

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010年7月1日(01.07.2010)



(10) 国際公開番号
WO 2010/074082 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/52 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/071328
- (22) 国際出願日: 2009年12月22日(22.12.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-328406 2008年12月24日(24.12.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 塩野義製薬株式会社(Shionogi & Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番8号 Osaka (JP). 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 佐藤 靖史(SATO, Yasufumi). 中村 巧(NAKAMURA, Takumi). 松本 光史(MATSUMOTO, Mitsunobu). 佐藤公昭(SATO, Masaaki). 北条 完二(HOJO, Kanji).
- (74) 代理人: 細田 芳徳(HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31号 OMMビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: MODIFIED VASOHIBIN

(54) 発明の名称: バソヒビン修飾体

(57) Abstract: A modified vasohibin bearing polyethylene glycol bonded thereto, which satisfies the requirements: (1) the solubility (25°C, pH7.4) is 1mg/mL or above and (2) an anti-angiogenic activity is exerted. The modified vasohibin exhibits a high solubility at a pH around neutrality, and is therefore suitable for use in treating diseases of which the treatment necessitates anti-angiogenic effect.

(57) 要約: (1)pH7.4における溶解度(25°C)が1mg/mL以上である、及び(2)血管新生抑制作用を有する、を満たすポリエチレングリコールが結合してなるバソヒビン修飾体。本発明のバソヒビン修飾体は、中性付近における溶解性が高いことから、血管新生抑制効果を要する疾患の治療等に好適に用いられる。



WO 2010/074082 A1

明 細 書

発明の名称： バソヒビン修飾体

技術分野

[0001] 本発明は、バソヒビン修飾体に関する。より詳しくは、特定の活性型ポリエチレングリコールを用いて修飾されたバソヒビン修飾体、その製造方法、及び該バソヒビン修飾体を含有する修飾体調製物、医薬組成物、ならびに、該バソヒビン修飾体、修飾体調製物、医薬組成物を投与することを特徴とする血管新生抑制作用を要する疾患の治療方法に関する。

背景技術

[0002] ポリエチレングリコール(polyethylene glycol : PEG)は、無毒性かつ非免疫原性の高分子であり、用途に応じてサイズや側鎖構造を変化させることができるという特徴を有する。この特徴を利用して、近年、生体内での安定性が悪いタンパク質の薬物動態特性や免疫特性を改善する方法として、目的タンパク質へのPEG修飾が注目されている。

[0003] 例えば、非特許文献1には、FDAに認可されたり、臨床試験が行われたりしている種々のPEG修飾薬物が報告されている。また、非特許文献2には、タンパク質のPEG修飾に関する種々の方法が記載されており、そのうち、非特許文献3には、N-succinimide(N-スクシンイミジル基)を有するPEG(NHS-PEG)を用いるN-アシル化反応によるPEG修飾が記載されている。具体的には、pH8.4の中性領域の緩衝液中で、N-スクシンイミジル基を有するPEGと抗体とを、1、3、6の各モル比(抗体/PEG)で反応させてPEG修飾を行っている。また、非特許文献4のようにアルデヒド基を官能基として有するPEG(CHO-PEG)を用いて還元的アミノ化反応によりタンパク質を修飾する例も報告されている。

[0004] バソヒビンは、腫瘍細胞や間質細胞、マクロファージなどから分泌される血管新生促進因子(VEGF、FGF-2等)の刺激により血管内皮細胞に発現し(特許文献1参照)、内皮細胞自身にオートクライン的に作用して、血管新生を抑制する作用を有するポリペプチドである。従って、バソヒビンは、

生体内における抗血管新生阻害効果、ひいては抗腫瘍効果を奏する薬物として、適用が期待される。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO 02/090546号パンフレット

非特許文献

[0006] 非特許文献1：C. Simone. Fishburn, Journal of Pharmaceutical Sciences、2008、10、p1-17

非特許文献2：M. J. Roberts, et al., Advanced Drug Delivery Reviews、2002、54、p459-476

非特許文献3：Eizo Sada, et al., Journal of Fermentation and Bioengineering、1991、71、No. 2、p137-139

非特許文献4：O. Kinstler, et al., Advanced Drug Delivery Reviews、2002、54、p477-485

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明者らはバソヒビンを調製する過程において、バソヒビンの中性域での溶解性が著しく低いことを見出した。中性pH域での溶解性が悪い場合には不溶化や凝集が発生するリスクが高く、これに伴う投与量の制限や抗原性の問題により医薬品としての応用が困難であり、解決する必要が生じた。

[0008] また、バソヒビンは中性付近での溶解性が低いため、各種ポリエチレングリコールのなかでもN-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールによるバソヒビン修飾は、常法に従って行うことが困難であることが判明した。

[0009] 本発明の課題は、中性付近における溶解性が向上し、生体内において優れた血管新生阻害効果及び抗腫瘍効果を発揮する、ポリエチレングリコールが結合しているバソヒビン修飾体、その製造方法、及び該バソヒビン修飾体を

含有する修飾体調製物、医薬組成物、ならびに、該バソヒビン修飾体、修飾体調製物、医薬組成物を投与することを特徴とする血管新生抑制作用を要する疾患の治療方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールとバソヒビンとの反応を、酸性領域で、かつ、ポリエチレングリコールを大過剰で反応させることにより、ポリエチレングリコールが結合したバソヒビン修飾体を得られ、当該修飾によりバソヒビンの生理活性を維持しつつ中性付近での溶解性及び生体内での安定性が著しく向上することを見出した。また、アルデヒド基を有するポリエチレングリコールとバソヒビンとを反応させることにより、N末端にのみ特異的にポリエチレングリコールが結合したバソヒビン修飾体を得られ、当該修飾によりバソヒビンの生理活性を維持しつつ中性付近での溶解性が著しく向上することを見出した。これらの修飾がバソヒビンを医薬品として用いるのに極めて優れた上記性質を付与することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] 即ち、本発明は、

〔1〕 下記(1)及び(2)を満たす、ポリエチレングリコールが結合してなるバソヒビン修飾体、

(1) pH7.4における溶解度(25℃)が1mg/mL以上である

(2) 血管新生抑制作用を有する

〔2〕 N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを反応させてなる、前記〔1〕記載のバソヒビン修飾体、

〔3〕 N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを酸性条件下で反応させる工程を含む、前記〔2〕記載のバソヒビン修飾体の製造方法、

。

〔4〕 前記〔1〕又は〔2〕記載のバソヒビン修飾体を含有してなる、バ

ソヒビン修飾体調製物、

〔５〕 アルデヒド基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを反応させてなる、前記〔１〕記載のバソヒビン修飾体、

〔６〕 前記〔１〕、〔２〕、又は〔５〕いずれか記載のバソヒビン修飾体を含有してなる、医薬組成物、ならびに

〔７〕 前記〔１〕、〔２〕、又は〔５〕記載のバソヒビン修飾体、前記〔４〕記載のバソヒビン修飾体調製物、前記〔６〕記載の医薬組成物のいずれかを投与することを特徴とする血管新生抑制作用を要する疾患の治療方法に関する。

発明の効果

- [0012] 本発明のバソヒビン修飾体は、中性付近における溶解性が向上し、生体内において優れた血管新生阻害効果及び抗腫瘍効果を発揮することができるという優れた効果を奏する。また、前記修飾体のなかでも、N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールによる修飾体は、前記特性に加えて、血中安定性も向上するという優れた効果も奏する。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1] 図１は、PEG(NHS)-Vh1のゲルろ過精製画分についてSDS-PAGE分析を行った結果を示す図である。Mは分子量マーカー、Lはゲルろ過ロード液、番号はフラクションNo.を示す。

[図2] 図２は、Vh1とPEG(NHS)-Vh1のMALDI-TOF MS分析を行った結果を示す図である。上段がVh1、下段がPEG(NHS)-Vh1のマスキロマトグラフであり、下段におけるピークトップの数値は分子量を示し、左から、PEGが2分子結合した修飾体(分子量:56664)、3分子結合した修飾体(分子量:67388)、4分子結合した修飾体(分子量:67388)、5分子結合した修飾体(分子量:72200)、6分子結合した修飾体(分子量:78188)、7分子結合した修飾体(分子量:83441)を示す。

[図3] 図３は、Vh1、PEG(NHS)-Vh1による角膜内血管新生阻害評価の結果を示す図である。

[図4] 図４は、PEG(NHS)-Vh1の血中安定性評価の結果を示す図である。

[図5] 図5は、Vh1とPEG(CHO)-Vh1のMALDI-TOF MS分析を行った結果を示す図である。上段がVh1、下段が分子量5,000のCHO-PEGを反応させて得られたPEG(CHO)-Vh1のマスキロマトグラフであり、下段におけるピーク1はPEGが1分子結合した修飾体、ピーク2はPEGが2分子結合した修飾体を示す。

[図6] 図6は、PEG(CHO)-Vh1のSDS-PAGE分析結果を示す。Mは分子量マーカー、5-40KはPEG(CHO)-Vh1についてVh1の修飾に用いたCHO-PEGの分子量でレーンを示した。b40Kには分岐型で平均分子量40,000のCHO-PEGを用いて修飾したVh1のレーンを示した。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明のバソヒビン修飾体は、バソヒビンにポリエチレングリコールが結合したものであり、

(1) pH7.4における溶解度(25℃)が1mg/mL以上である

(2) 血管新生抑制作用を有する

の特性を有する。このような中性付近における溶解性に優れ、血管新生抑制作用を有するバソヒビン修飾体としては、具体的には、バソヒビンとN-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール(以下、NHS-PEGと記載することもある)とを、酸性領域で特定のモル比(バソヒビン/NHS-PEG)で反応させることにより得られるもの(態様1のバソヒビン修飾体)、及び、バソヒビンとアルデヒド基を有するポリエチレングリコール(以下、CHO-PEGと記載することもある)とを反応させることにより得られるもの(態様2のバソヒビン修飾体)が挙げられる。なお、本明細書において「バソヒビン修飾体」とはポリエチレングリコールが結合したバソヒビンを意味し、態様1及び2のバソヒビン修飾体が例示される。「バソヒビン未修飾体」とはフリーのバソヒビンのことを意味する。

[0015] 本発明において、バソヒビン修飾体の「pH7.4における溶解度(25℃)が1mg/mL以上である」とは、バソヒビン修飾体がタンパク質換算で、25℃におけるpH7.4のリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline、PBS)に1mg/mL以上の濃度で溶解することを意味する。バソヒビン修飾体の溶解液のタンパク

質濃度は例えばブラッドフォード法、BCA法、ローリー法、紫外吸光法などの公知のタンパク質の定量方法により測定できる。なお、pH7.4のリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline、PBS)とは、pH7.35～7.44範囲内のいずれかのpHを示すPBSが好ましく、pH7.40のPBSがより好ましい。

[0016] 本発明において、血管新生抑制活性は、マウスの角膜を用いた抗血管新生アッセイで評価することができる。具体的には、後述の実施例の試験例1に示すように、マウスの角膜に、緩衝液のみ、VEGFのみ、VEGFとバソヒビン未修飾体、VEGFと態様1のバソヒビン修飾体(蛋白質換算でバソヒビン未修飾体と等量)をそれぞれ投与した場合の角膜内に新生した血管面積を測定する。VEGFのみを投与した場合の血管面積から、VEGFとバソヒビン未修飾体を投与した場合の血管面積を差し引いた値をバソヒビン未修飾体の血管新生抑制活性とする。一方、VEGFのみを投与した場合の血管面積から、VEGFと態様1のバソヒビン修飾体を投与した場合の血管面積を差し引いた値を態様1のバソヒビン修飾体の血管新生抑制活性とする。バソヒビン未修飾体の血管新生抑制活性を100%とした場合の、バソヒビン修飾体の血管新生抑制活性(%)が20%以上である場合に、態様1のバソヒビン修飾体は血管新生抑制活性を有すると判断する。なお、態様1のバソヒビン修飾体の血管新生抑制活性(%)は、50%以上が好ましく、80%以上がより好ましい。

[0017] また、血管新生抑制活性は、マウスにおける腫瘍増殖抑制アッセイにより評価することもできる。具体的には、後述の実施例の試験例3に示すように、BALB/cマウスの背皮内に、マウス腎癌株(Renca)を90%のマトリジェルと、10%の態様2のバソヒビン修飾体(最終濃度50 μ g/mL)又はネガティブコントロールであるヒト血清アルブミン(最終濃度50 μ g/mL)を含有する組成物で予め混和したものを背部皮内に0.05mL(1×10^6 個)移植を行い、移植後13日目に腫瘍を採取し重量の測定を行なう。コントロール投与群の腫瘍重量から態様2のバソヒビン修飾体投与群における腫瘍重量を差し引いた値を用いて、コントロール投与群の腫瘍増殖抑制活性を0%、投与後の腫瘍重量が0mgとなる腫瘍増殖抑制活性を100%とした場合の腫瘍増殖抑制活性(%)を算出して血管新

生抑制活性(%)とする。バソヒビン修飾体の有意な腫瘍増殖抑制活性が認められる場合に、バソヒビン修飾体は血管新生抑制活性を有すると判断する。なお、態様2のバソヒビン修飾体の血管新生抑制活性(%)は、35%以上が好ましく、45%以上がより好ましく、60%以上がさらに好ましい。

[0018] NHS-PEGを用いたタンパク質のPEG修飾は、通常、反応液のpHを中性付近にすることにより活性化したNHS-PEGの電子供与基の求核反応が主にタンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基又はN末端アミノ酸残基の α -アミノ基に対して行われて、それにより、N-スクシンイミジル基が脱離したPEGとタンパク質の複合体が形成される。また、PEGの修飾数は、NHS-PEGの添加量によってコントロールすることができ、例えば、タンパク質1分子に対するPEGの修飾数が1~7分子である場合、反応に供されるNHS-PEGとタンパク質のモル比(NHS-PEG/タンパク質)は、20/1~1/1程度である。しかし、本発明では、バソヒビンの中性付近での溶解性が低い(pH7.4での溶解度: 0.01mg/mL以下)ことから、NHS-PEGとタンパク質間の前記反応を、バソヒビンの溶解度が高い酸性領域において、バソヒビン1モルに対して、NHS-PEGを100モル以上添加混合して行うことにより、バソヒビン1分子に対してPEGが2~7分子結合したバソヒビンが得られた。

[0019] 一方、CHO-PEGを用いたタンパク質のPEG修飾は、タンパク質のアミノ基に対して還元的アミノ化反応により行うことができ、N末端アミノ基とリジン側鎖のアミノ基との pK_a の差を利用することで行うことができる。例えば、低pH域で反応を行えば、アルデヒド基とN末端アミノ基とが、選択的に還元的アミノ化反応を起こしてPEGによるN末端特異的修飾も可能である。

[0020] 態様1及び2のバソヒビン修飾体におけるバソヒビン(Vasohibin)としては、バソヒビン1(Vasohibin-1)及びバソヒビン2(Vasohibin-2)が挙げられるが、本明細書において、バソヒビンとは、バソヒビン1のことをいう。なお、WO 02/090546、WO 2006/073052等を開示されているようにバソヒビン1とバソヒビン2は、異なる染色体上に存在する別の遺伝子であるが、それらの遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は

58%の相同性を有している。バソヒビン1は配列番号1の386番目のAから1480番目のCで表される塩基配列からなるバソヒビン1ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質、及び配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるバソヒビン1ポリペプチドのことをいう。

[0021] バソヒビン1ポリヌクレオチドとしては、配列番号1に表される塩基配列からなるポリヌクレオチド以外に、前記ポリヌクレオチド又はそれらの相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうるポリヌクレオチドが例示される。

[0022] ここでいう「ストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうるポリヌクレオチド」とは、ポリヌクレオチドの断片をプローブとして、当該分野において周知慣用な手法、例えば、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるポリヌクレオチドを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のポリヌクレオチドを固定化したメンブランを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC(Saline Sodium Citrate: 150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウム)溶液を用い、65℃でメンブランを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition(1989)(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Current Protocols in Molecular Biology(1994)(Wiley-Interscience)、DNA Cloning 1: A Practical Approach Core Techniques, Second Edition(1995)(Oxford University Press)などに記載されている方法に準じて行うことができる。

[0023] 本明細書において「ハイブリダイズしうるポリヌクレオチド」とは、上記

ハイブリダイズ条件で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。そのようなポリヌクレオチドとして、具体的には、配列番号1で表されるバソヒビン1ポリヌクレオチドと少なくとも60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。なお、本明細書において、相同性は、例えば、Altschulら(The Journal of Molecular Biology, 215, 403-410(1990))の開発したアルゴリズムを使用した検索プログラムBLASTを用いることにより、スコアで類似度を算出することができる。

[0024] 上記ポリヌクレオチドは、公知の方法に準じて調製することができ、例えば、WO 02/090546に開示された方法に従って調製することができる。また、アミノ酸配列に基づいて、バソヒビン1ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても調製することができる。DNAの化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392などを用いて行うことができる。

[0025] バソヒビン1ポリペプチドとしては、配列番号2に表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド以外に、前記アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するポリペプチド、及びそれらの誘導体、ならびにそれらの塩が例示される。

[0026] 本明細書中において、「ポリペプチドの誘導体」とは、例えば、アセチル誘導体、パルミトイル誘導体、ミリスチル誘導体、アミド誘導体、アクリル誘導体、ダンシル誘導体、ビオチン誘導体、リン酸誘導体、サクシニル誘導体、アニリド誘導体、ベンジルオキシカルボニル誘導体、ホルミル誘導体、ニトロ誘導体、スルフォン誘導体、アルデヒド誘導体、環状化誘導体、グリコシル誘導体、モノメチル誘導体、ジメチル誘導体、トリメチル誘導体、グアニジル誘導体、アミジン誘導体、マレイル誘導体、トリフルオロアセチル誘導体、カルバミル誘導体、トリニトロフェニル誘導体、ニトロトロポニル

誘導体、又はアセトアセチル誘導体等が挙げられる。

[0027] 本明細書において、「塩」とは、ポリペプチド又はそれらの誘導体の薬理的に許容される任意の塩(無機塩及び有機塩を含む)をいい、例えば、ポリペプチド又はそれらの誘導体のナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、燐酸塩、有機酸塩(酢酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、プロピオン酸塩、蟻酸塩、安息香酸塩、ピクリン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩等)等が挙げられる。これらの中でも、好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩、燐酸塩が望ましい。

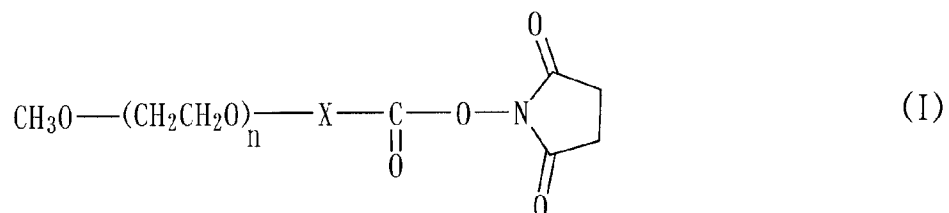
[0028] 上記ポリペプチドは、公知の方法に準じて調製することができ、例えば、WO 02/090546、WO 2006/073052等を開示された方法に従って調製することができる。

[0029] また、上記ポリペプチドの誘導体は、当該分野で公知の方法により、作製され得る。また、上記ポリペプチドの塩も、当該分野で公知の任意の方法により、当業者によって容易に作製され得る。

[0030] 本願明細書において、「ポリエチレングリコール」とは、エチレングリコールが重合した構造〔(—CH₂CH₂O—)の重合体〕を有する高分子化合物をいう。

[0031] 態様1におけるN-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール(N HS-PEG)としては、ポリエチレングリコールの末端にN-スクシンイミジル基を有するものであれば特に限定はないが、合成の容易さ及び品質の観点から、式(I)：

[0032] [化1]



[0033] (式中、Xは2価の有機基を示し、nは正の整数を示す)

で表わされる化合物が好ましい。

[0034] 式(I)中のXは2価の有機基を示し、得られるPEG修飾体に種々の物性を付与する観点から、各種官能基とすることができる。具体的には、 $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-$ 等が挙げられるが、安定性の観点から、 $-(\text{CH}_2)_5-$ が好ましい。

[0035] 式(I)中のnは、平均分子量の観点から、好ましくは100~120の整数である。

[0036] かかる式(I)で表される化合物としては、モノメトキシPEG-スクシニル-NHS、モノメトキシPEG-グルタリル-NHS、モノメトキシPEG-カルボキシメチル-NHS、モノメトキシPEG-カルボキシヘプチル-NHS等が挙げられ、これらは単独で又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0037] 式(I)で表される化合物の平均分子量は、2000~20000が好ましく、4000~6000がより好ましく、4500~5500がさらに好ましい。なお、本明細書において、ポリエチレングリコールの平均分子量は、ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)等により測定される。

[0038] 式(I)で表される化合物は、公知の方法で製造されたものを用いることができるが、市販品を用いてもよい。市販品としては、NOF社のSUNBRIGHT(登録商標)CSシリーズ、GSシリーズ、ASシリーズ、HSシリーズ等が挙げられる。

[0039] 態様2におけるアルデヒド基を有するポリエチレングリコール(CHO-PEG)としては、ポリエチレングリコールの末端にアルデヒド基を有するものであれば特に限定はないが、合成の容易さ及び品質の観点から、式(II)：



(式中、Yは2価の有機基を示し、mは正の整数を示す)

で表わされる化合物が好ましい。

[0040] 式(II)中のYは2価の有機基を示し、得られるPEG修飾体に種々の物性を付与する観点から、各種官能基とすることができる。Yは2価の有機基であれば特に限定されないが、安定性の観点から、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ が好ましい。

- [0041] 式(II)中の m は、平均分子量の観点から、好ましくは100～800の整数である。
- [0042] かかる式(II)で表される化合物の好適例としては、モノメトキシPEG－エチレンアルデヒド等が挙げられる。
- [0043] 式(II)で表される化合物の平均分子量は、血管新生抑制作用を保持する観点から、35000以下が好ましく、4500～35000がより好ましく、4750～32500がさらに好ましく、5000～30000がさらに好ましい。
- [0044] 式(II)で表される化合物は、公知の方法で製造されたものを用いることができるが、市販品を用いてもよい。市販品としては、NOF社のSUNBRIGHT(登録商標)ALシリーズ等が挙げられる。
- [0045] 次に、バソヒビンとNHS-PEGとの反応について説明する。
- [0046] 反応は、酸性条件下で行われ、具体的には、好ましくはpH3.0～4.0、より好ましくはpH3.00～4.00、さらに好ましくはpH3.25～3.75、さらに好ましくはpH3.40～3.60で行われる。
- [0047] なお、上記範囲のpH条件下で反応を行うために使用する緩衝液としては、酢酸緩衝液(酢酸溶液／酢酸ナトリウム溶液)、クエン酸緩衝液(クエン酸／クエン酸ナトリウム溶液)、リン酸－クエン酸緩衝液(リン酸水素二ナトリウム／クエン酸)等が挙げられる。これらの緩衝液において、バソヒビンは高い溶解性〔溶解度(25℃、pH3.5)：3mg/mL以上〕を示し、また、NHS-PEGも高い溶解性を示す。なお、緩衝液の濃度は特に限定はないが、緩衝作用と以後の精製操作の容易さの観点から、25～50mMが好ましい。
- [0048] 反応温度は、特に限定はないが、20～50℃が好ましく、30～40℃がより好ましい。反応時間は、反応条件によって一概には決定できないが、例えば、30～40℃で反応を行う場合、好ましくは1～4時間、より好ましくは3～4時間である。
- [0049] NHS-PEGとバソヒビンのモル比(NHS-PEG／バソヒビン)は、350/1～450/1が好ましく、375/1～425/1がより好ましく、390/1～410/1がさらに好ましい。なお、PEGの修飾数、即ち、バソヒビン1分子に対するPEGの付加分子数は、NH

S-PEGの添加量、バソヒビン濃度等によってコントロールすることができることから、修飾数を増加させる場合には、NHS-PEGの添加量を増加、即ち、前記モル比を大きくしたり、バソヒビン濃度を高くしたりすればよい。また、修飾数を低減させる場合には、NHS-PEGの添加量を低減、即ち、前記モル比を小さくしたり、バソヒビン濃度を低くしたりすればよい。

[0050] バソヒビンとNHS-PEGとの反応後には、公知の方法に従って精製、分画、希釈、濃縮等を行ってもよい。

[0051] 次に、バソヒビンとCHO-PEGとの反応について説明する。

[0052] 本発明においては、均一な修飾体を得る観点から、さらに部位特異的なPEG化によるバソヒビンへの影響をコントロールする観点から、反応は、バソヒビンのN末端アミノ基とリジン側鎖のアミノ基との pK_a の差を利用してN末端に特異的に修飾を行うために低pH域で行われる。具体的には、好ましくはpH3.0~6.0、より好ましくはpH3.00~6.00、さらに好ましくはpH4.00~6.00、さらに好ましくはpH4.75~5.25で行われる。

[0053] なお、上記範囲のpH条件下で反応を行うために使用する緩衝液としては、酢酸緩衝液(酢酸溶液/酢酸ナトリウム溶液)、クエン酸緩衝液(クエン酸/クエン酸ナトリウム溶液)、リン酸-クエン酸緩衝液(リン酸水素二ナトリウム/クエン酸)等が挙げられる。これらの緩衝液において、バソヒビンは高い溶解性〔溶解度(25°C、pH5.0): 1mg/mL以上〕を示し、また、CHO-PEGも高い溶解性を示す。なお、緩衝液の濃度は特に限定はないが、緩衝作用と以後の精製操作の容易さの観点から、25~200mMが好ましい。また還元的アミノ化反応のために、ホウ化水素シアン酸ナトリウム(sodium cyanoborohydride)等の還元剤が添加されることが好ましい。

[0054] 反応温度は、特に限定はないが、3~25°Cが好ましく、3~5°Cがより好ましい。反応時間は、反応条件によって一概には決定できないが、例えば、3~5°Cで反応を行う場合、好ましくは10~20時間、より好ましくは15~17時間である。

[0055] CHO-PEGとバソヒビンのモル比(CHO-PEG/バソヒビン)は、200/1~4/1が好

ましく、50/1～15/1がより好ましい。なお、PEGの修飾数、即ち、バソヒビン1分子に対するPEGの付加分子数は、CHO-PEGの添加量、バソヒビン濃度等によってコントロールすることができることから、修飾数を増加させる場合には、CHO-PEGの添加量を増加、即ち、前記モル比を大きくしたり、バソヒビン濃度を高くしたりすればよい。また、修飾数を低減させる場合には、CHO-PEGの添加量を低減、即ち、前記モル比を小さくしたり、バソヒビン濃度を低くしたりすればよい。なお、前記低pH域で反応が行われるのであれば、かかるモル比で反応することで、バソヒビンのN末端アミノ基にPEG化を行うことができる。

[0056] バソヒビンとCHO-PEGとの反応後には、公知の方法に従って精製、分画、希釈、濃縮等を行ってもよい。

[0057] かくしてバソヒビンにPEGが結合したバソヒビン修飾体が得られる。

[0058] NHS-PEGは、タンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基又はN末端アミノ酸残基の α -アミノ基に対して結合することから、得られた態様1の修飾体においてPEGが結合している位置は、具体的には、バソヒビン1ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、配列番号2の5、6、79、83、90、103、145、146、158、162、168、194、229、255、256、258、276、292、304、307、316、319、320、347、348及び353番目のリジン残基ならびにN末端のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つである。なお、PEGの結合位置は、ペプチドマッピング法などの従来から知られた方法により分かる。

[0059] 本発明の態様1のバソヒビン修飾体は、バソヒビン1分子に対するPEGの結合分子数によって、例えば、PEGが2分子結合した修飾体、3分子結合した修飾体、4分子結合した修飾体、5分子結合した修飾体、6分子結合した修飾体、7分子結合した修飾体等が挙げられ、これらは、単独で、又は2種以上組み合わせて使用してもよい。なお、本明細書において、態様1のバソヒビン修飾体におけるPEGの結合分子数は、後述の実施例に記載の方法により算出される。

- [0060] また、CHO-PEGは、N末端アミノ基とリジン側鎖のアミノ基に対して結合するが、本発明においては、態様2の修飾体を得る反応を低pH域で行うため、態様2の修飾体においてPEGが結合している位置は、N末端アミノ酸残基のみである。
- [0061] 本発明のバソヒビン修飾体は、態様1及び2のバソヒビン修飾体のいずれもが中性付近での溶解性が向上することから、pH7.4におけるバソヒビン修飾体の溶解度(25℃)は、タンパク質換算で1mg/mL以上であり、5mg/mL以上であることが好ましい。
- [0062] また、態様1のバソヒビン修飾体は、PEG化による分子量の増大に起因して糸球体ろ過効率や細胞間を通過する効率が減少することや、プロテアーゼに対する耐性が獲得されるために、血中安定性が良好である。具体的には、例えば、マウス血中での半減期が好ましくは1時間以上であり、より好ましくは4時間以上である。なお、マウス血中での半減期は以下の手順により測定することができる。まず、マウスの尾静脈より、態様1のバソヒビン修飾体をタンパク量で0.1mg(0.3~0.4mL)投与し、投与直後から経時的に心臓より採血を行う。バソヒビンを定量できるELISA法により血漿中のバソヒビン量を算出し、投与直後のバソヒビン量を100%とした場合の残存率を求め、60分後における残存率が50%以上である場合に、マウス血中での半減期が1時間以上であると判断する。同様に240分後における残存率が50%以上である場合、マウス血中の半減期は4時間以上であると判断する。
- [0063] 本発明は、また、N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール(NHS-PEG)と、バソヒビンとを酸性条件下で反応させる工程を含む、バソヒビン修飾体の製造方法を提供する。
- [0064] 上記工程の具体例としては、例えば、酢酸緩衝液(pH3.50)を用いて0.6~0.9mg/mL濃度のバソヒビン含有溶液を調製し、そこに、N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール(NHS-PEG)をバソヒビン1モルあたり400モル添加して、37℃において、1~4時間攪拌して反応させる態様が挙げられる。得られた反応物は、ゲルろ過精製を行ったり、濃縮したりしてもよい。な

お、バソヒビン含有溶液の調製には、NHS-PEGとバソヒビンとの反応が酸性条件下となるよう、好ましくはpH3.0～4.0、より好ましくはpH3.00～4.00、さらに好ましくはpH3.25～3.75、さらに好ましくはpH3.40～3.60の緩衝液を用いることが望ましい。

[0065] また、本発明の別の態様として、1分子に結合するPEGの分子数が異なった複数の態様1のバソヒビン修飾体からなるバソヒビン修飾体調製物を提供する。バソヒビン修飾体調製物の具体例としては、NHS-PEGとバソヒビンをモル比(NHS-PEG/バソヒビン)400/1で反応させることで得られる、タンパク質1分子に対して2～7分子のPEGが修飾した態様1のバソヒビン修飾体からなるバソヒビン修飾体調製物が挙げられる。このようにして得られたバソヒビン修飾体調製物は、ゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、塩析、結晶化、加熱等の公知の方法による分画、精製等を行うことで、所望のバソヒビン修飾体を得る事が出来る。

[0066] また、バソヒビン修飾体は、ポリエチレングリコールによる修飾を受けているため、生体内での安定性が向上する。それにより、生体内において、バソヒビンが有する血管新生抑制効果をより発揮することができると推定されることから、血管新生抑制作用を要する疾患に好適に用いられる。従って、本発明は、さらに、本発明のバソヒビン修飾体を含有する医薬組成物を提供する。

[0067] 本発明の医薬組成物としては、本発明のバソヒビン修飾体を公知の医薬用担体と組み合わせて製剤化したものが挙げられる。なお、バソヒビン修飾体としては、態様1のバソヒビン修飾体単独で、態様2のバソヒビン修飾体単独で、又は態様1及び2のバソヒビン修飾体を組み合わせて用いてもよい。

[0068] 本発明の医薬組成物の製造は、通常、本発明のバソヒビン修飾体を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合することにより行われ、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤や、通

常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。なお、医薬用担体は、医薬組成物の投与形態及び製剤形態に応じて選択することができ、特に限定はない。

[0069] 上記のような各種製剤形態での医薬組成物は、それぞれ公知の医薬用担体などを利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる医薬組成物における本発明のバソヒビン修飾体の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。本発明の医薬組成物中の本発明のバソヒビン修飾体の含有量としては通常 1 ～ 100 重量%程度である。

[0070] 本発明の医薬組成物は、製剤形態に応じた適当な投与方法で投与される。投与方法も特に限定はなく、例えば内用、外用及び注射により投与することができる。本発明の医薬組成物を注射により投与する場合は、たとえば静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内などに投与し得、外用により投与する場合は、たとえば、座剤等の外用剤として、その適する投与方法により投与すればよい。

[0071] 本発明の医薬組成物の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及び当該組成物の投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。また、投与は、所望の投与量範囲内において、1 日内において単回で、又は数回に分けて行ってもよい。投与期間も任意である。

[0072] 血管新生抑制作用を要する疾患としては、血管新生の進展を抑制することにより治療効果がみられる疾患であれば特に限定はないが、例えば、動脈硬化、リュウマチ、加齢黄斑変性症、血管新生が関連する糖尿病性網膜症又は癌が例示される。

[0073] 本発明はまた、被験体に、有効量のバソヒビン修飾体を投与することを含む、血管新生抑制作用を要する疾患の治療方法を提供する。

[0074] 本明細書中において被験体とは、好ましくは血管新生抑制作用を必要とするヒトであるが、ペット動物等であってもよい。

[0075] また、本明細書中において有効量とは、バソヒビン修飾体を上記被験体に投与した場合に、バソヒビン修飾体を投与していない被験体と比較して、血管新生抑制作用を発揮するバソヒビン修飾体の量である。具体的な有効量としては、投与形態、投与方法、使用目的及び被験体の年齢、体重、症状等によって適宜設定され一定ではない。

[0076] 本発明の血管新生抑制作用を要する疾患の治療方法においては、有効量のバソヒビン修飾体をそのまま上記被験体に投与してもよく、また、上記のようなバソヒビン修飾体調製物や医薬組成物等の医薬として投与してもよい。また、投与方法にも限定はなく、例えば、上記の医薬組成物と同様に、経口投与や注射等により投与すればよい。

[0077] 本発明の治療方法によれば、前記の本発明の医薬組成物の対象となる疾患を治療することができ、例えば、血管新生によって進展する疾患の治療を行う効果が発揮され得る。

実施例

[0078] 以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。なお、これらの実施例において、室温とは、特に断りのない限り、25℃を意味する。

[0079] 調製例 1. バソヒビン 1 の調製

<バソヒビン 1 発現株の構築>

バソヒビン 1 ポリヌクレオチド(配列番号 1 の 386 番目から 1480 番目の塩基配列)を基に当業者にとって周知な方法(Current Opinion in Biotechnology, 6, 494-500(1995)、等)により大腸菌での発現に適したコドンに変更したバソヒビン 1 (Vh1) 遺伝子をthioredoxin(Trx)融合発現用のpET-32 LIC/Xaベクター(Novagen社製)に導入し、Escherichia coli BL21(DE3)を形質転換した(BL21(DE3)/TrxVh1-pET32)。形質転換株は単一コロニーを単離した後、LB培地(1.0% Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、0.5% NaCl、50 µg/mL ampicillin、pH7.0)を用いて試験管で37℃、16h培養した。培養後、30% glycerolを等量添加

して-80℃で保管した(バソヒビン発現株保存液)。

[0080] <Vh1発現株の発酵・培養>

50mLのLB培地を仕込んだ500mL容三角フラスコに、バソヒビン発現株保存液 500 μ Lを添加し、37℃、9h前培養を行った。その後3Lの本培養培地 (4.0% glycerol、2.4% Bacto yeast extract、1.2% Bacto tryptone、1.25% K_2HPO_4 、0.23% KH_2PO_4 、500 μ g/mL polypropylene glycol #2000、50 μ g/mL ampicillin、pH7.0)を仕込んだ5L培養槽に前培養した培養液を1%植菌し、37℃で22h培養した。培養開始後OD₆₅₀値が4~5になれば最終濃度が1mMとなるように isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した。培養中のpHは28%アンモニア水と35%りん酸を用いてpH7.0に制御した。培養終了後の培養液をサンプリングし、SDS-PAGE分析によってthioredoxin(Trx)とVh1との融合タンパク質であるTrxVh1の発現を確認した。

[0081] <TrxVh1の調製>

培養終了液を遠心分離(10,000g、30min)によって集菌し、懸濁緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)、pH7.6)で洗浄した。高圧ホモジナイザーを用いて菌体を破碎(55Pa、5回)した後、遠心分離(10,000g、30min)を行い、さらに同緩衝液で洗浄して不溶性画分を取得した。得られた画分を可溶化緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM PMSF、5mM 2-mercaptoethanol、60mM imidazole、7M Guanidine-HCl、pH8.0)で可溶化し、不溶性画分を遠心分離(72,000g、30min)によって除去した後、予め同可溶化緩衝液で平衡化したNi Chelating Sepharose column(ϕ 16mm $\times$ 125mm)に供した。非吸着画分を洗浄緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM PMSF、5mM 2-mercaptoethanol、60mM imidazole、8M Urea、pH8.0)で洗い流した後、溶出緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM PMSF、5mM 2-mercaptoethanol、300mM imidazole、8M Urea、pH8.0)で溶出した。吸着、洗浄、溶出時の流速は1.0 mL/min、操作はすべて室温で実施した。溶出画分をSDS-PAGEでモニタリングし、TrxVh1画分を捕集した。

[0082] <Vh1の調製>

上記のようにして得られたTrxVh1をグリシン緩衝液(20mM Glycine-HCl、pH 3.5)に対して透析した後、Factor Xa(Novagen社製)切断用緩衝液(最終濃度: 50mM Tris-HCl、100mM NaCl、5mM CaCl_2 、pH8.0)で希釈して0.5mg/mLとした。Factor Xaを最終濃度2U/mLとなるように添加し、限定分解を25°Cで1h実施した。反応終了時に現れる沈殿画分を遠心分離(70,000g、30min)で回収後、可溶化緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM PMSF、5mM 2-mercapto ethanol、60mM imidazole、7M Guanidine-Cl、pH8.0)で可溶化し、予め同可溶化緩衝液で平衡化したNi Chelating Sepharose column(ϕ 16mm $\times$ 125mm)に供した。非吸着画分を洗浄緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM PMSF、5mM 2-mercaptoethanol、60mM imidazole、8M Urea、pH8.0)で洗い流した後、溶出緩衝液(20mM sodium phosphate、0.5M NaCl、1mM PMSF、5mM 2-mercaptoethanol、300mM imidazole、8M Urea、pH8.0)で溶出した。吸着、洗浄、溶出時の流速は1.0mL/min、操作はすべて室温で実施した。溶出画分をSDS-PAGEで分析し、Vh1画分を捕集後、20mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で透析し、再沈殿化精製した。さらに沈殿化Vh1をイオン交換カラム用緩衝液(25mM sodium phosphate、4M Urea、pH7.2)で溶解し、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラム(Q Sepharose、 ϕ 16mm $\times$ 140mm)に供した。Vh1の溶出は、溶出緩衝液(25mM sodium phosphate、4M Urea、1M NaCl、pH7.2)によってグラジエント溶出した。流速は2.0mL/min、操作はすべて室温で実施した。溶出画分はSDS-PAGEで分析し、Vh1画分を捕集後、酢酸緩衝液(20mM sodium acetate、pH3.5)に対して透析を行った。

[0083] 実施例1. Polyethylene glycol (PEG) 修飾Vh1(態様1の修飾体)の調製〔N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール(NHS-PEG)によるVh1の修飾〕

<PEG(NHS)-Vh1の調製>

調製例1で得られたVh1の酢酸緩衝液溶液を、最終濃度が0.6~0.9mg/mLになるようにした。このVh1溶液に平均分子量5000のNHS-PEG〔SUNBRIGHT(登録商標)ME-050HS、NOF社製〕をVh1に対してモル比でそれぞれ10、100、400倍添

加し、37°C、4時間反応させた(反応液pH3.50)。反応終了液は、直ちに酢酸緩衝液(20mM sodium acetate、pH3.5)で平衡化したSephacryl S200充填カラム(カラムサイズ: ϕ 16mm $\times$ 600mm(120mL)、流速: 1.0mL/min)に供してゲルろ過精製を行った。

[0084] <PEG(NHS)-Vh1生成の確認>

得られた溶出画分について、SDS-PAGE分析を行った。結果を図1に示す。図1より、Vh1に対してNHS-PEGをモル比400倍濃度で反応させた場合には、高分子量の反応物が得られていることが分かる。一方、Vh1に対してNHS-PEGをモル比10、100倍濃度で反応させた場合には、高分子量の生成物以外に、未反応のVh1が残存することが確認された。

[0085] <PEG(NHS)-Vh1画分の捕集>

次に、Vh1に対してNHS-PEGをモル比400倍濃度で反応させて得られた反応液について、紫外吸収測定(Abs 280nm)とSDS-PAGE分析を実施して、NHS-PEGと反応して得られたVh1〔PEG(NHS)-Vh1とする。〕画分を捕集した。捕集したPEG(NHS)-Vh1は、リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline、PBS)に対して透析を行い、限外ろ過膜によってタンパク濃縮をした。

[0086] <PEG(NHS)-Vh1のPEG付加分子数>

得られたPEG(NHS)-Vh1を、MALDI-TOF MS分析〔Ultraflex II (Bruker社製)、マトリックス: Sinapinic acid〕に供することによってPEG付加分子数を確認した。結果を図2に示す。図2より、反応物には、バソヒビン1分子に対して、PEGが2分子、3分子、4分子、5分子、6分子、7分子それぞれ結合した修飾体が含まれていることが分かった。

[0087] <PEG-Vh1の溶解性>

PEG(NHS)-Vh1の溶解性はブラッドフォード法を用いるタンパク質定量によって測定した。その結果、pH7.4(PBS)において6.5mg/mL以上の溶解度(25°C)を示した。なお、参照例として、Vh1(未修飾体)の溶解性もブラッドフォード法で測定した。結果、pH7.4(PBS)で透析するとVh1のほとんどが沈殿し、遠心分離(70,000g、30min)の上清液のタンパク質濃度は0.01mg/mLの検出限界以下

であった。

[0088] 試験例 1、PEG(NHS)-Vh1の評価(in vitro)

<血管新生抑制活性>

マウスの角膜を用いた抗血管新生アッセイで評価した。本方法は、マウスの角膜に対して血管新生を誘導する血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)を投与し、その時、同時に加えたVh1(未修飾体)、PEG(NHS)-Vh1がこの血管新生の領域をどこまで抑制するかで血管新生抑制効果を評価するモデルである。

[0089] 日本チャールス・リバー社より購入したBALB/cマウスの角膜に、VEGF(80ng)のみ、VEGF(80ng)とVh1(4ng)もしくはVEGF(80ng)と実施例 1 で得られたPEG(NHS)-Vh1(タンパク換算で4ng)を染み込ませたhydron pellet(IFN Science社製)を麻酔下で移植した。移植 7 日後に角膜を剥離し、角膜内に新生した血管面積をフォトメーターで測定した。対照群には、酢酸緩衝液(20 mM Sodium acetate、pH3.5)を投与した。結果を図 3 に示す。

[0090] 図 3 より、VEGFのみを投与した場合では、対照と比較し、明らかな血管新生の亢進が確認されるが、VEGFとVh1及びVEGFとPEG(NHS)-Vh1を投与した場合では、強く血管新生抑制効果が観察され、PEG修飾体においても活性が保持されていることが示された。なお、Vh1を投与した場合の血管新生抑制活性を100%とした場合、PEG(NHS)-Vh1を投与した場合の血管新生抑制活性(%)は98%であった。

[0091] <血中安定性>

日本チャールス・リバー社より購入したC57BL/6(♀、13週齢)の尾静脈より、Vh1及び実施例 1 で得られたPEG(NHS)-Vh1をタンパク量で各0.1mg(0.3~0.4 mL)投与し、投与直後、10分後、30分後、60分後、240分後にエーテル麻酔下においてEDTA-2K処理した注射筒にて心臓より採血を行った。対照マウスには20mM酢酸緩衝液(pH3.5)を0.3mL投与した(n=3)。

[0092] マウスより採血した血漿中のバソヒビン量は、ELISA法を用いて算出した。具体的には、あらかじめアッセイバッファー(0.5% BSA、0.05%Tween 80、1

0 μ g/mL γ -globulin及び0.1%ProClin150を含む、100mM PBS、pH7.0)を、抗バソヒビン抗体(VR1-12E7、文献：BBRC 2006、342、p640-646)固相イムノプレートに、各ウェル25 μ L添加した。次に、血漿サンプルあるいはアッセイバッファで調製した標準用のバソヒビンを25 μ Lずつ添加した後、HRP標識抗バソヒビン抗体(VC-12F6)Fab'を添加し、プレートを攪拌した。4°Cにて終夜静置した後、各ウェルを0.01% Tween20及び0.05% ProClin150を含む生理食塩水で3回洗浄し、各ウェル100 μ LのTMB溶液(Colorburst Blue、ALerCHEK社製)を添加し、攪拌後室温にて15分間静置した。0.5N 硫酸を50 μ L添加することにより反応停止し、450nmにおける吸光度を測定した。各標準バソヒビン(2000、667、222、74、24.7、0fmol/mL)の吸光度から標準曲線を作製して血漿中のバソヒビン量を算出し、投与直後のバソヒビン量を100%とした場合の残存率を求めた。結果を図4に示す。

[0093] 図4より、PEG(NHS)-Vh1はVh1に比較して血中での安定性が大きく改善され、240分経過後においてもほぼ投与時の濃度が維持され、残存率は60分経過後で91%、240分経過後においても91%であり、血中半減期が4時間以上であった。

[0094] 試験例2、PEG(NHS)-Vh1の評価(in vivo)

<腫瘍増殖抑制活性(1)>

日本チャールス・リバー社より購入したBALB/cマウス(♀、7~9週齢)に、90%マトリジェル(BD Biosciences社より購入)と、10%の実施例1で得られたPEG(NHS)-Vh1(最終タンパク濃度で0.8、8、80 μ g/mL)又は10% PBSを含有する組成物であらかじめ混和したマウス腎癌株(Renca)を背部皮内に0.05mL(1×10^6 個)移植を行い、移植後11日目に腫瘍を採取し重量の測定を行なった(各群6匹)。10% Vh1(未修飾体)を含有する組成物についても同様の方法での調製を試みたが、Vh1の殆どが沈殿し、サンプルを調製する事が出来ず、Vh1(未修飾体)についての腫瘍増殖抑制活性の測定は出来なかった。得られた測定値の平均値から、PBS投与群の腫瘍増殖抑制活性を0%、投与後の腫瘍重量が0mgとなる腫瘍増殖抑制活性を100%として、腫瘍増殖抑制活性(%)を算出した。結果

を表 1 に示す。なお、PBS投与群を基準とした有意差検定の結果も併せて示す。

[0095] [表1]

表 1

Renca (n=6)

群	タンパク濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	腫瘍重量 (mg)	腫瘍増殖抑制活性 (%)	有意差
コントロール (PBS)	---	131 ± 22	0	---
PEG (NHS)-Vh1	80	61 ± 29	53	$p < 0.01$
PEG (NHS)-Vh1	8	83 ± 36	37	$p < 0.05$
PEG (NHS)-Vh1	0.8	111 ± 30	21	n. s.

n. s. : 有意差なし

[0096] 表 1 より、PEG (NHS)-Vh1 を混ぜて移植した群においては濃度依存的に腫瘍増殖抑制効果が見られており、なかでも $80 \mu\text{g/mL}$ のタンパク濃度で PEG (NHS)-Vh1 を投与した群においては 53% の増殖抑制効果が認められた。

[0097] <腫瘍増殖抑制活性(2)>

日本クレア社より購入した BDF1 マウス (♀、7~9 週齢) に、90% マトリジェル (BD Biosciences 社より購入) と、10% の実施例 1 で得られた PEG (NHS)-Vh1 (最終タンパク濃度で 0.8、8、 $80 \mu\text{g/mL}$) 又は 10% PBS を含有する組成物であらかじめ混和したマウス肺癌株 (Lewis) を背部皮内に 0.05mL (1×10^6 個) 移植を行い、移植後 8 日目に腫瘍を採取し重量の測定を行なった (各群 5 匹)。10% Vh1 (未修飾体) を含有する組成物についても同様の方法での調製を試みたが、Vh1 の殆どが沈殿し、サンプルを調製する事が出来ず、Vh1 (未修飾体) についての腫瘍増殖抑制活性の測定は出来なかった。得られた測定値の平均値から、PBS 投与群の腫瘍増殖抑制活性を 0%、投与後の腫瘍重量が 0mg となる腫瘍増殖抑制活性を 100% として、腫瘍増殖抑制活性 (%) を算出した。結果を表 2 に示す。なお、PBS 投与群を基準とした有意差検定の結果も併せて示す。

[0098]

[表2]

表 2

Lewis (n=5)

群	タンパク濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	腫瘍重量 (mg)	腫瘍増殖抑制活性 (%)	有意差
コントロール (PBS)	---	239 ± 82	0	---
PEG (NHS)-Vh1	80	117 ± 43	45	$p < 0.05$
PEG (NHS)-Vh1	8	179 ± 39	16	n. s.
PEG (NHS)-Vh1	0.8	135 ± 65	37	n. s.

n. s. : 有意差なし

[0099] 表 2 より、Lewis に対する増殖抑制効果はRencaに比べ若干弱いものの、PEG (NHS)-Vh1の80 $\mu\text{g/mL}$ のタンパク濃度においては45%の有意な増殖抑制効果を示した。

[0100] これらの結果より、PEG (NHS)-Vh1は血管新生抑制活性を有すると判断することができる。

[0101] 実施例 2. Polyethylene glycol (PEG) 修飾Vh1の調製(態様 2 の修飾体) [アルデヒド基を持ったPEG (CHO-PEG) によるVh1の修飾]

事前にVh1に対するCHO-PEGによる修飾反応時のpHを検討した結果、pH5.0付近において最も特異的にVh1のN末端をPEG修飾することが可能であることを確認した。

[0102] 調製例 1 で得られたVh1を用いてPEG修飾を行った。PEG修飾反応は、最終濃度が25 μM Vh1、100mM sodium acetate (pH5.0)、1mM CHO-PEG、8mM sodium cyanoborohydrideの溶液を4℃、16時間反応させた。反応停止は50mM sodium acetate (pH 5.0) に対して透析することにより行った。その後50mM sodium acetate (pH 5.0) で平衡化したCM sepharoseカラム (GEヘルスケア社製) へロードし、NaCl濃度を30分間かけて0.0Mから0.8Mまで変化させ、PEG修飾Vh1 [PEG (CHO)-Vh1] を溶出させた。得られたPEG (CHO)-Vh1はPBSに対して透析を行い、最終サンプルとした。また用いたCHO-PEGは、分子量5,000 (5K-CHO-PEG)、10,

000 (10K-CHO-PEG)、20,000 (20K-CHO-PEG)、30,000 (30K-CHO-PEG)、40,000 (40K-CHO-PEG)、branch type 40,000 (b40K-CHO-PEG) それぞれSUNBRIGHT ME-050AL、SUNBRIGHT ME-100AL、SUNBRIGHT ME-200AL、SUNBRIGHT ME-300AL、SUNBRIGHT ME-400AL2、GL2-400AL3全てNOF社製)の6種類で、反応精製条件は全て上記と同一で行った。

[0103] <PEG(CHO)-Vh1生成の確認>

実施例2で得られたCHO-PEGと反応して得られた修飾Vh1 [PEG(CHO)-Vh1] におけるN末端へのPEGの特異的修飾はMALDI-TOF MS分析 [Ultraflex II (Bruker社製)、マトリックス: Sinapinic acid] により、1分子修飾体への収束(図5)とペプチドマッピングによるN末端フラグメントの消失により確認した。さらに、精製したPEG(CHO)-Vh1はSDS-PAGE分析によって予想される分子量を示すことを確認した(図6)。いずれについてもバンドは1本に収束した。

[0104] <PEG(CHO)-Vh1の溶解性>

実施例2で得られたPEG(CHO)-Vh1の溶解性はブラッドフォード法を用いるタンパク質定量によって測定した。その結果、調製したPEG化体はいずれもpH 7.4 (PBS) において1mg/mL以上の溶解度(25°C)を示した。

[0105] 試験例3、PEG(CHO)-Vh1の評価(in vivo)

<腫瘍増殖抑制活性>

日本チャールス・リバーより購入したBALB/cマウス(♀、7~9週齢)に、90%マトリジェル(BD Biosciences社より購入)と、10%の実施例2で得られたPEG(CHO)-Vh1(最終タンパク濃度50 µg/mL)又は10%のヒト血清アルブミン(最終濃度50 µg/mL)を含有する組成物であらかじめ混和したマウス腎癌株(Renca)を背部皮内に0.05mL (1 × 10⁶個)移植を行い、移植後13日目に腫瘍を採取し重量の測定を行ない、試験例2の(1)と同様にして評価を行った(各群5匹、但しPEG(40K-CHO)の群は4匹)。結果を表3に示す。なお、HSA投与群を基準とした有意差検定の結果も併せて示す。

[0106]

[表3]

表 3

Renca (n= 5、但しPEG(40K-CHO)-Vh1の群はn=4)

群	タンパク濃度 (μ g/mL)	腫瘍重量 (mg)	腫瘍増殖抑制活性 (%)	有意差
コントロール (HSA)	50	63.5 $\pm$ 16.9	0	---
PEG(5K-CHO)-Vh1	50	15.6 $\pm$ 18.4	75	p<0.01
PEG(20K-CHO)-Vh1	50	23.7 $\pm$ 19.2	63	p<0.01
PEG(30K-CHO)-Vh1	50	20.9 $\pm$ 8.1	67	p<0.01
PEG(40K-CHO)-Vh1	50	76.4 $\pm$ 32.3	0	n. s.

n. s. : 有意差なし

- [0107] 対照群であるHSAを混ぜて移植した場合の腫瘍重量に比べ、分子量5K~30KのCHO-PEGで修飾したVh1を混ぜて移植した群において有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。

産業上の利用可能性

- [0108] 本発明のバソヒビン修飾体は、中性付近における溶解性が高いことから、血管新生抑制効果を要する疾患の治療等に好適に用いられる。

配列表フリーテキスト

- [0109] 配列表の配列番号 1 は、バソヒビン 1 ポリヌクレオチド及びそこにコードされているポリペプチドである。

配列表の配列番号 2 は、バソヒビン 1 ポリペプチドである。

請求の範囲

[請求項1] 下記(1)及び(2)を満たす、ポリエチレングリコールが結合してなるバソヒビン修飾体。

(1) pH7.4における溶解度(25℃)が1mg/mL以上である

(2) 血管新生抑制作用を有する

[請求項2] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを反応させてなる、請求項1記載のバソヒビン修飾体。

[請求項3] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを酸性条件下で反応させてなる、請求項2記載のバソヒビン修飾体。

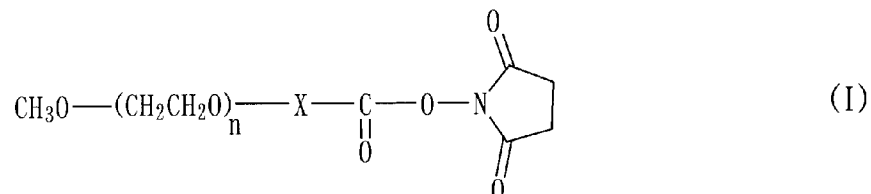
[請求項4] 酸性条件がpH3.0～4.0である、請求項3記載のバソヒビン修飾体。

[請求項5] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールとバソヒビンをモル比(ポリエチレングリコール/バソヒビン)350/1～450/1で反応させる、請求項2～4いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項6] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールの平均分子量が4000～6000である、請求項2～5いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項7] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールが、式(I) :

[化1]



(式中、Xは2価の有機基を示し、nは正の整数を示す)

で表わされる化合物である、請求項2～6いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項8] バソヒビン1分子に対して、ポリエチレングリコールが2分子～7分

子結合してなる、請求項2～7いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項9] ポリエチレングリコールが結合する位置が、配列番号2の5、6、79、83、90、103、145、146、158、162、168、194、229、255、256、258、276、292、304、307、316、319、320、347、348及び353番目のリジン残基ならびにN末端のアミノ酸残基からなる群より選ばれる少なくとも1つである、請求項2～8いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項10] マウス血中での半減期が1時間以上である請求項1～9いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項11] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを酸性条件下で反応させる工程を含む、請求項2～10いずれか記載のバソヒビン修飾体の製造方法。

[請求項12] 酸性条件がpH3.0～4.0である、請求項11記載のバソヒビン修飾体の製造方法。

[請求項13] N-スクシンイミジル基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンをモル比(ポリエチレングリコール/バソヒビン)350/1～450/1で反応させる、請求項11又は12記載のバソヒビン修飾体の製造方法。

[請求項14] 請求項1～10いずれか記載のバソヒビン修飾体を含有してなる、バソヒビン修飾体調製物。

[請求項15] アルデヒド基を有するポリエチレングリコールと、バソヒビンとを反応させてなる、請求項1記載のバソヒビン修飾体。

[請求項16] アルデヒド基を有するポリエチレングリコールの平均分子量が3500以下である、請求項15記載のバソヒビン修飾体。

[請求項17] アルデヒド基を有するポリエチレングリコールが、式(II)：

$$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{Y}-\text{CHO} \quad (\text{II})$$

(式中、Yは2価の有機基を示し、mは正の整数を示す)

で表わされる化合物である、請求項 15 又は 16 記載のバソヒビン修飾体。

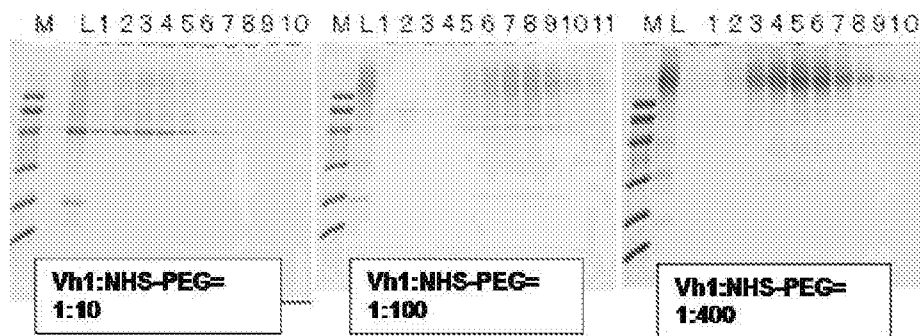
[請求項18] ポリエチレングリコールが、バソヒビンのN末端のアミノ酸残基にのみ結合してなる請求項 15～17 いずれか記載のバソヒビン修飾体。

[請求項19] 請求項 1～10、15～18 いずれか記載のバソヒビン修飾体を含むしてなる、医薬組成物。

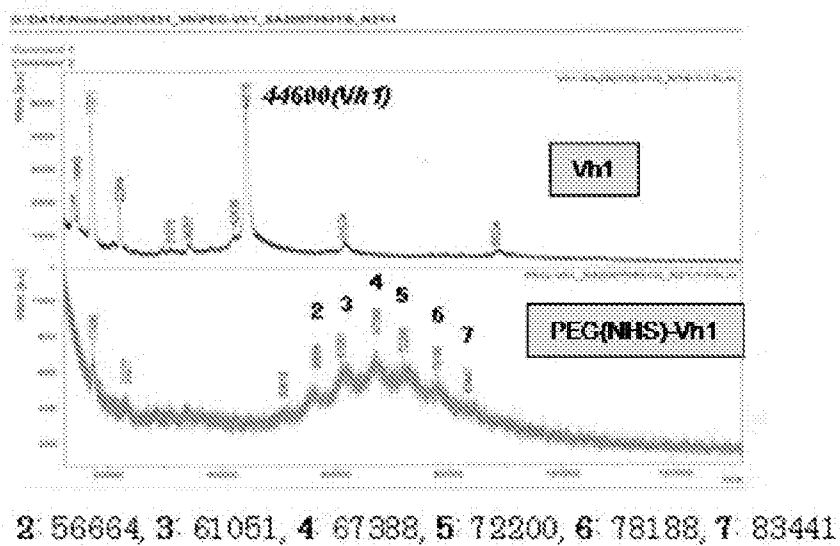
[請求項20] 血管新生抑制作用を要する疾患の治療に用いられる請求項 19 記載の医薬組成物。

[請求項21] 請求項 1～10、15～18 いずれか記載のバソヒビン修飾体、請求項 14 記載のバソヒビン修飾体調製物、請求項 19 又は 20 記載の医薬組成物のいずれかを投与することを特徴とする血管新生抑制作用を要する疾患の治療方法。

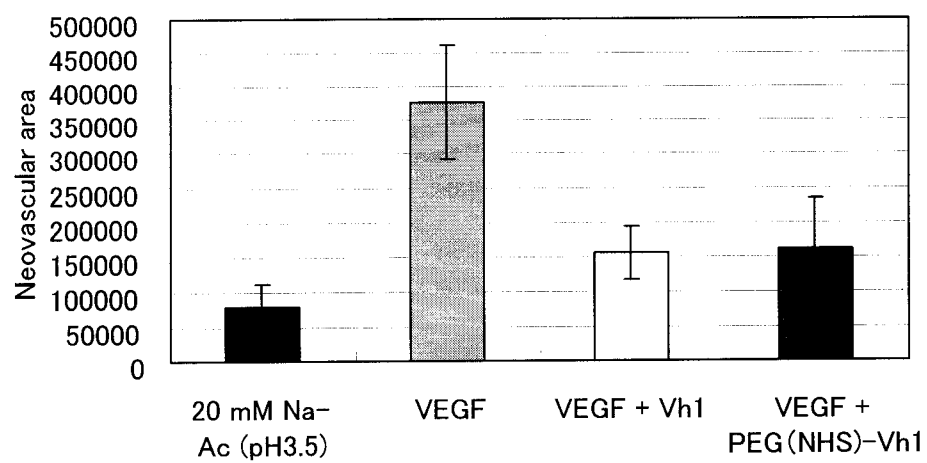
[図1]



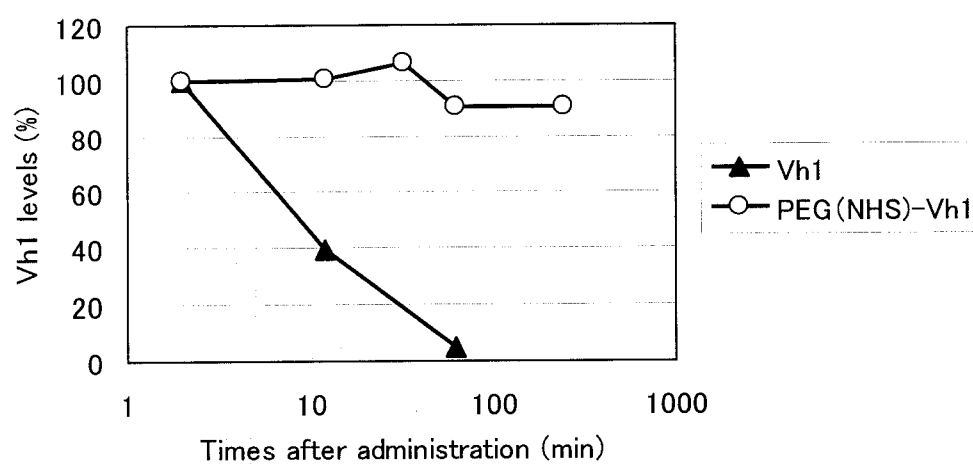
[図2]



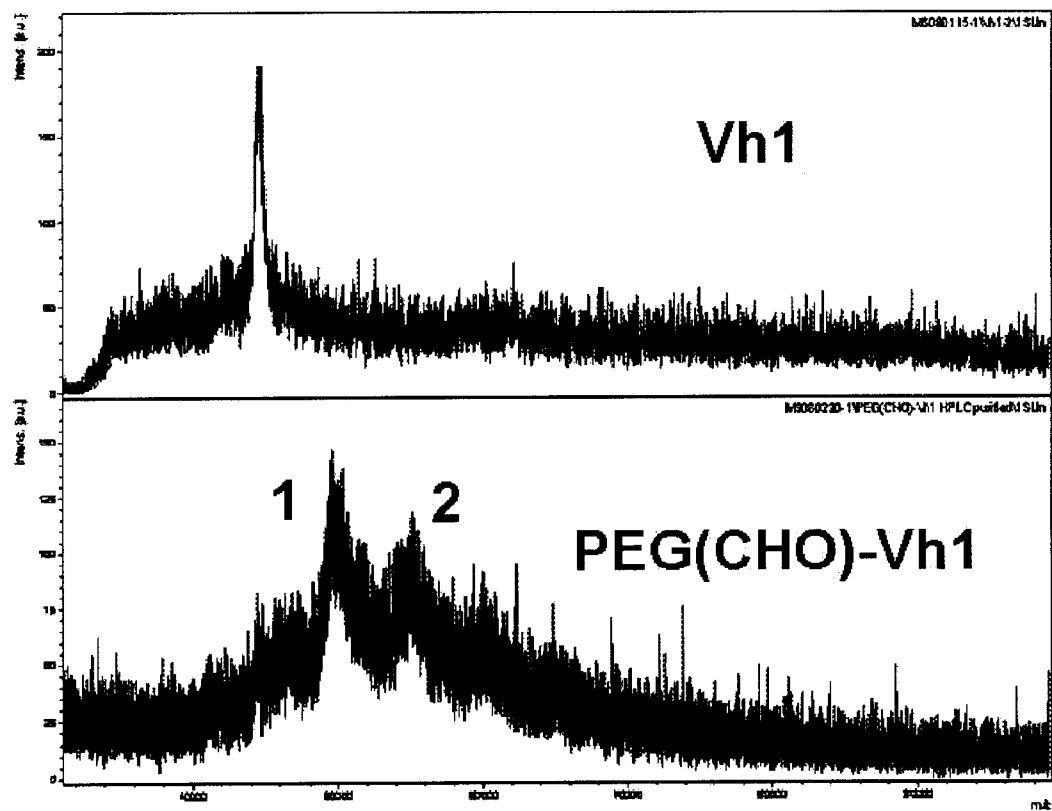
[図3]



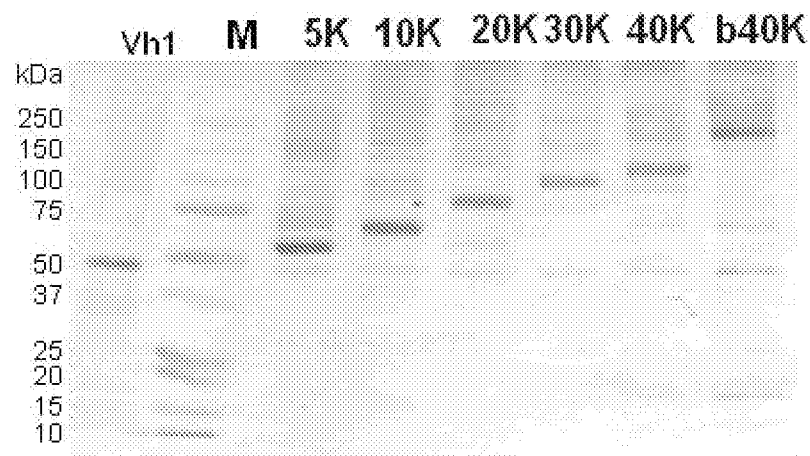
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/52(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K1/00-19/00, A61K38/00, A61K47/34, A61K47/48, A61P35/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/Capplus/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 2007/037245 A1 (Shionogi & Co., Ltd.), 05 April 2007 (05.04.2007), & EP 1930344 A1 & US 2009/0270314 A1	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	WO 2008/066032 A1 (Tohoku University), 05 June 2008 (05.06.2008), (Family: none)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	WO 2008/123308 A1 (Okayama University), 16 October 2008 (16.10.2008), (Family: none)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	ROBERTS, M.J. et.al., Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2002, vol.54, no.4, p.459-476 (cited in the present application)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 application or patent 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

26 January, 2010 (26.01.10)

Date of mailing of the international search report

02 February, 2010 (02.02.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071328

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	KINSTLER, O. et.al., Mono-N-terminal Poly (ethylene glycol)-protein Conjugates. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2002, vol.54, no.4, p.477-485 (cited in the present application)	<u>1-11,14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	FISHBURN, C.S., The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics. J. Pharm. Sci., 2008, Oct., vol.97, no.10, p.4167-4183 (cited in the present application)	<u>1-11,14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	WO 2004/081053 A1 (HANMI PHARM. CO., LTD.), 23 September 2004 (23.09.2004), & JP 2007-528346 A & EP 1601698 A1	<u>1-11,14-20</u> 12-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071328

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 21 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K14/52(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K1/00-19/00, A61K38/00, A61K47/34, A61K47/48, A61P35/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	WO 2007/037245 A1 (塩野義製薬株式会社) 2007. 04. 05. & EP 1930344 A1 & US 2009/0270314 A1	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	WO 2008/066032 A1 (国立大学法人東北大学) 2008. 06. 05. (ファミリーなし)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	WO 2008/123308 A1 (国立大学法人岡山大学) 2008. 10. 16. (ファミリーなし)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4 B

3 9 6 4

戸来 幸男

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	ROBERTS, M.J. et.al., Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2002, vol.54, no.4, p.459-476 (本願で引用)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	KINSTLER, O. et.al., Mono-N-terminal Poly(ethylene glycol)-protein Conjugates. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2002, vol.54, no.4, p.477-485 (本願で引用)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	FISHBURN, C.S., The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics. J. Pharm. Sci., 2008, Oct., vol.97, no.10, p.4167-4183 (本願で引用)	<u>1-11, 14-20</u> 12-13
<u>Y</u> A	WO 2004/081053 A1 (HANMI PHARM. CO. LTD.) 2004. 09. 23. & JP 2007-528346 A & EP 1601698 A1	<u>1-11, 14-20</u> 12-13

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 2 1 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 2 1 は「治療による人体の処置方法に関するもの」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。