

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5622117号  
(P5622117)

(45) 発行日 平成26年11月12日(2014.11.12)

(24) 登録日 平成26年10月3日(2014.10.3)

(51) Int.Cl.

F 1

|              |           |              |
|--------------|-----------|--------------|
| A 61 K 47/48 | (2006.01) | A 61 K 47/48 |
| A 61 K 47/34 | (2006.01) | A 61 K 47/34 |
| A 61 K 47/32 | (2006.01) | A 61 K 47/32 |
| A 61 K 47/36 | (2006.01) | A 61 K 47/36 |
| A 61 K 47/42 | (2006.01) | A 61 K 47/42 |

請求項の数 10 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-519228 (P2011-519228)  
 (86) (22) 出願日 平成21年7月17日 (2009.7.17)  
 (65) 公表番号 特表2011-528706 (P2011-528706A)  
 (43) 公表日 平成23年11月24日 (2011.11.24)  
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2009/001764  
 (87) 國際公開番号 WO2010/010324  
 (87) 國際公開日 平成22年1月28日 (2010.1.28)  
 審査請求日 平成24年7月11日 (2012.7.11)  
 (31) 優先権主張番号 0813339.9  
 (32) 優先日 平成20年7月21日 (2008.7.21)  
 (33) 優先権主張国 英国(GB)  
 (31) 優先権主張番号 0905762.1  
 (32) 優先日 平成21年4月2日 (2009.4.2)  
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者 510099774  
 ポリテリクス リミテッド  
 イギリス国、ロンドン、エヌダブリュ1  
 0ティーユー、カムデン、2 ロイヤルカ  
 レッジストリート、ザ ロンドン バイオ  
 テクノロジー イノベンション センター  
 (74) 代理人 100068618  
 弁理士 粂 経夫  
 (74) 代理人 100104145  
 弁理士 宮崎 嘉夫  
 (74) 代理人 100104385  
 弁理士 加藤 勉  
 (74) 代理人 100156889  
 弁理士 小山 京子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生体分子を接合するための新規な試薬及び方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般式：

X - [ N R - C O - A r - W - ( C H = C H )<sub>n</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - L ]<sub>m</sub> ( I )

(式中、

X は、ポリアルキレングリコール、ポリビニルピロイドン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリオキサゾリン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、H P M A コポリマー、ポリエステル、ポリアセタール、ポリ(オルトエステル)、ポリカーボネット、ポリ(イミノカーボネット)、ポリアミド、ジビニルエーテル-無水マレイン酸及びスチレン-無水マレイン酸のコポリマー、多糖及びタンパク質からなる群より選択されるポリマーを表し；

R は水素原子又はアルキル基、アリール基又はアルキル-アリール基を表し；

A r はフェニル基を表し；

W はケト基 C O を表し；

n は 0 又は 1 乃至 4 の整数を表し；

L は、- S R 、- S O<sub>2</sub> R 、- O S O<sub>2</sub> R 、- N<sup>+</sup> R<sub>3</sub> 、- N<sup>+</sup> H R<sub>2</sub> 、- N<sup>+</sup> H<sub>2</sub> R 、ハロゲン原子及び- O ( R は水素原子又は未置換の若しくは置換された、アルキル基、アリール基若しくはアルキル-アリール基を表し、そして は少なくとも 1 つの電子求引置換基を含む置換アリール基を表す。) からなる群より選択される脱離基を表し；そして

m は 1 乃至 8 の整数を表す。) で表される化合物。

10

20

## 【請求項 2】

前記 X はポリアルキレングリコールである、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

前記 X はポリエチレングリコールである、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

前記 n は 0 である、請求項 1 ないし 3 の何れか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 5】

一般式：

X - [ N H - C O - A r - W - ( C H = C H )<sub>n</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - S O<sub>2</sub> R' ]<sub>m</sub> ( I a )

(式中、

X、A r、W、n 及び m は請求項 1 ないし 4 の何れか 1 項に与えられた意味を有し、

R' は水素原子又は未置換の若しくは置換された、アルキル基、アリール基若しくはアルキル - アリール基を表す。) で表される、請求項 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 6】

前記 R' は p - トリル基を表す、請求項 5 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

ポリマーにペプチド又はタンパク質であるチオール基又はアミノ基を含んでいる分子を接合する方法であって、該方法は前記分子を、請求項 1 ないし 6 の何れか 1 項に記載の化合物と反応させることを含む方法。

## 【請求項 8】

一般式：

X - [ N R - C O - A r - W' - ( C H = C H )<sub>n</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - Z ]<sub>m</sub> ( I I )

(式中、

X、R、A r、n 及び m は請求項 1 ないし 6 の何れか 1 項に与えられた意味を有し、

Z はペプチド又はタンパク質であるチオール基又はアミノ基を介して接合された分子を表し、そして

W' はケト基 C O 又は C H ( O H ) 基を表す。) で表される化合物。

## 【請求項 9】

一般式：

X - [ N H - C O - A r - W' - ( C H = C H )<sub>n</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> - Z ]<sub>m</sub> ( I I a )

で表される、請求項 8 に記載の化合物。

## 【請求項 10】

薬学的に許容されるキャリヤーと共に請求項 8 又は 9 に記載の化合物を含む医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生体分子、特にタンパク質及びペプチドを接合するための新規な試薬及び新規な方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多くの治療効果のある分子、例えばタンパク質は、臨床医学的用途において、効力を發揮するために必要とされる特性を有していない。例えば、多くの天然タンパク質は、良い薬にはならない。その理由は、患者への投与時に、(1) タンパク質が血液又は組織中に存在する多くのエンド - 及びエキソ - ペプチダーゼによって消化される；(2) 多くのタンパク質はある程度免疫原性である；並びに(3) タンパク質は腎臓限外ろ過及びエンドサイトーシスにより迅速に排出され得る等を含んだいくつかの固有の欠点があるからである。医学の分野で有効な治療薬としての有用性を発見するかもしれない、いくつかの分子は組織的に有毒であるか又は最適な生物学的利用態及び薬物動態を欠いている。タンパク

10

20

30

40

50

質がすぐに血液循環から消えてなくなる場合は、タンパク質は一般的に頻繁に患者に投与されなければならない。頻繁な投与はさらに、毒性の危険性、特に免疫学的に生成された毒性を増加する。

【0003】

水溶性、合成ポリマー、特にポリアルキレングルコースは、タンパク質、ペプチド及び低分子薬物のような治療効果のある分子を接合するために幅広く使用される。これらの治療的な接合体は、循環時間を引き延ばすこと及び除去率を減少させること、組織的毒性を減少させること、並びにいくつかの場合では、さらなる臨床的有用性を発揮することにより、薬物動態を優位に変えることが示されている。ポリエチレンギリコール、PEGをタンパク質に共有結合する方法は、“PEG化(PEGylation)”として一般的に知られている。 10

【0004】

最適化された効力にとってタンパク質ごとに複合ポリマー分子の数は各分子に対して同じである用量一貫性のための投与量を確保すること、及び各タンパク質分子は各タンパク質分子中の同じアミノ酸残基と特に共有結合することは重要である。タンパク質分子に沿った部分での非特異的接合は接合生成物の配分及び頻繁に、非複合タンパク質をもたらして精製するのに難しく且つ費用がかかる複雑な混合物を生み出す。

【0005】

チオール特異的接合に対し、マレイミド基で一端を終端されたPEG鎖を有するPEG化試薬が一般的に使用される。そのような試薬は多くの出版物、例えば国際公開第2004/060965号パンフレットに記述されている。マレイミド末端試薬は市販されている。しかしながら、多くのPEG-マレイミドは保管及び薬剤候補接合の間加水分解的に不安定である。特に、マレイミド環の相当な程度の加水分解が抱合前も抱合後も、起こる。 20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2004/060965号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

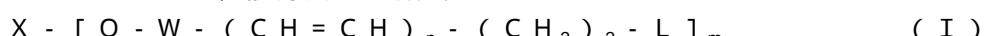
【0007】

我々は今、PEG化試薬群であって、単一の求核残基、例えばチオール基を介してポリマーにタンパク質及びペプチドを組み込んでいる接合分子に使用され得、そしてそのような市販試薬より有利であるものを見出した。 30

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、本発明はポリマーにチオール基又はアミノ基を含んでいる分子の接合方法を提供するものであって、該方法は一般式：



(式中、

Xはポリマーを表し；

Qは連結基を表し；

Wは電子求引基を表し；

nは0又は1乃至4の整数を表し；

Lは脱離基を表し；そして

mは1乃至8の整数を表す。)で表される化合物と前記分子の反応を含む。 40

【0009】

発明の方法による直接的な生成物は一般式：



(式中、

10

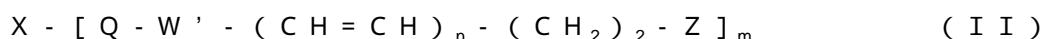
30

40

50

X、Q、W、n 及びmは上述した意味であり、そして  
Zはチオール基又はアミノ基を介して接合された前記分子を表す。)によって一般的に表され得る。必要に応じて、この式(I I a)で表される得られる化合物は他の望ましい生成物に変換され得る。

特に、一般式(I I a)で表される得られる化合物は一般式I I



(式中、W'は電子求引性部分又は電子求引性部分の還元によって調製できる部分を表す。)

で表される化合物に変換され得る。

【図面の簡単な説明】

10

【0010】

【図1】図1は実施例1の第一工程の反応スキームを示す図である。

【図2】図2は実施例1の第二工程の反応スキームを示す図である。

【図3】図3は実施例1の第三工程の反応スキームを示す図である。

【図4】図4は実施例1の第四工程の反応スキームを示す図である。

【図5】図5は実施例2の生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図6】図6は実施例3の生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図7】図7は実施例5の生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図8】図8は実施例6において反応からの逆相クロマトグラフィー分析を示す図である。

20

【図9】図9は実施例7の生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図10】図10は実施例8において反応からの陽イオン交換クロマトグラフィー分析を示す図である。

【図11】図11は実施例8のELISA結果を示す図である。

【図12】図12は実施例9の生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図13】図13は実施例11の経時的PEG化のクロマトグラムを示す図である。

【図14】図14は実施例10及び11にあるように化合物9、10及び11の相互変換を示す図である。

【図15】図15は実施例11の変換結果を示す図である。

【図16】図16は実施例12の逆相クロマトグラフィー結果を示す図である。

30

【図17】図17は実施例13の安定性結果を示す図である。

【図18】図18は実施例17の中間生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図19】図19は実施例17の最終生成物のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図20】図20は実施例17の吸光度結果を示す図である。

【図21】図21は実施例19の反応スキームを示す図である。

【図22】図22は実施例20の反応スキームを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

40

一般式(I)で表される化合物は新規であり、それ故に本発明もまたこれらの化合物自体を提供する。特に好ましい式(I)で表される新規な化合物は下記に定義された式(I a)で表されるものである。

【0012】

一般式(I I)で表される化合物もまた新規であり、それ故に本発明もまたこれらの化合物自体を提供する。特に好ましい式(I I)で表される新規な化合物は下記に定義された式(I I b)で表されるものである。

【0013】

mは1乃至8の整数、例えば1乃至6、好ましくは1乃至4、例えば1を表す。mが1の場合、单一の分子がポリマーに接合される。mが1より大きい場合、ポリマーに対し二

50

つ以上の分子の接合が得られ得る。2乃至8の基 - Q - W' - (CH=CH)<sub>n</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - Z又は - Q - W - (CH=CH)<sub>n</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - Lはポリマーに結合し、変数Q、W、W'、n、L及びZは各そのような基に対して同一又は異なっていても良い。多官能ポリマー化合物は利用でき、例えば、多数の基は、出発物質として登録商標“サンブライト(Sunbright)”：例えば、4-アーム(4-arm)製品は、式C [CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-Y]<sub>4</sub>(式中、Yは多数の異なった末端基の一つでもよい)の下、NOFから入手可能なマルチアーム(multi-arm)化合物を使用しながら結合され得る。多量体接合体は相乗的かつ追加的な便益をもたらすことができる。例えば、mが1の場合、得られる接合体は複合分子から離れたPEG鎖の末端上に末端基を有する必要がある。これは一般に、アルコキシ基又はよく似た基であり、そして薬学的応用に利用されるとき、そのような基は望ましくない免疫効果を導き得ることが示唆される。mが1より大きい場合、アルコキシ基のような末端基を必要とせずに、複合分子はPEG鎖の両末端に結合される。

## 【0014】

ポリマーXは、例えばポリアルキレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、例えばポリアクリロイルモルホリン、ポリメタクリレート、ポリオキサゾリン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド又はポリメタクリルアミド、例えばポリカルボキシメタクリルアミド、又はHPMAコポリマーであってもよい。さらに、Xは酵素又は加水分解の影響を受けやすいポリマーである。そのようなポリマーとしては、例えば、ポリエステル、ポリアセタール、ポリ(オルトエステル)、ポリカーボネート、ポリ(イミノカーボネート)、及びポリ(アミノ酸)のような、ポリアミドが挙げられる。ポリマーXはホモポリマー、ランダムコポリマー又はブロックコポリマーのような構造的に明確なコポリマーであってもよい。例えばXは二種以上のアルキレンオキシド、又はポリ(アルキレンオキシド)及びポリエステル、ポリアセタール、ポリ(オルトエステル)、又はポリ(アミノ酸)のいずれかから誘導されるブロックコポリマーであってもよい。使用され得る多官能性ポリマーはジビニルエーテル-無水マレイン酸及びスチレン-無水マレイン酸のコポリマーである。

## 【0015】

天然高分子、例えばキチン、デキストラン、デキストリン、キトサン、でんぶん、セルロース、グリコーゲン、ポリ(シアル酸)及びその誘導体のような多糖もまた使用され得る。タンパク質はポリマーとして使用され得る。これは第二のタンパク質、例えば酵素又は他の活性タンパク質に、1つのタンパク質、例えば抗体又は抗体フラグメントの接合を可能にする。また、触媒配列を含んでいるペプチド、例えばグリコシルトランスフェラーゼのO-グリカンレセプター部位が使用される場合、次の酵素反応の基質又はターゲットの取り込みを可能にする。ポリグルタミン酸又はポリグリシンのようなポリ(アミノ酸)もまた、サッカリド又はアミノ酸のような天然モノマー及びエチレンオキシド又はメタクリル酸のような合成モノマーから誘導されるハイブリッドポリマーとして使用され得る。

## 【0016】

ポリマーがポリアルキレングリコールである場合、これは好ましくはC<sub>2</sub>及び/又はC<sub>3</sub>単位を含んでいるものであり、特にポリエチレングリコールである。ポリマー、特にポリアルキレングリコールは、単一の線状鎖を含んでいてもよく、または多くの鎖-小さい或いは大きな多くの鎖-により構成された分岐形態を有していてもよい。いわゆるフルロニック(Pluronic)はPEGブロックコポリマーの重要な種類である。これらはエチレンオキシド及びプロピレンオキシドブロックから誘導される。置換ポリアルキレングリコール、例えばメトキシポリエチレングリコールは使用され得る。発明の好ましい実施態様では、単一鎖のポリエチレングリコールは適切な基、例えばアルコキシ基、例を挙げるとメトキシ基、アリールオキシ基、カルボキシ基又はヒドロキシ基によって開始され、そして鎖の反対側でリンカーベースQに結合される。

## 【0017】

ポリマーXはいくつかの所望の方法で誘導体化又は機能化され得る。反応基はポリマー

10

20

30

40

50

末端又は末端基で、またはペンドントリンカーを介してポリマー鎖に沿って結合され得る；そのような場合、ポリマーは例えばポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、又は無水マレイン酸コポリマーである。そのような機能性ポリマーは多量体接合体（例を挙げると、ポリマーが二つ以上の分子に接合される接合体）を調製するさらなる機会をもたらすのにより一層の機会をもたらす。必要に応じて、ポリマーは従来の方法を用いて担体に結合され得る。

【0018】

ポリマーの最適分子量はもちろん対象としている用途次第である。好ましくは、数平均分子量は250g/mol乃至およそ75,000g/molの範囲内である。一般式IIで表される化合物が医学的用途に用いられ、そして血液循環を離れて組織に浸透することを目的としている、例えば悪性腫瘍に起因する炎症、感染又は自己免疫疾患、又はトラウマの治療用の場合、2000-30,000g/molの範囲内にある低分子量ポリマーを使用することが有用である。一般式IIで表される化合物を血液循環中に残存させることを目的としている用途に対しては、例えば20,000-75,000g/molの範囲内にある高分子量ポリマーを使用することが有用である。

10

【0019】

接合体がその使用目的のために溶剤に溶解できるように使用されるポリマーを選ばなければならぬ。生物学的適用、特に診断的適用及び哺乳類への臨床治療的投与に対する治療への応用に対して、接合体は水媒体に溶解できる。しかしながら、多くの生物学的分子、例えば酵素のようなタンパク質は、例えば化学反応を触媒するために、産業での有用性がある。そのような用途で使用されるための接合体に対し、接合体は水媒体及び有機媒体の一方又は両方に溶解できる必要がある。ポリマーはもちろん接合される分子の所望の機能を不当に損なうべきではない。

20

【0020】

好ましくはポリマーは合成ポリマーであり、好ましくは水溶性ポリマーである。水溶性ポリエチレングリコールの使用は多くの用途に対して特に好まれる。

【0021】

連結基Qは、例えば直接結合、アルキレン基（好ましくはC<sub>1-10</sub>アルキレン基）、または隨意に置換されたアリール基又はヘテロアリール基であって、これらのうちどれでも1つ以上の酸素原子、硫黄原子、-NR基（Rは水素原子又はアルキル基（好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル基）、アリール基（好ましくはフェニル基）、又はアルキル-アリール基（好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル-フェニル基）を表す。）、ケト基、-O-CO-基、-CO-O-基、-O-CO-O-、-O-CO-NR-、-NR-CO-O-、-CO-NR-及び/又は-NR-CO-基によって終端又は中斷され得るものある。そのようなアリール基及びヘテロアリール基Qは発明の1つの好ましい実施形態を形成する。適切なアリール基としてはフェニル基及びナフチル基が挙げられ、一方、適切なヘテロアリール基としては、ピリジン基、ピロール基、フラン基、ピラン基、イミダゾール基、ピラゾール基、オキサゾール基、ピリダジン基、ピリミジン基及びプリン基が挙げられる。特に適切な連結基Qはヘテロアリール基又は、特に、アリール基、特にフェニル基であって、-NR-CO-基によって隣接したポリマーXを終端化したものである。ポリマーへの結合は加水分解に不安定な結合、又は非不安定な結合を介してでもよい。

30

【0022】

隨意に置換されたアリール基又はヘテロアリール基に存在し得る置換基としては、例えばアルキル基（好ましくはOH又はCO<sub>2</sub>Hによって隨意に置換されたC<sub>1-4</sub>アルキル基、特にメチル基）、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R、-COH、-CH<sub>2</sub>OH、-COR、-OR、-OCOR、-OCO<sub>2</sub>R、-SR、-SOR、-SO<sub>2</sub>R、-NHCOR、-NRCOR、NHC<sub>2</sub>R、-NR-CO<sub>2</sub>R、-NO、-NHOH、-NR-OH、-C=N-NHCOR、-C=N-NR-COR、-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R、ハロゲン原子、例えばフッ素原子又は塩素原子、-CCR、-C=CR<sub>2</sub>及び-C=CHR（ここで、各Rは独立して水素原子又はアルキル基（好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル基

40

50

)、アリール基(好ましくはフェニル基)、又はアルキル-アリール基(好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル-フェニル基)を表す。)から選ばれる1つ以上の同一又は異なった置換基が挙げられる。電子求引置換基の存在が特に好ましい。好ましい置換基は例えばC N、N O<sub>2</sub>、-O R、-OCOR、-SR、-NHCO<sub>2</sub>R、-NR<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R、-NHOH及び-NR<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Rが挙げられる。

【0023】

Wは、例えばケト基CO、エステル基-O-CO-又はスルホン基-SO<sub>2</sub>-を表し、そしてW'はそのような基又は例えばCH<sub>2</sub>OH基、エーテル基CH<sub>2</sub>OR、エステル基CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>C(O)R、アミン基CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>NHR又はCH<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>、またはアミドCH<sub>2</sub>NHC(O)R又はCH<sub>2</sub>N(C(O)R)<sub>2</sub>の還元によって得られる基を表す。

10

【0024】

好ましくは、nは0である。

【0025】

脱離基Lは例えば、-SR、-SO<sub>2</sub>R、-OSO<sub>2</sub>R、-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R、ハロゲン原子、又は-O-を表す(ここで、Rは上述した意味であり、そしては置換アリール基、特に少なくとも1つの電子求引置換基を含むフェニル基を表すものであって、該電子求引置換基としては、例えば、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R、-COH、-CH<sub>2</sub>OH、-COR、-OR、-OCOR、-OCO<sub>2</sub>R、-SR、-SOR、-SO<sub>2</sub>R、-NHCOR、-NRCOR、-NHCO<sub>2</sub>R、-NR'CO<sub>2</sub>R、-NO、-NH<sub>2</sub>、-NR'OH、-C=N-NHCOR、-C=N-NR'COR、-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>、-N<sup>+</sup>HR<sub>2</sub>、-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R、ハロゲン原子、特に塩素原子、又は特にフッ素原子、-C=C R、-C=C R<sub>2</sub>及び-C=CHRであり、各Rは独立して上述した意味の一つである。)。

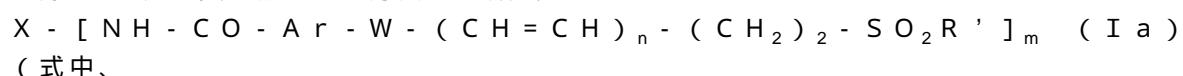
20

【0026】

mが2乃至8の整数を表す場合、必要に応じて異なったL基が存在し得る。これは異なった反応性のL基を選ぶことによって、逐次反応中のポリマーXに異なった分子を接合するための有利な条件をもたらす。

【0027】

好ましくは本発明による方法は一般式



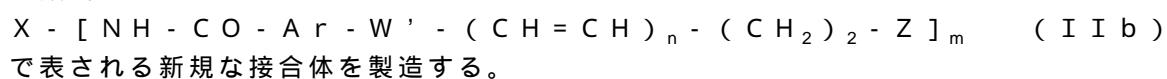
30

Arは未置換の又は置換アリール基、特にフェニル基を表すものであって、任意の置換基は連結基Qに含まれるアリール基に対する上記のものから選ばれ；

R'は水素原子又は随意に置換されたアルキル基(好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル基)、アリール基(好ましくはフェニル基)、又はアルキル-アリール基(好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル-フェニル基)を表し；そして

W及びmは上述した意味を有する。)で表される試薬を使用して、

一般式



40

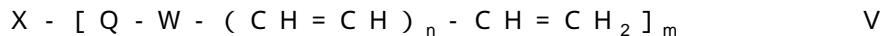
これらの好ましい化合物Ia及びIIbでは、好ましくはnは0であり、そして好ましくはmは1乃至4の整数、特に1を表す。好ましくはそれぞれのWはCO基を表し、そしてW'はCO基又はCH<sub>2</sub>OH基を表す。好ましくはR'は随意に置換されたアルキル基、例えば-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OHのような随意にヒドロキシ置換されたC<sub>1-4</sub>アルキル基、又は、特に、C<sub>1-4</sub>アルキル-アリール基、特にp-トルイル基を表す。好ましくはArは未置換のフェニル基である。好ましくはXはポリアルキレングリコール、特にポリエチレングリコールである。

【0028】

式Iで表される化合物、及び特に式Iaで表される化合物は、驚くほど安定であり、そしてまたチオール基又はアミノ基を含んでいる分子に対して高反応性であると考えられる

50

。本発明による接合方法は一般式



(式中、X、Q、W、n、及びmは上述した意味を有する。)

で表される中間化合物の形成を介して進行すると考えられる。

【0029】

本発明の方法によって接合される分子は任意の所望の分子であり得る。それは例えば天然分子又は天然分子から誘導される分子であり得、またはチオール基(-SH)又はアミノ基(-NHR)を含むという条件で、生物活性、例えば任意のドラッグを有している任意の分子であり得る。例えば、それはタンパク質又はペプチドであり得る：本明細書中、用語“タンパク質”は便宜上使用され、そして文脈上他の意味に解すべき場合を除き、“タンパク質”への言及は“タンパク質又はペプチド”への言及を意味していると理解すべきである。

【0030】

分子が結合されているチオール基又はアミノ基は、脱離基Lの脱離と同時に試薬Iと反応する能力がある求核試薬である。そのような基は天然生体分子中に存在し得る、または接合前に生体分子に導入され得る。

【0031】

2つのチオール基は天然又は人工ジスルフィド(システイン)架橋の還元によって発生し、それは鎖内又は鎖間であり得る。生体分子は1つ又は非常に多数のジスルフィド架橋を含むことができ、遊離スルフヒドリル部分を生じさせるための還元は1つ又は非常に多数のジスルフィド架橋を還元するために行われ得る。ジスルフィド還元の程度及び使用されるポリマー接合試薬の化学量論次第で、1つ又は非常に多数のポリマー分子を生体分子に接合させることができる。異なった反応条件又は変性剤の添加を使用して部分的な還元のように、ジスルフィド総数未満に減らすことを望む場合、固定化還元剤が使用され得る。

【0032】

また、チオール基は单一のシステイン残基又はもともとジスルフィド架橋から誘導されていない他のチオール基であり得る。单一のシステインは合成手段によって導入され得、付着の適切なポイントをもたらす。そのような手段はペプチドの接合に非常に有用である。

【0033】

アミノ基は例えばリシン又はヒスチジン残基であり得る。これらは天然生体分子中に存在し得る、または合成的に導入され得る。例えば、ヒスチジン残基は隣接するヒスチジン残基の短鎖、例えばタンパク質への合成方法により付着されるヒスチジン残基を最高で12個、ただし一般的には5又は6個の残基を含んでいる、his-タグ(his-tag)の方法によって導入され得る。His-タグはニッケル及びコバルトと強く結合し、His-タグを固定化金属アフィニティクロマトグラフィーとして知られている分離方法に使用されるニッケル-又はコバルト-含有カラムと結合させることを可能とする。ポリヒスチジンタグは幅広く使用され、広範囲のタンパク質及びペプチドに付着して、タンパク質及びペプチド又はそれらから誘導される生成物が、将来、混合物から分離されるようになる。

【0034】

分子がタンパク質の場合には、それは例えばペプチド、ポリペプチド、抗体、抗体フラグメント、酵素、サイトカイン、ケモカイン、レセプター、血液因子、ペプチド・ホルモン、毒素、転写タンパク質、又は多量体タンパク質であってもよい。

【0035】

所望の用途に応じて、本発明における有用性を有し得るいくつかの具体的なタンパク質を次に示す。酵素は炭水化物-特異的酵素、タンパク質分解酵素などが挙げられる。興味のある酵素としては、一般的適用や治療への応用において産業上(有機系の反応)及び生物学的応用に対して、米国特許第4,179,337号に開示されているオキシドレダク

10

20

30

40

50

ターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ及びリガーゼが特に挙げられる。興味のある特異的酵素としては、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、スーパーオキシドジスムターーゼ、カタラーゼ、キモトリプシン、リパーゼ、ウリカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルクロニダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルクロニダーゼ、及びグルタミナーゼが挙げられる。

## 【0036】

一般式Iで表される化合物に使用されるタンパク質としては、例えばアルブミンのような血漿タンパク質、転送、第VII因子、第VIII因子又は第IX因子、フォン・ヴィレブランド因子、インスリン、ACTH、グルカゴン(glucagen)、ソマトスタン、ソマトトロピン、サイモシン、副甲状腺ホルモン、色素ホルモン、ソマトメジン、エリスロポエチン、黄体形成ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、プロラクチン、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、ヘモグロビン、サイトカイン、抗体、抗体フラグメント、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン及び組織プラスミノゲン活性化因子が挙げられる。

## 【0037】

インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子のような特定の前記タンパク質もまた非グリコシル化形態で存在し、通常組み換えタンパク質技術による調製の結果に存在する。非グリコシル化型は本発明に使用され得る。

## 【0038】

興味のある他のタンパク質は、ポリ(アルキレンオキシド)のようなポリマーと接合させ、その結果寛容誘導物質(tolerance inducers)としての使用に適する場合、低下したアレルギー誘発性を有するとしてDreborg et al, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6:315-365によって開示されたアレルゲンタンパク質である。アレルゲンのうち、開示されたものはブタクサ抗原E、ミツバチ毒、ダニ・アレルゲンなどである。

## 【0039】

IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及びフラグメントのような免疫グロブリンがそうであるように、免疫グロブリン、オボアルブミン、リパーゼ、グルコセレブロシダーゼ、レクチン、組織プラスミノゲン活性化因子及びグルコシル化インターロイキンのような糖ポリペプチド、インターフェロンやコロニー刺激因子には興味がある。

## 【0040】

特に興味深いのは、レセプターやリガンド結合タンパク質及び抗体や抗体フラグメントであって、それらは診断及び治療目的で臨床医学において使用される。抗体は単独で使用され得又は放射性同位体又は細胞毒性/抗感染症薬のような別の原子又は分子と共有結合(投入“loaded”)され得る。エピトープは予防接種のために使用され得、免疫原性ポリマー-タンパク質接合体を生産する。

## 【0041】

必要に応じて生体分子は誘導体化又は機能化され得る。特に、接合前に、分子、例えば天然タンパク質は様々な保護基と反応され得、鋭敏基(sensitive group)表面を保護する; または本発明の方法を使用して或いは別の方法を使用して、1つ以上のポリマー又は他の分子と前もって接合され得る。

## 【0042】

分子は相対的に低分子量の合成分子であり得る。これは、例えば、接合が利点をもたらす任意の薬になり得る。多くのこのような分子に対し、発明による試薬に接合させるためにチオール基又はアミノ基を持っている適切なリンカーを挿入する必要がある。代表的な薬としては、例えばカプトブリル、アムホテリシンB、カンプトテシン、タクソール、イリノテカン及びSN38のようなその誘導体、ドセタキセル、及びリバビリンが挙げられる。

## 【0043】

10

20

30

40

50

発明の方法を使用して接合され得る興味がある別の分子としては国際公開第2004/060965号パンフレットに記載されているものが挙げられる。

【0044】

本発明による方法はすべての反応物が溶解できる溶媒又は溶媒混合液中で行われ得る。接合される分子、例えばタンパク質は、水性反応媒体中一般式Iで表される化合物と直接反応してもよい。求核試薬(チオール又はアミン)のpH所要値次第で、この反応媒体はまた緩衝され得る。反応に対する最適なpHはほとんどの場合少なくとも6.0、一般的に約6.8から約8.5の間、例えば約7.0乃至8.0、好ましくは約7.5-8.0であるが、別の場合は4.0という低いpHが使用され得、特にポリヒスチジンタグへの接合が要求されるとき、4.0乃至8.5の範囲にある有効なpHとなる。接合される分子の存在下、系中で上記式Vで表される化合物を生成することが好ましい場合、相対的に高いpHが全体に始めから終わりまで適切に使用される。また、分離工程において上記式Vで表される化合物を生じ、続いて分子を加えて接合体にすることが好ましい場合、第一工程は相対的に高いpH(例えば7.5-8.0)で適切に行われ、一方それに続く工程はより低いpH(例えば6.0乃至6.5)で最適に行われる。相対的に広範囲のpH条件でうまく使用され得ることが本発明の試薬の利点である。

【0045】

3-37間の反応温度が一般的に適切である:これらの方針が起こり得る温度で抱合反応が行われる場合、タンパク質は分解し、凝縮し又は障害機能及び/又は反応効率を変性し得る。有機媒体(例えばTHF、酢酸エチル、アセトン)中で行われる反応は一般的に外界までの温度で行われる。

【0046】

多くの他の試薬と違って、化学量論的当量又はわずかに過剰な試薬を使用することで分子は所望の試薬と効果的に抱合される。しかしながら、試薬は溶媒和物、例えばタンパク質に使用される水性媒体と競争反応を起こさないので、過剰な化学量論の試薬と抱合反応を行うことが可能である。過剰な試薬及び生成物は通常の精製中にイオン交換クロマトグラフィーによって、又はhis-タグが存在する場合はニッケルを使用する分離によって容易に分離され得る。

【0047】

分子が接合される基がチオール基である場合には、発明による方法は還元された生成物が式(I)で表される化合物と反応した後に、系中で生体分子中の二つのシステインアミノ酸から誘導されるジスルフィド結合を部分的に還元することによって行われ得る。ジスルフィドは、従来の方法を使用して、例えばジチオスレイトール、メルカプトエタノール、又はトリスカルボキシエチルホスフィンで還元され得る。

【0048】

発明による方法の即時生成物は一般式(I I)(式中、W'は電子求引基である。)で表される化合物である。そのような化合物はそれ自体に有用性がある:発明の方法は適切な条件下可逆的であるので、式(I I)(式中、W'は電子求引部分である。)で表される化合物は接合体からの分子の除去が求められる用途、例えば直接的な臨床的応用において有用性がある。しかしながら、電子求引部分W'は還元されて分子の除去を妨げる部分を生じさせ、そしてそのような化合物もまた多くの臨床的、産業的及び診断的適用において有用性がある。

【0049】

それ故、例えば、ケト基を含んでいる部分W'はCH(OH)基を含んでいる部分W'に還元され得る;エーテル基CH. ORはエーテル化剤によるヒドロキシ基の還元によって得られ得る;エステル基CH.O.C(O)Rはアシル化剤によるヒドロキシ基の反応によって得られ得る;アミン基CH.NH<sub>2</sub>、CH.NHR又はCH.NR<sub>2</sub>は還元的アミノ化によってケトン又はアルデヒドから調製され得る;またはアミドCH.NHC(O)R又はCH.N(C(O)R)<sub>2</sub>はアミンのアシル化によって形成され得る。還元剤としての、ホウ化水素、例えばホウ化水素ナトリウム、シアノホウ化水素ナトリウム、ホウ化

10

20

30

40

50

水素カリウム又はトリアセトキシホウ化水素ナトリウムの使用は特に好ましい。使用され得る他の還元剤としては、例えば塩化スズ(II)、アルミニウムアルコキシドのようなアルコキシド、及び水素化リチウムアルミニウムが挙げられる。

【0050】

一般式(I)で表される化合物は

一般式



(式中、Q、W、n及びLは上述した意味を有する。)で表される化合物を、一般式



10

(式中、Xはポリマーを表す。)で表される化合物

と反応させることによって調製され得る; A及びBは(III)及び(IV)で表される化合物が共に反応して、式(I)で表される所望の化合物を生じるように選ばれた基である。

【0051】

一般式IIで表される化合物は多くの用途がある。それらは例えば患者への直接的な臨床的応用に使用され得、また結果的に、本発明は薬学的に許容されるキャリヤーと共に一般式IIで表される新規な化合物を含む医薬組成物をさらに提供する。発明は治療用に一般式IIで表される新規な化合物、及び患者に対して本発明による一般式IIで表される新規な化合物の薬学的有効量又は発明による医薬組成物を投与することを含む患者を治療する方法をさらに提供する。任意の所望の薬学的效果、例えば外傷治療、酵素補充、タンパク製剤の補給、創傷管理、毒素除去、抗炎症薬、抗感染薬、免疫調節、ワクチン接種又は制癌は、生体分子の適切な選択によって得られ得る。一般式IIで表される化合物は造影剤、例えば放射性ヌクレオチドを含んでいてもよく、生体内で化合物を追跡することが可能である。

20

【0052】

一般式IIで表される化合物もまた非臨床的応用に使用され得る。例えば、酵素のような多くの生理的に活性な化合物は有機溶媒中で反応を触媒することが可能であり、そして一般式IIで表される化合物はそのような用途に使用され得る。さらに、一般式IIで表される化合物は診断ツールとしても使用され得る。

30

【実施例】

【0053】

以下の実施例は発明を説明する。

【0054】

実施例1: PEG試薬合成: 10kDa PEG試薬9の合成

第一工程: p-カルボキシ-3-ペリジノプロピオフェノンヒドロクロリド2の合成

本工程に対する反応スキームを図1に示す。

40

250mLの丸底フラスコにp-アセチル安息香酸(15.0g, 1)、ペリジンヒドロクロリド11.11g及びパラホルムアルデヒド8.23gを入れた。無水エタノール(90mL)及び濃塩酸(1mL)をその後加え、そして得られた懸濁液をアルゴン雰囲気下攪拌しながら10時間加熱還流した。還流終了後、アセトン(150mL)を加え、そして反応混合物を室温まで冷却した。得られた白色の沈殿物をガラスフィルター(G3)で単離し、そして冷やしたアセトンで2回洗浄した。固体をその後真空下で乾燥し、白色の結晶粉末(2, 9.72g)を得た。

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 1.79, 2.96, 3.45(br m, ペリジン部分のCH<sub>2</sub>), 3.36(t, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3.74(t, 2H, NCH<sub>2</sub>), 8.09(m, 4H, ArH)。

50

## 【0055】

第二工程：4 - (3 - (p - トリルチオ) プロパノイル) 安息香酸5の合成

本工程に対する反応スキームを図2に示す。

p - カルボキシ - 3 - ピペリジノプロピオフェノンヒドロクロリド2 (1.0 g) 及び4 - メチルベンゼンチオール (417 mg, 3) を無水エタノール (7.5 mL) 及びメタノール (5 mL) の混合液で懸濁した。ピペリジン (50  $\mu$ L) をその後加え、そして懸濁液をアルゴン雰囲気中で6時間攪拌しながら加熱還流した。室温まで冷却後得られた白色の沈殿物をガラスフィルター (G3) でろ過し、冷やしたアセトンで注意深く洗浄し、そして真空中で乾燥させて5 (614 mg)を得た。 10

$^1$ H NMR (400 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) 2.27 (s, 3H, フェニル - CH<sub>3</sub>) , 3.24, 3.39 (t, 2  $\times$  2H, CH<sub>2</sub>) , 7.14, 7.26 (d, 2  $\times$  2H, トリル部分のArH) , 8.03 (m, 4H, カルボン酸部分のArH)。

## 【0056】

第三工程：4 - (3 - トシリルプロパノイル) 安息香酸6の合成

本工程に対する反応スキームを図3に示す。

4 - (3 - (p - トリルチオ) プロパノイル) 安息香酸5 (160 mg) を水 (10 mL) 及びメタノール (10 mL) の混合液で懸濁した。氷浴で冷却後、オキソ (720 mg、アルドリッヂ (Aldrich)) を加え、そして反応混合物を一晩 (15時間)攪拌しながら室温まで温めた。得られた懸濁液を追加の水 (40 mL) で希釈して懸濁液をほぼ均一にし、混合物をその後クロロホルム (合計100 mL) で3回抽出した。溜まったクロロホルム抽出物を塩水で洗浄しその後 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。30、真空下での揮発性物質の蒸発により白色の固体物6 (149 mg)を得た。 20

$^1$ H NMR (400 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) 2.41 (s, 3H, フェニル - CH<sub>3</sub>) , 3.42 (t, 2H, CO - CH<sub>2</sub>) , 3.64 (t, 2H, SO<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub>) , 7.46, 7.82 (d, 2  $\times$  2H, トリル部分のArH) , 8.03 (m, 4H, カルボン酸部分のArH)。 30

## 【0057】

第四工程：PEG化4 - (3 - トシリルプロパノイル) 安息香酸、PEG試薬9の合成

本工程に対する反応スキームを図4に示す。

4 - (3 - トシリルプロパノイル) 安息香酸6 (133 mg) 及び - (2 - アミノエチル) - O' - メチル PEG8 (MW 10 kDa, 502 mg, バイオベクトラ (BioVector)) を乾燥トルエン (5 mL) に溶解した。溶媒を加熱しないで真空下で除去し、乾燥固体残渣をその後アルゴン雰囲気下、乾燥ジクロロメタン (15 mL) に再溶解した。氷浴で冷却した、得られた溶液に、アルゴン雰囲気下、ゆっくりとジイソプロピルカルボジイミド (DIPC, 60 mg) を加えた。反応混合物をその後室温で一晩 (15時間)攪拌し続けた。揮発性物質をその後真空下 (30、水浴) で除去し、アセトン (20 mL) 中微温 (35) で再溶解した固体残渣を得た。溶液を非吸収性コットンホールでろ過し、不溶性物質を除去した。溶液をその後乾燥氷浴で冷却し、遠心分離 (4600 rpm、30分間) によって分離された白色の沈殿物を得た。液相をデカントし、この沈殿操作を3回繰り返した。その後得られた灰色がかった白色の固体物を真空下で乾燥し、PEG試薬9 (437 mg)を得た。 40

$^1$ H NMR (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>) 2.46 (s, 3H, フェニル - CH<sub>3</sub>) , 3.38 (s, 3H, PEG - OCH<sub>3</sub>) , 3.44 - 3.82 (br m, PEG) , 7.38, 7.83 (d, 2  $\times$  2H, トリル部分のArH) , 7.95 (m, 4H, 力 50

ルボン酸部分の ArH)。

【0058】

異なったPEG分子量の類似したPEG試薬を同様の一般的な操作によって調製した。したがって、20kDaPEGを乾燥ジクロロメタン(15mL)中スルホン6(20.8mg)、O-(2-アミノエチル)-O'-メチル-PEG(20kDa, 250mg, フルカ(Fukka))及びDIPC(8.7mg, 7)の反応によって調製し、アセトン沈殿精製操作後、灰色がかった白色の固体物(245mg)を得た。

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2.46(s, 3H, フェニル-CH<sub>3</sub>), 3.38(s, 3H, PEG-OCH<sub>3</sub>), 3.44-3.82(br m, PEG), 7.38, 7.83(d, 2×2H, トリル部分のArH), 7.95(m, 4H, カルボン酸部分のArH)。 10

【0059】

実施例2：分子量5、10及び20kDaのPEG試薬<sup>9</sup>を用いた单一のヒンジジスルフィド(2つのチオール)を有するFab抗体フラグメントのPEG化

Fab溶液(アブカム(ABcam)cat.no.AB6520, 1mg/mL)100μLにDTT原液(脱イオン水中100mM)5μLを加え、そして得られた溶液を30分間、室温で放置した。溶液をpH7.8, 50mMリン酸緩衝液95μL、0.15M NaCl及び10mM EDTAで200μLに希釈し、そしてその後111usutra NAP-5 column(GEヘルスケア(GE Health care)cat.No.17-0854-01)に投入し、pH7.8, 50mMリン酸緩衝液、0.15M NaCl及び10mM EDTAで前平衡(pre-equilibrate)した。NAP-5 columnは未乾燥のpH7.8リン酸緩衝液の5×300μLで溶離される。還元Fabは主に画分3で特定され、タンパク質濃度は0.23mg/mLであると推定されるとすぐ、280nmでのUV吸光度を全ての画分用に測定した。 20

【0060】

分子量5kDa、10kDa及び20kDaを有する3つのPEG試薬をpH7.8リン酸緩衝液に溶解して、それぞれ溶液濃度0.5mg/mL、1mg/mL及び2mg/mLを得た。 30

【0061】

各PEG化反応に対して、還元Fab溶液(0.23mg/mL)5.0μL及びPEG溶液0.42μL(還元ヒンジジスルフィドチオールに対して1モル当量)を使用した。Fab反応溶液もまたpH7.8リン酸緩衝液4.6μLで希釈され、最終容積10μLを得た。反応溶液を12時間、4でインキュベートした。 30

【0062】

ニューページ[登録商標]ノーベックス4-12%ビス-トリスゲル(NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gels)(インビトロジエン(Invitrogen)cat.No.NP0321BOX)及びニューページMES SDSランニングバッファー(NuPAGE MES SDS running buffer)(インビトロジエン(Invitrogen)cat.No.NP002)を使用しながら、SDS-PAGE分析をその後反応溶液で行った。ゲルはインスタンブルー(イクスペドン(Expedon)cat.No ISB1L)で染色した。以下の図5に結果を示す。SDS-PAGE分析のPEGは、タンパク質マーカーに対してその本当の大きさのおよそ2倍になったので、5kDaは10kDaのようになった。Fabはおよそ50kDaのタンパク質であり、非還元或いは還元形態に対する約25kDaでのバンド又は2つのバンドのような場合、SDS-PAGEゲル上において約50kDaでのいずれかの単一バンドのようになった。これらは重くて明るい鎖であり、該鎖はSDSを用いた還元及びインキュベーション時にヒンジジスルフィドによってもはや結合していない。それ故、Fabはジ-PEG化されるが、それによって单一のPEGを溶液中還元ヒンジジスルフィドの2つのシステインのそれぞれに付着し、SDS-PAGE分析 40

は 25 kDa の重くて明るい鎖のモノPEG化を示す。標識 1 が付されたレーンはタンパク質マーカーである（ノヴェックス シャープ タンパク質スタンダード（Novex Sharp protein standards、インビトロジエン（In vitro gen）cat. No. LC5800）。レーン 2 は Fab を示す。標識 4 が付されたレーンは DTT（約 25 kDa）で還元された Fab を示す。レーン 5 は PEG 化 Fab に相当する 35 kDa において一次生成物であるバンドと 5 kDa PEG 化結果を示す。少量の還元 Fab は 25 kDa にとどまり、Fab がほとんど PEG 化されたことを示している。レーン 6 は 10 kDa PEG 化 Fab に相当する 40 kDa マーカーを超えた一次生成物であるバンドと 10 kDa PEG 化結果を示す。レーン 7 は 20 kDa PEG 化 Fab に相当する 60 kDa マーカーを超えた一次生成物であるバンドと 20 kDa PEG 化結果を示す。レーン 3 は事前の還元工程なしで試みられた PEG 化結果を示す：PEG 化の反応部位が還元ジスルフィド結合であるということを PEG 化生成物は示さないという事実。  
10

## 【0063】

実施例 3：5 kDa PEG 試薬<sub>9</sub>を用いたアスパラギナーゼの PEG 化

pH 7.8 において 150 mM NaCl 及び 5 mM EDTA を含んでいる 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中でアスパラギナーゼの 1 mg / mL 溶液（シグマ（Sigma）cat. no. A3809）1 mL を、DTT（15.4 mg）に加えそして数秒間ボルテックス（vortex）した後、得られた溶液を 40 分間、室温で放置した。ロード画分（load fraction）として溶離液を集めながら、溶液 1 mL をその後 pH 7.8 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液で前平衡（pre-equilibrate）された PD-10 カラム（GE ヘルスケア（GE Healthcare）cat. No. 17-0851-01）に加え、該緩衝液は 150 mM NaCl 及び 5 mM EDTA を含んでいる。カラムはその後未乾燥のリン酸緩衝液の 5 × 1 mL で溶離された。画分 3 及び 4 を混ぜ合わせて、2 mL とした。  
20

5 kDa PEG 試薬<sub>9</sub>の溶液 10 mg / mL を脱イオン水で調製し、2.0 μL（遊離チオールに対して 1.5 当量の PEG）を還元アスパラギナーゼ 100 μL に加えた。その溶液を数秒間ボルテックス（vortex）し、その次に一晩 4 で置き、その後サンプルを SDS-PAGE 分析した。その結果を図 6 に示す。レーン 1 は MW を推定するために使用したタンパク質マーカーであり、レーン 2 は PEG 化前のアスパラギナーゼでありそしてレーン 3 は 5 kDa PEG 試薬による還元アスパラギナーゼの反応溶液を示す。両方のシステインの PEG 化に相当する強いバンドが 60 kDa タンパク質マーカーの真上に一次生成物として見られた。第二のより低い MW バンドは 50 kDa タンパク質マーカーの真上に存在し、該マーカーは 2 つのシステインの 1 つのみの PEG 化に相当する。30 と 40 kDa の間には還元アスパラギナーゼに相当するごくかすかなバンドのみがあり、ほとんど全てのタンパク質は PEG 試薬<sub>9</sub>で PEG 化していることを示す。  
30

## 【0064】

実施例 4：5、10 及び 20 kDa の分子量を有する PEG 試薬<sub>9</sub>を用いた遊離した単一のシステインを持つ G-CSF（granulocyte-colony stimulating factor、顆粒球コロニー刺激因子）の PEG 化並びにマレイミド官能基を持つ 5 kDa PEG との比較  
40

G-CSF 原液（50 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 0.66 mg / mL、pH 6.2、150 mM NaCl 及び 10 mM EDTA を含む）を各々 100 μL の 5 つの画分（PEG 化反応に対して天然 G-CSF 及び 4 つの画分）に分けた。その画分を G-CSF に対して 1 モル当量の PEG 試薬と共に 4 で一晩インキュベートした。5 kDa PEG 試薬<sub>9</sub> 及び 5 kDa PEG マレイミド（フルカ（Fluka）cat. no. 63187）に対して、脱イオン水中で 5 mg / mL PEG 試薬 3.5 μL を加えた。10 kDa PEG 試薬<sub>9</sub> に対して、脱イオン水中で 5 mg / mL PEG 溶液 7 μL を加えた  
50

。20 kDa PEG試薬<sub>9</sub>に対して脱イオン水中で5 mg / mL 溶液14.0  $\mu$ Lを加えた。PEG化反応をSDS-PAGE(ニューページ[登録商標]ノーベックス4-12%ビス-トリスゲル、MESバッファー(全てインビトロジェン)(NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gels, MES buffer, all from Invitrogen)、及びインスタントブルーステイン(イクスペデオン(Expedeon)cat. No. ISB1L))によって分析した。添加されたPEG試薬を用いていないG-CSFは15と20 kDaタンパク質マーカーの間にバンドとして現れた。<sub>9</sub>による5 kDa PEG化に対し、5 kDaモノPEG化G-CSFに相当する約30 kDaにおいてバンドは可視的である。<sub>9</sub>による10 kDa PEG化に対し、40 kDaより下のバンドは10 kDaモノPEG化G-CSFに相当して可視的である。20 kDa PEG結果に対し、20 kDaモノPEG化G-CSFに相当する50と60 kDaの間のバンドは可視的である。5 kDa PEGマレイミド反応に対し、未反応のG-CSF以外にバンドは見られなく、反応は本試薬とでは起きたことを示す。

## 【0065】

実施例5：10 kDa及び20 kDa PEG試薬<sub>9</sub>を用いたC末端上の8個のヒスチジン配列を有するインターフェロン(IFN)-2bにおけるヒスチジン上のPEG化

IFN-2b(2 mM EDTA及び150 mM NaClを含んでいる10 mM リン酸ナトリウム緩衝液中1.13 mg / mL、pH 7.5)の20  $\mu$ L溶液に1モル当量の10 kDa PEG試薬<sub>9</sub>(脱イオン水中6 mg / mL溶液の1.8  $\mu$ L)を加え、得られた溶液を室温で一晩インキュベートした。1モル当量の20 kDa PEG試薬<sub>9</sub>(脱イオン水中6.6 mg / mL溶液の3.3  $\mu$ L)でも繰り返し行った。両サンプルをその後SDS-PAGE(ニューページ[登録商標]ノーベックス4-12%ビス-トリスゲル、MESランニングバッファー(全てインビトロジェン)(NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gels, MES running buffer, all from Invitrogen)、及びインスタントブルーステイン(イクスペデオン(Expedeon)cat. No. ISB1L))によって分析した。その結果を図7に示す。標識1が付されたレーンはタンパク質マーカーである。レーン2は出発IFNのみである。レーン3は10 kDa PEG試薬<sub>9</sub>反応の結果を示す。接合された1乃至5個のPEG鎖を有するIFNに相当する30と160 kDaタンパク質マーカーの間に5つのはっきりと区別できるバンドがある。レーン4は20 kDa PEG試薬<sub>9</sub>反応の結果を示す。接合された1乃至3つのPEG鎖を有するIFNに相当する60から110 kDaタンパク質マーカーの間に3つのはっきりと区別できるバンドがある。標識5が付されたレーンは染色していない20 kDa PEG試薬であり、そのためどのバンドも可視的ではない。標識6が付されたレーンは染色していない10 kDa PEG試薬であり、そのためどのバンドも可視的ではない。

## 【0066】

実施例6：5 kDa PEG試薬<sub>9</sub>用いたペプチド(構造中単一の遊離システインを持つ、レプチンフラグメント)のPEG化

レプチンフラグメント116-130アミドマウス(シグマ(Sigma)cat. no. L6788)1 mgをpH 7.8で150 mM NaCl及び10 mM EDTAを含んでいる50 mM リン酸ナトリウム緩衝液1 mLに溶解した。5 kDa PEG試薬<sub>9</sub>の5 mg / mL溶液をpH 7.8で同じ緩衝液で調製した。レプチンフラグメント溶液50  $\mu$ Lを50  $\mu$ L緩衝液及びPEG溶液(システイン上の遊離チオールに対して3モル当量のPEG)96.1  $\mu$ Lに加えた。溶液を数秒間ボルテックス(vortex)し、その次に一晩4で置いた、その後サンプルをRP-HPLC分析した。RP-HPLCはJASCO HPLCシステムに取り付けられた分析カラム Source 5RPC 4.6 / 150(アマシャムバイオサイエンス(Amersham bioscience)50

n c e ) c a t . n o . 1 7 5 1 1 6 0 1 ) から構成した。緩衝液Aは水 + 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸(フィッシャーサイエンティフィック HPLCグレード( Fisher scientific HPLC grade ) )であり、また緩衝液Bはアセトニトリル(フィッシャーサイエンティフィック HPLCグレード( Fisher scientific HPLC grade ) )であった。この方法は 1 m L / m i n の流速で 30 分以上かけて緩衝液Aの 1 0 0 % 緩衝液を 0 % にしたものである。HPLCプロファイ尔を 2 1 4 n m 及び 2 8 0 n m の下で観察した。レプチンフラグメント、PEG試薬及び反応溶液に対する結果を図8に示す。

レプチンフラグメントは 1 1 . 4 分の保持時間である。反応混合液ではこのピークは消失して 1 6 . 5 分におけるピークに置き換わり、これはフラグメントがうまく誘導体化されたことを示している。 10

#### 【 0 0 6 7 】

実施例7：分子量 2 0 k D a の P E G 試薬<sub>9</sub>を用いたポリヒスチジンタグドメイン抗体フラグメントの P E G 化及び生物活性

抗 TNF アルファドメイン抗体フラグメント溶液(図12において T A R 1 - 5 - 1 9 に記載された配列のように特許国際公開 2 0 0 5 / 0 3 5 5 7 2 号パンフレットから抜粋され、そしてタンパク質のC末端上の6個のヒスチジンタグで表わされるタンパク質配列、50 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム及び350 mM イミダゾール中 1 . 5 m g / m L 、p H 7 . 5 ) 2 . 7 m L を脱イオン水(40 m g / m L 、タンパク質に対して 1 . 9 モル当量)中で P E G 試薬の溶液 0 . 3 m L に加えた。この溶液を D - T u b e dialyzer(ノバジェン( Novagen ) , c a t . N o . 7 1 5 0 8 - 3 ) に移し、16時間以上 4 で 1 L p H 6 . 2 緩衝液(50 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、20 mM EDTA)に対して透析した。直線的濃度勾配法( linear gradient )(30分以上かけて、20 mM 酢酸ナトリウム、p H 4 . 5 を、700 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM 酢酸ナトリウム、p H 4 . 5 へとする)を用いながらこの反応溶液を Resource S カラム( GE ヘルスケア( GE Healthcare ) , c a t . N o . 1 7 - 1 1 7 8 - 0 1 ) で精製した。 20

#### 【 0 0 6 8 】

画分を集め、SDS-PAGEを使用しながら分析し、そしてその結果を図9に示した。ニューページ[登録商標]ノーベックス 4 - 1 2 % ビス-トリスゲル( NuPAGE Novex 4 - 1 2 % Bis - Tris gels )(インビトロジエン( Invitrogen ) c a t . N o . N P 0 3 2 1 B O X )及びニューページ M E S SDSランニングバッファー( NuPAGE MES SDS running buffer )(インビトロジエン( Invitrogen ) c a t . N o . N P 0 0 2 )を使用し、ゲルをインスタントブルー(イクスペドン( Expedon ) c a t . N o . I S B 1 L )で染色した。SDS-PAGE分析のPEGは、タンパク質マーカーに対してその本当の大きさのほぼ2倍になったので、20 k D a P E G は 4 0 k D a タンパク質のようになった。ドメイン抗体フラグメントはおよそ 1 2 . 7 k D a のタンパク質である。標識1が付されたレーンはタンパク質マーカーである(ノヴェックス シャープタンパク質スタンダード( Novex Sharp protein standard s )、インビトロジエン( Invitrogen ) c a t . N o . L C 5 8 0 0 )。レーン2はタンパク質のみを示す。標識3が付されたレーンは反応溶液である。53 k D a におけるバンドはモノPEG化タンパク質に相当する。ジPEG-タンパク質が約 8 0 k D a のバンド付近に現れ、レーンの上部に少量のマルチPEG化されたタンパク質が存在する。レーン4は未PEG化タンパク質からの混入がない単一のバンドとして精製されたモノPEG化ドメイン抗体フラグメントを示す。 40

#### 【 0 0 6 9 】

実施例8：20 k D a P E G 試薬<sub>9</sub>を用いた抗-TNF アルファ アフィボディ( anti-TNF alpha Affibody )(1つの遊離チオールシステイン)の 50

## P E G 化及び E L I S A 結合 ( E L I S A b i n d i n g )

p H 7 . 8 において 1 5 0 m M N a C l 及び 2 0 m M E D T A を含んでいる 5 0 m M リン酸緩衝液中で抗 - T N F アルファ アフィボディ (アフィボディ A B ( A f f i b o d y A B ) c a t . n o 1 0 . 0 8 4 1 . 0 1 ) の 1 m g / m L 溶液 1 m L を、 D T T ( 3 . 0 m g ) に加えて任意のジスルフィド結合を還元し、数秒間ボルテックス ( v o r t e x ) した後、得られた溶液を 3 0 分間室温で放置した。この溶液 1 m L をその後 p H 6 . 2 リン酸緩衝液 ( 5 0 m M リン酸ナトリウム、 1 5 0 m M N a C l 及び 2 0 m M E D T A ) で前平衡 ( p r e - e q u i l i b r a t e ) された P D - 1 0 カラム ( G E ヘルスケア ( G E H e a l t h c a r e ) c a t . n o . 1 7 - 0 8 5 1 - 0 1 ) に投入した。カラムはその後未乾燥の p H 6 . 2 リン酸緩衝液の 5 × 1 m L で溶離される。 A 2 8 0 n m 測定は画分 3 及び 4 が還元タンパク質を含むこと、また混ぜ合わせて 2 m L となることを示した。このタンパク質溶液に飽和水溶性ヒドロキノン溶液 1 0 μ L を加え、そしてよくかき混ぜた。 2 0 K D a P E G 試薬 9 の 2 0 m g / m L 溶液を脱イオン水で調製し、 7 3 μ L ( 遊離システインチオールに対して 1 モル当量の P E G ) を D T T 処理されたアフィボディに加えた。この溶液を数秒間ボルテックス ( v o r t e x ) し、そしてその次に 3 時間室温で置き、その後サンプルを S D S - P A G E 分析した。

## 【 0 0 7 0 】

3 時間後、かなりの量の P E G 化タンパク質が既に形成されたので、反応を終了させずに P E G 化反応を精製した。精製は直線的塩濃度勾配法 ( 0 - 7 0 0 m M N a C l ) ( l i n e a r s a l t g r a d i e n t ) ( 3 0 分以上かけて、 p H 4 . 5 、 2 0 m M 酢酸ナトリウム移動相で ) と共に R e s o u r c e S 陽イオン交換クロマトグラフィーカラム ( G E ヘルスケア ( G E H e a l t h c a r e ) , c a t . N o . 1 7 - 1 1 7 8 - 0 1 ) を使用して行った。この結果を図 1 0 に示す。図 1 0 において標識 1 が付されたレーンは M W を推定するために使用したタンパク質マーカーである。標識 2 が付されたレーンは D T T による処理前のアフィボディ溶液を示す。 D T T 存在下におけるアフィボディは標識 3 が付されたレーンに示される。レーン 4 は P D - 1 0 カラムによって D T T を除去した後のアフィボディを示し、 2 つのバンドは単量体アフィボディ ( P E G 化に使用可能な遊離チオールシステイン) 及び二量体アフィボディ ( P E G 化に使用不可能なシステイン) に相当して可視的である。レーン 5 は P E G 化反応溶液を示す。 5 0 k D a タンパク質マーカーの真上のバンドにモノ P E G 化アフィボディを見ることができる。陽イオン交換クロマトグラフィー精製されたモノ P E G 化アフィボディは未 P E G 化タンパク質からの混入がない単一のバンドとしてレーン 6 に示される。

## 【 0 0 7 1 】

T N F - への精製されたモノ P E G 化生成物の結合活性を E L S A 法によって分析した；

T N F - ( 1 5 m M N a <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> 、 3 4 . 9 m M N a H C O <sub>3</sub> 、 p H 9 . 6 中 1 0 μ g / m L ) を 1 0 0 μ L / w e l l で 9 6 穴マイクロプレート ( 9 6 - w e l l m i c r o t i t r e p l a t e ) ( M a x i s o r p , N u n c ) に加え、一晩 4 でインキュベートした。 T N F - をその後取り除き、 P B S / 1 % B S A を 1 0 0 μ L / w e l l で加え、そして室温で 1 時間インキュベートした。 P B S / 1 % B S A をその後取り除き、 P E G 化抗 T N F - アフィボディ ( P B S / 1 % B S A 中 0 . 0 2 6 、 0 . 1 3 、 0 . 6 5 、 3 . 2 5 μ g / m L ) を加え、そして室温で 1 時間インキュベートした。 P E G 化アフィボディを対照穴に加えなかった。このプレートをその後 P B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 ( P B S / T ) 3 0 0 μ L / w e l l で 3 回洗浄した。抗 P E G ウサギ抗体 ( エピトミクス ( E p i t o m i c s ) , c a t . n o . 2 0 6 1 - 1 ; 1 % B S A / P B S 中 1 : 1 0 0 0 ) をその後 1 0 0 μ L / w e l l で加え、そして室温で 1 時間インキュベートした。 P B S / T で 3 回洗浄した後に、西洋ワサビペルオキシダーゼ - 接合抗ウサギ抗体 ( アブカム ( A b c a m ) , c a t . n o . a b 6 7 2 1 ; P B

S / 1 % B S A 中 1 : 1 0 0 0 ) を 1 0 0  $\mu$  L / w e l l で加え、そして室温で 1 時間インキュベートした。穴をその後 P B S / T で 3 回洗浄し、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジン基質 (シグマ - アルドリッヂ (Sigma - Aldrich), c a t . n o . T 0 4 4 0 ) を 1 0 0  $\mu$  L / w e l l で加えた。暗闇において 15 分間のインキュベート後、停止試薬 (シグマ - アルドリッヂ (Sigma - Aldrich), c a t . n o . S 5 6 8 9 ) を 1 0 0  $\mu$  L / w e l l で加え、650 nm での吸光度を読み取った。

#### 【 0 0 7 2 】

図 1 1 に示された E L I S A 結果は P E G 化アフィボディによる T N F - への特異結合を示し、タンパク質がポスト - P E G 化後の活性をも保持することを裏付ける。T N F - がない場合は、抗 P E G 抗体の結合は存在しない。

#### 【 0 0 7 3 】

実施例 9 : 2 0 k D a P E G 試薬 9 を使用した N - 末端上に 8 個のヒスチジン配列を有するインターフェロン アルファ - 2 b ( I F N - 2 b ) のヒスチジン配列上の P E G 化。水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元をした場合としなかった場合における 2 0 k D a P E G 化 I F N の抗ウイルス活性。

N - 末端上に 8 個のヒスチジン配列を持つ I F N - 2 b の溶液 ( 1 5 0 mM N a C l を含んでいる 5 0 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 1 . 0 7 mg / mL, p H 7 . 4 ) 4 . 6 7 mL を 2 . 6 モル当量の 2 0 k D a P E G 試薬 9 ( 脱イオン水中 6 0 mg / mL 溶液 2 1 7  $\mu$  L ) に加え、得られた溶液を室温で一晩インキュベートした。 S D S - P A G E ( ニューページ [ 登録商標 ] ノーベックス 4 - 1 2 % ビス - トリスゲル、 M E S ランニングバッファー ( 全てインビトロジェン ) ( Nu P A G E N o v e x 4 - 1 2 % B i s - T r i s g e l s , M E S r u n n i n g b u f f e r , a l l f r o m I n v i t r o g e n ) 、及びインスタントブルー ( イクスペドン ( E x p e d o n ) c a t . N o I S B 1 L ) 染色による分析後、反応サンプルを高性能陰イオン交換クロマトグラフィー ( J a s c o H P L C システムに接続された、東ソー D E A E カラム、 S T S K g e l D E S E - 5 P W 、スペルコ ( S u p e l c o ) c a t n o . 8 - 0 7 1 6 4 ) にかけて、モノ P E G 化 I F N - 2 b を精製した。イオン交換カラムから得られた画分 ( 各 1 mL ) を S D S - P A G E によって分析した。主にモノ P E G 化 I F N を含んでいる画分を凍結乾燥した。凍結乾燥後に得られた残渣を 1 5 0 mM N a C l 及び 2 mM ホウ化水素ナトリウムを含んでいる 5 0 mM リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、室温で 1 時間放置した。得られた溶液をその後サイズ排除クロマトグラフィー ( H i L o a d 1 6 / 6 0 、 S u p e r d e x 2 0 0 、溶離液として 5 0 mM P B S 、 1 . 6 mL / m i n 流速及び 2 1 5 nm での検出 ) にかけて、モノ P E G 化 I F N を単離した。単離されたサンプルを S D S - P A G E によって分析し、その結果を図 1 2 に示す。図 1 2 の標識 1 が付されたレーンはタンパク質マーカーである。標識 2 が付されたレーンは出発 I F N のみを示す。レーン 3 は精製された 2 0 k D a モノ P E G 化 I F N - 2 b に相当する 5 0 と 6 0 k D a タンパク質マーカー間の単一のバンドを示す。

#### 【 0 0 7 4 】

抗ウイルス活性 : 抗ウイルス試験をペニシリン及びストレプトマイシンを含んでいる D M E M / 1 0 % ウシ胎仔血清 ( F C S ) で培養された A 5 4 9 細胞で実施した。 A 5 4 9 細胞を 0 . 2  $\times$  1 0 6 c e l l s / mL の濃度において D M E M / 1 0 % F C S 中で再懸濁し、 5 0  $\mu$  L / w e l l で 9 6 穴マイクロプレートの中にアリコートした。次の日に、 P E G 化及び天然 I F N サンプルを倍数希釈で調製し、各希釈液 5 0  $\mu$  L を穴に加えた。プレートをその後 2 4 時間インキュベートした。媒体をその後取り除き、細胞に D M E M / 5 % F C S ( 5 0  $\mu$  L / w e l l ) 中で調製された脳心筋炎ウイルス ( E M C V ) を接種した。細胞をさらに 2 4 時間インキュベートし、その後 P B S 3 0 0  $\mu$  L / w e l l で洗浄し、そして 3 0 分間 4 % ホルムアルデヒド / 0 . 1 % メチルバイオレット

10

20

30

40

40

50

(50  $\mu$ L/well; シグマ - アルドリッヂ (Sigma-Aldrich), cat no. 198099) で染色した。プレートをその後 PBS 300  $\mu$ L/well で 2 回洗浄し、空気乾燥させた。染料を 2% SDS 溶液 (50  $\mu$ L/well) で可溶化し、吸光度を 570 nm で測定した。(A) ホウ化水素ナトリウムで処理されていない、又は (B) 処理された 20 kDa PEG 化 IFN-2b はそれぞれ、64 pg/mL 及び 68 pg/mL の活性を示した。

## 【0075】

実施例 10：マレイミド官能基を有する市販の PEG 試薬と比較した PEG 試薬 9 の安定性

10

PEG 試薬 9 (5 kDa 及び 20 kDa 試料) の安定性を pH 7.4 における核磁気共鳴 (NMR) 分光学によってメトキシポリ (エチレングリコール) マレイミドプロピオンアミド (カイロテックテクノロジーリミテッド (Chirotech Technology Ltd), cat. no. 008-008, lot no. 223126001) 及び -メトキシ-エチル-マレイミドポリエチレングリコール (アイリスバイオテック (Iris Biotech) cat. no. PEG1146, lot no. 128512) と比較した。pH 7.4 において 150 mM NaCl 及び 20 mM EDTA を含んでいる 50 mM リン酸ナトリウム水溶液を最初に凍結乾燥し、そして酸化ジュウテリウムで同体積にもどすことで pH 7.4 D<sub>2</sub>O 溶液を製造した。基準としてアセトンを 3 mL につき 1.0  $\mu$ L で緩衝液に加えた。PEG 試薬のサンプルを緩衝液 0.75 mL 中 1  $\mu$ モルで溶解し、400 MHz NMR 分光学によって 4 時間後及び 25.5 時間後分析した。PEG マレイミドサンプルの安定性を 2.17 ppm におけるアセトン基準に対する積分を使用して標準化した後、6.86 ppm における積分を比較することによって決定した。PEG 試薬 9 の安定性は 2.21 ppm におけるアセトン基準に対する積分を使用して標準化した後、7.31、7.40、7.47、7.73、及び 8.03 ppm におけるシグナルに対する全積分を比較して決定した。7.31、7.47 及び 8.03 ppm におけるピークは PEG 試薬 9 から予想通りに形成されたタンパク質活性 PEG 試薬 10 (図 14) からのものである。実験中、9 の 10 に対する比率は両方のサンプル 1 及び 2 に対し 1.46 から 1.77 乃至 1 までの幅がある。安定性研究結果を表 1 に示す。PEG マレイミドサンプルは pH 7.4 において 21.5 時間以上で 19 から 55 % まで分解したが、一方 PEG 試薬 9 サンプルは同じ条件下では分解しなかった。

20

## 【0076】

## 【表 1】

表 1. PEG 試薬 9 と PEG マレイミドを比較した NMR 安定性研究に対する結果

| 試料                        | 6.86 ppm<br>ピークに対する<br>4 時間 積分                               | 6.86 ppm<br>ピークに対する<br>25 時間半 積分                                | pH 7.4 におけ<br>る 21.5 時間<br>以上での分解 |
|---------------------------|--|---|-----------------------------------|
| PEG マレイミド<br>サンプル 1       | 1.16   | 0.52  | 55                                |
| PEG マレイミド<br>サンプル 2       | 0.75   | 0.61  | 19                                |
|                           | 7.31、7.40、<br>7.47、7.73、<br>8.03 ppm ピーク<br>に対する 4 時間<br>全積分 | 7.31、7.40、<br>7.47、7.73、<br>8.03 ppm ピーク<br>に対する 25.5 時間<br>全積分 |                                   |
| PEG 試薬 <u>9</u><br>サンプル 1 | 4.85   | 4.82  | <1                                |
| PEG 試薬 <u>9</u><br>サンプル 2 | 3.93   | 4.01  | 0                                 |

40

50

## 【0077】

実施例11：様々なるpHでの単一の遊離システィンチオールを含んでいるラミニンフラグメント925-983 (Lam 1<sub>925-933</sub>) のPEG化

Lam 1<sub>925-933</sub>は合成直鎖非ペプチド (Cys - Asp - Pro - Gly - Tyr - Ile - Gly - Ser - Arg - NH<sub>2</sub>) (シグマ (Sigma) cat. no. C0668) であり、それはラミニンB1鎖の残基925-933に相当し、単一のシスティンチオールを含む。

様々なpHでのPEG試薬<sub>9</sub>を用いたPEG化：凍結乾燥されたLam 1<sub>925-933</sub>ペプチド (1mg) を脱イオン水500μLに溶解し、2mg/mL原液を得た。ボルテックス (vortex) した後、ペプチド原液を未乾燥で使用し又はアリコートし、そして使用するまで-80で保存した。Lam 1<sub>925-933</sub>原液を2倍に希釈し、PEG化反応混合液中で最終濃度1mg/mL (1mM)を得た。5kDa PEG試薬<sub>9</sub> (5mg) を脱イオン水200μLに溶解し、25mg/mL原液を得た。ボルテックス (vortex) した後、ペプチド原液を未乾燥で使用し又はアリコートし、そして使用するまで-80で保存した。PEG原液を5倍に希釈し、PEG化反応混合液中で最終濃度5mg/mL (1mM)を得た。緩衝原液はpH 6.0-8.0の範囲に対し1Mリン酸ナトリウム緩衝液及びpH 8.5-10.0の範囲に対し0.1mM炭酸 重炭酸ソーダを含む。全てのpH値に対し、緩衝原液もまた10mM EDTA及びヒドロキノン381μMを含む。緩衝原液を10倍に希釈し、最終濃度が100mMの緩衝剤 (リン酸ナトリウム又は炭酸 重炭酸ソーダ)、1mMのEDTA及び38μMのヒドロキノンを得た。

## 【0078】

各PEG化反応混合液は5μL Lam 1<sub>925-933</sub>原液、1μL緩衝液、PEG試薬溶液 (PEG試薬対Lam 1<sub>925-933</sub>型ペプチドのモル比率1:1に相当) 2μL及び脱イオン水2μLを含み、全反応容積を10μLとした。数秒間ボルテックス (vortex) した後、続けて簡潔な遠心分離 (5,000×gで30秒) を行い、チューブの底に溶液を集め、この反応混合液を室温のまま0.25、0.5、1、2、4、16及び24時間インキュベートした。室温でのインキュベート後、反応混合液を含んでいるチューブを-80に置き、逆相クロマトグラフィーによって分析するまで保存した。

## 【0079】

逆相クロマトグラフィー分析では、Source 5RPC ST 4.6/150 (GEヘルスケア (GE Healthcare), cat. no. 17-5116-01) カラムを使用した。PC及びレオダイン7725iマニュアルインジェクターバルブ (Rheodyne 7725i manual injector valve) に接続するため、カラムをJasco PU-980 インテリジェントポンプ (Intelligent Pump)、Jasco LG-980-02 ターナリ グラジエントユニット (Ternary Gradient Unit)、Jasco デガッシャ ポピュライレ デガッシング ユニット (Degassys Populaire Degas sing Unit)、Jasco UV-970 4- インテリジェント (Intelligent) UV ディテクター (Detector)、Jasco LC-Net II / ADC インターフェース (Interface) からなるJasco HPLCシステムに接続した。EZchrom SI バージョン3.2.1 ビルド3.2.1.34 クロマトグラフィーソフトウェアパッケージ (アジレント・テクノロジー (Agilent Technologies)) を使用しながら、コンピュータによってHPLCシステムを制御した。クロマトグラム分析及びデータのエクスポートもまたEZchrom SIクロマトグラフィーデータシステムを使用しながら行った。

## 【0080】

3つの溶離液方式を使用した。溶離液Aは脱イオン水中に5%アセトニトリル (Far UV、HPLCグレード、フィッシャー cat. no. A/0627/17) 及び0

10

20

30

40

50

.065%トリフルオロ酢酸(TFA)(アクロス(Acros)cat.no.139721000)を含む。溶離液Bはアセトニトリル中に0.075%TFAを含むが一方、溶離液Cは100%アセトニトリルである。溶離液を使用前に超音波処理によって脱気した。溶離プログラムは20分間の、0-64%B勾配を含み、続いて100%アセトニトリルで洗净し、溶離液Aで前平衡(pre-equilibrium)した(表2)。実行中、一定の流速1mL/minを保持した。215、250、280及び350nmにおける吸光度を実行中記録した。各サンプル(10μL)を解凍し、上澄み5μLを逆相クロマトグラフィーカラムに注入する前に速やかに簡潔に遠心分離機にかけた(14,000gで1分)。

【0081】

10

【表2】

表2：逆相クロマトグラフィー分析用に使用された勾配溶離プログラム設定

| 時間(分) | 流速(mL/min) | A(%) | B(%) | C(%) |
|-------|------------|------|------|------|
| 初期    | 1.00       | 100  | 0    | 0    |
| 20.00 | 1.00       | 36   | 64   | 0    |
| 20.20 | 1.00       | 0    | 0    | 100  |
| 24.00 | 1.00       | 0    | 0    | 100  |
| 24.20 | 1.00       | 100  | 0    | 0    |
| 30.00 | 1.00       | 100  | 0    | 0    |

【0082】

20

クロマトグラムにおける各ピークの同定を標準試料(PEG試薬、還元及び酸化された未反応のペプチド)を実行すること及び(PEG化生成物：ペプチド-PEG接合体について)相対的な寸法推定に対する分析用サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって確認した。分析用SECに用いられたカラムはBio-Sep-SEC-S3000(300×7.8mm)分析用カラム(フェノメネクス(Phenomenex),cat.no.00H-2146-KO)であった。用いられた実行中の溶離液は10%(v/v)アセトニトリルを含んでいる10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)であり、流速は実行中2mL/minで一定に保った。

【0083】

30

図13に1モル当量の5kDaPEG試薬9を用いた、pH6.5における経時的PEG化実験のクロマトグラムを示す。室温で15分のインキュベーション後、5つのピークが現れた：PEG反応性ペプチドLam<sub>1925-933</sub>(ピーク1)；ジスルフィド形成を経て形成された未反応のペプチド二量体(ピーク2)；PEG試薬9スルホン酸脱離基(ピーク3、図14中の化合物11)；PEG化ペプチド生成物(5kDaPEG-Lam<sub>1925-933</sub>接合体)に相当するピーク(ピーク4)及びPEG試薬9(ピーク6、未反応形態)。

【0084】

40

4時間のインキュベーション後、すべての遊離ペプチド(ピーク1)はPEG化が終了するにつれて消費された。一部の過剰ペプチドが未反応の二量体(ピーク2、PEG試薬は当量濃度においてペプチドより強く吸収することに留意する)を形成したので、やや過剰な活性PEG試薬ピーク(ピーク5、図14における化合物10)もまた存在する。酸化Lam<sub>1925-933</sub>(ピーク2)は遊離チオールを持たないので、PEG化されなかつた、それ故対応するピーク(ピーク2)は実験中、未変化のままであった。この結果は還元ペプチドを発生しながらシステインチオールPEG化と一致する。

【0085】

40

pH6.0とpH8.0間のLam<sub>1925-933</sub>に対するPEG試薬1の反応性をペプチド(ピーク1)から5kDaPEG化Lam<sub>1925-933</sub>生成物(ピーク4)への変換を測定することによって推定した。ペプチドピーク結果を100の値を各PEG化反応に使用されたペプチドの全量に相当する較正されたピークエリアに割り当てるによつ

50

て標準化した、一方生成物ピーク結果をペプチドの生成物への全変換に相当する推定される最大生成物ピークエリアを用いて標準化した。変換(%)を反応に用いられたペプチドの初期量と比較してPEG化ペプチドの割合として定義した。その結果を図15に示す。pH 6.0、6.5、7.0、7.5及び8.0において、全てのペプチドがPEG化された。終了速度はpHによって左右され、より高いpH程より速い速度であり、異なったpHにおいて反応性構造10(図14)の形成の異なった速度を示す。

#### 【0086】

実施例12：様々なpHでのPEG試薬9と商業的に入手可能なPEGマレイミドの反応性の比較

10

実施例11のLam 1<sub>925-933</sub>ペプチドに対するPEG試薬9の反応性を商業的に入手可能なチオール反応性PEG試薬、PEGマレイミド(O-(2-マレイミドエチル)-'メチル-ポリエチレングリコール5,000、フルカ(Frukacat.n.o.63187)と比較した。PEG試薬9が実験時間スケールにおいて反応に速やかに使用できるようにするため、試薬をpH 7.5でインキュベートすること(2時間、4)によってチオール反応性形態(試薬10、図14)を最初に形成し、そして試薬10をペプチド接合する前にRPクロマトグラフィーにより単離した。全てのペプチド反応は新規に溶解したPEG試薬を用いて行った。一時的に、PEG化反応溶液(反応スケール10 μL)は100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0-8.0)又は100mM炭酸重炭酸ソーダ(pH 8.5-10.0)及び1mM EDTA中で10 μg Lam

20

1<sub>925-933</sub>、PEG(5kDa)試薬50 μg(PEG試薬対Lam 1<sub>925-933</sub>型ペプチドのモル比率1:1に相当)を含んでいた。室温でのインキュベーション後、反応混合液を実施例11で述べたように逆相クロマトグラフィーによって分析した。その結果を図16に示す。PEG試薬9(pH 9.0乃至10)及び10(pH 6.0乃至8.0)に対し、ペプチドのPEG化形態への完全な変換は15分以内にpH 6.0とpH 10の間で達成された。

#### 【0087】

PEGマレイミド試薬に対し、変換は15分後単に最大で78.9%に達するもののみであった。より高いpHにおいて、変換はさらに低かった(pH 10で51.2)。pH 8.5におけるPEGマレイミド反応を16時間後再びサンプル採取し、全てのペプチドは消費された。

30

#### 【0088】

したがってテストされた全てのpH値において、PEG試薬9及び10はPEGマレイミド試薬より有効である。

#### 【0089】

実施例13：PEG試薬9ペプチド接合体の安定性及びPEGマレイミド誘導ペプチド接合体の比較

PEG試薬9から製造された精製Lam 1<sub>925-933</sub>ペプチド接合体及び実施例12からのPEGマレイミドの安定性を12日間以上比較した。接合体の安定性は実施例11で述べたように逆相クロマトグラフィーを用いてPEG-ペプチドピークの領域を測定することによって決定した。

40

PEG試薬9を用いたPEG化Lam 1<sub>925-933</sub>の合成：接合体は実施例11の修正法を用いて調製した(最終ペプチド濃度1.6mg/mL及びペプチド0.4mgを用いてpH 6.0)。生成物をRP-クロマトグラフィーで単離した。Lam 1<sub>925-933</sub>-PEG接合体に相当する溶離ピークを集め、凍結乾燥しそしてその後脱イオン水中で再懸濁した。最終的に、2mM水素化ホウ素ナトリウム(アクロスオルガニクス(Acros Organics), cat.no. 200050250)を加え、サンプルを室温で30分間インキュベートした後、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)を加

50

えた。

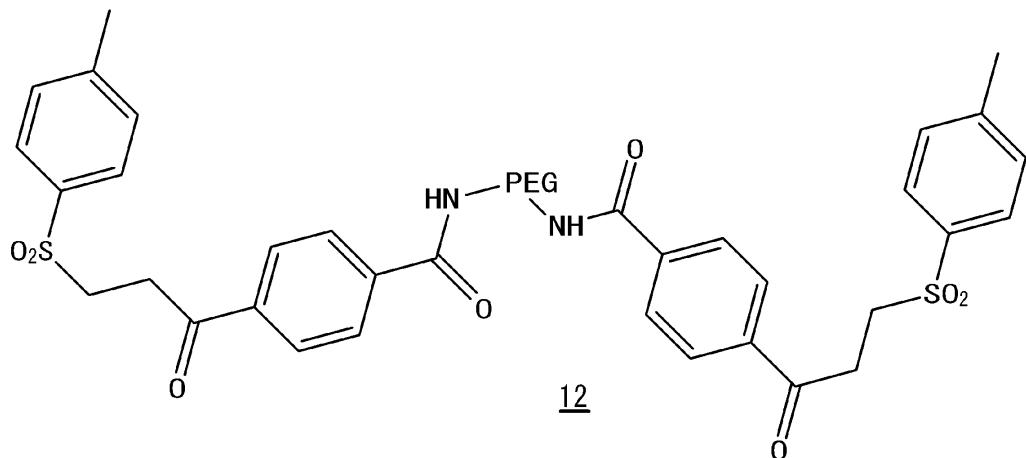
PEGマレイミドを用いたPEG化Lam 1<sub>925-933</sub>の合成：Lam 1<sub>925-933</sub>(0.4mg)を5kDaPEGマレイミド(5kDa、フルカ(Fluka)cat.no.63187)試薬と共にPEG化用に使用した。一時的に、10×緩衝原液(1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)及び10mM EDTAを含んでいる)20μL及びPEG試薬原液(脱イオン水中25mg/mL)40μLをペプチド原液(脱イオン水中2mg/mL)200μLに加えた。室温での1.5時間のインキュベーション後、生成物を実施例11で述べたようにRP-クロマトグラフィーを用いて精製した。溶離ピークサンプルを乾燥凍結し、そしてその次に脱イオン水で再懸濁しその後50mMのリン酸ナトリウム緩衝液をpHを8.0に調節するために加えた。両方のPEG-ペプチド溶液の濃度があおよそ等しいことを確認するためにRP-クロマトグラフィーを使用した。  
10

【0090】

両方の安定性サンプルを室温でインキュベートした。12日後、サンプルを分析用RPCによって分析し、安定性を図17に示されるように接合体ピークに対する積分領域の変化によって決定した。PEG試薬9から誘導された接合体は12日以上安定した状態を保っていた。PEGマレイミドから誘導された接合体に対し、たったの63%がクロマトグラム中にとどまり、このことはPEG試薬9はより安定した生成物をもたらすことを示す。

【0091】

実施例14：両末端で官能化されたPEGを使用したPEG化-PEG試薬12  
【化1】



PEG試薬12をO,O'-ビス(2-アミノエチル)ポリエチレングリコール600(フルカ(Fluka)cat.no.14504)を使用してPEG試薬9と同様に調製し、実施例11(Lam 1<sub>925-933</sub>)からのモデルペプチドと反応させた。水(6μL)、10×緩衝原液(1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)、381μMヒドロキノン及び10mM EDTAを含んでいる)2μL及びPEG試薬12(25mg/mL)2μLをLam 1<sub>925-933</sub>原液(脱イオン水中2mg/mL)10μLに加えた。これは1:0.375モデルペプチド対PEG試薬のモル比率に相当する。反応溶液(5μL)を室温で2.5時間インキュベーションした後に(実施例11で述べたように)分析用RPCによって分析した。反応溶液の全ての成分が別個のピークとして溶出した：Lam 1<sub>925-933</sub>単量体は8.1分で溶出した、酸化Lam 1<sub>925-933</sub>二量体は8.9分で溶出した、不活性PEG試薬は17.3分で溶出した、活性PEG試薬は15.7分で溶出しそして脱離基11は10.1分であった。生成物ピークは14.2分で溶出した。2.5時間後、反応溶液中に存在(試薬12に対する86%反応)する遊離Lam 1<sub>925-933</sub>の65%は接合され、PEG試薬12の両方の反応性末端が反応すること及びこの二官能性試薬はPEG分子の両末端で1つのペプチド分子に付着するのにうまく使用され得ることを示す。  
30  
40  
50

## 【0092】

実施例15：ポリマー成分としてのポリ(1-ビニル-2-ピロリドン)(PVP)の使用：Lam 1<sub>925-933</sub>モデルペプチドを用いたPVPの接合

PVP試薬の調製(3工程)：

工程1：末端アミノ基を有するPVP：

圧力管にシステアミン(0.028g)、ジオキサン(8mL)及びマグネチック搅拌子を入れた。溶液を形成するために穏やかな加熱後、この溶液をアルゴンと共に5分間室温でバージした。バージしながら、1-ビニル-2-ピロリドン(2.0g)をその後加え、さらに5分後次にこれに2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)を加えた(0.089g)。さらに2分後、圧力管をアルゴン雰囲気下スクリューキャップで封をし、搅拌しながら17時間60のオイルバス中に置いた。管及び内容物を室温まで冷却した後、ポリマー生成物の沈殿物を得るためにジエチルエーテル(15mL)を加えた。液相をデカントし固体残渣をアセトン(3mL)に再溶解した。得られたアセトン溶液をその後迅速に搅拌されているジエチルエーテル(25mL)に滴下し沈殿物を真空のほんの僅かなバーストと共にn o. 2 焼結ガラス漏斗で単離した。固体物を未乾燥のジエチルエーテル(10mL)で洗浄し、その後室温で真空下乾燥させた(質量=1.44g、白色の固体)。

10

20

工程2：PVP-アミンへのタンパク質反応末端基の接合：

PVP-アミン(500mg)、4-(3-トシリルプロパノイル)安息香酸(図3中の構造6、166mg)、及び4-ジメチルアミノピリジン(6mg)をアルゴン雰囲気下、無水ジクロロメタン(10mL)で混合し、その後搅拌しながら、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(155μL)を加えた。得られた混合物を室温で週末を通して搅拌した。週末の間揮発性物質は蒸発したので、固体残渣をジクロロメタン(10mL)中に再溶解し、そして非吸収性コットン-ホールを通してろ過した。その後ろ液にジエチルエーテル(30mL)を加え、得られた沈殿物を遠心分離(4,600rpm、-9、10分)によって単離した。液相をデカントし、残りの残渣をジクロロメタン(10mL)中に再溶解した。ジエチルエーテル沈殿精製方法を2回以上繰り返し、残渣を真空下乾燥させた(513mg)。リンカー基を接合させたPVPに対する特徴的なNMRシグナルはCDC1<sub>3</sub>において7.97、7.82、7.59及び7.38に現れた。

30

30

工程3：PVP試薬の分別：

上述の段階で得られた固体物の一部(120mg)を水溶性の20mM酢酸ナトリウム緩衝液、150mM NaCl、pH 4.0で混合し、その後透明な液が可視的になるまで13,000rpmで遠心分離機にかけ、そして液相0.45μmをろ過した。ろ液をその後溶出ピークの間1分ごとに留分を集めることにより1mL/minにおいて20mM酢酸ナトリウム緩衝液、150mM、pH 4.0を稼動させながら、HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade size exclusion column(GEヘルスケア(GE Healthcare))で分別した(1.9mL加えた)。73.9乃至74.9分の間に溶出している画分を凍結乾燥後にタンパク質接合用に使用した。ペプチド反応を1mM EDTA、38μMヒドロキノン、1.03mM Lam 1<sub>925-933</sub>及び過剰のPVP試薬を含んでいる100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)中で行った。反応混合液を実施例11で述べたように分析用RPCによって分析した。室温での1時間のインキュベーション後、反応混合液中に存在する遊離Lam 1<sub>925-933</sub>モデルペプチドのおよそ60%がLam 1<sub>925-933</sub>-PVP接合体(11.3分のRPC保持時間)に変換され、これはPEG以外のポリマーが使用され得ることをうまく証明している。

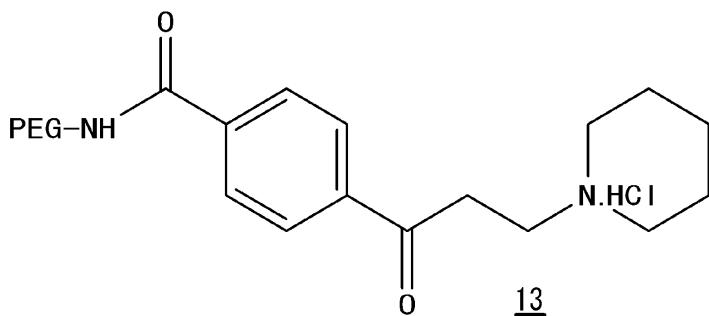
40

50

## 【0093】

実施例16：アミン性脱離基Lを有するPEG試薬の合成及び使用

## 【化2】



10

PEG試薬13の合成：PEG試薬13（図19）は実施例1と類似した操作でDIPC（11mg）を使用しながらDMSO（5mL）中で5kDa mPEG-NH<sub>2</sub>と化合物2（26mg）の直接的な接合により調製し、灰色がかった白色の固体物（31mg）を得た。（CDC<sub>3</sub>における）この生成物のNMRスペクトルは8.02及び7.59に特徴的なシグナルがあった。

実施例11のLam<sub>1925-933</sub>モデルペプチドとの反応：反応を1mM EDTA、38μMヒドロキノン、1.03mM Lam<sub>1925-933</sub>及び3モル当量のPEG試薬13を含んでいる100mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）中で行った。反応混合液を実施例11で述べたように分析用RPCによって分析した。単量体Lam<sub>1925-933</sub>は8.1分で溶出し、二量化Lam<sub>1925-933</sub>は8.9分で溶出し、アミン脱離基は9.3分で溶出し、アミン脱離基を有さないPEG試薬13は15.2分、PEG試薬13は15.75分、そして生成物のピークは14.2分であった。室温での1時間のインキュベーション後、反応混合液中に存在する遊離Lam<sub>1925-933</sub>モデルペプチドのおよそ10%がLam<sub>1925-933</sub>-PEG接合体に変換した。

20

## 【0094】

実施例17：PEG試薬9を使用したIL-1-RaのチオールPEG化及び活性

30

ヒトインターロイキン-1-レセプターアンタゴニスト（IL-1-Ra）の組み換え非グルコシル化形態をモデルタンパク質として使用した。IL-1-Raは153アミノ酸、2つのジスルフィド結合（Cys69/Cys116及びCys66/Cys122）からなり、17.3kDaの分子量を有しそしてN-末端のヘキサヒスチジンタグを含む。

一連のチオールPEG化は50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0及び7.5）中で1-4モル当量の10kDa PEG試薬9を使用して行った。発現されたタンパク質は還元したので、PEG化前にジスルフィドの還元は必要ではなかった。タンパク質濃度は0.1mg/mLであった。4での1時間のインキュベーション後、サンプルをSDS-PAGE分析し、その結果を図18に示した。pH6.0のみならず7.5においても、1モル当量のPEG試薬を使用した場合、PEG化反応の主な生成物はモノ-PEG化IL-1-Raであった。ジ-PEG化生成物に相当するかすかなバンドもまた見られ、同様に未PEG化IL-1-Raに相当するバンドも見られた。反応に使用されたPEGのモル当量を増加させるとジ-、トリ-及びテトラ-PEG化された種が増加した。pH6.0でのより大きなスケールのPEG化をその後20mM EDTAを含んでいる50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.0中でIR-1-Ra（0.2mg/mL）1.5mg及び1.5モル当量の20kDa PEG試薬9を使用して行った。溶液を少しの間ボルテックス（vortex）し、2時間4で置いた。PEG化IL-1-Raを固定

40

50

化金属アフィニティークロマトグラフィー( I M A C )及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。 I M A C 前に、アミコウルトラ-4( Amicon ultra-4 ) 3,000Da MWCO 限外ろ過遠心装置( ultrafiltration centrifugal device )(ミリポア( Millipore )、cat. no. UFC800324 )を使用しながら、 E D T A を未乾燥のリン酸緩衝液p H 7.4を用いて濃縮と希釈の繰り返しサイクルによって取り除いた。最終的に、サンプルを4m L に濃縮し室温で30分間、2m M ホウ化水素ナトリウムで処理し、続けてリン酸緩衝生理食塩水( P B S )p H 7.4で前平衡( pre-equilibrat e )させた H i s T r a p H P ( 1m L )カラム( GEヘルスケア( GE Healthcare ) , cat. no. 17-5247-01 )に投入した。カラムを20m L P B S で洗浄し、溶離は40分かけてP B S を500m M イミダゾールを含んでいるP B S にする勾配を含む。溶出液の画分( 1m L )を集め、各画分のアリコートをS D S - P A G E によって分析して、 P E G 化生成物を含んでいる画分を特定した。その後、 P E G 化生成物を含んでいる画分を溜めて限外ろ過( Amicon ultra-4 3,000Da MWCO )によって最終容積0.6m L に濃縮した。濃縮された I M A C 画分をP B S p H 7.4で前平衡( pre-equilibrat e )させた H i l o a d S u p e r d e x 200 16/60カラム( GEヘルスケア( GE Healthcare ) , cat. no. 17-1069-01 )に投入した。流速は実行中1m L / m i n に保ち、モノ- P E G 化生成物は約62分で溶出した。画分( 1m L )を溶出ピーク周辺で集め、各画分のアリコートをS D S - P A G E によって分析した。純粋なモノ- P E G 化生成物を含んでいる画分を限外ろ過によって濃縮しそしてS D S - P A G E によって再分析して、純度を確認した。その結果を図19のレーン2に示した。ゲルはモノ- P E G 化タンパク質に相当する単一のバンドを示し、遊離タンパク質は可視的ではなかった。

#### 【 0095 】

紫外分光光度法によって定量化した後、 M G - 63 細胞中の I L - 1 - 依存的 I L - 6 放出( I L - 1 - dependent I L - 6 release )の抑制を評価することによってインビトロ生物活性に関してサンプルを分析した。 M G - 63 細胞を D M E M / 10% F C S 100μ L 中 20,000 c e l l s / w e l l で加えた。次の日に、媒体を取り除き未乾燥の媒体 50μ L / w e l l を加えた。サンプルを5倍希釈で2サンプル( 25μ L / w e l l )に加え、1時間予備インキュベートし、その後 I L - 1 を最終濃度 0.3n g / m L ( 25μ L / m L )で加えた。プレートをさらに24時間インキュベートした。細胞の生存可能性を評価するために、 10μ L のチアゾリルブルーテトラゾリウムプロミド( M T T ; D M E M 中 5m g / m L ; シグマ - アルドリッヂ( Sigma - Aldrich ) cat. no. M 5655 )を各穴に加え、3時間インキュベートした。プレートをその後5分間 1,500g で遠心分離機にかけ、媒体を注意深く吸引した。代謝的に活発な細胞中のホルマザン生成物をその後 D M S O ( 100μ L / w e l l )で溶解し 570nm での吸光度を測定した。その結果を図20に示し、試薬9を用いた P E G 化後の P E G 化 I L - 1 R a は阻害活性を保持することを示す。

#### 【 0096 】

実施例18： P E G 試薬9を使用した I L - 1 R a のポリヒスチジン配列上の P E G 化、及び P E G 化タンパク質の活性

以下のような P E G 化反応前に硫酸銅を用いてタンパク質遊離システインを酸化してジスルフィドにした後、実施例17の I L - 1 R a をポリヒスチジンタグ上で P E G 化した；硫酸銅( 1m M )を 200m M N a C l を含んでいる 50m M T r i s · H C l ( p H 8.0 )において I L - 1 R a ( 0.6m g / m L 、 1.5m g I L - 1 - R a ) の 2.5m L 溶液に加えた。4で16時間のインキュベーション後、 25m M E D T A を加え、サンプルを 20m M E D T A を含んでいる 50m M リン酸ナトリウム緩衝液p H 7.5で前平衡( pre-equilibrat e )された P D - 10 カラム( GEヘルスケア( GE Healthcare ) )に投入した。カラムをその後未乾燥のリン

酸緩衝液3.5 μLで溶出した。PEG化に使用されたタンパク質濃度は0.43mg/mL及びpH7.4でありそして4で16時間インキュベートした。PEG試薬9(20kDa)はタンパク質に対して1.5モル当量である。反応は4で16時間インキュベートした。モノPEG化種をホウ化水素ナトリウム処理と共に実施例17で述べたように同じクロマトグラフィーを使用しながら単離した。生成物のSDS-PAGE結果を図19のレーン2に示した、レーン2には遊離タンパク質は見ることができなかった。生成物の生物活性は実施例17で述べたようにMG-63細胞中のIL-1-依存的IL-6放出の抑制を測定することによって評価し、その結果を図20に示した。PEG化IL-1Raは分析結果において阻害活性を有していた。

## 【0097】

10

## 実施例19：PEG試薬合成：10kDa PEG試薬15の合成

PEG化4-(3-(2-ヒドロキシエチルスルホニル)プロパノイル)安息香酸試薬15を図21に示されているように、実施例1中のPEG化4-(3-トシリルプロパノイル)安息香酸9の合成で記載されたのと類似の方法で4-(3-(2-ヒドロキシエチルスルホニル)プロパノイル)安息香酸14から調製した。最初に、4-(3-(2-ヒドロキシエチルスルホニル)プロパノイル)安息香酸14を4-(3-トシリルプロパノイル)安息香酸と類似の方法で4-メチルベンゼンチオールの替わりにメルカプトエタノールを使用して調製した(工程2、実施例1)。

<sup>1</sup>H NMR 14 (400MHz) 3.35 (t, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3.5 (重なり m, 4H, CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.8 (t, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 5.2 (br s, CH<sub>2</sub>OH), 8.05 (m, 4H, 芳香族CH), 13.4 (br s, 1H, COO H)。

20

PEG接合工程に対し、スルホン14(143mg)及びO-(2-アミノエチル)-O'-メチル-PEG(MW 10kDa, 1g, バイオベクトラ(BioVectra))を乾燥トルエン(5mL)に溶解した。溶媒を加熱しないで真空下で取り除き、乾燥固体残渣をその後アルゴン雰囲気下、乾燥ジクロロメタン(10mL)に再溶解した。冰浴で冷却した、得られた溶液にアルゴン雰囲気下でジイソプロピルカルボジイミド(DI PC, 87mg)をゆっくりと加えた。反応混合液をその後一晩(15時間)、室温で攪拌し続けた。揮発性物質をその後真空下(30、水浴)で取り除いて、アセトン中(45mL)で微温(35)で再溶解させた固体残渣を得た。溶液を非吸収性コットンウールでろ過して不溶性物質を取り除いた。この溶液をその後、ドライアイス浴で冷却して、遠心分離(4600rpm、30分間)により分離された白色の沈殿物を得た。液相をデカントし、この沈殿操作を3回繰り返した。その後、得られた灰色がかった白色の固体を真空下で乾燥して、PEG試薬15(1g)を得た。

30

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.30 (t, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3.40 (s, 3H, PEG-OCH<sub>3</sub>), 3.40-3.85 (br m, PEG), 3.50 (重なり m, 2×2H, CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.80 (t, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 7.95, 8.05 (2×d, 2×2H, カルボン酸部位のArH)。

## 【0098】

40

異なったPEG分子量の類似したPEG試薬を同じ基本操作によって調製した。それ故、5kDa PEGを乾燥ジクロロメタン(15mL)においてスルホン14(256mg)、O-(2-アミノエチル)-O'-メチル-PEG(5kDa, 1g, バイオベクトラ(BioVectra))及びDI PC(174mg)の反応によって調製し、アセトン沈殿精製操作後灰色がかった白色の固体15(1g)を得た。

## 【0099】

## 実施例20：PEG試薬合成：10 kDa PEG試薬17の合成

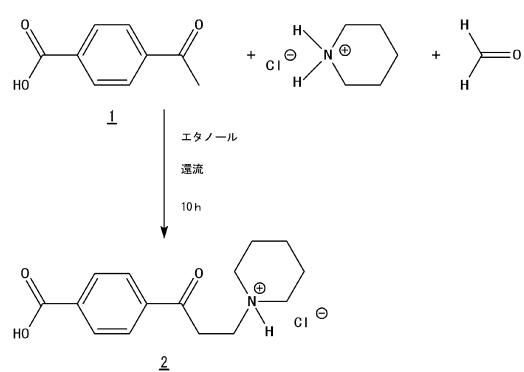
PEG試薬17を次のようにPEG試薬9から調製した(図22)：PEG試薬9(10kDa, 75mg)をおよそ18時間、脱イオン水中でメルカプトコハク酸(6mg)

50

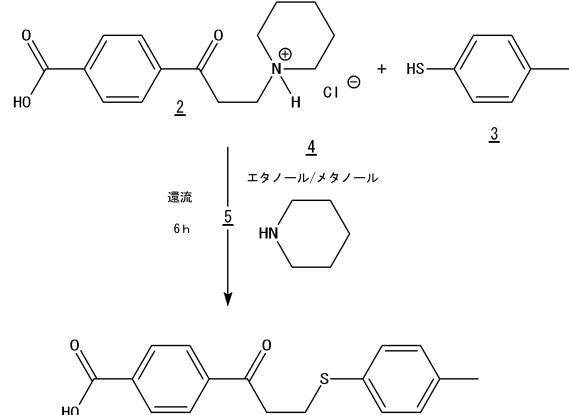
及び炭酸水素ナトリウム (20 mg) と一緒にかき混ぜた。揮発性物質をその後ロータリーエバポレーターで取り除き、非吸収性コットン - ウールを通してろ過により取り除いた不溶物と共に固体残渣を温めたアセトン (4 mL) に再溶解した。その後溶液をドライアイス浴で冷却することによって生成物をアセトンから沈殿させ、そして液相をデカントすることによって単離し続いて遠心分離した。アセトン沈殿物をさらに3回繰り返し、固体物をその後真空下で乾燥して 16 (51 mg) を得た。化合物 16 をおよそ18時間、1 : 1 メタノール : 水 (1 mL) 中でオキソンと混合することによってその後スルホン形態 17 に酸化した。この混合液をアセトン (10 mL) で希釈し、不溶物をその後非吸収性コットン - ウールを通して重力ろ過によって取り除いた。均一なろ液をロータリーエバポレーターで蒸発乾固しそして添加された 1 NHCl 2 滴を含むアセトン (2 mL) に再溶解し、その後 16 (mg) に対して述べられたように同一のアセトン沈殿によって単離した。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.24 - 3.08 (重なり m, CH<sub>2</sub>CH、COCH<sub>2</sub>) , 3.38 (s, PEG-OCH<sub>3</sub>) , 3.44 - 3.84 (br s, 重なり m, PEG & CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) , 4.44 (dd, SO<sub>2</sub>CH) , 7.45 (br s, NH) , 7.98 & 8.06 (2×d, 4H, カルボン酸部位のArH)。

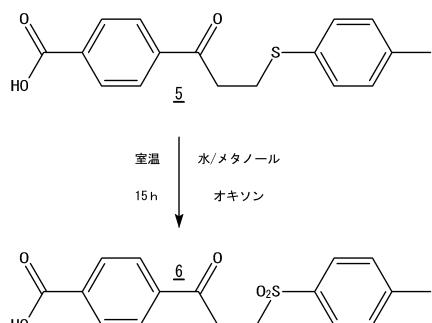
(  1 )



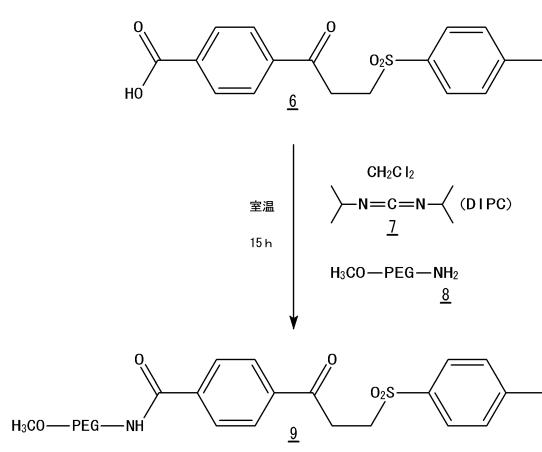
【 図 2 】



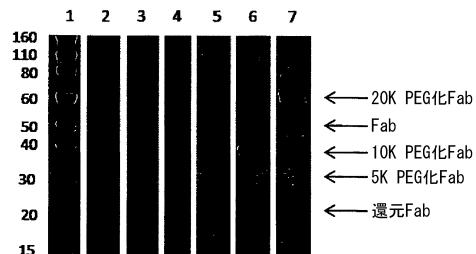
( 3 )



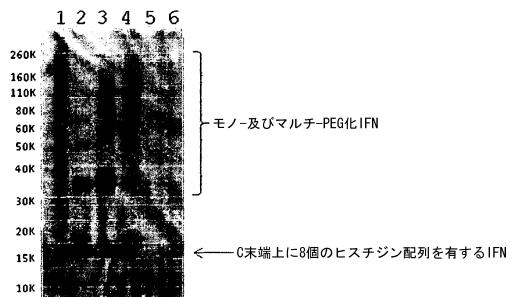
【図4】



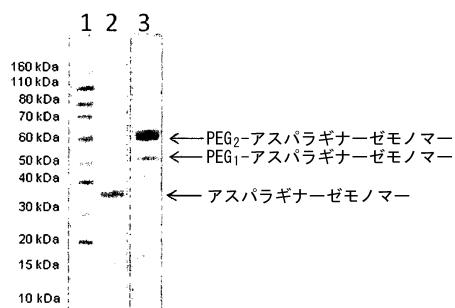
【図5】



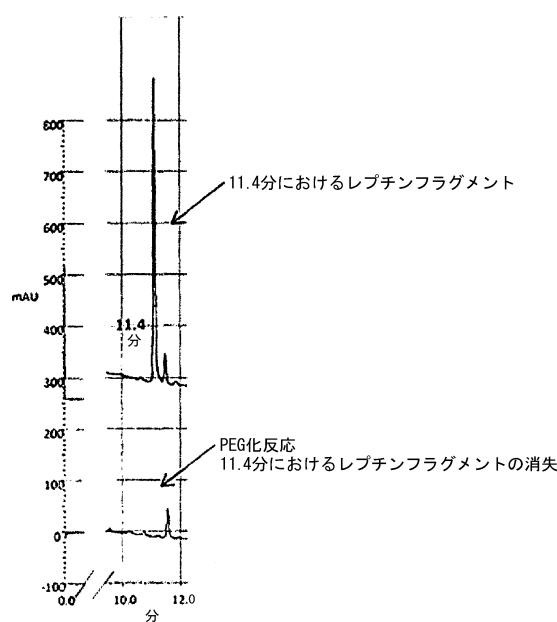
【図7】



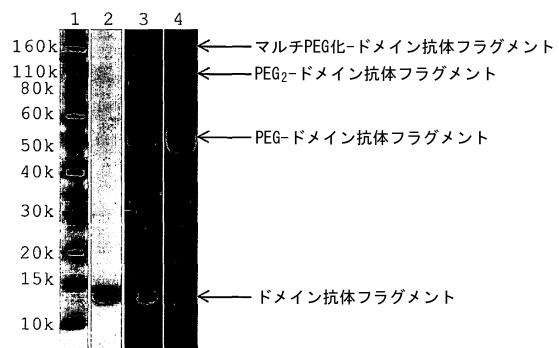
【図6】



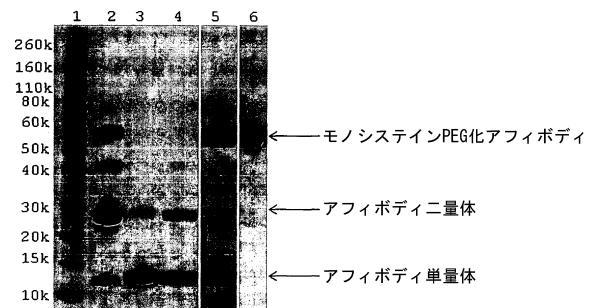
【図8】



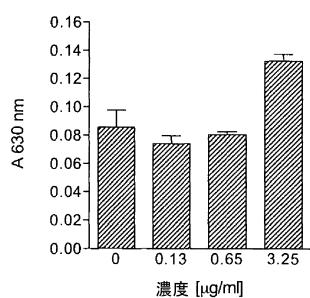
【図9】



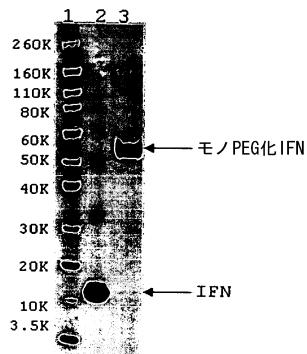
【図10】



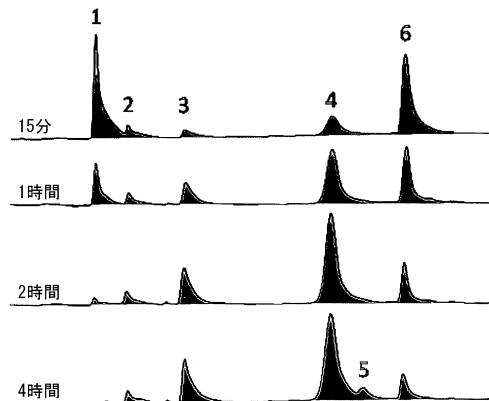
【図11】



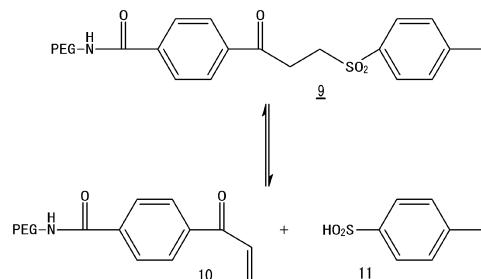
【図12】



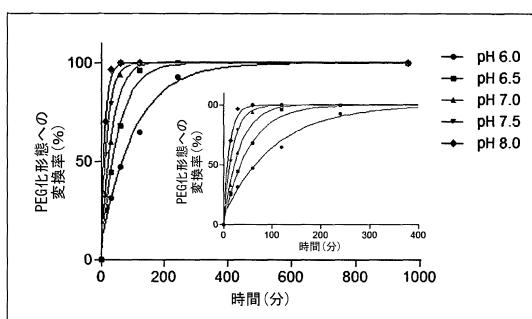
【図13】



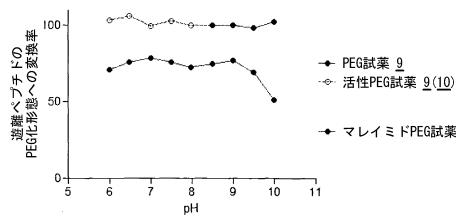
【図14】



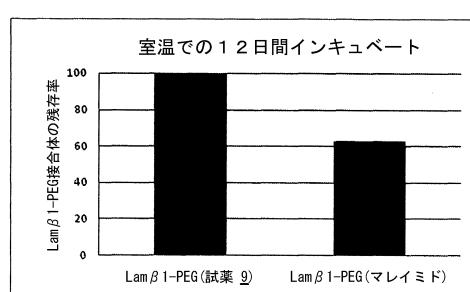
【図15】



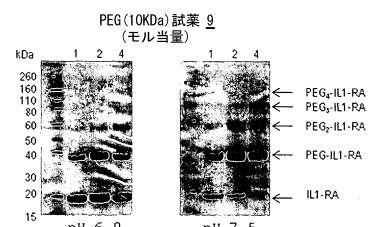
【図16】



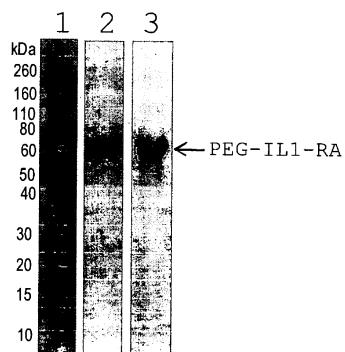
【図17】



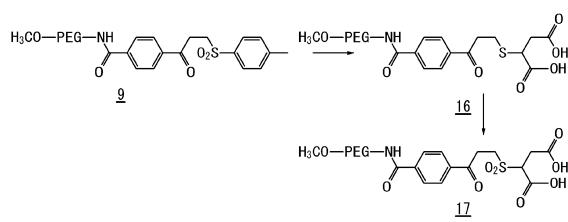
【図18】



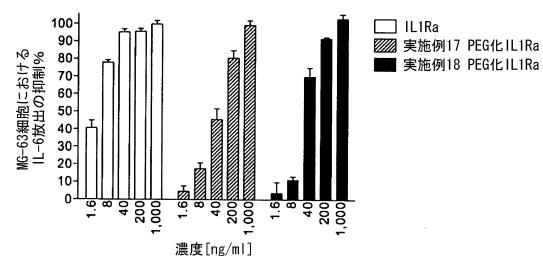
【図19】



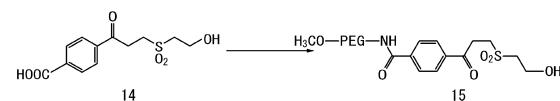
【図22】



【図20】



【図21】



---

フロントページの続き

|               |           |               |       |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| (51)Int.Cl.   | F I       |               |       |
| C 0 8 G 65/00 | (2006.01) | C 0 8 G 65/00 | C S P |
| C 0 8 G 85/00 | (2006.01) | C 0 8 G 85/00 |       |
| C 0 8 F 8/00  | (2006.01) | C 0 8 F 8/00  |       |

(74)代理人 100163360

弁理士 伴 知篤

(72)発明者 ゴドウィン, アンソニー

イギリス国、ロンドン イー11 3ビーゼット、レイトンストーン、612 ハイ ロード、2  
1 シルクス コート

審査官 伊藤 清子

(56)参考文献 特表平09-508926 (JP, A)

SHAUNAK, S. et al, Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge, Bioconjug. Chem., 2007年, Vol.18, No.1, p.61-76

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

|   |           |
|---|-----------|
| A 6 1 K                                 | 4 7 / 4 8 |
| A 6 1 K                                 | 4 7 / 3 2 |
| A 6 1 K                                 | 4 7 / 3 4 |
| A 6 1 K                                 | 4 7 / 3 6 |
| A 6 1 K                                 | 4 7 / 4 2 |
| C 0 8 F                                 | 8 / 0 0   |
| C 0 8 G                                 | 6 5 / 0 0 |
| C 0 8 G                                 | 8 5 / 0 0 |
| C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N ) |           |