

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7281140号
(P7281140)

(45)発行日 令和5年5月25日(2023.5.25)

(24)登録日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(51)国際特許分類	F I
C 0 8 G 69/40 (2006.01)	C 0 8 G 69/40
C 0 8 G 65/333 (2006.01)	C 0 8 G 65/333
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 10 (全39頁)

(21)出願番号	特願2021-559941(P2021-559941)	(73)特許権者	000004341 日油株式会社 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
(86)(22)出願日	平成31年4月15日(2019.4.15)	(73)特許権者	502035128 ユニヴァーシタ デグリ ステューディ ディ パドヴァ イタリア国、35122 パドヴァ、ヴ ィア エイト フェブツライオ 1848 、2番地
(65)公表番号	特表2022-529413(P2022-529413 A)	(74)代理人	100080791 弁理士 高島 一
(43)公表日	令和4年6月22日(2022.6.22)	(74)代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(86)国際出願番号	PCT/IT2019/000031	(74)代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87)国際公開番号	WO2020/213015		
(87)国際公開日	令和2年10月22日(2020.10.22)		
審査請求日	令和3年11月30日(2021.11.30)		

最終頁に続く

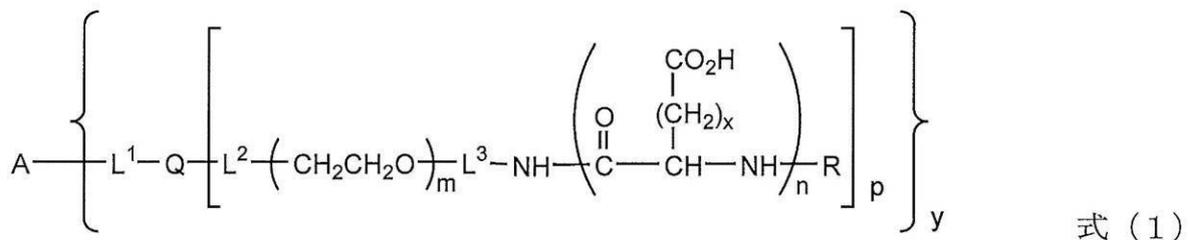
(54)【発明の名称】 生体関連物質とブロックポリマーとの結合体、および前記結合体を得るためのブロックポリマー誘導体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(1)で表される、ブロックポリマーと生体関連物質との結合体であって、生体関連物質Aがタンパク質、ペプチド(ただし、オクトレオチドを除く)、核酸、細胞およびウイルスからなる群より選択される1種以上である、結合体。

【化1】



10

(式中、Aは生体関連物質を示し、L¹、L²、L³はそれぞれ独立して単結合または2価のリンカーを示し、Qは2個または3個の活性水素を有する化合物の残基を示す。mは10~1400であり、nは2~100である。xは1または2であり、Rは水素原子またはアシル基を示し、pは1または2であり、yは1~40である。)

【請求項2】

式(1)において、yが1である、請求項1に記載の結合体。

20

【請求項 3】

式(1)において、mが40～1200であり、nが5～50である、請求項1または2に記載の結合体。

【請求項 4】

式(1)において、Qが、エチレングリコール、グリセリン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群より選択される化合物の残基である、請求項1～3のいずれか1項に記載の結合体。

【請求項 5】

式(1)において、L¹、L²、L³が、それぞれ独立して、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、トリアジン基、チオールの付加されたマレイミド基、オキシム結合、ならびに、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、トリアジン基、チオールの付加されたマレイミド基およびオキシム結合からなる群より選択される1種以上を含んでいてもよいアルキレン基からなる群より選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の結合体。

10

【請求項 6】

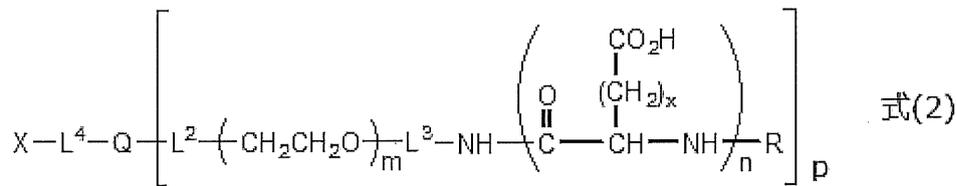
式(1)において、Aが、サイトカイン、ホルモン、酵素、抗体および核酸からなる群より選択される生体関連物質である、請求項1～5のいずれか1項に記載の結合体。

【請求項 7】

請求項1～6のいずれか1項に記載の結合体を得るための中間体であって、下記式(2)で表される、ブロックポリマー誘導体。

20

【化 2】



30

(式中、Xは生体関連物質と化学反応可能な官能基を示し、L²、L³、L⁴はそれぞれ独立して単結合または2価のリンカーを示し、Qは2個または3個の活性水素を有する化合物の残基を示す。mは10～1400であり、nは2～100である。xは1または2であり、Rは水素原子またはアシル基を示し、pは1または2である。)

【請求項 8】

式(2)において、Qが、エチレングリコール、グリセリン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群より選択される化合物の残基である、請求項7に記載のブロックポリマー誘導体。

【請求項 9】

式(2)において、L²、L³、L⁴が、それぞれ独立して、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、ならびに、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基およびウレア結合からなる群より選択される1種以上を含んでいてもよいアルキレン基からなる群より選択される、請求項7または8に記載のブロックポリマー誘導体。

40

【請求項 10】

式(2)において、Xが、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、カルボキシル基、チオール基、マレイミド基、置換マレイミド基、ヒドラジド基、ピリジリジチオ基、置換スルホ基、アミノ基、オキシアミノ基、ヨードアセトアミド基、アルキルカルボニル基、アルケニル基、ア

50

ルキニル基、アジド基、アクリロイル基、スルホニルオキシ基、 - ハロアセチル基、ア
リル基およびビニル基からなる群より選択される反応性官能基である、請求項 7 ~ 9 のい
ずれか 1 項に記載のブロックポリマー誘導体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体関連物質とアニオン性のブロックポリマーとの結合体、および前記結合
体を得るためのブロックポリマー誘導体に関する。

【背景技術】

【0002】

ホルモンやサイトカイン、抗体、酵素などの生体関連物質を用いた医薬品は、通常生体
内へ投与されると、腎臓における糸球体濾過や肝臓や脾臓などにおけるマクロファージに
よる取り込みによって、生体内から速やかに排出されてしまう。そのため血中半減期が短
く、十分な薬理効果を得ることが困難であることが多い。

かかる問題を解決するため、生体関連物質を、糖鎖、ポリエチレングリコールなどの親
水性高分子、アルブミンなどによって化学修飾する試みが行われている。その結果、分子
量の増大や水和層の形成などにより、生体関連物質の血中半減期を延長することが可能と
なる。

また、ポリエチレングリコールで修飾することで、生体関連物質の毒性や抗原性の低下
、難水溶性薬物の溶解性向上などの効果が得られることも良く知られている。

【0003】

ポリエチレングリコールで修飾された生体関連物質は、ポリエチレングリコールのエー
テル結合と水分子との水素結合により形成される水和層で覆われ、分子サイズが増大する
。そのため腎臓における糸球体濾過を回避することができる。さらにオプソニンや、各組
織を構成する細胞の表面との相互作用が低下し、各組織への移行が減少することが知られ
ている。

ポリエチレングリコールは、生体関連物質の血中半減期を延長させ得る優れた素材であ
り、ポリエチレングリコールで修飾した生体関連物質の研究が多数行なわれ、それらの血
中半減期を有意に延長できるという結果が得られている。

しかしながら、さらに血中半減期を延長できる新たな素材が求められている。

【0004】

生体関連物質の血中半減期を延長させる他の方法としては、負の電荷を生体関連物質に
付与する方法が挙げられる。腎臓の糸球体毛細血管壁には、負に帯電したグリコカリッ
クスが存在するため、負の電荷を複数有する分子は、グリコカリックスとの静電反発により
糸球体からの排出が抑制されることが知られている。

非特許文献 1 では、酵素であるペルオキシダーゼに負電荷を付与したところ、腎臓から
の排出が有意に抑制されたことが報告されている。また非特許文献 2 では、負電荷を付与
したデキストランポリマーにおいて、腎臓からの排出が抑制されたことが確認されている。

【0005】

生体関連物質の血中半減期を延長させるために、ポリエチレングリコールの修飾による
分子サイズの増大効果と、負電荷を付与する効果の両方を併せ持つ素材があれば、生体関
連物質の血中半減期のさらなる延長が期待できる。ポリエチレングリコール誘導体に負電
荷を付与する方法はいくつかあるが、ポリエチレングリコールに複数の負電荷を効率よく
導入し得る方法として、ポリエチレングリコールとアニオン性のポリアミノ酸を組み合わ
せたブロックポリマーが考えられる。一般的なポリエチレングリコールとアニオン性のポ
リアミノ酸のブロックポリマーの応用例としては、以下のようなものが挙げられる。

【0006】

たとえば、特許文献 1 には、ポリエチレングリコール、ポリサッカライド、ポリアクリ
ルアミド等と、ポリアスパラギン酸等のポリアミノ酸とのブロックポリマーに、疎水性の
薬物を結合させてなる水溶性高分子医薬が記載されている。特許文献 2 には、ポリエチレ

10

20

30

40

50

ングリコール類とポリグルタミン酸とのブロックポリマーに、抗癌剤を結合させた水溶性高分子抗癌剤が記載されている。特許文献3には、ポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸とのブロックポリマーからなる薬物の担体が記載されている。

上記特許文献に記載されたブロックポリマーは、総じて自己会合により高分子ミセルを形成し、ミセル内部に取り込まれた薬物の送達に用いられる。ブロックポリマーのポリアミノ酸部分の側鎖に存在するカルボキシル基は、薬物を共有結合させるのに利用され、高分子ミセルが形成された際には、ミセルの内部に取り込まれることになる。それゆえ、これらポリアミノ酸部分におけるカルボキシル基が負電荷を有するとしても、腎臓からの排出は抑制されない。また、これらブロックポリマーは、ポリアミノ酸部分のカルボキシル基以外に官能基を有しないことから、生体関連物質を修飾することができない。さらに、前記ブロックポリマーは、水溶液中ではミセルを形成してしまうため、生体関連物質の修飾には適していない。

10

【0007】

従って、血中半減期がさらに延長され、生体の血中での安定性がより向上された生体関連物質の修飾体が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】特許第2694923号公報

20

特許第3310000号公報

特許第3268913号公報

【非特許文献】

【0009】

【文献】H.G. Rennke, Y. Patel, M.A. Venkatachalam; *Kidney Int.* 13 (1978) 324-328

R.L.S. Chang, W.M. Deen, C.R. Robertson, B.M. Brenner; *Kidney Int.* 8 (1975) 212-218

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0010】

そこで、本発明の課題は、血中半減期がさらに延長され、生体の血中での安定性がより向上された、アニオン性を有するブロックポリマーにより修飾された生体関連物質を提供することにある。より具体的には、アニオン性のポリアミノ酸と親水性のポリエチレングリコールのブロックポリマー誘導体で修飾され、生体内の血中での安定性が向上した生体関連物質を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、アニオン性のポリアミノ酸と親水性のポリエチレングリコールのブロックポリマー誘導体と、生体関連物質との結合体とすることにより、生体関連物質の血中半減期をさらに延長することができ、生体の血中での安定性を向上させ得ることを見出し、本発明を完成した。

40

【0012】

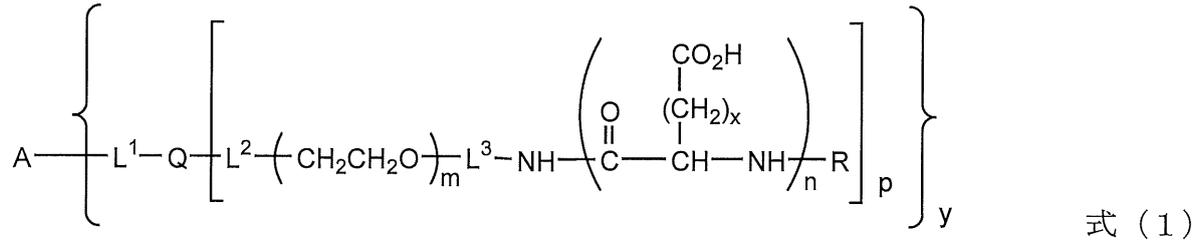
すなわち、本発明は以下に示す通りである。

[1] 下記式(1)で表される、ブロックポリマーと生体関連物質との結合体。

【0013】

50

【化1】



【0014】

(式中、Aは生体関連物質を示し、L¹、L²、L³はそれぞれ独立して単結合または2価のリンカーを示し、Qは2個または3個の活性水素を有する化合物の残基を示す。mは10～1400であり、nは2～100である。xは1または2であり、Rは水素原子またはアシル基を示し、pは1または2であり、yは1～40である。)

[2]式(1)において、yが1である、[1]に記載の結合体。

[3]式(1)において、mが40～1200であり、nが5～50である、[1]または[2]に記載の結合体。

[4]式(1)において、Qが、エチレングリコール、グリセリン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群より選択される化合物の残基である、[1]～[3]のいずれかに記載の結合体。

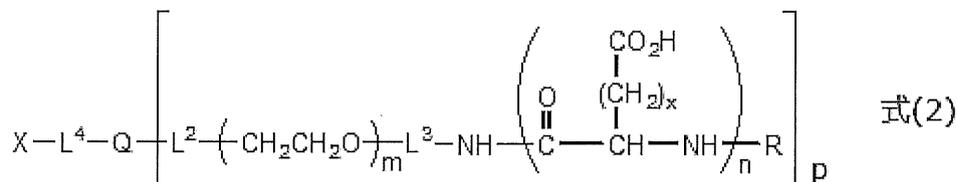
[5]式(1)において、L¹、L²、L³が、それぞれ独立して、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、トリアジン基、チオールの付加されたマレイミド基、オキシム結合、ならびに、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、トリアジン基、チオールの付加されたマレイミド基およびオキシム結合からなる群より選択される1種以上を含んでもよいアルキレン基からなる群より選択される、[1]～[4]のいずれかに記載の結合体。

[6]式(1)において、Aが、サイトカイン、ホルモン、酵素、抗体および核酸からなる群より選択される生体関連物質である、[1]～[5]のいずれかに記載の結合体。

[7][1]～[6]のいずれかに記載の結合体を得るための中間体であって、下記式(2)で表される、ブロックポリマー誘導体。

【0015】

【化2】



【0016】

(式中、Xは生体関連物質と化学反応可能な官能基を示し、L²、L³、L⁴はそれぞれ独立して単結合または2価のリンカーを示し、Qは2個または3個の活性水素を有する化合物の残基を示す。mは10～1400であり、nは2～100である。xは1または2であり、Rは水素原子またはアシル基を示し、pは1または2である。)

[8]式(2)において、Qが、エチレングリコール、グリセリン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群より選択される化合物の残基である、[7]に記載のブロックポリマー誘導体。

[9]式(2)において、L²、L³、L⁴が、それぞれ独立して、単結合、フェニレン基

10

20

30

40

50

、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、ならびに、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第2級アミノ基、カルボニル基およびウレア結合からなる群より選択される1種以上を含んでいてもよいアルキレン基からなる群より選択される、[7]または[8]に記載のブロックポリマー誘導体。

[10]式(2)において、Xが、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、カルボキシル基、チオール基、マレイミド基、置換マレイミド基、ヒドラジド基、ピリジルジチオ基、置換スルホ基、アミノ基、オキシアミノ基、ヨードアセトアミド基、アルキルカルボニル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、アクリロイル基、スルホニルオキシ基、 β -ハロアセチル基、アリル基およびビニル基からなる群より選択される反応性官能基である、[7]~[9]のいずれかに記載のブロックポリマー誘導体。

【発明の効果】

【0017】

本発明により、アニオン性を有するブロックポリマーで修飾された生体関連物質を得ることができる。

上記の修飾された生体関連物質は、ブロックポリマーを構成するポリエチレングリコールによる分子サイズの増大効果と、アニオン性のポリアミノ酸による負電荷の付与効果により、血中半減期が延長され、生体の血中での安定性が向上される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、実施例1(2)のブロックポリマー誘導体(18)のMALDI-TOF-MS分析の結果を示す図である。

【図2】図2は、実施例9(1)のブロックポリマー誘導体(23)とGCSFとの結合体(28)の反応液のRP-HPLC分析の結果を示す図である。

【図3】図3は、実施例9(1)のブロックポリマー誘導体(23)とGCSFとの結合体(28)の陽イオン交換クロマトグラフィー精製の結果を示す図である。

【図4】図4は、実施例9(1)のブロックポリマー誘導体(23)とGCSFとの結合体(28)のMALDI-TOF-MS分析の結果を示す図である。

【図5】図5は、実施例9(1)のブロックポリマー誘導体(23)とGCSFとの結合体(28)のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図6】図6は、実施例9(4)のブロックポリマー誘導体(26)とGCSFとの結合体(31)の反応液のRP-HPLC分析の結果を示す図である。

【図7】図7は、実施例9(4)のブロックポリマー誘導体(26)とGCSFとの結合体(31)のMALDI-TOF-MS分析の結果を示す図である。

【図8】図8は、実施例10(1)のブロックポリマー誘導体(19)とGCSFとの結合体(33)の反応液のRP-HPLC分析の結果を示す図である。

【図9】図9は、比較例1のメトキシPEG-GCSF結合体(36)のMALDI-TOF-MS分析の結果を示す図である。

【図10】図10は、試験例1において、GCSF、ブロックポリマー誘導体(26)とGCSFとの結合体(31)、メトキシPEG-GCSF結合体(36)について、ラットを用いた薬物動態評価の結果を示す図である。

【図11】図11は、実施例11(1)のブロックポリマー誘導体(26)とhGHとの結合体(37)の反応液のRP-HPLC分析の結果を示す図である。

【図12】図12は、実施例11(1)のブロックポリマー誘導体(26)とhGHとの結合体(37)の反応液の陽イオン交換クロマトグラフィー精製の結果を示す図である。

【図13】図13は、実施例11(1)のブロックポリマー誘導体(26)とhGHとの結合体(37)のSDS-PAGE分析の結果を示す図である。

【図14】図14は、比較例2のメトキシPEG-hGH結合体(39)の反応液のRP-HPLC分析の結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 15】図 15 は、試験例 2 において、各グループの下垂体摘出ラットの体重測定の結果を示す図である。

【図 16】図 16 は、試験例 2 において、各グループの下垂体摘出ラットについて、初期の体重で補正した頸骨長の増加量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

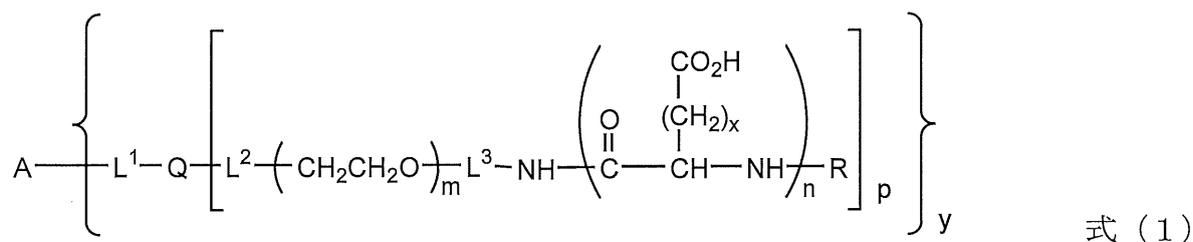
以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、アニオン性ブロックポリマーと、生体関連物質との結合体（以下、本明細書にて「本発明の結合体」ともいう）を提供する。

本発明の結合体は、ポリエチレングリコールとポリアミノ酸とが直接またはリンカーを介して結合されたブロックポリマー誘導体と、生体関連物質とが結合されて形成され、下記の式（1）で示される。

【0020】

【化 3】



【0021】

（式中、A は生体関連物質を示し、L¹、L²、L³ はそれぞれ独立して単結合または 2 価のリンカーを示し、Q は 2 個または 3 個の活性水素を有する化合物の残基を示す。m は 10 ~ 1400 であり、n は 2 ~ 100 である。x は 1 または 2 であり、R は水素原子またはアシル基を示し、p は 1 または 2 であり、y は 1 ~ 40 である。）

【0022】

式（1）中、m はエチレングリコールの重合度を示し、通常 10 ~ 1400 であり、好ましくは 40 ~ 1200 であり、さらに好ましくは 100 ~ 1000 である。

式（1）中、n はアミノ酸の重合度を示し、通常 2 ~ 100 であり、好ましくは 5 ~ 50 であり、さらに好ましくは 5 ~ 30 である。

式（1）中のエチレングリコールの重合度と、アミノ酸の重合度との比（m/n）は、通常 1 ~ 500 であり、好ましくは 2 ~ 240 であり、さらに好ましくは 5 ~ 200 である。

m/n 値が 1 よりも小さい、つまりエチレングリコールの重合度がアミノ酸の重合度よりも小さいと、ポリエチレングリコールによる分子サイズの増大効果が十分に得られない可能性がある。また、m/n 値が 500 よりも大きい、つまりアミノ酸の重合度が小さい場合、アニオン性のポリアミノ酸による負電荷の付与効果が十分に得られない可能性がある。

【0023】

式（1）中、x は 1 または 2 である。x が 1 である場合、式（1）中のポリアミノ酸部を構成するアミノ酸はアスパラギン酸であり、x が 2 である場合、式（1）中のポリアミノ酸部を構成するアミノ酸はグルタミン酸である。

ポリアミノ酸部を構成するアミノ酸としては、グルタミン酸（式（1）中、x = 2）がより好ましい。

また、ポリアミノ酸部を構成するアミノ酸としては、L 体、D 体、DL 体のいずれでもよいが、より好ましくは L 体である。

【0024】

式（1）中、R で示される基は、水素原子またはアシル基であり、好ましくはアシル基

10

20

30

40

50

である。

アシル基としては、炭素数 2 ~ 4 の飽和アシル基が好ましく、具体的な例としてはアセチル基、プロピオニル基などが挙げられ、好ましくはアセチル基である。

【 0 0 2 5 】

本発明の結合体を形成するブロックポリマー誘導体の 1 分子あたりの分子量は、通常 5 , 0 0 0 ~ 1 0 0 , 0 0 0 であり、好ましくは 1 0 , 0 0 0 ~ 8 0 , 0 0 0 であり、更に好ましくは 2 0 , 0 0 0 ~ 6 0 , 0 0 0 である。ここでいう分子量とは、ゲル浸透クロマトグラフィーにより測定され、算出される数平均分子量 (M n) をいう。

【 0 0 2 6 】

本発明において、上記したブロックポリマー誘導体と生体関連物質は、2 個または 3 個の活性水素を有する化合物を介して、または前記化合物と 2 価のリンカーを介して結合される。

10

従って、式 (1) 中、Q は、2 個または 3 個の活性水素を有する化合物の残基を示す。

ここで、「活性水素」とは、有機化合物の分子内水素のうち、反応性の高い水素をいい、たとえば、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基等の水素が挙げられる。なお、本発明においては、第 1 級アミノ基の場合は、活性水素は 1 個と数える。

本発明において、2 個または 3 個の活性水素を有する化合物としては、好ましくはエチレングリコール、グリセリン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられ、より好ましくはエチレングリコールおよびグリセリンが挙げられる。

それゆえ、「2 個の活性水素を有する化合物の残基」としては、エチレングリコールなどの残基が挙げられ、「3 個の活性水素を有する化合物の残基」としては、グリセリン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの残基が挙げられる。

20

【 0 0 2 7 】

本発明の結合体において、式 (1) 中の p が 1 である場合、本発明の結合体におけるブロックポリマー誘導体部は直鎖型であり、p が 2 である場合、本発明の結合体におけるブロックポリマー誘導体部は 2 分岐鎖型である。

【 0 0 2 8 】

本発明の結合体において、生体関連物質に結合するブロックポリマー誘導体の分子数は、式 (1) 中の y で示され、通常 1 ~ 4 0 であり、好ましくは 1 ~ 2 0 であり、さらに好ましくは 1 ~ 1 0 である。生体関連物質に結合するブロックポリマー誘導体の分子数 y を増やすことで得られる効果としては、血中半減期の延長、抗原性の低減などが挙げられる。生体関連物質の種類によっては、ブロックポリマー誘導体の結合量が多くなると、活性が低下する可能性がある。そのような生体関連物質については、ブロックポリマー誘導体分子の結合数 y を 1 とすることが好ましい。

30

なお、酵素などの生体関連物質においては、複数のポリマー誘導体を結合させても活性が低下しないことが知られている。

【 0 0 2 9 】

式 (1) 中、L¹、L²、L³ は、それぞれ独立して、単結合または 2 価のリンカーであり、共有結合を形成し得る結合または基であれば特に制限されないが、好ましくは、単結合、フェニレン基、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第 2 級アミノ基、カルボニル基、ウレア結合、トリアジン基、チオールの付加されたマレイミド基、オキシム結合、前記結合および基からなる群より選択される 1 種以上を含んでいてもよいアルキレン基であり、より好ましくは、単結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ウレタン結合、第 2 級アミノ基、トリアジン基、チオールの付加されたマレイミド基、オキシム結合、前記結合および基からなる群より選択される 1 種以上と 1 個または 2 個のアルキレン基とが結合して形成される基であり、特に好ましい態様は、下記の群 (I) に示されるものである。なお、エステル結合とカーボネート結合は、生体の血中で徐々に分解するため適さない。

40

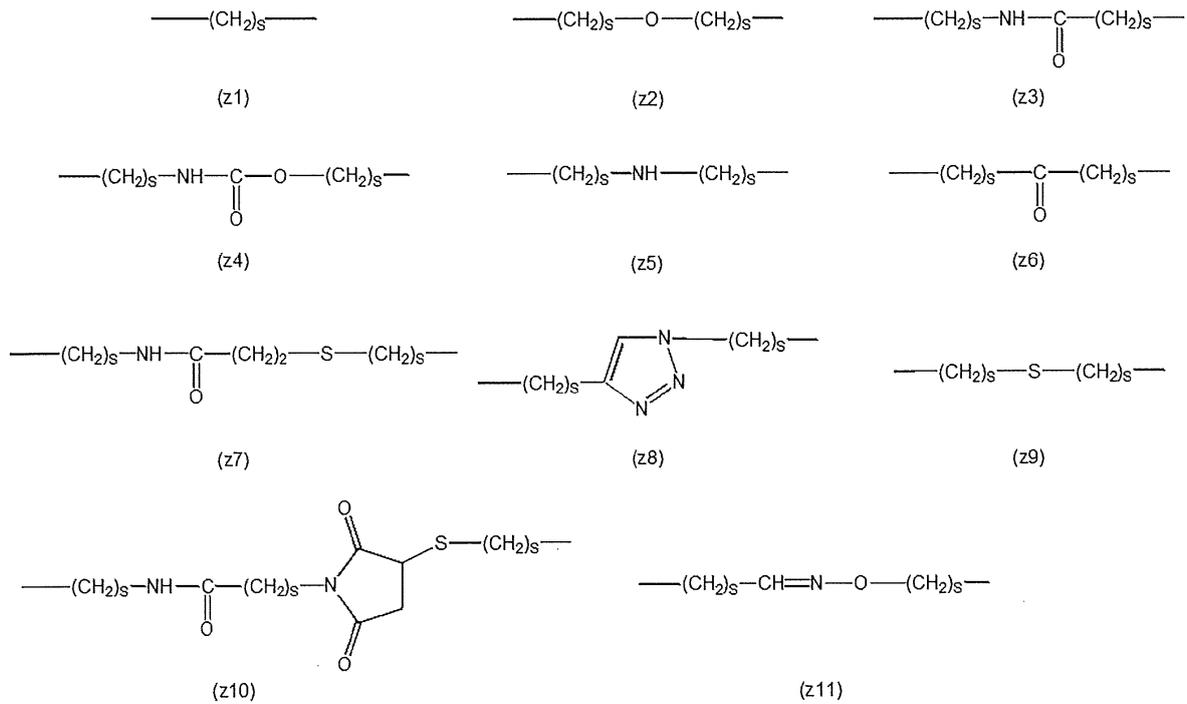
【 0 0 3 0 】

群 (I) :

50

【 0 0 3 1 】

【 化 4 】



10

20

【 0 0 3 2 】

群 (I) のリンカー (z 1) ~ (z 1 1) において、式中の s は 0 ~ 1 0 の整数を示し、好ましくは 0 ~ 6 の整数を示し、更に好ましくは 0 ~ 3 の整数を示す。また、リンカー (z 2) ~ (z 1 1) において、式中の 2 個の s は同一であってもよく、異なってもよい。

【 0 0 3 3 】

式 (1) 中、L¹ で示されるリンカーとしては、上記の群 (I) の (z 3)、(z 4)、(z 5)、(z 6)、(z 7)、(z 8)、(z 1 0)、(z 1 1) が好ましく、(z 3)、(z 4)、(z 5)、(z 6)、(z 1 0)、(z 1 1) がより好ましく、(z 3)、(z 5)、(z 1 0) が特に好ましい。

30

【 0 0 3 4 】

式 (1) 中、L² または L³ で示されるリンカーとしては、上記の群 (I) の (z 1)、(z 2)、(z 3)、(z 4)、(z 5)、(z 6)、(z 9) が好ましく、(z 1)、(z 2)、(z 3)、(z 4)、(z 6) がより好ましい。

【 0 0 3 5 】

式 (1) 中、A で示される生体関連物質は、ヒトまたは他の動物の疾患の診断、治療または予防に関わる物質であれば、特に制限されない。具体的にはタンパク質、ペプチド、核酸、細胞、ウイルスなどが挙げられ、タンパク質、ペプチドおよび核酸が好ましく用いられる。

40

【 0 0 3 6 】

タンパク質またはペプチドとしては、サイトカイン、成長因子、血液凝固因子、ホルモン、抗体、抗体フラグメント、酵素などが挙げられる。

より具体的には、サイトカインとしては、免疫を調節するインターフェロンタイプ I、タイプ II、タイプ III、インターロイキン、リンフォカイン；造血因子であるエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F) ；細胞増殖因子である上皮成長因子 (E G F)、線維芽細胞成長因子 (F G F)、血小板由来成長因子 (P D G F)、肝細胞成長因子 (H G F)、トランスフォーミング成長因子 (T G F) ；細胞傷害因子である腫瘍壊死因子 (T N F -)、リンフォトキシン (T N F -) ；アディポカイン；神経栄養

50

因子である神経成長因子 (N G F) ; それらの受容体アンタゴニストなどが挙げられる。

成長因子としては、インスリン様成長因子 (I G F) 、トランスフォーミング成長因子 (T G F) 、トロンボポエチン、骨形成タンパク質 (B M P) などが挙げられる。

血液凝固因子としては、フィブリノーゲン、フィブリン、血液凝固第 V 因子、第 V I I 因子、第 V I I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 X I I 因子などが挙げられる。

ホルモンとしては、カルシトニン、インスリン、そのアナログ、グルカゴン様ペプチド (G L P - 1) 、エクセナチド (G L P - 1 受容体アゴニスト) 、ソマトスタチン、ヒト成長ホルモンなどが挙げられる。

抗体としては、完全長抗体、また抗体フラグメントとして、F a b や s v F V 、ナノボディなどが挙げられる。

10

酵素としては、アスパラギナーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、尿酸オキシダーゼなどが挙げられる。

これらタンパク質は、血中での安定性が低く、本発明の結合体として修飾することにより、血中半減期の延長が期待される。

本発明において、タンパク質としては、好ましくはインターフェロン、インターロイキン、エリスロポエチン、G C S F 、血液凝固第 V I I I 因子、血液凝固第 I X 因子、ヒト成長ホルモン、抗体フラグメントが用いられ、より好ましくは、ヒト成長ホルモン、インターフェロン、G C S F 、エリスロポエチン、抗体フラグメント (特に F a b) が用いられ、さらに好ましくは、ヒト成長ホルモン、G C S F が用いられる。

本発明において、ペプチドとしては、好ましくはインスリン、ビバリルジン、テリパラチド、エクセナチド、エンフビルチド、デガレリクス、ミファミルチド、ネシリチド、ゴセレリン、グラチラマー、オクトレオチド、ランレオチド、イカチバント、ジコチニド、プラムリンチド、ロミプロスチム、カルシトニン、オキシトシン、リユープロレリン、グルカゴンが用いられ、より好ましくは、インスリン、エクセナチド、カルシトニンが用いられる。

20

【 0 0 3 7 】

核酸としては、DNA、RNA、RNAのキメラ核酸、DNA/RNAのハイブリッド、アプタマー、s i R N A 、m i c r o R N A 、アンチセンスRNA等を挙げることができるがこれらに限定されない。

また、核酸は1~3本鎖のいずれも用いることができるが、好ましくは1本鎖又は2本鎖である。

30

さらに、本発明において用いられる核酸は、他のタイプのヌクレオチド (たとえば、プリンまたはピリミジン塩基と、リボース、デオキシリボース以外の糖とのN-グリコシド等)、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するオリゴマー (たとえば、市販のペプチド核酸 (P N A) 等) などであってもよい。さらにまた、該核酸は、たとえば、公知の修飾の付加された核酸、当該分野で知られた標識のされた核酸、キャップの付加された核酸、メチル化された核酸、1個以上の天然ヌクレオチドを類縁物で置換した核酸等であってもよい。

より好適な核酸としては、血中で作用するアプタマーが挙げられる。

【 0 0 3 8 】

本発明の結合体の好ましい態様として、式 (1) 中、yで示される生体関連物質Aに対するブロックポリマー誘導体の結合数が1である結合体、すなわち、生体関連物質Aに、1分子のブロックポリマー誘導体が結合してなる結合体が挙げられる。

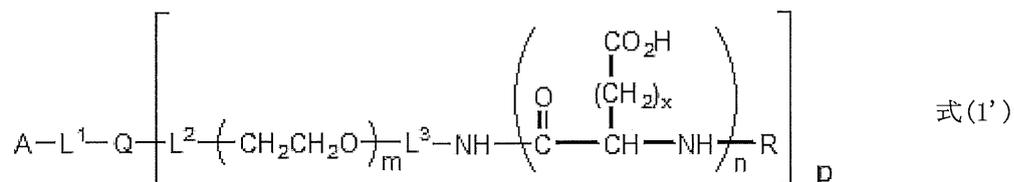
40

かかる結合体は、下記式 (1 ') で表され、上述したように、ブロックポリマー誘導体分子の結合数の増大により、活性が低下する可能性のある生体関連物質の修飾体として、好ましい。

【 0 0 3 9 】

50

【化5】



【0040】

(式中、Aは生体関連物質を示し、L¹、L²、L³はそれぞれ独立して単結合または2価のリンカーを示し、Qは2個または3個の活性水素を有する化合物の残基を示す。mは10～1400であり、nは2～100である。xは1または2であり、Rは水素原子またはアシル基を示し、pは1または2である。)

10

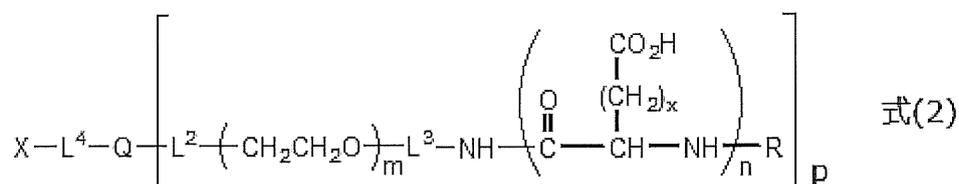
【0041】

本発明はまた、上記した本発明の結合体を製造するための中間体(以下、本明細書にて「本発明の中間体」とも称する)を提供する。

本発明の中間体は、下記式(2)で示されるブロックポリマー誘導体である。

【0042】

【化6】



20

【0043】

(式中、Xは生体関連物質と化学反応可能な官能基を示し、L²、L³、L⁴はそれぞれ独立して単結合または2価のリンカーを示し、Qは2個または3個の活性水素を有する化合物の残基を示す。mは10～1400であり、nは2～100である。xは1または2であり、Rは水素原子またはアシル基を示し、pは1または2である。)

30

【0044】

本発明の中間体において、式(2)中、mで示されるエチレングリコールの重合度、nで示されるアミノ酸の重合度、ブロックポリマー誘導体の総分子量、L²またはL³で示される2価のリンカー、Qで示される残基、x、Rで示される基、およびpについては、本発明の結合体において上記した通りである。

【0045】

式(2)中、L⁴は、単結合または2価のリンカーであり、本発明の結合体におけるL²、L³と同様である。

【0046】

式(2)中、Xで示される官能基は、化学修飾の対象となる生体関連物質、たとえば生理活性を有するタンパク質、ペプチド、抗体、核酸などに存在する官能基、たとえばアミノ基、チオール基、アルデヒド基、カルボキシル基、不飽和結合またはアジド基などの官能基と反応して、共有結合を形成し得る官能基であれば、特に制限されない。

40

たとえば、「Harris, J. M. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry; Plenum Press: New York, 1992」、「Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2008」および「PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications; Veronese, F. M., Ed.; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2009」などに記載されている官能基が挙げられる。

【0047】

50

式(2)中、Xで示される「生体関連物質と化学反応可能な官能基」として、具体的には、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、カルボキシル基、チオール基、マレイミド基、置換マレイミド基、ヒドラジド基、ピリジルジチオ基、置換スルホ基、アミノ基、オキシアミノ基、ヨードアセトアミド基、アルキルカルボニル基、アルケニル基、アルキニル基、アジド基、アクリロイル基、スルホニルオキシ基、 α -ハロアセチル基、アリル基、ビニル基等が挙げられる。

【0048】

上記において、活性エステル基とは、脱離能の高いアルコキシ基を有するエステル基である。脱離能の高いアルコキシ基としては、ニトロフェノール、N-ヒドロキシスクシンイミド、ペンタフルオロフェノールなどから誘導されるアルコキシ基が挙げられる。活性エステル基としては、N-ヒドロキシスクシンイミドから誘導されるアルコキシ基を有するエステル基が好ましい。

10

【0049】

上記において、活性カーボネート基とは、脱離能の高いアルコキシ基を有するカーボネート基である。脱離能の高いアルコキシ基としては、ニトロフェノール、N-ヒドロキシスクシンイミド、ペンタフルオロフェノール等から誘導されるアルコキシ基が挙げられる。活性カーボネート基としては、ニトロフェノールまたはN-ヒドロキシスクシンイミドから誘導されるアルコキシ基を有するカーボネート基が好ましい。

【0050】

上記において、置換マレイミド基とは、マレイミド環の二重結合の一端の炭素原子に結合した1個の水素原子が炭化水素基で置換されたマレイミド基である。炭化水素基としては、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第3級ブチル基などが挙げられ、メチル基、エチル基が好ましい。

20

【0051】

上記において、置換スルホ基とは、スルホ基の水酸基が、フッ素原子を含んでいてもよい炭化水素基で置換された基である。フッ素原子を含んでいてもよい炭化水素基としては、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第3級ブチル基、ヘキシル基、ノニル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、4-メチルフェニル基、トリフルオロメチル基、2,2,2-トリフルオロエチル基、4-(トリフルオロメトキシ)フェニル基等が挙げられ、メチル基、ビニル基、4-メチルフェニル基、2,2,2-トリフルオロエチル基が好ましい。

30

【0052】

Xで示される官能基としては、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、エポキシ基、カルボキシル基、チオール基、マレイミド基、ヒドラジド基、ピリジルジチオ基、ビニルスルホ基(ビニル基で置換されたスルホ基)、アミノ基、オキシアミノ基、アルキニル基、アジド基、アクリロイル基、スルホニルオキシ基、 α -ハロアセチル基、アリル基およびビニル基が好ましく、活性エステル基、活性カーボネート基、アルデヒド基、マレイミド基およびアミノ基がより好ましく、アルデヒド基およびアミノ基が特に好ましい。

40

【0053】

本発明の好適な実施形態において、式(2)中、Xで示される官能基は、下記の群(I I)、群(I I I)、群(I V)、群(V)、群(V I)および群(V I I)に分類することができる。

【0054】

群(I I)：生体関連物質が有するアミノ基と反応可能な官能基

下記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(j)、または(k)で示される基が挙げられる。

【0055】

群(I I I)：生体関連物質が有するチオール基と反応可能な官能基

下記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k)、または(l)で示される基

50

が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

群 (I V) : 生体関連物質が有するアルデヒド基と反応可能な官能基
下記の (h)、(m)、(n)、または (p) で示される基が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

群 (V) : 生体関連物質が有するカルボキシル基と反応可能な官能基
下記の (h)、(m)、(n)、または (p) で示される基が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

群 (V I) : 生体関連物質が有する不飽和結合と反応可能な官能基
下記の (h)、(m)、または (o) で示される基が挙げられる。

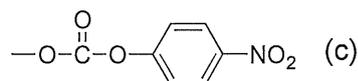
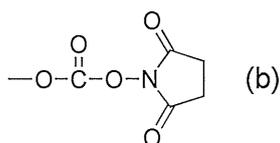
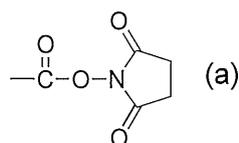
10

【 0 0 5 9 】

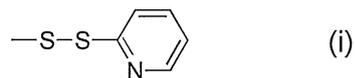
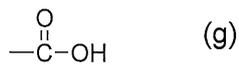
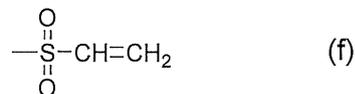
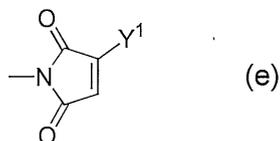
群 (V I I) : 生体関連物質が有するアジド基と反応可能な官能基
下記の (l) で示される基が挙げられる。

【 0 0 6 0 】

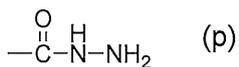
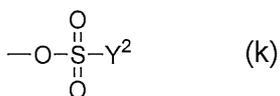
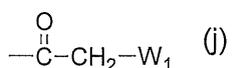
【 化 7 】



20



30



40

【 0 0 6 1 】

官能基 (j) において、式中の W_1 は、塩素原子 (Cl)、臭素原子 (Br)、ヨウ素原子 (I) などのハロゲン原子を示し、好ましくは臭素原子およびヨウ素原子であり、より好ましくはヨウ素原子である。

【 0 0 6 2 】

また、官能基 (e) 及び官能基 (l) において、式中の Y^1 、 Y^3 は、それぞれ独立して、水素原子または炭素数 1 ~ 5 の炭化水素基を示し、好ましくは炭素数 1 ~ 5 の炭化水素基である。

炭素数 1 ~ 5 の炭化水素基としては、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、

50

イソプロピル基、ブチル基、第3級ブチル基などが挙げられ、好ましくはメチル基およびエチル基である。

【0063】

また、官能基(k)において、式中の Y^2 は、フッ素原子を含んでいてもよい炭素数が1～10の炭化水素基を示し、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第3級ブチル基、ヘキシル基、ノニル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、4-メチルフェニル基、トリフルオロメチル基、2,2,2-トリフルオロエチル基、4-(トリフルオロメトキシ)フェニル基等が挙げられ、好ましくはメチル基、ビニル基、4-メチルフェニル基および2,2,2-トリフルオロエチル基である。

【0064】

式(2)中、Xで示される官能基として、好ましくは(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(m)、(n)および(o)であり、より好ましくは(d)、(e)および(m)であり、特に好ましくは(d)および(m)である。

【0065】

上記した本発明の中間体であるブロックポリマー誘導体は、親水性のポリエチレングリコールと親水性のポリアミノ酸とが、リンカーを介して結合した構造を有する。そのため、本発明の中間体は、通常、ミセルを形成しない。

【0066】

上記した本発明の中間体は、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸等、上記した生体関連物質の修飾に好適に用いられる。

従って、本発明は、生体関連物質の修飾方法(以下、本明細書にて「本発明の修飾方法」ともいう)をも提供する。

本発明の修飾方法において、本発明の中間体は、式(2)中、Xで示される官能基を介して生体関連物質と結合される。それゆえ、生体関連物質に結合したブロックポリマー誘導体のポリアミノ酸部分の側鎖に存在するカルボキシル基は遊離の状態で存在するため、ポリアミノ酸部分による負電荷を生体関連物質に十分に付与することができる。

【0067】

本発明の修飾方法において、本発明の中間体を生体関連物質と反応させるには、 $pH = 5 \sim 5.5$ 程度の緩衝液(たとえば酢酸ナトリウム緩衝液)または $pH = 8$ 程度の緩衝液(たとえばリン酸ナトリウム緩衝液)に、生体関連物質および本発明の中間体を20～25にて溶解する等して行うことができる。

生体関連物質の有する官能基と、本発明の中間体におけるXで示される官能基との反応は、後述する通り、一般的な反応条件および方法にて、たとえば縮合剤や還元剤を加えて反応させる等により、行うことができる。

【0068】

本発明の結合体は、例えば、式(1)中、Qがエチレングリコール残基であり、 L^2 が単結合である場合、次の工程図(I)に示すルートにより製造することができる。

【0069】

工程図(I)

【0070】

10

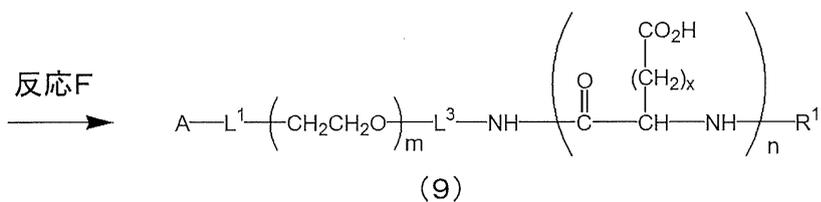
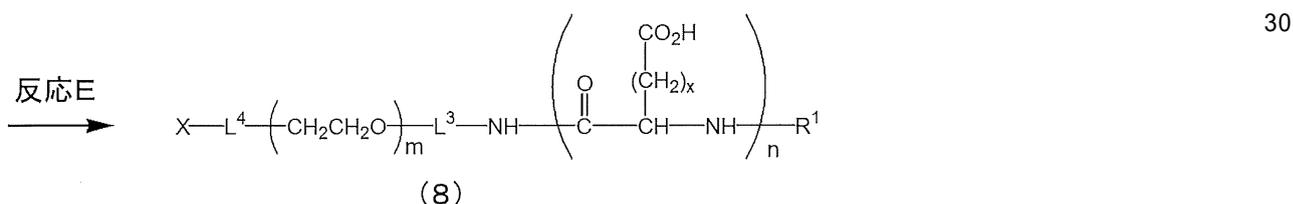
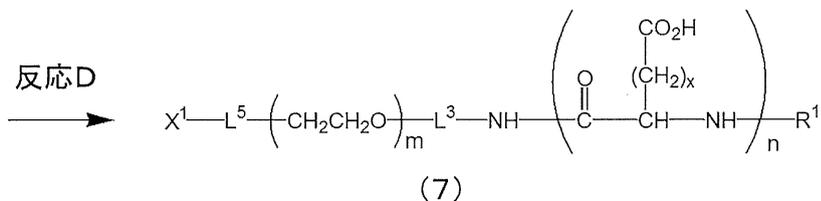
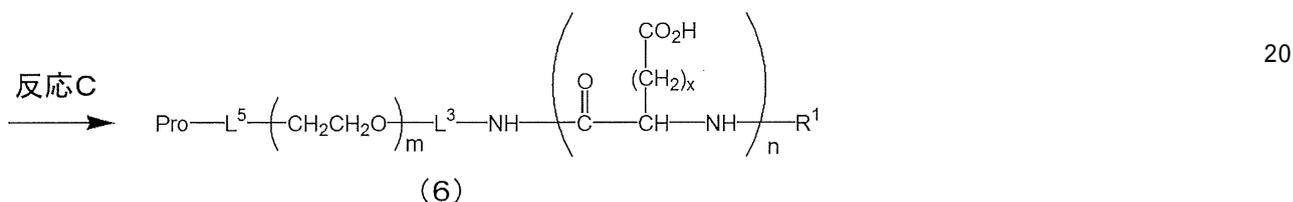
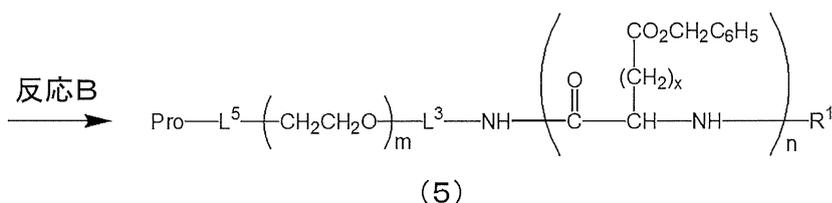
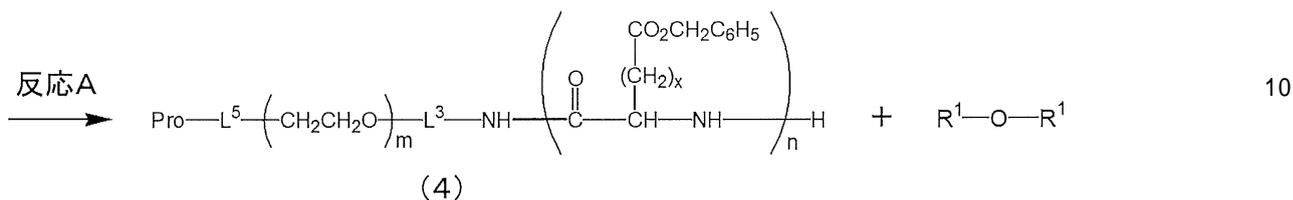
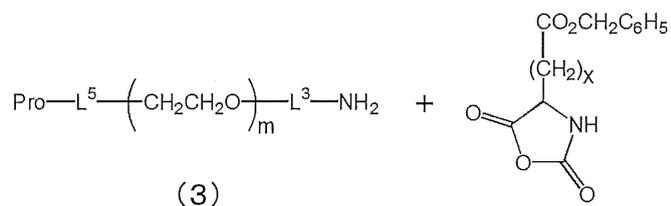
20

30

40

50

【化 8】



【0071】

(工程図(I)中、X¹は官能基を示し、ProはX¹の保護基を示し、L⁵は2価のリンカーを示し、R¹はアシル基を示す。A、X、L¹、L³、L⁴、m、n、xについては、上記と同義である)

【0072】

工程図(I)中、X¹で示される官能基は、基本的には式(2)中、Xで示される官能基と同様であるが、アルデヒド基、マレイミド基、水酸基、カルボキシル基、チオール基、アミノ基、オキシアミノ基、ヒドラジド基などであり、好ましくはアルデヒド基、マレイミド基、水酸基、アミノ基、オキシアミノ基であり、特に好ましくはアルデヒド基、マ

レイミド基およびアミノ基である。

【0073】

工程図(I)中、Proは、官能基X¹の保護基である。

ここで「保護基」とは、ある反応条件下で分子中の特定の化学反応可能な官能基の反応を防止または阻止する基である。保護基は、保護される化学反応可能な官能基の種類、使用される条件および分子中の他の官能基もしくは保護基の存在により変化する。保護基の具体的な例は多くの一般的な成書に見出すことができるが、例えば「Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Protective Groups in Organic Synthesis, 4th ed.; Wiley - Interscience: New York, 2007」に記載されている。

また、保護基で保護された官能基は、それぞれの保護基に適した反応条件にて脱保護、すなわち化学反応させることで、元の官能基を再生させることができる。保護基の代表的な脱保護条件は前述の文献に記載されている。

本工程においては、アルデヒド基の保護基、マレイミド基の保護基、水酸基の保護基、カルボキシル基の保護基、チオール基の保護基、アミノ基の保護基、オキシアミノ基の保護基、ヒドラジド基の保護基などであり、好ましくはアルデヒド基の保護基、マレイミド基の保護基、水酸基の保護基、アミノ基の保護基、オキシアミノ基の保護基であり、特に好ましくはアルデヒド基の保護基、マレイミド基の保護基およびアミノ基の保護基である。

【0074】

工程図(I)中、L⁵で示されるリンカーは、式(2)中、L²、L³、L⁴で示される2価のリンカーと同様である。

【0075】

工程図(I)中、R¹で示されるアシル基は、好ましくはアセチル基、プロピオニル基であり、より好ましくはアセチル基である。

【0076】

工程図(I)における反応Aは、片末端に保護基を有するポリエチレングリコールのアミン誘導体(3)を開始剤とし、-アミノ酸N-カルボキシ無水物をモノマーとした開環重合反応である。この反応により、片末端に保護基を有するポリエチレングリコール-ポリアミノ酸ブロックポリマー誘導体(4)を得ることができる。

【0077】

工程図(I)における反応Bは、反応Aにて得られたブロックポリマー誘導体(4)のポリアミノ酸の末端アミノ基と酸無水物との反応である。この反応によりポリアミノ酸の末端アミノ基をアシル基で封鎖したブロックポリマー誘導体(5)を得ることができる。

【0078】

工程図(I)における反応Cは、反応Bにて得られたブロックポリマー誘導体(5)のポリアミノ酸の側鎖カルボキシル基の保護基であるベンジル基を脱保護する反応である。この反応によりポリアミノ酸の側鎖カルボキシル基がフリーであるブロックポリマー誘導体(6)を得ることができる。

【0079】

工程図(I)における反応Dは、反応Cにて得られたブロックポリマー誘導体(6)のポリエチレングリコール末端の保護基を脱保護する反応である。この反応により末端に官能基を有するブロックポリマー誘導体(7)を得ることができる。また、反応Dは前記の反応Cと同時に実施することもできる。

【0080】

工程図(I)における反応Eは、反応Dにて得られたブロックポリマー誘導体(7)の末端の官能基を、必要に応じて異なる官能基に変換し、ブロックポリマー誘導体(8)とする反応である。本工程は、必ずしも実施する必要はない。

【0081】

工程図(I)における反応Fは、反応Dまたは反応Eにて得られたブロックポリマー誘導体(7)または(8)を生体関連物質に結合させ、ブロックポリマー結合体(9)を得る反応である。反応Fにおいてブロックポリマー誘導体を生体関連物質に結合させる方法

10

20

30

40

50

としては、特に制限は無いが、例えば「Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 3rd ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2013」や「Mark, Sonny S. Bioconjugate protocols, strategies and methods; 2011」に記載の方法を用いることができる。

【0082】

また、本発明の結合体は、例えば、式(1)中、Qがグリセリン残基であり、L²が単結合である場合、次の工程図(II)に示すルートにより製造することができる。

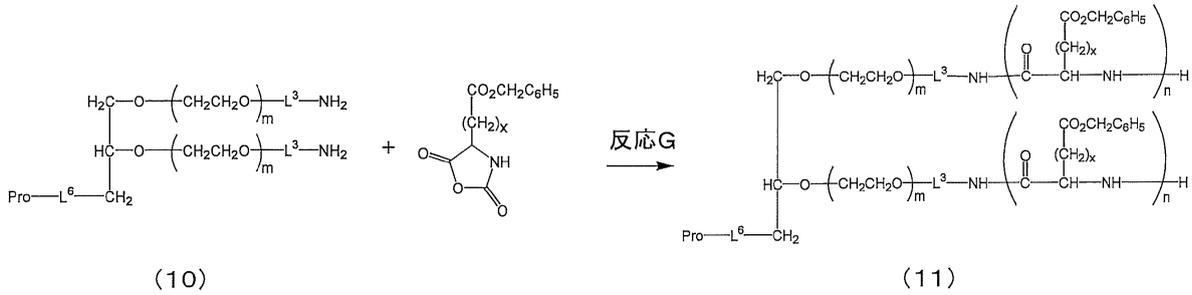
【0083】

工程図(II)

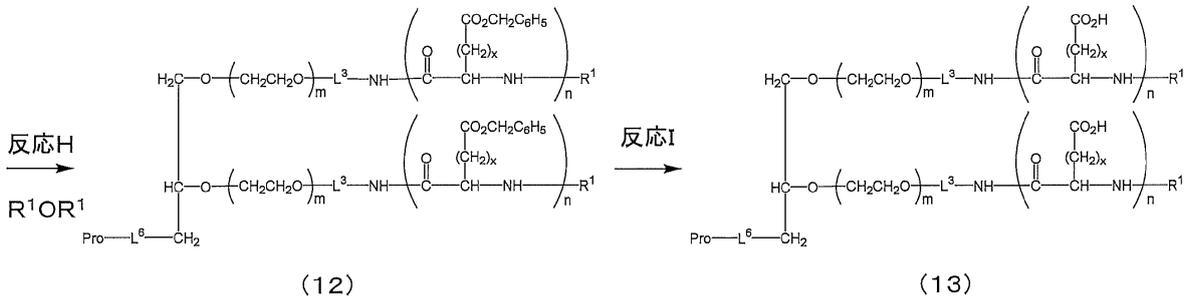
【0084】

【化9】

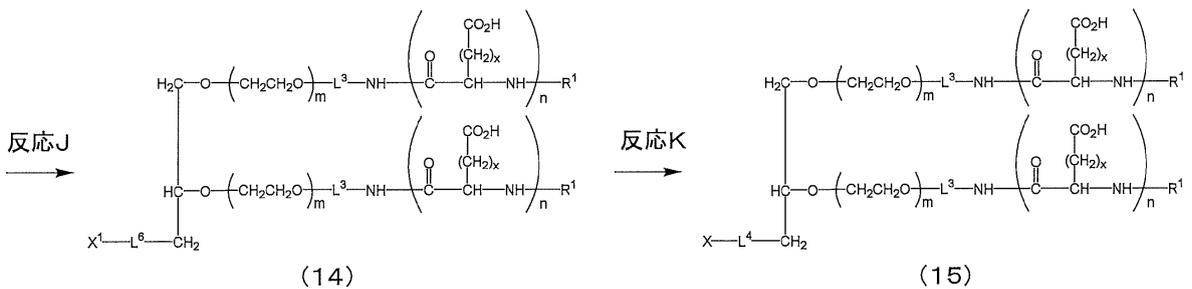
10



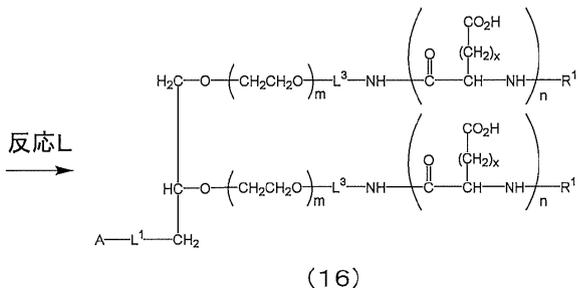
20



30



40



【0085】

(工程図(II)中、L⁶は2価のリンカーを示し、X¹、Pro、R¹、A、X、L¹、L³、L⁴、m、n、xは上記と同義である)

【0086】

工程図(II)中、L⁶で示される2価のリンカーは、式(2)および工程図(I)中、L²、L³、L⁴、L⁵で示される2価のリンカーと同様である。

50

【0087】

工程図(II)中における反応Gは、グリセリン骨格の3位に保護基、1位と2位にポリエチレングリコール鎖を有する2分岐鎖型のポリエチレングリコールアミン誘導体(10)を開始剤とし、 α -アミノ酸N-カルボキシ無水物をモノマーとした開環重合反応である。この反応により保護基を有する2分岐鎖型のポリエチレングリコール-ポリアミノ酸ブロックポリマー誘導体(11)を得ることができる。

【0088】

工程図(II)における反応Hは、反応Gにて得られたブロックポリマー誘導体(11)のポリアミノ酸の末端アミノ基と酸無水物との反応である。この反応によりポリアミノ酸の末端アミノ基をアシル基で封鎖したブロックポリマー誘導体(12)を得ることができる。

10

【0089】

工程図(II)における反応Iは、反応Hにて得られたブロックポリマー誘導体(12)のポリアミノ酸の側鎖カルボキシル基の保護基であるベンジル基を脱保護する反応である。この反応によりポリアミノ酸の側鎖カルボキシル基がフリーであるブロックポリマー誘導体(13)を得ることができる。

【0090】

工程図(II)における反応Jは、反応Iにて得られたブロックポリマー誘導体(13)の保護基を脱保護する反応である。この反応により官能基を有するブロックポリマー誘導体(14)を得ることができる。また、反応Jは前記の反応Iと同時に実施することもできる。

20

【0091】

工程図(II)における反応Kは、反応Jにて得られたブロックポリマー誘導体(14)の末端の官能基を、必要に応じて異なる官能基に変換し、ブロックポリマー誘導体(15)とする反応である。本工程は必ずしも実施する必要はない。

【0092】

工程図(II)の反応Lは、反応Jまたは反応Kにて得られたブロックポリマー誘導体(14)または(15)を生体関連物質に結合させ、ブロックポリマー結合体(16)を得る反応である。反応Lにおいてブロックポリマー誘導体を生体関連物質に結合させる方法としては、特に制限は無いが、例えば「Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 3rd ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2013」や「Mark, Sonny S. Bioconjugate protocols, strategies and methods; 2011」に記載の方法を用いることができる。

30

【0093】

ブロックポリマー誘導体は、一般的な方法として公知の精製方法、たとえば晶析、透析、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)などにより精製することができる。

また、得られたブロックポリマー誘導体は、一般的な分析方法、たとえばGPC、IEC、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計(MALDI-TOF-MS)を用いた測定、逆相クロマトグラフィー(RPLC)、核磁気共鳴(NMR)などの分析方法により評価することができる。

40

【0094】

本発明の結合体は、一般的な方法として公知の精製方法、たとえば透析、GPC、IECなどにより精製することができる。

また、得られた本発明の結合体は、一般的な分析方法、たとえばMALDI-TOF-MS、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、RPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、円偏光二色性測定などの分析方法により評価することができる。

【0095】

ブロックポリマー誘導体が結合した生体関連物質の血中半減期を評価するための試験方法については、特に制限は無いが、例えば、投与した動物から定期的に採血し、投与した生体関連物質の血中の濃度を適切な分析機器を用いて測定することにより評価できる。具

50

体的には E L I S A (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 等を用いてモニタリングす

る方法等が挙げられる。

【 0 0 9 6 】

ブロックポリマー誘導体が結合した生体関連物質の生理活性を評価する方法については、特に制限は無いが、例えば生体関連物質がインスリンであれば血中糖濃度、カルシトニンであれば血中カルシウム濃度など、投与した動物から定期的に採血し、血中の物質を適切な分析機器を用いて測定することにより評価できる。具体的には、インスリンの生理活性は、グルコース測定キットを使用して、投与後のグルコース濃度の低下をモニタリングし、カルシトニンの生理活性は、カルシウム測定キットを使用して、投与後のカルシウム濃度の低下をモニタリングすることにより評価することができる。また、成長ホルモンなどの場合は、脳下垂体を切除した動物に投与し、その体重増加や骨の伸長などを評価することにより生理活性を評価することができる。

10

【実施例】

【 0 0 9 7 】

以下、本発明について、実施例によりさらに詳細に説明する。

【 0 0 9 8 】

下記実施例にて、 $^1\text{H-NMR}$ は、日本電子データム株式会社製核磁気共鳴装置「JNM-EC400」または「JNM-ECA600」を用いて取得した。測定には 5 mm チューブを用い、重水素化溶媒として、重水 (D_2O) または、内部標準物質としてテトラメチルシラン (TMS) を含有する重水素化クロロホルム (CDCl_3) およびジメチルスルホキシド d_6 ($d_6\text{-DMSO}$) を用いた。

20

得られたブロックポリマー誘導体および本発明の結合体の分子量は、MALDI-TOF-MS (ブルカー社製「Autoflex I II」) を用いて測定した。前記 MS のマトリックスとしては、フェルラ酸およびシナピン酸を使用し、必要に応じて添加剤としてジイソプロピルエチレンアミンを添加した。

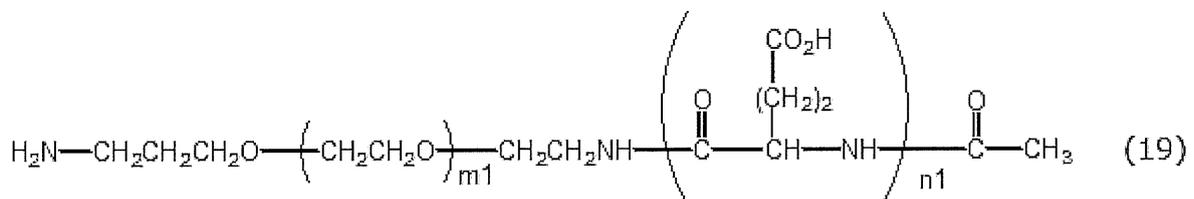
【 0 0 9 9 】

[実施例 1] ブロックポリマー誘導体 (1 9) ; $\text{NH}_2\text{-050GL10-AC}$ ($\text{NH}_2\text{-PEG-poly}(\text{-glutamate})\text{-acetyl}$, $m_1 = \text{ca. } 105$, $n_1 = \text{ca. } 10$) の合成

【 0 1 0 0 】

30

【化 1 0 】



【 0 1 0 1 】

40

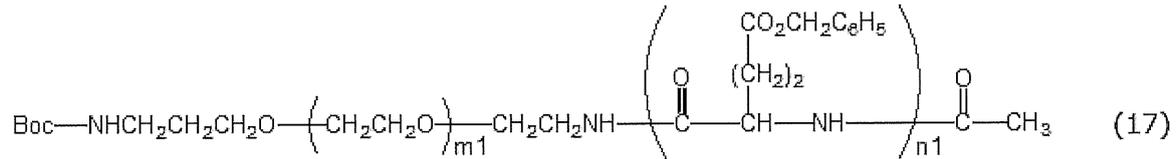
(1) ブロックポリマー誘導体 (1 7) ; BO-050BG10-AC ($\text{Boc-NH-PEG-poly}(\text{-benzyl}$

$\text{glutamate})\text{-acetyl}$, $m_1 = \text{ca. } 105$, $n_1 = \text{ca. } 10$) の合成

【 0 1 0 2 】

50

【化 1 1】



【0 1 0 3】

200mLの3つ口フラスコに、 γ -2-アミノエチル- γ -3-(N-t-ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ-ポリオキシエチレン(日油株式会社製「SUNBRIGHT BO-050EA」、数平均

10

分子量=4,635 Da)5gを入れ、脱水ジメチルホルムアミド(DMF)75gに溶解させた。これに γ -ベンジル-N-カルボキシ-L-グルタミン酸無水物(BLG-NCA)2.64g(10当量)を加えて、窒素雰囲気下40℃で6時間重合反応を行なった。その後、無水酢酸950 μ L(10当量)を添加し、6時間攪拌し、アセチルキャッピングにより重合を停止させた。停止反応終了後

、反応溶液を室温まで冷却し、酢酸エチルとヘキサンの混合溶液に加え、結晶を析出させた。結晶を吸引る過によってろ別した後、酢酸エチルとヘキサンの混合溶液で数回結晶の洗浄を行い、真空にて乾燥を行なうことで、上記ブロックポリマー誘導体(17)BO-050BG10-ACを得た(収量5.5g)。

20

$^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO) (ppm): 1.37(9H, s, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$)、1.59(2H, m, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)

、1.70-2.60(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph})\text{NH}]_m$)、2.95(2H, t, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、3.10-3.30(br, $\text{PEG-OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$)、3.40-3.80(br, PEG)、3.80-4.00(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph})\text{NH}]_m$)、4.90-5.20(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph})\text{NH}]_m$)、7.15-7.50(br, Ph)、7.90-8.45(br, NH)

ポリグルタミン酸の平均重合度:10 (NMRのピーク積分値より下式を用いて算出)

平均重合度 = Ph基(7.15-7.50ppm)のピーク積分値 / 5

ポリエチレングリコール鎖(3.4-3.8ppm)のピーク積分値を分子量=4,635 Daの理論プロトン数である421に設定した際の値

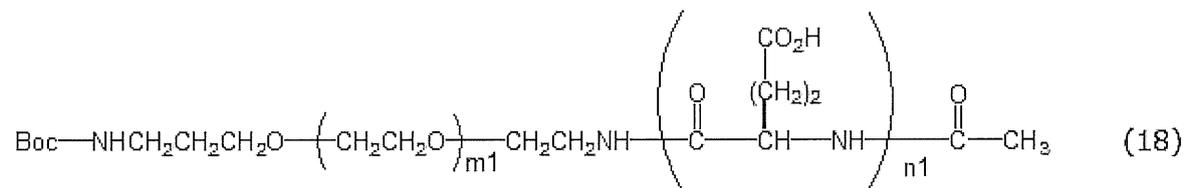
30

【0 1 0 4】

(2) ブロックポリマー誘導体(18); BO-050GL10-AC (Boc-NH-PEG-poly(γ -glutamate)-acetyl, $m1 = \text{ca. } 105$, $n1 = \text{ca. } 10$)の合成

【0 1 0 5】

【化 1 2】



40

【0 1 0 6】

200mLの3つ口フラスコに、(1)で得られたブロックポリマー誘導体(17)(BO-050BG10-AC)5gを入れ、水40gに分散させた。これに2.5mol/L水酸化ナトリウム水溶液10gを加え、室温で48時間加水分解反応を行なった。その後、反応溶液を24時間室温にて透析し(透析膜: Spectra/Por(登録商標)7、分画分子量(MWCO)=1,000、外液: 水)、内液を凍結乾燥することによって上記ブロックポリマー誘導体(18)(BO-050GL10-AC)

を得た(収量3.3g)。

50

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm) : 1.45 (9H, s, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$)、1.77(2H, m, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、1.85-2.6(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、3.16(2H, t, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、3.50-3.80 (br, PEG)、4.10-4.45(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)

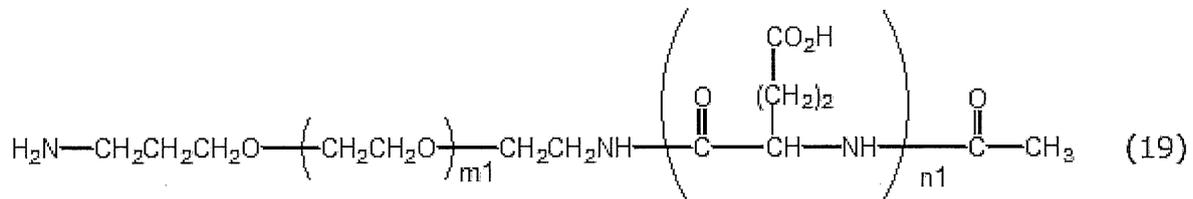
TOF-MS : 分子量6,292 (図 1)

【 0 1 0 7 】

(3) ブロックポリマー誘導体 (1 9) ; $\text{NH}_2\text{-050GL10-AC}$ ($\text{NH}_2\text{-PEG-poly}(\text{-glutamate})\text{-acetyl}$, $m_1 = \text{ca. } 105$, $n_1 = \text{ca. } 10$)の合成

【 0 1 0 8 】

【 化 1 3 】



10

【 0 1 0 9 】

200mLの3つ口フラスコに、(2) で得られたブロックポリマー誘導体 (1 8) (BO-050GL10-AC) 1gを入れ、54容量%ジクロロメタン/45容量%トリフルオロ酢酸/1容量%水の混合

20

溶液 1 0 mLに溶解し、室温で1時間脱保護反応を行なった。濃縮にて溶剤とトリフルオロ酢酸を除去後、濃縮物を水に溶解し、10mM炭酸アンモニウム水溶液にて中和した。その後、24時間室温にて透析し(透析膜 : Spectra /Por (登録商標) 7、MWCO = 1,000、外液 :

水)、内液を凍結乾燥することによって、上記ブロックポリマー誘導体 (1 9) ($\text{NH}_2\text{-050GL10-AC}$) を得た (収量0.7g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm) : 1.77(2H, m, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、1.85-2.6(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、3.16(2H, t, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、3.50-3.80 (br, PEG)、4.10-4.45(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)

30

アミノ基含量 : 0.124×10^{-3} mmol/mg (TNBS (2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸)

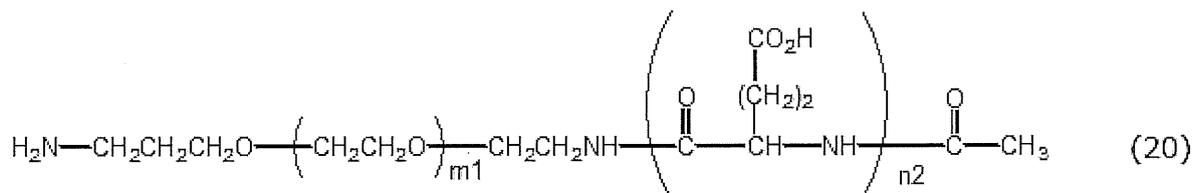
アッセイ)

【 0 1 1 0 】

[実施例 2] ブロックポリマー誘導体 (2 0) ; $\text{NH}_2\text{-050GL50-AC}$ ($\text{NH}_2\text{-PEG-poly}(\text{-glutamate})\text{-acetyl}$, $m_1 = \text{ca. } 105$, $n_2 = \text{ca. } 46$)の合成

【 0 1 1 1 】

【 化 1 4 】



40

【 0 1 1 2 】

原料であるBLG-NCA添加量を50当量とし、実施例 1 と同様に、PEG鎖の末端にポリグルタミン酸を導入し、脱保護を行うことで上記ブロックポリマー誘導体 (2 0) ($\text{NH}_2\text{-050GL50-AC}$) を得た (収量0.9g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm) : 1.77(2H, m, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、1.85-2.6(br, $[\text{CO-}$

50

$H(CH_2CH_2COOH)NH]_m)$ 、3.16(2H, t, $-NHCH_2CH_2CH_2-PEG$)、3.50-3.80 (br, PEG)、4.10-4.45(br, $[CO-CH(CH_2CH_2COOH)NH]_m)$

ポリグルタミン酸の平均重合度:46 (対PEG鎖基準(421H))

TOF-MS : 分子量12,731

アミノ基含量 : 0.0532×10^{-3} mmol/mg (TNBSアッセイ)

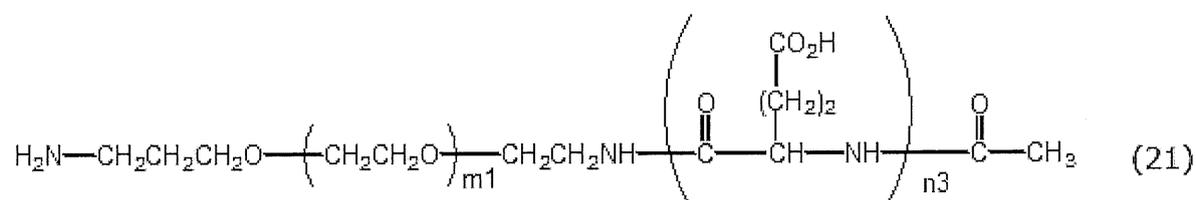
【0113】

[実施例3] ブロックポリマー誘導体(21); $NH_2-050GL100-AC$ ($NH_2-PEG-poly(-glutamate)-acetyl$, $m1 = ca. 105$, $n3 = ca. 92$)の合成

【0114】

【化15】

10



【0115】

原料であるBLG-NCA添加量を100当量とし、実施例1と同様に、PEG鎖の末端にポリグル

20

タミン酸を導入し、脱保護を行うことで上記ブロックポリマー誘導体(21) ($NH_2-050GL100-AC$)を得た(収量0.7g)。

$^1H-NMR(D_2O)$ (ppm) : 1.77(2H, m, $NH-CH_2CH_2CH_2-PEG$)、1.85-2.6(br, $[CO-CH(CH_2CH_2COOH)NH]_m)$ 、3.16(2H, t, $-NHCH_2CH_2CH_2-PEG$)、3.50-3.80 (br, PEG)、4.10-4.45(br, $[CO-CH(CH_2CH_2COOH)NH]_m)$

ポリグルタミン酸の平均重合度 : 92 (対PEG鎖基準(421H))

TOF-MS : 分子量17,569

アミノ基含量 : 0.0402×10^{-3} mmol/mg (TNBSアッセイ)

【0116】

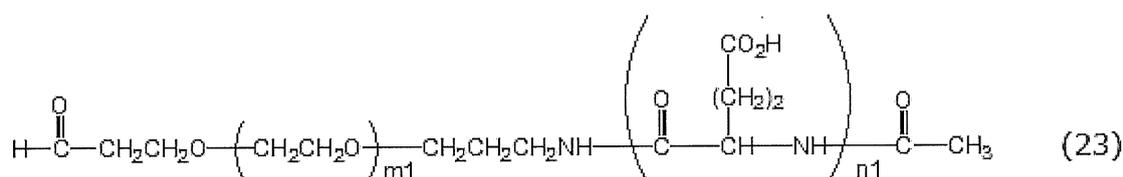
[実施例4] ブロックポリマー誘導体(23); $AL-050GL10-AC$ (Aldehyde-PEG-poly(

30

- glutamate)-acetyl, $m1 = ca. 103$, $n1 = ca. 10$)の合成

【0117】

【化16】



40

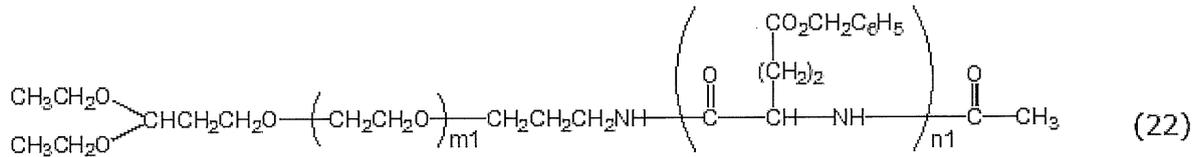
【0118】

(1) ブロックポリマー誘導体(22); $DE-050BG10-AC$ (Diethylacetal-PEG-poly(- glutamate)-acetyl, $m1 = ca. 103$, $n1 = ca. 10$)の合成

【0119】

50

【化 1 7】



【 0 1 2 0】

200mLの3つ口フラスコに、 ϵ -3-アミノプロピル- ϵ -3,3-ジエトキシプロピルオキシ-ポリオキシエチレン(日油株式会社製「SUNBRIGHT PA-050DE」、数平均分子量=4,544 Da) 5.0gを入れ、脱水 DMF 75 g に溶解させた。これに ϵ -ベンジル-N-カルボキシ-L-グルタミン酸無水物(BLG-NCA) 2.64 g (10当量)を加えて、窒素雰囲気下40℃で6時間重合反応を行なった。その後、トリエチルアミン3.49mL(25当量)及び無水酢酸950 μ L (10当量)を添加

し、6時間攪拌し、アセチルキャッピングにより重合を停止させた。停止反応終了後、反応溶液を室温まで冷却し、酢酸エチルとヘキサンの混合溶液に加え、結晶を析出させた。結晶を吸引ろ過によってろ別した後、酢酸エチルとヘキサンの混合溶液で数回結晶の洗浄を行い、真空にて乾燥を行なうことで、上記ブロックポリマー誘導体(22)(DE-050BG10-AC)を得た(収量6.0g)。

$^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO) (ppm): 1.11 (6H, t, $-\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)、1.65(2H, m, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-PEG}$)、1.74(2H, m, $\text{PEG-CHCH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)、1.80-2.62(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph})\text{NH}]_m$)、3.40-3.80 (br, PEG)、3.80-4.40(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph})\text{NH}]_m$)、4.55(1H, m, $\text{PEG-CHCH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$)、4.90-5.20(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph})\text{NH}]_m$)、7.15-7.50(br, Ph)、7.90-8.50(br, NH)

ポリグルタミン酸の平均重合度:10 (NMRのピーク積分値より下式を用いて算出)

平均重合度 = Ph基(7.15-7.50ppm)のピーク積分値 / 5

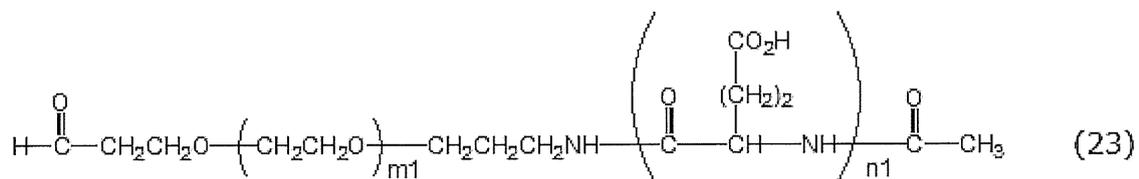
ポリエチレングリコール鎖(3.4-3.8ppm)のピーク積分値を分子量=4,544 Daの理論プロトン数である413に設定した際の値

【 0 1 2 1】

(2) ブロックポリマー誘導体(23); AL-050GL10-AC (Aldehyde-PEG- poly(ϵ -glutamate)-acetyl, $m1 = \text{ca. } 103$, $n1 = \text{ca. } 10$)の合成

【 0 1 2 2】

【化 1 8】



【 0 1 2 3】

200mLの3つ口フラスコに、(1)で得られたブロックポリマー誘導体(22)(DE-050BG10-AC) 5gを入れ、水 40g に分散させた。これに2.5mol/L 水酸化ナトリウム水溶液10gを加え、室温で48時間加水分解反応を行なった。次に、リン酸を添加しpHを2.0に調節し

た後、3時間室温で攪拌し、アセタール基の脱保護反応を行なった。その後、反応溶液を水酸化ナトリウム水溶液で中和し、反応溶液を24時間室温にて透析し(透析膜: Spectra / Por (登録商標) 7、MWCO = 1,000、外液: 水)、内液を凍結乾燥することによって、上記

10

20

30

40

50

ブロックポリマー誘導体(23)(AL-050GL10-AC)を得た(収量4.2g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm): 1.7-2.6(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、2.76 (t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$)

、3.40-4.00 (br, PEG)、3.15-3.3(br)、4.20-4.40(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、5.11(t, $-\text{CH}(\text{OH})_2$)、9.66 (s, $-\text{CHO}$)

TOF-MS: 分子量6,319

アルデヒド化率: 64% (NMRのピーク積分値より下式を用いて算出)

アルデヒド化率 = アルデヒド基(7.15-7.50ppm)のピーク積分値 / 1 × 100

ポリエチレングリコール鎖(9.66ppm)のピーク積分値を分子量=4,544 Daの理論プロトン数である413に設定した際の値

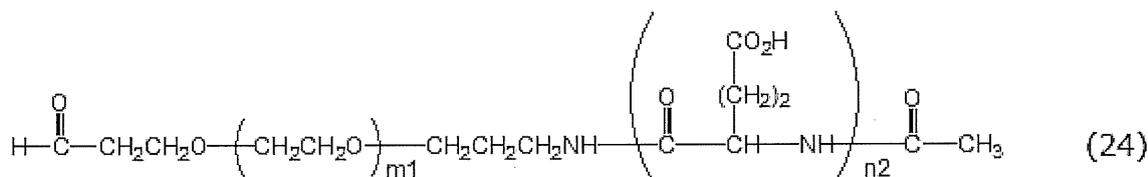
【0124】

[実施例5] ブロックポリマー誘導体(24); AL-050GL50-AC (Aldehyde-PEG-poly(

- glutamate)-acetyl, $m_1 = \text{ca. } 103$, $n_2 = \text{ca. } 48$)の合成

【0125】

【化19】



原料であるBLG-NCA添加量を50当量とし、実施例4と同様に、PEG鎖の末端にポリグルタミン酸を導入し、脱保護を行うことで、上記ブロックポリマー誘導体(24)(AL-050GL50-AC)を得た(収量3.4g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm): 1.7-2.6(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、2.76 (t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$)

、3.40-4.00 (br, PEG)、3.15-3.3(br)、4.20-4.40(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、5.11(t, $-\text{CH}(\text{OH})_2$)、9.66 (s, $-\text{CHO}$)

ポリグルタミン酸の平均重合度: 48 (対PEG鎖基準(413H))

TOF-MS: 分子量12,998

アルデヒド化率: 75% (対PEG鎖基準(413H))

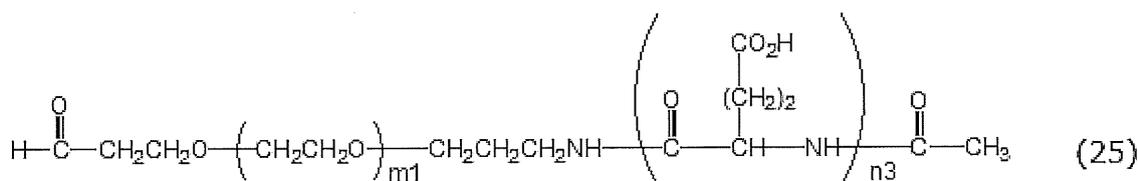
【0126】

[実施例6] ブロックポリマー誘導体(25); AL-050GL100-AC (Aldehyde-PEG-poly(

- glutamate)-acetyl, $m_1 = \text{ca. } 103$, $n_3 = \text{ca. } 94$)の合成

【0127】

【化20】



【0128】

原料であるBLG-NCA添加量を100当量とし、実施例4と同様に、PEG鎖の末端にポリグル

タミン酸を導入し、脱保護を行うことで、上記ブロックポリマー誘導体(25)(AL-050GL100-AC)を得た(収量3.4g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm) : 1.7-2.6(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、2.76 (t, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$)

、3.40-4.00 (br, PEG)、3.15-3.3(br)、4.20-4.40(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、5.11(t, - $\text{CH}(\text{OH})_2$)、9.66 (s, - CHO)

ポリグルタミン酸の平均重合度 : 94 (対PEG鎖基準(413H))

TOF-MS : 分子量17,918

アルデヒド化率 : 63% (対PEG鎖基準(413H))

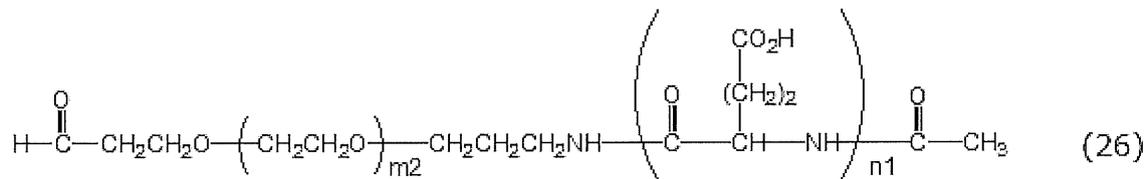
【0129】

[実施例7] ブロックポリマー誘導体(26) ; AL-200GL10-AC (Aldehyde-PEG-poly(

- glutamate)-acetyl, $m_2 = \text{ca. } 461$, $n_1 = \text{ca. } 9$)の合成

【0130】

【化21】



10

20

【0131】

原料として -3-アミノプロピル- -3,3-ジエトキシプロピルオキシ-ポリオキシエチレン(日油株式会社製「SUNBRIGHT PA-200DE」、数平均分子量=20,270 Da)を使用し、BLG-NCAを11当量加えて、実施例4と同様に、PEG鎖の末端にポリグルタミン酸を導入し、脱保

護を行うことで、上記ブロックポリマー誘導体(26)(AL-200GL10-AC)を得た(収量4.9g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ (ppm) : 1.7-2.6(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、2.76 (t, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$)

、3.40-4.00 (br, PEG)、3.15-3.3(br)、4.20-4.40(br, $[\text{CO-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{NH}]_m$)、5.11(t, - $\text{CH}(\text{OH})_2$)、9.66 (s, - CHO)

ポリグルタミン酸の平均重合度 : 9 (対PEG鎖基準(1843H))

TOF-MS : 分子量26,346

アルデヒド化率 : 67% (対PEG鎖基準(1843H))

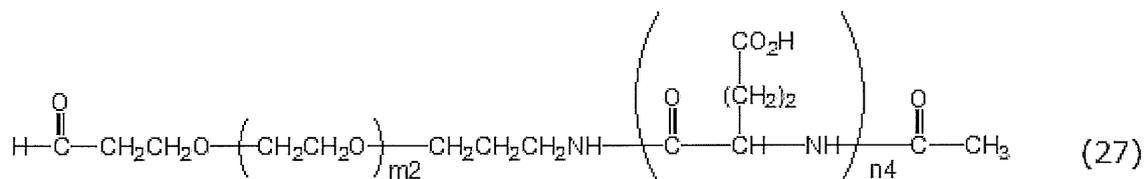
【0132】

[実施例8] ブロックポリマー誘導体(27) ; AL-200GL20-AC (Aldehyde-PEG-poly(

- glutamate)-acetyl, $m_2 = \text{ca. } 461$, $n_4 = \text{ca. } 19$)の合成

【0133】

【化22】



30

40

【0134】

原料として -3-アミノプロピル- -3,3-ジエトキシプロピルオキシ-ポリオキシエチレン(日油株式会社製「SUNBRIGHT PA-200DE」、数平均分子量=20,270 Da)を使用し

50

、BLG-NCAを22当量加えて、実施例4と同様に、PEG鎖の末端にポリグルタミン酸を導入し、脱保

護を行うことで、上記ブロックポリマー誘導体(27)(AL-200GL20-AC)を得た(収量4.6g)。

¹H-NMR(D₂O) (ppm) : 1.7-2.6(br, [CO-CH(CH₂CH₂COOH)NH]_m)、2.76 (t, -CH₂CH₂CHO)

、3.40-4.00 (br, PEG)、3.15-3.3(br)、4.20-4.40(br, [CO-CH(CH₂CH₂COOH)NH]_m)、5.11(t, -CH(OH)₂)、9.66 (s, -CHO)

ポリグルタミン酸の平均重合度 : 19 (対PEG鎖基準(1843H))

TOF-MS : 分子量27,753

アルデヒド化率 : 66% (対PEG鎖基準(1843H))

【0135】

[実施例9] 顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)のN末端とブロックポリマー誘導体との反応

【0136】

(1) ブロックポリマー誘導体(23)とGCSFとの結合体(28)の合成

GCSF(アミノ酸配列: 下記の通り)(ヒト由来、大腸菌を用いた一般的な形質導入方法に従って調製)を3mg含有する10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH=5.5、5(w/v)%ソルビトール含有)に、実施例4で得たアルデヒド基を有するブロックポリマー誘導体(23)を3当量添加し、GCSF濃度を3.0mg/mLに調整し、25にて1時間攪拌した。次いで、還元剤であるシアノ水素化ホウ素ナトリウム100当量を添加し、25にて24時間攪拌した。さらに、グリシルグリシンを100当量添加し、25にて1時間攪拌することで反応を停止した。逆相液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いて、下記分析条件にて分析を行い、図2に示すように、反応が進行したことを確認した。

【0137】

<GCSFのアミノ酸配列>

TPLGPASSLP QSFLLKCLEQ VRKIQGDGAA LQEKLCATYK LCHPEELVLL GHS LGIPWAP LSSCPSQALQ LAGCLS QLHS GLFLYQGLLQ ALEGISP ELG PTLDTLQLDV ADFATTIWQQ MEELGMAPAL QPTQGAMPAF ASAFQRRAGG VLVASHLQSF LEVSYRVLRH LAQP(配列番号: 1)

【0138】

<RP-HPLC分析条件>

装置: アジレント・テクノロジー株式会社製「Agilent 1200 Infinity」

検出器: UV(226nm)

カラム: Phenomenex Jupiter 5µm C18 300 column、4.6×250mm

移動相A: 水+0.1(v/v)%トリフルオロ酢酸

移動相B: アセトニトリル+0.1(v/v)%トリフルオロ酢酸

流速: 1mL/min

グラジエント条件: 表1に示す通り。

【0139】

【表1】

時間(分)	0	25	27	29
移動相B(%)	40%	70%	90%	40%

10

20

30

40

【0140】

RP-HPLC分析の結果、反応24時間後の反応率はおよそ80%であった。

【0141】

得られた反応液を24時間室温にて透析し（透析膜：Delchimica Scientific glassware社製（分画分子量 = 3.5 kDa）、外液：10 mMリン酸ナトリウム水溶液（pH = 4.5））、その後、陽イオン交換クロマトグラフィーにて、下記に示す条件で精製し、図3に示す結合体（28）を含む画分を分取した。

<精製条件>

カラム：TSK gel SP-STAT 7 μm column、4.6 × 100 mm

移動相A：10 mMリン酸ナトリウム、pH = 4.5

移動相B：100 mMリン酸ナトリウム + 100 mM塩化ナトリウム、pH = 5.75

流速：0.7 mL / 分

検出波長：280 nm

グラジエント条件：表2に示す通り。

【0142】

【表2】

時間 (分)	0	60	65	70
移動相B (%)	10%	100%	100%	10%

【0143】

上記イオン交換クロマトグラフィー精製にて分取した目的物を含む溶液を、限外ろ過（遠心式限外ろ過フィルター；「アミコン」、分画分子量 = 10 kDa、5000 × g、4）にて濃縮した後、24時間室温にて透析した（透析膜：Delchimica Scientific glassware社製（分画分子量 = 3.5 kDa）、外液：10 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH = 4.6、5 (w/v) %ソルビトール含有））。得られた溶液のGCSF濃度は、280 nmにおける吸光度を測定することで算出した（吸光係数 = 0.88 mL / mg · cm）。

得られたブロックポリマー誘導体（23）と、GCSFとの結合体（28）の同定は、上述したようにMALDI-TOF-MSにより分子量を測定し、また、下記に示す通り、SDS-PAGE、円偏光二色性測定およびサイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【0144】

(i) MALDI-TOF-MSによる分子量の測定

測定結果を図4に示した。図4より、MALDI-TOF-MSにより測定される分子量は24,438 Daであり、結合体（28）の生成が示唆された。

【0145】

(ii) SDS-PAGE

SDS-PAGEキットとして「4-15%ミニプロティアン（登録商標）TGX（商標）プレキャストゲル（バイオラッド（BIO-RAD）社）」を用い、キットの推奨測定条件に従い、結合体（28）の評価を行った。

染色液としては、クマシーブリリアントブルー溶液（CBB溶液）およびヨウ素染色溶液（塩化バリウム溶液 + ヨウ素溶液）を用いた。

SDS-PAGEの結果を図5に示す。図5中、レーンMは分子量マーカール、レーン1はGCSFを、レーン2は結合体（28）を示す。左図はクマシーブリリアントブルー（CBB）染色によるタンパク質の検出結果を示し、右図は、ヨウ素染色によるPEGの検出結果を示す。

結合体（28）の分析結果（レーン2）においては、タンパク質やペプチドを選択的に

染色するCBB染色でバンドが検出され、さらに、ポリエチレングリコールを染色するヨウ素染色でもバンドが検出された。両方の染色でバンドが検出されたことから、ブロックポリマー誘導体(23)とGCSFとが結合した目的物が得られたことが確認された。

【0146】

(iii)円偏光二色性の測定

円偏光二色性の測定は、タンパク質の変性状態を調べるのに有効な手段として知られている。下記の装置を用い、下記波長にて、円偏光二色性を測定した。

装置：Jasco J-700 Spectropolarimeter

波長：200-250nm

測定により得られたGCSFのスペクトルと、結合体(28)のスペクトルとを重ね合わせたところ、形状が一致していたことから、ブロックポリマー誘導体(23)による修飾により、GCSFが変性していないことが確認された。

10

【0147】

(iv)サイズ排除クロマトグラフィー分析

下記の分析条件で実施した。

<分析条件>

装置：Jasco LC1500-2000

カラム：Zorbax GF-250 Bio series, 粒子径=4μm, 150オンゲストローム, 4.6mm×250mm(アジレント(Agilent)社)

移動相：20mMリン酸ナトリウム+130mM塩化ナトリウム(pH=7.0)+20容量%アセトニトリル

20

流速：0.3mL/分

検出波長：226nm

GCSFおよび結合体(28)について得られたクロマトグラムを比較したところ、結合体(28)のピークが、GCSFのピークと比べて、高分子量側にシフトしていること、つまりブロックポリマー誘導体(23)がGCSFに結合し、分子量が増大したことが確認された。

【0148】

(2)ブロックポリマー誘導体(24)とGCSFとの結合体(29)の合成

原料としてブロックポリマー誘導体(24)を使用し、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製の際のグラジエント条件を表3に示す条件とした他は、実施例9(1)と同様に、ブロックポリマー誘導体(24)とGCSFとの結合体(29)を合成した。

30

【0149】

【表3】

時間(分)	0	10	70	75
移動相B(%)	2%	2%	100%	2%

40

【0150】

得られたブロックポリマー誘導体(24)とGCSFとの結合体(29)の同定は、実施例9(1)と同様に、MALDI-TOF-MSによる分子量の測定、SDS-PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【0151】

(3)ブロックポリマー誘導体(25)とGCSFとの結合体(30)の合成

原料としてブロックポリマー誘導体(25)を使用し、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製の際のグラジエント条件を表4に示す条件とした他は、実施例9(1)と同様に、ブロックポリマー誘導体(25)とGCSFとの結合体(30)を合成した。

50

【 0 1 5 2 】

【表 4】

時間 (分)	0	1 5	7 5	8 0
移動相B (%)	2 %	2 %	1 0 0 %	2 %

【 0 1 5 3 】

得られたブロックポリマー誘導体 (2 5) と G C S F との結合体 (3 0) の同定は、実施例 9 (1) の場合と同様に、MALDI - TOF - MSによる分子量の測定、SDS - PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

10

【 0 1 5 4 】

(4) ブロックポリマー誘導体 (2 6) と G C S F との結合体 (3 1) の合成

原料としてブロックポリマー誘導体 (2 6) を使用し、実施例 9 (1) と同様に、ブロックポリマー誘導体 (2 6) と G C S F との結合体 (3 1) を合成した。RP - HPLCを用いて分析を行い、図 6 に示すように、反応が進行したことを確認した。

次いで、陽イオン交換クロマトグラフィーを用い、下記精製条件にて精製した。

< 精製条件 >

カラム : T S K g e l S P - S T A T 7 μ m c o l u m n、4 . 6 × 1 0 0 m m

移動相 A : 1 0 m M リン酸ナトリウム、p H = 4 . 5

移動相 B : 1 0 0 m M リン酸ナトリウム、p H = 5 . 7 5

流速 : 0 . 7 m L / 分

検出波長 : 2 8 0 n m

グラジエント条件 : 表 5 に示す通り。

20

【 0 1 5 5 】

【表 5】

時間 (分)	0	1 0	7 0	7 5	8 0
移動相B (%)	1 0 %	1 0 %	8 0 %	1 0 0 %	1 0 %

30

【 0 1 5 6 】

得られたブロックポリマー誘導体 (2 6) と G C S F との結合体 (3 1) の同定は、実施例 9 (1) の場合と同様に、MALDI - TOF - MSによる分子量の測定 (図 7)、SDS - PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【 0 1 5 7 】

(5) ブロックポリマー誘導体 (2 7) と G C S F との結合体 (3 2) の合成

原料としてブロックポリマー誘導体 (2 7) を使用し、実施例 9 (4) と同様に、ブロックポリマー誘導体 (2 7) と G C S F との結合体 (3 2) を合成した。

得られたブロックポリマー誘導体 (2 7) と G C S F との結合体 (3 2) の同定は、実施例 9 (1) の場合と同様に、MALDI - TOF - MSによる分子量の測定、SDS - PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

40

【 0 1 5 8 】

[実施例 1 0] トランスグルタミナーゼを触媒として用いた顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F) のグルタミン残基とブロックポリマー誘導体の反応

50

【0159】

(1) ブロックポリマー誘導体(19)とGCSFとの結合体(33)の合成

GCSFを3mg含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH=8.0、5(w/v)%ソルビトール含有)に、実施例1で得たアミノ基を有するブロックポリマー誘導体(19)を3当量添加し、GCSF濃度を2.0mg/mLに調整した。次いで、微生物由来のトランスグルタミナーゼ(TGase、「Activa(登録商標)WM」(味の素株式会社製))を0.06mg(2重量%/GCSF)に加え、25℃にて4時間撹拌した。さらに、N-エチルマレイミドをTGaseに対して0.8当量添加し、25℃にて1時間撹拌することで反応を停止した。

RP-HPLCを用いて分析を行い、図8に示すように、反応が進行したことを確認した。RP-HPLCの分析条件は、上記実施例9(1)における分析条件と同じである。

RP-HPLC分析の結果、反応4時間後の反応率はおよそ84%であった。

【0160】

反応液を10mMリン酸ナトリウム(pH=4.5)にて5倍に希釈し、陽イオン交換クロマトグラフィーにて精製した。精製条件を以下に示す。

<精製条件>

カラム：TSKgel SP-STAT 7 μ m column、4.6 \times 100mm

移動相A：10mMリン酸ナトリウム、pH=4.5

移動相B：100mMリン酸ナトリウム、pH=5.75

流速：0.7mL/分

検出波長：280nm

グラジエント条件：表6に示す通り。

【0161】

【表6】

時間(分)	0	10	70	75	80
移動相B (%)	10%	10%	80%	100%	10%

【0162】

イオン交換クロマトグラフィー精製にて分取した目的物を含有する溶液を、限外ろ過(遠心式限外ろ過フィルター；「アミコン」(分画分子量=10kDa)、5000 \times g、4℃)にて濃縮した後、24時間室温にて透析した(透析膜：Delchimica Scientific glassware社製(分画分子量=3.5kDa)、外液：10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH=4.6、5(w/v)%ソルビトール含有))。得られた溶液のGCSF濃度は、280nmにおける吸光度を測定することで算出した(吸光係数=0.88mL/mg \cdot cm)。

得られたブロックポリマー誘導体(19)とGCSFとの結合体(33)の同定は、実施例9(1)の場合と同様に、MALDI-TOF-MSによる分子量の測定、SDS-PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【0163】

(2) ブロックポリマー誘導体(20)とGCSFとの結合体(34)の合成

原料としてブロックポリマー誘導体(20)を使用し、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製の際のグラジエント条件を表7に示す条件とした他は、実施例10(1)と同様に、ブロックポリマー誘導体(20)とGCSFとの結合体(34)を合成した。

【0164】

10

20

30

40

50

【表 7】

時間 (分)	0	10	70	75
移動相B (%)	2%	2%	100%	2%

【0165】

得られたブロックポリマー誘導体(20)とGCSFとの結合体(34)の同定は、実施例9(1)の場合と同様に、MALDI-TOF-MSによる分子量の測定、SDS-PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

10

【0166】

(3) ブロックポリマー誘導体(21)とGCSFとの結合体(35)の合成

原料としてブロックポリマー誘導体(21)を使用し、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製の際のグラジエント条件を表8に示す条件とした他は、上記(1)と同様に、ブロックポリマー誘導体(21)とGCSFとの結合体(35)を合成した。

【0167】

【表 8】

時間 (分)	0	10	75	80
移動相B (%)	2%	2%	100%	2%

20

【0168】

得られたブロックポリマー誘導体(21)とGCSFとの結合体(35)の同定は、実施例9(1)の場合と同様に、MALDI-TOF-MSによる分子量測定、SDS-PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

30

【0169】

[比較例1] 顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)のN末端とメトキシPEG誘導体との反応: メトキシPEGアルデヒド(分子量=20kDa)とGCSFとの結合体(36)の合成

GCSFを3mg含有する10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH=4.6、5(w/v))%ソルビトール含有)にメトキシPEGアルデヒド(日油株式会社製「SUNBRIGHT ME-200AL」、数平均分子量=約20kDa)を3当量添加し、GCSF濃度を3.0mg/m

Lに調整し、4にて1時間攪拌した。次いで、還元剤であるシアノ水素化ホウ素ナトリウム100当量を添加し、4にて24時間攪拌した。さらに、グリシルグリシンを100当量添加し、4にて1時間攪拌することで反応を停止した。RP-HPLCを用いて分析を行い、反応が進行したことを確認した。RP-HPLCの分析条件は、実施例9(1)における分析条件と同じである。

40

RP-HPLC分析の結果、反応24時間後の反応率はおよそ78%であった。

【0170】

得られた反応液を24時間室温にて透析し(透析膜: Delchimica Scientific glassware社製(分画分子量=3.5kDa)、外液: 10mMリン酸ナトリウム水溶液(pH=4.7))、その後、下記に示す精製条件にて、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

<精製条件>

50

カラム：TSK gel SP-5PW 10 μ m column、7.5 x 75 mm
 移動相A：10 mMリン酸ナトリウム、pH = 4.7
 移動相B：100 mMリン酸ナトリウム + 100 mM塩化ナトリウム、pH = 4.85
 流速：1.0 mL / 分
 検出波長：280 nm
 グラジエント条件：表9に示す通り。

【0171】

【表9】

時間 (分)	0	5	65	90	95
移動相B (%)	5%	5%	100%	100%	5%

10

【0172】

陽イオン交換クロマトグラフィー精製にて分取した目的物を含む溶液を、限外ろ過（遠心式限外ろ過フィルター；「アミコン」（分画分子量 = 10 kDa）、5000 x g、4）にて濃縮した後、24時間室温にて透析した（透析膜：Delchimica Scientific glassware社製（分画分子量 = 3.5 kDa）、外液：10 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH = 4.6、5（w/v）%ソルビトール含有））。得られた溶液のGC SF濃度は、280 nmにおける吸光度を測定することで算出した。

20

得られたメトキシPEG-GC SF結合体（36）の同定は、実施例9（1）の場合と同様に、MALDI-TOF-MSによる分子量の測定（図9）、SDS-PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【0173】

[試験例1] 動物モデルにおける薬物動態の評価

GC SF、実施例9（4）で得たブロックポリマー誘導体（26）とGC SFとの結合体（31）、および比較例1で得たメトキシPEG-GC SF結合体（36）を使用し、Sprague-Dawleyラット（体重200 g ~ 270 g）を用いて、薬物動態試験を行った（3匹/グループ）。

30

GC SFサンプルは、200 μ Lのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH = 7.4）を用いて調製した後、0.22 μ mのフィルターにてろ過した。調製したサンプル溶液を尾静脈注射（GC SFとして100 μ g / kg）した後、投与前（t = 0）および投与後の任意の時間に血液サンプルを採取した。動物実験の全ての作業はイソフルランによる麻酔下で行った。

血液サンプルを遠心分離（1500 x g、20分）し、得られた血清に含まれるGC SF量をELISAキット（Invitrogen社製）により測定した。結果はprogram 2.0 PK solverシステムにより、2コンパートメントモデルを用いて評価し、血中濃度曲線下面積（AUC）を比較した（表10、図10）。

40

【0174】

【表10】

サンプル	AUC 0-infinity (ng/mL·h)
GC SF	5744
結合体（31）	33607
結合体（36）	27869

50

【0175】

図10に示されるように、GCSFが投与後6時間でほぼ血中から消失してしまう((A))のに対し、実施例9(4)で得たブロックポリマー誘導体(26)とGCSFとの結合体(31)は、有意にGCSFの血中滞留性を延長させることができた((B))。また、表10および図10に示されるように、比較例1で得たメトキシPEG-GCSF結合体(36)と比べても、有意に血中滞留性を改善できることが確認できた。

ブロックポリマー誘導体(26)とGCSFとの結合体(31)と、メトキシPEG-GCSF結合体(36)のPEG部分は、同分子量(20kDa)であることから、ブロックポリマー誘導体(26)とGCSFとの結合体(31)にて観察される血中滞留性の向上は、PEG鎖の末端にポリアニオンであるポリグルタミン酸(平均重合度=9)を導入したことに起因するものであることが示唆された。

10

【0176】

[実施例11] ヒト成長ホルモン(hGH)のN末端とブロックポリマー誘導体との反応

【0177】

(1) ブロックポリマー誘導体(26)とhGHとの結合体(37)の合成

hGH(アミノ酸配列: 下記の通り)(シェナンドー(Shenandoah)社)を2mg含有する100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH=5.5)に実施例4で得たアルデヒド基を有するブロックポリマー誘導体(26)を5当量添加し、hGH濃度を1.0mg/mLに調整し、4にて1時間攪拌した。次いで、還元剤であるシアノ水素化ホウ素ナトリウム50当量を添加し、25にて24時間攪拌した。さらに、グリシルグリシンを100当量添加し、25にて1時間攪拌することで反応を停止した。逆相液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いて、下記に示す条件にて分析を行い、図11に示すように、反応が進行したことを確認した。

20

【0178】

< hGHのアミノ酸配列 >

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYI
PKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNL
ELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNV
YDLLKDLLEE GIQTLMGRLE DGSPRTGQIFKQTYSKFDT
NSHNDDALLKNYGLLYCFRKMMDKVVETFLRI VQCRSV
EGSCGF(配列番号: 2)

30

【0179】

< RP-HPLC分析条件 >

装置: アジレント・テクノロジー株式会社製「Agilent 1200 Infinity」

検出器: UV(226nm)

カラム: Phenomenex Jupiter 5µm C18 300 column、4.6×250mm

移動相A: 水+0.1(v/v)%トリフルオロ酢酸

移動相B: アセトニトリル+0.1(v/v)%トリフルオロ酢酸

流速: 1mL/min

グラジエント条件: 表11に示す通り。

40

【0180】

【表11】

時間(分)	0	25	27	29
移動相B (%)	40%	70%	90%	40%

【0181】

50

R P - H P L C 分析の結果、反応 2 4 時間後の反応率はおよそ 6 4 % であった。

【 0 1 8 2 】

得られた反応液を 2 4 時間室温にて透析し（透析膜：Delchimica Scientific glassware 社製（分画分子量 = 3 . 5 k D a ）、外液：1 0 m M 酢酸ナトリウム水溶液（p H = 4 . 7 ）、その後、陽イオン交換クロマトグラフィーにより、下記精製条件にて精製し、図 1 2 に示す結合体（3 7 ）の画分を分取した。

< 精製条件 >

カラム：T S K g e l S P - S T A T 7 μ m c o l u m n、4 . 6 × 1 0 0 m m

移動相 A：1 0 m M 酢酸ナトリウム、p H = 4 . 7

移動相 B：1 0 m M 酢酸ナトリウム + 5 0 0 m M 塩化ナトリウム、p H = 4 . 8 5

流速：0 . 7 m L / 分

検出波長：2 8 0 n m

グラジエント条件：表 1 2 に示す通り。

【 0 1 8 3 】

【 表 1 2 】

時間 (分)	0	1 0	7 5	7 5	8 0
移動相 B (%)	5 %	5 %	6 0 %	1 0 0 %	5 %

【 0 1 8 4 】

イオン交換クロマトグラフィー精製にて分取した目的物を含む溶液を、限外ろ過（遠心式限外ろ過フィルター；「アミコン」（分画分子量 = 1 0 k D a ）、5 0 0 0 × g、4 ）にて濃縮した後、2 4 時間室温にて透析した（透析膜：Delchimica Scientific glassware 社製（分画分子量 = 3 . 5 k D a ）、外液：1 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液（p H = 4 . 6、5 (w / v) % ソルビトール含有））。得られた溶液の h G H 濃度は、2 8 0 n m における吸光度を測定することで算出した。

得られたブロックポリマー誘導体（2 6 ）と h G H との結合体（3 7 ）の同定は、実施例 9 (1) の場合と同様に、M A L D I - T O F - M S による分子量の測定、S D S - P A G E、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

なお、S D S - P A G E による分析結果を図 1 3 に示した。図 1 3 中、レーン M は分子量マーカーを示し、レーン 1 はブロックポリマー誘導体（2 6 ）と h G H との結合体（3 7 ）を示し、レーン 2 は h G H を示す。

また、左図はクマシーブリリアントブルー染色によるタンパク質の検出結果を示し、右図はヨウ素染色による P E G の検出結果を示す。

図 1 3 において、ブロックポリマー誘導体（2 6 ）と h G H との結合体（3 7 ）については、タンパク質と P E G の双方のバンドが検出された（レーン 1 ）。

【 0 1 8 5 】

(2) ブロックポリマー誘導体（2 7 ）と h G H との結合体（3 8 ）の合成

原料としてブロックポリマー誘導体（2 7 ）を使用した他は、実施例 1 1 (1) と同様にして、ブロックポリマー誘導体（2 7 ）と h G H との結合体（3 8 ）を合成した。

得られたブロックポリマー誘導体（2 7 ）と h G H との結合体（3 8 ）の同定は、実施例 1 1 (1) の場合と同様に、M A L D I - T O F - M S による分子量測定、S D S - P A G E、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【 0 1 8 6 】

[比較例 2] ヒト成長ホルモン（h G H ）の N 末端とメトキシ P E G 誘導体との反応：メトキシ P E G アルデヒド（分子量 = 2 0 k D a ）と h G H との結合体（3 9 ）の合成

原料として、メトキシPEGアルデヒド(日油株式会社製「SUNBRIGHT ME-200AL」、数平均分子量約 = 20kDa) を使用した他は、実施例 11 (1) と同様にして、メトキシPEG - hGH 結合体 (39) を合成した。RP - HPLC 分析の結果、反応 24 時間後の反応率はおよそ 77 % であった (図 14) 。

得られたメトキシPEG - hGH 結合体 (39) の同定は、実施例 11 (1) の場合と同様に、MALDI - TOF - MS による分子量の測定、SDS - PAGE、円偏光二色性測定、サイズ排除クロマトグラフィーによる分析にて行い、目的物が得られたことを確認した。

【 0187 】

[試験例 2] 下垂体摘出ラットを用いた hGH の薬学的評価

下垂体を摘出したOVAラット(オス、体重 = 約 90g) は Charles River Laboratories (Lecco, Italy) より購入した。ラットを無作為に 6 グループ (4 匹 / グループ) に分け、実験前に動物施設にて 2 週間飼育した。

PBS コントロールグループには、PBS 溶液 200 μ L を尾静脈より投与した。hGH 投与グループには、ネイティブの hGH を 6 日間尾静脈より投与した (0.3 mg / kg / 日、約 27 μ g / ラット / 日、合計約 162 μ g / ラット) 。実施例 11 (1) で得たブロックポリマー誘導体 (26) と hGH との結合体 (37) を投与するグループ、実施例 11 (2) で得たブロックポリマー誘導体 (27) と hGH との結合体 (38) を投与するグループ、および比較例 2 で得たメトキシPEG - hGH 結合体 (39) を投与するグループには、各結合体をそれぞれ PBS に溶解し、単回で尾静脈より投与した (1.8 mg / kg、約 162 μ g / ラット) 。ラットは 11 日間、同時刻にモニターおよび体重測定を行い、結果を図 15 に示した。また、各ラットの頸骨長を 11 日間測定し、ラットの初期の体重で補正した頸骨長の増加量を図 16 に示した。

【 0188 】

図 15 および 16 に示されるように、hGH を投与したグループと比較して、ブロックポリマー誘導体 (26) と hGH との結合体 (37) 、ブロックポリマー誘導体 (27) と hGH との結合体 (38) をそれぞれ投与したグループでは、体重増加および頸骨の伸びが大きく、hGH の薬効が有意に向上され、また延長されたことが認められた。また、結合体 (37) および結合体 (38) 中に含まれる PEG と同じ分子量 (20 kDa) の PEG を有するメトキシPEG - hGH 結合体 (39) を投与したグループと比べても、高い体重増加効果および頸骨伸張効果が得られることが認められた。

【 産業上の利用可能性 】

【 0189 】

上記の通り、本発明により、生体関連物質をアニオン性ブロックポリマー誘導体と結合させた修飾体を提供することができ、生体関連物質の血中半減期を延長し、生体の血中の生体関連物質の安定性を向上させることができる。

10

20

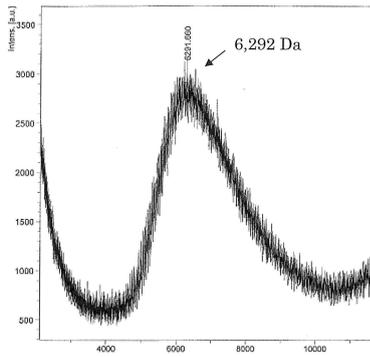
30

40

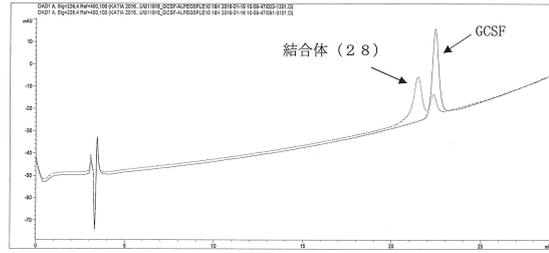
50

【 図面 】

【 図 1 】

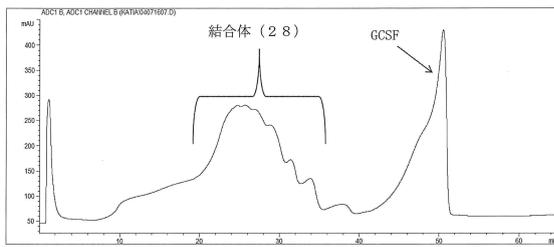


【 図 2 】

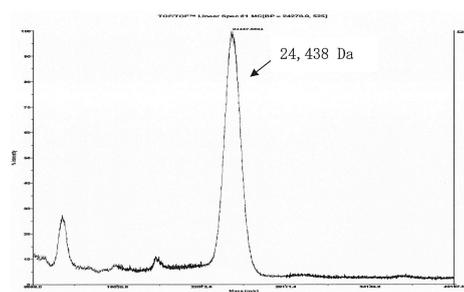


10

【 図 3 】

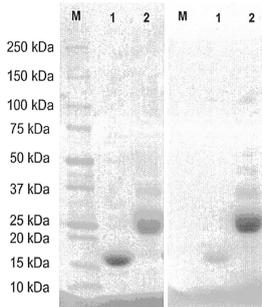


【 図 4 】

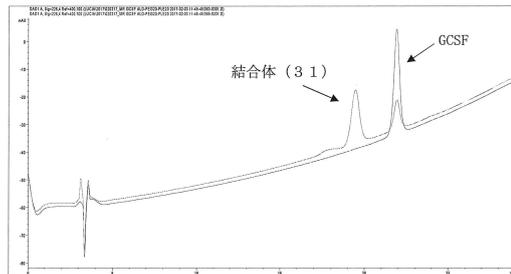


20

【 図 5 】



【 図 6 】

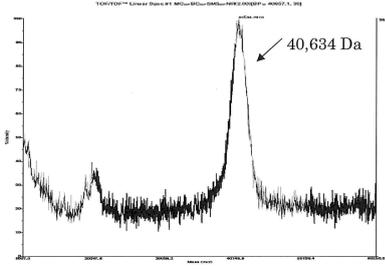


30

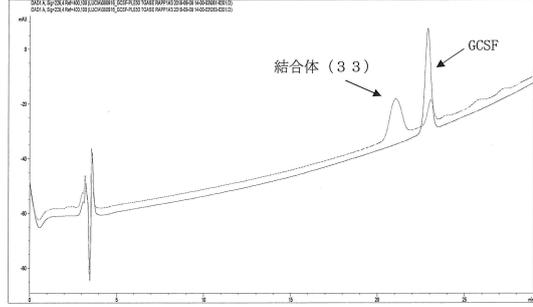
40

50

【図 7】

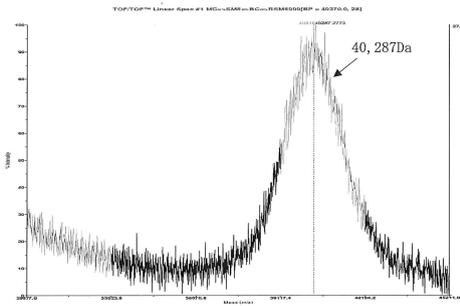


【図 8】

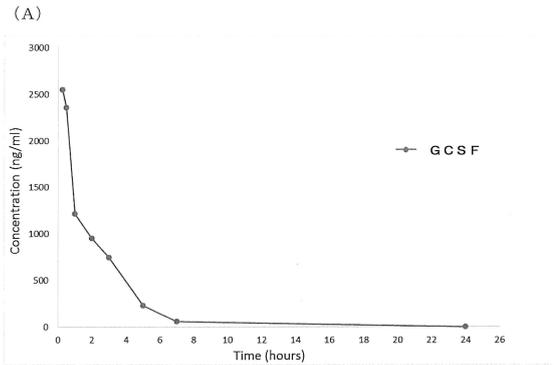


10

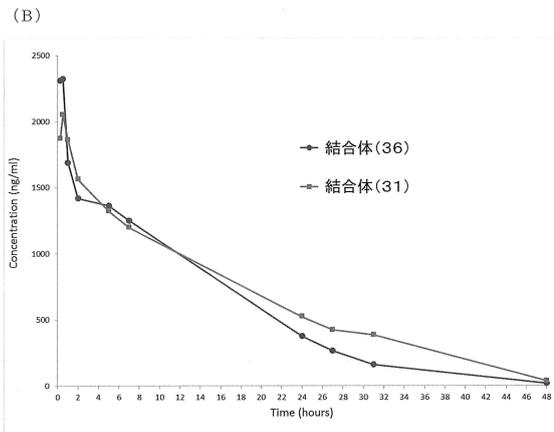
【図 9】



【図 10】



20

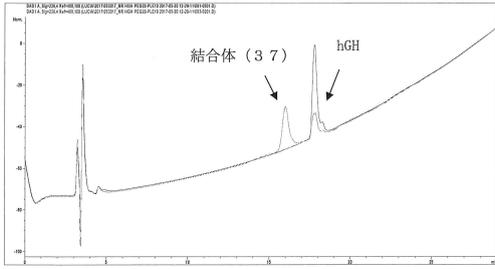


30

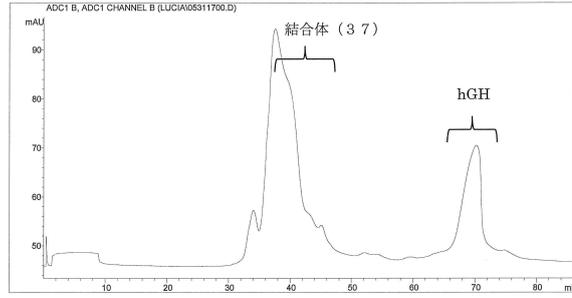
40

50

【 図 1 1 】

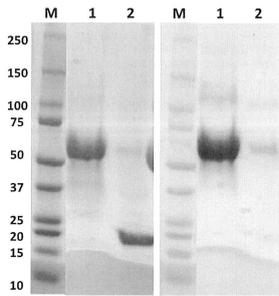


【 図 1 2 】

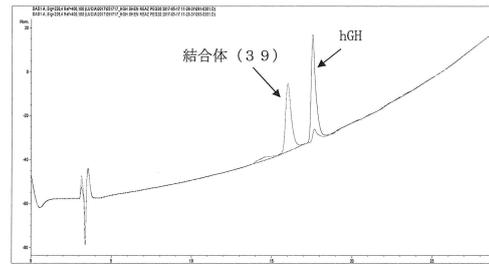


10

【 図 1 3 】

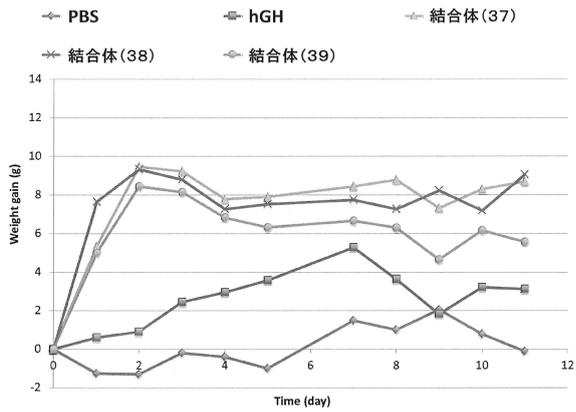


【 図 1 4 】

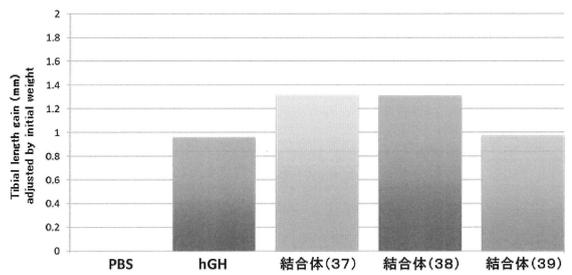


20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



30

【 配列表 】

0007281140000001.app

40

フロントページの続き

- (74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
- (74)代理人 100158724
弁理士 竹井 増美
- (72)発明者 吉岡 宏樹
神奈川県川崎市川崎区千鳥町 3 - 3 日油株式会社内
- (72)発明者 平居 翠
神奈川県川崎市川崎区千鳥町 3 - 3 日油株式会社内
- (72)発明者 神谷 昌樹
神奈川県川崎市川崎区千鳥町 3 - 3 日油株式会社内
- (72)発明者 パスット、ジャンフランコ
イタリア国、3 5 1 2 7 パドヴァ、ピア 2 0 アプリーレ 1 9 4 4、3 2
- 審査官 古妻 泰一
- (56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 9 5 5 0 0 6 0 (C N , A)
中国特許出願公開第 1 0 8 8 1 5 5 2 3 (C N , A)
特開 2 0 1 5 - 1 2 4 1 6 2 (J P , A)
特開 2 0 1 1 - 1 0 5 7 9 2 (J P , A)
特開平 0 6 - 2 0 6 8 3 2 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 8 4 3 7 8 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 6 / 0 8 8 2 4 8 (W O , A 1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
C 0 8 G 6 9 / 4 0
C 0 8 G 6 5 / 3 3 3
A 6 1 K 4 7 / 6 0
A 6 1 K 4 5 / 0 0