

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-536857

(P2010-536857A)

(43) 公表日 平成22年12月2日 (2010. 12. 2)

|                                 |                     |             |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 K 38/00</b> (2006. 01) | A 6 1 K 37/02 Z N A | 4 C 0 7 6   |
| <b>A 6 1 P 7/06</b> (2006. 01)  | A 6 1 P 7/06        | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 47/48</b> (2006. 01) | A 6 1 K 47/48       | 4 H 0 4 5   |
| <b>C 0 7 K 7/08</b> (2006. 01)  | C 0 7 K 7/08        |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁)

|               |                              |          |                         |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2010-521912 (P2010-521912) | (71) 出願人 | 000002934               |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年7月23日 (2008. 7. 23)     |          | 武田薬品工業株式会社              |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成22年4月15日 (2010. 4. 15)     |          | 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号     |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2008/070926            | (71) 出願人 | 510047247               |
| (87) 国際公開番号   | W02009/025957                |          | アフーマックス                 |
| (87) 国際公開日    | 平成21年2月26日 (2009. 2. 26)     |          | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4    |
| (31) 優先権主張番号  | 60/957, 396                  |          | 3 0 4, パロ アルト, ミランダ アベニ |
| (32) 優先日      | 平成19年8月22日 (2007. 8. 22)     |          | ュー 4 0 0 1              |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100092783               |
| (31) 優先権主張番号  | 60/989, 758                  |          | 弁理士 小林 浩                |
| (32) 優先日      | 平成19年11月21日 (2007. 11. 21)   | (74) 代理人 | 100095360               |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 片山 英二               |
|               |                              | (74) 代理人 | 100120134               |
|               |                              |          | 弁理士 大森 規雄               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エリスロポエチン受容体ペプチドの製剤及び使用

## (57) 【要約】

本発明は、エリスロポエチン受容体 (E P O - R) のアゴニストであるペプチド化合物の新規使用に関する。本発明はまた、化学療法起因の貧血を含む、不十分な又は欠陥のある赤血球産生に関連する障害を治療するためにそのようなペプチド化合物を使用する方法に関する。本発明のペプチド化合物を含有する医薬組成物も提供される。また、そのような化合物を含むキット及び製品も提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

肺癌、乳癌又は前立腺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である患者において、エリスロポエチンの欠乏又は低赤血球集団若しくは欠陥赤血球集団によって特徴づけられる障害を治療する方法であって、

(a) アミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (配列番号 1 4) を含む第 1 ペプチドモノマー；

(b) アミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (配列番号 1 4) を含む第 2 ペプチドモノマー；

(c) 第 1 ペプチドモノマーを第 2 ペプチドモノマーに共有結合するリンカー部分；及び 10

(d) リンカー部分とポリエチレングリコール (P E G) 部分を共有結合によって連結するスペーサー部分であって、前記 P E G 部分が約 1 0, 0 0 0 ダルトン～約 6 0, 0 0 0 ダルトンの分子量を有する直鎖状の非分枝 P E G を含む、スペーサー部分を含有する化合物の治療有効量を患者に投与することを含む、方法。

## 【請求項 2】

アミノ酸配列が C 末端に (M e G)、K 又は (M e G) K を付加的に含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

アミノ酸配列が (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R K (配列番号 1) である、請求項 2 に記載の方法。 20

## 【請求項 4】

アミノ酸配列が (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (M e G) (配列番号 3) である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

アミノ酸配列が (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (M e G) K (配列番号 2) である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

第 1 ペプチドモノマーの 2 個のシステイン残基がジスルフィド架橋を介して共に結合しており、第 2 ペプチドモノマーの 2 個のシステイン残基がジスルフィド架橋を介して共に結合している、請求項 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 7】

リンカー部分がリシン残基のアミド誘導体を含む、請求項 1 に記載の方法。

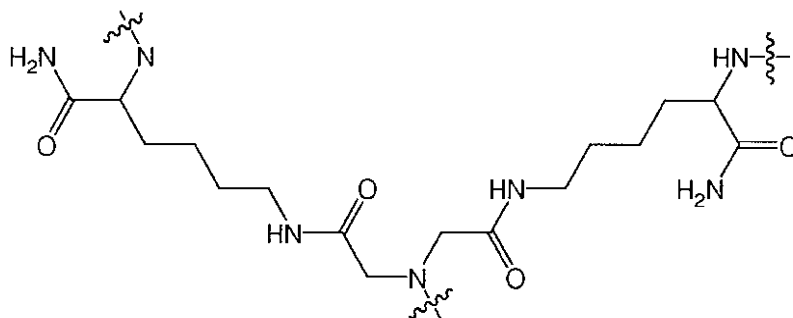
## 【請求項 8】

リシン残基のアミド誘導体はその側鎖の窒素原子を介して共有結合している、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

リンカー部分が式：

## 【化 1】

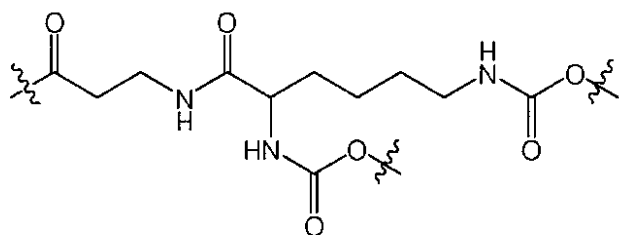


によって定義される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

スペーサー部分が式：

## 【化 2】



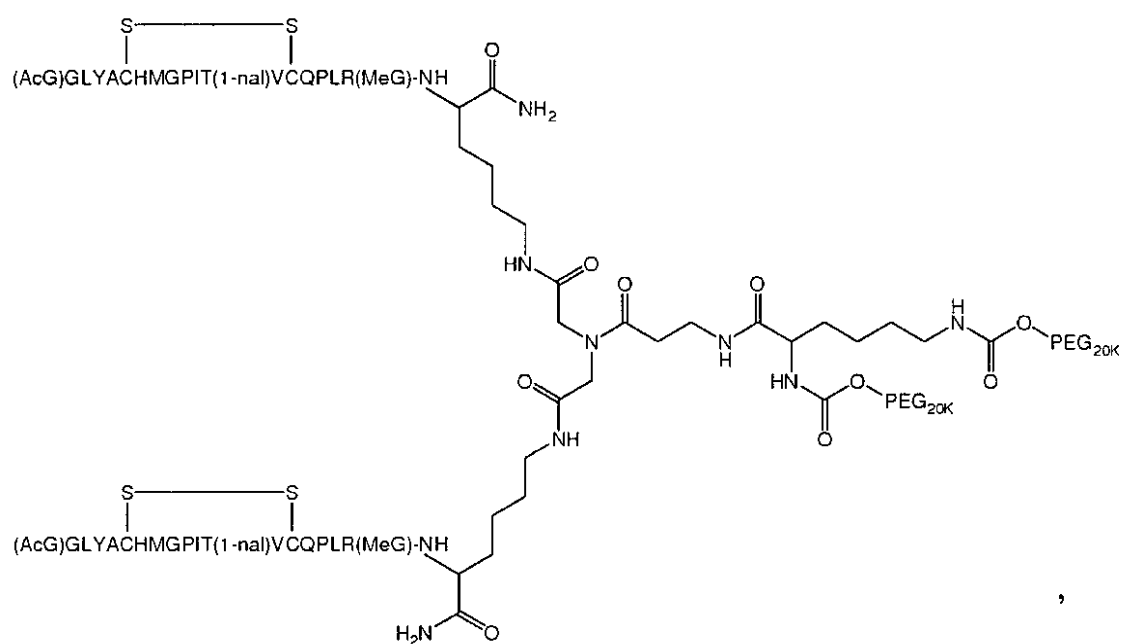
10

によって定義される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

化合物が式：

## 【化 3】



20

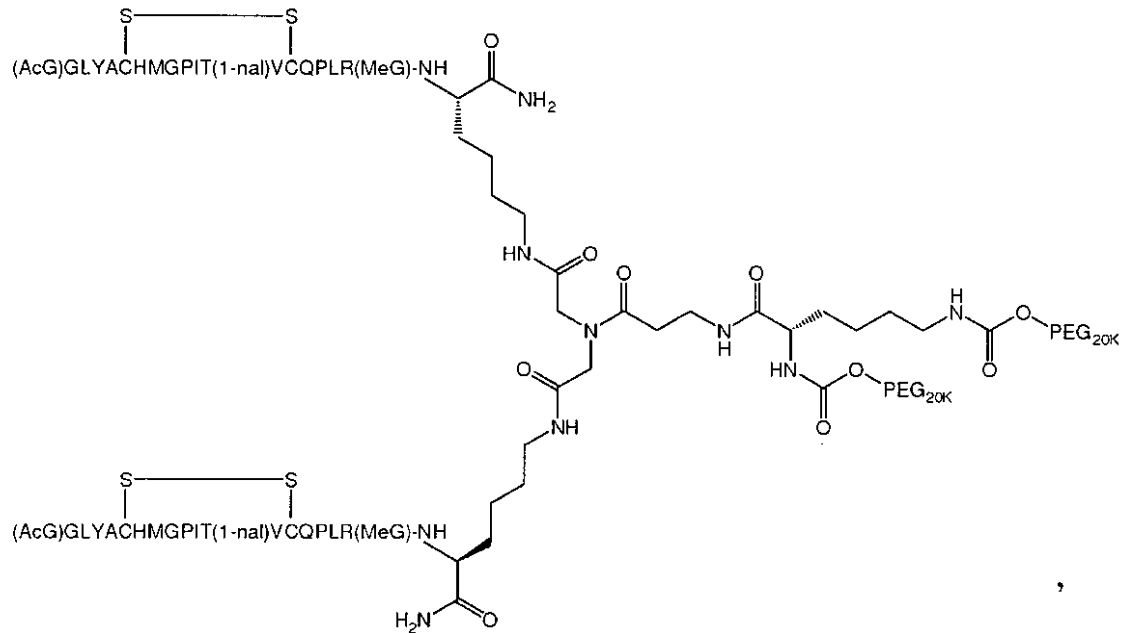
30

又はその医薬的に許容される塩、水和物、溶媒和物、互変異性体、アセタール、ケタール、プロドラッグ若しくは光学異性体によってさらに定義される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

化合物が、

## 【化 4】



10

又はその医薬的に許容される塩としてさらに定義され、それについての他の光学異性体を実質的に含まない、請求項 11 に記載の方法。

20

## 【請求項 13】

PEG 部分が約 10,000 ダルトン～約 50,000 ダルトンの分子量を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

PEG 部分が約 20,000 ダルトン～約 40,000 ダルトンの分子量を有する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

障害が貧血である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 16】

障害が化学療法起因の貧血である、請求項 15 に記載の方法。

30

## 【請求項 17】

患者が膀胱、血液、骨、脳、乳房、中枢神経系、結腸、子宮内膜、食道、尿生殖路、頭部、喉頭、肝臓、肺、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、脾臓、小腸、大腸、胃又は精巣の癌を有する、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 18】

患者が肺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 19】

肺癌が非小細胞肺癌である、請求項 18 に記載の方法。

40

## 【請求項 20】

患者が前立腺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 21】

患者が乳癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 22】

患者が霊長動物である、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 23】

患者がヒトである、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 24】

治療を必要とする患者を同定することをさらに含む、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 25】

化合物を局所的に投与する、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 26】

化合物を全身的に投与する、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 27】

化合物を静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内経路で、皮下的に又は経口的に投与する、請求項 26 に記載の方法。

10

## 【請求項 28】

治療有効量が患者の体重 1 kg 当たり化合物約 0.01 mg ～ 約 1,000 mg の用量である、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

治療有効量が患者の体重 1 kg 当たり化合物約 0.025 mg ～ 約 0.5 mg の用量である、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

治療有効量が患者の体重 1 kg 当たり化合物約 0.025 mg ～ 約 0.2 mg の用量である、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 31】

治療有効量が患者の体重 1 kg 当たり化合物約 0.05 mg ～ 約 0.1 mg の用量である、請求項 28 に記載の方法。

20

## 【請求項 32】

治療有効量を 1 日 1 回の単回用量で投与する、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 33】

治療有効量を 1 日 2 回又はそれ以上の分割用量で投与する、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 34】

治療有効量を 3 ～ 4 週間ごとに 1 回投与する、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 35】

肺癌、乳癌又は前立腺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である患者において、エリスロポエチンの欠乏又は低赤血球集団若しくは欠陥赤血球集団によって特徴づけられる障害を予防する又は治療するための医薬組成物であって、

30

(a) アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLR (配列番号 14) を含む第 1 ペプチドモノマー；

(b) アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLR (配列番号 14) を含む第 2 ペプチドモノマー；

(c) 第 1 ペプチドモノマーを第 2 ペプチドモノマーに共有結合するリンカー部分；及び

(d) リンカー部分とポリエチレングリコール (PEG) 部分を共有結合によって連結するスペーサー部分であって、前記 PEG 部分が約 10,000 ダルトン～約 60,000 ダルトンの分子量を有する直鎖状の非分枝 PEG を含む、スペーサー部分を含む化合物を含有する、医薬組成物。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、エリスロポエチン受容体 (EPO-R) のアゴニストであるペプチド化合物に関する。本発明はまた、化学療法起因の貧血 (chemotherapy induced anemia) を含む、不十分な又は欠陥のある赤血球産生に関連する障害を治療するためにそのようなペプチド化合物を使用する治療方法に関する。本発明のペプチド化合物を含有する医薬組成物も

50

提供される。

【背景技術】

【0002】

貧血は癌化学療法の典型的な合併症である。そのような癌患者において内因性エリスロポエチンレベルが有意に低い場合があることは公知である。成人男性に関しては、典型的には13.0 g/dL（グラム/デシリットル）未満のヘモグロビンレベルが貧血の診断指標であり、成人女性については、診断閾値は典型的には12.0 g/dL未満である。

【0003】

エリスロポエチン（EPO）は、約34キロダルトン（kD）の分子量を有する165アミノ酸の糖タンパク質ホルモンであり、アミノ酸24位、38位、83位及び126位に好ましいグリコシル化部位を有する。エリスロポエチンは、最初に23アミノ酸のシグナルペプチドを有する前駆体タンパク質として産生される。EPOは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 及びアシアロの3つの形態で存在し得る。 $\alpha$ 型と $\beta$ 型はその炭水化物成分がわずかに異なるが、同じ効力、生物活性及び分子量を有する。アシアロ型は、末端の炭水化物（シアル酸）が除去された $\alpha$ 型又は $\beta$ 型である。EPOをコードするDNA配列は報告されている [Linへの米国特許第4,703,008号]。

【0004】

EPOは赤血球前駆細胞の有糸分裂と分化を刺激し、したがって赤血球の産生を確実にする。EPOは、低酸素状態が優勢である場合に腎臓において産生される。EPOが誘導する赤血球前駆細胞の分化の間に、グロビン合成が誘導され、ヘム複合体の合成が刺激されて、フェリチン受容体の数が増加する。これらの変化により、細胞はより多くの鉄を獲得し、成熟赤血球において酸素と結合する機能性ヘモグロビンを合成する。このようにして、赤血球とそのヘモグロビンは、身体に酸素を供給するうえで鍵となる役割を果たす。これらの変化は、EPOと赤血球前駆細胞の表面上の適切な受容体との相互作用によって開始される [例えば、Graber and Krantz (1978) Ann. Rev. Med. 29:51-66参照]。

【0005】

EPOは、身体が健康な状態にあり、組織が既存の数の赤血球から十分な酸素添加を受けている場合は、非常に低い濃度で血漿中に存在する。この正常な低濃度は、通常加齢によって失われる赤血球の補充を刺激するのに十分である。

【0006】

循環中のEPOの量は、循環中の血液細胞による酸素輸送が減少する低酸素の条件下で増加する。低酸素は、例えば、出血による実質的な血液損失、放射線への過剰曝露による赤血球の破壊、高所若しくは長時間の意識消失に起因する酸素摂取量の減少、又は様々な形態の貧血によって引き起こされ得る。そのような低酸素ストレスに応答して、EPOレベルの上昇が赤血球系前駆細胞の増殖を刺激することによって赤血球の産生を増加させる。循環中の赤血球数が通常の組織酸素要求に必要なとされる量を上回ると、循環中のEPOレベルは低下する。

【0007】

EPOは赤血球形成の過程において必須であるので、このホルモンは、低赤血球産生又は赤血球産生欠乏によって特徴づけられる血液障害の診断及び治療の両方において潜在的に有用な適用を有する。種々の試験により、様々な疾患状態、障害及び血液学的異常の状態に対するEPO治療の効果を予測するための基礎が提供されており、これには $\beta$ サラセミア [Vedovato, et al. (1984) Acta. Haematol. 71:211-213参照]；嚢胞性線維症 [Vichinsky, et al. (1984) J. Pediatric 105:15-21参照]；妊娠及び月経障害 [Cotes, et al. (1993) Brit. J. Obstet. Gynaecol. 90:304-311参照]；未熟児の初期貧血 [Haga, et al. (1983) Acta Paediatr. Scand. 72:827-831参照]；脊髄損傷 [Claus-Walker, et al. (1984) Arch. Phys. Med. Rehabil. 65:370-374参照]；宇宙飛行 [Dunn, et al. (1984) Eur. J. Appl. Physiol. 52:178-182参照]；急性失血 [Miller, et al. (1982) Brit. J. Haematol. 52:545-590参照]；老化 [Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med. 103:574-580 and 581-588 and Lipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509参照]；赤血球

10

20

30

40

50

生成異常に伴う様々な腫瘍性疾患状態 [Dainiak, et al. (1983) Cancer 5: 1101-1106 and Schwartz, et al. (1983) Otolaryngol. 109:269-272参照] ; 並びに腎不全 [Eschbach, et al. (1987) N. Eng. J. Med. 316:73-78参照] が含まれる。

#### 【0008】

精製された均質な EPO が特徴づけられている [Hewick への米国特許第 4, 677, 195 号]。天然 EPO と同じ生化学的及び免疫学的性質を有する組換えポリペプチドを生産するため、EPO をコードする DNA 配列が精製され、クローニングされ、発現された。天然 EPO と同一のオリゴ糖を有する組換え EPO 分子も生産された [Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:12059-12076参照]。

#### 【0009】

EPO の生物学的作用は、一部には、細胞膜結合受容体との相互作用を通して媒介されると考えられる。マウス脾臓から単離した未成熟赤血球系細胞を使用した初期試験は、EPO 結合細胞表面タンパク質が、それぞれ 85, 000 ダルトン及び 100, 000 ダルトンのおよその分子量を有する 2 つのポリペプチドを含むことを示唆した [Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694参照]。EPO 結合部位の数は、細胞表面当たり平均 800 ~ 1000 と算定された。これらの結合部位のうちで、約 300 が約 90 pM (ピコモル) の  $K_d$  で EPO に結合し、残りは約 570 pM の低い親和性で EPO に結合した [Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562参照]。独立した試験は、フレンド白血病ウイルスの貧血株 (FVA) を注射したマウスから調製した EPO 応答性脾臓赤芽球が、それぞれ約 100 pM 及び 800 pM の  $K_d$  値を有する、合計約 400 の高親和性及び低親和性 EPO 結合部位を有することを示唆した [Landschulz, et al. (1989) Blood 73:1476-1486参照]。

#### 【0010】

その後の研究は、2 つの形態の EPO 受容体 (EPO-R) が 1 個の遺伝子によってコードされることを示した。この遺伝子はクローニングされている [例えば、Jones, et al. (1990) Blood 76, 31-35; Noguchi, et al. (1991) Blood 78:2548-2556; Maouche, et al. (1991) Blood 78:2557-2563参照]。例えば、マウス及びヒト EPO-R タンパク質についての DNA 配列及びコードされるペプチド配列は、D' Andrea, et al. への国際公開公報第 90/08822 号に記載されている。現在のモデルは、EPO-R への EPO の結合が 2 つの EPO-R 分子の二量体化及び活性化をもたらし、それがシグナル伝達のその後の工程を生じさせることを示唆する [例えば、Watowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144参照]。

#### 【0011】

EPO-R についてのクローン化遺伝子が入手可能であることは、この重要な受容体のアゴニスト及びアンタゴニストについての探索を容易にする。組換え受容体タンパク質が利用できることにより、種々のランダム及び半ランダムなペプチド多様性生成系における受容体-リガンド相互作用の試験が可能となる。これらの系は、「プラスミド上のペプチド」系 [米国特許第 6, 270, 170 号に記載されている] ; 「ファージ上のペプチド」系 [米国特許第 5, 432, 018 号及び Cwirla, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382 に記載されている] ; 「コード化合成ライブラリー」 (ESL) 系 [1992 年 9 月 16 日出願の米国特許出願第 946, 239 号に記載されている] ; 及び「非常に大規模な固定化ポリマー合成」系 [米国特許第 5, 143, 854 号 ; 国際公開公報第 PCT 90/15070 号 ; Fodor, et al. (1991) Science 251 :767-773 ; Dower and Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180 ; 及び米国特許第 5, 424, 186 号に記載されている] を含む。

#### 【0012】

少なくともある程度 EPO-R と相互作用するペプチドが同定されており、例えば、Wrighton, et al. への米国特許第 5, 773, 569 号、同第 5, 830, 851 号及び同第 5, 986, 047 号 ; Wrighton, et al. への国際公開公報第 96/40749 号 ; Johnson and Zivin への米国特許第 5, 767, 078 号及び国際公開公報第 96/407

10

20

30

40

50

72号；Baluへの国際公開公報第01/38342号；並びにSmith-Swintosky, et al.への国際公開公報第01/91780号に記載されている。特に、ペプチドモチーフを含むペプチドの群が同定されており、その成員はEPO-Rに結合して、EPO依存性細胞増殖を刺激する。さらに、モチーフを含むことがこれまでに同定されたペプチドは、インビトロで、約20ナノモル(nM)～約250nMのEC50値でEPO依存性細胞増殖を刺激する。したがって、EPOによって刺激される最大細胞増殖の50%を刺激するためには20nM～250nMのペプチド濃度が必要である。EPO受容体に結合するさらなる他のペプチド及びその構築物は、すべて2003年5月12日出願の米国特許出願第60/470,244号、同第60/470,245号及び同第60/469,993号；いずれも2004年11月11日出願の米国特許出願第60/627,432号及び同第60/627,433号；2004年5月12日出願の米国特許出願第10/844,968号で、現在の米国特許第7,084,245号、米国特許出願公開第2007/0104704号及び同第2008/0081783号；並びにいずれも2004年5月12日出願で、それぞれ国際公開公報第2004/101611号及び同第2004/101606号として公開されている、国際出願番号第PCT/US2004/14886号及び同第PCT/US2004/014889号に記載されている。これらの特許出願、特許公開及び特許の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許第4,703,008号

【特許文献2】米国特許第4,677,195号

【特許文献3】国際公開公報第90/08822号

【特許文献4】米国特許第6,270,170号

【特許文献5】米国特許第5,432,018号

【特許文献6】米国特許出願第946,239号

【特許文献7】米国特許第5,143,854号

【特許文献8】国際公開公報第PCT90/15070号

【特許文献9】米国特許第5,424,186号

【特許文献10】米国特許第5,773,569号

【特許文献11】米国特許第5,830,851号

【特許文献12】米国特許第5,986,047号

【特許文献13】国際公開公報第96/40749号

【特許文献14】米国特許第5,767,078号

【特許文献15】国際公開公報第96/40772号

【特許文献16】国際公開公報第01/38342号

【特許文献17】国際公開公報第01/91780号

【特許文献18】米国特許出願第60/470,244号

【特許文献19】米国特許出願第60/470,245号

【特許文献20】米国特許出願第60/469,993号

【特許文献21】米国特許出願第60/627,432号

【特許文献22】米国特許出願第60/627,433号

【特許文献23】米国特許出願第10/844,968号で、現在の米国特許第7,084,245号

【特許文献24】米国特許出願公開第2007/0104704号

【特許文献25】米国特許出願第2008/0081783号

【特許文献26】国際公開公報第2004/101611号として公開されている、国際出願第PCT/US2004/14886号

【特許文献27】国際公開公報第2004/101606号として公開されている、国際出願第PCT/US2004/014889号

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1】 Graber and Krantz (1978) Ann. Rev. Med. 29:51-66
- 【非特許文献 2】 Vedovato, et al. (1984) Acta. Haematol. 71:211-213
- 【非特許文献 3】 Vichinsky, et al. (1984) J. Pediatric 105:15-21
- 【非特許文献 4】 Cotes, et al. (1993) Brit. J. Ostet. Gyneacol. 90:304-311
- 【非特許文献 5】 Haga, et al. (1983) Acta Pediatr. Scand. 72:827-831
- 【非特許文献 6】 Claus-Walker, et al. (1984) Arch. Phys. Med. Rehabil. 65:370-374
- 【非特許文献 7】 Dunn, et al. (1984) Eur. J. Appl. Physiol. 52:178-182
- 【非特許文献 8】 Miller, et al. (1982) Brit. J. Haematol. 52:545-590
- 【非特許文献 9】 Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med. 103:574-580 and 581-588
- 【非特許文献 10】 Lipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509 10
- 【非特許文献 11】 Dainiak, et al. (1983) Cancer 5: 1101-1106
- 【非特許文献 12】 Schwartz, et al. (1983) Otolaryngol. 109:269-272
- 【非特許文献 13】 Eschbach. et al. (1987) N. Eng. J. Med. 316:73-78
- 【非特許文献 14】 Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:12059-12076
- 【非特許文献 15】 Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694
- 【非特許文献 16】 Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562
- 【非特許文献 17】 Landschulz, et al. (1989) Blood 73:1476-1486
- 【非特許文献 18】 Jones, et al. (1990) Blood 76, 31-35
- 【非特許文献 19】 Noguchi, et al. (1991) Blood 78:2548-2556
- 【非特許文献 20】 Maouche, et al. (1991) Blood 78:2557-2563 20
- 【非特許文献 21】 Watowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144

- 【非特許文献 22】 Cwirla, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382
- 【非特許文献 23】 Fodor, et al. (1991) Science 251 :767-773
- 【非特許文献 24】 Dower and Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0014】

EPO-R アゴニストの非常に大きな潜在的可能性にもかかわらず、特定疾患、例えば化学療法起因の貧血の治療へのそれらの適用可能性を同定する必要が現在も存在する。貧血は癌化学療法の高頻度の合併症である。そのような広いカテゴリーの中で、特定の EPO-R アゴニストが化学療法起因の貧血を治療するための有望な標的となる癌のサブタイプを同定する必要性も残されている。本発明はそのような方法を提供する。 30

#### 【0015】

この章の中で及び本明細書全体を通じて引用される参考文献の言及及び／又は考察は、単に本発明の説明を明確にするために提供されるものであり、そのような参考文献が本発明の「先行技術」であることの承認ではない。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0016】

本発明は、乳癌、前立腺癌又は肺癌の治療の間に起こり得るような、化学療法起因の貧血の治療のためのペプチド化合物を含む新規方法を提供する。本発明の方法によって使用されるペプチド化合物は、アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLRK (配列番号 1) を有するペプチドモノマーのホモダイマー、アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLR (MeG) K (配列番号 2) を有するペプチドモノマーのホモダイマー、及びアミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLR (MeG) (配列番号 3) を有するペプチドモノマーのホモダイマーを含み、前記配列において各々のアミノ酸は標準的な 1 文字略記によって示されており、「(AcG)」は N-アセチルグリシンであり、「(1-nal)」は 1-ナフチルアラニンであり、「(MeG)」は、サルコシンとしても公知の N-メチルグリシンである。ペプチドダイマーの各々のペプチドモノマーは、モノマーのシス 40 50

テイン残基の間に分子内ジスルフィド結合を含む。

【0017】

1つの態様では、本発明は、肺癌、乳癌又は前立腺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である患者において、エリスロポエチンの欠乏又は低赤血球集団若しくは欠陥赤血球集団 (low or defective red blood cell population) によって特徴づけられる障害を治療する方法であって、(a) アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-na1) VCQPLR (配列番号14) を含む第1ペプチドモノマー；(b) アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-na1) VCQPLR (配列番号14) を含む第2ペプチドモノマー；(c) 第1ペプチドモノマーを第2ペプチドモノマーに共有結合するリンカー部分；及び(d) リンカー部分とポリエチレングリコール (PEG) 部分を共有結合によって連結するスペーサー部分であって、前記PEG部分が約10,000ダルトン～約60,000ダルトンの分子量を有する直鎖状の非分枝PEGを含むスペーサー部分、を含有する化合物の治療有効量を患者に投与することを含む方法を提供する。

10

【0018】

一部の実施形態では、アミノ酸配列は、C末端に (MeG)、K又は (MeG) Kを付加的に含む。もう1つの実施形態では、アミノ酸配列は (AcG) GLYACHMGPIT (1-na1) VCQPLRK (配列番号1) である。さらにもう1つの実施形態では、アミノ酸配列は (AcG) GLYACHMGPIT (1-na1) VCQPLR (MeG) (配列番号3) である。さらなる実施形態では、アミノ酸配列は (AcG) GLYACHMGPIT (1-na1) VCQPLR (MeG) K (配列番号2) である。

20

【0019】

一部の実施形態では、第1ペプチドモノマーの2個のシステイン残基はジスルフィド架橋を介して共に結合しており、第2ペプチドモノマーの2個のシステイン残基はジスルフィド架橋を介して共に結合している。

【0020】

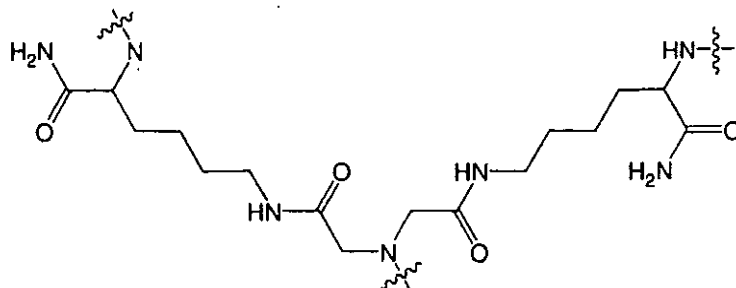
一部の実施形態では、リンカー部分はリシン残基のアミド誘導体を含む。この実施形態の変形では、リシン残基はその側鎖の窒素原子を介して共有結合している。

【0021】

一部の実施形態では、リンカー部分は式：

30

【化1】



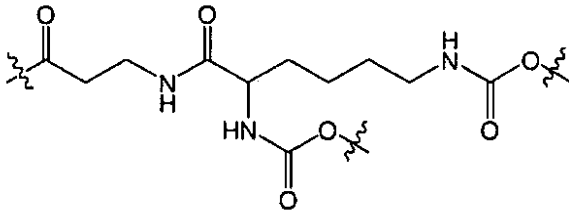
40

によって定義される。

【0022】

一部の実施形態では、スペーサー部分は式：

## 【化 2】

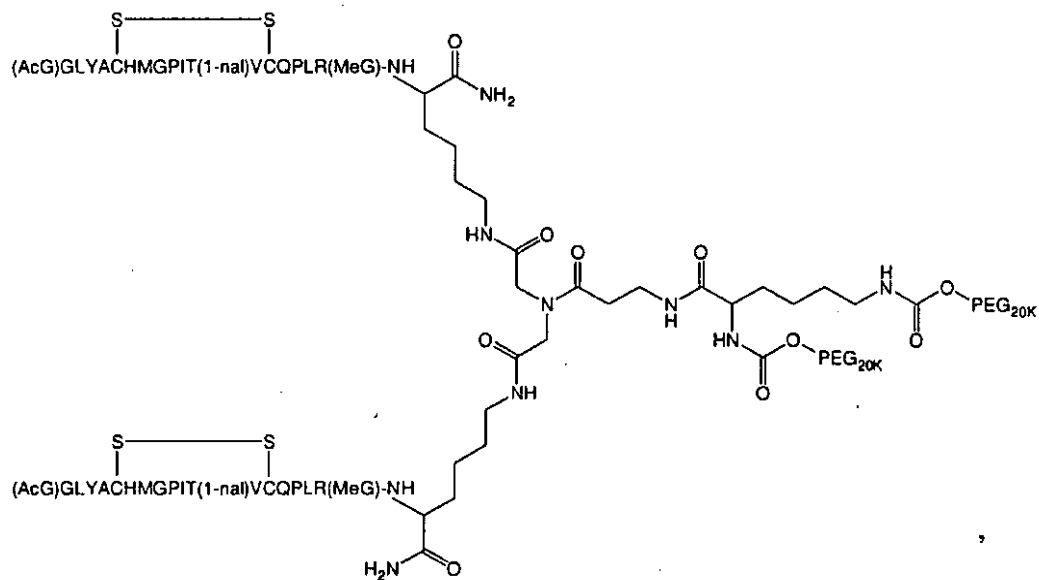


によって定義される。

## 【 0 0 2 3】

一部の実施形態では、化合物は式：

## 【化 3】

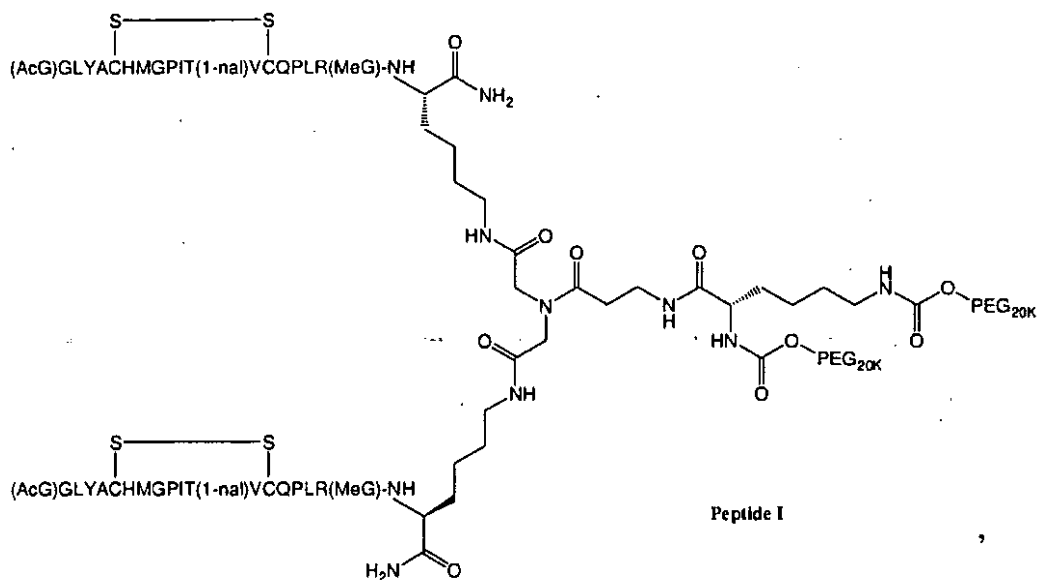


又はその医薬的に許容される塩、水和物、溶媒和物、互変異性体、アセタール、ケタール、プロドラッグ若しくは光学異性体によってさらに定義される。

## 【 0 0 2 4】

例えば、化合物は、

## 【化 4】



10

20

30

40

50

又はその医薬的に許容される塩としてさらに定義することができ、それについての他の光学異性体を実質的に含まない。

【0025】

一部の実施形態では、PEG部分は約10,000ダルトン～約50,000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG部分は約20,000ダルトン～約40,000ダルトンの分子量を有する。

【0026】

一部の実施形態では、障害は貧血、例えば化学療法起因の貧血である。

【0027】

一部の実施形態では、患者は、膀胱、血液、骨、脳、乳房、中枢神経系、結腸、子宮内膜、食道、尿生殖路、頭部、喉頭、肝臓、肺、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、脾臓、小腸、大腸、胃又は精巣の癌を有する。 10

【0028】

一部の実施形態では、患者は肺癌、例えば非小細胞肺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である。

【0029】

一部の実施形態では、患者は前立腺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である。

【0030】

一部の実施形態では、患者は乳癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である。 20

【0031】

一部の実施形態では、患者は霊長動物、例えばヒトである。

【0032】

一部の実施形態では、本発明の方法は、治療を必要とする患者を同定することをさらに含む。

【0033】

一部の実施形態では、化合物は局所的に投与される。

【0034】

一部の実施形態では、化合物は全身的に投与される。 30

【0035】

一部の実施形態では、化合物は、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内経路で、皮下的に又は経口的に投与される。

【0036】

一部の実施形態では、治療有効量は、患者の体重1kg当たり化合物約0.01mg～約1,000mgの用量である。一部の実施形態では、治療有効量は、患者の体重1kg当たり化合物約0.025mg～約0.5mgの用量である。一部の実施形態では、治療有効量は、患者の体重1kg当たり化合物約0.025mg～約0.2mgの用量である。一部の実施形態では、治療有効量は、患者の体重1kg当たり化合物約0.05mg～約0.1mgの用量である。 40

【0037】

一部の実施形態では、治療有効量は1日1回の単回用量で投与される。一部の実施形態では、治療有効量は1日2回又はそれ以上の分割用量で投与される。一部の実施形態では、治療有効量は3～4週間ごとに1回投与される。

【0038】

本発明はさらに、そのようなペプチド化合物を含む医薬組成物を提供する。例えば一態様において、本発明は、肺癌、乳癌又は前立腺癌のための化学療法を現在受けている、過去に受けたことがある又は今後受ける予定である患者においてエリスロポエチンの欠乏又は低赤血球集団若しくは欠陥赤血球集団によって特徴づけられる障害を予防する又は治療するための医薬組成物であって、 50

(a) アミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (配列番号 14) を含む第 1 ペプチドモノマー；

(b) アミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (配列番号 14) を含む第 2 ペプチドモノマー；

(c) 第 1 ペプチドモノマーを第 2 ペプチドモノマーに共有結合するリンカー部分；及び

(d) リンカー部分とポリエチレングリコール (P E G) 部分を共有結合によって連結するスペーサー部分であって、前記 P E G 部分が約 10,000 ダルトン～約 60,000 ダルトンの分子量を有する直鎖状の非分枝 P E G を含む、スペーサー部分を含む化合物を含有する医薬組成物を提供する。

10

#### 【0039】

ある実施形態では、P E G は約 20,000 ダルトンの分子量を有する。他の実施形態では、医薬組成物は、前記化合物のいずれか 1 つと医薬的に許容される担体を含有する。

#### 【0040】

前記実施形態のすべてに関して、薬剤をイオン化形態又は溶媒和形態で投与することは当分野において周知であるので、本発明は、そのようなイオン化形態及び溶媒和物が指定されているか否かにかかわらず、化合物のすべての医薬的に許容されるイオン化形態（例えば塩）及び溶媒和物（例えば水和物）を包含することが意図されていることに留意されたい。また、特定の立体化学が指定されていない限り、化合物の記述は、化合物が個別の異性体として存在するか又は異性体の混合物として存在するかとは無関係に、すべての可能な立体異性体（例えば、キラル中心の数に依存して鏡像異性体又はジアステレオマー）を包含することが意図されていることにも留意されたい。さらに、特に指定されない限り、化合物の記述は、すべての可能な共鳴形態及び互変異性体を包含することが意図されている。特許請求の範囲に関して、「式を含む化合物」、「式を有する化合物」及び「式の化合物」という言語は、特定の請求項において明確に指定されない限り、化合物及びすべての医薬的に許容されるイオン化形態と溶媒和物、すべての可能な立体異性体、並びにすべての可能な共鳴形態及び互変異性体を包含することが意図されている。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0041】

【図 1】 癌患者群別のペプチド I 治療による貧血の改善。ペプチド I による治療後の癌群別の応答患者のパーセンテージを示す。応答は、治療の第 9 週までの 1 g / d L 又はそれ以上のヘモグロビン (H g b) 濃度の上昇によって定義した (図 3 参照)。N S C L C は非小細胞肺癌である。

30

#### 【0042】

【図 2】 癌患者群別のペプチド I の平均有効用量。用量 (Y 軸) は、体重 1 k g 当たりのペプチド I の m g で示している。バーは、指示されている群の患者に投与した最小用量と最大用量を示す。N S C L C は非小細胞肺癌である。その群の各々の患者に投与した最終用量から群平均用量を算定した。

#### 【0043】

【図 3】 癌患者群別のペプチド I 治療の関数としてのヘモグロビン曲線。g / d L で表した血中ヘモグロビン (H g b) レベルを 4 回投与の多週間にわたる試験を通じて観測した。3 つのシリーズの曲線は、各々異なる種類の癌についての治療を受けている、3 つの群の患者に対応する。

40

#### 【0044】

【図 4】 乳癌患者群に対するペプチド I 治療の関数としてのヘモグロビン曲線。g / d L で表した血中ヘモグロビン (H g b) レベルを 4 回投与の多週間にわたる試験を通じて観測した。各々の値に誤差バーを割り当てた。

#### 【0045】

【図 5】 N S C L C 癌患者群に対するペプチド I 治療の関数としてのヘモグロビン曲線。g / d L での血中ヘモグロビン (H g b) レベルを 4 回投与の多週間にわたる試験を通じ

50

て観測した。各々の値に誤差バーを割り当てた。

【0046】

【図6】前立腺癌患者群に対するペプチドI治療の関数としてのヘモグロビン曲線。g/dLで表した血中ヘモグロビン(Hgb)レベルを4回投与の多週間にわたる試験を通じて観測した。各々の値に誤差バーを割り当てた。

【発明を実施するための形態】

【0047】

定義

ペプチド中のアミノ酸残基を以下のように略記する：フェニルアラニンはPhe又はFである；ロイシンはLeu又はLである；イソロイシンはIle又はIである；メチオニンはMet又はMである；バリンはVal又はVである；セリンはSer又はSである；プロリンはPro又はPである；トレオニンはThr又はTである；アラニンはAla又はAである；チロシンはTyr又はYである；ヒスチジンはHis又はHである；グルタミンはGln又はQである；アスパラギンはAsn又はNである；リシンはLys又はKである；アスパラギン酸はAsp又はDである；グルタミン酸はGlu又はEである；システインはCys又はCである；トリプトファンはTrp又はWである；アルギニンはArg又はRである；そしてグリシンはGly又はGである。ペプチド中の従来型でないアミノ酸は以下のように略記する：1-ナフチルアラニンは1-nal又はNpである；N-メチルグリシン（サルコシンとしても公知である）はMeG又はScである；そしてアセチル化グリシン（N-アセチルグリシン）はAcGである。

【0048】

本明細書で使用される、「ポリペプチド」又は「タンパク質」という用語は、アミド結合を介して共に連結されたαアミノ酸であるアミノ酸モノマーのポリマーを指す。ポリペプチドは、したがって、少なくとも2アミノ酸残基の長さであり、通常はより長い。一般に、「ペプチド」という用語は、数個のアミノ酸残基の長さしかないポリペプチドを指す。本発明の新規EPO-Rアゴニストペプチドは、好ましくは約50アミノ酸残基の長さにすぎない。それらは、より好ましくは約17～約40アミノ酸残基長である。ポリペプチドは、ペプチドと異なり、どのような数のアミノ酸残基も含み得る。したがって、ポリペプチドという用語は、ペプチド並びにより長い配列のアミノ酸を包含した。

【0049】

本明細書で使用される、「医薬的に許容される」という語句は、「一般的に安全とみなされる」分子実体及び組成物、例えば、生理的に耐容され、典型的にはヒトに投与されたときアレルギー反応又は同様の有害作用、例えば胃の不調、めまい感等を生じさせない分子実体及び組成物を指す。好ましくは、本明細書で使用される、「医薬的に許容される」という用語は、連邦政府若しくは州政府の規制機関によって承認されているか、又は動物、より詳細にはヒトにおける使用に関して米国薬局方若しくは他の一般的に認められている薬局方にリストされていることを意味する。「担体」という用語は、化合物がそれと共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤又はビヒクルを指す。そのような医薬担体は、滅菌液体、例えば水及び油であり得、石油、動物、植物又は合成起源のもの、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等を含む。水又は水溶液食塩水並びにデキストロース及びグリセロール水溶液が、特に注射溶液のために、担体として好ましく使用される。適切な医薬担体は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。

【0050】

本明細書で使用される、「アゴニスト」という用語は、その相補的で生物学的に活性な受容体に結合し、受容体を活性化して、受容体における生物学的応答を生じさせる又は受容体の既に存在する生物活性を増強する、生物学的に活性なリガンドを指す。

【0051】

EPO-Rアゴニストであるペプチド

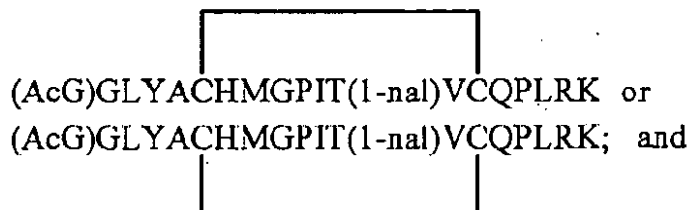
本発明は、著しく高い効力と活性を有するEPO-Rアゴニストであるペプチド化合物

の新規使用を提供する。これらのペプチド化合物は、アミノ酸配列 (AcG) GLYAC HMGPIT (1-nal) VCQPLRK (配列番号 1) を有するペプチドモノマーのホモダイマー、又はアミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLR (MeG) K (配列番号 2) を有するペプチドモノマーのホモダイマーであり、前記配列において各々のアミノ酸は標準的な 1 文字略記によって示されており、「(AcG)」は N-アセチルグリシンであり、「(1-nal)」は 1-ナフチルアラニンであり、「(MeG)」は、サルコシンとしても公知の N-メチルグリシンである。ペプチドダイマーの各々のペプチドモノマーは、モノマーのシステイン残基の間に分子内ジスルフィド結合を含む。そのようなモノマーは、以下のように図式的に表し得る：

【化 5】

10

(SEQ ID NO: 1)

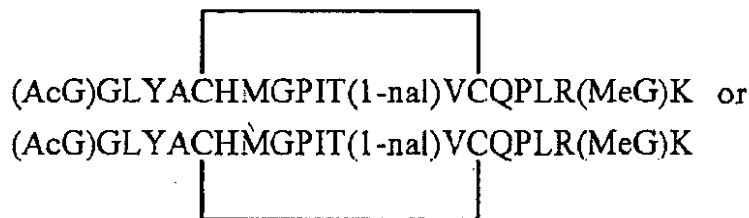


(配列番号 1)

【化 6】

20

(SEQ ID NO: 2)

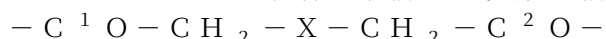


(配列番号 2)

30

【0052】

これらの単量体ペプチドは、高い EPO-R アゴニスト活性を有するペプチドダイマーを提供するために二量体化することができる。リンカー (L<sub>K</sub>) 部分は分枝鎖状の第三級アミドであり、各々のモノマーの C 末端リシン残基に同時結合することにより、2 つのペプチドモノマーの C 末端を架橋する。第三級アミドリンカーは、



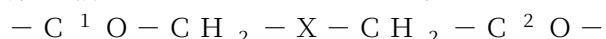
[式中、X は  $NC(=O)-(CH_2)_2-NH-$  であり、リンカーの C<sup>1</sup> は、第 1 ペプチドモノマーの C 末端リシン残基の ε アミノ基とアミド結合を形成し、リンカーの C<sup>2</sup> は、第 2 ペプチドモノマーの C 末端リシン残基の ε アミノ基とアミド結合を形成し、そして X の N<sup>1</sup> は、カルバメート結合又はアミド結合を介して活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合しており、PEG は約 20,000 ~ 約 40,000 ダルトン (「約」という用語は、PEG の製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す) の分子量を有する]

40

と表すことができる。

【0053】

第三級アミドリンカーはまた、

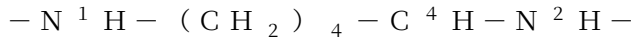


[式中、X は  $NC(=O)-(CH_2)_2-NH-C^3O-$  であり、リンカーの C<sup>1</sup> は、第 1 ペプチドモノマーの C 末端リシン残基の ε アミノ基とアミド結合を形成し、そしてリンカーの C<sup>2</sup> は、第 2 ペプチドモノマーの C 末端リシン残基の ε アミノ基とアミド結合を形成す

50

る]

と表すこともできる。本発明のペプチドダイマーは、以下の構造：



[式中、スペーサーのC<sup>4</sup>はXのC<sup>3</sup>に共有結合しており、スペーサーのN<sup>1</sup>は、カルバメート結合又はアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合しており、そしてスペーサーのN<sup>2</sup>は、カルバメート結合又はアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合しており、PEGは約10,000～約60,000ダルトン(「約」という用語は、PEGの製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す)の分子量を有する]

のスペーサー部分をさらに含む。

#### 【0054】

したがって、本発明において使用されるペプチドはまた、カルバメート結合又はアミド結合を介してペプチドダイマーの第三級アミドリンカーに共有結合している、PEG部分も含むことができる。PEGは医薬的に許容される水溶性ポリマーである。本発明における使用のためのPEGは、約20キロダルトン(20K)～約60K(「約」という用語は、PEGの製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す)の分子量を有する直鎖状の非分枝PEGであり得る。最も好ましくは、PEGは約30K～約40Kの分子量を有する。当業者は、所望投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性、もし存在する場合は、生物活性への作用、取扱いの容易さ、抗原性の程度又は抗原性の欠如、及び治療用ペプチドへのPEGの他の公知の作用などの考慮事項に基づいて、所望のポリマーサイズを選択することができる。

#### 【0055】

本発明のペプチド、ペプチドダイマー及び他のペプチドベースの分子は、分子の受容体結合部分(例えばペプチド+スペーサー)に水溶性ポリマーを連結するための様々な化学のいずれかを使用して水溶性ポリマー(例えばPEG)に結合することができる。典型的な実施形態は、水溶性ポリマーを受容体結合部分に共有結合するために単一連結部を使用するが、選択的实施形態では、複数の連結部も使用でき、スペーサー及び／又は一方若しくは両方のペプチド鎖への共有結合連結部を含み得る、異なる連結部において異なる種の水溶性ポリマーを受容体結合部分に結合するさらなる変形例を包含する。一部の実施形態では、ダイマー又はより高次のマルチマーは、異なる種のペプチド鎖を含む(すなわちヘテロダイマー又は他のヘテロマルチマー)。限定するわけではないが一例として、ダイマーは、PEG連結部を有する第1ペプチド鎖を含み得、第2ペプチド鎖は、PEG連結部を欠くか又は第1ペプチド鎖とは異なる結合化学を利用してもよく、一部の变形例では、スペーサーはPEG連結部を含み得るか又は含まなくてもよく、前記スペーサーは、PEG化されている場合、第1及び／又は第2ペプチド鎖とは異なる結合化学を利用し得る。選択的实施形態は、受容体結合部分のスペーサー部分に連結したPEGと、分子のペプチド部分のアミノ酸の1つの側鎖に結合した異なる水溶性ポリマー(例えば炭水化物)を使用する。

#### 【0056】

多種多様なポリエチレングリコール(PEG)種を受容体結合部分(ペプチド+スペーサー)のPEG化のために使用し得る。実質的にいかなる適切な反応性PEG試薬も使用できる。好ましい実施形態では、反応性PEG試薬は、受容体結合部分への結合時にカルバメート結合又はアミド結合の形成を生じさせる。適切な反応性PEG種は、NOF Corporation(Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 150-6019)のDrug Delivery Systemsカタログ(2003)及びNektar Therapeutics(490 Discovery Drive, Huntsville, Ala. 35806)のMolecular Engineeringカタログ(2003)において販売されているものを含むが、これらに限定されない。例えば、限定するわけではないが、以下のPEG試薬が様々な実施形態においてしばしば好ま

しい：m P E G 2 - N H S、m P E G 2 - A L D、マルチ-A r m P E G、m P E G ( M A L ) 2、m P E G 2 ( M A L )、m P E G - N H 2、m P E G - S P A、m P E G - S B A、m P E G - チオエステル、m P E G - ダブルエステル、m P E G - B T C、m P E G - B u t y r A L D、m P E G - A C E T、ヘテロ官能性 P E G ( N H <sub>2</sub> - P E G - C O O H、B o c - P E G - N H S、F m o c - P E G - N H S、N H S - P E G - V S、N H S - P E G - M A L)、P E G アクリレート ( A C R L - P E G - N H S)、P E G - リン脂質 (例えばm P E G - D S P E)、当業者によって選択される化学によって活性化されるグリセリンベースの P E G の G L シリーズを含む、S U N B R I T E シリーズのマルチアーム P E G、S U N B R I T E 活性化 P E G (カルボキシル - P E G、p - N P - P E G、トレシル - P E G、アルデヒド P E G、アセタール - P E G、アミノ - P E G、チオール - P E G、マレイミド - P E G、ヒドロキシル - P E G - アミン、アミノ - P E G - C O O H、ヒドロキシル - P E G - アルデヒド、カルボン酸無水物型 P E G、官能基化 P E G - リン脂質を含むが、これらに限定されない) のいずれか、並びに特定の適用及び用途のために当業者によって選択される他の類似の及び／又は適切な反応性 P E G。

10

### 【0057】

本発明の新規ペプチドはまた、カルバメート結合又はアミド結合を介してスペーサー部分に共有結合している2つの P E G 部分を含むことができ、スペーサー部分はペプチドダイマーの第三級アミドリinkerに共有結合している。本発明のそのような実施形態において使用される2つの P E G 部分の各々は直鎖状であり得、1つの結合点で共に連結され得る。各々の P E G 部分は、好ましくは約10キロダルトン (10K) ~ 約60K (「約」という用語は、P E G の製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す) の分子量を有する。直鎖状 P E G 部分が特に好ましい。より好ましくは、2つの P E G 部分の各々は、約20K ~ 約40K の分子量を有し、さらに一層好ましくは約20K から約40K の間の分子量を有する。さらに一層好ましくは、2つの P E G 部分の各々は約20K の分子量を有する。当業者は、所望投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性、もし存在する場合は、生物活性への作用、取扱いの容易さ、抗原性の程度又は抗原性の欠如、及び治療用ペプチドへの P E G の他の公知の作用などの考慮事項に基づいて、所望のポリマーサイズを選択することができる。

20

### 【0058】

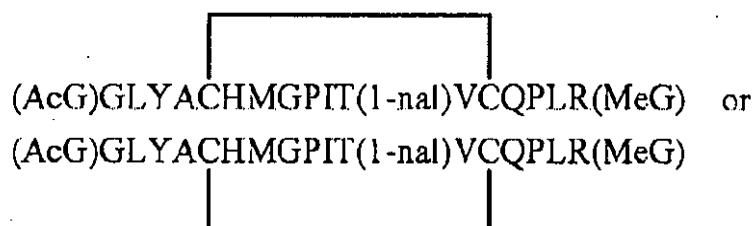
本発明はまた、アミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (M e G) (配列番号3) を有するペプチドモノマーのホモダイマーであるペプチドアゴニストの方法及び製剤を含み、前記配列において各々のアミノ酸は標準的な1文字略記によって示されており、「(A c G)」はN-アセチルグリシンであり、「(1 - n a l)」は1-ナフチルアラニンであり、「(M e G)」は、サルコシンとしても公知のN-メチルグリシンである。ペプチドダイマーの各々のペプチドモノマーは、モノマーのシステイン残基の間に分子内ジスルフィド結合を含む。そのようなモノマーは、以下のよう図式的に表し得る：

30

### 【化7】

(SEQ ID NO: 3)

40



(配列番号3)

### 【0059】

50

【化 8】

10



【化 9】

30

【 0 0 6 0 】

40

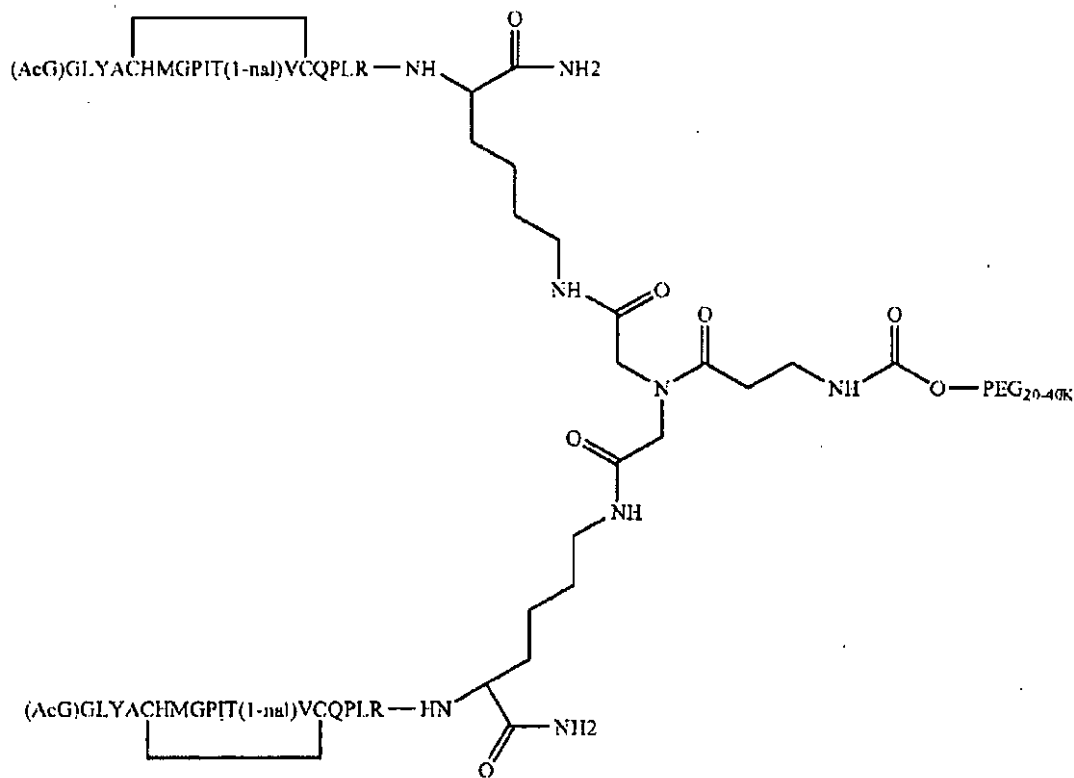


50

のためのPEGは、約20キロダルトン(20K)～約60K(「約」という用語は、PEGの製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す)の分子量を有する直鎖状の非分枝PEGであり得る。最も好ましくは、PEGは約20K～約40Kの分子量を有し、さらに一層好ましくは約30K～約40Kの分子量を有する。当業者は、所望投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性、もし存在する場合は、生物活性への作用、取扱いの容易さ、抗原性の程度又は抗原性の欠如、及び治療用ペプチドへのPEGの他の公知の作用などの考慮事項に基づいて、所望のポリマーサイズを選択することができる。

#### 【0062】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-na)VCQPLR(配列番号1)を有し、リンカーのN<sup>1</sup>がカルバメート結合を介して活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：



#### 【0063】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-na)VCQPLR(配列番号1)を有し、リンカーのN<sup>1</sup>がアミド結合を介して活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

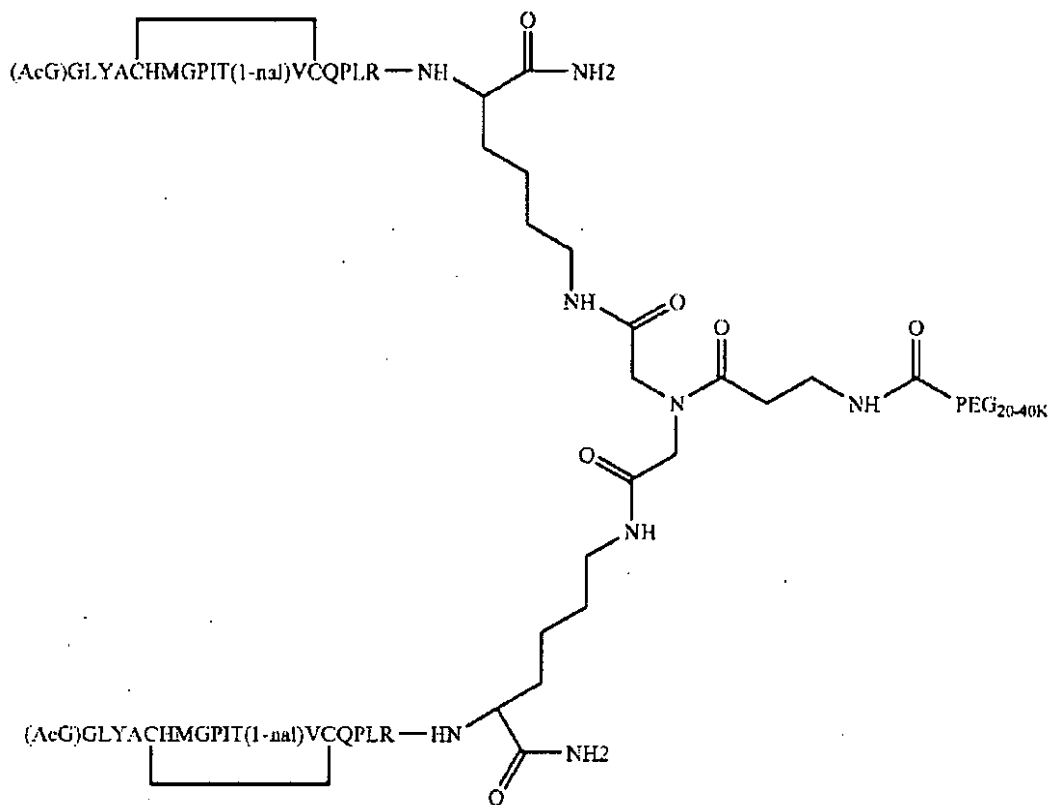
10

20

30

40

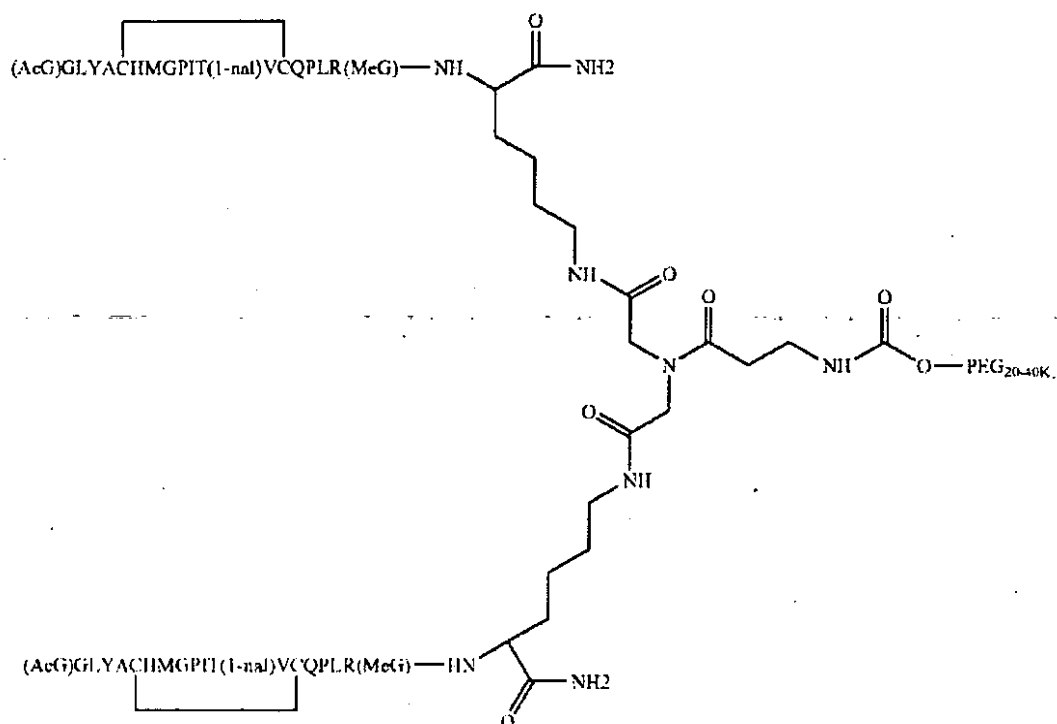
## 【化 1 1】



## 【0064】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K(配列番号2)を有し、リンカーのN<sup>1</sup>がカルバメート結合を介して活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

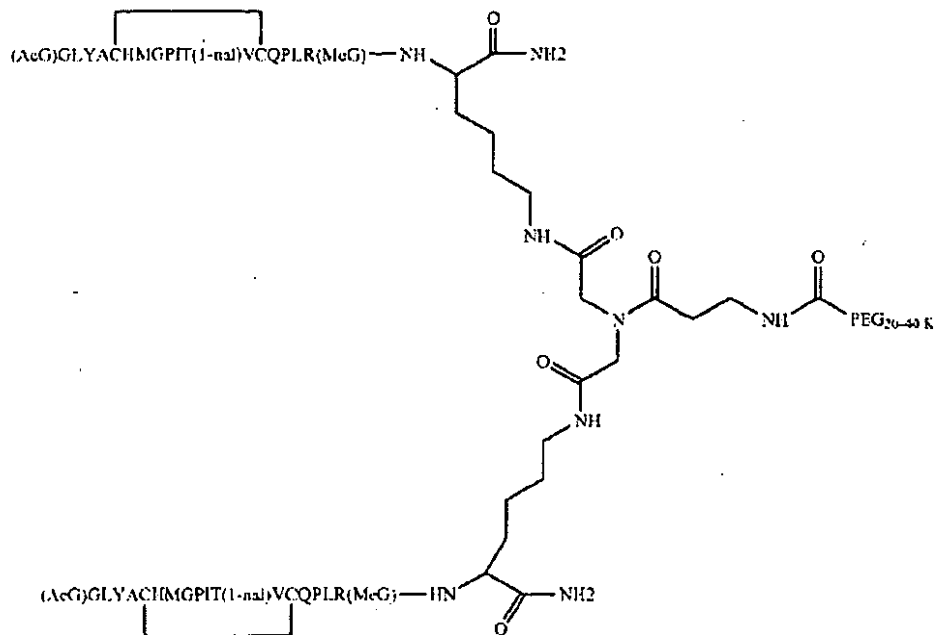
## 【化 1 2】



## 【0065】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(A c G) G L Y A C H M G P I T (1-nal) V C Q P L R (M e G) K (配列番号 2) を有し、リンカーの N<sup>1</sup> がアミド結合を介して活性化ポリエチレングリコール (P E G) 部分に結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

【化 1 3】



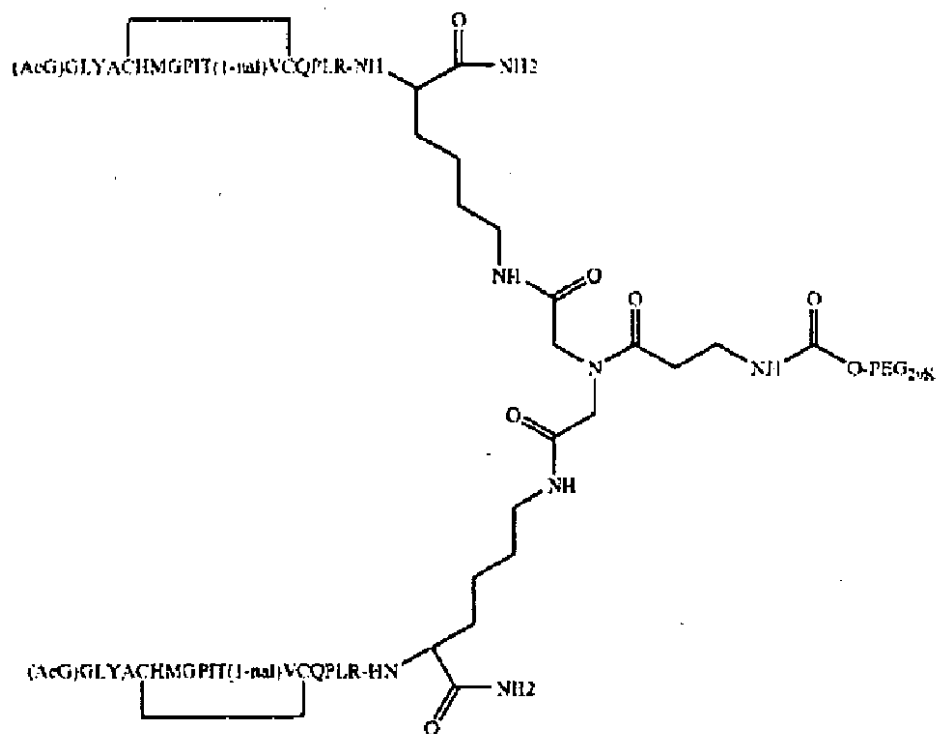
10

20

【0066】

本発明において使用し得るペプチドダイマーの例は、以下を含むが、これらに限定されない：

【化 1 4】



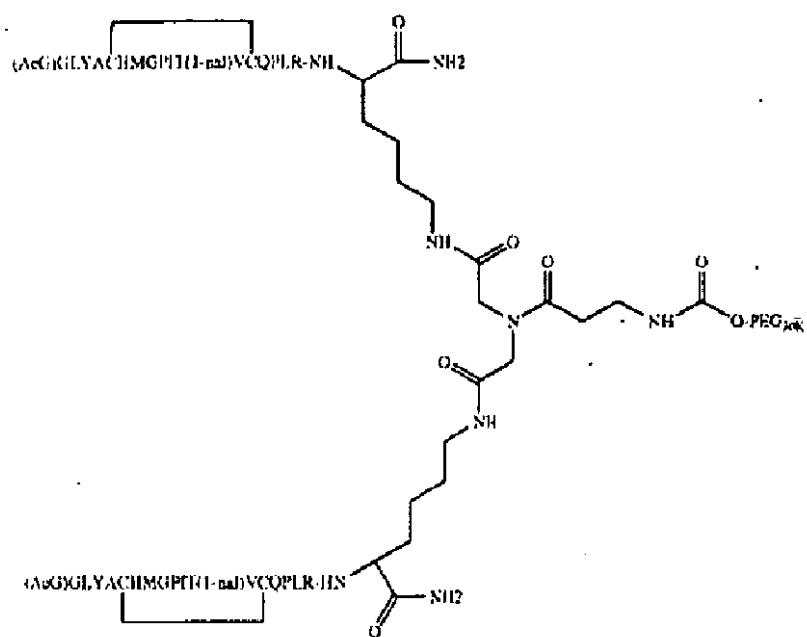
(SEQ ID NO: 11)

30

40

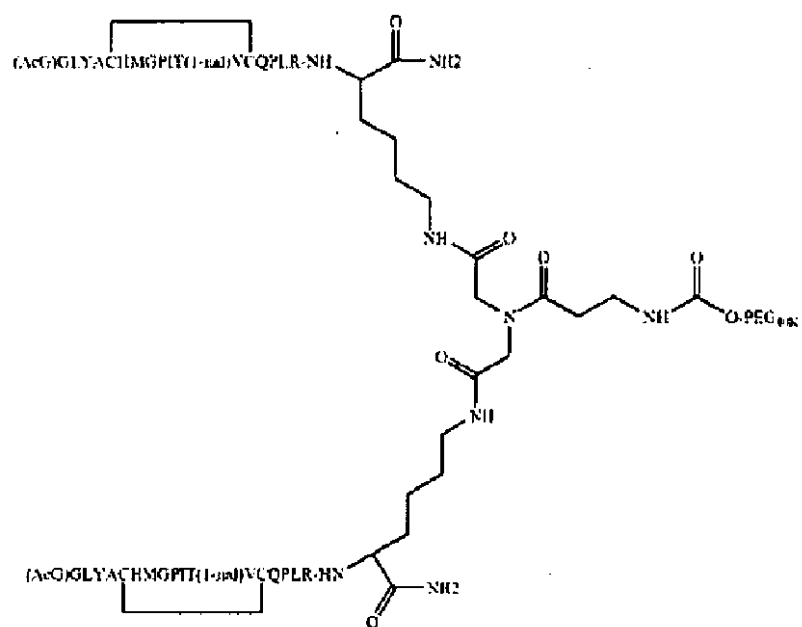
【化 15】

-continued



10

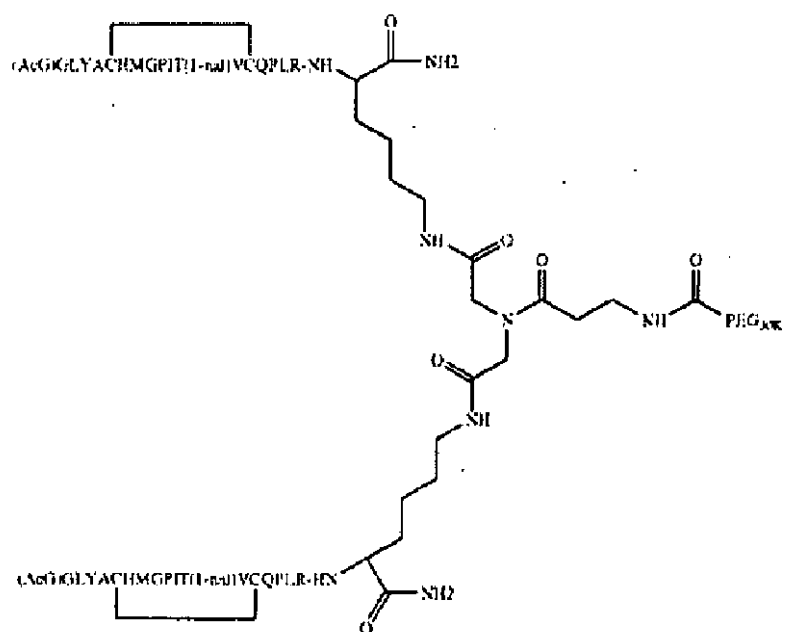
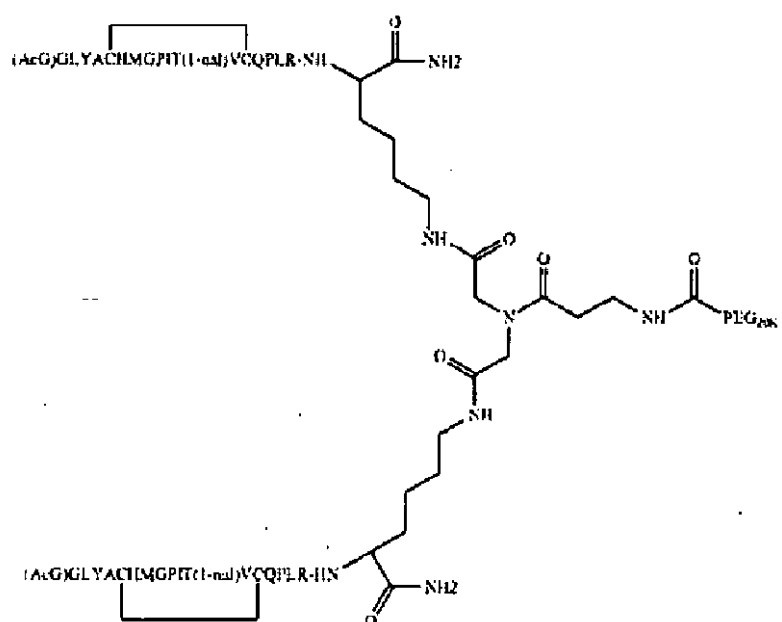
20



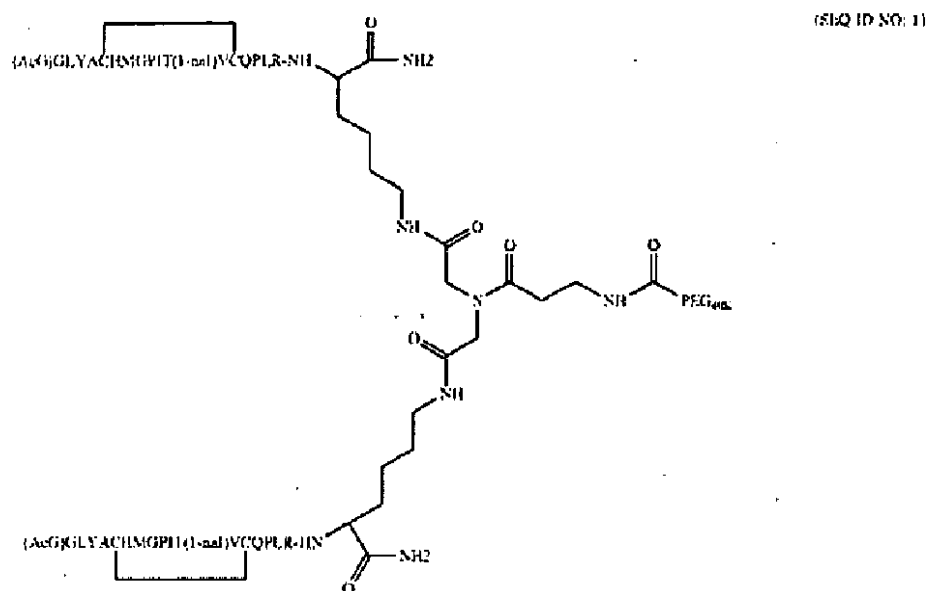
30

40

-continued-

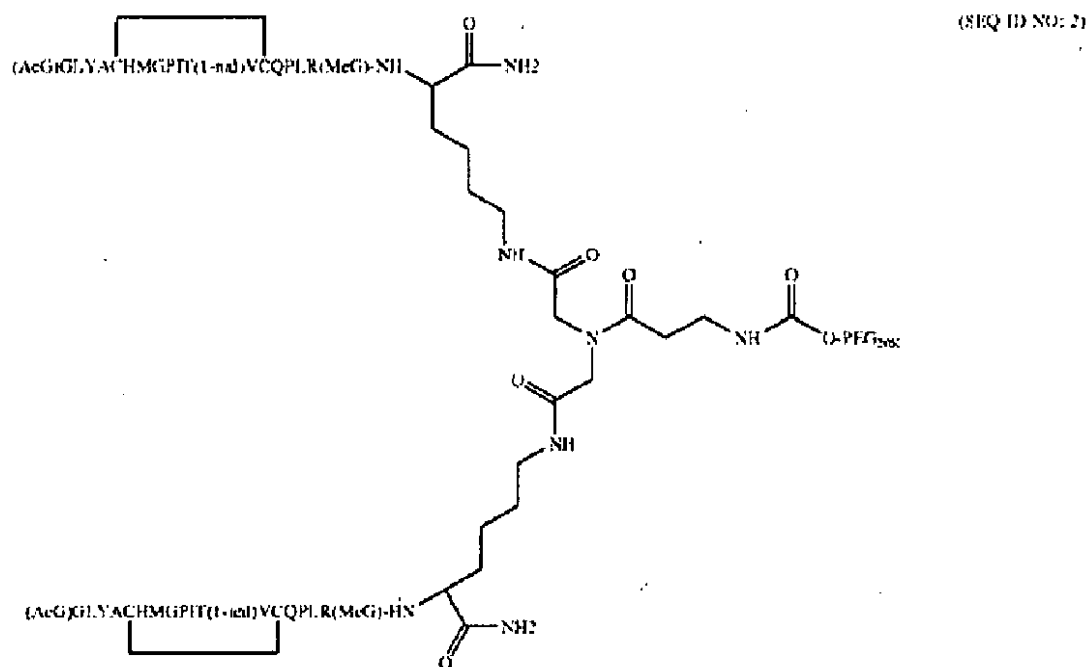


-continued



10

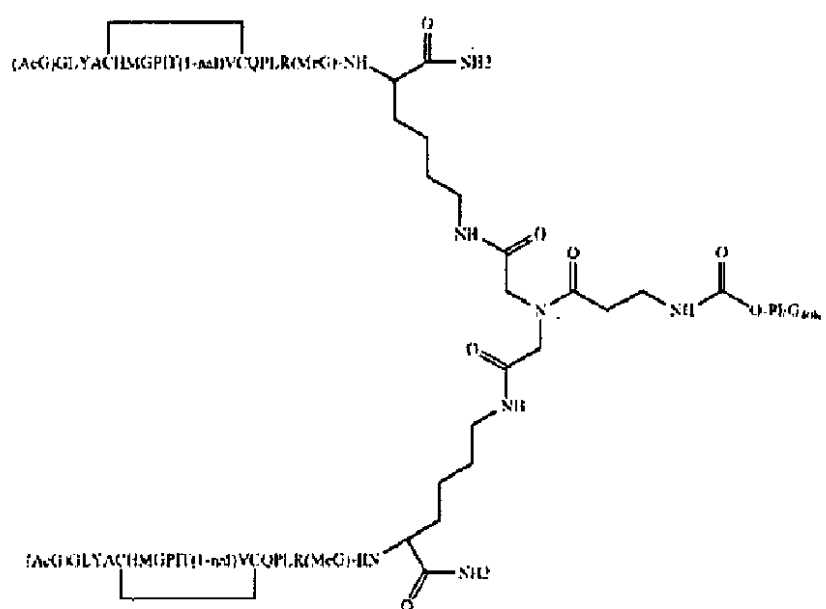
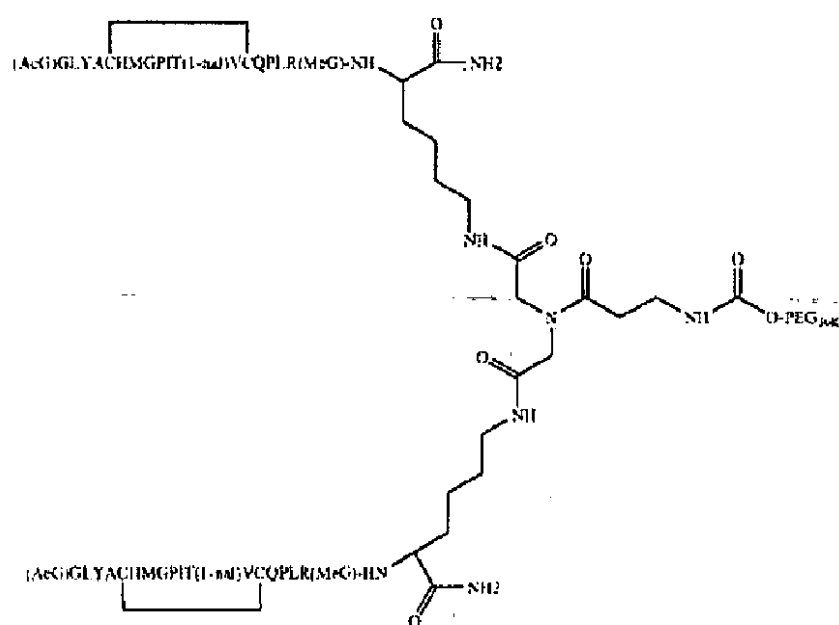
20



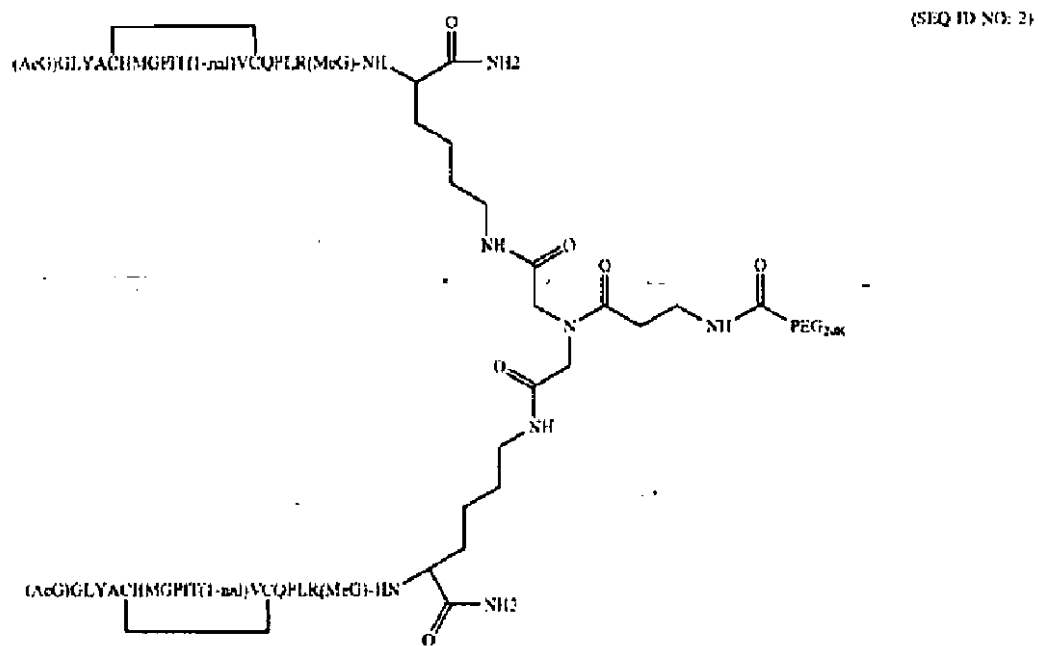
30

40

-continued

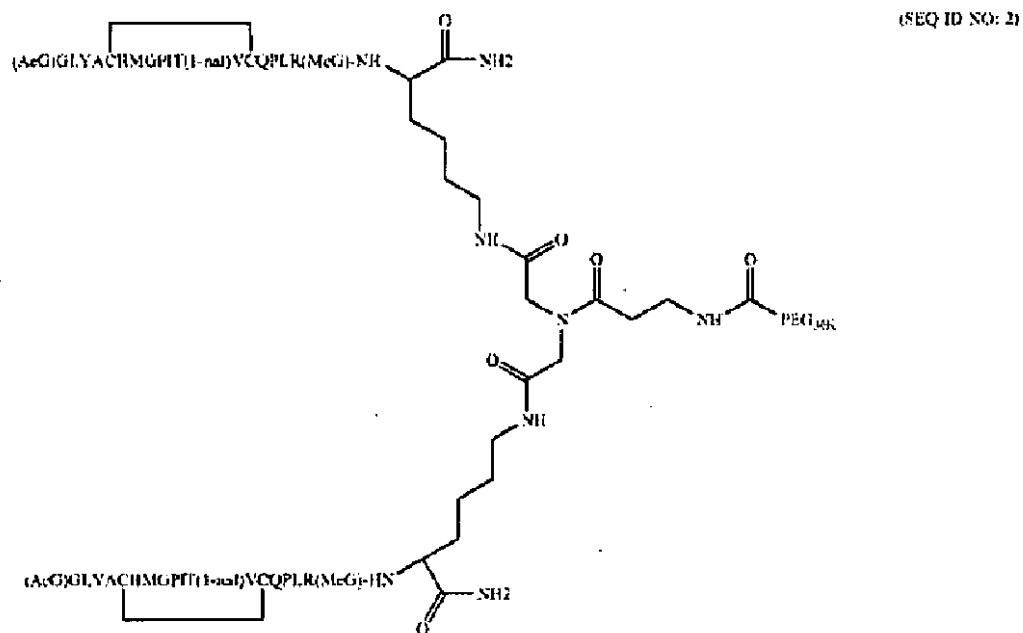


-continued



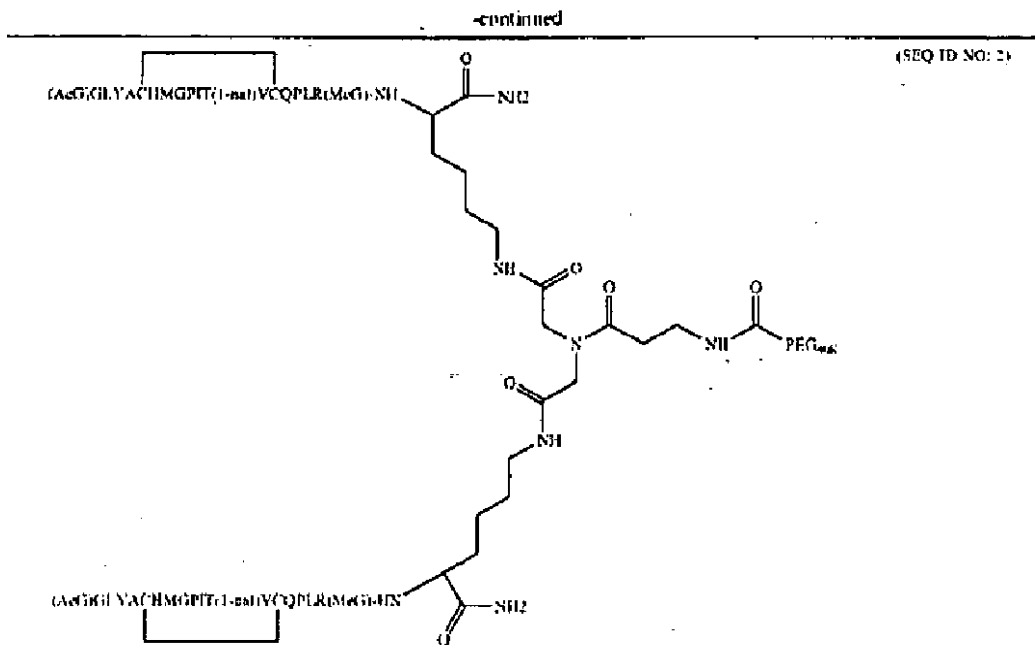
10

20



30

40

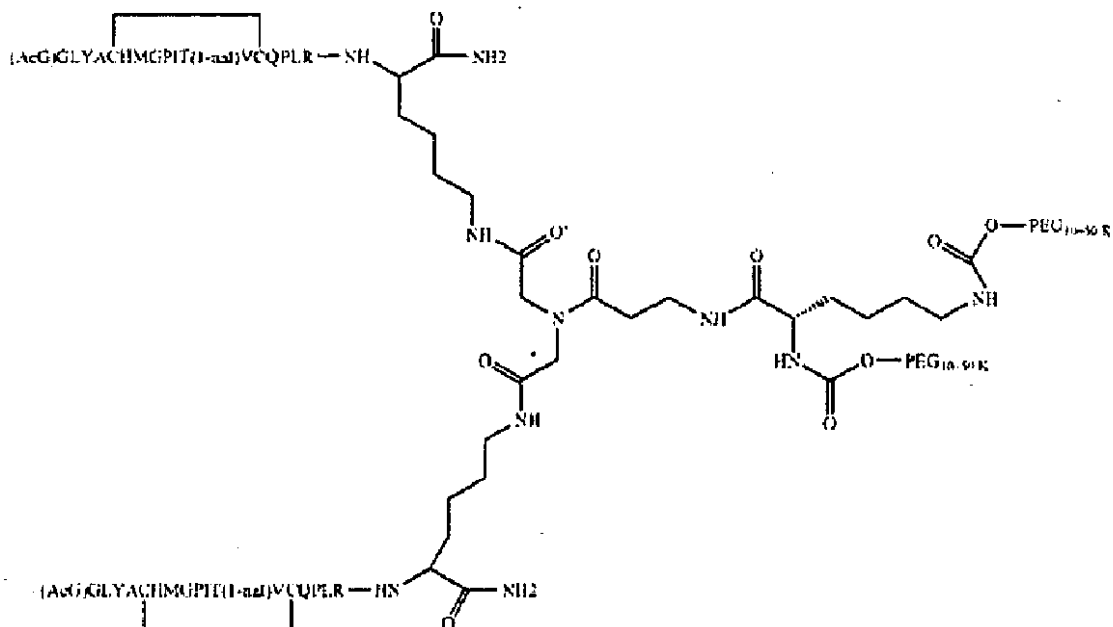


## 【0067】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-na)VCQPLRK(配列番号1)を有し、スペーサーのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>の両方がカルバメート結合を介して活性化PEG部分に共有結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

20

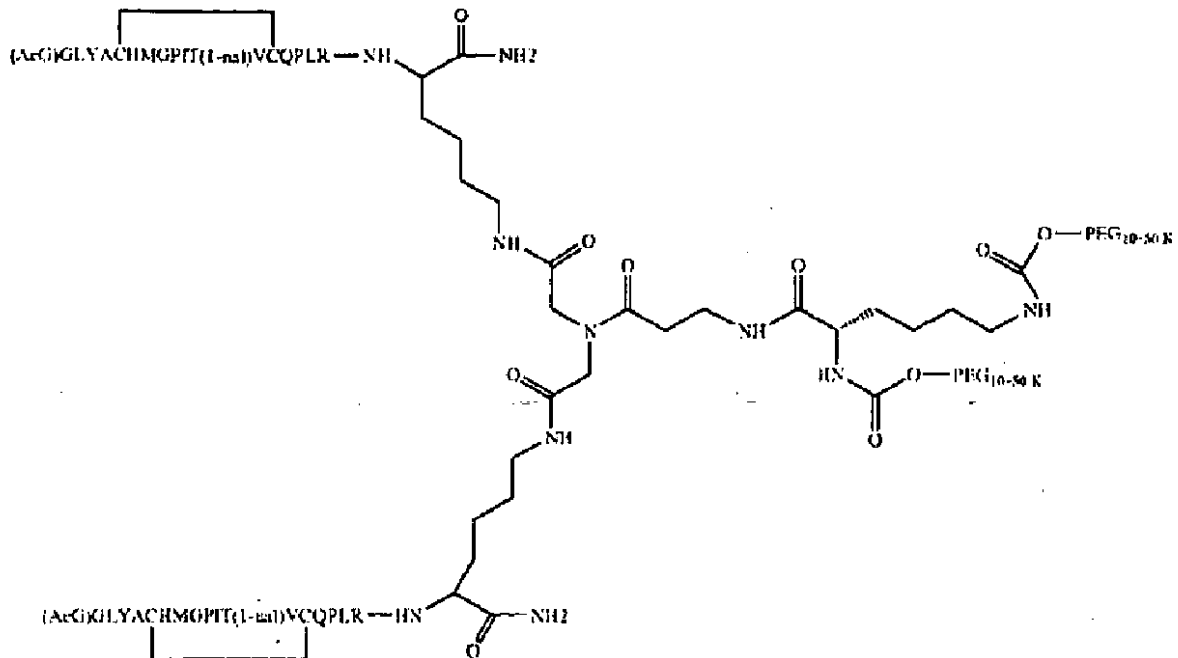
## 【化16】



## 【0068】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-na)VCQPLRK(配列番号1)を有し、スペーサーのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>の両方がアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

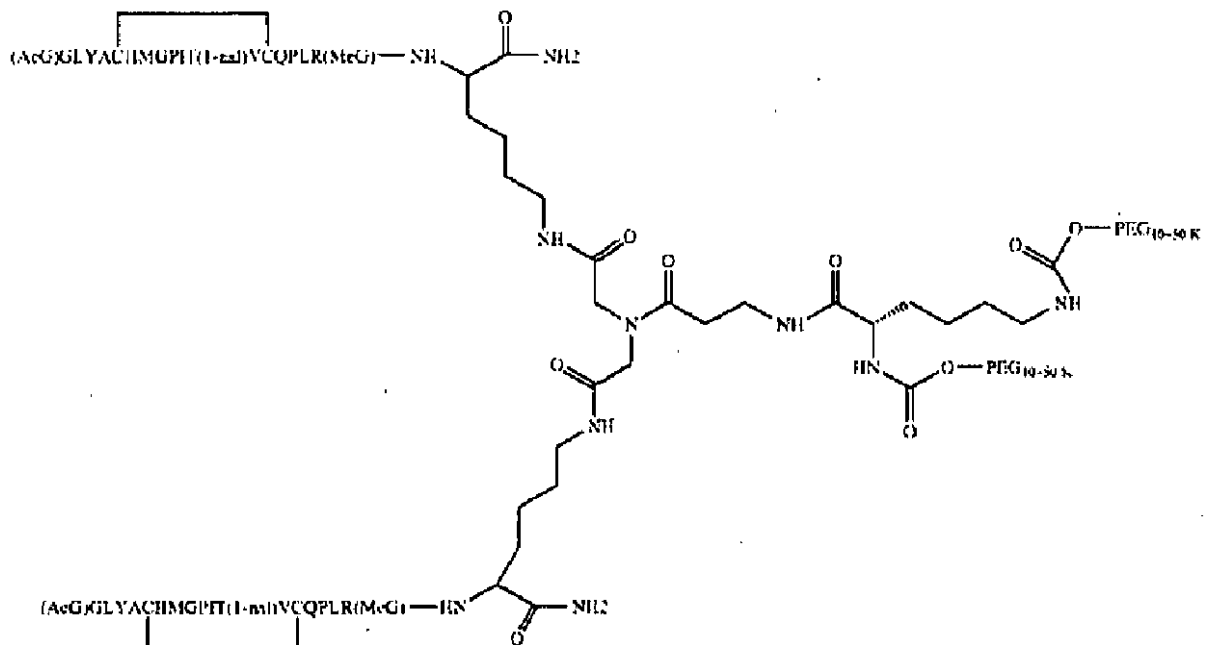
## 【化 17】



## 【0069】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-na)VCQPLR(MeG)K(配列番号2)を有し、スペーサーのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>の両方がカルバメート結合を介して活性化PEG部分に共有結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

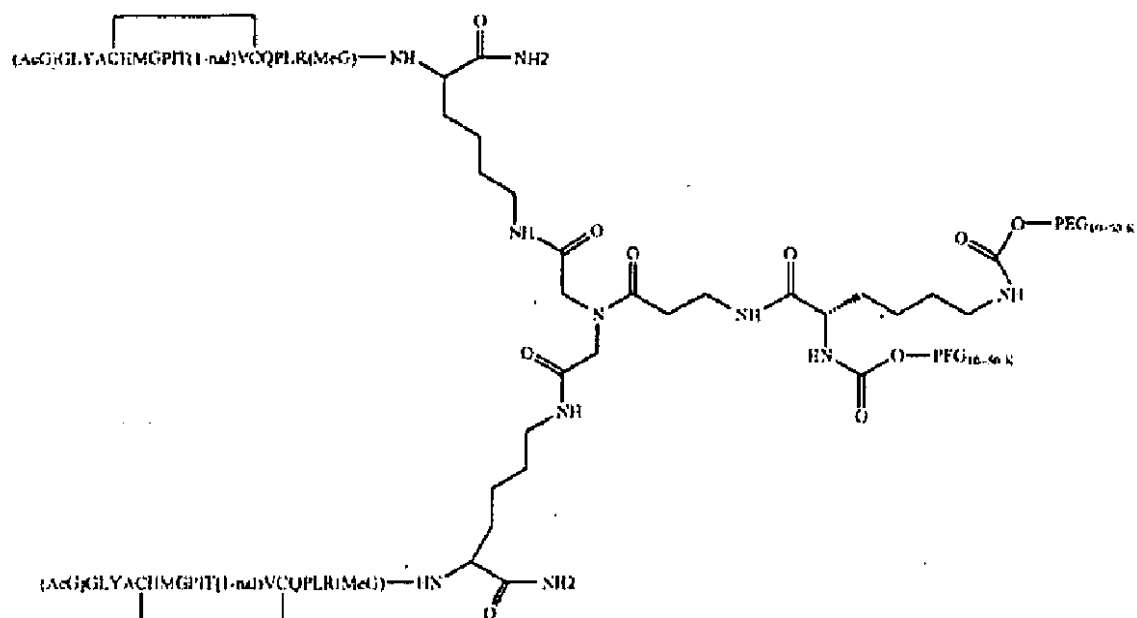
## 【化 18】



## 【0070】

ホモダイマーの各々のモノマーがアミノ酸配列、(AcG)GLYACHMGPIT(1-na)VCQPLR(MeG)K(配列番号2)を有し、スペーサーのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>の両方がアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物は以下のように表し得る：

【化 1 9】



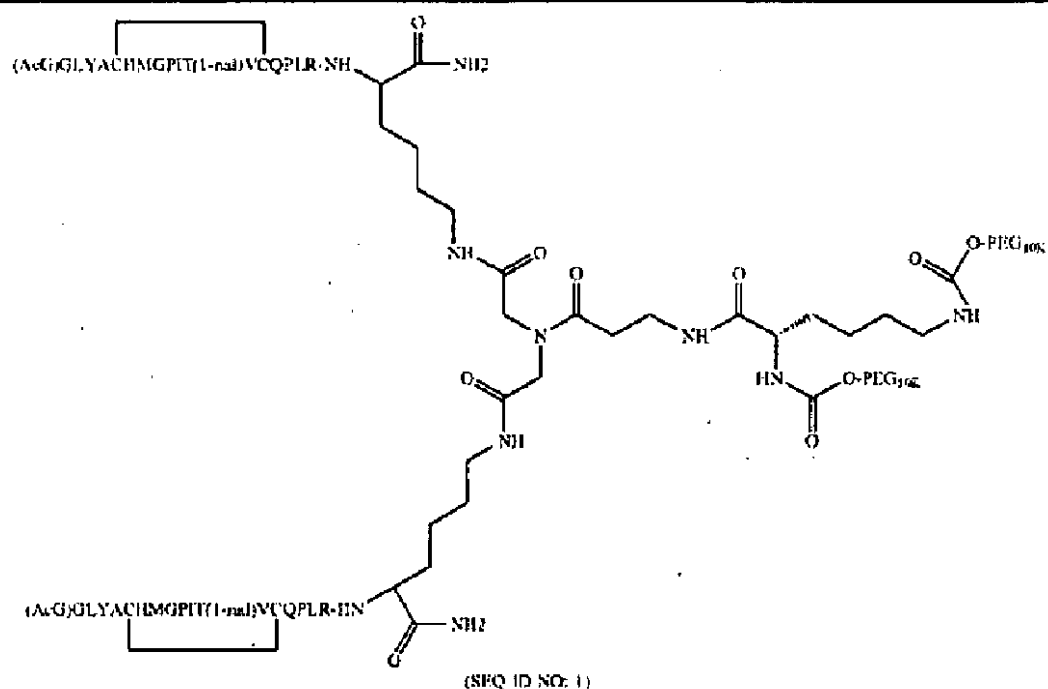
10

【 0 0 7 1 】

20

本発明に関して使用し得るペプチドダイマーの例は、以下を含むが、これらに限定されない：

【化 2 0】

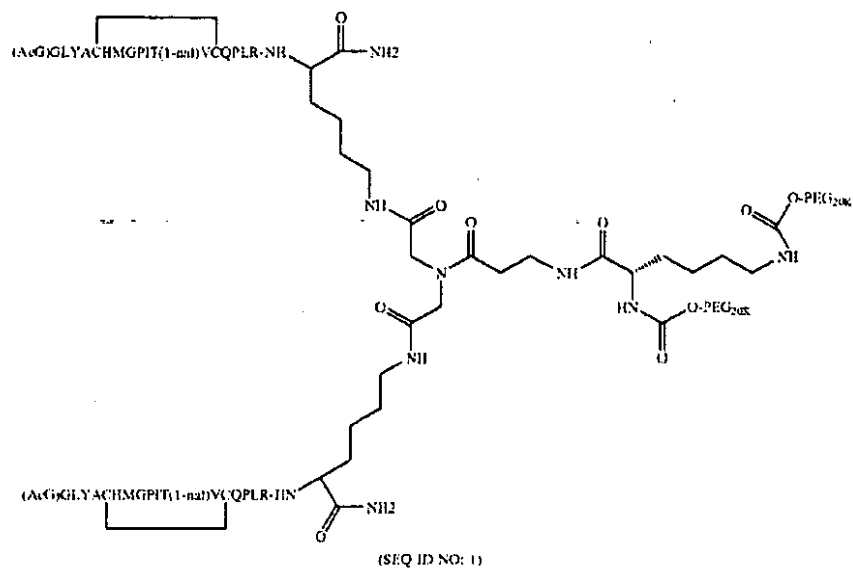


30

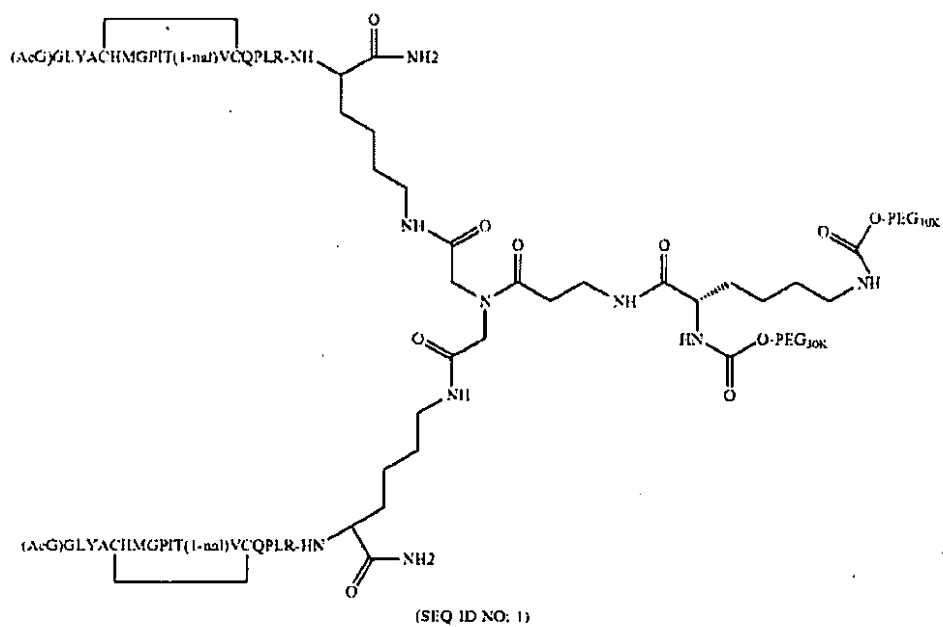
40

(SEQ ID NO: 1)

-continued



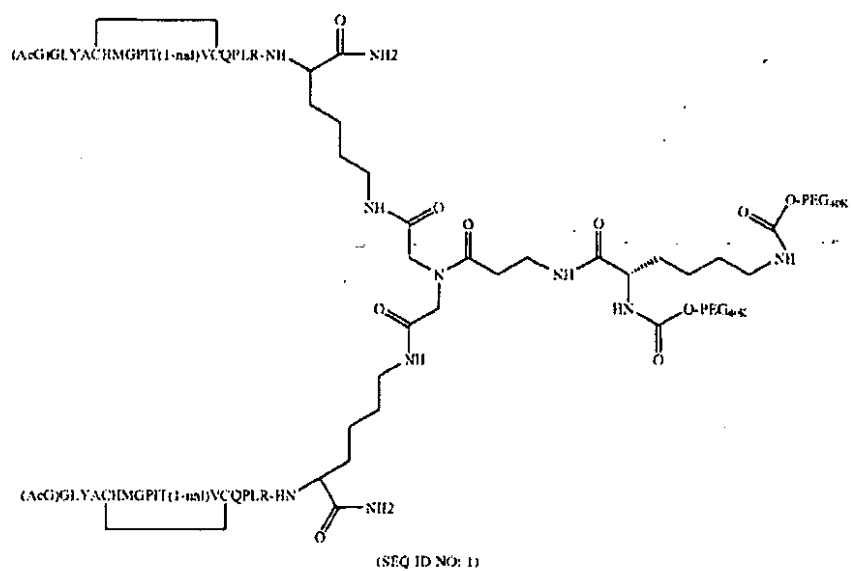
10



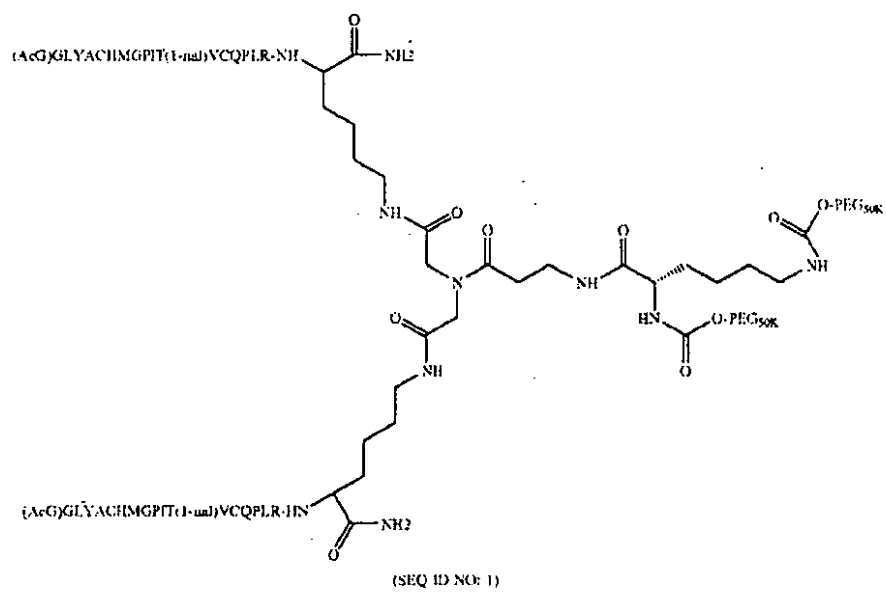
20

30

-continued



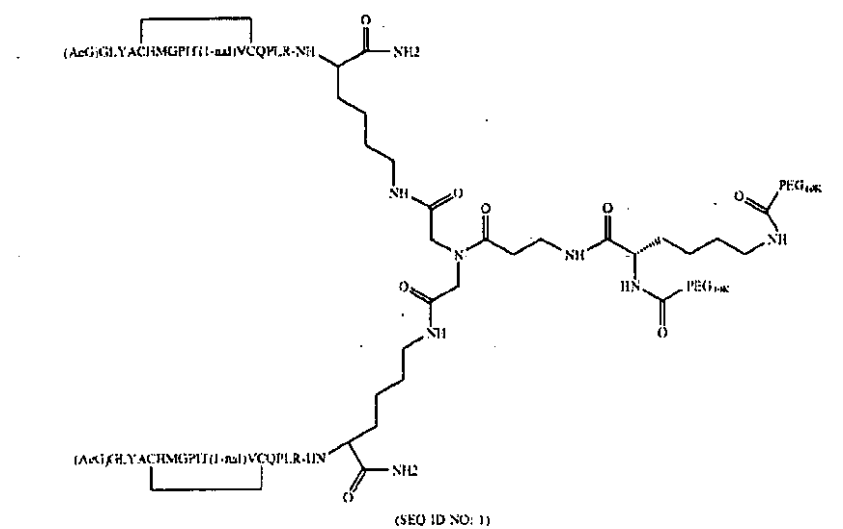
10



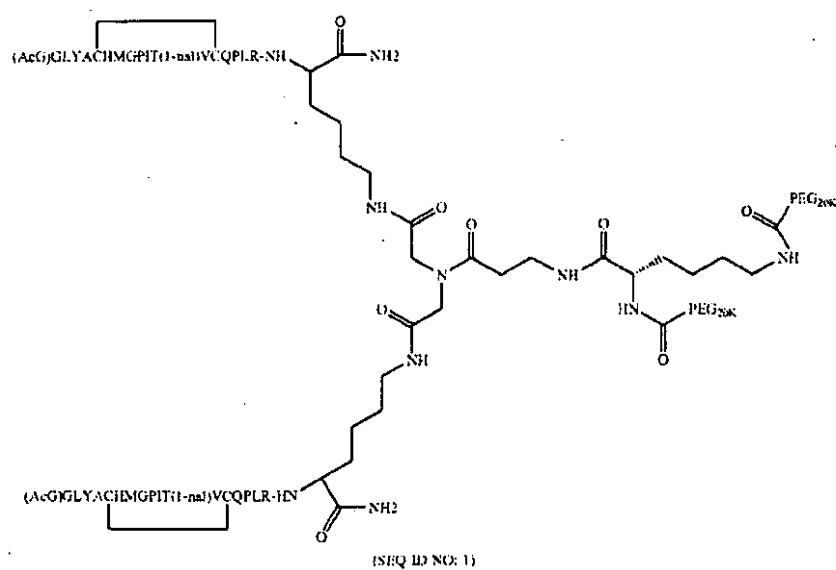
20

30

-continued



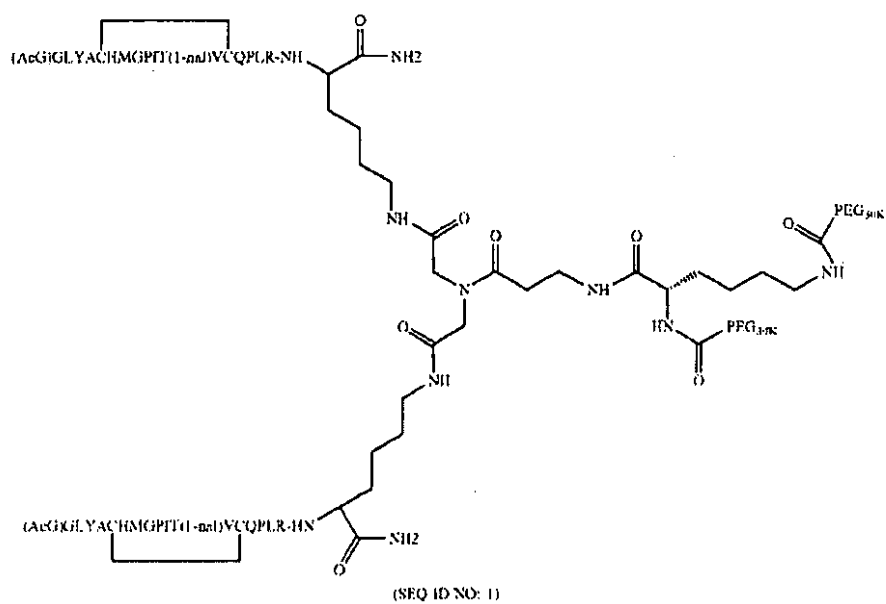
10



20

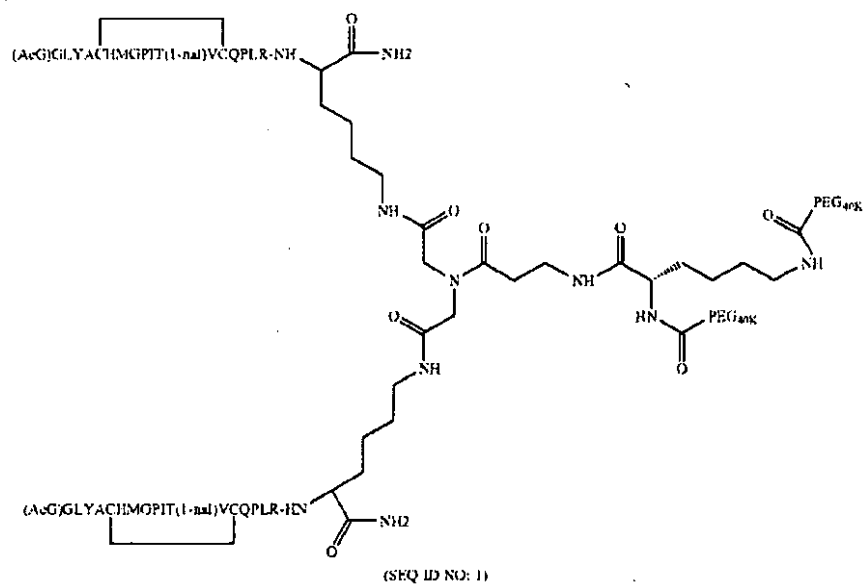
30

-continued



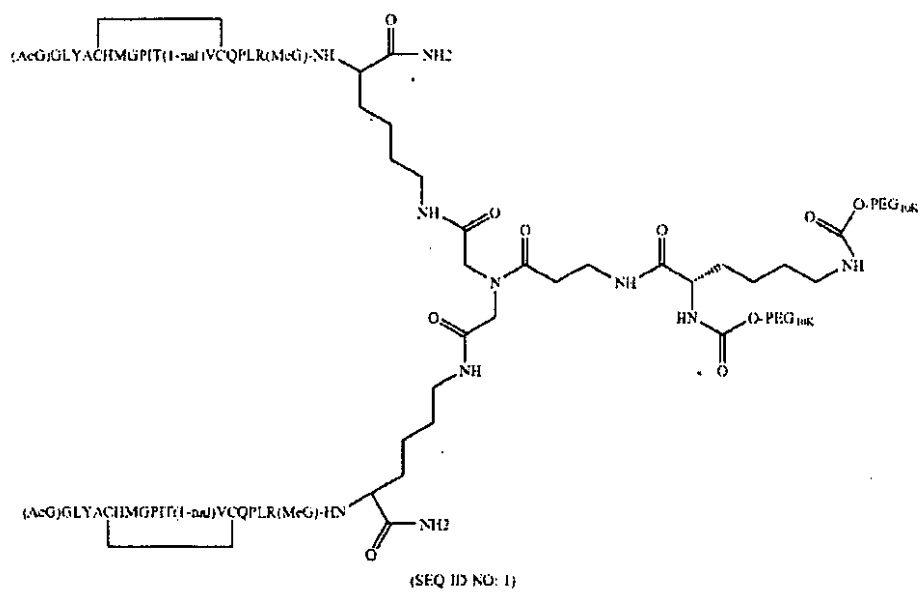
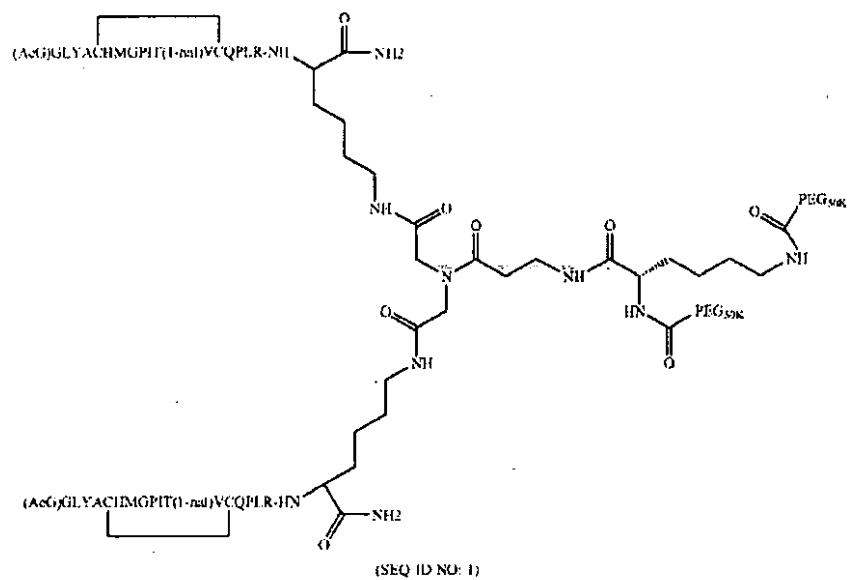
10

20

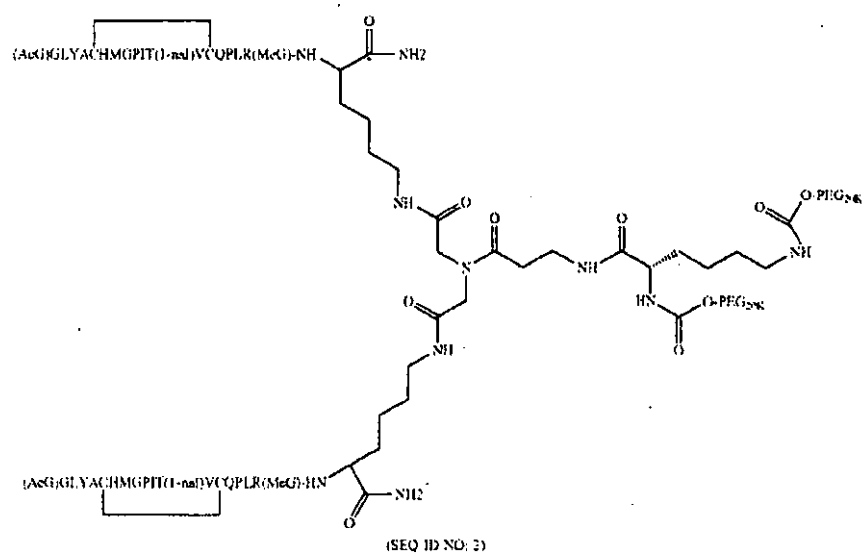


30

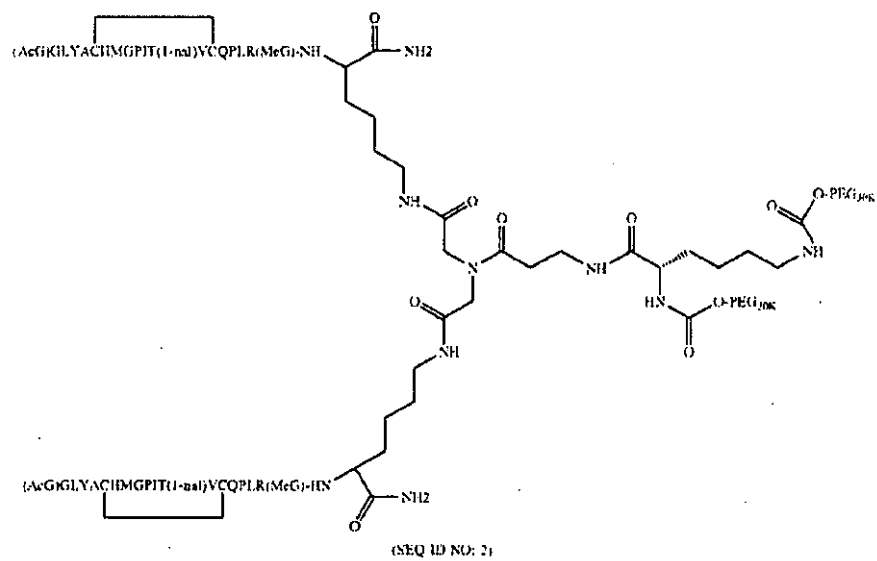
-continued



-continued



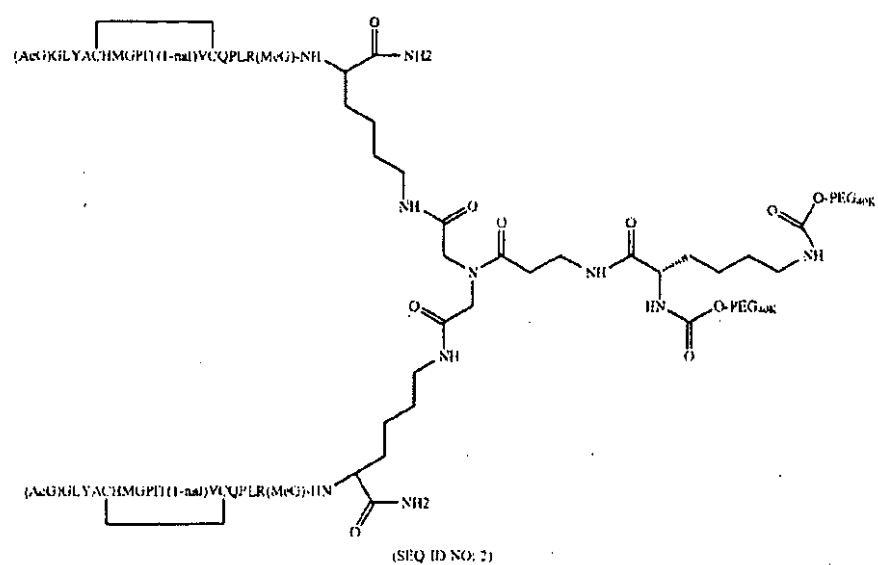
10



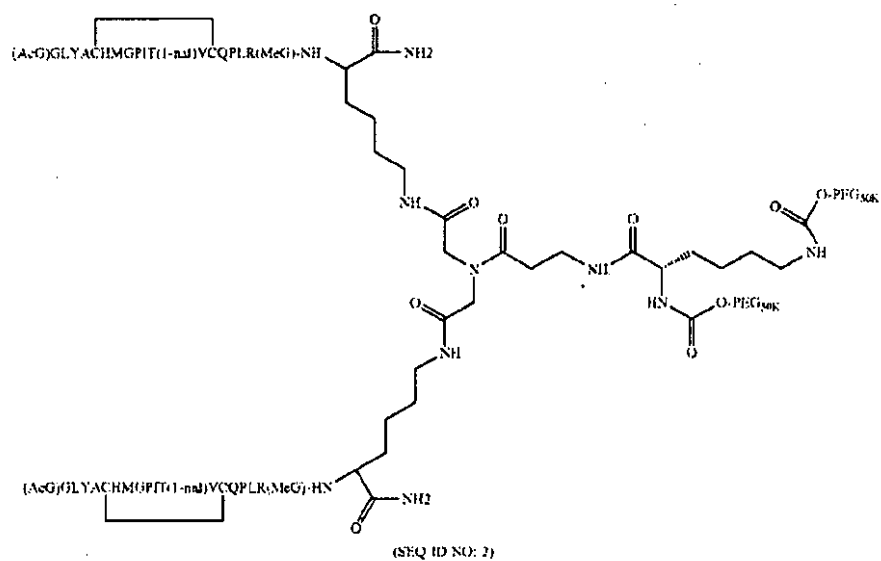
20

30

-continued



10



20

30

(AcG)GLYAC(HMGPT)(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH<sub>2</sub>

(AcG)GLYAC(HMGPT)(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH<sub>2</sub>

(SEQ ID NO: 2)

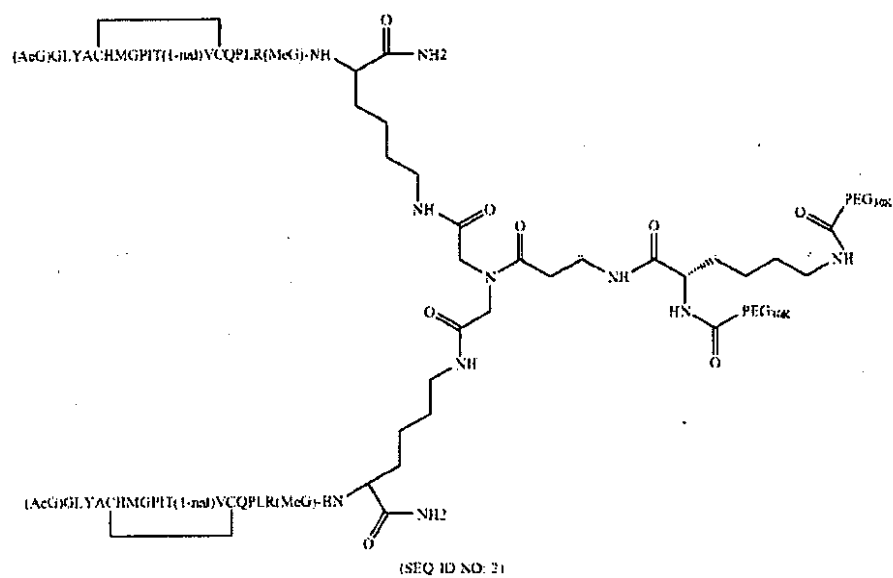
10

(SEQ ID NO: 2)

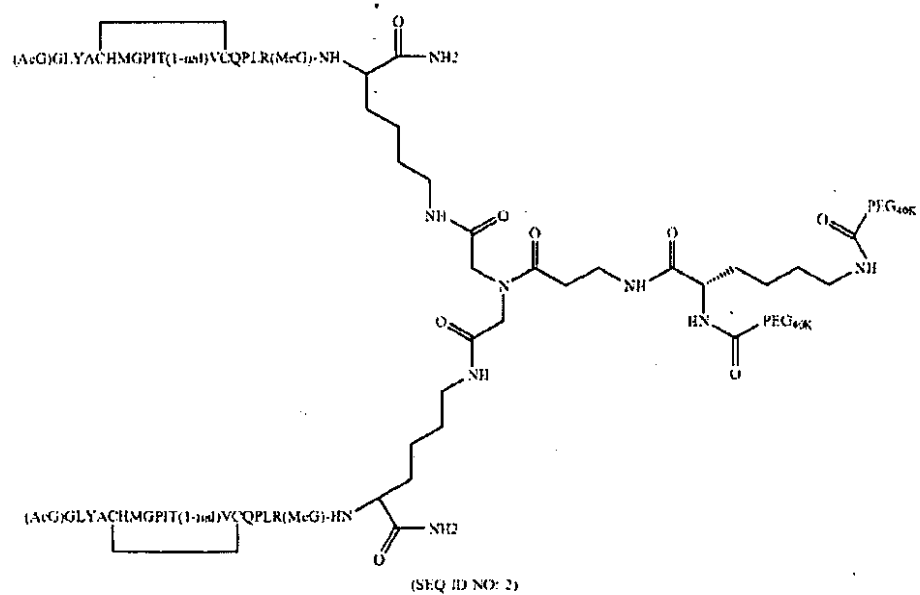
20

30

-continued



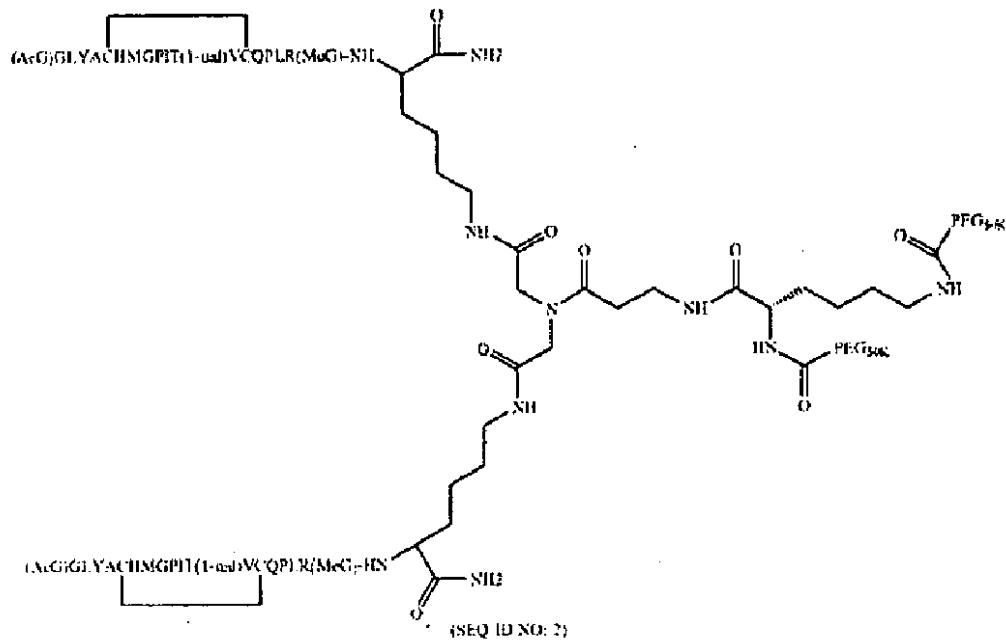
10



20

30

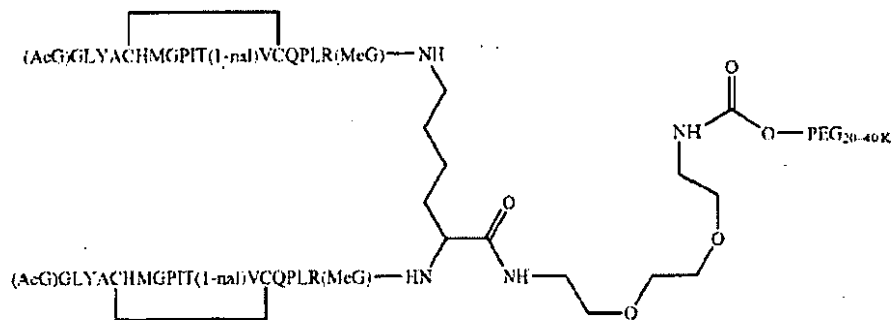
-continued



## 【0072】

スペーサーがカルバメート結合を介して活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物（配列番号3）は以下のように表し得る：

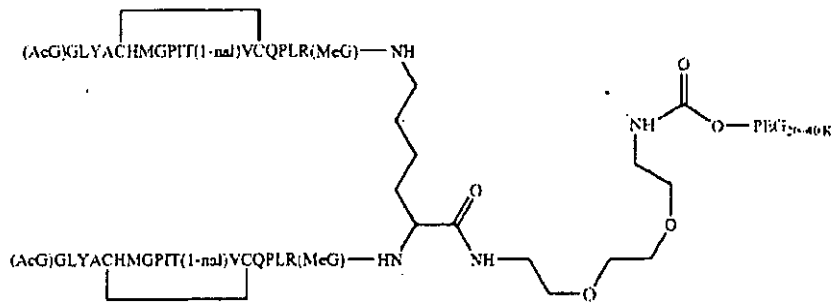
## 【化21】



## 【0073】

スペーサーがアミド結合を介して活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合している場合、本発明において使用されるペプチド化合物（配列番号3）は以下のように表し得る：

## 【化 2 2】



10

## 【0074】

この二量体構造は、[Ac-ペプチド、ジスルフィド]<sub>2</sub> Lys-スパーサー-PEG<sub>20~40K</sub>と書き表すことができ、N末端アセチル化ペプチドがリシンのαアミノ基とεアミノ基の両方に結合しており、各々のペプチドが分子内ジスルフィドループを含み、スパーサー分子がリシンのC末端とPEG部分の間で共有結合を形成しており、PEGが約20,000～約40,000ダルトンの分子量を有することを示す。

## 【0075】

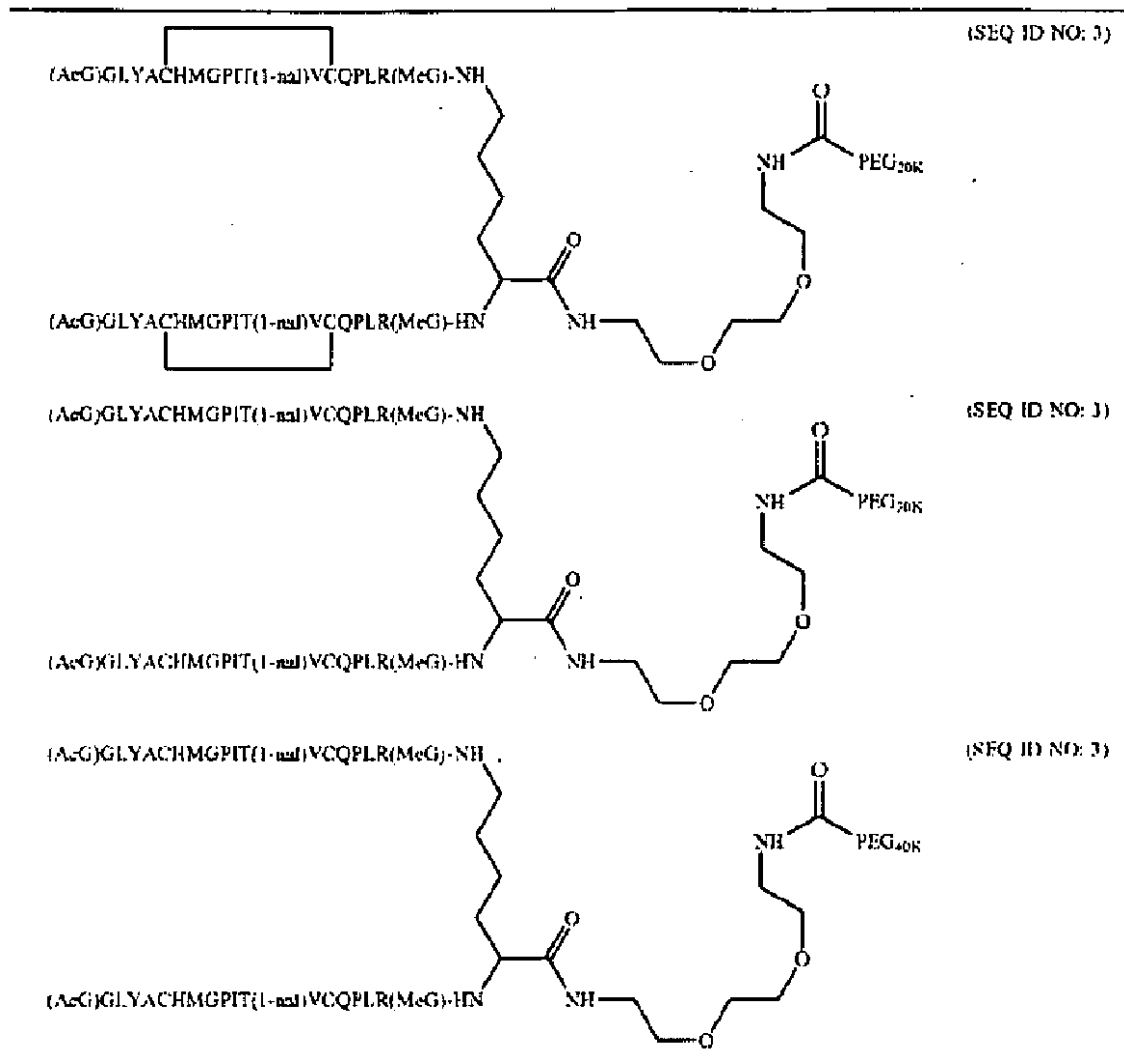
本発明に関する使用のためのペプチドダイマーの例は、以下を含むが、これらに限定されない：

20

[illegible]

30

-continued



10

20

30

40

50

## 【0076】

20の従来のアミノ酸の立体異性体（例えばD-アミノ酸）、非天然アミノ酸、例えば $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の非従来型アミノ酸も、本発明の化合物のための適切な成分であり得る。非従来型アミノ酸の例は、 $\beta$ -アラニン、3-ピリジルアラニン、4-ヒドロキシプロリン、O-ホスホセリン、N-メチルグリシン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、ノルロイシン、及び他の類似のアミノ酸及びイミノ酸を含むが、これらに限定されない。他の修飾も可能であり、アミノ末端の修飾、カルボキシ末端の修飾、天然に生じる遺伝的にコードされたアミノ酸の1又はそれ以上の、非従来型アミノ酸による置換、1又はそれ以上のアミノ酸残基の側鎖の修飾、ペプチドリ酸化等を含む。

## 【0077】

本発明のペプチド配列は、単独で又はペプチド鎖のN末端及び／若しくはC末端伸長部と共に存在し得る。そのような伸長部は、非天然に生じる配列を場合により含むか又は非天然に生じる配列を実質的に含まない、天然にコードされるペプチド配列であり得る；伸長部は、当業者の所望に応じて任意の付加、欠失、点突然変異、又は他の配列修飾若しくは組合せを含み得る。例えば、限定するわけではないが、天然に生じる配列は完全長又は部分長であり得、側鎖結合を介して炭水化物、PEG、他のポリマー等の結合のための部位を提供するアミノ酸置換を含み得る。1つの変形例では、アミノ酸置換は、ヒト免疫系と適合性にするための配列のヒト化を生じさせる。非免疫グロブリンスペーサー配列を有するか又は有さない、本発明のEPO-R活性化配列に隣接する又は近傍の免疫グロブリン

ン配列を含む、すべてのタイプの融合タンパク質が提供される。1つのタイプの実施形態は、重鎖及び／又は軽鎖の可変（V）領域の代わりにE P O－R活性化配列を有する免疫グロブリン鎖である。

#### 【0078】

本発明において使用されるペプチド化合物の調製  
ペプチドの合成

本発明において使用されるペプチドは、当分野で公知の古典的方法によって調製され得る。これらの標準的な方法は、排除固相合成、部分固相合成法、フラグメント縮合、古典的溶液合成、及び組換えDNA技術を含む〔例えば、Merrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149参照〕。

#### 【0079】

1つの実施形態では、ペプチドダイマーのペプチドモノマーを個別に合成し、合成後に二量体化する。本出願中の特定ペプチドの合成は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第US 2007/0104704号に存在する。

#### 【0080】

もう1つの実施形態では、ダイマーのペプチドモノマーは、ペプチド合成のための開始部位として働くことができる2つの官能基と、別の分子部分（例えば固体支持体の表面上に存在し得るような）への結合を可能にする3番目の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）を有する分枝鎖状の第三級アミドリinker  $L_K$  部分により、それらのC末端を介して連結される。この場合、2つのペプチドモノマーは、固相合成法の変形例においてリンカー  $L_K$  部分の2つの反応性窒素基上に直接合成され得る。そのような合成は、連続的であるか又は同時であり得る。

#### 【0081】

もう1つの実施形態では、2つのペプチドモノマーは、固相合成法の変形例においてリンカー  $L_K$  部分の2つの反応性窒素基上に直接合成され得る。そのような合成は、連続的であるか又は同時であり得る。この実施形態では、ペプチド合成のための開始部位として働くことができる2つのアミノ基と、別の分子部分（例えば固体支持体の表面上に存在し得るような）への結合を可能にする3番目の官能基（例えばリシンのカルボキシル基、又はカルボキシル基がアミド部分  $-CONH_2$  に変換されたリシン残基であるリシンアミドのアミノ基）を有する、リシンリンカー（ $L_K$ ）部分が使用される。

#### 【0082】

リンカー上でダイマーのペプチド鎖の連続的な合成を実施する場合は、リンカー分子上の2つのアミン官能基を2つの異なる除去可能な直交アミン保護基で保護する。保護されたリンカーを、リンカーの3番目の官能基を介して固体支持体に結合する。1番目のアミン保護基を除去し、ダイマーの第1ペプチドをその1番目の脱保護されたアミン部分上で合成する。次に2番目のアミン保護基を除去し、ダイマーの第2ペプチドをその2番目の脱保護されたアミン部分上で合成する。例えば、リンカーの1番目のアミノ部分は  $AlloC$  で保護することができ、2番目のアミノ部分は  $Fmoc$  で保護し得る。この場合、 $Fmoc$  基は弱塩基〔例えばジメチルホルムアミド（DMF）中の20%ピペリジン〕での処理によって除去することができ（ $AlloC$  基は除去できない）、第1ペプチド鎖が合成される。その後  $AlloC$  基を適切な試薬〔例えば  $Pd(PPh_3)/4$ -メチルモルホリン及びクロロホルム〕で除去することができ、第2ペプチド鎖が合成される。ジスルフィド結合の形成を制御するためにシステインについて異なるチオール保護基を使用する場合（以下で論じるように）、ダイマーのペプチド鎖の最終的なアミノ酸配列が同一である場合でもこの手法を使用しなければならないことに留意されたい。

#### 【0083】

リンカー上でダイマーのペプチド鎖の同時合成を実施する場合は、リンカー分子の2つのアミン官能基を同じ除去可能なアミン保護基で保護する。保護されたリンカーを、リンカーの3番目の官能基を介して固体支持体に結合する。この場合、リンカー分子の2つの保護された官能基を同時に脱保護し、脱保護されたアミン上で2つのペプチド鎖を同時に

合成する。この手法を用いると、ダイマーのペプチド鎖の配列は同一であり、システイン残基についてのチオール保護基はすべて同じであることに留意されたい。

#### 【0084】

ペプチド合成のための好ましい方法は固相合成である。固相ペプチド合成の手順は当分野において周知である〔例えば、Stewart Solid Phase Peptide Syntheses (Freeman and Co.: San Francisco) 1969; 2002/2003 General Catalog from Novabiochem Corp, San Diego, USA; Goodman Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl, Stuttgart) 2002参照〕。固相合成では、合成は、典型的には $\alpha$ -アミノ保護樹脂を使用してペプチドのC末端から開始される。適切な出発物質は、例えば、必要とされる $\alpha$ -アミノ酸をクロロメチル化樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ポリスチレン樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂等に結合することによって調製できる。そのようなクロロメチル化樹脂の1つは、Bio Rad Laboratories (Richmond, Calif.) によりBIO-BEADS SX-1の商標名で販売されている。ヒドロキシメチル樹脂の調製は記述されている〔Bodonszky, et al. (1966) Chem. Ind. London 38:1597〕。ベンズヒドリルアミン(BHA)樹脂は記述されており〔Pietta and Marshall (1970) Chem. Commun. 650〕、その塩酸塩形態がBeckman Instruments, Inc. (Palo Alto, Calif.) から市販されている。例えば、 $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸は、Gisin (1973) Helv. Chim. Acta 56:1467によって記述された方法に従って、炭酸水素セシウム触媒を用いてクロロメチル化樹脂に結合し得る。

#### 【0085】

最初のカップリング後、 $\alpha$ -アミノ保護基を、例えば室温で有機溶媒中のトリフルオロ酢酸(TFA)又は塩酸(HCl)溶液を用いて除去する。その後、 $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸を伸長中の支持体結合ペプチド鎖に連続的に結合する。 $\alpha$ -アミノ保護基は、ペプチドの段階的合成の分野において有用であることが公知のものであり、アシル型保護基(例えばホルミル、トリフルオロアセチル、アセチル)、芳香族ウレタン型保護基〔例えばベンジルオキシカルボニル(Cbz)及び置換Cbz〕、脂肪族ウレタン保護基〔例えば $t$ -ブチルオキシカルボニル(Boc)、イソプロピルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル〕、及びアルキル型保護基(例えばベンジル、トリフェニルメチル)、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、アリルオキシカルボニル(Alloc)、並びに1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキス-1-イリデン)エチル(Dde)を含む。

#### 【0086】

側鎖保護基(典型的にはエーテル、エステル、トリチル、PMC等)は、カップリングの間無傷のままであり、アミノ末端保護基の脱保護の間又はカップリングの間に分離されない。この側鎖保護基は、最終的なペプチドの合成の完了後に、標的ペプチドを変化させない反応条件下で除去可能でなければならない。Tyrについての側鎖保護基は、テトラヒドロピラニル、tert-ブチル、トリチル、ベンジル、Cbz、Z-Br-Cbz及び2,6-ジクロロベンジルを含む。Aspについての側鎖保護基は、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル、メチル、エチル及びシクロヘキシルを含む。Thr及びSerについての側鎖保護基は、アセチル、ベンゾイル、トリチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル及びCbzを含む。Argについての側鎖保護基は、ニトロ、トシル(Tos)、Cbz、アダマンチルオキシカルボニルメシトイルスルホニル(mesitoylsulfonyl)(Mts)、2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、4-メトキシ-2,3,6-トリメチル-ベンゼンスルホニル(Mtr)又はBocを含む。Lysについての側鎖保護基は、Cbz、2-クロロベンジルオキシカルボニル(2-Cl-Cbz)、2-ブロモベンジルオキシカルボニル(2-Br-Cbz)、Tos又はBocを含む。

#### 【0087】

$\alpha$ -アミノ保護基の除去後、残りの保護アミノ酸を所望の順序で段階的に結合する。各々の保護アミノ酸は、一般に、適切なカルボキシル基活性化剤、例えば溶液中の、例えば

塩化メチレン ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド (DMF) 又はそれらの混合物中の、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) 又はジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を使用して約3倍過剰で反応させる。

#### 【0088】

所望のアミノ酸配列が完成した後、所望のペプチドを試薬、例えばトリフルオロ酢酸 (TFA) 又はフッ化水素 (HF) で処理することによって樹脂支持体から脱結合するが、この処理は、樹脂からペプチドを切断するだけでなく、残りのすべての側鎖保護基も切断する。クロロメチル化樹脂を使用する場合、フッ化水素処理は遊離ペプチド酸の形成をもたらす。ベンズヒドリルアミン樹脂を使用する場合、フッ化水素処理は直接遊離ペプチドアミドを生じさせる。あるいは、クロロメチル化樹脂を使用する場合、側鎖保護ペプチドは、ペプチド樹脂をアンモニアで処理することによって脱結合し、所望の側鎖保護アミドを生成することができるか、又はアルキルアミンで処理することによって脱結合し、側鎖保護アルキルアミド又はジアルキルアミドを生成することができる。その後、フッ化水素で処理することによって通常の方法で側鎖保護を除去し、遊離アミド、アルキルアミド又はジアルキルアミドを生成する。

#### 【0089】

本発明のエステルを調製する場合、ペプチド酸を調製するために用いられる樹脂を使用し、側鎖保護ペプチドを塩基と適切なアルコール (例えばメタノール) で切断する。その後、フッ化水素で処理することによって通常の方法で側鎖保護基を除去し、所望のエステルを得る。

#### 【0090】

これらの手順はまた、20個の天然に生じる遺伝的にコードされたアミノ酸以外のアミノ酸が、本発明の化合物のいずれかの1、2又はそれ以上の位置で置換されているペプチドを合成するために使用できる。本発明のペプチドに置換され得る合成アミノ酸は、N-メチル、L-ヒドロキシプロピル、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニル、 $\delta$ アミノ酸、例えばL- $\delta$ -ヒドロキシリシル及びD- $\delta$ -メチルアラニル、L- $\alpha$ -メチルアラニル、 $\beta$ アミノ酸、及びイソキノリルを含むが、これらに限定されない。D-アミノ酸及び非天然に生じる合成アミノ酸も、本発明において使用されるペプチドに組み込むことができる。

#### 【0091】

本発明の他の化合物を生成するために本発明のペプチド化合物のアミノ末端及び／又はカルボキシ末端を修飾することもできる。例えば、アミノ末端を酢酸又はそのハロゲン化誘導体、例えば $\alpha$ -クロロ酢酸、 $\alpha$ -ブロモ酢酸又は $\alpha$ -ヨード酢酸でアセチル化し得る。

#### 【0092】

20個の遺伝的にコードされたアミノ酸 (又は立体異性D-アミノ酸) の天然に生じる側鎖を他の側鎖で、例えばアルキル、低級アルキル、環状4員、5員、6員から7員のアルキル、アミド、アミド低級アルキル、アミドジ (低級アルキル)、低級アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシ及びそれらの低級エステル誘導体などの基で、並びに4員、5員、6員から7員の複素環で置換することができる。特に、プロリン残基の環サイズが5員から4員、6員又は7員に変化しているプロリン類似体を使用できる。環式基は飽和であっても又は不飽和であってもよく、不飽和である場合は、芳香族であっても又は非芳香族であってもよい。複素環式基は、好ましくは1又はそれ以上の窒素、酸素及び／又は硫黄ヘテロ原子を含む。そのような基の例は、フラザニル、フリル、イミダゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、モルホリニル (例えばモルホリノ)、オキサゾリル、ピペラジニル (例えば1-ピペラジニル)、ピペリジニル (例えば1-ピペリジニル、ピペリジノ)、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリジニル (例えば1-ピロリジニル)、ピロリニル、ピロリル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、チオモ

ルホリニル（例えばチオモルホリノ）及びトリアゾリルを含む。これらの複素環式基は、置換されていてもよく又は置換されていなくてもよい。基が置換されている場合、置換基は、アルキル、アルコキシ、ハロゲン、酸素、又は置換若しくは非置換フェニルであり得る。

#### 【0093】

また、リン酸化及び他の方法〔例えばHruby, et al. (1990) Biochem J. 268:249-262に記載されているように〕によってもペプチドを容易に修飾することができる。

#### 【0094】

本発明のペプチド化合物はまた、類似の生物活性を有する非ペプチド化合物についての構造モデルとして役立つ。当業者は、リードペプチド化合物と同じか又は類似の所望の生物活性を有するが、溶解度、安定性、並びに加水分解及びタンパク質分解に対する感受性に関してリードペプチド化合物よりも好ましい活性を有する化合物を構築するために、様々な手法が利用可能であることを認識する〔Morgan and Gainor (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243-252参照〕。これらの手法は、ホスホネート、アミデート、カルバメート、スルホンアミド、第二級アミン及びN-メチルアミノ酸から構成される骨格でペプチド骨格を置換することを含む。

#### 【0095】

ジスルフィド結合の形成

本発明において使用される化合物は、2つの分子内ジスルフィド結合を含む。そのようなジスルフィド結合は、各々のペプチドモノマーのシステイン残基の酸化によって形成され得る。

#### 【0096】

1つの実施形態では、システイン結合形成の制御は、所望の異性体の形成を最適化するために有効な種類及び濃度の酸化剤を選択することによって行われる。例えば、2つの分子内ジスルフィド結合（各々のペプチド鎖上に1つ）を形成するためのペプチドダイマーの酸化は、酸化剤がDMSO又はヨウ素（ $I_2$ ）である場合優先的に（分子間ジスルフィド結合の形成に比べて）達成される。

#### 【0097】

他の実施形態では、システイン結合の形成は、ペプチド合成の間にチオール保護基を選択的に使用することによって制御される。例えば、2つの分子内ジスルフィド結合を有するダイマーを所望する場合、第1モノマーペプチド鎖を、1番目チオール保護基〔例えばトリチル（Trit）、アリルオキシカルボニル（Alloc）、及び1-（4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキス-1-イリデン）エチル（Dde）等〕で保護されたコア配列の2個のシステイン残基を有するように合成し、次に、第2モノマーペプチドを、1番目のチオール保護基とは異なる2番目のチオール保護基〔例えばアセトアミドメチル（Acm）、t-ブチル（tBu）等〕で保護されたコア配列の2個のシステイン残基を有するように合成する。その後、1番目のチオール保護基を除去して第1モノマーのビスルフィド環化（bisulfide cyclization）を生じさせ、次に2番目のチオール保護基を除去して第2モノマーのビスルフィド環化を生じさせる。

#### 【0098】

本発明の他の実施形態は、硫黄の1個が $CH_2$ 基又は硫黄の他の同配体によって置換された、これらのジスルフィド誘導体の類似体を提供する。これらの類似体は、各々のペプチドモノマーが2番目のC残基の代わりに少なくとも1つのC又はホモシステイン残基及び $\alpha$ -アミノ- $\gamma$ -酪酸を含む本発明の化合物から、分子内置換又は分子間置換を介して、当分野で公知の方法〔例えば、Barker, et al. (1992) J. Med. Chem. 35:2040-2048 and Or, et al. (1991) J. Org. Chem. 56:3146-3149参照〕を用いて調製することができる。当業者は、この置換が $\alpha$ -アミノ- $\gamma$ -酪酸及びホモシステインの他のホモログを使用しても起こり得ることを容易に理解する。

#### 【0099】

前記環化方法に加えて、他の非ジスルフィドペプチド環化方法も使用できる。そのよう

な選択的環化方法は、例えば、アミド環化法並びにチオエーテル結合の形成を含む方法を包含する。したがって、本発明の化合物は、分子内アミド結合又は分子内チオエーテル結合のいずれかを有する環化形態で存在し得る。例えば、コア配列の1個のシステインがリシンで置換され、2番目のシステインがグルタミン酸で置換されているペプチドを合成し得る。その後、これら2つの残基の側鎖の間のアミド結合を介して環状モノマーを形成し得る。あるいは、コア配列の1個のシステインがリシン（又はセリン）で置換されているペプチドを合成し得る。次に、リシン（又はセリン）残基の側鎖とコア配列の2番目のシステイン残基の間のチオエーテル結合を介して環状モノマーを形成し得る。従って、ジスルフィド環化法に加えて、アミド環化法及びチオエーテル環化方法は、どちらも本発明の化合物を環化するために容易に使用できる。あるいは、ペプチドのアミノ末端を $\alpha$ 置換酢酸でキャップすることができ、この場合 $\alpha$ 置換基は脱離基、例えば $\alpha$ -ハロ酢酸、例えば $\alpha$ -クロロ酢酸、 $\alpha$ -ブロモ酢酸又は $\alpha$ -ヨード酢酸である。

10

20

30

40

50

### 【0100】

分枝鎖状第三級アミドリンカーの付加

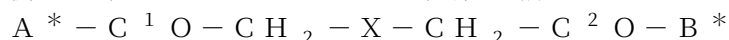
ペプチドモノマーは、分枝鎖状の第三級アミドリンカー部分によって二量体化され得る。1つの実施形態では、ペプチド合成の間にリンカーをペプチドに組み込む。例えば、リンカー $L_K$ 部分が、ペプチド合成のための開始部位として働くことができる2つの官能基と、1又はそれ以上の他の分子部分への結合を可能にする1又はそれ以上の他の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）を含む場合、リンカーを固体支持体に結合し得る。その後、2つのペプチドモノマーを、固相合成法の変形例においてリンカー $L_K$ 部分の2つの反応性窒素基上に直接合成し得る。

### 【0101】

選択的实施形態では、ペプチド合成後にリンカーをペプチドダイマーの2つのペプチドモノマーに結合し得る。そのような結合は、当分野で広く確立されている方法によって達成され得る。1つの実施形態では、リンカーは、合成ペプチドモノマーの標的官能基への結合に適した2つの官能基を含む。例えば、あらかじめ活性化されているか又は適切なカップリング試薬の存在下にある、2個のカルボキシル基を含むリンカーを、2つのペプチドモノマーの各々の標的リシン側鎖のアミン基と反応させ得る。

### 【0102】

例えば、ペプチドモノマーは、第三級アミドリンカー：

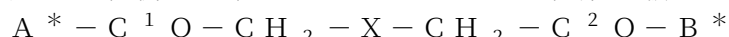


〔式中、Xは $NC(=O) - (CH_2)_2 - NH - Y$ であり、Yは適切な保護基、例えば $t$ -ブチルオキシカルボニル（Boc）保護基であり、 $A^*$ は、リンカーの $C^1$ を第1ペプチドモノマーのC末端リシン残基の $\epsilon$ アミノ基に結合するために使用される、適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドであり、そして $B^*$ は、リンカーの $C^2$ を第2ペプチドモノマーのC末端リシン残基の $\epsilon$ アミノ基に結合するために使用される、適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドである〕

に化学的にカップリングし得る。

### 【0103】

加えて、例えば、ペプチドモノマーは、第三級アミドリンカー：



〔式中、Xは $NC(=O) - (CH_2)_2 - NH - C^3O -$ であり、 $A^*$ は、リンカーの $C^1$ を第1ペプチドモノマーのC末端リシン残基の $\epsilon$ アミノ基に結合するために使用される、適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドであり、そして $B^*$ は、リンカーの $C^2$ を第2ペプチドモノマーのC末端リシン残基の $\epsilon$ アミノ基に結合するために使用される、適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドである〕に化学的にカップリングすることができ、そして第三級アミドリンカーは、スペーサー部分、 $Y - NH - (CH_2)_4 - C^4H - NH - Y$ 〔式中、Xの $C^3$ はスペーサーの $C^4$ に共有結合しており、Yは適切な保護基、例えば $t$ -ブチルオキシカルボニル（Boc）保護基である〕に化学的に結合される。

## 【0104】

ペプチドモノマーは、リシンリンカー $L_K$ 部分によって二量体化され得る。1つの実施形態では、ペプチド合成の間にリシンリンカーをペプチドに組み込む。例えば、リシンリンカー $L_K$ 部分が、ペプチド合成のための開始部位として働くことができる2つの官能基と、別の分子部分への結合を可能にする3番目の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）を含む場合、リンカーを固体支持体に結合し得る。その後、2つのペプチドモノマーを、固相合成法の変形例においてリシンリンカー $L_K$ 部分の2つの反応性窒素基上に直接合成し得る。

## 【0105】

ペプチドダイマーがリシンリンカー $L_K$ 部分によって二量体化される選択的实施形態では、ペプチド合成後に前記リンカーをペプチドダイマーの2つのペプチドモノマーに結合し得る。そのような結合は、当分野で広く確立されている方法によって達成され得る。1つの実施形態では、リンカーは、合成ペプチドモノマーの標的官能基への結合に適した少なくとも2つの官能基を含む。例えば、リシンの2つの遊離アミン基を、2つのペプチドモノマーの各々のC末端カルボキシル基と反応させ得る。

## 【0106】

スペーサーの付加

本発明において使用されるペプチド化合物は、スペーサー部分をさらに含む。1つの実施形態では、ペプチド合成の間にスペーサーをペプチドに組み込み得る。例えば、スペーサーが、遊離アミノ基と、別の分子部分への結合を可能にする2番目の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）を含む場合、スペーサーを固体支持体に結合し得る。

## 【0107】

1つの実施形態では、2つの官能基を含むスペーサーを、最初に1番目の官能基を介して固体支持体に結合する。次に、ペプチド合成のための開始部位として働くことができる2つの官能基と、別の分子部分への結合を可能にする3番目の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）を有するリシンリンカー $L_K$ 部分を、スペーサーの2番目の官能基とリンカーの3番目の官能基を介してスペーサーに結合する。その後、2つのペプチドモノマーを、固相合成法の変形例においてリンカー $L_K$ 部分の2つの反応性窒素基上に直接合成し得る。例えば、遊離アミン基を有する、固体支持体に結合したスペーサーを、リンカーの遊離カルボキシル基を介してリシンリンカーと反応させ得る。

## 【0108】

選択的实施形態では、ペプチド合成後にスペーサーをペプチドダイマーに結合し得る。そのような結合は、当分野で広く確立されている方法によって達成され得る。1つの実施形態では、リンカーは、合成ペプチドの標的官能基への結合に適した少なくとも1つの官能基を含む。例えば、遊離アミン基を有するスペーサーをペプチドのC末端カルボキシル基と反応させ得る。もう1つの例では、遊離カルボキシル基を有するリンカーをリシンアミドの遊離アミン基と反応させ得る。

## 【0109】

ポリエチレングリコール（PEG）の連結

近年、水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）が、治療上及び診断上重要なペプチドの共有結合修飾のために使用されてきた。そのようなポリマーの連結は、生物活性を増強し、血液循環時間を延長し、免疫原性を低下させ、水溶解度を高め、プロテアーゼ消化に対する抵抗性を高めると考えられる。例えば、治療用ポリペプチド、例えばインターロイキン（Knauf, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:15064; Tsutsumi, et al. (1995) J. Controlled Release 33:447）、インターフェロン（Kita, et al. (1990) Drug Des. Delivery 6:157）、カタラーゼ（Abuchowski, et al. (1977) J. Biol. Chem. 252:582）、スーパーオキシドジスムターゼ（Beauchamp, et al. (1983) Anal. Biochem. 131:25）、及びアデノシンデアミナーゼ（Chen, et al. (1981) Biochim. Biophys. Acta 660:293）へのPEGの共有結合連結は、インビボでそれらの半減期を延長させる及び／又は免疫原性と抗原性を低下させることが報告されている。

## 【0110】

本発明のペプチド化合物は、カルバメート結合又はアミド結合を介してペプチドダイマーの分枝鎖状第三級アミドリinker又はスパーサーに共有結合連結された、ポリエチレングリコール（PEG）部分を含み得る。本発明において使用されるPEGの一例は、約20キロダルトン（20K）～約40K（「約」という用語は、PEGの製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す）の分子量を有する直鎖状の非分枝PEGである。好ましくは、PEGは約30K～約40Kの分子量を有する。

## 【0111】

本発明において使用されるPEGのもう1つの例は、約10K～約60K（「約」という用語は、PEGの製剤中、一部の分子は言及されている分子量よりも重く、別の一部の分子はより軽いことを示す）の分子量を有する直鎖状PEGである。好ましくは、PEGは約20K～約40Kの分子量を有する。より好ましくは、PEGは約20Kの分子量を有する。

## 【0112】

PEGの共有結合連結（PEG化）のための方法の例を以下で述べる。これらの説明的記述は限定を意図しない。当業者は、広範囲のPEGの共有結合連結のための様々な方法が当分野において広く確立されていることを理解する。従って、PEGが当分野で公知の多くの結合方法のいずれかによって連結されたペプチド化合物は本発明に包含される。

## 【0113】

例えば、PEGは、活性化PEG分子を結合し得る反応性基（例えば遊離アミノ基又はカルボキシル基）を介してリンカーに共有結合し得る。PEG分子は、異なる反応性部分を有するメトキシル化PEG（「mPEG」）を使用してアミノ基に連結し得る。そのようなポリマーは、mPEG-スクシンイミジルスクシネート、mPEG-スクシンイミジルカーボネート、mPEG-イミデート、mPEG-4-ニトロフェニルカーボネート及びmPEG-塩化シアヌルを含む。同様に、PEG分子は、遊離アミン基を有するメトキシル化PEG（mPEG-NH<sub>2</sub>）を使用してカルボキシル基に連結し得る。

## 【0114】

一部の実施形態では、リンカー又はスパーサーは、末端アミノ基（すなわちスパーサーの末端に位置する）を含む。この末端アミノ基を、適切に活性化されたPEG分子、例えばmPEG-パラ-ニトロフェニルカーボネート（mPEG-NPC）と反応させて、安定な共有結合カルバメート結合を作製し得る。あるいは、この末端アミノ基を適切に活性化されたPEG分子、例えば反応性N-ヒドロキシルスクシンイミド（NHS）基を含むmPEG-スクシンイミジルブチレート（mPEG-SBA）又はmPEG-スクシンイミジルプロピオネート（mPEG-SPA）と反応させて、安定な共有結合カルバメート結合を作製し得る。他の実施形態では、リンカー反応性基は、適切な反応条件下で活性化されてアミン含有PEG分子と共有結合を形成することができるカルボキシル基を含む。適切なPEG分子はmPEG-NH<sub>2</sub>を含み、適切な反応条件はカルボジイミド媒介性アミド形成等を含む。

## 【0115】

EPO-Rアゴニスト活性アッセイ：  
インビトロ機能アッセイ

インビトロでの競合結合アッセイは、EPO-Rへの結合に関してEPOと競合する試験ペプチドの能力を定量する。例えば（例えば米国特許第5,773,569号に記載されているように）、ヒトEPO-Rの細胞外ドメイン（EPO結合タンパク質、EBP）を大腸菌において組換え生産し、組換えタンパク質を固体支持体、例えばマイクロタイターディッシュ又は合成ビーズ〔例えばPierce Chemical Co.（Rockford, IL）からのSulfolinkビーズ〕に結合し得る。固定化EBPを、次に、標識組換えEPOと共に、又は標識組換えEPO及び試験ペプチドと共にインキュベートする。試験ペプチドの段階希釈液をそのような実験のために使用する。試験ペプチ

10

20

30

40

50

ドを添加していないアッセイポイントは、E B P への総 E P O 結合を規定する。試験ペプチドを含む反応については、結合 E P O の量を定量し、対照（総計 = 1 0 0 %）結合のパーセンテージとして表す。これらの値をペプチド濃度に対してプロットする。I C 5 0 値は、E B P への E P O の結合を 5 0 % 低下させる試験ペプチドの濃度（すなわち E P O 結合の 5 0 % 阻害）と定義される。

#### 【0116】

異なるインビトロ競合結合アッセイは、2つのビーズ：E P O 結合ビーズ及び E P O - R 結合ビーズの近接性に依りて生成される光シグナルを測定する。ビーズの近接性は、E P O - R への E P O の結合によって生じる。E P O - R への結合に関して E P O と競合する試験ペプチドはこの結合を妨げ、光放出の減少を生じさせる。光放出を 5 0 % 減少させる試験ペプチドの濃度を I C 5 0 値として定義する。

10

#### 【0117】

本発明のペプチドは、E P O - R への結合に関して E P O と非常に効率良く競合する。この高い機能は、ペプチドの実質的により低い濃度で E P O の結合を阻害するそれらの能力によって示される（すなわちそれらは非常に低い I C 5 0 値を有する）。

#### 【0118】

E P O 受容体に特異的に結合する、本発明の単量体及び二量体ペプチド E P O - R アゴニストの生物活性及び効力は、インビトロでの細胞ベースの機能アッセイを使用して測定し得る。

#### 【0119】

1つのアッセイは、ヒト E P O - R を発現し、f o s プロモーターが駆動するルシフェラーゼレポーター遺伝子構築物でさらにトランスフェクトされたマウスプレ B 細胞株に基づく。E P O 又は別の E P O - R アゴニストに曝露すると、そのような細胞はルシフェラーゼを合成することによって応答する。ルシフェラーゼは、その基質であるルシフェリンを添加すると光の放出を生じさせる。したがって、そのような細胞における E P O - R 活性化のレベルは、ルシフェラーゼ活性の測定を介して定量し得る。試験ペプチドの段階希釈液を細胞に添加し、次にそれを 4 時間インキュベートすることによって試験ペプチドの活性を測定する。インキュベーション後、ルシフェリン基質を細胞に添加し、光放出を測定する。光の半最大放出を生じさせる試験ペプチドの濃度を E C 5 0 として記録する。

20

#### 【0120】

本発明のペプチドは、このアッセイにおいて E P O - R のシグナル伝達依存性ルシフェラーゼ発現を促進する著しく高い能力を示す。この高い機能は、ペプチドの実質的により低い濃度で半最大ルシフェラーゼ活性を生じさせるそれらの能力によって示される（すなわちそれらは非常に低い E C 5 0 値を有する）。このアッセイは、本発明の E P O - R アゴニストペプチドの効力と活性を評価するための好ましい方法である。

30

#### 【0121】

もう1つのアッセイは、E P O - R が安定にトランスフェクトされた、十分に特徴づけられた非形質転換マウス骨髓由来細胞系である、F D C - P 1 / E R 細胞を使用して実施し得る [Dexter, et al. (1980) J. Exp. Med. 152: 1036-1047]。これらの細胞は E P O 依存性増殖を示す。

40

#### 【0122】

そのようなアッセイの1つでは、必要な増殖因子の存在下で細胞を半定常密度まで増殖させる（例えば米国特許第 5, 7 7 3, 5 6 9 号に記載されているように）。次に細胞を P B S で洗浄し、増殖因子を含まない完全培地中で 1 6 ~ 2 4 時間飢餓状態にする。細胞の生存率を測定した後（例えばトリパンブルー染色によって）、約  $10^5$  細胞 /  $50 \mu\text{L}$  になるように保存溶液（増殖因子を含まない完全培地中）を作製する。試験するペプチド E P O - R アゴニスト化合物（典型的には、ファージ結合若しくは他の結合ペプチド又は固定化ペプチドと異なり、遊離の液相ペプチド）の連続希釈液を、9 6 穴組織培養プレートにおいて  $50 \mu\text{L}$  / ウェルの最終容量で作製する。細胞（ $50 \mu\text{L}$ ）を各ウェルに添加し、細胞を 2 4 ~ 4 8 時間インキュベートして、その時点で陰性対照は死滅するか又は静

50

止状態になるはずである。その後、当分野で公知の手法、例えば細胞増殖の指標としてH<sup>3</sup>-チミジンの取込みを測定するMTTアッセイ [Mosmann (1983) J. Immunol. Methods 65:55-63参照] によって細胞増殖を測定する。ペプチドを、EPO-R発現細胞株と親非発現細胞株の両方に関して評価する。半最大細胞増殖を生じさせるのに必要な試験ペプチドの濃度をEC50として記録する。

#### 【0123】

本発明のペプチドは、このアッセイにおいてEPO依存性細胞増殖を促進する著しく高い能力を示す。この高い機能は、ペプチドの実質的により低い濃度で半最大細胞増殖刺激活性を生じさせるそれらの能力によって示される（すなわちそれらは非常に低いEC50値を有する）。このアッセイは、本発明のEPO-Rアゴニストペプチドの効力と活性を評価するための好ましい方法である。

10

#### 【0124】

もう1つのアッセイでは、細胞をEPO添加培地において定常期まで増殖させ、収集して、その後EPOを含まない培地でさらに18時間培養する。細胞を等しい細胞密度の3つの群：添加因子を含まない群（陰性対照）、EPOを含む群（陽性対照）及び試験ペプチドを含む実験群に分ける。次に、培養細胞を様々な時点で収集し、固定して、DNA結合蛍光染料（例えば、いずれもSigmaより入手可能なヨウ化プロピジウム又はHoechst染料）で染色する。次に、例えばFACS Scan Flowサイトメーターを使用して蛍光を測定する。細胞周期の各々の期にある細胞の割合を、その後、例えばCellFITソフトウェアのSOBRモデル（Becton Dickinson）を使用して測定し得る。EPO又は活性ペプチドで処理した細胞は、陰性対照群と比較してS期の細胞の割合がより大きいことを示す（DNA含有量増加の指標としての蛍光上昇によって測定される）。

20

#### 【0125】

同様のアッセイを、FDCP-1細胞株 [例えばDexter et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047参照] 又はTF-1細胞株 [Kitamura, et al. (1989) Blood 73:375-380] を使用して実施し得る。FDCP-1は、WEHI-3ならし培地（IL-3を含有する培地、ATCC番号TIB-68）を添加したとき、増殖することはできるが分化することはできない、増殖因子依存性マウス多能性始原造血前駆細胞株である。そのような実験のために、FDCP-1細胞株をヒト又はマウスEPO-Rでトランスフェクトし、それぞれ、EPOの存在下で増殖することはできるが分化することはできないFDCP-1-hEPO-R細胞株又はFDCP-1-mEPO-R細胞株を生成する。EPO依存性細胞株であるTF-1は、細胞増殖へのペプチドEPO-Rアゴニストの作用を測定するためにも使用し得る。

30

#### 【0126】

さらにもう1つのアッセイでは、脾細胞へのH<sup>3</sup>-チミジン取込みに基づくマイクロアッセイに関してKrystal (1983) Exp. Hematol 11:649-660に述べられている手順を使用して、EPOアゴニストとして働く本発明の化合物の能力を確認し得る。簡単に述べると、B6C3F<sub>1</sub>マウスにフェニルヒドラジン（60mg/kg）を2日間毎日注射する。3日目に脾細胞を取り出し、24時間にわたって増殖するそれらの能力を、MTTアッセイを用いて確認する。

40

#### 【0127】

エリスロポエチン応答性細胞株におけるEPO-RへのEPOの結合は、受容体と、Shc、vav及びJAK2キナーゼを含む多くの細胞内タンパク質の両方のチロシンリン酸化を誘導する。したがって、もう1つのインビトロアッセイは、本発明のペプチドがEPO-R及び下流の細胞内シグナルトランスデューサータンパク質のチロシンリン酸化を誘導する能力を測定する。前述した結合アッセイ及び増殖アッセイによって同定される活性ペプチドは、エリスロポエチン応答性細胞においてEPOとほぼ同一のリン酸化パターンを惹起する。このアッセイのために、FDCP-1/ER細胞 [Dexter, et al. (1980) J Exp Med 152:1036-47] をEPO添加培地で維持し、定常期まで増殖させる。次にこ

50

これらの細胞を、EPOを含まない培地で24時間培養する。その後、規定された数のそのような細胞を試験ペプチドと共に37℃で約10分間インキュベートする。EPOを含む細胞の対照試料も各々のアッセイに供する。次に、処理した細胞を遠心分離によって収集し、SDS溶解緩衝液に再懸濁して、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。ゲル中の電気泳動したタンパク質をニトロセルロースに移し、ブロット上のホスホチロシン含有タンパク質を標準的な免疫学的手法によって視覚化する。例えば、ブロットを抗ホスホチロシン抗体（例えばUpstate Biotechnology, Inc.からのマウス抗ホスホチロシンIgG）でプローブし、洗浄して、次に二次抗体[例えばKirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)からのペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG]でプローブし得る。その後、ホスホチロシン含有タンパク質を、比色アッセイ、化学発光アッセイ又は蛍光アッセイを含む標準的な手法によって視覚化し得る。例えば、化学発光アッセイは、AmershamからのECL Western Blotting Systemを使用して実施し得る。

#### 【0128】

本発明のペプチドの活性を評価するために使用し得るもう1つの細胞ベースのインビトロアッセイは、マウス骨髄細胞又はヒト末梢血細胞を使用するコロニーアッセイである。マウス骨髄はマウスの大腿骨から入手でき、ヒト末梢血の試料は健常ドナーから入手し得る。末梢血の場合は、単核細胞を、例えばFicoll-Hypaque勾配[Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)]での遠心分離によって、最初に血液から単離する。このアッセイのために、有核細胞計数を実施してもとの試料中の有核細胞の数及び濃度を確認する。規定された数の細胞を製造者の指示に従って[Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)]メチルセルロース上に塗布する。実験群は試験ペプチドで処理し、陽性対照群はEPOで処理し、陰性対照群は処理を行わない。規定された期間、一般には10日間と18日間のインキュベーション後に、各々の群についての増殖コロニーの数を記録する。活性ペプチドはコロニー形成を促進する。

#### 【0129】

本発明の化合物の活性を明らかにするために使用できる他のインビトロ生物学的アッセイは、Greenberger, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2935 (EPO依存性造血前駆細胞株) ; Quelle and Wojchowski (1991) J. Biol. Chem. 266:609-614 (B6Sut. EP細胞におけるタンパク質チロシンリン酸化) ; Dusanter-Fourt, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:10670-10678 (ヒトEPO応答性細胞におけるEPO受容体のチロシンリン酸化) ; Quelle, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:17055-17060 (FDC-ER細胞におけるサイトゾルタンパク質、pp100のチロシンリン酸化) ; Worthington, et al. (1987) Exp. Hematol. 15:85-92 (ヘモグロビンについての比色アッセイ) ; Kaiho and Miuno (1985) Anal. Biochem. 149:117-120 (2, 7-ジアミノフルオレンによるヘモグロビンの検出) ; Patel, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:21300-21302 (c-mycの発現) ; Witthuhn, et al. (1993) Cell 74:227-236 (JAK2の結合及びチロシンリン酸化) ; Leonard, et al. (1993) Blood 82:1071-1079 (GATA転写因子の発現) ; 並びにAndo, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9571-9575 (サイクリングD2及びD3によるG<sub>1</sub>移行の調節) に開示されている。

#### 【0130】

マイクロフィジオメーターとして公知の、Molecular Devices Corp.によって設計された装置は、様々な受容体に対するアゴニスト及びアンタゴニストの作用を測定するために成功裏に使用されることが報告されている。この装置についての原理は、受容体活性化に応答した細胞外培地の酸性化速度の変化の測定である。

#### 【0131】

インビボ機能アッセイ

試験ペプチドの効力を評価するために使用し得る1つのインビボ機能アッセイは、赤血

球増加性過低酸素症 (exhypoxic) マウスのバイオアッセイである。このアッセイのために、マウスを数日間交互の条件づけサイクルに供する。このサイクルでは、マウスを低圧状態の期間と雰囲気圧状態の期間に交互に供する。その後、マウスを2～3日間雰囲気圧に維持した後、試験試料を投与する。試験ペプチド試料、又は陽性対照マウスの場合はEPO標準品を、条件づけしたマウスに皮下注射する。放射性標識鉄 (例えば $^{59}\text{Fe}$ ) を2日後に投与し、放射性標識鉄の投与の2日後に血液試料を採取する。次に、標準的手法によってヘマトクリット及び放射能の測定を各々の血液試料について実施する。活性試験ペプチドを注射したマウスからの血液試料は、試験ペプチド又はEPOを摂取しなかったマウスよりも高い放射能を示す (赤血球ヘモグロビンによる $\text{Fe}^{59}$ の結合に起因する)。

10

### 【0132】

試験ペプチドの効力を評価するために使用し得るもう1つのインビボ機能アッセイは、網状赤血球アッセイである。このアッセイのために、正常未処置マウスにEPO又は試験ペプチドのいずれかを3日間連続して皮下注射する。3日目に、前記マウスに鉄デキストランも腹腔内注射する。5日目に、マウスから血液試料を採集する。血液中の網状赤血球のパーセント (%) をチアゾールオレンジ染色及びフローサイトメーター分析 (retic-count プログラム) によって決定する。加えて、ヘマトクリットを手操作で測定する。補正した網状赤血球のパーセントを、以下の式を用いて決定する：

$$\% \text{RETIC}_{\text{補正}} = \% \text{RETIC}_{\text{観測}} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{個体}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{正常}})$$

20

活性試験化合物は、試験ペプチド又はEPOを摂取しなかったマウスと比較して $\% \text{RETIC}_{\text{補正}}$ レベルの上昇を示す。

### 【0133】

#### 医薬組成物

本発明のさらにもう1つの態様では、前記EPO-Rアゴニストペプチド化合物の医薬組成物が提供される。そのような組成物の投与によって緩和される又は調節される状態は、前記に示した状態を含む。そのような医薬組成物は、経口、非経口 (筋肉内、腹腔内、静脈内 (IV) 又は皮下注射)、経皮 (受動的に又はイオン導入法若しくは電気穿孔法を使用して)、経粘膜 (鼻、膈、直腸又は舌下) 投与経路による投与又は生体内分解性挿入物を使用した投与用であり得、各々の投与経路に適した投与形態に製剤することができる。一般に、本発明のEPO-Rアゴニストペプチド又は誘導体生成物の有効量を、医薬的に許容される希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び／又は担体と共に含有する医薬組成物は、本発明に包含される。そのような組成物は、様々な緩衝剤含有量 (例えば $\text{Tris-HCl}$ 、酢酸塩、リン酸塩)、pH強度及びイオン強度の希釈剤；添加物、例えば界面活性剤及び可溶化剤 (例えば $\text{Tween 20}$ 、 $\text{Tween 80}$ 、 $\text{Polysorbate 80}$ )、抗酸化剤 (例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、防腐剤 (例えばチメロサル、ベンジルアルコール) 及び増量物質 (例えばラクトース、マンニトール)；ポリマー化合物の微粒子製剤、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸等又はリポソームへの物質の組込みを含む。ヒアルロン酸も使用し得る。そのような組成物は、本発明のタンパク質及び誘導体の物理的状态、安定性、インビボでの放出の速度、及びインビボでのクリアランスの速度に影響を及ぼし得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pages 1435-1712参照。組成物は、液体形態で調製され得るか、又は乾燥粉末 (例えば凍結乾燥) 形態であり得る。

30

40

### 【0134】

#### 注射剤、溶液及び乳剤

本発明はまた、一般に皮下、筋肉内又は静脈内注射によって特徴づけられる、非経口投与によって本発明の化合物を投与するために設計された組成物を対象とする。注射剤は、任意の従来形態で、例えば液体溶液若しくは懸濁液として、注射の前に液体に溶解する若しくは懸濁するのに適した固体形態として、又は乳剤として調製され得る。

50

## 【0135】

本発明において注射剤と共に使用し得る賦形剤の例は、水、食塩水、デキストロース、グリセロール又はエタノールを含むが、これらに限定されない。注射剤組成物はまた、場合により少量の非毒性補助物質、例えば湿潤剤若しくは乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解促進剤、及び他のそのような作用物質、例えば酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン及びシクロデキストリンを含み得る。一定なレベルの用量が維持されるように、徐放システム又は持続放出システムの移植も（例えば米国特許第3,710,795号参照）、本明細書において考慮される。そのような非経口組成物に含有される活性化化合物の割合は、その特定の性質、並びに化合物の活性及び被験者に必要性に大きく依存する。

10

## 【0136】

製剤の非経口投与は、静脈内、皮下及び筋肉内投与を含む。非経口投与のための製剤は、注射用滅菌溶液、皮下用錠剤を含む、使用の直前に溶媒と組み合わせることができる滅菌乾燥可溶性製品、例えば本明細書で述べる凍結乾燥粉末、注射用滅菌懸濁液、使用の直前にビヒクルと組み合わせることができる滅菌乾燥不溶性製品、及び滅菌乳剤を含む。溶液は水性又は非水性のいずれでもよい。

## 【0137】

静脈内投与する場合、適切な担体の例は、生理食塩水又はリン酸緩衝食塩水（PBS）、並びに増粘剤及び可溶化剤、例えばグルコース、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコール及びそれらの混合物を含有する溶液を含むが、これらに限定されない。

20

## 【0138】

非経口製剤において場合により使用し得る医薬的に許容される担体の例は、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張化剤、緩衝剤、抗酸化剤、局所麻酔薬、懸濁化剤及び分散剤、乳化剤、金属イオン封鎖剤又はキレート化剤、並びに他の医薬的に許容される物質を含むが、これらに限定されない。

## 【0139】

場合により使用し得る水性ビヒクルの例は、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、等張デキストロース注射液、滅菌水注射液、デキストロース及び乳酸加リンガー注射液を含む。

## 【0140】

場合により使用し得る非水性非経口ビヒクルの例は、植物起源の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油及び落花生油を含む。

30

## 【0141】

特に製剤が多回投与用容器に包装されており、したがって保存されて、複数のアリコートを取り出すように設計されている場合は、静菌濃度又は静真菌濃度の抗菌剤を非経口製剤に添加し得る。使用し得る抗菌剤の例は、フェノール又はクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチル及びプロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム及び塩化ベンゼトニウムを含む。

## 【0142】

使用し得る等張化剤の例は、塩化ナトリウム及びデキストロースを含む。使用し得る緩衝液の例は、リン酸塩及びクエン酸塩を含む。使用し得る抗酸化剤の例は、重硫酸ナトリウムを含む。使用し得る局所麻酔薬の例は、プロカイン塩酸塩を含む。使用し得る懸濁化剤及び分散剤の例は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びポリビニルピロリドンを含む。使用し得る乳化剤の例は、Polysorbate 80（TWEEN 80）を含む。金属イオンの封鎖剤又はキレート化剤の例は、EDTAを含む。

40

## 【0143】

医薬担体はまた、場合により、水混和性ビヒクルのためのエチルアルコール、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコール、並びにpH調整のための水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸又は乳酸を包含し得る。

50

## 【0144】

非経口製剤中の阻害剤の濃度は、注射が所望の薬理作用を生じさせるのに十分な医薬的有効量を投与するように調整され得る。阻害剤の正確な濃度及び／又は使用される用量は、当分野で公知のように最終的には患者又は動物の年齢、体重及び状態に依存する。

## 【0145】

単位投与非経口製剤は、アンプル、バイアル又は針付き注射器に包装され得る。非経口投与のためのすべての製剤は、当分野において公知であり、実践されているように、無菌でなければならない。

## 【0146】

注射剤は、局所及び全身投与用に設計され得る。典型的には、治療有効用量は、治療される組織に対して少なくとも約0.1重量%～約90重量%又はそれ以上、例えば1重量%を超える濃度のEPO-Rアゴニストペプチド化合物を含むように製剤される。阻害剤は、一度に投与され得るか、又は時間間隔を置いて投与される複数のより小用量に分割され得る。正確な用量及び治療の期間は、組成物が非経口的に投与される場所、担体、及び公知の試験プロトコルを用いて又はインビボ若しくはインビトロ試験データからの推定によって経験的に決定され得る他の変数の関数であることが了解される。濃度及び用量の値はまた、治療される個体の年齢によっても異なることに留意すべきである。任意の特定被験者に関して、特定投与レジメンは、個体の必要性、及び製剤を投与する又は製剤の投与を監督する人物の専門的判断に従って経時的に調整される必要があり得ることがさらに了解されるべきである。したがって、本明細書で示す濃度範囲は例示であることが意図されており、特許請求される製剤の範囲又は実施を限定することは意図されない。

## 【0147】

EPO-Rアゴニストペプチド化合物は、場合により、より可溶性の活性生成物を生じるように又はプロドラッグを生じるように、微粉化形態又は他の適切な形態で懸濁され得るか又は誘導体化され得る。生じる混合物の形態は、意図される投与形式及び選択担体又はビヒクルへの化合物の溶解度を含む多くの因子に依存する。有効濃度は、疾患状態の症状を改善するために十分であり、経験的に決定され得る。

## 【0148】

経口送達

参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) at Chapter 89に一般的に述べられている経口固体投与形態は、本明細書における使用のために考慮される。固体投与形態は、錠剤、カプセル、丸剤、トローチ若しくはロゼンジ、カシェ剤、ペレット、散剤、又は顆粒剤を含む。また、本発明の組成物を製剤するためにリボソーム又はプロテイノイドのカプセル化を使用し得る（例えば、米国特許第4,925,673号に報告されているプロテイノイドミクロスフェアとして）。リボソームカプセル化が使用でき、リボソームは様々なポリマーで誘導体化され得る（例えば米国特許第5,013,556号）。治療薬のための可能な固体投与形態の説明は、参照により本明細書に組み込まれる、Marshall, K. In: Modern Pharmaceutics Edited by G. S. Banker and C. T. Rhodes Chapter 10, 1979に記載されている。一般に、製剤は、EPO-Rアゴニストペプチド（又はその化学修飾形態）及び胃環境からの保護と腸における生物活性物質の放出を可能にする不活性成分を含む。

## 【0149】

また、医薬的に許容される乳剤、溶液、懸濁液及びシロップを含む、経口投与のための液体投与形態も本明細書における使用のために考慮され、それらは、不活性希釈剤、補助剤、例えば湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、並びに甘味料、香味料及び香料を含む、他の成分を含有し得る。

## 【0150】

ペプチドは、誘導体の経口送達が有効であるように化学修飾され得る。一般に、考慮される化学修飾は、成分分子自体への少なくとも1つの部分の結合であり、前記部分は、（

10

20

30

40

50

a) タンパク質分解の阻害、及び (b) 胃又は腸からの血流への取込みを可能にする。また、成分の全体的な安定性の上昇及び体内での循環時間の延長も望ましい。前記で論じたように、PEG化は医薬用途のための好ましい化学修飾である。使用し得る他の部分は、以下を含む：プロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロリン、ポリ-1, 3-ジオキソラン及びポリ-1, 3, 6-チオキソカン [例えば、Abuchowski and Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," in *Enzymes as Drugs*. Hosenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, N. Y.) pp. 367-383; and Newmark, et al. (1982) *J. Appl. Biochem.* 4: 185-189参照]。

10

#### 【0151】

経口製剤に関して、放出の位置は、胃、小腸（十二指腸、空腸若しくは回腸）又は大腸であり得る。当業者は、胃では溶解しないが、十二指腸において又は腸内の別の場所で物質を放出する利用可能な製剤を有する。好ましくは、放出は、ペプチド（又は誘導体）の保護によって又は胃環境を越えた、例えば腸内でのペプチド（又は誘導体）の放出によって、胃環境の有害作用を回避する。

#### 【0152】

完全な胃耐性を確実にするため、少なくとも pH 5.0 に対して不透過性のコーティングが必須である。腸溶剤皮として使用されるより一般的な不活性化成分の例は、セルロースアセテートトリメリテート (CAT)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート (HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、セルロースアセテートフタレート (CAP)、Eudragit L、Eudragit S、及び Shellac である。これらのコーティングは混合薄膜として使用され得る。

20

#### 【0153】

コーティング又はコーティングの混合物はまた、胃に対する保護を意図されない錠剤に関しても使用できる。これは、糖コーティング又は錠剤を飲み込みやすくするコーティングを含み得る。カプセルは、乾燥治療薬（すなわち粉末）の送達のためのハードシェル（例えばゼラチン）で構成され得、液体形態についてはソフトゼラチンシェルを使用し得る。カシェ剤のシェル材料は、厚いデンプン又は他の食用紙であり得る。丸剤、ロゼンジ、成型錠剤又は粉薬錠剤については、モイストマッシング法 (moist massing techniques) が使用できる。

30

#### 【0154】

ペプチド（又は誘導体）は、粒径約 1 mm の顆粒又はペレットの形態の微細な多粒子として製剤に含めることができる。カプセル投与のための物質はまた、粉末、軽く圧縮されたプラグ、又はさらには錠剤としても製剤することができる。これらの治療薬は圧縮によって調製できる。

#### 【0155】

着色剤及び／又は香味料も含まれ得る。例えば、ペプチド（又は誘導体）は、製剤されて（例えばリポソーム又はミクロスフェアカプセル化によって）、その後さらに食用製品中に、例えば着色剤と香味料を含む冷蔵飲料中に含有され得る。

40

#### 【0156】

ペプチド（又は誘導体）の体積を不活性材料で希釈又は増加させ得る。これらの希釈剤は、炭水化物、特にマンニトール、 $\alpha$ -ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾デキストラン及びデンプンを含み得る。カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムを含む、ある種の無機塩も充填剤として使用し得る。市販の希釈剤の一部は、Fast-Flow、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress 及び Avicell である。

#### 【0157】

崩壊剤は、治療薬を固体投与形態に製剤する場合に含め得る。崩壊剤として使用される

50

材料は、デンプンに基づく市販の崩壊剤、E x p l o t a bを含む、デンプンを含むが、これに限定されない。ナトリウムデンプングリコレート、A m b e r l i t e、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸性カルボキシメチルセルロース、天然海綿及びベントナイトはすべて使用し得る。崩壊剤はまた、不溶性カチオン交換樹脂であり得る。粉末ゴムは、崩壊剤として及び結合剤として使用でき、粉末ゴム、例えば寒天、カラヤ又はトラガカントを含み得る。アルギン酸及びそのナトリウム塩も崩壊剤として有用である。

#### 【0158】

結合剤は、ペプチド（又は誘導体）物質を共に保持して硬錠剤を形成するために使用でき、天然生成物からの材料、例えばアカシア、トラガカント、デンプン及びゼラチンを含み得る。他には、メチルセルロース（MC）、エチルセルロース（EC）及びカルボキシメチルセルロース（CMC）が含まれる。ポリビニルピロリドン（PVP）及びヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）は、どちらもペプチド（又は誘導体）を顆粒化するためにアルコール溶液中で使用できる。

10

#### 【0159】

製剤工程の間の接着を防ぐため、抗摩擦剤をペプチド（又は誘導体）の製剤に含めてもよい。潤滑剤は、ペプチド（又は誘導体）とダイ壁の間の層として使用でき、これらは、そのマグネシウム塩とカルシウム塩を含むステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、流動パラフィン、植物油及びワックスを含み得るが、これらに限定されない。可溶性潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、様々な分子量のポリエチレングリコール、C a r b o w a x 4000及びC a r b o w a x 6000も使用し得る。

20

#### 【0160】

製剤の間の薬剤の流動特性を改善し、圧縮の間の再配置を助けるための流動促進剤も添加し得る。流動促進剤は、デンプン、滑石、発熱性シリカ及び水和シリコアルミネートを含み得る。

#### 【0161】

水性環境へのペプチド（又は誘導体）の溶解を助けるため、湿潤剤として界面活性剤を添加してもよい。界面活性剤は、アニオン界面活性剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム及びジオクチルスルホン酸ナトリウムを含み得る。カチオン界面活性剤も使用でき、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウムを含み得る。界面活性剤として製剤中に含めることができる潜在的な非イオン性界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50及び60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート20、40、60、65及び80、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース並びにカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、単独で又は種々の比率の混合物としてタンパク質又は誘導体の製剤中に存在し得る。

30

#### 【0162】

ペプチド（又は誘導体）の取込みを潜在的に増強する添加物は、例えば、脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸及びリノレン酸である。

40

#### 【0163】

制御放出経口製剤が望ましい場合がある。ペプチド（又は誘導体）を、拡散又は浸出機構のいずれかによる放出を可能にする不活性マトリックス、例えばゴムに組み込むことができる。緩やかに変性するマトリックスも製剤に組み込み得る。一部の腸溶剤皮も遅延放出作用を有する。制御放出のもう1つの形態は、O r o s t h e r a p e u t i c s y s t e m（A l z a C o r p.）に基づく方法によるものであり、すなわち薬剤は、水を浸入させ、浸透圧作用によって1つの小さな開口部を通して薬剤を押し出すことを可能にする半透膜に封入される。

#### 【0164】

他のコーティングも製剤のために使用し得る。これらは、コーティングパンに適用でき

50

る様々な糖類を含む。ペプチド（又は誘導体）はまた、フィルムコーティング錠剤としても提供することができ、この場合に使用される材料は2つの群に分けられる。最初の群は非腸溶性物質であり、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロビドン及びポリエチレングリコールを含む。2番目の群は、一般にフタル酸のエステルである腸溶性物質から成る。

#### 【0165】

最適のフィルムコーティングを提供するために物質の混合物を使用し得る。フィルムコーティングは、パンコーター若しくは流動床において又は圧縮コーティングによって実施し得る。

10

#### 【0166】

非経口送達

非経口投与のための本発明による製剤は、滅菌水性溶液若しくは非水性溶液、懸濁液又は乳剤を含む。非水性溶媒又はビヒクルの例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油及びトウモロコシ油、ゼラチン、並びに注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。そのような投与形態はまた、補助剤、例えば防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤を含み得る。それらは、例えば、細菌保持フィルターでのろ過によって、滅菌剤を組成物に組み込むことによって、組成物を照射することによって、又は組成物を加熱することによって滅菌し得る。それらはまた、使用の直前に、滅菌水又は何らかの他の滅菌注射用媒体を使用することによって製造できる。

20

#### 【0167】

直腸又は膣送達

直腸又は膣投与のための組成物は、好ましくは、活性物質に加えて、賦形剤、例えばココアバター又は坐剤ワックスを含み得る坐剤である。経鼻投与又は舌下投与のための組成物も、当分野で周知の標準的な賦形剤と共に調製される。

#### 【0168】

肺送達

EPO-Rアゴニストペプチド（又はその誘導体）の肺送達も本明細書において考慮される。ペプチド（又は誘導体）は、吸入の間に哺乳動物の肺に送達され、肺上皮内層を越えて血流に入る〔例えば、Adjei, et al. (1990) *Pharmaceutical Research* 7:565-569; Adjei, et al. (1990) *Int. J. Pharmaceutics* 63:135-144（酢酸ロイプロリド）; Braquet, et al. (1989) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13(sup5):143-146（エンドセリン-1）; Hubbard, et al. (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212（ $\alpha 1$ -アンチトリプシン）; Smith, et al. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146（ $\alpha 1$ -プロテイナーゼ）; Oswein, et al. (1990) "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II* Keystone, Colorado（組換えヒト成長ホルモン）; Debs, et al. (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488（インターフェロン $\gamma$ 及び腫瘍壊死因子 $\alpha$ ）;並びにPlatz, et al.への米国特許第5, 284, 656号（顆粒球コロニー刺激因子）参照〕。全身作用のための薬剤の肺送達についての方法及び組成物は、Wong, et al.への米国特許第5, 451, 569号に記載されている。

30

40

#### 【0169】

治療薬の肺送達のために設計された広範囲の機械装置が、本発明の実施における使用のために考慮され、それらは噴霧器、定量吸入器及び粉末吸入器を含むが、これらに限定されず、そのすべてが当業者によく知られている。本発明の実施に適した市販の装置の一部の特定例は、Ultravent噴霧器（Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO）; Acorn II噴霧器（Marquest Medical Products, Englewood, CO）; Ventolin定量吸入器（Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC）;及びSpinhaler粉末吸入器（Fisons Corp., Bedford, MA）である。

50

## 【0170】

すべてのそのような装置は、ペプチド（又は誘導体）の投薬に適した製剤の使用を必要とする。典型的には、各々の製剤は使用される装置のタイプに特異的であり、治療において有用な通常の希釈剤、補助剤及び／又は担体に加えて、適切な推進剤の使用を含み得る。また、リポソーム、マイクロカプセル若しくはミクロスフェア、封入複合体、又は他のタイプの担体の使用も考慮される。化学修飾されたペプチドも、化学修飾のタイプ又は使用される装置のタイプに依存して種々の製剤に調製され得る。

## 【0171】

ジェット式又は超音波式の噴霧器で使用するのに適した製剤は、典型的には溶液 1 mL 当たり生物活性タンパク質約 0.1 ~ 25 mg の濃度で水に溶解されたペプチド（又は誘導体）を含有する。製剤はまた、緩衝剤及び単純な糖（例えば、タンパク質の安定化及び浸透圧の調節のため）も含み得る。噴霧製剤はまた、エアロゾルを形成するときに溶液の噴霧化によって引き起こされるペプチド（又は誘導体）の表面誘導凝集を低減する又は防止するために界面活性剤を含み得る。

## 【0172】

定量吸入装置で使用するための製剤は、一般に、界面活性剤を用いて推進剤に懸濁されたペプチド（又は誘導体）を含む微細分割粉末を含有する。推進剤は、この目的に使用される任意の従来の材料、例えばクロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、又はトリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール及び 1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンを含む炭化水素、又はそれらの組合せであり得る。適切な界面活性剤は、トリオレイン酸ソルビタン及びダイズレシチンを含む。オレイン酸も界面活性剤として有用であり得る。

## 【0173】

粉末吸入装置から投薬するための製剤は、ペプチド（又は誘導体）を含む微細分割乾燥粉末を含有し、また、バルキング剤、例えばラクトース、ソルビトール、スクロース又はマンニトールを、装置からの粉末の散布を容易にする量、例えば製剤の 50 重量% ~ 90 重量% の量で含み得る。ペプチド（又は誘導体）は、最も好都合には、遠位肺への最も有効な送達のために 10 mm（又はミクロン）未満の平均粒径、最も好ましくは 0.5 ~ 5 mm の平均粒径を有する微粒子形態に調製されるべきである。

## 【0174】

経鼻送達

EPO-R アゴニストペプチド（又は誘導体）の経鼻送達も考慮される。経鼻送達は、肺における薬剤の沈着を必要とせずに、治療薬を鼻に投与した後ペプチドが直接血流に入ることを可能にする。経鼻送達のための製剤は、デキストラン又はシクロデキストランを含有する製剤を含む。

## 【0175】

経鼻送達を促進するために使用される他の浸透促進剤も、本発明のペプチドと共に使用するために考慮される（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2003 年 12 月 17 日出願の国際公開公報第 2004056314 号に記載されているもの）。

## 【0176】

用量

すべてのペプチド化合物について、さらなる試験を実施したとき、様々な患者における様々な状態の治療のための適切な用量レベルに関する情報が明らかになり、当業者は、受容者の治療背景、年齢及び全般的健康状態を考慮して、適切な用量を確認することができる。選択される用量は、所望治療効果、投与経路及び所望の治療期間に依存する。一般に 1 日当たり 0.001 ~ 10 mg / kg 体重の用量レベルが哺乳動物に投与される。一般に、静脈内注射又は注入に関しては、用量はより低いと考えられる。

## 【0177】

ある実施形態では、本発明のペプチドのいずれか 1 つを、透析前又は透析中の腎不全を

10

20

30

40

50

有する個体（透析前患者又は透析患者）を治療するために使用し得る。この実施形態における治療用量範囲は、個体の体重1キログラム（kg）につき化合物0.025～0.2ミリグラム（mg）（0.025～0.2 mg/kg）であり得る。より特定すると、0.05～0.1 mg/kgの用量範囲が好ましい。さらに、医師は、最初に0.025 mg/kgから出発して漸増用量を使用し、その後治療される各々の個体について、個々のヘモグロビン応答に基づき約0.025 mg/kgずつ用量を増加し得る。そのようにして、医師は、適切なヘモグロビン応答が達成されるまで各々の個体について用量を調節し得る。透析前又は透析患者である個体の場合は、適切なヘモグロビン応答は、正常なヘモグロビンレベル（14～15 g/dL）又は医師によって決定される別のヘモグロビンレベルを概ね達成することである。この実施形態では、各個別の透析前又は透析患者について10の薬理学的活性用量（PAD）は、0.067～0.075 mg/kgであると予想される。この実施形態の利点は、他の現在の赤血球生成刺激薬（ESA）の場合のように1週間に1回ではなく、各個別患者について3～4週間ごとに1回という低い投与頻度であると予想される。多くの投与経路が使用できる（前述したように経口、IV等）。透析患者についての好ましい投与経路は、静脈内経路である。透析前患者についての好ましい投与経路は、皮下経路である。他の特定実施形態では、前述した化合物の1つを、悪性疾患に関連する貧血を有する個体（腫瘍患者）を治療するために使用し得る。この実施形態における治療用量範囲は、透析前又は透析患者についての範囲の3～5倍（すなわち0.075～0.5 mg/kg）であると予想される。より詳細には、0.2～0.4 mg/kgの用量範囲が好ましい。前記のように、腫瘍患者を治療する医師は、0.075 mg/kg20から出発して、適切なヘモグロビン応答が達成されるまで0.075 mg/kgずつ漸増して用量を調節し得る。各個別腫瘍患者についてのPADは約0.25 mg/kgであると予想される。やはり、3～4週間ごとに1回という低い投与頻度の利点が各個別患者について期待される。さらに、腫瘍患者に関する他の利点は、網状赤血球刺激とヘモグロビン上昇の間の遅滞期のヘモグロビン低下を防ぐために、所定用量を化学療法の前に（例えば3～5日前に）投与し得るか又は化学療法と同時投与し得る。多くの投与経路が使用できる（前述したように経口、IV等）。皮下投与は腫瘍患者のための好ましい投与経路である。腫瘍患者を治療するときに使用するための化合物の例は、以下に示すものを含む。

#### 【0178】

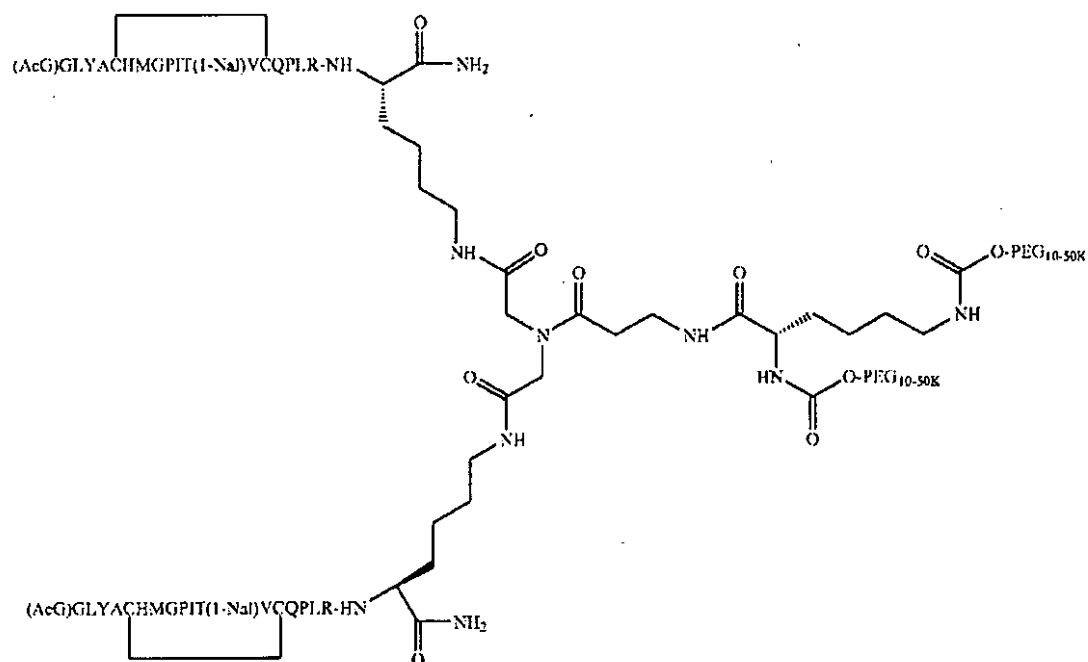
カルバメート結合、サルコシンなし、及び一連のPEG分子量（本明細書で示す配列番号1）：

10

20

30

【化 2 4】



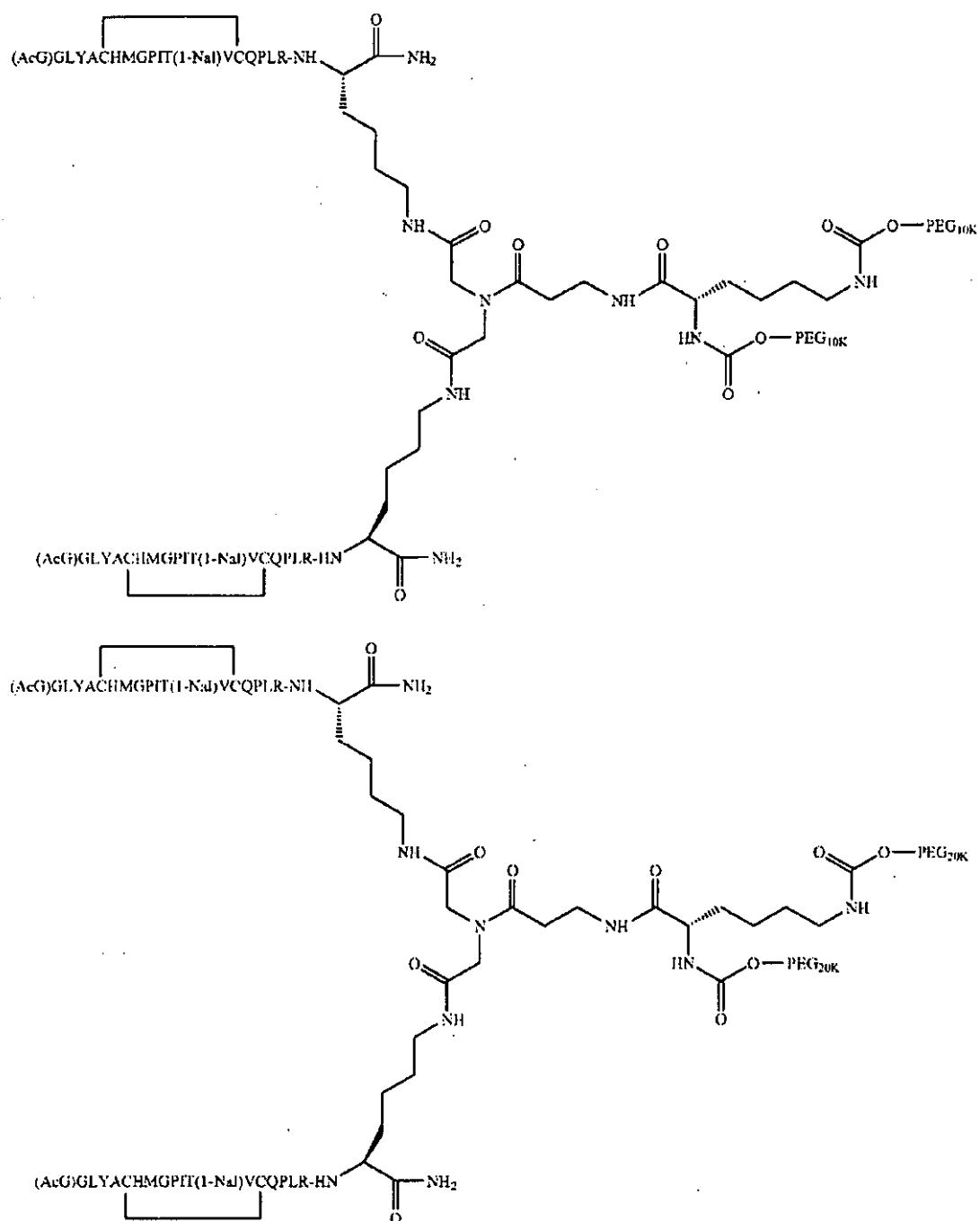
10

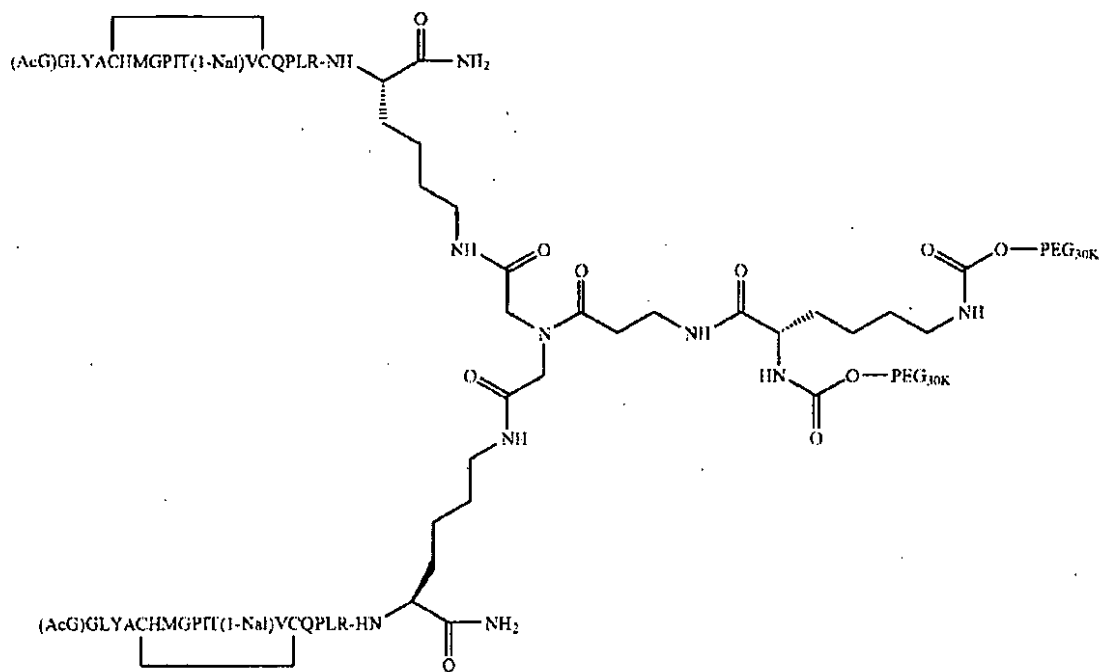
【 0 1 7 9】

20

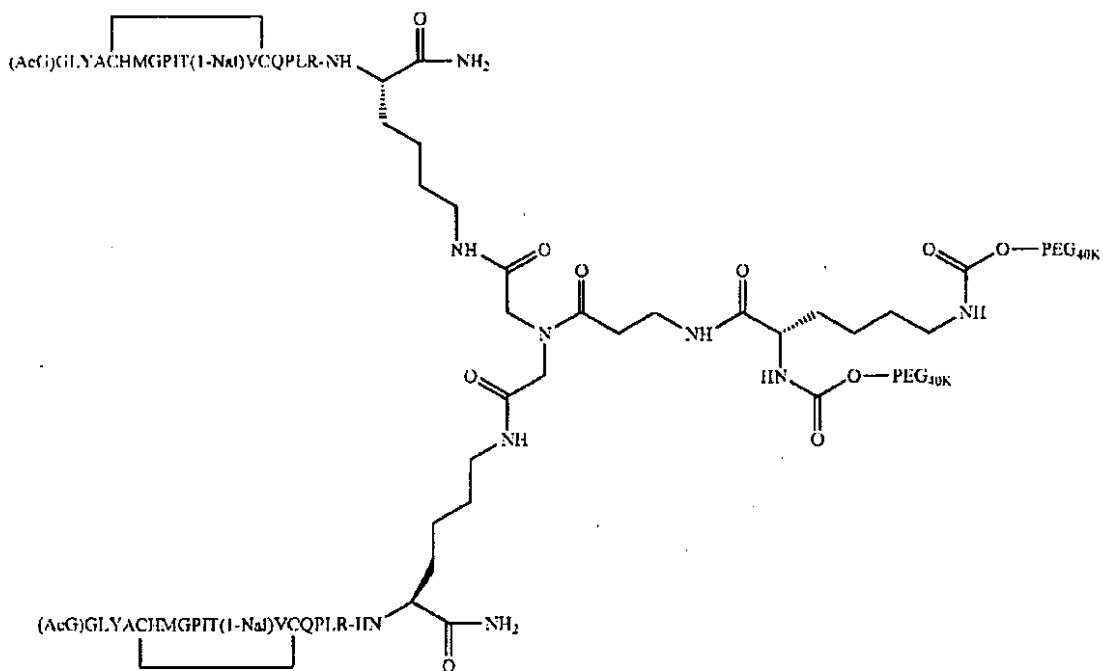
カルバメート結合、サルコシンなし、及び好ましい PEG 分子量（本明細書で示す配列番号 1）：

【化 2 5】



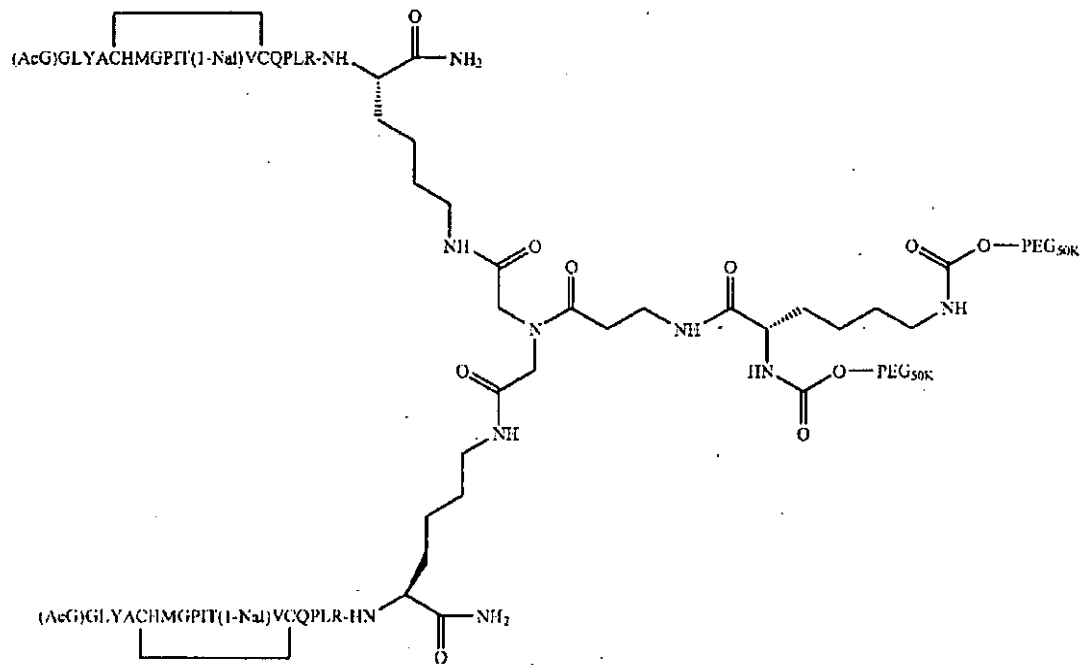


10



20

30



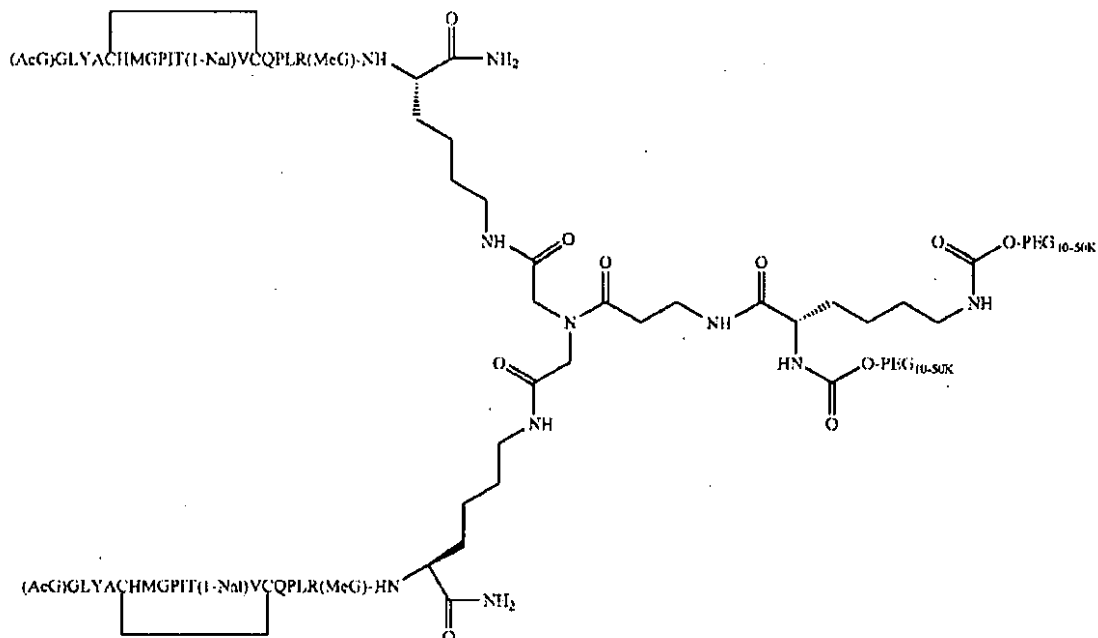
10

20

## 【0180】

カルバメート結合、サルコシン含有、及び一連のPEG分子量（本明細書で示す配列番号2）：

## 【化26】



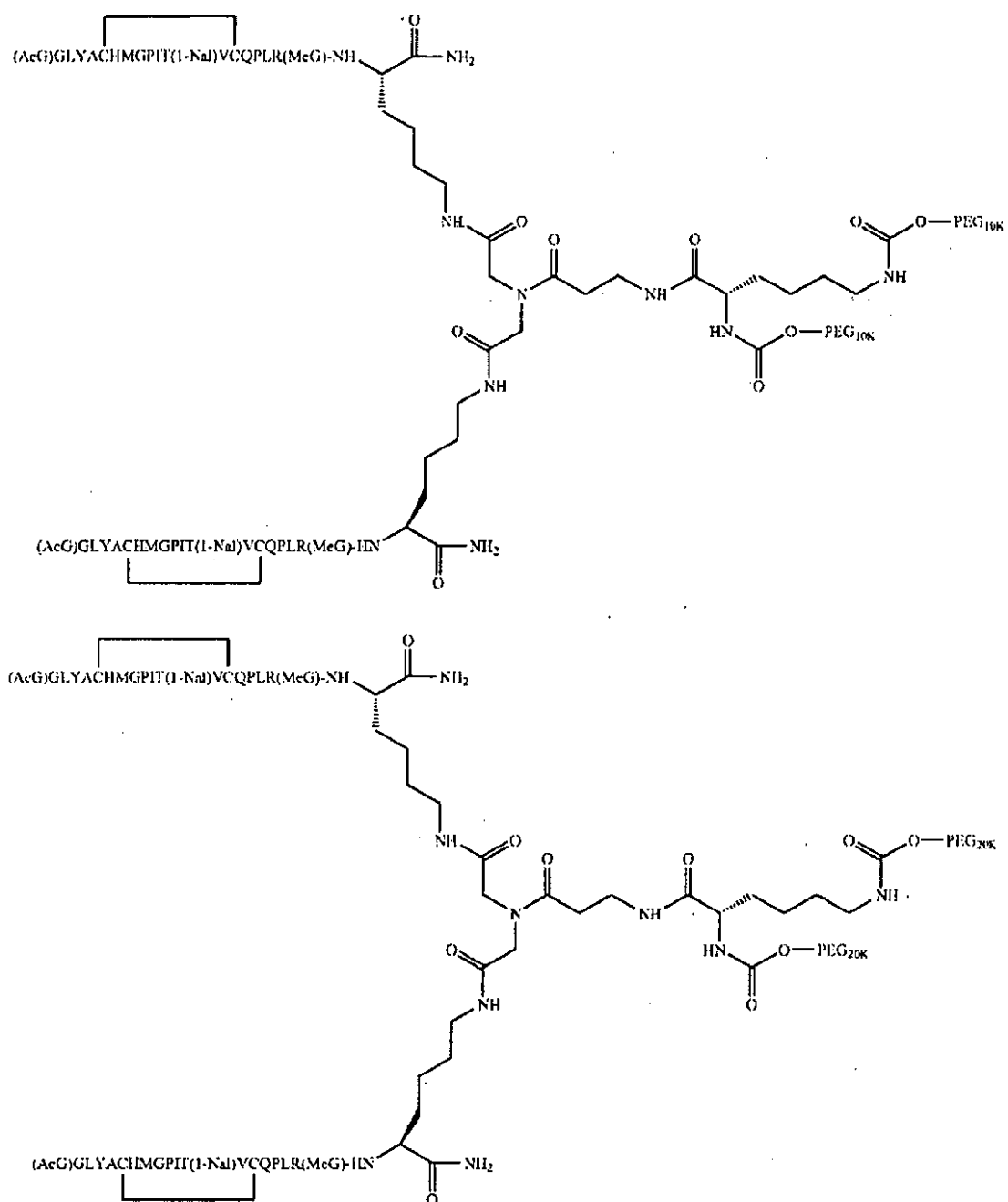
30

40

## 【0181】

カルバメート結合、サルコシン含有、及び好ましいPEG分子量（本明細書で示す配列番号2）：

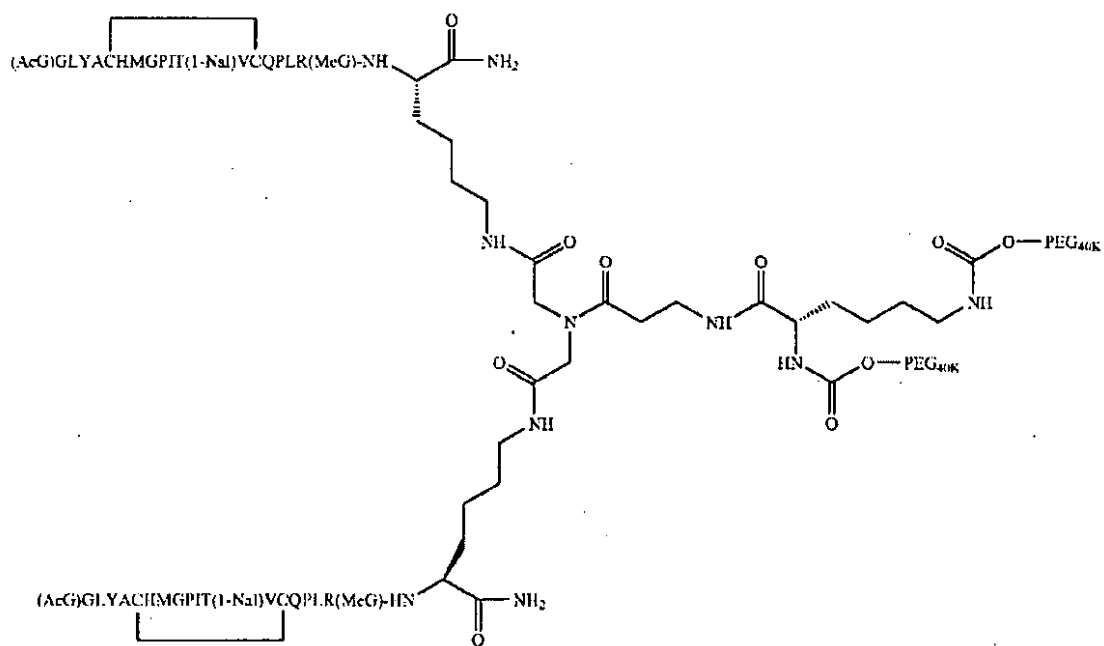
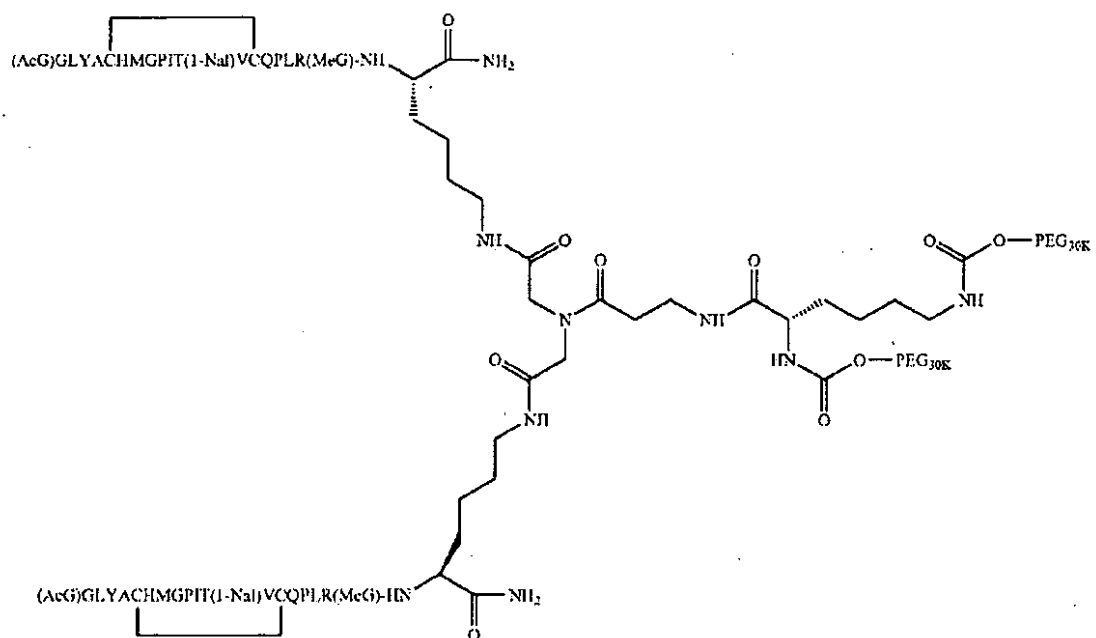
【化 2 7】

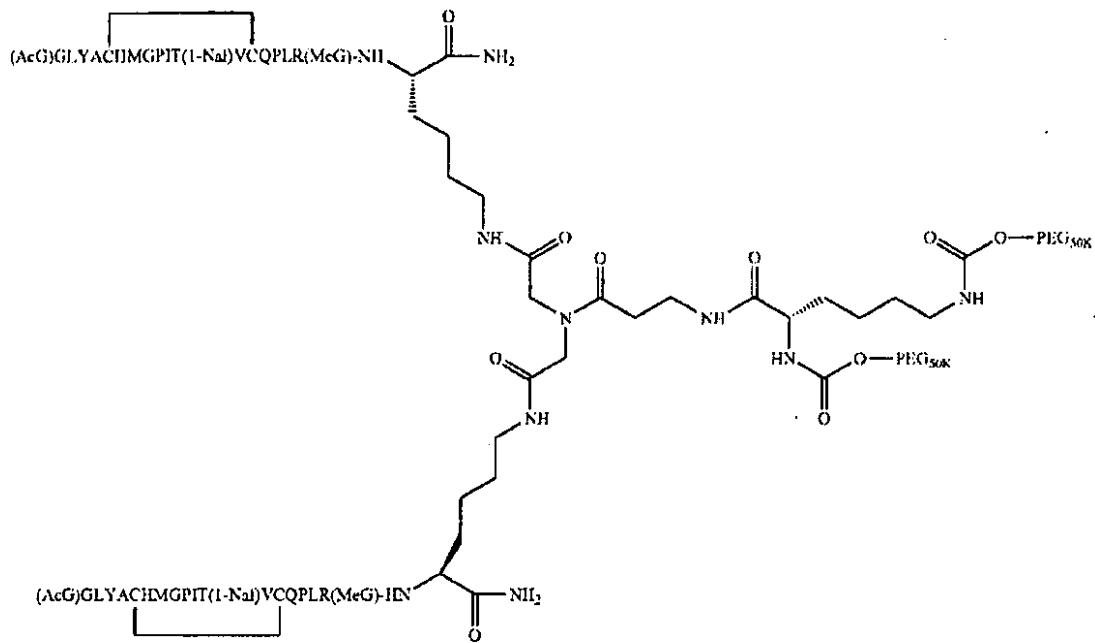


10

20

30





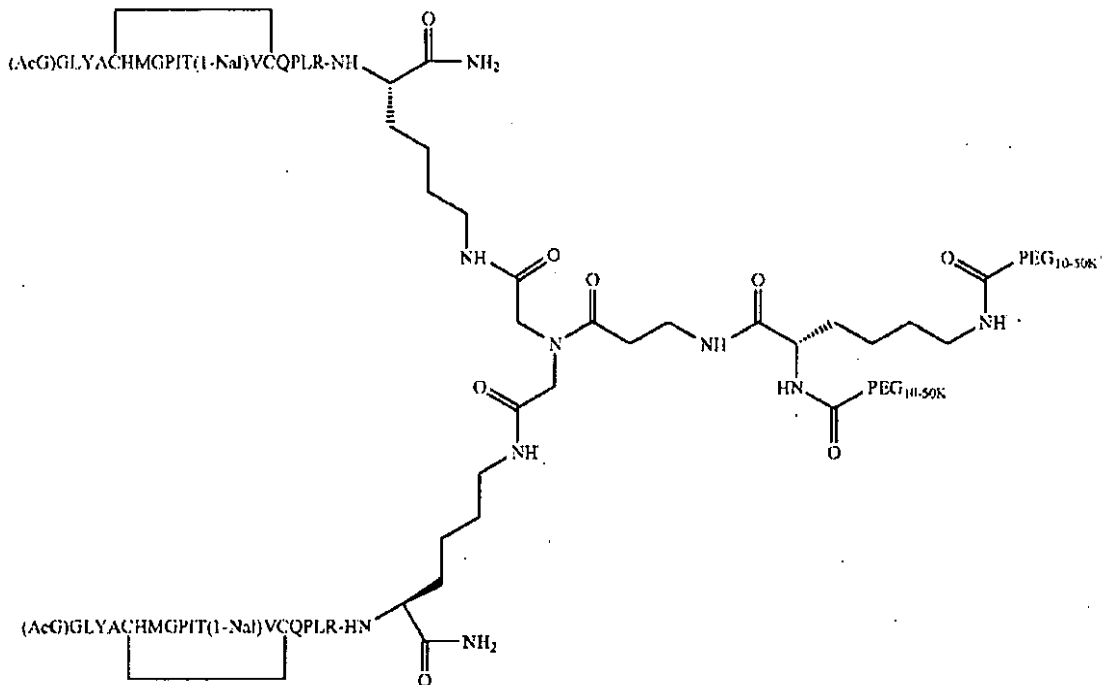
10

## 【0182】

20

アミド結合、サルコシンなし、及び一連のPEG分子量（本明細書で示す配列番号1）：

## 【化28】



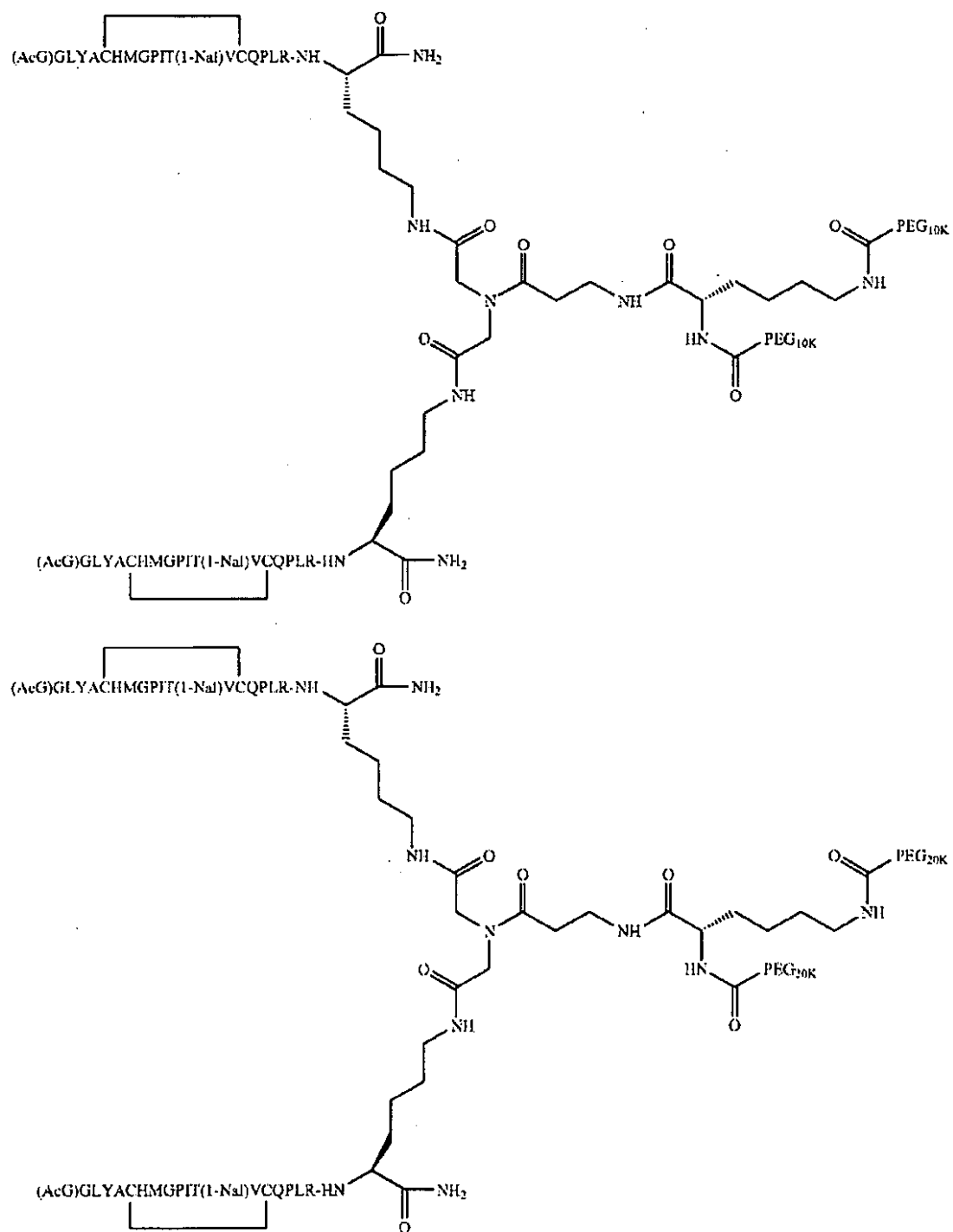
30

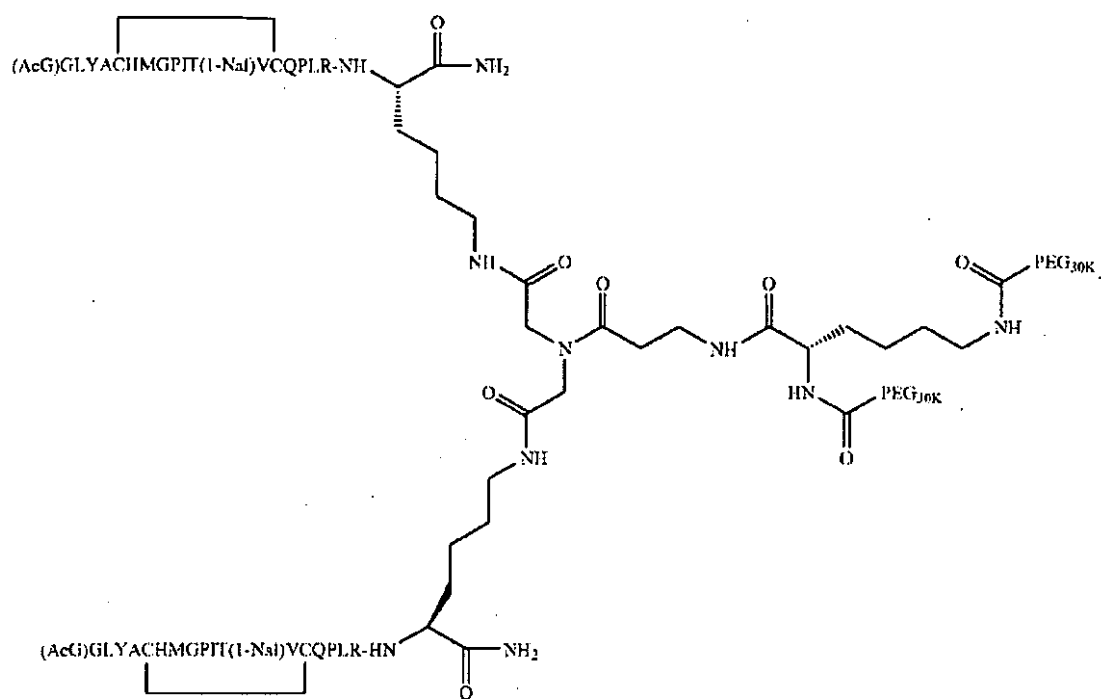
40

## 【0183】

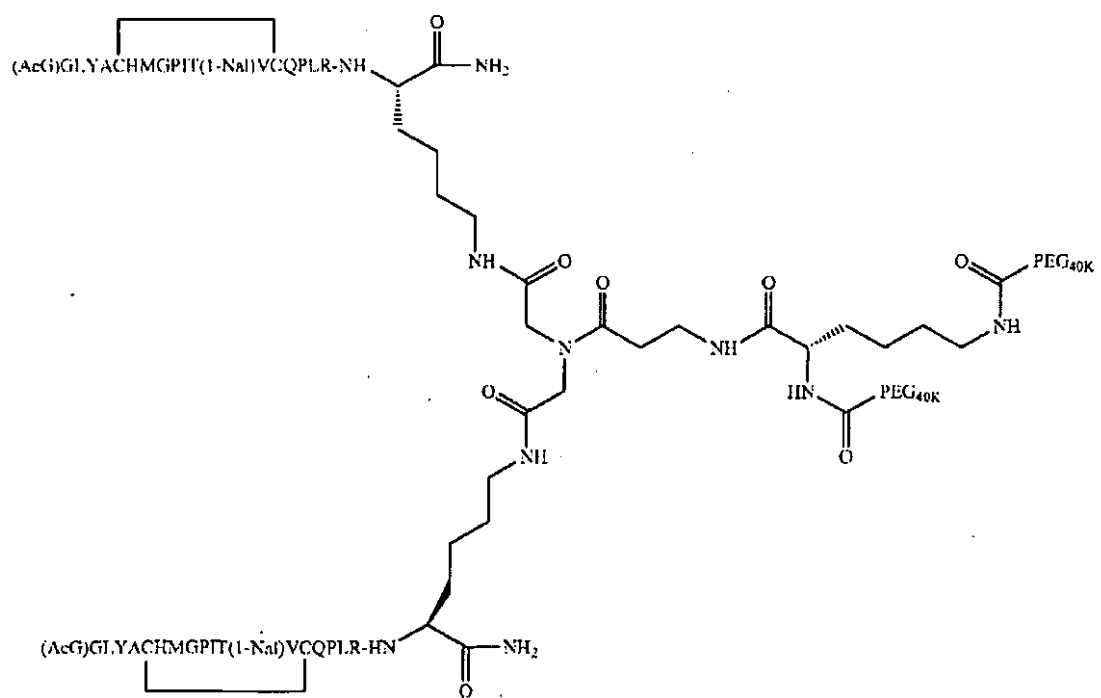
アミド結合、サルコシンなし、及び好ましいPEG分子量（本明細書で示す配列番号1）：

【化 2 9】



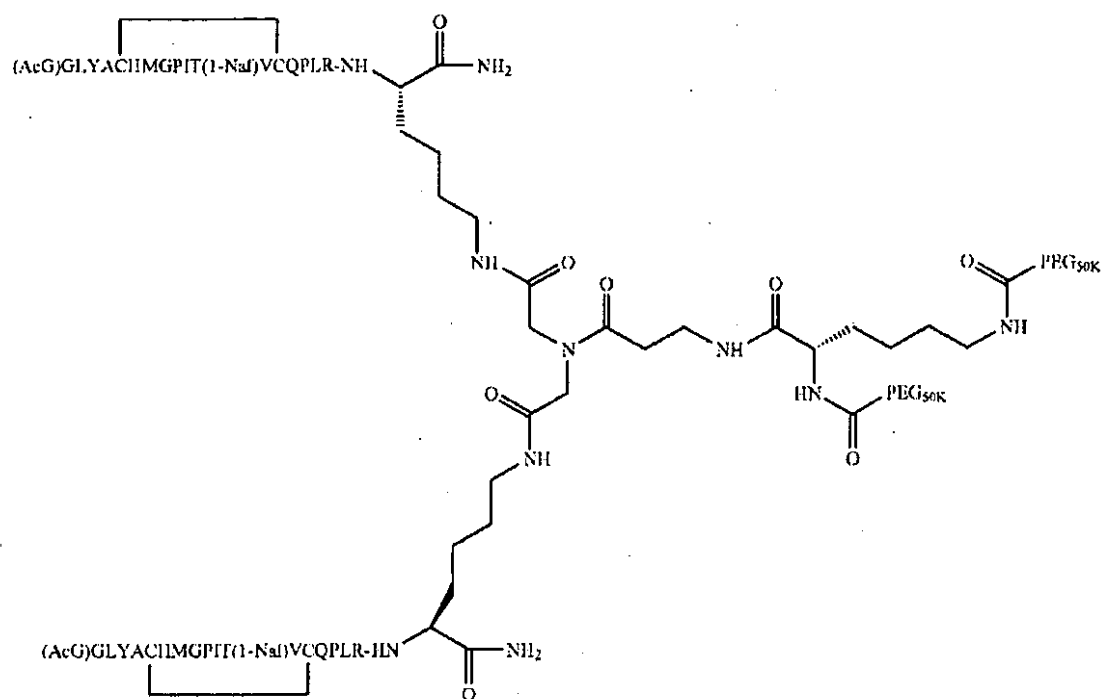


10



20

30



10

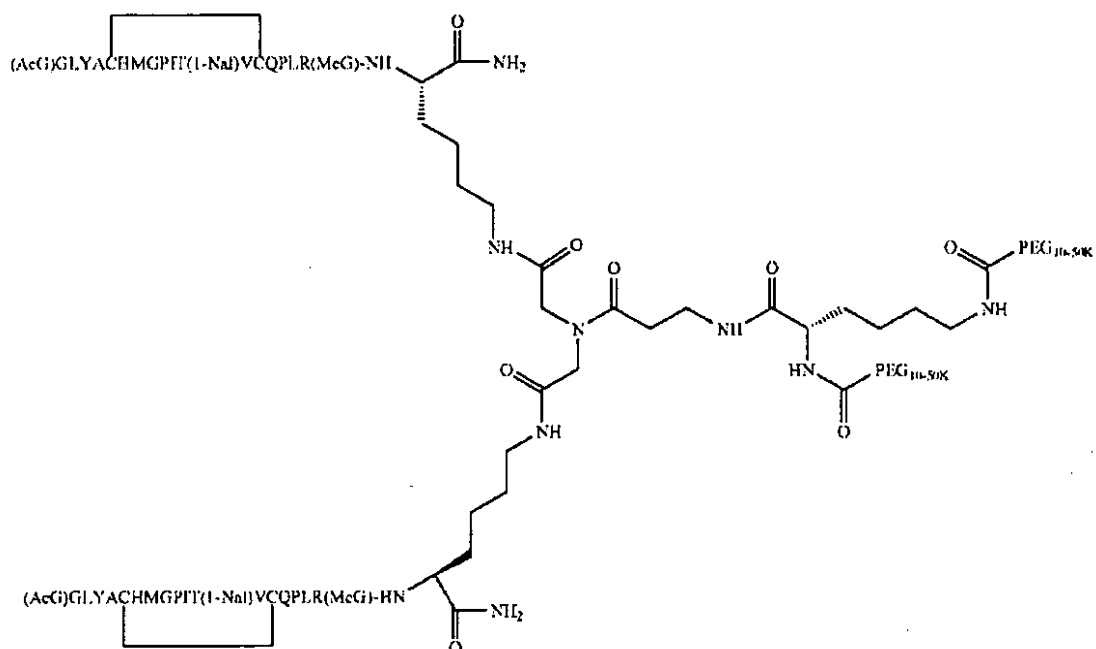
20

【0184】

アミド結合、サルコシン含有、及び一連のPEG分子量（本明細書で示す配列番号2）

:

【化30】



30

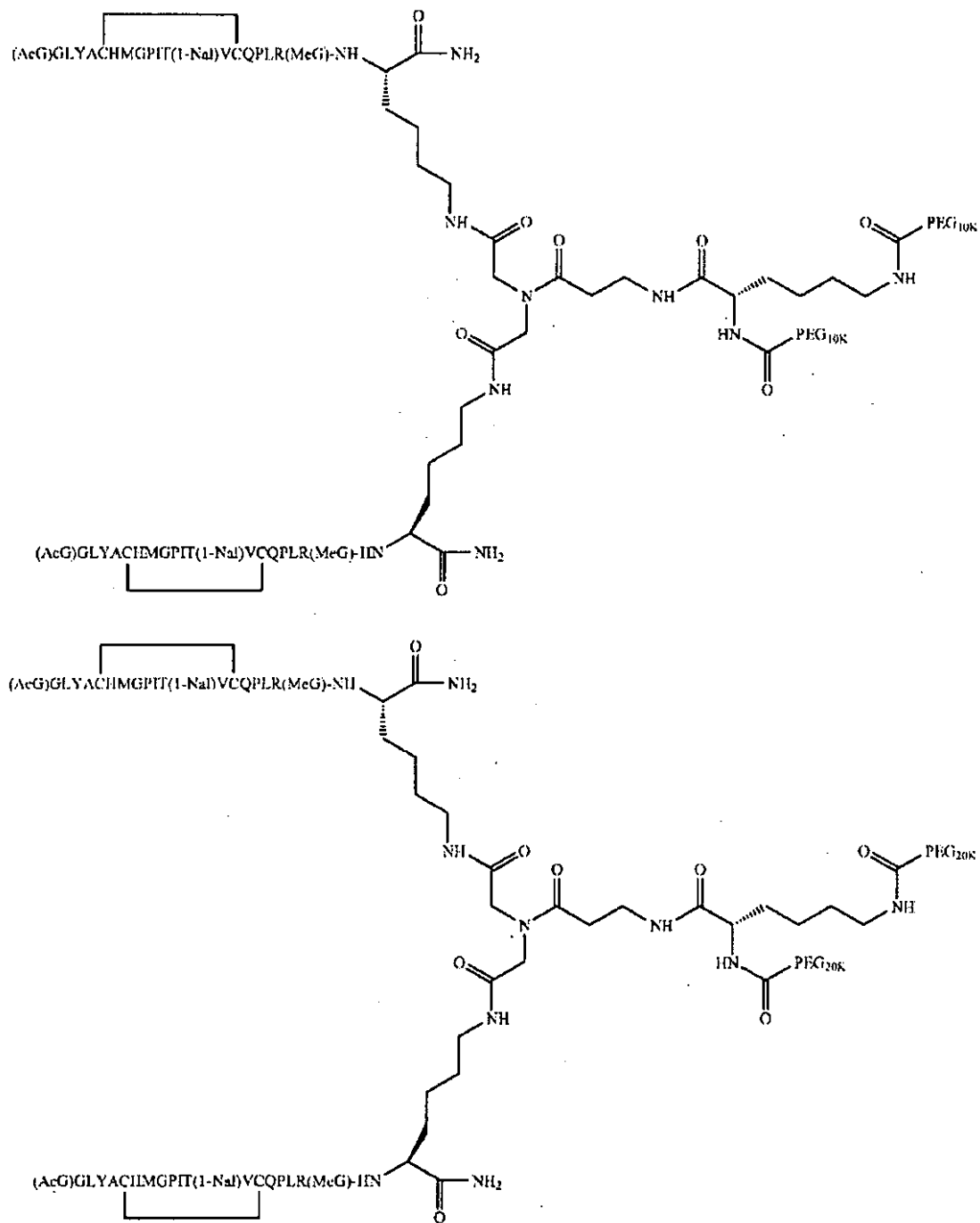
40

【0185】

アミド結合、サルコシン含有、及び好ましいPEG分子量（本明細書で示す配列番号2）

:

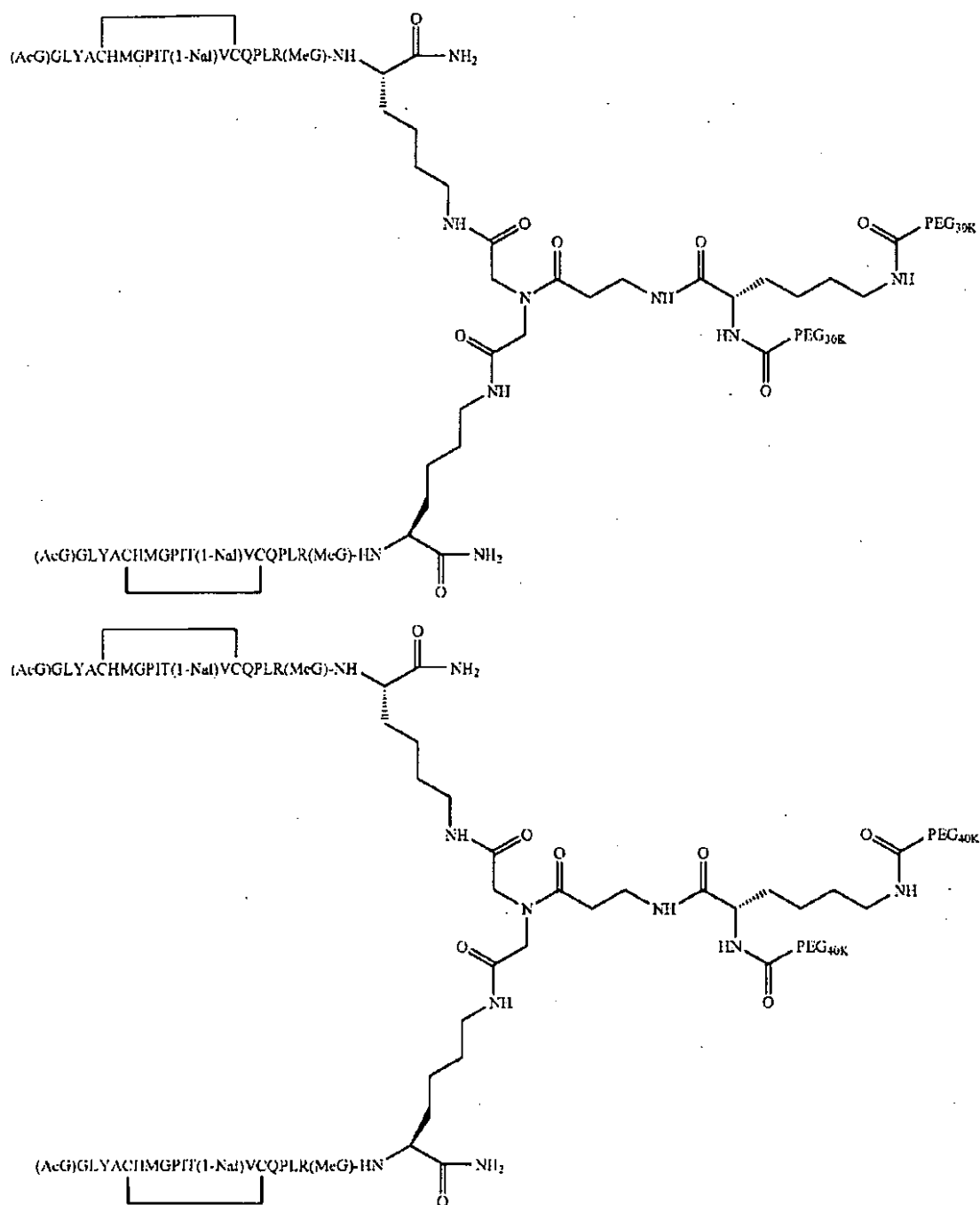
【化 3 1】

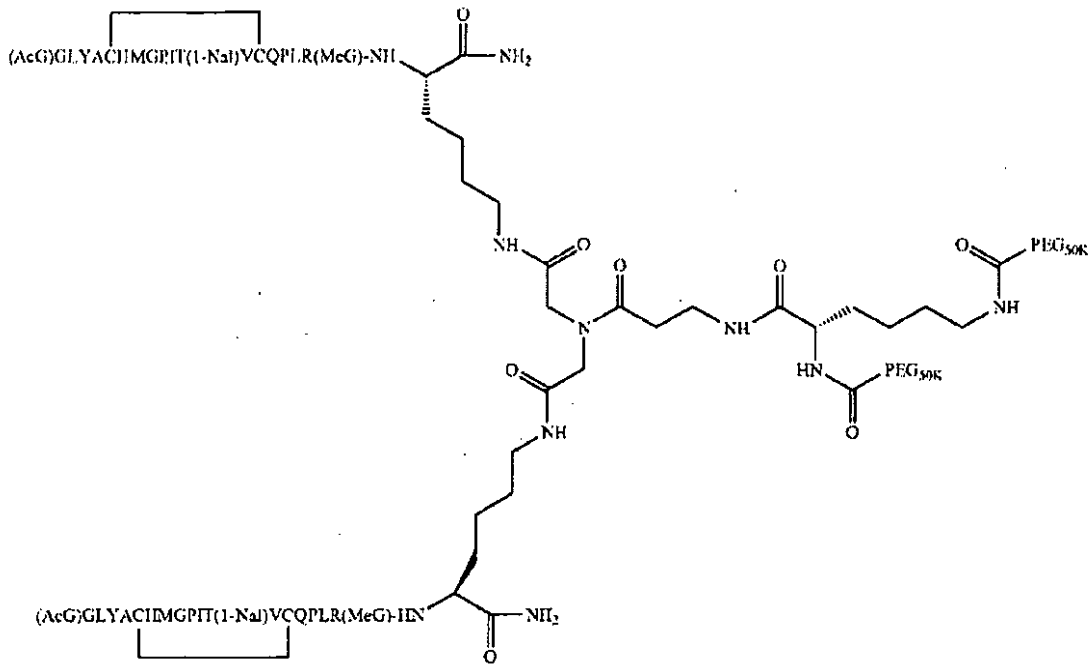


10

20

30





10

## 【0186】

20

本発明のペプチド（又はその誘導体）は、1又はそれ以上の付加的な有効成分又は医薬組成物と共に投与し得る。

## 【0187】

本発明の方法において使用される化合物は、米国特許出願公開第2007/0104704号及び同第2008/0081783号に開示されている手順に従って合成し得る。これらの方法は、当業者によって適用される有機化学及び／又は生物工学の原理と技術を使用してさらに改変し、最適化することができる。

## 【0188】

ペプチドダイマーの生物活性

本発明に関して使用し得るペプチドダイマーの生物活性を試験した。試験は、EPO-Rアゴニストペプチドの活性と効力を評価するためのインビトロアッセイとインビボアッセイの両方を含んだ。インビボアッセイの例は、赤血球増加性過低酸素症マウスのバイオアッセイ、網状赤血球アッセイ及び血液学的アッセイを含む。EPO-Rアゴニストペプチドに関して実施したインビトロアッセイの例は、レポーターアッセイ、増殖アッセイ、競合結合アッセイ及びC/BFU-eアッセイを含む。さらに、ラット、イヌ、サル及びヒトにおける薬物動態試験をペプチドIに関して実施した。ペプチドIは、0.025、0.05又は0.1mg/kgの単回IV投与後、安全であり、良好に耐受されると思われる、プラセボと同様の安全性プロファイルを有していた。薬物動態試験の結果は、約15～33時間の範囲の半減期を示し、平均値は0.1mg/kg用量で23.5時間であった。中央値はすべての用量に関して同等であり、注入の開始から15分後に生じた。C<sub>最大値</sub>は用量と直線関係を有すると思われた；AUC<sub>(0～無限大)</sub>は0.1mg/kg用量で非線形であると思われた。一次反応速度論はより低い薬剤濃度でのみ認められ、>400ng/mLの血漿中濃度での代謝／排泄過程の飽和を示唆した。ペプチドIは、評価したすべての用量で網状赤血球に対する薬理学的活性を示した；一般に応答は用量依存性であり、用量が高くなると共により大きく、より長い応答が生じた。0.1mg/kg用量群がNHVにおけるPADと定義され、ヘモグロビンの基線からの臨床的及び統計的に有意の上昇に結びついており、10名のペプチドI受容者の間で基線からの平均最大上昇は1.36±0.39g/dLであった。他の薬力学的パラメータの変化（赤血球数及びヘマトクリットの上昇、フェリチン及び網状赤血球ヘモグロビン含有量の一過性の減少、可溶性トランスフェリン受容体タンパク質の一過性の増加、及びEPOの一過性の減少）

30

40

50

は、赤血球生成の刺激と一致していた。

【0189】

2005年6月4日のストックホルムにおける第10回欧州血液学会年次総会（European Hematology Association 10th Annual Congress）で提示されたポスター及び抄録No. 0470は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0190】

前述した試験からのさらなる詳細は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第US2007/0104704号及び同第US2008/0081783号に示されている。

【実施例】

10

【0191】

本発明を、次に、以下の実施例によって説明する。しかし、この実施例及び本明細書の別の部分での他の実施例の使用は単なる説明であり、いかなる意味においても本発明又は何らかの例示される形態の範囲及び意味を限定しない。同様に、本発明は、本明細書で述べる何らかの特定実施形態に限定されない。実際に、本発明の多くの修正及び変形が、付属の図面を含む本明細書の読了後に当業者には明白であり得、その精神及び範囲から逸脱することなく実施され得る。そのような修正は付属の特許請求の範囲内に包含されるものである。本発明は、したがって、特許請求の範囲に対する全範囲の等価物と共に、付属の特許請求の範囲の用語によってのみ限定される。

【0192】

20

本発明は、本明細書で述べる特定実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際に、本明細書で述べるものに加えて、本発明の様々な修正が前記説明及び付属の図面から当業者に明らかになる。

【0193】

すべての数値は近似であり、説明のために提供されることがさらに了解されるべきである。

【0194】

特許、特許出願及び様々な公表文献を含む数多くの参考文献が本発明の説明において引用され、考察される。そのような参考文献の引用及び／又は考察は、単に本発明の説明を明確にするために提供されるものであり、そのような参考文献が本発明の「先行技術」であることの承認ではない。本明細書で引用され、考察されるすべての参考文献は、各々の参考文献が個別に参照して本明細書に組み込まれるのと同じように、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【実施例1】

【0195】

癌患者におけるペプチドI治療のHgb及び用量分析

化学療法を受けている貧血性癌患者において皮下投与したペプチドIの安全性、薬力学及び薬物動態のオープンラベル多施設用量漸増試験を実施した。この試験の目的は、化学療法を受けている貧血性癌患者の $\geq 50\%$ において9週目に $\geq 1\text{ g/dL}$ のヘモグロビン増加に結びつく、皮下（SC）注射によって3週間ごとに投与されるペプチドIの用量を決定することであった。試験の時間枠は約13週間であった。試験の結果は表1に示すように要約でき、試験した3つの癌タイプ、乳癌、非小細胞肺癌（NSCLC）及び前立腺癌によって結果を分類している。さらなる詳細を以下で論じ、表2から4及び図1から6に提示する。

40

【表 1】

表 1：癌患者についてのペプチド I 治療の結果の要約

|                          |                                                             | 癌のタイプ |                   |       |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------|-------|-------------------|-------|
|                          |                                                             | 乳癌    | NSCLC<br>(非小細胞肺癌) | 前立腺癌  |
| H g b<br>(ヘモグロビン)        | 被験者の数                                                       | 8     | 8                 | 6     |
|                          | 応答者の数 (9 週目までに<br>基線から $\geq 1 \text{ g/dL}$ の<br>H g b 変化) | 8     | 4                 | 3     |
|                          | 応答者の%                                                       | 100   | 50                | 50    |
| 用量<br>( $\text{mg/kg}$ ) | 平均値                                                         | 0.112 | 0.088             | 0.156 |
|                          | 最小値                                                         | 0.050 | 0.050             | 0.050 |
|                          | 最大値                                                         | 0.200 | 0.199             | 0.212 |

10

## 【0196】

20

試験の他の測定項目は以下を含んだ：（１）併用骨髄抑制化学療法を受けている癌患者において３週間ごとに皮下投与した４回までのペプチド I 投与の安全性プロファイルの評価、（２）ペプチド I の種々の用量レベルでの、化学療法を受けている貧血性癌患者におけるヘモグロビン（H g b）の基線からの変化の測定、（３）ペプチド I に対する H g b 応答を有する患者の割合の測定、（４）化学療法を受けている貧血性癌患者においてヘモグロビンを  $11 \sim 13 \text{ g/dL}$  の標的範囲内に上昇させ、維持する、皮下投与したペプチド I の測定、（５）化学療法を受けている貧血性癌患者において皮下投与した４回までのペプチド I 投与の薬力学的プロファイルの評価（試験患者の小集団において）、（６）ペプチド I の活性用量での投与頻度の影響の調査、及び（７）ペプチド I の活性用量での非経口的鉄補充の影響の調査。

30

## 【0197】

この試験についての患者の選択基準は以下のとおりであった：（１）患者は、この試験の試験的性質について通知され、施設、地域及び国のガイドラインに従って書面による署名済インフォームドコンセントを与えた；（２）１８歳以上、８０歳以下の年齢の男性又は女性；閉経前女性（手術により不妊である女性を除く）はスクリーニングにおいて妊娠試験陰性でなければならない；性的活動のある女性は、試験開始前少なくとも２週間は極めて有効な避妊方法を実施しなければならず、試験薬の最終投与後少なくとも４週間は避妊の実施を継続する意思がなければならない。極めて有効な避妊方法とは、一貫して正しく使用したとき低い失敗率（すなわち年間１％未満）を生じさせる方法、例えばインプラント、注射剤、混合経口避妊薬、一部の I U D、禁欲（ライフスタイルとして実施される場合のみ許容され、性的活動のあるものが試験期間中だけ禁欲を実施する場合は許容されない）又は精管切除術を受けたパートナーと定義される；（３）試験の間に少なくとも９週間の周期的骨髄抑制化学療法を受けることが予定されている、組織学的に確認された悪性固形腫瘍又はリンパ腫を有する患者；（４）試験薬の投与前１週間以内に  $\geq 8$  及び  $< 11 \text{ g/dL}$  のヘモグロビン値；（５）０～２の ECOG 一般状態；（６）試験薬の投与前４週間以内に１回の網状赤血球ヘモグロビン含有量（CHr） $> 29 \text{ pg}$ ；（７）試験薬の投与前４週間以内に１回のトランスフェリン飽和度  $\geq 15\%$ ；（８）試験薬の投与前４週間以内に１回の正常値の下限を上回る血清又は赤血球葉酸レベル；（９）試験薬の投与前４週間以内に１回の正常値の下限を上回るビタミン  $B_{12}$  レベル；（１０）試験薬の投与前１週間以内に１回の絶対好中球数  $\geq 1.0 \times 10^9/\text{L}$ ；（１１）試験薬の投与前１

40

50

週間以内に1回の血小板数 $\geq 75 \times 10^9 / L$ ；並びに(12)平均余命 $> 6$ カ月。

#### 【0198】

患者が試験者によって鉄欠乏とみなされ、IV鉄補充が必要である場合は、ヘモグロビンが前の週から $0.5 g/dL$ を超えて上昇しなくなるまで患者を週に1回(鉄投与後7日目から)再スクリーニングした。

#### 【0199】

患者の除外基準は以下を含んだ：(1)過去90日の間の何らかの赤血球生成刺激剤(ESA)による治療；(2)ESA治療に対して応答しなかった経歴；(3)他のESAに対する公知の抗体又は赤芽球ろう(PRCA)の既往歴；(4)急性若しくは慢性白血病、骨髓異形成症候群(MDS)、又は多発性骨髄腫；(5)骨盤又は脊柱のいずれかの50%超への過去の又は今後予定されている放射線治療；(6)非経口鉄補充に対する公知の不耐性；(7)試験薬の投与前4週間以内の赤血球(RBC)輸血；(8)公知の異常ヘモグロビン症(例えば同型接合性鎌状赤血球症、すべての型のサラセミア等)；(9)公知の溶血；(10)過去2年間の肺塞栓症若しくはDVTの既往歴又は現在の抗凝固薬の治療的投与；(11)貧血の原因としての公知の失血；(12)コントロールされない又は症候性の炎症性疾患(例えば関節リウマチ、全身性エリテマトーデス等)；(13)正常値の上限の $> 2.5$ 倍のAST又はALT；肝転移が存在する場合は正常値の上限の $> 5$ 倍のAST又はALT；(14)クレアチニン $> 175 \mu mol/L$ ；(15)骨髓移植又は末梢血細胞移植の経歴；(16)試験薬の投与前48時間以内の発熱 $\geq 39^\circ C$ の熱；(17)試験薬の投与前4週間以内の、試験者の判断によるコントロール不良の高血圧(例えば反復読取りで収縮期血圧 $\geq 170 mmHg$ 又は拡張期血圧 $\geq 100 mmHg$ )；(18)試験薬の投与前6カ月以内のてんかん発作；進行した慢性うっ血性心不全—ニューヨーク心臓協会(New York Heart Association)クラスIV；(19)試験の早期脱落又は中止の高い可能性(例えば過去3カ月以内の心筋梗塞；重症若しくは不安定冠動脈疾患；脳卒中；呼吸異常、自己免疫異常、神経精神医学的異常若しくは神経学的異常；活性B型若しくはC型肝炎を含む肝疾患；活性HIV疾患；又は試験者の見解で、患者の評価又はフォローアップを妨げ得る過去6カ月以内の他の何らかの臨床的に有意の医学的疾患若しくは状態)；(20)試験期間中に予想される待機的手術；(21)多剤アレルギーの既往歴；(22)試験薬の投与前又は試験期間中に予定されている服薬前1ヶ月以内の何らかの試験薬への暴露。

#### 【0200】

表2から4は、癌群ごとの臨床結果を示す。データは、ペプチドIについてのヘモグロビン濃度(各々の表の上の部分)及び投薬情報(各々の表の下の部分)を含む。これらの表において使用される略語は以下のとおりである；「Hgb」は $g/dL$ でのHgb濃度を指す；「n」は所見の数を示す；「std」は標準偏差を指す。「タキサン」は、患者がタキサンベースの化学療法剤で治療されていたことを示す。「非タキサン」は、患者が非タキサンベースの化学療法剤で治療されていたことを示す。空欄のセルは、データが得られなかったこと又は投与が行われなかったことを示す。

#### 【0201】

星印(\*)が付いた数値は、プロトコールにおいて予測されたように、これらのHgb値が輸血のために打ち切りされていることを示す。打ち切りは、検討している事項以外の何らかの事項によって交絡が引き起こされた可能性があるデータを無視する統計手法である。一部のデータの打ち切りは、典型的にはプロトコール又は統計解析計画のいずれかにおいて解析に先立って記載される。この場合は、試験患者が輸血を受けるとき、それらの患者のHgbデータは輸血後の一定期間交絡される。プロトコールは、Hgbなどの薬力学データが輸血後4週間打ち切りされることを規定していた。星印を付けた数値は輸血後4週間以内に生じたものであり、したがって解析では「無視」された。

表2: 乳癌患者群の結果

| 治療<br>患者ID | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキサン | 非タキ |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|

【表 3】

表2: 乳癌患者群の結果(続き)

| 治療<br>患者 I D         | 非タキサン<br>1            | 非タキサン<br>2            | 非タキサン<br>3            | 非タキサン<br>4            | 非タキサン<br>5            | 非タキサン<br>6            | タキサン<br>7             | タキサン<br>8             |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 週                    | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) |
| 17                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 13.3                  |                       |
| 18                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 12.9                  |                       |
| 19                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 12.1                  |                       |
| 20                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 12.3                  |                       |
| 21                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 12.9                  |                       |
| 22                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 12.7                  |                       |
| 23                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       | 12.4                  |                       |
| 基線                   | 9.35                  | 9.85                  | 10.8                  | 8.65                  | 9.85                  | 10.8                  | 10.7                  | 10                    |
| H g b変化 $\geq 1$     | 有                     | 有                     | 有                     | 有                     | 有                     | 有                     | 有                     | 有                     |
| 応答者の%                | 100                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 投薬の要約 (算定用量、mg / kg) |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 1 週目                 | 0.15                  | 0.1                   | 0.05                  | 0.1                   | 0.148                 | 0.148                 | 0.2                   | 0.2                   |
| 4 週目                 | 0.15                  | 0.1                   |                       | 0.1                   | 0.148                 | 0.148                 | 0.1                   | 0.188                 |
| 7 週目                 | 0.15                  | 0.1                   |                       | 0.1                   | 0.148                 |                       | 0.2                   | 0.094                 |
| 10 週目                | 0.15                  | 0.1                   |                       |                       | 0.148                 |                       | 0.1                   | 0.1                   |
| 総投与回数                | 4                     | 4                     | 1                     | 3                     | 4                     | 2                     | 4                     | 4                     |
| 平均値                  | 0.112                 |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 最小値                  | 0.05                  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 最大値                  | 0.2                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |

【表 4】

表 3 : 非小細胞肺癌患者群の結果

| 治療<br>患者 ID       | 非タキサン                | 非タキサン                | 非タキサン                | 非タキサン                | 非タキサン                | 非タキサン                | 非タキサン                |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 週                 | 9                    | 10                   | 11                   | 12                   | 13                   | 14                   | 15                   |
|                   | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | Hg b<br>(ヘモグロ<br>ビン) |
| -6                |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| -5                |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| -4                |                      |                      | 10.3                 |                      |                      |                      |                      |
| -3                |                      |                      |                      |                      | 8.9                  |                      | 9.8                  |
| -2                |                      |                      |                      |                      |                      | 9.6                  | 8.7                  |
| スクリーニング<br>(-1週目) | 9.1                  | 9.8                  | 10.8                 | 10.8                 | 9.3                  | 10.7                 | 10.3                 |
| 1回目の投与/1<br>週目    | 8.9                  | 10.1                 | 10.8                 | 12.3                 | 9.5                  | 9.8                  | 10.8                 |
| 2                 | 9.9                  | 9.3                  | 10                   | 11.6                 | 10.3                 | 9.8                  | 10.8                 |
| 3                 |                      | 8.7                  | 9.8                  |                      |                      | 8.4                  | 11.9                 |
| 2回目の投与/4<br>週目    | 9.6                  | 10                   | 11.4                 | 10.9                 | 11.3                 | 9.4                  | 6.7                  |
| 5                 | 10.7                 |                      | 9.3                  | 12                   | 11.2                 | 9.4                  | 9.2                  |
| 6                 | 10.7                 | 10.6                 | 10.3                 | 11.3                 |                      | 8.3                  | 9.8                  |
| 3回目の投与/7<br>週目    |                      |                      | 11                   | 9.7                  | 11.9                 | 9.6                  | 9.4                  |
| 8                 | 13.1                 |                      | 10.5                 | 11.5                 | 11.8                 | 9.4                  | 10.2                 |
| 9                 | 14.1                 |                      | 10.5                 | 11.5                 | 11.7                 | 9.3                  | 10.3                 |
| 4回目の投与/1<br>0週目   |                      |                      | 10.8                 | 9.7                  | 12.4                 | 8.9                  |                      |
| 11                |                      |                      |                      | 9.7                  | 11.5                 | 6.9                  |                      |
| 12                |                      |                      | 11.3                 | 10.8                 | 11.6                 | 6.1                  | 11.1                 |
| 13                |                      |                      | 10.8                 | 10.6                 | 11.6                 |                      | 11                   |
| 14                |                      |                      | 11.6                 | 10.4                 | 11.7                 | 9*                   | 10.5                 |
| 15                |                      |                      |                      |                      | 11.2                 |                      |                      |
| 16                |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |

10

20

30

40

50

【表 5】

表 3 : 非小細胞肺癌患者群の結果 (続き)

| 治療<br>患者 I D          | 9                     | 非タキサン                 | 10                    | 非タキサン                 | 11                    | 非タキサン                 | 12                    | 非タキサン                 | 13                    | 非タキサン                 | 14                    | 非タキサン                 | 15                    | 非タキサン                 |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 週                     | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) | H g b<br>(ヘモグロ<br>ビン) |
| 17                    |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 基線                    | 9                     | 9.95                  | 無                     | 10.8                  | 11.55                 | 9.4                   | 10.25                 | 10.55                 | 7.95                  | 有                     |                       |                       |                       |                       |
| H g b 変化 ≥ 1          | 有                     | 無                     | 無                     | 無                     | 無                     | 有                     | 無                     | 有                     | 有                     | 無                     | 無                     | 有                     | 有                     | 有                     |
| 応答者の %                | 50                    |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 投薬の要約 (算定用量、mg / k g) |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 1 週目                  | 0.199                 | 0.156                 | 0.053                 | 0.05                  | 0.05                  | 0.1                   | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  |
| 4 週目                  | 0.199                 | 0.156                 | 0.053                 | 0.05                  | 0.05                  | 0.1                   | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  |
| 7 週目                  | 0.197                 |                       | 0.053                 | 0.05                  | 0.05                  | 0.1                   | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  |
| 10 週目                 |                       |                       | 0.053                 | 0.05                  | 0.05                  | 0.1                   | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  | 0.05                  |
| 総投与回数                 | 3                     | 2                     | 4                     | 4                     | 4                     | 4                     | 4                     | 4                     | 4                     | 4                     | 4                     | 1                     | 1                     | 4                     |
| 平均値                   | 0.08825               |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 最小値                   | 0.05                  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 最大値                   | 0.199                 |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |

10

20

30

40

50

【表 6】

表 4：前立腺癌患者群の結果

| 治療<br>患者 I D<br>週   | 非タキサン<br>17       | タキサン<br>18        | タキサン<br>19        | タキサン<br>20        | タキサン<br>21        | タキサン              |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                     | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) |
| -6                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| -5                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| -4                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| -3                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| -2                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| スクリーニング<br>(-1 週目)  | 10.3              | 10.2              | 10.3              | 10.6              | 9.7               | 9.7               |
| 1 回目の投与 / 1<br>週目   | 10.5              | 10                | 10.1              | 10.5              | 9.5               | 10.3              |
| 2                   | 11.8              | 10.1              | 10.1              | 11                | 12.5*             | 8.8               |
| 3                   |                   | 9.9               | 10.1              | 10.7              | 11.5*             | 8.8               |
| 2 回目の投与 / 4<br>週目   | 12.6              | 10                | 10.6              | 11.5              | 11*               | 8.9               |
| 5                   |                   | 10.5              | 12.2              | 11.7              |                   | 8.7               |
| 6                   |                   | 10.1              | 10.5              |                   | 10.4              | 8.7               |
| 3 回目の投与 / 7<br>週目   | 11.9              | 10.3              | 10.9              | 12                | 9.8               | 8.9               |
| 8                   |                   | 11.2              | 12.7              | 13.1              | 9.4               | 9.1               |
| 9                   |                   | 9.9               | 11                |                   | 9.3               | 8                 |
| 4 回目の投与 / 1<br>0 週目 |                   | 10.9              |                   | 13.8              | 8.1               |                   |
| 11                  |                   | 10                | 10.9              | 13.7              | 7.6               |                   |
| 12                  |                   | 9.7               | 11.4              | 13                |                   | 9.8*              |
| 13                  |                   | 9.4               | 11.2              |                   |                   |                   |
| 14                  |                   | 9.8               | 11.2              |                   |                   |                   |
| 15                  |                   |                   |                   | 12.9              | 9.1*              |                   |

10

20

30

40

50

【表 7】

表 4 : 前立腺癌患者群の結果 (続き)

| 治療                     | 非タキサン             | タキサン              | タキサン              | タキサン              | タキサン              | タキサン              |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 患者 1 D                 | 17                | 18                | 19                | 20                | 21                | 22                |
| 週                      | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) | H g b<br>(ヘモグロビン) |
| 16                     |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| 基線                     | 10.4              | 10.1              | 10.2              | 10.55             | 9.6               | 10                |
| H g b 変化 ≥ 1           | 有                 | 無                 | 有                 | 有                 | 無                 | 無                 |
| 応答者の %                 | 50                |                   |                   |                   |                   |                   |
| 投薬の要約 (算定用量、m g / k g) |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| 1 週目                   | 0.05              | 0.15              | 0.15              | 0.204             | 0.193             | 0.199             |
| 4 週目                   |                   | 0.15              | 0.15              | 0.212             | 0.187             | 0.199             |
| 7 週目                   |                   | 0.15              | 0.141             | 0.204             | 0.193             | 0.199             |
| 10 週目                  |                   | 0.15              | 0.141             | 0.204             | 0.193             |                   |
| 総投与回数                  | 1                 | 4                 | 4                 | 4                 | 4                 | 3                 |
| 平均値                    | 0.156167          |                   |                   |                   |                   |                   |
| 最小値                    | 0.05              |                   |                   |                   |                   |                   |
| 最大値                    | 0.212             |                   |                   |                   |                   |                   |

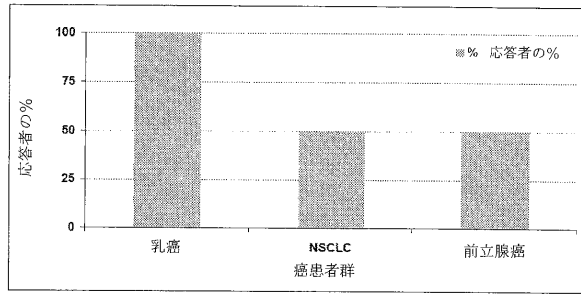
10

20

30

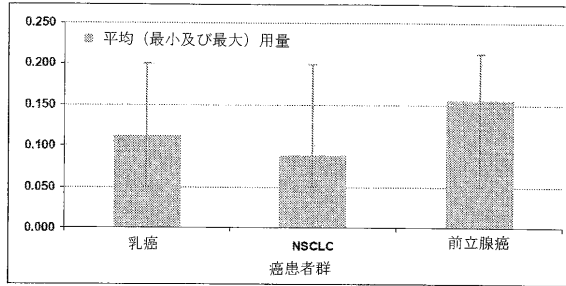
40

【図 1】



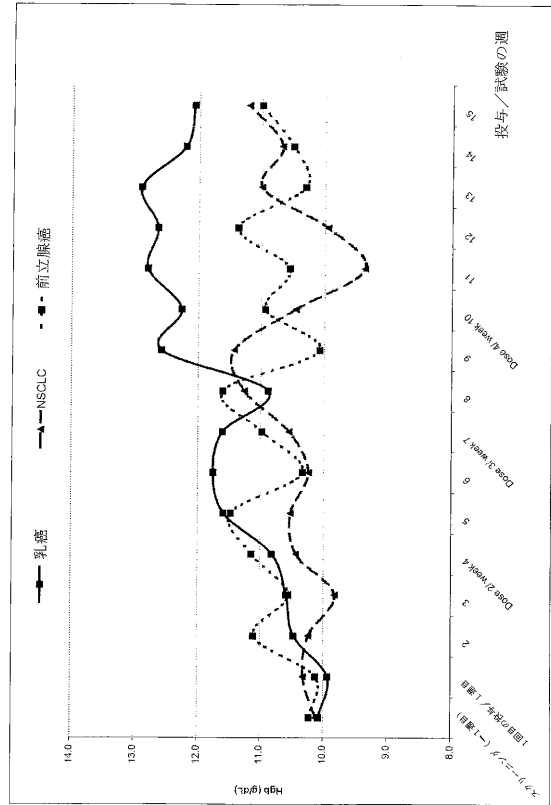
【図 1】

【図 2】



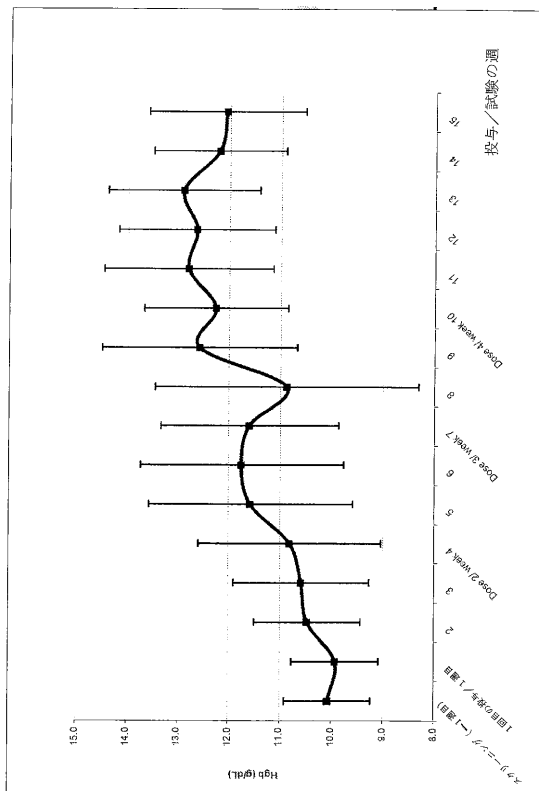
【図 2】

【図 3】



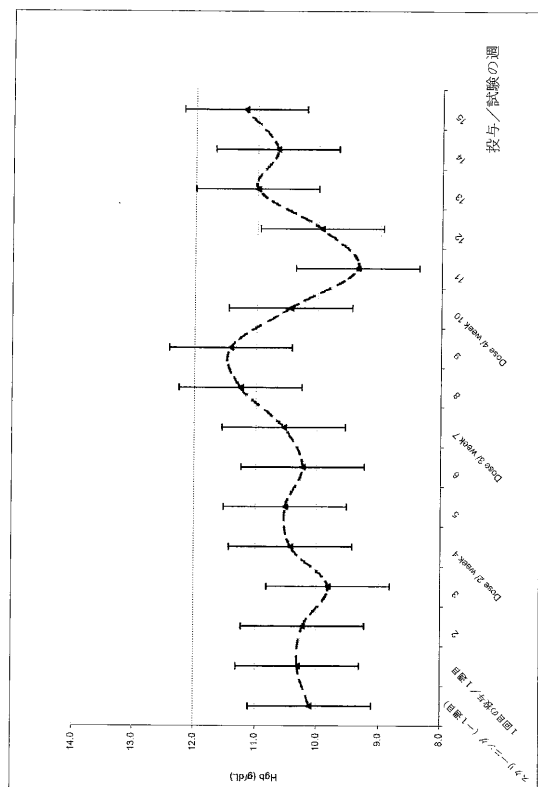
【図 3】

【図 4】



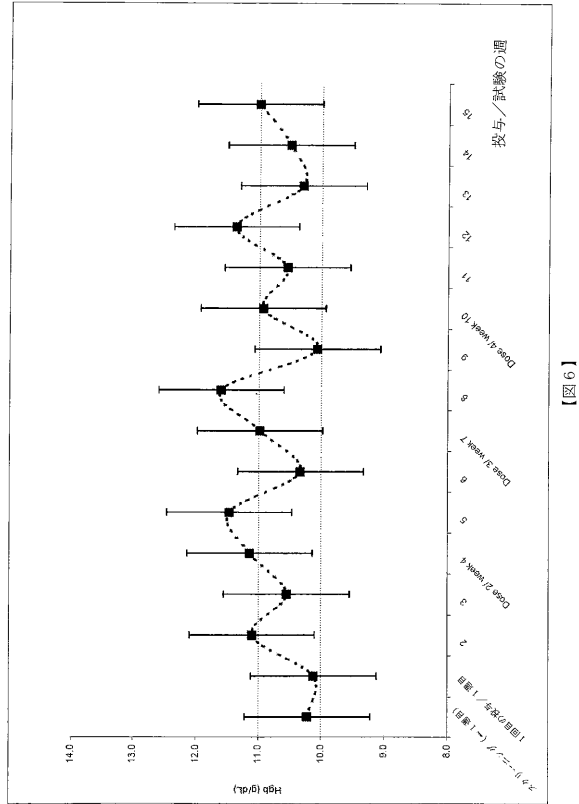
【図 4】

【図 5】



【図 5】

【図 6】



【図 6】

【配列表】

2010536857000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/070926

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/16 A61K38/17 A61K47/48 C07K14/505 A61P7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, COMPENDEX, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2006/133144 A (AFFYMAX INC [US];<br>DULIEGE ANNE-MARIE [US]; STEAD RICHARD<br>[US]; LEUTHER)<br>14 December 2006 (2006-12-14)<br>page 4, line 13 - page 12, line 26<br>page 55, line 23 - line 29<br>page 118, line 19 - page 121, line 11<br>----- | 1-35                  |
| X         | WO 2004/101606 A (AFFYMAX INC [US]; YIN<br>KEVIN [US]; HOLMES CHRIS [US]; LALONDE GUY<br>[US]); 25 November 2004 (2004-11-25)<br>page 4, line 11 - page 12, line 4<br>page 48, line 10 - line 23<br>-----                                              | 1-35                  |
| X         | US 2007/027074 A1 (HOLMES CHRISTOPHER P<br>[US] ET AL) 1 February 2007 (2007-02-01)<br>paragraphs [0022] - [0033], [0045],<br>[0077], [0111], [0112]<br>-----<br>-/--                                                                                  | 1-35                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 January 2009

Date of mailing of the international search report

02/02/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pilling, Stephen

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/070926

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
| X                                                    | GLASPY J A: "THE DEVELOPMENT OF ERYTHROPOIETIC AGENTS IN ONCOLOGY" EXPERT OPINION ON EMERGING DRUGS, ASHLEY PUBLICATIONS, GB, vol. 10, no. 3, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 553-567, XP008074550 ISSN: 1472-8214 table 4                                                                                            | 1-35                  |
| X                                                    | FAN ET AL: "Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 34, no. 10, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 1303-1311, XP005656813 ISSN: 0301-472X abstract                                                    | 1-35                  |
| X                                                    | WOODBURN ET AL: "Hematide is immunologically distinct from erythropoietin and corrects anemia induced by antierythropoietin antibodies in a rat pure red cell aplasia model" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 35, no. 8, 26 July 2007 (2007-07-26), pages 1201-1208, XP022171067 ISSN: 0301-472X abstract | 1-35                  |
| X                                                    | REDDY G K ET AL: "Preliminary results of a phase II dose-finding study of subcutaneous Hematide(TM) in patients with cancer receiving chemotherapy" SUPPORTIVE CANCER THERAPY 200701 US, vol. 4, no. 2, January 2007 (2007-01), pages 74-75, XP001539117 ISSN: 1543-2912 "clinical relevance" on page 75                 | 1-35                  |
| P,X                                                  | US 2008/081783 A1 (DULIEGE ANNE-MARIE [US] ET AL) 3 April 2008 (2008-04-03) paragraph [0016] - paragraph [0034]                                                                                                                                                                                                          | 1-35                  |
| P,X                                                  | DATABASE NLDB 28 January 2008 (2008-01-28), ANONYMOUS: "Clinic Roundup" XP002510130 retrieved from STN Database accession no. 2008:111355 abstract                                                                                                                                                                       | 1-35                  |

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/070926

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                    |                       |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
| P,X                                                  | & ANONYMOUS: BIOWORLD TODAY,<br>vol. 19, no. 18,<br>28 January 2008 (2008-01-28),<br>-----                                                                                                                                         | 1-35                  |
| P,X                                                  | DATABASE PHARMAML [Online]<br>4 February 2008 (2008-02-04),<br>ANONYMOUS: "Takeda doses first patient in<br>Ph I CIA Hematide trial"<br>XP002510131<br>retrieved from STN<br>Database accession no. 16770024<br>the whole document | 1-35                  |
| P,X                                                  | & ANONYMOUS: PHARMA MARKETLETTER,<br>4 February 2008 (2008-02-04),<br>-----                                                                                                                                                        | 1-35                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/070926

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                 | Publication<br>date                                                                                                        |
|-------------------------------------------|----|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 2006133144                             | A  | 14-12-2006          | AU 2006255081 A1<br>CA 2609401 A1<br>EP 1917023 A2<br>JP 2008542399 T<br>KR 20080021115 A                                                                  | 14-12-2006<br>14-12-2006<br>07-05-2008<br>27-11-2008<br>06-03-2008                                                         |
| WO 2004101606                             | A  | 25-11-2004          | AU 2004238870 A1<br>BR PI0411155 A<br>CA 2525568 A1<br>EP 1629007 A2<br>IS 8165 A<br>JP 2007530441 T<br>KR 20060022239 A<br>MX PA05012316 A<br>NZ 543905 A | 25-11-2004<br>11-07-2006<br>25-11-2004<br>01-03-2006<br>02-12-2005<br>01-11-2007<br>09-03-2006<br>18-04-2006<br>31-07-2008 |
| US 2007027074                             | A1 | 01-02-2007          | NONE                                                                                                                                                       |                                                                                                                            |
| US 2008081783                             | A1 | 03-04-2008          | NONE                                                                                                                                                       |                                                                                                                            |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

特許法第30条第1項適用申請有り

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ステッド, リチャード

アメリカ合衆国 98004, ベルビュー, 96ティーエイチ アベニュー 691

(72)発明者 ダリエジ, アンマリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94303, パロ アルト, ルイス ロード 2125

(72)発明者 レオン, ロバート, ホン チュン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94065, レッドウッド シティ, スパー ドライブ 632

(72)発明者 イワシタ, ジュリア

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95008, キャンベル, リガス ドライブ 657

(72)発明者 ラング, ウィリアム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94941, ミル バレー, コルネリア アベニュー 101

(72)発明者 ウェインバーグ, マーク, エイ.

アメリカ合衆国 イリノイ州 60026, グレンビュー, チェスナット アベニュー 2399

Fターム(参考) 4C076 EE59A

4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA18 BA42 MA05 NA14 ZA552

4H045 BA09 BA17 BA57 EA24 FA33 FA51