

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2718809号

(45) 発行日 平成10年(1998) 2月25日

(24) 登録日 平成9年(1997)11月14日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|--------|----------------|------------------------|
| C 0 7 K 14/00 | | | C 0 7 K 14/00 | |
| A 6 1 K 38/44 | | | A 6 1 K 39/395 | |
| | | | C 0 7 K 1/113 | |
| C 0 7 K 1/113 | | | 16/00 | |
| | | | C 1 2 N 9/00 | |
| | | | | 請求項の数 9 (全 7 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平2-176297

(22) 出願日 平成2年(1990) 7月5日

(65) 公開番号 特開平3-163100

(43) 公開日 平成3年(1991) 7月15日

(31) 優先権主張番号 特願平1-174371

(32) 優先日 平1(1989) 7月6日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(73) 特許権者 999999999
株式会社サム研究所
東京都千代田区永田町1丁目11番28号

(72) 発明者 水島 裕
東京都世田谷区代田4-25-20

(72) 発明者 五十嵐 理慧
神奈川県川崎市多摩区南生田3-3-12

(72) 発明者 武永 美津子
神奈川県川崎市宮前区菅生2-30-1

(72) 発明者 宮尾 興平
東京都文京区向丘1-20-6-1402

(72) 発明者 猪股 俊秀
埼玉県大宮市北袋町2-295-5

(74) 代理人 弁理士 内田 明 (外2名)

審査官 関 千弥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾生物活性蛋白

1

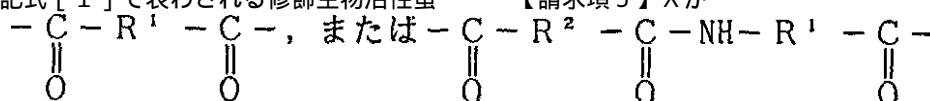
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 化学的橋かけを経てリゾレシチンの水酸基部分に結合した修飾生物活性蛋白。

【請求項2】 生物活性蛋白が抗体である、請求項1記載の修飾生物活性蛋白。

【請求項3】 生物活性蛋白がスーパーオキシドディスムターゼである、請求項1記載の修飾生物活性蛋白。

【請求項4】 下記式 [I] で表わされる修飾生物活性蛋白*



(ただし、R¹, R² はいずれもアルキレン基) である、請求項4記載の修飾生物活性蛋白。

【請求項6】 生物活性蛋白が抗体である、請求項4記載の修飾生物活性蛋白。

2

* 白。

A (X - B)_k ... [I]

A: 生物活性蛋白の残基

B: グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基

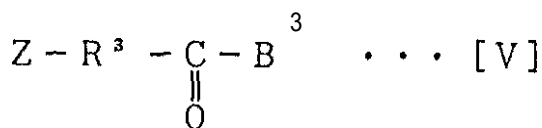
X: 化学的橋かけ

k: 1以上の結合数

【請求項5】 Xが

【請求項7】 生物活性蛋白がスーパーオキシドディスムターゼである、請求項4記載の修飾生物活性蛋白。

【請求項8】 下記式 [V] で表わされるレシチン誘導体。



B:グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基。

R³:ヘテロ原子あるいはカルボニル基を中間に有するアルキレン基。

Z:カルボキシル基、保護されたカルボキシル基、あるいはエステル活性化基が結合したカルボニル基。

【請求項9】請求項1~7のいずれか1項記載の修飾生物活性蛋白を有効成分とする医薬。 10

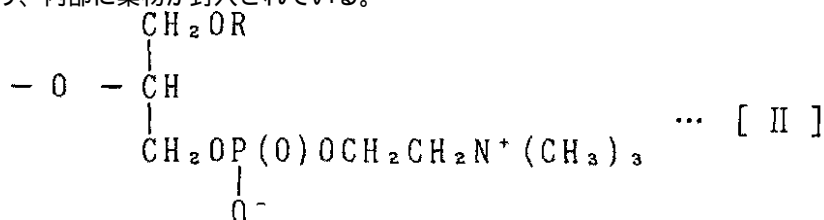
【発明の詳細な説明】

[産業上の利用分野]

本発明は、修飾生物活性蛋白に関する。

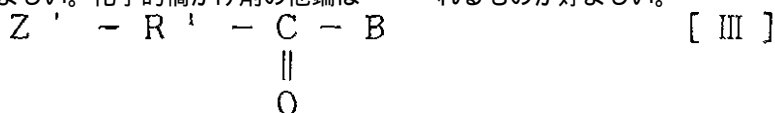
[従来の技術]

薬物の効果を高め、副作用を減らす試みは、古くから行なわれてきているが、最近採用されてきているものの一つとして、ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)がある。DDSとは、薬物を必要とする部位へ、なるべく選択的に、必要な時間の間移行させ、それにより薬物の効果を高め全身的な副作用を大幅に減少させる試みである。DDSに用いられるキャリアーとして種々のものがあるが、そのなかでリポソームとリピッドマイクロスフェアがある。リポソームは、天然に存在する脂質例えばレシチン、コレステロールなどを有機溶媒に溶解し、超音波処理などにより水に拡散し、これに薬物を封入したものである。一方、リピッドマイクロスフェアは、大豆油をレシチンとともに水に懸濁したものであり、レシチンがその表面にあり、内部に薬物が封入されている。*



上記式[II]において、Rは脂肪酸残基(アシル基)であり、特に炭素数8~30の飽和~不飽和の脂肪酸残基が好ましい。特に好ましくはミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基などの炭素数14~22の飽和脂肪酸残基である。最も好ましくは代表的レシチンのアシル基であるパルミトイル基である。式[I]におけるXは下記のような化学的橋かけ反応が行なわれた後のAとBを連結する有機基からなる化学的橋かけである。

化学的橋かけ剤は上記リゾレシチン残基にエステル結合で結合することが好ましい。化学的橋かけ剤の他端は



上記式[III]においてR¹は炭素数1~24の直鎖状あ

*両者とも、薬物は主として物理的な結合により内部に封入されている。リポソームは、安定性が悪く、又リピッドマイクロスフェアは、封入する薬物が脂溶性でなければならず、その上特殊な製造装置を使用する必要がある。

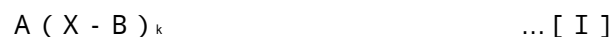
[発明の概要]

本発明者は、これら従来のものとは全く異なりしかも優れた効果を挙げることのできるやり方について検討した結果、本発明を見いだした。

このレシチン結合修飾生物活性蛋白は、生物体内分布、細胞親和性が著しく異なり、従って生物活性蛋白の薬理活性の強化、副作用の低下、吸収促進が期待できる。

即ち、本発明は化学的橋かけを経てリゾレシチンの水酸基部分に結合した修飾生物活性蛋白に関する。

本発明の修飾生物活性蛋白はリゾレシチンの残基(Bで表わす)に化学的橋かけ剤を結合させたレシチン誘導体を生物活性蛋白に1個以上結合して得られる。この修飾生物活性蛋白は下記式[I]で表わされる。Bは下記式[II]で表わされるグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基である。



A:生物活性蛋白の残基

B:グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基

X:化学的橋かけ

k:1以上の結合数

生物活性蛋白のアミノ基、アミド基あるいはカルボキシル基などの官能基に直接結合する官能基を有する。または第2の化学的橋かけ剤(一方は生物活性蛋白の官能基に結合し他方は第1の化学的橋かけ剤の官能基を有する少なくとも2個の官能基を有する化合物)に結合しうる官能基を有する。この第1の化学的橋かけ剤は官能基としてカルボキシル基(-COOH)あるいはアミノ基(-NH₂)を有することが好ましい。この第1の化学的橋かけ剤が結合したレシチン誘導体は下記式[III]で表わされるものが好ましい。

50 るいは分岐状アルキレン基であり、特に炭素数2~10の

合させる方法である。活性エステルとしては、たとえば、P - ニトロフェニルエステル、1,3,5 - トリクロロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、2,4 - ジニトロフェニルエステル、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、N - ヒドロキシピペリジンエステル、N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2,3 - ジカルボン酸イミドエステル、8 - ヒドロキシキノリンエステル、2 - ヒドロキシピリジンエステルなどがある。

本発明で用いられる生物活性蛋白は、生物活性を有する蛋白であれば、どんなものでもよい。例えば、抗体（モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体）、ペプチド性細胞成長因子（例えばNGF、EGF、FGF、CSF、EPO、インターロイキン1～4、CDF、ECGF、EGF）、インスリン、シクロスポリン、成長ホルモン、インターフェロン又はインターフェロン誘導物質、リウマトイド因子、生物活性を有する酵素（例えばウロキナーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カルジノゲナーゼ、ストレプトキナーゼ、エラスターゼ）、蛋白を置換基に有する薬物又はその他の蛋白製剤（例えば各種肝炎ワクチン）を含む。本発明の修飾生物活性蛋白は、従来のものに比べて製造が容易で、しかも生物活性蛋白の溶解性に関係なく修飾が可能である。

又、本発明の成分の一つであるレシチンは、天然に広く存在する毒性のない物質であるので、本発明の物質は毒性の点からも安全である。

[実施例]

実施例 1

2 - (6 - アミノカプロイル) リゾレシチン（式 [II I] においてR¹ はペンタメチレン基であり、Z は -NH₂、BのRはパルミトイル基）（0.0045g、0.006mmol）の水溶液（100 μl）に、氷冷下DMF（0.2ml）に溶解した塩化シアヌル（61mg）を4.2 μl 加え、pHを炭酸ナトリウムによりpH6.5～7.0とし1時間攪拌した。これにIgG（1mg、ホスフェート緩衝液中、332 μl）を加えpH7.0に保ち、室温で一晩攪拌して、IgG - レシチンを得た。

実施例 2

実施例 1 で用いた 2 - (6 - アミノカプロイル) リゾレシチンの水溶液（100 μl、0.006mmol）にIgG（1mg、ホスフェート緩衝液中、332 μl）を加え、さらにEDC（1.3mg）と砂糖（2mg）とを加え、2時間25℃でインキュベーションした後、中性で一晩放置した。次に、PBSで4回透析して、IgG - レシチンを得た。

実施例 3（生物活性試験）

(I) 本発明物質の細胞親和性を以下の方法で調べた。

ヒトの抹消血液（25ml）からFicoll Paqueを用いて赤血球とリンパ球とに分取し、RPMI1640（10% FCS添加）に懸濁した。それぞれに [¹²⁵I] IgG - レシチン（IgGとして10 μg）を添加、37℃で3時間インキュベートし、生理食塩水により4回洗浄し、細胞内に取り込まれてい

るか又は結合しているIgGの量をカウントした。

同様に、[¹²⁵I] IgG単独並びにレシチンと [¹²⁵I] IgGとを単に混合したものをを用いて実験を行なった。

(A) 実施例で得られたIgG - レシチンのリンパ球親和性は、次の通りである。この場合、同量のIgGを含むリビッドマイクロスフェアについても実験を行なった。

| 材料 | 取込量 (%) |
|-------------|---------|
| 実施例 1 の生成物 | 0.84 |
| 実施例 2 の生成物 | 0.91 |
| 遊離のIgG | 0.43 |
| レシチン + IgG | 0.32 |
| IgGマイクロスフェア | 0.69 |

(B) 実施例で得られたIgG - レシチンの赤血球親和性は、次の通りである。

| 材料 | 取込量 (%) |
|------------|---------|
| 実施例 1 の生成物 | 2.1 |
| 実施例 2 の生成物 | 2.2 |
| 遊離のIgG | 1.68 |
| レシチン + IgG | 1.0 |

20 上記の結果から分かるように、本発明の物質は、遊離の生物活性蛋白又はそれとレシチンとの単なる混合物に比べて細胞親和性に優れている。

(II) 本発明物質の動脈病変部への移行について、以下の方法により調べた。

SHR - SPラット（16週令、雄、ウイスター種）に、IgGとして100 μg/匹の量で [¹²⁵I] IgG - レシチン（溶媒:PBS）を静脈内に投与した。3時間後、脱血し、大動脈を摘出し、動脈部に取り込まれた [¹²⁵I] IgGの量をカウントした。

30 一方、正常なラット及び遊離の [¹²⁵I] IgGを用いて同様な実験を行なった。

結果は、次の通りである

| IgG - レシチン | |
|------------|---------|
| ラットの種類 | 取込量 (%) |
| SHR | 0.56 |
| 正常 | 0.29 |

| IgG | |
|--------|---------|
| ラットの種類 | 取込量 (%) |
| SHR | 0.24 |
| 正常 | 0.32 |

40 上記の結果から分かるように、本発明の物質は動脈病変部へ多量に取り込まれ、そのため優れた薬理効果を発揮することが分かる。

(III) 本発明物質の癌細胞への親和性について調べた。

MM46癌細胞をRPMI 1640（10% FCS添加）に2 × 10⁶ 個/mlになるように浮遊させ、これにIgGとして10 μg/mlとなるように [¹²⁵I] IgG - レシチンを加え、37℃で3時間インキュベートし、次に生理食塩水により洗浄し、MM46癌細胞に取り込まれた又は結合されたIgGの量をカウ

ントした。

別に、 $[^{125}\text{I}]$ IgG単独を使用して、同様な実験を行なった。

| 材料 | 取込量 (%) |
|------------|---------|
| IgG - レシチン | 7.5 |
| IgG | 1.0 |

上記の結果から分かるように、本発明の物質は、癌細胞に極めて多量に取り込まれることが分かる。

(IV) 次に、本発明の物質の体内分布について調べた。

C3Hマウス(雄、20~25g)を用い、IgG50 μg /匹となるように $[^{125}\text{I}]$ IgG - レシチン(溶媒:PBS)を静脈内投与し、3時間後に殺し、体内各臓器の分布を調べた。

一方、 $[^{125}\text{I}]$ IgG単独、 $[^{125}\text{I}]$ IgGとレシチンとの単なる混合物又は $[^{125}\text{I}]$ IgGリビッドマイクロスフェアを用いて、同様な実験を行なった。

結果を次に示す。

| 材料 | 取込量 (%) | | | | |
|-------------|---------|-----|-----|-----|-----|
| | 肺 | 心臓 | 腎臓 | 肝臓 | 脾臓 |
| IgG-レシチン | 2.2 | 1.8 | 1.4 | 8.3 | 2.8 |
| IgG | 1.1 | 1.7 | 0.5 | 0.6 | 0.8 |
| IgG+レシチン | 0.6 | 1.1 | 0.4 | 0.8 | 0.2 |
| IgGマイクロスフェア | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 0.9 | 0.4 |

上記の結果から分かるように、本発明の物質は、各臓器への取込に優れていることが分かる。特に、肝臓への取込に極めて優れているといえることができる。

これら実験の結果からいえることは、前述したように、本発明の物質は、生物体内分布、細胞親和性が著しく異なり、従って生物活性蛋白の薬理活性の強化、副作用の低下、吸収促進が期待できる。

又、(I)~(IV)の結果に示されるように、本発明の物質が、遊離の生物活性蛋白又はそれとレシチンとの単なる混合物に比べて優れた異なる物性を示すことから、レシチンと生物活性蛋白とが共有結合していることは明らかである。

実施例 4

2 - (4 - ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの合成レシチン導入法

グリセロールの2位が水酸基であるリゾレシリン(BのRはパルミトイル基、以下同様)204mg(0.4mmol)のクロロホルム - ピリジン(8ml/2ml)懸濁液に、DMAP(N,N - ジメチルアミノピリジン)98mg(0.8mmol)、無水グルタル酸91mg(0.8ml)を加え、60 で15時間撹拌した。反応液を冷却し、減圧濃縮した。濃縮残渣にクロロホルム:メタノール:水 - 4:5:1(2ml)を加えて溶解し同液に浸したイオン交換カラム(Dowex 50W - X8)に通した。減圧濃縮した後、残渣をシリゲルカラムにより精製した。225mg(0.36mmol,90%)。

$^1\text{H} - \text{NMR}$ (CDCl₃) 0.84 (t,3H), 1.20 (brs), 1.52 - 1.60 (brs,2H), 1.80 - 1.95 (m,2H), 2.20 - 2.42 (m,6H),

3.35 (s,9H), 3.78 (m,4H), 3.90 - 4.35 (m,4H), 5.20 (s,1H) .

実施例 5

2 - (4 - ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

実施例 4 で得られたカルボン酸225mg(0.36mmol)をDMF(N,N - ジメチルホルムアミド)5mlに溶解させ、0 に冷却し、N - ヒドロキシルスクシンイミド41mg(0.36mmol)、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)74mg(0.36mmol)を加えた。トリエチルアミンでpH6~7に調製し、室温で15時間撹拌した。不溶物をセライトで濾過して、活性エステル体のDMF溶液を得た。

実施例 6

2 - (4 - ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの活性エステル体の合成

実施例 4 で得られたカルボン酸225mg(0.36mmol)をジクロロメタン5mlに溶解させ、0 に冷却し、N - ヒドロキシルスクシンイミド41mg(0.36mmol)、DCC74mg(0.36mmol)を加えた。トリエチルアミンでpH6~7に調製し、室温で15時間撹拌した。不溶物をセライトで濾過し、活性エステル体のジクロロメタン溶液を得た。

実施例 7

2 - [N - (2 - ヒドロキシカルボニルプロピオニロキシ) - 6 - アミノカプロイル] リゾレシチンの合成

実施例 1 で用いたものと同じ2 - (6 - アミノカプロイル) リゾレシチン234mg(0.32mmol)のクロロホルム - ピリジン(8ml/2ml)懸濁液に、DMAP177mg(0.96mmol)無水コハク酸96mg(0.96mmol)を加え、60 で15時間撹拌した。反応液を冷却し、減圧した後濃縮した。濃縮残渣にクロロホルム:メタノール:水 = 4:5:1(2ml)を加えて溶解し、同液に浸したイオン交換カラム(Dowex 50W - X8)に通した。減圧下濃縮した後、残渣をシリゲルカラムにより精製した。134mg(0.19mmol,58%)。 $^1\text{H} - \text{NMR}$ (CDCl₃) 0.87 (t,3H), 1.20 (brs), 1.45 - 1.60 (m,8H), 2.30 (t,4H), 2.40 - 2.60 (brs,4H), 3.10 (brs,2H), 3.24 (s,9H), 3.67 (brs,2H), 3.93 (m,2H), 4.05 - 4.20 (m,4H) 5.20 (m,2H) .

実施例 8

2 - [N - (3 - ヒドロキシカルボニルプロピオニロキシ) - 6 - アミノカプロイル] リゾレシチンの活性エステル体の合成

実施例 7 で得られたカルボン酸134mg(0.19mmol)をジクロロメタン5mlに溶解させ0 に冷却し、N - ヒドロキシルスクシンイミド22mg(0.19mmol)、DCC39mg(0.19mmol)を加えた。トリエチルアミンでpH6~7に調製し、室温で15時間撹拌した。不溶物をセライトで濾過し、活性エステル体のジクロロメタン溶液を得た。

実施例 9 (レシチン化)

活性エステルレシチンの溶媒を留去し0.1M Borate bufferに溶解したSODを添加し、0 1時間、さらに室温

で2時間反応させ、蒸留水に対し透析した。この溶液をそのまま以後の測定に用いた。

下記表①はSODとして牛SODを用いた試験の結果を示すものであり、下記表②はSODとしてヒトSODを用いた試験の結果を示すものである。表中の「反応に用いたレシチンの量」はSOD中のアミノ基1モル当量に対する活性エステルレシチンのモル当量を表わす。「TNBS法による導入数」とはSOD1モルあたり平均の導入されたレシチンの数(モルで表わす)を表わす。「残存活性」とはレシチン導入前のSODの活性を100%とした場合のレシチン導入SODの相対活性を表わす。

なお、SODおよびレシチン導入SODの活性は、xanthine oxidase存在下にxanthineが酸化された場合に発生するスーパーオキシドアニオンをSODが消失させる活性を測定することによって測定した。

SODに対するレシチン導入数と残存活性

① Bovine SODの場合 in vitro

| | 反応に用いたレシチン量 | TNBS法による導入数 | 残存活性 |
|----------|-------------|-------------|------|
| 実施例5の化合物 | ×1.2倍mol | 10.4個 | 69% |
| | ×1.2 | 7.5 | 73 |
| | ×1.2 | 7.3 | 82 |
| | ×2.4 | 14 | 56 |
| | ×2.4 | 11 | 76 |
| | ×4.8 | 14 | 56 |
| | ×4.8 | 14 | 54 |
| 実施例8の化合物 | ×1.2 | 5 | 88 |
| | ×1.2 | 3 | 101 |
| | ×1.2 | 6 | 103 |
| | ×2.4 | 7 | 75 |

SODに対するレシチン導入数と残存活性

② ヒト SODの場合 in vitro

| | 反応に用いたレシチン量 | TNBS法による導入数 | 残存活性 |
|----------|-------------|-------------|------|
| 実施例5の化合物 | ×1.2倍mol | 5.7個 | 83% |
| | ×1.2 | 6.2 | 66 |
| | ×2.4 | 8.3 | 74 |
| | ×2.4 | 5.3 | 74 |

*

| | 反応に用いたレシチン量 | TNBS法による導入数 | 残存活性 |
|----------|-------------|-------------|------|
| | ×2.4 | 12.7 | 65 |
| | ×4.8 | 14 | 39 |
| 実施例8の化合物 | ×1.2 | 3 | 108 |
| | ×1.2 | 3 | 78 |
| | ×2.4 | 4.5 | 73 |
| | ×4.8 | 4.0 | 61 |

実施例10

火傷マウスに対する効果

C₃Hマウスの背中を脱毛した後、電気ゴテを400 に加熱し、10秒間押し当て、火傷マウスを作製した。

火傷直前と30分後レシチン化SODを10 μm/kg静脈投与し、無投与群とレシチン化SOD投与群とで治癒の程度を比較した。

治癒の程度は、①傷口が乾燥している

②かさぶたが出来ている

③火傷のあとの面積が小さくなっている

④回りに毛が殖えはじめた

の条件のうち1つを満たすごとに+を加えた。

[結果]

| | 処理時 | 3時間後 | 1日後 | 4日後 | 7日後 |
|-------------|-----|------|-----|-----|------|
| 無投与群 | - | - | + | + | + |
| レシチン化SOD投与群 | - | + | ++ | +++ | ++++ |

30 以上レシチン化SOD投与群の方が無投与群に比べ有意に治癒が早かった。

40

*

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
C 1 2 N 9/00
9/02

識別記号 庁内整理番号

F I
C 1 2 N 9/02
A 6 1 K 37/50

技術表示箇所

(72)発明者 西村 千夫
東京都杉並区阿佐谷南 1 9 17

(56)参考文献 特開 昭64 - 79660 (J P , A)
特開 昭62 - 42927 (J P , A)
特開 昭62 - 94 (J P , A)
国際公開87 / 5904 (W O , A 1)