

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-528589

(P2008-528589A)

(43) 公表日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	4C084
C07K 1/02 (2006.01)	C07K 1/02	4H045
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	
A61P 25/00 (2006.01)	A61P 25/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2007-553163 (P2007-553163)	(71) 出願人	501079705
(86) (22) 出願日	平成18年1月20日 (2006.1.20)		テバ ファーマシューティカル インダストリーズ リミティド
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月31日 (2007.7.31)		イスラエル国, 49131 ペターーティクバ, ピー. オー. ボックス 3190, バーゼル ストリート 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/002351	(74) 代理人	100058479
(87) 国際公開番号	W02006/083608		弁理士 鈴江 武彦
(87) 国際公開日	平成18年8月10日 (2006.8.10)	(74) 代理人	100091351
(31) 優先権主張番号	60/649,442		弁理士 河野 哲
(32) 優先日	平成17年2月2日 (2005.2.2)	(74) 代理人	100088683
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水素化分解を用いてポリペプチド混合物を作成する方法

(57) 【要約】

本発明は、多発性硬化症の治療において使用される、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成するための改良された方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成する方法であって、

a) チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメート、およびトリフルオロアセチルリジンの N - カルボキシ無水物を、0.01 ~ 20 重量%の量のイニシエーターを用いて、適切な時間、適切な温度で重合して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、保護されたポリペプチドの混合物を形成すること；

b) 保護されたポリペプチドを水素化分解触媒および水素と接触させることにより、保護されたポリペプチドの混合物からベンジル保護基を除去して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を作成すること；

c) トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドを有機ベース溶液と接触させることにより、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドからトリフルオロアセチル保護基を除去して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、ポリペプチドの混合物を形成すること；

d) 遊離のトリフルオロアセチル基および低分子量の不純物を限外濾過により除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を得ること；および

e) 各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を酢酸水溶液と接触させて、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を形成すること

を含む方法。

【請求項 2】

前記第一のピーク分子量が、2,000ダルトン ~ 40,000ダルトンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第一のピーク分子量が、4,700ダルトン ~ 11,000ダルトンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第一のピーク分子量が、12,500ダルトンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記所望のピーク分子量が、2,000ダルトン ~ 40,000ダルトンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記所望のピーク分子量が、4,700ダルトン ~ 11,000ダルトンである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記所望のピーク分子量が、12,500ダルトンである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記水素化分解触媒が、パラジウム/炭素、レーニーニッケル、Pt、Pt/C、PtO₂、Pd(OH)₂、Rh/C、またはRhCl(PPh₃)₃である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記水素化分解触媒が、パラジウム/炭素である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

パラジウム/炭素触媒に対する保護されたポリペプチドの重量比が、10 : 1 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ポリペプチドを水素化分解触媒と接触させる工程が、メタノール、エタノールまたはイ

10

20

30

40

50

ソプロパノールから成る群より選択される溶媒中で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記溶媒がメタノールである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記イニシエーターが、第一級アミン、ジアルキルアミン、またはナトリウムメトキシドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記イニシエーターがジエチルアミンである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記イニシエーターの量が 1 ~ 10 重量%である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記イニシエーターの量が 2 ~ 5 重量%である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記イニシエーターの量が 2 重量%である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記イニシエーターの量が 5 重量%である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

工程 c) における前記有機ベースが、水性有機ベースである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記水性有機ベースが、第一級、第二級もしくは第三級アミン、またはメタノールアンモニア (methanolic ammonia) である、請求項 1 9 に記載の方法。

20

【請求項 2 1】

前記水性有機ベースがピペリジンである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 - 2 1 の何れか 1 項に記載の方法により作成されるポリペプチドの酢酸塩の混合物。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の混合物および薬学的に許容可能なキャリアを含む薬学的組成物。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 に記載の混合物を薬学的に許容可能なキャリアと混合することを含む、薬学的組成物の調製方法。

30

【請求項 2 5】

各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の水性混合物を含有する薬学的組成物の調製方法であって、改良点が、請求項 1 - 2 1 の何れか 1 項に記載の方法によりポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成することを含む方法。

【請求項 2 6】

各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成り、かつ保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を作成する方法であって、

40

a) チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメート、およびトリフルオロアセチルリジンの N - カルボキシ無水物を、0.01 ~ 20 重量%の量のイニシエーターを用いて、適切な時間、適切な温度で重合して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、保護されたポリペプチドの混合物を形成すること；および

b) 保護されたポリペプチドを水素化分解触媒および水素と接触させることにより、保護されたポリペプチドの混合物からベンジル保護基を除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成り、かつ保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を得ること

を含む方法。

50

- 【請求項 27】
前記水素化分解触媒が、パラジウム/炭素、レーニーニッケル、Pt、Pt/C、PtO₂、Pd(OH)₂、Rh/C、またはRhCl(PPh₃)₃である、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記水素化分解触媒が、パラジウム/炭素である、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 29】
パラジウム/炭素触媒に対する保護されたポリペプチドの重量比が、10 : 1 である、請求項 28 に記載の方法。
- 【請求項 30】
ポリペプチドを水素化分解触媒と接触させる工程が、メタノール、エタノールまたはイソプロパノールから成る群より選択される溶媒中で行われる、請求項 26 に記載の方法。 10
- 【請求項 31】
前記溶媒がメタノールである、請求項 30 に記載の方法。
- 【請求項 32】
前記イニシエーターが、第一級アミン、ジアルキルアミン、またはナトリウムメトキシドである、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 33】
前記イニシエーターがジエチルアミンである、請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 34】
前記イニシエーターの量が 1 ~ 10 重量% である、請求項 26 に記載の方法。 20
- 【請求項 35】
前記イニシエーターの量が 2 ~ 5 重量% である、請求項 34 に記載の方法。
- 【請求項 36】
前記イニシエーターの量が 2 重量% である、請求項 35 に記載の方法。
- 【請求項 37】
前記イニシエーターの量が 5 重量% である、請求項 35 に記載の方法。
- 【請求項 38】
前記第一のピーク分子量が、2,000ダルトン ~ 40,000ダルトンである、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 39】
前記第一のピーク分子量が、4,700ダルトン ~ 11,000ダルトンである、請求項 38 に記載の方法。 30
- 【請求項 40】
前記第一のピーク分子量が、12,500ダルトンである、請求項 39 に記載の方法。
- 【請求項 41】
請求項 26 - 40 の何れか 1 項に記載の方法により作成される、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成る、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物。
- 【請求項 42】
各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成する方法であって、 40
- a) 請求項 41 に記載の混合物を有機ベース溶液で処理すること、
- b) 遊離のトリフルオロアセチル基および低分子量の不純物を限外濾過により除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を得ること、および
- c) 前記ポリペプチドの混合物を酢酸水溶液と接触させて、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を形成することを含む方法。
- 【請求項 43】 50

前記有機ベースが水性有機ベースである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記水性有機ベースが、第一級、第二級もしくは第三級アミン、またはメタノールアンモニア (methanolic ammonia) である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記水性有機ベースがピペリジンである、請求項 4 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【序文】

【0001】

本出願を通して、種々の刊行物が、完全な引用により参照される。これら刊行物の全体の開示は、本発明が属する技術の水準をより完全に説明するために、本出願に参照により組み込まれる。

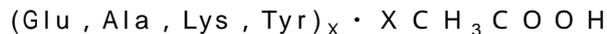
10

【発明の背景】

【0002】

グラチラマーアセテート (GA) は、多発性硬化症の治療のために承認されたポリペプチドの混合物である。COPAXONE (登録商標) は、グラチラマーアセテート (GA) を有効成分として含有する薬学的組成物の商標名であり、4 つの天然存在アミノ酸：L - グルタミン酸、L - アラニン、L - チロシン、および L - リジンを、それぞれ 0.141、0.427、0.095、および 0.338 の平均モル分率で含有する合成ポリペプチドの酢酸塩を含有する。グラチラマーアセテートの平均分子量は、4,700 ~ 11,000 ダルトンである。化学的にグラチラマーアセテートは、L - グルタミン酸と L - アラニン、L - リジンおよび L - チロシンの重合体、アセテート (塩) を意味する。その構造式は、以下のとおりである：

20



CAS - 147245-92-9

(“Copaxone”, Physician’s Desk Reference, (2000), Medical Economics Co., Inc., (Montvale, NJ), 3115)。

【0003】

グラチラマーアセテートを含むこのタイプのポリペプチドの製造方法は、Teitelbaum, et al. の 1974 年 11 月 19 日に発行された米国特許第 3,849,550 号、Konfino, et al. の 1998 年 9 月 1 日に発行された米国特許第 5,800,808 号、および 2000 年 2 月 3 日に公開された PCT 国際公開公報 WO 00/05250 (Aharoni, et al.) に記載され、これらは参照により本明細書に組み込まれる。たとえば、このタイプのポリペプチドは、チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメートおよび α -N-トリフルオロアセチルリジンの N-カルボキシ無水物から調製された。重合は、室温において、無水ジオキササン中で、イニシエーターとしてジエチルアミンを用いて行われた。グルタミン酸の α -カルボキシル基の脱ブロッキング (deblocking) は、氷酢酸中で、臭化水素 (HBr) による作用により行い、その後、1 M ピペリジンにより、リジン残基からトリフルオロアセチル基を除去した (Teitelbaum, et al. の 1974 年 11 月 19 日に発行された米国特許第 3,849,550 号)。

30

【0004】

グルタミン酸の α -カルボキシル基の脱保護には、大量の HBr/酢酸の使用が必要である。その結果、大量の酸性廃棄物がつくられる。この酸性廃棄物の処分は、困難でコストがかかる。酸性廃棄物の問題を解決するために、既存の方法に代わるかかるポリペプチドの作成方法が望まれている。

40

【発明の概要】

【0005】

本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成する方法であって、

a) チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメート、およびトリフルオロアセチルリジンの N-カルボキシ無水物を、0.01 ~ 20 重量% の量のイニシエーターを用いて、適切な

50

時間、適切な温度で重合して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、保護されたポリペプチドの混合物を形成すること；

b) 保護されたポリペプチドを水素化分解触媒および水素と接触させることにより、保護されたポリペプチドの混合物からベンジル保護基を除去して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を作成すること；

c) トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドを有機ベース溶液と接触させることにより、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドからトリフルオロアセチル保護基を除去して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、ポリペプチドの混合物を形成すること；

d) 遊離のトリフルオロアセチル基および低分子量の不純物を限外濾過により除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を得ること；および

e) 各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を酢酸水溶液と接触させて、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を形成すること

を含む方法を提供する。

【0006】

また本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成り、かつ保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を作成する方法であって、

a) チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメート、およびトリフルオロアセチルリジンのN-カルボキシ無水物を、0.01~20重量%の量のイニシエーターを用いて、適切な時間、適切な温度で重合して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、保護されたポリペプチドの混合物を形成すること；および

b) 保護されたポリペプチドを水素化分解触媒および水素と接触させることにより、保護されたポリペプチドの混合物からベンジル保護基を除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成り、かつ保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を得ること

を含む方法を提供する。

【発明の詳細な説明】

【0007】

本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成する方法であって、

a) チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメート、およびトリフルオロアセチルリジンのN-カルボキシ無水物を、0.01~20重量%の量のイニシエーターを用いて、適切な時間、適切な温度で重合して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、保護されたポリペプチドの混合物を形成すること；

b) 保護されたポリペプチドを水素化分解触媒および水素と接触させることにより、保護されたポリペプチドの混合物からベンジル保護基を除去して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を作成すること；

c) トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドを有機ベース溶液と接触させることにより、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドからトリフルオロアセチル保護基を除去して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、ポリペプチドの混合物を形成すること；

d) 遊離のトリフルオロアセチル基および低分子量の不純物を限外濾過により除去して

10

20

30

40

50

、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を得ること；および

e) 各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を酢酸水溶液と接触させて、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を形成すること

を含む方法を提供する。

【0008】

一つの態様において、第一のピーク分子量は、2,000ダルトン～40,000ダルトン、または2,000ダルトン～20,000ダルトン、または4,000ダルトン～8,600ダルトン、または4,000ダルトン～8,000ダルトン、または6,250ダルトン～8,400ダルトン、または2,000ダルトン～13,000ダルトン、または4,700ダルトン～13,000ダルトン、または10,000ダルトン～25,000ダルトン、または15,000ダルトン～25,000ダルトン、または18,000ダルトン～25,000ダルトン、または20,000ダルトン～25,000ダルトン、または4,700ダルトン～11,000ダルトン、または7,000ダルトン、または13,000ダルトン～18,000ダルトン、または15,000ダルトン、または12,500ダルトンであり得る。 10

【0009】

一つの態様において、所望のピーク分子量は、2,000ダルトン～40,000ダルトン、または2,000ダルトン～20,000ダルトン、または4,000ダルトン～8,600ダルトン、または4,000ダルトン～8,000ダルトン、または6,250ダルトン～8,400ダルトン、または2,000ダルトン～13,000ダルトン、または4,700ダルトン～13,000ダルトン、または10,000ダルトン～25,000ダルトン、または15,000ダルトン～25,000ダルトン、または18,000ダルトン～25,000ダルトン、または20,000ダルトン～25,000ダルトン、または4,700ダルトン～11,000ダルトン、または7,000ダルトン、または13,000ダルトン～18,000ダルトン、または15,000ダルトン、または12,500ダルトンであり得る。 20

【0010】

一つの態様において、水素化分解触媒は、パラジウム/炭素、レーニーニッケル、Pt、Pt/C、PtO₂、Pd(OH)₂、Rh/C、またはRhCl(PPh₃)₃であり得る。

【0011】

別の態様において、水素化分解触媒は、パラジウム/炭素であり得る。 30

【0012】

更に別の態様において、パラジウム/炭素触媒に対する保護されたポリペプチドの重量比は、10：1であり得る。

【0013】

一つの態様において、ポリペプチドを水素化分解触媒と接触させる工程は、メタノール、エタノールまたはイソプロパノールから成る群より選択される溶媒中で行われ得る。

【0014】

別の態様において、溶媒はメタノールであり得る。

【0015】

一つの態様において、イニシエーターは、第一級アミン、ジアルキルアミン、またはナトリウムメトキシドであり得る。 40

【0016】

別の態様において、イニシエーターはジエチルアミンであり得る。

【0017】

更に別の態様において、イニシエーターの量は、0.05～19重量%、または0.1～17重量%、または0.5～15重量%、または1～10重量%、または2～5重量%、または2重量%、または5重量%であり得る。

【0018】

一つの態様において、工程c)における有機ベースは、水性有機ベースであり得る。

【0019】

別の態様において、水性有機ベースは、第一級、第二級もしくは第三級アミン、またはメタノールアンモニア (methanolic ammonia) であり得る。

【0020】

更に別の態様において、水性有機ベースはピペリジンであり得る。

【0021】

また本発明は、前述の方法により作成されるポリペプチドの酢酸塩の混合物を提供する。

【0022】

更に本発明は、前述の混合物および薬学的に許容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。

【0023】

更に本発明は、前述の混合物を薬学的に許容可能なキャリアと混合することを含む、薬学的組成物の調製方法を提供する。

【0024】

更に本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の水性混合物を含有する薬学的組成物の調製方法であって、改良点が、前述の方法の何れかによりポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成することを含む方法を提供する。

【0025】

本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成り、かつ保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を作成する方法であって、

a) チロシン、アラニン、 α -ベンジルグルタメート、およびトリフルオロアセチルリジンのN-カルボキシ無水物を、0.01~20重量%の量のイニシエーターを用いて、適切な時間、適切な温度で重合して、保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、保護されたポリペプチドの混合物を形成すること；および

b) 保護されたポリペプチドを水素化分解触媒および水素と接触させることにより、保護されたポリペプチドの混合物からベンジル保護基を除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成り、かつ保護されていない形態のポリペプチドの混合物が第一のピーク分子量を有する、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を得ること

を含む方法を提供する。

【0026】

一つの態様において、水素化分解触媒は、パラジウム/炭素、レーニーニッケル、Pt、Pt/C、PtO₂、Pd(OH)₂、Rh/C、またはRhCl(PPh₃)₃であり得る。

【0027】

別の態様において、水素化分解触媒は、パラジウム/炭素であり得る。

【0028】

更に別の態様において、パラジウム/炭素触媒に対する保護されたポリペプチドの重量比は、10:1であり得る。

【0029】

一つの態様において、ポリペプチドを水素化分解触媒と接触させる工程は、メタノール、エタノールまたはイソプロパノールから成る群より選択される溶媒中で行われ得る。

【0030】

別の態様において、溶媒はメタノールであり得る。

【0031】

更に別の態様において、イニシエーターは、第一級アミン、ジアルキルアミン、またはナトリウムメトキシドであり得る。

【0032】

10

20

30

40

50

一つの態様において、イニシエーターはジエチルアミンであり得る。

【0033】

別の態様において、イニシエーターの量は、0.05～19重量%、または0.1～17重量%、または0.5～15重量%、または1～10重量%、または2～5重量%、または2重量%、または5重量%であり得る。

【0034】

一つの態様において、第一のピーク分子量は、2,000ダルトン～40,000ダルトン、または2,000ダルトン～20,000ダルトン、または4,000ダルトン～8,600ダルトン、4,000ダルトン～8,000ダルトン、または6,250ダルトン～8,400ダルトン、または2,000ダルトン～13,000ダルトン、または4700～13,000ダルトン、または10,000ダルトン～25,000ダルトン、または15,000ダルトン～25,000ダルトン、または18,000ダルトン～25,000ダルトン、または20,000ダルトン～25,000ダルトン、または4,700ダルトン～11,000ダルトン、または7,000ダルトン、または13,000ダルトン～18,000ダルトン、または15,000ダルトン、または12,500ダルトンであり得る。

10

【0035】

また本発明は、直前に記載の方法の何れかにより作成される、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびトリフルオロアセチルリジンから成る、トリフルオロアセチルで保護されたポリペプチドの混合物を提供する。

【0036】

また本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成する方法であって、

20

a) 前述の混合物を有機ベース溶液で処理すること、

b) 遊離のトリフルオロアセチル基および低分子量の不純物を限外濾過により除去して、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの混合物を得ること、および

c) 前記ポリペプチドの混合物を酢酸水溶液と接触させて、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成り、かつ所望のピーク分子量を有するポリペプチドの酢酸塩の混合物を形成すること

を含む方法を提供する。

【0037】

30

前述の方法の一つの態様において、有機ベースは水性有機ベースであり得る。

【0038】

前述の方法の別の態様において、水性有機ベースは、第一級、第二級もしくは第三級アミン、またはメタノールアンモニア(methanolic ammonia)であり得る。

【0039】

前述の方法の更に別の態様において、水性有機ベースはピペリジンであり得る。

【実験の詳細】

【0040】

例 1

ポリ[5-ベンジル-L-Glu, N6-TFA-L-Lys, L-Ala, L-Tyr]の合成

40

7.43 gのL-チロシンN-カルボキシ無水物を、260 mlのジオキササンに添加し、その混合液を60℃で20分間加熱し、その後濾過した。34.61 gのN6-トリフルオロアセチル-L-リジンN-カルボキシ無水物を、630 mlのジオキササンに添加し、その溶液を20～25℃で15分間攪拌し、その後濾過した。21.25 gのL-アラニンN-カルボキシ無水物を、395 mlのジオキササンに添加し、その溶液を20～25℃で15分間攪拌し、その後濾過した。14.83 gの5-ベンジル-L-グルタメートN-カルボキシ無水物を、260 mlのジオキササンに添加し、その溶液を20～25℃で10分間攪拌し、その後濾過した。

【0041】

これら溶液を、機械式スターラーを備えた2Lエルレンマイアースラスコ中で混合した。これら溶液を一緒に5分間攪拌した。その後、反応混合液に3.9 gのジエチルアミンを添加

50

した。その混合液を23 - 27 °Cで24時間撹拌した。

【0042】

その後、反応混合液を5Lの脱イオン水に添加した。固形反応生成物を濾過し、洗浄し、真空下60 °Cにおいて乾燥させた。65.6 gの固形ホワイト - オフホワイト粉末を得た。

【0043】

例2

ポリ[5-ベンジル-L-Glu, N6-TFA-L-Lys, L-Ala, L-Tyr]の脱保護(水素化分解)によるポリ[L-Glu, N6-TFA-L-Lys, L-Ala, L-Tyr]の形成

例1に記載されるとおり合成された18 gの固形生成物を、540 mlのメタノール中に懸濁した。1.8 gのウェットパラジウム炭(10% Pd on charcoal type 87L Powder, Johnson Matthey - Precious Metals Division)を添加した。その混合液にH₂を2 Atm.で7時間バブリングすることにより水素化分解を行った。混合液を濾過した。反応混合液を270 mlに濃縮し、600 mlの水に添加した。その混合液を1時間撹拌し、濾過し、乾燥させて、14 gのホワイト - オフホワイト粉末を得た。

【0044】

例3

トリフルオロアセチル基の除去によるポリ[L-Glu, L-Lys, L-Ala, L-Tyr]の形成

例2で合成された生成物9 gを540 mlの水に添加した。その混合液に60 mlのピペリジンを添加し、混合液を室温で24時間撹拌した。混合液を濾過し、黄色がかった透明な濾液を得た。5キロダルトンメンブレンを用いて限外濾過を行い、低分子量の不純物をすべて除去した。6サイクルの限界濾過を行った後、その溶液をpHが4.0になるまで酢酸で酸性化した。水を添加し、pHが5.5になるまで溶液に限外濾過を行った。その溶液を濃縮し、60時間凍結乾燥させた。4.7 gのポリ[L-Glu, L-Lys, L-Ala, L-Tyr]の白色凍結乾燥ケーキを得た。

【0045】

例4

分子量分析

例3の生成物の分子量を、UV検出器を備えたSuperose 12 HR Gel Permeation HPLCカラムを用いて決定した。リン酸緩衝液、pH 1.5を移動相として使用した。

【0046】

カラムの全保持時間を、1 mlの水で希釈した200 µlのアセトンを用いて決定した。カラムは、2003年2月4日に発行された米国特許第6,514,938号(Gad, et al.) (具体的には例2を参照) (これは参照により本明細書に組み込まれる)に記載されたミレニアム計算を利用して、TV分子量マーカーを用いてキャリブレーションを行った。

【0047】

キャリブレーション後、例3の生成物の5 mg/ml溶液を調製した。ピーク最大保持時間を測定し、ピーク分子量を12,700ダルトンと決定した。

【0048】

例5

加水分解およびアミノ酸含量の決定

例3で得たポリペプチド10 mgをアルギニン内部コントロール溶液に添加して、サンプル溶液を調製した。このサンプル溶液を、1% (w/v) フェノールを含有する濃HClを用いて、N₂雰囲気下において110 °Cで24時間加水分解した。グルタメート、アラニン、チロシン、およびリジンHClの一つをそれぞれが含有するアミノ酸コントロール溶液を調製し、加水分解を行った。サンプル溶液およびコントロール溶液を、オルト - フタルジアルデヒドを用いて誘導体化した。

【0049】

サンプルおよびコントロールを、UV検出器を備えたMerck LiChrosorb RP18 7 µmカラムを用いて分析した。移動相は、リン酸緩衝液pH 2.5/アセトニトリル勾配とした。ポリペプチドサンプル中のアミノ酸のモル分率を、ピーク面積に基いて決定した。

10

20

30

40

50

【表 1】

アミノ酸	モル分率
グルタミン酸	0.138
アラニン	0.42
チロシン	0.099
リジン	0.343

10

【0050】

例 6

酢酸塩の形成

例 1 - 3 の何れか一の生成物を酢酸水溶液と接触させ、ポリペプチド酢酸塩を形成した。

【考察】

【0051】

開示される発明の発明者らは、水素化分解が、保護されたポリペプチドのグルタメート残基からベンジル基を除去するのに有効であることを見出した。具体的には、本発明の発明者らは、パラジウム/炭素触媒を用いた水素化分解の利用が、グルタメート残基からベンジル基を除去し、リジン残基がトリフルオロアセチル基で保護されたトリフルオロアセチルポリペプチドを形成するのに有効であることを見出した。たとえばパラジウム/炭素などの触媒は、回収し再利用することにより、廃棄物を削減することができる。トリフルオロアセチル基は、その後、ピペリジンによりリジン残基から除去した。

20

【0052】

また、グルタメート残基からベンジル基を除去するのに、他の水素化分解触媒を使用してもよい。かかる公知の水素化分解触媒は、レーニーニッケル、Pt、Pt/C、PtO₂、Pd(OH)₂、Rh/C、RhCl(PPh₃)₃、および他の遷移金属触媒である。水素化分解反応は、20 ~ 100 の温度および 1 atm ~ 100 atm の圧力下で行うことができる。

30

【0053】

しかし、HBr/酢酸の代わりに水素化分解を利用してベンジル基を除去することは、更なる問題を引き起こした。HBr/酢酸を使用する場合、これは、グルタメート残基からのベンジル基の除去と、所望の平均分子量の混合物を得るためのポリペプチドの切断の二つの機能を果たす。しかし、水素化分解は、ポリペプチドを切断しない。このため、開示される方法の発明者らは、更に製造方法を改変して、特定量の重合反応のイニシエーターを用いることにより所望のピーク分子量を達成した。

【0054】

使用可能なイニシエーターは、n - ヘキシルアミンおよび他の第一級アミン、ジエチルアミンおよび他のジアルキルアミン、またはナトリウムメトキシド、またはイニシエーターの任意の組合せである。1998年9月1日に発行された米国特許第5,800,808号 (Konfino, et al.) は、室温で24時間行われる方法においてイニシエーターとして0.1 - 0.2%ジエチルアミンを使用して、更にHBrも利用して、5000 - 9000ダルトンの範囲の分子量を有するポリペプチドを得ることを開示する。一方、出願人は、この実施例で、23 ~ 27 で24時間行われる方法において、7.43 gのL-チロシンN-カルボキシ無水物、34.61 gのN6-トリフルオロアセチル-L-リジンN-カルボキシ無水物、21.25 gのL-アラニンN-カルボキシ無水物、および14.83 gの5-ベンジル-L-グルタメートN-カルボキシ無水物とともに、イニシエーターとして3.9 gのジエチルアミンを使用して、12,700ダルトンの平均分子量を有するポリペプチドの混合物を得た。また、ポリペプチドの混合物のピーク分子量は、処理温度および反応時間によっても影響を受ける。

40

50

【 0 0 5 5 】

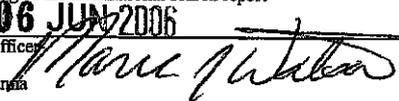
本発明の任意の態様において、ポリペプチドの混合物のピーク分子量の決定は、ポリペプチドの重合反応後、ただしベンジル保護基またはトリフルオロアセチル保護基の何れかを除去する前に行うことができる。あるいは、本発明の任意の態様において、ポリペプチドの混合物のピーク分子量は、ベンジル保護基の除去後であるが、トリフルオロアセチル保護基の除去前に決定することができる。本発明の任意の態様において、更に別の選択肢として、両方の保護基をポリペプチドから除去した後、ポリペプチドの混合物のピーク分子量を決定する。ポリペプチドの混合物のピーク分子量の調整は、公知の技術により、たとえばクロマトグラフィー分画、濾過、限外濾過、透析、酵素的加水分解、または沈降により、当該方法の上記ステップで同様に行うことができる。

10

【 0 0 5 6 】

本発明は、各々がグルタミン酸、アラニン、チロシンおよびリジンから成るポリペプチドの酢酸塩の混合物を作成する方法であって、水性廃棄物の産生が低減され、かつポリペプチドの酢酸塩の混合物のピーク分子量のコントロールが改良された方法を提供する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/02351
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 31/74(2006.01) USPC: 424/78.08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/78.08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (Copaxone), USPAT, US-PGPUB, DERWENT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/043995 A2 (Brantford Chemicals Inc.) 13 November 2003 (13.11.2003), the whole document, in particular page 4, lines 17-30	1-45
Y	US 6,048,898 (Konfino et al) 11 April 2000 (11.04.2000), the whole document, in particular, Example 3	1-45
Y	US 3,849,550 (Teitelbaum et al) 19 November, 1974 (19.11.1974), column 2, lines 53-64	1-45
Y	Itoh M. Selective Protection of alpha or Side-chain Carboxyl Groups of Aspartic and Glutamic Acid. A Facile Synthesis of beta-Aspartyl and gamma-Glutamyl Peptides 1969, Vol 17. No. 8, pages 1679-1686, especially page 1682.	1-21, 26-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 02 May 2006 (02.05.2006)		Date of mailing of the international search report 06 JUN 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  Hemant Khanna Telephone No. (571) 272-9045

フロントページの続き

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

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 ドリツキー、ベン - ジオン

イスラエル国、4 9 6 5 1 ペタク - テイクバ、ロハメ・ハゲット 3 2

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 BA01 BA44 MA02 ZA02

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 EA20 FA10