

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6194350号
(P6194350)

(45) 発行日 平成29年9月6日(2017.9.6)

(24) 登録日 平成29年8月18日(2017.8.18)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 35/18	(2015.01)	A 6 1 K 35/18	Z
A 6 1 K 38/46	(2006.01)	A 6 1 K 38/46	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/7068	(2006.01)	A 6 1 K 31/7068	

請求項の数 19 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-500924 (P2015-500924)	(73) 特許権者	511238790
(86) (22) 出願日	平成25年3月21日 (2013. 3. 21)		エリテック・ファルマ
(65) 公表番号	特表2015-510918 (P2015-510918A)		フランス エフ-69008 リオン ア
(43) 公表日	平成27年4月13日 (2015. 4. 13)		ヴニユ ロックフェラー 60 パティマ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/055928		ン アデニン
(87) 国際公開番号	W02013/139906	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成25年9月26日 (2013. 9. 26)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成28年2月22日 (2016. 2. 22)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	61/613, 660		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成24年3月21日 (2012. 3. 21)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性骨髄性白血病 (AML) の処置のための薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性骨髄性白血病 (AML) を治療するための、赤血球の懸濁液であって、前記赤血球にはアスパラギナーゼが封入されており、懸濁液の一回用量が体重 1 k g 当たり 5 0 ~ 5 0 0 IU の封入されたアスパラギナーゼを含む、懸濁液。

【請求項 2】

懸濁液の一回用量が体重 1 k g 当たり 5 0 ~ 2 0 0 IU の封入されたアスパラギナーゼを含む、請求項 1 に記載の懸濁液。

【請求項 3】

懸濁液の一回用量が体重 1 k g 当たり 8 0 ~ 1 7 0 IU の封入されたアスパラギナーゼを含む、請求項 1 に記載の懸濁液。

【請求項 4】

懸濁液の一回用量が体重 1 k g 当たり 1 0 0 IU ~ 1 5 0 IU のアスパラギナーゼを含む、請求項 1 に記載の懸濁液。

【請求項 5】

同じ患者に投与される 2 つの用量が 14 日以上の間隔で投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の懸濁液。

【請求項 6】

同じ患者に投与される 2 つの用量が 14 日 ~ 45 日の時間間隔で投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の懸濁液。

10

20

【請求項 7】

懸濁液が、それを必要とする患者の誘導期に用いるためのものである、請求項1~6のいずれか一項に記載の懸濁液。

【請求項 8】

前記患者が子供、大人または高齢者である、請求項1~7のいずれか一項に記載の懸濁液。

【請求項 9】

前記患者が、集中的な化学療法を受けることができない患者である、請求項8に記載の懸濁液。

【請求項 10】

一つまたは複数の他の化学療法剤が用いられる化学療法プロトコルにおいて用いられる、請求項1~9のいずれか一項に記載の懸濁液。

10

【請求項 11】

前記他の化学療法剤がシタラビン、ミトキサントロン、アムサクリン、エトポシド、チオグアニン、プレドニソロン、ピンクリスチン、VP16、ダウノルビシン、アザシチジンまたはデシタビンである、請求項10に記載の懸濁液。

【請求項 12】

前記懸濁液がシタラビンと一緒に用いられる、請求項10に記載の懸濁液。

【請求項 13】

前記懸濁液が誘導期においてシタラビンと一緒に用いられる、請求項10に記載の懸濁液。

20

【請求項 14】

シタラビンが低用量レジメンで用いられる、請求項12または13に記載の懸濁液。

【請求項 15】

シタラビンが1~100mg/m²/dの低用量レジメンで用いられる、請求項12または13に記載の懸濁液。

【請求項 16】

シタラビンが5~50mg/m²/dの低用量レジメンで用いられる、請求項12または13に記載の懸濁液。

【請求項 17】

シタラビンが20または40mg/m²/dの低用量レジメンで用いられる、請求項12または13に記載の懸濁液。

30

【請求項 18】

AMLの治療の、一または複数の統合期において用いるための、請求項1~17のいずれか一項に記載の懸濁液。

【請求項 19】

以下のフェーズスキーム：

最初の28日期間

シタラビン 40mg/m²、D1~D10で、毎日、
D11でのアスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液、100IU/kg、

40

第12か月までの第2の28日期間

シタラビン 40mg/m²、D1~D10で、毎日、
D1でのアスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液、100IU/kg、

との、請求項12に記載の懸濁液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、急性骨髄性白血病（AML）の治療的処置に関する。特にこの癌の治療および関連する治療処置方法のための特定の新規組成物にも関する。

【背景技術】

【0002】

AMLは造血前駆細胞の異種クローン性障害および成人における最も一般的な悪性の骨髄障害である。AMLが現れる患者の年齢中央値は65歳前後である。

【0003】

過去30年間、L-アスパラギナーゼは、急性リンパ性白血病（ALL）に対する化学療法において重要な役割を担っている。現在、L-アスパラギナーゼは、小児および若年成人（<55歳）のためのすべての治療の誘導期中に使用されている。

10

【0004】

成人ではCapizzi R. L. および White C. (The Yale Journal of Biology and Medicine 61 (1988) 11-22)が難治性の、または最初の再発の、AMLの成人患者において、AMLにおける、L-アスパラギナーゼの重要な利点を報告している。患者は、高用量シタラビンおよび6,000 IU/m²のアスパラギナーゼを受けた。

【0005】

Okada S. ら (British Journal of Haematology 2003, 123, 802-809)は、子供の頃のAMLの異なるサブタイプについて、in vitroでのL-アスパラギナーゼの潜在的有効性を検討してきた。結論として、AMLのM1、M4及びM5型からの細胞は、L-アスパラギナーゼに比較的敏感であり、M1細胞と一緒にではより敏感である。

20

【0006】

Rubnitz JEら (Blood 2009, 113, 21, 5083-5089)は、小児の急性混合系統白血病の治療に関心を寄せていた。彼らは、AML指向療法による完全寛解を達成することができなかった患者はしばしばプレドニゾン、ピンクリスチンおよびL-アスパラギナーゼのレジメンで誘導することができたことを観察した。著者らは、混合型白血病に対する治療を、患者の応答が不十分な場合はグルココルチコイド、ピンクリスチンおよびL-アスパラギナーゼとリンパ系型導入療法への移行のための準備と一緒に、AML-型の導入療法の一コースで始めることを提案している。

【0007】

しかし、小児および若年成人のための現在の標準療法は、L-アスパラギナーゼの投与を含んでいてもよい場合は、酵素は、特に第三の統合期の間、治療に遅れて投与される。最終的には、L-アスパラギナーゼは診断されたばかりの患者のための診療所での導入期（AMLに対する最初の処理）では使用されない。

30

【0008】

また、AMLの高齢患者のための標準的な治療は、予後不良を伴う。L-アスパラギナーゼ、ピンクリスチンおよびプレドニゾンおよび達成完全寛解を誘導した、AMLの66歳の日本人女性のケースが知られている。しかし、多くの場合、高齢の患者は集中的な化学療法に不向きであり、強力な化学療法を受けられず、そして唯一、対症療法だけが利用可能である。

【0009】

アスパラギナーゼは、抗白血病化学療法において約30年間使用されている細菌微生物（大腸菌またはエルウィニア・クリサンテミ（*Erwinia chrysanthemi*）から産生される酵素である。この酵素は、加水分解及びアスパラギン、細胞の生命のために必要なタンパク質の産生のための必須アミノ酸を枯渇させる。ここで、正常細胞とは対照的に、特定の癌性リンパ芽球細胞は、それら自体アスパラギンを生成する能力を有さず、それらのタンパク質の合成のために細胞外の供給源に依存している。アスパラギナーゼでの処置は、この必須の構成をそれらから奪うので、それらの死につながる。この抗有糸分裂剤は、腫瘍細胞に対して選択的である。

40

【0010】

この酵素に関連する望ましくない影響はよく知られており、主なものは、臨床症状を有

50

する特定のアレルギー、糖尿病、膵炎、精神障害および凝固障害である。特に、天然のアスパラギナーゼは、アスパラギナーゼの排出の増加、およびアレルギー反応を引き起こす循環抗体の産生を誘導し、時には、非常に厳しい。さらに、酵素の半減期が短く（24時間）、反復注射と入院を必要とする。これは、ペグ化形態、PEG-アスパラギナーゼの開発につながり、急性リンパ芽球性白血病（ALL）のファーストライン治療のためにFDAによって承認された。最終的には、抗体の誘導は、アスパラギナーゼの三つの形式（大腸菌、エルビニアおよびPEG-アスパラギナーゼ）で観察されており、PEG型は最も免疫原性でないようである。アレルギー反応の治療後の早期停止の理由により、規定された期間にプラズマアスパラギンの枯渇を達成するというアスパラギナーゼの治療目的は、非常にしばしば達成されない。

10

【0011】

治療指数を向上させるための、赤血球におけるアスパラギナーゼの封入は、開発研究の主題であった。赤血球中に封入されたアスパラギナーゼの耐性研究がKravtsoffらによって行われた（C. Eur J Clin Pharmacol, 1996; 51 (3-4): 221 -5）。主に非ホジキンリンパ腫を患っている13人の患者に、赤血球に封入されたアスパラギナーゼ（30-200 IU/kg）の注射を行った。研究は、アスパラギナーゼ（27%）の直接注射と比較して、アレルギー反応が存在しないことを実証した。また、赤血球中に封入されたアスパラギナーゼの注入によって、50日間連続して持続するアスパラギンの枯渇が可能となった。

【0012】

一方、異なる研究によって、アスパラギナーゼの赤血球中での封入ならびにリンパ腫および急性リンパ芽球性白血病のための適用の流れの中で封入された酵素の薬物動態学的特性が記載されている（WO-A-2006/016247; Millan C G et al., Journal of Controlled Release, 2004, 95(1):27-49; Kravtsoff R et al., Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1990, 42(7):473-476）。

20

【0013】

最終的に、AMLに対する現在の治療に代わるものを見つけることに大きな必要性があり、すでに強力な化学療法の対象である子供や若年成人のためだけでなく、集中的な化学療法は現時点で不可能である不適応患者、特に、高齢者のためにも有益である。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0014】

【特許文献1】国際公開公報WO-A-2006/016247号

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Capizzi R. L. and White C. (The Yale Journal of Biology and Medicine 61 (1988) 11 -22)

【非特許文献2】Okada S. et al., British Journal of Haematology 2003, 123, 802-809

【非特許文献3】Rubnitz JE et al., Blood 2009, 113, 21, 5083-5089

【非特許文献4】Kravtsoff et al., C. Eur J Clin Pharmacol, 1996; 51 (3-4): 221 - 5

40

【非特許文献5】Millan C G et al., Journal of Controlled Release, 2004, 95(1):27-49

【非特許文献6】Kravtsoff R et al., Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1990, 42(7):473-476

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明者らは、赤血球の内部に封入されたL-アスパラギナーゼを使用することによって、この目標を達成することができるそのような代替案が提案されることを見出した。特に

50

、この封入された形は、懸濁液形態の下で、特に注入可能、投与可能である。これは、第1のAMLの治療または新たに診断されたAML患者を受ける患者における誘導期を特に含む、化学療法治療の任意の段階で使用することができる。本発明者らはまた、この治療は新たに診断されたAML不向き患者、特に高齢患者を含む、集中的な化学療法不適格患者に適格であることを見出した。強力な化学療法の対象となることができなかつた患者が今や効率的な化学療法で治療することができるようになっただけでなく、ハイレベルな望ましくない影響によって以前には回避されていた、非常に効率的な分子、L-アスパラギナーゼの投与から利益を得ることもできる。商業的なGRASPA（登録商標）製品は、本発明を実行するために使用することができる、L-アスパラギナーゼを封入したヒト赤血球の懸濁液の一例である。

10

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明の第一の目的は、急性骨髄性白血病（AML）を治療するための薬剤としての、アスパラギナーゼを封入した赤血球の懸濁液である。

【0018】

本発明の第二の目的は、急性骨髄性白血病（AML）を治療するための医薬の製造のための、アスパラギナーゼを封入した赤血球の懸濁液の使用である。

【0019】

本発明の第三の目的は、アスパラギナーゼを封入した赤血球の懸濁液の有効量を投与することを含む、急性骨髄性白血病（AML）を治療する方法である。

20

【0020】

ここで提示される追加の特徴およびさまざまな実施形態は、本発明の第一、第二および第三のオブジェクトに適用される。

【0021】

ある実施形態において、患者は高齢者である。一般的に、高齢者は65歳以上の人である。

【0022】

別の実施形態では、患者は大人（65歳未満）、ヤングアダルト（<55歳）、または子供である。

【0023】

ある実施形態では、任意のAML患者は、FAB M3サブタイプの患者を除外して処理される。

30

【0024】

ある実施形態では、FAB M1サブタイプの患者が治療される。ある実施形態では、FAB M4サブタイプの患者が治療される。ある実施形態では、FABのM5サブタイプの患者が治療される。ある実施形態では、FAB M1、M4、M5のサブタイプの患者が治療される。他の実施形態では、FAB M1およびM4、M1とM5、またはM4、M5のサブタイプの患者が治療される。

【0025】

ある実施形態では、低レベルのアスパラギン合成酵素（ASNS）を発現するAML腫瘍細胞を有する患者が治療される。

40

【0026】

実施形態では、患者は、強力な化学療法に適さないものである。「強力な化学療法に適さない」とは、化学療法の標準プロトコルに関連した毒性をサポートしていないまたはサポートしない可能性がある患者を意味する。このような患者は、任意の集団において遭遇する。それは、65歳以上の、特に人の高齢者人口においてより一般的である。

【0027】

典型的には、赤血球は、薬学的に許容される生理食塩水に懸濁している。これは、赤血球用の標準培地、おそらく、グルコース、デキストロース、アデニンおよび/またはマンニトールのような追加の成分との、特にNaCl（好ましくは0.9%）の溶液であってもよい。使用できる標準的な培地は、アデニン、グルコース、マンニトールおよび塩化ナトリウ

50

ムをベースにした溶液であるSAGマンニトール及びADsolである。溶液はさらに、L-カルニチンなどの保存剤を含むことができる。

【0028】

実施形態では、懸濁液の単回投与は、体重kgあたり封入されたアスパラギナーゼ50~500 IU、より好ましくは50~200 IU、さらに好ましくは80~170 IUを含む。典型的な用量は、体重kg当りアスパラギナーゼ100 IU~150 IUである。定義によると、用量は所与の時間に患者に投与されるアスパラギナーゼの量である。

【0029】

封入とは、酵素が赤血球の内部に含まれていることを意味する。アスパラギナーゼのいくらかのマイナーな量は、赤血球の壁内に保持され得る。

【0030】

投与は、好ましくは静脈内または動脈内注射によって行われる。便利な態様において、投与は、血液バッグなどから灌流することにより行われる。投与は、典型的には、腕に、またはセントラルカテーテルを介して、静脈内に行われる。

【0031】

典型的には、一用量は、灌流や注入され、これは約15~45分続いてもよい。

【0032】

ある実施形態では、懸濁液の用量は、2回の投与間の遅延時間をあけて同じ患者に投与される。遅延時間は、一般的に上記または14日に等しい。これは、14~45日であってよい。約45日間の最長遅延時間は、先行する用量または薬物による治療の結果として開発された形成不全を有する患者に特に適合する。医師は、形成不全の終了を監視し、形成不全の回復後アスパラギナーゼの前記投与量を投与することができる。

【0033】

本発明によれば、懸濁液は、すでに決定されているアスパラギナーゼの投与量を患者に送達するのに十分である量の、赤血球と封入されたアスパラギナーゼを含む。典型的には、本発明の懸濁液は、1ミリリットル当たり30~300IU、好ましくは70~150IUの封入されたアスパラギナーゼを含有することができる。

【0034】

懸濁液はすぐに使用することができ、希釈することなく、注射によるまたは灌流による投与に適したヘマトクリットを有することができる。

【0035】

ある実施形態では、懸濁液は、すぐに使用することができる。本発明によれば、使用できる状態の懸濁液のヘマトクリット値は、有利には約40~70%、好ましくは約45~約55%、及びより好ましくは約50%である。

【0036】

別の実施形態では、懸濁液は、注射又は灌流による投与の前に、例えば、使用前に希釈しなければならない。そのような使用前に希釈する懸濁液の実施例は、希釈前のヘマトクリットが60~90%の間にある。

【0037】

懸濁液は、好ましくは約10~約250 mlの容量でパッケージングされる。パッケージングは、輸血に適したタイプの血液バッグであることが好ましい。好ましくは、処方箋に対応する封入されたアスパラギナーゼの量の全体が、1つの血液バッグ等に含まれている。また、いくつかの血液バッグ等に含有させてもよい。

【0038】

非常に有利な実施形態では、本発明の懸濁液は、それを必要とする患者における最初の意図 (first intention) において使用するためのものである。患者はAMLの診断が行われたばかりか、AMLに対して最初に処理される者であってもよい。患者は、再発した者でもよいし、再発したことがある者でもよい。最初の意図における使用とは、懸濁液は、誘導期 (寛解を誘導するように設計された第1の治療段階) の間、治療または新たな治療の開始時に使用されることを意味する。本発明により、早期にアスパラギナーゼを投与する、

10

20

30

40

50

強力な化学療法にアスパラギナーゼを使用することができるようになる。

【発明を実施するための形態】

【0039】

つまり、具体的な態様は、次のとおりである。

- 本発明の懸濁液は、AMLに対する治療の誘導期の中に、薬剤として使用するためのものである。
- AMLに対する治療における誘導期の中に投与される医薬の調製のための本発明の懸濁液の使用。
- AMLに対する治療の誘導期の中に本発明による懸濁液を投与することを含む、AMLの治療方法。

10

【0040】

これらの実施形態は、非常に有利に適さない患者を含めて、それを必要とするあらゆる患者に適用することができる

【0041】

患者にとって有益であるプロトコルでは、寛解を誘導し、たとえば導入期は、一般的に2または3のいくつかの統合期が後に続いてよい。本発明の懸濁液は、治療プロトコル中の任意の時点で、すなわち、任意のまたは全ての誘導および統合期で使用されてもよい。ある実施形態では、懸濁液は、すべての時期（フェーズ）で使用される。

【0042】

ある実施形態では、懸濁液は、マルチ療法または併用療法で患者の急性骨髄性白血病（AML）を治療するための薬剤として使用される。これは、アスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液が、1つまたはいくつかの他の化学療法剤が使用される化学療法プロトコル内で使用されることを意味する。

20

【0043】

別の化学療法剤により、AMLの治療のための任意の標準的または新規の化学的または生物学的物質を意味する。いくつかの例には、シタラビン（例えばAracytine（登録商標）またはAraC）ミトキサントロン、アムサクリン、エトポシド、チオグアニン、プレドニゾン、ピンクリスチン、VP16、ダウノルピシン、アザシチジン、デシタピンが含まれる。

【0044】

特定の実施形態では、別の化学療法剤は、シタラビンである。シタラビンは、低用量レジメンまたは高用量レジメンで使用することができる。低用量とは、標準的なプロトコルで使用される低用量レジメンと呼ばれるものである。低用量は、典型的には、10または20 mg/m²、一般的には一日二回である。対照的に、高用量レジメンは、200mg/m²/d（d=日）以上のオーダーである。低用量は、1~100 mg/m²/dの範囲で定義され、特に5~50mg/m²/dである。

30

【0045】

ある実施形態では、シタラビンは毎日、好ましくは5~15の連続日の間、特に8~12日間、例えば10日間投与される。

【0046】

ある実施形態では、急性骨髄性白血病（AML）を治療するための方法は、アスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液の有効量を投与することを含み、下記誘導期スキーム：

40

第1月

シタラビン

- 1~100 mg/m²/d、特に5~50mg/m²/d、例えば20、30または40 mg/m²/d、
- 5~15日間、特に8~12日間、例えば10日間、好ましくはD1~D10において、

アスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液

- 体重1kg当り封入されたアスパラギナーゼ50~500 IU、好ましくは50~200 IU、より好ましくは80~170 IU;典型的な用量は、100 IU及び150 IUである、
- 最後のシタラビン投与後に一用量の投与。

50

【 0 0 4 7 】

最後のシタラビン投与後1回用量の投与、導入期の終わり、すなわち第12月までの第2月、毎月
シタラビン

- 1~100 mg/m²/d、特に5~50mg/m²/d、例えば20、30または40 mg/m²/d、
- 5~15日間、特に8~12日間、例えば10日間、好ましくはD1~D10において、

アスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液

- 体重1kg当り封入されたアスパラギナーゼ50~500 IU、好ましくは50~200 IU、より好ましくは80~170 IU;典型的な用量は、100 IU及び150 IUである、
- D1、D2およびD3における一用量の投与。

10

【 0 0 4 8 】

ある実施形態では：

第1の28日の期間

シタラビン40 mg/m²、例えば20 mg/m² 投与(1日2回)、D1~D10、毎日
D11でのアスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液一用量100IU/kg

【 0 0 4 9 】

第2の28日の期間、第12か月まで

シタラビン40 mg/m²、例えば20 mg/m² 投与(1日2回)、D1~D10、毎日
D1でのアスパラギナーゼ封入赤血球の懸濁液一用量100IU/kg

20

【 0 0 5 0 】

ある実施形態において、ミトキサントロンは、同じ期間中、特に誘導期に、懸濁液及びシタラビンと関連している。

【 0 0 5 1 】

アスパラギナーゼ自体は、CAS番号：9015-68-3で指定される。その標準的な名前はアスパラギナーゼである。そのための他の一般的な名前は次のとおりである。コラスパーゼ、L-アスパラギナーゼおよびL-アスパラギンアミノヒドラーゼ。

【 0 0 5 2 】

本発明の意味における用語アスパラギナーゼは、任意の起源のアスパラギナーゼをカバーし、特に天然又は組換え体由来のものでよく、例えばPEG形態のようなアスパラギナーゼを組み込んだ任意の誘導体、又はLアスパラギナーゼ活性を保持するフラグメントでもよい。また、その細菌起源にかかわらずアスパラギナーゼもカバーする。したがって、アスパラギナーゼは、大腸菌型、特に大腸菌HAP-A-1-3、エルウィニア(Erwinia chrysanthemi)型、またはウォリネラ属サクシノゲネス(Wolinella succinogenes)型であってもよい。「型」は、それが問題の菌の培養物から得ることができるか、または組換えであり得ることを意味し、言い換えれば、遺伝子工学によって得られる細菌のアスパラギナーゼの形態をであることを意味すると理解される。好ましい実施形態では、大腸菌HAP-A-1-3型のものである。

30

【 0 0 5 3 】

用語アスパラギナーゼはまた、本発明の意味において、L-アスパラギンアミノヒドロ活性を有する細菌酵素であるアスパラギナーゼ様物質をカバーしている。一例として、アシネトバクター・グルタミナーゼアスパラギナーゼ(AGA)が挙げられる。

40

【 0 0 5 4 】

赤血球は、好ましくはヒト起源のものである。ある実施形態では、赤血球は、患者自身からのものである。

【 0 0 5 5 】

赤血球中の有効成分の封入の技術は知られており、ここで好ましい、溶解・再シールによる基本的な技術は特許EP-A-101 341及びEP-A-679 101に記載されており、当業者は参照することができる。この技術によれば、透析ユニットの一次区画(例えば、透析バッグまたは透析カートリッジ)は連続的に、赤血球の懸濁液が供給されるのに対し、二次コンパ

50

ートメントは赤血球を溶解するために赤血球の懸濁液に比べて低張の水溶液が含まれており;次に、再シールユニットにおいて、浸透圧および/または膠質浸透圧の増加による赤血球の再封がアスパラギナーゼの存在下で誘導され、その後アスパラギナーゼを含む赤血球の懸濁液が収集される。

【0056】

これまでに記載したバリエーションの中で、WO-A-2006/016247に記載された方法は、効率的で再現性、信頼性が高く、安定的なやり方でアスパラギナーゼを封入することができ、好ましい。この方法は以下の段階を含む：

1 - 65%以上のヘマトクリットレベルの赤血球ペレットの等張液中の懸濁液、冷蔵1~8、

2 - この同じ小体ペレットからの赤血球の試料を用いた浸透圧抵抗の測定、段階1および2は任意の順序(平行を含む)で実行することが可能

3 - アスパラギナーゼの溶解および内在化、同じエンクロージャ内で、常に1と8の間で維持された温度で、透析カートリッジに、マトクリットレベル65%以上の赤血球および+1 と+8 の間に冷蔵された低張溶解溶液の懸濁液を通過させることを含み、溶解パラメータは以前に測定された浸透圧抵抗に基づいて調整される；および

4 - 内部温度が+30 と40 の間である第2の筐体および高張液の存在下で行われる再シーリング手順。

【0057】

「内在化」は、赤血球の内部へのアスパラギナーゼの浸透を意味すると理解される。

【0058】

特に、透析のために、赤血球ペレットは等張溶液中に、65%以上で、より好ましくは70%以上の高いヘマトクリットレベルで懸濁し、この懸濁液を+1 と+8 の間、好ましくは+2 と+6 の間、典型的には約4 で冷却する。特定の態様によれば、ヘマトクリットレベルは、好ましくは70~80%、65~80%の間にある。

【0059】

浸透圧抵抗は、有利には、懸濁液中のアスパラギナーゼの存在または不存在下で、溶解段階の直前に、赤血球で測定される。赤血球、またはそれらを含む懸濁液は、有利には、溶解のために選択された温度に近いか同一の温度である。本発明の別の有利な特徴によれば、行われた浸透圧抵抗の測定は、迅速に利用され、言い換えれば溶解手順は、サンプルが採取された直後に行われる。好ましくは、サンプリング及び溶解の開始の間の時間経過は、30分以下、より好ましくは25分以下、さらには20分である。

【0060】

浸透圧抵抗の測定と許容を伴う、溶解 - 再封鎖手順を運用する方法に関する詳細については、当業者は、WO-A-2006/016247を参照することができるであろう。

【0061】

本発明は、非限定的な例として取られる実施の形態を用いてより詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】アスパラギナーゼまたは封入されたアスパラギナーゼの半減期の計算方法を示すグラフである。

【図2】アスパラギナーゼまたは封入されたアスパラギナーゼの半減期の計算方法を示すグラフである。

【実施例】

【0063】

実施例1：マウス赤血球でのL-アスパラギナーゼの封入のための方法

透析袋中の低張透析法によりL-アスパラギナーゼ(Kidrolase(登録商標)、OPI-EUSA Limonest France)をマウス赤血球(OF1マウス)中に封入する。血液は、血漿を除去するために事前に遠心分離し、その後、0.9%NaClで3回洗浄する。ヘマトクリットは、アスパラギナーゼの存在下で70%に調整し、透析を開始する前に、400 IU/mlの赤血球または赤

10

20

30

40

50

血球（RBC）の最終濃度に添加する。透析は低浸透圧の溶解バッファーに対して4 で50分間続ける。マウス赤血球を、次いで、高オスモル濃度溶液の添加を介して再封鎖して37 で30分間インキュベートする。0.9%のNaClで2回洗浄し、ウシ血清アルブミンBSA（6%）を補充したサグ-マンニトールで1回の洗浄の後、赤血球をヘマトクリット50%に調整する。L-アスパラギナーゼを封入した赤血球は、L-Aspa RBCと呼ばれる。封入により、50%ヘマトクリットでの40 IUのアスパラギナーゼ/ml RCの濃度で、L-Aspa RBCが生成される。

【0064】

封入手順の間に、全血、洗浄RBCを、（透析前）L-アスパラギナーゼと混合したRBC、およびL-アスパラギナーゼ（透析後）と一緒にロードされたRBCを、以下：

- ヘマトクリット（Ht）
- 平均赤血球容積（ACV）
- 平均赤血球ヘモグロビン濃度（ACHC）
- 総ヘモグロビン濃度、および
- 細胞数

について試験する。

【0065】

L-アスパラギナーゼ酵素活性の測定のため、細胞懸濁液のアリコート低張透析の前後に回収する。L-アスパラギナーゼの推定は、Orsonneau et al., Ann Biol Clin, 62: 568-72に発表されたプロトコルに従って行った。

【0066】

実施例2：マウスにおけるL-Aspa RBCの薬物動態学および薬力学的パラメータの決定
マウスにおける循環中のL-Aspa RBCの半減期を決定するために、およびマウスの血漿中のL-アスパラギンの枯渇を実証するために、マウスL-Aspa RBCをOF1マウスに注射した。200IU/kgの単回用量を、静脈内経路により各マウスに注射した。

【0067】

L-Aspa RBCの半減期は 12.39 ± 0.74 日である（酵素の活性に基づいて計算）。マウスL-Aspa RBCの半減期は、細胞標識（CFSE-L-Aspa RBC）を介して算出すると、値は 16.52 ± 3.13 日であり、単にCFDA-SEで標識したRBC（CFSE RBC）では 15.83 ± 3.31 日である。

【0068】

血漿L-アスパラギンの枯渇は、合計（ $< 2 \mu\text{M}$ ）であり、L-Aspa RBCの注射後15分で得られ、そして少なくとも20日間持続する。

【0069】

【表1】

表1：L-Aspa RBCおよびCFDA-SEで標識したマウスRBC（CFSE RBC）について得られた薬物動態データ

	RBC		L-アスパラギナーゼ	
	24時間生存率（%）	半減期（日）	24時間生存率（%）	半減期（日）
L-Aspa RBC			57.9 ± 2.5	12.39 ± 0.74
CFSE-L-Aspa RBC	80.7 ± 0.7	16.52 ± 3.13	76.7 ± 1.4	12.20 ± 1.38
CFSE RBC	92.7 ± 2.6	15.83 ± 3.31		

【0070】

半減期は、以下のように計算した。

プロット方程式から得られたインターセプトポイントを2で除算する。次に横軸の対応する値は、プロットにタンクを算出する。

計算されたインターセプトポイントは2,8461ある、算出例を図1に示す。
インターセプトポイントの半分：1.42

横軸の対応する値の計算： $1.42 = (-0.1145 * X) + 2.8$ 、 $X = (1.42 - 2.8) / 0.1145 = -1.38 / -0.1145 = 12$ 日

【0071】

よりリアルな半減期は、図2に示すように、縦軸のスケールは対数スケールであり、横軸のスケールは、リニアスケールであることを特徴とする第二の方法で計算することができた。

半減期は、以下のように計算される：

曲線の $\ln(2)$ /プロット係数

(図1と同じ例である) 図2の例では、半減期は、

$\ln(2) / 0.083 = 8.3$ 日。

【0072】

【表2】

表2：L-Aspa RBC及び遊離L-アスパラギナーゼの時間の関数としての残留L-アスパラギナーゼ活性の測定

時間							
	15分	24時間	3日	9日	14日	20日	残留アスパラギナーゼ活性 (%)
L-Aspa RBC	100	57.1	46.9	39.8	24.9	10.6	
遊離L-Aspa	100	3.3	0	0	0	0	

【0073】

さらに、循環血漿のL-アスパラギナーゼ推定は、マウスにL-Aspa RBCを注射した後24時間を超えて、得られた値は、アッセイの検出限界(1~3IU/リットル)であることを示している。

【0074】

実施例3：ヒト赤血球におけるL-アスパラギナーゼの封入

WO-A-2006/016247に記載された方法を用いてL-アスパラギナーゼを封入した赤血球のバッチを生成した。WO-A-2006/016247の教示に従い、浸透圧抵抗を考慮して、溶解パラメータはそれに応じて調整した(透析カートリッジ内の赤血球懸濁液の流量を調整した)。この方法はさらに、患者の体重および投与されるL-アスパラギナーゼの用量を考慮した医師の処方に合わせて行われた。最終製品の仕様は以下のとおりである：

- 平均赤血球容積(MCV)：70~95 FL
- 平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)：23~35g/dL
- 懸濁液の細胞外ヘモグロビン 0.2g/dL
- 浸透圧抵抗 NaCl 6g/L
- 赤血球の平均L-アスパラギナーゼ濃度：78~146 IU/mL
- 細胞外L-アスパラギナーゼ全酵素活性の2%。

このようにして得られた赤血球の懸濁液はGRASPA(登録商標)と呼ばれ、文献に記載されている。

【0075】

比較例4：子供および60歳前の若年成人のための、AMLに対する標準的な化学療法治療

誘導：

アラシチン(Aracytine) 200mg/m²/d × 7日

10

20

30

40

50

ミトキサントロン12 mg/m²/d × 5日

初回統合：

21日目以降

アラシチン 3g/m² × 2/d × 3日

アムサクリン 100mg/m²/d × 3日

第二回統合：

アラシチン 200 mg/m²/d × 4日

VP16 100 mg/m²/d × 4日

ダウノルピシン 40 mg/m²/d × 4日

10

第三回統合：

アラシチン 3 g/m² × 2/d D1、D2、D8、D9に

L-アスパラギナーゼ（遊離形態） 6000IU/m²/d

【0076】

比較例5：不適格患者のための、AMLに対する標準的な化学療法治療

これらの患者はアラシチンおよび/または他の薬物、緩和治療で治療される。不適格患者は、酵素を許容することはできないので、L-アスパラギナーゼは、これらの患者に使用されていない。

20

【0077】

実施例6：高齢者を含む不適格患者を含む任意の患者のための発明に係る治療；誘導期第1の28日間

シタラビン（Ara-C）20mg/m² 投与（一日二回）、D1～D10で、毎日、

GRASPA（登録商標）（アスパラギナーゼ封入赤血球、懸濁液中）、100 IU/kg、D11で

第12か月までの第2の28日間

シタラビン（Ara-C）20mg/m² 投与（一日二回）、D1～D10で、毎日、

GRASPA（登録商標）、100 IU/kg、D1で

【0078】

実施例7：高齢者を含む不適格患者のための本発明による治療

実施例6の誘導期は完全な回復まで、または死亡した日までの月間処理により寛解患者で続けられた。

シタラビン（Ara-C）20mg/m² 投与（一日二回）、D1～D10で、毎日、

GRASPA（登録商標）、100 IU/kg、D1で

【0079】

実施例8：子供と大人のための本発明による治療

実施例6の誘導期は、連結相、典型的には2または3の統合期が続く。

好ましくは、GRASPA（登録商標）100IU/kgは任意に、またはいくつかの統合期で他の化学療法剤と一緒に、使用される。ある実施形態では、GRASPA（登録商標）100IU/kgをすべての統合期で使用する。

40

【0080】

実施例9：子供および成人の高用量アラシチンによる治療；誘導期

第1実施形態

アラシチン 200mg/m²/d × 7日

ミトキサントロン12 mg/m²/d × 5日

1回用量GRASPA（登録商標）、100 IU/kg、D1で

第2実施形態

アラシチン 200mg/m²/d × 7日

50

ミトキサントロン $12 \text{ mg/m}^2/\text{d} \times 5$ 日
 1回用量GRASPA (登録商標)、100 IU/kg、D1で

【 0 0 8 1 】

実施例10：実施例9による誘導相後の統合

初回統合：

21日目以降

アラシチン $3 \text{ g/m}^2 \times 2/\text{d} \times 3$ 日

アムサクリン $100\text{mg/m}^2/\text{d} \times 3$ 日

1回用量GRASPA (登録商標)、100 IU/kg

第二回統合：

アラシチン $200 \text{ mg/m}^2/\text{d} \times 4$ 日

VP16 $100 \text{ mg/m}^2/\text{d} \times 4$ 日

ダウノルピシン $40 \text{ mg/m}^2/\text{d} \times 4$ 日

1回用量GRASPA (登録商標)、100 IU/kg

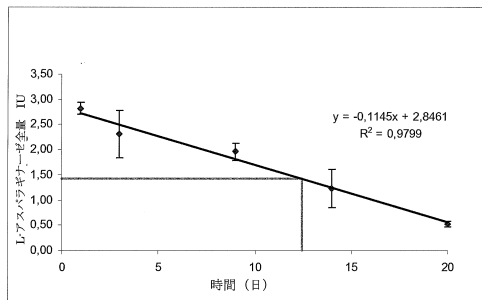
第三回統合：

アラシチン $3 \text{ g/m}^2 \times 2/\text{d}$ D1、D2、D8、D9に

1回用量GRASPA (登録商標)、100 IU/kg

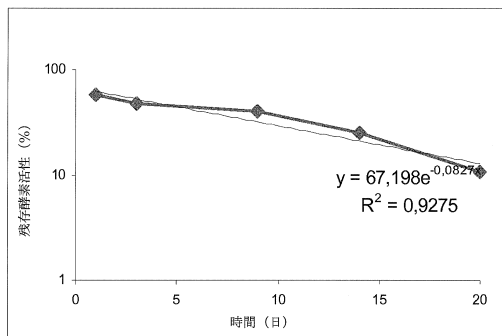
【 図 1 】

半減期の第1の計算方法



【 図 2 】

半減期の第2の計算方法



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/136	(2006.01)	A 6 1 K 31/136
A 6 1 K 31/473	(2006.01)	A 6 1 K 31/473
A 6 1 K 31/7048	(2006.01)	A 6 1 K 31/7048
A 6 1 K 31/573	(2006.01)	A 6 1 K 31/573
A 6 1 K 31/475	(2006.01)	A 6 1 K 31/475
A 6 1 K 31/704	(2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K 31/706	(2006.01)	A 6 1 K 31/706

(72)発明者 ヤン・ゴドフラン
フランス・69004・リヨン・リュ・アンリ・ゴルジュ・23

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 特表2011-507935(JP,A)
米国特許出願公開第2010/0143324(US,A1)
J. Controlled Release, 2004, Vol.95, pp.27-49
J. Pharm. Pharmacol., 1990, Vol.42, pp.473-476

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 1 8
A 6 1 K 3 1 / 1 3 6
A 6 1 K 3 1 / 4 7 3
A 6 1 K 3 1 / 4 7 5
A 6 1 K 3 1 / 5 7 3
A 6 1 K 3 1 / 7 0 4
A 6 1 K 3 1 / 7 0 4 8
A 6 1 K 3 1 / 7 0 6
A 6 1 K 3 1 / 7 0 6 8
A 6 1 K 3 8 / 4 6
A 6 1 K 4 5 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 2
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)