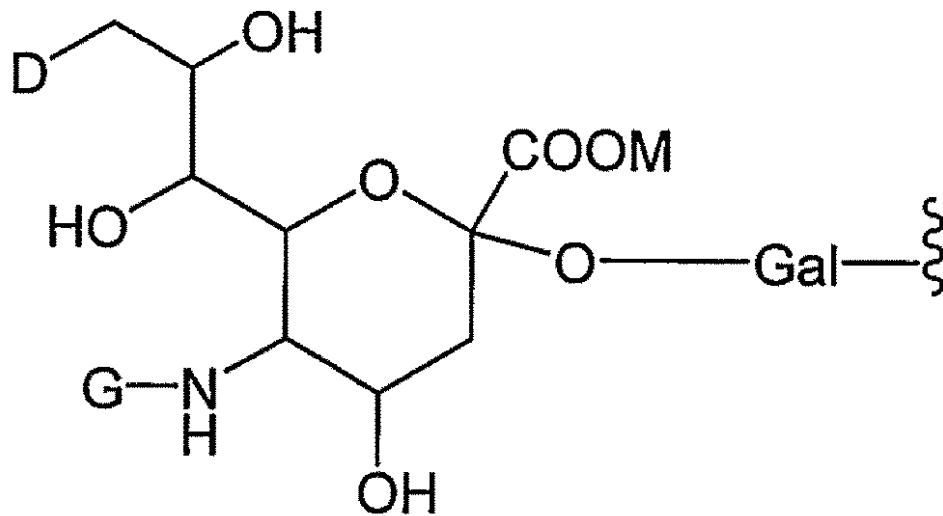


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式、

【化 1】



(式中、

Dは、 $-OH$ および $R^1-L-HN-$ から選択されるメンバーであり、

Gは、 R^1-L- および $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル $-R^1$ から選択されるメンバーであり、

R^1 は、直鎖ポリ(エチレングリコール)残基および分岐ポリ(エチレングリコール)残基から選択されるメンバーを含む部分であり、および

Mは、H、金属および単一の陰電荷から選択されるメンバーであり、

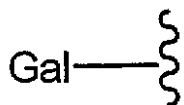
Lは、結合、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるメンバーであるリンカーであり、

ここで、DがOHであるときGは R^1-L- であり、およびGが $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルであるときDは $R^1-L-NH-$ である)

を有する修飾シアル残基を含むグリコシルリンカーを含む因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体の製造方法であって、

(a) グリコシル部分、

【化 2】



を含む因子V I I / 因子V I I a ペプチドを、
式、

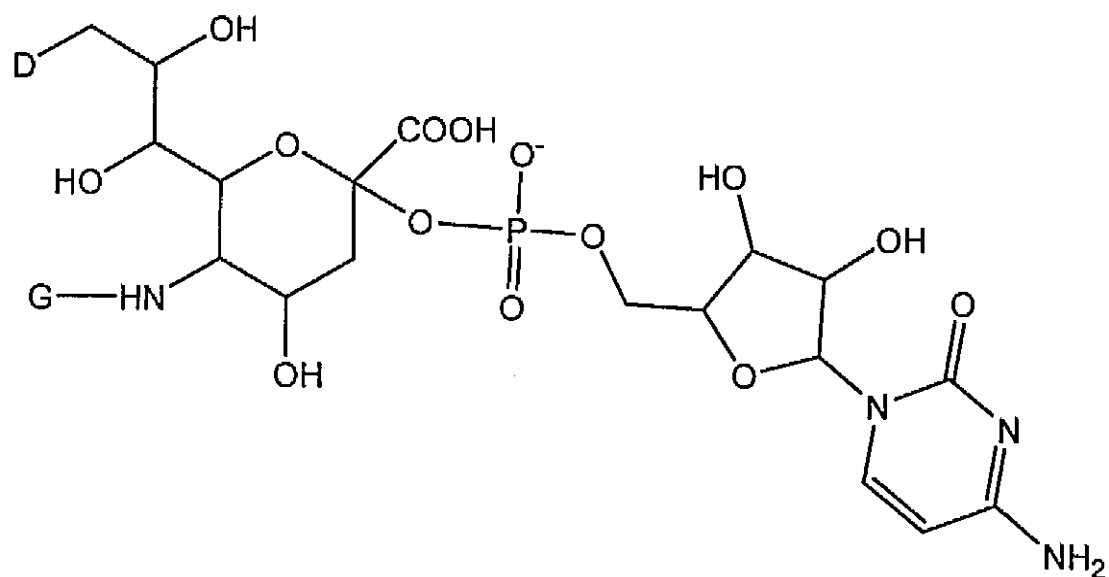
10

20

30

40

【化 3】



10

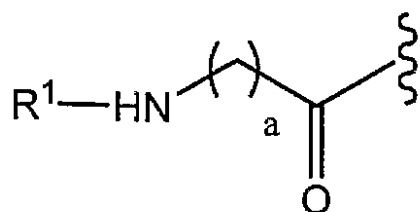
20

を有する P E G - シアル酸ドナー部分と、
前記 P E G - シアル酸を前記グリコシル部分の G a l へ転移させる酵素に、前記転移に適切な条件で接触させるステップを含む、方法。

【請求項 2】

L - R¹ が、式、

【化 4】



30

(式中、

a は、0 ~ 20 から選択される整数である)

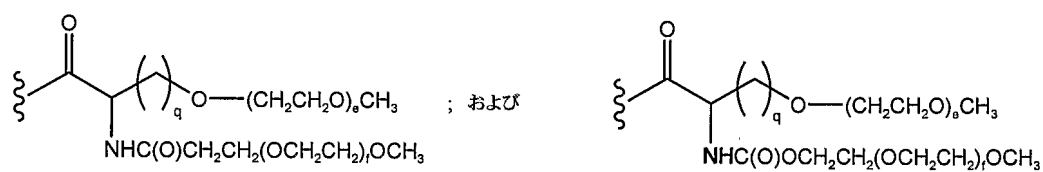
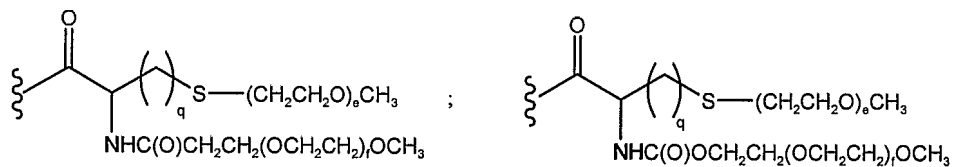
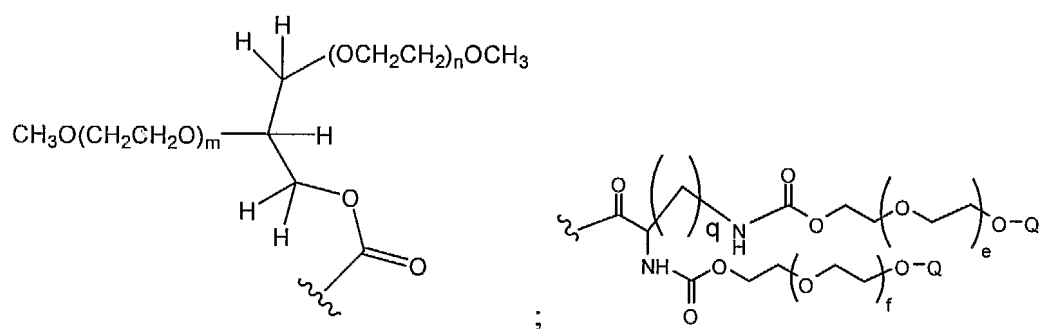
を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

R¹ が、

40

【化 5】



(式中、

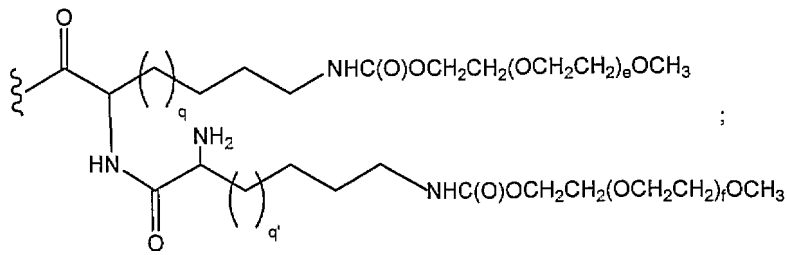
e、f、mおよびnは、1～2500から独立して選択される整数であり、および
qは、0～20から選択される整数である)

から選択されるメンバーである構造を有する、請求項1に記載の方法。

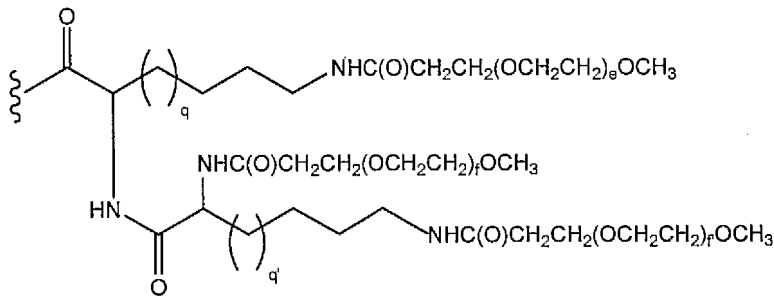
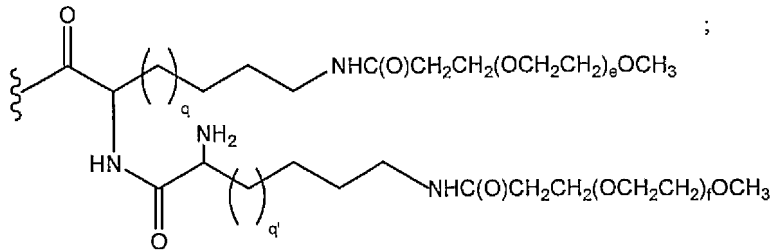
【請求項4】

R¹が、

【化 6】

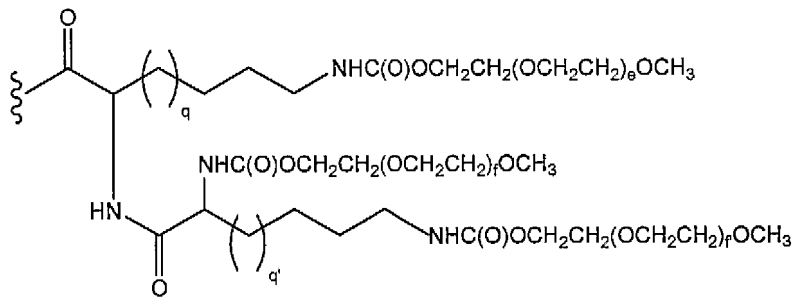


10



20

; および



30

(式中、

e、f および f' は、1～2500 から独立して選択される整数であり、および

q および q' は、1～20 から独立して選択される整数である)

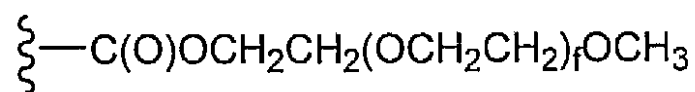
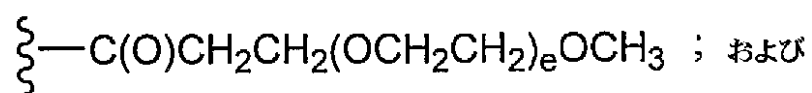
40

から選択されるメンバーである構造を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

R¹ が、

【化 7】



10

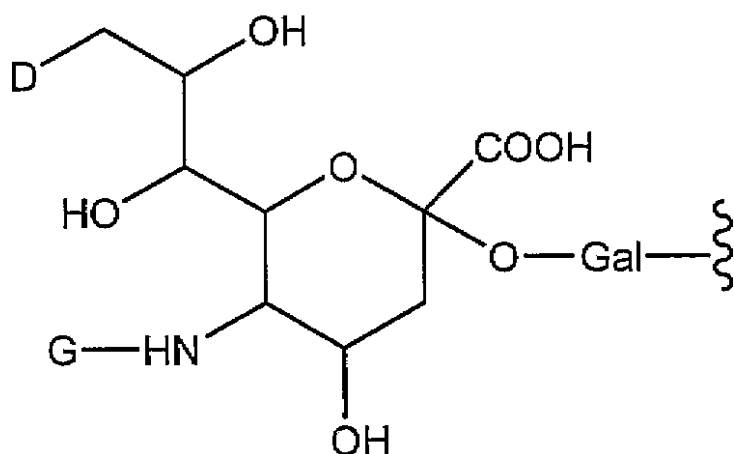
(式中、

e および f は、1 ～ 2 5 0 0 から独立して選択される整数である)
から選択されるメンバーである構造を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記グリコシルリンカーが、式、

【化 8】



20

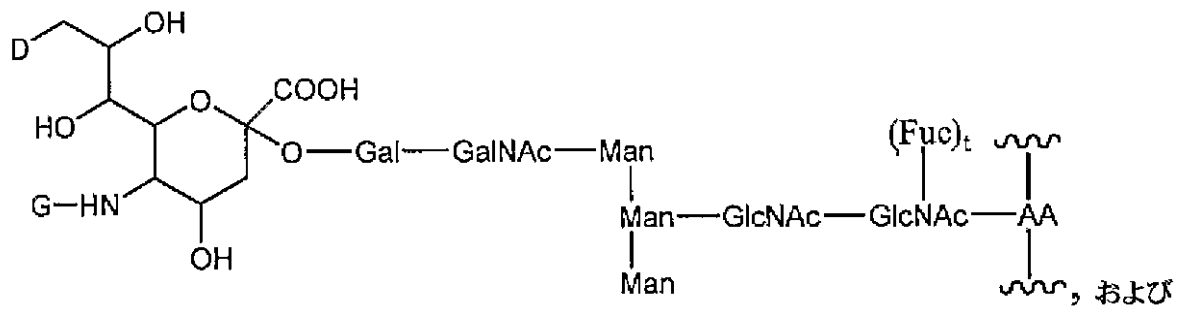
30

を有する、請求項 1 に記載の方法。

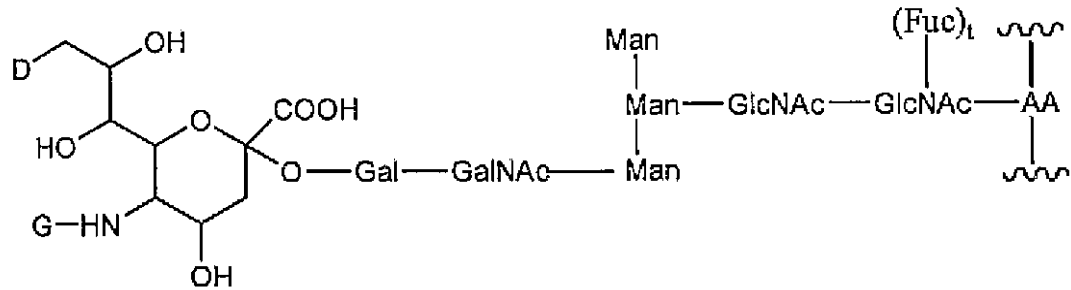
【請求項 7】

前記ペプチド複合体が、

【化 9】



10



20

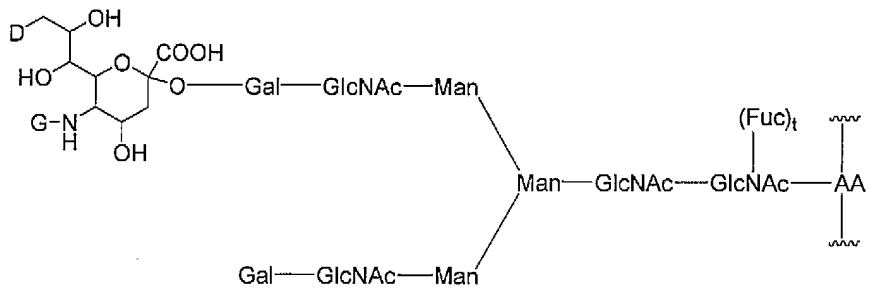
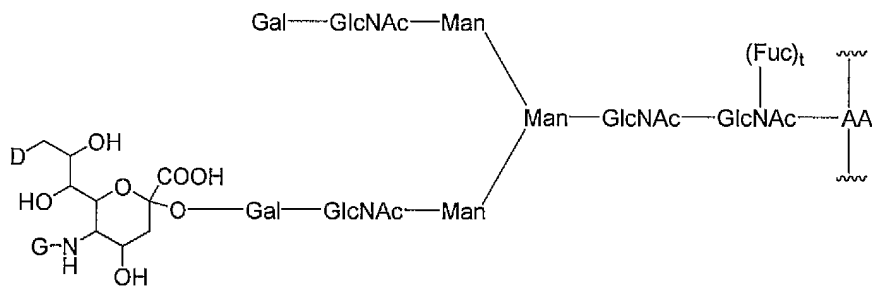
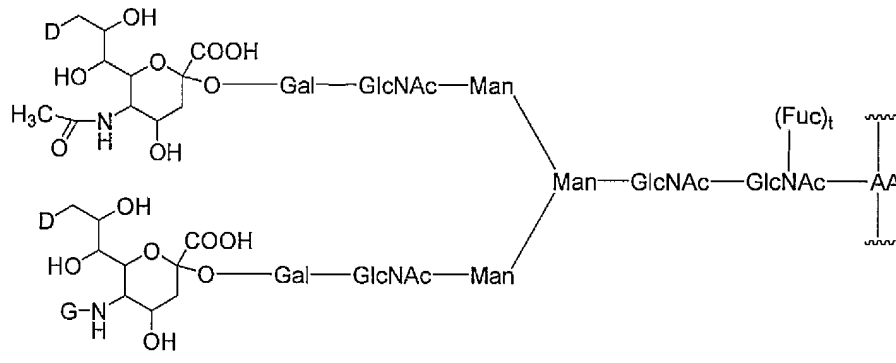
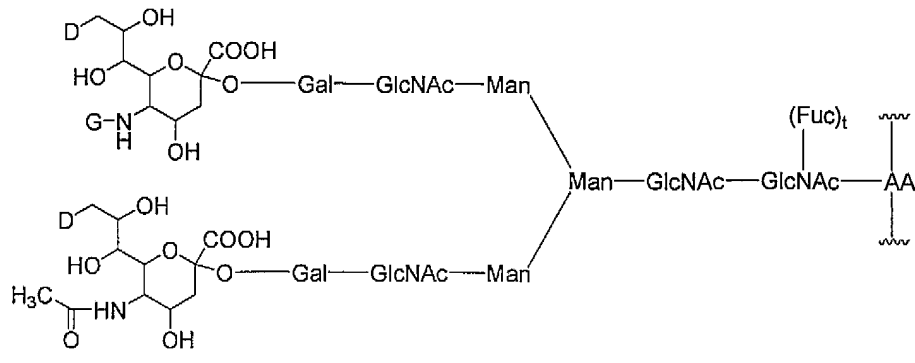
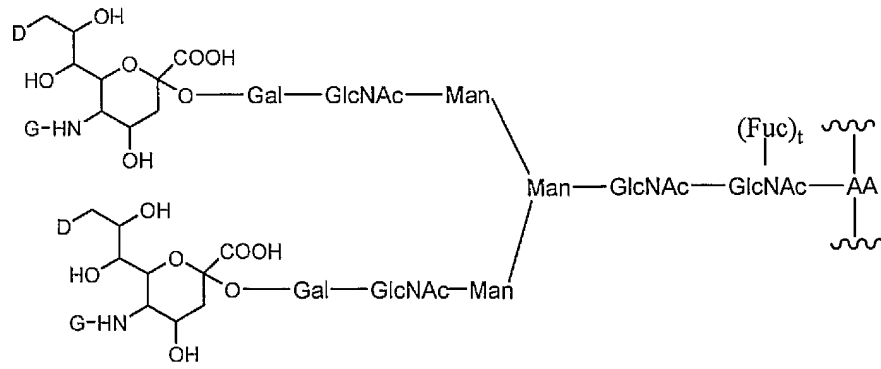
(式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数である)

から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記ペプチド複合体が、少なくとも1つの前記グリコシルリンカーを含み、ここで、前記グリコシルリンカーの各々は、以下の式、

【化 10】



(式中、A Aは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から

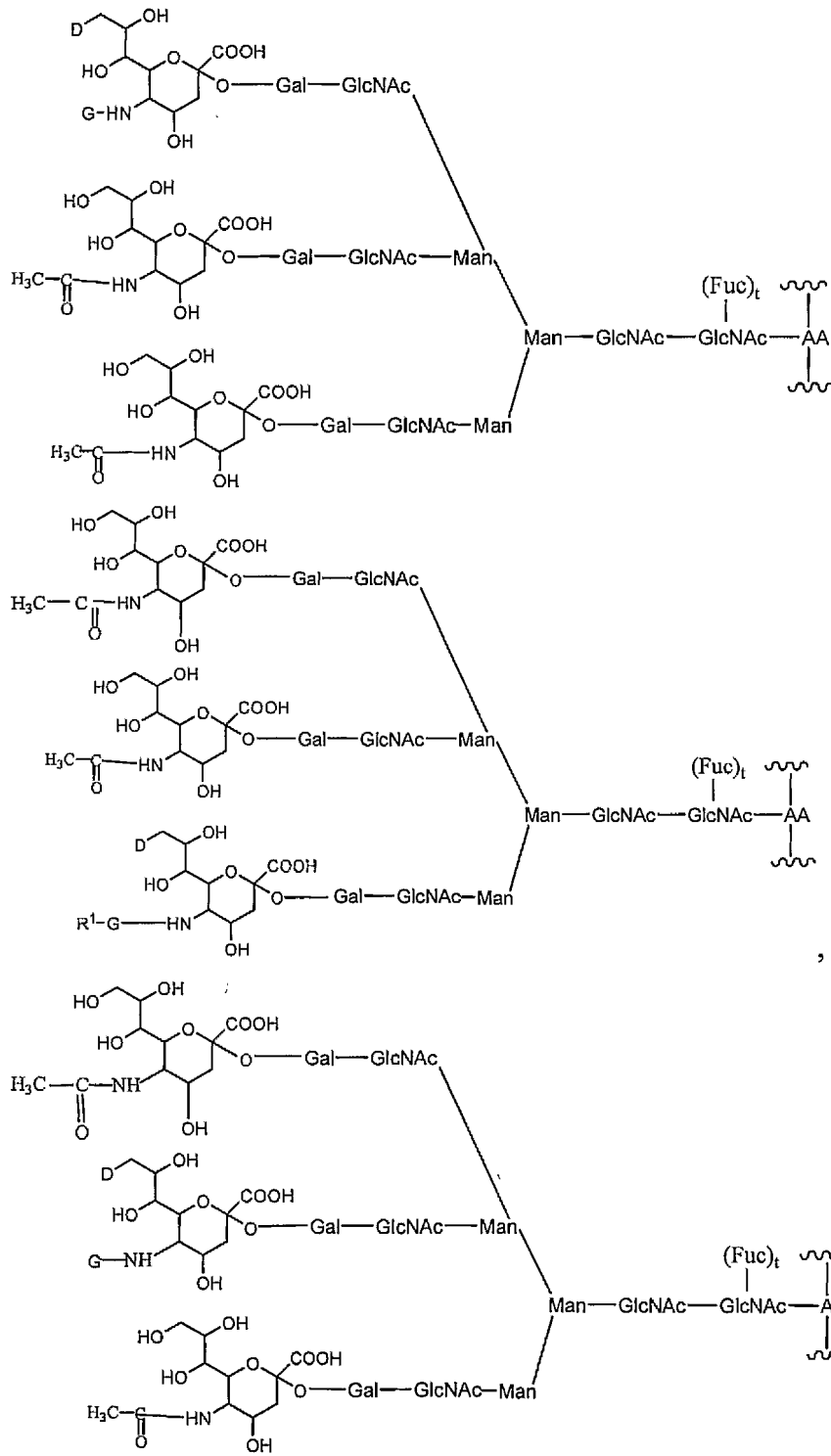
選択される整数である)

から独立して選択されるメンバーである構造を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ペプチド複合体が、

【化 1 1】



10

20

30

40

10



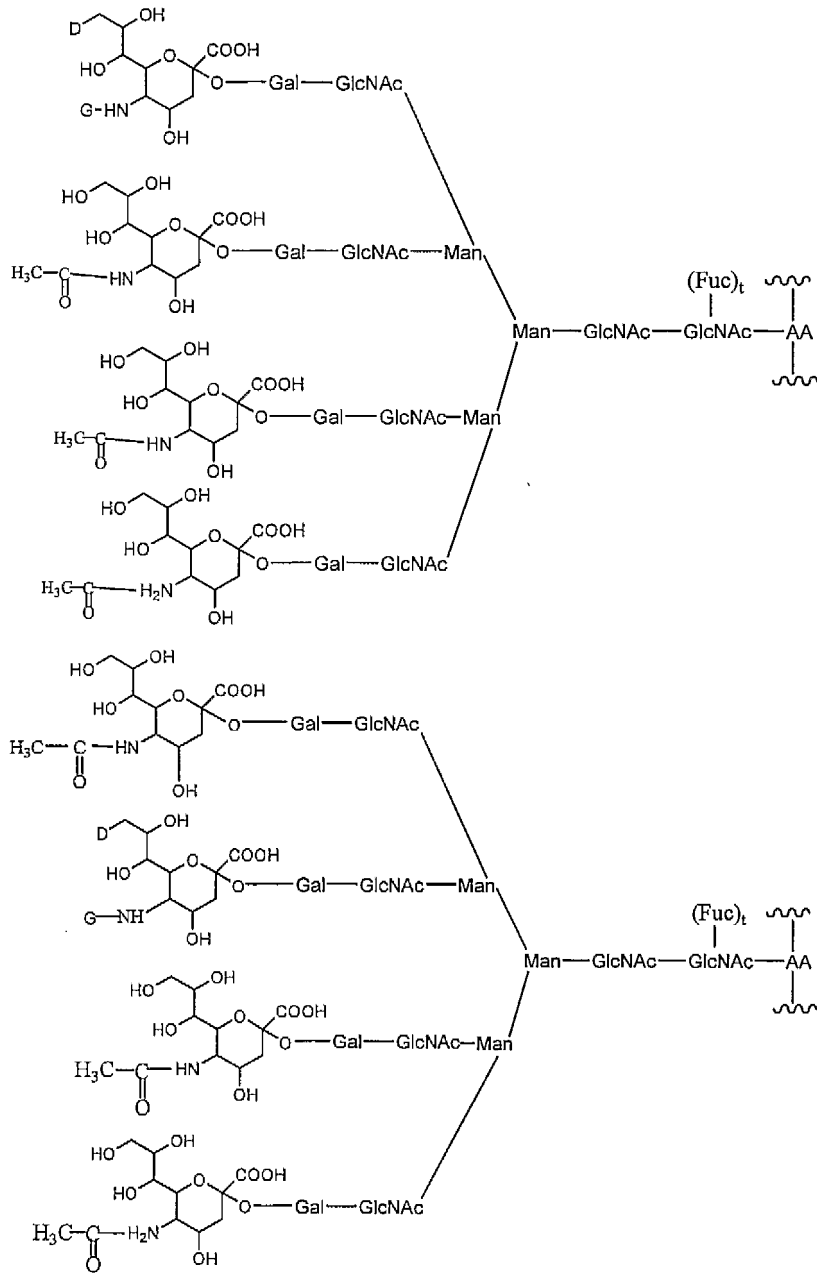
50

から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも１つを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１０】

前記ペプチド複合体が、

【化１３】



10

20

30

40

The figure displays two sets of chemical structures for oligosaccharides. The top set (1-5) shows branched oligosaccharides with a central mannose core. The bottom set (6-10) shows linear oligosaccharides. The structures are labeled with their respective sugar units and chemical structures.

Top Set (1-5):

- 1:** A branched oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 2:** A branched oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 3:** A branched oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 4:** A branched oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 5:** A branched oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.

Bottom Set (6-10):

- 6:** A linear oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 7:** A linear oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 8:** A linear oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 9:** A linear oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.
- 10:** A linear oligosaccharide with a central mannose core. The branches are: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$, and $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GlcNAc}$.

式中、Gを含まないシアリル部分の0および2つから選択されるメンバーがない)
から選択される式に基づく少なくとも1つの前記グリコシルリンカーを含む、請求項1に
記載の方法。

前記因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

前記グリコシルリンカーが、前記因子VII／因子VIIaペプチドに、セリンおよびスレオニンから選択されるアミノ酸残基を介して結合している、請求項1に記載の方法。

前記グリコシルリンカーが、前記因子V I I / 因子V I I a ペプチドに、アスパラギン

残基であるアミノ酸残基を介して結合されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記アスパラギン残基が、N 1 5 2、N 3 2 2 およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記因子 V I I a ペプチドが生理活性因子 V I I a ペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ステップ (a) の前に、

(b) 前記因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを好適な宿主において発現させるステップ
をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 1 7】

前記宿主が哺乳類発現系である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

それを必要とする対象における状態を処置する方法であって、前記状態は前記対象における易感染性凝固効力により特徴付けられ、前記対象における前記状態の回復に有効な量の、請求項 1 に記載の方法により產生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を対象に投与するステップを含む、方法。

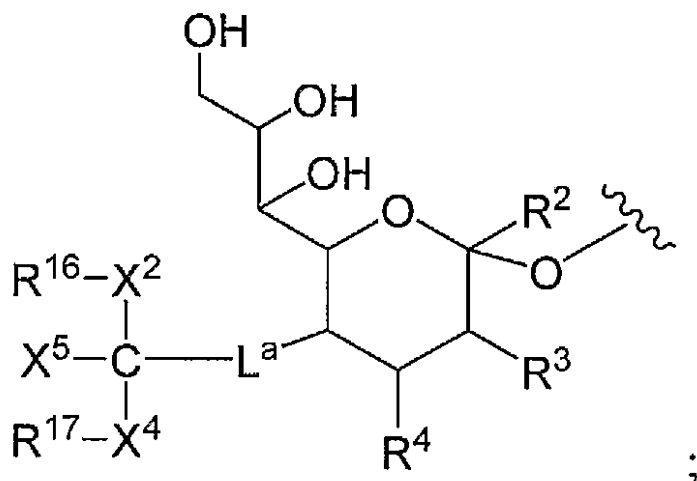
【請求項 1 9】

ある量の、請求項 1 に記載の方法により產生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を前記哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物における凝固効力を増強させる方法。 20

【請求項 2 0】

式、

【化 1 5】



;

(式中、

R^2 は H、 CH_2OR^7 、 $COOR^7$ または OR^7 であり、

式中、

R^7 は、H、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキルを表し、

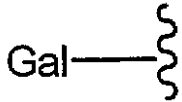
R^3 および R^4 は、H、置換または非置換アルキル、 OR^8 、 $NHC(O)R^9$ から独立して選択されるメンバーであり、

式中、

R^8 および R^9 は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルまたはシアル酸から独立して選択され、 50

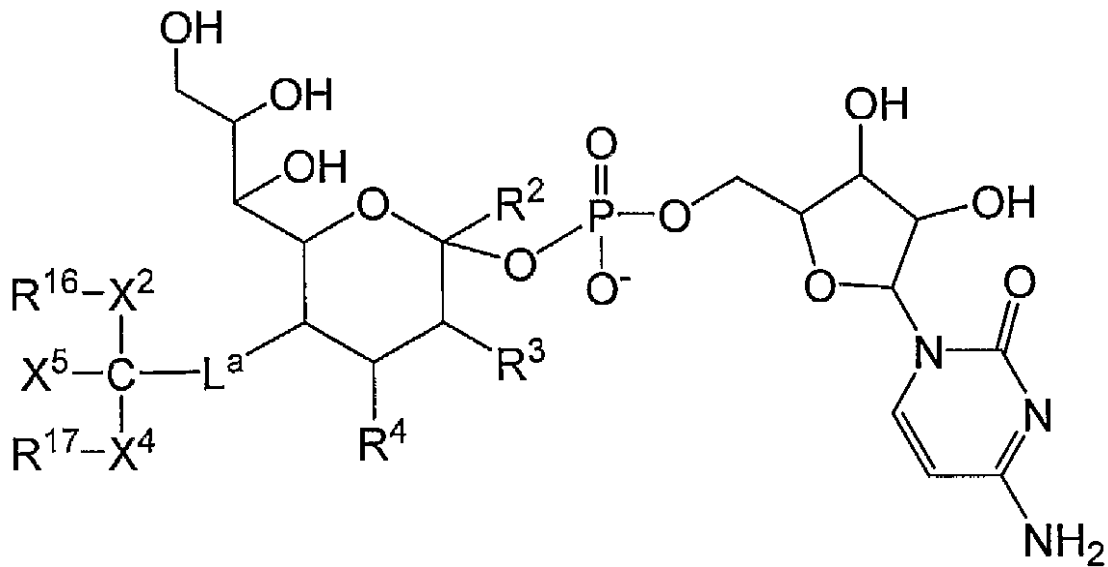
R^{16} および R^{17} は、独立して選択される高分子アームであり、
 X^2 および X^4 は、高分子部分 R^{16} および R^{17} を C に結合する、独立して選択されるリンケージ断片であり、
 X^5 は非反応性基であり、および
 L^a はリンカー基である)
 を有する修飾シアリル残基を含むグリコシルリンカーを含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の製造方法であって、
 (a) グリコシル部分、
 【化 1 6】

10



を含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを、
 式、
 【化 1 7】

20

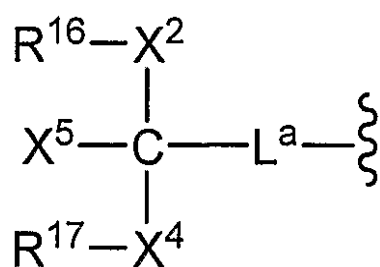


30

を有する P E G - シアル酸ドナー部分と、
 P E G - シアル酸を前記グリコシル部分の G a l へ転移させる酵素に、前記転移に適切な条件で接触させるステップを含む、方法。
 【請求項 2 1】
 部分、

40

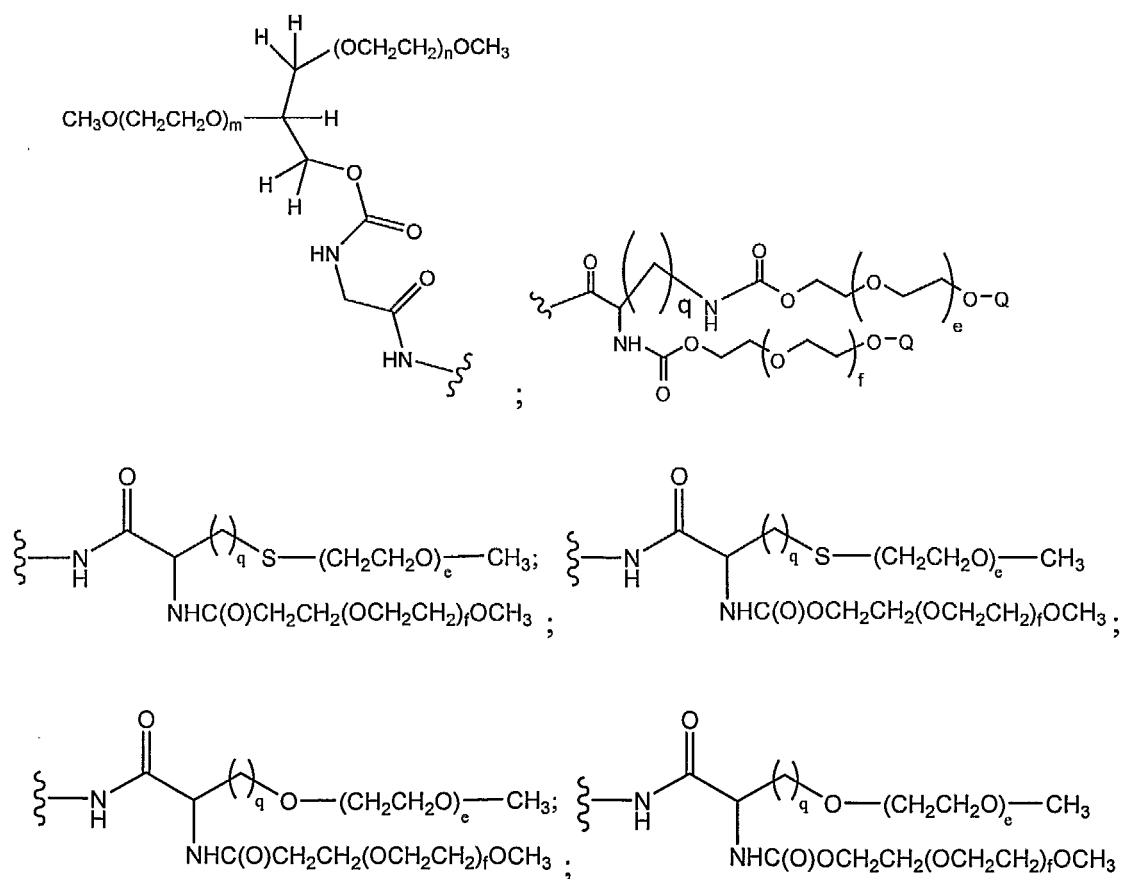
【化 1 8】



10

が、

【化 1 9】



20

30

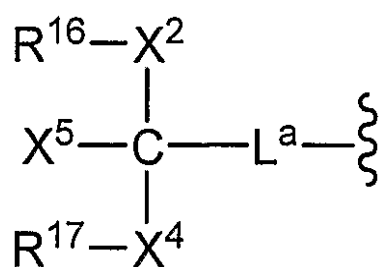
40

(式中、
e、f、mおよびnは、1～2500から独立して選択される整数であり、および
qは、0～20から選択される整数である)
から選択されるメンバーである式を有する、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

部分、

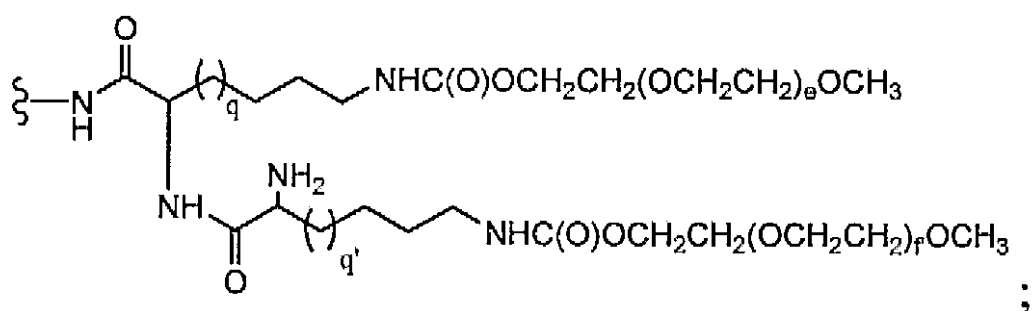
【化 2 0】



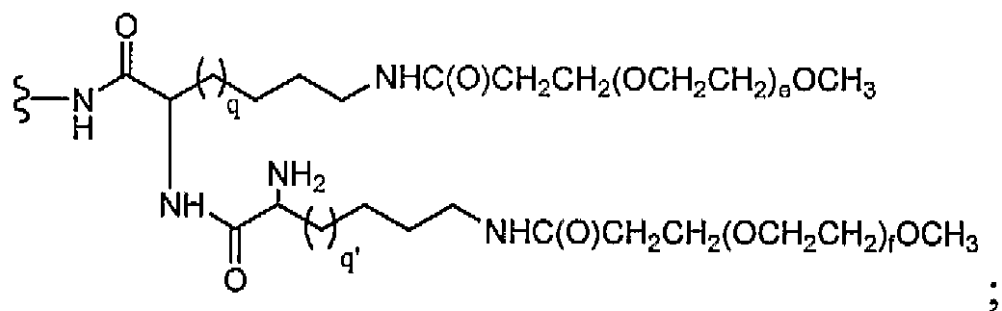
10

が、

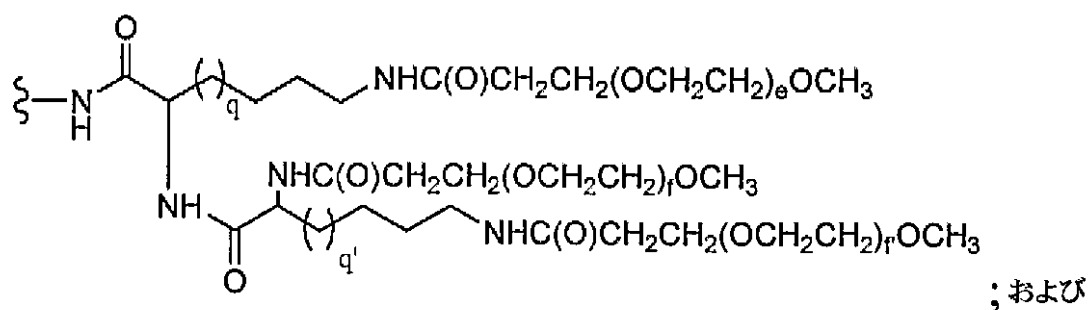
【化 2 1】



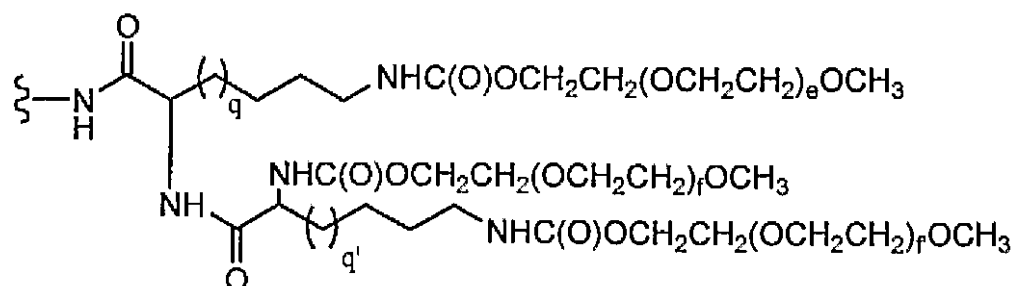
20



30



40



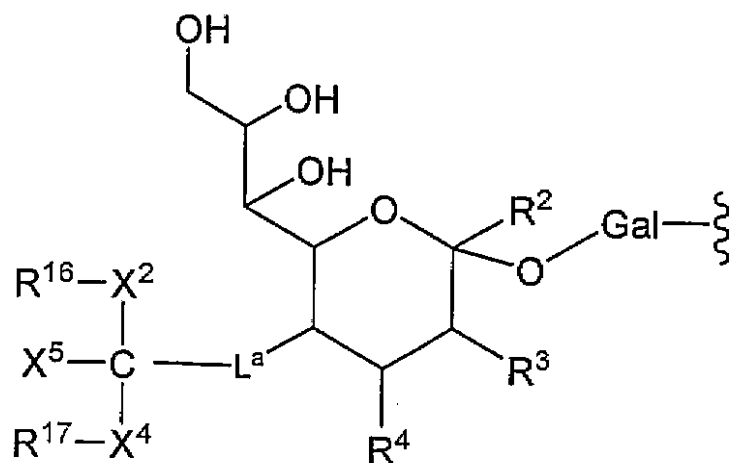
50

(式中、
 e、f および f' は、1～2500 から独立して選択される整数であり、および
 q および q' は、1～20 から独立して選択される整数である)
 から選択されるメンバーである式を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記グリコシルリンカーが式、

【化 22】



10

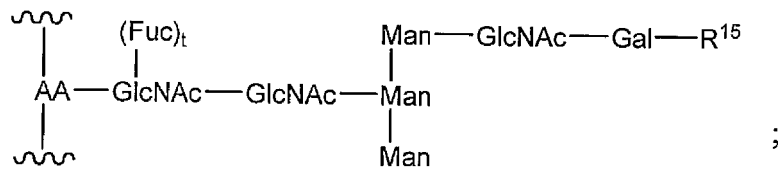
20

を含む、請求項 20 に記載の方法。

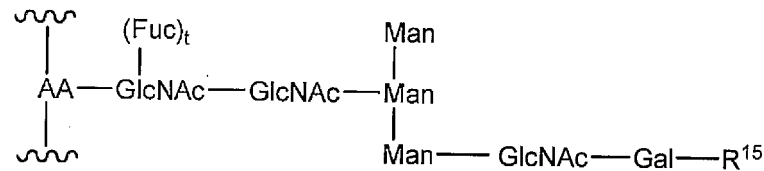
【請求項 24】

因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体が式、

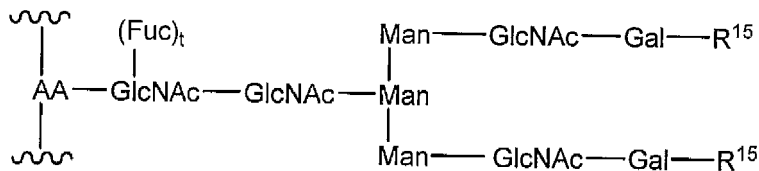
【化 2 3】



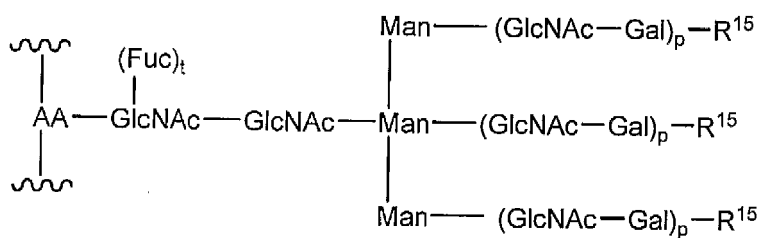
;



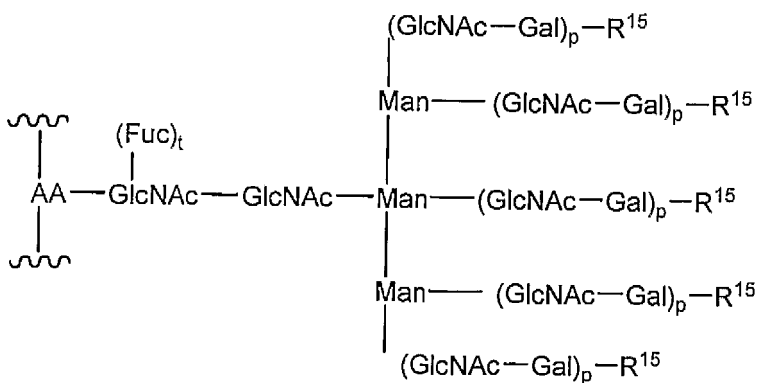
;



;



; および



(式中、

A A は、前記ペプチドのアミノ酸残基であり、

t は、0 および 1 から選択される整数であり、および

R¹⁵ は修飾シアリル部分である)

を有する少なくとも 1 つのグリコシルリンカーを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

前記因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 26】

前記グリコシルリンカーが、前記因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドに、アスパラギン残基であるアミノ酸残基を介して結合されている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 27】

10

20

30

40

50

前記アスパラギン残基が、N 1 5 2、N 3 2 2 およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記因子 V I I a ペプチドが生理活性因子 V I I a ペプチドである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 9】

ステップ (a) の前に、

(b) 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを好適な宿主において発現させるステップをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記宿主が哺乳類発現系である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

それを必要とする対象における状態を処置する方法であって、前記状態は前記対象における易感染性凝固効力により特徴付けられ、前記対象における前記状態の回復に有効な量の、請求項 2 0 に記載の方法により産生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 3 2】

ある量の、請求項 2 0 に記載の方法により産生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を前記哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物における凝固効力を増強させる方法。

【請求項 3 3】

a) シアリダーゼ、

b) グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選択されるメンバーである酵素、

c) 修飾糖質 / 修飾シアリル残基、

d) 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド

を組み合わせ、前記因子 V I I または因子 V I I a ペプチド複合体を合成するステップを含む、因子 V I I または因子 V I I a ペプチド複合体の合成方法。

【請求項 3 4】

前記組み合わせるステップが、10 時間未満の時間である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

キャッピングステップをさらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、すべて目的についてそれらの全体が参照により援用される、2006 年 5 月 9 日出願の米国仮特許出願第 60 / 7 4 6 , 8 6 8 号明細書; 2006 年 1 月 5 日出願の同第 60 / 7 5 6 , 4 4 3 号明細書; 2005 年 1 1 月 4 日出願の同第 60 / 7 3 3 , 6 4 9 号明細書; 2005 年 1 0 月 2 6 日出願の同第 60 / 7 3 0 , 6 0 7 号明細書; 2005 年 1 0 月 1 1 日出願の同第 60 / 7 2 5 , 8 9 4 号明細書; 2005 年 8 月 1 9 日出願の同第 60 / 7 0 9 , 9 8 3 号明細書に関連する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0002】

発明の概要

1 つ以上のポリ (エチレングリコール) 部分を有する因子 V I I または因子 V I I a の制御された修飾は、関連する未変性 (未ペグ化) 因子 V I I または因子 V I I a と比して向上した薬物動態学的特性を有する新規な因子 V I I または因子 V I I a ペプチド複合体をもたらすことが今では発見されている。さらに、本発明の因子 V I I または因子 V I I

10

20

30

40

50

a ペプチド複合体の産生の、信頼性があると共に再現性のある経済的な方法が発見され、および開発された。

【0003】

例示的な実施形態において、本発明の「グリコペグ化」因子V I Iまたは因子V I I a分子は、グリコシル化または非グリコシル化因子V I Iまたは因子V I I a ペプチドと、ポリ（エチレングリコール）などの高分子修飾基などの修飾基をその構造内に含む酵素的に転移可能な糖部分との複合体の酵素媒介形成により産生される。P E G部分は、糖部分に、直接的に（すなわち、2つの反応性基の反応によって形成された単一の基を介して）または例えば、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル等といったリンカー部分を介して結合される。

10

【0004】

それ故、一態様において、本発明は、例えばP E GといったP E G部分と、技術分野において認識されている因子V I Iまたは因子V I I aに同様の、またはそうでなければ類似のインビボ活性を有するペプチドとの複合体を提供する。本発明の複合体において、P E G部分は、共有結合的にペプチドに、無処置グリコシルリンク基を介して結合している。例示的な無処置グリコシルリンク基としては、P E Gと共に誘導されるシアル酸部分が挙げられる。

【0005】

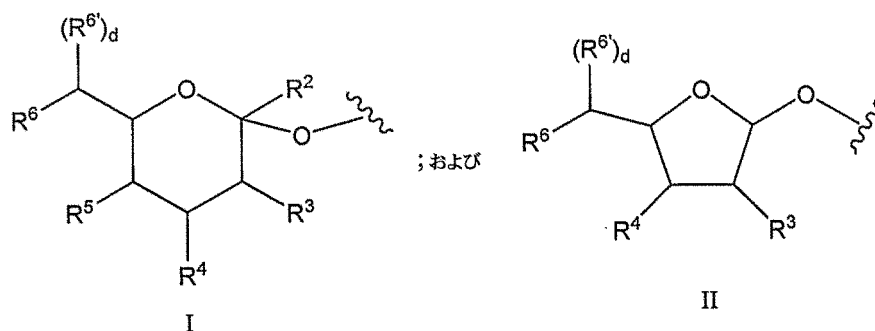
高分子修飾基は、因子V I Iまたは因子V I I aのグリコシル部分のいずれかの位置に結合されていることが可能である。しかも、高分子修飾基は、グリコシル残基に、野生種または変異因子V I Iまたは因子V I I a ペプチドのアミノ酸配列におけるいずれかの位置で結合されていることが可能である。

20

【0006】

例示的な実施形態において、本発明は、グリコシルリンク基を介して高分子修飾基に複合化された因子V I Iまたは因子V I I a ペプチドを提供する。例示的な因子V I Iまたは因子V I I a ペプチド複合体としては、

【化1】



30

から選択される式を有するグリコシルリンク基が挙げられる。

40

【0007】

式IおよびIIにおいて、R²はH、CH₂OR⁷、COOR⁷、COO⁻またはOR⁷であり、ここで、R⁷は、H、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキルを表す。符号R³、R⁴、R⁵、R⁶およびR^{6'}は、独立してH、置換または非置換アルキル、OR⁸、NHC(O)R⁹を表す。指数dは、0または1である。R⁸およびR⁹は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルまたはシアル酸から独立して選択される。R³、R⁴、R⁵、R⁶またはR^{6'}の少なくとも1つが、例えばP E Gといった高分子修飾基を含む。例示的な実施形態において、R⁶およびR^{6'}は、これらが結合している炭素と一緒に、シアルル部分の側鎖の構成成分である。さらなる例示的な実施形態において、この側鎖は、高分子修飾基で官能基化されてい

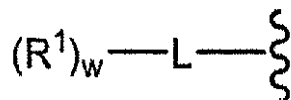
50

る。

【0008】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、一般的には、以下に示されるリンカー、Lを介して、

【化2】



10

(R^1 は高分子修飾基であり、およびLは、結合およびリンク基から選択される)、グリコシルコア上のヘテロ原子(例えばN、O)を介してグリコシルリンク基に結合している。指数wは、1~6、好ましくは1~3およびより好ましくは1~2から選択される整数を表す。例示的なリンク基としては、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル部分およびシアル酸が挙げられる。リンカーの例示的な成分は、アシル部分である。他の例示的なリンク基は、アミノ酸残基(例えば、システイン、セリン、リシン、および短鎖オリゴペプチド、例えば、Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Cys-Lys、Ser-Lys等)である。

20

【0009】

Lが結合である場合、これは、 R^1 の前駆体上の反応性官能基と、グリコシルリンク基の前駆体上の補完的な反応性の反応性官能基との反応により形成される。Lが非ゼロ次のリンク基である場合、Lは、 R^1 前駆体との反応前に、グリコシル部分上にあることが可能である。あるいは、 R^1 およびLの前駆体は、その後グリコシル部分に結合される予め形成されたカセットに組み込まれることが可能である。本願明細書において規定されている通り、適切な反応性官能基を有する前駆体の選択および調製は、当業者の能力の範囲内である。しかも、前駆体のカップリングは、技術分野においてよく理解されている化学によって進行する。

【0010】

30

例示的な実施形態において、Lは、アミノ酸、または小型ペプチド(例えば、1~4個のアミノ酸残基)から、高分子修飾部分が置換アルキルリンカーを介して結合されている修飾糖質を提供することで形成されるリンク基である。例示的なリンカーとしては、グリシン、リシン、セリンおよびシステインが挙げられる。本願明細書において定義されるアミノ酸類似体はまた、リンカー構成成分としての使用のものである。アミノ酸は、アミノ酸残基のアミン部分を介して形成された例えばアミドまたはウレタンといったアシルリンケージを介して、共有結合される例えばアルキル、ヘテロアルキルといったリンカーの追加の成分で修飾され得る。

【0011】

例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、式Iによる構造を有し、および R^5 は高分子修飾基を含む。他の例示的な実施形態において、 R^5 は、高分子修飾基および高分子修飾基をグリコシルコアに結合するリンカー、Lの両方を含む。Lは、直鎖または分岐構造であることが可能である。同様に、高分子修飾基は、分岐または直鎖であることが可能である。

40

【0012】

高分子修飾基は、水溶性または基本的に不水溶性であることが可能である2つ以上の反復単位を含む。本発明の化合物において用いられる例示的な水溶性ポリマーとしては、PEG、例えば、m-PEG、PPG、例えば、m-PPG、ポリシアル酸、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、生分解性ポリマー(例えば、ポリラクチド、ポリグリセリド)、および官能基化PEG、例えば、末端-官能基化

50

P E Gが挙げられる。

【0013】

因子V I Iまたは因子V I I aペプチド複合体において用いられるグリコシルリンク基のグリコシルコアは、天然および非天然フラノースおよびピラノースの両方から選択される。非天然サッカライドは、任意により、アルキル化またはアシル化ヒドロキシルおよび／またはアミン部分、例えば、環上のエーテル、エステルおよびアミド置換基を含む。他の非天然サッカライドは、H、ヒドロキシル、エーテル、エステルまたはアミド置換基を、天然サッカライドには置換基が存在しないような環状の位置に含む。あるいは、炭水化物は、例えばデオキシ糖質といったその名前が由来する炭水化物に見出されるであろう置換基に欠いている。また、さらなる例示的な非天然糖質は、酸化（例えば、*-onic*および*-uronic*酸）および還元（糖質アルコール）炭水化物の両方を含む。糖質部分は、モノー、オリゴーまたはポリーサッカライドであることが可能である。

10

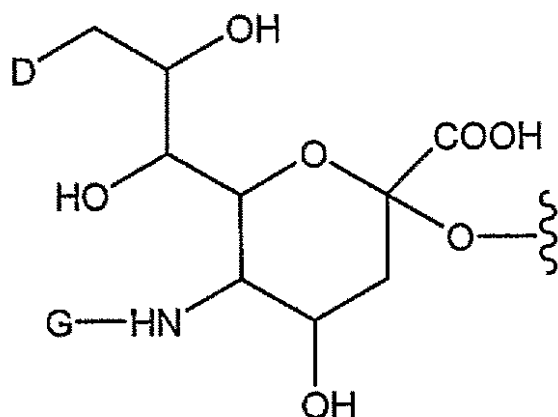
【0014】

本発明においてグリコシルリンク基の構成成分として用いられる例示的な天然糖質としては、グルコース、グルコサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、フコース、マンノース、マンノサミン、キシラノース（*xylosanose*）、リボース、N-アセチルグルコース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、およびシアル酸が挙げられる。

【0015】

一実施形態において、本発明は、部分、
【化3】

20



30

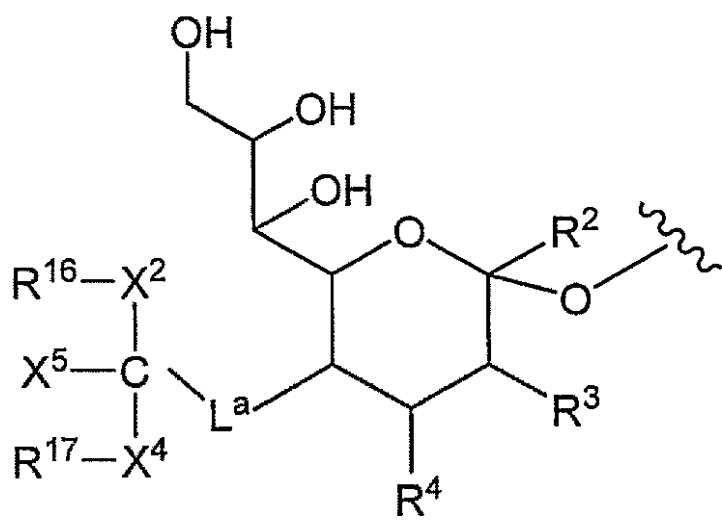
を含む因子V I Iまたは因子V I I aペプチド複合体を提供し、式中、Dは、*-OH*および $R^1-L-HN-$ から選択されるメンバーであり；Gは、Hおよび R^1-L- および $C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルから選択されるメンバーであり、 R^1 は、直鎖または分岐ポリ（エチレングリコール）残基を含む部分であり；およびLは、例えば結合（「ゼロ次」）、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルといったリンカーである。例示的な実施形態において、DがOHであるとき、Gは R^1-L- であり、およびGが $C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルであるときDは $R^1-L-NH-$ である。

40

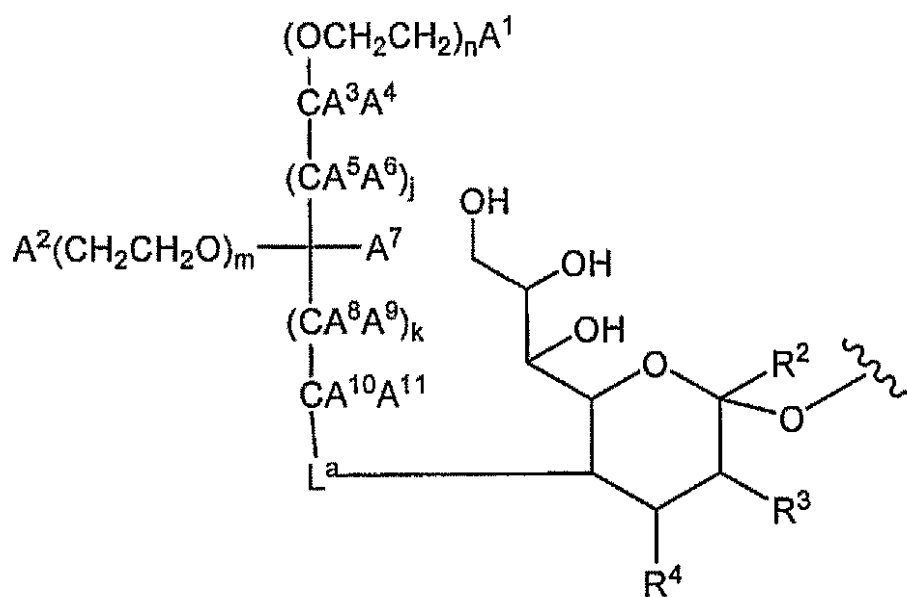
【0016】

他の態様において、本発明は、因子V I Iまたは因子V I I aであることが可能であるペプチドを含む因子V I IまたはV I I aペプチド複合体を提供する。複合体はまたグリコシルリンク基を含み、ここで、グリコシルリンク基は、前記ペプチドのアミノ酸残基に結合されており、および前記グリコシルリンク基は、

【化 4】

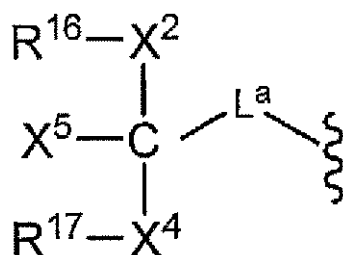


および



から選択されるメンバーである式を有するシアリルリンク基を含み、
式中、

【化 5】



10

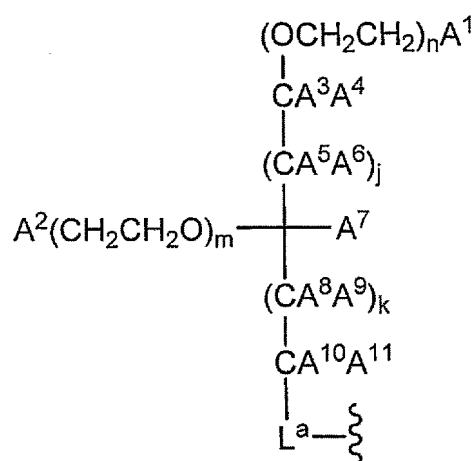
は修飾基である。R²は、H、CH₂OR⁷、COOR⁷、COO⁻およびOR⁷から選択されるメンバーである。R⁷は、H、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるメンバーである。R³およびR⁴は、H、置換または非置換アルキル、OR⁸、およびNHCO⁹から独立して選択されるメンバーである。R⁸およびR⁹は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルおよびシアリルから独立して選択される。L^aは、結合、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるリンカーである。X⁵、R¹⁶およびR¹⁷は、非反応性基および高分子アーム（例えばPEG）から独立して選択される。X²およびX⁴は、高分子部分R¹⁶およびR¹⁷をCに結合する独立して選択されるリンケージ断片である。指数jは、1～15から選択される整数である。

20

【 0 0 1 7 】

他の例示的な実施形態において、高分子修飾基は以下の式による構造を有する。

【化 6】



30

(IIIa)

40

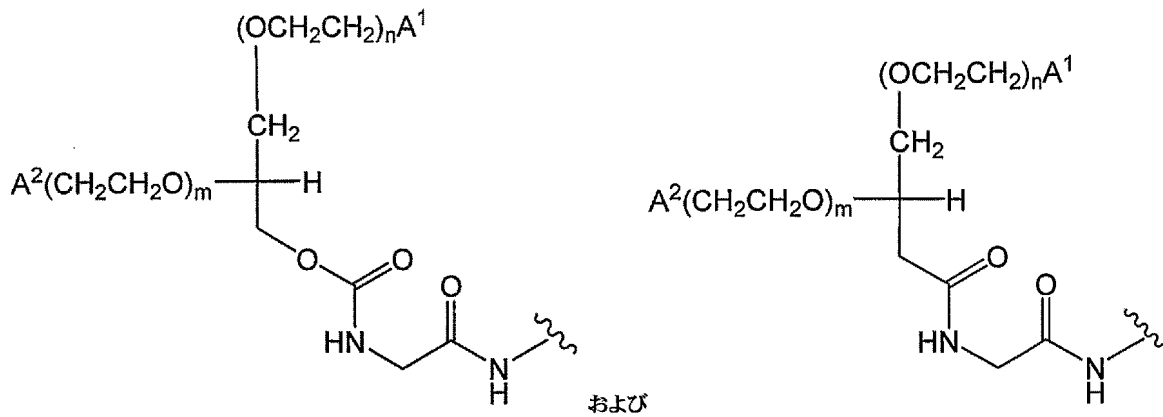
ここで、指数mおよびnは、0～5000から独立して選択される整数である。 A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 、 A^{10} および A^{11} は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、 $-NA^{12}A^{13}$ 、 $-OA^{12}$ および $-SiA^{12}A^{13}$ から独立して選択されるメンバーである。 A^{12} および A^{13} は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、および置換または非置換ヘテロアリールから独立して選択されるメンバーである。

50

【0018】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

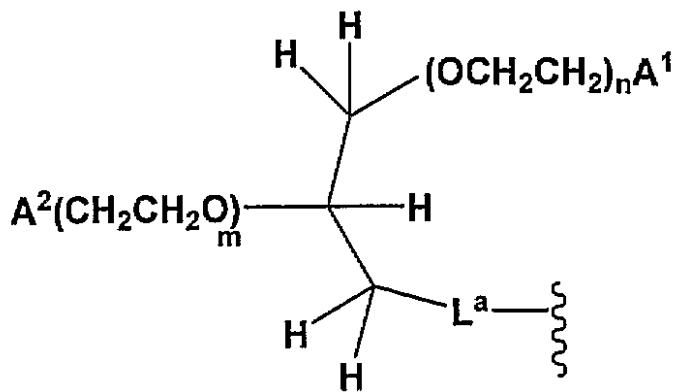
【化7】



【0019】

上記式による他の例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

【化8】

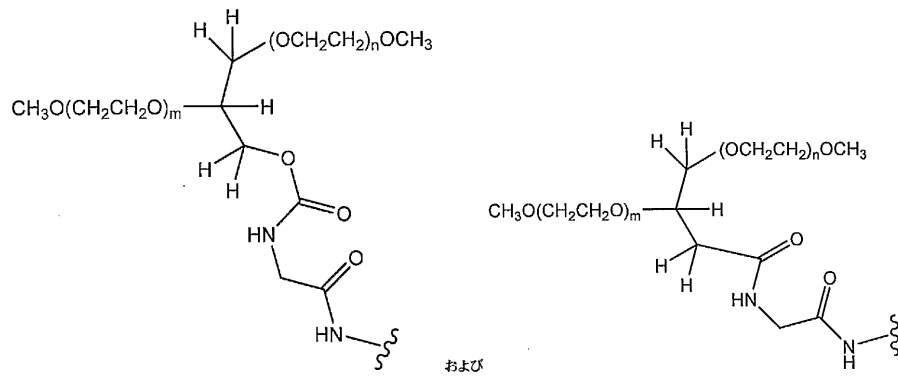


例示的な実施形態において、A¹ および A² は、各々、-OH および -OCH₃ から選択されるメンバーである。

【0020】

この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

【化 9】



10

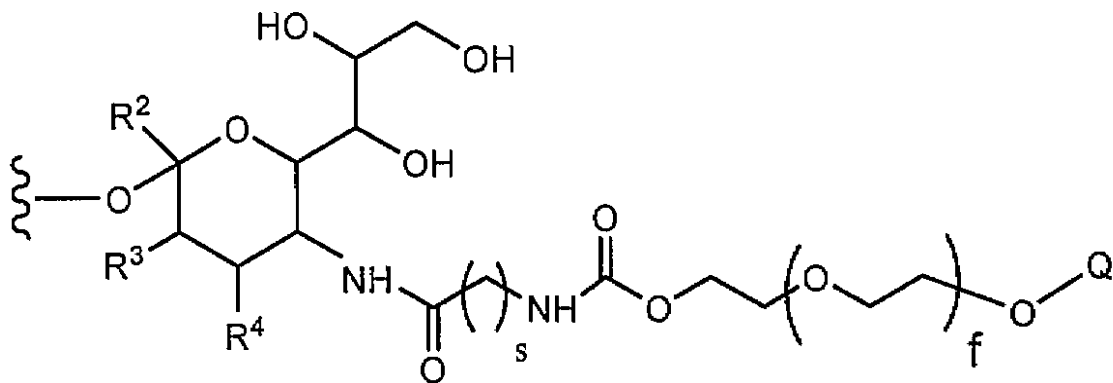
を含む。

【0021】

本発明は、因子V I Iおよび因子V I I aから選択されるメンバーであるペプチドを含む因子V I IまたはV I I aペプチド複合体を提供する。複合体はまたグリコシルリンク基を含み、ここで、グリコシルリンク基は、ペプチドのアミノ酸残基に結合されており、および、グリコシルリンク基は、式、

20

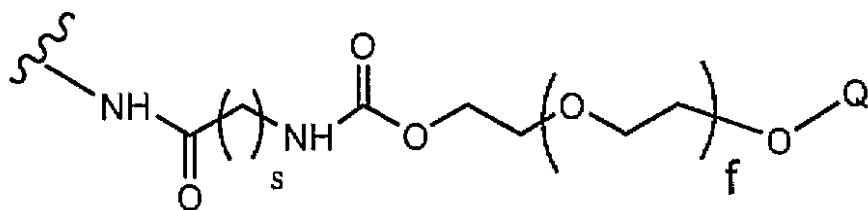
【化10】



30

を有するシアリルリンク基を含み、
式中、

【化11】



40

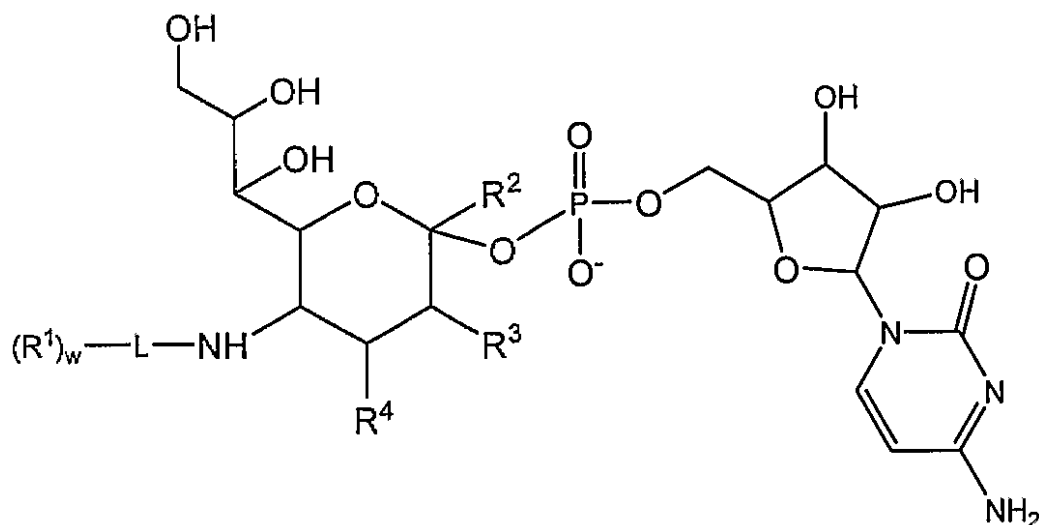
50

は修飾基である。指数 s は、1～20から選択される整数である。指数 f は、1～2500から選択される整数である。Qは、Hおよび置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択されるメンバーである。

【0022】

例示的な実施形態において、本発明は、以下の式を有する修飾糖質を提供する。

【化12】



10

20

【0023】

本発明は、例えば、因子VIIおよび因子VIIaといった因子VIIペプチドの複合体を形成する方法を提供する。本方法は、因子VII/因子VIIaペプチドを、糖質に共有結合した修飾基を有する修飾糖質ドナーと接触させるステップを含む。修飾糖質部分は、ドナーから、因子VII/因子VIIaペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に、酵素の作用により転移される。代表的な酵素としては、これに限定されないが、グリコシルトランスフェラーゼ、例えばシアリルトランスフェラーゼが挙げられる。本方法は、因子VII/因子VIIaペプチドを、a) 修飾糖質ドナーと、b) 修飾糖質部分を修飾糖質ドナーからペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に転移させることが可能である酵素とを、修飾糖質部分を、ドナーからペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に転移させる適切な条件下で接触させ、これにより前記因子VII/因子VIIaペプチド複合体を合成するステップを含む。

30

【0024】

好ましい実施形態において、ステップa)の前に、ペプチドはシアリダーゼと接触され、これにより、ペプチド上のシアリ酸の少なくとも一部を除去する。

【0025】

他の好ましい実施形態において、因子VII/因子VIIaペプチドは、シアリダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾糖質ドナーと接触される。この実施形態において、ペプチドは、シアリダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾糖質ドナーと、基本的に同時に、種々の構成成分の添加の順番に関係なく接触される。反応は、シアリ酸残基をペプチドから除去するためにシアリダーゼについて適切な条件下で；および修飾糖質部分を修飾糖質ドナーからペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に転移させるために、グリコシルトランスフェラーゼについて適切な条件下で実施される。

40

【0026】

他の好ましい実施形態において、脱シアリ化および複合化は、同一の容器内で実施され、および脱シアリ化ペプチドは、好ましくは複合化ステップの前に精製されない。他の例示的な実施形態において、本方法は、ペプチド複合体のシアリ化を含む「キャッピング」

50

ステップをさらに含む。このステップは、シアリダーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよび修飾糖質ドナーを含有する同一反応容器内で事前の精製無しで実施される。

【0027】

他の好ましい実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチドの脱シアル化が実施され、およびアシアロペプチドが精製される。精製されたアシアロペプチドが、次いで、複合化反応条件に供される。他の例示的な実施形態において、本方法は、ペプチド複合体のシアル化を含む「キャッピング」ステップをさらに含む。このステップは、シアリダーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよび修飾糖質ドナーを含有する同一反応容器内で事前の精製無しで実施される。

【0028】

他の例示的な実施形態において、キャッピングステップ、ペプチド複合体のシアル化は、シアリダーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよび修飾糖質ドナーを含有する同一反応容器内で、事前の精製無しで実施される。

【0029】

例示的な実施形態において、接触ステップは、20時間未満、好ましくは16時間未満、より好ましくは12時間未満、さらにより好ましくは8時間未満、およびなおより好ましくは4時間未満の時間である。

【0030】

さらなる態様において、本発明は、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体反応混合物を提供する。反応混合物は、a) シアリダーゼ、b) グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選択されるメンバーである酵素、c) 修飾糖質；およびd) 因子V I I / 因子V I I a ペプチドを含む。

【0031】

他の例示的な実施形態において、シアリダーゼ対因子V I I / 因子V I I a ペプチドの比は、0.1 U / L : 2 mg / mL ~ 10 U / L : 1 mg / mL、好ましくは0.5 U / L : 2 mg / mL、より好ましくは1.0 U / L : 2 mg / mL、さらにより好ましくは10 U / L : 2 mg / mL、なおより好ましくは0.1 U / L : 1 mg / mL、より好ましくは0.5 U / L : 1 mg / mL、さらにより好ましくは1.0 U / L : 1 mg / mL、およびなおより好ましくは10 U / L : 1 mg / mLから選択される。

【0032】

例示的な実施形態において、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%の前記因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体が、最大で2つのPEG部分を含む。PEG部分は、ワンポットプロセスで付加されることが可能であり、またはこれらは、アシアロ因子V I I / 因子V I I a が精製された後に付加されることが可能である。

【0033】

他の例示的な実施形態において、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%の因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体が、最大で1つのPEG部分を含む。PEG部分は、ワンポットプロセスで付加されることが可能であり、またはこれは、アシアロ因子V I I / 因子V I I a が精製された後に付加されることが可能である。

【0034】

さらなる例示的な実施形態において、本方法は、「キャッピング」、またはシアル酸をペプチド複合体に付加するステップをさらに含む。他の例示的な実施形態において、シアリダーゼは、30分、1時間、1.5時間、または2時間遅れで添加され、その後、グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダーゼ、またはエンドグリコシダーゼが添加される。

【0035】

他の例示的な実施形態において、シアリダーゼは、30分、1時間、1.5時間、または2時間遅れで添加され、その後、グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダー

10

20

30

40

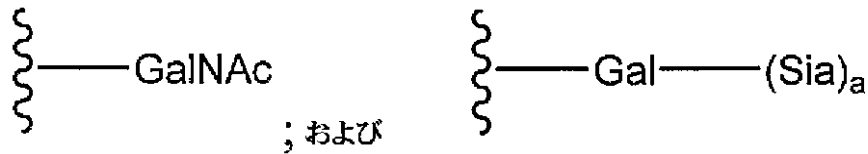
50

ぜ、またはエンドグリコシダーゼが添加される。本発明の他の目的および利点は、以下の詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。

【0036】

他の例示的な実施形態において、本方法は：（a）

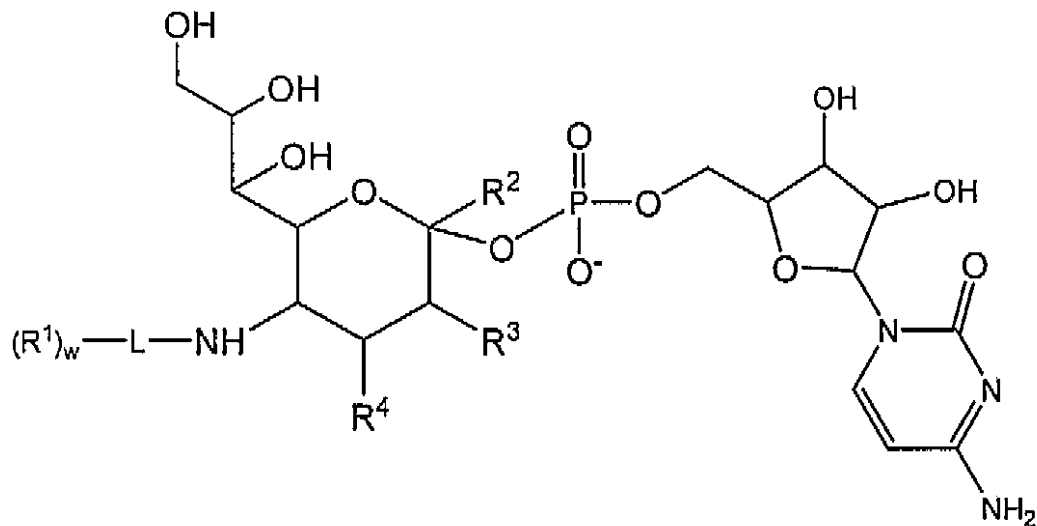
【化13】



10

から選択されるグリコシル基を含む因子VII／因子VIIaペプチドを、式、

【化14】



20

30

を有する修飾糖質と、

グリコシルリンク基を、前記グリコシル基のGalNAc、GalおよびSiaから選択されるメンバーへ転移させる適切なトランスフェラーゼとに、前記転移に適切な条件で接触させるステップを含む。例示的な修飾糖質は、リンカー部分を介して、例えば直鎖または分岐ポリ（エチレングリコール）部分といったポリマーで修飾されたCMPーシアル酸である。

40

【0037】

ペプチドは、基本的にいずれかのソースから得ることが可能であるが、しかしながら、一実施形態において、上述のとおり修飾される前に、因子VII／因子VIIaペプチドが好適な宿主において発現される。哺乳類（例えば、BHK、CHO）、細菌（例えば、大腸菌（E. coli））および昆虫細胞（例えば、Sf-9）は、本願明細書に記載の組成物および方法において用いられる因子VIIまたは因子VIIaを提供する例示的な発現系である。

【0038】

50

例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体は、虚血、外傷、炎症、または有害物質との接触などの組織外傷の処置のために、患者に投与され得る。他の例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体は、血友病Aを有する患者、血友病Bの患者、因子V I I I に対する抗体をも有する血友病Aを有する患者、因子I X に対する抗体をも有する血友病Bを有する患者、および肝硬変を有する患者の処置のために患者に投与され得る。

【0039】

他の例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体は、救急での出血、待機的手術、心臓外科手術、脊髄手術、肝臓移植、部分肝切除、骨盤寛骨臼骨折再構築、および同種幹細胞移植処置のために患者に投与され得、他の例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体は、急性脳内出血、外傷性脳外傷、静脈瘤出血および上部胃腸管系の出血の処置のために患者に投与され得る。

【0040】

他の態様において、本発明は、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体および薬学的に許容可能なキャリアを含む医薬品配合物を提供する。

【0041】

因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体において、基本的に、グリコシルリンク基または修飾基が結合したアミノ酸残基の各々は同一の構造を有する。例えば、一つのペプチドが、T h r がリンクしたグリコシル残基を含む場合、固体群中の少なくとも約70%、80%、90%、95%、97%、99%、99.2%、99.4%、99.6%、またはより好ましくは99.8%のペプチドが、同一のT h r 残基に共有結合的に結合した同一のグリコシルリンク基を有するであろう。

【0042】

本発明の他の目的および利点は、以下の詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

発明の詳細な説明および好ましい実施形態
略語

P E G、ポリ（エチレングリコール）；P P G、ポリ（プロピレングリコール）；A r a、アラビノシル；F r u、フルクトシル；F u c、フコシル；G a l、ガラクトシル；G a l N A c、N-アセチルガラクトサミニル；G l c、グルコシル；G l c N A c、N-アセチルグルコサミニル；M a n、マンノシル；M a n A c、マンノサミニルアセテート；X y l、キシロシル；N e u A c、シアリルまたはN-アセチルノイラミニル；S i a、シアリルまたはN-アセチルノイラミニル；およびこれらの誘導体および類似体。

【0044】

定義

他に定義されていない限りにおいて、本願明細書で用いたすべての技術的および科学的用語は、一般に、本発明が属する当該技術分野の当業者によって通常理解されている同一の意味を有する。一般的には、細胞培養、分子遺伝学、有機化学および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションにおいて、本願明細書において用いた命名および実験用手法は、技術分野において周知であると共に、普通用いられているものである。標準的な技術が核酸およびペプチド合成について用いられる。技術および手法は、一般的には、技術分野および、本明細書の全体を通して提供されている種々の一般的な文献における従来の方法に従って実施される（一般的には、本願明細書において参照により援用される、サンプブルック（S a m b r o o k）ら、「M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L」、第2版（1989年）C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（C o l d S p r i n g H a r b o r, N. Y.）を参照のこと）。本願明細書に用いられる命名ならびに、以下に記載の分析化学および有機合成において用いられる実験用手法

法は、技術分野において周知であると共に、普通用いられているものである。標準的な技術、またはそれらの改良は、化学合成および化学分析について用いられている。

【0045】

本願明細書に記載のすべてのオリゴ糖は、非還元サッカライド（すなわちGal）についての名称または略記、続いて、グリコシド結合（ α または β ）、環結合（1または2）の構成、結合に関与する還元サッカライドの環位置（2、3、4、6または8）、および次いで還元サッカライド（すなわち、GlcNAc）の名称または略記で記載されている。各サッカライドは、好ましくはピラノースである。標準的な糖鎖生物学命名の概説については、「Essentials of Glycobiology」ヴァルキ（Varki）ら編、CSHL Press（1999年）を参照のこと。

10

【0046】

オリゴ糖は、還元末端でのサッカライドが実際に還元糖質であるか否かに関わらず、還元末端および非還元末端を有すると見なされる。受け入れられている命名に従って、オリゴ糖は、本願明細書においては、左側の非還元末端および右側の還元末端と共に表す。

【0047】

用語「シアル酸」または「シアリル」は、9-炭素カルボキシ化糖質のファミリーのいずれかのメンバーを指す。シアル酸ファミリーの最も一般的なメンバーは、N-アセチル-ノイラミン酸（2-ケト-5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-D-グリセロール-ガラクトノヌロピラノース（galactononulopyranos）-1-オン酸（度々、Neu5Ac、NeuAc、またはNANAとして略記される）である。ファミリーの第2のメンバーは、N-グリコリル-ノイラミン酸（Neu5GcまたはNeuGc）であり、ここで、NeuAcのN-アセチル基はヒドロキシ化されている。第3のシアル酸ファミリーメンバーは、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸（KDN）である（ナダノ（Nadano）ら、（1986年）「J. Biol. Chem.」261：第11550～11557ページ；カナモリ（Kanamori）ら、「J. Biol. Chem.」265：第21811～21819ページ（1990年））。9-O-ラクチル-Neu5Acまたは9-O-アセチル-Neu5Acのような9-O-C₁～C₆アシル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Acおよび9-アジド-9-デオキシ-Neu5Acなどの9-置換シアル酸もまた含まれる。シアル酸ファミリーの概説については、例えば、ヴァルキ（Varki）、「Glycobiology 2」：第25～40ページ（1992年）；Sialic Acids：Chemistry, Metabolism and Function、R. シャウアー（R. Schauer）編（Springer-Verlag、ニューヨーク（New York）（1992年））を参照のこと。シアル化手法におけるシアル酸化合物の合成および使用は、1992年10月1日公開の国際公開第92/16640号パンフレットに開示されている。

20

30

【0048】

「ペプチド」は、モノマーがアミノ酸であると共に、アミド結合を介して一緒に結合されているポリマーを指し、あるいは、ポリペプチドとして称される。さらに、非天然アミノ酸、例えば、 β -アラニン、フェニルグリシンおよびホモアルギニンがまた含まれる。遺伝子コード化されていないアミノ酸もまた本発明において用いられ得る。しかも、反応性基、グリコシル化部分、ポリマー、治療的部分、生体分子等を含むよう修飾されたアミノ酸もまた、本発明において用いられ得る。本発明において用いられるアミノ酸のすべては、D-またはL-異性体のいずれかである。L-異性体が一般的には好ましい。さらに、他のペプチド模倣薬もまた本発明において有用である。本願明細書において用いられるところ、「ペプチド」は、グリコシル化および未グリコシル化ペプチドの両方を指す。ペプチドを発現する系により不完全にグリコシル化されたペプチドもまた含まれている。一般的な概説については、スパトラA. F.（Spatola, A. F.）、「CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS」、B. バインスタイン（B. Weinstein）

40

50

n) 編、Marcel Dekker、ニューヨーク (New York)、第 267 ページ (1983 年) を参照のこと。本発明のペプチドのいくつかのリストが図 13 に提供されている。

【0049】

用語「ペプチド複合体」は、ペプチドが本願明細書に記載の修飾糖質と複合化された本発明の種を指す。

【0050】

用語「アミノ酸」は、天然に生じるアミノ酸と同様に機能する、天然に生じるおよび合成アミノ酸、ならびにアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣薬を指す。天然のアミノ酸は、遺伝コードによってコードされたもの、ならびに後に、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタメート、および O-ホスホセリンで修飾されるアミノ酸によってコード化されるものである。アミノ酸類似体は、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム塩といった、天然に生じるアミノ酸と同一の基本的な化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、および R 基に結合している α 炭素を有する化合物を指す。このような類似体は、修飾 R 基 (例えば、ノルロイシン) または修飾ペプチド主鎖を有するが、天然に生じるアミノ酸と同一の基本的な化学構造を保持する。アミノ酸模倣薬は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然に生じるアミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

【0051】

本願明細書において用いられるところ、用語「修飾糖質」、または「修飾糖質残基」は、本発明のプロセスにおいてペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に酵素的に付加される天然に—または非天然に生じる炭水化物を指す。修飾糖質は、特にこれに限定されないが、糖質ヌクレオチド (モノー、ジー、およびトリーリン酸塩)、活性糖質 (例えば、ハロゲン化グリコシル、グリコシルメシレート) および活性糖質でもヌクレオチドでもない糖質を含む酵素基質から選択される。「修飾糖質」は、「修飾基」で共有結合的に官能基化されている。有用な修飾基としては、これに限定されないが、PEG 部分、治療的部分、診断上の部分、生体分子等が挙げられる。修飾基は、好ましくは天然に生じる、または未修飾炭水化物ではない。修飾基での官能化の部分は、「修飾糖質」が酵素的にペプチドに付加されることを防止しないよう選択される。

【0052】

用語「水溶性」は、いくらかの検出可能な程度の溶解度を水中に有する部分を指す。水への溶解度を検出するおよび/または定量化する本方法は、技術分野において周知である。例示的な水溶性ポリマーとしては、ペプチド、サッカライド、ポリ (エーテル)、ポリ (アミン)、ポリ (カルボン酸) 等が挙げられる。ペプチドは、例えばポリ (リシン) の単一アミノ酸から構成される混合配列を有することが可能である。例示的な多糖はポリ (シアル酸) である。例示的なポリ (エーテル) はポリ (エチレングリコール) である。ポリ (エチレンジイミン) は例示的なポリアミンであり、およびポリ (アクリル) 酸は代表的なポリ (カルボン酸) である。

【0053】

水溶性ポリマーのポリマー主鎖は、ポリ (エチレングリコール) (すなわち PEG) であることが可能である。しかしながら、他の関連するポリマーもまた、本発明の実施において用いるために好適であると共に、用語 PEG またはポリ (エチレングリコール) の使用は包括的であり、およびこの観点において排他的ではないことが意図されることが、理解されるべきである。用語 PEG は、ポリ (エチレングリコール) をそのいずれの形態においても含み、アルコキシ PEG、二官能性 PEG、マルチアーム化 PEG、フォーク化 PEG、分岐 PEG、ペンダント PEG (すなわち、ポリマー主鎖に対し側基である一つ以上の官能基を有する PEG または関連ポリマー)、または内部に分解性リンケージを有する PEG が挙げられる。

【0054】

ポリマー主鎖は直鎖または分岐であることが可能である。分岐ポリマー主鎖は、一般的

には技術分野において公知である。典型的には、分岐ポリマーは、中央分岐コア部分および中央分岐コアにリンクされた複数の直鎖状ポリマー鎖を有する。PEGは、普通、エチレンオキシドの、グリセロール、ペンタエリスリトールおよびソルビトールなどの種々のポリオールへの添加により調製されることが可能である分岐形態で用いられる。中央分岐部分はまた、リシンなどの数々のアミノ酸から誘導されることが可能である。分岐ポリ（エチレングリコール）は、一般には $R(-PEG-OH)_m$ としての形態で表されることが可能であり、ここで、Rは、グリセロールまたはペンタエリスリトールコア部分を表し、およびmはアームの数を表す。その全体が本願明細書において参照により援用される米国特許第5,932,462号明細書において記載されているものなどのマルチアーム化PEG分子もまたポリマー主鎖として用いることが可能である。

10

【0055】

多くの他のポリマーもまた本発明のために好適である。結合について約2〜約300部分内の非ペプチド性および水溶性であるポリマー主鎖が本発明において特に有用である。好適なポリマーの例としては、これに限定されないが、ポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）、エチレングリコールとプロピレングリコール等とのコポリマーなどの他のポリ（アルキレングリコール）；ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィン系アルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシプロピルメタクリルアミド）、ポリ（ α -ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ（N-アクリロイルモルホリン）、その全体が本願明細書において参照により援用される米国特許第5,629,384号明細書に記載のものなど、ならびにこれらのコポリマー、ターポリマー、および混合物が挙げられる。ポリマー主鎖の各鎖の分子量は異なることが可能であるが、典型的には、約100Da〜約100,000Da、度々約6,000Da〜約80,000Daの範囲内である。

20

【0056】

患者へのペプチド薬物の投与のコンテキストにおいて本願明細書において用いられるところ、「曲線下の面積」または「AUC」は、ゼロから無限への時間の関数としての、患者の全身的な循環系における薬物の濃度を表す、曲線下の総面積として定義される。

【0057】

用語「半減期」または「 $t_{1/2}$ 」は、患者へのペプチド薬物の投与のコンテキストにおいて本願明細書において用いられるところ、患者における薬物のプラズマ濃度が半分に低減されるまでに必要とされる時間として定義される。複数のクリアランスメカニズム、再分布、および技術分野において周知である他のメカニズムに応じて、2つ以上の半減期が、ペプチド薬物に関連してあり得る。通常は、 α および β 半減期は、 α 相は再分布に関連し、および β 相はクリアランスに関連するよう定義される。しかしながら、大部分で血流に限定されるタンパク質薬では、少なくとも2つのクリアランス半減期があることが可能である。いくつかのグリコシル化ペプチドについて、急速 β 相クリアランスは、マクロファージ上の受容体、または末端ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコースアミン、マンノース、またはフコースを認識する内皮細胞を介して媒介され得る。より遅い β 相クリアランスは、 $<2\text{ nm}$ （およそ68kD）の有効半径での分子についての腎性糸球体ろ過および／または組織における特定のまたは非特定の摂取および新陳代謝を介して生じ得る。グリコPEG化は、末端糖質（例えば、ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミン）をキャップし得、およびこれにより、これらの糖質を認識する受容体を介する急速 α 相クリアランスをブロックする。より大きな有効半径がまた与えられ得、およびこれにより分布および組織摂取の量を低減させ、これにより遅い β 相を延ばす。それ故、グリコPEG化の α 相および β 相半減期に対する正確な影響は、技術分野において周知のように、サイズ、グリコシル化の状態、および他のパラメータに応じて異なり得る。「半減期」のさらなる説明は、「Pharmaceutical Biotechnology」（1997年、DFAクロメルイン（DFA Crommelin）およびRDシンデラー（RD Sindelar）編、Harwood Publishers、アムステルダム（Amsterdam）、第101〜120ページ）に見出され

30

40

50

る。

【0058】

本願明細書において用いられるところ、用語「グリコ複合化」は、修飾糖質種の、例えば、本発明のG-C S Fペプチドといった、ポリペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基への酵素的に媒介された複合化を指す。「グリコ複合化」の亜属は、修飾糖質の修飾基がポリ（エチレングリコール）、およびそのアルキル誘導体（例えば、m-P E G）または反応性誘導体（例えば、H₂N-P E G、H O O C-P E G）である「グリコーP E G化」である。

【0059】

用語「大規模」および「工業規模」は、同義に用いられ、少なくとも約250mg、好ましくは少なくとも約500mg、およびより好ましくは少なくとも約1グラムの複合糖質を単一の反応サイクルの完了後に生成する反応サイクルを指す。

【0060】

本願明細書において用いられるところ、用語「グリコシルリンク基」は、修飾基（例えば、P E G部分、治療的部分、生体分子）が、共有結合しているグリコシル残基を指し；グリコシルリンク基は、修飾基を残りの複合体に結合する。本発明の方法において、「グリコシルリンク基」は、グリコシル化または未グリコシル化ペプチドに共有結合されることになり、これにより薬剤を、ペプチド上のアミノ酸および／またはグリコシル残基にリンクする。「グリコシルリンク基」は、一般的には、「修飾糖質」から、「修飾糖質」のペプチドのアミノ酸および／またはグリコシル残基への酵素的結合により有する同される。グリコシルリンク基は、修飾基-修飾糖質カセット（例えば、酸化→シッフ塩基形成→還元）の形成中に分解されるサッカライド由来構造であることが可能であり、またはグリコシルリンク基は無処置であり得る。「無処置グリコシルリンク基」は、修飾基と残りの複合体をリンクするサッカライドモノマーが、例えばナトリウムメタ過ヨウ素酸により分解（例えば酸化）されない、グリコシル部分から誘導されるリンク基を指す。本発明の「無処置グリコシルリンク基」は、グリコシル単位の付加または一つ以上のグリコシル単位の親サッカライド構造からの除去により、天然に生じるオリゴ糖から誘導され得る。

【0061】

本願明細書において用いられるところ、用語「非グリコシド修飾基」は、グリコシルリンク基に直接的にリンクされた天然に生じる糖質を含まない修飾基を指す。

【0062】

本願明細書において用いられるところ、用語「標的指向化部分」は、身体の特定の組織または領域で、選択的に局在化されることとなる種を指す。局在化は、分子決定要因の特定、標的指向化剤または複合体の分子サイズ、イオン性相互作用、疎水性相互作用等の認識によって媒介される。薬剤を特定の組織または領域に標的化させる他のメカニズムが当業者に公知である。例示的な標的指向化部分としては、抗体、抗体断片、トランスフェリン、H S-糖タンパク質、凝塊因子、血清タンパク質、β-糖タンパク質、G-C S F、G M-C S F、M-C S F、E P O等が挙げられる。

【0063】

本願明細書において用いられるところ、「治療的部分」とは、特にこれに限定されないが、抗生物質、抗炎症性剤、抗腫瘍薬、細胞毒、および放射性剤を含む、治療について有用であるいずれかの薬剤を意味する。「治療的部分」は、生理活性剤、2つ以上の治療的部分がキャリアに結合している構成物、例えば、多価剤のプロドラッグを含む。治療的部分はまた、タンパク質およびタンパク質を含む構成物を含む。例示的なタンパク質としては、これに限定されないが、顆粒球コロニー刺激因子（G C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M C S F）、インターフェロン（例えば、インターフェロン-α、-β、-γ）、インターロイキン（例えば、インターロイキンI I）、血清タンパク質（例えば、因子V I I、V I I a、V I I I、I X、およびX）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（H C G）、卵胞刺激ホルモン（F S H）および黄体形成ホルモン（L H）および抗体融合タンパク質（例えば腫瘍壊死因子受容体（（T N F R）／F cドメイン融合タンパ

ク質)) が挙げられる。

【0064】

本願明細書において用いられるところ、「薬学的に許容可能なキャリア」は、複合体と組み合わされたときにおいて複合体の活性を保持すると共に、対象の免疫系と非反応性であるいずれかの材料を含む。例としては、これに限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、および種々のタイプの湿潤剤などの標準的な医薬品キャリアのいずれかが挙げられる。他のキャリアはまた、無菌溶液、コート錠剤およびカプセルを含む錠剤を含み得る。典型的にはこのようなキャリアは、スターチ、乳剤、糖質、一定のタイプのクレイ、膠、ステアリン酸またはその塩、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、タルク、植物脂肪または油、ガム、グリコール、または他の公知の賦形物などの賦形物を含有する。このようなキャリアはまた、香料および着色添加剤または他の要素を含み得る。このようなキャリアを含む組成物は、周知の従来の方法によって配合される。

10

【0065】

本願明細書において用いられるところ、「投与する」とは、対象への、経口投与、座薬としての投与、局所的接触、静脈内、腹腔内、筋肉内、病巣内、鼻腔内または皮下投与、または例えばミニ浸透圧ポンプといった徐放デバイスの移植を意味する。投与は、非経口的、および経粘膜（例えば、経口、鼻の、膣の、肛門直腸の、または経皮的）を含むいずれかの経路による。非経口的投与としては、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、心室内、および頭蓋内が挙げられる。しかも、注射が、腫瘍の、例えばアポトーシスを含む治療である場合、腫瘍に直接的におよび／または腫瘍の周囲の組織へ投与し得る。送達他のモードは、これに限定されないが、リボソーム配合物、静脈内点滴、経皮パッチ等の使用を含む。

20

【0066】

用語「回復する」または「回復」は、寛解、緩解または症状の軽減または患者の物理的または精神的な状態の向上などのいずれかの客観的なまたは主観的なパラメータを含む、病理学の処置における成功のいずれかの証拠または状態を指す。症状の回復は、物理的試験および／または精神医学的評価の結果を含む客観的なまたは主観的なパラメータに基づくことが可能である。

【0067】

用語「治療」は、疾病の症状をまだ経験していないまたは示していないが、疾病に罹りやすい可能性がある動物における疾病または状態の発症の予防（予防的処置）、疾病の阻害（その発達を遅延または停止させる）、症状または疾病の副作用からの軽減の提供（緩和処置を含む）、および疾病の軽減（疾病を退縮させる）を含む、疾病または状態を「処置すること」またはその「処置」を指す。

30

【0068】

用語「有効量」または「有効な量」または「治療的に有効量」またはいずれかの文法的に同等の用語は、動物に疾病を処置するために投与されたときに、その疾病のための処置を有効とするに十分な量を意味する。

【0069】

用語「単離された」とは、材料の生成に用いられる構成成分を実質的にまたは基本的に含まない材料を指す。本発明のペプチド複合体について、用語「単離された」とは、ペプチド複合体の調製に用いられる混合物における材料を通常伴う構成成分を実質的にまたは基本的に含まない材料を指す。「単離された」および「純粋な」は同義的に用いられる。典型的には、単離された本発明のペプチド複合体は、好ましくは範囲として表記される純度レベルを有する。ペプチド複合体についての純度の範囲の下限は、約60%、約70%または約80%および純度の範囲の上限は約70%、約80%、約90%または約90%超である。

40

【0070】

ペプチド複合体が約90%を超えて純粋である場合、それらの純度はまた、好ましくは

50

、範囲として表記される。純度の範囲の下限は、約 90 %、約 92 %、約 94 %、約 96 % または約 98 % である。純度の範囲の上限は、約 92 %、約 94 %、約 96 %、約 98 % または約 100 % 純度である。

【0071】

純度は、いずれかの技術分野において認識された分析方法により測定される（例えば、銀染色ゲルでのバンド強度、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC、または同様の手段）。

【0072】

本願明細書において用いられるところ、「基本的に固体群の各メンバー」は、ペプチドに付加された選択された割合の修飾糖質が、ペプチド上の複数の、同等の受容体部位に付加された本発明のペプチド複合体の固体群の特徴を表す。「基本的に固体群の各メンバー」とは、修飾糖質に複合化されたペプチド上の部位の「均質性」を表し、および、少なくとも約 80 %、好ましくは少なくとも約 90 % およびより好ましくは少なくとも約 95 % 均質である本発明の複合体を指す。

【0073】

「均質性」は、修飾糖質が複合化される、受容体部分の固体群の全体にわたる構造的に一貫性を指す。それ故、他のすべての修飾糖質が複合化された受容体部位と同一の構造を有する受容体部位に各修飾糖質部分が複合化された本発明のペプチド複合体において、ペプチド複合体は、約 100 % 均質であると言う。均質性は、典型的には、範囲として表記される。ペプチド複合体についての均質性の範囲の下限は約 60 %、約 70 % または約 80 % であり、および純度の範囲の上限は、約 70 %、約 80 %、約 90 % または約 90 % 超である。

【0074】

ペプチド複合体が約 90 % 以上均質である場合、それらの均質性はまた、好ましくは範囲として表記される。均質性の範囲の下限は約 90 %、約 92 %、約 94 %、約 96 % または約 98 % である。純度の範囲の上限は約 92 %、約 94 %、約 96 %、約 98 % または約 100 % 均質性である。ペプチド複合体の純度は、典型的には当業者に公知である一種以上の方法、例えば、液体クロマトグラフィー質量分光測定（LC-MS）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器（MALDI-TOF）、毛管電気泳動等により測定される。

【0075】

「実質的に均一なグリコフォーム」または「実質的に均一なグリコシル化パターン」は、グリコペプチド種に言及する場合、関心のあるグリコシルトランスフェラーゼ（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）によってグリコシル化された受容体部分の割合を指す。例えば、 $\alpha 1, 2$ フコシルトランスフェラーゼの場合、実質的にすべての（以下に定義されたとおり） $\text{Gal}\beta 1, 4\text{-GlcNAc-R}$ およびそのシアル化類似体が発明のペプチド複合体においてフコシル化されていると、実質的に均一なフコシル化パターンが存在する。本願明細書に記載のフコシル化構造において、 Fuc-GlcNAc リンケージは、一般的には $\alpha 1, 6$ または $\alpha 1, 3$ であり、 $\alpha 1, 6$ が一般的には好ましい。出発材料は、グリコシル化受容体部分（例えば、フコシル化 $\text{Gal}\beta 1, 4\text{-GlcNAc-R}$ 部分）を含有し得ることが当業者によって理解されるであろう。それ故、算出されるグリコシル化割合は、本発明の方法によりグリコシル化された受容体部分、ならびに出発材料においてすでにグリコシル化されている受容体部分を含むであろう。

【0076】

「実質的に均一な」の上記の定義における、用語「実質的に」は、一般的には、特定のグリコシルトランスフェラーゼについての、少なくとも約 40 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、またはより好ましくは少なくとも約 90 %、およびなおより好ましくは少なくとも約 95 % の受容体部分がグリコシル化されていることを意味する。

【0077】

置換基が、左から右に向かって記載されるそれらの従来の化学式により特定される場合

、これらは、同様に、構造を右から左に記載してもたらされるであろう化学的に同等の置換基を包含し、例えば $-\text{CH}_2\text{O}-$ はまた $-\text{OCH}_2-$ を表すことを意図する。

【0078】

用語「アルキル」は、単独でまたは他の置換基の一部として、他に明記されていない限りにおいて、完全飽和、モノーまたは多価不飽和であり得、およびジーおよび多価ラジカルを含むことが可能であり、指定の数の炭素原子を有する（すなわち $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ は1～10個の炭素を意味する）、直鎖または分岐鎖、または環状炭化水素ラジカル、またはこれらの組み合わせを意味する。飽和炭化水素ラジカルの例としては、これに限定されないが、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、 t -ブチル、イソブチル、 sec -ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル；例えば、 n -ペンチル、 n -ヘキシル、 n -ヘプチル、 n -オクチル等の同族体および異性体などの基が挙げられる。不飽和アルキル基は、一つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例としては、これに限定されないが、ビニル、2-プロベニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2, 4-ペンタジエニル、3-（1, 4-ペンタジエニル）、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、および高級同族体および異性体が挙げられる。用語「アルキル」はまた、特に記載のない限り、「ヘテロアルキル」などの以下により詳細に定義されるアルキルの誘導体を含むことを意味する。炭化水素基に限定されるアルキル基は「ホモアルキル」と称される。

【0079】

用語「アルキレン」は、単独でまたは他の置換基の一部として、アルカン由来の二価ラジカルを意味し、制限されないが、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ により例示され、および「ヘテロアルキレン」として以下に記載の基のものをさらに含む。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は、1～24個の炭素原子を有し、10個以下の炭素原子を有する基が本発明において好ましいであろう。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、短鎖のアルキルまたはアルキレン基であり、一般的には8個以下の炭素原子を有する。

【0080】

用語「アルコキシ」、「アルキルアミノ」および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）は、それらの従来の意味で用いられ、および分子の残りに、それぞれ、酸素原子、アミノ基、または硫黄原子を介して結合されたアルキル基を指す。

【0081】

用語「ヘテロアルキル」は、単独でまたは他の用語と組み合わせられて、他に明記されていない限りにおいて、明記された数の炭素原子から構成され、およびO、N、SiおよびSからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子から構成される、安定な直鎖または分岐鎖、または環状炭化水素ラジカル、またはこれらの組み合わせを意味し、ここで、窒素および硫黄原子は、任意により酸化されていてもよく、および窒素ヘテロ原子は任意により四級化されていてもよい。ヘテロ原子O、NおよびSおよびSiは、ヘテロアルキル基のいずれかの内部分置またはアルキル基が分子の残りに結合している位置に位置され得る。例としては、これに限定されないが、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、および $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ が挙げられる。例えば、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ および $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ などのように2つ以下のヘテロ原子が連続していてもよい。同様に、用語「ヘテロアルキレン」は、単独でまたは他の置換基の一部として、ヘテロアルキル由来の二価ラジカルを意味し、制限されないが、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ および $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ として例示される。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子はまた、鎖終端（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノ等）の

いずれかまたは両方を占有することが可能である。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレンリンク基について、リンク基の向きは、リンク基の式が記載されている方向によっては意味されない。例えば、式 $-C(O)_2R'-$ は、 $-C(O)_2R'-$ および $-R'C(O)_2-$ の両方を表す。

【0082】

用語「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」は、それら自体で、または他の用語と組み合わせて、他に明記されていない限りにおいて、「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状版を、それぞれ表す。さらに、ヘテロシクロアルキルについて、ヘテロ原子は、複素環が分子の残りに結合する位置を占有することが可能である。シクロアルキルの例としては、これに限定されないが、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチル等が挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例としては、これに限定されないが、1-(1, 2, 5, 6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル等が挙げられる。

10

【0083】

用語「ハロ」または「ハロゲン」は、それら自体でまたは他の置換基の一部として、他に明記されていない限りにおいて、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むことを意味する。例えば、用語「ハロ($C_1 \sim C_4$)アルキル」は、制限されないが、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-ブロモプロピル等を含むことを意味する。

20

【0084】

用語「アリール」は、他に明記されていない限りにおいて、単環または一緒に縮合されたまたは共有結合された多環（好ましくは1～3環）であることが可能である多価不飽和、芳香族、置換基を意味する。用語「ヘテロアリール」は、N、O、およびSから選択されるヘテロ原子を1～4個含有するアリール基（または環）を指し、ここで、窒素および硫黄原子は、任意により酸化され、および窒素原子が任意により四級化される。ヘテロアリール基は、分子の残りとヘテロ原子を介して結合されていることが可能である。アリールおよびヘテロアリール基の非限定的な例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ピフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジニル、3-ピリジニル、4-ピリジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンゾイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、テトラゾリル、ベンゾ[b]フラニル、ベンゾ[b]チエニル、2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-イル、ベンゾ[1, 3]ジオキサール-5-イルおよび6-キノリルが挙げられる。上記のアリールおよびヘテロアリール環系の各々についての置換基は、以下に記載の許可能な置換基の群から選択される。

30

40

【0085】

簡潔さのために、用語「アリール」は、他の用語と組み合わせて用いられる場合（例えば、アリーロキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）、上記に定義したアリールおよびヘテロアリール環の両方を含む。それ故、用語「アリールアルキル」は、例えば、フェノキシメチル、2-ピリジニルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピル等、炭素原子が（例えば、メチレン基）例えば、酸素原子により置き換えられたアルキル基を含むアルキル基にアリール基が結合しているラジカル（例えば、ベンジル、フェネチル、

50

ピリジルメチル等)を含むことを意味している。

【0086】

上記の用語の各々(例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」)は、置換および非置換の両方の形態のラジカルを含むことを意味する。ラジカルの各タイプについての好ましい置換基が以下に記載されている。

【0087】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカルについての置換基(度々、アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルとして称される基のものを含む)は、一般に、「アルキル基置換基」として称され、およびこれらは、特にこれに限定されないが、 $2m' + 1$ の範囲の数(ここで、 m' はこのようなラジカルにおける炭素原子の総数である)での、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'R''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ および $-NO_2$ から選択される多様な基の一種以上であることが可能である。 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' は、各々、好ましくは、独立して、水素、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリール、例えば、1~3個のハロゲンで置換されたアリール、置換または非置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。例えば本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、R基の各々は、2つ以上のこれらの基が存在する場合、各々 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' 基であるとして独立して選択される。 R' および R'' が同一の窒素原子に結合されている場合、これらは、窒素原子と組み合わせられて、5-、6-、または7-員環を形成することが可能である。例えば、 $-NR'R''$ は、制限されないが、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含むことを意図する。置換基の上記の考察から、当業者は、用語「アルキル」は、ハロアルキル(例えば、 $-CF_3$ および $-CH_2CF_3$)およびアシル(例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ 等)などの水素基以外の基に結合された炭素原子を含む基を含むことを意味していることを理解するであろう。

【0088】

アルキルラジカルについて記載した置換基と同様に、アリールおよびヘテロアリール基についての置換基は、一般に、「アリール基置換基」として称される。置換基は、例えば： $-ハロゲン$ 、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'R''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ および $-NO_2$ 、 $-R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(PH)_2$ 、フルオロ($C_1 \sim C_4$)アルコキシ、およびフルオロ($C_1 \sim C_4$)アルキルから、ゼロから芳香族環系上の空原子価の総数までの範囲の数で選択され、ここで、 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' は、好ましくは、水素、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリールおよび置換または非置換ヘテロアリールから独立して選択される。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R基の各々は、2つ以上のこれらの基が存在する場合、各々 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' 基として独立して選択される。以下のスキームにおいて、符号Xは上記の「R」を表す。

【0089】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基の2つは、任意により、式

$-T-C(O)-(CRR')_u-U-$ の置換基で置き換えられ得、式中、TおよびUは、独立して $-NR-$ 、 $-O-$ 、 $-CRR'-$ または単結合であり、およびuは、0～3の整数である。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基の2つは、任意により、式 $-A-(CH_2)_r-B-$ の置換基で置き換えられ得、ここで、AおよびBは、独立して $-CRR'-$ 、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'-$ または単結合であり、およびrは1～4の整数である。このように形成された新しい環の単結合の1つは、任意により、二重結合で置き換えられ得る。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子の置換基の2つは、任意により、式 $-(CRR')_z-X-(CR''R''')_d-$ の置換基で置き換えられ得、ここで、zおよびdは、独立して、0～3の整数であり、およびXは $-O-$ 、 $-NR'-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または $-S(O)_2NR'-$ である。置換基R、R'、R''およびR'''は、好ましくは、水素または置換または非置換($C_1 \sim C_6$)アルキルから独立して選択される。

10

【0090】

本願明細書において用いられるところ、用語「ヘテロ原子」は、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)およびシリコン(Si)を含むことを意味する。

【0091】

本願明細書において用いられるところ、因子V I Iペプチドは、因子V I Iおよび因子V I I aペプチドの両方を指す。用語は、一般的には、付加、削除、置換および融合タンパク質変異体を含むこれらのペプチドの変異体(variant、mutant)に言及する。因子V I Iおよび因子V I I aの両方が用いられる場合、使用は、属「因子V I Iペプチド」の2つの種の例示であることが意図される。

20

【0092】

本発明は、本願明細書に記載の化合物に見出される特定の置換基に応じて、比較的無毒な酸または塩基で調製される本発明の化合物の塩を含むことを意味する。本発明の化合物が比較的酸性の官能基を含有する場合、塩基付加塩は、このような化合物の中性形態を、そのまま、または好適な不活性溶剤中で十分な量の所望の塩基と接触させることにより得ることが可能である。塩基付加塩の例としては、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、またはマグネシウム塩、または同様の塩が挙げられる。本発明の化合物が比較的塩基性の官能基を含有する場合、酸付加塩は、このような化合物の中性形態を、そのまま、または好適な不活性溶剤中で十分な量の所望の酸と接触させることにより得ることが可能である。酸付加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸、リン酸、一水素リン酸、二水素リン酸、硫酸、一水素硫酸、ヨウ化水素酸、または亜リン酸等のような無機酸から誘導されるもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸等のような比較的無毒な有機酸から誘導される塩が挙げられる。アルギン酸等などのアミノ酸の塩、およびグルクロン酸またはガラクトン酸等のような有機酸の塩(例えば、バーヂ(Berge)ら、「Pharmaceutical Salts」、Journal of Pharmaceutical Science 66:第1～19ページ(1977年)を参照のこと)もまた含まれる。本発明の一定の特定の化合物は、塩基性および酸性官能基の両方を含有して、化合物が塩基付加塩または酸付加塩のいずれにも添加されることを許容する。

30

40

【0093】

化合物の中性形態は、好ましくは、塩を塩基または酸と接触させ、および親化合物を従来の方式で分離することにより生成される。化合物の親形態は、種々の塩形態とは、極性溶剤中の溶解度などの一定の物理特性で異なる。

【0094】

本願明細書において用いられるところ、「塩対イオン」は、その部分の一つが陰性に荷電されている(例えば COO^-)場合の、本発明の化合物に関連する陽性荷電イオンを指

50

す。塩対イオンの例としては、 H^+ 、 H_3O^+ 、アンモニウム、カリウム、カルシウム、リチウム、マグネシウムおよびナトリウムが挙げられる。

【0095】

本願明細書において用いられるところ、用語「CMP-SPA-PEG」は、ポリエチレングリコール部分を含むシアル酸に複合化されたシチジン-リン酸分子である。ポリエチレングリコール鎖の長さが特定されていない場合、いずれのPEG鎖長も可能である（例えば1KDa、2KDa、5KDa、10KDa、20KDa、30KDa、40KDa）。例示的なCMP-SPA-PEGは、スキーム1における化合物5である。

【0096】

I. 導入

10

本発明は、因子VIIのリモデリングおよび修飾方法を包含する。血液凝塊経路は、多くの事象を含む複雑な反応である。この経路における中間事象は因子VIIであり、組織因子およびカルシウムイオンの存在下で（その因子VIIaへの活性化で）因子XをXaに転化することにより、血液凝塊の外因性経路に参与する酵素前駆体である。そして、因子Xaが、次いで、因子Va、カルシウムイオンおよびリン脂質の存在下で、プロトロンビンをつロンビンに転化する。因子Xの因子Xaへの活性化は、内因性および外因性血液凝塊経路の両方によって共有される事象であり、従って、因子VIIaは、因子VII欠乏性の患者または因子VIIの抑制剤を有する患者の処置に用いられることが可能である。因子VIIaは内因性経路にも関与し得ることを示唆するエビデンスがまたあり、従って、因子VII/因子VIIaの血液凝塊における役割の顕著性および重要性が増加する。

20

【0097】

因子VIIは、不活性な酵素原として血液中を循環する単鎖糖タンパク質である。因子VIIaの例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列が、図5に挙げられている。因子VIIのVIIaへの活性化は、因子XIIaなどの数々の異なるプラズマプロテアーゼにより触媒され得る。因子VIIの活性化は、因子VIIペプチド主鎖がアスパラギン152で開裂されるときに生じる。活性化生成物、因子VIIaは、少なくとも1つのジスルフィド結合によって一緒に保持された重鎖および軽鎖を含む糖タンパク質である。さらに、因子VIIaに転化されることができない修飾因子VII分子が記載されており、およびこれらは、血液凝固、血栓症等の場合などの抗凝塊治療薬として有用である。因子VIIの血液凝塊経路における重要性、および凝塊の増加したレベルおよび低下したレベルの両方についての処置としてのその使用の重要性を考慮すると、より長い生物学的半減期を有する分子が効力を増加するという結果となり、および、一般には、野生タイプ因子VIIにより類似の治療的プロファイルが、健常なヒトにおいて合成されおよび分泌されるため、血液凝塊疾患に対する処置として有益および有用であろう。

30

【0098】

因子VIIは治療的用途について重要でかつ有用な化合物である一方、組み換え型細胞から因子VIIを産生する本方法は、かなり短い生物学的半減期および至的ではないグリコシル化パターンを有する生成物をもたらす、これは、潜在的に、免疫原性、機能の喪失、同じ効果等を達成するための、より多量での投与およびより頻繁な投与の両方に対する高い必要性をもたらす可能性が高い。

40

【0099】

治療的目的のために用いられる組み換え型因子VII/因子VIIaの効力を向上させるために、本発明は、グリコシル化および未グリコシル化因子VII/因子VIIaペプチドの修飾基との複合体を提供する。修飾基は、例えば、PEG（m-PEG）、PPG（m-PPG）等、治療的部分、診断上の部分、標的指向化部分等などの高分子修飾基から選択されることが可能である。因子VII/因子VIIaペプチドの、例えば、水溶性高分子修飾基での修飾は、組み換え型因子VII/因子VIIaの患者の循環における安定性および滞留時間を向上させることが可能であり、および/または組み換え型因子VII/因子VIIaの抗原性を低減させることが可能である。

50

【0100】

本発明のペプチド複合体は、修飾糖質のグリコシル化または未グリコシル化ペプチドへの酵素的結合により形成されることが可能である。グリコシル化部分および／または修飾グリコシル基は、修飾基を有する修飾糖質を、ペプチドに、例えばグリコ複合化により複合化する部分を提供する。

【0101】

本発明の方法はまた、実質的に均質な誘導体化パターンを有するペプチド複合体およびグリコペプチド複合体を集合させることができる。本発明において用いられる酵素は、一般的には特定のアミノ酸残基、アミノ酸残基の組み合わせ、特定のグリコシル残基、またはペプチドのグリコシル残基の組み合わせについて選択的である。本方法はまた、ペプチド複合体の大規模生産のために実用的である。それ故、本発明の方法は、予め選択された均一な誘導体化パターンを有するペプチド複合体の大規模な調製のための実用的な手段を提供する。本方法は、特にこれに限定されないが、細胞培養細胞（例えば、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、真菌性細胞、イースト菌細胞、または原核細胞）または遺伝子組換え植物または動物における産生中に不完全にグリコシル化されたグリコペプチドを含む治療的ペプチドの修飾に特に良く適している。

【0102】

因子V I I／因子V I I a ペプチド複合体は、ペプチド複合体ならびに薬学的に許容可能なキャリアを含む医薬品配合物として産生されることが可能である。因子V I I／因子V I I a ペプチド複合体は、出血エピソードを有する血友病患者、血友病Aを有する患者、血友病Bの患者、血友病Aを有する患者（ここで、患者はまた因子V I I Iに対する抗体を有する）、血友病Bを有する患者（ここで、患者はまた因子I Xに対する抗体を有する）、肝硬変を有する患者、同所性肝臓移植を有する硬変患者、上部胃腸管系の出血を有する硬変患者、骨髄移植を有する患者、肝臓摘出を有する患者、部分肝切除を有する患者、骨盤寛骨臼骨折再構築を経験している患者、急性脳内出血で出血している患者、同種幹細胞移植を経験している患者、外傷性脳外傷で出血している患者、救急で出血している患者、外傷からの出血を有する患者、静脈瘤出血を経験している患者、待機的手術で出血している患者、心臓外科手術で出血している患者、脊髄手術、肝臓摘出で出血している患者からなる群から選択される患者に投与され得る。例示的な実施形態において、患者はヒト患者である。

【0103】

本発明はまた、例えば、低減されたクリアランス速度、または低減された免疫系または細網内皮系（R E S）による摂取速度により、長期化した治療的半減期を有するグリコシル化および未グリコシル化ペプチドの複合体を提供する。しかも、本発明の方法は、ペプチド上の抗原決定基をマスクする手段を提供し、それ故、ペプチドに対する宿主免疫応答を低減または排除する。標的指向化剤の選択的結合もまた、ペプチドを、特定の組織または、特定の標的指向化剤に特定の細胞表面受容体に標的化するために用いられることが可能である。

【0104】

因子V I I／因子V I I a 複合体の水溶性ポリマーとの調製についての至的条件の判定は、例えば、数多くのパラメータの至的化を含み、これはペプチドおよび水溶性ポリマーの同一性に依存する。例えば、ポリマーがポリ（エチレングリコール）、例えば、分岐ポリ（エチレングリコール）である場合、反応に用いられるポリマーの量およびこのポリマーの存在に起因する反応混合物の粘度の間に釣合いが好ましくは確立され、ポリマーが過度に濃縮されている場合、反応混合物は粘性になり、質量移動および反応速度を低下させる。

【0105】

さらに、酵素を過剰に添加することは直感的に明らかであるが、本発明者らは、酵素が過度の過剰量で存在する場合には、過剰な酵素が汚染物となり、その除去が余計な精製ステップおよび材料を必要とし、および最終生成物のコストを無用に増加させることを認識

した。

【0106】

しかも、一般的には、制御された修飾レベルでペプチドを産生することが所望される。いくつかの事例においては、1種の修飾糖質を選択的に添加することが望ましい。他の場合において、2種の修飾糖質を選択的に添加することが望ましい。それ故、反応条件は、好ましくは、修飾基のペプチドへの複合化の程度を影響するよう制御される。

【0107】

本発明は、所望の複合化レベルを有する因子V I I / 因子V I I a ペプチドの収率が最大化される条件を提供する。本発明の例示的な実施形態における条件はまた、種々の試薬および材料の費用および生成物を精製するために必要な時間を認識し、本願明細書に記載の反応条件は、高価な試薬の廃棄を最低限としながら、所望の生成物の優れた収率を提供するよう最的化されている。

【0108】

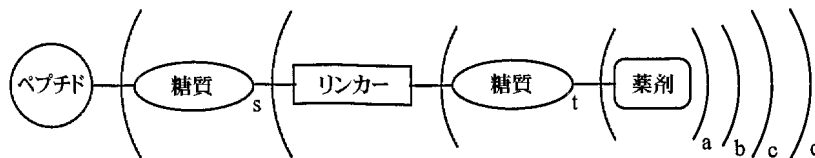
I I . 物質／ペプチド複合体の組成物

第1の態様において、本発明は、修飾糖質および因子V I I / 因子V I I a ペプチドの複合体を提供する。本発明はまた、修飾基および因子V I I / 因子V I I a ペプチドの複合体を提供する。ペプチド複合体は、数々の形態の一つを有することが可能である。例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、因子V I I / 因子V I I a ペプチドおよびペプチドのアミノ酸にグリコシルリンク基を介してリンクされた修飾基を含むことが可能である。他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、因子V I I / 因子V I I a ペプチドおよびペプチドに属するグリコシルにグリコシルリンク基を介してリンクされた修飾基を含むことが可能である。他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、因子V I I / 因子V I I a ペプチドおよび、グリコペプチド炭水化物および直接的にペプチド主鎖のアミノ酸残基の両方に結合したグリコシルリンク基を含むことが可能である。さらに他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、因子V I I / 因子V I I a ペプチドおよび直接的にペプチドのアミノ酸残基にリンクされた修飾基を含むことが可能である。この実施形態において、ペプチド複合体は、グリコシル基を含み得ない。これらの実施形態のいずれかにおいて、因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、グリコシル化されていてもいなくてもよい。

【0109】

本発明の複合体は、典型的には、一般構造、

【化15】



に関連することとなり、ここで、符号 a、b、c、d および s は、正の、ゼロではない整数を表し、および t は 0 または正の整数の一方である。「薬剤」、または修飾基は、治療剤、生理活性剤、検出可能な標識、水溶性ポリマー（例えば、PEG、m-PEG、PPG、および m-PPG）などの高分子修飾基等であることが可能である。「薬剤」、または修飾基は、ペプチド、例えば、酵素、抗体、抗原等であることが可能である。リンカーは、以下のリンク基の広いアレイのいずれかであることが可能である。あるいは、リンカーは単結合または「ゼロ次リンカー」であり得る。

【0110】

I I . A . ペプチド

因子V I I は、約 406 アミノ酸長であり、およびおよそ 50 KDa の分子量を有する単鎖ポリペプチドである。因子V I I の因子V I I a への転化は、因子V I I ペプチド主

鎖がアスパラギン 1 5 2 で開裂したときに生じる。因子 V I I および／または因子 V I I a ペプチドは 2 つの N-グリカン部位を含有し、その一方はアスパラギン 1 4 5 に位置されており、および他方がアスパラギン 3 2 2 に位置されている。アスパラギン 1 4 5 での N-グリカン部位は、F V I I a の軽鎖上に位置されている一方で、アスパラギン 3 2 2 での N-グリカン部位は、F V I I a の重鎖上に位置されている。因子 V I I および／または因子 V I I a ペプチドは、2 つの O-グリカン部位を含有する。

【0 1 1 1】

因子 V I I または因子 V I I a をクローン化し、および配列決定した。例示的な実施形態において、因子 V I I a ペプチドは配列番号 1 に示す配列を有する。

【0 1 1 2】

本発明は、本願明細書に記載の因子 V I I 核酸およびアミノ酸配列に限定されると解釈されるべきでは決してない。特性を増加あるいは低下させ、またはペプチドの構造的機構を修飾するために変異化された、他の配列の因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドの使用は本発明の範囲内である。例えば、本発明において用いられる変異因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドは、追加の O-グリコシル化部分または他の位置のこのような部位を有するものを含む。しかも、一つ以上の N-グリコシル化部分を含む変異ペプチドは、本発明において用いられる。因子 V I I の変異体は、例えば、米国特許第 4, 7 8 4, 9 5 0 号明細書および同第 5, 5 8 0, 5 6 0 号明細書に記載されており、ここで、リシン-3 8、リシン-3 2、アルギニン-2 9 0、アルギニン-3 4 1、イソロイシン-4 2、チロシン-2 7 8、およびチロシン-3 3 2 は、多様なアミノ酸で置き換えられている。さらに、米国特許第 5, 8 6 1, 3 7 4 号明細書、同第 6, 0 3 9, 9 4 4 号明細書、同第 5, 8 3 3, 9 8 2 号明細書、同第 5, 7 8 8, 9 6 5 号明細書、同第 6, 1 8 3, 7 4 3 号明細書、同第 5, 9 9 7, 8 6 4 号明細書、および同第 5, 8 1 7, 7 8 8 号明細書は、開裂して因子 V I I a を形成しない因子 V I I 変異体を記載する。当業者は、血液凝塊経路およびそこにおける因子 V I I の役割は周知であり、および従って、上記の、天然に生じるおよび操作された多くの変異体の両方が、本発明に含まれることを認識するであろう。例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a 活性を有するペプチドは、本願明細書に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % 相同的であるアミノ酸配列を有する。好ましくは、アミノ酸配列は、本願明細書に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 相同的である。

【0 1 1 3】

例示的な実施形態において、グリコシルリンク基が結合しているアミノ酸残基は、セリン、スレオニンおよびアスパラギンから選択されるメンバーである。他の例示的な実施形態において、ペプチドは、配列番号 1 の配列を有する。他の例示的な実施形態において、アミノ酸残基は、A s n 1 4 5、A s n 3 2 2 およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである。他の例示的な実施形態において、ペプチドは生理活性因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドである。

【0 1 1 4】

さらに他の例示的な実施形態において、因子 V I I a ペプチド複合体の修飾糖質および／または P E G 部分は、軽鎖上に位置されている。さらに他の例示的な実施形態において、因子 V I I a ペプチド複合体の修飾糖質および／または P E G 部分は、主に重鎖上にある。さらに他の例示的な実施形態において、因子 V I I a ペプチド複合体の固体群において、軽鎖は、主に修飾糖質および／または P E G 部分を含有する。さらに他の例示的な実施形態において、因子 V I I a ペプチド複合体の固体群において、重鎖は主に修飾糖質および／または P E G 部分を含有する。

【0 1 1 5】

他の例示的な実施形態において、固体群における軽鎖：重鎖官能化の比は約 3 3 : 6 6 である。他の例示的な実施形態において、固体群における軽鎖：重鎖官能化の比は約 3 5 : 6 5 である。他の例示的な実施形態において、固体群における軽鎖：重鎖官能化の比は約 4 0 : 6 0 である。他の例示的な実施形態において、固体群における軽鎖：重鎖官能化

の比は約 45 : 55 である。他の例示的な実施形態において、比は約 50 : 50 である。他の例示的な実施形態において、比は約 55 : 45 である。他の例示的な実施形態において、比は約 60 : 40 である。他の例示的な実施形態において、比は約 65 : 35 である。他の例示的な実施形態において、比は約 66 : 33 である。他の例示的な実施形態において、比は約 70 : 30 である。他の例示的な実施形態において、比は約 75 : 25 である。他の例示的な実施形態において、比は約 80 : 20 である。他の例示的な実施形態において、比は約 85 : 15 である。他の例示的な実施形態において、比は約 90 : 10 である。他の例示的な実施形態において、固体群における軽鎖：重鎖官能化の比は約 90 : 10 を超える。

【0116】

因子 V I I / 因子 V I I a の発現方法および活性を測定する方法は技術分野において周知であり、例えば、米国特許第 4, 784, 950 号明細書に記載されている。簡潔には、因子 V I I、またはその変異体の発現は、大腸菌 (E. coli)、CHO 細胞、BHK 細胞、昆虫細胞を含む多様な原核および真核系の両方において、バキュロウイルス発現系を用いて達成することが可能であり、これらのすべては技術分野において周知である。

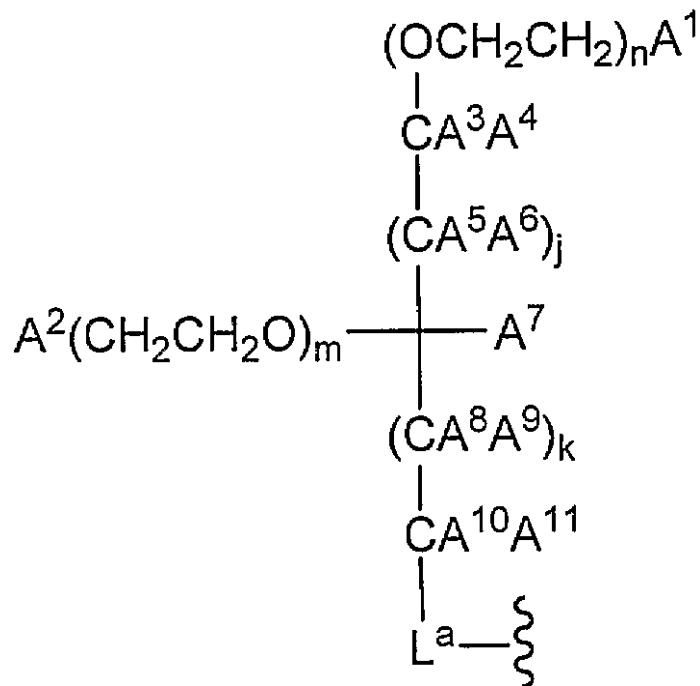
【0117】

本発明の方法に従って調製された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の活性についてのアッセイは、技術分野において周知の方法を用いて達成されることが可能である。非限定的な例として、クイック (Quick) ら (「Hemorrhagic Disease and Thrombosis」、第 2 版、Leat Febiger、フィラデルフィア (Philadelphia)、1966 年) は、本発明の方法に従って調製された因子 V I I 分子の生物活性の測定に有用である一段凝固アッセイを記載する。

【0118】

本発明において用いられるペプチドは、修飾基が、

【化 16】



であるときは、因子 V I I / 因子 V I I a に制限されない。

これらの場合において、ペプチド複合体におけるペプチドは、図13におけるペプチドから選択されるメンバーである。これらの場合において、ペプチド複合体におけるペプチドは、因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子IX、因子X、因子XIから選択されるメンバーであり、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、 α_1 -アンチトリプシン（ATT、または α_1 -プロテアーゼ抑制剤、グルコセレブロシダーゼ、組織タイププラスミノゲン活性因子（TPA）、インターロイキン-2（IL-2）、ウロキナーゼ、ヒトデオキシリボヌクレアーゼ、インスリン、B型肝炎表面タンパク質（HbsAg）、ヒト成長ホルモン、TNF受容体-IgG Fc領域融合タンパク質（エンブレル（Enbrel）（商標））、抗HER2モノクローナル抗体（ヘルセプチン（Herceptin）（商標））、呼吸器多核体ウイルスのタンパク質Fに対するモノクローナル抗体（シナジス（Synagis）（商標））、TNF- α に対するモノクローナル抗体（レミカーデ（Remicade）（商標））、糖タンパク質Ilg/IlgAに対するモノクローナル抗体（レオプロ（Reopro）（商標））、CD20に対するモノクローナル抗体（リツキサン（Rituxan）（商標））、抗トロンビンIII（ATTIII）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、 α -ガラクトシダーゼ（ファブラザイム（Fabrazyme）（商標））、 α -イズロニダーゼ（アルズラザイム（Aldurazyme）（商標））、卵胞刺激ホルモン、 β -グルコシダーゼ、抗TNF- α モノクローナル抗体（MLB5075）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、 β -グルコシダーゼ（MLB5064）、 α -ガラクトシダーゼA（MLB5082）および線維芽細胞増殖因子から選択されるメンバーであるペプチドである。

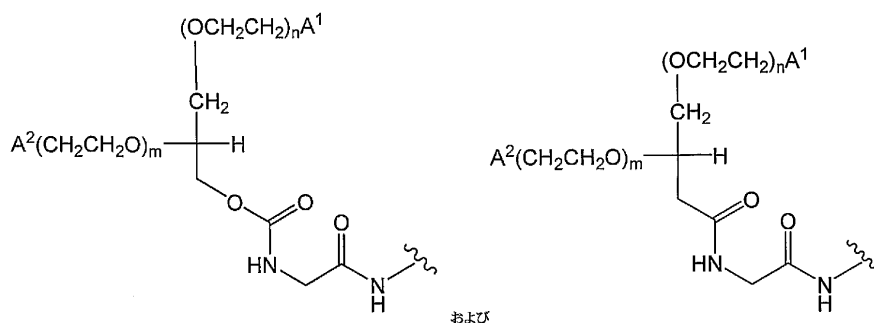
10

20

【0119】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

【化17】

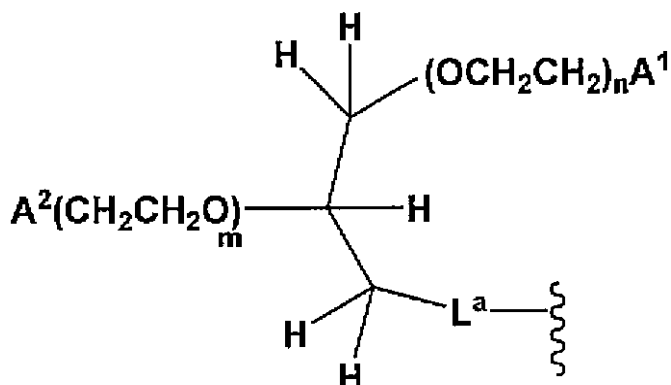


30

【0120】

本発明において用いられるペプチドはまた、修飾基が、

【化 1 8】



10

であるときは、因子 V I I または因子 V I I a に制限されない。

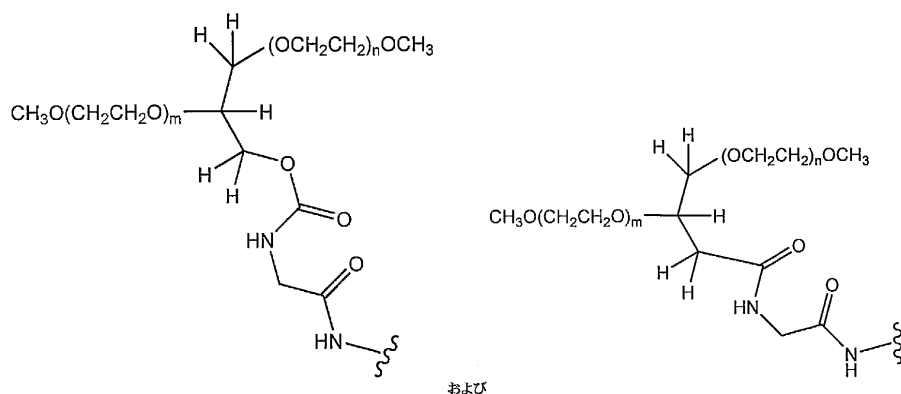
例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、各々 $-OH$ および $-OCH_3$ から選択されるメンバーである。

20

【0 1 2 1】

この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

【化 1 9】



30

を含む。

【0 1 2 2】

上記に示したもののような修飾基が分岐水溶性ポリマーである例示的な実施形態において、シアリダーゼの濃度が、反応混合物の約 1.5 ～ 約 2.5 U/L であることが一般的には好ましい。より好ましくは、シアリダーゼの量は約 2 U/L である。

40

【0 1 2 3】

他の例示的な実施形態において、約 5 ～ 約 9 グラムのペプチド基質が、上記に規定の量のシアリダーゼと接触される。

【0 1 2 4】

修飾糖質は、反応混合物中に、約 1 グラム ～ 約 6 グラム、好ましくは約 3 グラム ～ 約 4 グラムの量で存在する。分岐水溶性ポリマー修飾部分、例えば、上記に示した部分を有する修飾糖質の濃度を、約 0.5 mM 未満で維持することが一般的には好ましい。好ましい実施形態において、修飾基は、約 20 KDa ～ 約 60 KDa、より好ましくは、約 30 KDa ～ 約 50 KDa、およびさらにより好ましくは約 40 KDa の分子量を有する分岐ポ

50

リ（エチレングリコール）である。約 40 KDa の分子量を有する例示的な修飾基は、約 35 KDa ～ 約 45 KDa のものである。

【0125】

グリコシルトランスフェラーゼ濃度に関して、好ましい本実施形態において、上記に規定の修飾基を用いて、グリコシルトランスフェラーゼ対ペプチドの比は、約 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トランスフェラーゼ対約 200 μM ペプチドである。

【0126】

II. B. 修飾糖質

例示的な実施形態において、本発明のペプチドは修飾糖質と反応され、これによりペプチド複合体が形成される。修飾糖質は「糖質ドナー部分」ならびに「糖質移動部分」を含む。糖質ドナー部分は、ペプチドに、グリコシル部分またはアミノ酸部分を介して、本発明の複合体として、結合されることとなる修飾糖質のいずれかの部分である。糖質ドナー部分は、修飾糖質からペプチド複合体のグリコシルリンク基へのそれらの転化の間に化学的に変性される原子を含む。糖質移動部分は、本発明の複合体としてペプチドに結合されることはない修飾糖質のいずれかの部分である。例えば、本発明の修飾糖質は、PEG 化糖質スクレオチド、PEG-シアル酸CMP である。PEG-シアル酸CMP について、糖質ドナー部分、またはPEG-シアルドナー部分はPEG-シアル酸を含み、一方で、糖質移動部分またはシアル移動部分はCMP を含む。

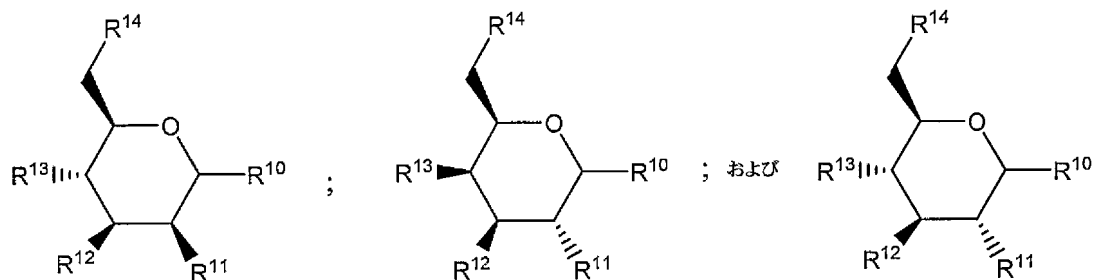
【0127】

本発明において用いられる修飾糖質において、糖部分は、好ましくは、サッカライド、デオキシサッカライド、アミノサッカライド、またはN-アシルサッカライドである。用語「サッカライド」およびその均等物は、「サッカルリル (saccharyl)」、「糖質」、および「グリコシル」は、モノマー、ダイマー、オリゴマーおよびポリマーを指す。糖質部分はまた、修飾基で官能基化されている。修飾基は、糖部分に、典型的には、アミン、スルフヒドリルまたはヒドロキシル、例えば、第1級ヒドロキシル、糖質上の部分での複合化を介して複合化されている。例示的な実施形態において、修飾基は、アミンと修飾基の反応性誘導体との反応により形成される、例えばアミド、ウレタンまたは尿素を介することで、糖質上のアミン部分を介して結合されている。

【0128】

いずれの糖部分も、修飾糖質の糖質ドナー部分として用いられることが可能である。糖部分は、マンノース、ガラクトースまたはグルコース、または公知の糖質の立体化学を有する種などの公知の糖質であることが可能である。これらの修飾糖質の一般式は、

【化20】



である。

【0129】

本発明の組成物の形成に有用である他の糖部分としては、これに限定されないが、フコ

ースおよびシアル酸、ならびにグルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミンなどのアミノ糖質、シアル酸の5-アミンアナログ等が挙げられる。糖部分は、自然に見出される構造であることが可能であり、または修飾されて、修飾基が複合化する部位を提供することが可能である。例えば、一実施形態において、修飾糖質は、9-ヒドロキシ部分がアミンで置き換えられたシアル酸誘導体を提供する。アミンは、選択された修飾基の活性化アナログで容易に誘導される。

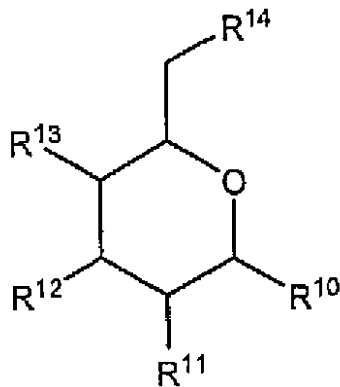
【0130】

本発明において用いられる修飾糖質の例が、本願明細書において参照により援用されるPCT国際出願第PCT/US05/002522号明細書に記載されている。

【0131】

さらなる例示的な実施形態において、本発明は、6-ヒドロキシル位置が、関連する、上記に規定のものなどのリンカー-修飾基カセットを有するアミン部分に添加された修飾糖質を用いる。これらの修飾糖質のコアとして用いられることが可能である例示的なグリコシル基としては、Gal、GalNAc、Glc、GlcNAc、Fuc、Xyl、Man等が挙げられる。この実施形態による代表的な修飾糖質は式、

【化21】



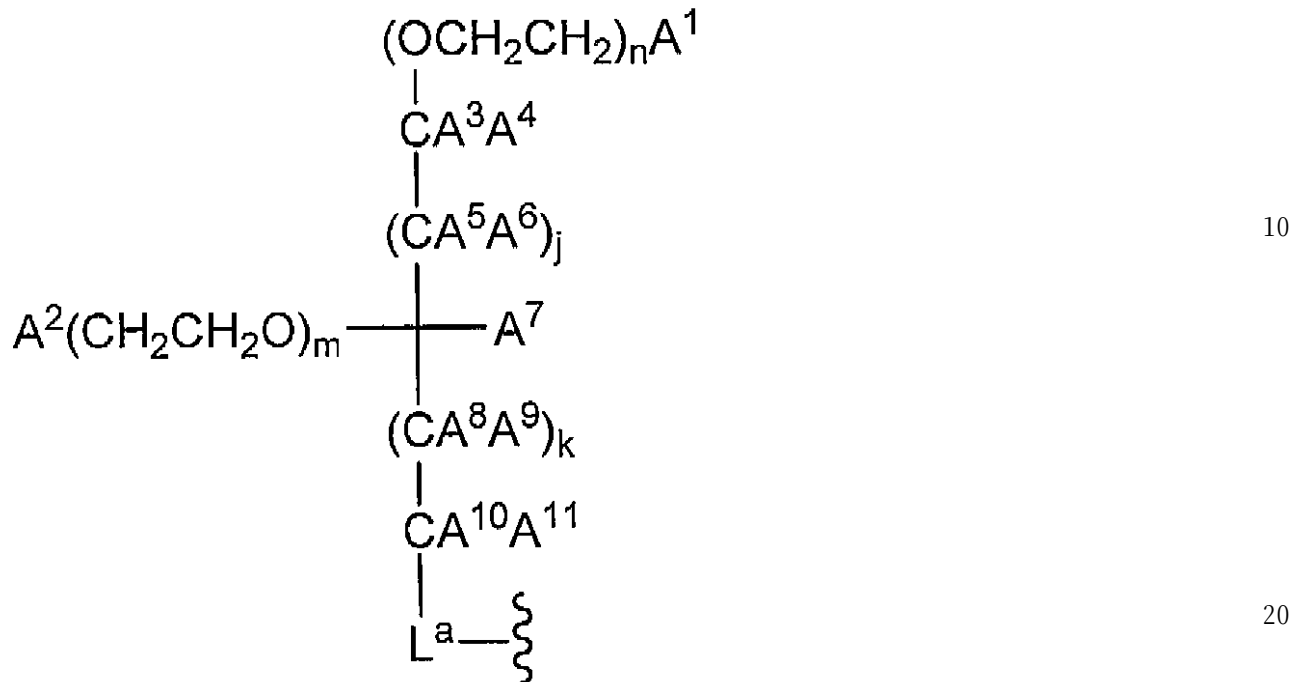
を有し、ここで、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、H、OH、 $C(O)CH_3$ 、NH、および $NHC(O)CH_3$ から独立して選択されるメンバーである。 R^{10} は、他のグリコシル残基（-O-グリコシル）または因子VII/因子VIIaペプチド（-NH-（因子VII/因子VIIa））のアミノ酸へのリンクである。 R^{14} は、 OR^1 、 NHR^1 または $NH-L-R^1$ である。 R^1 および $NH-L-R^1$ は上述のとおりである。

【0132】

II. C. グリコシルリンク基

例示的な実施形態において、本発明は、本発明の修飾糖質および因子VII/因子VIIaペプチドの間で形成されるペプチド複合体を提供する。他の例示的な実施形態において、修飾糖質上の修飾基が

【化 2 2】



である場合、ペプチド複合体におけるペプチドは、図 1 3 におけるペプチドから選択されるメンバーである。さらに他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体におけるペプチドは、因子 V I I、因子 V I I a、因子 V I I I、因子 I X、因子 X、因子 X I、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (G M-C S F)、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、 α_1 -アンチトリプシン (A T T、または α_1 -プロテアーゼ抑制剤、グルコセレブロシダーゼ、組織-タイププラスミノゲン活性因子 (T P A)、インターロイキン-2 (I L-2)、ウロキナーゼ、ヒトデオキシリボヌクレアーゼ、インスリン、B 型肝炎表面タンパク質 (H b s A g)、ヒト成長ホルモン、T N F 受容体-I g G F c 領域融合タンパク質 (エンブレル (E n b r e l) (商標))、抗 H E R 2 モノクローナル抗体 (ヘルセプチン (H e r c e p t i n) (商標))、呼吸器多核体ウイルスのタンパク質 F に対するモノクローナル抗体 (シナジス (S y n a g i s) (商標))、T N F- α に対するモノクローナル抗体 (レミカーデ (R e m i c a d e) (商標))、糖タンパク質 I I b / I I I a に対するモノクローナル抗体 (レオプロ (R e o p r o) (商標))、C D 2 0 に対するモノクローナル抗体 (リツキサン (R i t u x a n) (商標))、抗 トロンピン I I I (A T I I I)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (h C G)、 α -ガラクトシダーゼ (ファブラザイム (F a b r a z y m e) (商標))、 α -イズロニダーゼ (アルズラザイム (A l d u r a z y m e) (商標))、卵胞刺激ホルモン、 β -グルコシダーゼ、抗 T N F- α モノクローナル抗体 (M L B 5 0 7 5)、グルカゴン様ペプチド-1 (G L P-1)、 β -グルコシダーゼ (M L B 5 0 6 4)、 α -ガラクトシダーゼ A (M L B 5 0 8 2) および線維芽細胞増殖因子から選択されるメンバーである。この実施形態において、修飾糖質の糖質ドナー部分 (糖部分および修飾基など) は、「グリコシルリンク基」になる。「グリコシルリンク基」は、代替的に、ペプチドおよび修飾基の間に介在されるグリコシル部分を指すことが可能である。

【0 1 3 3】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

10

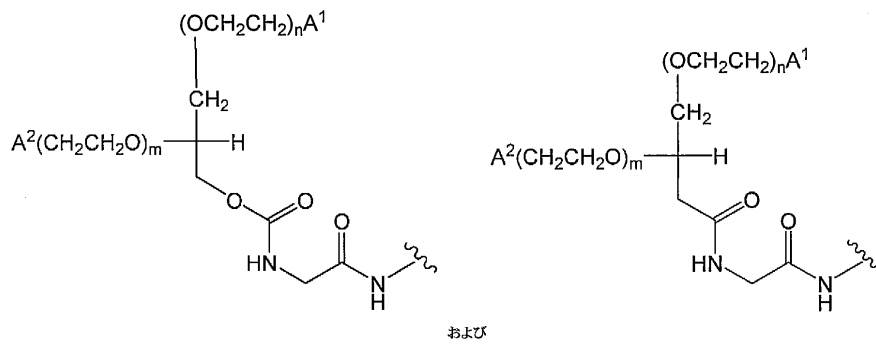
20

30

40

50

【化 2 3】

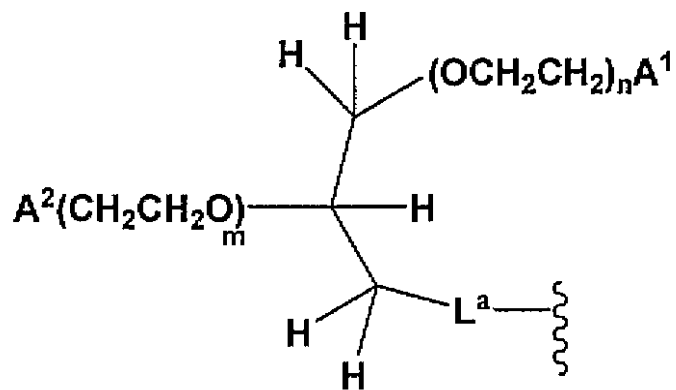


10

【 0 1 3 4】

例示的な実施形態において、修飾糖質上の修飾基は、

【化 2 4】



20

30

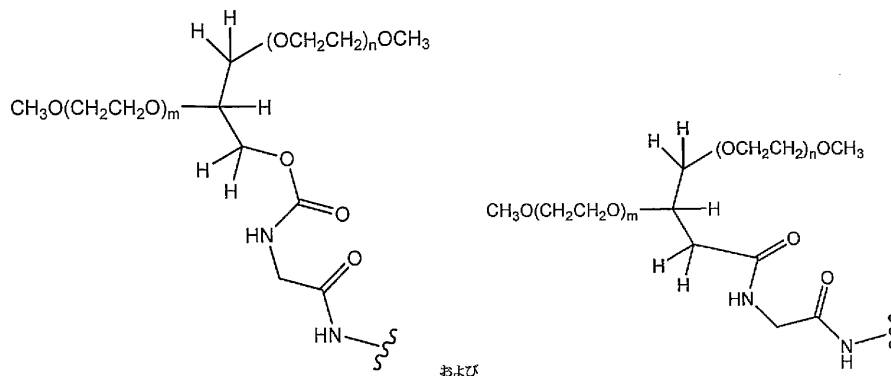
である。

例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、各々、 $-OH$ および $-OCH_3$ から選択されるメンバーである。

【 0 1 3 5】

この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

【化 2 5】



10

を含む。

【0136】

ペプチド上のグリコシル残基を付加するおよび／または修飾するために利用可能な方法の多用途性により、グリコシルリンク基は実質的にいずれの構造をも有することが可能である。以下の考察において、本発明は、フラノースおよびピラノース選択された誘導体の使用に言及することにより例示される。当業者は、考察に焦点を当てるのは、例示を明確にするためであり、規定の構造および組成物は、一般的には、グリコシルリンク基および修飾糖質の属にわたって適用可能であることを認識するであろう。グリコシルリンク基は、事実上いずれのモノーまたはオリゴサッカライドも含むことが可能である。グリコシルリンク基は、アミノ酸に、側鎖またはペプチド主鎖のいずれかを介して結合されることが可能である。あるいは、グリコシルリンク基は、ペプチドに糖部分を介して結合されることが可能である。この糖部分は、ペプチドのO-結合型またはN-結合型グリカン構造の一部であることが可能である。

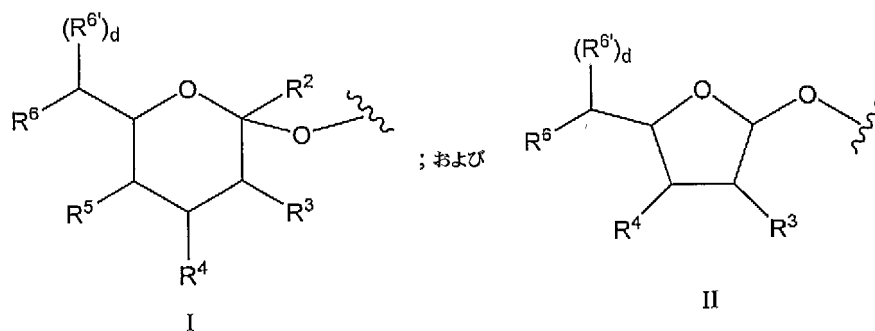
20

【0137】

例示的な実施形態において、本発明は、

30

【化 2 6】



40

から選択される式を有する無処置グリコシルリンク基を含むペプチド複合体を提供する。

【0138】

式 I において、 R^2 は、 H 、 CH_2OR^7 、 $COOR^7$ または OR^7 であり、ここで、 R^7 は、 H 、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキルを表す。 $COOR^7$ がカルボン酸またはカーボキシレートであるとき、両方の形態は、単一の構造

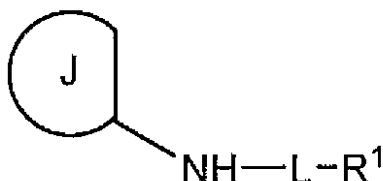
50

COO⁻またはCOOHの記載によって表される。式 I および I I において、符号 R³、R⁴、R⁵、R⁶ および R^{6'} は、独立して、H、置換または非置換アルキル、OR⁸、NHC(O)R⁹を表す。指数 d は、0 または 1 である。R⁸ および R⁹ は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、シアル酸またはポリシアル酸から独立して選択される。R³、R⁴、R⁵、R⁶ または R^{6'} の少なくとも 1 つが修飾基を含む。この修飾基は、例えば、結合またはリンク基を介してリンクされた PEG といった高分子修飾部分であることが可能である。例示的な実施形態において、R⁶ および R^{6'} は、それらが結合された炭素と一緒に、シアル酸のピルビル側鎖の構成成分である。さらなる例示的な実施形態において、ピルビル側鎖は高分子修飾基で官能基化されている。他の例示的な実施形態において、R⁶ および R^{6'} は、それらが結合された炭素と一緒に、シアル酸の側鎖の構成成分であり、および高分子修飾基は R⁵ の成分である。

10

【0139】

例示的な実施形態において、本発明は、式、
【化 27】



20

を有するグリコシルリンク基を用い、ここで、J はグリコシル部分であり、L は結合またはリンカーであり、および R¹ は修飾基、例えば高分子修飾基である。例示的な結合は、グリコシル部分上の NH₂ 部分と修飾基上の補完的な反応性基との間に形成されるものである。例えば、R¹ がカルボン酸部分を含む場合、この部分は、グリコシル残基上の NH₂ 部分で活性化およびカップリングされ得、構造 NHC(O)R¹ を有する結合をもたらす。J は、好ましくは、「無処置」であり、ピラノースまたはフラノース構造を開裂させる条件（例えば酸化性条件、例えばナトリウム過ヨウ素酸）への暴露により分解されていないグリコシル部分である。

30

【0140】

例示的なリンカーとしては、アルキルおよびヘテロアルキル部分が挙げられる。リンカーとしては、リンク基、例えばアシルベースのリンク基、例えば、-C(O)NH-、-OC(O)NH-等が挙げられる。リンク基は、本発明の種の構成成分の間、例えばグリコシル部分とリンカー(L)との間、またはリンカーと修飾基(R¹)との間に形成される結合である。他の例示的なリンク基は、エーテル、チオエーテルおよびアミンである。例えば、一実施形態において、リンカーは、グリシン残基などのアミノ酸残基である。グリシンのカルボン酸部分は、グリコシル残基上のアミンとの反応により関連するアミドに添加され、およびグリシンのアミンが、活性化カルボン酸または修飾基のカーボネートとの反応により関連するアミドまたはウレタンに転化される。

40

【0141】

NH-L-R¹ の例示的な種は、式、
-NH{C(O)(CH₂)_aNH}_s{C(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNH}_tR¹ を有し、ここで、指数 s および t は、独立して 0 または 1 である。指数 a、b および d は、独立して 0 ~ 20 の整数であり、および c は 1 ~ 2500 の整数である。他の同様のリンカーは、-NH 部分が他の基、例えば、-S、-O または -CH₂ で置き換えられた種に基づく。当業者が認識するであろうとおり、指数 s および t に対応する括弧内の部分の一つ以上は、置換または非置換アルキルまたはヘテロアルキル部分で置き換えられることが可能である。

50

【0142】

より具体的には、本発明は、 $\text{NH}-\text{L}-\text{R}^1$ が： $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$ 、および NHR^1 である化合物を用いる。これらの式において、指数 a 、 b および d は $0 \sim 20$ 、好ましくは $1 \sim 5$ の整数から独立して選択される。指数 c は、 $1 \sim$ 約 2500 の整数である。

【0143】

10

例示的な実施形態において、 c は、PEG 部分がおよそ 1 kD 、 5 kD 、 10 kD 、 15 kD 、 20 kD 、 25 kD 、 30 kD 、 35 kD 、 40 kD または 45 kD であるよう選択される。

【0144】

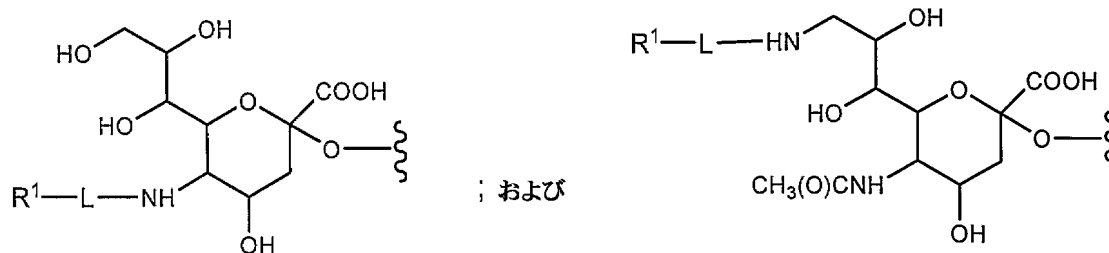
簡便性の目的のために、このセクションの残りにおけるグリコシルリンク基は、シアリル部分に基づくこととなる。しかしながら、当業者は、マンノシル、ガラクトシル、グルコシル、またはフコシルなどの他のグリコシル部分が、シアリル部分の代わりに用いられることができることを認識するであろう。

【0145】

例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、無処置グリコシルリンク基であり、ここで、リンク基を形成するグリコシル部分または部分は、化学的（例えば、ナトリウムメタ過ヨウ素酸）または酵素的（例えば、オキシダーゼ）プロセスによっては分解されない。本発明の選択された複合体は、アミノサッカライドのアミン部分、例えば、マンノサミン、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸等に結合された修飾基を含む。このモチーフに基づく例示的な修飾基—無処置グリコシルリンク基カセットは、式、

20

【化28】



30

を有するものなどのシアル酸構造に基づいている。

【0146】

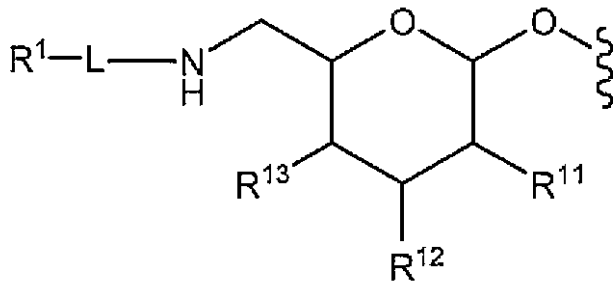
40

上記の式において、 R^1 および L は上記のとおりである。例示的な R^1 基の構造についてのさらなる詳細が以下に提供されている。

【0147】

さらなる例示的な実施形態において、複合体は、ペプチドおよび修飾糖質の間に形成され、ここで、修飾基は、リンカーを介して、修飾糖質の6位の一炭素位置で結合されている。それ故、この実施形態による例示のグリコシルリンク基は、式、

【化 2 9】



10

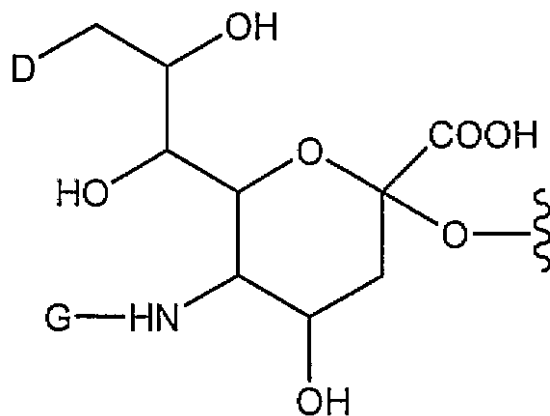
を有し、ここで、ラジカルは上述のとおりである。グリコシルリンク基としては、制限されないが、グルコース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、マンノサミン、N-アセチルマンノサミン等が挙げられる。

【0148】

一実施形態において、本発明は、以下のグリコシルリンク基、

20

【化 3 0】



30

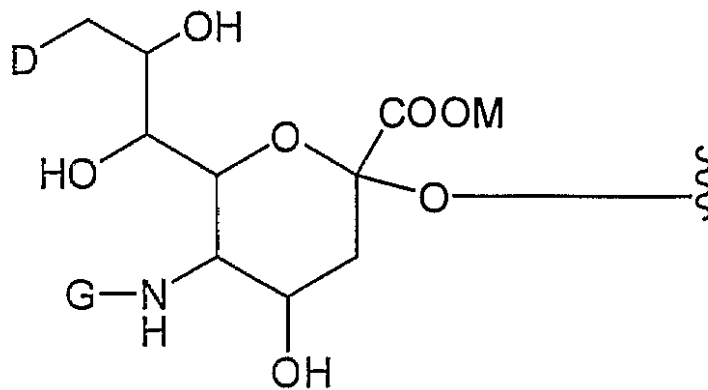
を含むペプチド複合体を提供し、式中、Dは、-OHおよび $R^1-L-HN-$ から選択されるメンバーであり、Gは、Hおよび R^1-L- および $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルから選択されるメンバーであり、 R^1 は、直鎖または分岐ポリ(エチレングリコール)残基を含む部分であり、およびLは、リンカー、例えば、結合(「ゼロ次」、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルである。例示的な実施形態において、DがOHであるとき、Gは R^1-L- であり、およびGが $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルであるときDは $R^1-L-NH-$ である。

40

【0149】

一実施形態において、本発明は、以下のグリコシルリンク基、

【化 3 1】



10

を含むペプチド複合体を提供する。

【0150】

Dは、 $-OH$ および $R^1-L-HN-$ から選択されるメンバーであり、Gは、 R^1-L- および $-C(O)(C_1 \sim C_6)アルキル-R^1$ から選択されるメンバーであり、 R^1 は、直鎖ポリ(エチレングリコール)残基および分岐ポリ(エチレングリコール)残基から選択されるメンバーを含む部分であり、およびMは、H、塩対イオンおよび単一の陰電荷から選択されるメンバーであり、Lは、結合、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるメンバーであるリンカーである。例示的な実施形態において、DがOHであるとき、Gは R^1-L- である。他の例示的な実施形態において、Gが $-C(O)(C_1 \sim C_6)アルキル$ であるときDは $R^1-L-NH-$ である。

20

【0151】

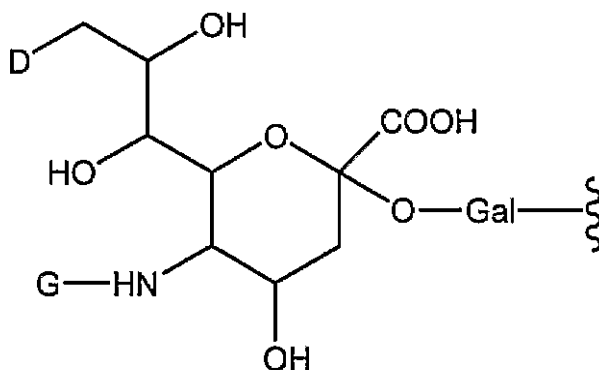
本発明のいずれかの化合物において、 $COOH$ 基は、代替的に、 $COOM$ であることが可能であり、式中、Mは、H、陰電荷、および塩対イオンから選択されるメンバーである。

。

【0152】

本発明は、式、

【化 3 2】



40

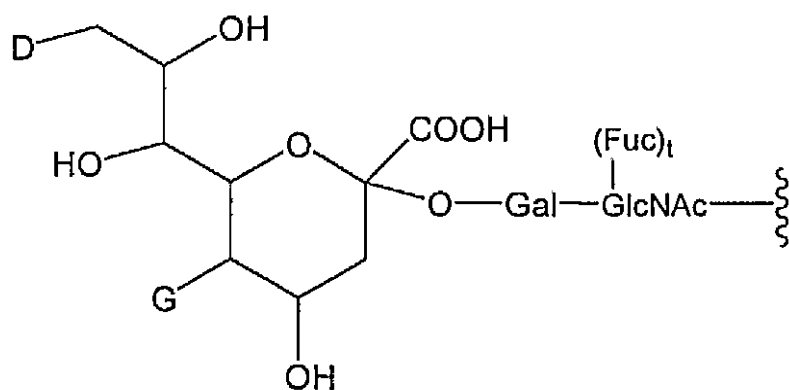
を有するグリコシルリンク基を含むペプチド複合体を提供する。

【0153】

他の実施形態において、グリコシルリンク基は式、

50

【化 3 3】



10

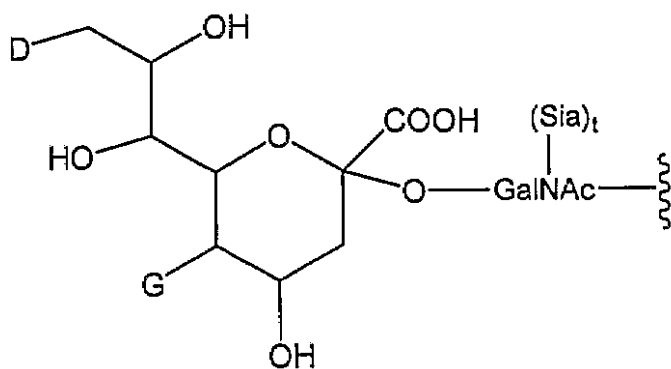
を有し、ここで、指数 t は 0 または 1 である。

【 0 1 5 4】

さらなる例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は式、

【化 3 4】

20



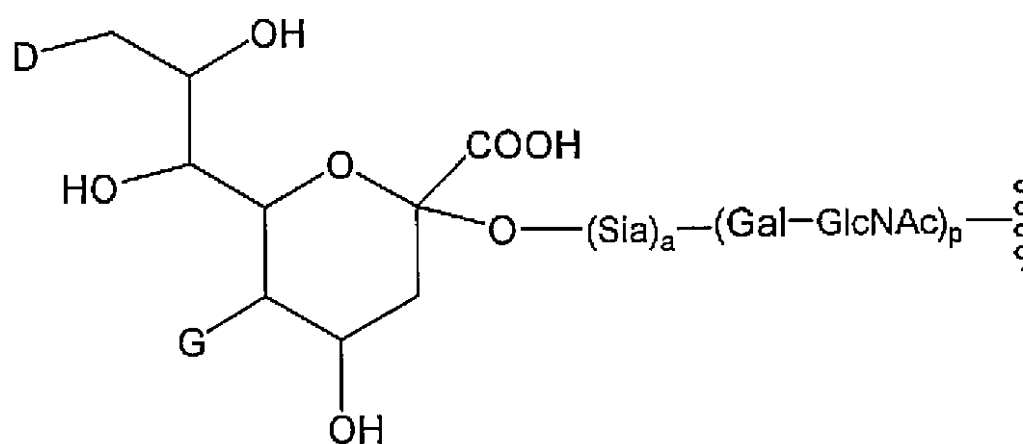
30

を有し、ここで、指数 t は 0 または 1 である。

【 0 1 5 5】

さらに他の実施形態において、グリコシルリンク基は式、

【化 3 5】



10

を有し、ここで、指数 p は、1～10の整数を表し、 a は0または1のいずれかである。

20

【0156】

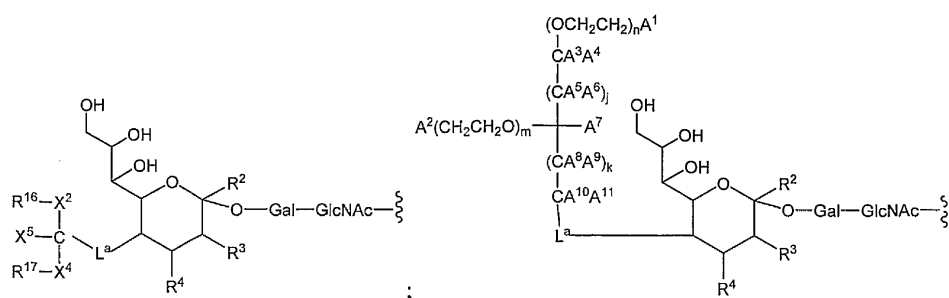
他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、式、

$$\begin{array}{c}
 \text{R}^{16}-\text{X}^2 \\
 | \\
 \text{X}^5-\text{C}-\text{L}^a \\
 | \\
 \text{R}^{17}-\text{X}^4
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH} \\
 | \\
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{R}^2 \\
 | \\
 \text{O} \cdots \text{S} \\
 | \\
 \text{R}^3 \\
 | \\
 \text{R}^4
 \end{array}
 \quad ; \quad
 \begin{array}{c}
 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{A}^1 \\
 | \\
 \text{CA}^3\text{A}^4 \\
 | \\
 (\text{CA}^5\text{A}^6)_j \\
 | \\
 \text{A}^2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}-\text{A}^7 \\
 | \\
 (\text{CA}^8\text{A}^9)_k \\
 | \\
 \text{CA}^{10}\text{A}^{11} \\
 | \\
 \text{L}^a
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH} \\
 | \\
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{R}^2 \\
 | \\
 \text{O} \cdots \text{S} \\
 | \\
 \text{R}^3 \\
 | \\
 \text{R}^4
 \end{array}
 \quad ;$$

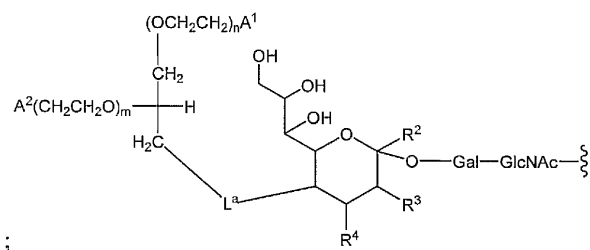
$$\begin{array}{c}
 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{R}^2)(\text{R}^3)(\text{R}^4) \\
 | \\
 \text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m
 \end{array}$$

40

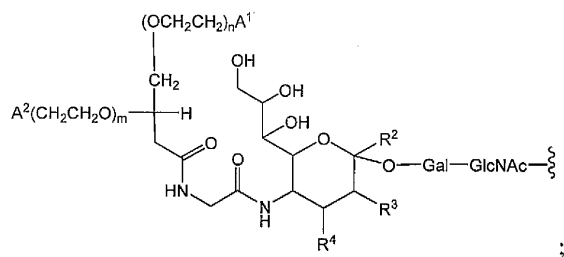
【化 37】



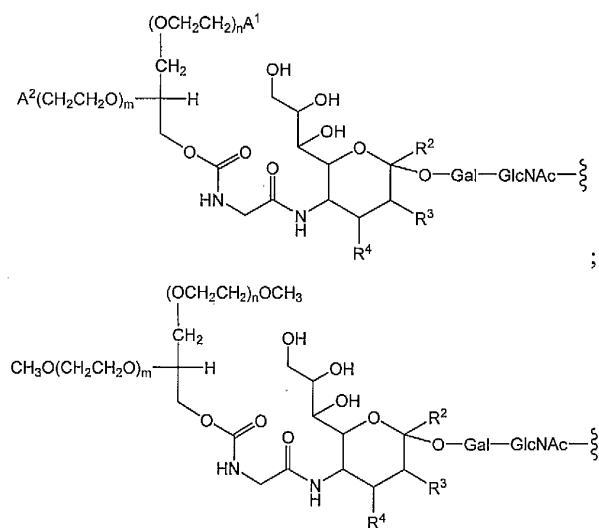
10



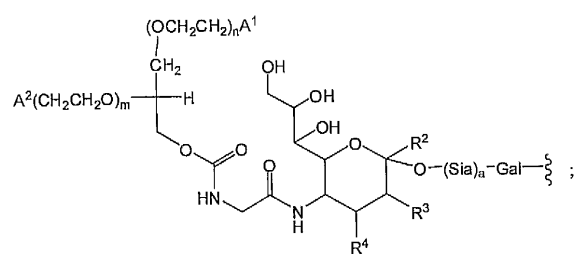
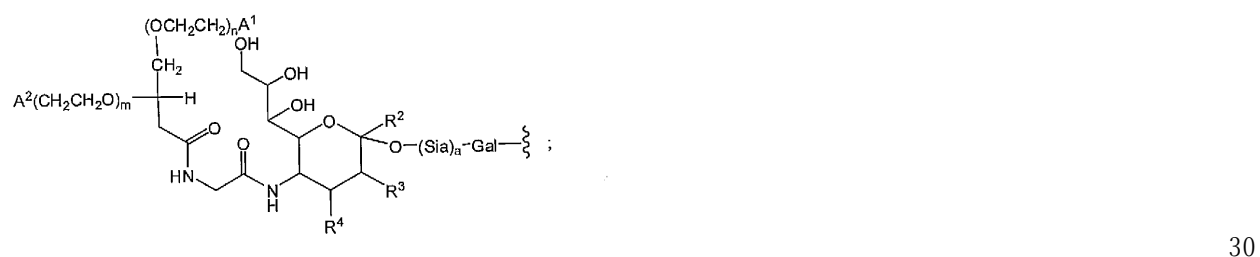
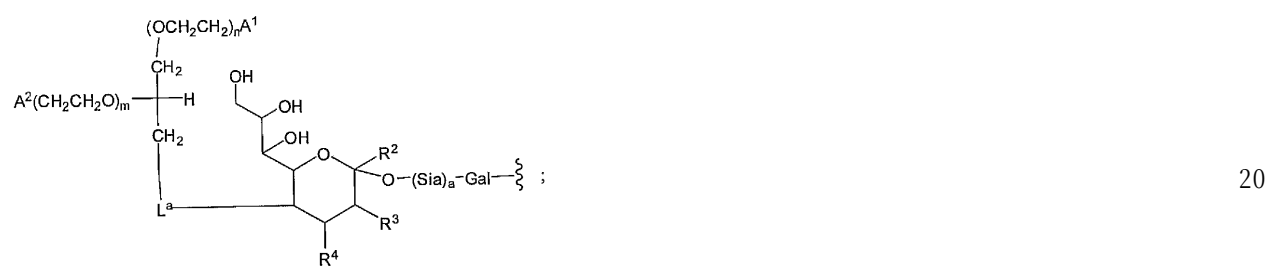
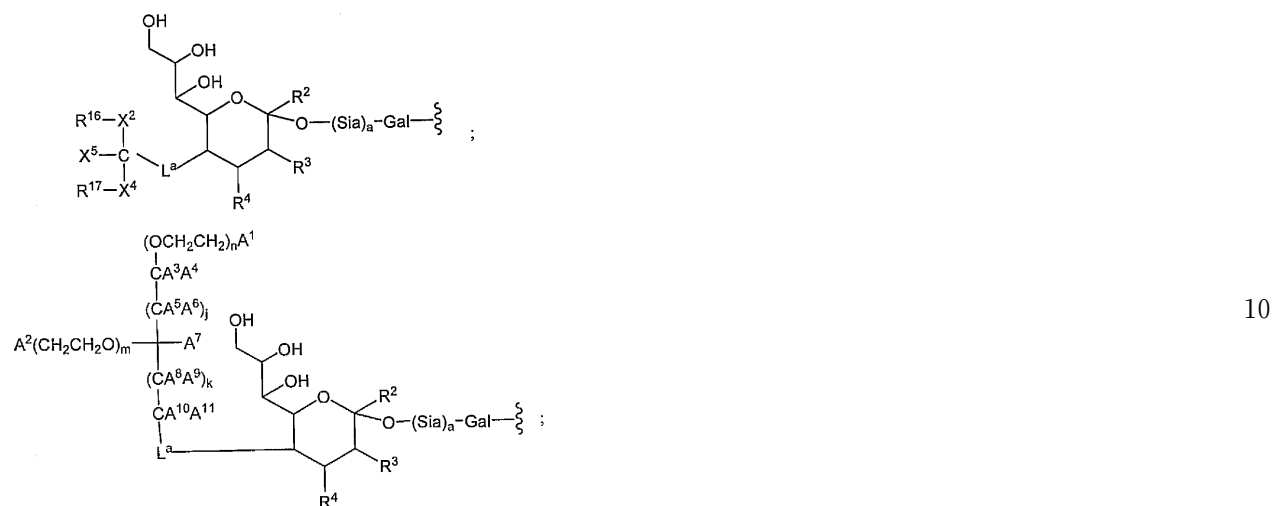
20



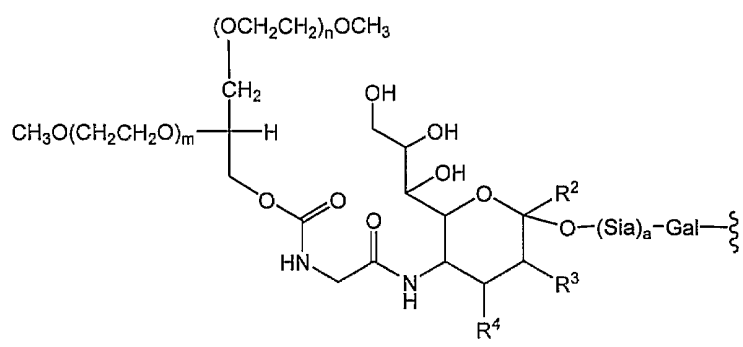
30



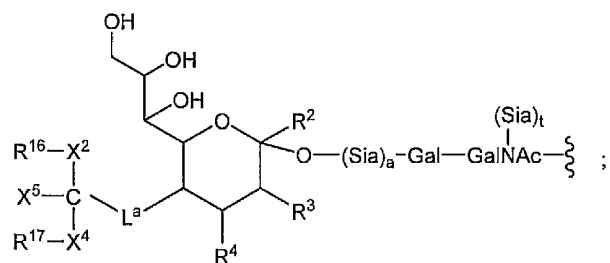
【化 3 8】



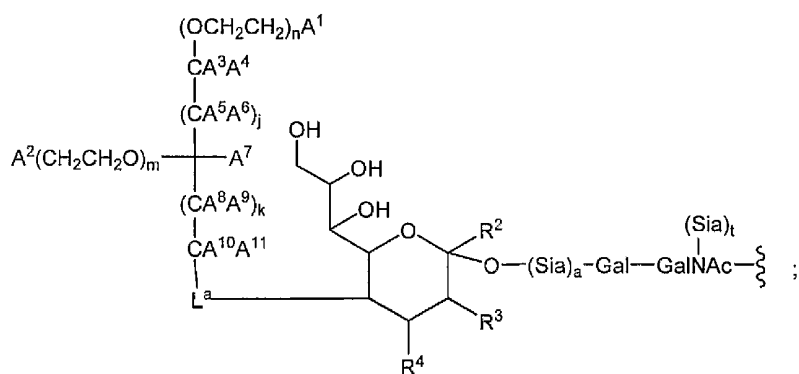
【化 3 9】



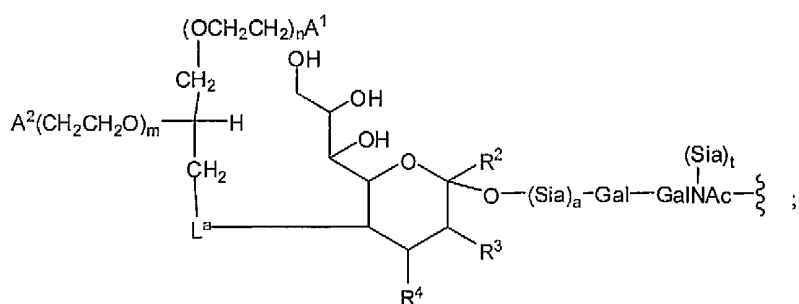
10



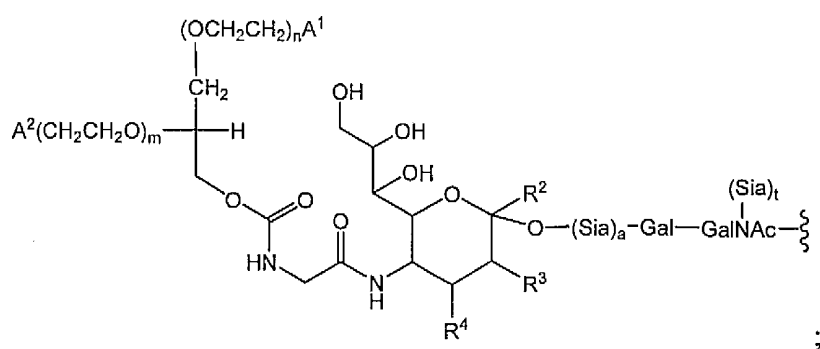
20



30



40



The chemical structure shows a central carbon atom bonded to four groups: a polyether chain $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, a hydrogen atom H , a polyether chain $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$, and an ester-linked side chain. The side chain consists of an ester group $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ connected to a CH_2 group, which is further connected to another ester group $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$. This second ester is linked to a sugar moiety (a six-membered ring with an oxygen atom). The sugar has substituents R^2 , R^3 , and R^4 . It is also substituted with a chain of sialic acid units $-(\text{Sia})_a-\text{Gal}-\text{Gal}-(\text{Sia})_t$ and an NAC group. The NAC group is represented by a wavy line with a vertical bar, indicating a connection to another polymer chain.

The chemical structure shows a branched oligosaccharide. The main chain consists of a glucose unit (C1-C6) linked to a galactose unit (C1'-C6') via a 1-6 glycosidic bond. The glucose unit has a core fucose (R¹⁶-X²-C(X⁵)(X⁴)-R¹⁷) attached at C2 via a linker L^a. The galactose unit has a branch at C4 consisting of a galactose unit (C1''-C6'') linked to an N-acetylglucosamine unit (C1'''-C6''') via a 1-6 glycosidic bond. The N-acetylglucosamine unit is further linked to an amino acid (AA) via a peptide bond. The amino acid is part of a polymer chain, indicated by wavy lines. The structure is labeled with various R groups and subscripts (a, t) to denote repeating units.

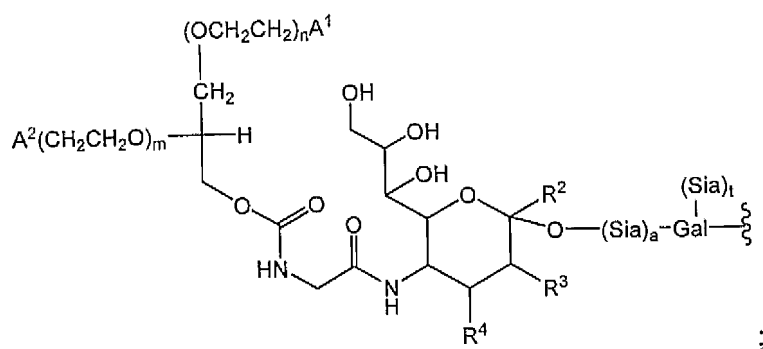
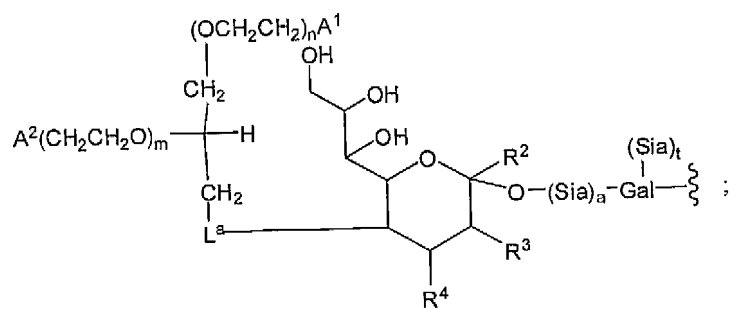
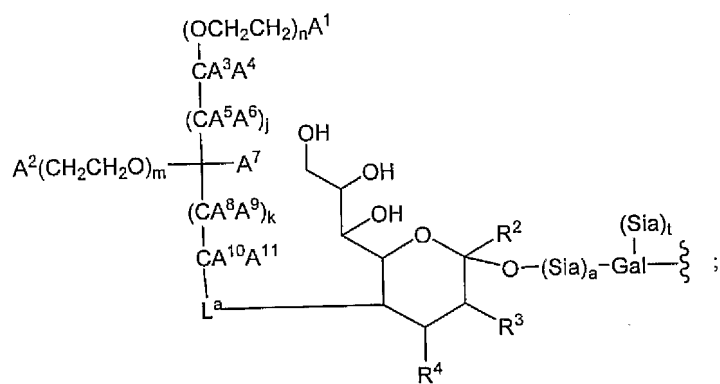
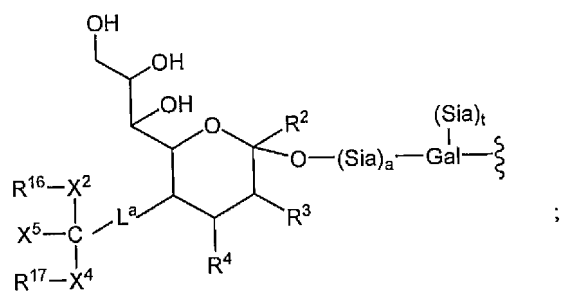
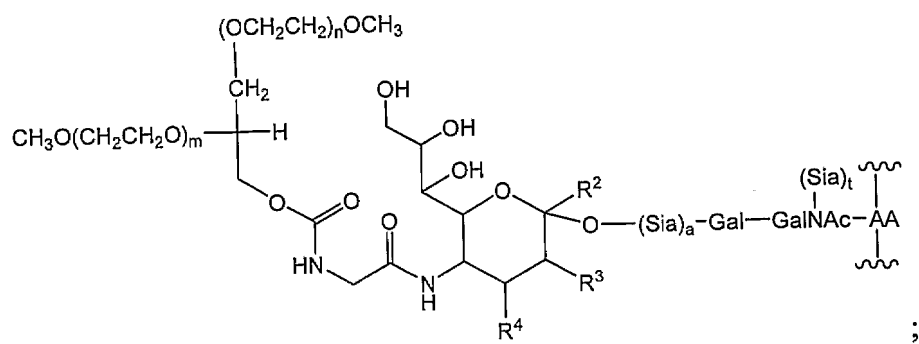
$$\begin{array}{c}
 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{A}^1 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{A}^2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m - \text{C} - \text{H} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{L}^a
 \end{array}$$

R²
O—(Sia)_a—Gal—GalNAC—AA
|
R³

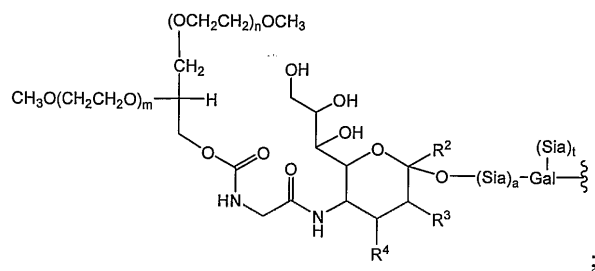
R⁴

[illegible]

【化 4 1】

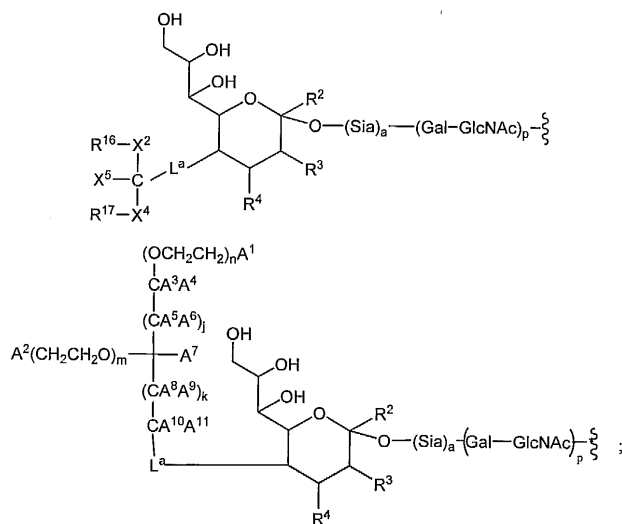


【化 4 2】



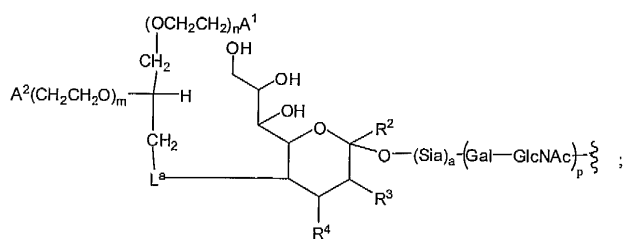
;

10



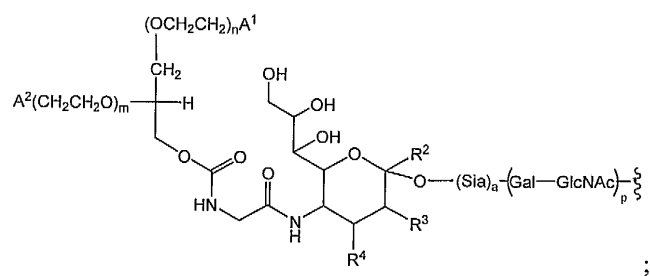
;

20



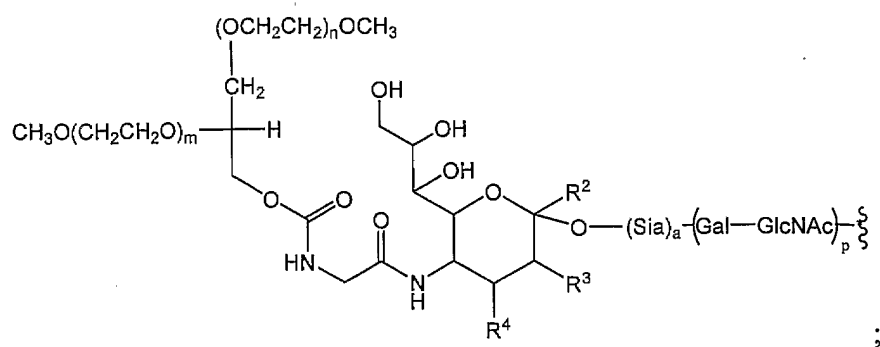
;

30

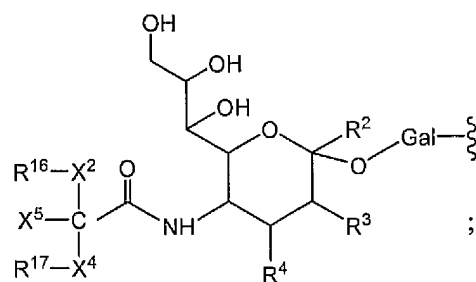


;

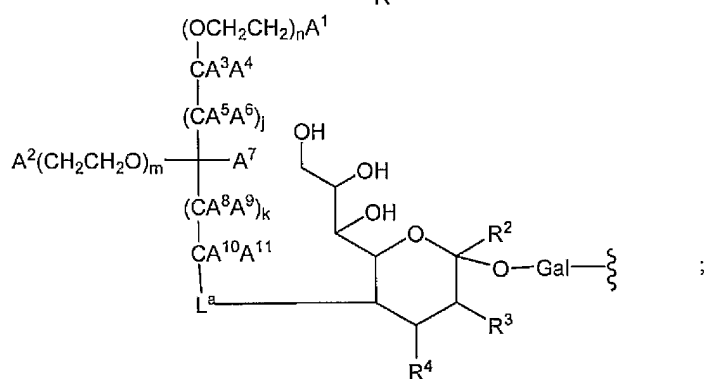
【化 4 3】



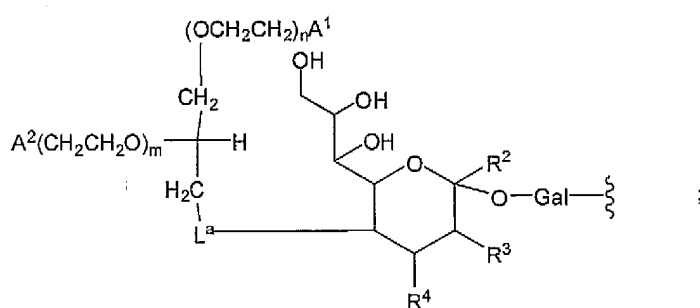
10



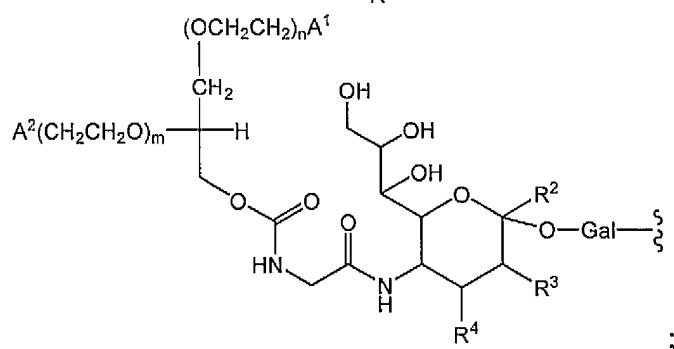
20



30



40

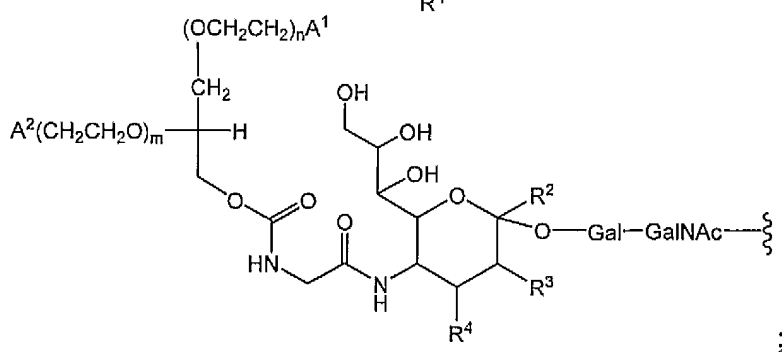
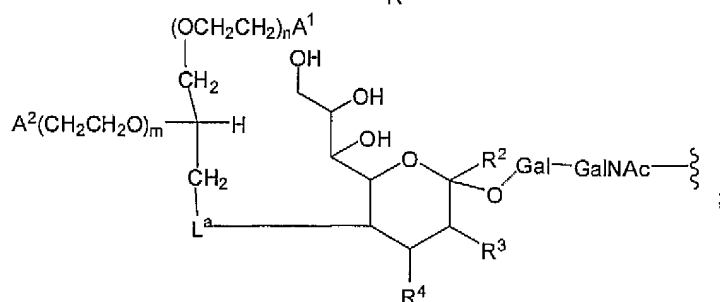
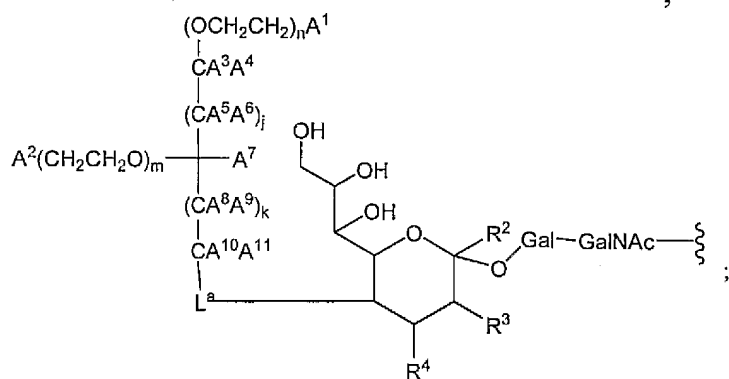
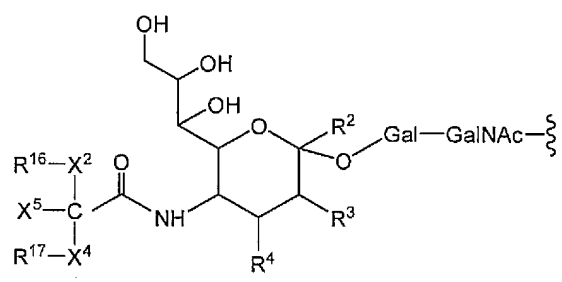
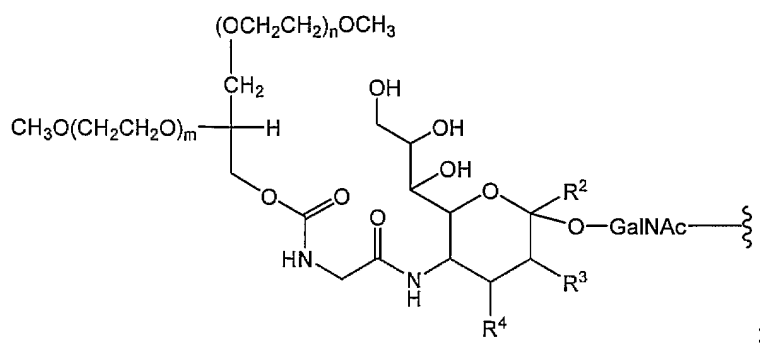


The diagram illustrates a branched dendritic polymer structure. A central carbon atom is bonded to four groups: $R^{16}-X^2$, $R^{17}-X^4$, X^5 , and a carbonyl group ($C=O$) which is part of an amide linkage ($-NH-$) to a sugar moiety. This sugar moiety is a six-membered ring with hydroxyl groups at the 2 and 3 positions, and substituents R^2 , R^3 , and R^4 . The R^2 group is linked via an oxygen atom to a GalNAc group, which is further connected to a wavy line representing a polymer chain. The amide nitrogen is also connected to a wavy line representing a polymer chain. The central carbon atom is also connected to a wavy line representing a polymer chain. The structure is further extended by a series of repeating units: $(OCH_2CH_2)_m A^1$, $CA^3 A^4$, $(CA^5 A^6)_j$, $A^2(CH_2CH_2O)_m$, A^7 , $(CA^8 A^9)_k$, $CA^{10} A^{11}$, and L^a . The L^a group is connected to another sugar moiety, which is identical to the first one, with substituents R^2 , R^3 , and R^4 , and a GalNAc group connected to a wavy line representing a polymer chain.

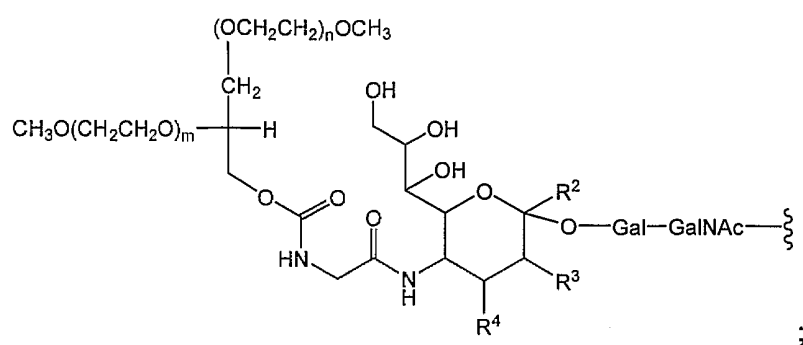
$$\begin{array}{c}
 \text{(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{A}^1 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{A}^2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m - \text{C} - \text{H} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{L}^a
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{C} - \text{R}^2 \\
 | \\
 \text{O} - \text{GalNAc} - \text{---} \\
 | \\
 \text{R}^3 \\
 | \\
 \text{R}^4
 \end{array}$$
$$\begin{array}{c}
 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{A}^1 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{A}^2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m - \text{C} - \text{H} \\
 | \\
 \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} -
 \end{array}$$

The above structure connects to a pyranose ring at its right end. The pyranose ring has substituents R², R³, and R⁴. An O-GalNAc group is attached to the ring, which is further linked to a chain of three sugar units represented by vertical bars.

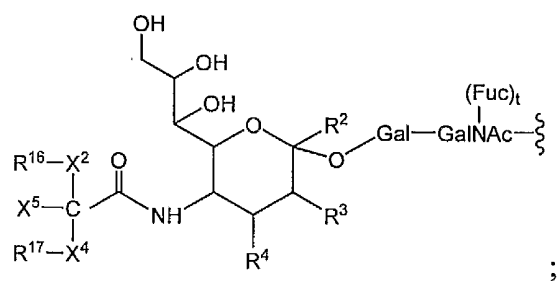
【化 4 5】



【化 4 6】

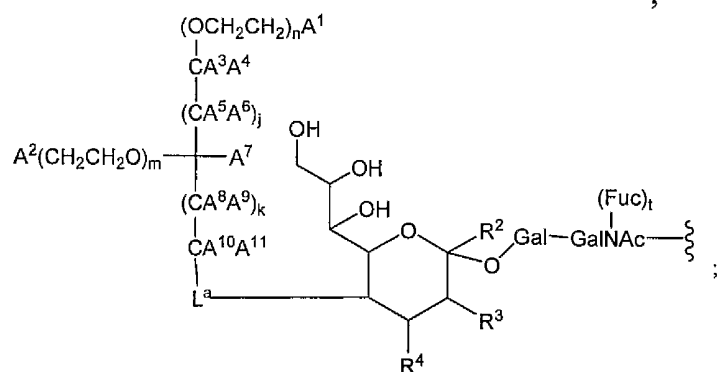


10

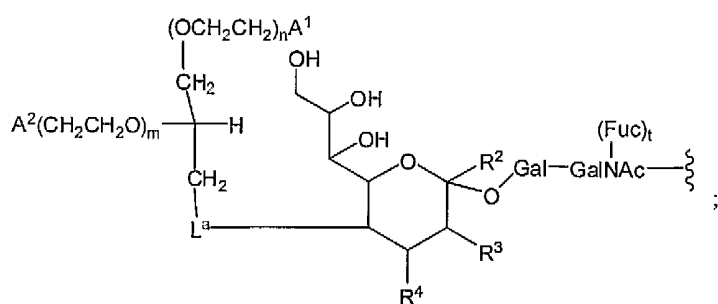


;

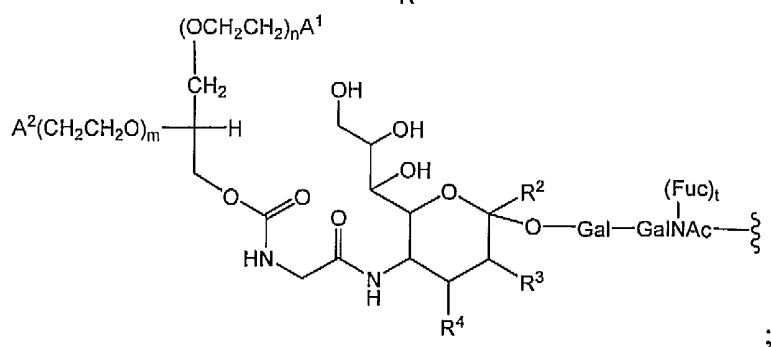
20



30

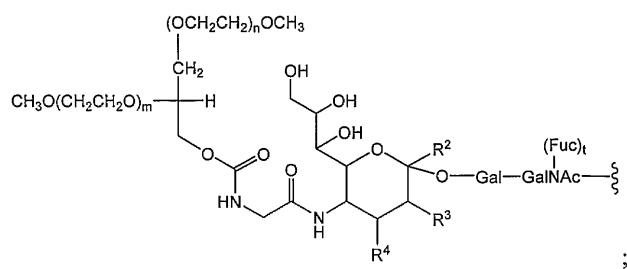


40

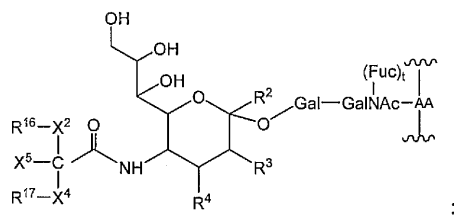


;

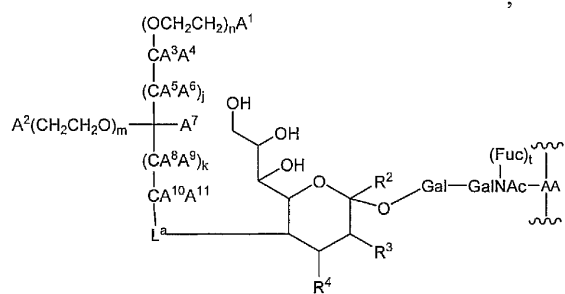
【化 4 7】



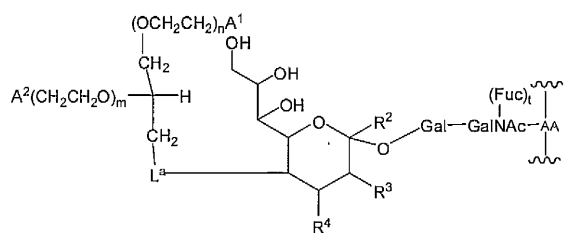
10



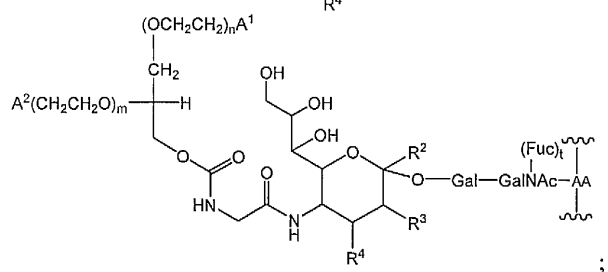
;



20



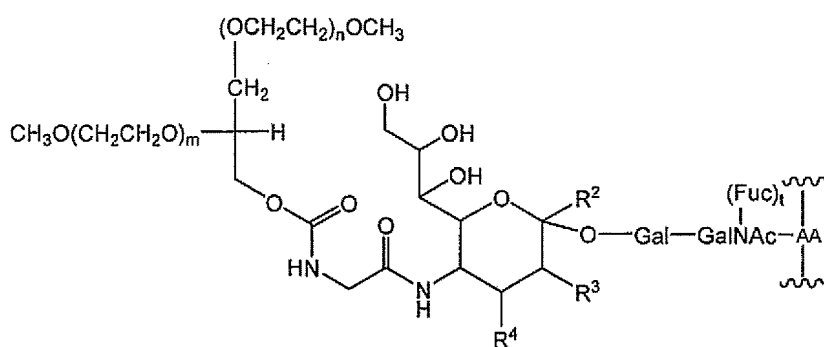
30



;

40

【化 4 8】



10

から選択されるグリコシル部分を含み、ここで、指数 a およびリンカー L^a は上述のとおりである。指数 p は、1～10の整数である。指数 t および a は、0または1から独立して選択される。これらの基の各々は、上記に規定の一分岐、二分岐、三分岐および四分岐サッカライド構造の構成成分として含まれることが可能である。AAはペプチドのアミノ酸残基である。

【0157】

例示的な実施形態において、PEG部分は、約20KDaの分子量を有する。他の例示的な実施形態において、PEG部分は約5KDaの分子量を有する。他の例示的な実施形態において、PEG部分は約10KDaの分子量を有する。他の例示的な実施形態において、PEG部分は約40KDaの分子量を有する。

20

【0158】

例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、システイン残基に基づく分岐SA-PEG-10KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つまたは2つは、ペプチドに共有結合されている。他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、リシン残基に基づく分岐SA-PEG-10KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つまたは2つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、システイン残基に基づく分岐SA-PEG-10KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つまたは2つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、リシン残基に基づく分岐SA-PEG-10KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つまたは2つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、システイン残基に基づく分岐SA-PEG-5KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つ、2つまたは3つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、リシン残基に基づく分岐SA-PEG-5KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つ、2つまたは3つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、システイン残基に基づく分岐SA-PEG-40KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つまたは2つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、リシン残基に基づく分岐SA-PEG-40KDa部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の1つまたは2つはペプチドに共有結合されている。

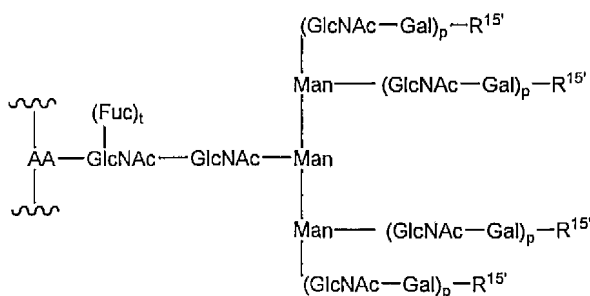
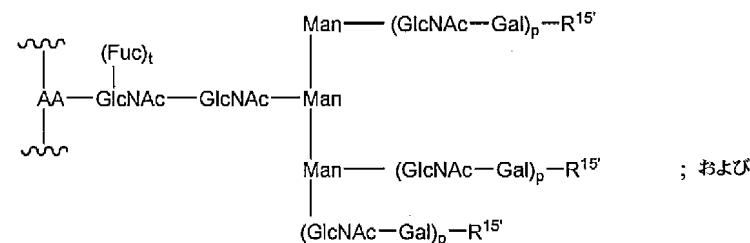
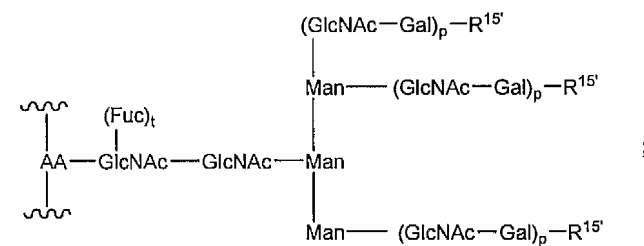
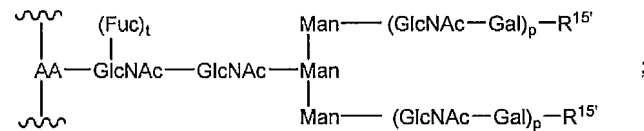
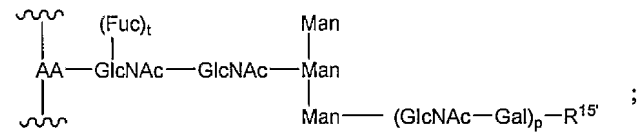
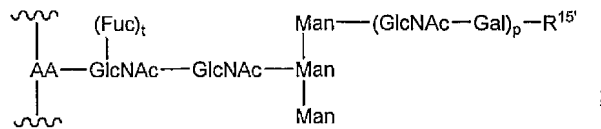
30

40

【0159】

例示的な実施形態において、本発明のグリコPEG化ペプチド複合体は、以下に規定の式、

【化 4 9】



から選択される。

【0160】

上記の式において、指数 t は、0～1の整数であり、および指数 p は、1～10の整数である。符号 $\text{R}^{15'}$ は、H、OH（例えば、 $\text{Gal} \text{---} \text{OH}$ ）、シアリル部分、シアリルリンク基（すなわち、シアリルリンク基—高分子修飾基（ $\text{Sia} \text{---} \text{L} \text{---} \text{R}^1$ ）、またはポリマー修飾シアリル部分が結合されたシアリル部分（例えば、 $\text{Sia} \text{---} \text{Sia} \text{---} \text{L} \text{---} \text{R}^1$ ）（「 $\text{Sia} \text{---} \text{Sia}^p$ 」））を表す。例示的なポリマー修飾糖部分は、式 I および II による構造を有する。本発明の例示的なペプチド複合体は、式 I または II による構造を含む $\text{R}^{15'}$ を有する少なくとも1つのグリカンを含むであろう。式 I および II の空原子価の酸素は、好ましくは、グリコシドリンケージを介して、Gal または GalNAc 部分の炭素に結合されている。さらなる例示的な実施形態において、酸素は、ガラクトー

ス残基の位置 3 で炭素に結合されている。例示的な実施形態において、修飾シアル酸は、 $\alpha 2, 3$ -でガラクトース残基にリンクされている。他の例示的な実施形態において、シアル酸は、 $\alpha 2, 6$ -でガラクトース残基にリンクされている。

【0161】

例示的な実施形態において、シアリルリンク基は、ポリマー修飾シアリル部分が結合しているシアリル部分である（例えば、 $\text{Sia}-\text{Sia}-\text{L}-\text{R}^1$ ）（「 $\text{Sia}-\text{Sia}^p$ 」）。ここで、グリコシルリンク基は、ガラクトシル部分にシアリル部分、

【化50】



10

を介してリンクされている。

【0162】

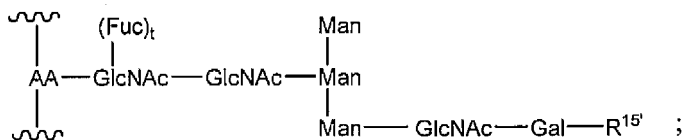
このモチーフによる例示的な種は、 $\text{Sia}-\text{L}-\text{R}^1$ をグリカンの末端シアル酸に、 $\text{Sia}-\text{Sia}$ 結合、例えば、 $\text{CST}-\text{II}$ 、 $\text{ST8Sia}-\text{II}$ 、 $\text{ST8Sia}-\text{III}$ および $\text{ST8Sia}-\text{IV}$ を形成する酵素を用いて複合化することにより調製される。

20

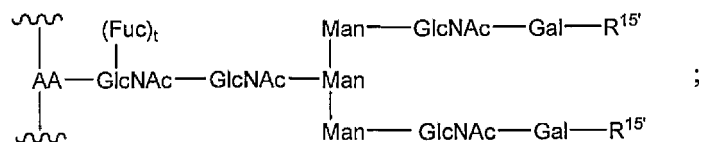
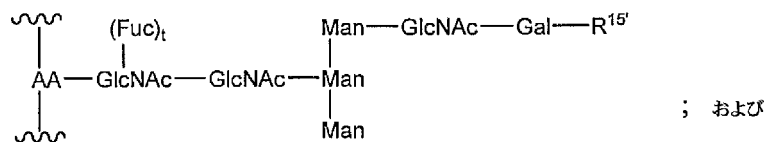
【0163】

他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体のグリカンは、群、

【化51】



30



40

から選択される式およびこれらの組み合わせを有する。

【0164】

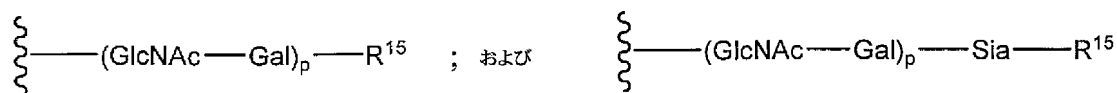
上記式の各々において、 $\text{R}^{15'}$ は上述のとおりである。しかも、本発明の例示的なペプチド複合体は、式 I または II による構造を有する R^{15} 部分を有する少なくとも 1 つのグリカンを含むであろう。

【0165】

他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、式、

50

【化 5 2】



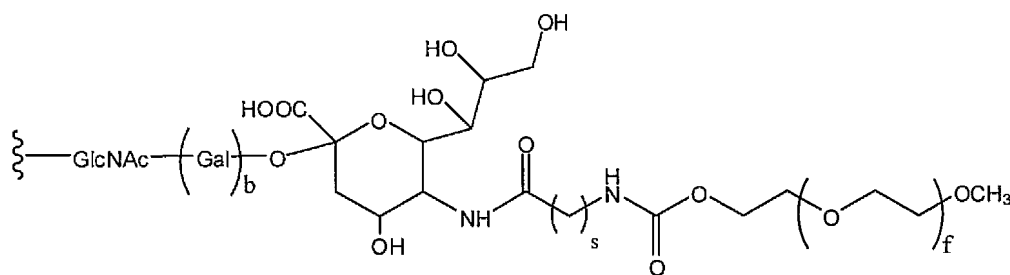
を有する少なくとも 1 種のグリコシルリンク基を含み、式中、 R^{15} は、前記シアリルリンク基であり、および指数 p は、1 ~ 10 から選択される整数である。

10

【0166】

例示的な実施形態において、グリコシルリンク部分は、式、

【化 5 3】



20

を有し、ここで、 b は、0 ~ 1 の整数である。指数 s は、1 ~ 10 の整数を表し、および指数 f は 1 ~ 2500 の整数を表す。

【0167】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は PEG である。他の例示的な実施形態において、PEG 部分は、約 20 KDa の分子量を有する。他の例示的な実施形態において、PEG 部分は、約 5 KDa の分子量を有する。他の例示的な実施形態において、PEG 部分は、約 10 KDa の分子量を有する。他の例示的な実施形態において、PEG 部分は、約 40 kDa の分子量を有する。他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、Asn145、Asn322、Ser52、Ser60 またはこれらの組み合わせに結合されている。

30

【0168】

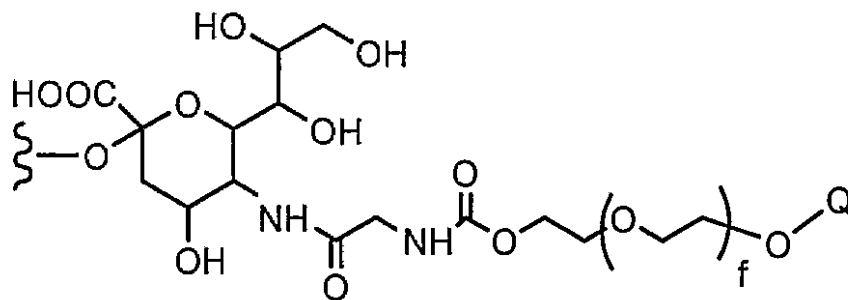
例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は直鎖 SA-PEG-10 KDa 部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の 1 つまたは 2 つはペプチドに共有結合されている。他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は直鎖 SA-PEG-20 KDa 部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の 1 つまたは 2 つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は直鎖 SA-PEG-5 KDa 部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の 1 つ、2 つまたは 3 つはペプチドに共有結合されている。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は直鎖 SA-PEG-40 KDa 部分であり、およびこれらのグリコシルリンク基の 1 つまたは 2 つはペプチドに共有結合されている。

40

【0169】

他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、式、

【化 5 4】



10

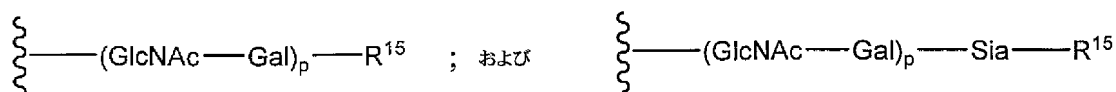
を有するシアリルリンク基である。

【0170】

他の例示的な実施形態において、Qは、HおよびCH₃から選択されるメンバーである。他の例示的な実施形態において、前記グリコシルリンク基は、式、

【化 5 5】

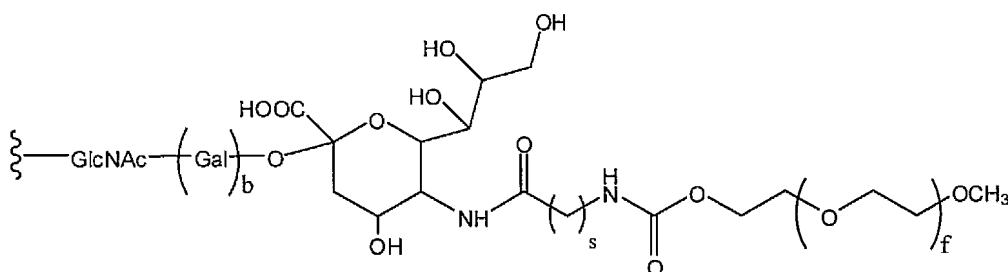
20



を有し、式中、R¹⁵は前記シアリルリンク基であり、および指数pは、1～10から選択される整数である。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、式、

【化 5 6】

30



40

を含み、式中、指数bは0および1から選択される整数である。例示的な実施形態において、指数sは1であり、および指数fは約200～約300から選択される整数である。他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、SA-PEG-10KDaおよびSA-PEG-20KDaから選択されるメンバーであり、ここで、因子VII/因子VIIaペプチドに共有結合された前記グリコシルリンク基の数は、1～2から選択される整数である。他の例示的な実施形態において、グリコシルリンク基は、SA-PEG-5KDaおよびSA-PEG-40KDaから選択されるメンバーであり、ここで、因子VII/因子VIIaペプチドに共有結合された前記グリコシルリンク基の数は、1～3

50

から選択される整数である。

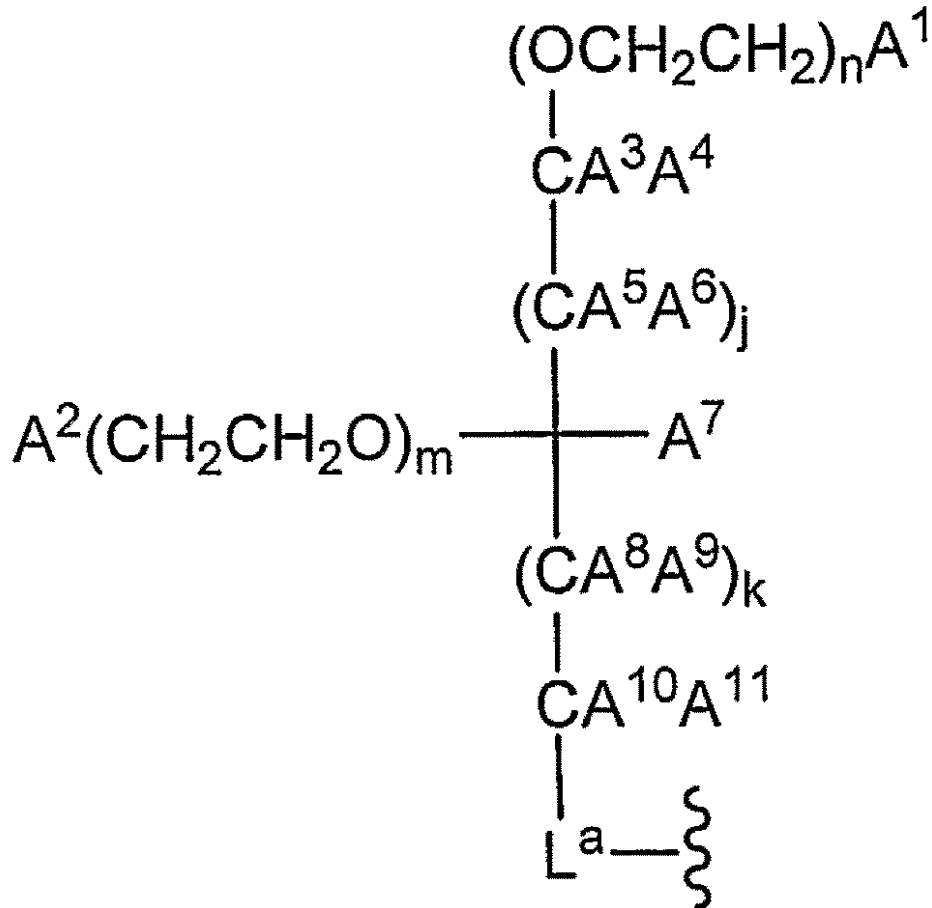
【0171】

II. D. 修飾基

本発明のペプチド複合体は修飾基を含む。この基は、因子VII／因子VIIaペプチドに、アミノ酸またはグリコシルリンク基を介して共有結合していることが可能である。

他の例示的な実施形態において、修飾基がペプチド

【化57】



である場合、ペプチド複合体は、図13におけるペプチドから選択されるメンバーである。他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体におけるペプチドは、因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、α₁-アンチトリプシン（ATT、またはα-1プロテアーゼ抑制剤、グルコセレブロシダーゼ、組織-タイプラスミノゲン活性因子（TPA）、インターロイキン-2（IL-2）、ウロキナーゼ、ヒトデオキシリボヌクレアーゼ、インスリン、B型肝炎表面タンパク質（HbsAg）、ヒト成長ホルモン、TNF受容体-IgG Fc領域融合タンパク質（エンブレ（Enbrel）（商標））、抗HER2モノクローナル抗体（ヘルセプチン（Herceptin）（商標））、呼吸器多核体ウイルスのタンパク質Fに対するモノクローナル抗体（シナジス（Synagis）（商標））、TNF-αに対するモノクローナル抗体（レミカーデ（Remicade）（商標））、糖タンパク質Ilg／IIIIaに対するモノクローナル抗体（レオプロ（Reopro）（商標））、CD20に対するモノク

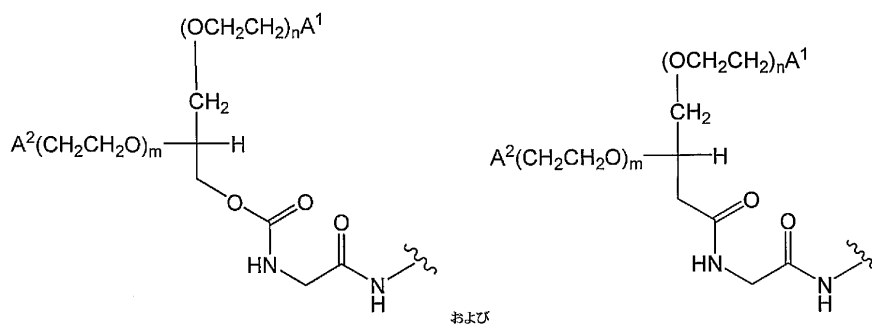
ローナル抗体（リツキサン（Rituxan）（商標））、抗トロンビンⅢ（ATⅢ）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、 α -ガラクトシダーゼ（ファブラザイム（Fabrazyme）（商標））、 α -イズロニダーゼ（アルズラザイム（Aldurazyme）（商標））、卵胞刺激ホルモン、 β -グルコシダーゼ、抗TNF- α モノクローナル抗体（MLB5075）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、 β -グルコシダーゼ（MLB5064）、 α -ガラクトシダーゼA（MLB5082）および線維芽細胞増殖因子から選択されるメンバーである。「修飾基」は、標的指向化部分、治療的部分、生体分子を含む多様な構造を包含することが可能である。さらに、「修飾基」は高分子修飾基を含み、これは、身体における生体利用率または半減期などのペプチドの特性を変化させることが可能であるポリマーである。

10

【0172】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

【化58】

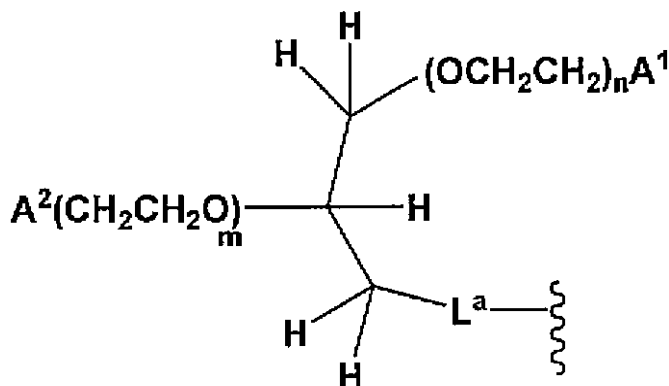


20

【0173】

上記式による他の例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

【化59】



40

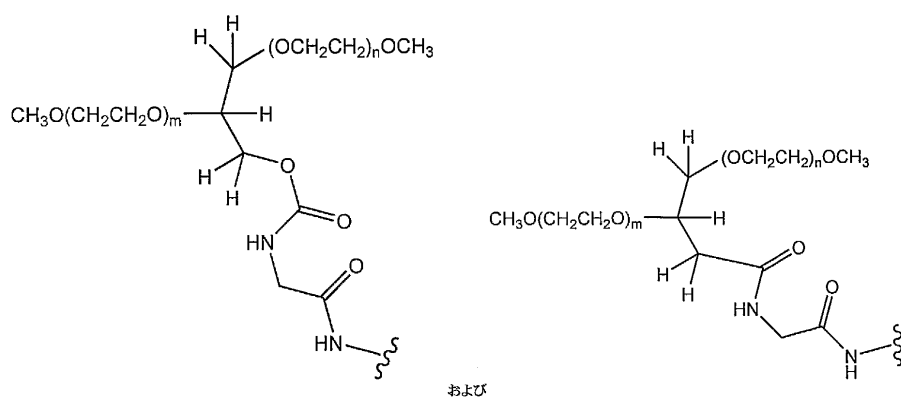
例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、各々、 $-OH$ および $-OCH_3$ から選択されるメンバーである。

【0174】

この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

50

【化 6 0】



10

を含む。

【0175】

簡便性の目的のために、このセクションの残りにおける修飾基は、水溶性および不水溶性ポリマーなどの高分子修飾基に大きく基づいていることとなる。しかしながら、当業者は、標的指向化部分、治療的部分および生体分子などの他の修飾基が、高分子修飾基の代わりに用いられることができることを認識するであろう。

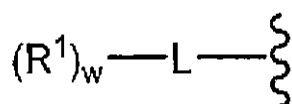
【0176】

20

I I. D. i. 修飾基のリンカー

修飾基のリンカーは、修飾基（すなわち高分子修飾基、標的指向化部分、治療的部分および生体分子）をペプチドに結合するために役立つ。例示的な実施形態において、高分子修飾基は、一般的には、以下に示すリンカー、L、

【化 6 1】



30

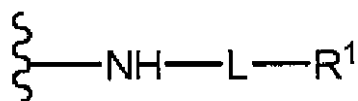
を介することで、コア上のヘテロ原子、例えば窒素を介してグリコシルリンク基に結合されている。R¹は高分子部分であり、およびLは結合およびリンク基から選択される。指数wは、1～6、好ましくは1～3およびより好ましくは1～2から選択される整数を表す。例示的なリンク基は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル部分およびシアル酸を含む。リンカーの例示的な成分は、アシル部分である。

【0177】

本発明による例示的な化合物は上記式 I または I I による構造を有し、ここで、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶ または R^{6'} の少なくとも1つは、式、

【化 6 2】

40



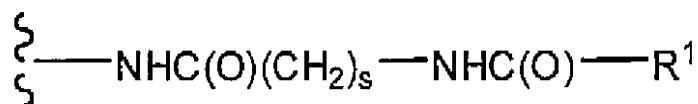
を有する。

【0178】

この実施形態による他の例において、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶ または R^{6'} の少

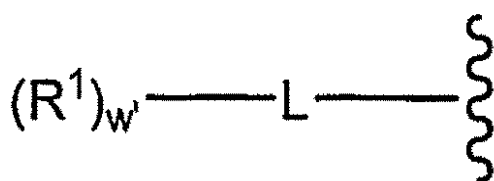
50

なくとも1つは、式、
【化63】



を有し、ここで、sは0～20の整数であり、およびR¹は直鎖高分子修飾部分である。
【0179】 10

例示的な実施形態において、高分子修飾基—リンカー構造は、中央部分に結合された2つ以上の高分子鎖を含む分岐構造である。この実施形態において、構造は、式、
【化64】



20

を有し、ここで、R¹およびLは上述のとおりであり、およびw'は、2～6、好ましくは2～4およびより好ましくは2～3の整数である。

【0180】

Lが結合である場合、これは、R¹の前駆体上の反応性官能基と、サッカリルコア上の補完的な反応性の反応性官能基との間に形成される。Lが非—ゼロ次リンカーである場合、Lの前駆体が、R¹前駆体との反応の前にグリコシル部分上にあることが可能である。あるいは、R¹およびLの前駆体は、予め形成され、その後グリコシル部分に結合されるカセットに組み込まれることが可能である。本願明細書に記載されているとおり、適切な反応性官能基を有する前駆体の選択および調製は、当業者の能力の範囲内である。しかも、前駆体のカップリングは、技術分野においてよく理解されている化学によって進行する。

30

【0181】

例示的な実施形態において、Lは、アミノ酸、または小型ペプチド（例えば、1～4アミノ酸残基）から、高分子修飾基が置換アルキルリンカーを介して結合された修飾糖質を提供することにより形成されるリンク基である。例示的なリンカーとしては、グリシン、リシン、セリンおよびシステインが挙げられる。PEG部分は、リンカーのアミン部分に、アミドまたはウレタン結合を介して結合されていることが可能である。PEGは、システインおよびセリンの硫黄または酸素原子に、チオエーテルまたはエーテル結合を、それぞれ介してリンクされている。

40

【0182】

例示的な実施形態において、R⁵は高分子修飾基を含む。他の例示的な実施形態において、R⁵は、高分子修飾基および修飾基を分子の残りに結合するリンカー、Lの両方を含む。上述のとおり、Lは、直鎖または分岐構造であることが可能である。同様に、高分子修飾基は分岐または直鎖であることが可能である。

【0183】

II. D. ii. 水溶性ポリマー

多くの水溶性ポリマーが当業者に公知であり、本発明の実施に有用である。水溶性ポリマーという用語は、サッカライド（例えば、デキストラン、アミロース、ヒアルロン酸、ポリ（シアル酸）、ヘパラン、ヘパリン等）；ポリ（アミノ酸）、例えば、ポリ（アスパ

50

ラギン酸)およびポリ(グルタミン酸);核酸;合成ポリマー(例えば、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エーテル)、例えば、ポリ(エチレングリコール);ペプチド、タンパク質等などの種を包含する。本発明は、ポリマーは複合体の残りが結合することが可能である点を含まなければならないことのみを制限として、いずれの水溶性ポリマーでも実施され得る。

【0184】

ポリマーの活性化方法はまた、国際公開第94/17039号パンフレット、米国特許第5,324,844号明細書、国際公開第94/18247号パンフレット、国際公開第94/04193号パンフレット、米国特許第5,219,564号明細書、米国特許第5,122,614号明細書、国際公開第90/13540号パンフレット、米国特許第5,281,698号明細書、およびさらに国際公開第93/15189号パンフレットにおいて見出すことが可能であり、ならびに、活性化ポリマーおよびペプチド間の複合化の方法は、例えば凝塊因子V I I I (国際公開第94/15625号パンフレット)、ヘモグロビン(国際公開第94/09027号パンフレット)、酸素担持分子(米国特許第4,412,989号明細書)、リボヌクレアーゼおよび超酸化ジスムターゼ(ペロネーゼ(Veronese)ら、App. Biochem. Biotech. 11:第141~45ページ(1985年))に見出すことが可能である。

【0185】

例示的な水溶性ポリマーは、ポリマーのサンプルにおける相当な比率のポリマー分子がおおよそ同一の分子量のものであるものであり、このようなポリマーは「均質分散」である。

【0186】

本発明は、ポリ(エチレングリコール)複合体に言及することによりさらに例示されている。PEGの官能化および複合化についての数々の概説および専攻論文が入手可能である。例えば、ハリス(Harris)、Macronol. Chem. Phys. C25:第325~373ページ(1985年);スカウテン(Scouten)、Methods in Enzymology 135:第30~65ページ(1987年);ワン(Wong)ら、Enzyme Microb. Technol. 14:第866~874ページ(1992年);デルガド(Delgado)ら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:第249~304ページ(1992年);ザリプスキー(Zalipsky)、Bioconjugate Chem. 6:第150~165ページ(1995年);およびバードラ(Bhadra)ら、Pharmazie, 57:第5~29ページ(2002年)を参照のこと。反応性PEG分子の調製経路および、反応性分子を用いる複合体の形成経路は、技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,672,662号明細書は、直鎖または分岐ポリ(アルキレンオキシド)、ポリ(オキシエチレート化ポリオール)、ポリ(オレフィン系アルコール)、およびポリ(アクリロモルホリン)から選択されるポリマー酸の活性エステルの水溶性および単離可能な複合体を開示する。

【0187】

米国特許第6,376,604号明細書は、ポリマーの末端ヒドロキシルと、ジ(1-ベンゾトリアゾリル)カーボネートとを有機溶剤中に反応させることにより、水溶性および非-ペプチド性ポリマーの水溶性1-ベンゾトリアゾリルカーボネートエステルを調製する方法を規定する。活性エステルは、タンパク質またはペプチドなどの生体活性剤と複合体を形成するために用いられる。

【0188】

国際公開第99/45964号パンフレットは、生体活性剤と、ポリマー主鎖に安定なリンケージを介してリンクされた少なくとも1つの終端を有するポリマー主鎖を含む活性化水溶性ポリマーとを含む複合体を記載し、ここで、少なくとも1つの終端は分岐部分にリンクされた近位の反応性基を有する分岐部分を含み、ここで、生体活性剤は、近位の反応性基の少なくとも1つにリンクされている。他の分岐ポリ(エチレングリコール)が国

際公開第 96/21469 号パンフレットに記載されており、米国特許第 5,932,462 号明細書は、反応性官能基を含む分岐末端を含む分岐 PEG 分子と形成された複合体を記載している。遊離性の反応性基が、タンパク質またはペプチドなどの生体活性種と反応するために利用可能であり、ポリ（エチレングリコール）および生体活性種の間で複合体が形成される。米国特許第 5,446,090 号明細書は、二官能性 PEG リンカーおよびペプチドを PEG リンカー末端の各々で有する複合体の形成におけるその使用を記載する。

【0189】

分解性 PEG リンケージを含む複合体が、国際公開第 99/34833 号パンフレット、および国際公開第 99/14259 号パンフレット、ならびに米国特許第 6,348,558 号明細書に記載されている。このような分解性リンケージは、本発明に適用可能である。

10

【0190】

技術分野において認識された、上記に規定のポリマー活性化の方法は、本願明細書に記載の分岐ポリマーの形成において、および、これらの分岐ポリマーの他の種、例えば、糖質、糖質ヌクレオチド等への複合化のためにも、本発明のコンテキストにおいて用いられる。

【0191】

例示的な水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）、例えば、メトキシーポリ（エチレングリコール）である。本発明において用いられるポリ（エチレングリコール）は、いずれの特定の形態または分子量範囲にも制限されない。非分岐ポリ（エチレングリコール）分子について、分子量は、好ましくは 500 および 100,000 の間である。2000~60,000 の分子量が好ましく用いられ、および好ましくは約 5,000~約 40,000 である。

20

【0192】

I I. D. i i i. 分岐水溶性ポリマー

他の実施形態において、ポリ（エチレングリコール）は、2つ以上の PEG 部分が結合された分岐 PEG である。分岐 PEG の例が、米国特許第 5,932,462 号明細書；米国特許第 5,342,940 号明細書；米国特許第 5,643,575 号明細書；米国特許第 5,919,455 号明細書；米国特許第 6,113,906 号明細書；米国特許第 5,183,660 号明細書；国際公開第 02/09766 号パンフレット；コデラ Y. (Kodera Y.)、Bioconjugate Chemistry 5: 第 283~288 ページ (1994 年)；およびヤマサキ (Yamasaki) ら、Agric. Biol. Chem.、52: 第 2125~2127 ページ、1998 年に記載されている。好ましい実施形態において、分岐 PEG の各ポリ（エチレングリコール）の分子量は、40,000 ダルトン以下である。

30

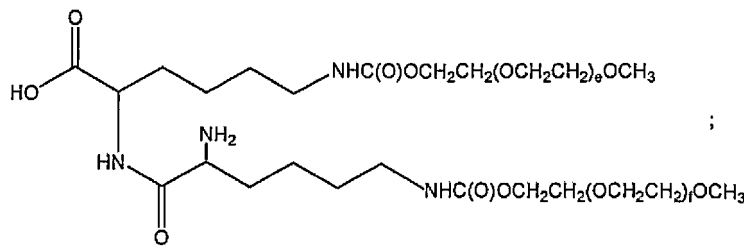
【0193】

代表的な高分子修飾部分は、例えば、セリン、システイン、リシン、および小型ペプチド、例えば、lys-lys といった側鎖含有アミノ酸に基づく構造を含む。例示的な構造としては、

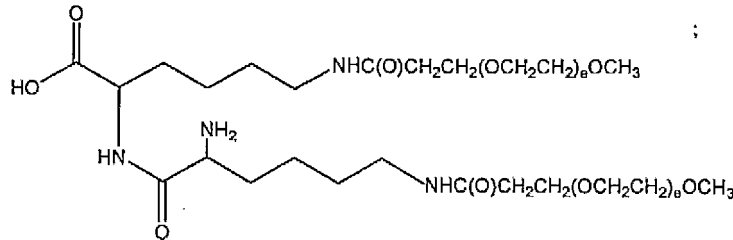
40

$$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_f-\text{C}(\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_e-\text{Q}$$

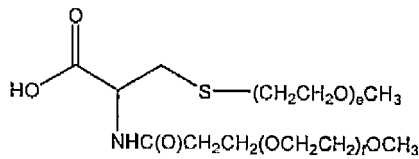
【化 6 6】



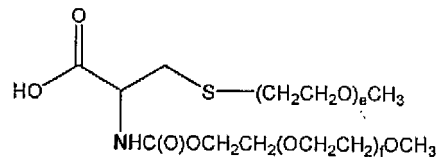
;



;

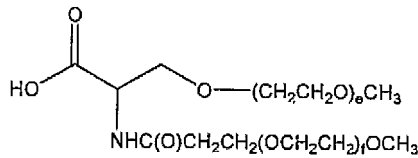


;

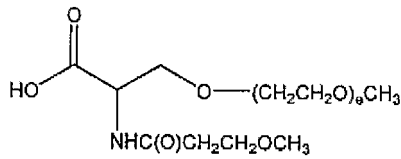
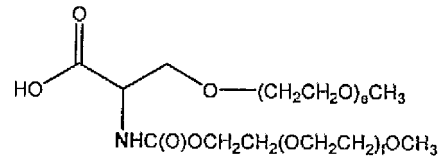


10

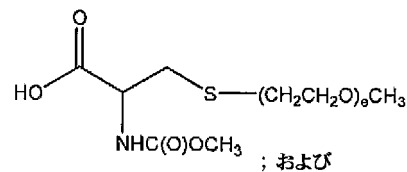
20



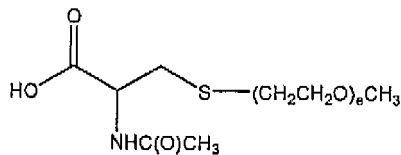
;



;



; および



30

40

が挙げられる。

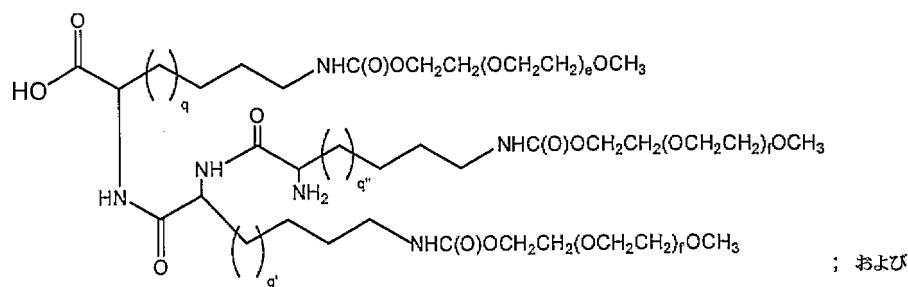
【0194】

当業者は、ジリーシン構造における遊離アミンはまた、PEG部分とのアミドまたはウレタン結合を介してペグ化されることが可能であることを認識するであろう。

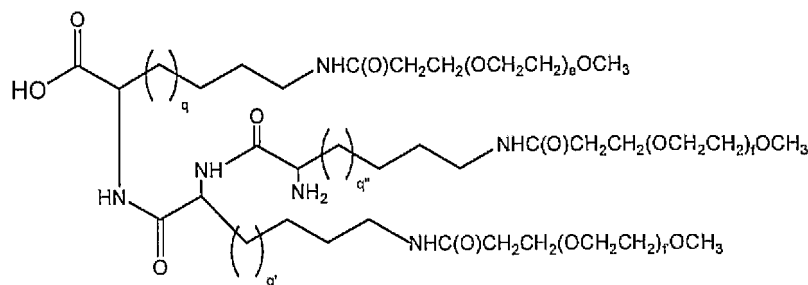
【0195】

さらに他の実施形態において、高分子修飾部分は、トリリーシンペプチドに基づく分岐PEG部分である。トリリーシンは、モノー、ジー、トリー、またはテトラーPEG-イル化されていることが可能である。この実施形態による例示的な種は、式、

【化 6 7】



; および



10

を有し、ここで、指数 e、f および f' は、1～2500 から独立して選択される整数であり、および指数 q、q' および q'' は、1～20 から独立して選択される整数である。

20

【0196】

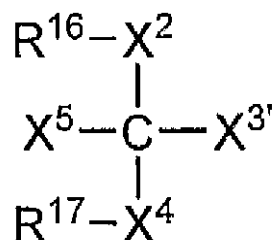
当業者に明らかであろうとおり、本発明において用いられる分岐ポリマーは、上記に規定の主題上での変形を含む。例えば上に示すジーリシン-PEG 複合体は、3つの高分子サブユニットを含むことが可能であり、3つ目は、上記構造において未修飾として示されている α-アミンに結合している。同様に高分子修飾部分で標識化された3つまたは4つの高分子サブユニットを有するトリ-リシン官能化物の所望の方式での使用は、本発明の範囲内である。

【0197】

30

本願明細書に議論したとおり、本発明の複合体において用いられる PEG は、直鎖または分岐であることが可能である。本発明のこの実施形態によるペプチド複合体を含有する分岐 PEG を形成するために用いられる例示的な前駆体は、式、

【化 6 8】



(III)

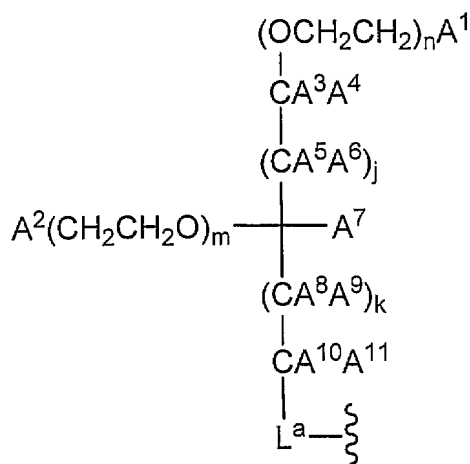
40

を有する。

【0198】

本発明のこの実施形態によるペプチド複合体を含有する分岐 PEG を形成するために用いられる他の例示的な前駆体は、式、

【化 6 9】



(IIIa)

10

を有する。

【0199】

この式による分岐ポリマー種は、基本的に純粋な水溶性ポリマーである。 $X^{3'}$ は、イオン性（例えば、 OH 、 COOH 、 H_2PO_4 、 HSO_3 、 HPO_3 、およびこれらの塩等）または例えば前述の他の反応性官能基を含む部分である。Cは炭素である。 X^5 、 R^{16} および R^{17} は、非反応性基（例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）および高分子アーム（例えば、PEG）から独立して選択される。 X^2 および X^4 は、好ましくは生理学的条件下で基本的に非反応性であるリンケージ断片であり、同一であっても異なってもよい。例示的なリンカーは、芳香族またはエステル部分のいずれも含まない。あるいは、これらのリンケージは、例えば、エステル、ジスルフィド等といった、生理学的に関連する条件下で分解するよう設計された一つ以上の部分を含むことが可能である。 X^2 および X^4 は、高分子アーム R^{16} および R^{17} をCに結合する。 $X^{3'}$ がリンカー上の補完的な反応性の反応性官能基と反応される場合、糖質またはリンカー糖質カセット、 $X^{3'}$ は、リンケージ断片 X^3 の成分に転化される。

20

30

【0200】

X^2 、 X^3 および X^4 についての例示的なリンケージ断片は独立して選択され、およびS、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNHおよびNHC(O)O、およびOC(O)NH、 CH_2S 、 CH_2O 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ 、 $(\text{CH}_2)_o\text{O}$ 、 $(\text{CH}_2)_oS$ または $(\text{CH}_2)_o\text{Y}'\text{-PEG}$ を含み、式中、 Y' は、S、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NH、またはOであり、およびoは1～50の整数である。例示的な実施形態において、リンケージ断片 X^2 および X^4 は、異なるリンケージ断片である。

【0201】

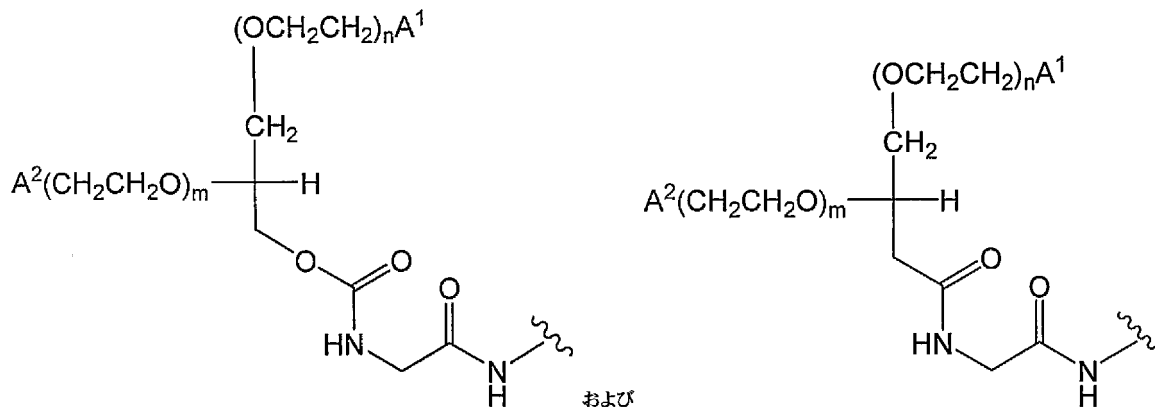
例示的な実施形態において、前駆体（式III）またはその活性化誘導体は、 $X^{3'}$ と、例えばアミンといった糖質部分上の補完的な反応性基との反応を通して、糖質、活性化糖質または糖質ヌクレオチドと反応され、および、これにより糖質、活性化糖質または糖質ヌクレオチドに結合する。あるいは、 $X^{3'}$ は、リンカー、Lの前駆体上の反応性官能基と反応する。式IおよびIIの R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 または $R^{6'}$ の一つ以上は、分岐高分子修飾部分を含むことが可能であり、またはこの部分はLを介して結合する。

40

【0202】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

【化 7 0】



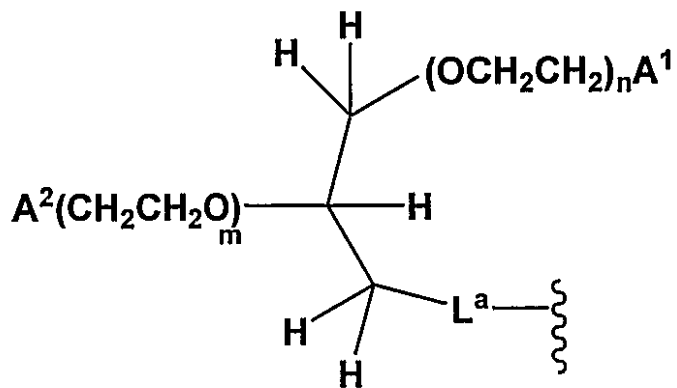
10

【 0 2 0 3】

上記式による他の例示的な実施形態において、分岐ポリマーは、以下の式による構造を有する。

【化 7 1】

20



30

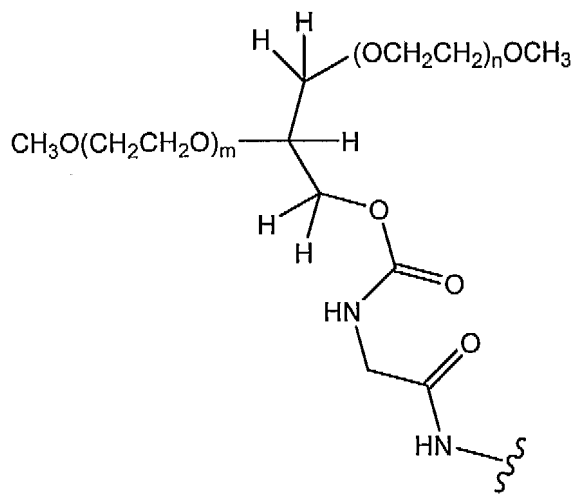
例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、各々、 $-OH$ および $-OCH_3$ から選択される。

【 0 2 0 4】

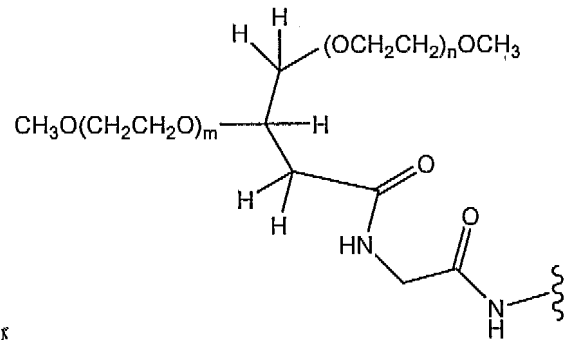
この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

40

【化 7 2】



および



10

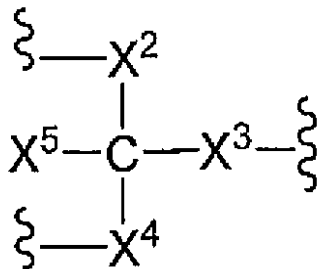
を含む。

【 0 2 0 5】

例示的な実施形態において、部分、

20

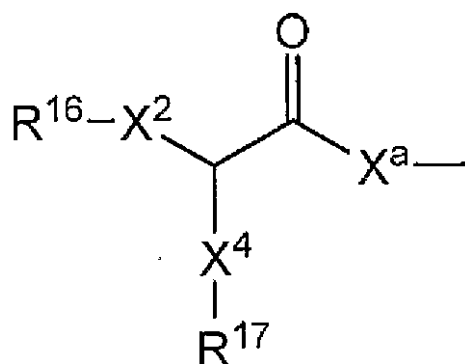
【化 7 3】



30

は、リンカーアーム、Lである。この実施形態において、例示的なリンカーは、天然または非天然アミノ酸、アミノ酸アナログまたはアミノ酸擬態物、または一種以上のこのような種から形成される小型ペプチドから誘導される。例えば、本発明の化合物において見出される一定の分岐ポリマーは、式、

【化 7 4】



(IV)

10

を有する。

【0206】

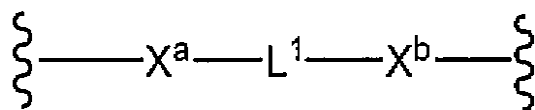
X^a は、分岐高分子修飾部分の前駆体上の反応性官能基（例えば $\text{X}^{3'}$ ）と、糖質部分上の反応性官能基との反応により形成されるリンケージ断片、またはリンカーの前駆体である。例えば、 $\text{X}^{3'}$ がカルボン酸である場合、これは活性化され、およびアミノ−サッカライドのアミン側基（例えば、 Sia 、 GalNH_2 、 GlcNH_2 、 ManNH_2 等）に直接的に結合されて、アミドである X^a を形成する。追加の例示的な反応性官能基および活性化前駆体が、本願明細書以下に記載されている。指数 c は、1～10の整数を表す。他の符号は、上述のものと同一である。

20

【0207】

他の例示的な実施形態において、 X^a は、他のリンカー、

【化 7 5】



30

と形成されたリンク部分であり、ここで、 X^b は第2のリンケージ断片であり、および X^a について規定された基から独立して選択され、および、 L と同様に、 L^1 は結合、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキルである。

【0208】

X^a および X^b についての例示的な種としては、 S 、 $\text{SC}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{HNC}(\text{O})\text{S}$ 、 $\text{SC}(\text{O})\text{O}$ 、 O 、 NH 、 $\text{NHC}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ および $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$ 、および $\text{OC}(\text{O})\text{NH}$ が挙げられる。

40

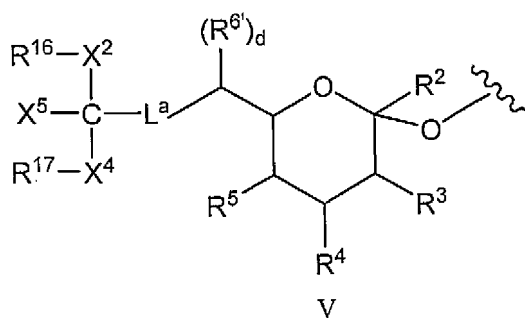
【0209】

他の例示的な実施形態において、 X^4 は、 R^{17} へのペプチド結合であり、これは、 α −アミン部分および／または側鎖ヘテロ原子が高分子修飾部分で修飾されている、アミノ酸、ジペプチド（例えば、 Lys-Lys ）またはトリペプチド（例えば、 Lys-Lys-Lys ）である。

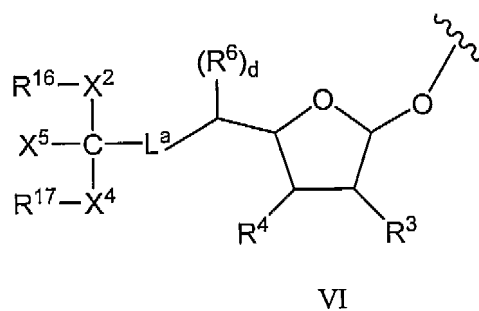
【0210】

さらに例示的な実施形態において、本発明のペプチド複合体は、

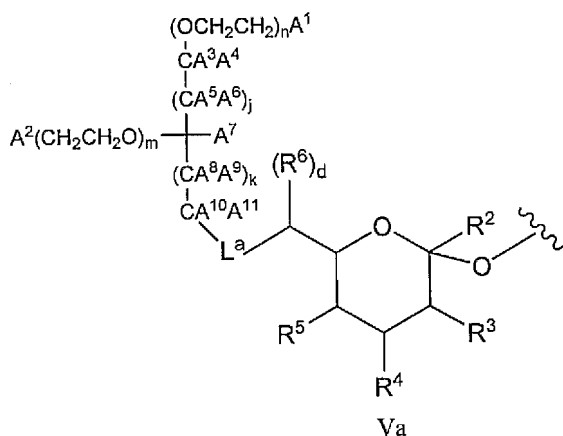
【化 7 6】



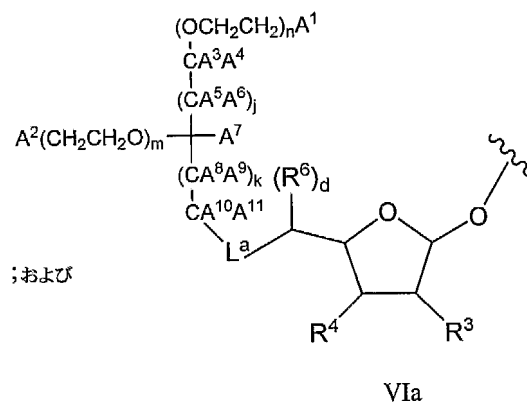
; および



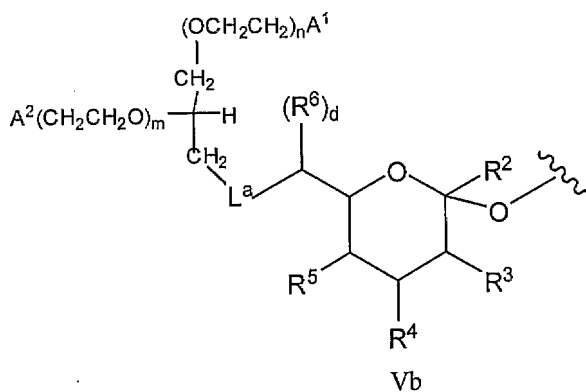
10



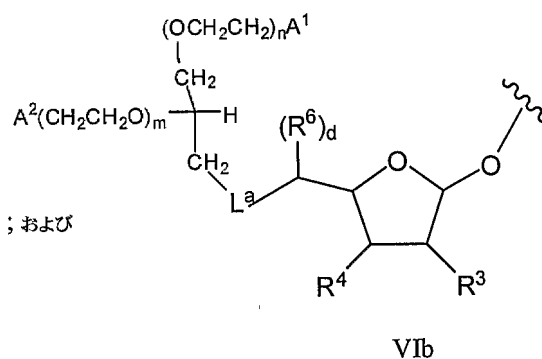
; および



20



; および



30

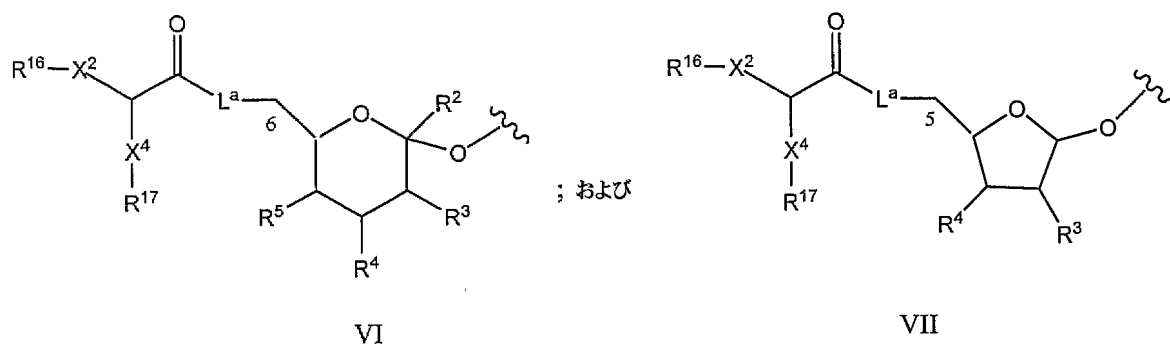
から選択される式を有する、例えば R^{1-5} 部分といった部分を含み、ここで、種々の符号によって表されるラジカルの同一性は、本願明細書上述のものと同一である。 L^a は、 L および L^1 について上述のとおり、結合またはリンカーであり、例えば、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキル部分である。例示的な実施形態において、 L^a は、示したとおり高分子修飾部分で官能基化されたシアル酸の側鎖の部分である。例示的な L^a 部分は、一つ以上の OH または NH_2 を含む置換または非置換アルキル鎖を含む。

【0211】

さらに他の例示的な実施形態において、本発明は、式、

40

【化 7 7】



10

を有する例えば R^{1-5} 部分といった部分を有するペプチド複合体を提供する。

【0212】

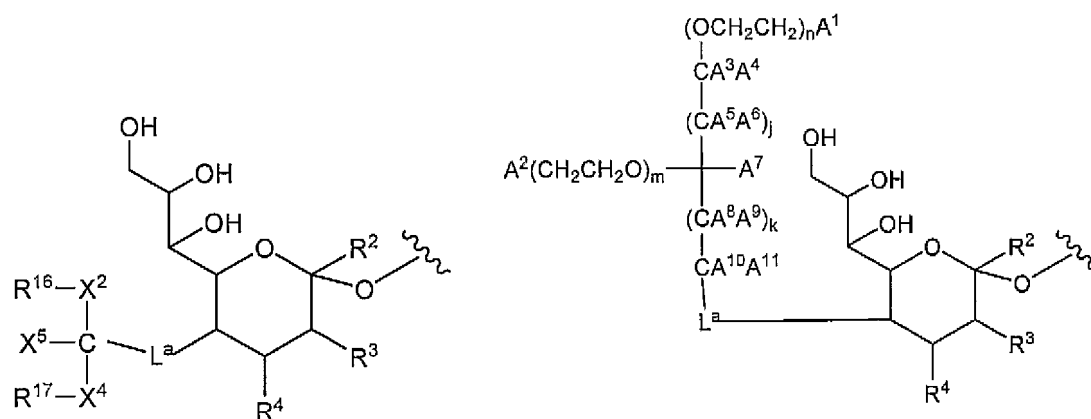
種々の符号によって表されるラジカルの同一性は、本願明細書上述のものと同一である。当業者が認識するであろうとおり、式VIおよびVIIにおけるリンカーアームは、本願明細書に記載の他の修飾糖質にも等しく適応可能である。例示的な実施形態において、式VIおよびVIIの種は、本願明細書に記載のグリカン構造に結合された R^{1-5} 部分である。

【0213】

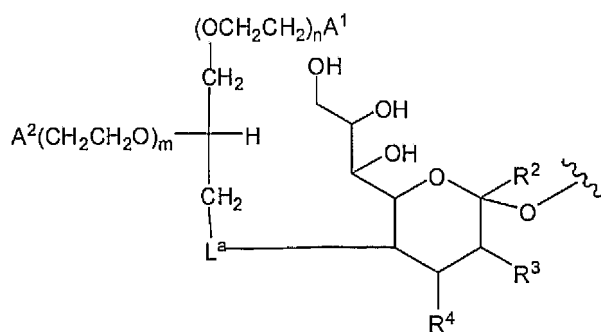
さらに他の例示的な実施形態において、因子VII / 因子VIIa ペプチド複合体は、

【化 7 8】

20



30



40

から選択されるメンバーである式を有する R^{1-5} 部分を含み、ここで、ラジカルの同一性

50

は上述のとおりである。L^aについての例示的な種は、 $-(CH_2)_jC(O)NH(CH_2)_hC(O)NH-$ であり、ここで、指数hおよびjは、0~10から独立して選択される整数である。さらなる例示的な種は $-C(O)NH-$ である。指数mおよびnは、0~5000から独立して選択される整数である。A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹、A¹⁰およびA¹¹は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、 $-NA^{12}A^{13}$ 、 $-OA^{12}$ および $-SiA^{12}A^{13}$ から独立して選択されるメンバーである。A¹²およびA¹³は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、および置換または非置換ヘテロアリールから独立して選択されるメンバーである。

10

【0214】

上記に規定の本発明の実施形態は、ポリマーが水溶性ポリマー、特にポリ(エチレングリコール) (「PEG」)、例えば、メトキシポリ(エチレングリコール)である種に言及することにより、さらに例示されている。続くセクションにおける焦点は、例示の明確さのためであり、およびPEGを例示的なポリマーとして用いて規定された種々のモチーフは、PEG以外のポリマーが用いられる種に対しても同等に適用可能であることを当業者は認識するであろう。

20

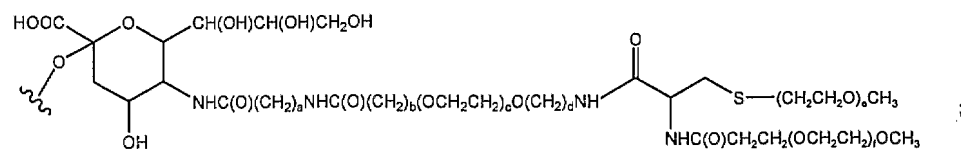
【0215】

例えば、1KDa、2KDa、5KDa、10KDa、15KDa、20KDa、25KDa、30KDa、35KDa、40KDaおよび45KDaといったいずれかの分子量のPEGが本発明において用いられる。

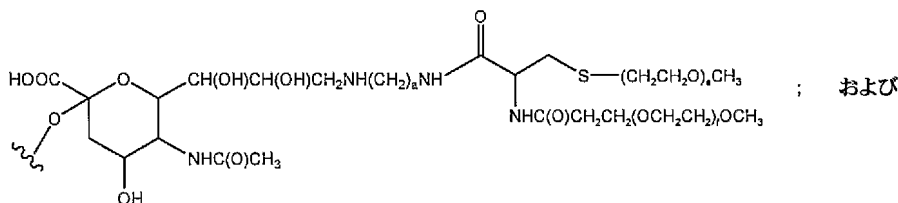
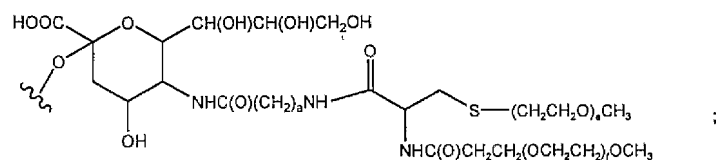
【0216】

例示的な実施形態において、R¹⁵部分は、群、

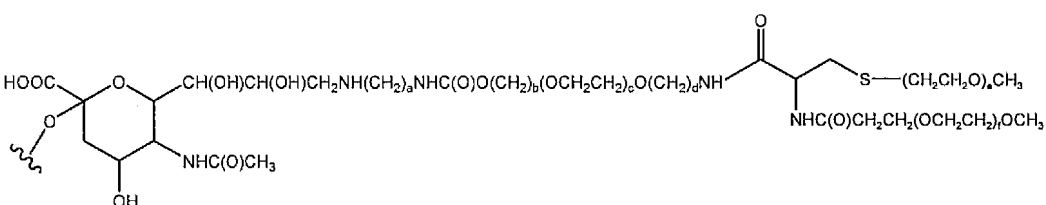
【化79】



30



40



50

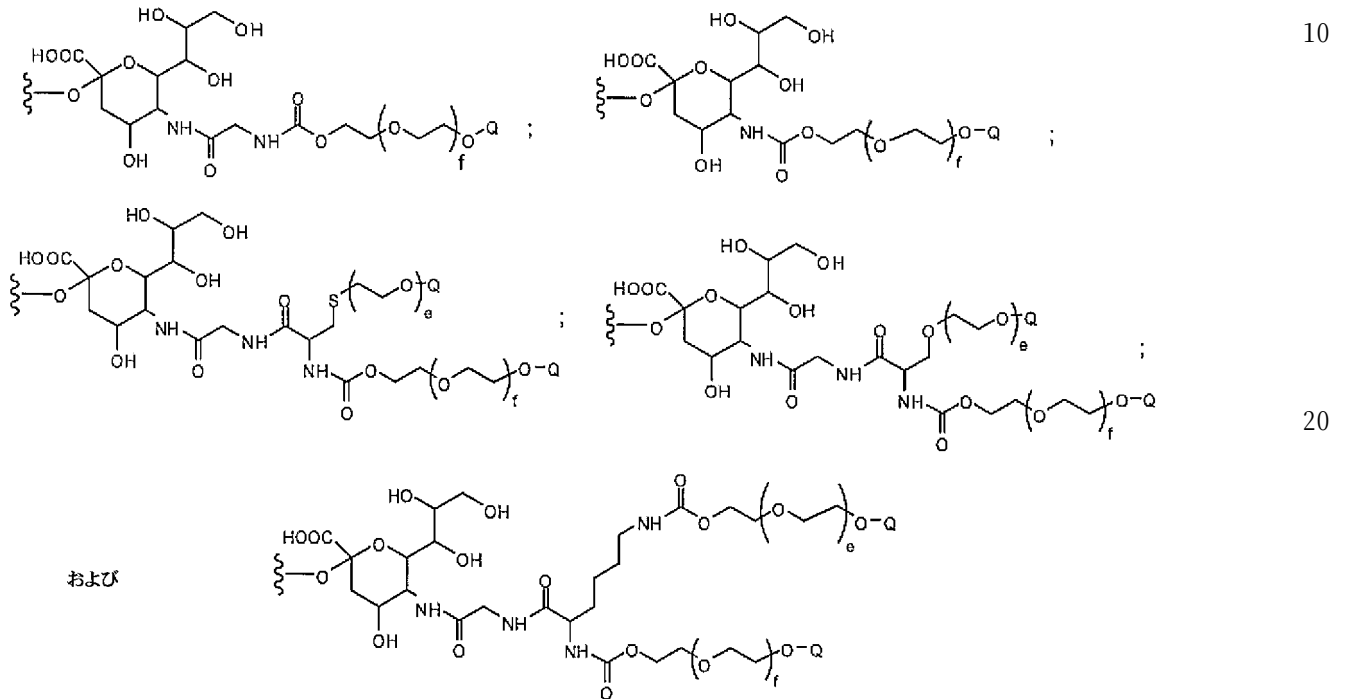
から選択されるメンバーである式を有する。

【0217】

上記構造の各々において、リンカー断片 $\text{—NH(CH}_2\text{)}_a\text{—}$ は存在していることも、不在であることも可能である。

【0218】

他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、群、
【化80】



から選択される R^{15} 部分を含む。

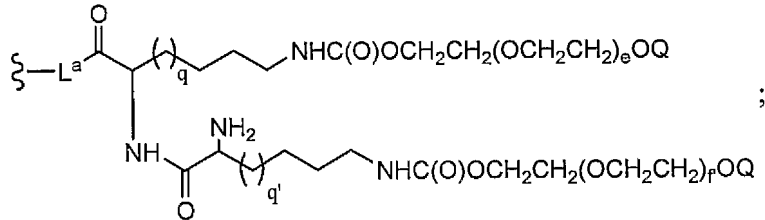
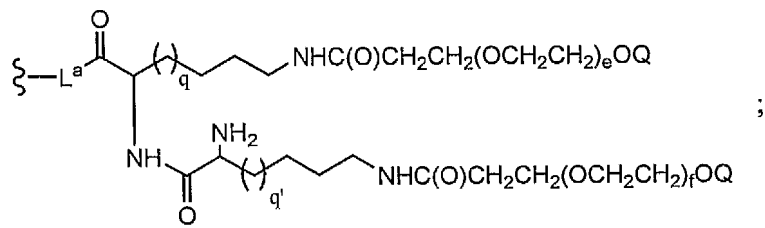
【0219】

上記式の各々において、指数 e および f は、1～2500の整数から独立して選択される。さらなる例示的な実施形態において、 e および f は、約1KDa、2KDa、5KDa、10KDa、15KDa、20KDa、25KDa、30KDa、35KDa、40KDaおよび45KDaであるPEG部分を提供するように選択される。符号 Q は、置換または非置換アルキル（例えば、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、例えば、メチル）、置換または非置換ヘテロアルキルまたは H を表す。

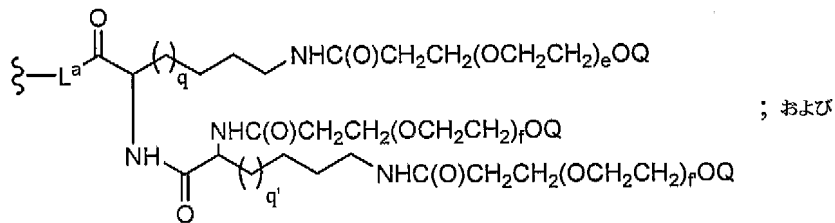
【0220】

他の分岐ポリマーは、例えば、

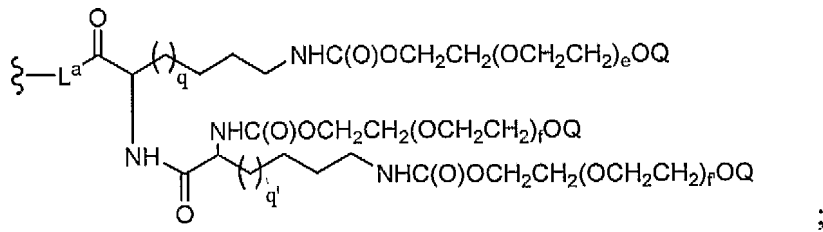
【化 8 1】



10



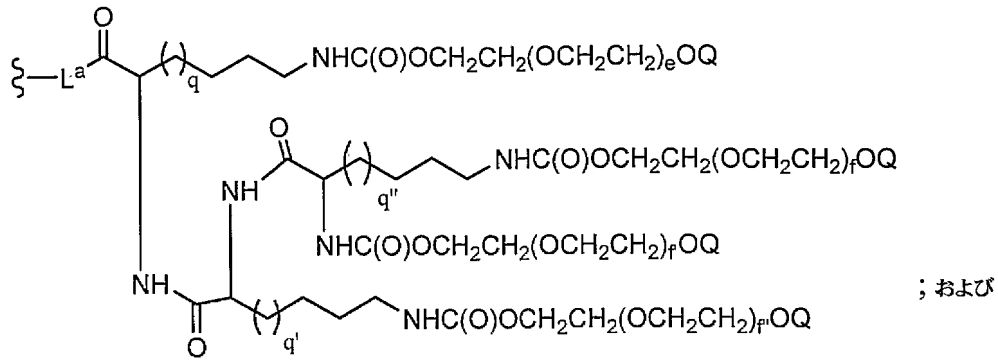
20



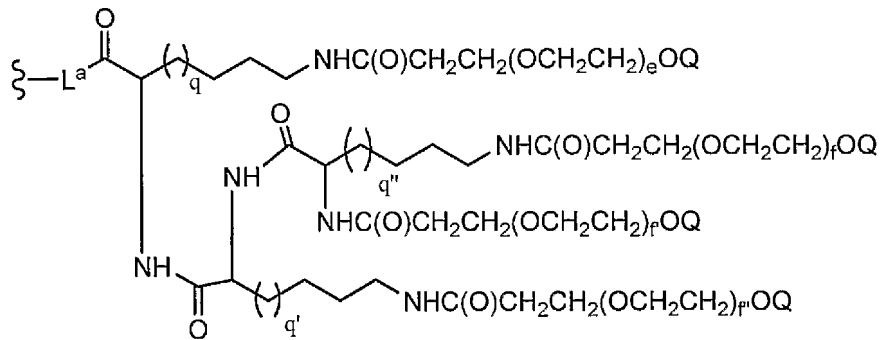
といったジーリシン (L y s - L y s) ペプチドに基づく構造を有し、および、例えば、

30

【化 8 2】



10



20

といったトリ-リシンペプチド (L y s - L y s - L y s) に基づく構造を有する。

【 0 2 2 1】

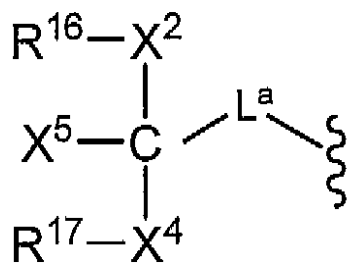
上記図の各々において、指数 e、f、f' および f'' は、1 ~ 2500 から独立して選択される整数を表す。指数 q、q' および q'' は、1 ~ 20 から独立して選択される整数を表す。

【 0 2 2 2】

他の例示的な実施形態において、修飾基、

30

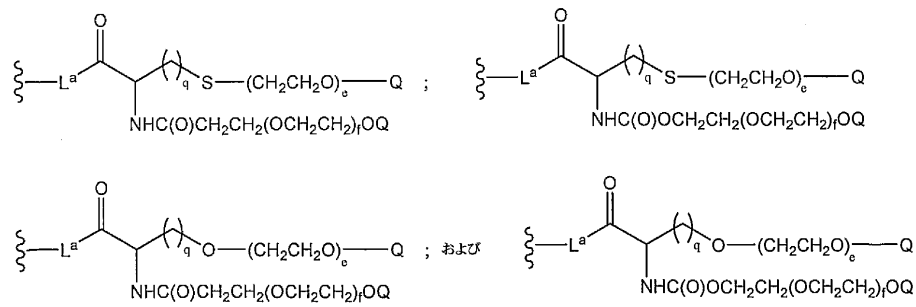
【化 8 3】



40

は、

【化 8 4】



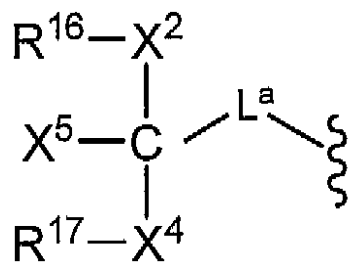
10

から選択されるメンバーである式を有し、式中、Qは、Hおよび置換または非置換C₁～C₆アルキルから選択されるメンバーである。指数eおよびfは、1～2500から独立して選択される整数であり、および指数qは、0～20から選択される整数である。

【0223】

他の例示的な実施形態において、修飾基、

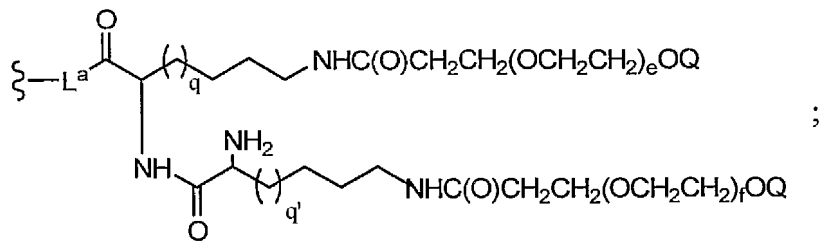
【化 8 5】



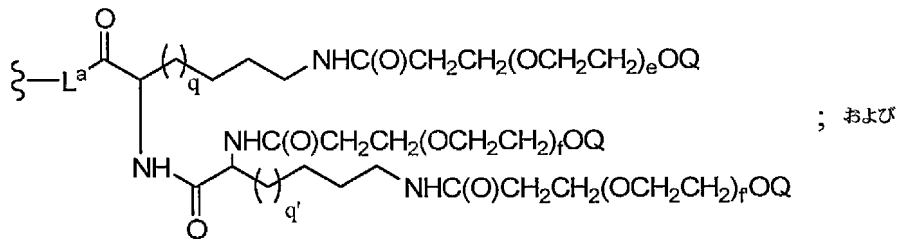
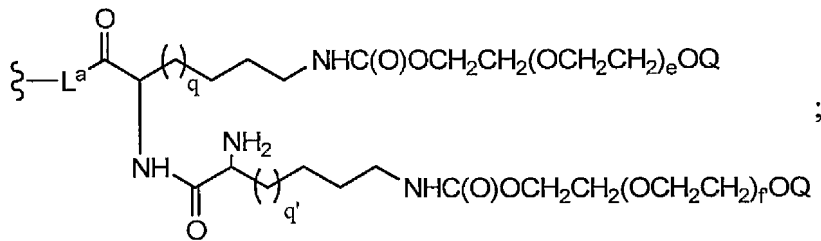
20

は、

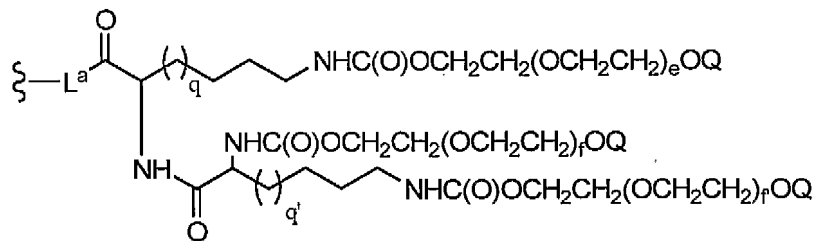
【化 8 6】



10



20



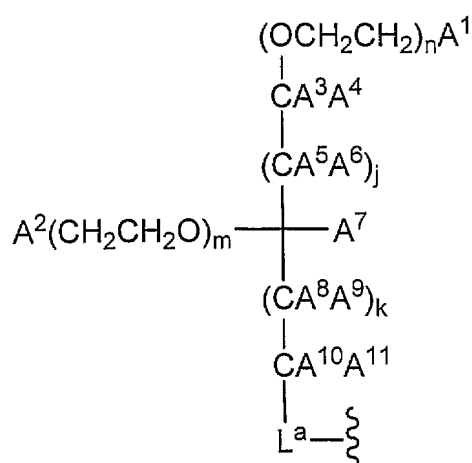
30

から選択されるメンバーである式を有し、式中、Qは、Hおよび置換または非置換C₁～C₆アルキルから選択されるメンバーである。指数e、fおよびf'は、1～2500から独立して選択される整数であり、およびqおよびq'は、1～20から独立して選択される整数である。

【0224】

他の例示的な実施形態において、分岐ポリマーは、以下の式による構造を有する。

【化 8 7】



(IIIa)

ここで、指数mおよびnは、0～5000から独立して選択される整数である。A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹、A¹⁰およびA¹¹は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、-NA¹²A¹³、-OA¹²および-SiA¹²A¹³から独立して選択されるメンバーである。A¹²およびA¹³は、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、および置換または非置換ヘテロアリールから独立して選択されるメンバーである。

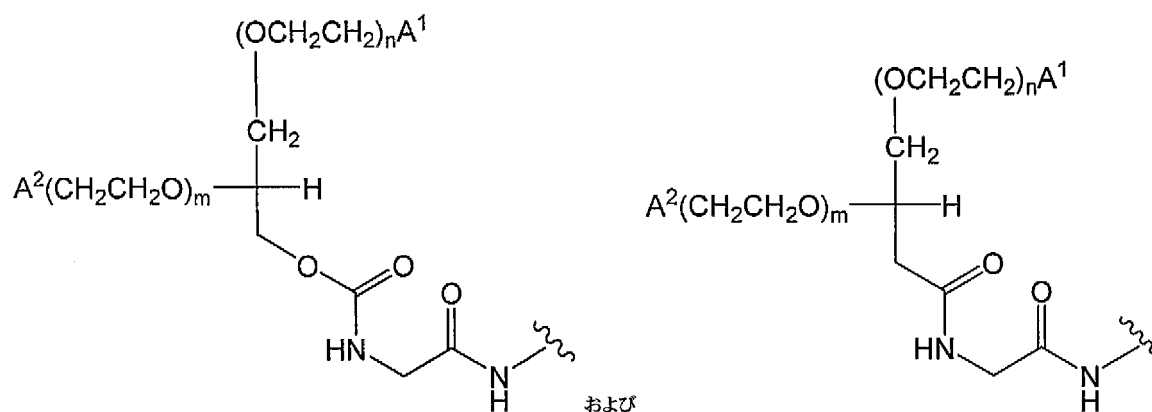
【 0 2 2 5 】

式 I I I a は、式 I I I のサブセットである。式 I I I a によって記載される構造はまた、式 I I I によっても包含される。

【 0 2 2 6 】

例示的な実施形態において、高分子修飾基は、以下の式による構造を有する。

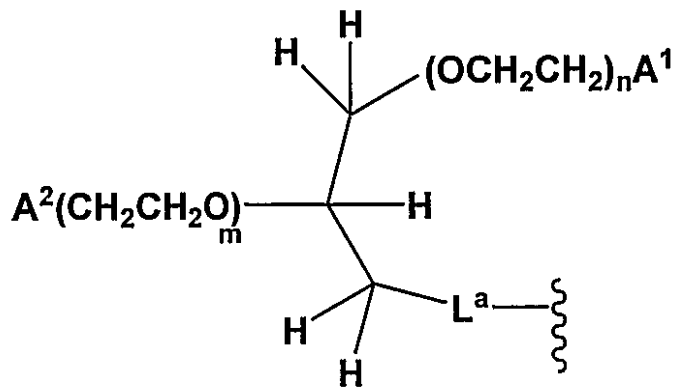
【化 8 8】



【 0 2 2 7 】

上記式による他の例示的な実施形態において、分岐ポリマーは、以下の式による構造を有する。

【化 8 9】



10

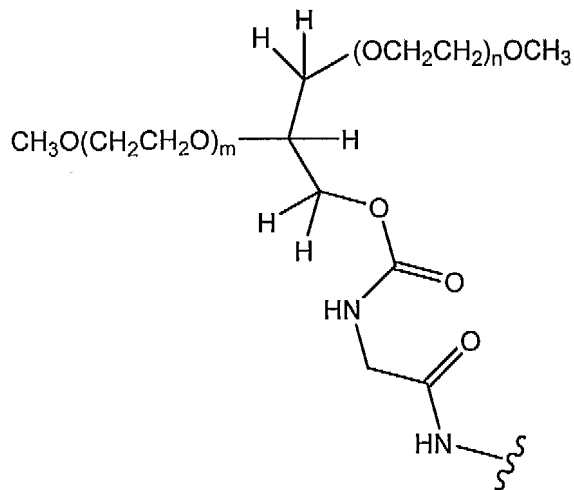
例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、 $-OH$ および $-OCH_3$ から独立して選択されるメンバーである。

【0228】

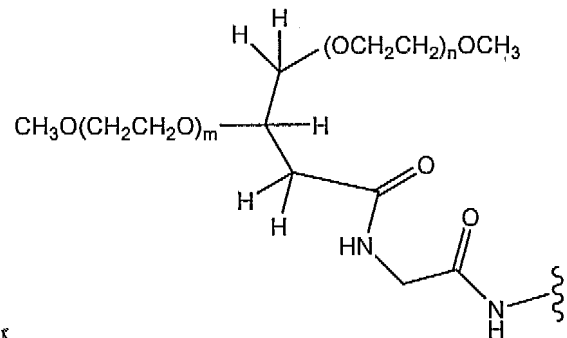
20

この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

【化 9 0】



および



30

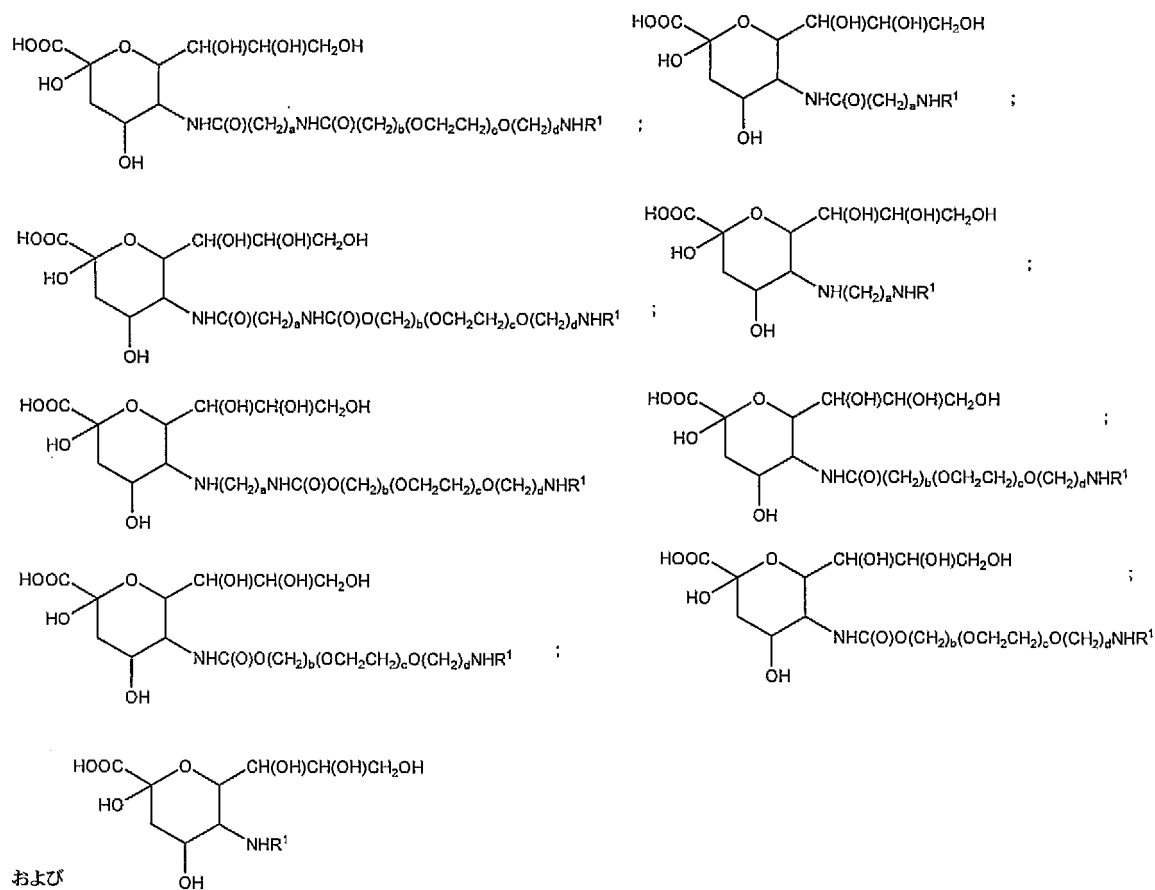
を含む。

【0229】

40

例示的な実施形態において、修飾糖質はシアル酸であり、および選択される、本発明において用いられる修飾糖質化合物は、式、

【化 9 1】



10

20

を有する。

【0230】

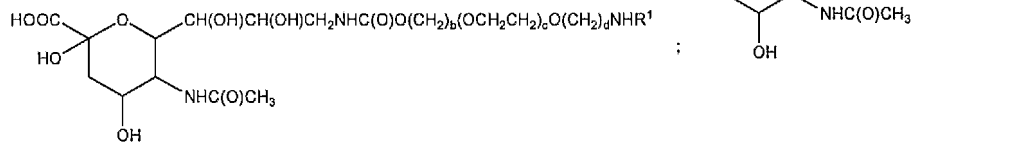
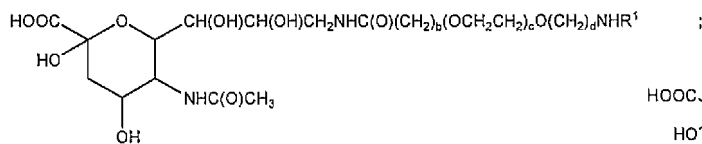
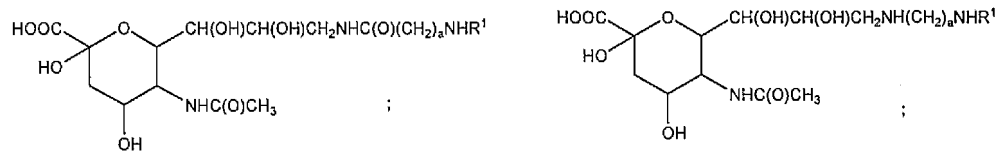
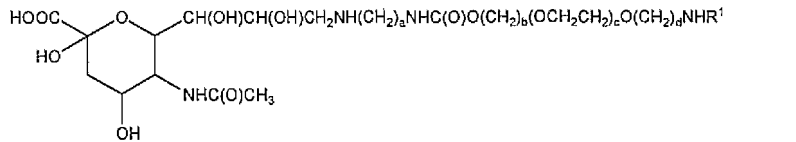
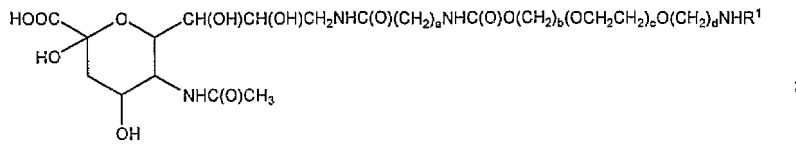
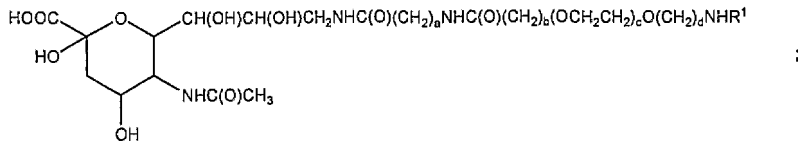
指数 a、b および d は、0 ~ 20 の整数である。指数 c は、1 ~ 2500 の整数である。上記に規定の構造は、R¹⁻⁵ の構成成分であることが可能である。

30

【0231】

他の例示的实施形態において、糖質の第1級ヒドロキシル部分は、修飾基で官能基化されている。例えば、シアル酸の9-ヒドロキシルは、関連するアミンに転化され、および官能基化されて、本発明による化合物を提供することが可能である。この実施形態による式としては、

【化 9 2】



が挙げられる。上記に規定の構造は、 R^1 の構成成分であることが可能である。

【0232】

本発明が、前述のセクションにおいてPEGについて言及することにより例示されているが、当業者が認識するであろうとおり、高分子修飾部分のアレイは、本願明細書に記載の化合物および方法において用いられるものである。

【0233】

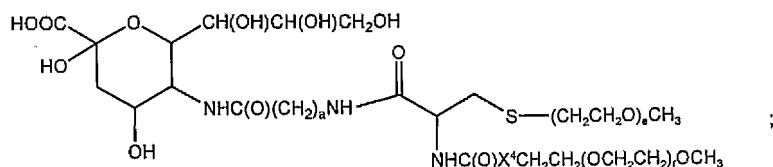
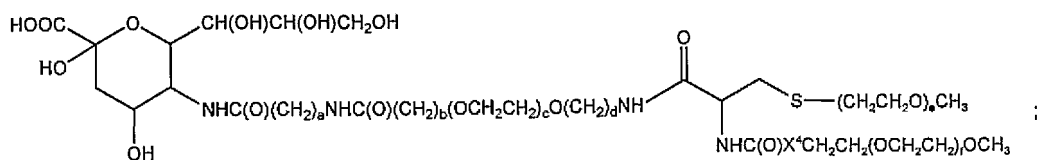
選択された実施形態において、 R^1 または $L-R^1$ は、分岐PEG、例えば、上記に規定された種の一つである。例示的な実施形態において、分岐PEG構造は、システインペプチドに基づいている。この実施形態による例示的修飾糖質は、

10

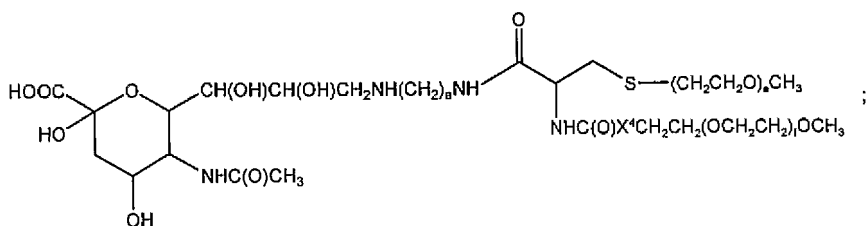
20

30

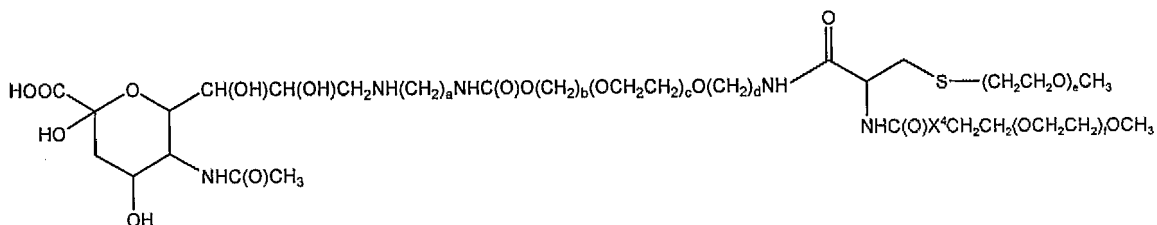
【化 9 3】



10



20



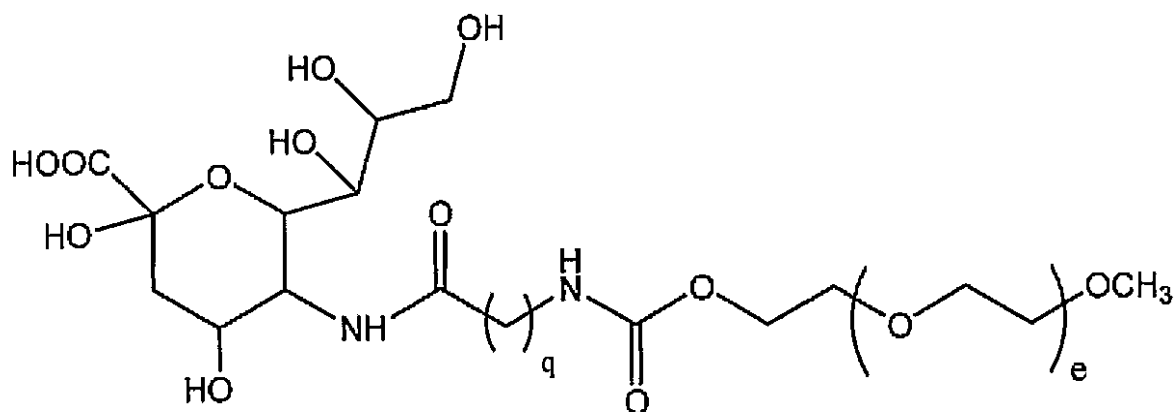
を含み、ここで、 X^4 は結合またはOである。上記構造の各々において、アルキルアミンリンカー $(\text{CH}_2)_a\text{NH}-$ は、存在していることも、不在であることも可能である。上記に規定された構造は $\text{R}^{15} / \text{R}^{15'}$ の構成成分であることが可能である。

30

【0234】

本願明細書において考察されるとおり、本発明において用いられるポリマー修飾シアル酸はまた直鎖構造であり得る。それ故、本発明は、

【化 9 4】



40

などの構造から誘導されるシアル酸部分を含む複合体を提供し、ここで、指数 q および e

50

は上述のとおりである。

【0235】

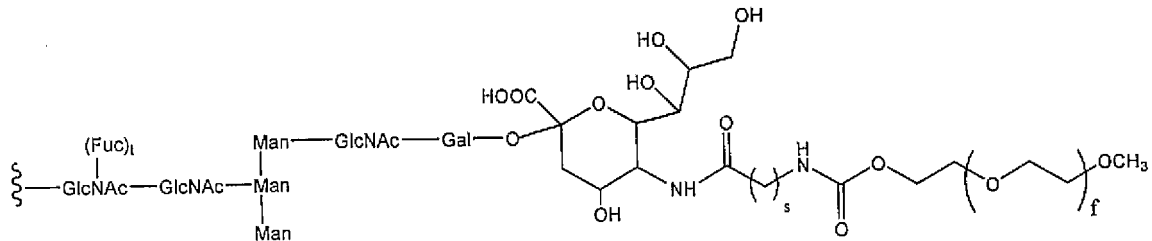
例示的な修飾糖質は、水溶性または不水溶性ポリマーで修飾されている。有用なポリマーの例が、以下にさらに例示されている。

【0236】

他の例示的な実施形態において、ペプチドは昆虫細胞由来のものであり、GlcNAc および Gal をマンノースコアに付加し、および直鎖 PEG 部分を有するシアル酸を用いてグリコペグ化することにより再構築され、式、

【化95】

10



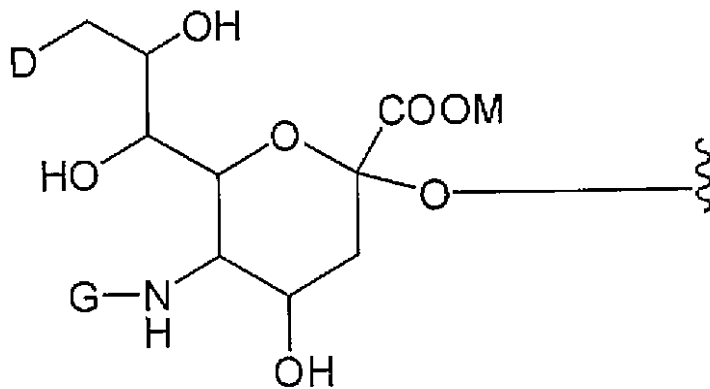
を有する少なくとも1つの部分を含む因子V I I / 因子V I I a ペプチドがもたらされ、ここで、指数 t は、0～1の整数であり、指数 s は1～10の整数を表し、および指数 f は、1～2500の整数を表す。

20

【0237】

一実施形態において、本発明は、以下のグリコシルリンク基、

【化96】



30

を含むペプチド複合体を提供する。

【0238】

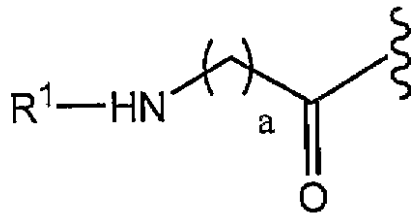
Dは、 $-OH$ および $R^1-L-HN-$ から選択されるメンバーであり、Gは、 R^1-L- および $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル- R^1 から選択されるメンバーであり、 R^1 は、直鎖ポリ(エチレングリコール)残基および分岐ポリ(エチレングリコール)残基から選択されるメンバーを含む部分であり、およびMは、H、塩対イオンおよび単一の陰電荷から選択されるメンバーであり、Lは、結合、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるメンバーであるリンカーである。例示的な実施形態において、DがOHであるとき、Gは R^1-L- である。他の例示的な実施形態において、Gが $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルであるときDは $R^1-L-NH-$ である。

40

50

【0239】

例示的な実施形態において、 $L-R^1$ は、式、
【化97】

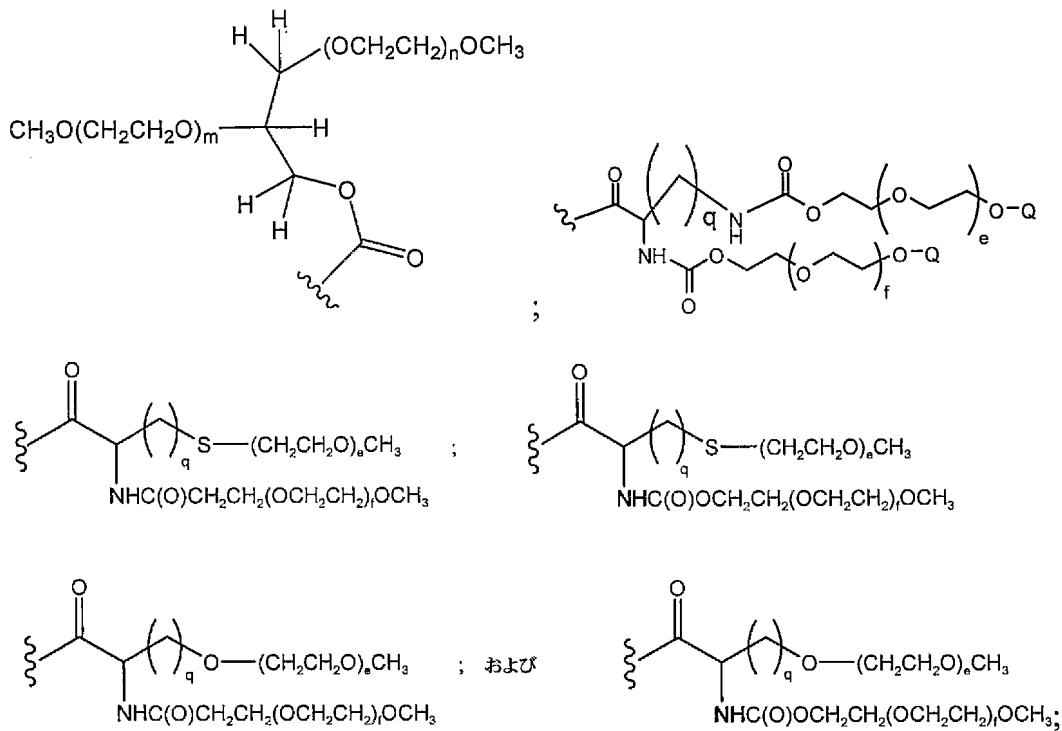


10

を有し、式中、 a は、0～20から選択される整数である。

【0240】

例示的な実施形態において、 R^1 は、
【化98】



20

30

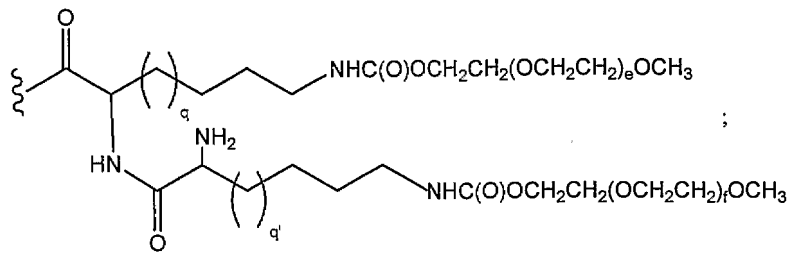
から選択されるメンバーである構造を有し、式中、 e 、 f 、 m および n は、1～2500から独立して選択される整数であり、および q は、0～20から選択される整数である。

【0241】

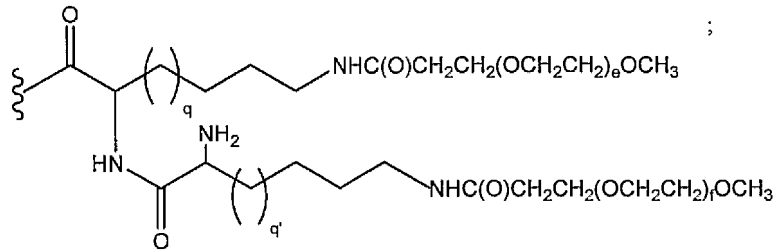
例示的な実施形態において、 R^1 は、

40

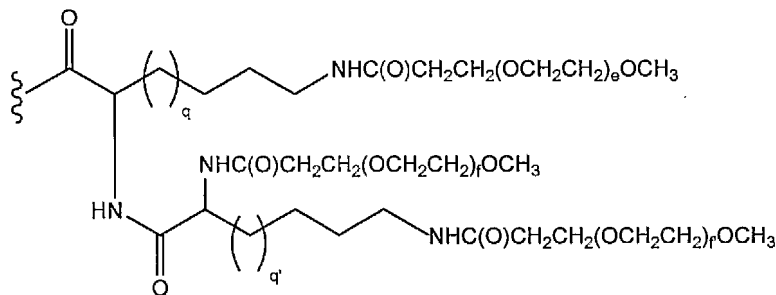
【化 9 9】



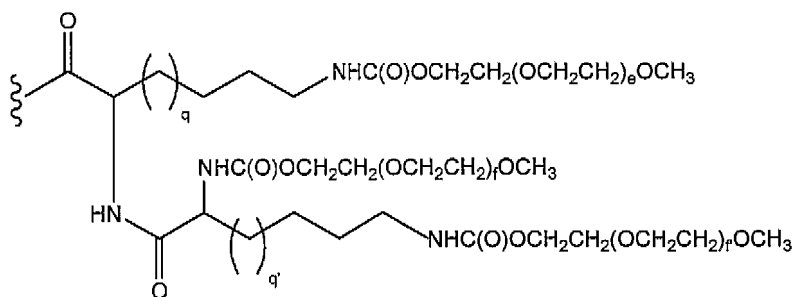
10



20



; および



30

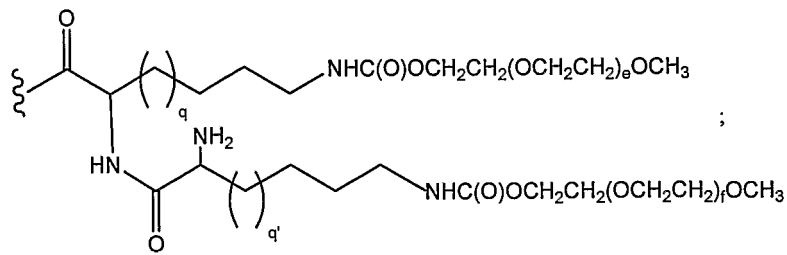
から選択されるメンバーである構造を有し、式中、e、fおよびf'は、1～2500から独立して選択される整数であり、およびqおよびq'は、1～20から独立して選択される整数である。

【0242】

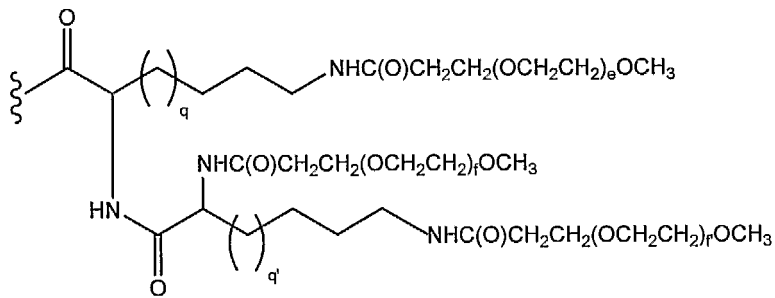
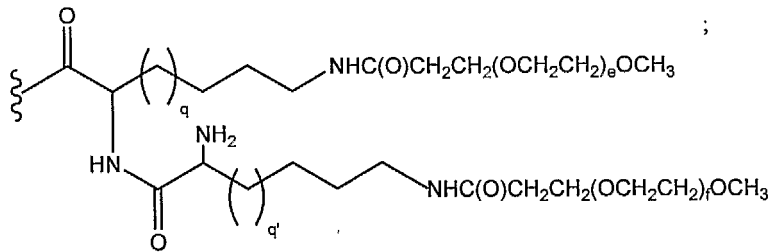
40

他の例示的な実施形態において、R¹は、

【化 1 0 0】

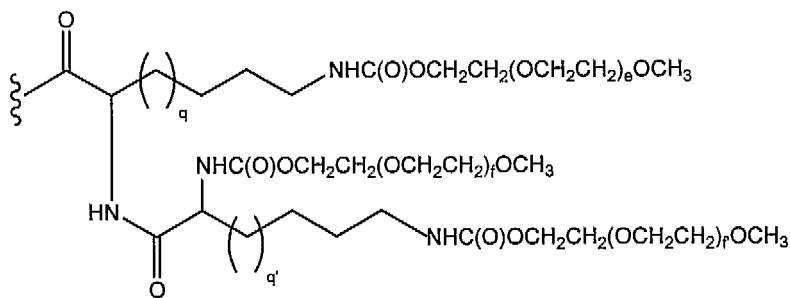


10



20

; および



30

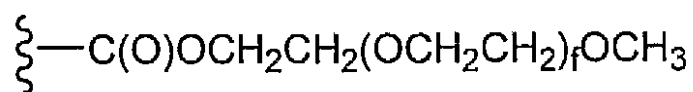
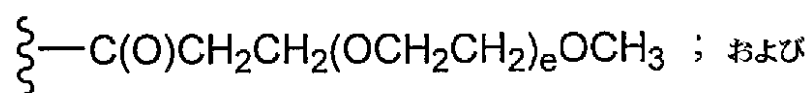
から選択されるメンバーである構造を有し、式中、 e 、 f および f' は、1～2500から独立して選択される整数であり、および q および q' は、1～20から独立して選択される整数である。

【0243】

40

他の例示的な実施形態において、 R^1 は、

【化 1 0 1】



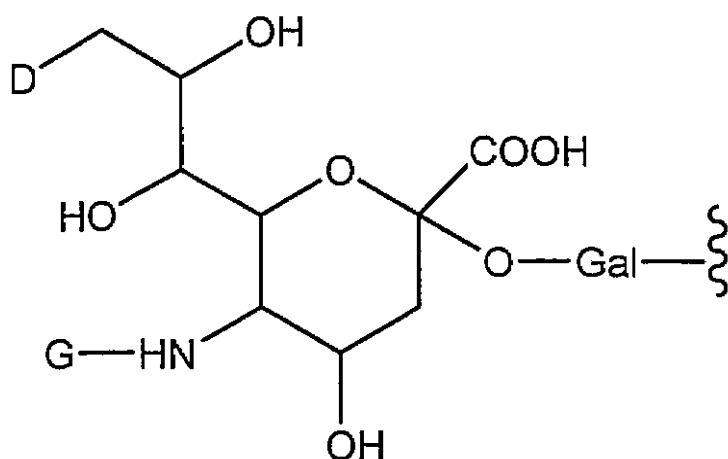
10

から選択されるメンバーである構造を有し、式中、e および f は、1 ～ 2 5 0 0 から独立して選択される整数である。

【 0 2 4 4】

他の例示的な実施形態において、グリコシルリンカーは、式、

【化 1 0 2】



20

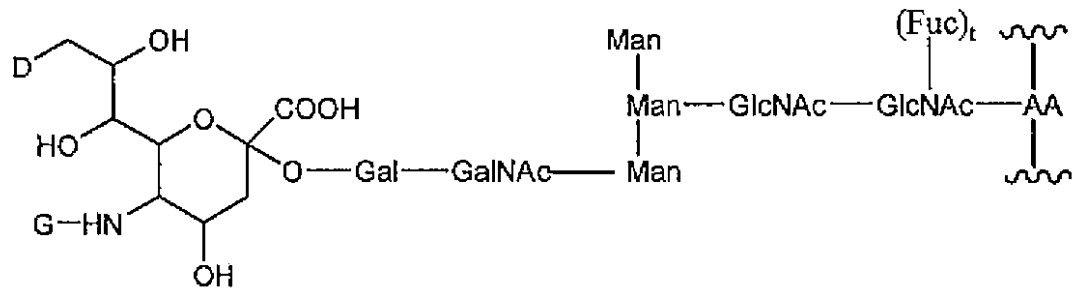
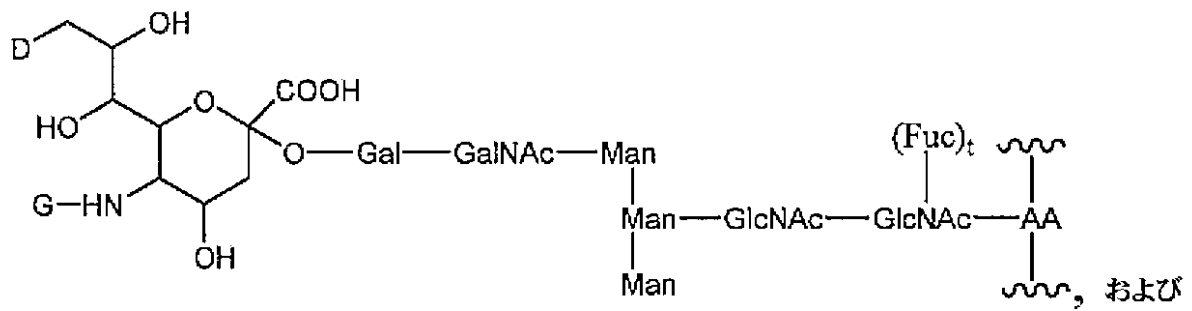
30

を有する。

【 0 2 4 5】

他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、

【化 1 0 3】

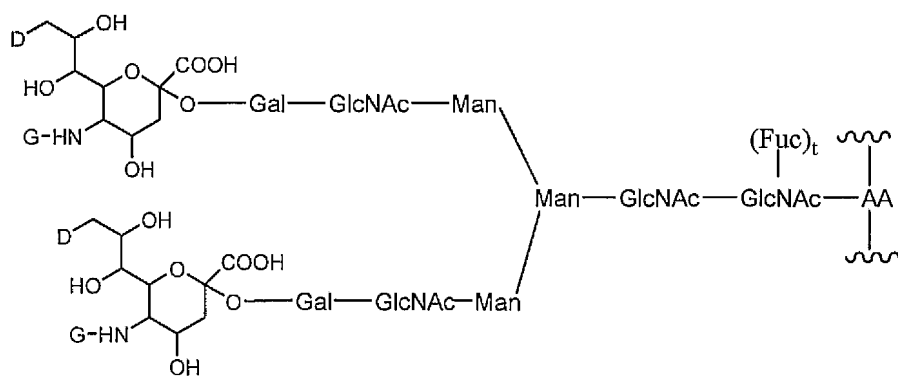


から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含み、式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数である。

【0 2 4 6】

他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含み、ここで、前記グリコシルリンカーの各々は、以下の式、

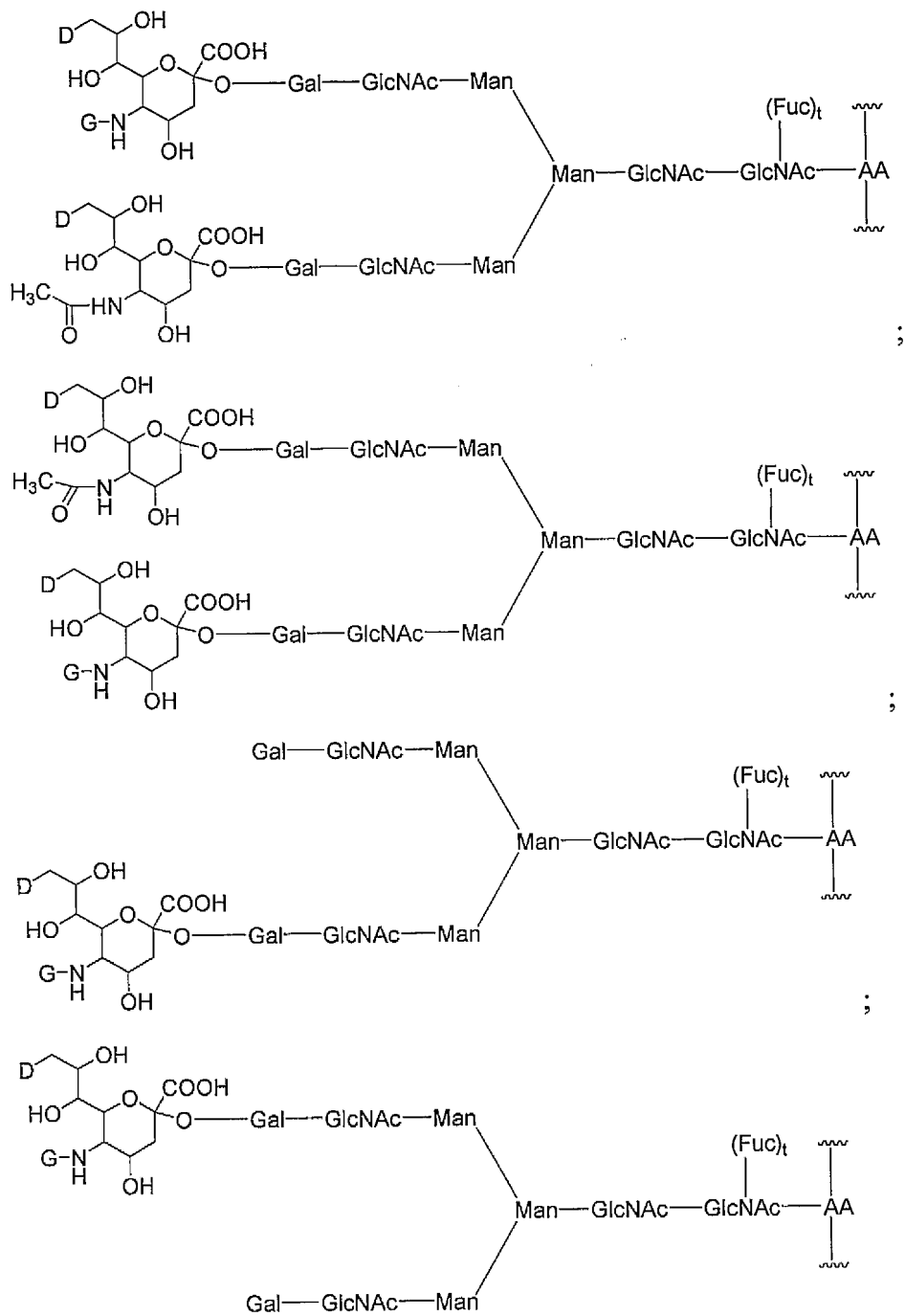
【化 1 0 4】



;

40

【化 1 0 5】



10

20

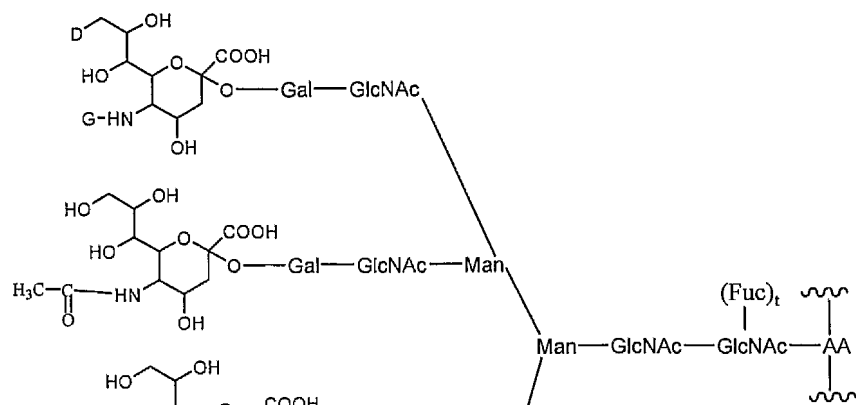
30

から独立して選択されるメンバーである構造を有し、式中、AAは前記ペプチド複合体の
 アミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数である。 40

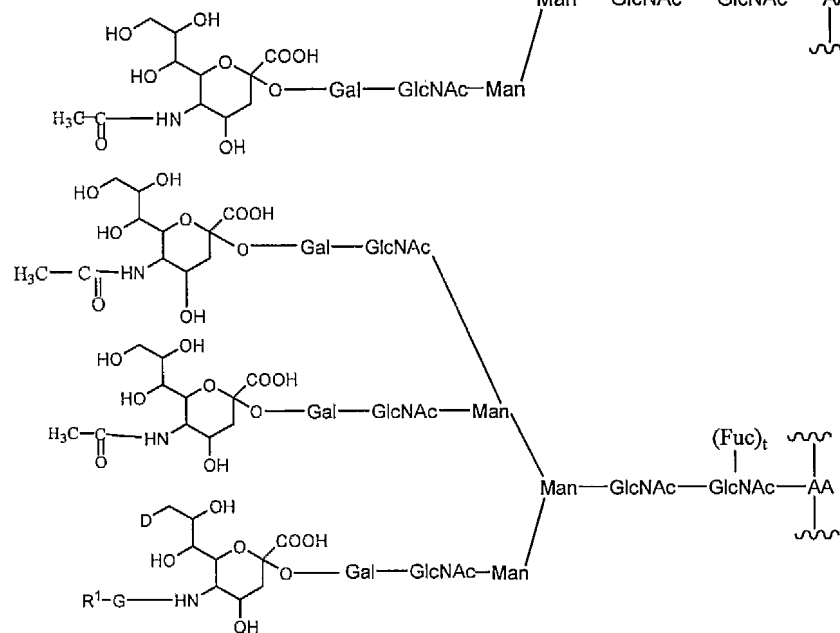
【0 2 4 7】

他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、

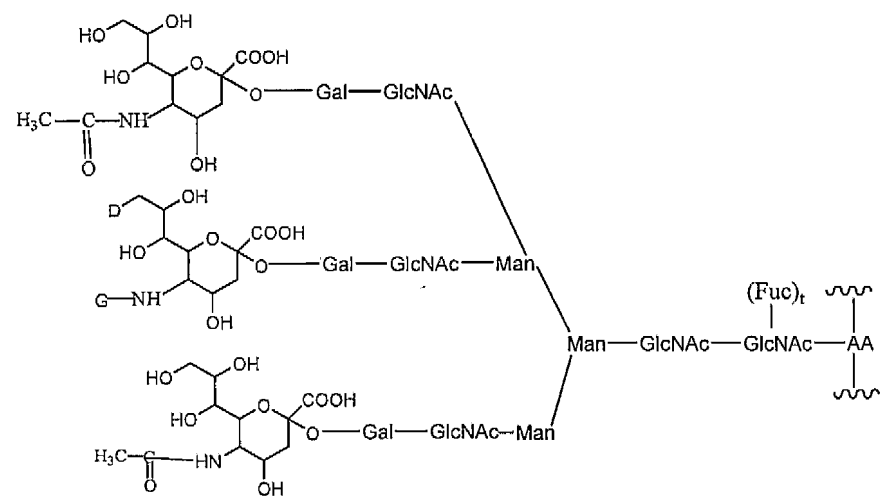
【化 1 0 6】



10



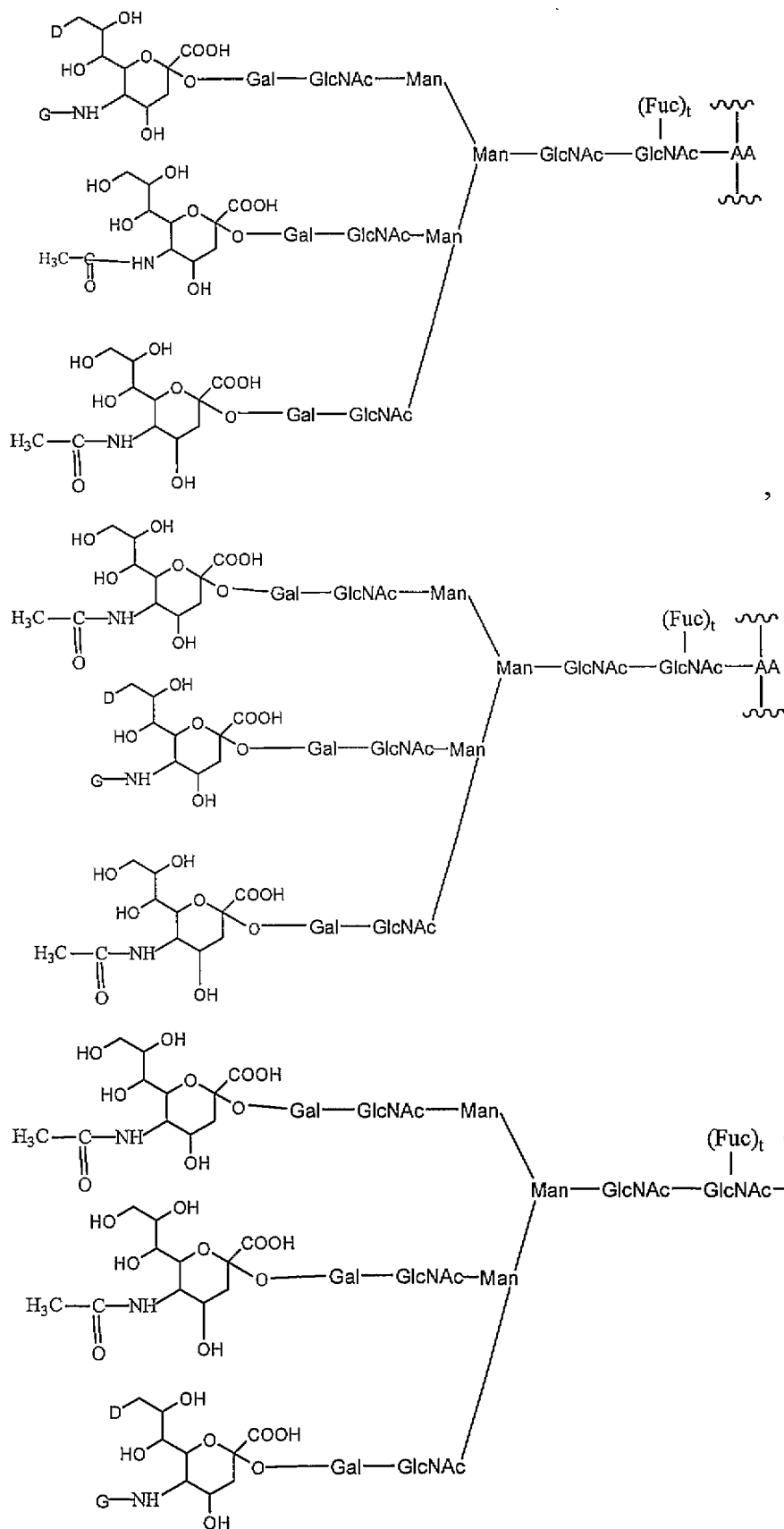
20



30

40

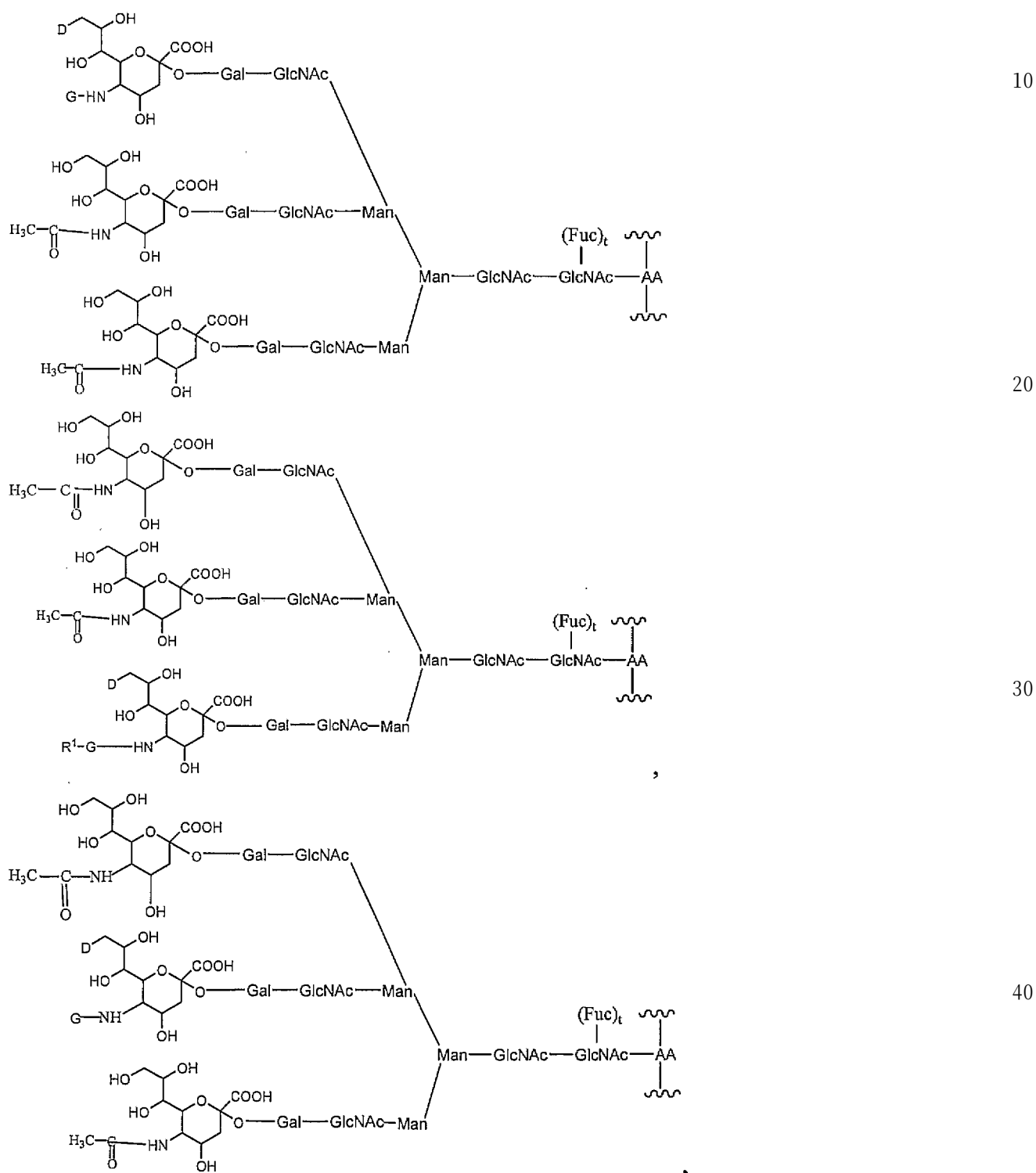
【化 1 0 7】



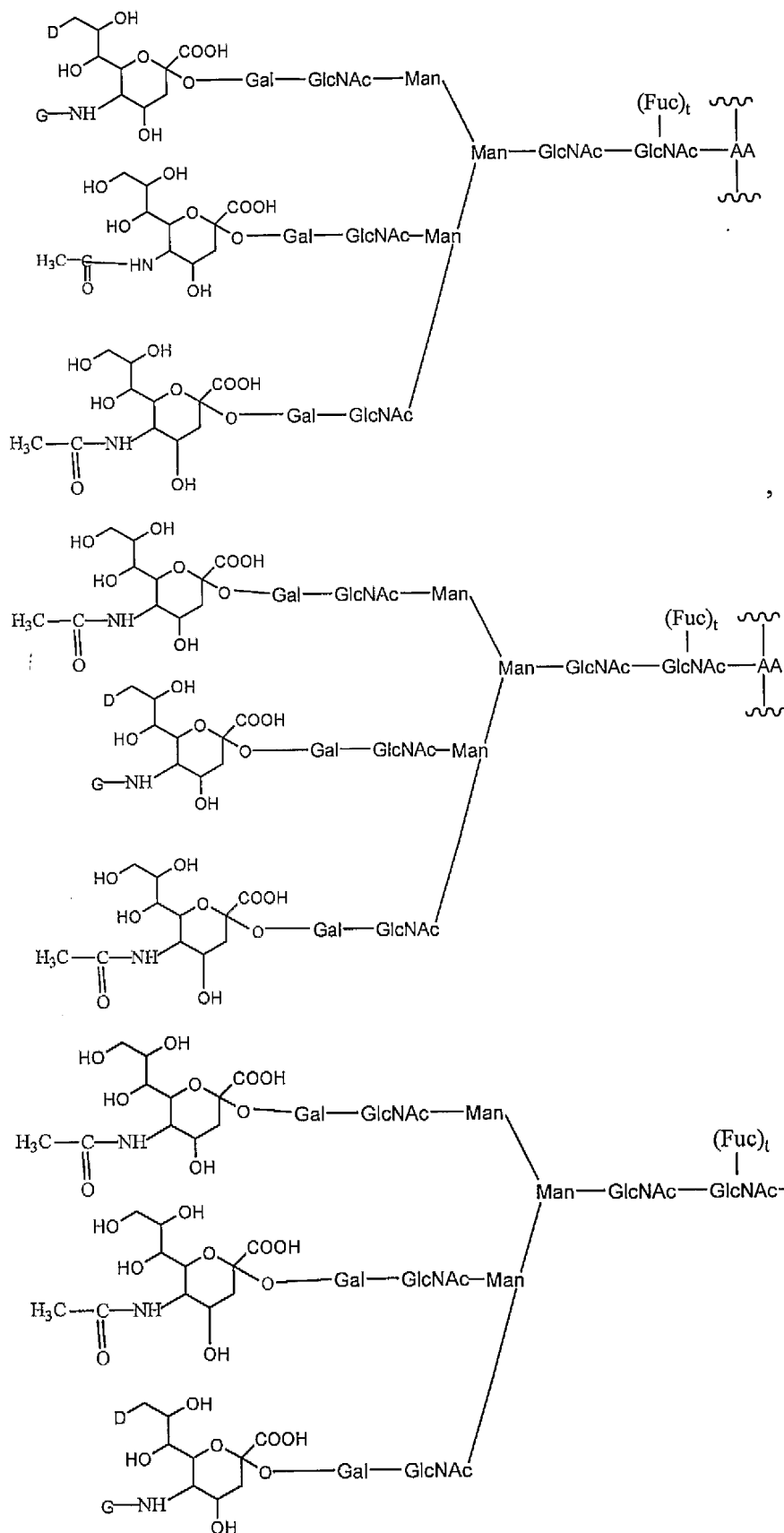
から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含み、式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整

【 0 2 4 8 】

【化 1 0 8】



【化 1 0 9】

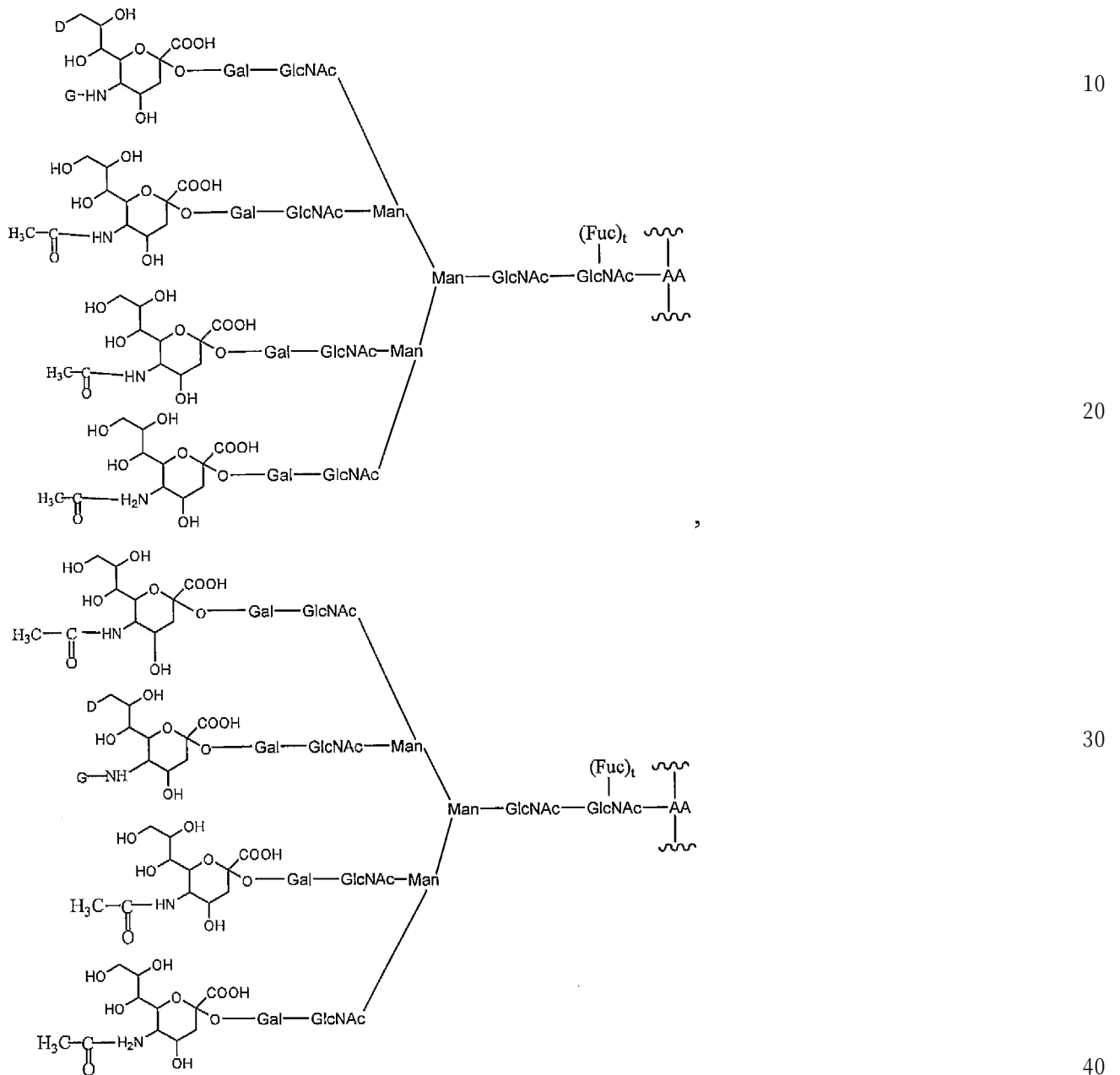


から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含み、式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整

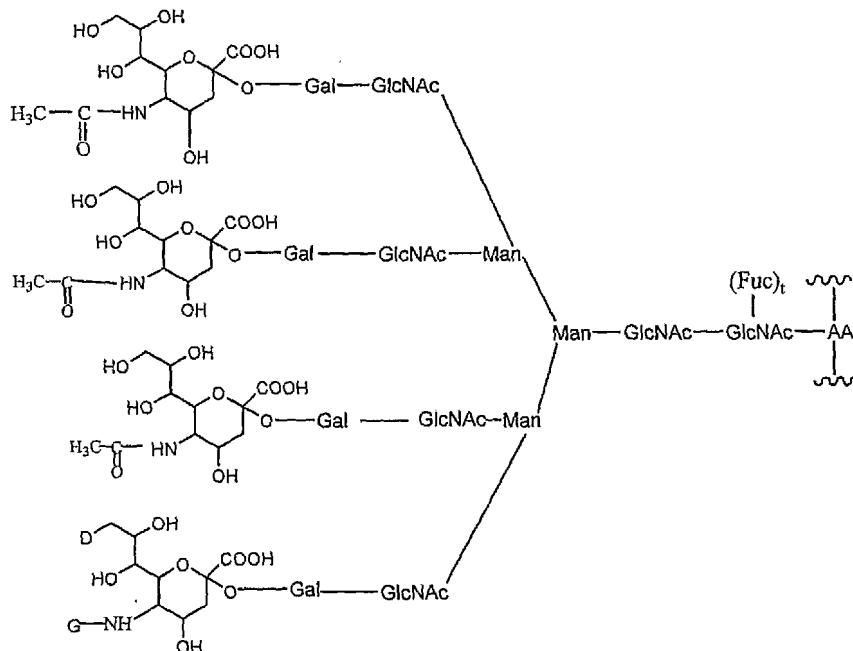
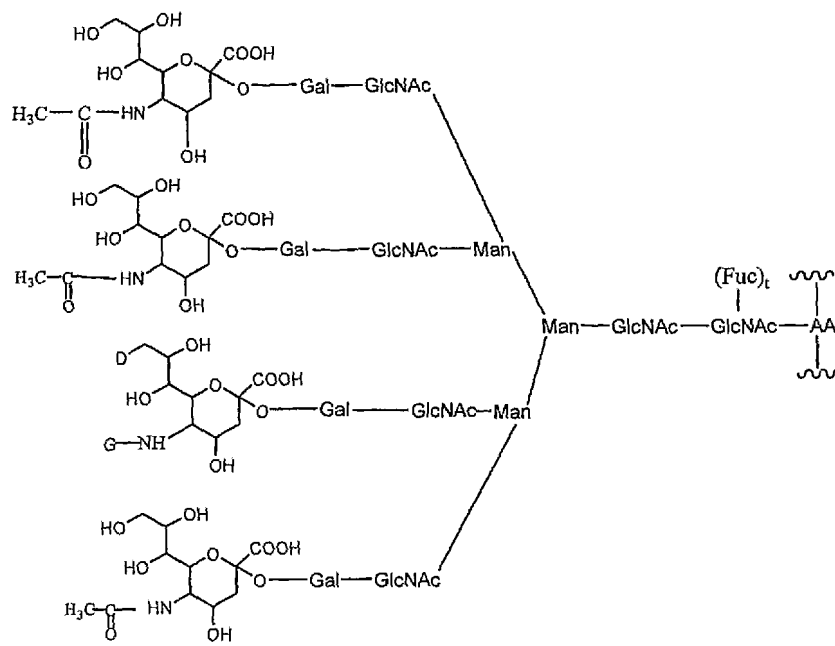
数である。例示的な実施形態において、Gを含まないシアリル部分の0および2つから選択されるメンバーがない。例示的な実施形態において、Gを含まないシアリル部分の1および2つから選択されるメンバーがない。

【0249】

他の例示的な実施形態において、ペプチド複合体は、
【化110】



【化 1 1 1】



から選択される式に基づく少なくとも1つの前記グリコシルリンカーを含み、式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数である。例示的な実施形態において、Gを含まないシアリル部分の0および2つから選択されるメンバーがない。例示的な実施形態において、Gを含まないシアリル部分の1および2つから選択されるメンバーがない。

【0250】

他の例示的な実施形態において、因子VII／因子VIIaペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する。他の例示的な実施形態において、グリコシルリンカーは、前記因子VII／因子VIIaペプチドに、セリンおよびスレオニンから選択されるアミノ酸残基を介して結合している。

【0251】

他の例示的な実施形態において、アスパラギン残基は、N152、N322およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである。

【0252】

他の例示的な実施形態において、因子V I I aペプチドは生理活性因子V I I aペプチドである。

【0253】

他の例示的な実施形態において、グリコシルリンカーは、前記因子V I I / 因子V I I aペプチドに、アスパラギン残基であるアミノ酸残基を介して結合されている。

【0254】

他の例示的な実施形態において、本発明は、好適な宿主において産生される因子V I I / 因子V I I aペプチドを提供する。本発明はまた、このペプチドを発現させる方法を提供する。他の例示的な実施形態において、宿主は哺乳類発現系である。

10

【0255】

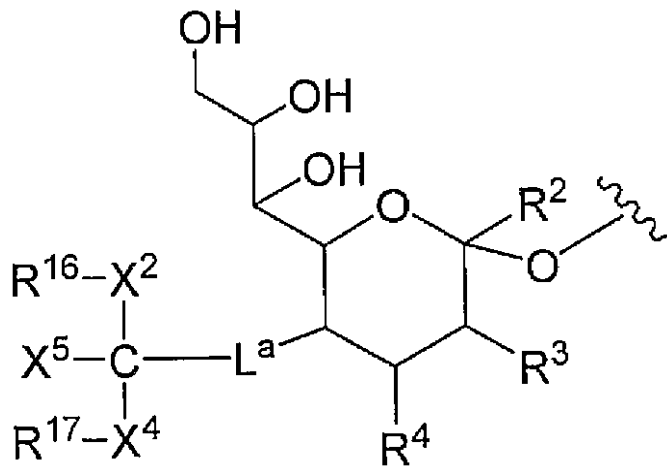
他の例示的な実施形態において、本発明は、それを必要とする対象における状態を処置する方法を提供し、前記状態は前記対象における易感染性凝固効力により特徴付けられ、前記方法は、前記対象における前記状態の回復に有効な量の、本発明の因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体を対象に投与するステップを含む。他の例示的な実施形態において、本方法は、前記哺乳動物に、ある量の本願明細書に記載の方法に基づいて産生された因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体を投与するステップを含む。

【0256】

他の態様において、本発明は、式、

【化112】

20

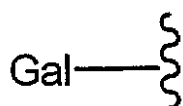


30

を有する修飾シアリル残基を含むグリコシルリンカーを含む因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体を形成する方法を提供し、式中、 R^2 は、 H 、 CH_2OR^7 、 $COOR^7$ または OR^7 である。 R^7 は、 H 、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキルを表す。 R^3 および R^4 は、 H 、置換または非置換アルキル、 OR^8 、 $NHC(O)R^9$ から独立して選択されるメンバーである。 R^8 および R^9 は、 H 、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルまたはシアリル酸から独立して選択される。 R^{16} および R^{17} は、独立して選択される高分子アームである。 X^2 および X^4 は、高分子部分 R^{16} および R^{17} をCに結合する独立して選択されるリンケージ断片である。 X^5 は非反応性基であり、および L^a はリンカー基である。本方法は、(a) グリコシル部分、

40

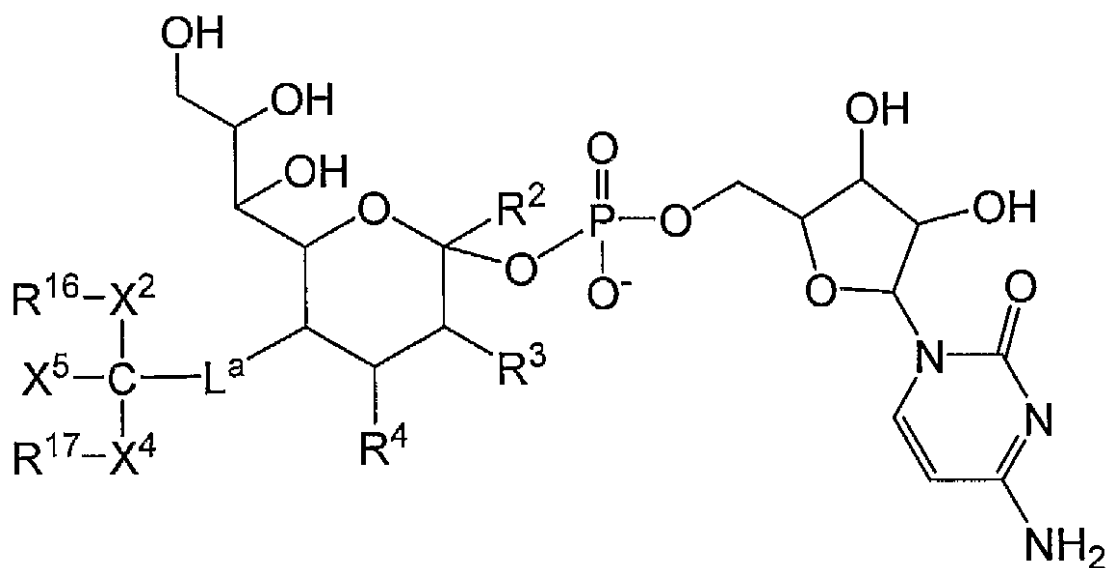
【化 1 1 3】



を含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを
式、

10

【化 1 1 4】



20

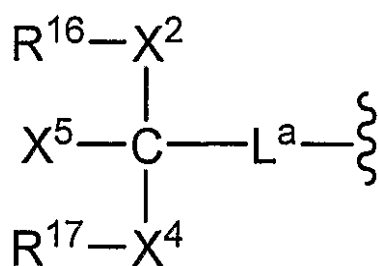
を有する P E G - シアル酸ドナー部分と、
P E G - シアル酸を前記グリコシル部分の G a l へ転移させる酵素とに、前記転移に適切
な条件で接触させるステップを含む。

30

【 0 2 5 7】

他の例示的な実施形態において、部分、

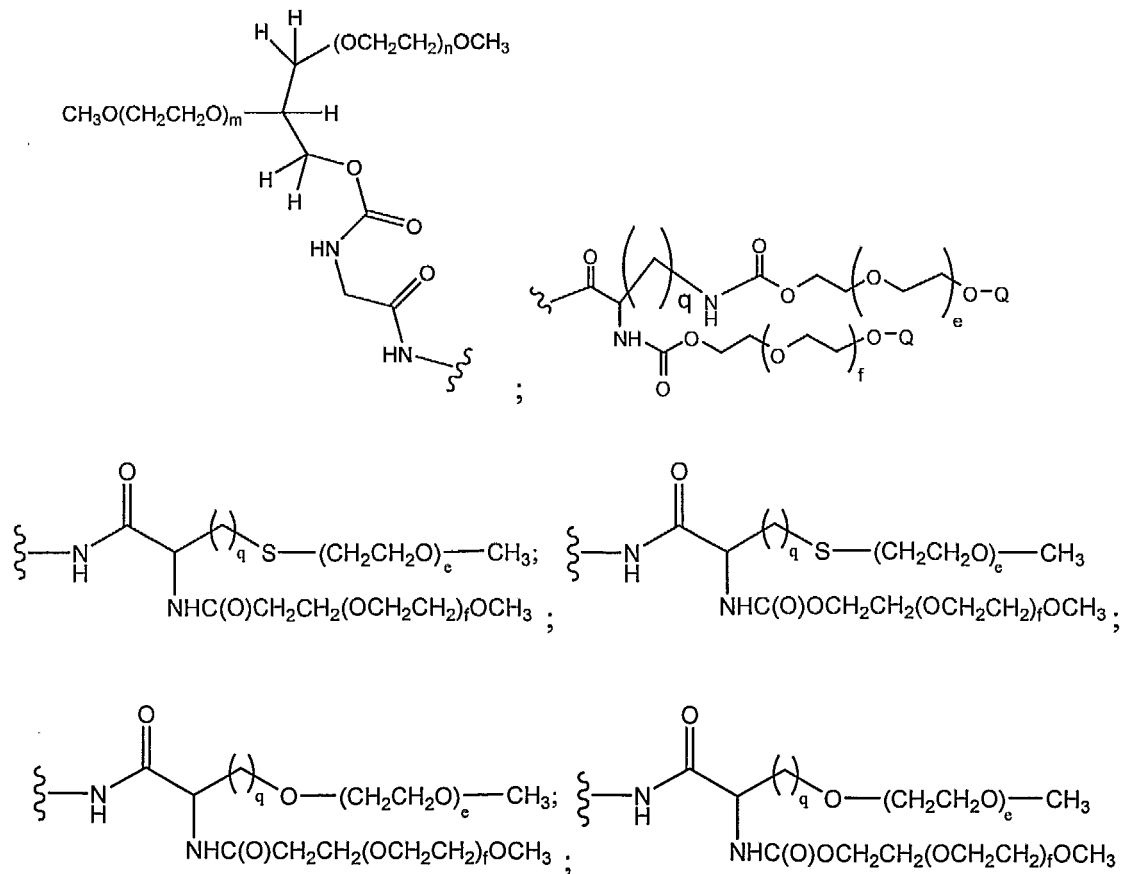
【化 1 1 5】



40

は、

【化 1 1 6】



10

20

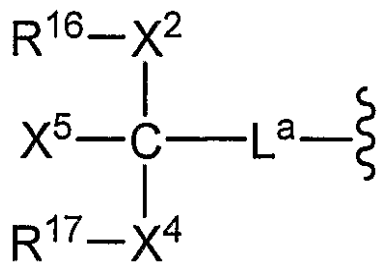
から選択されるメンバーである式を有し、式中、 e 、 f 、 m および n は、1～2500から独立して選択される整数であり、および q は、0～20から選択される整数である。

【0 2 5 8】

他の例示的な実施形態において、部分、

30

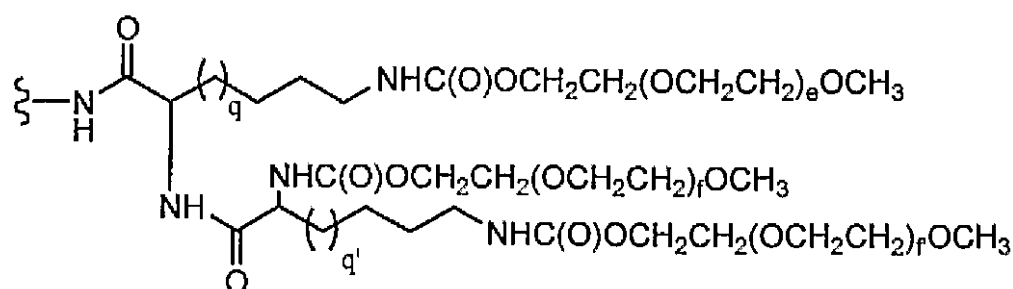
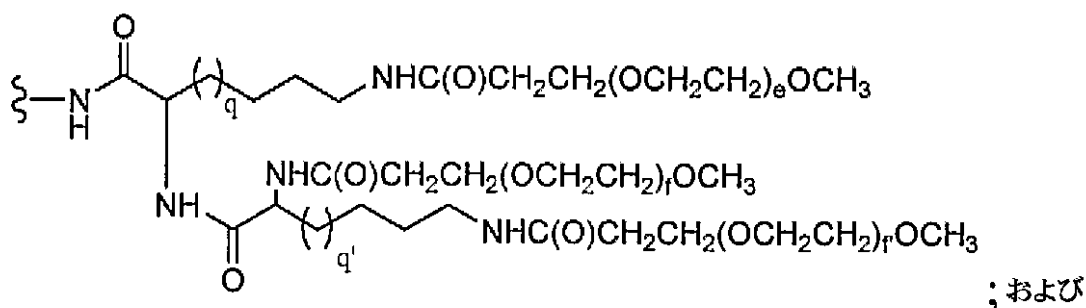
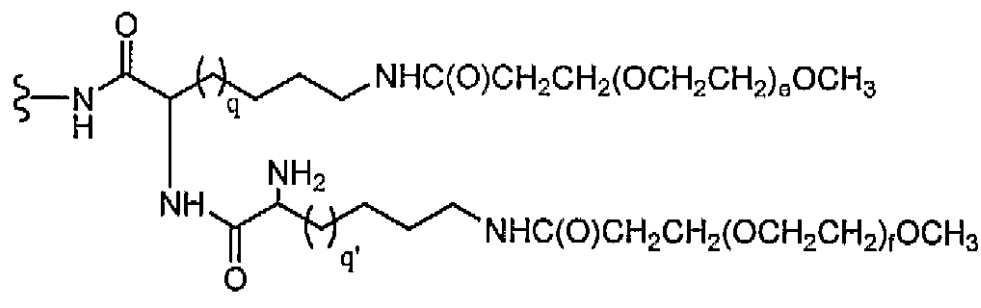
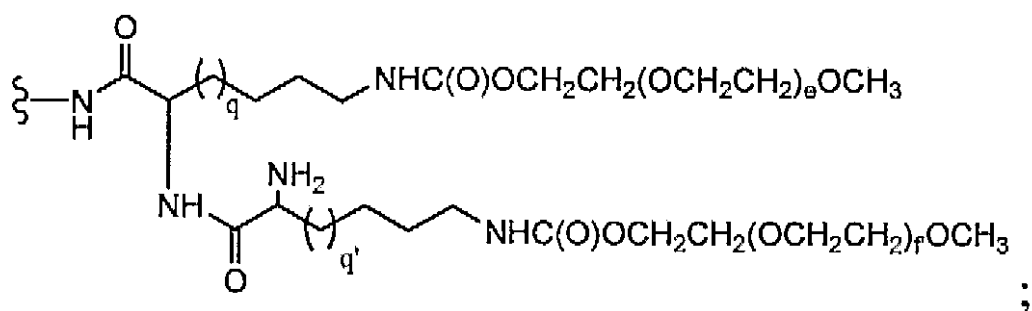
【化 1 1 7】



40

は、

【化 1 1 8】



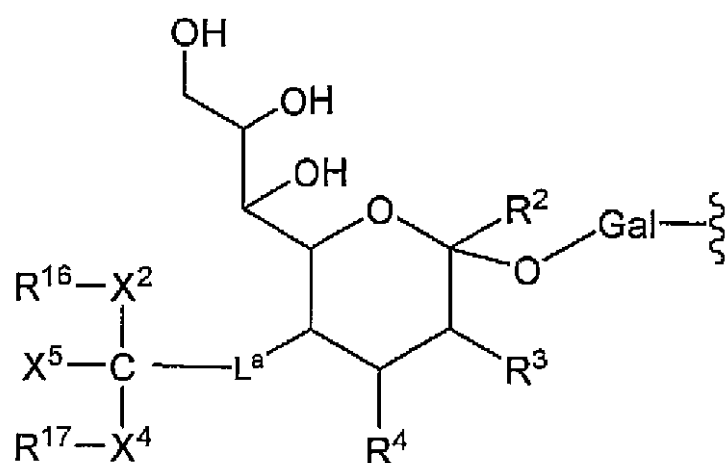
から選択されるメンバーである式を有し、式中、e、fおよびf'は、1～2500から独立して選択される整数であり、およびqおよびq'は、1～20から独立して選択される整数である。

40

【0259】

他の例示的な実施形態において、グリコシルリンカーは、式、

【化 1 1 9】



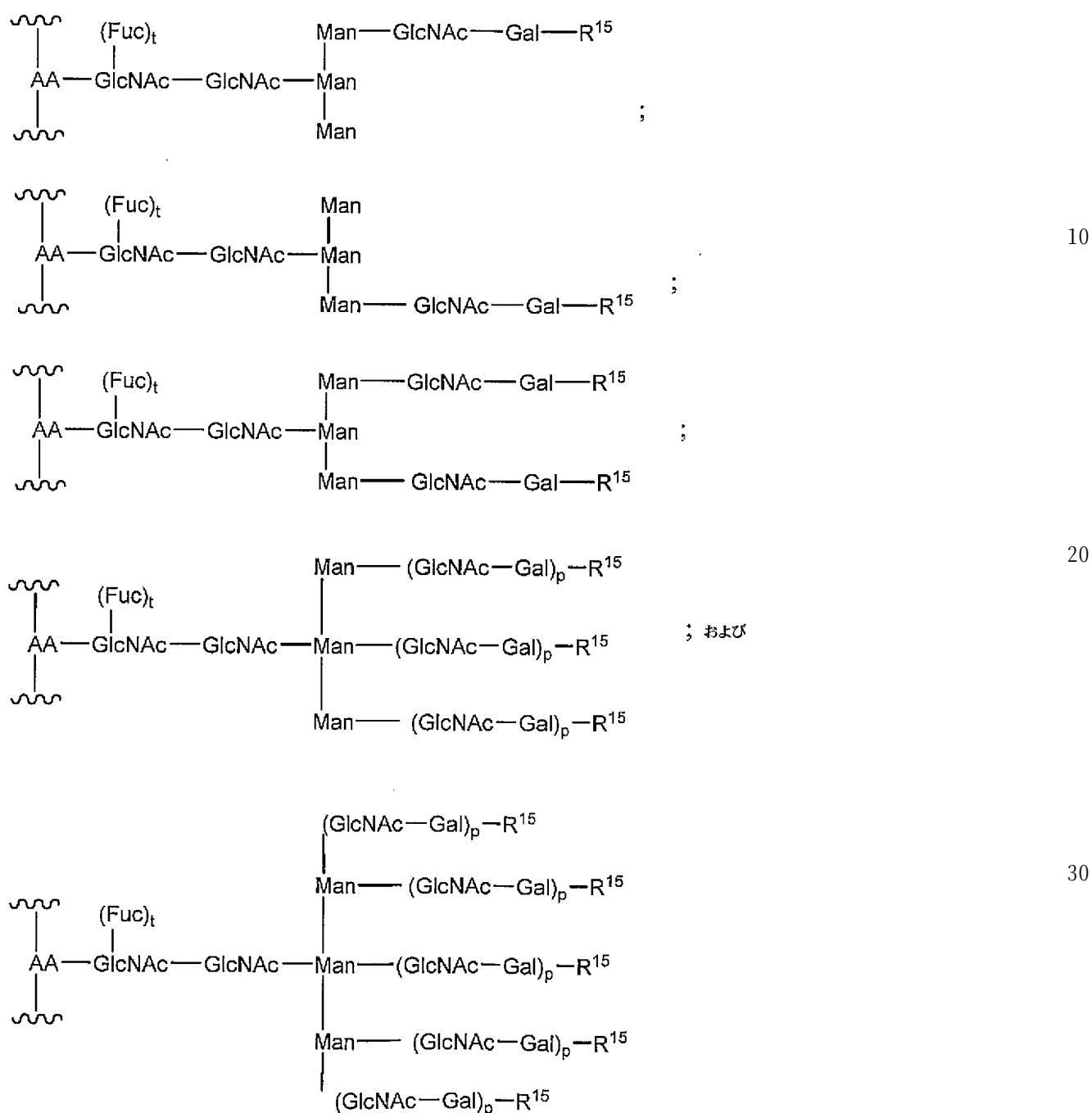
10

を含む。

【 0 2 6 0】

他の例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体は、式、

【化 1 2 0】



10

20

30

を有する少なくとも1つのグリコシルリンカーを含み、式中、AAは、前記ペプチドのアミノ酸残基であり、tは、0および1から選択される整数であり、および R^{15} は修飾シ

40

【0261】

他の例示的な実施形態において、因子VII／因子VIIaペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する。

【0262】

他の例示的な実施形態において、グリコシルリンカーは、前記因子VII／因子VIIaペプチドに、アスパラギン残基であるアミノ酸残基を介して結合されている。

【0263】

他の例示的な実施形態において、アスパラギン残基は、N152、N322およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである。

50

【0264】

他の例示的な実施形態において、因子V I I aペプチドは生理活性因子V I I aペプチドである。

【0265】

他の例示的な実施形態において、本方法は、ステップ(a)の前に、(b)因子V I I /因子V I I aペプチドを好適な宿主において発現させるステップを含む。

【0266】

他の態様において、本発明は、それを必要とする対象における状態を処置する方法を提供し、前記状態は前記対象における易感染性凝固効力により特徴付けられ、前記方法は、前記対象における前記状態の回復に有効な量の本願明細書に記載の方法に基づいて産生された因子V I I /因子V I I aペプチド複合体を対象に投与するステップを含む。他の例示的な実施形態において、本方法は、前記哺乳動物に、ある量の本願明細書に記載の方法に基づいて産生された因子V I I /因子V I I aペプチド複合体を投与するステップを含む。

10

【0267】

他の態様において、本発明は因子V I Iまたは因子V I I aペプチド複合体の合成方法を提供し、前記方法は、a)シアリダーゼ、b)グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選択されるメンバーである酵素、c)修飾糖質/修飾シアリル残基、d)因子V I I /因子V I I aペプチドを組み合わせ、これにより、前記因子V I Iまたは因子V I I aペプチド複合体を合成するステップを含む。例示的な実施形態において、組み合わせるステップは10時間未満の時間である。他の例示的な実施形態において、本発明は、キャッピングステップをさらに含む。

20

【0268】

I I . D . i v . 不水溶性ポリマー

他の実施形態において、上記において考察したものと同様に、修飾糖質は、水溶性ポリマーより不水溶性ポリマーを含む。本発明の複合体はまた、一種以上の不水溶性ポリマーを含み得る。本発明のこの実施形態は、治療的ペプチドを制御された方式で送達するためのビヒクルとしての複合体の使用によって例示される。高分子薬物送達系は、技術分野において公知である。例えば、ダン(Dunn)ら編、「POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS」、ACS Symposium Series第469巻、American Chemical Society、ワシントンD. C. (Washington, D. C.) 1991年を参照のこと。実質的にいずれの公知の薬物送達系も本発明の複合体に適用可能であることを当業者は認識するであろう。

30

【0269】

R^1 、 $L-R^1$ 、 R^{15} 、 $R^{15'}$ および他のラジカルについての上記に規定のモチーフは、当業者に容易に利用可能な化学を用いて制限されることなく直鎖および分岐構造に組み込まれ得る不水溶性ポリマーについても同様に適用可能である。

【0270】

代表的な不水溶性ポリマーとしては、これに限定されないが、ポリホスファジン、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアクリルアミド、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ハロゲン化ポリビニル、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート) ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(

40

50

酢酸ビニル)、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン、プルロニックおよびポリビニルフェノールおよびこれらのコポリマーが挙げられる。

【0271】

本発明の複合体において用いられる合成的に修飾された天然ポリマーとしては、これに限定されないが、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、およびニトロセルロースが挙げられる。合成的に修飾された天然ポリマーの幅広いクラスの特に好ましいメンバーとしては、これに限定されないが、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシメチルセルロース、セルローストリアセテート、硫酸セルロースナトリウム塩、およびアクリルおよびメタクリル酸エステルおよびアルギン酸のポリマーが挙げられる。

【0272】

本願明細書において考察されたこれらのおよび他のポリマーは、シグマケミカル社 (Sigma Chemical Co.) (ミズーリ州セントルイス (St. Louis, MO.))、ポリサイエンシズ (Polysciences) (ペンシルベニア州ウォーレントン (Warrenton, PA.))、アルドリッチ (Aldrich) (ウィスコンシン州ミルウォーキー (Milwaukee, WI.))、フルカ (Fluka) (ニューヨーク州ロンコンコマ (Ronkonkoma, NY.))、およびバイオラッド (BioRad) (カリフォルニア州リッチモンド (Richmond, CA.)) 等などの商業的供給者から容易に入手することが可能であり、これらの供給者から入手したモノマーから、標準的な技術を用いて合成されることが可能である。

【0273】

本発明の複合体において用いられる代表的な生分解性ポリマーとしては、これに限定されないが、ポリラクチド、ポリグリコリドおよびそのコポリマー、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-コ-カプロラクトン)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、これらのブレンドおよびコポリマーが挙げられる。特に用いられるのは、コラーゲン、プルロニック等を含むものなどのゲルを形成する組成物である。

【0274】

本発明において用いられるポリマーは、それらの構造の少なくとも一部中に生体吸収性分子を有する不水溶性材料を含む、「ハイブリッド」ポリマーを含む。このようなポリマーの例は、生体吸収性領域、親水性領域および複数の架橋性官能基/ポリマー鎖を有する不水溶性コポリマーを含むものである。

【0275】

本発明の目的について、「不水溶性材料」は、水または含水環境に実質的に不溶性である材料を含む。それ故、コポリマーの一定の領域またはセグメントが親水性またはさらには水溶性であり得ても、ポリマー分子は、全体として、水中には、いずれの実際的な尺度では溶解しない。

【0276】

本発明の目的について、用語「生体吸収性分子」は、代謝されまたは分解されて、再吸収および/または身体による通常の排泄経路を通じて排出されることが可能である領域を含む。このような代謝産物または分解生成物は、好ましくは、実質的に身体に無毒である。

【0277】

生体吸収性領域は、コポリマー組成物が全体として水溶性が付加されない限りにおいて疎水性または親水性のいずれかであり得る。それ故、生体吸収性領域は、ポリマーが、全体として、不水溶性のままでいる優先傾向に基づいて選択される。従って、相対的特性、すなわち、含有される官能基の種類、および生体吸収性領域の相対的比率、および親水性

領域は、有用な生体吸収性組成物が不水溶性のままであることが保障されるよう選択される。

【0278】

例示的な再吸収性ポリマーは、例えば、ポリ(α-ヒドロキシーカルボン酸)／ポリ(オキシアルキレン)の合成的に生成された再吸収性ブロックコポリマーを含む(コーン(Cohn)ら、米国特許第4,826,945号明細書を参照のこと)。これらのコポリマーは、架橋されておらず、水溶性であり、従って、身体は分解されたブロックコポリマー組成物を排出可能である。ユネス(Younes)ら、J Biomed. Mater. Res. 21:第1301~1316ページ(1987年)；およびコーン(Cohn)ら、J Biomed. Mater. Res. 22:第993~1009ページ(1988年)を参照のこと。

10

【0279】

ここで好ましい生体吸収性ポリマーとしては、ポリ(エステル)、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ(ラクトン)、ポリ(アミド)、ポリ(エステルアミド)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(オルトエステル)、ポリ(炭酸塩)、ポリ(ホスファジン)、ポリ(リン酸エステル)、ポリ(チオエステル)、多糖類およびこれらの混合物から選択される一種以上の構成成分が挙げられる。より好ましくは、生体吸収性ポリマーとしては、ポリ(ヒドロキシ)酸成分が挙げられる。ポリ(ヒドロキシ)酸のうち、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカブロン酸、ポリ酪酸、ポリ吉草酸およびコポリマーおよびこれらの混合物が好ましい。

20

【0280】

インビボで吸収される(「生体吸収される」)断片の形成に追加して、本発明の方法における使用のための好ましい高分子コーティングはまた、排出可能なおよび／または代謝可能な断片を形成することが可能である。

【0281】

より高次のコポリマーをまた本発明において用いることが可能である。例えば、1984年3月20日発行のケージー(Casey)ら、米国特許第4,438,253号明細書は、ポリ(グリコール酸)およびヒドロキシル末端ポリ(アルキレングリコール)エステル交換から生成されるトリブロックコポリマーを開示する。このような組成物は、再吸収性モノフィラメント縫合としての使用のために開示されている。このような組成物の柔軟性は、テトラ-*p*-トリルオルトカルボネートなどの芳香族オルトカルボネートのコポリマー構造への組み込みによって制御される。

30

【0282】

乳酸および／またはグリコール酸に基づく他のポリマーもまた用いられることが可能である。例えば、1993年4月13日発行のスピヌー(Spinu)、米国特許第5,202,413号明細書は、ラクチドおよび／またはグリコリドの、オリゴマー系ジオールまたはジアミン残基のいずれかへの開環重合、これに続く、ジイソシアネート、塩化ジアシルまたはジクロロシランなどの二官能性化合物での鎖延長により生成された順番に秩序だったポリラクチドおよび／またはポリグリコリドのブロックを有する生分解性マルチブロックコポリマーを開示する。

40

【0283】

本発明において有用なコーティングの生体吸収性領域は、加水分解的におよび／または酵素的に開裂可能であるように設計されることが可能である。本発明の目的について、「加水分解的に開裂可能」は、コポリマーの感受性、特に、水中でまたは含水環境で加水分解される生体吸収性領域を指す。同様に、本願明細書において用いられるところ、「酵素的に開裂可能」は、コポリマーの感受性、特に、内在性のまたは外因性の酵素によって開裂される生体吸収性領域を指す。

【0284】

身体内に置かれたときに、親水性領域は、排出可能なおよび／または代謝可能な断片に処理されることが可能である。それ故、親水性領域としては、例えば、ポリエーテル、ポ

50

リアルキレンオキシド、ポリオール、ポリ（ビニルピロリジン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アルキルオキサゾリン）、多糖類、炭水化物、ペプチド、タンパク質およびコポリマーおよびこれらの混合物を挙げることができる。さらに、親水性領域はまた、例えば、ポリ（アルキレン）オキシドであることが可能である。このようなポリ（アルキレン）オキシドは、例えば、ポリ（エチレン）オキシド、ポリ（プロピレン）オキシドおよびこれらの混合物およびコポリマーを含むことが可能である。

【0285】

ヒドロゲルの構成成分であるポリマーがまた本発明において有用である。ヒドロゲルは、比較的多量の水を吸収可能である高分子材料である。ヒドロゲル形成性化合物の例としては、これに限定されないが、ポリアクリル酸、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリジン、膠、カラゲナンおよび他の多糖類、ヒドロキシエチレンメタクリル酸（HEMA）、ならびにこれらの誘導体等が挙げられる。ヒドロゲルは、安定、生分解性および生体吸収性であるよう生成されることが可能である。しかも、ヒドロゲル組成物は、これらの特性の一つ以上を示すサブユニットを含むことが可能である。

【0286】

その完全性を架橋性を通して制御することが可能である生適合性ヒドロゲル組成物が公知であり、および本願において、本発明の方法における使用に好ましい。例えば、1995年4月25日に発行のハッベル（Hubbell）ら、米国特許第5,410,016号明細書および1996年6月25日発行の米国特許第5,529,914号明細書は、2つの加水分解的に易動性延長部の間に挟まれた水溶性中央ブロック断片を有する架橋されたブロックコポリマーである水溶性系を開示する。このようなコポリマーは、光重合性アクリレート官能基でさらに末端封止されている。架橋されたとき、これらの系はヒドロゲルになる。このようなコポリマーの水溶性中央ブロックは、ポリ（エチレングリコール）を含むことが可能であり、一方で、加水分解的に易動性延長部は、ポリグリコール酸またはポリ乳酸などのポリ（ α -ヒドロキシ酸）であることが可能である。ソーニー（Sawhney）ら、Macromolecules 26：第581～587ページ（1993年）を参照のこと。

【0287】

他の好ましい実施形態において、ゲルは熱可逆性ゲルである。プルロニック、コラーゲン、膠、ヒアルロン酸、多糖類、ポリウレタンヒドロゲル、ポリウレタン-尿素ヒドロゲルおよびこれらの組み合わせなどの構成成分を含む熱可逆性ゲルが本願において好ましい。

【0288】

さらに他の例示的な実施形態において、本発明の複合体は、リポソームの成分を含む。リポソームは、例えば、エップスタイン（Eppstein）ら、米国特許第4,522,811号明細書に記載のものといった、当業者に公知の方法により調製されることが可能である。例えば、リポソーム配合物は、適切な脂質（ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイルホスファチジルコリン、アラカドイルホスファチジルコリン、およびコレステロールなど）を無機溶剤中に溶解し、これを、次いで蒸発させて、乾燥した脂質の薄いフィルムをコンテナの表面に残留させることにより調製され得る。活性化化合物またはその薬学的に許容可能な塩の水溶液が次いでコンテナに導入される。次いで、コンテナを手でかき混ぜて、脂質材料をコンテナの側面から遊離させて脂質凝集物を分散させ、これにより、リポソーム懸濁液が形成される。

【0289】

上述の微小粒子および微小粒子の調製方法が実施例により提供されており、およびこれらは、本発明において用いられる微小粒子の範囲を定義することを意図しない。異なる方法により構成された微小粒子のアレイが本発明において用いられることは当業者に明らかであろう。

【0290】

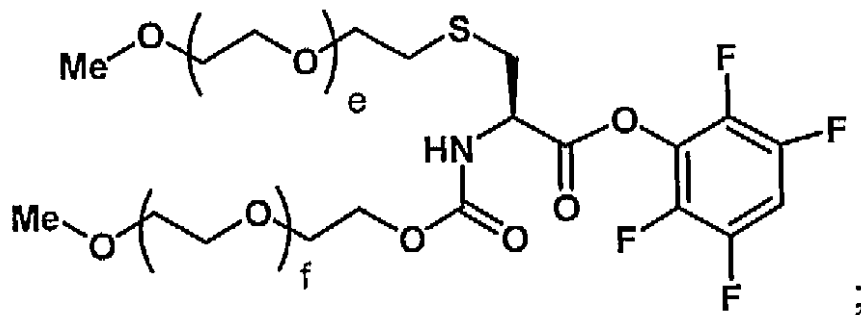
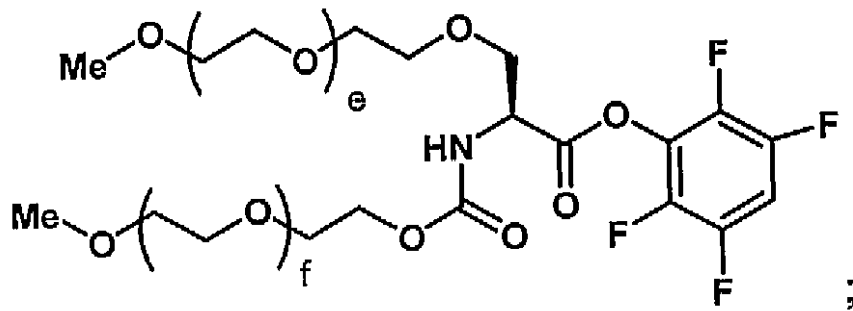
直鎖および分岐の両方の、水溶性ポリマーのコンテクストにおいて上記に考察された構造的様式は、一般的に、不水溶性ポリマーに関しても適用可能である。それ故、例えば、システイン、セリン、グリシン、およびトリリシン分岐コアは、2つの不水溶性ポリマー部分で官能基化されていることが可能である。これらの種の生成に用いられる方法は、一般的には、水溶性ポリマーの生成に用いられるものに密接に類似している。

【0291】

II. D. v. 高分子修飾基の生成方法

高分子修飾基は、グリコシルまたは糖部分またはアミノ酸部分との反応のために活性化されることが可能である。活性化種（例えば、炭酸塩および活性エステル）の例示的な構造としては、

【化121】

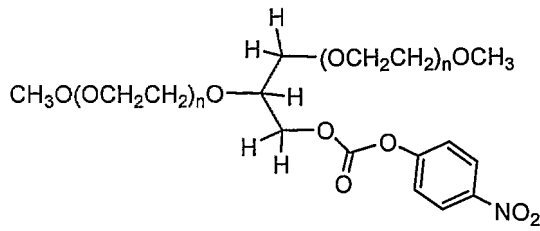


10

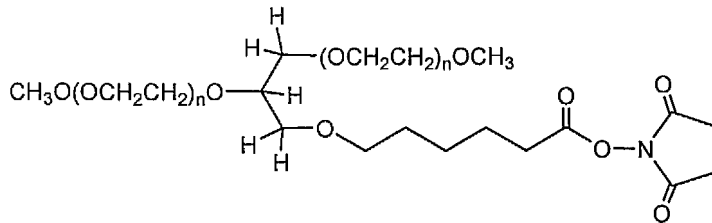
20

30

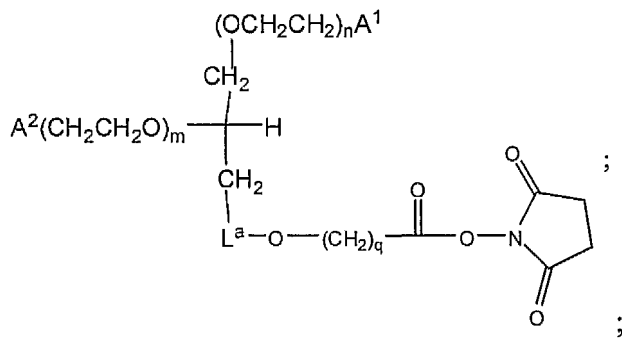
【化 1 2 2】



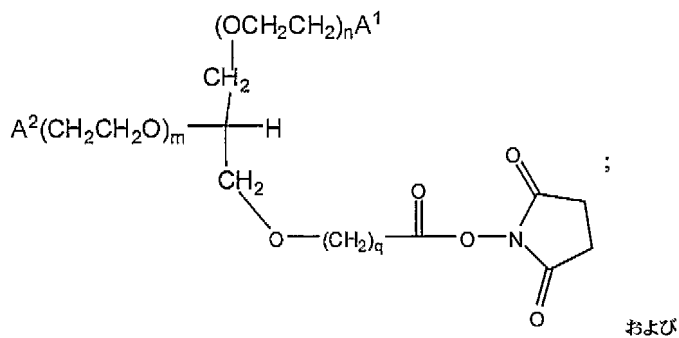
10



20



30



40

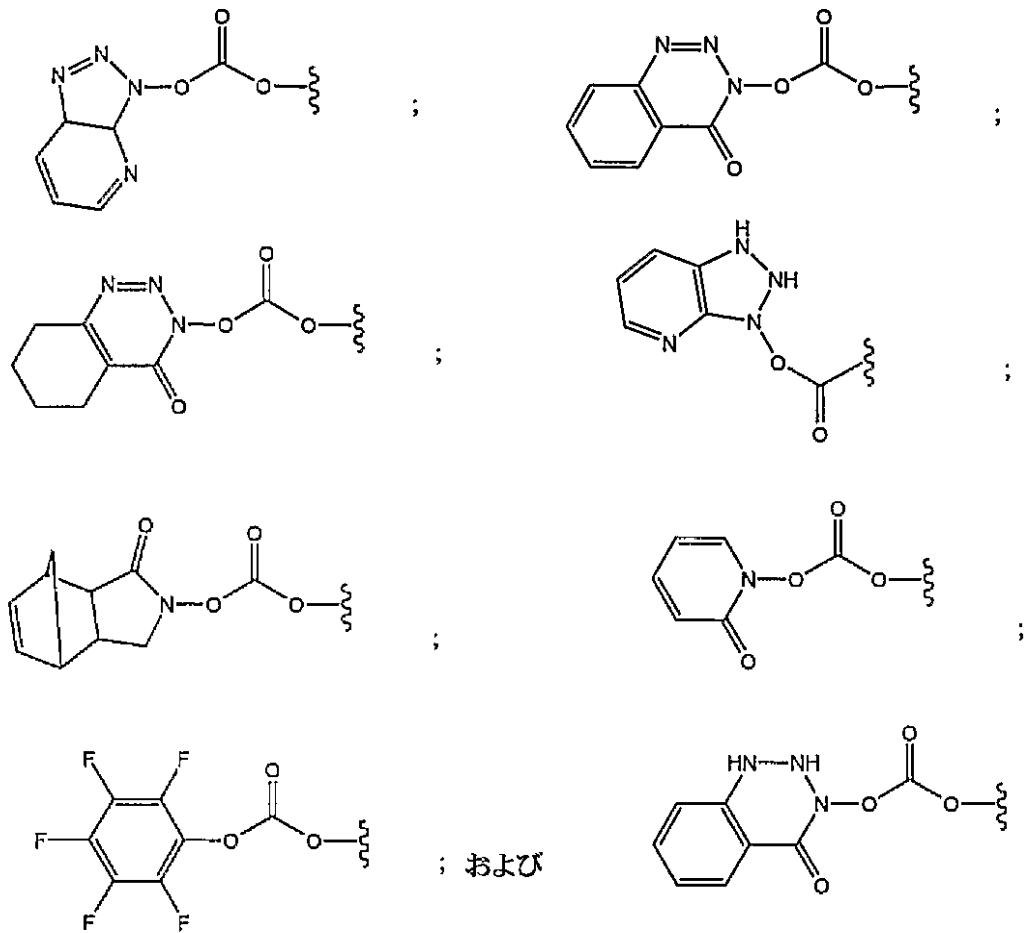
が挙げられる。

【0 2 9 2】

上記の図において、q は、1～40から選択されるメンバーである。本願明細書に記載の化合物の調製に用いられる直鎖および分岐 PEG を活性化するために適切な他の活性化、または脱離基としては、これに限定されないが、種、

50

【化 1 2 3】



が挙げられる。これらのおよび他の種および活性化 PEG の形成方法により活性化される PEG 分子が国際公開第 04/083259 号パンフレットに規定されている。

30

【0293】

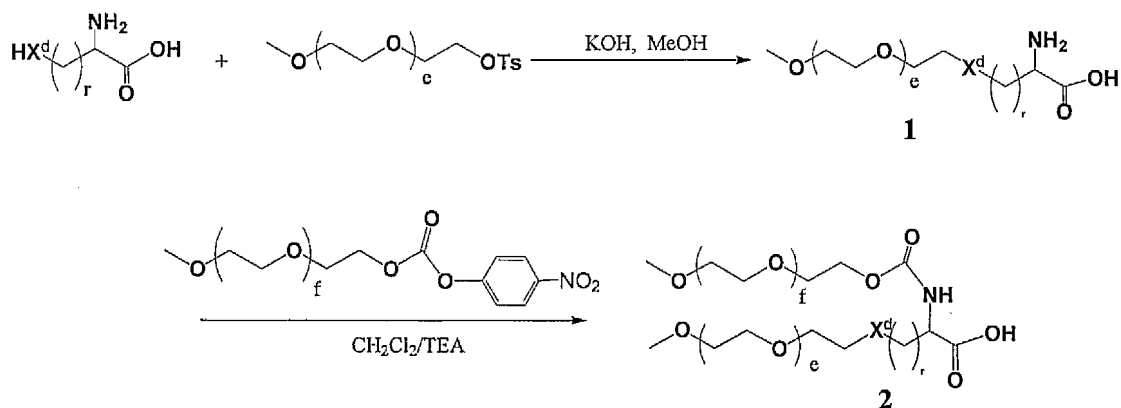
上に示す分岐ポリマーの m-PEG アームの一つ以上は、異なる終端、例えば、OH、COOH、NH₂、C₂~C₁₀-アルキル等を有する PEG 部分により置き換えられることが可能であることを当業者は認識するであろう。しかも、上記構造は、アミノ酸側鎖の α-炭素原子および官能基の間にアルキルリンカーを挿入する（または炭素原子を除去する）ことにより、容易に修飾される。それ故、「ホモ」誘導体および高級相同体、ならびに低級相同体が、本発明において用いられる分岐 PEG についてのコアの範囲内である。

【0294】

本願明細書に記載の分岐 PEG 種は、以下のスキーム、

40

【化 1 2 4】



10

20

30

40

50

に規定されるものなどの方法により容易に調製され、ここで、 X^d はOまたはSであり、および r は、1～5の整数である。指数 e および f は、1～2500から独立して選択される整数である。例示的な実施形態において、これらの指数の一方または両方が、ポリマーが約5 KDa、10 KDa、15 KDa、20 KDa、25 KDa、30 KDa、35 KDa、または40 KDaの分子量であるよう選択される。

【0295】

それ故、本スキームによれば、天然または非天然アミノ酸が、活性化m-P E G誘導体、この場合トシレートと接触されて、側鎖ヘテロ原子 X^d のアルキル化により1が形成される。単官能性化m-P E Gアミノ酸が、N-アシル化条件に反応性m-P E G誘導体と共に供され、これにより分岐m-P E G 2を集合させる。当業者が認識するであろうとおり、トシレート脱離基はいずれかの好適な脱離基、例えば、ハロゲン、メシレート、トリフレート等で置き換えられることが可能である。同様に、アミンのアシル化に用いられる反応性カーボネートは、活性エステル、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド等で置き換えられることが可能である、または酸は、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール等などの脱水剤を用いてインサイチュで活性化されることが可能である。

【0296】

他の例示的な実施形態において、尿素部分はアミドなどの基で置き換えられる。

【0297】

I I. E. 物質の均質分散ペプチド複合体組成物

化学的または酵素的に付加されたグリコシルリンク基を介して形成されるペプチド複合体の提供に追加して、本発明は、それらの置換パターンが高度に均質なペプチド複合体を含む物質の組成物を提供する。本発明の方法を用いて、因子V I I / 因子V I I a 複合体の固体群にわたる実質的な比率のグリコシルリンク基およびグリコシル部分が構造的に同等のアミノ酸またはグリコシル残基に結合されているペプチド複合体を形成することが可能である。それ故、第2の態様において、本発明は、ペプチドに、グリコシルリンク基、例えば、無処置グリコシルリンク基を介して共有結合的に結合された水溶性ポリマー部分の固体群を有するペプチド複合体を提供する。本発明の例示的なペプチド複合体において、水溶性ポリマー固体群の基本的に各メンバーは、グリコシルリンク基を介してペプチドのグリコシル残基に結合しており、およびグリコシルリンク基が結合しているペプチドの各グリコシル残基は、同一の構造を有する。

【0298】

本発明はまた、ペプチドが修飾基、例えば治療的部分、診断上の部分、標的指向化部分、毒素部分等に、グリコシルリンク基を介して複合化されている上述のものと類似の複合体を提供する。上記に記載の修飾基の各々は、小型分子、天然ポリマー（例えば、ポリペプチド）または合成ポリマーであることが可能である。修飾基がシアル酸に結合されてい

る場合、修飾基は実質的に非蛍光性であることが一般的に好ましい。

【0299】

例示的な実施形態において、本発明のペプチドは、高分子修飾基、例えば、PEG部分を含む修飾糖質でグリコシル化された、少なくとも1つのO-結合型またはN-結合型グリコシル化部分を含む。例示的な実施形態において、PEGは、ペプチドに、無処置グリコシルリンク基を介して、または非グリコシルリンカー、例えば、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルを介して共有結合されている。グリコシルリンク基は、ペプチドのアミノ酸残基またはグリコシル残基のいずれかに共有結合されている。あるいは、グリコシルリンク基は、グリコペプチドの1つ以上のグリコシル単位に結合されている。本発明はまた、グリコシルリンク基がアミノ酸残基およびグリコシル残基の両方に結合されている複合体を提供する。

10

【0300】

本発明のペプチド上のグリカンは、一般的には、哺乳類（BHK、CHO）細胞または昆虫（例えば、Sf-9）細胞により産生される因子VII/因子VIIaペプチドにおいて、本願明細書に記載の方法によるリモデリングで見出されるものに対応している。例えば、トリマンノシルコアと共に発現される昆虫由来の因子VII/因子VIIaペプチドは、その後、GlcNAcドナーおよびGlcNAcトランスフェラーゼおよびGalドナーおよびGalトランスフェラーゼと接触させられる。GlcNAcおよびGalのトリマンノシルコアへの付加は、2ステップまたは1ステップのいずれかで達成される。修飾シアル酸は、本願明細書において考察されたグリコシル部分の少なくとも一つの分岐に付加される。修飾シアル酸で官能基化されていないこれらのGal部分は、任意により、シアル酸ドナーとの、シアルルトランスフェラーゼの存在下での反応により「キャップ」される。

20

【0301】

例示的な実施形態において、ペプチドの固体群における末端Gal部分の少なくとも60%がシアル酸でキャップされ、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは、少なくとも80%、なおより好ましくは少なくとも90%およびさらに好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%がシアル酸でキャップされる。

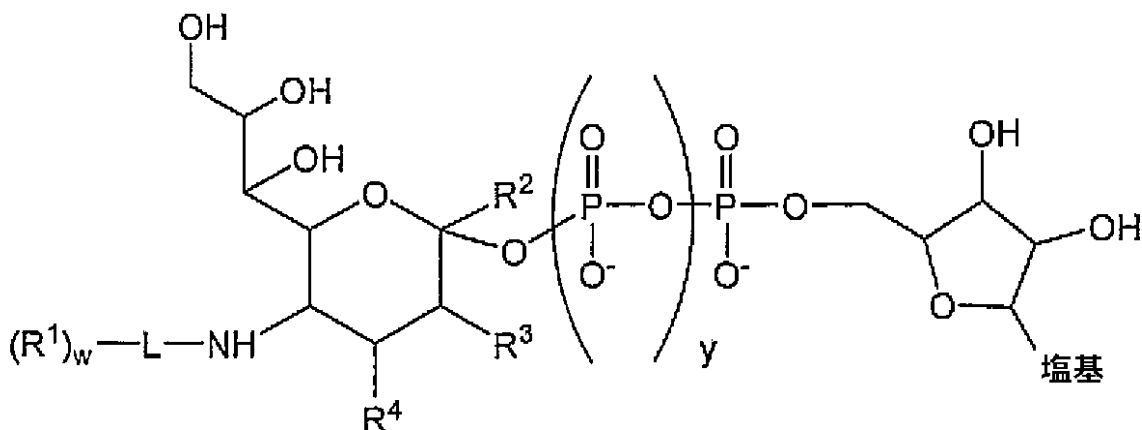
【0302】

II. F. ヌクレオチド糖質

30

本発明の他の態様において、本発明はまた、糖質ヌクレオチドを提供する。この実施形態による例示的な種は、

【化125】

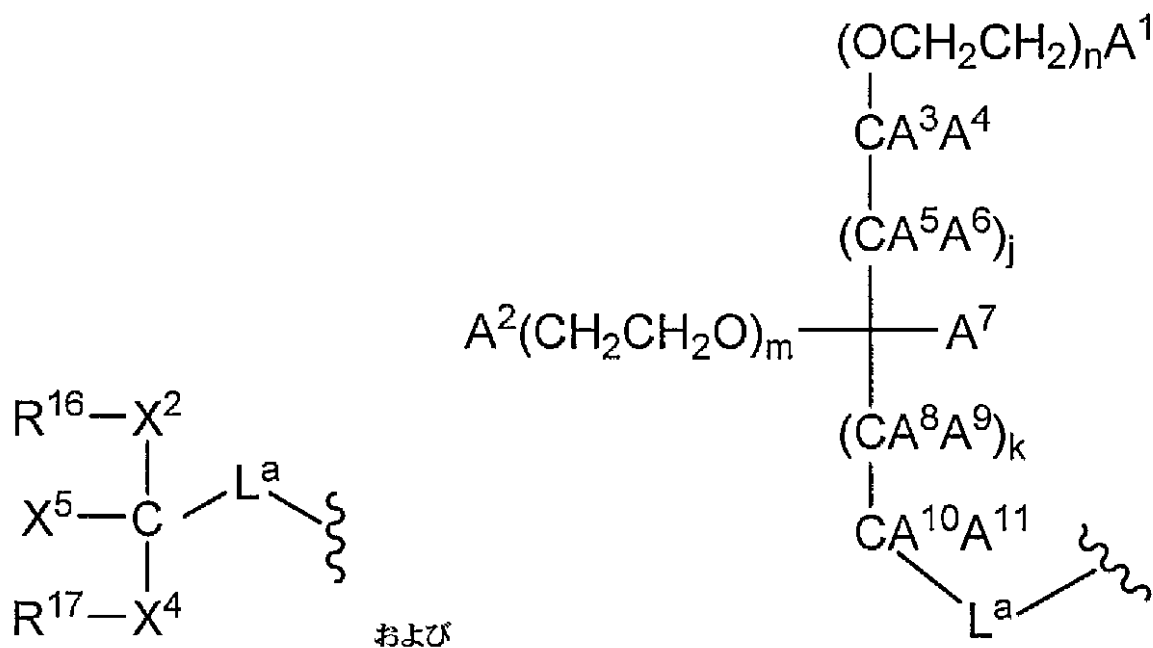


40

を含み、ここで、指数 y は、0、1および2から選択される整数である。塩基は、アデニン、チミン、グアニン、シチジンおよびウリジンなどの核酸塩基である。 R^2 、 R^3 およ

50

び R^4 は上記のとおりである。例示的な実施形態において、 $L-(R^1)_w$ は、
【化 1 2 6】

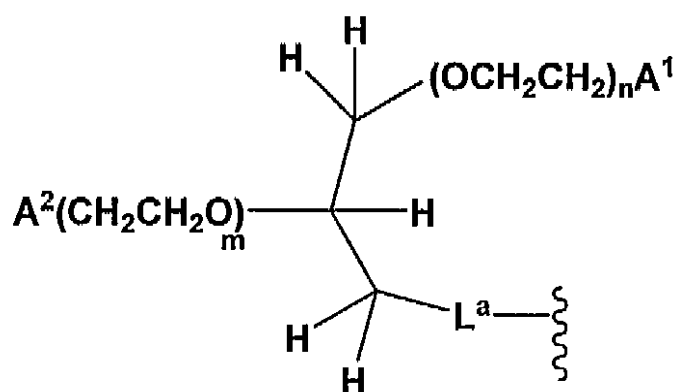


から選択されるメンバーであり、ここで、可変要素は上記のとおりである。

【0303】

例示的な実施形態において、 $L-(R^1)_w$ は、以下の式による構造を有する。

【化 1 2 7】



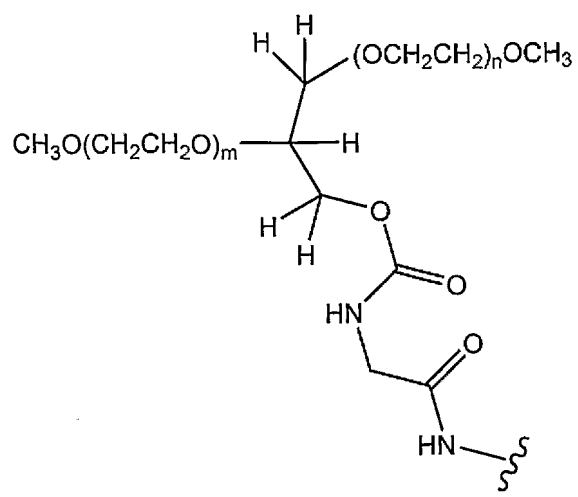
例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、各々、 $-OH$ および $-OCH_3$ から選択される。

40

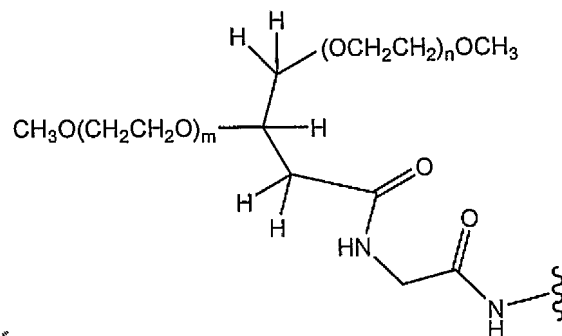
【0304】

この実施形態による例示的な高分子修飾基は、

【化 1 2 8】



および



10

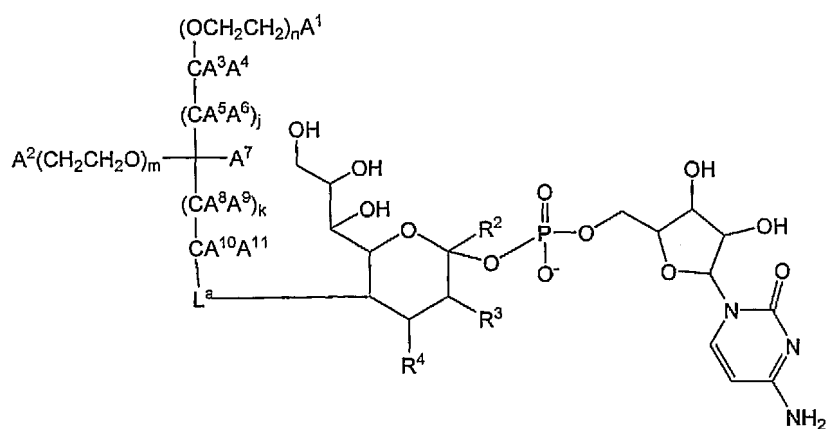
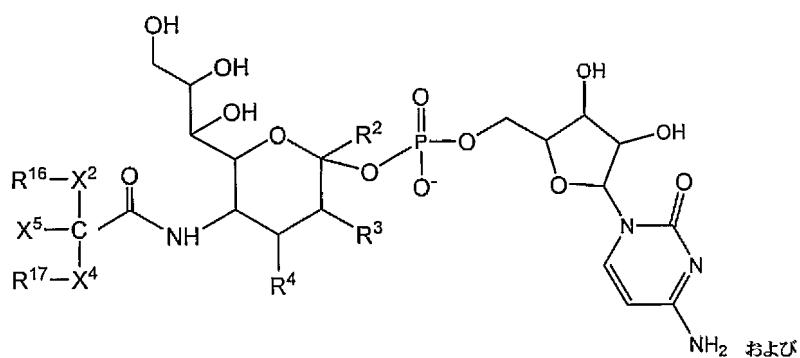
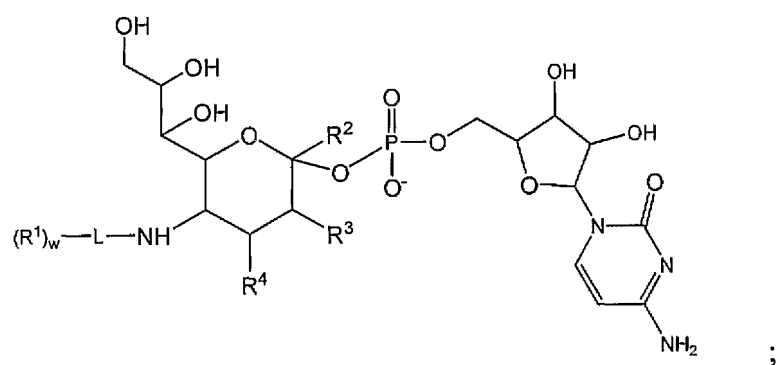
を含む。

【 0 3 0 5】

20

他の例示的な実施形態において、ヌクレオチド糖質は、

【化 1 2 9】

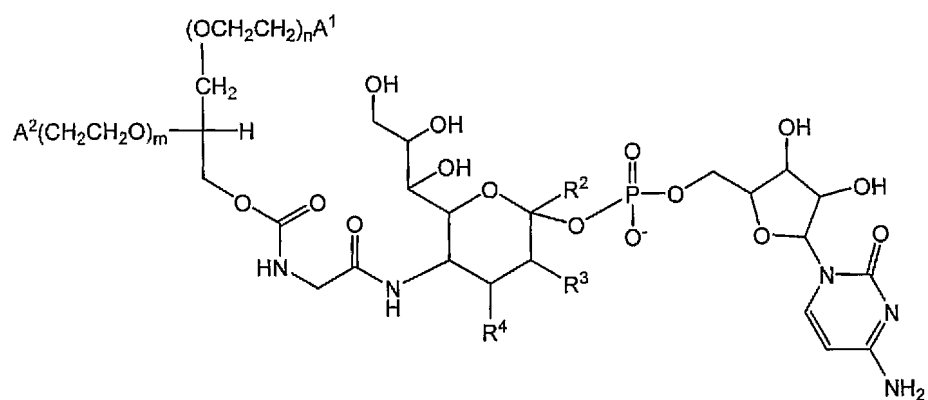


から選択されるメンバーである式を有する。

【0306】

この実施形態による例示的なヌクレオチド糖質は、構造、

【化 1 3 0】



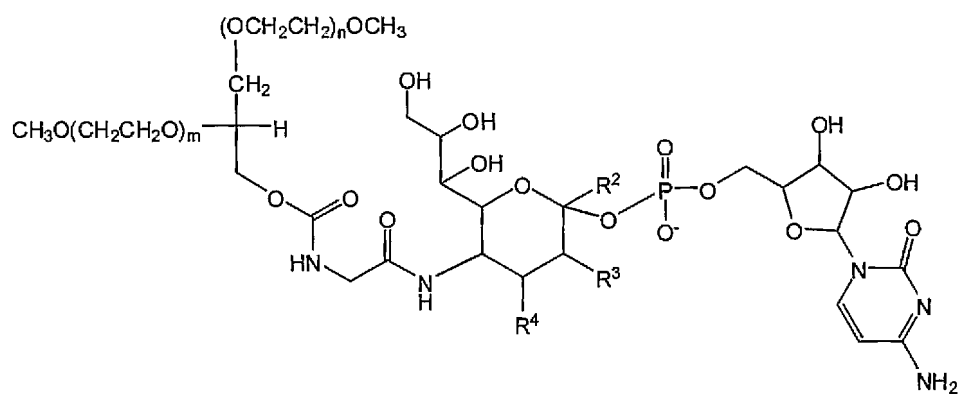
10

を有する。

【 0 3 0 7】

この実施形態による例示的なヌクレオチド糖質は、構造、

【化 1 3 1】



20

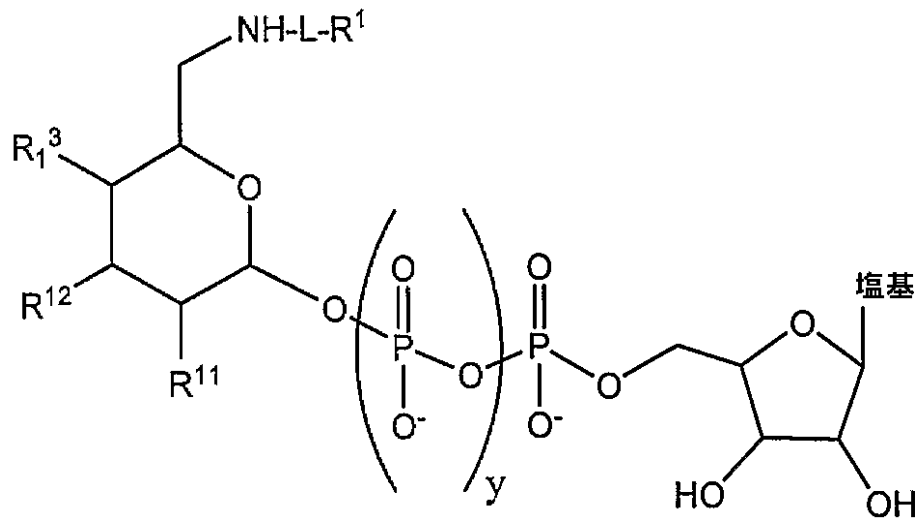
を有する。

【 0 3 0 8】

他の例示的な実施形態において、ヌクレオチド糖質は、以下の式、

30

【化 1 3 2】



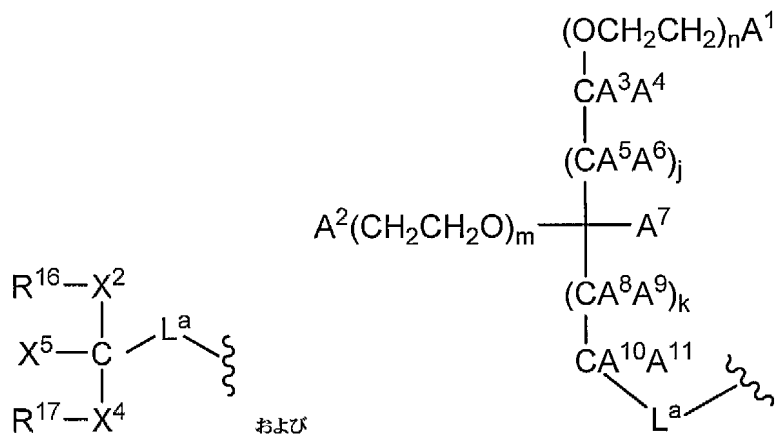
10

に基づいており、ここで、R基、およびLは、上述のと通りの部分を表す。指数「y」は 20
0、1または2である。例示的な実施形態において、Lは、NHおよびR¹の間の結合で
ある。塩基は核酸塩基である。

【0309】

例示的な実施形態において、L-R¹は

【化 1 3 3】



30

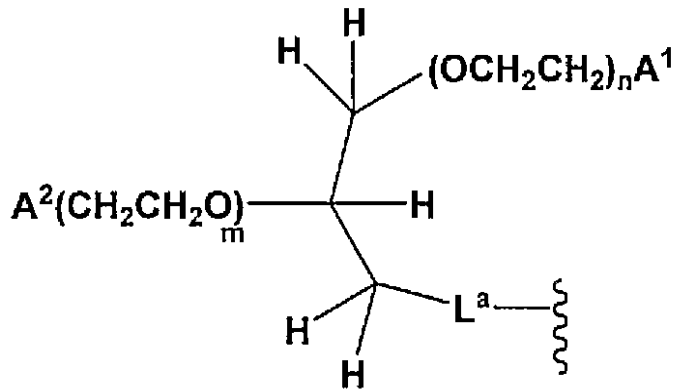
から選択されるメンバーであり、ここで、可変要素は上記のとおりである。

40

【0310】

例示的な実施形態において、L-R¹は、以下の式による構造を有する。

【化 1 3 4】



10

例示的な実施形態において、 A^1 および A^2 は、各々、 $-OH$ および $-OCH_3$ から選択される。

【0311】

I I I . 方法

上記に考察した複合体に追加して、本発明は、これらのおよび他の複合体を調製する方法を提供する。しかも、本発明は、疾病を発症させるリスクにある対象または疾病を患っている対象に、本発明の複合体を投与することにより、疾病状態を予防し、治癒または回復する方法を提供する。

20

【0312】

例示的な実施形態において、複合体は、高分子修飾部分およびグリコシル化または非グリコシル化ペプチドの間に形成される。ポリマーは、ペプチド（またはグリコシル残基）および修飾基（例えば、水溶性ポリマー）の間に介在され、およびその両方に共有結合されるグリコシルリンク基を介してペプチドに複合化される。本方法は、ペプチドを、修飾糖質と、例えば、グリコシルトランスフェラーゼといった修飾糖質を基質に複合化する酵素とを含有する混合物に接触させるステップを含む。反応は、適切な条件下で実施されて、共有結合を修飾糖質およびペプチドの間に形成する。修飾糖質の糖質部分は、好ましくは、ヌクレオチド糖質から選択される。因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を合成する方法は、a) シアリダーゼ、b) グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダーゼまたはエンドグリコシダーゼなどのグリコシルリンク基の転移を触媒可能な酵素、c) 修飾糖質、d) 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを組み合わせるステップを含み、これにより因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を合成する。反応は、適切な条件下で実施されて、共有結合を修飾糖質およびペプチドの間に形成する。修飾糖質の糖質部分は、好ましくは、ヌクレオチド糖質から選択される。

30

【0313】

例示的な実施形態において、上記に規定されたものなどの修飾糖質は、対応するヌクレオチド糖質として活性化される。本発明において、それらの修飾形態で用いられる例示的な糖質ヌクレオチドは、ヌクレオチド一、二または三リン酸塩またはこれらの類似体を含む。好ましい実施形態において、修飾糖質ヌクレオチドは、UDP-グリコシド、CMP-グリコシド、またはGDP-グリコシドから選択される。さらにより好ましくは、修飾糖質ヌクレオチドの糖質ヌクレオチド部分は、UDP-ガラクトース、UDP-ガラクトサミン、UDP-グルコース、UDP-グルコサミン、GDP-マンノース、GDP-フコース、CMP-シアル酸、またはCMP-NeuAcから選択される。例示的な実施形態において、ヌクレオチドリノ酸はC-1に結合されている。

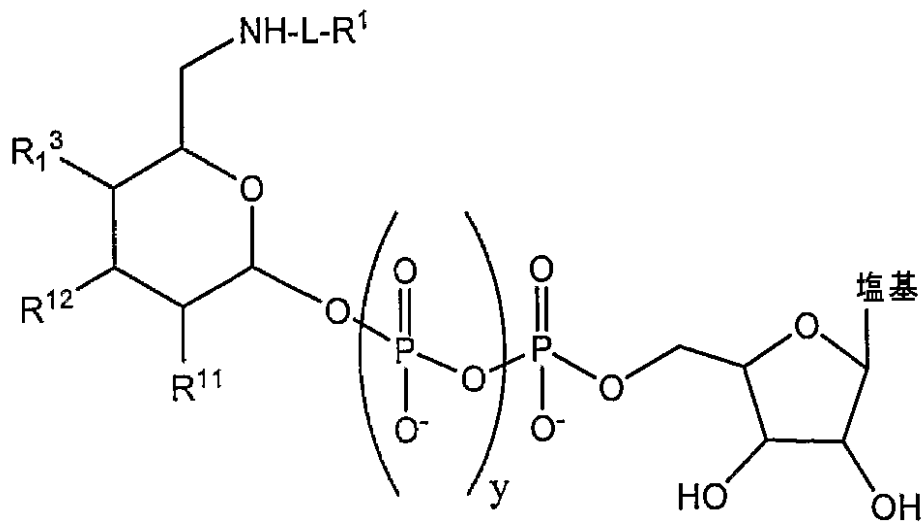
40

【0314】

本発明はまた、 $L-R^1$ で、6-炭素位置で修飾された糖質ヌクレオチドの使用を提供

50

する。この実施形態による例示的な種は、
【化 1 3 5】



10

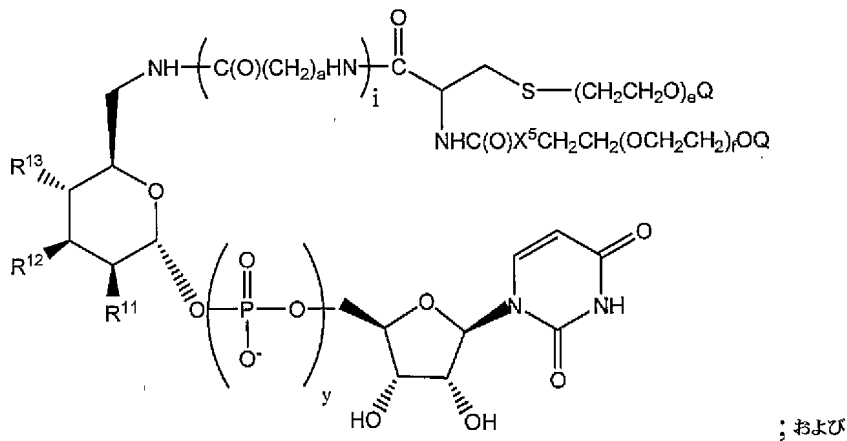
を含み、ここで、R 基、および L は上述のと通りの部分を表す。指数「y」は 0、1 または 2 である。例示的な実施形態において、L は、NH および R¹ の間の結合である。塩基は核酸塩基である。

20

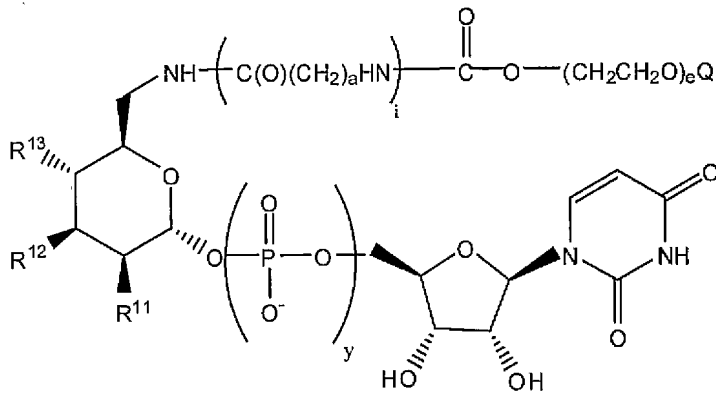
【0 3 1 5】

6 位置の炭素が修飾されている、本発明において用いられる例示的なヌクレオチド糖質は、GDP マンノースの立体化学を有する種、例えば、

【化 1 3 6】



; および



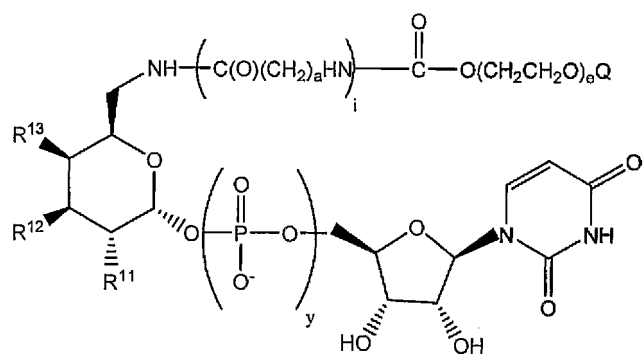
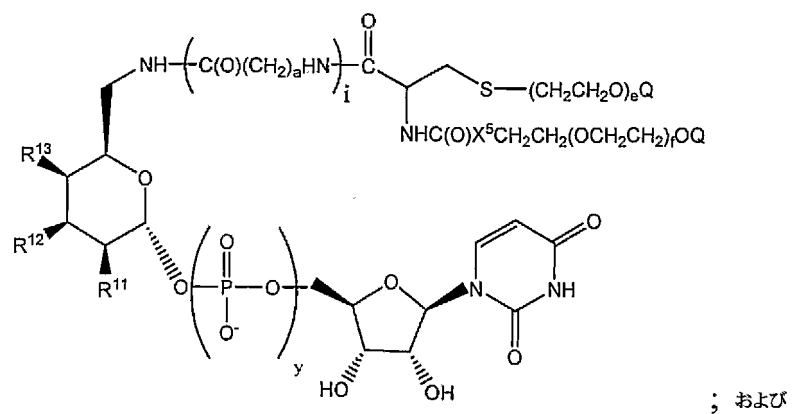
を含み、ここで、 X^5 は結合またはOである。指数 i は、0 または 1 を表す。指数 a は、1 ~ 20 の整数を表す。指数 e および f は、独立して、1 ~ 2500 の整数を表す。 Q は、上述のとおり、H または置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。当業者が認識するであろうとおり、 S が O で置き換えられたセリン誘導体はまた、この一般モチーフ内に属する。

30

【0 3 1 6】

さらなる例示的な実施形態において、本発明は、修飾糖質がUDPガラクトースの立体化学に基づいている複合体を提供する。本発明において用いられる例示的なヌクレオチド糖質は、構造、

【化 1 3 7】

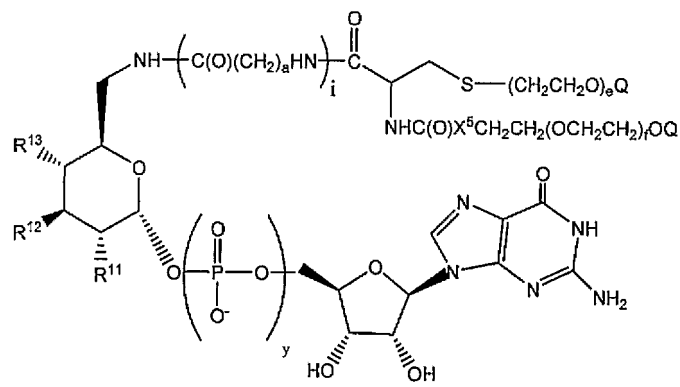


を有する。

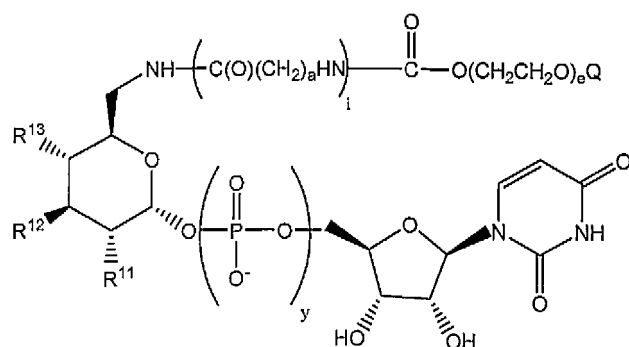
【0 3 1 7】

他の例示的な実施形態において、ヌクレオチド糖質はグルコースの立体化学に基づいて
いる。この実施形態による例示的な種は、式、

【化 1 3 8】



; および

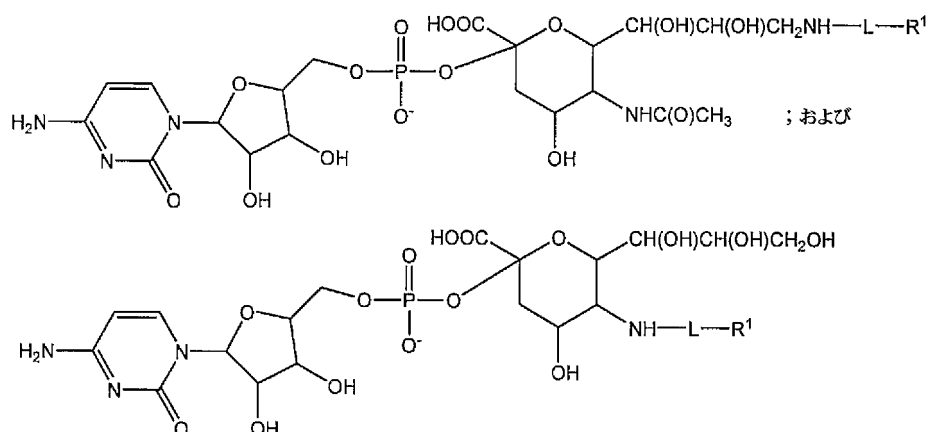


を有する。

【 0 3 1 8】

それ故、グリコシル部分がシアル酸である例示的实施形態において、本発明の方法は、式、

【化 1 3 9】



; および

を有する化合物を用い、ここで、 $L-R^1$ は上述のとおりであり、および L^1-R^1 は修飾基に結合したリンカーを表す。L と同様に、 L^1 による例示的なリンカー種は結合、アルキルまたはヘテロアルキル部分を含む。

【 0 3 1 9】

しかも、上述のとおり、本発明は、直鎖または分岐のいずれかである水溶性ポリマーで修飾されたヌクレオチド糖質の使用を提供する。例えば、以下に示す式を有する化合物は、本発明の範囲にある複合体の調製に用いられる、

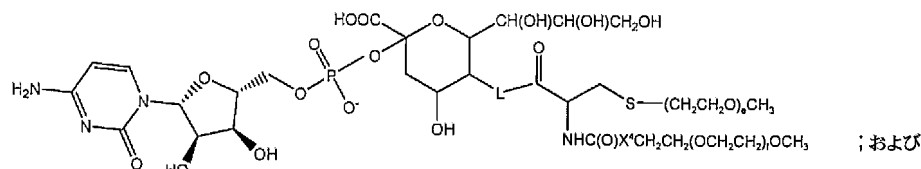
10

20

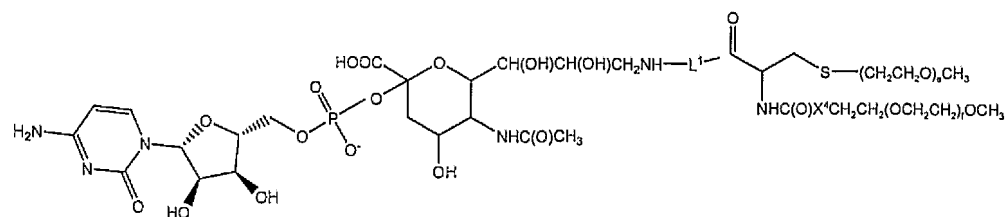
30

40

【化 1 4 0】



; および



10

ここで、 X^4 は O または 結合である。

【0320】

一般には、糖質部分または糖質部分—リンカーカセットおよび PEG または PEG—リンカーカセット基は、新たな有機官能基または非反応性種へのリンクプロセスにより典型的には形質転換されている反応性基の使用を介して、一緒にリンクされている。糖質反応性官能基は、糖質部分上のいずれかの位置に位置されている。本発明の実施において有用な反応性基および反応のクラスは、一般的には、生物複合体化学の技術分野において周知であるものである。反応性糖質部分で得られる現在好まれる反応のクラスは、比較的緩和な条件下で進行するものである。これらとしては、これに限定されないが、求核性置換（例えば、アミンおよびアルコールのハロゲン化アシル、活性エステルとの反応）、求電子性置換（例えば、エナミン反応）および炭素—炭素および炭素—ヘテロ原子多重結合への付加（例えば、マイケル反応、ディールズアルダー付加）が挙げられる。これらのおよび他の有用な反応は、例えば、3月、「ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY」、第3版、John Wiley & Sons、ニューヨーク（New York）、1985年；ヘルマンソン（Hermanson）、「BIOCONJUGATE TECHNIQUES」、Academic Press、サンディエゴ（San Diego）、1996年；およびフィーニー（Feeney）ら、「MODIFICATION OF PROTEINS」；「Advances in Chemistry Series」、第198巻、American Chemical Society、ワシントンD.C.（Washington, D.C.）、1982年において考察されている。

20

30

【0321】

糖質核または修飾基からの側基である有用な反応性官能基としては、これに限定されないが、

(a) 特にこれに限定されないが、N—ヒドロキシスクシンイミドエステル、N—ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p—ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステルを含む、カルボキシル基およびそれらの種々の誘導体、

40

(b) 例えば、エステル、エーテル、アルデヒド等に転化されることが可能であるヒドロキシル基、

(c) ハライドが、後に、例えば、アミン、カルボン酸アニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核性基で置き換えられることが可能であり、これにより、ハロゲン原子の官能基での新たな基の共有結合がもたらされる、ハロアルキル基、

(d) ディールスアルダー反応に関与することが可能である、例えばマレイミド基などのジエノフィル基、

50

(e) 例えばイミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンまたはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成を介して、またはグリニャール付加またはアルキルリチウム付加などのメカニズムを介してその後の誘導体化が可能であるようなアルデヒドまたはケトン基、

(f) 例えばアミンとのその後の反応でスルホンアミドを形成するハロゲン化スルホニル基、

(g) 例えば、ジスルフィドに転化されるか、またはハロゲン化アシルと反応されることが可能であるチオール基、

(h) 例えば、アシル化、アルキル化または酸化されることが可能であるアミンまたはスルフィドリル基、

(i) 例えば、環状付加、アシル化、マイケル付加等を受けることが可能であるアルケン、および

(j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応することが可能であるエポキシドが挙げられる。

【0322】

反応性官能基は、反応性糖質核または修飾基を集合させるために必要な反応に関与または干渉しないように選択されることが可能である。あるいは、反応性官能基は、保護基の存在によって反応に関与することから保護されることが可能である。当業者は、選択された組の反応条件に干渉しないように特定の官能基をどのように保護するかを理解している。有用な保護基の例については、例えば、グリーン (Greene) ら、「PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS」、John Wiley & Sons、ニューヨーク (New York)、1991年を参照のこと。

【0323】

以下の考察において、本発明の実施において有用である修飾糖質の多数の特定の例が規定されている。例示的な実施形態において、シアル酸誘導体は、修飾基が結合された糖質核として用いられる。シアル酸誘導体についての考察に焦点を当てるのは、あくまでも例示を明確にするためであり、本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。多様な他の糖質部分は、例としてシアル酸を用いて規定されるものと類似の方式で活性化されおよび誘導されることが可能であることを当業者は認識するであろう。例えば、数多くの方法が、ガラクトース、グルコース、N-アセチルガラクトサミンおよびフコースを修飾して、技術分野において公知の方法で容易に修飾されるいくつかの糖質基質を命名するために利用可能である。例えば、エルハラビ (Elhallaoui) ら、「Curr. Med. Chem.」6:93 (1999年)；およびシェファー (Schaffer) ら、「J. Org. Chem.」65:24 (2000年)を参照のこと。

【0324】

例示的な実施形態において、修飾糖質は、6-アミノ-N-アセチルグリコシル部分に基づいている。

【0325】

上記のスキームにおいて、指数nは、1~2500の整数を表す。例示的な実施形態において、この指数は、ポリマーが約10KDa、15KDaまたは20KDaの分子量であるよう選択される。符号「A」は、活性化基、例えば、ハロ、活性化エステル (例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)、カーボネートの成分 (例えば、p-ニトロフェニルカーボネート) 等を表す。他のPEG-アミドヌクレオチド糖質は、この方法および類似の方法によって容易に調製されることを当業者は認識するであろう。

【0326】

ペプチドは、典型的には、原核細胞 (例えば、大腸菌 (E. coli) などの細菌性細胞) において、または哺乳類、イースト菌、昆虫、真菌性または植物細胞などの真核細胞において新たに合成され、または組換え発現される。ペプチドは、完全長タンパク質または断片のいずれかであることが可能である。しかも、ペプチドは、野生タイプまたは変異型ペプチドであることが可能である。例示的な実施形態において、ペプチドは、一種以上

のNーまたはOー結合型グリコシル化部分をペプチド配列に付加する突然変異を含む。

【0327】

本発明の方法はまた、組換え産生される不完全グリコシル化ペプチドの修飾を提供する。多くの組換え産生される糖タンパク質は、炭水化物残基を露出させる不完全グリコシル化であり、例えば、免疫原性、RESによる認識といった望ましくない特性を有し得る。本発明の方法に修飾糖質を用いることで、ペプチドは、例えば水溶性ポリマー、治療剤等で、同時にさらにグリコシル化されおよび誘導されることが可能である。修飾糖質の糖質部分は、完全グリコシル化ペプチド中の受容体に適当に複合化されることがとなる残基、または望ましい特性を有する他の糖質部分であることが可能である。

【0328】

いずれかのソースからの実質的にいずれのペプチドまたはグリコペプチドを用いても本発明は実施されることが可能であることを当業者は認識するであろう。本発明を実施することが可能である例示的なペプチドは、国際公開第03/031464号パンフレット、およびこれに記載の文献に規定されている。

【0329】

本発明の方法により修飾されるペプチドは、合成または野生タイプペプチドであることが可能であり、またはこれらは、部位指向性変異誘発などの技術分野において公知である方法により産生された変異型ペプチドであることが可能である。ペプチドのグリコシル化は、典型的にはNー結合型またはOー結合型である。例示的なNーリンケージは、修飾糖質のアスパラギン残基の側鎖への結合である。Xがプロリン以外のいずれかのアミノ酸である、トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンが、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素的結合についての認識配列である。それ故、これらのトリペプチド配列のいずれかの、ポリペプチド内での存在は潜在的なグリコシル化部分を形成する。Oー結合型グリコシル化とは、1つの糖質（例えば、Nーアセチルガラクトサミン、ガラクトース、マンノース、GlcNAc、グルコース、フコースまたはキシロース）と、ヒドロキシアミノ酸、好ましくはセリンまたはスレオニンのヒドロキシ側鎖との結合を指すが、異常なまたは非天然アミノ酸、例えば、5ーヒドロキシプロリンまたは5ーヒドロキシリシンもまた用いられ得る。

【0330】

しかも、ペプチドに追加して、本発明の方法は、他の生物学的構造（例えば、グリコシル化部分を含有する、糖脂質、脂質、スフィンゴイド、セラミド、細胞全体等）で実施することが可能である。

【0331】

グリコシル化部分のペプチドまたは他の構造への付加は、一つ以上のグリコシル化部分を含有するようにアミノ酸配列を変性させることにより、従来達成されている。付加はまた、-OH基、好ましくはセリンまたはスレオニン残基を、ペプチド（Oー結合型グリコシル化部分について）の配列内に呈する一種以上の種の組み込みによりなされ得る。付加は、ペプチドの突然変異または完全な化学的合成によりなされ得る。ペプチドアミノ酸配列は、好ましくは、DNAレベルでの変化、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるようにペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基で変異させることにより、変化される。DNA突然変異は、好ましくは、当該技術分野において公知である方法を用いてなされる。

【0332】

例示的な実施形態において、グリコシル化部分は、ポリヌクレオチドをシャッフルすることにより付加される。候補ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAシャッフリングプロトコルで調節されることが可能である。DNAシャッフリングは、関連する遺伝子のプールの無作為な断片化により実施される反復的な組換えおよび突然変異、これに続く、ポリメラーゼ鎖反応一様プロセスによる断片の再構築のプロセスである。例えば、ステマー（Stemmer）、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 第10747~10751ページ（1994年）；ステマー（Stemmer）、「

10

20

30

40

50

ネイチャー (Nature)」370:第389~391ページ(1994年);および米国特許第5,605,793号明細書、同第5,837,458号明細書、同第5,830,721号明細書および同第5,811,238号明細書を参照のこと。

【0333】

本発明を実施することが可能である例示的なペプチド、グリコシル化部分を付加または除去する方法、およびグリコシル構造または下部構造を付加または除去する方法は、国際公開第03/031464号パンフレットおよび関連米国およびPCT出願に詳細に記載されている。

【0334】

本発明はまた、ペプチドに、一つ以上の選択されたグリコシル残基を付加(またはから除去する)して、その後、修飾糖質が、ペプチドの少なくとも1つの選択されたグリコシル残基に複合化されることをも利用する。本実施形態は、例えば、ペプチド上に存在しないか、あるいは所望の量で存在しない選択されたグリコシル残基に、修飾糖質を複合化することが所望されるときに有用である。それ故、修飾糖質のペプチドへのカップリングの前に、選択されたグリコシル残基がペプチドに、酵素的または化学的カップリングにより複合化される。他の実施形態において、グリコペプチドのグリコシル化パターンは、修飾糖質の複合化の前に、炭水化物残基のグリコペプチドからの除去により変性される。例えば国際公開第98/31826号パンフレットを参照のこと。

【0335】

グリコペプチド上に存在するいずれかの炭水化物部分の付加または除去は、化学的に、あるいは酵素的に達成される。例示的な化学的脱グリコシル化は、ポリペプチド変異体を化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または同等化合物へ露出することによりもたらされる。この処置は、リンク糖質(N-アセチルグルコースアミンまたはN-アセチルガラクトサミン)を除くほとんどのまたはすべての糖質の開裂をもたらし、一方でペプチドを無処置のまま残す。化学的脱グリコシル化は、ハキムディン(Hakimuddin)ら、「Arch. Biochem. Biophys」、259:52(1987年)およびエッジ(Edge)ら、「Anal. Biochem.」118:131(1981年)により記載されている。ポリペプチド変異体上の炭水化物部分の酵素的開裂は、トタクラ(Thotakura)ら、「Meth. Enzymol.」138:350(1987年)に記載のとおり、多様なエンドーおよびエクソグリコシダーゼの使用により達成することが可能である。

【0336】

例示的な実施形態において、ペプチドは、ペプチドにグリコ複合化またはリモデリングステップを実施する前に、ノイラミニダーゼで基本的に完全に脱シアル化されている。グリコ複合化またはリモデリングに続いて、ペプチドは、シアリルトランスフェラーゼを用いて任意に再シアル化される。例示的な実施形態において、再シアル化は、基本的に、シアリル受容体の固体群における、各(例えば、>80%、好ましくは85%超、90%超、好ましくは95%超およびより好ましくは、96%、97%、98%または99%を超える)末端糖受容体において生じる。好ましい実施形態において、サッカライドは、実質的に均一なシアル化パターン(すなわち、実質的に均一なグリコシル化パターン)を有する。

【0337】

グリコシル部分の化学的付加は、技術分野において認識されたいずれかの方法により実施される。糖質部分の酵素的付加は、好ましくは、本発明において用いられる修飾糖質についての天然グリコシル単位を置き換えることによる、本願明細書に記載の方法の変形を用いて達成される。糖質部分を付加する他の方法は、米国特許第5,876,980号明細書、同第6,030,815号明細書、同第5,728,554号明細書、および同第5,922,577号明細書に開示されている。

【0338】

選択されたグリコシル残基についての例示的な結合点としては、これに限定されないが

10

20

30

40

50

、（a）N-結合型グリコシル化についてのコンセンサス部位、およびO-結合型グリコシル化についての部位、（b）グリコシルトランスフェラーゼについての受容体である末端グリコシル部分、（c）アルギニン、アスパラギンおよびヒスチジン、（d）遊離カルボキシ基、（e）システインのものなどの遊離スルフヒドリル基、（f）セリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンのものなどの遊離ヒドロキシ基、（g）フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのものなどの芳香族残基、または（h）グルタミンのアミド基が挙げられる。本発明において用いられる例示的な方法が、1987年9月11日公開の国際公開第87/05330号パンフレット、およびアプリン（Appl i n）およびリストン（W r i s t o n）、「CRC C R I T . R E V . B I O C H E M .」、第259～306ページ（1981年）に記載されている。

10

【0339】

一実施形態において、本発明は、2つ以上のペプチドをリンク基を介してリンクする方法を提供する。リンク基はいずれかの有用な構造のものであり、および直鎖状-および分岐-鎖構造から選択され得る。好ましくは、ペプチドに結合されているリンカーの各終端は、修飾糖質（すなわち、新生無処置グリコシルリンク基）を含む。

【0340】

本発明の例示的な方法において、2つのペプチドは、高分子（例えば、PEGリンカー）を含むリンカー部分を介して一緒に結合されている。コンストラクトは上記図に規定の一般構造と一致する。本願明細書に記載のとおり、本発明のコンストラクトは、2つの無処置グリコシルリンク基（すなわち、 $s+1=1$ ）を含む。2つのグリコシル基を含むPEGリンカーの焦点は明確さの目的のためであり、および本発明のこの実施形態において用いられるリンカーアームの同一性を制限すると解釈されるべきではない。

20

【0341】

それ故、PEG部分は、第1の終端において第1のグリコシル単位で官能基化され、および第2の終端において第2のグリコシル単位で官能基化されている。第1のおよび第2のグリコシル単位は、好ましくは、それぞれ、第1のおよび第2のペプチドの、第1のおよび第2のグリコシル単位への直交する結合を許容する、異なるトランスフェラーゼのための基質である。実際には、 $(\text{グリコシル})^1 - \text{PEG} - (\text{グリコシル})^2$ リンカーが、第1のグリコシル単位が基質である、第1のペプチドおよび第1のトランスフェラーゼと接触させられ、これにより、 $(\text{ペプチド})^1 - (\text{グリコシル})^1 - \text{PEG} - (\text{グリコシル})^2$ が形成される。トランスフェラーゼおよび/または未反応ペプチドが、次いで、任意により反応混合物から除去される。第2のグリコシル単位が基質である第2のペプチドおよび第2のトランスフェラーゼが、 $(\text{ペプチド})^1 - (\text{グリコシル})^1 - \text{PEG} - (\text{グリコシル})^2$ 複合体に付加され、 $(\text{ペプチド})^1 - (\text{グリコシル})^1 - \text{PEG} - (\text{グリコシル})^2 - (\text{ペプチド})^2$ が形成され、グリコシル残基の少なくとも1つは、直接的にまたは間接的にO-結合されている。上記に要点を述べた方法はまた、例えば、分岐PEG、デンドリマー、ポリ（アミノ酸）、多糖等の使用による3つ以上のペプチド間の複合体の形成に適用可能であることを当業者は認識するであろう。

30

【0342】

例示的な実施形態において、本発明の方法により修飾されるペプチドは、哺乳類細胞（例えば、CHO細胞）または遺伝子組換え動物において産生されるグリコペプチドであり、それ故、不完全にシアル化されたN-および/またはO-結合型オリゴ糖鎖を含有する。シアル酸を含まず、末端ガラクトース残基を含有するグリコペプチドのオリゴ糖鎖は、PEG化され、PPG化され、またはそうでなければ修飾シアル酸で修飾されることが可能である。

40

【0343】

スキーム1においては、アミノグリコシド1が、保護されたアミノ酸（例えば、グリシン）誘導体の活性エステルで処理されて、糖質アミン残基を対応する保護されたアミノ酸アミド付加物に転化する。この付加物が、アルドラーゼで処理されて α -ヒドロキシカーボキシレート2が形成される。化合物2は、CMP-S Aシンセターゼの作用により対応

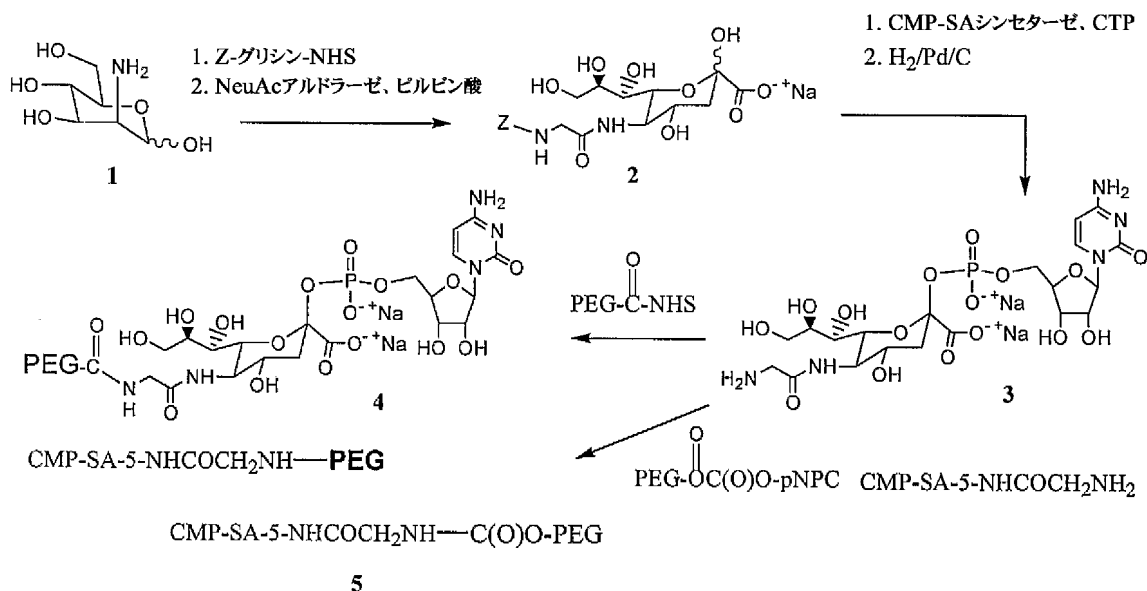
50

するCMP誘導体に転化され、続いて、CMP誘導体の接触水素化で化合物3が産生される。グリシン付加物の形成を介して導入されたアミンが、化合物3を活性化PEGまたはPPG誘導体（例えば、PEG-C(O)NHS、PEG-OC(O)O-p-ニトロフェニル）と反応させることによりPEG結合の位置として用いられ、それぞれ、4または5などの種が産生される。

スキーム1

【化141】

スキーム1



【0344】

例示的な実施形態において、修飾糖質は、因子VII/因子VIIaペプチド上のO-グリカン結合部位に結合されることが可能である。この因子VII/因子VIIaペプチド複合体の産生に用いられることが可能であるグリコシルトランスフェラーゼとしては、Ser56(-Glc-(Xyl)_n-Gal-SA-PEG-についてはガラクトシルトランスフェラーゼおよびシアリルトランスフェラーゼ；Ser56-Glc-(Xyl)_n-Xyl-PEG-についてはキシロシルトランスフェラーゼ；およびSer60-Fuc-GlcNAc-(Gal)_n-(SA)m-PEG-についてはGlcNAcトランスフェラーゼが挙げられる。

【0345】

III. A. 修飾糖質のペプチドへの複合化

PEG修飾糖質は、グリコシル化または非グリコシル化ペプチドに、複合化を媒介するために適切な酵素を用いて複合化される。好ましくは、修飾ドナー糖質、酵素および受容体ペプチドの濃度は、受容体が消費されるまでグリコシル化が進行するように選択される。以下に考察された用件は、シアリルトランスフェラーゼのコンテキストに規定されているが、一般的に他のグリコシルトランスフェラーゼ反応に適用可能である。本発明における使用に好ましいシアリルトランスフェラーゼのリストが図3に提供されている。

【0346】

グリコシルトランスフェラーゼを用いて所望のオリゴ糖構造を合成する多数の方法は公知であり、および一般的に本発明に適用可能である。例示的な方法は、例えば、本願明細書において参照により援用される、国際公開第96/32491号パンフレット、イトウ(Ito)ら、「Pure Appl. Chem.」65:753(1993年)、米国特許第5,352,670号明細書、同第5,374,541号明細書、同第5,545,553号明細書、所有者が共通の米国特許第6,399,336号明細書、および同第

6, 440, 703号明細書、および所有者が共通の国際公開第03/031464号パンフレット、国際公開第04/033651号パンフレット、国際公開第04/099231号パンフレットに記載されている。

【0347】

本発明は、単一のグリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼの組み合わせを用いて実施される。例えば、シアリルトランスフェラーゼおよびガラクトシルトランスフェラーゼの組み合わせを用いることが可能である。2つ以上の酵素を用いるこれらの実施形態において、酵素および基質は、好ましくは初期反応混合物中に組み合わせられ、または第2の酵素反応のための酵素および試薬が、一旦第1の酵素反応が完了したらまたはほぼ完了したら、反応媒体に添加される。連続した2つの酵素反応を単一の容器内で実施することにより、中間体種が単離される手法を超えて全収率が向上する。しかも、余剰溶剤および副生成物のクリーンアップおよび廃棄が低減される。

10

【0348】

好ましい実施形態において、第1のおよび第2の酵素の各々はグリコシルトランスフェラーゼである。他の好ましい実施形態において、一つの酵素は、エンドグリコシダーゼである。追加の好ましい実施形態において、3つ以上の酵素が、本発明の修飾糖タンパク質を集合させるために用いられる。ペプチド上のサッカライド構造を変異させるために、酵素が、修飾糖質をペプチドへ付加する前または後のいずれかの時点で用いられる。

【0349】

他の実施形態において、本方法は、一種以上のエクソーまたはエンドグリコシダーゼを利用する。グリコシダーゼは、典型的には、グリコシル結合を、破損させるのではなく形成するために操作される変異体である。変異グリカナナーゼは、典型的には、活性部位酸性アミノ酸残基のためのアミノ酸残基の置換を含む。例えば、エンドグリカナナーゼがエンド-Hであるとき、置換活性部位残基は、典型的には、位置130でのAsp、位置132でのGluまたはこれらの組み合わせであることとなる。アミノ酸は、一般的には、セリン、アラニン、アスパラギン、またはグルタミンで置き換えられる。

20

【0350】

変異酵素は、通常は、エンドグリカナナーゼ加水分解ステップの逆反応に類似の合成ステップにより反応を触媒する。これらの実施形態において、グリコシルドナー分子（例えば、所望のオリゴまたはモノサッカライド構造）は脱離基を含有し、および反応は、ドナー分子をタンパク質のGlcNAc残基へ付加することで進行する。例えば、脱離基はフッ化物などのハロゲンであることが可能である。他の実施形態において、脱離基はAsn、またはAsn-ペプチド部分である。さらなる実施形態において、グリコシルドナー分子のGlcNAc残基が修飾される。例えば、GlcNAc残基は、1, 2オキサゾリン部分を含み得る。

30

【0351】

好ましい実施形態において、本発明の複合体の産生に用いられる酵素の各々は、触媒量で存在する。特定の酵素の触媒量は、その酵素の基質の濃度ならびに温度、時間およびpH値などの反応条件に応じて異なる。予め選択された基質濃度および反応条件下での所与の酵素についての触媒量を決定するための手段は、当業者に周知である。

40

【0352】

上記のプロセスが実施される温度は、凝固点より僅かに高温からほとんどの感受性の酵素が変性される温度の範囲であることが可能である。好ましい温度範囲は、約0℃～約55℃、およびより好ましくは約20℃～約37℃である。他の例示的な実施形態において、本方法の一つ以上の構成部分は、好熱性酵素を用いて高温で実施される。

【0353】

反応混合物は、受容体がグリコシル化されるに十分な時間の間維持され、これにより、所望の複合体が形成される。複合体のいくつかは、度々、回収可能な量で数時間後に検出されることが可能であり、通常は24時間以内で入手される。反応速度は、選択された系について最適化される、多数の異なる要因（例えば、酵素濃度、ドナー濃度、受容体濃度

50

、温度、溶剤体積）に依存することを当業者は理解する。

【0354】

本発明はまた、修飾ペプチドの工業規模生産を提供する。本願明細書において用いられるところ、工業規模は、一般的には、少なくとも1グラムの最終、精製複合体を生産する。

【0355】

以下の考察において、本発明は、修飾シアル酸部分をグリコシル化ペプチドへ複合化することによって例示される。例示的な修飾シアル酸は、PEGで標識化される。PEG-修飾シアル酸およびグリコシル化ペプチドの使用についての以下の考察に焦点を当てるのは、あくまでも例示を明確にするためであり、本発明がこれらの2つのパートナーの複合化に制限されることを示唆することを意図するものではない。考察は、一般的に、シアル酸以外の修飾グリコシル部分の付加に適用可能であることを当業者は理解する。しかも、考察は、グリコシル単位の、他のPEG部分、治療的部分、および生体分子を含むPEG以外の薬剤での修飾に同等に適用可能である。

【0356】

酵素的アプローチを、PEG化またはPPG化炭水化物のペプチドまたはグリコペプチドへの選択的な導入に用いることが可能である。本方法は、PEG、PPG、またはマスク化反応性官能基を含有し、および適切なグリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシントナーゼと組み合わされる修飾糖質を用いる。所望の炭水化物リンケージを形成することとなるグリコシルトランスフェラーゼを選択することにより、および修飾糖質をドナー基質として用いることにより、PEGまたはPPGは、ペプチド主鎖、グリコペプチドの既存の糖質残基またはペプチドに付加された糖質残基に直接的に導入されることが可能である。

【0357】

例示的な実施形態において、シアリルトランスフェラーゼについての受容体は、修飾されるべきペプチド上に、天然に生じる構造として、または組換え的に、酵素的にまたは化学的に配置されて存在する。好適な受容体としては、例えば、Gal β 1, 4GlcNAc、Gal β 1, 4GalNAc、Gal β 1, 3GalNAc、ラクトーN-テトラオース、Gal β 1, 3GlcNAc、Gal β 1, 3Ara、Gal β 1, 6GlcNAc、Gal β 1, 4Glc（ラクトース）などのガラクトシル受容体、および当業者に公知である他の受容体（例えば、ポールソン（Paulson）ら、「J. Biol. Chem.」253：第5617～5624ページ（1978年）を参照のこと）。例示的なシアリルトランスフェラーゼは本願明細書に記載されている。

【0358】

一実施形態において、シアリルトランスフェラーゼについての受容体は、グリコペプチドのインビボ合成で修飾されるべきグリコペプチド上に存在する。このようなグリコペプチドは、特許請求の範囲の方法を用いて、グリコペプチドのグリコシル化パターン事前の修飾無しでシアル化されることが可能である。あるいは、本発明の方法は、好適な受容体を含まないペプチドのシアル化に用いられることが可能である；第1に、ペプチドを、当業者に公知の方法により受容体を含むよう修飾するもの。例示的な実施形態において、GalNAc残基は、GalNAcトランスフェラーゼの作用によって付加される。

【0359】

例示的な実施形態において、ガラクトシル受容体は、ガラクトース残基を、ペプチド、例えば、GlcNAcに結合された適切な受容体に結合することにより集合される。本方法は、修飾されるべきペプチドを、好適な量のガラクトシルトランスフェラーゼ（例えば、Gal β 1, 3またはGal β 1, 4）、および好適なガラクトシルドナー（例えば、UDP-ガラクトース）を含有する反応混合物と共にインキュベートするステップを含む。反応は実質的に完了するまで進行されるか、あるいは、反応は、予め選択された量のガラクトース残基が付加された時点で停止される。選択されたサッカライド受容体を集合される他の方法は当業者に明らかであろう。

【0360】

さらに他の実施形態において、グリコペプチド-結合型オリゴ糖は、先ず、全体でまたは部分的に、「トリム」して、シアリルトランスフェラーゼのための受容体あるいは1つ以上の適切な残基が付加されることが可能である部分を露出して好適な受容体を得られる。グリコシルトランスフェラーゼおよびエンドグリコシダーゼなどの酵素（例えば米国特許第5,716,812号明細書を参照のこと）は、結合およびトリム反応について有用である。この方法の他の実施形態において、ペプチドのシアル酸部分は、基本的に完全に除去されて（例えば、少なくとも90、少なくとも95または少なくとも99%）、修飾シアル酸についての受容体を露出させる。

【0361】

以下の考察において、本発明の方法は、これに結合されたPEG部分を有する修飾糖質の使用によって例示されている。考察に焦点を当てるのは、あくまでも例示を明確にするためである。考察は、修飾糖質が治療的部分、生体分子等を有する実施形態と同等に関連していることを当業者は認識するであろう。

【0362】

炭水化物残基が、修飾糖質の付加前に「トリム(trimmed)」される本発明の例示的な実施形態においては、高マンノースは、第1世代二分岐構造にトリムして戻される。PEG部分を有する修飾糖質は、「トリムし戻す(trimming back)」ことにより露出された一種以上の糖質残基に複合化される。一つの例において、PEG部分は、PEG部分に複合化されたGlcNAc部分を介して付加される。修飾GlcNAcは、二分岐構造の末端マンノース残基の一方または両方に結合される。あるいは、未修飾GlcNAcが、分岐種の終端の一方または両方に付加されることが可能である。

【0363】

他の例示的な実施形態において、PEG部分は、二分岐構造の末端マンノース残基の一方または両方に、末端マンノース残基に付加されたGlcNAc残基に複合化されたガラクトース残基を有する修飾糖質を介して付加される。あるいは、未修飾Galが、末端GlcNAc残基の一方または両方に付加されることが可能である。

【0364】

さらなる例において、PEG部分が、上記に考察されたものなどの修飾シアル酸を用いてGal残基上に付加される。

【0365】

他の例示的な実施形態において、高マンノース型構造は、二分岐構造が分岐するマンノースから「トリムし戻される」。一つの例において、PEG部分は、ポリマーで修飾されたGlcNAcを介して付加される。あるいは、未修飾GlcNAcがマンノースに付加され、次いで、結合されたPEG部分を有するGalが付加される。さらに他の実施形態において、未修飾GlcNAcおよびGal残基は、順次にマンノースに付加され、続いてPEG部分で修飾されたシアル酸部分が付加される。

【0366】

高マンノース型構造はまた、基本トリーマンノシルコアにトリムし戻されることが可能である。

【0367】

さらなる例示的な実施形態において、高マンノースは、第1のマンノースが結合されたGlcNAc「トリムし戻される」。GlcNAcは、PEG部分を有するGal残基に複合化される。あるいは、未修飾GalがGlcNAcに付加され、次いで、水溶性糖質を有するシアル酸修飾が付加される。さらなる例においては、末端GlcNAcがGalと複合化され、およびGlcNAcが、続いて、PEG部分を有する修飾フコースでフコシル化される。

【0368】

高マンノースはまた、ペプチドのAsnに結合された第1のGlcNAcにトリムし戻され得る。一つの例において、GlcNAc-(Fuc)_a残基のGlcNAcは、水溶

10

20

30

40

50

性ポリマーを有するGlcNAcで複合化される。他の例において、GlcNAc-(Fuc)_a残基のGlcNAcは、水溶性ポリマーを有するGalで修飾される。さらなる実施形態において、GlcNAcは、Galで修飾され、次いで、PEG部分で修飾されたシアル酸のGalに複合化される。

【0369】

他の例示的な実施形態が、所有者が共通の米国特許出願公開第20040132640号明細書；同第20040063911号明細書；同第20040137557号明細書；米国特許出願第10/369,979号明細書；同第10/410,913号明細書；同第10/360,770号明細書；同第10/410,945号明細書および国際出願第PCT/US02/32263号明細書に記載されており、これらの各々は本願明細書において参照により援用される。

10

【0370】

上記に規定された例は、本願明細書に記載の方法の能力の例示を提供する。本願明細書に記載の方法を用いて、「トリムし戻す」こと、および実質的にいずれか所望の構造の炭水化物残基を構築することが可能である。修飾糖質は、上記に規定された炭水化物部分の終端に付加されることが可能であり、またはペプチドコアと炭水化物の終端との中間体であることが可能である。

【0371】

例示的な実施形態において、既存のシアル酸はシアリダーゼを用いてグリコペプチドから除去され、これにより下位のガラクトシル残基のすべてのまたはほとんどを脱マスク化する。あるいは、ペプチドまたはグリコペプチドは、ガラクトース残基、またはガラクトース単位中で終結するオリゴ糖残基で標識化される。ガラクトース残基の露出または付加に続いて、適切なシアリルトランスフェラーゼが用いられて、修飾シアル酸が付加される。

20

【0372】

他の例示的な実施形態においては、シアル酸をシアル酸に転移させる酵素が用いられる。この方法は、シアリダーゼを有するシアル化グリカン进行处理してシアル酸下でグリカン残基を露出させることなく実施されることが可能である。例示的なポリマー修飾シアル酸は、ポリ(エチレングリコール)で修飾されたシアル酸である。シアル酸残基を含むグリカン上にシアル酸および修飾シアル酸部分を付加するか、またはこれらの種についてのグリカン上の既存のシアル酸残基を交換する他の例示的な酵素としては、ST3Gal3、CST-II、ST8Sia-II、ST8Sia-IIIおよびST8Sia-IVが挙げられる。

30

【0373】

さらなるアプローチにおいて、マスク化反応性官能基がシアル酸に存在する。マスク化反応性基は、好ましくは、修飾シアル酸を因子VII/因子VIIaペプチドに結合する条件によっては影響されない。修飾シアル酸のペプチドへの共有結合後、マスクは除去され、およびペプチドがPEGなどの薬剤と複合化される。薬剤は、修飾糖質残基上の非マスク化反応性基とのその反応による、特定の方式でペプチドに複合化される。

【0374】

いずれかの修飾糖質は、グリコペプチドのオリゴ糖側鎖の末端糖質に依存して、その適切なグリコシルトランスフェラーゼと共に用いられることが可能である。上述のとおり、PEG化構造の導入に必要とされるグリコペプチドの末端糖質は、発現中に自然に導入されることが可能であり、または適切なグリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシダーゼとグリコシルトランスフェラーゼとの混合物を用いて発現後に産生されることが可能である。

40

【0375】

さらなる例示的な実施形態において、UDP-ガラクトース-PEGがβ1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼと反応され、これにより修飾ガラクトースが適切な末端N-アセチルグルコースアミン構造に転移される。グリコペプチド上の末端GlcNAc残基

50

は、哺乳類、昆虫、植物または真菌類などの発現系において生じるように発現中に産生され得るが、必要に応じて、グリコペプチドを、シアリダーゼおよび／またはグリコシダーゼおよび／またはグリコシルトランスフェラーゼで処理することにより産生されることも可能である。

【0376】

他の例示的な実施形態においては、GNT1～5などのGlcNAcトランスフェラーゼが用いられて、PEG化-GlcNAcがグリコペプチド上の末端マンノース残基に転移される。さらなる例示的な実施形態においては、N-および／またはO-結合型グリカン構造が、グリコペプチドから酵素的に除去されて、アミノ酸または、その後、修飾糖質と複合化される末端グリコシル残基を露出させる。例えば、エンドグリカナーゼが、グリコペプチドのN-結合型構造の除去に用いられて、末端GlcNAcをグリコペプチド上のGlcNAc-結合型-Asnとして露出させる。UDP-Gal-PEGおよび適切なガラクトシルトランスフェラーゼが、PEG-ガラクトース官能基を露出されたGlcNAcに導入するために用いられる。

【0377】

代替的な実施形態において、修飾糖質は、ペプチド主鎖に、糖質残基をペプチド主鎖に転移させると公知であるグリコシルトランスフェラーゼを用いて直接的に付加される。本発明の実施に有用である例示的なグリコシルトランスフェラーゼとしては、これに限定されないが、GalNAcトランスフェラーゼ (GalNAc T1-14)、GlcNAcトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ等が挙げられる。このアプローチの使用により、修飾糖質をいかなる炭水化物も含まないペプチド上、あるいは、既存のグリコペプチドへ直接的な付加をすることが可能になる。両方の場合において、修飾糖質の付加は、化学的方法を用いるタンパク質のペプチド主鎖の修飾の間に生じるような無作為な方式ではなく、グリコシルトランスフェラーゼの基質特異性によって画定されるペプチド主鎖上の特定の位置で生じる。薬剤のアレイは、適切なアミノ酸配列をポリペプチド鎖中に操作することにより、グリコシルトランスフェラーゼ基質ペプチド配列を含まないタンパク質またはグリコペプチドに導入されることが可能である。

【0378】

上記の例示的な実施形態の各々において、修飾糖質のペプチドへの複合化の後に、一種以上の追加の化学的または酵素的修飾ステップを利用することが可能である。例示的な実施形態において、酵素 (例えばフコシルトランスフェラーゼ) が、ペプチドに結合された末端修飾糖質上にグリコシル単位 (例えば、フコース) を結合するために用いられる。他の例において、酵素反応が、修飾糖質が複合化できない部位を「キャップ」するために用いられる。あるいは、化学的反応が、複合化された修飾糖質の構造を変性するために用いられる。例えば、複合化された修飾糖質は、修飾糖質が結合されたペプチド成分とのそのリンケージを安定化または不安定化させる薬剤と反応させられる。他の例において、修飾糖質の成分は、ペプチドへのその複合化に続いて脱保護化される。本発明の方法において、修飾糖質がペプチドに複合化された後の段階で有用である酵素的および化学的手法のアレイがあることを当業者は認識するであろう。さらに、修飾糖質-ペプチド複合体の同化は本発明の範囲内である。

【0379】

本発明の複合体を調製するための酵素および反応条件が、本出願の親出願ならびに所有者が共通の国際公開第03/031464号パンフレット、国際公開第04/033651号パンフレット、国際公開第04/099231号パンフレットに詳細に考察されている。

【0380】

選択された実施形態において、昆虫細胞において発現された因子VII/因子VIIaペプチドは、再構築されたグリコペプチド上のグリカンがGlcNAc-Galグリコシル残基を含むように再構築される。GlcNAcおよびGalの付加は、個別の反応とし

てまたは単一の反応として単一の容器中に生じることが可能である。この例においては、G l c N A c トランスフェラーゼ I および G a l トランスフェラーゼ I が用いられる。修飾シアリル部分は S T 3 G a l - I I I を用いて付加される。

【0381】

他の実施形態において、G l c N A c、G a l および修飾 S i a の付加はまた、単一の反応容器中において、上記の酵素を用いて生じることが可能である。酵素的リモデリングおよびグリコ P E G 化ステップの各々は、個別に実施される。

【0382】

ペプチドが哺乳類細胞中に発現されるとき、異なる方法が用いられる。一実施形態において、ペプチドは、ペプチドを修飾シアリル酸を直接的にペプチド上のシアリル酸上に転移させるシアリルトランスフェラーゼと接触させて S i a - S i a - L - R¹ を形成することにより、またはペプチド上のシアリル酸を修飾シアリル酸と交換して、S i a - L - R¹ を形成することにより複合化前のリモデリングの必要無しで複合化される。この方法において用いられる例示的な酵素は C S T - I I である。シアリル酸をシアリル酸に付加する他の酵素は、当業者に公知であり、このような酵素の例が本願明細書に添付の図に示されている。

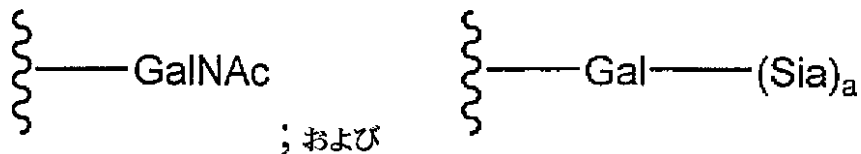
【0383】

本発明の複合体を調製するさらに他の方法において、哺乳類系において発現されたペプチドは、シアリダーゼを用いて脱シアリル化される。露出された G a l 残基は、O-結合型グリカンに特異的であるシアリルトランスフェラーゼを用いて修飾シアリル酸でシアリル化され、O-結合型修飾グリカンを持つ因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを提供する。脱シアリル化、修飾因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドは、任意により、S T 3 G a l I I I などのシアリルトランスフェラーゼを用いて部分的にまたは完全に再シアリル化される。

【0384】

他の態様において、本発明は、本発明の P E G 化因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を形成する方法を提供する。本方法は、(a)

【化142】



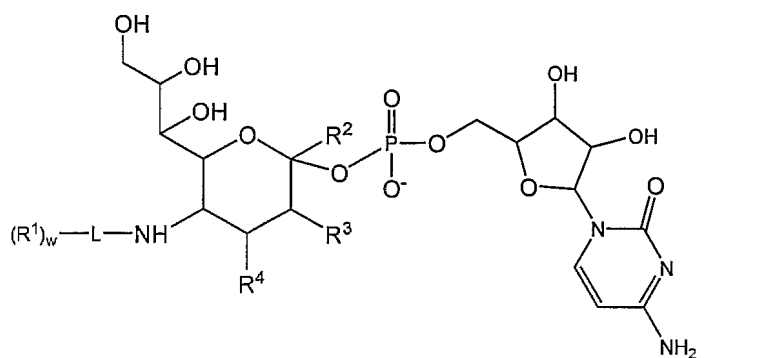
から選択されるグリコシル基を含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを、

10

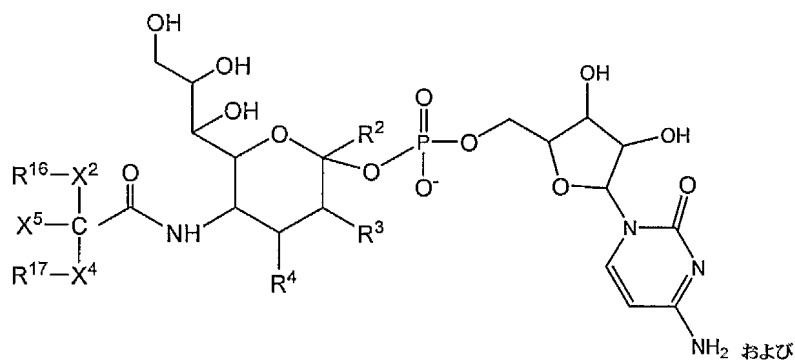
20

30

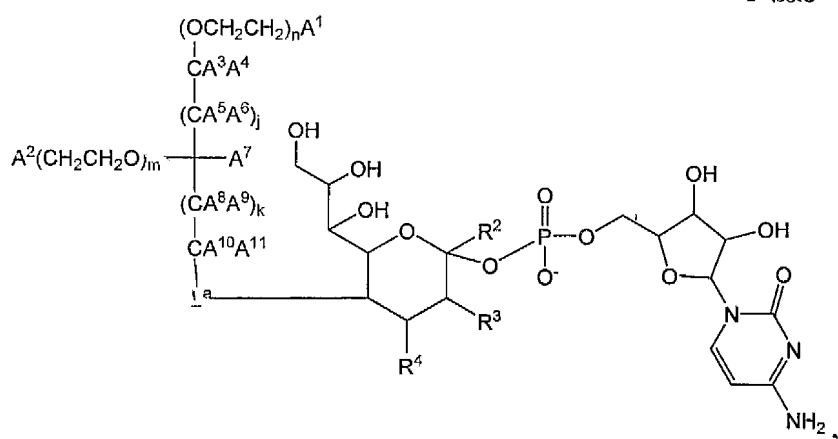
【化 1 4 3】



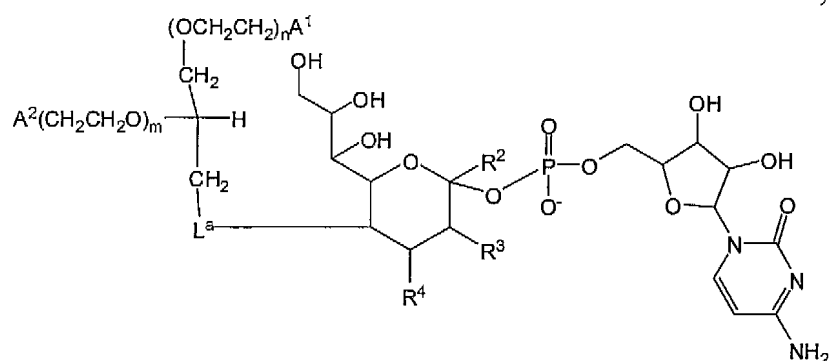
10



20



30



40

から選択されるメンバーである式を有するPEG-シアル酸ドナーと、PEG-シアル酸を、前記ドナーから、前記グリコシル基のGalNAc、GalおよびSiaから選択されるメンバーへ転移させる酵素とに、前記転移に適切な条件で接触させるステップを含む。例示的な修飾シアル酸ドナーは、リンカー部分を介して、ポリマー、例えば、直鎖または分岐ポリ（エチレングリコール）部分で修飾されたCMP-シアル酸である。本願明細書において考察されるとおり、ペプチドは、任意により、GalNAcおよび／またはGalおよび／またはSiaで、修飾糖質の結合の前にグリコシル化される（「リモデルされる」）。リモデリングステップは、同一の容器中に、ステップ間での

50

グリコシル化ペプチドの精製無しで連続して生じることが可能である。あるいは、一つ以上のリモデリングステップに続いて、グリコシル化ペプチドは、次のグリコシル化またはグリコPEG化ステップに供される前に精製されることが可能である。例示的な実施形態において、本方法は、ペプチドを宿主中に発現させるステップをさらに含む。例示的な実施形態において、宿主は哺乳類細胞または昆虫細胞である。他の例示的な実施形態において、哺乳類細胞は、BHK細胞およびCHO細胞から選択されるメンバーでありおよび昆虫細胞はヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞である。

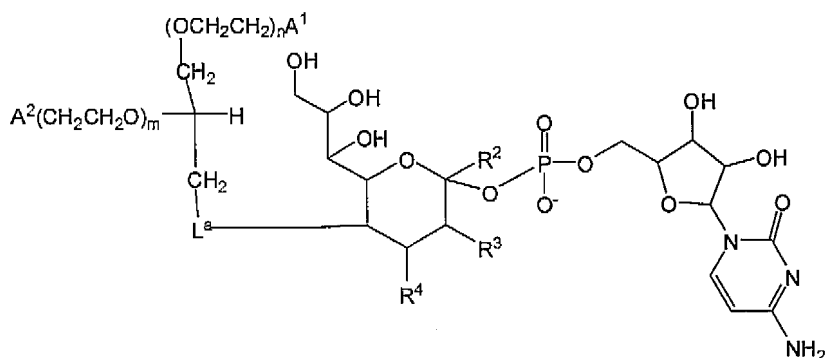
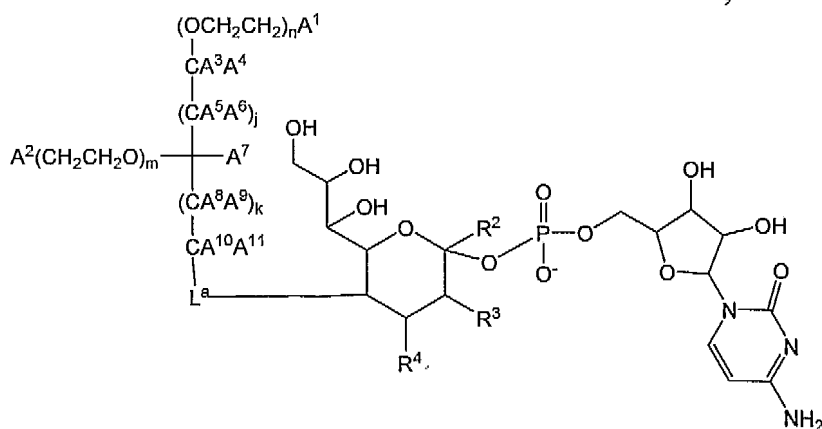
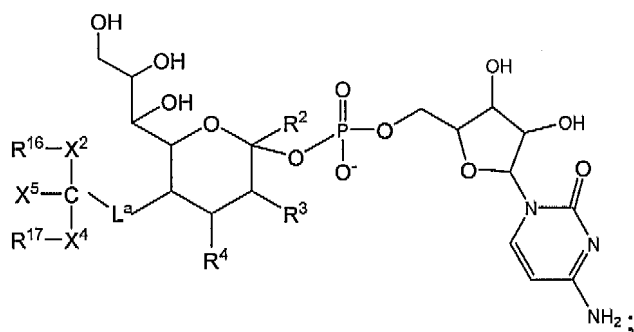
【0385】

例に示されおよび以下に考察されているとおり、PEG-糖質についての受容体部分の設置は、いずれか所望の数のステップで達成される。例えば、一実施形態において、GalNAcをペプチドへ付加することで、PEG-糖質がGalNAcに同一反応容器内で複合化される第2のステップが続くことが可能である。あるいは、これらの2つのステップは、単一の容器中においておよそ同時に実施されることが可能である。

【0386】

例示的な実施形態において、PEG-シアル酸ドナーは、式、

【化144】

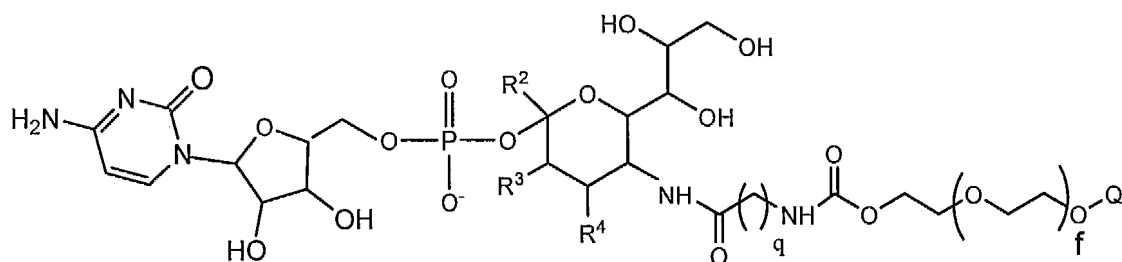


を有する。

【0387】

他の例示的な実施形態において、PEG-シアル酸ドナーは、式、

【化145】



10

を有する。

【0388】

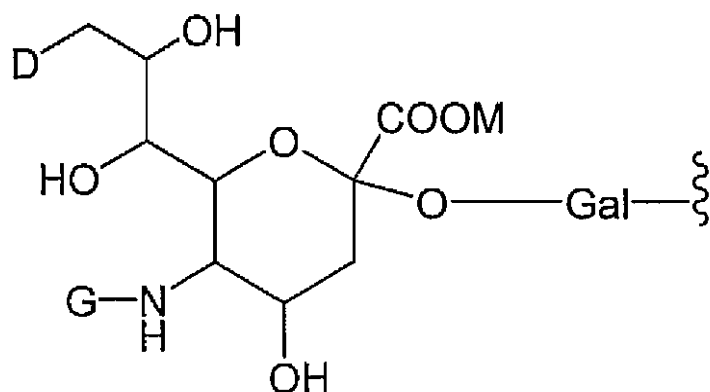
さらなる例示的な実施形態において、因子VII／因子VIIaペプチドは、グリコペグ化または再構築される前に適切な発現系において発現される。例示的な発現系としては、Sf-9／バキュロウイルスおよびチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）細胞が挙げられる。

20

【0389】

例示的な実施形態において、本発明は、式、

【化146】

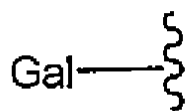


30

を有する修飾シアル残基を含むグリコシルリンカーを含む因子VII／因子VIIaペプチド複合体を形成する方法を提供し、式中、Dは、-OHおよび $R^1-L-HN-$ から選択されるメンバーであり、Gは、 R^1-L- および $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル- R^1 から選択されるメンバーであり、 R^1 は、直鎖ポリ（エチレングリコール）残基および分岐ポリ（エチレングリコール）残基から選択されるメンバーを含む部分であり、Mは、H、金属および単一の負電荷から選択されるメンバーであり、Lは、結合、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるメンバーであるリンカーであり、ここで、DがOHであるときGは R^1-L- であり、およびGが $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキルであるときDは $R^1-L-NH-$ であり、前記方法は、（a）グリコシル部分、

40

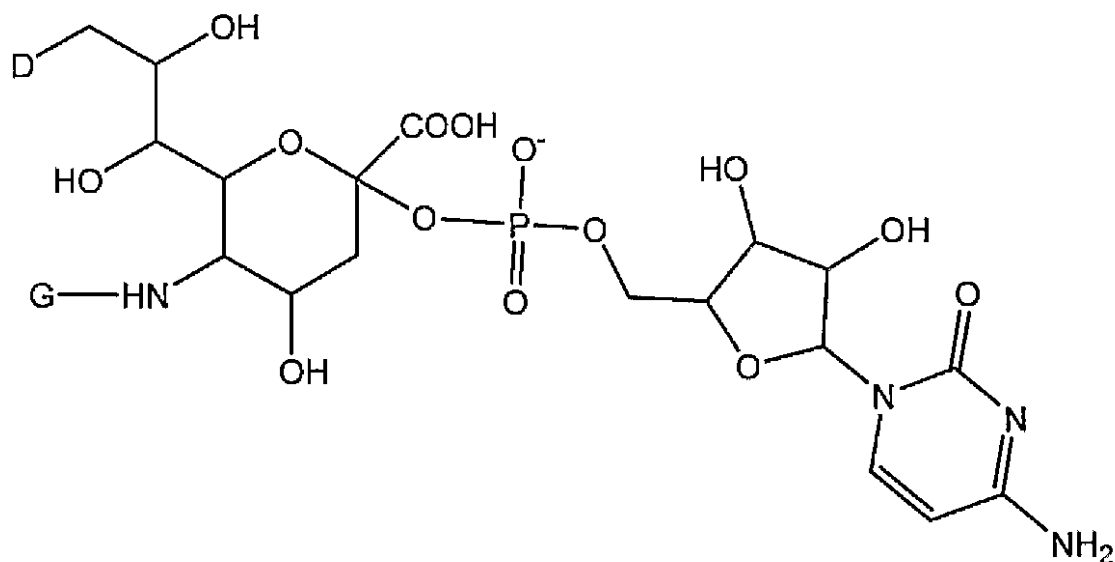
【化 1 4 7】



を含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを、
式、

【化 1 4 8】

10



20

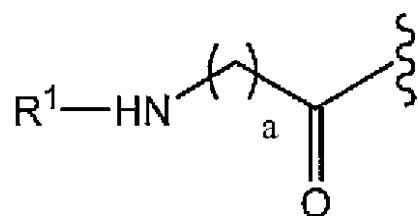
を有する P E G—シアル酸ドナー部分と、
前記 P E G—シアル酸を前記グリコシル部分の G a l へ転移させる酵素とに、前記転移に
適切な条件で接触させるステップを含む。

30

【 0 3 9 0】

例示的な実施形態において、L—R¹ は、式、

【化 1 4 9】



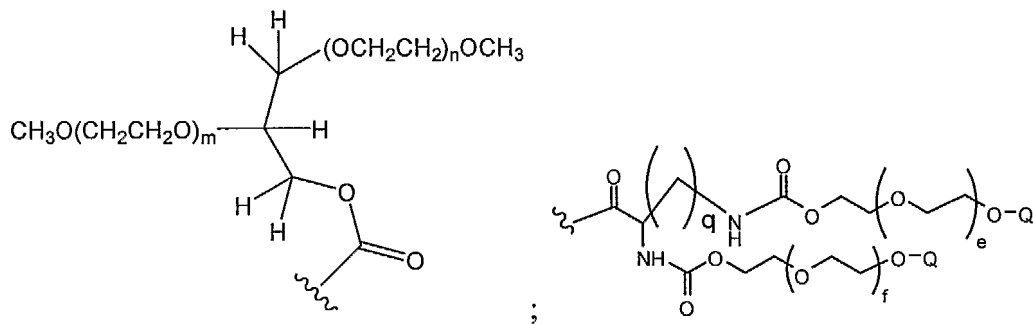
40

を有し、ここで、a は、0～20 から選択される整数である。

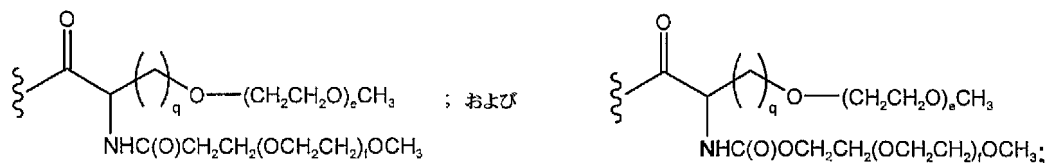
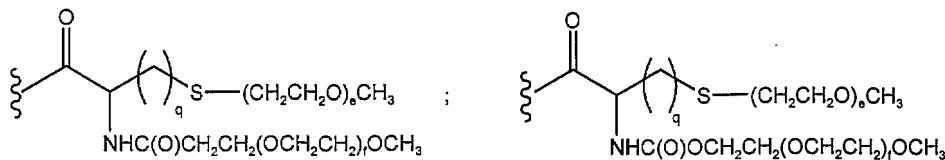
【 0 3 9 1】

他の例示的な実施形態において、R¹ は、

【化 1 5 0】



10



20

から選択されるメンバーである構造を有し、ここで、 e 、 f 、 m および n は、1～2500から独立して選択される整数であり、および q は、0～20から選択される整数である。

【0392】

大規模または小規模量の因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体を本願明細書に記載の方法によって生成することが可能である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.5mg～約100kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.1kg～約1kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.5kg～約10kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.5kg～約3kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.1kg～約5kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.08kg～約0.2kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.05kg～約0.4kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.1kg～約0.7kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約0.3kg～約1.75kgから選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド量は、約25kg～約65kgから選択される要素である。

30

40

【0393】

本願明細書に記載の反応に用いられる因子V I I / 因子V I I a ペプチドの濃度は、約0.5～約10mg 因子V I I / 因子V I I a ペプチド / mLの反応混合物から選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド濃度は、約0.5～約1mg 因子V I I / 因子V I I a ペプチド / mLの反応混合物から選択される要素である。例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド濃度は、

50

約 0.8～約 3 mg 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド / mL の反応混合物から選択される要素である。例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド濃度は、約 2～約 6 mg 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド / mL の反応混合物から選択される要素である。例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド濃度は、約 4～約 9 mg 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド / mL の反応混合物から選択される要素である。例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド濃度は、約 1.2～約 7.8 mg 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド / mL の反応混合物から選択される要素である。例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド濃度は、約 6～約 9.5 mg 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド / mL の反応混合物から選択される要素である。

10

【0394】

本願明細書に記載の反応において用いられることが可能である CMP-S A-P E G の濃度は、約 0.1～約 1.0 mM から選択される要素である。濃度を増加または低減させる因子としては、P E G のサイズ、インキュベーション時間、温度、緩衝液成分、ならびに用いられるグリコシルトランスフェラーゼのタイプ、および濃度が挙げられる。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.1～約 1.0 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.1～約 0.5 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.1～約 0.3 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.2～約 0.7 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.3～約 0.5 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.4～約 1.0 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.5～約 0.7 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.8～約 0.95 mM から選択される要素である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G 濃度は、約 0.55～約 1.0 mM から選択される要素である。

20

【0395】

本願明細書に記載の反応において用いられることが可能である CMP-S A-P E G のモル当量は、因子 V I I / 因子 V I I a タンパク質に付加されることが可能である S A-P E G の理論的数に基づいている。S A-P E G の理論的数は、CMP-S A-P E G の MW および従ってモル数と比したときの、因子 V I I / 因子 V I I a タンパク質上のシアル化部位の理論的数ならびに、因子 V I I / 因子 V I I a タンパク質の MW に基づく。2つのグリカン部位のみを有する主に二分岐および三分岐である N-グリカンに基づく、約 4 つまたは 5 つの P E G の因子 V I I / 因子 V I I a について。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、1～20 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、1～20 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、2～6 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、3～17 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、4～11 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、5～20 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、1～10 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、12～20 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、14～17 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、7～15 から選択される整数である。例示的な実施形態において、CMP-S A-P E G のモル当量は、8～16 から選択される整数である。

30

40

【0396】

I I I . B . 因子 V I I / 因子 V I I a の同時脱シアル化およびグリコ P E G 化

50

本発明は、因子V I I / 因子V I I aをグリコペグ化する「ワンポット」法を提供する。ワンポット法は、因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体を形成する他の例示的なプロセスとは異なり、連続的なシアリダーゼでの脱シアル化、その後のアシアロ因子V I I / 因子V I I aのアニオン交換カラムでの精製、次いでCMP-シアル酸-PEGおよびグリコシルトランスフェラーゼ（ST3Gal3などの）、エキソグリコシダーゼまたはエンドグリコシダーゼを用いるグリコPEG化を利用する。因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体は、次いで、アニオン交換、続いてサイズ排除クロマトグラフィーを介して精製されて、精製された因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体を生成する。

【0397】

ワンポット法は、因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体を生産する改良法である。この方法において、脱シアル化およびグリコPEG化反応がワンポット反応に組み合わされており、これは、アシアロ因子V I I / 因子V I I aペプチドを精製するための既述のプロセスにおいて用いられていた第1のアニオン交換クロマトグラフィーステップを除去する。このプロセスステップの減少は数々の利点を生む。まず、因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体の生成に必要なプロセスステップ数が減少され、これはまた、プロセスの操作複雑性を低減させる。第2に、ペプチド複合体の生成のためのプロセス時間が、例えば、4～2日間短縮される。これは、イン-プロセス制御に関連する原料要件および品質制御費用を低減させる。第3に、本発明はより少量のシアリダーゼを用い、例えば、20倍以下で少量のシアリダーゼ、例えば、500mU/Lが、プロセスと比して因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体の生成に必要とされる。シアリダーゼの使用におけるこの低減は、反応混合物中のシアリダーゼなどの汚染物の量を著しく低減させる。

【0398】

例示的な実施形態において、因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体は、以下の方法により調製される。第1のステップにおいて、因子V I I / 因子V I I aペプチドが、本発明の修飾糖質であるシアリダーゼ、およびグリコシルリンク基の修飾糖質からペプチドへの転移を触媒することが可能である酵素と組み合わせられ、これにより、因子V I I / 因子V I I aペプチド複合体が調製される。いずれかのシアリダーゼがこの方法において用いられ得る。本発明において用いられる例示的なシアリダーゼは、ケージー（CAZY）データベース（<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>）およびwww.cazy.org/CAZYを参照のこと）において見出されることが可能である。例示的なシアリダーゼは、いずれかの数々の供給業者から購入することが可能である（Q A-バイオ（Q A-Bio）、カルバイオケム（Calbiochem）、マルキン（Marukin）、プロザイム（Prozyme）等）。例示的な実施形態において、シアリダーゼは、細胞質シアリダーゼ、リソソームシアリダーゼ、エクソ- α シアリダーゼ、およびエンドシアリダーゼから選択されるメンバーである。他の例示的な実施形態において、用いられるシアリダーゼは、ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）または肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）などの細菌、またはアデノウイルスなどのウイルスから産生される。例示的な実施形態において、グリコシルリンク基の修飾糖質からペプチドへの転移を触媒することが可能である酵素は、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼなどのグリコシルトランスフェラーゼ、ならびにエキソグリコシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選択されるメンバーである。例示的な実施形態において、酵素は、ST3Gal3であるグリコシルトランスフェラーゼである。他の例示的な実施形態において、用いられる酵素は、大腸菌（*Escherichia Coli*）などの細菌またはクロコウジカビ（*Aspergillus niger*）などの真菌類から産生される。他の例示的な実施形態において、シアリダーゼは、グリコシルトランスフェラーゼよりも前に、特定の時間で因子V I I / 因子V I I aペプチドに付加され、これにより、PEG-シアル酸試薬およびグリコシルトランスフェラーゼの付加を伴うグリコPEG化反応の開始よりも前に、シアリダーゼ反応を進行させる。これらの例の多くが本願明細書において考察されている。最後に、本願明細書に記載のいずれかの修飾糖質がこの反応にお

10

20

30

40

50

いて用いられることが可能である。

【0399】

他の例示的な実施形態において、本方法は、「キャッピング」ステップをさらに含む。このステップにおいては、追加の非PEG化シアル酸が反応混合物に添加される。例示的な実施形態において、このシアル酸は、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体に付加され、これによりPEG-シアル酸のさらなる付加を防止している。他の例示的な実施形態において、このシアル酸は、グリコシルトランスフェラーゼの反応混合物における機能を妨害して、効果的にグリコシルリンク基を因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体に付加することを停止する。最も重要なことに、反応混合物に付加されたシアル酸は未グリコPEG化グリカンにキャップし、これにより向上した薬物動態を有する因子VII／因子VIIaペプチド複合体を提供する。さらに、このシアリダーゼは、一定の量のPEG化量が所望される場合、グリコPEG化反応混合物に直接的に事前の精製無しで添加されることが可能である。

10

【0400】

例示的な実施形態において、キャッピングステップの後、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体のシアル化部位の約50%未満がシアリル部分を含まない。例示的な実施形態において、キャッピングステップの後、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体のシアル化部位の約40%未満がシアリル部分を含まない。例示的な実施形態において、キャッピングステップの後、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体のシアル化部位の約30%未満がシアリル部分を含まない。例示的な実施形態において、キャッピングステップの後、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体のシアル化部位の約20%未満がシアリル部分を含まない。例示的な実施形態において、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体のシアル化部位の約20%および約5%がシアリル部分を含まない。例示的な実施形態において、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体のシアル化部位の約25%および約10%がシアリル部分を含まない。例示的な実施形態において、キャッピングステップの後、因子VII／因子VIIaペプチドまたはペプチド複合体の基本的なすべてのシアル化部位がシアリル部分を含む。

20

30

【0401】

III. C. 因子VII／因子VIIaペプチドの脱シアル化および選択的修飾

他の例示的な実施形態において、本発明は、因子VII／因子VIIaペプチドを脱シアル化する方法を提供する。本方法は、好ましくは、少なくとも約40%、好ましくは45%、好ましくは約50%、好ましくは約55%、好ましくは約60%、好ましくは約65%、好ましくは約70%、好ましくは約75%、好ましくは約80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは、少なくとも92%、好ましくは少なくとも94%、さらにより好ましくは少なくとも96%、なおより好ましくは少なくとも98%、およびなおより好ましくは100%脱シアル化された因子VII／因子VIIaペプチドを提供する。

40

【0402】

本方法は、因子VII／因子VIIaペプチドをシアリダーゼと、好ましくは一定の時間接触させるステップを含む。因子VII／因子VIIaペプチドを、所望の程度に脱シアル化する予め選択された時間が十分である。好ましい実施形態において、脱シアル化因子VII／因子VIIaペプチドは脱シアル化の所望の程度が達成されたらシアリダーゼから分離される。例示的な脱シアル化反応および精製サイクルは本願明細書に記載されている。

【0403】

当業者は、脱シアル化反応を実施する適切な予め選択された時間を決定できる。例示的な実施形態において、時間は24時間未満、好ましくは8時間未満、より好ましくは6時

50

間未満、より好ましくは4時間未満、なおより好ましくは2時間未満およびさらにより好ましくは未満1時間である。

【0404】

他の例示的な実施形態において、脱シアル化反応の最後での因子V I I / 因子V I I a 調製において、因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群のメンバーの少なくとも10%は、これに結合するシアル酸を1つだけ有し、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、なおより好ましくは少なくとも40%、さらになおより好ましくは少なくとも50%およびより好ましくは少なくとも60%、およびなおより好ましくは完全に脱シアル化されている。

【0405】

さらなる例示的な実施形態において、脱シアル化反応の最後での因子V I I / 因子V I I a 調製において、少なくとも10%の、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、さらにより好ましくは少なくとも40%、なおより好ましくは少なくとも50%およびさらになおより好ましくは少なくとも60%の因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群のメンバーが完全に脱シアル化されている。

【0406】

さらなる他の例示的な実施形態において、脱シアル化反応の最後での因子V I I / 因子V I I a 調製において、因子V I I / 因子V I I a ペプチド固体群のメンバーの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%または60%は、単一のシアル酸のみを有し、および因子V I I / 因子V I I a ペプチドの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%または60%が完全に脱シアル化されている。

【0407】

好ましい実施形態において、脱シアル化反応の最後での因子V I I / 因子V I I a 調製において、因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群の少なくとも50%が脱シアル化されており、および因子V I I / 因子V I I a ペプチド固体群のメンバーの少なくとも40%が単一のシアル酸部分のみを有する。

【0408】

脱シアル化に続いて、因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、任意により修飾糖質と複合化される。例示的な修飾糖質は、分岐または直鎖ポリ（エチレングリコール）部分に結合した糖部分を含む。複合化は、修飾糖質を修飾糖質ドナーから因子V I I / 因子V I I a ペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に転移させる酵素によって触媒される。例示的な修飾糖質ドナーは、分岐または直鎖ポリ（エチレングリコール）部分を有するCMP-シアル酸である。例示的なポリ（エチレングリコール）部分は、少なくとも約2 KDa、より好ましくは少なくとも約5 KDa、より好ましくは少なくとも約10 KDa、好ましくは少なくとも約20 KDa、より好ましくは少なくとも約30 KDa、およびより好ましくは少なくとも約40 KDaの分子量を有する。

【0409】

例示的な実施形態において、修飾糖質部分の修飾糖質ドナーからの転移に用いられる酵素はグリコシルトランスフェラーゼ、例えば、シアリルトランスフェラーゼである。本発明の方法において用いられる例示的なシアリルトランスフェラーゼはS T 3 G a l 3である。

【0410】

本発明の例示的な方法は、少なくとも一つ、好ましくは少なくとも二つ、好ましくは少なくとも三つの修飾基を有する修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドをもたらす。一実施形態において、生成された因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、単一の修飾基を因子V I I / 因子V I I a ペプチドの軽鎖上に有する。他の実施形態において、本方法は、単一の修飾基を重鎖上に有する修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドを提供する。さらなる他の実施形態において、本方法は、単一の修飾基を軽鎖上および単一の修飾基を重鎖上に有する修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドを提供する。

【0411】

他の態様において、本発明は、修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドを調製する方法を提供する。本方法は、因子V I I / 因子V I I a ペプチドを、修飾基を有する修飾糖質ドナーおよび修飾糖質部分を修飾糖質ドナーからペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基上に転移させることが可能である酵素に接触させるステップを含む。

【0412】

例示的な実施形態において、本方法は、少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%およびさらに好ましくは少なくとも80%の固体群メンバーが因子V I I / 因子V I I a ペプチドの軽鎖にモノー複合化された、修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群を提供する。

【0413】

例示的な実施形態において、本方法は、少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%およびさらに好ましくは少なくとも80%の固体群メンバーが因子V I I / 因子V I I a ペプチドの軽鎖にジマー複合化された、修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群を提供する。

【0414】

この態様の例示的な実施形態において、本方法は、50%以下、好ましくは30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下の固体群メンバーが因子V I I / 因子V I I a ペプチドの重鎖にモノー複合化された、修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群を提供する。

【0415】

この態様の例示的な実施形態において、本方法は、50%以下、好ましくは30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下の固体群メンバーが因子V I I / 因子V I I a ペプチドの重鎖にジマー複合化された、修飾因子V I I / 因子V I I a ペプチドの固体群を提供する。

【0416】

因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、接触ステップの前にシアリダーゼの作用に供されることが可能であり、またはこのペプチドは、事前の脱シアル化無しで用いられることが可能である。ペプチドがシアリダーゼと接触されるとき、基本的に完全に脱シアル化されるか、または部分的にのみ脱シアル化されていることが可能である。好ましい実施形態において、因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、接触ステップの前に少なくとも部分的に脱シアル化される。因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、基本的に完全に脱シアル化（基本的にアシアロ）されるか、または部分的にのみ脱シアル化され得る。好ましい実施形態において、脱シアル化因子V I I / 因子V I I a ペプチドは、本願明細書上述の脱シアル化実施形態の一つである。

【0417】

I I I . D . 因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体の合成に添加される試薬の追加のアリコート

本願明細書に記載のペプチド複合体の合成の例示的な実施形態において、反応成分／試薬の一つ以上の追加のアリコートが、選択された時間の後に反応混合物に添加される。例示的な実施形態において、ペプチド複合体は因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体である。他の例示的な実施形態において、添加される反応成分／試薬は修飾糖質ヌクレオチドである。修飾糖質ヌクレオチドの反応への導入は、グリコPEG化反応を完了へ導く可能性を高めるであろう。例示的な実施形態において、ヌクレオチド糖質は、本願明細書に記載のCMP-S A-P E Gである。例示的な実施形態において、添加される反応成分／試薬はシアリダーゼである。例示的な実施形態において、添加される反応成分／試薬は、グリコシルトランスフェラーゼである。例示的な実施形態において、添加される反応成分／試薬はマグネシウムである。例示的な実施形態において、添加される追加のアリコートは、反応の開始時に添加された元の量の約10%、または20%、または30%、または40%、または50%、または60%、または70%、または80%または90%を表す。例示的な実施形態において、反応成分／試薬は、開始から約3時間、または6時間、ま

10

20

30

40

50

たは 8 時間、または 10 時間、または 12 時間、または 18 時間、または 24 時間、または 30 時間、または 36 時間後に反応に添加される。

【0418】

III. E. 軽鎖 PEG 化因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の選択的生成

例示的な実施形態において、本発明は、重鎖上の軽鎖で修飾された因子 V I I a ペプチド複合体の産生を増加させる方法を提供する。この方法は重鎖の失活または隔離を含み、これにより、グリコ PEG 化を軽鎖上で優先的に生じさせる。因子 V I I a の重鎖のセリンプロテアーゼ活性は、この隔離に基づいて利用されることが可能である。ベンズアミジンマトリックスおよび／またはセリンプロテアーゼについての擬似アフィニティー樹脂をグリコ PEG 化反応混合物に添加することで、重鎖の隔離をもたらす一方で、グリコ PEG 化が軽鎖上で進行する。軽鎖は、次いで、重鎖から、当該技術分野において公知である標準的な技術により精製されることが可能である。重鎖は、ベンズアミジンの付加によりマトリックスから除去されることが可能であり、または樹脂から、溶液の pH を低下させることにより除去されることが可能である。このステップで導入されるベンズアミジン不純物は、ダイアフィльтраーションにより除去されることが可能である。

10

【0419】

III. E. 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の精製

上記プロセスによって生成される生成物は、精製せずに用いられることが可能である。しかしながら、通常は、生成物および一種以上の中間体、例えば、ヌクレオチド糖質、分岐および直鎖 PEG 種、修飾糖質および修飾ヌクレオチド糖質を回収することが好ましい。薄層または厚層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、またはメンブランろ過などのグリコシル化ペプチドの回収のための標準的な周知技術を用いることが可能である。メンブランろ過を用いることが好ましく、より好ましくは逆浸透圧メンブラン、または本願明細書中後述におよび本願明細書に引用される文献中に考察されるとおり、回収のための一種以上のカラムクロマトグラフィー技術を用いることが好ましい。例えば、メンブランが、約 3000～約 10,000 の分子量カットオフを有するメンブランろ過が、グリコシルトランスフェラーゼなどのタンパク質の除去に用いられることが可能である。場合によっては、不純物および生成物間の分子量カットオフ差が、生成物の精製を確実にするために利用されることとなる。例えば、因子 V I I a-S A-PEG-40 K D a 生成物を未反応 C M P-S A-PEG-40 K D a から精製するためには、例えば、因子 V I I a-S A-PEG-40 K D a を濃縮水中に残留させる一方で、C M P-S A-PEG-40 K D a を濾液中に流出させるフィルタが選択されなければならない。ナノろ過または逆浸透法が、次いで、塩を除去するためにおよび／または生成物サッカライドを精製するために用いられることが可能である（例えば、国際公開第 98/15581 号パンフレットを参照のこと）。ナノろ過メンブランは、単価の塩を通過させるが、多価塩および用いられるメンブランに応じて約 100～約 2,000 ダルトンより大きい未荷電の溶質を保持する逆浸透法メンブランのクラスである。それ故、典型的な用途において、本発明の方法によって調製されたサッカライドは、メンブラン中に保持され、汚染源の塩は通過されることとなる。

20

30

【0420】

ペプチドが細胞内で産生される場合には、第 1 のステップとして、宿主細胞または溶解した断片といった微粒子状デブリが除去される。グリコ PEG 化に続いて、PEG 化ペプチドが、例えば、遠心分離または限外ろ過といった技術分野において認識された方法によって精製され、任意により、タンパク質が、市販されているタンパク質濃度フィルタで濃縮され得、続いて、ポリペプチド変異体が他の不純物から、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換カラム分別（例えば、ジエチルアミノエチル（D E A E）またはカルボキシメチルまたはスルホプロピル基含有マトリックスで）；ブルーセファロース、C M ブルーセファロース、M O N O-Q、M O N O-S、レンチルレクチンセファロース、W G A-セファロース、C o n A-セファロース、エーテルトローパー（T o y o p e a r l）、ブチルトローパー（T o y o p e a r l）、フェニルトローパー

40

50

(Toyopearl)、またはタンパク質Aセファロースでのクロマトグラフィー；SDS-PAGEクロマトグラフィー；シリカクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；逆相HPLC（例えば付随脂肪族基を有するシリカゲル）；例えばセファデックス分子ふるいを用いるゲルろ過；またはサイズ排除イオンクロマトグラフィー；ポリペプチド、およびエタノールまたは硫酸アンモニウム沈殿物と選択的に結合するカラムでのクロマトグラフィーから選択される一つ以上のステップにより分離される。精製は、本セクションにおいて後にさらに記載されるとおり、因子VII／因子VIIaペプチド複合体の一方の鎖を他方の鎖から分離するのに用いられることが可能である。

【0421】

培養において産生された修飾グリコペプチドは、通常は、細胞、酵素等からの初期抽出、これに続く、濃度、塩析、水性イオン交換、またはサイズ排除イオンクロマトグラフィーステップの一つ以上により単離される。さらに、修飾糖タンパク質は、親和性クロマトグラフィーにより精製され得る。最後に、HPLCが最終精製ステップに利用され得る。

【0422】

プロテアーゼ抑制剤が、前述のステップのいずれかにおいて、タンパク質分解および抗生物質を阻害するために含まれていてもよく、または防腐剤が外来性汚染物の増殖を防止するために含まれていても良い。前述のステップにおいて用いられるプロテアーゼ抑制剤は、アンチパイン、 α -1-アンチトリプシン、抗トロンビン、ロイペプチン、アマスタチン、キモスタチン、ベンズアミジン、ならびに他のセリンプロテアーゼ抑制剤（すなわちセルピン）を含む低分子量抑制剤であり得る。一般的には、セリンプロテアーゼ抑制剤は、0.5～100 μ Mの範囲の濃度で用いられるべきであるが、細胞培養中のキモスタチンは、200 μ Mを超える濃度で用いられ得る。他のセリンプロテアーゼ抑制剤は、キモトリプシン様、サブチリシン様、 α / β ヒドロラーゼ、またはセリンプロテアーゼのシグナルペプチダーゼc1anに対して特異的な抑制剤を含むであろう。セリンプロテアーゼの他、他のタイプのプロテアーゼ抑制剤もまた用いられ得、システインプロテアーゼ抑制剤（1～10 μ M）およびアスパラギン酸プロテアーゼ抑制剤（1～5 μ M）、ならびにペプスタチンなどの非特異的プロテアーゼ抑制剤（1～5 μ M）が挙げられる。本発明において用いられるプロテアーゼ抑制剤はまた、ヒルから単離されたヒルスタシン（hirustasin）抑制剤などの天然プロテアーゼ抑制剤を含み得る。いくつかの実施形態において、プロテアーゼ抑制剤は、プロテアーゼ触媒部位に特異的に結合して、グリコPEG化反応での干渉無しで因子VII／因子VIIaを安定化させることができる合成ペプチドまたは抗体を含むであろう。

【0423】

他の実施形態中において、本発明の修飾グリコペプチドを産生する系からの上澄は、先ず、市販されているタンパク質濃度フィルタ、例えば、アミコン（Amicon）またはミリポアペリコン（Millipore Pellicon）限外ろ過ユニットを用いて濃縮される。濃縮ステップに続いて、濃縮物は、好適な精製マトリックスに適用され得る。例えば、好適な親和性マトリックスは、ペプチドについてのリガンド、好適な支持体に結合したレクチンまたは抗体分子を含み得る。あるいは、アニオン交換樹脂、例えばDEAE側基を有するマトリックスまたは基質を利用し得る。好適なマトリックスとしては、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製において通常用いられる他のタイプが挙げられる。あるいは、カチオン交換ステップが利用され得る。好適なカチオン交換体としては、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスが挙げられる。スルホプロピル基が特に好ましい。

【0424】

精製において用いられ得る他の方法としては、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびブルーセファロースでのクロマトグラフィーが挙げられる。これらの方法および他の有用な方法が、共譲渡された米国仮特許出願（2005年5月6日出願の代理人整理番号第

10

20

30

40

50

40853-01-5168-P1) に例示されている。

【0425】

疎水性 R P-H P L C 媒体、例えば、メチル側基または他の脂肪族側基を有するシリカゲルを利用する一つ以上の R P-H P L C ステップが、ポリペプチド複合体組成物をさらに精製するために用いられ得る。前述の精製ステップのいくつかまたはすべてがまた、種々の組み合わせで、均質なまたは基本的に均質な修飾糖タンパク質を提供するために利用されることが可能である。

【0426】

大規模発酵からもたらされる本発明の修飾グリコペプチドは、ウルダル (U r d a l) ら、J. C h r o m a t o g. 296:171 (1984年) により開示されているものと類似の方法により精製され得る。この文献は、組み換え型ヒト I L-2 の分取 H P L C カラムでの精製についての、2つの連続的な、R P-H P L C ステップを記載する。あるいは、親和性クロマトグラフィーなどの技術が修飾糖タンパク質の精製に用いられ得る。

【0427】

例示的な実施形態において、精製は、2005年3月24日出願の所有者が共通の、譲渡済みの米国仮特許出願第60/665,588号明細書に記載の方法により達成される。

【0428】

本発明によれば、連続的な脱シアル化または同時的なシアル化の一方を介して生成された、ペグ化ペプチド、例えば、因子 V I I、因子 V I I a ペプチドまたはペプチド複合体は、塩化マグネシウム勾配を用いることにより精製されまたは分離されることが可能である。

【0429】

例示的な実施形態において、因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体は、軽鎖および重鎖に分離されることが可能であり、および一方の鎖が他方から精製されることが可能である。他の例示的な実施形態において、生成物における因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の少なくとも80%が因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の軽鎖部分である生成物が得られる。他の例示的な実施形態において、生成物における因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の少なくとも90%が因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の軽鎖部分である生成物が得られる。他の例示的な実施形態において、生成物における因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の少なくとも95%が因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の軽鎖部分である生成物が得られる。この生成物は、本発明のいずれの化合物についても可能である。

【0430】

他の例示的な実施形態において、生成物における因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の少なくとも80%が因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の重鎖部分である生成物が得られる。他の例示的な実施形態において、生成物における因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の少なくとも90%が因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の重鎖部分である生成物が得られる。他の例示的な実施形態において、生成物における因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の少なくとも95%が因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の重鎖部分である生成物が得られる。この生成物は、本発明のいずれの化合物についても可能である。

【0431】

I I I. F. 因子 V I I / 因子 V I I a 複合体の特性

例示的な実施形態において、本発明の因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体は、未変性因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドと基本的に同一の生化学的特性を有する (例えば

10

20

30

40

50

凝固)。例示的な実施形態において、本発明の因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は、P E G化の部位、付加されたP E Gのサイズおよび付加されたP E Gの数に応じて、未変性因子V I I /因子V I I aペプチドより、低減された、または増加された生化学的特性を有する（例えば凝固）。

【0432】

因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は、血液凝固プロセスに關与する。例示的な実施形態において、因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は、未変性因子V I I /因子V I I aの、約20%、または約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%、または約55%、または約60%、または約65%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%の凝固活性を保持する。

10

【0433】

因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は、アミド分解活性を有する。例示的な実施形態において、因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は、未変性因子V I I /因子V I I aの、約20%、または約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%、または約55%、または約60%、または約65%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%のアミド分解活性を保持する。

【0434】

因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は因子Xを因子X aに転化することが可能である。例示的な実施形態において、因子V I I /因子V I I aペプチド複合体は、未変性因子V I I /因子V I I aの、約20%、または約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%、または約55%、または約60%、または約65%、または約70%、または約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%の因子X転化活性を保持する。

20

【0435】

I V . 医薬品組成物

他の態様において、本発明は医薬品組成物を提供する。医薬品組成物は、薬学的に許容可能な希釈剤、および非天然に生じる、P E G部分、治療的部分または生体分子およびグリコシル化または非グリコシル化ペプチド間の共有結合複合体を含む。ポリマー、治療的部分または生体分子は、ペプチドに、ペプチドおよびポリマー、治療的部分または生体分子の両方の間に介在されおよびこの両方を共有結合する無処置グリコシルリンク基を介して複合化される。

30

【0436】

本発明の医薬品組成物は、多様な薬物送達系における使用について好適である。本発明における使用に好適な配合物は、レミントン (Remington) の「Pharmaceutical Sciences」、Mace Publishing Company、ペンシルベニア州フィラデルフィア (Philadelphia, PA)、第17版 (1985年) に見出される。薬物送達の方法の簡潔な概説については、ランガー (Langer)、*「Science」* 249: 第1527~1533ページ (1990年) を参照のこと。

40

【0437】

例示的な実施形態において、医薬品配合物は、因子V I I /因子V I I aペプチド複合体と、塩化ナトリウム、塩化カルシウム二水和物、グリシルグリシン、ポリソルベート80、およびマンニトールから選択されるメンバーである薬学的に許容可能な希釈剤とを含む。他の例示的な実施形態において、薬学的に許容可能な希釈剤は塩化ナトリウムおよびグリシルグリシンである。他の例示的な実施形態において、薬学的に許容可能な希釈剤は塩化カルシウム二水和物およびポリソルベート80である。他の例示的な実施形態において、薬学的に許容可能な希釈剤はマンニトールである。

【0438】

50

医薬品組成物は、例えば、局所的、経口、鼻の、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下または筋肉内投与を含む投与のいずれかの適切な方式のために配合され得る。皮下注入などの非経口的な投与について、キャリアは、好ましくは、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックスまたは緩衝液を含む。経口投与について、上記キャリアのいずれかまたは、マンニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、および炭酸マグネシウムなどの固体キャリアが用いられ得る。生分解性微小球（例えば、ポリラクテートポリグリコレート）がまた、本発明の医薬品組成物についてのキャリアとして用いられ得る。好適な生分解性微小球が、例えば米国特許第4, 897, 268号明細書および同第5, 075, 109号明細書に開示されている。

10

【0439】

普通、医薬品組成物は、非経口的、例えば静脈内で投与される。それ故、本発明は、許容可能なキャリア、好ましくは水性キャリア、例えば、水、緩衝水、生理食塩水、PBS等中に溶解されたか、または懸濁された化合物を含む非経口的な投与についての組成物を提供する。この組成物は、pH調整および緩衝液、張度調整剤、湿潤剤、洗剤等などの生理学的条件に近づけるのに必要な薬学的に許容可能な補助物質を含有し得る。

【0440】

これらの組成物は、従来の滅菌技術により滅菌され得、または無菌ろ過され得る。得られる水溶液は、そのまま用いられるようにパッケージされ得、または凍結乾燥されて、この凍結乾燥調製物が無菌水性キャリアと投与の前に組み合わせられる。調製物のpHは、典型的には、3および11、より好ましくは5~9および最も好ましくは7および8の間となるであろう。

20

【0441】

いくつかの実施形態において、本発明のグリコペプチドは、標準的な小水疱形成性脂質から形成されたりリポソーム中に組み込まれることが可能である。多様な方法が、例えば、スゾカ(Szoka)ら、「Ann. Rev. Biophys. Bioeng.」9: 467 (1980年)、米国特許第4, 235, 871号明細書、同第4, 501, 728号明細書および同第4, 837, 028号明細書に記載のとおりリポソームの調製に利用可能である。多様な標的指向化剤（例えば、本発明のシアリルガラクトシド）を用いるリポソームの標的指向化が当該技術分野において周知である（例えば、米国特許第4, 957, 773号明細書および同第4, 603, 044号明細書を参照のこと）。

30

【0442】

標的指向化剤をリポソームにカップリングするための標準的な方法が用いられることが可能である。これらの方法は、一般的には、標的指向化剤、または本発明の脂質由来グリコペプチドなどの誘導親油性化合物の結合のために活性化されることが可能である、ホスファチジルエタノールアミンなどの脂質構成成分のリポソームへの組み込みを含む。

【0443】

標的指向化メカニズムは、一般的には、例えば細胞表面受容体といった標的との相互作用のために標的部分が利用可能であるような方式で、標的指向化剤がリポソームの表面上に位置されることを必要とする。本発明の炭水化物は、当業者に公知の方法を用いてリポソームが形成される前に脂質分子に結合され得る（例えば、炭水化物上に存在するヒドロキシル基の、それぞれ、長鎖ハロゲン化アルキルまたは脂肪酸でのアルキル化またはアシル化）。あるいは、リポソームは、コネクタ部分が、先ず、メンブランの形成時にメンブランに組み込まれるような方法で仕上げられ得る。コネクタ部分は、親油性部分を有していなければならない、これが、メンブランに強固に埋め込まれおよび固着される。これはまた、反応性部分を有していなければならない、これが、リポソームの水性表面上で化学的利用可能である。反応性部分は、安定な化学的結合を標的指向化剤または後に添加される炭水化物と形成するに化学的に好適であるよう選択される。ある場合には、標的指向化剤をコネクタ分子に直接的に結合することが可能であるが、ほとんどの場合、化学的橋架として第3の分子を用いることがより好適であり、これにより、メンブラン中のコネクタ分子

40

50

と、小水疱表面から三次元的に延長された標的指向化剤または炭水化物とがリンクされる。

【0444】

本発明の方法によって調製される化合物はまた、診断上の試薬としての使用が見出され得る。例えば、標識化合物は、炎症を疑われる患者における炎症または腫瘍転移領域の検出に用いられることが可能である。この使用については、化合物は、 ^{125}I 、 ^{14}C 、または三重水素で標識化されることが可能である。

【0445】

本発明の医薬品組成物において用いられる活性メンバーは、血液凝固産生を刺激する生物学的特性を有する因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体である。好ましくは、因子V I I / 因子V I I a ペプチド複合体は、非経口的（例えばI V、I M、S CまたはI P）に投与される。有効投与量は、治療される状態および投与経路に依存して著しく異なることが想定されるが、活性材料の約0.1（約7 U）～100（約7000 U） $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の範囲であると想定される。貧血性状態の処置についての好ましい投与量は、約50～約300単位/kgを1週間に3回である。本発明は、増強されたインビボ滞留時間を有する因子V I I / 因子V I I a ペプチドを含む物質の組成物を提供するため、本発明の組成物が投与されるとき、規定の投与量は、任意により低減される。

【0446】

本発明の組成物の調製において用いられる種についての調製方法は、一般的には、例えば、米国特許出願公開第20040137557号明細書；国際公開第04/083258号パンフレット；および国際公開第04/033651号パンフレットといった種々の特許公開に規定されている。以下の実施例は、本発明の複合体および方法を例示するために提供されているが、本発明の特許請求の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0447】

実施例

実施例1

因子V I I a の脱シアル化。

血清－遊離媒体中に発現した因子V I I a、媒体を含有する血清中に産生した因子V I I a、および三種の因子V I I a 変異体N145Q、N322Q、およびアナログDVQ（V158D/E296V/M298Q）。

【0448】

酵素的脱シアル化のための調製において、因子V I I aを、MES、150mM NaCl、5mM CaCl_2 、50mM MES、pH6中に、一晚、4℃で、10KDaのMWCOと共にスネークスキン透析チューブ中で透析した。因子V I I a（1mg/mL）の脱シアル化を、アルスロバクターウレアファシエンス（*Arthrobacter ureafaciens*）（カルバイオケム（Calbiochem））からの10U/L可溶性シアリダーゼと共に、32℃で18時間、交換緩衝液中で実施した。

【0449】

実施例2

因子V I I a のシアリル－PEG化。

シアリル－PEG化（「グリコPEG化」）を、アシアロー因子V I I a（1mg/mL）に、100U/L ST3Gal-I I Iおよび200 μM CMP－シアリ酸－PEG（40KDa、20KDa、10KDa、5KDa、および2KDa）と共に、32℃で、脱シアル化緩衝液中に2～6時間実施した。適切な反応時間の経過後、PEG化サンプルを直ぐに精製して、さらなるグリコPEG化を最低限とした。

【0450】

グリコPEG化因子V I I / 因子V I I aを、シアリ酸でキャップされたサンプルでキャップするために、シアリダーゼを、先ず、以下に示すとおり、アシアロー因子V I I aから、アニオン交換クロマトグラフィーにより除去した。過剰量のCMP－シアリ酸（5

10

20

30

40

50

mM)を添加し、32℃で2時間インキュベートし、グリコPEG化因子V I I aをシアル酸でキャッピングした。因子V I I aのシアルル-PEG化形態を、インビトロジェン (Invitrogen)により説明されているとおり、非還元性SDS-PAGE (トリス-グリシンゲルおよび/またはNuPAGEゲル) およびコロイド状青色染色キットにより分析した。

【0451】

実施例3

PEG化因子V I I aの精製。

因子V I I aのグリコPEG化サンプルを、修飾アニオン交換法で精製した。サンプルは5℃で扱った。カラムを充填する直前に、1gのキレックス (Chelex) 100 (バイオラッド (BioRad)) / 10mL 因子V I I a溶液を、再構築したサンプルに添加した。10分間攪拌した後、懸濁液を、セルロースアセテートメンブラン (0.2 μm) で、バキュームシステムを用いてろ過した。フィルタ上に残留したキレート剤樹脂を、1~2mL水 / 10mLバルクで1回洗浄した。濾液の導電率を5℃で10mS / cmに調整し、および必要であればpH8.6に調整した。

10

【0452】

アニオン交換を8~10℃で実施した。QセファロースFFを含有するカラムを、1M NaOH (10カラム体積)、水 (5カラム体積)、2M NaCl、50mM HOAc、pH3 (10カラム体積) で洗浄し、175mM NaCl、10mM グリシルグリシン、pH8.6 (10カラム体積) で平衡化させることにより充填前に用意した。各PEG化反応について、15~20mg 因子V I I aをXK16カラム (アマシャムバイオサイエンス社 (Amersham Biosciences)) に、10mL QセファロースFF (2mgタンパク質 / mL樹脂以下) と共に、100cm / 時間の流速で充填した。2KDa直鎖PEGについて、20mg 因子V I I aを、XK26カラム (アマシャムバイオサイエンス社 (Amersham Biosciences)) に、40mL QセファロースFF (0.5mgタンパク質 / 1mg樹脂) と共に、100cm / 時間の流速で充填した。

20

【0453】

充填後、カラムを、175mM NaCl、10mM グリシルグリシン、pH8.6 (10カラム体積) および50mM NaCl、10mM グリシルグリシン、pH8.6 (2カラム体積) で洗浄した。溶離を、15mM CaCl₂ のステップ勾配で、50mM NaCl、10mM グリシルグリシン、15mM CaCl₂、pH8.6 (5カラム体積) を用いることにより実施した。カラムを、次いで、1M NaCl、10mM グリシルグリシン、pH8.6 (5カラム体積) で洗浄した。溶離液を280nmでの吸光度で監視した。画分 (5mL) を、流通および2回の洗浄の最中に採取し; 2.5mL画分をCaCl₂ および1M塩溶離の最中に採取した。因子V I I aを含有する画分を、非還元性SDS-PAGE (トリス-グリシンゲルおよび/またはNuPAGEゲル) およびコロイド状青色染色キットにより分析した。因子V I I aを有する適切な画分をプールし、およびpHを4M HClで7.2に調整した。

30

【0454】

因子V I I a-SA-PEG-10KDaを、以下の変更を除き上記のとおり精製した。EDTA (10mM) をPEG化因子V I I a溶液に添加し、pHをpH6に調整し、および導電率を5℃で5mS / cmに調整した。約20mgの因子V I I a-SA-PEG-10KDaを、XK16カラム (アマシャムバイオサイエンス社 (Amersham Biosciences)) に、10mL ポロス (Poros) 50ミクロンHQ樹脂 (以下2mgタンパク質 / mL、樹脂) と共に、100cm / 時間の流速で充填した。充填後、カラムを、175mM NaCl、10mM ヒスチジン、pH6 (10カラム体積) および50mM NaCl、10mM ヒスチジン、pH6 (2カラム体積) で洗浄した。溶離を、50mM NaCl、10mM ヒスチジン、pH6 (5カラム体積) 中20mM CaCl₂ のステップ勾配で、実施した。カラムを、次いで、1M NaCl

40

50

、10 mM ヒスチジン、pH 6（5 カラム体積）で洗浄した。

【0455】

因子 V I I a - S A - P E G - 10 K D a を含有するアニオン交換溶出液（25 mL）を、製造業者の説明書（ミリポア（M i l l i p o r e））に従ってアミコンウルトラ（A m i c o n U l t r a）- 15 10 K 遠心ろ過装置を用いることにより、5 ~ 7 mL に濃縮した。濃縮に続いて、サイズ排除クロマトグラフィーを実施した。サンプル（5 ~ 7 mL）を、50 mM N a C l、10 mM グリシルグリシン、15 mM C a C l₂、pH 7.2 中に平衡化したスーパーデックス（S u p e r d e x）200（ハイロード（H i L o a d）16 / 60、プレップグレード；アマシャムバイオサイエンス社（A m e r s h a m B i o s c i e n c e s））を含有するカラムにほとんどの P E G 化変異体について充填した。因子 V I I a - S A - P E G - 10 K D a を、未修飾、アシアロー因子 V I I a から、1 mL / 分の流速で分離し、および吸光度を 280 nm で監視した。因子 V I I a を含有する画分（1 mL）を採取し、非還元性 S D S - P A G E（トリス-グリシンゲルおよび／または N u P A G E ゲル）およびコロイド状青色染色キットで分析した。標的とされた P E G 化アイソフォームを含有すると共に未修飾、アシアロー因子 V I I a を欠く画分をプールし、1 mg / mL に、アミコンウルトラ（A m i c o n U l t r a）- 15 10 K 遠心ろ過装置を用いて濃縮した。タンパク質濃度を、1.37 (mg / mL) ⁻¹ cm ⁻¹ の吸光係数を用いて 280 nm での吸光度読取値から測定した。

【0456】

実施例 4

逆相 H P L C 分析による P E G 化アイソフォームの判定。

P E G 化因子 V I I a を、逆相カラム（ゾルボックス（Z o r b a x）300 S B - C 3、5 μm 粒径、2.1 × 150 mm）での H P L C により分析した。溶離液は、A）水中の 0.1 T F A および B）アセトニトリル中の 0.09 % T F A とした。検出は 214 nm であった。勾配、流速、およびカラム温度は、P E G 長さに依存する（40 K D a、20 K D a、および 10 K D a P E G : 30 分で 35 ~ 65 % B、0.5 mL / 分、45 °C ; 10 K D a P E G : 30 分で 35 ~ 60 % B、0.5 mL / 分、45 °C ; 5 K D a : 40 分で 40 ~ 50 % B、0.5 mL / 分、45 °C ; 2 K D a : 67 分で 38 ~ 43 % B、0.6 mL / 分、55 °C）。各ピークの同一性を、未変性因子 V I I a の既知の滞留時間、単離されたピークの S D S - P A G E 移動、単離されたピークの M A L D I - T O F 質量スペクトル、および結合している P E G の数の増加を伴う各ピークの滞留時間の秩序だった進行の、4 つの異なるエビデンスの一部の 2 つ以上を基準として特定した。

【0457】

実施例 5

逆相 H P L C による P E G 結合部位の判定。

因子 V I I a および P E G 化因子 V I I a 変異体を、サンプル（1 mg / mL の濃度で 10 μL）を、還元性緩衝液（40 μL、50 mM N a C l、10 mM グリシルグリシン、15 mM E D T A、8 M 尿素、20 mM D T T、pH 8.6）と、15 分、室温で混合することにより還元した。水（50 μL）を添加し、サンプルを、H P L C 上に注入されるまで 4 °C に冷却した（< 12 時間）。H P L C カラム、溶離液、および検出は、非還元サンプルについての上記のとおりとした。流速は 0.5 mL / 分、90 分で勾配は 30 ~ 55 % B であり、90 % B 以下の簡単な洗浄サイクルを続けた。各ピークの同一性を、実施例 4 に記載のとおり割当てた。

【0458】

実施例 6

因子 V I I a 凝固アッセイ。

P E G 化サンプルおよび標準を、重複してテストし、100 mM N a C l、5 mM C a C l₂、0.1 % B S A (w t / v o l)、50 mM トリス、pH 7.4 中に希釈した。標準およびサンプルを 0.1 ~ 10 ng / mL の範囲にわたって検査した。同体

積の希釈した標準およびサンプルを、因子V I I a 欠乏プラズマ（ダイアグノースティカスタゴ（D i a g n o s t i c a S t a g o））と混合し、これらを検査する前に氷上に4時間以内で保管した。

【0459】

凝固時間を、S T a r t 4 凝固測定機（ダイアグノースティカスタゴ（D i a g n o s t i c a S t a g o））で計測した。凝固測定機で、サンプルキュベット中の磁性ボールの穏やかな前後方向の移動の停止によって示される、インビトロ凝固が形成されるまでの経過時間を計測した。

【0460】

各キュベットに、1つの磁性ボールを置き、さらに、100 μ L 因子V I I a サンプル／欠乏プラズマおよび100 μ L の希釈ラット脳セファリン溶液（氷上に4時間以内で保管した）を入れた。各試薬を、各ウェルに5秒間の間隔で添加し、および最終混合物を300秒、37℃でインキュベートした。希釈したラット脳セファリン（R B C）溶液を、2 mL R B C ストック溶液（ヘマケム（H a e m a c h e m）製の1バイアルR B C ストック、および10 mL の150 mM N a C l）および4 mL 100 mM N a C l、5 mM C a C l₂、0.1% B S A（w t / v o l）、50 mM トリス、p H 7.4から形成した。

【0461】

300秒、可溶性組織因子（2 μ g / mL；アミノ酸1～209）の100 mM N a C l、12.5 mM C a C l₂、0.1% B S A（w t / v o l）、50 mM トリス、p H 7.4中の予め加熱した（37℃）溶液の100 μ L の添加によりアッセイを開始した。再度、この次の溶液を、サンプル毎に5秒の間隔で添加した。

【0462】

希釈した標準からの凝固時間を用いて検量線を生成した（log 凝固時間対log 因子V I I a 濃度）。得られた直鎖の曲線からの回帰を用いて、P E G 化変異体の相対的な凝固活性を判定した。P E G 化因子V I I a 変異体を、因子V I I a のアリコートストックと比較した。

【0463】

実施例7

B H K 細胞中で産生した組み換え型因子V I I a のグリコP E G 化

この実施例は、B H K 細胞において形成した組み換え型因子V I I a のP E G 化を規定する。

【0464】

アシアロー因子V I I a の調製。組み換え型因子V I I a をB H K 細胞（ベビーハムスター腎臓細胞）中に産生させた。因子V I I a（14.2 mg）を1 mg / mL で緩衝溶液（p H 7.4、0.05 M トリス、0.15 M N a C l、0.001 M C a C l₂、0.05% N a N₃）中に溶解させ、300 m U / mL シアリダーゼ（コレラ菌（V i b r i o c h o l e r a））－アガロース複合体と共に、3日間、32℃でインキュベートした。反応を監視するために、反応の少量のアリコートを適切な緩衝液で希釈し、およびI E F ゲルをインビトロジェン（I n v i t r o g e n）手法（図157）に従って実施した。混合物を3,500 rpm で遠心分離し、上澄みを採取した。樹脂を、上記緩衝溶液（p H 7.4、0.05 M トリス、0.15 M N a C l、0.05% N a N₃）で3回（3 $\times$ 2 mL）洗浄し、組み合わせた洗浄物をセントリコン－プラス（C e n t r i c o n - P l u s）－20中で濃縮した。残った溶液を、0.05 M トリス（p H 7.4）、0.15 M N a C l、0.05% N a N₃で14.4 mL の最終体積に緩衝液交換した。

【0465】

因子V I I a－S A－P E G－1 K D a および因子V I I a－S A－P E G－10 K D a の調製。因子V I I a 溶液の脱シアル化を2つの等量の7.2 mL サンプルに分けた。各サンプルに、C M P－S A－P E G－1 K D a（7.4 mg）またはC M P－S A－P

10

20

30

40

50

EG-10KDa (7.4mg) の一方を添加した。ST3Gal3 (1.58U) を両方のチューブに添加し、反応混合物を32℃で96時間インキュベートした。反応を、インビトロジェン (Invitrogen) により説明された試薬および条件を用いてSDS-PAGEゲルにより監視した。反応が完了したら、反応混合物をPBS緩衝液 (pH 7.1) を用いるトソー (Toso) Haas TSK-ゲル-3000分取カラムを用いて精製し、および画分をUV吸収に基づいて採取した。生成物を含有する組み合わせた画分を、4℃で、セントリコン-プラス (Centricon-Plus) -20遠心ろ過 (ミリポア (Millipore)、マサチューセッツ州ベッドフォード (Bedford, MA)) 中に濃縮し、濃縮した溶液を再配合して1.97mg (ビシンコニン酸タンパク質アッセイ、BCAアッセイ、シグマアルドリッチ (Sigma-Aldrich)、ミズーリ州セントルイス (St. Louis, MO)) の因子VIIa-SAP-EGを得た。反応の生成物を、インビトロジェン (Invitrogen) 提供の手法および試薬に従って、SDS-PAGEおよびIEF分析を用いて分析した。サンプルを、水に対して透析し、MALDI-TOFで分析した。図7は、未変性因子VIIaについてのMALDI結果を示す。図8は、因子VIIa-SAP-EG-1KDaについてのMALDI結果を含む。図9は、因子VIIa-SAP-EG-10KDaについてのMALDI結果を含む。図10は、すべての反応生成物のSDS-PAGE分析を表し、因子VIIa-SAP-EG-10KDaについてのバンドが明らかである。

10

【0466】

実施例 8

20

因子VIIa-SAP-EG-10KDa：ワンポット法

因子VIIa (5mgを生成物配合物緩衝液に希釈して、1mg/mLの最終濃度とした)、CMP-SAP-EG-10KDa (10mM、60μL) およびクロコウジカビ (A. niger) 酵素ST3Gal3 (33U/L) および10mMヒスチジン、50mM NaCl、20mM CaCl₂を、10U/L、1U/L、0.5U/Lまたは0.1U/Lのいずれかの量のシアリダーゼ (カルバイオケム (CalBiochem)) と共に反応容器中に組み合わせた。成分を混合し、32℃でインキュベートした。反応進度を、最初の4時間の間はアリコートを30分間隔で分析することにより計測した。アリコートを、次いで、20時間の時点で除去し、SDS-PAGEに供した。PEG化の程度を、1.5、2.5および3.5時間の時点で1mLを除去することにより判定し、

30

【0467】

10U/Lのシアリダーゼを含有する反応条件について、相当量の因子VIIa-SAP-EG生成物は形成されなかった。1U/Lのシアリダーゼを含有する反応条件について、反応混合物中の因子VIIaの約17.6%が、1.5時間後、モノまたはジPEG化のいずれかであった。これが、2.5時間後には29%に、および3.5時間後には40.3%に増加した。0.5U/Lのシアリダーゼを含有する反応条件について、反応混合物中の因子VIIaの約44.5%が、3時間後、モノまたはジPEG化のいずれかであり、0.8%がトリPEG化以上であった。20時間後、69.4%がモノまたはジPEG化のいずれかであり、および18.3%がトリPEG化以上であった。

40

【0468】

0.1U/Lのシアリダーゼを含有する反応条件について、反応混合物中の因子VIIaの約29.6%が、3時間後、モノまたはジPEG化のいずれかであった。20時間後、71.3%がモノまたはジPEG化のいずれかであり、および15.1%がトリPEG化以上であった。

【0469】

結果が図11および図12に示されている。

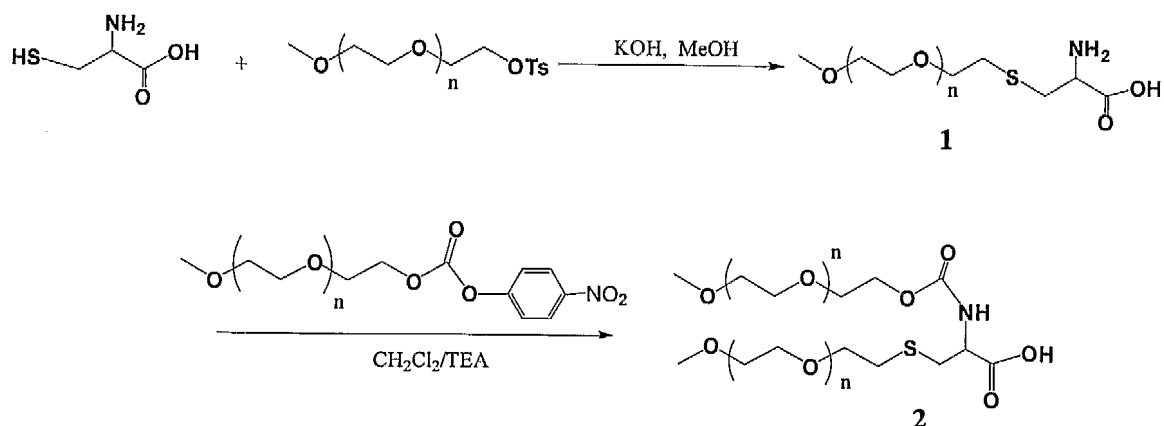
【0470】

実施例 9

システイン-PEG₂の調製 (2)

50

【化 1 5 1】



10

【0 4 7 1】

a. 化合物 1 の合成

水酸化カリウム（84.2 mg、1.5 mmol、粉末として）を、L-システイン（93.7 mg、0.75 mmol）の無水メタノール（20 L）中の溶液に、アルゴン雰囲気下で添加した。混合物を室温で30分攪拌し、次いで、分子量20キロダルトンのmPEG-O-トシレート（Ts；1.0 g、0.05 mmol）を、数回に分けて2時間かけて添加した。混合物を室温で5日間攪拌し、ロータリー蒸発により濃縮した。残渣を水（30 mL）で希釈し、および室温で2時間攪拌して、いずれかの過剰量の20キロダルトンmPEG-O-トシレートを破壊した。溶液を、次いで、酢酸で中和してpHをpH 5.0に調整し、および逆相クロマトグラフィー（C-18シリカ）カラムに充填した。カラムをメタノール／水（生成物は約70%メタノールで溶出される）の勾配で溶出し、生成物溶離を蒸発光散乱により監視し、適切な画分を採取し、水（500 mL）で希釈した。この溶液をクロマトグラフィー（イオン交換、XK50Q、ビッグ（BIG）ビーズ、300 mL、水酸化物形態；水対水／酢酸-0.75 Nの勾配）にかけ、および適切な画分のpHを酢酸で6.0に下げた。この溶液を、次いで、逆相カラム（C-18シリカ）で捕獲し、上記のメタノール／水勾配で溶出した。生成物画分をプールし、濃縮し、水中に再溶解させ、凍結乾燥させて453 mg（44%）の白色の固体（1）を得た。

20

30

【0 4 7 2】

化合物についての構造データは以下のとおりであった：¹H-NMR（500 MHz；D₂O）δ 2.83（t，2H，O-C-CH₂-S）、3.05（q，1H，S-CHH-CHN）、3.18（q，1H，（q，1H，S-CHH-CHN）、3.38（s，3H，CH₃O）、3.7（t，OCH₂CH₂O）、3.95（q，1H，CHN）。生成物の純度をSDS-PAGEにより確認した。

【0 4 7 3】

b. システイン-PEG₂（2）の合成

トリエチルアミン（約0.5 mL）を、化合物1（440 mg、22 μmol）を溶液が塩基性になるまで無水CH₂Cl₂（30 mL）に溶解させた溶液に滴下した。20キロダルトンmPEG-O-p-ニトロフェニルカーボネート（660 mg、33 μmol）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（3.6 mg、30.8 μmol）のCH₂Cl₂（20 mL）中の溶液を、数回に分けて1時間かけて室温で添加した。反応混合物を室温で24時間攪拌した。溶剤を、次いで、ロータリー蒸発により除去し、残渣を水（100 mL）中に溶解し、pHを1.0 N NaOHで9.5に調整した。塩基性溶液を室温で2時間攪拌し、次いで、酢酸でpH 7.0に中和した。溶液を、次いで、逆相クロマトグラフィー（C-18シリカ）カラムに充填した。カラムをメタノール／水（生成物は約

40

50

70%メタノールで溶出される)の勾配で溶出し、生成物溶離を蒸発光散乱により監視し、適切な画分を採取し、水(500mL)で希釈した。この溶液を、クロマトグラフィー(イオン交換、XK50Q、ビッグ(BIG)ビーズ、300mL、水酸化物形態;水対水/酢酸-0.75Nの勾配)にかけ、適切な画分のpHを酢酸で6.0に下げた。この溶液を、次いで、逆相カラム(C-18シリカ)で捕獲し、上記のメタノール/水の勾配で溶出した。生成物画分をプールし、濃縮し、水中に再溶解し、凍結乾燥して575mg(70%)の白色の固体(2)を得た。

【0474】

化合物についての構造データは以下のとおりであった： $^1\text{H-NMR}$ (500MHz; D_2O) δ 2.83 (t, 2H, O-C-CH₂-S)、2.95 (t, 2H, O-C-CH₂-S)、3.12 (q, 1H, S-CHH-CHN)、3.39 (s, 3HCH₃O)、3.71 (t, OCH₂CH₂O)。生成物の純度をSDS PAGEにより確認した。

【0475】

実施例10

因子V I I a-S A-P E G-40K D a

因子V I I aのグリコP E G化(カップリングを伴うワンポット)。因子V I I aのグリコP E G化を、脱シアル化およびP E G化が同時に生じ、シアル酸でのカップリングが続くワンポット反応で達成した。再循環水浴により32℃に制御したジャケット付きのガラス容器中で反応を実施した。先ず、濃縮した0.2μm-ろ過因子V I I aを容器に入れ、および攪拌棒で20分間混合することにより32℃に加熱した。シアリダーゼの溶液を、4,000U/Lの濃度で、10mMヒスチジン/50mM NaCl/20mM CaCl₂、pH6.0中の乾燥粉末から形成した。一旦因子V I I aを32℃に再加熱したら、シアリダーゼを因子V I I aに添加し、および反応物をおよそ5分間混合して、混合を停止した後の均一な溶液を確保とした。脱シアル化を1.0時間、32℃で進めさせた。脱シアル化反応の最中に、CMP-S A-P E G-40K D aを10mMヒスチジン/50mM NaCl/20mM CaCl₂、pH6.0緩衝液に溶解し、および濃度を271nmでのUV吸光度により判定した。CMP-S A-P E G-40K D aが溶解した後、CMP-S A-P E G-40K D aならびにST3Gal3を反応物に添加し、反応物をおよそ15分間、攪拌棒で攪拌して均一な溶液を確保とした。緩衝液の85mLの追加の量を添加して、反応を1.0Lとした。反応物を、CMP-S Aを4.3mMの濃度に添加して反応物をクエンチし、残った末端ガラクトース残基をシアル酸でカップする前に攪拌せずに24時間進行させた。クエンチを30分間32℃で混合しながら進行させた。反応物の総体積はクエンチ前は1.0Lであった。0、4.5、7.5、および24時間での時点のサンプル(1mL)を得、CMP-S Aでクエンチし、およびRP-HPLCおよびSDS PAGEにより分析した。

【0476】

因子V I I a-S A-P E G-40K D aの精製。カップリングの後、溶液を、一晚4℃で保管しておいた2.0Lの10mMヒスチジン、pH6.0で希釈し、サンプルを、0.2μmミリパック(Millipak)60フィルタを通してろ過した。得られた充填量は3.1Lであった。AEX2クロマトグラフィーを、20~25℃(周囲室温で、アクタパイロット(Akta Pilot)システムで実施した。充填後、平衡緩衝液での10カラム体積洗浄を実施し、生成物をカラムからMgCl₂の10カラム体積勾配を用いて溶出し、未P E G化因子V I I aからのP E G化-因子V I I a種の分離をもたらした。このカラムについての充填物は、意図的に低く維持した、標的指向化<2mg因子V I I a/mL樹脂であった。選択された画分および画分のプールのRP-HPLC分析に追加してSDS PAGEゲルをバルク生成物のプールを形成するために行った。プールした画分のpHを1M NaOHで6.0に調整し、2~8℃の低温室で一晚保管した。

【0477】

10

20

30

40

50

最終濃度／ダイアフィルトレーション、無菌ろ過およびアリコート化。プールした画分を、ミリパック（Millipack）20 0.2 μ m フィルタを通してろ過し、2～8℃で一晩保管した。濃度／ダイアフィルトレーションを実施するために、ミリポア（Millipore）0.1 μ m 30 KDa 再生セルロースメンブランを、ぜん動ポンプおよびシリコンチューブを備えたシステム中に用いた。システムを組み立て、水でフラッシュし、次いで、0.1 M NaOH で少なくとも1時間殺菌し、次いで、0.1 M NaOH 中に、10 mM ヒスチジン／5 mM CaCl_2 ／100 mM NaCl pH 6.0 ダイアフィルトレーション緩衝液と平衡化させて使用する直前まで保管した。生成物を、およそ400 mL に濃縮し、次いで、およそ5ダイアボリュウム（diavolume）の一定体積の緩衝液で膜分離した。生成物を、次いで、およそ300 mL に濃縮し、5分間の低圧再循環の後に回収し、および5分間再循環させることにより、メンブランを200 mL のダイアフィルトレーション緩衝液ですすいだ。洗浄物を生成物と共に回収し、他の50 mL の緩衝液を、さらなる5分間最終の洗浄のために再循環させた。得られたバルクはおよそ510 mL であり、これを、0.2 μ m PES メンブラン（ミリポア（Millipore））を備える1 L 真空フィルタを通してろ過した。無菌的にろ過したバルクを、次いで、50 mL 無菌ファルコンチューブ中に25 mL アリコートで分取し、および－80℃で凍結した。

【0478】

【表1】

HPLC による PEG 化反応の分析(実施例 10)

	複合化反応時間				精製
	0 時間	4.5 時間	7.5 時間	24 時間	クロマト グラフィー後
%未ペグ化	94.7	76.1	66.6	51.0	0.6
%モノペグ化	0.9	17.9	26.1	39.1	85.6
%ジペグ化	0.1	0.9	1.9	5.1	5.1
%トリペグ化	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2

【0479】

24 時間後、バルク生成物 PEG－状態分布は：0.7 % 未ペグ化、85.3 % モノペグ化、11.5 % ジペグ化、および0.3 % トリペグ化であった。カラムクロマトグラフィーは、主に未ペグ化材料をモノーおよびジペグ化種から除去することによる、生成物分布を生成するプロセスにおけるメインステップである。

【0480】

実施例 11

因子 V I I a－S A－P E G－10 K D a

以下の実施例は、因子 V I I a－S A－P E G－10 K D a の軽および重鎖への修飾糖質結合の数を逆相 H P L C により測定する手法を説明する。

【0481】

因子 V I I a－S A－P E G－10 K D a を、重鎖を軽鎖から分離するために還元条件下に供した。分離の後、重鎖および軽鎖を、分離逆相 H P L C 実験に供した。未変性因子 V I I a 対照のクロマトグラムにおける非修飾因子 V I I a ピークと相対的にそれらの位置を基準にしてピークを特定した。

【0482】

以下の表は、軽鎖についての H P L C 溶剤勾配パラメータを説明する。カラム温度は39℃であった。

【0483】

【表 2】

HPLC 軽鎖溶剤勾配パラメータ

時間、分	溶剤 B、%	流速、mL/分	コメント
0	30	0.5	初期条件
60	47	0.5	勾配溶出
60.2	90	0.5	洗浄開始
70	90	0.5	洗浄

10

【0484】

軽鎖因子 V I I a - S A - P E G - 1 0 K D a (上) および未変性軽鎖因子 V I I a (下) のクロマトグラムが図 1 4 A に提供されている。

【0485】

以下の表は、重鎖についての H P L C 溶剤勾配パラメータを記載する。カラム温度は 5 2 °C であった。

【0486】

【表 3】

HPLC 重鎖溶剤勾配パラメータ

時間、分	溶剤 B、%	流速、mL/分	コメント
0	42.5	0.5	初期条件
36	52.5	0.5	勾配溶出
36.1	90	0.5	洗浄開始
41	90	0.5	洗浄

20

【0487】

重鎖因子 V I I a - S A - P E G - 1 0 K D a (上) および未変性重鎖因子 V I I a (下) のクロマトグラムが図 1 4 B に提供されている。

30

【0488】

実施例 1 2

因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a

以下の実施例は、因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a の軽および重鎖への修飾糖質結合の数を逆相 H P L C により判定する手法を記載する。

【0489】

因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a を、重鎖を軽鎖から分離するために、還元条件に供した。分離の後、重鎖および軽鎖を、分離逆相 H P L C 実験に供した。未変性因子 V I I a 対照のクロマトグラムにおける非修飾糖質ピークと相対的にそれらの位置を基準にしてピークを特定した。

40

【0490】

以下の表は、軽鎖についての H P L C 溶剤勾配パラメータを記載する。カラム温度は 2 5 °C であった。

【0491】

【表 4】

HPLC 軽鎖溶剤勾配パラメータ

時間(分)	溶剤 B、%	コメント
0	30	初期条件
60	47	勾配溶出
60.5	90	洗浄開始
65.5	90	洗浄終了
66	42.5	重鎖法平衡の開始
70	42.5	操作の終了

10

【0492】

軽鎖因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a (下) および未変性軽鎖因子 V I I a (上) のクロマトグラムが図 1 5 A に提供されている。

20

【0493】

以下の表は、重鎖についての H P L C 溶剤勾配パラメータを記載する。カラム温度は 4 0 °C であった。

【0494】

【表 5】

HPLC 重鎖溶剤勾配パラメータ

時間(分)	溶出液 B(%)	コメント
0	42.5	初期条件
36	52.5	勾配溶出
36.5	90	洗浄開始
41.5	90	洗浄終了
42	30	軽鎖法平衡の開始
47	30	操作の終了

30

【0495】

重鎖因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a (下) および未変性重鎖因子 V I I a (上) のクロマトグラムが図 1 5 B に提供されている。

40

【0496】

本願明細書に記載の実施例および実施形態は、例示的目的のみのためであり、それらを考慮にいった種々の改良または変更は当業者に示唆されていることとなり、およびこれらは本出願の思想および範囲および添付の特許請求の範囲の範囲内に包含されるべきであることが理解される。本願明細書に引用したすべての公報、特許、および特許出願は、すべての目的について参照によりそれらの全体が援用される。

【図面の簡単な説明】

【0497】

50

図面の簡単な説明

【図 1】本発明の実施において有用である例示的な修飾シアル酸ヌクレオチドを示す。A. 例示的な分岐（例えば、30 KDa、40 KDa）CMP-シアル酸-PEG糖質ヌクレオチドの構造。B. 直鎖因子VIIa-SA-PEG-10 KDaの構造。

【図 2】本発明の複合体の調製において用いられる例示的なPEG-グリコシルリンク基前駆体（修飾糖質）を産生する合成スキームである。

【図 3】例えば、ペプチドを修飾シアル酸でグリコPEG化するために、本発明の複合糖質の形成において用いられる、例示的なシアリルトランスフェラーゼを提供する表である。

【図 4】図 4A～4Eを含み、因子VIIおよび因子VIIa上のグリカン構造をリモデリングするための例示的なスキームを規定する。図 4Aは、リモデリングのために想定されたグリカンに結合する残基を示す因子VIIおよび因子VIIaペプチドを表す図である。図 4Bは、リモデリングのために想定されたグリカンに結合する残基を示す因子VIIおよび因子VIIaペプチドA（中実線）およびB（点線）、およびグリカンについての式を表す図である。図 4C～4Eは、図 4Bにおけるペプチドのグリカンの、ペプチドが発現される細胞のタイプおよび所望の再構築されるグリカン構造に基づく想定されるリモデリングステップの図である。

【図 5】図 5Aおよび5Bを含み、例示的なヌクレオチドであり、および因子VIIaの対応するアミノ酸配列（それぞれ、配列番号1および2）である。

【図 6】アシアロー因子VIIaの等電電気泳動ゲル（pH 3～7）のイメージである。レーン1は因子VIIa；レーン2～5はアシアロー因子VIIaである。

【図 7】因子VIIaのMALDIスペクトラムのグラフである。

【図 8】因子VIIa-SA-PEG-1 KDaのMALDIスペクトラムのグラフである。

【図 9】因子VIIa-SA-PEG-10 KDaのMALDIスペクトラムを表すグラフである。

【図 10】PEG化因子VIIaのSDS-PAGEゲルのイメージである。レーン1はアシアロー因子VIIaである。レーン2は、アシアロー因子VIIaおよびCMP-SA-PEG-1 KDaのST3Gal3との反応の48時間後の生成物である。レーン3は、アシアロー因子VIIaおよびCMP-SA-PEG-1 KDaのST3Gal3との反応の48時間後の生成物である。レーン4は、アシアロー因子VIIaおよびCMP-SA-PEG-10 KDaのST3Gal3との反応の96時間での生成物である。

【図 11】図 11A～Bは、少量のシアリダーゼ、での同時脱シアル化およびPEG化を示す。これらの図は、シアリダーゼの存在下でのキャッピングが有効であることを強調する。図 11Aは、シアリダーゼが0.5 U/Lのレベルのときの反応経路を示す。レーン1は、未変性因子VIIaに対応し、一方で、レーン2はアシアロ因子VIIaに対応する。レーン3～レーン7では、時間の経過に伴ってPEG化生成物の量が増加している。レーン3において、主生成物はモノPEG化されており（64でのスポットを参照のこと）、一方で、後にアッセイされたアリコートは、ジ（97直下のスポットを参照のこと）、トリ（97直上のスポットを参照のこと）、およびより高級PEG化生成物の形成および量の増加を示す。レーン8および9は、反応への「キャッピング」、またはシアル酸付加の結果を示す。反応がキャップされる場合、レーン5、8および9に見出される同様のPEG化生成物分布からも見ることが可能であるとおり、反応の程度が停止する。図 11Bは、シアリダーゼが0.1 U/Lのレベルのときの反応経路を示す。

【図 12】図 12Aは、シアリダーゼおよびグリコシルトランスフェラーゼが同時に添加される状況を示す。図 12Bは、シアリダーゼが先ず添加され、続いてグリコシルトランスフェラーゼが30分後に添加される状況を示す。

【図 13】本発明のペプチド複合体を提供するために、一つ以上のグリコシルリンク基が結合されることが可能であるペプチドの表である。

【図 14】図 14AおよびBは、HPLC実験の結果を示すクロマトグラムを表す。図 1

10

20

30

40

50

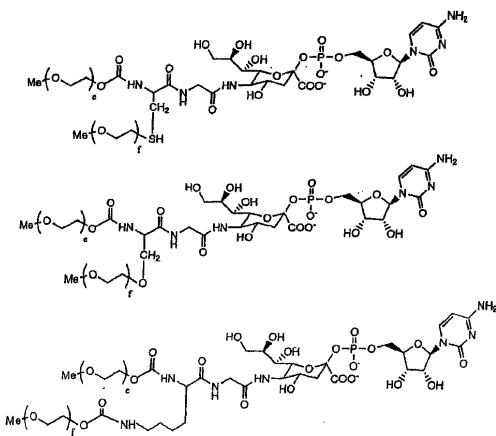
4 A は、軽鎖方法により分析された、因子 V I I a - S A - P E G - 1 0 K D a (上) および未変性因子 V I I a 対照 (下) の標識化クロマトグラムを表す。L C (軽鎖)、 $1 \times 10 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{L C}$ 、 $2 \times 10 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{L C}$ 、および $3 \times 10 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{L C}$ の他の生成物からの分離が示されている。図 1 4 B は、重鎖方法により分析された因子 V I I a - S A - P E G - 1 0 K D a (上) および未変性因子 V I I a 対照 (下) の標識化クロマトグラムを表す。H C (重鎖)、 $1 \times 10 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{H C}$ 、 $2 \times 10 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{H C}$ 、および $3 \times 10 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{H C}$ の他の生成物からの分離が示されている。

【図 1 5】図 1 5 A および B は、H P L C 実験の結果を示すクロマトグラムを表す。図 1 5 A は、軽鎖方法によって分析された還元未変性因子 V I I a 対照 (上) および還元因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a (下) の標識化クロマトグラムを表す。L C (軽鎖)、 $1 \times 40 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{L C}$ 、 $2 \times 40 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{L C}$ 、および $3 \times 40 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{L C}$ の他の生成物からの分離が示されている。図 1 5 B は、重鎖方法により分析された還元未変性因子 V I I a 対照 (上) および因子 V I I a - S A - P E G - 4 0 K D a (下) の標識化クロマトグラムを表す。H C (重鎖)、 $1 \times 40 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{H C}$ 、 $2 \times 40 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{H C}$ 、および $3 \times 40 \text{ K D a} - \text{P E G} - \text{H C}$ の他の生成物からの分離が示されている。

10

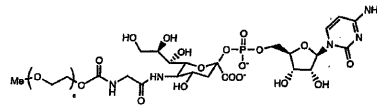
【図 1 A】

FIGURE 1A

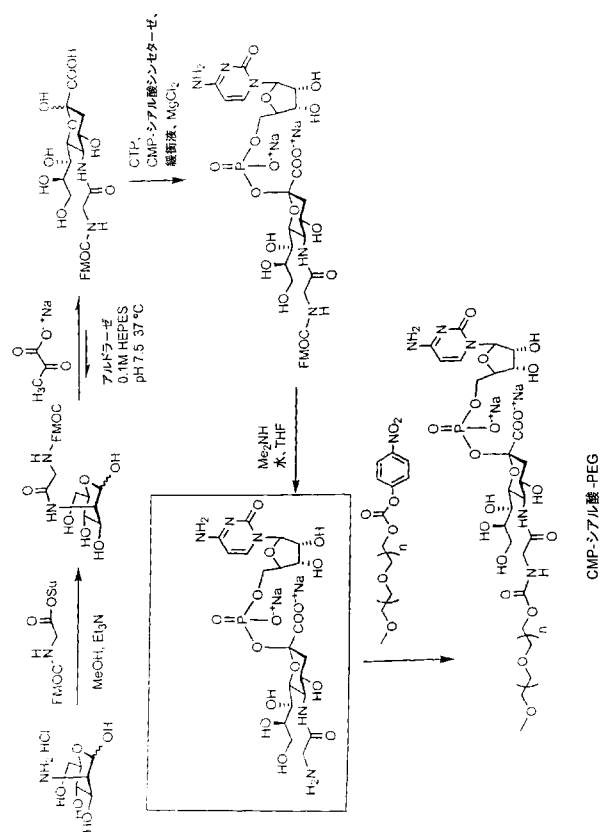


【図 1 B】

FIGURE 1B



【図 2】



【図 3 A】

図 3A

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt PDB / 3D
At1g08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011438 AAF18241.1 BT004583 AAO4282.1 NC_003070 NP_172355.1	Q84W00 Q9SGD2
At1g08660/F22013.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC020381 AAF59776.1 AY064135 AAL36042.1 AY124807 AAM70516.1 NC_003070 NP_172342.1 NM_180509 NP_850940.1	Q9VZ10 Q9FRF9
At3g48020/T2118.90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY060559 AAL5586.1 AY153816 AAM51750.1 AL132963 CAB87910.1 NM_114741 NP_194551.1	Q8RY09 Q9K3D1
α-2,3-sialyltransferase (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768 CAE51392.1	
α-2,3-sialyltransferase (ST3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620651 CAF05850.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.6	AJ699418 CAG27880.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421 CAG27883.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704563 CAG28696.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-VI)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 CAA73505.1 NM_177517 NP_803483.1	O18874
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-VII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450089 AAL47018.1	Q9WN13
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-VIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748041 CAG44450.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-IX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842 CAG44451.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-X)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843 CAG44452.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748844 CAG44453.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748845 CAG44454.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748846 CAG44455.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748847 CAG44456.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748848 CAG44457.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748849 CAG44458.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748850 CAG44459.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748851 CAG44460.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748852 CAG44461.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748853 CAG44462.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748854 CAG44463.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748855 CAG44464.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748856 CAG44465.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748857 CAG44466.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748858 CAG44467.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748859 CAG44468.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748860 CAG44469.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748861 CAG44470.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748862 CAG44471.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748863 CAG44472.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748864 CAG44473.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748865 CAG44474.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748866 CAG44475.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748867 CAG44476.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748868 CAG44477.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748869 CAG44478.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748870 CAG44479.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748871 CAG44480.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748872 CAG44481.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748873 CAG44482.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748874 CAG44483.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748875 CAG44484.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748876 CAG44485.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748877 CAG44486.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748878 CAG44487.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748879 CAG44488.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748880 CAG44489.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748881 CAG44490.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748882 CAG44491.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748883 CAG44492.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748884 CAG44493.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748885 CAG44494.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748886 CAG44495.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748887 CAG44496.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748888 CAG44497.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748889 CAG44498.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748890 CAG44499.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748891 CAG44500.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748892 CAG44501.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748893 CAG44502.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748894 CAG44503.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748895 CAG44504.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748896 CAG44505.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748897 CAG44506.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748898 CAG44507.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748899 CAG44508.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748900 CAG44509.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748901 CAG44510.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748902 CAG44511.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748903 CAG44512.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748904 CAG44513.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748905 CAG44514.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748906 CAG44515.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748907 CAG44516.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748908 CAG44517.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748909 CAG44518.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748910 CAG44519.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748911 CAG44520.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748912 CAG44521.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748913 CAG44522.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748914 CAG44523.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748915 CAG44524.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748916 CAG44525.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748917 CAG44526.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748918 CAG44527.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748919 CAG44528.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748920 CAG44529.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748921 CAG44530.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748922 CAG44531.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748923 CAG44532.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748924 CAG44533.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748925 CAG44534.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748926 CAG44535.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748927 CAG44536.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748928 CAG44537.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748929 CAG44538.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748930 CAG44539.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748931 CAG44540.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748932 CAG44541.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748933 CAG44542.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748934 CAG44543.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748935 CAG44544.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748936 CAG44545.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748937 CAG44546.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748938 CAG44547.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748939 CAG44548.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748940 CAG44549.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748941 CAG44550.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748942 CAG44551.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748943 CAG44552.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748944 CAG44553.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748945 CAG44554.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748946 CAG44555.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748947 CAG44556.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748948 CAG44557.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748949 CAG44558.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748950 CAG44559.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748951 CAG44560.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748952 CAG44561.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748953 CAG44562.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748954 CAG44563.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748955 CAG44564.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748956 CAG44565.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748957 CAG44566.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748958 CAG44567.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748959 CAG44568.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748960 CAG44569.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748961 CAG44570.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748962 CAG44571.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748963 CAG44572.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748964 CAG44573.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748965 CAG44574.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748966 CAG44575.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748967 CAG44576.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748968 CAG44577.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748969 CAG44578.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748970 CAG44579.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748971 CAG44580.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748972 CAG44581.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748973 CAG44582.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748974 CAG44583.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748975 CAG44584.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748976 CAG44585.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748977 CAG44586.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748978 CAG44587.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748979 CAG44588.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748980 CAG44589.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748981 CAG44590.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748982 CAG44591.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748983 CAG44592.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748984 CAG44593.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748985 CAG44594.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748986 CAG44595.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748987 CAG44596.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748988 CAG44597.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748989 CAG44598.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748990 CAG44599.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748991 CAG44600.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXVIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748992 CAG44601.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIX)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748993 CAG44602.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXI)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748994 CAG44603.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748995 CAG44604.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIII)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748996 CAG44605.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXIV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748997 CAG44606.1	
α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal-XXXXXXXV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748998 CAG44607.1	

【図 3 E】

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,8-polysialyltransferase ST8Sia IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	NM_018414 L41680 BC027866 S035657 NM_025668	NP_068854 AAAC41775.1 AAH27866.1 AAH53697.1 NP_065593.1	Q8N1F4 Q82187 Q82593 Q82593.1
α -2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) ST8Sia I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.8	L32867 L43494 BC046158 AY560975 D26360 X77922 NM_003034	AAAR2366.1 AAH46158.1 AAQ53140.1 AAS75763.1 BAQ05391.1 CAA54891.1 NP_003025.1	Q8X7X1 Q92185 Q83064
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 UR2762 XJ3551 BC069584 NM_006011	AAAC36613.1 AAE57242.1 AAAC24558.1 AAH65584.1 NP_060021.1	Q82196 Q92470 Q82746
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia III	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF004668 AF030392 NM_015579	AAAB87642.1 AAC15901.2 NP_080693.1	Q43173 Q9NS41
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U91641 CR457037 NM_013305	AAAC51727.1 CAG33318.1 NP_037437.1	Q15466
ENSP0000020221 (断片)		n.d.	AC023295	-	
lactosylceramide-2,3-sialyltransferase (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	AF105028 AF119415 BC065936 AY152815 AAF65086 AY359105 AB018356 AX876536 NM_003896	AAAD14634.1 AAF66146.1 AAH65936.1 AAO16866.1 AAF65086.1 AAQ89463.1 BAQ33501.1 CAE8320.1 NP_003887.2	Q8UNP4 Q94902
<i>N</i> -acetylgalactosaminide- α -2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc VI)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	BC006864 BC007802 BC016239 AY358672 AB035173 AK023900 J14507293 AX880950 CR457318 NM_013443	AAAH0564.1 AAH7802.1 BAE1539.1 AAQ89035.1 BAAB7035.1 BAB14715.1 CAD45373.1 CAE91145.1 CAG33599.1 NP_038471.2	Q989X2 Q9H5A2 Q9JLB8
<i>N</i> -acetylgalactosaminide- α -2,6-sialyltransferase IV (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 BC036705 AB035172 Y17461 AJ271734 AX061620 AX068265 AX968252 NM_014403 NM_175039	AAF00102.1 AAH36705.1 AAH63349.1 BAAB7034.1 BAA91281.1 CAB44354.1 CAC07404.1 CAC24981.1 CAC27250.1 CAF14360.1 NP_055218.3 NP_778204.1	Q9H4F1 Q9NWU6 Q8UKU1 Q9JLB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4
ST8Sia-VI (断片)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ621583 XM_281725 AK021922	CAF21722.1 NP_293722.1 BAB13840.1	
無名タンパク質産生体	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AX881696	CAE91353.1	Q9HAA9
Gal β -1,3-GlcNAc- α -2,6-Sialyltransferase	<i>Mesocricetus</i>	2.4.99.6	AB245699	BAAS3394.1	Q9OXF6

【 図 3 G 】

タンパク質		生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB
α -2.6-sialyltransferase ST6GalNAc IV	ST6galnac4	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	NM_011372/ NP_035502 BC070645 / AA068451 AC008570 / BAC395231 AJ007310 / CAA07446.1 Y15779 / CAB43507.1 Y15780 / CAB43514.1 Y19555 / CAB39345.1 Y19057 / CAB93948.1 NM_011373/ NP_035503.1	Q6C3J2 Q9JHP2 Q9R2B6 Q68725 Q9JHP0 Q9JUP9 Q9R2B5
α -2.8-sialyltransferase (GD3 synthase) ST8 Sia I	ST8sia1	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L36577 / AA091869.1 BC023482 / AA048421.1 AC046188 / BAC32295.1 AC052444 / BAC34994.1 BA8235 / CAA59014.1 AJ401102 / CAC27005.1 NM_011374/ NP_035504.1	Q64468 Q64687 Q8BL76 Q8BW10 Q8K1C1 Q9EPK0
α -2.8-sialyltransferase (ST8Sia VI)	ST8sia6	n.d.	n.d.	AB059554 / BAC01265.1 AC085105 / BAC39367.1 NM_145838/ NP_656837.1	Q8BI43 Q8K4T1
α -2.8-sialyltransferase ST8Sia II	ST8sia2	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	X83562 / CAA85648.8 X9646 / CAA67895.1 X9647 / CAA67955.1 X9648 / CAA67955.1 X9649 / CAA67965.1 X9650 / CAA67965.1 X9651 / CAA67965.1 NM_009181/ NP_033207.1	Q35696
α -2.8-sialyltransferase ST8Sia IV	ST8sia4	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 / AAH60112.1 AK003890 / BAB22941.1 AK011723 / BAC2104.1 AJ23956 / AA11685.1 X88000 / CAA59892.1 Y09484 / CAA70692.1 NM_009183/ NP_033209.1	Q64692 Q8BY70
α -2.8-sialyltransferase ST8Sia V	ST8sia5	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC034955 / AAH34855.1 AK078970 / BAC37354.1 X98014 / CAA66642.1 X98014 / CAA66643.1 X98014 / CAA66654.1 NM_013666/ NP_036934.1 NM_153124/ NP_694764.1 NM_177416/ NP_802135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3
α -2.8-sialyltransferase ST8Sia III	ST8sia3	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC075645 / AAH75645.1 AC015674 / BAC30012.1 X80502 / CAA56665.1 NM_009182/ NP_033208.1	Q64689 Q9CJU6
GD1 synthase (ST6GalNAc V)	ST6galnac5	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BC005737 / AAH55737.1 AB030836 / BAA05747.1 AB028840 / BAA65292.1 AK034387 / BAC28693.1 AK038434 / BAC29997.1 AK042683 / BAC31133.1 NM_012028/ NP_036198.2	Q8CAM7 Q8C5X1 Q9DYJ1 Q9R0K6
GM3 synthase (α -2.3- sialyltransferase) ST3Gal V	ST3gal5	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119416 / AAF66147.1 AB018048 / AAF65063.1 AB013302 / BAA33491.1 AK012961 / BAA74667.1 Y15003 / BAB28571.1 NM_011375/ NP_035505.1	Q58829 Q9C265 Q9QWF9
N- acetylglactosaminidase- 2.6-sialyltransferase (ST6GalNAc VI)	ST6galnac6	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC036985 / AAH36985.1 AB035174 / BAA67038.1 AB035123 / BAA65940.1 AC030948 / CAA27004.1	Q8CD33 Q8JZV3 Q9JUP5 Q9R0G9

【図 3 H】

図 3H

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	NM_016973/ NP_058689.1 U426578 AF170726 NC_001132 AAE61323.1 AAE61326.1 AAF15026.1 NP_051852.1 CAE51364.1	
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ585760	
α -2,6-sialyltransferase (Siat1)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAF05848.1
α -2,8-poly-sialyltransferase IV (ST8Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402	BAC77471.1 Q772X5
α -2,6-GalNAc α -2,6-sialyltransferase (RTST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	BAC77520.1 Q7T2X4
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.4.99.-	AF121967	AAF28871.1 Q9N257
OJ1217_F02 7	<i>Oryza sativa</i> (ジャポニカ種群)	n.d.	AP004084	BAD07616.1
OSJNB0043L24.2 中14	<i>Oryza sativa</i> (ジャポニカ種群)	n.d.	AL731626 AL562969	CAD41165.1 CAE04714.1
OSJNB0002J11.9	<i>Oryza sativa</i> (ジャポニカ種群)	n.d.	AP003289 AP003794	BAB83715.1 BAB90552.1
P04893/02.18 中14	<i>Oryza sativa</i> (ジャポニカ種群)	n.d.	AP003289 AP003794	BAB83715.1 BAB90552.1
P0489B03.1	<i>Oryza sativa</i> (ジャポニカ種群)	n.d.	AP003289 AP003794	BAB83715.1 BAB90552.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (断片)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ646876	CAG26705.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804	CAG32840.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626819	CAF25177.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824	CAF25182.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal VI (Siat10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744808	CAG32844.1
α -2,6-sialyltransferase (Siat7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38615.1
α -2,6-sialyltransferase (Siat7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (断片)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870	CAG26699.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875	CAG26704.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (断片)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1
α -2,8-sialyltransferase 8A (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ697658	CAG26896.1
α -2,8-sialyltransferase 8B (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1
α -2,8-sialyltransferase 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1
α -2,8-sialyltransferase 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1
α -2,8-sialyltransferase	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1

【図 3 J】

図 3J

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
sialyltransferase ST3Gal I (Siat4A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ748840	CAG44449.1
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-II)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763	CAE51387.1
α -2,6-sialyltransferase (Siat7b)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650	CAF05849.1
α -2,6-sialyltransferase (ST6Galnac)	<i>Stromylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ699425	CAG27887.1
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-III)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ585765	CAE51389.1
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ584674	CAE48299.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753	AAA31125.1 Q02745
α -2,6-sialyltransferase (断片) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136746	AAD33059.1 Q9XSG6
β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc-V)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.2
α -2,6-sialyltransferase (断片) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AF041031	AAC15633.1 Q62717
ST6GALNAC-V	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.1
α -2,3-sialyltransferase (Siat5-I)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744805	CAG32841.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAF25174.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal II (Siat5) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817	CAF25175.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAF25176.1
α -2,6-sialyltransferase ST6Gal I (Siat1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744800	CAG32836.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II B (Siat7E-断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc III (Siat7C) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456	CAG25678.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466 AJ646869	CAB44338.1 CAG26698.1 Q9W6U6
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873	CAG26702.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia I (Siat 8A) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia II (Siat 8B) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538	CAG29377.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia III (Siat 8C) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia IIIr (Siat 8Cr) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1
α -2,8-sialyltransferase ST6Sia V (Siat 8E)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29386.1

【図 3 I】

図 3I

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
8E (Siat8E)				
α -2,8-sialyltransferase 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697663	CAG26901.1
β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase I (ST6Gal I, Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624	CAF29492.1
β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625	CAF29493.1
GM3 synthase ST3Gal V (Siat9)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744807	CAG32843.1
S138L	<i>Rabbit fibroma virus Kasza</i>	n.d.	NC_001266	NP_052025
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 NM_031697	AAA42146.1 NP_113885.1 Q02734
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825	CAF25183.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743	CAF25053.1
α -2,6-sialyltransferase ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	X76988 NM_031695	CAA54293.1 NP_113883.1 Q11205
α -2,6-sialyltransferase ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18769 M83143	AAAA1156.1 AAB07233.1 P13721
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc I (Siat7A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458	CAG25684.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457	CAG25679.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L29554 BC072501 NM_019123	AAC42086.1 AAH72501.1 NP_061996.1 Q64686
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (断片)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871	CAG26700.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872	CAG26701.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (断片)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881	CAG26710.1
α -2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) ST8Sia	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U53883 D45255	AAC27541.1 BAA08213.1 P70554 P97713
α -2,8-sialyltransferase (Siat8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699422	CAG27884.1
α -2,8-sialyltransferase (Siat8F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423	CAG27885.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 NM_057156	AAA42147.1 NP_476497.1 Q07977 Q64688
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U55938 NM_013029	AAB50061.1 NP_037161.1 P97877
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U90215	AAB49989.1 Q08563
β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627626	CAF29494.1
GM3 synthase ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 NM_031337	BAA33492.1 NP_112627.1 Q68830

【図 3 K】

図 3K

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
(断片)				
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia VI (Siat 8F) (断片)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549	CAG29388.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia VIIr (Siat 8Fr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550	CAG29389.1
α -2,3-sialyltransferase (Siat5-I)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744806	CAG32842.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802	CAG32838.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822	CAF25180.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc I (Siat7B)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634462	CAG25683.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (断片)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879	CAG26708.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia I (Siat 8A) (断片)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536	CAG29375.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia II (Siat 8B) (断片)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537	CAG29376.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia III (Siat 8C) (断片)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539	CAG29378.1
α -2,3-sialyltransferase ST8Sia IIIr (Siat 8Cr) (断片)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540	CAG29379.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia V (Siat 8E) (断片)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715548	CAG29387.1
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-II)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585762	CAE51386.1
α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585766	CAE51390.1
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal-III (Siat6)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585764 AJ626823	CAE51388.1 CAF25181.1
α -2,8-poly-sialyltransferase	<i>Xenopus laevis</i>	2.4.99.-	AB007468	BAA52617.1 Q93234
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia-I (Siat8A, GD3 synthase)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AY272056 AY272057 AJ704562	AAQ16162.1 AAQ16163.1 CAG26895.1
不純 (MGC-81265 に含まれるタンパク質)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	BC068760	AAH68760.1
α -2,3-sialyltransferase (3Gal-VII)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ626744	CAF25054.1
α -2,3-sialyltransferase (Siat4c)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622908	CAF22058.1
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (断片)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ646878	CAG26707.1
α -2,8-sialyltransferase ST8Sia III (Siat 8C) (断片)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ715544	CAG29383.1
β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627628	CAF29496.1
sialyltransferase ST8Sia	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY652775	AAT67042
poly α -2,8-sialosyl sialyltransferase (NeuS)	<i>Escherichia coli K1</i>	2.4.-.-	M76370 X60598	AAA24213.1 CAA43053.1 Q57269
polysialyltransferase	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.-	M88479	AAZ4215.1 Q47404

【図 3 L】

図 3L

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
α -2,8-polysialyltransferase SiaD SynE	<i>Neisseria meningitidis</i> B1940	2.4.-.- M95053 X78068	AAA20478.1 CAA54985.1	Q51281 Q51145
polysialyltransferase (SiaD)(断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> FAM18	n.d. U75650	AAB53842.1	O06435
SiaD (断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M1019	n.d. AY234192	AAO85290.1	
SiaD (断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M209	n.d. AY281046	AAP34769.1	
polysialyltransferase (SiaD)(断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3045	n.d. AY234191	AAO85289.1	
SiaD (断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3315	n.d. AY281047	AAP34770.1	
polysialyltransferase (SiaD)(断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4211	n.d. AY234190	AAO85288.1	
SiaD (断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4642	n.d. AY281048	AAP34771.1	
polysialyltransferase (SiaD)(断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M5177	n.d. AY234193	AAO85291.1	
SiaD (断片)	<i>Neisseria meningitidis</i> M5178	n.d. AY281043	AAP34766.1	
NMB0067	<i>Neisseria meningitidis</i> M980	n.d. AY281045	AAP34768.1	
Lst	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	n.d. NC_003112	NP_273131	
ORF2	<i>Aeromonas punctata</i> Sch3	n.d. AF126256	AAS66624.1	
HI1699	<i>Haemophilus influenzae</i> A2	n.d. M94855	AAA24979.1	
α -2,3-sialyltransferase	<i>Neisseria meningitidis</i> F62	2.4.99.4 U60664	AAC44539.1	P72074
α -2,3-sialyltransferase	<i>Neisseria meningitidis</i> 126E, NRCC 4010	2.4.99.4 U60662	AAC44544.2	
α -2,3-sialyltransferase	<i>Neisseria meningitidis</i> 406Y, NRCC 4030	2.4.99.4 U60661	AAC44543.1	
α -2,3-sialyltransferase (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	2.4.99.4 U60660	AAC44541.1	P72097
NMA1118	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	n.d. AL162755	CA864380.1	Q9JUV5
PM0508	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d. AE006086	AAK02592.1	Q9CNC4
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB25	n.d. AF519787	AAM82550.1	Q8KS93
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB3	n.d. AF519788	AAM82551.1	Q8KS92
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB38	n.d. AF519789	AAM82552.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB53	n.d. AF519790	AAM82553.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB57	n.d. AF519791	AAM82554.1	Q8KS91
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB71	n.d. AF519793	AAM82556.1	Q8KS89
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB88	n.d. AF519792	AAM82555.1	Q8KS90

【図 3 N】

図 3N

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
sialyltransferase II (CstII)	O:4			
α -2,3(α -2,8-sialyltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:41	n.d.	-	AAO96670.1 AAT17967.1 CAF04168.1
α -2,3-sialyltransferase (cst-I)	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.- AF130466	AAF13495.1	Q9RGF1
二官能性 α -2,3-/2,8-シアルトランスフェラーゼ (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.- AF130984	AAF31771.1	1R07 1R08 C A
HI0352 (断片)	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d. U32720	AAC22013.1	P24324
PM1174	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d. X57315	CAA40567.1	Q9CLP3
米国特許第 6503744 号 明細書からの配列 10	不明	n.d.	-	AAO96672.1
米国特許第 6699705 号 明細書からの配列 10	不明	n.d.	-	AAT17969.1
米国特許第 6699705 号 明細書からの配列 12	不明	n.d.	-	AAT17970.1
米国特許第 6709834 号 明細書からの配列 2	不明	n.d.	-	AAT23232.1
米国特許第 6503744 号 明細書からの配列 3	不明	n.d.	-	AAO96668.1
米国特許第 6699705 号 明細書からの配列 3	不明	n.d.	-	AAT17965.1
米国特許第 6503744 号 明細書からの配列 34	不明	n.d.	-	AAO96684.1
米国特許第 6503744 号 明細書からの配列 35 (断片)	不明	n.d.	-	AAO96685.1
米国特許第 6699705 号 明細書からの配列 48	不明	n.d.	-	AAT17988.1
米国特許第 6699705 号 明細書からの配列 5	不明	n.d.	-	AAT17966.1
米国特許第 6503744 号 明細書からの配列 9	不明	n.d.	-	AAO96671.1

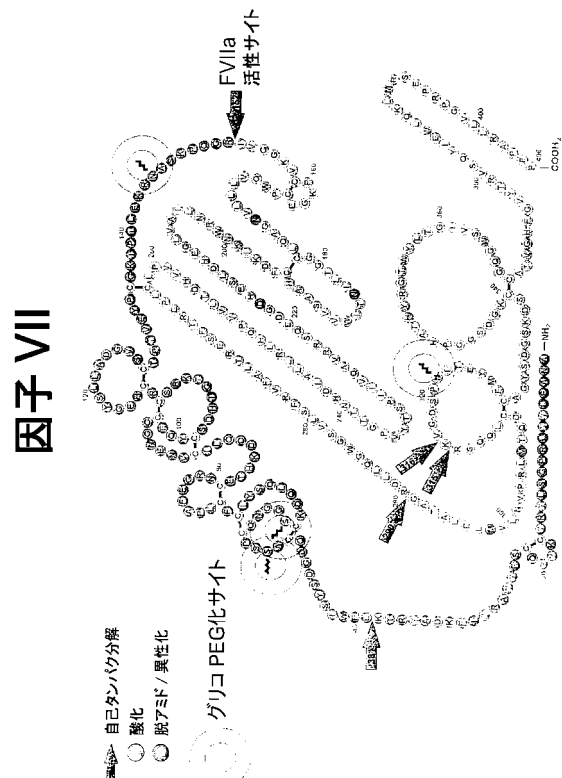
【図 3 M】

図 3M

タンパク質	生体	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC10V	n.d. AF519779	AAM88840.1	Q8KS99
WaaH (断片)	<i>Salmonella enterica</i> SARC12	n.d. AF519781	AAM88842.1	
WaaH (断片)	<i>Salmonella enterica</i> SARC13I	n.d. AF519782	AAM88843.1	Q8KS98
WaaH (断片)	<i>Salmonella enterica</i> SARC14I	n.d. AF519783	AAM88844.1	Q8KS97
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC15II	n.d. AF519784	AAM88845.1	Q8KS96
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II	n.d. AF519785	AAM88846.1	Q8KS95
WaaH (断片)	<i>Salmonella enterica</i> SARC3I	n.d. AF519772	AAM88834.1	Q8KSA4
WaaH (断片)	<i>Salmonella enterica</i> SARC4I	n.d. AF519773	AAM88835.1	Q8KSA3
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC5II	n.d. AF519774	AAM88836.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC6II	n.d. AF519775	AAM88837.1	Q8KSA2
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC8	n.d. AF519777	AAM88838.1	Q8KSA1
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC9V	n.d. AF519778	AAM88839.1	Q8KSA0
UDP-glucose α -1,2-glucosyltransferase (WaaH)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. anthoniae SARC 5	2.4.1.- AF511116	AAM88166.1	
bifunctional α -2,3-/2,8-sialyltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43449	n.d. AF401529	AAL06004.1	Q93CZ5
Cst	<i>Campylobacter jejuni</i> 81-176	n.d. AF305571	AAL09368.1	
α -2,3-sialyltransferase (Cst-I/II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43429	2.4.99.- AY044155	AAK73183.1	
α -2,3-sialyltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43430	2.4.99.- AF400047	AAK85419.1	
α -2,3-sialyltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43432	2.4.99.- AF215659	AAG43979.1	Q9F0M9
α -2,3/8-sialyltransferase (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43438	n.d. AF400048	AAK91725.1	Q93MG0
α -2,3-sialyltransferase (cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43446	2.4.99.- AF167344	AAF34137.1	
α -2,3-sialyltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43456	2.4.99.- AF401528	AAL05990.1	Q93D05
α -2,3/ α -2,8-sialyltransferase (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43460	2.4.99.- AY044868	AAK96001.1	Q938X6
α -2,3-sialyltransferase (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700297	n.d. AF216647	AAL36462.1	
ORF	<i>Campylobacter jejuni</i> GB11	n.d. AY422197	AAR82875.1	
α -2,3-sialyltransferase (cstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> MSC57360	2.4.99.- AF195055	AAG29922.1	
α -2,3-sialyltransferase (cstII) C1140	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	2.4.99.- AL139077	CAB73395.1	Q9PNF4
α -2,3/ α -2,8-sialyltransferase II (cstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:10	n.d. AX934427	AAO96669.1	
α -2,3/ α -2,8-sialyltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:19	n.d. AX934431	CAF04169.1	
α -2,3/ α -2,8-sialyltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:36	n.d. AX934436	CAF04171.1	
α -2,3/ α -2,8-sialyltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:36	n.d. AX934434	CAF04170.1	

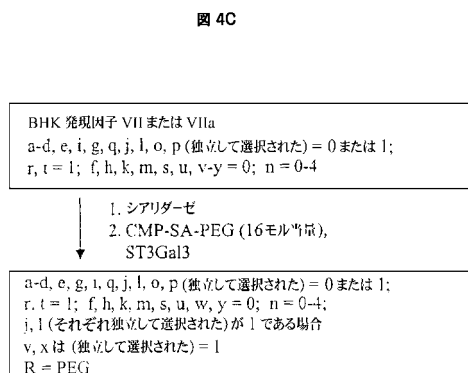
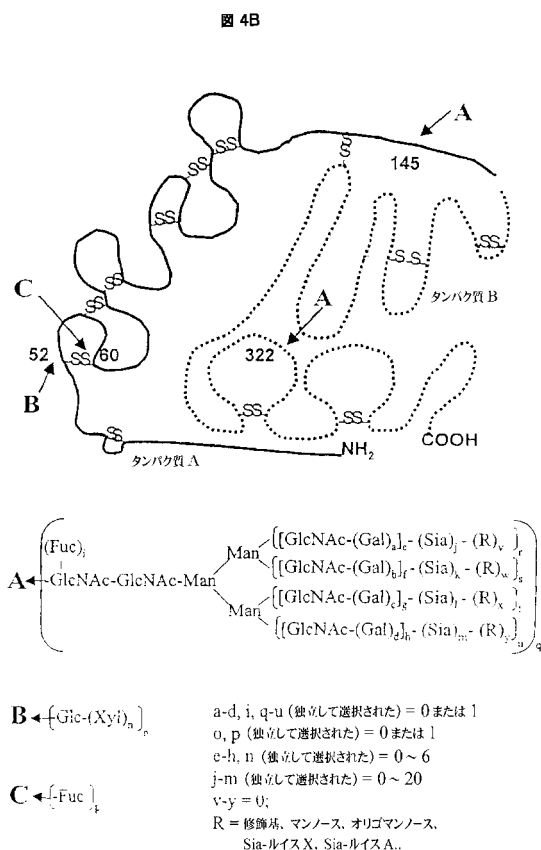
【図 4 A】

図 4A



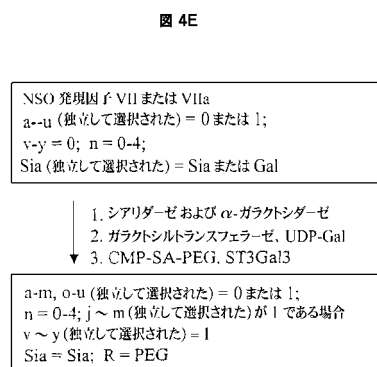
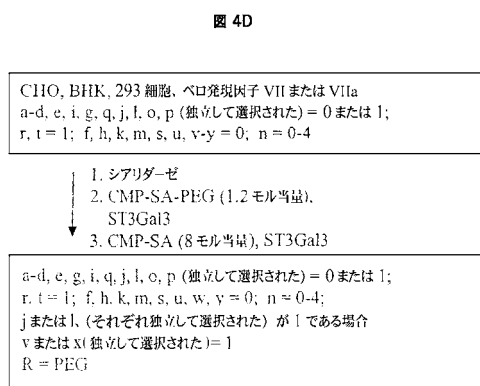
【図 4 B】

【図 4 C】



【図 4 D】

【図 4 E】



【図 5 A】

FIGURE 5A

ATGGTCTCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCAG
GGTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGT
CCTGCACCGGCGCGCGGCCAACCGCTTCTGGAGGAGCTGCGGC
CGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGTCTCTCGA
GGAGGCCCGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTC
TGGATTTCCTACAGTGATGGGACCAAGTGTGCTCAAGTCCATGCCA
GAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAAGTGTGAGACGACCAAGGATGAC
GCCTCCCTGCCTTCGAGGCGCGAACTGTGAGACGACCAAGGATGAC
CAGCTGATCTGTGTAACGAGAACGCGCGCTGTGAGCAGTACTGCAG
TGACCACACGGGACCAAGCGCTCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACT
CTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCA
TGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAGAAATGCCAGCAACCCCA
AGGCCGAATTGTGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCA
TGGCAGGTCTGTGTGTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGGGGGGAC
CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAA
AATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGAC
CTCAGCGAGCACGACGGGATGAGCAGAGCCGCGGGTGGCGCAGG
TCATCATCCCCAGCAGTACGTCCCGGGCACCAACCAACGACATC
CGCTGCTCCGCTGCACACGCGCTGTCTCACTGAGAGGACCTGGCCTTC
CCCTCTGCTGCCGAAACGAGCTTCTCTGAGAGGACCTGGCCTTC
GTGCGCTTCTCATTGGTACGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGG
CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTGTCTCAACGTGCCCGCGCTGATGA
CCAGGACTGCTGCAGCAGTACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAAT
ATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCACTACCGGG
GCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTACGTGGGGCCAGGGCTGCGCA
ACCGTGGGCCACTTGGGGGTACACACAGGGTCTCCAGTACATCGA
GTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCTCC
TGCAGGCCCATTTCCC

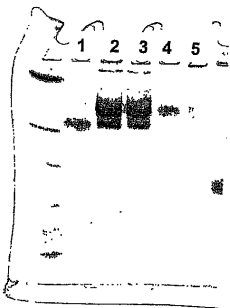
【図 5 B】

FIGURE 5B

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys
Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg
Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys
Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val
Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg
Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp
Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser
Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg
Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

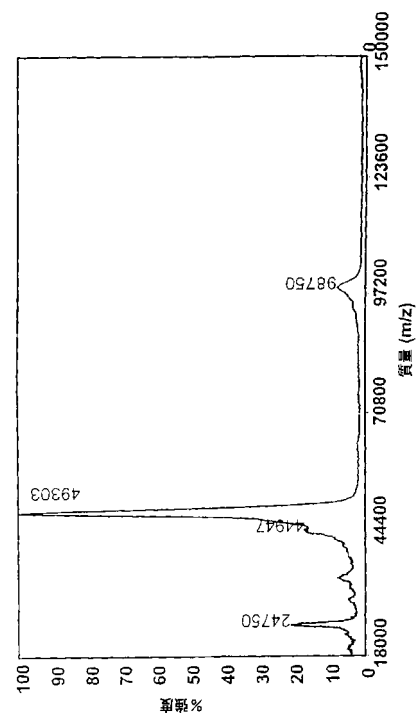
【図 6】

FIGURE 6

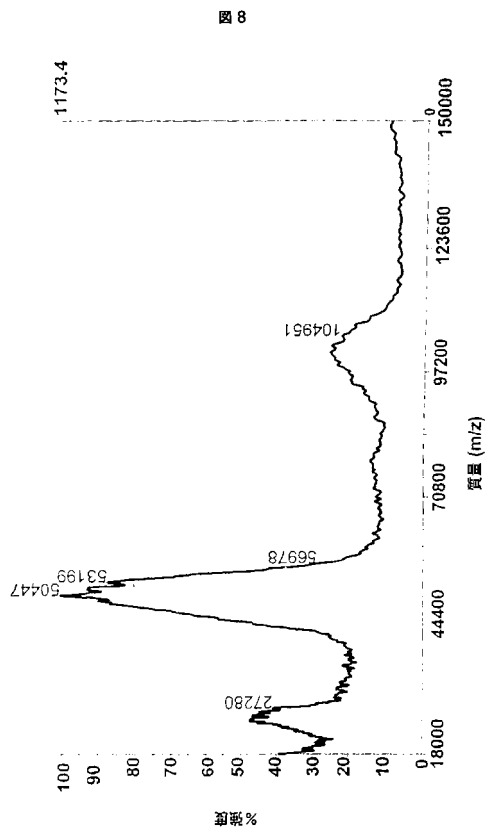


【図 7】

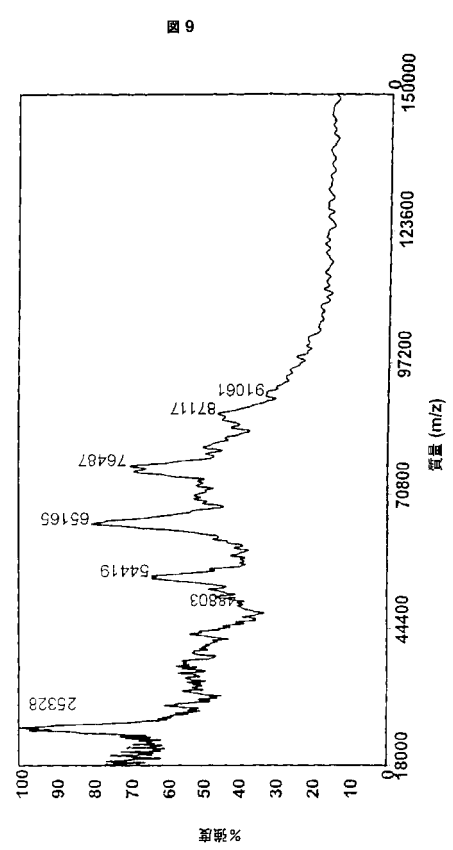
図 7



【図 8】

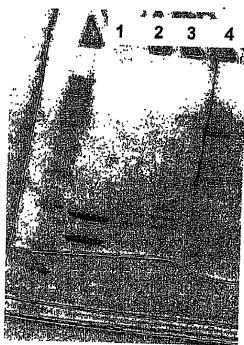


【図 9】



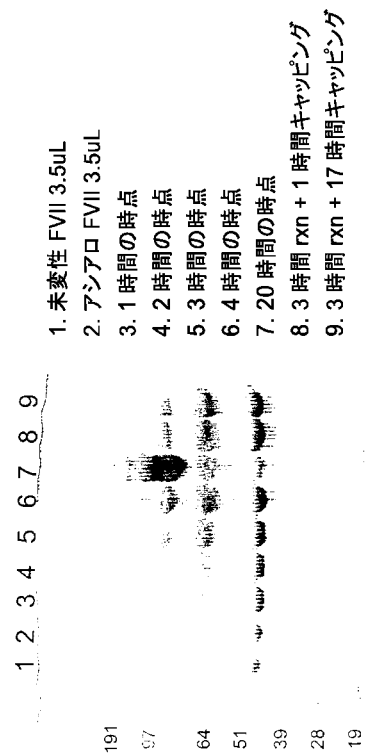
【図 10】

FIGURE 10



【図 11 A】

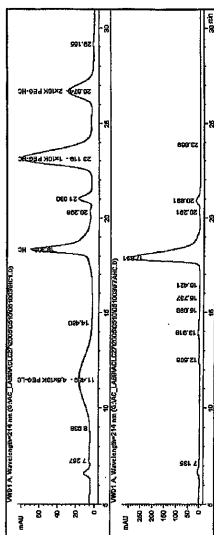
図 11A



同時脱シアル化 (0.5 U/L での) および PEG 化

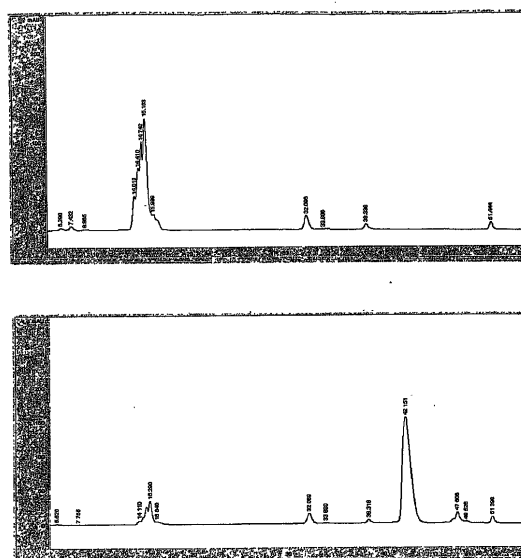
【図 14 B】

FIGURE 14B



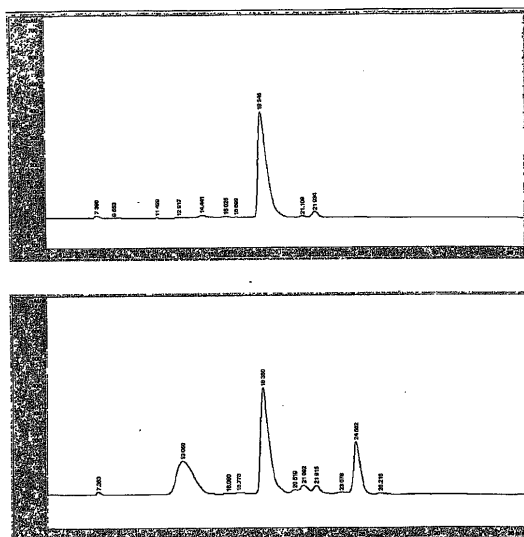
【図 15 A】

FIGURE 15A



【図 15 B】

FIGURE 15B



【図 13A】

図 13A

12AP1/E5 -- Viventia Biotech	AI-301 -- AutoImmune
1964 -- Aventis	AIDS vaccine -- ANRS, CIBG, Hersed
20K growth hormone -- AMUR	Biomed, Hollis-Eden, Rome, United
28P6/E6 -- Viventia Biotech	Biomedical, American Home Products,
3-Hydroxyphthaloyl-beta-lactoglobulin --	Maxygen
4-IBB ligand gene therapy --	airway receptor ligand -- IC Innovations
64-Cu MAb conjugate TETA-1A3 --	AJvW 2 -- Ajinomoto
Mallinckrodt Institute of Radiology	AK 30 NGF -- Alkermes
64-Cu MAb conjugate TETA-cT84.66	Albuferon -- Human Genome Sciences
64-Cu Trastuzumab TETA conjugate --	albumin -- Biogen, DSM Anti-Infectives,
Genentech	Genzyme Transgenics, PPL
A 200 -- Amgen	Therapeutics, TranXenoGen, Welfide
A10255 -- Eli Lilly	Corp.
A1PDX -- Hedral Therapeutics	aldesleukin -- Chiron
A6 -- Angstrom	alefacept -- Biogen
aaAT-III -- Genzyme	Alemtuzumab
Abciximab -- Centocor	Allergy therapy -- ALK-Abello/Maxygen,
ABI.001 -- Atlantic BioPharmaceuticals	ALK-Abello/RP Scherer
ABT-828 -- Abbott	allergy vaccines -- Allergy Therapeutics
Accutin	Alnidofibatide -- Aventis Pasteur
Actinohivin	Alnorine -- SRC VB VECTOR
activin -- Biotech Australia, Human	ALP 242 -- Gruenenthal
Therapeutics, Curis	Alpha antitrypsin -- Arriva/Hyland
AD 439 -- Tanox	Immuno/ProMetic/Protease Sciences
AD 519 -- Tanox	Alpha-1 antitrypsin -- Cutter, Bayer, PPL
Adalimumab -- Cambridge Antibody Tech.	Therapeutics, Profile, ZymoGenetics,
Adenocarcinoma vaccine -- Biomira -- NIS	Arriva
Adenosine deaminase -- Enzond	Alpha-1 protease inhibitor -- Genzyme
Adenosine A2B receptor antagonists --	Transgenics, Welfide Corp.
Adenosine Therapeutics	Alpha-galactose fusion protein --
ADP-001 -- Axis Genetics	Immunomedics
AF 13948 -- Affymax	Alpha-galactosidase A -- Research
Afelimomab -- Knoll	Corporation Technologies, Genzyme
AFP-SCAN -- Immunomedics	Alpha-glucosidase -- Genzyme,
AG 2195 -- Corixa	Novazyme
agalsidase alfa -- Transkaryotic Therapies	Alpha-lactalbumin
agalsidase beta -- Genzyme	Alpha-L-iduronidase -- Transkaryotic
AGENT-- Antisoma	Therapeutics, BioMarin
AI 300 -- AutoImmune	alteplase -- Genentech
AI-101 -- Teva	alvircept sudotox -- NIH
AI-102 -- Teva	ALX-0600, a GLP-2 agonist -- NPS Allelix
AI-201 -- AutoImmune	Corp.

【図 13 B】

図 13B

ALX1-11 –sNPS Pharmaceuticals
 Alzheimer's disease gene therapy
 AM-133 -- AMRAD
 Amb a 1 immunostim conj. -- Dynavax
 AMD 3100 – AnorMED -- NIS
 AMD 3465 – AnorMED -- NIS
 AMD 3465 – AnorMED -- NIS
 AMD Fab -- Genentech
 Amediplase – Menarini, Novartis
 AM-F9
 Amoebiasis vaccine
 Amphiregulin -- Octagene
 anakinra -- Amgen
 analgesic -- Nobex
 aneastim -- Amgen
 Anergix.RA – Corixa, Organon
 Angiocidin -- InKine
 angiogenesis inhibitors -- ILEX
 AngioMab – Antisoma
 Angiopoietins -- Regeneron/Procter & Gamble
 angiostatin -- EntreMed
 Angiostatin/endostatin gene therapy -- Genetix Pharmaceuticals
 angiotensin-II, topical -- Maret
 Anthrax -- EluSys Therapeutics/US Army Medical Research Institute
 Anthrax vaccine
 Anti platelet-derived growth factor D human monoclonal antibodies -- CuraGen
 Anti-17-1A MAb 3622W94 -- GlaxoSmithKline
 Anti-2C4 MAb -- Genentech
 anti-4-1BB monoclonal antibodies -- Bristol-Myers Squibb
 Anti-Adhesion Platform Tech. -- Cytovax
 Anti-adipocyte MAb -- Cambridge Antibody Tech./ObeSys
 antiallergics -- Maxygen
 antiallergy vaccine -- Acambis
 Anti-alpha-4-integrin MAb
 Anti-alpha β 3 integrin MAb – Applied Molecular Evolution
 Anti-angiogenesis monoclonal antibodies - - KS Biomedix/Schering AG
 Anti-B4 MAb-DC1 conjugate -- ImmunoGen
 Anti-B7 antibody PRIMATIZED -- IDEC
 Anti-B7-1 MAb 16-10A1
 Anti-B7-1 MAb 1G10
 Anti-B7-2 MAb GL-1
 Anti-B7-2-gelonin immunotoxin –
 Antibacterials/antifungals -- Diversa/IntraBiotics
 Anti-beta-amyloid monoclonal antibodies - - Cambridge Antibody Tech., Wyeth-Ayerst
 Anti-BLyS antibodies -- Cambridge Antibody Tech. /Human Genome Sciences
 Antibody-drug conjugates -- Seattle Genetics/Eos
 Anti-C5 MAb BB5-1 -- Alexion
 Anti-C5 MAb N19-8 -- Alexion
 Anti-C8 MAb
 anticancer cytokines -- BioPulse
 anticancer matrix – Telios Integra
 Anticancer monoclonal antibodies – ARIUS, Immunex
 anticancer peptides – Maxygen, Micrologix
 Anticancer prodrug Tech. -- Alexion Antibody Technologies
 anticancer Troy-Bodies -- Affite -- Affitech
 anticancer vaccine -- NIH
 anticancers -- Epimmune
 Anti-CCR5/CXCR4 sheep MAb -- KS Biomedix Holdings
 Anti-CD11a MAb KBA –
 Anti-CD11a MAb M17
 Anti-CD11a MAb TA-3 –
 Anti-CD11a MAb WT.1 –
 Anti-CD11b MAb -- Pharmacia

【図 13C】

図 13C

Anti-CD11b MAb LM2	Anti-CD4 idiotype vaccine
Anti-CD154 MAb -- Biogen	Anti-CD4 MAb -- Centocor, IDEC
Anti-CD16-anti-CD30 MAb -- Biotest	Pharmaceuticals, Xenova Group
Anti-CD18 MAb -- Pharmacia	Anti-CD4 MAb 16H5
Anti-CD19 MAb B43 --	Anti-CD4 MAb 4162W94 --
Anti-CD19 MAb -liposomal sodium	GlaxoSmithKline
butyrate conjugate --	Anti-CD4 MAb B-F5 -- Diaclone
Anti-CD147	Anti-CD4 MAb GK1-5
Anti-CD19 MAb-saporin conjugate --	Anti-CD4 MAb KT6
Anti-CD19-dsFv-PE38-immunotoxin --	Anti-CD4 MAb OX38
Anti-CD2 MAb 12-15 --	Anti-CD4 MAb PAP conjugate -- Bristol-
Anti-CD2 MAb B-E2 -- Diaclone	Myers Squibb
Anti-CD2 MAb OX34 --	Anti-CD4 MAb RIB 5-2
Anti-CD2 MAb OX54 --	Anti-CD4 MAb W3/25
Anti-CD2 MAb OX55 --	Anti-CD4 MAb YTA 3.1.2
Anti-CD2 MAb RM2-1	Anti-CD4 MAb YTS 177-9
Anti-CD2 MAb RM2-2	Anti-CD40 ligand MAb 5c8 -- Biogen
Anti-CD2 MAb RM2-4	Anti-CD40 MAb
Anti-CD20 MAb BCA B20	Anti-CD40 MAb 5D12 -- Tanox
Anti-CD20-anti-Fc alpha RI bispecific MAb	Anti-CD44 MAb A3D8
-- Medarex, Tenovus	Anti-CD44 MAb GKWA3
Anti-CD22 MAb-saporin-6 complex --	Anti-CD44 MAb IM7
Anti-CD3 immunotoxin --	Anti-CD44 MAb KM81
Anti-CD3 MAb 145-2C11 -- Pharming	Anti-CD44 variant monoclonal antibodies -
Anti-CD3 MAb CD4IgG conjugate --	- Corixa/Hebrew University
Genentech	Anti-CD45 MAb BC8-I-131
Anti-CD3 MAb humanised -- Protein	Anti-CD45RB MAb
Design, RW Johnson	Anti-CD48 MAb HuLy-m3
Anti-CD3 MAb WT32	Anti-CD48 MAb WM-63
Anti-CD3 MAb-ricin-chain-A conjugate --	Anti-CD5 MAb -- Becton Dickinson
Anti-CD3 MAb-xanthine-oxidase	Anti-CD5 MAb OX19
conjugate --	Anti-CD6 MAb
Anti-CD30 MAb BerH2 -- Medac	Anti-CD7 MAb-PAP conjugate
Anti-CD30 MAb-saporin conjugate	Anti-CD7 MAb-ricin-chain-A conjugate
Anti-CD30-scFv-ETA'-immunotoxin	Anti-CD8 MAb -- Amerimmune, Cytodyn,
Anti-CD38 MAb AT13/5	Becton Dickinson
Anti-CD38 MAb-saporin conjugate	Anti-CD8 MAb 2-43
Anti-CD3-anti-CD19 bispecific MAb	Anti-CD8 MAb OX8
Anti-CD3-anti-EGFR MAb	Anti-CD80 MAb P16C10 -- IDEC
Anti-CD3-anti-interleukin-2-receptor MAb	Anti-CD80 MAb P7C10 -- ID Vaccine
Anti-CD3-anti-MOV18 MAb -- Centocor	Anti-CD8-idarubicin conjugate
Anti-CD3-anti-SCLC bispecific MAb	Anti-CEA MAb CE-25

【図 13 D】

図 13D

- | | |
|--|---|
| Anti-CEA MAb MN 14 – Immunomedics | Anti-hCG antibodies -- Abgenix/AVI |
| Anti-CEA MAb MN14-PE40 conjugate – Immunomedics | BioPharma |
| Anti-CEA MAb T84.66-interleukin-2 conjugate | Anti-heparanase human monoclonal antibodies -- Oxford Glycosciences/Medarex |
| Anti-CEA sheep MAb -- KS Biomedix Holdings | Anti-hepatitis C virus human monoclonal antibodies -- XTL Biopharmaceuticals |
| Anti-cell surface monoclonal antibodies -- Cambridge Antibody Tech. /Pharmacia | Anti-HER-2 antibody gene therapy |
| Anti-c-erbB2-anti-CD3 bifunctional MAb -- Otsuka | Anti-herpes antibody -- Epicyte |
| Anti-CMV MAb -- Scotgen | Anti-HIV antibody -- Epicyte |
| Anti-complement | anti-HIV catalytic antibody -- Hesed Biomed |
| Anti-CTLA-4 MAb | anti-HIV fusion protein -- Idun |
| Anti-EGFR catalytic antibody -- Hesed Biomed | anti-HIV proteins -- Cangene |
| anti-EGFR immunotoxin -- IVAX | Anti-HM1-24 MAb -- Chugai |
| Anti-EGFR MAb -- Abgenix | Anti-hR3 MAb |
| Anti-EGFR MAb 528 | Anti-Human-Carcinoma-Antigen MAb -- Epicyte |
| Anti-EGFR MAb KSB 107 -- KS Biomedix | Anti-ICAM-1 MAb -- Boehringer Ingelheim |
| Anti-EGFR MAb-DM1 conjugate -- ImmunoGen | Anti-ICAM-1 MAb 1A-29 -- Pharmacia |
| Anti-EGFR MAb-LA1 – | Anti-ICAM-1 MAb HA58 |
| Anti-EGFR sheep MAb -- KS Biomedix | Anti-ICAM-1 MAb YN1/1.7.4 |
| Anti-FAP MAb F19-I-131 | Anti-ICAM-3 MAb ICM3 -- ICOS |
| Anti-Fas IgM MAb CH11 | Anti-idiotypic breast cancer vaccine 11D10 |
| Anti-Fas MAb Jo2 | Anti-idiotypic breast cancer vaccine ACA14C5 – |
| Anti-Fas MAb RK-8 | Anti-idiotypic cancer vaccine -- ImClone Systems/Merck KGaA ImClone, Viventia Biotech |
| Anti-Flt-1 monoclonal antibodies -- ImClone | Anti-idiotypic cancer vaccine 1A7 -- Titan |
| Anti-fungal peptides -- State University of New York | Anti-idiotypic cancer vaccine 3H1 -- Titan |
| antifungal tripeptides -- BTG | Anti-idiotypic cancer vaccine TriAb -- Titan |
| Anti-ganglioside GD2 antibody-interleukin-2 fusion protein -- Lexigen | Anti-idiotypic Chlamydia trachomatis vaccine |
| Anti-GM2 MAb -- Kyowa | Anti-idiotypic colorectal cancer vaccine -- Novartis |
| Anti-GM-CSF receptor monoclonal antibodies -- AMRAD | Anti-idiotypic colorectal cancer vaccine -- Onyvax |
| Anti-gp130 MAb -- Tosoh | Anti-idiotypic melanoma vaccine -- IDEC Pharmaceuticals |
| Anti-HCA monoclonal antibodies -- AltaRex/Epigen | Anti-idiotypic ovarian cancer vaccine ACA 125 |

【図 13 E】

図 13E

- | | |
|--|--|
| Anti-idiotypic ovarian cancer vaccine AR54
-- AltaRex | Anti-L-selectin monoclonal antibodies --
Protein Design Labs, Abgenix, Stanford
University |
| Anti-idiotypic ovarian cancer vaccine CA-
125 -- AltaRex, Biomira | Anti-MBL monoclonal antibodies --
Alexion/Brigham and Women's Hospital |
| Anti-IgE catalytic antibody -- Hesel
Biomed | Anti-MHC monoclonal antibodies |
| Anti-IgE MAb E26 -- Genentech | Anti-MIF antibody humanised -- IDEC,
Cytokine PharmaSciences |
| Anti-IGF-1 MAb | Anti-MRSA/VRSA sheep MAb -- KS
Biomedix Holdings |
| anti-inflammatory -- GeneMax | Anti-mu MAb -- Novartis |
| anti-inflammatory peptide -- BTG | Anti-MUC-1 MAb |
| anti-integrin peptides -- Burnha | Anti-MUC 18 |
| Anti-interferon-alpha-receptor MAb 64G12
-- Pharma Pacific Management | Anti-Nogo-A MAb IN1 |
| Anti-interferon-gamma MAb -- Protein
Design Labs | Anti-nuclear autoantibodies -- Procyon |
| Anti-interferon-gamma polyclonal antibody
-- Advanced Biotherapy | Anti-ovarian cancer monoclonal
antibodies -- Dompe |
| Anti-interleukin-10 MAb -- | Anti-p185 monoclonal antibodies |
| Anti-interleukin-12 MAb -- | Anti-p43 MAb |
| Anti-interleukin-1-beta polyclonal antibody
-- R&D Systems | Antiparasitic vaccines |
| Anti-interleukin-2 receptor MAb 2A3 | Anti-PDGF/bFGF sheep MAb -- KS
Biomedix |
| Anti-interleukin-2 receptor MAb 33B3-1 --
Immunotech | Anti-properdin monoclonal antibodies --
Abgenix/Gliatech |
| Anti-interleukin-2 receptor MAb ART-18 | Anti-PSMA (prostate specific membrane
antigen) |
| Anti-interleukin-2 receptor MAb LO-Tact-1 | Anti-PSMA MAb J591 -- BZL Biologics |
| Anti-interleukin-2 receptor MAb Mikbeta1 | Anti-Rev MAb gene therapy -- |
| Anti-interleukin-2 receptor MAb NDS61 | Anti-RSV antibodies -- Epicyte, Intracell |
| Anti-interleukin-4 MAb 11B11 | Anti-RSV monoclonal antibodies --
Medarex/MedImmune, Applied
Molecular Evolution/MedImmune |
| Anti-interleukin-5 MAb -- Wallace
Laboratories | Anti-RSV MAb, inhalation --
Alkermes/MedImmune |
| Anti-interleukin-6 MAb -- Centocor,
Diacor, Pharmadigm | Anti-RT gene therapy |
| Anti-interleukin-8 MAb -- Abgenix | Antisense K-ras RNA gene therapy |
| Anti-interleukin-8 MAb -- Xenotech | Anti-SF-25 MAb |
| Anti-JL1 MAb | Anti-sperm antibody -- Epicyte |
| Anti-Klebsiella sheep MAb -- KS Biomedix
Holdings | Anti-Tac(Fv)-PE38 conjugate |
| Anti-Laminin receptor MAb-liposomal
doxorubicin conjugate | Anti-TAPA/CD81 MAb AMP1 |
| Anti-LCG MAb -- Cytoclonal | Anti-tat gene therapy |
| Anti-lipopolysaccharide MAb -- VitaResc | Anti-TCR-alphabeta MAb H57-597 |

【図 13 F】

図 13F

Anti-TCR-alphabeta MAb R73	APC-8024 -- Demegen
Anti-tenascin MAb BC-4-I-131	ApoA-1 -- Milano, Pharmacia
Anti-TGF-beta human monoclonal antibodies -- Cambridge Antibody Tech., Genzyme	Apogen -- Alexion
Anti-TGF-beta MAb 2G7 -- Genentech	apolipoprotein A1 -- Avanir
Antithrombin III -- Genzyme Transgenics, Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL, Myriad	Apolipoprotein E -- Bio-Tech. General
Anti-Thy1 MAb	Applaggin -- Biogen
Anti-Thy1.1 MAb	aprotinin -- ProdiGene
Anti-tissue factor/factor VIIA sheep MAb -- KS Biomedix	APT-070C -- AdProTech
Anti-TNF monoclonal antibodies -- Centocor, Chiron, Peptech, Pharacia, Serono	AR 177 -- Aronex Pharmaceuticals
Anti-TNF sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	AR 209 -- Aronex Pharmaceuticals, Antigenics
Anti-TNFalpha MAb -- Genzyme	AR545C
Anti-TNFalpha MAb B-C7 -- Diaclone	ARGENT gene delivery systems -- ARIAD
Anti-tooth decay MAb -- Planet BioTech.	Arresten
Anti-TRAIL receptor-1 MAb -- Takeda	ART-123 -- Asahi Kasei
Antitumour RNases -- NIH	arylsulfatase B -- BioMarin
Anti-VCAM MAb 2A2 -- Alexion	Arylsulfatase B, Recombinant human -- BioMarin
Anti-VCAM MAb 3F4 -- Alexion	AS 1051 -- Ajinomoto
Anti-VCAM-1 MAb	ASI-BCL -- Intracell
Anti-VEC MAb -- ImClone	Asparaginase - Merck
Anti-VEGF MAb -- Genentech	ATL-101 -- Alizyme
Anti-VEGF MAb 2C3	Atrial natriuretic peptide -- Pharis
Anti-VEGF sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Aurintricarboxylic acid-high molecular weight
Anti-VLA-4 MAb HP1/2 -- Biogen	Autoimmune disorders -- GPC Biotech/MorphoSys
Anti-VLA-4 MAb PS/2	Autoimmune disorders and transplant rejection -- Bristol-Myers Squibb/Genzyme Tra
Anti-VLA-4 MAb R1-2	Autoimmune disorders/cancer -- Abgenix/Chiron, CuraGen
Anti-VLA-4 MAb TA-2	Autotaxin
Anti-VAP-1 human MAb	Avicidin -- NeoRx
Anti-VRE sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	axogenesis factor-1 -- Boston Life Sciences
ANUP -- TranXenoGen	Axokine -- Regeneron
ANUP-1 -- Pharis	B cell lymphoma vaccine -- Biomira
AOP-RANTES -- Senetek	B7-1 gene therapy --
Apan-CH -- Praecis Pharmaceuticals	BABS proteins -- Chiron
	BAM-002 -- Novelos Therapeutics
	Basiliximab (anti CD25 MAb) -- Novartis

【図 13 G】

図 13G

Bay-16-9996 -- Bayer
 Bay-39-9437 -- Bayer
 Bay-50-4798 -- Bayer
 BB-10153 -- British Biotech
 BBT-001 -- Bolder BioTech.
 BBT-002 -- Bolder BioTech.
 BBT-003 -- Bolder BioTech.
 BBT-004 -- Bolder BioTech.
 BBT-005 -- Bolder BioTech.
 BBT-006 -- Bolder BioTech.
 BBT-007 -- Bolder BioTech.
 BCH-2763 -- Shire
 BCSF -- Millenium Biologix
 BDNF -- Regeneron -- Amgen
 Becaplermin -- Johnson & Johnson,
 Chiron
 Bectumomab -- Immunomedics
 Beriplast -- Aventis
 Beta-adrenergic receptor gene therapy --
 University of Arkansas
 bFGF -- Scios
 BI 51013 -- Behringwerke AG
 BIBH 1 -- Boehringer Ingelheim
 BIM-23190 -- Beaufour-Ipsen
 birch pollen immunotherapy -- Pharmacia
 bispecific fusion proteins -- NIH
 Bispecific MAb 2B1 -- Chiron
 Bitistatin
 BIWA 4 -- Boehringer Ingelheim
 blood substitute -- Northfield, Baxter Intl.
 BLP-25 -- Biomira
 BLS-0597 -- Boston Life Sciences
 BLyS -- Human Genome Sciences
 BLyS radiolabelled -- Human Genome
 Sciences
 BM 06021 -- Boehringer Mannheim
 BM-202 -- BioMarin
 BM-301 -- BioMarin
 BM-301 -- BioMarin
 BM-302 -- BioMarin
 BMP 2 -- Genetics Institute/Medtronic-
 Sofamor Danek, Genetics Institute/
 Collagenesis, Genetics
 Institute/Yamanouch
 BMP 2 gene therapy
 BMP 52 -- Aventis Pasteur, Biopharm
 BMP-2 -- Genetics Institute
 BMS 182248 -- Bristol-Myers Squibb
 BMS 202448 -- Bristol-Myers Squibb
 bone growth factors -- IsoTis
 BPC-15 -- Pfizer
 brain natriuretic peptide --
 Breast cancer -- Oxford
 GlycoSciences/Medarex
 Breast cancer vaccine -- Therion
 Biologics, Oregon
 BSSL -- PPL Therapeutics
 BST-2001 -- BioStratum
 BST-3002 -- BioStratum
 BTI 322 --
 butyrylcholinesterase -- Shire
 C 6822 -- COR Therapeutics
 C1 esterase inhibitor -- Pharming
 C3d adjuvant -- AdProTech
 CAB-2.1 -- Millennium
 calcitonin -- Inhale Therapeutics Systems,
 Aventis, Genetronics, TranXenoGen,
 Unigene, Rhone Poulenc Rohrer
 calcitonin -- oral -- Nobex, Emisphere,
 Pharmaceutical Discovery
 Calcitonin gene-related peptide -- Asahi
 Kasei -- Unigene
 calcitonin, human -- Suntory
 calcitonin, nasal -- Novartis, Unigene
 calcitonin, Panoderm -- Elan
 calcitonin, Peptitrol -- Shire
 calcitonin, salmon -- Therapicon
 calin -- Biopharm
 Calphobindin I
 calphobindin I -- Kowa
 calreticulin -- NYU
 Campath-1G

【図 13 H】

図 13H

Campath-1M
 cancer therapy -- Cangene
 cancer vaccine -- Aixlie, Aventis Pasteur,
 Center of Molecular Immunology, YM
 BioSciences, Cytos, Genzyme,
 Transgenics, GlobelImmune, Igeneon,
 ImClone, Virogenetics, InterCell, Iomai,
 Jenner Biotherapies, Memorial Sloan-
 Kettering Cancer Center, Sydney
 Kimmel Cancer Center, Novavax,
 Protein Sciences, Argonex, SIGA
 Cancer vaccine ALVAC-CEA B7.1 --
 Aventis Pasteur/Therion Biologics
 Cancer vaccine CEA-TRICOM -- Aventis
 Pasteur/Therion Biologics
 Cancer vaccine gene therapy -- Cantab
 Pharmaceuticals
 Cancer vaccine HER-2/neu -- Corixa
 Cancer vaccine THERATOPE -- Biomira
 cancer vaccine, PolyMASC -- Valentis
 Candida vaccine -- Corixa, Inhibitex
 Canstatin -- ILEX
 CAP-18 -- Panorama
 Cardiovascular gene therapy -- Collateral
 Therapeutics
 carperitide -- Suntory
 Casocidin-1 -- Pharis
 CAT 152 -- Cambridge Antibody Tech.
 CAT 192 -- Cambridge Antibody Tech.
 CAT 213 -- Cambridge Antibody Tech.
 Catalase -- Enzon
 Cat-PAD -- Circassia
 CB 0006 -- Celltech
 CCK(27-32) -- Akzo Nobel
 CCR2-64I -- NIH
 CD, Procept -- Paligent
 CD154 gene therapy
 CD39 -- Immunex
 CD39-L2 -- Hyseq
 CD39-L4 -- Hyseq
 CD4 fusion toxin -- Senetek
 CD4 IgG -- Genentech
 CD4 receptor antagonists --
 Pharmacoepia/Progenics
 CD4 soluble -- Progenics
 CD4, soluble -- Genzyme Transgenics
 CD40 ligand -- Immunex
 CD4-ricin chain A -- Genentech
 CD59 gene therapy -- Alexion
 CD8 TIL cell therapy -- Aventis Pasteur
 CD8, soluble -- Avidex
 CD95 ligand -- Roche
 CDP 571 -- Celltech
 CDP 850 -- Celltech
 CDP-860 (PEG-PDGF MAb) -- Celltech
 CDP 870 -- Celltech
 CDS-1 -- Ernest Orlando
 Cedelizumab -- Ortho-McNeil
 Cetermin -- Insmmed
 CETP vaccine -- Avant
 Cetrorelix
 Cetuximab
 CGH 400 -- Novartis
 CGP 42934 -- Novartis
 CGP 51901 -- Tanox
 CGRP -- Unigene
 CGS 27913 -- Novartis
 CGS 32359 -- Novartis
 Chagas disease vaccine -- Corixa
 chemokines -- Immune Response
 CHH 380 -- Novartis
 chitinase -- Genzyme, ICOS
 Chlamydia pneumoniae vaccine -- Antex
 Biologics
 Chlamydia trachomatis vaccine -- Antex
 Biologics
 Chlamydia vaccine -- GlaxoSmithKline
 Cholera vaccine CVD 103-HgR -- Swiss
 Serum and Vaccine Institute Berne
 Cholera vaccine CVD 112 -- Swiss Serum
 and Vaccine Institute Berne
 Cholera vaccine inactivated oral -- SBL
 Vaccin
 Chrysalin -- Chrysalis BioTech.

【 図 1 3 I 】

図 13I

CI-782 -- Hitachi Kase	CSF -- ZymoGenetics
Ciliary neurotrophic factor -- Fidia, Roche	CSF-G -- Hangzhou, Dong-A, Hanmi
CIM project -- Active Biotech	CSF-GM -- Cangene, Hunan, LG Chem
CL 329753 -- Wyeth-Ayerst	CSF-M -- Zarix
CL22, Cobra -- ML Laboratories	CT 1579 -- Merck Frosst
Clenoliximab -- IDEC	CT 1786 -- Merck Frosst
Clostridium difficile antibodies -- Epicycle	CT-112 [^] -- BTG
clotting factors -- Octogene	CTB-134L -- Xenova
CMB 401 -- Celltech	CTC-111 -- Kaketsuken
CNTF -- Sigma-Tau	CTGF -- FibroGen
Cocaine abuse vaccine -- Cantab,	CTLA4-Ig -- Bristol-Myers Squibb
ImmuLogic, Scripps	CTLA4-Ig gene therapy --
coccidiomycosis vaccine -- Arizo	CTP-37 -- AVI BioPharma
collagen -- Type I -- Pharming	C-type natriuretic peptide -- Suntory
Collagen formation inhibitors -- FibroGen	CVS 995 -- Corvas Intl.
Collagen/hydroxyapatite/bone growth	CX 397 -- Nikko Kyodo
factor -- Aventis Pasteur, Biopharm,	CY 1747 -- Epimmune
Orquest	CY 1748 -- Epimmune
collagenase -- BioSpecifics	Cyanovirin-N
Colorectal cancer vaccine -- Wistar	Cystic fibrosis therapy -- CBR/IVAX
Institute	CYT 351
Component B, Recombinant -- Serono	cytokine Traps -- Regeneron
Connective tissue growth factor inhibitors	cytokines -- Enzon, Cytoclonal
-- FibroGen/Taisho	Cytomegalovirus glycoprotein vaccine --
Contortrostatin	Chiron, Aquila Biopharmaceuticals,
contraceptive vaccine -- Zonagen	Aventis Pasteur, Virogenetics
Contraceptive vaccine hCG	Cytomegalovirus vaccine live -- Aventis
Contraceptive vaccine male reversible --	Pasteur
IMMUCON	Cytosine deaminase gene therapy --
Contraceptive vaccine zona pellucida --	GlaxoSmithKline
Zonagen	DA-3003 -- Dong-A
Copper-64 labelled MAb TETA-1A3 -- NCI	DAB389interleukin-6 -- Senetek
Coralyn	DAB389interleukin-7
Corsevin M	DAC:GLP-2 -- ConjuChem, Inc.
C-peptide analogues -- Schwarz	Daclizumab (anti-IL2R MAb) -- Protein
CPI-1500 -- Consensus	Design Labs
CRF -- Neurobiological Tech.	DAMP [^] -- Incyte Genomics
cRGDFV pentapeptide --	Daniplestim -- Pharmacia
CRL 1095 -- CytRx	darbepoetin alfa -- Amgen
CRL 1336 -- CytRx	DBI-3019 -- Diabetogen
CRL 1605 -- CytRx	DCC -- Genzyme
CS-560 -- Sankyo	DDF -- Hyseq

【図 13 J】

図 13J

decorin – Integra, Telios	DWP-404 -- Daewoong
defensins -- Large Scale Biology	DWP-408 -- Daewoong
DEGR-VIIa	Dx 88 (Epi-KAL2) -- Dyax
Deimmunised antibody 3B6/22 AGEN	Dx 890 (elastin inhibitors) -- Dyax
Deimmunised anti-cancer antibodies -- Biovation/Viragen	E coli O157 vaccine -- NIH
Dendroamide A	E21-R -- BresaGen
Dengue vaccine -- Bavarian Nordic, Merck	Eastern equine encephalitis virus vaccine
denileukin diftitox -- Ligand	–
DES-1101 -- Desmos	Echicetin –
desirudin -- Novartis	Echinhinin 1 –
desmopressin -- Unigene	Echistatin -- Merck
Desmoteplase – Merck, Schering AG	Echitamine –
Destabilase	Ecromeximab – Kyowa Hakko
Diabetes gene therapy – DeveloGen, Pfizer	EC-SOD -- PPL Therapeutics
Diabetes therapy -- Crucell	Eculizumab (5G1.1) -- Alexion
Diabetes type 1 vaccine -- Diamyd Therapeutics	EDF -- Ajinomoto
DiaCIM -- YM BioSciences	EDN derivative -- NIH
dialytic oligopeptides -- Research Corp	EDNA -- NIH
Diamyd -- Diamyd Therapeutics	Edobacomab -- XOMA
DiaPep227-- Pepgen	Edrecolomab -- Centocor
DiavaX -- Corixa	EF 5077
Digoxin MAb -- Glaxo	Efalizumab -- Genentech
Diphtheria tetanus pertussis-hepatitis B vaccine -- GlaxoSmithKline	EGF fusion toxin – Seragen, Ligand
DIR therapy -- Solis Therapeutics –	EGF-P64k vaccine -- Center of Molecular Immunology
DNase -- Genentech	EL 246 -- LigoCyte
Dornase alfa -- Genentech	elastase inhibitor -- Synergen
Dornase alfa, inhalation -- Genentech	elcatonin -- Therapicon
Doxorubicin-anti-CEA MAb conjugate – Immunomedics	EMD 72000 -- Merck KGaA
DP-107 -- Trimeris	Emdogain -- BIORA
drotrecogin alfa -- Eli Lilly	emfilermin -- AMRAD
DTctGMCSF	Emoctakin -- Novartis
DTP-polio vaccine -- Aventis Pasteur	enamel matrix protein -- BIORA
DU 257-KM231 antibody conjugate -- Kyowa	Endo III -- NYU
dural graft matrix -- Integra	endostatin – EntreMed, Pharis
Dutiplase – Baxter Intl.	Enhancins -- Micrologix
DWP-401 -- Daewoong	Enlimomab -- Isis Pharm.
	Enoxaparin sodium -- Pharmuka
	enzyme linked antibody nutrient depletion therapy -- KS Biomedix Holdings
	Eosinophil-derived neutralizing agent –
	EP-51216 -- Asta Medica

【図 13 K】

図 13K

EP-51389 -- Asta Medica
 EPH family ligands -- Regeneron
 Epidermal growth factor -- Hitachi Kasei, Johnson & Johnson
 Epidermal growth factor fusion toxin -- Senetek
 Epidermal growth factor-genistein -- EPI-HNE-4 -- Dyax
 EPI-KAL2 -- Dyax
 Epoetin-alfa -- Amgen, Dragon Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
 Epratuzumab -- Immunomedics
 Epstein-Barr virus vaccine -- Aviron/SmithKline Beecham, Bioresearch
 Eptacog alfa -- Novo Nordisk
 Eptifibatide -- COR Therapeutics
 erb-38 --
 Erlizumab -- Genentech
 erythropoietin -- Alkermes, ProLease, Dong-A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies
 Erythropoietin Beta -- Hoffman La Roche
 Erythropoietin/Epoetin alfa -- Chugai
 Escherichia coli vaccine -- North American Vaccine, SBL Vaccin, Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
 etanercept -- Immunex
 examorelin -- Mediolanum
 Exendin 4 -- Amylin
 exonuclease VII
 F 105 -- Centocor
 F-992 -- Fornix
 Factor IX -- Alpha Therapeutics, Welfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics
 Factor IX gene therapy -- Cell Genesys
 Factor VII -- Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.
 Factor VIIa -- PPL Therapeutics, ZymoGenetics
 Factor VIII -- Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming
 Factor VIII -- PEGylated -- Bayer
 Factor VIII fragments -- Pharmacia
 Factor VIII gene therapy -- Targeted Genetics
 Factor VIII sucrose formulation -- Bayer, Genentech
 Factor VIII-2 -- Bayer
 Factor VIII-3 -- Bayer
 Factor Xa inhibitors -- Merck, Novo Nordisk, Mochida
 Factor XIII -- ZymoGenetics
 Factors VIII and IX gene therapy -- Genetics Institute/Targeted Genetics
 Famoxin -- Genset
 Fas (delta) TM protein -- LXR BioTech.
 Fas TR -- Human Genome Sciences
 Felvizumab -- Scotgen
 FFR-VIIa -- Novo Nordisk
 FG-001 -- F-Gene
 FG-002 -- F-Gene
 FG-004 -- F-Gene
 FG-005 -- F-Gene
 FGF + fibrin -- Repair
 Fibrimage -- Bio-Tech. General
 fibrin-binding peptides -- ISIS Innovation
 fibrinogen -- PPL Therapeutics, Pharming
 fibroblast growth factor -- Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics
 fibrolase conjugate -- Schering AG
 Filgrastim -- Amgen
 filgrastim -- PDA modified -- Xencor
 FLT-3 ligand -- Immunex
 FN18 CRM9 --
 follistatin -- Biotech Australia, Human Therapeutics
 follitropin alfa -- Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel

【 図 1 3 L 】

図 13L

Follitropin Beta -- Bayer, Organon	GM-CSF -- Immunex
FP 59	GM-CSF tumour vaccine -- PowderJect
FSH -- Ferring	GnRH immunotherapeutic -- Protherics
FSH + LH -- Ferring	Goserelin (LhRH antagonist) --
F-spondin -- CeNeS	AstraZeneca
fusion protein delivery system -- UAB	gp75 antigen -- ImClone
Research Foundation	gp96 -- Antigenics
fusion toxins -- Boston Life Sciences	GPI 0100 -- Galenica
G 5598 -- Genentech	GR 4991W93 -- GlaxoSmithKline
GA-II -- Transkaryotic Therapies	Granulocyte colony-stimulating factor --
Gamma-interferon analogues -- SRC VB	Dong-A
VECTOR	Granulocyte colony-stimulating factor
Ganirelix -- Roche	conjugate
gastric lipase -- Meristem	grass allergy therapy -- Dynavax
Gavilimomab --	GRF1-44 -- ICN
G-CSF -- Amgen, SRC VB VECTOR	Growth Factor -- Chiron, Atrigel, Atrix,
GDF-1 -- CeNeS	Innogenetics, ZymoGenetics, Novo
GDF-5 -- Biopharm	growth factor peptides -- Biotherapeutics
GDNF (glial derived neurotrophic factor) -	growth hormone -- LG Chem
- Amgen	growth hormone, Recombinant human --
gelsolin -- Biogen	Serono
Gemtuzumab ozogamicin -- Celltech	GT 4086 -- Gliatech
Gene-activated epoetin-alfa -- Aventis	GW 353430 -- GlaxoSmithKline
Pharma -- Transkaryotic Therapies	GW-278884 -- GlaxoSmithKline
Glanzmann thrombasthenia gene therapy	H 11 -- Viventia Biotech
--	H5N1 influenza A virus vaccine -- Protein
Glatiramer acetate -- Yeda	Sciences
glial growth factor 2 -- CeNeS	haemoglobin -- Biopure
GLP-1 -- Amylin, Suntory, TheraTech,	haemoglobin 3011, Recombinant -- Baxter
Watson	Healthcare
GLP-1 peptide analogues -- Zealand	haemoglobin crosfumaril -- Baxter Intl.
Pharaceuticals	haemoglobin stabilized -- Ajinomoto
GLP-2 -- Novo Nordisk, Ontario, Inc.,	haemoglobin, recombinant -- Apex
Suntory Limited	HAF -- Immune Response
glucagon -- Eli Lilly, ZymoGenetics	Hantavirus vaccine
Glucagon-like peptide-1 7-36 amide --	HB 19
Suntory	HBNF -- Regeneron
Glucogen-like peptide -- Amylin	HCC-1 -- Pharis
Glucocerebrosidase -- Genzyme	hCG -- Milkhaus
glutamate decarboxylase -- Genzyme	hCG vaccine -- Zonagen
Transgenics	HE-317 -- Hollis-Eden Pharmaceuticals
Glycoprotein S3 -- Kureha	

【図 13 M】

図 13M

- Heat shock protein cancer and influenza vaccines -- StressGen
- Helicobacter pylori vaccine -- Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron, Provalis
- Helistat-G -- GalaGen
- Hemolink -- Hemosol
- hepapoietin -- Snow Brand
- heparanase -- InSight
- heparinase I -- Ibex
- heparinase III -- Ibex
- Hepatitis A vaccine -- American Biogenetic Sciences
- Hepatitis A vaccine inactivated
- Hepatitis A vaccine Nothav -- Chiron
- Hepatitis A-hepatitis B vaccine -- GlaxoSmithKline
- hepatitis B therapy -- Tripep
- Hepatitis B vaccine -- Amgen, Chiron SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva, PowderJect, Rhein Biotech
- Hepatitis B vaccine recombinant -- Evans Vaccines, Eptec Combiotech, Genentech, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Rhein Biotech, Shantha Biotechnics, Vector, Yeda
- Hepatitis B vaccine recombinant TGP 943 -- Takeda
- Hepatitis C vaccine -- Bavarian Nordic, Chiron, Innogenetics Acambis,
- Hepatitis D vaccine -- Chiron Vaccines
- Hepatitis E vaccine recombinant -- Genelabs/GlaxoSmithKline, Novavax
- hepatocyte growth factor -- Panorama, Sosei
- hepatocyte growth factor kringle fragments -- EntreMed
- Her-2/Neu peptides -- Corixa
- Herpes simplex glycoprotein DNA vaccine -- Merck, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Genentech, GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda
- Herpes simplex vaccine -- Cantab Pharmaceuticals, CEL-SCI, Henderson Morley
- Herpes simplex vaccine live -- ImClone Systems/Wyeth-Lederle, Aventis Pasteur
- HGF derivatives -- Dompe
- hIAPP vaccine -- Crucell
- Hib-hepatitis B vaccine -- Aventis Pasteur
- HIC 1
- HIP-- Altachem
- Hirudins -- Biopharma, Cangene, Dongkook, Japan Energy Corporation, Pharmacia Corporation, SIR International, Sanofi-Synthelabo, Sotragene, Rhein Biotech
- HIV edible vaccine -- ProdiGene
- HIV gp120 vaccine -- Chiron, Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID Vaccine, Progenics, VaxGen
- HIV gp120 vaccine gene therapy --
- HIV gp160 DNA vaccine -- PowderJect, Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland Immuno, Protein Sciences
- HIV gp41 vaccine -- Panacos
- HIV HGP-30W vaccine -- CEL-SCI
- HIV immune globulin -- Abbott, Chiron
- HIV peptides -- American Home Products
- HIV vaccine -- Applied bioTech., Axis Genetics, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Genentech, Korea Green Cross, NIS, Oncogen, Protein Sciences Corporation, Terumo, Tonen Corporation, Wyeth-Ayerst, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Advanced BioScience Laboratories, Bavarian Nordic, Bavarian Nordic/Statens Serum Institute, GeneCure, Immune Response, Progenics, Therion Biologics, United Biomedical, Chiron
- HIV vaccine vCP1433 -- Aventis Pasteur
- HIV vaccine vCP1452 -- Aventis Pasteur

【図 13 N】

図 13N

HIV vaccine vCP205 -- Aventis Pasteur	Human monoclonal antibodies --
HL-9 -- American BioScience	Medarex/Northwest Biotherapeutics,
HM-9239 -- Cytran	Medarex/Seattle Genetics
HML-103 -- Hemosol	human netrin-1 -- Exelixis
HML-104 -- Hemosol	human papillomavirus antibodies --
HML-105 -- Hemosol	Epicyte
HML-109 -- Hemosol	Human papillomavirus vaccine -- Biotech
HML-110 -- Hemosol	Australia, IDEC, StressGen
HML-121 -- Hemosol	Human papillomavirus vaccine MEDI 501
hNLP -- Pharis	-- MedImmune/GlaxoSmithKline
Hookworm vaccine	Human papillomavirus vaccine MEDI
host-vector vaccines -- Henogen	503/MEDI 504 --
HPM 1 -- Chugai	MedImmune/GlaxoSmithKline
HPV vaccine -- MediGene	Human papillomavirus vaccine TA-CIN --
HSA -- Meristem	Cantab Pharmaceuticals
HSF -- StressGen	Human papillomavirus vaccine TA-HPV --
HSP carriers --Weizmann, Yeda, Peptor	Cantab Pharmaceuticals
HSPPC-70 -- Antigenics	Human papillomavirus vaccine TH-GW --
HSPPC-96, pathogen-derived --	Cantab/GlaxoSmithKline
Antigenics	human polyclonal antibodies --
HSV 863 -- Novartis	Biosite/Eos BioTech./ Medarex
HTLV-I DNA vaccine	human type II anti factor VIII monoclonal
HTLV-I vaccine	antibodies -- ThromboGenics
HTLV-II vaccine -- Access	humanised anti glycoprotein Ib murine
HU 901 -- Tanox	monoclonal antibodies --
Hu23F2G -- ICOS	ThromboGenics
HuHMFG1	HumaRAD -- Intracell
HumaLYM -- Intracell	HuMax EGFR -- Genmab
Human krebs statika -- Yamanouchi	HuMax-CD4 -- Medarex
human monoclonal antibodies --	HuMax-IL15 -- Genmab
Abgenix/Biogen, Abgenix/ Corixa,	HYB 190 -- Hybridon
Abgenix/Immunex, Abgenix/Lexicon,	HYB 676 -- Hybridon
Abgenix/ Pfizer, Athersys/Medarex,	I-125 MAb A33 -- Celltech
Biogen/MorphoSys, CAT/Searle,	Ibritumomab tiuxetan -- IDEC
Centocor/Medarex, Corixa/Kirin	IBT-9401 -- Ibex
Brewery, Corixa/Medarex, Eos	IBT-9402 -- Ibex
BioTech./Medarex, Eos/Xenerex,	IC 14 -- ICOS
Exelixis/Protein Design Labs,	Idarubicin anti-Ly-2.1 --
ImmunoGen/ Raven, Medarex/	IDEC 114 -- IDEC
B.Twelve, MorphoSys/ImmunoGen, XTL	IDEC 131 -- IDEC
Biopharmaceuticals/Dyax,	IDEC 152 -- IDEC
	IDM 1 -- IDM

【図 130】

図 130

IDPS -- Hollis-Eden Pharmaceuticals
 iduronate-2-sulfatase -- Transkaryotic Therapies
 IGF/IBP-2-13 -- Pharis
 IGN-101 -- Igeneon
 IK HIR02 -- Iketon
 IL-11 -- Genetics Institute/AHP
 IL-13-PE38 -- NeoPharm
 IL-17 receptor -- Immunex
 IL-18BP -- Yeda
 IL-1Hy1 -- Hyseq
 IL-1 β -- Celltech
 IL-1 β adjuvant -- Celltech
 IL-2 -- Chiron
 IL-2 + IL-12 -- Hoffman La-Roche
 IL-6/sIL-6R fusion -- Hadasit
 IL-6R derivative -- Tosoh
 IL-7-Dap 389 fusion toxin -- Ligand
 IL-21 -- Novo Nordisk, ZymoGenetics
 IM-862 -- Cytran
 IMC-1C11 -- ImClone
 imiglucerase -- Genzyme
 Immune globulin intravenous (human) -- Hoffman La Roche
 immune privilege factor -- Proneuron
 Immunocal -- Immunotec
 Immunogene therapy -- Briana Bio-Tech
 Immunoliposomal 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate --
 immunosuppressant vaccine -- Aixlie
 immunotoxin -- Antisoma, NIH
 ImmuRAIT-Re-188 -- Immunomedics
 imreg-1 -- Imreg
 infertility -- Johnson & Johnson, E-TRANS
 Infliximab -- Centocor
 Influenza virus vaccine -- Aventis Pasteur, Protein Sciences
 inhibin -- Biotech Australia, Human Therapeutics
 Inhibitory G protein gene therapy
 INKP-2001 -- InKine
 Inolimomab -- Diaclone
 insulin -- AutoImmune, Altea, Biobras, BioSante, Bio-Tech. General, Chong Kun Dang, Emisphere, Flamel, Provalis, Rhein Biotech, TranXenoGen
 insulin (bovine) -- Novartis
 insulin analogue -- Eli Lilly
 Insulin Aspart -- Novo Nordisk
 insulin detemir -- Novo Nordisk
 insulin glargine -- Aventis
 insulin inhaled -- Inhale Therapeutics Systems, Alkermes
 insulin oral -- Inovax
 insulin, AeroDose -- AeroGen
 insulin, AERx -- Aradigm
 insulin, BEODAS -- Elan
 insulin, Biphasix -- Helix
 insulin, buccal -- Generex
 insulin, I2R -- Flemington
 insulin, intranasal -- Bentley
 insulin, oral -- Nobex, Unigene
 insulin, Orasome -- Endorex
 insulin, ProMaxx -- Epic
 insulin, Quadrant -- Elan
 insulin, recombinant -- Aventis
 insulin, Spiros -- Elan
 insulin, Transfersome -- IDEA
 insulin, Zymo, recombinant -- Novo Nordisk
 insulinotropin -- Scios
 Insulysin gene therapy --
 integrin antagonists -- Merck
 interferon (Alpha2) -- SRC VB VECTOR, Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche, Genentech
 interferon -- BioMedicines, Human Genome Sciences
 interferon (Alfa-n3)—Interferon Sciences Intl.
 interferon (Alpha), Biphasix -- Helix

【図 13 P】

図 13P

interferon (Alpha)—Amgen, BioNative,
 Novartis, Genzyme Transgenics,
 Hayashibara, Inhale Therapeutics
 Systems, Medusa, Flamel, Dong-A,
 GeneTrol, Nastech, Shantha,
 Wassermann, LG Chem, Sumitomo,
 Aventis, Behring EGIS, Pepgen, Servier,
 Rhein Biotech,
 interferon (Alpha2A)
 interferon (Alpha2B) — Enzon, Schering-
 Plough, Biogen, IDEA
 interferon (Alpha-N1) -- GlaxoSmithKline
 interferon (beta) — Rentschler, GeneTrol,
 Meristem, Rhein Biotech, Toray, Yeda,
 Daiichi, Mochida
 interferon (Beta1A) — Serono, Biogen
 interferon (beta1A), inhale -- Biogen
 interferon (β1b)-- Chiron
 interferon (tau)-- Pepgen
 Interferon alfacon-1 -- Amgen
 Interferon alpha-2a vaccine
 Interferon Beta 1b -- Schering/Chiron,
 InterMune
 Interferon Gamma -- Boehringer
 Ingelheim, Sheffield, Rentschler,
 Hayashibara
 interferon receptor, Type I -- Serono
 interferon(Gamma1B) -- Genentech
 Interferon-alpha-2b + ribavirin — Biogen,
 ICN
 Interferon-alpha-2b gene therapy --
 Schering-Plough
 Interferon-con1 gene therapy —
 interleukin-1 antagonists -- Dompe
 Interleukin-1 receptor antagonist -- Abbott
 Bioresearch, Pharmacia
 Interleukin-1 receptor type I -- Immunex
 interleukin-1 receptor Type II -- Immunex
 Interleukin-1 trap -- Regeneron
 Interleukin-1-alpha -- Immunex/Roche
 interleukin-2 -- SRC VB VECTOR,
 Ajinomoto, Biomira, Chiron
 IL-2/ diphtheria toxin -- Ligand
 Interleukin-3 -- Cangene
 Interleukin-4 -- Immunology Ventures,
 Sanofi Winthrop, Schering-Plough,
 Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono
 interleukin-4 + TNF-Alpha -- NIH
 interleukin-4 agonist -- Bayer
 interleukin-4 fusion toxin -- Ligand
 Interleukin-4 receptor — Immunex, Immun
 Interleukin-6 — Ajinomoto, Cangene,
 Yeda, Genetics Institute, Novartis
 interleukin-6 fusion protein
 interleukin-6 fusion toxin — Ligand, Serono
 interleukin-7 -- IC Innovations
 interleukin-7 receptor -- Immunex
 interleukin-8 antagonists -- Kyowa
 Hakko/Millennium/Pfizer
 interleukin-9 antagonists -- Genaera
 Interleukin-10 — DNAX, Schering-Plough
 Interleukin-10 gene therapy —
 interleukin-12 -- Genetics Institute,
 Hoffman La-Roche
 interleukin-13 -- Sanofi
 interleukin-13 antagonists -- AMRAD
 Interleukin-13-PE38QQR
 interleukin-15 -- Immunex
 interleukin-16 -- Research Corp
 interleukin-18 -- GlaxoSmithKline
 Interleukin-18 binding protein -- Serono
 Ior-P3 -- Center of Molecular Immunology
 IP-10 -- NIH
 IPF -- Metabolex
 IR-501 -- Immune Response
 ISIS 9125 -- Isis Pharmaceuticals
 ISURF No. 1554 -- Millennium
 ISURF No. 1866 — Iowa State Univer.
 ITF-1697 -- Italfarmaco
 IxC 162 -- Ixion
 J 695 -- Cambridge Antibody Tech.,
 Genetics Inst., Knoll
 Jagged + FGF -- Repair
 JKC-362 -- Phoenix Pharmaceuticals

【図 13 Q】

図 13Q

JTP-2942 -- Japan Tobacco
 Juman monoclonal antibodies -- Medarex/Raven
 K02 -- Axys Pharmaceuticals
 Keliximab -- IDEC
 Keyhole limpet haemocyanin
 KGF -- Amgen
 KM 871 -- Kyowa
 KPI 135 -- Scios
 KPI-022 -- Scios
 Kringle 5
 KSB 304
 KSB-201 -- KS Biomedix
 L 696418 -- Merck
 L 703801 -- Merck
 L1 -- Acorda
 L-761191 -- Merck
 lactoferrin -- Meristem, Pharming, Agennix
 lactoferrin cardio -- Pharming
 LAG-3 -- Serono
 LAIT -- GEMMA
 LAK cell cytotoxin -- Arizona
 lamellarins -- PharmaMar/University of Malaga
 laminin A peptides -- NIH
 lanotriptyline -- Genetics Institute
 laronidase -- BioMarin
 Lassa fever vaccine
 LCAT -- NIH
 LDP 01 -- Millennium
 LDP 02 -- Millennium
 Lecithinized superoxide dismutase -- Seikagaku
 LeIF adjuvant -- Corixa
 leishmaniasis vaccine -- Corixa
 lenercept -- Hoffman La-Roche
 Lenograstim -- Aventis, Chugai
 lepirudin -- Aventis
 leptin -- Amgen, IC Innovations
 Leptin gene therapy -- Chiron Corporation
 leptin, 2nd-generation -- Amgen
 leridistim -- Pharmacia
 leuprolide, ProMaxx -- Epic
 leuprorelin, oral -- Unigene
 LeuTech -- Papatin
 LEX 032 -- SuperGen
 LiDEPT -- Novartis
 Lintuzumab (anti-CD33 MAb) -- Protein Design Labs
 lipase -- Altus Biologics
 lipid A vaccine -- EntreMed
 lipid-linked anchor Tech. -- ICRT, ID Biomedical
 liposome-CD4 Tech. -- Sheffield
 Listeria monocytogenes vaccine
 LMB 1
 LMB 7
 LMB 9 -- Battelle Memorial Institute, NIH
 LM-CD45 -- Cantab Pharmaceuticals
 lovastatin -- Merck
 LSA-3
 LT- β receptor -- Biogen
 lung cancer vaccine -- Corixa
 lusupultide -- Scios
 L-Vax -- AVAX
 LY 355455 -- Eli Lilly
 LY 366405 -- Eli Lilly
 LY-355101 -- Eli Lilly
 Lyme disease DNA vaccine -- Vical/Aventis Pasteur
 Lyme disease vaccine -- Aquila Biopharmaceuticals, Aventis, Pasteur, Symbicom, GlaxoSmithKline, Hyland Immuno, MedImmune
 Lymphocytic choriomeningitis virus vaccine
 lymphoma vaccine -- Biomira, Genitope
 LYP18
 lys plasminogen, recombinant
 Lysosomal storage disease gene therapy -- Avigen
 lysostaphin -- Nutrition 21
 M 23 -- Gruenenthal

【図 13 R】

図 13R

M1 monoclonal antibodies -- Acorda
 Therapeutics
 MA 16N7C2 -- Corvas Intl.
 malaria vaccine -- GlaxoSmithKline,
 AdProTech, Antigenics, Apovia, Aventis
 Pasteur, Axis Genetics, Behringwerke,
 CDCP, Chiron Vaccines, Genzyme
 Transgenics, Hawaii, MedImmune, NIH,
 NYU, Oxxon, Roche/Saramane, Biotech
 Australia, Rx Tech
 Malaria vaccine CDC/NIIMALVAC-1
 malaria vaccine, multicomponent
 mammaglobin -- Corixa
 mammastatin -- Biotherapeutics
 mannan-binding lectin -- Natlmmu
 mannan-MUC1 -- Psiron
 MAP 30
 Marinovir -- Phytera
 MARstem -- Maret
 MB-015 -- Mochida
 MBP -- ImmuLogic
 MCI-028 -- Mitsubishi-Tokyo
 MCIF -- Human Genome Sciences
 MDC -- Advanced BioScience -- Akzo
 Nobel, ICOS
 MDX 11 -- Medarex
 MDX 210 -- Medarex
 MDX 22 -- Medarex
 MDX 22
 MDX 240 -- Medarex
 MDX 33
 MDX 44 -- Medarex
 MDX 447 -- Medarex
 MDX H210 -- Medarex
 MDX RA -- Houston BioTech., Medarex
 ME-104 -- Pharmexa
 Measles vaccine
 Mecasermin -- Cephalon/Chiron, Chiron
 MEDI 488 -- MedImmune
 MEDI 500
 MEDI 507 -- BioTransplant
 melanin concentrating hormone --
 Neurocrine Biosciences
 melanocortins -- OMRF
 Melanoma monoclonal antibodies --
 Viragen
 melanoma vaccine -- GlaxoSmithKline,
 Akzo Nobel, Avant, Aventis Pasteur,
 Bavarian Nordic, Biovector, CancerVax,
 Genzyme Molecular Oncology, Humbolt,
 ImClone Systems, Memorial, NYU,
 Oxxon
 Melanoma vaccine Magevac -- Therion
 memory enhancers -- Scios
 meningococcal B vaccine -- Chiron
 meningococcal vaccine -- CAMR
 Meningococcal vaccine group B conjugate
 -- North American Vaccine
 Meningococcal vaccine group B
 recombinant -- BioChem Vaccines,
 Microscience
 Meningococcal vaccine group Y conjugate
 -- North American Vaccine
 Meningococcal vaccine groups A B and C
 conjugate -- North American Vaccine
 Mepolizumab -- GlaxoSmithKline
 Metastatin -- EntreMed, Takeda
 Met-CkB7 -- Human Genome Sciences
 met-enkephalin -- TNI
 METH-1 -- Human Genome Sciences
 methioninase -- AntiCancer
 Methionine lyase gene therapy --
 AntiCancer
 Met-RANTES -- Genexa Biomedical,
 Serono
 Metreleptin
 Microtubule inhibitor MAb
 Immunogen/Abgenix
 MGDF -- Kirin
 MGv -- Progenics
 micrin -- Endocrine
 microplasmin -- ThromboGenics
 MIF -- Genetics Institute

【図 13 S】

図 13S

migration inhibitory factor -- NIH
 Mim CD4.1 -- Xycte Therapies
 mirostipen -- Human Genome Sciences
 Mitumomab (BEC-2) -- ImClone Systems,
 Merck KGaA
 MK 852 -- Merck
 MLN 1202 (Anti-CCR2 monoclonal
 antibody) -- Millenium Pharmaceuticals
 Mobenakin -- NIS
 molgramostim -- Genetics Institute,
 Novartis
 monoclonal antibodies --
 Abgenix/Celltech, Immusol/ Medarex,
 Viragen/ Roslin Institute, Cambridge
 Antibody Tech./Elan
 MAb 108 --
 MAb 10D5 --
 MAb 14.18-interleukin-2 immunocytokine -
 - Lexigen
 MAb 14G2a --
 MAb 15A10 --
 MAb 170 -- Biomira
 MAb 177Lu CC49 --
 MAb 17F9
 MAb 1D7
 MAb 1F7 -- Immune Network
 MAb 1H10-doxorubicin conjugate
 MAb 26-2F
 MAb 2A11
 MAb 2E1 -- RW Johnson
 MAb 2F5
 MAb 31.1 -- International BioImmune
 Systems
 MAb 32 -- Cambridge Antibody Tech.,
 Peptech
 MAb 323A3 -- Centocor
 MAb 3C5
 MAb 3F12
 MAb 3F8
 MAb 42/6
 MAb 425 -- Merck KGaA
 MAb 447-52D -- Merck Sharp & Dohme
 MAb 45-2D9- -- haematoporphyrin
 conjugate
 MAb 4B4
 MAb 4E3-CPA conjugate -- BCM
 Oncologia
 MAb 4E3-daunorubicin conjugate
 MAb 50-6
 MAb 50-61A -- Institut Pasteur
 MAb 5A8 -- Biogen
 MAb 791T/36-methotrexate conjugate
 MAb 7c11.e8
 MAb 7E11 C5-selenocystamine conjugate
 MAb 93KA9 -- Novartis
 MAb A5B7-cisplatin conjugate --
 Biodynamics Research, Pharmacia
 MAb A5B7-I-131
 MAb A7
 MAb A717 -- Exocell
 MAb A7-zinostatin conjugate
 MAb ABX-RB2 -- Abgenix
 MAb ACA 11
 MAb AFP-I-131 -- Immunomedics
 MAb AP1
 MAb AZ1
 MAb B3-LysPE40 conjugate
 MAb B4 -- United Biomedical
 MAb B43 Genistein-conjugate
 MAb B43.13-Tc-99m -- Biomira
 MAb B43-PAP conjugate
 MAb B4G7-gelonin conjugate
 MAb BCM 43-daunorubicin conjugate --
 BCM Oncologia
 MAb BIS-1
 MAb BMS 181170 -- Bristol-Myers Squibb
 MAb BR55-2
 MAb BW494
 MAb C 242-DM1 conjugate -- ImmunoGen
 MAb C242-PE conjugate
 MAb c30-6
 MAb CA208-cytorhodin-S conjugate --
 Hoechst Japan
 MAb CC49 -- Enzon

【図 13 T】

図 13T

MAB ch14.18 –	MAB LL2-Y-90
MAB CH14.18-GM-CSF fusion protein -- Lexigen	MAB LS2D617 -- Hybritech
MAB chCE7	MAB LYM-1-gelonin conjugate
MAB CI-137 -- AMRAD	MAB LYM-1-I-131
MAB cisplatin conjugate	MAB LYM-1-Y-90
MAB CLB-CD19	MAB LYM-2 -- Peregrine
MAB CLB-CD19v	MAB M195
MAB CLL-1 -- Peregrine	MAB M195-bismuth 213 conjugate -- Protein Design Labs
MAB CLL-1-GM-CSF conjugate	MAB M195-gelonin conjugate
MAB CLL-1-IL-2 conjugate -- Peregrine	MAB M195-I-131
MAB CLN IgG -- doxorubicin conjugates	MAB M195-Y-90
MAB conjugates -- Tanox	MAB MA 33H1 -- Sanofi
MAB D612	MAB MAD11
MAB Dal B02	MAB MGB2
MAB DC101 -- ImClone	MAB MINT5
MAB EA 1 –	MAB MK2-23
MAB EC708 -- Biovation	MAB MOC31 ETA(252-613) conjugate
MAB EP-5C7 -- Protein Design Labs	MAB MOC-31-In-111
MAB ERIC-1 -- ICRT	MAB MOC-31-PE conjugate
MAB F105 gene therapy	MAB MR6 –
MAB FC 2.15	MAB MRK-16 -- Aventis Pasteur
MAB G250 -- Centocor	MAB MS11G6
MAB GA6	MAB MX-DTPA BrE-3
MAB GA733	MAB MY9
MAB Gliomab-H -- Viventia Biotech	MAB Nd2 -- Tosoh
MAB HB2-saporin conjugate	MAB NG-1 -- Hygeia
MAB HD 37 –	MAB NM01 – Nissin Food
MAB HD37-ricin chain-A conjugate	MAB OC 125
MAB HNK20 -- Acambis	MAB OC 125-CMA conjugate
MAB huN901-DM1 conjugate -- ImmunoGen	MAB OKI-1 -- Ortho-McNeil
MAB I-131 CC49 -- Corixa	MAB OX52 -- Bioproducts for Science
MAB ICO25	MAB PMA5
MAB ICR12-CPG2 conjugate	MAB PR1
MAB ICR-62	MAB prost 30
MAB IRac-ricin A conjugate	MAB R-24
MAB K1	MAB R-24 α Human GD3 -- Celltech
MAB KS1-4-methotrexate conjugate	MAB RFB4-ricin chain A conjugate
MAB L6 -- Bristol-Myers Squibb, Oncogen	MAB RFT5-ricin chain A conjugate
MAB LiCO 16-88	MAB SC 1
MAB LL2-I-131 – Immunomedics	MAB SM-3 -- ICRT
	MAB SMART 1D10 -- Protein Design Labs

【図 13 U】

図 13U

MAB SMART ABL 364 -- Novartis	muplestim -- Genetics Institute, Novartis,
MAB SN6f	DSM Anti-Infectives
MAB SN6f-deglycosylated ricin A chain	murine MAB -- KS Biomedix
conjugate --	Mutant somatropin -- JCR Pharmaceutical
MAB SN6j	MV 833 -- Toagosei
MAB SN7-ricin chain A conjugate	Mycoplasma pulmonis vaccine
MAB T101-Y-90 conjugate -- Hybritech	Mycoprex -- XOMA
MAB T-88 -- Chiron	myeloperoxidase -- Henogen
MAB TB94 -- Cancer ImmunoBiology	myostatin -- Genetics Institute
MAB TEC 11	Nacolomab tafenatox -- Pharmacia
MAB TES-23 -- Chugai	Nagrecor -- Scios
MAB TM31 -- Avant	nagrestipen -- British Biotech
MAB TNT-1 -- Cambridge Antibody Tech.,	NAP-5 -- Corvas Intl.
Peregrine	NAPc2 -- Corvas Intl.
MAB TNT-3	nartograstim -- Kyowa
MAB TNT-3 -- IL2 fusion protein --	Natalizumab -- Protein Design Labs
MAB TP3-At-211	Nateplase -- NIH, Nihon Schering
MAB TP3-PAP conjugate --	nateplase -- Schering AG
MAB UJ13A -- ICRT	NBI-3001 -- Neurocrine Biosci.
MAB UN3	NBI-5788 -- Neurocrine Biosci.
MAB ZME-018-gelonin conjugate	NBI-6024 -- Neurocrine Biosci.
MAB-BC2 -- GlaxoSmithKline	Nef inhibitors -- BRI
MAB-DM1 conjugate -- ImmunoGen	Neisseria gonorrhoea vaccine -- Antex
MAB-ricin-chain-A conjugate -- XOMA	Biologics
MAB-temoporfin conjugates	Neomycin B-arginine conjugate
Monopharm C -- Viventia Biotech	Nerelimomab -- Chiron
monteplase -- Eisai	Nerve growth factor -- Amgen -- Chiron,
montirelin hydrate -- Gruenenthal	Genentech
moroctocog alfa -- Genetics Institute	Nerve growth factor gene therapy
Moroctocog-alfa -- Pharmacia	nesiritide citrate -- Scios
MP 4	neuregulin-2 -- CeNeS
MP-121 -- Biopharm	neurocan -- NYU
MP-52 -- Biopharm	neuronal delivery system -- CAMR
MRA -- Chugai	Neutrophil inhibitory Factor -- Corvas
MS 28168 -- Mitsui Chemicals, Nihon	Neuroprotective vaccine -- University of
Schering	Auckland
MSH fusion toxin -- Ligand	neurotrophic chimaeras -- Regeneron
MSI-99 -- Genaera	neurotrophic factor -- NsGene, CereMedix
MT 201 -- Micromet	NeuroVax -- Immune Response
Muc-1 vaccine -- Corixa	neurturin -- Genentech
mucosal tolerance -- Aberdeen	neutral endopeptidase -- Genentech
mullerian inhibiting subst	NGF enhancers -- NeuroSearch

【図 13 V】

図 13V

NHL vaccine -- Large Scale Biology	onychomycosis vaccine -- Boehringer
NIP45 -- Boston Life Sciences	Ingelheim
NKI-B20	opebecan -- XOMA
NM 01 -- Nissin Food	opioids -- Arizona
NMI-139 -- NitroMed	Oprelvekin -- Genetics Institute
NMMP -- Genetics Institute	Oregovomab -- AltaRex
NN-2211 -- Novo Nordisk	Org-33408 b-- Akzo Nobel
Noggin -- Regeneron	Orolip DP -- EpiCept
Nonacog alfa	oryzacystatin
Norelin -- Biostar	OSA peptides -- GenSci Regeneration
Norwalk virus vaccine	osteoblast-cadherin GF -- Pharis
NRLU 10 -- NeoRx	Osteocalcin-thymidine kinase gene
NRLU 10 PE -- NeoRx	therapy
NT-3 -- Regeneron	osteogenic protein -- Curis
NT-4/5 -- Genentech	osteopontin -- OraPharma
NU 3056	osteoporosis peptides -- Integra, Telios
NU 3076	osteoprotegerin -- Amgen, SnowBrand
NX 1838 -- Gilead Sciences	otitis media vaccines -- Antex Biologics
NY ESO-1/CAG-3 antigen -- NIH	ovarian cancer -- University of Alabama
NYVAC-7 -- Aventis Pasteur	OX40-IgG fusion protein -- Cantab,
NZ-1002 -- Novazyme	Xenova
obesity therapy -- Nobex	P 246 -- Diatide
OC 10426 -- Ontogen	P 30 -- Alfacell
OC 144093 -- Ontogen	p1025 -- Active Biotech
OCIF -- Sankyo	P-113 [^] -- Demegen
Oct-43 -- Otsuka	P-16 peptide -- Transition Therapeutics
Odulimomab -- Immunotech	p43 -- Ramot
OK PSA - liposomal	P-50 peptide -- Transition Therapeutics
OKT3-gamma-1-ala-ala	p53 + RAS vaccine -- NIH, NCI
OM 991	PACAP(1-27) analogue
OM 992	paediatric vaccines -- Chiron
Omalizumab -- Genentech	Pafase -- ICOS
oncoimmunin-L -- NIH	PAGE-4 plasmid DNA -- IDEC
Oncolysin B -- ImmunoGen	PAI-2 -- Biotech Australia, Human
Oncolysin CD6 -- ImmunoGen	Therapeutics
Oncolysin M -- ImmunoGen	Palifermin (keratinocyte growth factor) --
Oncolysin S -- ImmunoGen	Amgen
Oncophage -- Antigenics	Palivizumab -- MedImmune
Oncostatin M -- Bristol-Myers Squibb	PAM 4 -- Merck
OncoVax-CL -- Jenner Biotherapies	pamiteplase -- Yamanouchi
OncoVax-P -- Jenner Biotherapies	pancreatin, Minitabs -- Eurand
onercept -- Yeda	Pangen -- Fournier

【図 13 W】

図 13W

Pantarin – Selective Genetics	Pemtumomab
Parainfluenza virus vaccine – Pharmacia, Pierre Fabre	Penetratin -- Cyclacel
paraoxanase -- Esperion	Pepscan – Antisoma
parathyroid hormone – Abiogen, Korea Green Cross	peptide G – Peptech, ICRT
Parathyroid hormone (1-34) -- Chugai/Suntory	peptide vaccine -- NIH ,NCI
Parkinson's disease gene therapy -- Cell Genesys/ Ceregene	Pexelizumab
Parvovirus vaccine -- MedImmune	pexiganan acetate -- Genaera
PCP-Scan – Immunomedics	Pharmaprojects No. 3179 -- NYU
PDGF -- Chiron	Pharmaprojects No. 3390 -- Ernest Orlando
PDGF cocktail -- Theratechnologies	Pharmaprojects No. 3417 -- Sumitomo
peanut allergy therapy -- Dynavax	Pharmaprojects No. 3777 -- Acambis
PEG anti-ICAM MAb -- Boehringer Ingelheim	Pharmaprojects No. 4209 -- XOMA
PEG asparaginase -- Enzon	Pharmaprojects No. 4349 -- Baxter Intl.
PEG glucocerebrosidase	Pharmaprojects No. 4651
PEG hirudin – Knoll	Pharmaprojects No. 4915 -- Avanir
PEG interferon-alpha-2a -- Roche	Pharmaprojects No. 5156 -- Rhizogenics
PEG interferon-alpha-2b + ribavirin – Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals, Schering-Plough	Pharmaprojects No. 5200 -- Pfizer
PEG MAb A5B7 –	Pharmaprojects No. 5215 -- Origene
Pegacaristim – Amgen -- Kirin Brewery -- ZymoGenetics	Pharmaprojects No. 5216 -- Origene
Pegaldesleukin -- Research Corp	Pharmaprojects No. 5218 -- Origene
pegaspargase -- Enzon	Pharmaprojects No. 5267 -- ML Laboratories
pegfilgrastim -- Amgen	Pharmaprojects No. 5373 -- MorphoSys
PEG-interferon Alpha -- Viragen	Pharmaprojects No. 5493 -- Metabolex
PEG-interferon Alpha 2A -- Hoffman La- Roche	Pharmaprojects No. 5707 -- Genentech
PEG-interferon Alpha 2B -- Schering- Plough	Pharmaprojects No. 5728 -- Autogen
PEG-r-hirudin -- Abbott	Pharmaprojects No. 5733 -- BioMarin
PEG-rHuMGDF -- Amgen	Pharmaprojects No. 5757 -- NIH
PEG-uricase -- Mountain View	Pharmaprojects No. 5765 -- Gryphon
Pegvisomant – Genentech	Pharmaprojects No. 5830 -- AntiCancer
PEGylated proteins, PolyMASC -- Valentis	Pharmaprojects No. 5839 -- Dyax
PEGylated recombinant native human leptin -- Roche	Pharmaprojects No. 5849 -- Johnson & Johnson
	Pharmaprojects No. 5860 -- Mitsubishi- Tokyo
	Pharmaprojects No. 5869 -- Oxford GlycoSciences
	Pharmaprojects No. 5883 -- Asahi Brewery
	Pharmaprojects No. 5947 -- StressGen

【図 13 X】

図 13X

Pharmaprojects No. 5961 -- Theratechnologies	Plasminogen activators -- Abbott Laboratories, American Home Products, Boehringer Mannheim, Chiron
Pharmaprojects No. 5962 -- NIH	Corporation, DuPont Pharmaceuticals, Eli Lilly, Shionogi, Genentech, Genetics
Pharmaprojects No. 5966 -- NIH	Institute, GlaxoSmithKline, Hemispherx
Pharmaprojects No. 5994 -- Pharming	Biopharma, Merck & Co, Novartis, Pharmacia Corporation, Wakamoto, Yeda
Pharmaprojects No. 5995 -- Pharming	plasminogen-related peptides -- Bio-Tech. General/MGH
Pharmaprojects No. 6023 -- IMMUCON	platelet factor 4 -- RepliGen
Pharmaprojects No. 6063 -- Cytoclonal	Platelet-derived growth factor -- Amgen -- ZymoGenetics
Pharmaprojects No. 6073 -- SIDDCO	plusonermin -- Hayashibara
Pharmaprojects No. 6115 -- Genzyme	PMD-2850 -- Protherics
Pharmaprojects No. 6227 -- NIH	Pneumococcal vaccine -- Antex Biologics, Aventis Pasteur
Pharmaprojects No. 6230 -- NIH	Pneumococcal vaccine intranasal -- BioChem Vaccines/Biovector
Pharmaprojects No. 6236 -- NIH	PR1A3
Pharmaprojects No. 6243 -- NIH	PR-39
Pharmaprojects No. 6244 -- NIH	pralmorelin -- Kaken
Pharmaprojects No. 6281 -- Senetek	Pretarget-Lymphoma -- NeoRx
Pharmaprojects No. 6365 -- NIH	Priliximab -- Centocor
Pharmaprojects No. 6368 -- NIH	PRO 140 -- Progenics
Pharmaprojects No. 6373 -- NIH	PRO 2000 -- Procept
Pharmaprojects No. 6408 -- Pan Pacific	PRO 367 -- Progenics
Pharmaprojects No. 6410 -- Athersys	PRO 542 -- Progenics
Pharmaprojects No. 6421 -- Oxford GlycoSciences	pro-Apo A-I -- Esperion
Pharmaprojects No. 6522 -- Maxygen	prolactin -- Genzyme
Pharmaprojects No. 6523 -- Pharis	Prosaptide TX14(A) -- Bio-Tech. General
Pharmaprojects No. 6538 -- Maxygen	prostate cancer antibodies -- Immunex, UroCor
Pharmaprojects No. 6554 -- APALEXO	prostate cancer antibody therapy -- Genentech/UroGenesys, Genotherapeutics
Pharmaprojects No. 6560 -- Ardana	prostate cancer immunotherapeutics -- The PSMA Development Company
Pharmaprojects No. 6562 -- Bayer	prostate cancer vaccine -- Aventis Pasteur, Zonagen, Corixa, Dendreon, Jenner Biotherapies, Therion Biologics
Pharmaprojects No. 6569 -- Eos	
Phenoxazine	
Phenylase -- Ibex	
Pigment epithelium derived factor -- plasminogen activator inhibitor-1, recombinant -- DuPont Pharmaceuticals	

【 図 1 3 Y 】

図 13Y

prostate-specific antigen -- EntreMed	rDnase -- Genentech
protein A -- RepliGen	RDP-58 -- SangStat
protein adhesives -- Enzon	RecepTox-Fce -- Keryx
protein C -- Baxter Intl., PPL Therapeutics, ZymoGenetics	RecepTox-GnRH -- Keryx, MTR Technologies
protein C activator -- Gilead Sciences	RecepTox-MBP -- Keryx, MTR Technologies
protein kinase R antags -- NIH	recFSH -- Akzo Nobel, Organon
protirelin -- Takeda	REGA 3G12
protocadherin 2 -- Caprion	Regavirumab -- Teijin
Pro-urokinase -- Abbott, Bristol-Myers Squibb, Dainippon, Tosoh -- Welfide	relaxin -- Connetics Corp
P-selectin glycoprotein ligand-1 -- Genetics Institute	Renal cancer vaccine -- Macropharm
pseudomonal infections -- InterMune	repifermin -- Human Genome Sciences
Pseudomonas vaccine -- Cytovax	Respiratory syncytial virus PFP-2 vaccine -- Wyeth-Lederle
PSGL-Ig -- American Home Products	Respiratory syncytial virus vaccine -- GlaxoSmithKline, Pharmacia, Pierre Fabre
PSP-94 -- Procyon	Respiratory syncytial virus vaccine inactivated
PTH 1-34 -- Nobex	Respiratory syncytial virus-parainfluenza virus vaccine -- Aventis Pasteur, Pharmacia
Quilimmune-M -- Antigenics	Retepase -- Boehringer Mannheim, Hoffman La-Roche
R 744 -- Roche	Retropep -- Retroscreen
R 101933	RFB4 (dsFv) PE38
R 125224 -- Sankyo	RFI 641 -- American Home Products
RA therapy -- Cardion	RFTS -- UAB Research Foundation
Rabies vaccine recombinant -- Aventis Pasteur, BioChem Vaccines, Kaketsuken Pharmaceuticals	RG 12986 -- Aventis Pasteur
RadioTheraCIM -- YM BioSciences	RG 83852 -- Aventis Pasteur
Ramot project No. 1315 -- Ramot	RG-1059 -- RepliGen
Ramot project No. K-734A -- Ramot	rGCR -- NIH
Ramot project No. K-734B -- Ramot	rGLP-1 -- Restoragen
Ranibizumab (Anti-VEGF fragment) -- Genentech	rGRF -- Restoragen
RANK -- Immunex	rh Insulin -- Eli Lilly
ranpirnase -- Alfacell	RHAMM targeting peptides -- Cangene
ranpirnase-anti-CD22 MAb -- Alfacell	rHb1.1 -- Baxter Intl.
RANTES inhibitor -- Milan	rhCC10 -- Claragen
RAPID drug delivery systems -- ARIAD	rhCG -- Serono
rasburicase -- Sanofi	Rheumatoid arthritis gene therapy
rBPI-21, topical -- XOMA	
RC 529 -- Corixa	
rCFTR -- Genzyme Transgenics	
RD 62198	

【 図 1 3 Z 】

図 13Z

Rheumatoid arthritis vaccine -- Veterans Affairs Medical Center	SC 56929 -- Pharmacia
rhLH -- Serono	SCA binding proteins -- Curis, Enzon
Ribozyme gene therapy -- Genset	scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories, Schering AG
Rickettsial vaccine recombinant	ScFv(FRP5)-ETA --
RIGScan CR -- Neoprobe	ScFv6C6-PE40 --
RIP-3 -- Rigel	SCH 55700 -- Celltech
Rituximab -- Genentech	Schistosomiasis vaccine -- Glaxo Wellcome/Medeva, Brazil
RK-0202 -- RxKinetix	SCPF -- Advanced Tissue Sciences
RLT peptide -- Esperion	scuPA-suPAR complex -- Hadasit
rM/NEI -- IVAX	SD-9427 -- Pharmacia
rmCRP -- Immtech	SDF-1 -- Ono
RN-1001 -- Renovo	SDZ 215918 -- Novartis
RN-3 -- Renovo	SDZ 280125 -- Novartis
RNAse conjugate -- Immunomedics	SDZ 89104 -- Novartis
RO 631908 -- Roche	SDZ ABL 364 -- Novartis
Rotavirus vaccine -- Merck	SDZ MMA 383 -- Novartis
RP 431 -- DuPont Pharmaceuticals	Secretin -- Ferring, Repligen
RP-128 -- Resolution	serine protease inhbs -- Pharis
RPE65 gene therapy --	sermorelin acetate -- Serono
RPR 110173 -- Aventis Pasteur	SERP-1 -- Viron
RPR 115135 -- Aventis Pasteur	sertenef -- Dainippon
RPR 116258A -- Aventis Pasteur	serum albumin, Recombinant human -- Aventis Behring
rPSGL-Ig -- American Home Products	serum-derived factor -- Hadasit
r-SPC surfactant -- Byk Gulden	Sevirumab -- Novartis
RSV antibody -- Medimmune	SGN 14 -- Seattle Genetics
Ruplizumab -- Biogen	SGN 15 -- Seattle Genetics
rV-HER-2/neu -- Therion Biologics	SGN 17/19 -- Seattle Genetics
SA 1042 -- Sankyo	SGN 30 -- Seattle Genetics
sacrosidase -- Orphan Medical	SGN-10 -- Seattle Genetics
Sant 7	SGN-11 -- Seattle Genetics
Sargramostim -- Immunex	SH 306 -- DuPont Pharmaceuticals
saruplase -- Gruenenthal	Shanvac-B -- Shantha
Satumomab -- Cytogen	Shigella flexneri vaccine -- Avant, Acambis, Novavax
SB 1 -- COR Therapeutics	Shigella sonnei vaccine --
SB 207448 -- GlaxoSmithKline	sICAM-1 -- Boehringer Ingelheim
SB 208651 -- GlaxoSmithKline	Silteplase -- Genzyme
SB 240683 -- GlaxoSmithKline	SIV vaccine -- Endocon, Institut Pasteur
SB 249415 -- GlaxoSmithKline	SK 896 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
SB 249417 -- GlaxoSmithKline	
SB 6 -- COR Therapeutics	
SB RA 31012 --	

【図 13 A A】

図 13AA

SK-827 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
 Skeletex -- CellFactors
 SKF 106160 -- GlaxoSmithKline
 S-nitroso-AR545C --
 SNTP -- Active Biotech
 somatomedin-1 -- GroPep, Mitsubishi-Tokyo, NIH
 somatomedin-1 carrier protein -- Insmed
 somatostatin -- Ferring
 Somatotropin/
 Human Growth Hormone -- Bio-Tech. General, Eli Lilly
 somatropin -- Bio-Tech. General, Alkermes, ProLease, Aventis Behring, Biovector, Cangene, Dong-A, Eli Lilly, Emisphere, Enact, Genentech, Genzyme Transgenics, Grandis/InfiMed, CSL, InfiMed, MacroMed, Novartis, Novo Nordisk, Pharmacia Serono, TranXenoGen
 somatropin derivative -- Schering AG
 somatropin, AIR -- Eli Lilly
 Somatropin, inhaled -- Eli Lilly/Alkermes
 somatropin, Kabi -- Pharmacia
 somatropin, Orasome -- Novo Nordisk
 Sonermin -- Dainippon Pharmaceutical
 SP(V5.2)C -- Supertek
 SPf66
 sphingomyelinase -- Genzyme
 SR 29001 -- Sanofi
 SR 41476 -- Sanofi
 SR-29001 -- Sanofi
 SS1(dsFV)-PE38 -- NeoPharm
 β 2 microglobulin -- Avidex
 β 2-microglobulin fusion proteins -- NIH
 β -amyloid peptides -- CeNeS
 β -defensin -- Pharis
 Staphylococcus aureus infections -- Inhibitex/ZLB
 Staphylococcus aureus vaccine conjugate -- Nabi
 Staphylococcus therapy -- Tripep
 Staphylokinase -- Biovation, Prothera, Thrombogenetics
 Streptococcal A vaccine -- M6 Pharmaceuticals, North American Vaccine
 Streptococcal B vaccine -- Microscience
 Streptococcal B vaccine recombinant -- Biochem Vaccines
 Streptococcus pyogenes vaccine
 STRL-33 -- NIH
 Subalin -- SRC VB VECTOR
 SUIS -- United Biomedical
 SUIS-LHRH -- United Biomedical
 SUN-E3001 -- Suntory
 super high affinity monoclonal antibodies - - YM BioSciences
 Superoxide dismutase -- Chiron, Enzon, Ube Industries, Bio-Tech, Yeda
 superoxide dismutase-2 -- OXIS
 suppressin -- UAB Research Foundation
 SY-161-P5 -- ThromboGenics
 SY-162 -- ThromboGenics
 Systemic lupus erythematosus vaccine -- MedClone/VivoRx
 T cell receptor peptides -- Xoma
 T cell receptor peptide vaccine
 T4N5 liposomes -- AGI Dermatics
 TACI, soluble -- ZymoGenetics
 targeted apoptosis -- Antisoma
 tasonermin -- Boehringer Ingelheim
 TASP
 TASP-V
 Tat peptide analogues -- NIH
 TBP I -- Yeda
 TBP II
 TBV25H -- NIH
 Tc 99m ior cea1 -- Center of Molecular Immunology
 Tc 99m P 748 -- Diatide
 Tc 99m votumumab -- Intracell
 Tc-99m rh-Annexin V -- Theseus Imaging
 teceleukin -- Biogen

【図 13 B B】

図 13BB

tenecteplase -- Genentech	TM 29 -- Avant
Teriparatide -- Armour Pharmaceuticals, Asahi Kasei, Eli Lilly	TMC-151 -- Tanabe Seiyaku
terlipressin -- Ferring	TNF tumour necrosis factor -- Asahi Kasei
testisin -- AMRAD	TNF Alpha -- CytImmune
Tetrafibricin -- Roche	TNF antibody -- Johnson & Johnson
TFPI -- EntreMed	TNF binding protein -- Amgen
tgD-IL-2 -- Takeda	TNF degradation product -- Oncotech
TGF-Alpha -- ZymoGenetics	TNF receptor -- Immunex
TGF- β -- Kolon	TNF receptor 1, soluble -- Amgen
TGF- β 2 -- Insmed	TNF Tumour necrosis factor-alpha -- Asahi Kasei, Genetech, Mochida
TGF- β 3 -- OSI	TNF-Alpha inhibitor -- Tripep
Thalassaemia gene therapy -- Crucell	TNFR:Fc gene therapy -- Targeted Genetics
TheraCIM-h-R3 -- Center of Molecular Immunology, YM BioSciences	TNF-SAM2
Theradigm-HBV -- Epimmune	Tolerimab -- Innogenetics
Theradigm-HPV -- Epimmune	Toxoplasma gondii vaccine -- GlaxoSmithKline
Theradigm-malaria -- Epimmune	TP 9201 -- Telios
TheraFab -- Antisoma	TP10 -- Avant
ThGRF 1-29 -- Theratechnologies	TP20 -- Avant
ThGRF 1-44 -- Theratechnologies	tPA -- Centocor
Thrombin receptor activating peptide -- Abbott	trafermin -- Scios
thrombomodulin -- Iowa, Novocastra	TRAIL/Apo2L -- Immunex
Thrombopoietin -- Dragon Pharmaceuticals, Genentech	TRAIL-R1 MAb -- Cambridge Antibody Technologies
thrombopoietin, Pliva -- Recepton	transferrin-binding proteins -- CAMR
Thrombospondin 2 --	Transforming growth factor-beta-1 -- Genentech
thrombostatin -- Thromgen	transport protein -- Genesis
thymalfasin -- SciClone	Trastuzumab -- Genentech
thymocartin -- Gedeon Richter	TRH -- Ferring
thymosin Alpha1 -- NIH	Triabin -- Schering AG
thyroid stimulating hormone -- Genzyme	Triconal
tICAM-1 -- Bayer	Triflavin
Tick anticoagulant peptide -- Merck	troponin I -- Boston Life Sciences
TIF -- Xoma	TRP-2 ^A -- NIH
Tifacogin -- Chiron, NIS, Pharmacia	trypsin inhibitor -- Mochida
Tissue factor -- Genentech	TSP-1 gene therapy --
Tissue factor pathway inhibitor	TT-232
TJN-135 -- Tsumura	TTS-CD2 -- Active Biotech
TM 27 -- Avant	

【図 13CC】

図 13CC

Tuberculosis vaccine -- Aventis Pasteur, Genesis	vascular targeting agents -- Peregrine
Tumor Targeted Superantigens -- Active Biotech -- Pharmacia	vasopermeation enhancement agents -- Peregrine
tumour vaccines -- PhotoCure	vasostatin -- NIH
tumour-activated prodrug antibody conjugates -- Millennium/ImmunoGen	VCL -- Bio-Tech. General
tumstatin -- ILEX	VEGF -- Genentech, Scios
Tuvirumab -- Novartis	VEGF inhibitor -- Chugai
TV-4710 -- Teva	VEGF-2 -- Human Genome Sciences
TWEAK receptor -- Immunex	VEGF-Trap -- Regeneron
TXU-PAP	viscumin, recombinant -- Madaus
TY-10721 -- TOA Eiyo	Vitaxin
Type I diabetes vaccine -- Research Corp	Vitrax -- ISTA Pharmaceuticals
Typhoid vaccine CVD 908	West Nile virus vaccine -- Bavarian Nordic
U 143677 -- Pharmacia	WP 652
U 81749 -- Pharmacia	WT1 vaccine -- Corixa
UA 1248 -- Arizona	WX-293 -- Willex BioTech.
UGIF -- Sheffield	WX-360 -- Willex BioTech.
UIC 2	WX-UK1 -- Willex BioTech.
UK 101	XMP-500 -- XOMA
UK-279276 -- Corvas Intl.	XomaZyme-791 -- XOMA
urodilatin -- Pharis	XTL 001 -- XTL Biopharmaceuticals
urofolitrophin -- Serono	XTL 002 -- XTL Biopharmaceuticals
Urokinase -- Abbott	yeast delivery system -- GlobelImmune
uteroferrin -- Pepgen	Yersinia pestis vaccine
V 20 -- GLYCODesign	YIGSR-Stealth -- Johnson & Johnson
V2 vasopressin receptor gene therapy	Yissum Project No. D-0460 -- Yissum
vaccines -- Active Biotech	YM 207 -- Yamanouchi
Varicella zoster glycoprotein vaccine -- Research Corporation Technologies	YM 337 -- Protein Design Labs
Varicella zoster virus vaccine live -- Cantab Pharmaceuticals	Yttrium-90 labelled biotin
Vascular endothelial growth factor -- Genentech, University of California	Yttrium-90-labeled anti-CEA MAb T84.66
Vascular endothelial growth factors -- R&D Systems	—
	ZD 0490 -- AstraZeneca
	ziconotide -- Elan
	ZK 157138 -- Berlex Laboratories
	Zolimomab aritox
	Zorcell -- Immune Response
	ZRXL peptides -- Novartis

【配列表】

[2009515508000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月6日(2009.1.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

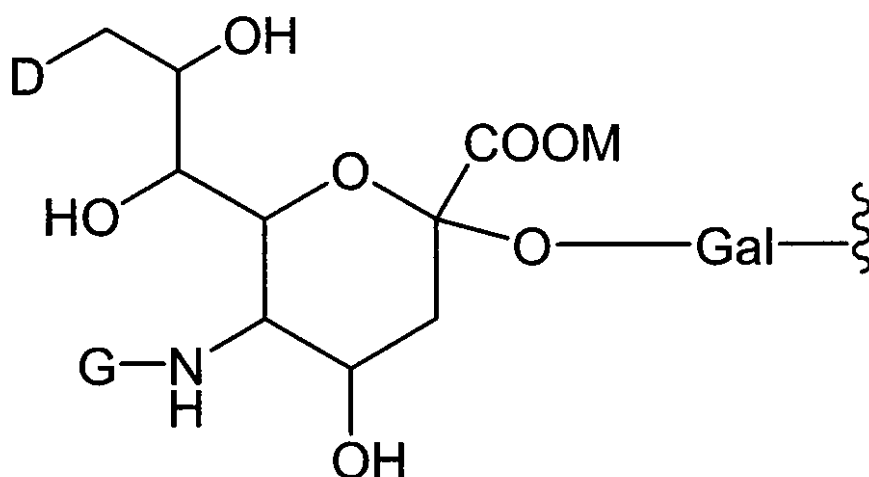
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式、

【化 1】



(式中、

Dは、 —OH および $\text{R}^1\text{—L—HN—}$ から選択されるメンバーであり、

Gは、 $\text{R}^1\text{—L—}$ および $\text{—C(O)(C}_1\sim\text{C}_6\text{)アルキル—R}^1$ から選択されるメンバーであり、

R^1 は、直鎖ポリ(エチレングリコール)残基および分岐ポリ(エチレングリコール)残基から選択されるメンバーを含む部分であり、および

Mは、H、金属および単一の陰電荷から選択されるメンバーであり、

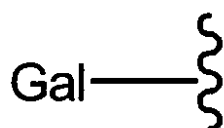
Lは、結合、置換または非置換アルキルおよび置換または非置換ヘテロアルキルから選択されるメンバーであるリンカーであり、

ここで、DがOHであるときGは $\text{R}^1\text{—L—}$ であり、およびGが $\text{—C(O)(C}_1\sim\text{C}_6\text{)アルキル—}$ であるときDは $\text{R}^1\text{—L—NH—}$ である)

を有する修飾シアル残基を含むグリコシルリンカーを含む因子VII／因子VIIaペプチド複合体の製造方法であって、

(a) グリコシル部分、

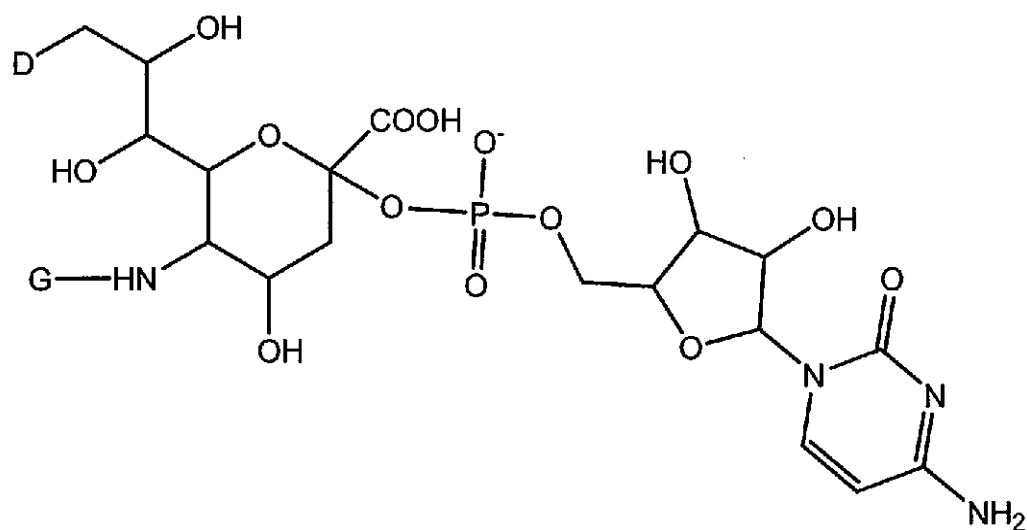
【化 2】



を含む因子VII／因子VIIaペプチドを、

式、

【化 3】



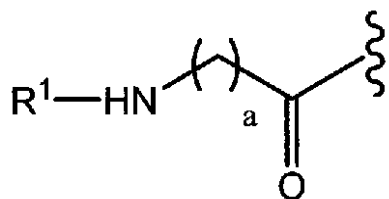
を有する PEG-シアル酸ドナー部分と、

前記 PEG-シアル酸を前記グリコシル部分の Gal へ転移させる酵素に、前記転移に適切な条件で接触させて、前記複合体を形成するステップを含む、方法。

【請求項 2】

L-R¹ が、式、

【化 4】



(式中、

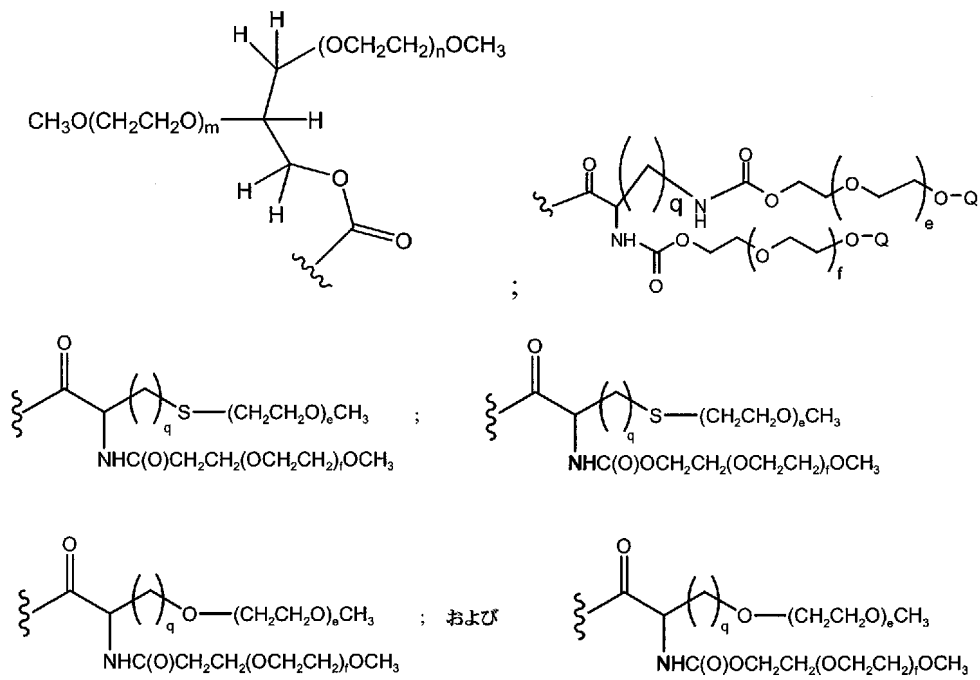
a は、0 ~ 20 から選択される整数である)

を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

R¹ が、

【化 5】



(式中、

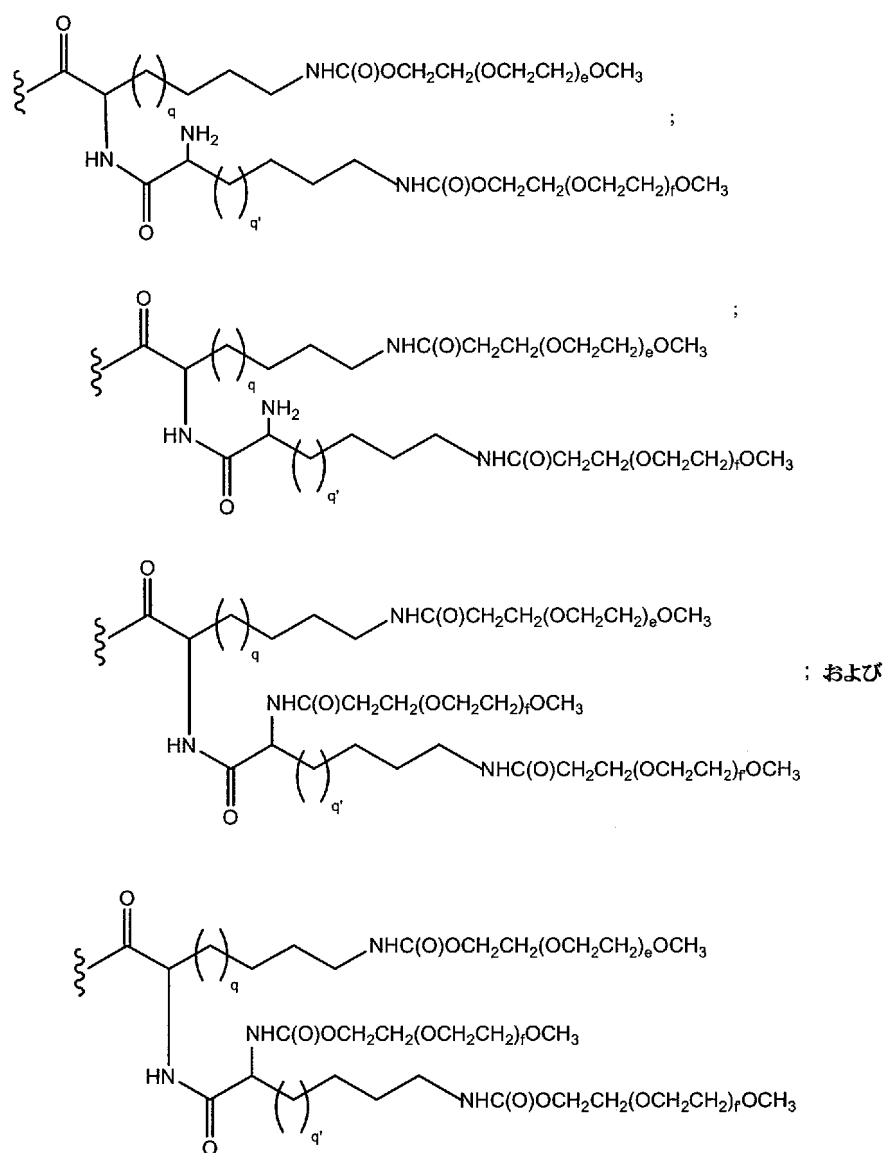
e、f、mおよびnは、1～2500から独立して選択される整数であり、およびqは、0～20から選択される整数である)

から選択されるメンバーである構造を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

R¹が、

【化 6】



(式中、

e 、 f および f' は、1～2500 から独立して選択される整数であり、および

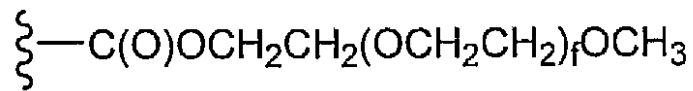
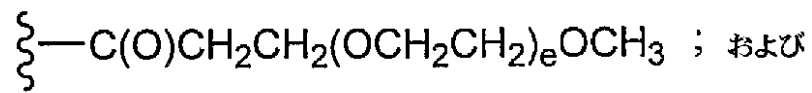
q および q' は、1～20 から独立して選択される整数である)

から選択されるメンバーである構造を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

R^1 が、

【化 7】



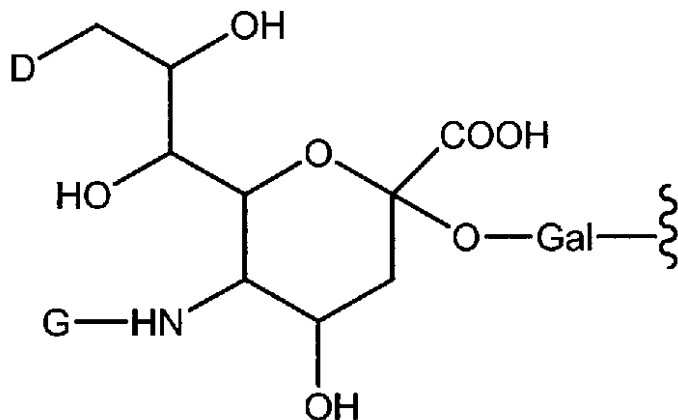
(式中、

e および f は、1 ～ 2 5 0 0 から独立して選択される整数である)
から選択されるメンバーである構造を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記グリコシルリンカーが、式、

【化 8】

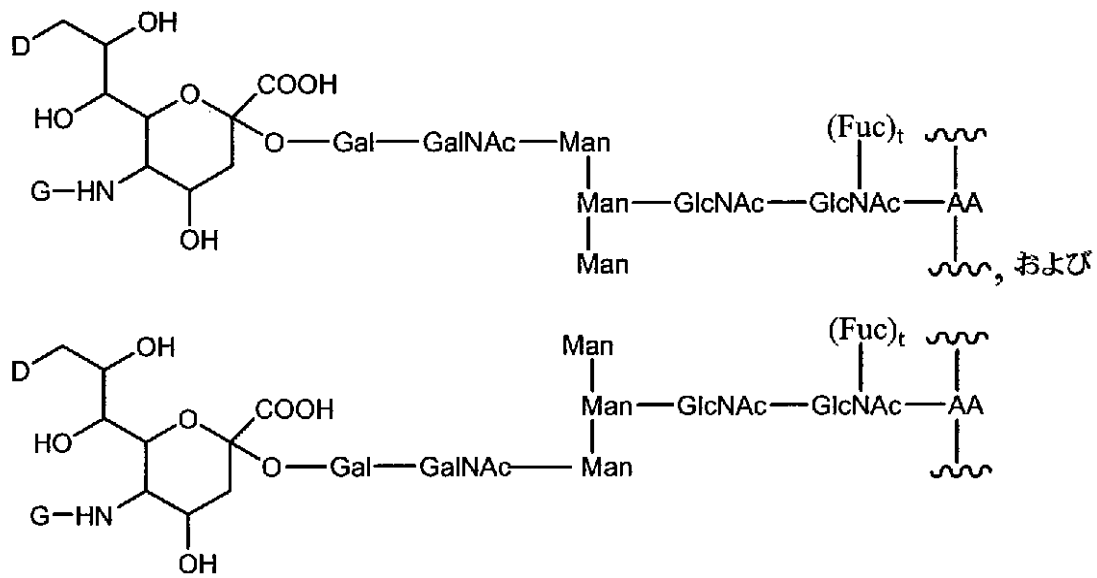


を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペプチド複合体が、

【化 9】



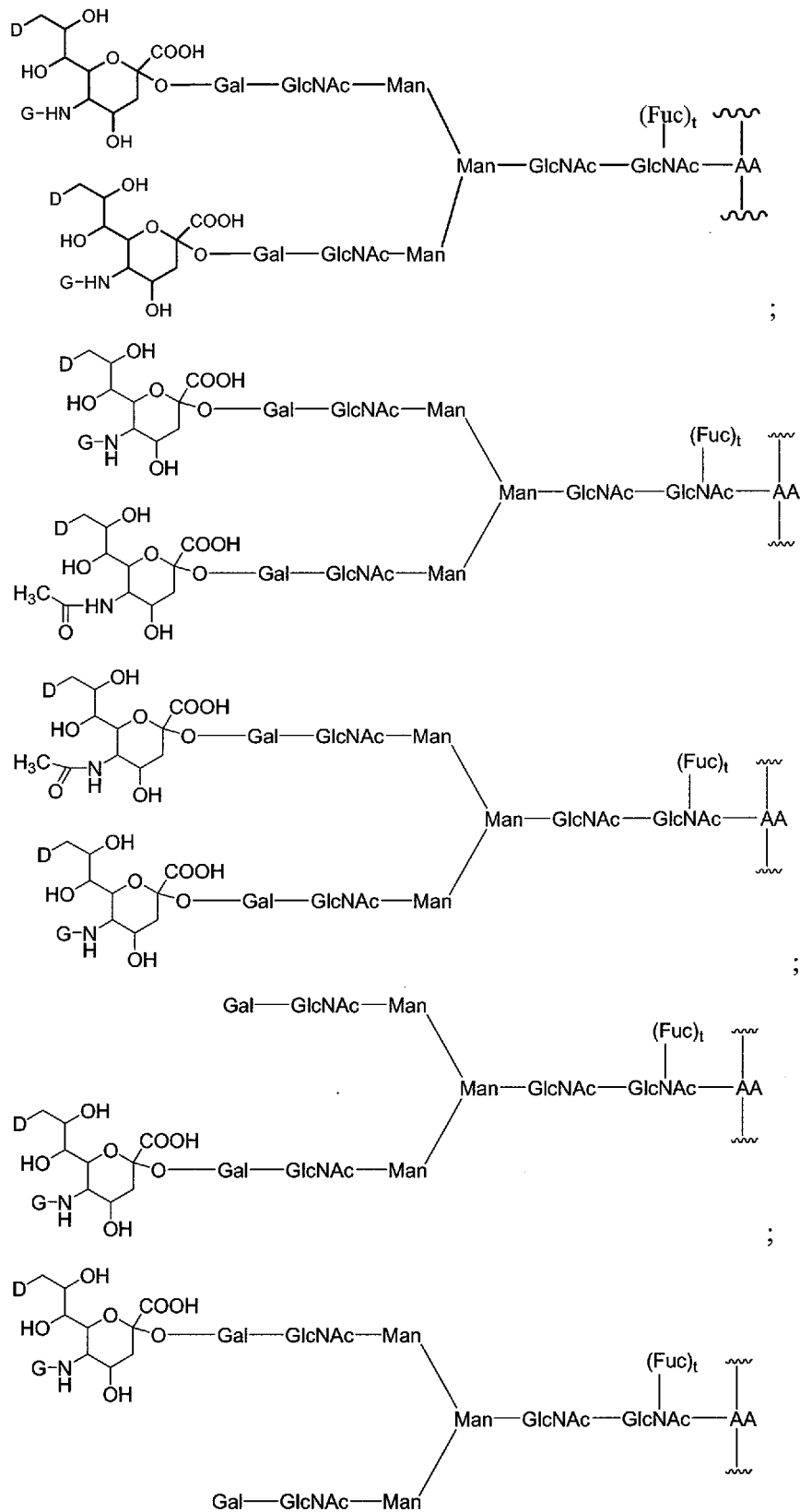
(式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数である)

から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記ペプチド複合体が、少なくとも1つの前記グリコシルリンカーを含み、ここで、前記グリコシルリンカーの各々は、以下の式、

【化 10】



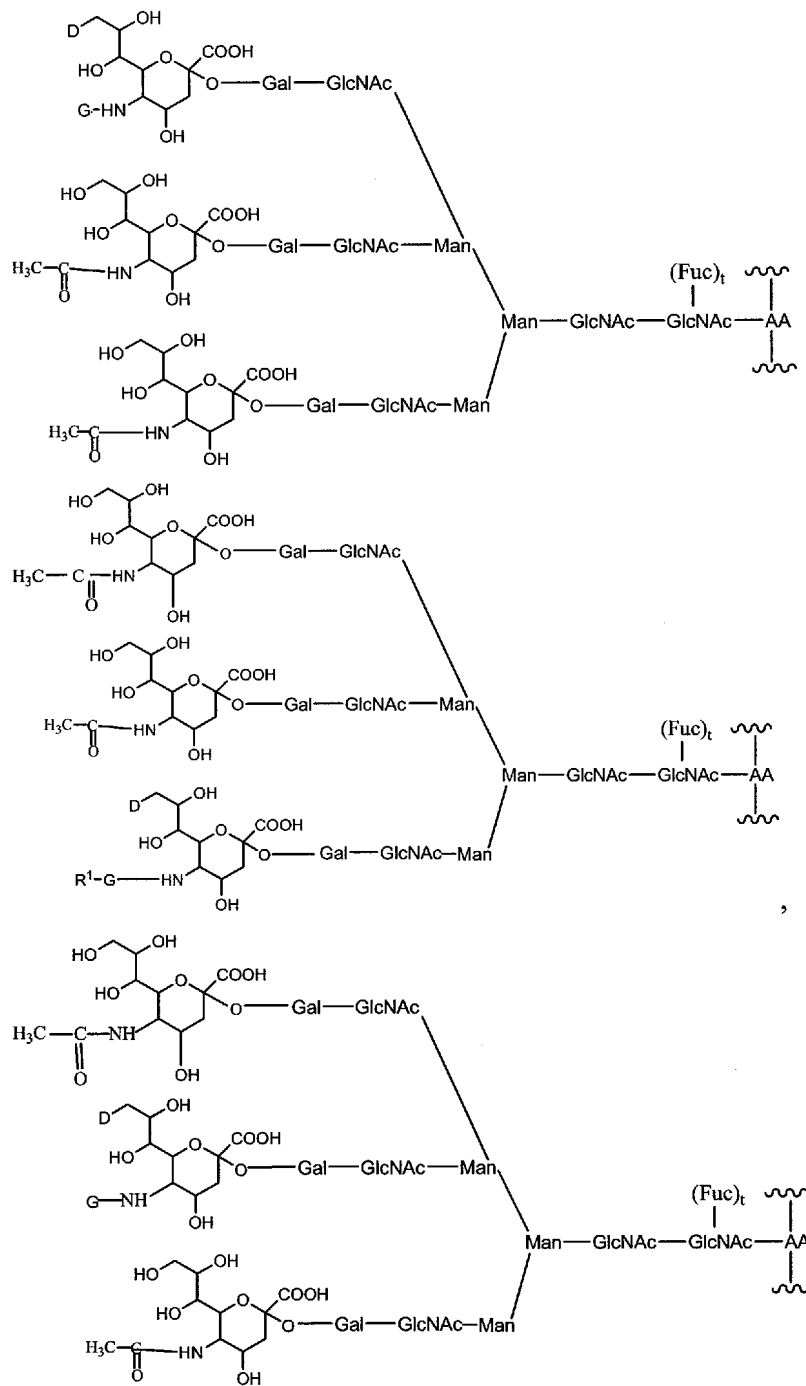
(式中、AAは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数である)

から独立して選択されるメンバーである構造を有する、請求項 1 に記載の方法。

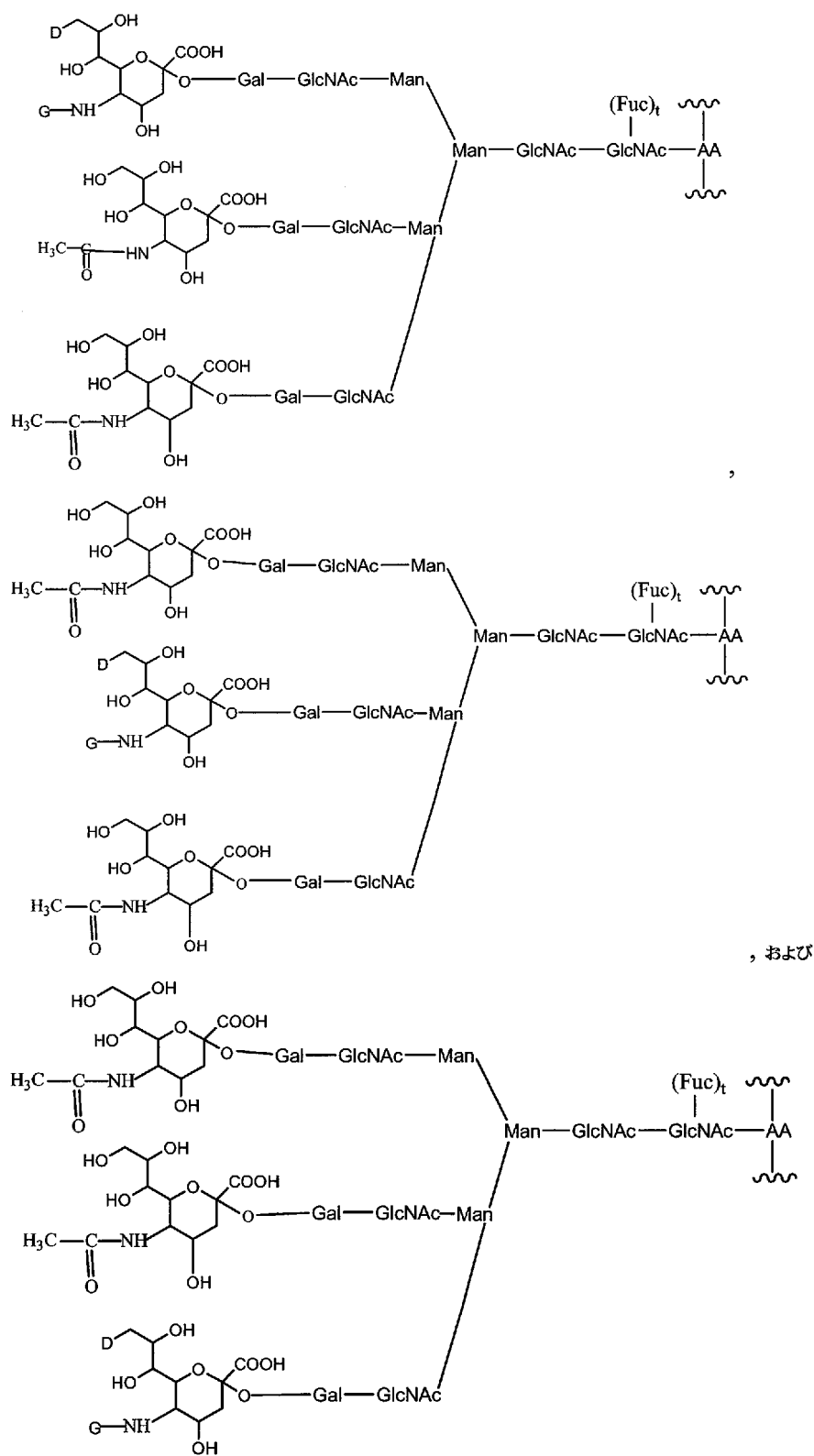
【請求項 9】

前記ペプチド複合体が、

【化 1 1】



【化 1 2】



(式中、A Aは前記ペプチド複合体のアミノ酸残基であり、およびtは、0および1から選択される整数であり、および

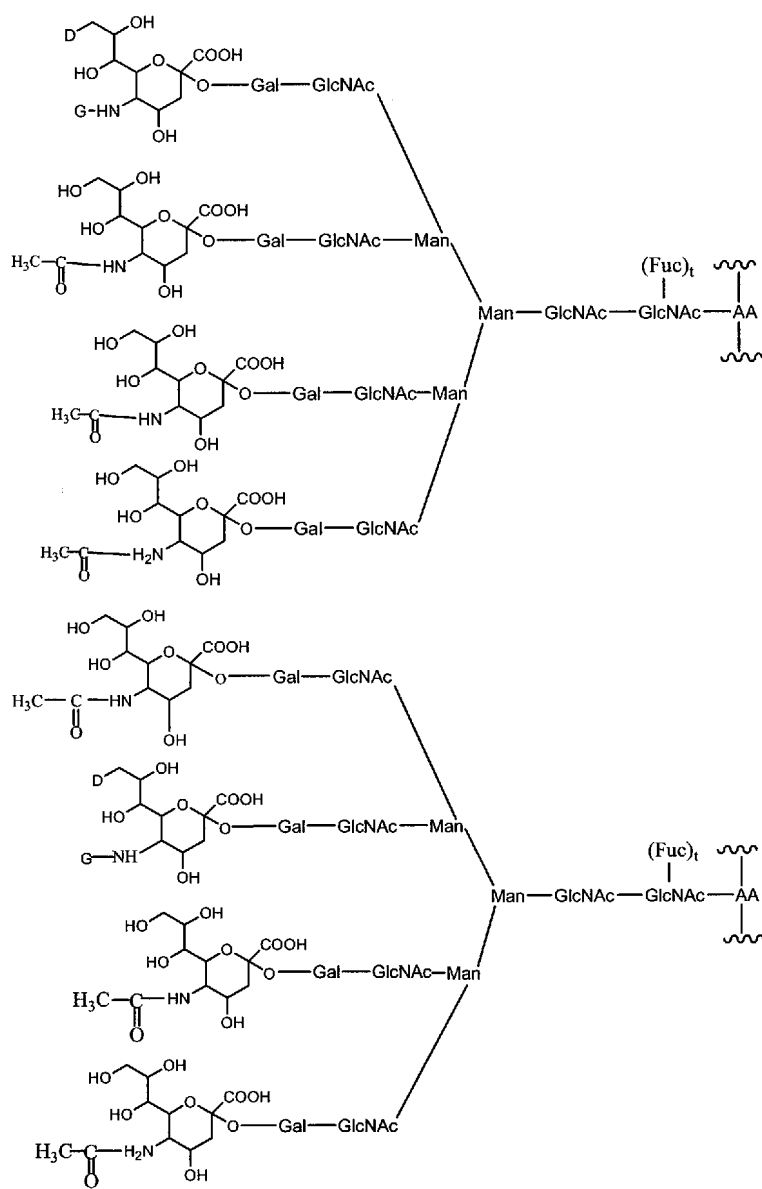
式中、Gを含まないシアリル部分の0および2つから選択されるメンバーがない)

から選択される式に基づく前記グリコシルリンカーの少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記ペプチド複合体が、

【化 13】



式中、Gを含まないシアリル部分の0および2つから選択されるメンバーがない)
から選択される式に基づく少なくとも1つの前記グリコシルリンカーを含む、請求項1に
記載の方法。

前記因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

前記グリコシルリンカーが、前記因子V I I / 因子V I I a ペプチドに、セリンおよびスレオニンから選択されるアミノ酸残基を介して結合している、請求項1に記載の方法。

前記グリコシルリンカーが、前記因子V I I / 因子V I I a ペプチドに、アスパラギン残基であるアミノ酸残基を介して結合されている、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

前記アスパラギン残基が、N 1 5 2、N 3 2 2 およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記因子 V I I a ペプチドが生理活性因子 V I I a ペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ (a) の前に、

(b) 前記因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを好適な宿主において発現させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記宿主が哺乳類発現系である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

それを必要とする対象における状態を処置する方法であって、前記状態は前記対象における易感染性凝固効力により特徴付けられ、前記対象における前記状態の回復に有効な量の、請求項 1 に記載の方法に基づいて産生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を対象に投与するステップを含む、方法。

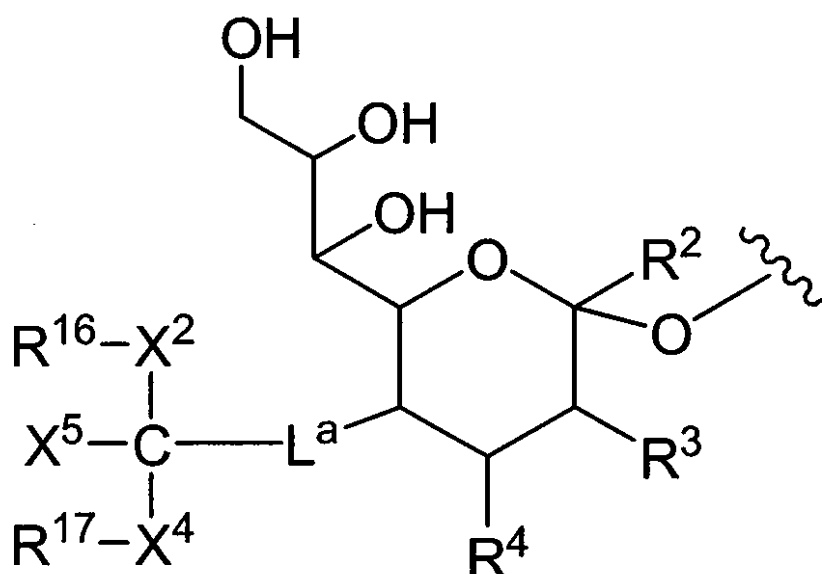
【請求項 19】

ある量の、請求項 1 に記載の方法に基づいて産生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を前記哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物における凝固効力を増強させる方法。

【請求項 20】

式、

【化 15】



(式中、

R^2 は H、 CH_2OR^7 、 $COOR^7$ または OR^7 であり、

式中、

R^7 は、H、置換または非置換アルキルまたは置換または非置換ヘテロアルキルを表し、

R^3 および R^4 は、H、置換または非置換アルキル、 OR^8 、 $NHC(O)R^9$ から独立して選択されるメンバーであり、

式中、

R^8 および R^9 は、H、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルまたはシアル酸から独立して選択され、

R^{16} および R^{17} は、独立して選択される高分子アームであり、

X^2 および X^4 は、高分子部分 R^{16} および R^{17} を C に結合する、独立して選択されるリンケージ断片であり、

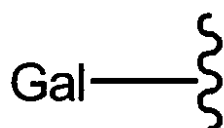
X^5 は非反応性基であり、および

L^a はリンカー基である)

を有する修飾シアル残基を含むグリコシルリンカーを含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体の製造方法であって、

(a) グリコシル部分、

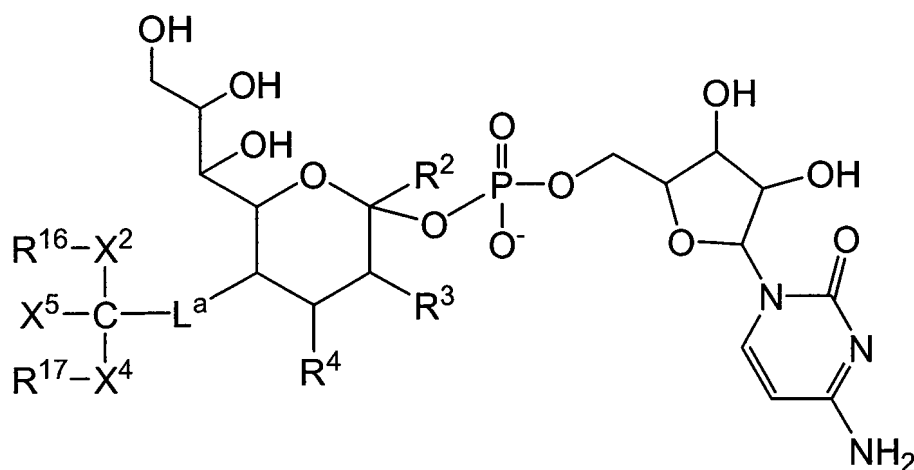
【化 1 6】



を含む因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを、

式、

【化 1 7】



を有する P E G -シアル酸ドナー部分と、

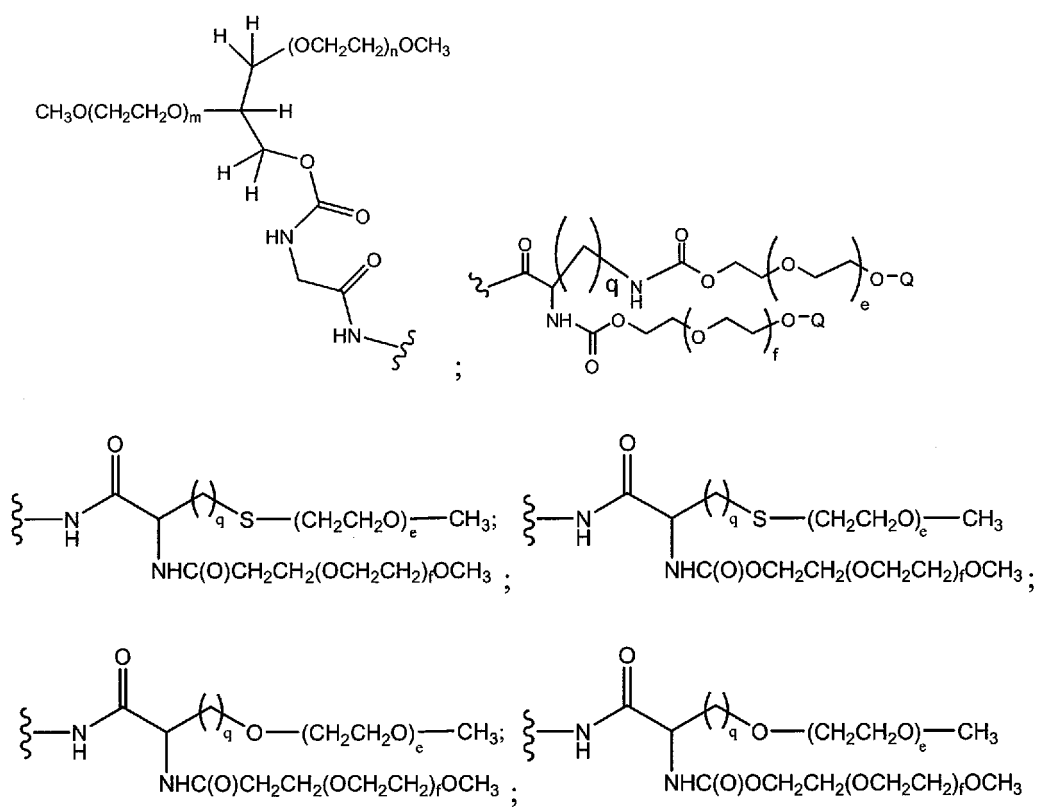
P E G -シアル酸を前記グリコシル部分の G a l へ転移させる酵素に、前記転移に適切な条件で接触させて、前記複合体を形成するステップを含む、方法。

【請求項 2 1】

部分、

$$\begin{array}{c} \text{R}^{16}-\text{X}^2 \\ | \\ \text{X}^5-\text{C}-\text{L}^a-\text{wavy line} \\ | \\ \text{R}^{17}-\text{X}^4 \end{array}$$

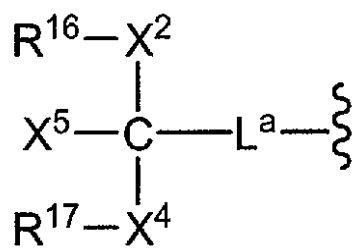
【化 1 9】



e、f、mおよびnは、1～2500から独立して選択される整数であり、およびqは、0～20から選択される整数である)

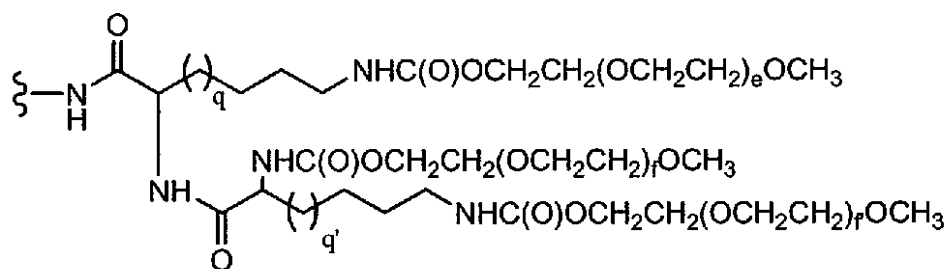
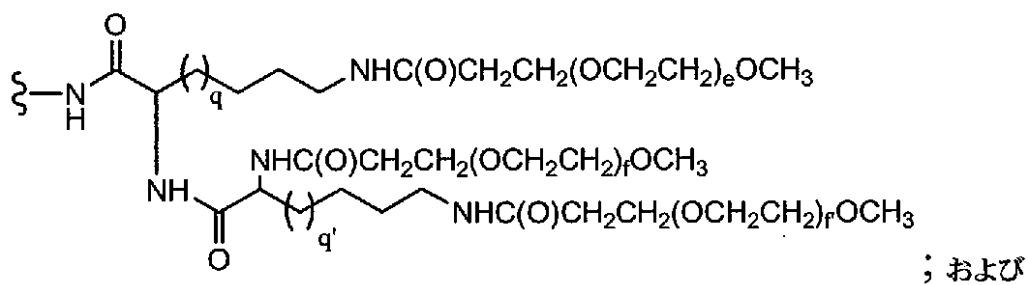
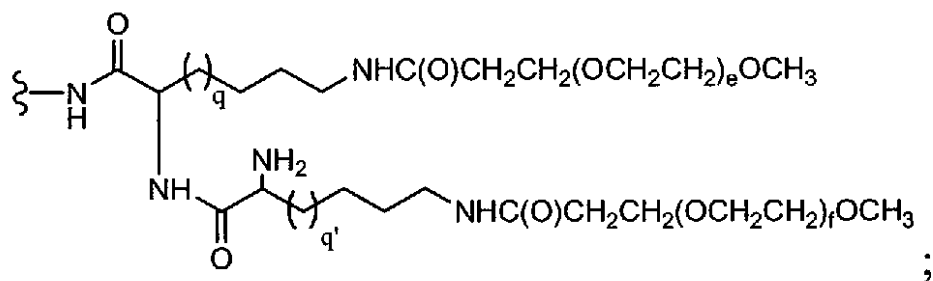
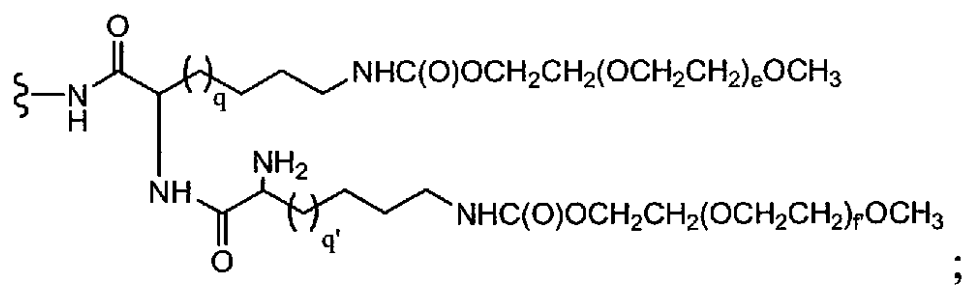
部分、

【化 2 0】



が、

【化 2 1】

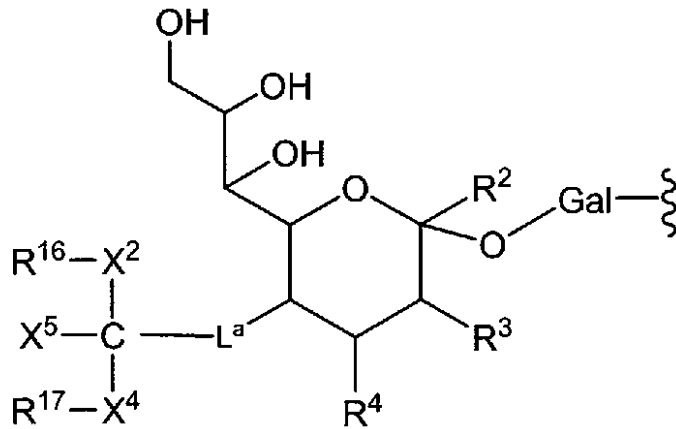


(式中、

e、f および f' は、1～2500 から独立して選択される整数であり、および
q および q' は、1～20 から独立して選択される整数である)
から選択されるメンバーである式を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記グリコシルリンカーが式、
【化 22】

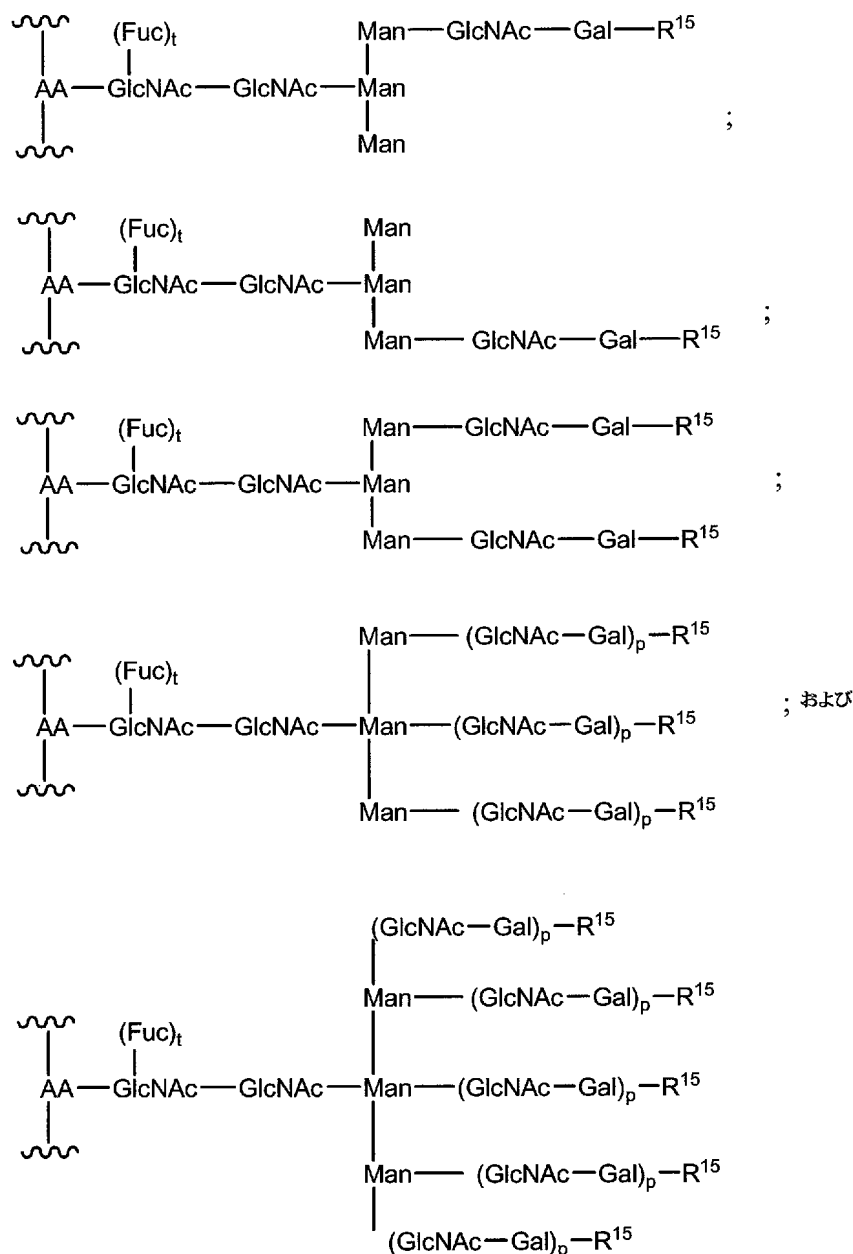


を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体が式、

【化 2 3】



(式中、

AAは、前記ペプチドのアミノ酸残基であり、

tは、0および1から選択される整数であり、および

R¹⁵は修飾シアリル部分である)

を有する少なくとも1つのグリコシルリンカーを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項25】

前記因子VII／因子VIIaペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有する、請求項20に記載の方法。

【請求項26】

前記グリコシルリンカーが、前記因子VII／因子VIIaペプチドに、アスパラギン残基であるアミノ酸残基を介して結合されている、請求項20に記載の方法。

【請求項27】

前記アスパラギン残基が、N152、N322およびこれらの組み合わせから選択され

るメンバーである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記因子 V I I a ペプチドが生理活性因子 V I I a ペプチドである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 29】

ステップ (a) の前に、

(b) 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドを好適な宿主において発現させるステップをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 30】

前記宿主が哺乳類発現系である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

それを必要とする対象における状態を処置する方法であって、前記状態は前記対象における易感染性凝固効力により特徴付けられ、前記対象における前記状態の回復に有効な量の、請求項 20 に記載の方法に基づいて産生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 32】

ある量の、請求項 20 に記載の方法に基づいて産生された因子 V I I / 因子 V I I a ペプチド複合体を前記哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物における凝固効力を増強させる方法。

【請求項 33】

a) シアリダーゼと、

b) グリコシルトランスフェラーゼ、エキソグリコシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選択されるメンバーである酵素と、

c) 修飾糖質 / 修飾シアリル残基と、

d) 因子 V I I / 因子 V I I a ペプチドと、

を前記複合体を合成するのに適切な条件下で組み合わせて、前記因子 V I I または因子 V I I a ペプチド複合体を合成するステップを含む、因子 V I I または因子 V I I a ペプチド複合体の合成方法。

【請求項 34】

前記組み合わせるステップが、10 時間未満の時間である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

キャッピングステップをさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

(b) (a) で形成された前記ペプチド複合体を、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いて精製するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 37】

(b) (a) で形成された前記ペプチド複合体を、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いて精製するステップをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/32649
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8)- C07K 14/745; C12P 19/00 (2007.01) USPC- 530/384, 395; 435/72 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) USPC- 530/384, 395; 435/72 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched PubWEST (DB=USPT, USOC, PGPB, EPAB, JPAB) (see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (DB=USPT, USOC, PGPB, EPAB, JPAB), Google Scholar, Google Patents Search Terms: polyethylene glycol, PEG, sialic acid donor, sialyl moiety or group, peptide, polypeptide, conjugate, factor V, factor VII, sialyl residue or glycosyl linker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/099231 A2 (DE FREES et al.) 18 Nov 2004 (18.11.2004), pg 420, para 2-3; pg 297, para 2; pg 298, para 3; pg 356, para 2; pg 271, para 2; Fig. 14b and 18a.	1-35
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 11 May 2007 (11.05.2007)		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/32649

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/733,649
(32)優先日 平成17年11月4日(2005.11.4)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/756,443
(32)優先日 平成18年1月5日(2006.1.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/746,868
(32)優先日 平成18年5月9日(2006.5.9)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L,C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 デフリース, ショーン
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 19454, ノース ウェールズ, フィリー ドライブ 126
(72)発明者 ゴフ, デービッド, エー.
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 19087, ウェーン, ビーチツリー レーン 560
(72)発明者 トウテ, スザン
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 18073, ペンスバーグ, イースト バック ロード 3374
(72)発明者 ウィレット, ダブリュー., スコット
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州 18901, ドイルスタウン, コムリー サークル 3820
(72)発明者 バイヤー, ロバート, ジェイ.
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92122, サンディエゴ, ディラック ストリート 6105
(72)発明者 カロ, マシュー
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92104, サンディエゴ, ルイジアナ ストリート 3649, ナンバー110

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA21 CB30 CC03 CD12 CD19 CD20 CE10 DA01
4H045 AA10 BA50 BA53 CA40 DA65 EA23 FA51 GA21