

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3911023号

(P3911023)

(45) 発行日 平成19年5月9日(2007.5.9)

(24) 登録日 平成19年2月2日(2007.2.2)

(51) Int. Cl. F I  
**C O 7 K 14/755 (2006.01)** C O 7 K 14/755  
**C O 7 K 17/00 (2006.01)** C O 7 K 17/00  
**C O 7 K 1/06 (2006.01)** C O 7 K 1/06

請求項の数 9 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願平9-513363	(73) 特許権者	バイオビトラム・アクティエボラーク
(86) (22) 出願日	平成8年9月27日(1996.9.27)		スウェーデン国、エス・エー - 1 1 2 7
(65) 公表番号	特表平11-513378		6・ストックホルム
(43) 公表日	平成11年11月16日(1999.11.16)	(74) 代理人	弁理士 川口 義雄
(86) 国際出願番号	PCT/SE1996/001215		弁理士 小野 誠
(87) 国際公開番号	W01997/011957	(74) 代理人	弁理士 井上 満
(87) 国際公開日	平成9年4月3日(1997.4.3)		弁理士 一入 章夫
審査請求日	平成15年7月15日(2003.7.15)	(74) 代理人	弁理士 大崎 勝真
(31) 優先権主張番号	9503380-9		
(32) 優先日	平成7年9月29日(1995.9.29)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドと生体適合性ポリマーとのコンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リコンビナント第 V I I I S Q 因子ポリペプチドの露出された標的を保護する方法であって

a) 陰イオン交換リガンドを有するグループ特異的吸着剤との相互作用によりリコンビナント第 V I I I S Q 因子を固定化し、  
 b) 生体適合性ポリマーを活性化させ、  
 c) 活性化した生体適合性ポリマーを固定化リコンビナント第 V I I I S Q 因子の外側の部位とコンジュゲーションさせ、その後  
 d) 吸着剤からコンジュゲートを溶出させる  
 ことを特徴とする前記方法。

【請求項 2】

第 V I I I S Q 因子の比活性が、固定化前は少なくとも総タンパク質 1 m g 当たり 2 , 0 0 0 I U である請求項 1に記載の方法。

【請求項 3】

第 V I I I S Q 因子の比活性が固定化前は総タンパク質 1 m g 当たり 5 , 0 0 0 から 2 0 , 0 0 0 I U の範囲にある請求項 2に記載の方法。

【請求項 4】

第 V I I I S Q 因子の活性が固定化前は少なくとも 2 , 0 0 0 I U / m l である請求項 1から3のいずれか1に記載の方法。

## 【請求項 5】

第 V I I I S Q 因子の活性が固定化前は 5 , 0 0 0 から 5 0 , 0 0 0 I U / m l の範囲にある請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

生体適合性ポリマーがモノアルキルでキャッピングされたポリアルキレンオキシドのホモポリマー、共重合体又はブロック共重合体からなる群より選ばれたものである請求項 1 から 5 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

モノアルキルでキャッピングされたポリアルキレンオキシドがポリエチレングリコール・ホモポリマーとポリプロピレングリコール・ホモポリマーからなる群より選ばれたものである請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

モノアルキルでキャッピングされたポリアルキレンオキシドがモノメトキシ・ポリエチレングリコール ( m P E G ) である請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

陰イオン交換リガンドが第 4 アミノメチル、第 4 アミノエチル及びトリメチルアミノエチルまたはそれらの混合物からなる群より選ばれたものである請求項 1 から 8 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 発明の分野

本発明は、有機化学合成により生産されたりガンドを有するグループ特異的吸着剤へポリペプチドを固定化し、生体適合性ポリマーを活性化し、この活性化生体適合性ポリマーを固定化ポリペプチドとコンジュゲーションし、その後吸着剤からコンジュゲートを溶出させることにより、当該ポリペプチドの露出した標的を保護してそのポリペプチドのインビボでの機能を改善する方法に関する。本発明はさらに本方法により得られるポリペプチドと生体適合性ポリマーとのコンジュゲートおよび当該コンジュゲートの薬剤としての使用に関する。とりわけ、ポリペプチドは第 VIII 因子、フォン・ウィルブランド因子または第 IX 因子である。この発明は特に、ポリペプチドが高比活性を有する第 VIII 因子で、生体適合性ポリマーとしてモノメトキシポリアルキレンオキシド ( m P E G ) を用いたコンジュゲートが望ましい。

## 発明の背景

ポリペプチドのインビトロでの安定性とインビボでの半減期が生体適合性ポリマー ( biocompatible polymer ) への共有結合により増加することは良く知られている ( 以下、コンジュゲーションまたは修飾と呼ぶ ) 。ポリペプチド表面の修飾はまた、ポリペプチドが示す免疫原性を減らすという利点もある。

ペジル化 ( pegylation ) 、すなわち、いろいろなポリエチレングリコール ( PEG ) をポリペプチドに結合させることは、例えばタンパク質のインビトロでの安定性とインビボでの半減期を増加するために広く用いられている技術である。ペジル化については何年にもわたって多くの技術が提案された。このことは Zalipsky, S. et al in Poly ( Ethylene Glycol ) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, New York ( 1992 ) , and Katre N.V., Adv. Drug Deliv. Rev., 10, 91-114 ( 1993 ) に論及されている。

ある種のタンパク質ではこのコンジュゲーションの結果、活性や機能の低下が認められ、その効果は修飾程度により増加する ( Inada, Y. et al, Trends in Biotechnology, 13, 86-91 ( 1995 ) ) 。この問題を回避すべく結合をより選択的にする方法が開発された。例えば、部位特異的突然変異がリコンビナントインターロイキン - 2 ( rIL-2 ) に適用された。特異的な標的はシステインの挿入により創られる ( Goodson, R. J. and Katre, N. V., Bio/Technology 8, 344-346 ( 1990 ) ; Katre 1993, 上を参照 ) 。そのような手段は一般的には治療用タンパク質には適用できない。なぜならばアミノ酸置換は分子の元々の性格を変えその結果、問題が生じるからである。その代わりに、ポリマーはタンパク質の糖鎖形成部位に直接結合させることができる。例えば、W0/94/29370 ( Enzon ) で開示された第 IX 因子 ( fact

10

20

30

40

50

or IX) がある。しかし、この場合、糖タンパク質を過ヨウ素酸ナトリウムと反応させたりガラクトースオキシダーゼにより酵素的に処理をしたときに起こりうる炭化水素部分の酸化を伴う。このような状態は分子にとって有害であることが多い。この開示された例では、コンジュゲーションしようとする糖鎖形成部位は第IX因子のインビボで加水分解活性化の間に除去されてしまうペプチド配列に存在していた。それゆえ、生体適合性ポリマーは活性ポリペプチドの機能に影響しない。

W094/13322 (Farmitalia Carlo Erba) には、特定のタンパク質 (第1物質) の機能に不可欠な部位の機能を損なわずに行われるペジル化が示されている。これは第1物質の機能部位に特異的に結合しうる第2物質と接触させ、その部位を防護することにより達成される。さらに詳細には、特定のタンパク質を当該タンパク質に対して特異的な親和性を有するリガンドを用いてレジンに固定化して、ペジル化を行う。第2物質は例えば相補的な生物学的分子である。W094/13322には、抗体 (第1物質) - 対応する抗原 (第2物質)、特異的阻害剤 (第1物質) - 酵素 (第2物質)、成長因子 (第1物質) - 対応するレセプター (第2物質) の対、またはこれらの対を逆にした対が例として開示されている。

しかし、医薬製造を意図したプロセスでは、生物学的に複雑な物質の使用を最小限に抑えることが好ましい。これは主として、当該物質の生物化学的な均一性および使用時の安定性の検証が厳密に要求されるからである。従って、有機化学合成により製造されるアフィニティリガンドを使用するのが望ましい。

DE3717210はバイオポリマー、好ましくは電荷を有するバイオポリマーの修飾に関する。バイオポリマーを、例えばイオン交換吸着剤に固定化し、酵素や他の生物化学的試薬などの試薬と反応させ反応生成物を得て、次いで反応生成物を吸着剤から脱着させるというプロセスである。反応生成物は好ましくは制限酵素により切断された核酸である。DE3717210では、吸着した状態のバイオポリマーを利用してバイオポリマーと試薬の接触 (露出) をより良好にし、それにより修飾効率を上げている。しかし、インビボでのバイオポリマーを機能上有利にする、露出した標的を保護することについてもバイオポリマーの活性を維持することについても開示されていない。DE3717210の発明は核酸などの生物分子の特性のマッピング、実際上のプロセシングによる元来の性質の変更、または放射性同位元素の結合などによる高分子の機能的実体 (functional entities) の数の増大を目的にしたにすぎない。

治療用を意図した多くのタンパク質が、様々なペジル化技術を用いてコンジュゲーションされている (Francis, G.E. et al, in Stability of Protein Pharmaceuticals/Series: Pharmaceutical Biotechnology 3, 235-263 (1992); Inada, Y. et al, Trends in Biotechnology, 13, 86-91 (1995))。多くの例は静脈内投与に関する。しかし、m-PEGとアレルゲンとのコンジュゲートの皮下投与後の血漿、肺、肝臓、脾臓への取り込みが開示され、m-PEGとアレルゲンとのコンジュゲートの皮下投与による免疫療法が有効であることが立証されている (Dreborg, S. and Kerblom, E.B., Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Sys. 6 (4), 315-365 (1990))。また、筋肉内投与はアデノシンデアミナーゼの臨床試験で用いられた (Hershfield, M.S. et al, New Eng. J. Med. 316, 589-596 (1987))。また、少数ではあるが、ペジル化は経口投与でも有益であると主張されている。経口投与のためのIgGのペジル化はMount Sinai School of MedicineのEP-A-0614373に開示された。経口投与のための第VIII因子と第IX因子のペジル化はSakuragawa et al, Acta Med. Biol., 34 (3), 77-84 (1987) とNippon Chemifar Companyの日本特許出願番号No. 44509/83に開示された。

第VIII因子は本質的に備わっている血液凝固に関与するタンパク質であり、リン脂質とカルシウムイオンの存在下で、酵素第IXa因子が酵素前駆体第X因子を最終的にフィブリン塊を導く活性体、第Xa因子に変える反応の補因子である。ヒトの第VIII因子は約300キロダルトンの単鎖分子として合成され構造的ドメインA1-A2-B-A3-C1-C2からなる (Gitschier et al., 1984, Nature 312, p. 326; Wood et al., 1984, Nature 312, p. 330; Vehar et al., 1984, Nature 312, p. 337; Toole et al., 1984, Nature, 312, p. 342)。前駆体産生物はゴルジ体で200キロダルトンと80キロダルトンの2つのポリペプチド鎖にプロセスされ、2つの鎖は金属イオンの働きで結合を保ち、血液中出现する (Kaufman et al., 1988, J. Biol

10

20

30

40

50

.Chem.,263,p.6352;Andersson et al.,1986,Proc.Natl.Acad.Sci.,83,p.2979)。第VIII因子のBドメインは第VIII因子の補因子機能に関して不可欠であるとみられているのに対して、A,Cドメインは止血において役割を果たす別の高分子と相互作用する部位を持つ(Sandberg et al.,1993,Thrombos.Haemostas.,69,p.1204 and Lind et al.,1995,Eur.J.Biochem.,232,p.19)。

フォン・ウィルブランド因子(vWf)は約240キログルトンのジスルフィド結合したサブユニットからなる多機能ポリマー血漿タンパク質である。これらのサブユニットは、約1メガダルトンから20メガダルトンの分子量を有する多量体の不均一な集団を形成する。1次止血におけるvWfの機能は高い剪断速度の状況下で血小板の血管壁への接着を促進することにある。vWfはまた第VIII因子と共有結合ではないが、強く結合する。正常ヒト血漿中で第VIII因子とvWfは互いに複合体を作って循環する。vWf第VIII因子をプロテアーゼによる分解から保護するという点で、第VIII因子分子の重要な安定化効果を有する(Koedam et al.,1987,Doctoral Thesis,ICG Printing,Dordrecht,1986,p83;Hamer et al.,1986,Haemostasis,1987,58,p.223)。ヒトの第VIII因子のインビボでの半減期は通常10~15時間である。vWf欠乏の患者において、低下したvWfレベルは第VIII因子の放出の低下と第VIII因子の分解速度の上昇に起因する第VIII因子レベルの低下を伴う。Tuddenham et al.,1982,Br.J.Haemato.,52,p.259およびBrinkhous et al.,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.,82,p.8752はvWfの存在が第VIII因子のインビボでの残存に対して重要な効果があることを示した。第VIII因子を血友病の犬に注入したときの半減期は7~10時間であったが、vWf欠乏犬に注入した後は約1時間であった(Brinkhous et al.,上を参照)。

第IX因子は上述の第IXa因子の酵素前駆体である。第IX因子はセリンプロテアーゼで、ビタミンK依存凝固タンパク質の1つであり、分子量は約55キログルトンである(DiScipio et al.,1977,Biochemistry,16,p.698)。第IXa因子は他の成分と特異的に相互作用して第X因子を活性化する(In:Haemostasis and Thrombosis,1994,vol.1,third edition,ed.Bloom A.et al.)。

上のパラグラフから明らかなように、第VIII因子はそれぞれ特異的な機能を引き受けるいくつかの相互作用部位を有するタンパク質である。それゆえ、第VIII因子を生物学的機能を充分保持したまま修飾するのは困難である。

ベジル化技術は以前に第VIII因子を含むタンパク質混合物に適用された。W094/15625(Enzon)に、修飾程度は測定不可能であるが、第VIII因子に対して100倍モル過剰のmPEGを混ぜ、カルバミン酸(ウレタン)結合を利用して第VIII因子をベジル化すると、マウスのインビボでの半減期を13時間から55時間に増加させ得ることが開示されている。マウスにおける半減期は通常約1時間であると考えられている。それゆえ、13時間というのは異常に長い半減期である。その上、最初の第VIII因子試料の極めて低い精製度(20-50IU/mgタンパク質)を考えると、カップリング反応の間第VIII因子よりも他のタンパク質が優勢であったことを考慮しなければならない。低い精製度の第VIII因子試料の中に通常存在する重要なタンパク質はフォン・ウィルブランド因子であり、それは第VIII因子の機能を安定化させると共にコンジュゲーションプロセスの間、対応する機能部位の保護に非常に良く貢献し得る。コンジュゲーション後、mPEGは、通常第VIII因子を少しだけ含むタンパク質混合物中のどのタンパク質上にも存在し得る。第VIII因子を含むベジル化タンパク質混合物は静脈内投与に用いられた。しかし、薬品製造に要求される管理条件として、最初に含まれる物質を十分に明らかにすることが不可欠である。

他のポリマーも第VIII因子のコンジュゲーションに用いられている。U.S.Patent 4,970,300にはデキストランコンジュゲートが第VIII因子の半減期を長くできることが開示されている。

ほとんどのカップリング技術でポリマー試薬はポリペプチドのリシン残基の $\epsilon$ -アミノ基と反応する。この基はポリペプチドの表面全体に存在し、機能部位に近接してのコンジュゲーションが生じる。この結果、ランダムカップリングによって、活性や機能が破壊されることが多い。我々の経験では、凝集活性を有するB-ドメイン欠失リコンビナント第VIII因子のような非常に精製度の高い試料にこのような技術を適用するとき、第VIII因子1分

10

20

30

40

50

子当たり約5mPEGの修飾程度で活性は著しく低下する。

#### 発明の概要

本発明の発明者は、ポリペプチドをカップリング反応前にグループ特異的吸着剤 (group-specific adsorbent) に単に固定化し、その後、通常の技術により脱着させることにより、コンジュゲートされたポリペプチドの比活性が高度に維持され得ることを見いだした。これは全く驚くべきことである。なぜならば、これまでは生物学的機能に重要なドメインの保護を達成するためには、問題となっているポリペプチドに関して特異的に結合する性質を有する吸着剤を使用することが必要と考えられていたからである。

修飾に用いる生体適合性ポリマーの利点は修飾の程度に依存することが多い。ゆえに、高度の修飾、即ちポリペプチド1分子当たりの多数の生体適合性ポリマーが加水分解活性に対する効率的な防御のために要求されるのが普通である。本発明では生体適合性ポリマーがより選択的に導入されるので、特異的活性は良く維持される。こうして、本発明の発明者は第VIII因子に対する分解活性が認められるインビトロの環境下で、第VIII因子を分解から効率的に保護し得ることを見い出した。この効果は第VIII因子当たりわずか4-5mPEGの修飾程度で達成され得る。

本発明によればグループ特異的吸着剤の使用は先行技術に開示された吸着剤に比べ経済的である。グループ特異的吸着剤の使用はまた治療薬としてコンジュゲートを登録するときにより有利である。

本発明の方法によると、特に生物学的利用能 (bioavailability) を含む薬物動態学的機能を改善することにより、またポリペプチドが示す免疫原性を減らせることにより、ポリペプチドのインビボでの機能を改善することができる。

それゆえ、本発明はポリペプチドの露出された標的を防護することにより当該ポリペプチドのインビボでの機能を改善する方法に関する。本方法においては、

- a) 有機化学合成により製造されたりガンドを有するグループ特異的吸着剤との相互作用によりポリペプチドを固定化し、
- b) 生体適合性ポリマーを活性化し、
- c) 固定化ポリペプチドと活性化した生体適合性ポリマーとをコンジュゲーションし、その後
- d) 吸着剤からコンジュゲートを溶出する。

#### 発明の詳細な説明

本発明では、相互作用部位という語は特定のポリペプチドの生物学的機能に必要ないろいろな部位に関連する。

本発明では、露出された標的という語は、インビボで望ましくない反応を受けやすい問題となるポリペプチド上の外側の部位に関連する。例えば、抗原性を有するエピトープや加水分解の開裂部位がある。ある種の加水分解開裂部位は相互作用部位とも呼ばれる。

本発明は、例えば加水分解開裂や凝集などのインビボでの望ましくない反応の影響を低下させることを可能にする一方で、ポリペプチドの生物学的機能に必要な相互作用部位には影響しない。従来、これは不可能であった。このことは(リコンビナント)第VIII因子のmPEGコンジュゲーションの適用により明らかになった。より詳細には、有機化学合成により製造されたりガンドを有するグループ特異的吸着剤との相互作用によるポリペプチドの固定化により、ポリペプチド上の相互作用部位は生体適合性ポリマーへのコンジュゲーションから保護される。その上、活性化された生体適合性ポリマーをポリペプチドの望みの外側の部位へコンジュゲーションすることにより、露出した標的はタンパク質分解酵素などの働きから守られる。

本発明において、ポリペプチドは鎖中に少なくとも20アミノ酸を有するタンパク質やオリゴペプチドを意味する。本発明により産生されるポリペプチドのアミノ酸の数は30~4,500の間で、好ましくは40~3,000である。ポリペプチドはほ乳類、特にヒト由来か、またはリコンビナントDNA技術により生産されたものであってもよい。本発明によりコンジュゲートされ得るポリペプチドには凝集活性を表すポリペプチド、または凝集に対して補助機能を有するポリペプチドが含まれる。ポリペプチドは完全長のものであってもよい。す

10

20

30

40

50

なわち、アミノ酸の配列は一般的には乳類に見出せる配列および特にヒトに見出せる配列に一致するアミノ酸配列であっても良い。ポリペプチドはまた1つ以上のアミノ酸が失われた完全長ポリペプチドの欠失誘導体であっても良い。ポリペプチドは第VIII凝集因子、フォン・ウィルブランド因子(vwf)並びにそれらの組合せ、または第IX凝集因子が適しており、第VIII凝集因子が好ましい。ヒト血しょうに存在する完全長第VIII因子は約300キロダルトンの分子量を有する。ヒト血しょう由来の第VIII因子濃縮物はAndersson et alに記載されたいくつかの断片化された完全に活性な第VIII因子型を含む(上を参照)。最も小さい活性型は約170キロダルトンの分子量を有し金属イオンにより結合している約90キロダルトンと約80キロダルトンの2つの鎖からなる。このことはPharmacia & Upjohn ABによるEP-A-0 197 901で論及されている。それゆえ、本発明に従って生産される生物学的に活性な第VIII因子は約170キロダルトンから約300キロダルトンまでの範囲の分子量を有するものが適切である。

Pharmacia Ab of Stockholm, Swedenは治療用第VIII因子濃縮物中の170キロダルトン血しょう第VIII因子型に対応したリコンビナント第VIII因子を開発した。截形(truncated)リコンビナント第VIII因子分子はr-VIIISQと呼ばれ無血清培地での細胞培養系でチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞により生産される。r-VIIISQの比活性は総タンパク質1mg当たり約15,000IU VIII:Cであった。r-VIIISQの構造と生化学はPharmacia ABに譲渡されたW0-A-91/09122に記載されている。

本発明では、第VIII因子は血しょう第VIII因子またはリコンビナント第VIII因子のどちらでもよい。第VIII因子がリコンビナントのとき、それは完全長の第VIII因子であるか、または好ましくは凝集活性を有する完全長の第VIII因子からの欠失誘導体である。さらに好ましくは、欠失誘導体はリコンビナント第VIIISQ因子(r-VIIISQ)である。ここで、欠失誘導体はBドメインの全部または一部が失われているが凝集活性は残っている凝集第VIII因子と定義される。残りのドメインはアミノ酸リンカーと結合する。いろいろなリンカーの構造の例はP.Lind et al, Eur. J. Biochem., vol. 232 (1995) pp. 19-27に示されている。本発明は多種の第VIII因子製造物中に生体適合性ポリマーを選択的に導入するのに使用することができて有益である。それゆえ、本発明はフォン・ウィルブランド因子(vwf)であるキャリアタンパク質との共働によりすでに安定化しているインビボでの血しょう第VIII因子をさらに安定化させるために用いることができる。

最終生産物が明確になっているのは有利である。それゆえ、本発明のカップリング後の第VIII因子比活性は少なくとも約1,000IU/mg総タンパク質であり、少なくとも2,000IU/mg総タンパク質が適している。第VIII因子比活性は好ましくは5,000~20,000IU/mg総タンパク質の間であり、さらに好ましくは10,000~17,000IU/mg総タンパク質の間である。

カップリング後の第VIII因子活性は少なくとも約1,000IU/mlであり、少なくとも2,000IU/mlが適している。第VIII因子活性は好ましくは5,000から50,000IU/mlの間であり、さらに好ましくは20,000~40,000IU/mlの間である。

本発明の生体適合性ポリマーは、モノアルキルでキャッピングされたポリアルキレンオキサイドのホモポリマー、共重合体またはブロック共重合体からなるグループから選択される。生体適合性ポリマーは直鎖でも分枝があってもよい。モノアルキルでキャッピングされたポリアルキレンオキシドはポリエチレングリコールホモポリマーとポリプロピレングリコールホモポリマーからなるグループより選択されるのが適している。生体適合性ポリマーは好ましくはポリエチレングリコール(PEG)ホモポリマーである。PEGの分子量は約300~20,000までで、このなかでも1,500~10,000までが適しており、好ましくは3,000~5,000までである。

生体適合性ポリマーは交差誘導体化(cross derivatization)を防止すべく一端がキャッピングされている。この目的のために適した基の例は直鎖または分枝鎖の低級アルコキシ基であり、好ましくはモノメトキシ基である。当該発明の中で特に好ましい生体適合性ポリマーはモノメトキシポリエチレングリコール(mPEG)である。

他の生体適合性ポリマーもまた考えられる。例えばデキストラン、ポリビニルピロリドンとDLアミノ酸がある。

10

20

30

40

50

生体適合性ポリマーは共有結合が形成されるようにカップリング反応の前に活性化されなければならない。この目的のため、ポリペプチドに接する生体適合性ポリマーの終端には活性化されやすい水酸基が結合していなければならない。生体適合性ポリマーを活性化する方法は、共有結合形成のために選択されたアミノ酸に依存して多数ある。アミノ基へのカップリングに適したmPEG誘導体はmPEGスクシニイミジルスクシネート、mPEGスクシニイミジルスクシンアミド、mPEGスクシニイミジルプロピオネート、mPEGスクシニイミジルカーボネート、カルボキシメチル化されたmPEGスクシニイミジルエステル、mPEGオキシカルボニルイミダゾール、mPEGニトロフェニルカーボネート、mPEGトリクロロフェニルカーボネート、mPEGトレシレート（最後のものはNilsson K., Mosbach K., *Methods in Enzymology*, Vol104, pp56-69 (1984)）,（ここに挙げた総ての試薬はShearwater Polymer, Inc., Huntsville, AL, USAで市販されている）, mPEG無水マレイン酸並びにmPEG無水メチルマレイン酸（Garman A., Kajindjian S.B., *FEB Vol223:2*, pp361-365）及びmPEGコハク酸の混合酸無水物、mPEG酢酸またはmPEGプロピオン酸である（Dreborg S. and Akerblom E., 上を参照）。

システイン残基はmPEGマレイミド、mPEGビニルスルホン及びmPEGオルトピリジルジスルフィドとコンジュゲートしうる（Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USAが市販）。アルギニンのグアニジノ基のコンジュゲーションに適した試薬はフェニルグリオキサールのmPEG誘導体である（Zalipski 上を参照）。

炭化水素は最初に酸化されるに違いないのでアルデヒド基が存在しmPEGヒドラジドとコンジュゲートしうる（Zalipski 上を参照）。

カップリング手順はアミノ酸がコンジュゲーションされるのに適したpHで行われる。この際、生体適合性ポリマーの反応性がpHに依存することと同様に、ポリペプチド全体として適したpHがあることも考慮されなければならない。それ故、通常カップリングのためのpHは約7から約8の間にある。約7はカップリング過程の延長を避けるための下限値であり、また約8はポリペプチドに対して穏和な条件を与える上限値である。このpH範囲はリシンの関与するコンジュゲーションに適している。それゆえ、本出願の実施例では、そのような穏和な条件下で第VIII因子活性を有する物質をコンジュゲートした。この範囲外のpH値もときには適している。例えば、システインが関与するコンジュゲーションは約7より下のpHが適しているが、アルギニンは約5.5から約9.3のpH範囲が適している。

カップリング手順は0より上の温度で行われ、約5から約40が適しており、好ましくは10から30である。ここでも、生体適合性ポリマーへの反応温度が影響するのと同じく、ポリペプチド全体に適した温度も考慮しなければならない。本出願の実施例では、すべてのカップリング過程は室温で行われた。

本発明で用いられた吸着剤は固定化すべきポリペプチドに関してはグループ特異的（group-specific）である。グループ特異的吸着剤はいろいろなポリペプチドに対して親和性を有する。とりわけ、その結合は比較的弱い場合が多く、その溶出は、単一かまたは非常に少数のポリペプチドに結合する単一特異的（mono-specific）吸着剤の場合より穏和な条件で行われる。適切なグループ特異的な吸着剤はJansson, J.-C. et al, *Protein Purification, Principles, High Resolution Methods, and Applications*, VCH Publishers, pp.274-285 (1989) が参考文献として載っている。本発明の吸着剤はさらに有機化学合成により製造されたりガンドを有することを特徴とする。この基準に適合した吸着剤の例として、一般的にタンパク質の吸着に使用できるクロマトグラフィー用樹脂がある。クロマトグラフィー用樹脂には例えば、陰イオンおよび陽イオン交換基、スルフヒドリル基、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）基、直鎖若しくは分枝鎖で飽和若しくは不飽和の炭化水素鎖および芳香族基のようなリガンドを結合させた生体適合性基質がある。混合機能リガンド、例えば、アミノアルキルまたはジメチルアミノプロピルカルバミルペンチルのようなイオン性及び疎水性部分を有するリガンドも有用である。これらの2つのリガンドは血しょう由来第VIII因子の精製に有益であると報告されている。これらはMorgenthaler et al, *Thromb. Haemostas.* 47 (2), 124ff. (1982) and Te Booy, M. P. W. M., et al, *J. Chrom.* 503, 103-114 (1990), にそれぞれ開示されている。アミノア

10

20

30

40

50

ルキルの好ましい例はアミノヘキシルである。有機化学合成により合成されたペプチド、リン脂質のようなより複雑なリガンドも使用しうる。当業者ならば、有機化学合成により合成されたグループアフィニティリガンドにはいろいろな物質が含まれることがわかる。反応性のトリアジンベースの繊維染料は、キナーゼやヒドロゲナーゼのようないろいろな酵素の吸着剤として有用である。また、有機化学合成により合成された糖誘導体、ヌクレオチドやペプチド、それらの類似体も有益である (Dechow, F.J., Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, USA, p.440-443 (1989))。

本発明での使用に適したリガンドにはさらに陰イオン交換基があり、第4アミノエチル (QAE)、トリメチルアミノエチル (TMAE)、第4アミノメチル (Q) のように強いものが好ましく、第4アミノメチル (Q) はさらに好ましい。リガンドはさらに基質に強く結合しうる、またアルキルアミン、ヘキシルアミン、ジアミノジプロピルアミン、エチルアミノスクシンアミド (Persson & Lagerstrom, in Packings and stationary phases in chromatographic techniques, Unger, K.K., ed., Marcel Dekker Inc. 1990, p.754) のようなスパーサーを介して、さらにまたリガンドが結合する分枝した触手 (tentacle) (Merck of Germany製造のFractogel TME MD Merck of Germanyが好例である) を介して強く結合しうる。当該カップリング手順の後、ポリペプチドのコンジュゲートは通常の技術で溶出される。この際、ポリペプチドのコンジュゲートの分解を避けるために、物理化学的条件を考慮することが必須である。カップリング経路がある範囲内のpHで不安定なコンジュゲーション結合に関わるならば、これを避けなければならない。

カップリング手順の中で、ポリペプチドが吸着剤上に固定化されているとき、ポリペプチドを可溶性ブロッキング試薬と接触させることにより、ポリペプチドの別の部位がコンジュゲートされるのを防止できる。そのようなブロッキング試薬は有機化学合成により合成すべきで、さらに、ポリマーに結合した上記定義のリガンドのいずれとも結合すべきである。このポリマーは例えば、モノアルキルでキャッピングされたポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンオキシドの共重合体またはブロック共重合体、ポリエチレングリコールホモポリマーまたはポリプロピレングリコールホモポリマーから選ばれる。ブロッキング試薬はそれ自体がポリペプチドに対する特異的親和性を有することがある。

溶出後、可溶性ブロック試薬は適切な化学的条件下で脱着される。例えば、ブロッキング試薬が疎水結合で吸着しているならば、イオン強度を下げるか又は単純に温度を下げることで脱着できる。可溶性ブロッキング試薬はその後、通常の条件でゲル浸透クロマトグラフィーによりコンジュゲートから分離される。

本発明に用いる吸着剤の基質 (matrix) として、生物学的分子と適合することが知られている市販のレジンが使用できる。基質としていろいろな強親水性基質を選択しうる。強親水性基質には例えばPharmacia Biotech of Uppsala, Swedenにより市販されている多様なSephacrose<sup>TM</sup>のようなアガロース基質、Tosoh Corp. of Tokyo, Japanにより市販されているTSK-GELのような有機ポリマー基質、PerSeptive Biosystems of Boston, USAにより市販されている高度に多孔性の有機ポリマー基質がある。また、膜基質も適している。例えば、Sartorius of Germanyにより市販されているSartobind<sup>TM</sup>、Millipore of USAにより市販されているMemSep<sup>TM</sup>がある。アガロース基質が基質として好ましい。本発明に適したアガロース基質は、Sephacrose<sup>TM</sup>に加え、Kem-EnTec A/S of Copenhagen, Denmarkにより売られているMinileak<sup>TM</sup>、Bio-Rad, of Brussels, Belgiumにより売られているBio-Gel Aがある。基質は早い速度 (FF) とそれがもたらす高い生産力を持つ架橋されたものが好ましい。本発明のクロマトグラフィーはQ Sepharose<sup>TM</sup> FF gelにより行われることがさらに好ましい。さらに、オリゴエチレングリコール、グリシジルメタクリレート、Fractogel<sup>TM</sup> (Merck of Germanyが市販) のようなペンタエリトロールジメタクリレート、セルロースおよび多孔性ガラスも有益である。

本発明方法で得られるポリペプチドと生体適合性ポリマーのコンジュゲートは新規である。本方法により、コンジュゲーション後のポリペプチド活性は当該コンジュゲーション前の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも70%を維持

10

20

30

40

50



できる。

本発明方法で得られるポリペプチドと生体適合性ポリマーのコンジュゲートは医薬として用いることができる。特に、本方法により生産された第VIII因子、フォン・ウィルブランド因子、これらの組合せまたは第IX因子のいずれか1つと生体適合性ポリマーのコンジュゲートは医薬として使用できる。第VIII因子と生体適合性ポリマーのコンジュゲートの医薬としての使用は、コンジュゲーションの程度がモノアルキルでキャッピングされたPEG / 第VIII因子の分子比が1 ~ 15のときに有益で、好ましくは2 ~ 10で、さらに好ましくは3 ~ 7である。この場合、リコンビナントDNA技術により生産された第VIII因子のコンジュゲートが適しており、凝集活性を有する完全長の第VIII因子のリコンビナント欠失誘導体が好ましく、リコンビナント第VIIIISQ ( r-VIIIISQ ) の欠失誘導体はさらに好ましい

10

。本発明のポリペプチドコンジュゲートは皮下、筋肉内、皮内または静脈内に投与するのが適している。特に第VIII因子のコンジュゲートは血友病Aの治療、特に皮内、筋肉内、皮下または静脈内投与による治療用医薬の製造に用いられる。さらに、vWfコンジュゲートはフォン・ウィルブランド病の治療用、特に皮内、筋肉内、皮下または静脈内投与による治療用医薬に用いられる。本発明に従ってそれぞれコンジュゲートさせた第VIII因子とフォン・ウィルブランド因子は組み合わせて使うこともできる。また、第IX因子コンジュゲートも血友病Bの治療、特に皮内、筋肉内、皮下または静脈内投与による治療用医薬の製造に用いられる。

本発明は、さらに本方法に従って生産される第VIII因子と生体適合性ポリマーのコンジュゲートの皮内、筋肉内、皮下または静脈内投与による血友病Aの治療法に関する。

20

#### 実施例

以下の実施例は例示を目的に挙げたに過ぎず、請求の範囲で明示された本発明の範囲をいかなる意味でも限定的に解釈するためのものではない。

#### 実施例 1

##### リコンビナント第VIII因子の調製

リコンビナント第VIIIISQ ( r-VIIIISQ ) 因子の生産は本質的には特許W0-A-9109122、実施例1 ~ 3に記載されたように行った。DHFR欠損CHO細胞株 ( DG44N.Y ) にr-VIIIISQ遺伝子を含む発現ベクターとジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を含む発現ベクターをエレクトロポレーションにより導入した。選択培地による選択後生き残ったコロニーを、メトトレキサート量を段階的に増加させた増殖により増幅した。生じたコロニーの上清はコロニー毎に第VIII因子活性を測定してスクリーニングした。産生クローンを選択し、ついで明示の無血清培地で浮遊増殖させ、最後に大量培養により増やした。ある時間経ったところで上清を集め以下に述べるように精製した。

30

コンディションドメディウムをフィルトレーションにより浄化し、pHを調整し、次いで、ろ液をS Sepharose<sup>TM</sup> FFカラム ( カラム容積は3L ) にのせた。洗浄後、第VIII因子を5mM CaCl<sub>2</sub>と0.02% Triton<sup>TM</sup> X-100を含む塩バッファーで溶出した。この陽イオン交換クロマトグラフィー過程は2 ~ 8で行った。S Sepharose<sup>TM</sup> FF過程で得られた溶出液 ( S-溶出液 ) はさらに精製するまで凍結した。

700mLのS-溶出液を融解させ室温に戻した。リン酸トリ-n-ブチル ( TNBP ) とTriton<sup>TM</sup> X-100をそれぞれ最終濃度0.3% ( V/V )、1% ( V/V ) で30分間インキュベーションすることによりウィルスを不活性化した。260mLのモノクローナル抗体 ( mAb ) イムノアフィニティーカラムを、ウィルス不活性化薬品を前述の濃度で含むS-溶出液を用いて平衡化した。次いで、第VIII因子溶液をmAbカラムにのせ、その後洗浄した。溶出は50%のエチレングリコールを含むバッファーで行った。

40

Q Sepharose<sup>TM</sup> カラムは高濃度の塩化ナトリウムでプレ平衡化し、次いでイムノアフィニティーカラムの溶出に用いたのと同じ組成のバッファーで平衡化した。mAb溶出液をのせ平衡化バッファーで洗浄し、次いで生理的イオン強度のバッファーで洗浄した。NaCl濃度を0.6Mに上げることによりカラムから溶出した。Q-カラムの洗浄、溶出には界面活性剤は使用しなかった。ブチルSepharose<sup>TM</sup> 4FFカラムを50mMヒスチジン、1.4M NH<sub>4</sub>Ac、50mM Ca

50

Cl<sub>2</sub>と0.02% Tween<sup>TM</sup> 80を含むバッファーpH6.8で平衡化した。NH<sub>4</sub>Acを最終濃度1.0Mになるように、Tween<sup>TM</sup> 80を最終濃度0.02%になるようにQ-溶出液に添加した。この溶液を60cm/hの直線流速でブチルゲルカラムにのせた。次いで、カラム容積の5倍量の平衡化バッファーでカラムを洗浄し、次いで、50mMヒスチジン、0.5M NH<sub>4</sub>Ac、50mM CaCl<sub>2</sub>と0.02% Tween<sup>TM</sup> 80を含むpH6.8のバッファーを用いて35cm/hの直線流速で溶出した。この調製品の精製度は非常に高く12,000～17,000IU/mgタンパク質の比活性を有する。

#### 分析

実施例1～8で第VIII因子活性は他の方法が述べられていない限り色素アッセイ (Chromogenic AB of Molndal, Sweden) で行った。第VIII因子の量はA280で分光光度学的に、およびアミノ酸分析により決定した。ポリペプチドに結合したmPEGの量はプロトンNMR法 (Dreborg, S. and Kerblom, E. B., Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Sys. 6 (4), 315-365 (1990)) により測定した。

#### 実施例2 (比較のための実施例)

##### mPEGコハク酸の混合無水物とコンジュゲーションされる第VIII因子

実施例1に従って調製されたHIC溶出液のバッファー組成は、あらかじめ0.25M hepes, 4mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.8の組成のバッファーで平衡化されたSuperose 12カラム (Pharmacia Biotech of Uppsala, Swedenが市販) を用いたゲル浸透クロマトグラフィーにより置換した。r-VIIIISQ溶液の一部に35、60または100倍モル過剰 (r-VIIIに対して) のmPEGコハク酸の混合無水物 (MW 3,000) を添加した。混合液を室温において回転装置上で1.5時間反応させた。過剰のmPEGコハク酸を除去し、不均一なrVIIIコンジュゲートをサイズに従って分離するために、今度はSuperose 6カラム (Pharmacia Biotech of Uppsala, Swedenが市販) を用いて、ゲル浸透クロマトグラフィーを行った。各々のカップリング反応でタンパク質ピークの最初の半分と2番目の半分の別々に分析した (表1にプール1とプール2として示した)。表1はr-VIIIISQとmPEGコハク酸混合無水物とのコンジュゲーションの結果を示す。

表 1

	r-VIII SQ (mg)	添加 mPEG 量 (モル過剰)	修飾程度 (mPEG/rVIII)	比活性 (IU/mg)	比活性 (%天然r-VIII SQ)
天然 r-VIII SQ	-	0	0	15,000	100
35*mPEGプール1	1.2	35	2.5	4,200	28
35*mPEGプール2	1.2	35	1.2	6,800	45
60*mPEGプール1	1.6	60	2.4	2,000	13
60*mPEGプール2	1.6	60	na	4,800	32
100*mPEGプール1	1.1	100	4.8	1,300	9
100*mPEGプール2	1.1	100	3.8	2,700	18

表1から明らかなように、rVIIIの比活性はこのコンジュゲーション程度の低い条件でも劇的に低下した。

#### 実施例3

##### mPEGコハク酸混合無水物との結合の間のQセファロースFFゲルに吸着した第VIII因子

第VIII因子分子上の負電荷に囲まれた反応性のリシンは、陰イオン交換ゲル上に第VIII因子が吸着しているのでmPEGとのコンジュゲーションから保護された。50mM L-ヒスチジン、0.15M NaCl, 4mM CaCl<sub>2</sub>, pH6.5の組成のバッファーで平衡化されたQ Sepharose<sup>TM</sup> FF (Pharmacia Biotech of Uppsala, Swedenが市販) を詰めたカラムを第VIII因子の吸着に用いた。実施例1に従って調製されたHIC溶出液をカラムにのせた。mPEGカップリングのための適当な条件を得るために、mPEGを添加する前にカラムを0.25M hepes, 4mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.8のバッファーで洗浄した。ゲルを反応容器に移し、mPEGコハク酸混合無水物 (MW 3,000) を、表2に示した第VIII因子に対するモル過剰に対応する量をスラリーに添加した。反応は

回転させながら 1 . 5 時間行った。カラムを再度ゲル詰めし、rVIIIコンジュゲートを 50mM L-ヒスチジン, 0.6M NaCl, 4mM CaCl<sub>2</sub>, pH6.8 バッファーで溶出した。ゲルの量当たりの r-VIIISQ 添加量を一定にして、4 回の調製を行った。総ての過程を室温で行った。表 2 は Q Sepharose<sup>TM</sup> FFゲルに吸着した r-VIIISQ コンジュゲートの結果を示す。

表 2

	r-VIIISQ (mg)	添加 mPEG 量 (モル過剰)	修飾程度 (mPEG/rVIII)	比活性 (IU/mg)	比活性 (%天然 r-VIIISQ)
天然 r-VIIISQ	-	0	0	15,000	100
調製品 1	1.9	300	3.9	8,400	56
調製品 2	1.9	370	4.4	7,800	52
調製品 3	1.9	430	5.6	6,800	45
調製品 4	1.9	530	9.5	2,800	19

表 2 から明らかなように、r-VIIISQ コンジュゲートの比活性は実施例 2 の r-VIIISQ コンジュゲートに比較して有意に高く維持されている。

#### 実施例 4

mPEGトレシレート (tresylate) とのカップリングの間に Qセファロース FFゲルに吸着された FVIII

この実施例での r-VIIISQ の Qセファロース FFゲルとの吸着、カップリング、溶出の総ての過程は実施例 3 と同様に行った。mPEGトレシレート (MW 5,000) を第 VIII 因子のコンジュゲートに用いた。表 3 は発明に従って Q Sepharose<sup>TM</sup> FFゲル上に吸着された r-VIIISQ と mPEGトレシレートのコンジュゲートでの結果を示す。

表 3

	r-VIIISQ (mg)	添加 mPEG 量 (モル過剰)	修飾程度 (mPEG/rVIII)	比活性 (IU/mg)	比活性 (%天然 r-VIIISQ)
天然 r-VIIISQ	-	0	0	15,000	100
調製品 1	1.8	300	2.2	9,600	64
調製品 2	1.8	400	na	8,300	55
調製品 3	1.8	500	5.8	3,400	23

この場合の比活性は、おそらく mPEG の分子量が高いためか、実施例 3 より若干低い。

#### 実施例 5

mPEGコハク酸混合無水物とのカップリングの間に触手 (tentacle) 陰イオン交換ゲルに吸着された第 VIII 因子

Fractogel<sup>TM</sup> EMD TMAE650 (Merck が販売) を詰めたカラムを r-VIIISQ の吸着に用いた。総ての過程は実施例 3 のように行った。表 4 は発明に従って触手陰イオン交換ゲル上に吸着された r-VIIISQ と mPEGコハク酸混合無水物のコンジュゲートでの結果を示す。

表 4

	r-VIIISQ (mg)	添加 mPEG 量 (モル過剰)	修飾程度 (mPEG/rVIII)	比活性 (IU/mg)	比活性 (%天然 r-VIIISQ)
天然 r-VIIISQ	-	0	0	15,000	100
調製品 1	2.0	300	na	na	
調製品 2	2.0	500	na	2,100	14

#### 実施例 6

mPEG とコンジュゲートした第 VIII 因子の トロンビン による活性化

r-VIIISQコンジュゲートのトロンビンによる活性化は当業者に良く知られたインビトロのアッセイにより行った。実施例3に従って調製した試料で修飾程度がr-VIIISQ当たり4mPEGである試料をアッセイに用いた。r-VIIISQコンジュゲートはヒトトロンビンにより量依存的に活性化された。続いて、不活性化が起こった。図1はr-VIIISQコンジュゲート1ユニット当たり1NIHユニットのトロンビンを添加したときの活性変化のカーブである。Mikaelsson et al., 1983, Blood 62, p1006に従い行う1段階凝固法を反応混液から採取した試料の迅速なアッセイに用いた。1分以内に30倍の活性が得られ、次いで不活性化した。トロンビンで得られた活性化 - 不活性化パターンは第VIII因子とトロンビンとの相互作用の研究の報告と適合する (Fulcher et al., 1983, Blood, 61, p.807, Andersson et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, p.2979, Eaton et al., 1986, Biochemistry, 25, p.505, Rotblat et al., 1985, Biochemistry, 24, p.4294)。

10

#### 実施例7

##### ブタ組織抽出液中でのmペジル化 (mPEGylation) 第VIII因子の安定性試験

皮下環境を表した溶液中で第VIII因子の安定性に対するmPEGコンジュゲーションの影響を評価するために、ブタ組織抽出液を用いたインビトロ試験を行った。mPEGと第VIII因子のコンジュゲートを実施例3に記載したように2つ調製し、抽出液中でインキュベートし、一部分について0、2、4、6及び24時間で色素アッセイを用いて凝集活性を調べた。最初の6時間はコンジュゲーション程度は残存活性と相関した。

表 5

	残存活性 (%) 0h	残存活性 (%) 2h	残存活性 (%) 4h	残存活性 (%) 6h	残存活性 (%) 24h
天然 r-VIIISQ (コントロール)	100	45	13	6	0
4.4mPEG/rVIII	100	96	93	78	32
9.5mPEG/rVIII	100	100	107	102	47

20

30

表5と図2はmPEGコンジュゲーションが有意に第VIII因子の安定性を高めることを示している。

#### 実施例8

##### カニクイサル (cynomolgus monkey) 中でのmPEG化第VIII因子の生物学的利用能試験

インビボでの第VIII因子の安定性に対するmPEGコンジュゲーションの影響を評価するために、薬物動態学試験を行った。第VIII因子とmPEGのコンジュゲート調製試料を2つ、実施例3のように生産し、それらの比活性を表6に示すように決定した。カップリング手順で均一性の高い修飾物質を得るために、調製品の分画をゲル浸透クロマトグラフィーを用いて2回行った。19mM L-ヒスチジン、0.31MNaCl, 3.4mMNaCl<sub>2</sub>, 0.02% Tween80, pH7.0で平衡化したSuperdex200PGXK16/60カラム (Pharmacia Biotech of Uppsala, Swedenが市販) を用いた。2回目のゲル浸透クロマトグラフィーの前に第VIII因子溶液は加圧滅菌したCentriplus30コンセントレイター; 遠心限外濾過器 (カットオフ30キログルトン、Amicon Inc. MA, USAが市販) で濃縮した。濃縮は2,500gで45分間3回行った。2回目のゲル浸透クロマトグラフィー後に得られたプール分画は次いで最終製剤と同じバッファー、すなわち、19mM L-ヒスチジン、0.31MNaCl, 3.4mMNaCl<sub>2</sub>, 0.02%Tween80, 17.5mMスクロース, pH7.0で希釈した。タンパク質溶液は最後には0.22µm Millex GVフィルター (Millipore, MA, USAが市販) で濾過し、加圧滅菌した瓶に詰めた。溶液は使用時まで-70℃で保存した。

40

6匹の雌カニクイサルに対して別々の時期に1キログラム当たり250IUの調製試料1を静脈内投与し、また1キログラム当たり1,500IUの調製試料1および調製試料2を皮下投与した。溶液は総て投与前に注射のために水で倍に希釈した。皮下投与の注射部位は動物の

50

左または右背部、静脈内投与の注射部位は左または右橈側皮静脈 (cephalic vein) であった。血液サンプルは総ての動物から大腿静脈 (femoral vein) の穿刺を通して抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム (総容積の10%) の入ったチューブに集めた。サンプルは注射後以下に挙げる時間に集めた。

静脈内投与：0 (投与前), 0.25, 1, 2, 4, 8, 24, 30, 48時間

皮下投与：0 (投与前), 3, 6, 9, 12, 15, 24, 30, 48時間

コンジュゲーションしていない第VIII因子の薬物動態学試験も同じ種を用いて別々に行った。投与量、投与方法と結果 (平均 (±標準偏差 (SD))) を表6に示す。

表 6

	比活性 (IU/mg)	投与経路	投与量 (IU/kg)	半減期 (h)	生物学的利用能 (F <sup>1)</sup> ) (平均±標準偏差)
未コンジュゲーション r-VIII SQ	15,000	I.V.	250	6.7.	-
mPEG-rVIII 調製品 1	10,000	I.V.	250	8.3	-
未コンジュゲーション r-VIII SQ	15,000	S.C.	2,500	-	0.053 (0.021)
mPEG-rVIII 調製品 1	10,000	S.C.	1,500	-	0.22 (0.13)
mPEG-rVIII 調製品 2	6,700	S.C.	1,500	-	0.19 (0.15)

I.V. = 静脈内

S.C. = 皮下

$$1) F = \frac{AUC(S.C.) \times DOSE(I.V.)}{AUC(I.V.) \times DOSE(S.C.)}$$

ここでAUCは血しょう中濃度 - 時間曲線の下面積を示す。

表6から明らかなように、どちらの第VIII因子とmPEGのコンジュゲートの調製品も皮下投与した場合、コンジュゲーションしていないr-VIII SQの皮下投与に比べ顕著に高い生物学的利用能を示した。Student's t 検定による統計学的分析によりその差は有意であることがわかった。

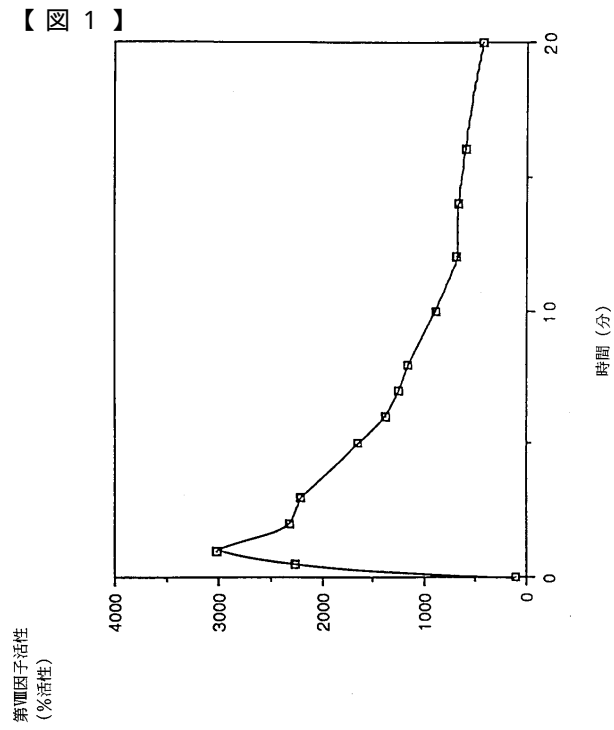


Figure 1

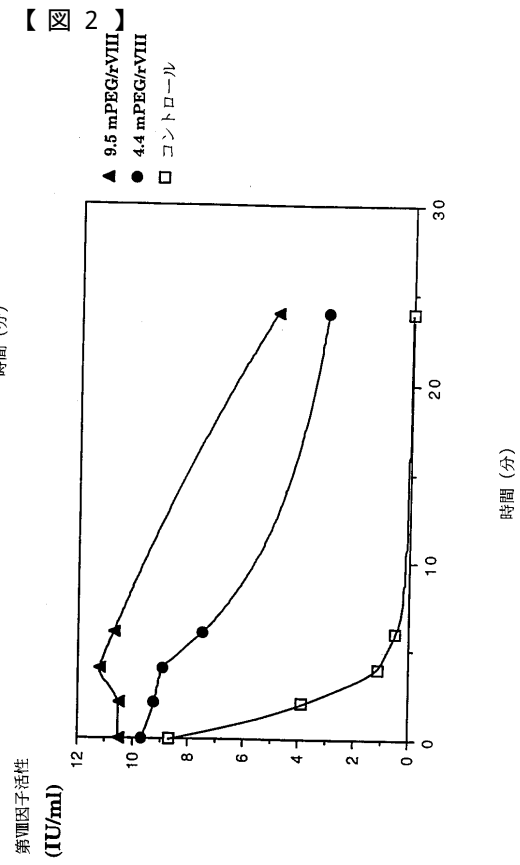


Figure 2

## フロントページの続き

## (74)代理人

弁理士 相馬 貴昌

## (72)発明者 ダルボルイ, ヨハンナ

スウェーデン国、エス - 1 1 8 5 0 ・ストックホルム、ポールマル・イクスクルスガートン・4  
2

## (72)発明者 サンドベルイ, ヘレナ

スウェーデン国、エス - 1 6 1 3 7 ・ブロンマ、イーエルコーツベージェン・2 1

## (72)発明者 スメツズ, アンナ - リーサ

スウェーデン国、エス - 1 9 1 3 9 ・ソーレンチューナ、テゲルハクスベージェン・4 1

## (72)発明者 オーケルプロム, エバ

スウェーデン国、エス - 7 5 6 5 2 ・ウプサラ、タリオクスベージェン・1 5

審査官 光本 美奈子

## (56)参考文献 国際公開第 9 1 / 0 0 9 1 2 2 ( WO , A 1 )

J Bioactive Compatible Polymers 9 p.252-266 (1994)

Eur J Biochem 166 p.37-43 (1987)

J Bioactive Compatible Polymers 8 p.41-50 (1993)

Biotechnol Bioeng 34 p.532-540 (1989)

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/755

C07K 17/00

C07K 1/06

BIOSIS/WPI(DIALOG)

JMEDPlus(JDream2)

JST7580(JDream2)

JSTPlus(JDream2)

PubMed