

明 細 書

発明の名称：止血用医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖ーポリペプチド複合体を含む止血用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] ヒドロゲルやフィブリン糊などのバイオゲルは、三次元培養等の研究用基材、術中／術後の止血剤や創傷治癒シート等の外科用基材、ドラッグデリバリーシステム（DDS）などに利用されている。

[0003] しかし、これらの多くは生物由来材料を用いたものであることから、使用の際には、ウイルス等の微生物の感染、免疫原性、疾患の伝搬等のリスクが存在する。例えば、フィブリン糊は手術時の止血剤として利用価値が高いが、原料がヒト血液由来であるため、実際に手術時に使用した際に、患者がフィブリン糊に混入していた肝炎ウイルスに感染する事故が多発し、大きな社会問題となっている。また、生物由来のバイオゲルでは、必ずしも均質な品質のゲルを供給できないという問題点も存在する。

[0004] 生物由来のバイオゲルに対し、化学合成によって製造されたバイオゲルは、感染のリスクがなく、均質な品質のゲルが提供できることが知られている（特許文献1）。しかし、これまでに知られているバイオゲルは、ゲルを形成させる際にバッファー交換や置換、多剤混合などの手順が必要であり、操作が複雑である。また、pH域によっては難溶解性となるため、併用する試薬や溶媒が限定されるだけでなく、適用できる部位（患部）が限られることや、使用時にシリンジやチューブが詰まってしまうなどの問題がある。また、特に生体のpHに近い、中性域において難溶解性（すなわち、透明でない）であると、例えば手術野などの視認性を必要とする場面において、用いることが困難である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許第5 6 7 0 4 8 3号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、これまでのバイオゲルを用いた止血剤と比較してユーザビリティが高く、広範囲なpHにおいて透明で均質なヒドロゲルを形成し得る止血用医薬組成物を提供することを課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに、糖鎖を結合させることによって製造された糖鎖-ポリペプチド複合体が、驚くべきことに、広範なpH域、特に中性域において高い水溶性を示し、透明で均質なヒドロゲルを形成するだけでなく、このヒドロゲルが止血剤として極めて有用であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は、糖鎖-ポリペプチド複合体を含む止血用医薬組成物であって、前記糖鎖-ポリペプチド複合体における前記ポリペプチドが、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、前記ポリペプチドに1または複数の糖鎖が結合していることを特徴とする、止血用医薬組成物を提供する。

[0009] また、本発明の一実施態様においては、前記糖鎖-ポリペプチド複合体における前記ポリペプチドが、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置された、8～34個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする。

[0010] また、本発明の一実施態様においては、前記糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものであることを特徴とする。

[0011] また、本発明の一実施態様においては、前記止血用医薬組成物に含まれる前記糖鎖-ポリペプチド複合体の濃度が0.1重量%～20重量%であるこ

とを特徴とする。

[0012] また、本発明の一実施態様においては、前記ポリペプチドに結合している 1 または複数の糖鎖に存在する糖残基の数の合計が 5 以上であることを特徴とする。

[0013] また、本発明の一実施態様においては、前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が、1、2、または、3 本であることを特徴とする。

[0014] また、本発明の一実施態様においては、前記ポリペプチドの N 末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 x 番目までの全てのアミノ酸、および、C 末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 y 番目までの全てのアミノ酸（ここで、 x および y は整数であり、 $x \geq 0$ であり、 $y \geq 0$ であり、 $x + y$ は、ポリペプチドに結合している糖鎖の数の合計である）に糖鎖が結合していることを特徴とする。

[0015] また、本発明の一実施態様においては、前記糖鎖が、分岐を有する糖鎖であることを特徴とする。

[0016] また、本発明の一実施態様においては、前記医薬組成物が、ヒドロゲルの状態にあることを特徴とする。

[0017] 以上述べた本発明の一又は複数の特徴を任意に組み合わせた発明も、本発明の範囲に含まれることを、当業者であれば理解するであろう。

発明の効果

[0018] 本発明に係る止血用医薬組成物は、中性域を含む広範な pH 域において高い水溶性を有し、均一で透明なヒドロゲルを形成することから、併用する試薬や溶媒の制限を受けにくく、ユーザビリティの高い止血剤として用いることができる。また、広範な pH 域において用いられ得ることから、適用部位（患部）が制限されにくい。

[0019] また、本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、中性域を含む広範な pH 域において高い水溶性を有し、均一で透明なヒドロゲルを形成することから、中性 pH においてゾル状態とゲル状態が可逆的に存在し得る。すなわち、糖鎖-ポリペプチド複合体は、一旦ゲル状態

を形成した後に、機械的攪拌によってゾル状態になっても、再びゲル状態となることができる。したがって、ゲル状態（すなわち、Ready-to-useの状態）で流通させることができ、他のペプチド性のゲルのように、ゲル化に適したpH（例えば、酸性pH）でゲルを形成させた後に、中性pHにするためのバッファー交換（または置換）を行うなど、煩雑な操作を必要としない。

すなわち、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、他のペプチド性のゲルと比較して、操作性に非常に優れている。また、本発明に係る止血用医薬組成物は、使用できるpH域が広いと、使用時にシリンジやチューブが詰まってしまうなどの問題が生じにくい。

[0020] また、本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、動物の生体内に存在する糖鎖によって修飾されているため、なんら修飾を有しないペプチドと比較して、抗原性が低減されている。また、本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、ポリエチレングリコール（PEG）などによって修飾された化合物で見られるような毒性が生じる危険性もほとんどない。したがって、本発明に係る止血用医薬組成物は、生体への使用に際して安全性が高い。

[0021] また、本発明に係る止血用医薬組成物は、生理的条件下（中性域）において均一で透明なヒドロゲルを形成し、抗原性も少ないため、動物の生体に用いる止血剤として好適である。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]図1は、C(DiGlcNAc)-(RADA)4を超純水、食塩水またはリン酸緩衝溶液に溶解した組成物について、それぞれ円偏光二色性（CD）測定を行った結果を示す。

[図2]図2は、(RADA)4を超純水、食塩水またはリン酸緩衝溶液に溶解した組成物について、それぞれ円偏光二色性（CD）測定を行った結果を示す。

[図3]図3は、C(DiGlcNAc)-(RADA)4と(RADA)4と

の繊維状構造形成能を比較した図を示す。

[図4]図4は、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 及び (R A D A) 4 の、水溶液状態における貯蔵弾性率を示す。

[図5]図5は、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 及び (R A D A) 4 の、塩添加後の貯蔵弾性率を示す。

[図6]図6は、ラット肝穿刺モデルにおいて、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 又は (R A D A) 4 を適用した場合の、適用3分後における止血効果スコアの分布を示す。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、生物由来であってもよく、化学合成によって製造されたものでもよいが、安全性や品質の安定性、糖鎖の均一性の面から、化学合成によって製造されたものであることが好ましい。

[0024] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、例えば、水溶液中において、ペプチド分子間の静電的相互作用、水素結合、および、疎水性相互作用などの相互作用を介して自己集合しうる。本明細書において、糖鎖-ポリペプチド複合体が水溶液中で「自己集合する」とは、水溶液中においてポリペプチド同士が、何らかの相互作用（例えば、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用等）を介して、自発的に集合することを意味し、限定的な意味で解釈されてはならない。

[0025] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、水溶液中において自己集合し、 β シート構造を形成しうる。さらに、その β シート構造が何重にも重なることにより、ヒドロゲルを形成し得る。水溶液中において糖鎖-ポリペプチド複合体が β シート構造を形成していることの確認方法は特に限定されないが、例えば、糖鎖-ポリペプチド複合体を含む水溶液の円偏光二色性 (CD) を測定することにより、確認することができる。一般的に、 β シート構造を有する分子の特徴として、197 nm 付近の波長に極大がみられ、216 nm 付近の波長に極小がみられることから、円

偏光二色性の測定により、これらの波長付近のピークを確認することによって、 β シート構造の形成を確認することができる。

[0026] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖ーポリペプチド複合体は、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むことにより、水溶液中において β シート構造を形成した際に、 β シート構造の一方の面には極性アミノ酸残基のみが配置され得、他方の面に非極性アミノ酸残基のみが配置されうる。したがって、かかる β シート構造は、疎水面（非極性アミノ酸残基のみが配置された面）を隠すように集合して二層構造を形成しうる。そして、分子の自己集合が進むにつれてこの β シートの層構造が伸長してゆき、三次元の立体構造（例えば、ヒドロゲル）を形成しうる。

[0027] 本発明において、「pHが中性付近」であるとは、pHが7.0付近であることを意味し、より具体的にはpHが5.0～9.0の範囲、好ましくは、pHが6.0～8.0の範囲内であることを意味する。

[0028] 本発明の止血用医薬組成物に含まれる糖鎖ーポリペプチド複合体の濃度は、本発明の適用症状や適用部位に応じて当業者が適宜調節することができるが、例えば、0.1重量%～20重量%であってよく、好ましくは0.2重量%～15重量%であってよく、さらに好ましくは0.5重量%～10重量%であってよい。止血用医薬組成物に含まれる糖鎖ーポリペプチド複合体の濃度が0.1重量%以下であると適切にヒドロゲルが形成されない可能性がある。なお、本明細書において、ヒドロゲルとは、分散媒が実質的に水である、ゲル状又はゾル状の組成物を広く意味し、限定的な意味で解釈されてはならない。

[0029] 本発明の止血用医薬組成物は水溶液の状態で用いてもよく、ヒドロゲルの状態で用いてもよい。前記水溶液や前記ヒドロゲルの調製方法は特に限定されないが、例えば、糖鎖ーポリペプチド複合体を超純水に溶解することによって水溶液状態の止血用医薬組成物を得てもよく、糖鎖ーポリペプチド複合体を超純水に溶解した水溶液に、さらに塩を含む溶媒（例えば、生理食塩水

、PBS等)を加えてヒドロゲル状態の止血用医薬組成物を得てもよい。

[0030] また、止血用医薬組成物とは、糖鎖-ポリペプチド複合体と溶媒(水、PBS、生理食塩水等)のみを含むものに限定されず、その他の様々な成分を含んでいてもよい。例えば、消毒・殺菌成分を有する薬剤を含むことにより、傷口からの出血を止めるだけでなく、同時に傷口の殺菌・消毒も行うことができる。

[0031] 本明細書の実施例でも示されているとおり、本発明の止血用医薬組成物は、水溶液の状態において貯蔵弾性率が低く、ヒドロゲルの状態において貯蔵弾性率が高い。また、本発明の止血用医薬組成物は、中性域を含む幅広いpHの範囲で均一な繊維状構造を有する透明なヒドロゲルを形成する。本発明の止血用医薬組成物の適用症状や適用部位は特に限定されないが、上記のような性質から、特に、手術中など患部状況の目視が必要な場合の止血、死角にあたる出血部位の止血、広範囲の出血部位の止血、立体または複雑な形状の出血部位の止血等に好適に用いることができる。

[0032] 本発明の一実施形態においては、止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合して β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものであることを特徴とするが、当該特徴を有している限り、pHが中性付近以外の水溶液中においても自己集合して β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものを除外するものではない。

[0033] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、当該アミノ酸配列の長さは限定されず、好ましくは8~34個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってよく、より好ましくは12~25個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってよく、さらに好ましくは16~21個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってよい。

[0034] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体は、

極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、本発明において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、タンパク質構成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タンパク質非構成アミノ酸を含む。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本発明におけるアミノ酸として、例えば、タンパク質構成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、オルニチンなどのタンパク質非構成アミノ酸；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。タンパク質非構成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- γ -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 -フルオロメチルーヒスチジンおよび α -メチルーヒスチジンなど）、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。本発明の好ましい態様において、本発明において用いられるアミノ酸は、タンパク質構成アミノ酸であってよい。

[0035] 本発明において、極性アミノ酸残基は、側鎖が極性を有しうるアミノ酸残基であれば特に限定されないが、例えば、酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基が含まれる。本明細書において、酸性アミノ酸残基は、例えば、アスパラギン酸（A s p : D）残基、および、グルタミン酸（G l u : E）などを含み、塩基性アミノ酸とは、例えば、アルギニン（A r g : R）、リジン（L y s : K）、ヒスチジン（H i s : H）などを含む。

[0036] なお、本明細書中において、例えば「アスパラギン酸（A s p : D）」などの表記は、アスパラギン酸の略号として、三文字表記で「A s p」、一文字表記で「D」を用いることがあることを意味する。

[0037] また、本明細書において、中性アミノ酸残基のうち、水酸基、酸アミド基、チオール基等を含むアミノ酸残基は、極性を有するものとして、極性アミ

ノ酸残基に含まれるものとする。例えば、本明細書において、チロシン（Tyr：Y）、セリン（Ser：S）、トレオニン（Thr：T）、アスパラギン（Asn：N）、グルタミン（Gln：Q）、システイン（Cys：C）は極性アミノ酸残基に含まれる。

[0038] 本明細書において、非極性アミノ酸残基は、側鎖が極性を有しないアミノ酸であれば特に限定されないが、例えば、アラニン（Ala：A）、バリン（Val：V）、ロイシン（Leu：L）、イソロイシン（Ile：I）、メチオニン（Met：M）、フェニルアラニン（Phe：F）、トリプトファン（Trp：W）、グリシン（Gly：G）、プロリン（Pro：P）などを含む。

[0039] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖ーポリペプチド複合体において、「極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列」は、好ましくは、当該アミノ酸配列は「RADA」の繰り返し配列（繰り返しが2～8回、好ましくは繰り返しが3～6回）であってよく、より好ましくは、当該アミノ酸配列は、RADARADARADARADA（配列番号1）またはRADARADARADARADARADA（配列番号2）であってよい。

[0040] 本発明において、「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。

[0041] また、本発明において、「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-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。

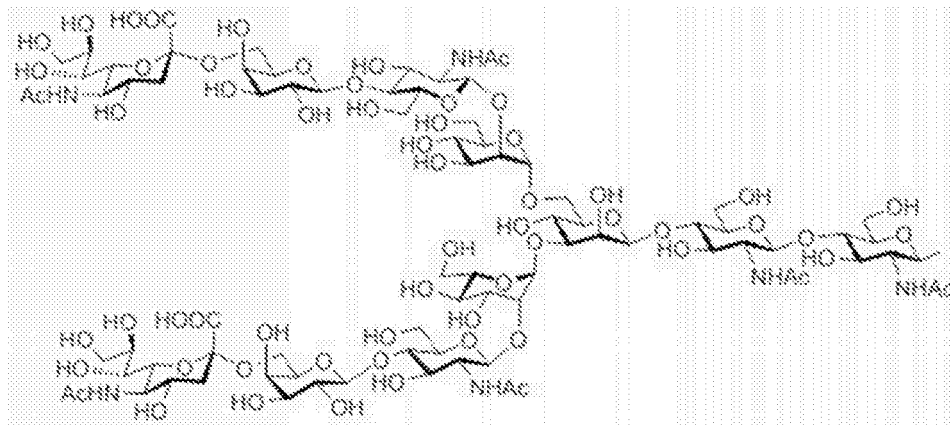
[0042] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体において、ポリペプチドに結合される糖鎖は特に限定されないが、生体適合性の観点から、生体内で複合糖質（糖ペプチド（または糖タンパク質）、プロテオグリカン、糖脂質等）として存在する糖鎖であることが好ましい。かかる糖鎖としては、生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）としてペプチド（またはタンパク質）に結合している糖鎖であるN-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖等が挙げられる。

[0043] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体において、ポリペプチドに結合される糖鎖は、例えば、ジシアロ（Disialo）糖鎖、アシアロ（Asialo）糖鎖、ジグルクナック（DiGlcNAc）糖鎖、ジマンノース（DiMan）糖鎖、グルクナック（GlcNAc）糖鎖、マルトトリオース（Maltotriose）糖鎖、マルトース（Maltose）糖鎖、マルトテトラオース（Maltotetraose）糖鎖、マルトヘプタオース（Maltoheptaose）糖鎖、 β -シクロデキストリン（ β -cyclodextrin）糖鎖、 γ -シクロデキストリン（ γ -cyclodextrin）糖鎖を用いることができる。

[0044] より具体的には、本発明に用いられる糖鎖は、以下の式（1）で示すジシアロ糖鎖であってよく、以下の式（2）で示すアシアロ糖鎖であってよく、以下の式（3）で示すジグルクナック糖鎖であってよく、以下の式（4）で

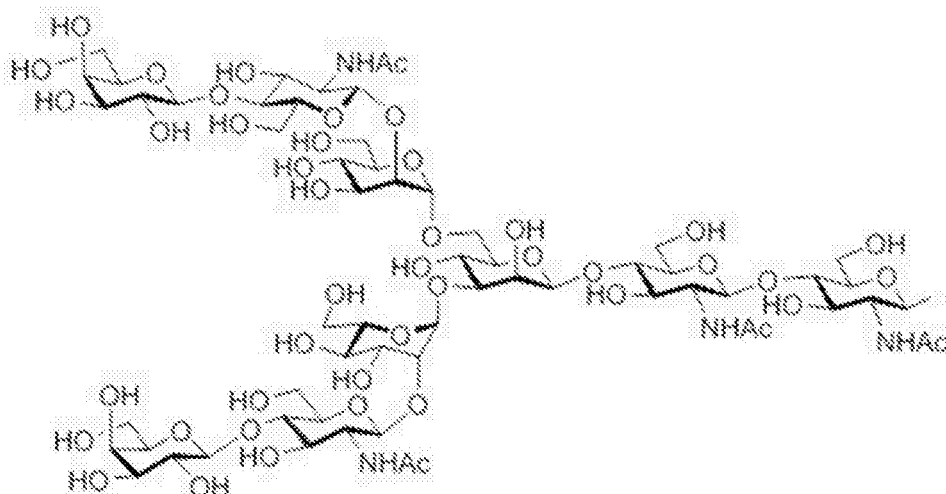
示すジマンノース糖鎖であってよく、以下の式（５）で示すグルクナック糖鎖であってよく、以下の式（６）で示すマルトリオース糖鎖であってよく、以下の式（７）で示すマルトース糖鎖であってよく、以下の式（８）で示すマルトテトラオース糖鎖であってよく、以下の式（９）で示すマルトヘプタオース糖鎖であってよく、以下の式（１０）で示す β -シクロデキストリン糖鎖であってよく、以下の式（１１）で示す γ -シクロデキストリン糖鎖であってよい。

[化1]



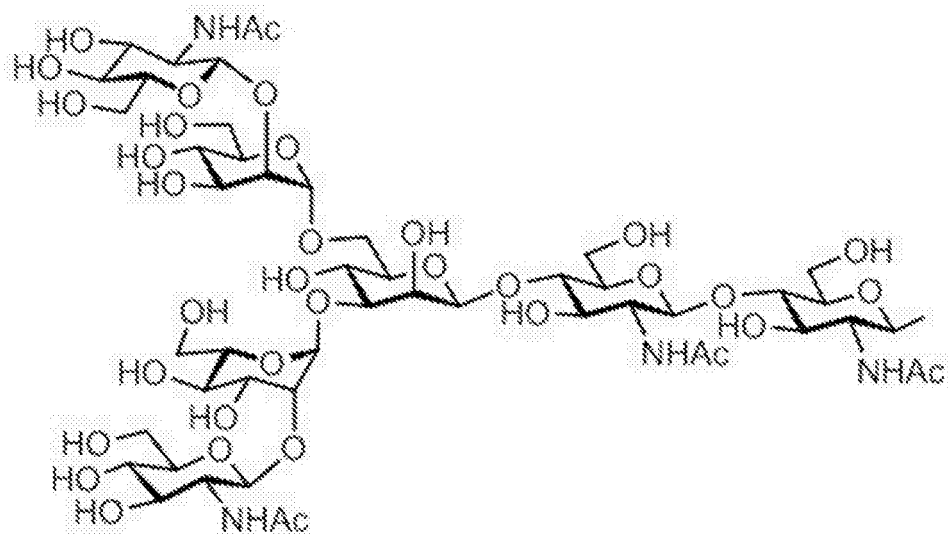
式（１） ジシアロ糖鎖

[化2]



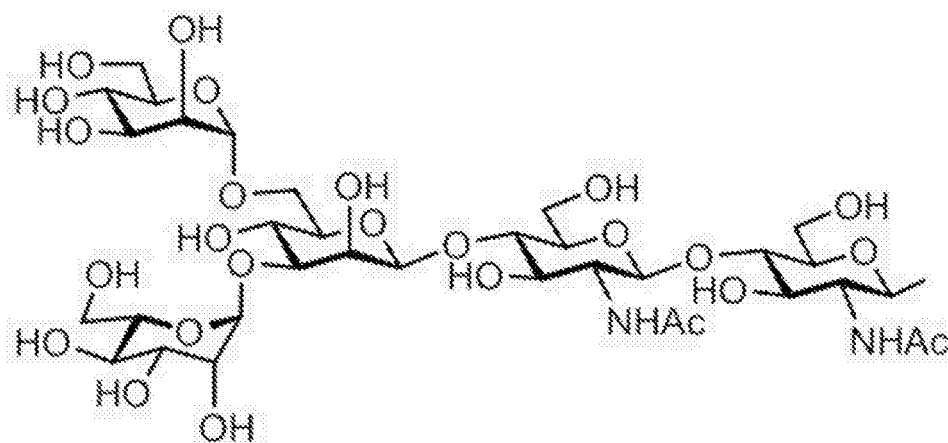
式（２） アシアロ糖鎖

[化3]



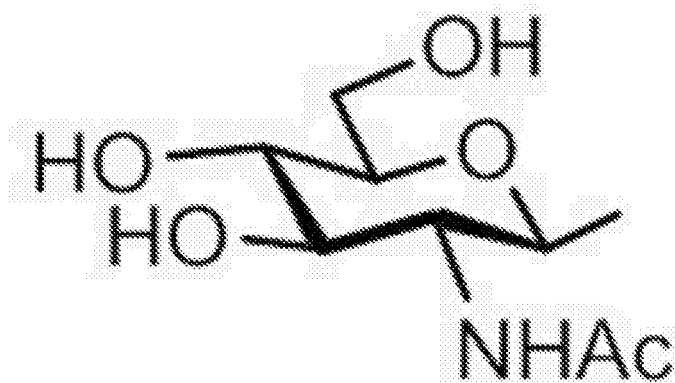
式（３）ジグルクナック糖鎖

[化4]



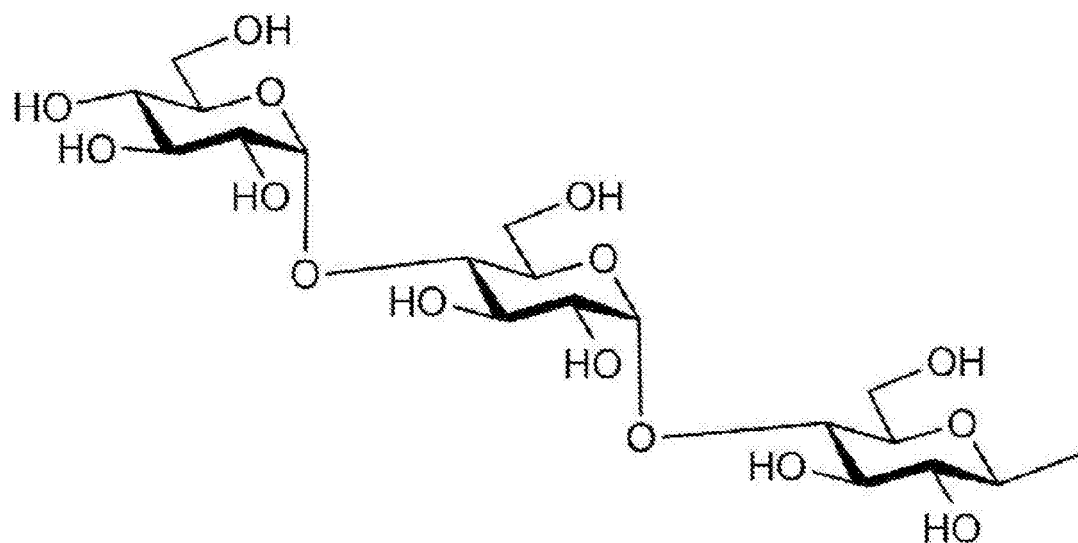
式（４）ジマンノース糖鎖

[化5]



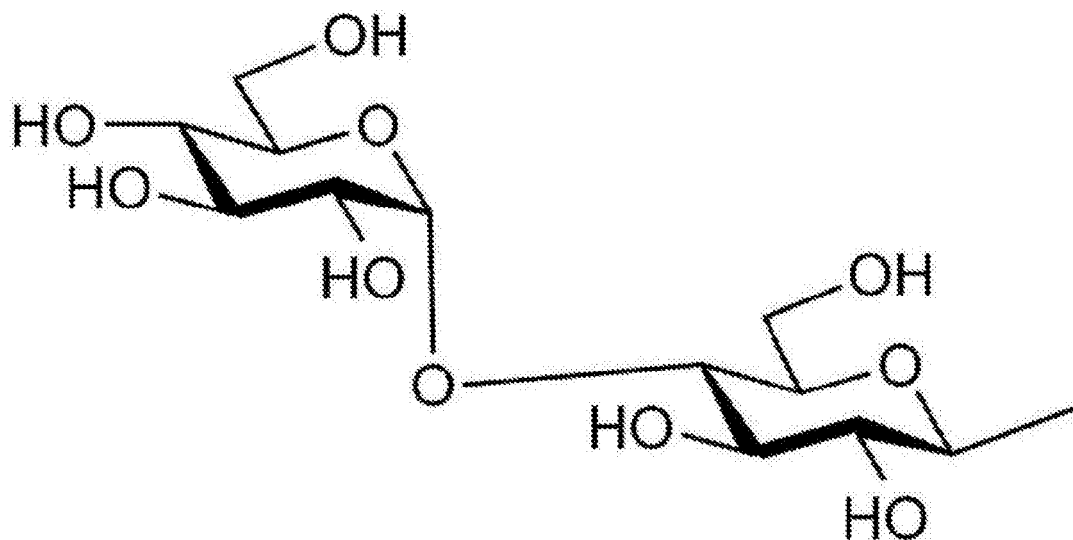
式（５）グルクナック糖鎖

[化6]



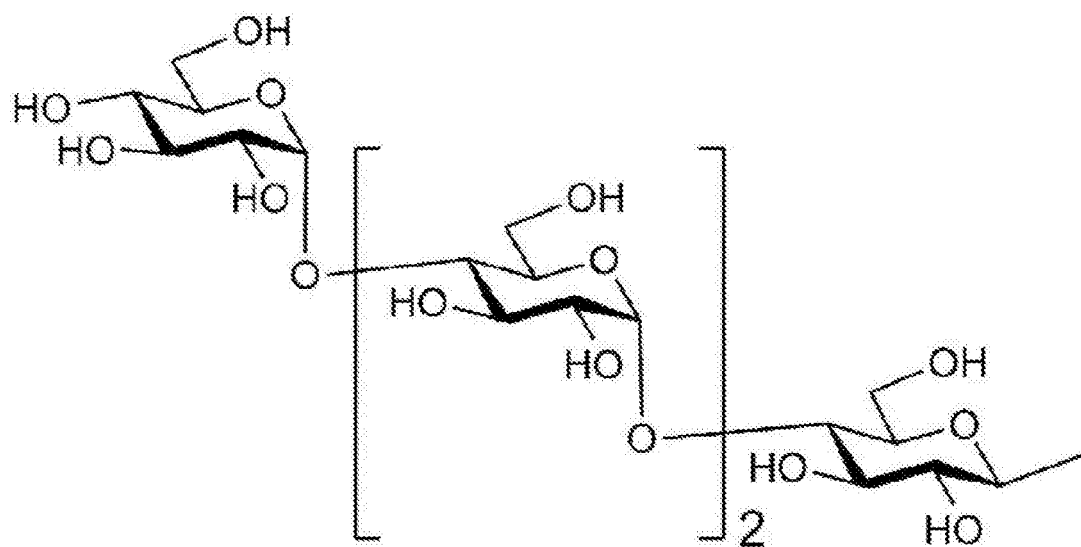
式（６）マルトトリオース糖鎖

[化7]



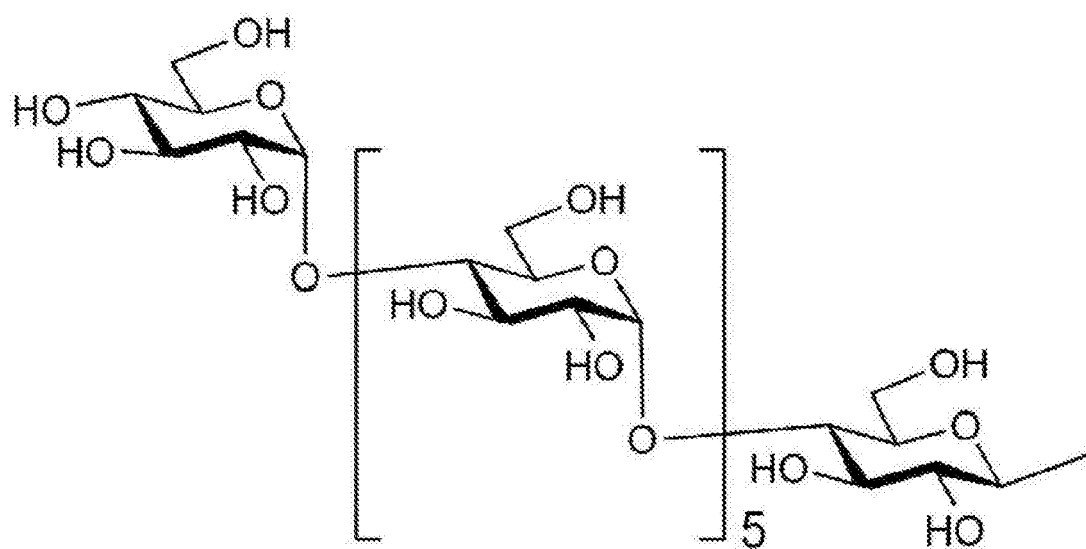
式（７）マルトース糖鎖

[化8]



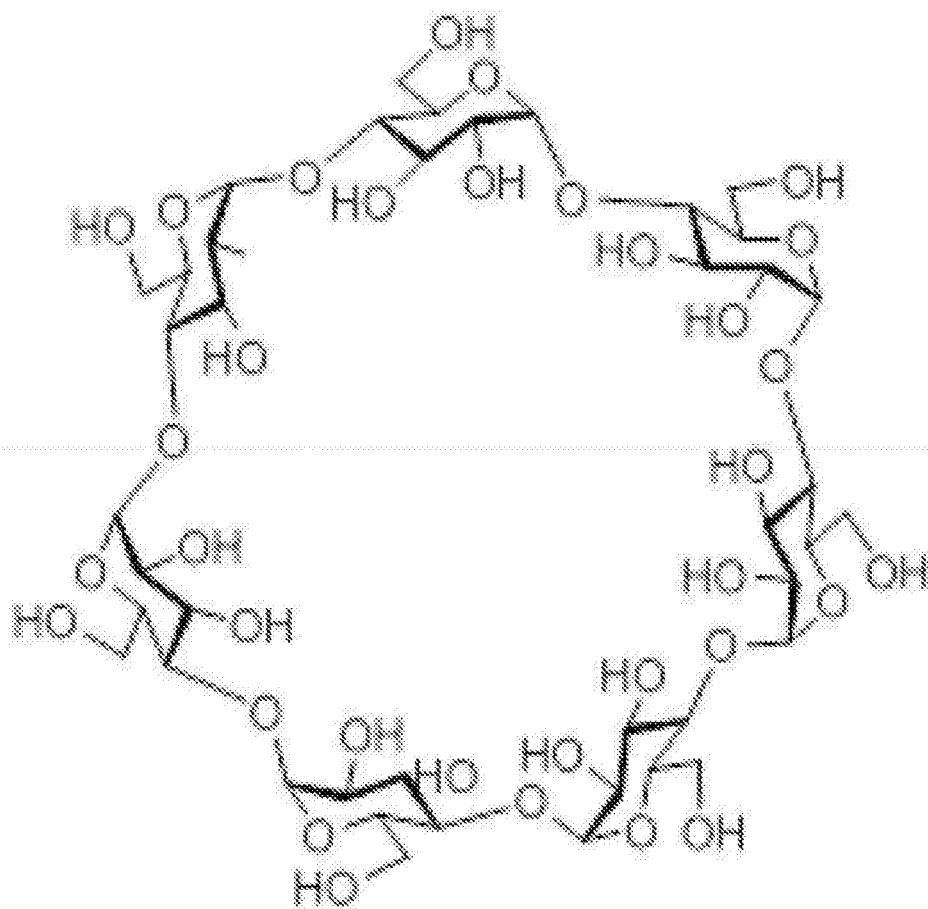
式（８）マルトテトラオース糖鎖

[化9]

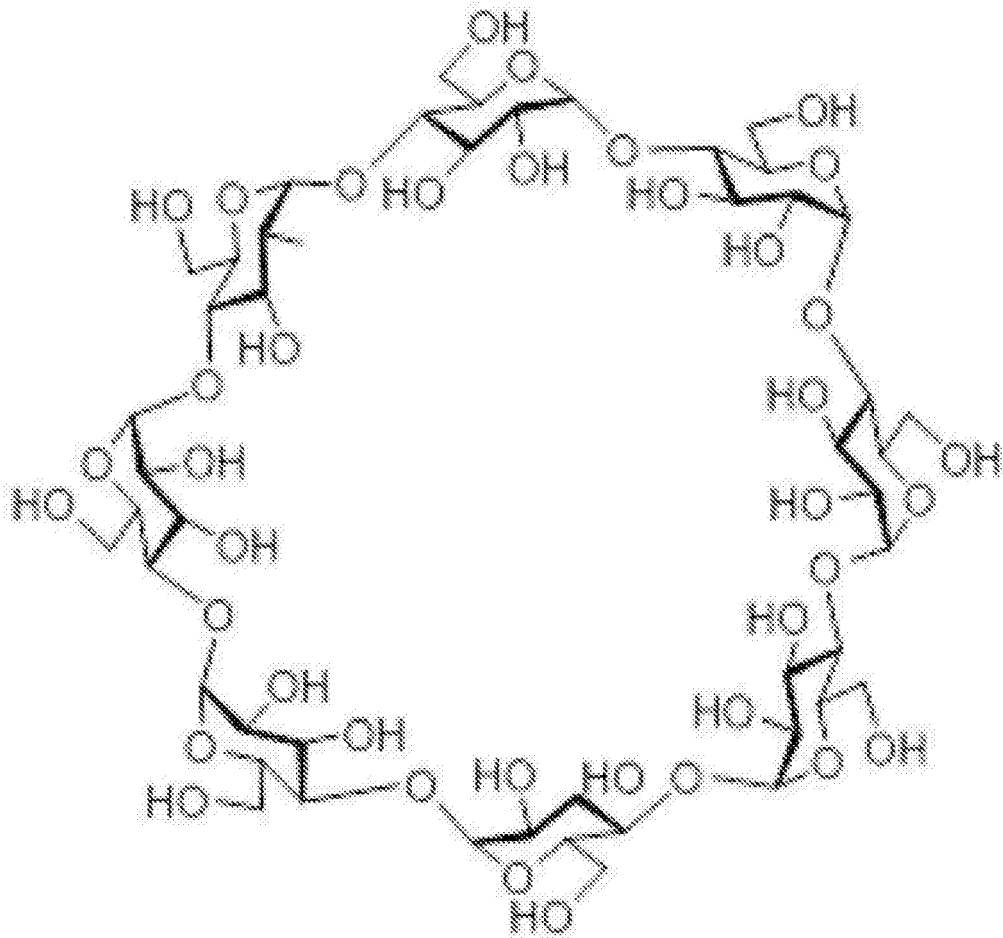


式（９）マルトヘプタオース糖鎖

[化10]

式(10) β -シクロデキストリン糖鎖

[化11]

式（11） γ -シクロデキストリン糖鎖

[0045] 本発明において、上記のジシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖、ジマンノース糖鎖、またはマルトヘプタオース糖鎖の非還元末端から1または複数の糖を失った糖鎖も用いることができる。

[0046] 本発明において、糖鎖が結合されるアミノ酸残基は特に限定されないが、例えば糖鎖をシステイン（Cys : C）またはアスパラギン（Asn : N）に結合させることができ、好ましくはシステイン（Cys : C）に結合させることができる。

[0047] 本発明において、アミノ酸に糖鎖を結合させる方法は特に限定されず、例えば、アミノ酸残基に糖鎖を直接結合してもよく、アミノ酸残基にリンカーを介して糖鎖を結合させてもよい。

[0048] また、本発明において、糖鎖が結合したアミノ酸残基は、「極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列」に対して直接結合していてもよく、例えば、リンカーを介して結合していてもよい。

[0049] このようなリンカーとしては、例えば、アミノ酸とペプチド結合できるように、両末端にアミノ基およびカルボキシ基を有するアルキル鎖やPEG鎖等を挙げることができる。このようなリンカーとしては、例えば、 $-NH-(CH_2)_n-CO-$ （式中、 n は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは1～15の整数を示す。）や $-NH-(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-CO-$ （式中、 m は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは1～7の整数を示す。）等を挙げることができる。より具体的には、 $-NH-(CH_2)_{11}-CO-(C12linker)$ や $-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-CO-(PEGlinker)$ 等を挙げることができる。

[0050] 本発明に用いられる糖鎖-ポリペプチド複合体は、当業者に公知のポリペプチド合成方法に、糖鎖付加工程を組み込むことで製造することができる。糖鎖付加に際しては、トランスグルタミナーゼに代表される、酵素を利用する方法も用いることができるが、この場合、付加する糖鎖が大量に必要な場合、最終工程後の精製が煩雑になる、糖鎖の付加位置および付加可能な糖鎖が制限される、等の問題があるため、アッセイ用等の少量の合成には用いることが可能でも、大規模な製造には実用的な方法とは言えないことがある。

[0051] 本発明に用いられる糖鎖-ポリペプチド複合体の簡便な製造方法の具体例として、以下、糖鎖が結合したAsn（糖鎖付加Asn）を使用し、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-ポリペプチド複合体を製造する方法（A法）、および、任意のアミノ酸残基をCysとしたポリペプチドを公知のペプチド合成方法に従って製造し、その後、Cysに化学合成により糖鎖を付加し、糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法（B法）を例示する。これらの製造方法を参考に、当業者であれば

様々な方法で糖鎖ーポリペプチド複合体を製造することが可能である。

[0052] また、これらのA法およびB法は、2つ以上を組み合わせで行うことも可能である。アッセイなどに用いる少量の合成であれば、さらに、上記の方法に、転移酵素による糖鎖伸長反応を組み合わせることも可能である。なお、A法は、国際公開第2004/005330号パンフレット（US2005222382（A1））に、B法は、国際公開第2005/010053号パンフレット（US2007060543（A1））に、それぞれ記載されており、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。また、A法およびB法において用いられる糖鎖構造が均一な糖鎖の製造に関しては、国際公開第03/008431号パンフレット（US2004181054（A1））、国際公開第2004/058984号パンフレット（US2006228784（A1））、国際公開第2004/058824号パンフレット（US2006009421（A1））、国際公開第2004/070046号パンフレット（US2006205039（A1））、国際公開第2007/011055号パンフレット等に記載されており、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。

[0053] 糖鎖ーポリペプチド複合体を製造する方法（A法）

糖鎖ーポリペプチド複合体は、例えば、以下に概略を示すように、糖鎖が結合したAsn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を、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) 上記(5)で合成したペプチドの遊離アミノ基をアセチル基で保護する場合、無水酢酸、酢酸等を用いてアセチル化することも好ましい。

(7) 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。

[0054] 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A s n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A s nを有するペプチドを得ることができる。

[0055] 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A s nを用いれば、ポリペプチドの任意の箇所に糖鎖を結合させることができる。

[0056] このように、(1)および(3)のいずれかの工程で、2回以上、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A s nを用いることで、ポリペプチドの任意の2ヶ所以上に糖鎖を結合させることができる。

[0057] 糖鎖付加A s n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(7)を行えば、N末端に糖鎖付加A s nを有するポリペプチドを得ることができる。

[0058] C末端をアミド基として供給する樹脂(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、アミノ基で官能化されたR i n k - A m i d e - レジン(メルク社製)、R i n k - A m i d e - P E G A レジン(メルク社製)や、NH - S A L - レジン(渡辺化学社製)を用いることが好ましい。また、アミノ基で官能化されたA m i n o - P E G A - レジン(メルク社製)等にF m o c - NH - S A L - レジン-リンカ

ー（渡辺化学社製）等を結合させてもよい。このレジン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。

[0059] また、C末端をカルボン酸にする場合の樹脂（レジン）としては、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-PEG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-PEGレジン（メルク社製）等を用いることができる。また、Amino-PEGレジンと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 NovaPEG樹脂（メルク社製）等も用いることができる。

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へエステル結合させる。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。

[0060] 糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法-2（A法）

糖鎖-ポリペプチド複合体は、例えば、以下に概略を示すように、糖鎖が結合したAsnを用いた液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アミノ基が遊離でカルボキシ基が保護またはアミド化されたアミノ酸へ結合

させる。

(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を、溶液中でアミド化反応させる。この場合、N末端側のアミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しており、C末端側のカルボキシ基は保護またはアミド化されているので、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、遊離のアミノ基とカルボキシ基とが反応して結合が起こる。

(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、C末端のカルボキシ基が保護またはアミド化され、N末端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

(6) 上記(5)で合成したペプチドの遊離アミノ基をアセチル基で保護する場合、無水酢酸、酢酸等を用いてアセチル化することも好ましい。

(7) 最後に、酸で側鎖の脂溶性保護基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。

[0061] 糖鎖ーポリペプチド複合体を製造する方法ー3 (A法)

糖鎖ーポリペプチド複合体は、例えば、以下に概略を示すように、糖鎖が結合したAsnを用いたフラグメント合成法によって製造することができる。

(1) 上記の糖鎖ーポリペプチド複合体を製造する方法(A法)の(1)ー(6)によって、アセチル基または脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたポリペプチドまたは糖鎖ーポリペプチド複合体を樹脂上に合成する。

(2) 側鎖保護基が脱保護されない条件で、レジンからポリペプチドまたは糖鎖ーポリペプチド複合体を切断し、C末端に遊離のカルボキシを有し、N末端がアセチル基または脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたポリペプチドまたは糖鎖ーポリペプチド複合体を得る。

(3) 得られたアセチル基または脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたポリペプチドまたは糖鎖-ポリペプチド複合体を、固相合成法または液相合成法により、樹脂またはポリペプチドと連結させる。

(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ペプチドが得られる。

(6) 最後に、酸でレジン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。

[0062] 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(Fmoc)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ー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。

[0063] 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を挙げることができる。

[0064] 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-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-

Cys (Acm) -OH、Fmoc-Cys (StBu) -OH、Fmoc-Cys (tBu) -OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Trp (Boc) -OH、Fmoc-Tyr (tBu) -OHを挙げることができる。

[0065] また、糖鎖-ポリペプチド結合体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。

[0066] 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。また、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 (DIC) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。アミノ酸と脱水縮合剤との使用割合は、前者1等量に対して、後者が、通常1~10等量、好ましくは2~5等量である。

[0067] 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。

- [0068] この時固相上の未反応の基を、無水酢酸等を用いてアセチル化してキャッピングすることも好ましい。
- [0069] 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。
- [0070] 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。
- [0071] 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-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ェート（HBTU）、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシド ヘキサフルオロホスフェート（HCTU）、O-(7-アザ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ホネート（HATU）、O-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テトラフルオロボレート（TBTU）、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロジ-4-オキサ-1,2,3-ベンゾトリアジン（Dhbt）、4

ー(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリニウム クロライド n-ハイドレート (DMT-MM) 等を挙げることができる。

[0072] 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当量とするのが好ましい。

[0073] 溶媒としては、例えばDMSO、DMF、ジクロロメタン等を挙げることができる。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。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

[0074] アミノ基で官能化されたRink-Amide-レジン（メルク社製）、Rink-Amide-PEGレジン（メルク社製）、NH-SAL-レジン（渡辺化学社製）や、NH-SAL-レジン-リンカーが結合したAmino-PEGレジン（メルク社製）等にC末端のアミノ酸を導入する場合、上記のアミド化反応を用いて導入することができる。

[0075] 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酢酸（TFA）、弗化水素（HF）等を挙げることができる。

[0076] このようにして、所望の位置に糖鎖付加Asnを有する糖鎖-ポリペプチド複合体を得ることができる。

[0077] なお、本発明の一実施態様において、固相合成に用いる糖鎖付加Asnにおける糖鎖上の非還元末端にシアル酸を含む場合には、酸処理によりシアル酸が切断されるのを防ぐために、当該シアル酸のカルボキシ基を、保護基により保護していることが好ましい。保護基としては、例えば、ベンジル基、アリル基、ジフェニルメチル基、フェナシル基等を挙げることができる。保護基の導入および保護基の脱離の方法は、公知の方法により行うことができる。

[0078] 糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法（B法）

糖鎖-ポリペプチド複合体は、まずポリペプチドを合成し、後で合成したポリペプチドへ糖鎖を付加する方法によっても製造することができる。具体的には、糖鎖を付加したい位置にCysを含むポリペプチドを、固相合成法、液相合成法、細胞により合成する方法、天然に存在するものを分離抽出する方法等により製造する。ポリペプチドを固相合成法または液相合成法により合成する場合、アミノ酸は一残基ずつ連結させても良く、ポリペプチドを連結させてもよい。ここで、ジスルフィド結合を形成する予定の位置にあるCys等、糖鎖を付加しないCysに対しては、例えばアセトアミドメチル(Acm)基で保護しておく。また、糖鎖を付加せず、かつ、ジスルフィド結合の形成にも使用しないCysを糖鎖-ポリペプチド複合体に導入する場合には、糖鎖付加工程およびジスルフィド結合形成工程の間、Cysを保護基により保護しておき、その後脱保護するようにしてCysを導入することができる。このような保護基としては、例えば、tert-ブチル(tBu)や4-メトキシベンジルを挙げることができる。

[0079] また、1つのポリペプチド中のCysに、異なる糖鎖を付加する場合には、最初に糖鎖を導入するCysを無保護とし、次に異なる糖鎖を導入するCysを、StBu等により保護しておくことで、異なる糖鎖を導入することができる。具体的には、固相合成等によりポリペプチドを合成する際、第一の糖鎖を導入したいCysを無保護とし、かつ、第二の糖鎖を導入したいCysをFmoc-Cys(StBu)-OH等を用いて、保護基を有するCysとする。その後、StBu等の保護基を保持したまま、無保護のCysへ糖鎖を導入する。次に、StBu基等を脱保護することで、無保護となったCysへ異なる糖鎖を導入することができる。なお、第一の糖鎖を導入したいCysおよび第二の糖鎖を導入したいCysは、1つ又は複数個とすることができる。

[0080] なお、StBu基の脱保護は、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)、ジチオトレイトール(DTT)、トリブチルホスフィン等の還元剤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。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30分～5時間程度である。反応終了後は、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。

[0081] 異なる糖鎖を導入する際には、Cysの脱保護工程における還元条件やHPLC等の精製工程における酸性条件に対して、より安定な糖鎖から導入することが好ましい。特に、シアル酸含有糖鎖を導入する際には、シアル酸を有さない糖鎖又はシアル酸残基数が少ない糖鎖から、先に導入することが好ましい。

[0082] また、糖鎖－ポリペプチド複合体のアミノ酸配列中に、リンカーを付加させたい場合には、例えば固相合成の過程において、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、合成したポリペプチドの好ましい位置に、リンカーを挿入することができる。

[0083] 次に、ハロアセチル化糖鎖誘導体を上記で得た無保護のCysを含むペプチドと反応させることにより、糖鎖を無保護のCysのチオール基と反応させ、ペプチドに結合させる。上記反応は、リン酸緩衝液、トリス－塩酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはこれらの混合溶液中において、通常0～80℃、好ましくは、10～60℃、更に好ましくは15～35℃で行うのが良い。反応時間は、通常10分～24時間、好ましくは、通常30分～5時間程度である。反応終了後は、適宜、公知の方法（例えば、HPLC）で精製するのが良い。

[0084] ハロアセチル化糖鎖誘導体は、例えば、アスパラギン結合型糖鎖の1位の炭素に結合している水酸基を、 $-NH-(CH_2)_a-(CO)-CH_2X$ （Xはハロゲン原子、aは整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0～4の整数を示す。）で置換した化合物である。

[0085] 具体的には、ハロアセチル化複合型糖鎖誘導体とCys含有ポリペプチド

とをリン酸緩衝液中、室温で反応させる。反応終了後、HPLCで精製することにより糖鎖が結合したCysを有する糖鎖-ポリペプチド複合体を得ることができる。

[0086] また、DMSO、DMF、メタノール、アセトニトリルといった有機溶媒と、上記の緩衝液との混合溶液中で反応を行うこともできる。このとき、有機溶媒の比率は、0～99%（v/v）の範囲で、上記緩衝液に添加することができる。緩衝液への溶解性が低い無保護のCysを含むペプチドは、このような有機溶媒を添加することにより反応溶液への溶解性を向上させることができ、好ましい。

[0087] または、DMSO、DMF、メタノール、アセトニトリルといった有機溶媒や、それらの混合溶液中で反応を行うこともできる。その際、塩基の存在下で行うのが好ましい。塩基としては、例えばDIPA、トリエチルアミン、ピリジン、2, 4, 6-コリジン等を挙げることができる。また、グアニジン塩酸塩や尿素を緩衝溶液に加えた混合溶液中においても反応を行うことができる。なお、グアニジン塩酸塩や尿素は、最終濃度が1M～8Mとなるように上記緩衝液に加えることができる。グアニジン塩酸塩や尿素の添加によっても、緩衝液への溶解性の低いペプチドの溶解性を向上させることができ、好ましい。

[0088] さらに、無保護のCysを含むポリペプチドが、ジスルフィド結合を介した2量体を形成することを防止するために、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩（TCEP）やジチオトレイトール（DTT）を緩衝液に添加して反応させることもできる。TCEPやDTTは、最終濃度が10μM～10mMとなるように緩衝液に加えることができる。

[0089] また、ジシアロ糖鎖やモノシアロ糖鎖等のシアル酸含有糖鎖をペプチド配列中に複数本有する糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する際には、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、アリル基、ジフェニルメチル基、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できる。

- [0090] シアル酸のカルボキシ基が保護された糖鎖を導入した際には、後述する糖鎖ーポリペプチド複合体におけるジスルフィド結合の形成工程の後、シアル酸保護基の脱保護の工程をすることができる。
- [0091] 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、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。また、シアル酸のカルボキシ基の保護は、酸に不安定なシアル酸の脱離を防ぐことも可能である。
- [0092] 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。また、糖鎖ーポリペプチド複合体において、シアル酸のカルボキシ基の保護基は、塩基性条件下で加水分解することによって脱保護できる。上記反応は、通常0～50℃、好ましくは、0～40℃、更に好ましくは0～30℃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、HPLC）で精製するのが良い。
- [0093] また、B法においてハロアセチル化複合型糖鎖誘導体と反応させるアミノ酸は、チオール基を含有するアミノ酸であれば特に限定されず、例えば、D体のシステイン（D-Cys）、ホモシステイン、ノルシステイン、ペニシラミンなどもCysと同様に用いることが可能である。
- [0094] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖ーポリペプチド複合体に結合する糖鎖の種類は特に限定されないが、糖鎖ーポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計が5以上であることが好ましい。例えば、5糖以上の糖鎖を1本以上付加してもよく、5糖以下の糖鎖を複数本付加することにより、1つの糖鎖ーポリペプチド複合体に付加された糖鎖に存在する糖残基の数が5以上になるようにしてもよい。糖鎖を複数本付加する場合には、1つのペプチドに結合される糖鎖の種類は同一であってもよく、異なる種類の糖鎖を組み合わせる結合してもよいが、同一であることが好ましい。
- [0095] 例えば、糖鎖ーポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基

の数の合計が5の場合、2つの糖残基を有するマルトース糖鎖と、3つの糖残基を有するマルトトリオース糖鎖がそれぞれ1本ずつ結合していてもよい。また、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計が6の場合、マルトース糖鎖が3本結合されていてもよく、マルトトリオース糖鎖が2本結合されていてもよい。また、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計が7の場合、マルトース糖鎖が2本およびマルトトリオース糖鎖が1本結合していてもよく、7つの糖残基を有するジグルクナック糖鎖が1本結合していてもよい。同様に、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計が8以上の場合においても、様々な組み合わせの糖鎖が結合していてもよい。

[0096] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体に結合する糖鎖の数は、糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を形成するという特徴を失わない限り限定されない。例えば、1、2、3、4、5、または、6本であってよく、好ましくは、1、2、または、3本であってよい。

[0097] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体において、糖鎖が結合するアミノ酸残基の位置は、糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を形成するという特徴を失わない限り限定されない。例えば、糖鎖が結合するアミノ酸残基の位置はポリペプチドのN末端側および／またはC末端側であってよく、N末端側およびC末端側以外の位置であってもよい。

[0098] 好ましくは、ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 x 番目までの全てのアミノ酸、および、C末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 y 番目までの全てのアミノ酸（ここで、 x および y は整数であり、 $x \geq 0$ であり、 $y \geq 0$ であり、 $x + y$ は、ポリペプチドに結合している糖鎖の数の合計である）に糖鎖が結合していてもよい。

[0099] より具体的には、ポリペプチドに結合している糖鎖の数が1本の場合には

、当該1本の糖鎖は、前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、または、C末端に位置するアミノ酸残基と結合してもよい。

[0100] また、ポリペプチドに結合している糖鎖の数が2本の場合には、当該2本の糖鎖は、次の(1)～(3)からなる群から選択されるアミノ酸残基と結合していてもよい。

(1) ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基

(2) ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基

(3) ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、および、前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

[0101] また、ポリペプチドに結合している糖鎖の数が3本の場合には、当該3本の糖鎖は、次の(1)～(4)からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸残基と結合していてもよい。

(1) ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目、2番目、および、3番目のアミノ酸残基

(2) ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目、2番目、および、3番目のアミノ酸残基

(3) ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基、ならびに、ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

(4) ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、ならびに、ポリペプチドのC末端から数えて1番目および2番目に位置するアミノ酸残基

[0102] 本発明に係る止血用医薬組成物に含まれる糖鎖-ポリペプチド複合体に付加される糖鎖は、分岐を有していることが好ましい。ここで、本発明において、ポリペプチドに結合された糖鎖が「分岐を有する糖鎖」であるとは、例えば、ジシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖のように、1つの糖鎖の中で分岐を有している場合に限定されず、例えば、1つのポリペプチ

ドに複数本の直鎖状の糖鎖が付加されることにより、ペプチド全体として糖鎖が分岐を有している状態にある場合も含まれる。例えば、1つのペプチドにマルトース糖鎖やマルトリオース糖鎖等の直鎖状の糖鎖が2本以上結合している場合も、本発明において「分岐を有する糖鎖」に含まれることとする。

[0103] 本発明において、ヒドロゲルの強度や性質についての評価方法は特に限定されないが、例えば、スチール球載荷試験や動粘度測定によって評価することができる。スチール球載荷試験では、例えば、ダーラム管内で形成させたヒドロゲルの表面に所定の重量のスチール球を載荷し、スチール球がヒドロゲルの表面に留まるか、沈むかを観察することによって、ヒドロゲルの強度を評価することができる。また、スチール球載荷試験では、ヒドロゲル中の透明度や、不溶物・沈殿の有無を目視で確認することができる。ヒドロゲルの動粘度測定では、対象となるヒドロゲルについて、検流計を用いて動粘度を測定することにより、時間の経過にともなうヒドロゲルの強度の変化を測定することができる。

[0104] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態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。

[0105] 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（技術用語及び科学用語を含む。）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、本明細書及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、又は、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] 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場合

があるが、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、実施例により本発明をより具体的に説明するが、しかしながら、本発明はいろいろな形態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。

[0109] 本明細書において、例えば、D i G l c N A c - B r A cと示した場合には、ブロモアセチル化されたジグルクナック糖鎖を示す。また、例えば、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4と示した場合には、R A D A R A D A R A D Aのアミノ酸配列を有するポリペプチドのN末端に、ジグルクナック糖鎖が結合したシステイン残基が結合していることを示す。

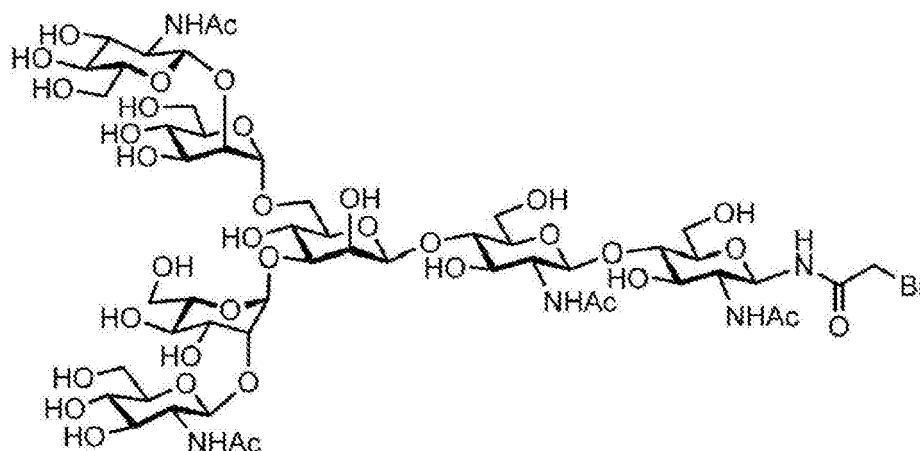
実施例

[0110] (合成例1) C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4の合成

(合成例1-1) D i G l c N A c - B r A cの合成

WO 2005/010053に記載の方法と同様の手法で合成を行い、下記式(12)であらわされるD i G l c N A c - B r A cを得た。

[化12]



式(12)

[0111] (合成例 1-2) Ac-C(RADA)4-NH₂の合成

固相合成用カラムに Rink amide PEGA 樹脂 (100 μmol) を取り、DMF およびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH (124.5 mg、400 μmol) と 1-ビスジメチルアミノメチレン-5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシドヘキサフルオロホスフェイト (HCTU) (157.2 mg、380 μmol) とジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (104.5 μL、600 μmol) の DMF (2.5 mL) 溶液を加え、15 分間振盪した。ジクロロメタンおよび DMF で洗浄後、Fmoc 保護基を、DMF 中の 20% のピペリジンで処理することにより除去した。DMF で洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc 法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式 (13) で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (配列番号 3) を合成した。縮合反応は、縮合剤として HCTU を使用して DMF 中で行った。

[化13]



式 (13)

[0112] Fmoc 保護基を、DMF 中の 20% のピペリジンで処理することにより除去した。DMF およびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え 1 時間振盪した。DMF およびジクロロメタンで洗浄後、トリフルオロ酢酸 (TFA) : 水 : トリイソプロピルシラン : エタンジチオール (= 90 : 2.5 : 5 : 2.5) を加え、4 時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部を HPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20 x 250 mm、流速 : 7.0 mL/分、展開溶媒 A : 0.1% TFA 水 B : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル、グラジエント A : B = 88 : 12

→ 7 8 : 2 2 1 1 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (14)

[化14]



式 (14)

[0113] (合成例 1-3) C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 の合成

合成例 1-2 で合成したポリペプチド (配列番号 4) (25.3 mg、13.9 μmol) と、合成例 1-1 で合成した D i G l c N A c - B r A c (30.0 mg、20.9 μmol 、ペプチド 1 に対して 1.5 等量) を 33 μM の T C E P および 8 M グアニジン塩酸塩を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.3、4.7 mL) に溶解し、室温で 3 時間反応させた。

[0114] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A: B = 88:12 → 81:19 10 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (15) で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号 5) (23.9 mg、7.53 μmol 、収率 54%) を得た。

[化15]



式 (15)

[0115] (実施例 1) 円偏光二色性 (CD) 測定および解析

(RADA) 4 などの自己組織化ペプチドは、分子間相互作用により β シート構造を形成し、さらにその構造がイオン存在下、何重にも重なることで、ヒドロゲルが形成されることが知られている。この β シート構造を確認する有効な手法として、CD 測定が知られている。一般的に、 β シート構造を有する場合の CD スペクトルは、197 nm 付近の正の極大と 216 nm 付

近の負の極大を示す。そこで、CD測定を行うことにより、本発明の組成物が広範なpHにおいてβシート構造を形成することを確認した。

[0116] 合成例1で合成したC(DiGlcNAc)-(RADA)4および対照となる(RADA)4(商品名:PuraMatrix、3D Matrix社製、製品番号:354250)をそれぞれ超純水に溶解し、1重量%水溶液を調製した。この水溶液に、同量の超純水、1.8%食塩水、または0.3Mリン酸緩衝溶液(pH7.4)を加え、それぞれ0.5重量%水溶液及びヒドロゲルを作製した。その後、各溶液のペプチド濃度が100mMになるように超純水で希釈した。これらの溶液を光路長0.1cmの石英セルに移した。そして、円二色性分散計(J-805、Jasco)を用いて、波長190-260nmで、CDスペクトルを測定した。平均残基楕円型性(Mean residue ellipticity) θ は以下の式を用いて算出した。

$$[\theta] = (\theta_{obs} / 10 \cdot l \cdot c) / r$$

ここで θ_{obs} はミリ度で測定した楕円形性、 l はセル長さ(cm)、 c は濃度(M)、そして r はアミノ酸の残基数を表す。

図1にC(DiGlcNAc)-(RADA)4を含む組成物の測定結果を、図2に(RADA)4を含む組成物の測定結果をそれぞれ示す。

水溶液中及び生理食塩水溶液中においては、C(DiGlcNAc)-(RADA)4及び(RADA)4ともに、197nm付近の正の極大と216nm付近の負の極大を示したことから、両ペプチドはβシート構造を形成していることが確認された。一方、リン酸緩衝溶液中においては、C(DiGlcNAc)-(RADA)4のみβシート構造の形成が確認された。

[0117] (実施例2) 繊維状構造形成の確認

合成例1で合成したC(DiGlcNAc)-(RADA)4及び対照となる(RADA)4をそれぞれ超純水に溶解し、1重量%水溶液を調製した。調製したそれぞれの水溶液を0.5重量%になるように、超純水、1.8%食塩水又はリン酸緩衝溶液(pH7.4)を用いてそれぞれ希釈した。得

られた希釈液 1 μL を、劈開させたマイカ基板（商品名：M I C A G r a d e V - 4、S P I s u p p l i e s 社製）上にそれぞれ滴下した。その後、前記マイカ基板上の余分な化合物を、100 μL の蒸留水で洗い流した。ついで、室温（25℃）で基板を空気乾燥させた。

[0118] 乾燥後のマイカ基板上のペプチドを、原子間力顕微鏡（商品名：ナノスケールハイブリット顕微鏡 VN-8000、キーエンス社製）を用いて観察した。その結果を、図1に示す。

[0119] 図3に示されるように、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 は、いずれの条件下においても自己組織化して繊維状構造を形成することが分かった。一方、(R A D A) 4 は、リン酸緩衝溶液中では凝集物のようなものが観察され、繊維状構造を形成しないことが分かった。

[0120] (実施例3) 動粘度測定及び解析

動粘度の測定には、0.3 mm のギャップ高を有する直径40 mm のステンレス鋼平行プレートを備えた検流計 (D i s c o v e r y H R - 2、T A インスツルメント社製) を用いた。C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 を超純水に溶解し、0.5-5 重量% のペプチド水溶液を調製した。また、対照となる (R A D A) 4 も超純水に溶解し、0.5-1 重量% のペプチド水溶液を調製した。その後、これらの水溶液を25℃に設定した検流計に移し、P r e s h e a r を30秒間、100 S^{-1} の回転速度で行った後、各種物性データを時間経過に従ってモニターした（周波数=1 Hz、歪み=10%）。この測定結果を図4に示す。

[0121] C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4 を超純水に溶解後、同量のリン酸緩衝液（300 mM、pH 7.4）を添加することで、0.5-5 重量% のヒドロゲルを作成した。また、(R A D A) 4 を超純水に溶解後、同量の1.8% の食塩水を添加することで、0.5-1 重量% のヒドロゲルを作製した。なお、(R A D A) 4 は2重量%以上の濃度において完全に溶解せず、操作が困難であり、試験を実施することができなかった。これらのヒドロゲルの動粘度を、上記と同様の条件で測定した。この測定結果を図5に示す

。

[0122] 図4ではC (D i G l c N A c) - (R A D A) 4および(R A D A) 4の水溶液状態での貯蔵弾性率を示している。1重量%のC (D i G l c N A c) - (R A D A) 4と1重量%の(R A D A) 4の水溶液状態における貯蔵弾性率を比較すると、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4が低い値を示した。一方、図5に示した、塩を添加した後のヒドロゲル状態におけるそれぞれの貯蔵弾性率を同様に比較すると、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4と(R A D A) 4とが同等の値を示した。これらの結果から、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4は、水溶液状態では貯蔵弾性率が低く扱いが容易である一方、塩を添加すると即座にゲル化するという特徴を有していることがわかった。また、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4は水溶性が高いため、ペプチド濃度を高くしても凝集物を生じることなく、高い貯蔵弾性率を有するヒドロゲルを提供することができる。

[0123] (実施例4) 止血作用の評価

本発明のヒドロゲルが生体において止血作用を有するかを確認するため、ラットの肝臓穿刺による出血モデルでの評価試験を行った。

[0124] 9週齢のC r l j : S Dラットをイソフルランにて麻酔し、尾静脈からヘパリンナトリウム注(200 U / r a t、味の素製薬株式会社)を投与した。ラットを開腹し、肝臓の外側左葉または内側右葉の下側にプラスチックパラフィンフィルムをあて、肝臓表面を露出させた。肝臓の同一部位を針器具(ピンを直径7mm程度に束ね、深さ3~4mmまで刺さるようにしたもの)で3回刺して肝臓穿刺モデルとした。穿刺後から10秒間の出血は脱脂綿にて除去し、その後直ちに被験物質(C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4、(R A D A) 4)、または、媒体(精製水、PBS)を各100 μ L、穿刺部位に滴下にて局所投与した。投与後1.5分および3分の時点で下記のスコア基準により止血および出血状態を確認し被験物質の止血効果を評価した。C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4はPBS (pH 7.4, phosphate buffered saline) によって0.5重

量%となるように溶解し評価に使用した。(RADA)4は精製水によって0.5重量%となるように溶解し評価に使用した。

[表1]

表1 止血および出血状態の確認スコア

判定	スコア	穿刺部位の状態
○：止血	2	出血が認められない状態。
△：ほぼ止血	1	断続的であっても、わずかに出血が見られる状態。
×：出血	0	出血が継続して見られる状態。

[0125] 止血効果の評価結果を表2に示した。また、3分後の止血効果についてスコア分布を図6に示した。3分後まで持続的な出血が認められた個体は、PBS適用群では16例中12例(75%)、精製水適用群では15例中13例(87%)であった。一方、C(DiGlcNAc)-(RADA)4適用群では3分後まで持続的な出血が認められた個体は15例中4例(27%)であり、(RADA)4適用群では3分後まで持続的な出血が認められた個体は15例中3例(20%)であった。その他の個体は穿刺後3分までにゲル状の固形物または被膜等を形成し、出血部位からの血液の流出が止まるか、流出量が減少した。

[0126] 本試験系ではラットに被験物質を投与する前にヘパリンを投与し、内因性血液凝固系を抑制した条件下で検討を行っていることから、上記の結果は、被験物質自体が持つ止血効果を示している。

[表2]

表2		C(DiGlcNAc)- RADA4	PBS	RADA4	精製水
15分	持続的な出血 (スコア0)	9/15 (60%)	16/16 (100%)	11/15 (73%)	14/15 (93%)
	ほぼ止血 (スコア1)	4/15 (27%)	0/16 (0%)	3/15 (20%)	0/15 (0%)
	止血 (スコア2)	2/15 (13%)	0/16 (0%)	1/15 (7%)	1/15 (7%)
3分	持続的な出血 (スコア0)	4/15 (27%)	12/16 (75%)	3/15 (20%)	13/15 (87%)
	ほぼ止血 (スコア1)	1/15 (7%)	1/16 (6%)	2/15 (13%)	0/15 (0%)
	止血 (スコア2)	10/15 (67%)	3/16 (19%)	10/15 (67%)	2/15 (13%)
観察個体数/評価個体数(百分率)					

[0127] 以上の結果から、C(DiGlcNAc)-(RADA)4は、(RADA)4と比較して高いユーザビリティを備えておりながら、(RADA)

4 と同等の止血効果を示すことがわかった。すなわち、本発明のヒドロゲルは止血用医薬組成物として極めて高い利用価値を有することが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 糖鎖ーポリペプチド複合体を含む止血用医薬組成物であって、
前記糖鎖ーポリペプチド複合体における前記ポリペプチドが、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、
前記ポリペプチドに1または複数の糖鎖が結合していることを特徴とする、
止血用医薬組成物。
- [請求項2] 請求項1に記載の止血用医薬組成物であって、
前記糖鎖ーポリペプチド複合体における前記ポリペプチドが、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置された、8～34個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする、
止血用医薬組成物。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の止血用医薬組成物であって、
前記糖鎖ーポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものであることを特徴とする、
止血用医薬組成物。
- [請求項4] 請求項1に記載の止血用医薬組成物であって、
前記止血用医薬組成物に含まれる前記糖鎖ーポリペプチド複合体の濃度が0.1重量%～20重量%であることを特徴とする、
止血用医薬組成物。
- [請求項5] 請求項1に記載の止血用医薬組成物であって、
前記ポリペプチドに結合している1または複数の糖鎖に存在する糖残基の数の合計が5以上であることを特徴とする、
止血用医薬組成物。
- [請求項6] 請求項5に記載の止血用医薬組成物であって、

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が、1、2、または、3本であることを特徴とする、
止血用医薬組成物。

[請求項7]

請求項5に記載の止血用医薬組成物であって、

前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 x 番目までの全てのアミノ酸、および、C末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 y 番目までの全てのアミノ酸（ここで、 x および y は整数であり、 $x \geq 0$ であり、 $y \geq 0$ であり、 $x + y$ は、ポリペプチドに結合している糖鎖の数の合計である）に糖鎖が結合していることを特徴とする、

止血用医薬組成物。

[請求項8]

請求項1に記載の止血用医薬組成物であって、

前記糖鎖が、分岐を有する糖鎖であることを特徴とする、
止血用医薬組成物。

[請求項9]

請求項1～8のいずれか1項に記載の止血用医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、ヒドロゲルの状態にあることを特徴とする、
止血用医薬組成物。