

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6208269号
(P6208269)

(45) 発行日 平成29年10月4日(2017.10.4)

(24) 登録日 平成29年9月15日(2017.9.15)

(51) Int. Cl.	F I
C O 8 B 37/00 (2006.01)	C O 8 B 37/00 K
C O 7 H 7/027 (2006.01)	C O 7 H 7/027
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 V
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 10 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-40490 (P2016-40490)	(73) 特許権者	507042545
(22) 出願日	平成28年3月2日(2016.3.2)		リポクセン テクノロジーズ リミテッド
(62) 分割の表示	特願2012-522241 (P2012-522241) の分割		イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイ
原出願日	平成22年7月26日(2010.7.26)		チ ロンドン ロイヤル カレッジ スト
(65) 公開番号	特開2016-113626 (P2016-113626A)		リート 2 ロンドン バイオサイエンス
(43) 公開日	平成28年6月23日(2016.6.23)	(73) 特許権者	516064840
審査請求日	平成28年3月2日(2016.3.2)		バクサルタ インコーポレイテッド
(31) 優先権主張番号	61/228,828		アメリカ合衆国 イリノイ 60015,
(32) 優先日	平成21年7月27日(2009.7.27)		バノックバーン, レイクサイド ドライブ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1200
(31) 優先権主張番号	61/347,136		
(32) 優先日	平成22年5月21日(2010.5.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非血液凝固タンパク質の糖ポリシアル酸化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリシアル酸 (P S A) または修飾 P S A (m P S A) を、 D N A 分解酵素の酸化した糖質部分に、 アジピン酸ジヒドラジド を用いて結合体化させる方法であって、

該方法が、

a) 水溶性ポリマーである該 P S A または m P S A を酸化してアルデヒド基を形成させる工程 ;

b) 該 アジピン酸ジヒドラジド を、酸化した P S A または m P S A と反応させる工程 ;

c) 該 D N A 分解酵素を酸化し、アルデヒド基を形成させる工程 ; および

d) 工程 b) で合成された化合物を、工程 c) からの酸化した D N A 分解酵素と反応させ、該 D N A 分解酵素の該酸化した糖質部分の該アルデヒド部分と該工程 b) で合成された化合物の ヒドラジド基 との間でヒドラゾン結合を形成させる工程

を含み、

m P S A が、酸化または還元により末端 N - アセチルノイラミン酸部分から誘導された部分を含む P S A である、方法。

【請求項2】

前記 P S A または m P S A が、コロミン酸または修飾コロミン酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記 P S A または m P S A が、 2 ~ 5 0 0 のシアル酸単位を含む、請求項1または2に

記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 c) における前記糖質部分の酸化が、前記 DNA 分解酵素を過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) とインキュベートすることを含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記工程 a) が、前記 PSA または mPSA を酸化させて、該 PSA または mPSA の末端単位にアルデヒド基を形成させる工程を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

NaIO_4 を用いて、前記 PSA または mPSA を酸化させる工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

アニリンおよびアニリン誘導体より選択される求核触媒を含む緩衝液中で、前記酸化した糖質部分を、前記 PSA または mPSA と接触させる工程を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

還元性化合物の存在下でインキュベートすることによって、結合体化した DNA 分解酵素のヒドラゾン結合を還元する工程をさらに含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記還元性化合物が、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaCNBH_3) またはアスコルビン酸 (ビタミン C) である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

アジピン酸ジヒドラジドの末端の一つの窒素原子が、酸化した DNA 分解酵素中のアルデヒド基由来のカルボニル炭素原子との間でヒドラゾン結合し、該アジピン酸ジヒドラジドの他の末端の別の一つの窒素原子が、酸化した PSA 中のアルデヒド基由来のカルボニル炭素原子との間でヒドラゾン結合してなる、結合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水溶性ポリマー（特に、ポリシアル酸）を糖質含有化合物（特に、血液凝固タンパク質以外の糖タンパク質）に結合体化させるための材料および方法、ならびに得られた結合体に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリペプチド薬物の（例えば、PEG 化またはポリシアル酸化による）結合は、血液循環中の分解からポリペプチド薬物を保護し、このようにそれらの薬学的および薬物動態学プロファイルを改善させる（Harris および Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 214-21; S. Jain, D. Hreczuk-Hirst, P. Laing および G. Gregoriadis, Drug Delivery Systems and Sciences, 4 (No 1): 3-9, 2004.）。PEG 化プロセスにより、エチレングリコールの反復単位（ポリエチレングリコール（PEG））をポリペプチド薬物に付着させる。PEG 分子は巨大な流体力学量（球状タンパク質の 5 ~ 10 倍量）を有し、高度な水溶性と水和性、非毒性、および非免疫原性であり、生体内から速やかに除去される。分子の PEG 化は、薬物の酵素的分解に対する抵抗性の増大、インビボでの半減期の延長、投薬頻度の減少、免疫原性の減少、物理的および熱安定性の増大、溶解性の増大、液体安定性の増大、および凝集の低減をもたらす。最初の PEG 化薬物は 1990 年代初期に FDA により承認された。それ以来、FDA は経口、注射用および局所投与用の数々の PEG 化薬物を承認している。

【0003】

10

20

30

40

50

シアル酸（N - アセチルノイラミン酸ともよばれる）およびポリシアル酸は、動物組織、および、より少ない程度で、植物および真菌から酵母および細菌に及ぶ他種において、大部分は糖タンパク質やガングリオシドに広く分布していることがわかっている。

【 0 0 0 4 】

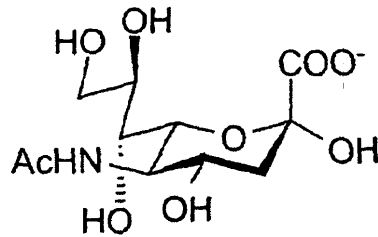
本明細書中で用いる略語である「P S A」は、用語「ポリシアル酸」のことをいう。同様に、本明細書中で用いる「m P S A」は、用語「修飾ポリシアル酸」のことをいう。

【 0 0 0 5 】

P S A は、N - アセチルノイラミン酸のポリマー（通常、ホモポリマー）からなる。二級アミノ基は、通常、アセチル基を持つが、代わりにグリコシル基を持ってよい。ヒドロキシル基の可能な置換基としては、アセチル基、ラクチル基、エチル基、硫酸基、およびリン酸基が挙げられる。

【 0 0 0 6 】

【化 1】



N-アセチルノイラミン酸
Neu5Ac

シアル酸（N-アセチルノイラミン酸）の構造

【 0 0 0 7 】

P S A および m P S A は、一般的には、2, 8 - または 2, 9 - グリコシド結合、あるいはこれらの組み合わせ（例えば、2, 8 - および 2, 9 - で交互に結合したもの）で連結された N - アセチルノイラミン酸部分から本質的になる線状ポリマーを含む。特に好ましい P S A および m P S A では、グリコシド結合が 2, 8 である。そのような P S A および m P S A は、好都合には、コロミン酸に由来し、本明細書中では「C A」および「m C A」という。典型的な P S A および m P S A は、少なくとも 2、好ましくは少なくとも 5、より好ましくは少なくとも 10、最も好ましくは少なくとも 20 の N - アセチルノイラミン酸部分を含む。したがって、P S A および m P S A は、5 から 500 の N - アセチルノイラミン酸部分、好ましくは 10 から 300 の N - アセチルノイラミン酸部分を含み得る。P S A および C A は、異なる糖部分を含むポリマーであり得る。P S A および C A は、コポリマーであり得る。P S A および C A は、好ましくは、N - アセチルノイラミン酸以外の糖部分を本質的に含まない。P S A および C A は、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 98% の N - アセチルノイラミン酸部分を含む。

【 0 0 0 8 】

P S A および C A が N - アセチルノイラミン酸以外の部分を含む場合（例えば、m P S A および m C A におけるように）、これらの部分は、好ましくは、ポリマー鎖の一端または両端に位置している。例えば、そのような「他の」部分は、酸化または還元により末端 N - アセチルノイラミン酸部分から誘導された部分であり得る。

【 0 0 0 9 】

例えば、WO-A-0187922には、過ヨウ素酸ナトリウムとの反応によって、非還元末端 N - アセチルノイラミン酸単位がアルデヒド基に変換された m P S A および m C A が記載されている。さらに、WO 2005/016974には、還元末端 N - アセチルノイラミン酸単位が還元を受け、この還元末端 N - アセチルノイラミン酸単位で還元的に開環し、それにより隣接

10

20

30

40

50

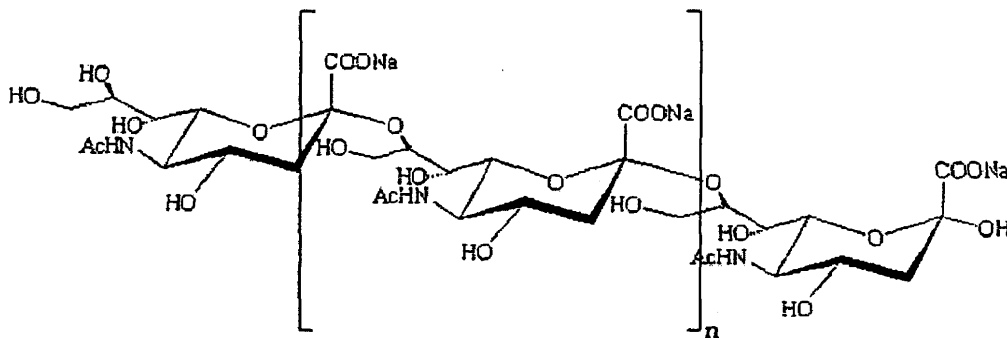
オール基が形成され、それに伴い引き続き酸化され、隣接ジオール基をアルデヒド基に変換した m P S A および m C A が記載されている。

【 0 0 1 0 】

シアル酸リッチの糖タンパク質は、ヒトおよび他の生物でセレクチンを結合する。それらは、ヒトのインフルエンザ感染に重要な役割を果たす。例えば、シアル酸は、マンノース結合レクチンから、宿主細胞または細菌の表面上のマンノース抗原を隠し得る。このことは、補体の活性化を妨げる。また、シアル酸は、最後から 2 番目の位置にあるガラクトース残基を隠し、肝実質細胞上のガラクトース受容体による、糖タンパク質の急速な排除を妨げる。

【 0 0 1 1 】

【 化 2 】



コロミン酸 (N-アセチルノイラミン酸のホモポリマー) の構造

【 0 0 1 2 】

とりわけ、C A は、K 1 抗原をもつ特定の大腸菌株により生産される。C A は多くの生理機能を有する。それらは、薬物および化粧品の原材料として重要である。

【 0 0 1 3 】

ポリシアル酸化および非修飾のアスパラギナーゼを用いたインビボでの比較試験により、ポリシアル酸化が酵素の半減期を増大させることが判明した (Fernandes および Gregoriadis, Biochimica Biophysica Acta 1341: 26-34, 1997)。

【 0 0 1 4 】

水溶性ポリマーと治療用タンパク質との間の共有結合の形成による結合体の調製は、様々な化学的方法によって実施され得る。P S A を治療用タンパク質へカップリングさせるための 1 つのアプローチは、上記タンパク質の糖質部分を介したポリマーの結合である。タンパク質中の糖質の隣接するヒドロキシル (O H) 基は、過ヨウ素酸ナトリウム (N a I O₄) で容易に酸化され得、活性アルデヒド基を形成する (Rothfus および Smith, J Biol Chem 1963; 238: 1402-10; van Lenten および Ashwell, J Biol Chem 1971; 246: 1889-94)。その後、上記ポリマーは、例えば、活性ヒドラジド基を含有する試薬を用いて、糖質のアルデヒド基にカップリングされ得る (Wilchek M および Bayer EA, Methods Enzymol 1987; 138: 429-42)。より最新の技術は、アルデヒドと反応してオキシム結合を形成させるアミノオキシ基を含む試薬の使用である (W O 96/40662, W O 2008/025856)。

【 0 0 1 5 】

P S A の治療用タンパク質への結合体化を記載しているさらなる例が、US Publication No. 2009/0076237 (r F V I I I の酸化、ならびにその後のヒドラジド化学物質を用いた、P S A および他の水溶性ポリマー (例えば、P E G、H E S、デキストラン) へのカップリングが教示されている)、および W O 2008/025856 (種々の凝固因子 (例えば、r F I X、F V I I 1、および F V I I a) の酸化、ならびにその後のポリマー (例えば、P E G) へのカップリングが教示されている) に記載されている。

【 0 0 1 6 】

10

20

30

40

50

近年、シアル酸の穏やかな過ヨウ素酸酸化によりアルデヒドを生じさせ、引き続き触媒量のアニリン存在下で、アミノオキシ基含有試薬と反応させる工程を含む、改良された方法が記載された (Dirksen AおよびDawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; 19, 2543-8; およびZeng Yら, Nature Methods 2009; 6: 207-9)。アニリン触媒作用はオキシム結合を劇的に促進し、非常に低濃度の試薬の使用を可能にする。

【0017】

水溶性ポリマーを治療用タンパク質へ結合体化させるのに利用できる方法があるにもかかわらず、様々な試薬に関するコストを最小限に抑えながら、化合物の薬力学的および/または薬物動態的特性を改善させる、水溶性ポリマーを血液凝固タンパク質以外の糖質含有化合物へ結合体化させるための材料および方法を開発する必要がある。 10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明は、様々な試薬に関するコストを最小限に抑えながら、化合物の薬力学的および/または薬物動態的特性を改善させる、水溶性ポリマーを血液凝固タンパク質以外の糖質含有化合物へ結合体化させるための材料および方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明の1つの実施形態では、水溶性ポリマーを血液凝固タンパク質以外の糖質含有化合物の酸化した糖質部分に結合体化させる方法が提供され、上記方法は、上記酸化した糖質部分を上記水溶性ポリマーと、結合体化を可能とする条件下で接触させる工程を含み、上記水溶性ポリマーがアミノオキシ基を含み、上記酸化した糖質部分と上記水溶性ポリマー上の上記アミノオキシ基との間でオキシム結合が形成される、または、上記水溶性ポリマーがヒドラジド基を含み、上記酸化した糖質部分と上記水溶性ポリマー上の上記ヒドラジド基との間でヒドラゾン結合が形成される。上記化合物は、(1)血液凝固タンパク質以外の糖タンパク質、(2)ガングリオシド、または(3)糖質基を含むドラッグデリバリーシステムであり得る。 20

【0020】

上記糖質部分は、糖特異的酸化酵素(例えば、ガラクトースまたはグルコースオキシダーゼ)を用いて、または過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)、四酢酸鉛(Pb(OAc)_4)、および過ルテニウム酸カリウム(KRuO_4)より選択される酸化剤を含むバッファーとインキュベートすることによって、酸化され得る。 30

【0021】

上記糖質部分は、シアル酸、マンノース、ガラクトース、またはグルコース残基にて酸化され得る。

【0022】

本発明に用いられる水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)、分岐PEG、PEG誘導体、PSA、mPSA、CA、mCA、ヒドロキシエチルセルロース(HEC)、デキストリン、ポリオキサゾリン、糖質、ポリサッカリド、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、デンプン、デキストラン、カルボキシメチル-デキストラン、ポリアルキレンオキシド(PAO)、ポリアルキレングリコール(PAG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン無水マレイン酸共重合体、ポリスチレン無水マレイン酸共重合体、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムリン酸(MPC)であり得るが、これらに限定されない。 40

【0023】

以下の実施例に示す本発明の特定の実施形態では、上記水溶性ポリマーが、PEGまたは分岐PEGである。 50

【0024】

以下の実施例に示す本発明のさらなる特定の実施形態では、上記水溶性ポリマーがポリシアル酸(PSA)または修飾PSA(mPSA)である。上記PSAまたはmPSAは、350Daから120,000Da、500Daから100,000Da、1000Daから80,000Da、1500Daから60,000Da、2,000Daから45,000Da、または3,000Daから35,000Daの範囲の分子量を有し得る。

【0025】

上記PSAまたはmPSAは、コロミン酸または修飾コロミン酸であり得る。

【0026】

本発明の別の実施形態では、上記PSAまたはmPSAは、約2~500または10~300のシアル酸単位で構成される。さらに別の実施形態では、酸化剤が過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)である、上述の方法が提供される。

10

【0027】

本発明の方法は、水溶性ポリマーを酸化させて、水溶性ポリマーの末端シアル酸単位にアルデヒド基を形成させる工程、および酸化した水溶性ポリマーとアミノオキシリンカーとを反応させる工程を含み得る。

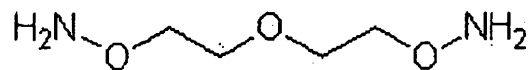
【0028】

本発明のさらに別の実施形態では、活性化アミノオキシリンカーと酸化した水溶性ポリマーとを反応させることによって水溶性ポリマーが調製される、上述の方法が提供され、上記リンカーは、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性リンカーである。上記ホモ二官能性リンカーは、一般式 $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n\text{ONH}_2$ を有し得、 n は1~50、好ましくは1~11、より好ましくは1~6である。上記リンカーは、特に、次式の3-オキサ-ペンタン-1,5-ジオキシアミンリンカー

20

【0029】

【化3】



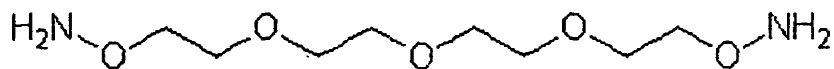
【0030】

および次式の3,6,9-トリオキサ-ウンデカン-1,11-ジオキシアミンリンカー

30

【0031】

【化4】



【0032】

より選択され得る。PSAまたはmPSAは、酸化剤とインキュベートすることによって酸化され、PSAの非還元末端で末端アルデヒド基を形成し得る。

【0033】

40

本方法は、水溶性ポリマーを酸化させて、水溶性ポリマーの末端単位(例えば、PSAまたはmPSAの末端シアル酸単位)にアルデヒド基を形成させる工程、および酸化した水溶性ポリマーとアミノオキシリンカーとを反応させる工程を含み得る。さらにもう1つの実施形態では、上記アミノオキシリンカーが3-オキサ-ペンタン-1,5-ジオキシアミンである、上述の方法が提供される。関連する実施形態では、酸化剤は NaIO_4 である。

【0034】

本発明の別の実施形態では、アニリンおよびアニリン誘導体からなる群より選択される求核触媒を含むバッファー中で、酸化した糖質部分と活性化された水溶性ポリマーとの接触が生じる、上述の方法が提供される。

50

【0035】

ヒドラジド基は、酸化した水溶性ポリマーとヒドラジドリンカーとを反応させることによって、水溶性ポリマー上で形成され得る。上記ヒドラジドリンカーは、適宜、アジピン酸ジヒドラジドまたはヒドラジンであり得る。

【0036】

本発明のさらに別の実施形態では、結合体化したタンパク質のオキシム結合またはヒドラゾン結合を還元する工程（例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ NaCNBH_3 ）およびアスコルビン酸（ビタミンC）からなる群より選択される還元性化合物を含むバッファー中に、結合体化したタンパク質をインキュベートすることによって）をさらに含む、上述の方法が提供され得る。関連する実施形態では、上記還元性化合物がシアノ水素化ホウ素ナトリウム（ NaCNBH_3 ）である。

10

【0037】

本発明の別の実施形態では、上述のいずれかの方法で生産された、結合体化した糖タンパク質が提供される。本発明のさらに別の実施形態では、血液凝固タンパク質以外の糖タンパク質、ガングリオシド、またはドラッグデリバリーシステムの結合体は、（a）上記糖タンパク質、ガングリオシド、またはドラッグデリバリーシステム、および、（b）（a）の糖タンパク質に結合した少なくとも1のアミノオキシ水溶性ポリマーを含み、上記アミノオキシ水溶性ポリマーは、1以上の糖質部分を介して、上記糖タンパク質、ガングリオシド、またはドラッグデリバリーシステムに付着されている。本発明のさらに別の実施形態では、血液凝固タンパク質以外の糖タンパク質、ガングリオシド、またはドラッグデリバリーシステムの結合体は、（a）上記糖タンパク質、ガングリオシド、またはドラッグデリバリーシステム、および、（b）（a）の糖タンパク質に結合した少なくとも1のヒドラジド水溶性ポリマーを含み、上記ヒドラジド水溶性ポリマーは、1以上の糖質部分を介して、上記糖タンパク質、ガングリオシド、またはドラッグデリバリーシステムに付着されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、水溶性ジアミノキシリンカーである3-オキサ-ペンタン-1,5-ジオキシアミンおよび3,6,9-トリオキサ-ウンデカン-1,11-ジオキシアミンの合成を示す。

30

【図2】図2は、アミノオキシ-PSAの調製を示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

糖質含有化合物（例えば、血液凝固タンパク質以外の糖タンパク質）の薬理学的および免疫学的特性は、水溶性ポリマー（特に、PEGまたはPSAまたはmPSA）との化学的な修飾および結合体化により改善され得る。上記の結果生じる結合体の特性は、一般的に、ポリマーの構造およびサイズに強く依存する。したがって、規定のおよび狭いサイズ分布を持つポリマーが通常好ましい。PSAおよびmPSA（具体例で使用）は、狭いサイズ分布を持つ最終的なPSA調製物を生じるように、精製され得る。

40

【0040】

糖タンパク質

本明細書中に記載されるように、本発明によって考慮される血液凝固タンパク質以外の糖タンパク質としては、サイトカイン、例えば、インターロイキン、 IL-1 、 IL-2 、および IL-6 、インターフェロン、コロニー刺激因子（顆粒球コロニー刺激因子を含む）、線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、ホスホリパーゼ活性化タンパク質（PLA₂）、インスリン、植物タンパク質、例えば、レクチンおよびリシン、腫瘍壊死因子および関連対立因子、可溶性腫瘍壊死因子受容体、インターロイキン受容体および可溶性インターロイキン受容体、成長因子、組織成長因子、トランスフォーミング増殖因子、例えば、TGF β またはTGF α 、および上皮成長因子、ホルモン、ソマトメジン、色素性ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン

50

、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノーゲン活性化因子、および免疫グロブリン、例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、およびIgD、モノクローナル抗体、エリスロポエチン(EPO)、血液凝固タンパク質以外の血液因子、ガラクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、DNA分解酵素、フェチュイン、それらの断片、および上記タンパク質またはその断片のいずれかを治療用糖タンパク質一般とともに含む任意の融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、糖タンパク質はEPOである。さらなる実施形態では、糖タンパク質はガラクトシダーゼである。なおさらなる実施形態では、糖タンパク質はDNA分解酵素である。よりさらなる実施形態では、糖タンパク質はフェチュインである。最後に、なおよりさらなる実施形態では、糖タンパク質は顆粒球コロニー刺激因子である。

10

【0041】

本明細書中で用いられるように、「生物学的に活性な誘導体」または「生物学的に活性な改変体」は、その分子の実質的に同じ機能的および/または生物学的な特性(例えば、結合特性)および/または同じ構造基盤(例えば、ペプチド骨格または基本ポリマー単位)を有する分子のいかなる誘導体または改変体も包含する。

【0042】

「類似体」、「改変体」、または「誘導体」は、天然に存在する分子に対し、場合により程度は異なるが、実質的に構造が類似し、かつ同じ生物学的活性を有する化合物である。例えば、ポリペプチド改変体は、参照ポリペプチドと、実質的に類似の構造を共有し、かつ同じ生物学的活性を有するポリペプチドをいう。改変体または類似体は、類似体が由来する天然に存在するポリペプチドと比べて、アミノ酸配列の組成が異なる。これは、(i)ポリペプチドの1以上の末端および/または天然に存在するポリペプチド配列の1以上の内部領域での1以上のアミノ酸残基(例えば、フラグメント)の欠失、(ii)ポリペプチドの1以上の末端(典型的には、「付加」または「融合」)および/または上記天然に存在するポリペプチド配列の1以上の内部領域(典型的には、「挿入」)での1以上のアミノ酸残基の挿入または付加、または(iii)天然に存在するポリペプチド配列における1以上のアミノ酸の他のアミノ酸による置換を包含する1以上の変異に基づく。例として、「誘導体」は、例えば化学的に、修飾された参照ポリペプチドと同じまたは実質的に類似の構造を共有するポリペプチドをいう。

20

【0043】

改変体または類似体のポリペプチドとしては挿入改変体が挙げられ、この改変体では、1以上のアミノ酸残基が本発明のタンパク質アミノ酸配列に付加されている。挿入は、タンパク質のいずれか一方または両方の末端に位置し得、および/またはタンパク質アミノ酸配列の内部領域内に配置され得る。挿入改変体は、いずれか一方または両方の末端に付加残基を持ち、例えば、融合タンパク質およびアミノ酸タグまたは他のアミノ酸ラベルを含むタンパク質を包含する。1つの局面では、タンパク質分子は、特にこの分子が細菌細胞(例えば大腸菌)で組換え発現される場合、必要に応じて、N末端のメチオニンを含む。

30

【0044】

欠失改変体では、本明細書中に記載されるように、タンパク質またはポリペプチド内の1以上のアミノ酸残基が除去される。欠失は、タンパク質またはポリペプチドのいずれか一方または両方の末端で生じ得、および/またはタンパク質アミノ酸配列内の1以上の残基の除去を伴う。したがって、欠失改変体は、タンパク質またはポリペプチド配列のフラグメントを包含する。

40

【0045】

置換改変体では、タンパク質またはポリペプチドの1以上のアミノ酸残基が除去され、代替の残基で置き換えられる。1つの局面では、置換は本質的に保存的であり、このタイプの保存的置換は当該技術分野で周知である。あるいは、本発明はまた、非保存的な置換も包含する。例示的な保存的置換はLehninger, [Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77]に記載されており、すぐ下に示される。

50

保存的置換

側鎖特性

アミノ酸

非極性（疎水性）：

A．脂肪族

A L I V P

B．芳香族

F W

C．硫黄含有

M

D．ボーダーライン

G

非荷電極性：

A．ヒドロキシル

S T Y

B．アミド

N Q

C．スルフヒドリル

C

D．ボーダーライン

G

陽性荷電（塩基性）

K R H

陰性荷電（酸性）

D E

【 0 0 4 6 】

あるいは、例示的な保存的置換をすぐ下に示す。

保存的置換 I I

元の残基

例示的置換

A l a (A)

V a l、L e u、I l e

A r g (R)

L y s、G l n、A s n

A s n (N)

G l n、H i s、L y s、A r g

A s p (D)

G l u

C y s (C)

S e r

G l n (Q)

A s n

G l u (E)

A s p

H i s (H)

A s n、G l n、L y s、A r g

I l e (I)

L e u、V a l、M e t、A l a、P h e

L e u (L)

I l e、V a l、M e t、A l a、P h e

L y s (K)

A r g、G l n、A s n

M e t (M)

L e u、P h e、I l e

P h e (F)

L e u、V a l、I l e、A l a

P r o (P)

G l y

S e r (S)

T h r

T h r (T)

S e r

T r p (W)

T y r

T y r (Y)

T r p、P h e、T h r、S e r

V a l (V)

I l e、L e u、M e t、P h e、A l a

【 0 0 4 7 】

ガングリオシド

本発明の実施形態では、ガングリオシドが、水溶性ポリマー（例えば、PEGまたはP
S Aまたはm P S A）に結合体化される。ガングリオシドは、細胞認識および細胞間コ
ミュニケーションにおいて働き得る識別性表面マーカーを細胞に提供することが知られてい
る。それらは治療剤として有用である。

【 0 0 4 8 】

本発明の結合体は、ガングリオシドおよび水溶性ポリマーを含み得、ガングリオシドは
、1以上のシアル酸が糖鎖に結合したスフィンゴ糖脂質（セラミドおよびオリゴ糖）を含
む。ガングリオシドは、分子に存在しているシアル酸単位の数に従って分類され得る。ガ
ングリオシドの例は、G M 1、G M 2、およびG M 3（モノシアロ - ガングリオシド）、
G D 1 a、G D 1 b、G D 2、およびG D 3（ジシアロ - ガングリオシド）、G T 1 b（
トリシアロ - ガングリオシド）およびG Q 1（テトラシアロ - ガングリオシド）である。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

本発明での使用に関して、好ましいガングリオシドは、セラミドがグルコースに結合し、グルコースが第1のガラクトースに結合し、第1のガラクトースがN - アセチルガラクトサミンに結合し、N - アセチルガラクトサミンが第2のガラクトースに結合したものを含む。この第2のガラクトースは1つのシアル酸に結合し得る。上記第1のガラクトースは1、2、3、または4つのシアル酸に結合し得る。シアル酸は、モノマー（各ガラクトース分子に1つずつ）として、または第1のガラクトースにオリゴシアル酸（2～4シアル酸）として結合し得る。

【 0 0 5 0 】

投与された場合、治療用ガングリオシドは長期間血液中を循環する必要がある。標的組織に対するそれらの作用がより効果的であるように、ガングリオシドは、例えば、本発明の方法によってポリシアル酸化され得る。

10

【 0 0 5 1 】

ドラッグデリバリーシステム

本発明のさらなる実施形態では、ドラッグデリバリーシステムが、水溶性ポリマー（例えば、PEGまたはPSAまたはmPSA）に結合体化される。一般に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）は、付随する薬物の運命および効果を制御し得る分子または粒子物質である。DDSは、2つの一般的なタイプに分けられ得る。第1のタイプは、高分子（MDDS）、例えば、抗体、ネオ糖タンパク質、ならびに合成ポリマー（例えば、ポリ（ヒドロキシプロピルメタクリルアミド）、ポリリジン、および重合アルキルシアノアクリレート）を含む。薬物と種々のタイプの高分子キャリアー（所望の部位にこの薬物をターゲティングするモノクローナル抗体を含む）との会合は、例えば、Gregoriadis Nature 265, 407-411 (1977)に記載されている。第2のタイプは、粒子DDS（PDDS）であり、例えば、生分解性材料（例えば、アルブミン）または半生分解性材料（例えば、デキストランおよびアルキルシアノアクリレートポリマー）を含むナノ粒子もしくはマイクロ粒子を含み、あるいは非イオン系界面活性剤で形成される小胞またはリポソームを含む。その詳細は、例えば、Gregoriadis NIPS, 4, 146-151 (1989)を参照のこと。

20

【 0 0 5 2 】

薬物は、DDSに共有結合され得るか、またはDDS内に受動的に捕捉され得る。例えば、界面活性剤小胞またはリポソームを含むPDDSは、界面活性剤または脂質分子の層の適切な組み合わせから形成されることによって、親水性または疎水性の薬学的に活性化化合物を捕捉し得る。薬学的に活性化化合物は通常、例えば、当該活性化化合物がその機能を実行する前または後、体内で溶解され得るまたはされ得ない結合によって、MDDSに共有結合されている。

30

【 0 0 5 3 】

上記MDDSの多くは、標的細胞または組織によって、それらの表面上の受容体を通じて認識される内在性（例えば、抗体）または獲得性（例えば、ネオ糖タンパク質）の能力を有する。典型的には、そのようなDDSは、注入時に標的によって特異的に取り込まれる。しかしながら、特異的取り込みは制限され、上記DDSの大部分は、他の（治療に）無関係な組織によって取り込まれる。この理由のため、抗体および他のDDSタンパク質（標的の特異性を問わず）は、他のタンパク質と同様に、それらの生物学的寿命の終了で分解されなければならない。

40

【 0 0 5 4 】

高分子タイプのMDDSに用いられる合成ポリマーは、例えば、ポリ（ヒドロキシプロピルメタクリルアミド）、ポリリジン、および重合アルキルシアノアクリレートである。これらは、細網内皮系（RES）または他の組織で適切なリソソーム酵素によって分解され得る。ある手段によって、例えば、RESまたは他の組織によるDDSの取り込みを減らすことによって、またはRESによって一度取り込まれたらリソソーム酵素による分解を減らすことによって、そのような生物分解性の高分子タイプのDDSの分解速度を下げるのが望ましい。

50

【 0 0 5 5 】

粒子DDS (PDDS) は、通例、RES によって循環から除去される。RES に対するそれらの傾向のため、PDDS は、しばしばこれらの組織への薬物の送達のために用いられる。しかしながら、PDDS がRES 以外の組織に指向されることが、しばしば望ましい。本目的を達成するために、PDDS のRES 妨害を遮断または遅延しなければならない。

【 0 0 5 6 】

本発明で用いるDDS は、グリコンを初期に含まなくてよい。必要に応じて、グリコンをDDS 構造に付加あるいはさもなければ組み込ませる。そのような場合の例は、マンノシル化またはガラクトシル化された脂質を組み込んだリポソームである。これらの糖リポソームは、マンノースまたはガラクトース受容体それぞれを発現する組織に、活性物をターゲティングする。

10

【 0 0 5 7 】

例えば、標的組織による取り込みが (肝実質細胞と同様に) より効果的であるように、DDS が長期間血液中で循環する必要がある場合、それらは、本発明の方法により、有利にポリシアル酸化される。

【 0 0 5 8 】

投与

1 つの実施形態では、本発明の結合体化した化合物は、注射 (例えば、静脈、筋肉内、あるいは腹腔内注射) によって投与され得る。その組成物は、治療、診断および / または同様の薬剤として有用であり得る。

20

【 0 0 5 9 】

本発明の結合体化した化合物を含む組成物をヒトまたは試験動物に投与するために、1 つの局面では、上記組成物は、1 以上の薬学的に受容可能なキャリアーを含む。用語「薬学的に」または「薬理学的に受容可能な」は、以下に記載されるように、安定であり、タンパク質分解 (例えば、凝集および切断生成物) を妨げ、ならびに、さらに当該技術分野で周知の経路を用いて投与されたときにアレルギーまたはその他の副作用を生じない、分子物質および組成物をいう。「薬学的に受容可能なキャリアー」は、上記の薬剤を含めて、任意のかつ全ての臨床的に有用な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、アイソトニックおよび吸収遅延剤などを包含する。

30

【 0 0 6 0 】

本明細書中で用いられているように、「有効量」は、臨床的に定義された疾患を有する哺乳類を治療するために適する投与量を包含する。

【 0 0 6 1 】

上記組成物は、経口的に、局所的に、経皮的に、非経口的に、吸入スプレーにより、腔内に、直腸内に、または頭蓋内注射により投与され得る。本願明細書中で用いられている用語「非経口的」は、皮下注射、静脈内、筋肉内、および大槽内注射、または点滴法を包含する。静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、髄腔内、眼窩内、肺内注射および / または特定部位での外科移植による投与が、同様に考慮される。一般的に、組成物は、発熱因子、ならびにレシピエントに有害となり得る他の不純物を本質的に含まない。

40

【 0 0 6 2 】

組成物の単一または複数の投与が実施され得、投与レベルおよびパターンは、治療を行っている医師によって選択される。疾病の予防または治療のために、適切な投与量は、上記のように、治療される疾病のタイプ、疾病の重症度および経過、予防または治療のいずれの目的で薬物が投与されるか、以前の治療、患者の病歴および薬物に対する応答、ならびに主治医の裁量に依存し得る。

【 0 0 6 3 】

本発明はまた、本明細書中に定義されたように、結合体化した化合物またはタンパク質の有効量を含む薬学的組成物に関する。薬学的組成物は、薬剤的に受容可能なキャリアー、希釈剤、塩、バッファー、または賦形剤をさらに含み得る。薬学的組成物は、臨床的に

50

定義された疾患を治療するために用いられ得る。本発明の薬学的組成物は、溶液または凍結乾燥製品であり得る。薬学的組成物の溶液は、任意の適切な凍結乾燥プロセスに供され得る。

【0064】

さらなる局面として、本発明は、本発明の組成物を含むキットを包含し、この組成物は、被験体への投与のためにその使用を容易にするようにパッケージングされている。1つの実施形態では、そのようなキットは、本明細書中に記載された化合物または組成物（例えば、結合体化したタンパク質を含む組成物）を含み、この化合物または組成物は、コンテナ、例えば、密閉された瓶または容器内にパッケージングされ、方法を実施する際の化合物または組成物の使用を記載するラベルが上記コンテナに貼り付けられるか、あるいはパッケージ内に含まれる。1つの実施形態では、上記キットは、結合体化したタンパク質を含む組成物を有する第1コンテナ、および上記第1コンテナ内の組成物に関して生理学的に受容可能な再構成溶液を有する第2コンテナを含む。1つの局面では、化合物または組成物は、単位投与形態でパッケージングされる。キットは、特定の投与経路に従って組成物を投与するために適切なデバイスをさらに含み得る。好ましくは、キットは、治療用タンパク質またはペプチド組成物の使用を記載したラベルを含む。

10

【0065】

1つの実施形態では、誘導体は、本来の治療用化合物の完全な機能活性を保持し、本来の治療用化合物に比べて、延長されたインビボ半減期を提供する。別の実施形態では、誘導体は、本来の化合物に対して、少なくとも20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、または150パーセント（%）の生物学的活性を保持する。

20

【0066】

シアル酸およびPSA

本明細書中で用いられるように、「シアル酸部分」は、シアル酸モノマーまたはポリマー（「ポリサッカリド」）を含み、これらは、水性の溶液または懸濁液に可溶であり、薬学的有効量でPSA-タンパク質結合体を投与した場合に哺乳類に対する負の影響（例えば、副作用）をほとんどまたは全く有さない。1つの局面では、PSAおよびmPSAは、1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、または500のシアル酸単位を有するものとして特徴付けられる。ある局面では、異なるシアル酸単位が、1つの鎖内で組み合わせられる。

30

【0067】

本発明の1つの実施形態では、PSAまたはmPSA化合物のシアル酸部分が高度に親水性であり、別の実施形態では、化合物全体が高度に親水性である。親水性は、主にシアル酸単位のペンダントカルボキシル基によって、ならびにヒドロキシル基によって、与えられる。サッカリド単位は、他の官能基（例えば、アミン、ヒドロキシルまたは硫酸基、あるいはそれらの組み合わせ）を含み得る。これらの基は、天然に存在するサッカリド化合物上に存在し得るか、または誘導体ポリサッカリド化合物に導入され得る。本発明の方法および結合体で用いられるPSAおよびmPSAは、発明の背景において上述したように、さらに特徴付けられ得る。

40

【0068】

天然に存在するポリマーPSAは、広いサイズ分布（例えば、Sigma C-5762）および高い多分散度（PD）を示す多分散調製物として入手され得る。ポリサッカリドは、通常、エンドトキシンを共精製する固有の危険性を有する細菌で生産されるので、長いシアル酸ポリマー鎖の精製は、エンドトキシン含量増加の確率を高め得る。また1~4のシアル酸

50

単位を有する短いP S A分子が、合成的に調製され得 (Kang SHら、Chem Commun. 2000; 227-8; Ress DKおよびLinhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004; 1: 31-46)、これにより、高いエンドトキシンレベルの危険性を最小化する。しかしながら、エンドトキシンプリーでもある、狭いサイズ分布および低い多分散度を有するP S A調製物が、今や製造され得る。1つの局面では、本発明について特に用いられるポリサッカリド化合物は、細菌によって生産されたものである。これらの天然に存在するポリサッカリドのいくつかは、糖脂質として知られている。1つの実施形態では、上記ポリサッカリド化合物は、末端ガラクトース単位を実質的に含まない。

【0069】

種々の実施形態では、上記化合物は、化学量論量 (例えば、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:7、1:8、1:9、または1:10など) で、P S Aまたはm P S A化合物に結合されるか、または会合している。種々の実施形態では、1~6、7~12、または13~20のP S Aおよび/またはm P S A単位が、上記化合物に結合されている。さらに他の実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のP S Aおよび/またはm P S A単位が、上記化合物に結合されている。

【0070】

必要に応じて、上記化合物は修飾されて、グリコシル化部位 (すなわち、本来のグリコシル化部位以外の部位) を導入する。そのような修飾は、当該技術分野で知られる標準の分子生物学的手法を用いて達成され得る。さらに、上記化合物は、1以上の糖質部分を介する結合体化前に、インビボまたはインビトロにてグリコシル化され得る。

【0071】**アミノオキシ結合**

本発明の1つの実施形態では、ヒドロキシルアミンまたはヒドロキシルアミン誘導体とアルデヒドとを (例えば、過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化後に糖質部分上で) 反応させて、オキシム基を形成することが、化合物の結合体の調製に適用される。例えば、まず、糖タンパク質を、酸化剤、例えば、過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) を用いて酸化する (Rothfus JAおよびSmith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; ならびにVan Lente n LおよびAshwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94)。例えば糖タンパク質の過ヨウ素酸酸化は、1928年に記載された古典的なマラプラード反応に基づき、隣接ジオールを過ヨウ素酸で酸化し、活性アルデヒド基を形成する (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96)。そのような酸化剤のさらなる例は、四酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$)、酢酸マンガン ($\text{MnO}(\text{Ac})_3$)、酢酸コバルト ($\text{Co}(\text{OAc})_2$)、酢酸タリウム (TlOAc)、硫酸セリウム ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) (US 4,367,309)、または過ルテニウム酸カリウム (KRuO_4) (Markoら、J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2) である。「酸化剤」によって、生理的反応条件下、糖質中の隣接ジオールを酸化し、活性アルデヒドを生成し得る、穏やかな酸化化合物が意図される。

【0072】

第2の工程は、アミノオキシ基を含むポリマーを酸化した糖質部分にカップリングし、オキシム結合を形成することである。本発明の1つの実施形態では、本工程は、求核触媒であるアニリンまたはアニリン誘導体の触媒量の存在下で実施され得る (Dirksen AおよびDawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Yら、Nature Methods 2009; 6: 207-9)。アニリン触媒はオキシム結合を劇的に加速し、試薬を非常に低い濃度で用いることを可能とする。本発明の別の実施形態では、オキシム結合は、 NaCNBH_3 で還元してアルコキシアミン結合を形成することによって、安定化される。

【0073】

本発明の1つの実施形態では、P S Aまたはm P S Aをタンパク質に結合体化させる反応工程は、個別および順次、実施される (すなわち、出発物質 (例えば、タンパク質、ポリマーなど)、試薬 (例えば、酸化剤、アニリンなど)、および反応生成物 (例えば、タ

10

20

30

40

50

ンパク質上の酸化した糖質、活性化アミノオキシポリマーなど)は、個々の反応工程間で分けられている)。

【0074】

アミノオキシ技術に関するさらなる情報は、以下の参考文献に見出され得、各参考文献は、それらの全体が援用されている：EP 1681303A1 (ヒドロキシアルキルデンブレン化 (H A S y l a t e d) エリスロポエチン)；WO 2005/014024 (オキシム結合基によって結合されたポリマーとタンパク質との結合体)；WO96/40662 (アミノオキシ含有リンカー化合物および結合体におけるその適用)；WO 2008/025856 (修飾タンパク質)；Peri Fら、T etrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb JおよびPozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees Aら、Vaccine 2006, 24 (6), 716-29; ならびにHeredia KLら、Macro moecules 2007, 40 (14), 4772-9.

10

【0075】

本発明の利点は、結合体の高い回収率、結合体化されていないタンパク質と比べて結合体化された糖タンパク質の活性の高い保持、および高い結合効率を含む。

【0076】

本発明は、以下の実施例を参照することによって説明される。実施例1～3、9および11～27は、本発明の具体的な実施形態を示している。実施例4～8および10は、本発明の対応する結合体の調製に関連する参考例として含まれる。

【実施例】

【0077】

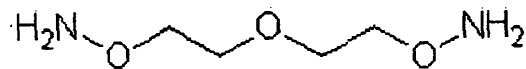
(実施例1：ホモ二官能性リンカー-NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂の調製)

ホモ二官能性リンカー-NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂

20

【0078】

【化5】



【0079】

(3-オキサ-ペンタン-1,5-ジオキシアミン)(2つの活性アミノオキシ基を含む)を、Boturynら(Tetrahedron 1997; 53: 5485-92)に従い、一級アミンの改変ガブリエル合成を用いる二工程有機反応で合成した。第1の工程では、ジメチルホルムアミド(DMF)中、1分子の2,2-クロロジエチルエーテルを2分子のエンド-N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミドと反応させた。所望のホモ二官能性生成物を、エタノール中、ヒドラジン分解によって生じた中間体から調製した。特に指定のない場合を除き、以下の実施例では、これをジアミノオキシリンカーという。

30

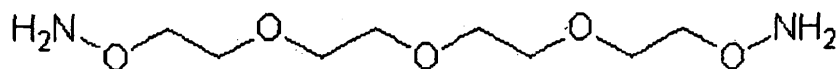
【0080】

(実施例2：ホモ二官能性リンカー-NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂の調製)

ホモ二官能性リンカー-NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂

【0081】

【化6】



40

【0082】

(3,6,9-トリオキサ-ウンデカン-1,11-ジオキシアミン)(2つの活性アミノオキシ基を含む)を、Boturynら(Tetrahedron 1997; 53: 5485-92)に従い、一級アミンの改変ガブリエル合成を用いる二工程有機反応で合成した。第1の工程では、DMF中、1分子のビス-(2-(2-クロロエトキシ)-エチル)-エーテルを2分子のエンド

50

- N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボキシミドと反応させた。所望のホモ二官能性生成物を、エタノール中、ヒドラジン分解によって生じた中間体から調製した。

【 0 0 8 3 】

(実施例 3 : アミノオキシ - P S A の調製)

Serum Institute of India (Pune, India) から得た酸化した P S A (分子量 1 8 . 8 k D) 5 0 0 m g を、5 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 5 . 5) 8 m L 中に溶解した。次に、3 - オキサ - ペンタン - 1 , 5 - ジオキシアミン 1 0 0 m g を添加した。室温にて 2 時間振盪後、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 4 4 m g を添加した。4 にてさらに 4 時間振盪後、この反応混合物をSlide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) 透析カセット (3 . 5 k D 膜、再生セルロース) に注入し、P B S (p H 7 . 2) に対して 4 日間透析した。この生成物を - 8 0 にて凍結した。本手順に従ったアミノオキシ - P S A の調製を、図 2 に示す。

10

【 0 0 8 4 】

(実施例 4 : アミノオキシ - P S A の r F I X へのカップリングおよび結合体の精製)

5 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0) 6 . 3 m L 中に溶解した r F I X 1 2 . 6 m g に、過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (1 0 m M) 2 8 9 μ L を添加した。この混合物を、暗所下、4 にて 1 時間振盪し、1 M グリセロール 6 . 5 μ L の添加によって、室温にて 1 5 分間クエンチした。Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 濃縮器 (3 0 k D 膜、再生セルロース) を用いた限外濾過 / 透析濾過 (U F / D F) によって、低分子量の夾雑物を除去した。次に、アミノオキシ - P S A 4 3 m g を U F / D F 保留物に添加し、この混合物を 4 にて 1 8 時間振盪した。疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) によって過剰な P S A 試薬を除去した。冷却した反応混合物の電気伝導度を 1 8 0 m S / c m に上げ、5 m L HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) H I C カラム (1 . 6 x 2 . 5 c m) に注入した。このカラムは、5 0 m M H E P E S、3 M 塩化ナトリウム、6 . 7 m M 塩化カルシウム、0 . 0 1 % T w e e n 8 0、p H 6 . 9 であらかじめ平衡化しておいた。結合体を、5 0 m M H E P E S、6 . 7 m M 塩化カルシウム、0 . 0 0 5 % T w e e n 8 0、p H 7 . 4 を用いて、流速 5 m L / 分にて 2 . 4 カラムボリューム (C V) 内に溶出させた。調製物を、総タンパク質量 (B C A) および F I X 発色活性を測定することによって解析評価した。P S A - r F I X 結合体について、8 0 . 2 I U / m g タンパク質の比活性が求められた (本来の r F I X と比べて 5 6 . 4 %) 。本結果を表 1 にまとめる。

20

30

【 0 0 8 5 】

【表 1】

項目	BCA [mg/mL]	FIX発色 [IU/mL]	比活性 [IU FIX発色/mg BCA]	比活性 [%]
rFIX	8.58	1221	142.3	100
PSA-rFIX	1.15	92.2	80.2	56.4

40

【 0 0 8 6 】

(実施例 5 : 求核触媒としてのアニリン存在下でのアミノオキシ - P S A の r F I X へのカップリング)

5 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0) 1 . 4 m L 中に溶解した r F I X 3 . 0 m g に、過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (1 0 m M) 1 4 . 1 μ L を添加した。この混合物を、暗所下、4 にて 1 時間振盪し、1 M グリセロール 1 . 5 μ L の添加によって、室温にて 1 5 分間クエンチした。P D - 1 0 脱塩カラム (GE Healthcare, Fairfield,

50

CT)を用いるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)によって、低分子量の夾雑物を除去した。酸化した r F I X 1.2 mg を、50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 1.33 mL に溶解し、これをアニリン (200 mM ストック水溶液) 70 μ L と混合し、室温にて45分振盪した。次に、アミノオキシ - P S A 4.0 mg を添加し、この混合物を室温にて2時間、さらに4にて16時間振盪した。1時間後、2時間後、および18時間後の反応終了時に、サンプルを取得した。次に、HICによって、過剰な P S A 試薬および遊離 r F I X を除去した。この冷却した反応混合物の電気伝導度を180 m S / c m に上げ、5 mL HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC カラム (1.6 \times 2.5 cm) に注入した。このカラムは、50 mM H E P E S、3 M 塩化ナトリウム、6.7 mM 塩化カルシウム、0.01% T w e e n 80、pH 6.9 であらかじめ平衡化しておいた。結合体を、50 mM H E P E S、6.7 mM 塩化カルシウム、0.005% T w e e n 80、pH 7.4、流速5 mL / 分のリニアグラジエントで20 C V 内に溶出させた。

【0087】

(実施例6:アミノオキシ - P S A の r F I X へのカップリングおよび N a C N B H ₃ を用いた還元)

50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 5.25 mL 中に溶解した r F I X 10.5 mg に、過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (10 mM) 53 μ L を添加した。混合物を、暗所下、4にて1時間振盪し、1 M グリセロール 5.3 μ L の添加によって、室温にて15分間クエンチした。Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 濃縮器 (30 k D 膜、再生セルロース) を用いる U F / D F によって、低分子量の夾雑物を除去した。次に、アミノオキシ - P S A 35.9 mg を U F / D F 保留物に添加し、混合物を室温にて2時間振盪した。次に、シアノ水素化ホウ素ナトリウム水溶液 (5 M) 53 μ L を添加し、この反応をさらに16時間進行させた。次いで、HICによって、過剰な P S A 試薬を除去した。この冷却した反応混合物の電気伝導度を180 m S / c m に上げ、5 mL HiTrap Butyl FF HIC (GE Healthcare, Fairfield, CT) カラム (1.6 \times 2.5 cm) に注入した。このカラムは、50 mM H E P E S、3 M 塩化ナトリウム、6.7 mM 塩化カルシウム、0.01% T w e e n 80、pH 6.9 であらかじめ平衡化しておいた。結合体を、50 mM H E P E S、6.7 mM 塩化カルシウム、0.005% T w e e n 80、pH 7.4 を用いて、流速5 mL / 分にて2.4 C V 内に溶出させた。

【0088】

(実施例7:アミノオキシ - P S A (リンカー: N H ₂ [O C H ₂ C H ₂] ₄ O N H ₂) の r F I X へのカップリングおよび結合体の精製)

50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 2.8 mL 中に溶解した r F I X 5.6 mg に、過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (10 mM) 102 μ L を添加した。混合物を、暗所下、4にて1時間振盪し、1 M グリセロール 2.9 μ L の添加によって、室温にて15分間クエンチした。Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 濃縮器 (30 k D 膜、再生セルロース) を用いる U F / D F によって、低分子量の夾雑物を除去した。次いで、アミノオキシ - P S A 19 mg を U F / D F 保留物に添加し、混合物を4にて18時間振盪した。HICによって過剰な P S A 試薬を除去した。冷却した反応混合物の電気伝導度を180 m S / c m に上げ、5 mL HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC カラム (1.6 \times 2.5 cm) に注入した。このカラムは、50 mM H E P E S、3 M 塩化ナトリウム、6.7 mM 塩化カルシウム、0.01% T w e e n 80、pH 6.9 であらかじめ平衡化しておいた。結合体を、50 mM H E P E S、6.7 mM 塩化カルシウム、0.005% T w e e n 80、pH 7.4 を用いて、流速5 mL / 分にて2.4 C V 内に溶出させた。

【0089】

(実施例8:アミノオキシ - P S A の r F V I I I へのカップリング)

H e p e s バッファー、pH 6 (50 mM H e p e s、5 mM C a C l ₂、150 mM N a C l、0.01% T w e e n) 11 mL 中に溶解した r F V I I I 11 mg

10

20

30

40

50

に、10 mM 過ヨウ素酸ナトリウム 57 μ L を添加した。混合物を、暗所下、4 にて 30 分振盪し、1 M グリセロール水溶液 107 μ L を加えることによって、4 にて 30 分間クエンチした。次いで、アミノオキシ - P S A (18 . 8 k D) 19 . 8 m g を添加し、この混合物を 4 にて一晩振盪した。8 M 酢酸アンモニウムを含むバッファー (8 M 酢酸アンモニウム、50 mM H e p e s、5 mM C a C l ₂、350 mM N a C l、0 . 01 % T w e e n 80、p H 6 . 9) を最終濃度が 2 . 5 M の酢酸アンモニウムになるまで添加することによって、イオン強度を上昇させた。次に、反応混合物を、平衡化バッファー (2 . 5 M 酢酸アンモニウム、50 mM H e p e s、5 mM C a C l ₂、350 mM N a C l、0 . 01 % T w e e n 80、p H 6 . 9) で平衡化した HiTrap B u t y l F F (G E H e a l t h c a r e , F a i r f i e l d , C T) カラムに注入した。この生成物を、溶出バッ

10

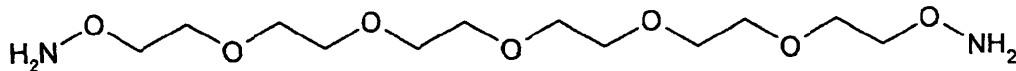
【 0 0 9 0 】

(実施例 9 : ホモ二官能性リンカー - N H ₂ [O C H ₂ C H ₂] ₆ O N H ₂ の調製)

ホモ二官能性リンカー - N H ₂ [O C H ₂ C H ₂] ₆ O N H ₂

【 0 0 9 1 】

【 化 7 】



20

【 0 0 9 2 】

(3 , 6 , 9 , 1 2 , 1 5 - ペンタオキサ - ヘプタデカン - 1 , 1 7 - ジオキシアミン) (2 つの活性アミノオキシ基を含む) を、Boturyn ら (T e t r a h e d r o n 1 9 9 7 ; 5 3 : 5 4 8 5 - 9 2) に従い、一級アミンの改変ガブリエル合成を用いる二工程有機反応で合成した。第 1 の工程では、D M F 中、1 分子のヘキサエチレングリコールジクロライドを 2 分子のエンド - N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボキシミドと反応させた。所望のホモ二官能性生成物を、エタノール中、ヒドラジン分解によって、生じた中間体から調製した。

30

【 0 0 9 3 】

(実施例 10 : マレイミド / アミノオキシリンカーシステムを用いた r F I X のポリシアル酸化)

A . 修飾試薬の調製

アミノオキシ - P S A 試薬を、マレイミド / アミノオキシリンカーシステム (T o y o k u n i ら、B i o c o n j u g a t e C h e m 2 0 0 3 ; 1 4 , 1 2 5 3 - 9) を用いることによって調製する。遊離末端 S H 基を含む P S A - S H (2 0 k D) は、二工程の手順を用いて調製する : a) N H ₄ C l での酸化した P S A の還元的アミノ化による P S A - N H ₂ の調製 (W O 0 5 0 1 6 9 7 3 A I に従う) および b) 末端の一級アミノ基と 2 - イミノチオラン (トラウト試薬 / P i e r c e , R o c k f o r d , I L) との反応によるスルフヒドリル基の導入 (U S 7 6 4 5 8 6 0 に記載の通り) 。 P S A - S H を、P B S バッファー中、p H 7 . 5 にてリンカーのマレイミド基にカップリングさせる (1 0 倍モル過剰のリンカーおよび 5 0 m g / m L の P S A - S H 濃度を使用) 。反応混合物を室温にて穏やかな振盪下、2 時間インキュベートする。次いで、過剰なリンカー試薬を除去し、アミノオキシ - P S A を透析濾過によって酸化バッファー (5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 0) にバッファー交換する。バッファーを P e l l i c o n X L 5 k D 再生セルロース膜 (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M A) を用いて 2 5 回交換する。

40

【 0 0 9 4 】

B . N a I O ₄ での事前酸化後の r F I X の修飾

r F I X を、バッファー中に 1 0 0 μ M 過ヨウ素酸ナトリウムを用いた 5 0 m M リン酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0) 中で酸化する。この混合物を、暗所下、4 にて 1

50

時間振盪し、グリセロールを最終濃度 5 mM となるように添加して、室温にて 15 分間クエンチした。P D - 10 脱塩カラム (GE Healthcare, Fairfield, CT) を用いた。次いで、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって、低分子量の夾雑物を除去した。酸化した r F I X を、アニリンに添加して 10 mM の最終濃度として、5 倍モル過剰の P S A となるようにアミノオキシ - P S A 試薬と混合する。反応混合物を、暗所下、室温にて穏やかな振盪の下、2 時間インキュベートした。

【 0 0 9 5 】

C . 結合体の精製

HICによって、過剰な P S A 試薬および遊離 r F I X を除去する。この反応混合物の電気伝導度を 180 m S / c m に上げ、48 mL Butyl - Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) を充填したカラムに注入する。このカラムは、50 mM H e p e s 、3 M 塩化ナトリウム、6.7 mM 塩化カルシウム、0.01% Tween 80、pH 6.9 であらかじめ平衡化しておいた。その後、結合体を、60% 溶出バッファー (50 mM H e p e s 、6.7 mM 塩化カルシウム、pH 7.4) のリニアグラジエントにて 40 CV 内に溶出させる。最終的に、P S A - r F I X 含有画分を集め、再生セルロース製の 30 k D 膜 (Millipore) の使用によって、U F / D F に供する。この調製物を、総タンパク質量 (B C A) および F I X 発色活性を測定することによって解析評価した。両改変体を用いて調製した P S A - r F I X 結合体について、本来の r F I X と比べて 50% を上回る比活性が求められた。

【 0 0 9 6 】

(実施例 11 : アミノオキシ - P S A 試薬の調製)

実施例 3 に従って、アミノオキシ - P S A 試薬を調製した。最終生成物は、5 k D 膜 (再生セルロース、Millipore) を用いて、pH 7.2 のバッファー (50 mM H e p e s) に対して透析濾過し、-80 °C にて凍結し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、この試薬を適切な容量の水に溶解し、糖質修飾を介する P S A - タンパク質結合体の調製に用いた。

【 0 0 9 7 】

(実施例 12 : アミノオキシ - P S A 試薬の合成の詳細)

Botyrynら (Tetrahedron 1997; 53: 5485-92) に従って、実施例 1 に概説した二工程有機合成にて、3 - オキサ - ペンタン - 1 , 5 ジオキシアミンを合成した。

【 0 0 9 8 】

工程 1 :

無水 N , N - ジメチルホルムアミド 700 mL 中のエンド - N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボキシミド (59.0 g ; 1.00 eq) の溶液に、無水 K₂CO₃ (45.51 g ; 1.00 eq) および 2,2 - ジクロロジエチルエーテル (15.84 mL ; 0.41 eq) を添加した。この反応混合物を 50 °C にて 22 時間攪拌した。この混合物を減圧下、乾燥するまで蒸発させた。残渣をジクロロメタン 2 L 中に懸濁し、飽和 NaCl 水溶液 (各 1 L) で 2 回抽出した。ジクロロメタン層を Na₂SO₄ で乾燥させ、次いで、減圧下、乾燥するまで蒸発させ、高真空中で乾燥させ、3 - オキサペンタン - 1 , 5 - ジオキシ - エンド - 2' , 3' - ジカルボキシジイミドノルボルネン 64.5 g を黄色がかった白の固体 (中間体 1) として得た。

【 0 0 9 9 】

工程 2 :

無水エタノール 800 mL 中の中間体 1 (64.25 g ; 1.00 eq) の溶液に、ヒドラジン水和物 31.0 mL (4.26 eq) を添加した。次いで、この反応混合物を 2 時間還流した。混合物を、減圧下、溶媒を蒸発させることによって、開始容量の半分に濃縮した。生成した沈殿物を濾別した。残存するエタノール層を、減圧下、乾燥するまで蒸発させた。粗生成物である 3 - オキサ - ペンタン - 1 , 5 - ジオキシアミンを含む残渣を真空中で乾燥させ、46.3 g を得た。この粗生成物を、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル 60 ; ジクロロメタン / メタノール混合物、9 + 1 の定組成溶離) によってさらに精製し、精製した最終生成物の 3 - オキサ - ペンタン - 1 , 5 - ジオキシアミン 11 .

7 g を得た。

【0100】

(実施例13: アミノオキシ-PSAポリマーの調製)

酸化したコロミン酸(23kDa) 1.3 gは、50 mM酢酸ナトリウム(pH 5.5 ± 0.02) 18 mL中に溶解した。20倍モル過剰の1,11-ジアミノ-3,6,9-トリオキサウンデカン(3,6,9-トリオキサ-ウンデカン-1,11-ジオキシアミンともよばれる)を、最小量の50 mM酢酸ナトリウム(pH 5.5 ± 0.02)中に溶解し、PSA溶液に加えた。最終的なコロミン酸の濃度は62.5 mg/mLであった。この反応混合物を、穏やかなミキサー(1分あたり22の振動)上で、22 ± 1.0にて2 ± 0.1時間インキュベートした。その後、上記反応混合物に160 mg/mL NaCNBH₃溶液0.65 mLを加え、最終濃度を5.00 mg/mLとした。これを、混合のための十分なヘッドスペースを持つエンドトキシンプリーの気密容器内で、シェーカー(1分あたり22の振動)上で、4.0 ± 1.0にて3.0 ± 0.20時間インキュベートした。精製のために、サンプルを2 mMトリエタノールアミン(pH 8.0 ± 0.02)で希釈し、20 mg/mLの最終コロミン酸濃度とした。反応混合物を脱塩し、過剰な1,11-ジアミノ-3,6,9-トリオキサウンデカン、NaCNBH₃、および反応の副生物を除去した。これに引き続いて、20 mMトリエタノールアミンバッファー(pH 8.0 ± 0.02)を用いてSephadex G25カラムで脱塩した。脱塩したサンプルのpHを、pH 7.8 ~ 8.0に調整し、20 mM TEA pH 8.0で1回、2 mMトリエタノールアミン(TEA) pH 8.0で2回、限外濾過/透析濾過した。このサンプルを凍結乾燥し、-80にて保存した。

10

20

【0101】

あるいは、脱塩および限外濾過/透析濾過(UF/DF)工程の間、高塩濃度下で精製を行った。高塩濃度下での陰イオン交換クロマトグラフィーもまた用いて、高純度のアミノオキシ-PSAを作製した。同様にして、種々の分子量のアミノオキシ-PSAを合成した。

【0102】

(実施例14: ジアミノオキシ(3,6,9-トリオキサ-ウンデカン-1,11-ジオキシアミン)-PSAの -ガラクトシダーゼへのカップリング)

-ガラクトシダーゼ(-Gal)の酸化のために、種々の濃度(0.157 mMから2 mMまで及ぶ)のNaIO₄を用いた。-Gal 0.5 mgを、5.75の酸性pHのもと、暗所下、4にて30分間酸化した。最終濃度が5 mMとなるようにNaHSO₃を添加することによって、酸化を停止させた。酸化した-GalとジアミノオキシPSAポリマー(22kDa)とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は1.25 mMであり、一方、-Galの濃度は0.125 mg/mL ~ 0.76 mg/mLまで及んだ。全ての反応をpH 5.75で行った。50 mMまたは3.17 mg/mLの濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を4にて実施し、1、2、および24時間の期間でサンプルを集めた。結合体を、SDS PAGEおよびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。SDS PAGEにおいて結合体に関してバンドの移動が見られ、このことを、ウエスタンブロットティングによっても確認した。

30

40

【0103】

最良の反応条件に基づき、-Gal 1.9 mgを、1.5 mM NaIO₄を用いて、4にて30分間酸化し、次いで、最終濃度が5 mMとなるようにNaHSO₃を添加することによって、酸化を停止させた。酸化した-GalとジアミノオキシPSAポリマーとを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物のポリマーおよびタンパク質の最終濃度はそれぞれ1.25 mMおよび0.76 mg/mLであった。反応混合物中の最終pHはおよそ5.75であった。50 mMまたは3.17 mg/mLの濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を4にて2時間実施した。精製および非精製の結合体を、SDS PAGEおよびウエスタンブロットティング

50

を用いて特徴付けた。SDS PAGEにおいて結合体に関してバンドの移動が見られ、このことを、抗PSA抗体を用いたウエスタンブロットティングによっても確認した。オールインワン Gal アッセイキット (Pierce) を用いると、PSA - Gal 結合体のインビトロでの活性は、本来のタンパク質に匹敵した。アルデヒドリンカーケミストリーを用いて作製した比較結合体では50%未満の活性を観察した。さらに、プロセス全体を3倍までスケールアップした。

【0104】

(実施例15：ジアミノオキシ - PSAのフェチュインへのカップリング)

フェチュインを、10 mM NaIO_4 を用いて、暗所下、4 にて60分間酸化し、10 mMの最終濃度となるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化したフェチュインとジアミノオキシPSAポリマー(23 kDa) とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度はpH 5.75で2.5 mMであった。50 mMまたは3.17 mg/mLの濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。この反応で最終タンパク質濃度は0.714 mg/mLであり、反応を4 にて2時間実施した。これらの結合体を、SDS PAGEおよびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。SDS PAGEにおいて結合体に関してバンドの移動が見られ、このことを、ウエスタンブロットティングによっても確認した。

10

【0105】

スケールアップ反応のために、フェチュイン5 mgを、10 mM NaIO_4 を用いて、暗所下、4 にて60分間酸化し、次いで、最終濃度が10 mMとなるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化したフェチュインとジアミノオキシPSAポリマー(23 kDa) とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は5.75のpHで2.5 mMであった。50 mMまたは3.17 mg/mLの濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を4 にて実施し、2時間後にサンプルを集めた。精製および非精製の結合体を、SDS PAGEおよびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。SDS PAGEにおいて結合体に関してバンドの移動が見られ、このことを、ウエスタンブロットティングによっても確認した。

20

【0106】

(実施例16：求核触媒として作用するアニリンを用いたジアミノオキシ - PSAのフェチュインへのカップリング)

フェチュイン0.2 mgを、10 mM NaIO_4 を用いて、暗所下、4 にて30分間酸化し、次いで、最終濃度が5 mMとなるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化したフェチュインとジアミノオキシPSAポリマー(23 kDa) とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は1.25 mMであった。反応混合物の最終pHは5.75であった。50 mMまたは3.17 mg/mLの濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。この反応で最終タンパク質濃度は0.125 mg/mLであった。200 mMアニリン溶液84.21 μL を反応混合物1.6 mLに加えた。反応を4 にて一晩実施した。

30

40

【0107】

(実施例17：ジアミノオキシ - PSAのエリスロポイエチン(EPO)へのカップリング)

EPO 0.2 mgを、10 mM NaIO_4 を用いて、4 にて30分間酸化した。最終濃度が5 mMとなるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化したEPOと23 kDaのジアミノオキシポリマーとを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は1.25 mMであった。反応混合物中のEPOの最終濃度は0.125 mg/mLであった。反応混合物の最終pHは5.75であった。50 mMまたは3.17 mg/mLの濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を4 にて24時間実施した。非精製の結合体を、

50

S D S P A G E を用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られた。

【 0 1 0 8 】

(実施例 1 8 : 求核触媒として作用するアニリンを用いたジアミノオキシ - P S A の E P O へのカップリング)

E P O 0 . 2 m g を、1 0 m M N a I O ₄ を用いて、4 にて 3 0 分間酸化した。最終濃度が 5 m M となるように N a H S O ₃ を添加することにより、酸化を停止させた。酸化した E P O とジアミノオキシ P S A ポリマー (2 2 k D a) とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は 1 . 2 5 m M であった。反応混合物の最終 p H は 5 . 7 5 であった。5 0 m M または 3 . 1 7 m g / m L の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。この反応で最終タンパク質濃度は 0 . 1 2 5 m g / m L であった。2 0 0 m M アニリン溶液 8 4 . 2 1 μ L を反応混合物 1 . 6 m L に加えた。反応を 4 にて一晩実施した。結合体を、S D S P A G E を用いて特徴付けた。この結合体でバンドの移動が見られた。この結合体の活性において、アニリンの悪影響は観察されなかった。

10

【 0 1 0 9 】

(実施例 1 9 : ジアミノオキシ - P S A の D N A 分解酵素へのカップリング)

D N A 分解酵素の糖ポリシアル酸化のために、ウシ膵臓 D N A 分解酵素を結合体化反応に用いた。この D N A 分解酵素のソースは凍結乾燥粉末として供給され、- 2 0 にて保存した。反応前に、本凍結乾燥粉末を酢酸ナトリウムバッファー (p H 5 . 7 5) 中に溶解した。糖ポリシアル酸化に用いたポリマーは、1 0 k D a ~ 2 2 k D a の範囲の分子量を有した。D N A 分解酵素のグリコン部分の酸化のために、N a I O ₄ を酸化剤として 1 m M の最終濃度で用いた。5 . 7 5 の酸性 p H のもと、4 にて 3 0 分間、D N A 分解酵素を酸化した。最終濃度が 2 m M となるように N a H S O ₃ を添加することによって、酸化を停止させた。酸化が完了した後、ジアミノオキシ P S A ポリマーを 1 . 2 5 m M の最終濃度となるように添加することによって、結合体化反応を実施した。最終濃度が 5 0 m M または 3 . 1 7 m g / m L となるように N a C N B H ₃ を反応混合物に添加し、D N A 分解酵素のポリシアル酸化を、4 . 0 ± 1 . 0 にて少なくとも 2 時間実施した。反応をポリマーに対して 2 5 倍モル過剰の T r i s で停止させた。結合体を、S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。活性は 9 5 % であると測定された (アルデヒドリンカーケミストリーを用いて作製した比較結合体で観察した 5 0 % 以下と比較して) 。

20

30

【 0 1 1 0 】

(実施例 2 0 : ジアミノオキシ (3 オキサ - ペンタン - 1 , 5 - ジオキシアミンリンカー) - P S A の - ガラクトシダーゼへのカップリング)

- ガラクトシダーゼの酸化のために、2 m M の濃度で N a I O ₄ を用いた。- ガラクトシダーゼ 3 m g を 5 . 7 5 の酸性 p H のもと、4 にて 3 0 分間酸化し、次いで、最終濃度が 2 m M となるように N a H S O ₃ を添加することにより、酸化を停止させた。酸化した - ガラクトシダーゼとジアミノオキシ P S A ポリマー (2 3 k D a) とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は 1 . 5 m M であった。反応混合物中の - ガラクトシダーゼの最終濃度は 0 . 8 6 7 m g / m L であった。反応混合物の最終 p H はおよそ 5 . 7 5 であった。5 0 m M または 3 . 1 7 m g / m L の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を 4 にて 2 時間実施した。結合体を、S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。

40

【 0 1 1 1 】

(実施例 2 1 : ヒドラジド - コロミン酸の調製)

本発明者らは、アジピン酸ジヒドラジドを用いて P S A - ヒドラジド (コロミン酸 - ヒ

50

ドラジド)を調製するため、以下のプロトコルを用いた。他のPSA-ヒドラジドを作製するために類似の方法を用いた。

1 活性化コロミン酸1gを20mM酢酸ナトリウム(pH5.5±0.02)約10mL中に溶解する。最終的なコロミン酸の濃度は62.5mg/mLとする。

2 25倍モル過剰(酸化したコロミン酸「CAO」に対して)のアジピン酸ジヒドラジド(分子量174.2g)を最小量の20mM酢酸ナトリウム(pH5.5±0.02)中に溶解し、1の溶液に加える。

3 添加するアジピン酸ジヒドラジド量

【0112】

【数1】

10

添加するアジピン酸ジヒドラジド量

$$= \frac{\text{CAOの質量 (g)} \times 25 \times \text{アジピン酸ジヒドラジドの分子量 (g)}}{\text{CAOの分子量 (Da)}}$$

$$= \frac{1 \times 25 \times 174.2}{15 \times 10^3}$$

$$= 0.290 \text{ g}$$

20

【0113】

4 アジピン酸ジヒドラジド溶液を加えた後、コロミン酸の容量を最終濃度が62.5mg/mLとなるように酢酸ナトリウムで補充する。したがって、総反応容量は16mLである。

5 反応混合物を、シェーカー(1分あたり22振動)上で、22.0±1.0にて2±0.1時間インキュベートする。

6 濃縮したNaCNBH₃溶液(165mg/mL)を調製し、0.5mLを1の溶液に加えて、最終反応混合物中のこの最終濃度が5.0mg/mLとなるようにする。反応混合物を、シェーカー(1分あたり22振動)上で、4.0±1.0にて3.0±0.20時間インキュベートする。

30

7 適切な混合のために50mL余分ヘッドスペース(反応混合物が容器の蓋に触れないよう十分なスペースがある)を持つエンドトキシフリーの気密容器内に反応混合物を保存する。

8 4にて3時間反応後、2mMトリエタノールアミン(pH8.0±0.02)でサンプルを希釈し(50mLまでボリュームアップする)、最終コロミン酸濃度を20mg/mLとする。

9 反応混合物を脱塩し、ポリマーから過剰な未処理のアジピン酸ジヒドラジド、NaCNBH₃などを除去する。これは、GPC(XK 50 Sephadex G-25 medium matrix; 1.8mgCA/mLマトリックス以下; ベッド高35cm; カラムボリューム687mL)によって、UV224nmおよび電気伝導度を観察することによってなされ得る。脱塩は20mMトリエタノールアミン(pH8.0±0.02)バッファーを用いて実施する。

40

10 脱塩後、コロミン酸-ヒドラジドは、限外濾過1サイクル、20mM TEA(pH8.0±0.02)を用いた透析濾過1サイクル、および2mM TEA(pH8.0±0.02)を用いた透析濾過少なくとも3サイクルに供する。これは3kDaのVivaflowカセットを用いてなされ得る。

11 脱塩したサンプルのpHをpH7.8~8.0に調整する。必要に応じて、このサンプルを凍結乾燥し、引き続き再乾し、過剰な湿気を除去する。

【0114】

50

(実施例 22 : ヒドラジド - P S A のエリスロポイエチンへのカップリング)

エリスロポイエチン (E P O) の酸化のために、 NaIO_4 を 10 m M の濃度で用いた。E P O (1 m g) を、p H 5 . 7 5 で 4 にて 30 分間酸化し、次いで、最終濃度が 5 m M となるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化した E P O とヒドラジド - P S A ポリマーとを用いて、結合体化反応を実施した。結合体化に用いたヒドラジド - P S A の分子量は 24 . 34 k D a であった。反応混合物中のヒドラジド - P S A の最終濃度は 1 . 25 m M であった。反応混合物中の E P O の最終濃度は 0 . 125 m g / m L であった。反応混合物の最終 p H はおよそ 5 . 7 5 であった。50 m M または 3 . 17 m g / m L の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を 4 にて 24 時間実施した。結合体を、S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。

10

【 0 1 1 5 】

(実施例 23 : ヒドラジド - P S A の α - ガラクトシダーゼへのカップリング)

α - ガラクトシダーゼ (0 . 5 ~ 4 . 5 m g) を、0 . 625 ~ 2 m M の NaIO_4 を用いて、4 にて 30 分間酸化した。最終濃度が 5 m M となるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化した α - ガラクトシダーゼと 24 . 34 k D a ~ 27 . 9 k D a まで及ぶヒドラジド - P S A とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のヒドラジド - P S A の最終濃度は 1 . 25 m M であった。反応混合物中の α - ガラクトシダーゼの最終濃度は 0 . 125 m g / m L ~ 0 . 76 m g / m L までの範囲内であった。反応混合物の最終 p H はおよそ 5 . 7 5 であった。50 m M または 3 . 17 m g / m L の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を 4 にて実施し、1、2、および 24 時間でサンプルを集めた。精製および非精製の結合体を、S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。活性は 84 % であると測定された。アルデヒドリンカーケミストリーを用いて作製した比較結合体で 50 % 未満の活性を観察した。

20

【 0 1 1 6 】

(実施例 24 : ヒドラジド - P S A のフェチュインへのカップリング)

フェチュイン (0 . 25 m g) を、 NaIO_4 (5 または 10 m M) を用いて、4 にて 30 または 60 分間酸化した。酸化に用いた NaIO_4 の濃度に一致させるのに適当であるように、最終濃度が 5 または 10 m M となるように NaHSO_3 を添加することにより、酸化を停止させた。酸化したフェチュインとアジピン酸ジヒドラジド - P S A ポリマーとを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は 1 . 25 ~ 2 . 5 m M の間であった。反応混合物の最終 p H は 5 . 7 5 であった。50 m M または 3 . 17 m g / m L の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を 4 にて 1 時間 ~ 4 時間実施した。結合体を S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。反応条件の各セットにつき、S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。

30

40

【 0 1 1 7 】

フェチュイン 5 m g のスケールアップ反応、引き続き、生じた結合体の精製を実施した。フェチュイン 5 m g を、10 m M NaIO_4 を用いて、4 にて 60 分間酸化し、次いで、10 m M の最終濃度となるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化したフェチュインとアジピン酸ジヒドラジド - P S A ポリマーとを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は 2 . 5 m M であった。反応混合物の最終 p H はおよそ 5 . 7 5 であった。50 m M または 3 . 17 m g / m L の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を 4 にて実施し、2 時間でサンプルを集めた。精製および非精製の結合体を、S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合

50

体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。

【0118】

(実施例25：ヒドラジド - P S A の D N A 分解酵素へのカップリング)

D N A 分解酵素を、0.2 mM ~ 2 mM まで及び最終濃度になるよう NaIO_4 を用いて、4 にて30分間酸化した。酸化に用いた NaIO_4 の濃度に依存する2 ~ 5 mM の間の最終濃度となるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化した D N A 分解酵素に1.25 mM の最終濃度となるようヒドラジド - P S A ポリマーを添加することによって、酸化した D N A 分解酵素の糖ポリシアル酸化を実施した。50 mM または3.17 mg / mL の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加し、D N A 分解酵素の糖ポリシアル酸化を、4 にて1時間から2時間に及び期間実施した。反応をポリマーに対して25倍モル過剰の Tris で停止させた。結合体を、S D S P A G E およびウエスタンブロットティングを用いて特徴付けた。S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られ、ウエスタンブロットティングから陽性結果を得た。活性は49%であると測定された。

10

【0119】

(実施例26：アミノオキシリンカー(3 - オキサ - ペンタン - 1, 5 - ジオキシアミン)を用いた - ガラクトシダーゼの P E G 化)

- ガラクトシダーゼ(1 mg)を、1.5 mM の NaIO_4 を用いて、4 にて30分間酸化した。最終濃度が1.5 mM となるように NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。

20

【0120】

酸化した - ガラクトシダーゼとジアミノオキシ - P E G ポリマー(20 k D a)とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は1.25 mM であった。反応混合物中の - ガラクトシダーゼの最終濃度は1 mg / mL であった。反応混合物の最終 pH はおよそ5.75 であった。50 mM または3.17 mg / mL の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応を4 にて2時間実施した。非精製の結合体を、S D S P A G E を用いて特徴付け、S D S P A G E において結合体に関してバンドの移動が見られた。活性は59%であると測定された。

【0121】

(実施例27：アミノオキシリンカーを用いたエリスロポイエチンの P E G 化)

エリスロポイエチン(E P O ; 0.2 mg)を、5 または10 mM の NaIO_4 を用いて、50 mM の酢酸ナトリウム(p H 5.75)中で4 にて45分間酸化し、次いで、(酸化に用いられた NaIO_4 の濃度に一致させるように)5 mM または10 mM の最終濃度となるよう NaHSO_3 を添加することによって、酸化を停止させた。酸化した E P O とジアミノオキシ - P E G ポリマー(20 k D a)とを用いて、結合体化反応を実施した。反応混合物中のポリマーの最終濃度は1.5 mM であった。反応混合物の最終 pH はおよそ5.75 であった。50 mM または3.17 mg / mL の濃度となるように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加した。反応の最終タンパク質濃度は0.4 mg / mL であった。結合体化反応を4 にて一晩実施した。

30

40

【0122】

したがって、本発明は、血液凝固タンパク質以外の化合物と、水溶性ポリマー、特に、P S A および m P S A、との結合体を提供する。

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 47/42 (2017.01) A 6 1 K 47/42
 A 6 1 K 47/36 (2006.01) A 6 1 K 47/36
- (73)特許権者 516064851
 バクサルタ ゲーエムベーハー
 スイス国 8 1 5 2 グラットパーク (オプフィコン), サーガウアーシュトラッセ 1 3 0
- (74)代理人 100163647
 弁理士 進藤 卓也
- (72)発明者 ジェイン, サンジャイ
 イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイチ ロンドン, ロイヤル カレッジ ストリート 2,
 ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター
- (72)発明者 グレゴリアディス, グレゴリー
 イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイチ ロンドン, ロイヤル カレッジ ストリート 2,
 ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター
- (72)発明者 ドウィベディ, アーチャナ
 イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイチ ロンドン, ロイヤル カレッジ ストリート 2,
 ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター
- (72)発明者 ナース, スリジット
 イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイチ ロンドン, ロイヤル カレッジ ストリート 2,
 ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター
- (72)発明者 シークマン, ユルゲン
 オーストリア国 アー - 1 2 1 0 ウィーン, ゲラスドルファー シュトラッセ 1 5 3 / 2 0 9
- (72)発明者 ハイダー, ステファン
 オーストリア国 アー - 3 3 8 5 プリンツァースドルフ, モーツァルトシュトラッセ 2
- (72)発明者 ロッテンシュタイナー, ハンスペーター
 オーストリア国 アー - 1 0 2 0 ウィーン, ハイドガッセ 1 0 / 1 7
- (72)発明者 タレセク, ペーター
 オーストリア国 アー - 3 4 0 0 クロスターノイブルク, ハウプトストラッセ 5 9ゲー, ヴェ
 イドリンク

審査官 三木 寛

- (56)参考文献 特表2008-531764(JP,A)
 特表2008-510025(JP,A)
 特表2008-510024(JP,A)
 特表2007-501889(JP,A)
 特表2007-501888(JP,A)
 特開2005-232172(JP,A)
 特表2003-533537(JP,A)
 国際公開第2008/012542(WO,A1)
 国際公開第2008/012540(WO,A1)
 国際公開第2008/012528(WO,A1)
 国際公開第2008/012525(WO,A1)
 国際公開第2008/089403(WO,A1)
 国際公開第2008/025856(WO,A1)
 特表2007-527891(JP,A)
 特表2006-516534(JP,A)

特表2006-511635(JP,A)
特表2006-505635(JP,A)
米国特許出願公開第2002/0137125(US,A1)
特開平07-196925(JP,A)
特表平06-506217(JP,A)
国際公開第94/028024(WO,A1)
特表平03-503759(JP,A)
国際公開第2007/126808(WO,A1)
特表2007-520589(JP,A)
特表2007-501870(JP,A)
Vaccine, 2006年, Vol.24, p.716-729
Advanced Drug Delivery Reviews, 2002年, Vol.54, P.459-476

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B 37/00

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)