

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4612919号
(P4612919)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 47/48	(2006.01)	A 61 K 47/48
A 61 K 31/337	(2006.01)	A 61 K 31/337
A 61 K 31/437	(2006.01)	A 61 K 31/437
A 61 K 31/519	(2006.01)	A 61 K 31/519
A 61 K 31/573	(2006.01)	A 61 K 31/573

請求項の数 11 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-540638
(86) (22) 出願日	平成10年3月13日(1998.3.13)
(65) 公表番号	特表2001-519784(P2001-519784A)
(43) 公表日	平成13年10月23日(2001.10.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US1998/004966
(87) 國際公開番号	W01998/041562
(87) 國際公開日	平成10年9月24日(1998.9.24)
審査請求日	平成17年3月7日(2005.3.7)
(31) 優先権主張番号	08/821,055
(32) 優先日	平成9年3月20日(1997.3.20)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	508299614 エンゾン、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 08854 ニュージャ ージー州 ピスカタウェイ、キングスブリ ッジ ロード 20
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一

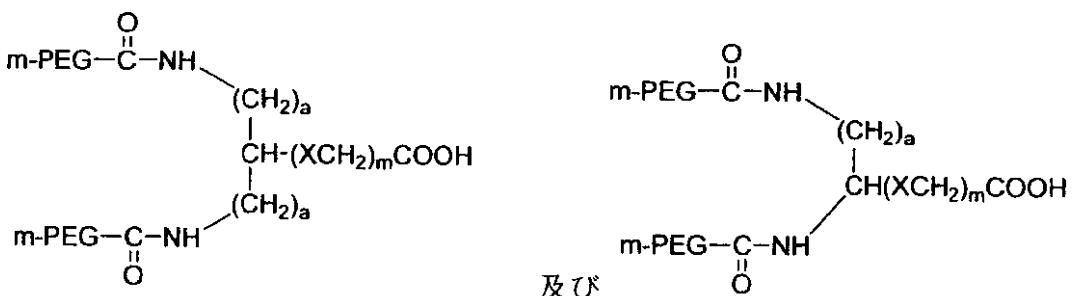
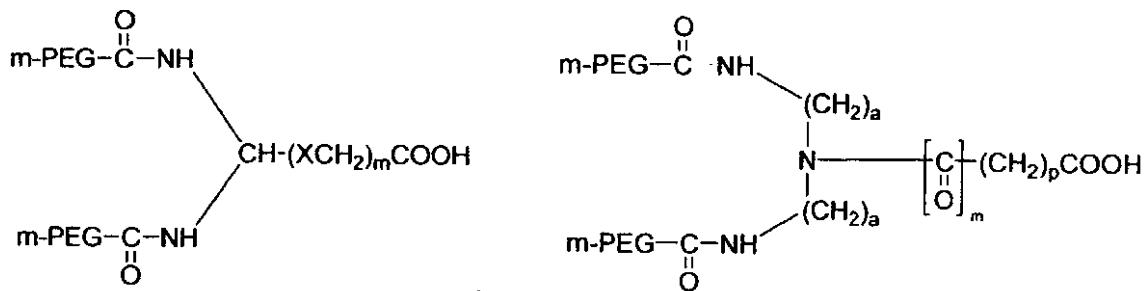
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】非抗原性分枝ポリマーコンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

【化 1】



[式中、

20

m-PEGは200～80,000の分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)であり、

(a) は1から5の整数であり、

(m) は1であり、

XはO、NQ、S、SO及びSO₂からなる群から選択され、QはH、C_{1～8}アルキル、C_{1～8}分枝アルキル、C_{1～8}置換アルキル、アリールまたはアラルキルであり、

(p) は正の整数である】

からなる群から選択される構造を有する非抗原性の分枝ポリマー。

【請求項2】

タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素、及び化学療法用分子からなる群から選択される生物活性求核物質を、請求項1に記載の活性化された非抗原性分枝ポリマーと接触させることを含む、生物活性コンジュゲートの形成方法。

10

【請求項3】

請求項1に記載の非抗原性の分枝ポリマーを求核物質と反応させることにより製造されたポリマーコンジュゲート。

【請求項4】

求核物質がタンパク質、ペプチド及びポリペプチドからなる群から選択される請求項3に記載のコンジュゲート。

【請求項5】

求核物質が、抗新生物薬、抗感染薬、抗不安薬、抗胃腸薬、中枢神経系活性化剤、鎮痛剤、排卵誘発剤、避妊薬、抗炎症薬、ステロイド剤、抗尿毒症薬、心血管薬、血管拡張剤、及び血管収縮剤からなる群のメンバーである請求項3に記載のコンジュゲート。

20

【請求項6】

抗新生物薬が、タキソール、タキサン、タキソテール、タキソイド分子、カンプトテカン、アントラサイクリン、及びメトトレキセートからなる群から選択される請求項5に記載のコンジュゲート。

【請求項7】

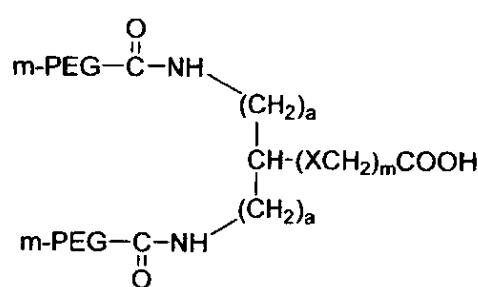
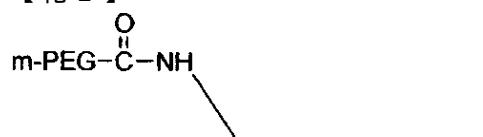
請求項1に記載の非抗原性分枝ポリマーの製造方法であって、

i) 非抗原性の分枝ポリマーを、塩基の存在下でアルキルハロアセテートと接触させて非抗原性の分枝ポリマーのアルキルエステルを形成し、

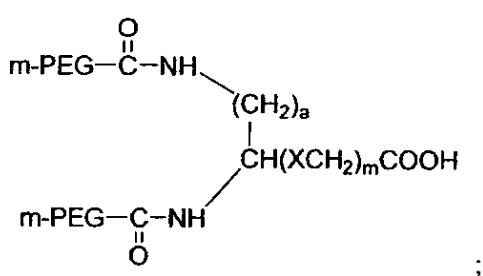
ii) そのアルキルエステルを酸と反応させて、

30

【化2】



及び



[式中、

m-PEGは200～80,000の分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)であり、

(a) は1から5の整数であり、

(m) は1であり、

40

50

XはO、NQ、S、SO及びSO₂からなる群から選択され、QはH、C₁₋₈アルキル、C₁₋₈分枝アルキル、C₁₋₈置換アルキル、アリールまたはアラルキルであり、

(p)は正の整数である】

からなる群から選択される構造を有する、反応性カルボン酸を含む非抗原性の分枝ポリマーを形成する、

ことを含んでなる方法。

【請求項8】

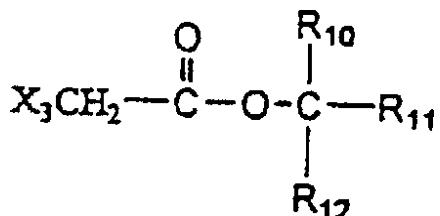
アルキルハロアセテートが3級アルキルハロアセテートである請求項7に記載の方法。

【請求項9】

3級アルキルハロアセテートが、式

10

【化3】



(式中、

X₃は塩素、臭素、またはヨウ素であり、

R₁₀₋₁₂は、C₁₋₈アルキル、C₁₋₈置換アルキルまたはC₁₋₈分枝アルキル及びアリールからなる群から独立に選択される)を有する、請求項8に記載の方法。

20

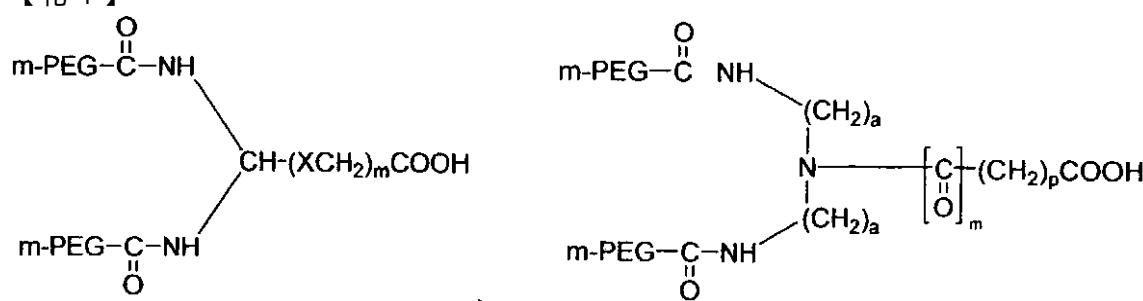
【請求項10】

3級アルキルハロアセテートがt-ブチルハロアセテートである請求項8に記載の方法。

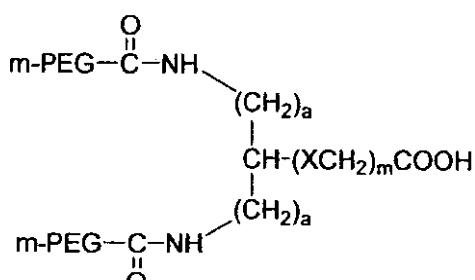
【請求項11】

請求項1に記載の非抗原性分枝ポリマーのスクシンイミジルカーボネート活性エステルの製造方法であって、

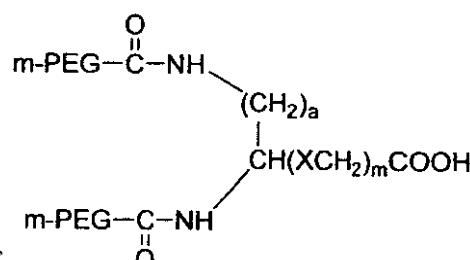
【化4】



30



及び



40

[式中、

m-PEGは200~80,000の分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)であり、

(a)は1から5の整数であり、

(m)は1であり、

XはO、NQ、S、SO及びSO₂からなる群から選択され、QはH、C₁₋₈アルキル、C₁₋₈分枝アルキル、C₁₋₈置換アルキル、アリールまたはアラルキルであり、

(p)は正の整数である】

50

からなる群から選択される構造を有する非抗原性の分枝ポリマーを、N-ヒドロキシスクシンイミド及び縮合剤と接触させる、
ことを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、生物活性物質のin vivo循環寿命を延長するのに有用な分枝ポリマーに関する。また本発明は該ポリマーから形成されたコンジュゲートに関する。

ペプチドあるいはポリペプチドを、ポリ(エチレングリコール)PEG、及び同様な水溶性ポリ(アルキレンオキシド)に結合する最初の概念は米国特許第4,179,337号に開示されている。この開示は引用により本明細書の一部とする。これらのポリマーにより修飾されたポリペプチドは低下した免疫原性/抗原性を有し、非修飾のものよりも長く血流中を循環する。
10

ポリ(アルキレンオキシド)をコンジュゲート化するためには、ヒドロキシル末端基の1つが反応性官能基に変換される。このプロセスは「活性化」と称されることが多く、生成物は「活性化ポリ(アルキレンオキシド)」と称される。その他の実質的に非抗原性のポリマーも同様に「活性化」され、官能化される。

このような活性化ポリマーは、結合部位として作用する求核性官能基を有する治療剤と反応させられる。結合部位として通常使用される求核性官能基の1つはリシンの-アミノ基である。遊離のカルボン酸基、適当に活性化されたカルボニル基、酸化された炭水化物部分及びメルカプト基も結合部位として使用される。
20

最初にコンジュゲート化された治療剤としてインシュリン及びヘモグロビンが挙げられる。これらはいくつかの遊離-アミノ結合部位を含む比較的大きなポリペプチドである。十分な数のポリマーを結合させて、生物活性を有意に喪失させることなく免疫原性を低下させ、循環寿命を延長することが可能であった。

しかし、過剰なポリマーのコンジュゲーション及び/または生物活性と関連する基が存在する治療部分の活性部位におけるコンジュゲーションは活性を喪失させ、従って治療上の有用性を喪失することが多いことが判っている。これはしばしば生物活性に関与しない結合部位をわずかしか有していない低分子量のペプチドにあてはまる。多くの非ペプチド治療剤もポリマー修飾の利益を得るのに十分な数の結合部位を有していない。
30

上記の問題を克服するための提案の1つは、より長鎖のより高い分子量のポリマーを使用することである。しかしそのような物質は製造するのが困難であり、使用するのにコストがかかる。さらにそのようなものは容易に利用できるポリマーと比較してわずかな改善しか示さない。

別の代替的提案は、タンパク質のアミノ基にトリアジン環を介してポリマーの2つの鎖を結合することである。例えば、Enzyme, 26, 49-53 (1981) 及び Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 188, 364-9 (1988) を参照。しかしトリアジンは有毒な物質であり、コンジュゲーションの後に許容できるレベルに毒性を低下させることは困難である。さらにトリアジンは平面的な基であり、2つのポリマーにより置換されることしかできない。この平面構造は2つのポリマー鎖を平面内に強固に固定する。これにより、ポリマー鎖長を長くすることにより得られるものと同じようにポリマーコンジュゲーションの利益が限定されてしまう。従って、トリアジンを用いない活性化ポリマーであればこの分野に有意な利益をもたらす可能性がある。
40

しかし上記の場合、ポリマーと親生物活性部分との間に実質的に加水分解抵抗性の結合(リンクエージ)を有する生物活性ポリマーコンジュゲートが形成されている。従って、親分子が最終的にin vivoで放出されるプロドラッグそのものというよりは永久的な性質を有する持続性コンジュゲートが製造されていた。

また、プロドラッグを製造する方法も長年提案されてきている。プロドラッグは生物的に活性な親化合物の化学的誘導体を含み、これは投与されると最終的にin vivoで活性な親化合物を放出する。プロドラッグを使用することにより、当業者は、生物活性化合物のin
50

vivoにおける作用の開始及び／または持続期間を改変することができる。プロドラッグは親化合物すなわち活性化合物の生物学的に不活性な形態、すなわち実質的に不活性な形態であるものが多い。活性薬物の放出速度は、生物活性親化合物をプロドラッグキャリアに結合するリンカーの加水分解速度等のいくつかの要因により影響される。

エステルあるいはリン酸結合に基づくプロドラッグが報告されている。殆どの場合、プロドラッグを形成するために用いた特定のタイプのエステル結合は、水性環境中で最大数日間の加水分解のための $T_{1/2}$ を与える。プロドラッグが形成されたと思うだろうが、コンジュゲートの殆どはin vivoで十分な加水分解が得られる前に排泄されてしまう。従って、in vivoにおけるポリマー-薬物結合のより速い加水分解を可能とし、より迅速に親薬物化合物の生成を可能とする結合を有するプロドラッグを提供することが好ましい。

驚くべきことに、それぞれ分子量が10,000未満の1個または2個のポリマーのみを、有機部分のような生物活性化合物にコンジュゲート化すると、得られるコンジュゲートはin vivoで迅速に排泄されることが多いことが見出されている。実際に、そのようなコンジュゲートは非常に速やかに体内からクリアランスされるので、たとえ実質的に加水分解されやすいエステル結合を使用しても、親分子が十分には再生成されない。

水溶性ポリマー上に親薬物化合物を有するコンジュゲートに基づくこれまでのプロドラッグは、あまりに遅い結合の加水分解等の種々の理由により成功していなかったが、この分野における研究は続けられている。ポリマーをベースとするプロドラッグの改善、特にプロドラッグのポリマー部分の荷重量を有意に増加させる方法についての改良が依然として求められている。本発明はこれらの欠点を解決するものである。

10

20

発明の概要

本発明の1つの形態によれば、式



に対応する実質的に非抗原性の分枝ポリマーが提供される。

式中、(R)は水溶性の非抗原性ポリマーを含み、

(n)=2または3であり、

(L)は各(R)に共有結合した脂肪族リンク部分であり、

(A)は求核置換を受けることが可能な活性化性官能基である。

例えば、(A)は生物活性求核物質あるいは同様に拳動し得る部分に結合し得る基であり得る。本発明の特に好ましい形態によれば、(R)はポリ(アルキレンオキシド)PAO、例えばポリ(エチレングリコール)(以下PEG)を包含する。

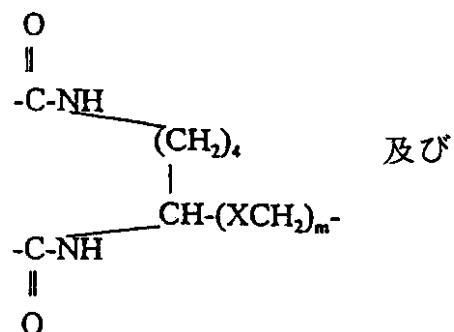
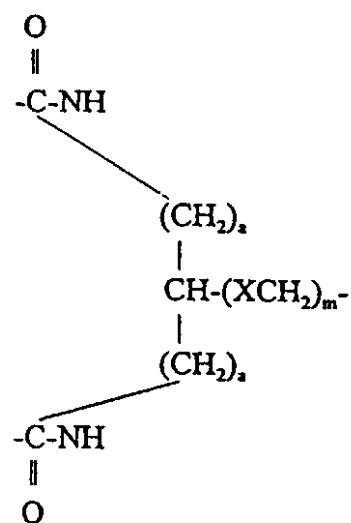
30

本発明の好ましい実施形態の1つは、エステル結合に基づいたプロドラッグの形成に有用な末端カルボン酸基を含む分枝ポリマーを提供する。この分枝ポリマーは、式

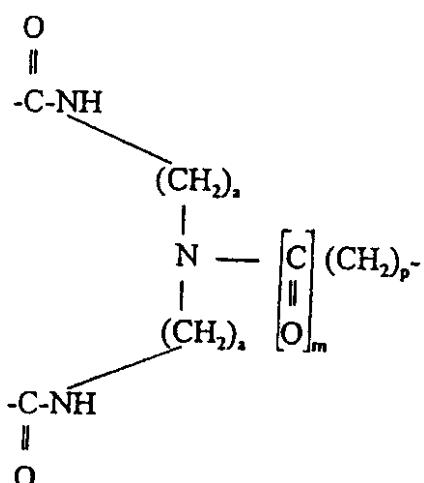


を有する。式中、(R)、(n)及び(L)は上記に定義した通りである。

本発明の好ましい別の実施形態は、上記と同じ式、すなわち(R)_nL-Aを有するが、ただし(L)が下記



10



20

からなる群から選択される分枝ポリマーを包含する。式中、

(a) は約1から約5の整数であり、

30

Xは0、NQ、S、SOまたはSO₂であり、QはH、C₁₋₈アルキル、C₁₋₈分枝アルキル、C₁₋₈置換アルキル、アリールまたはアラルキルであり、

(m) は0または1であり、

(p) は正の整数、好ましくは約1～約6であり、

(R) 及び (n) は上記に定義した通りであり、

(A) は上記に定義した通りであり、式(Ia)に示したCOOHを包含する。

これらの本発明の傘型分枝ポリマー(U-PAOまたはU-PEG)は生物活性求核物質と反応してコンジュゲートを形成する。ポリマーの結合点は官能基(A)に依存する。例えば、(A)はスクシンイミジルスクシネートあるいはカーボネートとすることことができ、アミノリシンと反応する。あるいは(A)はカルボン酸とことができ、これは生物活性求核物質上のヒドロキシル基と反応してエステル結合プロドラッグを形成することができる。また上記分枝ポリマーは、生物活性物質上の1級あるいは2級アミノ基、メルカプト基、カルボン酸基、反応性カルボニル基等のいずれとも結合するように活性化され得る。その他の基は当業者に明らかであろう。

40

本発明の別の形態は、生物活性物質及び1以上の上記した分枝ポリマーを含むコンジュゲート、並びにその製造方法を包含する。生物活性物質は、合成あるいは天然界から単離されたタンパク質、ペプチド、酵素、医薬化学物質、有機部分を包含する。前記方法は、置換反応を起こすことができる求核基を含む生物活性物質を、少なくとも生物活性の一部を維持したまま結合を生じるのに十分な条件下で上記の分枝ポリマーと接触させることを含む。

50

本発明は、種々の疾患及び症状を治療する方法も包含する。この形態においては、例えばタンパク質、酵素あるいは有機部分のような生物活性物質と本発明の分枝ポリマーを含むコンジュゲートの有効量を、治療を要する哺乳動物に投与する。

本発明の主要な利点の1つは、前記ポリマーが分枝していることにより、それらとコンジュゲート化される物質に対して傘状の三次元保護外被が与えられることである。これは慣用のポリマーコンジュゲートの線状の構造とは異なるものである。さらに、共通の基底部分からポリマー鎖が分枝していることにより *in vivo*で動的な非平面的挙動が可能となる。従って、前記分枝ポリマーによれば、同等な分子量を有する直鎖ポリマーと比較して有意な利益が得られるものである。

前記分枝ポリマーの第2の利点は、生物作用物質に複数のポリマー鎖が結合することと関連した利点を与える一方で、実質的に数少ないコンジュゲーション部位しか必要としないことである。分枝ポリマーのこの利点は利用できる結合部位が少ない治療剤にとって特に劇的なものとなる。ポリマーコンジュゲーションの所望される特性がいずれも得られ、生物活性の低下は最小限のものとなる。

発明の詳細な説明

1. ポリマー置換基及び定義された式(Ⅰ)

本発明の活性化された分枝ポリマーは、好ましくは室温で水溶性のポリ(アルキレンオキシド)(PAO)から製造される。この群には -置換ポリアルキレンオキシド誘導体、例えばメトキシポリ(エチレングリコール)(mPEG)、あるいはその他の適当なアルキル置換PAO誘導体、例えばモノあるいはビス末端C₁-C₄基を含むもの等が包含される。直鎖非抗原性ポリマー、例えばモノメチルPEGホモポリマー、例えばmPEG-CH₂-O-CO-、mPEG-O-CO-、及びmPEG-O-CH₂-CH₂-等が好ましい。その他のポリアルキレンオキシド、例えばポリ(エチレングリコール)ホモポリマー、その他のアルキルポリ(エチレンオキシド)ブロックコポリマー、及びポリ(アルキレンオキシド)のブロックコポリマーのコポリマーも有用である。

本発明のポリマーは式(Ⅰ)



で表され、式中、

(R)は水溶性の実質的に非抗原性のポリマーを含み、

(n)=2または3であり、

(L)は各(R)に共有結合した脂肪族リンク部分であり、

(A)は求核置換を受けることが可能な活性化性官能基を示す。

各(R)は水溶性の実質的に非抗原性のポリマー鎖とすることができます。ポリマー鎖がPEGまたはmPEGである場合は、各鎖は約200～約80,000ダルトン、好ましくは約2,000～約42,000ダルトンの間の分子量を有する。約5,000～約20,000ダルトンの分子量が最も好ましい。

その他のポリマー物質としては、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、あるいはその他の同様な非抗原性ポリマーが挙げられる。そのようなポリマーも本発明に包含されるように官能化あるいは活性化することができる。上記したものは単なる例示であり、本発明において使用するのに適当な非抗原性ポリマーの種類を限定することを意図するものではない。

本発明の別の実施形態においては、(R)は生物活性物質から2次的あるいは3次的な分枝をするための分枝ポリマーである。2官能性あるいはヘテロ2官能性活性ポリマーエステルも使用することができる。また本発明のポリマーは、2官能性物質、例えばポリ(アルキレングリコール)ジアミンと共に重合させて、透過性コンタクトレンズ、創傷用包帯、ドラッグデリバリー器具等に適する相互侵入ポリマーネットワークを形成することもできる。そのような分枝の立体構造的制限及び水溶性は当業者により容易に理解されうるものだが、好ましくは、多重分枝ポリマーの分子量は80,000ダルトンを越えてはならない。

式Iに示すように、本明細書中で(R)と記した2～3個のポリマー鎖は脂肪族リンク部分(L)に結合している。適する脂肪族物質としては、置換アルキルジアミン及びトリアミン

10

20

30

40

50

、リシンエステル、及びマロン酸エステル誘導体等が挙げられる。リンク部分は好ましくは非平面状で、ポリマー鎖が強固に固定されないものである。リンク部分(L)は、複数のポリマー鎖、すなわち「分枝」を(A)に結合する手段でもあり、この部分を介してポリマーが生物作用物質に結合する。

(L)は好ましくは多官能化された、18個まで、より好ましくは1~10個の炭素原子を含むアルキル基を含む。該アルキル鎖は、窒素、酸素あるいはイオウのようなヘテロ原子を含んでいてもよい。該アルキル鎖は炭素原子、あるいは窒素原子において分枝していてよい。本発明の別の形態においては、(L)は単一の窒素原子である。

(L)及び各(R)は好ましくは、(R)及び(L)上の求核官能基間の反応により結合される。各(R)は求核置換を起こし、(L)と結合するように適当に官能化される。ポリマーのそのような官能化は当業者に容易に理解されるものである。10

(R)及び(L)の間の結合としては広範な種類のものを使用し得る。ウレタン(カルバメート)結合が好ましい。この結合は、例えば、1,3-ジアミノ-2-プロパノールのアミノ基を米国特許第5,122,614号に記載されたようなメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルカーボネートと反応させることにより形成することができる。前記特許の開示は引用により本明細書の一部とする。アミド結合は、アミノ末端を有する非抗原性ポリマー、例えばメトキシポリエチレングリコール-アミン(mPEGアミン)をアシルクロリド官能基と反応させることにより形成される。

(R)及び(L)の間の結合のその他の例としては、エーテル、アミン、尿素、及びチオ及びそのチオール類似体、並びに上記のウレタン及びアミド結合のチオ及びチオール類似体が挙げられる。これらの結合は当業者に十分に理解された方法により形成される。その他の適当な結合及びその形成方法は上記に引用した米国特許第4,179,337号を参照することにより決定できる。20

式Iの部分(A)は、生物活性物質とのコンジュゲーションのために本発明の分枝ポリマーを「活性化する」基を表す。

(A)は下記から選択される部分とすることができます。

I. アミノ基と反応することができる官能基、例えば

a) p-ニトロフェニルあるいはスクシンイミジル等のカーボネート、30

b) カルボニルイミダゾール、

c) アズラクトン、

d) 環状イミドチオン、あるいは

e) イソシアネートあるいはイソチオシアネート。

II. カルボン酸基及び反応性カルボニル基と反応することができる官能基、例えば

a) 1級アミン、あるいは

b) ヒドラジン及びヒドラジド官能基、例えばアシルヒドラジド、カルバゼート、セミカルバメート、チオカルバゼート等。

III. メルカプトあるいはスルフヒドリル基と反応することができる官能基、例えばフェニルグリオキサール。例えば米国特許第5,093,531号を参照。この開示は引用により本明細書の一部とする。

IV. ヒドロキシリル基と反応することができる官能基、例えば(カルボン)酸類、例えば式(Ia)のものあるいは求電子中心と反応することができるその他の求核基。非限定的なリストとしては、例えば、ヒドロキシリル、アミノ、カルボキシリル、チオール基、活性メチレン等が挙げられる。40

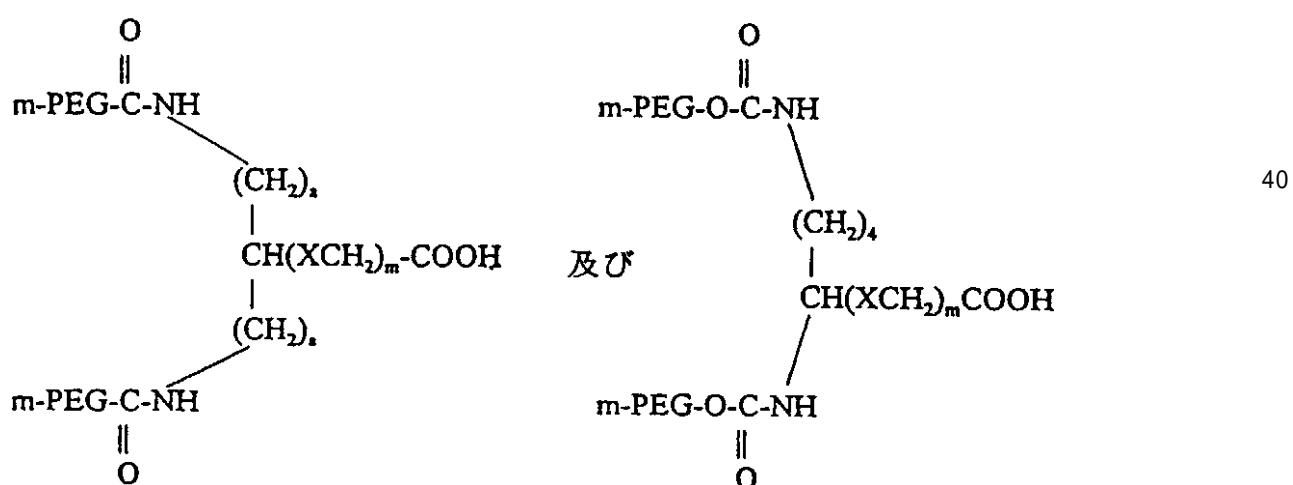
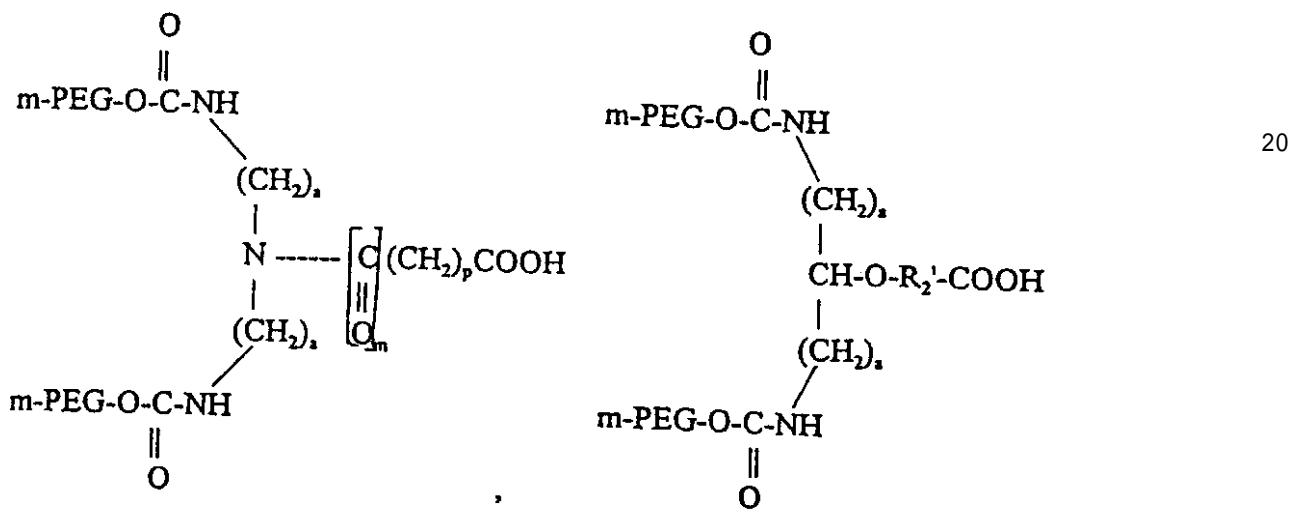
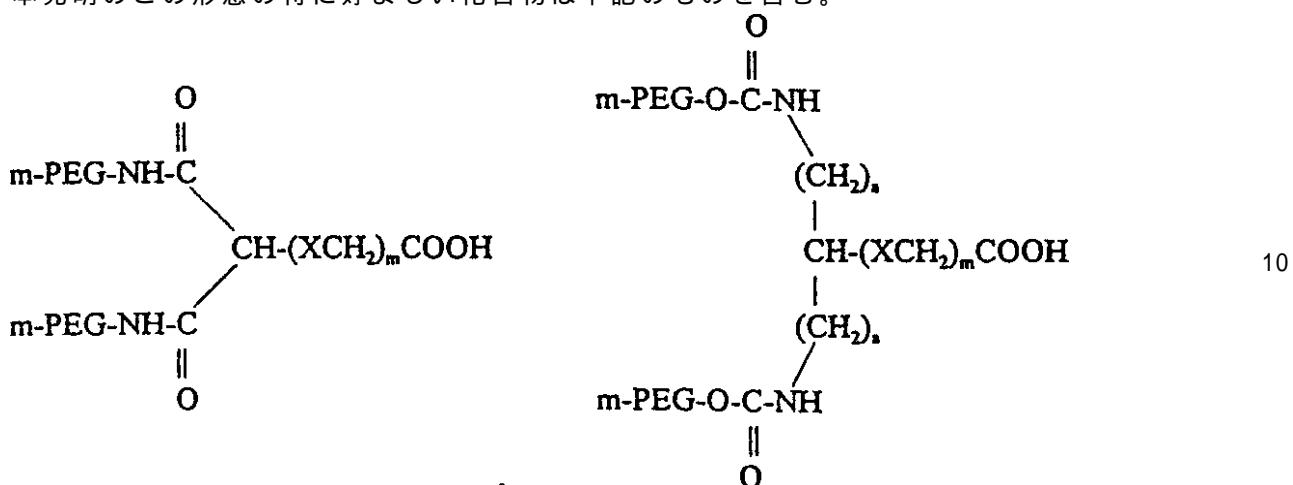
部分(A)は、脂肪族リンク部分(L)の近位に位置するスペーサー部分を含むことができる。このスペーサー部分は、18個までの炭素原子を有するヘテロアルキル、アルコキシ、アルキル、さらには別のポリマー鎖とすることができます。スペーサー部分は標準的な合成法を用いて付加することができる。(A)について選択される部分は、生物活性求核物質に加えてその他の部分とも反応できるものと理解されなければならない。

本発明のある好ましい実施形態によれば、エステルに基づいたプロドラッグを形成するのに有用な末端カルボン酸基を有する分枝ポリマーが提供される。該分枝ポリマーは下記式50



を有する。式中、(R)、(n)及び(L)は上記に定義した通りである。

本発明のこの形態の特に好ましい化合物は下記のものを含む。



及び

式中、

(a) は約1から約5の整数であり、

(m) は0または1であり、

XはO、NQ、S、SOまたはSO₂であり、QはH、C₁₋₈アルキル、C₁₋₈分枝アルキル、C₁₋₈置換アルキル、アリールまたはアラルキルであり、

(p) は0または約1から約6の整数であり、

R₂は末端カルボン酸基の付加を生じる置換反応を受けた後の、下記に説明する対応するスペーサー部分R₂表す。

もちろん例示のために上記に示したm-PEGは任意のポリアルキレンオキシドあるいは本明細書に記載したその他の任意の非抗原性ポリマーにより置換できることは当業者が容易に理解できるものである。

本発明の別の好ましい実施形態は、上記に記載したものと同じ式、すなわち(I)及び(Ia)：(R)_nL-Aの分枝ポリマーであって、ただし(L)が下記の群から選択されるものを包含する。 10

O

||

-C-NH

(CH₂)₄

|

CH-(XCH₂)_m-

|

(CH₂)₄

-C-NH

||

O

O

||

-C-NH

(CH₂)₄

|

CH-(XCH₂)_m-

|

O

及び

10

20

O

||

-C-NH

(CH₂)₄

|

N ---- [C] (CH₂)_p-

|

(CH₂)₄

-C-NH

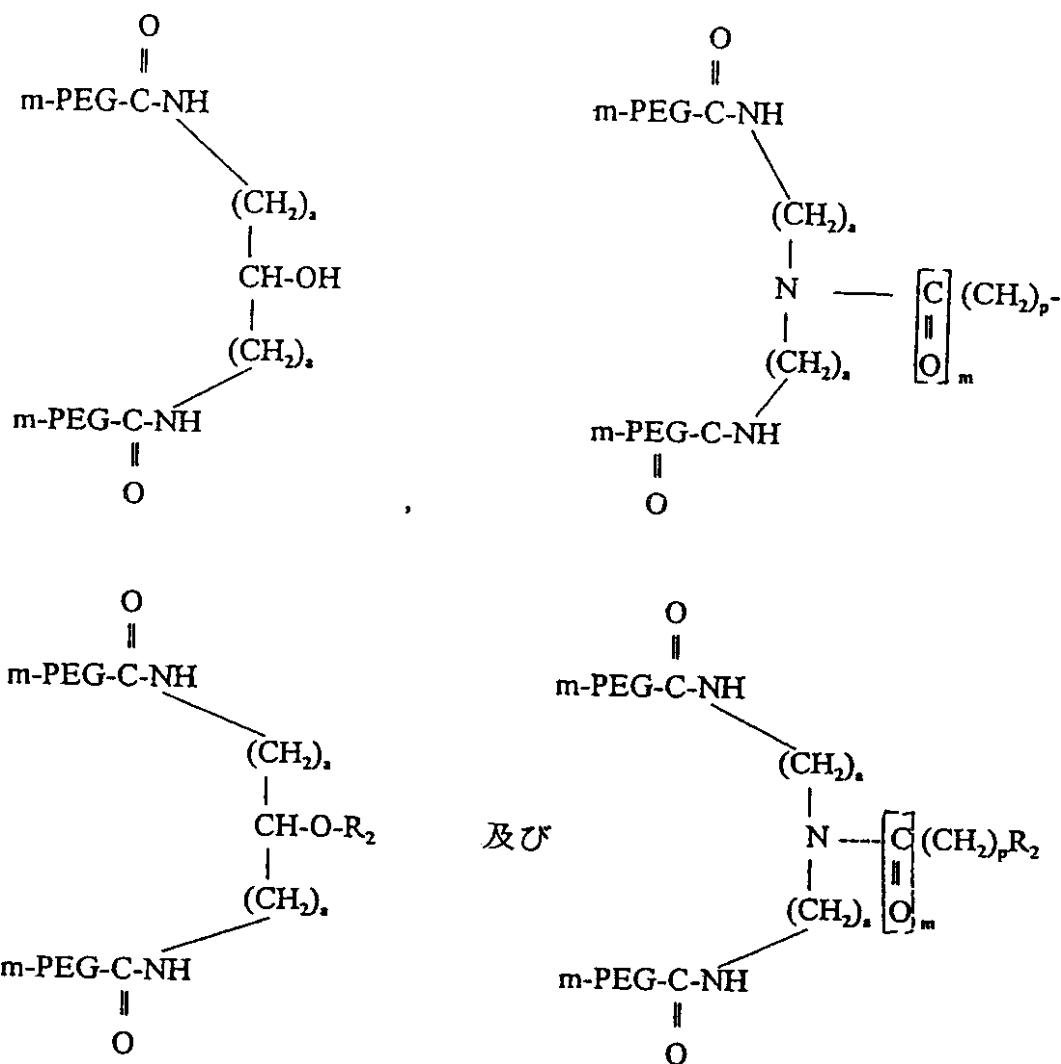
||

O

30

上記中(a)、(m)、(p)及びXは上記したものである。

本発明のこの形態に包含される特に好ましい化合物としては下記のものが挙げられる。



上記中、

(a) は約1から約5の整数であり、

(m) は0または1であり、

(p) は正の整数、好ましくは約1から約6であり、

R_2 はポリマー、 $-CO-NH-(CH_2)_dX_2$ 、 $-CO-NH-(CH_2-CH_2-O-)_dX_2$ 、

$-CO-NH-\text{C}_6\text{H}_4-X_2$ 及び $-CO-NH-\text{C}_6\text{H}_4-(O-CH_2-CH_2-)_dX_2$

から選択されるスペーサー部分であり、

dは約1から約18の整数であり、

(X_2) はH、OH、NH₂またはCOOHである。

2. 分枝ポリマーの合成

分枝ポリマー（一般にはU-PAOまたはU-PEG）は通常の反応法を使用して形成される。各ポリマー鎖(R)を結合するため、リンク化合物(L)は(n)に対応する数（すなわち2または3）の求核性官能基を有する。1つの形態においては、上記のようにして製造した分枝ポリマーサブユニット(R)_nLをp-ニトロフェニルクロロホルメートと、その後N-ヒドロキシスクシンイミドと接触させてスクシンイミジルカーボネートを形成することにより、分枝ポリマーのスクシンイミジルカーボネート活性エステルを製造する。あるいは、ヒドロキシ部分をビス-スクシンイミジルカーボネートと直接反応させることもできる。ポリマーサブユニット(R)_nLは、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、及びチオール基等、並びにアミノあるいはメチレン水素を含み、(A)に結合し得る。

分枝ポリマーは、求核性官能基により置換された脂肪族結合化合物、例えばジあるいはトリアミノ、メルカプトアルコールあるいはアルキルトリオールを、活性化あるいは官能化

30

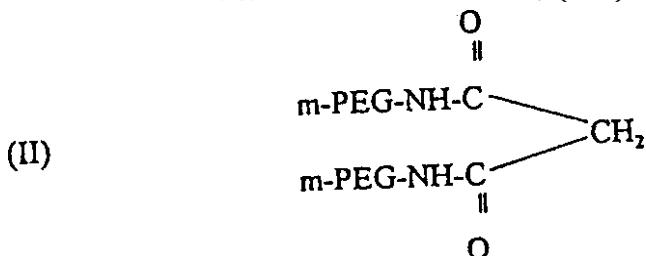
40

50

ポリマー鎖、例えばSC-PEG、PEG-NCO、PEG-NCS、SS-PEG、PEG-酸及び酸誘導体等と反応させることによっても形成することができる。官能化ポリマー鎖及び適当な脂肪族リンク基は市販品として入手でき、あるいは容易に合成することができるので、このような方法が好ましい。

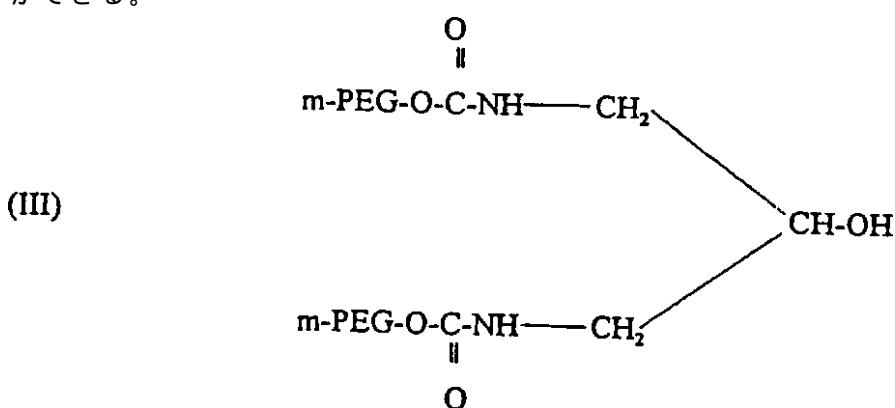
合成のその他の形態としては、例えばPEG-アルコール、PEG-アミンあるいはPEG-メルカプタン等の求核部分により官能化したポリマーを、二官能性分子、例えばマロン酸誘導体あるいはグリオキサール酸誘導体と反応させることができることが挙げられる。

例えば、2モルのメトキシポリ(エチレングリコール)アミンを置換または非置換のマロニルクロリドと反応させることにより式(II)の化合物を形成することができる。

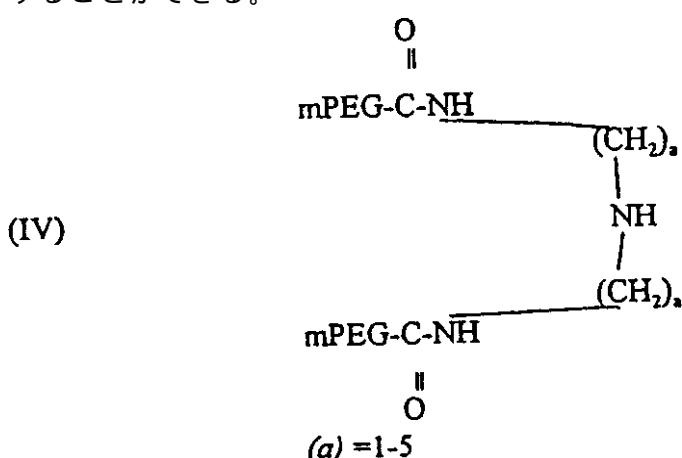


強塩基との反応によりメチレンリンカーがアニオンに変換され、これはさらに官能化され得る。例えば、前記アニオンはジエチルオキサレートと反応させることにより対応するケトエステルを生成することができる。

同様に、2モルのメトキシポリ(エチレングリコール)スクシンイミジルカーボネートを1,3-ジアミノ-2-プロパノールと反応させることにより式(III)の化合物を形成することができる。



同様に、米国特許第5,349,001号(この内容は引用により本明細書の一部とする)に従つて製造できるmPEG-N-アシル-チアゾリジン(以下mPEG-FLAN)の2モルを、トリアミン、例えばジエチレントリアミンと反応させることにより式(IV)の構造を有する化合物を形成することができる。



分枝ポリマー(III)及び(IV)はさらに活性化することができる。(III)の活性化の1

つの方法は、最初にヒドロキシル基を活性化することができる化合物、例えばp-ニトロフェニルクロロホルメートにより官能化して反応性p-ニトロフェニルカーボネートを形成することを含む。得られるp-ニトロフェニルカーボネートポリマーは、生物活性求核物質と直接反応させることができる。

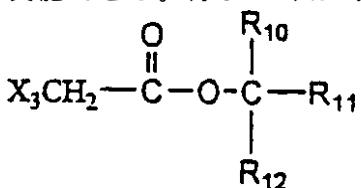
p-ニトロフェニルカーボネートポリマーは中間体としても使用できる。これを大過剰のN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させることによりスクシンイミジルカーボネート活性化分枝ポリマーを形成することができる。スクシンイミジルカーボネートへの別の経路も利用でき、本発明において使用することが考えられる。あるいはp-ニトロフェニルカーボネートポリマー中間体を無水ヒドラジンと反応させることによりカルバゼート分枝ポリマーを形成することができる。

分枝ポリマー(III)も、塩基の存在下でアルキルハロアセテートと反応させて活性化し、対応するポリマーカルボン酸の中間体アルキルエステルを形成し、その後中間体アルキルエステルをトリフルオロ酢酸のような酸と反応させることにより末端カルボン酸を含む対応するポリマー化合物を形成することができる。好ましくは、3級アルキルハロアセテートを使用する。特に、前記カルボン酸誘導体は、

i) 構造 $(R)_n L-A-(R)$ 、(n)、(L)及び(A)は上記した通りである)の分枝ポリマーを、塩基の存在下でアルキルハロアセテートと接触させることにより分枝非抗原性ポリマーのアルキルエステルを形成し、

ii) 前記アルキルエステルを酸と反応させて反応性カルボン酸を含む分枝ポリマーを形成することにより形成される。

上記反応の実施において、アルキルハロアセテートの、分枝ポリマー、すなわちポリアルキレンオキシドに対するモル比は1:1より大きいものとする。反応段階ii)は約0 ~ 約50の温度、好ましくは約20 ~ 約30 の温度で行う。任意に反応段階ii)は水の存在下で実施できる。好ましくは式



[式中、 X_3 は塩素、臭素、またはヨウ素であり、 R_{10-12} は、 C_{1-8} アルキル、 C_{1-8} 置換アルキルまたは C_{1-8} 分枝アルキル及びアリールからなる群から独立に選択される。]の3級アルキルハロアセテートを使用する。

好ましい3級アルキルハロアセテートとしては、t-ブチルプロモアセテートあるいはt-ブチルクロロアセテートのような3級ブチルハロアセテートが挙げられる。適当な塩基としては、カリウムt-ブトキシドあるいはブチルリチウム、ナトリウムアミド、及び水素化ナトリウムが挙げられる。適当な酸としては、トリフルオロ酢酸あるいは硫酸、リン酸及び塩酸が挙げられる。

分枝ポリマー(IV)は、ヒドロキシ酸、例えば乳酸あるいはグリコール酸と反応させて活性化し、ヒドロキシアミドを形成することができる。その後このヒドロキシアミドを(II)について上記したのと同様に官能化する。

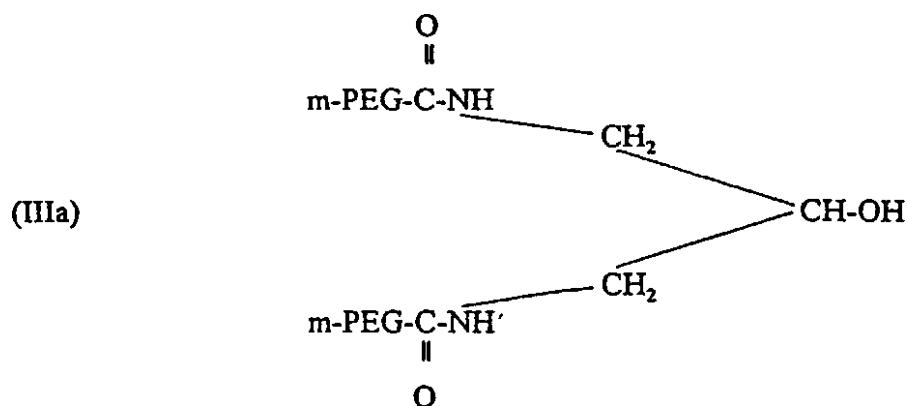
別の態様においては、2モルのメトキシ-ポリ(エチレングリコール)酸またはmPEG-FLANを1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンと反応させて式(IIIa)：

10

20

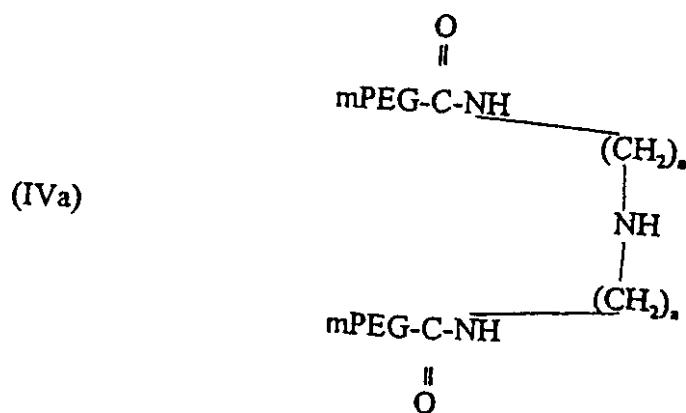
30

40



の化合物を形成することができる。

同様に、2モルのmPEG酸、あるいは好ましくはmPEG-FLANを、ジエチレントリアミンのようなトリアミンと反応させて式 (IVa) :



[この場合、(a)は2である。]

の構造を有する化合物を形成することができる。

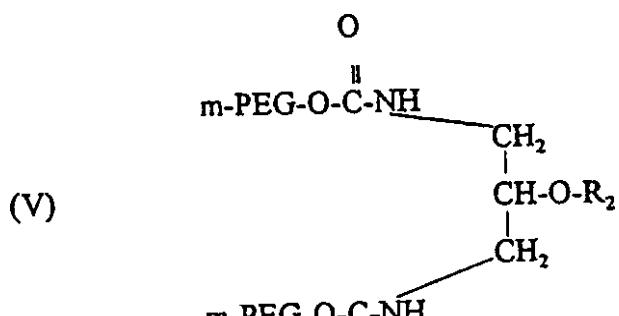
分枝ポリマー (IIIa) 及び (IVa) はその後、化合物 (III) 及び (IV) に関して上記したものと同様の方法で活性化することができる。

mが0の場合（すなわちカルボニル基が存在しない場合）、分枝ポリマーの合成はトリアミン（すなわちジエチレントリアミン）により行うことができ、これを2当量のアシル化剤、例えばスクシンイミジルカーボネート活性化PEG (SC-PEG) と反応させ、末端アミノ基をPEGにより官能化する。2級アミンを含むこの中間体をエチルプロモアセテートあるいはt-ブチルブモアセテートによりアルキル化して分枝ポリマーを得る。

mが1である場合（すなわちカルボニル基が存在する場合）も、分枝ポリマーの合成は同様に行うことができる。末端アミンを活性化PEG、例えばSC-PEGにより官能化する。その後、残存する2級アミンを別のアシル化剤、例えば無水コハク酸とより強力な条件下で反応させてより反応性の低い3級アミンをアシル化する。

容易に理解されるように、官能化ポリマー鎖と脂肪族リンク化合物との間の反応の数多くの変形及び組合せを本発明の化合物を形成するのに利用できる。上記の反応は本発明の例示のために開示したものである。

式 (II)、(III)、(IIIa)、(IV)、(IVa) 等に対応する分枝ポリマーは、ここではR₂と称する、脂肪族リンク部分と求核置換を起こすことができる基との間のスペーサー部分により伸長することもできる。例えば、スペーサー部分を有する式 (III) のポリマーは式 (V) により表される。



(R₂)により表されるスペーサー部分は、限定するものではないが、

-CO-NH-(CH₂-)_dX₄

-CO-NH-(CH₂-CH₂-O-)_dH

-CO-NH--X₄

-CO-NH--(O-CH₂-CH₂-)_dX₄

等が挙げられ、(d)は1~18の整数を示し、(X₄)はOH、NH₂またはCOOHである。場合により、-OH基の-Hがスペーサー部分の末端に結合して末端ヒドロキシル基を形成する。すなわち、スペーサー基はLに対して近位にあるといえる。

(V)に対応する化合物の合成は、式(III)の化合物のp-ニトロフェニルカーボネートまたはN-スクシンイミジルカーボネート活性エステルと、

H₂N-(CH₂-)_dOH、

H₂N-(CH₂-CH₂-O-)_dH、

アミノフェノール、あるいは

-(CH₂-CH₂-O-)_dOH

のような試薬と反応させることを含む。

式(IIla)及び(IVa)の化合物も、上記したものと同様な方法で対応するR₂スペーサー含有化合物に変換できる。

スペーサー部分の分枝ポリマーへの結合は、限定するものではなく、例示として式(II)のポリマーについて記載する。本発明により開示された分枝ポリマーの任意のものを使用して同様な生成物が得られる。例えば、スペーサー部分(R₂)は、ヒドロキシル基以外の基により置換されたリンカー部分(L)に結合することができる。ヒドロキシル基がアミノ基により置換されている場合、あるいはヒドロキシル基により置換された炭素が2級アミンにより置換されている場合は、(L)は、置換イソシアネートあるいはイソチオシアネート等の適当な試薬と反応させることができる。上記した脂肪族リンク部分と同様に、スペーサー部分の末端基は同様に官能化して求核物質と反応させることができ、すなわち適当な(A)部分、すなわちCOOHあるいはその他の「活性化末端基」と結合することができる。

合成の後、活性化分枝ポリマーは慣用の方法により精製し、ポリマーと結合することができる求核基を含む生物活性物質と、未修飾の形態の該物質が有する活性の少なくともいくらかを維持しながら、反応させることができる。

3. コンジュゲート形成に適する生物活性物質

分枝ポリマーとコンジュゲート化される求核物質は、「生物学的に活性な(生物活性)」と記載される。しかしこの用語は、生理学的あるいは医薬的活性に限定されない。例えば、求核物質コンジュゲートのあるもの、例えば酵素を含むものは有機溶媒中で反応を触媒することができる。同様に、コンカナバリンA、免疫グロブリン等のようなタンパク質を含む本発明のポリマーコンジュゲートのあるものは実験的診断に有用である。全てのコンジュゲートの重要な特徴は、未修飾の生物活性物質の有する活性の少なくとも一部が維持

されているということである。

コンジュゲートは、生物学的に活性であり、多くの治療上の用途を有する。生物活性物質を使用する治療を必要とする哺乳動物を、その所望の生物活性物質を含むポリマーコンジュゲートの有効量を投与することにより治療することができる。例えば、酵素あるいは血液因子の置換治療を必要とする哺乳動物に所望の物質を含む分枝ポリマーコンジュゲートを投与することができる。

本発明の対象となる生物活性求核物質としては、限定するものではないが、天然または合成由来のタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素、有機分子、例えば医薬化学物質等が挙げられる。

対象となる酵素としては、炭水化物特異的酵素、タンパク質分解酵素、オキシドリダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ等が挙げられる。特定の酵素に限定されないが、対象となる酵素の例としては、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、スーパーオキシドディスクターゼ、エンドトキシナーゼ、カタラーゼ、キモトリプシン、リパーゼ、ウリカーゼ、アデノシンジホスファターゼ、チロシナーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等が挙げられる。対象となる炭水化物特異的酵素としては、グルコースオキシダーゼ、グルコダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルコウロニダーゼ等が挙げられる。

対象となるタンパク質、ポリペプチド及びペプチドはとしては、限定するものではないが、ヘモグロビン、天然及び組換え型変異株、因子VII、VIII及びIXを含む血液因子等の血清タンパク質、免疫グロブリン、インターロイキン、-、-及び-インターフェロン等のサイトカイン、顆粒球コロニー刺激因子のようなコロニー刺激因子、血小板由来増殖因子、ホスホリバーゼ活性化タンパク質(PLAP)等が挙げられる。一般的な生物学的あるいは治療的に重要なその他のタンパク質としては、インシュリン、レクチン及びリシンのような植物タンパク質、腫瘍壞死因子及び関連対立遺伝子、組織増殖因子のような増殖因子、例えばTGFあるいはTGF及び上皮細胞増殖因子、ホルモン、ソマトメジン、エリスロポエチン、色素ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、プロラクチン、胎盤性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノーゲンアクチベーター等が挙げられる。対象となる免疫グロブリンとしては、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及びそれらの断片が挙げられる。

インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子のようなある種のタンパク質は、通常は組換え法を使用した結果として非グリコシリ化形態でも存在する。そのような非グリコシリ化物も本発明の生物活性求核物質の範囲に包含されるものである。

また、本発明の生物活性求核物質は *in vivo* 生物活性を示すポリペプチドの任意の部分を包含する。このようなものとしては、アミノ酸配列、アンチセンス部分等、抗体断片、単鎖結合抗原(例えば米国特許第4,946,778号を参照。この開示は引用により本明細書の一部とする)、結合分子、例えば抗体あるいはその断片の融合物、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、触媒抗体、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

タンパク質またはその部分は、当業者に知られる技術、例えば組織培養、動物ソースからの抽出等、あるいは組換えDNA技術により調製あるいは単離することができる。タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸配列等のトランスジェニックソースも考えられる。そのような材料としてはトランスジェニック動物、すなわちマウス、ブタ、ウシ等から得られ、そのような動物においては前記タンパク質はミルク、血液、あるいは組織中に発現される。トランスジェニック昆虫及びバキュロウイルス発現系もソースとして考えられる。さらにタンパク質の変異体、例えば変異体TNF及び/または変異体インターフェロン等も本発明の範囲内にあるものである。

対象となるその他のタンパク質としては、ブタクサ、抗原E、ミツバチ毒、ダニアレルゲン等のアレルゲンタンパク質が挙げられる。

有用な生物活性求核物質は、タンパク質及びペプチドに限定されない。実質的にあらゆる生物活性化合物が本発明の範囲内に包含される。本発明は、ポリマーとのコンジュゲート化のための求核性結合部位をわずか、あるいは1つしか有しない化合物、例えば天然から

10

20

30

40

50

単離されたかあるいは合成された医薬化学物質のような化合物に特に適している。化学療法分子、例えば医薬化学物質、すなわち抗腫瘍剤、例えばパクリタキセル、タキソテール、関連タキソテール類、タキソイド分子、カンプトテシン、ポドフィロトキシン、アントラサイクリン、メトトレキセート等、心臓血管作用薬、抗新生物薬、抗感染薬、抗不安薬、胃腸薬、中枢神経系活性化剤、鎮痛剤、受精または避妊薬、抗炎症薬、ステロイド剤、抗尿毒症薬 (anti-urecemic agents)、心血管薬剤、血管拡張剤、血管収縮剤等が挙げられる。

上記は、本発明のポリマーとのコンジュゲート化に適した生物活性求核物質の例である。具体的に挙げてはいないが、適當な求核基を有する生物活性物質は同様に意図され、本発明の範囲内にあるものと理解されなければならない。

10

4. 生物活性コンジュゲートの合成

標準的な化学反応により1以上の活性化分枝ポリマーを生物活性求核物質に結合することができる。コンジュゲートは式



によって表される。式中 (R) は水溶性で実質的に非抗原性のポリマーであり、n=2または3であり、(L) は脂肪族のリンク部分であり、(A¹) は (L) と求核物質との間の結合を示し、(z) は1以上の整数であり、生物活性求核物質にコンジュゲート化したポリマーの数を表す。(z) の上限は利用可能な求核物質結合部位の数、及び当業者により求められるポリマー結合の程度に依存する。コンジュゲート形成の程度は、周知の技術を使用して反応化学量論を変化させることにより変更することができる。化学量論上過剰な活性化ポリマーを求核物質と反応させることにより、1より多いポリマーを求核物質にコンジュゲート化することができる。

20

生物活性求核物質は、水性反応媒体中で活性化分枝ポリマーと反応させることができ、該媒体は求核物質のpH要求性により緩衝化することができる。反応の至適pHは一般に約6.5～約8.0であり、タンパク質性/ポリペプチド物質については好ましくは約7.4である。有機/化学療法剤部分は非水性系中で反応させることができる。求核物質の安定性、反応効率等に最適な反応条件は当業者の技術の範囲内である。好ましい温度範囲は4～37の範囲である。反応媒体の温度は、求核物質が変性あるいは分解する温度を越えてはならない。求核物質は過剰量の活性化分枝ポリマーと反応させることが好ましい。反応後、コンジュゲートを回収し、透析濾過、カラムクロマトグラフィー、それらの組合せ等により精製する。

30

本発明の活性化非抗原性分枝ポリマーが、生物活性物質のコンジュゲート化、特にそのような物質が十分な数の適當なポリマー結合部位を有していない場合に有用な新規なツールであることは容易に理解できるものである。

実施例

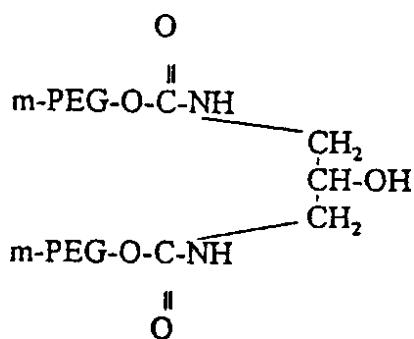
以下の非限定的な実施例は本発明の特定の形態を例示するものである。特記しないかぎり全ての部及びパーセントは重量によるものであり、全ての温度は である。

材料

メトキシポリ(エチレングリコール)(m-PEG)(mw=5,000)はUnion Carbideから得た。溶媒はAldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsinから得た。メトキシポリ(エチレングリコール)-N-スクシンイミジルカーボネット(SC-PEG)は、分子量約5,000のm-PEGを使用して米国特許第5,122,614号に記載されたように製造した。m-PEG-FLANは米国特許第5,349,001号に記載されたように製造した。実施例1～9の生成物のそれぞれは¹³C-NMRにより構造を確認した。

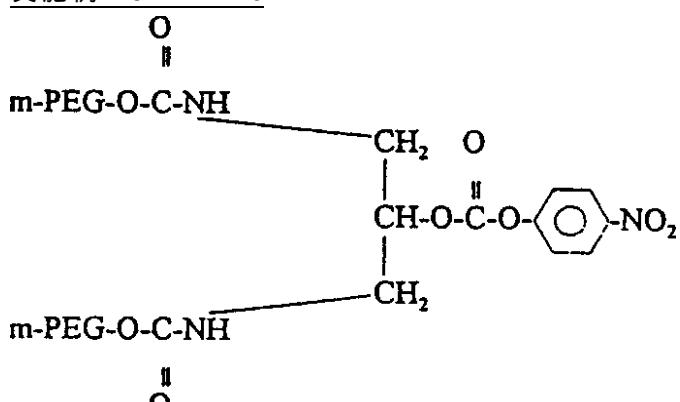
40

実施例1 U-PEG-OH



この分枝ポリマーは、100mg (1.1mmol) の1,3-ジアミノ-2-プロパノールを10.0g (2mmol) のSC-PEGのメチレンクロリド溶液 (50mL) に加えることにより製造した。混合液を室温で18時間攪拌し、その後濾過した。過剰な溶媒を減圧下で蒸留することにより除去した。残渣を2-プロパノールから再結晶させて7.1gの生成物を得た (収率70%)。

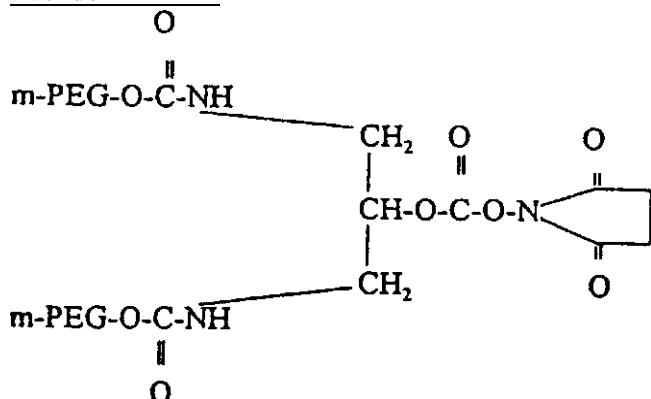
実施例2 U-PNP-PEG



実施例1の化合物をp-ニトロフェニルクロロホルメートで活性化した。最初に75mLのトルエン中で2時間還流させることにより5.0g (0.5mmol) のU-PEGを共沸乾燥し、25mLの溶媒/水を除去した。反応混合液を30℃に冷却し、120mg (0.6mmol) のp-ニトロフェニルクロロホルメート及び50mg (0.6mmol) のピリジンを加えた。得られた混合液を45℃で2時間攪拌し、その後室温で一晩攪拌した。

そして反応混合液をCELITE (登録商標) を通して濾過し、減圧下で蒸留することにより濾液から溶媒を除去した。残渣を2-プロパノールから再結晶させることにより4.2gの生成物を得た (収率81%)。

実施例3 US-PEG

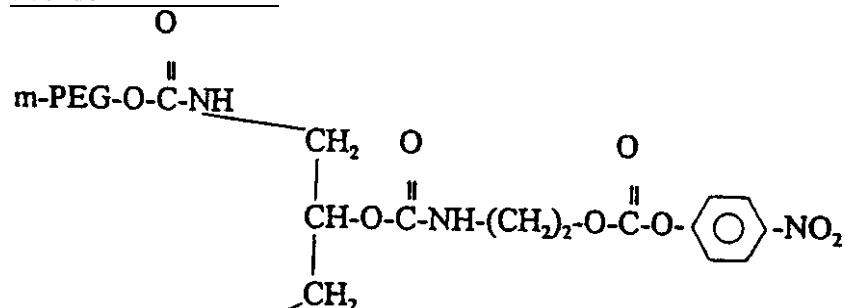


この実施例においては、実施例2のU-PNP-PEGをN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させてU-PEGのスクシンイミジルカーボネートエステルを生成した。5.0g (0.5mmol) のU-PNP-PEG、0.6g (5mmol) のN-ヒドロキシスクシンイミド及び0.13g (1mmol) のジイソプロピルエチルアミンを含有するメチレンクロリド溶液 (40mL) を18時間還流させた。その後溶媒を減圧下で蒸留することにより除去し、残渣を2-プロパノールから再結晶させることにより

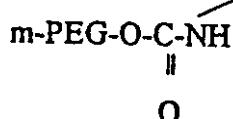
50

4.2gのスクシンイミジルカーボネートエステルを得た(収率82%)。

実施例4 NU-PNP-PEG



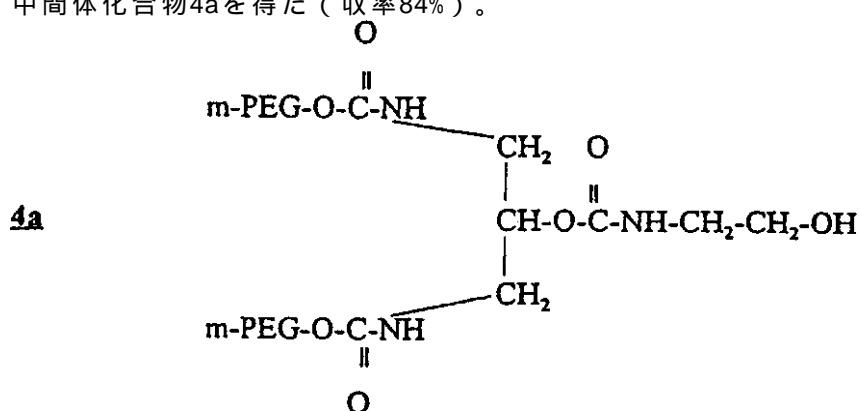
10



この上記の分枝ポリマーは、U-PNP PEG(実施例2)をエタノールアミン、次いでp-ニトロフェニルクロロホルメートと反応させることにより製造した。

5.0g(0.5mmol)のU-PNP PEGを含有するメチレンクロリド溶液(40mL)を60mg(1mmol)のエタノールアミンと合わせ、室温で一晩攪拌した。その後、減圧下で蒸留することにより溶媒を除去した。残渣を2-プロパノールから再結晶させることにより4.3gの下記に示す中間体化合物4aを得た(収率84%)。

20

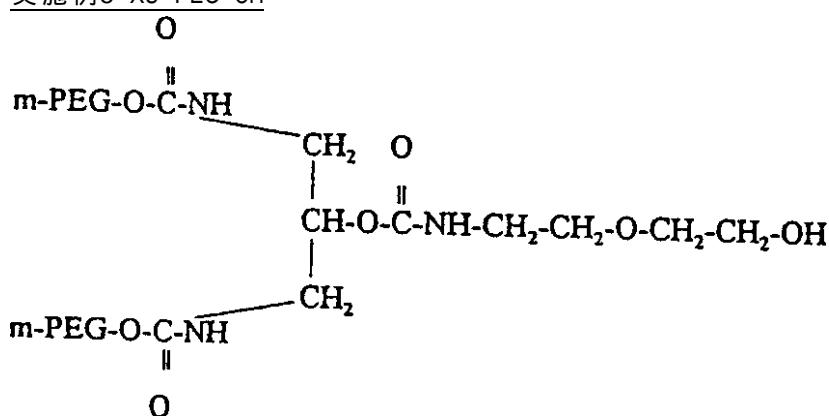


30

上記中間体をp-ニトロフェニルクロロホルメートと反応させることによりNU-PEG-OHを製造した。40mLのトルエン中で2.0g(0.2mmol)の前記中間体を2時間還流させることにより共沸乾燥し、25mLの溶媒/水を除去した。実施例2の手順に従い、反応混合液を冷却し、0.3mmolのp-ニトロフェニルクロロホルメート及び0.3mmolのピリジンを加えた。得られた混合液を45℃で2時間攪拌し、その後室温で一晩攪拌した。

NU-PEG-OHを同様に実施例2の手順によって回収し、1.5gを得た(収率71%)。

実施例5 XU-PEG-OH



40

この分枝ポリマーは、実施例4に記載した手順に従い、実施例2のU-PNP PEGを2-(2-アミ

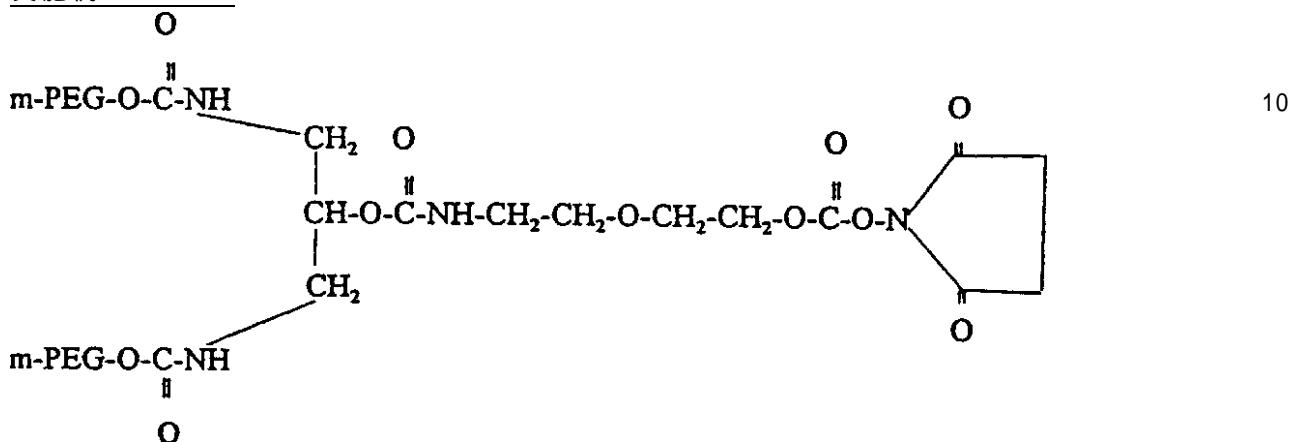
50

ノエトキシ)エタノールと反応させることにより製造した(すなわちアミノアルコールをp-ニトロフェニルカーボネートと反応させた)。再結晶させた生成物の収率は86%であった。

実施例6 XU-PNP-PEG

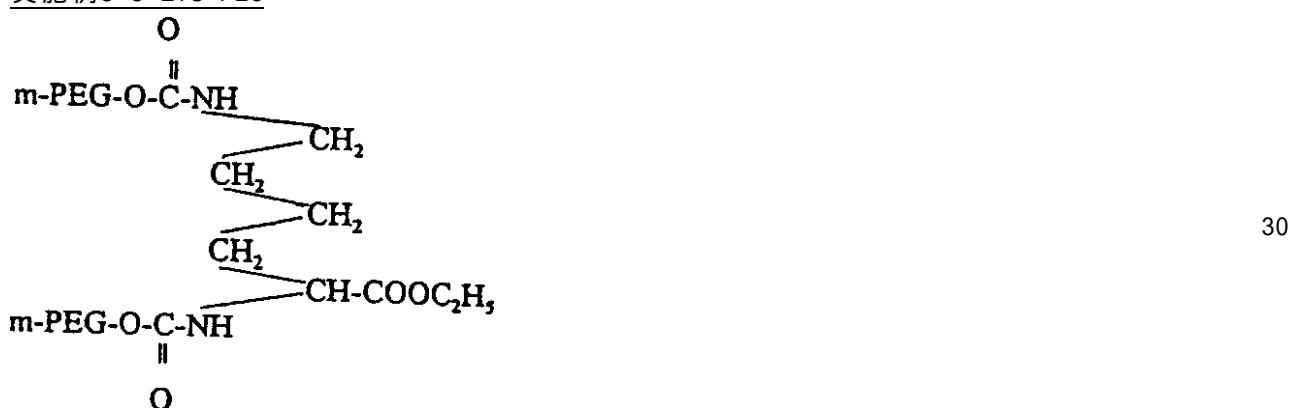
実施例2及び4のように、実施例5の化合物をp-ニトロフェニルカーボネートにより官能化した。再結晶させた生成物の収率は83%であった。

実施例7 XUS-PEG



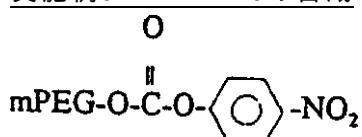
この実施例においては、実施例3に記載した方法に従い、N-ヒドロキシスクシンイミドを実施例6のp-ニトロフェニルカーボネート誘導体と反応させることにより、実施例5で製造した化合物のスクシンイミジルカーボネート誘導体を製造した。回収された生成物の収率は84%であった。

実施例8 U-LYS-PEG



上記の分枝ポリマーはm-PNP PEGをリシンエチルエステルと反応させることにより製造した。具体的には、5.0g (1.0mmol) のポリマー、150mg (0.6mmol) のリシンジヒドロクロリド及び140mg (1.8mmol) のピリジンの混合物を18時間還流させた。減圧下で蒸留することにより溶媒を除去した。残渣を2-プロパノールから再結晶させて4.5g (収率88%) の生成物を得た。

実施例9 m-PNP-PEGの合成



50g (0.01mol) のm-PEG-OH (MW=5000) のトルエン溶液 (500ml) を2時間共沸させ、100ml のトルエン/水を除去した。反応混合液を30℃に冷却し、その後2.6g (0.013mol) のp-ニトロフェニルクロロホルムート及び1.0ml (0.013mol) のピリジンを加えた。得られた混合液を45℃で2時間攪拌し、その後室温で一晩攪拌した。

そして反応混合液をCELITE (登録商標) を通して濾過し、減圧下で蒸留して溶媒を除去し

40

50

た。残渣を2-プロパノールから再結晶させることにより48.2gの生成物を得た(収率93%)。

実施例10及び11

Centricon-10(Amicon Corporation, Beverly, MA)を使用して、0.1Mリン酸バッファー、pH7.0の溶液に対して2種の3.0mgエリスロポエチン(EPO)サンプル(ヒト組換えチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞培養物)を透析することにより、EPOのUS-PEG(実施例3)とのコンジュゲートを製造した。最初のEPO溶液は1.954mg(2倍モル過剰)のUS-PEGと合わせ、2番目のEPO溶液は3.908mg(4倍モル過剰)のUS-PEGと合わせた。反応混合液を室温(約22~25℃)で1時間攪拌した。過剰のポリマーを遠心分離により除去し、反応混合液を10mMリン酸バッファー、pH8.0に対して透析した。未反応EPOをイオン交換カラム(2-HDカラム、Sepracor)上で除去した。
10

SDS-PAGE分析により、双方の反応混合液について約2~3個の分枝ポリマーが各タンパク質分子に共有結合していることが確認された。コンジュゲートのEPO活性を、DA1-K細胞、すなわち増殖についてIL-3、GM-CSF及びEPOに依存性を示すネズミリンパ芽球細胞系を使用して比色アッセイにより測定した。前記細胞は5%FCSを含むIMDMで増殖させ、空气中5%CO₂中37℃においてインキュベートする。アッセイ時間は72時間とし、細胞増殖はMTT色素の取り込みによりモニターする。アッセイにおいて双方のコンジュゲートサンプルは非コンジュゲート化EPOの40~50%の活性を有していた。

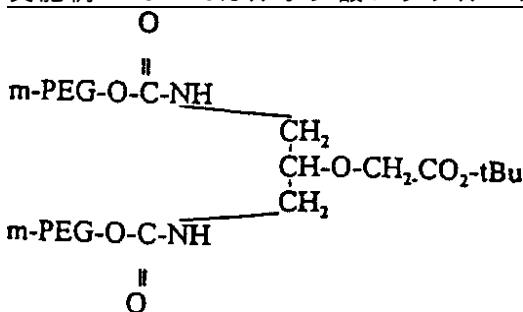
実施例12及び13

腫瘍壞死因子(TNF)を実施例7のXUS-PEGとコンジュゲート化した。比較として、TNFを米国特許第5,122,614号の線状SC-PEG、メトキシポリ(エチレンギリコール)スクシンイミジルカーボネートともコンジュゲート化した。双方のコンジュゲートは、500μgのTNF、2.0mg/mLを25倍モル過剰のポリマーと反応させることにより製造した。各反応は氷上で140分行った。
20

分枝コンジュゲートのED₅₀は、0.1μg/mLの希釈物により作成された濃度-応答曲線については0.29ng/mL、0.01μg/mLの希釈物により作成された濃度-応答曲線については0.625ng/mLであった。非修飾TNFのED₅₀は0.01~0.02ng/mLであった。線状スクシンイミジルカーボネートコンジュゲートのED₅₀は8~19ng/mLの範囲であった。

*in vitro*における殺腫瘍及び毒性データによれば、分枝コンジュゲートは非分枝コンジュゲートよりも細胞毒性が高いようであることが示された。
30

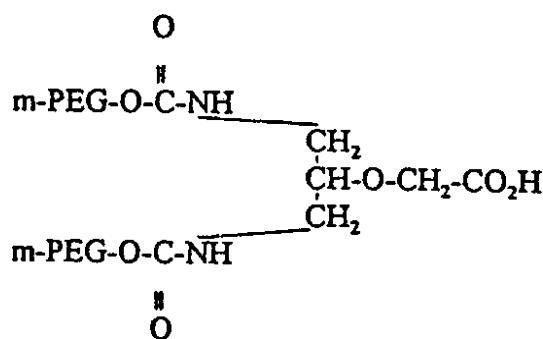
実施例14 U-PEGカルボン酸t-ブチルエステル



1.0g(0.099mmol)のU-PEG-OHのトルエン溶液(30mL)を共沸させ、10mLの蒸留物を除去した。反応混合液を30℃に冷却し、50μL(0.34mmol)のt-ブチルプロモアセテート及び0.1mL(1.0mmol)の1.0Mカリウムt-ブトキシドのt-ブタノール溶液を加えた。得られた混合液を40℃で一晩攪拌した。反応混合液をCeliteパッドを通して濾過し、減圧下で蒸留することにより溶媒を除去した。残渣を2-プロパノールから再結晶させて0.98g(回収率97%)を得た。生成物は¹³C NMRで測定して60%の所望のt-ブチルエステルを含んでいた。
40

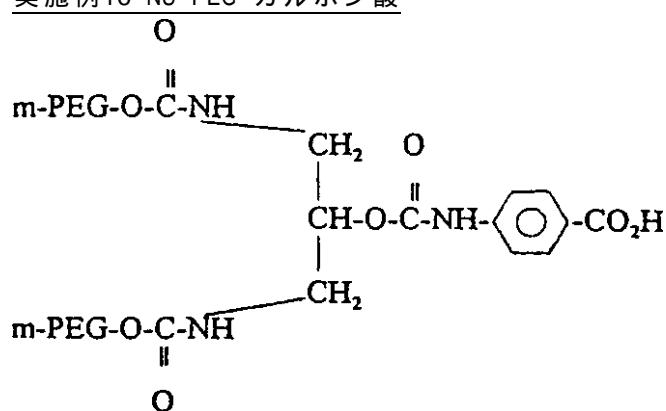
¹³C NMR: (CH₃)₃C-, 27.54ppm; -CH₂NH-, 45.31ppm; -OCH₃, 58.40ppm; (CH₃)₃C-, 80.21ppm; -OC(=O)NH-, 157.20ppm; -C(=O)O-, 166.89ppm.

実施例15 U-PEGカルボン酸



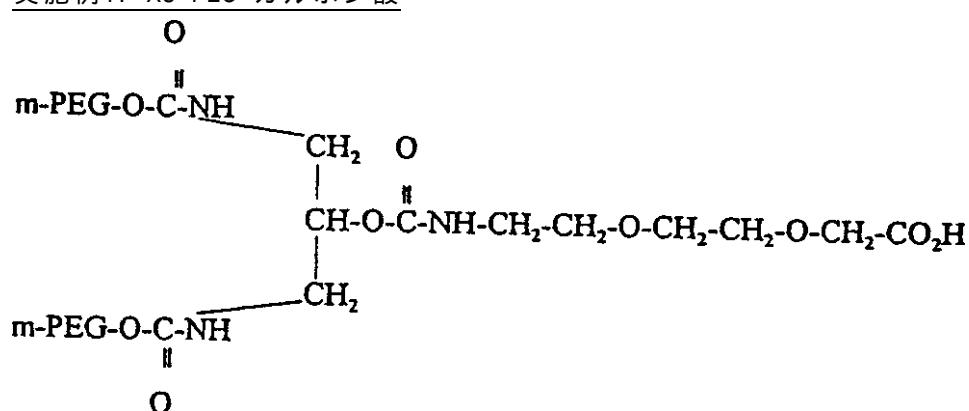
0.5g (0.049mmol) のU-PEGカルボン酸t-ブチルエステル及び2.5mLのトリフルオロ酢酸のメチレンクロリド溶液 (5mL) を室温で3時間攪拌した。その後減圧下での蒸留により溶媒を除去し、残渣を冷却メチレンクロリド/エチルエーテル (エーテル中の20%v/vメチレンクロリド、全体で約20mL) から再結晶させて0.42g (収率85%) の生成物を得た。
¹³C NMR: -CH₂NH-, 43.31ppm; -OCH₃, 58.04ppm; -OC(=O)NH-, 156.20ppm; -C(=O)O-, 169.89ppm.

実施例16 NU-PEG-カルボン酸



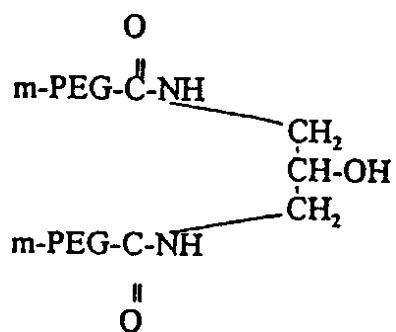
この上記の分枝ポリマーは、US-PEG (実施例3) をメチルp-アミノベンゾエートと反応させ、その後選択的に加水分解して製造し、末端カルボン酸を含む分枝ポリマーを得た。

実施例17 XU-PEG-カルボン酸



この実施例においては、実施例14及び15に記載した方法により実施例5の化合物 (XU-PEG-OH) のカルボン酸誘導体を製造し、末端カルボン酸誘導体を形成した。

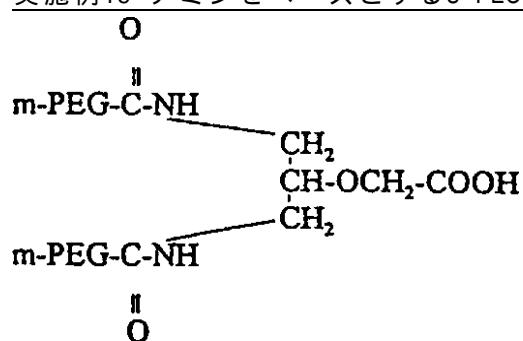
実施例18 アミンをベースとするU-PEG-OH



以前に米国特許第5,349,001号に記載されたように製造した10.0g (2mmol) のm-PEG-Flanのメチレンクロリド溶液 (50mL) に100mg (1.1mmol) の1,3-ジアミノ-2-プロパノールを加える。この混合液を18時間室温で攪拌し、その後濾過し、減圧下での蒸留により溶媒を除去する。得られる残渣を2-プロパノールから再結晶させて7.1gの生成物を得る。

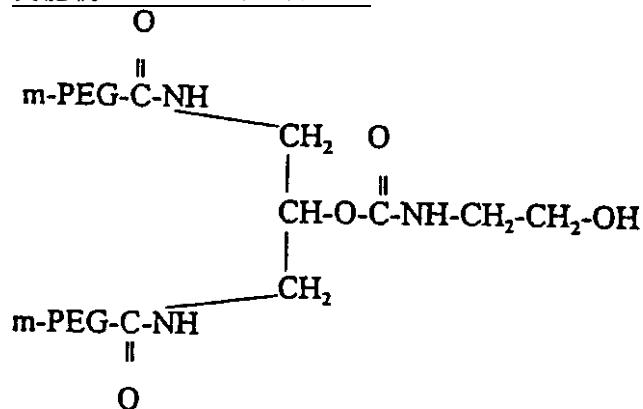
^{13}C NMRアサインメント: CH_2NH , 43.2ppm; OCH_3 , 58.1ppm; CHOH , 63.0ppm; $\text{C}-\text{O}$, 171.2ppm.

実施例19 アミンをベースとするU-PEG-COOH



実施例18の化合物に対応するカルボン酸誘導体を、実施例14及び15に記載の手順を使用して形成した。

実施例20 NU-PEGアミン-OH



この分枝ポリマーは、実施例18の化合物を出発化合物として使用して、実施例4の段階を反復することにより化合物4aを生成することにより形成した。

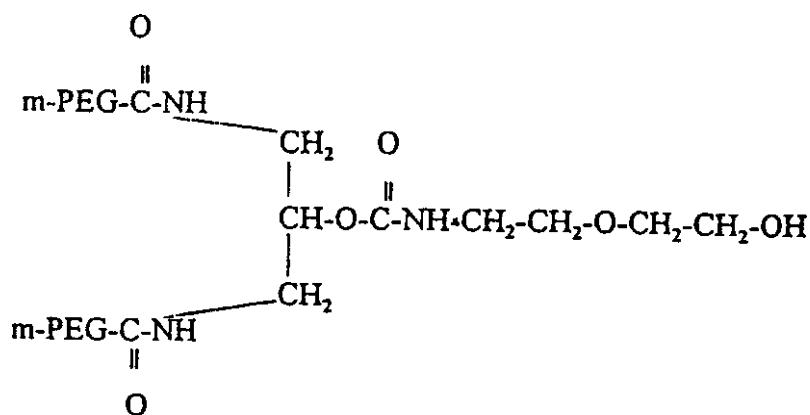
実施例21 XU-PEGアミン-OH

10

20

30

40



この分枝ポリマーは実施例18の化合物を使用して実施例5を反復することにより形成した。

実施例22 20-Sカンプトテシン-U-PEG 5,000

4.0g (0.4mmol) の実施例15で製造したU-PEGカルボン酸、0.28g (0.8mmol) のカンプトテシン、0.10g (0.8mmol) のジイソプロピルカルボジイミド、及び0.10g (0.8mmol) の4-ジメチルアミノピリジンの混合物を50mlの無水ジクロロメタンに0℃で加える。この混合液の温度を室温まで上昇させ、18時間攪拌を続け、その後減圧下での蒸留により溶媒を除去する。残渣を2-プロパノールから再結晶させて3.4gの表題の生成物を得る。

実施例23 2'-パクリタキセル-U-PEG 5,000

4.0g (0.4mmol) の実施例16で製造したNU-PEGカルボン酸、0.68g (0.08mmol) のパクリタキセル、0.10g (0.8mmol) のジイソプロピルカルボジイミド、及び0.10g (0.8mmol) の4-ジメチルアミノピリジンの混合物を50mlの無水ジクロロメタンに0℃で加える。この混合液の温度を室温まで上昇させ、18時間攪拌を続け、その後減圧下での蒸留により溶媒を除去する。残渣を2-プロパノールから再結晶させて3.4gの表題の生成物を得る。

実施例24 2'-パクリタキセル-U-PEG 5,000

4.0g (0.4mmol) の実施例19の化合物U-PEG、0.68g (0.8mmol) のパクリタキセル、0.10g (0.8mmol) のジイソプロピルカルボジイミド、及び0.10g (0.8mmol) の4-ジメチルアミノピリジンの混合物を50mlの無水ジクロロメタンに0℃で加える。この混合液の温度を室温まで上昇させ、18時間攪拌を続け、その後蒸留により溶媒を除去する。残渣を2-プロパノールから再結晶させて3.4gの表題の生成物を得る。

10

20

30

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/08
A 6 1 P 13/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/00
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08
A 6 1 P 15/16 (2006.01)	A 6 1 P 15/16
A 6 1 P 15/18 (2006.01)	A 6 1 P 15/18
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/22
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 8 G 65/333 (2006.01)	C 0 8 G 65/333
C 0 8 G 73/00 (2006.01)	C 0 8 G 73/00

(72)発明者 グリーンワルド, リチャード, ピー.

アメリカ合衆国 0 8 8 7 3 ニュージャージー州, サマセット, ヒッコリー ロード 113

(72)発明者 マルチネス, アンソニー, ジェイ.

アメリカ合衆国 0 8 6 9 0 ニュージャージー州, ハミルトン スクウェアー, ウェイボーン
ロード 20

審査官 北畠 勝彦

(56)参考文献 国際公開第95/011924(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 9/00 - 9/72

A61K 47/00 - 47/48