生物吸収性領域は、コポリマー組成物が全体として水溶性にならない限り、疎水性又は親水性のいずれでもよい。このように、生物吸収性領域は、ポリマーが全体として水溶性のままであるとの優先度に基づいて選択される。したがって、相対特性(即ち、含まれる官能基の種類、及び生物吸収性領域の相対的割合、及び親水性領域)を選択し、有用な生物吸収性組成物が水溶性のままであることを保証する。

【0305】

例示的な吸収性ポリマーは、例えば、合成的に産生される、ポリ(-ヒドロキシ-カルボン酸)/ポリ(オキシアルキレン)の吸収性ブロックコポリマーを含む(Cohn et al., 米国特許第4,826,945号を参照のこと)。これらのコポリマーは、架橋されず、水溶性であり、身体は分解ブロックコポリマー組成物を排泄することができる。Younes et al., J Biomed. Mater. Res. 21: 1301-1316 (1987); 及びCohn et al., J Biomed. Mater. Res. 22: 993-1009 (1988)を参照のこと。

40

【0306】

現在、好ましい生物吸収性ポリマーは、ポリ(エステル)、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ(ラクトン)、ポリ(アミド)、ポリ(エステル-アミド)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(オルトエステル)、ポリ(カーボネート)、ポリ(ホスファゼン)、

50

ポリ(リン酸エステル)、ポリ(チオエステル)、ポリサッカライド、及びそれらの混合物より選択される1つ又は複数の成分を含む。より好ましくは、生物吸収性ポリマーは、ポリ(ヒドロキシ)酸成分を含む。ポリ(ヒドロキシ)酸の内、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロン酸、ポリ酪酸、ポリバレリアン酸、ならびにそれらのコポリマー及び混合物が好ましい。

【0307】

インビボで吸収される(「生物吸収性」)フラグメントの形成に加えて、本発明の方法における使用のための好ましいポリマーコーティングは、また、排泄可能及び/又は代謝可能なフラグメントを形成することができる。

【0308】

より高次のコポリマーも本発明において使用することができる。例えば、Casey et al.、米国特許第4,438,253号(1984年3月20日に公開)では、ポリ(グリコール酸)及びヒドロキシ末端化ポリ(アルキレングリコール)のトランスエステル化から産生されるトリブロックコポリマーが開示されている。そのような組成物は、吸収性モノフィラメント縫合としての使用のために開示されている。そのような組成物の柔軟性は、芳香族オルトカーボネート(例えばテトラ-p-トリルオルトカーボネートなど)のコポリマー構造中への組み入れにより制御される。

【0309】

乳酸及び/又はグリコール酸に基づく他のポリマーも利用することができる。例えば、Spinu、米国特許第5,202,413号(1993年4月13日に公開)には、オリゴマーのジオール又はジアミン残基のいずれかへのラクチド及び/又はグリコリドの開環重合、それに続く二官能性化合物(例えばジイソシアネート、ジアシルクロライド(diacyl chloride)、又はジクロロシラン)を用いた鎖伸長によって産生される、ポリ乳酸及び/又はポリグリコリドの連続的に順序付けられたブロックを有する、生物分解性マルチブロックコポリマーが開示されている。

【0310】

本発明において有用なコーティングの生物吸収性領域は、加水分解的及び/又は酵素的に切断可能であるようにデザインすることができる。本発明の目的のために、「加水分解的に切断可能な」は、コポリマー、特に生物吸収性領域が、水又は水含有環境における加水分解に対して感受性であることを指す。同様に、「酵素的に切断可能な」は、本明細書において使用される通り、コポリマー、特に生物吸収性領域が、内因性又は外因性の酵素による切断に対して感受性であることを指す。

【0311】

体内に置かれた場合、親水性領域を排泄可能及び/又は代謝可能なフラグメントに加工することができる。このように、親水性領域には、例えば、ポリエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポリオール、ポリ(ビニルピロリジン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アルキルオキサゾリン)、ポリサッカライド、炭水化物、ペプチド、タンパク質、ならびにそれらのコポリマー及び混合物が含まれうる。さらに、親水性領域は、また、例えば、ポリ(アルキレン)オキシドでありうる。そのようなポリ(アルキレン)オキシドは、例えば、ポリ(エチレン)オキシド、ポリ(プロピレン)オキシド、ならびにそれらの混合物及びコポリマーが含まれうる。

【0312】

ヒドロゲルの成分であるポリマーも本発明において有用である。ヒドロゲルは、比較的大量の水を吸収することが可能なポリマー物質である。ヒドロゲル形成化合物の例は、限定はされないが、ポリアクリル酸、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリジン(polyvinyl pyrrolidone)、ゼラチン、カラゲナン及び他のポリサッカライド、ヒドロキシエチレンメタクリル酸(HEMA)、ならびにそれらの誘導体などを含む。安定で、生物分解性の、生物吸収性のヒドロゲルを産生することができる。さらに、ヒドロゲル組成物は、これらの特性の1つ又は複数を示すサブユニットを含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【0313】

その整合性を、架橋を通じて制御することができる、生物適合性ヒドロゲル組成物が公知であり、現在、本発明の方法における使用のために好ましい。例えば、Hubbell et al.、米国特許第5,410,016号(1995年4月25日に公開)、第5,529,914号(1996年6月25日に公開)には、水溶性系が開示されており、それは、2つの加水分解的に変化しやすい伸長部の間にサンドイッチされた、水溶性の中心ブロックセグメントを有する架橋されたブロックコポリマーである。そのようなコポリマーは、さらに、光重合性アクリレート官能基を用いてエンドキャップされる。架橋される場合、これらの系はヒドロゲルになる。そのようなコポリマーの水溶性の中心ブロックは、ポリ(エチレングリコール)を含みうるが；加水分解的に変化しやすい伸長部は、ポリ( - ヒドロキシ酸) (例えばポリグリコール酸又はポリ乳酸など) でありうる。Sawhney et al., *Macromolecules* 26: 581-587 (1993)を参照のこと。

10

## 【0314】

別の実施態様において、ゲルは、熱可逆的ゲルである。熱可逆的ゲル(例えばプルロニック、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリサッカライド、ポリウレタンヒドロゲル、ポリウレタン-尿素ヒドロゲル、及びそれらの組み合わせなどの成分を含む)が、現在、好ましい。

## 【0315】

さらに別の例示的な実施態様において、本発明の抱合体は、リポソームの成分を含む。リポソームは、当業者に公知の方法に従って、例えば、Eppstein et al.、米国特許第4,522,811号(1985年6月11日に公開)に記載されている通りに調製することができる。例えば、リポソーム製剤は、適切な脂質(例えばステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイルホスファチジルコリン、アラカドイル(arachadoyl)ホスファチジルコリン、及びコレステロールなど)を、無機溶媒中に溶解させ、次に蒸発させ、容器の表面上に乾燥した脂質の薄膜を残すことによって調製してよい。活性化化合物又はその薬学的に許容され得る塩の水溶液を、次に、その容器中に導入する。この容器を、次に、手で回し、脂質物質を容器の側面から遊離させ、脂質凝集物を分散させ、それによりリポソーム懸濁液を形成させる。

20

## 【0316】

上に記載する微粒子及び微粒子を調製する方法は、例として与えられ、それらは、本発明において使用される微粒子の範囲を定義することを意図しない。異なる方法により製作される一連の微粒子が、本発明において有用であることは、当業者に明らかであろう。

30

## 【0317】

水溶性ポリマー(直鎖及び分枝の両方)に関連して上で考察した構造的フォーマットは、一般的に、水不溶性ポリマーに関しても適用可能である。このように、例えば、システイン、セリン、グリジン、及びトリリジン分岐中心は、2つの水不溶性ポリマー成分を用いて官能性を持たせることができる。これらの種を産生するために使用される方法は、一般的に、水溶性ポリマーを産生するために使用される方法と密接に類似している。

## 【0318】

他の修飾基

本発明は、また、ポリペプチドが、治療用成分、診断用成分、標的成分、毒素成分などにグリコシル連結基を介して抱合された、上に記載ものに類似する抱合体を提供する。上に記載する成分の各々は、小分子、天然ポリマー(例えば、ポリペプチド)又は合成ポリマーでありうる。

40

## 【0319】

さらなる実施態様において、本発明は、抱合体の成分としての標的薬剤の存在に起因して、特定の組織において選択的に局在化する抱合体を提供する。例示的な実施態様において、標的薬剤はタンパク質である。例示的なタンパク質は、トランスフェリン(脳、血液プール)、HS-糖タンパク質(骨、脳、血液プール)、抗体(脳、抗体特異的抗原を伴う組織、血液プール)、凝固因子V-XII(損傷組織、血餅、癌、血液プール)、血清

50

タンパク質、例えば、 $\alpha$ -酸性糖タンパク、フェチュイン、 $\beta$ -胎児タンパク質（脳、血液プール）、 $\alpha$ -2-糖タンパク質（肝臓、アテローム性動脈硬化巣粥腫、脳、血液プール）、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、及びEPO（免疫刺激、癌、血液プール、赤血球過剰産生、神経保護）、アルブミン（半減期の増加）、IL-2及びIFN- $\gamma$ を含む。

#### 【0320】

例示的な標的抱合体において、インターフェロナルファ2（IFN- $\gamma$ ）を、トランスフェリンに、グリコシル連結基をPEG成分の各末端に含む二官能性リンカーを介して抱合させる（スキーム1）。例えば、PEGリンカーの1つの末端を、トランスフェリンに付着させたインタクトなシアル酸リンカーを用いて官能性を持たせ、他を、IFN- $\gamma$ に付着させたインタクトなC連結Manリンカーを用いて官能性を持たせる。

10

#### 【0321】

生体分子

別の実施態様において、修飾された糖は生体分子を持つ。さらなる実施態様において、生体分子は、機能性のタンパク質、酵素、抗原、抗体、ペプチド、核酸（例えば、単一のヌクレオチド又はヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、及び一本鎖又はそれ以上の核酸）、レクチン、受容体、又はそれらの組み合わせである。

#### 【0322】

好ましい生体分子は、本質的に非蛍光性であり、又は、そのような最小量の蛍光を発光し、それらはアッセイにおける蛍光マーカーとしての使用に不適切である。さらに、一般的に、糖ではない生体分子を使用することが好ましい。この優先度に対する例外は、別の実体（例えば、PEG、生体分子、治療用成分、診断用成分など）の共有結合的な付着により修飾される本来なら天然である糖の使用である。例示的な実施態様において、糖成分は、生体分子であり、リンカーアームに抱合され、糖リンカーアームカセットは、後に、ポリペプチドに、本発明の方法を介して抱合される。

20

#### 【0323】

本発明を実行する際に有用な生体分子は、任意の供給源に由来しうる。生体分子は天然の供給源から単離することができ、又は、それらは合成方法により産生することができる。ポリペプチドは天然ポリペプチド又は突然変異ポリペプチドでありうる。突然変異は、化学的な突然変異誘発、部位特異的な突然変異誘発、又は当業者に公知の突然変異を誘発する他の手段により影響を受ける。本発明を実行する際に有用なポリペプチドは、例えば、酵素、抗原、抗体、及び受容体を含む。抗体はポリクローナル又はモノクローナルのいずれか、インタクト又はフラグメントのいずれかでありうる。ポリペプチドは、場合により、進化分子工学のプログラムの産物である。

30

#### 【0324】

天然由来及び合成のペプチドならびに核酸の両方が、本発明に関連して有用である。これら分子は、糖残基成分に、又は、任意の利用可能な反応基により架橋薬剤に付着させることができる。例えば、ポリペプチドは、反応性のアミン、カルボキシル、スルフヒドリル、又はヒドロキシル基を通じて付着させることができる。反応基は、ポリペプチド末端又はペプチド鎖内部の部位に存在しうる。核酸は、塩基（例えば、環外アミン）上の反応基を通じて、又は、糖成分（例えば、3'-又は5'-ヒドロキシル）上の利用可能なヒドロキシル基を通じて付着させることができる。ペプチド及び核酸鎖は、1又は複数の部位でさらに誘導化でき、鎖上への適切な反応基の付着を可能にすることができる。Chrisey et al. *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039 (1996)を参照のこと。

40

#### 【0325】

さらなる実施態様において、生体分子は、本発明の方法により修飾されたポリペプチドを、特定の組織に向けるように選択され、それにより、組織に送達される非誘導体化ポリペプチドの量と比べ、その組織へのポリペプチドの送達が増強される。さらなる実施態様において、特定の組織に、選択された時間内に送達される誘導体化ポリペプチドの量は、少なくとも約20%、より好ましくは、少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約

50

100%だけ誘導体化により増強される。現在、標的適用のための好ましい生体分子は、抗体、ホルモン、及び細胞表面受容体に対するリガンドを含む。

【0326】

さらなる例示的な実施態様において、ビオチンを伴う抱合体として提供される。このように、例えば、選択的にビオチン化されたポリペプチドは、1つ又は複数の修飾基を持つアビジン又はストレプトアビジン成分の付着により合成される。

【0327】

治療用成分

別の実施態様において、修飾された糖は治療用成分を含む。当業者は、治療用成分のカテゴリと生体分子の間に重複が存在することを理解するであろう；多くの生体分子は治療特性又は可能性を有する。

10

【0328】

治療用成分は、臨床使用のために既に承認された薬剤でありうる。又は、それらは使用が実験的である（すなわちその活性もしくは作用機構が研究中である）薬物でありうる。治療用成分は、所定の病状における証明された作用を有しうる、又は、所定の病状において所望の作用を示すことが仮定されるだけでありうる。別の実施態様において、治療用成分は化合物であり、それらは、選択された組織と相互作用するそれらの能力についてスクリーニングされている。治療用成分は、本発明を実行する際に有用であり、種々の薬理的活性を有する広範な薬物クラスからの薬物を含む。好ましい治療用成分は、本質的に非蛍光性であり、又は、そのような最小量の蛍光を発光し、それらはアッセイにおける蛍光マーカーとしての使用に不適切である。さらに、一般的に、糖ではない治療用成分を使用することが好ましい。この優先度に対する例外は、別の実体（例えば、PEG、生体分子、治療用成分、診断用成分など）の共有結合的な付着により修飾される糖の使用である。別の例示的な実施態様において、治療用糖成分はリンカーアームに抱合され、糖リンカーアームカセットは、後に、ポリペプチドに、本発明の方法を介して抱合される。

20

【0329】

治療用及び診断用の薬剤を種々の他の種に抱合する方法は、当業者に周知である。例えば、Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; 及びDunn et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C1991を参照のこと。

30

【0330】

例示的な実施態様において、治療用成分は、選択された条件下で切断される連結を介して修飾された糖に付着させる。例示的な条件は、限定はされないが、選択されたpH（例えば、胃、腸、エンドサイトーシス液胞）、活性酵素の存在（例えば、エステラーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ）、光、熱などを含む。多くの切断可能な基が当技術分野において公知である。例えば、Jung et al., Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983); Joshi et al., J. Biol. Chem., 265: 14518-14525 (1990); Zarling et al., J. Immunol., 124: 913-920 (1980); Bouizar et al., Eur. J. Biochem., 155: 141-147 (1986); Park et al., J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986); Browning et al., J. Immunol., 143: 1859-1867 (1989)を参照のこと。

40

【0331】

有用な治療用成分のクラスは、例えば、非ステロイド性抗炎症薬物（NSAIDs）を含む。NSAIDsは、例えば、以下のカテゴリより選択することができる：（例えば、プロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ピフェニルカルボン酸誘導体、及びオキシカム）；ヒドロコルチゾンなどを含むステロイド性抗炎症薬；抗ヒスタミン薬（例えば、クロルフェニラミン、トリプロリジン）；鎮咳剤（例えば、デキストロメトルファン、コデイン、カラミフェン、及びカルベタペンタン）；止痒薬（例えば、メトジラジン及びトリメブラジン）；抗コリン作用薬（例えば、スコポラミン、アトロピン、ホマトロピン、レボドパ）；制吐薬及び制嘔吐薬（例えば、シクリジン、メクリジン、クロルプロマジン、ブクリジン）；食欲減退薬（例えば、ベンズフェタミン、フェンテルミン、

50

クロルフェンテルミン、及びフェンフルラミン)；中枢刺激薬(例えば、アンフェタミン、メタンフェタミン、デクストロアンフェタミン、及びメチルフェニデート)；抗不整脈薬(例えば、プロパノロール、プロカインアミド、ジソピラミド、キニジン、エンカイニド)； $\alpha$ -アドレナリン遮断薬(例えば、メトプロロール、アセプトロール、ベタキソロール、ラベタロール、及びチモロール)；強心薬(例えば、ミルリノン、アムリノン、及びドブタミン)；降圧薬(例えば、エナラプリル、クロニジン、ヒドララジン、ミノキシジル、グアナドレル、グアネチジン)；利尿薬(例えば、アミロライド及びヒドロクロチアジド)；冠血管拡張薬(例えば、ジルチアゼム、アミオダロン、イソクスプリン、ナイリドリン、トラゾリン、及びベラパミル)；血管収縮薬(例えば、ジヒドロエルゴタミン、エルゴタミン、及びメチルセルギド)；抗潰瘍薬(例えば、ラニチジン及びシメチジン)；麻酔薬(例えば、リドカイン、プピバカイン、クロロプロカイン、ジブカイン)；抗鬱薬(例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン)；精神安定薬及び鎮静薬(例えば、クロルジアゼポキシド、ペナシチジン、ベンズキナミド、フルラゼパム、ヒドロキシジン、ロキサピン、及びプロマジン)；抗精神病薬(例えば、クロルプロチキセン、フルフェナジン、ハロペリドール、モリンドン、チオリダジン、及びトリフルオペラジン)；抗微生物薬(抗菌、抗真菌、抗原虫、及び抗ウイルス薬)。

10

#### 【0332】

本発明の組成物中に組み入れられるための好ましい抗微生物薬は、例えば、 $\beta$ -ラクタム薬、キノロン薬、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミカシン、トリクロサン、ドキシサイクリン、カブレオマイシン、クロルヘキシジン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クリンダマイシン、エタムブトール、ヘキサミジンイソチオネート、メトロニダゾール、ペンタミジン、ゲンタマイシン、カナマイシン、リネオマイシン、メタサイクリン、メタンアミド、ミノサイクリン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ミコナゾール、及びアマンタジンの薬学的に許容されうる塩を含む。

20

#### 【0333】

本発明を実行する際に使用される他の薬物成分は、抗悪性腫瘍薬(例えば、アンチアンドロゲン(例えば、ロイプロリド又はフルタミド)、細胞破壊薬(例えば、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、タキソール、シクロホスファミド、ブスルファン、シスプラチン、 $2$ -インターフェロン)抗エストロゲン薬(例えば、タモキシフェン)、代謝拮抗薬(例えば、フルオロウラシル、メトトレキセート、メルカプトプリン、チオグアニン)を含む。また、このクラスに含まれるのは、診断及び治療の両方のためのラジオアイソトープベースの薬剤、及び抱合毒素(例えばリシン、ゲルダナマイシン、マイタンシン、CC-1065、デュオカルマイシン、クリケアマイシン(Chlicheamycin)、ならびにそれらの関連する構造及び類似体など)である。

30

#### 【0334】

治療的成分は、また、ホルモン(例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラジオール、ロイプロリド、メゲステロール、オクトレチド、又はソマトスタチン)；筋弛緩薬(例えば、シンナメドリン、シクロベンザプリン、フラボキセート、オルフェナドリン、パバヴェリン、メベヴェリン、イダヴェリン、リトドリン、ジフェノキシレート、ダントロレン、及びアズモレン)；抗瘻薬；骨-活性薬(例えば、ジホスホネート及びホスホノアルキルホスフィネート薬化合物)；内分泌調節薬(例えば、避妊薬(例えば、エチノジオール、エチニルエストラジオール、ノレチンドロン、メストラノール、デソゲステレル、メドロキシプロゲステロン)、糖尿病の調節物質(例えば、グリブリド又はクロルプロバミド)、同化剤(例えばテストラクトン又はスタノゾロールなど)、アンドロゲン(例えば、メチルテストステロン、テストステロン、又はフルオキシメステロン)、抗利尿薬(例えば、デスモプレッシン及びカルシトニン)でありうる。

40

#### 【0335】

また、本発明において使用されるのはエストロゲン(例えば、ジエチルシチルベステロ

50

ール)、グルココルチコイド(例えば、トリアムシノロン、ベタメサゾンなど)、及びプロゲステロン(例えばノレチンドロン、エチノジオール、ノレチンドロン、レボノルゲストレルなど);甲状腺剤(例えば、リオチロニン又はレボチロキシン)又は抗甲状腺剤(例えば、メチマゾール);抗過プロラクチン血症薬(例えば、カベルゴリン);ホルモンサプレッサー(例えば、ダナゾール又はゴセレリン)、子宮収縮剤(例えば、メチルエルゴノピン又はオキシトシン)及びプロスタグランジン(例えばミオプロストール、アルプロスタジル、又はジノプロストーンなど)であり、これらを用いることもできる。

【0336】

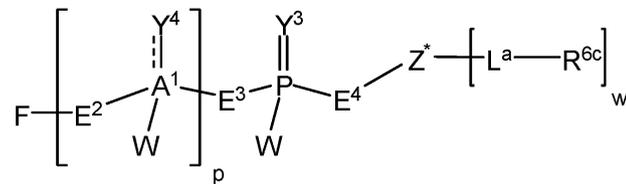
他の有用な修飾基は、免疫調節薬(例えば、抗ヒスタミン剤、マスト細胞安定化剤(例えばロドキサミド及びノ又はクロモリンなど)、ステロイド(例えば、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、コルチゾン、デキサメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ベクロメタゾン、又はクロベタゾル)、ヒスタミンH<sub>2</sub>アンタゴニスト(例えば、ファモチジン、シメチジン、ラニチジン)、免疫抑制剤(例えば、アザチオプリン、シクロスポリン)などを含む。抗炎症活性を伴うグループ、例えばスリダク、エトドラク、ケトプロフェン、及びケトロラクなども有用である。本発明と共に使用される他の薬物は、当業者に明らかであろう。

【0337】

グリコシル供与体種

一実施態様において、本発明のポリペプチド抱合体は、ポリペプチドをグリコシル供与体種と、酵素(それに対してグリコシル供与体種は基質である)の存在下において接触させることにより調製される。一例において、グリコシル供与体種は、化学式(X):

【化41】



(X)

の構造を有する。

【0338】

化学式(X)において、pは0~1より選択される整数である;及び、wは0~20より選択される整数である。一例において、wは1~8より選択される。別の例において、wは1~6より選択される。別の例において、wは1~4より選択される。さらに別の例(それにおいてwは0である)において、-L<sup>a</sup>-R<sup>6c</sup>をHで置換される。Fは脂質成分である。例示的な脂質成分が、本明細書において以下に記載される。一例において、脂質成分はドリコール又はウンデカプレニル成分である。

【0339】

化学式(X)において、Z<sup>\*</sup>は本発明のグリコシル成分を表わす。グリコシル成分は、本明細書において、例えば、ポリペプチド抱合体に関連して(例えば、化学式IIIについて)定義され、本発明のグリコシル供与体種に等しく適用される。代表的な実施態様において、グリコシル成分はモノサッカライド及びオリゴサッカライドより選択される。別の代表的な実施態様において、Z<sup>\*</sup>は、モノアンテナ、ジアンテナ、トリアンテナ、及びテトラアンテナのサッカライドより選択される。別の実施態様において、Z<sup>\*</sup>は、GlcNAc、GalNAc、又はバシロサミン中と同様にC-2-N-アセトアミド基を含む。

【0340】

化学式(X)において、各L<sup>a</sup>は、単結合、官能基、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるリンカー成分である。

各  $R^6$  は、非依存的に選択される本発明の修飾基である。  $A^1$  は、P (リン) 及び C (炭素) より選択されるメンバーである。  $Y^3$  は、酸素 (O) 及び硫黄 (S) より選択されるメンバーである。  $Y^4$  は、O、S、 $SR^1$ 、 $OR^1$ 、OQ、 $CR^1R^2$ 、及び  $NR^3R^4$  より選択されるメンバーである。  $E^2$ 、 $E^3$ 、及び  $E^4$  は、 $CR^1R^2$ 、O、S、及び  $NR^3$  より非依存的に選択されるメンバーである。一例において、 $E^2$  は O である。別の例において、 $E^3$  は O である。さらに別の例において、 $E^4$  は O である。特定の例において、 $E^2$ 、 $E^3$ 、及び  $E^4$  の各々は O である。各 W は、 $SR^1$ 、 $OR^1$ 、OQ、 $NR^3R^4$ 、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである。化学式 (X) において、各 Q は、H、負電荷、及び塩対イオン (陽イオン) より非依存的に選択されるメンバーであり、各  $R^1$ 、各  $R^2$ 、各  $R^3$ 、及び各  $R^4$  は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである。一例において、酵素はオリゴサッカリルトランスフェラーゼであり、グリコシル供与体種は脂質 - ピロリン酸連結グリコシル成分である。

10

## 【0341】

## グリコシル供与体の脂質成分

一実施態様において、化学式 (X) の脂質成分は、1 ~ 約 200 の炭素原子、好ましくは約 5 ~ 約 100 の炭素原子を含み、直鎖又は分岐鎖で配置されている。この鎖中の炭素 - 炭素結合は、飽和及び不飽和より非依存的に選択される。二重結合はシス又はトランス立体配置を有しうる。一実施態様において、炭素鎖は、少なくとも 1 つの芳香族又は非芳香族の環状構造を含む。一例において、脂質成分は、少なくとも 5 つ、好ましくは少なくとも 6 つ、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つ、又は少なくとも 10 の炭素原子を含む。別の実施態様において、炭素原子は、少なくとも 1 つの官能基により中断されている。例示的な官能基は、エーテル、チオエーテル、アミン、カルボキサミド、スルホンアミド、ヒドラジン、カルボニル、カルバメート、尿素、チオ尿素、エステル、及びカーボネートを含む。

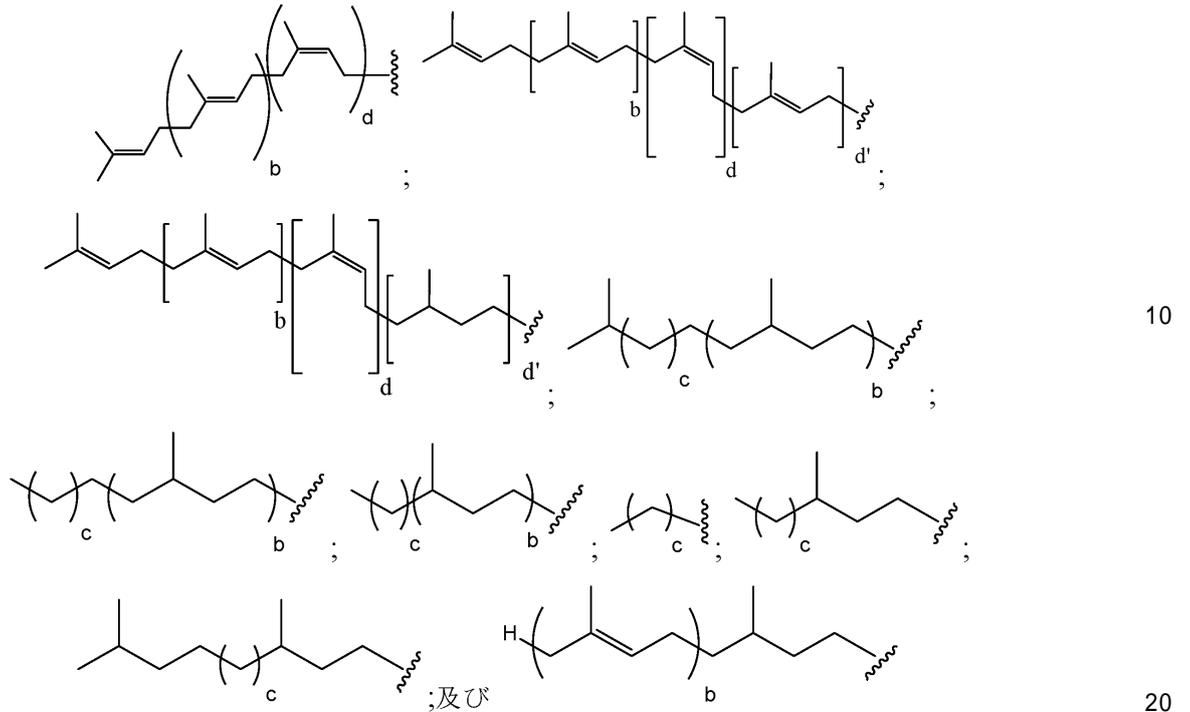
20

## 【0342】

一実施態様において、脂質成分は置換又は非置換アルキルである。別の実施態様において、脂質成分は、少なくとも 1 つのイソプレニル又は還元イソプレニル成分を含む。さらに別の実施態様において、脂質成分は、ポリ - イソプレニル、還元ポリ - イソプレニル、及び部分還元ポリ - イソプレニルより選択される。例示的な脂質成分は、以下の構造：

30

## 【化42】

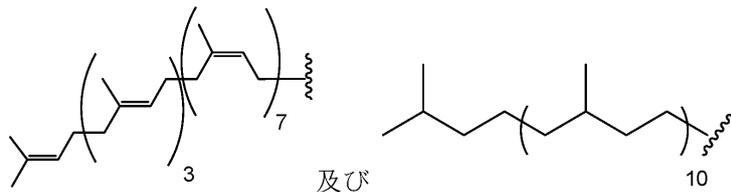


(式中、b、c、d、及びd'は、0～100より非依存的に選択される整数である)の1つを含む。一実施態様において、脂質成分は、合計約2～約40のイソプレニル及び/又は還元イソプレニル単位を含む。別の実施態様において、脂質成分は、合計約5～約22のイソプレニル及び/又は還元イソプレニル単位を含む。

## 【0343】

この実施態様の一例において、脂質成分はウンデカプレニル、C55イソプレノイドである。別の例において、脂質成分は、還元又は部分還元ウンデカプレニルである。例示的な脂質成分は以下：

## 【化43】



を含む。

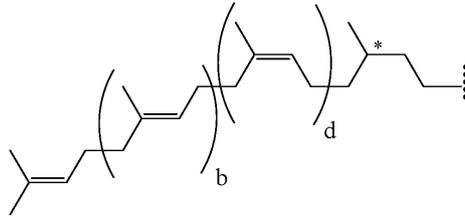
## 【0344】

別の実施態様において、脂質成分は、脂肪酸アルコール、例えば天然であるものなどに由来する。さらに別の実施態様において、脂質成分は、ドリコール又はポリプレノールに由来する。ドリコール由来成分は、本発明のポリペプチド抱合体の形成において真核生物のオリゴサッカリルトランスフェラーゼを使用する際に特に有用である。一例において、脂質成分は、以下の一般的な構造：

30

40

## 【化 4 4】



(式中、 $b$  及び  $d$  は、 $0 \sim 100$  より非依存的に選択される整数である) を有する。一例において、 $d$  は、 $1 \sim$  約  $50$  より、好ましくは  $1 \sim$  約  $40$  より、より好ましくは  $1 \sim$  約  $30$  より、さらにより好ましくは  $1 \sim$  約  $20$  より、又は  $1 \sim$  約  $10$  より選択される。別の例において、 $d$  は、 $7 \sim 20$  より、好ましくは  $7 \sim 19$ 、 $7 \sim 18$ 、 $7 \sim 17$ 、 $7 \sim 16$ 、 $7 \sim 15$ 、 $7 \sim 14$ 、 $7 \sim 13$ 、 $7 \sim 12$ 、 $7 \sim 11$ 、 $7 \sim 10$ 、 $7 \sim 9$ 、又は  $7 \sim 8$  より選択される。別の例において、 $d$  は、 $13 \sim 20$  より、好ましくは  $14 \sim 19$  より、及びより好ましくは  $14 \sim 17$  より選択される。別の例において、 $b$  は  $0 \sim 6$  より選択される。さらに別の例において、 $b$  は  $0 \sim 2$  より選択される。さらなる例において、ドリコール成分は、約  $15 \sim$  約  $22$  のイソプレノイド単位を有する。星印でマークした立体中心は、(S) 又は (R) 立体配置を有しうる。

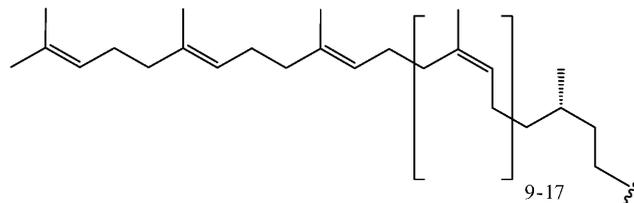
10

## 【0345】

例示的なドリコール及びポリプレノール成分が、例えば、T. Chojnacki et al., Cell. Biol. Mol. Lett. 2001, 6(2), 192; T. Chojnacki and G. Dallner, Biochem. J. 1988, 251, 1-9; E. Swiezewska et al., Acta Biochim. Polon. 1994, 221-260; 及び G. Van Duij et al., Chem. Scripta 1987, 27, 95-100 において記載されており、その開示は本明細書においてそれらの全体が全ての目的のために組み入れられる。特定の例において、ドリコール成分は以下の構造：

20

## 【化 4 5】



30

を有する。

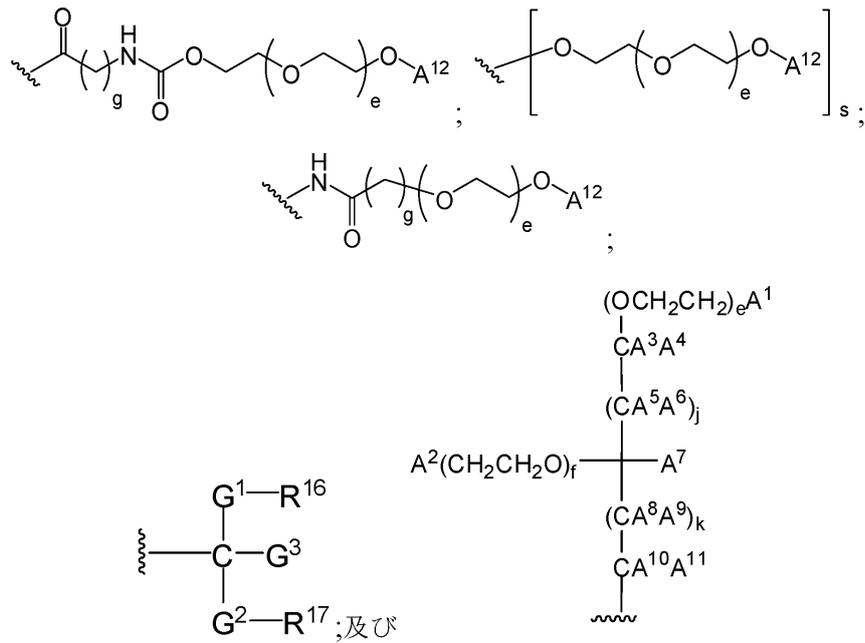
## 【0346】

グリコシル供与体の修飾基

化学式 (X) において、 $R^{6c}$  は本発明の修飾基を表わす。修飾基が、本明細書において、例えば、ポリペプチド抱合体に関連して記載され、本発明の化合物 (即ち、グリコール供与体種) に等しく適用される。代表的な実施態様において、化学式 (X) のグリコシル供与体種は、以下

40

## 【化46】



(式中、 $g$ 、 $j$ 、 $k$ 、 $e$ 、 $f$ 、 $s$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、 $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 、 $A^5$ 、 $A^6$ 、 $A^7$ 、 $A^8$ 、 $A^9$ 、 $A^{10}$ 、 $A^{11}$ 、及び $A^{12}$ は上の通りに定義される)より選択されるメンバーである構造を有する修飾基 $R^{6c}$ を含む。

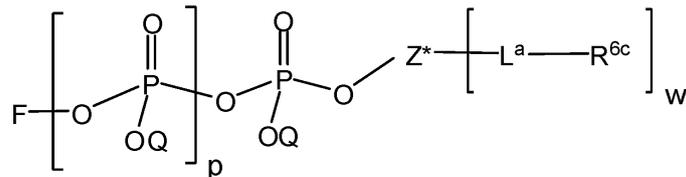
20

## 【0347】

例示的なグリコシル供与体種

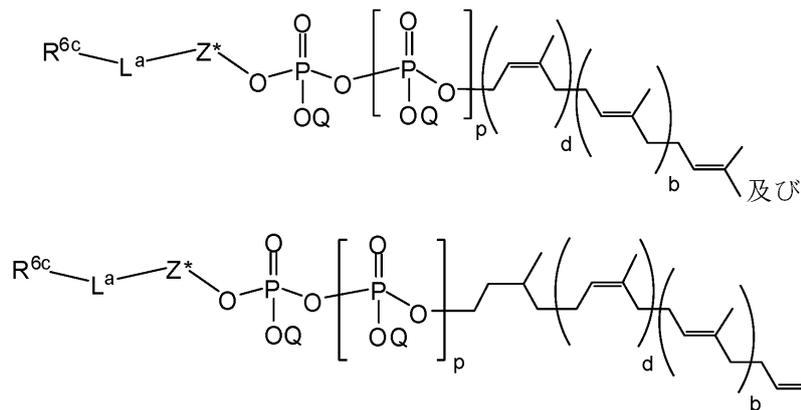
例示的な実施態様において、グリコシル供与体種は、リン酸又はピロリン酸成分を含み、以下の構造：

## 【化47】



(式中、 $w$ 、 $p$ 、 $L^a$ 、 $R^{6c}$ 、 $F$ 、 $Q$ 、及び $Z^*$ は、本明細書において上で化学式(X)について定義される)を有する。この実施態様の例示的な化合物は、以下の化学式：

## 【化48】

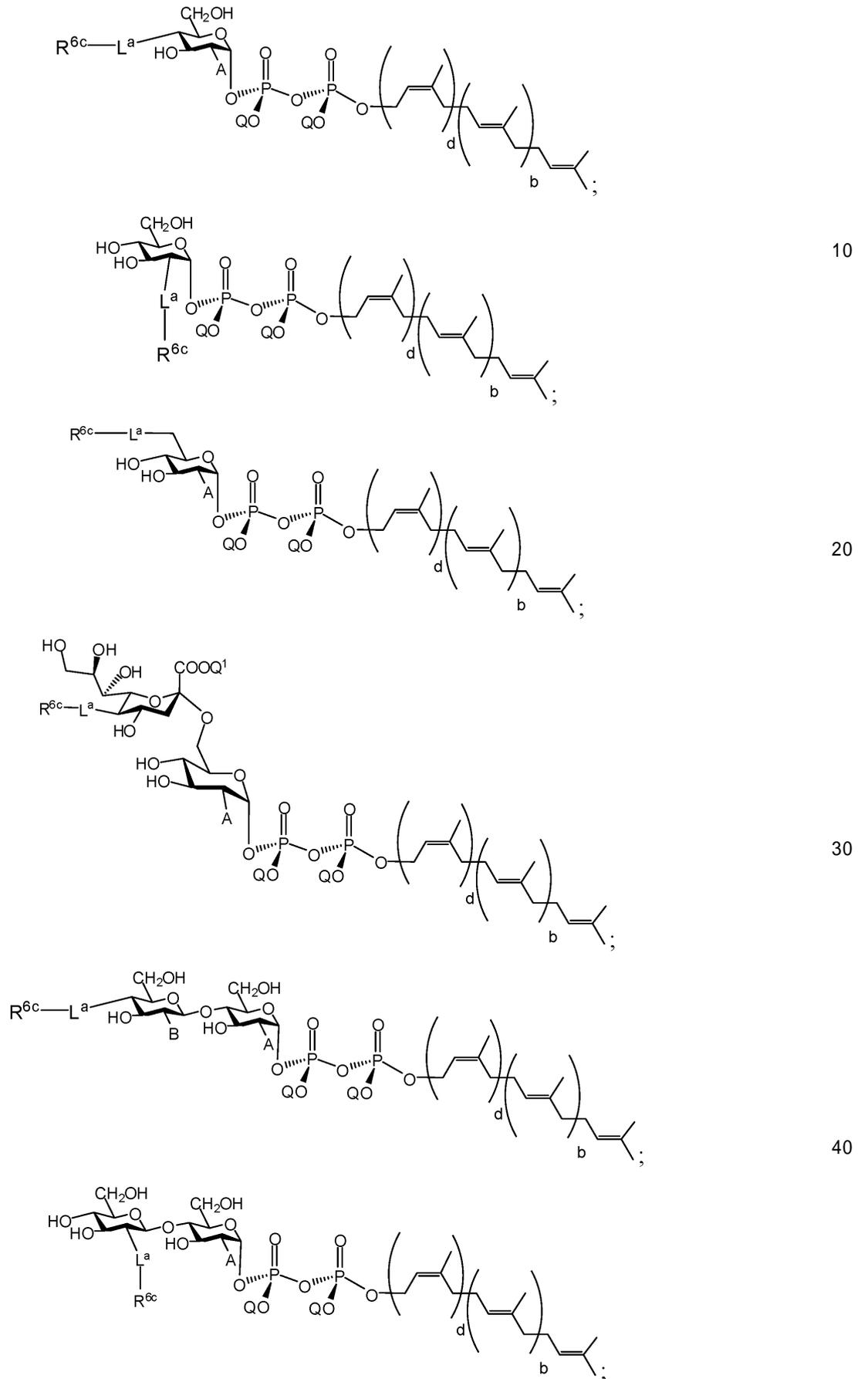


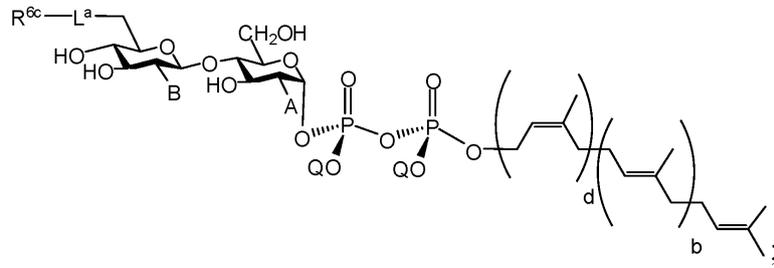
(式中、b及びdは、0～100より非依存的に選択される)のものを含む。一実施態様において、bは3である。別の実施態様において、dは7である。さらに別の実施態様において、dは7であり、bは3である。

【0348】

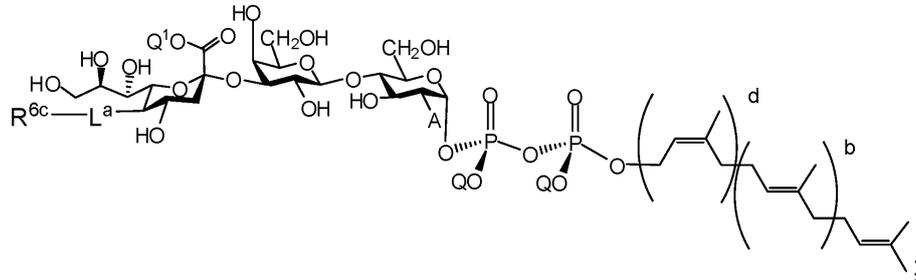
例示的な実施態様において、化学式(X)中のグリコシル成分Z\*は、GlcNAc-GlcNAc、GlcNH-GlcNAc、GlcNAc-GlcNH、又はGlcNH-GlcNH成分より選択されるメンバーである。一実施態様において、Z\*はGlcNAc-Gal又はGlcNH-Gal成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-GlcNAc-Gal、GlcNH-GlcNAc-Gal、GlcNAc-GlcNH-Gal、又はGlcNH-GlcNH-Gal成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-Gal-Sia成分である。別の実施態様において、Z\*はGlcNAc-GlcNAc-Gal-Sia、GlcNH-GlcNAc-Gal-Sia、GlcNAc-GlcNH-Gal-Sia、又はGlcNH-GlcNH-Gal-Sia成分である。例示的なグリコシル供与体種は以下：

【化 4 9】

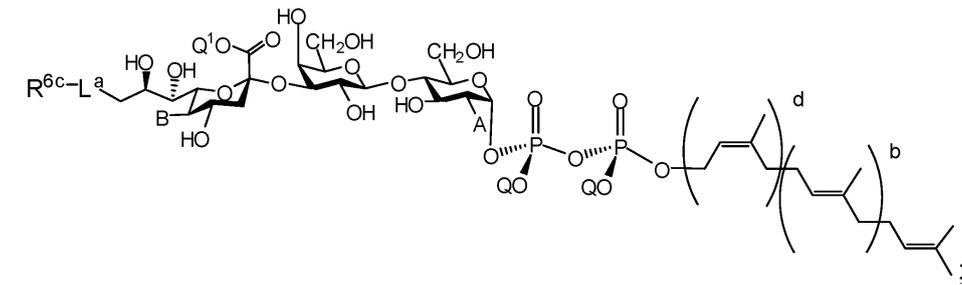




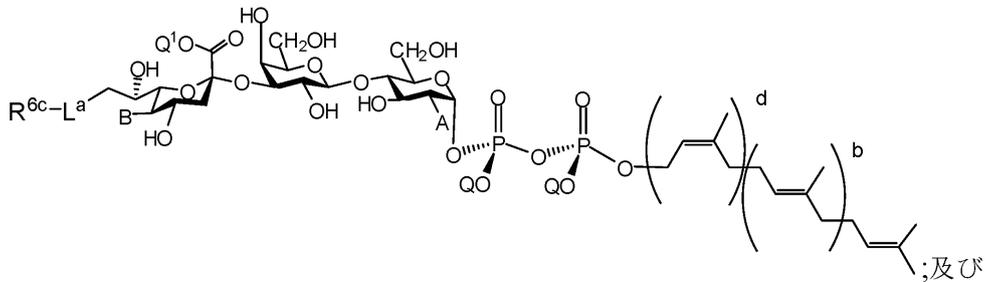
10



20



30



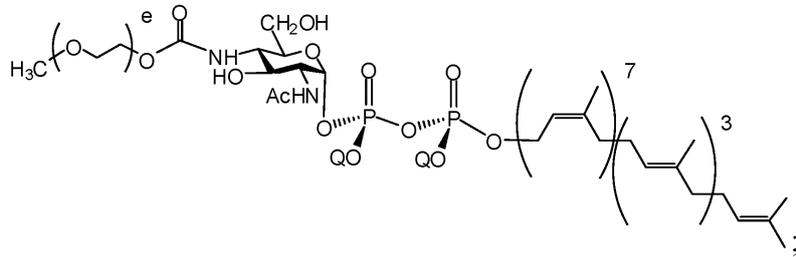
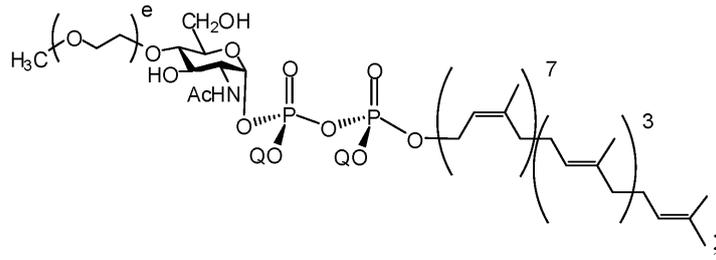
40

(式中、b、d、Q、La、及びR<sup>6c</sup>は本明細書において上で定義される通りである)を含む。Q<sub>1</sub>はH、単一の負電荷、又は陽イオン(例えば、Na<sup>+</sup>又はK<sup>+</sup>)である。A及びBは、OR(例えば、OH)及びNHCO<sub>R</sub>(例えば、NHAc)より非依存的に選択されるメンバーである。上に示すピロリン酸は、場合により、リン酸でありうる。

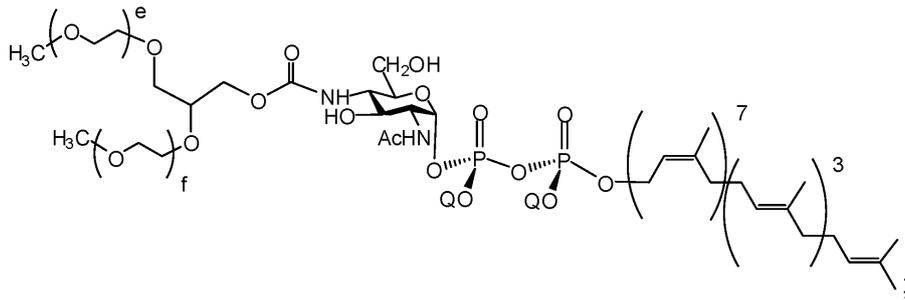
【0349】

例示的なグリコシル供与体種は以下：

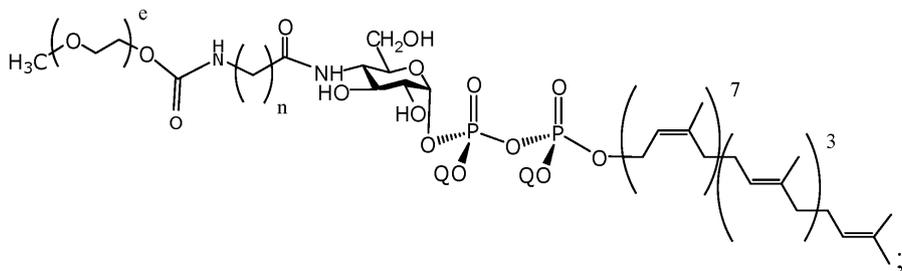
【化50】



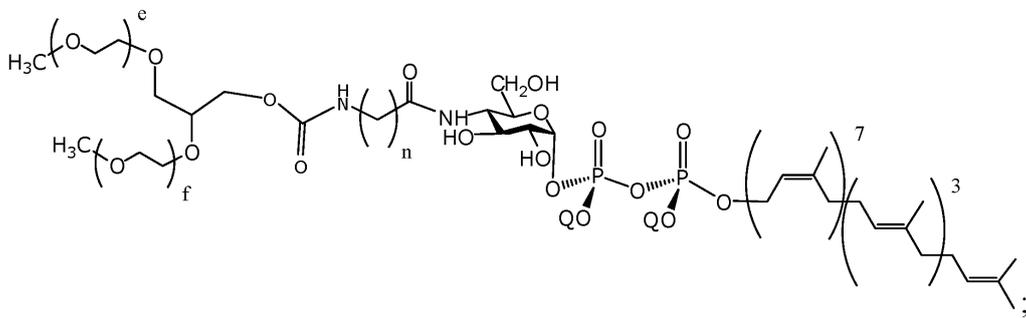
10



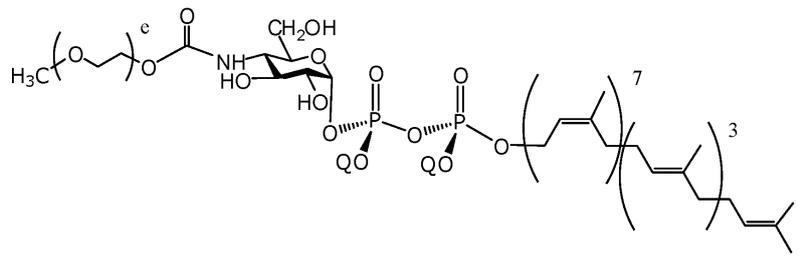
20

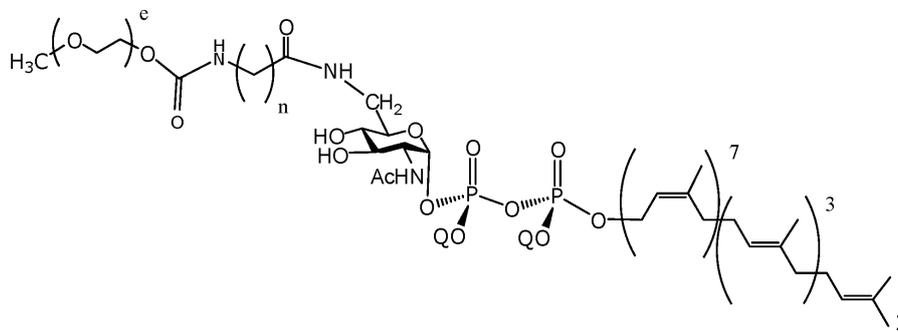
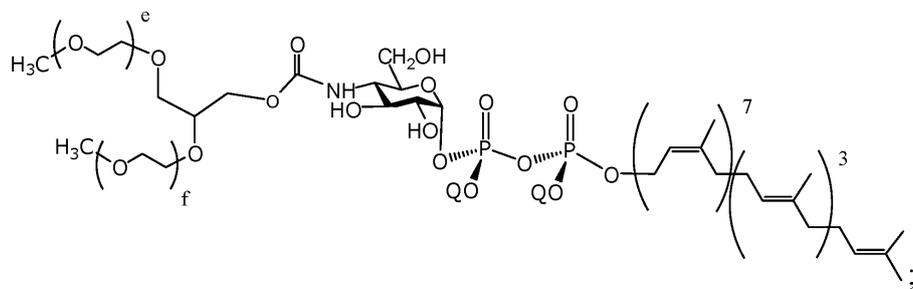


30

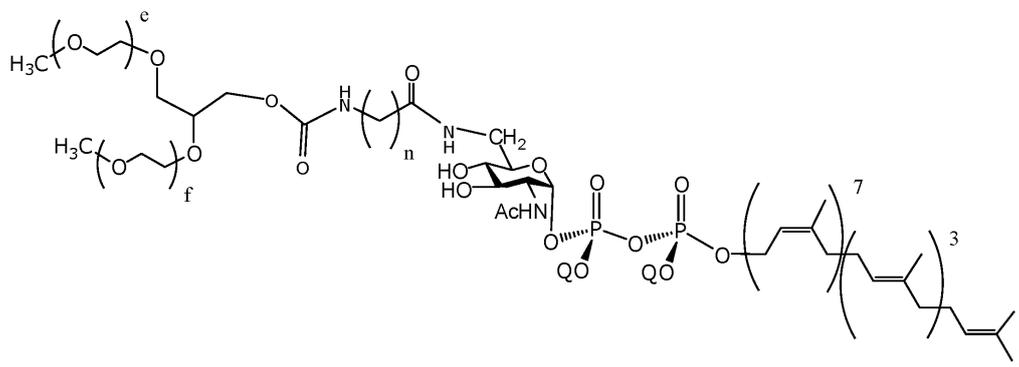


40

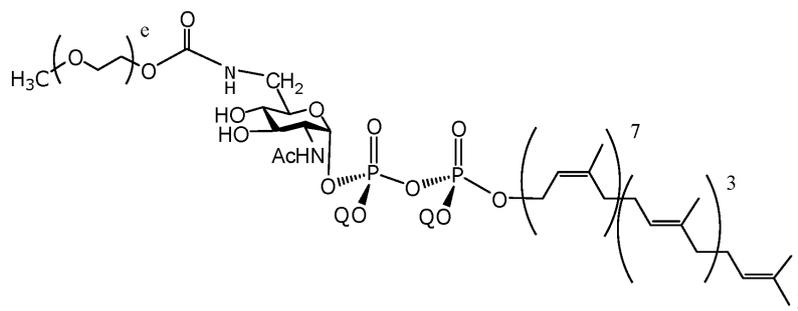




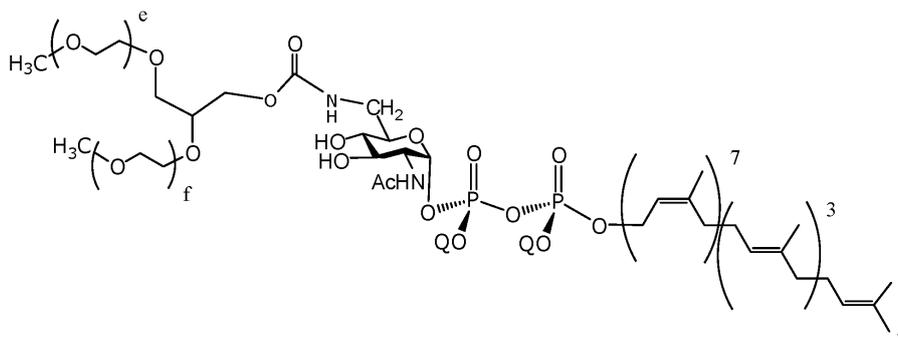
10



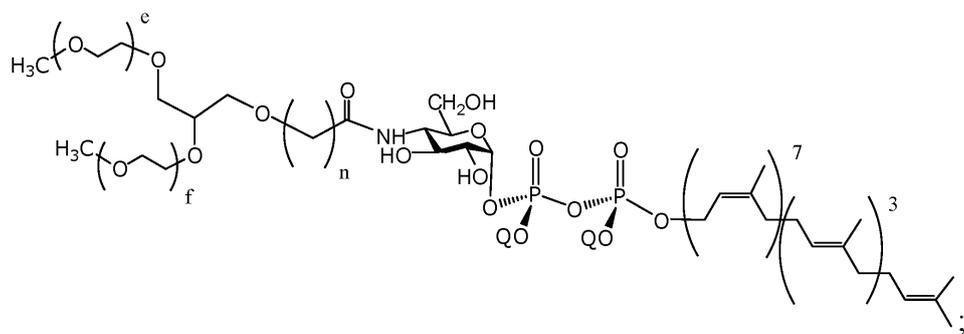
20



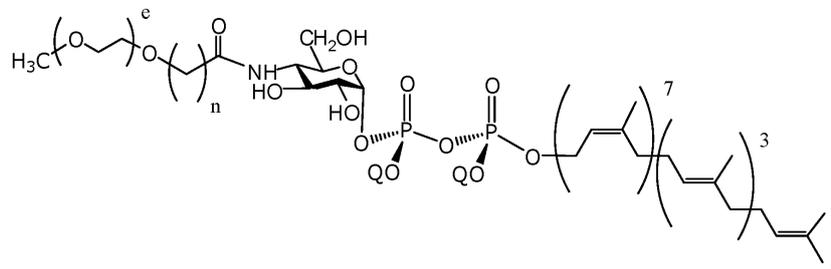
30



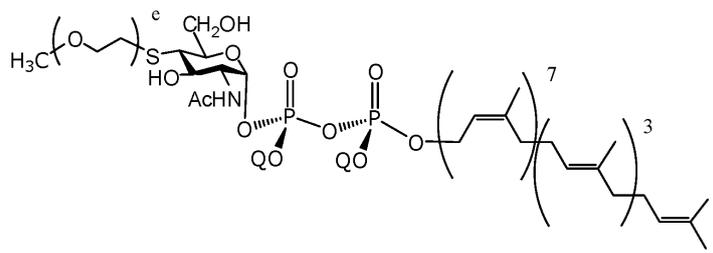
40



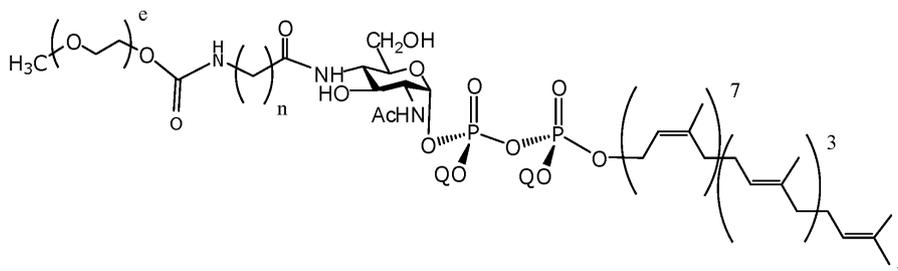
10



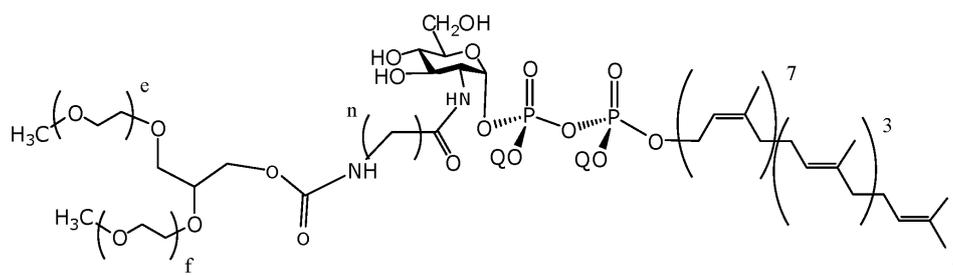
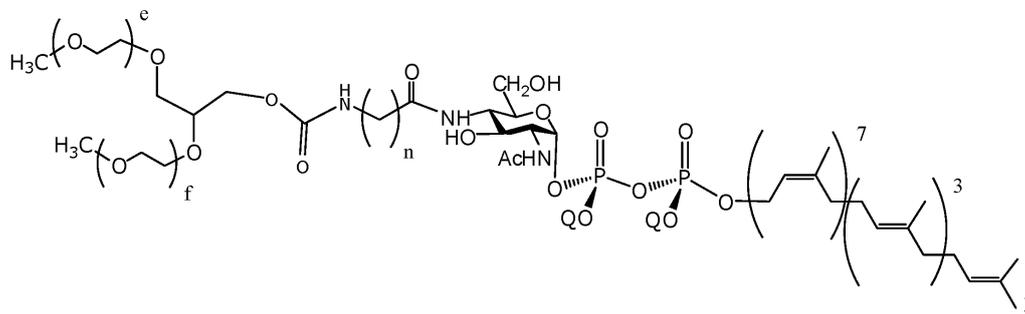
20

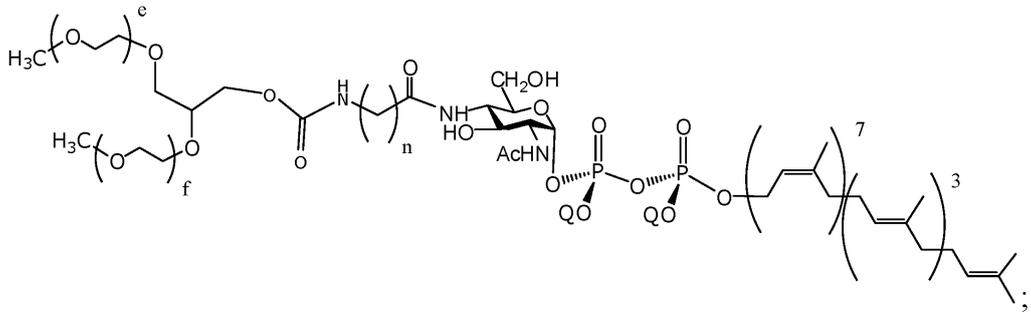


30

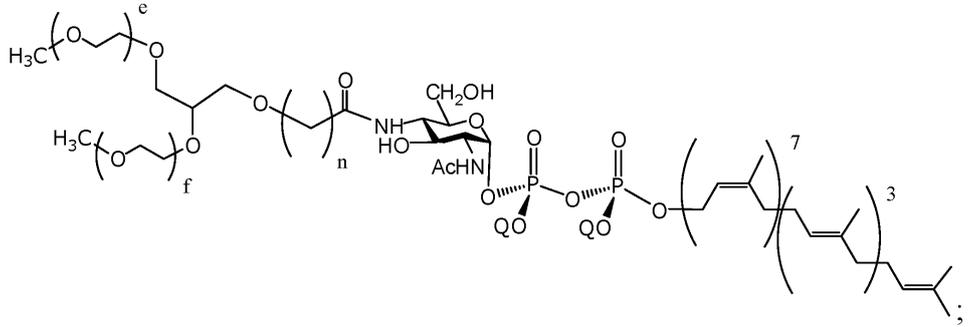


40

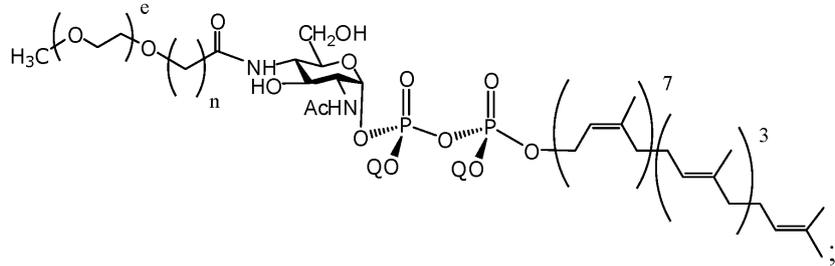




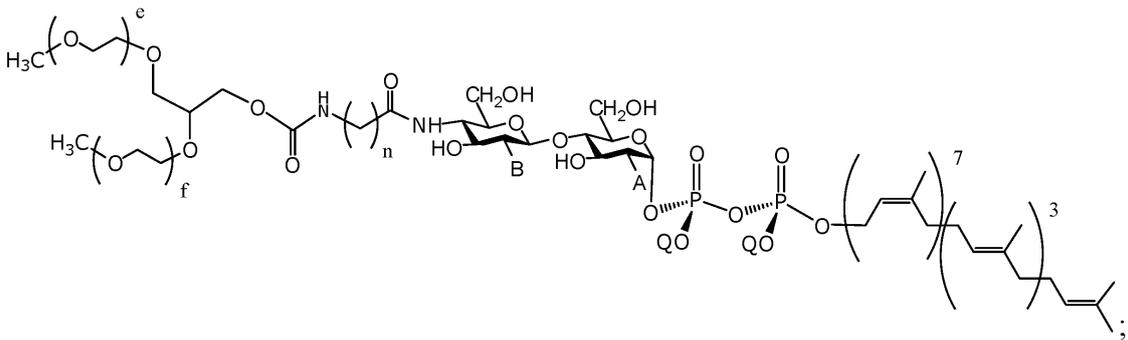
10



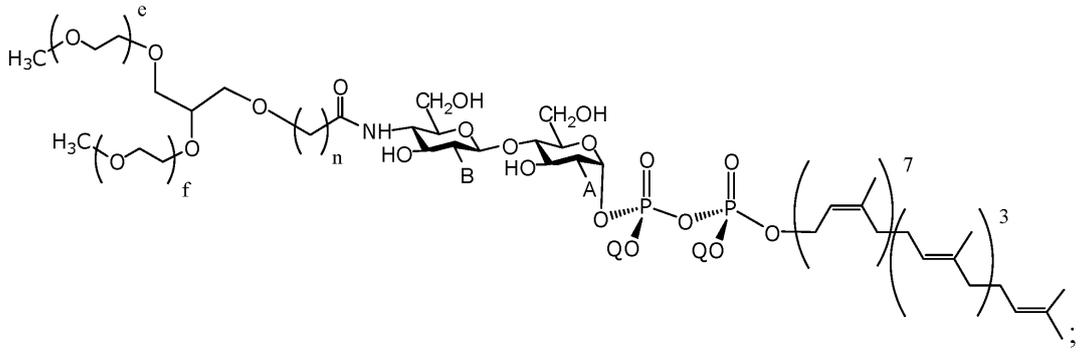
20



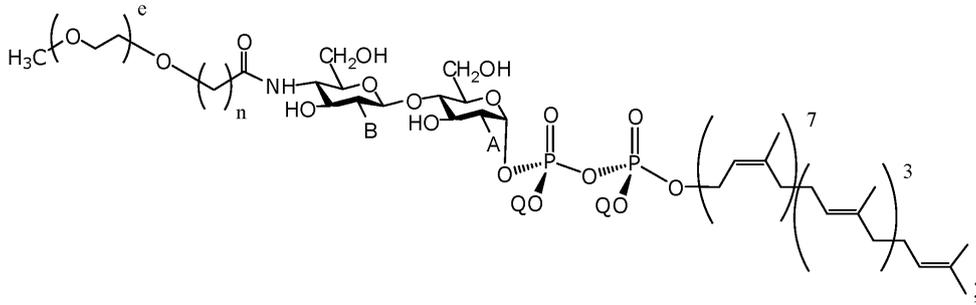
30



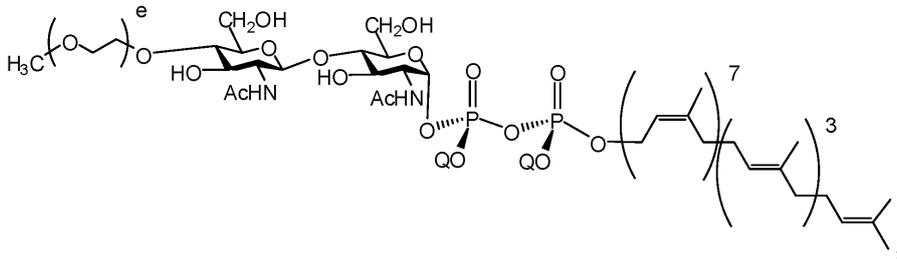
40



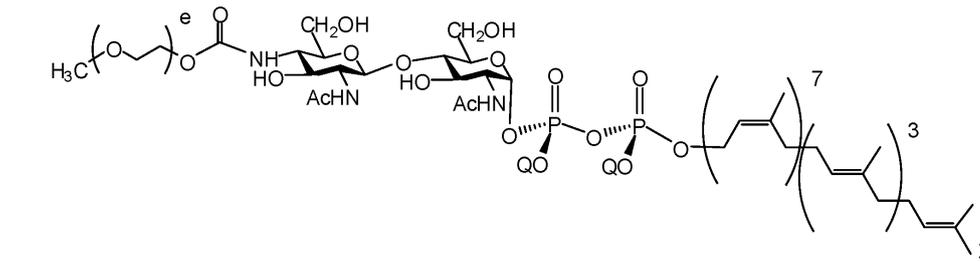
10



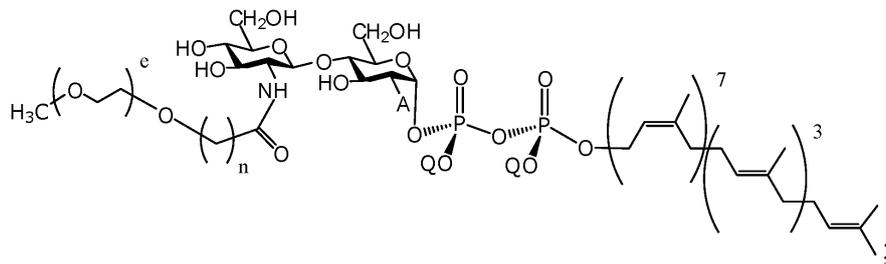
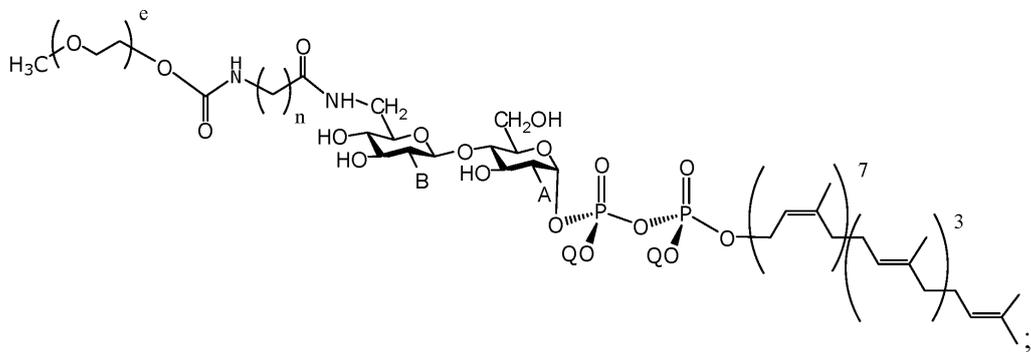
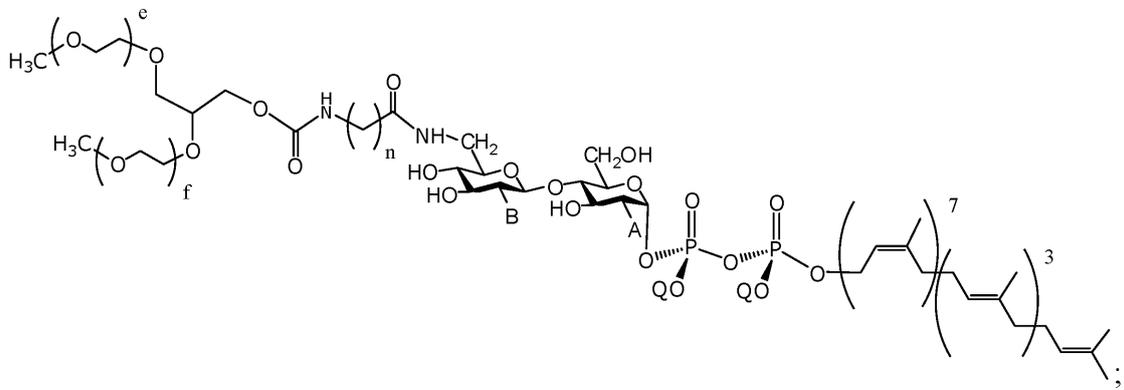
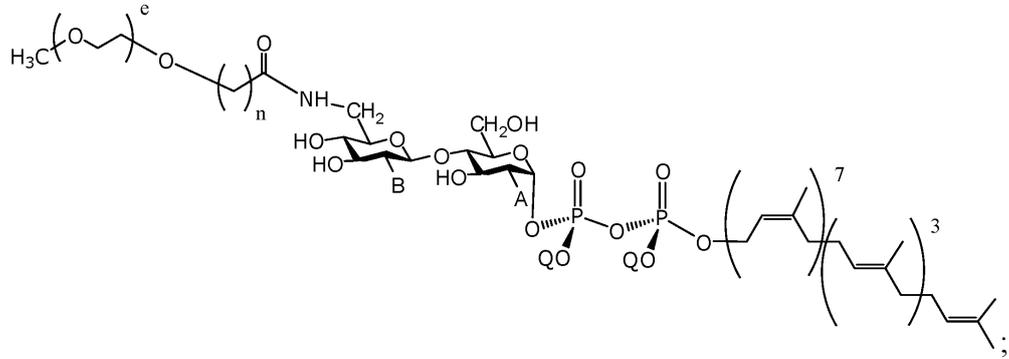
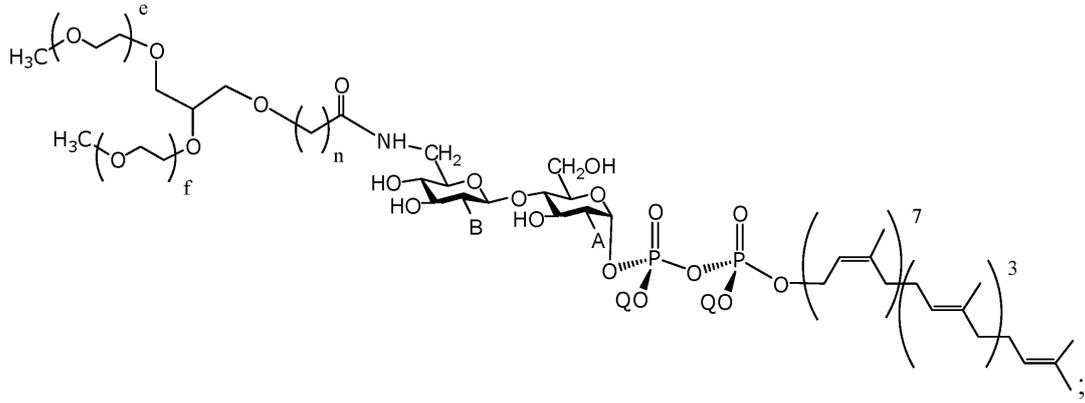
20

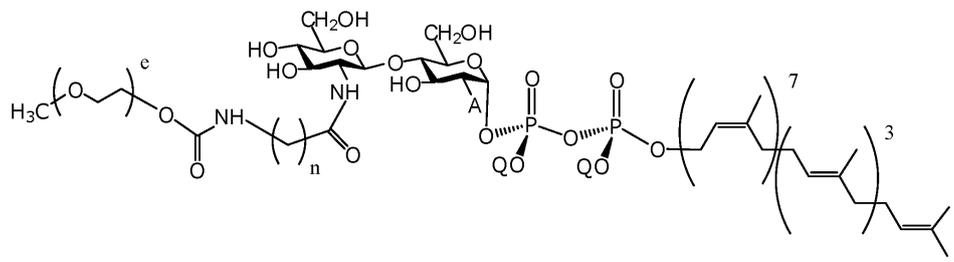


30

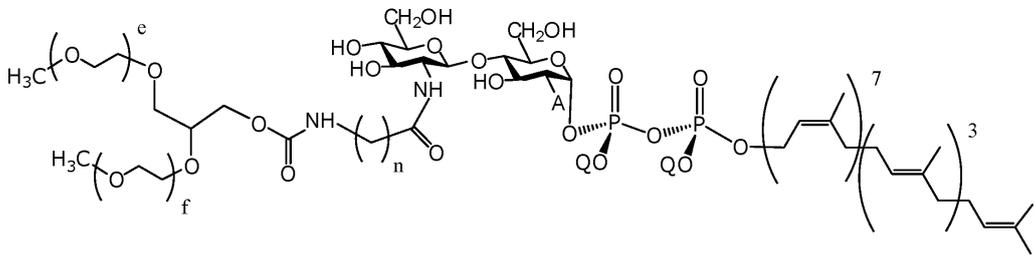


40

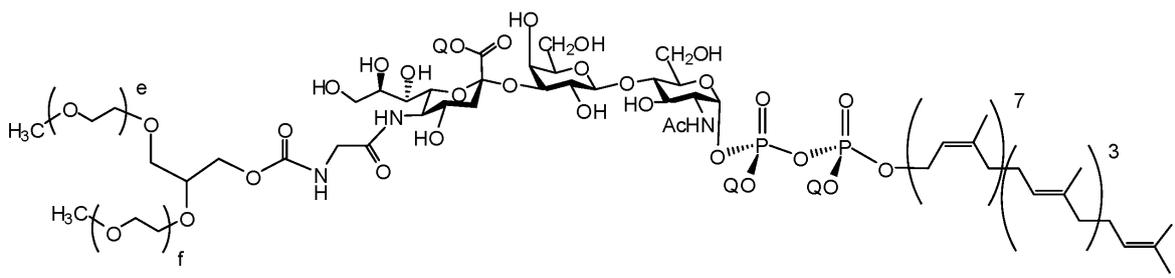




10

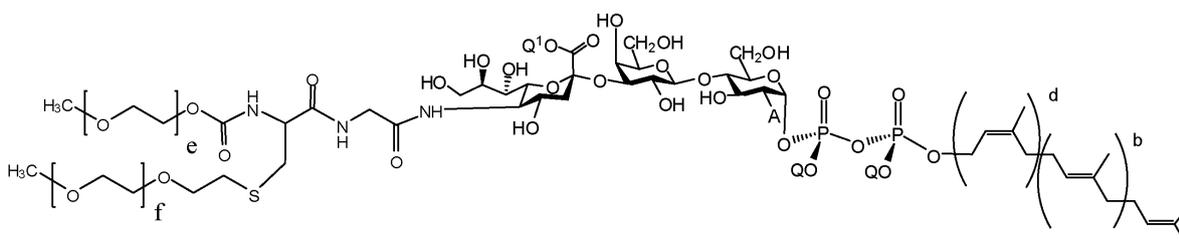


20



30

及び



を含む。

【0350】

グリコシル供与体種の合成

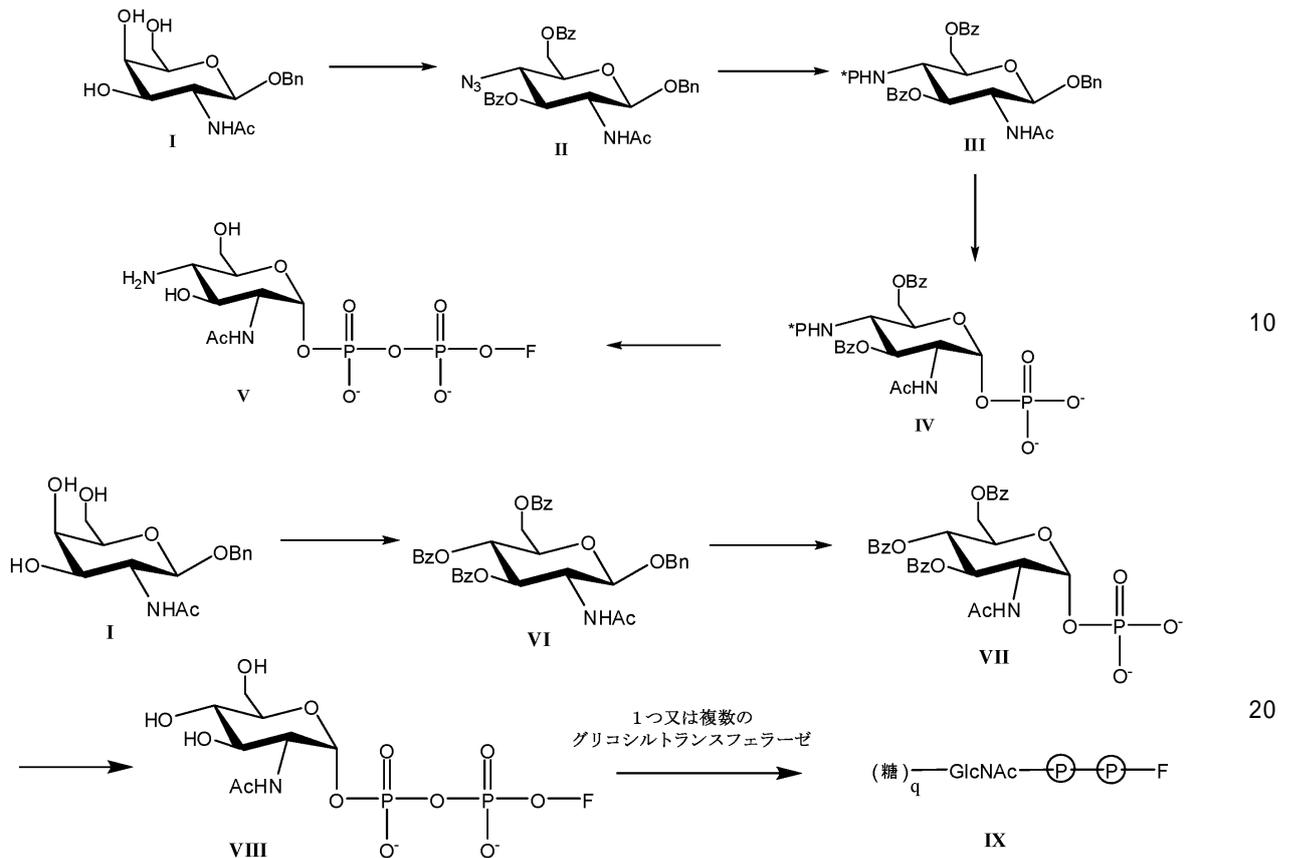
本発明のグリコシル供与体種は、当技術分野で認識されている方法の組み合わせを使用して合成してよい。例えば、ウンデカプレニル - ピロリン酸連結パシロサミンの合成が、E. Weerapana et al., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127: 13766-13767により報告されており、その開示は本明細書において参照によりその全体が組み入れられる。この合成手順を採用して、種々のポリプレニルサッカライドを合成することができる。脂質 - ピロリン酸連結 GlcNAc 成分の合成のための例示的な合成ルートを、スキーム3において以下に示す。

40

【0351】

スキーム3 a : 脂質リン酸糖及び脂質ピロリン酸糖の例示的な合成

## 【化51】



## 【0352】

スキーム3aにおいて、Fは脂質成分、例えばウンデカプレニルなどである；P\*は保護基であり、アミノ基の保護に適する；及び、整数qは1～40より選択される。

## 【0353】

スキーム3aにおいて、化合物IIは、公知のベンジル2-アセトアミド-2-デオキシシ-D-ガラクトピラノシドIから、3-及び6-ヒドロキシル基の保護、例えば、ベンゾイルクロライドを用いて、離脱基（例えば、トリフラート）への5-ヒドロキシル基の変換及び後の求核置換（例えば、アジ化ナトリウムを使用）を通じて調製することができる。化合物IIを、次に、アジド基の還元及び適した保護基（例えばFmocなど）を用いた結果として得られるアミノ基の保護により合成してよい。Bn保護基の選択的除去及び塩基（例えば、LiHMDS）及び保護されたリン酸供与体、例えば保護されたホスホ無水物など（例えば、 $[(BnO)_2P(O)]_2O$ ）を用いた産物の処理。後のリン酸基の脱保護によって化合物IVが与えられ、それは脂質リン酸（ウンデカプレニル-リン酸）及び適した共役試薬（例えばカルボニルジイミダゾール）を使用してVに変換されうる（アミノ基の脱保護が続く）。結果として得られる一次アミノ基を使用して、ピロリン酸糖を修飾糖に、活性化修飾基前駆体（例えば本明細書において記載のものなど）を用いた反応により共役させることができる。一例において、修飾基はポリ（エチレングリコール）成分を含む。活性化PEG試薬は市販されている。あるいは、アミノ基をNHAc基に変換することができる。

30

40

## 【0354】

あるいは、スキーム3aにおいて、化合物VIは、公知のベンジル2-アセトアミド-2-デオキシシ-D-ガラクトピラノシドIから、3-及び6-ヒドロキシ基の保護（例えば、ベンゾイルクロライドを用いて）及びC-5での立体中心の転化（例えば、Mitsunobu化学反応を通じて）を通じて調製してよい。上に記載する後の脂質成分のリン酸化及び共役によって化合物VIIが与えられる。化合物は、さらに、1つ又は複数のグリコシルトランスフェラーゼ及び各糖供与体（例えばヌクレオチド糖）を使用して

50

I X に変換させることができる。一例において、糖供与体は、本発明の修飾基（例えば、修飾されたシアル酸成分）を含む修飾されたヌクレオチド糖である。修飾された糖供与体を、修飾された糖供与体が基質であるグリコシルトランスフェラーゼ（例えば、シアリルトランスフェラーゼ）と組み合わせて使用する。スキーム 3 中の反応は例示的であり、本発明の範囲を限定することを意味しない。当業者は、種々のリン酸を類似の合成ルートを通じて作製するために、化合物 I の代わりに、任意の他の糖成分を出発物質として使用することができることを理解するであろう。

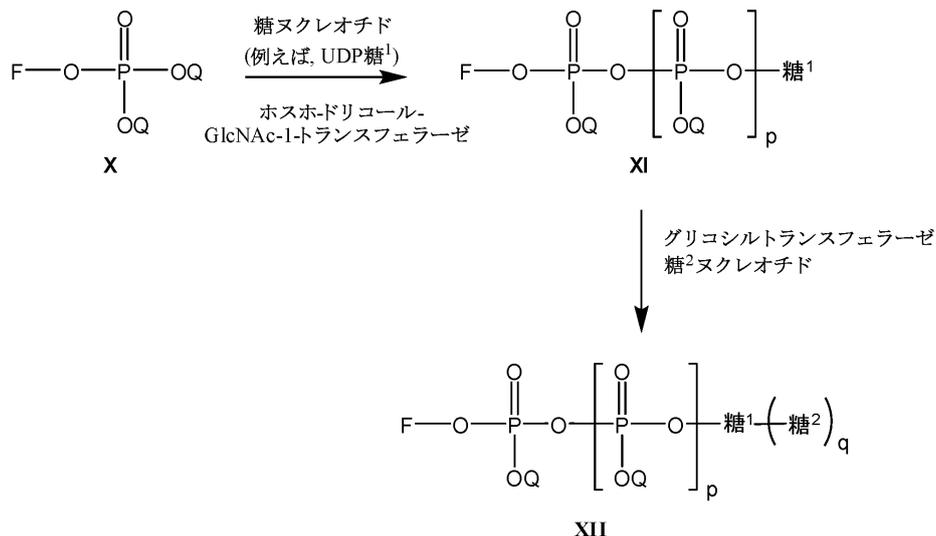
【 0 3 5 5 】

脂質 - ピロリン酸糖又は脂質ピロリン酸糖の合成のための別のアプローチを、スキーム 3 b において例証する。このアプローチにおいて、脂質リン酸 X を、第 1 糖成分、例えば UDP - 糖など（例えば、UDP - GlcNAc、UDP - GlcNH、UDP - GalNAc、UDP - GalNH、UDP - パシロサミン、UDP - Glc など）を含む糖ヌクレオチドと、酵素の存在下で反応させ、それによってヌクレオチド糖の第 1 の糖成分が、脂質リン酸上に移され、化合物 X I がもたらされ、それはリン酸基又はピロリン酸基を含みうる。一実施態様において、酵素はホスホ - ドリコール - GlcNAc - 1 - リン酸トランスフェラーゼ（GPT）である。例示的なリン - ドリコール - GlcNAc - 1 - リン酸トランスフェラーゼが本明細書において以下に記載されている。追加の糖成分を、次に、1 つ又は複数のグリコシルトランスフェラーゼ及び適切な糖ヌクレオチドを使用して第 1 の糖成分に加えて、化合物 X I I を与えてよい。例示的なグリコシルトランスフェラーゼも本明細書において以下に記載されている。

【 0 3 5 6 】

スキーム 3 b :

【 化 5 2 】



【 0 3 5 7 】

スキーム 3 b において、各 Q は、H、単一の負電荷、及び陽イオン（例えば、 $\text{K}^+$  又は  $\text{Na}^+$ ）より選択されるメンバーである。整数 p は 0 及び 1 より選択される；及び、整数 q は 1 ~ 40 より選択される。

【 0 3 5 8 】

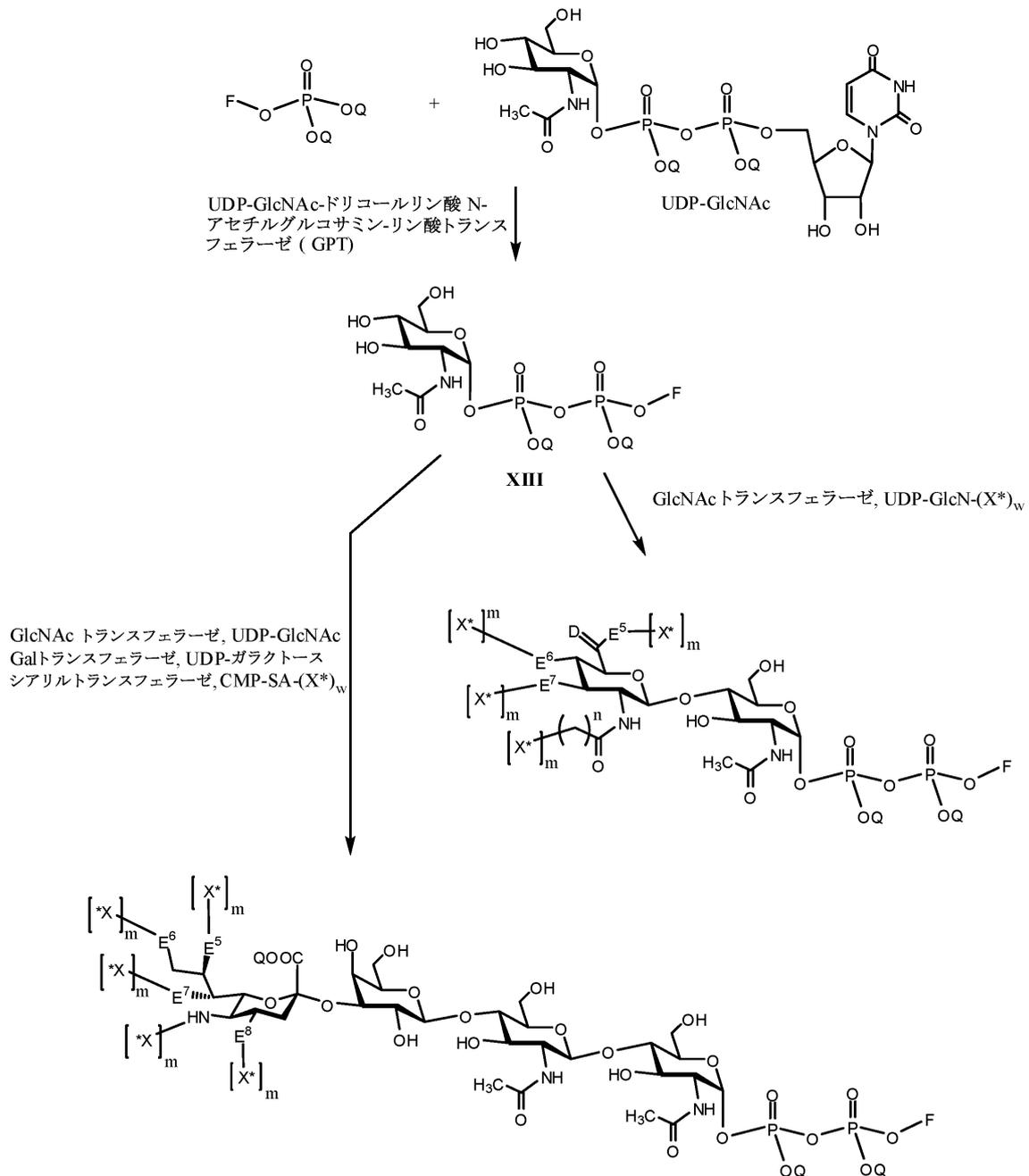
一実施態様において、スキーム 3 b における第 1 の糖成分は GlcNAc であり、第 1 の糖ヌクレオチドは UDP - GlcNAc である。一例において、第 1 の GlcNAc 成分を、修飾された GlcNAc - 又は GlcNH - 成分に連結させる。別の例において、別の GlcNAc 成分を、第 1 の GlcNAc 成分に加える。結果として得られる GlcNAc - GlcNAc 成分を、次に、修飾された Gal 成分に連結させてよい。あるいは、GlcNAc - GlcNAc 成分を、最初に、Gal 成分に連結させて、修飾された Sia 成分を、結果として得られる GlcNAc - GlcNAc - Gal 成分に加える。こ

これらの実施態様の例示的な合成ルートを、スキーム 3 c において以下に例証する。

【 0 3 5 9 】

スキーム 3 c : 修飾された脂質 - ピロリン酸糖の例示的な合成

【 化 5 3 】



10

20

30

【 0 3 6 0 】

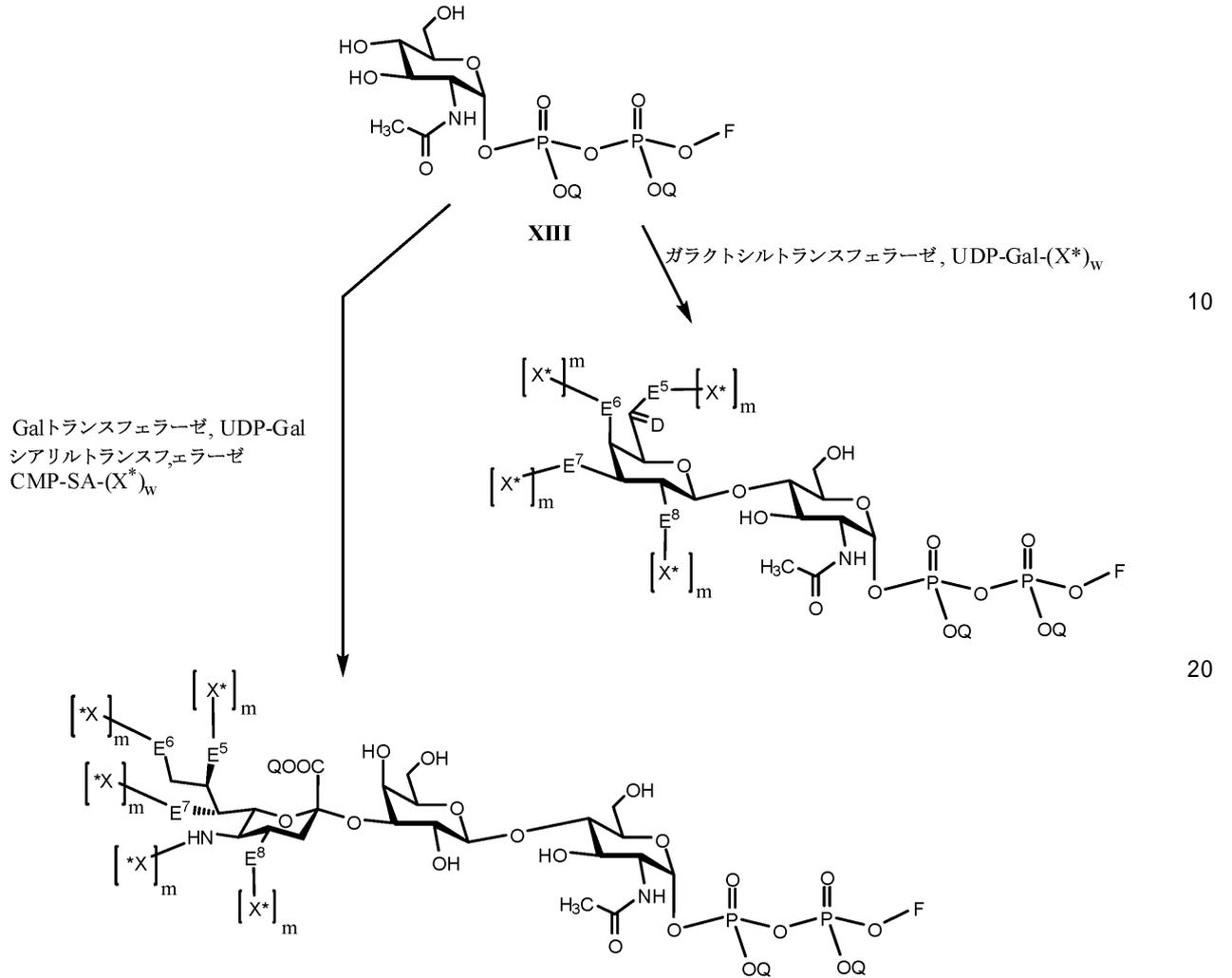
さらに別の実施態様において、スキーム 3 c における化合物 X I I I の第 1 の G l c N A c 成分は、修飾された G a l 成分に連結される。さらなる実施態様において、化合物 V I I I の第 1 の G l c N A c 成分は、最初に、G a l 成分に連結される。G a l 成分は、次に、修飾された S i a 又はノイラミン酸成分に連結される。これらの実施態様をスキーム 3 d において以下に例証する。

【 0 3 6 1 】

スキーム 3 d :

40

## 【化54】



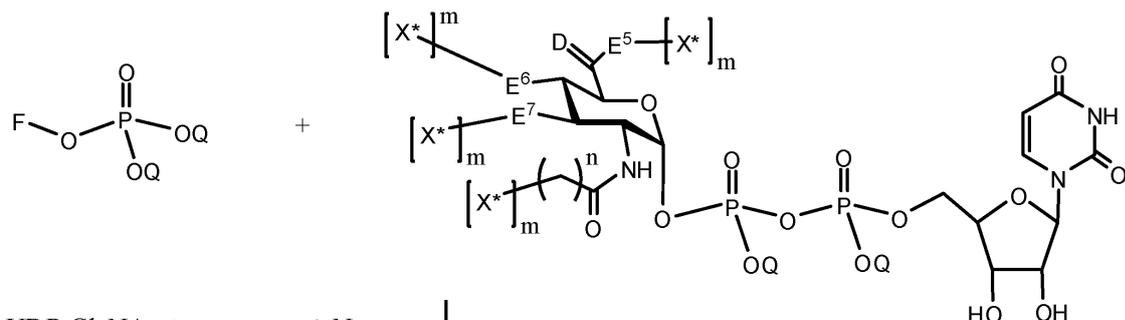
## 【0362】

別の実施態様において、リン脂質Xは、修飾された糖ヌクレオチド（例えば、修飾されたUDP-GlcNAc）と、適切なドリコールリン酸N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼの存在下で反応させ、修飾された脂質-リン酸糖又は脂質ピロリン酸糖を生じる。この実施態様の例示的な合成アプローチを、スキーム3eにおいて以下に例証する。

## 【0363】

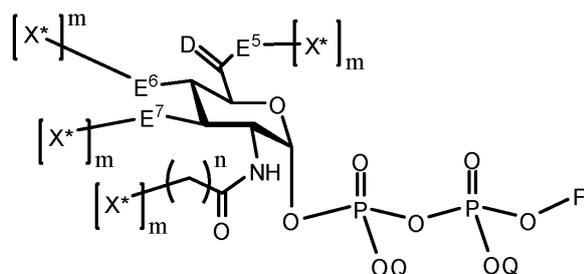
スキーム3e：

## 【化55】



UDP-GlcNAc-ドリコールリン酸 N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ (GPT)

10



20

## 【0364】

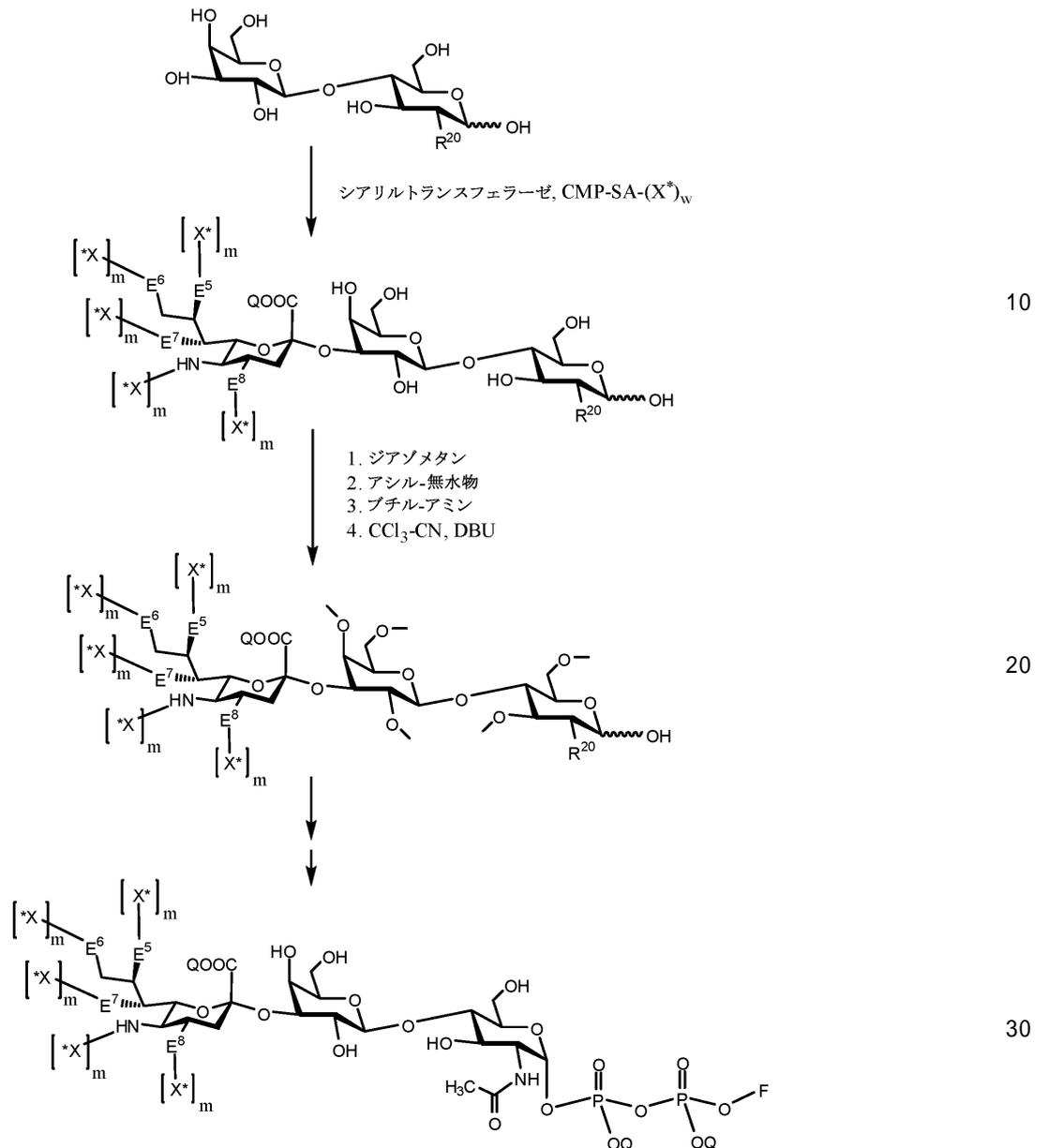
さらなる実施態様において、脂質 - リン酸糖又は脂質 - ピロリン酸糖が、スキーム 3 f において以下に概説される合成ルートに従って合成される。この例において、モノサッカライド又はポリサッカライド (例えば、Gal 成分を含むジサッカライド) は、最初に、修飾されたグリコシル成分 (例えば、修飾された Sia) に連結される。一例において、修飾されたグリコシル成分は、出発物質に、グリコシルトランスフェラーゼ (例えばシアリルトランスフェラーゼなど) 及び適切な修飾された糖ヌクレオチド (例えば、修飾された CMP - Sia) を使用して連結される。グリコシド OH 基は、次に、例えば、それらの対応するメチルエーテルとして保護されることがあり、結果として得られる保護された修飾サッカライドは、次に、リン酸脂質又はピロリン酸脂質に連結することができる。

30

## 【0365】

スキーム 3 f :

## 【化56】



式中、 $\text{R}^{20}$ は、 $\text{OH}$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHAc}$ 、 $\text{NHCO}$ アリアル、及び $\text{NHCO}$ アルキルより選択されるメンバーである。

## 【0366】

スキーム3c~3fにおいて、Fは本明細書において記載される脂質成分である；各Qは、H、単一の負電荷、及び陽イオン（例えば、 $\text{K}^+$ 又は $\text{Na}^+$ ）より非依存的に選択されるメンバーである。整数wは1~8より、好ましくは1~4より（例えば、Glc又はGal成分について）又は1~5（例えば、Sia成分について）選択される；整数nは0~40より選択される；及び、各整数mは0及び1より非依存的に選択されるメンバーである。mが0である場合、 $(\text{X}^*)_m$ はHで置換される。一例において、各 $\text{X}^*$ は、本明細書において記載される直鎖又は分岐ポリマー修飾基より非依存的に選択されるメンバーである。別の例において、 $\text{X}^*$ は、少なくとも1つのポリマー成分、例えばPEG成分など（例えば、mPEG）を含む。さらに別の例において、 $\text{X}^*$ は、ポリマー修飾基を分子の残部に連結するリンカー成分を含む。さらなる例において、各 $\text{X}^*$ は、本明細書において化学式(V)について記載される $\text{L}^b\text{-R}^{6c}$ である。E5、E6、E7、及びE8は、 $\text{CR}^1\text{R}^2$ （例えば、 $\text{CH}_2$ ）及び官能基、例えばO、S、 $\text{NR}^3$ （例えば、NH）

、C(O)、C(O)NR<sup>3</sup>（例えば、CONH）、NHC(O)、NHC(O)NH、NHC(O)Oなどより選択されるメンバーである；及び、Dは、H<sub>2</sub>（この場合において、二重結合は、2つの単結合で置換される）、O、S、NR<sup>3</sup>（例えば、NH）より非依存的に選択されるメンバーであり、それにおいて、各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、各R<sup>3</sup>、及び各R<sup>4</sup>は、H、置換又は非置換アルキル、置換又は非置換ヘテロアルキル、置換又は非置換アリール、置換又は非置換ヘテロアリール、及び置換又は非置換ヘテロシクロアルキルより非依存的に選択されるメンバーである。

【0367】

種々のグリコシルトランスフェラーゼ及び適切な修飾又は非修飾糖ヌクレオチドを使用して、リン酸糖又はピロリン酸糖の第1の糖成分が合成されうる（例えば、スキーム3における化合物VIIII）。例えば、第2のGlcnAc成分を第1のGlcnAc成分に加えることができる。第2のGlcnAc成分は、場合により、本発明の修飾基で修飾されうる（例えばスキーム3cと比較すること）。別の例において、修飾されたシアル酸成分は、酵素的に、リン酸糖又はピロリン酸糖のGlcnAc、GlcnAc-GlcnAc-、又はGlcnAc-GlcnAc-Gal成分に移されうる（例えばスキーム3cと比較すること）。あるいは、任意の他のグリコシル成分（例えば、Gal、GalNAcなど）は、第1の糖成分に、本明細書において記載される適切なグリコシルトランスフェラーゼを使用して加えることができる。

【0368】

修飾された糖残基を、既存の糖残基に、酵素的に、修飾された糖ヌクレオチド又は修飾された活性化糖を、適したグリコシルトランスフェラーゼ（それについて、修飾された糖種が基質である）を組み合わせて使用して加えてよい。故に、修飾された糖は、好ましくは、修飾された糖ヌクレオチド、活性化・修飾された糖、及び単純サッカライド（ヌクレオチドではなく、活性化もされていない）修飾された糖より選択される。典型的に、構造はモノサッカライドであるが、しかし、本発明は、修飾されたモノサッカライド糖の使用に限定されない。オリゴサッカライド、ポリサッカライド、及びグリコシル-模倣成分も有用である。

【0369】

別の実施態様において、グリコシル供与体種は、脂質-リン酸前駆体（例えば、ウンデカプレニル-リン酸）から、精製酵素（例えば、細菌又は酵母N-グリコシル化経路から）を使用して合成される。組換え酵素を使用したそのような反応は、KJ Glover et al. (PNAS 2005, 102(40): 14255-14259) により記載されており、その開示は本明細書において参照によりその全体が組み入れられる。例えば、PglCを使用して、UDP-バシロサミンからの修飾又は非修飾バシロサミン成分を、ウンデカプレニル-リン酸上に加えて、ウンデカプレニル-ピロリン酸連結バシロサミンを与えてよく、それは、さらに、ウンデカプレニル-ピロリン酸連結バシロサミンに、PglA及びUDP GalNAcを使用して変換させてよく、それにおいて、GalNAc成分は、場合により、修飾させることができる。追加の糖成分を、他の酵素（例えばPglHJ又はPglIなど）を使用して加えてよい。2つ又はそれ以上のこれらの反応は、単一の反応容器において実施してよい。2つ又はそれ以上の工程のための試薬（即ち、酵素及びヌクレオチド糖）を、連続的に又は同時に加えてよい。酵母経路からの例示的な酵素は、本発明のグリコシル供与体種を作製するために使用してよく、Alg1-14（例えば、Alg1、Alg2、Alg7、及びAlg13/14）を含む。

【0370】

修飾基を、糖成分に、酵素的手段、化学的手段、又はそれらの組み合わせにより付着させ、それにより修飾された糖を産生する。糖は、修飾基の付着を可能にする任意の位置で置換されるが、しかし、それによって、依然として、糖は、修飾された糖を脱離構造に連結するために使用される酵素の基質として機能することが可能になる。例示的な実施態様において、シアル酸が糖である場合、シアル酸は、ピルビル（pyruvyl）側鎖で、又は、通常はシアル酸においてアセチル化される5の位置のアミンで、修飾基で置換される。

10

20

30

40

50

## 【0371】

## 修飾された糖ヌクレオチド

本発明の特定の実施態様において、修飾された糖は利用し、修飾された糖成分をグリコシル供与体種の前駆体に加える。本発明において使用される例示的な糖ヌクレオチドは、それらの修飾された形状で、ヌクレオチドモノ、ジ、又はトリリン酸又はその類似体を含む。好ましい実施態様において、修飾された糖ヌクレオチドは、UDP - グリコシド、CMP - グリコシド、及びGDP - グリコシドより選択される。さらにより好ましくは、修飾された糖ヌクレオチドは、UDP - ガラクトース、UDP - ガラクトサミン、UDP - グルコース、UDP - グルコサミン、UDP - バシロサミン、UDP - 6 - ヒドロキシバシロサミン、GDP - マンノース、GDP - フコース、CMP - シアル酸、及びCMP - NeuAcより選択される。糖ヌクレオチドのN - アセチルアミン誘導体も、本発明の方法において有用である。

10

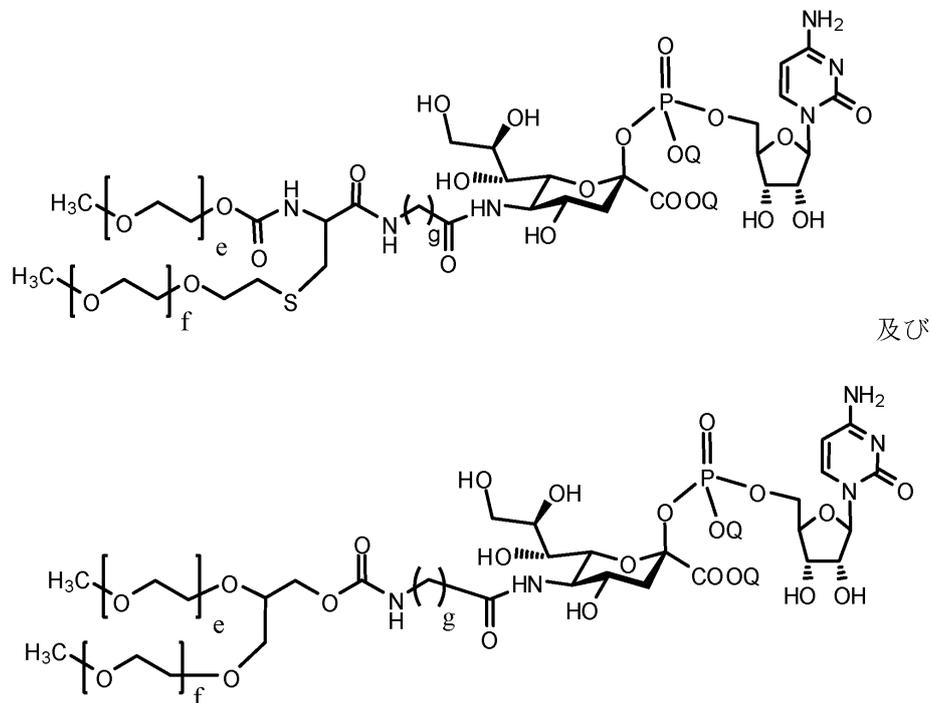
## 【0372】

一例において、ヌクレオチド糖種は水溶性ポリマーで修飾される。例示的な修飾された糖ヌクレオチドは、糖上のアミン成分を通じて修飾される糖基を持つ。修飾された糖ヌクレオチド（例えば、糖ヌクレオチドのサッカリル - アミン誘導体）も、本発明の方法において有用である。例えば、サッカリルアミン（修飾基を伴わない）を、酵素的に、ポリペプチド（又は他の種）に抱合させることができ、遊離サッカリルアミン成分を後に所望の修飾基に抱合させる。あるいは、修飾された糖ヌクレオチドは、修飾された糖をポリペプチド上のサッカリル受容体に転移させる酵素の基質として機能しうる。

20

例示的な修飾された糖ヌクレオチドは、例えば以下：

## 【化57】



30

40

（式中、e、f、及びQは本明細書において定義され、gは1～20より選択される整数である）の修飾されたシアル酸ヌクレオチドを含む。

## 【0373】

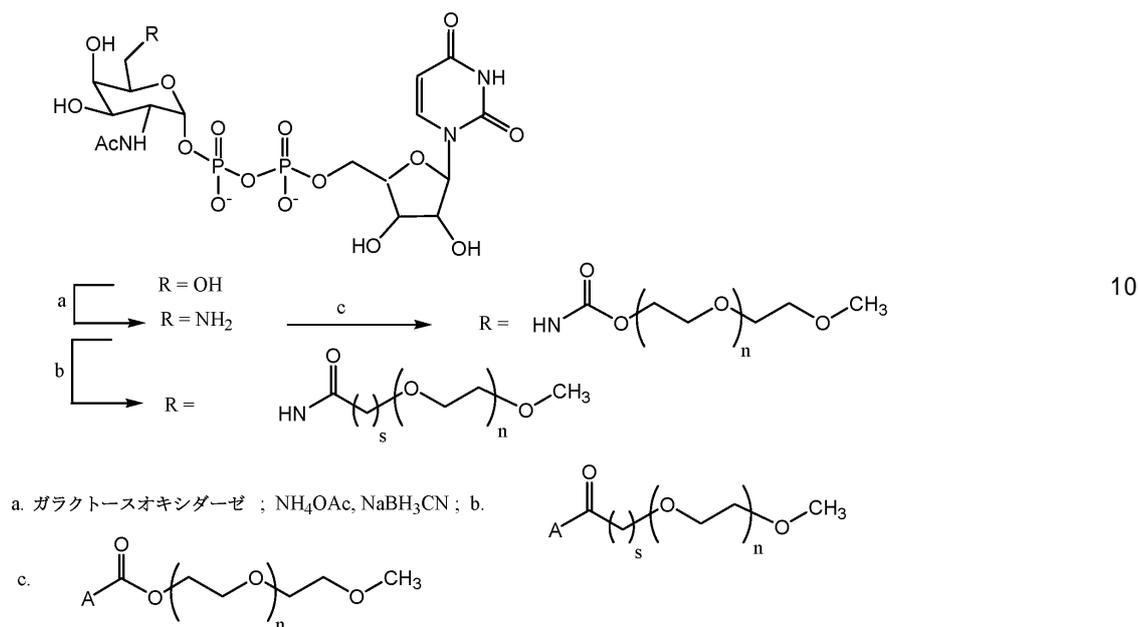
例示的な実施態様において、修飾された糖は、6 - アミノ - N - アセチル - グリコシル成分に基づく。スキーム4において以下に示す通り、N - アセチルガラクトサミンについて、修飾された糖ヌクレオチドは、標準的な方法を使用して容易に調製することができる。

## 【0374】

50

## スキーム 4 : 例示的な修飾された糖ヌクレオチドの調製

【化 5 8】



【 0 3 7 5 】

スキーム 4 において、上で、指数  $n$  は  $0 \sim 2500$ 、好ましくは  $10 \sim 1500$ 、より好ましくは  $10 \sim 1200$  の整数を表わす。記号「A」は、活性化基（例えば、ハロ）、活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）の成分、カーボネート（例えば、p-ニトロフェニルカーボネート）などを表わす。当業者は、他の PEG アミドヌクレオチドが、これ及び類似の方法により容易に調製されることを認識するであろう。

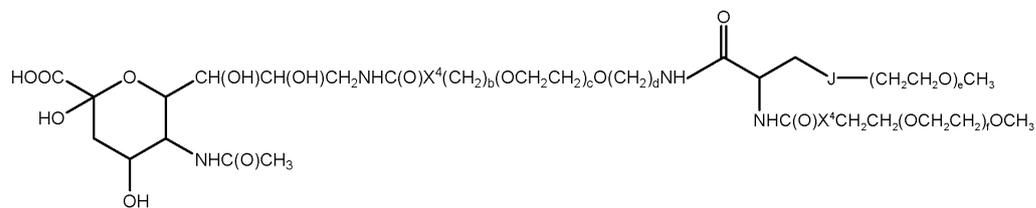
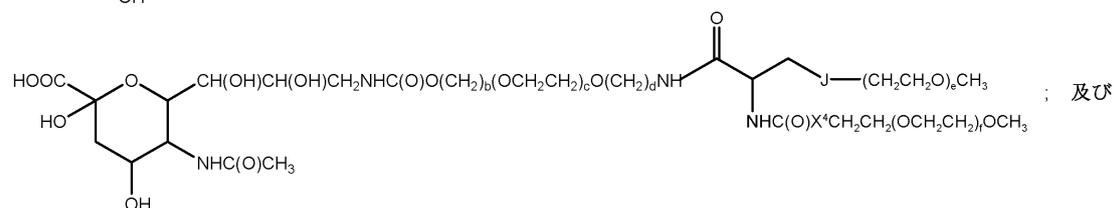
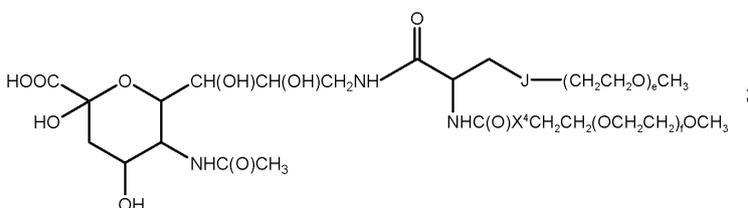
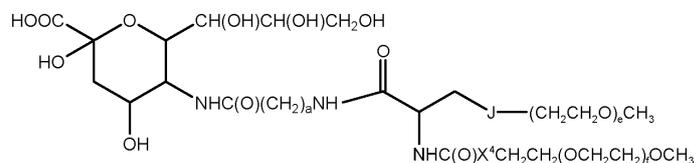
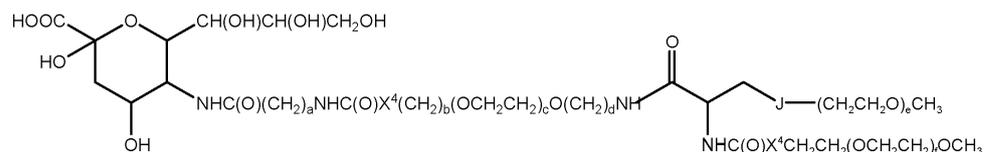
【 0 3 7 6 】

他の例示的な実施態様において、アミド成分は、基（例えばウレタン又は尿素など）により置換される。

【 0 3 7 7 】

さらなる実施態様において、 $R^1$  は分岐 PEG、例えば、上に記載する種の 1 つである。この実施態様の例証的な化合物は以下：

## 【化59】



10

20

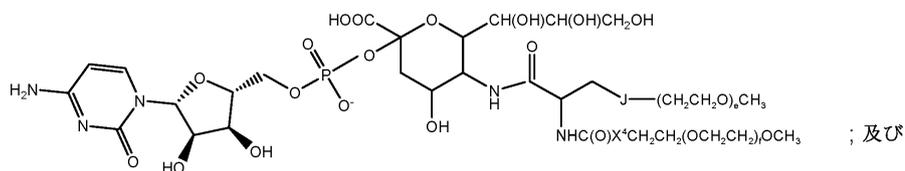
30

(式中、 $X^4$  は結合又はOであり、JはS又はOである)を含む。

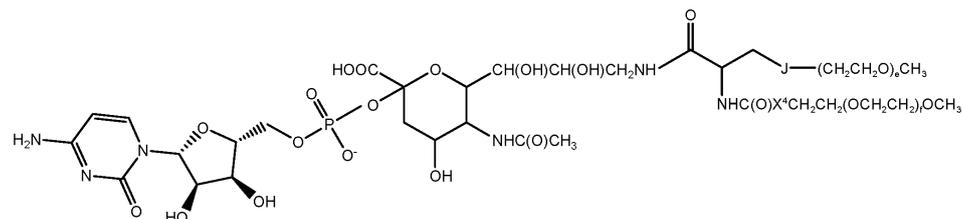
## 【0378】

さらに、上で考察した通り、本発明は、水溶性ポリマー(直鎖又は分岐のいずれかである)で修飾されるヌクレオチド糖を提供する。例えば、下に示す化学式:

## 【化60】



40



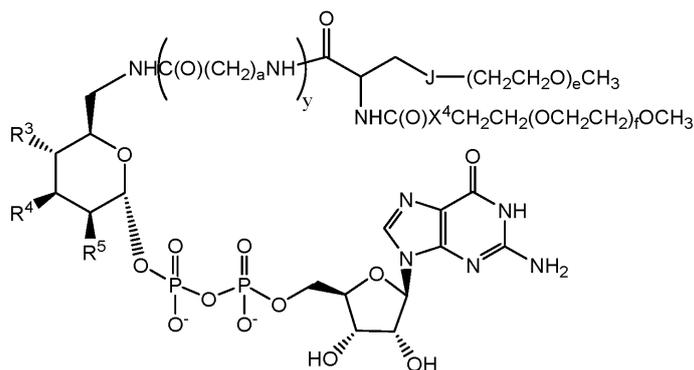
(式中、 $X^4$  はO又は結合であり、JはS又はOである)を有する化合物は、本発明の範囲内である。

50

## 【0379】

同様に、本発明は、それらの修飾された糖のヌクレオチド糖を使用して形成されるポリペプチド抱合を提供し、それにおいて6の位置の炭素が修飾される：

## 【化61】



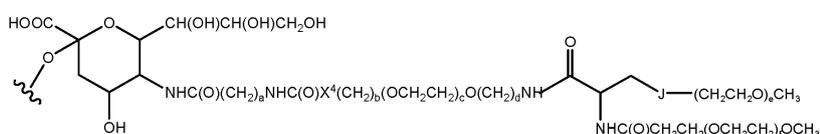
10

(式中、 $X^4$  は結合又はOであり、JはS又はOであり、yは0又は1である)。

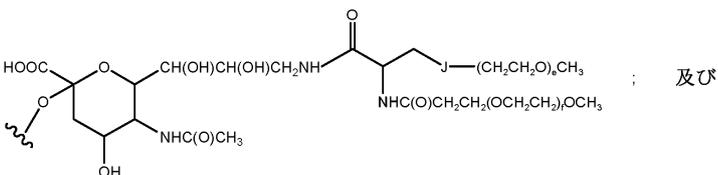
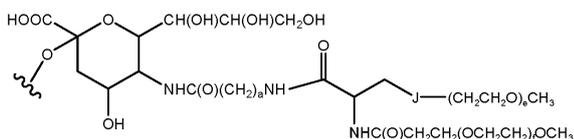
## 【0380】

また、以下の化学式：

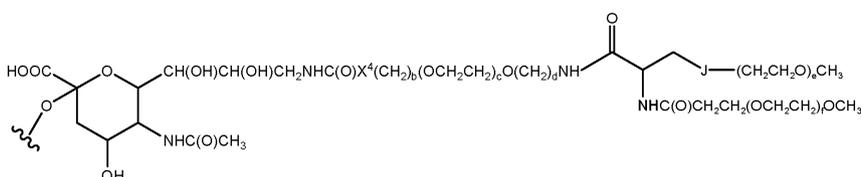
## 【化62】



20



30



40

(式中、JはS又はOである)を有するポリペプチド及びグリコペプチドを提供する。

## 【0381】

## 活性化された糖

他の実施態様において、修飾された糖は活性化された糖である。活性化及び修飾された糖は、本発明において有用であり、典型的に、合成的に改変され、脱離基を含むグリコシドである。一例において、活性化された糖を酵素反応において使用し、活性化された糖を、ポリペプチド又はグリコペプチド上の受容体上に転移させる。別の例において、活性化された糖を、化学的手段によりポリペプチド又はグリコペプチドに加える。「脱離基」(又は活性化基)は、それらの成分を指し、それらは酵素調節された求核置換反応において容易に置換され、又は、あるいは、求核反応パートナー(例えば、スルフヒドリル基を保

50

有するグリコシル成分)を利用した化学的反應において置換される。各型の反應のために適した脱離基を選択することは当業者の能力の範囲内である。多くの活性化された糖が、当技術分野において公知である。例えば、Vocadlo et al., In CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY, Vol. 2, Ernst et al. Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2000 ; Kodama et al., Tetrahedron Lett. 34: 6419 (1993); Lougheed, et al., J. Biol. Chem. 274: 37717 (1999)を参照のこと。

#### 【0382】

脱離基の例は、ハロゲン(例えば、フルオロ、クロロ、ブromo)、トシレートエステル、メシレートエステル、トリプレートエステルなどを含む。酵素媒介性反應において使用するための好ましい脱離基は、グリコシドの受容体への酵素的転移を、有意に、立体的に邪魔しないものである。したがって、活性化されたグリコシド誘導体の好ましい実施態様は、グリコシルフルオライド及びグリコシルメシレートを含み、グリコシルフルオライドが特に好ましい。グリコシルフルオライドの内、 $\alpha$ -ガラクトシルフルオライド、 $\alpha$ -マンノシルフルオライド、 $\alpha$ -グルコシルフルオライド、 $\alpha$ -フコシルフルオライド、 $\alpha$ -キシロシルフルオライド、 $\alpha$ -シアリルフルオライド、 $N$ -アセチルグルコサミニルフルオライド、 $N$ -アセチルガラクトサミニルフルオライド、 $\alpha$ -ガラクトシルフルオライド、 $\alpha$ -マンノシルフルオライド、 $\alpha$ -グルコシルフルオライド、 $\alpha$ -フコシルフルオライド、 $\alpha$ -キシロシルフルオライド、 $\alpha$ -シアリルフルオライド、 $N$ -アセチルグルコサミニルフルオライド、及び $N$ -アセチルガラクトサミニルフルオライドが最も好ましい。非酵素的な求核置換では、これら及び他の脱離基が有用でありうる。例えば、活性化された供与体グリコシドは、ジニトロフェニル(DNP)、又はブromo-グリコシドでありうる。

#### 【0383】

例証として、グリコシルフルオライドを、糖成分を最初にアセチル化し、次にHF/ピリジンで処理することにより、遊離糖から調製することができる。これによって、保護された(アセチル化された)グリコシルフルオライド(即ち、 $\alpha$ -グリコシルフルオライド)の熱力学的に最も安定なアノマーが生成される。それほど安定ではないアノマー(即ち、 $\beta$ -グリコシルフルオライド)が望ましい場合、それは、ペルアセチル化糖をHBr/HOAc又はHClを用いて変換し、アノマーブromide又はクロライドを生成することにより調製することができる。この中間体をフッ化塩(例えばフッ化銀など)と反応させて、グリコシルフルオライドを生成させる。アセチル化グリコシルフルオライドを、メタノール(例えば、NaOMe/MeOH)中の弱(触媒)塩基を用いた反應により脱保護させてよい。また、多くのグリコシルフルオライドが市販されている。

#### 【0384】

他の活性化されたグリコシル誘導体は、当業者に公知の従来方法を使用して調製することができる。例えば、グリコシルメシレートを、メシルクロライドを用いた、完全にベンジル化されたヘミアセタール形状の糖の処理、続くベンジル基を除去するための触媒水素化により調製することができる。

#### 【0385】

さらなる例示的な実施態様において、修飾された糖は、アンテナ構造を有するオリゴサッカライドである。別の実施態様において、アンテナの1つ又は複数の末端は、修飾成分を持つ。複数の修飾成分を、アンテナ構造を有するオリゴサッカライドに付着させる場合、オリゴサッカライドは、修飾成分を「増幅させる」ために有用である；ポリペプチドに抱合させた各オリゴサッカライド単位は、複数コピーの修飾基をポリペプチドに付着させる。上の図面において記載する本発明の典型的な抱合体の一般的な構造は、アンテナ構造を利用した本発明の抱合体の調製に起因する多価種を包含する。多くのアンテナサッカライド構造が、当技術分野において公知であり、本方法はそれらを用いて、限定なく実行することができる。

#### 【0386】

修飾された糖の調製

一般的に、糖成分（脂質 - ピロリン酸糖のものを含む）と修飾基の間の共有結合は、典型的に、連結プロセスにより新たな有機官能基又は非反応性種に転換される反応性官能基の使用を通じて形成される。結合を形成するために、修飾基及び糖成分は、相補的な反応性官能基を保有する。反応性官能基は、糖成分上の任意の位置に位置付けることができる。

#### 【 0 3 8 7 】

本発明を実行する際に有用な反応性基及び反応のクラスは、一般的に、バイオコンジュゲート (bioconjugate) 化学の分野において周知のものである。反応性糖成分と利用可能な現在好適なクラスの反応は、比較的穏やかな条件下で進行するものである。これらは、しかし限定されないが、求核性置換（例えば、アミン及びアルコールとアシルハライド、活性エステルとの反応）、求電子置換（例えば、エナミン反応）、及び炭素 - 炭素及び炭素 - ヘテロ原子多重結合への付加（例えば、マイケル反応、ディールス - アルダー付加）を含む。これらの及び他の有用な反応は、例えば、March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY* 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; 及び Feeney et al., *MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C.1982において考察されている。

#### 【 0 3 8 8 】

##### 反応性官能基

糖核又は修飾基からペンダント状の有用な反応性官能基は、しかし限定されないが、以下：

( a ) カルボキシル基及びそれらの種々の誘導体、しかし限定されないが、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、N - ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、酸ハライド、アシルイミダゾール、チオエステル、p - ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニル及び芳香族エステルを含む；

( b ) アルデヒド等に転換できるヒドロキシル基（例えば、エステル、エーテル）；

( c ) ハロアルキル基、それにおいてハライドは、例えばアミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルバニオン、又はアルコキシドイオンなどの求核性基で後に置換することができ、それによりハロゲン原子の官能基での新たな基の共有結合をもたらす；

( d ) ディールス - アルダー反応に関与することが可能なジエノフィル基、例えばマレイミド基など；( e ) 後の誘導化が、例えばイミン、ヒドラゾン、セミカルバゾン又はオキシムなどのカルボニル誘導体の形成を介して、あるいはグリニャール付加又はアルキルリチウム付加などの機構を介して可能となるアルデヒド又はケトン基；

( f ) 例えば、スルホンアミドを形成するために、アミンとの後の反応のためのスルホニルハライド基；

( g ) 例えば、ジスルフィドに変換される、又は、アシルハライドと反応することができるチオール基；

( h ) 例えば、アシル化、アルキル化又は酸化されうるアミン基又はスルフヒドリル基；

( i ) 例えば、付加環化、アシル化、マイケル付加などを受けることができるアルケン；及び

( j ) 例えば、アミン及びヒドロキシル化合物と反応することができるエポキシドを含む。

#### 【 0 3 8 9 】

反応性官能基は、それらが反応性糖核 (reactive sugar nucleus) 又は修飾基の集合に必要な反応に関与せず、又は妨害しないように選択することができる。あるいは、反応性官能基は、保護基の存在により反応へ関与することから保護することができる。当業者は、選択した組の反応条件を妨害しないように、どのように特定の官能基を保護するかを理解している。有用な保護基の例については、Greene et al., *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, New York, 1991を参照のこと。

## 【0390】

## 架橋基

本発明の方法における使用のための修飾された糖の調製には、修飾基の糖残基への付着、及びグリコシルトランスフェラーゼの基質である安定な付加物の形成を含む。糖及び修飾基は、ゼロ又はそれより高いオーダーの架橋剤により共役させることができる。修飾基を炭水化物成分に付着させるために使用することができる例示的な二官能性化合物は、しかし限定されないが、二官能性ポリ(エチレングリコール)、ポリアミド、ポリエーテル、ポリエステルなどを含む。炭水化物を他の分子に連結するための一般的アプローチは、文献において公知である。例えば、Lee et al., *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia et al., *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 88 10  
86 (1990)及びBednarski et al., WO 92/18135を参照のこと。続く考察において、反応基は、新生の修飾された糖の糖成分上で良性(benign)として処理される。この考察に焦点は、例証の明確さのためである。当業者は、考察が修飾基上の反応基にも関連することを理解するであろう。

## 【0391】

種々の試薬を使用して、分子内の化学架橋で修飾糖の成分を修飾する(架橋試薬及び架橋手順の総説に関しては: Wold, F., *Meth. Enzymol.* 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., and Cooney, D. A., In: *ENZYMES AS DRUGS*. (Holcenberg, and Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., *Meth. Enzymol.* 91: 580-609, 1983; Mattson et al., *Mol. Biol. Rep.* 17: 167-183, 1993を参照のこと(これら全てが本明細書 20  
において参照により組み入れられる))。好ましい架橋試薬は、種々のゼロ長(zero-length)、ホモ二官能性、及びヘテロ二官能性架橋試薬に由来する。ゼロ長架橋試薬は、外因性物質の導入を伴わない、2つの内因性化学基の直接的抱合を含む。ジスルフィド結合の形成を触媒する薬剤は、このカテゴリーに属する。別の例は、カルボキシルと一級アミノ基の縮合を誘導して、アミド結合を形成する試薬、例えばカルボジイミド、エチルクロロホルメート、ウッドワード(Woodward's)試薬K-(2-エチル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホン酸)、及びカルボニルイミダゾールなどである。これらの化学試薬に加えて、酵素トラスングルタミナーゼ(グルタミル-ペプチド-グルタミルトランスフェラーゼ; EC 2.3.2.13)をゼロ長架橋試薬として使用してよい。 30  
この酵素は、通常、基質として一級アミノ基を用いて、タンパク質-結合グルタミニル残基のカルボキサミド基でアシル転移反応を触媒する。好ましいホモ及びヘテロ二官能性試薬は、それぞれ2つの同一又は2つの非類似部位を含み、それらはアミノ、スルフヒドリル、グアニジノ、インドール、又は非特異的基について反応性となりうる。

## 【0392】

部位特異的な反応性成分の使用に加えて、本発明では、糖を修飾基に連結するための非特異的反応基の使用を熟慮する。

## 【0393】

例示的な非特異的架橋剤は、暗中で完全に不活性化可能な(photoactivatable)基を含み、それは適切なエネルギーの光子の吸収時に反応性種に変換される。一実施態様において、光活性化可能な基は、アジドの加熱又は光分解時に生成されるニトレンの前駆体より選択される。電子欠損ニトレンは極めて反応性であり、N-H、O-H、C-H、及びC=Cを含む種々の化学結合と反応することができる。3型のアジド(アリール、アルキル、及びアシル誘導体)を用いてよいが、アリールアジドが現在好適である。光分解時のアリールアジドの反応性は、C-H結合よりもN-H及びO-Hでより良い。電子欠損アリールニトレンは迅速に環が拡大してデヒドロアゼピンを形成し、それはC-H挿入産物を形成するより、求核性物質と反応する傾向がある。アリールアジドの反応性は、電子吸引置換基、例えば環中のニトロ基又はヒドロキシル基などの存在により増加させることができる。そのような置換基は、アリールアジドの最大吸収をより長い波長に押す(push)。非置換アリールアジドは260~280nmに範囲において最大吸収を有し、ヒドロキシ及びニトロアリールアジドは305nmを越えて有意な光を吸収する。従って、ヒド 40  
50

ロキシ及びニトロアリアルアジドが最も好ましい。なぜなら、それらでは、非置換アリアルアジドよりも親和性成分についてより害が少ない光分解条件を用いることを可能にするためである。

#### 【0394】

さらなる実施態様において、リンカー基には、切断されて糖残基から修飾基を放出することができる基が提供される。多くの切断可能基が当該技術分野において公知である。例えばJung et al., *Biochem. Biophys. Acta* 761: 152-162 (1983); Joshi et al., *J. Biol. Chem.* 265: 14518-14525 (1990); Zarling et al., *J. Immunol.* 124: 913-920 (1980); Bouizar et al., *Eur. J. Biochem.* 155: 141-147 (1986); Park et al., *J. Biol. Chem.* 261: 205-210 (1986); Browning et al., *Immunol.* 143: 1859-1867 (1989)を参照のこと。さらに、広範な切断可能な二官能性（ホモ及びヘテロ二官能性の両方）リンカー基が供給源（例えばPierceなど）から市販されている。

10

#### 【0395】

例示的な切断可能成分は、光、熱、又は試薬（例えばチオール、ヒドロキシルアミン、塩基、過ヨウ素酸塩など）を使用して切断することができる。さらに、特定の好ましいは、エンドサイトーシスに反応してインピボで切断される（例えば、シス-アコニチル；Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048 (1991)を参照のこと）。好ましい切断可能基は、ジスルフィド、エステル、イミド、カーボネート、ニトロベンジル、フェナシル、及びベンゾイン基からなる群より選択されるメンバーである切断可能成分を含む。

20

#### 【0396】

続く考察において、本発明の実行において有用である修飾された糖の多くの具体例が記載されている。例示的な実施態様において、シアル酸誘導体を糖核として利用し、それに修飾基を付着させる。シアル酸誘導体に関する考察の焦点は、例証の明確さだけのためであり、本発明の範囲を限定すると解釈すべきではない。当業者は、例としてシアル酸を使用して記載されるものと類似の方法で、種々の他の糖成分を活性化させ、誘導化することができることを理解するであろう。例えば、ガラクトース、グルコース、N-アセチルガラクトサミン、及びフコースを修飾して、当該技術分野で認識されている方法により容易に修飾される数個の糖基質を名付けるために多数の方法を利用することができる。例えば、Elhalabi et al., *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999)及びSchafer et al., *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000)を参照のこと。

30

#### 【0397】

例示的な実施態様において、本発明の方法により修飾されるポリペプチドは、原核細胞（例えば、大腸菌）、真核細胞（酵母及び哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）を含む）、又はトランスジェニック動物において産生されるグリコペプチドであり、このようにしてN-及び/又はO-連結オリゴサッカライド鎖を含み、それらは不完全にシアル化されている。シアル酸を欠き、末端ガラクトース残基を含むグリコペプチドのオリゴサッカライド鎖は、糖PEG化、糖PPG化、又は別の方法で、修飾されたシアル酸を用いて修飾することができる。

#### 【0398】

スキーム5において、アミノグリコシド1を、保護されたアミノ酸（例えば、グリシン）誘導体の活性化エステルを用いて処理し、糖のアミン残基を対応する保護されたアミノ酸アミド付加物に変換させる。付加物を、アルドラーゼを用いて処理し、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボキシレート2を形成する。化合物2を、CMP-SAシンターゼの作用により対応するCMP誘導体へ変換させ、続いてCMP誘導体の触媒的水素付加により化合物3を産生させる。グリシン付加物の形成を介して導入されたアミンは、化合物3を活性化(m- )PEG又は(m- )PPG誘導体と反応させることによりPEG又はPPG付着の位置として利用して（例えば、PEG-C(O)NHS、PPG-C(O)NHS）、それぞれ4又は5を産生する。

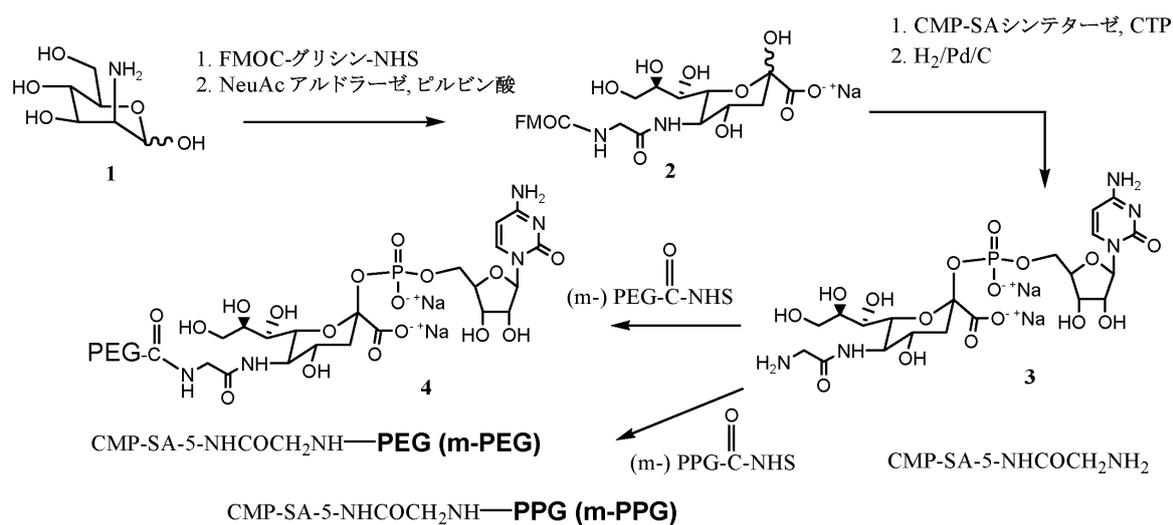
40

#### 【0399】

50

## スキーム 5

## 【化 6 3】



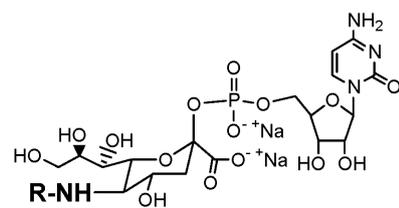
## 【 0 4 0 0 】

以下の表 1 1 には、PEG 又は PPG 成分を用いて誘導化される糖ーリン酸の代表例が記載される。表 2 の特定の化合物が、スキーム 4 の方法により調製される。他の誘導体は、当技術分野で認識されている方法により調製される。例えば、Keppler et al., *Glycobiology* 11: 11R (2001); 及び Charter et al., *Glycobiology* 10: 1049 (2000) を参照のこと。他のアミン反応性 PEG 及び PPG 類似体は市販されているか、又は、当業者が容易に入手できる方法により調製することができる。

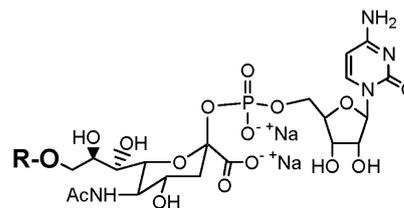
## 【 0 4 0 1 】

表 1 1 : PEG 又は PPG を用いて誘導体化された糖ーリン酸の例

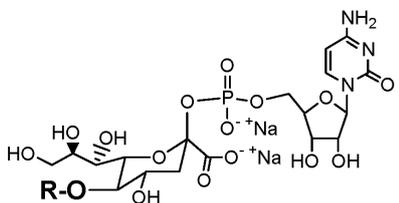
## 【化64】



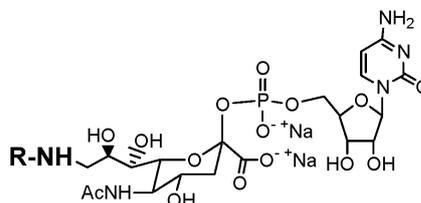
CMP-SA-5-NH-R



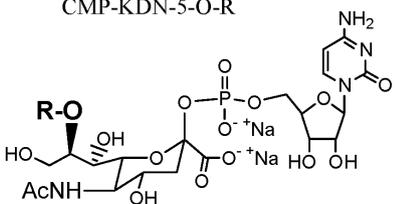
CMP-NeuAc-9-O-R



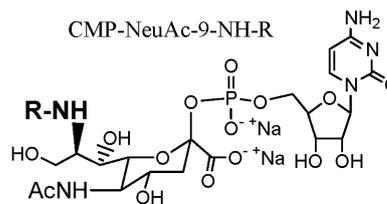
CMP-KDN-5-O-R



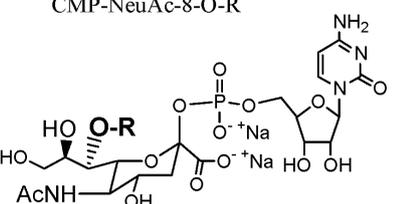
CMP-NeuAc-9-NH-R



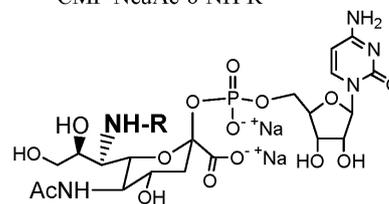
CMP-NeuAc-8-O-R



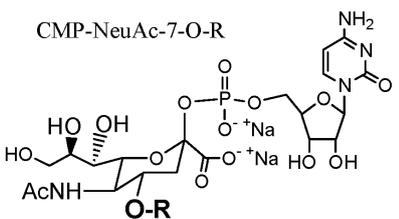
CMP-NeuAc-8-NH-R



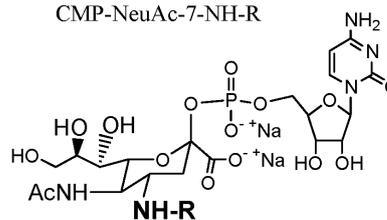
CMP-NeuAc-7-O-R



CMP-NeuAc-7-NH-R



CMP-NeuAc-4-O-R

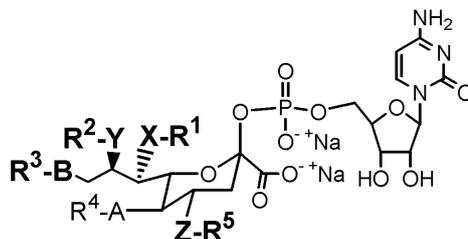


CMP-NeuAc-4-NH-R

## 【0402】

本発明を実行する際に使用される修飾された糖リン酸を、他の位置ならびに上に記載する位置において置換することができる。シアル酸のこの好ましい置換基を化学式(VII I) :

## 【化65】



(VII I)

(式中、Xは、好ましくは - O -、- N(H) -、- S、CH<sub>2</sub> -、及びN(R)<sub>2</sub>より選択される連結基であり、それにおいて、各RはR<sup>1</sup> ~ R<sup>5</sup>より非依存的に選択されるメ

10

20

30

40

50

ンバーである)において記載する。記号Y、Z、A、及びBは、各々がXの同一性について上に記載される基より選択される基を表す。X、Y、Z、A、及びBは、各々が非依存的に選択され、従って、それらが同じ又は異なりうる。記号R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、及びR<sup>5</sup>は、H、水溶性ポリマー、治療用成分、生体分子、又は他の成分を表す。あるいは、これらの記号は、水溶性ポリマー、治療用成分、生体分子、又は他の成分に結合したリンカーを表す。

#### 【0403】

本明細書において開示する抱合体に付着する例示的な成分は、しかし限定されないが、PEG誘導體(例えば、アルキル-PEG、アシル-PEG、アシル-アルキル-PEG、アルキル-アシル-PEGカルバモイル-PEG、アリール-PEG)、PPG誘導體(例えば、アルキル-PEG、アシル-PPG、アシル-アルキル-PPG、アルキル-アシル-PPGカルバモイル-PPG、アリール-PPG)、治療用成分、診断用成分、マンノース-6-リン酸、ヘパリン、ヘパラン、SLe<sub>x</sub>、マンノース、マンノース-6-リン酸、シアリルルイスX、FGF、VFGF、タンパク質、コンドロイチン、ケラタン、デルマタン、アルブミン、インテグリン、アンテナ状オリゴサッカライド、ペプチドなどを含む。種々の修飾基をサッカライド成分に抱合する方法は、当業者が容易に入手できる(POLY(ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series No. 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; 及びDunn et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C 1991)。

#### 【0404】

例示的な戦略は、ヘテロ二官能性架橋剤SPDP(n-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)を使用すること、及び次に修飾基上の別のスルフィドリルとのジスルフィド結合の形成のためにスルフィドリルを脱保護することを含む。

#### 【0405】

SPDPがグリコシルトランスフェラーゼの基質として作用する修飾された糖の能力に悪影響を及ぼす場合、一連の他の架橋剤、例えば2-イミノチオラン又はN-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート(SATA)などの1つを使用して、ジスルフィド結合を形成する。2-イミノチオランは一級アミンと反応し、直ちに非保護スルフィドリルがアミン含有分子に組み入れられる。SATAも一級アミンと反応するが、しかし、保護されたスルフィドリルを組み入れ、それは後にヒドロキシルアミンを使用して脱アセチル化され、遊離スルフィドリルを産生する。各々の場合において、組み入れられたスルフィドリルは、他のスルフィドリル又は保護されたスルフィドリルとSPDPのように自由に反応し、要求されるジスルフィド結合を形成する。

#### 【0406】

上記の戦略は例示的であり、本発明において使用する架橋剤を限定しない。他の架橋剤を利用可能であり、それらは修飾基をポリペプチドに架橋するための様々な戦略において使用することができる。例えば、TPCH(S-(2-チオピリジル)-L-システインヒドラジド及びTPMPH(S-(2-チオピリジル)メルカプト-プロピオノヒドラジド)は、穏やかな過ヨウ素酸塩処理により以前に酸化された炭水化物成分と反応し、このように架橋剤のヒドラジド部分と過ヨウ素酸塩が生成したアルデヒドの間にヒドラゾン結合を形成する。TPCH及びTPMPHは2-ピリジルチオン保護スルフィドリル基を糖上に導入し、それはDTTで脱保護することができ、そして後に抱合のために使用される(例えば成分間でのジスルフィド結合の形成など)。

#### 【0407】

ジスルフィド結合が安定な修飾された糖を産生するには不適であることが見出された場合、成分間により安定な結合を組み入れる他の架橋剤を使用してよい。ヘテロ二官能性架

10

20

30

40

50

橋剤 G M B S ( N - ガンマ - マレイミドブチリルオキシ ) スクシンイミド ) 及び S M C C ( スクシンイミジル 4 - ( N - マレイミド - メチル ) シクロヘキサン ) は一級アミンと反応し、このようにしてマレイミド基を成分上に導入する。マレイミド基は、後に、以前に言及した架橋剤により導入することができる他の成分上のスルフヒドリルと反応し、このようにして成分間に安定なチオエーテル結合を形成する。成分間の立体障害がいずれかの成分の活性又は修飾された糖がグリコシルトランスフェラーゼの基質として作用する能力を妨害する場合、成分間に長いスペーサーアームを導入し、そして以前に言及した架橋剤 ( 即ち、S P D P ) の一部の誘導体を含む架橋剤を使用することができる。このように、有用である適した架橋剤が豊富に存在する：その各々が、最適なポリペプチド抱合体及び修飾された糖の産生に有する効果に依存して選択される。

10

#### 【 0 4 0 8 】

種々の試薬を使用して、分子内の化学架橋で修飾糖の成分を修飾する ( 架橋試薬及び架橋手順の総説に関しては : Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., and Cooney, D. A., In: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, and Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson et al., Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993を参照のこと ( これら全てが本明細書において参照により組み入れられる ) ) 。好ましい架橋試薬は、種々のゼロ長、ホモ二官能性、及びヘテロ二官能性架橋試薬に由来する。ゼロ長架橋試薬は、外因性物質の導入を伴わない、2つの内因性化学基の直接的抱合を含む。ジスルフィド結合の形成を触媒する薬剤は、このカテゴリーに属する。別の例は、カルボキシルと一級アミノ基の縮合を誘導して、アミド結合を形成する試薬、例えばカルボジイミド、エチルクロロホルメート、ウッドワード試薬 K ( 2 - エチル - 5 - フェニルイソオキサゾリウム - 3 ' - スルホン酸 ) 、及びカルボニルイミダゾールなどである。これらの化学試薬に加えて、酵素トラスングルタミナーゼ ( グルタミル - ペプチド - グルタミルトランスフェラーゼ ; E C 2 . 3 . 2 . 1 3 ) をゼロ長架橋試薬として使用してよい。この酵素は、通常、基質として一級アミノ基を用いて、タンパク質 - 結合グルタミル残基のカルボキサミド基でアシル転移反応を触媒する。好ましいホモ及びヘテロ二官能性試薬は、それぞれ2つの同一又は2つの非類似部位を含み、それらはアミノ、スルフヒドリル、グアニジノ、インドール、又は非特異的基について反応性となりうる。

20

#### 【 0 4 0 9 】

架橋試薬中の好ましい特異的部位

##### 1 . アミノ反応基

一実施態様において、架橋剤上の部位はアミノ反応基である。アミノ反応基の有用な非限定的な例は、N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) エステル、イミドエステル、イソシアネート、アシルハライド、アリアルアジド、p - ニトロフェニルエステル、アルデヒド、及びスルホニルクロライドを含む。

30

#### 【 0 4 1 0 】

N H S エステルは、修飾された糖成分の一級 ( 芳香族を含む ) アミノ基と優先的に反応する。ヒスチジンのイミダゾール基は一級アミンと反応を競合するが、反応産物は不安定であり、容易に加水分解される。この反応は、N H S エステルの酸カルボキシル上でのアミンの求核的攻撃が含み、アミドを形成してN - ヒドロキシスクシンイミドを放出する。このように、元のアミノ基の正電荷が失われる。

40

#### 【 0 4 1 1 】

イミドエステルは、修飾された糖成分のアミン基との反応のための最も特異的なアシル化試薬である。p H 7 ~ 1 0 で、イミドエステルは一級アミンとだけ反応する。一級アミンはイミデートを求核的に攻撃し、高p Hでアミジンに、又は低p Hで新たなイミデートに分解する中間体を産生する。この新たな中間体は別の一級アミンと反応することができ、このように、推定上、単官能性イミデートが二官能的に反応する場合、2つのアミノ基を架橋する。一級アミンとの反応の主な産物は、元のアミンよりも強い塩基であるアミジンである。元のアミノ基の正電荷が、従って、保持される。

50

## 【0412】

イソシアネート（及びイソチオシアネート）は、修飾された糖成分の一級アミンと反応して、安定な結合を形成する。スルフヒドリル基、イミダゾール基、及びチロシル基とそれらの反応は、比較的不安定な産物を与える。

## 【0413】

アシルアジドもアミノ特異的試薬として使用され、それにおいて親和性成分の求核性アミンがわずかにアルカリ条件下、例えばpH 8.5で酸性カルボキシル基を攻撃する。

## 【0414】

アリールハライド、例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなどは、修飾された糖成分のアミノ基及びチロシンフェノール基と優先的に反応するが、しかし、スルフヒドリル基及びイミダゾール基とも反応する。

10

## 【0415】

モノ及びジカルボン酸のp-ニトロフェニルエステルも有用なアミノ反応基である。試薬の特異性はそれほど高くないが、-及び-アミノ基は最も迅速に反応するように見える。

## 【0416】

アルデヒド（例えばグルタルアルデヒドなど）は、修飾された糖の一級アミンと反応する。不安定なシッフ塩基がアミノ基とアルデヒドのアルデヒドとの反応で形成されるが、グルタルアルデヒドは安定な架橋で修飾糖を修飾することが可能である。pH 6~8で（このpHは典型的な架橋条件である）、環状ポリマーは脱水を受けて-不飽和アルデヒドポリマーを形成する。シッフ塩基は、しかし、別の二重結合と抱合した時に安定である。両方の二重結合の共鳴的相互作用は、シッフ連結の加水分解を妨げる。さらに、アミンは、高い局所濃度で、エチレン二重結合を攻撃し、安定なマイケル付加産物を形成することができる。

20

## 【0417】

芳香族スルホニルクロライドは、修飾された糖成分の種々の部位と反応するが、しかし、安定なスルホンアミド連結を生じるアミノ基との反応が最も重要である。

## 【0418】

## 2. スルフヒドリル反応基

別の実施態様において、部位はスルフヒドリル反応基である。スルフヒドリル反応基の有用な非限定的な例は、マレイミド、アルキルハライド、ピリジルジスルフィド、及びチオフタルイミドを含む。

30

## 【0419】

マレイミドは修飾された糖成分のスルフヒドリル基と優先的に反応し、安定なチオエーテル結合を形成する。それらは、また、ずっと遅い速度で、一級アミノ基及びヒスチジンのイミダゾール基と反応する。しかし、pH 7では、マレイミド基はスルフヒドリルに特異的な基と考えることができる。なぜなら、このpHで、単純チオールの反応速度は、対応するアミンの反応速度よりも1000倍大きいからである。

## 【0420】

アルキルハライドは、スルフヒドリル基、スルフィド、イミダゾール、及びアミノ基と反応する。中性からわずかにアルカリ性のpHでは、しかし、アルキルハライドは主にスルフヒドリル基と反応し、安定なチオエーテル結合を形成する。より高pHで、アミノ基との反応が好適である。

40

## 【0421】

ピリジルジスルフィドは、ジスルフィド交換を介して遊離スルフヒドリルと反応し、混合ジスルフィドを与える。結果として、ピリジルジスルフィドは最も特異的なスルフヒドリル反応基である。

## 【0422】

チオフタルイミドは遊離スルフヒドリル基と反応し、ジスルフィドを形成する。

## 【0423】

50

### 3. カルボキシル反応性残基

別の実施態様において、水及び有機溶媒の両方において可溶性のカルボジイミドをカルボキシル反応試薬として使用する。これらの化合物は遊離カルボキシル基と反応してブソイドウレアを形成し、次にこれは利用可能なアミンに共役してアミド連結を生じることができる。カルボジイミドを用いてカルボキシル基を修飾する方法が教示されている (Yamada et al., Biochemistry 20: 4836-4842, 1981)。

#### 【0424】

架橋試薬中の好ましい非特異的部位

部位特異的な反応成分の使用に加えて、本発明では、糖を修飾基に連結するための非特異的反応基の使用を熟慮する。

10

#### 【0425】

例示的な非特異的架橋剤は、暗中で完全に不活性な光活性化可能な基を含み、それは適切なエネルギーの光子の吸収時に反応性種に変換される。一実施態様において、光活性化可能な基は、アジドの加熱又は光分解時に生成されるニトレンの前駆体より選択される。電子欠損ニトレンは極めて反応性であり、N-H、O-H、C-H、及びC=Cを含む種々の化学結合と反応することができる。3型のアジド(アリール、アルキル、及びアシル誘導体)を用いてよいが、アリールアジドが現在好適である。光分解時のアリールアジドの反応性は、C-H結合よりもN-H及びO-Hでより良い。電子欠損アリールニトレンは迅速に環が拡大してデヒドロアゼピンを形成し、それはC-H挿入産物を形成するより、求核性物質と反応する傾向がある。アリールアジドの反応性は、電子吸引置換基、例えば環中のニトロ基又はヒドロキシル基などの存在により増加させることができる。そのような置換基は、アリールアジドの最大吸収をより長い波長に押す。非置換アリールアジドは260~280nmに範囲において最大吸収を有し、ヒドロキシ及びニトロアリールアジドは305nmを越えて有意な光を吸収する。従って、ヒドロキシ及びニトロアリールアジドが最も好ましい。なぜなら、それらでは、非置換アリールアジドよりも親和性成分についてより害が少ない光分解条件を用いることを可能にするためである。

20

#### 【0426】

別の好ましい実施態様において、光活性化可能な基はフッ素化されたアリールアジドより選択される。フッ素化されたアリールアジドの光分解産物はアリールニトレンであり、その全てが、高い効率で、C-H結合の挿入を含むこの基の特徴的な反応を受ける (Kean et al., J. Org. Chem. 55: 3640-3647, 1990)。

30

#### 【0427】

別の実施態様において、光活性化可能な基はベンゾフェノン残基より選択される。ベンゾフェノン試薬は、一般的に、アリールアジド試薬よりも高い架橋収率を与える。

#### 【0428】

別の実施態様において、光活性化可能な基は、ジアゾ化合物より選択され、それは光分解時に電子欠損カルベンを形成する。これらのカルベンは、C-H結合への挿入、二重結合への付加(芳香族系を含む)、水素誘引、及び求核中心への配位を含む種々の反応を受け、炭素イオンを与える。

40

#### 【0429】

さらに別の実施態様において、光活性化可能な基はジアゾピルベートより選択される。例えば、p-ニトロフェニルジアゾピルベートのp-ニトロフェニルエステルは、脂肪族アミンと反応してジアゾピルピル酸アミドを与え、それは紫外線光分解を受けてアルデヒドを形成する。光分解されたジアゾピルベートで修飾された親和性成分は、ホルムアルデヒド又はグルタルアルデヒドのように反応して架橋を形成する。

#### 【0430】

ホモ二官能性試薬

##### 1. 一級アミンと反応性であるホモ二官能性架橋剤

アミン反応性架橋剤の合成、特性、及び適用は、文献において商業的に記載されている(架橋手順及び試薬の総説については上記を参照のこと)。多くの試薬が利用可能である

50

(例えば、Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.)。

【0431】

ホモ二官能性NHSEステルの好ましい非限定的な例は、ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS)、ジスクシンイミジルトルトレート(DST)、ジスルホスクシンイミジルトルトレート(スルホ-DST)、ビス-2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチルスルホン(BSOCOES)、ビス-2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチルスルホン(スルホ-BSOCOES)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、及びジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(スルホ-DSP)を含む。ホモ二官能性イミドエステルの好ましい非限定的な例は、ジメチルマロンイミデート(DMM)、ジメチルスクシンイミデート(DMSC)、ジメチルアジピミデート(DMA)、ジメチルピメリミデート(DMP)、ジメチルスベリミデート(DMS)、ジメチル-3,3'-オキシジプロピオンイミデート(DODP)、ジメチル-3,3'-(メチレンジオキシ)ジプロピオンイミデート(DMDP)、ジメチル-3,3'-(ジメチレンジオキシ)ジプロピオンイミデート(DDDP)、ジメチル-3,3'-(テトラメチレンジオキシ)-ジプロピオンイミデート(DTDP)、及びジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート(DTBP)を含む。

10

20

【0432】

ホモ二官能性イソチオシアネートの好ましい非限定的な例は：p-フェニレンジイソチオシアネート(DITC)、及び4,4'-ジイソチオシアノ-2,2'-ジスルホン酸スチルベン(DIDS)を含む。

【0433】

ホモ二官能性イソシアネートの好ましい非限定的な例は、キシレン-ジイソシアネート、トルエン-2,4-ジイソシアネート、トルエン-2-イソシアネート-4-イソチオシアネート、3-メトキシジフェニルメタン-4,4'-ジイソシアネート、2,2'-ジカルボキシ-4,4'-アゾフェニルジイソシアネート、及びヘキサメチレンジイソシアネートを含む。

30

【0434】

ホモ二官能性アリールハライドの好ましい非限定的な例は、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DFDNB)、及び4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニル-スルホンを含む。

【0435】

ホモ二官能性脂肪族アルデヒド試薬の好ましい非限定的な例は、グリオキサール、マロンジアルデヒド、及びグルタルアルデヒドを含む。

【0436】

ホモ二官能性アシル化試薬の好ましい非限定的な例は、ジカルボン酸のニトロフェニルエステルを含む。

40

【0437】

ホモ二官能性芳香族スルホニルクロライドの好ましい非限定的な例は、フェノール-2,4-ジスルホニルクロライド及び-ナフトール-2,4-ジスルホニルクロライドを含む。

【0438】

追加のアミノ反応性ホモ二官能性試薬の好ましい非限定的な例は、アミンと反応してビスカルバメートを与えるエリトリトールビスカルボネートを含む。

【0439】

2. 遊離スルフヒドリル基と反応性であるホモ二官能性架橋剤

そのような試薬の合成、特性、及び適用は、文献において記載されている(架橋手順及

50

び試薬の総説については上記を参照のこと)。試薬の多くが市販されている(例えば、Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)。

#### 【0440】

ホモ二官能性マレイミドの好ましい非限定的な例は、ビスマレイミドヘキサノール(BMH)、N, N'-(1,3-フェニレン)ビスマレイミド、N, N'-(1,2-フェニレン)ビスマレイミド、アゾフェニルジマレイミド、及びビス(N-マレイミドメチル)エーテルを含む。

#### 【0441】

ホモ二官能性ピリジルジスルフィドの好ましい非限定的な例は、1,4-ジ(3'-2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミドブタン(DPDPB)を含む。 10

#### 【0442】

ホモ二官能性アルキルハライドの好ましい非限定的な例は、2,2'-ジカルボキシ-4,4'-ジヨードアセトアミドアゾベンゼン、2,2'-ジヨード-p-キシレンスルホン酸、2,2'-ジプロモ-p-キシレンスルホン酸、N, N'-ビス(b-プロモメチル)ベンジルアミン、N, N'-ジ(プロモアセチル)フェニルヒドラジン、及び1,2-ジ(プロモアセチル)アミノ-3-フェニルプロパンを含む。

#### 【0443】

##### 3. ホモ二官能性の光活性化可能な架橋剤

そのような試薬の合成、特性、及び適用は、文献において記載されている(架橋手順及び試薬の総説については上記を参照のこと)。試薬のいくつかが市販されている(例えば、Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)。 20

#### 【0444】

ホモ二官能性の光活性化可能な架橋剤の好ましい非限定的な例は、ビス(4-アジドサリチルアミド)エチルジスルフィド(BASED)、ジ-N-(2-ニトロ-4-アジドフェニル)-シスタミン-S, S'-ジオキシド(DNCO)、及び4,4'-ジチオビスフェニルアジドを含む。

#### 【0445】

##### ヘテロ二官能性試薬 30

##### 1. ピリジルジスルフィド部分を伴うアミノ反応性ヘテロ二官能性試薬

そのような試薬の合成、特性、及び適用は、文献において記載されている(架橋結合の手順及び試薬の総説については上記を参照のこと)。試薬の多くが市販されている(例えば、Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)。

#### 【0446】

ピリジルジスルフィド成分及びアミノ反応性NHSEステルを伴うヘテロ二官能性試薬の好ましい非限定的な例は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル6-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミドヘキサノエート(LC-SPDP)、スルホスクシンイミジル6-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミドヘキサノエート(スルホ-LCSPDP)、4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエン(SMPT)、及びスルホスクシンイミジル6-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルアミドヘキサノエート(スルホ-LC-SMPT)を含む。 40

#### 【0447】

##### 2. マレイミド成分を伴うアミノ反応性ヘテロ二官能性試薬

そのような試薬の合成、特性、及び適用は、文献において記載されている。マレイミド成分及びアミノ反応性NHSEステルを伴うヘテロ二官能性試薬の好ましい非限定的な例は、スクシンイミジルマレイミジルアセテート(AMAS)、スクシンイミジル3-マレイミジルプロピオネート(BMPS)、N-マレイミドブチリルオキシスクシンイミ 50

ドエステル (G M B S) N - - マレイミドブチリルオキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ - G M B S) スクシンイミジル 6 - マレイミジルヘキサノエート (E M C S)、スクシンイミジル 3 - マレイミジルベンゾエート (S M B)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M B S)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ - M B S)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C)、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - S M C C)、スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (S M P B)、及びスルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (スルホ - S M P B) を含む。

10

## 【0448】

## 3. アルキルハライド成分を伴うアミノ反応性ヘテロ二官能性試薬

そのような試薬の合成、特性、及び適用は、文献において記載されている。アルキルハライド成分及びアミノ反応性 N H S エステルを伴うヘテロ二官能性試薬の好ましい非限定的な例は、N - スクシンイミジル - (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (S I A B)、スルホスクシンイミジル - (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (スルホ - S I A B)、スクシンイミジル - 6 - (ヨードアセチル) アミノヘキサノエート (S I A X)、スクシンイミジル - 6 - (6 - ((ヨードアセチル) - アミノ) ヘキサノイルアミノ) ヘキサノエート (S I A X X)、スクシンイミジル - 6 - ((4 - ヨードアセチル) - アミノ) - メチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボニル) アミノヘキサノエート (S I A C X)、及びスクシンイミジル - 4 ((ヨードアセチル) - アミノ) - メチルシクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S I A C) を含む。

20

## 【0449】

アミノ反応性 N H S エステル及びアルキルジハライド成分を伴うヘテロ二官能性試薬の好ましい例は、N - ヒドロキシスクシンイミジル 2, 3 - ジブロモプロピオネート (S D B P) を含む。S D B P は、クロスリンカーを、そのアミノ基に抱合することにより親和性成分に分子内架橋剤を導入する。一級アミン基に対するジブロモプロピオニル成分の反応性は、反応温度により制御される (McKenzie et al., Protein Chem. 7: 581-592 (1988))。

## 【0450】

アルキルハライド成分及びアミノ反応性 p - ニトロフェニルエステル成分を伴うヘテロ二官能性試薬の好ましい非限定的な例は、p - ニトロフェニルヨードアセテート (N P I A) を含む。

30

## 【0451】

他の架橋剤も当業者に公知である。例えば Pomato et al., 米国特許第 5, 965, 106 号を参照のこと。特定の適用のための適切な架橋剤を選ぶ能力は、当業者の能力の範囲内である。

## 【0452】

## 切断可能リンカー基

さらなる実施態様において、リンカー基には、切断されて糖残基から修飾基を放出することができる基が提供される。多くの切断可能基が当該技術分野において公知である。例えば、Jung et al., Biochem. Biophys. Acta 761: 152-162 (1983); Joshi et al., J. Biol. Chem. 265: 14518-14525 (1990); Zarling et al., J. Immunol. 124: 913-920 (1980); Bouizar et al., Eur. J. Biochem. 155: 141-147 (1986); Park et al., J. Biol. Chem. 261: 205-210 (1986); Browning et al., J. Immunol. 143: 1859-1867 (1989) を参照のこと。さらに、広範な切断可能な二官能性 (ホモ及びヘテロ二官能性の両方) リンカー基が供給源 (例えば Pierce など) から市販されている。

40

## 【0453】

例示的な切断可能成分は、光、熱、又は試薬 (例えばチオール、ヒドロキシルアミン、塩基、過ヨウ素酸塩など) を使用して切断することができる。さらに、特定の好ましい基

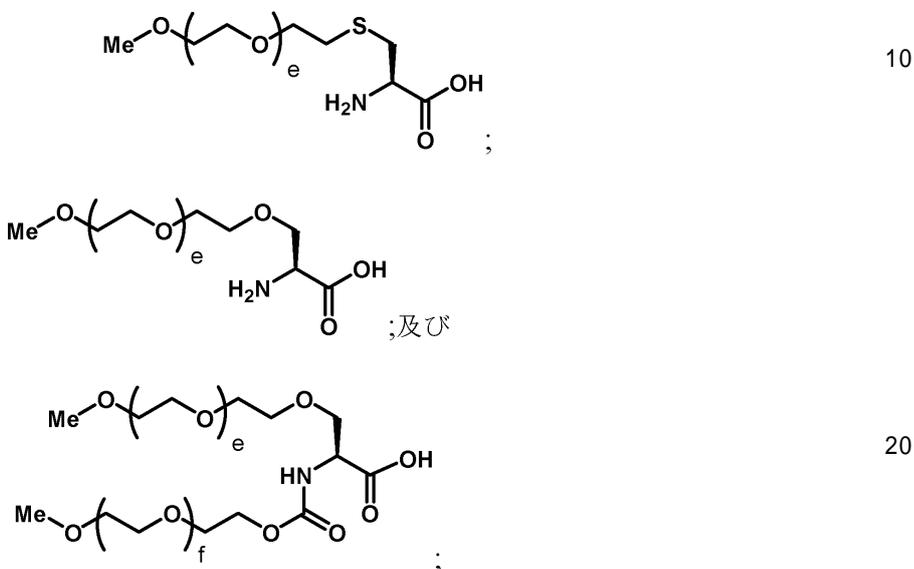
50

は、エンドサイトーシスにตอบสนองしてインピボで切断される（例えば、シス - アコニチル； Shen et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1048 (1991)を参照のこと）。好ましい切断可能基は、ジスルフィド、エステル、イミド、カーボネート、ニトロベンジル、フェナシル、及びベンゾイン基からなる群より選択されるメンバーである切断可能成分を含む。

【 0 4 5 4 】

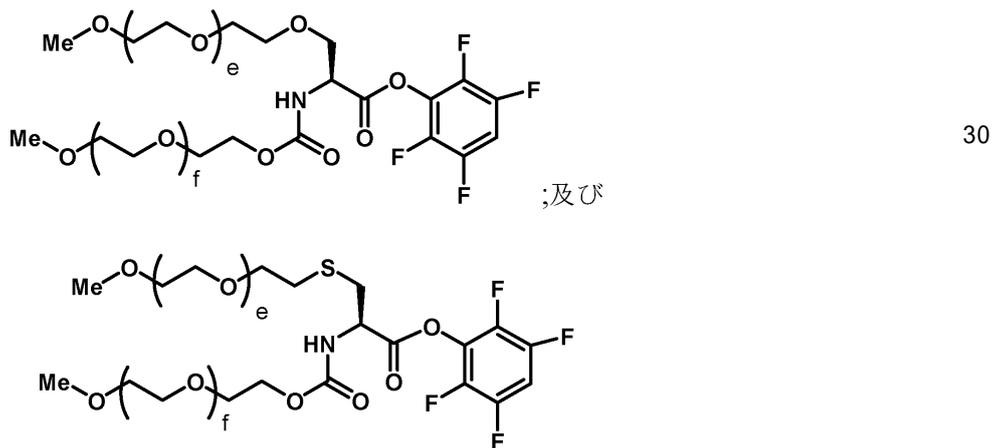
本発明の反応性 P E G 試薬の特定の実施態様は、

【 化 6 6 】



ならびにカーボネート及びこれらの種の活性エステル、例えば、

【 化 6 7 】



などを含む。

【 0 4 5 5 】

核酸

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。ポリペプチドは、そのアミノ酸配列内に、本発明の1つ又は複数の外因性N連結グリコシル化配列を含む。一実施態様において、本発明の核酸は発現ベクターの一部である。別の関連する実施態様において、本発明は、本発明の核酸を含む細胞を提供する。例示的な細胞は、宿主細胞、例えば大腸菌の種々の株、昆虫細胞、酵母細胞、及び哺乳動物細胞（例えばCHO細胞など）などを含む。

【 0 4 5 6 】

薬学的組成物

本発明のポリペプチド抱合体は、広範囲の薬学的適用を有する。例えば、複合糖質化されたエリスロポエチン（EPO）は、一般的な貧血、再生不良性貧血、化学療法により誘発された傷害（例えば骨髄傷害など）、慢性腎不全、腎炎、及びサラセミアを処置するために使用してよい。修飾されたEPOは、さらに、神経障害、例えば脳/脊椎傷害、多発性硬化症、及びアルツハイマー病などを処置するために使用することができる。

【0457】

第2の例はインターフェロン（IFN-）であり、AIDS及びB又はC型肝炎、種々のウイルス、例えばヒトパピローマウイルス（HBV）、コロナウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）などによって引き起こされるウイルス感染症、癌（例えばヘアリー細胞白血病など）、AIDS関連カポジ肉腫、悪性黒色腫、濾胞性非ホジキンリンパ腫、フィラデルフィア染色体（Ph）陽性の慢性期の骨髄性白血病（CML）、腎臓癌、骨髄腫、慢性骨髄性白血病、頭部及び頸部の癌、骨癌、ならびに子宮頸部異形成、及び中枢神経系（CNS）の障害（例えば多発性硬化症など）を処置するために使用することができる。さらに、本発明の方法に従って修飾されたIFN-は、他の疾患及び状態の分類、例えばシェーグレン症候群（自己免疫疾患）、ベーチェット病（自己免疫性炎症性疾患）、線維筋痛症（筋骨格の疼痛/疲労を伴う疾患）、アフタ性潰瘍（口内糜爛）、慢性疲労症候群、及び肺線維症などを処置するために有用である。

【0458】

別の例はインターフェロンであり、それはCNS障害、例えば多発性硬化症（再発寛解型又は慢性進行性）など、AIDS及びB又はC型肝炎、種々のウイルス、例えばヒトパピローマウイルス（HBV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）などによって引き起こされるウイルス感染症、耳感染症、筋骨格感染症、ならびに、癌（乳癌、脳の癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、頭部、及び頸部の癌、基底細胞癌、子宮頸部異形成、黒色腫、皮膚癌、肝臓癌を含む）を処置するために有用である。本発明の方法に従って修飾されたIFN-は、また、他の疾患及び状態、例えば移植拒絶（例えば、骨髄移植）、ハンチントン舞蹈病、大腸炎、脳炎、肺線維症、黄斑変性症、肝硬変、及び角結膜炎などを処置する際に使用される。

【0459】

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）は、さらなる例である。本発明の方法に従って修飾されたG-CSFは、癌を処置するための化学療法における補助剤として使用してよく、また、一部の医療処置に関連した状態又は合併症、例えば、化学療法により誘発された骨髄傷害、白血球減少症（全般的）、化学療法により誘発された発熱性好中球減少症、骨髄移植に関連した好中球減少、及び重度の慢性好中球減少を予防又は軽減する。修飾されたG-CSFは、移植、末梢血細胞動メンバー、骨髄破壊的化学療法又は骨髄抑制性化学療法を受ける予定の患者において採取するための末梢血前駆細胞動メンバー、ならびに、急性骨髄性白血病（AML）に対する導入/強化処置後の好中球減少、発熱、抗生物質使用、入院期間の低下に使用してもよい。他の状態又は障害（喘息及びアレルギー性鼻炎を含む）を、修飾されたG-CSFを用いて処置してよい。

【0460】

1つの追加の例として、本発明の方法に従って修飾されたヒト成長ホルモン（hGH）を、成長に関連した状態、例えば小人症、小児及び成人における低身長、カヘキシー/筋衰弱、全身の筋萎縮、及び性染色体異常（例えば、ターナー症候群）などを処置するために使用してよい。他の状態（短腸症候群、リポジストロフィー、骨粗しょう症、尿毒症（uraemia）、火傷、女性の不妊症、骨再生、一般の糖尿病、II型糖尿病、変形性関節炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、及び不眠症を含む）を、修飾されたhGHを使用して処置してよい。さらに、修飾されたhGHを、種々のプロセス（例えば、全組織の再生、骨再生、及び創傷治癒）を促進するために、又は、ワクチン補助剤として使用してもよい。

【0461】

10

20

30

40

50

このように、別の局面において、本発明は、本発明の少なくとも1つのポリペプチド又はポリペプチド抱合体及び薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物を提供する。薬学的に許容可能な担体は、希釈剤、媒体、添加剤、及びそれらの組み合わせを含む。例示的な実施態様において、薬学的組成物は、水溶性ポリマー（例えば、非天然水溶性ポリマー）、及び本発明のグリコシル化又は非グリコシル化ポリペプチドの間の共有結合抱合体ならびに薬学的に許容可能な希釈剤を含む。

#### 【0462】

本発明の薬学的組成物は、種々の薬物送達系における使用に適する。本発明における使用のための適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA<sup>17</sup>th ed. (1985)において見出される。薬物送達のための方法の簡潔な総説については、Langer, Science 249: 1527-1533 (1990)を参照のこと。

10

#### 【0463】

薬学的組成物は、任意の適切な投与方法（例えば、局所、経口、経鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下、又は筋内投与を含む）のために製剤化してよい。非経口投与、例えば皮下注入などでは、担体は、好ましくは、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、又はバッファーを含む。経口投与では、上の担体又は固体担体、例えばマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、及び炭酸マグネシウムなどを用いてよい。生分解性マトリクス、例えば微小球など（例えば、ポリラクテートポリグリコレート）を本発明の薬学的組成物のための担体として用いてもよい。適した生分解性微小球は、例えば米国特許第4,897,268号及び第5,075,109号に開示されている。

20

#### 【0464】

通常、薬学的組成物は皮下又は非経口的、例えば静脈内に投与される。このように、本発明は、許容可能な担体、好ましくは水性担体（例えば、水、緩衝化水、生理食塩水、PBSなど）に溶解又は懸濁された化合物を含む非経口投与用の組成物を提供する。組成物は、また、界面活性剤（例えばTween 20及びTween 80など）；安定化剤（例えばマンニトール、ソルビトール、スクロース、及びトレハロースなど）；及び保存剤（例えばEDTA及びメタ-クレゾールなど）を含みうる。その組成物は、生理的条件を模倣するために要求される、薬学的に許容可能な補助物質（例えばpH調整剤及び緩衝剤、浸透圧調整剤、湿潤剤、界面活性剤など）を含みうる。

30

#### 【0465】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌してよく、又は濾過滅菌してよい。結果として得られる水溶液は、そのまま、又は凍結乾燥して使用のためにパッケージングしてよく、その凍結乾燥させた調製物は、投与前に滅菌水性担体と合わせられる。調製物のpHは、典型的には、3と11との間、より好ましくは5~9、そして最も好ましくは7~8である。

#### 【0466】

いくつかの実施態様において、本発明のグリコペプチドは、標準的なベシクル形成脂質から形成されたりポソーム中に組み入れられうる。例えば、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980)、米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、及び第4,837,028号に記載されるように、リポソームを調製するための種々の方法が利用可能である。種々の標的薬剤（例えば、本発明のシアリルガラクトシド）を使用するリポソームの標的化は、当技術分野において周知である（例えば、米国特許第4,957,773号及び第4,603,044号を参照のこと）。

40

#### 【0467】

標的薬剤をリポソームに共役させるための標準的方法を使用することができる。これらの方法は、一般的に、脂質成分（例えばホスファチジルエタノールアミンなど）のリポソーム中への組み入れを含み、それは標的薬剤、又は誘導体化された脂溶性化合物（例えば本発明の脂質-誘導体化グリコペプチド）の付着のために活性化させることができる。

#### 【0468】

50

標的化機構は、一般的に、標的薬剤をリポソーム表面上に、標的成分が標的、例えば、細胞表面受容体との相互作用のために利用可能であるような方法で、位置付けられることを要求する。本発明の炭水化物は、リポソームが当業者に公知の方法を使用して形成される前に、脂質分子に付着されうる（例えば、炭水化物上に存在するヒドロキシル基の、それぞれ長鎖アルキルハライドを用いた、又は、脂肪酸を用いたアルキル化又はアシル化）。あるいは、リポソームは、コネクタ部分、最初に、膜を形成する時に、膜中に組み入れられるように形作ってよい。コネクタ部分は脂溶性部分を有さなければならず、それは膜中に堅く包埋及び固定される。それは、また、反応性部分を有さなければならず、それはリポソームの水性表面上で化学的に利用可能である。反応性部分は、それが標的薬剤又は炭水化物（後に加えられる）との安定な化学結合を形成するために化学的に適するように選択される。一部の場において、標的薬剤をコネクタ分子に直接的に付着させることが可能であるが、しかし、大半の例において、第3の分子を化学的架橋として作用するように使用することがより適しており、このようにして膜中にあるコネクタ分子を標的薬剤又は炭水化物（媒体表面から三次元的に伸長される）と連結される。

10

**【0469】**

本発明の方法によって調製される化合物は、また、診断用試薬として使用してよい。例えば、標識された化合物を用いて、炎症を有することが疑われる患者において炎症又は腫瘍転移の領域を位置付けることができる。この使用のために、化合物を<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、又はトリチウムで標識することができる。別の例において、化合物は、発光成分（例えばランタニド複合体など）で標識される。

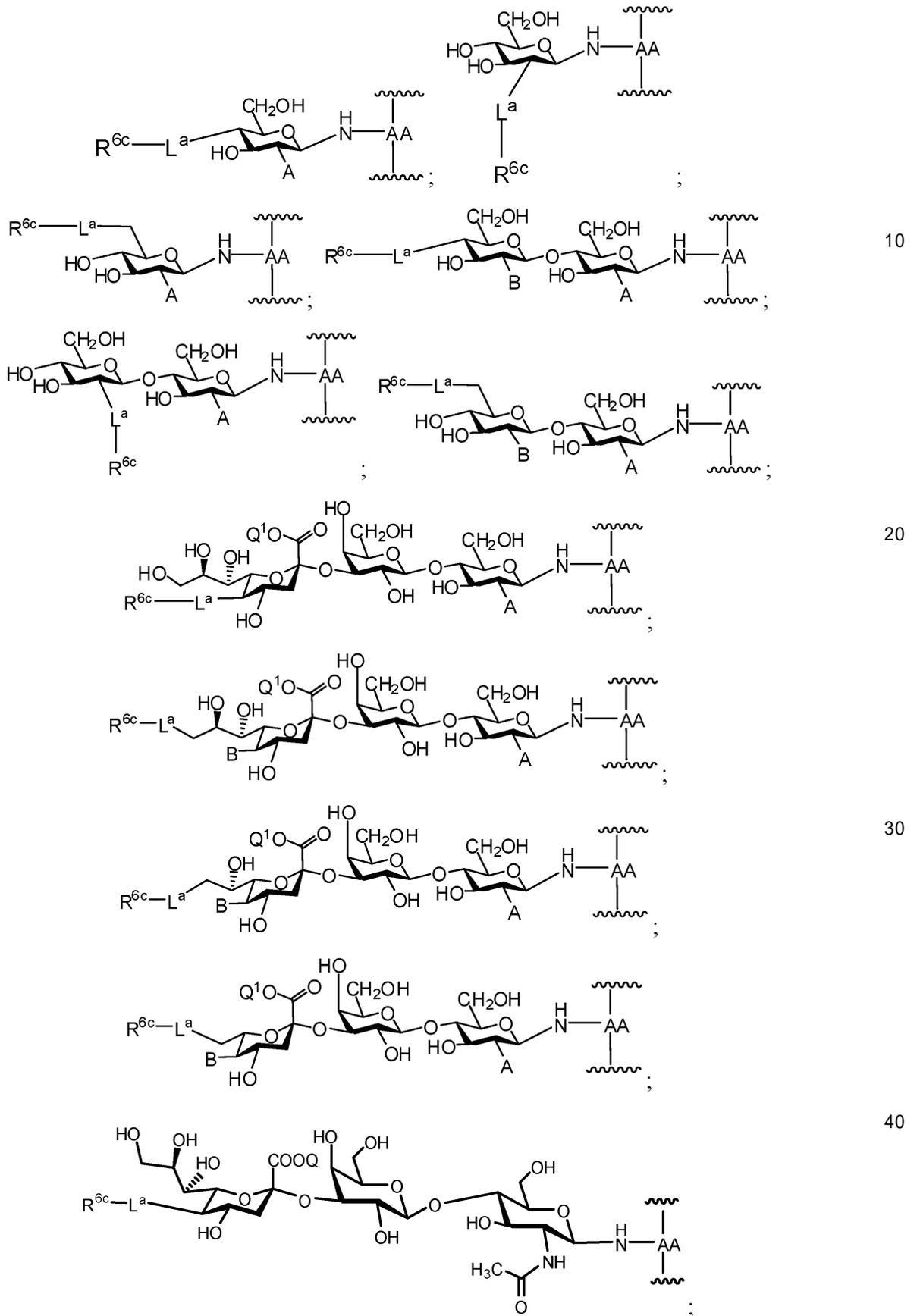
20

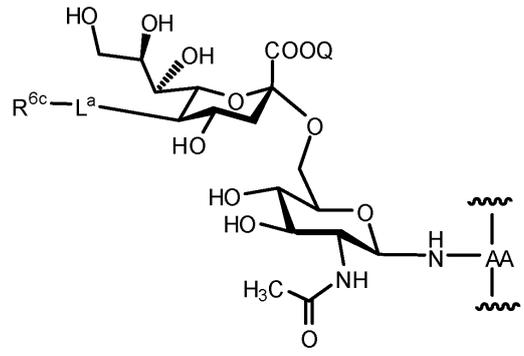
**【0470】**

本発明の例示的な抱合体

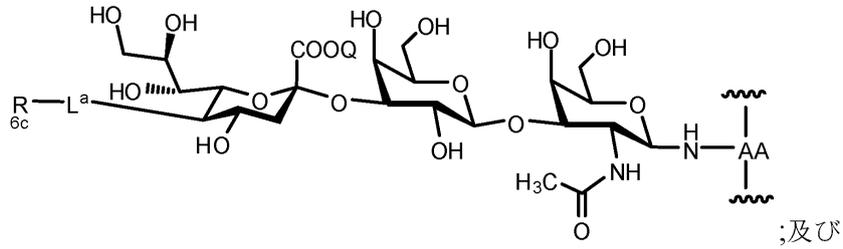
－実施態様において、本発明の抱合体は、以下：

【化 6 8】

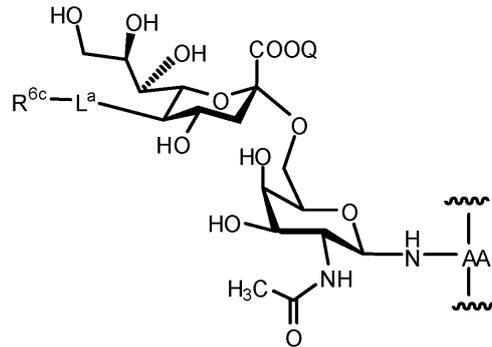




10



;及び



20

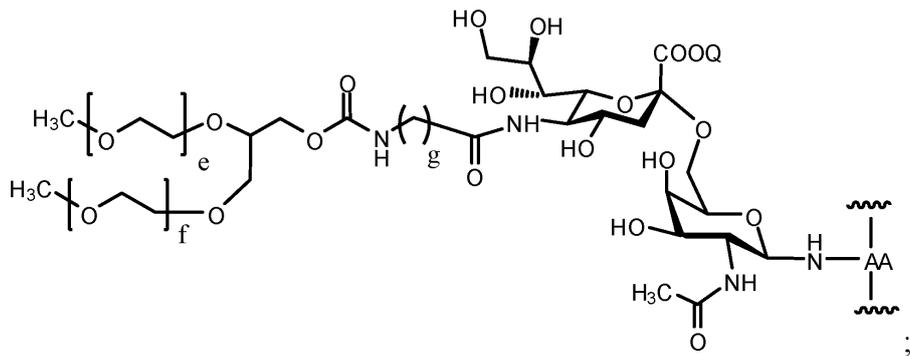
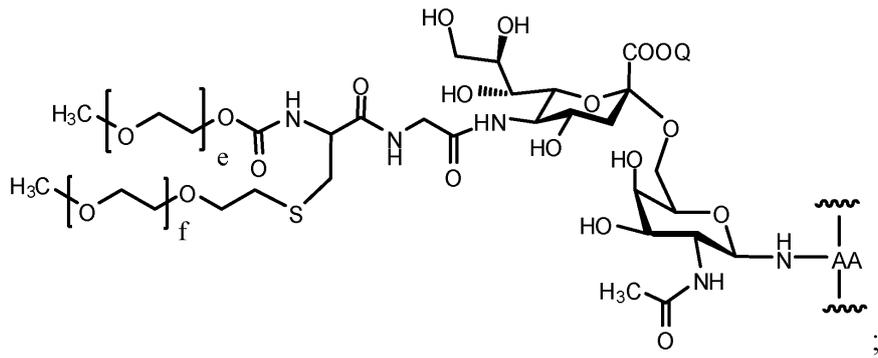
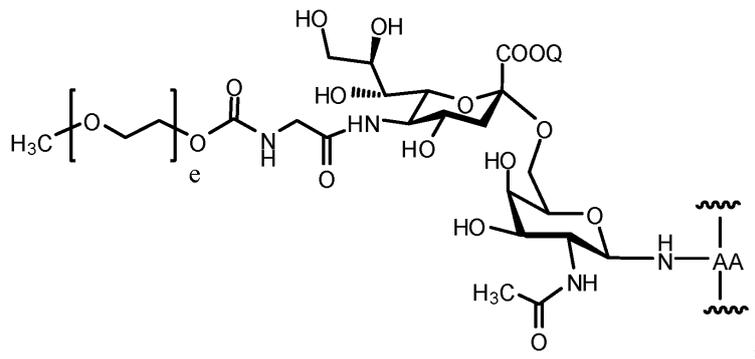
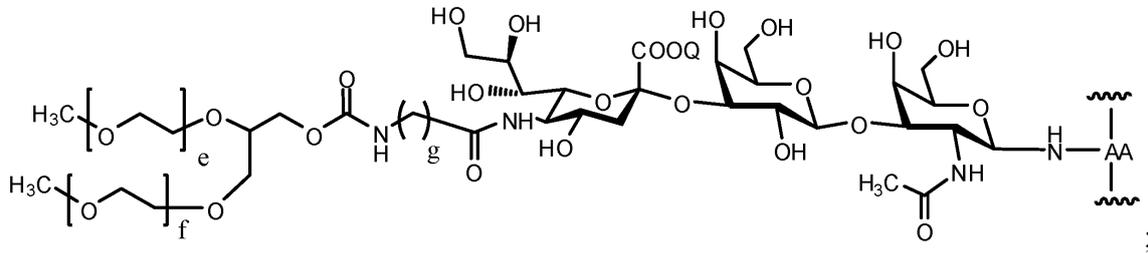
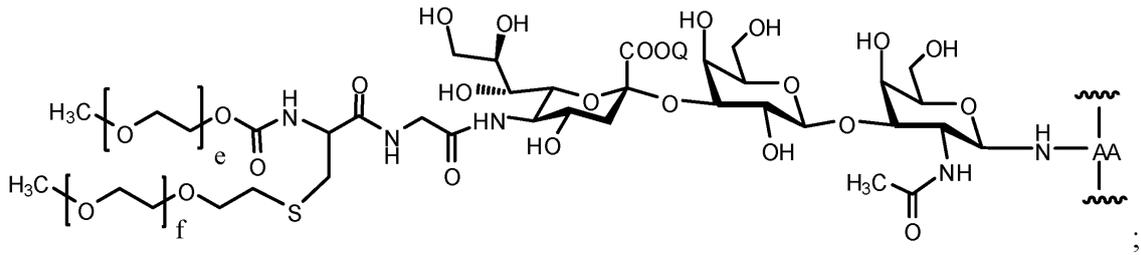
(式中、AAは、アミノ基を含むアミノ酸残基に由来する)より選択される成分を含む。このアミノ酸残基はポリペプチドの一部である。一例において、AAはアスパラギン残基に由来する。Q、L<sup>a</sup>、及びR<sup>6c</sup>は、本明細書において上に定義する通りである。Q<sup>1</sup>はH、単一の負電荷、又は陽イオン(例えば、Na<sup>+</sup>又はK<sup>+</sup>)である。A及びBは、OR(例えば、OH)及びNHCO R(例えば、NHAc)より非依存的に選択されるメンバーである。

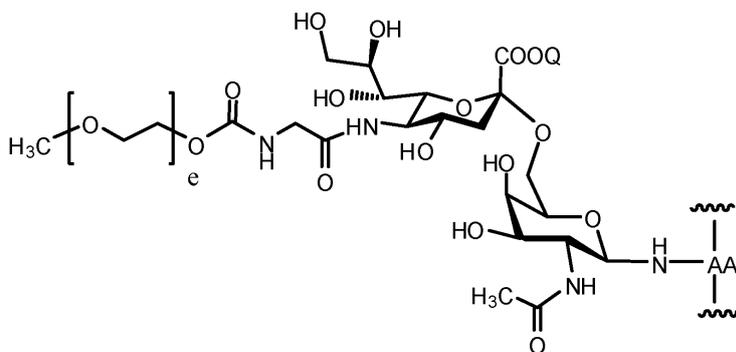
30

【0471】

上の実施態様のいずれかの一例において、抱合体は、以下：

【化 6 9】





10

より選択される成分を含む。

【0472】

V. 方法

ポリペプチドの生成

ポリペプチドを（例えば、組換え技術を通じて）生成する方法は、当技術分野において公知である。例示的な方法が、本明細書において記載されている例示的な方法は、(i) 外因性N連結グリコシル化配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現ベクターを生成すること。方法は、さらに、(ii) 宿主細胞を発現ベクターでトランスフェクトすることを含んでよい。方法は、さらに、(iii) ポリペプチドを宿主細胞において発現させることを含む。方法は、さらに、(iv) ポリペプチドを単離することを含んでよい。方法は、さらに、(v) ポリペプチドを、N連結グリコシル化配列で、例えば、内因性又は組換えオリゴサッカリルトランスフェラーゼを使用して酵素的にグリコシル化することを含んでよい。例示的なグリコシルトランスフェラーゼ（例えば細菌 PglB など）が、本明細書において記載される。

20

【0473】

ポリペプチド抱合体の形成

別の局面において、本発明は、修飾基とポリペプチドの間に共有結合抱合体を形成する方法を提供する。本発明のポリペプチド抱合体は、グリコシル化又は非グリコシル化ポリペプチドと多様な種（例えば水溶性ポリマー、治療用成分、生体分子、診断用成分、標的

30

【0474】

ポリペプチドの無細胞インビトログリコシル化

一実施態様において、ポリペプチドのグリコシル化及び/又は糖PEG化はインビトロで実施される。例えば、ポリペプチドは、宿主細胞中で合成又は発現され、場合により、精製される。ポリペプチドは、次に、本発明のグリコシル供与体種（例えば、ウンデカプレニル-ピロリン酸連結グリコシル成分）ならびに適したオリゴサッカリルトランスフェラーゼを含むグリコシル化又は糖PEG化に供する。

40

【0475】

一実施態様において、ポリペプチドは、ポリペプチドをグリコシル供与体種に接触させることにより修飾基に共有結合的に連結させ、それにおいて、グリコシル供与体種の少なくとも1つのグリコシル供与体成分が、グリコシル供与体種が基質であるオリゴサッカリルトランスフェラーゼの存在下で、修飾基に共有結合的に連結される。故に、例示的な実施態様において、本発明は、ポリペプチドと修飾基（例えば、ポリマー修飾基）の間に共有結合抱合体を形成する無細胞インビトロ方法を提供する。この方法において、ポリペプチドは、アスパラギン残基を含む、本発明のN連結グリコシル化配列を含む。修飾基は、ポリペプチドに、アスパラギン残基で、ポリペプチドと修飾基の間に挿置され、その両方に共有結合的に連結されたグリコシル連結基を介して、共有結合的に連結される。方法は

50

、ポリペプチド及び本発明のグリコシル供与体種を、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの存在下で、オリゴサッカリルトランスフェラーゼが、グリコシル供与体種からのグリコシル成分を、N連結グリコシル化配列のアスパラギン残基上に転移させるために十分な条件下で、接触させることを含む。方法は、さらに、ポリペプチドを、例えば、組換え技術又は化学合成を通じて生成することを含んでよい。ポリペプチドを生成するための方法が、本明細書において記載される。方法は、さらに、共有結合抱合体を単離することを含んでよい。一実施態様において、ポリペプチドは、治療用ポリペプチドである親ポリペプチドに対応する。例示的な親ポリペプチドが、本明細書において記載される。

#### 【0476】

##### 宿主細胞内でのグリコシル化

本発明のN連結グリコシル化配列を含むポリペプチドのグリコシル化は、また、宿主細胞内で生じうる（それにおいてポリペプチドが発現される）。一実施態様において、宿主細胞は、本発明の適したグリコシル供与体種と接触させて、それを内在化する。例えば、グリコシル供与体種を細胞培養液に加えて、それを使用して宿主細胞を培養する。宿主細胞内のオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、内在化されたグリコシル供与体種を基質として使用し、グリコシル成分を発現されたポリペプチド上に転移させる。一実施態様において、細胞内グリコシル化を使用して、宿主細胞を、修飾基で誘導体化されたグリコシル成分を含むグリコシル供与体種と接触させることにより、修飾基をポリペプチドに共有結合的に連結する。したがって、本発明は、ポリペプチドと修飾基（例えば、ポリマー修飾基）の間に共有結合抱合体を形成する方法を提供し、それにおいて、ポリペプチドは、アスパラギン残基を含むN連結グリコシル化配列を含む。修飾基は、ポリペプチドに、アスパラギン残基で、ポリペプチドと修飾基の間に挿置され、その両方に共有結合的に連結されたグリコシル連結基を介して、共有結合的に連結される。方法は、(i)ポリペプチド及び本発明のグリコシル供与体種を、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの存在下で、オリゴサッカリルトランスフェラーゼが、グリコシル成分をグリコシル供与体種からN連結グリコシル化配列のアスパラギン残基上に転移させるために十分な条件下で、接触させることを含み、それにおいて接触が宿主細胞内で生じ、それにおいてポリペプチドが発現される。方法は、さらに、(ii)宿主細胞を本発明のグリコシル供与体種と接触させることを含んでよい。方法は、さらに、(iii)宿主細胞を、宿主細胞がグリコシル供与体種を内在化するために十分な条件下でインキュベートすることを含んでよい。方法は、さらに、(iii)ポリペプチドを、例えば、組換え技術又は化学合成を通じて生成することを含んでよい。ポリペプチドを生成するための方法が、本明細書において記載される。方法は、さらに、(iv)共有結合抱合体を単離することを含んでよい。一実施態様において、ポリペプチドは、治療用ポリペプチドである親ポリペプチドに対応する。例示的な親ポリペプチドが、本明細書において記載される。

#### 【0477】

一例において、宿主細胞は、内在化されたグリコシル供与体種を基質として使用することが可能である内因性オリゴサッカリルトランスフェラーゼを含み、グリコシル供与体種のグリコシル成分をポリペプチド上に細胞内に転移させることができる。

#### 【0478】

別の例示的な実施態様において、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは組換え酵素であり、宿主細胞において、ポリペプチドと一緒に同時発現される。細胞内グリコシル化は、次に、発現されたポリペプチドを基質として使用することができるオリゴサッカリルトランスフェラーゼを同時発現させることにより達成される。酵素は、ポリペプチドを、グリコシル化配列で、細胞内で、内在化されたグリコシル供与体種をグリコシル基質として使用して、グリコシル化することが可能である。

#### 【0479】

宿主細胞は、ポリペプチドの発現のために適した任意の細胞でありうる。一実施態様において、宿主細胞は細菌細胞である。別の実施態様において、宿主細胞は真核細胞、例えば酵母細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞などである。

10

20

30

40

50

## 【0480】

ポリペプチドが効率的にグリコシル化されるか否かを決定するための方法を利用可能である。例えば、細胞ライセート（1又は複数のサンプル調製工程後）を、マスマスベクトロメトリーにより分析し、グリコシル化ポリペプチド及び非グリコシル化ポリペプチドの間の比率を測定する。別の例において、細胞ライセートをゲル電気泳動により分析し、グリコシル化ポリペプチドを非グリコシル化ポリペプチドから分離する。

## 【0481】

別の例示的な実施態様において、ポリペプチドが発現される微生物は細胞内酸化環境を有する。微生物は、遺伝的に修飾され、細胞内酸化環境を有する。細胞内グリコシル化は、単一のグリコシル残基の転移に限定されない。いくつかのグリコシル残基を、連続的に、要求される酵素の同時発現及び各グリコシル供与体の存在により加えることができる。このアプローチを使用して、商業スケールでポリペプチドを産生することもできる。例示的な技術が、米国仮特許出願第60/842,926号（2006年9月6日に出願）において記載されており、それは本明細書において参照によりその全体が組み入れられる。宿主細胞は、原核微生物、例えば大腸菌又はシュドモナス株などでよい。例示的な実施態様において、宿主細胞は、*trxB gor supp*突然変異大腸菌細胞である。

## 【0482】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼの基質としてのシークオンポリペプチドの同定

酵素及びグリコシル供与体種を使用したグリコシル化反応に供した際に満足な収率でグリコシル化させることができるシークオンポリペプチドの同定のための1つの戦略は、シークオンポリペプチドのライブラリーを調製することであり（それにおいて、各シークオンポリペプチドは、本発明の少なくとも1つの外因性N連結グリコシル化配列を含む）、及び、各シークオンポリペプチドを、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの効率的な基質として機能するその能力についてテストすることである。シークオンポリペプチドのライブラリーは、本発明の選択されたN連結グリコシル化配列を、親ポリペプチド内の異なる位置で含むことにより生成することができる。

## 【0483】

シークオンポリペプチドのライブラリー

一局面において、本発明は、シークオンポリペプチドの1つ又は複数のライブラリーを生成する方法を提供し、それにおいて、シークオンポリペプチドは親ポリペプチド（例えば、野生型ポリペプチド）に対応する。一実施態様において、親ポリペプチドはmのアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。シークオンポリペプチドのライブラリーを生成する例示的な方法は、以下の工程を含む：（i）第1のシークオンポリペプチド（例えば、組換え的に、化学的に、又は他の手段により）を、親ポリペプチド内の本発明のN連結グリコシル化配列を第1のアミノ酸位置（AA）<sub>n</sub>（nは1～mより選択されるメンバーである）に導入することにより産生すること；（ii）少なくとも1つの追加のシークオンポリペプチドを、N連結グリコシル化配列を追加のアミノ酸位置に導入することにより産生すること。一実施態様において、追加のアミノ酸位置は、（AA）<sub>n+x</sub>、例えば（AA）<sub>n+1</sub>である。別の実施態様において、追加のアミノ酸位置は、（AA）<sub>n-x</sub>、例えば（AA）<sub>n-1</sub>である。これらの実施態様において、xは、1～（m-n）より選択されるメンバーである。一実施態様において、追加のシークオンポリペプチドは、第1のシークオンポリペプチドと同じN連結グリコシル化配列を含む。別の実施態様において、追加のシークオンポリペプチドは、第1のシークオンポリペプチドとは異なるN連結グリコシル化配列を含む。例示的な実施態様において、シークオンポリペプチドのライブラリーは、本明細書において上に記載される「シークオンスキニング」により生成される。本発明のライブラリーにおいて有用な、例示的な親ポリペプチド及びN連結グリコシル化配列も本明細書において記載される。

## 【0484】

リードポリペプチドの同定

ライブラリーのメンバー中で、酵素的グリコシル化及び/又は糖PEG化反応に供した

10

20

30

40

50

場合に、有効にグリコシル化及び/又は糖 P E G 化されるそれらのポリペプチドを選択することが望ましい。有効にグリコシル化及び/又は糖 P E G 化されることが見出されているシークオンポリペプチドは、「リードポリペプチド」と呼ばれる。例示的な実施態様において、酵素的グリコシル化又は糖 P E G 化反応の収率を使用し、1つ又は複数のリードポリペプチドを選択する。別の例示的な実施態様において、リードポリペプチドでの酵素的グリコシル化又は糖 P E G 化の収率は、約 10%~約 100%、好ましくは約 30%~約 100%、より好ましくは約 50%~約 100%、最も好ましくは約 70%~約 100%である。ポリペプチドが複数の N 連結グリコシル化配列を含む場合、収率は、別々に、各 N 連結グリコシル化配列について決定される。効率的にグリコシル化することができるリードポリペプチドは、場合により、さらに、例えば、グリコシル化リードポリペプチドを別の酵素的グリコシル化又は糖 P E G 化反応に供することにより評価される。

10

## 【0485】

このように、本発明は、リードポリペプチドを同定するための方法を提供する。例示的な方法は以下の工程を含む：(i)本発明のシークオンポリペプチドのライブラリーを生成すること；(ii)ライブラリーの少なくとも1つのメンバーを酵素的グリコシル化(又は、場合により、酵素的糖 P E G 化反応)に供すること。一実施態様において、この反応中に、グリコシル成分を、グリコシル供与体分子から、少なくとも1つの N 連結グリコシル化配列に移し、それにおいてグリコシル成分は、場合により、修飾基で誘導体化される。方法は、さらに、(iii)ライブラリーの少なくとも1つのメンバーについて酵素的グリコシル化又は糖 P E G 化反応での収率を測定することを含んでよい。測定は、当技術分野において公知の任意の方法及び本明細書において以下に記載される方法を使用して達成することができる。方法は、さらに、工程(i)の前に、(iv)ライブラリーの少なくとも1つのメンバーを精製することを含んでよい。

20

## 【0486】

工程(ii)の移されたグリコシル成分は、モノサッカライド及びオリゴサッカライドを含む任意のグリコシル成分ならびにグリコシル模倣基でありうる。それらは、場合により、修飾基、例えば水溶性ポリマー修飾基などで誘導体化される。例示的な実施態様において、グリコシル成分は、最初のグリコシル化反応においてシークオンポリペプチドに加えられ、G l c N A c 成分、G a l N A c 成分、G l c N A c - G l c N A c 成分、又は 6 - ヒドロキシ - バシロサミン成分である。後のグリコシル化反応は、場合により、少なくとも1つの追加のグリコシル残基(例えば、修飾された S i a 成分)を結果として得られるグリコシル化されたポリペプチドに加えるために用いることができる。修飾基は、本発明の任意の修飾基(水溶性ポリマー(例えば m P E G など)を含む)でありうる。一実施態様において、工程(ii)の酵素的グリコシル化反応が、宿主細胞において生じ、それにおいてポリペプチドが発現される。方法は、さらに、(v)工程(ii)の産物を P E G 化反応に供することを含んでよい。一実施態様において、工程(ii)及び工程(v)は、同じ反応容器中で実施される。一実施態様において、P E G 化反応は酵素的糖 P E G 化反応である。別の実施態様において、P E G 化反応は化学的 P E G 化反応である。方法は、さらに、(vi)P E G 化反応の収率を測定することを含んでよい。P E G 化反応の収率を測定するために有用な方法が、以下に記載されている。方法は、さらに、(vii)シークオンポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現ベクターを生成することを含んでよい。方法は、さらに、(viii)宿主細胞を発現ベクターでトランスフェクトすることを含んでよい。

30

40

## 【0487】

例示的な実施態様において、シークオンポリペプチドのライブラリーの各メンバーを、酵素的グリコシル化反応に供する。例えば、各シークオンポリペプチドを別々にグリコシル化反応に供し、グリコシル化反応の収率を1つ又は複数の選択された反応条件について決定する。

## 【0488】

例示的な実施態様において、ライブラリーの1つ又は複数のシークオンポリペプチドは

50

、さらなるプロセッシング（例えばグリコシル化及び/又は糖 P E G 化など）の前に精製される。

#### 【0489】

別の例において、シークオンポリペプチドのグループを合わせることができ、結果として得られるシークオンポリペプチドの混合物を、グリコシル化又は糖 P E G 化反応に供することができる。1つの例示的な実施態様において、ライブラリーの全てのメンバーを含む混合物を、グリコシル化反応に供する。一例において、この実施態様に従い、グリコシル供与体試薬を、グリコシル化反応混合物に化学量論量未満（存在するグリコシル化部位に関して）で加えることができ、シークオンポリペプチドが基質として酵素について競合する環境を作る。それらのシークオンポリペプチドは、酵素の基質であり、次に、例えば、先行するグリコシル化混合物の分離又は精製を伴う、又は、伴わない質量スペクトル解析により同定することができる。この同じアプローチを、各々が本発明の異なる O 連結グリコシル化配列を含む、シークオンポリペプチドのグループについて使用してよい。

10

#### 【0490】

酵素的グリコシル化反応、酵素的糖 P E G 化反応、又は化学的糖 P E G 化反応についての収率を、任意の適した当技術分野において公知の方法を使用して決定することができる。例示的な実施態様において、グリコシル化又は糖 P E G 化ポリペプチドと未反応（例えば、非グリコシル化又は糖 P E G 化）ポリペプチドの間を区別するために使用される方法は、マススペクトロメトリー（例えば、LC-MS、MALDI-TOF）を含む技術を使用して決定される。別の例示的な実施態様において、収率は、ゲル電気泳動を含む技術を使用して決定される。さらに別の例示的な実施態様において、収率は、核磁気共鳴（NMR）を含む技術を使用して決定される。さらなる例示的な実施態様において、収率は、クロマトグラフィー（例えば HPLC 又は GC など）を含む技術を使用して決定される。一実施態様において、マルチウェルプレート（例えば、96 ウェルプレート）を使用して、多くのグリコシル化反応を並行して行う。プレートは、場合により、分離又はろ過媒質（例えば、ゲルろ過膜）を各ウェルの底に備えてよい。スピニングを使用して、マススペクトロメトリー又は他の手段による分析前に、各サンプルを前条件付けしてよい。

20

#### 【0491】

目的のシークオンポリペプチド（例えば、選択されたリードポリペプチド）は、個々のスケールで発現させることができる（例えば、250 mg 超、好ましくは 500 mg 超のタンパク質の単離を導く）。

30

#### 【0492】

リードポリペプチドのさらなる評価

一実施態様において、それにおいて最初のスクリーニング手順が、未修飾グリコシル成分を使用した酵素グリコシル化を含み（例えば、GlcNAc 成分の転移）、選択されたリードポリペプチドを、さらなる修飾（例えば、別の酵素反応又は化学修飾を通じた）のための効率的な基質になるそれらの能力についてさらに評価してよい。例示的な実施態様において、後の「スクリーニング」は、グリコシル化されたリードポリペプチドを、別のグリコシル化及び/又は P E G 化反応に供することを含む。

#### 【0493】

P E G 化反応は、例えば、化学的 P E G 化反応又は酵素的糖 P E G 化反応でありうる。効率的に糖 P E G 化されるリードポリペプチドを同定するために、少なくとも1つのリードポリペプチド（場合により、先にグリコシル化されている）を P E G 化反応に供し、この反応での収率を決定する。一例において、各リードポリペプチドについての P E G 化収率を決定する。例示的な実施態様において、P E G 化反応での収率は、約 10% ~ 約 100%、好ましくは約 30% ~ 約 100%、より好ましくは約 50% ~ 約 100%、最も好ましくは約 70% ~ 約 100% である。P E G 化収率は、当技術分野において公知の任意の分析方法を使用して決定することができ、それはポリペプチド分析に適しており、例えばマススペクトロメトリー（例えば、MALDI-TOF、Q-TOF）、ゲル電気泳動（例えば、定量のための手段と組み合わせる、例えばデンストメトリーなど）、NMR 技術など

40

50

、ならびにクロマトグラフィー方法、例えば、分析されるポリペプチドのPEG化種及び非PEG化種の分離のために有用な適切なカラム物質を使用したHPLCなどである。上でグリコシル化について記載する通り、マルチウェルプレート（例えば、96ウェルプレート）を使用して、多くのPEG化反応を並行して行うことができる。プレートは、場合により、分離又はろ過媒質（例えば、ゲルろ過膜）を各ウェルの底に備えてよい。スピニング及び再構成を使用して、マススペクトロメトリー又は他の手段による分析前に、各サンプルを前条件付けしてよい。

#### 【0494】

別の例示的な実施態様において、シークオンポリペプチドのグリコシル化及び糖PEG化は、「ワンスポット反応」において、以下に記載の通りに生じる。一例において、シークオンポリペプチドを第1の酵素（例えば、GalNAc-T2）及び適切な供与体分子（例えば、UDP-GalNAc）と接触させる。混合物を、第2の酵素（例えば、Core-1-GalT1）及び第2のグリコシル供与体（例えば、UDP-Gal）を加える前に、適した量の時間のわたりインキュベートする。任意の数の追加のグリコシル化/糖PEG化反応をこの方法で実施することができる。あるいは、複数の酵素及び複数のグリコシル供与体を突然変異ポリペプチドと接触させて、複数のグリコシル残基を1つの反応工程において加えることができる。例えば、突然変異ポリペプチドを、3つの異なる酵素（例えば、GalNAc-T2、Core-1-GalT1、及びST3Gal1）及び3つの異なるグリコシル供与体成分（例えば、UDP-GalNAc、UDP-Gal、及びCMP-SA-PEG）と、適したバッファー系において接触させて、糖PEG化された突然変異ポリペプチド、例えばポリペプチド-などを生成する（実施例4.6を参照のこと）。全収率は、上に記載する方法を使用して決定することができる。

#### 【0495】

グリコシル成分の除去

本発明は、また、1つ又は複数の選択されたグリコシル残基をポリペプチドに加える（又は除去する）手段を提供し、その後、修飾された糖が、ポリペプチドの少なくとも1つの選択されたグリコシル残基に抱合される。この実施態様は、例えば、修飾された糖を、ポリペプチド上に存在しない又は所望の量で存在しない選択されたグリコシル残基に抱合させることが望ましい場合、有用である。このように、修飾された糖をポリペプチドに抱合させる前に、選択されたグリコシル残基をポリペプチドに酵素的又は化学的な共役により抱合させる。別の実施態様において、グリコペプチドのグリコシル化パターンは、グリコペプチドからの炭水化物残基の除去による修飾された糖の抱合の前に改変される。例えば、WO 98/31826を参照のこと。

#### 【0496】

GDFプロペプチド上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に達成されうる。化学的脱グリコシル化は、GDFプロペプチドの化合物トリフルオロメタンスルホン酸又は等価な化合物への曝露を必要とする。この処理は、連結糖（N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン）以外のほとんど糖又は全ての糖の切断を生じるが、アミノ酸配列はインタクトなままにする。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)及びEdge et al., Anal. Biochem. 118: 131 (1981)により記載されている。GDFプロペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)によって記載されるように、種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成されうる。

#### 【0497】

グリコシル成分の化学的付加は、当技術分野で認識されている方法で行う。糖成分の酵素的付加は好ましくはここに示した方法の修正を用いて行い本発明で用いた修飾糖を天然グリコシル単位で置換する。糖成分付加の他法は米国特許5,876,980、6,030,815、5,728,554及び5,922,577に開示されている。本発明で用いる典型的な方法はWO 87/05330（1987年9月11日公開）、及びAplin an

10

20

30

40

50

d Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., pp.259-306 (1981)において記載されている。

【0498】

2つ又はそれ以上のポリペプチドを含むポリペプチド抱合体

また、リンカーアームを通じて一緒に連結された2つ又はそれ以上のポリペプチドを含む抱合体、即ち、多機能性抱合体を提供する；少なくとも1つのポリペプチドがNグリコシル化されている、又は、外因性N連結グリコシル化配列を含む。本発明の多機能性抱合体は、2つ又はそれ以上のコピーの同じポリペプチド又は異なる構造及び/又は特性を伴う多様なポリペプチドのコレクションを含みうる。この実施態様の例示的な抱合体において、2つのポリペプチドの間のリンカーを、少なくとも1つのポリペプチドに、N連結グリコシル残基（例えばN連結グリコシルインタクトグリコシル連結基など）を通じて付着

10

【0499】

一実施態様において、本発明は、2つ又はそれ以上のポリペプチドを、連結基を通じて連結させるための方法を提供する。連結基は任意の有用な構造であり、直鎖及び分岐鎖構造より選択してよい。好ましくは、リンカーの各末端は、ポリペプチドに付着され、修飾された糖を含む（即ち、新生インタクトグリコシル連結基）。一実施態様において、2つのポリペプチドの連結は、ポリペプチドで修飾されたグリコシル供与体種を使用することにより達成される。

【0500】

修飾された糖のペプチドへの酵素的抱合

修飾された糖は、抱合を媒介する適切な酵素によって、グリコシル化ペプチド又は非グリコシル化ペプチドに抱合される。好ましくは、修飾された供与体糖、酵素、受容体ポリペプチドの濃度は、受容体が消費されるまでグリコシル化が進行するように選択される。以下で考察する検討は、シアリルトランスフェラーゼに関連して記載するが、一般的に、他のグリコシルトランスフェラーゼ反応に適用可能である。

20

【0501】

グリコシルトランスフェラーゼを使用して、望ましいオリゴサッカライド部分を有する糖タンパク質及び糖脂質を合成する多くの方法が公知である。例示的な方法は、例えば、WO 96 / 3 2 4 9 1, Ito et al., (1993) Pure Appl. Chem. 65:753、ならびに米国特許第5, 3 5 2, 6 7 0号、第5, 3 7 4, 5 4 1号、及び第5, 5 4 5, 5 5 3号に記載されている。

30

【0502】

本発明は、単一のグリコシルトランスフェラーゼ又はグリコシルトランスフェラーゼの組み合わせを使用して実行される。例えば、シアリルトランスフェラーゼ及びガラクトシルトランスフェラーゼの組み合わせを使用することができる。複数の酵素を使用するそれらの実施態様において、酵素及び基質は、好ましくは、最初の反応混合物中で合わされ、又は、第2の酵素反応のための酵素及び試薬が、第1の酵素反応が完了した、又は、ほとんど完了した時点で、加えられる。2つの酵素反応を連続して単一の容器中で行うことにより、全収率が、中間種が単離される手順にわたり改善される。さらに、余分な溶媒及び副産物の精製及び廃棄が低下される。

40

【0503】

本発明の抱合体のO連結グリコシル成分は、一般的に、ポリペプチドに付着されているGalNAc成分に由来する。GalNAcトランスフェラーゼのファミリーの任意のメンバーを用いて、GalNAc部分をポリペプチドに結合させることができる（例えば、Hassan H, Bennett EP, Mandel U, Hollingsworth MA, and Clausen H (2000);及びControl of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases; Eds.Ernst, Hart, and Sinay; Wiley-VCH chapter "Carbohydrates in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook", 273-292を参照のこと）。GalNAc部分それ自体が完全なグリコシルリンカーになりうる。あるいは、サッカリル残基を、1つ又は複数の酵素及び1つ又は複数の適切なグ

50

リコシル基質を使用して構築する。修飾された糖を、伸長されたグリコシル成分に加えてよい。

#### 【0504】

変異体酵素は、通常、エンドグリカナーゼ加水分解工程の逆反応に類似した合成工程によって、反応を触媒する。これらの実施態様において、グリコシル供与体分子（例えば、所望のオリゴサッカライド構造体又は単糖構造体）は脱離基を含み、反応は、タンパク質上のGlcNAc残基への供与体分子の付加とともに進行する。例えば、脱離基は、フルオリドなどのハロゲンでよい。別の実施態様において、脱離基は、Asn、又はAsn-ペプチド部分である。さらに別の実施態様において、グリコシル供与体分子上のGlcNAc残基が修飾される。例えば、GlcNAc残基は、1,2オキサゾリン部分を含んでよい。

10

#### 【0505】

別の実施態様において、本発明の抱合体を産生するために利用される各酵素は、触媒量で存在している。個々の酵素の触媒量は、その酵素の基質の濃度、ならびに温度、時間、pH値などの反応条件に応じて変動する。予め選択された基質濃度及び反応条件における所与の酵素の触媒量を決定するための手段は、当業者には周知である。

#### 【0506】

上記の方法が実施される温度は、氷点をちょうど上回る温度から最も敏感な酵素が変性する温度までの範囲をとりうる。好ましい温度範囲は、約0～約55、より好ましくは約20～約32である。別の例示的な実施態様において、本発明の方法の1つ又は複数の構成要素が、好熱性酵素を用いて昇温で実施される。

20

#### 【0507】

反応混合物を、受容体がグリコシル化されるのに十分な期間にわたり維持し、それにより所望の抱合体を形成させる。抱合体の一部を、しばしば、数時間後に検出することができ、回収可能な量が通常24時間以内に得られる。当業者は、反応速度が、選択された系について最適化されるいくつかの変動要因（例えば、酵素濃度、供与体濃度、受容体濃度、温度、溶媒体積）に依存していることを理解する。

#### 【0508】

本発明は、修飾ペプチドの工業規模の作製も提供する。本明細書では、工業規模では、通常、少なくとも約250mg、好ましくは少なくとも約500mg、より好ましくは少なくとも1グラムの完成し、精製された抱合体を作製する。その際、1回の反応サイクルの後であること、即ち、抱合体は、連続的に反復された同一の合成サイクルから得られた反応生成物の組合せ物ではないことが好ましい。

30

#### 【0509】

続く考察において、本発明は、グリコシル化ペプチドへの修飾されたシアル酸部分の抱合により例示される。例示的な修飾されたシアル酸は、(m-)PEGで標識される。PEG修飾されたシアル酸及びグリコシル化ペプチドの使用に関する以下の考察の焦点は、例示を明確にするためのものであり、本発明がこれら2つのパートナーの抱合に限定されることを意味するためのものではない。当業者は、考察が、一般的に、シアル酸以外の修飾されたグリコシル成分の付加に適用可能であることを理解する。さらに、考察は、PEG以外の薬剤（他の水溶性ポリマー、治療用成分、及び生体分子を含む）を用いたグリコシル単位の修飾にも等しく適用可能である。

40

#### 【0510】

(m-)PEG化又は(m-)PPG化された糖をペプチド又はグリコペプチド上に選択的に導入するために、酵素的手法を使用することができる。この方法は、PEG、PPG、又はマスクされた反応性官能基を含む修飾された糖を利用し、また、適切なグリコシルトランスフェラーゼ又はグリコシターゼと併用される。所望の糖連結を作るグリコシルトランスフェラーゼを選択し、修飾された糖を供与体基質として利用することによって、修飾基を、ポリペプチド骨格上、グリコペプチドの既存の糖残基上、又はポリペプチドに付加された糖残基上に直接的に導入することができる。別の実施態様において、方法は

50

修飾された糖を利用し、それはマスクされた反応性官能基を保有し、それは、修飾された糖のポリペプチド又はグリコペプチド上への転移後に、修飾基の付着のために使用することができる。

【0511】

一例において、グリコシルトランスフェラーゼはシアリルトランスフェラーゼであり、修飾されたシアリル残基をグリコペプチドに付加するために使用される。シアリル残基のためのグリコシド受容体を、O連結グリコシル化配列に、例えばポリペプチドの発現中に加えることができ、又は、ポリペプチドの発現後に、適切なグリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、又はそれらの組み合わせを使用して、化学的又は酵素的に加えることができる。適した受容体成分は、例えば、ガラクトシル受容体、例えばGalNAc、Gal 1, 4GlcNAc、Gal 1, 4GalNAc、Gal 1, 3GalNAc、ラクト-N-テトラオース、Gal 1, 3GlcNAc、Gal 1, 3Ara、Gal 1, 6GlcNAc、Gal 1, 4Glc(ラクトース)、及び当業者に公知の他の受容体などを含む(例えば、Paulson et al., J. Biol. Chem. 253: 5617-5624 (1978)を参照のこと)。

10

【0512】

例示的な実施態様において、GalNAc残基を、O連結グリコシル化配列に、GalNAcトランスフェラーゼの作用により加える。Hassan H, Bennett EP, Mandel U, Hollingsworth MA, and Clausen H (2000), Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases (Eds. Ernst, Hart, and Sinay), Wiley-VCH chapter "Carbohydrates in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook", pages 273-292. 方法は、修飾すべきポリペプチドを、適した量のガラクトシルトランスフェラーゼ及び適したガラクトシル供与体を含む反応混合物とインキュベートすることを含む。反応を実質的に完了まで進めさせて、又は、あるいは、反応を、前選択された量のラクトース残基を加える際に終結させる。選択されたサッカライド受容体を組み立てる他の方法は、当業者に明らかであろう。

20

【0513】

続く考察において、本発明の方法は、それに付着した水溶性ポリマーを有する修飾された糖の使用により例示される。考察の焦点は、例証の明確さのためである。当業者は、考察がそれらの実施態様(それにおいて修飾された糖は、治療用成分、生体分子などを持つ)と等しく関連することを理解するであろう。

30

【0514】

別の例示的な実施態様において、水溶性ポリマーが、GalNAc残基に、修飾されたガラクトシル(Gal)残基を介して加えられる。あるいは、非修飾Galを、末端GalNAc残基に加えることができる。

【0515】

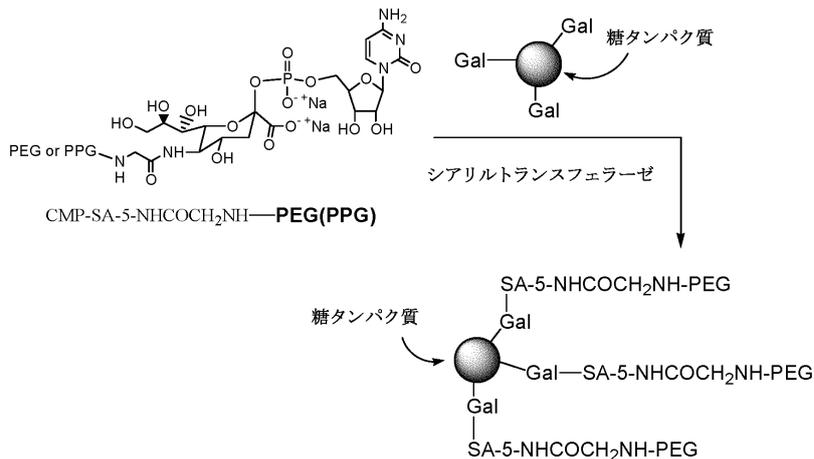
さらなる例において、水溶性ポリマー(例えば、PEG)を、末端Gal残基上に、修飾されたシアリル酸成分及び適切なシアリルトランスフェラーゼを使用して加える。この実施態様は、スキーム9において以下に例証される。

40

【0516】

スキーム9：修飾されたシアリル成分の糖タンパク質への添加

【化70】



10

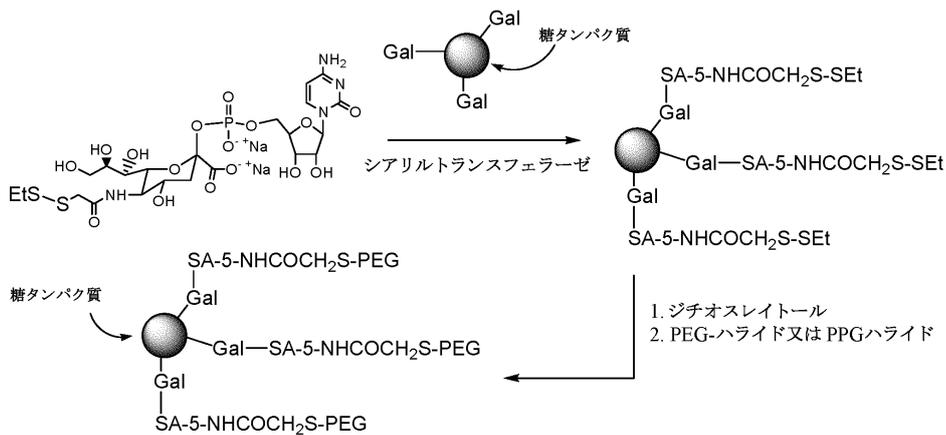
【0517】

さらなるアプローチにおいて、マスクされた反応性官能基がシアリル酸上に存在する。マスクされた反応基は、好ましくは、修飾されたシアリル酸をポリペプチドに付着させるために使用される条件による影響を受けない。修飾されたシアリル酸のポリペプチドへの共有結合的付着後、マスクを除去し、ポリペプチドを、修飾基（例えば水溶性ポリマー（例えば、PEG又はPPG）など）に、修飾された糖残基上の非マスク反応基と反応性修飾基との反応により抱合させる。この戦略を、スキーム10において以下に例証する。

20

【0518】

スキーム10：反応性官能基を保有するシアリル成分を使用したグリコペプチドの修飾【化71】



30

【0519】

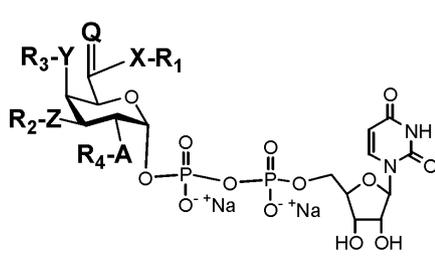
任意の修飾された糖を、グリコペプチドのオリゴサッカライド側鎖の末端糖に依存して、適切なグリコシルトランスフェラーゼとの組み合わせで使用することができる（表12）。

40

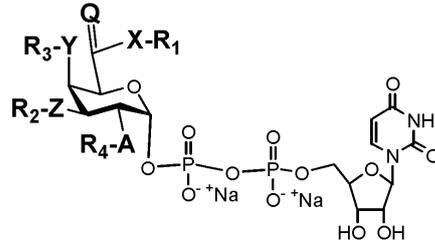
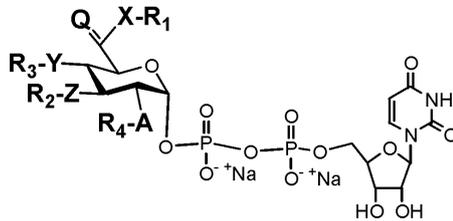
【0520】

表12：例示的な修飾された糖

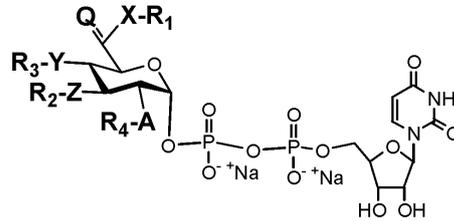
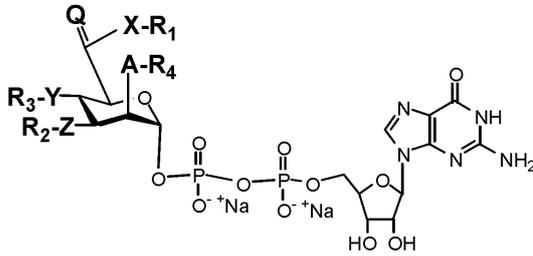
## 【化72】



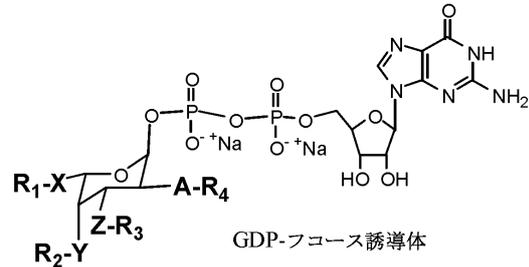
UDP-ガラクトース誘導体

UDP-ガラクトサミン誘導体  
(A = NHの場合、R<sub>4</sub>はアセチルでありうる)

UDP-グルコース誘導体

UDP-グルコサミン誘導体  
(A = NHの場合、R<sub>4</sub>はアセチルでありうる)

GDP-マンノース誘導体



GDP-フコース誘導体

X = O, NH, S, CH<sub>2</sub>, N-(R<sub>1-5</sub>)<sub>2</sub>.  
Y = X; Z = X; A = X; B = X.

Q = H<sub>2</sub>, O, S, NH, N-R.

R, R<sub>1-4</sub> = H, リンカー M, M.

M = 目的のリガンド

目的のリガンド = アシル-PEG, アシル-PPG, アルキル-PEG,  
アシル-アルキル-PEG, アシル-アルキル-PPG, カルバモイル-PEG,  
カルバモイル-PPG, PEG, PPG, アシル-アリル-PEG, アシル-アリル-PPG,  
アリル-PEG, アリル-PPG, マンノース-6-リン酸, ヘパリン, ヘパラン,  
SLex, マンノース, FGF, VFGF, タンパク質, コンドロイチン, ケラタン,  
デルマタン, アルブミン, インテグリン, ペプチドなど.

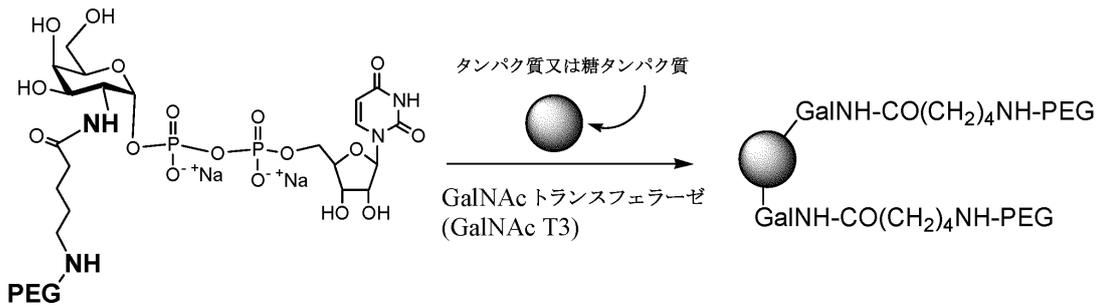
## 【0521】

代わりの実施態様において、修飾された糖を、ペプチド骨格に、糖残基をポリペプチド骨格上のO連結グリコシル化配列に転移させることが公知のグリコシルトランスフェラーゼを使用して、直接的に加える。この例示的な実施態様を、スキーム11において以下に記載する。本発明を実行する際に有用である例示的なグリコシルトランスフェラーゼは、

## 【0522】

スキーム11：先行するグリコシル化なしでのポリペプチド上への例示的な修飾された糖の転移

## 【化73】



10

## 【0523】

上に記載した例示的な実施態様の各々において、1つ又は複数の追加の化学的又は酵素的修飾工程を、修飾された糖のペプチドへの抱合後に利用することができる。例示的な実施態様において、酵素（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）を用いて、ポリペプチドに付着されている末端の修飾された糖にグリコシル単位（例えばフコース）を付加させる。別の実施例では、酵素反応を利用して、修飾された糖が抱合することができなかった部位を「キャップ」（例えば、シアル酸付加）する。あるいは、化学反応を利用して、抱合された修飾された糖の構造を改変する。例えば、抱合された修飾された糖を、その修飾された糖が付着しているペプチド成分との結合を安定化又は不安定化させる薬剤と反応させる。別の実施例では、修飾された糖の成分を、ペプチドへの抱合の後に脱保護する。当業者は、修飾された糖がペプチドに抱合された後の段階で、本発明の方法において有用な一連の酵素的手順及び化学的手順があることを理解するであろう。修飾された糖とペプチド抱合体のさらなる加工も本発明の範囲内である。

20

## 【0524】

別の例示的な実施態様において、グリコペプチドは、標的薬剤、例えば、トランスフェリン（血液脳関門を越え、また、エンドソームへとペプチドを送達する）、カルニチン（ペプチドを筋肉細胞に送達する；例えば、LeBorgne et al., *Biochem. Pharmacol.* 59: 1357-63 (2000)を参照のこと）、ならびにホスホネート、例えば、ビスホスホネート（骨及び他の石灰質組織にペプチドを標的化する；例えば、*Modern Drug Discovery*, August 2002, page 10を参照のこと）に抱合される。ホスホネート標的化に有用な他の薬剤は、当業者には明らかである。例えば、グルコース、グルタミン、及びIGFも、筋肉を標的とするために有用である。

30

## 【0525】

標的成分及び治療用ポリペプチドは、本明細書で考察する任意の方法によって、又は当技術分野公知の別の方法によって抱合される。当業者は、上に記載したものの以外のポリペプチドも、本明細書において記載される通りに誘導体化できることを理解するであろう。例示的なペプチドは、本願の権利者が所有する同時係属中の2001年10月10日に出願された米国仮出願第60/328,523号の付属書類において記載されている。

## 【0526】

例示的な実施態様において、標的薬剤及び治療用ポリペプチドは、リンカー成分を介して結合している。この実施態様において、治療用ポリペプチド又は標的薬剤のうちの少なくとも1つが、本発明の方法による完全なグリコシル結合基を通じてリンカー成分に結合している。例示的な実施態様において、リンカー成分は、ポリ（エーテル）、例えばポリエチレングリコールなどを含む。別の例示的な実施態様において、リンカー成分は、インピボで分解されて、身体の標的とされている組織又は領域にその抱合体を送達した後、標的薬剤から治療用ポリペプチドを放出させる少なくとも1つの結合を含む。

40

## 【0527】

さらに別の例示的な実施態様において、標的成分に治療用ポリペプチドを抱合せずに治療用成分上のグリコフォームを改変することを介して、治療用成分のインピボでの分布が改変される。例えば、治療用ポリペプチドは、グリコシル基の末端ガラクトース成分を

50

シアル酸（又はその誘導体）でキャップすることによって、細網内皮系による取り込みから回避させることができる。

【0528】

酵素

オリゴサッカリルトランスフェラーゼ

本発明の方法において有用なオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、真核生物又は原核生物の酵素でありうる。一実施態様において、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、特定の宿主細胞（それにおいてポリペプチドが発現される）に内因性である。例えば、ポリペプチドを細菌宿主細胞において発現させる場合、内因性酵素は P g 1 B 又は P g 1 B と有意な配列同一性を有する別の酵素でよい。一例において、内因性酵素は、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 92%、少なくとも約 94%、少なくとも約 96%、少なくとも約 98%、又は約 98% 超の配列同一性を P g 1 B 又は P g 1 B の対応する部分と有する。一例において、酵素は P g 1 B より小さいが、しかし、P g 1 B 配列の少なくとも部分に対応するアミノ酸配列を有する。別の例において、ポリペプチドは、真核生物宿主細胞（例えば酵母細胞など）において発現される。この例において、内因性オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、S t t 3 p 酵素又は S t t 3 p と有意な配列同一性を呈する別の酵素を含んでよい。

10

【0529】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、単一の酵素又はタンパク質複合体の部分、場合により膜結合でありうる。例えば、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ活性を有する膜結合酵素を含む膜調製物を、グリコシル化反応のための試薬として使用してよい。1つの特定の例において、細菌酵素 P g 1 B を宿主細胞（例えば、細菌細胞）において過剰発現させ、そのような宿主細胞の膜調製物を無細胞インビトログリコシル化反応のために使用する。

20

【0530】

一実施態様において、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは組換え酵素である。この実施態様の一例において、組換えオリゴサッカリルトランスフェラーゼを宿主細胞において同時発現させ、それにおいてポリペプチドが発現される。故に、一例において、宿主細胞は、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ（例えば、P g 1 B）をコードする核酸配列を含むベクター及び基質ポリペプチドをコードする核酸配列を含む別のベクターを含む。あるいは、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ及びポリペプチドの両方の核酸配列が、同じトランスフェクションベクターの一部である。

30

【0531】

別の実施態様において、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、膜アンカードメインを欠く可溶性タンパク質である。例えば、酵素は P g 1 B でよく、それにおいて N 末端疎水性部分の少なくとも一部を除去する。そのような切断は、残りの配列が、少なくともある程度のオリゴサッカリルトランスフェラーゼ活性を有する酵素を表わす限り、任意の数のアミノ酸残基を含みうる。一例において、可溶性酵素を宿主細胞において発現させ、次に単離する。単離された酵素をインビトログリコシル化プロトコールにおいて使用してよい。

40

【0532】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼは任意の種に由来しうる。オリゴサッカリルトランスフェラーゼの代表的な例は、真核生物（例えば、酵母、哺乳動物）タンパク質、例えば S t t 3 p など、細菌（例えば、大腸菌、カンピロバクター・ジェジュニ）タンパク質、例えば P g 1 B など、昆虫タンパク質などを含む。一例において、本発明では、組換え P g 1 B、又は P g 1 B 酵素と高い配列同一性を有する酵素を使用する。本発明の例示的なオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、配列番号 102 のアミノ酸配列を含む。例示的なオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 92%、少な

50

くとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、又は約98%超の配列同一性を配列番号102又はそのSTT3サブユニット(アミノ酸残基9~626)と有するアミノ酸配列を有する。

## 【0533】

P g l B (カンピロバクター・ジェジュニ、Accession CAL35243)

## 【表57】

(配列番号102)

MLKKEYLKNPYLVLFAMIVLAYVFSVFCRFYVWWASEFNEYFFNNQLMIISNDGYAFAEG  
 ARDMIAGFHQPNDLSYYGSSLSTLYWLKITYPFESFESIILYMSTFLSSLVVIPIILLANEYKRPL  
 MGFVAALLASVANSYYNRTMSGYYDTDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIY  
 LWWYPSSYTLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIAVILSSLTLSNIAWFYQSAHVILFALFALEQ  
 KRLNFMIIIGLGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIFRSDESANLTQGFMYFNVNQTIQEVENVD  
 FSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMIMALPILVLGFLALKGGLRFTIYSVPMALGF  
 GFLLEFKAILVKKYSQLTSNVCIVFATILTLAPVFIHIYNYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANR  
 EDYVVTWWDYGYPVRYYSVVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFSLSKDEQAAANMARLSVEYTE  
 KSFYAPQNDILKSDILQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFS  
 TVASFNFINDTGVLDPFTFSTAYPLDVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVVSNSIVEI  
 NSIKQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYDKNLFDLV  
 INSRDAKVFKLKI

10

20

## 【0534】

P g l B (ナイセリア・ゴノレア、Accession YP\_207258)

## 【表58】

(配列番号103)

MSKAVKRLFDIIASASGLIVLSPVFLVLIYLIRKNLGSPVFFIRERPGKDGKPFKMKVFRSMRD  
 ALDSDGIPLPDSERLTDFGKKLRATSLDELPELWNVLKGEMSLVGPRPLLMQYLPLYNKFQN  
 RRHEMKPGITGWAQVNGRNALSWDEKFCSDVWYTDNFSFWLDMKILFLTVKKVLIKEGISA  
 QGEATMPPFAGNRKLA VIGAGGHGKVVAELAAALGTYGEIVFLDDRTQGSVNGFPVIGTTLL  
 LENSLSPEQFDITVA VGNNRIRRQITENAAALGFKLPVLIHPDATVSPSAIIGQGSVVMKAVV  
 QAGSVLKDGVIVNTAATVDHDCLLDAFVHISPGAHLGNTTRIGEESTRIGTGACSRQQTTVGSG  
 VTAGAGAVIVCDIPDGMTVAGNPAKPLTGKNPKTGTA

30

## 【0535】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼ(サッカロマイセス・セレピシエ、Accession EDN64373)

## 【表59】

(配列番号104)

MKWCSTYIIWLAIIHFHKFQKSTATASHNIDDILQLKGGDTGVITVTADNYPLLSRGVPGY  
 FNILYITMRGTNSNGMSCQLCHDFEKTYQAVADVIRSQAPQSLNLFFTVDVNEVPQLVKD  
 LKLQNVPHLVVYPPAESNKQSQFEWKTSPFYQYSLVPENAENTLQFGDFLAKILNISITV  
 PQAFNVQEFVYYFVACMVVFIFIKK VILPKVTNKWKLFSMILSLGILLPSITGYKVFEMN  
 AIPFIARDAKNRIMYFSGGSGWQFGIEIFSVSLMYIVMSALSVLLIYVPKISCVSEKMRG  
 LLSSFLACVLFYFFSYFISCYLIKPNPGYPIVF

40

## 【0536】

50

オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (ホモ・サピエンス、Accession BAA  
23670)

【表60】

(配列番号 105)

MGYFRCAGAGSFGRRRKMEPSTAARAWALFWLLLPLLGAVCASGPRTLVLLDNLDNVRETHS  
LFFRSLKDRGFELTFKTADDPSLSLIK YGEFL YDNLIIFSPSVEDFGGNIN VETISAFIDGGGSVL  
VAASSDIGDPLREL GSECGIEFDEEKTAVIDHHNYDISDLGQHTLIVADTENLLKAPTIVGKSS  
LNPI LFRGVGMVADPDNPLVLDIL TGSSTSY SFFPDKPITQYPH AVGKNTLLIAGLQARNNAR  
VIFSGSLDFFSDFNSAVQKAAPGSQRYSQTGNYELAVALS RWFVKEEGVLRVGPVSHHRV  
GETAPPNAYTVTDLVEYSIVIQQLSNAKWV PFDGDDIQLEFVRIDPFVRTFLKKKGKYSVQF  
KLPDVYGVFQFKVDYNRLGYTHL YSSTQVSVRPLQHTQYERFIPSA YPYYASAFPMMLGLFI  
FSIVFLHMKEKEKSD

10

【0537】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (ムス・ムスクスル、Accession BAA  
23671)

【表61】

(配列番号 106)

MKMDPRLAVRAWPLCGLLLAVLGCVCASGPRTLVLLDNLDNVRDTHSLFFRSLKDRGFELTF  
KTADDPSLSLIK YGEFL YDNLIIFSPSVEDFGGNIN VETISAFIDGGGSVLVAASSDIGDPLREL  
GSECGIEFDEEKTAVIDHHNYDVSDLGQHTLIVADTENLLKAPTIVGKSSLNPI LFRGVGMVAD  
PDNPLVLDIL TGSSTSY SFFPDKPITQYPH AVGRNTLLIAGLQARNNARVIFSGSLDFFSDAFFN  
SAVQKATPGAQRYSQTGNYELAVALS RWFVKEEGVLRVGPVSHHRV GEMAPPNAYTVTDL  
VEYSIVIEQLSNGKWV PFDGDDIQLEFVRIDPFVRTFLKRKGKYSVQFKLPDVYGVFQFKVD  
YNRLGYTHL YSSTQVSVRPLQHTQYERFIPSA YPYYASAFSMMAGLFI FSIVFLHMKEKEKSD

20

【0538】

オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (カンジダ・アルビカンス、Accession  
XP\_714366 又は XP\_440145)

【表62】

(配列番号 107)

MAKSASNKKS IPTTSSSSTTTSAASSSVLKEVKSTLTTINNYFDTISAQPRLKLIDLFLIFLVL  
LGILQFIYVLIIGNFPFNSFLGGFISCVGQFVLLVSLRLQINDSTTTTNTKESDDQLELDEDKIEN  
GTTGGGNGRLFK EITPERSFGDFIFASLILHFIVHFIN

30

【0539】

ホスホ - ドリコール - GlcNAc - 1 - リン酸トランスフェラーゼ  
UDP - N - アセチルグルコサミン - ドリチル - リン酸 - N - アセチルグルコサミン - ホ  
スホトランスフェラーゼアイソフォーム b (ホモ・サピエンス、Accession N  
P\_976061)

40

## 【表 6 3】

(配列番号 108)

MIFLGFADDVLNLRWRHKLLLPTAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFPRPILGLHLDLILYY  
 VYMGLLAVFCTNAINILAGINGLEAGQSLVISASIIVFNLVELEGDCRDDHVFSLYFMIPFFFTT  
 LGLLYHNWYPSRVFVGDTCYFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPQVFNFLYSLPQLLHIIP  
 CPRHRIPRLNIKTGKLEMSYSKFKTKSLSFLGTFILKVAESLQLVTVHQSETEDGEFTECNMT  
 LINLLLKVLGPIHERNLTLTLLQLIGSAITFSIRYQLVRLFYDV

## 【0540】

10

UDP - N - アセチルグルコサミン - ドリチル - リン酸 - N - アセチルグルコサミン - ホ  
 スホトランスフェラーゼアイソフォーム a (ホモ・サピエンス、Accession N  
 P\_001373)

## 【表 6 4】

(配列番号 109)

MWAFSELPMPLLINLIVSLLGFVATVTLIPAFRGHFIAARLCGQDLNKTSRQQIPESQGVISGA  
 VFLIILFCFIPFPFLNCFVKEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVLNLRWRHKLLL  
 TAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFPRPILGLHLDLILYYVYMGLLAVFCTNAINILAGINL  
 EAGQSLVISASIIVFNLVELEGDCRDDHVFSLYFMIPFFFTTLGLLYHNWYPSRVFVGDTCYF  
 AGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPQVFNFLYSLPQLLHIIPCPRHRIPRLNIKTGKLEMSYSK  
 KTKSLSFLGTFILKVAESLQLVTVHQSETEDGEFTECNMTLINLLLKVLGPIHERNLTLTLL  
 LQILGSAITFSIRYQLVRLFYDV

20

## 【0541】

UDP - N - アセチルグルコサミン - ドリチル - リン酸 - N - アセチルグルコサミン - ホ  
 スホトランスフェラーゼ (GPT、G1PT、GlcNAc-1-P-トランスフェラー  
 ゼ) (ムス・ムスクスル、Accession P42867)

## 【表 6 5】

(配列番号 110)

MWAFPELPLPLLVNLIGSLLGFVATVTLIPAFRSHFIAARLCGQDLNKLSQQQIPESQGVISG  
 AVFLIILFCFIPFPFLNCFVEEQCKAFPHHEFVALIGALLAICCMIFLGFADDVLNLRWRHKLLL  
 PTAASLPLLMVYFTNFGNTTIVVPKPFPRWILGLHLDLILYYVYMGLLAVFCTNAINILAGIN  
 GLEAGQSLVISASIIVFNLVELEGDYRDDHIFSLYFMIPFFFTTLGLLYHNWYPSRVFVGDTC  
 YFAGMTFAVVGILGHFSKTMLLFFMPQVFNFLYSLPQLFHIIPCPRHRMPRLNAKTGKLEMSY  
 SKFKTKNLSFLGTFILKVAENLRLVTVHQGESEDGAFTECNMTLINLLLKVFPIHERNLTL  
 LLLLQVLSSAATFSIRYQLVRLFYDV

30

## 【0542】

40

UDP - N - アセチルグルコサミン - ドリチル - リン酸 - N - アセチルグルコサミン - ホ  
 スホトランスフェラーゼ (GPT、G1PT、GlcNAc-1-P-トランスフェラー  
 ゼ) (サッカロマイセス・セレピシエ、Accession P07286)

## 【表 6 6】

(配列番号 111)

MLRFLSLALITCLIYYSKNQGPSALVAAVGFAGIAGYLATDMLIPRVGKSFIKIGLFGKDLSKPG  
 RPVLPETIGAIPAAVYLFVMIYIPFIFYKYMVITTSGGGHRDVSVVEDNGMNSNIFPHDKLSE  
 YLSAILCLESTVLLGIADDFDLRWRHKFFLPAIAAIPLLMVYYVDFGVTHVLIIPGFMERWLK  
 KTSVDLGLWYYVYMASMAIFCPNSINILAGVNGLEVGCIVLAILALLNDLLYFSMGPLATR  
 DSHRFSAVLIIPFLGVSLALWKWNRWPATVVFVGDYCYFAGMVFAVVGILGHFSKTMLLLFI  
 PQIVNFIYSCPQLFKLVPCPRHRLPKFNEKDGLMYPSTRANLKEEPPKSIFKPILKLLYCLHLIDL  
 EFDENNEIISTSNMTLINLTLVWFGPMREDKLCNTILKLQFCIGILALLGRHAIGAIIFGHDNLW  
 TVR

10

## 【0 5 4 3】

グリコシル供与体分子の合成のために有用な他の酵素 P g l C (カンピロバクター・ジェ  
 ジュニ、Accession AAD51385)

## 【表 6 7】

(配列番号 112)

MYEKVFKRIFDFILALVLLVLFSPVILITALLKITQGSVIFTQNRPLGDEKIFKIYKFKTMSDER  
 DEKGELLSDELRLKAFGKIVRSLDELQLFNVLKGDMSFVGPRPLLVEYLSLYNEEQKLRH  
 KVRPGITGWAQVNGRNAISWQKKFELDVYYVKNISFLDLKIMFLTALKVLKRSVSGVSKEGH  
 VTTEKFNGKN

20

## 【0 5 4 4】

P g l C (ナイセリア・ゴノレア、Accession YP\_207257)

## 【表 6 8】

(配列番号 113)

MLNTALSPWPSFTREEADAVSKVLLSNKVNWTGSECREFEKEFAAFAGTRYAVALSNGTL  
 ALDAALKAIGIGAGDDVIVTSRTFLASASCIVNAGANPVFADVDLNSQNISAETVKAVLTPNT  
 KAVIVVHLAGMPAEMDGIMALAKEHDLWVIEDCAQAHGATYKKGKSVGSIGHVGAWSFCQD  
 KIITGGEGGMVTTNDKTLWEKMWAYYKDHGKSYDAVYHREHAPGFRWLHESFGTNWRM  
 MEMQAVIGRIQLKHLPEWTARRQENAAKLAESLRKFKSIRLIEVAGYIGHAQYKFYAFVKPE  
 HLKDDWTRDRIVSELNARNVPCYQGGCSEVYLEKAFDNTPWPKERLKNARELGGTALTFL  
 VHPTLTDDEIAFCKKHIEAVL TEAAR

30

## 【0 5 4 5】

グリコシルトランスフェラーゼ (メタノプレバクター・スミシイ、Accession  
 YP\_001273863)

40

## 【表 6 9】

(配列番号 114)

MKTAVLIPCYNELTIKKVILDFKKALPKADIYVYDNNSTDNSYEIAKDTGAIVKREYRQGGK  
 NVVRSMFRDIDADCYILVDGDDTYPAEASKEIEELILSKKADMVIGDRLSSTYFEENKRRFHN  
 SGNKLVKRLINTIFNSDISDIMTGMRGFSYEFVKSFPISSEFEIETEMTIFALNHNFLIKELPIEY  
 RDRMDGSESKLNTFSDGYKVISLLFGLFRDIRPLFFSLVTLVLLIAGLYFFPILIDFYRTGFVE  
 KVPTLITVGVVAIVAIIFFTGVVVHVIRKQHDENFEHHLNLIAQNKKR

## 【0 5 4 6】

50

### グリコシルトランスフェラーゼ

一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼが、本発明のグリコシル供与体種の合成において使用される。別の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼを、本発明のポリペプチド抱合体を作製する方法において使用してよい。グリコシルトランスフェラーゼは、タンパク質、グリコペプチド、脂質もしくは糖脂質、又は、伸長中のオリゴサッカライドの非還元末端に、活性化された糖（供与体のNDP-糖）を段階的様式で付加する反応を触媒する。例えば、第1の工程において、ポリペプチドは、本発明のグリコシル供与体種（例えば、脂質-ピロリン酸連結グリコシル成分）及び適したオリゴサッカリルトランスフェラーゼを使用してグリコシル化してよい。このグリコシル化反応は、場合により、宿主細胞において生じてよく、それにおいてポリペプチドが発現される。第2の工程において、グリコシル化されたポリペプチドを、修飾又は非修飾糖ヌクレオチド及び適したグリコシルトランスフェラーゼを含むグリコシル化又は糖PEG化反応に供する。

10

#### 【0547】

多数のグリコシルトランスフェラーゼが当技術分野において公知である。そのような酵素の例は、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、グルクロノニルトランスフェラーゼ（glucurononyltransferase）などロワール経路のグリコシルトランスフェラーゼを含む。

20

#### 【0548】

グリコシルトランスフェラーゼ反応を使用する酵素的糖合成のために、グリコシルトランスフェラーゼをクローン化し、又は、任意の供給源から単離することができる。多くのクローン化グリコシルトランスフェラーゼが公知であり、それらのポリヌクレオチド配列が知られている。グリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列、及びアミノ酸配列をそれから推測できる、グリコシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列は、Genbank、Swiss-Prot、EMBL、及び他のものを含めて、公的に利用可能な種々のデータベースにある。

#### 【0549】

本発明の方法において用いることができるグリコシルトランスフェラーゼは、限定はされないが、ガラクトシルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、グルクロニルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グルクロン酸トランスフェラーゼ、ガラクトン酸トランスフェラーゼ、及びオリゴサッカリルトランスフェラーゼを含む。適したグリコシルトランスフェラーゼは、真核生物、ならびに原核生物から得られるものを含む。

30

#### 【0550】

グリコシルトランスフェラーゼをコードするDNAは、化学合成によって、適切な細胞もしくは細胞株培養物からのmRNAの逆転写物のスクリーニングによって、適切な細胞からのゲノムライブラリーのスクリーニングによって、又は、これらの手順の組合せによって得ることができる。mRNA又はゲノムDNAのスクリーニングは、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子配列から作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて実施することができる。プローブは、公知の手順に従って、化学発光基、放射性原子、又は化学発光基などの検出可能な基で標識し、従来のハイブリダイゼーションアッセイで使用することができる。代替方法では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）手順により、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子配列から作製されるPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、グリコシルトランスフェラーゼの遺伝子配列を得ることができる。Mullis et al.、米国特許第4,683,195号、及びMullis et al.、米国特許第4,683,202号を参照のこと。

40

50

## 【0551】

グリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするDNAを含むベクターで形質転換させた宿主細胞中で、グリコシルトランスフェラーゼを合成することができる。ベクターを用いて、グリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするDNAを増幅させ、かつ/又は、グリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするDNAを発現させる。発現ベクターは、グリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードするDNA配列が、適した宿主中でグリコシルトランスフェラーゼ酵素の発現をもたらすことができる適した制御配列に機能的に連結している、複製可能なDNAコンストラクトである。そのような制御配列の必要性は、選択される宿主及び選ばれる形質転換方法に依存して変動しうる。通常、制御配列は、転写プロモーター、転写を制御するための任意選択のオペレーター配列、適したmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写及び翻訳の終結を制御する配列を含む。増幅ベクターは、発現制御ドメインを要求しない。必要とされるのは、複製起点によって通常与えられる、宿主中で複製する能力と、形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子だけである。

10

## 【0552】

例示的な実施態様において、本発明は、原核生物の酵素を利用する。そのようなグリコシルトランスフェラーゼは、多くのグラム陰性細菌によって産生される、リポオリゴサッカライド(LOS)の合成に参与する酵素を含む(Preston et al., Critical Reviews in Microbiology 23(3): 139-180 (1996))。そのような酵素は、限定はされないが、大腸菌やネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)などの種のrfaオペロンのタンパク質が含まれ、1,6ガラクトシルトランスフェラーゼ及び1,3ガラクトシルトランスフェラーゼ(例えば、EMBLアクセッション番号M80599及びM86935(大腸菌); EMBLアクセッション番号S56361(ネズミチフス菌)、グルコシルトランスフェラーゼ(Swiss-Protアクセッション番号P25740(大腸菌)、1,2-グルコシルトランスフェラーゼ(rfaJ)(Swiss-Protアクセッション番号P27129(大腸菌)及びSwiss-Protアクセッション番号P19817(ネズミチフス菌))、ならびに1,2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(rfaK)(EMBLアクセッション番号U00039(大腸菌))を含む。アミノ酸配列が公知である他のグリコシルトランスフェラーゼは、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌、ネズミチフス菌、サルモネラエンテリカ(*Salmonella enterica*)、腸炎エルシニア(*Yersinia enterocolitica*)、らい菌(*Mycobacterium leprosum*)などの生物で特徴付けられているrfaBや緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)のrh1オペロンなどのオペロンによってコードされているものを含む。

20

30

## 【0553】

ラクト-N-ネオテトラオース、D-ガラクトシル-1,4-N-アセチル-D-グルコサミニル-1,3-D-ガラクトシル-1,4-D-グルコース、ならびに、粘膜病原菌の淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)及び髄膜炎菌(*N. meningitidis*)のLOS中で同定されたP<sup>k</sup>血液型の3糖配列、D-ガラクトシル-1,4-D-ガラクトシル-1,4-D-グルコース(Scholten et al., J. Med. Microbiol. 41: 236-243 (1994))を含む構造体を作るのに参与しているグリコシルトランスフェラーゼも本発明で使用するために適している。これらの構造体の生合成に参与しているグリコシルトランスフェラーゼをコードする、髄膜炎菌及び淋菌からの遺伝子は、髄膜炎菌の免疫型L3及びL1(Jennings et al., Mol. Microbiol. 18: 729-740 (1995))ならびに淋菌変異体F62(Gotshlich, J. Exp. Med. 180: 2181-2190 (1994))から同定されている。髄膜炎菌では、3種の遺伝子、lgtA、lgtB、及びlgtEからなる部位が、ラクト-N-ネオテトラオース鎖中の糖の最後の3つを付加するために要求されるグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードする(Wakarchuk et al., J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996))。最近、lgtB及びlgtA遺伝子産物の酵素活性が実証され、提唱されているそれらのグリコシルトランスフェラーゼ機能に関して初めて直接的な証拠が提供された(Wakarchuk et al., J. Biol. Chem. 271(45): 28271-276 (1996))。淋菌(*N. gonorrh*

40

50

oeae) では、2種の追加の遺伝子、 $\alpha$ -D-GalNAcをラクト-N-ネオテトラオース構造体の末端ガラクトースの3位に付加する1gtD、及び、切断LOSのラクトースエレメントに末端 $\alpha$ -D-Galを付加し、このようにしてP<sup>k</sup>血液型の抗原構造を作製する1gtCがある(Gotshlich (1994)、上記)。髄膜炎菌では、分離した免疫型L1も、P<sup>k</sup>血液型抗原を発現し、また、1gtC遺伝子を有することが示されている(Jennings et al., (1995)、上記)。ナイセリア(*Neisseria*)のグリコシルトランスフェラーゼ及び関連遺伝子は、米国特許第5545553号(Gotshlich)でも記載されている。ヘリコバクターピロリ(*Helicobacter pylori*)からの1,2-フコシルトランスフェラーゼ及び1,3-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子も、特徴付けられている(Martin et al., *J. Biol. Chem.* 272: 21349-21356 (1997))。また、カンピロバクター・ジエジュニ(*Campylobacter jejuni*)のグリコシルトランスフェラーゼも本発明において有用である(例えば、[http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf\\_42.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html)を参照のこと)。

10

#### 【0554】

##### (a) GalNAcトランスフェラーゼ

実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼは、UDP-GalNAcの大ファミリーのメンバーである：ポリペプチドN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ(GalNAcトランスフェラーゼ)は、通常、GalNAcをセリン及びトレオニン受容体部位に転移させる(Hassan et al., *J. Biol. Chem.* 275: 38197-38205 (2000))。これまでに、哺乳動物のGalNAcトランスフェラーゼファミリーの12種のメンバーが同定され、特徴付けされており(Schwientek et al., *J. Biol. Chem.* 277: 22623-22638 (2002))、また、ゲノムデータベースの解析により、この遺伝子ファミリーの数種の推定上の追加メンバーが予測されている。GalNAcトランスフェラーゼのアイソフォームは種々の動態諸特性を有し、時間的かつ空間的に異なる発現パターンを示す。これは、それらの生物学的機能が異なることを示唆している(Hassan et al., *J. Biol. Chem.* 275: 38197-38205 (2000))。GalNAcトランスフェラーゼの配列解析により、これらの酵素が2種の異なるサブユニットを有するという仮説が導かれた。これらのサブユニットは、中央の触媒ユニット、ならびに、「レクチンドメイン」と呼ばれる、植物のレクチンリシンに配列が類似したC末端ユニットである(Hagen et al., *J. Biol. Chem.* 274: 6797-6803 (1999); Hazes, *Protein Eng.* 10: 1353-1356 (1997); Breton et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 563-571 (1999))。選択された保存残基の部位特異的突然変異誘発を伴う以前の実験により、触媒ドメインの変異は触媒活性を消失させることが確認された。一方、「レクチンドメイン」における変異は、GalNAcトランスフェラーゼのアイソフォームであるGalNAc-T1の触媒活性に対して有意な影響を及ぼさなかった(Tenno et al., *J. Biol. Chem.* 277(49): 47088-96 (2002))。したがって、C末端の「レクチンドメイン」は、機能的ではなく、GalNAcトランスフェラーゼの酵素機能に対して役割を果たしていないと考えられていた(Hagen et al., *J. Biol. Chem.* 274: 6797-6803 (1999))。

20

30

#### 【0555】

ポリペプチドGalNAcトランスフェラーゼも、明らかなGalNAcグリコペプチド特異性は示していないが、その推定上のレクチンドメインによって調節されているようである(PCR出願WO01/85215 A2号)。最近、GalNAc-T1の推定上のレクチンドメインにおける変異が、GalNAc-T4において以前に分析された変異と同様に(Hassan et al., *J. Biol. Chem.* 275: 38197-38205 (2000))、GalNAc-T4と同様の様式で酵素の活性を変更することが発見された。このように、野生型GalNAc-T1は、複数の受容体部分を有するペプチド基質に複数の連続GalNAc残基を付加したが、突然変異GalNAc-T1は、同じ基質に複数のGalNAc残基を付加することができなかった(Tenno et al., *J. Biol. Chem.* 277(49): 47088-96 (2002))。より最近では、マウスGalNAc-T1(Fritz et al., *PNAS* 2004, 101(43): 15307-15312)ならびにヒトGalNAc-T2(Fritz et al., *J. Biol. Chem.* 2006,

40

50

281(13): 8613-8619) の X 線結晶構造が決定されている。ヒト GalNAc-T2 構造によって、触媒ドメイン及びレクチンドメインの間の予想外の柔軟性が明らかにされており、グリコシル化基質を捕捉するための GalNAc-T2 による新たな機構が示唆された。レクチンドメインを欠く GalNAc-T2 の動態解析によって、このドメインのグリコペプチド基質に作用する際の重要性が確認された。しかし、非グリコシル化基質に関する酵素活性は、レクチンドメインの除去により有意な影響を受けなかった。このように、レクチンドメインを欠く切断ヒト GalNAc-T2 酵素又は切断レクチンドメインを有するそれらの酵素は、ポリペプチド基質のグリコシル化のために有用でありうる(ここで、結果として得られるモノグリコシル化ポリペプチドのさらなるグリコシル化は望まれない)。

10

## 【0556】

遺伝子操作によりクローン化した遺伝子からの酵素 GalNAc-TI-XIV のようなタンパク質の生産も周知である。例えば米国特許第 4,761,371 号を参照のこと。1つの方法は、十分なサンプルの回収を含み、次に、酵素のアミノ酸配列を N-末端シーケンシングにより決定する。この情報を次に使用して全長の(膜に結合した)トランスフェラーゼをコードする cDNA クローンを単離し、これは昆虫細胞系 Sf9 中で発現して完全に活性な酵素の合成をもたらす。酵素の受容体特異性を、次に、16種の異なるタンパク質における既知のグリコシル化配列周辺のアミノ酸の半定量的分析、それに続く合成ペプチドのインビトロでのグリコシル化試験により決定する。この操作によって、特定のアミノ酸残基がグリコシル化ペプチドセグメント中で過剰提示されること、及び、グリコシル化されたセリン及びトレオニン残基周辺の特異的位置の残基が、他のアミノ酸成分よりも顕著な効果を受容体効率に有しうることが実証された。

20

## 【0557】

GalNAc トランスフェラーゼの突然変異を利用し、野生型酵素により産生されるものとは異なるグリコシル化パターンを産生することができることが実証されているため、本発明の1つ又は複数の突然変異又は切断 GalNAc トランスフェラーゼを利用することは本発明の範囲内である。GalNAc-T2 タンパク質の触媒ドメイン及び切断突然変異体が、例えば、米国仮特許出願第 60/576,530 号(2004年6月3日出願)；及び米国仮特許出願第 60/598,584 号(2004年8月3日出願)において記載されている；これらの両方が、本明細書において参照により全ての目的のために組み入れられる。触媒ドメインは、また、公知のグリコシルトランスフェラーゼを伴うアラインメントにより同定することができる。切断 GalNAc-T2 酵素(例えばヒト GalNAc-T2(51)、ヒト GalNAc-T2(51 445)など)及びこれらの酵素を得る方法も、WO 06/102652(PCT/US06/011065、2006年3月24日出願)及び PCT/US05/00302(2005年1月6日出願)において記載されており、それらは本明細書において参照により全ての目的のために組み入れられる。

30

## 【0558】

## (b) フコシルトランスフェラーゼ

いくつかの実施態様において、本発明の方法において使用されるグリコシルトランスフェラーゼは、フコシルトランスフェラーゼである。フコシルトランスフェラーゼは、当業者には公知である。例示的なフコシルトランスフェラーゼは、L-フコースを GDP-フコースから受容体糖のヒドロキシ位置に転移させる酵素を含む。非ヌクレオチド糖を受容体に転移させるフコシルトランスフェラーゼも、本発明において有用である。

40

## 【0559】

いくつかの実施態様において、受容体糖は、例えば、オリゴサッカライドグリコシド中の Gal(1,3,4)GlcNAc 基の GlcNAc である。この反応に適したフコシルトランスフェラーゼは、ヒトの乳から最初に特徴を明らかにされた Gal(1,3,4)GlcNAc 1-(1,3,4)フコシルトランスフェラーゼ(FTIIIE.C.No.2.4.1.65)(Palcic, et al., Carbohydrate Res. 190: 1-11

50

(1989); Prieels, et al., J. Biol. Chem. 256: 10456-10463 (1981);及びNunez, et al., Can. J. Chem. 59: 2086-2095 (1981)を参照のこと)、ならびにヒト血清中に存在するGal (1 4) GlcNAc - フコシルトランスフェラーゼ (FTIV、FTV、FTVI)を含む。FTVII (E.C.No.2.4.1.65)、シアリル (2 3) Gal (1 3) GlcNAc フコシルトランスフェラーゼも特徴を明らかにされている。Gal (1 3, 4) GlcNAc - (1 3, 4) フコシルトランスフェラーゼの組換え型も特徴を明らかにされている (Dumas, et al., Bioorg. Med. Letters 1: 425-428 (1991)及びKukowska-Latallo, et al., Genes and Development 4: 1288-1303 (1990)を参照のこと)。他の例示的なフコシルトランスフェラーゼは、例えば、1, 2 フコシルトランスフェラーゼ (E.C.No.2.4.1.69)を含む。Mollicone, et al., Eur. J. Biochem. 191: 169-176 (1990)又は米国特許第5, 374, 655号で記載されている方法によって、酵素的フコシル化を実施することができる。フコシルトランスフェラーゼを得るために使用される細胞は、また、GDP - フコースを合成するための酵素系を含む。

#### 【0560】

##### (c) ガラクトシルトランスフェラーゼ

別の群の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼは、ガラクトシルトランスフェラーゼである。例示的なガラクトシルトランスフェラーゼは、(1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼを含む (E.C.No.2.4.1.151、例えば、Dabkowski et al., Transplant Proc. 25: 2921 (1993)及びYamamoto et al. Nature 345: 229-233 (1990)、ウシ (Genbank j04989、Joziassse et al., J. Biol. Chem. 264: 14290-14297 (1989))、マウス (GenBank m26925; Larsen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989))、ブタ (GenBank L36152; Strahan et al., Immunogenetics 41: 101-105 (1995))を参照のこと。他の適した(1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼは、B血液型抗原の合成に参与しているものである (EC2.4.1.37, Yamamoto et al., J. Biol. Chem. 265: 1146-1151 (1990) (ヒト))。さらに別の例示的なガラクトシルトランスフェラーゼは、コアGal-T1である。Cho, S.K. and Cummings, R.D. (1997) J. Biol. Chem., 272, 13622-13628により報告されているものなど1, 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼの可溶性も、本発明を実施するうえで適切である。

#### 【0561】

別の実施態様において、ガラクトシルトランスフェラーゼは、(1, 3) - ガラクトシルトランスフェラーゼ (例えばCore-1-GalT1など)である。ヒトCore-1 - 1, 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼが記載されている (例えば、Ju et al., J. Biol. Chem. 2002, 277(1): 178-186を参照のこと)。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 酵素が、Correia et al., PNAS 2003, 100(11): 6404-6409及びMuller et al., FEBS J. 2005, 272(17): 4295-4305において記載されている。追加のCore-1 - 3ガラクトシルトランスフェラーゼ (その切断バージョンを含む) が、WO/0144478及び米国仮特許出願第60/842, 926号 (2006年9月6日に出願)において開示されている。例示的な実施態様において、(1, 3) - ガラクトシルトランスフェラーゼは、PubMed Accession Number AA F52724 (CG9520-PCの転写物)により記載される酵素及びその修飾バージョン、例えばその変異体など (それらは細菌中での発現のためにコドン最適化されている)より選択されるメンバーである。例示的な可溶性Core-1-GalT1 (Core-1-GalT1 31) 酵素の配列が以下に示されている：

#### 【0562】

(1, 4) ガラクトシルトランスフェラーゼも本発明の方法で使用するために適しており、例えば、EC2.4.1.90 (LacNAcシンターゼ)及びEC2.4.1.22 (ラクトースシンターゼ) (ウシ (D'Agostaro et al., Eur. J. Biochem. 183: 211-217 (1989))、ヒト (Masri et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 657-663 (1988))、マウス (Nakazawa et al., J. Biochem. 104: 165-168 (1988))、ならび

10

20

30

40

50

に E . C . 2 . 4 . 1 . 3 8 及びセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ ( EC2.4.1.45 , Stahl et al., J. Neurosci. Res. 38: 234-242 (1994) ) を含む。他の適したガラクトシルトランスフェラーゼは、例えば、 1 , 2 ガラクトシルトランスフェラーゼ ( 例 えば、シゾサッカロミセスポンベ ( Schizosaccharomyces pombe ) から、Chapell et al., Mol . Biol. Cell 5: 519-528 (1994) ) を含む。

【 0 5 6 3 】

( d ) シアリルトランスフェラーゼ

シアリルトランスフェラーゼは、組換え細胞及び本発明の反応混合物において有用な別の型のグリコシルトランスフェラーゼである。組換え型シアリルトランスフェラーゼを産生する細胞は、また、シアリルトランスフェラーゼに対するシアル酸供与体である CMP - シアル酸を産生する。本発明で使用するために適したシアリルトランスフェラーゼの例は、ST3Gal III ( 例 えば、ラット又はヒトの ST3Gal III )、ST3Gal IV、ST3Gal I、ST6Gal I、ST3Gal V、ST6Gal II、ST6GalNAc I、ST6GalNAc II、及びST6GalNAc III を含む ( 本明細書において使用されるシアリルトランスフェラーゼの命名法は、Tsuji et al., Glycobiology 6: v-xiv (1996) において記載される通りである ) 。 ( 2 , 3 ) シアリルトランスフェラーゼ ( EC 2 . 4 . 9 9 . 6 ) と呼ばれる例示的な ( 2 , 3 ) シアリルトランスフェラーゼは、2 糖 Gal 1 3 Glc の非還元末端 Gal 又はグリコシドにシアル酸を転移させる。Van den Eijnden et al., J. Biol. Chem. 256 : 3159 (1981), Weinstein et al., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982), 及びWen et al ., J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992) を参照のこと。別の例示的な 2 , 3 - シアリルトランスフェラーゼ ( EC 2 . 4 . 9 9 . 4 ) は、2 糖の非還元末端 Gal 又はグリコシドにシアル酸を転移させる。Rearick et al., J. Biol. Chem. 254: 4444 (1979) 及び Gillespie et al., J. Biol. Chem. 267: 21004 (1992) を参照のこと。別の例示的な酵素は、Gal - - 1 , 4 - GlcNAc - 2 , 6 シアリルトランスフェラーゼを含む ( Kurosawa et al. Eur. J. Biochem. 219: 375-381 (1994) を参照のこと ) 。

【 0 5 6 4 】

好ましくは、グリコペプチドの糖をグリコシル化する場合、シアリルトランスフェラーゼは、完全にシアル酸付加された糖構造体上で末端シアル酸の土台となる最も一般的な末端から 2 番目の配列である Gal 1 , 4 GlcNAc 配列にシアル酸を転移させることができる ( 以下の表 1 4 を参照のこと ) 。

【 0 5 6 5 】

10

20

30

## 【表 70】

表 14: 受容体基質として Gal $\beta$ 1,4GlcNAc 配列を使用するシアリルトランスフェラーゼ

シアリルトランスフェラーゼ	供給源	形成される配列	参考文献
ST6Gal I	哺乳動物	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	哺乳動物	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	哺乳動物	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	哺乳動物	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	
ST6Gal II	フォトバクテリウム	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	3

1) Goochee *et al.*, *Bio/Technology* 9: 1347-1355 (1991)2) Yamamoto *et al.*, *J. Biochem.* 120: 104-110 (1996)3) Gilbert *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 28271-28276 (1996)

## 【0566】

特許請求の範囲の方法で有用なシアリルトランスフェラーゼの例は、(2, 3)シアリルトランスフェラーゼ (EC 2.4.99.6) と呼ばれる ST3Gal III である。この酵素は、Gal 1, 3GlcNAc 又は Gal 1, 4GlcNAc グリコシドの Gal へのシアル酸の転移を触媒し (例えば、Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992); Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1991)) を参照のこと)、グリコペプチド中のアスパラギン結合型オリゴサッカライドのシアル酸付加を司っている。シアル酸は、Gal に結合し、2つの糖の間に結合が形成される。これらの糖の間の結合形成 (結合) は、NeuAc の 2 位と Gal の 3 位の間にある。この特定の酵素は、ラットの肝臓 (Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982)); ヒト cDNA (Sasaki *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 1394-1401) 及びゲノム (Kitagawa *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 931-938) から単離することができる。DNA 配列が公知であり、組換え発現によってこの酵素を作製することを容易にしている。別の実施態様において、特許請求の範囲のシアル酸付加の方法は、ラット ST3Gal III を使用する。

## 【0567】

本発明において有用な他の例示的なシアリルトランスフェラーゼは、(2, 3)を含めて、カンピロバクター・ジェジュニから単離されるものを含む。例えば、WO 99/49051 号を参照のこと。

## 【0568】

表 5 に記載したものの以外のシアリルトランスフェラーゼも、商業的に重要なグリコペプチドにシアル酸付加するための経済的かつ効率的な大規模プロセスにおいて有用である。これら他の酵素の有用性を調べるための簡単な試験として、種々の量の各酵素 (1 ~ 100 mU / mg タンパク質) を、(1 ~ 10 mg / ml で) アシアロ - 1 AGP と反応させて、問題のシアリルトランスフェラーゼがグリコペプチドにシアル酸付加する能力を、ウシの ST6Gal I、ST3Gal III、又は両方のシアリルトランスフェラーゼに対して比較する。あるいは、他のグリコペプチドもしくはグリコペプチド、又は、ペプチド主鎖から酵素的に遊離された N - 結合型オリゴサッカライドを、アシアロ - 1 AGP の代わりにこの評価に使用することができる。(本開示において ST3Gal III に関して例示するように) ST6Gal I より効率的にグリコペプチドの N - 結合型オリゴサッカライドにシアル酸付加する能力を有するシアリルトランスフェラーゼは、ペプチ

ドにシアル酸付加するための実用的な大規模プロセスにおいて有用である。他の例示的なシアリルトランスフェラーゼは、図10に示す。

【0569】

本発明の抱合体において、Sia修飾基カセットを、Galに、2,6又は2,3連結において連結させることができる。

【0570】

#### 融合タンパク質

他の例示的な実施態様において、本発明の方法は、所望のグリコペプチド抱合体の合成に参与している複数の酵素活性を有する融合タンパク質を利用する。融合ポリペプチドは、例えば、補助酵素の触媒活性ドメインに結合しているグリコシルトランスフェラーゼの触媒活性ドメインから構成されるものでよい。補助酵素の触媒ドメインは、例えば、グリコシルトランスフェラーゼのための供与体であるヌクレオチド糖を形成する工程を触媒することができる、又は、グリコシルトランスフェラーゼサイクルに参与している反応を触媒することができる。例えば、グリコシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを、ヌクレオチド糖合成に参与している酵素をコードするポリヌクレオチドにインフレームで結合させることができる。結果として得られる融合タンパク質は、次に、ヌクレオチド糖の合成だけでなく、受容体分子への糖成分の転移も触媒することができる。融合タンパク質は、1つの発現可能なヌクレオチド配列に結合された2種以上のサイクル酵素になることができる。他の実施態様において、融合タンパク質は、2種以上のグリコシルトランスフェラーゼの触媒活性ドメインを含む。例えば、5641668を参照のこと。本発明の修飾されたグリコペプチドは、種々の適した融合タンパク質を利用することによって、容易にデザインし製造することができる（例えば、1999年6月24日にWO99/31224号として公開されたPCT特許出願PCT/CA98/01180号を参照のこと）。

【0571】

#### 固定化酵素

細胞結合型酵素に加えて、本発明は、固体及び/又は可溶性の支持体上に固定化された酵素の使用も提供する。例示的な実施態様において、本発明の方法による完全なグリコシルリンカーを介してPEGに抱合されているグリコシルトランスフェラーゼが提供される。PEG-リンカー-酵素抱合体は、場合により、固体支持体に付着されている。本発明の方法において固体に支持された酵素を使用することにより、反応混合物の精密な検査及び反応生成物の精製が簡易になり、また、酵素を容易に回収することも可能になる。グリコシルトランスフェラーゼ抱合体は、本発明の方法で利用される。酵素及び支持体の他の組合せ物は、当業者に明らかであろう。

【0572】

#### ペプチド抱合体の精製

本明細書において記載されるプロセスにより産生されたポリペプチド抱合体は、精製なしで使用することができる。しかし、通常は、生成物を回収することが好ましい。薄層もしくは厚層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、又は膜ろ過など、グリコシル化された糖を回収するための標準的な周知の技術を使用することができる。より好ましくは、逆浸透膜を利用した膜ろ過、又は、以下及び本明細書において引用する文献において考察されている通りに、1つ又は複数のカラムクロマトグラフィー技術を回収のために使用することが好ましい。例えば、分子量カットオフ値が約3000~10,000の膜による膜ろ過を用いて、グリコシルトランスフェラーゼなどのタンパク質を除去することができる。次に、ナノろ過又は逆浸透法を用いて、塩類の除去及び/又は糖生成物の精製を行うことができる（例えば、WO98/15581号を参照のこと）。ナノフィルター膜は、使用する膜に応じて、1価の塩類を通過させるが多価の塩類及び約100~約2000ダルトンより大きい非荷電の溶質は保持する、ある種類の逆浸透膜である。このように、典型的な適用において、本発明の方法により調製されるサッカライドは膜中に保持され、混入塩は通過する。

10

20

30

40

50

## 【0573】

修飾された糖タンパク質が細胞内で産生される場合、第1の工程として、粒子状細片（細胞及び細胞細片を含む）を、例えば、遠心分離又は限外ろ過によって除去する。場合により、市販のタンパク質濃縮フィルターを用いてタンパク質を濃縮し、続いて、イミノアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー（例えば、ジエチルアミノエチル（DEAE）又はマトリクス含有カルボキシメチル基又はスルホプロピル基）、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）の1つ又は複数の工程により、他の不純物からポリペプチド変異体を分離してよい。例示的な固定相は、Blue-セファロース、CM Blue-セファロース、MONO-Q、MONO-S、レンチルレクチン-セファロース、WGA-セファロース、Con A-セファロース、エーテルトヨパール、ブチルトヨパール、フェニルトヨパール、SP-セファロース、又はタンパク質Aセファロースを含む。

10

## 【0574】

他のクロマトグラフィー技術は、SDS-PAGEクロマトグラフィー、シリカクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、逆相HPLC（例えば、脂肪族基を付加されたシリカゲル）、例えばセファデックスの分子ふるいもしくはサイズ排除クロマトグラフィーを用いたゲルろ過、ポリペプチドを選択的に結合するカラムでのクロマトグラフィー、及びエタノールもしくは硫酸アンモニウム沈殿を含む。

## 【0575】

培養において産生される修飾されたグリコペプチドは、通常、細胞、酵素などから最初に抽出し、それに続き、1つ又は複数の濃縮、塩析、水系イオン交換、又はサイズ排除クロマトグラフィーの工程、例えば、SPセファロースを用いた工程を行うことによって単離される。さらに、修飾された糖タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーによって精製してもよい。HPLCを、1つ又は複数の精製工程のために用いてもよい。

20

## 【0576】

タンパク分解を阻害するために、前述の工程のいずれかに、プロテアーゼ阻害剤、例えばメチルスルホニルフルオリド（PMSF）を含めてよく、また、外因性の汚染菌の増殖を防止するために、抗生物質を含めてよい。

## 【0577】

別の実施態様において、本発明の修飾されたグリコペプチドを作製する系から得た上清を、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon限外ろ過ユニットを用いて、最初に濃縮する。濃縮工程に続き、濃縮物を適した精製マトリクスに適用してよい。例えば、適した親和性マトリクスは、ポリペプチドに対するリガンド、適した支持体に結合されたレクチン又は抗体分子を含んでよい。あるいは、陰イオン交換樹脂、例えば、ペンダント状のDEAE基を有するマトリクス又は基質を用いてよい。適したマトリクスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、又は、タンパク質精製で通常用いられる他の型のものを含む。あるいは、陽イオン交換工程を用いてよい。適した陽イオン交換体には、スルホプロピル基又はカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリクスが含まれる。スルホプロピル基が特に好ましい。

30

## 【0578】

最後に、疎水性RP-HPLC媒体、例えばペンダント状のメチル基又は他の脂肪族基を有するシリカゲルを用いた1つ又は複数のRP-HPLC工程を用いて、ポリペプチド変異体組成物をさらに精製してよい。前述の精製工程のうちの一部又は全てを、種々の組合せで用いて、均質な修飾された糖タンパク質を提供することもできる。

40

## 【0579】

大規模な発酵から得られる本発明の修飾されたグリコペプチドを、Urdal et al., J. Chromatog. 296: 171 (1984)により開示されているものに類似した方法により精製してよい。この参考文献では、調製HPLCカラムでの組換えヒトIL-2の精製のための2回連続したRP-HPLC工程について記載されている。あるいは、技術、例えばアフィニティークロマトグラフィーなどを利用して、修飾された糖タンパク質を精製してもよい。

50

## 【0580】

## ペプチドコード配列の取得

## 一般的な組換え技術

突然変異ポリペプチド（本発明のO連結グリコシル化配列を組み入れる）の作製は、ポリペプチドの突然変異により又は完全化学合成により、対応する親ポリペプチドのアミノ酸配列を改変することにより達成することができる。ポリペプチドのアミノ酸配列は、好ましくは、DNAレベルでの変化を通じて、具体的には、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生産するように予め選択された塩基で、そのポリペプチドをコードするDNA配列を突然変異させることにより改変される。DNA突然変異は、好ましくは、当技術分野において公知の方法を使用して作製される。

10

## 【0581】

本発明は、組換え遺伝学の分野における慣用技術に依存する。本発明において有用な一般的方法を開示している基本的な教科書は、Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed.2001); Krieglner, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990);及びAusubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994)を含む。

## 【0582】

核酸のサイズは、キロベース(kb)又は塩基対(bp)で与えられる。これらは、アガロース又はアクリルアミドゲル電気泳動、配列決定された核酸、又は公開されているDNA配列に由来する推定値である。タンパク質について、サイズはキロダルトン(kDa)又はアミノ酸残基数で与えられる。タンパク質のサイズは、ゲル電気泳動から、配列決定されたタンパク質から、派生するアミノ酸配列から、又は公開されているタンパク質配列から推定される。

20

## 【0583】

市販されていないオリゴヌクレオチドは、例えば、Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981)により最初に記載された固相ホスホルアミダイトリエステル法に従い、Van Devanter et. al., *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984)において記載されている通りに自動合成機を使用して化学的に合成することができる。遺伝子全体も、化学的に合成することができる。オリゴヌクレオチドの精製は、当技術分野で認識されている任意の戦略、例えば、未変性アクリルアミドゲル電気泳動、又はPearson & Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983)において記載されている陰イオン交換HPLCを用いて実施される。

30

## 【0584】

クローン化された野生型ポリペプチド遺伝子、突然変異ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び合成オリゴヌクレオチドの配列は、例えば、Wallace et al., *Gene* 16: 21-26 (1981)の二本鎖鋳型を配列決定するためのチェーンターミネーション法によって、クローニング後に検証することができる。

## 【0585】

例示的な実施態様において、グリコシル化部位は、ポリヌクレオチドをシャッフリングすることにより加えられる。候補ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、DNAシャッフリングプロトコルを用いて調節することができる。DNAシャッフリングは、関連遺伝子のプールのランダムフラグメント化と、それに続くポリメラーゼ連鎖反応様プロセスによるフラグメントの再構築により実施される、反復される組換え及び突然変異のプロセスである。例えば、Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370: 389-391 (1994); ならびに米国特許第5,605,793号、第5,837,458号、第5,830,721号、及び第5,811,238号を参照のこと。

40

## 【0586】

## 野生型ペプチドコード配列のクローニング及びサブクローニング

野生型ポリペプチドをコードする多数のポリヌクレオチド配列が決定されており、商業

50

的な供給者から利用可能である。例えば、ヒト成長ホルモン、例えば、GenBank Accession No. NM000515、NM002059、NM022556、NM022557、NM022558、NM022559、NM022560、NM022561、及びNM022562である。

【0587】

ヒトゲノム研究の迅速な進歩によって、公知のヌクレオチド配列に対してある程度の割合の配列相同性を有する任意の遺伝子セグメント、例えば以前に同定されているポリペプチドのコード配列などを調べるためにヒトDNA配列データベースを検索することができるクローニングアプローチが可能になっている。そのようにして同定された任意のDNA配列は、後に、化学合成及び/又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術、例えばオーバーラップ伸長法などにより得ることができる。短い配列について、完全なデノボ合成が十分となりうるが、より大きな遺伝子を得るには、合成プローブを使用したヒトcDNA又はゲノムライブラリーからの全長コード配列のさらなる単離が必要となることがある。

10

【0588】

あるいは、標準的クローニング技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などを使用して、ポリペプチドをコードする核酸配列を、ヒトcDNA又はゲノムDNAライブラリーから単離することもできる。それにおいて、ホモロジーベースのプライマーは、しばしば、ポリペプチドをコードする公知の核酸配列に由来することができる。この目的のために最もよく使用される技術は、標準的な教科書、例えば、Sambrook及びRussell(上記)において記載されている。

20

【0589】

野生型ポリペプチドのコード配列を得るために適したcDNAライブラリーは、市販されているものでもよく、あるいは、構築してよい。mRNAを単離し、逆転写によりcDNAを作製し、cDNAを組換えベクター中に連結し、組換え宿主にトランスフェクトして増殖させ、スクリーニングし、クローニングする一般的な方法は、周知である(例えば、Gubler and Hoffman, Gene, 25: 263-269 (1983); Ausubel et al. (上記)を参照のこと)。PCRによりヌクレオチド配列の増幅セグメントを得た直後に、そのセグメントをプローブとしてさらに使用して、野生型ポリペプチドをコードする全長ポリヌクレオチド配列をcDNAライブラリーから単離することができる。適切な手順の一般的な記載は、Sambrook及びRussell(上記)において見出すことができる。

30

【0590】

類似の手順に従って、野生型ポリペプチド、例えば、上で言及したGenBank Accession No.のうちの任意のものをコードする全長配列をヒトゲノムライブラリーから得ることができる。ヒトゲノムライブラリーは市販されており、又は、当技術分野で認識されている種々の方法に従って構築することができる。一般的に、ゲノムライブラリーを構築するためには、DNAを、最初に、ポリペプチドが見出される可能性の高い組織から抽出する。DNAを、次に、機械的に切断し、又は、酵素的に消化して、約12~20kbの長さのフラグメントを生じる。フラグメントを、後に、勾配遠心分離により、非所望のサイズのポリヌクレオチドフラグメントから分離し、バクテリオファージベクター中に挿入する。これらのベクター及びファージを、インビトロでパッケージングする。組換えファージは、Benton and Davis, Science, 196: 180-182 (1977)において記載されている通り、プラークハイブリダイゼーションにより解析する。コロニーハイブリダイゼーションを、Grunstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA72: 3961-3965 (1975)により記載される通りに行う。

40

【0591】

配列相同性に基づき、縮重オリゴヌクレオチドをプライマーセットとしてデザインすることができ、及び、PCRを適した条件下で実施して(例えば、White et al., PCR Protocols: Current Methods and Applications, 1993; Griffin and Griffin, PCR Technology, CRC Press Inc. 1994を参照のこと)、ヌクレオチド配列のセグメントをcDNA又はゲノムライブラリーから増幅させることができる。増幅されたセグメントをプローブとし

50

て使用して、野生型ポリペプチドをコードする全長核酸を得る。

【0592】

野生型ポリペプチドをコードする核酸配列を得ると、コード配列をベクター、例えば発現ベクター中にサブクローニングして、組換え野生型ポリペプチドを、結果として得られるコンストラクトから産生できるようにすることができる。野生型ポリペプチドのコード配列にさらなる修飾、例えば、ヌクレオチド置換を後に行って、分子の特性を改変してよい。

【0593】

ポリペプチド配列中への突然変異の導入

コードポリヌクレオチド配列から、野生型ポリペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。後に、このアミノ酸配列を修飾して、アミノ酸配列中の種々の位置に追加のグリコシル化配列を導入することにより、タンパク質のグリコシル化パターンを改変してよい。

【0594】

いくつかの型のタンパク質グリコシル化配列は、当技術分野において周知である。例えば、真核生物において、N連結グリコシル化が、コンセンサス配列  $A s n - X_{aa} - S e r / T h r$  (式中、 $X_{aa}$  はプロリン以外の任意のアミノ酸である) のアスパラギン上で生じる (Kornfeld et al., Ann Rev Biochem 54: 631-664 (1985); Kukuruzinska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA <sup>8</sup> 4: 2145-2149 (1987); Herscovics et al., FASEB J 7: 540-550 (1993); 及びOrlean, Saccharomyces Vol. 3 (1996))。O連結グリコシル化は、セリン又はトレオニン残基上で起こる (Tanner et al., Biochim. Biophys. Acta. 906: 81-91 (1987); 及びHounsell et al., Glycoconj. J. 13: 19-26 (1996))。他のグリコシル化パターンは、タンパク質のカルボキシル末端のカルボキシル基にグリコシルホスファチジルイノシトールを連結することにより形成される (Takeda et al., Trends Biochem. Sci. 20: 367-371 (1995); 及びUdenfriend et al., Ann. Rev. Biochem. 64: 593-591 (1995))。この知識に基づき、適した突然変異を野生型ポリペプチド配列にこのように導入して、新たなグリコシル化配列を形成することができる。

【0595】

ポリペプチド配列内のアミノ酸残基の直接的な修飾が、新たなN連結又はO連結グリコシル化部位の導入に適していることもあるが、より頻繁には、ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を変異させることによって、新たなグリコシル化配列の導入が行われる。これは、公知の突然変異誘発方法のうちのいずれかにを使用することにより達成することができる、そのうちのいくつかを以下で考察する。

【0596】

突然変異を生成する種々のプロトコールが確立されており、当技術分野において記載されている。例えば、Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA94: 4504-4509 (1997); 及びStemmer, Nature, 370: 389-391 (1994)を参照のこと。これらの手順を別々に又は組み合わせ使用して、1組の核酸の変異体、故に、コードされるポリペプチドの変異体を得ることができる。突然変異誘発、ライブラリー構築、及び他の多様性を生成する方法のためのキットが市販されている。

【0597】

多様性を生成する突然変異方法は、例えば、部位特異的突然変異誘発 (Botstein and Shortle, Science, 229: 1193-1201 (1985))、ウラシル含有鋳型を用いた突然変異誘発 (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA <sup>8</sup> 2: 488-492 (1985))、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発 (Zoller and Smith, Nucl. Acids Res., 10: 6487-6500 (1982))、ホスホロチオエート修飾DNA突然変異誘発 (Taylor et al., Nucl. Acids Res., 13: 8749-8764及び8765-8787 (1985))、及びギャップ二重鎖DNAを使用した突然変異誘発 (Kramer et al., Nucl. Acids Res., 12: 9441-9456 (1984))を含む。

【0598】

突然変異を生成するための他の方法は、点ミスマッチ修復 (Kramer et al., Cell, 38:

10

20

30

40

50

879-887 (1984))、修復能欠損宿主株を使用した突然変異誘発 (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4431-4443 (1985))、欠失突然変異誘発 (Eghtedarzadeh and Henikoff, Nucl. Acids Res., 14: 5115 (1986))、制限選択及び制限精製 (Wells et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. A<sup>3</sup>17: 415-423 (1986))、全遺伝子合成による突然変異誘発 (Nambiar et al., Science, 223: 1299-1301 (1984))、二重鎖切断修復 (Mandecki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA<sup>8</sup>3: 7177-7181 (1986))、ポリヌクレオチドチェーンターミネーション法 (米国特許第 5, 9 6 5, 4 0 8 号) による突然変異誘発、及びエラープロン PCR (Leung et al., Biotechniques, 1: 11-15 (1989)) を含む。

#### 【 0 5 9 9 】

宿主生物における好ましいコドン使用のための核酸の修飾

10

ポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチド配列をさらに改変して、特定の宿主の好ましいコドン使用に合致させることができる。例えば、1株の細菌細胞での好ましいコドン使用を使用して、本発明のポリペプチド変異体をコードし、この株に好適なコドンを含むポリヌクレオチドを派生させることができる。宿主細胞によって示される好ましいコドン使用頻度は、その宿主細胞によって発現されている多数の遺伝子における好ましいコドン使用頻度を平均することによって計算することができる (例えば、計算サービスは、かずさDNA研究所 (Kazusa DNA Research Institute) (日本) のウェブサイトから利用可能である)。この解析は、好ましくは、宿主細胞により高発現される遺伝子に限定される。米国特許第 5, 8 2 4, 8 6 4 号には、例えば、双子葉植物及び単子葉植物により示される高発現遺伝子によるコドン使用頻度が提供されている。

20

#### 【 0 6 0 0 】

修飾の完了時に、ポリペプチド変異体コード配列を配列決定により確認し、次に、組換え産生用の適切な発現ベクター中に、野生型ポリペプチドと同じ方法でサブクローニングする。

#### 【 0 6 0 1 】

突然変異ポリペプチドの発現

配列確認に続き、本発明のポリペプチド変異体を、組換え遺伝学の分野における慣用技術を使用して、本明細書において開示するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に依存して産生することができる。

#### 【 0 6 0 2 】

30

発現系

本発明の突然変異ポリペプチドをコードする核酸の高レベル発現を得るために、典型的に、突然変異ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、転写を指示する強いプロモーター、転写/翻訳ターミネーター、及び翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含む発現ベクター中にサブクローニングする。適した細菌プロモーターは当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook及びRussell (上記)、ならびにAusubel et al. (上記) において記載されている。野生型ポリペプチド又は突然変異ポリペプチドを発現するための細菌発現系は、例えば、大腸菌、バチルス種 (Bacillus sp)、サルモネラ属 (Salmonella)、及びコーロバクター属 (Caulobacter) において利用可能である。そのような発現系のためのキットが市販されている。哺乳動物細胞、酵母、及び昆虫細胞のための真核生物発現系が、当技術分野において周知であり、また、市販されている。一実施態様において、真核細胞用発現ベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ関連ベクター、又はレトロウイルスベクターである。

40

#### 【 0 6 0 3 】

異種核酸を直接発現させるために使用されるプロモーターは、特定の適用に依存する。プロモーターは、場合により、その天然の設定においてプロモーターが転写開始部位から離れている距離とおよそ同じ距離だけ、異種の転写開始部位から離れた位置にある。当技術分野において公知であるように、しかし、この距離のいくらかの変動は、プロモーター機能の喪失なく適応させることができる。

#### 【 0 6 0 4 】

50

プロモーターに加えて、発現ベクターは、典型的に、宿主細胞における突然変異ポリペプチドの発現のために要求される全ての追加エレメントを含む転写単位又は発現カセットを含む。典型的な発現カセットは、このように、突然変異ポリペプチドをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターならびに転写物の効率的なポリアデニル化のために要求されるシグナル、リボソーム結合部位、及び翻訳終結部位を含む。ポリペプチドをコードする核酸配列は、典型的に、形質転換細胞によるペプチド分泌を促進するための切断可能なシグナルペプチド配列に連結されている。そのようなシグナルペプチドは、とりわけ、組織プラスミノゲンアクチベーター、インシュリン、及び神経成長因子、ならびにオオタバコガ (*Heliothis virescens*) の幼虫ホルモンエステラーゼからのシグナルペプチドを含む。このカセットの追加エレメントは、エンハンサー、及び、ゲノムDNAが構造遺伝子として使用される場合、機能性のスプライス供与部位及び受容体部位を伴うイントロンを含んでよい。

10

## 【0605】

プロモーター配列に加えて、発現カセットは、効率的な終結を提供するために、構造遺伝子の下流に転写終結領域も含むべきである。この終結領域は、プロモーター配列と同じ遺伝子から得てよく、又は、異なる遺伝子から得てよい。

## 【0606】

遺伝情報を細胞中に輸送するために使用される特定の発現ベクターは、特に重要ではない。真核細胞又は原核細胞における発現用に使用される従来のベクターのいずれかを使用してよい。標準的な細菌発現ベクターは、プラスミド(例えばpBR322ベースのプラスミド、pSKF、pET23Dなど)及び融合発現系(例えばGSTやLacZなど)を含む。エピトープタグ、例えば、c-mycを組換えタンパク質に付加し、便利な単離方法を提供することができる。

20

## 【0607】

真核生物ウイルスからの調節エレメントを含む発現ベクターが、典型的に、真核細胞用発現ベクター、例えば、SV40ベクター、パピロームウイルスベクター、及びエプスタイン・バーウイルス由来のベクターにおいて使用される。他の例示的な真核細胞用ベクターは、pMSG、pAV009/A<sup>+</sup>、pMTO10/A<sup>+</sup>、pMAMneo-5、パキキュロウイルスpDSVE、ならびに、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、又は、真核細胞中での発現のために有効であることが示されている他のプロモーターの指示下でのタンパク質発現を可能にする他の任意のベクターを含む。

30

## 【0608】

一部の例示的な実施態様において、発現ベクターは、2004年4月9日出願の共有の米国特許出願明細書において開示されている通り、pCWin1、pCWin2、pCWin2/MBP、pCWin2-MBP-SBD(pMS<sub>39</sub>)、及びpCWin2-MBP-MCS-SBD(pMXS<sub>39</sub>)から選ばれ、それは本明細書において参照により組み入れられる。

## 【0609】

一部の発現系は、遺伝子増幅を提供するマーカー、例えばチミジンキナーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、及びジヒドロ葉酸レダクターゼなどを有する。あるいは、遺伝子増幅を含まない高収率発現系、例えばポリヘドリンプロモーター又は他の強いパキキュロウイルスプロモーターの指示下で突然変異ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を有する、昆虫細胞中のパキキュロウイルスベクターなども適している。

40

## 【0610】

発現ベクター中に典型的に含まれるエレメントは、大腸菌中で機能するレプリコン、組換えプラスミドを保有する細菌の選択を可能にする抗生物質耐性をコードする遺伝子、及び真核生物の配列の挿入を可能にする、プラスミドの非必須領域中の固有の制限酵素認識部位も含む。選ばれる特定の抗生物質耐性遺伝子は重要ではなく、当技術分野において公

50

知の多くの耐性遺伝子のうちの任意のものが適する。原核生物の配列を、場合により、それらが真核細胞中のDNAの複製を妨害しないように、必要な場合に選択する。

#### 【0611】

組換えタンパク質（例えば、本発明のhgh突然変異体）のペリプラズム発現が望まれる場合、発現ベクターは、発現させるべきタンパク質のコード配列の5'に直接結合している、大腸菌OppA（ペリプラズムのオリゴペプチド結合タンパク質）分泌シグナルやその修飾バージョンなどの分泌シグナルをコードする配列をさらに含む。このシグナル配列は、細胞質中で産生された組換えタンパク質を、細胞膜を通じてペリプラズム空間中に導く。この発現ベクターは、さらに、組換えタンパク質がペリプラズム空間に入る際にシグナル配列を酵素的に切断することが可能であるシグナルペプチダーゼ1のコード配列も含んでよい。組換えタンパク質のペリプラズムでの産生に関するより詳細な説明は、例えば、Gray et al., Gene 39: 247-254 (1985)、米国特許第6,160,089号、及び第6,436,674号において見出すことができる。

10

#### 【0612】

上で考察した通り、当業者は、ポリペプチドの生物活性を依然として保持しつつ、任意の野生型ポリペプチドもしくは突然変異ポリペプチド又はそのコード配列に種々の保存的置換を作製することができることを認識するであろう。さらに、ポリヌクレオチドコード配列の修飾を作製し、結果として得られるアミノ酸配列を改変することなく特定の発現宿主において好ましいコドン使用を適応させてよい。

#### 【0613】

##### トランスフェクション方法

標準的なトランスフェクション方法を使用して、大量の突然変異ポリペプチドを発現する細菌、哺乳動物、酵母、又は昆虫の細胞株を産生し、それらを次に標準技術を使用して精製する（例えば、Colley et al., J. Biol. Chem. 264: 17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)を参照のこと）。真核細胞及び原核細胞の形質転換を、標準技術に従って実施する（例えば、Morrison, J. Bact. 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101: 347-362 (Wu et al., eds, 1983)を参照のこと）。

20

#### 【0614】

外来ヌクレオチド配列を宿主細胞中に導入するための周知の手順のうちの任意のものを使用してよい。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター（plasma vector）、ウイルスベクター、ならびにクローン化されたゲノムDNA、cDNA、合成DNA、又は他の外来遺伝物質を宿主細胞に導入するための他の周知の方法のいずれかの使用を含む（例えば、Sambrook及びRussell（上記）を参照のこと）。使用される特定の遺伝子工学手順が、突然変異ポリペプチドを発現することが可能である宿主細胞中に少なくとも1つの遺伝子を上手く導入することが可能であることだけ必要である。

30

#### 【0615】

##### 宿主細胞における突然変異ポリペプチド発現の検出

適切な宿主細胞中に発現ベクターを導入した後、トランスフェクトされた細胞を、突然変異ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養する。細胞を、次に、標準技術を使用して培養物から後に回収される組換えポリペプチドの発現について細胞をスクリーニングする（例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); 米国特許第4,673,641号; Ausubel et al.（上記）; ならびにSambrook及びRussell（上記）を参照のこと）。

40

#### 【0616】

遺伝子発現をスクリーニングするためのいくつかの一般的な方法は、当業者の間では周知である。第1に、遺伝子発現を核酸レベルで検出することができる。核酸ハイブリダイゼーション技術を使用した特定のDNA及びRNA測定の種類の方法が、通常使用される

50

(例えば、Sambrook及びRussell(上記))。一部の方法は、電気泳動による分離(例えば、DNA検出用のサザンプロット及びRNA検出用のノーザンプロット)を含むが、しかし、電気泳動なしに(例えばドットプロットによるなど)DNA又はRNAの検出を行うこともできる。トランスフェクトされた細胞における突然変異ポリペプチドをコードする核酸の存在も、配列特異的プライマーを使用したPCR又はRT-PCRにより検出することができる。

#### 【0617】

第2に、遺伝子発現をポリペプチドレベルで検出することができる。種々の免疫学的アッセイ、特に、本発明の突然変異ポリペプチドと特異的に反応するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を使用したアッセイが、遺伝子産物のレベルを測定するために、当業者により通常使用される(例えば、Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975))。そのような技術は、突然変異ポリペプチド又はその抗原性部分に対する高い特異性を伴う抗体を選択することによる抗体調製を要求する。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を生じさせる方法は十分に確立されており、それらの記載は、文献、例えば、Harlow及びLane(上記)、ならびに、Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976)において見出すことができる。本発明の突然変異ポリペプチドに対する抗体の調製及び突然変異ポリペプチドを検出する免疫学的アッセイの実施に関するより詳細な説明は、後のセクションで提供される。

#### 【0618】

組換え産生された突然変異ポリペプチドの精製

ひとたびトランスフェクトされた宿主細胞における組換え突然変異ポリペプチドの発現が確認されれば、宿主細胞を、次に、組換えポリペプチドを精製する目的のために適切なスケールで培養する。

#### 【0619】

##### 1. 細菌からの精製

本発明の突然変異ポリペプチドが、形質転換細菌により大量に組換え産生される場合、典型的に、プロモーター導入後、発現は構成的となりうるが、それらのタンパク質は不溶性の凝集体を形成することがある。タンパク質封入体の精製に適したいくつかのプロトコールが存在する。例えば、凝集タンパク質(以下、封入体と呼ぶ)の精製は、典型的に、細菌細胞の破壊により、例えば、約100~150 µg/mlのリゾチーム及び0.1% No nidet P40(非イオン系界面活性剤)のバッファー中でのインキュベーションによる封入体の抽出、分離、及び/又は精製を含む。細胞懸濁液は、Polytron粉砕機(Brinkman Instruments, Westbury, NY)を使用して粉砕することができる。あるいは、細胞を氷上で超音波処理することができる。細菌を溶解する代替方法は、Ausubel et al.(上記)、ならびにSambrook及びRussell(上記)において記載されており、当業者に明らかであろう。

#### 【0620】

細胞懸濁液は、一般的に、遠心分離し、封入体を含む沈殿を、封入体を溶解しないが洗浄するバッファー、例えば、20mM Tris-HCl(pH7.2)、1mM EDTA、150mM NaCl、及び2% Triton-X100(非イオン系界面活性剤)中に再懸濁する。可能な限り多くの細胞細片を除去するために洗浄工程を繰り返すことが必要となりうる。封入体の残存沈殿を、適切なバッファー(例えば、20mMリン酸ナトリウム、pH6.8、150mM NaCl)中に再懸濁してよい。他の適切なバッファーは、当業者に明らかであろう。

#### 【0621】

洗浄工程に続き、封入体を、強い水素受容体及び強い水素供与体の両方である溶剤(又は、これらの特性の1つを各々が有する溶剤の組合せ)の添加により可溶化する。封入体を形成したタンパク質を、次に、適合するバッファーを用いた希釈又は透析により再生してよい。適した溶媒は、限定はされないが、尿素(約4M~約8M)、ホルムアミド(少なくとも約80%(体積/体積ベース)、及びグアニジン塩酸塩(約4M~約8M)を含む。

凝集体形成タンパク質を可溶化することが可能であるいくつかの溶媒、例えばSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）及び70%ギ酸などを、タンパク質を不可逆的に変性させ、免疫原性及び/又は活性の欠如を伴う可能性があるため、この手順における使用に不適切でありうる。グアニジン塩酸塩及び類似の薬剤は変性剤であるが、この変性は不可逆的ではなく、変性剤を除去（例えば、透析による）又は希釈すると再生が生じ、免疫学的及び/又は生物学的に活性な目的のタンパク質の再形成を可能にしうる。可溶化後、そのタンパク質を、他の細菌タンパク質から標準的な分離技術により分離することができる。細菌の封入体からの組換えポリペプチドの精製に関するさらなる記載については、例えば、Patra et al., Protein Expression and Purification 18: 182-190 (2000)を参照のこと。

#### 【0622】

あるいは、組換えポリペプチド、例えば突然変異ポリペプチドを細菌のペリプラズムから精製することが可能である。組換えタンパク質が細菌のペリプラズム中に排出される場合、細菌のペリプラズム分画は、当業者に公知の他の方法に加えて低温浸透圧ショックにより単離することができる（例えば、Ausubel et al. (上記)を参照のこと）。組換えタンパク質をペリプラズムから単離するために、細菌細胞を遠心分離してペレットを形成させる。ペレットを、20%スクロースを含むバッファー中に再懸濁させる。細胞を溶解するために、細菌を遠心分離し、沈殿を氷冷した5mM MgSO<sub>4</sub>に再懸濁し、氷浴中で約10分間保つ。細胞懸濁液を遠心分離し、上清をデカントし、保存する。上清中に存在する組換えタンパク質を、当業者に周知の標準的な分離技術により宿主のタンパク質から分離することができる。

#### 【0623】

##### 2. 精製のための標準的なタンパク質分離技術

組換えポリペプチド、例えば本発明の突然変異ポリペプチドが、宿主細胞において可溶化形状で発現される場合、その精製は標準的なタンパク質精製手順（例えば、本明細書において以下に記載するもの）に従うことができる、又は、精製は、他の場所に開示される方法（例えば、PCT公開WO2006/105426）を使用して達成することができ、それは参照により本明細書において組み入れられる。

#### 【0624】

##### 溶解性分画

しばしば、最初の工程として、及び、タンパク質混合物が複雑な場合、最初の塩分画によって、不必要な宿主細胞タンパク質（又は細胞培養培地に由来するタンパク質）の多くを、目的の組換えタンパク質、例えば、本発明の突然変異ポリペプチドから分離することができる。好ましい塩は、硫酸アンモニウムである。硫酸アンモニウムは、タンパク質混合物中の水の量を有効に低下させることによりタンパク質を沈殿させる。タンパク質は、次に、それらの溶解性に基づいて沈殿する。タンパク質の疎水性が高いほど、それは、より低い硫酸アンモニウム濃度で沈殿する可能性が高い。典型的なプロトコールは、飽和硫酸アンモニウムをタンパク質溶液に加え、結果として得られる硫酸アンモニウム濃度が20~30%になるようにすることである。これによって大半の疎水性タンパク質は沈殿する。この沈殿は（目的タンパク質が疎水性ではない場合）廃棄し、硫酸アンモニウムを上清に、目的タンパク質を沈殿させることが公知である濃度まで加える。沈殿を、次に、バッファー中で可溶化させ、過剰な塩を、必要な場合、透析又はダイアフィルトレーションのいずれかを通じて除去する。タンパク質の溶解性に依存する他の方法、例えば低温エタノールによる沈殿などは、当業者に周知であり、複雑なタンパク質混合物を分画するために使用することができる。

#### 【0625】

##### 限外ろ過

計算された分子量に基づき、サイズのより大きなタンパク質及びサイズのより小さなタンパク質を、限外ろ過を使用し、様々なポアサイズの膜（例えば、Amicon又はMillipore社製の膜）を通して単離することができる。第1の工程として、タンパク質混合物を、目的タンパク質、例えば、突然変異ポリペプチドの分子量より低い分子量のカットオフ値を

10

20

30

40

50

有するポアサイズの膜を通して限外ろ過する。限外ろ過の濃縮液を、次に、目的タンパク質の分子量より大きな分子カットオフ値を伴う膜に対して限外ろ過する。組換えタンパク質は、膜を通過してろ液中に入る。このろ液を、次に、以下に記載する通りにクロマトグラフィーにかけることができる。

【0626】

カラムクロマトグラフィー

目的タンパク質（例えば本発明の突然変異ポリペプチドなど）は、それらのサイズ、正味の表面電荷、疎水性、又はリガンドに対する親和性に基づいて他のタンパク質から分離することもできる。また、ポリペプチドに対して生じた抗体を、カラムマトリックスに抱合させ、ポリペプチドを免疫精製することもできる。これらの方法の全てが、当技術分野において周知である。

10

【0627】

クロマトグラフィー技術を、任意のスケールで、多くの様々な製造業者（例えば、Pharmacia Biotech）からの装置を使用して実施できることは、当業者に明らかであろう。

【0628】

突然変異ポリペプチド発現の検出のためのイムノアッセイ

組換え突然変異ポリペプチドの産生を確認するために、免疫学的アッセイが、サンプル中でポリペプチドの発現を検出するために有用となりうる。免疫学的アッセイは、また、組換えホルモンの発現レベルを定量化するために有用である。突然変異ポリペプチドに対する抗体が、これらの免疫学的アッセイを行うために必要である。

20

【0629】

突然変異ポリペプチドに対する抗体の産生

目的の免疫原と特異的に反応するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を産生する方法は、当業者に公知である（例えば、Coligan, *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY<sup>1</sup>991; Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY<sup>1</sup>989; Stites et al. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA、及び本明細書において引用される参考文献; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed) Academic Press, New York, NY<sup>1</sup>986; 及び Kohler and Milstein *Nature* 256: 495-497, 1975) を参照のこと)。そのような技術は、ファージ又は類似のベクター中の組換え抗体ライブラリーから抗体を選択することによる抗体調製を含む（Huse et al., *Science* 246: 1275-1281, 1989; 及び Ward et al., *Nature* 341: 544-546, 1989を参照のこと）。

30

【0630】

所望の特異性を伴う抗体を含む抗血清を産生するために、目的ポリペプチド（例えば、本発明の突然変異ポリペプチド）又はその抗原性フラグメントを使用して、適した動物（例えば、マウス、ウサギ、又は霊長類）を免疫化することができる。標準的なアジュバント、例えばフロイントのアジュバントなどを、標準的な免疫化プロトコールに従って使用することができる。あるいは、その特定のポリペプチドに由来する合成の抗原ペプチドを、担体タンパク質に抱合させ、後に免疫原として使用することができる。

【0631】

免疫原調製物に対する動物の免疫応答を、試験血液を採取し、目的の抗原に対する反応性の力価を測定することによりモニターする。抗原に対する抗体の適切に高い力価が得られた場合、血液を動物から採取し、抗血清を調製する。抗原に特異的に反応する抗体を濃縮するための抗血清のさらなる分画及び抗体の精製を、後に実施することができる。Harlow及びLane（上記）、ならびに上に提供されたタンパク質精製に関する一般的な記載を参照のこと。

40

【0632】

モノクローナル抗体は、当業者に周知の種々の技術を使用して得られる。典型的には、所望の抗原を用いて免疫化された動物からの脾臓細胞を、通常、骨髄腫細胞との融合により不死化させる（Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976を参照のこと）。

50

と)。不死化の代替方法は、例えば、エプスタインバーウイルス、癌遺伝子、もしくはレトロウイルスによる形質転換、又は当技術分野において周知の他の方法を含む。単一的不死化細胞から生じるコロニーを、所望の特異性及び抗原に対する親和性を有する抗体の産生のためにスクリーニングし、そのような細胞により産生されるモノクローナル抗体の収率を、脊椎動物宿主の腹腔中への注入を含む、種々の技術により増強させてよい。

#### 【0633】

また、モノクローナル抗体を、Huse et al. (上記)により概説されている一般的なプロトコールに従ってヒトB細胞cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、所望の特異性を有する抗体又はそのような抗体の結合フラグメントをコードする核酸配列を同定した時点で、組換え産生してよい。上で考察した組換えポリペプチド産生の一般的な原理及び方法は、組換え方法による抗体産生に適用可能である。

10

#### 【0634】

望まれる場合、本発明の突然変異ポリペプチドを特異的に認識することが可能である抗体を、野生型ポリペプチドに対するそれらの交差反応性について試験し、このようにして野生型タンパク質に対する抗体から区別することができる。例えば、突然変異ポリペプチドを用いて免疫化した動物から得られた抗血清を、野生型ポリペプチドを固定化したカラムに通すことができる。カラムを通過する抗血清部分は、突然変異ポリペプチドだけを認識し、野生型ポリペプチドは認識しない。同様に、突然変異ポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、また、突然変異体だけを認識し、野生型ポリペプチドは認識しないそれらの排他性についてスクリーニングすることができる。

20

#### 【0635】

本発明の突然変異ポリペプチドだけを特異的に認識し、野生型ポリペプチドは認識しないポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体は、例えば、固体支持体上に固定化された、突然変異ペプチドに特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体と共にサンプルをインキュベートすることにより、突然変異タンパク質を野生型タンパク質から単離するために有用である。

#### 【0636】

組換えペプチド発現を検出するためのイムノアッセイ

ひとたび本発明の突然変異ポリペプチドに対して特異的な抗体が利用可能になれば、サンプル中のポリペプチド、例えば、細胞ライセートの量は、当業者に定性的及び定量的結果を提供する種々のイムノアッセイ法により測定することができる。一般的な免疫学的手順及びイムノアッセイ手順の総説については、例えば、Stites (上記)、米国特許第4,366,241号、第4,376,110号、第4,517,288号、及び第4,837,168号を参照のこと。

30

#### 【0637】

イムノアッセイにおける標識

イムノアッセイでは、抗体及び標的タンパク質により形成された結合複合体に特異的に結合し、それを標識する標識薬剤をしばしば利用する。標識薬剤は、それ自体が、抗体/標的タンパク質複合体を含む成分の1つでよく、又は、抗体/標的タンパク質複合体に特異的に結合する第3の成分(例えば別の抗体など)でよい。標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、又は化学的手段により検出可能でありうる。例は、限定はされないが、磁性ビーズ(例えば、「Dynabeads(商標)」)、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド(Texas red)、ローダミンなど)、放射標識(例えば、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、又は<sup>32</sup>P)、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びELISAにおいて通常使用される他の酵素)、及び比色標識薬剤、例えばコロイド金又は有色ガラスもしくはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズなどを含む。

40

#### 【0638】

一部の場合において、標識薬剤は、検出可能な標識を持つ二次抗体である。あるいは、

50

二次抗体は標識を欠いてよいが、しかし、それは、代わりに、二次抗体が対応する種の抗体に特異的な、標識された三次抗体により結合されうる。二次抗体は、検出可能成分（例えばビオチンなど）を用いて修飾することができ、それに第3の標識分子（例えば酵素標識ストレプトアビジンなど）が特異的に結合することができる。

#### 【0639】

免疫グロブリンの定常領域に特異的に結合することが可能である他のタンパク質、例えばプロテインA又はプロテインGも、標識薬剤として使用することができる。これらのタンパク質は、連鎖球菌の細胞壁の通常の構成成分である。それらは、種々の種からの免疫グロブリンの定常領域との強い非免疫原性の反応性を示す（一般的には、Kronval, et al. J. Immunol., 111: 1401-1406 (1973);及びAkerstrom, et al., J. Immunol., 135: 2589-2542 (1985)を参照のこと）。

10

#### 【0640】

##### イムノアッセイのフォーマット

目的の標的タンパク質（例えば、突然変異ヒト成長ホルモン）をサンプルから検出するためのイムノアッセイは、競合的でも非競合的でもよい。非競合イムノアッセイは、捕捉された標的タンパク質の量が直接測定されるアッセイである。1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいて、例えば、標的タンパク質に特異的な抗体を固体基質に直接結合させ、そこでその抗体を固定化することができる。それは、次に、試験サンプル中の標的タンパク質を捕捉する。このようにして固定化された抗体/標的タンパク質複合体を、次に、標識を持つ、上に記載した標識薬剤、例えば二次抗体又は三次抗体などにより結合させる。

20

#### 【0641】

競合アッセイにおいて、サンプル中の標的タンパク質の量を、サンプル中に存在する標的タンパク質により標的タンパク質に特異的な抗体から置換された（又は競争して追いやられた）、追加の（外因性の）標的タンパク質の量を測定することにより間接的に測定する。そのようなアッセイの典型的な例において、抗体を固定化し、外因性の標的タンパク質を標識する。抗体に結合する外因性標的タンパク質の量は、サンプル中に存在する標的タンパク質の濃度に反比例するため、サンプル中の標的タンパク質レベルを、抗体に結合し、このようにして固定化された外因性標的タンパク質の量に基づいて決定することができる。

30

#### 【0642】

一部の場合において、ウエスタンブロット（イムノブロット）解析を使用し、サンプル中の突然変異ポリペプチドの存在を検出及び定量する。この技術は、一般的に、分子量に基づくゲル電気泳動によりサンプルタンパク質を分離すること、分離されたタンパク質を適した固体支持体（例えばニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、又は誘導体化ナイロンフィルターなど）に転移させること、及び標的タンパク質に特異的に結合する抗体と共にサンプルをインキュベートすることを含む。これらの抗体を直接標識してよく、あるいは、突然変異ポリペプチドに対する抗体に特異的に結合する標識抗体（例えば、標識されたヒツジの抗マウス抗体）を使用して、後に検出してよい。

40

#### 【0643】

他のアッセイフォーマットはリポソームイムノアッセイ（LIA）を含み、それでは特定の分子（例えば、抗体）に結合するようにデザインされたリポソームが使用され、封入された試薬又はマーカーを放出する。放出された化学物質を、次に、標準技術に従って検出する（Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev., 5: 34-41 (1986)を参照のこと）。

#### 【0644】

##### 処理の方法

上で考察した抱合体に加えて、本発明は、本発明のポリペプチド抱合体を、疾患を発生するリスクがある被験者又は疾患を有する被験者に投与することにより、病状を予防、治療、又は回復させる方法を提供する。また、本発明は、本発明の抱合体を身体の特定の組織又は部分に標的化するための方法を提供する。

50

【 0 6 4 5 】

以下の例を提供して、本発明の組成物及び方法を例証するが、しかし、主張する本発明を限定しない。

【 図 1 A 】

MQIELSTCFCLLRFCSATRRYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVKSPFPNTSVVYKTL  
 FVEFTVHLFNIAKPRPPWMLGLPTQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQT  
 SQREKEDDKVFPGGSHYVWQVLEKNGPMASDPLCLTYSHVLDLNSGLIGALLVCREGSLA  
 KEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS  
 VYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTFLTAQTLMLDGLQFLFCHISSHQHDGMEA  
 YVKVDSCEPEQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE  
 EDWDYAPLVLAPDDRSYKSYQLNNGPQIRGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVG  
 DTLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPLPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCL  
 TRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQMSDKRNVILFSVDENRSWYL TENIQRFLPNA  
 GVQLEDFEQASNIMHSINGYVFDLSVCLHEVAYWYLSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHVMYEDTL  
 TLPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDY YEDSYEDISAYLLSKNNA  
 IEPRSFSQNSRHPSTRQKFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTMPKIQNVSSDILLMLRQSPHPHGLSLSD  
 LQEAKEYTFSDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSQDMVFTPESEGLQLRNEKLGTTAAATELKKLDF  
 KVSSTSNLSTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQDITLFGKSSPLTESGGPLSLSEENNDKSL  
 LESGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVVISLLKTNKTSNNSATNRKTHID  
 GPSLLIENSPSVWQNILSDETFKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGIP  
 IPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQNFLESEKNKVVVG  
 KGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLNLHENNTHNQEKKIQEIEKKEKTLIQENVVLPQIHTVGTGN  
 FMKNLFLSTRQNVESYEGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEK  
 YACTRISPNTSQQNFVTRQSKRALKQFRPLEEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLQIDYNEK  
 EKGAITQPSLSDCLTRSHSIPQANRSLPIAKVSSFPISIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESS  
 HFLQGAKKNLAILTEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKEVENTVLPKPDLPKTSVGKVELLPKVHI  
 YQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLQGTGGAIKWNEANRPKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWD  
 NYHTQIPKEEWSQEKSPKTAFFKKDITLSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCS  
 QNPVYLRHQREITRTLQSDQEEIDYDITISVEMKKEFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERL  
 WYDGMSSSPHVLNRNAQSGVSPQFKVVFQEFDDGSFTQPLR YGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT  
 FRNQASRPYFYSLSIYEDQRQGAEPKRNFKPNETKTYFWKVQHMMAPTKEFDCKAWAYFSDV  
 DLEKDVHSLGJLPLVCHTNTLPAHGRQVTVQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPNCIQMEDP  
 TFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGNSNIHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNL  
 YPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKQTPLMGASGHIRDQITASGQYQGW  
 APKLARLHYSGINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSLSYISOFIMYSLDGKWKQTYR  
 GNSTGLTMVFFGNVSSGKIHFNIPPIARYIRLHPHTYSIRSTRLMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD  
 AQTASSYTNMFATWSPSKARLHLQGRSNARWPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGTTQGVKSLTST  
 MYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQNGDSFPPVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRME  
 VLGCEAQDLY (配列番号 8)

【 図 1 B 】

ATRRYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVKSPFPNTSVVYKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPW  
 MGLGPTQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHY  
 YVWQVLEKNGPMASDPLCLTYSHVLDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFD  
 EGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTPEVHSI  
 FLEGHTFLVRNHRQASLEISPTFLTAQTLMLDGLQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEQLRMK  
 NNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDR  
 SYKSYQLNNGPQIRGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLIIFKNQASRPYNI  
 YPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPLPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLA  
 SGLIGPLLYCYKESVDQRGNQMSDKRNVILFSVDENRSWYL TENIQRFLPNAAGVQLEDFEQASNIM  
 HSINGYVFDLSVCLHEVAYWYLSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHVMYEDTLTLPFSGETVFMSE  
 NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDY YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTR  
 QKQFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTMPKIQNVSSDILLMLRQSPHPHGLSLSDLQEAKEYTFSDPSP  
 GAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSQDMVFTPESEGLQLRNEKLGTTAAATELKKLDFKVSSTSNLSTIPSD  
 NLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQDITLFGKSSPLTESGGPLSLSEENNDKSLLESGLMNSQESSWG  
 KNVSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVVISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQ  
 NILESDETFKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGIPPPDAQNPDMSFFK  
 MLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQNFLESEKNKVVVGKGEFTKDVGLKE  
 MVFPSSRNLFLTNLNLHENNTHNQEKKIQEIEKKEKTLIQENVVLPQIHTVGTGNFMKNLFLSTRQ  
 NVEGSEYEGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTRISPNTS  
 QQNFVTRQSKRALKQFRPLEEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLQIDYNEK EKGAITQPSLSD  
 CLTRSHSIPQANRSLPIAKVSSFPISIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNL  
 SLAILTEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKEVENTVLPKPDLPKTSVGKVELLPKVHIYQKDLFPTETS  
 GSPGHLDLVEGSLQGTGGAIKWNEANRPKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEW  
 KQEKSPKTAFFKKDITLSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVYLRHQREI  
 TRRTLQSDQEEIDYDITISVEMKKEFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWYDGMSSSPHVLNR  
 NAQSGVSPQFKVVFQEFDDGSFTQPLR YGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYFYS  
 LISYEDQRQGAEPKRNFKPNETKTYFWKVQHMMAPTKEFDCKAWAYFSDVLEKDVHSLGJLPL  
 LVCHTNTLPAHGRQVTVQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPNCIQMEDP TFKENYRFHAING  
 YIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGNSNIHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS  
 KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKQTPLMGASGHIRDQITASGQYQGWAPKLARLHYSGSI  
 NAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSLSYISOFIMYSLDGKWKQTYRGNSTGLTMVFFG  
 NVDSSGKIHFNIPPIARYIRLHPHTYSIRSTRLMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQTASSYTNM  
 FATWSPSKARLHLQGRSNARWPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGTTQGVKSLTSTMYVKEFLISSQ  
 DGHQWTLFFQNGKVKVFGQNGDSFPPVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY  
 (配列番号 9)

【 図 2 】

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSPFPNTSVVYKKTLEFVEFDHFLFNIA  
 MGLLGPITQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAGVSVYKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHY  
 YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFD  
 EGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLGCHRSVYVHVGIMGTTPEVHSI  
 FLEHGTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGGQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEEPQLRMK  
 NNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDR  
 SYKSQYLNNQPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNI  
 YPHGIDTVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSVFNMERDLA  
 SGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNMIM  
 HSINGYVFDLSQLSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDITLFPFSGETVFMMSME  
 NPGWLWLGCHNSDFRNRGMTALLKVSCKDNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR<sup>20</sup>E<sup>1049</sup>ITRITLQSD  
 DQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSG  
 SVPQFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGGLPYIRAEVEDNIMVTRNQASRPYSFYSSLISYEED  
 QRQGAEPKRNFKVNETKYFWKQVHHMPTKDEFDCKAWAYFSDVLEKDVHSLGILGPLLCHTNT  
 LNPAGHRQVTVQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAIINGYIMDTLP  
 GLVMAQDQIRWYLLSMGNSNIHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMPLSKAGIWR  
 VECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKQPTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTK  
 EPFSWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSLLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGLTMVFFGNVDSGI  
 KHNFNPIIARYIRLHPTHYSIRSLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSP  
 KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTL  
 LFFQNGKVKVFGQNDQSFVTVVNSLDPPLLTRYLRHHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (配列番号  
 3)

【 図 4 】

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSPFPNTSVVYKKTLEFVEFDHFLFNIA  
 KPRPPWMGLLGPITQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAGVSVYKASEGAEYDDQTSQREK  
 EDDKVFPPGSHYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDVKDLNSGLIGALLVCREGL  
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG  
 LIGCHRSVYVHVGIMGTTPEVHSIFLEHGTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGGQFL  
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPFI  
 QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNQPQRIGRKYKVRFM  
 AYTDTEFTKTREAIQHESGILGPLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGIDTVRPLYSRRLPKG  
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSVFNMERDLASGLIGPLLCYKES  
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNMIMHSINGYV  
 FDSLQSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDITLFPFSGETVFMMSMEN  
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSCKDNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR<sup>20</sup>SFQNSR  
 HPS<sup>20</sup>TRQKQFNATTIPENDIEKTD<sup>20</sup>WEA<sup>20</sup>HRRRRAQR<sup>20</sup>EITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEF  
 DIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVPQFKKVVQFEFT  
 DGSFTQPLYRGELNEHLGGLPYIRAEVEDNIMVTRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEP  
 RKNFKVNETKYFWKQVHHMPTKDEFDCKAWAYFSDVLEKDVHSLGILGPLLCHTNT  
 LNPAGHRQVTVQEFALFFITFDETKSWYFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAIINGYI  
 MDITLPGLVMAQDQIRWYLLSMGNSNIHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM  
 PLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKQPTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAP  
 KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSLLYISQFIIMYSLDGKKW  
 QTYRGNSTGLTMVFFGNVDSGIKHNFNPIIARYIRLHPTHYSIRSLRMELMGCDLNSCSM  
 PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK  
 MKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQNDQSFVTVVNSLDP  
 PLLTRYLRHHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

(配列番号 5)

【 図 3 】

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSPFPNTSVVYKKTLEFVEFDHFLFNIA  
 KPRPPWMGLLGPITQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAGVSVYKASEGAEYDDQTSQREK  
 EDDKVFPPGSHYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDVKDLNSGLIGALLVCREGL  
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG  
 LIGCHRSVYVHVGIMGTTPEVHSIFLEHGTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGGQFL  
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPFI  
 QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNQPQRIGRKYKVRFM  
 AYTDTEFTKTREAIQHESGILGPLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGIDTVRPLYSRRLPKG  
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSVFNMERDLASGLIGPLLCYKES  
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNMIMHSINGYV  
 FDSLQSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDITLFPFSGETVFMMSMEN  
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSCKDNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR<sup>20</sup>SFQNSP  
 VLKRHRQREITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIDEDENQSPRSFQKTRHYFIAA  
 VERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVPQFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGGLPYIRAE  
 VEDNIMVTRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVNETKYFWKQVHHMPTK  
 DEFDCKAWAYFSDVLEKDVHSLGILGPLLCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFITFDETKSW  
 YFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAIINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGNS  
 ENHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMPLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMST  
 LFLVYSNKQPTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVD  
 LLAPMIIHGKIQGARQKFSLLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGLTMVFFGNVDSGIKH  
 NFNPIIARYIRLHPTHYSIRSLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT  
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLI  
 SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQNDQSFVTVVNSLDPPLLTRYLRHHPQSWVHQIALRMEVL  
 GCEAQDLY (配列番号 4)

【 図 5 】

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSPFPNTSVVYKKTLEFVEFDHFLFNIA  
 KPRPPWMGLLGPITQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAGVSVYKASEGAEYDDQTSQREK  
 EDDKVFPPGSHYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDVKDLNSGLIGALLVCREGL  
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG  
 LIGCHRSVYVHVGIMGTTPEVHSIFLEHGTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGGQFL  
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPFI  
 QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNQPQRIGRKYKVRFM  
 AYTDTEFTKTREAIQHESGILGPLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGIDTVRPLYSRRLPKG  
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSVFNMERDLASGLIGPLLCYKES  
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNMIMHSINGYV  
 FDSLQSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDITLFPFSGETVFMMSMEN  
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSCKDNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR<sup>20</sup>SFQNSR  
 HPS<sup>20</sup>QNPV<sup>20</sup>LRHRQREITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIDEDENQSPRSFQKTRH  
 YFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVPQFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGGL  
 GPYIRAEVEDNIMVTRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVNETKYFWKQV  
 HHMPTKDEFDCKAWAYFSDVLEKDVHSLGILGPLLCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFIT  
 DETKSWYFTENMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAIINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLL  
 LSMGNSNIHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMPLPSKAGIWRVECLIGEHL  
 HAGMSTLFLVYSNKQPTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP  
 FS<sup>20</sup>WIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSLLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGLTMVFFGNV  
 DSSGIKHNFNPIIARYIRLHPTHYSIRSLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFT  
 NMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLI  
 SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQNDQSFVTVVNSLDPPLLTRYLRHHPQSWVHQIALRMEVL  
 GCEAQDLY

(配列番号 6)

【図 6 A】

親ポリペプチド	C 末端	N 末端	内部	全挿入	1アミノ酸置換	2アミノ酸置換	3アミノ酸置換
BMP-7	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
BMP-7	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
BMP-7	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
BMP-7	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
BMP-7	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
BMP-7	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
BMP-7	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
BMP-7	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
BMP-7	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
BMP-7	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
BMP-7	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
BMP-7	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
BMP-7	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
BMP-7	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
BMP-7	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
BMP-7	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
BMP-7	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
BMP-7	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
BMP-7	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
BMP-7	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
BMP-15	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
BMP-15	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
BMP-15	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
BMP-15	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
BMP-15	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
BMP-15	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
BMP-15	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
BMP-15	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
BMP-15	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
BMP-15	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
BMP-15	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
BMP-15	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT

【図 6 B】

親ポリペプチド	C 末端	N 末端	内部	全挿入	1アミノ酸置換	2アミノ酸置換	3アミノ酸置換
BMP-15	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
BMP-15	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
BMP-15	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
BMP-15	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
BMP-15	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
BMP-15	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
BMP-15	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
BMP-15	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
NT3	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
NT3	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
NT3	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
NT3	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
NT3	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
NT3	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
NT3	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
NT3	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
NT3	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
NT3	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
NT3	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
NT3	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
NT3	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
NT3	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
NT3	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
NT3	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
NT3	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
NT3	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
NT3	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
NT3	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
FGF-7	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
FGF-7	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
FGF-7	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
FGF-7	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
FGF-7	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS

【図 6 C】

親ポリペプチド	C 末端	N 末端	内部	全挿入	1アミノ酸置換	2アミノ酸置換	3アミノ酸置換
FGF-7	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
FGF-7	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
FGF-7	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
FGF-7	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
FGF-7	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
FGF-7	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
FGF-7	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
FGF-7	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
FGF-7	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
FGF-7	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
FGF-7	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
FGF-7	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
FGF-7	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
FGF-7	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
FGF-7	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
FGF-21	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
FGF-21	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
FGF-21	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
FGF-21	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
FGF-21	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
FGF-21	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
FGF-21	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
FGF-21	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
FGF-21	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
FGF-21	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
FGF-21	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
FGF-21	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
FGF-21	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
FGF-21	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
FGF-21	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
FGF-21	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
FGF-21	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
FGF-21	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT

【図 6 D】

親ポリペプチド	C 末端	N 末端	内部	全挿入	1アミノ酸置換	2アミノ酸置換	3アミノ酸置換
FGF-21	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
FGF-21	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
vWF	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
vWF	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
vWF	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
vWF	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
vWF	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
vWF	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
vWF	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
vWF	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
vWF	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
vWF	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
vWF	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
vWF	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
vWF	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
vWF	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
vWF	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
vWF	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
vWF	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
vWF	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
vWF	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
vWF	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
Factor VII	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
Factor VII	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
Factor VII	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
Factor VII	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
Factor VII	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
Factor VII	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
Factor VII	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
Factor VII	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
Factor VII	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
Factor VII	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
Factor VII	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS

## 【 図 6 E 】

親ポリペプチド	C 末端	N 末端	内部	全挿入	1アミノ酸置換	2アミノ酸置換	3アミノ酸置換
Factor VII	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
Factor VII	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
Factor VII	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
Factor VII	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
Factor VII	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
Factor VII	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
Factor VII	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
Factor VII	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
Factor VII	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
Factor VIII	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
Factor VIII	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
Factor VIII	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
Factor VIII	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT
Factor VIII	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
Factor VIII	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
Factor VIII	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
Factor VIII	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
Factor VIII	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
Factor VIII	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
Factor VIII	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
Factor VIII	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
Factor VIII	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
Factor VIII	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
Factor VIII	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
Factor VIII	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
Factor VIII	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
Factor VIII	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
Factor VIII	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
Factor VIII	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT
Factor IX	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS	NGS
Factor IX	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT	NGT
Factor IX	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS	NAS
Factor IX	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT	NAT

## 【 図 6 F 】

親ポリペプチド	C 末端	N 末端	内部	全挿入	1アミノ酸置換	2アミノ酸置換	3アミノ酸置換
Factor IX	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS	NVS
Factor IX	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT
Factor IX	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS	NLS
Factor IX	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT	NLT
Factor IX	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS	NIS
Factor IX	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT	NIT
Factor IX	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS	NFS
Factor IX	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT	NFT
Factor IX	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS	NSS
Factor IX	NST	NST	NST	NST	NST	NST	NST
Factor IX	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS	NTS
Factor IX	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT	NTT
Factor IX	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
Factor IX	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT	NCT
Factor IX	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS	NYS
Factor IX	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT	NYT

## 【 配列表 】

0005647899000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02  
C 0 7 H 11/04 (2006.01) C 0 7 H 11/04  
C 0 8 G 81/00 (2006.01) C 0 8 G 81/00

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100141357

弁理士 鈴木 音哉

(72)発明者 デフリーズ, シャウン

アメリカ合衆国、ペンシルベニア 1 9 4 5 4、ノース・ウェールズ、フィリー・ドライブ 1 2  
6

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第2006/050247(WO, A1)

国際公開第2004/103275(WO, A1)

国際公開第2004/033651(WO, A1)

特表2005-521635(JP, A)

特表2007-525941(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

PubMed