

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102215876 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980146030. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 09. 18

A61K 47/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/19 (2006. 01)

61/098, 569 2008. 09. 19 US

C07K 14/535 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/057600 2009. 09. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/033884 EN 2010. 03. 25

(71) 申请人 马克西根公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 格兰特·约尼希罗

托马斯·J. 麦克维蒂

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

权利要求书 3 页 说明书 26 页

序列表 1 页 附图 5 页

(54) 发明名称

通过施用多 PEG 化的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 变体来治疗辐射诱发的嗜中性细胞减少症的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于在暴露于辐射的患者中治疗或预防辐射诱发的嗜中性细胞减少症的方法,其通过对该患者施用多 PEG 化的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 变体来进行。

1. 一种用于在经受辐射暴露的患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的方法,包括在该辐射暴露之后对该患者施用多 PEG 化的 G-CSF 变体,其中该多 PEG 化的 G-CSF 变体包含:

展现 G-CSF 活性的多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列相差至多 15 个氨基酸残基的氨基酸序列,和

两个或更多个聚乙二醇 (PEG) 模块,每个 PEG 模块直接地或间接地共价附着至该多肽的氨基酸残基。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列和至少一处选自下组的相对于 SEQ ID NO :1 的替代:T1K, P2K, L3K, G4K, P5K, A6K, S7K, S8K, L9K, P10K, Q11K, S12K, F13K, L14K, L15K, E19K, Q20K, V21K, Q25K, G26K, D27K, A29K, A30K, E33K, A37K, T38K, Y39K, L41K, H43K, P44K, E45K, E46K, V48K, L49K, L50K, H52K, S53K, L54K, I56K, P57K, P60K, L61K, S62K, S63K, P65K, S66K, Q67K, A68K, L69K, Q70K, L71K, A72K, G73K, S76K, Q77K, L78K, S80K, F83K, Q86K, G87K, Q90K, E93K, G94K, S96K, P97K, E98K, L99K, G100K, P101K, T102K, D104K, T105K, Q107K, L108K, D109K, A111K, D112K, F113K, T115K, T116K, W118K, Q119K, Q120K, M121K, E122K, E123K, L124K, M126K, A127K, P128K, A129K, L130K, Q131K, P132K, T133K, Q134K, G135K, A136K, M137K, P138K, A139K, A141K, S142K, A143K, F144K, Q145K, S155K, H156K, Q158K, S159K, L161K, E162K, V163K, S164K, Y165K, V167K, L168K, H170K, L171K, A172K, Q173K 和 P174K。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列包含至少一处选自下组的替代:Q70K, Q90K, T105K, Q120K, T133K, S159K 和 H170K。

4. 权利要求 2 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列进一步包含至少一处选自下组的替代:K16R/Q, K34R/Q 和 K40R/Q。

5. 权利要求 3 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列包含替代 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列由替代 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K 以及任选和 N 端处的甲硫氨酸残基组成。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体包含 2-6 个 PEG 模块,每个具有约 1-10kDa 的分子量。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体包含附着至 N 端的 PEG 模块和附着至赖氨酸残基的 PEG 模块。

9. 权利要求 7 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 包含 2-4 个 PEG 模块,每个具有约 4-6kDa 的分子量。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列包含一处或多处选自 K16R/Q, K34R/Q 和 K40R/Q 的替代和一处或多处选自 Q70K, Q90K, T105K, Q120K, T133K 和 S159K 的替代,且包含 2-6 个附着的 PEG 模块,每个具有约 1-10kDa 的分子量。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列包含一处或多处选自 K16R/Q, K34R/Q 和 K40R/Q 的替代和至少一处选自 T105K 和 S159K 的替代,且包含 2-4 个附着的 PEG 模块,每个具有约 1-10kDa 的分子量。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体的氨基酸序列包含替代 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K,且包含 2-4 个附着的 PEG 模块,每个具有约 4-6kDa 的分子量。

13. 权利要求 13 的方法,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体是 PEG 位置异构体种类的混合物。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述 PEG 位置异构体种类混合物包含至少 2 种 PEG 位置异构体,每个具有 3 个附着的 PEG 模块,其中所述异构体之一具有在 N 端, Lys23 和 Lys159 处附着的 PEG 模块,且其它异构体具有在 N 端, Lys105 和 Lys159 处附着的 PEG 模块。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述 PEG 模块每个具有约 1-10kDa 的分子量。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述 PEG 模块每个具有约 5kDa 的分子量。

17. 权利要求 1 的方法,其中当在动物模型中在可比条件下测试时所述多 PEG 化的 G-CSF 变体展现与 Neulasta® (PEG 非格司亭) 相比改良的药动学特性。

18. 权利要求 17 的方法,其中在动物模型中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体展现与 Neulasta® 相比延长的血清半衰期。

19. 权利要求 17 的方法,其中在动物模型中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体展现与 Neulasta® 相比增大的 AUC。

20. 权利要求 1 的方法,其中以在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型系统中在用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组中相对于不用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组有效缩短重度嗜中性细胞减少症持续时间的量对所述患者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

21. 权利要求 1 的方法,其中以在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型系统中在用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组中相对于不用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组有效增加辐射暴露后 30 天的存活者数目的量对所述患者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

22. 权利要求 1 的方法,其中以约 20ug/kg 患者体重至约 300ug/kg 患者体重的剂量对所述患者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

23. 权利要求 1 的方法,其中所述患者是成年人且以自约 1-30mg 每患者起的剂量对所述患者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

24. 权利要求 1 的方法,其中施用一种或多种别的造血生长因子。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述别的造血生长因子选自粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 干细胞因子 SCF), FLT3 配体 (FL), 白介素 -3 (IL-3), 巨核细胞生长和发育因子 (MGDF), 血小板生成素 (TPO), TPO 受体激动剂和红细胞生成素 (EPO)。

26. 权利要求 1 的方法,其中在所述辐射暴露之后约 3 天之内对所述受试者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

27. 权利要求 1 的方法,其中所述辐射暴露等于或大于约 1Gy。

28. 多 PEG 化的 G-CSF 变体在制备用于在经受辐射暴露的患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的药物中的用途,包括以在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型系统中在用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组中相对于不用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组有效缩短重度嗜中性细胞减少症持续时间的量对所述患者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

29. 多 PEG 化的 G-CSF 变体在制备用于在经受辐射暴露的患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的药物中的用途,包括以在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型系统中在用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组中相对于不用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组有效增加辐射暴露后 30 天的存活者数目的量对所述患者施用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体。

30. 依照权利要求 28 或 29 的用途,其中所述动物模型系统是非人灵长类动物模型系统。

31. 依照权利要求 28-30 任一项的用途,其中所述多 PEG 化的 G-CSF 变体及其用途如权利要求 1-27 任一项中所限定的。

通过施用多 PEG 化的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 变体来 治疗辐射诱发的嗜中性细胞减少症的方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 依照 35 U. S. C. § 119(e), 本申请要求 2008 年 9 月 19 日提交的美国临时申请流水号 61/098, 569 的权益, 通过本文中的引用完整收录它的公开内容用于所有目的。

发明领域

[0003] 本申请涉及通过施用多 PEG 化的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 变体来治疗或预防辐射诱发的嗜中性细胞减少症 (neutropenia) 的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 骨髓中白血球生长、分裂和分化的过程称作造血 (Dexter and Spooncer, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 3 :423, 1987)。每一种血细胞类型均源自多能干细胞。体内生成的血细胞一般有三类: 红血球 (红细胞)、血小板和白血球 (白细胞), 后者的大多数涉及宿主免疫防御。造血前体细胞的增殖和分化受到一族细胞因子的调节, 包括集落刺激因子 (CSF) 诸如 G-CSF 和白介素 (Arai et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 59 :783-836, 1990)。体内 G-CSF 的主要生物学效应是刺激称作嗜中性粒细胞或嗜中性细胞的某些白血球的生长和发育 (Welte et al., *PNAS* 82 :1526-1530, 1985 ;Souza et al., *Science*, 232 :61-65, 1986)。当被释放入血流中时, 嗜中性细胞发挥功能来抗击细菌和其它感染。

[0006] 人 G-CSF (hG-CSF) 的氨基酸序列报告于 Nagata et al., *Nature* 319 :415-418, 1986。hG-CSF 是一种单体蛋白, 它通过形成 2 个 G-CSF 分子和 2 个受体分子的 2 :2 复合物来二聚化 G-CSF 受体 (Horan et al., *Biochemistry* 35(15) :4886-96, 1996)。一份更近的出版物 (Tamada et al., *PNAS* 103 :3135-3140, 2006) 记载了人 G-CSF 与 GCSF 受体之配体结合区之间的信号传导复合物的晶体结构。

[0007] 白细胞减少症 (白血球水平降低) 和嗜中性细胞减少症 (嗜中性细胞水平降低) 是导致对多种类型的感染的易感性升高的病症。对于具有重度嗜中性细胞减少症 (也称作热性嗜中性细胞减少症, 表现为绝对嗜中性细胞计数 (ANC) 低于约 500 个细胞 /mm³) 的患者, 甚至相对轻微感染也会变得严重, 甚至危及生命。重组人 G-CSF (rhG-CSF) 常常被用于治疗 and 预防多种形式的白细胞减少症和嗜中性细胞减少症。rhG-CSF 的制剂已商品化, 例如 Neupogen® (非格司亭 (Filgrastin), 它是非糖基化的且在重组大肠杆菌细胞中生产) 和 Neulasta® (PEG 非格司亭 (pegfilgrastin), 它具有与 Neupogen® 相同的氨基酸序列但含有一个 N 端连接的 20kDa 聚乙二醇 (PEG) 基团)。此单 PEG 化 rhG-CSF 分子已经显示出具有与非 PEG 化的 G-CSF 相比延长的半衰期且因此可以以比非 PEG 化的 G-CSF 产品要低的频率施用, 而且缩短嗜中性细胞减少症持续时间至与施用非 PEG 化的 G-CSF 大致相同的天数。

[0008] 急性辐射综合征 (Acute Radiation Syndrome, ARS) (也称作辐射病或放射病) 涵盖通过暴露于高剂量辐射而促成的一组复杂病理生理过程, 影响血液、胃肠和心血管系统。ARS 一般在相对较短时间段里全身或有效部分身体投递约 0.7 至 1 戈瑞 (Gy) 或更多辐照

之后发生 (Waselenko J.K. et al., *Annals of Internal Medicine* 140(12):1037-1051, 2004; Jarrett D.G. et al., *Radiation Measurements* 42:1063-1074, 2007)。ARS 的各种表现的潜伏期、严重性、和持续时间是辐射剂量、剂量率、和辐射类型, 以及促成性暴露的异质性或同质性的函数。

[0009] ARS 遵循可某种程度预测的过程, 而且以症状来表征, 它们是多种细胞、组织、和器官系统对辐射的特定反应的表现 (参见例如 Waselenko et al., *supra*, 特别是其中的图 1, 表 1-3 和表 5)。与 ARS 有关的症状包括恶心、呕吐、腹泻、嗜中性细胞减少症、皮肤灼伤和溃疡、疲劳、脱水、炎症、脱发、口腔粘膜和 GI 系统的溃疡形成、口干燥症、和出血 (例如来自鼻、口和直肠)。以高速复制的细胞 (诸如造血祖细胞、精母细胞、和肠隐窝细胞) 最易受急性辐射暴露攻击。可测量的临床影响的概率随总剂量或剂量率升高而升高。然而, 如果在延长的时间段里给予, 可以耐受在一次快速暴露之后产生可观察影响的总辐射剂量, 所耐受的是很少的可测量影响。

[0010] 循环中的造血细胞和造血祖 (骨髓) 细胞属于辐射敏感性最高的细胞。与辐射病有关的症状的一个共同根本原因是辐射对此类细胞的影响。造血综合征 (hematopoietic syndrome, H-ARS) 见于暴露于一般超过约 0.7-1 Gy 的有效部分身体或全身辐射水平的人 (Jarrett et al., *supra*; Waselenko et al., *supra*), 而且在此水平以下罕见有临床意义。有丝分裂活性造血祖细胞在 2 至 3Gy 的一剂全身辐射之后具有有限的分裂能力。ARS 的造血综合征特征在于血细胞数目——白血球 (WBC; 嗜中性细胞和淋巴细胞)、血小板 (也称作凝血细胞) 和红细胞 (RBC)——减少及潜在的临床重要后果。暴露于电离辐射可导致 WBC 计数降低, 这表现为嗜中性细胞减少症 (嗜中性细胞/粒细胞减少) 和淋巴细胞减少症 (淋巴细胞减少)。RBC 减少可导致贫血症, 而血小板减少可导致血小板减少症。辐射诱发的嗜中性细胞减少症、血小板减少症和贫血症的动力学依赖于接受的剂量、剂量率 (dose rate)、和身体受辐照的程度 (Waselenko et al., *supra*)。辐射诱发的对骨髓中细胞生成的损害开始于暴露之时。虽然大多数骨髓祖细胞在足够高的辐射剂量之后对细胞死亡易感, 但是已经发现干细胞或辅助细胞的一些亚群更加耐受辐射, 大概是因为它们的非周期 (G_0) 状态, 这可能在暴露于潜在致死剂量之后造血的恢复中发挥重要作用 (Waselenko et al., *supra*)。

[0011] 辐射效应还依赖于暴露的体表面积量。认为人体可以以全身面积吸收多至约 2Gy 的单剂而不会有死亡的即时风险。如果不处理, 由于骨髓衰竭, 超过约 2Gy 的一剂导致可能的或必然的死亡。在较短的时间段里给予全身约 8Gy 或更多的一剂几乎是必然致命的。相反, 当在较长的时间段里投递, 和 / 或投递至小体积的组织 (如在例如癌症治疗中) 时, 可耐受数十 Gy。

[0012] 辐射诱发的嗜中性细胞减少症提高对腐生性和致病性生物体所致危及生命的感染的易感性, 而且降低对在皮下组织中蔓延的和来自肠壁完整性破口的细菌的免疫抗性。这种对感染和脓毒病 / 败血症 (sepsis) 的易感性是暴露于 2-8Gy 范围中的电离辐射的受试者死亡的主要原因。与嗜中性细胞减少症并发, 还可观察到不同程度的血小板减少症。如果不做处理, 重度血小板减少症可提高对危及生命的出血的易感性。

[0013] 与 ARS 有关的辐射诱发的嗜中性细胞减少症在经例如核事故或意外辐射暴露而暴露于高水平辐射的患者中导致重大发病率和死亡率。需要可安全地施用来减轻与 ARS 有关的辐射诱发的嗜中性细胞减少症的长效 G-CSF 产品, 特别是多 PEG 化的 G-CSF, 而且需要

使用此类 G-CSF 产品来治疗和预防辐射诱发的嗜中性细胞减少症的方法。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明的目的是提供一种在暴露于辐射（例如由于核爆炸或意外辐射暴露）的患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的方法，以通过在此类患者中缩短和 / 或降低辐射诱发的嗜中性细胞减少症的持续时间和 / 或严重性及如此降低危及生命的感染的风险来提高存活力。

[0016] 本发明的一个方面如此涉及一种用于在经受辐射暴露的患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的方法，包括以有效减轻辐射诱发的嗜中性细胞减少症，诸如与急性辐射综合征 (ARS)，例如 ARS 的造血综合征 (H-ARS) 有关的辐射诱发的嗜中性细胞减少症的量对所述患者施用多 PEG 化的 G-CSF 变体。

[0017] 本发明的又一个方面涉及用于凭借本文所述方法来治疗或预防嗜中性细胞减少症的多 PEG 化的 G-CSF 变体。本发明的这个方面如此涉及用于治疗辐射诱发的嗜中性细胞减少症的多 PEG 化的 G-CSF 变体。本发明的这个方面还涉及用于通过对暴露于辐射的患者施用多 PEG 化的 G-CSF 变体来在该患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的该多 PEG 化的 G-CSF 变体。

[0018] 本发明的又一个方面涉及多 PEG 化的 G-CSF 变体在制备用于凭借本文所述方法来治疗或预防辐射诱发的嗜中性细胞减少症的药物中的用途。本发明的这个方面如此涉及多 PEG 化的 G-CSF 变体在制备用于在暴露于辐射的患者中治疗或预防辐射诱发的嗜中性细胞减少症的药物中的用途，其中以有效减轻辐射诱发的嗜中性细胞减少症的量对该患者施用该多 PEG 化的 G-CSF 变体。本发明的这个方面还涉及多 PEG 化的 G-CSF 变体在制备用于治疗辐射诱发的嗜中性细胞减少症的药物中的用途。本发明的这个方面还涉及多 PEG 化的 G-CSF 变体在制备用于通过对暴露于辐射的患者施用该多 PEG 化的 G-CSF 变体来在该患者中治疗或预防辐射诱发的嗜中性细胞减少症的药物中的用途。

[0019] 在一些实施方案中，多 PEG 化的 G-CSF 变体以在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型系统（诸如非人灵长类动物模型系统）中在用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组中相对于不用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组有效缩短重度嗜中性细胞减少症持续时间的量对患者施用。在其它实施方案中，多 PEG 化的 G-CSF 变体以在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型系统（诸如非人灵长类动物模型系统）中在用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组中相对于不用所述多 PEG 化的 G-CSF 变体处理的组有效增加辐射暴露后 30 天或 60 天的存活者数目的量对患者施用。

[0020] 当结合附图阅读以下详述时，本发明的这些和其它方面和特征会变得更加显而易见。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1 显示了恒河猴中的 60 天造血综合征致死剂量应答关系，呈现为概率单位百分比致死率 (probit percent lethality) 对对数尺度上以戈瑞 (Gy) 计的 TBI 剂量。暴露于 2MV LINAC 光子并获得支持护理的恒河猴 / 猕猴的所得 LD50/60 值表示为 LD50_{LINAC} (括号 [] 中为 95% 置信区间)。此图还显示了两个历史数据集，显示了暴露于 Co-60 伽马和 2MV X-辐射（分别表示为 LD50_{Co60} 和 LD50_{X射线}）的恒河猴 / 猕猴的 TBI 剂量应答和计算的 LD50/30 值（括号 [] 中为 95% 置信区间）。该历史研究中的动物没有获得支持护理 (supportive

care)。

[0023] 图 2 显示了暴露于剂量近似 LD30/60(720 厘戈瑞 (cGy))、LD50/60(755cGy)、和 LD70/60(805 cGy) 的全身辐照之后,并获得支持护理的恒河猴中均值绝对嗜中性细胞计数(ANC)变化的时程。

[0024] 图 3 证明了本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体(在本文中标识为“Maxy-G21”)相对于单 PEG 化的 rhG-CSF 改善非人灵长类动物中辐射暴露之后的嗜中性细胞恢复。恒河猴中的绝对嗜中性细胞计数(ANC)是在 600 cGy(6.00 Gy)辐照和辐照后一天施用 Maxy-G21、Neulasta®、或对照(血清)之后测定的。重度嗜中性细胞减少症(ANC < 500/ μ L)以水平线标示。

[0025] 图 4 显示了经 600 cGy 辐照,辐照后一天给予 300 μ g/kg Maxy-G21 或 300 μ g/kg Neulasta®的恒河猴的药动力学(PK)概况。

[0026] 图 5 显示了暴露于 776 cGy 辐射且随后用本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体(“G34”,在本文中也标识为“Maxy-G34”)或稀释剂(“媒介”)处理的小鼠的 Kaplan-Meier 存活曲线。辐照 C57BL/6 小鼠,然后在暴露后 24 小时和 7 天时(空心菱形)或在暴露后 24 小时、7 天、和 14 天时(空心正方形)皮下注射 G34(1.0mg/kg = 20 μ g/20gm 小鼠)。在暴露后 24 小时、7 天、和 14 天时给对照小鼠注射稀释剂(实心三角形)。该小鼠不用抗生素处理。

[0027] 图 6 显示了暴露于 796 cGy 辐射且随后用本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体(“G34”,在本文中也标识为“Maxy-G34”)或稀释剂(“媒介”)处理的小鼠的 Kaplan-Meier 存活曲线。辐照 C57BL/6 小鼠,然后在暴露后 24 小时和 7 天时(空心菱形)或在暴露后 24 小时、7 天、和 14 天时(空心正方形)皮下注射 G34(1.0mg/kg = 20 μ g/20gm 小鼠)。在暴露后 24 小时、7 天、和 14 天时给对照小鼠注射媒介(实心三角形)。该小鼠不用抗生素处理。

[0028] 定义

[0029] 在说明书和权利要求书中,使用下述定义。

[0030] 术语“多肽”或“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸的聚合物,不限于任何特定长度的氨基酸序列。这些术语意图不仅包括全长蛋白质,而且还包括任何给定蛋白质或多肽的例如片段或截短形式、变体、结构域、等。

[0031] “G-CSF 多肽”为具有 SEQ ID NO:1 所示人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)序列的多肽,或展现 G-CSF 活性的 hG-CSF 变体。“G-CSF 活性”可以是结合 G-CSF 受体的能力(Fukunaga et al., J. Bio. Chem, 265:14008, 1990, 通过述及而收入本文),但是优选是 G-CSF 细胞增殖活性,这可以例如在使用鼠细胞系 NFS-60(ATCC 号:CRL-1838)的体外活性测定法中测定。一种用于 G-CSF 活性的合适的使用 NFS-60 细胞系的体外测定法记载于 Hammerling et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 13(1):9-20, 1995, 通过述及而收入本文。当“展现 G-CSF 活性的”多肽展示可测量的功能时,例如在体外测定法中可测量的细胞增殖活性,认为它具有此类活性。

[0032] “变体”(例如“G-CSF 变体”)为与亲本多肽相差一个或多个氨基酸残基的多肽,其中该亲本多肽一般是具有天然、野生型氨基酸序列的多肽,通常是天然哺乳动物多肽,而且更通常的是天然人多肽。因此所述变体与天然多肽相比含有一处或多处替代、插入或删除。

这些可以例如包括 N 和 / 或 C 端截短一个或多个氨基酸残基,或在 N 和 / 或 C 端添加一个或多个氨基酸残基,例如在 N 端添加甲硫氨酸残基。所述变体最通常会与亲本多肽相差多至 15 个氨基酸残基,诸如多至 12,10,8 或 6 个氨基酸残基。具体而言,一些 G-CSF 变体在 N 端有或未添加甲硫氨酸残基的 G-CSF 序列中具有氨基酸替代。

[0033] 术语“经修饰的”G-CSF 指具有人 G-CSF 或人 G-CSF 变体的序列的 G-CSF 分子,其是通过例如改变聚糖结构而经过修饰的。例如,可以为了提供糖-PEG 化的 G-CSF 分子的目的而修饰 G-CSF 的聚糖结构,其中将聚乙二醇模块附着至糖基连接基团,诸如唾液酸模块,如记载于 WO 2005/055946 的,通过述及而收入本文。经修饰的 G-CSF 分子的另一个例子是含有至少一个在野生型多肽中不存在的 O 连接的糖基化位点的分子。具有此类非天然发生的 O 连接的糖基化位点的 G-CSF 分子,以及 G-CSF 的经修饰的糖的 PEG 化记载于 WO2005/070138,通过述及而收入本文。

[0034] 除非另外指明,术语“G-CSF”如本文中使用的意图涵盖具有天然人序列 (SEQ ID NO :1) 的 G-CSF 分子以及人 G-CSF 序列的变体。在任一情况中,术语“G-CSF”还意图包括经修饰的 G-CSF,诸如 G-CSF 糖基化变体。

[0035] “包含多个聚乙二醇模块的”PEG 化的 G-CSF (在本文中称作“多 PEG 化的 G-CSF”)指有两个或更多个 PEG 模块直接地或间接地共价附着至所述多肽的氨基酸残基的 G-CSF 多肽,这不同于只有一个 PEG 模块共价附着至所述多肽的“单 PEG 化的 G-CSF”。合适的附着位点包括例如赖氨酸残基的 ϵ -氨基或 N 端氨基、游离羧基基团 (例如 C 端氨基酸残基的或者天冬氨酸或谷氨酸残基的)、半胱氨酸残基的硫醇基、适当活化的羰基、氧化的碳水化合物模块和巯基。更多关于 PEG 附着位点和用于将 PEG 模块附着至蛋白质的方法的信息可参阅例如 WO 01/51510 ;WO 03/006501 ;及 Nektar Advanced PEGylation Catalog 2005-2006 (Nektar Therapeutics),都通过述及而收入本文。PEG 化的另一种可能性是将 PEG 模块附着至 G-CSF 的聚糖结构,例如经由聚糖修饰 (见上文)。

[0036] “多 PEG 化的 G-CSF 变体”指有两个或更多个 PEG 模块直接地或间接地共价附着至变体的氨基酸残基的 G-CSF 变体。

[0037] 在本申请中,氨基酸名称和原子名称 (例如 CA, CB, NZ, N, O, C, 等) 如蛋白质数据库 (PDB) 所定义的那样使用,其基于 IUPAC 命名法 (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names etc.), Eur. J. Biochem., 138, 9-37 (1984) 连同它们在 Eur. J. Biochem., 152, 1 (1985) 中的更正)。术语“氨基酸残基”意图表示任何天然的或非天然发生的氨基酸残基,特别是由 20 种天然发生的氨基酸组成的组中含有的氨基酸残基,即丙氨酸 (Ala 或 A)、半胱氨酸 (Cys 或 C)、天冬氨酸 (Asp 或 D)、谷氨酸 (Glu 或 E)、苯丙氨酸 (Phe 或 F)、甘氨酸 (Gly 或 G)、组氨酸 (His 或 H)、异亮氨酸 (Ile 或 I)、赖氨酸 (Lys 或 K)、亮氨酸 (Leu 或 L)、甲硫氨酸 (Met 或 M)、天冬酰胺 (Asn 或 N)、脯氨酸 (Pro 或 P)、谷氨酰胺 (Gln 或 Q)、精氨酸 (Arg 或 R)、丝氨酸 (Ser 或 S)、苏氨酸 (Thr 或 T)、缬氨酸 (Val 或 V)、色氨酸 (Trp 或 W)、和酪氨酸 (Tyr 或 Y) 残基。

[0038] 本文中用于鉴别氨基酸位置 / 替代的术语学例示如下 :F13 表示参照氨基酸序列中由苯丙氨酸残基占据的第 13 位。F13K 表示第 13 位的苯丙氨酸残基被赖氨酸残基替代。除非另外指明,本文中做出的氨基酸残基编号方式是相对于 SEQ ID NO :1 所示 hG-CSF 氨基酸序列做出的。择一替代用“/”来表示,例如 K16R/Q 意味着氨基酸序列中的第 16 位赖氨酸

酸被精氨酸或谷氨酰胺替代。多重替代用“+”来表示,例如 K40R+T105K 意味着氨基酸序列包含第 40 位赖氨酸残基用精氨酸残基替代和第 105 位苏氨酸残基用赖氨酸替代。

[0039] 术语“功能性体内半衰期”以其常规含义使用,即如下的时间,此时身体/靶器官中仍然存在测试分子(例如 PEG 化的缀合物)的生物学活性的 50%,或者如下的时间,此时多肽或缀合物的活性为初始值的 50%。“血清半衰期”定义为如下的时间,其中 50%的缀合物分子在被清除之前在血浆或血流中循环。血清半衰期的备选术语包括“血浆半衰期”、“循环半衰期”、“血清清除”、“血浆清除”和“清除半衰期”。测试分子(例如 PEG 化的缀合物)通过网状内皮系统(RES)、肾、脾或肝中一项或多项的作用,通过受体介导的降解,或者通过特异性或非特异性蛋白水解,特别是通过受体介导的清除和肾清除的作用被清除。通常,清除取决于尺寸(相对于肾小球过滤的截留)、电荷、附着的碳水化合物链、和针对蛋白质的细胞受体的存在。要保留的功能性通常选自增殖或受体结合活性。功能性体内半衰期和血清半衰期可通过本领域已知的任何合适方法来测定。

[0040] 术语“延长的”如述及体内半衰期或血清半衰期所使用的用于表示测试分子(即多 PEG 化的 G-CSF 变体)的半衰期相对于参照分子诸如非缀合的(即非 PEG 化的) hG-CSF(例如 Neupogen®)或优选相对于单 PEG 化的 G-CSF Neulasta®有统计学上显著的延长,如在可比条件下测定的(通常在实验动物,诸如大鼠、家兔、猪或猴中测定)。例如,测试分子的血清半衰期($t_{1/2}$)可相对于参照分子延长至少约 1.2 倍(就是说(测试分子的 $t_{1/2}$)/(参照分子的 $t_{1/2}$) = 1.2)、例如至少约 1.4 倍、诸如至少约 1.5 倍、例如至少约 1.6 倍、诸如至少约 1.8 倍、例如至少约 2.0 倍、2.5 倍、3 倍、5 倍、或 10 倍,相对于参照分子而言。

[0041] 术语“AUC”或“曲线下面积”以其常规含义使用,即血清浓度对时间曲线下的面积,其中已经对受试者施用测试分子。一旦确定了实验浓度-时间点,可通过计算机程序诸如 GraphPad Prism®(GraphPad Software, Inc.)方便地计算 AUC。术语“增大的”如述及 AUC 所使用的用于表示测试分子(即多 PEG 化的 G-CSF 变体)的 AUC 相对于参照分子诸如非缀合的 hG-CSF(例如 Neupogen®)或优选相对于单 PEG 化的 hG-CSF Neulasta®有统计学上显著的增大,如在可比条件下测定的(通常在实验动物,诸如大鼠、家兔、猪或肾中测定)。例如,测试分子的 AUC 可相对于参照分子增大至少约 1.2 倍(就是说(测试分子的 AUC)/(参照分子的 AUC) = 1.2),例如至少约 1.4 倍、诸如至少约 1.5 倍、例如至少约 1.6 倍、诸如至少约 1.8 倍、例如至少约 2.0 倍、2.5 倍、3 倍、5 倍、或 10 倍,相对于参照分子而言。

[0042] 术语“受试者”指动物,诸如哺乳动物,包括非灵长类动物(例如牛、猪、马、猫、或犬)或灵长类动物(例如猴、黑猩猩、或人)诸如非人灵长类动物(例如猴或黑猩猩)、或人。在一些情况中,受试者是已经暴露于辐射的哺乳动物,诸如人。术语“受试者”与“患者”在本文中可互换使用。

[0043] 术语“急性辐射暴露”指在较短的时间段里发生的暴露于辐射,即 24 小时以内(诸如不到 20 小时、不到 16 小时、不到 12 小时、不到 10 小时、不到 8 小时、不到 6 小时、不到 2 小时、不到 1 小时、不到 30 分钟、不到 20 分钟、不到 10 分钟、不到 5 分钟、或不到 1 分钟)。急性辐射暴露可源自核事件(诸如核爆炸);实验室或制造事故;在几分钟或几小时里操作强放射源期间的暴露;或者意外的或有意的高医疗剂量。

[0044] 术语“辐射剂量”指被材料或组织吸收的总辐射量,一般以厘戈瑞(cGy)或戈瑞(Gy)来表述。

[0045] 术语“辐射剂量率”指单位时间吸收的辐射剂量。

[0046] 术语“LD_x/y”指导致 x% 的受试者到 y 天死亡的平均辐射剂量。例如，术语 LD₅₀/30 和 LD₅₀/60 分别指导致 50% 的受试者到 30 天或 60 天死亡的平均辐射剂量。

[0047] 本文中定义或以其它方式表征了多个别的术语。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明提供了一种用于在暴露于辐射的患者中治疗或预防嗜中性细胞减少症的方法，其中该方法包括以有效减轻辐射诱发的嗜中性细胞减少症的量对所述患者施用多 PEG 化的 G-CSF 变体。

[0050] 我们发现在经辐照的非人灵长类动物模型中施用多 PEG 化的 G-CSF 变体在缩短辐射诱发的嗜中性细胞减少症持续时间方面与施用单 PEG 化的 hG-CSF (Neulasta®) 相比时更加有效。距绝对嗜中性细胞恢复 (ANC) 的时间的缩短与对照和单 PEG 化的 hG-CSF (Neulasta®) 二者相比也有显著改善。如本文中使用的，术语“距 ANC 恢复的时间”定义为自化疗第一天开始，直至受试者连续两天计数超出 0.5×10^9 个 ANC 细胞 /L，即超出重度嗜中性细胞减少症的定义极限的第一天的天数。距 ANC 恢复的时间、白细胞减少症的持续时间 / 天数、和重度嗜中性细胞减少症的持续时间 / 天数都指示暴露于辐射的患者处于免疫遏制状态的时段（术语“嗜中性细胞减少症的天数”和“重度嗜中性细胞减少症的天数”在本文中可互换使用）。在此时段期间，患者易受感染，这可加剧急性辐射综合征的其它症状及可导致死亡。鉴于本文实施例中描述的结果，施用多 PEG 化的 G-CSF 变体比施用单 PEG 化的 hG-CSF (Neulasta®) 在受试者中降低和缩短辐射诱发的嗜中性细胞减少症的程度和持续时间方面更加有效。

[0051] 本发明的方法有效地缩短距 ANC 恢复的时间、白细胞减少症的天数、和嗜中性细胞减少症的天数。在等同的剂量，该方法与单 PEG 化的 hG-CSF (Neulasta®) 相比时更加有效地缩短距 ANC 恢复的时间、白细胞减少症的天数、和嗜中性细胞减少症的天数。

[0052] 依照本发明的方法，多 PEG 化的 G-CSF 变体优选在辐射暴露之后 7 天之内施用。例如，多 PEG 化的 G-CSF 变体可以在辐射暴露之后约 4 天之内、诸如在辐射暴露之后 3 天之内、例如在辐射暴露之后 2 天之内、诸如在辐射暴露之后 1 天（24 小时）之内施用。根据患者的预后，多 PEG 化的 G-CSF 变体可以在治疗方案的过程里施用两次或更多次。例如，多 PEG 化的 G-CSF 变体可以每周施用一次，持续例如两周、三周或四周。由于多 PEG 化的 G-CSF 变体与非 PEG 化的 hG-CSF（例如 Neupogen®）和单 PEG 化的 hG-CSF（例如 Neulasta®）相比卓越的生物利用度，多 PEG 化的 G-CSF 变体优选可以在较长的时间段里施用，诸如例如每 10 天、每 2 周、每 18 天、或每 3 周，这取决于患者的预后。

[0053] 多 PEG 化的 G-CSF 变体

[0054] 多 PEG 化的蛋白质可以以本领域公知的多种方式来制备。聚乙二醇 (PEG) 模块对蛋白质或多肽的共价附着（即缀合）（“PEG 化”）是一种用于改进此类蛋白质或多肽，特别是药用蛋白质的特性的公知技术，例如为了改善循环半衰期和 / 或遮蔽潜在表位及如此降低不想要的免疫原性应答的潜力。有众多基于活化的 PEG 的技术可用于提供 PEG 模块对蛋白质上一种或多种基团的附着。例如，mPEG-琥珀酰亚氨基丙酸酯 (mPEG-SPA, 可得自 Nektar Therapeutics) 一般被看作选择性地经酰胺键附着至 N 端和赖氨酸残基的 ϵ -氨基。如上所述，商品化的 PEG 化的 G-CSF 产品 Neulasta® 含有一个附着至 G-CSF 分子 N 端

的 20kDa PEG 模块。

[0055] 在一些实施方案中,本文所述多 PEG 化的 G-CSF 变体当在实验动物诸如大鼠中测试时展现相对于单 PEG 化的 G-CSF Neulasta® (PEG 非格司亭) 改良的药动力学参数,诸如延长的血清半衰期和 / 或和增大的曲线下面积 (AUC)。依照本发明,发现在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的动物模型中多 PEG 化的 G-CSF 变体优于单 PEG 化的 G-CSF Neulasta®,在等量的剂量提供更短的距恢复的时间和更短的嗜中性细胞减少症 / 白细胞减少症时段。

[0056] 在一个实施方案中,依照本发明施用的多 PEG 化的 G-CSF 变体可以用胺特异性的活化的 PEG 来 PEG 化,该胺特异性的活化的 PEG 经酰胺键优先附着至 N 端氨基和 / 或赖氨酸残基的 ϵ -氨基。胺特异性的活化的 PEG 衍生物的例子包括 mPEG-琥珀酰亚氨基丙酸酯 (mPEG-SPA)、mPEG-琥珀酰亚氨基丁酸酯 (mPEG-SBA) 和 mPEG-琥珀酰亚氨基 α -甲基丁酸酯 (mPEG-SMB) (可得自 Nektar Therapeutics; 参见 Nektar Advanced PEGylation Catalog 2005-2006, "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation"); PEG-SS (琥珀酰亚氨基琥珀酸酯)、PEG-SG (琥珀酰亚氨基戊二酸酯)、PEG-NPC (对硝基苯基碳酸酯)、和 PEG-异氰酸酯,可得自 SunBio Corporation; 及 PEG-SCM, 可得自 NOF Corporation。聚乙二醇可以是线性的或分支的。

[0057] 用于获得 PEG 化的蛋白质的方法是本领域公知的; 参见例如 Nektar Advanced PEGylation Catalog 2005-2006, 通过述及而收入本文。PEG 化的 G-CSF 变体和用于制备它们的方法例如记载于 WO 01/51510; WO 03/006501; US 6,646,110; US 6,555,660 和 US 6,831,158, 每一篇通过述及而收入本文。

[0058] 在一个优选的实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体包含一个附着至 N 端的 PEG 模块和至少一个附着至赖氨酸残基的 PEG 模块。

[0059] 在一个实施方案中,施用的多 PEG 化的 G-CSF 变体在 SEQ ID NO:1 的 hG-CSF 序列中包含至少一处替代以在想要 PEG 化的位置引入赖氨酸残基。具体而言,赖氨酸残基可经由一处或多处选自下组的替代来引入: T1K, P2K, L3K, G4K, P5K, A6K, S7K, S8K, L9K, P10K, Q11K, S12K, F13K, L14K, L15K, E19K, Q20K, V21K, Q25K, G26K, D27K, A29K, A30K, E33K, A37K, T38K, Y39K, L41K, H43K, P44K, E45K, E46K, V48K, L49K, L50K, H52K, S53K, L54K, I56K, P57K, P60K, L61K, S62K, S63K, P65K, S66K, Q67K, A68K, L69K, Q70K, L71K, A72K, G73K, S76K, Q77K, L78K, S80K, F83K, Q86K, G87K, Q90K, E93K, G94K, S96K, P97K, E98K, L99K, G100K, P101K, T102K, D104K, T105K, Q107K, L108K, D109K, A111K, D112K, F113K, T115K, T116K, W118K, Q119K, Q120K, M121K, E122K, E123K, L124K, M126K, A127K, P128K, A129K, L130K, Q131K, P132K, T133K, Q134K, G135K, A136K, M137K, P138K, A139K, A141K, S142K, A143K, F144K, Q145K, S155K, H156K, Q158K, S159K, L161K, E162K, V163K, S164K, Y165K, V167K, L168K, H170K, L171K, A172K, Q173K 和 P174K (其中残基位置是相对于 SEQ ID NO:1 而言的)。

[0060] 优选的氨基酸替代的例子如此包括 Q70K, Q90K, T105K, Q120K, T133K, S159K 和 H170K/Q/R 中的一项或多项, 诸如这些替代中的两、三、四或五项, 例如: Q70K+Q90K, Q70K+T105K, Q70K+Q120K, Q70K+T133K, Q70K+S159K, Q70K+H170K, Q90K+T105K, Q90K+Q120K, Q90K+T133K, Q90K+S159K, Q90K+H170K, T105K+Q120K, T105K+T133K, T105K+S159K, T105K+H170K, Q120K+T133K, Q120K+S159K, Q120K+H170K, T133K+S159K, T133K+H170K, S159K+H170K, Q70K+Q90K+T105K, Q70K+Q90K+Q120K,

Q70K+Q90K+T133K, Q70K+Q90K+S159K, Q70K+Q90K+H170K, Q70K+T105K+Q120K, Q70K+T105K+T133K, Q70K+T105K+S159K, Q70K+T105K+H170K, Q70K+Q120K+T133K, Q70K+Q120K+S159K, Q70K+Q120K+H170K, Q70K+T133K+S159K, Q70K+T133K+H170K, Q70K+S159K+H170K, Q90K+T105K+Q120K, Q90K+T105K+T133K, Q90K+T105K+S159K, Q90K+T105K+H170K, Q90K+Q120K+T133K, Q90K+Q120K+S159K, Q90K+Q120K+H170K, Q90K+T133K+S159K, Q90K+T133K+H170K, Q90+S159K+H170K, T105K+Q120K+T133K, T105K+Q120K+S159K, T105K+Q120K+H170K, T105K+T133K+S159K, T105K+T133K+H170K, T105K+S159K+H170K, Q120K+T133K+S159K, Q120K+T133K+H170K, Q120K+S159K+H170K, T133K+S159K+H170K, Q70K+Q90K+T105K+Q120K, Q70K+Q90K+T105K+T133K, Q70K+Q90K+T105K+S159K, Q70K+Q90K+T105K+H170K, Q70K+Q90K+Q120K+T133K, Q70K+Q90K+Q120K+S159K, Q70K+Q90K+Q120K+H170K, Q70K+Q90K+T133K+S159K, Q70K+Q90K+T133K+H170K, Q70K+Q90K+S159K+H170K, Q70K+T105K+Q120K+T133K, Q70K+T105K+Q120K+S159K, Q70K+T105K+Q120K+H170K, Q70K+T105K+T133K+S159K, Q70K+T105K+T133K+H170K, Q70K+T105K+S159K+H170K, Q70K+Q120K+T133K+S159K, Q70K+Q120K+T133K+H170K, Q70K+T133K+S159K+H170K, Q90K+T105K+Q120K+T133K, Q90K+T105K+Q120K+S159K, Q90K+T105K+Q120K+H170K, Q90K+T105+T133K+S159K, Q90K+T105+T133K+H170K, Q90K+T105+S159K+H170K, Q90K+Q120K+T133K+S159K, Q90K+Q120K+T133K+H170K, Q90K+Q120K+S159K+H170K, Q90K+T133K+S159K+H170K, T105K+Q120K+T133K+S159K, T105K+Q120K+T133K+H170K, T105K+Q120K+S159K+H170K, T105K+T133K+S159K+H170K 或 Q120K+T133K+S159K+H170K。在任何上文所列变体中,替代 H170K 可改为 H170Q 或 H170R。引入赖氨酸特别优选的替代包括 T105K 和 S159K 之一或二者。

[0061] 在又一个实施方案中,可改变 G-CSF 多肽以产生如下的 G-CSF 变体,其中消除位置 16, 23, 34 和 40 中的一个或多个天然赖氨酸残基以避免这些位置的 PEG 化。例如,消除一个或多个这些赖氨酸残基可经由替代,优选用精氨酸或谷氨酰胺残基,更优选用精氨酸残基。优选地,经由替代消除位置 16, 34 和 40 处的一个或多个赖氨酸残基,更优选消除两个或三个这些赖氨酸,且最优选消除此位置的所有三个赖氨酸,通过替代。如此,在一个优选的实施方案中, G-CSF 变体包含 SEQ ID NO :1 的序列及至少一处选自下组的替代: K16R, K16Q, K34R, K34Q, K40R 和 K40Q;就是说,至少一处选自下组的替代: K16R/Q, K34R/Q 和 K40R/Q。在一个特别优选的实施方案中,变体包含替代 K16R/Q+K34R/Q+K40R/Q, 诸如例如 K16R+K34R+K40R 或 K16Q+K34R+K40R 或 K16R+K34Q+K40R 或 K16R+K34R+K40Q 或 K16Q+K34Q+K40R 或 K16R+K34Q+K40Q 或 K16Q+K34Q+K40Q。

[0062] 在另一个实施方案中, G-CSF 变体包含至少一处替代以引入赖氨酸残基连同至少一处替代以消除赖氨酸残基,如上所述。

[0063] 在另一个实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体包含位置 16, 34 和 40 处的一个或多个赖氨酸残基的替代,诸如用精氨酸或谷氨酰胺残基,例如精氨酸残基,及一处或多处选自 Q70K, Q90K, T105K, Q120K, T133K, 和 S159K 的替代,而且缀合有 2-6 个、诸如 2-4 个聚乙二醇模块,每个具有约 1000-10,000Da 的分子量。

[0064] 在另一个实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体含有一处或多处选自 K16R, K34R 和

K40R 的替代,及一处或多处选自 Q70K, Q90K, T105K, Q120K, T133K 和 S159K 的替代,而且缀合有 2-6 个、诸如 2-4 个聚乙二醇模块,每个具有约 1000-10,000Da 的分子量。

[0065] 在另一个实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体包含位置 16, 34 和 40 处的一个或多个赖氨酸残基的替代,诸如用精氨酸或谷氨酰胺残基,例如精氨酸残基,及至少一处选自 T105K 和 S159K 的替代,而且缀合有 2-6 个、诸如 2-4 个聚乙二醇模块,每个具有约 1000-10,000Da 的分子量。

[0066] 在另一个实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体包含一处或多处选自 K16R, K34R 和 K40R 的替代,及至少一处选自 T105K 和 S159K 的替代,而且缀合有 2-6 个、诸如 2-4 个聚乙二醇模块,每个具有约 1000-10,000Da 的分子量。

[0067] 在一个特别的实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体包含替代 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K,而且缀合有 2-6 个、诸如 2-4 个分子量为约 1000-10,000Da 的聚乙二醇模块。

[0068] 在一个特别的实施方案中,多 PEG 化的 G-CSF 变体可附着有 2-6 个、通常 2-5 个、诸如 2-4 个分子量约 5000-6000Da 的聚乙二醇模块,例如分子量约 5kDa 的 mPEG。优选地,多 PEG 化的 G-CSF 变体附着有 2-4 个分子量约 5000-6000Da 的聚乙二醇模块,例如 5kDa mPEG。适合于在本发明的方法中使用的一种特别优选的多 PEG 化的 G-CSF 变体包含替代 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K,而且含有 2-4 个 PEG 模块,每个具有约 5kDa 的分子量,诸如 3 个此类 PEG 模块。

[0069] 在一个实施方案中,可生成多 PEG 化的 G-CSF 变体,使得只附着有一种数目的 PEG 模块,例如 2, 3, 4 或 5 个 PEG 模块每个缀合物,或得到附着有不同数目的 PEG 模块的期望的缀合物混合物,例如具有 2-5, 2-4, 3-5, 3-4, 4-6, 4-5 或 5-6 个附着的 PEG 模块的缀合物混合物。如上所述,一种优选的缀合物混合物的一个例子是如下的混合物,具有 2-4 个约 5kDa 的 PEG 模块,例如每个缀合物主要附着有 3 个 PEG 模块的缀合物,但是有小比例的缀合物附着有 2 或 4 个 PEG 模块。

[0070] 会理解,具有特定数目的附着的 PEG 模块的缀合物,或具有有限范围数目的附着的 PEG 模块的缀合物的混合物可通过选择合适的 PEG 化条件及任选地通过使用后续纯化分出具有期望数目的 PEG 模块的缀合物来获得。分出具有不同数目的附着的 PEG 模块的 G-CSF 缀合物的方法以及用于测定附着的 PEG 模块的数目的方法的例子记载于例如 WO 01/51510 和 WO 03/006501,均通过述及而收入本文。为了本发明的目的,如果在 SDS-PAGE 凝胶上进行的分开显示没有显示或只是不显著地显示与给定数目的 PEG 模块对应的条带以外的条带,那么缀合物可视为具有给定数目的附着的 PEG 模块。例如,如果运行缀合物样品的 SDS-PAGE 凝胶显示与 3 个 PEG 基团对应的主要条带,而且只是不显著地显示或优选不显示与 2 或 4 个 PEG 基团对应的条带,那么该样品视为具有 3 个附着的 PEG 基团。

[0071] 在一些情况中,胺特异性活化的 PEG 衍生物诸如 mPEG-SPA 可能不是专门经酰胺键附着至 N 端和赖氨酸残基的 ϵ -氨基,而是还经酯键附着至丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸残基的羟基。因此,PEG 化的蛋白质可能不具有足够程度的均一性,而且可能含有意图以外的多种不同 PEG 异构体。此类经酯键结合的 PEG 模块通常会是不稳定的,而且可通过美国临时专利申请 No. 60/686,726 (通过述及而收入本文) 中记载的方法来除去,其涉及使 PEG 化的多肽经受升高的 pH,时间段足以除去不稳定的附着至羟基的 PEG 模块。此方法还记载于 USSN

11/420, 546 (美国专利 No. 7, 381, 805) 和 WO 2006/128460, 均通过述及而收入本文。

[0072] 在一个优选的实施方案中, 多 PEG 化的 G-CSF 变体是 PEG 位置异构体种类的混合物。如本文中使用的, 术语蛋白质的“PEG 位置异构体”指蛋白质的不同 PEG 化形式, 其中 PEG 基团位于蛋白质的不同氨基酸位置。本发明的实践中采用的一种优选的多 PEG 化的 G-CSF 变体是赖氨酸 /N 端 PEG 异构体的混合物。蛋白质的术语“赖氨酸 /N 端 PEG 异构体”意味着 PEG 基团附着于蛋白质的氨基端和 / 或蛋白质中的赖氨酸残基的 ϵ -氨基。例如, 短语“具有 3 个附着的 PEG 模块的赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体”, 如应用于 G-CSF 的, 意味着 G-CSF PEG 位置异构体的混合物, 其中三个 PEG 基团附着至蛋白质的赖氨酸残基的 ϵ -氨基和 / 或 N 端。典型地, “具有 3 个附着的 PEG 模块的赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体”会有两个 PEG 模块附着至赖氨酸残基和一个 PEG 模块附着至 N 端。对 PEG 位置异构体的分析可使用阳离子交换 HPLC 来实施, 如记载于 WO2006/128460 的, 通过述及而收入本文。

[0073] 典型地, PEG 位置异构体种类的混合物是赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物。多肽的“赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物”指已经经受层析或其它纯化规程以清除杂质诸如非赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体的赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体混合物。“赖氨酸 /N 端 PEG 位置异构体的基本上纯化的混合物”会例如不含最不稳定的附着于羟基的 PEG 模块 (它们在其它情况中在本文所述部分去 PEG 化步骤和后续纯化缺失下会存在), 而且通常会含有少于约 20% 的含有不稳定的附着于羟基的 PEG 模块的多肽, 更通常为少于约 15%。优选地, 含有不稳定的附着至羟基的 PEG 模块的多肽会少于约 10%, 例如少于约 5%。

[0074] 优选地, PEG 位置异构体种类的混合物是 G-CSF 变体的 PEG 位置异构体的同质混合物。术语“多肽 (G-CSF) 变体的 PEG 位置异构体的同质混合物”意味着不同 PEG 位置异构体的多肽模块是相同的。这意味着混合物的不同 PEG 位置异构体均基于一种多肽变体序列。例如, PEG 化的 G-CSF 多肽变体的 PEG 位置异构体的同质混合物意味着混合物的不同 PEG 位置异构体基于一种 G-CSF 多肽变体。

[0075] 典型地, G-CSF 变体的 PEG 位置异构体的同质混合物展现实质性均一性。如本文中使用的, “均一性”指 PEG 化的多肽在不同位置异构体 (即含有不同数目的在不同位置处附着的 PEG 模块的不同多肽异构体) 的数目以及这些位置异构体的相对分布方面的同质性。对于意图用于治疗人或动物的药用多肽, 通常希望不同 PEG 位置异构体和不同 PEG 化种类的数目是最小限度的。

[0076] 在一个实施方案中 (在下文实施例中称作“Maxy-G21”), 多 PEG 化的 G-CSF 变体是 PEG 位置异构体的混合物, 其中 G-CSF 变体构件具有 SEQ IDNO :1 的氨基酸序列及替代 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K (相对于 SEQID NO :1), 包含每个具有 4 或 5 个附着的 PEG 模块的位置异构体, 包括 Ser66 或 Tyr165 之一或二者处的不稳定的 PEG 模块, 以及 N 端处及位置 K23, K105 和 K159 之一或之二处的稳定的 PEG 模块。在本文中称作 Maxy-G21 的多 PEG 化的 G-CSF 变体包含的 PEG 模块是 mPEG-SPA (Nektar), 均具有 5000Da 的平均分子量。

[0077] 术语“部分去 PEG 化”在本文中指除去不稳定的附着至羧基的 PEG 模块, 而更加稳定的附着至 N 端或赖氨酸残基的氨基的 PEG 模块保持不动。用于进行此类工艺的方法记载于 USSN 60/686, 726 ;USSN 11/420, 546 (美国专利 No. 7, 381, 805) ;和 WO 2006/128460, 均通过述及而收入本文。

[0078] 在另一个实施方案中（在下文实施例中称作“Maxy-G34”），多 PEG 化的 G-CSF 变体是 PEG 位置异构体的混合物，其中 G-CSF 变体构件具有 SEQ IDNO :1 的氨基酸序列及突变 K16R, K34R, K40R, T105K 和 S159K（相对于 SEQID NO :1），而且其中至少 80% 的混合物含有 2 种 PEG 位置异构体，每种附着有 3 个 PEG 模块，其中一种异构体的 PEG 基团附着于 N 端、Lys 23 和 Lys 159 且另一种异构体的 PEG 基团附着于 N 端、Lys105 和 Lys159。在本文中称作 Maxy-G34 的多 PEG 化的 G-CSF 变体包含的 PEG 模块是 mPEG-SPA (Nektar)，每个均具有 5000Da 的平均分子量。

[0079] 对于上文所述任何实施方案，G-CSF 变体和多 PEG 化的 G-CSF 变体可任选包括添加至 N 端的甲硫氨酸残基。

[0080] 在别的实施方案中，要依照本发明施用的多 PEG 化的 G-CSF 变体可以如任何下述所述制备，均通过述及而收入本文：

[0081] ● WO 89/05824 (G-CSF 的赖氨酸删除变体)

[0082] ● US 5, 824, 778 (有至少一个 PEG 分子共价附着至多肽的至少一个氨基酸的 G-CSF, 附着经由所述氨基酸的羧基)

[0083] ● WO 99/03887 (PEG 化的 G-CSF 半胱氨酸变体)

[0084] ● WO 2005/055946 (“糖-PEG 化”G-CSF 缀合物, 有经完整糖基连接基团连接的 PEG 模块)

[0085] ● WO 2005/070138 (包含突变肽序列的 G-CSF 多肽, 该序列编码相应野生型多肽中不存在的 O 连接的糖基化位点)

[0086] ● US 2005/0114037 A1 (有至少一个聚合模块的 G-CSF, 该聚合模块附着在多个不同规定氨基酸位置中的至少一个处)

[0087] 在另一个实施方案中，要依照本发明施用的多 PEG 化的 G-CSF 变体展现与单 PEG 化的 hG-CSF, **Neulasta®** 相比改良的药动学特性，诸如延长的血清半衰期和 / 或增大的 AUC。优选地，多 PEG 化的 G-CSF 变体展现血清半衰期或 AUC 延长 / 增大 **Neulasta®** 血清半衰期或 AUC 至少约 1.2 倍，例如延长 / 增大单 PEG 化的 hG-CSF, **Neulasta®** 的至少约 1.4 倍、诸如至少约 1.5 倍、例如至少约 1.6 倍、诸如至少约 1.8 倍、例如至少约 2.0 倍、2.5 倍、3 倍、5 倍、或 10 倍。

[0088] 辐射暴露和处理

[0089] A. 辐射暴露对造血系统的影响。

[0090] 辐射事故情况提供了在设计紧急状况准备模型和经重度辐照的个体的处理策略中有用的数项限定特征。身体位置、偶然遮蔽和相对于源的距离会对任何个体组导致单侧的、不均匀的和异质的暴露。另外，暴露与处理启动之间的时间间隔可能不及最佳值。这些暴露方面强调了确定精确吸收剂量的难度；用于建立伤员鉴别分类和处理的基础及另外处理对生物剂量确定法的影响未知。关于辐射暴露，合理的是假设上述特征预报高度可变的剂量分布，有可能防护 (sparing) 骨髓衍生的造血干和祖细胞 (“BM 衍生 HSC 和 HPC”) 和胸腺组织，由此增强造血和淋巴样再生响应及时施用造血生长因子 (“HGF”) 的潜力。

[0091] 造血系统是急性全身辐照 (TBI) 后对辐射最敏感且限制剂量的器官系统。HSC 和 HPC 以剂量依赖性指数方式被杀死，具有最低限度修复能力，指示暴露剂量的适度增加就导致不成比例升高的 HSC 和 HPC 伤亡。成熟的、更加分化的细胞比高度增殖性干和祖细胞对

辐射更有抗性。已经提出 HSC 的一个子集对辐射有相对抗性。HSC 和 HPC 的细胞杀死的指数式、剂量依赖性性质,连同不均匀辐射暴露及因此活跃骨髓间的可变剂量分布的现实,提示小或适度比例的 HSC 和 HPC 以及各 BM(成骨细胞)、血管和胸腺(上皮细胞)小生境的细胞会在造血综合征中的潜在致死剂量的辐射后存活,而且顺从本文所述治疗办法。

[0092] 源自核爆炸或事故的急性暴露有可能会是单侧的,不均匀的,而且有一定程度的部分身体遮蔽。因此,位于骨髓和血管小生境(niche)内的一部分 HSC 和 HPC 可能不暴露或只暴露于显著更低剂量的辐射。有动物模型中的一致数据库,证明了部分身体或不均匀辐照的防护效应(sparing effect)。单侧暴露能导致单侧对双侧暴露的 LD50/30 值(导致 50%受试者在 30 天内死亡的平均辐射剂量)升高大约 20%。还必须以生物学术语评估辐射源的方向。由于大部分活跃骨髓在年轻成人的肋骨和骨盆的背面及脊柱中,背侧暴露使骨髓损害最大化。相反,由于大量活跃骨髓的腹侧遮蔽,腹侧暴露使骨髓损害最小化。不均匀暴露不应当视为像骨髓的部分身体遮蔽那样有效。这是重要的,原因在于辐射剂量与 HSC/HPC 存活之间的指数关系,例如全身剂量减半不是将 HSC 存活提高至 50%,而只是至 10%。

[0093] B. 辐射剂量

[0094] 非人灵长类动物(“NHP”)中急性的,辐射诱发的造血综合征的数据库衍生自涉及 250 千伏峰(kVp)X-辐射或 Co-60 伽马和 2 兆伏(MV)X-辐射全身辐照(TBI)的实验。Co-60 伽马辐射诱发的致死率的数据库是一项在 1967 年实施的未发表的实验(n = 90 NHP)。Dalrymple et al. Radiation Res. 25 :377-400, 1965 使用 2MV X-辐射来建立 TBI 和造血综合征致死率的剂量-应答关系。这两项研究充当基础来建立不接受支持护理的暴露于伽马辐射或高能 X-射线(2MV)的 NHP 中辐射诱发的造血综合征致死率的剂量-应答关系。此数据库充当对照分组,自其能选择出单剂辐射和具有一定程度必然性的相关致死率。自这些较早研究获得的 NHP 的 LD50/30 值分别为 6.40Gy [6.06, 7.75] 和 6.65Gy [6.00, 10.17] (括号 [] 中为 95%置信区间(CI))。为了比较,暴露于 250kVp X 射线 TBI 的 NHP 的各 LD50/30 值为大约 4.80Gy,证明了较低能量 X-射线(即 Dalrymple 实验中使用的 2MV X-射线)的 X-辐照的相对生物学效果。

[0095] 关于人类全身或有效部分身体辐照的效果的数据必然是从过去的核事故收集的,诸如广岛爆炸和切尔诺贝利事故。此类数据保存于辐射紧急状况援助中心/培训站(REAC/TS)(Oak Ridge, Tennessee)处的登记簿。基于此数据,由于绝对淋巴细胞计数(ALC)在暴露于穿透辐射后不久下降,因此开发了一种通过测定 48 小时时段里淋巴细胞计数的降低速率来评估个体中的辐射剂量的方法(Goans R.E., et al. Health Phys. 81 :446-449, 2001)。此类评估需要两次或更多次相距 4 至 6 小时间隔的 ALC 测定。在此类测量不切实际的情况下,诸如在大量伤亡的情况下,辐射剂量的另一项评估基于辐射暴露之后,受试者呕吐之前的时间长度。Berger, M.E. et al. Occupational Medicine 56 :162-172, 2006) 提供了一张表,显示了暴露于至少 2Gy 的急性全身辐照的个体大多数(70-90%)会在暴露后 1 至 2 小时内呕吐,而基本上暴露于至少 4Gy 的辐射的个体 100%会在 1 小时内呕吐;而暴露于至少 6Gy 的辐射的个体会在 30 分钟内呕吐。严重性和距与急性全身辐射暴露有关的其它身体症状(诸如体温、头痛、腹泻)发作的时间也列表于 Berger et al., (supra)。

[0096] C. 支持护理

[0097] 使用抗生素、流体、血液产品、镇痛药和营养物是暴露于骨髓抑制和致死剂量辐射

的患者的“标准护理”。单独的支持护理,诸如抗生素、全血或血小板输注、流体和营养物能显著增强经辐照受试者的存活。支持护理和暴露于致死剂量辐射的动物中造血综合征存活之间的关系已经在犬科动物中证明,但是在非人灵长类动物(NHP)中没有。Byron 等人的一项研究证明了单独的抗生素方案在暴露于 100%致死剂量的恒河猴/猕猴中显著提高存活至 72%的能力。另外,巴尔的摩的马里兰大学(UMB)和武装部队放射生物学研究所(AFRRI)的 Mac Vittie/Farese 实验室确立了支持护理对自下文所述数据库估算的单剂致死 TBI(LD70/30)的效果。这些数据显示,当施用支持护理时,经来自 Co-60 伽马辐射,剂量等同于 LD70/30(即在支持护理缺失下导致 70%受试者在 30 天中死亡的剂量)的 TBI 辐照的 NHP 将 30 天里的死亡数降低至大约 14%受试者(即 LD 14/30)。用暴露于 250kVp X-射线 TBI 的恒河猴/猕猴实施了相似的研究(MacVittie/Farese UMB 实验室)。添加单独的支持护理将与 6.00Gy TBI 有关的估算 70%致死率降低至 9%。

[0098] 使用如上所述不接受支持护理的 NHP 中辐射诱发的造血综合征致死率的剂量-应答研究中获得的结果来设计一项最近的盲的、辐射剂量随机化的研究,以确定接受支持护理的 NHP 中的致死剂量应答关系(实施例 1)。LD50/60 的所得值为 7.52Gy,而无支持的历史对照分组的 LD50/60 为大约 6.50Gy。这有助于确认支持护理的存活增强效果,以及提供剂量关系来确定施用支持护理(在其它情况中在造血综合征内称作医疗管理)的暴露于致死剂量辐射的 NHP 的各 LD30/60、LD50/60 和 LD70/60 剂量。

[0099] 此存活增强效果取决于两个条件。第一,存活的 HSC 和 HPC 必须能够自发再生,第二,造血恢复必须在临界的、临床可管理的时间段内导致功能性嗜中性细胞和/或血小板的生成。

[0100] D. 造血生长因子在 ARS 的治疗中的作用

[0101] 有骨髓抑制和/或致死辐射暴露的小型 and 大型动物模型的一个可观且一致的数据库,这些模型证明了造血生长因子(HGF)在以它们的最佳时间表施用且与支持护理组合时显著改善存活及嗜中性细胞和血小板的恢复,超过对单独的支持护理所记录的。MacVittie 实验室先前确立了单独的以及 G-CSF 施用联合的支持护理在以诱发完全造血综合征的水平暴露于 Co-60 TBI 的犬中的效用。没有支持护理时的 LD50/30 为 2.60Gy,它在有支持护理时提高至 3.38Gy,而且在以其最佳施用时间表添加 G-CSF 时进一步提高至 4.88Gy。此研究使用辐照的标准实验室模型,其涉及中等剂量率的均匀 TBI。

[0102] 施用 HGF 的常规时间表是在辐照后 24 小时内早期启动处理,及继续每日施用以确保造血祖细胞的再生及嗜中性细胞和/或血小板的生成。然而,就核爆炸或事故后的处理而言一种更加现实的时间表是辐照后 48-72 小时延迟的施用。已经实施了多项临床前研究来评估延迟的 HGF 施用的效果。大多数这些研究显示造血应答的量级因 HGF 施用和辐照之间延长的时间间隔而显著减轻。连同 G-CSF 和 PEG 化的 G-CSF,ARS 的治疗中有时使用的其它 HGF 包括粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干细胞因子(SCF)、FLT3 配体(FL)、白介素-3(IL-3)、巨核细胞生长和发育因子(MGDF)、血小板生成素(TPO)、TPO 受体激动剂、和红细胞生成素(EPO)(Drouet, M. et al., *Haematologica* 93(3)465-466, 2008; Herodin F. et al., *Experimental Hematology* 35:1172-1181, 2007)。在这些中,作为单一药剂,只有 G-CSF 和 GM-CSF 当前可用于治疗经潜在致死辐照的人员,如果在标签以外(“off-label”)使用的话。这些 HGF 有可能会被首先建议 FDA 在 FDA “动物规则”(AR) 下批准。对 HGF “鸡

尾酒”的考虑必须包括对各自毒性和暴露后施用时间的分析。

[0103] E. 动物模型系统中辐射诱发的嗜中性细胞减少症的治疗中的多 PEG 化的 G-CSF 变体

[0104] 恒河猴中辐射诱发的血细胞减少症已经被证明是一种用于研究药剂在治疗血小板减少症和嗜中性细胞减少症中的功效的有效模型系统。在实施例 2 中描述的研究中, 单次注射依照本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 (在本文中鉴别为“Maxy-G21”) 诱导显著的外周血总的有核细胞、嗜中性细胞、单个核细胞增多, 及显著的集落形成细胞动员入外周血中。与暴露于 6.0Gy TBI 的对照动物 (它们展现 14.8-15.2 天的嗜中性细胞减少症时段) 相比, 在 TBI 后 24 小时以剂量 300 μ g/kg 施用 Maxy-G21 的动物展示显著缩短的嗜中性细胞减少症时段, 7.3 ± 1.1 天。嗜中性细胞减少症的持续时间以动物具有低于 500/ μ L 的观察或估算 ANC 的天数来测定。ANC 最低值 (定义为第一剂测试化合物后至少 2 天发生的第一个最低观察或估算 ANC) 也自对照动物中的 49 ± 22 / μ L 显著改善至 140 ± 45 / μ L。距恢复的时间 (以自研究第 1 天至首次连续 2 天观察或估算 ANC 为 500/ μ L 或以上的天数来测定) 类似地自对照值 21.2 ± 0.4 天改善至 Maxy-G21 处理分组中的 15.5 ± 0.3 天。

[0105] 与包括研究内 Neulasta® 组和一个历史分组 ($n = 9$) 的组合 Neulasta® 分组相比, Maxy-G21 显著缩短嗜中性细胞减少症的持续时间 ($p = 0.02$) 以及距恢复的时间。抗生素需要也显著不同于 Neulasta® 组, 即 Maxy-G21 处理分组只需要抗生素 9.8 天, 而组合 Neulasta® 处理分组需要抗生素支持 14.7 天。

[0106] 实施例 2 中描述的研究证明了给恒河猴皮下施用依照本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 (在本文中鉴别为 Maxy-G21) 在经辐照的 NHP 中显著缩短嗜中性细胞减少症时段。另外, 当与包括研究内 Neulasta® 分组和一个历史 Neulasta® 分组 ($N = 9$) 的分组相比时发现该效果超过 Neulasta®。药动学数据提供了证据, 即在经辐照的猕猴中, 多 PEG 化的 G-CSF 变体展现与 Neulasta® 相比显著延长的血浆半衰期 (图 4)。PK 数据如此支持该工作假说, 即在经历重度辐射诱发的骨髓抑制状态的 NHP 中以及在健康的 (未辐照的) NHP 中, 多 PEG 化的 G-CSF 变体具有比单 PEG 化的 hG-CSF, Neulasta® 要大的生物利用度。

[0107] 总之, 发现多 PEG 化的 G-CSF 变体在非人灵长类动物中显著缩短辐射诱发的嗜中性细胞减少症时段。另外, 当与一个历史 Neulasta® 分组相比时发现嗜中性细胞减少症时段的缩短超过 Neulasta®。通过依照本发明的方法施用多 PEG 化的 G-CSF 变体, 显著缩减了辐射诱发的嗜中性细胞减少症的程度和持续时间。

[0108] 在实施例 3 描述的研究中, 小鼠暴露于多种足以杀死 20% 未处理对照动物 (7.76 Gy ;LD20/30) 或 45% 未处理对照动物 (7.96Gy ;LD45/30) 的剂量的辐射。在 TBI 后第一天, 动物以 20 μ g/20g 小鼠的剂量施用依照本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 (在本文中鉴别为“Maxy-G34”) 或稀释剂。在第 7 天及在一些动物中在第 14 天重复服药。在 LD20/30 水平和 LD45/30 水平的辐照后施用多 PEG 化的 G-CSF 变体的小鼠展现与未处理动物相比显著更大的 30 天后百分比存活 (分别为图 5 和 6)。

[0109] 实施例 2 和 3 呈现的研究证明了依照本发明的多 PEG 化的 G-CSF 变体在两种动物模型系统中有效缩减辐射诱发的嗜中性细胞减少症的程度和持续时间及延长存活。多 PEG 化的 G-CSF 变体可如此有效治疗与危及生命的辐射暴露有关的嗜中性细胞减少症, 如发生核紧急情况事件时的 ARS。

[0110] 多 PEG 化的 G-CSF 变体的施用

[0111] A. 剂量

[0112] 依照本发明施用的多 PEG 化的 G-CSF 变体的剂量一般会是与单 PEG 化的 hG-CSF (Neulasta®) 在化疗应用中当前批准的剂量 (为 6mg/ 成人患者, 例如 100 μ g/kg 60kg 患者) 相似的数量级。多 PEG 化的 G-CSF 变体的一种适宜剂量因此涵盖在约 1mg 至约 30mg、诸如约 2mg 至约 20mg、诸如约 3mg 至约 15mg 的范围中。一种合适的剂量可以如此为例如约 1mg、约 2mg、约 3mg、约 6mg、约 9mg、约 12mg、约 15mg、约 20mg、或约 30mg。或者, 剂量可以基于患者的重量, 使得多 PEG 化的 G-CSF 变体的一种适宜剂量涵盖在约 20 μ g/kg 至约 500 μ g/kg、诸如约 30 μ g/kg 至约 400 μ g/kg、诸如约 40 μ g/kg 至约 300 μ g/kg、诸如约 50 μ g/kg 至约 200 μ g/kg 的范围中。一种合适的剂量可以如此为例如约 20 μ g/kg、约 30 μ g/kg、约 40 μ g/kg、约 50 μ g/kg、约 60 μ g/kg、约 75 μ g/kg、约 100 μ g/kg、约 125 μ g/kg、约 150 μ g/kg、约 175 μ g/kg、约 200 μ g/kg、约 250 μ g/kg、约 300 μ g/kg、约 400 μ g/kg、或约 500 μ g/kg。多 PEG 化的 G-CSF 变体优选在辐射暴露后尽可能早地施用, 例如在辐射暴露后 7 天内、在 4 天内、在 3 天内、在 2 天内 (即在 48 小时内) 或更优选在 1 天内 (即在 24 小时内)。根据疾病的性质及患者的预后和响应, 可以在前次施用后 1-4 周之间 (例如约 7 天、约 10 天、约 14 天、约 18 天、约 21 天、约 24 天、约 28 天) 给予多 PEG 化的 G-CSF 变体的第二次和可能的第三次施用。

[0113] 多 PEG 化的 G-CSF 变体的施用的精确剂量和频率会取决于多种因素, 诸如多 PEG 化的 G-CSF 变体的比活性和药动学特性, 以及所处理的状况的性质和严重性 (诸如辐射暴露的水平 / 或持续时间、暴露的身体的区域和量、辐射的类型、ARS 相关症状的严重性) 及本领域技术人员知道的其它因素。通常, 剂量应当能够预防或减轻 / 缩短受试者中嗜中性粒细胞减少症的程度和 / 或持续时间。此类剂量可以称作“有效”或“治疗有效”量。对本领域技术人员会显而易见的是, 本发明的多 PEG 化的 G-CSF 变体的有效量取决于所处理的状态的严重性, 剂量, 施用时间表, 是单独地还是与其它治疗剂组合地施用多 PEG 化的 G-CSF 变体, 多 PEG 化的 G-CSF 变体的血清半衰期和其它药动学特性, 以及患者的体型、年龄、和一般健康, 等等。施用的剂量和频率可以由本领域技术人员使用已知技术来确定。

[0114] B. 药物组合物

[0115] 依照本发明施用的多 PEG 化的 G-CSF 变体可以以包括一种或多种药学可接受载体或赋形剂的组合物来施用。多 PEG 化的 G-CSF 变体可以以本身本领域已知的方式配制成药物组合物, 产生贮存足够稳定且适合于对人或动物施用的药剂。药物组合物可配制成多种形式, 包括液体或凝胶, 或冻干的, 或任何其它合适形式。优选的形式会取决于所处理的具体适应症, 而且对于本领域技术人员会是显而易见的。

[0116] “药学可接受”意味着载体或赋形剂在所采用的剂量和浓度在施用它的患者中不引起任何不当效果。此类药学可接受载体和赋形剂是本领域公知的 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); 及 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000))。

[0117] C. 胃肠外组合物

[0118] 药物组合物的一个例子是设计用于胃肠外施用（例如通过皮下路径）的溶液。虽然在许多情况中药物溶液配制剂以适合于立即使用的液体形式提供，但是此类胃肠外配制剂也可以以冷冻的或以冻干的形式提供。在前一种情况中，组合物必须在使用前融化。后一种常常用于提高组合物中含有的活性化合物在极其多种贮存条件下的稳定性，正如本领域技术人员认可的，冻干制剂一般比它们的液体对应物要更加稳定。此类冻干制剂在使用前通过添加一种或多种合适的药学可接受稀释剂诸如无菌注射用水或无菌生理盐水溶液来重建。

[0119] 在胃肠外的情况中，它们通过恰当地混合具有期望纯度的多肽与一种或多种本领域通常采用的药学可接受载体、赋形剂或稳定剂（都称作“赋形剂”）（例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等张剂（isotonifier）、非离子型去污剂、抗氧化剂和 / 或其它多种多样的添加剂）来制备，作为冻干配制剂或水溶液，供贮存。

[0120] 缓冲剂帮助将 pH 维持在近似生理条件的范围中。它们通常以范围为约 2mM 至约 50mM 的浓度存在。适合与本发明一起使用的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐，诸如柠檬酸盐缓冲剂（例如柠檬酸一钠 - 柠檬酸二钠混合物、柠檬酸 - 柠檬酸三钠混合物、柠檬酸 - 柠檬酸一钠混合物、等）、琥珀酸盐缓冲剂（例如琥珀酸 - 琥珀酸一钠混合物、琥珀酸 - 氢氧化钠混合物、琥珀酸 - 琥珀酸二钠混合物、等）、酒石酸盐缓冲剂（例如酒石酸 - 酒石酸钠混合物、酒石酸 - 酒石酸钾混合物、酒石酸 - 氢氧化钠混合物、等）、延胡索酸盐缓冲剂（例如延胡索酸 - 延胡索酸一钠混合物、延胡索酸 - 延胡索酸二钠混合物、延胡索酸一钠 - 延胡索酸二钠混合物、等）、葡萄糖酸盐缓冲剂（例如葡糖酸 - 葡糖酸钠混合物、葡糖酸 - 氢氧化钠混合物、葡糖酸 - 葡糖酸钾混合物、等）、草酸盐缓冲剂（例如草酸 - 草酸钠混合物、草酸 - 氢氧化钠混合物、草酸 - 草酸钾混合物、等）、乳酸盐缓冲剂（例如乳酸 - 乳酸钠混合物、乳酸 - 氢氧化钠混合物、乳酸 - 乳酸钾混合物、等）和乙酸盐缓冲剂（例如乙酸 - 乙酸钠混合物、乙酸 - 氢氧化钠混合物、等）。别的可能有磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和三甲胺盐诸如 Tris。

[0121] 添加防腐剂来延迟微生物生长，而且通常以约 0.2% - 1% (w/v) 的量添加。适合与本发明一起使用的防腐剂包括酚、苯醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯化十八烷基二甲基苄基铵、苄烷胺 (benzalkonium) 卤化物（例如苄烷胺氯化物、溴化物或碘化物）、氯己双铵、对羟基苯甲酸羟基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇和 3- 戊醇。

[0122] 添加等张剂来确保液体组合物的等张性，而且包括多羟基糖醇，优选三羟基或更高级的糖醇，诸如甘油、赤藓醇、阿糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇。多羟基醇可以以介于 0.1% 和 25%（以重量计）之间，通常 1% 至 5% 的量存在，考虑到其它组分的相对量。

[0123] 稳定剂指一大类赋形剂，其功能的范围可以自增量剂至溶解治疗剂或帮助防止变性或粘附至容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇（上文列举的）；氨基酸，诸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L- 亮氨酸、2- 苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、等；有机糖或糖醇，诸如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌肉肌醇、半乳糖醇、甘油、等，包括环多醇诸如肌醇；聚乙二醇；氨基酸聚合物；含硫的还原剂，诸如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α - 单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量多肽（即 < 10 个残基）；蛋白质，诸如人血清清蛋白、牛血清清蛋白、明

胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；单糖，诸如木糖、甘露糖、果糖和葡萄糖；二糖，诸如乳糖、麦芽糖和蔗糖；三糖，诸如棉子糖；和多糖，诸如右旋糖酐。稳定剂通常以基于活性蛋白质重量而言 0.1 至 10,000 份重量的范围存在。

[0124] 非离子型表面活性剂或去污剂（也称作“湿润剂”）可以存在来帮助溶解治疗剂以及保护治疗性多肽免于搅动诱导的聚集，这还容许配制剂暴露于剪切表面应力而不引起多肽变性。合适的非离子型表面活性剂包括聚山梨酯（20、80、等）、Polyoxamers（184、188、等）、Pluronic®多元醇、聚氧乙烯山梨聚糖单醚（Tween®-20、Tween®-80、等）。

[0125] 别的多种多样的赋形剂包括增量剂或填充剂（例如淀粉）、螯合剂（例如 EDTA）、抗氧化剂（例如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素 E）和共溶剂。

[0126] 活性组分也可封装在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中（例如羟甲基纤维素、明胶或聚-（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊），在胶状药物投递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）或在粗滴乳状液中。此类技术披露于 Remington's Pharmaceutical Sciences, supra。

[0127] 要用于体内施用的胃肠外配制剂必须是无菌的。这例如通过过滤穿过无菌滤膜来容易地实现。

[0128] 本发明通过下面的非限制性实施例来进一步描述。

实施例

[0129] 实施例 1：致死辐射剂量应答及支持护理在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的非人灵长类动物模型中的效果。

[0130] 下面描述了一项初步研究，其设计用来在暴露于剂量渐增的全身电离辐射（TBI）并接受支持护理（也称作“医疗管理（medical management）”）的恒河猴/猕猴（rhesus macaque）中限定剂量应答。此研究设计用来评估：

[0131] 1. 暴露于致死剂量的 LINAC 衍生 6MV（平均能量，2MV）光子的 TBI 加医疗管理的恒河猴/猕猴的 LD50/30 和支持辐射-剂量存活曲线，和

[0132] 2. 医疗管理对单独的 TBI 的各 LD50/30 和剂量应答关系的影响，与历史数据集相比。

[0133] 材料和方法

[0134] 使用 6 兆伏（MV）LINAC 光子源（Varian model #EX-21）（平均 2MV 光子）以 80 ± 2.5 cGy/min 的剂量率使四十八（48）只雄性恒河猴暴露于双侧、均匀、全身辐照（TBI）。给动物（每种辐射剂量 2-8 只的组）辐照六种随机剂量的 TBI：7.20Gy, 7.55Gy, 7.85Gy, 8.05Gy, 8.40Gy 和 8.90Gy。提供的医疗管理包括抗生素、流体、输血、营养支持、止泻药、抗溃疡药、解热药和疼痛管理。经辐照的动物在 TBI 后观察 60 天。

[0135] 主要医学相关参数是 60 天死亡率。次要中点是关键嗜中性细胞和血小板（PLT）相关参数，包括：各嗜中性细胞和血小板最低值，嗜中性细胞减少症（ANC < 500/ μ l）和血小板减少症（PLT < 20,000/ μ l）持续时间，及距恢复至 ANC > 1,000/ μ l 和 PLT > 20,000/ μ l 的时间。还记录 ANC < 100/ μ l 的日子和持续时间。其它参数包括发热（温度 $\geq 103^\circ$ F）的天数、有记录的感染的发病率、热性嗜中性细胞减少症和死者的均值存活时间（MST）。

[0136] 对 48 只暴露于 TBI 的雄性恒河猴/猕猴收集 60 天的数据，6 个剂量组，每组 8 只

动物,为 7.20,7.55,7.85,8.05,8.40 和 8.90Gy。计算每个剂量组的死亡率。

[0137] 使用 SAS 第 9 版来实施描述性分析和对数回归,并使用 SPLUS 第 6.2 版来实施 LD 评估。对数回归分析是双侧进行的,主效应的 α 水平为 0.05 而边际效应为 0.10。呈现了计数数据的频率和百分比;呈现了连续数据的均值、标准偏差、中值、最小值和最大值。对数回归分析及作为结果的 60 天死亡率测试剂量的影响,计算是使用剂量的自然对数实施的。

[0138] 结果

[0139] A. 辐射剂量和致死率

[0140] 四十八 (48) 只雄性恒河猴 / 猕猴在七个分组中 (分组 1, $n = 2$; 分组 2, $n = 6$; 分组 3 至 7, $n = 8$) 在 7.20Gy 至 8.90Gy 的剂量范围上进行辐照并施用医疗管理。总共 48 只动物中有三十二 (32) 只 (66.6%) 死于造血综合征。剂量应答关系呈现于图 1 和表 1。辐射剂量是死亡率的重要预报项 ($P = 0.01$), 升高的死亡率实现于较高的剂量。

[0141] 表 1: 恒河猴 / 猕猴中辐射暴露后的百分比存活和均值存活时间

[0142]

辐射暴露(Gy)	7.20	7.55	7.85	8.05	8.40	8.90
%致死率	38%	50%	75%	63%	75%	100%
死者/总数	3/8	4/8	6/8	5/8	6/8	8/8
死者的存活时间 (天)						
均值	20.0	18.3	22.2	16.2	17.5	21.1
中值	15.0	18.5	16.5	14.0	17.5	18.0

[0143]

[0144] 此研究中暴露于 TBI 的恒河猴的估算 LD30/60、LD50/60、和 LD70/60 值 (括号中为 95% CI) 分别为 7.09Gy [6.50, 7.73], 7.52Gy [7.12, 7.93] 和 7.97Gy [7.60, 8.36]。另外, LD5/60 (6.24Gy) [3.56, 6.91] 和 LD10/60 (6.51Gy) [4.09, 7.09] 相对于 LD95/60 (9.05Gy) [8.45, 12.93] 和 LD90/60 (8.68Gy) [8.22, 11.27] 的估值决定了“少数”和“多数”动物的致死剂量间的各比值。LD5 : LD95 为 1.45 [1.24, 3.57], 而 LD10 : LD90 为 1.33 [1.18, 2.70]。“少数”和“多数”致死事件间 Gy 的各差异为大约 2.81 至 2.17。

[0145] B. 医疗管理对 LD50 的影响。

[0146] 如图 1 所示, 来自暴露于相似质量的 TBI 的恒河猴 / 猕猴的两项可得历史研究的 LD50/30 在支持护理 (医疗管理) 缺失下估算为 6.40 Gy (Co-60 γ -辐射, LD50_{Co60}) 和 6.65 Gy (2MV X-辐射, LD50_{X射线})。自采用 2MV 平均 LINAC 光子 TBI 加医疗管理的当前研究估算的 LD50/60 值为 7.52 Gy。此回归比较指示医疗管理会在致死造血综合征辐射剂量范围上提高 LD50 值和存活 (图 1 和表 2)。

[0147] 每种辐射剂量的死者的均值存活时间 (MST) 范围为 16.2 天至 22.2 天 (表 1)。本研究的所有剂量间的总体平均 MST 为 19.4 天。由于未实施不接受医疗管理的动物的致死率剂量-应答研究, 因此对所有使用恒河猴 / 猕猴的已发表的剂量应答研究计算 MST。此分

析产生了所有已知研究间 14.0 天的平均 MST (表 2)。

[0148] 表 2 :全身辐照和 60 天死亡率 :

[0149] 所有施用医疗管理的动物的估算 LD30/60, LD50/60 和 LD70/60 和死者的 MST

[0150]

造血综合症的致死剂量	
初步研究估算剂量(Gy [95% CI])	文献值* (Gy [95% CI])
LD30/60 = 7.09 [6.50, 7.73]	LD50/30 = 6.40 [6.06,6.75] Co-60
LD50/60 = 7.52 [7.12, 7.93]	LD50/30 = 6.65 [5.00, 10.17] 2 MV x-射线
LD70/60 = 7.97 [7.60, 8.36]	
均值存活时间 (天) **	
TBI, LINAC加医疗管理 = 19.4天	
TBI, Co-60, @ MV x-射线无医疗管理 = 14.0天	

[0151] * 一项完整的剂量应答研究 (2MV x- 射线) 在文献 (Dalrymple, et al.1965) 中可得 ;另一项 (Co-60) 是作为 Dr. MacVittie 的个人通信提供的。这些研究中没有提供医疗管理。

[0152] ** 14.0 天的平均 MST 是自所有可得文献计算的,测定无医疗管理下恒河猴 / 猕猴的造血综合症的致死剂量应答。

[0153] 接受医疗管理的死者显示与不接受医疗管理的死者相比平均延长大约 5.4 天的 MST。当在对接受有效医疗管理的经致死辐照的动物施用潜在缓和剂,诸如本发明的多 PEG 化的 G-CSF 变体 (诸如例如 Maxy-G34) 的语境中考虑时,此观察结果是重要的。在这种情况下,候选缓和剂会有额外 5 天的优势来增强骨髓再生和成熟细胞诸如嗜中性细胞生成。

[0154] C. 辐射诱发的嗜中性细胞减少症的持续时间。

[0155] 嗜中性细胞提供针对机会性感染的一线防御。在此研究中施用的致死剂量的 TBI 在 TBI 后大约 5 天内将循环绝对嗜中性细胞计数 (ANC) 降低至 $500/\mu\text{L}$, 不管辐射剂量 (表 3)。

[0156] 表 3 :血细胞减少症的持续时间 ;嗜中性细胞相关参数

[0157]

TBI	ANC第一天(d)		持续时间(d)		恢复至ANC ≥ 1000/ μ L	服用抗生素的日子	最低值 (ANC/ μ L)
	< 500/ μ L	< 100/ μ L	< 500/ μ L	< 100/ μ L			
7.20	4.6 ± 0.3	7.3 ± 0.3	11.5	11.5	23.74	19	0
7.55	5.5 ± 0.6	7.1 ± 0.4	24.0	9.8	26.7	28	0
7.85	4.6 ± 0.3	6.5 ± 0.4	14.3	10.3	21.7	18	5
8.05	5.0 ± 0.0	6.5 ± 0.3	15.0	10.3	22.3	11	0
8.40	5.0	6.4	19.0	15.0	42.0	19	0
8.90	4.6	6.0	---	---	---	---	0

[0158] * 持续时间 (d) 不包括来自死者动物的数据, 除非在死亡前发生恢复至该水平, 例如 $ANC \geq 100/\mu L$ 或 $\geq 500/\mu L$ 。

[0159] 当 $ANC < 500/\mu L$ 时, 施用抗生素, 因为预期 ANC 可能继续降低至 $< 100/\mu L$ 的值。在重度 4 级嗜中性细胞减少症 ($ANC < 100/\mu L$), 动物处于最大的感染和脓毒病/败血症风险。另外, 这些值决定施用初级 (primary) 抗生素预防的有效性。所有经致死辐照的动物中的 ANC 在接下来的 1.5 至 3.0 天内降低至 $< 100/\mu L$, 而且在除一个 (7.85Gy) 外的所有剂量分组中继续降低至绝对嗜中性细胞减少症 ($ANC \sim 0/\mu L$)。7.85Gy 分组的平均最低值为 $5/\mu L$ (表 3)。存活者的 4 级嗜中性细胞减少症 ($ANC < 100/\mu L$) 的持续时间在所有剂量分组间的范围为 9.8 至 15.0 天, 其中 $ANC < 500/\mu L$ 的持续时间在所有剂量分组间的范围为 11.5 至 24.0 天。别的嗜中性细胞相关参数显示于表 3。图 2 显示了所有暴露于剂量近似 LD30/60、LD50/60 和 LD70/60 水平的 TBI 的动物的嗜中性细胞恢复曲线。

[0160] 总之, 此研究证明了平均 2MV LINAC 光子的均匀 TBI 的剂量是致死率的重要预报项。在本文中使用的 TBI 剂量容许评估 LD30/60、LD50/60、和 LD70/60 水平来为降低与 ARS 的造血综合征有关的致死率的药剂设计功效试验。在此研究中, LD30/60、LD50/60、和 LD70/60 水平分别为 7.09、7.52 和 7.97 Gy。与设计用来评估无医疗管理的好处下恒河猴/猕猴的致死辐射剂量的研究中确定的文献值相比, 医疗管理 (如本文所述研究中施用的) 提高与 ARS 的造血综合征有关的 LD50/60, 而且延长死者的 MST。

[0161] 实施例 2: 多 PEG 化的 G-CSF 变体在辐射诱发的嗜中性细胞减少症的非人灵长类动物模型中的药效学和药动学

[0162] 研究方案:

[0163] 实验是依照实验动物护理和使用指南 (The Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, 1996) 中叙述的原则进行的。均值重量 4.6 ± 0.7 kg 的雄性恒河猴 (*Macaca mulatta*) 以后前位单侧暴露于 0.13 Gy/min 的 250kVp X-辐照, 并在服药中间 (3.00 Gy) 旋转 108E 至前后位来完成总共 6.00 Gy 暴露。动物根据需要接受临床支持, 包括抗生素、新鲜的经辐照的全血、和流体。庆大霉素 (Elkin Sinn, Cherry Hill NJ) 在处理的头七天每天 (q. d.) 以 10mg/d 肌肉内施用 (i. m.)。Baytril® (Bayer Corp., Shawnee Mission, KS) 在抗微生物处理的整个时段施用 10mg/d i. m. q. d.。

施用抗生素直至动物维持 $WBC \geq 1,000/\mu l$ 连续 3 天且达到 $ANC \geq 500/\mu l$ 。当血小板 (PLT) 计数 $< 20,000/\mu l$ 和血小板比容 (HCT) $< 18\%$ 时,动物接受来自随机供体猴的新鲜的经辐照的 (经 $15.00 Gy Co^{60}$ -辐照的) 全血,大约 30ml/ 输注。

[0164] 九只经辐照的和两只未辐照的雄性恒河猴用依照本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 (在本文中鉴别为“Maxy-G21”) 处理,而四只经辐照的恒河猴 / 猕猴用 Neulasta® 处理。四只只用稀释剂 (“媒介”) 处理的动物充当对照。在 Neulasta® 组中,两只动物采样用于 PK 分析,而所有 Maxy-G21 处理的动物包括在药动学评估中。每只动物在全身辐照后 24 小时施用单剂皮下测试化合物或媒介。采用两种不同剂量的 Maxy-G21 :100 和 $300 \mu g/kg$,分别采用 4 和 5 只猴。Neulasta® 组施用 $300 \mu g/kg$ 。两只施用 $300 \mu g/kg$ Maxy-G21 的未辐照的动物用于研究 CD34+ 细胞和体外集落形成细胞 (CFC) 的动员。自隐静脉收集血液样品。研究设计的概况提供于表 4。

[0165] 表 4 :研究方案的概要

[0166]

药物	剂量 ($\mu g/kg$)	动物数目	路径
媒介	N/A	4	s. c.
Maxy-G21	300	5	s. c.
Maxy-G21	300	4	s. c.
Maxy-G21*	100	2	s. c.
Neulasta	300	4	s. c.

[0167] * 这些动物用于研究 CD34+ 细胞和体外集落形成细胞 (CFC) 的动员。

[0168] 结果 :

[0169] 与施用自体血清 (AS) 的暴露于 $6.00 Gy$ TBI 的对照动物 (它们展现 14.8-15.7 天的嗜中性细胞减少时段) 相比,施用 $300 \mu g/kg$ Maxy-G21 的经辐照的动物展现缩短的嗜中性细胞减少时段, 7.3 ± 1.1 天。ANC 最低值也自对照动物中低达 $49 \pm 22/\mu L$ 显著改善至 $140 \pm 45/\mu L$ 。Maxy-G21 处理的分组中距恢复的时间类似地自对照值 21.2 ± 0.4 和 23.0 ± 0.0 天 (在三个分开的对照分组中) 改善至 15.5 ± 0.3 天。与采用等同剂量的 Neulasta® ($300 \mu g/kg$) 的研究内 Neulasta® 分组 ($N = 4$) 相比,发现 Maxy-G21 将嗜中性细胞减少持续时间缩短 2 天 (自 9.3 天缩短至 7.3 天),将距恢复的时间缩短 3 天 (自 18.5 天缩短至 15.5 天),并将抗生素需要缩短 3 天 (自 11.5 天缩短至 9.8 天;表 5)。

[0170] 表 5 :与用 Neulasta® 或对照自体血清 (AS) 处理相比,

[0171] 在经 $6.00 Gy$ x-辐照的恒河猴 / 猕猴中

[0172] Maxy-G21 施用对嗜中性细胞相关参数的影响 :

[0173] 嗜中性细胞减少持续时间、最低值、距恢复的时间和临床支持

[0174]

处理组	n	嗜中性细胞减少症持续时间(天)	ANC最低值(每 μ L)	距恢复的时间(天)	抗生素需要(天)
对照分组:					
AS FY01-02*	11	14.8 \pm 0.6	49 \pm 22	21.2 \pm 0.4	16.8 \pm 0.6
AS FY02-03*	7	15.2 \pm 0.6	80 \pm 30	22.0 \pm 0.3	15.4 \pm 0.3
AS 此研究	4	15.7 \pm 0.8	109 \pm 37	23.0 \pm 0.0	16.0 \pm 0.0
Maxy-G21	4	7.3 \pm 1.1	140 \pm 45	15.5 \pm 0.3	9.8 \pm 1.5
Neulasta®分组:					
此研究	4	9.3 \pm 1.5	135 \pm 16	18.5 \pm 1.7	11.5 \pm 2.4
历史	5	14.4 \pm 1.4	80 \pm 24	21.2 \pm 1.6	17.2 \pm 1.2
**Neulasta®	9	12.1 \pm 1.3	104 \pm 17	20.0 \pm 1.2	14.7 \pm 1.5

[0175]

[0176] * 分开的对照分组

[0177] ** 组合的Neulasta®分组, 包含此研究和一个来自 Mac Vittie 实验室的已发表的分组。

[0178] 当来自一项历史Neulasta®分组 (n = 5) 的数据与当前研究内Neulasta®分组 (n = 4) 组合时, 嗜中性细胞减少症持续时间为 12.1 \pm 1.3 天。与组合的Neulasta®组相比, Maxy-G21 组中的嗜中性细胞减少症持续时间显著更短 (P = 0.02) (图 3, 表 5)。对照和 Maxy-G21 处理分组只需要抗生素 9.8 天, 而组合的Neulasta®处理分组需要抗生素支持 14.7 天。以 100 μ g/kg 施用的 Maxy-G21 (数据未显示) 在此研究的条件下没有有效刺激嗜中性细胞恢复, 如通过所有嗜中性细胞相关参数所评估的。

[0179] 皮下施用 Maxy-G21 后, 药物在经辐照的和未辐照的恒河猴 / 猕猴中都在 24 至 96 小时内达到峰值血浆浓度。在两个 300 μ g/kg 剂量组中, 峰值血浆浓度比 100 μ g/kg 组要高大约三倍。在用 300 μ g/kg 药物处理的正常的和经辐照的动物中都看到两阶段 Maxy-G21 消除样式 (图 4)。

[0180] 用 300 μ g/kg Maxy-G21 处理的经辐照的动物展现早期 - 缓慢消除阶段, 均值血清半衰期 59 小时。早期 - 缓慢阶段的持续时间为 12-13 天 (图 4)。早期概况特征在于 5 只猕猴中的一致性。在注射药物后第 15 天, 缓慢阶段被更快的阶段代替, 其显示均值血清半衰期 16 小时。基于对来自 3 只动物的数据的分析, 晚期消除阶段特征在于血浆半衰期的更大的动物间差异。在用 100 μ g/kg Maxy-G21 处理的经辐照的动物中, 所述药物以单阶段消除, 均值血清半衰期 49 小时。

[0181] 未辐照的 (“正常的”) 动物以快速 - 早期和更慢 - 晚期阶段动力学概况消除 Maxy-G21 (300 μ g/kg)。晚期阶段的均值血浆半衰期为 62 小时, 比较而言, 一项已发表的研究中Neulasta®在未辐照的动物中不到 35 小时 (数据未显示)。未辐照的与经辐照的动物

之间的比较显示在 300 μ g/kg 相同剂量 Maxy-G21 的情况下, AUC 有 3 倍差异 (表 6)。

[0182] 发现 Neulasta® 以单阶段消除, 均值血浆半衰期 23 小时, 这比对 Maxy-G21 观察到的显著要快 (图 4)。发现 Neulasta® 的峰值血浆浓度与 Maxy-G21 相比要低 5-6 倍 (表 6)。11 至 15 天后, Neulasta® 在血浆中检测不到。Neulasta® 的 AUC 与 Maxy-G21 相比低大约 9-10 倍。

[0183] 表 6 : Maxy-G21 和 Neulasta® 处理的经辐照的恒河猴和 Maxy-G21 处理的未经辐照的恒河猴的药动学。

[0184] 数值呈现均值 \pm 标准偏差。

[0185]

PK 参数	Maxy-G21 300 μ g/kg 经辐照的	Maxy-G21 100 μ g/kg 经辐照的	Maxy-G21 300 μ g/kg 未辐照的	Neulasta® 300 μ g/kg 经辐照的
$C_{\text{最大值}}$ (ng/mL)	7219 \pm 1476	1961 \pm 172	5953 \pm 490	1239 \pm 658
$T_{\text{最大值}}$ (hr)	53 \pm 31	50 \pm 4	31 \pm 0	15 \pm 13
AUC (hr/mL)	928609 \pm 88114	165798 \pm 45705	359040 \pm 18837	198684 \pm 124275

[0186] 结论：

[0187] 本研究提供了证据, 即对恒河猴 / 猕猴 s. c. 施用依照本发明的一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 (在本文中鉴别为 Maxy-G21) 能够显著缩短辐射诱发的嗜中性细胞减少症 NHP 中的嗜中性细胞减少症时段。另外, 当与包括研究内 Neulasta® 分组和一个历史 Neulasta® 分组 (N = 9) 的分组相比时发现该效果超过 Neulasta®。

[0188] 总之, 在经历重度辐射诱发的骨髓抑制状态的 NHP 中以及在健康 (未经辐照的) 非人灵长类动物中, 例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 Maxy-G21 展现与单 PEG 化的 hG-CSF Neulasta® 相比显著延长的血浆半衰期。PK 数据支持这一工作假说, 即在重度辐射诱发的骨髓抑制期间以及在正常 (未经辐照的) NHP 中, 多 PEG 化的 G-CSF 变体诸如 Maxy-G21 具有相对于单 PEG 化的 Neulasta® 更大的生物利用度和持久的作用持续时间。

[0189] 实施例 3 : C57BL/6 小鼠中在致死辐射暴露后皮下施用多 PEG 化的 G-CSF 变体的辐射缓和活性

[0190] 以 1mg/kg 剂量及以两种不同致死剂量的辐射测试一种例示性多 PEG 化的 G-CSF 变体 (在本文中鉴别为 Maxy-G34) 的功效。将每种辐射剂量水平的小鼠分派入处理组, 每组 20 只小鼠 (10 只雌性和 10 只雄性), 在以 7.76 Gy 或 7.96 Gy 辐照后第 1 天、第 7 天、和第 14 天或者第 1 天和第 7 天接受 Maxy-G34。媒介处理的小鼠在第 1 天、第 7 天、和第 14 天接受稀释剂 (10mM 乙酸钠, 45mg/ml 甘露醇, 0.05mg/ml 聚山梨酯 20, pH 4.0 的无菌液体溶液)。如此, 三组小鼠接受下述处理之一：

[0191] 1. Maxy-G34 ; 7.76 Gy 辐照后 24 \pm 4hr 和 7d \pm 4hr

[0192] (Maxy-G34 d1, d7)

[0193] 2. Maxy-G34 ; 7.76 Gy 辐照后 24 \pm 4hr, 7d \pm 4hr 和 14d \pm 4hr

- [0194] (Maxy-G34 d1, d7, d14)
- [0195] 3. 媒介 ;7.76 Gy 辐照后 24±4hr, 7d±4hr 和 14d±4hr
- [0196] (媒介 d1, d7, d14)
- [0197] 4. Maxy-G34 ;7.96 Gy 辐照后 24±4hr 和 7d±4hr
- [0198] (Maxy-G34 d1, d7)
- [0199] 5. Maxy-G34 ;7.96 Gy 辐照后 24±4hr, 7d±4hr 和 14d±4hr
- [0200] (Maxy-G34 d1, d7, d14)
- [0201] 6. 媒介 ;7.96 Gy 辐照后 24±4hr, 7d±4hr 和 14d±4hr
- [0202] (媒介 d1, d7, d14)
- [0203] 小鼠以 14-16 只动物的组以下述剂量进行辐照 :
- [0204] 7.76 Gy :66.104cGy/min (11 分 44 秒暴露时间)
- [0205] 7.96 Gy :66.104cGy/min (12 分 02 秒暴露时间)
- [0206] 小鼠不施用抗生素。主要终点为 30 天总体存活, 而次要终点为均值存活时间 (MST)。
- [0207] 结果 :
- [0208] 30 天的存活者和均值存活时间 (MST) 显示于表 7、表 8、图 5 和图 6。
- [0209] 表 7 :30 天存活和 MST
- [0210]

组	拉德剂量 (Gy)	组的描述	存活者/总的数目	百分比存活	死者的均值存活时间
1	7.76	Maxy-G34 d1,d7	19/20	95	16.0
2	7.76	Maxy-G34 d1, d7, d14	19/20	95	12.0
3	7.76	媒介 d1, d7, d14	16/20	80	17.5
4	7.96	Maxy-G34 d1,d7	15/20	75	12.6
5	7.96	Maxy-G34 d1, d7, d14	17/20	85	8.3
6	7.96	媒介 d1, d7, d14	11/20	55	15.1

- [0211]
- [0212] 表 8 :存活者和均值存活时间的统计分析
- [0213] (7.76Gy 和 7.96Gy 的合并数据)
- [0214]

比较	一侧 p 值
“Maxy-G34 d1, d7”与“媒介 d1, d7, d14”比较 30 天存活者	0.0499
“Maxy-G34 d1, d7, d14”与“媒介 d1, d7, d14”比较 30 天存活者	0.017

“Maxy-G34 d1, d7”与“媒介 d1, d7”比较 MST	不显著
“Maxy-G34 d1, d7, d14”与“媒介 d1, d7, d14”比较 MST	不显著

[0215] 小鼠以 7.76Gy 辐射剂量辐照,接着在暴露后 d1, d7 和 d14 用媒介处理导致 30 天后 80% 存活 (即 LD20/30)。在暴露后 d1, d7 和 d14, 或者在暴露后 d1 和 d7 用 1mg/kg Maxy-G34 处理经 7.76Gy (LD20/30) 辐照的小鼠都将 30 天后的存活提高至 95% (表 7)。

[0216] 在 7.96 Gy 辐射剂量,媒介 d1, d7, d14 组中的存活者在暴露后 30 天为 55% (即 LD 45/30)。在 d1 和 d7 用 1mg/kg Maxy-G34 处理经 7.96 Gy (LD45/30) 辐照的小鼠在暴露后 30 天显示 75% 存活,而 Maxy-G34 d1, d7, d14 组在暴露后 30 天显示 85% 存活。在此辐射剂量水平,3 周服药方案 (d1, d7, d14) 看来比 2 周给药方案 (d1, d7) 更加有效。

[0217] 组合自两个辐射水平获得的数据 (表 8)。在此研究的条件下,3 周 Maxy-G34 给药组和 2 周 Maxy-G34 给药组都显示与媒介对照组相比统计学显著的辐照后 30 天存活升高。在此研究中采用的辐射剂量,处理组和媒介对照组之间的 MST 差异不是统计学显著的。

[0218] 虽然为了清楚和理解的目的已经较为详细地描述了上述发明,但是在阅读该公开文本后,本领域技术人员清楚可以作出在形式和细节方面的多种变化而不背离本发明的真实范围。要理解,本文中描述的实施例和实施方案仅用于例示目的,而且根据它们的多种修饰或变化会暗示给本领域技术人员且包括在本申请的精神和权限及所附权利要求的范围内。本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请、和 / 或其它文件通过述及而完整收入本文用于所有目的,程度与每一篇个别出版物、专利、专利申请、和 / 或其它文件个别指明通过述及而完整收入本文用于所有目的相同。

[0001]

序列表

<110> 马克西根公司 (Maxygen, Inc.)

<120> 通过施用多 PEG 化的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 变体来治疗辐射诱发的嗜中性细胞减少症的方法

<130> 0370.210W0

<140> PCT/US2009/057600

<141> 2009-09-18

<150> US 61/098,569

<151> 2008-09-19

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
 100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
 115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
 130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
 145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170

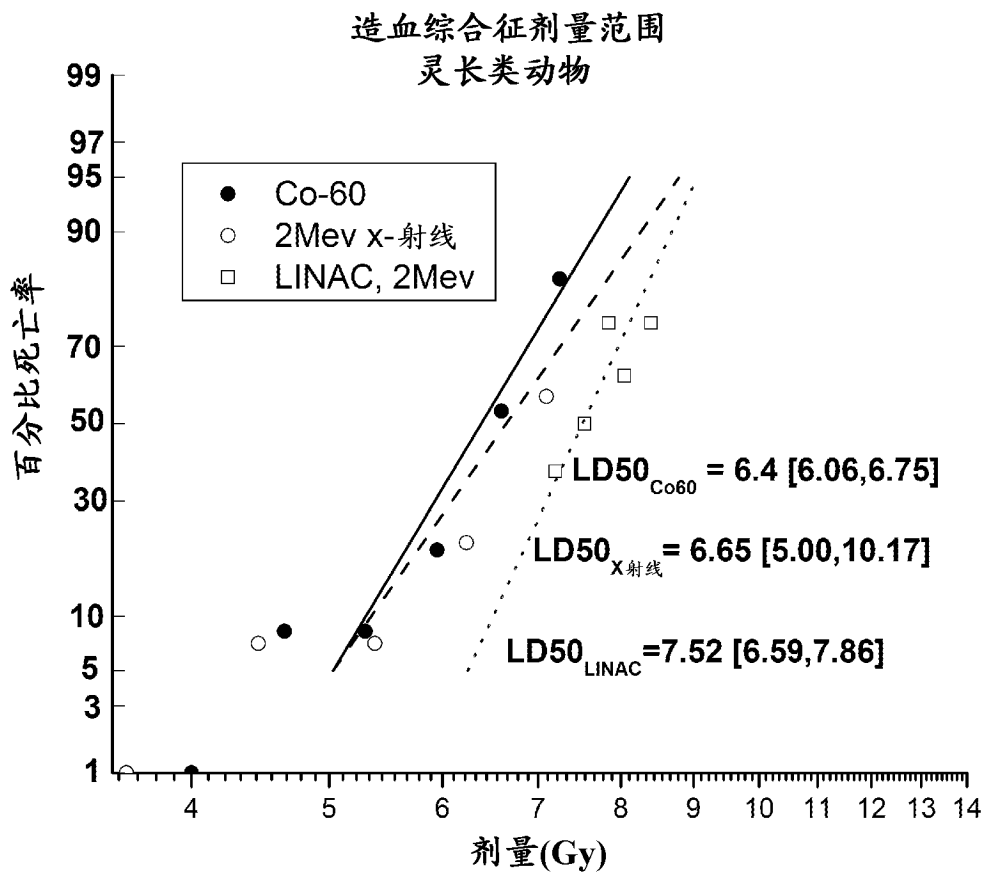


图 1

辐照(LINAC)和支持护理后恒河猴中的均值绝对嗜中性细胞计数

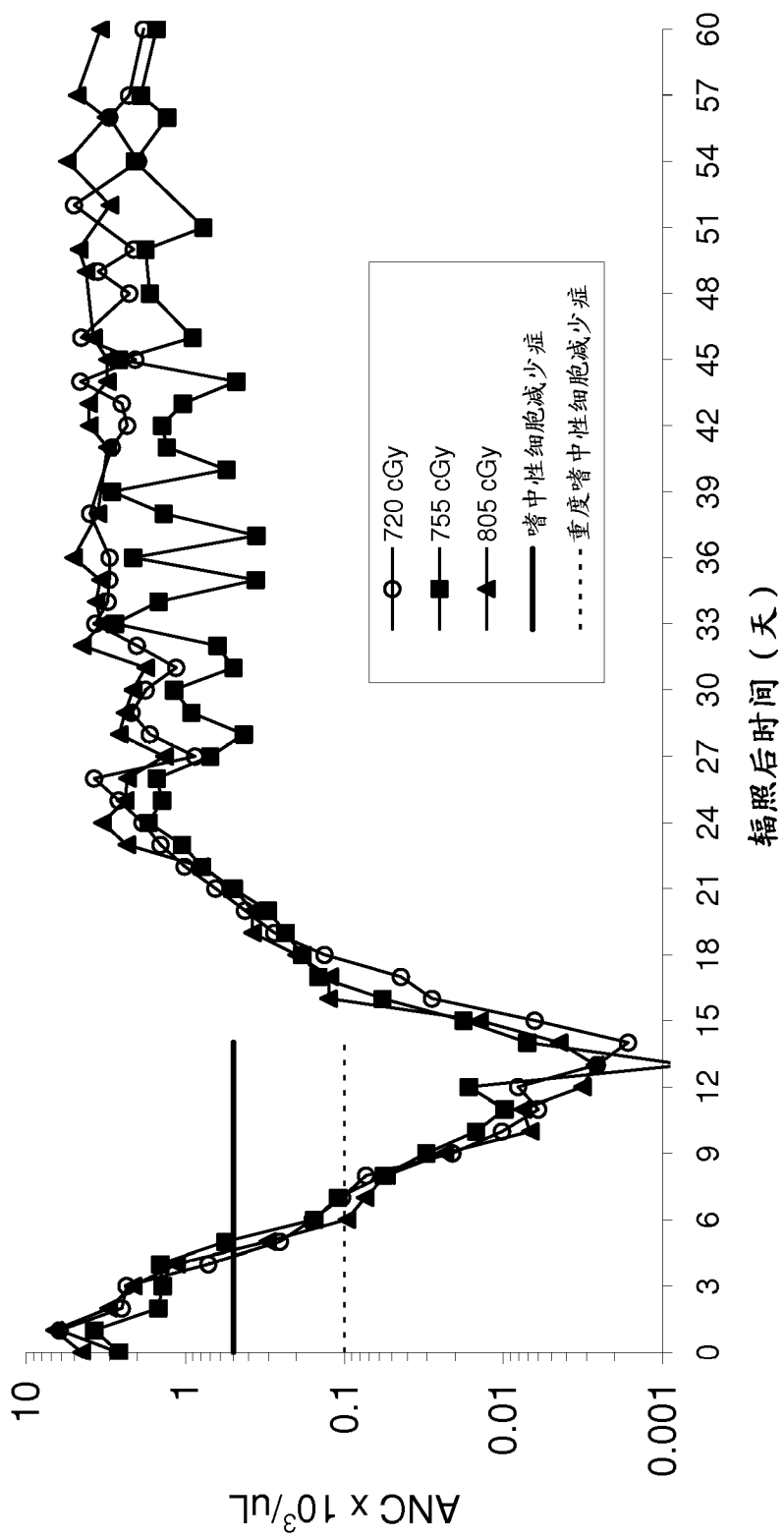


图 2

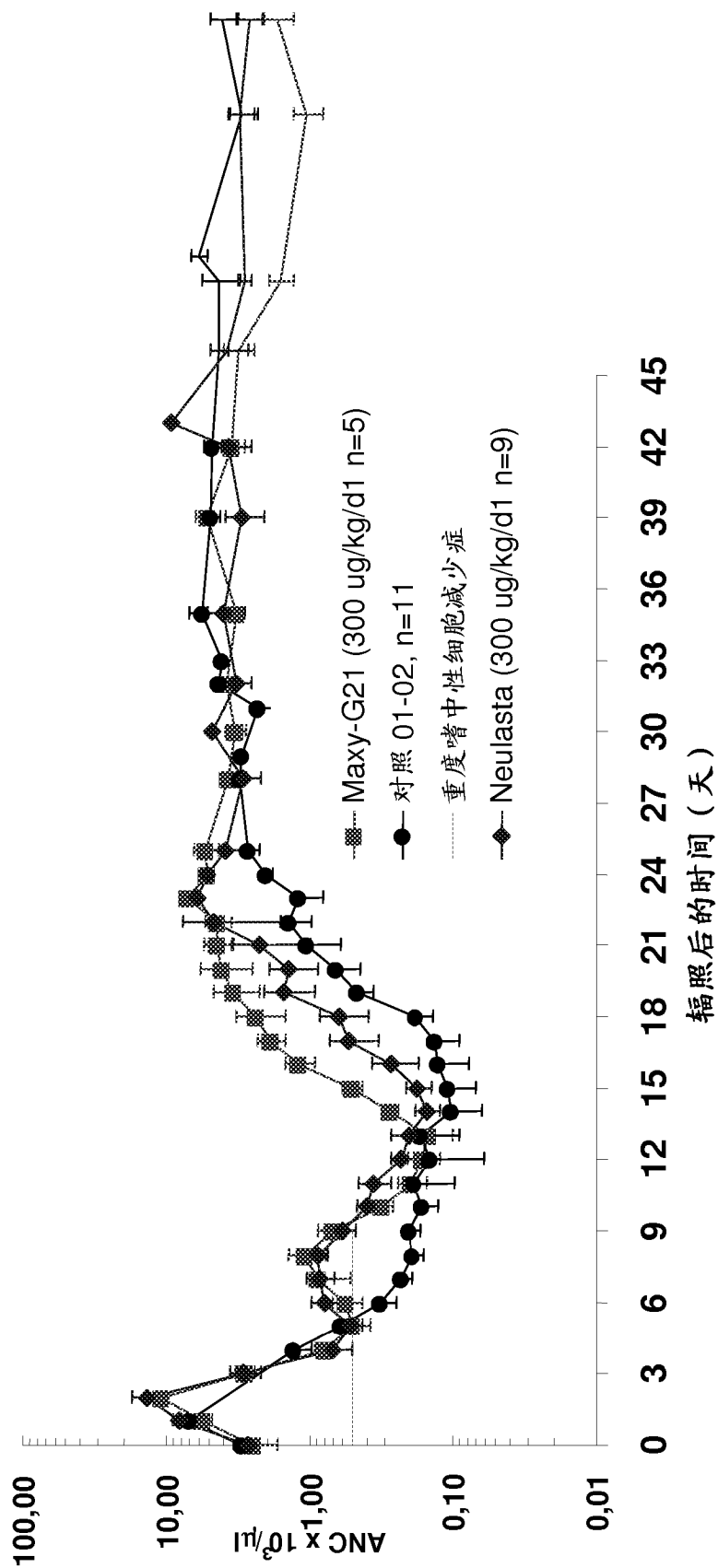


图 3

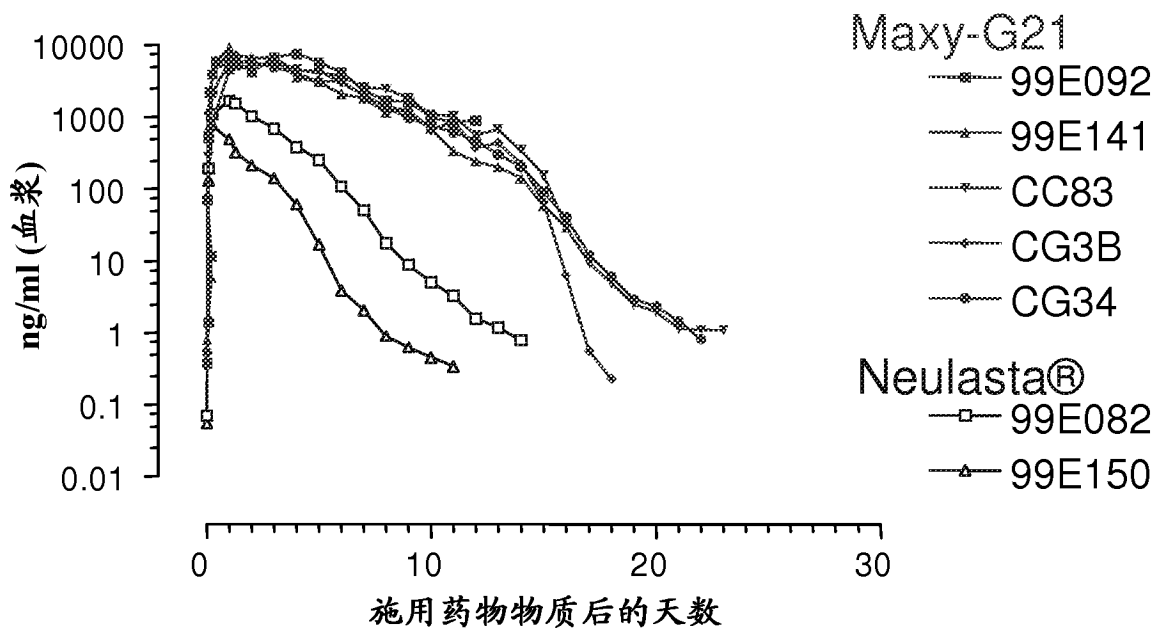


图 4

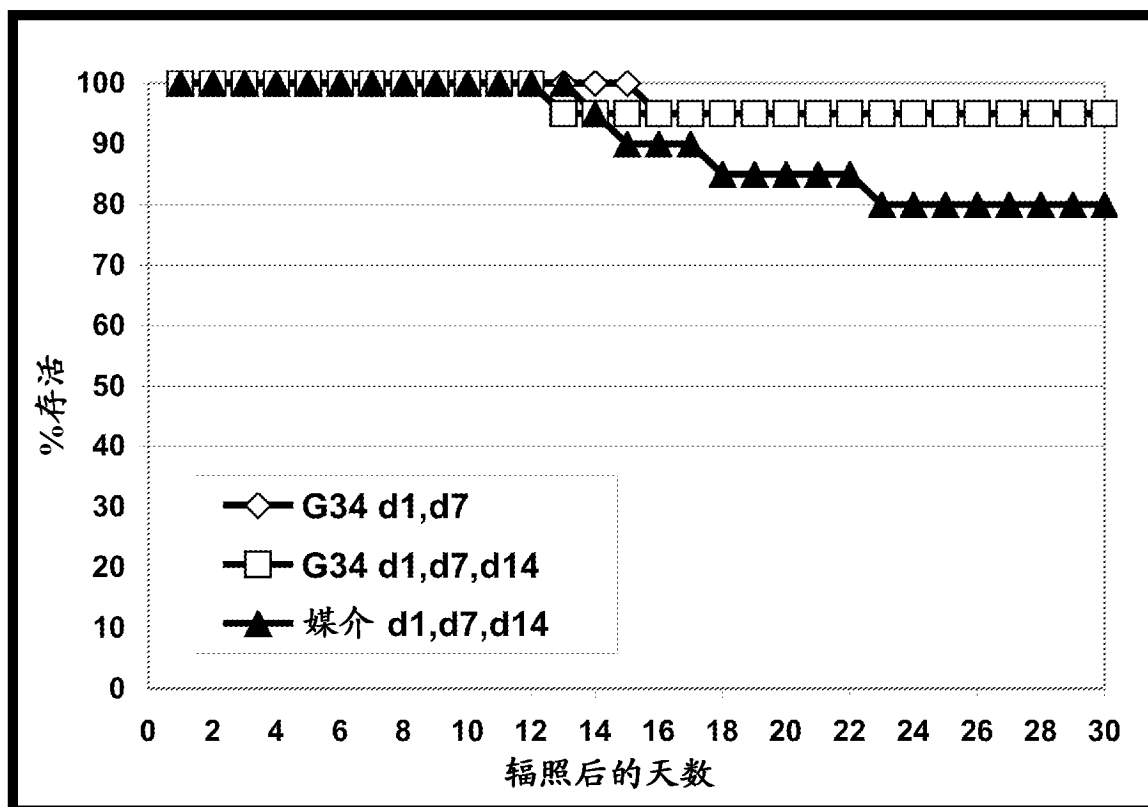


图 5

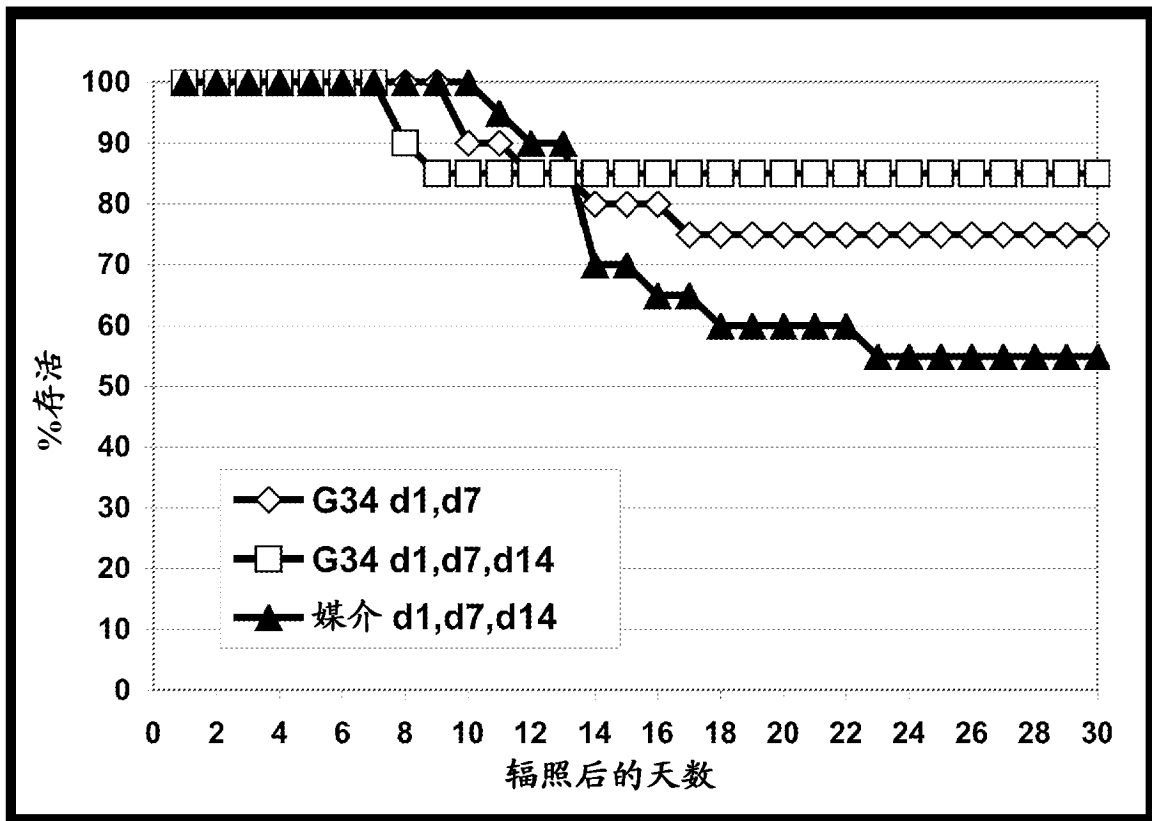


图 6