

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3727009号  
(P3727009)

(45) 発行日 平成17年12月14日(2005.12.14)

(24) 登録日 平成17年10月7日(2005.10.7)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

C O 7 K 14/505  
A 6 1 K 38/22  
A 6 1 K 47/48  
A 6 1 P 7/06  
A 6 1 P 13/12

C O 7 K 14/505 Z N A  
A 6 1 K 47/48  
A 6 1 P 7/06  
A 6 1 P 13/12  
C O 7 K 17/08

請求項の数 9 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-201525 (P2000-201525)  
(22) 出願日 平成12年7月3日(2000.7.3)  
(65) 公開番号 特開2001-64300 (P2001-64300A)  
(43) 公開日 平成13年3月13日(2001.3.13)  
審査請求日 平成12年7月3日(2000.7.3)  
(31) 優先権主張番号 60/142254  
(32) 優先日 平成11年7月2日(1999.7.2)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 60/150225  
(32) 優先日 平成11年8月23日(1999.8.23)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 60/151548  
(32) 優先日 平成11年8月31日(1999.8.31)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(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 100102978  
弁理士 清水 初志  
(72) 発明者 パスカル セバスチャン バイロン  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 フ  
ローハム パーク ウッドバイン ロード  
21

審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

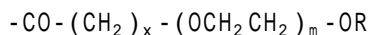
(54) 【発明の名称】 エリスロポエチン誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1個の遊離アミノ基を有し、かつ骨髄細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増大を引き起こすインピボ生体活性を有するエリスロポエチン糖タンパク質であって、かつ、ヒトエリスロポエチンと、1~6個のグリコシル化部位の付加または少なくとも1個のグリコシル化部位の転位によって修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有するその類似体とからなる群より選択されたものを含む、複合体であって；該糖タンパク質が、下記式のポリ(エチレングリコール)基に共有結合し、該ポリ(エチレングリコール)基の-COが、該遊離のアミノ基の1個とアミド結合を形成する複合体：

【式】

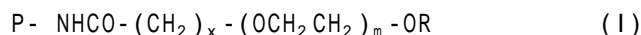


式中、Rは炭素原子を1~6個含む直鎖または分枝鎖のアルキル基であり；xは2または3であり；mは450~900であり；かつ、mは、複合体分子量からエリスロポエチン糖タンパク質分子量を差し引いたものが20キロダルトンから100キロダルトンであるように選択される。

【請求項2】

下記式で表される請求項1記載の複合体：

【式】



式中、x、mおよびRは請求項1において定義されたものであり、かつPは、アミド結合を形

成している遊離のアミノ基を除いた糖タンパク質残基である。

【請求項 3】

糖タンパク質が、ヒトエリスロポエチンである、請求項 2 記載の複合体。

【請求項 4】

ヒト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って発現される、請求項 3 記載の複合体。

【請求項 5】

糖タンパク質が、配列番号：1の配列を有する、請求項 3 記載の複合体。

【請求項 6】

Rがメチルである、請求項 5 記載の複合体。

10

【請求項 7】

xが3である、請求項 5 記載の複合体。

【請求項 8】

前記分子量が20 kDaから40 kDaである、請求項 5 記載の複合体。

【請求項 9】

前記分子量が30 kDaである、請求項 8 記載の複合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、エリスロポエチン誘導体に関する。

20

【0002】

【従来の技術】

赤血球形成(erythropoiesis)とは、赤血球(RBC)の産生であり、これは、細胞破壊の相殺を生じる。赤血球形成は、適当な組織の酸化に赤血球を十分利用できるようにする制御された生理的機構である。天然のヒトエリスロポエチン(hEPO)は腎において生成され、これは赤血球産生を刺激する液性血漿因子である(Carnot, PおよびDeflandre, C、C.R. Acad. Sci., 143:432(1906); Erslev, AJ, Blood, 8:349(1953); Reissmann, KR, Blood, 5:372(1950); Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, WおよびPlzak, LF, Nature, 179:6331-4(1957))。天然のEPOは、骨髄における方向づけられた赤血球系の祖先(committed erythroid progenitor)の分裂および分化を刺激し、かつ赤血球系前駆細胞(erythroid precursor)上の受容体に結合することによりその生理活性を発揮する(Krantz, BS, Blood, 77:419(1991))。

30

【0003】

エリスロポエチンは、組換えDNA技法を用い生合成的に製造されており(Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, JR, Immunobiol., 72:213-224(1986))、これはチャイニーズハムスター卵巣組織細胞(CHO細胞)中に挿入されかつ発現されたクローニングされたヒトEPO遺伝子産物である。hEPOの優勢な完全に処理された形の一次構造を、配列番号：1に示している。そこには、Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>161</sup> およびCys<sup>29</sup>-Cys<sup>33</sup>の間に2個のジスルフィド架橋がある。EPOポリペプチド鎖の糖部分を除いた分子量は18,236 Daである。完全なEPO分子においては、分子量のおよそ40%を、タンパク質のグリコシル化部位においてタンパク質をグリコシル化する糖質基が占めている(Sasaki, H, Bothner, B, Dell, AおよびFukuda, M, J. Biol. Chem., 262:12059(1987))。

40

【0004】

ヒトのエリスロポエチンは赤血球の形成において必須であるので、このホルモンは、赤血球産生の低下または欠損を特徴とする血液疾患の治療において有用である。臨床的には、EPOは、慢性腎不全患者(CRF)における貧血の治療に使用され(Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MRら、NEJM, 316:73-78(1987); Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JKら、Ann. Intern. Med., 111:992(1989); Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW, Kidney Intl., 33: 262(1988); Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, Dら、Ann. Intern. Med., 110:108-114(1989))、ならびにAIDSおよび化学療法を受けている癌患者において

50

使用される(Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RIの著書、MB, Garnick編、エリスロポエチンの臨床応用 - 内科的展望(Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective)、ニューヨーク:Marcel Dekker; 1990年: 301-324ページ)。しかしながら、EPOのような市販のタンパク質療法の生体利用性は、それらの血漿半減期が短く、プロテアーゼによる分解を受けやすいことにより、制限されたものである。これらの欠点は、これらが最大の臨床上の効力に到達することを妨げている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、高いインビボ生体活性を有し、優れた臨床上の効力を示すエリスロポエチン複合体を提供することを課題とする。

10

【0006】

【課題を解決するための手段】

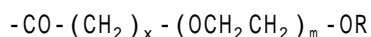
本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行なった結果、少なくとも1個の遊離アミノ基を有し、骨髄細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増強を引き起こすインビボ生体活性を示し、かつ、ヒトエリスロポエチンと1から6個のグリコシル化部位の付加または少なくとも1個のグリコシル化部位の転位により修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有するその類似体とからなる群より選択されるエリスロポエチン糖タンパク質を含む複合体であって、該糖タンパク質が、式  $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$  である「n」ポリ(エチレングリコール)基に共有結合し、各ポリ(エチレングリコール)基の-CO(すなわちカルボニル)が該アミノ基の1個とアミド結合を形成する複合体(式中、Rは低級アルキルであり; xは2または3であり; mは約450~約900であり; nは1~3であり; かつ、nおよびmは、複合体分子量からエリスロポエチン糖タンパク質分子量を差し引いたものが20~100キログルトンであるように選択される)が、未修飾のEPO(すなわち、PEGが結合していないEPO)および従来のPEG-EPO複合体と比べて、増大した循環血中半減期および血漿滞留時間、低下したクリアランス、ならびに増大したインビボ臨床活性を有することを見出した。この複合体は、EPOと同じように使用することができる。特に、この複合体は、EPOが患者の治療に使用されるのと同じ方法で骨髄において方向づけられた赤血球系の先祖の分裂および分化を刺激することができるため、患者の治療において有用である。

20

本発明の複合体は、より詳しくは、以下のように特徴付けられるものである。本発明に係る複合体においては、(1)少なくとも1個の遊離アミノ基を有し、かつ骨髄細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増大を引き起こすインビボ生体活性を有するエリスロポエチン糖タンパク質を含む複合体であって、ヒトエリスロポエチンと、1~6個のグリコシル化部位の付加または少なくとも1個のグリコシル化部位の転位によって修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有するその類似体とからなる群より選択されたものを含む、複合体であって; 該糖タンパク質が、下記式の「n」ポリ(エチレングリコール)基に共有結合し、各ポリ(エチレングリコール)基の-COが、該アミノ基の1個とアミド結合を形成する複合体であることを特徴とする:

30

【式】



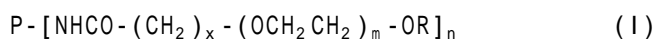
(式中、Rは低級アルキルであり; xは2または3であり; mは約450~約900であり; nは1~3であり; かつ、nおよびmは、複合体分子量からエリスロポエチン糖タンパク質分子量を差し引いたものが20キログルトンから100キログルトンであるように選択される)。

40

【0007】

また、本発明に係る複合体においては、(2)下記式で表される上記(1)記載の複合体であることを特徴とする:

【式】



(式中、x、m、nおよびRは上記(1)において定義されたものであり、かつPは、ポリ(エチレングリコール)基とアミド結合を形成しているnアミノ基を除いた糖タンパク質残基である)。

50

## 【 0 0 0 8 】

また、本発明に係る複合体においては、( 3 ) Rがメチルである、上記(1)または(2)記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 0 9 】

また、本発明に係る複合体においては、( 4 ) mが約650～約750である、上記(1)～(3)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 1 0 】

また、本発明に係る複合体においては、( 5 ) nが1である、上記(1)～(4)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

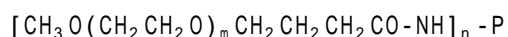
## 【 0 0 1 1 】

また、本発明に係る複合体においては、( 6 ) Rがメチルであり；mが約650～約750であり；かつ、nが1である、上記(1)～(5)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 1 2 】

また、本発明に係る複合体においては、( 7 ) 下記式で表される上記(1)～(6)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする：

## 【 式 】



( 式中、mは650～750であり、nは1であり、かつPは上記(1)において定義されたものである )。

## 【 0 0 1 3 】

また、本発明に係る複合体においては、( 8 ) 糖タンパク質が、ヒトエリスロポエチンである、上記(1)～(7)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 1 4 】

また、本発明に係る複合体においては、( 9 ) ヒト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って発現される、上記(1)～(7)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 1 5 】

また、本発明に係る複合体においては、( 1 0 ) 糖タンパク質が、配列番号：1の配列を有する、上記(1)～(9)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 1 6 】

また、本発明に係る複合体においては、( 1 1 ) 糖タンパク質が、1～6個のグリコシル化部位の付加によって修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有する、上記(1)～(8)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 1 7 】

また、本発明に係る複合体においては、( 1 2 ) 糖タンパク質が、下記からなる群より選択された修飾によって修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有する、上記(1)～(11)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする：

10

20

30

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;  
 Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;  
 Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;  
 Asn<sup>69</sup>;  
 Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
 Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
 Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>;  
 Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
 Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;  
 Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;  
 Thr<sup>125</sup>; および  
 Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>。

10

20

## 【 0 0 1 8 】

また、本発明に係る複合体においては、(13)糖タンパク質が、ヒトエリスロポエチン配列、およびヒトエリスロポエチン配列のカルボキシ末端の第二配列を含む配列を有し、該第二配列が少なくとも1個のグリコシル化部位を含む、上記(1)~(12)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

30

## 【 0 0 1 9 】

また、本発明に係る複合体においては、(14)第二配列が、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのカルボキシ末端配列に由来する配列を含む、上記(13)記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 0 】

また、本発明に係る複合体においては、(15)糖タンパク質が、下記からなる群より選択される配列を有する、上記(13)記載の複合体であることを特徴とする：

(a)ヒトエリスロポエチン配列およびヒトエリスロポエチン配列のカルボキシ末端における配列番号：3の配列；

40

(b)Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>で修飾された(a)の配列；および

(c)Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>で修飾された(a)の配列。

## 【 0 0 2 1 】

また、本発明に係る複合体においては、(16)糖タンパク質が、少なくとも1個のグリコシル化部位の転位によって修飾されたヒトエリスロポエチンの配列を有する、上記(1)~(7)のいずれか一項記載の複合体であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 2 】

また、本発明に係る複合体においては、(17)転位が、ヒトエリスロポエチン中のN結合グリコシル化部位の欠失とヒトエリスロポエチン配列の88位でのN結合グリコシル化部位の付加とを含む、上記(16)記載の複合体であることを特徴とする。

50

## 【 0 0 2 3 】

また、本発明に係る複合体においては、(18)糖タンパク質が、下記からなる群より選択される修飾によって修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有する、上記(17)記載の複合体であることを特徴とする：

Gln<sup>24</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> ；

Gln<sup>38</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> ；および

Gln<sup>83</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> 。

## 【 0 0 2 4 】

また、本発明に係る組成物においては、(19)複合体を含有する組成物であって、該複合体の各々が、少なくとも1個の遊離アミノ基を有し、かつ骨髄細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増大を引き起こすインビボ生体活性を有する、エリスロポエチン糖タンパク質であって、かつヒトエリスロポエチンと、1~6個のグリコシル化部位の付加または少なくとも1個のグリコシル化部位の転位によって修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有するその類似体とからなる群より選択されたものを含み；該複合体中の各々の糖タンパク質が、式  $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$  の「n」ポリ(エチレングリコール)基に共有結合し、各ポリ(エチレングリコール)基の-COが、該アミノ基の1個とアミド結合を形成し；該複合体の各々において、Rは低級アルキルであり；xは2または3であり；mは約450~約900であり；nは1~3であり；nおよびmは、複合体分子量からエリスロポエチン糖タンパク質分子量を差し引いたものが20キログルトンから100キログルトンであるように選択され；nが1である複合体の割合が、少なくとも90%である、組成物であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 5 】

また、本発明に係る組成物においては、(20)nが1である複合体の割合が、少なくとも90%である、上記(1)~(18)のいずれか一項記載の複合体を含有する組成物であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 6 】

また、本発明に係る組成物においては、(21)nが1である複合体の割合が、少なくとも92%である、上記(19)または(20)記載の組成物であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 7 】

また、本発明に係る組成物においては、(22)nが1である複合体の割合が、少なくとも96%である、上記(21)記載の組成物であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 8 】

また、本発明に係る組成物においては、(23)nが1である複合体の割合が、90%~96%である、上記(19)または(20)記載の組成物であることを特徴とする。

## 【 0 0 2 9 】

また、本発明に係る組成物においては、(24)上記(1)~(23)のいずれか一項記載の複合体または組成物および薬学的に許容できる賦形剤を含有する、薬学的組成物であることを特徴とする。

## 【 0 0 3 0 】

また、本発明に係る使用においては、(25)慢性腎不全患者(CRF)の貧血、AIDSに関連した疾患の治療または予防、および化学療法を受けている癌患者の治療のための医薬品の製造を目的とする、上記(1)~(23)のいずれか一項記載の複合体または組成物の使用であることを特徴とする。

## 【 0 0 3 1 】

また、本発明に係る方法においては、(26)上記(1)~(23)のいずれか一項記載の組成物を患者に投与する工程を含む、慢性腎不全患者(CRF)の貧血、AIDSおよび化学療法を受けている癌患者に関連した疾患の予防的および/または治療的処置の方法であることを特徴とする。

## 【 0 0 3 2 】

また、本発明に係る方法においては、(27)下記式の化合物を、エリスロポエチン糖タ

10

20

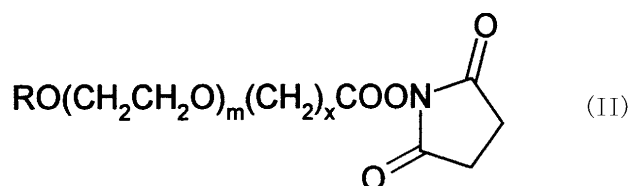
30

40

50

ンパク質と縮合する工程を含み、式中R、mおよびxは上記(1)～(6)のいずれか一項で定義されたものである、上記(1)～(23)のいずれか一項記載の化合物の製造法であることを特徴とする：

【式】



10

【0033】

また、本発明に係る化合物においては、(28)上記(27)記載の方法により製造された、上記(1)～(3)のいずれか一項記載の化合物であることを特徴とする。

【0034】

また、本発明に係る化合物においては、(29)慢性腎不全患者(CRF)の貧血、AIDSおよび化学療法を受けている癌患者に関連した疾患を治療するための、上記(1)～(23)のいずれか一項記載の化合物であることを特徴とする。

【0035】

20

【発明の実施の形態】

本発明は、エリスロポエチン複合体を提供し、この複合体は、少なくとも1個の遊離アミノ基を有し、かつ骨髓細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増強を引き起こすインビボ生体活性を有する、エリスロポエチン糖タンパク質であって、かつヒトエリスロポエチンと、1から6個のグリコシル化部位の付加または少なくとも1個のグリコシル化部位の転位により修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有するその類似体とからなる群より選択されたものを含み；該糖タンパク質が、式  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$  である「n」ポリ(エチレングリコール)基に共有結合し、各ポリ(エチレングリコール)基の-CO(すなわちカルボニル)が該アミノ基の1個とアミド結合を形成し；式中、Rは低級アルキルであり；xは2または3であり；mは約450～約900であり；nは1～3であり；かつ、nおよびmは、複合体分子量からエリスロポエチン糖タンパク質分子量を差し引いたものが20～100キログルトンであるように選択される。

30

【0036】

本発明の複合体は、未修飾のEPOと同じ方法で使用することができる。しかし本発明の複合体は、増大した循環血中半減期および血漿滞留時間、低下したクリアランス、ならびに増大したインビボ臨床活性を有する。これらの改善された特性のために、本発明の複合体は、未修飾EPOを週3回投与する代わりに、週1回で投与することができる。投与頻度の減少は患者の服薬遵守の改善をもたらし、これは治療結果の向上、更には患者の生活の質(QOL)の向上につながることを期待される。ポリエチレングリコールに連結したEPOである従来の複合体と比べて、本発明の複合体の分子量およびリンカー構造を有する複合体が、改善された効力、安定性、AUC、循環血中半減期、および良好なコストプロファイルを有することはわかっている。

40

【0037】

本発明の複合体は、EPO投与と同じ方法で、患者に治療有効量で投与することができる。治療有効量とは、骨髓細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増大を引き起こすインビボ生体活性に必要な複合体の量である。複合体の正確な量は、治療される状態の正確な種類、治療される患者の状態に加え、組成物中の他の成分のような因子に対する好ましさの問題である。例として、体重1kgにつき0.01～10μg、好ましくは体重1kgにつき0.1～1μgを、例えば週1回投与することができる。

【0038】

50

この複合体を含有する薬学的組成物は、赤血球産生の低下または欠損を特徴とする血液疾患に罹患したヒト患者に様々な方法で投与される有効強度で製剤することができる。本複合体の平均治療有効量は変動することができ、かつ特に有資格の医師の推奨および処方に基づきされるべきものである。

【0039】

本発明に従って調製されたエリスロポエチン糖タンパク質生成物は、当該技術分野において公知の方法により、薬学的に許容できる担体または溶媒と共に、注射に適した薬学的組成物中に調製することができる。例えば適当な組成物は、国際公開公報第97/09996号、第97/40850号、第98/58660号、および第99/07401号に開示されている。本発明の製造物の製剤にとってとりわけ好ましい薬学的に許容できる担体は、ヒト血清アルブミン、ヒト血漿タンパク質などである。本発明の化合物は、例えば132mM塩化ナトリウムのような等張剤を含有するpH7の10mMナトリウム/カリウムリン酸バッファー中に製剤することができる。任意に、この薬学的組成物は保存剤を含有することができる。薬学的組成物は、様々な量のエリスロポエチン、例えば10~1000 μg/ml、例えば50 μgまたは400 μgを含むことができる。

10

【0040】

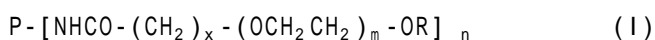
「エリスロポエチン」または「EPO」の用語は、(配列番号：1)もしくは(配列番号：2)に記載されたアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列を有する糖タンパク質を意味し、それらの生物学的特性は、赤血球産生の刺激ならびに骨髄における方向づけられた赤血球系の先祖の分裂および分化の刺激に関係している。本明細書において使用したように、これらの用語は、例えば位置指定突然変異により意識的に、もしくは、突然変異により偶発的に修飾されたこのようなタンパク質を含む。これらの用語は更に、1~6個のグリコシル化部位の付加を有する類似体を含み、これは糖タンパク質のカルボキシ末端の端に少なくとも1個の追加のアミノ酸を有し、この追加のアミノ酸が少なくとも1個のグリコシル化部位を有する類似体と、少なくとも1個のグリコシル化部位の転位を含むアミノ酸配列を有する類似体とを含む。これらの用語は、天然および組換えにより製造されたヒトエリスロポエチンの両方を含む。

20

【0041】

本発明のエリスロポエチン複合体は、下記式で表すことができる：

【式】



式中、x、m、nおよびRは前述のものである。式1において、Pは、本明細書において説明したエリスロポエチン糖タンパク質の残基(すなわち、アミノ基、または式1に記載されたカルボニルとアミド結合を形成するアミノ基を除く。)であり、骨髄細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増大を引き起こすインビボ生体活性を有する。

30

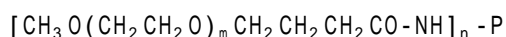
【0042】

本発明の好ましい態様において、Rはメチルである。好ましくは、mは約650~約750であり、nは好ましくは1である。

【0043】

本発明の最も好ましい態様において、Rはメチルであり、mは約650~約750であり、nは1であり、すなわちこの複合体は、下記式で定義される：

【式】



式中、mは650~750であり、nは1であり、Pは先に定義されたものである。好ましくはmは平均約680である。

40

【0044】

先に定義した複合体の糖タンパク質は、ヒトエリスロポエチンが好ましい。ヒトエリスロポエチンおよび先に定義した類似タンパク質は、内因性遺伝子活性化によって発現される。好ましいヒトエリスロポエチン糖タンパク質は、配列番号：1および配列番号：2のものであり、最も好ましくは配列番号：1のものである。

50



## 【0045】

更にPは、ヒトエリスロポエチン残基およびグリコシル化部位の付加1~6個を有するその類似体の残基からなる群より選択することができる。以下に詳細に説明するように、EPOの調製および精製は、当該技術分野において周知である。EPOは、組織のような任意の一般的供給原料、タンパク質合成、天然または組換え細胞の細胞培養物などから得られる、好ましくはヒトの、天然または組換えタンパク質を意味する。EPO活性を有するいずれかのタンパク質、例えば突然変異タンパク質、さもなければ修飾されたタンパク質が包含されている。組換えEPOは、組換えDNA技法または内因性遺伝子活性化により、CHO-、BHK-またはHeLa細胞株における発現により調製することができる。内因性遺伝子活性化によるEPOを含むタンパク質の発現は、当該技術分野において周知であり、例えば米国特許第5,733,761号、第5,641,670号、および第5,733,746号、ならびに国際公開公報第93/09222号、第94/12650号、第95/31560号、第90/11354号、第91/06667号および第91/09955号に開示されており、それら各々の内容は本明細書に参照として組入れられている。エリスロポエチン糖タンパク質生成物の調製にとって好ましいEPO種は、ヒトEPO種である。より好ましいEPO種は、配列番号：1または配列番号：2のアミノ酸配列、より好ましくは配列番号：1のアミノ酸配列を有するヒトEPOである。

10

## 【0046】

ある態様において、Pは、1~6個のグリコシル化部位の付加を有する糖タンパク質類似体の残基である。1個以上のオリゴ糖基による、タンパク質のグリコシル化は、ポリペプチド骨格に沿った特定の位置で生じ、かつタンパク質の安定性、分泌、細胞局在(subcellular localization)、生体活性のようなタンパク質の生理特性に大きく影響を及ぼす。グリコシル化には通常2種類がある。O-結合オリゴ糖は、セリンまたはトレオニン残基に結合し、かつN-結合オリゴ糖は、アスパラギン残基に結合する。N-結合およびO-結合オリゴ糖の両方において認められるある種のオリゴ糖は、N-アセチルノイラミン酸(シアル酸)であり、これは9個以上の炭素原子を含むアミノ糖ファミリーである。シアル酸は、通常N-結合およびO-結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、これは負電荷を生じるので、糖タンパク質に酸性の特性を付与する。アミノ酸165個を有するヒトエリスロポエチンは、糖タンパク質の総分子量の約40%を構成している3個のN-結合オリゴ糖鎖および1個のO-結合オリゴ糖鎖を含む。N-結合グリコシル化は、24、38および83位に位置するアスパラギン残基で生じ、O-結合したグリコシル化は、126位に位置したセリン残基で生じる。これらのオリゴ糖鎖は、末端のシアル酸残基によって修飾される。グリコシル化されたエリスロポエチンからの全てのシアル酸残基を酵素的に除去すると、インビボ活性は失われるが、インビトロ活性は失なわれず、これはエリスロポエチンのシアル化(sialylation)が、肝結合タンパク質による、その結合およびそれに続くクリアランスを妨げるからである。

20

30

## 【0047】

本発明の糖タンパク質は、シアル酸結合部位の数の増大を生じるような、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列に1個以上の変更を伴うヒトエリスロポエチン類似体を含む。これらの糖タンパク質類似体は、グリコシル化に利用できる部位を増大または変更するような、アミノ酸残基の付加、欠失または置換を有する、位置指定突然変異によって製造することができる。ヒトエリスロポエチンにおいて認められるものよりも多いシアル酸レベルを有する糖タンパク質類似体は、生体活性に必要な二次または三次構造を混乱させることのないグリコシル化部位の付加によって製造される。本発明の糖タンパク質は、N-結合部位またはO-結合部位に密に近接している1個以上のアミノ酸の置換に通常含まれる、グリコシル化部位での糖質の結合レベルが増大した類似体も含む。本発明の糖タンパク質はまた、エリスロポエチンのカルボキシ末端の端から伸び、かつ少なくとも1個の糖質基の付加部位を提供する、1個以上のアミノ酸を有する類似体も含む。本発明の糖タンパク質は更に、グリコシル化部位の少なくとも1個の転位を含むアミノ酸配列を有する類似体も含む。このようなグリコシル化部位の転位は、ヒトエリスロポエチンにおける1個以上のグリコシル化部位の欠失および1個以上の天然に生じないグリコシル化部位の付加に関係している。エリスロポエチン上の糖質鎖の数が増し、その結果エリスロポエチン1分子あたり

40

50

のシアル酸の数が増すと、溶解度の増大、タンパク質分解に対するより大きい抵抗性、免疫原性の低下、血清半減期の延長、および生体活性の増大のような有利な特徴を与える。グリコシル化部位の付加を有するエリスロポエチン類似体は、Elliotの、1995年3月1日に公開された欧州特許出願第640 619号により詳細に開示されている。

【 0 0 4 8 】

好ましい態様において、本発明の糖タンパク質は、例えば下記から選択された修飾により修飾されたヒトエリスロポエチン配列を含むエリスロポエチンであるが、これに限定されるものではない、少なくとも1個のグリコシル化の付加部位を有するアミノ酸配列を含んでいる：

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;

Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;

Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;

Asn<sup>69</sup>;

Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;

Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;

Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;

Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;

Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;

Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;

Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>;

Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;

Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;

Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;

Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;

Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;

Thr<sup>125</sup>; および

Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>。

【 0 0 4 9 】

アミノ酸配列の修飾に関して本明細書で使用した表記法は、上付き数字によって示された対応する未修飾のタンパク質（例えば配列番号：1または配列番号：2のhEPO）の位置が、それぞれの上付き数字のすぐ前のアミノ酸（複数）によって変更されることを意味する。

【 0 0 5 0 】

糖タンパク質は、更に糖タンパク質のカルボキシ末端の端に少なくとも1個のアミノ酸付加を有する類似体であることができ、この付加されたアミノ酸は、少なくとも1個のグリコシル化部位を含み、すなわち先に定義された複合体は、糖タンパク質が、ヒトエリスロポエチン配列、およびヒトエリスロポエチン配列のカルボキシ末端の第二配列を含む配列であって、この第二配列が少なくとも1個のグリコシル化部位を含有するようなものを含む配列を有する化合物を意味する。付加されたアミノ酸は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのカルボキシ末端の端に由来するペプチド断片を含むことができる。好ましくは、この糖タンパク質は、(a) アミノ酸配列、Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (配列番号：3)を

10

20

30

40

50

有し、カルボキシ末端から伸びている、ヒトエリスロポエチン；(b)更にSer<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPOを含む(a)の類似体；および、(c)更にAsn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPOを含む(a)の類似体からなる群より選択された類似体である。

【0051】

前記糖タンパク質は、少なくとも1個のグリコシル化部位の転位を含むアミノ酸配列を有する類似体であることもできる。この転位は、ヒトエリスロポエチンのN-結合糖質部位の欠損、およびヒトエリスロポエチンのアミノ酸配列の88位でのN-結合糖質部位の付加を含むことができる。好ましくは、この糖タンパク質は、Gln<sup>24</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO；Gln<sup>38</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO；および、Gln<sup>83</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPOからなる群より選択される類似体であることができる。

10

【0052】

本明細書において使用される「低級アルキル」は、炭素原子を1~6個含む直鎖または分枝鎖のアルキル基を意味する。低級アルキル基の例は、メチル、エチルおよびイソプロピルを含む。本発明においては、Rはいずれかの低級アルキルである。Rがメチルである複合体が好ましい。

【0053】

記号「m」は、ポリ(エチレンオキシド)基の中のエチレンオキシド残基(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)の数を示している。エチレンオキシドである1個のPEGサブユニットは、分子量約44ダルトンを有する。従って、この複合体の分子量(EPOの分子量を除く)は、数字「m」によって決まる。本発明の複合体において「m」は、約450から約900(分子量約20kDaから約40kDaに相当)であり、好ましくは約650から約750(分子量約30kDaに相当)である。数字mは、本発明で得られる複合体が、未修飾EPOに匹敵する生理活性を有するように選択され、その活性は、未修飾EPOの対応する活性と同じ、更にはその一部を示すことができる。「約」特定数の分子量とは、通常分析法によって決定される数値の理にかなった範囲内であることを意味する。数字「m」は、エリスロポエチン糖タンパク質に共有結合した各ポリ(エチレングリコール)基の分子量が、約20kDaから約40kDaである、好ましくは約30kDaであるように選択される。

20

【0054】

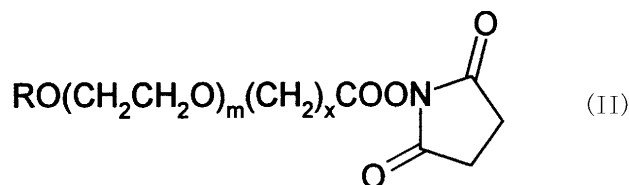
本発明の複合体において、数字「n」は、エリスロポエチンタンパク質の遊離アミノ基(リシンアミノ酸の - アミノ基および/またはアミノ末端のアミノ基を含む)に、アミド結合を介して共有結合したポリ(エチレングリコール)基の数である。本発明の複合体は、EPO 1モルにつき1、2または3個のPEG基を有することができる。「n」は、1~3の整数であり、好ましくは「n」は1または2であり、より好ましくは「n」は1である。

30

【0055】

式Iの化合物は、下記式IIの化合物をエリスロポエチン糖タンパク質と縮合することにより、公知の高分子材料から調製することができる：

【式】



40

式中、Rおよびmは先に記したものである。式中xが3である式2の化合物は、 - 低級アルコキシ、ポリエチレングリコール - 酪酸スクシンイミジルエステル(低級アルコキシ-PEG-SBA)である。式中xは2である式2の化合物は、 - 低級アルコキシ、ポリエチレングリコール - プロピオン酸スクシンイミジルエステル(低級アルコキシ-PEG-SPA)である。活性化されたエステルをアミンと反応し、アミドを生成する従来の方法を使用することができ

50

る。前述の反応において、例示されたスクシンイミジルエステルは、アミド生成を引き起こす脱離基である。タンパク質との複合体を生成するための式2の化合物のようなスクシンイミジルエステルの使用は、1997年9月30日に公開された米国特許第5,672,662号(Harrisら)に開示されている。

#### 【0056】

ヒトEPOは、9個の遊離アミノ基、アミノ末端アミノ基と8個のリシン残基の -アミノ基とを含んでいる。PEG化(pegylation)試薬を、式2のSBA化合物と組合わせた場合、pH7.5で、タンパク質：PEGの比が1：3であり、かつ20～25℃の反応温度で、モノ-、ジ-および微量のトリ-PEG化された種が生成されることがわかった。PEG化試薬が式2のSPA化合物である場合、タンパク質：PEGの比が1：2である以外は同様の条件を用いることにより、主にモノ-PEG化された種が生成された。PEG化EPOは、混合物として、または陽イオン交換クロマトグラフィーによって分離された異なるPEG化された種として投与することができる。反応条件(例えば、試薬の比、pH、温度、タンパク質濃度、反応時間など)を操作することによって、様々なPEG化された種の相対量を変動することができる。

10

#### 【0057】

ヒトエリスロポエチン(EPO)は、赤血球の形成を刺激するヒト糖タンパク質である。その調製および治療適応は、詳細に、例えば米国特許第5,547,933号および第5,621,080号、欧州特許第EP-B 0 148 605号、Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2708-2712(1984)、欧州特許第EP-B 0 205 564号、第EP-B 0 209 539号および第EP-B 0 411 678号、更にはLai, P.H.ら、J. Biol. Chem. 261:3116-3121(1986)、およびSasaki, H.ら、J. Biol. Chem. 262: 12059-12076(1987)に開示されている。治療の用途のためのエリスロポエチンは、組換え法により製造することができる(欧州特許第EP-B 0 148 605号、第EP-B 0 209 539号およびEgrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. ら、Immunobiol.72:213-224(1986))に開示されている。

20

#### 【0058】

血清を含まない培地におけるエリスロポエチンの発現および調製の方法は、例えば1996年11月14日に公開されたBurgの国際公開公報第96/35718号、および1992年6月12日に公開されたKochの欧州特許出願第513 738号に開示されている。前述の公表物に加えて、EPO 遺伝子を含む組換えCHO細胞の血清非含有発酵を実行することができることがわかっている。このような方法は、例えば、欧州特許公開第EP-A 0 513 738号、第EP-A 0 267 678号、および一般的な形でKawamoto, T.ら、Analytical Biochem.130:445-453(1983)、欧州特許公開第EP-A 0 248 656号、Kowar, J.およびFranek, F., Methods in Enzymology 421:277-292(1986)、Bavister, B., Expcology 271:45-51(1981)、欧州特許公開第EP-A 0 481 791号、第EP-A 0 307 247号、第EP-A 0 343 635号、国際公開公報第88/00967号に開示されている。

30

#### 【0059】

欧州特許公開第EP-A 0 267 678号において、透析後の血清非含有培養中に生成されたEPOの精製について、S-セファロース上でのイオン交換クロマトグラフィー、C8カラム上での分取逆相HPLCおよびゲルろ過クロマトグラフィーが開示されている。この組合せにおいて、ゲルろ過クロマトグラフィー工程は、S-セファロース・ファストフロー上で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。更に、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)カラム上での色素クロマトグラフィーを行うことができることが提唱されている。

40

#### 【0060】

組換えEPOの精製工程は、Nobuo, I. ら、J. Biochem.107:352-359(1990)に記されている。しかしこの方法においては、EPOは、精製工程の前に、Tween(登録商標)20、フェニルメチルスルホニルフルオリド、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によって処理される。Burgの1996年11月14日に公開された国際公開公報第96/35718号を含む公開は、血清非含有発酵法によるエリスロポエチン(EPOsf)の調製法を開示している。

50

## 【 0 0 6 1 】

本発明のEPOまたはEPO複合体の比活性は、当該技術分野において公知の様々なアッセイ法により測定することができる。本発明の精製されたEPOタンパク質の生体活性は、ヒト患者への注射によるEPOタンパク質の投与によって、対象の非注射群または対照群と比べて、骨髓細胞における網状赤血球および赤血球の産生を増大を引き起こすようなものである。本発明において得られかつ精製されたEPOタンパク質、またはそれらの断片の生体活性は、Annableらの方法 (Bull. Wld. Hlth. Org., 47:99-112 (1972)およびPharm. Europa Spec. Issue Erythropoetin BRP Bio, 1997(2)) に従う方法で試験することができる。EPOタンパク質の活性を測定するための別の生物学的アッセイである、正赤血球性貧血(normocytthaemic)マウスアッセイ法については、実施例 4 に示した。

10

## 【 0 0 6 2 】

本発明は、前述の複合体で構成された組成物を提供する。少なくとも90%のモノ-PEG複合体、すなわちnが1であるものを含有する組成物は、実施例 5 に示したように調製することができる。通常エリスロポエチン糖タンパク質のモノ-PEG複合体が望ましく、その理由はこれらが、ジ-PEG複合体よりもより高い活性を有する傾向があるからである。モノ-PEG複合体の割合、更にはモノ-およびジ-PEG種の比は、溶離ピークの周囲の比較的広い画分をプールし、組成物中のモノ-PEGの割合を小さくするか、もしくは、比較的狭い画分をプールし、モノ-PEGの割合を増加することによって制御することができる。約90%のモノ-PEG複合体が、収量および活性の釣り合いが良い。例えば少なくとも92%のまたは少なくとも96%の複合体がモノ-PEG種(nが1である)であるような組成物が望ましいことが多い。本発明の態様において、nが1である複合体の割合は、90%から96%である。

20

## 【 0 0 6 3 】

本発明は更に、前述の複合体または組成物および薬学的に許容できる賦形剤を含有する対応する薬学的組成物に関連している。

## 【 0 0 6 4 】

本発明の複合体および組成物は、特に慢性腎不全患者(CRF)の貧血、AIDSに関連した疾患の治療または予防、および化学療法を受けている癌の治療のための医薬品の調製において有用である。

## 【 0 0 6 5 】

本発明の別の態様は、前述の組成物を患者に投与する工程を含む、慢性腎不全患者(CRF)の貧血、AIDSおよび化学療法を受けている癌患者の予防的および/または治療的処置の方法に関する。

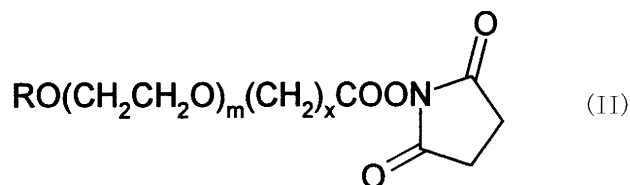
30

## 【 0 0 6 6 】

更に、本発明は、下記式 2 の化合物 (R、mおよびxは先に記したもの) とエリスロポエチン糖タンパク質との縮合を含み、前述のような化合物を調製する方法に関する：

## 【 0 0 6 7 】

【 式 】



40

## 【 0 0 6 8 】

本発明は更に、慢性腎不全患者(CRF)の貧血、AIDSおよび化学療法を受けている癌患者に関連した疾患の治療のための前述の化合物にも関する。

## 【 0 0 6 9 】

本発明は、本明細書に記された発明を例証するが、限定するものではなく、下記の実施例

50

を参照することにより、より良く理解されると思われる。

【0070】

【実施例】

実施例1：ヒトEP0の発酵および精製

a) 接種材料の調製および発酵

EP0-産生CHO細胞株(欧州特許第EP 411 678号(Genetics Institute)において開示されたATCC CRL8695を使用することができる)を起源とする、Working Cell Bankの1種のウイルスを、液体窒素貯蔵タンクの気相から採取した。細胞を、ガラス製の回転フラスコに移し、かつ加湿したCO<sub>2</sub>培養装置中の炭酸水素 - 緩衝した(hydrogen carbonate-buffered)培地において培養した。接種材料の調製および発酵のために使用した代表的な血清非含有培地は、1992年6月12日に公表されたKochの欧州特許出願第513 738号または1996年11月14日に公表されたBurgの国際公開公報第96/35718号に開示されており、例えば、培地DMEM/F12 (例えば、JRHバイオサイエンス/ハズルトン・バイオロジックス社(JRH Biosciences/Hazlet on Biologics)、デンバー、米国、注文番号57-736)、および更に炭酸水素ナトリウム、L+グルタミン、D+グルコース、組換えインスリン、亜セレン酸ナトリウム、ジアミノブタン、ヒドロコルチゾン、硫酸鉄(II)、アスパラギン、アスパラギン酸、セリンおよび哺乳動物細胞の安定剤、例えばポリビニルアルコール、メチルセルロース、ポリデキストラン、ポリエチレングリコール、プルロニックF68、血漿増量剤ポリゲリン(HEMACCEL(登録商標))またはポリビニルピロリドン(国際公開公報第96/35718号)を含む。

10

【0071】

この培養物を、微生物の混入の有無について顕微鏡でチェックし、細胞密度を決定した。これらの試験は各分離(splitting)工程で行った。

20

【0072】

最初の増殖期間の後、細胞培養物を、新鮮な培地で出発時の細胞密度に希釈し、別の増殖サイクルを施した。この手順を、培養容量がガラス製回転フラスコ1個につきおよそ2Lになるまで繰り返した。およそ12倍になった後、この培養物1~5Lを利用し、その後10Lの接種発酵槽への接種材料として使用した。

【0073】

3~5日後、10Lの発酵槽中の培養物を、100L接種発酵槽のための接種材料として用いることができた。

30

【0074】

更に3~5日間培養し、100Lの発酵槽中の培養物を、1000Lの生成発酵槽のための接種材料として使用した。

【0075】

b) 回収および細胞分離

バッチ再供給(refeed)法を用い、すなわち、望ましい細胞密度に到達した時点で培養物の約80%を回収した。残りの培養物に新鮮な培地を再び満たし、かつ次の回収まで培養した。1回の製造の試行は、最大10の連続する回収からなり：これは、9回の部分回収および最終発酵時の1回の全回収であった。回収は、3~4日毎に行った。

【0076】

決定した回収容量を、冷却容器に移した。細胞を、遠心またはろ過により除去し、かつ廃棄した。遠心工程のEP0含有上清を、インラインでろ過し、かつ第二の冷却容器に収集した。各回収物を、精製時に個別に処理した。

40

【0077】

EP0-タンパク質の精製の代表的方法は、1996年11月14日に公表されたBurgの国際公開公報第96/35718号に開示されている。この精製法を、以下に説明する。

【0078】

a) ブルーセファロースクロマトグラフィー

ブルーセファロース(ファルマシア社)は、表面にシバクロンブルー色素が共有結合したセファロースビーズからなる。EP0は、ほとんどの非タンパク質性混入物、いくつかのタ

50

ンパク質性不純物およびPVAよりも、ブルーセファロースに強力に結合するので、EP0はこの工程で濃縮することができる。ブルーセファロースカラムの溶離は、塩濃度に加えpHを上昇することで行った。

【0079】

カラムにブルーセファロース80~100Lを充填し、NaOHで再生し、かつ平衡バッファー(塩化ナトリウム/塩化カルシウムおよび酢酸ナトリウム)で平衡化した。酸性化され、かつろ過した発酵槽上清を負荷した。負荷が完了した後、カラムをまずより高い塩化ナトリウム濃度を有する平衡バッファーに類似のバッファーで洗浄し、引き続きTris-ベースバッファーで洗浄した。生成物を、Tris-ベースバッファーで溶離し、主要な溶離プロフィールに従って単一の画分中に回収した。

10

【0080】

b) ブチルトヨパールクロマトグラフィー

ブチルトヨパール(Butyl Toyoparl)650 C (TOSOハス社)は、脂肪族ブチル残基が共有結合したポリスチレンを主成分にしたマトリックスである。EP0は、このゲルにほとんどの不純物およびPVAよりもより強力に結合するので、これはイソプロパノールを含有するバッファーで溶離しなければならない。

【0081】

カラムに、ブチルトヨパール650 Cの30~40Lを充填し、NaOHで再生し、Tris-ベースバッファーで洗浄し、かつイソプロパノールを含有するTris-ベースバッファーで平衡化した。

20

【0082】

ブルーセファロース溶離液を、カラム平衡化バッファー中のイソプロパノール濃度に調節し、カラムに負荷した。その後、このカラムを、イソプロパノールの濃度を漸増しながら平衡バッファーで洗浄した。生成物を、溶離バッファー(高イソプロパノール含量のTris-ベースバッファー)で溶離し、主要な溶離プロフィールに従って単一の画分中に回収した。

【0083】

c) ヒドロキシアパタイトウルトロゲルクロマトグラフィー

ヒドロキシアパタイトウルトロゲル(バイオスペラ社)は、力学的特性を向上するためにアガロースマトリックスに組込まれたヒドロキシアパタイトからなる。EP0は、ヒドロキシアパタイトに対する親和性が低く、その結果タンパク質不純物よりもより低いリン酸濃度で溶離することができる。

30

【0084】

このカラムにヒドロキシアパタイトウルトロゲル30~40Lを充填し、リン酸カリウム/塩化カルシウムバッファーおよびNaOHで再生し、その後Tris-ベースバッファーで再生した。その後、少量のイソプロパノールおよび塩化ナトリウムを含有するTris-ベースバッファーで平衡化した。

【0085】

ブチルトヨパールクロマトグラフィーのEP0含有溶離液を、カラムに負荷した。引き続き、カラムを平衡バッファーで洗浄し、イソプロパノールおよび塩化ナトリウムを含まないTris-ベースバッファーで洗浄した。生成物を、低濃度のリン酸カリウムを含有するTris-ベースバッファーで溶離し、主要な溶離プロフィールに従って単一の画分中に収集した。

40

【0086】

d) Vydac C4上での逆相HPLC

RP-HPLC材料Vydac C4 (Vydac社)は、シリカゲル粒子からなり、その表面にC4-アルキル鎖を保持している。タンパク質性不純物からのEP0の分離は、疎水性相互作用の強度の様々な差を基にしている。溶離は、希釈したトリフルオロ酢酸中のアセトニトリル勾配を用いて行った。

【0087】

50

分取HPLCは、ステンレス鋼製のカラム(2.8~3.2LのVydac C4シリカゲルを充填した)を用いて行った。ヒドロキシアパタイトウルトロゲルの溶離液を、トリフルオロ酢酸を添加することにより酸性とし、Vydac C4カラムに負荷した。洗浄および溶離のために、希釈したトリフルオロ酢酸中のアセトニトリル勾配を用いた。画分を回収し、かつリン酸バッファーで迅速に中和した。IPC限界内の EPO画分をプールした。

**【 0 0 8 8 】**

e) DEAEセファロースクロマトグラフィー

DEAEセファロース(ファルマシア社)物質は、セファロースビーズの表面に共有結合したジメチルアミノエチル(DEAE)基からなる。EPOのDEAE基への結合は、イオン相互作用により媒介される。アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸は、保持されずに、カラムを通過した。これらの物質を洗浄除去した後、微量の不純物を、カラムを低pHの酢酸バッファーで洗浄することによって除去した。その後、カラムを中性リン酸バッファーで洗浄し、かつイオン強度を増大したバッファーでEPOを溶離した。

10

**【 0 0 8 9 】**

カラムにDEAEセファロース・ファストフローを充填した。カラム容量を、EPO負荷が、3~10mg EPO/mlゲルの範囲に確実に納まるように調節した。カラムを水および平衡バッファー(リン酸ナトリウム/リン酸カリウム)で洗浄した。HPLC溶離液のプールした画分を負荷し、カラムを平衡バッファーで洗浄した。その後、カラムを洗浄バッファー(酢酸ナトリウムバッファー)で洗浄し、その後平衡バッファーで洗浄した。引き続き、EPOを、溶離バッファー(塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム/リン酸カリウム)でカラムから溶離し、かつ主要な溶離プロフィールに従って単一の画分中に回収した。

20

**【 0 0 9 0 】**

DEAEセファロースカラムの溶離液は、特定の伝導度に調節した。得られる医薬物質は、テフロン瓶中に滅菌ろ過し、-70 で保管した。

**【 0 0 9 1 】**

実施例 2 : mPEG-SBAによるEPOのPEG化

実施例 1 の血清を使用しない方法によって精製されたEPO(EPOsf)は、分析法により調べたところ均質であり、かつ8種の異性体からなる典型的アイソフォームパターンを示していた。これは、正赤血球性貧血マウスアッセイ法で調べたところ、生体比活性190,000IU/mgを有していた。使用したPEG化試薬は、メトキシ-PEG-SBAであり、これは式 2 の化合物(式中、Rはメチル; xは3; およびmは650~750である(平均約680、これは平均分子量約30kDaに相当))である。

30

**【 0 0 9 2 】**

PEG化反応

EPOsf 100mg (10.3mg/ml EPOsfストック9.71ml、5.48  $\mu$ mol)に、30kDaのメトキシ-PEG-SBA 506mg (16.5  $\mu$ mol) (シェアウォーター・ポリマー社(Shearwater Polymers, Inc.)、ハンツビル、アラバマから入手)を含有する0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH7.5)を10ml添加し、室温(20~23 )で2時間混合した。最終のタンパク質濃度は5mg/mlであり、かつタンパク質:PEG試薬の比は1:3であった。2時間後、氷酢酸を使ってpH4.5に調節することにより反応を停止し、精製に使用するまで-20 で貯蔵した。

40

**【 0 0 9 3 】**

精製

1. 複合体混合物: およそ28mlのSP-SEPHAROSE FF (スルホ - プロピル陽イオン交換樹脂)を、AMICONガラスカラム(2.2 x 7.5 cm)に充填し、かつ20mM酢酸バッファー、pH4.5、流量150ml/時で平衡化した。タンパク質30mgを含有する反応混合液6 mlを、平衡バッファーで5倍希釈し、カラムに載せた。吸着されない物質を、該バッファーで流出し、吸着されたPEG複体の混合物を、平衡バッファーを溶媒とする0.175 M NaClでカラムから溶離した。依然カラムに留まっている未修飾のEPOsfは、750mM NaClで溶離した。カラムは、出発バッファーで再度平衡化した。試料を、SDS-PAGEで分析し、それらのPEG化程度を決定した。0.175M NaCl溶離液は、モノ-に加え、ジ-および微量のトリ-PEG化された種を含む

50



一方で、750mM NaCl溶離液は未修飾のEPOsfを含むことがわかった。

【0094】

2. ジ-PEGおよびモノ-PEG-EPOsf：先の工程のカラムから溶離した精製複合体の混合物を、該バッファーで4倍希釈し、カラムに再度載せ、前述のように洗浄した。ジ-PEG-EPOsfおよびモノ-PEG-EPOsfを、それぞれ、0.1M NaClおよび0.175M NaClを用いてカラムから個別に溶離した。溶離は、更に750mM NaClで行い、残留している未修飾のEPOsfを全て溶離した。

【0095】

あるいは、反応混合物を5倍量の酢酸バッファーで希釈し、SP-セファロースカラムに載せた(~0.5mgタンパク質/ゲル)。カラムを洗浄し、かつ吸着したモノ-PEG-EPOsf、ジ-PEG-EPOsfおよび未修飾のEPOsfを、先の段に記したように溶離した。

【0096】

結果

PEG-EPOsfは、数平均分子量30kDaを有する直鎖のPEG分子の化学的に複合することによって合成した。PEG-EPOsfは、EPOsfの1級アミノ基と30kDa PEG-酪酸のスクシンイミジルエステル誘導体の間で、アミド結合を生じる反応によって生成した。

【0097】

結果を表1にまとめた。SDS-PAGE 分析によると、精製した複合体混合物は、モノ-およびジ-PEG-EPOsfで構成され、かつ未修飾のEPOsf混合物は含まなかった。複合体混合物は、23.4mgまたは出発材料の78%に相当していた。陽イオン交換クロマトグラフィーによるモノ-およびジ-PEG-EPOsf の分離は、複合体混合物中のモノ-PEG対ジ-PEGの比がほぼ1:1であることを示した。反応が完了した後、モノ:ジ:未修飾の個々の成分の比は、40:38:20(%)であった。全体の収量はほぼ定量的であった。

【0098】

【表1】

EPOsf PEG化における結果のまとめ

試料	蛋白質(mg)	収率(%)
Rxn. Mix.	30	100
モノ-	12.0	40
ジ-	11.4	38
非修飾	6.0	20
複合体混合物	23.4	78

【0099】

実施例3：mPEG-SPAによるEPOのPEG化

実施例2において使用した様々なEPOsfのアリコートをも、30kDa メトキシ-PEG-SPA (シェアウォーター・ポリマー社、ハンツビル、アラバマ)と反応させた。反応は、タンパク質:試薬の比1:2で行い、実施例2の精製法を行った。主にモノ-PEG化された種が生成した。

【0100】

実施例4：正赤血球性貧血マウスアッセイ法によって測定したPEG化されたEPOのin-vivo活性

正赤血球性貧血マウスのバイオアッセイ法は当該技術分野において(Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2))、およびPh. Eur. BRP.のエリスロポエチン専門書の方法として公知である。試料を、BSA-PBSに希釈した。7~15週齢の通常の健常マウスに、実施例2または3のPEG化されないEPOまたはトリ-、ジ-もしくはモノ-PEG化EPOを含有するEPO-画分0.2 mlを皮下(s.c.)投与した。6日間にわたって、尾静脈の穿刺により採血し、0.15 μmolアクリジンオレンジ染色液1ml中に、血液1 μLが存在するように希釈した。染色時間は3~10分とした。フローサイトメーターにおいて赤色蛍光のヒストグラム

10

20

30

40

50

を分析することにより、微量蛍光定量的に網状赤血球のカウントを行った。網状赤血球のカウントは、絶対数(absolute figures) (分析した血球30,000個あたり)で示した。提示したデータに関して、各群は、マウス5匹/日からなり、これらのマウスは1回のみ採血した。

【0101】

別の実験において、未修飾のEPO(EPO 25ng)、実施例2のPEG(SBA)-EPO混合物(複合体10ng)、実施例2のモノ-およびジ-PEG化EPO(複合体10ng)、実施例3のPEG(SPA)-EPO(複合体10ng)およびバッファー溶液の単回用量を、マウスに投与した。結果を表2に示した。この結果は、未修飾EPOの25ng用量と比較し、マウス当たり同じ用量(10ng)を使用した場合に、網状赤血球量の顕著な増加および最大網状赤血球カウントのシフトによって示されるように、PEG化されたEPO種が優れた活性を持ち、半減期が延長されることを示した。

10

【0102】

【表2】

	<b>EPO</b> (非修飾)	<b>30 kDa</b> <b>SPA</b> <b>PEG</b>	モノ <b>30K</b> <b>SBA</b>	ジ <b>30K</b> <b>SBA</b>	<b>PEG-EPO</b> <b>SBA 複合体</b> <b>混合物</b>	対照 <b>バッファー</b>
<b>72h</b>	1000	1393	1411	994	1328	857
<b>96h</b>	500	1406	1501	926	1338	697
<b>120h</b>	~200	1100	1182	791	944	701
<b>144h</b>	~0	535	607	665	660	708

20

【0103】

実施例5：優勢なモノ-PEG-EPOの調製

PEG化反応

100mMリン酸カリウムバッファー (pH7.5) 中のEPOsf 100mg(5.48 μmol)の出発物質を実施例1に従って調製し、1mM HCl 3mlに溶解した30kDa PEG-SBA試薬329mg(10.96 μmol)を添加した。十分量の100mMリン酸カリウムバッファー (pH7.5) を添加し、反応混合液の容量を20mlとした。最終のタンパク質濃度は5mg/mlであり、かつタンパク質：PEG試薬の比は1：2であった。この反応混合液を周囲温度(20~22 )で2時間混合した。2時間後、氷酢酸をpH4.5になるまで添加し反応を停止し、精製に使用するまで-20 で凍結保存した。

30

【0104】

精製

先の工程の反応混合液を、10mM酢酸ナトリウム (pH4.5) で1：5に希釈し、4.2 x 19cm カラムに充填した300mlのSP-セファロースFF (スルホプロピル陽イオン交換樹脂) に載せた。カラムは、あらかじめ同じバッファーで平衡化した。カラムの溶離液を、Gilson UV モニターを使い、280nmでモニタリングし、Kipp and Zonen記録計で記録した。カラムを、300mlまたは1床容量の平衡バッファーで洗浄し、過剰な試薬、反応副産物およびオリゴマーPEG-EPOを除去した。引き続き、100mM NaCl 2床容量で洗浄し、ジ-PEG-EPOを除去した。その後モノ-PEG-EPOを200mM NaClで溶離した。モノ-PEG-EPOの溶離時には、タンパク質の最初のピーク50mlを廃棄し、モノ-PEG-EPOを150ml画分として回収した。カラムに残留している未修飾EPOsfは、750mM NaClで溶離した。全ての溶離バッファーは、平衡バッファーを溶媒として調製した。全ての溶離した試料は、SDS-PAGE、および高速サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析した。150ml 画分から得たモノ-PEG-EPOプールには、未修飾EPOsfは検出されず、これを次に~4.5~7.5mg/mlに濃縮し、かつ貯蔵バッファー、10mMリン酸カリウム、100mM NaCl (pH7.5) に対しダイアフィльтраーションした。濃縮/ダイアフィльтраーションは、50 kDaでカットするミリポア社のPellicon XL Biomax 50膜を装着したミリポア社のLabScale (登録商標) TFFシステムを用い、周囲温度で行った。濃縮したモノ-PEG-EPOを滅菌ろ過し、-20 で凍結保存した。

40

【0105】

50

EP0sf のおよそ75%がPEG化された。精製後の総収率は、モノ-PEG-EP0が~30%で、未修飾のEP0sf は検出されず、かつジ-PEG-EP0は約25%であった。残りのタンパク質は、オリゴマーおよびPEG化されないEP0sfが占めた。150ml画分から得たモノ-PEG-EP0のプールは、モノ-PEG-EP0がおよそ90%であり、ジ-PEG-EP0がおよそ10%であった。

【0106】

【発明の効果】

本発明により、少なくとも1個の遊離アミノ基を有し、かつ骨髓細胞において網状赤血球および赤血球の産生の増大を引き起こすインビボ生体活性を有するエリスロポエチン糖タンパク質であって、かつヒトエリスロポエチン、および1~6個のグリコシル化部位の付加または少なくとも1個のグリコシル部位の転位により修飾されたヒトエリスロポエチン配列を有するその類似体からなる群より選択されたものを含む、エリスロポエチンのポリエチレングリコールとの複合体であり；該糖タンパク質が、式  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$  の「n」ポリ(エチレングリコール)基に共有結合し、各ポリ(エチレングリコール)基のカルボニルが該アミノ基の1個とアミド結合を形成し；式中、R は低級アルキルであり；xは2または3であり；mは約450~約900であり；nは1~3であり；ならびに、nおよびmは、複合体分子量からエリスロポエチン糖タンパク質分子量を差し引いたものが20キロダルトンから100キロダルトンになるように選択されるものである複合体が提供された。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> F.Hoffmann-La Roche AG

<120> Erythropoietin Conjugates

<130> RC-A0011

10

<150> US 60/142,254

<151> 1999-07-02

<150> US 60/150,225

<151> 1999-08-23

20

<150> US 60/151,548

<151> 1999-08-31

<150> US 60/166,151

<151> 1999-11-17

<160> 3

30

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15

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 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
 50 55 60

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

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

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala

10

20

30

40



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

10

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 165

20

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 20 25

40

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> F I  
C 0 7 K 17/08 A 6 1 K 37/24

(31) 優先権主張番号 60/166151

(32) 優先日 平成11年11月17日(1999.11.17)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(56) 参考文献 特表平08 - 506023 (JP, A)

特表平09 - 504299 (JP, A)

(58) 調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C07K 14/505

C07K 17/08

A61K 38/22

A61K 47/48

A61P 7/06

A61P 13/12

SwissProt/PIR/GeneSeq

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)