

明 細 書

発明の名称：

糖鎖付加ポリペプチドおよび当該ポリペプチドを含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖付加ポリペプチドおよび当該ポリペプチドを含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 天然のヒトインターフェロン β （IFN- β ）は、166個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質である。インターフェロン β は、サイトカインファミリーに属し、免疫調整作用、抗ウイルス活性、細胞増殖抑制作用に関与することが知られている。また、ヒトインターフェロン β は、そのアミノ酸配列における17位、31位、141位に3つのCysを有しており、80位のアスパラギンに1本の複合型のN結合型オリゴ糖を有している。また、31位と141位のCysにおいてジスルフィド結合を有していることが知られている。薬剤としてのインターフェロン β は、細胞発現系を利用し製造されており、発現させる宿主の違いによりIFN- β -1aまたはIFN- β -1bに分類される。IFN- β -1aは糖タンパク質であるが、一方、IFN- β -1bはオリゴ糖を有さない。そして、糖鎖を有するIFN- β -1aは、IFN- β -1bと比べて、免疫原性、抗ウイルス活性、および、抗腫瘍特性においてより強力な効能を有していることが知られている。

[0003] ここで、糖タンパク質中に含まれる糖鎖構造は、薬物動態に対して強い影響力を有することが知られている。特に、糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸の有無が、血中半減期の延長に影響を有することが知られている。しかしながら、これまでに生合成されたIFN- β -1aは、そのポリペプチド中に有する糖鎖の構造が不均一であることが報告されている（例えば、CE-TOF-MSにより糖鎖構造の不均一性を分析した結果が、非特許文献1に記載されている）。また、合成されたIFN- β や天然に存在するIFN

－ β から、糖鎖の構造が実質的に均一であるIFN－ β を単離したことについては報告されていない。よって、どの糖鎖構造が生理活性に重要であるかを推定する障害となっていた。

[0004] 近年、細胞発現系を利用するバイオテクノロジーは、インターフェロンを含め、インシュリン、エリスロポイエチン、G-CSFのような生理活性タンパク質製剤の製造を可能としてきた。これらのタンパク質製剤において、タンパク質の糖化パターンは、フォールディング工程や、コンフォメーション特性、安定性、免疫反応、血中半減期、および、生体系におけるタンパク質の機能のようなタンパク質の物理特性や化学特性に変化を与えることが報告されている（非特許文献2）。また、これらのタンパク質製剤に付加される糖鎖の構造は、非ヒト型の糖鎖によって生じる重大な免疫原性を考慮すると、ヒト型の糖鎖であることが好ましい。

このような糖タンパク質製剤は、その唯一の方法として、細胞発現系により製造されてきた。しかしながら、このような細胞発現系の技術は、上述のように、糖鎖の構造までを制御することができず、この結果、製造される糖タンパク質中の糖鎖の構造に不均一性を生じていた（例えば、非特許文献3）。このため、製造ロット間の品質のばらつきや、糖鎖の最適化ができない等の問題点を有していた。よって、糖鎖構造を容易に調整可能である均一の糖タンパク質の調製方法が長い間望まれており、現在のところ、化学合成により生体内で生理活性を示すヒト型の均一な糖タンパク質の合成は報告されていない。

[0005] また、このような細胞発現系による技術によって製造される生理活性糖タンパク質はウイルスや遺伝物質を含む可能性がある。また、生体由来の試料から調製した糖鎖を使用して生理活性糖タンパク質を合成する場合にも、このような遺伝物質等の混入の可能性がある。安全なタンパク質製剤を製造するためには、これらの遺伝物質を崩壊させることのできる加熱処理法の適用が望まれている。しかしながら、現在のところ、生理活性糖タンパク質製剤に対する加熱処理は、糖タンパク質を失活させてしまい、加熱処理法の適用は

報告されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Anal Bioanal Chem (2011) 40

O: 295-303

非特許文献2: Nat. Biotechnol., 2006, 24,

1241-1252

非特許文献3: J. Biotechnol., 42, 117-131 (

1995)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、均一な糖鎖構造を有する糖鎖付加ポリペプチドであって、インターフェロン β 活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、均一な糖鎖構造を有する糖鎖付加ポリペプチドであって、インターフェロン β の活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを、製造することに成功した。

即ち、本発明は、

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて

て、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；

ド；

(c) インターフェロン β の類縁体；および

(d) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対し

て、80%以上の相同性を有するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β にお

ける80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有し、かつ、インターフェロン β 活性を有する糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドが、実質的に均一な糖鎖を有することを特徴とする糖鎖付加ポリペプチドに関する。

ここで、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが化学合成により作製されたものであることを特徴とする。

[0009] また、本発明の別の態様は、糖鎖付加ペプチドフラグメントと、少なくとも2つのペプチドフラグメントとを合成する工程と、前記糖鎖付加ペプチドフラグメントと前記少なくとも2つのペプチドフラグメントとを連結させる工程を含む方法により得られる糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、

- (a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；
- (c) インターフェロン β の類縁体；および
- (d) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β における80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有し、かつ、インターフェロン β 活性を有することを特徴とする

糖鎖付加ポリペプチドに関する。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様において、糖鎖付加ポリペプチドは、糖鎖付加ペプチドフラグメントと、少なくとも2つのペプチドフラグメントとを合成する工程と、前記糖鎖付加ペプチドフラグメントと前記少なくとも2つのペプチドフラグメントとを連結させる工程を含む方法により得られた糖鎖付加ポリペプチドであって、

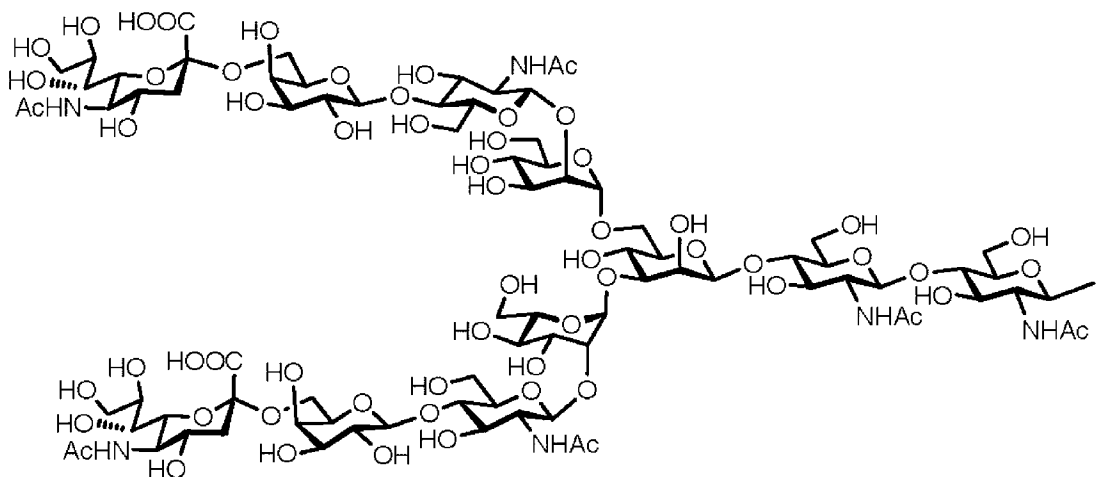
前記糖鎖付加ポリペプチドは、

- (a) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
 - (b) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；
 - (c) インターフェロン β の類縁体；および
 - (d) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有する糖鎖付加ポリペプチド；
- からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β における 80 位に相当するアミノ酸に糖鎖を有し、かつ、インターフェロン β 活性を有することを特徴とする糖鎖付加ポリペプチドに関する。

ここで、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖が、アスパラギン結合型糖鎖であることを特徴とする。

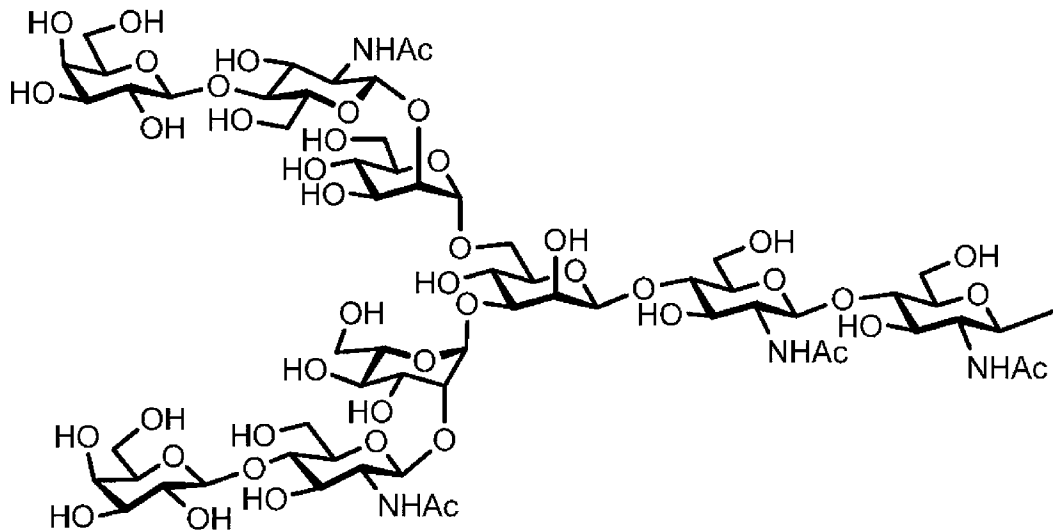
また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖が、下記式 (a) で表わされるジシアロ糖鎖、または、下記式 (b) で表わされるアシアロ糖鎖であることを特徴とする。

[化1]



(a)

[化2]



(b)

[0010] また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドがインターフェロン β の31位および141位に相当するCysが、ジスルフィド結合を形成していることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが加熱処理されていることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが90%以上の純度を有することを特徴とする。

[0011] また、本発明の別の態様は、前記糖鎖付加ポリペプチドを含む組成物であって、前記組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが実質的に均一であることを特徴とする組成物に関する。

ここで、本発明の組成物の一実施態様においては、前記組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが90%以上均一であることを特徴とする。

また、本発明の組成物の一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが、90%以上の純度を有することを特徴とする。

[0012] また、本発明の組成物は、糖鎖付加ポリペプチドを含む組成物であって、前記糖鎖付加ポリペプチドは、次の(a)～(d)のポリペプチド：

- (a) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
 - (b) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；
 - (c) インターフェロン β の類縁体；および
 - (d) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；
- からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β における 80 位に相当するアミノ酸に糖鎖を有し、かつ、インターフェロン β 活性を有する糖鎖付加ポリペプチドであって、
- 前記組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが、実質的に均一であることを特徴とする、
- 組成物であることを特徴とする。

[0013] また、本発明の別の態様は、(I) 請求項 1～7 のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチドおよび／または薬学的に許容されるその塩、および、

(II) 薬理的に許容される担体を含むことを特徴とする医薬組成物に関する。

ここで、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖が実質的に均一であることを特徴とする。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖が 90%以上均一であることを特徴とする。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドが、90%以上の純度を有することを特徴とする。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、インターフェロン β に関連する疾患の治療または予防のために用いられることを特徴とする。

また、本発明の医薬組成物の一実施態様においては、前記インターフェロン β に関連する疾患が、多膠芽腫、髄芽腫、および、星細胞腫を含む脳腫瘍、皮膚悪性黒色腫、B 型慢性活動性肝炎、C 型慢性肝炎、亜急性硬化性全脳

炎、C型代償性肝硬変、ならびに、多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする。

[0014] また、本発明の別の態様は、前記糖鎖付加ポリペプチドの有効量を投与することを特徴とする、インターフェロン β に関連する疾患の治療または予防方法に関する。

ここで、本発明のインターフェロン β に関連する疾患の治療または予防方法の一実施態様においては、前記インターフェロン β に関連する疾患が、多膠芽腫、髄芽腫、および、星細胞腫を含む脳腫瘍、皮膚悪性黒色腫、B型慢性活動性肝炎、C型慢性肝炎、亜急性硬化性全脳炎、C型代償性肝硬変、ならびに、多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする。

[0015] また、本発明の別の態様は、

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；

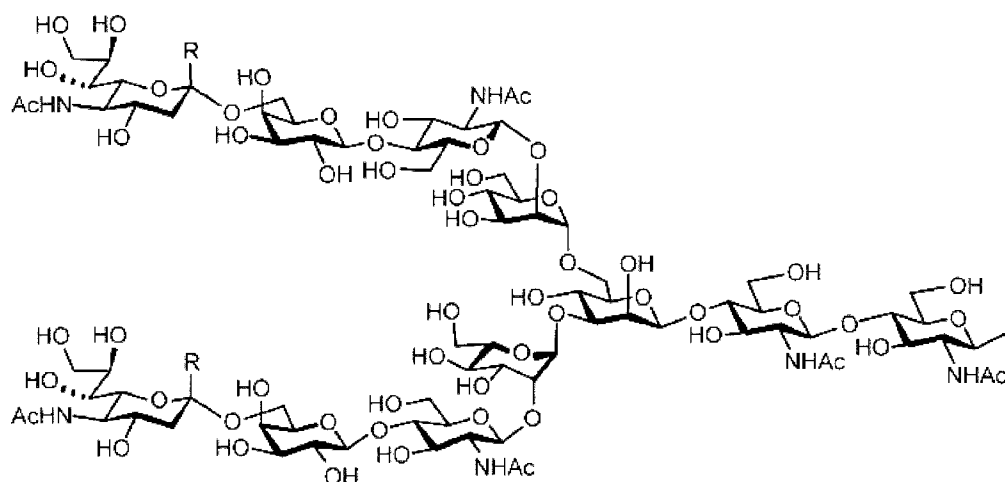
(c) インターフェロン β の類縁体；および

(d) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β における80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチドであり、かつ、インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysが保護基により保護されていることを特徴とする糖鎖付加ポリペプチドに関する。

ここで、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、前記糖鎖が、下記式(c)で表わされる糖鎖非還元末端に存在するシアル酸のカルボキシ基が保護されたジシアロ糖鎖、または、下記式(b)で表わされるアシアロ糖鎖であることを特徴とする。

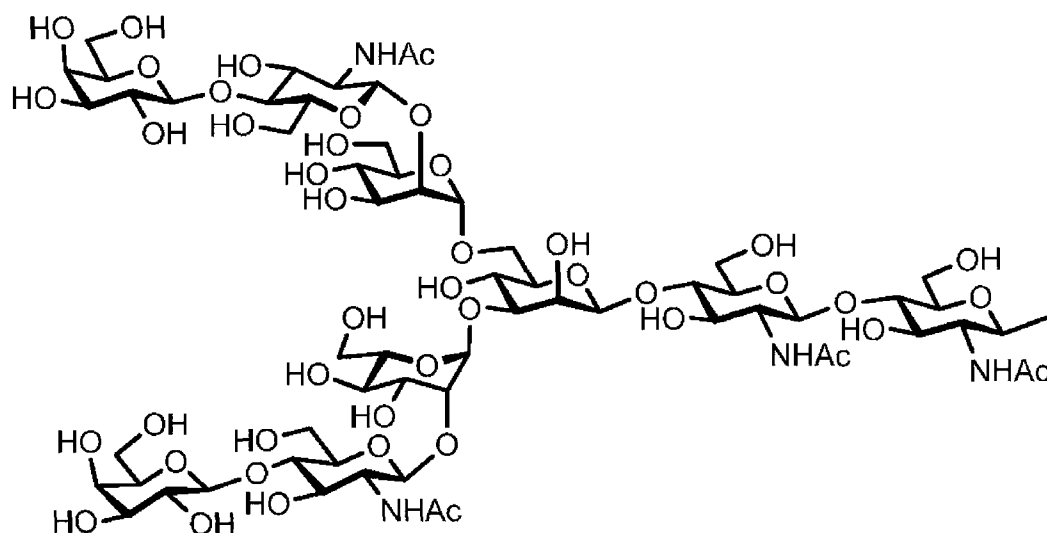
[化3]



(c)

(式中、Rは、 $-\text{COOBn}$ 、 $-\text{COOEt}$ 、 $-\text{COOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{COPh}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph(OMe)}_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhNO}_2$ 、または、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph(NO}_2)_2$ を表わす。なお、式中、Bnはベンジル基を示し、Etはエチル基を示し、Meはメチル基を示し、Phはフェニル基を示す。)

[化4]



(b)

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施態様においては、前記糖鎖

付加ポリペプチドにおいて、前記インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysが、Ac基、アルコキシメチル基、トリフェニルメチル基、t-ブチル基、ベンジル基および、 β 位が置換されたエチル基からなる群より選択されるいずれか一つの保護基により保護されていることを特徴とする。

[0016] また、本発明の別の態様は、糖鎖付加ポリペプチドの製造方法であって、Cysが保護されている前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、保護基により保護されている前記インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysを脱保護する工程を含むことを特徴とする糖鎖付加ポリペプチドの製造方法に関する。

ここで、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、前記Cysを脱保護する工程の前に、インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysが保護基により保護された前記糖鎖付加ポリペプチドを調製する工程をさらに含むことを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、Cysの保護基を脱保護する工程の前に、糖鎖付加ポリペプチドを加熱処理することを特徴とする。

[0017] また、本発明の別の態様は、

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；

(c) インターフェロン β の類縁体；および

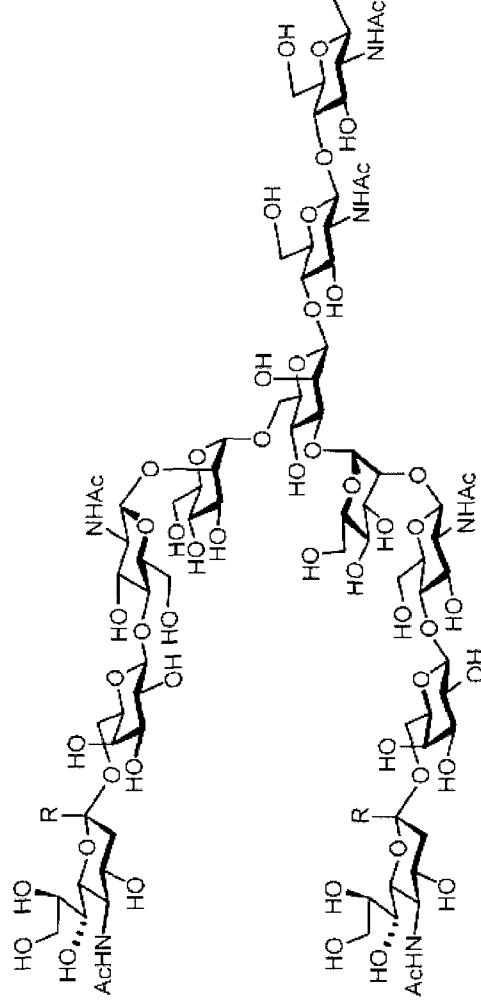
(d) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有する糖鎖付加ポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β における80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチドであり、

、

前記糖鎖が下記式 (c) により表わされる、糖鎖非還元末端に存在するシアル酸のカルボキシ基が保護されたジシアロ糖鎖であることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチドに関する。

[化5]



(c)

(式中、Rは、 $-\text{COOBn}$ 、 $-\text{COOE t}$ 、 $-\text{COOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{COPh}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph(OMe)}_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhNO}_2$ 、または、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph(NO}_2)_2$ を表わす。なお、式中、Bnはベンジル基を示し、E tはエチル基を示し、Meはメチル基を示し、Phはフェニル基を示す。)

[0018] また、本発明の別の態様は、糖鎖付加ポリペプチドの製造方法であって、シアル酸のカルボキシ基が保護された糖鎖を有する前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖非還元末端に存在するシアル酸のカルボキシ基の保護基を脱保護する工程を含むことを特徴とする糖鎖付加ポリペプチドの製造方法に関する。

ここで、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、前記シアル酸のカルボキシ基の脱保護の工程の前に、シアル酸のカルボキシ基が保護された糖鎖を有する前記糖鎖付加ポリペプチドを調製する工程をさらに含むことを特徴とする。

発明の効果

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法は、前記糖鎖付加ポリペプチドをフォールディングする工程をさらに含むことを特徴とする。

[0019] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、均一な糖鎖構造を有するため、ロット間のばらつきが少なく、品質の安定したイソタールエロソβ活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを提供することができる。また、結合している糖鎖の種類を均一化することができ、糖鎖構造を目的に応じて最適化することが可能である。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、熱処理をすることができるため、ウイルスや未知の遺伝物質の混入を防ぐことが可能である。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、イソタールエロソβのフミノ酸配列における68位-88位までのフミノ酸を有する糖ペプチドブシラグメントBと89位-166位までのフミノ酸を有するペプチドブシラグメントCとをライゲーションさせる工程の模式図である。

[図2]図2は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、イソタールエロソβのフミノ酸配列における1位-67位までのフミノ酸を有するペプチドブシラグメントAと68位-166位までのフミノ酸を有する糖ペプチドブシラグメント(B+C)とをライゲーションさせる工程の模式図である。

[図3]図3は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、ライゲーションにより作製した、イソタールエロソβのフミノ酸配列における1位-166位までのフミノ酸を有する糖ペプチドブシラグメント(A+B+C)の特定のシスチン、アラニンへ還元させる工程の模式図である。

[図4]図4は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、ライゲーションにより作製した、イソタールエロソβのフミノ酸配列に

おける1位－166位までのアミノ酸を有する糖ペプチドフラグメント（A＋B＋C）であって、アラニンへの還元工程後の糖ペプチドフラグメント（A＋B＋C）に対して行うシステインの保護基の脱保護をする工程を示す模式図である。

[図5]図5は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（11）のHPLCデータ（A）およびESI－MSデータ（B）を示す。

[図6]図6は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（11）のアミノ酸配列を示す。

[図7]図7は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（12）のHPLCデータ（A）およびESI－MSデータ（B）を示す。

[図8]図8は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（12）のアミノ酸配列を示す。

[図9]図9は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（13）のHPLCデータ（A）およびESI－MSデータ（B）を示す。

[図10]図10は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（13）のアミノ酸配列を示す。

[図11]図11は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（14）のHPLCデータ（A）およびESI－MSデータ（B）を示す。

[図12]図12は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（14）のアミノ酸配列を示す。

[図13]図13は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（15）のHPLCデータ（A）およびESI－MSデータ（B）を示す。

[図14]図14は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

において製造される糖ペプチドフラグメント（１５）のアミノ酸配列を示す。

[図15]図１５は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造された糖ペプチドフラグメント（１５）の純度をＨＰＬＣにより測定した際のデータを示す。

[図16]図１６は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（５）のＨＰＬＣデータ（Ａ）およびＥＳＩ－ＭＳデータ（Ｂ）を示す。

[図17]図１７は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（５）のアミノ酸配列を示す。

[図18]図１８は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（６）のＨＰＬＣデータ（Ａ）およびＥＳＩ－ＭＳデータ（Ｂ）を示す。

[図19]図１９は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（６）のアミノ酸配列を示す。

[図20]図２０は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（７）のＨＰＬＣデータ（Ａ）およびＥＳＩ－ＭＳデータ（Ｂ）を示す。

[図21]図２１は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（７）のアミノ酸配列を示す。

[図22]図２２は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（８）のＨＰＬＣデータ（Ａ）およびＥＳＩ－ＭＳデータ（Ｂ）を示す。

[図23]図２３は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（８）のアミノ酸配列を示す。

[図24]図２４は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント（９）のＨＰＬＣデータ（Ａ）およびＥＳＩ－ＭＳデータ（Ｂ）を示す。

[図25]図２５は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

図26]図26は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造される糖ペプチドフラグメント(10)のHPLCデータ(A)

を示す。

[図27]図27は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造される糖ペプチドフラグメント(10)のアミノ酸配列を示す。

[図28]図28は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造された糖ペプチドフラグメント(10)の純度をHPLCにより

測定した際のデータを示す。

[図29]図29は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造されるペプチドフラグメント(18)のHPLCデータ(A)お

よびESI-MSデータ(B)を示す。

[図30]図30は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造される糖ペプチドフラグメント(19)のHPLCデータ(A)

およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図31]図31は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて、製造される糖ペプチドフラグメント(20)のHPLCデータ(A)

およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図32]図32は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造される糖ペプチドフラグメント(21)のHPLCデータ(A)

およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図33]図33は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造される糖ペプチドフラグメント(22)のHPLCデータ(A)

およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図34]図34は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

おいて製造される糖ペプチドフラグメント(23)のHPLCデータ(A)

およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図35]図35は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に

において製造される糖ペプチドフラグメント（24）のHPLCデータ（A）およびESI-MSデータ（B）を示す。

[図36]図36は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施の態様である、17位、31位、141位のCysがAc基で保護されたジベンジルジシアロ糖鎖付加ポリペプチド（7）のアミノ酸配列の模式図と、当該ジベンジルジシアロ糖鎖付加ポリペプチド（7）を加熱処理する前および加熱処理後の、HPLCおよびESI-MSによる分析データを示す。図36aおよびcは加熱処理前のESI-MSデータを示し、図36bおよびeは加熱処理後のESI-MSデータを示す。また、図36dは、加熱処理前のHPLC分析データを示し、図36fは、加熱処理後のHPLC分析データを示す。

[図37]図37は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの一実施の態様である、17位、31位、141位のCysが無保護のジベンジルジシアロ糖鎖付加ポリペプチド（8）のアミノ酸配列の模式図と、当該ジベンジルジシアロ糖鎖付加ポリペプチド（8）を加熱処理する前および加熱処理後の、HPLCおよびESI-MSによる分析データを示す。図37aおよびcは加熱処理前のESI-MSデータを示し、図37bおよびeは加熱処理後のESI-MSデータを示す。また、図37dは、加熱処理前のHPLC分析データを示し、図37fは、加熱処理後のHPLC分析データを示す。

[図38]図38は、本発明の一実施の態様である、化学合成した糖鎖付加ポリペプチド（非加熱処理）のIFN- α/β receptor 2に対する受容体親和性解析のデータを示す。

[図39]図39は、本発明の一実施の態様である、化学合成した糖鎖付加ポリペプチド（加熱処理）のIFN- α/β receptor 2に対する受容体親和性解析のデータを示す。

[図40]図40は、本発明の一実施の態様である、化学合成した糖鎖付加ポリペプチドをマウスに投与した際の薬物動態解析のデータを示す。なお、対照区として、生合成により作製されたIFN β モチダを使用した。図40において、Aは静脈投与した際のデータを示し、Bは皮下投与した際のデータを

示す。

[図41]図41は、本発明の一実施の態様である、化学合成した糖鎖付加ポリペプチドの抗腫瘍活性を示すデータである。なお、対照区として、PBS (Vehicle群)、および、生合成により作製されたIFN β モチダを使用した。

[図42]図42は、本発明の一実施の態様である、化学合成した糖鎖付加ポリペプチドにおいて、加熱処理したものと非加熱処理のものとで、細胞増殖抑制活性を比較したデータを示す。

[図43]図43は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、インターフェロン β のアミノ酸配列における68位-75位までのアミノ酸を有するペプチドフラグメントB2と76位-88位までのアミノ酸を有する糖ペプチドフラグメントB1とをライゲーションさせる工程を示す模式図である。

[図44]図44は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、ライゲーションにより作製した、インターフェロン β のアミノ酸配列における68位-88位までのアミノ酸を有する糖ペプチドフラグメント(B1+B2)の特定のシステインのチオール基(-SH)を、メチルチオ基(-SMe)へメチル化する工程を示す模式図である。

[図45]図45は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において、糖ペプチドフラグメント(B1+B2)上の、メチル化されたチオール基(-SMe)を有するシステインが、セリンへと変換される分子内アシル転位化工程を示す模式図である。

[図46]図46は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造される糖ペプチドフラグメント(25)のHPLCデータ(A)およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図47]図47は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様において製造されるペプチドフラグメント(26)のHPLCデータ(A)およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図48]図48は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に
おいて製造される糖ペプチドフラグメント(27)のHPLCデータ(A)
およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図49]図49は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に
おいて製造される糖ペプチドフラグメント(28)のHPLCデータ(A)
およびESI-MSデータ(B)を示す。

[図50]図50は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造する一実施の態様に
おいて製造される糖ペプチドフラグメント(29)のHPLCデータ(A)
およびESI-MSデータ(B)を示す。

発明を実施するための形態

[0021] 本明細書において、「イソタールエロソβ」または「IFN-β」とは、
配列番号1で表わされる166個のアミノ酸配列を有するポリペプチドであ
る。なお、イソタールエロソβは、下記アミノ酸配列における31位と14
1位のシステイン間においてジスルフィド結合を有している。また、本明細
書において、「イソタールエロソβ」とは、好ましくは、下記アミノ酸配列
(配列番号1)を有し、かつ、糖鎖を有するヒト型のイソタールエロソβ-
1aに相当するものである。なお、イソタールエロソβ-1aは、下記アミ
ノ酸配列において、80位のアスパギンに糖鎖が付加している。

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln¹⁰-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys
-Gln-Lys-Leu²⁰-Leu-Tyr-Gln-Leu-Asn-
Gly-Arg-Leu-Gly-Tyr³⁰-Cys-Leu-Lys-A
sp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile⁴⁰-Pro-Gl
u-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe⁵⁰
-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-I
le-Tyr⁶⁰-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Ph
e-Ala-Ile-Phe⁷⁰-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser
-Ser-Thr-Gly-Tyr-Asn⁸⁰-Glu-Thr-Ile-

Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn⁹⁰-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr¹⁰⁰-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp¹¹⁰-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu¹²⁰-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu¹³⁰-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His¹⁴⁰-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile¹⁵⁰-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu¹⁶⁰-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn¹⁶⁶

6

[0022] 本明細書中において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸のみならずアミノ酸変異体および誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えば、天然タンパク原性L-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体および誘導体などの化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 β -アラニン、オルニチンなどの天然非タンパク原性アミノ酸；およびアミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられることを理解するであろう。非天然アミノ酸の例として、 α -メチルアミノ酸（ α -メチルアラニンなど）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジンおよび α -メチル-ヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）および側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）が挙げられる。好ましい態様において、本発明の化合物に含まれるアミノ酸は、天然アミノ酸のみからなる。

[0023] 本明細書中において、アミノ酸配列における1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたという場合、置換等されるアミノ酸の個数は

、インターフェロン β 活性を保持する限り特に限定されないが、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または、10個程度アミノ酸が相違していることを意味する。あるいは、全体のアミノ酸配列の長さの20%以内、好ましくは10%以内のアミノ酸が相違する場合も含まれる。置換または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸またはアミノ酸アナログであり得、好ましくは天然のアミノ酸である。

[0024] 本明細書において、「ペプチドフラグメント」とは、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを製造するにあたり、最終的な糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列の一部の配列を有するペプチドフラグメントをいう。また、本明細書において、「糖鎖付加ペプチドフラグメント」または「糖ペプチドフラグメント」とは、このようなペプチドフラグメント中のアミノ酸配列において、糖鎖付加アミノ酸を含むペプチドフラグメントをいう。本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、糖鎖付加ペプチドフラグメントと、少なくとも2つのペプチドフラグメントを連結させることにより製造される。

[0025] 本発明において、「インターフェロン β の類縁体」とは、インターフェロン β と構造上類似したポリペプチドおよび／またはインターフェロン β と重複した構造を有するポリペプチド、例えば、インターフェロン β のアミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が保存的に置換されたポリペプチド、インターフェロン β 改変体、インターフェロン β 活性を有するインターフェロン β のフラグメント、インターフェロン β 活性を有する伸長インターフェロン β が挙げられる。

[0026] 本明細書中において、「アミノ酸の1若しくは数個のアミノ酸が保存的に置換された」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数および／または疎水性指数が類似している置換であって、そのような置換の前後で、インターフェロン β 活性の明らかな低下または消失を生じない置換をいう。

[0027] 本明細書中において、「インターフェロン β 改変体」とは、インターフェロン β の改変体であって、インターフェロン β の天然に存在する変異体、ま

たはインターフェロン β を人工的に改変した化合物を含み、そのような改変としては、例えば、インターフェロン β の1または複数のアミノ酸残基の、アルキル化、アシル化（例えばアセチル化）、アミド化、カルボキシル化、エステル形成、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、水酸化、標識成分の結合等が挙げられる。

[0028] 本明細書中において、「インターフェロン β 活性を有するインターフェロン β のフラグメント」とは、インターフェロン β のN末端および／またはC末端から1個またはそれ以上のアミノ酸が欠失し、かつインターフェロン β 受容体に活性を維持したペプチドである。

[0029] 本明細書中において、「インターフェロン β 活性を有する伸長インターフェロン β 」とは、インターフェロン β のN末端および／またはC末端に1個またはそれ以上のアミノ酸が付加され、かつインターフェロン β 活性を維持したペプチドである。

[0030] 上述するようなインターフェロン β の類縁体としては、例えば、1位のMetが欠損し、17位のCysがSerに置換されたインターフェロン β -1bとして知られているアミノ酸配列を挙げることができる。

[0031] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、配列番号1で表わされるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、インターフェロン β における80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチドであり、かつ、インターフェロン β 活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを含む。本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、配列番号1と80%以上の相同性を有する場合には、好ましくは、85%以上、90%以上、95%以上、99%以上の相同性を有することができる。

[0032] 本明細書において、「インターフェロン β における特定の位置に相当するアミノ酸」とは、糖鎖付加ポリペプチドにおいてアミノ酸の付加、欠失等がない限り、インターフェロン β のアミノ酸配列に対応する同一の位置のアミノ酸をいう。また、糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列内において、アミノ酸の付加、欠失が存在する場合には、アミノ酸の付加、欠失によるアミノ

酸配列上の移動を考慮した位置にあるアミノ酸をいう。例えば、1位から4位までにMet₁-Ser₂-Tyr₃-Asn₄-の配列を有する糖鎖付加ポリペプチドにおいて、2位と3位のアミノ酸の間に1つのアミノ酸（Trp）が付加された場合（Met-Ser-Trp-Tyr-Asn-）、3位のアミノ酸（Tyr）に相当するアミノ酸とは、糖鎖付加ポリペプチドにおいて、Trpの挿入によりC末端側に1つ移動したアミノ酸（Tyr）をいう。

[0033] 本明細書中において、「糖鎖」とは、単位糖（単糖および／またはその誘導体）が1つ以上連なってできた化合物をいう。単位糖が2つ以上連なる場合、各々の単位糖同士の間は、グリコシド結合による脱水縮合によって結合する。このような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される単糖類および多糖類（グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸並びにそれらの複合体および誘導体）の他、分解された多糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解または誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。糖鎖は直鎖型であっても分岐鎖型であってもよい。

[0034] また、本明細書中において、「糖鎖」には糖鎖の誘導体も含まれ、糖鎖の誘導体としては、例えば、糖鎖を構成する糖が、カルボキシ基を有する糖（例えば、C-1位が酸化されてカルボン酸となったアルドン酸（例えば、D-グルコースが酸化されたD-グルコン酸）、末端のC原子がカルボン酸となったウロン酸（D-グルコースが酸化されたD-グルクロン酸））、アミノ基またはアミノ基の誘導体を有する糖（例えば、D-グルコサミン、D-ガラクトサミンなど）、アミノ基およびカルボキシ基を両方とも有する糖（例えば、N-グリコイルノイラミン酸、N-アセチルムラミン酸など）、デオキシ化された糖（例えば、2-デオキシーD-リボース）、硫酸基を含む硫酸化糖、リン酸基を含むリン酸化糖などである糖鎖が挙げられるがこれらに限定されない。

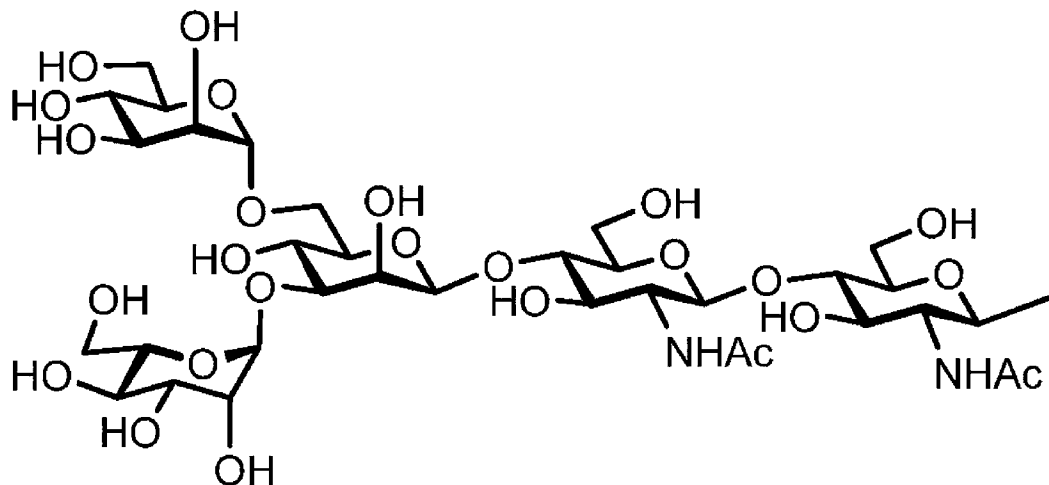
[0035] 本発明において、好ましい糖鎖は、糖鎖付加ポリペプチド中に付加された場合に、インターフェロン β 活性を消失させない糖鎖である。

このような、本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖は特に限定されず、生体内で複合糖質（糖ペプチド（または糖タンパク質）、プロテオグリカン、糖脂質等）として存在する糖鎖であってもよいし、生体内では複合糖質として存在しない糖鎖であってもよい。

[0036] 生体内で複合糖質として存在する糖鎖は、本発明の糖鎖付加ポリペプチドが生体に投与されるという観点から好ましい。かかる糖鎖としては、生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）としてペプチド（またはタンパク質）に結合している糖鎖であるN-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖等が挙げられる。好ましくは、N-結合型糖鎖が用いられる。N結合型糖鎖としては、例えば、高マンノース（ハイマンノース）型、複合（コンプレックス）型、混成（ハイブリッド）型を挙げることができ、特に好ましくは、複合型が良い。

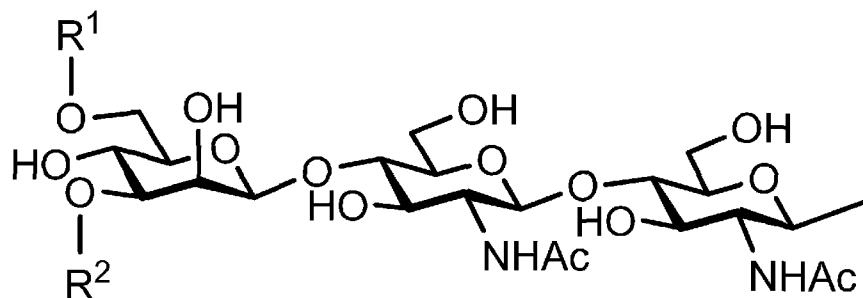
[0037] 本発明の好ましい一態様において、本発明の糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖は、複合型糖鎖である。複合型糖鎖とは、2種類以上の単糖を含み、以下に示す基本構造と、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ で示されるラクトサミン構造を有することを特徴とする。

[化6]



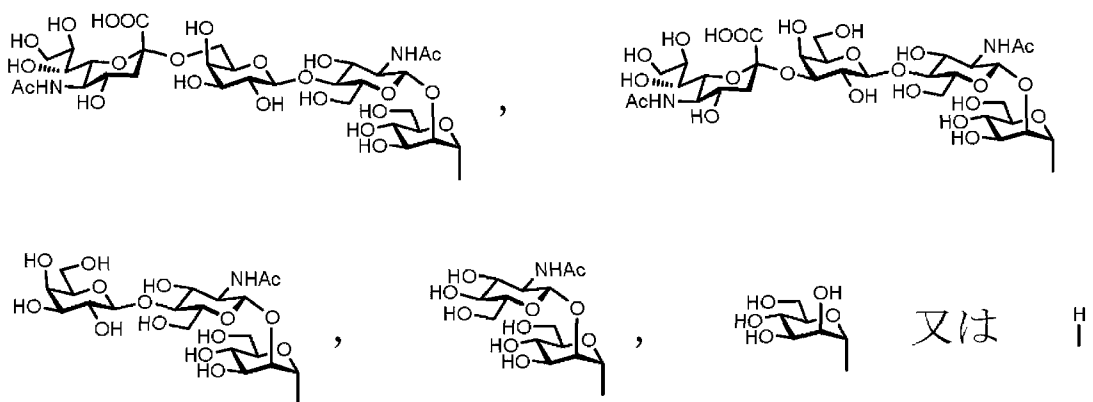
[0038] 本発明で使用する好ましい複合型糖鎖としては、例えば、下記一般式

[化7]



[式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって、

[化8]

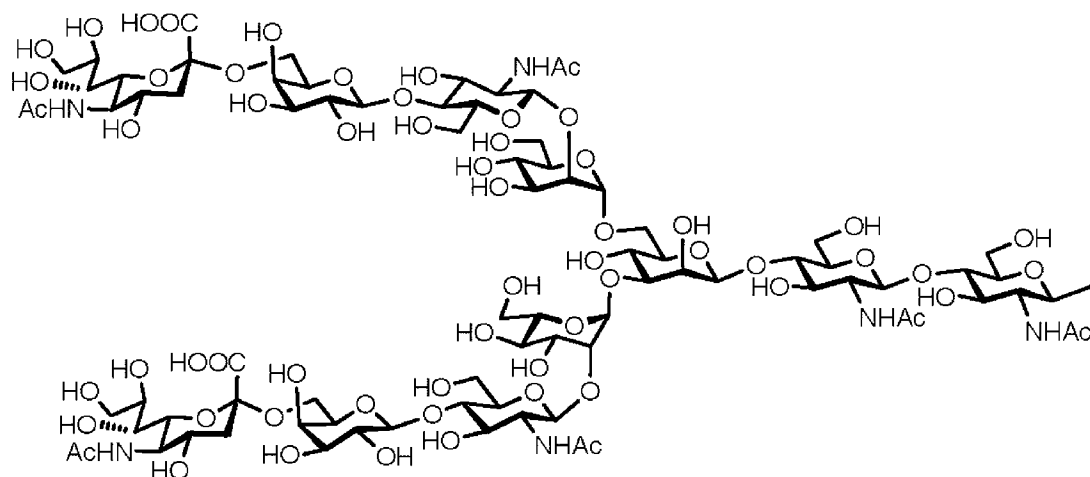


を示す。Acはアセチル基を示す。]

で表される糖鎖等が挙げられる。

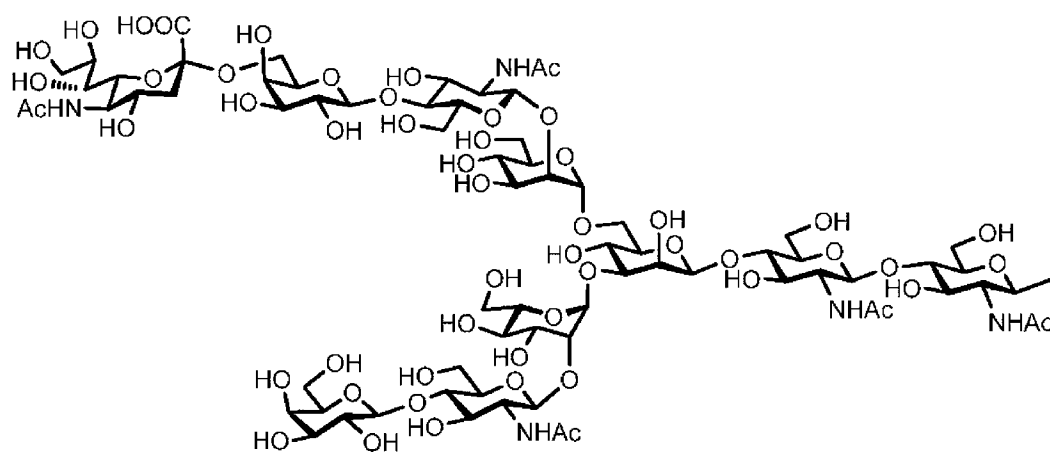
また、本発明において、複合型糖鎖には、2本鎖複合糖鎖を含む。2本鎖複合型糖鎖とは、基本構造の末端の2つのマンノースに、それぞれ0～3糖からなる1本鎖の糖鎖が結合しているものをいう。2本鎖複合型糖鎖としては、例えば、以下に示すジシアロ糖鎖、

[化9]

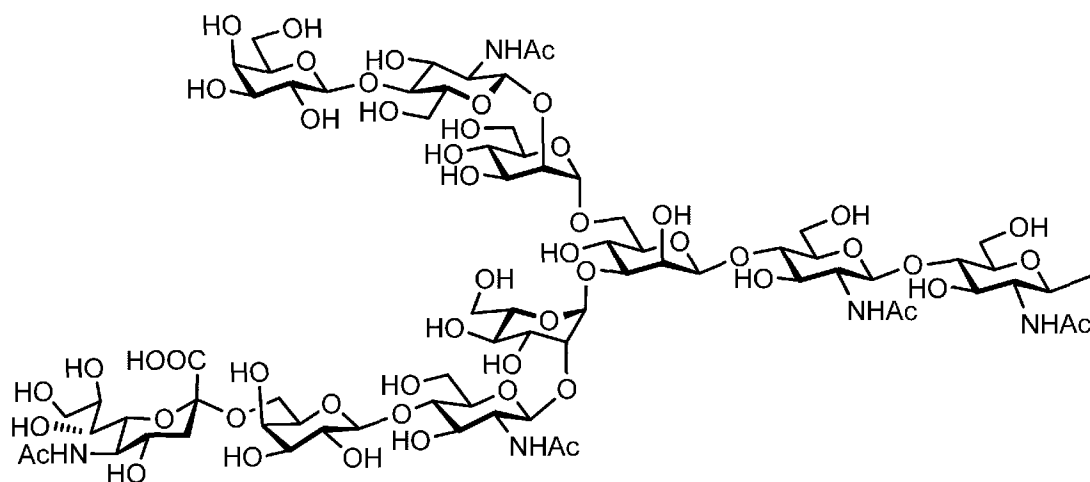


モノシアロ糖鎖、

[化10]

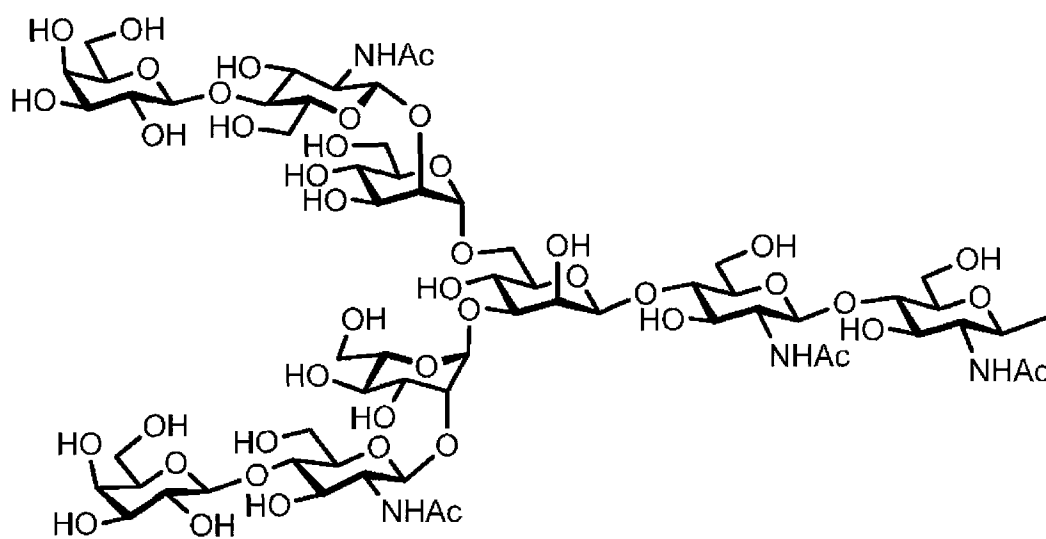


[化10A]



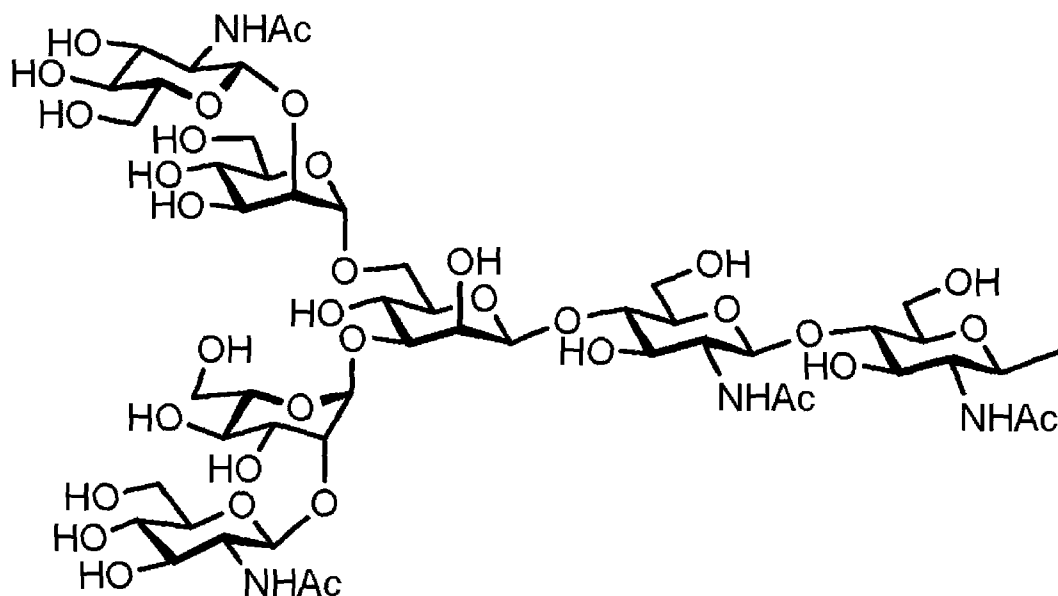
アシアロ糖鎖、

[化11]



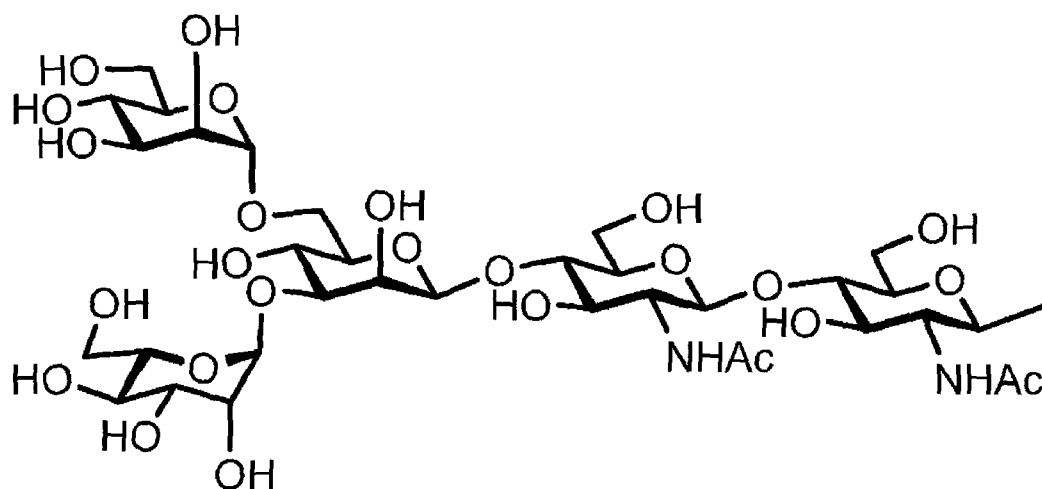
ジグルクナック糖鎖、

[化12]



ジマンノース糖鎖、

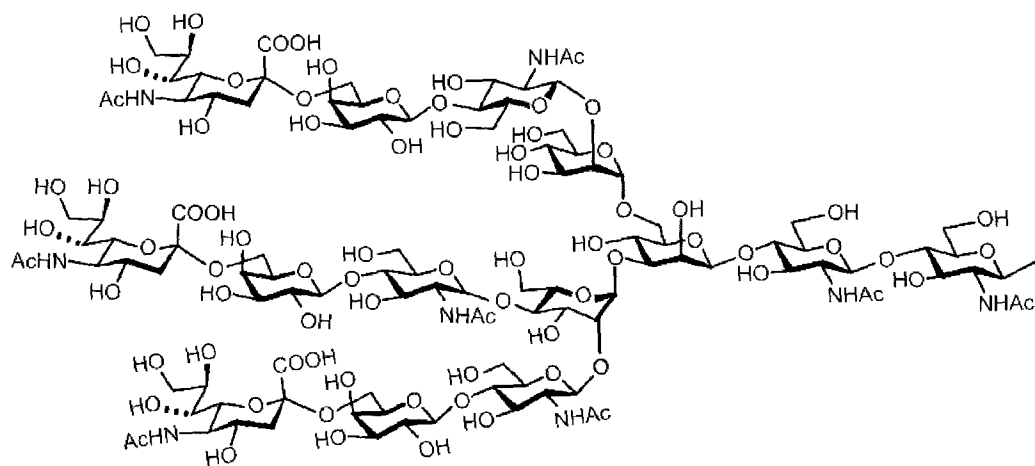
[化13]



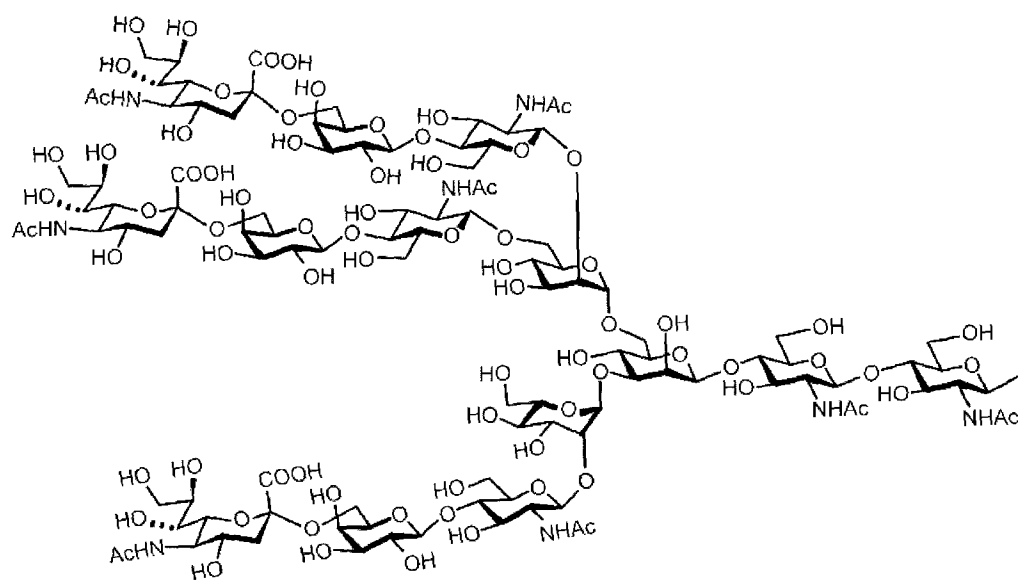
等が好ましい。2本鎖複合型糖鎖としては、ジシアロ糖鎖またはアシアロ糖鎖がより好ましく、最も好ましくは、ジシアロ糖鎖である。

また、本発明の複合型糖鎖には、上記の2本鎖複合型糖鎖（2分岐型複合型糖鎖）の他、3本鎖の複合型糖鎖（3分岐型複合型糖鎖）、4本鎖の複合型糖鎖（4分岐型複合型糖鎖）も含む。例えば、3本鎖、4本鎖の複合型糖鎖としては、以下の構造式で表わされる、トリシアロ糖鎖

[化14]

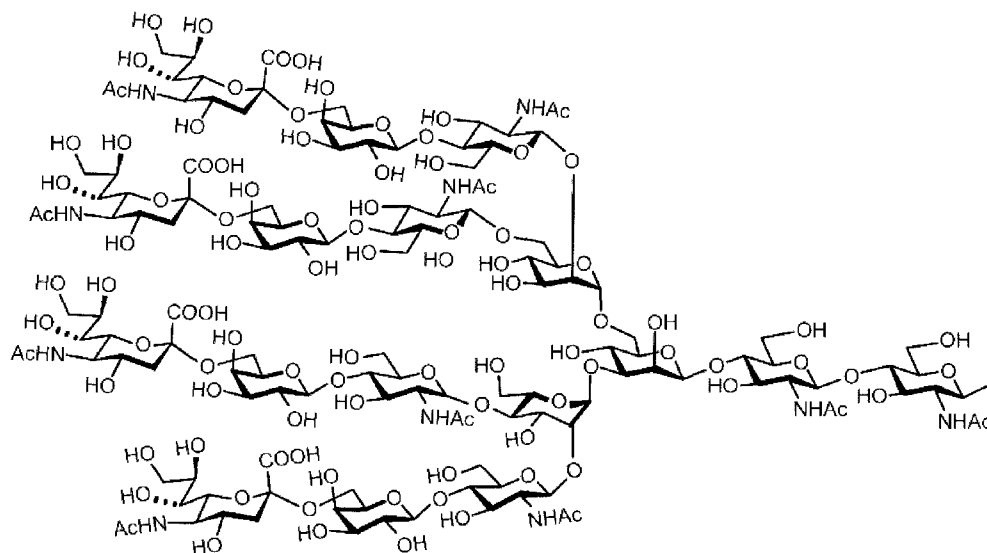


[化15]



下記構造式で表わされるテトラシアロ糖鎖

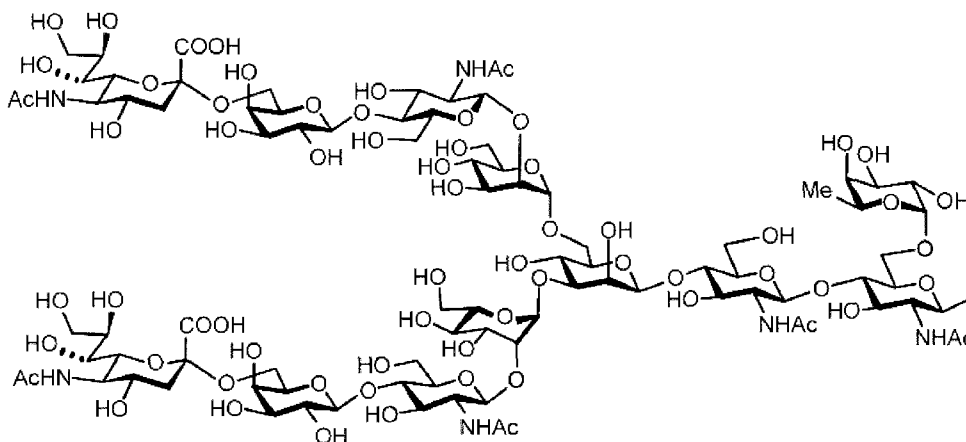
[化16]



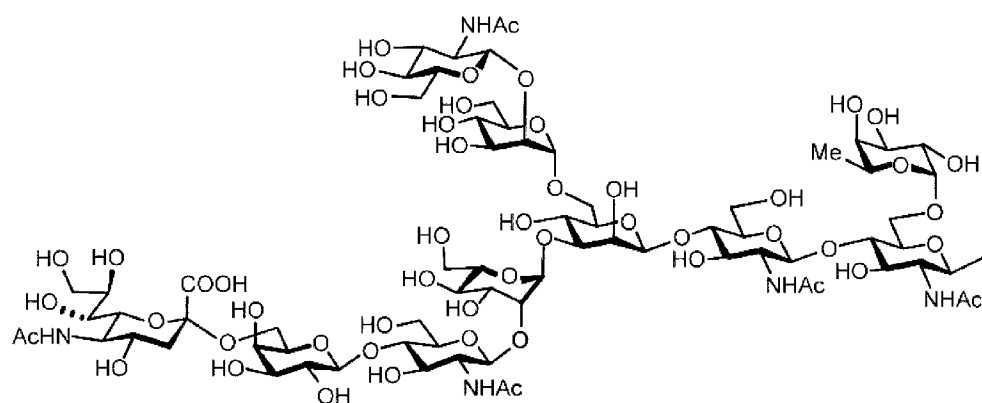
を挙げることができる。また、3本鎖複合型糖鎖および4本鎖複合型糖鎖としては、これらのトリシアロ糖鎖およびテトラシアロ糖鎖の非還元末端から1又は複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。

さらに、本発明の複合型糖鎖には、フコースが付いたものも含む。フコースが付いた複合型糖鎖としては、以下の構造式で表わされるフコース含有複合型糖鎖

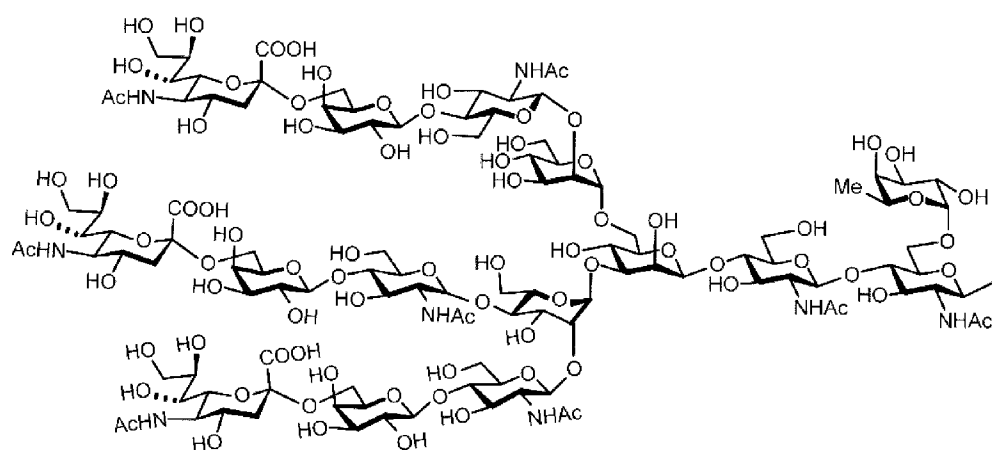
[化17]



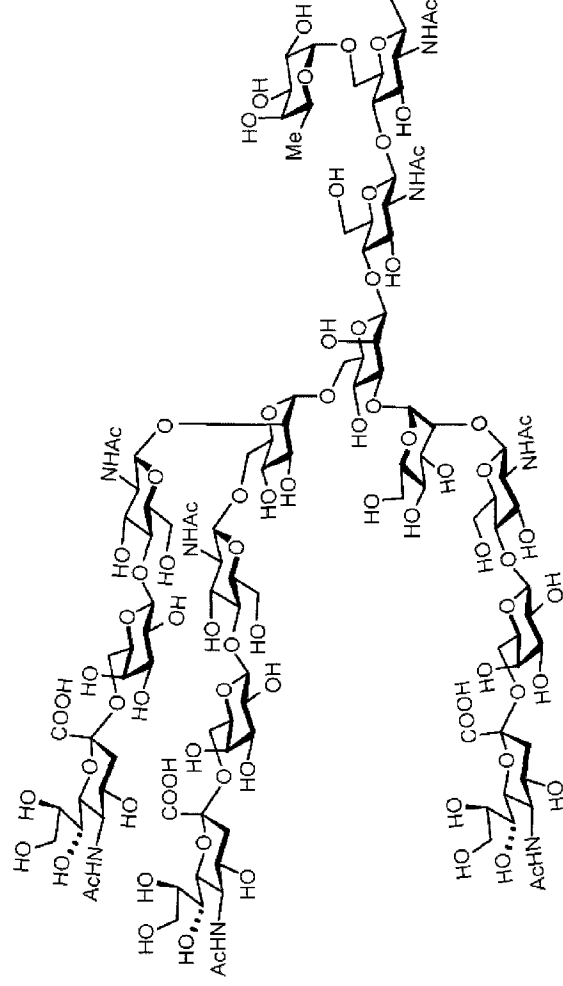
[化18]



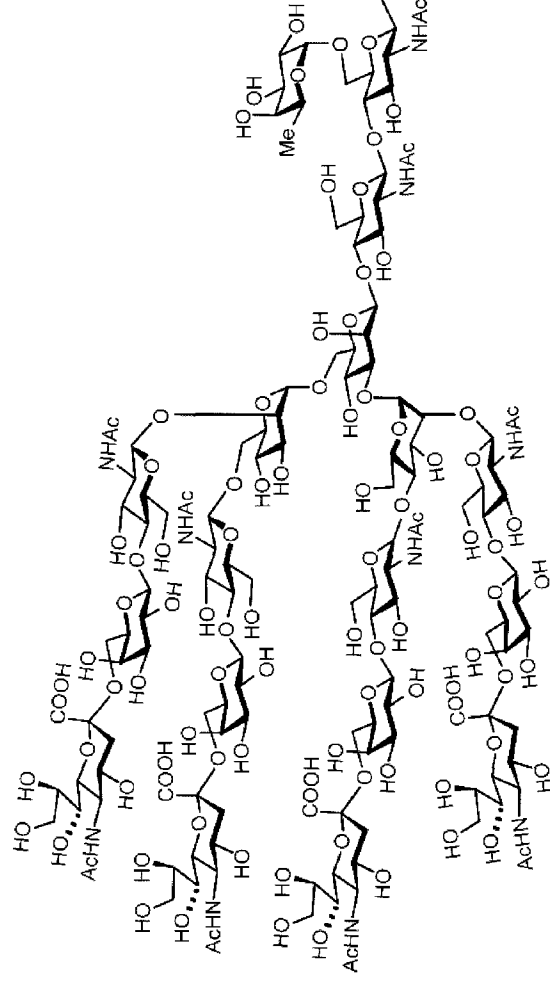
[化19]



[化20]



[化21]



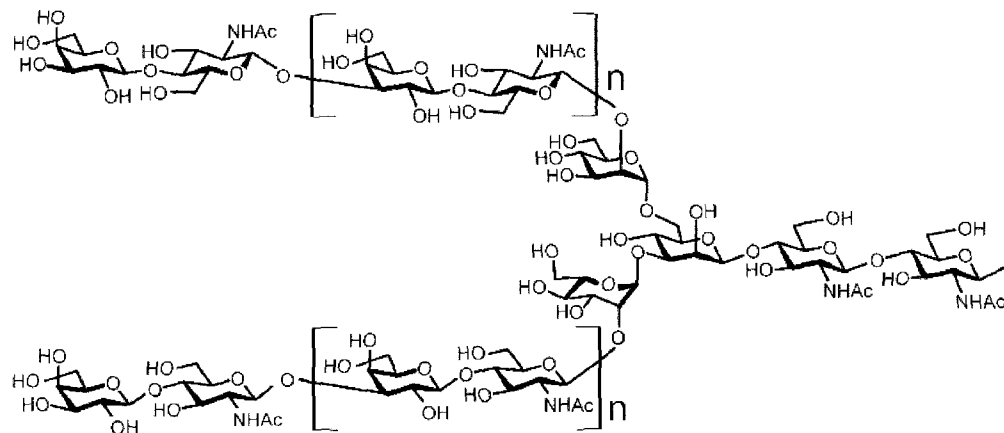
を挙げることができる。また、これらのフコース含有複合型糖鎖の非還元末端から1又は複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。

また、本明細書中において「2本鎖複合型糖鎖」、「ジシアロ糖鎖」、「モノシアロ糖鎖」、「アシアロ糖鎖」、「ジグルクナック糖鎖」、「ジマンノース糖鎖」、「3本鎖複合型糖鎖」、「4本鎖複合型糖鎖」、「フコース含有複合型糖鎖」には、上記化学式で示したもののほか、化学式で示した例

と結合様式の異なるものも含まれ、かかる糖鎖も本発明の糖鎖として好ましく用いられる。かかる糖鎖としては、例えば、ジシアロ糖鎖またはモノシアロ糖鎖においてシアル酸とガラクトースが ($\alpha 2 \rightarrow 3$) 結合で結合しているもの等が挙げられる。

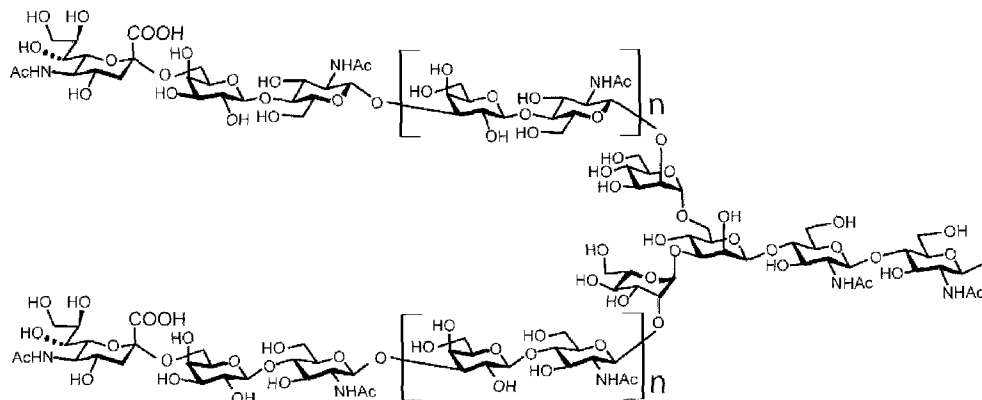
[0039] また、本発明の複合型糖鎖には、下記式で表わされるポリラクトサミン構造またはシアリルポリラクトサミン構造を有する糖鎖も含む。

[化22]



(式中、 n は 2 ～ 3 の整数である。)

[化23]



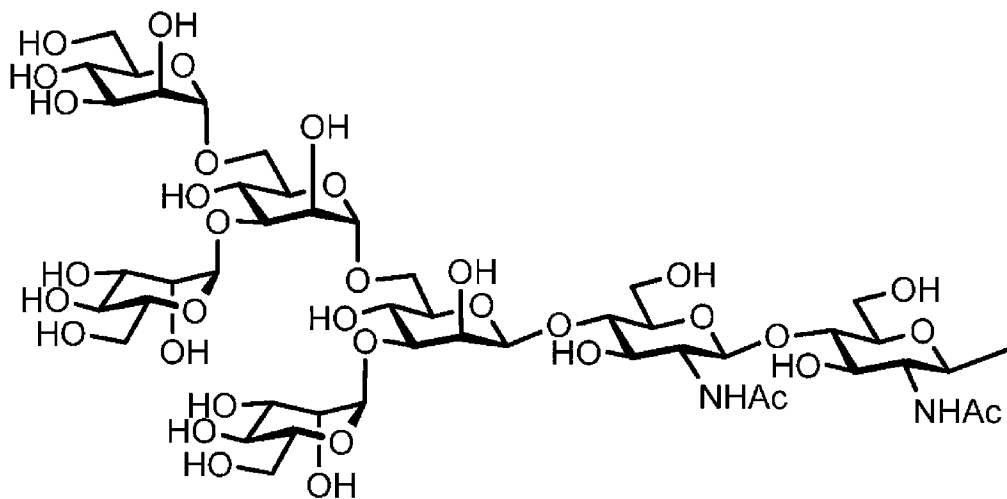
(式中、 n は 2 ～ 3 の整数である。)

[0040] また、本発明で用いられる高マンノース型糖鎖は、上述した複合型糖鎖の

基本構造に、さらにマンノースが2個以上結合している糖鎖である。高マンノース型糖鎖は嵩高いので、ペプチドに高マンノース型糖鎖を結合させることにより血中安定性がより高くなりうる。哺乳類の高マンノース型糖鎖のように、5～9個のマンノースを含む糖鎖が好ましいが、酵母の高マンノース型糖鎖のように、より多くのマンノースを含む糖鎖であってもよい。本発明に好ましく用いられる高マンノース型糖鎖としては、例えば、

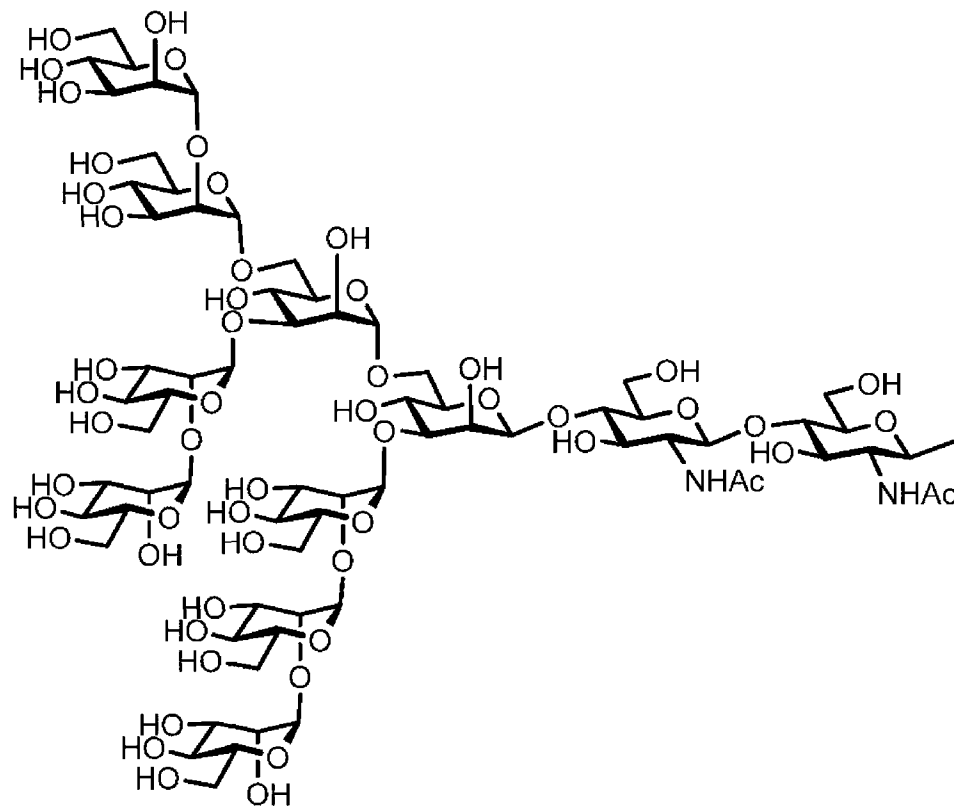
ハイマンノースー5 (M-5)

[化24]



ハイマンノースー9 (M-9)

[化25]

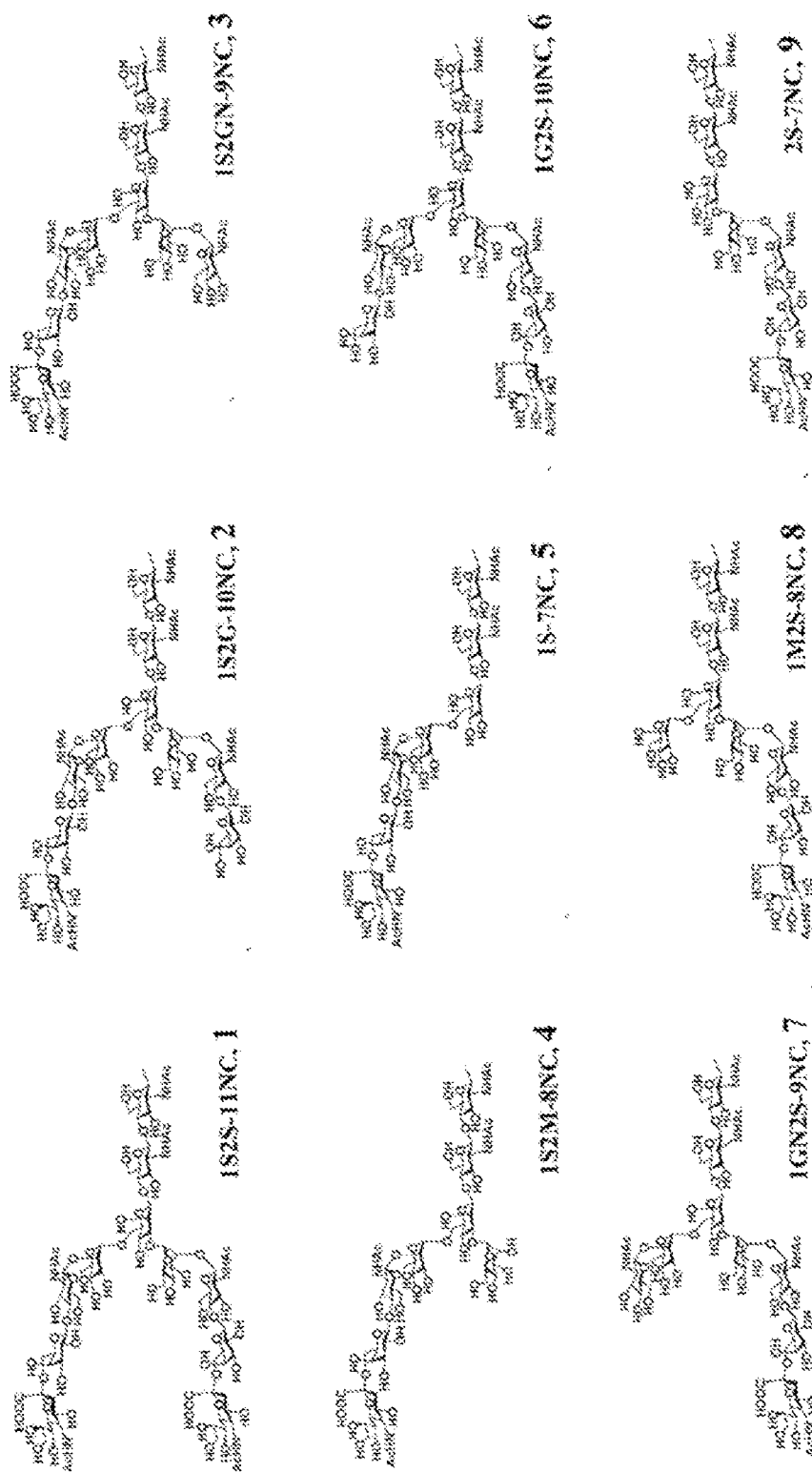


等を挙げることができる。

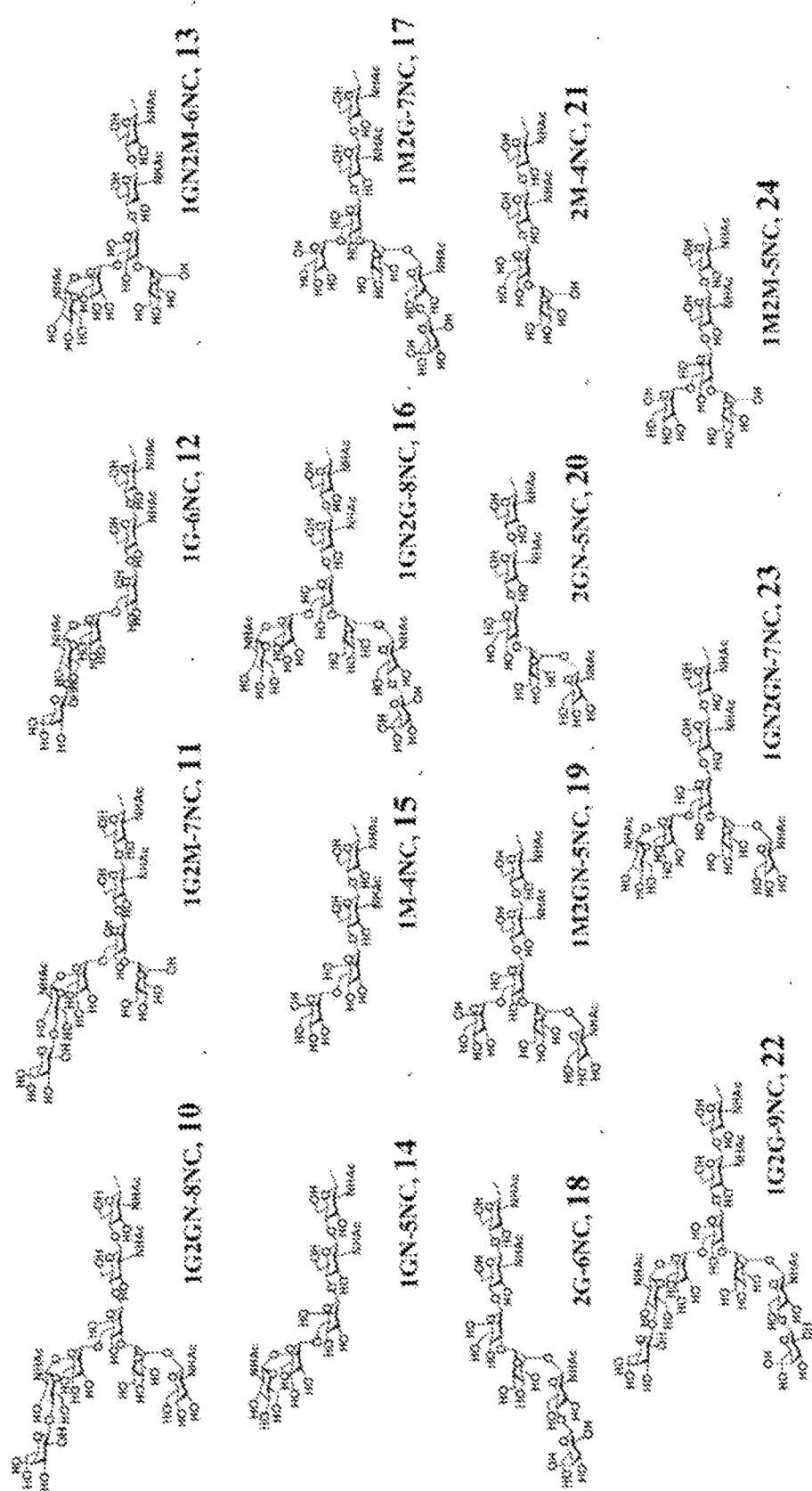
[0041] 本発明において、好ましい糖鎖としては、例えば、ヒト体内において、タンパク質と結合した糖タンパク質として存在する糖鎖（例えば、「F E B S L E T T E R S V o l . 5 0 , N o . 3 , F e b . 1 9 7 5」に記載の糖鎖）と、同一の構造を有する糖鎖（構成糖の種類及びそれらの結合様式が同一の糖鎖）又はこれの非還元末端から1又は複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。具体的には、下記に列挙される糖鎖を挙げることができる。

[0042]

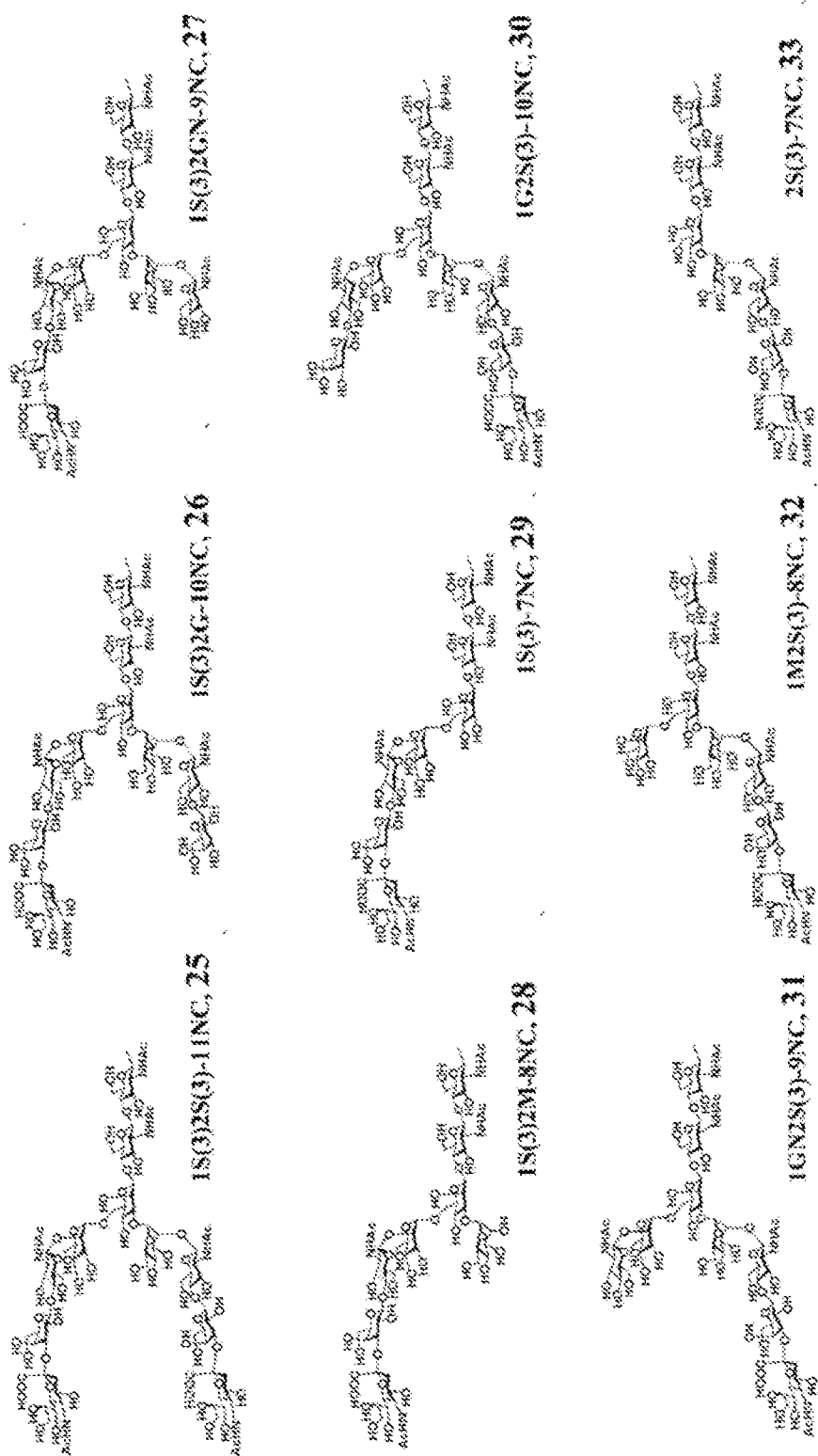
[化26]



[0043] [化27]

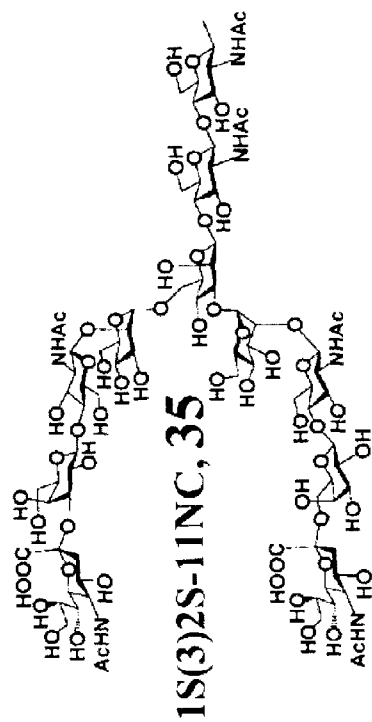
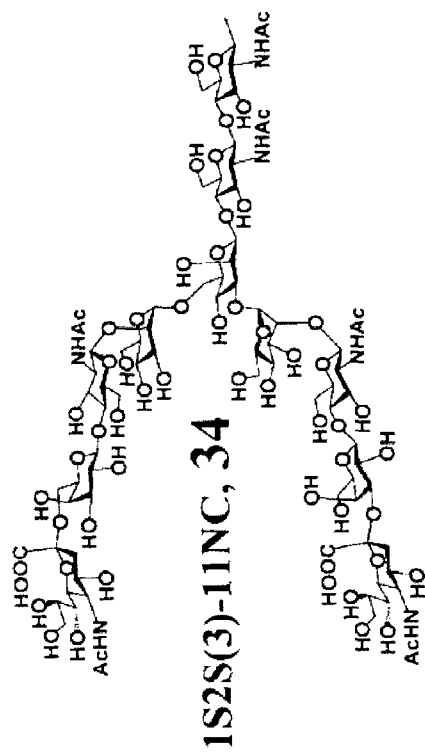


[0044] [化28]



[0045]

[化29]



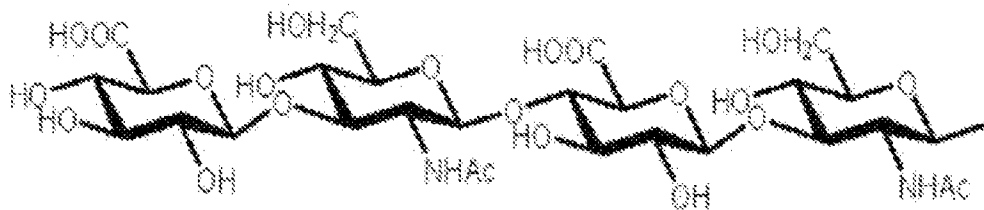
[0046] なお、本発明の一実施の態様において、糖鎖は、非還元末端に位置するシアル酸のカルボキシ基が修飾されていてもよい。このような糖鎖としては、上記で挙げる糖鎖のうち非還元末端にシアル酸を有する糖鎖であって、かつ、当該シアル酸のカルボキシ基 ($-\text{COOH}$) の水素原子が、 Bn 、 Et 、 Me 、 CH_2COPh 、 CH_2PhOMe 、 $\text{CH}_2\text{Ph}(\text{OMe})_2$ 、 CH_2PhNO_2 、または、 $\text{CH}_2\text{Ph}(\text{NO}_2)_2$ で置換された（すなわち、当該シアル酸のカルボキシ基が、 $-\text{COOBn}$ 、 $-\text{COOEt}$ 、 $-\text{COOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{COPh}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph}(\text{OMe})_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhNO}_2$ 、または、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph}(\text{NO}_2)_2$ で表わされる）糖鎖を挙げることができる。

[0047] また、本発明の一態様において、好ましい糖鎖は、直鎖構造を有する糖鎖である。かかる糖鎖としては、例えば、オリゴヒアルロン酸が挙げられる。本明細書において、オリゴヒアルロン酸とは、 N -アセチルグルコサミンとグルクロン酸が交互に2～32糖、好ましくは2～16糖、より好ましくは4～8糖、直鎖上に結合した糖鎖をいう。

本発明に用いられるオリゴヒアルロン酸のうち、特に好ましいものとして、 N -アセチルグルコサミンとグルクロン酸とからなる単位を1単位とした場合、2単位（4糖）以上8単位（16糖）以下の糖鎖が挙げられ、さらに好ましくは、2単位（4糖）～4単位（8糖）、最も好ましくは2単位（4糖）である。

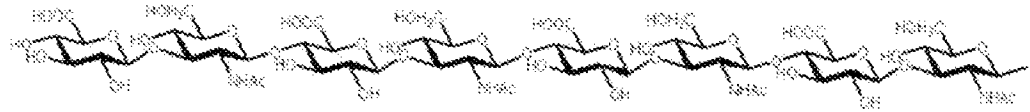
本発明に好ましく用いられるヒアルロン酸としては、例えば、4糖のオリゴヒアルロン酸、

[化30]



8糖のオリゴヒアルロン酸

[化31]



等が挙げられる。

[0048] 本発明の糖鎖付加ポリペプチド中の糖鎖が付加するアミノ酸は、天然に存在するインターフェロン β と同様に、インターフェロン β における80位に相当するアミノ酸に付加していることが好ましい。また、糖鎖が付加するアミノ酸は、アスパラギンであることが好ましい。

[0049] 本発明の好ましい一態様において、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの糖鎖は、均一であることが好ましい。本明細書において、糖鎖付加ポリペプチドにおいて糖鎖が均一とは、糖鎖付加ポリペプチド間において糖鎖を比較した場合に、ペプチド中の糖鎖付加部位、糖鎖を構成する各糖の種類、結合順序、および糖間の結合様式が同一であることをいう。具体的には、糖鎖付加ポリペプチド間において、少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上で糖鎖の構造が均一であることを言う。

また、本明細書において、糖鎖付加ポリペプチドを含む組成物における組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが均一とは、当該組成物中に含まれる糖鎖付加ポリペプチド間において糖鎖およびポリペプチド部分を比較した場合に、ペプチド中の糖鎖付加部位、糖鎖を構成する各糖の種類、糖鎖の結合順序、糖間の結合様式、ポリペプチドを構成するアミノ酸の種類、アミノ酸の配列順序が同一であることをいう。具体的には、組成物中に含まれる糖鎖付加ポリペプチド間において、少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上で糖鎖の構造およびポリペプチド部分が均一であることを言う。

特に、糖ペプチド間において糖鎖が均一である糖ペプチドを含む組成物等

は、品質が一定であり、特に医薬品の製造や、アッセイなどの分野において好ましい。均一な糖鎖の割合や均一な糖鎖付加ポリペプチドの割合は、例えば、HPLC、キャピラリー電気泳動、NMR、質量分析等を用いた方法によって測定することが可能である。

[0050] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、糖鎖付加ペプチドフラグメントと少なくとも2つのペプチドフラグメントを連結されることにより製造される。

(ペプチドフラグメント)

このような、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを構成する糖鎖付加ペプチドフラグメントおよびペプチドフラグメントは、上述するように、それぞれがインターフェロン β のアミノ酸配列の一部を有する。すなわち、各フラグメントは、インターフェロン β の166個のアミノ酸配列を少なくとも3つに分割した、それぞれのアミノ酸配列を有する。

ここで、フラグメントの数、および、各フラグメントの長さは、各フラグメント合成時の伸長による収率の低下、各フラグメントを連結させる際に必要なアミノ酸の種類、連結工程の回数による収率の低下を考慮して、好ましいフラグメント数およびアミノ酸位置で、各フラグメントのアミノ酸配列を選択することが好ましい。

各フラグメントの長さは、フラグメントの調製方法により異なるが、例えば、9～84の長さとするのが好ましく、67～78の長さとするのがより好ましい。

また、各フラグメントを連結させる方法としては、Thiol-free ligation, Staudinger Ligation, Sugar-Assisted Ligation, Thiol auxiliary ligation (Chem. Commu., 2011, 47, 6201-6207), (Chem. Commu., 2010, 46, 21-43) 等、公知の方法で連結させることができ、好ましくは、ネイティブケミカルライゲーション法 (Native Chemical Ligation: NCL) を用いて連結させることができる。

[0051] ネイティブケミカルライゲーション法を用いる際には、インターフェロン β のアミノ酸配列より選択される各フラグメントのN末端をCysとする必要がある。Cys以外のアミノ酸を各フラグメントのN末端のアミノ酸として選択する場合には、Ala、His、Lys、Phe、Ser、Thr、Val、Metを選択することができる。例えば、フラグメントのN末端をAlaとした場合には、N末端のAlaの代わりにCysを導入したフラグメントを合成しておき、他のフラグメントとライゲーション後に、CysをAlaに還元することが可能である。また、フラグメントのN末端をPheまたはValとした場合には、導入するアミノ酸として、 β 位にチオール基を有する非天然型アミノ酸を用いて、ライゲーションを行い、その後還元処理することが可能である。Ser、ThrをフラグメントのN末端として設計する場合には、N末端としてシステインを導入し、ライゲーション後に当該システイン残基のチオール基のメチル化、続くシアノジェンブロマイド処理により、Ser、Thrへ変換させることができる。また、HisまたはLysをフラグメントのN末端として設計する場合には、これらのアミノ酸をN末端として導入後、アミノ基の求核攻撃を利用したライゲーション反応により望むアミド結合を形成させることが可能となる。その他のアミノ酸をフラグメントのN末端とする場合も、公知の方法により、ネイティブケミカルライゲーション法を適用し、最終的な糖鎖付加ポリペプチドを構成することができる。

または、インターフェロン β のアミノ酸配列において所望の位置にシステインが存在しない場合には、最終生産物である糖鎖ポリペプチドがインターフェロン β 活性を有する限り、所望の位置にシステインを導入しフラグメントのN末端とすることも可能である。また、望ましい限りにおいて、導入されたシステインは、各ペプチドフラグメント同士のライゲーションの工程後、上記のようにAla、Ser、Thrへ置換することもできる。

[0052] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造において、フラグメントのN末端として選択するアミノ酸としては、フラグメント数や最終生成物の収率の点に

において、A l a、P h e、V a l、S e r、T h rから選択することが好ましく、還元反応により置換可能であるA l a、P h e、V a lから選択することがより好ましい。より具体的な例としては、インターフェロン β における1-67位までを第一フラグメントとし、68位のA l aをN末端に有する68-88位までを第二フラグメントとし、89位のA l aをN末端に有する89-166位までを第三フラグメントとすることができる。また、例えば、上記の89-166位の第三フラグメントは、89-133位のフラグメントと、134位のA l aをN末端に有する134-166位のフラグメントに分けて製造することも可能である。

[0053] (フラグメントの製造方法)

このようなペプチドフラグメントの製造方法は、生合成、化学合成または無細胞合成等の方法によって製造することができる。特に、糖鎖を有するペプチドフラグメントの合成は、糖鎖を均一とするために、化学合成により製造することが好ましい。化学合成による製造方法としては、固相合成、液相合成等の公知のペプチド合成方法を適用することにより糖鎖付加ポリペプチドを製造する方法を用いることができる。また、各フラグメントのN末端としてA l aを選択するような場合には、各フラグメントをライゲーション後、A l aの代わりにN末端へ導入した特定のC y sをA l aに還元する必要があるため、還元しないC y sを予め選択的に保護しておくことが好ましい。よって、このような場合には、化学合成によりペプチドフラグメントを製造することが簡便であり好ましい。

[0054] 本発明の糖鎖付加ペプチドフラグメントの製造方法であって、かつ、糖鎖の構造が均一である糖鎖付加ポリペプチドの安定した製造方法の具体例としては、糖鎖が付加したアミノ酸として糖鎖付加A s nを使用し、ペプチドフラグメントと同様に、固相合成、液相合成等の公知のペプチド合成方法を適用することにより糖鎖付加ペプチドフラグメントを製造する方法を用いることができる。このような方法は、例えば、Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 6851-6855に記載されている

。また、例えば、国際公開第2004/005330号パンフレット（US 2005222382（A1））にも記載されており、その開示は全体として本明細書に参照により組み込まれる。

[0055] 糖鎖付加ポリペプチドは、例えば、以下に概略を示す糖鎖付加アスパラギンを用いた固相合成によって製造することができる。

（1）脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシ基を樹脂（レジン）へ結合させる。この場合、アミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しているので、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、レジンとアミノ酸とが反応して結合が起こる。

（2）得られた反応物の脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

（3）この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とアミド化反応させる。

（4）上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

（5）上記（3）および（4）の工程を1回以上繰り返すことにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

（6）最後に、酸でレジンを切断することにより、所望のアミノ酸配列を有するペプチドを得ることができる。

ここで、（1）において、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加アスパラギンを用い、当該アスパラギン部分のカルボキシ基とレジンの水酸基とを反応させれば、C末端に糖鎖付加アスパラギンを有する糖鎖付加ペプチドフラグメントを得ることができる。

また、（2）の後、または、（3）と（4）を1回以上の任意の回数繰り返した後、（3）において、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加アスパラギンを用いれば、任意の箇所に糖鎖を付加することができる。また、糖鎖

付加アスパラギンを付加した後に、さらに、（３）と（４）とを繰り返して、ペプチドを伸長させることもできる。

糖鎖付加アミノ酸を結合させた後、脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、その直後に工程（６）を行えば、N末端に糖鎖付加アスパラギンを有するペプチドを得ることができる。

[0056] 上記の合成方法において結合される糖鎖は、同一の構造を有する上述の糖鎖を用いる。このような糖鎖としては、任意の公知の方法により得ることができる。具体的な手法としては、限定されることなく、例えば、糖鎖を化学合成すること（例えば、J. Seifert et al., *Angew Chem Int. Ed.* 2000, 39, p531-534参照）や、天然または人工の糖鎖給源から分離したものや市販されているものを利用することができる。当該手法において、同一の構造を有する糖鎖アミノ酸としては、限定されることなく、例えば、天然または人工の糖鎖給源からの同一構造の糖鎖の分離は、例えば、WO2004/058789に記載の方法により行うことができる。具体的には、鶏卵などの天然の糖鎖給源から、Seko et al., *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1335 (1-2): 23-32などに記載の方法で糖鎖アスパラギンを含む混合物（シアリルグリコペプチド（SGP））を単離し、該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基（例えば、Fmoc）を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得、これをクロマトグラフィーに供することにより、該混合物に含まれる種々の構造の糖鎖を、その構造に応じて分離することができる。また、種々の保護基を有するまたは有しない特定の構造の糖鎖アスパラギンは、例えば、大塚化学株式会社より入手可能である。

[0057] 樹脂（レジン）としては、通常、固相合成で使用する樹脂（レジン）であればよく、例えば、塩素で官能化された2-クロロトリチルクロリド樹脂（メルク社製）や、アミノ基で官能化されたAmino-PEGALレジン（メルク社製）、水酸基を有するNovaSyn TGTアルコール樹脂（メルク社製）、Wangレジン（メルク社製）、HMPA-PEGALレジン（メ

ルク社製)等を用いることができる。また、Amion-PEGALジソルト
アミノ酸との間にリンカーを存在させてもよく、このようなリンカーとして
、例えば、4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸(HMPA)、4-(4-
ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ)-ブチル酢酸(HMPB)等
を挙げることができる。C末端のアミノ酸が樹脂にあらかじめ結合したH-
Cys (Trt)-Trityl Novapeptide樹脂(メルク社製)等も
用いることができる。

また、C末端をアミド化する場合には、例えば、アミノ基で官能化された
Rink-Amide-PEGALジソルト(メルク社製)を用いることができる。
る。このジソルトとペプチドを酸で切断することにより、ペプチドのC末端ア
ミノ酸をアミド化することができる。

樹脂と脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸との結合は、例
えば、水酸基を有する樹脂や塩素で官能化された樹脂を使用するには、アミ
ノ酸のカルボキシ基を樹脂ヘエスチル結合させる。また、アミノ基で官能化
された樹脂を使用する場合には、アミノ酸のカルボキシ基を樹脂にアミド結
合により結合させる。

なお、2-クロロトリチルクロリド樹脂は、固相合成においてペプチド鎖
を伸長する際、末端にあるCysのラセミ化を防止することができる点にお
いて、好ましい。

[0058] アミノ酸としては全てのアミノ酸を用いることができ、例えば、天然アミ
ノ酸である、セリン(Ser)、アスパラギン(Asn)、バリン(Val
)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、アラニン(Ala)、
チロシン(Tyr)、グリシン(Gly)、リジン(Lys)、アルギニン
(Arg)、ヒスチジン(His)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミ
ン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、アスロニン(Thr)、シスチイ
ン(Cys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリ
プトファン(Trp)、プロリン(Pro)を挙げることができる。

[0059] 脂溶性保護基としては、例えば9-フルオレニルメトキシカルボニル(F

moc) 基、t-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を挙げることができる。アミノ酸に脂溶性保護基を導入するには、例えば Fmoc 基を導入する場合には 9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入できる。反応は 0~50℃、好ましくは室温で、約 1~5 時間程度行うのが良い。

[0060] 脂溶性保護基で保護したアミノ酸としては、市販のものも使用することができる。例えば、Fmoc-Ser-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys-OH、Fmoc-Arg-OH、Fmoc-His-OH、Fmoc-Asp-OH、Fmoc-Glu-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr-OH、Fmoc-Cys-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Pro-OH、Boc-Ser-OH、Boc-Asn-OH、Boc-Val-OH、Boc-Leu-OH、Boc-Ile-OH、Boc-Ala-OH、Boc-Tyr-OH、Boc-Gly-OH、Boc-Lys-OH、Boc-Arg-OH、Boc-His-OH、Boc-Asp-OH、Boc-Glu-OH、Boc-Gln-OH、Boc-Thr-OH、Boc-Cys-OH、Boc-Met-OH、Boc-Phe-OH、Boc-Trp-OH、Boc-Pro-OH を挙げることができる。

また、脂溶性保護基で保護したアミノ酸であって、側鎖に保護基を導入したものとして、例えば、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Cys(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu(O

t Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser (t Bu) -OH、Fmoc-Thr (t Bu) -OH、Fmoc-Trp (Boc) -OH、Fmoc-Tyr (t Bu) -OH、Fmoc-Val-OH、Boc-Met-OH、Boc-Thz-OHを挙げることができる。なお、本明細書において、Thzは、Cysのチアゾリジン型 (Thiazolidine-4-carboxylic acid) を示す。

なお、固相合成等によりペプチドフラグメントを合成する際には、N末端をBoc基で保護されたアミノ酸とすることで、ペプチドフラグメント合成後にチオエステル化が必要な際、アミノ基が起こす求核反応による副反応を抑えることができる点で好ましい。

[0061] また、糖鎖付加ポリペプチドのアミノ酸配列中に、リンカーを付加させたい場合には、固相合成の過程において、上記の脂溶性保護基で保護したアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基で保護したリンカーを使用することで、好ましい位置に、リンカーを挿入することができる。

[0062] 水酸基を有する樹脂を用いる場合、エステル化触媒として、例えば1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール (MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。また、2-クロロトリチルクロリド樹脂を用いる場合、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、トリエチルアミン、ピリジン、2, 4, 6-コリジン等の塩基を用いることでエステル化を行うことができる。アミノ酸と脱水縮合剤との使用割合は、前者1重量部に対して、後者が、通常1~10重量部、好ましくは2~5重量部である。

[0063] エステル化反応は、例えば、固相カラムにレジンを入れ、このレジンを溶

剤で洗浄し、その後アミノ酸の溶液を加えることにより行うのが好ましい。洗浄用溶剤としては、例えばジメチルホルムアミド（DMF）、2-プロパノール、ジクロロメタン等を挙げることができる。アミノ酸を溶解する溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）、DMF、ジクロロメタン等を挙げることができる。エステル化反応は0～50℃、好ましくは室温で、約10分～30時間程度、好ましくは15分～24時間程度行うのが良い。

[0064] また、この時固相上の未反応の水酸基を、無水酢酸等を用いてアセチル化してカップリングすることも好ましい。

[0065] 脂溶性保護基の脱離は、例えば塩基で処理することにより行うことができる。塩基としては、例えばピペリジン、モルホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下で行うのが好ましい。溶媒としては、例えばDMSO、DMF、メタノール等を挙げることができる。

[0066] 遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とのアミド化反応は、活性化剤および溶媒の存在下行うのが好ましい。

[0067] 活性化剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩（WSC/HCl）、ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）、カルボニルジイミダゾール（CDI）、ジエチルシアノホスホネート（DEPC）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウム（DIPCI）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、ヒドロキスクシンイミド（HOSu）、ジメチルアミノピリジン（DMAP）、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール（HOAt）、ヒドロキシフタルイミド（HOPht）、ペンタフルオロフェノール（Pfp-OH）、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホス

フエート (HBTU)、1-[ピス (ジメチルアミノ) メチレン]-5-クロロ-1-ヒンゾトリブチルアム 3-オキシド ヘキサフルオロホスフエート (HCTU)、O-(7-アザベンゾトリブチル-1-イル)-1-エート (HA, 1, 3, 3-チトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスホネート (HA, 1, 3, 3-チトラメチルウロニウムヘキサフルオロボレート (TBTU)、3, 4-ジヒドロ-3-ヒンゾ-4-オキサー-1, 2, 3-ベンゾトリブチル (Dhbt) 等を挙げることもできる。

[0068] 活性化剤の使用量は、脂溶性の保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸に対して、1~20当量、好ましくは1~10当量、さらに好ましくは、1~5当量とするのが良い。

[0069] 溶媒としては、例えばDMF、ジクロロメタン等を挙げることもできる。反応は0~50℃、好ましくは室温で、約10~30時間程度、好ましくは15分~24時間程度行うのが良い。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

[0070] 樹脂 (レジン) からペプチド鎖を切断するには酸で処理するのが好ましい。酸としては、例えば、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液 (1:1)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、弗化水素 (HF) 等を挙げることもできる。

[0071] ペプチドフラグメントは、上記のように固相合成等の化学合成により作製することができるが、当業者に公知の合成による方法によっても調製が可能である。例えば、組換えペクターに目的の遺伝子を導入することで、目的のペプチドフラグメントを発現させることができる。本発明で用いる組換えペクターとしては、宿主細胞を形質転換し得るものであればよく、宿主細胞に応じて大腸菌用のプラスミド、枯草菌用のプラスミド、酵母用のプラスミド、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。これらには、その宿主細胞にてタンパク質を適切に発現させ得るプロモーター等の制御配列を有しているものが好ま

しい。また、宿主細胞としては、組換えベクターにて外来性遺伝子を発現できる物であればよく、一般的には、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

[0072] 宿主細胞に組換えベクターを移入する方法としては、一般的に常用されている方法を用いればよく、例えば、大腸菌の場合は、ヒートショック法、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法、酵母の場合は塩化リチウム法やエレクトロポレーション法が利用できる。また、動物細胞の形質転換は、エレクトロポレーション等の物理的方法、あるいは、リボソーム法やリン酸カルシウム法等の化学的方法、あるいはレトロウイルス等のウイルスベクターを用いて行なうことができる。また、ベクター導入後は、当業者に周知の方法により、目的のDNA配列が正しく組込まれていることを確認することが好ましい。形質転換体である宿主細胞の培養形態は、宿主の栄養生理学的性質を考慮して培養条件を選択すればよい。

[0073] また、生合成により作製されるペプチドは、精製されていることが好ましい。ペプチドの精製方法は通常の一般的な精製により行うことができる。たとえば、組換えタンパク質であれば、本発明で使用される組換えタンパク質を発現する菌体あるいは細胞を培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりペプチドの粗抽出液を調製する。緩衝液中には、尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。このようにして得られた抽出液、あるいは培養上清中に含まれるペプチドの精製は、公知の精製方法によって行うことができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、フィルター、限外ろ過、ゲルろ過、電気泳動、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、ペプチドの分離、精製を行うことが可能である。

[0074] また、組換えタンパク質の精製を容易にするために、発現ベクターに種々のタグを組み込んでおくこともできる。タグの例としては、発現効率を向上

させるタグや、精製効率を向上させるタグ等、当業者に周知のタグを使用することができ、例えば、チオレドキシン、GSTタグ、Mycタグ、FLAGタグ、マルトース結合タンパク（MBP）などが挙げられる。

[0075] また、ペプチドフラグメントの所望のN末端にライゲーシオンに使用するシステインが存在しない場合には、当該部位にシステインを導入することもできる。例えば、宿主細胞に導入する核酸分子に、エラープローンPCR、部位特異的変異導入、アセンブリPCR、DNAシャッフリング、*in vivo*変異導入、カセット変異導入、リカーシブアンサンブル変異導入（*recursive ensemble mutagenesis*）、およびエクスポネンシャルアンサンブル変異導入（*exponential ensemble mutagenesis*）を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で周知の任意の変異導入法によって、所望の部位をシステインに変異させることが可能である。

[0076] また、上記のように生合成により作製されたペプチドフラグメントにおいて、アミノ酸側鎖の保護が好ましい場合には、当業者に周知の方法で保護することができる。例えば、システインを保護する際には、N末端のシステインをホルムアルデヒド等で保護し、ペプチド中のCys残基側鎖チオール基をS-9-Fluorenylmethyl thioether（Fm-SR）などを用いて選択的に保護することができる。

[0077] （各フラグメントの連結）

上記のような方法で作製された糖鎖付加ペプチドフラグメントとペプチドフラグメントとを連結する工程には、上述するような、2本のペプチドフラグメント鎖を連結できる任意の公知の方法を用いることができ、例えば、ネイティブケミカルライゲーシオン（NCL、特表2004-518621等を参照）を挙げることができる。NCLは、C末端にチオエステルを有するペプチドフラグメントAと、N末端にシステインを有するペプチドフラグメントBとを緩衝溶液中で混合し、ペプチドフラグメントBのN末端にあるシステインのスルフヒドリル基の求核攻撃により、ペプチドAのC末端のチオ

エステル基を脱離させ、続くアミンの求核攻撃によって2つのペプチド同士を天然のペプチド結合を介して連結する方法である。

[0078] したがって、上述するように、連結工程にNCLを用いる場合には、N末端側に位置するポリペプチドのC末端をチオエステル化する工程が、連結工程に先立って必要となる。かかるチオエステル化は、例えば、C末端のカルボン酸をPyBOPおよびDIPEAを用いて活性化させ、過剰のアルキルチオールを加えることで達成することができる。この手法を用いる場合、フラグメント末端のアミノ酸の α 炭素の立体配置を抑制するため、アルキルチオールの添加は10℃～-80℃の低温にて行うのが好ましく、0℃～-40℃の温度で行うことがより好ましい。特に、上記チオエステル化の反応においては、アルキルチオールの代わりに、チオフェノールを用いることが好ましい。チオフェノールの添加によるチオエステル化反応は、反応速度が速く、反応をほぼ完結させることができる。このため、チオエステル反応中に、ペプチドフラグメントの環化反応の副反応を抑えることができ、好ましい。

また、上記チオエステル化は、Yamamoto et al., J. Am. Chem. Soc. 2008, 130 (2), 501-510に記載のFmoc法やBoc法などによっても行うことができる。

[0079] NCLは、好ましくは当モル量の糖鎖結合部分のポリペプチド鎖と糖鎖非結合部分のポリペプチド鎖とを、緩衝溶液中で混合することにより行う。好ましい態様において、ライゲーシオン反応は、pH6～8を有する緩衝液中で実行され、好ましいpHの範囲は6.5～7.5である。この緩衝液は、水性、有機性、またはその混合物であってもよい。ライゲーシオン反応はさらに、1種または2種以上の触媒および／または1種または2種以上の還元剤、脂質、他の変性剤または可溶化剤などを含むことができる。好ましい触媒の例としては、チオールおよびホスフィン含有物質、たとえばチオフェノール、ベンジルメルカプタン、TCEPおよびアルキルホスフィンなどが挙

げられる。変性剤および／または可溶化剤の例には、グアニジン、尿素水溶液またはT F E、H F I P、DMF、NMPなど有機溶媒溶液、水、またはグアニジンおよび尿素水溶液と混合したアセトニトリルが含まれる。ライゲーション反応の速度は温度により調節することができるが、通常は5～55℃、好ましくは15～40℃で行うことができる。特に、I F N-βのライゲーション反応は、6～8 Mグアニジンの条件で行う事が好ましく、例として、6 Mグアニジンを含む、p H 6. 8～7. 8の緩衝液と、1～3 %チオフェノールとを用いる反応系において良好に進行する。

なお、ライゲーション工程後の生成物と原料との分離が困難な場合には、例えば、反応性の高いC末端チオフェニルエステル体を過剰量利用することで、ライゲーションの連結点となったシステインのチオール基を故意にチオエステル化させることができる。このように、ライゲーションにより生成されたペプチド側鎖のチオール基をチオエステル化させることで、生成物の脂溶性または水溶性を高め分離を容易にすることができる。

なお、この操作により過剰にチオエステル化させたチオール基が生成された場合には、メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム等を用いて、容易にチオール基へもどすことが可能である。

[0080] なお、A I aをN末端として各フラグメントを設計した場合には、上記の方法により、N末端のA I aの位置に、代わりにC y sを有する糖鎖付加ポリペプチドが製造される。よって、このような場合には、作製された糖鎖付加ポリペプチド中において、還元が必要なアミノ酸（C y s）を還元反応により、A I aに戻すことが好ましい。

このようなC y sをA I aに還元する方法としては、ラジカル還元、ヒドリド還元等の方法を使用することができ、特にラジカル還元が好ましい。

ラジカル還元の反応は、例えば、ペプチドフラグメントを含むT C E P等の溶媒中に、t B u S H、2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム、または、グルタチオン等を添加することにより行うことができる。ラジカル還元反応に使用される溶媒としては、水、有機溶媒（アセトニトリルなど）、

バッファー（リン酸バッファーなど）等を用いることができ、具体的には、例えば、トリスカルボキシエチルホスフィン溶液（TCEP溶液）を挙げることができる。また、溶媒中には可溶化剤を含むことができ、例として、6 M～8 M グアニジンを含む事が好ましい。また、ラジカル還元反応は、pH 7.5～pH 8.0の範囲で行うことが好ましく、反応温度は、-15～40℃で行うことが好ましい。pHが7.5より低くなると、反応が完結しないため好ましくない。また、反応時間は、2～6時間とすることができる。6時間を超えると、ピークの減衰が始まり好ましくない。ラジカル還元反応の例としては、7 M グアニジン、0.25 M TCEPを用いて、pH 7.5、20℃、4時間の条件下で行うことができる。

なお、ラジカル還元反応において、還元されることが好ましくないCysは、保護基により保護させることができる。このような保護基としては、Ac基、アルコキシメチル基、トリフェニルメチル基、t-ブチル基、ベンジル基および、β位が置換されたエチル基等公知の保護基を用いることができる。

また、ラジカル還元反応は、反応溶液を入れるデットボリュームが少なくなるような反応容器を採用することが反応を完結させるために好ましい。

[0081] また、上記還元工程の後、Ac基等で保護されているCysがある場合には、Cysの脱保護を行う。

脱保護の工程は、例えば、Cysの保護基がAc基である場合は、水、メタノール、酢酸、またはこれらの混合溶液中において、ヨウ素、酢酸水銀（I）、硝酸銀（I）、または、酢酸銀（I）等を用いて反応させることにより脱保護することができる。また、保護基がアルコキシメチル基である場合は酸加水分解あるいは銀塩、水銀塩等を用いて脱保護することができる。保護基がトリフェニルメチル基である場合は、水銀（I）塩等を用いて脱保護することができる。

上記反応は、通常0～80℃、好ましくは、5～60℃、更に好ましくは10～35℃で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常5分～24時

間程度である。その他の保護基も、当業者に周知の方法により脱保護することができる。また、反応終了後は、ジチオトレイトール（D T T）や塩酸等により処理した後、適宜、公知の方法（例えば、高速液体カラムクロマトグラフィー（H P L C））で精製するのが良い。

[0082] また、S e rをN末端として各フラグメントを設計した場合には、上記の方法により、N末端のS e rの位置に、代わりにC y sを有する糖鎖付加ポリペプチドが製造される。よって、このような場合には、作製された糖鎖付加ポリペプチド中において、S e rへの変換が必要なアミノ酸（C y s）を、ライゲーション後に、S e rへと変換する。

このような変換工程としては、例えば、C y s上の－S H基のメチル化反応、シアン化反応およびそれに続く分子内アシル転位反応により行うことができる。

より具体的には、上記変換工程は、（１）C y sを含むペプチドにおいて、C y sの－S H基にメチル化剤を反応させて、－S M e基を形成させる（メチル化）工程と、（２）（１）の工程により得られたペプチド上の－S M e基とシアン化剤とを反応させ（シアン化反応）、その反応の後、当該ペプチドを塩基性条件下におくことにより、－S M e基を反応中間体を経て－O H基へと変換する（分子内アシル転位反応）工程とを含む。なお、このような変換工程は、例えば国際公開2009／017154に記載されており、その開示は全体として本明細書に参照により組み込まれる。

[0083] C y sの－S H基のメチル化反応に用いるメチル化剤としては、－S H基を－S M e基へ変換できるものであれば特に限定されず、例えば、ヨードメタン、メチルー４－ニトロベンゼンスルホネート等を挙げることができる。

メチル化剤の使用量は、原料ペプチドあるいは原料糖ペプチドのシステイン残基１残基に対して、１～１０００当量とする。好ましくは、１０～１００当量がよい。さらに好ましくは、１５～３０当量がよい。メチル化反応は、０～５０℃、好ましくは２０～３０℃で、約１０分～３０時間程度、好ましくは１５分～１時間程度行うのが良い。

溶媒としては緩衝溶液がよく、そのpHは7～9を示すものがよく、好ましくは8～9を示すものがよい。例えば、6 M グアニジン塩酸液、0.25 M トリス塩酸液、3.3 mM EDTA 溶液にて調整したpH 8.6の緩衝溶液等を挙げることができる。

[0084] また、シアン化剤としては、例えば、安定性等の観点から、臭化シアン、フェニルシアネート等を用いることができ、好ましくは、入手容易な臭化シアンを用いることができる。

シアン化剤の使用量は、-SMe基1残基に対して、1～1000当量とすることができ、好ましくは、10～100当量、より好ましくは、15～30当量とすることができる。シアン化剤との反応は、0～50℃、好ましくは30～40℃で、約30分～100時間程度、好ましくは12時間～50時間程度行うことが望ましい。

シアン化剤との反応は、酸性条件下で行い、特に、好ましくはpH 2～3で行う。酸性水溶性物質、具体的には、蟻酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸等の使用に依り、反応を酸性条件下で行うことができる。この際、使用する酸性水溶性物質は、硫黄原子の酸化防止のため脱気したものであることが特に好ましい。また、シアン化剤の安定性の観点から、反応は遮光下で行うことが好ましい。

溶媒としては、上記のpH 2～3を示す水溶性溶媒、例えば、80%蟻酸溶液、70%蟻酸溶液、2%トリフルオロ酢酸／39%アセトニトリル含有水溶液等を好適に用いることができる。

[0085] なお、ペプチド中にアミノ酸としてメチオニン残基が含まれる場合には、メチオニン残基の-SMe基とメチル化反応で得られる-SMe基とを区別することが好ましい。この区別は、例えば、保護基の導入により行うことができる。本明細書中において、保護基が導入されたメチオニン（保護メチオニン）としては、シアン化反応におけるシアン化剤と反応しない化合物であれば特に限定されず、例えば、スルホキシド型メチオニン（Met(O)：-CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃)を挙げることができる。シアン化反応

後または分子内アシル転位反応後に、保護メチオニン残基は、メチオニン残基へと変換させることができる。なお、脱保護の方法は、当業者に周知の方法により適宜行うことができる。

[0086] 分子内アシル転位反応は、シアン化反応時と比較してより塩基性条件下とすることで行うことができる。これにより、 $-OH$ 基を有するアミノ酸残基を含むペプチドが得られる。

分子内アシル転位反応における塩基性条件は、シアン化反応と比較してより塩基性条件であれば酸性又は中性であってもよく、より特定すれば、シアン化反応で得られた反応中間体のエステル結合に隣接するC原子上の $-NH_2$ 基がプロトン化されない条件であればよい。反応中間体から $-OH$ 基を有するペプチドへの変換を効率よく行うという観点からは、弱塩基性条件又は強塩基性条件を用いることができる。

塩基性条件は、当業者に公知のpH調整剤である塩基性化合物（グアニジン、燐酸二ナトリウム、トリス、炭酸水素ナトリウム、ヒドラジン含水物、50 mM水酸化ナトリウム水溶液等）を添加することにより行うことができる。このとき、塩基性化合物の使用量は、原料ペプチドに対して、0.5～1000当量とすることができ、好ましくは、10～100当量、より好ましくは、15～30当量とすることができる。

分子内アシル転位は、0～50℃、好ましくは20～30℃で、約5分～30時間程度、好ましくは5分～1時間、より好ましくは5分～10分程度行うことが望ましい。

反応の終了は、pHを下げるにより行うことができる。または、そのままpHを変化させずに、HPLC等による精製工程に移ることも可能である。

[0087] なお、ThrをペプチドフラグメントのN末端として選択した場合には、Cysの代わりに、 $-SH$ 基を有するトレオニン（Thr）誘導体（または、当該 $-SH$ 基がジスルフィド結合等により保護されたトレオニン誘導体）残基をペプチドフラグメントのN末端に導入することができる。トレオニン

誘導体が導入されたペプチドフラグメントは、ライゲーション後に、上記メチル化反応、シアン化反応、および分子内アシル転位反応に供することにより、当該ペプチドフラグメント中のトレオニン誘導体をトレオニンへと置換することができる。

[0088] なお、シアル酸を有する糖鎖をペプチドフラグメントへ導入する際には、導入する糖鎖上のシアル酸のカルボキシ基が、ベンジル（Bn）基等を含むアリール基、エチル基（Et）やメチル基（Me）等を含むアルキル基、ジフェニルメチル基、フェナシル基、アルコキシ基又はニトロ基等により環構造を形成する炭素の側鎖が置換されたフェナシル基等により保護されたシアル酸含有糖鎖を用いることが好ましい。より具体的には、例えば、シアル酸のカルボキシ基を、 $-\text{COOBn}$ 、 $-\text{COOEt}$ 、 $-\text{COOMe}$ 、 $-\text{COOCH(Ph)}_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{COPh}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph(OMe)}_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhNO}_2$ 、または、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph(NO}_2)_2$ で表わされるように保護する保護基が好ましい。このように、シアル酸のカルボキシ基をベンジル基等で保護することにより、酸に不安定なシアル酸の脱離を防ぐことが可能である。特に、後述する加熱処理をする場合にも、シアル酸の糖鎖非還元末端からの脱離を防ぐことが可能となる。また、シアル酸のカルボキシ基への保護基の導入は、製造工程におけるHPLC等による分離・精製工程が容易となる。

[0089] 糖鎖上のシアル酸のカルボキシ基の保護反応は、当業者に周知の方法により行うことができる。例えばベンジル基、ジフェニルメチル基、フェナシル基により保護されたシアル酸のカルボキシ基の保護基の脱保護も、当業者に周知の方法により行うことができる。例えば、脱保護の反応は、以下に限定されないが、塩基性条件下で加水分解することによって行うことができる。脱保護の反応は、通常 $0\sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは、 $0\sim 40^\circ\text{C}$ 、更に好ましくは $0\sim 30^\circ\text{C}$ で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常5分～5時間程度である。反応終了後は、リン酸や酢酸などの弱酸によって中和した後、適宜、公知の方法（例えば、高速液体カラムクロマトグラフィー（HPLC

))で精製するのが良い。なお、シアル酸のカルボキシ基の保護基を脱保護する工程は、フォールディング工程の前または、フォールディング工程の後に行うことができる。

[0090] なお、上記で示したインターフェロン β の製造における各工程は、1ポット合成とすることができる。例えば、複数のフラグメントを作成し、複数のライゲーション工程によりインターフェロン β を製造する場合には、複数のライゲーション工程を1ポット合成とすることができる。さらに、フラグメント連結後に、システインの還元工程が必要な場合には、複数のライゲーション工程に加えて、その後のシステインの還元工程も1ポット合成とすることができる。

さらに、ライゲーション工程（必要な場合には、システインの還元工程等）の後に必要な、システインの脱保護工程と糖鎖のシアル酸の脱保護工程も1ポット合成とすることができる。例えば、本願明細書中の実施例2および3に記載の第1工程のライゲーションと第2工程のライゲーションとを1ポット化することにより、収率を約1.6倍向上させることが可能である。

このように、製造工程を1ポット化することにより、HPLC工程の削減による製造工程時間の短縮及び簡便化を図ることができ、さらには収率を向上させることができ、好ましい。

[0091] (フォールディング工程)

上記の方法により糖鎖付加ペプチドフラグメントとペプチドフラグメントとが結合され、必要なアミノ酸の置換の工程や、脱保護工程の後に、全ての部分が連結された糖鎖付加ポリペプチドをフォールディングさせる工程を含むことができる。フォールディング工程は、種々の公知の手法を用いることができるが、限定されることなく、例えば、フォールディングバッファー中での透析を含むことができる。フォールディングバッファーは、限定されることなく、例えば、グルタチオン、シスチノーシステイン、グアニジンなどのグアニジン基を有する化合物またはその塩を含み、pHは6.0～9.0とすることができる。透析は、複数回行うことができ、また、各透析処理の

フォールディングバッファの組成やpHは同一であっても異なってもよい。

より具体的には、例えば3回の透析によりフォールディング工程を行う場合には、1回目の透析を、8 M グアニジンを含むpH 8.0～9.0の溶液中で0.5～6時間行い、2回目の透析条件を2 M～4 M グアニジンを含むpH 8.0～9.0の溶液中で6～24時間行い、3回目の透析を1 mM～20 mM 酢酸水溶液を含むpH 2.0～4.0の溶液中で6～24時間行うことができる。

また、フォールディング工程に用いるフォールディングバッファ中に酸化型および還元型のグルタチオンを含む場合には、酸化型および還元型の濃度の比を、ポリペプチドに付加している糖鎖の種類によって適宜変更することが好ましい。例えば、糖鎖がジシアロ糖鎖である場合には、フォールディングバッファ中に含まれるグルタチオン酸化型とグルタチオン還元型の比を、1 : 1～4 : 1の範囲内とすることが好ましく、1 : 1～3 : 1とすることがより好ましく、特に2 : 1とすることが好ましい。また、糖鎖がアシアロ糖鎖である場合には、グルタチオン酸化型とグルタチオン還元型の比を、4 : 1～16 : 1の範囲内とすることが好ましく、6 : 1～10 : 1の範囲内とすることがより好ましく、特に8 : 1とすることが好ましい。

なお、フォールディング前の原料を溶解する際に原料を低濃度にするすることで、ジスルフィド結合の意図しない部位での形成や、アグリゲーション等を抑制することができる。

ポリペプチドがフォールディングしたことは、ポリペプチドの立体構造を解析する任意の手法で確認することができ、これには、限定されることなく、ジスルフィドマッピング法、立体構造エピトープに特異的な抗体への結合性の評価、X線解析などが含まれる。

[0092] (加熱処理)

また、上記の方法により製造される糖鎖付加ポリペプチドは、加熱処理をすることもできる。加熱処理は、フォールディング工程の前に行うことが好

ましい。また、糖鎖ポリペプチド中において糖鎖の非還元末端にシアル酸を有する場合には、シアル酸のカルボキシ基がベンジル基等で保護されている状態で加熱処理することが好ましい。

加熱処理は、例えば、6 M～10 Mのグアニジン（Gn）を含むpH 3.5～7のバッファー溶液中において、40℃～60℃の温度条件で、約24～72時間行うことができる。加熱処理を行うことで、コンタミネーションのおそれのあるHIV、HCV、HBV等のエンベロープウイルスの不活化をすることができる。そして、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、加熱処理を加えた場合であっても、そのインターフェロンβ活性を維持することができる。

また、システインのチオール基は、加熱処理により副反応を生じる可能性が高いため、加熱処理工程においては、システインのチオール基を、Ac基等で保護しておくことが好ましい。

[0093] （活性）

本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、インターフェロンβ活性を有している。本明細書において、「インターフェロンβ活性」とは、免疫調整作用、抗ウイルス活性、抗腫瘍活性等公知の活性のうち少なくとも1つの活性を有することを意味する。

[0094] 例えば、糖鎖付加ポリペプチドのインターフェロンβ活性は、実施例12に記載の抗腫瘍活性測定試験などを用いて測定することができる。

抗腫瘍活性の測定試験は、例えば、腫瘍を有するマウスに、対象となる糖鎖付加ポリペプチドを皮下投与し、経時的な腫瘍体積の測定により調べることができる。

[0095] なお、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、90%以上の純度を有するものとして提供することができる。また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは、より好ましくは、95%、97%、98%、99.0%、99.5%以上の純度を有している。

本明細書において、糖鎖付加ポリペプチドの純度とは、目的とする糖鎖付

加ポリペプチド作製時の全収量（g）から未反応物等の不純物を除いた収量（g）を、糖鎖付加ポリペプチドの作製時の全収量で割った値に100をかけた値をいう。なお、糖鎖付加ポリペプチド作製時の全収量とは、より具体的には、フォールディング工程の後に続く、HPLCによる生成物の分離工程で得られた目的とする糖鎖付加ポリペプチド分画の収量をいう。また、不純物等には、糖鎖構造が同一でない糖鎖付加ポリペプチドも含まれる。

なお、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを含む組成物とする場合において、糖鎖付加ポリペプチドの純度とは、組成物に含まれる他の成分とは区別して、組成物中に1成分として含まれる糖鎖付加ポリペプチド自体の純度をいう。

このように、高純度の糖鎖付加ポリペプチドを含む組成物は、品質が一定であり、特に医薬品の製造や、アッセイなどの分野において好ましい。

また、糖鎖付加ポリペプチドの純度は、HPLC分析により測定することができる。HPLCにより測定される糖鎖付加ポリペプチドの純度は、HPLCエリア面積%で示すことができる。

[0096]（医薬組成物）

次に、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物について説明する。

本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、インターフェロン β に関連する疾患の治療または予防に有効である。上述の通り、インターフェロン β には種々の作用が知られており、これらの作用に関連する疾患も様々である。例えば、インターフェロン β に関連する疾患には、例えば、膠芽腫、髄芽腫、および、星細胞腫等の脳腫瘍、皮膚悪性黒色腫、B型慢性活動性肝炎、C型慢性肝炎、亜急性硬化性全脳炎、C型代償性肝硬変、ならびに、多発性硬化症等が含まれる。本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、上記疾患の治療または予防に有効である。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成

物の投与対象は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。

[0097] 上記医薬組成物は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いて、通常の医薬組成物の形態に製剤したものである。

このような医薬組成物としては、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、吸入剤、点眼剤、注射剤等が挙げられる。

[0098] 医薬組成物中に含有される本発明の糖鎖付加ポリペプチドの量は、特に限定されず広い範囲内から適宜選択することができるが、通常、医薬組成物中に本発明の糖鎖付加ポリペプチドを1～90重量%含有させるのが好ましく、1～70重量%含有させるのがより好ましい。

[0099] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、さらに他の有効成分を含有することもできるし、他の有効成分を含有する医薬組成物と組み合わせて用いることもできる。また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物は、糖鎖付加ポリペプチドを薬学的に許容可能な塩として含むこともできるし、さらに異なる1以上の本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有することもできる。また、異なる1以上の本発明の糖鎖付加ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物と組み合わせて用いることもできる。また、医薬組成物に含有させることのできるその他の成分としては、当業者に周知の薬学的に許容される担体等を挙げることができる。

[0100] 本発明に係る医薬組成物の投与方法としては特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、疾患の状態、その他の条件に応じた方法で投与される。錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤の場合の投与方法としては、例えば、経口投与が挙げられる。また、注射剤の場合には、単独で、またはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して、静脈内、筋肉内、皮内、皮下または腹腔内に投与することができる。坐剤の場合には

、直腸内に投与される。点眼剤の場合は、結膜嚢などの眼組織に適用する。
吸入剤の場合には、気管支または肺に適用する。

[0101] 上記医薬組成物の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、例えば、体重 1 k g に対して本発明の糖鎖付加ポリペプチドが 0. 001 ~ 9 n m o l、好ましくは 0. 01 ~ 0. 2 n m o l となる投与量とすることができる。

[0102] 上記医薬組成物の投与回数は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件に応じて適宜選択すればよく、例えば、3 回 / 1 日、2 回 / 1 日、1 回 / 1 日、さらにはその血中安定性に応じて、より頻度の少ない投与回数（例えば、1 回 / 週、1 回 / 月など）も選択しうる。好ましくは、上記医薬組成物の投与回数は、1 回以下 / 1 日である。

[0103] 本発明の糖鎖付加ポリペプチドに付加された糖鎖は、体内の代謝系で容易に分解される。また、本発明の一態様において、該糖鎖は生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）として結合して存在する構造を有する。従って、本発明の糖鎖付加ポリペプチドおよび該ペプチドを有効成分として含む医薬組成物は、生体内に投与しても副作用や抗原性を示すことがなく、アレルギー反応や、抗体産生により薬効が得られなくなる心配が少ないなどの利点を有する。

[0104] さらに、本発明の糖鎖付加ポリペプチドは安定して簡便に大量に供給することが可能であり、品質の安定した、高品質の医薬品の提供という観点からも、非常に有用である。

本発明はまた、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの有効量を投与することを特徴とする、インターフェロン β に関連する疾患の治療または予防方法も提供する。

[0105] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、

数字など)が存在することを意図するものであり、それ以外の事項(部材、ステップ、要素、数字など)が存在することを排除しない。

[0106] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語(技術用語および科学用語を含む。)は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書および関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、または、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0107] 本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合がある。

第一の、第二のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素は第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

[0108] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

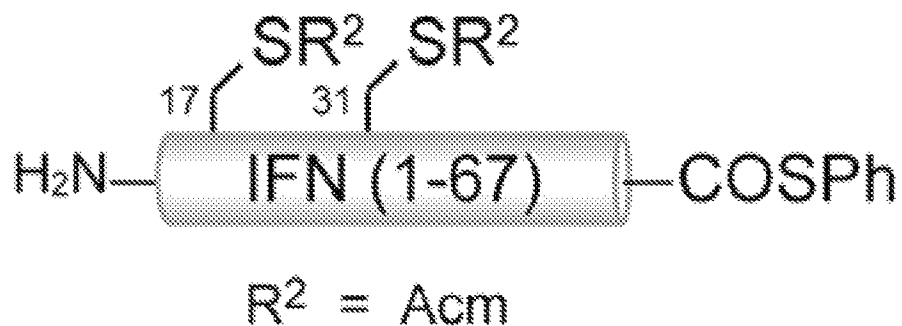
[0109] 下記の実施例においては、インターフェロン β のアミノ酸配列における1-166個のアミノ酸を、1位-67位までのアミノ酸を有するペプチドフラグメントA、68位-88位までのアミノ酸を有する糖ペプチドフラグメントB、89位-166位までのアミノ酸を有するペプチドフラグメントCの3つのフラグメントに分けて製造する方法を例示する。

より具体的には、下記の工程を含む製造方法を例示する：

(1) 下記式(d)で表わされるペプチドフラグメントA、下記式(e)で

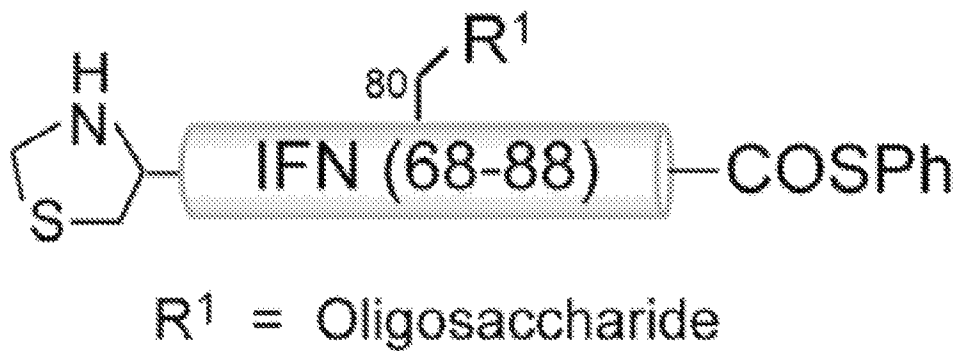
表わされる糖ペプチドフラグメントB、および、下記式（f）で表わされるペプチドフラグメントCを作製する工程。

[化32]



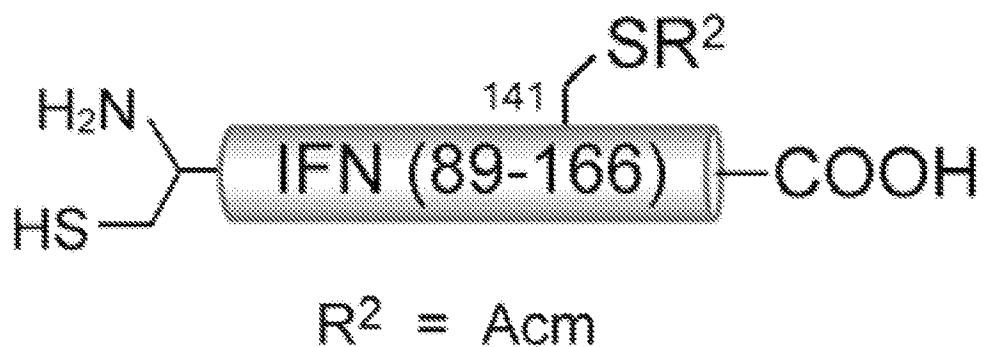
(d)

[化33]



(e)

[化34]



(f)

(I I) フラグメントBとフラグメントCとをライゲーションにより連結させてフラグメント (B+C) を作成し、フラグメント (B+C) のN末端のチアゾリジン型のシステインをシステインに変換する工程 (図1 参照)。

(I I I) フラグメントAとフラグメント (B+C) とをライゲーションにより連結させてフラグメント (A+B+C) を作成する工程 (図2 参照)、

(I V) フラグメント (A+B+C) において、ライゲーションに用いたシステインをアラニンへ還元する工程 (図3 参照)。

(I V) システインの保護基を脱保護する工程 (図4 参照)

なお、各フラグメントにおいて、ライゲーションによる連結に使用するC末端はチオエステル化されており、ライゲーションによる連結に使用するN末端はシステインを有する。また、上記式 (I I) で表わされる糖ペプチドフラグメントBは、C末端側におけるライゲーション工程において、副反応を避けるために、N末端側のシステインをチアゾリジン型にしている。

上記フラグメントBおよびフラグメントCのN末端のアミノ酸は、インターフェロン β における68位および89位のアラニンとなる。しかしながら、ライゲーションにシステインが要求されるため、上記製造例においては、フラグメントBおよびフラグメントCのN末端のアミノ酸を、アラニンの代わりにシステインとして合成し、ライゲーション後に、アラニンへと還元した。

また、本明細書において、例えば、フラグメント (A+B) とは、フラグメントAとフラグメントBとが、連結したものを示す。

[0110] 実施例1 各ペプチドフラグメントの合成

(1-1. ペプチドフラグメントA-SPhの合成)

固相合成用カラムにAmino-PEG Aレジン (メルク社製) (100 μmol) を入れ、塩化メチレン (DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酪酸 (HMPB) (0.25 mmol)、TBTU (0.25 mmol)

及びN-エチルモルホリン (0.25 mmol) をDMF (2 ml) に溶解させてカラムに入れ、室温で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEGアレジンを得、固相合成の固相として用いた。

Fmoc-Phe (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.375 mmol) をDCM (2 ml) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

[0111] 攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン (NMP) (1 ml) に溶解させ、0.45 M HCTU・HOBT/NMP (0.4 mmol) を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9 M DIPEA/NMP (0.8 mmol) を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基およびBoc基で保護したアミノ酸 (0.5 mmol) を使用しアミノ酸を順次縮合させた。

[0112] Fmoc基およびBoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Phe, Fmoc-Ile, Fmoc-Asn (Trt), Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Met, Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Tyr (tBu), Fmoc-Ile, Fmoc-Leu-Thr (ψMe, MePro), Fmoc-Ala, Fmoc-Ala, Fmoc-Asp (OtBu), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Phe, Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc

-Ile, Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Pro, Fmoc-Ile, Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Phe, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Met, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-Cys(Acm), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Cys(Acm), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Phe, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Ser(tBu)-Ser(Ψ Me, MePro), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Ser(tBu), Boc-Metを順次用いて固相樹脂に連結させた。その結果、固相樹脂にPhe-Ile-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Leu-Met-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Thr(Ψ Me, MePro)-Leu-Ala-Ala-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Phe-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Pro-Ile-Asp(OtBu)-Phe-Asn(Trt)-Met-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Leu-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Asn(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Cys(Acm)-Gln(Trt)-Phe-Asn(Trt)-Ser(Ψ Me, M

ePro) - Ser (tBu) - Arg (Pbf) - Gln (Trt) - Leu - Phe - Gly - Leu - Leu - Asn (Trt) - Tyr (tBu) - Ser (tBu) - Met - BocNHの67残基ペプチド(1) (配列番号2)を得た。

- [0113] 上記で得られたペプチド(1)をDCM及びDMFを用いて洗浄した後、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液(1:1)を十分に樹脂が浸る程度加え、18時間室温で攪拌することで、樹脂とペプチド1とを切り離した。切り離した樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣を濃縮し、アミノ酸の側鎖が保護されたペプチド(1) (配列番号3) : Phe-Ile-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Leu-Met-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Ile-Thr(ΨMe, MePro)-Leu-Ala-Ala-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Phe-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Pro-Ile-Asp(OtBu)-Phe-Asn(Trt)-Met-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Leu-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Asn(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Cys(Acm)-Gln(Trt)-Phe-Asn(Trt)-Ser(ΨMe, MePro)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-Leu-Phe-Gly-Leu-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Met-BocNHを得た。

- [0114] 67残基のアミノ酸を有し、アミノ酸側鎖が保護されたペプチド(1) 100 μmol相当を、ナスフラスコに移し、DMF (3.0 mL) に溶解させた後、窒素雰囲気下、-15℃~-20℃に冷却した。このものにチオフェノール (308 μl, 3.0 mmol) を加えた後、PyBOP (260

、0 mg、0.50 mmol)、続いて、DIPEA (85.0 μ l, 0.5 mmol)を加えた。-15℃~-20℃において2時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸 (0.1 mL)を加え、徐々に室温に戻した。室温に戻った後、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95：2.5：2.5)を加え室温で攪拌した。2時間後、再度、この溶液を別途用意したジエチルエーテル (150 mL)に加え沈殿させた後、遠心分離を行い溶液部分を除くことで目的とするペプチドチオエステル体を含む残渣が得られた。この得られた残渣をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速：7.0 mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水、B液：0.09% TFA/10%水/90%AN グラジエント A：B=55：45→55：45 (5分)→25：75 (35分)→5：95 (36分)、isocratic elution for 5min and the n liner gradient]で精製し、C末端がチオフェニルエステルであるペプチドフラグメントA-SPh (1) (配列番号4)：H₂N-Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys (Acm)-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys (Acm)-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-SPhを得た。

ESI-MS: Calcd for C₃₇₈H₅₈₁N₉₇O₁₀₆S₆: [M+4H]⁴⁺ 2094.16、[M+5H]⁵⁺ 1675.53、[M+6H]⁶⁺ 1396.44, found. 2094.06、1675.43、1396.17

[0115] (1-2. ジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB-SPhの合成)

固相合成用カラムにAmino-PEGALレジン(メルク社製)(100 μmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酪酸(HMPB)(0.25 mmol)、TBTU(0.25 mmol)及びN-エチルモルホリン(0.25 mmol)をDMF(2 ml)に溶解させてカラムに入れ、室温で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEGALレジンを得、固相合成の固相として用いた。

Fmoc-Leu(0.50 mmol)、MSNT(0.50 mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375 mmol)をDCM(2 ml)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

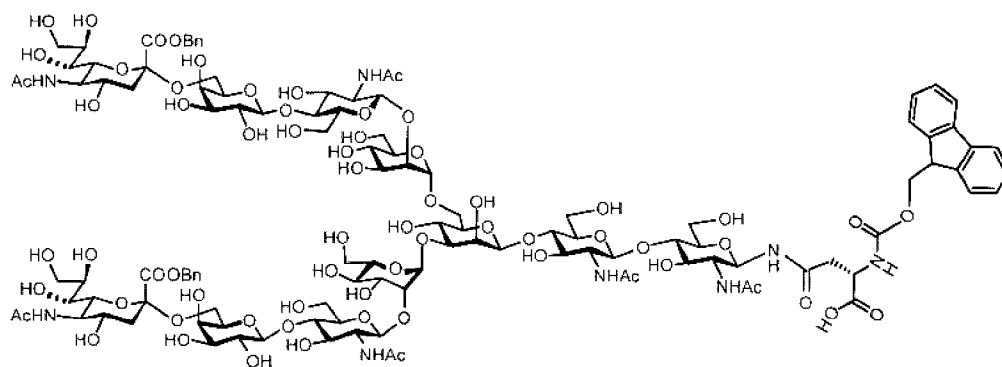
[0116] 攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2 ml)を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン(NMP)(1 ml)に溶解させ、0.45 M HCTU・HOBT/NMP(0.4 mmol)を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9 M DIPEA/NMP(0.8 mmol)を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2 ml)を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸(0.5 mmol)を使用しアミノ酸を順次縮合させた。

[0117] Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Val, Fmoc-Ile, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Glu(OtBu)を順次使い、固相樹脂上にLeu-Leu-Asn(Tr

t) -Glu(OtBu) -Val-Ile-Thr(tBu) -Glu(OtBu) の8残基ペプチドを得た。この8残基ペプチドに対して、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて15分間処理し脱保護し、DMFで洗浄後、別途用意した遠沈管にジベンジルジシアロ糖鎖アスパラギン(g)(547.8mg, 200 μ mol)とDEPBT(59.9mg, 200 μ mol)をDMF/DMSO(1:1混合溶液、3.33ml)に溶解させ、固相合成用カラムに入れ、DIPEA(52.3 μ l, 300 μ mol)を加えて室温にて18時間攪拌した。DMFとDCMとで洗浄すると、固相上にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(dibenzyl-disialooligosaccharide)-FmocNHの9残基糖鎖ペプチド(配列番号5)が得られた。

[化35]



(g)

[0118] その後の糖ペプチド鎖の伸長は、上記で得られた固相樹脂上の9残基糖鎖ペプチドの脂溶性保護基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて脱保護した後、以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg, 0.50mmol)、DIPCI(73.1 μ l, 0.475mmol)をDMF(6.3ml)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラ

ムに入れた。室温で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン／DMF溶液（2ml）を用いて20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基およびBoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Gly, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ser(tBu)-Ser(ΨMe, MePro), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Phe, Fmoc-Ile, Boc-L-thiazolidine-4-carboxylic acidを順次用いて固相樹脂に連結させた。その結果、固相樹脂にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(dibenzyl-disialooligosaccharide)-Trp(Boc)-Gly-Thr(tBu)-Ser(ΨMe, MePro)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Ile-Thz-BocNの21残基の糖鎖付加ペプチドフラグメント（2）（配列番号6）を得た。

[0119] その後、DCM及びDMFを用いて洗浄した後、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液（1：1）を十分に樹脂が浸る程度加え、18時間室温で攪拌することで、樹脂と糖鎖付加ペプチドフラグメントとを切り離した。切り離した樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣を濃縮し、アミノ酸側鎖が保護された21残基の糖鎖ペプチド（2）（配列番号7）：Leu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(dibenzyl-disialooligosaccharide)-Trp(Boc)-Gly-Thr(tBu)-Ser(ΨMe, MePro)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Ile-Thz-BocNを得た。

[0120] 21残基のアミノ酸を有し、アミノ酸側鎖が保護された糖鎖付加ペプチド

フラグメント (2) の $100 \mu\text{mol}$ 相当をナスフラスコに移し、DMF (3.0 mL) に溶解させた後、窒素雰囲気下、 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ に冷却した。このものにチオフェノール ($308 \mu\text{l}$, 3.0 mmol) を加えた後、PyBOP (260.0 mg , 0.50 mmol)、続いて、DIPEA ($85.0 \mu\text{l}$, 0.5 mmol) を加えた。 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ において2時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸 (0.1 mL) を加え、徐々に室温に戻した。室温に戻った後、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95:2.5:2.5) を加え室温で攪拌した。2時間後、この溶液を別途用意したジエチルエーテル (150 mL) に加え沈殿させた後、遠心分離を行い溶液部分を除くことで目的とする糖鎖付加ペプチドチオエステル体を含む残渣が得られた。この得られた残渣をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C_4 , $5 \mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速： 7.0 mL/min 、溶離液 A液： $0.1\% \text{ TFA}$ 水、B液： $0.09\% \text{ TFA} / 10\% \text{ 水} / 90\% \text{ AN}$ 、グラジエント A:B= $65:35 \rightarrow 52:48$ (26分) $\rightarrow 5:95$ (28分)、linear gradient] で精製し、C末端がチオフェニルエステルであるジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB-SPh (2) (配列番号8): $\text{HN-Thz-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn (dibenzyl-disialooligosaccharide)-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-SPh}$ を得た。

ESI-MS: Calcd for $\text{C}_{209}\text{H}_{314}\text{N}_{34}\text{O}_{96}\text{S}_2$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1635.34, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1226.76, found. 1635.04, 1226.51

[0121] (1-3. アシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB-SPhの合成)

固相合成用カラムにAmino-PEGALレジン (メルク社製) ($100 \mu\text{mol}$) を入れ、塩化メチレン (DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチルー3-メトキシフェノキ

シ酪酸 (HMPB) (0.25 mmol)、TBTU (0.25 mmol) 及びN-エチルモルホリン (0.25 mmol) をDMF (2 ml) に溶解させてカラムに入れ、室温で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEG Aレジンを得、固相合成の固相として用いた。

Fmoc-Leu (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.375 mmol) をDCM (2 ml) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

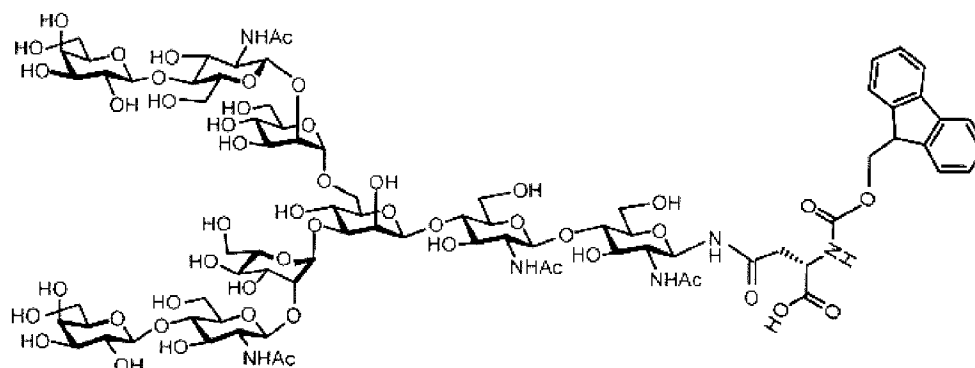
[0122] 攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン (NMP) (1 ml) に溶解させ、0.45M HCTU・HOBT/NMP (0.4 mmol) を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9M DIPEA/NMP (0.8 mmol) を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸 (0.5 mmol) を使用しアミノ酸を順次縮合させた。

[0123] Fmoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Asn (Trt), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Val, Fmoc-Ile, Fmoc-Thr (tBu), Fmoc-Glu (OtBu) を順次用いて固相樹脂上に連結した。その結果、固相樹脂上にLeu-Leu-Asn (Trt)-Glu (OtBu)-Val-Ile-Thr (tBu)-Glu (OtBu) の8残基のペプチドフラグメント (配列番号9) を得た。この8残基のペプチドフラグメントに対して、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (1 ml) を用いて15分

間処理し脱保護し、DMFで洗浄後、別途用意した遠沈管にアシアロ糖鎖アスパラギン誘導体 (h) (547.8 mg, 200 μ mol) とDEPBT (59.9 mg, 200 μ mol) をDMF/DMSO (1:1 混合溶液、3.33 ml) に溶解させ、固相合成用カラムに入れ、DIPEA (52.3 μ l, 300 μ mol) を加えて室温にて18時間攪拌した。DMFとDCMとで洗浄すると、固相上にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(Asialooligosaccharide)-FmocNHの9残基の糖鎖付加ペプチドフラグメント (配列番号10) が得られた。

[化36]



(h)

[0124] その後の糖ペプチド鎖の伸長は、上記で得られた固相樹脂上の9残基糖鎖ペプチドの脂溶性保護基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて脱保護した後、以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt (67.6 mg, 0.50 mmol)、DIPCI (73.1 μ l, 0.475 mmol) をDMF (6.3 ml) に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。室温で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基およびBoc基で保護したアミノ酸

として、Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Gly, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ser(tBu)-Ser(Ψ Me, MePro), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Phe, Fmoc-Ile, Boc-L-thiazolidine-4-carboxylic acidを順次用いて固相樹脂上に連結させた。その結果、固相樹脂にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(Asialooligosaccharide)-Trp(Boc)-Gly-Thr(tBu)-Ser(Ψ Me, MePro)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Ile-Thz-BocNの21残基のアミノ酸側鎖が保護された糖鎖付加ペプチドフラグメント(3)(配列番号11)を得た。

[0125] DCM及びDMFを用いて洗浄した後、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液(1:1)を十分に樹脂が浸る程度加え、18時間室温で攪拌することで、樹脂と糖鎖付加ペプチドフラグメント(3)とを切り離した。切り離した樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣を濃縮し、アミノ酸側鎖が保護された糖鎖付加ペプチドフラグメント(3)(配列番号12): Leu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(Asialooligosaccharide)-Trp(Boc)-Gly-Thr(tBu)-Ser(Ψ Me, MePro)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Ile-Thz-BocNを得た。

[0126] 21残基のアミノ酸側鎖が保護された糖鎖付加ペプチドフラグメント(3)の100 μ mol相当をナスフラスコに移し、DMF(3.0mL)に溶解させた後、窒素雰囲気下、-15℃~-20℃に冷却した。このものにチオフェノール(308 μ l, 3.0mmol)を加えた後、PyBOP(2

60.0 mg, 0.50 mmol)、続いて、DIP EA (85.0 μ l, 0.5 mmol)を加えた。−15℃〜−20℃において2時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸(0.1 mL)を加え、徐々に室温に戻した。室温に戻った後、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95：2.5：2.5)を加え室温で攪拌した。2時間後、再度、この溶液を別途用意したジエチルエーテル(150 mL)に加え沈殿させた後、遠心分離を行い溶液部分を除くことで目的とする糖鎖付加ペプチドオエステル体を含む残渣が得られた。この得られた残渣をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速：7.0 mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水 B液：0.09% TFA/10%水/90%AN、グラジエント A：B=65：35→52：48 (26分)→5：95 (28分)、1 liner gradient]で精製し、C末端がチオフェニルエステルであるアシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB-SPh (3) (配列番号1 3)：HN-THz-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn (Asialo oligosaccharide)-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-A sn-Leu-SPhを得た。

ESI-MS：Calcd for $C_{173}H_{268}N_{32}O_{80}S_2$ ：[M+3H]³⁺ 1381.09, [M+4H]⁴⁺ 1036.07, found d. 1380.90, 1035.92

[0127] (1-4. ペプチドフラグメントCの合成)

固相合成用カラムにAmion-P EGALジン(メルク社製)(100 μ mol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酪酸(HMPB)(0.25 mmol)、TBTU(0.25 mmol)及びN-エチルモルホリン(0.25 mmol)をDMF(2 mL)に溶解させてカラムに入れ、室温で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十

分に洗浄し、HMPB-PEGアレジンを得、固相合成の固相として用いた。

Fmoc-Asn(Trt) (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.375 mmol) をDCM (2 ml) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

[0128] 攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

[0129] Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン (NMP) (1 ml) に溶解させ、0.45 M HCTU・HOBT/NMP (0.4 mmol) を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9 M DIPEA/NMP (0.8 mmol) を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸 (0.5 mmol) を使用しアミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基およびBoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Leu、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Gly、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Leu、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Ile、Fmoc-Phe、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Phe、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Leu、Fmoc-Ile、Fmoc-Glu(OtBu)、Fmoc-Val、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Val、Fmoc-Ile、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Trp(Boc)、Fmoc-Ala、Fmoc-Cys(Acm)、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Tyr(t

Bu) -Ser (Ψ Me, MePro), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Ala, Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-Tyr (tBu), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Ile, Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Tyr (tBu), Fmoc-Tyr (tBu), Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-His (Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Ser (tBu) -Ser (Ψ Me, MePro), Fmoc-Met, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Gly, Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Phe-Thr (Ψ Me, MePro), Fmoc-Asp (OtBu), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Val, Fmoc-Lys (Boc) -Thr (Ψ Me, MePro), Fmoc-Leu, Fmoc-His (Trt), Fmoc-Asn (Trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Tyr (tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Asn (Trt), Boc-Cys (Trt) を順次用いて固相樹脂上に連結させた。その結果、固相樹脂に Asn (Trt) -Arg (Pbf) -Leu-Tyr (tBu) -Gly-Thr (tBu) -Leu-Arg (Pbf) -Asn (Trt) -Ile-Phe-Tyr (tBu) -Phe-Asn (Trt) -Arg (Pbf) -Leu-Ile-Glu (OtBu) -Val-Arg (Pbf) -Val-Ile-Thr (tBu) -Trp (Boc) -Ala-Cys (Acm) -His (Trt) -Ser (Ψ Me, MePro) -Tyr (tBu) -Glu (OtBu) -Lys (Boc) -Ala-Lys (Boc) -Leu-Tyr (tBu) -His (Trt) -Leu-Ile-Arg (Pbf) -Gly-Tyr (tBu) -Tyr (t

Bu) - Arg (Pbf) - Lys (Boc) - Leu - His (Trt) - Leu - Ser (ΨMe, MePro) - Ser (tBu) - Met - Leu - Lys (Boc) - Gly - Arg (Pbf) - Thr (ΨMe, MePro) - Phe - Asp (OtBu) - Glu (OtBu) - Lys (Boc) - Glu (OtBu) - Leu - Lys (Boc) - Glu (OtBu) - Glu (OtBu) - Leu - Val - Thr (ΨMe, MePro) - Lys (Boc) - Leu - His (Trt) - Asn (Trt) - Ile - Gln (Trt) - His (Trt) - Tyr (tBu) - Val - Asn (Trt) - Cys (Trt) - BocNHの78残基のペプチドフラグメント(4) (配列番号14)を得た。

[0130] 上記で得られたペプチドフラグメント(4)をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95：2.5：2.5)を加え室温で3.5時間攪拌して、樹脂とペプチドフラグメント(4)とを切り離した。その後、別途用意したジエチルエーテル(150ml)に加え沈殿させた後、遠心分離操作を行い、目的とするペプチドフラグメント(4)を含む沈殿物と溶液部分とを分けた。その後、溶液部分を除去した後、目的物をHPLCで確認した後、HPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5μm)、φ20×250mm、流速：7.0mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水 B液：0.09% TFA/10%水/90%AN、グラジエント A：B=65：35→65：35 (5分)→30：70 (35分)→5：95 (45分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]で精製し、目的とするペプチドフラグメントC(4) (配列番号15)：H₂N-Cys-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-L

eu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys
(Acm)-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-
Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-
Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-
Asnを得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{441}H_{688}N_{124}O_{114}S_3$: $[M+8H]^{8+}$ 1206.89, $[M+9H]^{9+}$ 1072.90, $[M+10H]^{10+}$ 965.71, $[M+11H]^{11+}$ 804.93, found. 1206.85, 1072.87, 965.58, 877.90, 804.90

[0131] 実施例2 アシアロIFN- β の合成

アシアロ糖鎖を有する活性IFN- β は以下に示す全5工程で合成を行った。

(2-1. 第1工程 アシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントBとペプチドフラグメントCの連結)

21残基のC末端がチオフェニルエステル体のアシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB (3) (1.8 mg) と78残基のペプチドフラグメントC (4) (2.5 mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.2のバッファー溶液 (0.26 ml) (8 M グアニジン塩酸液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM トリスカルボキシエチルホスフィン溶液 (TCEP 溶液) にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (7.8 μ l) を加え、室温で反応を行った。24時間後、反応をHPLCで確認した後、反応溶液に0.2 M メトキシアミン溶液 (0.39 ml) (0.2 M メトキシアミン溶液に20 mM TCEP 溶液を加え調製) を加え、室温で反応を行った。12時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、糖ペプチドフラグメントを含む濾液部分をHPLC [カラム: SHISEIDO

proteonavi (C4, $5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速：7.0 mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水 B液：0.09% TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=65:35→65:35 (5分)→30:70 (35分)→5:95 (45分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient] にて精製し、目的とするインターフェロン β の80位に相当する位置にアシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント (11) (配列番号16) を得た (図5および図6)。

ESI-MS: Calcd for $\text{C}_{607}\text{H}_{950}\text{N}_{156}\text{O}_{194}\text{S}_4$: [M+10H] $^{10+}$ 1367.52, [M+11H] $^{11+}$ 1243.29, [M+12H] $^{12+}$ 1139.77, [M+13H] $^{13+}$ 1052.17, [M+14H] $^{14+}$ 977.09, [M+15H] $^{15+}$ 912.02, [M+16H] $^{16+}$ 855.08, [M+17H] $^{17+}$ 804.84, [M+18H] $^{18+}$ 760.18, found. 1367.64, 1243.33, 1139.80, 1052.20, 977.10, 912.03, 855.09, 804.84, 760.18

[0132] (2-2. 第2工程 ペプチドフラグメントAとアシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント (B+C) との連結)

上記第1工程で得られた、67残基のC末端がチオフェニルエステルペプチド (1) (2.3 mg) とインターフェロン β の80位に相当する位置にアシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント (11) (アシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント (B+C)) (68-166) (1.9 mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.2のバッファー溶液 (0.14 mL) (8M グアニジン塩酸液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM TCEP 溶液にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (4.2 μL) を加え、室温で反応を行った。24時間後、反応をHPLCで確認した後、メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (1.1 mg) を加え、室温で反応を行った。12時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認

した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20x250mm、流速：7.0mL/min、溶離液 A液：0.1%TFA水 B液：0.09%TFA/10%水/90%AN、A：B=55：45→55：45 (5分)→25：75 (35分)→5：95 (36分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]にて精製し、68、89位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(12) (配列番号17)を得た(図7および図8)。

ESI-MS: Calcd for $C_{979}H_{1525}N_{253}O_{300}S_9$: [M+17H] $^{17+}$ 1290.86, [M+18H] $^{18+}$ 1219.20, [M+19H] $^{19+}$ 1155.09, [M+20H] $^{20+}$ 1097.38, [M+21H] $^{21+}$ 1045.18, [M+22H] $^{22+}$ 997.71, [M+23H] $^{23+}$ 954.38, [M+24H] $^{24+}$ 914.65, [M+25H] $^{25+}$ 878.11, [M+26H] $^{26+}$ 844.37, [M+27H] $^{27+}$ 813.14, [M+28H] $^{28+}$ 784.13, [M+29H] $^{29+}$ 757.13, found. 1219.21, 1155.11, 1097.43, 1045.23, 997.71, 954.43, 914.67, 878.11, 844.37, 813.17, 784.13, 757.16

[0133] (2-3. 第3工程 CysのAlaへの還元)

上記第2工程で得られた、68、89位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(12) (1.0mg)をナスフラスコに入れ、pH7.5のバッファー溶液(0.10ml) (8Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液にて調製)に溶解させた後、pH7.5の0.5Mトリスエチルカルボキシホスフィ

ン溶液（TCEP溶液）（0.10ml）（TECP, 6Mグアニジン塩酸溶液、0.2mMリン酸溶液、トリエチルアミンにて調製）、tBuSH（4.2μl）、0.1MVA-044溶液（4.2μl）（VA-044を水に溶解させ調製）を加え、室温にて反応させた。4時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてtBuSHを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5μm)、φ20×250mm、流速：7.0mL/min、溶離液 A液：0.1%TFA水 B液：0.09%TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45→55:45（5分）→25:75（35分）→5:95（36分）、isocratic elution for 5min and then liner gradient] にて精製し、68、89位CysがAlaに変換され、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド（13）（配列番号18）を得た（図9および図10）。

ESI-MS: Calcd for $C_{979}H_{1525}N_{253}O_{300}S_7$: [M+17H]¹⁷⁺ 1287.09, [M+18H]¹⁸⁺ 1215.64, [M+19H]¹⁹⁺ 1151.71, [M+20H]²⁰⁺ 1094.18, [M+21H]²¹⁺ 1042.12, [M+22H]²²⁺ 994.80, [M+23H]²³⁺ 951.59, [M+24H]²⁴⁺ 911.98, [M+25H]²⁵⁺ 875.54, [M+26H]²⁶⁺ 841.91, [M+27H]²⁷⁺ 810.76, [M+28H]²⁸⁺ 781.84, [M+29H]²⁹⁺ 754.92, found. 1287.05, 1215.71, 1151.76, 1094.23, 1042.17, 994.88, 951.64, 911.99, 875.61, 841.95, 810.77, 781.85, 754.94

[0134] (2-4. 第4工程 Ac m基の脱保護)

上記第3工程で得られた、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(13)(0.3mg)をエッペンドルフチューブに入れ、90%酢酸水溶液(0.03ml)に溶解させた後、酢酸銀(0.10mg)を加え、室温にて遮光させながら反応させた。3.5時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液にジチオスレイトール(1.0mg)を加え、室温で5分間攪拌したのち、遠心分離を行い、沈殿物を除く上澄み液を回収した。その回収した上澄み液をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi(C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=50:50 $\rightarrow$ 50:50(5分) $\rightarrow$ 20:80(35分) $\rightarrow$ 5:95(35.5分)、isocratic elution for 5 min and then liner gradient]にて精製し、17位、31位、および、141位のシステインのAc基が脱保護された、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチド(14)(配列番号19)を得た(図11および図12)。

ESI-MS: Calcd for $C_{970}H_{1510}N_{250}O_{297}S_7$: [M+17H] $^{17+}$ 1274.55, [M+18H] $^{18+}$ 1203.80, [M+19H] $^{19+}$ 1140.49, [M+20H] $^{20+}$ 1083.52, [M+21H] $^{21+}$ 1031.97, [M+22H] $^{22+}$ 985.11, [M+23H] $^{23+}$ 942.32, [M+24H] $^{24+}$ 903.10, [M+25H] $^{25+}$ 867.01, [M+26H] $^{26+}$ 833.70, [M+27H] $^{27+}$ 802.86, [M+28H] $^{28+}$ 774.23, [M+29H] $^{29+}$ 747.56, found. 1274.62, 1203.82, 1140.53, 1083.55, 1032.01, 985.15, 942.38, 903.12, 867.05, 833.72, 802.91, 774.29, 747.55

[0135] (2-5. 第5工程 フォールディング工程)

上記第4工程で得られた、80位A s nにアシアロ糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチド(14)(0.32mg)を遠沈管に入れ、pH8.5のバッファー溶液(3.5ml)(8Mグアニジン塩酸液、0.1mMトリス溶液にて調製)に溶解させた後、室温にて静置させた。1時間後、この溶液を透析膜(Spectra/Pro、MWCO;8000)に移し替えた。この透析膜を透析外液A(3Mグアニジン塩酸液、0.1mMトリス溶液、8mM還元型グルタチオン溶液、1mMグルタチオン溶液にて調製)に入れ、4℃にて透析を行った。12時間後、この透析膜を透析外液B(1Mグアニジン塩酸液、0.1mMトリス溶液にて調製)に入れ直し、4℃にて透析を行った。12時間後、この透析膜を透析外液C(10mM酢酸溶液)に入れ直し、4℃にて透析を行った。24時間後、この透析膜を透析外液から取り出し、透析膜内液を遠沈管に移し替えた。透析膜内液をHPLCにて分析したところ、主要ピークの溶出時間は段階透析操作開始時間の17.4分から段階透析操作終了後には11.6分に短縮しており、このピークをESI-MS測定したところ、段階透析操作開始前分子量から2Da減少した分子量が確認できた。そこで、そのままHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi(C4, 5μm)、φ20×250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=50:50→50:50(5分)→20:80(35分)→5:95(35.5分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient]にて精製し糖鎖付加ポリペプチド(15)(配列番号20)を得た(図13および図14)。また、この分取液をHPLCにて純度の確認したところ、99.00%(HPLCエリア面積%)の純度を有していた(図15)。その後、得られた糖鎖付加ポリペプチド(15)の凍結乾燥を行った。この凍結乾燥品物に対して、10mM酢酸水溶液にて再溶解させたのち、分光光度計(紫外吸収法)を用いて糖タンパク質定量を行い

、濃度規定を行い *In vitro* 活性用サンプルとした。また *In vivo* 活性用サンプルとしては糖鎖付加ポリペプチド (15) を含む、糖タンパク質濃度が規定された 10 mM 酢酸水溶液を、製剤化用として別途用意したバッファー (人血清アルブミン (30 mg)、塩化ナトリウム (24.4 mg)、リン酸水素ナトリウム水和物 (7.53 mg)、結晶リン酸二水素ナトリウム (1.41 mg) にて調製) に溶解させ、再度、凍結乾燥した後、日局注射用水を用いて溶解させ調製した。

段階透析後 HPLC 精製後 ESI-MS: Calcd for $C_{970}H_{1508}N_{250}O_{297}S_7$: $[M+9H]^{9+}$ 2406.37, $[M+10H]^{10+}$ 2165.83, $[M+11H]^{11+}$ 1969.03, $[M+12H]^{12+}$ 1805.03, $[M+13H]^{13+}$ 1666.25, $[M+14H]^{14+}$ 1547.31, $[M+15H]^{15+}$ 1444.22, $[M+16H]^{16+}$ 1354.02, $[M+17H]^{17+}$ 1274.43, $[M+18H]^{18+}$ 1203.68, found. 2406.21, 2165.68, 1968.85, 1804.85, 1666.09, 1547.16, 1444.05, 1353.93, 1274.39, 1203.63

[0136] 実施例 3. ジシアロ IFN- β の合成

ジシアロ糖鎖を有する活性 IFN- β は以下に示す全 6 工程で合成を行った。

(3-1. 第 1 工程 ジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B とペプチドフラグメント C との連結)

21 残基の C 末端がチオフェニルエステル体であるジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B (2) (2.2 mg) と 78 残基のペプチドフラグメント C (4) (2.5 mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.3 のバッファー溶液 (0.21 ml) (8 M グアニジン塩酸液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM トリスカルボキシエチルホスフィン溶液 (TCEP 溶液) にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (6.2 μ l) を加え、室温で反応を行った。24 時間後、反応を HPLC で確認した後、反

応溶液に0.2Mメトキシアミン溶液(0.31ml)(0.2Mメトキシアミン溶液に20mMTCEP溶液を加え調製)を加え、室温で反応を行った。12時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、糖ペプチドフラグメントを含む濾液部分をHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45 $\rightarrow$ 55:45(5分) $\rightarrow$ 25:75(35分) $\rightarrow$ 5:95(36分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient]にて精製し、目的とするインターフェロン β の80位に相当する位置にジベンジルジシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント(B+C)(5)(配列番号21)を得た(図16および図17)。

ESI-MS: Calcd for C₆₄₃H₉₉₆N₁₅₈O₂₁₀S₄: [M+10H]¹⁰⁺ 1443.10, [M+11H]¹¹⁺ 1312.63, [M+12H]¹²⁺ 1203.33, [M+13H]¹³⁺ 1110.84, [M+14H]¹⁴⁺ 1031.57, [M+15H]¹⁵⁺ 962.87, [M+16H]¹⁶⁺ 902.75, [M+17H]¹⁷⁺ 849.70, [M+18H]¹⁸⁺ 802.55, [M+19H]¹⁹⁺ 760.37, found. 1443.78, 1312.66, 1203.36, 1110.84, 1031.58, 962.86, 902.76, 849.70, 802.55, 760.36

[0137] (3-2. 第2工程 ペプチドフラグメントAとジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント(B+C)との連結)

67残基のC末端がチオフェニルエステル体のペプチドフラグメントA(1)(2.9mg)と上記第1工程で得られた、インターフェロン β の80位に相当する位置にジベンジルジシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント

(ジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント (B+C)) (5) (3.3 mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.2 のバッファー溶液 (0.22 ml) (8 M グアニジン塩酸液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM TCEP 溶液にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (7.0 μ l) を加え、室温で反応を行った。24 時間後、反応を HPLC で確認した後、メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (2.0 mg) を加え、室温で反応を行った。12 時間後、HPLC と ESI-MS を用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分を HPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A 液: 0.1% TFA 水 B 液: 0.09% TFA/10% 水/90% AN、A:B=55:45 $\rightarrow$ 55:45 (5 分) $\rightarrow$ 25:75 (35 分) $\rightarrow$ 5:95 (36 分)、isocratic elution for 5 min and then linear gradient] にて精製し、68、89 位 Cys に遊離チオール基を持ち、80 位 Asn にジベンジルジシアロ糖鎖を有する 166 残基の糖鎖付加ポリペプチド (6) (配列番号 22) を得た (図 18 および図 19)。

ESI-MS: Calcd for $C_{1015}H_{1571}N_{255}O_{316}S_9$: [M+16H]¹⁶⁺ 1419.15, [M+17H]¹⁷⁺ 1335.73, [M+18H]¹⁸⁺ 1261.58, [M+19H]¹⁹⁺ 1195.23, [M+20H]²⁰⁺ 1135.52, [M+21H]²¹⁺ 1081.50, [M+22H]²²⁺ 1032.38, [M+23H]²³⁺ 987.54, [M+24H]²⁴⁺ 946.44, [M+25H]²⁵⁺ 908.62, [M+26H]²⁶⁺ 873.71, [M+27H]²⁷⁺ 841.39, [M+28H]²⁸⁺ 811.37, [M+29H]²⁹⁺ 783.43, [M+30H]³⁰⁺ 757.35, found. 1419.12, 1335.73, 1261.55, 1195.21, 1135.48, 1081.49

, 1032.35, 987.51, 946.42, 908.61, 873.70, 841.39, 811.36, 783.42, 757.36

[0138] (3-3. 第3工程 CysのAlaへの還元)

上記第2工程で得られた、68、89位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(6)(4.0mg)をナスフラスコに入れ、pH7.5のバッファー溶液(0.28ml)(8Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液にて調製)に溶解させた後、pH7.5の0.5Mトリスエチルカルボキシホスフィン溶液(TECP溶液)(0.28ml)(TECP, 6Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液、トリエチルアミンにて調製)、tBuSH(28 μ l)、0.1MVA-044溶液(28 μ l)(VA-044を水に溶解させ調製)を加え、室温にて反応させた。4時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてtBuSHを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi(C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45 $\rightarrow$ 55:45(5分) $\rightarrow$ 25:75(35分) $\rightarrow$ 5:95(36分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]にて精製し、68、89位CysがAlaに変換され、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(7)(配列番号23)を得た(図20および図21)。

ESI-MS: Calcd for C₁₀₁₅H₁₅₇₁N₂₅₅O₃₁₆S₇: [M+18H]¹⁸⁺ 1258.02, [M+19H]¹⁹⁺ 1191.86, [M+20H]²⁰⁺ 1132.32, [M+21H]²¹⁺ 1078.44, [M+22H]²²⁺ 1029.47, [M+23H]²³⁺ 984.75

, $[M+24H]^{24+}$ 943.76, $[M+25H]^{25+}$ 906.05,
 $[M+26H]^{26+}$ 871.24, $[M+27H]^{27+}$ 839.01, $[M+28H]^{28+}$ 809.08, $[M+29H]^{29+}$ 781.22, found. 1258.02, 1191.86, 1132.31, 1078.39, 1029.43, 984.73, 943.76, 906.04, 871.25, 839.01, 809.06, 781.17

[0139] (3-4. 第4工程 Ac m基の脱保護)

上記第3工程で得られた、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(7)(2.9mg)をエッペンドルフチューブに入れ、90%酢酸水溶液(0.13ml)に溶解させた後、酢酸銀(0.43mg)を加え、室温にて遮光させながら反応させた。3.5時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液にジチオスレイトール(3.0mg)を加え、室温で5分間攪拌したのち、遠心分離を行い、沈殿物を除く上澄み液を回収した。その回収した上澄み液をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=50:50 $\rightarrow$ 50:50(5分) $\rightarrow$ 20:80(35分) $\rightarrow$ 5:95(35.5分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]にて精製し、17位、31位、141位のAc m基が脱保護された、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(8)(配列番号24)を得た(図22および図23)。

ESI-MS: Calcd for $C_{1006}H_{1556}N_{252}O_{313}S_7$: [$M+18H]^{18+}$ 1246.17, $[M+19H]^{19+}$ 1180.64, $[M+20H]^{20+}$ 1121.65, $[M+21H]^{21+}$ 1068.29, $[M+22H]^{22+}$ 1019.78, $[M+23H]^{23+}$ 975.48

, $[M+24H]^{24+}$ 934.88, $[M+25H]^{25+}$ 897.52, $[M+26H]^{26+}$ 863.04, $[M+27H]^{27+}$ 831.11, $[M+28H]^{28+}$ 801.47, $[M+29H]^{29+}$ 773.86, found. 1246.16, 1180.60, 1121.62, 1068.27, 1019.74, 975.44, 934.85, 897.49, 863.00, 831.08, 801.45, 773.81

[0140] (3-5. 第5工程 ベンジル基の脱保護)

上記第4工程で得られた、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(8)(1.9mg)をナスフラスコに入れ、8Mグアニジン溶液(0.17ml)(グアニジン塩酸塩、20mM TCEPにて調製)に溶解させた後、室温にて攪拌した。氷水にて冷却した後、50mM水酸化ナトリウム水溶液(0.85ml)をゆっくり加えた。氷水にて20分間反応させた後、バッファー(2.1ml)(8Mグアニジン溶液、0.2M酢酸ナトリウム水溶液にて調製)を用いて中和した。反応はHPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液をそのままHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi(C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=50:50 $\rightarrow$ 50:50(5分) $\rightarrow$ 20:80(35分) $\rightarrow$ 5:95(35.5分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]にて精製し、80位Asnにジシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(9)(配列番号25)を得た(図24および図25)。

ESI-MS: Calcd for $C_{992}H_{1544}N_{252}O_{313}S_7$: $[M+17H]^{17+}$ 1308.81, $[M+18H]^{18+}$ 1236.16, $[M+19H]^{19+}$ 1171.15, $[M+20H]^{20+}$ 1112.64, $[M+21H]^{21+}$ 1059.71, $[M+22H]^{22+}$ 1011.5

8, [M+23H]²³⁺ 967.64, [M+24H]²⁴⁺ 927.37,
 , [M+25H]²⁵⁺ 890.31, [M+26H]²⁶⁺ 856.11,
 [M+27H]²⁷⁺ 824.44, [M+28H]²⁸⁺ 795.03, [M+29H]²⁹⁺ 767.65, [M+30H]³⁰⁺ 742.09, found. 1308.80, 1236.17, 1171.12, 1112.63, 1059.67, 1011.56, 967.63, 927.34, 890.29, 856.09, 824.42, 795.01, 767.63, 742.08

[0141] (3-6. 第6工程 フォールディング工程)

上記第5工程により得られた、80位Asnにジシアロ糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチド(9)(1.3mg)を遠沈管に入れ、pH8.5のバッファー溶液(13ml)(8Mグアニジン塩酸液、0.1mMトリス溶液にて調製)に溶解させた後、室温にて静置させた。1時間後、この溶液を透析膜(Spectra/Pro、MWCO;8000)に移し替えた。この透析膜を透析外液A(3Mグアニジン塩酸液、0.1mMトリス溶液、2mM還元型グルタチオン溶液、1mMグルタチオン溶液にて調製)に入れ、4℃にて透析を行った。12時間後、この透析膜を透析外液B(1Mグアニジン塩酸液、0.1mMトリス溶液にて調製)に入れ直し、4℃にて透析を行った。12時間後、この透析膜を透析外液C(10mM酢酸溶液)に入れ直し、4℃にて透析を行った。24時間後、この透析膜を透析外液から取り出し、透析膜内液を遠沈管に移し替えた。透析膜内液をHPLCにて分析したところ、主要ピークの溶出時間は段階透析操作開始時間の28.0分から段階透析操作終了後には26.1分に短縮しており、このピークをESI-MS測定したところ、段階透析操作開始前分子量から2Da減少した分子量が確認できた。そこで、そのままHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi(C4, 5μm)、φ20×250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=46:54→46:54(

5分) → 34.5 : 65.5 (28分) → 5 : 95 (28.5分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient] にて精製し、糖鎖付加ポリペプチド (10) (配列番号 26) を得た (図 26 および 図 27)。また、この分取液を HPLC にて純度の確認したところ、99.36% (HPLC エリア面積%) の純度を有していた (図 28)。その後、得られた糖鎖付加ポリペプチド (10) の凍結乾燥を行った。この凍結乾燥品物に対して、10mM 酢酸水溶液にて再溶解させたのち、分光光度計 (紫外吸収法) を用いて糖タンパク質定量を行い、濃度規定を行い *In vitro* 活性用サンプルとした。

また *In vivo* 活性用サンプルとしては糖鎖付加ポリペプチド 10 を含む、糖タンパク質濃度が規定された 10mM 酢酸水溶液を、製剤化用として別途用意したバッファー (人血清アルブミン (30mg)、塩化ナトリウム (24.4mg)、リン酸水素ナトリウム水和物 (7.53mg)、結晶リン酸二水素ナトリウム (1.41mg) にて調製) に溶解させ、再度、凍結乾燥した後、日局注射用水を用いて溶解させ調製した。

段階透析後 HPLC 精製後 ESI-MS: Calcd for $C_{992}H_{1542}N_{252}O_{313}S_7$: $[M+10H]^{10+}$ 2224.08, $[M+11H]^{11+}$ 2021.98, $[M+12H]^{12+}$ 1853.57, $[M+13H]^{13+}$ 1711.06, $[M+14H]^{14+}$ 1588.92, $[M+15H]^{15+}$ 1483.05, $[M+16H]^{16+}$ 1390.43, $[M+17H]^{17+}$ 1308.69, $[M+18H]^{18+}$ 1236.05, found. 2223.88, 2021.80, 1853.43, 1710.91, 1588.77, 1482.92, 1390.35, 1308.61, 1236.01

[0142] 上記実施例 2 および 3 では、インターフェロン β のアミノ酸配列を 3 つのフラグメントに分けて製造したが、下記実施例 4 ~ 6 では、インターフェロン β のアミノ酸配列を 4 つのフラグメントに分けて製造した例を示す。

なお、実施例 4 ~ 6 においては、インターフェロン β における 89 位 - 1

66位までのアミノ酸を有するペプチドフラグメントCを、89-134位のフラグメントC1と、134位のA1aをN末端に有する135-166位のフラグメントC2とにさらに分けて、計4つのペプチドフラグメントから糖鎖付加ポリペプチドを製造する。

[0143] 実施例4. ペプチドフラグメント(C1+C2)の合成

(4-1. ペプチドフラグメントC1-SPHの合成)

固相合成用カラムにAmion-PEGALジン(マルク社製)(100 μ m)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフエニキシ酪酸(HMPB)(0.25mmol)、TBTU(0.25mmol)及びN-エチルモルホリン(0.25mmol)をDMF(2ml)に溶解させてカラムに入れ、室温で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEGALジンを得、固相合成の固相として用いた。

Fmoc-Lys(Boc)(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(2ml)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

[0144] 攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

[0145] Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン(NMP)(1ml)に溶解させ、0.45M HCTU・HOBt/NMP(0.4mmol)を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9M DIPEA/NMP(0.8mmol)を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて15分間処理し脱保護

護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸（0.5 mmol）を使用しアミノ酸を順次縮合させた。

[0146] Fmoc基またはBoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Ile, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Ser(tBu)-Ser(ΨMe, MePro), Fmoc-Met, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gly, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Phe-Thr(ΨMe, MePro), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Val, Fmoc-Lys(Boc)-Thr(ΨMe, MePro), Fmoc-Leu, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Asn(Trt), Boc基で保護したアミノ酸にはBoc-L-thiazolidine-4-carboxylic acidを順次用いて固相樹脂上に連結させた。その結果、固相樹脂にLys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-His(Trt)-Leu-Ile-Arg(Pbf)-Gly-Tyr(tBu)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Leu-His(Trt)-Leu-Ser(ΨMe, MePro)-Ser(tBu)-Met-Leu-Lys(Boc)-Gly-Arg(Pbf)-Thr(ΨMe, MePro)-Phe-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Leu-

Lys (Boc) -Glu (OtBu) -Glu-V
 al-Thr (ΨMe, MePro) -Lys (Boc) -Leu-His
 (Trt) -Asn (Trt) -Ile-Gln (Trt) -His (Trt)
 t) -Tyr (tBu) -Val-Asn (Trt) -Thz-BocNの
 46残基のペプチドフラグメント (16) (配列番号27) を得た。

[0147] 上記で得られたペプチドフラグメント (16) を有する固相樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄した後、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液 (1:1) を十分に樹脂が浸る程度加え、18時間室温で攪拌することで、

樹脂とペプチドフラグメント (16) とを切り離れた。切り離れた樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣を濃縮し、アミノ

酸側鎖が保護されたペプチドフラグメント (16) (配列番号28) : Lys (Boc) -Leu-Thr (tBu) -His (Trt) -Leu-Ile-Arg (Pbf) -Gly-Tyr (tBu) -Tyr (tBu) -Leu-Arg (Pbf) -Lys (Boc) -Leu-His (Trt) -Leu-Ser (ΨMe, MePro) -Ser (tBu) -Met-Leu-Lys (Boc) -Gly-Arg (Pbf) -Thr (ΨMe, MePro) -Phe-Asp (OtBu) -Glu (OtBu) -Lys (Boc) -Glu (OtBu) -Leu-Lys (Boc) -Glu (OtBu) -Leu-Val-Thr (ΨMe, MePro) -Lys (Boc) -Leu-His (Trt) -Asn (Trt) -Ile-Gln (Trt) -His (Trt) -Tyr (tBu) -Val-Asn (Trt) -Thz-BocNを得た。

[0148] 46残基の保護ペプチドフラグメント (16) の100μmol相当をチアソラスコに移し、DMF (3.0mL) に溶解させた後、窒素雰囲気下、-15℃~-20℃に冷却した。このものにチオフェノール (308μl, 3.0mmol) を加えた後、PyBOP (260.0mg, 0.50mmol)、続いて、DIPPA (85.0μl, 0.5mmol) を加えた。-15℃~-20℃において2時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸 (0.1

mL)を加え、徐々に室温に戻した。室温に戻った後、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95：2.5：2.5)を加え室温で攪拌した。2時間後、この溶液を別途用意したジエチルエーテル(150mL)に加え沈殿させた後、遠心分離を行い、溶液部分を除くことで目的とするペプチドチオエステル体を含む残渣が得られた。この得られた残渣をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速：7.0mL/min、溶離液 A液：0.1%TFA水 B液：0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A：B=65：35 $\rightarrow$ 65：35 (5分) $\rightarrow$ 30：70 (35分) $\rightarrow$ 5：95 (45分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]で精製し、C末端がチオフェニルエステルであるペプチドフラグメントC1-SPh (16) (配列番号29)：HN-Thz-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-SPhを得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{263}H_{412}N_{72}O_{67}S_3$: [M+4H]⁴⁺ 1438.68, [M+5H]⁵⁺ 1151.14, [M+6H]⁶⁺ 959.45, [M+7H]⁷⁺ 822.53, [M+8H]⁸⁺ 719.84, found. 1438.51, 1151.00, 959.34, 822.43, 719.74

[0149] (4-2. ペプチドフラグメントC2の合成)

固相合成用カラムにAmino-PEGALレジン(メルク社製)(100 μ mol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキ

シ酪酸 (HMPB) (0.25 mmol)、TBTU (0.25 mmol) 及びN-エチルモルホリン (0.25 mmol) をDMF (2 ml) に溶解させてカラムに入れ、室温で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEG Aレジンを得、固相合成の固相として用いた。

Fmoc-Asn(Trt) (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.375 mmol) をDCM (2 ml) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

[0150] Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン (NMP) (1 ml) に溶解させ、0.45 M HCTU・HOBT/NMP (0.4 mmol) を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9 M DIPEA/NMP (0.8 mmol) を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 ml) を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸 (0.5 mmol) を使用しアミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基またはBoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Leu、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Gly、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Leu、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Ile、Fmoc-Phe、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Phe、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Leu、Fmoc-Ile、Fmoc-Glu(OtBu)、Fmoc-Val、Fmoc-

Arg (Pbf), Fmoc-Val, Fmoc-Ile, Fmoc-Thr (tBu), Fmoc-Trp (Boc), Fmoc-Ala, Fmoc-Cys (AcM), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Tyr (tBu)-Ser (ΨMe, MePro), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Lys (Boc), Boc-Cys (Trt) を順次用いて固相樹脂上に連結した。その結果、固相樹脂に Asn (Trt)-Arg (Pbf)-Leu-Tyr (tBu)-Gly-Thr (tBu)-Leu-Ar g (Pbf)-Asn (Trt)-Ile-Phe-Tyr (tBu)-Phe-Asn (Trt)-Arg (Pbf)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Val-Arg (Pbf)-Val-Ile-Thr (tBu)-Trp (Boc)-Ala-Cys (AcM)-His (Trt)-Ser (ΨMe, MePro)-Tyr (tBu)-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Cys (Trt)-BocNHの32残基のペプチドブ ラグメント (17) (配列番号30) を得た。

[0151] 上記で得られたペプチドブ ラグメント (17) をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95：2.5：2.5) を加え室温で3.5時間攪拌すること で、樹脂とペプチドブ ラグメント (17) とを切り離した。その後、別途用意したジエチルエーテル (150 ml) に加え沈殿させた後、遠心分離操作を行い、目的とするペプチドを含む沈殿物と溶液部分とを分けた。その後、溶液部分を除去した後、目的物をHPLCで確認した後、HPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μm)、φ20×250 mm、流速：7.0 mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水 B液：0.09% TFA/10%水/90%AN、ブ ラグメント A：B =65：35→65：35 (5分) →30：70 (35分) →5：95 (45分)、isocratic elution for 5 min and then linear gradient] で精製し、目的とするペプチドブ ラグメントC2 (17) (配列番号31)：H₂N-Cys-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys (AcM)-Ala-Trp-Th

r-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asnを得た。

ESI-MS: ESI-MS: Calcd for $C_{185}H_{282}N_{52}O_{47}S_2$: $[M+3H]^{3+}$ 1351.22, $[M+4H]^{4+}$ 1013.67, $[M+5H]^{5+}$ 811.13, found. 1351.02, 1013.51, 811.01

[0152] 実施例5. ペプチドフラグメントC1とペプチドフラグメントC2の連結

46残基のC末端がチオフェニルエステル体のペプチドフラグメントC1-SPh(16)(8.7mg)と32残基のペプチドフラグメントC2(17)(3.5mg)の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH6.8のバッファー溶液(1.0ml)(8Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液、20mMトリスカルボキシエチルホスフィン溶液(TCEP溶液)にて調製)に溶解させた後、チオフェノール(30 μ l)を加え、室温で反応を行った。24時間後、反応をHPLCで確認した後、反応溶液に0.2Mメトキシアミン溶液(1.5ml)(0.2Mメトキシアミン溶液に20mM TCEP溶液を加え調製)を加え、室温で反応を行った。12時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物フラグメントを含む濾液部分をHPLC[カラム: SHISEIDO proteonavi(C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速: 7.0mL/min、溶離液 A液: 0.1%TFA水 B液: 0.09%TFA/10%水/90%AN、グラジエント A:B=65:35 $\rightarrow$ 65:35(5分) $\rightarrow$ 30:70(35分) $\rightarrow$ 5:95(45分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]にて精製し、目的とするペプチドフラグメント(18)(配列番号32)(ペプチドフラグメント(C1+C2))(89-166)を得

た (図 29)。

ESI-MS: Calcd for $C_{441}H_{688}N_{124}O_{114}S_4$: $[M+8H]^{8+}$ 1210.90, $[M+9H]^{9+}$ 1076.47, $[M+10H]^{10+}$ 968.92, $[M+11H]^{11+}$ 880.93, $[M+12H]^{12+}$ 807.60, $[M+13H]^{13+}$ 745.55, $[M+14H]^{14+}$ 692.37, found. 1210.77, 1076.46, 968.91, 880.92, 808.50, 745.47, 692.37

[0153] 実施例 6. アシアロ IFN- β 合成法 2

(6-1. アシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B とペプチドフラグメント (C1+C2) との連結)

21 残基の C 末端がチオフェニルエステル体のアシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B (3) (1.5 mg) と 78 残基のペプチドフラグメント (18) (ペプチドフラグメント C1・C2) (2.4 mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.2 のバッファー溶液 (0.25 ml) (8 M グアニジン塩酸液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM トリスカルボキシエチルホスフィン溶液 (TCEP 溶液) にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (7.4 μ l) を加え、室温で反応を行った。24 時間後、反応を HPLC で確認した後、反応溶液に 0.2 M メトキシアミン溶液 (0.37 ml) (0.2 M メトキシアミン溶液に 20 mM TCEP 溶液を加え調製) を加え、室温で反応を行った。12 時間後、HPLC と ESI-MS を用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、糖ペプチドフラグメントを含む濾液部分を HPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A 液: 0.1% TFA 水 B 液: 0.09% TFA / 10% 水 / 90% AN、グラジエント A : B = 65 : 35 $\rightarrow$ 65 : 35 (5 分) $\rightarrow$ 30 : 70 (35 分) $\rightarrow$ 5 : 95 (45 分)、isocratic elution for 5

min and then liner gradient]にて精製し、目的とするインターフェロン β の80位に相当する位置にアシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント(19)(配列番号33)(アシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント(B+C1+C2))(68-166)を得た(図30)。

ESI-MS: Calcd for $C_{607}H_{950}N_{156}O_{194}S_5$: [M+10H] $^{10+}$ 1370.73, [M+11H] $^{11+}$ 1246.21, [M+12H] $^{12+}$ 1142.44, [M+13H] $^{13+}$ 1054.64, [M+14H] $^{14+}$ 979.38, [M+15H] $^{15+}$ 914.15, [M+16H] $^{16+}$ 857.08, [M+17H] $^{17+}$ 806.72, [M+18H] $^{18+}$ 761.96, [M+19H] $^{19+}$ 721.91, found. 1370.66, 1246.14, 1142.38, 1054.56, 979.38, 914.08, 856.99, 806.65, 761.92, 721.86

[0154] (6-2 ペプチドフラグメントAと糖ペプチドフラグメントB+C1+C2の連結)

67残基のC末端がチオフェニルエステル体のペプチドフラグメントA(1)(3.0mg)と上記6-1.で得られたインターフェロン β の80位に相当する位置にアシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント(19)(アシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB+C1+C2)(68-166)(3.3mg)の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH7.2のバッファー溶液(0.24ml)(8Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液、20mMTCEP溶液にて調製)に溶解させた後、チオフェノール(7.2 μ l)を加え、室温で反応を行った。24時間後、反応をHPLCで確認した後、メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム(2.1mg)を加え、室温で反応を行った。12時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフ

フィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20x250mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A液: 0.1% TFA水 B液: 0.09% TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45→55:45 (5分)→25:75 (35分)→5:95 (36分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient] にて精製し、68、89、135位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(20) (配列番号34)を得た(図31)。

ESI-MS: Calcd for $C_{979}H_{1525}N_{253}O_{299}S_{11}$: [M+17H]¹⁷⁺ 1293.69, [M+18H]¹⁸⁺ 1221.88, [M+19H]¹⁹⁺ 1157.62, [M+20H]²⁰⁺ 1099.79, [M+21H]²¹⁺ 1047.47, [M+22H]²²⁺ 999.90, [M+23H]²³⁺ 956.47, [M+24H]²⁴⁺ 916.66, [M+25H]²⁵⁺ 880.03, [M+26H]²⁶⁺ 846.22, [M+27H]²⁷⁺ 814.92, [M+28H]²⁸⁺ 785.85, found. 1292.75, 1221.01, 1156.79, 1098.99, 1046.71, 999.19, 955.78, 916.00, 879.39, 845.63, 814.34, 785.29

[0155] (6-3 CysのAlaへの還元)

上記6-2. で得られた、68、89、135位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(20) (1.1 mg)をナスフラスコに入れ、pH7.5のバッファー溶液(0.20 ml) (8Mグアニジン塩酸液、0.2 mMリン酸溶液にて調製)に溶解させた後、pH7.5の0.5 Mトリスエチルカルボキシホスフィン溶液(TCEP溶液) (0.20 ml) (TECP, 6Mグアニジン塩酸液、0.2 mMリン酸溶液、トリエチルアミンにて調製)、tBuSH (20 μ l)、0.1 MVA-044溶液(20 μ l) (VA-044

を水に溶解させ調製)を加え、室温にて反応させた。4時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてtBuSHを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速: 7.0mL/min、溶離液 A液: 0.1%TFA水 B液: 0.09%TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45 $\rightarrow$ 55:45 (5分) $\rightarrow$ 25:75 (35分) $\rightarrow$ 5:95 (36分)、isocratic elution for 5min and then liner gradient]にて精製し、68、89、135位CysがAlaに変換され、80位Asnにアシアロ糖鎖を有する166残基の糖鎖付加ポリペプチド(21)(配列番号35)を得た(図32)。

ESI-MS: Calcd for $C_{979}H_{1525}N_{253}O_{300}S_7$: [M+17H] $^{17+}$ 1287.09, [M+18H] $^{18+}$ 1215.64, [M+19H] $^{19+}$ 1151.71, [M+20H] $^{20+}$ 1094.18, [M+21H] $^{21+}$ 1042.12, [M+22H] $^{22+}$ 994.80, [M+23H] $^{23+}$ 951.59, [M+24H] $^{24+}$ 911.98, [M+25H] $^{25+}$ 875.54, [M+26H] $^{26+}$ 841.91, [M+27H] $^{27+}$ 810.76, [M+28H] $^{28+}$ 781.84, [M+29H] $^{29+}$ 754.92, found. 1287.11, 1215.69, 1151.72, 1094.20, 1042.16, 994.83, 951.61, 911.98, 875.57, 841.93, 810.80, 781.88, 754.88

[0156] 上記6-3. で得られた糖鎖付加ポリペプチド(21)は、2-4. および2-5. に記載の工程と同様の条件のAc基の脱保護およびフォールディング工程を経ることで、糖鎖付加ポリペプチド(15)を得ることができる。

[0157] 実施例 7. ジシアロ I F N- β 合成法 2

(7-1 ジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B とペプチドフラグメント (C1+C2) との連結)

21 残基の C 末端がチオフェニルエステル体のジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B (2) (17.9 mg) と 78 残基のペプチドフラグメント (18) (ペプチドフラグメント (C1+C2)) (22.9 mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.2 のバッファー溶液 (2.37 ml) (8 M グアニジン塩酸液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM トリスカルボキシエチルホスフィン溶液 (TCEP 溶液) にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (71.1 μ l) を加え、室温で反応を行った。24 時間後、反応を HPLC で確認した後、反応溶液に 0.2 M メトキシアミン溶液 (3.55 ml) (0.2 M メトキシアミン溶液に 20 mM TCEP 溶液を加え調製) を加え、室温で反応を行った。12 時間後、HPLC と ESI-MS を用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、糖ペプチドフラグメントを含む濾液部分を HPLC [カラム: SHISEIDO proteon avi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A 液: 0.1% TFA 水 B 液: 0.09% TFA / 10% 水 / 90% AN、A : B = 55 : 45 $\rightarrow$ 55 : 45 (5 分) $\rightarrow$ 25 : 75 (35 分) $\rightarrow$ 5 : 95 (36 分)、isocratic elution for 5 min and then liner gradient] にて精製し、目的とするインターフェロン β の 80 位に相当する位置にジベンジルジシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント (22) (配列番号 36) を得た (図 33)。

ESI-MS: Calcd for $C_{643}H_{996}N_{158}O_{210}S_4$: [M+11H]¹¹⁺ 1315.55, [M+12H]¹²⁺ 1206.00, [M+13H]¹³⁺ 1113.31, [M+14H]¹⁴⁺ 1033.86,

[M+15H]¹⁵⁺ 965.00, [M+16H]¹⁶⁺ 904.75, [M+17H]¹⁷⁺ 851.59, [M+18H]¹⁸⁺ 804.34, [M+19H]¹⁹⁺ 762.06, found. 1315.59, 1205.97, 1113.28, 1033.83, 964.98, 904.74, 851.57, 804.32, 762.02

[0158] (7-2 ペプチドフラグメントAとジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント (B+C1+C2))

67残基のC末端がチオフェニルエステル体のペプチドフラグメントA (1) (4.7mg) と上記7-1. で得られたインターフェロンβの80位に相当する位置にジベンジルジシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント (22) (5.2mg) の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH7.2のバッファー溶液 (0.35ml) (8Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液、20mMTCEP溶液にて調製) に溶解させた後、チオフェノール (11μl) を加え、室温で反応を行った。24時間後、反応をHPLCで確認した後、メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (3.3mg) を加え、室温で反応を行った。12時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5μm)、φ20×250mm、流速: 7.0mL/min、溶離液 A液: 0.1%TFA水 B液: 0.09%TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45→55:45 (5分) →25:75 (35分) →5:95 (36分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient] にて精製し、68、89、135位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基のペプチドフラグメント (23) (配列番号37) を得た (図34)。

ESI-MS: Calcd for C₁₀₁₅H₁₅₇₁N₂₅₅O₃₁₆S₁₀:

$[M+16H]^{16+}$ 1421.16, $[M+17H]^{17+}$ 1337.62,
 $[M+18H]^{18+}$ 1263.36, $[M+19H]^{19+}$ 1196.92,
 $[M+20H]^{20+}$ 1137.13, $[M+21H]^{21+}$ 1083.02,
 $[M+22H]^{22+}$ 1033.84, $[M+23H]^{23+}$ 988.93,
 $[M+24H]^{24+}$ 947.77, $[M+25H]^{25+}$ 909.90,
 $[M+26H]^{26+}$ 874.94, $[M+27H]^{27+}$ 842.57,
 $[M+28H]^{28+}$ 812.52, $[M+29H]^{29+}$ 784.53,
 found. 1421.13, 1337.57, 1263.35, 1196.90,
 1137.08, 1082.99, 1033.80, 988.89,
 947.73, 909.87, 874.92, 842.55, 812.51,
 784.50

[0159] (7-3 CysのAlaへの還元)

上記7-2. で得られた68、89、135位Cysに遊離チオール基を持ち、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基のペプチドフラグメント(23)(6.1mg)をナスフラスコに入れ、pH7.5のバッファー溶液(0.27ml)(8Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液にて調製)に溶解させた後、pH7.5の0.5Mトリスカルボキシエチルホスフィン溶液(TCEP溶液)(0.27ml)(TECP, 6Mグアニジン塩酸液、0.2mMリン酸溶液、トリエチルアミンにて調製)、tBuSH(100μl)、0.1MVA-044溶液(100μl)(VA-044を水に溶解させ調製)を加え、室温にて反応させた。4時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液を遠沈管に移し替え、ジエチルエーテルを用いてチオフェノールを抽出した後、目的物を含む水層をメンブレンフィルターで濾過し、目的物を含む濾液部分をHPLC[カラム:SHISEIDO proteonavi(C4, 5μm)、φ20×250mm、流速:7.0mL/min、溶離液 A液:0.1%TFA水 B液:0.09%TFA/10%水/90%AN、A:B=55:45→55:45(5分)→25:75(35

分) → 5 : 95 (36分)、isocratic elution for 5 min and then liner gradient] にて精製し、68、89、135位CysがAlaに変換され、80位Asnにジベンジルジシアロ糖鎖を有する166残基のペプチドフラグメント(24) (配列番号38)を得た(図35)。

ESI-MS: Calcd for $C_{1015}H_{1571}N_{255}O_{316}S_7$: [M+18H]¹⁸⁺ 1258.02, [M+19H]¹⁹⁺ 1191.86, [M+20H]²⁰⁺ 1132.32, [M+21H]²¹⁺ 1078.44, [M+22H]²²⁺ 1029.47, [M+23H]²³⁺ 984.75, [M+24H]²⁴⁺ 943.76, [M+25H]²⁵⁺ 906.05, [M+26H]²⁶⁺ 871.24, [M+27H]²⁷⁺ 839.01, [M+28H]²⁸⁺ 809.08, [M+29H]²⁹⁺ 781.22, found. 1258.05, 1191.87, 1132.37, 1078.47, 1029.51, 984.77, 943.79, 906.05, 871.25, 839.04, 809.05, 781.24

[0160] 上記7-3. で得られた糖鎖付加ポリペプチド(24)は、3-4、3-5、および3-6に記載の工程と同様の条件のAcM基の脱保護、ベンジル基の脱保護、およびフォールディング工程を経ることで、糖鎖付加ポリペプチド(10)を得ることができる。

[0161] 上記実施例1~3では、AlaをN末端に有するペプチドフラグメントを設計し、ライゲーシオンに用いた。そのため、実施例1~3においては、当該ペプチドフラグメントのN末端に位置するAlaの位置にCysを導入したペプチドフラグメントを合成し、ライゲーシオン後、CysをAlaへ還元した。

以下の実施例では、SerをN末端に有するペプチドフラグメントを設計した。すなわち、Serの位置にCysを導入したペプチドフラグメントを合成し、ライゲーシオン後、CysをSerへ変換する例を示す。なお、より具体的には、インターフェロンβのアミノ酸配列における68位-88位

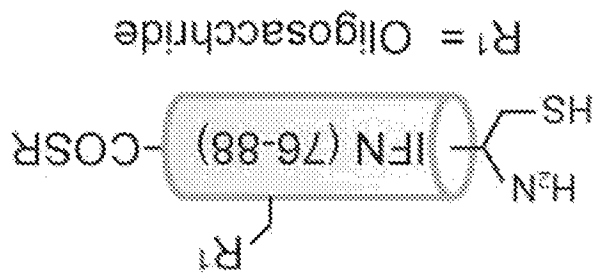
までのアミノ酸を有するペプチドフラグメントBを、68位-75位のフラグメントB2と、76位のSerの代わりにCysをN末端に有する76位-88位のフラグメントB1とに分けて合成し、インターフェロンの76位に相当する位置のアミノ酸がCysであるペプチドフラグメント(B1+B2)-SR(Cys体)という)をライゲーションにより合成するライゲーション工程、およびペプチドフラグメント(B1+B2)-SR(Cys体)におけるインターフェロンの76位に相当する位置のCysをSerへ変換する工程を経て、インターフェロンの76位に相当する位置のアミノ酸がSerであるペプチドフラグメント(B1+B2)-SRを合成する例を示す。

[0162] すなわち、より具体的には、下記の工程を含む製造方法を例示する：

(1) 下記式(1)で表わされるペプチドフラグメントB1を作製する工程

。

[化37]

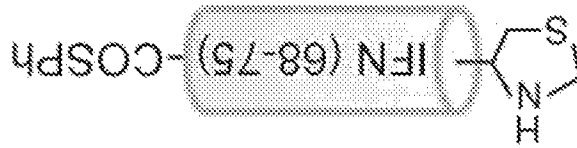


R¹ = Oligosacchride

(1)

(11) 下記式(1)で表わされる糖ペプチドB2を作製する工程

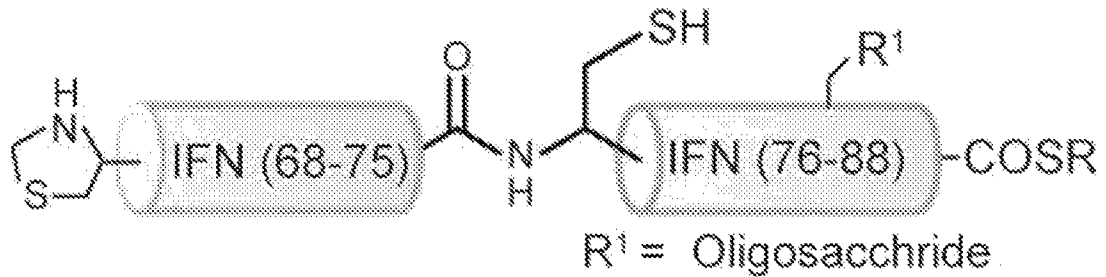
[化38]



(j)

(111) ペプチドB1と糖ペプチドB2を連結することにより、下記式(k)で表わされる糖ペプチドを作製し、その後、当該ペプチド上の特定のシステインをセリンに変換する工程(図43~45参照)

[化39]



(k)

[0163] 実施例8. ジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント(B1+B2)-SRの合成

(8-1 ペプチドフラグメントB1-SRの合成)

固相合成用カラムにHMPB-ChemMatrix(Biotage社製)(0.10mmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。

Fmoc-Leu(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(2ml)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

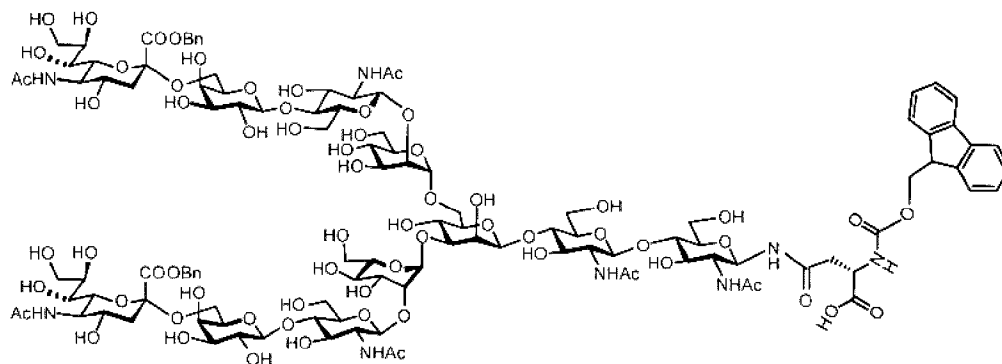
攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン(NMP)(1ml)に溶解させ、0.45M HCTU·HOBT/NMP(0.4mmol)を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9M DIPEA/NMP(0.8mmol)を固相合成用カラムに加えた。室温

で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸(0.5mmol)を使用しアミノ酸を順次縮合させた。

Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Val, Fmoc-Ile, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Glu(OtBu)を順次使い、固相樹脂上にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)の8残基ペプチドを得た。この8残基ペプチドに対して、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて15分間処理し脱保護し、DMFで洗浄後、別途用意した遠沈管にジベンジルジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体(g)(547.8mg, 200 μ mol)とDEPBT(59.9mg, 200 μ mol)をDMF/DMSO(1:1混合溶液、3.33ml)に溶解させ、固相合成用カラムに入れ、DIPEA(52.3 μ l, 300 μ mol)を加えて室温にて18時間攪拌した。DMFとDCMとで洗浄すると、固相上にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(dibenzyl-disialooligosaccharide)-FmocNHの9残基糖鎖ペプチド(配列番号39)が得られた。

[0164] [化40]



(g)

[0165] その後の糖ペプチド鎖の伸長は、上記で得られた固相樹脂上の9残基糖鎖ペプチドの脂溶性保護基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて脱保護した後、以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg, 0.50mmol)、DIPCI(73.1μl, 0.475mmol)をDMF(6.3ml)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。室温で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2ml)を用いて20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基およびBoc基で保護したアミノ酸として、Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Gly, Fmoc-Thr(tBu), Boc-Cys(Trt)を順次用いて固相樹脂に連結させた。その結果、固相樹脂にLeu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(dibenzyl-disialooligosaccharide)-Trp(Boc)-Gly-Thr(tBu)-Cys(Trt)-BocNHの13残基の糖鎖付加ペプチドフラグメント(25)(配列番号40)を得た。

その後、DCM及びDMFを用いて洗浄した後、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液(1:1)を十分に樹脂が浸る程度加え、18時間室温で攪拌することで、樹脂と糖鎖付加ペプチドフラグメントとを切り離した。切り離した樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣を濃縮し、アミノ酸側鎖が保護された糖鎖付加ペプチド(25)(配列番号41): Leu-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Val-Ile-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Asn(dibenzyl-disialooligosaccharide)-Trp(Boc)-Gly-Thr(tBu)-Cys(Trt)-BocNHを得た。

13残基のアミノ酸を有し、アミノ酸側鎖が保護された糖鎖付加ペプチド

フラグメント (25) の $100\ \mu\text{mol}$ 相当をナスフラスコに移し、DMF (3.0 mL) に溶解させた後、窒素雰囲気下、 $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ に冷却した。このものに 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (492.5 mg, 3.0 mmol) を加えた後、PyBOP (260.0 mg, 0.50 mmol)、続いて、DIPEA (85.0 μl , 0.5 mmol) を加えた。 $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ において2時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸 (0.1 mL) を加え、徐々に室温に戻した。室温に戻った後、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95 : 2.5 : 2.5) を加え室温で攪拌した。2時間後、再度、この溶液を別途用意したジエチルエーテル (150 mL) に加え沈殿させた後、遠心分離を行い、溶液部分を除くことで目的とするペプチドチオエステル体を含む残渣が得られた。この得られた残渣をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μm)、 $\phi 20\times 250\text{ mm}$ 、流速：7.0 mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水、B液：0.09% TFA/10%水/90% AN、グラジエント A : B = 72 : 28 $\rightarrow$ 59 : 41 (26分)、linear gradient] で精製し、C末端がアルキルチオエステルであるジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメント B1-SR (25) (配列番号42) : $\text{H}_2\text{N}-\text{Cys}-\text{Thr}-\text{Gly}-\text{Trp}-\text{Asn}(\text{dibenzyl-disialooligosaccharide})-\text{Glu}-\text{Thr}-\text{Ile}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{Asn}-\text{Leu}-\text{Leu}-\text{SR}$ を得た (図46)。なお、-SRは、スルホン酸エチルチオエステルを示す。

[0166] (8-2 ペプチドフラグメント B2-SPh の合成)

固相合成用カラムにHMPB-ChemMatrix (Biotage社製) (0.10 mmol) を入れ、塩化メチレン (DCM)、DMF で十分に洗浄した後、DCM で十分に膨潤させた。

Fmoc-Ser(tBu) (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.375 mmol) をDCM (

2 ml) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。

攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2 ml)を用いて15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸をN-メチルピロリドン(NMP)(1 ml)に溶解させ、0.45 M HCTU・HOBT/NMP(0.4 mmol)を加えた後に、固相合成用カラムに加え、続いて0.9 M DIPEA/NMP(0.8 mmol)を固相合成用カラムに加えた。室温で20分間攪拌した後、樹脂をDCM及びDMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2 ml)を用いて15分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、Fmoc基で保護したアミノ酸(0.5 mmol)を使用しアミノ酸を順次縮合させた。

Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Ser(tBu), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Phe, Fmoc-Ile, Boc-L-thiazolidine-4-carboxylic acidを順次用いて固相樹脂に連結させた。その結果、固相樹脂にSer(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Ile-Thz-BocNの8残基のペプチドフラグメント(26)(配列番号43)を得た。

その後、DCM及びDMFを用いて洗浄した後、トリフルオロエタノールと酢酸の混合溶液(1:1)を十分に樹脂が浸る程度加え、18時間室温で攪拌することで、樹脂とペプチドフラグメントとを切り離した。切り離した樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣を濃縮し、アミノ酸側鎖が保護されたペプチド(26)(配列番号44): Ser(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-A

rg (Pbf) - Phe - Ile - Thz - BocNを得た。

[0167] 8残基のアミノ酸を有し、アミノ酸側鎖が保護されたペプチドフラグメント(26)の100 μ mol相当をナスフラスコに移し、DMF (3.0 mL)に溶解させた後、窒素雰囲気下、 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ に冷却した。このものにチオフェノール (308 μ l, 3.0 mmol)を加えた後、PyBOP (260.0 mg, 0.50 mmol)、続いて、DIPEA (85.0 μ l, 0.5 mmol)を加えた。 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ において2時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸 (0.1 mL)を加え、徐々に室温に戻した。室温に戻った後、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をトリフルオロ酢酸：水：TIPS (=95 : 2.5 : 2.5)を加え室温で攪拌した。2時間後、再度、この溶液を別途用意したジエチルエーテル (150 mL)に加え沈殿させた後、遠心分離を行い溶液部分を除くことで目的とするペプチドチオエステル体を含む残渣が得られた。この得られた残渣をHPLC [カラム：SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：7.0 mL/min、溶離液 A液：0.1% TFA水、B液：0.09% TFA / 10%水 / 90% AN、グラジエント A : B = 78 : 22 $\rightarrow$ 68 : 32 (20分)、linear gradient]で精製し、C末端がチオフェニルエステルであるペプチドフラグメントB2-SPh (26) (配列番号45) : HN-Thz-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-SPhを得た (図47)。

[0168] (8-3 ジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB1-SRとペプチドフラグメントB2-SPhとの連結)

13残基のC末端がアルキルチオエステル体であるジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントB1-SR (0.60 mg)と8残基のペプチドフラグメントB2-SPh (0.16 mg)の二種類を同じナスフラスコにいれ、pH 7.2のバッファー溶液 (0.15 mL) (8M グアニジン塩酸溶液、0.2 mM リン酸溶液、20 mM トリスカルボキシエチルホスフィン溶液 (TCEP溶液) にて調製) に溶解させた、室温で反応を行った。14.

5時間後、HPLCとESI-MSを用いて、目的物が生成していることを確認した。反応溶液をメンブレンフィルターで濾過し、糖ペプチドフラグメントを含む濾液部分をHPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20x250mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A液: 0.1% TFA水 B液: 0.09% TFA/10%水/90% AN、A:B=78:22→56:44 (22分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient] にて精製し、目的とするジベンジルジシアロ糖鎖を有し、C末端がアルキルチオエステル化された糖鎖付加ペプチドフラグメント (B1+B2)-SR (Cys体) (27) (配列番号46) を得た (図48)。

[0169] (8-4 Cysのメチル化)

得られた21残基のペプチドアルキルチオエステル (27) 5.3 mg (1.03 μ mol) をエッペンチューブにいれ、pH8.6の緩衝溶液 (1.09 mL) (8M グアニジン塩酸液、0.25 トリス塩酸液、3.3 mM EDTA 溶液にて調製) とアセトニトリル (0.36 mL) に溶解させた後、25℃にてメチルー4-ニトロベンゼンスルホネート (5.1 mg) を加えた。30分後、10% TFA 溶液 (0.2 mL) 加え、pH4にした後、反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20x250mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A液: 0.1% TFA水 B液: 0.09% TFA/10%水/90% AN、A:B=72:55→55:45 (34分)、isocratic elution for 5min and then linear gradient] にて精製し、原料に含まれるシステイン残基の硫黄原子がメチル化されたジベンジルジシアロ糖鎖を有し、C末端がアルキルチオエステル化された糖鎖付加ペプチドフラグメント (B1+B2)-SR (Cys体) (28) (配列番号47) を得た (図49)。

[0170] (8-5 メチル化されたCysのシアノ化およびシアノ化につづく分子

内アシル転移反応)

得られたシスライン残基の硫黄原子がメチル化されたジベンジルジシアロ糖鎖を有するペプチドフラグメント(28)をエッセンスチューブに入れ、0.1 mM 80%蟻酸溶液(3.3 mL)に溶解させた後、25℃にて臭化シアニド(23.2 mg (219 μmol))を加えた。反応容器を遮光した後、37℃にて反応を行い、26.5時間後、反応溶液を減圧下に濃縮した。

得られた残渣にpH 8.0の緩衝溶液(8 M グアニジニ塩酸液と0.2 M リン酸溶液にて調製)(0.33 mL)にて溶解させた後、37℃にて反応させた。1時間後、20%ピリジン/DMF溶液(3.3 μL、1% v/v)を添加し、反応が終了していることをHPLCで確認後、HPLC [カラム: SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μm)、φ 2.0 × 250 mm、流速: 7.0 mL/min、溶離液 A液: 0.1% TFA 水 B液: 0.09% TFA/10%水/90%AN、A:B=72:55 → 55:45 (34分)、isocratic elution for 5 min and then linear gradient]にて精製し、反応中間体の21残基のジベンジルジシアロ糖鎖を有し、C末端がアルキルチオエスチル化された糖鎖付加ペプチドフラグメント(B1+B2)-S-R(29)(配列番号48)を得た(図50)。なお、-SRは、スルホン酸エチルチオエスチルを示す。

[0171] 上記8-5.で得られた糖鎖付加ポリペプチド(29)を、実施例3におけるジベンジルジシアロ糖鎖付加ペプチドフラグメントBの代わりに用いることで、実施例3と同様にして、ジシアロIFN-βを合成することができる。

[0172] 実施例9 加熱処理方法

(9-1. 17, 31, 141 Cys (Acm) - 80N (dibenzylidene) - 1F N-βの加熱処理)

10 mLのナスフラスコに上記3-3.で得られた糖鎖付加ポリペプチド

(7) (17, 31, 141 Cys (Acm) - 80N (dibenzyl-disialooligosaccharide) - IFN- β) (3.7 mg) を入れ、pH 7.0 の 0.2 M リン酸緩衝液 (8 M グアニジンを含む) (3.3 mL ; 基質濃度 : 50 mM) を入れた。ガラス栓をナスフラスコにした後、オイルバスにて 60°C に加温した。10 時間後、室温にもどした後、HPLC 分析を行った。分解していないことを HPLC, ESI-MS により確認した後 (図 36)、HPLC [カラム : SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速 : 7.0 mL/min、溶離液 A 液 : 0.1% TFA 水 B 液 : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% AN、グラジエント A : B = 50 : 50 $\rightarrow$ 50 : 50 (5 分) $\rightarrow$ 20 : 80 (35 分) $\rightarrow$ 5 : 95 (35.5 分)] で脱塩を行い、加熱処理サンプル (4.0 mg) を得た。

[0173] (9-2. 80N (dibenzyl-disialooligosaccharide) - IFN- β の加熱処理)

0.5 mL のエッペンドルフチューブに上記 3-4. で得られた糖鎖付加ポリペプチド (8) (80N (dibenzyl-disialooligosaccharide) - IFN- β (30 μ g)) を入れ、pH 7.0 の 0.2 M リン酸緩衝液 (8 M グアニジンを含む) (30 μ L ; 基質濃度 : 50 mM) を入れた。蓋をした後、オイルバスにて 60°C に加温した。10 時間後、室温にもどし HPLC 分析 [カラム : SHISEIDO proteonavi (C4, 5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速 : 7.0 mL/min、溶離液 A 液 : 0.1% TFA 水 B 液 : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% AN、グラジエント A : B = 50 : 50 $\rightarrow$ 50 : 50 (5 分) $\rightarrow$ 20 : 80 (35 分) $\rightarrow$ 5 : 95 (35.5 分) isocratic elution for 5 min and then linear gradient] を行い、HPLC、ESI-MS により純度を確認した (図 37)。

HPLC および ESI-MS のデータを上記 9-1. で加熱試験に使用し

たCysが保護された糖鎖付加ポリペプチド（7）と比較すると、システインが無保護である糖鎖付加ポリペプチド（8）は、加熱処理により、回収量が落ちていた。

[0174] 実施例10 受容体親和性解析

IFN- α/β receptor 2に対する非加熱または加熱処理した化学合成IFN- β の受容体親和性解析を行った。

IFN- α/β receptor 2に対する非加熱または加熱処理した化学合成IFN- β の結合親和性は、Protein XPR36 (Bio-rad)を用いてSPR (Surface plasmon Resonance; 表面プラズモン共鳴技術)で測定した。

具体的には、流速30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で0.005% Tween20/PBSを流しながら、アミンカップリングキット (Bio-rad)を用いて説明書に従い、GLMチップ (Bio-rad)に10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のIFN- α/β receptor 2 (10 mM酢酸緩衝液, pH4.5)を固定化した。実施例3で作製した非加熱ジシアロ糖鎖付加ポリペプチド(10)、または、上記9-1.で加熱処理したジシアロ糖鎖付加ポリペプチドを上記3-4.~3-6.に記載の脱Ac工程、ベンジル基の脱保護工程、および、フォールディング工程に供して得られた加熱処理したジシアロ糖鎖付加ポリペプチドを、0.1% BSA, 2 mM EDTA/PBSで0.31-25 nMに調整し、流速50 $\mu\text{L}/\text{min}$ でチップに添加した。なお、糖鎖付加ポリペプチド(10)は、0.31 nM、0.93 nM、2.8 nM、8.3 nM、25 nMの5つの濃度を用いてそれぞれ実施した。結合定数(k_a)、解離定数(k_d)及び結合解離定数(K_d)はProtein Manager softwareを用いて解析した。

その結果を図38、図39、および、表1に示す。

図38は、IFN- α/β receptor 2に対する非加熱のジシアロ糖鎖付加ポリペプチド(10)の結合親和性を解析したグラフを示す。また、図39は、IFN- α/β receptor 2に対する加熱処理した

ジシアロ糖鎖付加ポリペプチドの結合親和性を解析したグラフを示す。図38、図39、および表1に示すように、本発明の化学合成された糖鎖付加ポリペプチドは、加熱処理後であっても、非加熱処理の糖鎖付加ポリペプチドと同等の受容体親和性を有していた。

[表1]

	非加熱処理	加熱処理
k_a [1/M・sec]	5.5×10^6	4.3×10^6
k_d [1/sec]	2.7×10^{-3}	2.3×10^{-3}
K_d [M]	4.9×10^{-10}	5.3×10^{-10}

[0175] 実施例11 薬物動態解析

上記実施例にて作製される本発明に係る糖鎖付加ポリペプチドを、静脈内および皮下に投与した場合の、薬物動態解析の実施例を下記に示す。

(11-1. 投与液、試薬の調製)

化学合成したIFN- β としては、実施例2で作製したアシアロ糖鎖付加ポリペプチド(15)(アシアロIFN- β)および実施例3で作製したジシアロ糖鎖付加ポリペプチド(10)(ジシアロIFN- β)を用い、BSA及びリン酸緩衝液溶液を添加し、凍結乾燥を行った。投与直前にミリQ水60 μ Lを用いて溶解し、Phosphate buffered saline溶液(PBS、和光純薬工業)を用いて50万IU/mLとなるように投与液を調製した。また、対照のIFN- β としては、生合成により作製されたIFN β モチダ注射用(持田製薬)を用い、添付の注射用水を用いて1200万IU/mLに溶解し、そして、PBSを用いて50万IU/mLに調製した。EDTA-PBSは、EDTA-2Na(和光純薬工業)が2mMとなるようにPBSに加えた。なお、本実施例の薬物動態解析に用いた

化学合成した糖鎖付加ポリペプチドは、加熱処理をしていないものを用いた。また、IFN β モチダとは、ヒト繊維芽細胞由来の生合成により作製されたIFN β -1aである。

[0176] (11-2. 投与および採血)

マウス(BALB/cマウス、雄性、体重20.45~25.28g)に対し、200万IU/kgの用量で、飽食下で、眼窩静脈もしくは背部皮下から、インスリン用シリンジマイJECTA-29G $\times$ 1/2(テルモ社)を用いて容量4mL/kgで投与した。静脈内投与時は投与前、および投与後2、10、30分、1、3、6、8時間に、皮下投与時は、投与前、および投与後10、30分、1、2、4、6、8時間に眼窩静脈からヘパリン処理ヘマトクリット毛細管(HIRSHMANN LABORGERATE)を用いて75 μ L採血した。採取血液と同体積のEDTA-PBSと速やかに混和し、遠心分離(15000rpm、4 $^{\circ}$ C、10分)した。上清を90 μ L採取し、血漿サンプルとした。血漿サンプルは測定に用いるまで冷凍保存した。チップおよびチューブはビーエム機器社の低吸着性のものを使用した。

[0177] (11-3. 血中濃度測定)

糖鎖付加ポリペプチド(IFN- β)の血中濃度の測定は、ヒトインターフェロン- β ELISAキット(鎌倉テクノサイエンス)を用いた。すなわち、血漿サンプルは同じくキット付属希釈液を用いて、必要に応じ、360、120、12倍の希釈を調製し、測定サンプルとした。検量線を作成するためのスタンダードとして、投与に用いたものと同一ロットの化学合成IFN- β 、IFN β モチダ注射用を用い、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125IU/mLになるようにキット付属希釈液で調製した。検量線には、血漿サンプルの希釈率に応じ、同じ持ち込み量となるようにブランク血漿を添加した。得られた結果より、希釈率を掛け、さらに抗凝固処理としてのEDTA-PBSでの希釈率2を掛けることにより、血中濃度を算出した。得られた血漿中IFN- β 濃度推移を図40に示した

。

[0178] (11-4. 薬物速度論的パラメータの算出)

得られたIFN- β の濃度推移からモーメント解析手法を用い、血漿中濃度曲線下面積(AUC)を台形法により算出した。また、外挿法により静脈内投与時の予測初期濃度(C_0)、さらに血漿中半減期($t_{1/2}$)、平均滞留時間(MRT)、および皮下投与時の実測値より最高血漿中濃度(C_{max})を求めた。得られた薬物速度論的パラメータを表2に示す。

図40より、本発明に係る化学合成により作製された糖鎖付加ポリペプチドは、生合成により作製されたIFN- β と比較して、同等の血中動態を示した。

[表2]

	静脈内投与				皮下投与			
	$t_{1/2}$	AUC	MRT	C_0	$t_{1/2}$	AUC	MRT	C_{max}
IFN β モチダ	84	232831	50	20723	121	120287	170	606
アシアロIFN- β	68	85183	43	6754	222	39853	319	149
ジシアロIFN- β	96	254544	70	15204	300	97078	345	403
($t_{1/2}$: min, AUC : min · IU/mL, MRT : min, C_0 : IU/mL, C_{max} : IU/mL)								

[0179] 実施例12 抗腫瘍活性測定試験

(12-1. 細胞培養、試薬の調製)

抗腫瘍活性試験には、ヒト・バーキットリンパ腫であるDaudi細胞を用いた。培地はRPMI1640 (Invitrogen) に、56℃で30分間非働化处理したFetal Bovine Serum (GIBCO) を10%、ペニシリン・ストレプトマイシン (SIGMA) を加えたものを用いた。培養プレートは、Non-treat dish (IWAKI) を用い、37℃、CO₂濃度5%条件下で培養し、2～3日に1度継代を行った。

[0180] (12-2. 担がんマウスの作成法)

上記12-1. で培養したDaudi細胞をチューブに回収し、遠心分離(1300rpm、4℃、3分)した。上清をアスピレーターを用いて除き、HBSS(ナカライ)を加え、細胞を懸濁した。次に再度遠心分離を行い、上清を除いた。この細胞洗浄処理を計3回行った。そして、血球計算板を用いて細胞数を計算し、 $2 \times 10^8 \text{ Cell/mL}$ になるようにHBSSを用いて細胞懸濁液を作成した。Daudi細胞接種直前に、細胞懸濁液と同体積のマトリゲル(BD)を加えて2倍希釈し、接種用細胞懸濁液を作成した。接種用細胞懸濁液は接種直前まで、氷上に保存した。麻酔薬として、ソムノペンチル(共立製薬)をPBSで 5 mg/mL に希釈して用いた。SCIDマウス(C. B-17/1cr-scid/scidJclマウス、雄性)(日本クレア)に、インスリン用シリンジマイJECTA-29G $\times$ 1/2(テルモ)を用いて、麻酔薬を250~300 μL 腹腔内投与した。麻酔が導入された事を確認後、バリカンを使用してマウスの右わき腹の毛を刈った。26G1/2の注射針(テルモ)と1mLの注射筒(テルモ)を用いて、接種用細胞懸濁液を100 μL 皮下接種した。

[0181] (12-3. 抗腫瘍活性の測定方法と評価方法)

上記11-3. の細胞接種処理からおよそ30日後、ノギス(Mitsutoyo)を用いて形成された腫瘍組織の長径(mm)と短径(mm)を測定した。得られた数値を用いて、腫瘍体積(mm^3)を求めた。腫瘍体積は、 $\text{腫瘍体積}(\text{mm}^3) = \text{長径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm}) \times 0.5$ の式を用いて算出した。腫瘍体積を経時的に算出し、グラフにプロットすることで、抗腫瘍活性能として評価した。

[0182] (12-4. 投与液の調製法および投与方法)

実施例2で合成したアシアロ糖鎖付加ポリペプチド(15)および実施例3で合成したジシアロ糖鎖付加ポリペプチド(10)を、PBSを用いて500万IU/mLに調製した。対照のIFN- β としては、生合成により作製されたIFN β モチダ注射用(持田製薬)を用い、添付の注射用水を用い

て1200万IU/mLに溶解し、そして、PBSを用いて500万IU/mLに調製した。投与液の調製は、投与直前に行った。上記12-3.で測定した腫瘍体積を用いて、担がんマウスを4群に群分けした(n=4/群)。群分け時の腫瘍体積は、およそ800mm³であった。調製した投与液を用いて、背部皮下に2000万IU/kgの用量になるよう4mL/kgの容量でインスリン用シリンジマイJECTA-29G×1/2を用いて投与した。Vehicle投与群には、投与液調製時に用いたPBSを4mL/kgの容量で投与した。群分け&投与1回目をday 0とし、day 9まで連日10回背部皮下投与を行った。

[0183] (12-5. 抗腫瘍活性の評価)

12-3.に示した方法を用いて、day 3、6、8、10、13、15、17に腫瘍体積を算出し、経時的な腫瘍体積の変化を図41に示した。

図41より、本発明に係る化学合成により作製された糖鎖付加ポリペプチドは、生合成により作製されたIFN-βと比較して、同等または優れた抗腫瘍活性を示した。特に、ジシアロ糖鎖が実質的に均一に付加している本発明の糖鎖付加ポリペプチド(10)は、生合成により作製されたIFN-βと比較して、優れた抗腫瘍活性を示した。

[0184] 実施例13 加熱処理後の細胞増殖抑制能の評価

また、上記9-1.で加熱処理したジシアロ糖鎖付加ポリペプチドを上記3-4.~3-6.に記載の脱Ac工程、ベンジル基の脱保護工程、および、フォールディング工程に供して得られた加熱処理したジシアロ糖鎖付加ポリペプチドの細胞増殖抑制能を評価した。

具体的な細胞増殖抑制能評価は下記のように行った。

ヒト・バーキットリンパ腫細胞株Daudiを10%Fatal Bovine Serum, 100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin含有RPMI 1640培地(10%FCS-RPMI 1640)を用いて1.25×10⁵個/mLとなるよう懸濁した。細胞懸濁液を1×10⁴/80μL/wellずつ96穴平底プレ

ートに播種し、さらに10%FCS-RPMI1640を用いて希釈された完全化学合成IFN- β を20 μ L/wellずつ添加し、CO₂濃度を5%に調整したCO₂インキュベーター中で37℃、3日間培養した。細胞増殖抑制能は、培養3日目のミトコンドリア脱水素酵素活性を指標として、Cell counting kit-8（同仁化学）を用いてキット添付のマニュアルに従って測定を行った。

また、対照として、非加熱処理のジシアロ糖鎖付加ポリペプチド（10）を使用した。その結果を図42に示す。図42に示すように、加熱処理後の糖鎖付加ポリペプチドであっても、非加熱処理の糖鎖付加ポリペプチドと、同等の細胞増殖抑制能を示した。

請求の範囲

[請求項1] (a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；

(c) インターフェロン β の類縁体；および

(d) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド
に対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロンβにおける80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有し、かつ、インターフェロンβ活性を有する糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドが、実質的に均一な糖鎖を有することを特徴とする、
糖鎖付加ポリペプチド。

〔請求項2〕 前記糖鎖付加ポリペプチドが化学合成により作製されたものであることを特徴とする、請求項1に記載の糖鎖付加ポリペプチド。

〔請求項3〕 糖鎖付加ペプチドフラグメントと、少なくとも2つのペプチドフラグメントとを合成する工程と、前記糖鎖付加ペプチドフラグメントと前記少なくとも2つのペプチドフラグメントとを連結させる工程を含む方法により得られる糖鎖付加ポリペプチドであって、

前記糖鎖付加ポリペプチドは、

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド:

(b) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド；

(c) インターフェロン β の類縁体；および

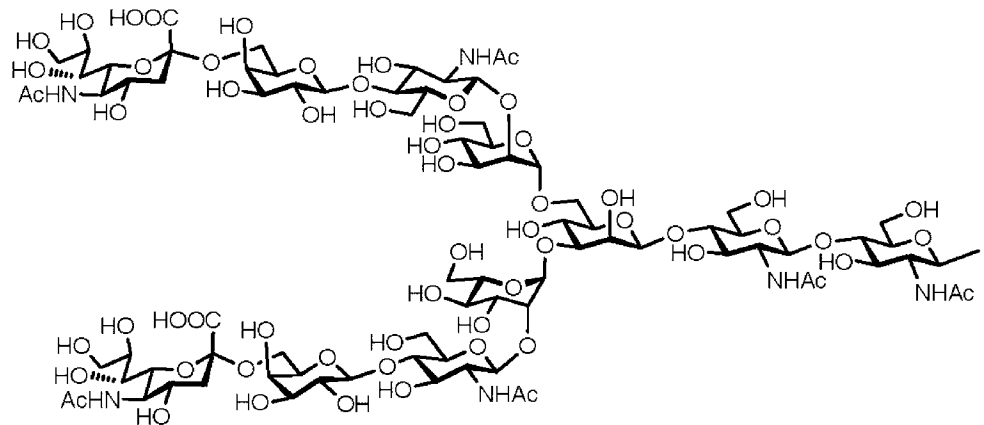
(d) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに

対して、８０％以上の相同性を有するポリペプチド；
 からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン
 β における８０位に相当するアミノ酸に糖鎖を有し、かつ、インター
 フェロン β 活性を有することを特徴とする、
 糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項４] 前記糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖が、アスパラギン結合型糖
 鎖であることを特徴とする請求項３に記載の糖鎖付加ポリペプチド。

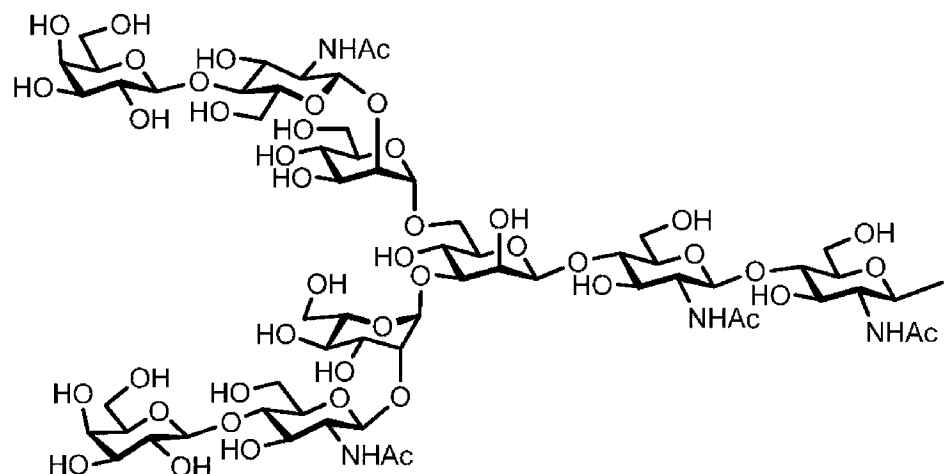
[請求項５] 前記糖鎖付加ポリペプチドにおける糖鎖が、下記式（ａ）で表わさ
 れるジシアロ糖鎖、または、下記式（ｂ）で表わされるアシアロ糖鎖
 であることを特徴とする、請求項４に記載の糖鎖付加ポリペプチド。

[化１]



(a)

[化２]



(b)

- [請求項6] 請求項3～5のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチドであって、インターフェロン β の31位および141位に相当するCysが、ジスルフィド結合を形成していることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項7] 加熱処理されていることを特徴とする、請求項3～6のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項8] 90%以上の純度を有することを特徴とする、請求項1または2に記載の糖鎖付加ポリペプチド。
- [請求項9] 請求項1～7のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチドを含む組成物であって、前記組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが実質的に均一であることを特徴とする、組成物。
- [請求項10] 請求項9に記載の組成物であって、前記組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが90%以上均一であることを特徴とする、組成物。
- [請求項11] 前記組成物中の糖鎖付加ポリペプチドが、90%以上の純度を有することを特徴とする、請求項9または10に記載の組成物。
- [請求項12] (I) 請求項1～7のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチドおよび／または薬学的に許容されるその塩、および、
(II) 薬理学的に許容される担体を含むことを特徴とする、
医薬組成物。
- [請求項13] 請求項12に記載の医薬組成物であって、
前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖が実質的に均一であることを特徴とする、
医薬組成物。
- [請求項14] 請求項13に記載の医薬組成物であって、
前記糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖が90%以上均一であることを特徴とする、

医薬組成物。

[請求項15] 前記糖鎖付加ポリペプチドが、90%以上の純度を有することを特徴とする、請求項12～14のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項16] 請求項12～15のいずれか一項に記載の医薬組成物であって、インターフェロン β に関連する疾患の治療または予防のために用いられることを特徴とする、医薬組成物。

[請求項17] 請求項16に記載の医薬組成物であって、前記インターフェロン β に関連する疾患が、多膠芽腫、髄芽腫、および、星細胞腫を含む脳腫瘍、皮膚悪性黒色腫、B型慢性活動性肝炎、C型慢性肝炎、亜急性硬化性全脳炎、C型代償性肝硬変、ならびに、多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする、医薬組成物。

[請求項18] 請求項1～7のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチドの有効量を投与することを特徴とする、インターフェロン β に関連する疾患の治療または予防方法。

[請求項19] 請求項18に記載の治療または予防方法であって、前記インターフェロン β に関連する疾患が、多膠芽腫、髄芽腫、および、星細胞腫を含む脳腫瘍、皮膚悪性黒色腫、B型慢性活動性肝炎、C型慢性肝炎、亜急性硬化性全脳炎、C型代償性肝硬変、ならびに、多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1つの疾患であることを特徴とする、治療または予防方法。

[請求項20] 糖鎖付加ポリペプチドであって、前記糖鎖付加ポリペプチドは、
(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド
；
(b) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され

たポリペプチド；

(c) インターフェロン β の類縁体；および

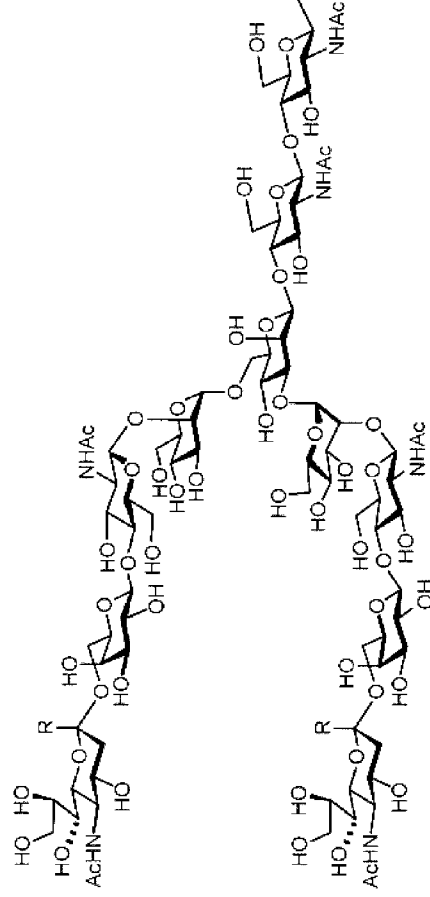
(d) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有するポリペプチド；

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロン β における80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチドであり、かつ、インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysが保護基により保護されていることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項21]

請求項20に記載の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、前記糖鎖が、下記式(c)で表わされるジシアロ糖鎖、または、下記式(b)で表わされるアシアロ糖鎖であることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。

[化3]

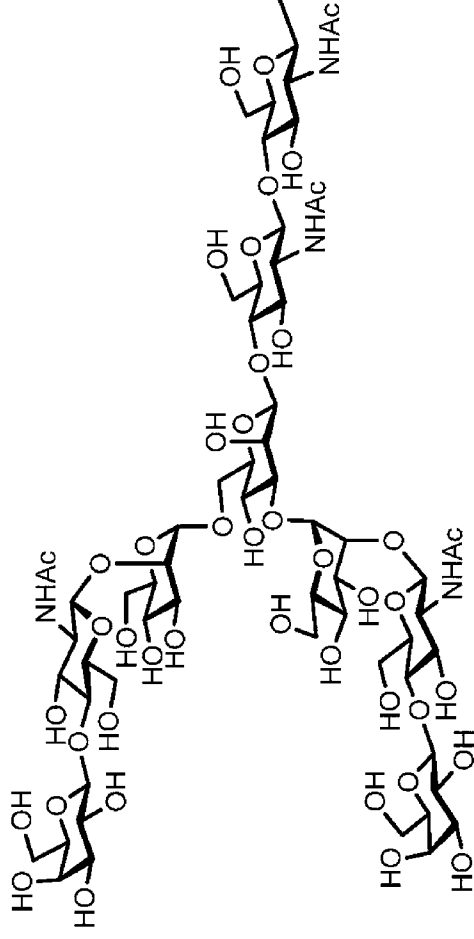


(c)

(式中、Rは、 $-\text{COOBn}$ 、 $-\text{COOEt}$ 、 $-\text{COOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{COPh}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph}(\text{OMe})_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhNO}_2$ 、または、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph}(\text{NO}_2)_2$ を表わす。なお、式中、Bnはベンジル基を示し、Etはエチル基を示し、Meはメチル基を示し、Phはフェニル基を示す

。)

[化4]



(b)

[請求項22]

請求項20または21に記載の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、前記インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysが、Ac基、アルコキシメチル基、トリフェニルメチル基、t-ブチル基、ベンジル基、および、 β 位が置換されたエチル基からなる群より選択されるいずれか一つの保護基により保護されていることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。

[請求項23]

糖鎖付加ポリペプチドの製造方法であって、請求項20～22のいずれか一項に記載の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、保護基により保護されている前記インターフェロン β における17位、31位、および141位に相当するCysを脱保護する工程を含むことを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチドの製造方法。

[請求項24]

請求項23に記載の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法であって、Cysの保護基を脱保護する工程の前に、糖鎖付加ポリペプチドを加熱処理することを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチドの製造方法。

[請求項25]

糖鎖付加ポリペプチドであって、前記糖鎖付加ポリペプチドは、

(a) 配列番号1で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド

;

(b) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいて、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチド;

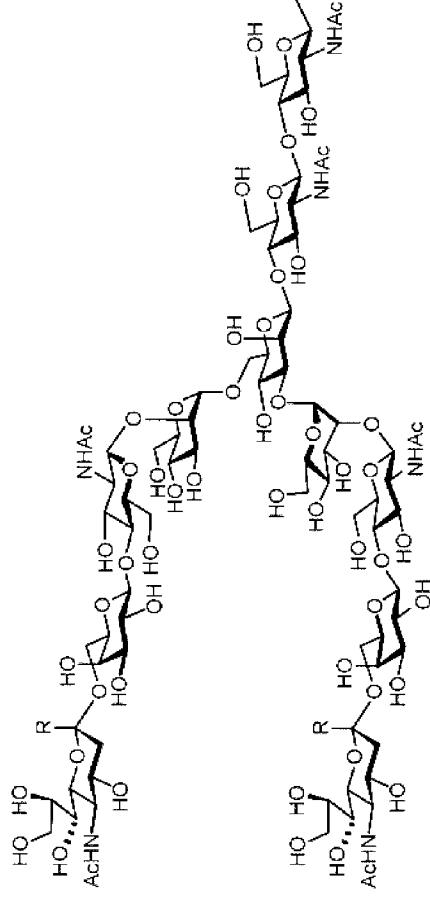
(c) インターフェロンの類縁体; および

(d) 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して、80%以上の相同性を有する糖鎖付加ポリペプチド;

からなる群より選択されるポリペプチドにおいて、インターフェロンのβにおける80位に相当するアミノ酸に糖鎖を有する糖鎖付加ポリペプチドであり、

前記糖鎖が下記式 (c) により表わされる、糖鎖非還元末端に存在するシアル酸のカルボキシ基が保護されたジシアロ糖鎖であることを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチド。

[化5]



(c)

(式中、Rは、 $-\text{COOBn}$ 、 $-\text{COOEt}$ 、 $-\text{COOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{COPh}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhOMe}$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph}(\text{OMe})_2$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{PhNO}_2$ 、または、 $-\text{COOCH}_2\text{Ph}(\text{NO}_2)_2$ を表わす。なお、式中、Bnはベンジル基を示し、Etはエチル基を示し、Meはメチル基を示し、Phはフェニル基を示す

。)

[請求項26] 糖鎖付加ポリペプチドの製造方法であって、請求項25に記載の糖鎖付加ポリペプチドにおいて、糖鎖非還元末端に存在するシアル酸のカルボキシ基の保護基を脱保護する工程を含むことを特徴とする、糖鎖付加ポリペプチドの製造方法。

[請求項27] 前記糖鎖付加ポリペプチドをフォールディングする工程をさらに含むことを特徴とする、請求項23、24、および26のいずれか一つに記載の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法。