

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4025727号

(P4025727)

(45) 発行日 平成19年12月26日(2007.12.26)

(24) 登録日 平成19年10月12日(2007.10.12)

(51) Int. Cl.

F I

C07K	14/505	(2006.01)	C07K	14/505	ZNA
C07K	1/00	(2006.01)	C07K	1/00	
A61K	38/22	(2006.01)	A61K	37/24	
A61P	7/06	(2006.01)	A61P	7/06	
C12P	21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 14 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2003-532536 (P2003-532536)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月20日(2002.9.20)
 (65) 公表番号 特表2005-509609 (P2005-509609A)
 (43) 公表日 平成17年4月14日(2005.4.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/010556
 (87) 国際公開番号 W02003/029291
 (87) 国際公開日 平成15年4月10日(2003.4.10)
 審査請求日 平成16年4月26日(2004.4.26)
 (31) 優先権主張番号 01122555.4
 (32) 優先日 平成13年9月25日(2001.9.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄
 (72) 発明者 ティッシュャー, ヴィルヘルム
 ドイツ国、82380 パイセンベルク、
 フィンケンヴェーク 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PEG化およびジグリコシル化されたエリスロポエチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

骨髓細胞に網状赤血球および赤血球の産生を増加させるインピボの生物学的活性を有するエリスロポエチンムテインであって、Asn38およびAsn83においてN-グリコシル化されているがAsn24においてN-グリコシル化されていないことを特徴とする、エリスロポエチンムテイン。

【請求項2】

N-末端アミノ基および/またはLys20の - アミノ基において低級アルコキシポリ(エチレングリコール)基に結合することを特徴とする、請求項1に記載のエリスロポエチンムテイン。

【請求項3】

各ポリ(エチレングリコール)部分の平均分子量が5キロダルトン~40キロダルトンである、請求項2に記載のエリスロポエチンムテイン。

【請求項4】

各ポリ(エチレングリコール)部分の平均分子量が30キロダルトンである、請求項2に記載のエリスロポエチンムテイン。

【請求項5】

ポリ(エチレングリコール)部分がメトキシによりキャップされている、請求項2~4のいずれか1項に記載のエリスロポエチンムテイン。

【請求項6】

10

20

配列番号 1 または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のエリスロポエチンムテイン。

【請求項 7】

骨髓細胞に網状赤血球および赤血球の産生を増加させるインビボの生物学的活性を有するエリスロポエチンムテインであって、Asn 38 および Asn 83 において N - グリコシル化されているが Asn 24 において N - グリコシル化されていないことを特徴とするエリスロポエチンムテインと、薬学的に許容され得る緩衝剤とを含む、水性組成物。

【請求項 8】

前記エリスロポエチンムテインが N - 末端アミノ基および / または Lys 20 の - アミノ基において低級アルコキシポリ (エチレングリコール) 基に結合することを特徴とする、請求項 7 に記載の水溶性組成物。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のムテインまたは組成物と、薬学的に許容され得る賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 10】

慢性腎不全 (CRF) 患者ならびに化学療法を受けている AIDS および癌患者における貧血の治療用の薬剤を調製するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のムテインまたは組成物の使用。

【請求項 11】

エリスロポエチンムテインの製造方法 (ここで、エリスロポエチンムテインは Asn 38 および Asn 83 において N - グリコシル化されているが Asn 24 において N - グリコシル化されていない) であって、保持された Asn 24 および Gly 28 を有するエリスロポエチンのアミノ酸 1 ~ 28 からなる N - 末端エリスロポエチン断片と、Asn 38 および Asn 83 においてグリコシル化されると共に保持された Cys 29 を有するエリスロポエチンのアミノ酸 29 ~ 165 または 166 からなる C - 末端エリスロポエチン断片とを、Gly 28 と Cys 29 との間の化学的結合により結合させ、そしてエリスロポエチンムテインを単離することを特徴とする方法。

20

【請求項 12】

前記 N - 末端断片がエリスロポエチン配列の N - 末端および / またはリシン 20 において PEG 化される、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記 N - 末端断片が化学的合成により製造される、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 C - 末端断片が組換え遺伝子発現により製造される、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ジグリコシル化されたエリスロポエチンの新規変異体、その生成方法、使用および製剤組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

赤血球形成は、細胞破壊を相殺するために起こる赤血球の産生である。赤血球形成は、十分な赤血球を適切な組織酸素化に利用可能にすることができる制御された生理学的機構である。天然産ヒトエリスロポエチン (hEPO) は、腎臓において生成されると共に赤血球産生を刺激する体液性血漿因子である、165 個のアミノ酸を含む糖蛋白である。ヒト EPO は、骨髓中での委任赤血球前駆細胞の分裂および分化を刺激する。ヒト EPO は、赤血球前駆体上の受容体に結合することによりその生物学的活性を発現する。天然産ヒトエリスロポエチンは、老化により失われる赤血球の交換を刺激するために血漿中に低濃

50

度で存在する酸性糖蛋白である。

【0003】

エリスロポエチンは、組換えDNA技術(Egrie, J.C.ら、Immunobiol. 第72巻(1986年)213~224頁)を用いて生合成的に製造され、そしてチャニーズハムスターの卵巣組織細胞(CHO細胞)中に挿入されて発現されたクローンヒトEPO遺伝子の産物である。天然産ヒトEPOは、まず、アルギニン166と共にポリペプチド鎖を含む166個のアミノ酸に翻訳される。翻訳後修飾においてアルギニン166は、カルボキシペプチダーゼにより開裂される。ヒトEPO(165個のアミノ酸および166個のアミノ酸)の一次構造を、配列番号1および配列番号2に示す。Cys7-Cys161とCys29-Cys33との間に2つのジスルフィド橋がある。糖部分を含まないヒトEPOのポリペプチド鎖の分子量は18236Daである。無傷のEPO分子において、分子量の約40%が、炭水化物基による(Sasaki, H.ら、J.Biol.Chem.第262巻(1987年)12059~12076頁)。

10

【0004】

エリスロポエチンは赤血球形成において必須であるので、そのホルモンは赤血球産生の低下または不全を特徴とする血液疾患の処置において有用である。臨床的には、EPOは、例えば、慢性腎不全(CRF)患者および化学療法を受けているAIDSおよび癌患者における貧血の治療に用いられる(Danna, R.P.ら、MB, Garnick編、Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. ニューヨーク、ニューヨーク州: Marcel Dekker; 1990年、301~324頁)。しかしながら、EPOのような現在利用できるタンパク質治療剤の生物学的利用性は、その短い血漿半減期およびプロテアーゼ分解に対する感受性より制限される。これらの欠点は、最大の臨床的性能を得ることを妨げる。

20

【0005】

EPOのアミノ酸配列の修飾が、米国特許第4,835,260号; WO94/25055; WO94/24160; WO94/02611; WO95/05465; および当該技術水準の多くの他の刊行物において提案されている。

【0006】

ヒト尿由来エリスロポエチンおよび組換えエリスロポエチン(哺乳動物細胞中で発現)の両方が、3つのN-結合および1つのO-結合オリゴ糖鎖を含み、これらは一緒になって、糖蛋白の合計分子量の約40%を占める。24、38および83の位置にあるアスパラギン残基においてN-結合グリコシル化が起こり、126の位置にあるセリン残基においてO-結合グリコシル化が起こる(Laiら、J.Biol.Chem.第261巻(1986年)3116頁; Broudy, V.C.ら、Arch.Biochem.Biophys.第265巻(1988年)329頁)。オリゴ糖鎖が、末端シアル酸残基で修飾されることが示された。全てのシアル酸残基を除去するためにグリコシル化エリスロポエチンを酵素的に処理すると、インビボ活性が失われるが、インビトロ活性に影響を与えない(Lowyら、Nature第185巻(1960年)102頁; Goldwasser, E.ら、J.Biol.Chem.第249巻(1974年)4202~4206頁)。この挙動は、肝アシアログリコプロテイン結合性タンパク質との相互反応により循環からアシアロエリスロポエチンが迅速に取り除かれることにより説明された(Morrelら、J.Biol.Chem.第243巻(1968年)155頁; Briggs, D.W.ら、Am.J.Physiol.第227巻(1974年)1385~1388頁; Ashwell, GおよびKawasaki, T.、Methods Enzymol.第50巻(1978年)287~288頁)。すなわち、肝結合性タンパク質による結合を避けるためにシアル化された場合のみに、エリスロポエチンがインビボ生物学的活性を有する。

30

40

【0007】

エリスロポエチンのオリゴ糖鎖における他の成分の役割は、あまり明確にされていない。部分的に脱グリコシル化されたエリスロポエチンが、グリコシル化型と比べてインビボ活性が大幅に低下しているが、インビトロ活性は保持していることが示された(Dordal, M.S.ら、Endocrinology第116巻(1985年)2293~2299頁)。しかしながら

50

、別の研究において、N - 結合またはO - 結合オリゴ糖鎖の除去単独で、またはグリコシル化部位であるアスパラギンまたはセリン残基の変異誘発を伴うと、哺乳動物細胞中で産生される変化したエリスロポエチンのインビトロ活性が急激に低下した (Dube, S.ら、J. Biol. Chem. 第263巻 (1988年) 17516 ~ 17521頁)。

【0008】

オリゴヌクレオチド定方向突然変異誘発を用いて、グリコシル化のための特異的部位を欠くEPOの構造変異体が調製された (Yamaguchi, K.ら、J. Biol. Chem. 第266巻 (1991年) 20434 ~ 20439頁; およびHiguchi, M.ら、J. Biol. Chem. 第267巻 (1992年) 7703 ~ 7709頁)。大腸菌における非グリコシル化EPOのクローニングおよび発現が、Lee-Huang, S.によるProc. Natl. Acad. Sci. USA 61 (1984年) 2708 ~ 2712頁および米国特許第5,641,663号に記載されている。

10

【0009】

EPO640619は、少なくとも1つの付加的なグリコシル化部位を含むアミノ酸配列を含むヒトエリスロポエチンの類似体に関する。グリコシル化のために付加された部位は、ヒトエリスロポエチンよりも、多数の炭水化物鎖および高いシアル酸含量となる。少なくとも1つのグリコシル化部位の再配列を含むアミノ酸配列を含むエリスロポエチン類似体も提供されている。エリスロポエチンのカルボキシ末端に1つ以上のアミノ酸が付加され、その付加により少なくとも1つのグリコシル化部位が提供される類似体も含まれる。

【0010】

グリコシル化EPOのPEG化がWO01/02017に記載されている。そのような分子は、向上した生物学的活性を示す。WO00/32772およびFrancis, G.E.らのInt. J. Hem. 第68巻 (1988年) 1 ~ 18頁は、ポリエチレングリコール修飾非グリコシル化EPOを記載している。WO00/32772の分子は、さらに、166位において修飾されている。そのような分子は、ヘマトクリットの著しい増加を引き起こさないと記載されている。PEGポリマー部分は、1 ~ 5個のポリマー鎖からなる。WO00/32772は、pHを低下させ、PEG:アミン比を減少させることによりPEG化の程度および部位を制御することを提案している。pH7にてPEGアルデヒド:アミン基のモル比1.5:1で反応を進め、好ましくはN末端アミノ基と反応させる。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

EPOについて知られている多くの修飾にも拘わらず、修飾された特性を有する、特に修飾されたクリアランスを有するさらなるEPOムテイン、およびその簡便な再現性のある製造方法がなお求められている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、新規クラスのEPOムテインを提供する。本発明によるEPOムテインは、骨髄細胞に、網状赤血球および赤血球細胞の産生を増加させるインビボの生物学的活性を有する。

40

【0013】

本発明は、Asn24、Asn38およびAsn83において潜在的N - グリコシル化部位を保持し、Asn38およびAsn83においてN - グリコシル化されているがAsn24においてN - グリコシル化されておらず、そして、好ましくは、N - 末端アミノ基および/またはLys20の - アミノ基においてポリ(エチレングリコール)基(PEG)、好ましくはアルコキシポリ(エチレングリコール)基、より好ましくは低級メトキシポリ(エチレングリコール)基に結合している、エリスロポエチンムテインを提供する。

【0014】

本発明のムテインは、EPOと同じ用途を有する。特に、本発明のムテインは、骨髄中

50

の委任赤血球前駆細胞 (committed erythroid progenitor) の分裂および分化を刺激することにより患者を処置するのに有用である。同様に E P O は患者を処置するために使用される。

【 0 0 1 5 】

本発明は、ヒトにおける貧血を治療するための方法、および好ましくはそのような治療のための薬剤の製造のためのムテインの使用も含む。

【 0 0 1 6 】

本発明は、アミノ酸 2 6 ~ 1 6 5 からなるグリコシル化 E P O 断片 (E P O 2 6 ~ 1 6 5) を製造し、その後、前記断片を、アミノ酸 1 ~ 2 8 からなるグリコシル化されていないが好ましくは P E G 化されている E P O 断片と融合させることを含む、本発明による

10

エリスロポエチンムテインを製造するための方法も含む。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 7 】

「エリスロポエチン」 (E P O) という用語は、配列番号 1 または配列番号 2 の配列を有するタンパク質、またはこれに実質的に相同性であるタンパク質またはポリペプチドを意味し、その生物学的特性は、赤血球産生の刺激ならびに骨髄中の委任赤血球前駆細胞の分裂および分化の刺激に関わる。

【 0 0 1 8 】

「実質的に相同性」という用語は、特定の対象配列が、例えば変異体配列が、対照配列と 1 ~ 5 個の置換、欠失または付加により異なり、その正味の効果は、対照配列と対象配列との間の逆機能的非類似性 (adverse functional dissimilarity) とならないことを意味する。しかしながら、前述のように、潜在的グリコシル化部位 A s n 2 4、A s n 3 8 および A s n 8 3 は保持される。

20

【 0 0 1 9 】

ヒト E P O は 1 つの o - グリコシル化部位 (配列番号 1 の S e r 1 2 6 において) および 3 つの N - グリコシル化部位 (配列番号 1 の A s n 2 4、A s n 3 8 および A s n 8 3 において) を有する。これらの部位におけるグリコシル残基はシアル化され、生体内半減期およびその後の E P O の効果に重要である。グリコシル化部位 A s n 2 4 を除去すると、向上したインビボ効果を有する E P O ムテインが得られる。しかしながら、そのような E P O ムテインは、グリコシル化することができない別のアミノ酸により A s n 2 4 を置き換えることにより当該技術水準によって生成することしかできない。したがって、これらのムテインは、配列の感受性部位において修飾されたアミノ酸を有することにより天然産 E P O と異なる。そのような、修飾アミノ酸配列および修飾グリコシル化を有する E P O ムテインが、例えば、Nimtz, M. ら、Eur. J. Biochem. 第 2 1 3 巻 (1 9 9 3 年) 3 9 ~ 5 6 頁 ; Sasaki, H. ら、Biochemistry 第 2 7 巻 (1 9 8 8 年) 8 6 1 8 ~ 8 6 2 6 頁 ; Delorme, C. ら、Biochemistry 第 3 1 巻 (1 9 9 2 年) 9 8 7 1 ~ 9 8 7 6 頁 ; Fibi, M. R. ら、Blood 第 8 5 巻 (1 9 9 5 年) 1 2 2 9 ~ 1 2 3 6 頁 ; および WO 9 9 / 1 1 7 8 1 (E P O 4 1 1 6 7 8 ; Takeuchi, M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第 8 6 巻 (1 9 8 9 年) 7 8 1 9 ~ 7 8 2 2 頁 ; E P O 4 2 7 1 8 9 ; E P O 4 0 9 1 1 3 ; Dube, S. ら、J. Biol. Chem. 第 2 6 3 巻 (1 9 8 8 年) 1 7 5 1 6 ~ 1 7 5 2 1 頁 ; Yamaguchi, K. ら、J. Biol. Chem. 第 2 6 6 巻 (1 9 9 1 年) 2 0 4 3 4 ~ 2 0 4 3 9 頁 ; E P O 6 4 0 6 1 9 ; および Fibi, M. R. ら、Applied Microbiol. Biotechnol 第 3 5 巻 (1 9 9 1 年) 6 2 2 ~ 6 3 0 頁も参照) に記載されている。

30

40

【 0 0 2 0 】

したがって、当該技術水準によれば、A s n 2 4 に対するグリコシル化は、このアミノ酸の欠失、修飾または置換によってしか防止することができない。アミノ酸 A s n 2 4、A s n 3 8 および A s n 8 3 を保持するが A s n 3 8 および A s n 8 3 においてのみグリコシル化され A s n 2 4 においてはグリコシル化されていないエリスロポエチンムテインは、当該技術水準において記載されておらず、そのような分子をいかに製造するかの指図はない。

50

【0021】

本発明は、Cys 29で始まる分子のC末端部分においてグリコシル化、好ましくは自然なグリコシル化を保持し、Gly 28までのN末端部分においてグリコシル化しておらず、それにより、所望であれば、さらに前記N末端部分を非常に容易に、広い範囲で修飾できる、EPOムテインを製造するための簡単な方法を提供する。そのような修飾は例えばポリエチレングリコールなどの側鎖の再現性のある明確な付着である。

【0022】

「N末端EPO断片」または「EPO 1 - 28」という用語は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸1 - 28から本質的になるEPO断片を意味する。前述のように、この用語は、結合した分子中のEPOの薬学的特性が悪影響を受けない限り、そして断片の配列のC末端においてAsn 24が保持されGly 28が保持される限りは、アミノ酸配列中の僅かな修飾（約2個までの交換、付加、欠失）を有する断片も含む。

10

【0023】

「C末端EPO断片」または「EPO 29 - 165」という用語は、配列番号1のアミノ酸29 - 165または配列番号2のアミノ酸29 - 166から本質的になるEPO断片を意味する。前述のように、この用語は、結合した分子中のEPOの薬学的特性が本質的に影響されない限り、そして前記断片のN末端アミノ酸としてAsn 38およびAsn 83が保持されCys 29が保持される限りは、アミノ酸配列中の僅かな修飾（約3個までの交換、付加、欠失）を有する断片も含む。

【0024】

本発明によれば、Cys 29で始まるエリスロポエチンのC末端部分は、真核生物細胞中で組換えにより製造され、それによりAsn 38およびAsn 83がグリコシル化されるが、先頭部からGly 28までのN末端部分はインビトロで化学反応により合成される。

20

【0025】

したがって、本発明は、保持されたAsn 24およびGly 28を有するEPOのアミノ酸1 ~ 28からなるN - 末端EPO断片と、Asn 38およびAsn 83においてグリコシル化されると共に保持されたCys 29を有するEPOのアミノ酸29 ~ 165または166からなるC - 末端EPO断片とを、Gly 28とCys 29との間の化学的結合により結合させ、そしてEPOムテインを単離することを特徴とする、EPO変異体を製造する方法を提供する。

30

【0026】

組換えC末端EPO断片を、真核生物細胞中、例えば、CHO、BHKまたはHeLa細胞系において組換えDNA技術または内因性遺伝子活性化により発現させることにより調製してもよく、すなわち、エリスロポエチン糖タンパク質が内因性遺伝子活性化により発現される。本発明による好ましいエリスロポエチンムテインは、ヒトEPOの配列に基づく。より好ましくは、ヒトEPOは、配列番号1または配列番号2に示すアミノ酸配列を有し、最も好ましくは、ヒトEPOは配列番号1に示すアミノ酸配列を有する。

【0027】

C末端EPO断片は、好ましくは、全長EPOを製造するのと同様の方法でCHO細胞中において製造されるか、または好ましくは、WO 99 / 05268およびEP 1037821によるヒト細胞の内因性遺伝子活性化によっても製造される。

40

【0028】

N末端EPO断片は、段階的固相法を用いて合成され、樹脂から開裂され、脱保護されることができる。これは、クロマトグラフィーにより、例えば、高性能液体クロマトグラフィーにより精製することができ、例えば、Schnoelzer, M.ら、Int. J. Pept. Protein Res. 第40巻（1992年）180 ~ 193頁；Dawson, P.E.ら、Science第266巻（1994年）776 ~ 779頁；およびSchnoelzerら、G.G.Fields（編）、Solid Phase Peptide Synthesis, Methods Enzymology第289巻（1977年）（全巻参照）に記載のようにイオンブレイ質量分析により特徴付けられる。C末端において、この断片は、好ましく

50

は、C末端断片のCys 29に結合するためのチオカルボキシエステルを含む。

【0029】

N末端EPO断片とC末端EPO断片との結合は、C末端断片が、好ましくはCys 29であるアミノ末端システイン残基を有する限り、簡単な方法で自然化学的結合により行うことができる(Dawson,P.E.ら、Science第266巻(1994年)776~779頁)。この原理によれば、N末端断片は、 γ -カルボキシ基においてチオエステルを含み、C末端断片のアミノ末端のCys残基の側鎖により求核攻撃を受ける。最初のチオエステル結合生成物は、迅速な分子内反応を受け、結合部位において天然ペプチド結合を有する生成物を提供する。そのようなペプチドの化学的結合方法が、Dawson,P.E.およびKent,S.B.H.、Annual Review of Biochemistry第69巻(2000年)923~960頁において

10

【0030】

N末端EPO断片およびC末端EPO断片を、好ましくは、Dawson,P.E.ら、Science第266巻(1994年)776~779頁またはDawson,P.E.ら、J.Am.Chem.Soc.第119巻(1997年)4325~4329頁に従って、グアニジン塩酸塩または尿素などの変性溶液中での結合中に可溶化させ、結合させた。

【0031】

結合したEPOムテインの精製は、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなどの慣用の方法により行われる。

【0032】

「PEG化」という用語は、ポリペプチドのN末端および/またはリシン20における(ポリエチレン)グリコール残基の共有結合を意味する。タンパク質のPEG化は、当該技術水準において広く知られており、例えば、Veronese,F.M.、Biomaterials第22巻(2001年)405~417頁に検討されている。PEGは、異なる官能基および異なる分子量のポリエチレングリコール、線状および分岐PEG、ならびに異なる結合性基を用いて結合することができる(Francis,G.E.ら、Int.J.Hematol.第68巻(1998年)1~18頁; Delgado,C.ら、Crit.Rev.Ther.、Drug Carrier Systems第9巻(1992年)249~304頁も参照)。

20

【0033】

N末端断片のPEG化は、例えばWO00/44785に記載のように、好ましくは分子量が5~40kDaのNHS活性化線状または分岐PEG分子を用いて、水性溶液中でPEG化試薬を用いて行うことができる。PEG化は、Lu,Y.ら、Reactive Polymers第22巻(1994年)221~229頁に従って固相で行うこともできる。

30

【0034】

そのような方法により、Lys 20の ϵ -アミノ基および/またはN-末端アミノ基においてPEG化されるN末端EPO断片が得られる。N末端アミノ酸における選択的PEG化は、Felix,A.M.ら、ACS Symp.Ser.第680巻(ポリ(エチレングリコール))(1997年)218~238頁に従って行うことができる。選択的N末端PEG化は、N-PEG化アミノ酸誘導体をペプチド鎖のN-1末端アミノ酸にカップリングすることにより固相合成中に達成することができる。側鎖PEG化は、N-PEG化リシン誘導体を成長している鎖にカップリングすることにより固相合成中に行うことができる。N末端および側鎖の同時PEG化は、前述のように固相合成中に、またはアミノ脱保護ペプチドに活性化PEG試薬を適用することによる溶液相合成により実行できる。

40

【0035】

適切なPEG誘導体は、平均分子量が好ましくは約5~約40kDa、より好ましくは約20~約40kDa、最も好ましくは約30kDaである活性化されたPEG分子である。PEG誘導体は、線状または分岐PEGであることができる。PEGタンパク質およびPEGペプチド複合体の調製に好適に用いられる種々のPEG誘導体を、Shearwater Polymersから得ることができる(ハンツビル、アラバマ州、アメリカ; www.swpolymers.com)。

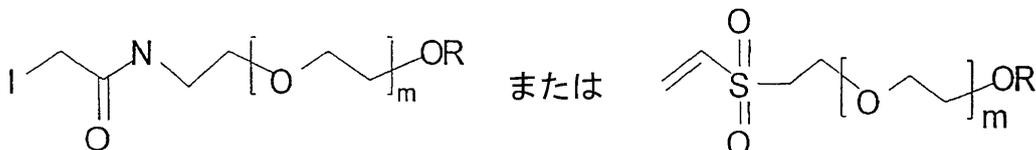
50

【0036】

活性化PEG誘導体は当該分野において知られており、例えば、PEGビニルスルホンについてMorpurgo, M.ら、J. Bioconj. Chem. 第7巻(1996年)363~368頁に記載されている。線状鎖および分岐鎖PEG種は、PEG化断片の調製に適している。反応性PEG試薬の例は、ヨード-アセチル-メトキシ-PEGおよびメトキシ-PEG-ビニルスルホン：

【0037】

【化1】



10

【0038】

(mは好ましくは、約450~約900の整数であり、Rは1~6個の炭素原子を有する線状または分岐状の低級アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル等であるが、メチルが好ましい)である。

【0039】

これらのヨード活性化物質の使用は、当該分野において知られており、例えば、Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, サン・ディエゴ(1996年) 147~148頁に記載されている。

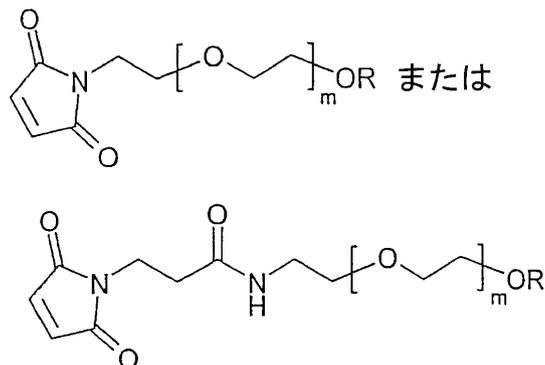
20

【0040】

最も好ましくは、PEG種は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

【0041】

【化2】



30

【0042】

により、(メトキシ-PEG-N-ヒドロキシスクシンイミド(分子量30000; Shearwater Polymers, Inc.)などのアルコキシ-PEG-N-ヒドロキシスクシンイミド)を用いて活性化される(ここで、Rおよびmは上述のとおり定義される)。

40

【0043】

「アルコキシ」という用語は、アルキルエーテル基(ここで、「アルキル」という用語は最大4個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖アルキル基を意味する)、例えば、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ等を意味し、メトキシが好ましい。

【0044】

モノまたはジPEG化種の分離を含むPEG化N末端断片のさらなる精製は、当該分野で知られている方法、例えば、カラムクロマトグラフィーにより行ってもよい。

【0045】

さらに、本発明は、上記のEPOムテインまたは組成物と緩衝剤等の薬学的に許容される賦形剤とを含む、水性組成物および医薬組成物に関し、また慢性腎不全(CRF)患

50

者における貧血およびAIDSに関する疾患の治療または予防用ならびに化学療法を受けている癌患者の治療用薬剤を調製するための、上記EPOムテインまたは組成物の使用に関する。さらに、本発明は、慢性腎不全(CRF)患者における貧血、AIDSおよび化学療法を受けている患者の癌を含む疾患の予防および/または治療方法であって、上記の組成物を治療有効量で患者に投与する段階を含む方法に関する。

【0046】

「治療有効量」という用語は、骨髄細胞に網状赤血球および赤血球の産生を増加させるインビボの生物学的活性に必要な本発明のエリスロポエチンムテインの量である。エリスロポエチンムテインの正確な量は、処置される症状の正確なタイプ、処置される患者の症状、および組成物中の他の成分等の要因に左右される選択事項である。エリスロポエチンムテインを含む医薬組成物は、赤血球産生の低下または欠損により特徴付けられる血液疾患を患っているヒト患者に種々の手段により投与するために効果的な力価で製剤化される。エリスロポエチン糖タンパク質生産物の平均治療有効量は、変化してよく、特に、資格のある医師の推奨および処方に基づくべきである。

10

【0047】

さらに、本発明は、上記方法により調製された上記EPOムテインおよび組成物、ならびに慢性腎不全(CRF)患者における貧血、AIDSおよび化学療法を受けている癌患者に関する疾患の処置のための上記EPOムテインおよび組成物に関する。

【0048】

本発明のEPO断片およびEPOムテインは、当該技術水準に従って精製することができる。

20

【0049】

EP-A0267678には、EPOの精製のために、S-セファロース上のイオン交換クロマトグラフィー、C8カラム上の分取逆相HPLCおよびゲル濾過クロマトグラフィーが記載されている。これに関して、ゲル濾過クロマトグラフィー工程は、S-セファロースファーストフロー上のイオン交換クロマトグラフィーに置き換えることができる。イオン交換クロマトグラフィーの前にブルートリスアクリル(Blue Trisacryl)カラム上の色素クロマトグラフィーを行うことも提案されている。組換えEPOの精製方法も、No buo, l.ら、J.Biochem.第107巻(1990年)352~359頁に記載されている。しかしながら、この方法において、EPOは、精製工程前に、Tween(登録商標)20、フッ化フェニルメチルスルホニル、エチルマレイミド、ペプスタチンA、硫酸銅およびオキサミド酸の溶液で処理される。

30

【0050】

本発明によるEPOまたはEPOムテインの特異的活性を、当該分野で知られている種々のアッセイにより測定することができる。本発明の精製EPOタンパク質の生物学的活性とは、EPOタンパク質をヒト患者に注射することにより投与すると、非注射または対照被験者群と比べて骨髄細胞が網状赤血球および赤血球の産生を増加させるようなことである。本発明により得られ精製されたEPOムテインまたはその断片の生物学的活性は、Pharm.Europa Spec.Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)による方法によって試験することができる。

40

【0051】

EPOの活性を測定するためのもう一つの生物学的アッセイである正赤血球性(normocythaemic)マウスアッセイを実施例5に記載している。

【0052】

本発明により調製されるエリスロポエチンムテインは、当該分野で知られている方法により、薬学的に許容され得る担体または賦形剤と共に注射するのに適した医薬組成物中に調製してもよい。例えば、適切な組成物がWO97/09996、WO97/40850、WO98/58660およびWO99/07401に記載されている。本発明の生産物を調製するための好ましい薬学的に許容され得る担体には、ヒト血清アルブミン、ヒト血漿タンパク質などがある。本発明の化合物は、等張剤、例えば、132mM塩化ナトリウ

50

ムを含む pH 7 の 10 mM リン酸ナトリウム / カリウム緩衝液中に製剤化される。任意に医薬組成物は防腐剤を含んでよい。医薬組成物は、異なる量の、例えば、10 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば、50 μg または 400 μg のエリスロポエチンを含んでよい。

【0053】

本発明のエリスロポエチン糖タンパク質生産物を投与すると、ヒトにおいて赤血球が形成される。したがって、エリスロポエチン糖タンパク質生産物を投与すると、赤血球の生成において重要であるこの EPO タンパク質が補給される。エリスロポエチン糖タンパク質生産物を含む医薬組成物は、赤血球産生の低下または欠損により特徴付けられる血液疾患を単独でまたは症状もしくは疾患の一部として患っているヒト患者に種々の手段により投与するために効果的な力価で調製されてもよい。医薬組成物は、皮下または静脈内注射等の注射により投与してもよい。エリスロポエチン糖タンパク質生産物の平均量は、変化してよく、特に、資格のある医師の推奨および処方に基づくべきである。複合剤の正確な量は、治療される症状の正確なタイプ、治療される患者の症状および組成物中の他の成分等の要因に左右される選択事項である。例えば、体重 1 kg 当たり 0.01 ~ 10 μg 、好ましくは体重 1 kg 当たり 0.1 ~ 1 μg を、例えば、週 1 回投与してもよい。

10

【0054】

本出願全体において、種々の公報を参照にした。これらの公報の開示を、当該技術水準をより十分に説明するために本明細書に引用して援用する。

【0055】

以下の実施例、参考例および配列表は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は添付の請求の範囲に示す。本発明の精神から逸脱することなく、示された手順において修正が施され得ることが理解される。

20

【実施例 1】

【0056】

PEG 化 EPO (1 - 28) の生成: N - PEG - CH₂ - CO - (Lys (PEG - CH₂ - CO)²⁰) - EPO (1 - 28) COSBz1 の合成およびモノ PEG 化フラクションの単離

【0057】

ペプチドを段階的固相法を用いて合成し、樹脂から開裂し、脱保護し、高性能液体クロマトグラフィーにより精製し、文献 (Schnolzer, M. ら、Int. J. Pept. Protein Res. 第 40 巻 (1992 年) 180 頁; Schnolzer, P. M. ら、G. G. Fields (編)、Solid Phase Peptide Synthesis, Meth. Enzymol. 第 289 巻 (1977 年) 全巻を参照) に記載のイオンプレート質量分析により特徴付けするが、ここで C 末端ベンジルチオエステルの形成について、Lu, W. ら、J. Am. Chem. Soc. 第 118 巻 (1996 年) 8518 ~ 8523 頁の経路に従った。

30

【0058】

1.1 PEG - CH₂ - CO - NHS の合成

m PEG - CH₂ - COOH (CH₃ - (O - CH₂ - CH₂)_n - O - CH₂ - COOH) を、Lu, Y. A. 著、Int. J. Pept. Protein Res. 第 43 巻 (1994 年) 127 ~ 138 頁に記載のとおり N - ヒドロキシスクシンイミドで活性化した。エチレンオキシド繰り返し単位数 n は、110 [分子量は 5000 (PEG₅₀₀₀) を与える]、440 (PEG_{20k})、880 (PEG_{40k}) の範囲にあった。

40

【0059】

1.2 EPO (1 - 28) COSBz1 の合成

N 末端ペプチドを、Lu, W. ら、J. Am. Chem. Soc. 第 118 巻 (1996 年) 8518 ~ 8523 頁に従って段階的固相合成により調製した。アミノ酸の段階的付着のために、BOC - Gly - (チオエステルリンカー) - アミノメチル樹脂を用いた。得られたペプチドを脱保護し樹脂から開裂させた。

【0060】

臭化ベンジルを添加してチオエステルを調製し、次に、これを HPLC により精製した

50

。チオエステルを含むフラクションをプールし、HPLCにより精製した。

【0061】

1.3 EPO(1~28) COSBz1のPEG化
PEG-CH₂-CO-NHSを添加して、N末端アラニンの-NH₂および20位におけるリシンの-NH₂において、ペプチドをN-アシル化した。モノおよびジPEG化EPO(1-28)チオエステルを分離し、HPLCで精製し、凍結乾燥した。

【実施例2】

【0062】

二官能試薬によるEPO(1-28)のPEG化

【0063】

a)チオール基の共有結合

この実施例は、チオール基を断片に共有結合させるための反応条件の決定を開示している。条件を決めるために、ブロックされたチオール基を含む異なる量の試薬、ここではSATA(スクシンイミジルアセチルチオアセテート)またはSATP(スクシンイミジルアセチルチオプロピオネート)(10mg/mlでDMSOに溶解)を、断片EPO(1-28) COSBz1の溶液に、ここでは10mMのリン酸カリウム、50mMのNaCl、pH7.3中の5mg/ml断片の1mlに添加した。反応液を約30分間攪拌(25)し、1Mリシン溶液を10mMで添加して停止させた。過剰量のSATAおよびSATPを、10mMリン酸カリウム、50mM NaClおよび2mM EDTA, pH6.2に対して透析することにより除去した。保護性アセチル基をヒドロキシルアミンで除去した後、断片に共有結合しているチオール基の数を、Grasetti,D.R.およびMurray, J.F.著、J.Appl.Biochem.Biotechnol.第119巻(1967年)41~49頁により記載された方法に従って、ジチオジピリジンを用いて光度計により測定した。

【0064】

b)活性化EPO(1-28)のPEG化

メトキシ-PEG-マレイミド(分子量30000; Shearwater Polymers, Inc., ハンツビル(アラバマ州、合衆国))380mgを、活性化EPO95mgを含む溶液(10mMリン酸カリウム、50mM NaCl、2mM EDTA、pH6.2中に4.5mg/ml)に溶解した。得られた溶液中の活性化断片とメトキシ-PEG-マレイミドとの分子比は1:4であった。1Mヒドロキシルアミン水溶液を30mM、pH6.2で上記溶液に添加することにより、活性化断片の共有結合ブロックチオール基を脱ブロックした。溶液の反応混合物中の得られた活性化断片は、遊離チオール(-SH)基を含んでいた。チオール基の脱ブロックに続いて、直ちに、遊離チオール(-SH)基を含む活性化断片とメトキシ-PEG-マレイミドとの間のカップリング反応を90分間行った(攪拌、25)。カップリング反応は、反応混合物に、0.2Mシステイン水溶液を2mMで添加することにより停止させた。30分後、メトキシ-PEG-マレイミドと反応しなかった活性化断片の過剰の遊離チオール基を、DMSO中の0.5M N-メチルマレイミド溶液を添加して5mMの濃度にし、ブロックした。30分後、得られたPEG化断片を含む反応混合物を、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、10mMリン酸カリウム、pH7.5に対して15時間以上透析した。

【実施例3】

【0065】

EPO(29-165)の組換体の製造

EPO(29-165)を、WO99/05268の実施例1に従って調製した。

【0066】

収穫および細胞分離:

パッチ再供給プロセスを用いた。すなわち、所望の細胞密度に達したとき、培地の約80%を収集した。残りの培地に、新鮮培養培地を補給し、次の収集まで培養した。1回の生産工程は、最大10回の後に続く収集:9回の部分的収集と発酵終了時における1回の全収集とからなる。収集は3~4日毎に行う。

10

20

30

40

50

【0067】

測定した収集容量を、冷却した容器中に移した。細胞を遠心分離または濾過により除去し廃棄した。遠心分離段階の断片を含む上澄みを、インライン濾過し、第2の冷却された容器中に集めた。各収集物は精製中に別々に処理する。

【実施例4】

【0068】

結合および単離

実施例1および2に従って調製したPEG-EPO(1-28)COSBz1およびEPO(29-165)の両方の等モル量を、0.1Mリン酸緩衝液、6MグアニジンHCl中、pH7.5で約6mg/mlの割合で可溶化した。3%チオフェノールおよび1%ベンジルメルカプタン(容量%)を添加し、同様に過剰のDTTをタンパク質の還元を維持するために添加し、約36時間完了するまで結合させた。次に、過剰の試薬を、イオン交換クロマトグラフィーにより除去した。6MグアニジンHClで緩衝液およびpHを約1mg/ml蛋白濃度に調節し、約0.2mg/mlに希釈することによりタンパク質の再折りたたみを達成した。結合生成物を、W001/02017の実施例1に従って精製した。

10

【実施例5】

【0069】

正赤血球性マウスアッセイにより測定されたPEG化EPOのインビボ活性

PEG-EPO、非修飾EPOおよび緩衝溶液をマウスに投与した。その結果から、マウスに対する同じ投与量での網状赤血球の量の有意な増加および最大網状赤血球数の変化により表される、非修飾EPOに対するPEG化EPO種の優れた活性および半減期の延長が示された。

20

【0070】

正赤血球性マウスバイオアッセイは当該分野において知られている(Pharm.Europa Spec.Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2))。試料はBSA-PBSで希釈した。7~15週齢の正常健康マウスに、実施例4に記載のとおりPEG化EPO 0.2mlを皮下投与した。投与後72時間目から開始して4日目まで、尾静脈の穿刺により採血し、0.15μmolアクリジンオレンジ染色溶液1ml中に血液1μlが存在するように希釈した。染色時間は3~10分である。網状赤血球の計数を、赤色蛍光ヒストグラムを分析することによりフローサイトメーターにおいてマイクロ蛍光測定により行う(分析した30000個の血球当たり)。各検査群は、1日当たりマウス5匹とし、マウスは1回のみ採血した。

30

【0071】

【表 1】

参考文献

- Ashwell, G., and Kawasaki, T., *Methods Enzymol.* 50 (1978) 287-288
- Briggs, D.W., et al., *Am. J. Physiol.* 227 (1974) 1385-1388
- Broudy, V.C., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 265 (1988) 329
- Danna, R.P., et al., In: MB, Garnick, ed. *Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective.* New York, NY: Marcel Dekker; 1990, pp. 301-324 10
- Dawson, P.E., and Kent, S.B.H., *Annual Review of Biochemistry* 69 (2000) 923-960
- Dawson, P.E., et al., *Science* 266 (1994) 776-779
- Dawson, P.E., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 4325 -4329
- Delgado, C., et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9 (1992) 249-304
- Delorme, C., et al., *Biochemistry* 31 (1992) 9871-9876
- Dordal, M.S., et al., *Endocrinology* 116 (1985) 2293-2299
- Dube, S., et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17516-17521
- Egrie, J.C., et al., *Immunobiol.* 72 (1986) 213-224 20
- EP 0 409 113
- EP 0 411 678
- EP 0 427 189
- EP 0 640 619
- EP 1 037 821
- EP-A 0 267 678
- Felix, A.M., et al., *ACS Symp. Ser.* 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997) 218-238
- Fibi, M.R., et al., *Applied Microbiol. Biotechnol* 35 (1991) 622-630 30
- Fibi, M.R., et al., *Blood* 85 (1995) 1229-1236
- Francis, G.E., et al., *Int. J. Hematol.* 68 (1998) 1-18
- Goldwasser, E., et al. *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 4202-4206
- Grasetti, D.R., and Murray, J.F., *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119 (1967) 41-49
- Hermanson, G. T., in *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) p. 147-148
- Higuchi, M., et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 7703-7709
- Laemmli, U.K., et al., *Nature* 227 (1970) 680-685 40
- Lee-Huang, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61 (1984) 2708-2712
- Lowy et al., *Nature* 185 (1960) 102
- Lu, W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 8518 -8523
- Lu, Y.A., *Int. J. Pept. Protein Res.* 43 (1994) 127-138
- Lu, Y., et al., *Reactive Polymers* 22 (1994) 221-229
- Morpurgo, M., et al., *J. Bioconj. Chem.* 7 (1996) 363-368

- Morrell et al., J. Biol. Chem. 243 (1968) 155
- Nimtz, M., et al., Eur. J. Biochem. 213 (1993) 39-56
- Nobuo, I., et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359
- Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997 (2)
- Sasaki, H., et al., Biochemistry 27 (1988) 8618-8626
- Sasaki, H., et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076
- Schnoelzer et al., G.G. Fields (ed.), Solid Phase Peptide Synthesis, Methods Enzymology
289 (1977), see whole volume 10
- Schnoelzer, M., et al., Int. J. Pept. Protein Res. 40 (1992) 180-193
- Takeuchi, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 7819-7822
- U.S. Patent No. 4,835,260
- U.S. Patent No. 5,641,663
- Veronese, F.M., Biomaterials 22 (2001) 405-417
- WO 00/32772
- WO 00/44785
- WO 01/02017 20
- WO 94/02611
- WO 94/24160
- WO 94/25055
- WO 95/05465
- WO 97/09996
- WO 97/40850
- WO 98/58660
- WO 99/05268 30
- WO 99/07401
- WO 99/11781
- Yamaguchi, K., et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 20434-20439

【配列表】

SEQUENCE LISTING

5 <110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
 <120> Diglycosylated erythropoietin
 <130> 20971
 10 <140>
 <141>
 <150> EP01122555.4
 <151> 2001-09-25
 15 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 20 <210> 1
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 1
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 30 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 40 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 45 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 50 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

フロントページの続き

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第01/002017(WO, A1)

Blood, 1995年, Vol.85, p.1229-1236

Proc.Natl Acad.Sci.USA., 1999年, Vol.96, p.10068-10073

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/505

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)