

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-518029

(P2012-518029A)

(43) 公表日 平成24年8月9日(2012. 8. 9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 14/755 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/755 Z N A	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 B	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 38/43 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/465	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 7/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁)

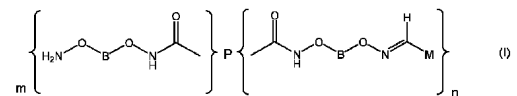
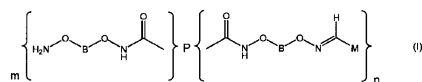
(21) 出願番号	特願2011-550560 (P2011-550560)	(71) 出願人	511099685 ノヴォ・ノルディスク・アー／エス デンマーク・DK-2880・ハウスベア ・ノヴォ・アレ・ (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成22年2月18日 (2010. 2. 18)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85) 翻訳文提出日	平成23年10月18日 (2011. 10. 18)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/052022	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02010/102886	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成22年9月16日 (2010. 9. 16)	(72) 発明者	マガリ・ツンデル デンマーク・DK-2870・デュセボー ・ブランテヴァイ・27・3・ティ・ホ 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	09153257.2		
(32) 優先日	平成21年2月19日 (2009. 2. 19)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	61/161, 510		
(32) 優先日	平成21年3月19日 (2009. 3. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 第V I I I 因子の修飾

## (57) 【要約】

式(I)の第VIII因子誘導体[式中、BはC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルキレンを表し、mは0または1~19の整数を表し、nは1~20の整数を表し、mとnの合計は1~20であり、Pは、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からm+n個のカルバモイル基を除去することによって得られた、第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカルを表し、Mは、第VIII因子誘導体の血漿内半減期を増大させる部分(M<sup>1</sup>)またはレポーター部分(M<sup>2</sup>)を表す]または薬学的に許容されるその塩

。

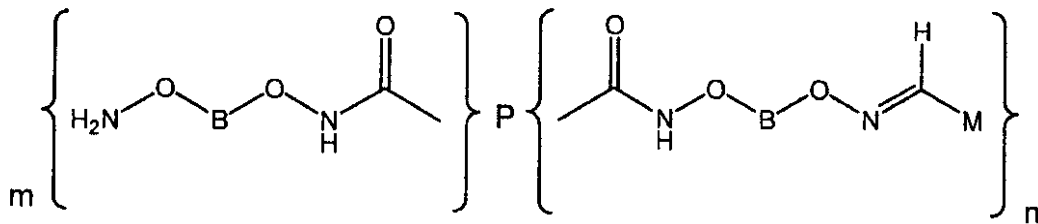


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式(1)の第VIII因子誘導体

## 【化 1】



10

(I)

[式中、

Bは $C_2 \sim C_{10}$ アルキレンを表し、

mは0または1～19の整数を表し、nは1～20の整数を表し、mとnの合計は1～20であり、

Pは、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からm+n個のカルバモイル基を除去することによって得られた、第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカルを表し、

Mは、第VIII因子誘導体の血漿内半減期を増大させる部分( $M^1$ )またはレポーター部分( $M^2$ )を表す]

または薬学的に許容されるその塩。

20

## 【請求項 2】

前記部分 $M^1$ が、1つまたは複数のポリエチレングリコール(PEG)部分、ポリペプチドまたは血漿タンパク質バインダーを含む、請求項1に記載の第VIII因子誘導体。

## 【請求項 3】

前記ペプチドが、アルブミン、またはその抗体もしくは断片である、請求項2に記載の第VIII因子誘導体。

## 【請求項 4】

前記血漿タンパク質バインダーがアルブミンバインダーである、請求項2に記載の第VIII因子誘導体。

## 【請求項 5】

前記部分 $M^1$ がポリエチレングリコール(PEG)部分を含む、請求項2に記載の第VIII因子誘導体。

30

## 【請求項 6】

前記部分 $M^2$ が、ビオチン、蛍光マーカ―または放射性同位体を含む、請求項1に記載の第VIII因子誘導体。

## 【請求項 7】

mが0または1～9の整数を表し、nが1～10の整数を表し、mとnの合計が1～10である、請求項1から6のいずれか一項に記載の第VIII因子誘導体。

## 【請求項 8】

Bが $C_2 \sim C_6$ アルキレンを表す、請求項1から7のいずれか一項に記載の第VIII因子誘導体。

40

## 【請求項 9】

Bが $C_2 \sim C_4$ アルキレンを表し、

mが0または1～5の整数を表し、nが1～6の整数を表し、mとnの合計が1～6であり、

Mが、ポリエチレングリコール(PEG)部分および/またはアルブミンバインダーを含む部分( $M^1$ )を表す、

請求項1に記載の第VIII因子誘導体。

## 【請求項 10】

Bが $C_2 \sim C_4$ アルキレンを表し、

mが0または1～5の整数を表し、nが1～6の整数を表し、mとnの合計が1～6であり、

50

Mが、ビオチンまたは蛍光マーカを含む部分(M<sup>2</sup>)を表す、  
請求項1に記載の第VIII因子誘導体。

【請求項 1 1】

BがC<sub>3</sub>アルキレンを表す、請求項9または10に記載の第VIII因子誘導体。

【請求項 1 2】

請求項1から11のいずれか一項に記載の第VIII因子誘導体および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 1 3】

療法によってヒトまたは動物の身体の治療に使用するための、請求項1から11のいずれか一項に記載の第VIII因子誘導体。

【請求項 1 4】

血友病Aの治療に使用するための、請求項13に記載の第VIII因子誘導体。

【請求項 1 5】

血友病Aの治療のための医薬品の製造における、請求項1から11のいずれか一項に記載の第VIII因子誘導体の使用。

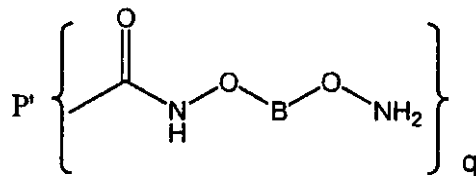
【請求項 1 6】

血友病Aを有する患者に、治療有効量の請求項1から11のいずれか一項に記載の第VIII因子誘導体または請求項12に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、前記患者を治療する方法。

【請求項 1 7】

式(II)の第VIII因子誘導体

【化 2】



(II)

[式中、

BはC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルキレンを表し、

qは1～20の整数を表し、

P'は、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からq個のカルバモイル基を除去することによって得られた、第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカルを表す]

または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 1 8】

第VIII因子を、トランスグルタミナーゼの存在下で、式(III)の化合物  
H<sub>2</sub>N-O-B-O-NH<sub>2</sub> (III)

[式中、Bは請求項1または8から11のいずれか一項に記載の通りである]

と反応させるステップを含む、請求項17に記載の式(II)の第VIII因子誘導体を調製する方法。

【請求項 1 9】

トランスグルタミナーゼが、ストレプトマイセス・モバラエンス(*Streptomyces mobaraense*)のトランスグルタミナーゼである、請求項18に記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項17に記載の式(II)の第VIII因子誘導体を、式(IV)のアルデヒド

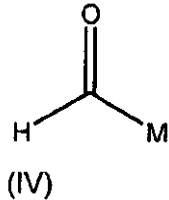
10

20

30

40

## 【化 3】



[式中、Mは請求項1から6、9または10のいずれか一項に記載の通りである]

と反応させるステップを含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の式(1)の第VIII因子誘導体を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、第VIII因子誘導体、前記誘導体の調製方法、および療法における前記誘導体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

第VIII因子は、凝血カスケードにおける重要なタンパク質である。第VIII因子の欠損は、凝血疾患である血友病Aを引き起こす。血友病Aは、必要に応じて患者に第VIII因子を投与することによって治療することができる。第VIII因子の血漿内半減期が短いため、現在のところ第VIII因子を用いる血友病Aの有効で好都合な予防処置は不可能である。したがって、長期にわたって十分な第VIII因子の活性を維持することは困難である。したがって、より長い血漿内半減期を有する新しい第VIII因子誘導体を同定することによって、血友病Aの安全で好都合な予防処置が提供され得る。

【0003】

血液からのタンパク質のクリアランスにとって重要な位置に、タンパク質を遮蔽する適切な化学的部分を導入することによって、タンパク質の血漿内半減期を増大させることが可能な場合がある。レポーター基として作用する化学的部分を、タンパク質に導入することも有利になり得る。しかし、かかる化学的部分が非選択的に導入されると、タンパク質の生物活性が低減し、または破壊されるおそれがある。したがって、タンパク質への化学的部分の位置選択的な導入が望ましい。しかし、第VIII因子などの大型タンパク質に化学的部分を位置選択的に導入することは困難である。

【0004】

したがって、化学的部分を第VIII因子に位置選択的に導入するための新しい技術が必要になる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,156,956号

【特許文献2】米国特許第5,252,469号

【特許文献3】JP-A-2003199569

【特許文献4】US5,731,183

【特許文献5】WO96/06931

【特許文献6】WO96/22366

【特許文献7】EP-A-0555649

【特許文献8】米国特許第5,736,356号

【特許文献9】US2003/0118592

【特許文献10】US2003/0133939

【特許文献11】WO2008/074032

【特許文献 1 2】WO95/013301

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Manucci および Tripodi, 「Factor VIII clotting activity」、E. C. A. T. assay procedures、London: Kluwer Academic Publishers、1999年

【非特許文献 2】Hemker ら、 「The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma.」、Thrombosis and haemostasis、第83巻: 589 ~ 591頁

【非特許文献 3】Kaempfer, J. Gen. Microbiol.、137、1831 ~ 1892頁、1991年

【非特許文献 4】Toole ら、Nature 1984、312:342 ~ 347頁

【非特許文献 5】Fulcher ら; Proc. Acad. Nat. Sci. USA 1982年; 79:1648 ~ 1652頁

10

【非特許文献 6】Rotblat ら; Biochemistry 1985年; 24:4294 ~ 4300頁

【非特許文献 7】Fass ら; Blood 1982年; 59:594 ~ 600頁

【非特許文献 8】Knutson ら; Blood 1982年; 59:615 ~ 624頁

【非特許文献 9】Lollar ら; Blood 2000年; 95(2):564 ~ 568頁

【非特許文献 10】Lollar ら; Blood 2001年; 97(1):169 ~ 174頁

【非特許文献 11】Wood, W.I. ら (1984年) Nature 312、330 ~ 336頁

【非特許文献 12】Vehar, G.A. ら (1984年) Nature 312、337 ~ 342頁

【非特許文献 13】Kjalke M、Heding A、Talbo G、Persson E、Thomsen J および Ezban M (1995年)、「Amino acid residues 721-729 are required for full Factor VIII activity」、Eur. J. Biochem: 234: 773 ~ 779頁

20

【非特許文献 14】「Polymer Synthesis and Characterization」、J. A. Nairn、University of Utah、2003年

【非特許文献 15】J. Med. Chem、43、2000年、1986 ~ 1992頁

【非特許文献 16】Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年

【非特許文献 17】Williams および Polli (1984年) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48 ~ 59頁

【非特許文献 18】Masters (1991年) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical、Essex、U.K.)、491 ~ 676頁

【非特許文献 19】Broadhead ら (1992年) Drug Devel. Ind. Pharm. 18: 1169 ~ 1206頁

30

【非特許文献 20】Mumenthaler ら (1994年) Pharm. Res. 11: 12 ~ 20頁

【非特許文献 21】Carpenter および Crowe (1988年) Cryobiology 25: 459 ~ 470頁

【非特許文献 22】Roser (1991年) Biopharm. 4: 47 ~ 53頁

【非特許文献 23】Lelievre ら、Tetr. Lett. 39 (1998年)、9675頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、驚くべきことに、トランスグルタミナーゼ酵素が、第VIII因子の限られた数のグルタミン残基を選択的に標的にすることを見出した。したがって、第VIII因子誘導体の合成においてトランスグルタミナーゼを使用することによって、第VIII因子への化学的部分の位置選択的な導入が可能になる。これらの方法は、新しい種類の第VIII因子誘導体を調製するために使用されているものである。

40

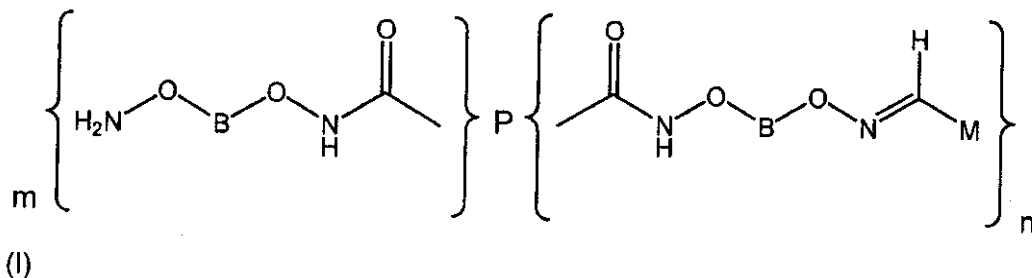
【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって本発明は、式(1)の第VIII因子誘導体

【0009】

## 【化 1】



【 0 0 1 0 】

10

[式中、

BはC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルキレンを表し、

mは0または1～19の整数を表し、nは1～20の整数を表し、mとnの合計は1～20であり、

Pは、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からm+n個のカルバモイル基を除去することによって得られた、第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカルを表し、

Mは、第VIII因子誘導体の血漿内半減期を増大させる部分(M<sup>1</sup>)またはレポーター部分(M<sup>2</sup>)を表す]

または薬学的に許容されるその塩に関する。

【 0 0 1 1 】

20

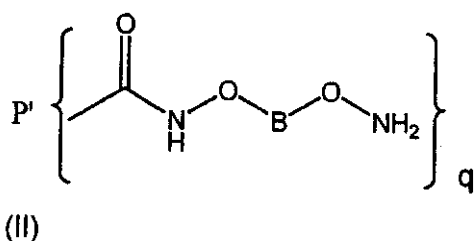
本発明はさらに、以下を提供する。

- 先に定義の第VIII因子誘導体および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物、
- 療法によってヒトまたは動物の身体の治療に使用するための、先に定義の第VIII因子誘導体、
- 血友病Aの治療に使用するための、先に定義の第VIII因子誘導体、
- 血友病Aの治療のための医薬品の製造における、先に定義の第VIII因子誘導体の使用、
- 血友病Aの患者に、治療有効量の先に定義の第VIII因子誘導体または先に定義の医薬組成物を投与するステップを含む、前記患者を治療する方法、
- 式(II)の第VIII因子誘導体

【 0 0 1 2 】

30

## 【化 2】



【 0 0 1 3 】

40

[式中、

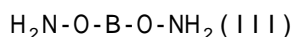
BはC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルキレンを表し、

qは1～20の整数を表し、

P'は、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からq個のカルバモイル基を除去することによって得られた、第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカルを表す]

または薬学的に許容されるその塩、

- 第VIII因子を、トランスグルタミナーゼの存在下で、式(III)の化合物



[式中、Bは先に定義の通りである]

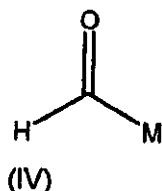
と反応させるステップを含む、先に定義の式(II)の第VIII因子誘導体を調製する方法、

- 先に定義の式(II)の第VIII因子誘導体を、式(IV)のアルデヒド

50

【 0 0 1 4 】

【 化 3 】



【 0 0 1 5 】

[ 式中、Mは先に定義の通りである ]

10

と反応させるステップを含む、先に定義の式(1)の第VIII因子誘導体を調製する方法。

【 発明を実施するための形態 】

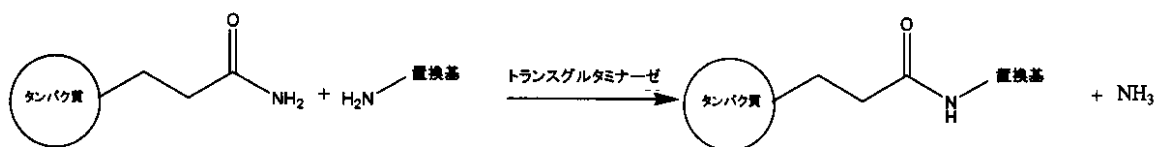
【 0 0 1 6 】

本発明は、タンパク質上の限られた数の部位に置換基を担持する新しい第VIII因子誘導体を提供する。第VIII因子の位置選択的な置換は、その調製方法によって制御される。本発明の方法における重要なステップは、酵素トランスグルタミナーゼ(Tgase)を使用することである。トランスグルタミナーゼは、タンパク質-グルタミン- -グルタミルトランスフェラーゼとしても公知である。トランスグルタミナーゼは、以下の一般的な反応を触媒する。

【 0 0 1 7 】

20

【 化 4 】



【 0 0 1 8 】

先に示したタンパク質上の-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH<sub>2</sub>基は、タンパク質のグルタミン残基の側鎖である。

【 0 0 1 9 】

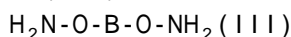
30

本発明者らは、驚くべきことに、トランスグルタミナーゼが、第VIII因子の限られた数のグルタミン残基を選択的に標的にすることを見出した。第VIII因子誘導体の配列は、64~70個のグルタミン残基を含有する。しかしトランスグルタミナーゼは、これらのグルタミン残基の一部だけを標的にする。一般に1~20個、好ましくは1~15個、より好ましくは1~10個、最も好ましくは1~7個のグルタミン残基が、トランスグルタミナーゼの標的となる。最も好ましくは、FVIII誘導体は、配列SFSQNSRHP SQNPPVLKRHQ Rを有するペプチドが重鎖のC末端に結合しているBドメイン欠失第VIII因子化合物である。この第VIII因子類似体は、66個のグルタミン残基を有する。トランスグルタミナーゼは、ストレプトマイセス・モバラエンス(*Streptomyces mobaraense*)由来のトランスグルタミナーゼであり、この酵素が標的とするグルタミン残基の数は1~20個である。

40

【 0 0 2 0 】

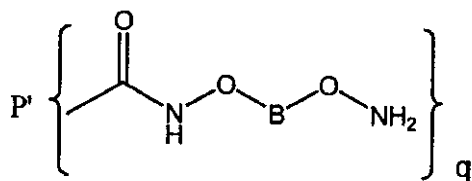
本発明の方法の第1ステップは、第VIII因子を、トランスグルタミナーゼの存在下で、式(III)のジヒドロキシルアミン化合物



と反応させるステップを含む。トランスグルタミナーゼは、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖と、式(III)のジヒドロキシルアミン化合物のアミン基との反応を触媒して、式(II)の第VIII因子誘導体をもたらす。

【 0 0 2 1 】

【化5】



(II)

【0022】

[式中、

BはC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルキレンを表し、

qは1～20の範囲の整数を表し、

P'は、第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からq個のカルバモイル基を除去することによって得られた、第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカルを表す]。

【0023】

一実施形態では、Bは-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-である。

【0024】

当業者には明らかになる通り、式(II)の第VIII因子誘導体の形成は、第VIII因子上のグルタミン残基の「q」個の側鎖の反応を伴う。したがって各第VIII因子分子は、ジヒドロキシルアミン化合物の「q」個の分子と反応する。

【0025】

一般にこの反応ステップは、水溶液、好ましくは緩衝水溶液中で実施される。適切な緩衝液は、当業者に公知である。前記溶液の温度は、一般に0～60、好ましくは20～40である。

【0026】

修飾されるグルタミン残基の数は、一方がFVIIIまたはFVIII類似体であり、他方がビスヒドロキシルアミン試薬である反応物のそれぞれの濃度によって制御することができる。同様に、酵素の濃度(活性において測定される)およびトランスグルタミナーゼの起源を使用して、反応度、1つまたは複数の修飾部位、および反応速度を制御することができる。

【0027】

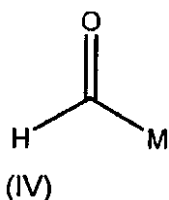
粗生成物は、一般に、イオン交換および/または限外濾過などの公知の技術によって精製される。

【0028】

本発明の方法の第2ステップは、式(II)の第VIII因子誘導体を、式(IV)のアルデヒド

【0029】

【化6】



【0030】

と反応させるステップを含む。

【0031】

式(IV)のアルデヒドと、式(II)の第VIII因子誘導体上の1つまたは複数の-C(O)-NH-O-B-O-NH<sub>2</sub>部分とが反応して、式(I)の第VIII因子誘導体を形成する。

【0032】

10

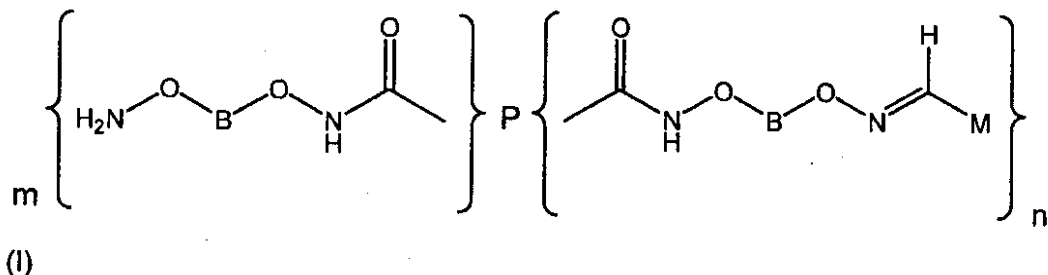
20

30

40



## 【化 7】



## 【 0 0 3 3 】

10

当業者は、先のステップに適した反応条件を容易に決定することができる。正確な反応条件は、置換基Mの性質によって決まることになる。一般に前記反応は、水溶液、好ましくは緩衝水溶液中で生じる。好ましくは、例えばpH6.0~8.5、より好ましくはpH6.3~7.5などの、FVIIIが安定である、オキシムの形成に適したpHが使用される。適切な緩衝液は、当業者に公知である。前記溶液の温度は、一般に0~60、好ましくは20~40である。公知の技術によって反応をモニタして、最適な反応またはインキュベーション時間を決定することができる。粗生成物は一般に、その後のステップの前に、イオン交換および/または限外濾過などの公知の技術によって精製される。

## 【 0 0 3 4 】

20

式(II)の第VIII因子誘導体は、式(I)の第VIII因子誘導体の形成における有用な中間体である。

## 【 0 0 3 5 】

式(I)の第VIII因子誘導体のmとnの合計は、それが調製される式(II)の第VIII因子誘導体のqに等しい。したがって、(i)式(II)の第VIII因子誘導体のq個の-C(O)-NH-O-B-O-NH<sub>2</sub>部分の内のn個は、式(IV)のアルデヒドと反応し、(ii)式(II)の第VIII因子誘導体のq個の-C(O)-NH-O-B-O-NH<sub>2</sub>部分の内のm個は、式(IV)のアルデヒドとは反応しない。したがって、式(II)の第VIII因子誘導体の各分子は、式(IV)のアルデヒドのn個の分子と反応する。

## 【 0 0 3 6 】

式(II)の化合物では、qは1~20の整数を表す。一般に、qは1~15の整数を表す。好ましくは、qは1~10の整数を表す。より好ましくは、qは1~6の整数を表す。

30

## 【 0 0 3 7 】

式(I)の化合物では、mは0または1~19の整数を表し、nは1~20の整数を表し、mとnの合計は1~20である。好ましくは、mは0または1~14の整数を表し、nは1~15の整数を表し、mとnの合計は1~15である。より好ましくは、mは0または1~9の整数を表し、nは1~10の整数を表し、mとnの合計は1~10である。最も好ましくは、mは0または1~5の整数を表し、nは1~6の整数を表し、mとnの合計は1~6である。

## 【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される場合、薬学的に許容される塩は、薬学的に許容される酸または塩基との塩である。薬学的に許容される酸には、塩酸、硫酸、リン酸、二リン酸、臭化水素酸または硝酸などの無機酸、およびクエン酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、酒石酸、安息香酸、酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸またはp-トルエンスルホン酸などの有機酸の両方が含まれる。薬学的に許容される塩基には、アルカリ金属(例えば、ナトリウムまたはカリウム)およびアルカリ土類金属(例えば、カルシウムまたはマグネシウム)の水酸化物、ならびにアルキルアミン、アラルキルアミンおよび複素環式アミンなどの有機塩基が含まれる。

40

## 【 0 0 3 9 】

先に論じた誘導体の第VIII因子活性は、一般に、活性化ヒト第VIII因子の活性と実質的に同じである。「FVIII活性」は、凝固カスケードにおいて機能し、第IXa因子との相互反応を介して活性化血小板上での第Xa因子の形成を誘発し、血餅の形成を支持する能力と定義される。第VIII因子活性は、例えば、ManucciおよびTripodi、「Factor VIII clotting

50

activity」、E. C. A. T. assay procedures、London: Kluwer Academic Publishers、1999年に記載の血餅分析、Hemkerら、「The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma.」、Thrombosis and haemostasis、第83巻: 589~591頁に記載の内因性トロンビンの電位解析、および当業者に公知の他の技術などの技術によって、インビトロで評価することができる。

【0040】

したがって一般に、本発明の第VIII因子誘導体をスクリーニングして、活性化ヒト第VIII因子と実質的に同じ活性を維持しているかどうかを評価することになる。

【0041】

本明細書で使用される場合、活性化ヒト第VIII因子の活性と実質的に同じ第VIII因子の活性とは、第VIII因子の活性が、ヒト第VIII因子の活性の少なくとも100%などの、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%であることを意味する。第VIII因子の活性は、特に、ヒト第VIII因子の活性の約50~約75%、約75~約85%、約85~約95%であり、さらには100%を超える。

【0042】

トランスグルタミナーゼ

用語「トランスグルタミナーゼ」は、本明細書で使用される場合、種類EC2.3.2.13の酵素を指す。有用なトランスグルタミナーゼの例には、微生物のトランスグルタミナーゼ、一般にストレプトマイセス・モバラエンス、ストレプトマイセス・シナモネウム(*Streptomyces cinnamoneum*)およびストレプトマイセス・グリセオカルネウム(*Streptomyces griseocarneum*)(すべて参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第5,156,956号に開示されている)、ストレプトマイセス・ラベンデュラ(*Streptomyces lavendulae*)(参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第5,252,469号に開示されている)またはストレプトマイセス・ラダカヌム(*Streptomyces ladakanum*)(参照によって本明細書に組み込まれるJP-A-2003199569)に由来のものが含まれる。かつてのストレプトベルティシリウム(*Streptovorticillium*)属のメンバーは、現在ストレプトマイセス属に含まれることに留意されたい[Kaempfer, J. Gen. Microbiol., 137, 1831~1892頁、1991年]。

【0043】

有用な微生物のトランスグルタミナーゼの他の例は、枯草菌(*Bacillus subtilis*)(参照によって本明細書に組み込まれるUS5,731,183に開示されている)および様々な粘菌類(*Myxomycetes*)から単離されたものである。有用な微生物のトランスグルタミナーゼの他の例は、共に参照によって本明細書に組み込まれるWO96/06931(例えば、バチルスリジクス(*Bacillus lydicus*)のトランスグルタミナーゼ)およびWO96/22366に開示されているものである。

【0044】

有用な非微生物のトランスグルタミナーゼには、モルモットの肝臓のトランスグルタミナーゼ、ならびに平らな魚のマダイ(*Pagrus major*)(参照によって本明細書に組み込まれるEP-A-0555649に開示されている)および日本の牡蠣であるマガキ(参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第5,736,356号に開示されている)のような様々な海産物供給源に由来するトランスグルタミナーゼが含まれる。

【0045】

列挙すべき他のトランスグルタミナーゼは、ヒトのトランスグルタミナーゼTG2、TG3、TG7またはFXIIIである。

【0046】

他の有用な非微生物のトランスグルタミナーゼは、ヒトのトランスグルタミナーゼTG1およびTG6である。

【0047】

ストレプトマイセス・モバラエンス由来のトランスグルタミナーゼが好ましい。

【0048】

10

20

30

40

50

## 第VIII因子

第VIII因子の成熟分子は、2332個のアミノ酸からなり、これらは3つの相同なAドメイン、2つの相同なCドメインおよび1つのBドメインに分類することができ、A1-A2-B-A3-C1-C2の順に配列している。単鎖第VIII因子は、血漿への分泌の最中、B-A3の境界およびBドメイン内の様々な部位で切断されるため、細胞内でプロセッシングを受けて、金属イオン結合した一連のヘテロ二量体になる。このプロセッシングにより、A1、A2およびBドメインの様々な部分からなり、90kDa～200kDaの範囲の分子の大きさを有する重鎖が生じる。重鎖は、A3、C1およびC2ドメインからなる軽鎖に金属イオンを介して結合している。血漿中では、このヘテロ二量体の第VIII因子は、フォンビルブランド因子(vWF)と高親和性で結合し、それによりフォンビルブランド因子を早熟な異化作用から保護する。vWFに結合した非活性化第VIII因子の半減期は、血漿中で約12時間である。

10

## 【0049】

血液凝固過程中、第VIII因子は、重鎖内のアミノ酸Arg372およびArg740、ならびに軽鎖内のArg1689における第Xa因子およびトロンビンによるタンパク分解性切断によって活性化され、その結果、フォンビルブランド因子が放出され、活性化第VIII因子ヘテロ三量体が生成され、それによりこの三量体が、Ca<sup>2+</sup>が存在するという条件下で、リン脂質表面において第IXa因子および第X因子とのテナーゼ複合体を形成することになる。ヘテロ三量体は、50kDaの断片であるA1ドメイン、43kDaの断片であるA2ドメイン、および73kDaの断片である軽鎖(A3-C1-C2)からなる。したがって、第VIII因子の活性型(第VIII因子a)は、トロンビンにより切断されたA3-C1-C2軽鎖に、二価の金属イオン結合を介して連結したA1サブユニットと、A1およびA3ドメインに相対的に緩く連結した遊離A2サブユニットとからなる。

20

## 【0050】

Bドメインから派生した小型リンカーと結合した第VIII因子の重鎖(HC)および軽鎖(LC)からなる第VIII因子分子(Bドメインが欠失した第VIII因子またはBDD-FVIII)は、全長の(未変性の)第VIII因子の生物活性を保持している。

## 【0051】

本明細書で使用される場合、用語「第VIII因子」は、治療上有用な、例えば出血を予防または治療するのに有効な任意の第VIII因子ポリペプチドを含む。これには、それに限定されるものではないが、野生型ヒト第VIII因子、混成ヒト/ブタ第VIII因子、Bドメインが欠失したヒト第VIII因子および部分的にBドメインが欠失したヒト第VIII因子が含まれる。

30

## 【0052】

用語「第VIII因子」は、それに限定されるものではないが、Tooleら、Nature 1984、312:342～347頁に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド(野生型ヒト第VIII因子)、ならびに例えば、ウシ、ブタ、イヌ、マウスおよびサケの第VIII因子などの他の種に由来する野生型第VIII因子を包含することを企図する。この用語はさらに、個人によって存在したり生じたりすることがある第VIII因子の自然対立遺伝子変異を包含する。また、グリコシル化または他の翻訳後修飾の程度および位置は、選択される宿主細胞および宿主細胞の環境の性質に応じて変わり得る。用語「第VIII因子」は、切断されていない(酵素前駆体)形態を包含し、タンパク分解性のプロセッシングを受けて、第VIII因子aと指定され得るそれらのそれぞれの生物活性形態をもたらすものを包含することも企図する。

40

## 【0053】

用語「第VIII因子」は、わずかに修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、例えばN末端アミノ酸の欠失もしくは付加を含む被修飾N末端を有するポリペプチド、および/またはヒト第VIII因子に対して化学的に修飾されているポリペプチドを包含することを企図する。用語「第VIII因子」は、第VIII因子の変異体を含むことを企図し、野生型第VIII因子と実質的に同じ生物活性、またはそれより高い生物活性を示すか、あるいは野生型第VIII因子に対して実質的に修飾された生物活性、またはそれより低い生物活性を示すかにかかわらず、それに限定されるものではないが、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失

50

または置換によって野生型第VIII因子の配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0054】

第VIII因子の非限定的な例には、例えばFulcherら；Proc. Acad. Nat. Sci. USA 1982年；79:1648～1652頁およびRotblatら；Biochemistry 1985年；24:4294～4300頁に記載の血漿由来のヒト第VIII因子、ならびに例えばFassら；Blood 1982年；59:594～600頁およびKnutsonら；Blood 1982年；59:615～624頁に記載の血漿由来のブタFVIIIが含まれる。第VIII因子配列変異体の非限定的な例は、例えばLollarら；Blood 2000年；95(2):564～568頁(混成ブタ/ヒトFVIIIポリペプチド)およびLollarら；Blood 2001年；97(1):169～174頁に記載されている。

10

【0055】

第VIII因子のcDNAクローニング(Wood, W.I.ら(1984年) Nature 312、330～336頁；Vehar, G.A.ら(1984年) Nature 312、337～342頁)によって、第VIII因子を組換えにより発現させて、いくつかの組換え第VIII因子生成物を開発することが可能になり、これは規制機関によって1992年～2003年の間承認された。アミノ酸Arg-740とGlu-1649の間に存在する第VIII因子ポリペプチド鎖の中心であるBドメインが完全な生物活性にとって必要でないと思われることも、Bドメインが欠失した第VIII因子の開発につながっている。Kjalke M、Heding A、Talbo G、Persson E、Thomsen JおよびEzban M (1995年)、「Amino acid residues 721-729 are required for full Factor VIII activity」、Eur. J. Biochem: 234: 773～779頁も参照されたい。第VIII因子は、本明細書で使用される場合、1つまたは複数のドメインまたは領域が欠失しているものを含む、第VIII因子のすべての変異体を含む。

20

【0056】

トランスグルタミナーゼの触媒作用の下で反応するグルタミン残基の位置は、例えばトリプシンなどの適切な酵素で直接消化させ、その後ペプチドマッピングすることによって、または例えばビオチンなどのレポーター基もしくは例えばAlexa 488などの蛍光基を用いてペプチドマッピングすることによって決定し得る。一般に、第VIII因子が、ストレプトマイセス・モバラエンス由来のトランスグルタミナーゼと反応する場合、式(1)に示したグルタミン残基のほとんどは、第VIII因子の重鎖内のグルタミン残基の側鎖に由来するものである。好ましくは、前記グルタミン残基は、ほとんどA1ドメインに存在する。

【0057】

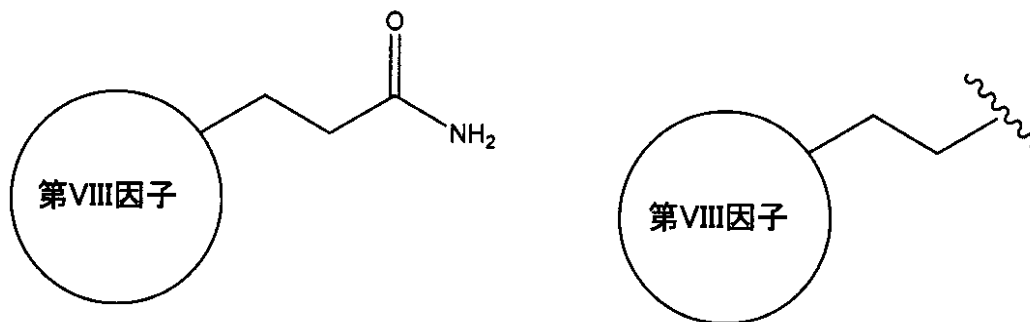
本明細書で使用される場合、カルバモイル基という用語は、例えばグルタミン残基の側鎖に存在するようなラジカル-C(O)-NH<sub>2</sub>を指す。本明細書で使用される場合、用語「第VIII因子のグルタミン残基の側鎖からn+m個またはq個のカルバモイル基を除去することによって得られた第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカル」は、n+m個またはq個の-C(O)-NH<sub>2</sub>基が、グルタミン残基の側鎖から形式上除去されることを意味する。当業者には理解される通り、これらの用語の使用は、グルタミン残基の炭素-炭素結合が切断されることを示すのではなく、単に本明細書で使用される「第VIII因子のモノラジカルまたはポリラジカル」の定義が、1つまたは複数のグルタミン残基のカルバモイル部分を含まないことを示すものである。これを以下に例示する。

30

【0058】

40

## 【化 8】



10

## 【0059】

左の図は、グルタミン側鎖を有する第VIII因子分子を示す。右の図は、「第VIII因子のグルタミン残基の側鎖から1つのカルボモイル基を除去することによって得られた第VIII因子のモノラジカル」を示す。

## 【0060】

第VIII因子誘導体の血漿内半減期を増大させる部分(M<sup>1</sup>)

式(II)の第VIII因子誘導体と式(IV)のアルデヒドの反応によって、部分Mを第VIII因子に導入する。一実施形態では、Mは、第VIII因子誘導体の血漿内半減期を増大させる部分(M<sup>1</sup>)である。

20

## 【0061】

第VIII因子は、いくつかのクリアランス部位を有する。本明細書で使用される場合、用語「クリアランス部位」は、タンパク質分解に関与する生理的な機構によって認識される第VIII因子分子上の領域と定義される。したがって、第VIII因子の半減期は、置換基M<sub>1</sub>の導入により前記クリアランス部位を破壊することによって増大させることができる。「破壊されたクリアランス部位」は、前述の修飾の結果、同族受容体または相互反応パートナーとの結合が弱まった第VIII因子分子上のクリアランス部位と定義される。

## 【0062】

したがって、第VIII因子の血漿内半減期は、クリアランス部位を破壊する1つまたは複数の部分を第VIII因子に導入することによって改善することができる。かかる部分は一般に、第VIII因子上の1つまたは複数のクリアランス部位を隠し、覆い、または覆い隠す。したがって一実施形態では、本発明は、血漿内半減期が改善された第VIII因子誘導体を提供する。この改善は、対応する未修飾第VIII因子に関するものである。

30

## 【0063】

第VIII因子または第VIII因子誘導体の血漿内半減期は、インビボ血漿内半減期を測定することによって決定される。ヒト第VIII因子は、約12~14時間の血漿内半減期を有する。「インビボ血漿内半減期」は、第VIII因子または第VIII因子誘導体の50%が、血漿または血液流内をそれが除去されるまで循環している時間である。血漿内半減期の決定は、一般に、機能的半減期を決定するよりも簡単であり、血漿内半減期の規模は、通常、機能的インビボ半減期の規模の良好な指標になる。血漿内半減期の代替用語には、血清半減期、循環半減期、循環性半減期、血清クリアランス、血漿クリアランスおよびクリアランス半減期が含まれる。

40

## 【0064】

血漿内半減期と併用される用語「増大」は、関連する第VIII因子誘導体の半減期が、未修飾第VIII因子の半減期に対して、同程度の条件下で決定して統計的に有意に増大することを示すために使用される。例えば、関連する半減期は、少なくとも約50%などの少なくとも約25%、例えば少なくとも約100%、150%、200%、250%または500%増大し得る。一実施形態では、本発明の第VIII因子誘導体は、親第VIII因子の半減期に対して少なくとも約5時間、好ましくは少なくとも約24時間、より好ましくは少なくとも約72時間、最も好ましくは少なくとも約7日の半減期の増大を示す。

50

## 【0065】

用語「親第VIII因子」は、本明細書で使用される場合、問題の第VIII因子誘導体が由来する特定の第VIII因子を指す。

## 【0066】

インビボ血漿内半減期の測定は、文献に記載のいくつかの方法で実施することができる。インビボ血漿内半減期の増大は、クリアランス(CL)の減少または平均滞留時間(MRT)の増大として定量化することができる。CLが、適切なアッセイで決定して、親第VIII因子のCLの50%未満、20%未満、10%未満などの70%未満に低減する本発明の第VIII因子誘導体は、インビボ血漿内半減期が増大するとされる。MRTが、適切なアッセイにおいて、親第VIII因子のMRTの150%超、200%超、500%超などの130%超に増大する本発明の第VIII因子誘導体は、インビボ血漿内半減期が増大するとされる。クリアランスおよび平均滞留時間は、適切な試験動物を使用して標準の薬物動態試験で評価することができる。当業者は、所与のタンパク質に適した試験動物を選択することができる。当然のことながら、ヒトにおける試験が最終試験となる。一般に、また一例として、マウス、ラット、イヌ、サルまたはブタに、対象となる化合物が注射される。注射量は試験動物に応じて変わる。その後、CLおよびMRTの評価に適した1~5日の期間にわたって、血液サンプルを収集する。血液サンプルは、ELISA技術によって好都合に分析される。

10

## 【0067】

M<sup>1</sup>は、一般に、1つまたは複数の親水性のポリマーまたは血漿タンパク質バインダーを含む。ポリマーは、例えばポリエチレングリコール(PEG)部分などの化学的ポリマーであってよく、またはポリマーは、例えば、多糖、ポリシアル酸部分、ヒアルロン酸部分もしくはポリペプチドなどのバイオポリマーであってよい。多糖の例はポリシアル酸である。ある種類のアミノ酸からなるポリペプチドの例は、ポリ-Glyである。様々なアミノ酸からなるポリペプチドを本発明の例として使用することもできる。好ましくは、M<sup>1</sup>は、(a)1つのPEG部分、ポリシアル酸ポリペプチドもしくは血漿タンパク質バインダー、(b)1つのPEG部分および1つの血漿タンパク質バインダー、(c)1つのPEG部分および1つのポリペプチド、(d)1つのポリペプチドおよび1つの血漿タンパク質バインダー、(e)1つのポリシアル酸部分および1つの血漿タンパク質バインダー、または(f)1つのポリシアル酸部分および1つのポリペプチドを含む。

20

## 【0068】

用語「PEG」は、本明細書で使用される場合、ポリエーテルであるポリ(エチレンオキシド)(PEO)またはポリオキシエチレン(POE)としても公知のポリ(エチレングリコール)を指す。PEGは、エチレンオキシドの重合によって調製され、300~10,000,000g/molの広範な分子量にわたって市販されている。

30

## 【0069】

重合過程に使用される開始剤に応じて、異なる形態のPEGも利用可能である。PEGの最も一般的な形態は、mPEGと略される単官能性メチルエーテルPEG(メトキシポリ(エチレングリコール))である。

## 【0070】

直鎖および分岐PEGなどの異なる形状のPEGも利用可能である。

40

## 【0071】

PEGは、構造HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)<sub>n</sub>-H、分子式C<sub>2n</sub>H<sub>4n+2</sub>O<sub>n+1</sub>、およびCAS番号[25322-68-3]を有する。モル質量は、当然のことながらnによって決まる。

## 【0072】

名称PEGにしばしば含まれる数は、それらの平均分子量を示し、例えばn=80のPEGであれば、約3500ダルトンの平均分子量を有し、PEG 3500と表示され得る。

## 【0073】

ほとんどのPEGは、ある分子量分布を有する分子を含み、すなわち多分散系である。粒度分布は、その重量平均分子量(Mw)およびその数平均分子量(Mn)によって統計的に特徴付けることができ、この比は多分散指数(Mw/Mn)と呼ばれる(例えば、「Polymer Synthesis

50

and Characterization」、J. A. Nairn、University of Utah、2003年参照)。MwおよびMnは、質量分析法によって測定することができる。

【0074】

したがって、多分散指数は1以上の数であり、ゲル浸透クロマトグラフィーによるデータからも推定され得る。多分散指数が1である場合、その生成物は単分散系であり、したがって単一の分子量を有する化合物から構成される。多分散指数が1を超える場合、そのポリマーは多分散系であり、多分散指数は、様々な分子量を有するポリマー分布がどれくらい広いを示す。多分散指数は一般に、PEGまたはmPEGの分子量に伴い増加する。

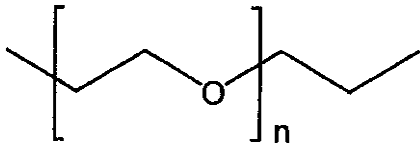
【0075】

本発明の目的では、用語「PEG」および「Peg」は交換可能に使用され、基本的に、構造

10

【0076】

【化9】



【0077】

を含むラジカルまたはジラジカルを意味し、式中、nは1を超える整数である。

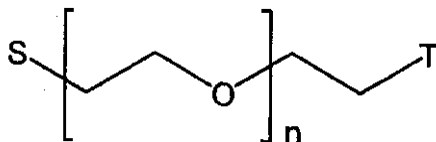
【0078】

20

用語PEGは、ポリ(エチレングリコール)ならびにポリ(エチレングリコール)モノアルキルエーテルを示すことを企図し、このアルキルは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルなどのC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキルを示す。したがって、好ましい一実施形態では、本発明に従って使用されるPegは次式によって表され、

【0079】

【化10】



30

【0080】

式中、nは1を超える整数であり、SおよびTは独立に、アルキルオキシ、ヒドロキシを示すか、または存在しない。先に説明した通り、Sがメチルオキシを示し、Tが存在しないこの式の化合物は、mPEGとも呼ばれる。

【0081】

本発明に従って使用されるPEGの分子量は、好ましくは約100Da～約1000000Daである。Pegの分子量であるkDaは、括弧で示されることがある。例えばmPEG(30k)は、約30kDaの分子量を有するポリ(エチレングリコール)モノメチルエーテルを示す。このポリマーは、ちなみに約680±100個のエチレングリコール単位から構成され得る。別の例として、mPEG(4k)では、nは90であり、分子量は3991Daであり、すなわち約4kDaである。同様に、mPEG(20k)は20kDaの平均分子量を有し、nの平均は454である。

40

【0082】

本発明に従って使用されるPEGは、直鎖または分岐である。特定の実施形態では、本発明に従って使用されるPEGは、a)多分散系またはb)単分散系である。特定の実施形態では、本発明に従って使用されるPegの多分散指数は、i)1.06未満、ii)1.05未満、iii)1.04未満、iv)1.03未満、またはv)1.02～1.03である。

【0083】

M<sup>1</sup>内に存在するポリシアル酸は、好ましくは8～100kD、好ましくは20～40kDの分子量の、(2-8)ケトシド結合(コロミン酸)を有するN-アセチルノイラミン酸のホモポリマーで

50

ある。

【0084】

M<sup>1</sup>内に存在するポリペプチドは、好ましくは血漿タンパク質である。用語「血漿タンパク質」は、本明細書で使用される場合、アルブミン、抗体およびフィブリノゲンを指し、好ましくはアルブミンおよび抗体を指す。

【0085】

用語「アルブミン」は、本明細書で使用される場合、血清由来の血清アルブミンを指し、これには、ヒト血清アルブミンならびに他の供給源由来の血清アルブミンが含まれる。用語「アルブミン」は、本明細書で使用される場合、アルブミンの任意の誘導体またはアルブミンの修飾型を含む。

10

【0086】

抗体は、ヒト抗体またはキメラ抗体であってよい。抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。好ましくは、抗体はIgG1(例えば、IgG1、1)、IgG3(例えば、IgG3、3)およびIgG4(例えば、IgG4、4)抗体である。しかし、IgG2、IgM、IgA1、IgA2、分泌IgA、IgDおよびIgEを含む他の抗体アイソタイプも本発明に包含される。かかる抗体の適切な抗原結合断片には、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、単鎖Fv断片または二重特異性抗体が含まれる。さらに、抗原結合断片には、(i)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合する結合ドメインポリペプチド(重鎖可変領域または軽鎖可変領域など)、(ii)ヒンジ領域と融合した免疫グロブリン重鎖CH2一定領域、および(iii)CH2一定領域と融合した免疫グロブリン重鎖CH3一定領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質が含まれる。かかる結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、US2003/0118592およびUS2003/0133939にさらに開示されている。あるいは、断片は抗体の一定領域を含むことができ、したがって断片は、Fc断片またはその一部であってよい。

20

【0087】

用語「血漿タンパク質バインダー」は、本明細書で使用される場合、血漿タンパク質、特にアルブミンに結合することができる任意の部分指す。アルブミンに結合する部分は、「アルブミンバインダー」である。化合物のアルブミンとの結合能は、参照によって本明細書に組み込まれるJ. Med. Chem. 43、2000年、1986~1992頁に記載の通り決定することができる。本発明の文脈では、化合物は、Ru/Daが0.10超、0.12超、さらには0.15超などの0.05を超える場合に、アルブミンと結合すると定義される。アルブミンバインダーは、一般に、好ましくは脂肪酸に由来する高疎水性の分子である。したがって、アルブミンバインダーは、好ましくは-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-部分を含むことになる。

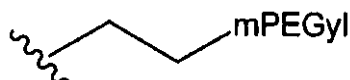
30

【0088】

PEG部分を含む好ましい部分(M<sub>1</sub>)は、

【0089】

【化11】



【0090】

であり、式中、mPEGylは多分散系であり、約20kDaの分子量を有する。

40

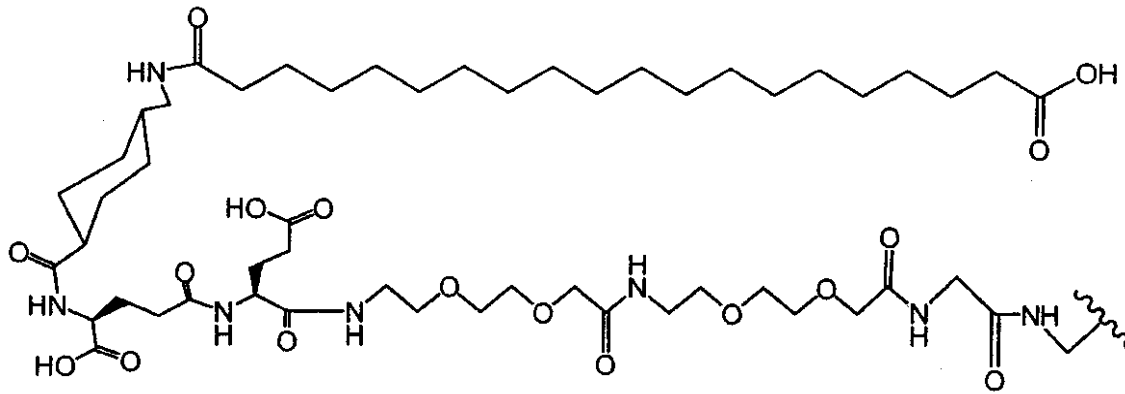
【0091】

アルブミンバインダーを含む好ましい部分(M<sub>1</sub>)は、

【0092】



【化 1 2】



10

【 0 0 9 3】

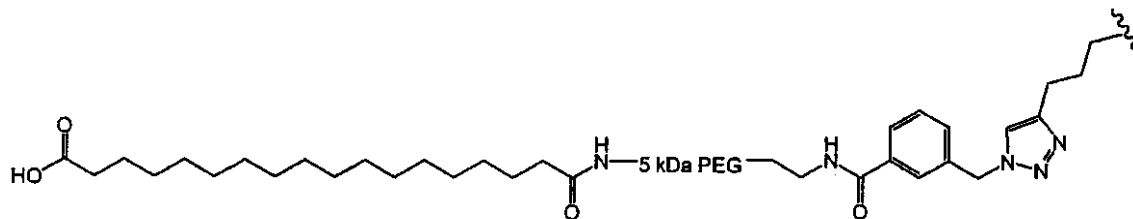
である。

【 0 0 9 4】

PEG部分およびアルブミンバインダーを含む好ましい部分(M<sub>1</sub>)は、

【 0 0 9 5】

【化 1 3】



20

【 0 0 9 6】

である。

【 0 0 9 7】

レポーター部分(M<sup>2</sup>)

式(II)の第VIII因子誘導体と式(IV)のアルデヒドとの反応によって、部分Mが第VIII因子に導入される。一実施形態では、Mはレポーター部分(M<sup>2</sup>)である。1つまたは複数のレポーター部分(M<sup>2</sup>)を担持する式(II)の第VIII因子誘導体は、一般に、活性化ヒト第VIII因子と実質的に同じ活性を有する。用語「活性化ヒト第VIII因子と実質的に同じ活性」は、先に定義の意味を有する。

30

【 0 0 9 8】

レポーター部分(M<sup>2</sup>)は、第VIII因子誘導体を検出できるようにする任意の適切な標識を含むことができる。適切な標識は当業者に周知であり、それには、ビオチン；フルオレセインラジカル、ローダミンラジカル、Texas Red(登録商標)ラジカル、Alex Fluor 488などのAlexa Fluor(登録商標)色素およびフィコピリンタンパク質ラジカルなどの蛍光マーカー；放射性同位体、例えばCu-64、Ga67、Ga-68、Zr-89、Ru-97、Tc-99、Rh-105、Pd-109、In-111、I-123、I-125、I-131、Re-186、Re-188、Au-198、Pb-203、At-211、Pb-212およびBi-212；ならびにp-酢酸ニトロフェノールラジカルなどの酵素基質が含まれる。ビオチンまたは蛍光マーカーを含むレポーター部分が好ましい。

40

【 0 0 9 9】

ビオチン標識は、当業者に公知の、一般にストレプトアビジン(streptavidin)を使用するアッセイ、例えばALISAアッセイを使用して、容易に検出または認識され得る。蛍光標識は、やはり当業者に公知の、例えばフローサイトメトリーを使用するアッセイを使用して検出または認識され得る。放射性同位体は、やはり当業者に公知のアッセイを使用して検出または認識され得る。

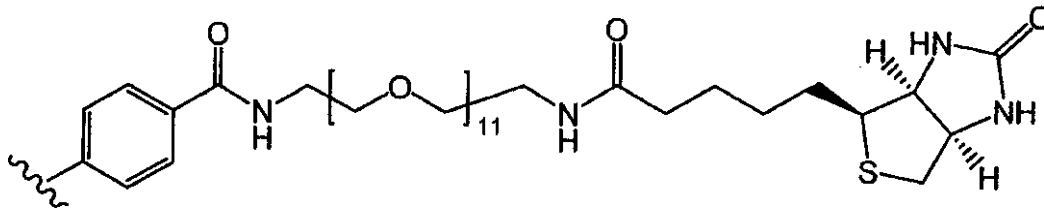
【 0 1 0 0】

50

ビオチンを含む好ましいレポーター部分(M<sup>2</sup>)は、

【0101】

【化14】



10

【0102】

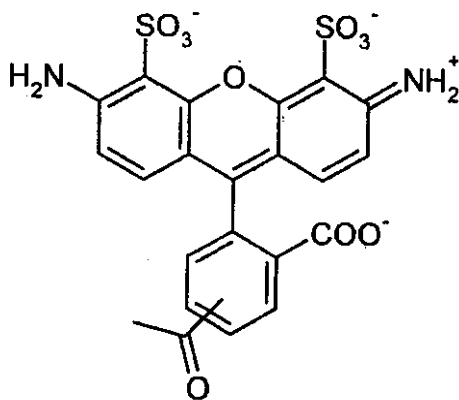
である。

【0103】

好ましいレポーター部分(M<sup>2</sup>)は、Invitrogenから市販のAlexaシリーズの色素である。これに関して好ましい色素は、Alexa 488である。Alexa 488を結合させるためのいくつかの試薬は、Invitrogenから市販されている。この色素は、その蛍光により容易に検出することができ、励起495nmおよび発光519nmで観測され得る。Alexa 488の一般構造は、

【0104】

【化15】



20

30

【0105】

である。

【0106】

ジヒドロキシルアミン試薬

本発明で使用するジヒドロキシルアミン化合物は、式(III)

H<sub>2</sub>N-O-B-O-NH<sub>2</sub> (III)

の化合物であり、式中、BはC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルキレンを表す。前記C<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルキレンは、直鎖または分岐アルキレン、好ましくは直鎖である。Bは、一般にC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキレン、好ましくはC<sub>2</sub>~C<sub>4</sub>アルキレンを表す。Bは、好ましくはn-エチレン、n-プロピレンまたはn-ブチレン基、最も好ましくはn-プロピレン基である。したがって、好ましいジヒドロキシルアミン化合物は、1,3-ジアミノオキシプロパンである。

40

【0107】

式(III)のジヒドロキシルアミン化合物は、当業者に公知の技術により公知の方法と類似の方法によって、市販の試薬から容易に調製される。

【0108】

医薬組成物

本発明はまた、式(I)の第VIII因子誘導体を含む医薬組成物に関する。一般に、前記医薬組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤をさらに含む。

【0109】

50

好ましい薬学的に許容される担体または賦形剤は、緩衝水溶液である。したがって本発明は、第VIII因子誘導体および緩衝液の水溶液を含む医薬製剤に関し、第VIII因子誘導体は、0.01mg/ml以上の濃度で存在し、前記製剤は、約2.0～約10.0のpHを有する。

#### 【0110】

一般に、緩衝液は、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リシン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム、およびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(aminomethan)、ピシン、トリシン、リンゴ酸、コハク酸塩、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸またはその混合物からなる群から選択される。これらの特定の緩衝液のそれぞれは、本発明の代替の一実施形態を構成する。

10

#### 【0111】

一般に、製剤は、薬学的に許容される保存剤をさらに含む。本発明のさらなる一実施形態では、保存剤は、フェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、2-フェノキシエタノール、p-ヒドロキシ安息香酸ブチル、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノールおよびチメロサル(thiomerosal)、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロルヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレソール、p-ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン(3p-クロルフェノキシプロパン-1,2-ジオール)またはその混合物からなる群から選択される。本発明のさらなる一実施形態では、保存剤は、0.1mg/ml～20mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、保存剤は、0.1mg/ml～5mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、保存剤は、5mg/ml～10mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、保存剤は、10mg/ml～20mg/mlの濃度で存在する。これらの特定の保存剤のそれぞれは、本発明の代替の一実施形態を構成する。医薬組成物における保存剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照する。

20

#### 【0112】

一般に、製剤は、等張剤をさらに含む。本発明のさらなる一実施形態では、等張剤は、塩(例えば、塩化ナトリウム)、糖もしくは糖アルコール、アミノ酸(例えば、L-グリシン、L-ヒスチジン、アルギニン、リシン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニン)、アルジトール(例えば、グリセロール(グリセリン)、1,2-プロパンジオール(プロピレングリコール)、1,3-プロパンジオール、1,3-ブタンジオール)ポリエチレングリコール(例えばPEG400)、またはその混合物からなる群から選択される。単糖、二糖もしくは多糖などの任意の糖、または例えばフルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプンおよびカルボキシメチルセルロース-Naを含む水溶性グルカンを使用することができる。一実施形態では、糖添加剤はスクロースである。糖アルコールは、少なくとも1つの-OH基を有するC<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>炭化水素と定義され、これには、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、ダルシトール、キシリトールおよびアラビトールが含まれる。一実施形態では、糖アルコール添加剤はマンニトールである。前述の糖または糖アルコールは、個々にまたは組み合わせて使用することができる。糖または糖アルコールが液体調製物に可溶性であり、本発明の方法を使用して達成される安定化作用に対して有害に作用しない限り、その使用量は制限されない。一実施形態では、糖または糖アルコールの濃度は、約1mg/ml～約150mg/mlである。本発明のさらなる一実施形態では、等張剤は、1mg/ml～50mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、等張剤は、1mg/ml～7mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、等張剤は、8mg/ml～24mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、等張剤は、25mg/ml～50mg/mlの濃度で存在する。これらの特定の等張剤のそれぞれは、本発明の代替の一実施形態を構成する。医薬組成物における等張剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照する。

30

40

50

## 【0113】

一般に、製剤は、キレート剤をさらに含む。本発明のさらなる一実施形態では、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸およびアスパラギン酸の塩、ならびにその混合物から選択される。本発明のさらなる一実施形態では、キレート剤は、0.1mg/ml ~ 5mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、キレート剤は、0.1mg/ml ~ 2mg/mlの濃度で存在する。本発明のさらなる一実施形態では、キレート剤は、2mg/ml ~ 5mg/mlの濃度で存在する。これらの特定のキレート剤のそれぞれは、本発明の代替の一実施形態を構成する。医薬組成物におけるキレート剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照する。

## 【0114】

一般に、製剤は、安定剤をさらに含む。医薬組成物における安定剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照する。

## 【0115】

一般に、本発明の医薬組成物は、組成物の保存中にポリペプチドによる凝集体の形成を低減するのに十分な量のアミノ酸塩基をさらに含むことができる。「アミノ酸塩基」とは、任意の所与のアミノ酸が、その遊離塩基形態またはその塩の形態のいずれかで存在する、アミノ酸またはアミノ酸の組合せを企図する。アミノ酸の組合せが使用される場合、アミノ酸のすべてがそれらの遊離塩基形態で存在してもよく、すべてがそれらの塩の形態で存在してもよく、またはいくらかがそれらの遊離塩基形態で存在し、他のものがそれらの塩の形態で存在してもよい。一実施形態では、本発明の組成物の調製に使用するアミノ酸は、アルギニン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸などの、荷電側鎖を担持しているアミノ酸である。特定のアミノ酸(例えば、グリシン、メチオニン、ヒスチジン、イミダゾール、アルギニン、リシン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニンおよびその混合物)の任意の立体異性体(すなわち、L、DまたはDL異性体)またはこれらの立体異性体の組合せは、該特定のアミノ酸が、その遊離塩基形態またはその塩の形態のいずれかで存在する限り、本発明の医薬組成物に存在することができる。一実施形態では、L-立体異性体を使用される。本発明の組成物は、これらのアミノ酸の類似体を用いて製剤化することもできる。「アミノ酸類似体」とは、本発明の液体医薬組成物の保存中にポリペプチドによる凝集体の形成を低減する所望の作用をもたらす、天然に生じるアミノ酸の誘導体を企図する。適切なアルギニン類似体には、例えば、アミノグアニジン、オルニチンおよびN-モノエチルL-アルギニンが含まれ、適切なメチオニン類似体には、エチオニンおよびブチオニンが含まれ、適切なシステイン類似体には、S-メチル-Lシステインが含まれる。アミノ酸類似体は、他のアミノ酸と同様に、それらの遊離塩基形態またはそれらの塩の形態のいずれかで組成物に組み込まれる。本発明のさらなる一実施形態では、アミノ酸またはアミノ酸類似体は、タンパク質の凝集を予防または遅延するのに十分な濃度で使用される。

## 【0116】

本発明のさらなる一実施形態では、治療剤として作用するポリペプチドが、メチオニンスルホキシドへの酸化を受けやすい少なくとも1つのメチオニン残基を含むポリペプチドである場合、メチオニン残基がメチオニンスルホキシドに酸化するのを阻害するために、メチオニン(または他の硫黄アミノ酸またはアミノ酸類似体)を添加することができる。「阻害する」とは、経時的にメチオニン酸化種の蓄積を最小限に抑えることを企図する。メチオニン酸化の阻害によって、ポリペプチドをその適切な分子形態で保持することができる。メチオニンの任意の立体異性体(L、DまたはDL異性体)またはその組合せを使用することができる。添加する量は、メチオニンスルホキシドの量が規制機関に許容されるように、メチオニン残基の酸化を阻害するのに十分な量にすべきである。一般にこれは、組成物が、約10% ~ 約30%を超えないメチオニンスルホキシドを含有することを意味する。一般にこれは、添加するメチオニンとメチオニン残基の比が、10:1 ~ 約100:1などの約1:1 ~ 約1000:1の範囲になるように、メチオニンを添加することによって達成され得る。

10

20

30

40

50

## 【0117】

一般に、製剤は、高分子量ポリマーまたは低分子量化合物の群から選択される安定剤をさらに含む。本発明のさらなる一実施形態では、安定剤は、ポリエチレングリコール(例えば、PEG 3350)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、カルボキシ/ヒドロキシセルロースまたはその誘導体(例えば、HPC、HPC-SL、HPC-LおよびHPMC)、シクロデキストリン、モノチオグリセロール、チオグリコール酸および2-メチルチオエタノールなどの硫黄を含有する物質、ならびに様々な塩(例えば、塩化ナトリウム)から選択される。これらの特定の安定剤のそれぞれは、本発明の代替の一実施形態を構成する。

## 【0118】

医薬組成物はまた、該組成物中の治療活性のあるポリペプチドの安定性をさらに強化する追加の安定剤を含むことができる。本発明にとって特に関心の高い安定剤には、それに限定されるものではないが、メチオニン酸化からポリペプチドを保護するメチオニンおよびEDTA、ならびに凍結融解または機械的剪断に関連する凝集からポリペプチドを保護する非イオン性界面活性剤が含まれる。

## 【0119】

本発明のさらなる一実施形態では、製剤は界面活性剤を含む。界面活性剤は、洗浄剤、エトキシ化ヒマシ油、ポリグリコール化(polyglycolized)グリセリド、アセチル化モノグリセリド、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックポリマー(例えば、Pluronic(登録商標)F68、ボロキサマー-188および407、Triton X-100などのボロキサマー)、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アルキル化およびアルコキシル化誘導体などのポリオキシエチレンおよびポリエチレン誘導体(tween、例えば、Tween-20、Tween-40、Tween-80およびBrij-35)、モノグリセリドもしくはそのエトキシ化誘導体、ジグリセリドもしくはそのポリオキシエチレン誘導体、アルコール、グリセロール、レクチンおよびリン脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ジホスファチジルグリセロールおよびスフィンゴミエリン)、リン脂質の誘導体(例えば、ジパルミトイルホスファチジン酸)およびリゾリン脂質の誘導体(例えば、パルミトイルリゾホスファチジル-L-セリンおよびエタノールアミン、コリン、セリンまたはスレオニンの1-アシル-sn-グリセロ-3-リン酸エステル)、ならびにリゾホスファチジルおよびホスファチジルコリンのアルキル、アルコキシル(アルキルエステル)、アルコキシ(アルキルエーテル)誘導体、例えば、リゾホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンのラウロイルおよびミリストイル誘導体、ならびに極性頭部の修飾物、すなわちコリン、エタノールアミン、ホスファチジン酸、セリン、スレオニン、グリセロール、イノシトール、ならびに正電荷のDODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、リゾホスファチジルセリンおよびリゾホスファチジルスレオニン、ならびにグリセロリン脂質(例えば、セファリン)、グリセロ糖脂質(例えば、ガラクトピラノシド(galactopyransoide))、スフィンゴ糖脂質(例えば、セラミド、ガングリオシド)、ドデシルホスホコリン、鶏卵リゾレシチン、フシジン酸誘導体(例えば、タウロジヒドロフシジン酸ナトリウム等)、長鎖脂肪酸およびそのC<sub>6</sub>~C<sub>12</sub>塩(例えば、オレイン酸およびカプリル酸)、アシルカルニチンおよび誘導体、リシン、アルギニンもしくはヒスチジンのN-アシル化誘導体、またはリシンもしくはアルギニンもしくはヒスチジンの側鎖アシル化誘導体、またはリシンもしくはアルギニンの側鎖アシル化誘導体、リシン、アルギニンもしくはヒスチジンおよび中性もしくは酸性アミノ酸の任意の組合せを含むジペプチドのN-アシル化誘導体、中性アミノ酸および2つの荷電アミノ酸の任意の組合せを含むトリペプチドのN-アシル化誘導体、DSS(ドクサートナトリウム、CAS登録番号[577-11-7]、ドクサートカルシウム、CAS登録番号[128-49-4]、ドクサートカリウム、CAS登録番号[7491-09-0])、SDS(ドデシル硫酸ナトリウムまたはラウリル硫酸ナトリウム)、カプリル酸ナトリウム、コール酸もしくはその誘導体、胆汁酸およびその塩、ならびにグリシンもしくはタウリンコンジュゲート、ウルソデオキシコール酸、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸塩、ア

10

20

30

40

50

ニオン性(アルキル-アリール-スルホネート)の一価の界面活性剤、双性イオン界面活性剤(例えば、N-アルキル-N,N-ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホン酸塩、3-コールアミド(cholamido)-1-プロピルジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホン酸塩、カチオン性界面活性剤(第4級アンモニウム塩基)(例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化セチルピリジニウム)、非イオン性界面活性剤(例えば、ドデシル-D-グルコピラノシド)、プロピレンオキシドおよびエチレンオキシドをエチレンジアミンに逐次的に添加することによって得られる四官能性ブロックコポリマーであるボロキサミン(例えばTetronic)、またはイミダゾリン誘導体の群から選択することができる界面活性剤、またはその混合物であってよい。これらの特定の界面活性剤のそれぞれは、本発明の代替の一実施形態を構成する。

10

#### 【0120】

医薬組成物における界面活性剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版、1995年を参照する。

#### 【0121】

本発明の医薬製剤に、他の成分が存在することも可能である。かかる追加の成分には、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、増量剤、浸透圧調節因子、キレート剤、金属イオン、油性媒体、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質)および双性イオン(例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リシンおよびヒスチジンなどのアミノ酸)が含まれ得る。かかる追加の成分は、当然のことながら、本発明の医薬製剤の全体の安定性に有害に影響すべきではない。

20

#### 【0122】

一実施形態では、第VIII因子誘導体は乾燥形態であり、医師または患者が使用前に溶媒および/または賦形剤をこれに添加する。「乾燥形態」とは、液体医薬組成物または製剤を、フリーズドライ(すなわち凍結乾燥;例えば、WilliamsおよびPolli(1984年) J. Parental Sci. Technol. 38: 48~59頁参照)、スプレー乾燥(Masters(1991年) in Spray-Drying Handbook(5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), 491~676頁; Broadheadら(1992年) Drug Devel. Ind. Pharm. 18: 1169~1206頁およびMumenthalerら(1994年) Pharm. Res. 11: 12~20頁参照)、または風乾(CarpenterおよびCrowe(1988年) Cryobiology 25: 459~470頁およびRoser(1991年) Biopharm. 4: 47~53頁)によって乾燥することを企図する。

30

#### 【0123】

治療への利用性

本発明の第VIII因子誘導体は、一般に、遺伝性出血障害である血友病A(典型的な血友病)の治療に、治療上有用である。血友病Aは、血液凝固第VIII因子の染色体X結合欠損から生じ、10,000人に1人か2人の発症率で、ほぼ例外なく男性に影響を及ぼす。血友病Aの臨床症状は、出血傾向の増大である。

#### 【0124】

したがって本発明の第VIII因子誘導体は、血友病Aに関連する症候を緩和し、またはこれらの症候のさらなる進行もしくは悪化を停止するために使用することができる。一般に、治療するとは、血友病Aの患者の出血傾向を低減することを意味する。

40

#### 【0125】

この方法は、治療有効量の本発明の第VIII因子誘導体または医薬組成物を、血友病Aの患者に投与するステップを含む。本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、血友病Aの患者の出血傾向を低減する量を含む。したがってこの量は、障害の重症度を検出可能に低減するのに、すなわち一般に出血傾向を低減するのに十分な量にすべきである。好ましくは、本発明の第VIII因子誘導体は、週1回の投与管理体制の一部として投与される。

#### 【0126】

本発明の第VIII因子誘導体は、様々な剤形で投与することができる。したがって、皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内(intrasternally)、経皮によって非経口投与することができ、または注入技術によって投与することができる。第VIII因子誘導体は、経鼻または経肺(p

50

ulmonal) スプレーによって、経鼻または経肺スプレーの形態の第VIII因子誘導体の溶液剤または懸濁剤を使用して投与することもできる。経皮投与には、無針注射またはイオン泳動パッチなどのパッチの使用が含まれる。

【0127】

一般的な用量は、特定の化合物の活性、治療を受ける対象の年齢、体重および状態、疾患の種類および重症度、ならびに投与頻度および投与経路に従って、体重1kg当たり約15～100U、好ましくは体重1kg当たり約20～75U、より好ましくは体重1kg当たり約25～50U、最も好ましくは体重1kg当たり約30～40Uである。

【0128】

本発明を、以下の実施例によって例示する。

10

【0129】

(実施例)

以下の緩衝液を、中間体の調製および実施例において準備し、使用した。

- 緩衝液A: 10mMの $\text{CaCl}_2$ 、0.02%Tween 80、1Mグリセロールおよび0.15MのNaClを含有する20mMイミダゾール緩衝液pH7.3、
- 緩衝液B: 10mMの $\text{CaCl}_2$ 、0.02%Tween 80、1Mグリセロールおよび0.5MのNaClを含有する20mMイミダゾール緩衝液pH7.3、
- 緩衝液C: 10mMの $\text{CaCl}_2$ 、0.02%Tween 80、1Mグリセロールを含有する20mMイミダゾール緩衝液pH7.3、
- 緩衝液D: 10mMの $\text{CaCl}_2$ 、0.02%Tween 80、1Mグリセロールおよび1MのNaClを含有する20mMイミダゾール緩衝液pH7.3、
- 緩衝液E: 0.02%Tween 80、10%容量/容量グリセロール、10mMの $\text{CaCl}_2$ を含有する100mMイミダゾール緩衝液pH6.5、
- 緩衝液F: 5%(重量/容量)ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、ならびに
- 緩衝液G: 0.02%Tween 80、10%容量/容量グリセロール、0.15MのNaCl、10mMの $\text{CaCl}_2$ を含有する100mMイミダゾール緩衝液pH6.5。

20

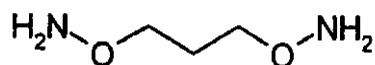
【0130】

中間体1: 1,3-ジアミノオキシプロパン (diaminoxopropane)

【0131】

【化16】

30



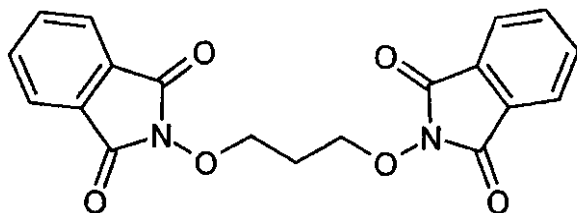
【0132】

1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデク-7-エン(7.9ml、53mmol)を、ヒドロキシフタルイミド(8.68g、53mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(50ml)溶液に滴下添加した。1,3-ジプロモプロパン(2.7g、26mmol)を添加した。溶液を85℃で1時間撹拌した。それを室温に冷却し、氷(200ml)上に注いだ。混合物を撹拌した。形成した沈殿物を濾過によって単離し、冷水(50ml)および冷却したアセトニトリル(50ml)で洗浄した。粗生成物を、ブタノール(150ml)から再結晶させ、乾燥して、1,3-ビス-(1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロイソインドール-2-イルオキシ)プロパン2.67gを得た。

40

【0133】

## 【化 17】



## 【 0 1 3 4 】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.22 (五重線, 2H); 4.51 (t, 4H); 7.75 (m, 4H); 7.82 (m, 2H)

10

## 【 0 1 3 5 】

1,3-ビス-(1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロイソインドール-2-イルオキシ)プロパン(2.5g、6.8mmol)の濃塩酸(10ml)および酢酸(15ml)中混合物を、115 で3時間撹拌した。溶媒を真空中で除去した。水(15ml)を添加した。沈殿物を濾過によって単離した。それを6Mの塩酸(15ml)で洗浄した。粗生成物をエタノールから再結晶させて、1,3-ジアミノオキシプロパンの塩酸塩480mgを得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 2.05 (五重線, 2H); 4.13 (t, 4H)。

## 【 0 1 3 6 】

中間体2: $\text{N}^{\text{Gln}}$ -(3-アミノオキシ(aminoxy)プロピルオキシ)第VIII因子を得るための、中間体1を用いた第VIII因子のアミノ基転移

20

ストレプトバーティシリウム・モバラエンス(*Streptoverticillium mobaraense*)由来の微生物のトランスグルタミナーゼ(TGase)(Ajinomoto製)を、1%重量/重量タンパク質を含む粉末として得た。溶液(11.4  $\mu\text{M}$ )を緩衝液Aで生成した。

## 【 0 1 3 7 】

緩衝液Aの溶液(11.67ml)に、配列SFSQNSRHPSQNPPVLKRHRQRを有するペプチドが重鎖のC末端に結合しているBドメイン欠失第VIII因子化合物の、緩衝液B溶液(5.4mg/ml、400  $\mu\text{l}$ )を添加し、その後1,3-ジアミノオキシプロパン(中間体1)の緩衝液A溶液(55mg/ml、6.97ml)を添加した。TGase酵素溶液(11.4  $\mu\text{M}$ 、950  $\mu\text{l}$ )を添加すると反応が開始した。反応混合物を27 で4時間インキュベートした。N-エチルマレイミド溶液(緩衝液A中15.6mg/ml、86  $\mu\text{l}$ )を添加することによって反応を停止し、27 で10分間インキュベートした。

30

## 【 0 1 3 8 】

生成物を、以下の通りイオン交換によって精製した。反応混合物を緩衝液C(104ml)で希釈し、緩衝液Cで予め平衡化した2つのイオン交換Vivapure Q Maxi M装置(VivaScience製品番号VS-IX20QM08、Vivascience AG、ドイツ)に適用した。同じ緩衝液を用いて2つの洗浄ステップにかけた後、反応生成物を溶出緩衝液D(装置1つ当たり19ml)で溶出した。得られた溶出液を、Amicon Ultra装置(50kDaカットオフ)(Millipore Corp.、USA)で限外濾過にかけて1.3mlに濃縮した(upconcentrated)。

## 【 0 1 3 9 】

280nmにおける吸収度を測定することによって( $E1\% = 14.6\text{Lg} \cdot 1\text{cm}^{-1}$ )(Nanodrop ND-1000、Nanodrop Technologies, Inc、USA)、タンパク質濃度を推定し、97%の推定タンパク質回収率を得た。

40

## 【 0 1 4 0 】

生成物(中間体2)を、その後のステップでそのまま使用した。

## 【 0 1 4 1 】

中間体3~7:アルデヒドの調製

アルデヒド中間体を、以下の通り多段階合成を使用して調製した。

## 【 0 1 4 2 】

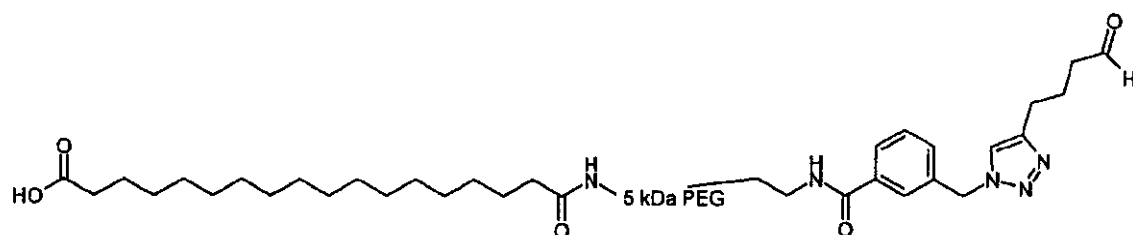
中間体3:7-(( - (2-(3-((4-(3-ホルミルプロピル)-1,2,3-トリアゾール-1-イル)メチル)ベンゾイルアミノ)エチル)5kDa PRGyl)カルバモイル)ヘプタデカン酸

50



【 0 1 4 3 】

【 化 1 8 】



10

【 0 1 4 4 】

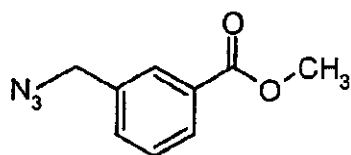
中間体3は、PEG基および $-(CH_2)_{12}$ -アルブミンバインダーを含有する。

【 0 1 4 5 】

ステップ1: 3-(アジドメチル)安息香酸メチル

【 0 1 4 6 】

【 化 1 9 】



20

【 0 1 4 7 】

ナトリウムアジド(5.68g、87mmol)を、3-(プロモメチル(bromomethyl))安息香酸メチル(5.00g、22mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(50ml)溶液に添加した。ヨウ化テトラブチルアンモニウム(81mg、0.22mmol)を添加した。反応混合物を60℃にして16時間加熱した。それを室温に冷却し、水(200ml)に注いだ。この混合物を酢酸エチル(400ml)で抽出した。有機層を水で洗浄し(3×200ml)、逐次的に硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去して、粗生成物3-(アジドメチル)安息香酸メチル4.11gを得、それをさらなる精製なしに使用した。

MS:  $m/z = 192$ 。

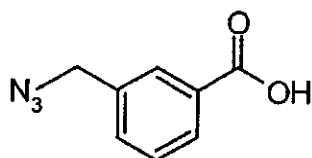
30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.92 (s, 3H); 4.40 (s, 2H); 7.50 (m, 2H); 8.00 (m, 2H)。

ステップ2: 3-(アジドメチル)安息香酸

【 0 1 4 8 】

【 化 2 0 】



40

【 0 1 4 9 】

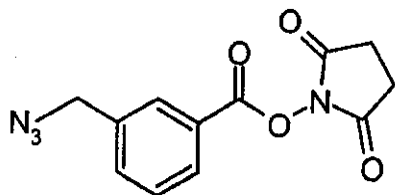
水酸化リチウム(3.81g、21.5mmol)の水(25ml)溶液を、粗生成物3-(アジドメチル)安息香酸メチル(4.11g、21.5mmol)の1,4-ジオキサン(25ml)溶液に添加した。水および1,4-ジオキサンを、透明溶液が得られるまで添加した。反応混合物を室温で16時間撹拌した。水酸化ナトリウムの1M水溶液(100ml)を添加した。反応混合物をtert-ブチルメチルエーテル(2×100ml)で洗浄した。水相を、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液で酸性にした。それを酢酸エチル(2×200ml)で抽出した。混合した酢酸エチル相を、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去して、粗生成物3-(アジドメチル)安息香酸3.68gを得、それをさらなる精製なしに使用した。

MS:  $m/z = 150$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.57 (s, 3H); 7.55 (m, 2H); 8.00 (m, 2H); 13.10 (br, 1H)。

50

ステップ3: ピロリジン-2,5-ジオン-1-イル3-(アジドメチル)安息香酸(benzoic)エステル  
 【0150】  
 【化21】



【0151】

10

テトラフルオロホウ酸2-スクシンイミド(succinimido)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム(TSTU、32.52g、107mmol)を、3-(アジドメチル)安息香酸(19.01g、107mmol)およびトリエチルアミン(14.96ml、107mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(50ml)溶液に添加した。反応混合物を室温で16時間撹拌した。それを酢酸エチル(250ml)で希釈し、水で洗浄した(3×120ml)。有機層を、炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液(150ml)で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去して、ピロリジン-2,5-ジオン-1-イル3-(アジドメチル)安息香酸エステル25.22gを得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 2.92 (m, 4H); 4.45 (s, 2H); 7.55 (t, 1H)、7.65 (d, 2H); 8.10 (m, 2H)。

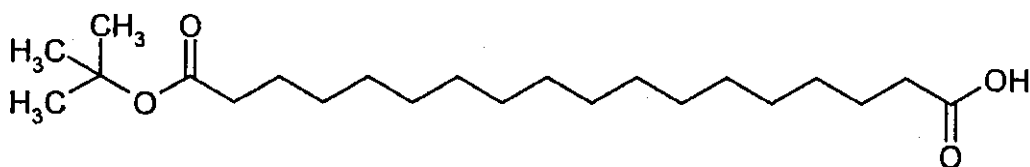
【0152】

20

ステップ4: オクタデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル

【0153】

【化22】



【0154】

30

N,N-ジメチルホルムアミドジ-tert-ブチルアセタール(35.2ml、147mmol)を、オクタデカン二酸(15.4g、49.0mmol)のトルエン(250ml)溶液に滴下添加し、それを95℃で維持した。反応混合物を95℃で16時間維持した。それを室温に冷却した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(150ml)に溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(150ml)に溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(150ml)に溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(85ml)に溶解した。不溶性材料を濾過によって除去した。溶媒を、真空中で濾液から除去した。残渣をジクロロメタン(18ml)に溶解した。ヘプタン(180ml)を添加した。形成した沈殿物を濾過によって除去した。溶媒を真空中で除去した。ヘプタン(150ml)を添加した。沈殿物が形成した。これを濾過によって単離し、真空中で乾燥した。溶媒を、真空中で母液から除去した。形成した固体を濾過によって単離し、真空中で乾燥した。単離した固体の2つのバッチを混合し、できるだけ少量の還流ジクロロメタンに溶解した。溶液を室温に冷却した。ヘプタン(ジクロロメタンの体積の10倍)を添加した。混合物を0℃で維持した。形成した沈殿物を濾過によって単離し、ヘプタン(30ml)で洗浄し、真空中で乾燥して、オクタデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル4.19gを得た。

40

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 1.23 (m, 24H); 1.39 (s, 9H); 1.47 (m, 4H); 2.16 (m, 4H)。

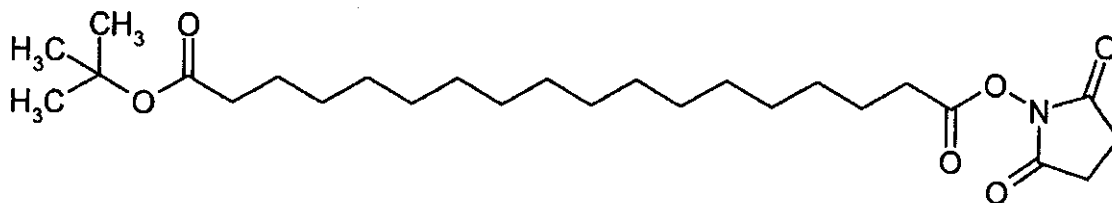
【0155】

ステップ5: オクタデカン二酸tert-ブチルエステル2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル

【0156】

50

## 【化 2 3】



## 【 0 1 5 7】

テトラフルオロホウ酸2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム (TSTU、378mg、0.71mmol) を、オクタデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル(300mg、0.64mmol) のジクロロメタン(10ml) 溶液に添加した。エチルジイソプロピルアミン(0.152ml、0.71mmol) を、反応混合物に添加した。それを室温で3日間撹拌した。それを、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(2×10ml)、炭酸水素ナトリウムの飽和溶液(10ml)、および最後にブライン(10ml) で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去して、オクタデカン二酸tert-ブチルエステル2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルを得、それをさらなる精製なしに使用した。

10

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.20~1.65 (m, 26H); 1.44 (s, 9H); 1.74 (五重線, 2H); 2.20 (t, 2H); 2.60 (t, 2H); 2.84 (m, 4H)。

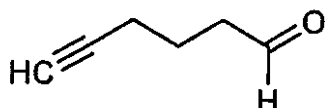
## 【 0 1 5 8】

20

ステップ6: ヘキサ-5-イナール

## 【 0 1 5 9】

## 【化 2 4】



## 【 0 1 6 0】

ジメチルスルホキシド溶液(0.13ml、2mmol) を-78 に冷却した。塩化オキシアリル(oxy alyl)(0.12ml、1.38mmol) のジクロロメタン(1ml) 溶液を、この溶液に添加した。混合物を-78 で20分間撹拌した。ヘキサ-5-イン-1-オール(0.10ml、0.922mmol) のジクロロメタン(0.5ml) 溶液を、この溶液に添加した。それを-78 で20分間撹拌した。トリエチルアミン(0.51ml、3.69mmol) を添加した。反応混合物を-78 で10分間撹拌した。溶液を室温に温めた。それを酢酸エチル(40ml) で希釈し、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(2×20ml) で洗浄した。有機層をブライン(20ml) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去して、ヘキサ-5-イナールを得た。

30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.86 (五重線, 2H); 2.27 (t, 2H); 2.62 (t, 2H)、9.81 (s, 1H)。

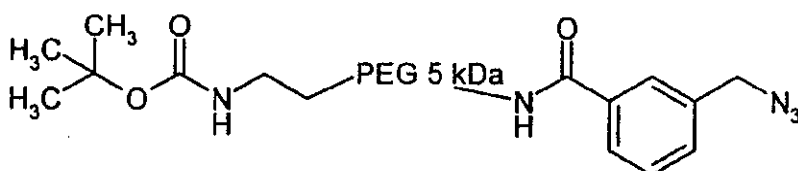
## 【 0 1 6 1】

ステップ7: 3-(アジドメチル)-N-( -(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エチル)5kDa PEGyl)安息香酸アミド

40

## 【 0 1 6 2】

## 【化 2 5】



## 【 0 1 6 3】

50

ピロリジン-2,5-ジオン-1-イル3-(アジドメチル)安息香酸エステル(64mg、0.234mmol)およびエチルジイソプロピルアミン(0.10ml、0.585mmol)を、その後市販の2-(3-(アジドメチル)5kDa PEGyl)エチルカルバミン酸tert-ブチル溶液(例えば、Rapp、1.00g、0.195mmol)に添加した。反応混合物を室温で16時間撹拌した。溶媒を真空中で除去した。エーテル(20ml)を添加した。形成した沈殿物を濾過によって単離し、真空中で乾燥して、3-(アジドメチル)-N-(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エチル)5kDa PEGyl)安息香酸アミドを得た。 $\text{CDCl}_3$ の $^1\text{H-NMR}$ は予想通りであった。

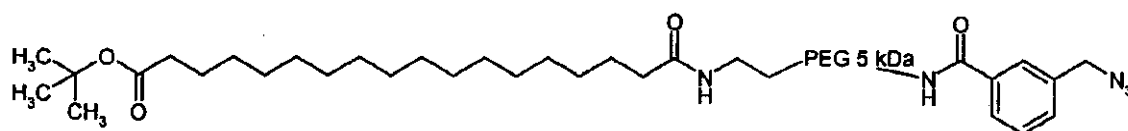
【0164】

ステップ8:17-(2-(3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸tert-ブチル

10

【0165】

【化26】



【0166】

トリフルオロ酢酸(5ml)を、3-(アジドメチル)-N-(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エチル)5kDa PEGyl)安息香酸アミド(1.03g、0.19mmol)のジクロロメタン(5ml)溶液に添加した。反応混合物を室温で15分間撹拌した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(10ml)に溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(10ml)に溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(10ml)に溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(10ml)に溶解した。オクタデカン二酸tert-ブチルエステル2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル(90mg、0.243mmol)のジクロロメタン(5ml)およびエチルジイソプロピルアミン(0.83ml、4.86mmol)溶液を、その後添加した。反応混合物を室温で16時間撹拌した。それをジクロロメタン(40ml)で希釈し、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(2×30ml)およびブライン(30ml)で洗浄した。溶液を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去した。残りの油をエーテル(30ml)で処理した。形成した固体を濾過によって単離した。それをエーテル(10ml)で洗浄し、真空中で乾燥して、17-(2-(3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸tert-ブチル783mgを得た。 $\text{CDCl}_3$ の $^1\text{H-NMR}$ は予想通りであった。

20

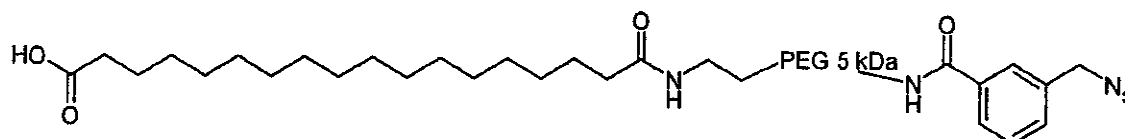
30

【0167】

ステップ9:17-(2-(3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸

【0168】

【化27】



40

【0169】

トリフルオロ酢酸(5ml)を、17-(2-(3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸tert-ブチル(500mg、0.09mmol)のジクロロメタン(5ml)溶液に添加した。反応混合物を室温で45分間撹拌した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(25ml)に溶解した。その後、それを炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液(25ml)およびブライン(25ml)で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で(in vacuo)除去して、17-(2-(3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸を得た。

50

## 【 0 1 7 0 】

ステップ10:17-(( - (2-(3-((4-(3-ホルミルプロピル)-1,2,3-トリアゾール-1-イル)メチル)ベンゾイルアミノ)エチル)5kDa PEGyl)カルバモイル)ヘプタデカン酸(中間体3)

17-(2-( - (3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸(200mg、0.036mmol)を、水(3.5ml)中2%2,6-ルチジンからなる緩衝液に溶解した。ヘキサ-5-イナール(70mg、0.725mmol)のエタノール(0.5ml)溶液を添加した。硫酸銅(II)五水和物(180mg)の水(2.50ml)溶液を、アスコルビン酸(638mg、3.626mmol)の水(2.5ml)および2,6-ルチジン(0.125ml)の混合物溶液に添加した。この溶液を室温で45秒間維持した後、17-(2-( - (3-(アジドメチル)ベンゾイルアミノ)5kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ヘプタデカン酸およびヘキシナール(hexynal)の溶液に添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌した。それを水(25ml)で希釈し、ジクロロメタン(2×100ml)で抽出した。ジクロロメタン相を硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(2×100ml)およびブライン(100ml)で洗浄した。それを硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去した。エーテル(30ml)を添加した。形成した沈殿物を濾過によって単離した。それを炭酸水素ナトリウム(5ml)の50mM水溶液に再溶解し、濾過し、HiPrep 26/10 Desaltingカラム(GE Healthcare)および50mM炭酸水素アンモニウムの緩衝液を使用して、ゲルクロマトグラフィーにかけた。所望の材料を含有する画分をプールし、凍結乾燥して、17-(( - (2-(3-((4-(3-ホルミルプロピル)-1,2,3-トリアゾール-1-イル)メチル)ベンゾイルアミノ)エチル)5kDa PEGyl)カルバモイル)ヘプタデカン酸(中間体3)を得た。

10

20

## 【 0 1 7 1 】

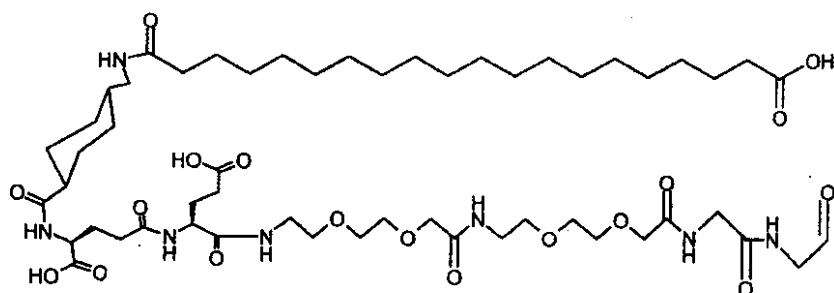
<sup>1</sup>H-NMR分析は、約10%の予測のアルデヒド(中間体3)を示した。

## 【 0 1 7 2 】

中間体4:19-(((trans-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-(1-(ホルミルメチルカルバモイル)メチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)-3-カルボキシプロピルカルバモイル)-1-カルボキシプロピルカルバモイル)シクロヘキシル)メチル)カルバモイル)ノナデカン酸

## 【 0 1 7 3 】

## 【 化 2 8 】



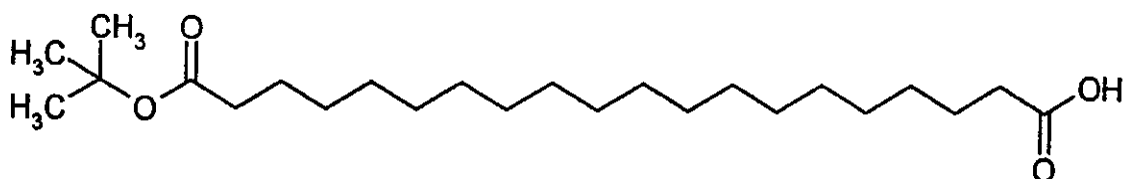
30

## 【 0 1 7 4 】

ステップ1:イコサン二酸モノ-tert-ブチルエステル

## 【 0 1 7 5 】

## 【 化 2 9 】



40

## 【 0 1 7 6 】

イコサン二酸(10g、29mmol)を115℃でトルエンに溶解した。溶液をこの温度で維持しながら、N,N-ジメチルホルムアミドジ-tert-ブチルアセタールを1時間かけて滴下添加した

50

。反応混合物を115℃で16時間撹拌した。それを0℃に冷却した。形成した沈殿物を濾過によって除去した。溶媒を濾液から除去して、イコサン二酸モノ-tert-ブチルエステル7.49 gを得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.25 (m, 28H); 1.44 (s, 9H); 1.59 (m, 4H); 2.20 (t, 2H); 2.34 (t, 2H)。

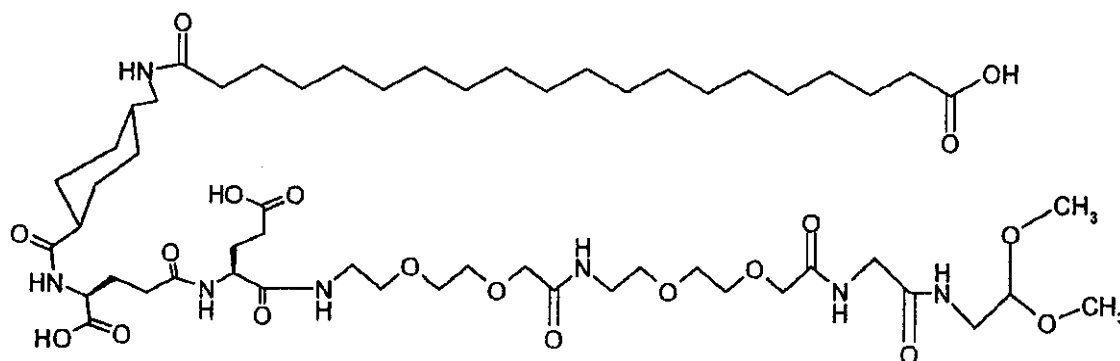
【0177】

ステップ2: 19-((((trans-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-((2,2-ジ-メトキシエチルカルバモイル)メチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)-3-カルボキシプロピルカルバモイル)-1-カルボキシプロピルカルバモイル)シクロヘキシル)メチル)カルバモイル)ノナデカン酸

10

【0178】

【化30】



20

【0179】

市販の樹脂Boc-Gly-PAM樹脂(例えば、Fluka、0.25mmol)を、トリフルオロ酢酸(trifluoroacetic acid)(10ml)で手短に処理した。溶媒を除去し、樹脂をN,N-ジメチルホルムアミド(3×10ml)で洗浄した。樹脂をABI433ペプチド合成装置に移した。以下のカップリングでは標準のプログラムを使用し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール/2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3,-テトラメチルウロニウム(tetramethyluronium)ヘキサフルオロリン酸塩をカップリング試薬として用いた。以下の酸(それぞれ1mmol)を、以下の順で使用した。

30

- FmocNH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-COOH
- FmocNH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-COOH
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH
- Fmoc-Glu(OH)-OtBu
- Fmoc-トラネキサム酸
- イコサン二酸モノ-tert-ブチルエステル

【0180】

樹脂を、その後トリフルオロ酢酸(2ml)、トリイソプロピルシラン(isopropylsilane)(0.050ml)および水(0.050ml)の混合物で1時間処理した。溶媒を除去した。樹脂を、クロロホルムおよびアミノアセトアルデヒドジメチルアセタールの3:2の比の混合物(2ml)で45℃において20時間処理した。樹脂を濾過によって除去した。溶媒を真空中で濾液から除去した。残渣をアセトニトリルの50%水溶液に溶解した。数滴の酢酸を、わずかに酸性の溶液が得られるまで添加した。ペプチドを、溶離液として水中勾配40~60%のアセトニトリルを使用してHPLCによって精製した(両方の溶媒を、0.1%トリフルオロ酢酸で緩衝した)。ペプチドを、最終的に凍結乾燥によって単離した。

40

【0181】

ステップ3: 19-((((trans-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-(1-(ホルミルメチルカルバモイル)エチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)-3-カルボキシプロピルカルバモイル)-1-カルボキシプロピルカルバモイル)シクロヘキシル)メチル)カルバモイル)ノナデカン酸

50

アルデヒドを、Lelievreら、Tetr. Lett. 39 (1998年)、9675頁に従ってTFAで処理することによって得た。簡潔には、ジメチルアセタール[19-(((trans-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-((2,2-ジ-メトキシエチルカルバモイル)メチルカルバモイル)メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)-メトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)-3-カルボキシプロピルカルバモイル)-1-カルボキシプロピルカルバモイル)シクロヘキシル)メチル)カルバモイル)ノナデカン酸](2mg)を、TFA(50  $\mu$ l)で6分間、周囲温度で処理し、真空下で蒸発乾固させた。EtOH(50  $\mu$ l)を添加し、真空下で蒸発させることによって(3回反復)、残りのTFAを除去した。得られた生成物を5%(重量/容量)ヒドロキシプロピル-シクロデキストリンに溶解し、N<sup>Gln</sup>-(3-(アミノオキシ)プロピルオキシ)FVIII(中間体2)のカップリングですぐに使用した。

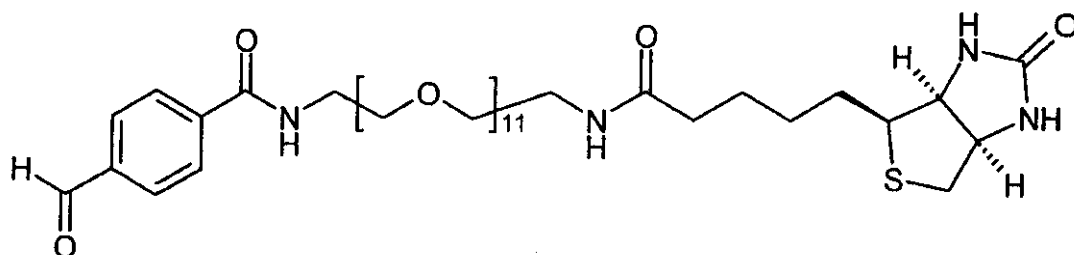
10

【0182】

中間体5:N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(ピオチルアミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-4-ホルミル安息香酸アミド

【0183】

【化31】



20

【0184】

中間体5は、ピオチンレポーター部分を含有する。

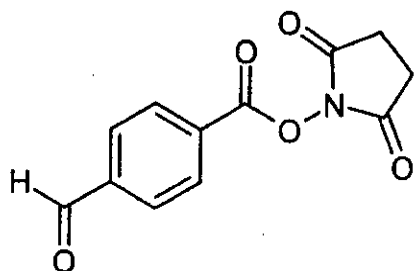
【0185】

ステップ1:4-ホルミル安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル

【0186】

【化32】

30



【0187】

トリエチルアミン(2.04ml、14.65mmol)および2-スクシンイミド-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸塩(TSTU、4.44g、14.65mmol)を、4-ホルミル安息香酸(2.0g、13.3mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(30ml)溶液に逐次的に添加した。反応混合物を室温で16時間撹拌した。それを酢酸エチル(150ml)で希釈し、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(100ml)で洗浄した。水相を酢酸エチル(2×30ml)で抽出した。混合有機層を、ブライン(50ml)および水(50ml)の混合物で洗浄した。混合有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去した。粗生成物を酢酸エチルから再結晶させて、4-ホルミル安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル1.89gを得た。

40

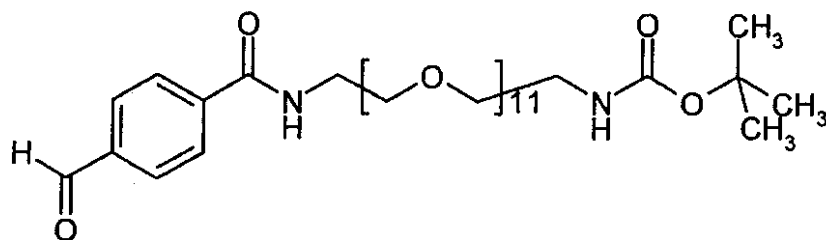
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)。 2.95 (s, 4H); 8.04 (d, 2H)、8.32 (d, 2H); 10.15 (s, 1H)。

【0188】

ステップ2:N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)

50

【化 3 3】



10

【 0 1 9 0 】

20

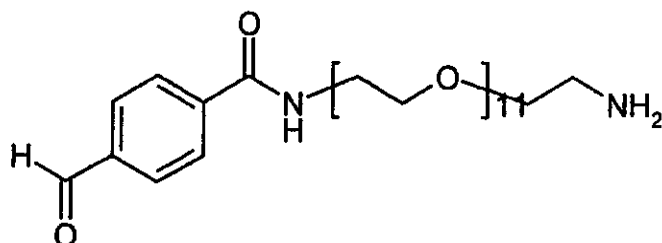
MS:  $m/z = 799$ 、 $677$ 、 $[M+Na]^+$  の計算値:  $799$ 、 $[M+1-Boc]^+$  の計算値:  $677$

【 0 1 9 1 】

30

【 0 1 9 2 】

【化 3 4】



40

【 0 1 9 3 】

50



[illegible]<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)。 3.18 (m, 2H)、3.50~3.80 (m, 46H); 7.42 (br, 1H); 7.61 (br, 3H); 7.97 (d, 2H); 8.02 (d, 2H); 10.08 (s, 1H)。

MS:  $m/z = 677$ 、 $699$ 、 $[M+1]^+$  の計算値:  $677$ 、 $[M+Na]^+$  の計算値:  $699$ 。

【 0 1 9 4 】

ステップ4:N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(ピオチニルアミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-4-ホルミル安息香酸アミド

市販のスクシンイミドピオチン(例えば、Fluka、302mg、0.886mmol)を、N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(アミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-4-ホルミル安息香酸アミドのトリフルオロ酢酸塩(545mg、0.805mmol)およびエチルジイソプロピルアミン(2.10ml、12.1mmol)のジクロロメタン(10ml)溶液に添加した。反応混合物を室温で3日間撹拌した。溶媒を真空中で除去した。粗生成物を、HPLCによって逆相C18カラムおよび水中勾配15~50%のアセトニトリルを使用して精製した(両方の溶媒を、0.1%トリフルオロ酢酸で緩衝した)。HPLC分析によって判断して妥当な純度の所望の化合物を含有する画分を混合し、凍結乾燥して、N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(ピオチニルアミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-4-ホルミル安息香酸アミド62mgを得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)。 1.47 (m, 2H); 1.70 (m, 4H); 2.25 (水で隠れている(?), 2H); 2.78 (d, 1H); 2.93 (d, 1H); 3.19 (d, 1H); 3.40~3.75 (m, 46H); 4.38 (d, 1H); 4.56 (d, 1H); 5.55 (br, 1H); 6.03 (br, 1H); 6.59 (br, 1H); 7.31 (br, 1H); 7.95 (d, 2H); 8.02 (d, 2H)、10.08 (s, 1H)。

MS:  $m/z = 903$ 、 $[M+1]^+$  の計算値: 903。

【 0 1 9 5 】

中間体6:N-2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-ホルミルベンゾイルアミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチルAlexa 488カルボン酸アミド

市販のAlexa 488カルボン酸スクシンイミジルエステル(Invitrogen、A20000、1mg、0.002mmol)の250mM炭酸水素ナトリウム水溶液(0.50ml)溶液を、N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(アミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-4-ホルミル安息香酸アミド(1.89mg、0.003mmol)の250mM炭酸水素ナトリウム水溶液(0.482ml)溶液に添加した。反応混合物を室温で3日間攪拌した。硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(5ml)を添加した。混合物を、C18-逆相カラムでトリフルオロ酢酸の0.1%水溶液中、勾配15~45%のトリフルオロ酢酸の0.1%アセトニトリル溶液を使用して、HPLCクロマトグラフィーにかけた。LC-MSに従って所望の化合物を含有する画分を混合し、凍結乾燥した。

LC-MS: 実測値:  $m/z = 1193$ 、 $[M+1]^+$  の計算値:  $m/z = 1193$ 。

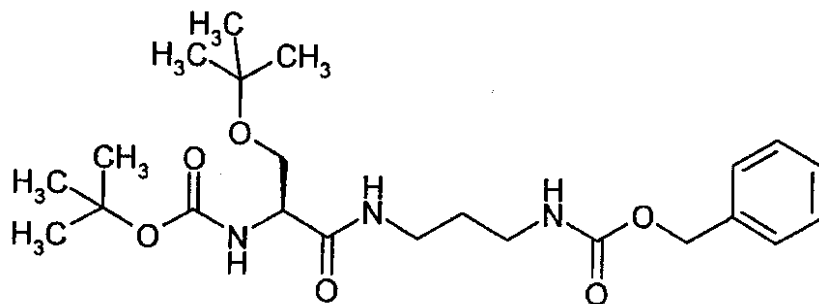
【 0 1 9 6 】

[illegible]

ステップ1: [3-((S)-3-(tert-ブトキシ)-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピオニルアミノ)プロピル]カルバミン酸ベンジルエステル

【 0 1 9 7 】

## 【化 3 5】



10

## 【 0 1 9 8 】

市販のBoc-Ser(tBu)-OH(1.14g、4.36mmol)を、ジクロロメタン(10ml)およびN,N-ジメチルホルムアミド(10ml)の混合物に溶解した。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(0.71g、5.23mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(0.92g、4.79mmol)を逐次的に添加した。反応混合物を室温で15分間撹拌した。市販の(3-アミノプロピル)カルバミン酸ベンジルエステル(2.13g、8.71mmol)およびエチルジイソプロピルアミン(3.73ml、21.77mmol)を添加した。

## 【 0 1 9 9 】

反応混合物を室温で6日間撹拌した。それジクロロメタン(50ml)で希釈し、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液(2×50ml)、炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液(2×50ml)および最後にブライン(50ml)で洗浄した。それを硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去して、粗生成物[3-((S)-3-(tert-ブトキシ)-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピオニルアミノ)プロピル]カルバミン酸ベンジルエステル2.3gを得、それをさらなる精製なしに次のステップで使用した。

20

MS: 実測値:  $m/z = 474$ 、 $[M+Na]^+$ の計算値: 474

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.16 (s, 9H); 1.46 (s, 9H); 1.64 (m, 2H); 3.22 (m, 2H); 3.39 (m, 2H); 3.80 (m, 1H); 4.16 (br, 1H); 5.10 (s, 2H); 5.42 (br, 1H); 5.46 (br, 1H); 6.76 (br, 1H); 7.35 (m, 5H)。

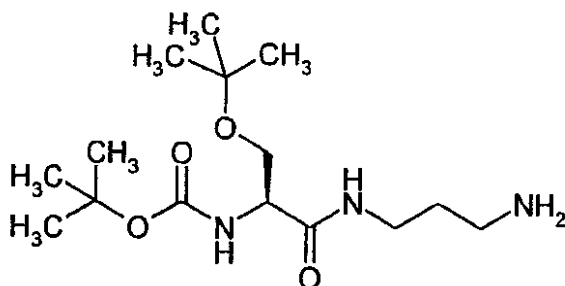
## 【 0 2 0 0 】

ステップ2: [(S)-1-(3-アミノプロピルカルバモイル)-2-(tert-ブトキシ)エチル]カルバミン酸tert-ブチルエステル

30

## 【 0 2 0 1 】

## 【化 3 6】



40

## 【 0 2 0 2 】

ステップ1の粗生成物[3-((S)-3-(tert-ブトキシ)-2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピオニルアミノ)プロピル]カルバミン酸ベンジルエステル(2.3g)を、エタノール(20ml)に溶解した。50%湿潤の木炭中5%パラジウム(1g)を添加した。混合物を室温において圧力100psiで水素化した。反応混合物を、セライトプラグを介して濾過した。溶媒を、真空中で濾液から除去した。残渣をエタノール(20ml)に再溶解した。50%湿潤の木炭中5%パラジウム(1.7g)を添加した。

## 【 0 2 0 3 】

混合物を室温において圧力300psiで水素化した。それを、セライトプラグを介して濾過

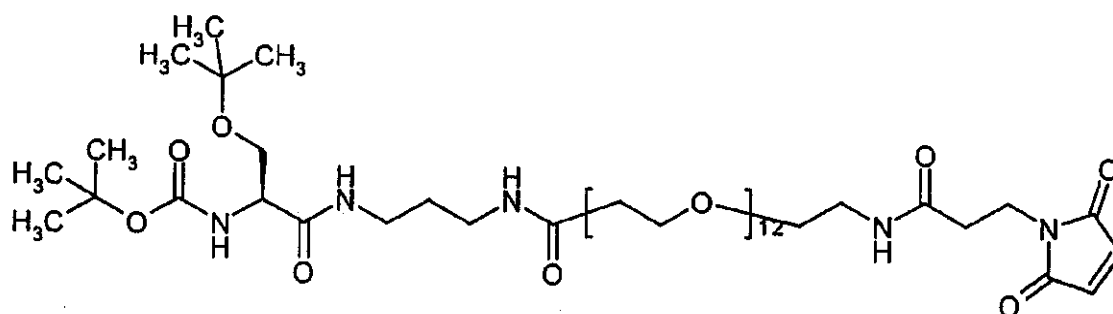
50

10

20

[illegible]

【化 3 7】

[illegible][illegible]

40

[illegible]

【 0 2 0 9 】

N[C@@H](CO)C(=O)NCCCCNC(=O)[CH2]12[O]1CCCCCCC1CCCCCCC2CCNC(=O)CCn1cnc2ccccc12

## 10

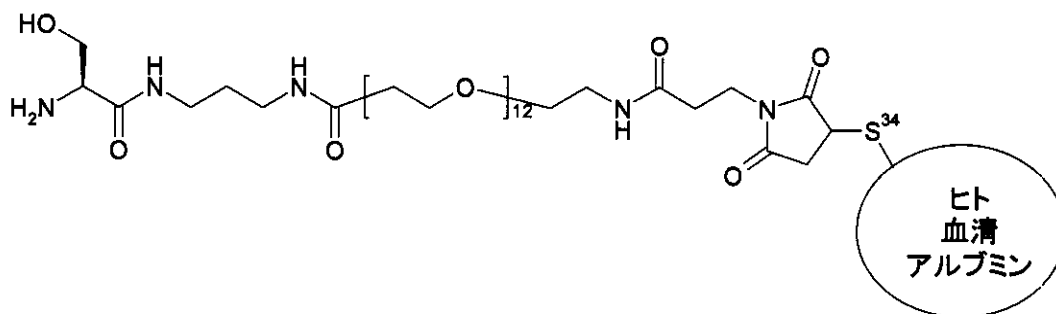
20

[illegible]

30

[illegible]

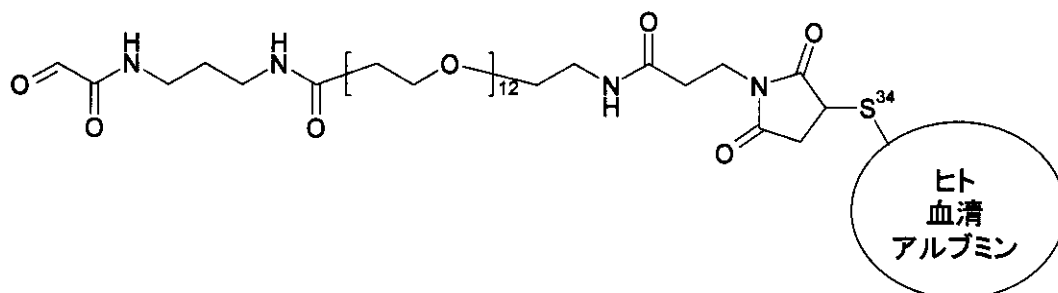
## 【化 3 9】



遊離システイン基を有する組換えアルブミン(2.2mg、33nmol、例えばNew Century Pharmaceuticals Inc.から市販)を水(0.200ml)に溶解した。トリエタノールアミン(0.0077mg)の水(0.100ml)溶液および3-メチルチオプロパン-1-オール(0.153mg、1025nmol)の水(0.1mmol)溶液を添加した。過ヨウ素酸ナトリウム(0.019mg、88nmol)の水(0.100ml)溶液を添加した。反応混合物を、暗室において室温で40分間維持した。10kDaの分子カットオフのAmicon Ultra遠心分離装置で、速度4000rpmにおいて6分間、超遠心分離法を反復すると、反応混合物の緩衝液はトリエタノールアミン(0.154ml)の水(0.200ml)溶液に変化した。

## 50

【化 4 0】



10

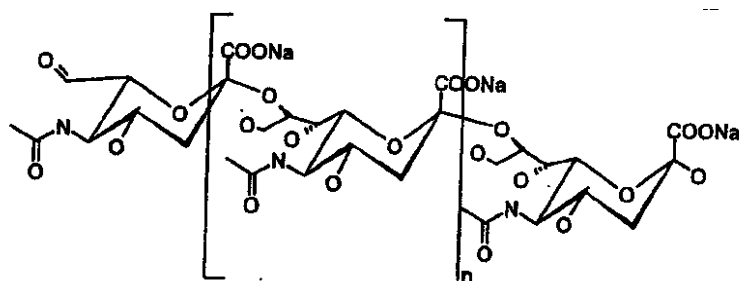
S<sup>34</sup>-((1-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(3-((S)-2-アミノ-3-ヒドロキシプロパノイルアミノ)プロピルカルバモイル)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)エチル)2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-3-イル)アルブミン(21mg、312nmol))を水(0.800ml)に溶解した。トリエタノールアミン(0.077mg)の水(1.00ml)溶液および3-メチルチオプロパン-1-オール(1.53mg、10250nmol)の水(1.0ml)溶液を添加した。過ヨウ素酸ナトリウム(0.19mg、880nmol)の水(1.00ml)溶液を添加した。反応混合物を、暗室において室温で40分間維持した。10kDaの分子カットオフのAmicon Ultra遠心分離装置で、速度4000rpmにおいて6分間、超遠心分離法を反復すると、反応混合物の緩衝液はトリエタノールアミン(0.77ml)の水(1.00ml)溶液に変化した。材料を、オキシム形成反応で直接使用した。

20

中間体8: 過ヨウ素酸によって酸化したコロミン酸

30

【化 4 1】



40

(nは約70である)

## ステップ1: コロミン酸の分取

使用したコロミン酸は、Sigma-Aldrich製の市販の化合物(ナトリウム塩)であった。より均質な材料を得るために(その分子量に関して)、コミロン酸をW02008/074032に従ってイオン交換カラムで分取した。約20kDの分子量に相当する画分を、その後の実験で使用した。

ステップ2: 20kDのコロミン酸の過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化

20kDのコロミン酸溶液(ステップ1で得た( $H_2O$ :2.24ml中40mg))に、過ヨウ素酸ナトリウム

50

溶液 (H<sub>2</sub>O 2.244ml 中 0.96mg) を添加した。反応物を、23 で15分間、暗室でインキュベートした。過剰の過ヨウ素酸を3-メチルチオ-1-プロパノール (4.7 μl) でクエンチした。反応物を23 でさらに2時間インキュベートした。試薬を、限外濾過によってMillipore Ultra、5kDのカットオフで排除した。水で数回希釈した。得られた材料を凍結乾燥した。

【0223】

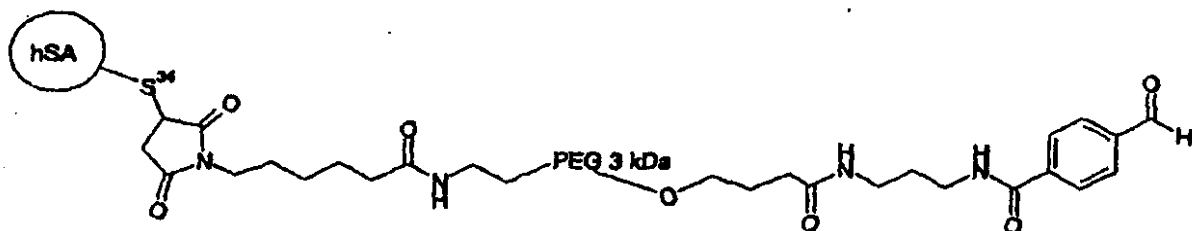
中間体9:

C<sup>34</sup>-(1-(5-(2-( - (3-{4-(ホルミル)ベンゾイルアミノ)プロピルカルバモイルメチル)3kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ペンチル)2,5-ジオキソピロリジン-3-イル)アルブミン

【0224】

【化42】

10



【0225】

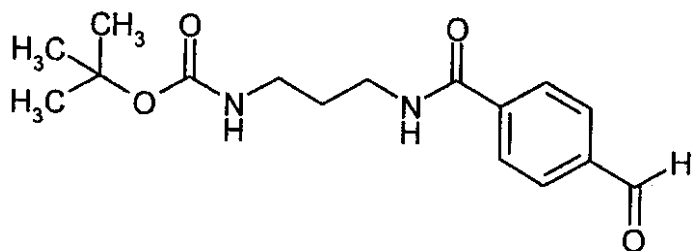
ステップ1:

N-[3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ (butoxycarbonylamino))プロピル]-4-ホルミルベンズアミド

【0226】

【化43】

20



30

【0227】

4-ホルミル安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル (1.56g、6.31mmol) を、市販の3-アミノプロピルカルバミン (aminopropylcarbamate) 酸tert-ブチルエステル (1.10ml、6.31mmol) およびエチルジイソプロピルアミン (2.16ml、12.62mmol) のジクロロメタン (25ml) 溶液に添加した。反応混合物を室温で24時間撹拌した。ジクロロメタン (100ml) を添加した。混合物を、硫酸水素ナトリウムの10%水溶液 (70ml) で洗浄した。水相をジクロロメタン (50ml) で抽出した。混合有機層をブライン (100ml) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去した。材料を、シリカ (90g) によるフラッシュクロマトグラフィーによって、溶離液として酢酸エチル/ヘプタン (3:1) 混合物を使用して精製して、N-[3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ (butoxycarbonylamino))プロピル]-4-ホルミルベンズアミド 1.05g を得た。

40

MS: m/z = 329、[M+Na]<sup>+</sup> の計算値: 329。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.46 (s, 9H); 1.75 (五重線, 2H); 3.28 (t, 2H); 3.54 (t, 2H); 4.84 (br, 1H); 7.60 (br, 1H); 7.96 (d, 2H); 8.03 (d, 2H); 10.09 (s, 1H)。

【0228】

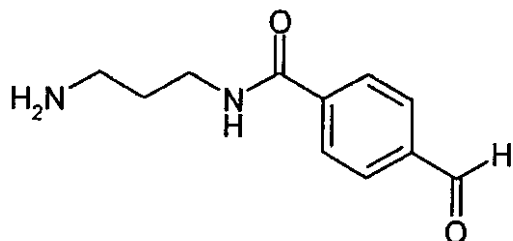
ステップ2:

N-[3-アミノプロピル]-4-ホルミルベンズアミド

【0229】

50

## 【化 4 4】



## 【 0 2 3 0】

10

トリフルオロ酢酸(10ml)を、N-[3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピル]-4-ホルミルベンズアミド(1.1g、3.43mmol)のジクロロメタン(10ml)溶液に添加した。反応混合物を室温で1.5時間撹拌した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(50ml)に再溶解した。溶媒を真空中で除去した。残渣をジクロロメタン(50ml)に再溶解した。溶媒を真空中で除去して、N-[3-アミノプロピル]-4-ホルミルベンズアミドのトリフルオロ酢酸塩1.76gを得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.46 (s, 9H); 2.07 (br, 2H); 3.71 (q, 2H); 4.20 (br, 2H); 7.95 (d, 2H); 8.01 (d, 2H); 10.11 (s, 1H)。

## 【 0 2 3 1】

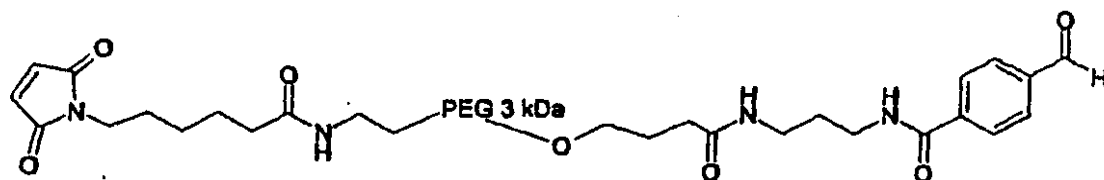
20

ステップ3:

N-(3-(2-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)ヘキサノイルアミノ)エチル)3kDa PEGyl アセチルアミノ)プロピル)-4-ホルミルベンズアミド

## 【 0 2 3 2】

## 【化 4 5】



30

## 【 0 2 3 3】

N-[3-アミノプロピル]-4-ホルミルベンズアミド(57mg、0.178mmol)のトリフルオロ酢酸塩を、市販の(例えば、Rapp Polymere GmbH、ドイツ)、(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)ヘキサノイルアミノ)エチル)3kDa PEGyl 酢酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル(500mg、0.149mmol)のジクロロメタン(4ml)溶液に添加した。エチルジイソプロピルアミン(0.893ml、5.25mmol)を添加した。pH紙を使用してpHが約pH10~11になるようにチェックした。反応混合物を1時間撹拌した。エーテル(70ml)を添加した。混合物を室温で1時間置いて、形成した沈殿物を熟成させた。沈殿物を濾過によって単離した。それをエーテル(50ml)に懸濁した。沈殿物を濾過によって単離して、N-(3-(2-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)ヘキサノイルアミノ)エチル)3kDa PEGyl アセチルアミノ)プロピル)-4-ホルミルベンズアミド475mgを得た。所望の生成物の予想通り、 $\text{CDCl}_3$ の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、マレイミド基ならびにパラ置換芳香族環およびアルデヒド基の存在を示した。

40

## 【 0 2 3 4】

ステップ4:

1N水酸化ナトリウムを添加することによってpH7.00に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(1.6ml)中、N-(3-(2-(5-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロピロール-1-イル)ヘキサノイルアミノ)エチル)3kDa PEGyl アセチルアミノ)プロピル)-4-ホルミルベンズアミド(1.6mg、452nmol)の溶液を、1N水酸化ナトリウムを添加することによってpH7.00に調節した25mMのHEPESからなる緩衝液(13.4ml)中、遊離システインを有する組換えヒト血清アルブミン

50

(hSA、15mg、226nmol)の溶液に添加した。反応混合物を、20～22℃で16時間、300rpmで穏やかに振とうした。10kDaのカットオフを有するAmicon超遠心分離装置に、材料を入れた。1N塩酸を添加することによってpH8.00に調節した25mMトリスからなる緩衝液(15ml)を添加した。この溶液を4000rpmで10分間、遠心分離にかけた。1N塩酸を添加することによってpH8.00に調節した25mMトリスからなる緩衝液(15ml)を添加した。この溶液を4000rpmで10分間、遠心分離にかけた。材料を、約8mlの大きさを有するベッドのMonoQカラムで、pH8.00に調節した25mMトリスからなる緩衝液中、pH8.00に調節した25mMトリスおよび2MのNaClからなる勾配0～75%の緩衝液を使用して、流速4ml/分で30CVにわたってアニオン交換クロマトグラフィーにかけた。カラムへのサンプルの適用は、流速0.5ml/分で行った。SDS-PAGE分析によってC<sup>34</sup>-(1-(5-(2-( $\alpha$ -(3-(4-(ホルミル)ベンゾイルアミノ)プロピルカルバモイルメチル)3kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ペンチル)2,5-ジオキソピロリジン-3-イル)アルブミンに合致した材料を含有する画分を混合した。混合した画分を、Superdex G25材料53mlおよび25mM炭酸水素アンモニウムからなる緩衝液を使用して、流速7ml/分で分子ふるいクロマトグラフィーにかけた。SDS-PAGE分析によってC<sup>34</sup>-(1-(5-(2-( $\alpha$ -(3-(4-(ホルミル)ベンゾイルアミノ)プロピルカルバモイルメチル)3kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ペンチル)2,5-ジオキソピロリジン-3-イル)アルブミンに合致した材料を含有する画分を収集し、混合し、凍結乾燥にかけて、標題化合物0.803mgを得た。収率は、Nanodrop photometry装置で、280nmにおいてモル吸光度4.11を使用して決定した。

10

#### 【0235】

N<sup>Gln</sup>-(3-アミノオキシプロピルオキシ)第VIII因子(中間体2)とアルデヒド(中間体3、4、5、6、7、8および9)の反応

20

先の通り調製した中間体2を、オキシム化反応においていくつかのアルデヒドと反応させて、第VIII因子誘導体を形成した。

#### 【0236】

(実施例1)

N<sup>Gln</sup>-(3-(3-(mPEGyl)-プロピリデンアミノオキシ)プロピルオキシ)FVIIIを得るための、3-(mPEGyl)プロパナル(propanal)を用いた中間体2のオキシム化

mPEGylは多分散系であり、分子量約20kDaを有する。以下の溶液を調製した。

- 中間体2の溶液:緩衝液D中1.74mg/ml;

- 3-(mPEGyl)プロパナル(20kDa)(NOFのCH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO ME-200AL):緩衝液E中12.9mg/ml;および

30

- 4-ヒドロキシベンズアルデヒド(MW=122.13)。緩衝液E溶液13.8mg/ml。

#### 【0237】

中間体2(77.6μl、135μg)の溶液に、緩衝液E(2.4μl)および緩衝液E中3-(mPEGyl)プロパナル溶液(595μl、7.7mg)を添加した。反応混合物を25℃で3時間インキュベートした。次いで4-ヒドロキシベンズアルデヒド溶液(32.8μl、453μg)を添加した(未反応ヒドロキシルアミン部分をキャップする)。反応混合物を25℃でさらに3時間インキュベートした。

#### 【0238】

生成物を、以下の通りイオン交換によって精製した。反応混合物を緩衝液Cで8回希釈し、予め緩衝液Cで平衡化した2つのイオン交換Vivapure Q Mini M装置(VivaScience製品番号VS-IX01QM24、Vivascience AG、ドイツ)に適用した。同じ緩衝液を用いた2つの洗浄ステップ後、反応生成物を溶出緩衝液Dで溶出した。

40

#### 【0239】

タンパク質濃度を、280nmにおける吸収を測定することによって推定し(E<sub>1%</sub>=14.6Lg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)(Nanodrop ND-1000、Nanodrop Technologies, Inc、USA)、83%の推定タンパク質回収率を得た。

#### 【0240】

生成物を、使用説明書に従って(150Vで70分)、NuPage 7%トリス-酢酸塩ゲル(Invitrogen EA03555BOX)を使用してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけた。ゲルを銀染色

50



した(Invitrogen LC6070)。標準のタンパク質をInvitrogenから得た(HiMark HMW標準LC5688)。

#### 【0241】

SDSゲルは、重鎖が最も重度に修飾されたもの(the most heavily modified)であることを示す。予想通り、より高いMWのいくつかのバンドが現れる。最高のMWのバンドは約400kDaで現れる。

#### 【0242】

トロンピン消化した生成物

トロンピン(ヒトのトロンピン、Roche diagnostica)を、H<sub>2</sub>Oに20U/mlで溶解し、さらに緩衝液Aで2U/mlに希釈した。実施例1(2.9  $\mu$ l、1.2  $\mu$ g)の生成物の溶液に、緩衝液A(8.9  $\mu$ l)およびトロンピン溶液(0.24  $\mu$ l)を添加した。反応混合物を37℃で15分間インキュベートした。FVIIIのトロンピン消化を平行して実施した。反応混合物を、HPLCによってZorbax 300SB-C18、0.21  $\times$  15cm、5  $\mu$ mで分析した。溶離液は、A:水中0.1%TFAおよびB:アセトニトリル中0.07%TFAであった。流速は0.2ml/分、温度は40℃であった。勾配は以下の通りであった。2分かけて0~15%、21分かけて15~80%、10分かけて80~100%B。UV( $\lambda$ =280nm)によって検出を行った。

10

#### 【0243】

得られたクロマトグラムによって、トロンピン消化したFVIIIのA1ドメインに対応するピーク(青色トレース)は、実施例1のペグ化FVIII(赤色トレース)のトロンピン消化では、ほぼ消失したことが示された。したがって、A1ドメインは実際、最も重度に修飾されたものであった。

20

#### 【0244】

(実施例2)

N<sup>Gln</sup>-(3-(4-(1-(3-((17-(カルボキシ)ヘプタデカノイルアミノ)5kDa PEGyl)カルバモイル)ベンジル)1,2,3-トリアゾール-4-イル)ブチリデンアミノオキシ)プロピルオキシ)FVIIIを得るための、中間体3を用いた中間体2のオキシム化

以下の溶液を調製した。

- 中間体2: 緩衝液D中2.36mg/ml;
- 中間体3(MW:5600): 緩衝液E中1.79mM;
- 4-ヒドロキシベンズアルデヒド溶液: 緩衝液E中17.3mg/ml; および
- 塩酸メトキシルアミン: 緩衝液E中11mg/ml。

30

#### 【0245】

中間体3(500  $\mu$ l、848nmole)の緩衝液E溶液に、緩衝液E(644.3  $\mu$ l)および中間体2の緩衝液E溶液(105.9  $\mu$ l、250  $\mu$ g)を添加した。反応混合物を25℃で3時間インキュベートした。次いで4-ヒドロキシベンズアルデヒド溶液(50  $\mu$ l、865  $\mu$ g)を添加した(未反応ヒドロキシルアミン部分をキャップする)。反応混合物を25℃でさらに1時間インキュベートした。塩酸メトキシルアミン(62.5  $\mu$ l、687  $\mu$ g)を添加することによって、過剰のアルデヒドをクエンチした。反応混合物を25℃でさらに30分間インキュベートした。

#### 【0246】

生成物を、以下の通りイオン交換によって精製した。塩濃度を、連続希釈(緩衝液Cを用いる)およびAmicon Ultra装置(50kDaカットオフ)(Millipore Corp.、USA)による濃縮ステップによって、25mM未満の塩濃度に低減した。得られた溶液を、予め緩衝液Cで平衡化した2つのイオン交換Vivapure Q Mini M装置(VivaScience製品番号VS-IX01QM24、Vivascience AG、ドイツ)に適用した。同じ緩衝液を用いた2つの洗浄ステップ後、反応生成物を溶出緩衝液Dで溶出した。

40

#### 【0247】

タンパク質濃度を、280nmにおける吸収を測定することによって推定し( $E_{1\%}^{1\text{cm}}=14.6\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )(Nanodrop ND-1000、Nanodrop Technologies, Inc、USA)、73%の推定タンパク質回収率を得た。

#### 【0248】

50

生成物を、使用説明書に従って(150Vで70分)、NuPage 7%トリス-酢酸塩ゲル(Invitrogen EA03555BOX)を使用してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけた。ゲルを銀染色した(Invitrogen LC6070)。標準のタンパク質をInvitrogenから得た(HiMark HMW標準LC5688)。

【0249】

SDSゲルは、やはり重鎖が最も重度に修飾されたものであることを示す。より高いMWのいくつかのバンドが現れる。最高のMWのバンドは、約120kDaで現れる。

【0250】

生成物を、やはりVydac C4、0.21 × 5cm、5 μ (Vydac番号:214TP5205)でHPLCにかけた。

【0251】

溶離液は、A:水中0.1%TFAおよびB:アセトニトリル中0.07%TFAであった。流速は0.2ml/分、温度は40 °Cであった。勾配は以下の通りであった。3分かけて30~40%、60分かけて40~50%、12.5分かけて50~100%B。UV(λ=280nm)および蛍光(λ<sub>Exc</sub>=280nm、λ<sub>Em</sub>=348nm)によって検出を行った。

【0252】

得られたクロマトグラムによって、重鎖は実際、最も重度に修飾されたものであることが確認された。

【0253】

(実施例3)

中間体4を用いた中間体2のオキシム化

以下の溶液を調製した。

- 中間体2:緩衝液D中2.36mg/ml、
- 中間体4(MW=122.1):5.55mg/ml
- 塩酸メチルヒドロキシルアミン(MW=83.5)。緩衝液E中10.2mg/ml。

【0254】

中間体2の溶液(106.7 μl、250 μg)および先得たアルデヒド試薬である中間体4の溶液(1.144ml、833.8 μg)を混合し、25 °Cで3時間インキュベートした。4-ヒドロキシベンズアルデヒド溶液(63 μl、350 μg)を添加することによって、残っている可能性のある遊離アミノオキシ基をキャップし、得られた混合物を25 °Cで1時間インキュベートした。塩酸メチルヒドロキシルアミン(62.5 μl、638 μg)を添加することによって、過剰のアルデヒドをクエンチした。反応混合物を25 °Cでさらに30分間インキュベートした。

【0255】

生成物を、以下の通りイオン交換によって精製した。反応混合物を、緩衝液C(9.625ml)を添加することによって希釈した。得られた溶液を、予め緩衝液Cで平衡化した2つのイオン交換Vivapure Q Maxi M装置(VivaScience製品番号VS-IX20QM08、Vivascience AG、ドイツ)に適用した。同じ緩衝液を用いた2つの洗浄ステップ後、反応生成物を溶出緩衝液Dで溶出した。

【0256】

タンパク質濃度を、280nmにおける吸収を測定することによって推定し( $E_{1\%}^{1\text{cm}}=14.6\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )(Nanodrop ND-1000、Nanodrop Technologies, Inc、USA)、96%の推定タンパク質回収率を得た。

【0257】

生成物を、使用説明書に従って(150Vで70分)、NuPage 7%トリス-酢酸塩ゲル(Invitrogen EA03555BOX)を使用してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけた。ゲルを銀染色した(Invitrogen LC6070)。標準のタンパク質をInvitrogenから得た(HiMark HMW標準LC5688)。

【0258】

生成物を、Vydac C4、0.21 × 5cm、5 μ (Vydac番号:214TP5205)でHPLCにかけた。溶離液は、A:水中0.1%TFAおよびB:アセトニトリル中0.07%TFAであった。流速は0.2ml/分、温度は40 °Cであった。勾配は以下の通りであった。3分かけて30~40%、60分かけて40~50%、1

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

- 50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

中間体2(1.00mg、5.60nmol)の、20mMイミダゾール、10mMのCaCl<sub>2</sub>、10%グリセロールおよび0.02%Tween 80からなる緩衝液溶液を、中間体7に添加した。反応混合物を室温で16時間置いた。塩化ナトリウムの5M水溶液(0.046ml)。反応混合物を、CNBrで活性化したF25抗体から調製したカラム(例えば、W095/013301に記載の通り)に適用した。非結合材料を洗い流した。カラムを、20mMイミダゾール、10mMのCaCl<sub>2</sub>、0.02%Tween 80および650mMのNaClからなる緩衝液(5ml)、pH7.35で洗浄した。もう1つの画分を、20mMイミダゾール、10mMのCaCl<sub>2</sub>、0.02%Tween 80および2.5MのNaCl、50%容量/容量エチレングリコール(ehtyleneg

lycol) からなる緩衝液(5ml)、pH7.35で洗い流した。SDS分析によって、最後の緩衝液(20mMイミダゾール、10mMのCaCl<sub>2</sub>、0.02%Tween 80および2.5MのNaCl、50%容量/容量エチレングリコール、pH7.35)を使用して、アルブミン-FVIIIコンジュゲートをカラムから洗浄できたことが示された。アルブミン-FVIIIコンジュゲートは、SDSゲルでそれぞれ重鎖および軽鎖の分子量に相当する約70kDaおよび90kDaのバンド、ならびに軽鎖および重鎖のアルブミンコンジュゲートの予測質量に相当する約140kDaおよび160kDaのバンドによって同定された。

#### 【0269】

(実施例6)

N<sup>Gln</sup>-(3-(4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(Alexa 48-イルアミノ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチルカルバモイル)ベンジリデンイミノオキシ)プロピルオキシ)FVIIIを得るための、中間体6を用いた中間体2のオキシム化

10

溶液:

- N<sup>Gln</sup>-(3-アミノオキシプロピルオキシ)FVIII:0.02%Tween 80、10%容量/容量グリセロール、1MのNaCl、10mMのCaCl<sub>2</sub>を含有する20mMイミダゾール緩衝液中1.74mg/ml、pH7.4
- 中間体6:緩衝液G中1.70mg/ml

#### 【0270】

手順:

N-(3-(アミノオキシ)プロピルオキシ)FVIII溶液(115 μl、200 μg)に、緩衝液G(485 μl)および中間体6の溶液(400 μl、678 μg)を添加した。反応混合物を25℃で3時間30分インキュベートした。

20

#### 【0271】

塩酸メチルヒドロキシルアミン(25 μl、71 μg)を添加することによって、過剰のアルデヒドをクエンチした。反応混合物を周囲温度でさらに45分間インキュベートした。

#### 【0272】

精製:

精製は、実施例4の通り行った。

#### 【0273】

タンパク質濃度を、280nmにおける吸収を測定することによって推定し(Nanodrop ND-1000、Nanodrop Technologies, Inc、USA)、40%の推定タンパク質回収率を得た。

30

#### 【0274】

(実施例7)

中間体8を用いた中間体2のオキシム化

溶液:

- 中間体2:0.02%Tween 80、10%容量/容量グリセロール、1MのNaCl、10mMのCaCl<sub>2</sub>を含有する20mMイミダゾール緩衝液中2.74mg/ml、pH7.4、
- 塩酸メチルヒドロキシルアミンの、0.02%Tween 80、10%容量/容量グリセロール、10mMのCaCl<sub>2</sub>を含有する100mMイミダゾール緩衝液溶液、pH6.5、

#### 【0275】

40

手順:

中間体2の溶液(91 μl、250 μg)に、中間体7の緩衝液G溶液(175 μl、15.7mg)を添加した。反応混合物を27℃で2時間インキュベートした。

#### 【0276】

塩酸メチルヒドロキシルアミン(12.5 μl、296 μg)を添加することによって、過剰のアルデヒドをクエンチした。反応混合物を27℃でさらに30分間インキュベートした。

#### 【0277】

精製:

精製は、実施例4の通り行った。タンパク質濃度を、280nmにおける吸収を測定することによって推定し(Nanodrop ND-1000、Nanodrop Technologies, Inc、USA)、45%の推定タン

50

パク質回収率を得た。

【0278】

生成物を、使用説明書に従って(150Vで70分)、NuPage 7%トリス-酢酸塩ゲル(Invitrogen EA03555BOX)を使用してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけた。ゲルを銀染色した(Invitrogen LC6070)。標準のタンパク質をInvitrogenから得た(HiMark HMW標準LC5688)。

【0279】

FVIIIの重鎖は、やはり最も重度に修飾されたものであり、コロミン酸-FVIIIコンジュゲートは、SDSゲルで93～約140kDに存在する広範な拡散したバンドによって同定された。

【0280】

(実施例8)

中間体9を用いた中間体2のオキシム化

中間体2(210 µg、1.42nmole)の緩衝液E(44 µl)溶液に、C<sup>34</sup>-(1-(5-(2-(  
- (3-(4-(ホルミル)ベンゾイルアミノ)プロピルカルバモイルメチル)3kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ペンチル)2,5-ジオキソピロリジン-3-イル)アルブミン(100 µg、1.41nmole)の緩衝液E(10 µl)溶液を添加した。緩衝液E中0.3Mアニリン溶液を添加した(2 µl)。反応物を30 で終夜インキュベートした。

【0281】

水(2 µl)中4-ヒドロキシベンズアルデヒド(1.46 µg)を添加することによって、過剰の中間体2をクエンチした。混合物を30 で1時間置いた。

【0282】

混合物を、緩衝液Cで1:11(容量/容量)に希釈した後、VivaPure Q mini M(Vivascience)によるアニオン交換によって精製した。搭載後、材料を緩衝液Cで洗浄し、緩衝液Dで溶出した。次いで溶出液を、Superdex 200 10/300 GLカラム(GE Healthcare)によって分子ふるいクロマトグラフィーにかけた。流速は0.5ml/分であり、溶離液は、スクロース(3g/l)、ヒスチジン(1.5g/l)、塩化ナトリウム(18g/l)、Tween 80(0.1g/l)、塩化カルシウム(0.25g/l)からなる緩衝液、pH7.3であった。

【0283】

SDS PAGE分析によって、それぞれFVIIIの重鎖上の1つ、2つまたは3つのC<sup>34</sup>-(1-(5-(2-(  
- (3-(4-(ホルミル)ベンゾイルアミノ)プロピルカルバモイルメチル)3kDa PEGyl)エチルカルバモイル)ペンチル)2,5-ジオキソピロリジン-3-イル)アルブミン部分の結合に暫定的に割り当てられる約166kD、228kDおよび332kDのバンドの存在が示された。

【0284】

FVIII発色活性分析-COA試験

サンプルを含有するFVIIIの活性は、市販のCOA試験(COATEST(登録商標)SP FVIII、Chromogenix Art. No.:82 4086 63)を用いて決定することができる。

【0285】

薬物動態パラメータの決定

試験では、Taconic M&Bで飼育された体重約21.8gの15匹のFVIII KOマウスを使用した。マウスに、尾静脈への単回注射として化合物を投与し、採血のためにイソフルラン/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>Oによって麻酔した。眼窩の神経叢への投与の0.08、0.33、1、3、7、16、24、48、64時間後の各時点において、2匹または3匹のマウスから血液を採取した。10 µlの毛細ガラス管を使用して、目から4滴の血液を採取した。第3の血液サンプルを得た後、マウスを頸椎脱臼によって屠殺した。血液45 µlを、クエン酸ナトリウム(0.13M)5 µlを入れたエッペンドルフ管に移した。200 µlのFVIII coatest SP緩衝液を添加し、希釈した血液を、室温で5分間、4000gで遠心分離にかけた。ELISA抗原および発色活性分析を用いて、上清を分析した。

【0286】

10

20

30

40

【表 1】

Table 1 化合物および用量

化合物の説明	実施例番号	用量 (IU/kg)	用量体積 (ml/kg)	濃度 *(IU/ml)
中間体 2 と中間体 3 の 反応生成物	2	280	5	56
中間体 2 と中間体 4 の 反応生成物	3	280	5	56
中間体 2 と 3- (mPEGyl)プロパナー ルの反応生成物	1	280	4.30	65.1

10

【 0 2 8 7 】

【表 2】

Table 2 NCA によって得られた PK パラメータ

アッセイ	実施例	Cmax (IU/L)	AUC (h*IU/L)	AUC extrap (%)	T1/2 (h)	Cl (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	MRT (h)
FVIII COA	1	2945	36751	1	11	7.6	116	15
FVIII COA	2	2504	37258	5	13	6.9	137	20
FVIII COA	3	4534	46025	2	9.3	10	121	12
FVIII COA	BDD-FVIII	2740	26000	3	7.8	11	117	11
FVIII ELISA	1	2557	30635	8	13	9.1	160	17
FVIII ELISA	2	2750	39054	4	13	7.2	128	18
FVIII ELISA	3	3020	27927	3	9.6	10	126	13
FVIII ELISA	BDD-FVIII	1990	20000	10	8.2	14	159	12

20

30

【 0 2 8 8 】

3つすべての化合物をi.v.投与投与した後、FVIII発色活性およびFVIII ELISAの両方によって測定すると、Bドメインが欠失したFVIII(BDD-FVIII)(7.8~8.2時間)と比較して、終末相半減期の増大またはわずかな増大(9.3~13時間)が観測される。3つの化合物の平均滞留時間(MRT)(12~20時間)も同様に、BDD-FVIII(11~12時間)と比較して増大した。さらに、化合物のクリアランスは、BDD-FVIII(11~14mL/時間/kg)と比較して低下した(6.9~10mL/時間/kg)。

40

【配列表】

2012518029000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/052022

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/755 A61K38/37 C12P21/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/126808 A (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; SIEKMANN JUERGEN [AT]; VAR) 8 November 2007 (2007-11-08) paragraph [0024] - paragraph [0036]	1-20
A	WO 2006/053299 A (BAYER HEALTHCARE LLC; PAN CLARK Q [US]; MURPHY JOHN E [US]; MEI BAISON) 18 May 2006 (2006-05-18) paragraph [0019] - paragraph [0024] paragraph [0060] - paragraph [0073]	1-20
A	SAENKO E L ET AL: "Strategies towards a longer acting factor VIII" HAEMOPHILIA 200607 GB, vol. 12, no. SUPPL. 3, July 2006 (2006-07) , pages 42-51, XP002542117 ISSN: 1351-8216 1365-2516 the whole document	1-20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 May 2010		28/05/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Donath, Cornelia

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/052022

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RAMOS D ET AL: "Chemoenzymatic synthesis of neoglycopeptides: application to an alpha-Gal-terminated neoglycopeptide." THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY 4 MAY 2001, vol. 66, no. 9, 4 May 2001 (2001-05-04), pages 2948-2956, XP002981410 ISSN: 0022-3263 the whole document</p>	1-20
A	<p>SATO M ET AL: "Site-specific introduction of sialic acid into insulin" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, vol. 43, no. 12, 12 March 2004 (2004-03-12), pages 1516-1520, XP002981412 ISSN: 1433-7851 the whole document</p>	1-20
A	<p>EP 0 379 606 A (AJINOMOTO KK [JP]; AMANO PHARMA CO LTD [JP]) 1 August 1990 (1990-08-01) cited in the application page 3, line 20 - page 8, line 9</p>	1-20



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/052022

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007126808	A	08-11-2007	AU 2007245190 A1	08-11-2007
			CA 2647314 A1	08-11-2007
			EP 2010222 A1	07-01-2009
			JP 2009532351 T	10-09-2009
			KR 20080108147 A	11-12-2008
WO 2006053299	A	18-05-2006	AU 2005304622 A1	18-05-2006
			BR P10517795 A	21-10-2008
			CA 2586379 A1	18-05-2006
			CN 101124331 A	13-02-2008
			EP 1824988 A2	29-08-2007
			HR 20070268 A2	30-09-2007
			JP 2008524117 T	10-07-2008
			KR 20070110260 A	16-11-2007
			NZ 555032 A	26-02-2010
EP 0379606	A	01-08-1990	JP 1027471 A	30-01-1989
			JP 6065280 B	24-08-1994
			US 5156956 A	20-10-1992

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ベルント・ペシュケ

デンマーク・DK - 2 7 6 0 ・モーレウ・エスケビュエーガルド・5 6 ・2 ・ティヴィ

(72)発明者 ディテ・マリア・カーフ

デンマーク・DK - 3 6 7 0 ・ヴェクスー・シェラン・ススム・ススムヴァイ・1 0 5

(72)発明者 ケル・マスン

デンマーク・DK - 3 5 0 0 ・ヴェアルーセ・ニュ・ヴェスタゴースヴァイ・3

Fターム(参考) 4B064 AG00 CA21 CB30 DA01

4C084 AA02 AA06 AA07 BA41 BA42 BA44 CA59 DC15 NA05 NA12

ZA532

4H045 AA10 AA20 AA30 BA57 CA42 DA66 EA24 FA50