

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5334347号
(P5334347)

(45) 発行日 平成25年11月6日(2013.11.6)

(24) 登録日 平成25年8月9日(2013.8.9)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06

請求項の数 15 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2001-574155 (P2001-574155)	(73) 特許権者	500049716 アムジェン・インコーポレーテッド アメリカ合衆国 シーエー 91320, サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
(86) (22) 出願日	平成13年4月6日(2001.4.6)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(65) 公表番号	特表2003-530361 (P2003-530361A)	(72) 発明者	キンスラー, オラフ・ボリス アメリカ合衆国、カリフォルニア・913 20、ニューベリー・パーク、ピア・リン ダ・641
(43) 公表日	平成15年10月14日(2003.10.14)	(72) 発明者	ゲツグ, コリン・ブイ アメリカ合衆国、カリフォルニア・913 20、ニューベリー・パーク、デルウッド ・コート・487
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/011346		
(87) 国際公開番号	W02001/076640		
(87) 国際公開日	平成13年10月18日(2001.10.18)		
審査請求日	平成20年4月2日(2008.4.2)		
(31) 優先権主張番号	09/545, 335		
(32) 優先日	平成12年4月7日(2000.4.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学的に修飾した新規なエリスロポエチン刺激タンパク質組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬剤として許容される希釈剤、担体またはアジュバント中に場合によっては存在する、化学的に修飾された新規なエリスロポエチン刺激タンパク質 (NESP) の調製物であって、前記 NESP はポリエチレングリコール (PEG) で化学的に修飾され、かつ調製物の少なくとも90%がポリマー：タンパク質の複合体であり、多くとも10%が未反応タンパク質であり、

前記 NESP が配列番号1において同定される配列を有し、

前記 NESP はアミド結合又は硫黄を有するリンカーを介して PEG に共有結合していない、調製物。

【請求項2】

調製物の少なくとも95%がポリマー：タンパク質の複合体であり、多くとも5%が未反応タンパク質である請求項1に記載の調製物。

【請求項3】

前記ポリエチレングリコールが2kDと100kDの間の分子量を有する請求項1または2に記載の調製物。

【請求項4】

前記ポリエチレングリコールが5kDと30kDの間の分子量を有する請求項3に記載の調製物。

【請求項5】

10

20

前記調製物がモノポリエチレングリコール化NESPとポリポリエチレングリコール化NESPの混合集団からなる請求項1に記載の調製物。

【請求項6】

前記調製物が少なくとも95%のN末端モノポリエチレングリコール化NESPおよび多くとも5%の非ポリエチレングリコール化NESPからなる請求項1に記載の調製物。

【請求項7】

(a) 請求項1～6のいずれかに記載の調製物、および
(b) 薬剤として許容される希釈剤、安定剤、防腐剤、可溶化剤、乳濁剤、アジュバントおよび/または担体を含む薬剤組成物。

10

【請求項8】

少なくとも95%のポリマー：タンパク質の複合体および、多くとも5%の未反応NESPを含む請求項7に記載の薬剤組成物。

【請求項9】

(a) モノポリエチレングリコール化NESPの調製物であって、前記モノポリエチレングリコール化NESPが、そのN末端のみでNESP部分に結合したポリエチレングリコールからなる調製物、および5%未満の非ポリエチレングリコール化NESP、および
(b) 薬剤として許容される希釈剤、アジュバントまたは担体を含む請求項7または8に記載の薬剤組成物。

20

【請求項10】

(a) モノポリエチレングリコール化NESPの調製物であって、前記モノポリエチレングリコール化NESPが、前記NESPの炭水化物鎖中で生成されたアルデヒドを介してNESP部分に結合したポリエチレングリコールからなる調製物、および5%未満の非ポリエチレングリコール化NESP、および
(b) 薬剤として許容される希釈剤、アジュバントまたは担体を含む請求項7または8に記載の薬剤組成物。

【請求項11】

(a) ポリエチレングリコール化NESPの調製物であって、前記ポリエチレングリコール化NESPが、モノポリエチレングリコール化NESPとポリポリエチレングリコール化NESPの混合集団を含む調製物、および5%未満の非ポリエチレングリコール化NESP、および
(b) 薬剤として許容される希釈剤、アジュバントまたは担体を含む請求項7または8に記載の薬剤組成物。

30

【請求項12】

請求項1に記載の調製物であって、当該調製物を治療的に有効な用量、投与することを含む造血障害を治療する方法に使用するため調製物。

【請求項13】

(a) NESPが1以上のPEG基に結合する条件下で、NESPをポリエチレングリコールと反応させるステップ、および
(b) 反応生成物を得るステップを含む請求項1に記載の調製物を製造する方法。

40

【請求項14】

ステップ(a)が、PEG-アルデヒドをNESPの第一級アミンに結合させる還元的アルキル化を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ステップ(a)が、
(i) アルデヒドの酸化のための最後から2番目のグリコシル単位シアル酸のペンダントジオールを標的にするために選択した条件下におけるNESPの穏やかな酸化、
(ii) PEGとNESPの間の半安定性のヒドラゾンを形成するための、生じたグリコアルデヒドとメトキシ-PEG-ヒドラジドの反応、および

50

(i i i) 安定な P E G - N E S P 複合体を生成するための、シアノ水素化ホウ素ナトリウムによるヒドラゾンの還元

を含む請求項 1 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

発明の背景

新規なエリスロポエチン刺激タンパク質 (N E S P) は、r H u E P O のアミノ酸配列中に 5 個の変化を有する、2 個の追加的な炭水化物鎖を備えた過グリコシル化エリスロポエチンの類似体である。より具体的には、N E S P は 2 個の追加的な N 結合型炭水化物鎖をアミノ酸残基 3 0 および 8 8 (番号はヒトの E P O の配列に対応する) において含む (その全体が参照によって本明細書に組み込まれている P C T A p p l i c a t i o n N o . U S 9 4 / 0 2 9 5 7 を参照のこと) 。 N E S P は E P O とは生化学的に異なり、血清半減期がより長く、i n v i v o での生物活性がより高い ; E g r i e 他、A S H 9 7、B l o o d、9 0 : 5 6 a (1 9 9 7) 。 N E S P は、マウス、ラット、イヌおよび人間において血清半減期が約 3 倍増大することが示されている ; 同上の文献。マウスにおいては、血清半減期がより長く、i n v i v o での活性がより高いことにより、r H u E P O と比較して、同じ生物学的応答を得るために投与の頻度をより少なくすること (1 週間に 1 度あるいは 1 週間おきに 1 度) が可能である ; 同上の文献。

10

【 0 0 0 2 】

薬物動態の研究により、動物実験と一致して、N E S P が慢性的な腎臓障害の患者中で r H u E P O よりも大幅に長い血清半減期を有することが実証され、低頻度投与スケジュールがヒトにおいても使用することができることが示唆された ; M a c D o u g a l l 他、J A m e r i c a n S o c i e t y o f N e p h r o l o g y、8 : 2 6 8 A (1 9 9 7) 。低頻度投与スケジュールは、内科医および患者の双方にとってより好都合であり、自己投与に関わっている患者には特に有用であると思われる。低頻度投与の他の利点には、患者中に導入される薬剤が少ないこと、r H u E P O の投与に見られるいくらかの副作用の性質または激しさが低下すること、およびコンプライアンスが高まることであってよい。

20

【 0 0 0 3 】

N E S P の半減期が延びることによって、E P O と比べて投与の頻度がより少ないという利点が提供されているが、N E S P が現在示しているよりも一層長い治療半減期を必要とすると思われる化学療法などの潜在的な適応法が依然として存在する。

30

【 0 0 0 4 】

i n v i v o でのタンパク質の半減期を延ばすためにしばしば使用される一般的手法は、ポリエチレングリコール (P E G) などの水溶性ポリマーを当該のタンパク質に化学的に結合させることである。一般に、ポリエチレングリコール分子は、タンパク質上に見られる反応基を介してタンパク質に連結される。リジン残基上、あるいは N 末端などのアミノ基は、このような結合に好都合である。

【 0 0 0 5 】

ポリエチレングリコール分子をタンパク質に結合させるために (P E G 化)、さまざまな手法が使用されている。たとえば、R o y e r (米国特許第 4 , 0 0 2 , 5 3 1 号) は、ポリエチレングリコール分子を酵素に結合させるために、還元的アルキル化を使用したことを述べている。D a v i s 他 (米国特許第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号) は、たとえば酵素およびインシュリンを含む P E G - タンパク質複合体を開示している。S h a w (米国特許第 4 , 9 0 4 , 5 8 4 号) は、反応性アミン基を介してポリエチレングリコール分子を結合させるために、タンパク質中のリジン残基の数を変更することを開示している。H a k i m i 他 (米国特許第 5 , 8 3 4 , 5 9 4 号) は、たとえばタンパク質 I L - 2、インターフェロン、および I L - 1 r a を含む、免疫原性がほとんどない水溶性 P E G - タンパク質複合体を開示している。H a k i m i 他の方法は、独特のリンカーを利用して、タンパク質中のさまざまな遊離アミノ基を P E G に結合させることを含む。K i n s t l

40

50

er他(米国特許第5,824,784号および5,985,265号)は、G-CSFおよびコンセンサインターフェロンを含めた、選択的にN末端が化学修飾されたタンパク質およびその類似体を与える方法を教示している。重要なことに、これらの修飾型タンパク質はタンパク質の安定性に関して利点を有し、加工上の利点も備えている。

【0006】

前記のようなPEG化の手法は、溶解性および*in vivo*での循環半減期を改善するために(典型的にはこれらの性質は、真核生物における発現過程において付加される炭水化物部分によって、グリコシル化タンパク質(糖タンパク質)に賦与される)、細菌の発現系から誘導される非グリコシル化タンパク質に対して伝統的に適用されている。非グリコシル化タンパク質の*in vivo*での半減期に対するPEG化の影響は、PEGの物理化学的および動的性質から誘導され、より大きな流体力学的体積および全質量が複合体に与えられ、したがって腎クリアランスの割合を低下させると一般には考えられている。他の利点として、典型的には、複合体の溶解性の増大および免疫原性の低下が含まれる。しかしながら、すべてのタンパク質がPEG化に等しく応答するわけではなく、性能が改善される保証はない。

10

【0007】

本発明は、高度にグリコシル化されているタンパク質、たとえばNE SPをPEG化することによって、NE SPよりもさらに一層劇的な持続期間プロファイルを有する薬剤組成物を提供し、ヘマトクリット値を上昇させ、貧血を治療するために4~6週間毎に1度の投与を可能にし、したがって素晴らしい治療上の利点を提供し得るという驚くべき発見に基づくものである。

20

【0008】

発明の概要

本発明は、化学的に修飾されたNE SP(またはその類似体)の実質的に均質な調製物、および関連する方法に関する。

【0009】

さらに本発明は、N末端が化学的に修飾されたNE SP(またはその類似体)の実質的に均質な調製物に関する。

【0010】

さらに本発明は、モノ置換位置イソ形またはポリ置換形のいずれかの混合集団として表される、化学的に修飾されたNE SPの調製物に関する。

30

【0011】

図面の簡単な説明

図1は、NE SPをPEG化するための設計戦略を示す図である。(A)PEGポリマーのサイズを5kD、20kDおよび30kDで変える、(B)PEGポリマーの形態は、PEGの合計分子量が10kD、20kDまたは40kDである、線状または分枝型のいずれかであってよい、さらに(C)置換の程度が異なるPEGとNE SPの調製物を単離して、モノPEG、ジPEG、またはある場合にはトリPEG-NE SPを含ませることができる。

【0012】

図2は、NE SPをPEG化するための、さまざまな反応化学的手法を示す図である。(A)PEG-アルデヒドを用いるNE SPの還元型アルキル化、(B)PEGのN-スクシニミジルエステルを用いるNE SPのアシル化、さらに(C)炭水化物の制限的な過ヨウ素酸塩によるNE SP多糖側鎖のPEG化、結果として生じるアルデヒドをPEG-ヒドラジドと反応させてヒドラゾン複合体を形成し、次にシアン水素化ホウ素ナトリウムを用いてさらに還元を行って、結合を安定化させる。

40

【0013】

図3は、さまざまな5kDのポリPEG-NE SP複合体と、非修飾型NE SP()の、*in vivo*での活性データを示すグラフである。サンプル、 、およびは5kDのポリPEG-NE SPの混合物であり、置換の程度が段階的に低くなっている

50

。鉄の取り込み%を、投与した1 mLあたりのngに対してプロットする。

【0014】

図4は、非修飾型NES Pに対してさまざまなPEG - NES P複合体を用いる治療に
 応答する、高いヘモグロビン(HGB)レベルの持続を示すグラフである。1回の大量注
 射で、NES P()、NHS - エステル活性型メトキシ - PEGから誘導される20k
 Dの線状モノPEG - NES P複合体()、還元型アルキル化によってアルデヒド活性
 型PEGから誘導される20kDの線状(80%までのモノPEG - NES Pおよび20
 %のジPEG - NES P)複合体()、および塩水コントロール()を100 μg /
 kg注射する。HGB(g / dL)を、治療後の日数#に対してプロットする。

【0015】

図5は、非修飾型NES Pに対してさまざまなPEG - NES P複合体を用いる治療に
 応答する、高い網状赤血球レベルの持続を示すグラフである。1回の大量注射で、NES
 P()、20kDの線状モノPEG - NES P()、還元型アルキル化によってアル
 デヒド活性型メトキシ - PEGから誘導される5kDの線状モノPEG - NES P()
 および5kDの線状ジPEG - NES P複合体()、NHS - エステル活性型PEGから
 の20kDの分枝型モノPEG - NES P()複合体、および塩水コントロール()
 を100 μg / kg注射する。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数#に対してプ
 ロットする。

【0016】

図6は、非修飾型NES Pに対してさまざまなPEG - NES P複合体を用いる治療に
 応答する、高いヘモグロビンレベルの持続を示すグラフである。1回の大量注射で、NE
 SP()、20kDの線状モノPEG - NES P()、還元型アルキル化によってアル
 デヒド活性型メトキシ - PEGから誘導される5kDの線状モノPEG - NES P()
 および5kDの線状ジPEG - NES P複合体()、NHS - エステル活性型PEG
 からの20kDの分枝型モノPEG - NES P複合体()を100 μg / kg注射する
 。HGB(g / dL)を、治療後の日数#に対してプロットする。

【0017】

図7は、5kDのポリPEG - NES P複合体のQ Sepharose HPカラム
 でのクロマトグラムを示す図である。このカラムは、50mM NaCl ~ 200mM
 NaClの直線勾配を使用して生成物を溶離する、HiTrap Q Sepharose
 HPカラムであった。

【0018】

図8は、20kDのモノPEG - NES P複合体のQ Sepharose HPカラ
 ムでのクロマトグラムを示す図である。このカラムは、50mM NaCl ~ 200mM
 NaClの直線勾配を使用して生成物を溶離する、HiTrap Q Sepharo
 se HPカラムであった。

【0019】

図9は、30kDのモノPEG - NES P複合体のQ Sepharose HPカラ
 ムでのクロマトグラムを示す図である。このカラムは、50mM NaCl ~ 200mM
 NaClの直線勾配を使用して生成物を溶離する、HiTrap Q Sepharo
 se HPカラムであった。

【0020】

図10は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体()を3 μg /
 kg、20kDのモノPEG - NES P複合体()を3 μg / kg、および5kDのポ
 リPEG - NES P複合体混合物()を3 μg / kg注射した後の、貧血マウスの網状
 赤血球の応答を示すグラフである。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数#
 に対してプロットする。

【0021】

図11は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体()を10 μg
 / kg、20kDのモノPEG - NES P複合体()を10 μg / kg、および5kD

10

20

30

40

50

のポリPEG - NES P複合体混合物 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、貧血マウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0022】

図12は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および非修飾型NES P () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、貧血マウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0023】

図13は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、貧血マウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。HGB (g/dL) を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0024】

図14は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、貧血マウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。HGB (g/dL) を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0025】

図15は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および非修飾型NES P () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、貧血マウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。HGB (g/dL) を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0026】

図16は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、正常なマウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0027】

図17は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、正常なマウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0028】

図18は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および非修飾型NES P () を $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、正常なマウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。絶対的な網状赤血球の数を、治療後の日数 # に対してプロットする。

【0029】

図19は、1回の大量注射で30kDのモノPEG - NES P複合体 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、20kDのモノPEG - NES P複合体 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、および5kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 注射した後の、正常なマウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。HGB (g/dL) を、治療後の日数 # に対して

10

20

30

40

50

プロットする。

【0030】

図20は、1回の大量注射で30kDのモノPEG-NESP複合体()を10 μ g/kg、20kDのモノPEG-NESP複合体()を10 μ g/kg、および5kDのポリPEG-NESP複合体混合物()を10 μ g/kg注射した後の、正常なマウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。HGB(g/dL)を、治療後の日数#に対してプロットする。

【0031】

図21は、1回の大量注射で30kDのモノPEG-NESP複合体()を30 μ g/kg、20kDのモノPEG-NESP複合体()を30 μ g/kg、5kDのポリPEG-NESP複合体混合物()を30 μ g/kg、および非修飾型NESP()を30 μ g/kg注射した後の、正常なマウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。HGB(g/dL)を、治療後の日数#に対してプロットする。

10

【0032】

図22は、5kDのポリPEG-NESP()、20kDのモノPEG-NESP(- - -)、および30kDのモノPEG-NESP(...)の、サイズ排除HPLCクロマトグラムを示す図である。SECカラムは、100mM NaHPO₄、10%エタノール、150mM NaCl、pH6.9を使用して生成物を溶離する、Tosoh Haas TSK 3000 SWx1(5ミクロン、7.8mm \times 30cm)であった。

【0033】

20

発明の詳細な説明

NESPなどの糖タンパク質の*in vivo*での治療的半減期がPEG化から利便を得られるかどうかを発見するために、さまざまな異なるPEG-NESP複合体を合成し、長時間持続する赤血球生成を求めて*in vivo*の試験をした。

【0034】

PEG化の潜在的な効果を最適化し、PEG結合の好ましい部位および化学的性質を特定するために、ポリマーの長さ、コンホメーション、および結合の程度および部位を変える、設計戦略を採用した(図1を参照のこと)。

【0035】

本発明のPEG化NESPを調製するための方法は一般に、(a)NESPが1つまたは複数のPEG基に結合する条件下で、NESPとポリエチレングリコール(PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体など)を反応させるステップ、および(b)反応生成物を得るステップを含む。NESP修飾の特異的部位が複合体の本来の活性を大幅に変える可能性があるため、3種のPEG化の化学的手法を調べた(図2を参照のこと)。第1の手法は、還元的アルキル化を使用して、PEG-アルデヒド(O-(3-オキソプロピル)-O'-メチルポリエチレングリコール)をNESPの第一級アミンに結合させる。適切な条件下では、この手法によって、タンパク質のN末端の-アミンを介して主に修飾されたPEG複合体が生成することが実証された。PEGは還元的アルキル化によって第二級アミンを介して結合しているため、タンパク質のN末端において電荷が保存されている可能性がある。

30

40

【0036】

NESPのPEG化に適用される第2の化学的手法は、メトキシ-PEG(O-[(N-スクシニミジロキシカルボニル)-メチル]-O'-メチルポリエチレングリコール)のNHS-エステルを使用する、NESPの第一級アミンのアシル化であった。前の化学的手法とは対照的に、メトキシ-PEG-NHSを用いるアシル化によってアミド結合が結果として生じ、これによって元の第一級アミンから電荷が取り除かれると思われる。

【0037】

評価した最後の化学的手法結合では、アルデヒドへの酸化用の最後から2番目のグリコシル単位シアル酸のペンダントジオールを標的にするために選択した条件下で、NESPの穏やかな酸化を使用した。次いで結果として生じたグリコアルデヒドをメトキシ-PE

50

G - ヒドラジド (O - (ヒドラジノカルボニルメチル) - O ' - メチルポリエチレングリコール) と反応させて、PEG と NES P の間の半安定性のヒドラゾン を形成した。その後ヒドラゾン をシアノ水素化ホウ素ナトリウムによって還元して、安定した PEG - NES P 複合体を生成した。

【 0 0 3 8 】

本発明の方法はそれぞれ、ポリマー - タンパク質複合体の実質的に均質な混合物を提供する。本明細書で使用する「実質的に均質な」とは、ポリマー - タンパク質複合体分子のみが観察されることを意味する。ペプチド地図および N 末端配列決定によって確認されるように、以下の一例によって、少なくとも 9 0 % がポリマー - タンパク質複合体であり、せいぜい 1 0 % が未反応タンパク質である調製物が提供される。PEG 化物質は少なくとも 9 5 % がこの調製物であることが好ましく (以下の作業実施例中のように)、PEG 化物質は 9 9 % 以上がこの調製物であることが最も好ましい。ポリマー - タンパク質複合体は生物学的活性を有しており、本明細書で提供する本発明の「実質的に均質な」PEG 化 NES P 調製物は、均質な調製物の利点、たとえばロット毎の薬物動態の予測における臨床的な適用のしやすさを示すほど、充分均質な調製物である。

10

【 0 0 3 9 】

ポリマー - タンパク質複合体分子の混合物を調製するために選択することもでき、本明細書で提供する利点は、混合物中に含ませるためのモノポリマー - タンパク質複合体の割合を選択することができることである。したがって、望むならば、さまざまなタンパク質とさまざまな数の結合したポリマー部分 (すなわちジ、トリ、テトラなど) の混合物を調製し、前記複合体を本発明の方法を使用して調製したモノポリマー - タンパク質複合体と結びつけ、混合物に所定の割合のモノポリマー - タンパク質複合体を有させることができる。

20

【 0 0 4 0 】

PEG - タンパク質反応の化学量論を評価および最適化するために意図した最初の実験によって、PEG - アルデヒドを使用する還元型アルキル化による PEG 化は、驚くべきことに若干効率が悪く、非グリコシル化タンパク質について典型的に観察されるよりも、相当大きな PEG とタンパク質のモル比を必要とすることが明らかになった。同様に、PEG - NHS エステルを用いるアシル化も、予想よりも遅く効率が悪かった。したがって、非グリコシル化タンパク質の PEG 化は必ずしもグリコシル化タンパク質の PEG 化の前兆となるものではなく、反応条件のさらなる最適化が必要であることは明らかであった。

30

【 0 0 4 1 】

本明細書に記載する PEG 化手法において使用することを企図するポリマー分子は、水溶性ポリマーまたはその混合物の中から選択することができる。水溶性ポリマーは、たとえばポリエチレングリコール、モノメトキシ - ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ - (N - ビニルピロリドン)、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (たとえば、グリセロール)、デキストラン、HPMA、Fleximer (商標)、およびポリビニルアルコールからなる群から選択することができる。選択するポリマーは、それが結合するタンパク質が生理学的環境などの水性環境中で沈殿しないように、水溶性でなければならない。アシル化反応については、選択するポリマーは 1 つの反応性エステル基を有していなければならない。本発明の還元型アルキル化については、選択するポリマーは 1 つの反応性アルデヒド基を有していなければならない。好ましい反応性 PEG - アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは水に対して安定性があるか、あるいはモノ C 1 ~ C 1 0 アルコキシまたはそのアリロキシ誘導体である (米国特許第 5 , 2 5 2 , 7 1 4 号を参照のこと)。ポリマーは分枝型であるかあるいは非分枝型であってよい。最終品調製物を治療用を使用するために、ポリマーは薬剤として許容されるものであることが好ましい。

40

【 0 0 4 2 】

50

本明細書で使用するのに特に好ましい水溶性ポリマーはポリエチレングリコールであり、これをPEGと略す。本明細書で使用するように、ポリエチレングリコールは、モノ-(C1~C10)アルコキシまたはアルコキシ-ポリエチレングリコールなどの他のタンパク質を誘導するために使用されている、PEGの任意の形を含むことを意味する。

【0043】

ポリエチレングリコール分子とタンパク質分子の割合は、反応混合物中のそれらの濃度と同様に変わるであろう。一般に、最適な比(過剰な未反応タンパク質またはポリマーが存在しない反応の効率の点において)は、選択したポリエチレングリコールの分子量、および利用可能な反応基(典型的には または アミノ基)の数によって決定される。分子量に関しては、ポリマーの分子量が大きくなるほど、タンパク質に結合することができるポリマー分子の数は少なくなる。同様に、これらのパラメータを最適化するときは、ポリマーの分枝化を考慮しなければならない。一般に、分子量が大きくなるほど(あるいは分枝が増えるほど)、ポリマーとタンパク質の比は大きくなる。本発明では、いくつかの異なる線状PEGポリマーの長さを評価した(5kD、20kDおよび30kD)。同様に、2アーム型分枝PEGポリマー(10kD、20kDおよび40kD)の複合体も試験した。それぞれの調製物から、モノ置換およびジ置換PEG-NESPのサンプルを単離して、PEG化の第2の部位の影響を調べた。

10

【0044】

一般に、本明細書で企図するPEG化反応については、好ましい平均分子量は約2kDa~約100kDaである(「約」という語は、 ± 1 kDaを示す)。より好ましくは、平均分子量は約5kDa~約40kDaである。一般に水溶性ポリマーとNESPの比は、モノPEGについては1:1、ジPEGについては2:1などの範囲であり、PEGとタンパク質の質量比は、5kDモノPEGについては~1:7、30kDモノPEGについては~1:1.3であろう。

20

【0045】

PEG化NESP調製物を得る方法は、非PEG化NESP分子の集団からのPEG化物質の調製によるものであってよい。たとえば以下に示すのは、モノおよび/またはジPEG化NESPをイオン交換サイズクロマトグラフィを使用して分離する一例である。サイズ排除クロマトグラフィを分析用ツールとして使用して、精製した生成物を特徴付ける。

30

【0046】

本発明は、N末端が化学的に修飾されたNESPを選択的に得るための方法も提供する。この方法は還元的アルキル化を含み、このアルキル化は、特定のタンパク質における誘導に利用可能な、異なるタイプの第一級アミノ基の特異な反応性(リジンとN末端)を利用するものである。適切な反応条件下では、カルボニル基含有ポリマーを用いた、N末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導が行われる。この反応は、リジン残基の -アミノ基とタンパク質のN末端残基の -アミノ基の間のpKaの差を利用することができるpHで行う。このような選択的な誘導によって、水溶性ポリマーのタンパク質への結合が調節される -ポリマーとの結合は主にタンパク質のN末端で起こり、リジン側鎖アミノ基などの他の反応基の大きな変化は起こらない。調製物は80%を超えてモノポリマー -タンパク質複合体であることが好ましく、95%を超えてモノポリマー -タンパク質複合体であることがさらに好ましい。

40

【0047】

本発明のNESPは、それぞれの部位に追加的な炭水化物鎖が結合している2個の追加のグリコシル化部位を含む、過グリコシル化EPOの類似体である。NESPは位置指定突然変異導入法を使用して構築され、哺乳動物の宿主細胞中で発現した。NESPの生成の詳細は、共同所有するPCT Application No. US94/02957中に提供されている。rHuEPOの新しいN結合グリコシル化部位は、DNA配列を変えてアミノ酸Asn-X-Ser/Thrをポリペプチド鎖中にコードすることによって導入した。NESPをコードするDNAをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)宿主細胞

50

胞にトランスフェクトし、発現したポリペプチドを追加的な炭水化物鎖の存在について分析した。好ましい実施形態では、NE SPは2つの追加的なN結合型炭水化物鎖を残基30および88において有する。アミノ酸配列の番号は、ヒトのエリスロポエチン(EPO)のものである。NE SPのアミノ酸配列は、配列番号1で示される配列である。NE SPは、N結合およびO結合グリコシル化部位、さらに新しい部位の正常な相補性を有することが理解される。

【0048】

本発明のNE SPは、配列番号1中の1つまたは複数の残基において、保存性アミノ酸変化体を含んでもよい。これらの変化体によって炭水化物鎖の追加が結果としてもたらされることはなく、類似体の生物学的活性に影響を与えることはほとんどない。

10

【0049】

一般に、本発明に含まれるのは、有効量の本発明のタンパク質または誘導体生成物、および薬剤として許容される希釈剤、安定剤、防腐剤、可溶化剤、乳濁剤、アジュバントおよび/または担体を含む、薬剤組成物である。このような組成物は、緩衝含有物(たとえばトリス-HCl、リン酸塩)、pHおよびイオン強度がさまざまである希釈剤、洗浄剤および可溶化剤などの添加剤(たとえばポリソルベート20、ポリソルベート80)、抗酸化剤(たとえばアスコルビン酸、メタ亜硫酸ナトリウム)、防腐剤(たとえばチメロゾール、ベンジルアルコール)、およびバルキング物質(たとえばラクトース、マンニトール)を含む。たとえば、参照によって本明細書に取り込まれている、RemingtonのPharmaceutical Sciences、18th Ed.(1990、Mack Publishing Co.、Easton、PA18042)ページ1435:1712を参照のこと。活性成分の有効量とは、治療上、予防上、あるいは診断上有効な量のことであり、身体重量、年齢、および治療的または予防的目標などの要因を考慮することによって、この量は当業者により容易に決定することができる。

20

【0050】

本発明のPEG-NE SP組成物は、溶液のpHを所望の範囲内に保つために、緩衝剤を含んでもよい。好ましい緩衝剤には、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、およびクエン酸ナトリウムがある。これらの緩衝剤の混合物を使用することもできる。組成物中において有用な緩衝剤の量は、使用する個々の緩衝液および溶液のpHに大きく依存する。たとえば酢酸は、pH6よりもpH5においてより有効な緩衝液であるので、pH5においてはpH6よりも少量の酢酸を使用してよい。本発明の組成物の好ましいpH範囲は、pH3.0~7.5である。

30

【0051】

本発明の組成物は、溶液を等張にし注射により適したものにするために、等張性調節剤をさらに含んでもよい。最も好ましい調節剤は、0~150mMの濃度範囲内の塩化ナトリウムである。

【0052】

本明細書で使用するように、PEG-NE SP複合体を企図するとき、「治療的に有効な量」とは、ヘマトクリット値を増大させ患者に利点を提供する量のことである。この量は個体によって変わり、患者の全体的な身体状況および貧血の根本的な原因を含めた、いくつかの要因に依存するであろう。たとえば、慢性的な腎臓障害で苦しんでいる患者のrHuEPOの治療的に有効な量は、1週間に3回、1kgあたり50~150単位である。治療用使用するrHuEPOの量によって、許容可能なヘマトクリット値の増大の比率が与えられ、この量によってヘマトクリット値が有益なレベル(通常は少なくとも約30%、典型的には30%~36%の範囲)に保たれる。本発明の組成物の治療的に有効な量は、一般的に利用可能な物質および手順を使用して、当業者によって容易に確かめることができる。

40

【0053】

本発明は、NE SPおよび/またはEPOよりも少ない頻度でPEG-NE SP複合体を投与することを提供する。投与の頻度は治療を受ける条件に応じて変わるであろうが、

50

一般には4～6週間毎に約1回であろう。異なる個体によってPEG-NE SP複合体への応答性が変わるために、実際に使用する投与の頻度は本明細書で開示する頻度とは幾分変わってもよいことが理解され、「約」という語はこのような変化を反映させることを意図するものである

したがって本発明を使用して、赤血球細胞の生成を刺激し、低下した赤血球細胞のレベルを正すことができる。最も一般的には、赤血球細胞のレベルは貧血のために低下する。本発明によって治療可能な状態には、腎臓機能の低下または損失（慢性的な腎臓障害）を伴う貧血、化学療法または抗ウイルス薬剤（AZTなど）などの骨髄抑制治療を伴う貧血、非骨髄性のガンの進行を伴う貧血、およびウイルス感染（HIVなど）を伴う貧血がある。正常では健康な個体において貧血をもたらす可能性がある状態、手術中の血液の予期される損失なども治療可能である。一般に、rHuEPOおよび/またはNE SPを用いて治療可能な任意の状態は、本発明のPEG-NE SP複合体を用いても治療することができる。

10

【0054】

本発明は、治療中により多くのエリスロポエチンを保つために、治療的に有効な量の鉄を投与することも提供する。与えられる量は、rHuEPOを用いる治療に基づいて、当業者によって容易に決定することができる。

【0055】

本発明に従って調製したPEG-NE SP複合体は、腹腔内、皮下、あるいは筋肉内に注射することによって投与することが好ましい。しかしながら、本発明の組成物を使用して、他の送達経路も有効に利用することができることは、当業者には明らかであろう。

20

【0056】

本発明をより完全に例示するために以下の実施例を提供するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものとして解釈すべきではない。実施例1では、PEG-NE SP複合体の調製および試験を記載し、この複合体は、過ヨウ素酸ナトリウムの酸化によってNE SPの炭水化物鎖中に生成させたアルデヒドを介して、5kDまたは20kDのメトキシ-PEG-ヒドラジドをNE SPにカップリングさせることにより調製した。実施例2では、PEG-NE SP複合体の調製および試験を記載し、この複合体は、NH₂-PEGエステルおよびPEG-アルデヒドとして20kDのPEGポリマーを使用して、それぞれアシル化および還元アルキル化によって、PEG-NE SP複合体を生成させることにより調製した。実施例3では、置換の程度の働き、ポリマーサイズの変化、およびさまざまなPEG-NE SP複合体の形態に対する影響を実証する。実施例4では、貧血のマウスモデルにおいてNE SPコントロールに対して3つの異なる用量で調べた、3種のPEG-NE SP複合体、20kDのモノPEG-NE SP、5kDのポリPEG-NE SP混合物、および30kDのモノPEG-NE SPの効率を記載する。実施例5では、3つの異なるPEG-NE SP複合体を正常なマウスのバイオアッセイで評価して、そのエリスロポエチンポテンシャルおよび持続時間を比較および対比した。

30

【0057】

実施例1

過ヨウ素酸ナトリウムの酸化によってNE SPの炭水化物鎖中に生成させたアルデヒドを介して、5kDまたは20kDのメトキシ-PEG-ヒドラジドをNE SPにカップリングさせることにより、PEG-NE SP複合体を生成した。修飾の程度は、酸化中に過ヨウ素酸ナトリウムの濃度を変えることによって調節した。

40

【0058】

最初にNE SP（50mMの酢酸ナトリウム中に2～4mg/ml）を1mMまたは10mMのメタ過ヨウ素酸ナトリウム（Sigma）で、pH5.6の100mMの酢酸ナトリウム中において室温で30分間酸化することによって、複合体を調製した。次いで過ヨウ素酸塩を、pH5.4の100mMの酢酸ナトリウムに緩衝液を交換することによって取り除く。

【0059】

50

次いでメトキシ - PEG - ヒドラジド (Shearwater Polymers) を、ポリマー - タンパク質 5 ~ 100 倍モル過剰 (100 倍を超えることが好ましい) で加える。中間ヒドラゾン複合体を、15 mM のシアノ水素化ホウ素ナトリウム (Sigma) を加えることによってさらに還元し、4 で一晚反応させた。次いで結果として生じた複合体を、Superdex 75、26 mm x 60 cm カラム (Pharmacia) を使用するサイズ排除 FPLC によって画分し、20 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.2 で溶離した。結果として生じた調製物は、SDS - PAGE によって測定したように、サイズが ~ 40 kD ~ 200 kD の範囲であった。

【0060】

PEG - NES P のサンプルを、*in vitro* での EIA フォーマットにおいて受容体結合について試験した。この *in vitro* でのアッセイは置換アッセイであり、PEG - NES P 複合体は、レポーターとして使用する EPO - HRP 複合体と EPO 受容体の結合に関して競合する。この *in vitro* でのアッセイの結果によって、PEG - NES P 複合体は、NES P 受容体に関して見た目の親和性が低かったことを示す。

10

【0061】

次いでさまざまな PEG - NES P 複合体の生物学的活性を、複合体を 1 回皮下投与した後に、げっ歯類における鉄の取り込みを観察することによって *in vivo* で評価した。このアッセイでは、マウスを高圧酸素室中において予め条件付けして、内因性エリスロポエチンの発現を抑制し、次いで NES P または PEG - NES P 複合体を、1 回の皮下への大量注射によって投与した。5 日後、トレーサーとしての Fe⁵⁹ アイソトープをマウスに静脈注射して、赤血球細胞中の鉄の取り込みを観察した。Fe⁵⁹ の投与の 2 日後、動物を殺傷し、鉄の取り込みを用量の関数として分析した。

20

【0062】

最初に、PEG 化の程度がさまざまである 5 kD のポリ PEG - NES P 複合体のいくつかのプールを、複合体用量の関数としての鉄の取り込みについて試験した。この *in vivo* でのアッセイの結果は図 3 に示し、この結果によって、PEG - ヒドラジドを酸化 NES P にカップリングさせることによって調製した PEG - NES P 複合体は、鉄の取り込みのバイオアッセイにおいて NES P 単独と同等に機能することが実証された。

【0063】

実施例 2

この実施例は、20 kD の PEG ポリマーから生成した NHS - PEG エステルおよび PEG - アルデヒドを使用して調製した、PEG - NES P 複合体の調製および試験を記載する。それぞれの化学物質についての反応化学量論および緩衝液条件を最適化して、20 kD のモノ PEG - NES P 複合体を良い収率で生成した。20 kD のメトキシ - PEG - NHS エステルによる NES P のアシル化によって誘導される 20 kD のモノ PEG - NES P、および還元的アルキル化によって誘導される 20 kD のモノ / ジ PEG - NES P の混合物 (~ 80% / 20%) を調製した。

30

【0064】

メトキシ - PEG - アルデヒド (Shearwater Polymers) との反応は、pH 4 ~ 6、最適には pH 5.2 で行うことができる。反応混合物中の NES P の濃度は、50 mM の酢酸ナトリウム中に 4 mg / ml であった。使用したモル過剰の PEG アルデヒドは 5 ~ 20 倍であり、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを最終濃度 15 mM まで加えた。この反応物を周囲温度で 1 時間、次いで 5 で 18 時間攪拌した。反応の終了時に、混合物を 5 mS / cm 未満の導電率まで希釈し、pH を 7.0 まで上昇させ、Q Sepharose HP カラム (Pharmacia) 上に混合物を載せた。50 mM NaCl ~ 200 mM NaCl の直線勾配を使用して生成物をカラムから溶離させ、10 mM のビス - トリス - プロパン、pH 7.0 中において緩衝剤で処理した。この精製により、NES P に結合した PEG 分子の数に基づいて、化学種を分離することができる。

40

【0065】

PEG 活性型 NHS エステル、メトキシ - SPA - PEG (Shearwater P

50

olymers)との反応は、50 mMのBicine緩衝液中において2~4 mg/mlのNESP濃度、pH 8.0で行った。NESPの緩衝溶液を、10~20モル当量のPEGに加えた。この反応物を周囲温度で1時間攪拌した。反応の終了時に、混合物を5 mS/cm未満の導電率まで希釈し、pHを7.0まで上昇させ、QHPカラム(Pharmacia)上にサンプルを載せた。50 mM NaCl~200 mM NaClの直線勾配で生成物をカラムから溶離させ、10 mMのビス-トリス-プロパン、pH 7.0中において緩衝剤で処理した。

【0066】

次いで2つの単離したPEG-NESP複合体、20 kDのモノPEG-NESP(NHS)および20 kDのモノ/ジPEG-NESP(アルデヒド)の混合物(~80%/20%)を、in vivoでのバイオアッセイでマウスにおいて試験した。このマウスのバイオアッセイでは、正常なマウスにおいてNESPまたはPEG-NESPの1回の投与に应答するエリスロポエチンのモニターとしての、網状赤血球、赤血球の前駆体、およびヘモグロビンを測定する。具体的には、このバイオアッセイでは、メスのBDF1マウスにおける100 µg/kgの皮下への大量注射の結果生じる、増大したヘモグロビンおよび網状赤血球の应答の強度および持続期間を測定する。このアッセイの結果を図4中に示し、この実験の結果によって、等用量のNESP単独と比べて、PEG-NESP複合体からのヘモグロビン应答が大幅に増大し持続することが示された。

10

【0067】

実施例3

この実施例では、置換の程度の働き、ポリマーサイズの変化、およびPEG-NESP複合体の形態に対する影響を実証する。

20

【0068】

メトキシ-PEG-アルデヒドとメトキシ-PEG-NHSの両方をベースとする化学物質を使用して、5 kD、20 kDおよび30 kDの線状ポリマー、および10 kD、20 kDおよび40 kDの分枝型ポリマーから、さまざまなPEG-NESP複合体を合成した。これらの反応物から、モノ置換およびジ置換PEG-NESPの調製物をクロマトグラフィによって単離し、マウスのバイオアッセイにおいて長時間作用性のエリスロポエチンについて試験した。

【0069】

メトキシ-PEG-アルデヒド(Shearwater Polymers)との反応は、4 mg/mlのNESPの濃度で行い、20 mMのNaOAc、pH 5.0中ではPEGが25倍モル過剰であり、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを最終濃度20 mMまで加えた。この反応物を4で一晩攪拌し、20 mMトリス、pH 7.2で4倍希釈し、NaOHでpHを7.4に調整した。次いで希釈した反応混合物を、5 mlのHiTrap Q Sepharose HPカラム(Pharmacia)上に載せた。PEG化NESPのイソ形を、20 mMトリス、pH 7.2中で0~150 mMのNaCl勾配を用いて溶離することにより分解した。

30

【0070】

メトキシ-PEG-NHSEステル(Shearwater Polymers)との反応は、4 mg/mlのNESPの濃度で行い、50 mMのBicine緩衝液、pH 8中ではPEGが5~7倍モル過剰であった。この反応物を4で一晩攪拌し、20 mMトリス、pH 7.2で4倍希釈し、NaOHでpHを7.4に調整した。次いで希釈した反応混合物を、5 mlのHiTrap Q Sepharose HPカラム(Pharmacia)上に載せた。PEG化NESPのイソ形を、20 mMトリス、pH 7.2中で0~150 mMのNaCl勾配を用いて溶離することにより分解した(図5~7を参照のこと)。

40

これらのプロセススキームを、それぞれの5 kD、20 kDおよび30 kDの線状ポリマー、および10 kD、20 kDおよび40 kDの分枝型PEG-NHSEステルについて使用した。さまざまな複合体を以下の表1に記載する。

50

【0071】

【表1】

【表1】

表1		
PEGポリマー	複合体化学物質	置換の程度
5 kD線状	mPEG-NHSエステル	モノ/ジ-PEG
20 kD線状	mPEG-NHSエステル	モノ-PEG
20 kD線状	mPEG-NHSエステル	ジ-PEG
30 kD線状	mPEG-NHSエステル	モノ-PEG
30 kD線状	mPEG-NHSエステル	ジ-PEG
5 kD線状	mPEG-アルデヒド	モノ-PEG
5 kD線状	mPEG-アルデヒド	ジ-PEG
20 kD線状	mPEG-アルデヒド	モノ-PEG
30 kD線状	mPEG-アルデヒド	モノ-PEG
30 kD線状	mPEG-アルデヒド	ジ-PEG
10 kD分枝型	分枝型mPEG-NHSエステル	モノ/ジ-PEG
20 kD分枝型	分枝型mPEG-NHSエステル	モノ-PEG
40 kD分枝型	分枝型mPEG-NHSエステル	モノ-PEG
20 kD分枝型	分枝型mPEG-アルデヒド	モノ-PEG
40 kD分枝型	分枝型mPEG-アルデヒド	モノ-PEG
5 kD線状	mPEG-ヒドラジド	高い (>7 PEG)
5 kD線状	mPEG-ヒドラジド	低い (1~5 PEG)
20 kD線状	mPEG-ヒドラジド	高い (>7 PEG)
20 kD線状	mPEG-ヒドラジド	中程度 (~4~7 PEG)
20 kD線状	mPEG-ヒドラジド	低い (1~5 PEG)

10

20

30

【0072】

次いでそれぞれの精製したイソ形を、正常なメスのBDF1マウスにおける100 µg / kgの皮下への1回の大量注射後の、網状赤血球およびヘモグロビン測定における変化によって測定した長時間作用性のエリスロポエチン活性について、マウスの*in vivo*でのバイオアッセイにおいて試験した。線状および分枝型ポリマーシリーズからのそれぞれのモノ置換PEG-NE SP複合体は、有意で同等なエリスロポエチン効果の持続を示した(図8および9を参照のこと)。20 kDおよび30 kDのPEGポリマーからのジ置換PEG-NE SP複合体は非常に活性が低かったが、意外なことに5 kDのジ置換PEG-NE SP複合体は、モノ置換の相当物と等しい活性を示した。モノ置換、分枝型PEG-NE SP複合体はすべて、類似のモノ置換線状PEG-NE SP複合体と比べて、より長期の活性を示した。

40

【0073】

したがってこれらの例は、正常なマウスモデルにおいて1回の大量注射を使用して、さまざまなPEG-NE SP複合体によるエリスロポエチン刺激の時間が長くなることを示す。

50

【0074】

実施例4

この実施例では、貧血のマウスモデルにおいてNES Pコントロールに対して3つの異なる濃度で調べた、3つのPEG-NES P複合体：20kDのモノPEG-NES P、5kDのポリPEG-NES P混合物、および30kDのモノPEG-NES Pの効率を記載する。

【0075】

貧血状態を誘導するために、1mg/kg/1日のシスプラチニンで3日間、次に残りの7日間、マウスを事前に処理した。3回の10日間サイクルの後、30μg/kg、10μg/kgまたは3μg/kgの20kDのモノPEG-NES P、30kDのモノPEG-NES Pまたは5kDのポリPEG-NES P複合体の1回の大量注射をマウスに行い、30μg/kgのNES P単独の対照と比較した。時間の関数として、それぞれの薬剤の1回の投与に応じて、網状赤血球およびヘモグロビンレベルを観察した(図10~15を参照のこと)。

10

【0076】

これらのデータによって、NES P単独と比べてPEG-NES P複合体の用量が3倍まで減少しエリスロポエチンの半減期が大幅に増大するという予期せぬ利点の実証され、したがってこれらの結果によって、PEG-NES P複合体に対する網状赤血球およびヘモグロビン応答の程度および持続時間についての、明らかな用量依存性の実証される。いくつかの場合では、30kDのモノPEG-NES P複合体は、20kDのモノPEG-NES Pよりもわずかに効率が良い5kDのポリPEG-NES P複合体よりもわずかに効率が良いようであり、このことは、30kDのモノPEG-NES P複合体が好ましい形態である可能性があることを示唆する。

20

【0077】

実施例5

この実施例では、3つの異なるPEG-NES P複合体を正常なマウスのバイオアッセイにおいて評価して、そのエリスロポエチンポテンシャルおよび持続時間を比較および対比した。試験した3つの化合物は、30kDのPEG-NHSエステルとのアシル化によって誘導された30kDのモノPEG-NES P、20kDのPEG-アルデヒドとの還元型アルキル化によって誘導された20kDのモノPEG-NES P、および5kDのPEG-アルデヒドとの還元型アルキル化によって誘導された5kDのポリPEG-NES P混合物であった。それぞれのPEG-NES P複合体を、30μg/kg、10μg/kgまたは3μg/kgの皮下用量で、1つのボーラスとして試験した。非修飾型NES Pを、1回の大量注射において30μg/kgでコントロールとして使用した。エリスロポエチンの応答および持続時間を、網状赤血球数またはヘモグロビン濃度の関数として(図16~21を参照のこと)、時間の関数として観察した。これらのデータによって、3つのPEG-NES P形はすべて、強いエリスロポエチン応答および大幅な用量の減少を誘導することができることが示される。さらにこれらのPEG-NES P複合体は、非修飾型NES Pと比べてより持続的な効能を示す。

30

【0078】

物質および方法

本発明のNES Pは、前に参照によって組み込んだPCT Application No. US 94/02957に従って調製することができる。

40

【0079】

本明細書において調製した複合体は、分析用ツールとしてのサイズ排除HPLCクロマトグラフィ(SEC)を使用しても特徴付けた。SECカラムは、100mM NaHPO₄、10%エタノール、150mM NaCl、pH6.9を使用して生成物を溶離する、Tosohhaas TSK 3000 SWx1(5ミクロン、7.8mm x 30cm)であった。代表的なクロマトグラフを図22に示す。

【0080】

50

本発明をいくつかの好ましい実施形態で記載してきたが、当業者が変形形態および変更形態を思い浮かべるであろうことは理解される。したがって添付の特許請求の範囲は、特許請求する本発明の範囲内にある、このような均等な変形形態すべてを含むことを意図している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 NES PをPEG化するための設計戦略を示す図である。

【図2】 NES PをPEG化するための、さまざまな反応化学的手法を示す図である。

【図3】 さまざまな5 k DのポリPEG - NES P複合体と、非修飾型NES Pの、*in vivo*での活性データを示すグラフである。

【図4】 非修飾型NES Pに対してさまざまなPEG - NES P複合体を用いる治療に
10 応答する、高いヘモグロビン(HGB)レベルの持続を示すグラフである。

【図5】 非修飾型NES Pに対してさまざまなPEG - NES P複合体を用いる治療に
10 応答する、高い網状赤血球レベルの持続を示すグラフである。

【図6】 非修飾型NES Pに対してさまざまなPEG - NES P複合体を用いる治療に
10 応答する、高いヘモグロビンレベルの持続を示すグラフである。

【図7】 5 k DのポリPEG - NES P複合体のQ Sepharose HPカラム
10 でのクロマトグラムを示す図である。

【図8】 20 k DのモノPEG - NES P複合体のQ Sepharose HPカラム
10 でのクロマトグラムを示す図である。

【図9】 30 k DのモノPEG - NES P複合体のQ Sepharose HPカラム
20 でのクロマトグラムを示す図である

【図10】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を3 μ g /
k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を3 μ g / k g、および5 k Dのポリ
PEG - NES P複合体混合物()を3 μ g / k g注射した後の、貧血マウスの網状
赤血球の応答を示すグラフである。

【図11】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を10 μ g
/ k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を10 μ g / k g、および5 k D
のポリPEG - NES P複合体混合物()を10 μ g / k g注射した後の、貧血マウス
の網状赤血球の応答を示すグラフである。

【図12】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を30 μ g
/ k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を30 μ g / k g、5 k Dのポリ
PEG - NES P複合体混合物()を30 μ g / k g、および非修飾型NES P()
を30 μ g / k g注射した後の、貧血マウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。

【図13】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を3 μ g /
k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を3 μ g / k g、および5 k Dのポリ
PEG - NES P複合体混合物()を3 μ g / k g注射した後の、貧血マウスのヘモ
グロビンの応答を示すグラフである。

【図14】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を10 μ g
/ k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を10 μ g / k g、および5 k D
のポリPEG - NES P複合体混合物()を10 μ g / k g注射した後の、貧血マウス
のヘモグロビンの応答を示すグラフである。

【図15】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を30 μ g
/ k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を30 μ g / k g、5 k Dのポリ
PEG - NES P複合体混合物()を30 μ g / k g、および非修飾型NES P()
を30 μ g / k g注射した後の、貧血マウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。

【図16】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を3 μ g /
k g、20 k DのモノPEG - NES P複合体()を3 μ g / k g、および5 k Dのポリ
PEG - NES P複合体混合物()を3 μ g / k g注射した後の、正常なマウスの網
状赤血球の応答を示すグラフである。

【図17】 1回の大量注射で30 k DのモノPEG - NES P複合体()を10 μ g
50

/ kg、20 kDのモノPEG - NES P複合体 () を10 μg / kg、および5 kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を10 μg / kg注射した後の、正常なマウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。

【図18】 1回の大量注射で30 kDのモノPEG - NES P複合体 () を30 μg / kg、20 kDのモノPEG - NES P複合体 () を30 μg / kg、5 kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を30 μg / kg、および非修飾型NES P () を30 μg / kg注射した後の、正常なマウスの網状赤血球の応答を示すグラフである。

【図19】 1回の大量注射で30 kDのモノPEG - NES P複合体 () を3 μg / kg、20 kDのモノPEG - NES P複合体 () を3 μg / kg、および5 kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を3 μg / kg注射した後の、正常なマウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。

10

【図20】 1回の大量注射で30 kDのモノPEG - NES P複合体 () を10 μg / kg、20 kDのモノPEG - NES P複合体 () を10 μg / kg、および5 kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を10 μg / kg注射した後の、正常なマウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。

【図21】 1回の大量注射で30 kDのモノPEG - NES P複合体 () を30 μg / kg、20 kDのモノPEG - NES P複合体 () を30 μg / kg、5 kDのポリPEG - NES P複合体混合物 () を30 μg / kg、および非修飾型NES P () を30 μg / kg注射した後の、正常なマウスのヘモグロビンの応答を示すグラフである。

20

【図22】 5 kDのポリPEG - NES P ()、20 kDのモノPEG - NES P (- - -)、および30 kDのモノPEG - NES P (...) の、サイズ排除HPLCクロマトグラムを示す図である。

【図1】

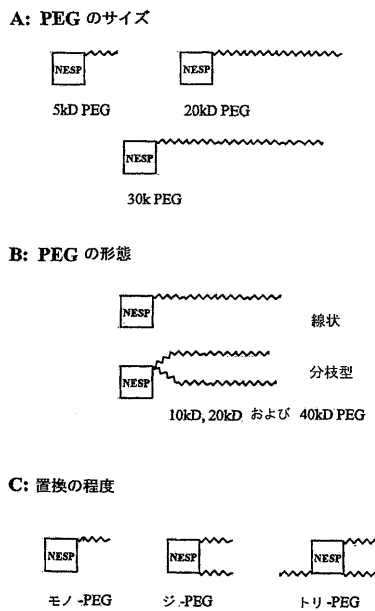


FIGURE 1

【図2】

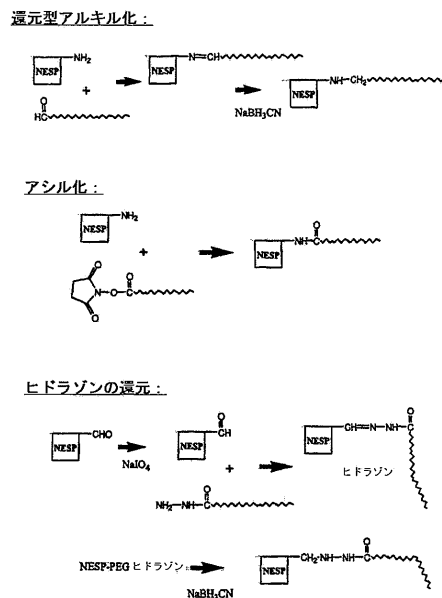


FIGURE 2

【 図 3 】

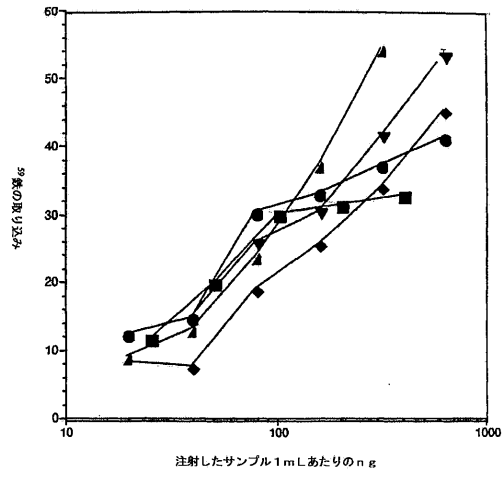


FIGURE 3

【 図 4 】

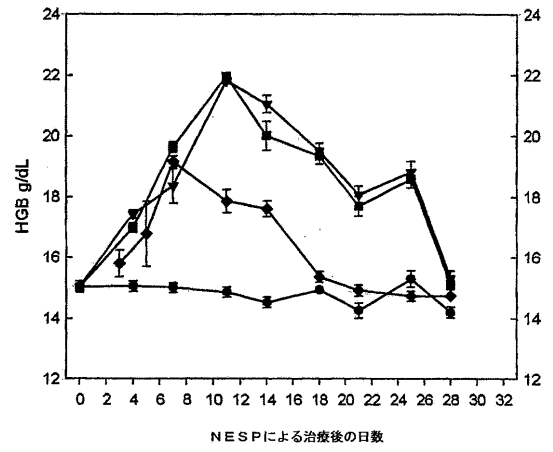


FIGURE 4

【 図 5 】

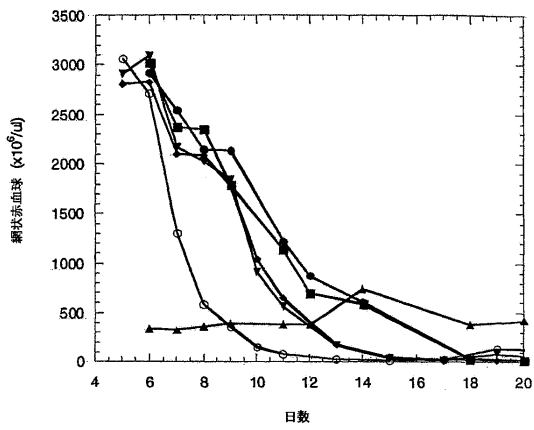


FIGURE 5

【 図 6 】

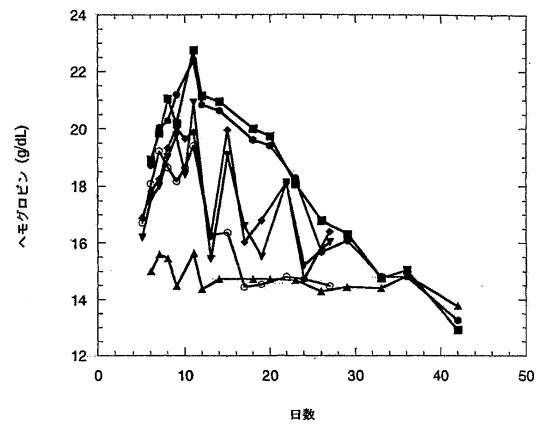


FIGURE 6

【 図 7 】

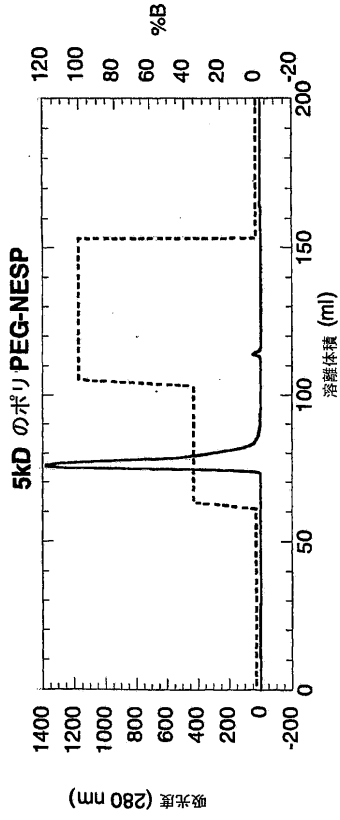


FIGURE 7

【 図 8 】

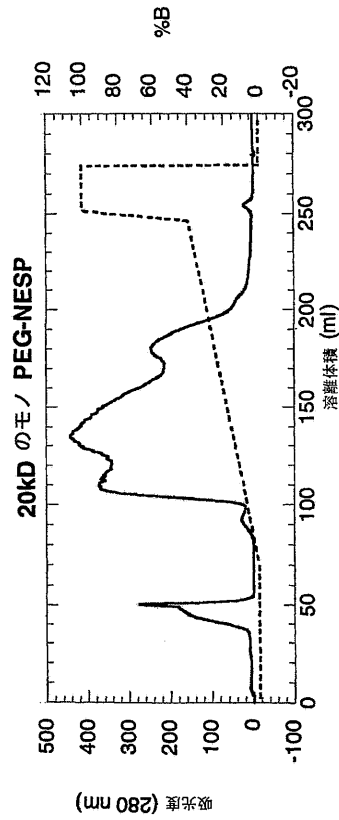


FIGURE 8

【 図 9 】

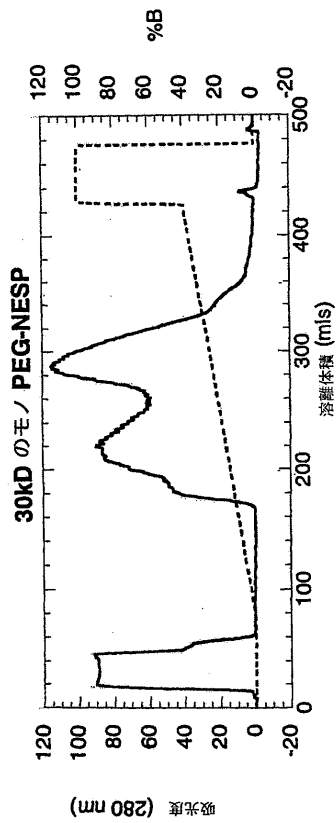


FIGURE 9

【 図 10 】

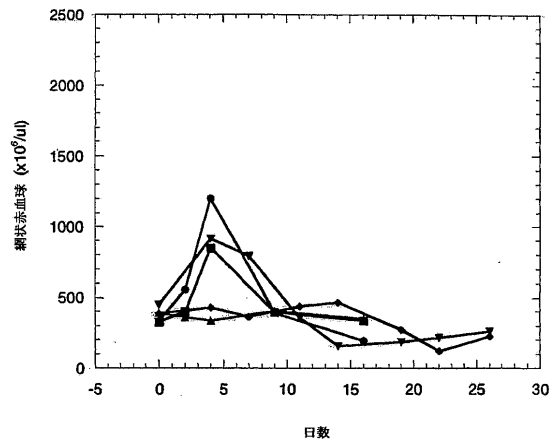


FIGURE 10

【 図 1 1 】

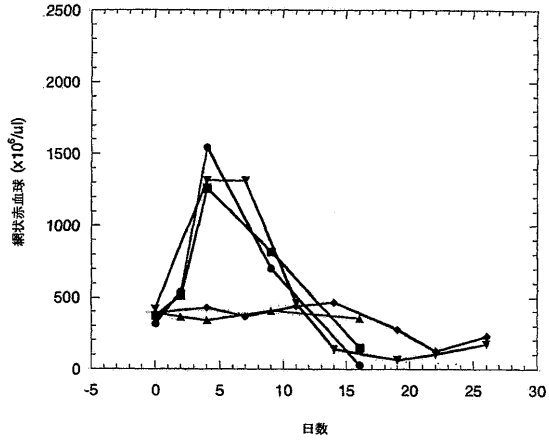


FIGURE 11

【 図 1 2 】

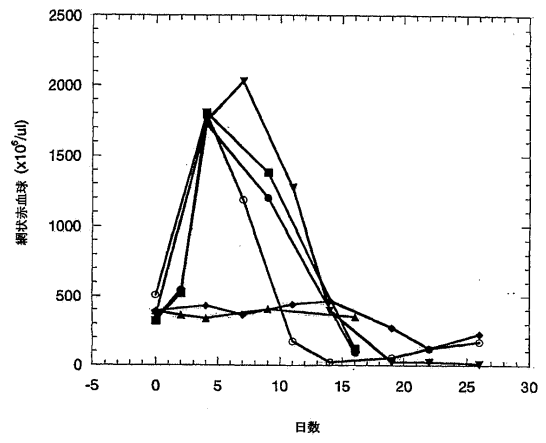


FIGURE 12

【 図 1 3 】

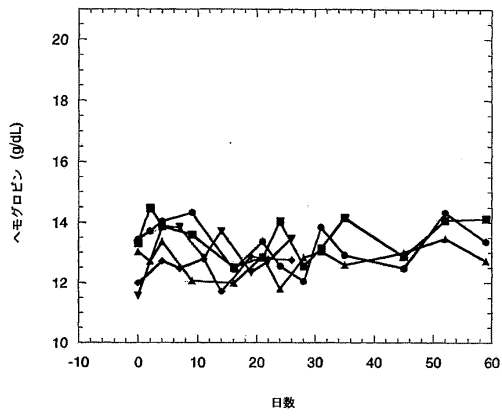


FIGURE 13

【 図 1 4 】

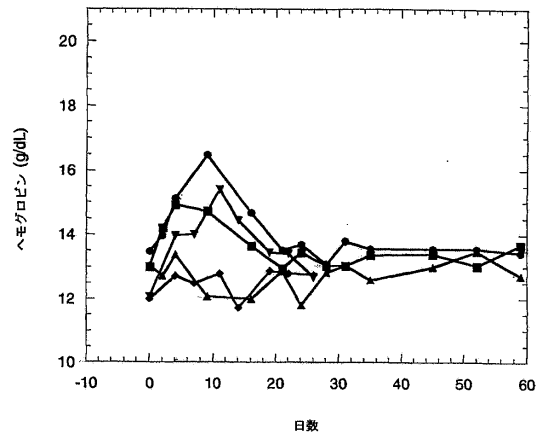


FIGURE 14

【 図 15 】

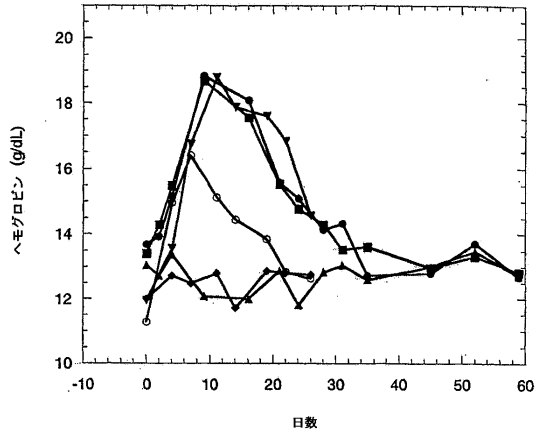


FIGURE 15

【 図 16 】

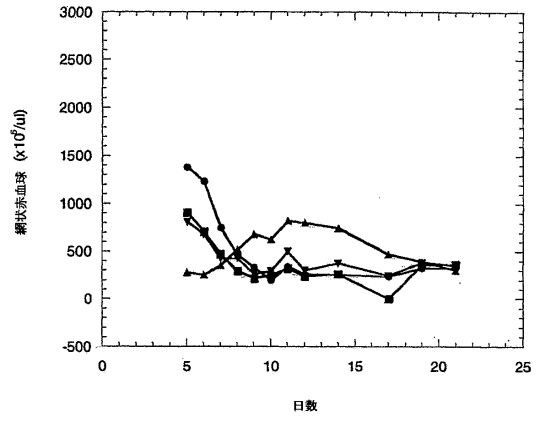


FIGURE 16

【 図 17 】

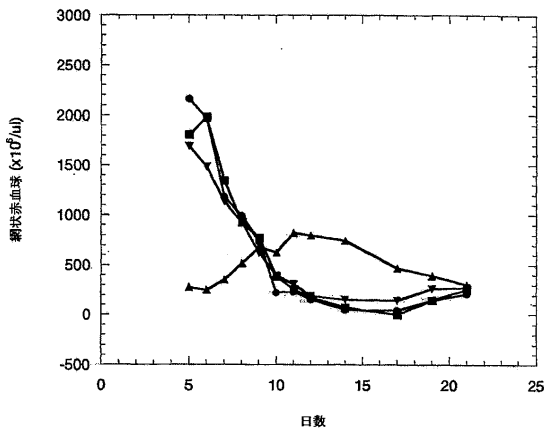


FIGURE 17

【 図 18 】

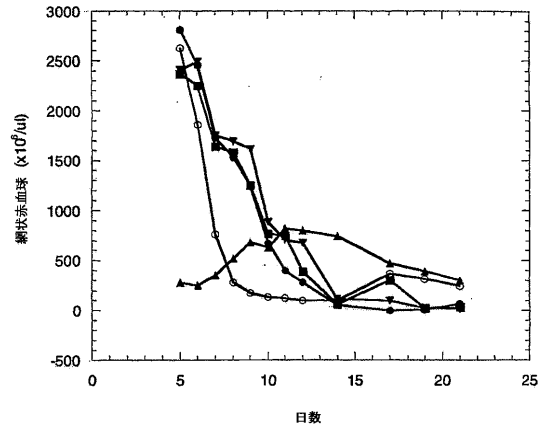


FIGURE 18

【 図 19 】

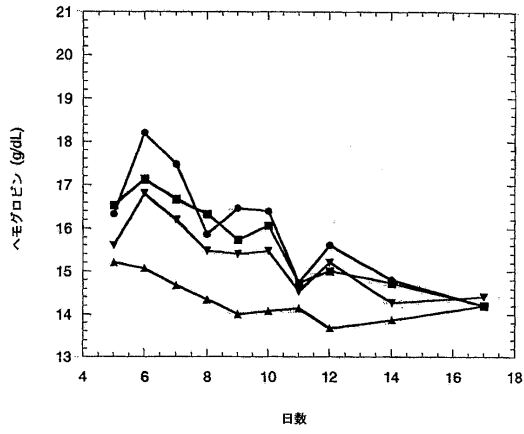


FIGURE 19

【 図 20 】

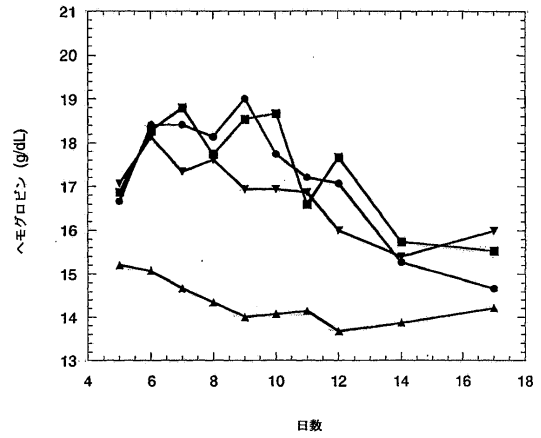


FIGURE 20

【 図 21 】

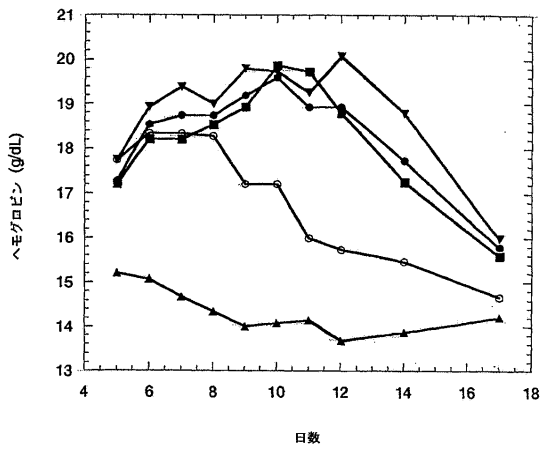


FIGURE 21

【 図 22 】

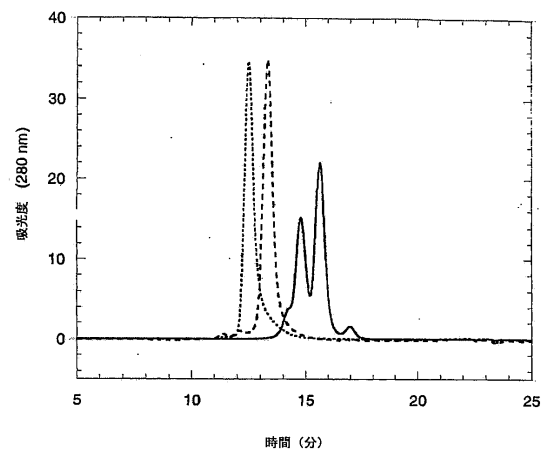


FIGURE 22

【配列表】

0005334347000001.xml

フロントページの続き

- (72)発明者 フリーマン, エイミー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、ニューベリー・パーク、ロテラ・ドライブ・1
253
- (72)発明者 ブーン, トーマス・チャールズ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、ニューベリー・パーク、デИАー・バリー・アベ
ニュー・3010

審査官 福井 悟

- (56)参考文献 特表平08-506023(JP, A)
特開平07-196925(JP, A)
特開2001-064300(JP, A)
特表2003-503464(JP, A)
国際公開第94/028024(WO, A1)
国際公開第98/041562(WO, A1)
国際公開第98/005363(WO, A1)
Journal of the American Society of Nephrology, 1999年, Vol.10, pp.2392-2395

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 47/00

A61K 9/00

A61K 38/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)