

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4295831号  
(P4295831)

(45) 発行日 平成21年7月15日(2009.7.15)

(24) 登録日 平成21年4月17日(2009.4.17)

(51) Int.Cl.		F I
<b>C 0 7 K 14/525</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 14/525
<b>A 6 1 K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 K 38/22</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/24
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00

請求項の数 14 (全 17 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平10-534488</p> <p>(86) (22) 出願日 平成10年1月15日(1998.1.15)</p> <p>(65) 公表番号 特表2001-511784(P2001-511784A)</p> <p>(43) 公表日 平成13年8月14日(2001.8.14)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US1998/000683</p> <p>(87) 国際公開番号 W01998/031383</p> <p>(87) 国際公開日 平成10年7月23日(1998.7.23)</p> <p>審査請求日 平成17年1月17日(2005.1.17)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/035,521</p> <p>(32) 優先日 平成9年1月15日(1997.1.15)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 09/006,810</p> <p>(32) 優先日 平成10年1月14日(1998.1.14)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 ボラリス・グループ 台湾106・台北・セクション4・チャン グーシアオイーストロード・ナンバー28 9・9エフ</p> <p>(74) 代理人 弁理士 特許業務法人小田島特許事務所</p> <p>(72) 発明者 クラーク, マイク・エイ アメリカ合衆国ケンタッキー州40502 レキシントン・スコビルロード1276</p> <p>審査官 濱田 光浩</p> <p>(56) 参考文献 British J. Cancer, (1996), Vol. 74, p. 1090-1095</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 改変された腫瘍壊死因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

20,000ないし40,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)分子にN-ヒドロキシスクシンイミジルスクシネート連結基またはN-ヒドロキシスクシンイミド連結基を介して共有結合したTNFを含んでなる改変されたTNF。

【請求項2】

PEGが20,000ないし30,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有する請求項1記載の改変されたTNF。

【請求項3】

TNFが5ないし12個のPEG分子に共有結合している請求項1記載の改変されたTNF。

【請求項4】

TNFがTNF上の第一級アミンを介してPEG分子に共有結合している請求項1記載の改変されたTNF。

【請求項5】

TNFがTNF-である請求項1記載の改変されたTNF。

【請求項6】

TNFが単離されたヒトTNFである請求項1記載の改変されたTNF。

【請求項7】

10

20

T N F が組み換えヒト T N F である請求項 1 記載の改変された T N F。

【請求項 8】

20,000 ないし 40,000 の範囲のおおよその重量平均分子量を有する P E G 分子を N - ヒドロキシスクシンイミジルスクシネート連結基または N - ヒドロキシスクシンイミド連結基を介して T N F に共有結合することにより該 T N F を改変することを含んでなる T N F の循環半減期を増大する方法。

【請求項 9】

20,000 ないし 40,000 の範囲のおおよその重量平均分子量を有する P E G 分子を N - ヒドロキシスクシンイミジルスクシネート連結基または N - ヒドロキシスクシンイミド連結基を介して T N F に共有結合することにより該 T N F を改変することを含んでなる T N F の殺腫瘍活性を高める方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 記載の改変された T N F を有効成分として含んでなる腫瘍を患っている患者の処置用製薬学的製剤。

【請求項 11】

腫瘍が黒色腫である請求項 10 記載の製剤。

【請求項 12】

腫瘍が結腸癌である請求項 10 記載の製剤。

【請求項 13】

腫瘍が腎臓癌である請求項 10 記載の製剤。

20

【請求項 14】

腫瘍が乳癌である請求項 10 記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

関連出願

本出願は 1997 年 1 月 15 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 035,521 号の利益を請求する。

発明の分野

本出願はとりわけ 10,000 ないし 40,000 の範囲の分子量を有するポリエチレングリコールで改変された腫瘍壊死因子及びそのような改変された腫瘍壊死因子を用いて腫瘍を処置するための方法に関する。

30

発明の背景

悪性黒色腫（3 期）は診断の 1 年以内に大部分の患者を死亡させる致死的な疾病である。黒色腫の発生は米国において急速に増加しており、豪州のような他の国より高くさえある。黒色腫を患っている患者のための有効な処置が緊急に必要とされている。

腎臓癌により現在米国では毎年約 13,000 人が死亡している。この型の癌はしばしばかなり進行するまで検出されない。患者の予後に顕著に影響を与える処置の唯一の形態は冒された臓器の外科的切除である。残念なことに、この型の癌は非常に転移性であるので、全ての転移の完全な除去は不可能でないにしても困難である。

結腸癌は癌の最も一般的な型の一つであり、現在米国では毎年約 140,000 人が死亡している。この疾病を処置するために開発された多数の伝統的な化学療法薬があるが、（5 年またはそれより長く生存する患者のパーセンテージとして定義される）長期生存はここ 40 年であまり変わっていない。さらに、開発された伝統的な化学療法薬は全て非常に有毒であり、有害なそしてしばしば致命的な副作用を有し、そして費用がかかる。この疾病の治癒的な無毒の処置が緊急に必要とされている。

40

黒色腫、腎臓及び結腸腫瘍の特徴は、これらの腫瘍が伝統的な化学療法に対する抵抗性を急速に持つようになることである。たとえ患者が最初に化学療法処置によい反応を示すことができても、薬剤抵抗性の腫瘍が急速に発生し、そして結局患者を死亡させる。これらの腫瘍を処置するための代替の方法は腫瘍に「弱点」を同定し、その標的を選択的に処置する治療を開発することである。1 つのそのような可能性のある標的が同定されている。具体的には、これらの型の腫瘍の 3 つ全ては、癌が成長するために転移の各々の多量の

50

血管新生を必要とすることが認められている。それ故、これらの腫瘍の血管新生を妨げる治療薬はこれらの腫瘍を処置する独特な手段を与える可能性があるとして予測される。

手段壊死因子(TNF)は、免疫刺激活性を有する、白血球及び関連する細胞により産生される一群の多様なタンパク質である多数のサイトカインの1つである。TNFは元来、腫瘍を壊死させるその能力にちなんで命名された。TNFが腫瘍を殺すと考えられる少なくとも2つの異なる機構がある。第一のものは腫瘍自体への直接作用による。あるいはまた、TNFは腫瘍の血管新生を選択的に分断することができる。TNFを記述する初期の原稿において、Carswell及びOldはMETH A腫瘍細胞がインビトロでTNFに完全に抵抗性であることを報告した、J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA、72:3666-3670(1975)。しかしながら、マウスにおけるMETH A腫瘍はインビボでTNFに非常に感受性であった。これはTNFがこれらの腫瘍の血管新生を選択的に分断したためであると考えられた。今までのところ同定されていないある因子がいくつかの腫瘍により放出され、それにより腫瘍に隣接する正常な血管内皮細胞がTNFに殺されやすくなることが後に示された。簡潔に言えば、腫瘍細胞を直接的に殺すことによるのではなく、むしろ血液、酸素及び生存し成長するために必要な他の栄養物を腫瘍に供給する血管に沿って並ぶ正常な血管内皮細胞を殺すことによりTNFはこれらの腫瘍を殺す。

10

残念なことに、初期の臨床試験はTNFを直接殺腫瘍剤として開発しようとして試みた。このように用いられる場合、TNFは迅速に(20分未満)血液循環から除かれるので多量のTNFが注入される必要があった。さらに、これらの高投与量のTNFは血圧の急降下を特徴とする「ショック」様症状を引き起こした。TNFを用いる代替の方法はそれが血液循環中にとどまるようにそれを配合することである。これを実施することにより、TNFは腫瘍の血管系と相互作用するためにより多くの時間があり、そして腫瘍への血液供給を分断するために十分な時間がある。

20

いくつかの他の治療タンパク質がポリエチレングリコール(PEG)と配合されており、その結果、それらはより長く循環し、そして血管系にとどまる。これらのタンパク質はアスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ及びスーパーオキシドジスムターゼを含む。例えば、Harras、J.M.「Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biochemical Applications」中、Plenum Press(1992)を参照。日本人研究者のグループはTNFをある種のPEGと配合できたこと及び得られる材料が実質的に増加した循環半減期及びより大きい抗腫瘍活性を有したことを以前に記述している。Tsutsumi、Y.等、Jap. J. Cancer Res.、85:9-12(1994); Tsutsumi、Y.等、Jap. J. Cancer Res.、85:1185-1188(1994); Tsutsumi、Y.等、Jap. J. Cancer Res.、87:1078-1085(1997)。これらの研究者はスクシンイミジルスクシネートリンカーでTNF上の第一級アミンに結合させた5000の分子量を有するPEGのみを用いた。

30

#### 発明の要約

今回、意外にも、約10,000ないし約40,000の範囲、好ましくは20,000ないし30,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)でTNFを改変することがTNFの循環半減期を著しく増し、また、TNFの殺腫瘍活性も高めることが見いだされた。例えば、TNFの血清半減期はそのような改変により20分のようなわずから15日まで上げられ、そして抗腫瘍ED50は1000-3000IUのような多量から10-50IUのような少量まで下げられている。改変の結果として、患者に対するより少ない随伴する不都合な副作用で、腫瘍を有効に処置するために、より低い投与量のTNFを投与することができる。

40

それ故、本発明は改変されたTNFに関し、その場合、該改変は約10,000ないし約40,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有する1個またはそれより多いPEG分子を、直接的または生体適合性の連結剤を介してのいずれかで、該TNFに共有結合的

50

に結合することを含んでなる。好ましくは、TNFは5ないし12個のPEG分子、より好ましくは約5ないし9個のPEG分子で改変される。

また、本発明は該改変されたTNFの治療的に有効な量を腫瘍を患っている患者に投与することにより該患者を処置する方法にも関する。

本発明はさらに約10,000ないし約40,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有する約5ないし12個の間のPEG分子をTNFに共有結合的に結合することにより該TNFを改変することを含んでなるTNFの循環半減期を増大する方法に関する。

本発明はさらに約10,000ないし約40,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有する約5ないし12個の間のPEG分子をTNFに共有結合的に結合することにより該TNFを改変することを含んでなるTNFの殺腫瘍活性を高める方法に関する。

10

#### 図面の説明

図1は天然のTNF- $\alpha$ （開いた丸）、SS 5,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた丸）及び20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （開いた三角）のマウス血清中の循環半減期を示すグラフである。

図2は天然のTNF- $\alpha$ （開いた丸）、SS 5,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた丸）、SS 12,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた三角）、SS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （開いた三角）、NHS 12,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた四角）及びNHS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （開いた四角）のマウス血清中の循環半減期を示すグラフである。

#### 発明の詳細な説明

20

本明細書に用いられる「腫瘍壊死因子」または「TNF」は、単離されたヒトもしくはマウスTNFタンパク質のような天然に得られるタンパク質、または組み換えネズミTNF及び組み換えヒトTNFのような組み換え技術を用いて製造されるタンパク質を包含する。TNF-タンパク質が好ましいが、「TNF」という用語はTNF-タンパク質も包含する。また、その用語は生物学的活性を著しく損なわずにアミノ酸の欠失または改変により突然変異させたTNFタンパク質も包含する（例えば、限定しない例として、アミノ酸212-220を欠失させるかまたは248、592、508のリシンをアラニンに変える）。

「ポリエチレングリコール」または「PEG」は一般式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ により表される、分枝鎖または直鎖の、エチレンオキド及び水の縮合ポリマーの混合物をさす。「ポリエチレングリコール」または「PEG」はそのおおよその重量平均分子量を示すために数字の接尾辞と組み合わせて用いられる。例えば、PEG 5,000は約5,000のおおよその重量平均分子量を有するポリエチレングリコールをさし；PEG 12,000は約12,000のおおよその重量平均分子量を有するポリエチレングリコールをさし；そしてPEG 20,000は約20,000のおおよその重量平均分子量を有するポリエチレングリコールをさす。そのようなポリエチレングリコールはいくつかの商業的製造業者から入手でき、そして上に示したようにそれらの重量平均分子量により慣例的に呼ばれる。

30

「黒色腫」は口腔、食道、肛門管、膺、脳軟膜及び/または結膜もしくは眼を初めとする、皮膚及び他の器官のメラノサイト系から生じる悪性または良性の腫瘍であってもよい。

40

「黒色腫」という用語は例えば先端黒子型黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、結節型黒色腫、爪下黒色腫及び表在拡大型黒色腫を含む。

「患者」は動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトをさす。

「生体適合性の」は一般に生物学的機能に有害ではなく、そしてアレルギーを起こす及び疾病状態を初めとするいかなる程度の許容できない毒性ももたらさない物質または化合物をさす。

「循環半減期」は、患者への改変されたTNFの注入後に、TNFの量が初めの最大血清レベルの半分のレベルまで取り除かれるまでの期間をさす。ヒトまたはマウスを初めとするあらゆる適切な種において循環半減期を測定することができる。

50

本明細書に用いられる「共有結合的に結合した」は、直接的またはリンカーを介してのいずれかで、PEG分子にTNFタンパク質を連結する共有結合をさす。

本発明により、TNFを10,000ないし40,000の範囲、好ましくは20,000ないし30,000の範囲のおおよその重量平均分子量を有するポリエチレングリコールで改変する。通例、30,000またはそれより多い分子量を有するポリエチレングリコールは溶解するのが困難であり、配合された生成物の収率を非常に下げる。ポリエチレングリコールは分枝鎖または直鎖であってもよいが、好ましくは直鎖である。

生体適合性の連結基を介してポリエチレングリコールをTNFに結合することができる。上に説明したように、「生体適合性の」は化合物または基が無毒であり、そして損傷、疾病、疾患または死を引き起こさずにインビトロまたはインビボでそれを利用できることを示す。PEGを例えば、エーテル結合、エステル結合、チオール結合またはアミド結合により連結基に結合することができる。適当な生体適合性の連結基は例えば、エステル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、炭水化物、(例えば、スクシンイミジルスクシネート(SS)、スクシンイミジルプロピオネート(SPA)、スクシンイミジルカルボキシメチレート(SCM)、スクシンイミジルスクシンアミド(SSA)もしくはN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を初めとする)マレイミド基、エポキシド基、(例えば、ニトロフェニルカーボネート(NPC)もしくはトリクロロフェニルカーボネート(TPC)を初めとする)オキシカルボニルイミダゾール基、トリシレート(trysylate)基、アルデヒド基、イソシアネート(isocyanate)基、ビニルスルホン基、チロシン基、システイン基、ヒスチジン基または第一級アミンを含む。好ましくは、生体適合性の連結基はエステル基及び/またはマレイミド基であり、TNFタンパク質上の第一級アミンを介してTNFに結合する。より好ましくは、連結基はSS、SPA、SCM、SSAまたはNHSであり;SSが最も好ましい。

あるいはまた、アミノ基、スルフィドリル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基を介して直接的に(すなわち、連結基なしに)TNFをPEGに結合することができる。例えば、引用することにより本明細書に開示が組み込まれるHarras、J.M.「Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biochemical Applications」中、Plenum Press(1992)中に記述されたように、直接的または生体適合性の連結基を介してPEGにTNFを共有結合的に結合するための方法は当該技術分野で知られている。TNFタンパク質を5ないし12個のPEG分子に共有結合的に結合することが好ましい。タンパク質に結合したPEG分子の数を測定するための方法は当該技術分野で知られている、例えば、引用することにより本明細書に組み込まれるHabeeb、A.F.S.A.、Anal. Biochem.、14:328-339(1966);Harras、J.M.上記。TNFに結合するPEG分子の数は利用する連結基、反応の長さ及び反応に利用するTNFとPEGのモル比により変わる。

当業者が認識するように、本発明の改変されたTNFを多数の方法で、例えば、経口的、鼻内、腹腔内、非経口的、静脈内、リンパ管内、腫瘍内、筋肉内、間質(interstitially)、動脈内(intrarterially)、皮下、眼内、滑液内(intrasynovially)、経上皮及び経皮的に投与することができる。本発明の改変された化合物のいずれかの治療的に有効な量は腫瘍成長を抑制するために有効な量であり、その量は投与の方法により変わる可能性がある。通例、有効な投与量は週1回で約0.001ないし0.1mg/kgの範囲であるべきである。当該技術分野で知られているように、改変されたTNFを製薬学的に許容しうる担体及び希釈剤と配合することができる。例えば、静脈内投与のためには、注入前に、改変されたTNFをリン酸緩衝食塩水溶液または当業者に知られているあらゆる他の適切な溶液と混合することができる。改変されたTNFが黒色腫、結腸癌、腎臓癌及び乳癌腫瘍を処置することに特に有効であることが試験から示されている。

本発明は以下の実施例においてさらに示され、それらは例示の目的のためであり、本発明の範囲を限定しないと考えられる。

10

20

30

40

50

以下に記述する実験に用いるTNFはマウス及びヒト起源のものである。ヒトTNH(全タンパク質)をエシェリキア・コリ(E. coli)で製造し、ネズミTNF及びヒトTNF突然変異体をピチエア・パストリス(Pichia pastoris)で製造した。Pennica, D.等、Nature、312:724-729(1981); Streekishna, K.等、Biochemistry、28:4117-4125(1989)中で記述されたものに類似した方法を用いてエシェリキア・コリまたはピチエアで組み換えTNFを製造した。マウスTNFをエシェリキア・コリまたはピチエアで製造した。

#### 実施例1

##### TNF- の比活性

ペジレーション(pegylation)前に、以下に記述するようにL929細胞障害性アッセイを用いて成熟組織壊死因子(TNF- ) (ヒト組み換え体)を試験した。TNF- の比活性は $10^6$  I.U. ユニット/mgであった。SDS-PAGEゲルのデンシトメトリーから材料が99%純粋であることが示された。

材料(16.8mg/mlで1ml、ピーターソン修飾(Peterson modification)、ウシ血清アルブミン(BSA)基準で、Bradford, M.M., Anal. Biochem.、72:248-254(1976)の方法により測定された)を3,000kDaカットオフセントリコン(Centricon)を用いて約0.1mlに濃縮した。次に、この材料を100mMリン酸バッファー、pH8.0で4mlに希釈し、0.1mlに再濃縮した。この手順を2回繰り返して、得られた材料を最後に1mlの総容量の同じバッファー中に集めた。

次に、タンパク質濃度をBradford、上記の方法により測定した。BSAを基準として用い、約0.6mgのタンパク質を回収した。

##### ペジレーション

上に引用したHarras, J.M.中に記述された一般法を用いてペジレーション反応を実施した。TNF(100mMリン酸バッファー、pH7.2-7.5中に1mg/ml)に、SS-PEGまたはNHS-PEGを10ないし50モル過剰で添加し、室温で1時間混合した。用いた特定のpH及びモル比はPEGの反応性で変わり、実験的に決定しなければならなかった。100kDaカットオフフィルターを用いて限外濾過によりPEG-TNFを未反応のPEG及びTNFから分離した。この実施例に参照として載せる

改変の各々において、TNFは5ないし9分子のPEGで改変された。PEG-TNFの純度をSDS-PAGEにより評価し、そしてこの方法により改変された第一級アミンのパーセントをS.J. Stocks(Anal. Biochem. 154:232(1986))により記述されたようにフロレスカミン(florescamine)を用いて測定した。SDS-PAGEの結果から、あるとしても非常にわずしか天然のTNF- がペジレーション後の調製物中に残っていないことが示された。

##### PEG-TNF- のインビトロ活性

細胞の継代数が分からないことを除いて、以下に記述する方法に従って実施するL-929細胞障害性アッセイを用いてインビトロ細胞障害性活性に関してPEG-TNF- を調べた。TNF- 出発材料の比活性は $1.5 \times 10^6$  ユニット/mgまたは最初の比活性測定の約半分であった。比活性の差は異なるタンパク質測定方法の使用及び未知の細胞継代数に起因すると考えた。

SS 5,000 MW PEG-TNF- の比活性は $0.7 \times 10^6$  ユニット/mgまたは天然の材料の比活性の約半分であった。SS 20,000 MW PEG-TNF- の比活性はSS 5,000 MW PEG-TNF- に類似した値の $0.8 \times 10^6$  ユニット/mgであった。

##### PEG-TNF- の致死率

スクリーニングとして、2匹のC57 b16マウス(メス、20-25g)に天然のTNF- またはSS-PEG-TNF- のいずれかを腹腔内(i.p.)に注入し、それらの動物の生存を調べた。用いた投与量は1,000、5,000及び10,000ユ

10

20

30

40

50

キットの活性であった。

天然のTNF- $\alpha$ では、以下の結果が得られた：

10,000 I.U. - 両方のマウスは翌朝に死亡した。

5,000 I.U. - 1匹のマウスは翌朝に死亡し；もう1匹のマウスは明らかな苦痛の状態にあり（毛は乱れ、ほとんど動かない）、2日後に死亡した。

1,000 I.U. - 1匹のマウスは翌朝に死亡し；もう1匹のマウスは苦痛の状態にあり（毛は乱れ、ほとんど動かない）、2日後にそのような弱った状態にあり、それを安楽死させた。

SS-PEG-TNF- $\alpha$ では、全ての投与量で全てのマウスが注入後2週間優れた健康状態のままであった。食べること及び飲むことであるような、行動は正常であった。毛に

10

変化はなかった（毛は乱れなかった）。全てのマウスを注入後15日目に安楽死させた。

PEG-TNF- $\alpha$ の血清半減期の測定  
Genzymeから入手したヒトTNFのELISAアッセイを用いた。製造業者により提示されるようにキットを用いた。TNF- $\alpha$ またはPEG-（100ユニット）のいずれかをマウスにi.p.注入し、図1に示す時間で後部眼窩出血から約25 $\mu$ lの血清を集めた。各群に全部で5匹のマウス（メス、C57 b16マウス、20-25g）であった。

天然のTNF- $\alpha$ （開いた丸）は非常に迅速に取り除かれ、ベースラインより上の唯一のデータ点は注入後30分であった。

SS 5,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた丸）は約4日の半減期であった。20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （開いた三角）の半減期は>15日であった。

20

以下に挙げる処置群を用いてこの実験を繰り返し、それらの結果を図2に示す：天然のTNF- $\alpha$ （開いた丸）；SS 5,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた丸）、SS 12,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた三角）；SS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （開いた三角）；NHS 12,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （閉じた四角）（及びNHS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ （開いた四角）が欠落？）。異なる処置群の血清半減期はNHS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ 及びSS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ では>15日；SS 5,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ では約4日；SS 12,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ では約6日；NHS 12,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ では約8日；そして天然のTNF- $\alpha$ では注入後30分であった。要約すると、各PEG-TNF- $\alpha$ は天然のTNF- $\alpha$ よりかなり長い半減期を示したが；しかしながら、NHS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ 及びSS 20,000 MW PEG-TNF- $\alpha$ はより低い分子量のPEGで改変されたTNF- $\alpha$ より著しく長い半減期(>15日)を有した。

30

PEG-TNF- $\alpha$ の抗腫瘍活性

B16黒色腫モデルを用いた。C57 b16マウス（メス、20-25g）の横腹に $1 \times 10^6$ 個のB16細胞をs.q.注入した。処置を開始する前に1週間腫瘍を成長させた。各処置群は5匹のマウスからなった。

処置群は：リン酸バッファーコントロール（pH7.5）、リン酸バッファー（pH7.5）中の天然のTNF- $\alpha$ （10 I.U.及び100 I.U.）及びリン酸バッファー（pH7.5）中のSS-PEG-TNF- $\alpha$ （10 I.U.、100 I.U.及び1000 I.U.）を含んだ。7日、14日及び21日目に週に1回マウスに0.1mlをi.p.注入した。動物の生存を記録した。

40

2週間（最初の処置後1週目）に、コントロール動物における腫瘍は完全に識別できた。SS-PEG-TNF- $\alpha$ で処置した動物はいずれも成長する腫瘍がないようであった。22日目に、表1に示す結果を得た：

表 1

処置群	結果
コントロール	4匹は死亡し、1匹は大きな腫瘍を有した
天然の TNF- $\alpha$	
10 I.U.	全ての動物は死亡した
100 I.U.	4匹は死亡し、1匹は大きな腫瘍を有した
5000 MW SS-PEG-TNF- $\alpha$	
10 I.U.	2匹は死亡し、3匹は大きな腫瘍を有した
100 I.U.	2匹は死亡し、2匹は腫瘍を有し、1匹は腫瘍がなかった
1000 I.U.	1匹は死亡し、3匹は小さな腫瘍を有し、 1匹は腫瘍がなかった
20000 MW SS-PEG-TNF- $\alpha$	
10 I.U.	0匹が死亡し、1匹は小さな腫瘍を有し、4匹は腫瘍がなかった
100 I.U.	全ての動物は腫瘍がなかった
1000 I.U.	全ての動物は腫瘍がなかった

180日後に、表2に示す結果を得た。

表 2

処置群	生存期間	平均
コントロール	18, 18, 20, 21, 24 日	20.2 日
天然の TNF- $\alpha$		
10 I.U.	17, 18, 19, 21, 21 日	20.2 日
100 I.U.	16, 18, 19, 19, 23 日	19.0 日
5000 MW SS-PEG-TNF- $\alpha$		
10 I.U.	20, 22, 24, 26, 27 日	23.6 日
100 I.U.	21, 22, 24, 26, 27 日	35.0 日
1000 I.U.	21, 49, 53 日; 2匹の動物が生存した	
20,000 MW SS-PEG-TNF- $\alpha$		
10 I.U.	38 日, 4匹の動物が生存した	
100 I.U.	全ての動物が生存した	
1000 I.U.	全ての動物が生存した	

これらの結果から、PEGでのTNFの改変がTNFの致死率を下げるだけでなく、約20,000分子量を有するPEGで改変されたTNFが驚くべき増大された循環半減期及び驚くべき著しく高められた抗腫瘍活性を示したことが示される。

これらの結果は多くの理由から意外である。高分子量のPEGでTNFを改変することがTNFの循環半減期を増すことを予測することはできなかった。実際、一般にタンパク質のクリアランス速度をそれらの分子量に基づいて予測することはできない。高分子量のPEGでのTNFの改変がTNFの殺腫瘍活性を減らさないだけでなく、実際は高めることは、高分子量の改変物(modifier)により生み出されると考えられる付加される立体障害を考慮すると意外である。なおさらに、改変されたTNFは、その増大した循環半減期のために、天然のTNFよりさらに有毒であると予測されており、それは事実ではなかった。

以下のものはこの実施例において利用する細胞障害性アッセイの説明である。

#### A. 材料

L929 繊維芽細胞 ATCC # CCL1 NCTC クローン 929 ダルベッコの修正必須培地(DMEM)

ウシ胎仔血清(GIBCO Laboratories, Grand Island, NY # 16000-010)

正常食塩水(Normal Saline)中1MのHEPESバッファー(BioWhittaker, Inc. # 17-737E)

ゲンタマイシン硫酸塩(BioWhittaker, Inc. # 17-518Z)

トリプシン-EDTA 1X(GIBCO Laboratories, # 25300-021)

トリパンブールステイン(GIBCO Laboratories, # 15250-01

2)

組織培養フラスコ、150 cm<sup>2</sup>、75 cm<sup>2</sup>、25 cm<sup>2</sup> (Corning, Inc., Corning, NY、#25120、#25110、#25100)

96ウェル細胞培養プレート、平底 (Corning, Inc., #25861)

12チャンネルピペッター (Titer tek)

ピペッター用滅菌チップ (Intermountain Scientific Corp., Bountiful, UT、#P-3250-8)

滅菌試薬容器 (Costar Corp., Cambridge, MA、#4870)

組み換えヒト腫瘍壊死因子 - (TNF-) (社内で製造した)

アルブミン、ウシ、MEM中10% (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN、#652237)

リン酸緩衝食塩水 (PBS)

ダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (DPBS) (GIBCO Laboratories、#310-4190)

マイクロタイタープレート読み取り装置 (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA、Emax)

B.L929 繊維芽細胞の増殖:

1. 以下のようにDMEM/10% FBS中で毎週2回継代することにより繊維芽細胞を維持する。フラスコから培地を吸引し、付着した細胞を残す。細胞単層を5 mlのトリプシン-EDTAで洗浄し、トリプシン-EDTAを吸引して除く。37 °Cで1ないし2分インキュベートする。15 mlのDMEM/FBSを添加して単層を洗浄し、トリプシンの酵素活性を止める。

2. 細胞を数え、トリパンブルー排除により生存度を評価する。T75フラスコ中の抗生物質を含まない30 mlのDMEM/FBS (FBS?) に  $1 \times 10^6$  の細胞を接種する。37 °C、5% CO<sub>2</sub>湿度調節 (humidified) インキュベーター中でインキュベートする。

3. アッセイのために、T150フラスコ中の60 mlのDMEM/FBSに  $2 \times 10^6$  の細胞を接種する。細胞が融合するまで (80-90%) フラスコを3または4日間インキュベートする。

C. TNF- $\alpha$  インビトロ細胞障害性アッセイ

1日目: 細胞の調製

1. 細胞をトリプシンで処理し、DMEM/FBSで  $1.22 \times 10^6$  細胞/mlの最終濃度まで希釈する。ゲンタマイシン硫酸塩を50  $\mu$ g/mlの最終濃度まで添加する。

$2 \times 10^6$  細胞の細胞数が各プレートに必要とされ、そしてT150フラスコから  $1.75 - 2 \times 10^7$  細胞を期待できる。

2. 96ウェル平底組織培養プレートの各ウェルに150  $\mu$ lの細胞懸濁液を添加することによりL929繊維芽細胞を平板培養する。37 °C、5% CO<sub>2</sub>湿度調節インキュベーター中で一晩インキュベートする。

2日目: サンプルの添加

1. 続ける前に、倒立顕微鏡を用いて各ウェルの融合性を調べる。各ウェルはアッセイが再現できるために同等に融合していなければならない。プレートの外側のウェルはこれらのウェルにおける細胞の不均一な増殖のためにアッセイ計算には用いない。最高感度のためには細胞は75ないし90%融合していなければならない。細胞の継代数が増すにつれて、細胞の倍加当たりの時間は減少する。従って、適切な融合性を得るために細胞数/ウェルを調整することができる。

2. TNF- $\alpha$  基準作業溶液を調製する。使用するまで4 °Cで保管する。

3. 2及び3列の1番目のウェルに150  $\mu$ lのTNF作業溶液を添加する。4ないし10列の1番目のウェルに150  $\mu$ lのサンプルを添加する。1、11及び12列にDMEM/FBS/ゲンタマイシンを添加する。1番目のウェルの中身を混合し、12チャンネルピペッターを用いて150  $\mu$ lを列の2番目のウェルに移すことにより2倍連続希釈物

10

20

30

40

50

を作製する。最後に、8番目のウェル(横列H)の中身を混合し、各ウェルから150 $\mu$ lを廃棄する。この時点で、全てのウェルは150 $\mu$ lを含むはずである。

4. プレートを37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>湿度調節インキュベーター中で20時間インキュベートする。

3日目:

20 $\mu$ lの3[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)(リン酸緩衝食塩水pH7.4中で25mg/ml)を培養プレートの各ウェルに添加し、培養物を37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートすることにより細胞の生存度を測定した。その期間の後に、培養上清を廃棄し、150 $\mu$ lのDMSOを各ウェルに添加した。各ウェルの570nmでの吸光度をマイクロタイタープレート読み取り装置を用いて測定した。コントロールの相加平均の50%に最も近いA<sub>540</sub>を示すウェルは、L929細胞の50%溶解(1ユニット)を表すとみなされる。

10

D. 溶液

TNF - 基準(10 $\mu$ g)

凍ったTNF - 基準を氷上で解かす。ねじ蓋クリオチューブ中に2 $\mu$ g/チューブで等分し、-80 $^{\circ}$ Cで保存する。

TNF - 基準ストック溶液(256ng/ml)

1つのチューブ(2 $\mu$ g)のTNF - 基準に、DPBS/ゲンタマイシン中1%のアルブミン7.81mlを添加する。1mlチューブに等分し、4 $^{\circ}$ Cで保存する。典型的には溶液を6カ月間使用する。

20

TNF - 作業溶液(0.8ng/ml)

2枚のプレートには、3.12 $\mu$ lのストック溶液を997 $\mu$ lのDMEM/FBS/ゲンタマイシンに添加する。(基準溶液は0.4ng/mlの最終濃度にマルチウェルプレートの1番目のウェル中で1:2に希釈される)。使用するまで4 $^{\circ}$ Cで保管する。

リン酸緩衝食塩水 1L (PBS、1x)

0.2gのKCl、0.2gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8gのNaCl及び1.14gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を900mlの水に溶解する。1Lまで適当量、pHを7.4に調整する。オートクレーブする。

実施例2

(Harras、上記中に記述された一般法に従って)PEGで改変されたヒト組み換えTNFのさらなるサンプルを調製し、それらの血清半減期及び比活性の保持に関して試験した。各場合において、TNFは約5ないし9分子のPEGで改変された。データ(表3)から、意外にも、約10000ないし40000、好ましくは約20000-30000のおおよその分子量平均を有するPEGで改変されたTNFが高い比活性を保持しながら著しく増大した血清半減期を示すことが示される。

30

Genzyme(Cambridge, MA)から入手したELISAアッセイを製造業者により提示されるように用いて、TNFの様々な配合物の血清半減期を測定した。ヘパリンを添加した50 $\mu$ lの毛細管を用いて後部眼窩集網叢から血清サンプルを集めた。TNFまたはPEG-TNF配合物のi.v.注入のすぐ前に処置前血液サンプルを集めた。処置後30分、24時間並びに3、7、12及び15日でさらなる血液サンプルを集めた。サンプルを遠心分離し、得られた上清をアッセイするまで-20 $^{\circ}$ Cで凍結して保存した。

40

表 3

処置	血清半減期(日)	保持された比活性 %
SS-PEG 5000 TNF- $\alpha$ (2 試験)	4, 4	55, 58
SS-PEG 12000 TNF- $\alpha$ (2 試験)	8, 8	52, 53
SS-PEG 20000 TNF- $\alpha$	16	56
SS-PEG 30000 TNF- $\alpha$	17	54
SS-PEG 40000 TNF- $\alpha$	17	55
SP-PEG 5000 TNF- $\alpha$	5	51
SP-PEG 20000 TNF- $\alpha$	8	53
分枝鎖 スクシンイミド-PEG 10000 TNF- $\alpha$	7	49
分枝鎖 スクシンイミド-PEG 20000 TNF- $\alpha$	16	52
分枝鎖 スクシンイミド-PEG 40000 TNF- $\alpha$	18	54

## 実施例 3

PEGで改変されたヒト組み換えTNFのさらなるサンプルを調製し、血清半減期及び比活性保持に関して試験した。表4に示すデータから、半減期及び比活性が利用するリンカーにより変わる可能性があることが示される。

表 4

処置 (#PEGの数/TNF)	血清半減期(日)	保持された比活性 %
SCM-PEG 5000 TNF- $\alpha$ (5-9 PEG's)	5	54
アミノ酸のスクシンイミジル エステル-PEG 5000 TNF- $\alpha$ (6-8 PEG's)	4	55
エポキシド PEG 8000 TNF- $\alpha$ (第1級アミノ結合部位) (9-12 PEG's)	6	38
エポキシド PEG 8000 TNF- $\alpha$ (ヒドロキシル結合部位) (10-20 PEG's)	5	0
グリシジルエーテル PEG 5000 TNF- $\alpha$ (15 PEG's)	12	0
ニトロフェニル PEG 5000 TNF- $\alpha$ (6-9 PEG's)	5	21
トリクロロフェニルカーボネート PEG 5000 TNF- $\alpha$ (12-15 PEG's)	5	11
PEG トレシレート 5000 TNF- $\alpha$ (10-12 PEG's)	2	8
PEG アルデヒド 5000 TNF- $\alpha$ (1 PEG)	<1	100
PEG アルデヒド 20000 TNF- $\alpha$ (1 PEG)	2	100
PEG イソシアネート 5000 TNF- $\alpha$ (5-12 PEG's)	9	19
PEG ビニルスルホン 5000 TNF- $\alpha$ (4 PEG's)	3	12
PEG マレイミド 5000 TNF- $\alpha$ (3 PEG's)	3	43

## 実施例 4

異なる種類の腫瘍細胞を注入したマウスに対する PEG で改変された組み換えヒト TNF の効果を評価するためにさらなる試験を実施した。これらの試験に利用する TNF を Harras、上記に記述されたような方法に従って SS-PEG 20000 で改変した。マウスに  $1 \times 10^6$  の腫瘍細胞を注入し、2 週後に、PEG-TNF を週に 1 回 3 週間 i.p. 注入した。未処置の動物より 5 倍長く生存する動物のパーセントとして治癒を定義した。結果を表 5 に示し、それにより、本発明の改変された TNF が黒色腫、腎臓腫瘍、結腸腫瘍及び乳腫瘍を処置することに有効であることが示される。

表 5

腫瘍型	細胞系	PEG-TNF の投与量 I.U.	% 治療
黒色腫	B16	10	75
		30	100
		100	100
腎臓	G401	10	80
		30	80
結腸	HT29	10	40
		30	60
		100	80
乳	MCF7	10	0
		30	0
		100	20
脳	SW1088	100	0
白血病	L1210	100	0
肝細胞癌	Hep3B	100	0

## 実施例 5

PEGで改変された、様々な起源からのTNFを評価するために試験を実施した。結果を表6に示す。

10

20

30

表 6

TNF タンパク質	比活性	LD50	低血圧 ED50	抗腫瘍 ED50
ピチエアで 製造された 組み換え ネズミTNF	$2.1 \times 10^7$ IU/mg	20 $\mu$ g	1 $\mu$ g	> 1000 IU
“- SS-PEG MW 20000 で改変された	$1.0 \times 10^7$ IU/mg	100 $\mu$ g	2 $\mu$ g	20 IU
エシェリキア・コリで 製造された 組み換えネズミ	$2.0 \times 10^7$ IU/mg	70 $\mu$ g	1 $\mu$ g	> 3000 IU
“- SS-PEG MW 20000 で改変された	$1.0 \times 10^7$ IU/mg	300 $\mu$ g	4 $\mu$ g	20 IU
アミノ酸 212-220 の欠失により 突然変異させた ヒトTNF	$2.1 \times 10^7$ IU/mg	60 $\mu$ g	1 $\mu$ g	> 2000 IU
“- SS-PEG MW 20000 で改変された	$0.9 \times 10^7$ IU/mg	100 $\mu$ g	5 $\mu$ g	10 IU
248, 592, 508 の リシンをアラニンに 変えることにより 突然変異させた ヒトTNF	$1.5 \times 10^7$ IU/mg	300 $\mu$ g	100 $\mu$ g	> 1000 IU
“- SS-PEG MW 20000 で改変された	$0.5 \times 10^7$ IU/mg	> 1000 $\mu$ g	> 100 $\mu$ g	5 IU

10

20

30

40

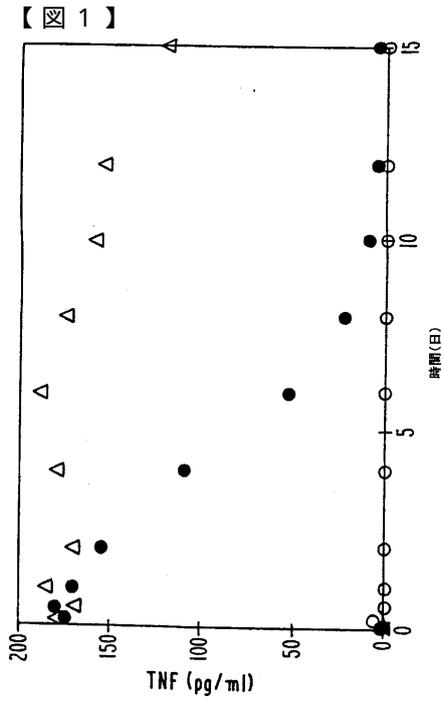


Fig.1

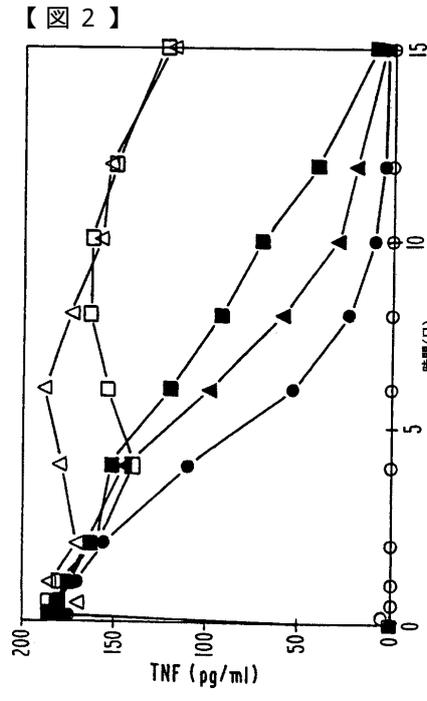


Fig.2

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/525

A61K 38/00

A61P 35/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed