(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3626494号

(P3626494)

(45)発行日　平成17年3月9日(2005.3.9)　(24)登録日　平成16年12月10日(2004.12.10)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C07K 17/08	C07K 17/08
A61K 47/48	A61K 47/48
C08F 283/00	C08F 283/00
C08G 65/48	C08G 65/48

請求項の数 24　(全 16 頁)

(21)出願番号	特願平7-512785
(86)(22)出願日	平成6年10月24日(1994.10.24)
(65)公表番号	特表平9-504299
(43)公表日	平成9年4月28日(1997.4.28)
(86)国際出願番号	PCT/US1994/012237
(87)国際公開番号	WO1995/011924
(87)国際公開日	平成7年5月4日(1995.5.4)
審査請求日	平成13年10月11日(2001.10.11)
(31)優先権主張番号	08/143,403
(32)優先日	平成5年10月27日(1993.10.27)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
エンゾン，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　０８８５４　ニュージャージー州　ピスカタウェイ，キングスブリッジ　ロード　４０番地
(74)代理人
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人
弁理士　石井　貞次
(74)代理人
弁理士　早川　康
(72)発明者　グリーンワルド，リチャード　ビー．
アメリカ合衆国　０８８７３　ニュージャージー州　サマーセット，ヒッコリー　ロード　１１３番地

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非抗原性分枝ポリマー複合体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

式：

（Ｒ）$_n$Ｌ－Ａ

［式中、

（Ｒ）は末端C_1－C_4基を含有する水溶性で実質的に非抗原性のポリマー；

（ｎ）＝２；

（Ｌ）は各（Ｒ）に共有結合している、置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステル、マロン酸エステル誘導体からなる群から選択される脂肪族連結分子部分；そして

（Ａ）は生物活性求核物質と結合し得る官能基またはこうした求核物質と反応するように官能基化し得る分子部分である］

からなる実質的に非抗原性の分枝ポリマー。

【請求項２】

（Ｒ）の少なくとも１つが直鎖ポリマーである、請求項１記載のポリマー。

【請求項３】

（Ｒ）の少なくとも１つがポリ（アルキレンオキサイド）である、請求項１記載のポリマー。

【請求項４】

ポリ（アルキレンオキサイド）がα－置換ポリ（アルキレンオキサイド）である、請求項

３記載のポリマー。
【請求項５】
ポリ（アルキレンオキサイド）がポリ（エチレングリコール）ホモポリマー、アルキル末端基付加ポリ（エチレンオキサイド）、およびポリ（アルキレンオキサイド）ブロックコポリマーのコポリマーからなる群から選択される、請求項３記載のポリマー。
【請求項６】
ポリ（アルキレンオキサイド）が約200～約20,000の分子量を有する、請求項５記載のポリマー。
【請求項７】
各（Ｒ）がポリ（エチレングリコール）ホモポリマーである、請求項２記載のポリマー。
【請求項８】
（Ｒ）の少なくとも１つが分枝ポリマーである、請求項１記載のポリマー。
【請求項９】
（Ａ）がヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、アルボニル、チオールもしくはメチレン水素部分、またはスクシンイミジルもしくはｐ－ニトロフェニルカーボネート活性エステルである、請求項１記載のポリマー。
【請求項１０】
（Ａ）が脂肪族連結分子部分（Ｌ）に近接したスペーサー分子部分を含有する、請求項１記載のポリマー。
【請求項１１】
スペーサー分子部分が炭素原子数18までのアルキル若しくはシクロアルキル基またはポリマーを含有する、請求項10記載のポリマー。
【請求項１２】
（Ｒ）の少なくとも１つが求核物質と共有結合し得る官能基をさらに含有する、請求項１記載のポリマー。
【請求項１３】
式：
$(R)_nL-A$
［式中、
（Ｒ）は末端C_1-C_4基を含有する水溶性で実質的に非抗原性のポリマー；
（ｎ）＝２；
（Ｌ）は非抗原性ポリマーのそれぞれに共有結合している、置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステル、マロン酸エステル誘導体からなる群から選択される脂肪族連結分子部分；そして
（Ａ）は生物活性求核物質と共有結合し得る官能基である］
で示される構造を有する活性化した非抗原性の分枝ポリマーを生物活性求核物質に接触させること含む、生物活性複合体の形成方法。
【請求項１４】
式：
$[(R)_nL-A^1]_z-$（求核物質）
［式中、
（Ｒ）は末端C_1-C_4基を含有する水溶性で実質的に非抗原性のポリマー；
（ｎ）＝２；
（Ｌ）は、脂肪族分子部分が置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステル、マロン酸エステル誘導体からなる群から選択される脂肪族連結分子部分；
（$A^{1)}$は（Ｌ）と生物活性求核物質との間の共有結合を表し；そして、
（ｚ）は求核物質に結合したポリマーの数を表す］
で示される構造を含有する、ポリマー複合体。
【請求項１５】
（Ｒ）の少なくとも１つがポリ（アルキレンオキサイド）である、請求項14記載の複合体

。
【請求項１６】
ポリ（アルキレンオキサイド）がα－置換ポリ（アルキレンオキサイド）である、請求項15記載の複合体。
【請求項１７】
ポリ（アルキレンオキサイド）がポリ（エチレングリコール）ホモポリマー、アルキル末端基付加ポリ（エチレンオキサイド）、およびポリ（アルキレンオキサイド）ブロックコポリマーのコポリマーからなる群から選択される、請求項15記載の複合体。
【請求項１８】
ポリ（アルキレンオキサイド）が約200～約20,000の分子量を有する、請求項17記載の複合体。
【請求項１９】
各（Ｒ）がポリ（エチレングリコール）ホモポリマーである、請求項15記載の複合体。
【請求項２０】
（Ｒ）の少なくとも１つが分枝ポリマーである、請求項14記載の複合体。
【請求項２１】
（Ｌ）が非平面的分子部分である、請求項14記載の複合体。
【請求項２２】
求核物質がタンパク質、ペプチドおよびポリペプチド、ならびに抗新生物薬、抗感染薬、抗不安薬、胃腸薬、中枢神経系－活性薬、鎮痛薬、妊娠促進薬、避妊薬、抗炎症薬、ステロイド薬、抗尿毒症薬、心臓血管薬、血管拡張薬、血管収縮薬からなる群の物質の１つである、請求項14記載の複合体。
【請求項２３】
ｉ）　式：
（Ｒ）$_{n}$Ｌ－Ａ
［式中、
（Ｒ）は、それぞれ独立して、末端C_1－C_4基を含有する水溶性で実質的に非抗原性のポリマー；
（ｎ）＝２；
（Ｌ）は非抗原性ポリマーのそれぞれに共有結合している、脂肪族分子部分が置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステル、マロン酸エステル誘導体からなる群から選択される脂肪族連結分子部分；そして
（Ａ）は求核物質と共有結合を形成し得る官能基である」
で示される構造を有する非抗原性の分枝ポリマーをｐ－ニトロフェニルクロロホルメートと接触させること；および
ii）　工程ｉ）のｐ－ニトロフェニルカーボネート活性エステルをＮ－ヒドロキシスクシンイミドと反応させること；
を含む、非抗原性分枝ポリマーのスクシンイミジルカーボネート活性エステルの製造方法。
【請求項２４】
ｉ）　式：
（Ｒ）$_{n}$Ｌ－Ａ
［式中、
（Ｒ）は、それぞれ独立して、末端C_1－C_4基を含有する水溶性で実質的に非抗原性のポリマー；
（ｎ）＝２；
（Ｌ）は非抗原性ポリマーのそれぞれに共有結合している、脂肪族分子部分が置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステル、マロン酸エステル誘導体からなる群から選択される脂肪族連結分子部分；そして
（Ａ）は求核物質と共有結合を形成し得る官能基である］

で示される構造を有する非抗原性の分枝ポリマーをビス－スクシンイミジルカーボネートと接触させること、
を含む、非抗原性分枝ポリマーのスクシンイミジルカーボネート活性エステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明が属する分野

本発明は生物活性物質のin vivoでの循環寿命を延長させるのに有用な分枝ポリマーに関するものである。また本発明は、このポリマーで製造した複合体にも関するものである。

ペプチドまたはポリペプチドをポリ（エチレングリコール）PEGおよび類似の水溶性ポリ（アルキレンオキサイド）に連結させるという最初の概念のいくつかが、米国特許第4,179,337号に開示されており、この開示事項をここに参考として引用する。これらのポリマーで修飾されたポリペプチド類は免疫原性／抗原性の低下を示し、未修飾の物質よりも長期にわたって血流中を循環する。

ポリ（アルキレンオキサイド）と複合体化するためには、ヒドロキシル末端基の１つを反応性官能基に変換させる。この変換過程は通常“活性化”に属するもので、生成物は“活性化ポリ（アルキレンオキサイド）”と称される。他の実質的に非抗原性のポリマーも同様に“活性化”または官能基化される。

この活性化ポリマーを、付着部位の役割を担う求核性官能基を有する治療薬と反応させる。付着部位として通常使用される求核性官能基の１つにリジンのε－アミノ基がある。遊離カルボン酸基、好適に活性化されたカルボニル基、酸化炭水化物分子部分およびメルカプト基もまた付着部位として使用されてきた。

インスリンおよびヘモグロビンは最初に複合体化された治療薬に属するものである。これらの比較的大きいポリペプチドは複数個のフリーなε－アミノ付着部位を含んでいる。生物活性が有意に低下することなく、免疫原性が低下し、循環寿命が増大するために、十分な数のポリマーを付着させることができた。

しかし、過剰のポリマーの複合体化および／または治療薬分子部分の中で官能基が生物活性に関係している活性部位を含んだ複合体化はしばしば活性の低下をもたらし、その結果治療上の有用性の減少を招くことになる。生物活性に関係しない付着部位がほとんど存在しない、低分子量のペプチドにおいては、このような事態がしばしば生じる。多くの非ペプチド治療薬もまた、ポリマー修飾の効果を得るために十分な数の付着部位を有していない。

上に述べた問題の解決策の１つとして、より長い、高分子量のポリマーの使用がある。しかし、これらの物質は製造が容易でなく、使用するには高価である。しかも、これらはより容易に入手できるポリマーに比較してほとんど効果が改良されない。

また別の解決策は、タンパク質のアミノ基にトリアジン環を介してポリマーの２本鎖を付着させることである。例えば、Enzyme,26,49－53（1981）およびProc.Soc.Exper.Biol.Med.,188,364－９（1988）を参照されたい。

この分野での研究は継続されてきた。トリアジンは毒性物質であり、この毒性は複合体化後容認できるレベルまで減少させるのが困難である。さらに、トリアジンは平面基であり、２つのポリマーしか置換することができない。この平面構造は２つのポリマー鎖を一定の位置に堅く固定する。このことにより、ポリマーを複合体化しても、ポリマーの鎖長を増大させた場合の効果と同程度のものしか得られない。これらのことから、トリアジンを介在させない活性化ポリマーは、この分野での実質的利益をもたらすと考えられる。本発明はこの必要性に応えるものである。

発明の要約

本発明の一態様において、式：

$(R)_nL-A$ （Ｉ）

［式中、（Ｒ）は水溶性非抗原性ポリマーを含み；

（ｎ）＝２または3;

（Ｌ）は各（Ｒ）に共有結合している脂肪族連結分子部分であり；そして
（Ａ）は求核置換を行なうことができる活性化官能基を示す］
に相当する実質的に非抗原性の分枝ポリマーが提供される。例えば、（Ａ）は生物活性求核物質または同様に作用し得る分子部分と結合することができる官能基である。
本発明の特に好ましい態様において、（Ｒ）はポリ（エチレングリコール）PEGなどのポリ（アルキレンオキサイド）PAOを含む。
本発明のこれらの傘状に分枝したポリマー（Ｕ－PAOまたはＵ－PEG）は生物活性求核物質と反応して複合体を形成する。ポリマーの付着位置は官能基（Ａ）によって決まる。例えば、（Ａ）としてはスクシンイミジルスクシネートまたはカーボネートが可能で、これはリジンのイプシロンアミノ基と反応する。この分枝ポリマーは、生物活性物質上にある一級または二級アミノ基、メルカプト基、カルボン酸基、カルボニル基または類似の基のいずれかと連結するように活性化することもできる。他の基はこの分野での通常の技術者にとっては明白である。
本発明の別の態様として、生物活性物質と上記の分枝ポリマーの１つまたはそれ以上とを含有する複合体、およびそれらの製造方法が含まれる。生物活性物質には、合成または天然物から単離されたタンパク質、ペプチド、酵素、医療用化学物質または有機分子部分が含まれる。方法には、置換反応を行い得る求核部分を有する生物活性物質を、その生物活性の少なくとも一部を維持したままで付着効果を与えるのに十分な条件下で、上記の分枝ポリマーと接触させることが含まれる。
本発明には各種疾病および症状の治療方法もまた含まれる。この態様においては、治療を必要としている哺乳動物に、タンパク質、酵素または有機分子部分などの生物活性物質と本発明の分枝ポリマーからなる複合体の有効量を投与する。
本発明の主要な利点の一つは、複合体化した物質をポリマーの分枝が傘状に三次元的に保護して被覆する点である。これは従来のポリマー複合体の線状構造と対比される点である。さらに、共通の基部からのポリマー鎖の分枝は、in vivoでの動的で非平面的な作用を可能にする。このように、分枝ポリマーは、同分子量の直鎖ポリマーよりも実質的に効果がある。
分枝ポリマーの第２の利点は、実質的により少ない複合体化部位のみを必要として、ポリマーのいくつかの鎖が生体に有用な物質に付着する点である。この分枝ポリマーの利点は、有用な付着部位がわずかしかない治療薬に関して特に劇的である。ポリマー複合体に必要とされる特性のすべてが実現され、そして生物活性の減少が最少となる。

発明の詳細な説明

1.ポリマー置換基および式Ｉの定義
本発明の活性化分枝ポリマーは好ましくは室温で水溶性のポリ（アルキレンアキサイド）（PAO）から製造される。この群に入るものとして、メトキシポリ（エチレングリコール）（mPEG）などのアルファ置換ポリアルキレンオキサイド誘導体またはモノ若しくはビス末端C_1－C_4基を含有するものなどの、他の好適なアルキル置換PAO誘導体がある。モノメチルPEGホモポリマーなどの直鎖非抗原性ポリマーが好ましい。他のポリ（エチレングリコール）ホモポリマー、他のアルキルポリ（エチレンオキサイド）ブロックコポリマー、およびポリ（アルキレンオキサイド）ブロックコポリマーのコポリマーなどの、別種のポリアルキレンオキサイドもまた有用である。
本発明のポリマーは、式（Ｉ）：

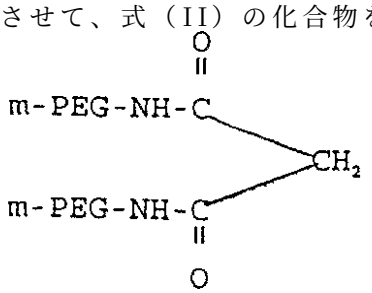
$$(R)_n L-A \qquad (I)$$

［式中、（Ｒ）は水溶性で実質的に非抗原性ポリマーを含み；
（ｎ）＝２または3;
（Ｌ）は各（Ｒ）に共有結合している脂肪族連結分子部分；そして
（Ａ）は求核置換を行なうことができる活性化官能基を表す。］
で示される。
各（Ｒ）が水溶性で実質的に非抗原性のポリマー鎖という場合がある。このポリマー鎖がPEGまたはmPEGの場合は、各鎖は分子量約200～約12,000ダルトン、好ましくは約1,000～

約10,000ダルトンである。分子量約5,000ダルトンが最も好ましい。
別種のポリマー物質として、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドまたは他の同様の非免疫原性ポリマーなどの物質が含まれる。これらのポリマーもまた本発明の範囲に含まれるために官能基化または活性化することができる。前記の物質は単なる例示であって、ここで使用するのに好適な非抗原性ポリマーのタイプを限定するつもりはない。
本発明の別の態様において、（Ｒ）は生物活性物質から見て、第２級または３級分枝となる分枝ポリマーである。２官能性およびヘテロ２官能性活性ポリマーエステルもまた使用し得る。また本発明のポリマーは、ポリ（アルキレングリコール）ジアミンなどの２官能性物質と共重合させて、透過性コンタクトレンズ、外傷用包帯、薬品送出器などに使用するのに好適な、相互貫入高分子編目構造を形成させることもできる。これらの分枝の立体的制限および水溶性については、当分野の普通の技術者が容易に認識するはずである。しかし、好ましくは、この多重分枝を有するポリマーの分子量は80,000ダルトンを超えるべきではない。
式Ｉに示されるように、ここで（Ｒ）として示される２または３のポリマー鎖は、脂肪族連結分子部分（Ｌ）に結合している。好適な脂肪族として、置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステルならびにマロン酸エステル誘導体が含まれる。連結分子部分は、ポリマー鎖が堅く固定されないように、非平面性であることが好ましい。連結分子部分（Ｌ）は多重ポリマー鎖または“分枝”を（Ａ）に付着させる仲介体の意味もあり、この分子部分を介してポリマーが生物作用物質に付着する。
（Ｌ）は、好ましくは18まで、より好ましくは１～10の炭素原子を有する多重官能性アルキル基を含む。アルキル鎖中に窒素、酸素または硫黄などの異種原子が含まれてもよい。このアルキル基はまた炭素または窒素原子のところで分枝していてもよい。本発明の別の態様において、（Ｌ）は単独の窒素原子である。
（Ｌ）および各（Ｒ）は好ましくは（Ｒ）および（Ｌ）上の両方の求核官能基間の反応によって連結される。各（Ｒ）は求核置換を行なって（Ｌ）と結合するために好適に官能基化される。こうしたポリマーの官能基化は、当分野の通常の技術者にとって容易に明らかとなる。
（Ｒ）および（Ｌ）間には極めて多種の連結が予想される。ウレタン（カルバメート）連結が好ましい。この結合は、例えば1,3－ジアミノ－２－プロパノールなどのアミノ基をメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルカーボネートと反応させて形成させる。この反応は米国特許第5,122,614号に記載されており、この開示事項をここに参考として引用する。アミド連結は、メトキシポリエチレングリコール－アミン（mPEGアミン）などのアミノ末端非抗原性ポリマーを塩化アシル官能基と反応させることによって形成させることができる。
その他の（Ｒ）と（Ｌ）間の連結の例として、エーテル、アミン、尿素、およびこれらのチオおよびチオール類似体、そしてまた上記のウレタンおよびアミド連結のチオおよびチオール類似体が含まれる。これらの連結は、この分野の通常の技術者によく知られた方法によって形成される。上に引用した米国特許第4,179,337号を参照して、他の好適な連結およびその形成を決定することができる。
式（Ｉ）の分子部分（Ａ）は、本発明の分枝ポリマーを生物活性物質と複合体化させるために“活性化”する基を示している。
（Ａ）は以下のものから選択される分子部分である：
I.以下に示すような、アミノ基と反応し得る官能基：
ａ）ｐ－ニトロフェニル、またはスクシンイミジルなどのカーボネート；
ｂ）カルボニルイミダゾール；
ｃ）アズラクトン；
ｄ）環状イミドチオン；または
ｅ）イソシアナートまたはイソチオシアナート。
II.以下に示すような、カルボン酸基および反応性カルボニル基と反応し得る官能基：

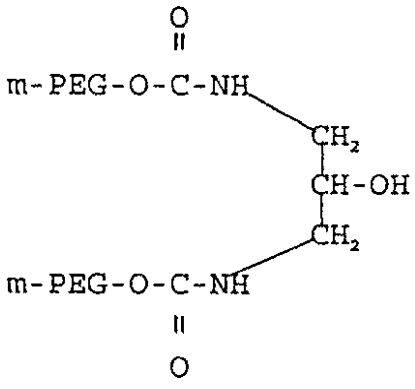
ａ）第一級アミン；または
ｂ）アシルヒドラジド、カルバゼート、セミカルバメート、チオカルバゼートその他などのヒドラジンおよびヒドラジド官能基。
III.フェニルグリオキサールなどの、メルカプトまたはスルフヒドリル基と反応し得る感応基；例えば米国特許第5,093,531号を参照されたい。この開示事項をここに参考として引用する。
IV.求電子中心と反応し得るその他の求核基。限定するものではないが、例えばヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、チオール基、活性メチレンなどが含まれる。
分子部分（Ａ）は脂肪族連結分子部分（Ｌ）に近接して存在するスペーサー分子部分をも含むことができる。このスペーサー分子部分は炭素原子数18までを含有するヘテロアルキル、アルコキシ、アルキル、またはさらにポリマー鎖を付加したものでもよい。このスペーサー分子部分は標準的な合成技術を使用して付加することができる。（Ａ）として選択されるこれらの分子部分は生物活性求核基の他に別の分子部分とも反応し得るものと理解されるべきである。
2.分枝ポリマーの合成
分枝ポリマー（一般にＵ－PAOまたはＵ－PEG）は従来の反応技術を使用して形成させる。付着させる各ポリマー鎖（Ｒ）に対して、連結化合物（Ｌ）は（ｎ）に対応した数の求核官能基を有する（すなわち２または３）。一態様として、上述のように製造した分枝ポリマーサブユニット（Ｒ）$_n$Lにｐ－ニトロフェニルクロロホルメートを接触させ、その後Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドを接触させてスクシンイミジルカーボネートを形成させることによって、分枝ポリマーのスクシンイミジルカーボネート活性エステルを製造する。別法として、ヒドロキシ分子部分を直接ビス－スクシンイミジルカーボネートと反応させることもできる。ポリマーサブユニット（Ｒ）$_n$Lは、（Ａ）に付着し得るように、アミノまたはメチレン水素の他に、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシルおよびチオール基などを含まなければならない。
分枝ポリマーはまた、ジ－若しくはトリ－アミノ、メルカプトアルコールまたはアルキルチオールなどの求核官能基で置換した脂肪族連結化合物にSC－PEG、PEG－NCO、PEG－NCS、SS－PEG、PEG酸および酸誘導体などの活性化または官能基化ポリマー鎖を反応させることによっても形成させることができる。官能基化ポリマーおよび好適な脂肪族連結基が市販されているかまたは容易に合成されるので、これらの方法の方が好ましい。
合成の別法として、PEG－アルコール、PEG－アミンまたはPEG－メルカプタンなどの求核分子部分で官能基化したポリマーにマロン酸誘導体またはグリオキサール酸誘導体などの２官能性分子を反応させるものが含まれる。
例えば、メトキシ－ポリ（エチレングリコール）アミン２モルに置換または非置換マロニルクロライドを反応させて、式（II）の化合物を形成させることができる：

(II)



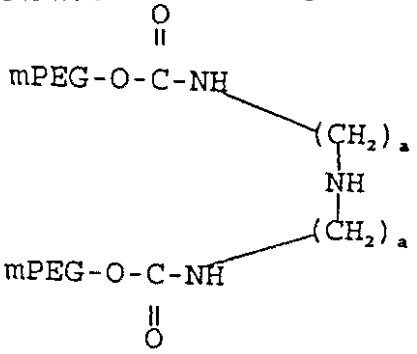
強塩基との反応によって、メチレン連結基がアニオンに変化し、これがさらに官能基化される。
同様にして、メトキシ－ポリ（エチレングリコール）スクシンイミジルカーボネート２モルに1,3－ジアミノ－２－プロパノールを反応させて、式（III）の化合物を形成させてもよい：

(III)



同様に、mPEG2モルにジエチレントリアミンなどのトリアミンを反応させて、式（IV）の構造を有する化合物を形成させることができる：

(IV)



a=1-5

分枝ポリマー（III）はその後、まずｐ－ニトロフェニルクロロホルメートなどの、ヒドロキシル基を活性化し得る化合物で官能基化し、反応性ｐ－ニトロフェニルカーボネートを形成させる。生成したｐ－ニトロフエニルカーボネートポリマーに直接生物活性求核物質を反応させることができる。

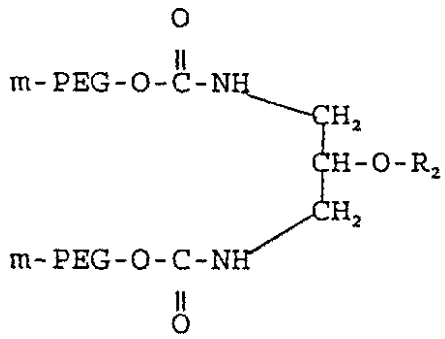
このｐ－ニトロフェニルカーボネートポリマーは中間体として使用することもできる。これに大過剰のＮ－ヒドロキシスクシンイミドを反応させて、スクシンイミジルカーボネート活性化分枝ポリマーを形成させることができる。スクシンイミジルカーボネートのその他の形成方法も有効であり、ここでの使用が想起される。別法として、ｐ－ニトロフェニルカーボネートポリマー中間体に無水ヒドラジンを反応させて、カルバゼート分枝ポリマーを形成させる。

分枝ポリマー（IV）は、この（IV）に乳酸などのヒドロキシ酸を反応させてヒドロキシアミドを形成させることによって、活性化することができる。その後、このヒドロキシアミドを（III）について述べたのと同様の方法によって官能基化する。

容易に認識されるように、本発明の化合物を形成させるためには、極めて多種の官能基化ポリマー鎖と脂肪族連結化合物との反応とその組合せを利用することができる。前記の反応は本発明を説明するために開示したものである。

式（II）、式（III）などに相当する分枝ポリマーを、脂肪族連結分子部分と求核置換を行い得る基との間のスペーサー分子部分（ここでR_2で表される）によって延長することもできる。例えば、スペーサー分子部分を有する式（III）のポリマーは式（Ｖ）によって表される：

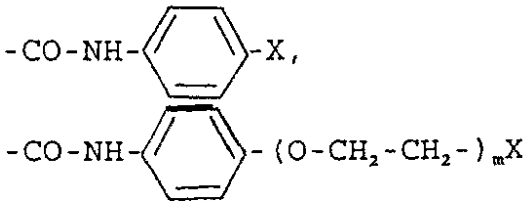
(V)



（R_2）で表されるスペーサー分子部分には以下のものが含まれるが、これらに限定されるわけではない：

$-CO-NH-(CH_2-)_mX$

$-CO-NH-(CH_2-CH_2-O-)_mX$



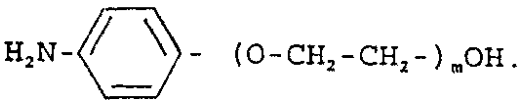
など。ここで（ｍ）は１～18の整数であり、（Ｘ）＝H,OH,NH_2,COOHである。状況に応じて、－OH基の－Ｈをスペーサー分子部分末端に付着させて末端ヒドロキシル基を形成させる。

（Ｖ）に相当する化合物の合成には、式（III）の化合物のｐ－ニトロフェニルカーボネートまたはＮ－スクシンイミジルカーボネート活性エステルに下記のような試薬を反応させるものが含まれる。

$H_2N-(CH_2-)_mOH$,

$H_2N-(CH_2-CH_2-O-)_mH$,

aminophenols, or



分枝ポリマーへのスペーサー分子部分の付着を説明するために、式（II）のポリマーについて述べるが、これに限定するものではない。本発明に開示されたいずれの分枝ポリマーについても同様の生成物が得られるはずである。例えば、スペーサー分子部分（R_2）はヒドロキシル基以外の基で置換された連結分子部分（Ｌ）と結合することができる。ヒドロキシル基の代わりにアミノ基の場合、またはヒドロキシル基で置換される炭素原子の代わりに第二級アミンの場合、（Ｌ）は置換イソシアナートまたはイソチオシアナートその他などの好適な試薬と反応することができる。上記の脂肪族連結分子部分と同様に、スペーサー分子部分の末端基を同様に官能基化して求核基と反応し得るようにすることもできる。

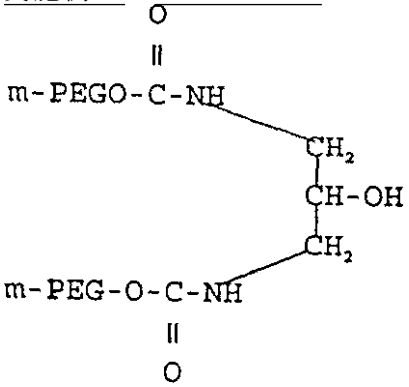
合成後、活性化された分枝ポリマーを従来法によって精製し、このポリマーと結合することができる求核基を有する生物活性物質とを、非修飾のこの物質に関する活性の少なくとも一部を維持したままで、反応させることができる。

3.複合体化に好適な生物活性物質

分枝ポリマーと複合体化する求核物質は“生物活性”であると記載している。しかし、この語句は生理学的または薬理学的活性に限定されるものではない。例えば、酵素を含有するもののようなある種の求核複合体は有機溶媒中での反応を触媒することができる。同様に、コンカナバリンＡ、イムノグロブリンその他のタンパク質を含有するある種の本発明のポリマー複合体は、実験室での診断にも有用である。複合体の全部に共通する特徴は、

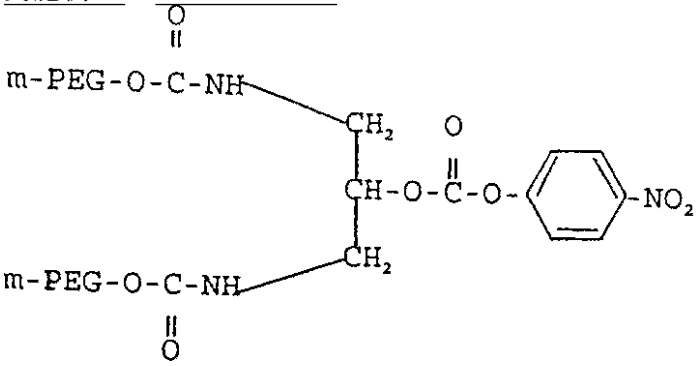
非修飾生物活性物質に関する活性の少なくとも一部が維持されていることである。
複合体は生物活性であり、多数の治療用用途がある。生物活性物質を含む治療を必要とする哺乳動物に、必要な生物活性物質を含有するポリマー複合体の有効量を投与することによって、治療することができる。例えば、酵素置換治療または血液因子を必要としている哺乳動物に、必要な物質を含有する分枝ポリマー複合体を与えることができる。
本発明の対象となる生物活性求核物質としては、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、酵素、医薬品などの天然または合成起源の有機物質その他があるが、これらに限定されるものではない。
対象となる酵素としては、炭水化物特異性酵素、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼおよびリガーゼが含まれる。
特定の酵素に限定するわけではないが、対象酵素の例として、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、エンドトキシナーゼ、カタラーゼ、キモトリプシン、リパーゼ、ウリカーゼ、アデノシンジホスファターゼ、チロシナーゼおよびビリルビンオキシダーゼが含まれる。対象となる炭水化物特異性酵素としては、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルコウロニダーゼ、その他が含まれる。
限定するわけではないが、対象となるタンパク質、ポリペプチドおよびペプチドとしては、ヘモグロビン、ファクターVII,VIII,およびIXを含む血液因子などの血清タンパク質；イムノグロブリン、インターロイキンなどのサイトカイン、α－、β－およびγ－インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子を含むコロニー刺激因子、血小板由来増殖因子およびホスホリパーゼ活性タンパク質（PLAP）が含まれる。一般の生体または治療関係のその他のタンパク質としては、インスリン、レクチンおよびリシンなどの植物タンパク質、腫瘍壊死因子および関連対立因子、TGFαまたはTGFβなどの組織成長因子および上皮成長因子などの成長因子、ホルモン、ソマトメジン、エリトロポイエチン、色素ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、プロラクチン、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、組織プラスミノーゲン活性化因子などが含まれる。対象となるイムノグロブリンにはIgG,IgE,IgM,IgA,IgDおよびそれらの断片が含まれる。
インターロイキン、インターフェロンおよびコロニー刺激因子などのある種のタンパク質は組換え体技術を使用した時に通常生じる非グリコシル化形態でも存在する。この非グリコシル化物もまた本発明の生物活性求核物質の中に入る。
本発明の生物活性求核物質にはin vivoでの生物活性を示すポリペプチドのいずれの部分でも含まれる。これにはアミノ酸配列、アンチセンス分子部分など、抗体断片、一本鎖結合抗原（例えば米国特許第4,946,778号参照、この開示事項をここに参考として引用する）、抗体または断片の融合を含む結合分子、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、触媒性抗体、ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドが含まれる。
タンパク質またはその部分は、組織培養、動物源からの抽出、または組換えDNA方法論によるなどの、この分野での通常の技術者に知られた手法を使用して製造または単離することができる。タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸配列などのトランスジェニック源もまた意図するものである。これらの物質はトランスジェニック動物、すなわちマウス、ブタ、ウシその他から得られる。これらの動物中、タンパク質は乳、血液または組織中に発現される。トランスジェニック昆虫およびバキュロウィルス発現系もまた採取源として意図するものである。さらに、突然変異TNFおよび／または突然変異インターフェロンなどの突然変異型タンパク質もまた本発明の範囲に入る。
対象となるその他のタンパク質はブタクサ、抗原E、蜂蜜毒、ダニアレルゲンその他などのアレルゲンタンパク質である。
有用な生物活性求核物質はタンパク質およびペプチドに限定されるわけではない。基本的にどのような生物活性化合物でも本発明の範囲に含まれる。本発明は、天然物から単離されるか合成されるかにかかわらず、医薬品などの、ポリマー複合体化のための求核付着部位をわずかまたはただ１つしか有していない化合物に対して特に適している。化学療法分子としては、医薬化学物質、すなわち抗腫瘍薬、心臓血管薬、抗新生物薬、抗感染薬、抗

不安薬、胃腸薬、中枢神経系－活性薬、鎮痛薬、妊娠促進または避妊薬、抗炎症薬、ステロイド薬、抗尿毒症薬、心臓血管薬、血管拡張薬、血管収縮薬などである。
上記のものは本発明のポリマーとの複合体化に適した生物活性求核物質の実例である。これらの生物活性物質は特定するためのものではなく、好適な求核基を有するものをもまた意図するものであり、これらも本発明の範囲に入ると理解されるべきである。
4.生物活性複合体の合成
標準的な化学反応によって、１またはそれ以上の活性化分枝ポリマーを生物活性求核物質に付着させることができる。この複合体は次式（VI）で表される：
（VI）　［（Ｒ）$_n$Ｌ－A^1］$_z$－（求核物質）
［式中、（Ｒ）は水溶性の基本的に非抗原性ポリマー;n＝２または3;（Ｌ）は脂肪族連結分子部分；（A^1）は（Ｌ）と求核物質との連結物質を表し、（ｚ）は１以上の整数で、生物活性求核物質と複合体化するポリマーの数を表すものである。（ｚ）の上限値は技術者による研究によって、利用し得る求核物質の付着部位の数とポリマー付着の程度から決定されるはずである。複合体化の程度は周知の手法を使用して反応化学量論量を変化させることによって調節し得る。化学量論的に過剰の活性化ポリマーを求核物質に反応させることによって、求核物質に１より多い数のポリマーを複合体化したものを得ることができる。
生物活性物質は、場合によってはこの求核物質に必要なpHに応じて緩衝化した水性反応媒体中で、活性化分枝ポリマーと反応させることができる。この反応の最適pHはタンパク質類／ポリペプチドについては一般に約6.5～約8.0であり、好ましくは約7.4である。有機／化学療法用分子部分は非水性系で反応させることができる。求核物質の安定性、反応効率その他に関する最適反応条件はこの分野の普通の技術レベル範囲である。好ましい温度範囲は４℃～37℃である。反応媒体の温度は求核物質が変性または分解する温度を超えてはいけない。求核物質を過剰の活性化分枝ポリマーと反応させるのが好ましい。反応後、複合体を回収し、ダイアフィルトレーション、カラムクロマトグラフィー、それらの組合せその他によって精製する。
本発明の活性化分枝非抗原性ポリマーは、生物活性物質、特に十分な数の好適なポリマー付着部位が不足しているものとの複合体化において、新規で有用な材料であることは容易に評価することができる。
実施例
以下の実施例は限定的なものではなく、本発明をいくつかの面から説明するものである。すべての割合およびパーセンテージは特に記さないかぎり重量比であり、すべての温度は℃である。
材料物質
メトキシポリ（エチレングリコール）（ｍ－PEG）はUnion Carbideより入手した。溶媒はAldrich Chemical,Milwauke,Wisconsinより入手した。分子量約5,000のｍ－PEGを使用して、米国特許第5,122,614号の記載にしたがって、メトキシポリ（エチレングリコール）－Ｎ－スクシンイミジルカーボネート（SC－PEG）を製造した。実施例１～９において製造した各生成物を炭素－13NMRによって構造確定した。
実施例１－Ｕ－PEG－OH



この分枝ポリマーはメチレンクロライド50mL中のSC－PEG10.0g（2mmol）溶液に1,3－ジアミノ－２－プロパノール100mg（1.1mmol）を添加することによって製造した。混合物を室温で18時間撹拌し、その後濾過した。過剰の溶媒を真空蒸留によって除去した。残渣を２－プロパノールから再結晶し、生成物7.1gを得た（収率70%）。

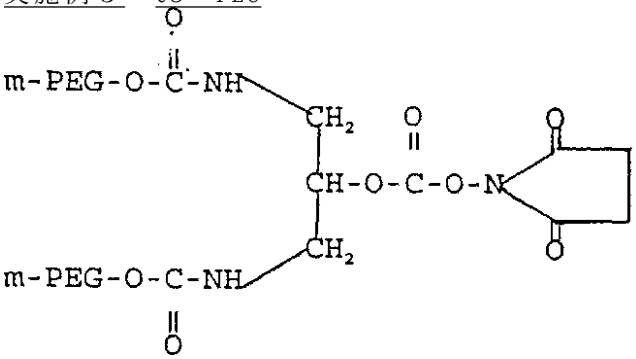
実施例２－U－PNP－PEG



実施例１の化合物をｐ－ニトロフェニルクロロホルメートで活性化した。最初に、U－PEG5.0g（0.5mmol）をトルエン75mL中で２時間還流させることによって共沸乾燥し、その結果溶媒／水を25mL除去した。反応混合物を30℃に冷却し、続いてｐ－ニトロフェニルクロロホルメート120mg（0.6mmol）およびピリジン50mg（0.6mmol）を添加した。この混合物を45℃において２時間撹拌し、続いて室温で一晩撹拌した。

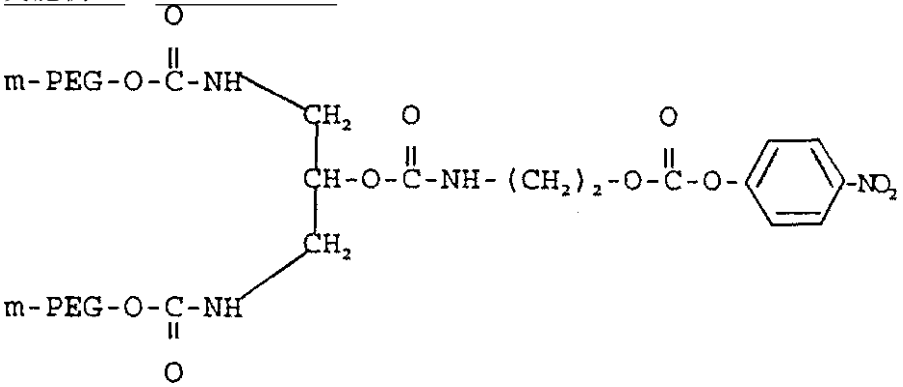
反応混合物をCELITE（登録商標）を通して濾過し、続いて真空蒸留によって濾液から溶媒を除去した。残渣を２－プロパノールから再結晶し、生成物4.2gを得た（収率81%）。

実施例３－US－PEG



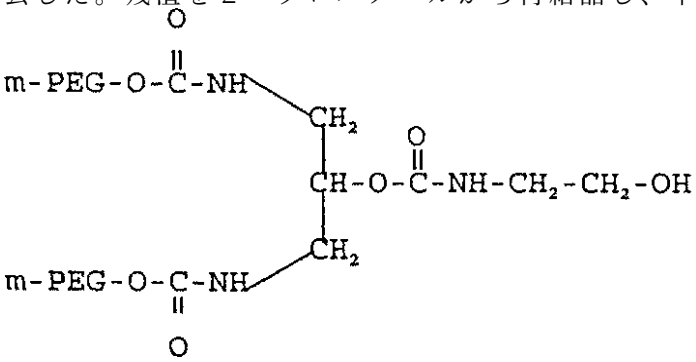
この実施例においては、U－PEGのスクシンイミジルカーボネートエステルを形成させるために、実施例２のU－PNP－PEGにN－ヒドロキシスクシンイミドを反応させた。メチレンクロライド40ml中U－PNP－PEG5.0g（0.5mmol）、N－ヒドロキシスクシンイミド0.6g（5mmol）およびジイソプロピルエチルアミン0.13g（1mmol）を含有する溶液を18時間還流した。その後、真空蒸留によって溶媒を除去し、残渣を２－プロパノールから再結晶し、スクシンイミジルカーボネート4.2gを得た（収率82%）。

実施例４－NU－PNP－PEG

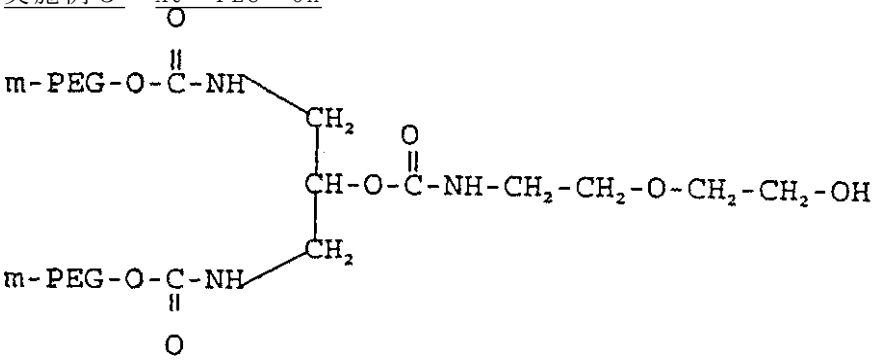


U－PNP－PEG（実施例２）にエタノールアミンを反応させ、続いてｐ－ニトロフェニルク

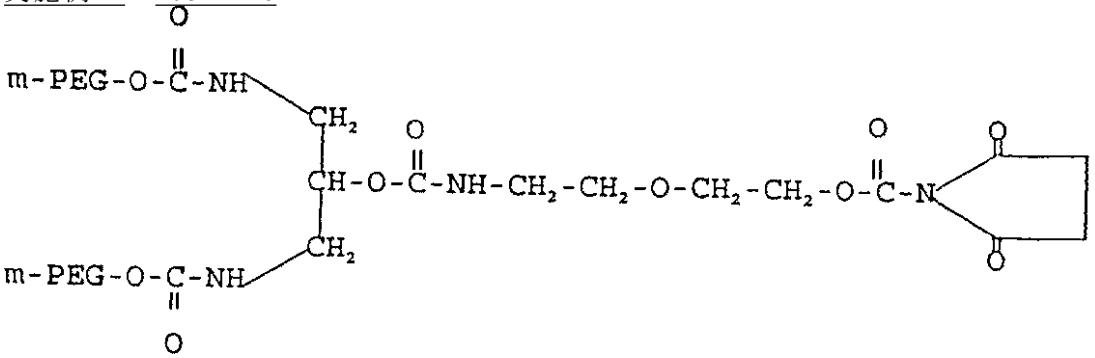
ロロホルメートを反応させることによって、この上記の分枝ポリマーを製造した。
メチレンクロライド40ml中Ｕ－PNP－PEG5.0g（0.5mmol）を含有する溶液にエタノールアミン60mg（1mmol）を混合し、室温で一晩撹拌した。その後、真空蒸留によって溶媒を除去した。残渣を２－プロパノールから再結晶し、下記の中間体4.3gを得た（収率84%）。



上記の中間体にｐ－ニトロフェニルクロロホルメートを反応させることによって、NU－PEG－OHを製造した。この中間体2.0g（0.2mmol）をトルエン40mL中で２時間還流させることによって共沸乾燥し、溶媒／水を25mL除去した。実施例２の操作にしたがって、反応混合物を冷却し、続いてｐ－ニトロフェニルクロロホルメート0.3mmolおよびピリジン0.3mmolを添加した。この混合物を45℃において２時間撹拌し、続いて室温で一晩撹拌した。
実施例２の操作によってNU－PEG－OHもまた回収され、1.5gが得られた（収率71%）。
実施例５－XU－PEG－OH

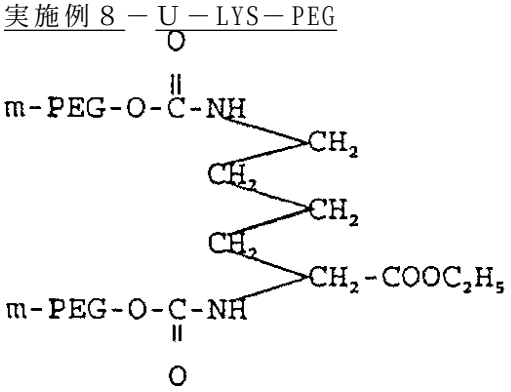


実施例４に記載した操作にしたがって、実施例２のＵ－PNP－PEGに２－（２－アミノエトキシ）エタノールを反応させることによって、この分枝ポリマーを製造した（すなわち、アミノアルコールがｐ－ニトロフェニルカーボネートと反応した）。再結晶生成物の収率は86%であった。
実施例６－XU－PNP－PEG
実施例２および４と同様にして、実施例５の化合物をｐ－ニトロフェニルカーボネートで官能基化した。再結晶生成物の収率は83%であった。
実施例７－XUS－PEG



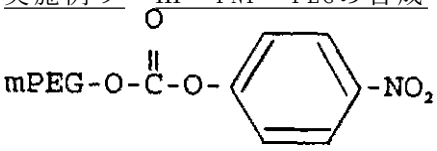
この実施例においては、実施例３に記載した操作にしたがって、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドを実施例６のｐ－ニトロフェニルカーボネート誘導体に反応させることによって、実施例５において製造した化合物のスクシンイミジルカーボネート誘導体を製造した。回収生成物の収率は84%であった。

実施例８－Ｕ－LYS－PEG



Ｕ－PNP－PEGにリジンエチルエステルを反応させることによって、上記の分枝ポリマーを製造した。特定すると、このポリマー5.0g（1.0mmol）、リジンジヒドロクロライド150mg（0.6mmol）およびピリジン140mg（1.8mmol）の混合物を18時間還流した。真空蒸留によって溶媒を除去した。残渣を２－プロパノールから再結晶し、生成物4.5gを得た（収率88％）。

実施例９－ｍ－PNP－PEGの合成



ｍ－PEG－OH（分子量5000）50g（0.01mol）のトルエン500mL中溶液を２時間共沸させ、その間トルエン／水を100mL除去した。反応混合物を30℃に冷却し、続いてｐ－ニトロフェニルクロロホルメート2.6g（0.013mol）およびピリジン1.0ml（0.013mol）を添加した。この混合物を45℃において２時間撹拌し、続いて室温で一晩撹拌した。

反応混合物をCELITE（登録商標）を通して濾過し、続いて真空蒸留によって溶媒を除去した。残渣を２－プロパノールから再結晶し、生成物48.2gを得た（収率93％）。

実施例10および11

Centricon－10（Amicon Corporation,Beverly,MA）を使用して、エリトロポイエチン（EPO）3.0mgの２つの試料（ヒト組換えチャイニーズハムスター卵胞（CHO）細胞培養物）を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0中に透析して、EPOとUS－PEG（実施例３）の複合体を製造した。第１のEPO溶液はUS－PEG1.954mg（２倍モル過剰）と混合し、第２のEPO溶液はUS－PEG3.908mg（４倍モル過剰）と混合した。反応混合物を室温（約22～25℃）で１時間撹拌した。過剰のポリマーを遠心分離によって除去し、反応混合物を10mMリン酸緩衝液、pH8.0中に透析した。イオン交換カラム（２－HDカラム、Sepracor）上で未反応のEPOを除去した。SDS－PAGE分析により、どちらの反応混合物においても、各タンパク質分子当たり２～３の分枝ポリマーが共有結合していることが確認された。DA1－Ｋ細胞、IL－３依存性マウスリンパ芽球細胞系、GM－CSFおよびEPOを使用して、増殖に関する複合体のEPO活性を比色分析した。細胞を５％FCS含有IMDM中で増殖させ、５％CO_2空気中、37℃でインキュベートした。分析時間は72時間で、MTT色素吸尽によって増殖をモニターした。分析において、どちらの複合体試料も非複合体化EPOの活性の40～50％を保持していた。

実施例12および13

腫瘍壊死因子（TNF）を実施例７のXUS－PEGと複合体化した。比較のため、TNFを線状SC－PEG（米国特許第5,122,614号のメトキシポリ（エチレングリコール）スクシンイミジルカーボネート）とも複合体化した。どちらの複合体も、TNF500mg（2.0mg/mL）を25倍モル過剰のポリマーと反応させることによって製造した。各反応を氷上で140分実施した。

分枝複合体のED_{50}は、0.1μg/mLの希釈物によって作成した濃度－応答曲線によると0.29ng/mLであり、0.01μg/mLの希釈物によって作成した濃度－応答曲線によると0.625ng/mLであった。非修飾TNFのED_{50}は0.01～0.02ng/mLであった。線状スクシンイミジルカーボネート複合体のED_{50}は８から19ng/mLの範囲であった。

in vitroでの腫瘍化および毒性のデータによると、非分枝複合体よりも分枝ポリマーの方がより細胞毒性があることが示された。
ここに、現在のところ本発明の好ましい実施態様であると確信するものを記載したが、当業者は本発明の精神からはずれることなく変形や改変がなされることを認識するはずである。それらの変形や改変のすべてが本発明の範囲に入るものとして請求の範囲とするものである。

フロントページの続き

(72)発明者　マーチネズ，アンソニー
アメリカ合衆国　０８６９０　ニュージャージー州　ハミルトン　スクエア，ウェイバーン　ロード　２０番地

審査官　鈴木　恵理子

(56)参考文献　特開平０４－１０８８２７（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０５０９１５４２（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C07K 17/08
C08F283/00 ～ 06
A61K 47/48