

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4933536号
(P4933536)

(45) 発行日 平成24年5月16日 (2012. 5. 16)

(24) 登録日 平成24年2月24日 (2012. 2. 24)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 30/88 (2006. 01)

G O 1 N 30/88 2 O 1 R

B O 1 J 20/281 (2006. 01)

B O 1 J 20/22 D

G O 1 N 30/88 J

請求項の数 7 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2008-510633 (P2008-510633)
(86) (22) 出願日 平成18年5月9日 (2006. 5. 9)
(65) 公表番号 特表2008-543738 (P2008-543738A)
(43) 公表日 平成20年12月4日 (2008. 12. 4)
(86) 国際出願番号 PCT/GB2006/001693
(87) 国際公開番号 W02006/120427
(87) 国際公開日 平成18年11月16日 (2006. 11. 16)
審査請求日 平成19年11月9日 (2007. 11. 9)
(31) 優先権主張番号 0509443. 8
(32) 優先日 平成17年5月9日 (2005. 5. 9)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 501436609
プロメティック バイオサイエンシズ リ
ミティド
イギリス国, アイル オブ マン アイエ
ム9 2エービー, パラサラ, フリーポー
ト
(74) 代理人 100099759
弁理士 青木 篤
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敬
(74) 代理人 100087871
弁理士 福本 積
(74) 代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

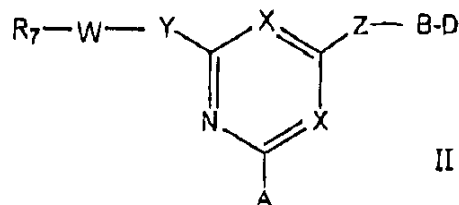
(54) 【発明の名称】 第VIII因子及びvonWillebrand' s 因子のためのアフィニティー吸着剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第VIII因子、von Willebrand' s 因子又はいずれかのアナログであるタンパク質の分離、除去、単離、精製、特徴付け、同定又は定量のためのアフィニティー吸着剤の使用であって、当該アフィニティー吸着剤が、以下の式 (I I) :

【化 1】



{ 式中、1 の X が N であり、そして他の X が N , C - C I 又は C - C N であり ;

A は、スペーサーによりトリアジン環に場合により連結された支持マトリックスであり ;

;

Y は O , S 又は N R₂ であり ;

Z は O , S 又は N - R₃ であり ;

R₂ と R₃ は各々 H、C₁₋₆ アルキル、C₁₋₆ ヒドロキシアルキル、ベンジル又は β - フェニルエチルであり ;

B と W は各々、1 ~ 10 個の炭素原子を含む場合により置換された炭化水素連結であり ;

D は H、OH 又は第一アミノ、第二アミノ、第三アミノ、第四アンモニウム、イミダゾール、グアニジノ又はアミジノ基であり ; 又は

B - D は、- CHCOOH - (CH₂)₃₋₄ - NH₂ であり ; そして

R₇ は、中性 pH において正電荷をもつ第三アミン基である。} で表される化合物である前記使用。

10

【請求項 2】

前記アミンが環の一部を形成する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

B 又は W が、芳香族基を含む、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

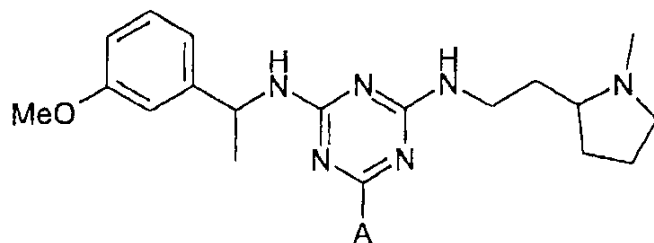
前記吸着剤が血漿のサンプルと接触する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5】

前記アフィニティー吸着剤は、以下の式 (III) :

【化 2】

20



III

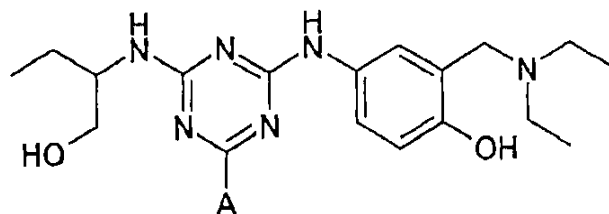
{ 式中、A は、スパーサーによりトリアジン環に場合により連結された支持マトリックスである。} で表される化合物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 6】

前記アフィニティー吸着剤は、以下の式 (IV) :

【化 3】



IV

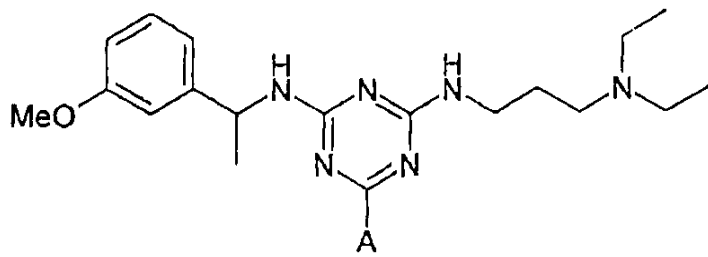
40

{ 式中、A は、スパーサーによりトリアジン環に場合により連結された支持マトリックスである。} で表される化合物、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

前記アフィニティー吸着剤は、以下の式 (V) :

【化 4】



V

10

{ 式中、A は、スパーサーによりトリアジン環に場合により連結された支持マトリックスである。 } で表される化合物、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

本発明は、化合物、及びアフィニティー・リガンドとしてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

20

【0002】

本発明の背景

(抗血友病因子として先に知られていた) 第VIII因子は、約 200 ng / mL のレベルで循環血漿中に存在する糖タンパク質である。天然の成熟 1 本鎖タンパク質は、糖添加に依存して 265 ~ 270 kDa の間の異質な分子量をもつ。但し、170 ~ 280 kDa の広いレンジの分子量のタンパク質が、対立遺伝子の変動、糖添加、修飾、及びインビボにおける断片化に依存して、血漿中で観察される。多数の組換え第VIII因子産物が入手可能であり、そしてまた、タンパク質構造及び分子量においてかなり変動している。

【0003】

血漿第VIII因子は、追加の複合体化因子を有し、それは、von Willebrand ' s 因子 (vWF) 、すなわち血液凝固に関連する複合体多量体タンパク質と密接に関係して存在する。vWF 自体も、単独で又は第VIII因子とともに、治療用途をもつ。

30

【0004】

第VIII因子は、最終的に、vWF / FVIII からフィブリンへの変換、及びフィブリン血塊の形成に至る複雑な血液凝固カスケードに参加する。第VIII因子の生成における遺伝的異常は、血友病 A をもたらし、これは、低下した血塊形成又はその不在に因る、主に繰り返される出血エピソードに現れる。血友病 A 及びその兆候 (例えば、制御できない出血) は、血漿由来又は組換え第VIII因子により処置されうる。適当な投薬により、第VIII因子の予防的使用は、外科手術の間に観察されるものを含む、出血エピソードの数及び重度を顕著に低減しうる。

40

【0005】

血漿からの第VIII因子 / vWF の精製又は組換え源からの第VIII因子の精製は、一般に、多数のクロマトグラフィー、及び / 又は沈殿、及び / 又は不活性化ステップを含む複雑なプロセスである。血漿からの精製は、さらに、しばしば、初期の寒冷沈降及び再構成ステップを含む。これらの複雑な精製手順は、タンパク質に固有な不安定性とともに、精製された産物の低収率をもたらす。免疫アフィニティー・クロマトグラフィーが記載されているが、その固有の高価を除き、使用されるクロマトグラフィー材料は安定性とクリーニング可能性を欠くという問題があり、再使用は極めて困難である。ペプチド・リガンド・ベースの媒質も、免疫アフィニティー媒質として同様の問題があり、そして広く受け入れられていない。これまで不可能であった収率、純度、及び費用効果をもって多数の源から

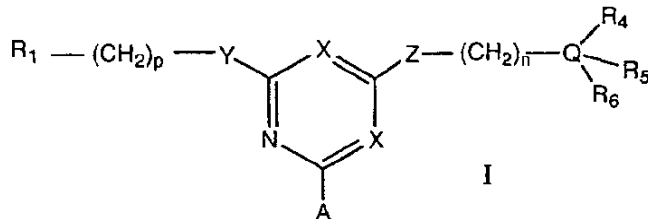
50

第VIII因子又は第VIII因子 / von Willebrand ' s 因子を単離することができるクロマトグラフィー材料を取得することが望まれる。

【 0 0 0 6 】

WO 9 7 / 1 0 8 8 7 は、アフィニティー吸着剤として有用な、以下の式 (I) :

【 化 1 】



10

{ 式中、R₁は、H、アルキル、ヒドロキシアルキル、シクロアルキル、NH₂、フェニル、ナフチル、1 - フェニルピラゾール、インダゾール、ベンズチアゾール、ベンズオキサゾール又はベンズイミダゾールであり、その芳香族基の内のいずれかは、アルキル、アルコキシ、アシルオキシ、アシルアミノ、アミノ、NH₂、OH、CO₂H、スルホンル、カルバモイル、スルファモイル、アルキルスルフォニル、及びハロゲンの内の1以上で置換

20

されておりてもよく；

1のXはNであり、そして他のXはN、C - Cl又はC - CNであり；

YはO、S又はNR₂であり；

ZはO、S又はNR₃であり；

R₂とR₃は各々H、アルキル、ヒドロキシアルキル、ベンジル又はβ - フェニルエチルであり；

Qは、ベンゼン、ナフタレン、ベンズチアゾール、ベンズオキサゾール、1 - フェニルピラゾール、インダゾール又はベンズイミダゾールであり；

R₄、R₅とR₆は各々、H、OH、アルキル、アルコキシ、アミノ、NH₂、アシルオキシ、アシルアミノ、CO₂H、スルホン酸、カルバモイル、スルファモイル、アルキルス

30

ルフォニル又はハロゲンであり；

nは0 ~ 6であり；

pは0 ~ 20であり；そして

Aは、スペーサーによりトリアジン環に場合により連結された支持マトリックスである。}で表されるトリアジン - ベースの化合物を開示する。

【 0 0 0 7 】

式 (I) の化合物は、免疫グロブリン、インスリン、第VII因子又はヒト成長ホルモンの如きタンパク質に対してアフィニティーをもつものとして開示されている。

【 0 0 0 8 】

関連構造をもつ化合物は、WO 0 0 / 6 7 9 0 0 及びWO 0 3 / 0 9 7 1 1 2 中に開示される。それらは内毒素に対するアフィニティーをもつ。

40

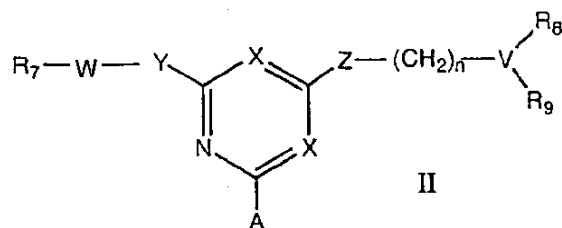
【 発 明 の 開 示 】

【 0 0 0 9 】

本発明の概要

驚ろくべきことに、その内の多くが新規である特定の化合物がvWF / FVIIIのアフィニティー - ベースの単離のために有用であることが発見された。これらの化合物は以下の式 (II) :

【化 2】



10

{ 式中、X、Y、Z、n、及びAは先に式(I)のために定義したものと同一であり；
 R_7 は、中性pHにおいて正電荷をもつ基であり；
Wは、任意的リンカーであり；
Vは、Qのために先に記載したものと同一であるが、節構造であってもよく；そして
 R_8 と R_9 は、 R_4 、 R_5 と R_6 のために定義したものと同一であるが、環構造をさらに含むか、又は R_8 と R_9 は連結して、当該環構造を形成する。}を有する。

【0010】

さらに、本発明の化合物は、式中Aがトリアジン環に直接又は間接的に連結された官能基により置換され、支持マトリックス上に固定化されうる、対応のリガンドを含む。用語「リガンド」と「吸着剤」は、以下、互換使用されうる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の説明

WO97/10887、WO00/67900、及びWO03/097112は、リガンドのコンビナトリアル・ライブラリーが固体支持体上でどのようにして構築されうるかということを開示する。本発明に共通する態様及び手順の例を含むそれらの開示を、本明細書中に援用する。供給原料としてプールされたヒト血漿を用いてこれらのコンビナトリアル・ライブラリーのセットをスクリーニングする間、ヒトvWF/FVIIIに選択的に結合し、かつ、これを溶出することができるものとして多数のリガンドが同定された。

30

【0012】

本発明において使用される式(II)の化合物は、当業者に知られた手順により調製されうる。これらの手順は、前記した3つのPCT公開公報中に記載され；それらは、新規化合物の調製のために容易に改作されうる。

【0013】

WO97/10887は、それを介してトリアジン環が固体支持体Mに連結されるところのスペーサー又はリンカーLを含むAの実施例を与える。WO97/10887中に記載されるように、このような支持体は、アガロース、セファロース、シリカ、セルロース、デキストラン、デンプン、アルギン酸塩、カラギーナン、合成ポリマー、ガラス、及び金属酸化物を含む。このような材料は、反応前に活性化されて、本発明の吸着剤が形成される。

40

【0014】

Lは、例えば、 $-T-(V^1-V^2)_m-$ であることができ、ここで
TはO、S又は $-NR^7-$ であり；
mは0又は1であり；
 V^1 は2～20個のC原子の場合により置換された炭化水素基であり；そして
 V^2 はO、S、 $-COO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-PO_3H-$ 、 $-NH-$ アリレン- $SO_2-CH_2-CH_2-$ 又は $-NR_8-$ であり；そして
 R^7 と R^8 は各々独立にH又は C_{1-6} アルキルである。

【0015】

50

本発明の化合物においては、 R_7 は、好ましくは、第二、又はより好ましくは、第三アミンであり、例えば、式 $NR_{10}R_{11}$ { 式中、 R_{10} と R_{11} は各々独立に C_{1-6} アルキル（例えば、メチル）である。 } を有し、又は NR_8R_9 は、環を形成し、又は R_{10} と R_{11} の内の1つは、リンカーW内の原子と一緒に環を形成する。リンカーWは、アルキル、芳香族又はアラルキル・リンカーであることができ、例えば、2～7、好ましくは3～4個の鎖原子をもち、それら自身、例えば、OH基で置換されうる。

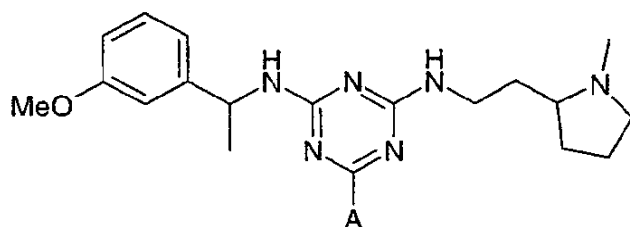
【0016】

他の「腕」、すなわち、Z - B - Dの性質は、決定的ではない。

【0017】

本発明の好ましい態様においては、vWF / FVIII結合性吸着剤は、以下の構造III：
【化3】

10



III

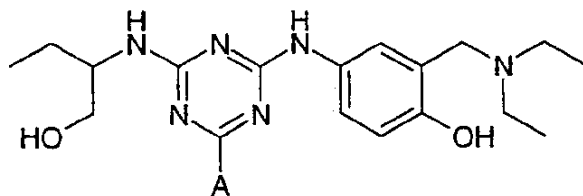
20

により表される。

【0018】

本発明のさらに好ましい態様においては、vWF / FVIII結合性吸着剤は、（生理学的pHにおいてプロトン化される）以下の構造IV：

【化4】



IV

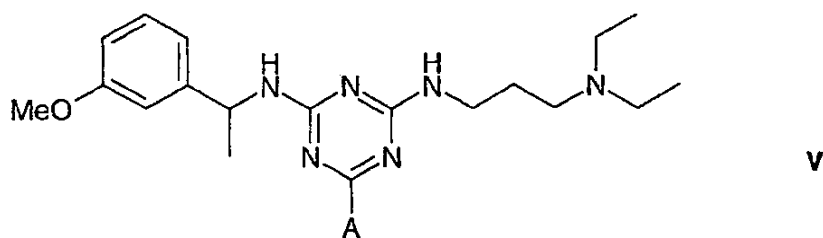
30

により表される。

【0019】

本発明の最も好ましい態様においては、vWF / FVIII結合性吸着剤は、以下の構造V：
：

【化5】



10

により表される。

【0020】

本明細書中に記載する vWF / FVIII 結合性リガンド及び吸着剤は、非制限的に、ヒト血漿及び組換え発酵上清を含む複雑な混合物からの vWF / FVIII の精製に有用である。この有用性は、ヒトのプールされた血漿を用いたクロマトグラフィー実験により、実施例 4 において以下に証明される。

【0021】

用語「vWF / FVIII」は、vWF / FVIII 自体、及び例えば、本明細書中に記載される所定の化合物に対するアフィニティーの点で、vWF / FVIII の機能特性をもつアナログを記載するために使用される。したがって、アナライトは、vWF / FVIII の機能的断片であるタンパク質、又は同一結合部位の全ての内の 1 以上をもつ構造アナログ、又は融合タンパク質でありうる。

20

以下の実施例は本発明を説明する。

【実施例】

【0022】

ジクロロトリアジニル - (R) - 1 - (3 - メトキシフェニル) - エチルアミンの合成

アセトン (35 mL) 中に溶解した塩化シアヌール酸 (5.0 g) を 0 に冷却し、その後、アセトン (50 mL) 中に溶解した (R) - 1 - (3 - メトキシフェニル) エチルアミン (4.1 g) を冷却しながら 30 分間にわたり滴下して添加して、その温度が 5 を上廻らないようにした。次いで、10 M 水酸化ナトリウム (2.71 mL) をゆっくりと添加した。45 分後、反応混合物を攪拌しながら氷水 (20 g) に添加した。油状生成物をジクロロメタン (150 mL) 中に抽出し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、そして蒸発させて黄色油 (7.96 g) として生成物を得た。

30

【0023】

実施例 1 - 吸着剤 V の合成

アミノ - Sepharose CL - 4B (水中沈殿 475 g - 16 μ mol / g 置換) に、ジメチルホルムアミド (DMF) (475 mL) を添加した。ジイソプロピルエチルアミン (4.37 mL) を添加し、混合物を 15 分間攪拌し、その後、DMF (250 mL) 中に溶解したジクロロトリアジニル - (R) - 1 - (3 - メトキシフェニル) - エチルアミン (7.57 g) を反応混合物に添加した。この混合物を 3 時間にわたり攪拌し、その後、ゲルを、70 % 水性 DMF (4 $\times$ 500 mL)、50 % 水性 DMF (2 $\times$ 500 mL)、及び水 (11 $\times$ 500 mL) で洗浄した。水 (75 mL) 中にスラリー化した上記材料 150 g を、60 で水 (75 mL) 中 N, N - ジエチル - 1, 3 - プロパンジアミン (3.8 mL) の溶液に分割して添加した。添加後、混合物を 60 に温め、そして 19 時間にわたりこの温度で攪拌した。次いで、ゲルを濾過し、そして水 (12 $\times$ 150 mL) で洗浄し、その後、20 % 水性エタノール保存液中で保存した。

40

【0024】

実施例 2 - 吸着剤 III の合成

50

実施例 2 (1 5 0 g 沈殿) からの中間体ゲル生成物を、水 (7 5 mL) 中にスラリー化し、そして 6 0 における水 (7 5 mL) 中の 2 - (2 - アミノエチル) - 1 - メチルピロリジン (3 . 5 mL) の溶液に分割して添加した。添加後、混合物を再び 6 0 に温め、そして 1 9 時間にわたりこの温度で撹拌した。次いで、このゲルを濾過し、そして水 (1 2 × 1 5 0 mL) で洗浄し、その後、 2 0 % 水性エタノール保存液中で保存した。

【 0 0 2 5 】

実施例 3 - 吸着剤 IV の合成

アミノ - S e p h a r o s e C L - 4 B (水中沈殿 1 0 0 g - 1 6 μmol / g 置換) を、 1 M リン酸カリウム pH 7 . 0 (1 0 0 mL) 中に懸濁し、次いで排水した。その後このゲルに、 1 M リン酸カリウム pH 7 . 0 (2 5 mL)、及び R O 水 (2 5 0 mL) を添加した。このスラリーを激しく撹拌し、同時にアセトン (5 0 mL) を添加した。 3 0 分間にわたり氷 / 塩浴内で冷却した後、冷アセトン (2 5 mL) 中塩化シアヌール酸 (2 . 5 g) を一部で添加した。この混合物を 1 時間にわたり 0 で撹拌し、その後、 5 0 % 水性アセトン (5 × 1 0 0 mL)、R O 水 (5 × 1 0 0 mL)、 5 0 % 水性アセトン (5 × 1 0 0 mL)、及び R O 水 (1 0 × 1 0 0 mL) で洗浄した。この沈殿ゲルをその後、 4 時間にわたり室温で、 2 - アミノブタノール (1 g) を含む 5 0 % 水性 D M F (1 0 0 mL) でスラリー化した。このスラリーを濾過し、次いで 5 0 % 水性 D M F (5 × 1 0 0 mL) 及び R O 水 (1 0 × 1 0 0 mL) で洗浄した。次いでこの沈殿ゲルを、 4 - アミノ - a - ジエチルアミノ - o - クレゾールジヒドロクロリド (4 . 2 g) を含む 5 0 % 水性 D M F (1 0 0 mL) でスラリー化し、そして 6 0 で一夜撹拌した。このスラリーを濾過し、その後、 5 0 % 水性 D M F (5 × 1 0 0 mL) と R O 水 (1 0 × 1 0 0 mL) で洗浄した。このゲルを 4 0 で 3 日間にわたり 0 . 5 M N a O H / 2 5 % エタノールの最終濃度でインキュベートし、 0 . 5 M N a O H / 2 5 % エタノール (5 × 1 0 0 mL) で洗浄し、その後 R O 水 (1 0 × 1 0 0 mL) で洗浄した。最終洗浄液を重力下で放置して排水した後、 1 . 0 M N a O H (1 0 0 mL) を添加し、そして混合物を 3 日間 4 0 でインキュベートした。その後、ゲルを 0 . 5 M N a O H (5 × 1 0 0 mL) で、次いで R O 水 (1 0 × 1 0 0 mL) で洗浄した。 0 . 1 M P B S pH 7 . 0 (3 × 1 0 0 mL) で洗浄した後、ゲルをさらに R O 水 (1 0 × 1 0 0 mL) で洗浄し、その後、 2 0 % v / v 水性エタノール中 4 で冷却室内で保存した。

【 0 0 2 6 】

実施例 4 - 吸着剤 V を用いたヒト血漿に対するクロマトグラフィーの例

低圧クロマトグラフィー・システム (K i p p & Z o n e n 平床チャート - レコーダー、 G i l s o n ミニプラス 3 蠕動ポンプ、及び G i l s o n U V 検出器) を用いた 2 0 mL カラム容量をもつ 1 . 6 cm 直径 X K 1 6 / 2 0 カラムを用いて、クロマトグラフィー実験を実施した。カラムを、 8 0 cm / 時間において、 2 0 mM T r i s - H C l、 2 0 mM クエン酸ナトリウム、 1 4 0 mM 塩化ナトリウム pH 7 . 5 の 5 カラム容量で平衡化した。ヒト起源血漿を、 2 0 mM T r i s - H C l 及び 1 0 0 mM 塩化ナトリウム (最終濃度) で処理した。処理した血漿 2 0 0 mL を 1 0 μm で濾過し、次いで、 8 0 cm / 時間でロードした。ロード後洗浄を 2 0 mM T r i s - H C l、 2 0 mM クエン酸ナトリウム、及び 1 4 0 mM 塩化ナトリウム pH 7 . 5 で行い、ベースライン吸光度までもっていった。次いでこのカラムを 2 0 mM T r i s - H C l、 2 0 mM クエン酸ナトリウム、 3 mM C a C l ₂、 3 0 % エチレングリコール、及び 5 0 0 mM 塩化ナトリウム、及び 0 . 0 1 % T w e e n 8 0 pH 7 . 5 で溶出した。溶出後、カラムを 8 M 尿素 pH 7 . 0 で殺菌洗浄した。その後、カラムを 0 . 5 M 水酸化ナトリウムで洗浄した。ロード、非結合、及び溶出フラクションを、比濁計、 v W F E L I S A、及び第 VIII 因子発色活性アッセイにより分析して回収率を測定した。 S D S P A G E も実施して純度を調べた。

回収率を以下の表 1 に報告する。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

表 1

吸着剤 V を用いたクロマトグラフィーからの vWF / FVIII の回収

ロード	vWF	1632 μ g	
	FVIII	147 IU	
			(%回収率)
非結合	vWF	512 μ g	32
	FVIII	29.2 IU	20
			(%回収率)
溶出	vWF	879 μ g	54
	FVIII	79 IU	54

10

【 0 0 2 8 】

第VIII因子の結果は、発色活性アッセイ (Chromogenicにより供給された C O A T E S T VIII : C / 4) により測定された。結果は、国際単位 (IU) で表され、ここで、正常ヒト血漿は、1 mL 当り 1 国際単位の第VIII因子活性を含有する。

vWF 結果は E L I S A により測定された。

20

フロントページの続き

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(72)発明者 ベトリー, ジェイソン リチャード

イギリス国, エスジー 9 9 エーエス ハートフォードシャー, バンティングフォード, チャーチ
ストリート 17

(72)発明者 ベインズ, バルデブ シング

イギリス国, シービー 4 0 ゼットエー ケンブリッジ, ミルトン ロード, ケンブリッジ サイ
エンス パーク 211, プロメティック バイオサイエンシズ リミティド

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表平 11 - 512442 (JP, A)

特表 2002 - 543898 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 30/00-30/96

B01J 20/281