

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6603662号
(P6603662)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 1/02 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)C07K 1/02
C07K 2/00 Z N A

請求項の数 13 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2016-538783 (P2016-538783)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月15日 (2014.12.15)
 (65) 公表番号 特表2017-501148 (P2017-501148A)
 (43) 公表日 平成29年1月12日 (2017.1.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/077777
 (87) 國際公開番号 WO2015/086853
 (87) 國際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)
 審査請求日 平成29年12月5日 (2017.12.5)
 (31) 優先権主張番号 13197150.9
 (32) 優先日 平成25年12月13日 (2013.12.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 511031755
ノヴォ・ノルディスク・ヘルス・ケア・ア
ーゲー
スイス・CH-8050・チューリッヒ・
サーガウアーシュトラーセ・36/38
(74) 代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(74) 代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦
(72) 発明者 シャルロッテ・スロー・フネシエ
デンマーク・DK-2880・バウスヴェ
ア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ
・ノルディスク・アーエス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】タンパク質のチオエーテルコンジュゲーション方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法であって、

a) 混合ジスルフィド組成物を得る工程であって、前記混合ジスルフィドが、キャップ化遊離システム(P-S-S-Cap)を有するタンパク質であり、前記混合ジスルフィドの濃度が少なくとも2.5g/Lである工程と、

b) 前記混合ジスルフィド組成物にホスフィンを添加し還元混合物を得る工程であって、還元混合物中のホスフィンの量が、混合ジスルフィドの濃度の最大10当量である工程と、

c) 還元反応を生じさせる工程と、

d) 還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程と、

e) 分子量が10kDa未満の溶液の分子を除去する工程と、

f) 溶液(還元タンパク質を含む)に、活性化された化学的部分(Z*)を添加し、1から4当量の化学的部分(Z*)を含むコンジュゲーション混合物を得る工程と、

g) コンジュゲーション反応を生じさせる工程と、

h) 前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程と
を含み、

少なくとも工程a)及びe)がタンジェンシャルフロー濾過システムで行われる、方法。

【請求項 2】

Capがシステイン、システアミン又はグルタチオンに由来する、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

工程b)の還元混合物が、少なくともC_{min}の混合ジスルフィドの濃度を有し、ここでC_{min}が

$$C_{min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T)$$

により定義され、Tは摂氏温度での温度であり、Iは還元混合物のイオン強度(M)であり、a=0.137*10⁻³M^{1.425}、a₁=0.425及びb=0.070⁻¹である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

f)のコンジュゲーション混合物が、少なくともC_{min}の還元タンパク質の濃度を有し、ここでC_{min}が

$$C_{min} = a * \exp(-b_1 * T - b_2 * I) + d * \exp(-d_1 * T)$$

10

により定義され、Tは摂氏温度での温度であり、Iはコンジュゲーション混合物のイオン強度(M)であり、a=6.96*10⁻⁴M、b₁=0.0396⁻¹、b₂=10.9M⁻¹、d=6.12*10⁻⁵M及びd₁=0.0289⁻¹である、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ホスフィンがトリアリールホスフィンである、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

トリアリールホスフィンがトリフェニルホスフィン-3,3'-ジスルホン酸二ナトリウム(TPPDS)である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

活性化された化学的部分(Z^{*})が、Br、I又はClを含むハロゲン化アルブミン結合体である、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

工程f)のコンジュゲーション混合物が、混合ジスルフィドと比べて、最大で3当量の活性化された化学的部分(Z^{*})を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

工程e)が、セルロース膜を用いて行われる透析濾過である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

透析濾過緩衝液が還元剤を含まない、請求項9に記載の方法。

30

【請求項 11】

工程a)の混合ジスルフィド、工程b)の還元混合物、工程d)の溶液、工程f)のコンジュゲーション混合物、及び/又は工程h)の調製物がトリエタノールアミンを含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

工程a)の混合ジスルフィド、工程b)の還元混合物、工程d)の溶液、工程f)のコンジュゲーション混合物、及び/又は工程h)の調製物がpH7.0から8.0を有する、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質がL101C点変異を含む成長ホルモンポリペプチドである、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、目的とする部分の付加部位としてタンパク質の遊離システィンを用いる、チオエーテルとのタンパク質コンジュゲートを調製するための改善された方法に関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質コンジュゲートは特に、目的とする治療的タンパク質に様々な部分を共有結合させ、これにより、特に目的とする分子の特性を向上させる能力が必要とされる製薬産

50

業において多様な機能性を有する。

【0003】

ペプチドのコンジュゲーションは、通常、固相合成により得られるが、このアプローチはより大きなタンパク質にはあまり魅力的でない。より大きなポリペプチド/タンパク質のコンジュゲーションが望まれる場合、均一な生成物を得るために部位特異的コンジュゲーションを得る必要性により、プロセスは複雑化する。N及びC末端残基、並びに内部のアミノ酸残基にコンジュゲートする手段を提供する様々な手法が開発されている。

【0004】

成長ホルモンタンパク質に関して、Gln及びLys残基は、WO2005/070468及びWO2009/027369等に記載されているように標的化に成功しており、これらでは、特定の内部のアミノ酸残基に対する酵素の特異性が、コンジュゲーションの部位特異性を保証している。

10

【0005】

成長ホルモンを含むタンパク質の部位特異的コンジュゲーションは、以前に、例えばWO99/03887に記載されており、ここでは部位特異的コンジュゲーションは、タンパク質をシステイン反応性ポリマー又は部分と反応させることにより、付加されたシステイン残基を介して実現されている。これに先立ち、タンパク質は、タンパク質のジスルフィド結合まで還元しないように注意しながら、ジチオスレイトール(DTT)で部分的に還元して、PEGマレイミド(又はPEGビニルスルホン)によるPEG化を向上させる。該公報は更に、最終生成物である組成物において、高い割合のモノPEG化タンパク質を得ることは困難であると記載している。

20

【0006】

付加されたシステインを選択的に還元するための様々な手段が、やはり内部のジスルフィド結合を含む第VIIa因子を主に扱うWO2006/134173にも記載される。WO2010/089255及びWO2012/010516は、それぞれアルブミン結合体及びコール酸残基のコンジュゲーションのための更なるシステイン残基の使用を開示している。

【0007】

更に、cysコンジュゲーションは、WO2007/03898及びWO2012/166622に記載されているように、タンパク質、抗体又はこれらの断片にも適用することができる。

【0008】

還元及びコンジュゲーション工程は、それ自体既知の化学プロセスであるが、該プロセスは多くの処理を必要とするため、時間がかかり、非効率的である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO2005/070468

【特許文献2】WO2009/027369

【特許文献3】WO99/03887

【特許文献4】WO2006/134173

【特許文献5】WO2010/089255

【特許文献6】WO2012/010516

40

【特許文献7】WO2007/03898

【特許文献8】WO2012/166622

【特許文献9】WO2011/089250

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、cysコンジュゲート化合物に関し、研究から開発に進むために、産業規模において効率的、経済的及び適用可能な方法を提供することが依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

50

【0011】

一態様において本出願は、タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法であって、

- a)該タンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物を得る工程と、
- b)前記タンパク質組成物に還元剤を添加する工程と、
- c)還元を生じさせる工程と、
- d)還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程と、
- e)分子量が10kDa未満の溶液の分子を除去する工程と、
- f)還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z*)を添加する工程と、
- g)コンジュゲーション反応を生じさせる工程と、
- h)前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程と

を含む方法に関する。 10

【0012】

本方法は、特定の実施形態においてクロスフロー濾過/タンジェンシャルフロー濾過システムの使用を必要とし得る。特に還元反応及びコンジュゲーション反応は、本発明により濾過システムの保持液槽で行われてもよく、好ましいと考えられる場合には濾過システムはプロセス全体にわたって使用され得る。

【0013】

本方法は、限外濾過及び/又は透析濾過の工程を更に含んでもよい。1つ又は複数の反応物の規定濃度が望まれる状況では、限外濾過工程が適用され得る。例として、混合ジスルフィドの濃度は、出発調製物における混合ジスルフィドの濃度とは無関係に、少なくとも100 μ、例えば150 μ、250 μ、350 μ等、又は更に例えば400 μ超等に達するよう限外濾過の工程により調整することができる。成長ホルモンに関しては、濃度は、出発調製物における成長ホルモンの濃度とは無関係に、少なくとも2g/L、例えば5g/L等又は例えば10g/L等であってもよい。 20

【0014】

透析濾過は、濾過システムから小分子を除去するのに使用することができ、10kDa等の妥当な閾値が、当然ながら使用されるタンパク質及び反応物に応じて使用され得る。

【0015】

本方法は、出発点として混合ジスルフィドを適用する。この理由は、混合ジスルフィドは、通常は、Capがシステイン、システアミン又はグルタチオンに由来するキャップ化遊離システイン(capped free cysteine)のかたちの遊離システインを有するタンパク質の、信頼できる供給源であることが見出されているためである。 30

【0016】

還元のための還元剤及び条件は、混合ジスルフィド及びトリアリールホスフィン等のホスフィンの選択的還元に有利であるべきであり、特にトリフェニルホスフィン-3,3'-ジスルホン酸二ナトリウム(TPPDS)は有用な還元剤として同定されている。本発明者らは、より効率的なプロセスは、還元剤の濃度がタンパク質の濃度に少なくとも等しい時に得られる(P-S-S-Cap)が、本発明の方法が高濃度の還元剤の必要性をなくすることを見出した。

【0017】

活性化された化学的部分(Z*)として、ハロゲン化部分が使用されてもよい。活性化された化学的部分が還元タンパク質に添加される場合(工程f)、混合ジスルフィドの量と比べて、少なくとも1当量の活性化された化学的部分(Z*)がより有利であることが見出される。

【0018】

本明細書に記載されるように、本方法は、広範なタンパク質及び化学的部分のコンジュゲーションに適用することができ、このようなタンパク質コンジュゲートを得るための効率的で便利な方法を提供する。

【0019】

本発明はまた、例示的な実施形態の開示から明白となる更なる問題も解決することがで 50

きる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】5当量のTPPDS、pH7.4による、2.4g/Lの濃度のGH-L101C-S-グルタチオンの還元を示す図である。反応に続いてAIE-HPLCが行われ、出発物質、反応中間体及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。：GH-L101C-S-グルタチオン、X:反応中間体、：GH-L101C-SH。

【図1B】図1Aに示された4時間にわたる還元後の側鎖と還元GH-L101C-SHとのコンジュゲーションを示す図である。2.2当量の側鎖が、任意の透析濾過なしで還元混合物に直接添加される。出発物質及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。側鎖の面積%は、コンジュゲーション反応の開始時で100%に設定されている。X:側鎖、：GH-L101C-SH、：GH-L101C-S-側鎖、O: GH-L101C-S-グルタチオン、：反応中間体。

【図2】pH8.0及び20℃で10当量のTPPDSによる、限外濾過後の5g/LまでのGH-L101C-S-グルタチオンの還元を示す図である。反応に続いてAIE-HPLCが行われ、出発物質、反応中間体及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。：GH-L101C-S-グルタチオン、X:反応中間体、O: GH-L101C-SH。図は、Table 1(表3)の実験17からのデータを表す。

【図3A】図2に示された4時間にわたる還元後の側鎖と還元GH-L101C-SHとのコンジュゲーションを示す図である。3当量の側鎖が、任意の透析濾過なしで還元混合物に直接添加される。出発物質及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。側鎖の面積%は、コンジュゲーション反応の開始時で100%に設定されている。：側鎖、：GH-L101C-SH、：GH-L101C-S-側鎖。

【図3B】図2に示された4時間にわたる還元後の側鎖と還元GH-L101C-SHとのコンジュゲーションを示す図である。還元混合物が緩衝液1に透析濾過された後で、3当量の側鎖が還元タンパク質に添加される。出発物質及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。側鎖の面積%は、コンジュゲーション反応の開始時で100%に設定されている。：側鎖、O: GH-L101C-SH、：GH-L101C-S-側鎖。

【図4A】5当量のTPPDS、pH7.4による限外濾過後の濃度10g/LまでのGH-L101C-S-グルタチオンの還元を示す図である。反応に続いてAIE-HPLCが行われ、出発物質、反応中間体及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。：GH-L101C-S-グルタチオン、X:反応中間体、O: GH-L101C-SH。

【図4B】図4Aに示された4時間にわたる還元後の側鎖と還元GH-L101C-SHとのコンジュゲーションを示す図である。還元混合物が緩衝液3に透析濾過された後で、2.2当量の側鎖が還元タンパク質に添加される。出発物質及び生成物の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。側鎖の面積%は、コンジュゲーション反応の開始時で100%に設定されている。X:側鎖、O: GH-L101C-SH、：GH-L101C-S-側鎖。

【図5】3つの異なる温度でイオン強度を関数とした、還元中の最小タンパク質濃度の相関を示す図である。Table 1(表3)からの実験例が以下の記号：X: T=5℃、：T=20℃及びO: T=40℃で表されている。

【図6】Table 1(表3)からの実験9、12、15及び16の条件下のGH-L101C-S-グルタチオンの還元を示す図である。反応がAIE-HPLCによりモニターされ、出発物質の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。実線は5℃であり、点線は40℃である。

【図7】3つの異なる温度でイオン強度を関数とした、コンジュゲーション中の最小タンパク質濃度の相関を示す図である。Table 2(表4)からの実験例が以下の記号；X: T=5℃、：T=20℃及びO: T=40℃で表されている。

【図8】還元タンパク質(GH-L101C-SH)の相対含量がモニターされるコンジュゲーション反応の実施例を示す図である。図8Aは、Table 2(表4)からの実験5、6及び11の条件下の還元タンパク質の相対含量を示す。図8Bは、Table 2(表4)からの実験14、15、18及び19のコンジュゲーション反応中の還元タンパク質の相対含量を示す。図は、還元GH-L101C-SH(透析濾過後)の変換及び側鎖の添加を示す。反応はAIE-HPLCによりモニターされ、出発物

10

20

30

40

50

質の相対面積%が反応時間に対してプロットされている。

【発明を実施するための形態】

【0021】

配列番号1-ヒト成長ホルモンAA1～181

FPTIPLSRLF DNAMLRAHRL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSESIPT PSNREETQQK SNL
ELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG IQTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSKF
DTNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV QCRSVEGSCG F

【0022】

定義

用語「ポリペプチド」及び「ペプチド」は本明細書で使用される場合、アミド(又はペプチド)結合により連結された少なくとも2つのアミノ酸から成る化合物を意味する。 10

【0023】

用語「アミノ酸」には、本明細書において標準的アミノ酸と呼ばれる遺伝子コードによりコードされたアミノ酸の群が含まれる。更に含まれるのは、遺伝子コードによりコードされない天然のアミノ酸、及び合成アミノ酸である。

【0024】

一般に知られている天然のアミノ酸には、-カルボキシグルタミン酸、ヒドロキシプロリン、オルニチン、サルコシン及びホスホセリンが含まれる。一般に知られている合成アミノ酸は、Aib (アルファ-アミノイソ酪酸)、Abu (アルファ-アミノ酪酸)、Tie (tert-ブチルグリシン)、-アラニン、3-アミノメチル安息香酸、アントラニル酸等の化学合成により製造されたアミノ酸を含む。 20

【0025】

用語「タンパク質」は本明細書で使用される場合、1つ又は複数のポリペプチドから成る生化学的化合物を意味する。

【0026】

用語「成長ホルモン」は、配列番号1により特定されるヒト成長ホルモン等の野生型成長ホルモンを記載するのに使用される。

【0027】

用語「成長ホルモンバリアント」は本明細書で使用される場合、天然のヒト成長ホルモンに生じる少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加及び/若しくは置換、並びに/又は少なくとも1つのアミノ酸残基の付加により、天然の成長ホルモンの構造、例えば、配列番号1により特定されるヒト成長ホルモンの構造に由来するアミノ酸配列を有する成長ホルモンタンパク質を意味する。該用語は、成長ホルモン配列の1つ若しくは複数のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基により置換されている、並びに/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基が成長ホルモンから欠失されている、並びに/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基が成長ホルモンに付加及び/若しくは挿入されている修飾された成長ホルモンタンパク質にも使用される。 30

【0028】

本明細書で使用される場合、用語「成長ホルモン化合物」によって、配列番号1により特定されるヒト成長ホルモンの少なくとも幾つかの機能性を保持する成長ホルモン分子、並びに成長ホルモンバリアントにおいてC53をC165と、及びC182をC189又は対応するアミノ酸残基と連結する2つの分子内ジスルフィド結合を含むこの全体構造が意味される。このような分子は、成長ホルモンバリアント、成長ホルモン誘導体又は成長ホルモン融合体、並びに成長ホルモンバリアントの誘導体及び融合体であってもよい。 40

【0029】

本明細書で使用される場合、用語「成長ホルモン誘導体」はしたがって、成長ホルモン又は成長ホルモンバリアント若しくは類似体の1つ又は複数のアミノ酸側鎖等、1つ又は複数のアミノ酸に付加された少なくとも1つの共有結合修飾を含むヒト成長ホルモン又はヒト成長ホルモン類似体/バリアントであって、修飾がアミド類、炭水化物、アルキル基の付加、エステル、PEG化の形態にある、ヒト成長ホルモン又はヒト成長ホルモン類似体/バ 50

リアントのことである。

【0030】

このような成長ホルモン誘導体は、場合によりリンカーを介した成長ホルモンタンパク質への1つ又は複数の化学的部分の付加による成長ホルモンの修飾を含め、「アルキル化成長ホルモン」と呼ばれてもよい。

【0031】

化学的部分は、特性修飾実体(property modifying entity)として記載されてもよい。化学的部分は、脂肪酸を含むことにより脂溶性であってもよく、場合によりリンカーを介して成長ホルモンタンパク質又は類似体に結合されてもよい。場合により任意のリンカーを含む化学的部分は、「側鎖」として記載されてもよい。化学的部分を遊離システインに連結する本出願において、「側鎖」はシステインアミノ酸残基の伸長として結合されることになる。

【0032】

用語「成長ホルモン融合体」は本明細書で使用される場合、成長ホルモン化合物(野生型又はバリアント)が、目的とするポリペプチドを有する融合タンパク質として発現され、故に伝統的なペプチド結合により連結されたタンパク質分子を指す。

【0033】

用語「薬物」、「治療薬」、「医薬品(medicament)」又は「薬品(medicine)」は本明細書で使用される場合、治療で使用され得る、医薬組成物において使用される活性成分を指す。

【0034】

用語「限外濾過」は、適切な膜又はフィルターを用いて溶液を濾過するプロセスを記載するのに使用され、通常、圧力差によるプロセスは溶液の容量の減少をもたらし、その結果、溶液中の目的とする分子は濃縮される。

【0035】

用語「透析濾過」は、適切な膜又はフィルターを用いて溶液を濾過するプロセスを記述するのに使用され、このプロセスでは、システムから排出される溶液が新たな溶液と置換されるので、出発溶液を新たな溶液に交換すると、溶液の賦形剤が変更される。ほとんどのシステムにおいて、溶液は、出発溶液の容量の5倍がシステムから排出された場合に交換と判断され、システムは等量の新たな溶液を充填される。このプロセスにより、目的とする分子は1つの溶液から新たな溶液に移される。

【0036】

一態様において本発明は、タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法に関する。本方法は、コンジュゲーションに供されるタンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物から出発してもよい。このジスルフィドは、コンジュゲーションに適した遊離システイン(P-SH)を有するタンパク質を得るために還元される。コンジュゲーション反応は、その後、活性化された化学的部分(Z*)を還元タンパク質に添加して行われ、コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)が形成される。本明細書に記載されるように、個々の工程は、タンパク質コンジュゲートの調製にとって効率的なプロセスを得るように最適化されている。

【0037】

本出願は、タンパク質(P)がチオエーテルを形成する硫黄原子を介して化学的部分(Z)に連結される、タンパク質コンジュゲートの調製する方法に関する。以下の本明細書に記載されるように、タンパク質は目的とする任意のタンパク質であってもよく、成長ホルモン及び成長ホルモンバリアント等の特に治療的タンパク質を含む。

【0038】

1つの実施形態において本発明は、化学的部分がタンパク質のシステイン残基を介してタンパク質に連結されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法に関する。硫黄原子は故に、タンパク質に付加される化学的部分の付加部位となり、これによりタンパク質及び化学的部分はチオエーテルを介して共有結合される。

10

20

30

40

50

【0039】

「遊離システイン」は、様々な特性修飾基のコンジュゲーションに適切な付加部位であることが見出されている。遊離システインは本明細書において、1つ又は2つのポリペプチドの2つのシステイン間の通常のジスルフィド結合に関与しないシステイン残基を指す。通常、遊離システインは、部位選択的変異誘発により目的とするポリペプチド配列に導入されなかったシステインとなるが、幾つかのタンパク質は適切な位置にシステインを代わりに含むことができる。背景技術に記載されているように、付加されたシステインは、タンパク質への特性修飾基の適切な付加部位となり得る。システイン残基を導入することにより、ジスルフィド結合を形成するためのパートナーがタンパク質中に存在しないことから、遊離システインが通常得られる。

10

【0040】

1つの実施形態において本発明は、タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法であって、
 a)該タンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物を得る工程と、
 b)前記組成物に還元剤を添加し還元混合物を得る工程と、
 c)還元を生じさせる工程と、
 d)還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程と、
 e)分子量が10kDa未満の溶液の分子を場合により除去する工程と、
 f)還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z*)を添加し、コンジュゲーション混合物を得る工程と、
 g)コンジュゲーション反応を生じさせる工程と、
 h)前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程と
 を含む方法に関する。

20

【0041】

本方法は、遊離システインの選択的還元を可能にし、これによりタンパク質の選択的化学コンジュゲーションを可能にする。

【0042】

混合ジスルフィド

ジスルフィド(R1-S-S-R2)は、異なる(又は同じ)分子に存在し得る2個の硫黄原子の共有結合である。タンパク質においてシステイン残基は、シスチンとも呼ばれるジスルフィド結合を介して連結され得る。

30

【0043】

コンジュゲーション反応の有効な標的となるために、遊離システインは還元型でなければならない。遊離システインを有するタンパク質は、同じ理由のため生成するのが困難となり得、故に小さな有機部分を含む混合ジスルフィドとしてしばしば得られる。混合ジスルフィドは、各々がポリペプチド配列(同じ又は異なっていてもよい)に含まれた2つのシステインアミノ酸残基間のジスルフィド結合と類似したジスルフィドを含む分子である。小さな有機部分は、本明細書においてCapと呼ばれ、混合ジスルフィドは故にタンパク質-S-S-Cap分子である。本出願において用語「混合ジスルフィド」は、両方ともポリペプチドなわけではない2つの異なる実体を連結するジスルフィド結合を含む分子に対して使用されるが、分子は、混合ジスルフィドに加えて「通常の」ジスルフィド結合を更に含んでもよい。

40

【0044】

1つの実施形態において本発明の方法は、コンジュゲーションに供されるタンパク質がタンパク質-S-S-Cap分子の組成物の形態で得られることから、タンパク質-S-S-Cap分子の還元工程を含む。

【0045】

上記に記載されているように、Capは通常、混合ジスルフィドのジスルフィド結合の一部である少なくとも1個の硫黄原子を含む、小さな有機部分に由来する。このような有機部分は、還元型における単量体として存在してもよく、又は酸化型における二量体として

50

存在してもよい。混合ジスルフィドにおいて、-S-Capは故に単量体又は半二量体の酸化型である。1つの実施形態において-S-Capは、システイン/シスチン、システアミン/シスタミン(脱炭酸されたシスチンである)、又はグルタチオン(G-SH)/グルタチオンジスルフィド(GS-SG)に由来し、したがって混合ジスルフィドは一実施形態においては、タンパク質-S-S-cys、タンパク質-S-S-cyst、又はタンパク質-S-S-G(cysはシスチンの半分を指し、cystはシスタミンの半分を指し、Gはグルタチオンジスルフィドの半分を指す)から選択される。換言すれば、1つの実施形態においてタンパク質-S-S-CapのCapは、システイン、システアミン又はグルタチオンに由来する。

【0046】

上記に記載されているように還元の目的は、コンジュゲーション反応において反応性である遊離還元システイン(-SH)を有する分子を得ることである。 10

【0047】

1つの実施形態において混合ジスルフィドは、タンパク質-Sが遊離システインを含むタンパク質に由来するタンパク質-S-S-Cap分子である。

【0048】

1つの実施形態において本発明は、タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法であって、

a)該タンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物を得る工程と、

b)前記タンパク質組成物に還元剤を添加する工程と

c)還元を生じさせる工程と、

d)還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程と、

e)分子量が10kDa未満の溶液の分子を場合により除去する工程と、

f)還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z*)を添加する工程と、

g)コンジュゲーション反応を生じさせる工程と、

h)前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程と

を含む方法に関する。 20

【0049】

各工程は、本明細書において以下に更に説明され、実施例において例示される。

【0050】

成長ホルモンタンパク質

30

上記に記載されているように還元の目的は、コンジュゲーション反応において反応性である遊離還元システイン(-SH)を有するタンパク質分子を得ることである。

【0051】

1つの実施形態において混合ジスルフィドは、タンパク質-Sが遊離システインを含むタンパク質に由来するタンパク質-S-S-Cap分子である。更なる一実施形態においてタンパク質は成長ホルモンである。

【0052】

成長ホルモンタンパク質の構造は、3つのループ(L1～3)に連結した4つのヘリックス(ヘリックス1～4)、及びC末端セグメントから成る。ヒト成長ホルモン(配列番号1)においてヘリックス1はAA残基6～35により定義され、ヘリックス2はAA残基71～98により定義され、ヘリックス3はAA残基107～127により定義され、及びヘリックス4はAA残基155～184として定義される。 40

【0053】

野生型ヒト成長ホルモンは遊離システインを含まないことから、本発明は主に、遊離システインを提供する追加のシステインを含む成長ホルモンバリアントに関する。本方法は、このような遊離システインを用いて成長ホルモンコンジュゲート又は誘導体を調製するプロセスにおいて適用することができる。このような誘導体は、成長ホルモン配列の単一のアミノ酸置換を介して導入された遊離チオール基のアルキル化により得ることができる。

【0054】

50

成長ホルモンは、一実施形態において成長ホルモン融合体、例えば、ペプチド結合を用いて第2のタンパク質配列に連結された成長ホルモン配列を含むタンパク質分子であってもよい。融合体は通常、前記成長ホルモン配列をコードするDNA配列を、場合によりリンカー配列を含む前記第2のタンパク質をコードするDNA配列と連結する組換え発現ベクターを用いた融合タンパク質の発現により得られる。成長ホルモン融合体には、抗体Fc領域及び/又はアルブミンタンパク質を含む融合体が含まれるが、これに限定されない。

【0055】

用語「成長ホルモン化合物」は本明細書で使用される場合、配列番号1により特定される成熟ヒト成長ホルモンの機能特性を実質的に保持する成長ホルモン分子を集合的に指す。該化合物は故に、成長ホルモン、成長ホルモン融合体タンパク質、成長ホルモンバリアント若しくは類似体、又はアシル化若しくはアルキル化成長ホルモンも含む成長ホルモン誘導体であり得る。

【0056】

1つの実施形態において本発明による成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて8個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。

【0057】

1つの実施形態において成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて7個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。1つの実施形態において成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて6個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。

【0058】

1つの実施形態において成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて5個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。1つの実施形態において成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて4個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。1つの実施形態において成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて3個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。1つの実施形態において成長ホルモン類似体は、ヒト成長ホルモンと比べて2個未満の修飾(置換、欠失、付加)を含む。

【0059】

一連の実施形態において成長ホルモンの成長ホルモン類似体は、配列番号1により特定されるヒト成長ホルモンと少なくとも95、96、97、98又は99%同一である。

【0060】

成長ホルモン化合物は好ましくは、野生型ヒト成長ホルモンと比較して増加した血漿半減期($T_{1/2}$)を有する。これは、分解からタンパク質を安定化するアミノ酸置換等の当業者に知られた様々な手段により達成することができる。成長ホルモン化合物の増加した循環時間は、血清タンパク質との共有又は非共有結合によっても得ることができる。血清アルブミンは、直接コンジュゲーション(場合によりリンカーを含む)により、又は成長ホルモン若しくはこのバリアントとのタンパク質融合により使用されてもよい。或いは、アルブミンとの化学結合も、抗体Fc領域との融合又は連結と同様に検討されてもよい。アルブミンとの非共有結合は、成長ホルモン又はこのバリアントに共有結合されたアルキル基等のアルブミン結合体の使用により得られてもよい。

【0061】

1つの実施形態において成長ホルモンは、タンパク質分解(特異的変異による)に対して安定化されたバリアントであり、このようなバリアントは更に、成長ホルモンタンパク質の1つ又は複数のアミノ酸においてアルキル化されてもよい。

【0062】

タンパク質分解(特異的変異による)に対して安定化された成長ホルモンタンパク質の非限定例は、WO 2011/089250に見出すことができる。

【0063】

プロテアーゼ安定化成長ホルモンタンパク質バリアントには、追加のジスルフィド架橋が導入されたバリアントが含まれる。追加のジスルフィド架橋は、好ましくはL3をヘリックス2と結する。このジスルフィド架橋は、2つの余分なシステインアミノ酸残基を導入し

10

20

30

40

50

て得ることができる。好ましい実施形態においては、これらのシステインアミノ酸残基は、配列番号1のH2におけるAA84又はAA85、及びL3におけるAA143又はAA144に対応する位置の野生型アミノ酸残基を置換する。成長ホルモンバリアントは故に本発明により、配列番号1におけるL73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C又はF92C/T148Cに対応する1対の変異を好ましくは含み得る。更なる一実施形態において成長ホルモンバリアントは、配列番号1におけるL81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C又はF92C/T148Cに対応する1対の変異を含む。

【 0 0 6 4 】

1つの実施形態において成長ホルモンは、場合により、上記に記載された任意のプロテアーゼ安定化変異に加えて、変異により導入された遊離システインに対する1つの化学的部分のアルキル化等の一置換/部位特異的修飾に適した成長ホルモンバリアントである。アルキル化に適した成長ホルモンバリアントの非限定的リストは、WO2011/089255に見出すことができる。

【 0 0 6 5 】

更なる一実施形態においてタンパク質は、遊離システインを含む成長ホルモンバリアントである。更なる一実施形態においてタンパク質は、配列番号1により特定されるヒト成長ホルモンに導入された遊離システインを含む成長ホルモンバリアントである。更なる一実施形態においてタンパク質は、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C及びG190Cの群から選択されるシステイン変異を含む成長ホルモンバリアントである。更なる一実施形態においてタンパク質は、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C及びG126Cの群から選択されるシステイン変異を含む成長ホルモンバリアントである。

【 0 0 6 6 】

更なる実施形態において遊離cys変異は、hGHにおけるAA93～106内又はhGHバリアントにおける対応する残基内に位置する。更なる特定の実施形態において遊離cys変異は、AA99～106若しくはAA99～103内又は対応する残基内等のL2内に位置する。

【 0 0 6 7 】

更なる実施形態において遊離cys変異は、E30C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、S95C、A98C、N99C、L101C、V102C及びS108Cの群から選択される。

【 0 0 6 8 】

更なる一実施形態において単一のcys変異はE30Cである。更なる実施形態において単一のcys変異はY42Cである。更なる一実施形態において単一のcys変異はS55Cである。更なる一実施形態において単一のcys変異はS57Cである。更なる実施形態において単一のcys変異はS62Cである。更なる一実施形態において遊離cys変異はQ69Cである。更なる実施形態において遊離cys変異はS95Cである。更なる一実施形態において遊離cys変異はA98Cである。更なる実施形態において遊離cys変異はN99Cである。更なる一実施形態において遊離cys変異はS100Cである。更なる一実施形態において遊離cys変異はL101Cである。更なる一実施形態において遊離cys変異はV102Cである。更なる一実施形態において遊離cys変異はS108Cである。

【 0 0 6 9 】

更なる一実施形態においてタンパク質は、Y42C及びL101Cから選択されるシステイン変異を含む成長ホルモンバリアントである。

【 0 0 7 0 】

還元剤

反応性硫黄原子を含むタンパク質を得るために、還元剤が混合ジスルフィド組成物に添

10

20

30

40

50

加して還元を生じさせ、混合物がインキュベートされて反応性硫黄原子を含むタンパク質、例えば、タンパク質-S-Hの形式の還元タンパク質を得る。記載された工程は、a)該タンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物を得る工程、b)前記タンパク質組成物に還元剤を添加する工程、c)還元を生じさせ、還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程である。

【0071】

還元剤は、複数の利用可能な還元剤の間で選択することができ、当業者が還元剤のはるかにより大きなレパートリーから選択できることをわかっているため、数個のみが本明細書において言及される。

【0072】

1つの実施形態において還元剤は、グルタチオン、ガンマ-グルタミルシステイン、システイニルグリシン、システイン、N-アセチルシステイン、システアミン及びリポアミドの群から選択されるレドックス緩衝液である。 10

【0073】

1つの実施形態において、グルタレドキシン等の酵素等のチオールジスルフィドレドックス触媒が含まれる。

【0074】

1つの実施形態において還元剤は、DTT等の小分子還元剤から選択される。

【0075】

1つの実施形態において還元剤は、トリフェニルホスフィン-3,3',3"-トリスルホン酸三ナトリウム(TPPTS)等又はトリフェニルホスフィン-3,3'-ジスルホン酸二ナトリウム(TPPD-S)等の置換トリアリールホスフィン等のトリアリールホスフィン等の芳香族ホスフィン等のホスフィンである。 20

【0076】

混合ジスルフィドが還元されると、還元タンパク質(P-SH)を含む溶液が得られる。これに続くコンジュゲーション前に、還元剤及び/又は放出されたCap分子を除去することが有益となり得る。1つの実施形態において、還元タンパク質(P-SH)を含む溶液から、分子量が10kDa未満の分子等の小分子を除去する任意選択の工程が含まれてもよい。1つの実施形態において分子量が10kDa未満の分子が、還元タンパク質を含む溶液から透析濾過により除去される。

【0077】

化学的部分(Z)

コンジュゲーション反応において化学的部分は、還元タンパク質(タンパク質-SH)の遊離システインの硫黄原子に共有結合される。

【0078】

化学的部分は、特性修飾部分等のタンパク質とのコンジュゲーションに適した任意の部分であってもよい。特性修飾部分は、目的とするタンパク質の1つ又は複数の特徴を変えることができる化学的部分であってもよい。1つの実施形態において化学的部分は、タンパク質を安定化し、循環半減期を増加又は効力を増加させることができる化学的部分等の特性修飾基である。1つの実施形態において化学的部分は、延長剤である。1つの実施形態において化学的部分(Z)は、アルブミン結合体(AB)である。コンジュゲーションが効果的に生じるように、化学的部分は活性化型(Z*)で使用されてもよい。本明細書で上記に記載されるように本発明による方法において、活性化された化学的部分(Z*)は還元タンパク質を含む溶液に添加され、還元タンパク質との化学的部分のコンジュゲーションは、コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製をもたらす。故に本発明による方法は、更なる工程:還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z*)を添加する工程、コンジュゲーション反応を生じさせる工程、及び前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程を含む。 40

【0079】

上記の記載の概要において、本発明は、タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コンジュゲートを調製する方法であって、

10

20

30

40

50

- a) 該タンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物を得る工程と
 - b) 前記タンパク質組成物に還元剤を添加する工程と
 - c) 還元を生じさせる工程と、
 - d) 還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程と、
 - e) 分子量が10kDa未満の溶液の分子を場合により除去する工程と、
 - f) 還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z^*)を添加する工程と、
 - g) 選択的化学コンジュゲーション等のコンジュゲーション反応を生じさせる工程と、
 - h) 前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程と
- を含む方法に関する。

【0080】

10

化学的部分は、特性修飾部分等のタンパク質とのコンジュゲーションに適した任意の部分であってもよい。特性修飾部分は、目的とするタンパク質の1つ又は複数の特徴を変えることができる化学的部分であってもよい。1つの実施形態において化学的部分は、タンパク質を安定化し、循環半減期を増加又は効力を増加させることができる化学的部分等の特性修飾基である。1つの実施形態において化学的部分は、アルブミン結合体である。コンジュゲーションが効果的に生じるように、化学的部分は活性化型で使用されてもよい。本明細書で上記に記載されるように本発明による方法において、活性化された化学的部分は還元タンパク質と組み合わされ、還元タンパク質に化学的部分をコンジュゲーションすると、硫黄原子を介したコンジュゲートタンパク質が調製される。

【0081】

20

化学的部分は、好ましくは、タンパク質-S-化学的部分分子を形成するタンパク質-SHと反応することができる部分を意味する活性化された化学的部分である。このような活性化された化学的部分は、当技術分野で知られたマレイミド基又はハロアセチル基を含む柔らかい求電子アルキル化試薬を含んでもよい。

【0082】

1つの実施形態において活性化された化学的部分(Z^*)は、ハロゲン化延長剤等のハロゲン化特性修飾基等のハロゲン化化学的部分(Z -ハロ)である。ハロゲン化化学的部分(Z -ハロ)には、Br、I又はClが含まれ得る。好ましければ、特定の活性化反応は、コンジュゲーション前及び還元タンパク質への化学的部分の添加前に行われてもよい。

【0083】

30

1つの実施形態において活性化された化学的部分(Z^*)は、ハロゲン化アルブミン結合体(AB-ハロ)である。1つの実施形態において化学的部分(Z^*)は、WO2010/089255に記載されているようなBr、I又はClを含むハロゲン化されたアルブミン結合体である。1つの実施形態において活性化された化学的部分は、アルブミン結合体側鎖のヨードアセトアミド等のヨードアセトアミドである。

【0084】

1つの実施形態において活性化された化学的部分(Z^*)は、マレイミド置換延長剤等のマレイミド置換特性修飾基等のマレイミド置換化学的部分(Z -マレイミド)である。1つの実施形態において活性化された化学的部分(Z^*)は、WO2010/089255に記載されているようなマレイミド置換アルブミン結合体である。

40

【0085】

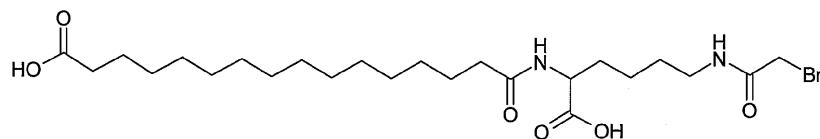
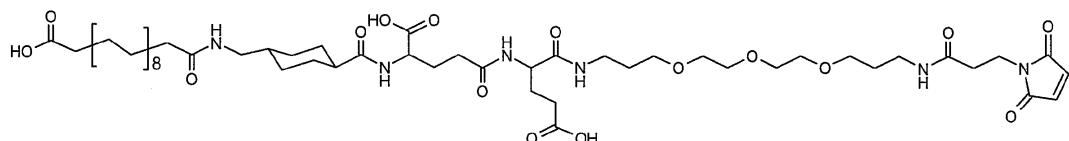
実施例2及び3に記載された還元反応及びコンジュゲーション反応は、ハロゲンがヨウ素であるハロゲン化アルブミン結合体側鎖との還元成長ホルモンL101Cの反応を含む。

【0086】

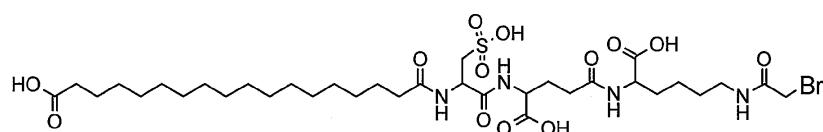
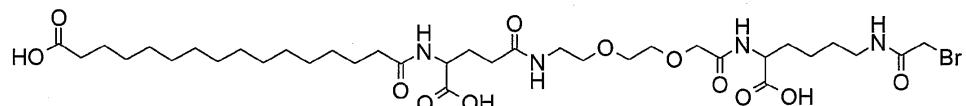
1つの実施形態においてアルブミン結合側鎖は、おそらく、

【0087】

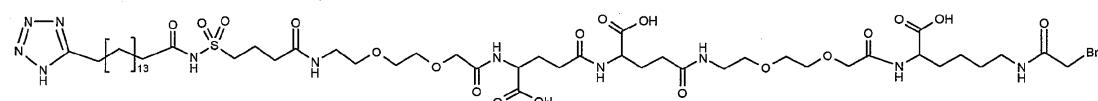
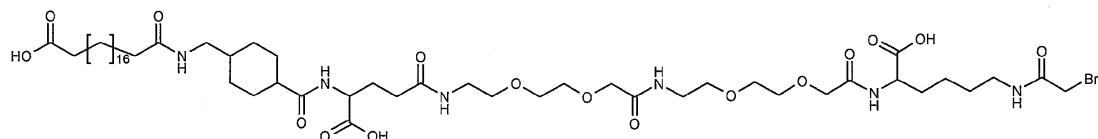
【化1】



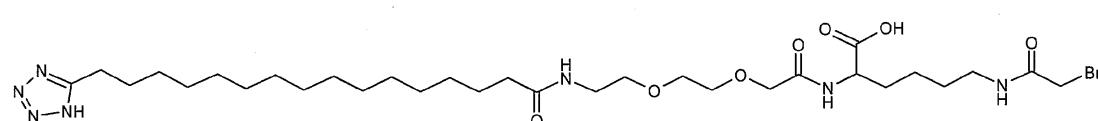
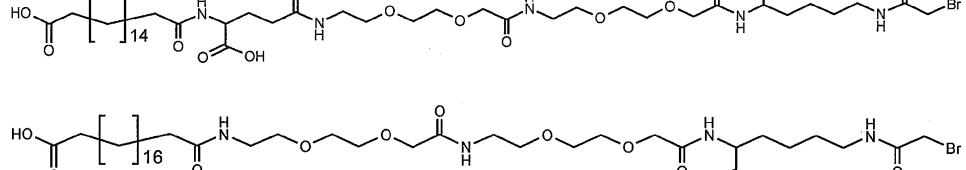
10



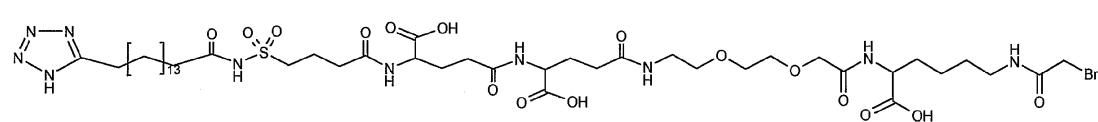
20



30



40



【0088】

から選択される。

【0089】

更なるアルブミン結合側鎖は、W02010/089255に記載されている。1つの実施形態において活性化アルブミン側鎖は、上記のもののヨウ化物版である。このようなヨウ化物部分は、KI(ヨウ化カリウム)溶液にハロゲン化(Br又はCl)化学的部分を溶解し、ヨードアセトアミドをもたらすことにより得ることができる。

【0090】

化学的部分の更なる例には、PEG分子、血清アルブミン、アルブミン結合体、Fcドメイ

50

ン、成長ホルモン結合タンパク質、AAポリマー[XTEN技術、Amunix、及びPASylation(登録商標)、XL-タンパク質]、並びにヘパロサン及びヒドロキシエチルデンプン等の炭水化物群が含まれる。

【0091】

本明細書で以下に記載されるように、コンジュゲーション工程の有効性は、還元タンパク質(P-SH)及び活性化された化学的部分(Z*)の比に依存し得る。

【0092】

混合ジスルフィドの組成物

遊離システインにおいてコンジュゲートされるタンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物は、好ましくは、少量の他のタンパク質又は不純物のみを含む精製組成物として得られ、当業者は、混合ジスルフィドの一部として遊離システインを有するタンパク質を生成及び精製する方法を知っていると考えられる。 10

【0093】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、5~4000 μ、25~1000 μ、50~850 μ、100~600 μ、250~600 μ 又は250~500 μ のタンパク質濃度を有する。更なる実施形態においてタンパク質の濃度は、100 μ 超、例えば150 μ、250 μ、350 μ 等、又は更に例えば400 μ 超等であることが好ましい。

【0094】

混合ジスルフィドが成長ホルモン又は成長ホルモンバリアントである一実施形態において、濃度は、好ましくは0.1~100g/L、0.5~25g/L、1~20g/L、2~15g/L、5~15g/Lであり、又は5~12g/L等である。1つの実施形態においてhGH組成物は、少なくとも2.5g/L、又は少なくとも4.0g/L等、又は少なくとも8.0g/L等、又は少なくとも10g/L等の濃度を有する。濃度は追加の工程を含むことにより調整することができ、これにより混合ジスルフィド調製物が希釈又は濃縮されてタンパク質の好ましい濃度に達することにも留意される。1つの実施形態において本方法は、混合ジスルフィド組成物の組成物を生成する混合ジスルフィド調製物の限外濾過の工程を含む。 20

【0095】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、4~10、例えば5~9又は6~8等のpH等、タンパク質の還元に適したpH及び/又はその後コンジュゲートされる還元タンパク質に適したpHを有する。更なる一実施形態においてpHは、7.0~8.0、又は7.2~7.8又は7.3~7.6、例えばおよそ7.4~7.5等であってもよい。 30

【0096】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、22 でおよそ5~50mS/cm、若しくは例えば22 でおよそ5~25mS/cm等の導電率、又は22 でおよそ10mS/cmの導電率を有する。

【0097】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は緩衝液を含む。

【0098】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、BES、HEPES、MES、リン酸、クエン酸、Bis-Tris及びトリエタノールアミンから成る群から選択される緩衝液を含む。 40

【0099】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、5~50mmol/kgトリエタノールアミン、例えば10~25mmol/kgトリエタノールアミン等、又は例えばおよそ20mmol/kgトリエタノールアミン等を含む。

【0100】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は塩を含む。

【0101】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、ナトリウム塩、アンモニウム塩、グアニジン塩、及びカリウム塩から成る群から選択される塩を含む。

【0102】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、硫酸塩、酢酸塩、及びハロゲン化

物塩から成る群から選択される塩を含む。

【0103】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、硫酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、グアニジン塩酸、KI及びNaClから成る群から選択される塩を含む。

【0104】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物はNaClを含む。

【0105】

1つの実施形態において混合ジスルフィド組成物は、25～500mmol/kg NaCl、例えば50～250mmol/kg等、例えば75～100mmol/kg NaCl等、又は例えばおよそ80mmol/kg NaCl等を含む。

10

【0106】

方法工程

上記の概要において本方法に使用される成分は、若干の変動を伴って記載されている。本発明の範囲内の変動の追加項目は、プロセス工程の持続時間、各成分の種々の濃度の使用、並びに成分が提供される溶液の賦形剤及び各方法工程が行われる溶液の賦形剤である。

【0107】

当業者は更なる変更が可能となり得ることが分かるであろうが、以下の記載は、本発明者らが特に有利と見出した実施形態を更に記載する。プロセスを例証する詳細は、実施例に見出すことができる。

20

【0108】

還元剤の添加

混合ジスルフィドの有効な還元を持つように、モル濃度での過剰な還元剤が通常適用される。混合ジスルフィドの組成物への還元剤の添加により、還元混合物が得られる。還元剤の量が混合ジスルフィドの量の1当量である場合、混合物中の混合ジスルフィド及び還元剤のモル濃度が等しくなるように、還元剤の量は、混合ジスルフィド(又はP-S-S-Cap)の量の当量で表すことができる。

【0109】

1つの実施形態において、工程b)で添加される還元剤の量は、混合ジスルフィド(又はP-S-S-Cap)の量の少なくとも2当量、例えば3～20当量等、例えば4～15当量等、又は例えば5～10当量等である。1つの実施形態において2～12当量の還元剤が添加される。1つの実施形態において2～10当量の還元剤が添加される。1つの実施形態において3～7又は4～6当量の還元剤が添加される。

30

【0110】

還元剤はコストのかかる資源となり得ることから、必要とされる量を低減することが有利であり、これは本明細書に記載されるように、プロセス工程が最適化される場合に可能である。

【0111】

より低量の還元剤を用いる有効な還元反応は、本発明により提供されるように、残りの反応条件が慎重に選択されることを必要とする。

40

【0112】

1つの実施形態において還元剤の量は、混合ジスルフィドの最大で10当量、例えば最大で8当量等、例えば最大で5当量等、還元される混合ジスルフィドの例えば最大で4当量等、例えば最大で3当量等、例えば最大で2.5当量等、例えば最大で2当量等、例えば最大で1.5当量等である。

【0113】

1つの実施形態において還元剤の量は、還元される混合ジスルフィドの1～8当量等、例えば2～6当量等である。

【0114】

混合ジスルフィドの還元は、条件に応じて数分又は数時間かかる場合がある。当業者は

50

、異なる条件が異なる有効性をもたらすことが分かるであろう。故に、混合ジスルフィドを完全又はほぼ完全に還元するのに必要とされる時間及び条件が、本明細書で以下により詳細に記載される。

【0115】

還元剤は、混合ジスルフィド組成物に濃縮物として添加されてもよく、又は単に還元剤を固体粉末として添加することによってもよい。還元剤は、混合ジスルフィド組成物と混合されて還元を開始する。該混合物は還元混合物と呼ばれてもよい。

【0116】

十分に有効なプロセスを有するために、還元は混合ジスルフィドの合計量の少なくとも80%還元、例えば少なくとも90%還元等をもたらすべきである。このような場合、混合ジスルフィドの量が還元混合物中の混合ジスルフィドの量の最大で20%、例えば最大で10%等であるならば、還元は十分と見なされる。好ましい実施形態において混合ジスルフィドのおよそ95%の還元は、還元タンパク質を含む溶液におよそ5%非還元混合ジスルフィドを残して得ることができる。更なる一実施形態において効率的なプロセスは、適切な時間内に最大で2%混合ジスルフィドを残す。

10

【0117】

還元は、少なくとも15分、例えば少なくとも30分等、又は例えば少なくとも1時間等の期間で生じ得る。1つの実施形態において還元混合物は、還元剤の添加後2~10時間、例えば3~6時間又はおよそ3~4時間等にわたって放置される。

【0118】

20

1つの実施形態において還元は、最大24時間、例えば最大12時間等、例えば最大8時間等、例えば最大6時間等、例えば最大4時間等にわたって行われる。

【0119】

還元は、1つの実施形態において1~50、例えば室温等、例えば18~25等で行われてもよい。代わりの実施形態において還元は、より低温、例えば10未満等、例えばおよそ4~6等で行われてもよい。

【0120】

適用される条件に応じて、還元混合物に塩を含むことが有利となる場合がある。塩は、任意の塩、又は混合ジスルフィド組成物に関して記載された塩等の塩の組み合わせであつてもよい。

30

【0121】

本発明の発明者らは、混合ジスルフィドの効率的な還元を可能にする一連の条件を提供し、温度及び塩(還元混合物のイオン強度)に応じて使用される混合ジスルフィドの濃度を記述するのにこの情報を使用した。

【0122】

溶液中の塩の量は、イオン強度(I)により記述することができる。この値は、この溶液に存在する全イオンの濃度及び電荷から計算される。簡略化のために、タンパク質及び還元剤の電荷は、本発明による計算には一切含めないが、緩衝液及び塩成分は含める。本明細書の実施例から分かるように、イオン強度の増加(主に塩濃度の増加による)は、あまり有利でない条件(低温又は反応物のより低い濃度)下で効率的な反応を可能にする。

40

【0123】

実施例5に記載されているように、還元反応の条件は、タンパク質の適切な最低濃度と、温度及び、還元混合物中の還元剤を最大10当量とした場合のイオン強度との間の相関を用いて記述することができる。効率的な還元を可能にする最小タンパク質濃度は故に、式:

$C_{min}=a \cdot I^{-a_1} \exp(-b \cdot T)$ により定義され、ここで、Tは摂氏温度での温度であり、IはM (mol/L)のイオン強度であり、 C_{min} はM (mol/L)であり、定数は $a=0.137 \cdot 10^{-3} M^{1.425}$ であり、 $a_1=0.425$ 及び $b=0.070^{-1}$ である。

【0124】

多くのタンパク質が極めて高濃度で可溶性でないことから、混合ジスルフィドの濃度の

50

上限は実用的なたぐいとなり得る。ほとんどのタンパク質に関して還元反応は、最大100g/Lの濃度で機能することが意図される。

【0125】

多くの塩が極めて高濃度で可溶性でないことから、還元混合物のイオン強度の上限も実用的なたぐいとなり得る。ほとんどの塩に関して還元反応は、最大5Mの濃度で機能することが意図される。

【0126】

多くのタンパク質が極めて高温で可溶性でないことから、還元混合物の温度の上限は実用的なたぐいとなり得る。ほとんどのタンパク質に関して還元反応は、最大50℃の濃度で機能することが意図される。

10

【0127】

この手引きに従って、有効な還元反応は、最大で10当量の還元剤を用いて起こすことができる。個々のタンパク質及び反応には、その安定性に依存した調整が必要とされ得ることも当業者には明らかであろう。

【0128】

幾つかの実施形態において還元混合物中の混合ジスルフィドの濃度は、還元剤が単に濃縮形態で組成物に添加されることから、混合ジスルフィド組成物のタンパク質濃度と類似している。1つの実施形態において混合ジスルフィドの濃度は、5~4000μM、25~1000μM、50~850μM、100~600μM、250~600μM、又は250~500μM等であってもよい。

更なる実施形態において混合ジスルフィドの濃度は、100μM超、例えば150μM、250μM、350μM等、又は更に例えば400μM超等であることが好ましい。混合ジスルフィドが成長ホルモン又は成長ホルモンバリアントである一実施形態において、濃度は好ましくは0.1~100g/L、0.5~25g/L、1~20g/L、2~15g/L、5~15g/L、又は例えば5~12g/L等である。1つの実施形態においてGHの濃度は、少なくとも2.5g/L、又は例えば少なくとも4.0g/L等、又は例えば少なくとも8.0g/L等、又は例えば少なくとも10g/L等である。

20

【0129】

中間工程

コンジュゲーション工程を進める前に、還元タンパク質(P-SH)は、過剰な還元剤及び/又は混合ジスルフィドの小有機分子、例えば、キャップ化遊離システイン(P-S-S-Cap)を有するタンパク質のH-S-Cap等の還元混合物から分離されてもよい。この任意選択の工程は、分子量が10kDa未満の分子等の低分子量を有する分子を除去する工程であってもよい。

30

【0130】

当業者は、適切な膜を用いた濾過による等、小分子量化合物を除去する様々な方法を知っているであろう。1つの実施形態において本方法は、5kDa、10kDa又は30kDaのカットオフを有する膜/フィルターを用いた透析濾過の工程を含む。

【0131】

カットオフは、生成物の分子量に近いカットオフが生成物を失うリスクを高めることを分かりつつ、必要とされるサイズ特異性に応じて当業者により選択され得る。おおまかには、目的とする生成物の分子量のカットオフ1/3~1/6を有することである。

40

【0132】

コンジュゲーション工程を進める前の更なる選択肢は、還元タンパク質(P-SH)の溶液を変更すること、例えば溶媒、すなわち溶媒の個々の賦形剤又は賦形剤の濃度を変更することである。1つの実施形態において本方法は、工程f)の前に工程d)の溶液の溶媒を変更する工程を含む。

【0133】

溶媒を変更する便利な方法は透析濾過である。1つの実施形態において透析濾過工程は、分子量が10kDa未満の溶液の分子を除去するために、及び/又は還元タンパク質(P-SH)を含む溶液の溶媒を変更するために含まれる。

【0134】

50

透析濾過工程の有効性、例えば、除去される小分子及び賦形剤の量は、保持液容量と比べた作製濾液容量に関する。この文脈での語「除去する(remove)」は、「～の濃度を低減する」と解釈されるべきであることにも留意される。この理由は、低分子量分子及び賦形剤の残存量は、通常、低分子量を有する分子を「除去する」透析濾過工程(又は代わりのプロセス工程)後に存在するためである。

【0135】

透析濾過が開始される場合の組成物の総容量は、必要とされる容量を評価するための参考として使用される。透析濾過は通常、作製された濾液の容量が、該システムに入れられる新たな溶媒の容量に等しいように定容で行われる。透析濾過が有効であるために、1容量超の新たな溶媒が好ましくは使用されるべきである。

10

【0136】

1つの実施形態において少なくとも2容量の溶媒が透析濾過に適用され、或いは、少なくとも3、例えば少なくとも4又は少なくとも5容量等の溶媒が透析濾過に適用される。

【0137】

1つの実施形態において本発明による方法は、コンジュゲーション反応を開始する前に還元タンパク質を含む溶液の溶媒を変更する工程を含む。

【0138】

1つの実施形態において本発明による方法は、工程f)の前に工程d)の溶液の溶媒を変更する工程を含む。更なる一実施形態において、溶媒は透析濾過により変更される。

20

【0139】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、タンパク質、得られた還元タンパク質、及び調製されるタンパク質コンジュゲートに適したpH、例えば4～10等、例えば5～9又は6～8等のpHを有する溶液に変更されている又は変更される。更なる一実施形態においてpHは、7.0～8.0、又は7.2～7.8若しくは7.3～7.6、例えばおよそ7.4～7.5等であってもよい。

【0140】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、22 でおよそ1～150mS/cm、若しくは例えば22 で5～50mS/cm等、若しくは例えば22 で5～25mS/cm等の導電率、又は22 でおよそ10mS/cmの導電率を有する溶液に変更されている又は変更される。

【0141】

30

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、緩衝液を含む溶液を含む又は該溶液に変更される。1つの実施形態において緩衝液は、BES、HEPES、MES、リン酸、クエン酸、Bis-Tris及びトリエタノールアミンから選択される。

【0142】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、5～50mmol/kgトリエタノールアミン、例えば10～25mmol/kgトリエタノールアミン等、又は例えばおよそ20mmol/kgトリエタノールアミン等を含む溶液を含む又は該溶液に変更される。

【0143】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、混合ジスルフィド組成物に関して記載した任意の塩等の塩を含む溶液を含む又は該溶液に変更される。

40

【0144】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、硫酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、グアニジン塩酸、KI及びNaClから成る群から選択される塩を含む溶液を含む又は該溶液に変更される。

【0145】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、NaClを含む溶液を含む又は該溶液に変更される。

【0146】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、塩を含まない溶液を含む又は該溶液に変更される。1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、NaClを含まない溶液を

50

含む又は該溶液に変更される。

【0147】

1つの実施形態において還元タンパク質の溶液は、10～2000mmol/kg NaCl、例えば50～500mmol/kg NaCl、例えば75～100mmol/kg NaCl等、又は例えばおよそ80mmol/kg NaCl等を含む溶液を含む又は該溶液に変更される。

【0148】

コンジュゲーション工程

上記に記載されているようにコンジュゲーションは、還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z^*)を添加して行われる方法による。

【0149】

前の還元が完全でない場合、還元タンパク質対混合ジスルフィド(P-SH/P-S-S-Cap)の比は、高収率のコンジュゲーション反応を妨げる可能性がある。更に、過剰な還元剤及び放出されたCap分子の存在は、コンジュゲーション反応を妨げる可能性がある。

【0150】

この場合もやはり、反応物、例えば還元タンパク質及び活性化された化学的部分の相対比は、反応の有効性に影響を与える。

【0151】

1つの実施形態において活性化された化学的部分のモル濃度は、コンジュゲートされるタンパク質のモル濃度に少なくとも等しく、又はおそらく2倍である。これは当量でも表すことができ、コンジュゲートされるタンパク質と比べて例えば少なくとも10当量、例えば8当量等、例えば6当量等、例えば4当量等、例えば2当量等、又は例えば少なくとも1当量等の活性化された化学的部分(Z^*)が使用されてもよい。活性化された化学的部分(Z^*)はコストのかかる資源となり得ることから、必要とされる量を低減することが有利であり、これは本明細書に記載されるように、前の工程が最適化される場合に可能である。活性化された化学的部分(Z^*)の還元量を用いる有効なコンジュゲーション反応は、本発明により提供されるように、残りの反応条件が慎重に選択されることを必要とする。1つの実施形態において活性化された化学的部分(Z^*)の量は、タンパク質の最大で8当量、コンジュゲートされるタンパク質の例えば最大で6当量等、例えば最大で4当量等、例えば最大で3当量等、例えば最大で2.5当量等、例えば最大で2当量等、例えば最大で1.5当量等である。

【0152】

還元混合物に関して記載されているように、コンジュゲーションの溶液は、コンジュゲーション混合物と呼ばれてもよい。上記に記載された方法工程a)～h)に関して、工程f)における活性化された化学的部分(Z^*)の添加によってコンジュゲーション混合物が形成される。コンジュゲーション条件が最適になるようにコンジュゲーション混合物の成分を調整することができることは、更に明らかである。

【0153】

化学的部分を有する還元タンパク質のコンジュゲーションは、条件に応じて数分又は数時間かかる場合がある。当業者は、異なる条件が異なる有効性をもたらすことが分かるであろう。故に、完全又はほぼ完全なコンジュゲーションを得るのに必要とされる時間は、本明細書で以下により詳細に記載されるように条件に基づき異なるであろう。本方法によりコンジュゲーション反応は、出発物質、例えば還元タンパク質の量が10%、例えば5%又は好ましくは2%以下に達した場合、十分と見なされる。

【0154】

実施例6に記載されているように、コンジュゲーション反応の条件は、温度、イオン強度に依存するタンパク質の適切な最低濃度と、コンジュゲーション混合物に使用される活性化された化学的部分(Z^*)の相対量との間の相関を用いて記述することができる。効率的なコンジュゲーションを可能にする最小タンパク質濃度[M (mol/L)のC_{min}]は故に、 $C_{min} = a * \exp(-b_1 * T - b_2 * I) + d * \exp(-d_1 * T)$ により定義され、ここでTは摂氏温度での温度であり、IはM (mol/L)のイオン強度であり、 $a = 6.96 * 10^{-4} M$ 、 $b_1 = 0.0396^{-1}$ 、 $b_2 = 10.9 M^{-1}$ 、 $d = 6.12 * 10^{-5} M$ 及び $d_1 = 0.0289^{-1}$ である。

10

20

30

40

50

【0155】

還元に関して上記に記載されているように、タンパク質、イオン強度及び温度の上限は実用的なたぐいとなり得る。ほとんどのタンパク質に関してコンジュゲーション反応は、最大100g/Lの濃度で機能することが意図される。ほとんどの塩に関してコンジュゲーション反応は、最大5Mの濃度で機能することが同様に意図される。ほとんどのタンパク質に関してコンジュゲーション反応は、最大50 の濃度で機能することが更に意図される。この手引きに従って、有効なコンジュゲーション反応は、最大で4当量の活性化された化学的部分(Z^*)を用いて得ることができる。

【0156】

活性化された化学的部分は、還元タンパク質を含む溶液に濃縮物として添加されてもよく、又は単に薬剤を固体粉末として添加することによってもよい。1つの実施形態において活性化された化学的部分は、還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分を添加する前に適切な溶液に溶解される。化学的部分が、コンジュゲーション反応の前に溶液中で活性化されることもまたあり得る。

10

【0157】

本発明によりコンジュゲーション混合物は、好ましくは5~10、例えば7.0~9.0又は7.0~8.5等のpHを有する。

【0158】

1つの実施形態において、コンジュゲーション混合物中の還元タンパク質の濃度は、少なくとも50 μ である。更なる実施形態においてコンジュゲーション混合物中の還元タンパク質の濃度は、100 μ 超、例えば150 μ 、250 μ 、350 μ 等、又は更に例えば400 μ 超等であることが好ましい。

20

【0159】

ヒト成長ホルモンのコンジュゲーションに関する一実施形態において、濃度は少なくとも1g/Lである。好ましい実施形態においてヒト成長ホルモンの濃度は更により高く、例えば少なくとも2.0g/L等、例えば少なくとも3.0g/L等、例えば少なくとも5g/L等、又は少なくとも7.5g/L若しくは少なくとも10g/Lである。

【0160】

本発明によりコンジュゲーションの有効性は、コンジュゲーション混合物中に含まれる塩により改善することができる。これは、より低いタンパク質濃度範囲において、例えば、還元タンパク質の濃度が50mM~150mMである場合、又はヒト成長ホルモンに関してタンパク質濃度がコンジュゲーション混合物中1~3g/Lである場合に特に有用である。より高いタンパク質濃度が適用される場合に塩を含むことも、当然ながら可能である。

30

【0161】

塩は、コンジュゲーション混合物に使用される溶液、又は反応条件を最適化するために別個に添加される溶液のどちらかに含まれてもよい。塩は、等しい正電荷及び負電荷をもたらす陽イオン及び陰イオンにより構成される。塩は、水で加水分解された場合に得られるイオンに基づき、中性、塩基性又は酸性と記載され得る。塩は、混合ジスルフィド組成物に関して記載された任意の塩等、いずれの塩であってもよい。塩は、ナトリウム塩、アンモニウム塩、グアニジン塩及びカリウム塩等、又は硫酸塩、酢酸塩及びハロゲン化物塩等、又は硫酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、グアニジン塩酸、KI及びNaCl等の無機又は有機であってもよい。

40

【0162】

溶液中の塩の量は、イオン強度(I)により記載することができる。この値は、この溶液に存在する全イオンの濃度及び電荷から計算される。簡略化のために、タンパク質及び活性化された化学的部分(Z^*)の任意の電荷は本発明による計算に含まれないが、緩衝液及び塩成分は含まれる。本明細書の実施例から分かるように、 I を計算する際には、トリエタノールアミン(緩衝液)及びNaCl (又は他の塩)の濃度を含める。

【0163】

1つの実施形態においてコンジュゲーション混合物のイオン強度(I)は、0.1M超、例えば

50

0.2M超等、例えば0.3M超等、例えば0.4M超等、例えば0.5M超等である。上述されているようにこれは、コンジュゲーション混合物中の還元タンパク質の濃度が、ヒト成長ホルモンに関して例えば50～250 μg等、又は例えば1～5g/L若しくは0.5～3.0g/L等低い場合に特に有用となり得る。

【0164】

同様に、反応条件は、コンジュゲーション反応の温度に応じて調整することができる。多くの状況で室温($T= 18 \sim 25$ °C)又は室温前後で大規模反応を行うことが有利と考えられるが、他の状況ではコンジュゲーション反応の温度を上下させることが様々な理由で好ましいことがある。

【0165】

1つの実施形態においてコンジュゲーション反応は、還元タンパク質の濃度が上記に記載された150 μg超である状況等に15～50 °Cで行われる。代わりの実施形態において、塩がコンジュゲーション混合物に含まれるならばより低い温度範囲が適用され得る。

【0166】

コンジュゲーション反応が室温より低い温度、例えば20 °C未満等、例えば15 °C未満等、例えば10 °C未満等、又は例えば2～8 °C等で行われる1つの実施形態において、コンジュゲーション混合物は、0.1M超、例えば0.2M超等、例えば0.3M超等、例えば0.4M超等、例えば0.5M超等のイオン強度(I)を好ましくは有する。

【0167】

活性化された化学的部分は、還元タンパク質と混合されてコンジュゲーションを開始する。該混合物は、本明細書においてコンジュゲーション混合物と呼ばれる。コンジュゲーションは、少なくとも15分、例えば少なくとも1時間等、例えば少なくとも2時間等、例えば少なくとも3時間等、例えば少なくとも4時間等、又は例えば少なくとも5時間等の期間で生じ得る。1つの実施形態においてコンジュゲーション混合物は、活性化された化学的部分の添加後2時間、例えば3～6時間又はおよそ3～4時間等にわたって放置される。1つの実施形態においてコンジュゲーション混合物は、活性化された化学的部分の添加後2～20時間、例えば6～16時間又はおよそ8～12時間等にわたって放置される。

【0168】

1つの実施形態においてコンジュゲーションは、最大24時間、例えば最大18時間等、例えば最大12時間等、例えば最大6時間等、例えば最大4時間等にわたって行われてもよい。

【0169】

コンジュゲーション反応は、様々な温度、例えば1～50 °C等、又は例えば10～50 °C等で行われてもよい。コンジュゲーションは、1つの実施形態において室温、例えば15～25 °C又は20～25 °C等で行われてもよい。代わりの実施形態において還元は、より低温、例えば10 °C未満等、例えばおよそ4～6 °C等で行われてもよい。

【0170】

コンジュゲーション反応が進むにつれて、コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物が得られ、このような調製物が得られれば、当業者は、上記に記載されているような、低分子量を有する不純物を除去する適切な貯蔵緩衝に対する生成物の透析濾過等の更なる精製工程、又は陰イオン交換クロマトグラフィー等のより特異的な精製工程へと進むことができる。

【0171】

装置

本明細書の実施例において使用される装置は、本方法を実施するための適切な装置を例示する。本方法は、通常のガラス/チューブ等において、必要に応じて間で移しつつ行うことができる。本発明はまた、非常に有利なことには、クロスフロー濾過又はタンジェンシャルフロー濾過(TFF)装置で行うこともできる。このような装置は当技術分野でよく知られており、プロセスの規模を実験室から産業規模へと拡大することを可能にする。

【0172】

クロスフロー濾過において液体は膜/フィルターを接線方向に通過され、保持液及び透

10

20

30

40

50

過液又は濾液は連続的に回収/排出され得、保持液はシステムに再循環され得る。

【0173】

実施例に記載されているように、システムは、コンジュゲーションプロセスにおける様々な段階でタンパク質の限外濾過及び/又は透析濾過に使用することができる。還元の前にジスルフィド調製物を限外濾過して、所望の濃度の混合ジスルフィドの組成物を得ることができる。

【0174】

入口圧力及び出口圧力は調整することができ、透過液がシステムから排出される際に緩衝液及び/又は他の賦形剤を含む新たな溶液が添加され得る。

【0175】

システムは、圧力差を適用することなく使用することもできる。これは、液体容量が一定であり透過液がシステムから排出されないことを意味する。

【0176】

本発明の方法に関して1つ又は複数の工程は、一実施形態において限外濾過/透析濾過システム又はTFFシステムで行われる。

【0177】

更なる一実施形態において還元(工程c)は、限外濾過/透析濾過システム又はクロスフロー濾過/TFFシステムの保持液槽で行われる。

【0178】

還元剤は保持液槽に添加することができ、循環が適用されて還元剤を混合ジスルフィドの組成物と混合することができる。混合中、溶液(混合ジスルフィド及び還元剤を含む)の賦形剤は変更されず、この容量は一定に保たれる。混合はシステムにおいて生じるが、濾過は適用されず(例えば追加の溶液はシステムに入れられず)、及び/又は圧力差は膜を越えて適用されず、その結果として透過液は得られない。

【0179】

1つの実施形態において透過液は、還元剤の添加中及び/又は還元剤と混合ジスルフィドとの混合中に得られず又は生成されない。1つの実施形態において透過液は、還元工程中に得られず又は生成されない。1つの実施形態において透析濾過は、工程b)及び/又はc)の一部として行われない。

【0180】

更なる一実施形態においてコンジュゲーション(工程g)は、限外濾過/透析濾過システム又はクロスフロー濾過/TFFシステムの保持液槽で行われる。

【0181】

一実施形態においてクロスフロー濾過/タンジェンシャルフロー濾過システムがプロセス全体を通して使用される。

【0182】

更なる一実施形態において本方法は、タンパク質を濃縮するための、分子量が10kDa未満の分子を除去するための、又は使用される溶液の賦形剤又は賦形剤の濃度を変更するための1つ又は複数の限外濾過/透析濾過工程を含む。

【0183】

本方法が終了した際、コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物(工程h)は、クロスフロー濾過システムを空にして得ることができる。

【0184】

本明細書で以下に記載される実施形態及び実施例は、本発明の特定の特徴を記載及び例証する。当業者であれば、今や、多くの修飾形態、置換形態、変形態、及び均等物を思いつくはずであり、故にこれらも本発明の一部と見なされることから、本発明は、いかなる形でもこれらに限定されないことが理解されるべきである。

【0185】

実施形態

1. タンパク質(P)がチオエーテルを介して化学的部分(Z)に共有結合されるタンパク質コ

10

20

30

40

50

ンジュゲートを調製する方法であって、

- a) 該タンパク質を含む混合ジスルフィドの組成物を得る工程と、
- b) 前記タンパク質組成物に還元剤を添加し還元混合物を得る工程と、
- c) 還元を生じさせる工程と、
- d) 還元タンパク質(P-SH)を含む溶液を得る工程と、
- e) 分子量が10kDa未満の溶液の分子を場合により除去する工程と、
- f) 還元タンパク質を含む溶液に、活性化された化学的部分(Z^*)を添加し、コンジュゲーション混合物を得る工程と、
- g) コンジュゲーション反応を生じさせる工程と、
- h) 前記コンジュゲートタンパク質(P-S-Z)の調製物を得る工程と

を含む方法。 10

【0186】

2. クロスフロー濾過/タンジェンシャルフロー濾過システムで行われる、実施形態1に記載の方法。

【0187】

3. 混合ジスルフィドが、キャップ化遊離システイン(P-S-S-Cap)を有するタンパク質である、実施形態1又は2に記載の方法。

【0188】

4.a)の組成物が少なくとも100 μ 、例えば150 μ 、250 μ 、350 μ 等、又は更に例えば400 μ 超等のP-S-S-Capの濃度を有する、実施形態3に記載の方法。 20

【0189】

5. a)の組成物が限外濾過により得られた、実施形態3に記載の方法。

【0190】

6. Capがシステイン、システアミン又はグルタチオンに由来する、実施形態3に記載の方法。

【0191】

7. 工程g)のコンジュゲーションが選択的化学コンジュゲーションである、実施形態1から6のいずれか1つに記載の方法。

【0192】

8. 還元剤が、トリフェニルホスフィン-3,3',3"-トリスルホン酸三ナトリウム(TPPTS)等又はトリフェニルホスフィン-3,3'-ジスルホン酸二ナトリウム(TPPDS)等の置換トリアリールホスフィン等のトリアリールホスフィン等の芳香族ホスフィン等のホスフィンである、実施形態1から7のいずれか1つに記載の方法。 30

【0193】

9. 還元剤の量が、タンパク質の少なくとも2当量、例えばタンパク質の4~15当量等、例えばおよそ5~10当量等である、実施形態1から8のいずれか1つに記載の方法。

【0194】

10. 還元が10時間未満で行われる、実施形態1から9のいずれか1つに記載の方法。

【0195】

11. 化学的部分(Z)が延長剤等の特性修飾基である、実施形態1から10のいずれか1つに記載の方法。 40

【0196】

12. 活性化された化学的部分(Z^*)がハロゲン化延長剤である、実施形態1から11のいずれか1つに記載の方法。

【0197】

13. 活性化された化学的部分(Z^*)がマレイミド置換延長剤である、実施形態1から12のいずれか1つに記載の方法。

【0198】

14. 化学的部分(Z)がアルブミン結合体(AB)である、実施形態1から13のいずれか1つに記載の方法。 50

【0199】

15. 活性化された化学的部分(Z^*)がハロゲン化アルブミン結合体であり、前記ハロゲンがBr、I又はClである、実施形態1から14のいずれか1つに記載の方法。

【0200】

16. 活性化された化学的部分(Z^*)がマレイミド置換アルブミン結合体(AB)である、実施形態1から15のいずれか1つに記載の方法。

【0201】

17. 混合ジスルフィドと比べて、最大で5当量、例えば最大で4、3当量又は最大で2当量等の活性化された化学的部分(Z^*)が工程f)で添加される、実施形態1から16のいずれか1つに記載の方法。

10

【0202】

18. 工程f)の前に工程d)の溶液の溶媒を変更する工程を含む、実施形態1から17のいずれか1つに記載の方法。

【0203】

19. 工程e)を含む、実施形態1から18のいずれか1つに記載の方法。

【0204】

20. 工程e)及び/又は溶媒変更工程が透析濾過により行われる、実施形態1から19のいずれか1つに記載の方法。

【0205】

21. 分子量が10kDa未満の分子を除去する、及び/又は工程h)の調製物の溶媒を変更する更なる工程i)を含む、実施形態1から20のいずれか1つに記載の方法。

20

【0206】

22. 工程h)の調製物の透析濾過により行われる更なる工程i)を含む、実施形態1から21のいずれか1つに記載の方法。

【0207】

23. 工程a)の1つ若しくは複数の組成物、工程d)の溶液及び/又は工程h)の調製物が緩衝液及び塩を含む、実施形態1から22のいずれか1つに記載の方法。

【0208】

24. 工程b)の還元混合物が緩衝液及び塩を含む、実施形態1から23のいずれか1つに記載の方法。

30

【0209】

25. 工程f)の調製物のコンジュゲーション混合物が緩衝液及び塩を含む、実施形態1から24のいずれか1つに記載の方法。

【0210】

26. 工程i)が塩を除去する、実施形態1から25のいずれか1つに記載の方法。

【0211】

27. 緩衝液がトリエタノールアミンである、実施形態1から26のいずれか1つに記載の方法。

【0212】

28. 塩がNaCl及び/又はKIである、実施形態1から27のいずれか1つに記載の方法。

40

【0213】

29. 工程a)の組成物、工程d)の溶液及び工程h)の調製物が同じpHを有する、実施形態1から28のいずれか1つに記載の方法。

【0214】

30. 工程a)の組成物、工程d)の溶液及び工程h)の調製物がpH7.0～8.0を有する、実施形態1から29のいずれか1つに記載の方法。

【0215】

31. 工程d)の溶液及び工程i)の調製物が異なる導電率を有する、実施形態1から30のいずれか1つに記載の方法。

【0216】

50

32. 工程d)の溶液の導電率が10mS/cm (22)である、実施形態1から31のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 1 7 】

33. 工程i)の調製物の導電率が1~2mS/cm (22)である、実施形態1から32のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 1 8 】

34. 工程e)が、10kD Hydrosart(登録商標)膜等のセルロース膜を用いて行われる、実施形態1から33のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 1 9 】

35. 工程i)が10kD Hydrosart(登録商標)膜等のセルロース膜を用いて行われる、実施形態1から34のいずれか1つに記載の方法。 10

【 0 2 2 0 】

36. 少なくとも1つの工程がクロスフロー濾過/タンジェンシャルフロー濾過システムで行われる、実施形態1から35のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 2 1 】

37. 還元(工程c)が限外濾過/透析濾過装置の保持液槽において行われる、実施形態1から36のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 2 2 】

38. コンジュゲーション(工程g)が限外濾過/透析濾過装置の保持液槽において行われる、実施形態1から37のいずれか1つに記載の方法。 20

【 0 2 2 3 】

39. クロスフロー濾過/タンジェンシャルフロー濾過システムがプロセス全体を通して使用される、実施形態1から38のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 2 4 】

40. 調製物h)又はi)がクロスフロー濾過システムを空にして得られる、実施形態1から39のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 2 5 】

41. 調製物h)又はi)が少なくとも5g/Lの濃度を有する、実施形態1から40のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 2 6 】

42. 調製物h)又はi)のコンジュゲートタンパク質(P-S-Z)が、Q sepharose HP等を用いるイオン交換クロマトグラフィー(AIEC)により精製される、実施形態1から41のいずれか1つに記載の方法。 30

【 0 2 2 7 】

43. 調製物h)又はi)のコンジュゲートタンパク質(P-S-Z)が、少なくとも10g/L、例えば20g/L等の濃度をもたらす限外濾過を用いて濃縮される、実施形態1から42のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 2 8 】

44. 遊離システィンが点変異により導入される、実施形態1から43のいずれか1つに記載の方法。 40

【 0 2 2 9 】

45. タンパク質が成長ホルモンポリペプチドである、実施形態1から44のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 3 0 】

46. 成長ホルモンポリペプチドの遊離システィンが、E30C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、S95C、A98C、N99C、L101C、V102C及びS108Cから成る群から選択される点変異によりもたらされる、実施形態1から45のいずれか1つに記載の方法。

【 0 2 3 1 】

47. 成長ホルモンポリペプチドがL101C点変異を含む、実施形態1から46のいずれか1つに記載の方法。 50

【0232】

48. 工程b)の還元混合物が、少なくとも C_{min} の混合ジスルフィドの濃度を有し、ここで C_{min} が

$$C_{min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T)$$

により定義され、Tは摂氏温度での温度であり、Iは還元混合物のイオン強度(M)であり、 $a = 0.137 * 10^{-3} M^{1.425}$ 、 $a_1 = 0.425$ 及び $b = 0.070^{-1}$ である、実施形態1から47のいずれか1つに記載の方法。

【0233】

49. f)のコンジュゲーション混合物が、少なくとも C_{min} の還元タンパク質の濃度を有し、ここで C_{min} が

$$C_{min} = a * \exp(-b_1 * T - b_2 * I) + d * \exp(-d_1 * T)$$

により定義され、Tは摂氏温度での温度であり、Iはコンジュゲーション混合物のイオン強度(M)であり、 $a = 6.96 * 10^{-4} M$ 、 $b_1 = 0.0396^{-1}$ 、 $b_2 = 10.9 M^{-1}$ 、 $d = 6.12 * 10^{-5} M$ 及び $d_1 = 0.0289^{-1}$ である、実施形態1から48のいずれか1つに記載の方法。

【実施例】

【0234】

遊離システィンを有する成長ホルモンタンパク質を調製する一般的方法

タンパク質は、WO 2011/089255に記載されているような大腸菌(E.Coli)で組換えによって発現させることができる。

【0235】

手短に述べると、GH-L101Cを発現する大腸菌細胞を遠心分離により単離する。細胞ペレットを、EDTA及びポリソルベート20を含有するTris緩衝液で再懸濁する。細胞を高圧ホモジナイザーを通過させて破壊する。得られたホモジネートを尿素溶液と混合し、pHを調整し、一晩放置する。タンパク質はこれにより可溶化され、天然のグルタチオンが遊離システィンとカップリングしてGH-L101C-S-グルタチオンが形成される。還元/アルブミン側鎖とのコンジュゲーションの前に、GH-L101C-S-グルタチオン前駆体は陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製することができる。

【0236】

タンパク質を、固定相としてQ Sepharose XL及び移動相としてTris緩衝液を用いる陰イオン交換工程で捕捉する。溶出は線形塩化ナトリウム勾配を用いて行う。イオン強度の調整後、溶出タンパク質を疎水性相互作用クロマトグラフィーにより精製する。Phenyl Sepharose FFを固定相として、Tris緩衝液を移動相として使用する。溶出は、塩化ナトリウム濃度が変化するステップ勾配を適用して行う。

【0237】

前駆体の酵素消化によりMEAEタグを除去してGH-L101C-S-グルタチオンを得、これを、希釈後最終的に陰イオン交換により精製する。Source 30Qを固定相として、及びトリエタノールアミンを移動相として使用する。溶出は線形塩化ナトリウム勾配を用いて行う。タンパク質は今やコンジュゲーション工程の準備が整っている。

【0238】

アルブミン結合体側鎖を調製する一般的方法

アルブミン結合体側鎖は、WO2011/089255に記載されているように合成することができる。

【0239】

GH-L101C-SHとのアルブミン結合体側鎖のコンジュゲーションの前に、側鎖をKI (5M)、アスコルビン酸(50mM)、及びトリエタノールアミン (150mM)、pH7.5の溶液に溶解して、側鎖を活性化する。KI溶液中の側鎖の濃度は、通常5から30g/Lの間である。

【0240】

(実施例1)TFFシステムを使用しない還元及びコンジュゲーション

GH-L101C-S-グルタチオンは、上記に記載されているように陰イオン交換クロマトグラフィーで得たものを用いる。濃度は2.4g/Lであり、NaClは0.08Mであり、トリエタノール

10

20

30

40

50

アミンは0.02Mである(pH7.4)。イオン強度は0.09Mである。

【0241】

TPPDS(5当量、GH-L101C-S-グルタチオン1g当たり約0.12g)をGH-L101C-S-グルタチオンに添加し、還元に続いて30分ごとに4時間のAIE-HPLCを行う(オートサンプラーを用いて、図1A参照)。4時間後、側鎖溶液(2.2当量、GH-L101C-S-グルタチオン1g当たり約0.12g)を還元混合物に添加し、コンジュゲーション反応に続いてAIE-HPLCを一晩行う(図1B参照)。

【0242】

(実施例2)限外濾過及び透析濾過にTFFシステムを使用するGH-L101C-SHの還元及びコンジュゲーション

装置:

10

Millipore Labscale TFFシステム

AKTAcrossflow TFFシステム

Sartocon Slice 200 Filter、カットオフ10kD [Hydrosart(登録商標)]

溶液:

【0243】

【表1】

	GH-L101C-S-グルタチオン 調製物:	透析濾過緩衝液 "1"	透析濾過緩衝液 "2"
トリエタノールアミン (mmol/kg)	20	20	20
NaCl(mmol/kg)	80	80	0
pH(22°C)	7.4	8.0	8.0
導電率(mS/cm)	10	10	1·2
イオン強度(M)	0.09	0.09	0.01

【0244】

GH-L101C-S-グルタチオンの調製物は、上記の方法に記載されているように得る。GH調製物をTFFシステム(Millipore LabスケールTFFシステム)に掛け、5g/Lの濃度が得られるまで限外濾過を行う。還元剤(TPPDS)を過剰なGH(10当量、GH-L101C-S-グルタチオン1g当たり約0.24g)に添加し、保持液槽に入れ、均一になるまで循環させる(約15分)。還元混合物を4時間(循環なしで)放置する。反応に続いてAIE-HPLCを行う。図2に示すように、還元は適用条件下、4時間以内に生じる。

20

【0245】

透析濾過工程を含める効果を評価するために、このような工程の前後に還元GH-L101C-SHの試料(1ml)を取り、別個のコンジュゲーション反応を行う。

【0246】

還元タンパク質は、低分子量(<10kda)分子を除去する10kD [Hydrosart(登録商標)]膜を用いて、透析濾過緩衝液1[条件: 350mL、0.4バール(流入)、0.3バール(流出)、及びフラックス17LMH]を用いて定容で5倍容量により透析濾過する。還元溶液のOD280は、TPPDSのため23.7であった。TPPDSの除去をOD280で追跡した。透過液は最初に280nMで高い吸光度を示し、0.058まで低下した。最後に保持液はTPPDSの添加前のOD280に等しいOD280を有し、TPPDSが除去されたことを示した。

40

【0247】

コンジュゲーションは、3当量(GH-L101C-S-グルタチオン1g当たり約0.16g)の側鎖の添加に対応する0.1mL側鎖溶液の添加により、1mLの還元タンパク質(透析濾過前に得られた)を用いて行い、アルキル化プロセスをAIE-HPLCによりモニターする(図3A)。

【0248】

同時に、1mLの濃縮保持液(透析濾過後の還元GH-L101C-SH)を用い、3当量(GH-L101C-S-グルタチオン1g当たり約0.16g)の側鎖の添加に対応する0.1mL側鎖溶液を添加して、コン

50

ジュゲーション反応を開始する。コンジュゲーション反応をHPLCによりモニターする(図3B)。

【0249】

残りの濃縮保持液(66mL)を側鎖溶液と混合し、TFFシステムで循環させて確実に混合する。混合物をポンピングなしで一晩放置する。

【0250】

生成物を更に精製するために、コンジュゲーション混合物(保持液)を透析濾過緩衝液2に対して、定容で5倍容量により透析濾過することで、分子量が10kDa未満の溶液の分子が除去され、これに続く任意のクロマトグラフィー工程用の生成物が調製される。

【0251】

最終透析濾過コンジュゲートGH-L101C-S-側鎖のAIE-HPLCは、コンジュゲーション混合物と比較して、側鎖及びKIの量でのほぼ完全なGH-L101C-SHの変換及び成功裡の還元を示す(不図示)。

【0252】

(実施例3)高いGH濃度及び低い側鎖濃度で限外濾過及び透析濾過にTFFシステムを使用するGH-L101C-SHの還元及びコンジュゲーション

装置:

Millipore Labscale TFFシステム

AKTAcrossflow TFFシステム

Sartocon Slice 200 Filter、カットオフ10kD [Hydrosart(登録商標)]

溶液:

【0253】

【表2】

	GH-L101C-S-グルタチオン 調製物:	透析濾過緩衝液 "3"	透析濾過緩衝液 "4"
トリエタノールアミン (mmol/kg)	20	20	20
NaCl(mmol/kg)	80	80	0
pH(22°C)	7.4	7.4	7.4
導電率(mS/cm)	10	10	1-2
イオン強度(M)	0.09	0.09	0.01

【0254】

上記の通りGH調製物をTFFシステム(AKTAcrossflow)に掛け、10g/LのGH-L101C-S-グルタチオンの濃度が得られるまで限外濾過を行う(入口圧力2バール、出口圧力1バール)。実施例1と同量のTPPDS(5当量)を保持液槽に添加し、均一になるまで循環させる(約15分)。還元に続いて30分ごとに4時間のAIE-HPLCを行う(オートサンプラーを用いて、図4A参照)。

【0255】

4時間後、還元混合物を定容で透析濾過緩衝液3に対して5回透析濾過する。側鎖溶液(2.2当量、GH-L101C-S-グルタチオン1g当たり約0.12g)を添加し、均一になるまで循環を適用する(約15分)。コンジュゲーション反応に続いてAIE-HPLCを行う(オートサンプラーを用いて、図4B参照)。

【0256】

コンジュゲーション反応後、KI及び残りの側鎖の含量を低減し、これに続く任意のクロマトグラフィー工程用のコンジュゲートタンパク質を調製するために、コンジュゲーション混合物を透析濾過緩衝液4に対して、5倍容量により透析濾過する。

【0257】

(実施例4)コンジュゲートタンパク質GH-L101C-S-側鎖を精製する方法

コンジュゲーション後、Q Sepharose HPを固定相として及びトリエタノールアミンを移

10

20

30

40

50

動相として使用する陰イオン交換クロマトグラフィーにより、生成物を精製することができる。溶出は線形塩化ナトリウム勾配で行うことができる。生成物は、10kDa膜のカットオフよりサイズが小さな不純物を除去する適切な貯蔵緩衝液への透析濾過に供することができる。UF/DF工程はまた、濃縮生成物の調製も可能にする。

【0258】

実施例1~4の概要

TFFシステムを用いて行われた還元及びコンジュゲーションプロセスは、成功であると分かった。TPPDSを使用するGH-L101C-S-グルタチオンの還元の3つの実施例が示され、結果は図1A、2及び4Aに示されている。図1Aは、2.4g/Lのタンパク質濃度で5当量のTPPDSによる還元を示す。出発物質の変換は、4時間後にわずか約60%である。しかし、還元を10当量のTPPDSで5g/L(図2)、又は5当量のTPPDSで10g/L(図4A)で行う場合、反応は4時間未満で完了する。基質(タンパク質前駆体)濃度がより高いと還元剤の量を減さすことができるこ¹⁰とも観察されている。

【0259】

上記の実施例は、コンジュゲーション反応をTFFシステムで行うことができるという幾つかの証明を含んでいる(図3A、3B及び4B)。実施例全てにおいて還元は4時間実行した。

【0260】

図1Bに示されたコンジュゲーションは、20時間後に60%未満のコンジュゲーションをもたらした。図1Aに示されているように、出発物質の還元は不完全であり、したがって、残りのGH-L101C-S-グルタチオン及び反応中間体がコンジュゲーション反応を妨げる可能性がある。反応期間の間、GH-L101C-S-グルタチオン及び反応中間体はGH-L101C-SHに完全に変換されたが、GH-L101C-S-側鎖への完全な変換は起こらなかった。側鎖は、タンパク質の遊離チオールと反応し得る前に、グルタチオン及びおそらく残りのTPPDSとの反応により枯渇したと考えられる。

【0261】

図3Aと3Bの唯一の違いは中間透析濾過工程であり、これは、80%未満と比べて90%超までコンジュゲーションの収率を増加させる。

【0262】

中間透析濾過が側鎖の濃度に影響を与えることも分かる。透析濾過なしでは側鎖の濃度はほとんどすぐに低下するが、中間透析濾過工程の実行は側鎖濃度のこの急激な低下を回避する。

【0263】

側鎖濃度の低下は、放出されたグルタチオン(側鎖の1当量に対応する)及びおそらくTPPDSとの側鎖の反応に起因する可能性がある。中間透析濾過の導入により、これらの副反応はもはや起こりえない。

【0264】

限外濾過及び透析濾過の併用の別の利点を、図3B及び4Bを比較し例証する。図3Bでは、3当量の側鎖の添加及びpH8.0の使用により、速いほぼ完全なコンジュゲーション反応が得られている。タンパク質はpH8.0あまり安定でないため、より低いpHが有利となる。しかし、より低いpHはより低い反応速度もたらすことになる。同様に、側鎖の使用は最小限に抑えるべきであるが、側鎖の減少もまた反応速度を低下させることになる。図4Bは、コンジュゲーション反応中のタンパク質濃度を高めることにより、より少ない側鎖及びより低いpHの使用で速い十分な反応を得ることを示している。

【0265】

コンジュゲーション混合物として得られるようなコンジュゲートタンパク質はあまり安定でないことから、更なる精製工程を含めることが有利となり得る。実施例4に記載されているように、最終透析濾過工程の導入は、通常の条件下で保管することができる安定なタンパク質調製物をもたらし、更にタンパク質調製物は、希釀又はpH調整なしで、故に更なる処理を回避してその後のカラムに直接適用することができる。

【0266】

10

20

30

40

50

(実施例5)還元反応の最小タンパク質濃度の定義

本発明の発明者らは、制御すべき重要なパラメータが還元反応混合物中のタンパク質の濃度であることを見出した。上記の通り、出発物質が比較的低濃度である状況では、還元剤を添加する前に濃度工程を含めることにより反応を改善することができる。タンパク質組成物の濃縮により、より少ない当量の還元剤を用いて十分に還元することができた。更なる試験は、反応速度も、還元混合物の温度及びイオン強度により影響を受けることを示した。

【0267】

還元混合物のタンパク質濃度、温度及びイオン強度の複合的影響を記載するために、かなりの数の条件を調べた(Table 1(表3)の実施例)。基準としてトリエタノールアミン(20mM)及びNaCl (80mM)を、0.09のイオン強度という条件で含めた。実験4、5、10、11及び16では追加の塩を含めてイオン強度を上げたが、14及び15では塩濃度を下げた。緩衝液のイオン強度は、緩衝液の総濃度を乗じた荷電緩衝液の分数として計算する。荷電緩衝液の分数(x)は、ヘンダーソン-ハッセルバルヒの式:

【0268】

【数1】

$$x = \frac{1}{1+10^{pH-pK_a}}m. \quad (pK_a \text{ はトリエタノールアミンに関して } 22^{\circ}\text{C} \text{ で } 7.8 \text{ である。})$$

【0269】

を用いて緩衝液のpKaから計算する。

【0270】

10

20

【表3】

実験	C _P (mM)	温度(°C)	n(TPPDS)	NaCl (mM)	トリエタノールアミン(mM)	イオン強度(M)	pH	C _{min} (mM)
1	0.11	30	5	80	20	0.09	7.5	0.05
2	0.11	30	10	80	20	0.09	7.5	0.05
3	0.45	20	3	80	20	0.09	7.4	0.09
4	0.45	20	3	580	20	0.59	7.4	0.04
5	0.22	20	5	580	20	0.59	7.4	0.04
6	0.22	20	5	80	20	0.09	7.4	0.09
7	0.10	20	5	80	20	0.09	7.4	0.09
8	0.11	20	5	80	20	0.09	7.5	0.09
9	0.11	5	10	80	20	0.09	7.4	0.26
10	0.11	5	10	280	20	0.29	7.4	0.16
11	0.11	5	10	580	20	0.59	7.4	0.12
12	0.45	5	10	80	20	0.09	7.4	0.26
13	0.04	40	10	80	20	0.09	7.4	0.02
14	0.04	40	10	27	7	0.03	7.4	0.04
15	0.02	40	10	16	4	0.02	7.4	0.04
16	0.02	40	10	516	4	0.52	7.4	0.01
17	0.22	20	10	80	20	0.09	8	0.09
18	0.22	20	10	80	20	0.09	8	0.09
19	0.11	20	10	80	20	0.08	8.5	0.10
20	0.11	20	10	80	20	0.09	7.5	0.09

Table 1 還元実験1～20に関する還元混合物(緩衝液を含むがタンパク質成分を除く)中のタンパク質濃度(C_p)、温度(Temp)、還元剤の当量数(n)、及びイオン強度を含む還元反応の条件。以下に記載される計算したC_{min}も比較のために含まれる。実施例9～20は図5にプロットされている。

【0271】

反応速度論に基づき還元を表す機構モデルを開発した。タンパク質濃度及び還元剤のモル比の固有の影響のほかに、モデルは反応速度定数に対する導電率及び温度の影響を含む。モデルパラメータは実験データに合わせて決定した。モデルシミュレーションを次いで用いて、かなりの数の条件でタンパク質濃度、温度、及びイオン強度の複合的影響を表した。

【0272】

所与の温度及びイオン強度において十分に還元するために必要とされる最小濃度を表す相関を得た。この場合の十分とは、開始タンパク質の濃度が約6時間以内に<2%まで低下することを意味する。シミュレーションを用いて生成した多数のデータ点により、詳細な相関、故に特有の(珍しい)形の相関が可能となった。

【0273】

以下の相関が導かれ、図5により図示される。

$$C_{min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T), \text{ここで、}$$

Tは摂氏温度での温度であり

IはM (mol/L)のイオン強度であり

C_{min}はM (mol/L)であり、定数は

$$a = 0.137 * 10^{-3} M^{1.425}$$

$$a_1 = 0.425$$

$$b = 0.070^{-1} \text{である。}$$

【0274】

10

20

30

40

50

Table 1(表3)及び図9からの実験9及び16に関する C_{min} の計算をここで以下に例示する。
 C_{min} は上記に記載された以下の相関、 $C_{min}=a*I^{-a}exp(-b*T)$ により計算する。

実験9に関する計算

$$I=0.08(NaCl)+0.02*1/(1+10^{(7.4-7.8)})(トリエタノールアミン)=0.09M$$

T=5 :

$$C_{min}=0.137*10^{-3}*0.09^{-0.425}*exp(-0.070*5)=0.26*10^{-3}M=0.26mM$$

実験9の C_P は0.11mMであった。これは C_{min} 未満であり、故に本発明による好ましい条件の範囲外である。

実験16に関する計算

$$I=0.516(NaCl)+0.004*1/(1+10^{(7.4-7.8)})(トリエタノールアミン)=0.52M$$

10

T=40 :

$$C_{min}=0.137*10^{-3}*0.52^{-0.425}*exp(-0.070*40)=0.01*10^{-3}M=0.01mM$$

実験16の C_P は0.02で、これは C_{min} を超えており、本発明による好ましい条件の範囲内である。

【0275】

有用性は、タンパク質濃度(C_P)が C_{min} より高い2つの実験(実験12及び16)、及び C_P が C_{min} より低い2つの実験(実験9及び15)を示す図6から更に明らかである。実験12及び16において出発物質(タンパク質-S-S-Cap)は6時間の反応時間内に、2%未満になるまで変換される。実験12及び16は、低い温度を補う高いタンパク質濃度(実験12)、又は低いタンパク質濃度を補う高いイオン強度及びより高い温度の両方を有すること(実験16)のどちらかにより、有用な反応収率が得られることを示すものである。

20

【0276】

(実施例6)コンジュゲーション反応のための最小タンパク質濃度の定義

前の実施例(実施例3等)で示されているように、コンジュゲーション反応においてもより高いタンパク質濃度を用いることによって、十分なコンジュゲーション反応が得られ、これにより、アルブミン結合側鎖により例示されるように、より少ない当量の活性化された化学的部分(Z^*)の使用が可能になった。この場合もやはり、イオン強度及び温度の影響を調べた。この場合の十分なコンジュゲーション反応とは、開始タンパク質(タンパク質-SH)の濃度が約10時間以内に<5%まで低下することを意味する。基準としてトリエタノールアミン(20mM)、NaCl (80mM)及びKI (0.5M)を、イオン強度およそ0.5という条件で含めた。

30

【0277】

【表4】

実験	C _p (mM)	温度 (°C)	n (Z*)	NaCl/グアニジン HCl(mM)	KI (mM)	トリエタノール アミン(mM)	イオン 強度(M)	pH	C _{min} (mM)
1	0.11	30	3	80	450	20	0.55	7.0	0.03
2	0.11	30	3	80	450	20	0.54	8.0	0.03
3	0.45	20	2.2	80	460	20	0.55	7.4	0.04
4	0.45	20	2.2	280	460	20	0.75	7.4	0.03
5	0.45	20	2	80	200	20	0.29	7.4	0.05
6	0.45	20	2	580	200	20	0.79	7.4	0.03
7	0.45	20	2	580*	200	20	0.79	7.4	0.03
8	0.45	20	2	400	200	20	0.61	7.4	0.03
9	0.22	20	2	80	320	20	0.41	7.4	0.04
10	0.08	20	3.6	80	450	20	0.55	7.0	0.04
11	0.08	20	3.6	80	450	20	0.54	8.0	0.04
12	0.22	20	4.7	80	160	20	0.25	7.4	0.05
13	0.22	20	4.7	280	160	20	0.45	7.4	0.04
14	0.11	5	4	80	220	20	0.31	7.4	0.07
15	0.45	5	4	80	750	20	0.84	7.4	0.05
16	0.11	5	4	280	220	20	0.51	7.4	0.06
17	0.11	5	4	580	220	20	0.81	7.4	0.05
18	0.04	40	4	27	70	7	0.10	7.4	0.07
19	0.04	40	4	427	70	7	0.50	7.4	0.02
20	0.11	40	4	20	220	5	0.24	7.4	0.03
21	0.05	40	4	320	110	5	0.43	7.4	0.02

Table 2 コンジュゲーション反応に関してテストした種々の条件の実施例。コンジュゲーション反応の条件には、コンジュゲーション実験 1~21 に関するコンジュゲーション混合物(緩衝液を含むがタンパク質及び側鎖を除く)中のタンパク質濃度(C_p)、温度(Temp)、側鎖 Z*の当量数、及びイオン強度が含まれる。実施例 10~21 は図 7 にプロットされている。

以下に記載される計算した C_{min} も比較のために含まれる。

*この例は、グアニジンHClによる唯一のものである。

【0278】

コンジュゲーション反応の条件には、還元混合物(緩衝液を含むがタンパク質及び側鎖成分を除く)中のタンパク質濃度(C_p)、摂氏温度(Temp)、側鎖の当量数(n)、及びイオン強度、例えば塩の濃度が含まれる。Table 2(表4)の実験1~20でテストしたコンジュゲーション条件に基づき、還元に関するのと同じアプローチを用いて機構モデルを開発した。シミュレーションを使用してかなりの量のデータを生成し、これにより、所与の温度及びイオン強度の任意の組み合わせにおいて十分なコンジュゲーションを得るために必要とされる最小タンパク質濃度を表す相関を得ることが可能となった。この場合の十分とは、還元タンパク質の濃度が約10時間以内に<5%まで低下することを意味する。得られたデータに基づき、コンジュゲーション反応の適切な条件は、図7により図示された温度及びイオン強度に依存する最小タンパク質濃度(C_{min})に関する以下の定義を用いて定義することができる。

$$C_{min}=6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-0.0396 \times 5 - 10.9 \times I) + 6.12 \times 10^{-5} \times \exp(-0.0289 \times 5) \\ = 6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-1.98 - 10.9 \times I) + 5.30 \times 10^{-5}$$

C_{min}=a*exp(-b₁*T-b₂*I)+d*exp(-d₁*T)、ここで、Tは摂氏温度での温度であり、IはM (mol/L)のイオン強度であり、C_{min}はM (mol/L)の最小タンパク質濃度であり

$$a=6.96 \times 10^{-4} M$$

$$b_1=0.0396 \text{ mol}^{-1}$$

$$b_2=10.9 M^{-1}$$

$$d=6.12 \times 10^{-5} M$$

10

20

30

40

50

$d_1 = 0.0289 \text{ } \text{m}^{-1}$ である。

【 0 2 7 9 】

コンジュゲーション実験15及び18の計算を以下に示す：

実施例15に関する計算

$$I=0.08(\text{NaCl})+0.75(\text{KI})+0.02*1/(1+10^{(7.4-7.8)}) \text{ (トリエタノールアミン)}=0.84M$$

T=5 :

$$C_{min} = 6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-0.0396 \times 5 - 10.9 \times 0.84) + 6.12 \times 10^{-5} \times \exp(-0.0289 \times 5) = 0.05 \times 10^{-3} M = 0.05 \text{ mM}$$

実験15のタンパク質濃度(C_P)は、計算した C_{min} を明らかに超える0.45Mであった。

【 0 2 8 0 】

実験18に関する計算

I=0.027(NaCl)+0.07(KI)+0.007*1/(1+10^(7.4-7.8))(トリエタノールアミン)=0.10M

T=40 :

$$C_{min} = 6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-0.0396 \times 40 - 10.9 \times 0.10) + 6.12 \times 10^{-5} \times \exp(-0.0289 \times 40) = 0.07 \times 10^{-3} M = 0.07 mM$$

実験18のタンパク質濃度(C_p)は、0.10Mの C_{min} 未満である0.04mMであった。

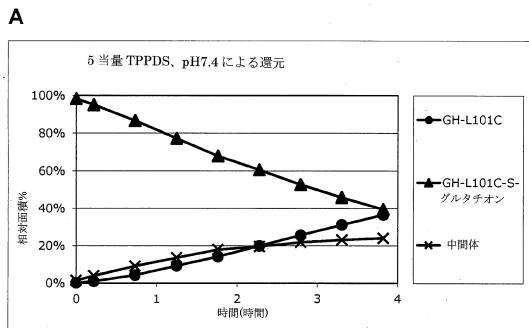
【 0 2 8 1 】

相関の有用性は、種々のコンジュゲーション条件をテストする一連の実験を示す図8A及び8Bから明らかである。実験11において、還元タンパク質の量は、20%で約10時間後、出発物質のおよそ5%まで減少する($C_p=0.08\text{mM}$ 及び3.6当量の側鎖)。実験5において、側鎖の当量数が2当量まで減少しても、還元タンパク質(C_p)の量を増加させることによって得られる反応はより速い。実験5と比較して、実験6により示されているように、イオン強度の増加は反応を更に加速させる。実験14、15及び19(図8B)においてタンパク質濃度(C_p)は C_{min} より高い。一方、実験18からは、 C_{min} 未満の C_p での実験の有効性が低いことが示される。後者では反応は極めて緩徐であった。20時間後、約20%の出発物質が依然として残っている。実験19においてイオン強度は増加するが、実験18と比較して C_p 及びTは一定のままであり、より高い反応速度をもたらし、したがって出発物質は3時間未満で、5%未満になるまで変換される。5%での2つの実施例は両方とも C_{min} を超える C_p を有し、出発物質は約10時間以下で、5%未満になるまで変換される。しかし、実験14と比較して実験15における C_p 及びイオン強度の増加は、出発物質の更により効率的な変換をもたらした。

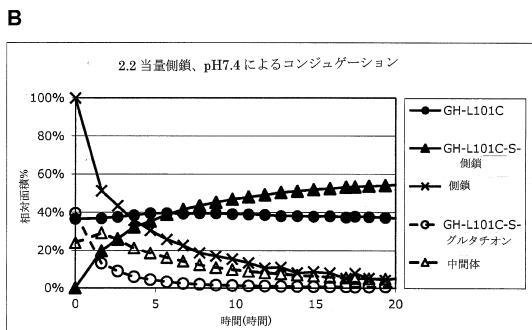
【 0 2 8 2 】

本発明の特定の特徴を本明細書に図示し、記載したが、当業者であれば、今や、多くの修飾形態、置換形態、変更形態、及び均等物を思いつくはずである。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨の範囲内にあるような全ての修飾形態及び変更形態を含むことを意図するものであることが理解されるべきである。

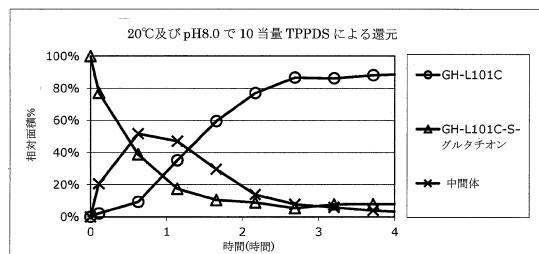
【図1A】



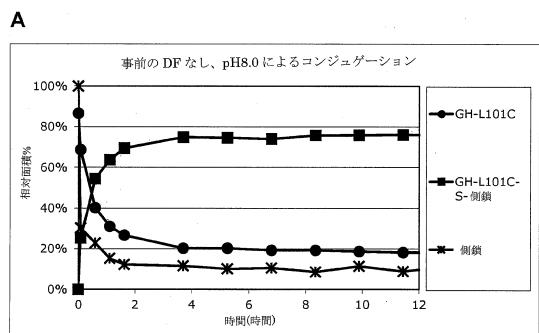
【図1B】



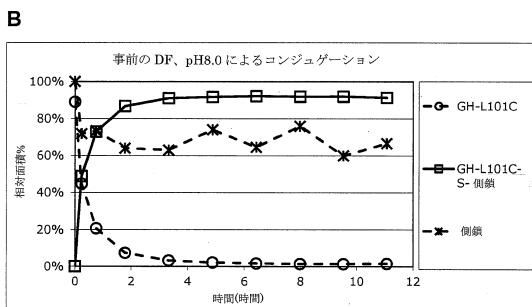
【図2】



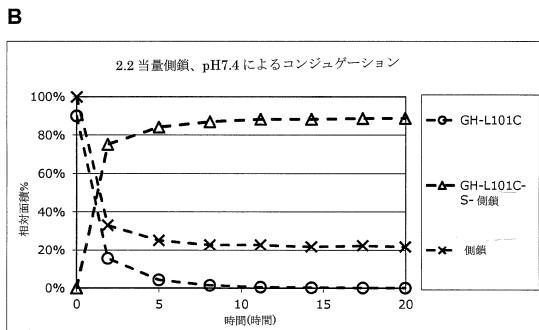
【図3A】



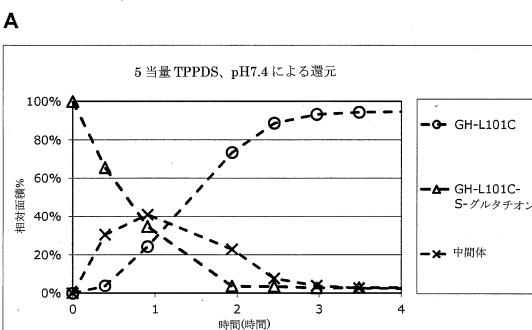
【図3B】



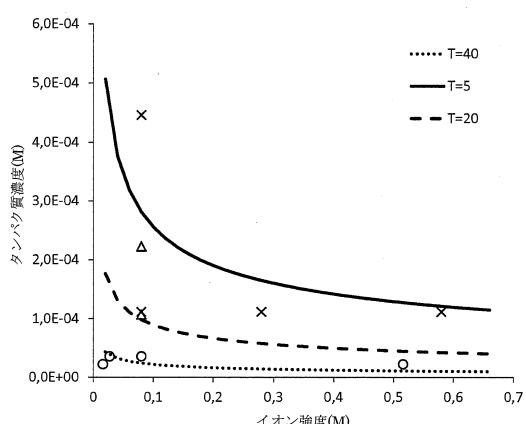
【図4B】



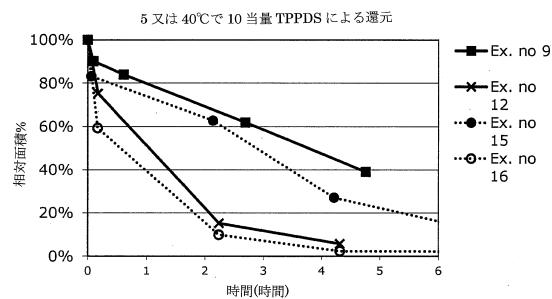
【図4A】



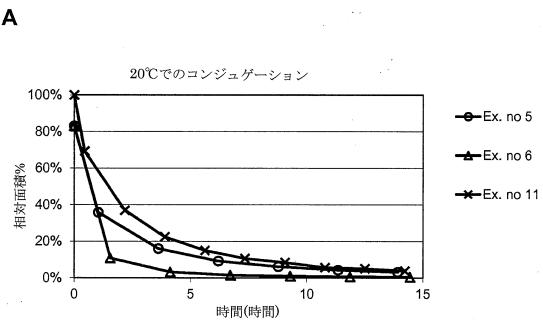
【図5】



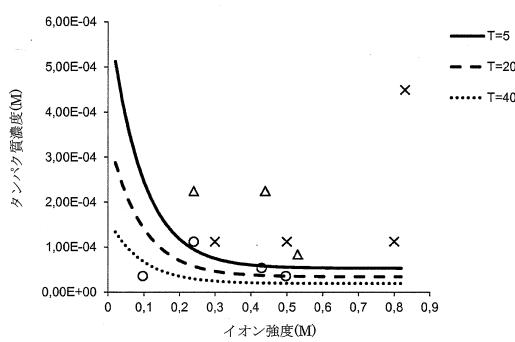
【図6】



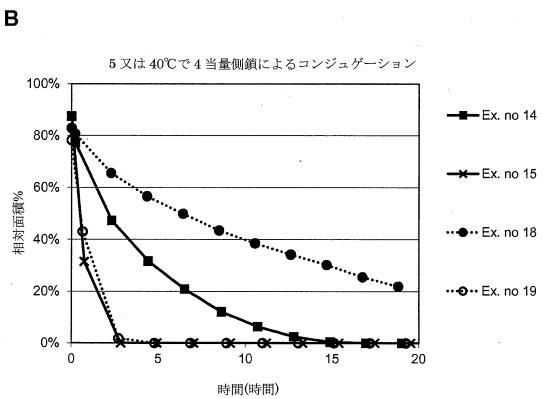
【図8 A】



【図7】



【図8 B】



【配列表】

0006603662000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 トーマス・ブッデ・ハンセン
デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーエス
(72)発明者 エルнст・プロベルグ・ハンセン
デンマーク・DK-2880・バウスヴェア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーエス

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 特表2002-534119(JP,A)
特表2004-508014(JP,A)
特表2008-544976(JP,A)
特表2013-518038(JP,A)
特表2008-546670(JP,A)
J. Chromatogr. A, 2011年, vol.1221, p.57-70
Biochem. J., 2005年, vol.392, p.555-564

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/WPIDS/EMBASE/BIOSIS(STN)