

(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2010-536858

(P2010-536858A)

(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 38/22 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 37/24 Z N A	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 7/06 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 7/06	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 13/12 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 13/12	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>C 0 7 K 14/505 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 14/505	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 137 頁)		

(21) 出願番号	特願2010-521913 (P2010-521913)	(71) 出願人	503210245
(86) (22) 出願日	平成20年7月23日 (2008. 7. 23)		アフィーマックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月19日 (2010. 4. 19)		A f f y m a x , I n c .
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/070943		アメリカ合衆国、9 4 3 0 4 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02009/025958		ニア州、パロ・アルト、ミランダ・アベニ
(87) 国際公開日	平成21年2月26日 (2009. 2. 26)		ュ、4 0 0 1
(31) 優先権主張番号	60/957, 396	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成19年8月22日 (2007. 8. 22)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100095360
(31) 優先権主張番号	60/989, 758		弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成19年11月21日 (2007. 11. 21)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
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製剤及び用途

## (57) 【要約】

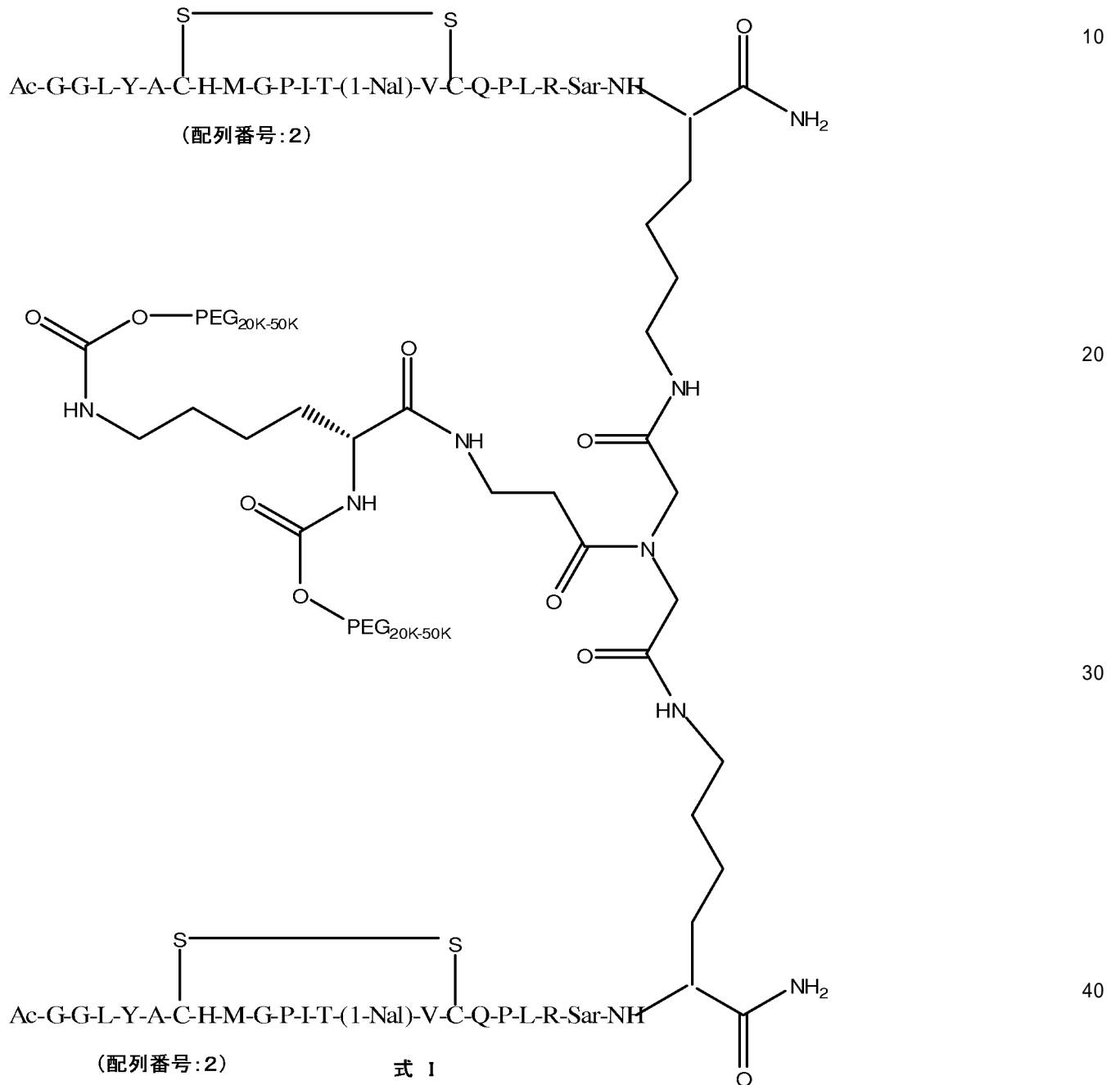
本発明は、エリスロポエチン受容体 (E P O - R) のアゴニストであるペプチド化合物に関する。本発明は、そのようなペプチド化合物を使って赤血球産生の不足又は欠陥に関連する障害を処置する治療方法にも関係する。本発明のペプチド化合物を含む医薬組成物及び投薬量も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エリスロポエチンの不足又は低数の赤血球集団若しくは欠陥性赤血球集団を特徴とする障害を有する患者を処置するための方法であって、エリスロポエチン受容体（EPO-R）に結合してそれを活性化する式 I の化合物の治療有効量を前記患者に投与することを含み、前記治療有効量が前記患者の体重 1 キログラムにつき 0.025 ~ 0.5 ミリグラムの化合物という投薬量である方法：

## 【化 89】



[ 式中、PEGは、約 20,000 ~ 約 50,000 ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール部分である ]。

## 【請求項 2】

前記化合物が式 I a：

Chemical structure of compound 1a, a dimeric peptide derivative. The structure consists of two identical peptide chains linked by a disulfide bond (S-S) between the cysteine (C) residues. Each peptide chain is represented as Ac-G-G-L-Y-A-C-H-M-G-P-I-T-(1-Nal)-V-C-Q-P-L-R-Sar-NH<sub>2</sub>. The Cysteine (C) residue is linked to a long-chain amide group, which is further linked to a complex side chain. This side chain includes a PEG<sub>20K</sub> group, a long-chain amide, and a complex amide structure with multiple amide bonds and a long-chain amide group. The structure is labeled (配列番号: 2) and 式 1a.

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

前記障害が悪性疾患に関連する貧血である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記治療有効量が前記患者の体重 1 キログラムにつき 0.075 ~ 0.5 ミリグラムの化合物という投薬量である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記投薬量が前記患者の体重 1 キログラムにつき 0.2 ~ 0.4 ミリグラムの化合物である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記治療有効量が 3 ~ 4 週間ごとに 1 回投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記障害が慢性腎臓疾患である、請求項 1 の方法。

10

## 【請求項 12】

前記治療有効量が前記患者の体重 1 キログラムにつき 0.25 ~ 1.25 ミリグラムの化合物という投薬量である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記投薬量が前記患者の体重 1 キログラムにつき 0.5 ~ 0.75 ミリグラムの化合物である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記治療有効量が 3 ~ 6 週間ごとに 1 回投与される、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記治療有効量が 4 週間ごとに 1 回投与される、請求項 14 に記載の方法。

20

## 【請求項 16】

前記治療有効量が静脈内注射又は皮下注射のいずれかによって投与される、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記治療有効量が皮下注射によって投与される、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記治療有効量が前記患者の体重 1 キログラムにつき 0.05 ~ 0.5 ミリグラムの化合物という投薬量である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記悪性疾患が固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫である、請求項 7 に記載の方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) 項に基づいて、米国仮特許出願第 60/989,758 号 (2007 年 11 月 21 日出願) 及び米国仮特許出願第 60/957,396 号 (2007 年 8 月 22 日出願) への優先権を主張する。上記出願の内容は参照によりその全体が本開示に組み込まれる。





## 【0002】

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、そのようなペプチド化合物を使って赤血球産生の不足又は欠陥に関連する障害を処置する治療方法にも関係する。本発明のペプチド化合物を含む医薬組成物も提供する。

40

## 【背景技術】

## 【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、アミノ酸位置 24、38、83、及び 126 に優先的糖鎖付加部位を有する。これはまず、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、、及びアシアロという 3 つの形態で見出されうる。 型及び  型はその糖質構成要素がわずかに異なるものの、同じ力価、生物学的活性、及び分子量を有する。アシアロ型は末端糖質 (シアル酸) が除去された  型又

50

は型である。EPOをコードするDNA配列は報告されている[米国特許第4,703,008号(Lin)]。

【0004】

EPOは赤血球前駆体細胞の有糸分裂及び分化を刺激し、よって赤血球の産生を保証する。これは、低酸素状態が優勢である時に腎臓で産生される。赤血球前駆体細胞のEPO誘発性分化中は、グロビン合成が誘導され、ヘム錯体合成が刺激され、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、より多くの鉄を帯びて、成熟赤血球中で酸素を結合する機能的なヘモグロビンを合成することが可能になる。こうして、赤血球及びそのヘモグロビンは、身体に酸素を供給する上で極めて重要な役割を果たす。これらの変化は、EPOが赤血球前駆体細胞の細胞表面上で適当な受容体と相互作用することによって開始される[例えばGraber and Krantz (1978) Ann. Rev. Med. 29:51-66参照]。

10

【0005】

EPOは、身体が健康な状態にあって組織が現存する数の赤血球から十分な酸素供給を受けている時は、血漿中に極めて低い濃度で存在する。加齢によって正常に失われる赤血球の補充を刺激するには、この正常低濃度で十分である。

【0006】

循環中の血球による酸素輸送が減少する低酸素症の状態では、循環中のEPOの量が増加する。低酸素症は、例えば出血によるかなりの失血、過剰な被曝による赤血球の破壊、高高度若しくは長時間にわたる失神による酸素摂取量の減少、又はさまざまな形態の貧血によって引き起こされうる。そのような低酸素ストレスに应答して、上昇したEPOレベルが、赤血球前駆細胞の増殖を刺激することによって、赤血球産生を増加させる。循環中の赤血球数が正常組織酸素要求量に必要な数を上回れば、循環中のEPOレベルが減少する。

20

【0007】

EPOは赤血球形成のプロセスに不可欠であるので、このホルモンは、低い赤血球産生量又は赤血球産生の欠陥を特徴とする血液障害の診断及び処置の両方に、潜在的に有用な応用を有する。最近の研究により、例えば次に挙げるような、さまざまな疾患状態、障害、及び血液異常状態に対するEPOの治療効力を推定するための根拠が得られている：ベータサラセミア[Vedovato, et al. (1984) Acta. Haematol. 71:211-213参照]；囊胞性線維症[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]；未熟児早期貧血[Haga, et al. (1983) Acta Pediatr. 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]；加齢[Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med. 103:574-580及び581-588並びにLipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509参照]；異常赤血球生成を伴う種々の新生物疾患状態[Dainiak, et al. (1983) Cancer 5:1101-1106及び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]。

30

【0008】

精製された均一なEPOが特徴づけられている[米国特許第4,677,195号(Hewick)]。EPOをコードするDNA配列が精製され、クローニングされ、発現されて、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が生産された。天然EPO上のオリゴ糖と同じオリゴ糖を有する組換えEPO分子も生産されている[Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:12059-12076参照]。

40

【0009】

EPOの生物学的効果は、一部は、細胞膜結合型受容体との相互作用によって媒介されるようである。マウス脾臓から単離された未熟赤血球系細胞を使った初期の研究では、EPO結合性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が示唆された[Sawyer,

50

et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694]。EPO結合部位の数は平均すると1細胞表面あたり800～1000と計算された。これらの結合部位のうち、およそ300がEPOを約90 pM (ピコモル濃度)の $K_d$ で結合し、残りはそれより低い約570 pMのアフィニティーでEPOを結合した[Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562]。独立した研究により、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されたEPO応答性脾臓赤芽球は、それぞれ約100 pM及び800 pMの $K_d$ 値を有する合計約400の高及び低アフィニティーEPO結合部位を有することが示唆された[Landschulz, et al. (1989) Blood 73:1476-1486]。

#### 【0010】

その後の研究で、2つの形態のEPO受容体(EPO-R)は単一の遺伝子によってコードされることが示された。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、DNA配列及びコードされるペプチド配列が、PCT公開番号WO90/08822(D'Andreaら)に記載されている。最新のモデルでは、EPOのEPO-Rへの結合が2つのEPO-R分子のダイマー化及び活性化をもたらし、それがその後のシグナル伝達ステップをもたらすことが示唆されている[例えばWatowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144参照]。

#### 【0011】

クローニングされたEPO-Rの遺伝子を利用できることで、この重要な受容体のアゴニスト及びアンタゴニストの探索が容易になる。組換え受容体タンパク質を利用できることで、さまざまなランダム及びセミランダム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研究が可能になる。これらの系には「ペプチド・オン・プラスミド(peptides on plasmids)」系[米国特許第6,270,170号に記載]、「ペプチド・オン・ファージ(peptides on phage)」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]、「コード化合成ライブラリ(encoded synthetic library)」(ESL)系[米国特許出願第946,239号(1992年9月16日出願)に記載]、及び「超大規模固定化ポリマ合成(very large scale immobilized polymer synthesis)」系[米国特許第5,143,854号; PCT公開第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]が含まれる。

#### 【0012】

EPO-Rと少なくともある程度は相互作用するペプチドが、例えば米国特許第5,773,569号、同第5,830,851号、及び同第5,986,047号(Wrightonら); PCT公開番号WO96/40749(Wrightonら); 米国特許第5,767,078号及びPCT公開第96/40772号(Johnson及びZivin); PCT公開番号WO01/38342(Balu); 並びにWO01/91780(Smith-Swintoskyら)に同定され、記載されている。特に、あるペプチドモチーフを含有する一群のペプチドであって、その構成要素がEPO-Rに結合してEPO依存的細胞増殖を刺激するものが同定されている。しかしながら、このモチーフを含有するペプチドであって現在までに同定されたものは、インビトロで、EPO依存的細胞増殖を、約20ナノモル濃度(nM)～約250 nMのEC50値で刺激する。したがって、EPOによって刺激される最大細胞増殖の50%を刺激するには、20 nM～250 nMのペプチド濃度が要求される。EPO受容体に結合するさらに別のペプチド及びそのコンストラクトが、米国仮特許出願第60/470,244号、同第60/470,245号、及び同第60/469,993号(いずれも2003年5月12日出願); 米国仮特許出願第60/627,432号及び同第60/627,433号(どちらも2004年11月11日出願); 米国非仮特許出願第10/844,968号(2004年5月12日出願); 並びに国際出願番号PCT/US2004/14886及びPCT/U

10

20

30

40

50

S 2 0 0 4 / 0 1 4 8 8 9 ( どちら も 2 0 0 4 年 5 月 1 2 日 に 出 願 さ れ 、 そ れ ぞ れ W O 2 0 0 4 / 1 0 1 6 1 1 及 び W O 2 0 0 4 / 1 0 1 6 0 6 と し て 公 開 さ れ た ) に 記 載 さ れ て い る 。 こ れ ら の 出 願 の そ れ ぞ れ は 参 照 に よ り そ の 全 体 が 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る 。

【 先 行 技 術 文 献 】

【 特 許 文 献 】

【 0 0 1 3 】

【 特 許 文 献 1 】 米 国 特 許 第 4 , 7 0 3 , 0 0 8 号 明 細 書

【 特 許 文 献 2 】 米 国 特 許 第 4 , 6 7 7 , 1 9 5 号 明 細 書

【 特 許 文 献 3 】 国 際 公 開 第 9 0 / 0 8 8 2 2 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 4 】 米 国 特 許 第 6 , 2 7 0 , 1 7 0 号 明 細 書

10

【 特 許 文 献 5 】 米 国 特 許 第 5 , 4 3 2 , 0 1 8 号 明 細 書

【 特 許 文 献 6 】 米 国 特 許 第 5 , 1 4 3 , 8 5 4 号 明 細 書

【 特 許 文 献 7 】 国 際 公 開 第 9 0 / 1 5 0 7 0 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 8 】 米 国 特 許 第 5 , 4 2 4 , 1 8 6 号 明 細 書

【 特 許 文 献 9 】 米 国 特 許 第 5 , 7 7 3 , 5 6 9 号 明 細 書

【 特 許 文 献 1 0 】 米 国 特 許 第 5 , 8 3 0 , 8 5 1 号 明 細 書

【 特 許 文 献 1 1 】 米 国 特 許 第 5 , 9 8 6 , 0 4 7 号 明 細 書

【 特 許 文 献 1 2 】 国 際 公 開 第 9 6 / 4 0 7 4 9 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 1 3 】 米 国 特 許 第 5 , 7 6 7 , 0 7 8 号 明 細 書

20

【 特 許 文 献 1 4 】 国 際 公 開 第 9 6 / 4 0 7 7 2 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 1 5 】 国 際 公 開 第 0 1 / 3 8 3 4 2 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 1 6 】 国 際 公 開 第 0 1 / 9 1 7 8 0 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 1 7 】 国 際 公 開 第 2 0 0 4 / 1 0 1 6 1 1 号 パ ン フ レ ッ ト

【 特 許 文 献 1 8 】 国 際 公 開 第 2 0 0 4 / 1 0 1 6 0 6 号 パ ン フ レ ッ ト

【 非 特 許 文 献 】

【 0 0 1 4 】

【 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. Obstet. Gynecol. 90:304-311

30

【 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

【 非 特 許 文 献 1 0 】 Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med. 103:581-588

【 非 特 許 文 献 1 1 】 Lipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509

【 非 特 許 文 献 1 2 】 Dainiak, et al. (1983) Cancer 5:1101-1106

【 非 特 許 文 献 1 3 】 Schwartz, et al. (1983) Otolaryngol. 109:269-272

【 非 特 許 文 献 1 4 】 Eschbach, et al. (1987) N. Eng. J. Med. 316:73-78

40

【 非 特 許 文 献 1 5 】 Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:12059-12076

【 非 特 許 文 献 1 6 】 Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694

【 非 特 許 文 献 1 7 】 Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562

【 非 特 許 文 献 1 8 】 Landschulz, et al. (1989) Blood 73:1476-1486

【 非 特 許 文 献 1 9 】 Jones, et al. (1990) Blood 76, 31-35

【 非 特 許 文 献 2 0 】 Noguchi, et al. (1991) Blood 78:2548-2556

【 非 特 許 文 献 2 1 】 Maouche, et al. (1991) Blood 78:2557-2563

【 非 特 許 文 献 2 2 】 Watowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-214

4

【 非 特 許 文 献 2 3 】 Cwirla, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382

50

【非特許文献 2 4】Fodor, et al. (1991) Science 251:767-773

【非特許文献 2 5】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】

【0015】

この受容体によって媒介される重要な生物学的活性の研究にとっても、疾患の処置にとっても、EPO-R アゴニストが計り知れない潜在性を有することを考えると、力価及び活性が強化されたペプチド EPO-R アゴニストを同定する必要は、依然としてある。本発明はそのような化合物を提供する。

10

【0016】

この項及び本明細書の全体における引用及び/又は引用文献の議論は、本発明の説明を理解しやすくするために記載されるに過ぎず、それらの参考文献のいずれかが本発明にとって「先行技術」であるとの承認ではない。

【課題を解決するための手段】

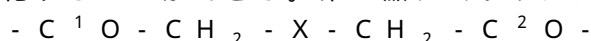
【0017】

本発明は、劇的に強化された力価及び活性を有する EPO-R アゴニストである新規ペプチド化合物を提供する。これらのペプチド化合物は、アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1 - n al) 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 - n al) 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、アミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1 - n al) 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である (ここでは、各アミノ酸が標準の一字表記で示されており、「(AcG)」は N - アセチルグリシンであり、「(1 - n al)」は 1 - ナフチルアラニンであり、「(MeG)」は N - メチルグリシン (サルコシンとも呼ばれている) である)。ペプチドダイマーの各ペプチドモノマーは、モノマーのシステイン残基間に分子内ジスルフィド結合を含有する。

20

【0018】

ペプチドモノマーは分岐第三級アミドリリンカーに共有結合で取付けることによってダイマー化することができる。第三級アミドリリンカーは



30

[式中、X は  $NC(=O)-(CH_2)_2-NH-$  であり、リンカーの  $C^1$  は第 1 ペプチドモノマーの C 末端リジン残基の - アミノ基とアミド結合を形成し、リンカーの  $C^2$  は第 2 ペプチドモノマーの C 末端リジン残基の - アミノ基とアミド結合を形成し、X の  $N^1$  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) 部分に取付けられ、ここに PEG は約 20,000 ~ 約 40,000 ダルトンの分子量を有する (用語「約」は PEG の調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)]

と表すことができる。

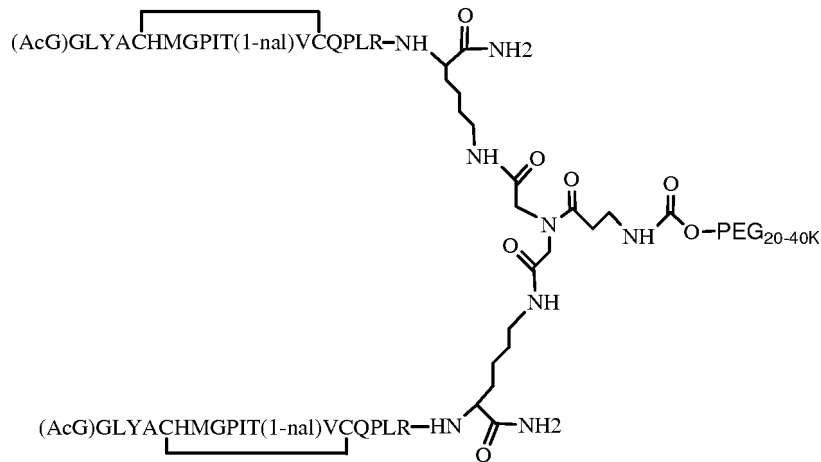
【0019】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG) GLYACHMGPIT (1 - n al) VCQPLRK (配列番号 1) を有し、リンカーの  $N^1$  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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

40



## 【化 1】

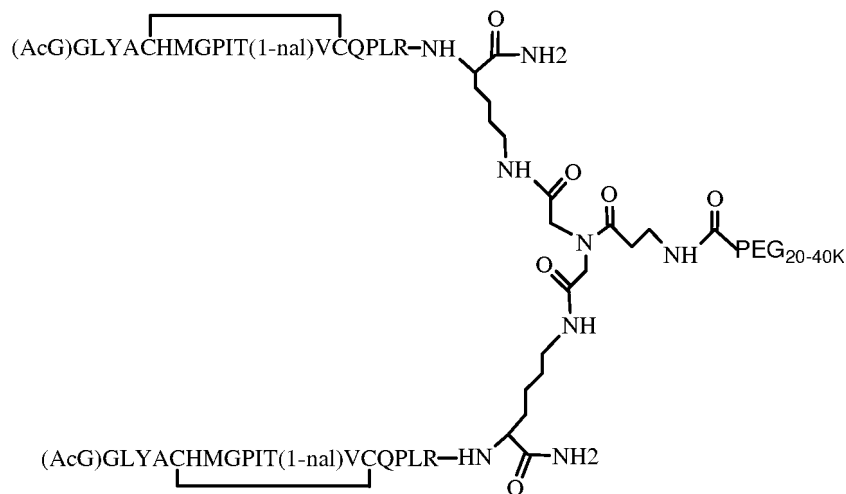


10

## 【 0 0 2 0 】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 2】



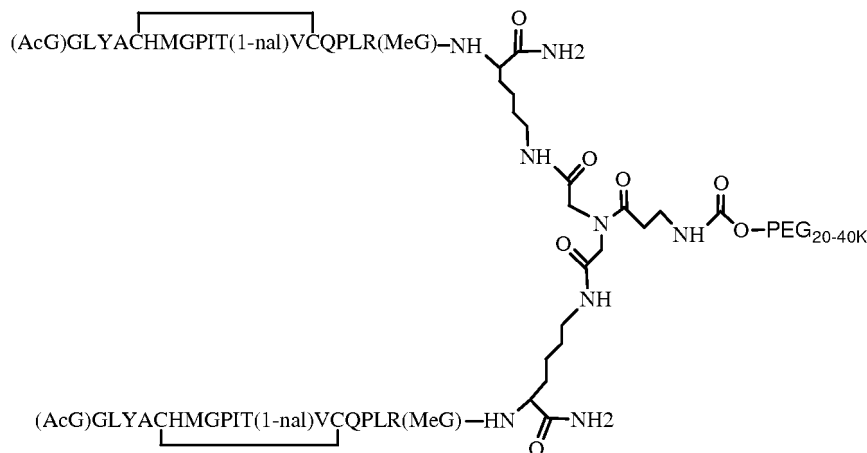
20

30

## 【 0 0 2 1 】

ホモダイマーの各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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 3】



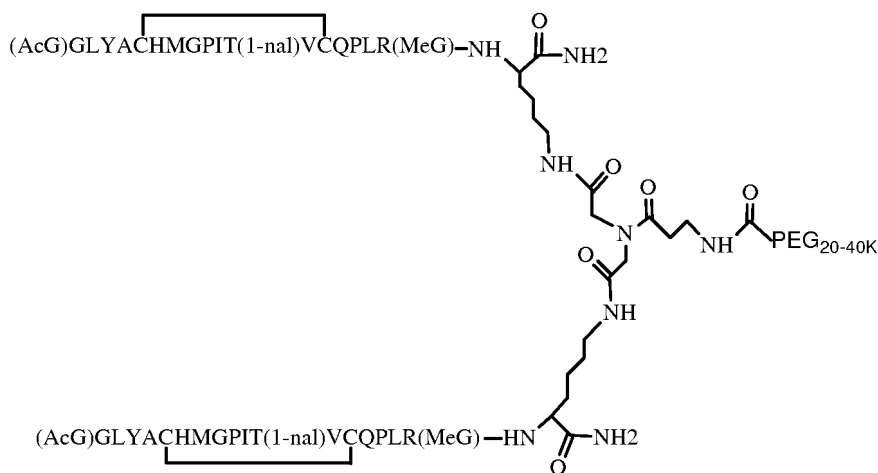
10

## 【 0 0 2 2 】

ホモダイマーの各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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

20

## 【化 4】



30

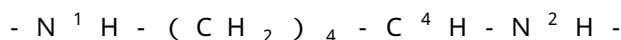
## 【 0 0 2 3 】

ペプチドモノマーは分岐第三級アミドリンカーに共有結合で取付けることによってダイマー化することもできる。第三級アミドリンカーは



[式中、Xは $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$ 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末端リジン残基の - 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末端リジン残基の - アミノ基とアミド結合を形成する]と表すことができる。本発明のペプチドダイマーはさらに、次の構造のスペーサ部分を含む：

40



[式中、スペーサのC<sup>4</sup>はXのC<sup>3</sup>に共有結合で結合され、スペーサの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) 部分に共有結合で取付けられ、スペーサの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部分に共有結合で取付けられ、ここにPEGは約10,000～約50,000ダルトンの分子量を有する(用語「約」はPEGの調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)]。各PEG部分は、個別に、10,000ダルトン(10kD)、20kD、30kD、40kD、又は50k

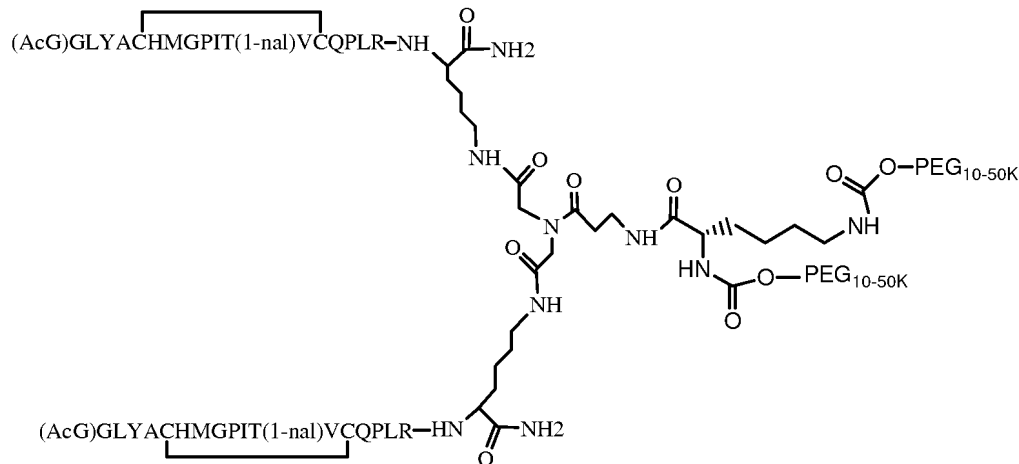
50

Dであることができる。

【0024】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH<sub>2</sub> (1-nal)VCQPLR-NH<sub>2</sub> (配列番号1)を有し、スペーサのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>がどちらもカルバメート結合を介して活性化PEG部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

【化5】



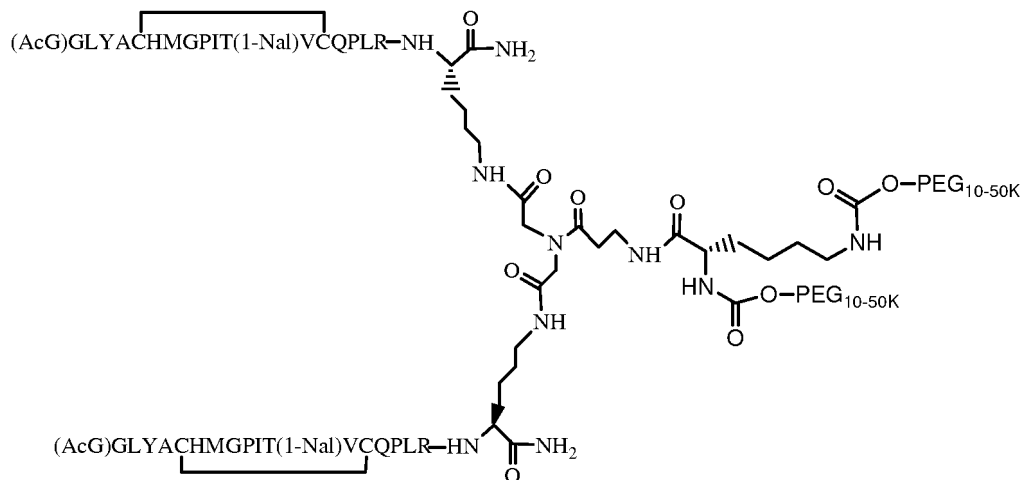
10

20

【0025】

好ましい実施形態では、2つのペプチドモノマーのC末端リジンがL-リジンである。また、2つの線状PEG部分がリジンによって(例えばmPEG<sub>2</sub>-Lys-NHSとして、又はmPEG<sub>2</sub>-リシノール-NPCとして)つながれ、そのリジンもまた好ましくはL-リジンであって、以下の立体化学を生じることは、上記の化学構造から、当業者には理解されるだろう。

【化6】



30

40

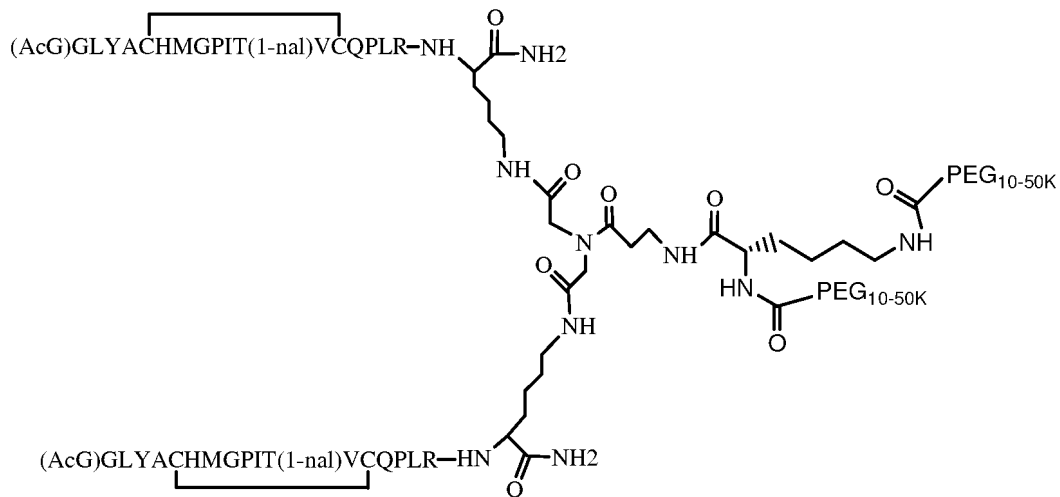
【0026】

或いは、リジン残基の1つ又はそれ以上がD-リジンであって、当業者には容易に理解されるであろう、もう一方の立体化学を生じてよい。

【0027】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH<sub>2</sub> (配列番号1)であり、スペーサのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>がどちらもアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 7】

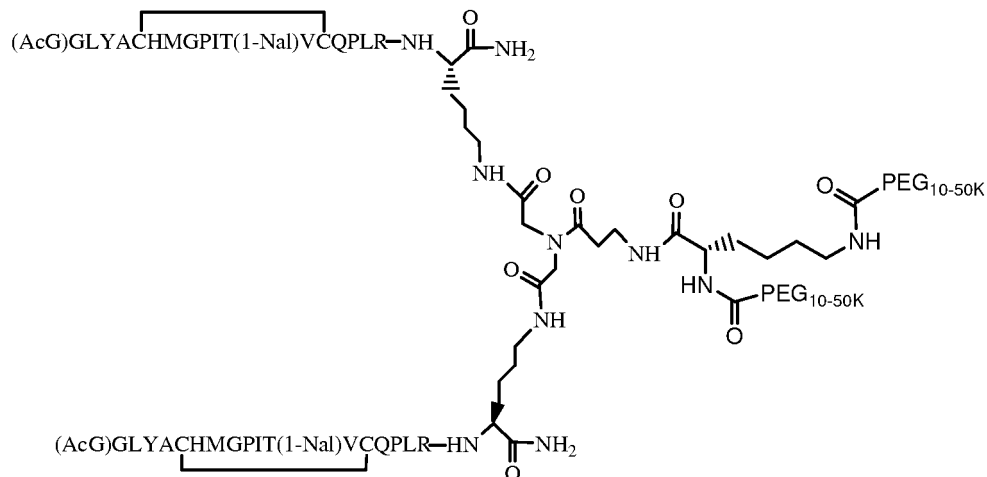


10

## 【 0 0 2 8 】

ここでも、この化合物中のリジン分子は好ましくは全て L - リジンであって、次の立体化学を生じる。

## 【化 8】



20

30

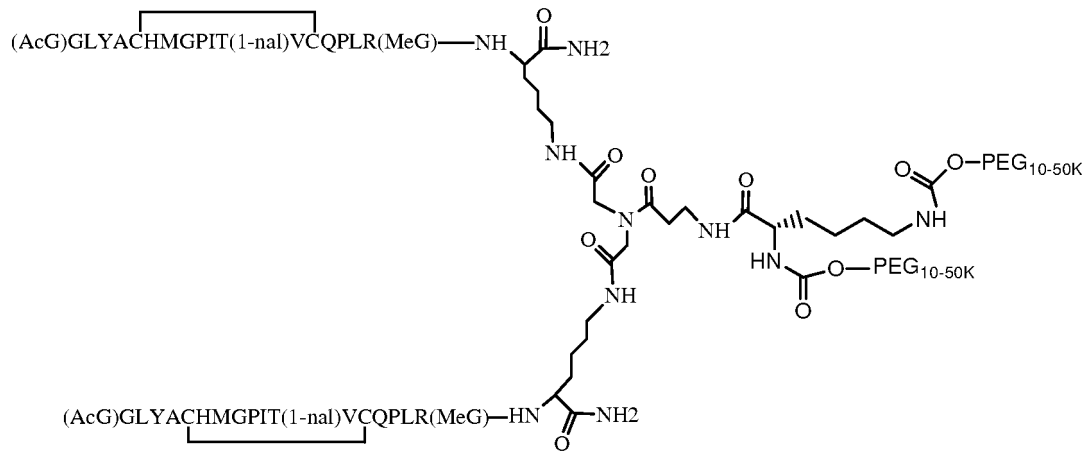
## 【 0 0 2 9 】

或いは、リジン残基の 1 つ又はそれ以上が D - リジンであって、当業者には容易に理解されるであろう、もう一方の立体化学を生じてよい。

## 【 0 0 3 0 】

ホモダイマーの各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、スパーサの N<sup>1</sup> 及び N<sup>2</sup> がどちらもカルバメート結合を介して活性化 PEG 部分に共有結合で取付けられ、Y がカルバメート基である場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

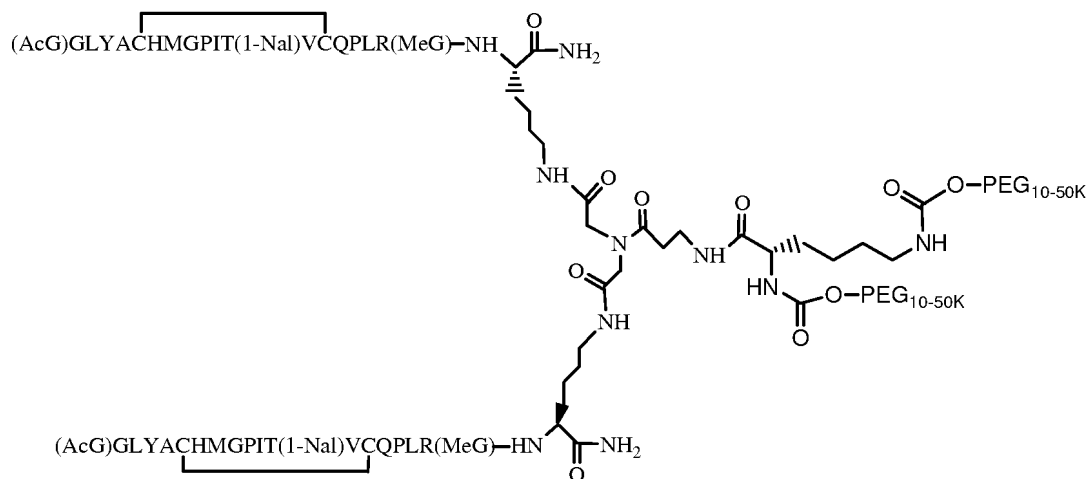
## 【化 9】



## 【 0 0 3 1】

好ましくは、この分子においてペプチドモノマーと線状PEG部分とをつなぐリジン残基は全てL-リジンであって、次の立体化学を生じる。

## 【化 10】



30

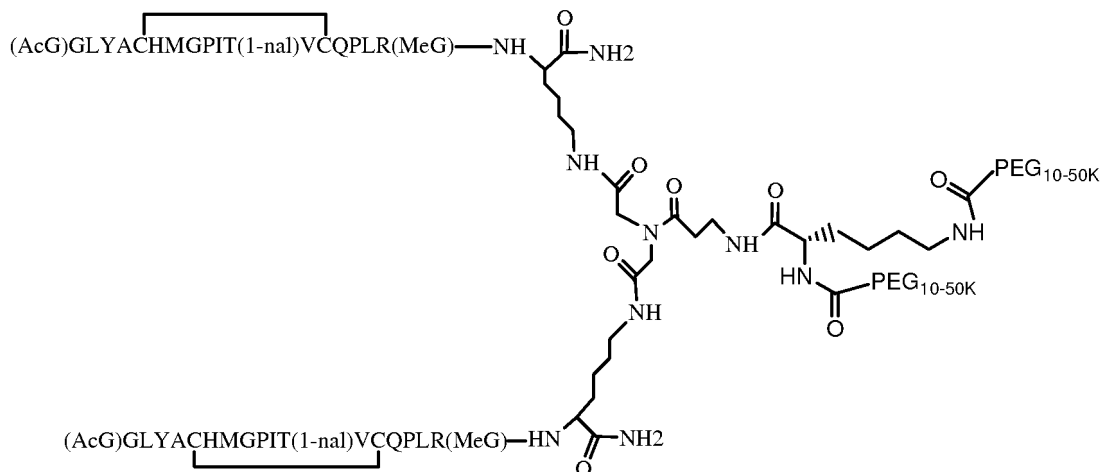
## 【 0 0 3 2】

或いは、リジン残基の1つ又はそれ以上がD-リジンであって、当業者には容易に理解されるであろう、もう一方の立体化学を生じてよい。

## 【 0 0 3 3】

ホモダイマーの各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、スペーサのN<sup>1</sup>及びN<sup>2</sup>がどちらもアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 1 1】

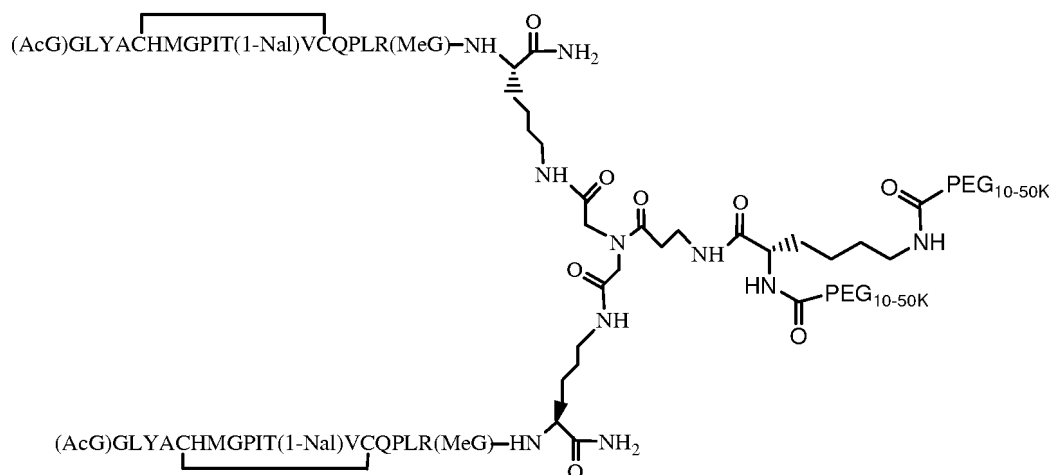


10

## 【 0 0 3 4】

好ましくは、この分子においてペプチドモノマーと線状 P E G 部分とをつなぐリジン残基は全て L - リジンであって、次の立体化学を生じる。

## 【化 1 2】



20

30

## 【 0 0 3 5】

別の実施形態では、リジン残基の 1 つ又はそれ以上が D - リジンであって、当業者には容易に理解されるであろう、もう一方の立体化学を生じてよい。

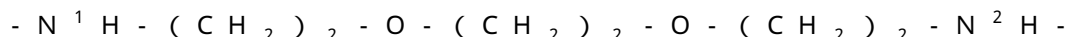
## 【 0 0 3 6】

ペプチドモノマーはリジンリンカーへの取付けによってダイマー化することもでき、この場合は、一方のペプチドモノマーがその C 末端でリジンの - アミノ基に取付けられ、第 2 のペプチドモノマーがその C 末端でリジンの - アミノ基に取付けられる。

## 【 0 0 3 7】

本発明のペプチドダイマーは、さらに、次の構造のスペーサ部分を含む。

40



一方の末端では、スペーサの  $N^1$  が、アミド結合を介して、リジンリンカーのカルボニル炭素に取付けられる。反対の末端では、スペーサの  $N^2$  が、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 ( P E G ) 部分に取付けられ、ここに P E G は約 20,000 ~ 約 40,000 ダルトンの分子量を有する (用語「約」は P E G の調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)。

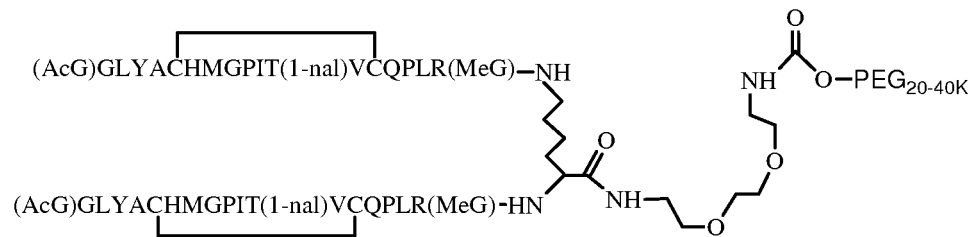
## 【 0 0 3 8】

スペーサ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 ( P E G ) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物 ( 配列番号 3 ) は、次のように表すこと

50

ができる。

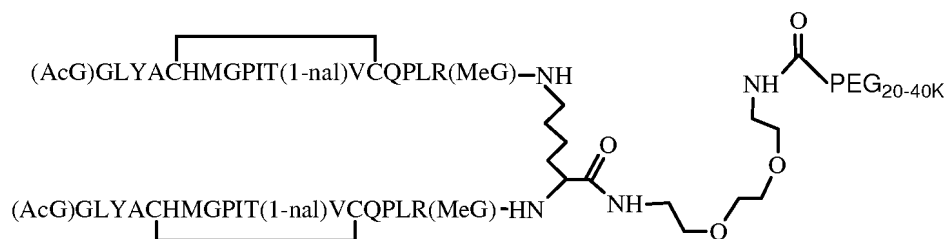
【化 1 3】



【 0 0 3 9】

スペーサ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）部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物（配列番号 3）は、次のように表すことができる。

【化 1 4】



【 0 0 4 0】

本発明はさらに、上記のペプチド化合物を使ってさまざまな医学的状態を処置するための方法を提供する。本方法には、エリスロポエチンの不足又は低数の赤血球集団若しくは欠陥性赤血球集団を特徴とする障害を有する患者を、その患者に上記化合物の 1 つの治療有効量を投与することによって処置することが含まれる。一定の実施形態では、障害が、末期腎不全又は透析；慢性腎臓疾患、AIDS、自己免疫疾患又は悪性疾患に関連する貧血；ベータサラセミア；嚢胞性線維症；未熟児早期貧血；慢性炎症性疾患に関連する貧血；脊髄損傷；急性失血；加齢；又は異常赤血球生成を伴う新生物疾患状態である。さらにまた、一定の実施形態では、障害が腎不全又は透析であり、治療有効量が患者の体重 1 キログラムにつき 0.025 ~ 0.2 ミリグラムの化合物という投薬量である。別の実施形態では、障害が腎不全又は透析であり、治療有効量が患者の体重 1 キログラムにつき 0.05 ~ 0.1 ミリグラムの化合物という投薬量である。一定の実施形態では、障害が悪性疾患に関連する貧血であり、治療有効量が患者の体重 1 キログラムにつき 0.05 ~ 0.5 ミリグラムの化合物という投薬量であるか、或いは患者の体重 1 キログラムにつき 0.075 ~ 0.5 ミリグラムの化合物である。別の実施形態では、障害が悪性疾患に関連する貧血であり、治療有効量が患者の体重 1 キログラムにつき 0.2 ~ 0.4 ミリグラムの化合物という投薬量である。治療有効量は 3 ~ 4 週間ごとに 1 回投与することができる。

【 0 0 4 1】

好ましい実施形態では、障害が慢性腎臓疾患であり、治療有効量が好ましくは患者の体重 1 キログラムにつき 0.25 ~ 1.25 ミリグラムの化合物という投薬量であり、より好ましくは、投薬量は患者の体重 1 キログラムにつき 0.5 ~ 0.75 ミリグラムの化合物である。治療有効量は 3 ~ 6 週間ごとに 1 回投与することができる。好ましい実施形態では、治療有効量が 4 週間ごとに 1 回投与される。治療有効量は静脈内注射又は皮下注射によって投与することができる。好ましい実施形態では、治療有効量が皮下注射によって投与される。特に好ましい実施形態では、慢性腎臓疾患患者が透析前である。

【 0 0 4 2】

本発明はさらに、上記ペプチド化合物を含んでなる医薬組成物を提供する。一定の実施形態では、PEG が約 20,000 ダルトンの分子量を有する。別の実施形態では、医薬組成物が上記の化合物のいずれか 1 つ及び医薬的に許容できる担体を含む。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0043】

【図1】0～12週間でベースラインからの平均網状赤血球変化を示す。

【図2】0～12週間でベースラインからの平均ヘモグロビン（Hgb）変化を示す。

【図3】用量及び処置継続期間による貧血の補正（Hgb > 11 g / dL）を示す。

【図4】12～22週間でベースラインからの平均ヘモグロビン（Hgb）変化を示す。

【図5】0～12週間で0.05 mg / kg コホートにおける個々の患者に関するベースラインからのヘモグロビン（Hgb）変化を示す。

【図6】3、6、9、及び12週間で、0.5 mg / kg、0.1 mg / kg、0.15 mg / kg、及び0.2 mg / kg コホートにおいて、個々の患者のベースラインから1 g / dLのヘモグロビン増加を示した患者のパーセントを示す。

【図7】0.5 mg / kg、0.1 mg / kg、0.15 mg / kg、及び0.2 mg / kg 用量コホートにおいて、2 g / dLのヘモグロビン増加、又は1 g / dLの増加と少なくとも11 g / dLのヘモグロビン値との組合せを示す患者のパーセントを示す。

【図8】0～14週間で0.1 mg / kg、0.15 mg / kg、及び0.2 mg / kg 用量コホートの患者に関するベースラインからのヘモグロビン増加を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0044】

## 定義

ペプチド中のアミノ酸残基は次のように略記する：フェニルアラニンはPhe又はF；ロイシンはLeu又はL；イソロイシンはIle又はI；メチオニンはMet又はM；バリンはVal又はV；セリンはSer又はS；プロリンはPro又はP；スレオニンはThr又はT；アラニンはAla又はA；チロシンはTyr又はY；ヒスチジンはHis又はH；グルタミンはGln又はQ；アスパラギンはAsn又はN；リジンはLys又はK；アスパラギン酸はAsp又はD；グルタミン酸はGlu又はE；システインはCys又はC；トリプトファンはTrp又はW；アルギニンはArg又はR；及びグリシンはGly又はGである。ペプチド中の異常アミノ酸は次のように略記する：1-ナフチルアラニンは1-nal又はNp；N-メチルグリシン（サルコシンとも呼ばれている）はMeG又はSc；及びアセチル化グリシン（N-アセチルグリシン）はAcGである。

## 【0045】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、アミド結合によって一つにつながれたアミノ酸であるアミノ酸モノマーのポリマーを指す。したがって、ポリペプチドは少なくとも2アミノ酸残基の長さを有し、通常はそれより長い。一般に、用語「ペプチド」は、長さが数アミノ酸残基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長さが約50アミノ酸残基を超えない。より好ましくは、約17～約40アミノ酸残基の長さである。ポリペプチドは、ペプチドとは異なり、アミノ酸残基をいくつ含んでもよい。したがって、用語ポリペプチドは、ペプチドに加えて、より長いアミノ酸の配列を包含する。

## 【0046】

本明細書で使用する表現「医薬的に許容できる」は、「一般に安全と認められる（generally regarded as safe）」、例えば生理的に忍容でき、ヒトに投与した場合に、通例、アレルギー反応又は類似の有害反応、例えば腹痛（gastric upset）、めまいなどを生じない、分子実体及び組成物を指す。好ましくは、本明細書に使用する用語「医薬的に許容できる」は、哺乳動物（より具体的にはヒト）における使用に関して、連邦政府若しくは州政府の規制当局によって承認されていること、又は米国薬局方若しくは他の広く認識されている薬局方に記載されていることを意味する。用語「担体」は、本化合物と一緒に投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、又は溶剤を指す。そのような医薬担体は滅菌された液体、例えば水、及び油（石油、動物、植物又は合成由来のものを含み、例えばラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などを含む）であることができる。水又は食塩水溶液及びデキ



ストロース水溶液及びグリセロール水溶液は、担体として、特に注射溶液剤用の担体として、好ましく使用される。適切な医薬担体は、E. W. Martinにより、「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

#### 【0047】

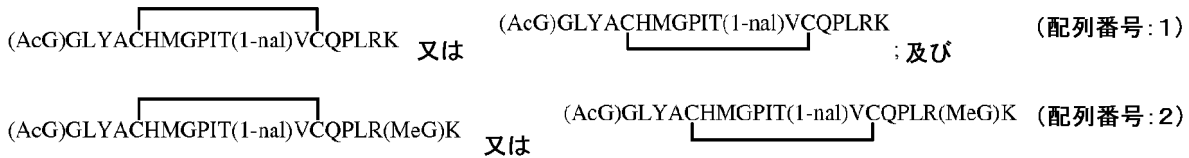
本明細書で使用する用語「アゴニスト」は、その相補的生物活性受容体に結合してそれを活性化することにより、その受容体における生物学的応答を引き起こすか、又はその受容体の既存の生物学的活性を強化する、生物活性リガンドを指す。

#### 【0048】

EPO-Rアゴニストである新規ペプチド

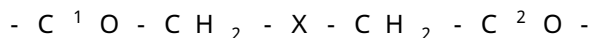
本発明は、劇的に強化された力価及び活性を有するEPO-Rアゴニストである新規ペプチド化合物を提供する。これらのペプチド化合物は、アミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK(配列番号1)を有するペプチドモノマーのホモダイマー、又はアミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K(配列番号2)を有するペプチドモノマーのホモダイマーである(ここでは、各アミノ酸が標準の一字表記で示されており、「(AcG)」はN-アセチルグリシンであり、「(1-nal)」は1-ナフチルアラニンであり、「(MeG)」はN-メチルグリシン(サルコシンとも呼ばれている)である)。ペプチドダイマーの各ペプチドモノマーは、モノマーのシステイン残基間に分子内ジスルフィド結合を含有する。そのようなモノマーは次のように図解することができる。

#### 【化15】



#### 【0049】

これらのモノマーペプチドをダイマー化すると、強化されたEPO-Rアゴニスト活性を有するペプチドダイマーが得られる。リンカー(L<sub>K</sub>)部分は、各モノマーのC末端リジン残基に同時に結合することによって2つのペプチドモノマーのC末端を架橋する分岐第三級アミドである。第三級アミドリンカーは

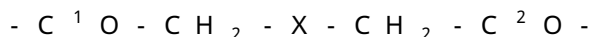


[式中、XはNCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N<sup>1</sup>H-であり、リンカーのC<sup>1</sup>は第1ペプチドモノマーのC末端リジン残基の-アミノ基とアミド結合を形成し、リンカーのC<sup>2</sup>は第2ペプチドモノマーのC末端リジン残基の-アミノ基とアミド結合を形成し、XのN<sup>1</sup>はカルバメート結合又はアミド結合を介して活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に取付けられ、ここにPEGは約20,000~約40,000ダルトンの分子量を有する(用語「約」はPEGの調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)]

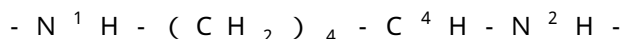
と表すことができる。

#### 【0050】

第三級アミドリンカーは



[式中、XはNCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-C<sup>3</sup>O-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末端リジン残基の-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末端リジン残基の-アミノ基とアミド結合を形成する]と表すこともできる。本発明のペプチドダイマーはさらに、次の構造のスペーサ部分を含む:



[式中、スペーサのC<sup>4</sup>はXのC<sup>3</sup>に共有結合で結合され、スペーサの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部分に共有結合で取付けられ、スペーサの

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部分に共有結合で取付けられ、ここにPEGは約10,000～約60,000ダルトンの分子量を有する(用語「約」はPEGの調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)】。

#### 【0051】

したがって本発明の新規ペプチドは、カルバメート結合又はアミド結合によっ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で取付けられたPEG部分も含有することができる。PEGは医薬的に許容できる水溶性ポリマーである。本発明で使用されるPEGは、約20キロダルトン(20K)～約60Kの分子量を有する線状非分岐PEGであることができる(用語「約」はPEGの調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)。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、考慮すべき事項、例えば望ましい投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する耐性、生物学的活性に対する効果があるとすれば、その効果、取扱いの容易さ、抗原性の程度又は欠如、及びPEGが治療ペプチドに及ぼす他の公知の効果などに基づいて、望ましいポリマサイズを選択することができるだろう。

10

#### 【0052】

本発明のペプチド、ペプチドダイマー及びペプチドに基づく他の分子は、水溶性ポリマーを分子(例えばペプチド+スペーサ)の受容体結合部分に連結するためのさまざまなケミストリーのいずれかを使って、水溶性ポリマー(例えばPEG)に取付けることができる。典型的な実施形態では、単一の取付け接合部を利用して、水溶性ポリマーを受容体結合部位に共有結合で取付けるが、これに代わる実施形態では、スペーサ及び/又は一方若しくは両方のペプチド鎖への共有結合取付け接合部を含みうる複数の取付け接合部を使用してもよく、これには、異なる水溶性ポリマー種が異なる取付け接合部で受容体結合部位に取付けられるというさらなる変形が含まれる。いくつかの実施形態では、ダイマー又はさらに高次の多量体が、異なるペプチド鎖種を含むだろう(すなわちヘテロダイマー又は他のヘテロ多量体)。限定するわけではないが、一例として、ダイマーはPEG取付け接合部を有する第1ペプチド鎖を含み、第2ペプチド鎖は、PEG取付け接合部を欠くか、第1ペプチド鎖とは異なる連結ケミストリーを利用することができ、いくつかの変形では、スペーサがPEG取付け接合部位を含有するか、PEG取付け接合部位を欠くことができ、前記スペーサは、もしPEG化されるのであれば、第1及び/又は第2ペプチド鎖とは異なる連結ケミストリーを利用することができる。これに代わる実施形態では、受容体結合部分のスペーサ部分に取付けられたPEG、及びその分子のペプチド部分のアミノ酸の1つの側鎖にコンジュゲートされた異なる水溶性ポリマー(例えば糖質)を利用する。

20

30

#### 【0053】

多種多様なポリエチレングリコール(PEG)種を受容体結合部位(ペプチド+スペーサ)のPEG化に使用することができる。適切な反応性PEG試薬は実質上どれでも使用することができる。好ましい実施形態では、反応性PEG試薬が、受容体結合部位へのコンジュゲーション時に、カルバメート結合又はアミド結合の形成をもたらすだろう。限定するわけではないが、適切な反応性PEG種には、日油株式会社(150-6019東京都渋谷区恵比寿4丁目20-3エビスガーデンプレイスタワー)のDrug Delivery Systemsカタログ(2003)及びNektar Therapeutics(35806アラバマ州ハンツビル、ディスカバリドライブ490)のMolecular Engineeringカタログ(2003)で販売されているものが含まれる。例えば、限定するわけではないが、次のPEG試薬はさまざまな実施形態においてしばしば好ましい:mPEG2-NHS、mPEG2-ALD、マルチアーム(multi-Arm)PEG、mPEG(MAL)2、mPEG2(MAL)、mPEG-NH2、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-チオエステル、mPEG-ダブルエステル、mPEG-BTC、mPEG-ButyRALD、mPEG-ACET、ヘテロ官能性PEG(NH2-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NH

40

50

10

## 20

20

## 30

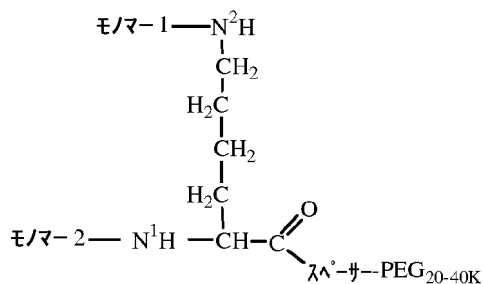
30

## 40

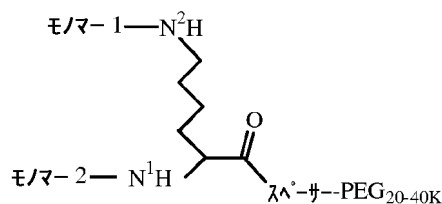


## 【化 17】

式 I



式 II

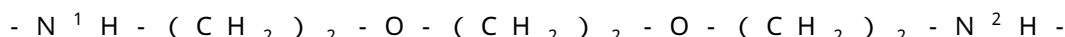


10

式 I 及び式 II において、 $\text{N}^2$  は、リジンの  $\alpha$ -アミノ基の窒素原子を表し、 $\text{N}^1$  はリジンの  $\omega$ -アミノ基の窒素原子を表す。

## 【0057】

本発明のペプチドダイマーはさらに、次の構造のスペーサ部分を含む。



一方の末端では、スペーサの  $\text{N}^1$  が、アミド結合を介して、リジンリンカーのカルボニル炭素に取付けられる。反対の末端では、スペーサの  $\text{N}^2$  が、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) 部分に取付けられ、ここに PEG は約 10,000 ~ 約 60,000 ダルトンの分子量を有する (用語「約」は PEG の調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)。より好ましくは、PEG が約 20,000 ~ 約 40,000 ダルトンの分子量を有する。

20

## 【0058】

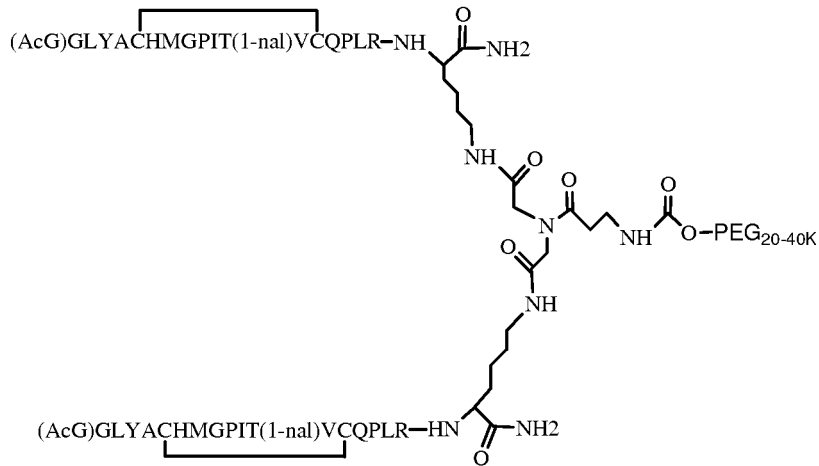
したがって本発明の新規ペプチドは、そのペプチドダイマーに共有結合で取付けられる PEG 部分も含有する。PEG は医薬的に許容できる水溶性ポリマーである。本発明で使用する PEG は、約 20 キロダルトン (20K) ~ 約 60 K の分子量を有する線状非分岐 PEG であることができる (用語「約」は PEG の調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す)。最も好ましくは、PEG は約 20 K ~ 約 40 K の分子量を有し、さらにより好ましくは約 30 K ~ 約 40 K の分子量を有する。当業者は、考慮すべき事項、例えば望ましい投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する耐性、生物学的活性に対する効果があるとすれば、その効果、取扱いの容易さ、抗原性の程度又は欠如、及び PEG が治療ペプチドに及ぼす他の公知の効果などに基づいて、望ましいポリマーサイズを選択することができるだろう。

30

## 【0059】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPI T (1 - n a l)VCQPLRK (配列番号 1) を有し、リンカーの  $\text{N}^1$  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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 18】

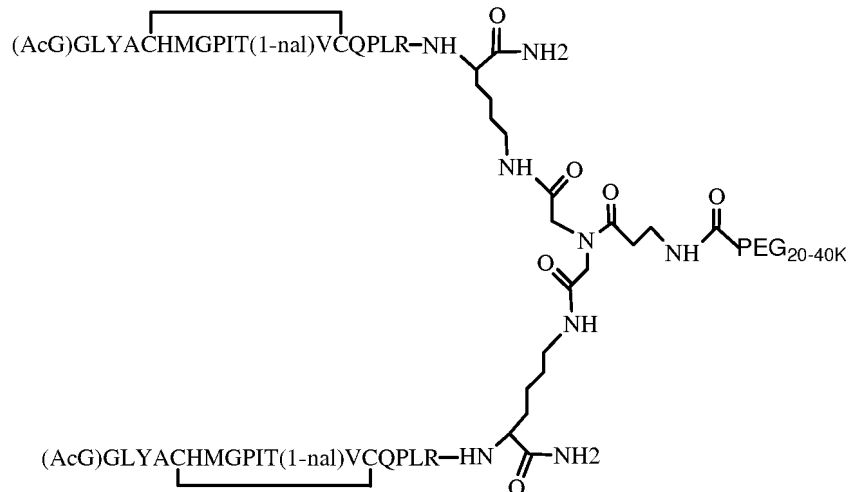


10

## 【0060】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 19】



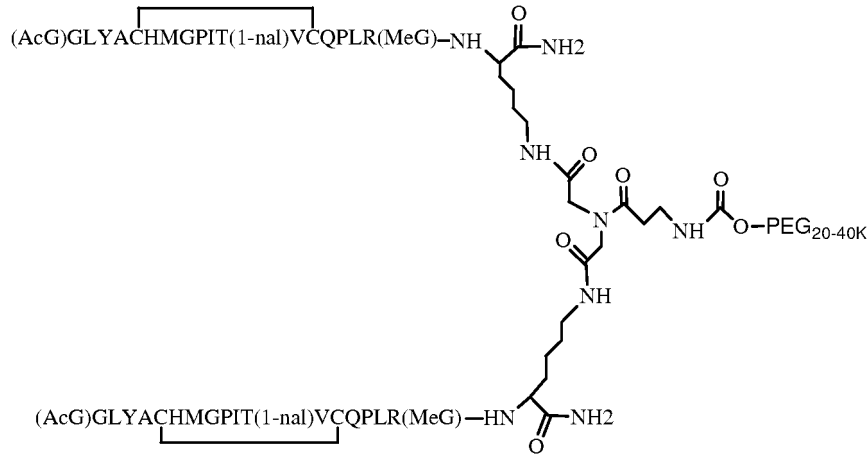
20

30

## 【0061】

ホモダイマーの各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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 2 0】

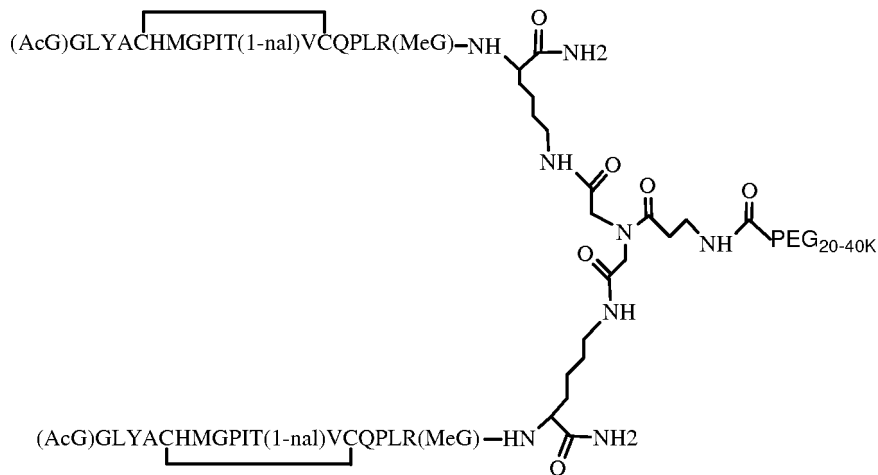


10

## 【 0 0 6 2】

ホモダイマーの各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) 部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 2 1】



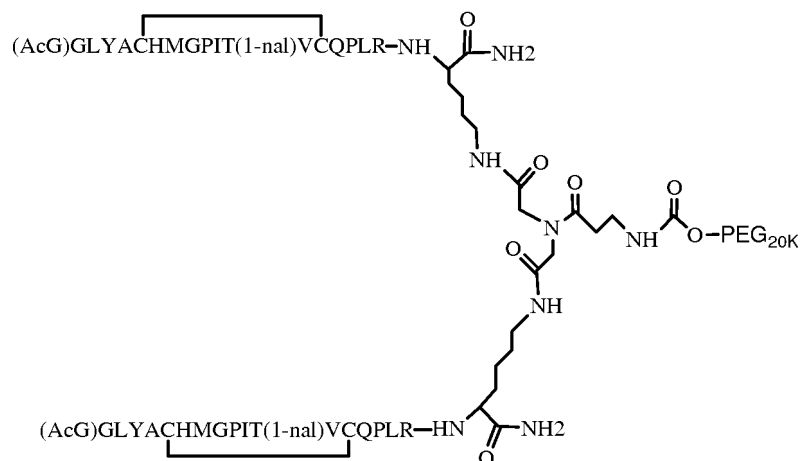
20

30

## 【 0 0 6 3】

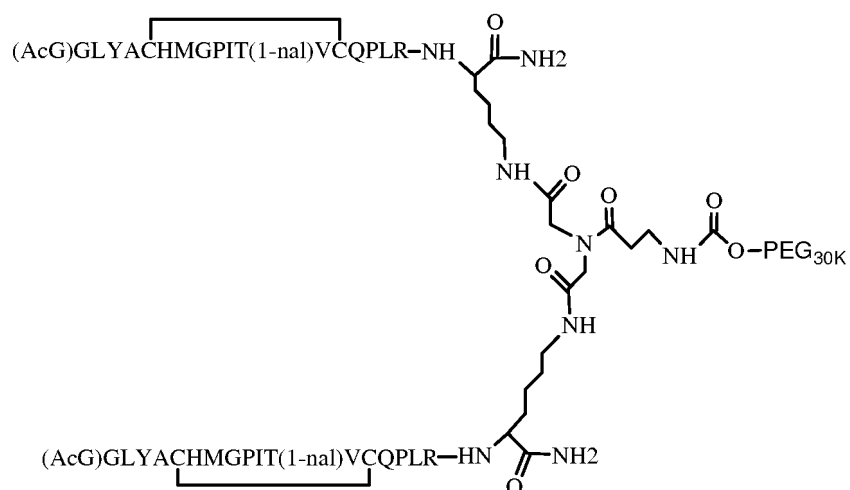
限定するわけではないが、本発明の好ましいペプチドダイマーには、次に挙げるものが含まれる：

【化 2 2】



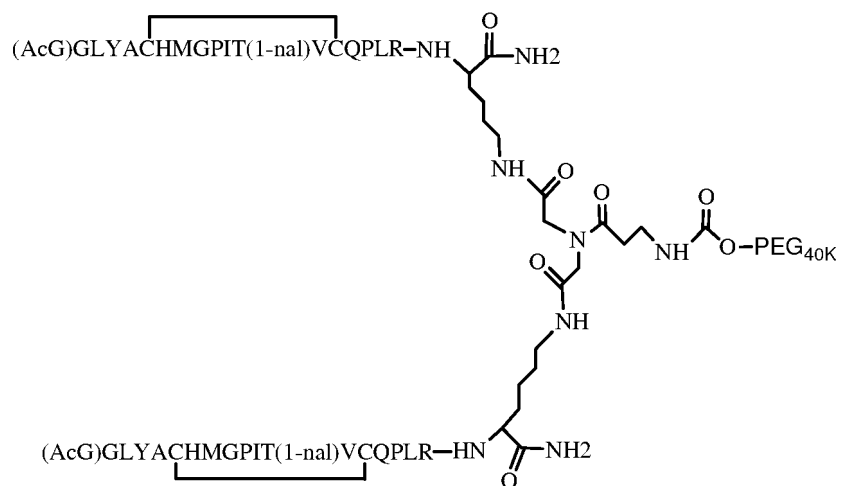
(配列番号:1)

10



(配列番号:1)

20

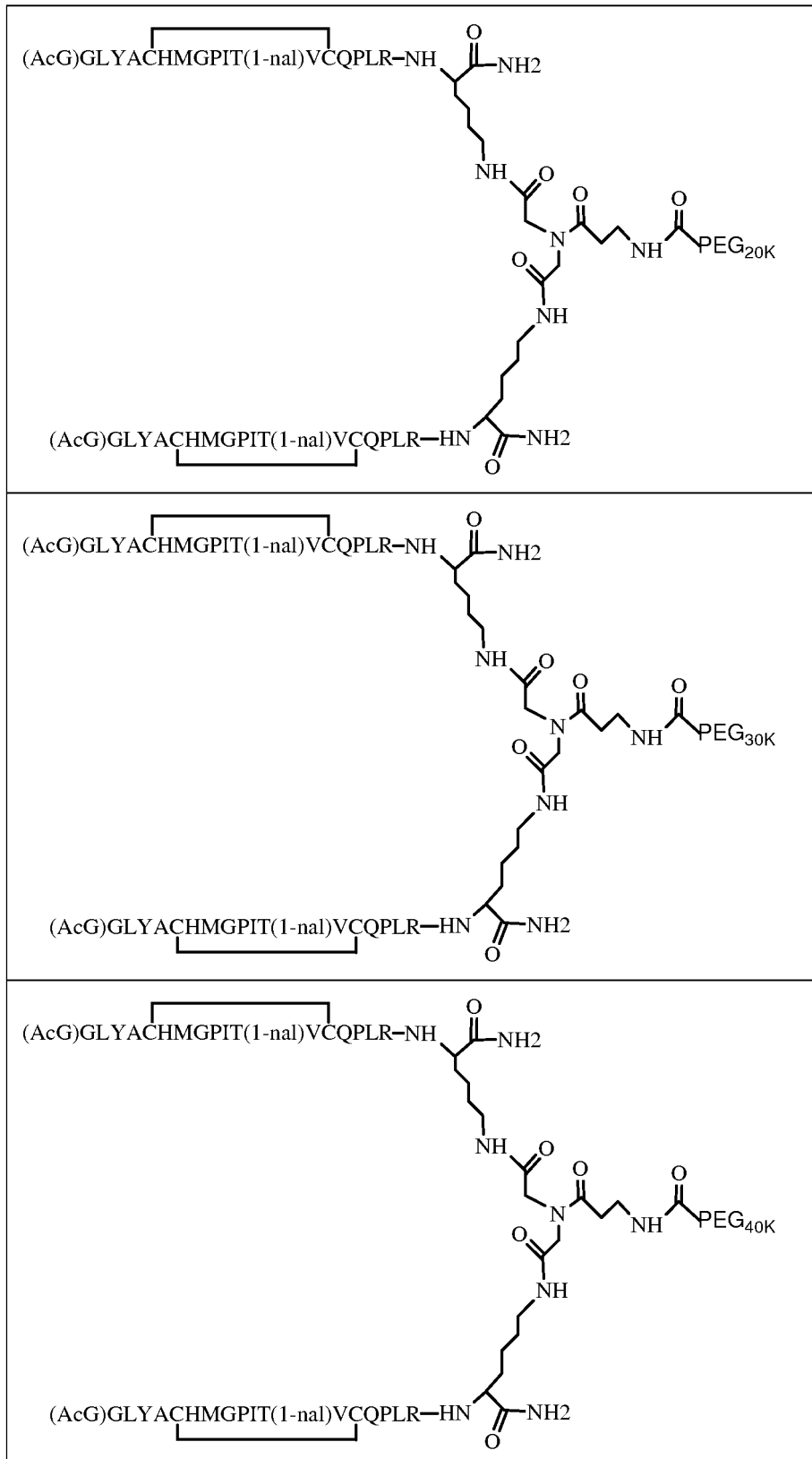


(配列番号:1)

30

40

## 【化 2 3】



(配列番号: 1)

10

(配列番号: 1)

20

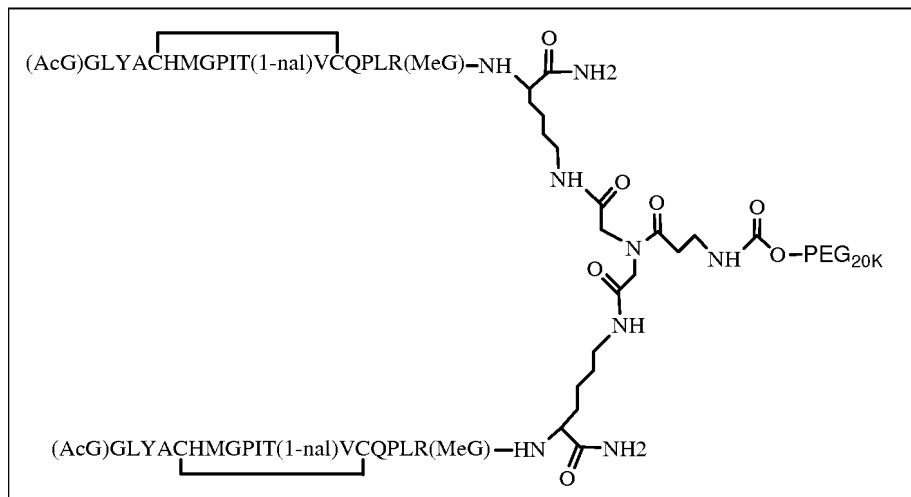
(配列番号: 1)

30

40

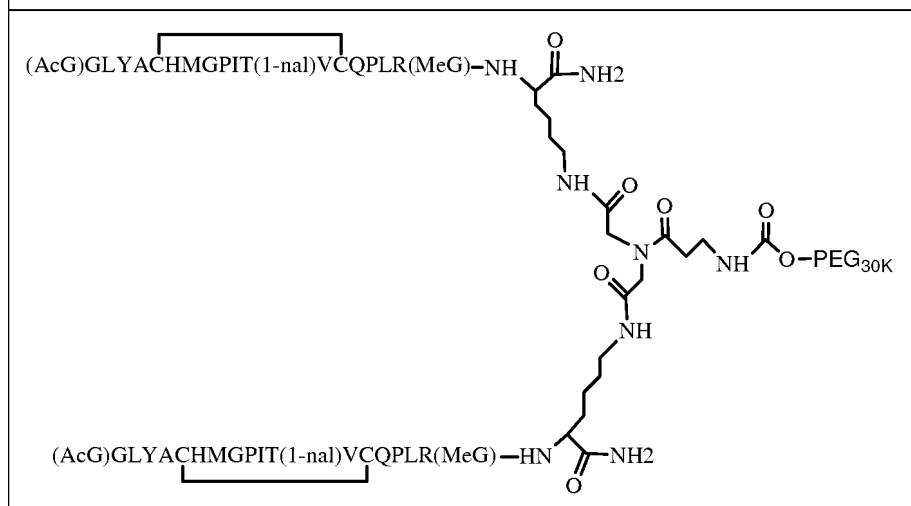


## 【化 2 4】



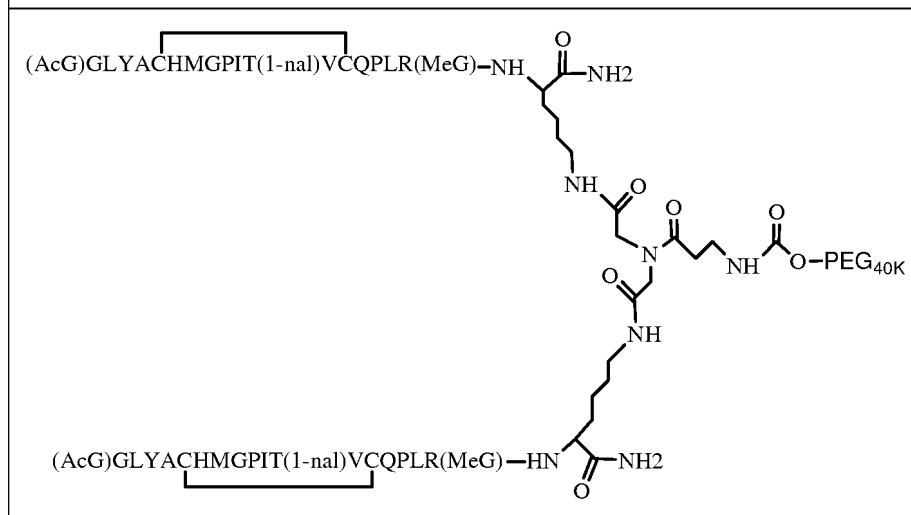
(配列番号: 2)

10



(配列番号: 2)

20

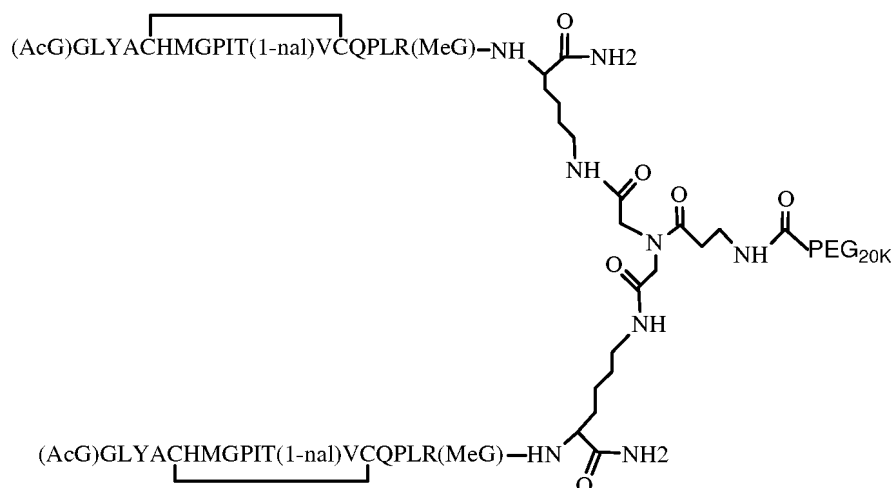


(配列番号: 2)

30

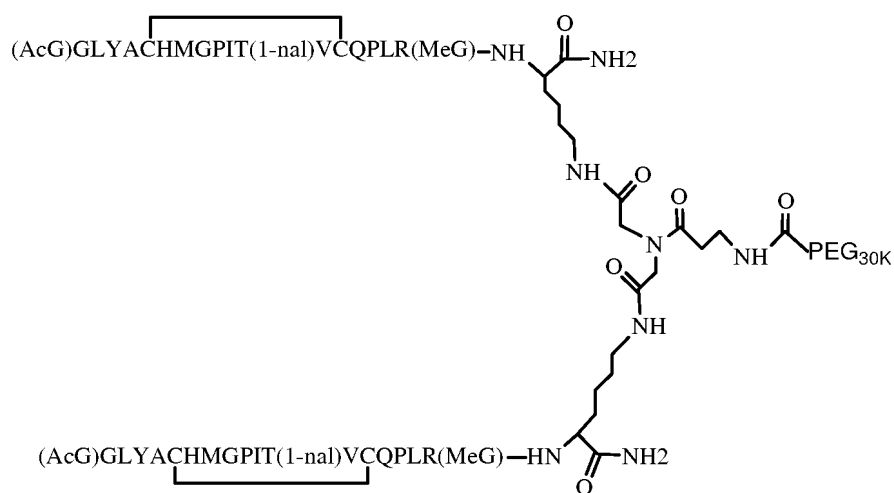
40

【化 2 5】



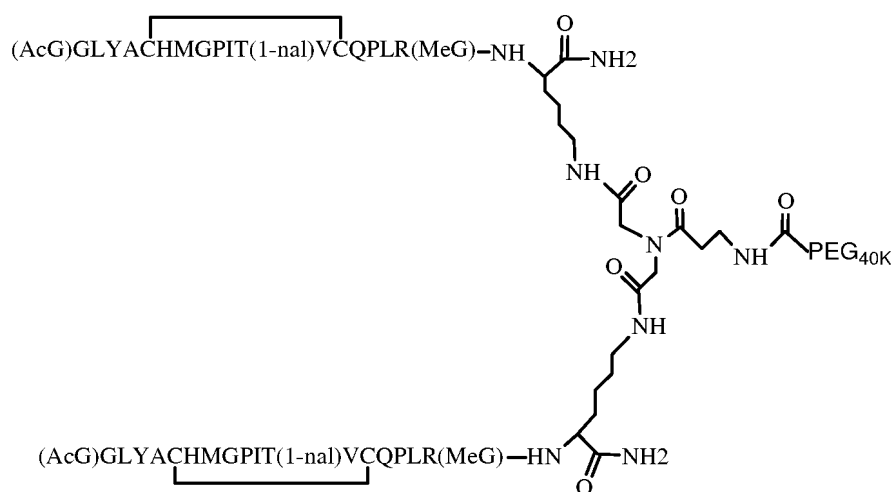
(配列番号:2)

10



(配列番号:2)

20



(配列番号:2)

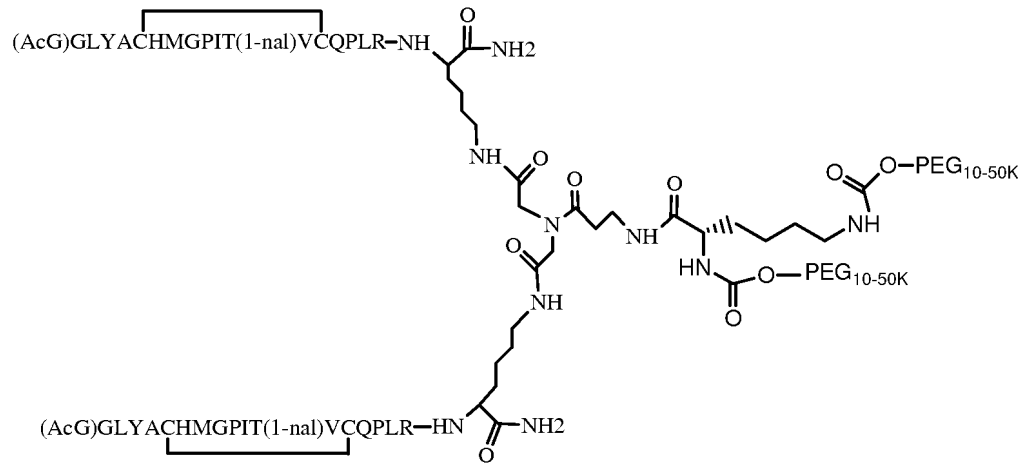
30

40

【 0 0 6 4 】

ホモダイマーの各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 - n a l) V C Q P L R K (配列番号 1) を有し、スパーサの N<sup>1</sup> 及び N<sup>2</sup> がどちらもカルバメート結合を介して活性化 P E G 部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 2 6】

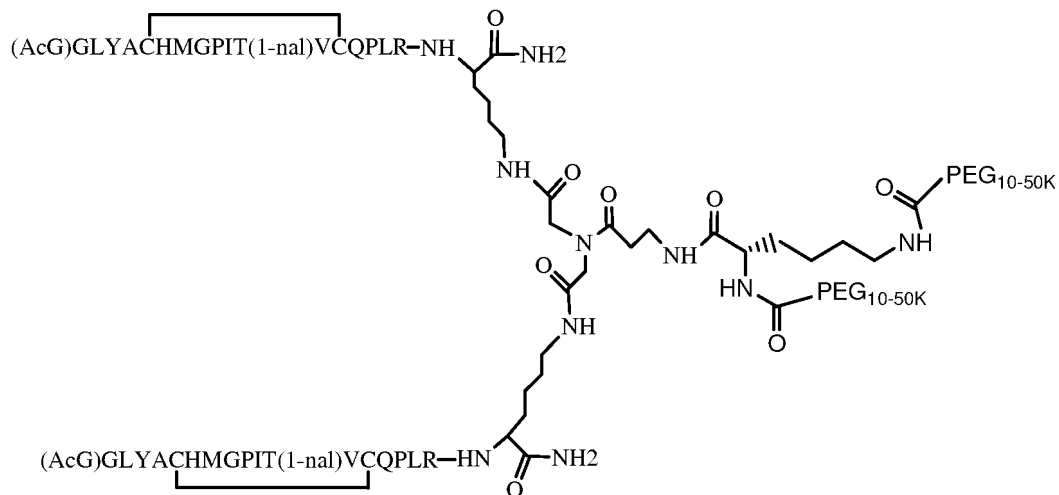


10

## 【 0 0 6 5】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (配列番号1) を有し、スペーサのN<sup>1</sup> 及びN<sup>2</sup> がどちらもアミド結合を介して活性化PEG部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

## 【化 2 7】



20

30

## 【 0 0 6 6】

ホモダイマーの各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、スペーサのN<sup>1</sup> 及びN<sup>2</sup> がどちらもカルバメート結合を介して活性化PEG部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

[illegible]

10

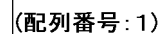
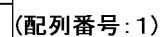
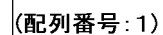
ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T ( 1 - n a l ) V C Q P L R ( M e G ) K ( 配列番号 2 ) を有し、スぺーサの N <sup>1</sup> 及び N <sup>2</sup> がどちらもアミド結合を介して活性化 P E G 部分に共有結合で取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物は、次のように表すことができる。

20

30

限定するわけではないが、本発明の好ましいペプチドダイマーには、次に挙げるものが含まれる：

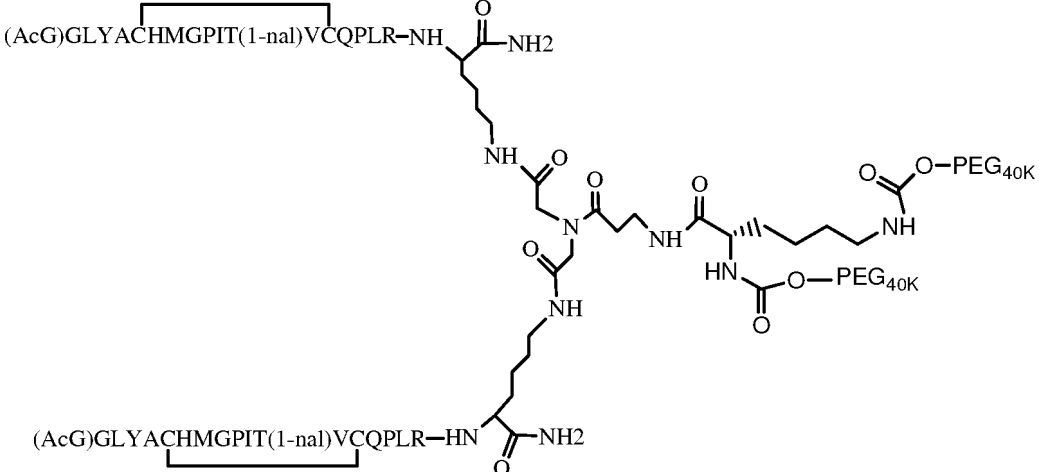
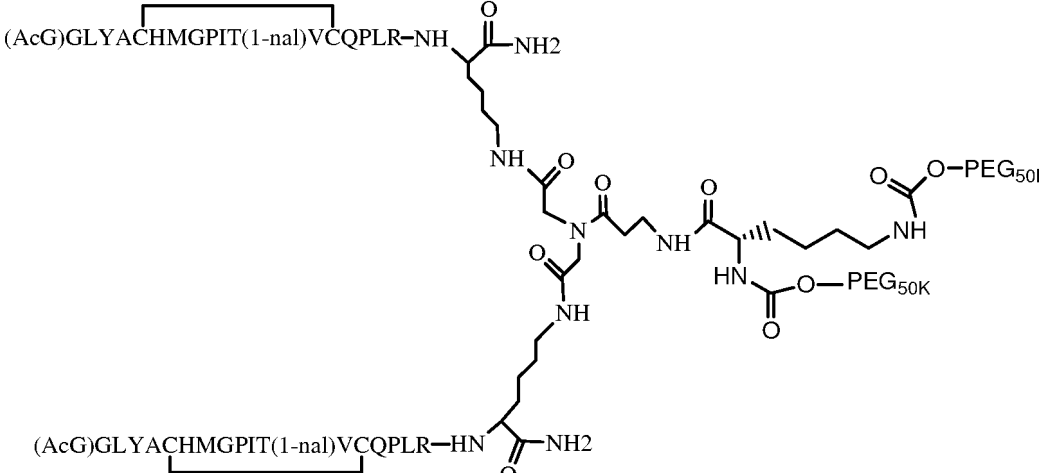
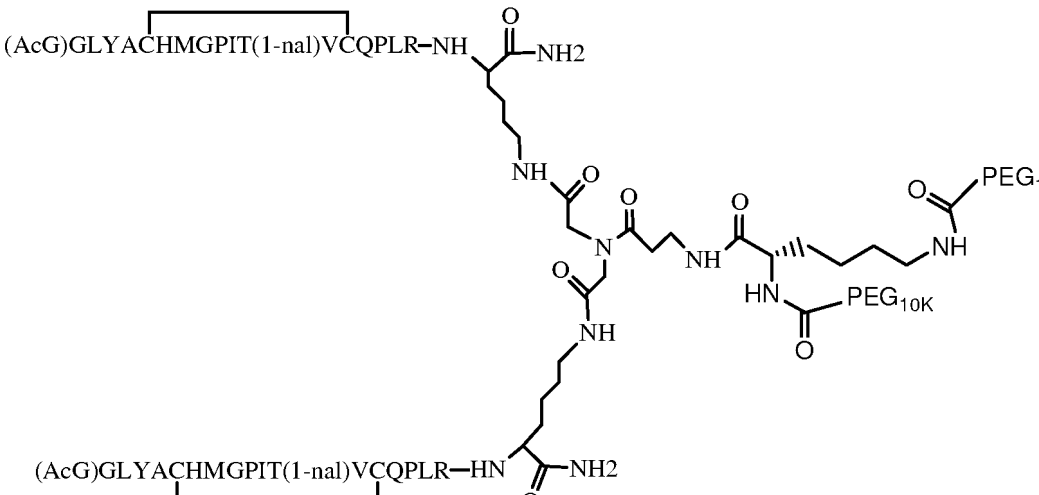
10



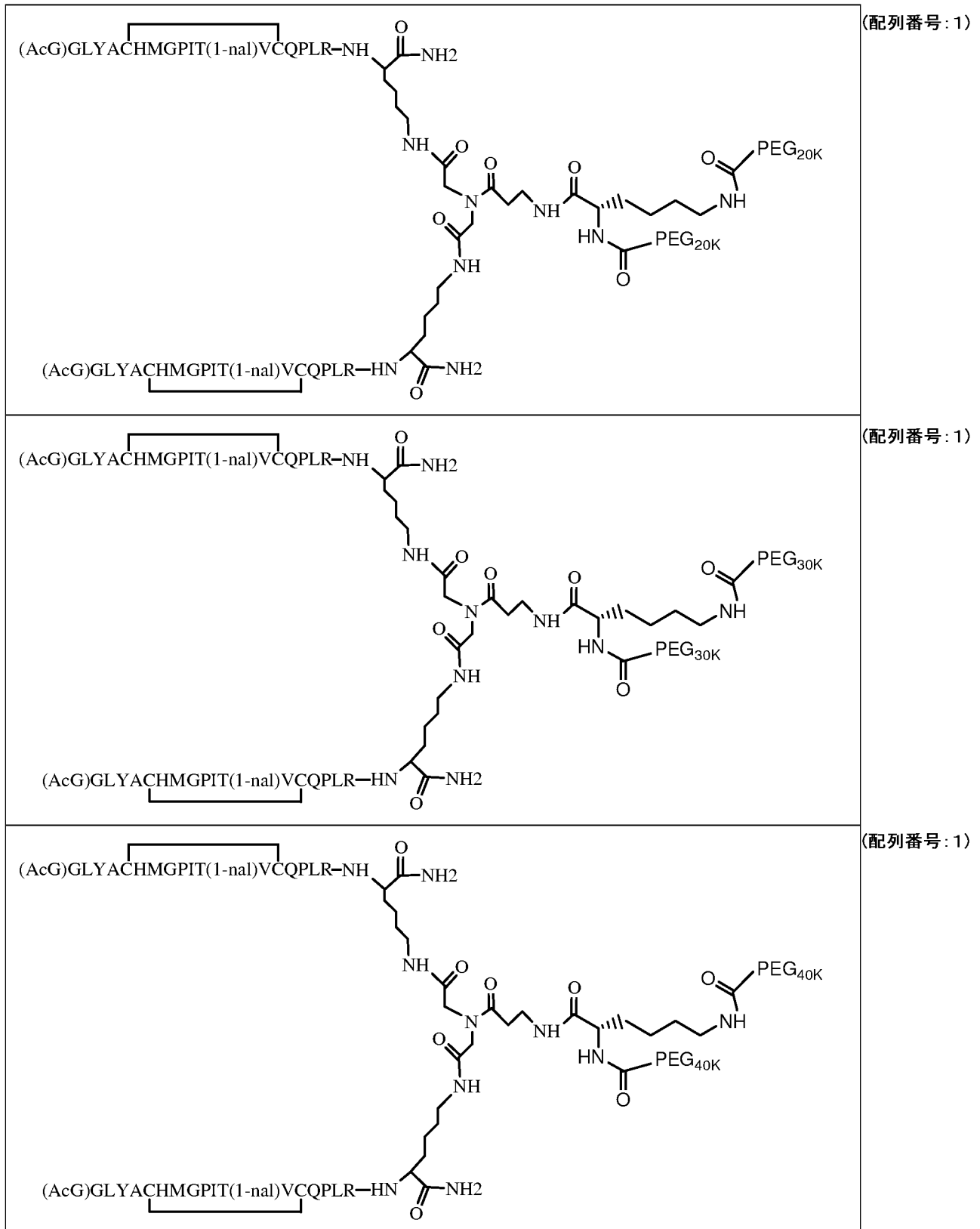
30

40

## 【化 3 1】

 <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH</p>	(配列番号: 1)
 <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH</p>	(配列番号: 1)
 <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH</p>	(配列番号: 1)

## 【化 3 2】



10

20

30

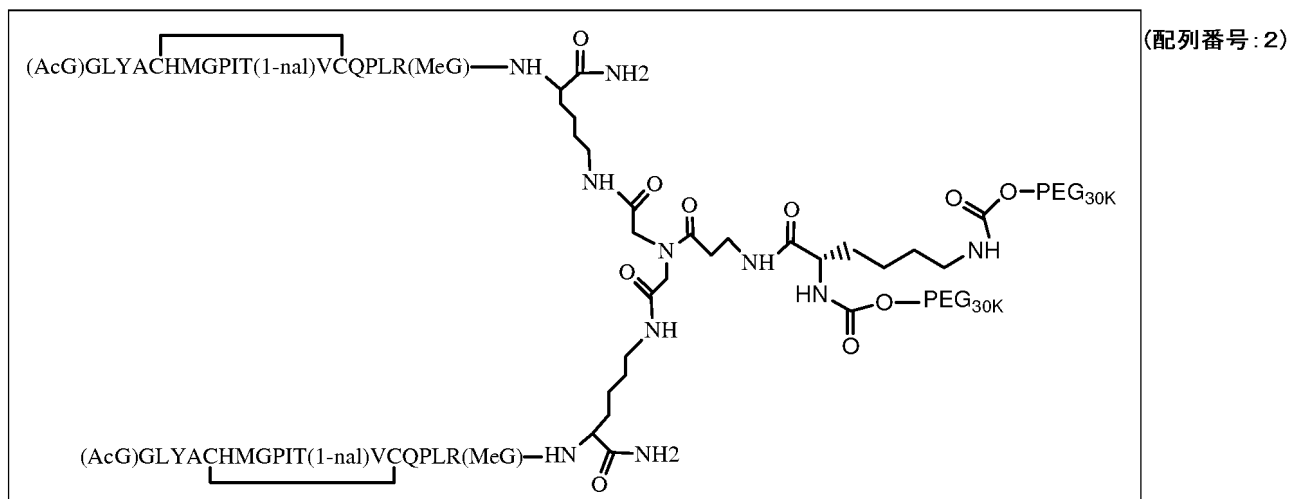
40

【化 3 3】

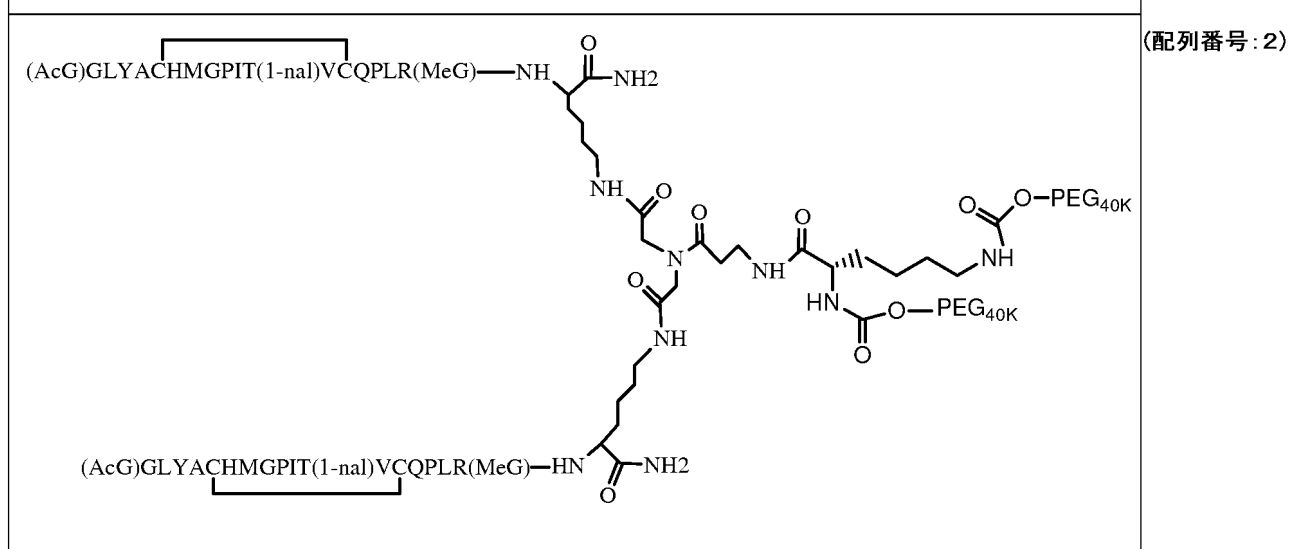
<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH-C(=O)-NH<sub>2</sub></p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-HN-C(=O)-NH<sub>2</sub></p>	(配列番号: 1)
<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH-C(=O)-NH<sub>2</sub></p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-HN-C(=O)-NH<sub>2</sub></p>	(配列番号: 1)
<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH-C(=O)-NH<sub>2</sub></p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-HN-C(=O)-NH<sub>2</sub></p>	(配列番号: 2)



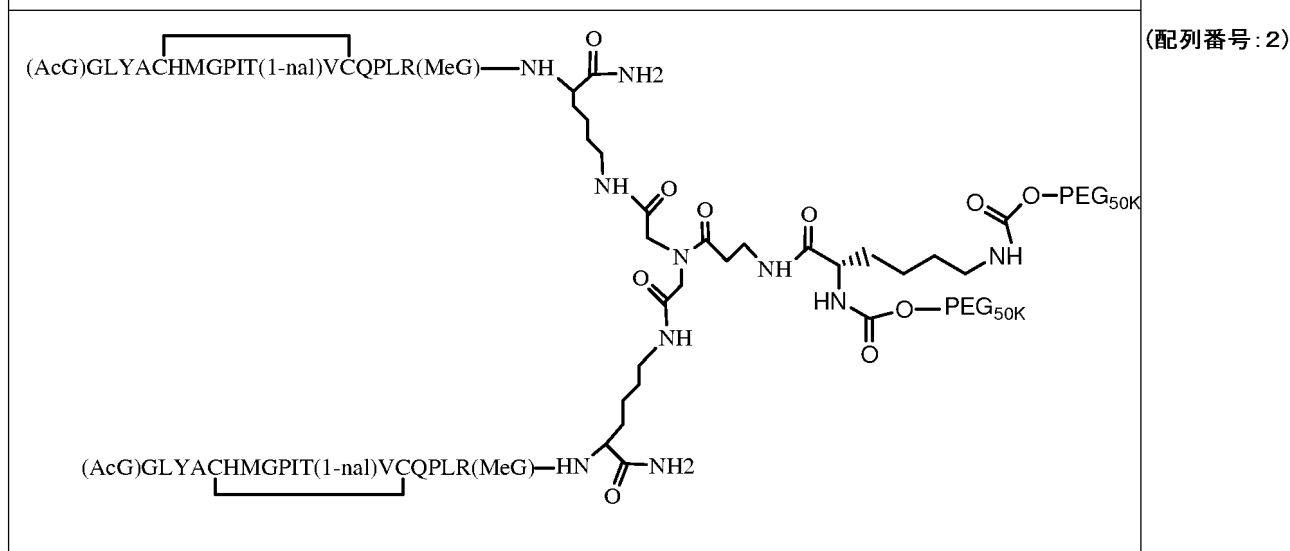
【化 3 4】



10



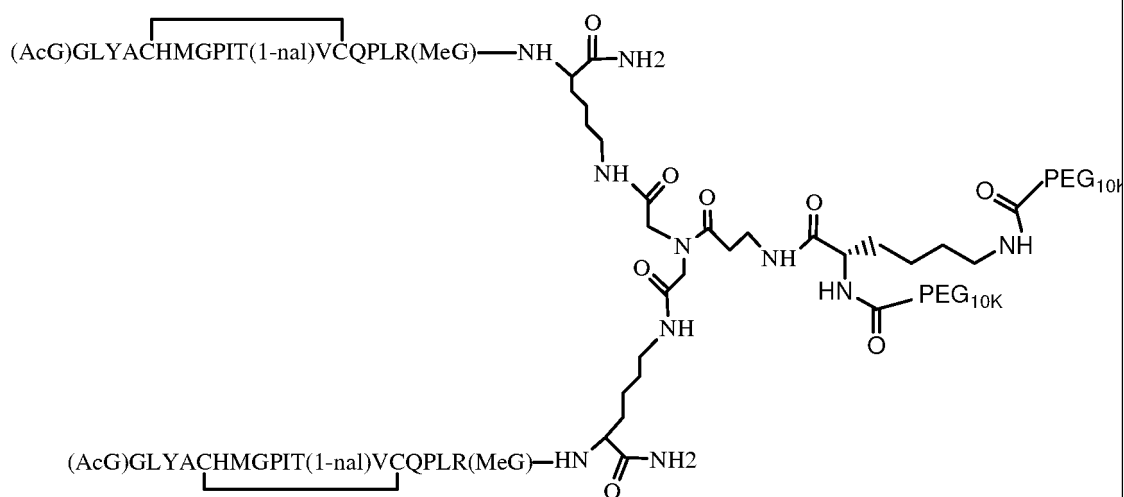
20



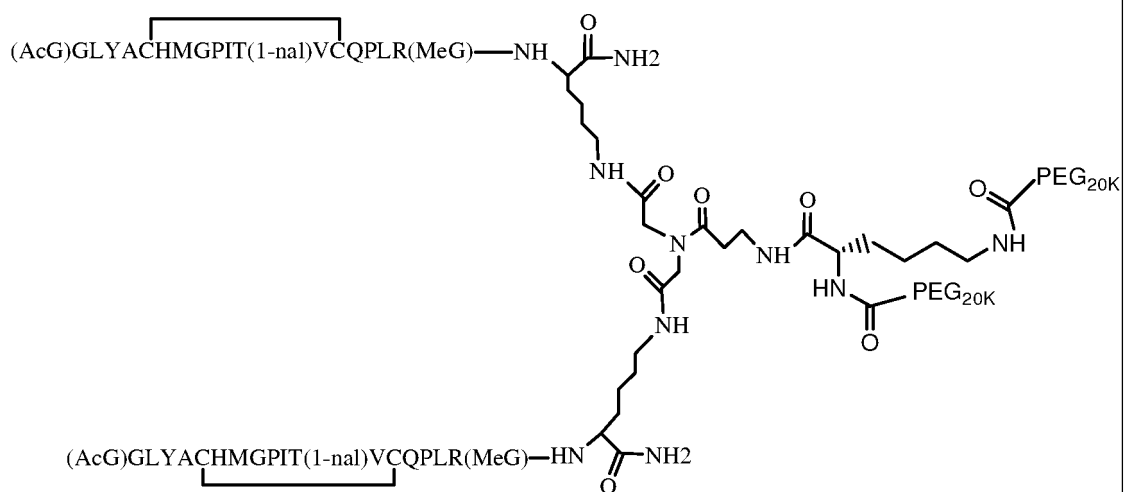
30

40

(配列番号:2)

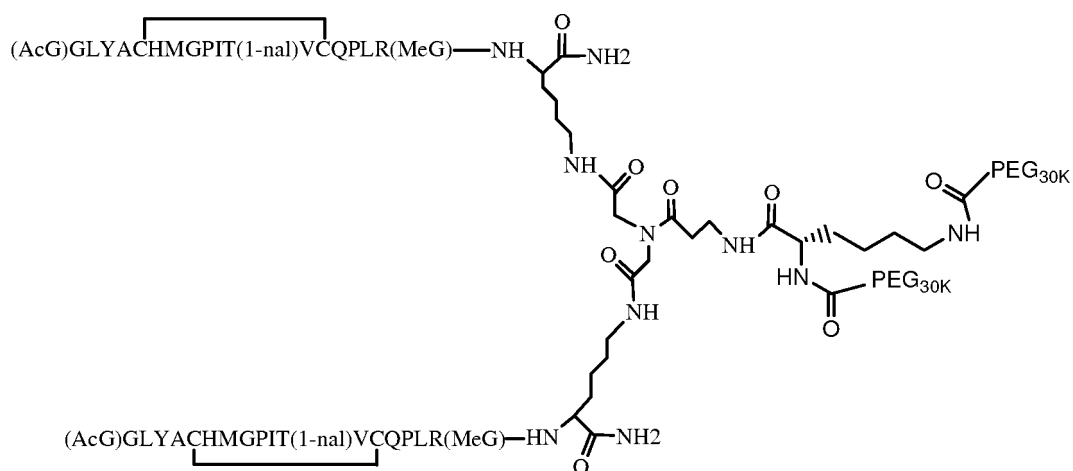


10



20

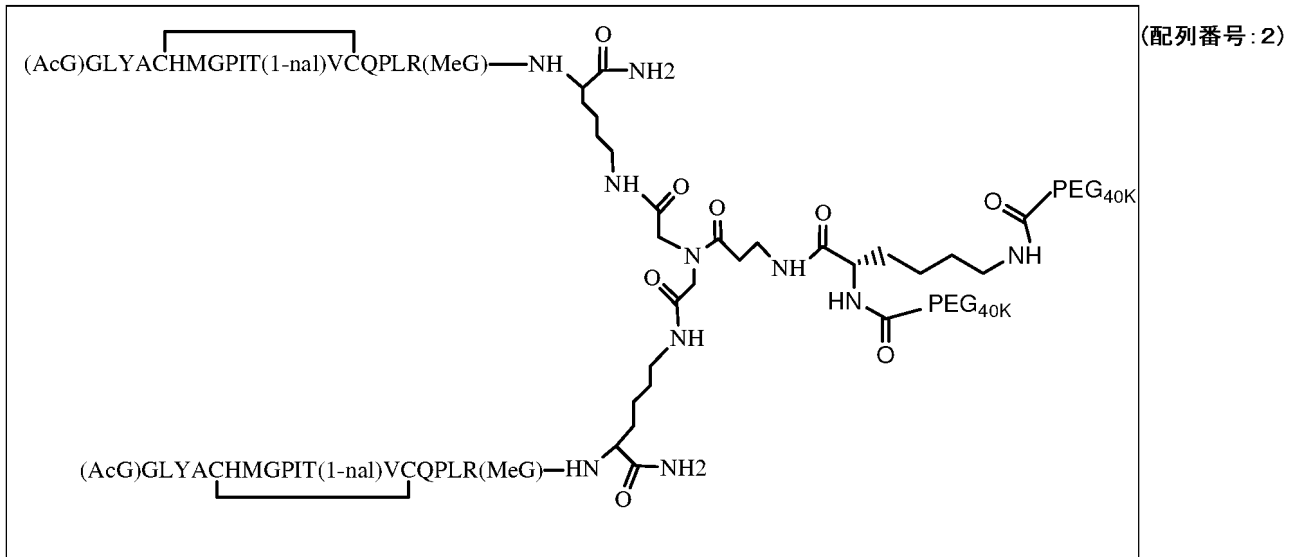
30



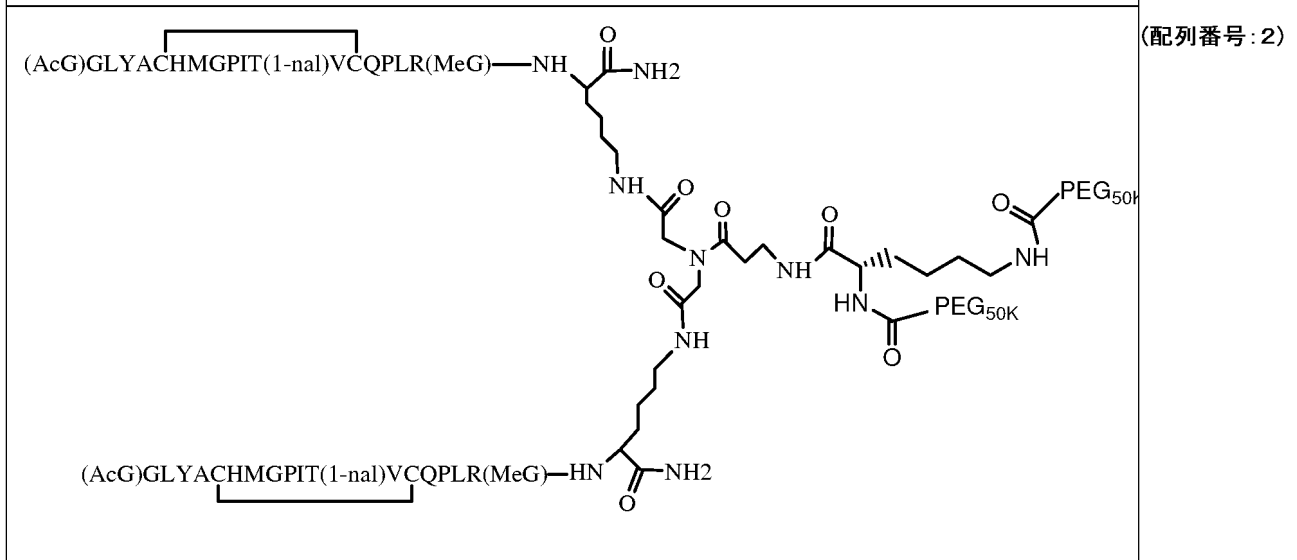
(配列番号:2)

40

## 【化 3 6】



10



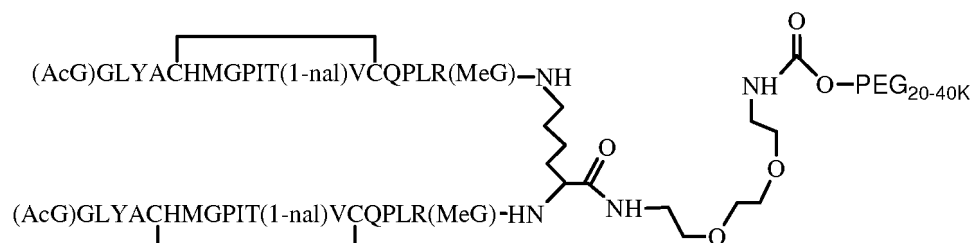
20

30

## 【 0 0 6 9 】

スペーサ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）部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物（配列番号 3）は、次のように表すことができる。

## 【化 3 7】



40

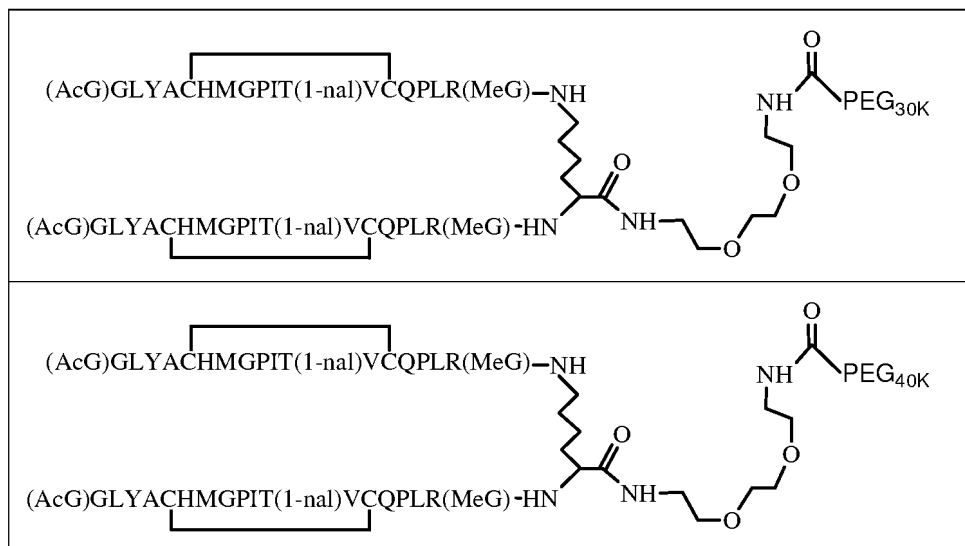
## 【 0 0 7 0 】

スペーサ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）部分に取付けられる場合、本発明の新規ペプチド化合物（配列番号 3）は、次のように表すことができる。

Chemical structure of the linear peptide PEG-40K-100. The structure shows two identical peptide chains linked by a central amide bond. Each chain consists of an N-terminal acetyl group (AcG), followed by the sequence GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG), and a C-terminal amide group (-NH). The central amide bond connects the C-terminal amide of one chain to the N-terminal amide of the other chain. A PEG<sub>20-40K</sub> chain is attached to the central amide bond via an ether linkage.

<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH- (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-HN-</p>	(配列番号:3)	20
<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH- (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-HN-</p>	(配列番号:3)	30
<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH- (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-HN-</p>	(配列番号:3)	40
<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH- (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-HN-</p>	(配列番号:3)	40

## 【化 4 0】



10

## 【 0 0 7 3】

20の通常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a, a-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の異常アミノ酸も、本発明の化合物の適切な構成要素になりうる。限定するわけではないが、異常アミノ酸の例には、-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-ヒドロキシリジン、ノルロイシン、並びに他の類似のアミノ酸及びイミノ酸が含まれる。他の修飾、例えばアミノ末端の修飾、カルボキシ末端の修飾、遺伝子にコードされた天然アミノ酸の1つ又はそれ以上の、異常アミノ酸による置換、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基の側鎖の修飾、ペプチドリソ酸化なども考えられる。

20

## 【 0 0 7 4】

本発明のペプチド配列は単独で存在するか、ペプチド鎖のN末端及び/又はC末端伸長部と繋がって存在することができる。そのような伸長部は自然にコードされたペプチド配列であり、場合により非天然配列を有しても非天然配列を実質的に有さなくてもよく、この伸長部は、当業者が望むとおり、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うる。例えば、限定するわけではないが、天然配列は完全長又は部分長であることができ、側鎖のコンジュゲーションを介して糖質、PEG、他のポリマなどを取付けるための部位が得られるようにアミノ酸置換を含みうる。ある変形では、アミノ酸置換が、配列のヒト化をもたらして、それをヒト免疫系に適合させる。本発明のEPO-R活性化配列に隣接した、又は本発明のEPO-R活性化配列に近接した、非免疫グロブリンスペーサ配列を有する、又は非免疫グロブリンスペーサ配列を有さない免疫グロブリン配列を含む、あらゆるタイプの融合タンパク質が提供される。実施形態のタイプは、重鎖及び/又は軽鎖の可変(V)領域の代わりにEPO-R活性化配列を有する免疫グロブリン鎖である。

30

40

## 【 0 0 7 5】

本発明のペプチド化合物の製造：

## ペプチド合成

本発明のペプチドは当分野において公知の古典的方法によって製造することができる。これらの標準的方法には、完全固相合成、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技術が挙げられる[例えばMerrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149参照]。

## 【 0 0 7 6】

ある実施形態では、ペプチドダイマーのペプチドモノマーが個別に合成され、合成後にダイマー化される。

50

## 【 0 0 7 7 】

もう一つの実施形態では、ダイマーのペプチドモノマーが、そのC末端を介して、ペプチド合成の開始部位として機能することができる2つの官能基及びもう一つの分子部分（例えば固形支持体の表面上に存在しうるもの）への結合を可能にする第3の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）を有する分岐第三級アミドリンカー-L<sub>K</sub>部分によって、連結される。この場合、2つのペプチドモノマーは、さまざまな固相合成技法で、リンカー-L<sub>K</sub>部分の2つの反応性窒素基上に直接合成することができる。そのような合成は逐次的であっても同時であってもよい。

## 【 0 0 7 8 】

もう一つの実施形態では、2つのペプチドモノマーを、さまざまな固相合成技法で、リンカー-L<sub>K</sub>部分の2つの反応性窒素基上に直接合成することができる。そのような合成は逐次的であっても同時であってもよい。この実施形態では、ペプチド合成の開始部位として機能することができる2つのアミノ基及びもう一つの分子部分（例えば固形支持体の表面上に存在しうるもの）への結合を可能にする第3の官能基（例えばリジンのカルボキシル基；又はリジンアミド（カルボキシル基がアミド部分-C(=O)NH<sub>2</sub>に変換されているリジン残基）のアミノ基）を有するリジンリンカー（L<sub>K</sub>）部分が使用される。

## 【 0 0 7 9 】

リンカー上にダイマーのペプチド鎖を逐次的に合成しようとする場合は、リンカー分子上の2つのアミン官能基を、オルソゴナルに除去することができる2つの異なるアミン保護基で保護する。保護されたリンカーはリンカーの第3官能基を介して固形支持体にカップリングされる。第1アミン保護基を除去し、ダイマーの第1ペプチドを、脱保護された第1アミン部分上で合成する。次に第2アミン保護基を除去し、ダイマーの第2ペプチドを脱保護された第2アミン部分上で合成する。例えば、リンカーの第1アミノ部分をA<sub>1</sub>locで保護し、第2アミノ部分をFmocで保護することができる。この場合は、温和な塩基[例えば20%ピペリジン/ジメチルホルムアミド(DMF)]による処理でFmoc基を除去して(A<sub>1</sub>loc基は除去されない)、第1ペプチド鎖を合成することができる。その後、A<sub>1</sub>loc基を適切な試薬[例えばPd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/4-メチルモルホリン及びクロロホルム]で除去して、第2ペプチド鎖を合成することができる。システインに異なるチオール保護基を使ってジスルフィド結合形成を(後述のように)制御しようとする場合は、たとえ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っても、この技法を使用しなければならないことに注意されたい。

## 【 0 0 8 0 】

リンカー上にダイマーのペプチド鎖を同時に合成しようとする場合は、リンカー分子の2つのアミン官能基を除去可能な同じアミン保護基で保護する。保護されたリンカーは、リンカーの第3官能基を介して固形支持体にカップリングされる。この場合は、リンカー分子の保護された2つの官能基を同時に脱保護し、脱保護されたアミン上で2つのペプチド鎖が同時に合成される。この技法を使うと、ダイマーのペプチド鎖の配列は同一になり、システイン残基のチオール保護基は全て同じになることに注意されたい。

## 【 0 0 8 1 】

好ましいペプチド合成法は固相合成である。固相ペプチド合成手法は当分野では周知である[例えばStewart Solid Phase Peptide Syntheses (Freeman and Co.: San Francisco) 1969; Novabiochem Corp (米国サンディエゴ)の2002/2003 General Catalog; Goodman, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl, Stuttgart) 2002参照]。固相合成では、合成が、通例、-アミノ保護樹脂を使ってペプチドのC末端から開始される。適切な出発物質は、例えば、必要な-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などに取付けることなどによって製造することができる。そのようなクロロメチル化樹脂の一つは、BIO-BEADS SX-1という商品名でBioRad Laboratories (カリフォルニア州リッチモンド)が販売している。ヒドロキシメチル樹脂の製造は記述されている[Bodonszky, et al. (1966) Chem. Ind. London

10

20

30

40

50

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]、その塩酸塩型は Beckman Instruments, Inc. (カリフォルニア州パロアルト) 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に記載の方法に従い、炭酸水素セシウム触媒を利用してクロロメチル化樹脂にカップリングすることができる。

#### 【0082】

最初のカップリング後は、 $\alpha$ -アミノ保護基を、例えばトリフルオロ酢酸 (TFA) 又は塩酸 (HCl) の有機溶媒溶液を使って、室温で除去する。その後は、支持体に結合された成長するペプチド鎖に、 $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸を連続的にカップリングする。 $\alpha$ -アミノ保護基は、段階的ペプチド合成の分野で有用であることが公知であるもの、例えばアシルタイプの保護基 (例えばホルミル、トリフルオロアセチル、アセチル)、芳香族ウレタンタイプの保護基 [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]、及びアルキルタイプの保護基 (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)、及び 1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル (Dde) である。

#### 【0083】

側鎖保護基 (典型的にはエーテル、エステル、トリチル、PMC など) は、カップリング中は無傷のままであり、アミノ末端保護基の脱保護中及びカップリング中は切り離されない。側鎖保護基は、最終的なペプチドの合成が完了したら、ターゲットペプチドを変化させないような反応条件下で除去可能でなければならない。Tyr 用の側鎖保護基には、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 2,5-ジクロロベンジルが挙げられる。Asp 用の側鎖保護基には、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が挙げられる。Thr 及び Ser 用の側鎖保護基には、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 が挙げられる。Arg 用の側鎖保護基には、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 (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 が挙げられる。Lys 用の側鎖保護基には、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 が挙げられる。

#### 【0084】

$\alpha$ -アミノ保護基の除去後に、残った保護アミノ酸を所望の順序で段階的にカップリングする。各保護アミノ酸は一般に、適当なカルボキシル基活性化剤、例えば 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) を使って、溶液中で、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)、又はその混合物中で、約 3 倍過剰に反応させる。

#### 【0085】

所望のアミノ酸配列が完成した後、所望のペプチドを、ペプチドを樹脂から切断するだけでなく、残っている側鎖保護基も全て切断する試薬、例えばトリフルオロ酢酸 (TFA) 又はフッ化水素 (HF) による処理で、樹脂支持体から切り離す。クロロメチル化樹脂を使用する場合は、フッ化水素処理によって遊離ペプチド酸の形成が起こる。ベンズヒドリルアミン樹脂を使用する場合は、フッ化水素処理によって遊離ペプチドアミドが直接生成する。或いは、クロロメチル化樹脂を使用する場合は、アンモニアによるペプチド樹脂の処理で所望の側鎖保護アミドを得るか、アルキルアミンによるペプチド樹脂の処理で側鎖保護アルキルアミド又はジアルキルアミドを得ることにより、側鎖保護ペプチドを切り離すこともできる。次に、側鎖保護をフッ化水素による処理で通常どおり除去して、遊離

10

20

30

40

50

のアミド、アルキルアミド、又はジアルキルアミドを得る。

【0086】

本発明のエステルを製造する際は、ペプチド酸の製造に使用される樹脂を使用し、側鎖保護ペプチドを塩基及び適当なアルコール（例えばメタノール）で切断する。次に、側鎖保護基をフッ化水素による処理で通常どおりに除去して、所望のエステルを得る。

【0087】

これらの手法を使って、本発明の化合物のいずれかの1、2、又はそれ以上の位置において、遺伝子にコードされた20の天然アミノ酸以外のアミノ酸が代用されているペプチドを合成することもできる。限定するわけではないが、本発明のペプチド内に代用することができる合成アミノ酸には、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、アミノ酸、例えばL-ヒドロキシリシル及びD-メチルアラニル、L-メチルアラニル、アミノ酸、並びにイソキノリルが挙げられる。D-アミノ酸及び非天然合成アミノ酸も、本発明のペプチド中に組み込むことができる。

10

【0088】

ペプチド修飾

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して、本発明の他の化合物を製造することもできる。例えばアミノ末端は、酢酸又はそのハロゲン化誘導体、例えば-クロロ酢酸、-ブromo酢酸、又は-ヨード酢酸でアセチル化することができる。

20

【0089】

遺伝子にコードされた20のアミノ酸（又は立体異性体Dアミノ酸）の天然側鎖を、他の側鎖、例えばアルキル、低級アルキル、4員、5員、6員、又は7員までの環状アルキル、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、カルボキシ及びその低級エステル誘導体、並びに4員、5員、6員、又は7員までの複素環式基などといった基で置き換えることができる。特に、プロリン残基の環サイズを5員から4員、6員又は7員へと変化させたプロリン類似体を、使用することができる。環式基は飽和又は不飽和であることができ、不飽和である場合は、芳香族又は非芳香族であることができる。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有する。そのような基の例には、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、イソオキサゾリル、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）、及びトリアゾリルが挙げられる。これらの複素環式基は、置換されていても無置換でもよい。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、又は置換フェニル若しくは無置換フェニルであることができる。

30

【0090】

ペプチドをリン酸化又は他の方法で〔例えばHruby, et al. (1990) Biochem J. 268:249-262に記載されているように〕容易に修飾することもできる。

40

【0091】

本発明のペプチド化合物は類似する生物学的活性を有する非ペプチド化合物のための構造モデルとしても役立つ。リードペプチド化合物と同じ又は類似する望ましい生物学的活性を有するが、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よりもさらに好ましい活性を有する化合物を構築するために、さまざまな技法を利用できることは、当業者には理解されている〔Morgan and Gainor (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243-252参照〕。これらの技法には、ペプチド主鎖を、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

50



構成される主鎖で置き換えることが含まれる。

#### 【0092】

##### ジスルフィド結合の形成

本発明の化合物は、2つの分子内ジスルフィド結合を含有する。そのようなジスルフィド結合は、各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せることができる。

#### 【0093】

ある実施形態では、システイン結合形成の制御が、所望する異性体の形成を最適化するのに有効なタイプ及び濃度の酸化剤を選択することによって遂行される。例えば、酸化剤がDMSO又はヨウ素( $I_2$ )である場合は、ペプチドダイマーの酸化による2つの分子内ジスルフィド結合(各ペプチド鎖上に1つ)の形成が(分子間ジスルフィド結合の形成と比較して)優先的に達成される。

10

#### 【0094】

別の実施形態では、ペプチド合成中のチオール保護基の選択的使用によって、システイン結合の形成が制御される。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が望まれる場合、コア配列の2つのシステイン残基が第1チオール保護基[例えばトリチル(Trt)、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サ-1-イリデン)エチル(Dde)など]で保護された第1モノマーペプチド鎖を合成し、次に、コア配列の2つのシステイン残基が第1チオール保護基とは異なる第2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)など]で保護されている第2モノマーペプチドを合成する。その後、第1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を達成し、次に第2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達成する。

20

#### 【0095】

本発明の他の実施形態は、硫黄の一つが $CH_2$ 基又は硫黄の他の等配電子体で置き換えられているこれらジスルフィド誘導体の類似体にも対応する。これらの類似体は本発明の化合物から製造することができ、この場合、各ペプチドモノマーは、当分野で公知の方法を使った分子内又は分子間置換により、少なくとも一つのC又はホモシステイン残基と、第2C残基の代わりに - アミノ - - 酪酸とを含有する[例えばBarker, et al. (1992) J. Med. Chem. 35:2040-2048及びOr, et al. (1991) J. Org. Chem. 56:3146-3149参照]。この置換を - アミノ - - 酪酸及びホモシステインの他のホモログを使って行なうこともできることは、当業者には容易に理解されるだろう。

30

#### 【0096】

上述の環化戦略に加えて、他の非ジスルフィドペプチド環化戦略も使用することができる。そのような代替環化戦略には、例えばアミド環化戦略並びにチオエーテル結合の形成を伴うものが含まれる。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を伴う環化型で存在することができる。例えば、コア配列の1つのシステインをリジンで置き換え、第2のシステインをグルタミン酸で置き換えたペプチドを合成することができる。その場合は、これら2つの残基の側鎖間のアミド結合によって環状モノマーを形成させることができる。或いは、コア配列の1つのシステインをリジン(又はセリン)で置き換えたペプチドを合成してもよい。その場合は、そのリジン(又はセリン)残基の側鎖とコア配列の第2システイン残基との間のチオエーテル結合によって、環状モノマーを形成させることができる。したがって、ジスルフィド環化戦略に加えて、アミド環化戦略及びチオエーテル環化戦略はどちらも、本発明の化合物を環化するために容易に使用することができる。或いは、ペプチドのアミノ末端を、 - 置換基が脱離基である - 置換酢酸、例えば - ハロ酢酸、例えば - クロロ酢酸、 - プロモ酢酸、又は - ヨード酢酸でカップリングすることもできる。

40

#### 【0097】

##### 分岐第三級アミドリンカーの付加

ペプチドモノマーは分岐第三級アミドリンカー部分によってダイマー化することができ

50

る。ある実施形態では、リンカーがペプチド合成の際にペプチド中に組み込まれる。例えばリンカー $L_K$ 部分がペプチドの合成の開始部位として機能することができる2つの官能基と、1つ又はそれ以上の他の分子部分への結合を可能にする1つ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）とを含有する場合は、リンカーを固形支持体にコンジュゲートすることができる。その後、2つのペプチドモノマーを、リンカー $L_K$ 部分の2つの反応性窒素基上に、固相合成技法の変形で、直接合成することができる。

#### 【0098】

これに代わる実施形態では、ペプチド合成後に、リンカーがペプチドダイマーの2つのペプチドモノマーにコンジュゲートされる。そのようなコンジュゲーションは、当分野で十分に確立された方法によって達成することができる。ある実施形態では、リンカーが、合成されたペプチドモノマーのターゲット官能基への取付けに適した2つの官能基を含有する。例えば、2つのカルボキシル基を含有するリンカーは、前もって活性化されることで、又は適切なカップリング試薬の存在下で、2つのペプチドモノマーのそれぞれのターゲットリジン側鎖アミノ基と反応させることができる。

10

#### 【0099】

例えばペプチドモノマーは、第三級アミドリリンカー



[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末端リジン残基の - アミノ基にコンジュゲートするために用いられる適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドであり； $B^*$ は、リンカーの $C^2$ を第2ペプチドモノマーのC末端リジン残基の - アミノ基にコンジュゲートするために用いられる適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドである]

20

に、化学的にカップリングすることができる。

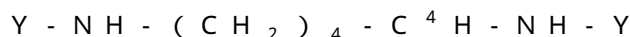
#### 【0100】

また、例えばペプチドモノマーは、第三級アミドリリンカー



[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末端リジン残基の - アミノ基にコンジュゲートするために用いられる適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドであり； $B^*$ は、リンカーの $C^2$ を第2ペプチドモノマーのC末端リジン残基の - アミノ基にコンジュゲートするために用いられる適切な官能基、例えばN-オキシスクシンイミドであり；第三級アミドリリンカーはスペーサ部分

30



(式中、Xの $C^3$ はスペーサの $C^4$ に共有結合で結合され；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]

に、化学的にカップリングすることもできる。

#### 【0101】

リジンリンカーの付加

40

ペプチドモノマーはリジンリンカー $L_K$ 部分によってダイマー化することができる。ある実施形態では、リジンリンカーがペプチド合成の際にペプチド中に組み込まれる。例えばリジンリンカー $L_K$ 部分がペプチド合成の開始部位として機能することができる2つの官能基と、もう一つの分子部分への結合を可能にする第3の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）とを含有する場合は、リンカーを固形支持体にコンジュゲートすることができる。その後、2つのペプチドモノマーを、リジンリンカー $L_K$ 部分の2つの反応性窒素基上に、固相合成技法の変形で、直接合成することができる。

#### 【0102】

ペプチドダイマーがリジンリンカー $L_K$ 部分によってダイマー化されるもう一つの実施形態では、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

50

ーにコンジュゲートすることができる。そのようなコンジュゲーションは、当分野で十分に確立された方法によって達成することができる。ある実施形態では、リンカーが、合成されたペプチドモノマーのターゲット官能基への取付けに適した少なくとも2つの官能基を含有する。例えばリジンの2つの遊離アミン基を、2つのペプチドモノマーのそれぞれのC末端カルボキシル基と反応させることができる。

#### 【0103】

スペーサの付加

本発明のペプチド化合物はさらにスペーサ部分を含む。ある実施形態では、ペプチド合成の際にスペーサをペプチド中に組み込むことができる。例えばスペーサが遊離アミノ基と、もう一つの分子部分への結合を可能にする第2の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）とを含有する場合は、スペーサを固形支持体にコンジュゲートすることができる。

10

#### 【0104】

ある実施形態では、2つの官能基を含有するスペーサをまず第1官能基を介して固形支持体にカップリングする。次に、ペプチド合成の開始部位として機能することができる2つの官能基と、もう一つの分子部分への結合を可能にする第3の官能基（例えばカルボキシル基又はアミノ基）とを有するリジンリンカー $L_K$ 部分を、スペーサの第2官能基及びリンカーの第3官能基を介してスペーサにコンジュゲートする。その後、2つのペプチドモノマーを、リンカー $L_K$ 部分の2つの反応性窒素基上に、固相合成技法の変形で、直接合成することができる。例えば、固形支持体にカップリングした、遊離アミン基を有するスペーサは、リンカーの遊離カルボキシル基を介してリジンリンカーと反応させることができる。

20

#### 【0105】

これに代わる実施形態では、スペーサを、ペプチド合成後のペプチドダイマーにコンジュゲートすることができる。そのようなコンジュゲーションは、当分野で十分に確立された方法によって達成することができる。ある実施形態では、リンカーが、合成されたペプチドのターゲット官能基への取付けに適した少なくとも一つの官能基を含有する。例えば、遊離アミン基を有するスペーサは、ペプチドのC末端カルボキシル基と反応させることができる。もう一つの例では、遊離カルボキシル基を有するリンカーを、リジンアミドの遊離アミン基と反応させることができる。

30

#### 【0106】

ポリエチレングリコール（PEG）の取付け

近年、水溶性ポリマ、例えばポリエチレングリコール（PEG）は、治療上及び診断上重要なペプチドの共有結合修飾に使用されてきた。そのようなポリマの取付けは、生物学的活性を強化し、血液循環時間を引き延ばし、免疫原性を低減し、水溶性を増加させ、プロテアーゼ消化に対する耐性を強化すると考えられている。例えばPEGを、治療ポリペプチド、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) に共有結合で取付けると、それらの生体内半減期が延び、且つ/又はそれらの免疫原性及び抗原性が減少すると報告されている。

40

#### 【0107】

本発明のペプチド化合物は、ペプチドダイマーの分岐第三級アミドリリンカー又はスペーサに、カルバメート結合を介して、又はアミド結合を介して、共有結合で取付けられるポリエチレングリコール（PEG）部分を含みうる。本発明で使用されるPEGの一例は、約20キロダルトン（20K）～約40Kの分子量を有する線状非分岐PEGである（用語「約」はPEGの調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す）。好ましくはPEGは約30K～約40Kの分子

50

量を有する。

【0108】

本発明で使用するPEGのもう一つの例は、約10K～約60Kの分子量を有する線状PEGである（用語「約」はPEGの調製物において、一部の分子は明記した分子量より重く、一部の分子は明記した分子量より軽いことを示す）。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。

【0109】

PEGを共有結合で取付ける方法（PEG化）の例を以下に説明する。これらの例示的説明は限定を意図するものではない。多様なPEGを共有結合で取付けるためのさまざまな方法が当分野において十分に確立されていることは、当業者には理解されるだろう。したがって、当分野でいくつか知られている取付け方法のいずれかによってPEGが取付けられているペプチド化合物は、本発明によって包含されうる。

10

【0110】

例えばPEGは、活性化PEG分子を結合させうる反応性基（例えば遊離の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で結合することができる。PEG分子は、さまざまな反応性部分を有するメトキシル化PEG（「mPEG」）を使って、アミノ基に取付けることができる。そのようなポリマには、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-シアヌリククロライドが挙げられる。同様に、遊離アミン基を有するメトキシル化PEG（mPEG-NH<sub>2</sub>）を使ってPEG分子をカルボキシル基に取付けることもできる。

20

【0111】

いくつかの実施形態では、リンカー又はスペーサが末端アミノ基（すなわちスペーサの末端に位置するもの）を含有する。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、安定な共有結合であるカルバメート結合を作らせることができる。或いは、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-スクシンイミド（NHS）基を含有する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）などと反応させて、安定な共有結合であるカルバメート結合を作らせることができる。別の実施形態では、リンカー反応性基が、適切な反応条件下でアミン含有PEG分子との共有結合を形成するように活性化することができるカルボキシル基を含有する。適切なPEG分子にはmPEG-NH<sub>2</sub>が挙げられ、適切な反応条件にはカルボジイミドが媒介するアミド形成などが挙げられる。

30

【0112】

EPO-Rアゴニスト活性アッセイ：

インビトロ機能アッセイ

インビトロ競合結合アッセイでは、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が定量される。例えば（例えば米国特許第5,773,569号に記述されているように）、ヒトEPO-Rの細胞外ドメイン（EPO結合タンパク質、EBP）は大腸菌内で組換え生産することができ、その組換えタンパク質を、固形支持体、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.（イリノイ州ロックフォード）のSulfolinkビーズ]にカップリングすることができる。次に、固定化されたEBPを、標識された組換えEPOと共に、又は標識された組換えEPO及び試験ペプチドと共にインキュベートする。そのような実験には試験ペプチドの希釈系列を使用する。試験ペプチドを加えないアッセイポイントによって、EBPに対する全EPO結合量が定義される。試験ペプチドを含有する反応について、結合したEPOの量を定量し、対照（全=100%）結合量の百分率として表す。これらの値をペプチド濃度に対してプロットする。IC50値は、EBPへのEPOの結合を50%減少させる（すなわちEPO結合の50%阻害）試験ペプチドの濃度と定義される。

40

50

## 【 0 1 1 3 】

もう一つの異なるインビトロ競合結合アッセイでは、2つのビーズ、すなわちEPOコンジュゲートビーズ及びEPO-Rコンジュゲートビーズの近接の関数として生成する光シグナルを測定する。ビーズの近接性はEPO-RへのEPOの結合によって生じる。EPO-Rへの結合に関してEPOと競合する試験ペプチドはこの結合を妨げて、発光の減少を引き起こすだろう。発光を50%減少させる試験ペプチドの濃度が、IC50値と定義される。

## 【 0 1 1 4 】

本発明のペプチドは、EPO-Rへの結合に関して、極めて効率よくEPOと競合する。この強化された機能は、EPOの結合をかなり低いペプチド濃度で阻害するその能力によって表される（すなわち、これらは極めて低いIC50値を有する）。

10

## 【 0 1 1 5 】

EPO受容体の特異的に結合する、本発明のモノマー型及びダイマー型ペプチドEPO-Rアゴニストの生物学的活性及び力価は、インビトロ細胞ベース機能アッセイを使って測定することができる。

## 【 0 1 1 6 】

あるアッセイは、ヒトEPO-Rを発現させるマウスブレB細胞株であって、fosプロモーター駆動のルシフェラーゼレポータ遺伝子コンストラクトをさらにトランスフェクトされたものに基づく。そのような細胞は、EPO又は別のEPO-Rアゴニストにばく露されると、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、その基質ルシフェリンを添加すると、発光を引き起こす。したがって、そのような細胞におけるEPO-R活性化のレベルは、ルシフェラーゼ活性の測定によって定量することができる。試験ペプチドの活性は細胞に試験ペプチドの希釈系列を加え、それを4時間インキュベートすることによって測定される。インキュベーション後に、ルシフェリン基質を細胞に加え、発光を測定する。最大半量の(half-maximal)発光をもたらす試験ペプチドの濃度をEC50として記録する。

20

## 【 0 1 1 7 】

本発明のペプチドは、このアッセイにおいて、劇的に強化された、EPO-Rシグナリング依存的ルシフェラーゼ発現を促進する能力を示す。この強化された機能は、かなり低いペプチド濃度で最大ルシフェラーゼ活性の半分を与えるその能力によって表される（すなわち、これらは極めて低い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力価及び活性を見積るための好ましい方法である。

30

## 【 0 1 1 8 】

もう一つのアッセイは、FDC-P1/ER細胞[Dexter, et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047]（詳しく特徴づけられた非形質転換マウス骨髓由来細胞株にEPO-Rが安定にトランスフェクトされているもの）を使って行なうことができる。これらの細胞はEPO依存的増殖を示す。

## 【 0 1 1 9 】

そのようなアッセイの一つでは、細胞を必要な増殖因子の存在下で半定常期密度(half stationary density)まで成長させる（例えば米国特許5,773,569号に記載のとおり）。次に、細胞をPBSで洗浄し、増殖因子を含まない全培地(whole media)中で16~24時間飢餓状態に置く。細胞の生存率を（例えばトリパンブルー染色によって）決定した後、原液を（増殖因子を含まない全培地中に）作製して、50µLあたり約10<sup>5</sup>細胞にする。試験しようとするペプチドEPO-Rアゴニスト化合物（典型的には、ファージ結合型若しくは他の結合型ペプチド又は固定化ペプチドではなく、遊離の溶液相ペプチド）の希釈系列を、最終体積が1ウェルあたり50µLになるように、96穴組織培養プレート中に作製する。細胞(50µL)を各ウェルに加え、細胞を24~48時間インキュベートする。この時点で陰性対照は死ぬか、静止状態にあるはずである。次に、当分野で公知の技法、例えばH<sup>3</sup>-チミジン取り込みを細胞増殖の指標として測定するMTTアッセイ[Mosmann (1983) J. Immunol. Methods 65:55-63参照]によって、細胞増

40

50

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で評価する。最大細胞増殖の半分を得るのに必要な試験ペプチドの濃度をEC50として記録する。

#### 【0120】

本発明のペプチドは、このアッセイにおいて、劇的に強化された、EPO依存性細胞成長を促進する能力を示す。この強化された機能は、かなり低いペプチド濃度で最大細胞増殖刺激活性の半分を与えるその能力によって表される（すなわち、これらは極めて低い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力価及び活性を見積るための好ましい方法である。

#### 【0121】

もう一つのアッセイでは、細胞をEPO補足培地中で定常期まで成長させ、収集した後、EPOを含まない培地中でさらに18時間培養する。細胞を細胞密度が等しい3つの群、すなわち因子を添加しない群（陰性対照）、EPOを添加する群（陽性対照）、及び試験ペプチドを加える実験群に分割する。次に、培養された細胞をさまざまな時点で集め、固定し、DNA結合性蛍光色素（例えばヨウ化プロビジウム又はヘキスト色素、どちらもSigmaから入手できる）で染色する。次に蛍光を、例えばFACS Scanフローサイトメータを使って測定する。次に、細胞周期の各期にある細胞の百分率を、例えばCellFITソフトウェア（Becton Dickinson）のSOBRモデルを使って決定することができる。EPO又は活性ペプチドで処理した細胞では、陰性対照群と比較してS期にある細胞（増加したDNA含量の指標となる増加した蛍光によって決定されるもの）の比率が大きくなるだろう。

10

20

#### 【0122】

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]を使って行なうことができる。FDCP-1は、WEHI-3馴化培地(IL-3を含有する培地、ATCC番号TIB-68)を補足すれば増殖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原始造血前駆体細胞株である。そのような実験では、FDCP-1細胞株にヒト又はマウスEPO-Rをトランスフェクトして、EPOの存在下で増殖できるが分化することはできない、それぞれFDCP-1-hEPO-R又はFDCP-1-mEPO-R細胞株を作製する。EPO依存性細胞株であるTF-1も、細胞増殖に対するペプチドEPO-Rアゴニストの効果を測定するために使用することができる。

30

#### 【0123】

さらにもう一つのアッセイでは、脾臓細胞へのH<sup>3</sup>-チミジン取り込みに基づく微量アッセイに関する、Krystal (1983) Exp. Hematol 11:649-660に記載の手法を使って、EPOアゴニストとして機能する本発明の化合物の能力を確認することができる。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日目に脾臓細胞を取り出し、24時間にわたるその増殖能力を、MTTアッセイを使って確認する。

#### 【0124】

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、受容体のチロシンリン酸化と、数多くの細胞内タンパク質、例えばShc、vav及びJAK2キナーゼのチロシンリン酸化をどちらも誘発する。したがってもう一つのアッセイでは、EPO-R及び下流の細胞内シグナル伝達タンパク質のチロシンリン酸化を誘発する本発明のペプチドの能力を測定する。上述の結合アッセイ及び増殖アッセイで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とほぼ同じリン酸化パターンを引き出す。このアッセイでは、FDCP-1/ER細胞[Dexter, et al. (1980) J Exp Med 152:1036-47]をEPO補足培地中に維持し、定常期まで成長させる。次に、これらの細胞を、EPOを含まない培地で24時間培養する。次に、所定の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を使った細胞の対照試料も各アッセイと共に処理する。次に、処理された細胞を遠心分離によって

40

50

集め、SDS溶解緩衝液に再懸濁し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。ゲル中の電気泳動されたタンパク質をニトロセルロースに転写し、プ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技法によって視覚化する。例えばプロットを抗ホスホチロシン抗体（例えばUpstate Biotechnology, Inc.のマウス抗ホスホチロシンIgG）でプローブし、洗浄した後、二次抗体[例えばKirkgaard & Perry Laboratories, Inc. (ワシントンDC)のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG]でプローブすることができる。その後、ホスホチロシン含有タンパク質を、標準的な技法、例えば比色アッセイ、化学発光アッセイ、又は蛍光アッセイなどによって可視化することができる。例えば化学発光アッセイはAmershamのECL Western Blotting Systemを使って行なうことができる。

10

#### 【0125】

本発明のペプチドの活性を評価するために使用することができるもう一つの細胞ベースインビトロアッセイは、マウス骨髓細胞又はヒト末梢血細胞を用いるコロニーアッセイである。マウス骨髓はマウス的大腿骨から得ることができ、ヒト末梢血の試料は健常ドナーから得ることができる。末梢血の場合、例えばフィコール-ハイバック勾配による遠心分離によって、まず単核球が血液から単離される[Stem Cell Technologies, Inc. (カナダ・バンクーバ)]。このアッセイでは、有核細胞の計数を行なって、元の試料における有核細胞の数及び濃度を確定する。製造者の指示[Stem Cell Technologies, Inc. (カナダ・バンクーバ)]に従って、所定の数の細胞をメチルセルロース上に播種する。実験群を試験ペプチドで処理し、陽性対照群をEPOで処理し、陰性対照群には処理を加えない。次に、所定のインキュベーション期間（一般的には10日及び18日）後に、成長するコロニーの数を、各群についてスコア化する。活性ペプチドはコロニー形成を促進するだろう。

20

#### 【0126】

本発明の化合物の活性を証明するために使用することができる他のインビトロ生物学的アッセイが、Greenberger, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2935 (EPO依存性造血前駆体細胞株); Quelle and Wojchowski (1991) J. Biol. Chem. 266:609-614 (B6Sut. EPO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細胞における細胞質タンパク質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-mybの発現); Witthuhn, et al. (1993) Cell 74:227-236 (JAK2の会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); 及びAndo, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9571-9575 (サイクリンD2及びD3によるG<sub>1</sub>移行の調節)に開示されている。

30

#### 【0127】

Molecular Devices Corp.によって設計されたマイクロフィジオメータ(microphysiometer)と呼ばれる装置は、さまざまな受容体に対するアゴニスト及びアンタゴニストの効果の測定に、うまく使用できると報告されている。この機器の原理は、受容体活性化に应答して起こる細胞外培地の酸性化速度の変化を測定することにある。

40

#### 【0128】

##### インビボ機能アッセイ

試験ペプチドの力価を評価するために使用することができるインビボ機能アッセイの一つは、低酸素多血(polycythemic exhypoxic)マウスバイオアッセイである。このアッセイではマウスを数日にわたって交互の条件付けサイクルに供する。このサイクルではマウ

50

スが減圧状態の期間と周囲圧状態の期間とを交互に繰り返す。その後、マウスを2～3日間周囲圧に維持してから、試験試料の投与を行なう。試験ペプチド試料、又は陽性対照マウスの場合のEPO標準は、条件付けされたマウスに皮下注射される。放射標識された鉄（例えば $^{59}\text{Fe}$ ）を2日後に投与し、放射標識された鉄を投与した2日後に、血液試料を採取する。次に、ヘマトクリット及び放射能測定値を、各血液試料について、標準的技法で決定する。活性試験ペプチドを注射したマウスから得られる血液試料は、試験ペプチドもEPOも投与されなかったマウスより高い放射能（赤血球ヘモグロビンによる $\text{Fe}^{59}$ の結合に起因するもの）を示すだろう。

#### 【0129】

試験ペプチドの力価を評価するために使用することができるもう一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。このアッセイでは、正常無処置マウスに、3日連続して、EPO又は試験ペプチドを皮下注射する。3日目にはマウスに鉄デキストランも腹腔内注射する。5日目に血液試料をマウスから集める。血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解析（網状赤血球数（retic-count）プログラム）で決定する。加えて、ヘマトクリットも手作業で決定する。補正された網状赤血球のパーセントは、次の式を使って決定される：

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

活性試験化合物は、試験ペプチドもEPOも投与しなかったマウスと比較して、増加した $\% \text{RETIC}_{\text{補正}}$ レベルを示すだろう。

#### 【0130】

本発明のEPO-Rアゴニストペプチドの使用

本発明のペプチド化合物は、EPOの生物学的役割を理解するためのツールとして、例えばEPOの産生及びEPO-RへのEPOの結合に影響を及ぼし、またEPOの産生及びEPO-RへのEPOの結合によって影響されと思われる多くの因子（例えばEPO/EPO-Rシグナル伝達/受容体活性化の機構）の評価に、インビトロで役立つ。本ペプチドはEPO-Rに結合する他の化合物の開発にも役立つ。なぜなら本化合物は、その開発を容易にする重要な構造-活性相関情報を与えるからである。

#### 【0131】

さらにまた、本発明のペプチドは、EPO-Rに結合するその能力に基づいて、生細胞上、固定された細胞上、生体液中、組織ホモジネート中、精製天然生物材料中などのEPO-Rを検出するための試薬として使用することもできる。例えば、そのようなペプチドを標識することにより、表面にEPO-Rを有する細胞を同定することができる。加えて、本発明のペプチドは、EPO-Rに結合するその能力に基づいて、in situ染色、FACS（蛍光活性化細胞分別）解析、ウェスタンブロット法、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）などに使用することができる。加えて、本発明のペプチドは、EPO-Rに結合するその能力に基づいて、受容体の精製や、細胞表面（若しくは透過処理された細胞の内部）にEPO-Rを発現させる細胞の精製に、使用することができる。

#### 【0132】

本発明のペプチドは、さまざまな医学研究及び診断目的に市販試薬として利用することもできる。限定するわけではないが、そのような使用には、（1）さまざまな機能アッセイにおいて候補EPO-Rアゴニストの活性を定量するための較正標準としての使用；（2）ランダムペプチドスクリーニングにおけるブロック試薬としての使用、すなわち、EPO-Rペプチドリガンドの新しいファミリーを捜す際に、本発明のEPOペプチドの回収を阻止するために、本ペプチドを使用することができる；（3）EPO-Rとの共結晶化における使用、すなわちEPO-Rに結合した本発明のペプチドの結晶を形成させることができ、それにより、X線結晶解析による受容体/ペプチド構造の決定が可能になる；（4）分化を開始することによって、グロビン合成及びヘム錯体合成を誘導し、フェリチン受容体の数を増加させる、赤血球前駆体細胞の能力を測定するための使用；（5）EPO依存的細胞株、例えばFDCP-1-mEPO-R細胞株及びTF-1細胞株の増

10

20

30

40

50



殖及び成長を維持するための使用；（６）放射性発色団による本発明のペプチドの標識に係る使用；並びに（７）EPO-Rが好ましく活性化され、又はそのような活性化が既知量のEPO-Rアゴニストなどに対して都合よく較正されるような、他の研究及び診断用途、を含めることができる。

#### 【０１３３】

本発明のさらにもう一つの態様では、処置方法及び医薬の製造方法が提供される。本発明のペプチド化合物は、インビボでEPO-RへのEPOの結合を刺激するために、温血動物（ヒトを含む）に投与することができる。したがって本発明は、EPOの不足に関連する障害の治療的処置方法であって、EPO-Rを刺激するのに十分な量、したがってインビボでのEPOの不足に関連する症状を軽減するのに十分な量で、本発明のペプチドを投与することを含む方法を包含する。例えば本発明のペプチドは、腎不全及び／又は末期腎不全／透析；慢性腎臓疾患、AIDSに関連する貧血；慢性炎症性疾患（例えば関節リウマチ及び慢性腸炎）並びに自己免疫疾患に関連する貧血の処置や、手術前の患者の赤血球数の増強に役立つだろう。本発明のペプチドを投与することによって処置しうる他の疾患状態、障害、及び血液異常状態には、ベータサラセミア；嚢胞性線維症；妊娠及び月経障害；未熟児早期貧血；脊髄損傷；宇宙飛行；急性失血；加齢；脳卒中、虚血（CNS虚血及び心虚血の両方）；並びに異常赤血球生成を伴う種々の新生物疾患状態が挙げられる。

10

#### 【０１３４】

別の実施形態では、本発明のペプチド化合物を、低赤血球数又は赤血球の不足を特徴としない障害の処置に、例えば輸液に先立つ前処置として、使用することができる。加えて、本発明の化合物の投与は出血時間の低下をもたらすことができ、したがって術前の患者への投与又は出血が起こると予想される適応症に役立つだろう。加えて、本発明の化合物は巨核球の活性化にも役立つだろう。

20

#### 【０１３５】

EPOは、血管内皮細胞に対する分裂促進効果及び化学走性効果並びに中枢コリン作動性ニューロンに対する効果を有することが示されているので〔例えばAmagnostou, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5978-5982及びKonishi, et al. (1993) Brain Res. 609:29-35参照〕、本発明の化合物は、さまざまな血管障害の処置、例えば創傷治療の促進；側副冠血管の成長（例えば心筋梗塞後に起こりうるもの）の促進；外傷処置；及び血管移植後処置にも役立つだろう。本発明の化合物は、一般に、低いアセチルコリン絶対レベル、又は他の神経活性物質（例えば神経伝達物質）と比較して低いアセチルコリン相対レベルを特徴とする、さまざまな神経障害の処置にも役立つだろう。

30

#### 【０１３６】

##### 医薬組成物

本発明のさらにもう一つの態様では、上記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軽減又は調整されうる状態には上に示したものが含まれる。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（受動的投与又はイオントフォoresis若しくはエレクトロポレーションを用いる投与）、経粘膜（鼻、膣、直腸、又は舌下）投与経路による投与用、又は生分解性インサートを使った投与用であることができ、各投与経路に適した剤形に製剤することができる。一般に、本発明に包含されるのは、本発明のEPO-Rアゴニストペプチド又は誘導品の有効量を、医薬的に許容できる希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、佐剤及び／又は担体と共に含む医薬組成物である。そのような組成物は、さまざまな緩衝剤含量（例えばトリス-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pH及びイオン強度の希釈剤；添加剤、例えば洗剤及び可溶化剤（例えばツイーン20、ツイーン80、ポリソルベート80）、酸化防止剤（例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えばチメルソール（Thimersol）、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）；ポリマ化合物（例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸など）の粒状調製物又はリポソームへの材料の組み込みを含む。ヒアルロン酸も使用しうる。そのよ

40

50

うな組成物は、本タンパク質及び誘導体の物理的状态、安定性、インピボ放出速度、及びインピボクリアランスの速度に影響を及ぼしうる。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)の1435～1712頁を参照されたい。本組成物は液状に製造してもよいし、乾燥粉末（例えば凍結乾燥）の形態であってもよい。

#### 【0137】

##### 経口送達

ここでの使用が考えられるのは、経口固形剤形であり、これは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)の第89章に概説されている。固形剤形には、錠剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤又は口中錠、カシェ剤、ペレット剤、粉末剤、又は顆粒剤が挙げられる。また、リボソーム又はプロテノイド封入も、（例えば米国特許第4,925,673号に報告されているプロテノイドミクロスフェアのような）本組成物の製剤に使用することができる。リボソーム封入を使用することができ、リボソームはさまざまなポリマで誘導体化することができる（例えば米国特許第5,013,556号）。治療薬のための考える固形剤形は、Marshall, K.により、「Modern Pharmaceutics」(G. S. Banker及びC. T. Rhodes編)の第10章(1979)に説明されており、この文献は参照により本明細書に組み込まれる。一般に本製剤は、EPO-Rアゴニストペプチド（又はその化学修飾体）と、胃環境からの保護及び腸での生物活性物質の放出を見込んだ不活性成分とを含む。

10

20

#### 【0138】

また、経口投与用の液状剤形、例えば医薬的に許容できる乳剤、溶液、懸濁剤、及びシロップ剤も、ここでの使用が考えられ、これは、他の構成要素、例えば不活性希釈剤；佐剤、例えば湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤；並びに甘味剤、着香剤、及び芳香剤を含有しうる。

#### 【0139】

本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することができる。一般に、考えられる化学修飾は構成要素分子そのものへの少なくとも一つの部分の取付けであり、前記部分は（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り込みを可能にする。また、1又は複数の構成要素の総合的安定性の増加及び体内での循環時間の増加も望まれる。上述のようにPEG化は医薬的使用法にとって好ましい化学修飾である。使用しうる他の部分には、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、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（tioxocane）が挙げられる[例えばAbuchowski and Davis (1981)「Soluble Polymer-Enzyme Adducts」Enzymes as Drugs. Hoenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, NY) pp. 367-383；及びNewmark, et al. (1982) J. Appl. Biochem. 4:185-189参照]。

30

#### 【0140】

経口製剤の場合、放出場所は胃、小腸（十二指腸、空腸、若しくは回腸）、又は大腸でありうる。当業者は、胃では溶解しないが、十二指腸又は腸のどこか他の場所で物質を放出する製剤を利用することができる。好ましくは、放出は、ペプチド（又は誘導体）を保護することによるか、或いは胃環境を越えてから、例えば腸内で、ペプチド（又は誘導体）を放出することによって、胃環境の有害な作用を回避する。

40

#### 【0141】

完全な胃耐性を保証するには、少なくともpH5.0までは不浸透性のコーティングが不可欠である。腸溶コーティングとして使用される、より一般的な不活性成分の例は、酢酸セルローストリメリテート（CAT）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート（HPMCP）、HPMCP50、HPMCP55、ポリ酢酸ビニルフタレート（PVAP）、オイドラギットL30D、アクアテリック、酢酸セルロースフタレート（CAP

50

）、オイドラギット L、オイドラギット S、シェラックである。これらのコーティングは混合フィルムとして使用することができる。

#### 【0142】

コーティング又はコーティングの混合物は、胃からの保護を意図しない錠剤にも使用することができる。これには、糖コーティング、又は錠剤を嚥下しやすくするコーティングを含めることができる。カプセル剤は、乾燥治療薬（すなわち粉末）を送達するためのハードシェル（例えばゼラチン）からなることができ、液状治療薬には軟ゼラチンシェルを使用することができる。カシェ剤のシェル材料は厚いデンブun又は他の可食ペーパーであることができる。丸薬、口中剤、成型錠剤又は擦り込み錠には、湿式塊化（moist massing）技法を使用することができる。

10

#### 【0143】

本ペプチド（又は誘導体）は、粒径約 1 mm の顆粒又はペレットの形をした微細マルチ粒子（fine multiparticulates）として製剤に組み込むことができる。カプセル投与用の物質の製剤は、粉末として、又は軽く圧縮したプラグ（plug）として行なうことができ、さらには錠剤として行なうこともできる。これらの治療薬は圧縮によって製造することができる。

#### 【0144】

着色剤及び/又は着香剤も含めることができる。例えばペプチド（又は誘導体）を（例えばリボソーム又はマイクロスフェア封入などによって）製剤した後、さらに可食製品、例えば着色剤及び着香剤を含有する冷蔵保存飲料などに含有させることができる。

20

#### 【0145】

ペプチド（又は誘導体）の体積を不活性物質で希釈又は増加させることができる。これらの希釈剤には、糖質、特にマンニトール、-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ブunを挙げることができる。一定の無機塩、例えば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も、充填剤として使用することができる。市販希釈剤の例は、ファースト-フロ（Fast-Flo）、エムデックス（Emdex）、STA-Rx 1500、エムコンプレス（Emcompress）及びアビセルである。

#### 【0146】

固形剤形への治療薬の製剤には崩壊剤を含めることができる。限定するわけではないが、崩壊剤として使用される材料には、デンブun、例えばデンブunに基づく市販の崩壊剤であるエキスプロタブが含まれる。グリコール酸デンブunナトリウム、アンバーライト、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（ultramylpectin）、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、海綿及びベントナイトは全て使用することができる。崩壊剤は不溶性カチオン交換樹脂であることもできる。粉末ゴムを崩壊剤及び結合剤として使用することができ、これには粉末ゴム、例えば寒天、カラヤゴム又はトラガカントゴムを挙げることができる。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。

30

#### 【0147】

結合剤はペプチド（又は誘導体）剤を一つに保持して硬い錠剤を形成させるために使用することができ、これには天然物由来の材料、例えばアラビアゴム、トラガカント、デンブun及びゼラチンが挙げられる。その他、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）も挙げられる。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）を造粒するために、アルコール溶液中で使用することができる。

40

#### 【0148】

製剤プロセス中の粘着を防ぐために、ペプチド（又は誘導体）の製剤には減摩剤を含めることができる。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することができ、限定するわけではないが、これには、ステアリン酸（そのマグネシウム塩及びカルシウム塩を含む）、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挙げることができる。可溶性潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム、

50

ラウリル硫酸マグネシウム、さまざまな分子量のポリエチレングリコール、カーボワックス 4000 及び 6000 などを使用することができる。

【0149】

製剤時に薬物の流動性を改善しうる流動促進剤を、圧縮時の再配列を助けるために加えてもよい。流動促進剤には、デンプン、タルク、熱分解法シリカ及び水和シリコアルミネートを挙げることができる。

【0150】

水性環境へのペプチド(又は誘導体)の溶解を助けるために、界面活性剤を湿潤剤として加えてもよい。界面活性剤には、アニオンデタージェント、例えばラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルソジウムスルホサクシネート及びジオクチルソジウムスルホネートなどを挙げることができる。カチオンデタージェントを使用してもよく、これにはベンザルコニウムクロライド又はベンゼトニウムクロライドを挙げることができる。界面活性剤として製剤に含めることができる潜在的な非イオン性デタージェントのリストは、ラウロマクロゴール 400、ポリオキシシル 40 ステアレート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 10、50 及び 60、グリセロールモノステアレート、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、又はさまざまな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できる。

10

【0151】

ペプチド(又は誘導体)の取り込みを潜在的に強化する添加剤は、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。

20

【0152】

放出制御経口用製剤が望ましい可能性がある。拡散機序又は浸出機序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)中にペプチド(又は誘導体)を組み込むことができる。ゆっくり変性するマトリックスも製剤中に組み込むことができる。いくつかの腸溶コーティングも、遅延放出効果を有する。放出制御のもう一つの形態は、Oros 治療システム(Alza Corp.)に基づく方法によるものである。すなわち、浸透圧効果によって単一の小さな開口部から水の進入を可能にし、かつ薬物を押し出すことを可能にする半透膜に、薬物を封入する。

【0153】

30

製剤には他のコーティングを使用することができる。これらには、コーティングバンで適用することができるさまざまな糖が挙げられる。ペプチド(又は誘導体)をフィルムコート錠に入れて与えることもでき、その場合に使用される材料は2つの群に分割される。1つ目は非腸溶性材料であり、これには、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、プロピドン(providone)及びポリエチレングリコールが挙げられる。2つ目の群は、一般的にフタル酸のエステル類である腸溶性材料を含める。

【0154】

40

最適なフィルムコーティングを得るために、材料の混合物を使用してもよい。フィルムコーティングは、パンコーティング機又は流動床で行なってもよいし、圧縮コーティングによって行なってもよい。

【0155】

非経口送達

非経口投与のための本発明の調製物には、滅菌された水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳剤が挙げられる。非水性溶媒又は溶剤の例は、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、並びに注射可能な有機エステル、例えばエチルオレートである。そのような剤形は、佐剤、例えば保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤も含有しうる。それらは、例えば細菌保持フィルタによる濾過、組成物への滅菌剤の組み込み、組成物の放射線照射、又は組成物の加熱によっ

50

て滅菌することができる。滅菌水又は他の何らかの滅菌注射可能媒質を使って、それらを使用直前に作製することもできる。

#### 【0156】

直腸送達又は膣送達

直腸又は膣投与用の組成物は、好ましくは坐剤であり、これは、活性物質に加えて、賦形剤、例えばカカオ脂又は坐剤用ワックスを含みうる。鼻又は舌下投与用の組成物も当分野で周知の標準的賦形剤を使って製造される。

#### 【0157】

肺送達

ここではEPO-Rアゴニストペプチド（又はその誘導体）の肺送達も考えられる。ペプチド（又は誘導体）は、吸入時に哺乳動物の肺に送達され、肺の上皮層を横切って血流に至る〔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（1-アンチトリプシン）; Smith, et al., (1989) J. Clin. Invest. 84:1145-1146（-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-及び腫瘍壊死因子）; 及び米国特許第5, 284, 656号（Platzら）（顆粒球コロニー刺激因子）参照〕。全身作用を得るために薬物を肺送達するための方法及び組成物は米国特許第5, 451, 569号（Wongら）に記載されている。

#### 【0158】

治療薬製品の肺送達用に設計された種々の機械器具も、本発明の実施における使用が考えられる。限定するわけではないが、そのような機械器具には、ネブライザ、定量吸入器、及び粉末吸入器が含まれ、これらは全て当業者にはよく知られている。本発明の実施に適した市販器具の具体例には、Ultraventネブライザ（Mallinckrodt Inc.、ミズーリ州セントルイス）、Acorn IIネブライザ（Marquest Medical Products、コロラド州エングルウッド）、Ventolin定量吸入器（Glaxo Inc.、ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク）、及びSpinhaler粉末吸入器（Fisons Corp.、マサチューセッツ州ベッドフォード）がある。

#### 【0159】

これらの器具はいずれもペプチド（又は誘導体）の投薬に適した製剤の使用を必要とする。通例、各製剤は、使用する器具のタイプに固有であり、治療に有用な通常の希釈剤、佐剤及び/又は担体に加えて、適当な噴射材の使用を伴いうる。また、リボソーム、マイクログラブル若しくはマイクロスフェア、包接錯体、又は他のタイプの担体の使用も考えられる。化学修飾ペプチドは、化学修飾のタイプ又は使用する器具のタイプに応じて、異なる製剤に調製することもできる。

#### 【0160】

ネブライザ（ジェット又は超音波）と共に使用するのに適した製剤は、通例、溶液1 mLにつき生物活性タンパク質約0.1~25 mgの濃度で水に溶解させたペプチド（又は誘導体）を含む。製剤は緩衝剤及び単糖も含みうる（例えばタンパク質の安定化及び浸透圧の調節のため）。ネブライザ用製剤は、エアロゾルを形成する際に溶液の噴霧によって引き起こされるペプチド（又は誘導体）の表面誘発凝集を減少させ又は防止するために、界面活性剤も含有しうる。

#### 【0161】

定量吸入器と共に使用される製剤は、一般に、界面活性剤を利用して噴射剤に懸濁させたペプチド（又は誘導体）を含有する微細粉末を含む。噴射剤は、この目的に使用される従来の任意の材料、例えばクロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、

10

20

30

40

50

ハイドロフルオロカーボン、又は炭化水素、例えば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、又はそれらの組合せなどであることができる。適切な界面活性剤には、ソルビタントリオレート及び大豆レシチンが含まれる。オレイン酸も界面活性剤として役立つ。

#### 【0162】

粉末吸入器具から投薬するための製剤は、ペプチド（又は誘導体）を含有する微細乾燥粉末を含み、増量剤、例えばラクトース、ソルビトール、スクロース、又はマンニトールも、その器具からの粉末の分散を容易にする量（例えば製剤の 50 ~ 90 重量%）で含む。ペプチド（又は誘導体）は、肺末端に最も効果的に送達されるように、最も好都合には、10 mm（又はミクロン）未満、最も好ましくは 0.5 ~ 5 mm の平均粒径を有する粒子状に、調製されるべきである。

10

#### 【0163】

##### 鼻送達

EPO-R アゴニストペプチド（又は誘導体）の鼻送達も考えられる。鼻送達は、鼻への治療薬製品の投与後に、ペプチドが血流に直接移行することを可能にし、その製品を肺に沈着させる必要がない。鼻送達用の製剤には、デキストラン又はシクロデキストランを含むものが挙げられる。

#### 【0164】

鼻送達を容易にするために使用される他の浸透強化剤も、本発明のペプチドと一緒に使用することが考えられる（例えば参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許公開第 2004056314 号（2003 年 12 月 17 日出願）に記載されているもの）。

20

#### 【0165】

##### 投薬量

全ての本ペプチド化合物について、さらなる研究が行なわれるにつれて、さまざまな患者におけるさまざまな状態を治療するのに適当な投薬量レベルに関する情報が明らかになり、当業者は、治療状況、受容者の年齢及び全身の健康状態を考慮して、適正な投薬を確かめることができるだろう。選択される投薬量は、所望する治療効果、投与経路、及び所望する処置継続期間に依存する。一般に、毎日 0.001 ~ 10 mg / kg 体重の投薬量レベルが、哺乳動物に投与される。一般に、静脈内注射又は静脈内注入の方が、投薬量は少ないだろう。

30

#### 【0166】

一定の実施形態では、本発明のペプチドのいずれか一つを使って、透析前又は透析中の腎不全を有する個体（透析前患者又は透析患者）を処置することができる。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）あたり 0.025 ~ 0.2 ミリグラム（mg）の化合物（0.025 ~ 0.2 mg / kg）であり得る。より具体的には、0.05 ~ 0.1 mg / kg の用量範囲が好ましいだろう。さらにまた、医師は、まず 0.025 mg / kg から開始して使用する投薬量を増加させ、処置を受ける各個体について、個々のヘモグロビン応答に基づいて、およそ 0.025 mg / kg 刻みで投薬量を調整（titrate）することができる。したがって医師は、各個体について、十分なヘモグロビン応答が達成されるまで、投薬量を調整することができる。透析前患者又は透析患者である個体の場合、十分なヘモグロビン応答とは、正常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ほぼ達成することだろう。この実施形態では、個々の透析前患者又は透析患者に関する薬理学的活性用量（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、他の現行赤血球生成刺激剤（ESA）の場合のように毎週ではなく、個々の患者ごとに 3 ~ 4 週間ごとに 1 回という低い投薬頻度であると予想される。多くの投与経路を使用することができる（上述のように経口、IV など）。透析患者にとって好ましい投与経路は静脈内である。透析前患者にとって好ましい投与経路は皮下である。他の一定の実施形

40

50

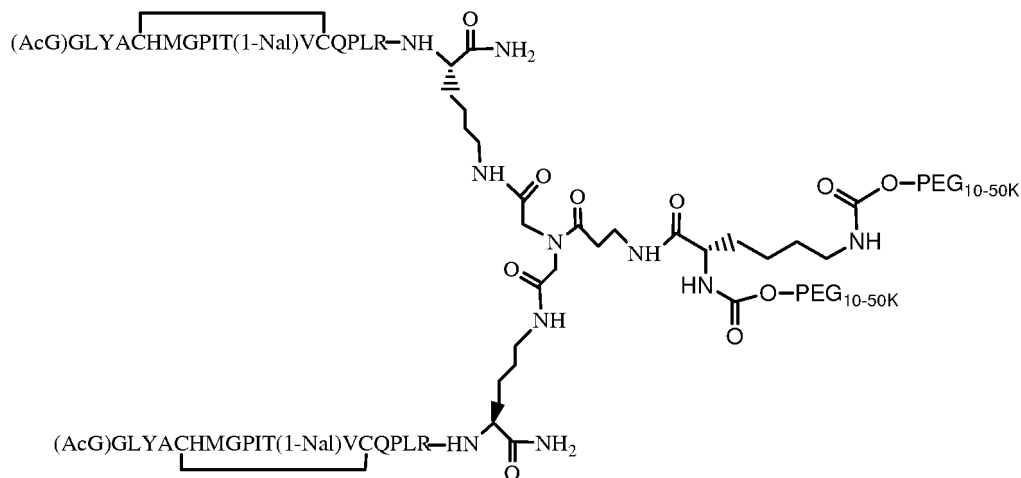
態では、上述の化合物のうち1つを使って、悪性疾患に関連する貧血を有する個体（腫瘍患者）を処置することができる。この実施形態における治療用量範囲は、透析前患者又は透析患者に関する範囲の3～5倍（すなわち0.075～0.5 mg/kg、或いは0.05～0.5 mg/kg）であると予想される。より具体的には、0.2～0.4 mg/kgの用量範囲が好ましい。上記と同様に、腫瘍患者を処置する医師は、0.075 mg/kgから、或いは0.05 mg/kgから出発して、0.075 mg/kg刻み、或いは0.05 mg/kg刻みで、十分なヘモグロビン応答が達成されるまで、投薬量を調整することができる。個々の腫瘍患者に関するPADは、約0.25 mg/kgであると予想される。ここでも、3～4週間おきという低頻度の投薬という利点が、個々の患者について予想される。さらにまた、腫瘍患者にとっての別の利点は、網状赤血球刺激とヘモグロビン上昇の間の誘導期中のヘモグロビンの低下を防ぐために、この投薬量を化学療法前（例えば3～5日前）に投与しうること、又は化学療法と同時投与しうることである。多くの投与経路を使用することができる（上述のように経口、IVなど）。皮下投与は腫瘍患者にとって好ましい投与経路であるだろう。透析前患者、透析患者、又は腫瘍患者の処置に使用するための好ましい化合物には、以下に示すものが挙げられる。

10

## 【0167】

カルバメート結合、サルコシンなし、及びPEG重量の範囲（ここには配列番号1を示す）：

## 【化41】



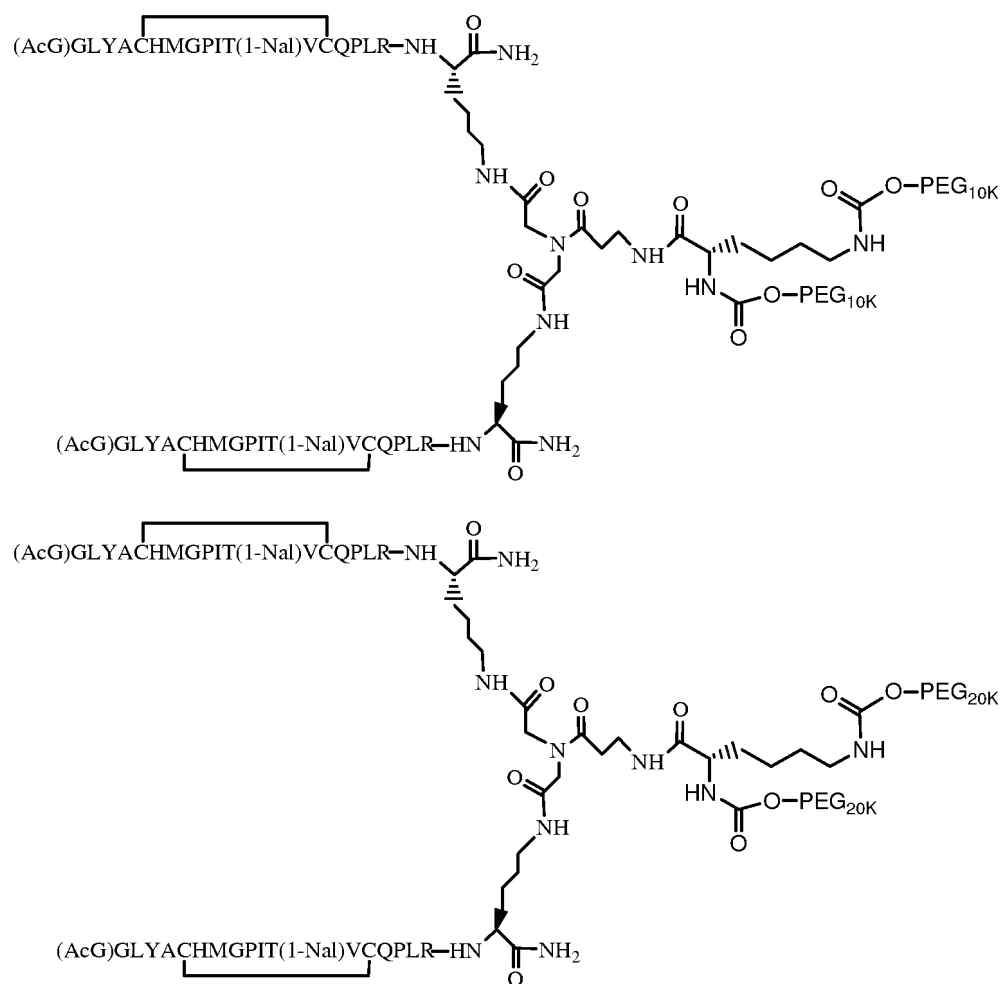
20

30

## 【0168】

カルバメート結合、サルコシンなし、及び好ましいPEG重量（ここには配列番号1を示す）：

## 【化 4 2】

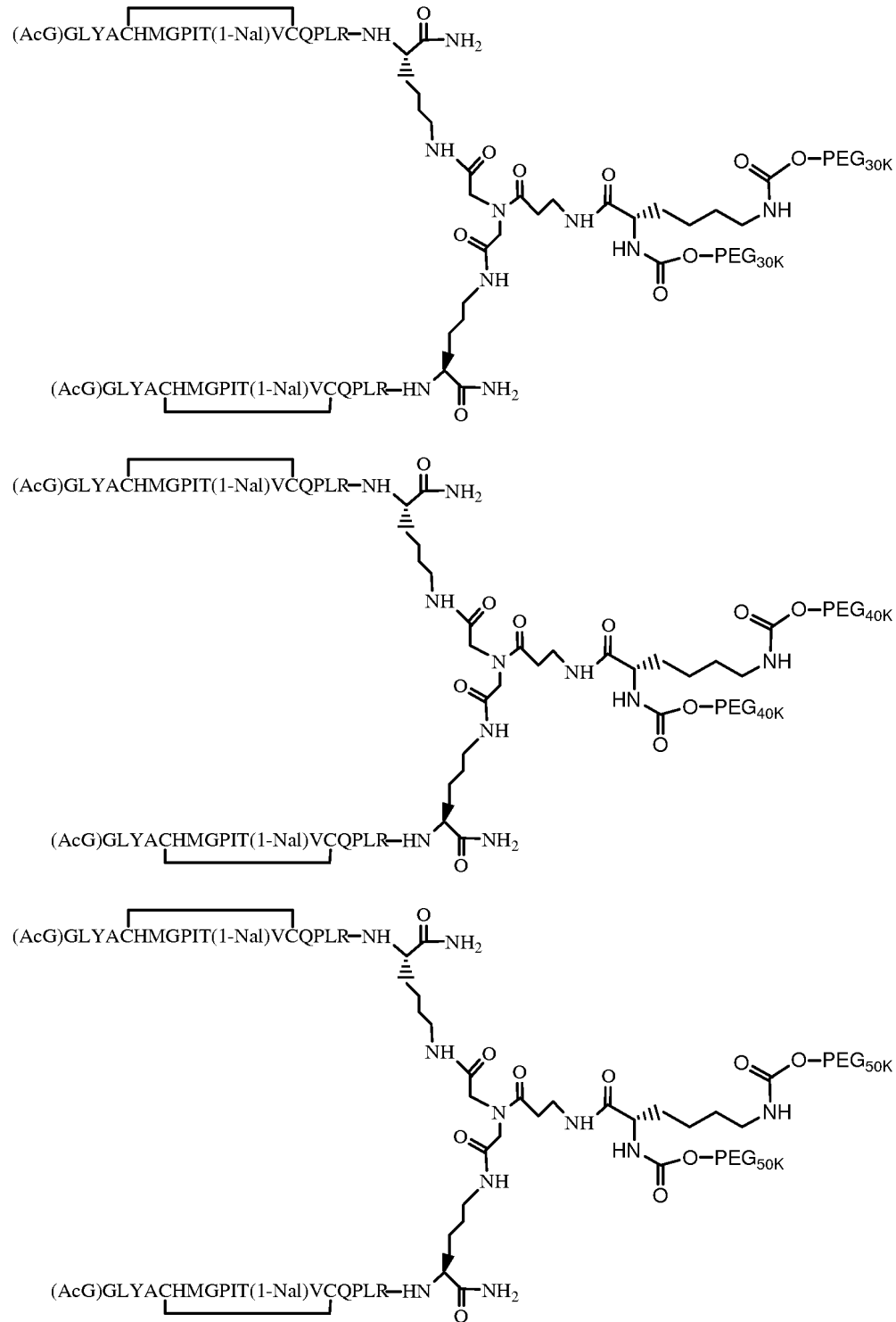


10

20



## 【化 4 3】



10

20

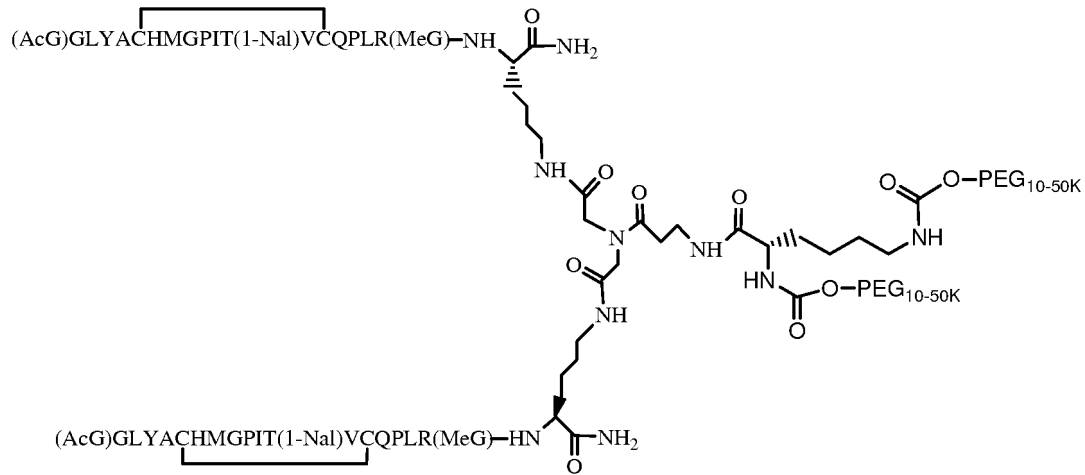
30

40

## 【 0 1 6 9】

カルバメート結合、サルコシンあり、及び P E G 重量の範囲（ここには配列番号 2 を示す）：

## 【化 4 4】

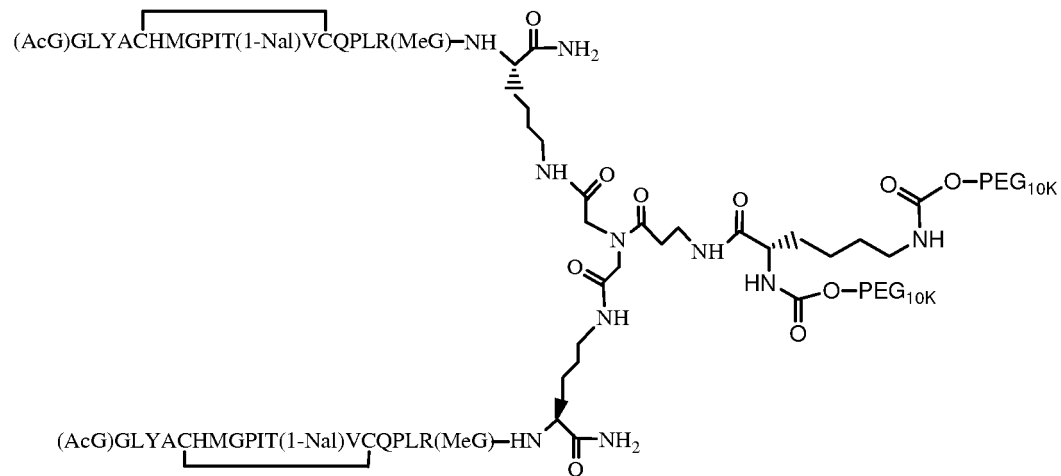


10

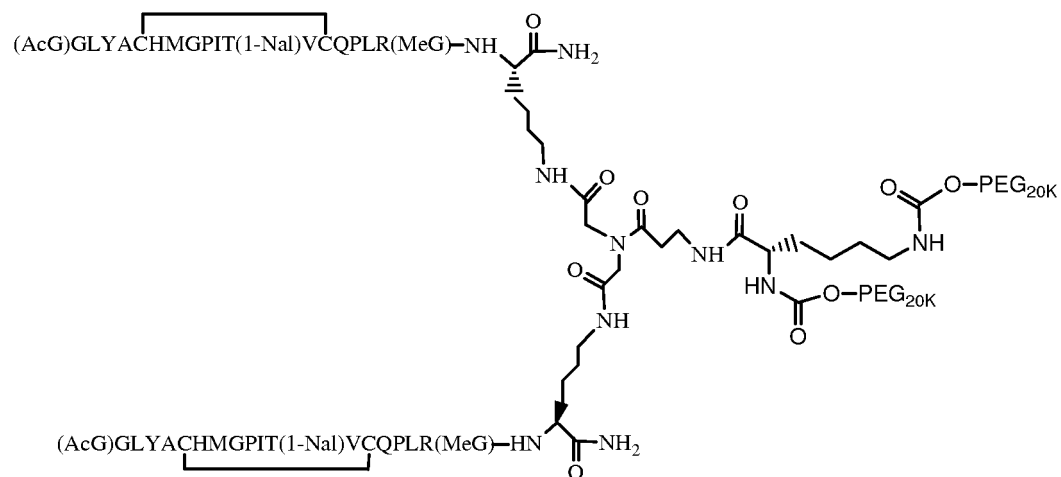
## 【 0 1 7 0】

カルバメート結合、サルコシンあり、及び好ましいPEG重量（ここには配列番号2を示す）：

## 【化 4 5】



20



30

40

10

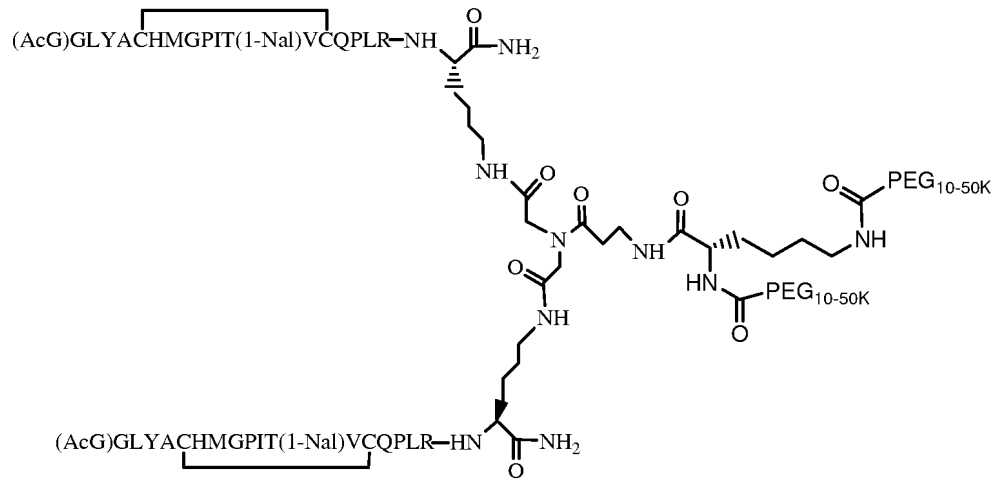
20

30

40

アミド結合、サルコシンなし、及び P E G 重量の範囲（ここには配列番号 1 を示す）：

## 【化 4 7】

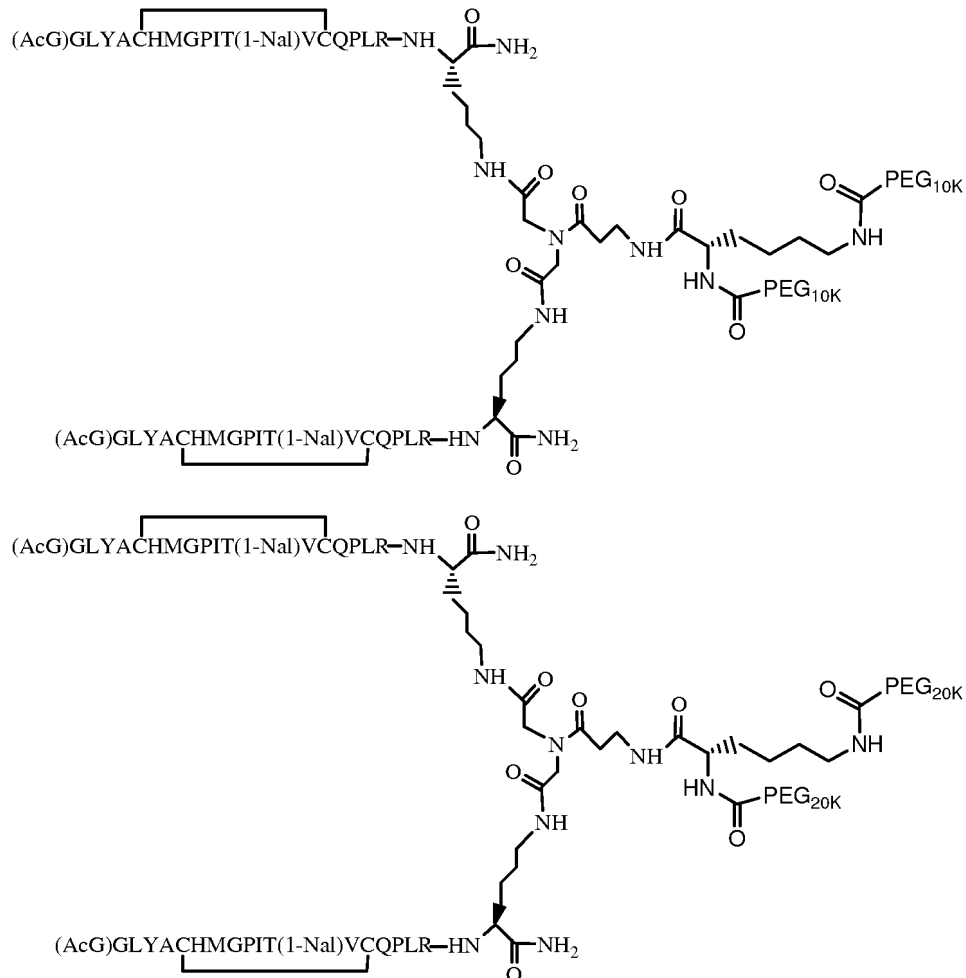


10

## 【 0 1 7 2】

アミド結合、サルコシンなし、及び好ましいPEG重量（ここには配列番号1を示す）：

## 【化 4 8】



20

30

40

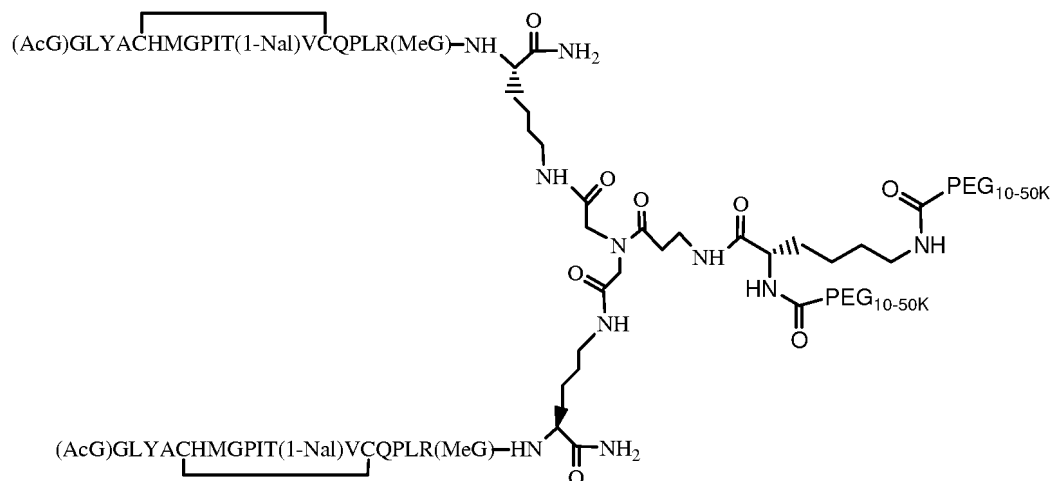
10

20

30

アミド結合、サルコシンあり、及びPEG重量の範囲（ここには配列番号2を示す）：

【化 5 0】

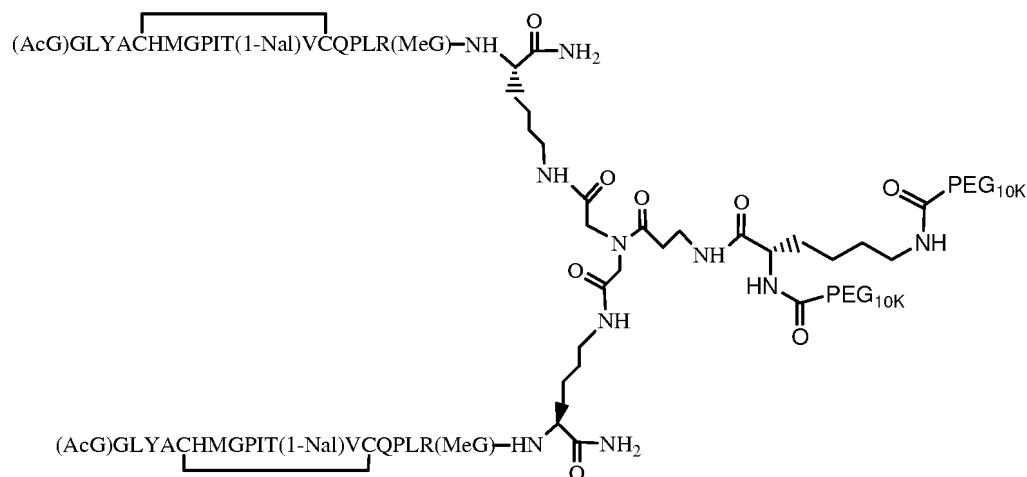


10

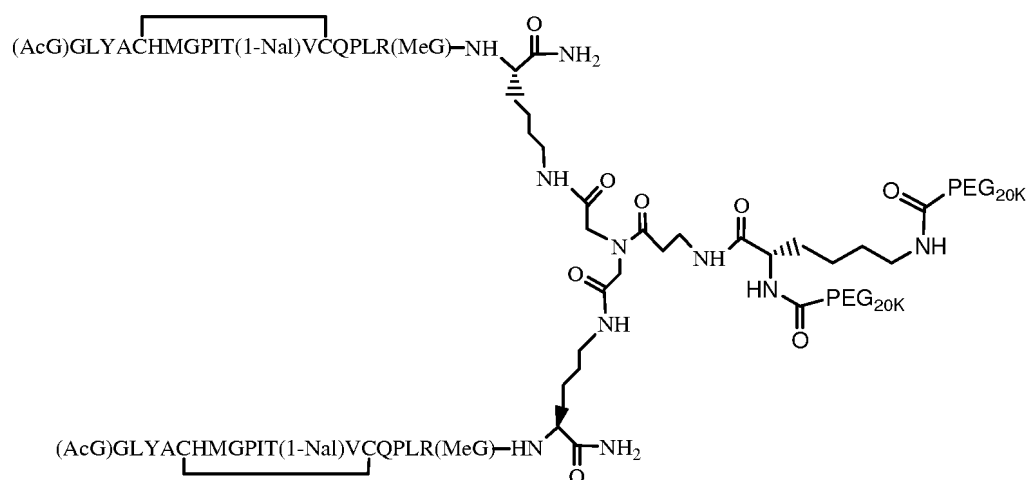
【 0 1 7 4】

アミド結合、サルコシン、及び好ましいPEG重量（ここには配列番号2を示す）：

【化 5 1】



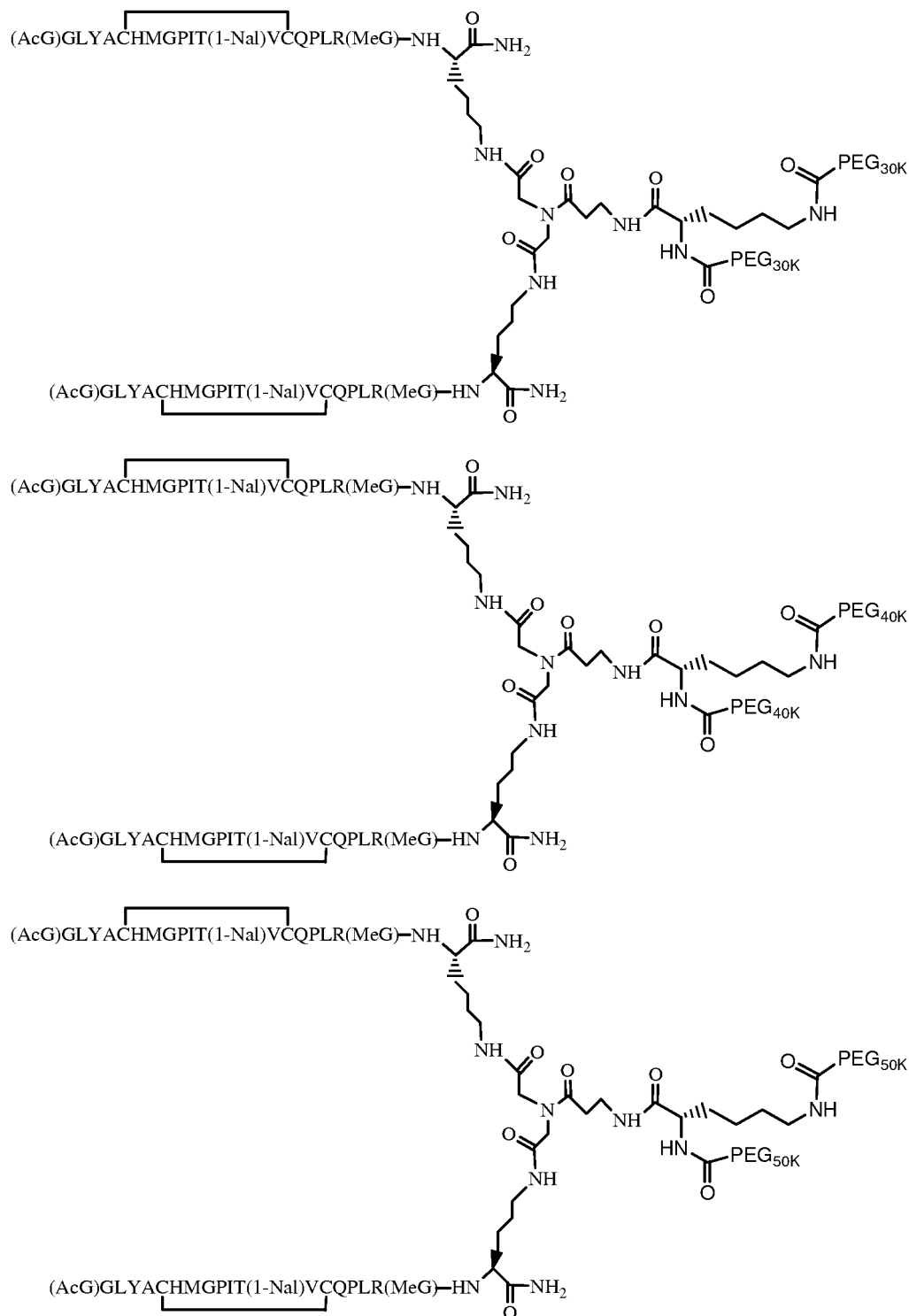
20



30

40

## 【化 5 2】



10

20

30

40

## 【 0 1 7 5】

本発明のペプチド（又はその誘導体）は、1又はそれ以上の追加活性成分又は医薬組成物と一緒に投与することができる。

## 【実施例】

## 【 0 1 7 6】

次に本発明を以下の実施例によって説明する。しかし、これらの実施例及び本明細書のどこかに記載する他の例は、単なる例示であって、決して、本発明の及び例示した形態の範囲及び意味を限定するものではない。また本発明は本明細書に記載するどの特定の好ましい実施形態にも限定されない。実際、本明細書を読んだ当業者には本発明の数多くの変更及び変形が明白であるだろうし、それらを、その要旨及び範囲から逸脱することなく行

50

なうことができる。したがって本発明は、請求項に認められるべき均等物の全範囲と共に、本願特許請求の範囲の語句によってのみ限定されるものとする。

【実施例 1】

【0177】

固相合成による EPO-R アゴニストペプチドダイマーの合成

ステップ 1 - Cbz-TAP の合成：市販のジアミン (Aldrich Chemical Co. の「TAP」) (10 g、67.47 mmol) を含有する無水 DCM (100 ml) 溶液を 0℃ まで冷却した。ベンジルククロホルメート (4.82 ml、33.7 mmol) の無水 DCM (50 ml) 溶液を、滴下漏斗により、反応混合物の温度を 0℃ に維持しながら 6~7 時間かけてゆっくり加えた後、室温 (約 25℃) まで温めた。さらに 16 時間の後、DCM を減圧下で除去し、残渣を 3 N HCl とエーテルとに分配した。水層を集め、50% NaOH 水溶液で pH 8~9 に中和し、エチルアセテートで抽出した。そのエチルアセテート層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した後、減圧下で濃縮することにより、粗モノ-Cbz-TAP (5 g、収率約 50%) を得た。この化合物をこれ以上精製せずに次の反応に使用した。

10

【化 53】

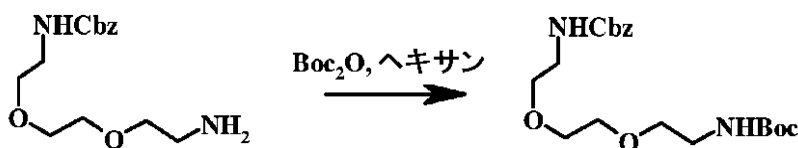


20

【0178】

ステップ 2 - Cbz-TAP-Boc の合成：Cbz-TAP (5 g、17.7 mmol) をヘキサン (25 ml) 中で激しく攪拌した懸濁液に、Boc<sub>2</sub>O (3.86 g、17.7 mmol) を加え、室温で終夜攪拌を続けた。反応混合物を DCM (25 ml) で希釈し、10% クエン酸水溶液 (2 回)、水 (2 回) 及びブラインで洗浄した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、減圧下で濃縮した。粗生成物 (収量 5 g) をそのまま次の反応に使用した。

【化 54】



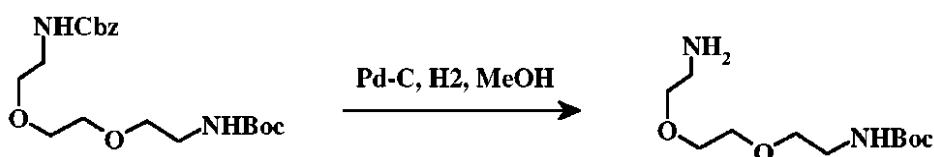
30

【0179】

ステップ 3 - Boc-TAP の合成：先の反応で得た粗生成物をメタノール (25 ml) に溶解し、5% Pd 炭素 (5% w/w) の存在下、バルーン圧力下で 16 時間水素化した。混合物を濾過し、メタノールで洗浄し、濾液を減圧下で濃縮することにより、粗 H-TAP-Boc 生成物 (収量 3.7 g) を得た。ステップ 1~3 後の Boc-TAP のおよその総収率は 44% だった (使用した Cbz-Cl の量に基づいて計算)。

40

【化 55】



【0180】

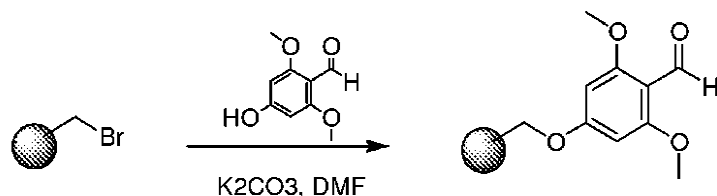
ステップ 4 - Tentagel-リンカーの合成：Tentagel プロミド (2.5 g、0.48 mmol/g、Rapp Polymere、ドイツ)、フェノール系リンカー (5 当量) 及び K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 当量) を、20 mL の DMF 中で 14 時間、70℃ に

50



加熱した。室温まで冷却した後、樹脂を洗浄し（0.1 N HCl、水、ACN、DMF、MeOH）、乾燥することにより、琥珀色の樹脂を得た。

【化56】

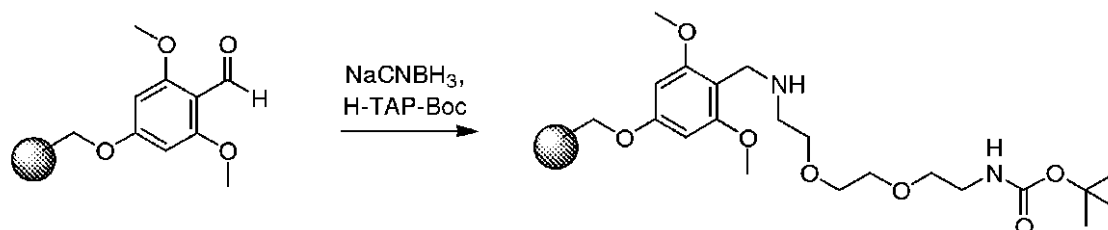


【0181】

10

ステップ5 - Tentagel - リンカー - TAP (Boc) の合成：2.5 gmの上で得た樹脂及びH-TAP-Boc (1.5 gm、5当量) 及び氷AcOH (34  $\mu$ l、5当量) を、1:1のMeOH-THF混合物にとり、終夜振とうした。これに、1 Mシアノ水素化ホウ素ナトリウム (5当量) / THF溶液を加え、さらに7時間振とうした。樹脂を濾過し、洗浄し (DMF、THF、0.1 N HCl、水、MeOH)、乾燥した。少量の樹脂をDCM中、Bz-Cl及びDIEAでベンゾイル化し、70% TFA-DCMで切断し、LCMS及びHPLCでチェックした。

【化57】



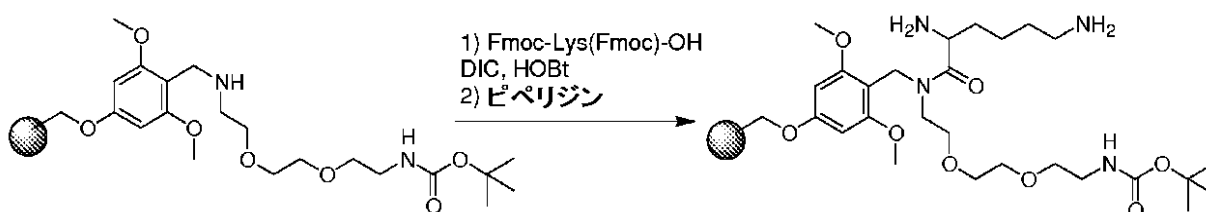
20

【0182】

ステップ6 - Tentagel - リンカー - TAP - Lys の合成：上で得た樹脂を活性化されたFmoc-Lys (Fmoc) - OHの溶液 (5当量のアミノ酸及び5当量のHATUをDMFに0.5 Mの濃度で溶解した後、10当量のDIEAを加えることによって調製) で処理し、14時間穏やかに振とうした。樹脂を洗浄し (DMF、THF、DCM、MeOH)、乾燥することにより、保護樹脂を得た。樹脂をDCM中の10%無水酢酸及び20%ピリジン溶液で20分間処理することによって残存アミン基をキャッピングした後、上述のように洗浄した。樹脂を30%ピペリジン/DMF中で20分間穏やかに振とうすることによってFmoc基を除去した後、洗浄し (DMF、THF、DCM、MeOH)、乾燥した。

30

【化58】



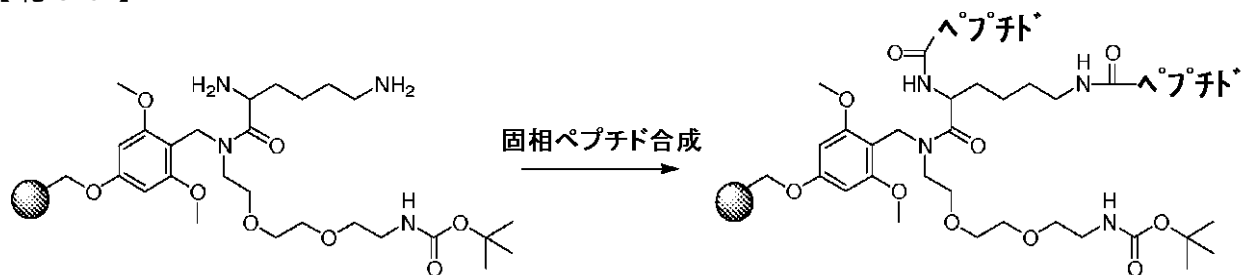
40

【0183】

ステップ7 - Tentagel - リンカー - TAP - Lys (ペプチド)<sub>2</sub> の合成：上で得た樹脂を、HBUT/HOBT活性化によるFmoc-アミノ酸カップリングとピペリジンによるFmoc除去の繰返しサイクルに供することにより、両方のペプチド鎖を同時に構築した。これは、Applied Biosystems, Inc. から入手可能なABI 433自動ペプチド合成装置で、都合よく行なわれた。最後のFmoc除去後に、末端アミノ基をDMF中の無水酢酸 (10当量) 及びDIEA (20当量) で20分間アシル化してから、上述のように洗浄した。

50

## 【化 5 9】

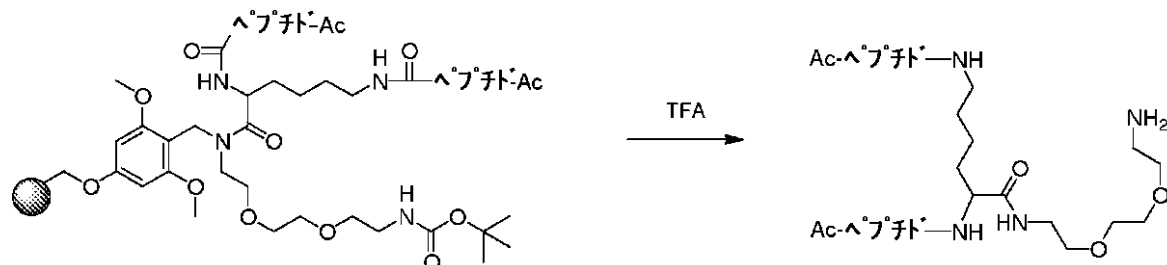


## 【 0 1 8 4】

10

ステップ 8 - 樹脂からの切断：上で得た樹脂を、TFA (82.5%)、フェノール (5%)、エタンジチオール (2.5%)、水 (5%)、及びチオアニソール (5%) の溶液に、室温で 3 時間、懸濁した。これに代わる切断用カクテル、例えば TFA (95%)、水 (2.5%)、及びトリイソプロピルシラン (2.5%) も使用することができる。TFA 溶液を 5 に冷却し、Et<sub>2</sub>O に注ぎ込んで、ペプチドを沈殿させた。減圧下で濾過及び乾燥することにより、所望のペプチドを得た。C18 カラムを用いる分取 HPLC で精製することにより、純粋なペプチドを得た。

## 【化 6 0】



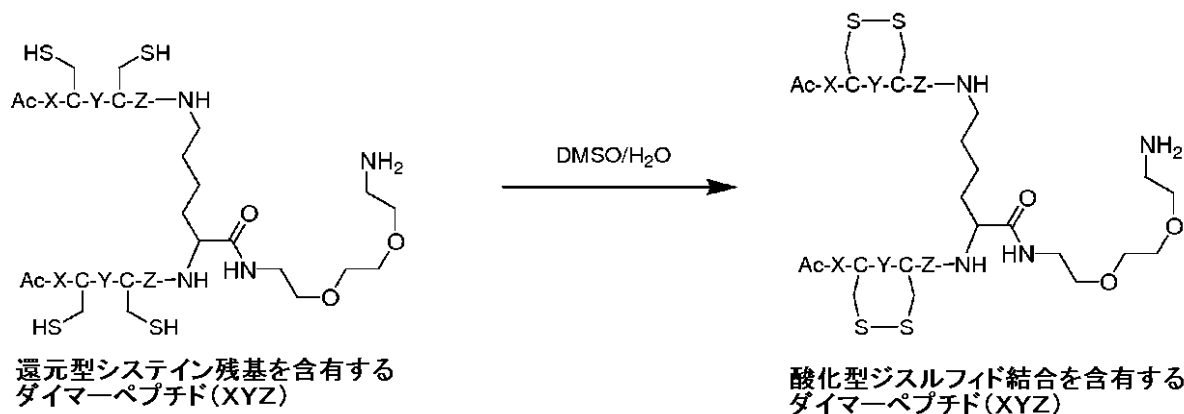
20

## 【 0 1 8 5】

ステップ 9 - ペプチドの酸化による分子内ジスルフィド結合の形成：ペプチドダイマーを 20% DMSO / 水に溶解し (乾燥重量で 1 mg のペプチド / mL)、室温で 36 時間静置した。反応混合物を C18 HPLC カラム (Waters Delta-Pak C18、粒径 15 ミクロン、孔径 300 オングストローム、40 mm x 200 mm 長) にロードした後、40 分にわたって 5% ACN から 95% ACN までの直線的 ACN / 水 / 0.01% TFA 勾配をかけることによって、ペプチドを精製した。所望のペプチドを含有する画分を凍結乾燥すると、生成物が綿毛状の白色固体として得られる。

30

## 【化 6 1】



40

## 【 0 1 8 6】

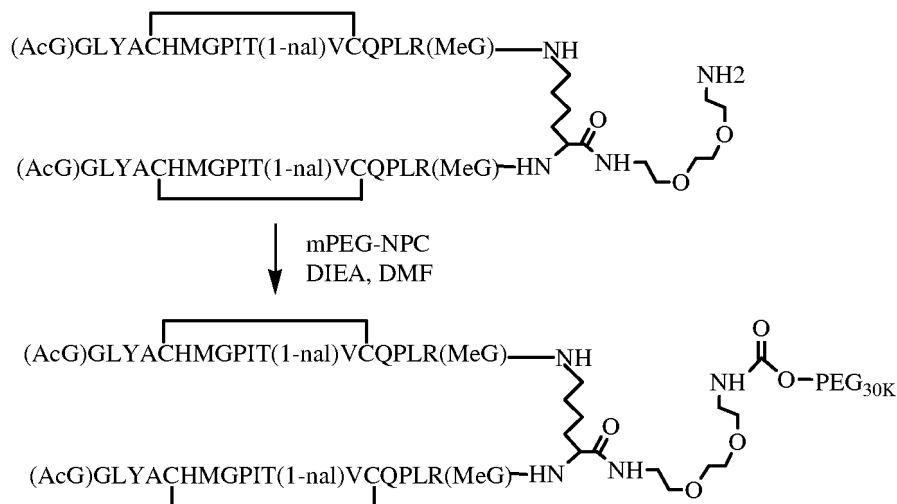
ステップ 10 - 末端 - NH<sub>2</sub> 基の PEG 化：

カルバメート結合を介した PEG 化：ペプチドダイマーを 1.5 当量 (モルベース) の活性化 PEG 種 (日油株式会社 (日本) の mPEG-NPC) と乾燥 DMF 中で混合して、透明な溶液を得た。5 分後に 4 当量の DIEA を上記の溶液に加えた。その混合物を周

50

周囲温度で14時間撹拌した後、C18逆相HPLCで精製した。PEG化ペプチドの構造はMALDI質量で確認した。精製ペプチドを、以下に概説する陽イオン交換クロマトグラフィによる精製にも供した。このmPEG-NPC PEG化を、次のスキームに、配列番号3を使って示す。

【化62】



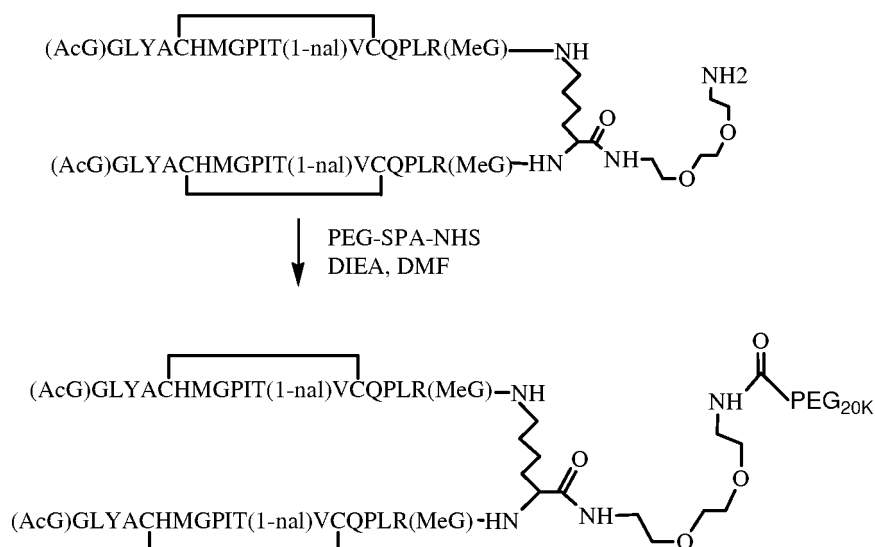
10

20

【0187】

アミド結合を介したPEG化：ペプチドダイマーを1.5当量（モルベース）の1当量活性化PEG種（Shearwater Corp（米国）のPEG-SPA-NHS）と乾燥DMF中で混合して、透明な溶液を得る。5分後に10当量のDIEAを上記の溶液に加える。その混合物を周囲温度で2時間撹拌した後、C18逆相HPLCで精製する。PEG化ペプチドの構造はMALDI質量で確認した。精製ペプチドを以下に概説する陽イオン交換クロマトグラフィによる精製にも供した。このPEG-SPA-NHS PEG化を、次のスキームに、配列番号3を使って示す。

【化63】



30

40

【0188】

ステップ11 - イオン交換精製：いくつかの交換支持体を、出発ダイマーペプチドを保持するその能力に加えて、上記ペプチド-PEGコンジュゲートを未反応の（又は加水分解された）PEGから分離するその能力について調査した。イオン交換樹脂（2～3g）を1cmカラムに充填した後、ナトリウム型に変換し（溶出液がpH14になるまで0.2N NaOHをカラムにロード、約5カラム体積）、次に水素型に変換し（溶出液がロードのpHと一致するまで0.1N HCl又は0.1M HOAcのいずれかで溶出、約

50

5 カラム体積)、次に pH 6 になるまで、25% ACN / 水で洗浄した。コンジュゲーション前のペプチド又はペプチド - PEG コンジュゲートを 25% ACN / 水に溶解し (10 mg / mL)、TFA で pH を < 3 に調節してから、カラムにロードした。2 ~ 3 カラム体積の 25% ACN / 水で洗浄して、5 mL 画分を集めた後、25% ACN / 水中の 0.1 M NH<sub>4</sub>OAc による溶離で、ペプチドをカラムから放出させ、再び 5 mL 画分を集めた。HPLC で解析したところ、どの画分が所望のペプチドを含有しているかが明らかになった。エバポレイティブ光散乱検出器 (ELSD) で解析したところ、ペプチドがカラム上に保持されて NH<sub>4</sub>OAc 溶液で溶出させた場合 (一般に画分 4 と画分 10 の間) は、非コンジュゲート PEG が夾雑物として観察されないことが示された。ペプチドが最初の洗浄緩衝液 (一般に最初の 2 画分) 中に溶出した場合、所望の PEG コンジュゲートと過剰の PEG との分離は観察されなかった。

10

## 【0189】

次に挙げるカラムは、ペプチドとペプチド - PEG コンジュゲートをどちらもうまく保持し、ペプチド - PEG コンジュゲートを非コンジュゲートペプチドからうまく精製した。

## 【表 1】

表1:イオン交換樹脂

支持体	供給元
Mono S HR5/5 強カチオン交換 充填済みカラム	Amersham Biosciences
SE53 セルロース微粒子 強カチオン交換支持体	Whatman
SP セファローズ・ファースト・ フロア 強カチオン交換支持体	Amersham Biosciences

20

## 【実施例 2】

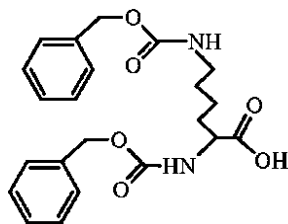
## 【0190】

フラグメント縮合による EPO - R アゴニストペプチドダイマーの合成

ステップ 1 - (Cbz)<sub>2</sub> - Lys の合成: リジンを標準的条件でベンジルクロロホルメートの溶液と反応させて、その 2 つのアミノ基が Cbz 基で保護されたリジンを得る。

## 【化 64】

30



## 【0191】

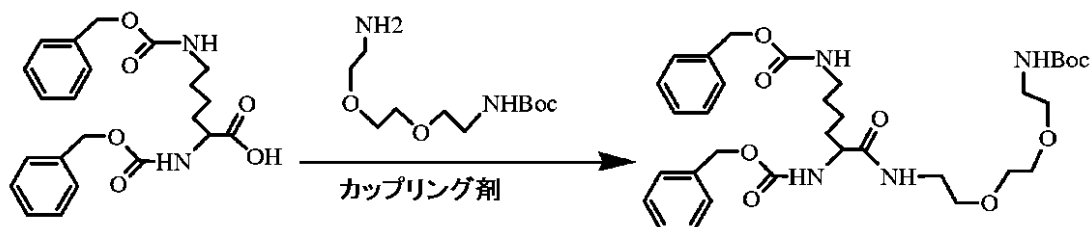
ステップ 2 - Boc - TAP の合成: Boc - TAP を実施例 1 のステップ 1 ~ 3 で説明したように合成する。

## 【0192】

40

ステップ 3 - (Cbz)<sub>2</sub> - Lys と Boc - TAP のカップリング: (Cbz)<sub>2</sub> - Lys と Boc - TAP を標準的カップリング条件でカップリングして、(Cbz)<sub>2</sub> - Lys - TAP - Boc を得る。

## 【化 6 5】

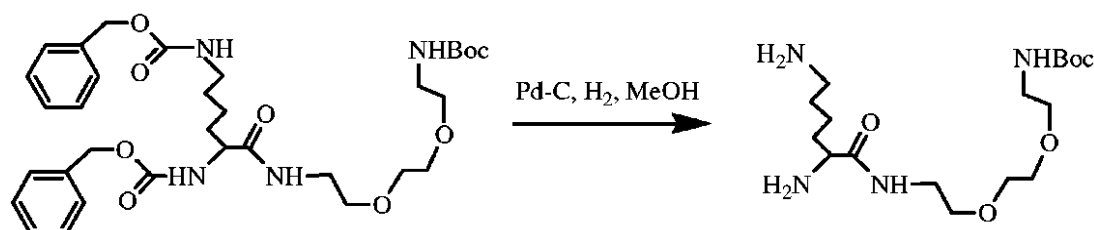


## 【 0 1 9 3】

ステップ 4 - L y s - T A P - B o c : 先の反応で得た粗生成物をメタノール ( 2 5 m l ) に溶解し、5 % P d 炭素 ( 5 % w / W ) の存在下、バルーン圧力下で、1 6 時間水素化する。混合物を濾過し、メタノールで洗浄し、濾液を減圧下で濃縮することにより、粗 L y s - T A P - B o c 生成物を得る。

10

## 【化 6 6】



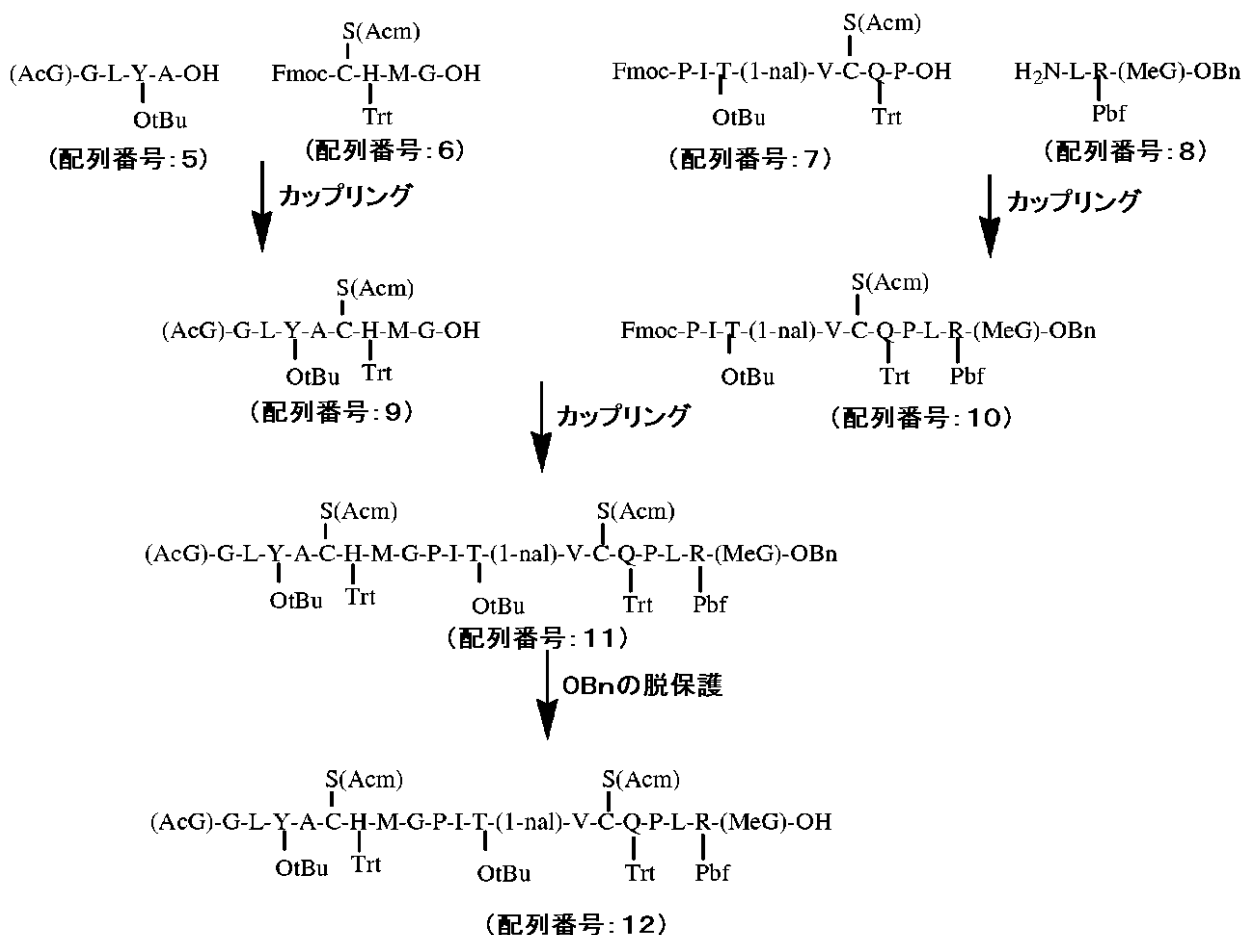
20

## 【 0 1 9 4】

ステップ 5 - フラグメント縮合によるペプチドモノマーの合成 : ペプチドモノマー配列の 4 つのペプチドフラグメントを標準的技術によって合成する。次に、これらの部分的に保護されたフラグメントを、2 ラウンドの独立したカップリングに供する。第 1 ラウンドでは、モノマーの N 末端側の半分を、2 つのペプチドフラグメントをカップリングすることによって形成させると共に、モノマーの C 末端側の半分を、他の 2 つのペプチドフラグメントのカップリングによって形成させる。第 2 ラウンドのカップリングでは、その N 末端及び C 末端側の各半分をカップリングして、完全に保護されたモノマーを形成させる。次にモノマーを標準的技法で O B n 脱保護する。

30

## 【化 6 7】



10

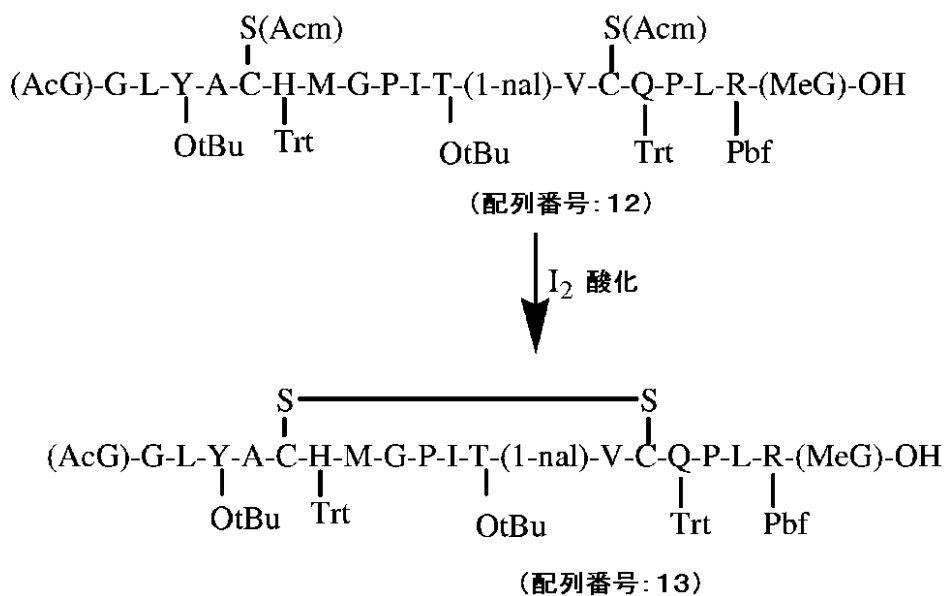
20

## 【 0 1 9 5】

ステップ 6 - ペプチドモノマーの酸化による分子内ジスルフィド結合の形成：次に、OBn 脱保護された縮合ペプチドモノマー（配列番号 12）をヨウ化物で酸化して、モノマーの Acm 保護システイン残基間に分子内ジスルフィド結合を形成させる。

30

## 【化 6 8】



40

## 【 0 1 9 6】

ステップ 7 - 酸化型 OBn 脱保護モノマーへの Lys - TAP - Boc のカップリングによるペプチドダイマーの形成：Lys - TAP - Boc を 2 倍モル過剰の酸化型 OBn

50

【化 6 9】



30

【 0 1 9 8 】

### 【实施例 3】

【 0 1 9 9 】

40

【 0 2 0 0 】

【 0 2 0 1 】

これらインビトロ活性アッセイの結果を表2に要約する。

#### 【0202】

##### 1. レポータアッセイ

このアッセイは、マウスブレB細胞株由来のレポータ細胞 B a f 3 / E p o R / G C S F R f o s / l u x に基づく。このレポータ細胞株は、ヒト G C S F 受容体の細胞内部分に融合したヒト E P O 受容体の細胞外部分を含むキメラ受容体を発現させる。この細胞株には、さらに、f o s プロモーター駆動のルシフェラーゼレポータ遺伝子コンストラクトがトランスフェクトされる。赤血球生成剤の添加によるこのキメラ受容体の活性化は、ルシフェラーゼレポータ遺伝子の発現をもたらす。したがってルシフェラーゼ基質ルシフェリンを添加した時には、光の生成をもたらす。こうして、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によって定量することができる。

10

#### 【0203】

B a f 3 / E p o R / G C S F R f o s / l u x 細胞は、10%ウシ胎仔血清 ( F B S ; H y c l o n e )、10% W E H I - 3 上清 ( W E H I - 3 細胞、A T C C 番号 T I B - 6 8 の培養物から得た上清)、及びペニシリン/ストレプトマイシンを補足した D M E M / F 1 2 培地 ( G i b c o ) で培養される。アッセイの約18時間前に、10% F B S 及び0.1% W E H I - 3 上清を補足した D M E M / F 1 2 培地に細胞を移すことによって、細胞を飢餓状態にする。アッセイの日に、10% F B S を補足した ( W E H I - 3 上清なしの ) D M E M / F 1 2 培地で細胞を1回洗浄し、次に10% F B S を補足した ( W E H I - 3 上清なしの ) D M E M / F 1 2 培地中、既知濃度の試験ペプチドの存在下で、又は陽性対照としての E P O ( R & D S y s t e m s I n c .、ミネソタ州ミネアポリス) と共に、 $1 \times 10^6$  細胞 / m L を培養する。このアッセイでは、試験ペプチドの希釈系列が同時に試験される。アッセイプレートを5% C O<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で4時間インキュベートした後、ルシフェリン ( S t e a d y - G l o ; P r o m e g a、ウィスコンシン州マディソン) を各ウェルに加える。5分間のインキュベーション後に、P a c k a r d T o p c o u n t L u m i n o m e t e r ( P a c k a r d I n s t r u m e n t C o .、イリノイ州ダウナーズグローブ) で、発光を測定する。光カウントを試験ペプチド濃度に対してプロットし、G r a p h P a d ソフトウェアを使って解析する。最大半量の発光をもたらす試験ペプチドの濃度を E C 5 0 として記録する [ 表2: レポータ E C 5 0 参照 ]。

20

30

#### 【0204】

##### 2. 増殖アッセイ

このアッセイは、ヒト E P O - R を発現するようにトランスフェクトされたマウスブレB細胞株 B a f 3 に基づく。その結果生じる細胞株 B a f 3 / G a l 4 / E l k / E P O R の増殖は E P O - R 活性化に依存する。細胞増殖の程度を M T T を使って定量する。この場合、M T T アッセイにおけるシグナルは生細胞の数に比例する。

#### 【0205】

B a f 3 / G a l 4 / E l k / E P O R 細胞を、スピナーフラスコ中、10% F B S ( H y c l o n e ) 及び2% W E H I - 3 上清 ( A T C C 番号 T I B - 6 8 ) を補足した D M E M / F 1 2 培地 ( G i b c o ) で培養する。培養細胞を、スピナーフラスコ中、 $1 \times 10^6$  細胞 / m L の細胞密度において、10% F B S 及び0.1% W E H I - 3 上清を補足した D M E M / F 1 2 培地で、終夜、飢餓状態に置く。次に、飢餓細胞をダルベッコ P B S ( G i b c o ) で2回洗浄し、10% F B S を補足した ( W E H I - 3 上清なしの ) D M E M / F 1 2 培地に再懸濁して、密度を  $1 \times 10^6$  細胞 / m L にする。次に、50  $\mu$  L ( 約 50,000 細胞 ) ずつの細胞懸濁液を、96穴アッセイプレートに、3つ一組にして播種する。10% F B S を補足した ( W E H I - 3 上清なしの ) D M E M / F 1 2 培地中、50  $\mu$  L ずつの試験 E P O ミメティックペプチドの希釈系列、又は50  $\mu$  L の E P O ( R & D S y s t e m s I n c .、ミネソタ州ミネアポリス) 若しくは A r a n e s p ( 商標 ) ( ダルベゴエチン、A m g e n から市販されている E P O - R アゴニスト) を、96穴アッセイプレートに加える ( 最終ウェル液量 100  $\mu$  L )。例えば、試験ペ

40

50



プチド（又は対照 E P O ペプチド）の最終濃度が 8 1 0 p M ~ 0 . 0 0 4 5 p M の範囲にわたる 1 2 個の異なる希釈液を試験することができる。次に、播種した細胞を、3 7 で 4 8 時間インキュベートする。次に、1 0 μ L の M T T ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) を各培養皿ウェルに加えてから、4 時間インキュベートしておく。次に、1 0 % S D S + 0 . 0 1 N H C l を加えることによって、反応を停止させる。次に、プレート を 3 7 で終夜、インキュベートする。次に、5 9 5 n m の波長における各ウェルの吸光度を分光測光法で測定する。吸光度の読み 対 試験ペプチド濃度のプロットを構築し、G r a p h P a d ソフトウェアを使って E C 5 0 を計算する。最大半量の吸光度をもたらす試験ペプチドの濃度を E C 5 0 として記録する [ 表 2 : 増殖 E C 5 0 参照 ] 。

【 0 2 0 6 】

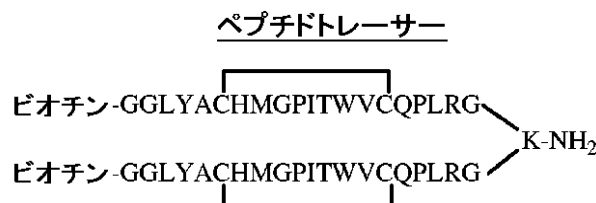
### 3 . 競合結合アッセイ

競合結合計算は、光シグナルが 2 つのビーズ（すなわち、ビオチン化 E P O - R 結合ペプチドトレーサを保持するストレプトアビジンドナービーズと、E P O - R が結合しているアクセプタビーズ）の近接の関数として生成するアッセイを使って行なわれる。光は、光の照射時に一重項酸素が第 1 ビーズから放出され、放出された一重項酸素との接触が第 2 ビーズの発光を引き起こすという、無放射性エネルギー移動によって生成する。これらのビーズセットは市販されている（ P a c k a r d ） 。 ビーズの近接は、E P O - R への E P O - R 結合ペプチドトレーサ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 - R 結合ペプチドトレーサと競合する試験ペプチドはこの結合を妨げることになり、発光の減少を引き起こす。

【 0 2 0 7 】

さらに詳しく述べると、この方法は次のとおりである。4 μ L の試験 E P O - R アゴニストペプチドの希釈系列、又は陽性若しくは陰性対照を、3 8 4 穴プレートのウェルに加える。次に 2 μ L / ウェルの受容体 / ビーズカクテルを加える。受容体ビーズカクテルは、1 5 μ L の 5 m g / m l ストレプトアビジンドナービーズ（ P a c k a r d ） 、 1 5 μ L の 5 m g / m l モノクローナル抗体 a b 1 7 9 （この抗体は組換え E P O - R に含まれるヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の一部を認識する）、プロテイン A 被覆アクセプタビーズ（プロテイン A は a b 1 7 9 抗体に結合することになる； P a c k a r d ） 、 1 1 2 . 5 μ L の、組換え E P O - R （チャイニーズハムスター卵巣細胞中で、a b 1 7 9 ターゲットエピトープを含有するヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の一部との融合タンパク質として生産されるもの）の 1 : 6 . 6 希釈液、及び 6 0 7 . 5 μ L の A l p h a q u e s t 緩衝液（4 0 m M H E P E S 、 p H 7 . 4 ; 1 m M M g C l <sub>2</sub> ; 0 . 1 % B S A 、 0 . 0 5 % ツィーン 2 0 ） からなる。タッピングして混合する。2 μ L / ウェルのビオチン化 E P O - R 結合ペプチドトレーサを加える（3 0 n M の最終濃度）。ビオチン - G G L Y A C H M G P I T W V C Q P L R G （配列番号 4 ） という配列を有するペプチドトレーサ E P O - R 結合ペプチド（表の「レポータ E C 5 0 （ p M ） 」を参照）を、実施例 1 に記載の方法に従って作製する。

【 化 7 0 】



【 0 2 0 8 】

混合するために 1 分間遠心分離する。プレートを P a c k a r d T o p S e a l で封止し、ホイルで包む。室温で終夜インキュベートする。1 8 時間後に A l p h a Q u e s t リーダー（ P a c k a r d ） を使って発光を読む。発光対ペプチド濃度をプロットし、G r a p h P a d 又は E x c e l で解析する。

【 0 2 0 9 】

試験ペプチドなしで観察される発光と比較して発光を50%減少させる試験ペプチドの濃度を、IC50として記録する[表2: A Q IC50 参照]。

#### 【0210】

##### 4. C / B F U - e アッセイ

E P O - R シグナリングは、骨髄幹細胞から増殖する赤血球前駆体への分化を刺激する。このアッセイは初代ヒト骨髄多能性幹細胞からの赤血球前駆体の増殖及び分化を刺激する試験ペプチドの能力を測定する。

#### 【0211】

このアッセイのために、試験ペプチドの希釈系列を、10% F B S ( H y c l o n e ) を補足した I M D M 培地 ( G i b c o ) 中に調製する。次に、これらの希釈系列、又は陽性対照 E P O ペプチドを、メチルセルロースに加えて最終体積を1.5 mLにする。次に、そのメチルセルロース及びペプチド混合物を十分にボルテックスする。ヒト骨髄由来 C D 3 4 + 細胞 ( P o i e t i c s / C a m b r e x ) のアリコート ( 1 0 0 , 0 0 0 細胞 / m L ) を解凍する。解凍した細胞を50 mL チューブ中の0.1 mL の1 mg / m l D N A s e ( S t e m C e l l s ) に静かに加える。次に、40 ~ 50 mL の I M D M 培地を細胞に静かに加える。すなわち培地は、最初の10 mL を50 mL チューブの側面に沿って1滴ずつ加えた後、残りの培地をチューブの側面に沿ってゆっくりと分注する。次に細胞を900 rpm で20分間遠心し、培地を静かに吸引することにより、注意深く除去する。細胞を1 mL の I M D M 培地に再懸濁し、1 mL あたりの細胞密度を血球計盤スライドでカウントする ( スライド上に10  $\mu$  L の細胞懸濁液、細胞密度は平均数  $\times$  10 , 0 0 0 細胞 / m l である ) 。次に、細胞を I M D M 培地に希釈して、細胞密度を15 , 0 0 0 細胞 / m L にする。次に、100  $\mu$  L の希釈細胞を各1.5 mL のメチルセルロース + ペプチド試料に加え ( アッセイ培地中の最終細胞濃度は1 , 0 0 0 細胞 / m L である ) 、その混合物をボルテックスする。混合物中の気泡を消失させた後、鈍針を使って1 mL 吸引する。各試料から得た0.25 mL の吸引混合物を、24穴プレート ( F a l c o n ブランド ) の4つのウェルのそれぞれに加える。播種した混合物を、湿潤培養器中、5 % C O <sub>2</sub> 下、37 °C で、14日間インキュベートする。位相差顕微鏡 ( 対物5  $\times$  ~ 10  $\times$  、最終倍率100  $\times$  ) を使って、赤血球系コロニーの存在についてスコア化する。形成されるコロニーの数が、E P O 陽性対照を使って観察される値との比較で、最大の90% になる試験ペプチドの濃度を、E C 9 0 として記録する [ 表 2 : C / B F U - e E C 9 0 参照 ] 。

#### 【0212】

##### 5. 放射性リガンド競合結合アッセイ

代替の放射性リガンド競合結合アッセイを使って、本発明におけるペプチドの I C <sub>50</sub> 値を測定することもできる。このアッセイでは、E P O r への <sup>125</sup>I - E P O の結合を測定する。アッセイは、好ましくは、以下の例示的プロトコルに従って実施される。

## 【化 7 1】

組換えヒトEPO R/Fcキメラ	<ul style="list-style-type: none"> <li>名称:組換えヒトEPO R/Fcキメラ</li> <li>供給者:R&amp;D Systems(米国ミネソタ州ミネアポリス)</li> <li>カタログ番号:963-ER</li> <li>ロット番号:EOK033071</li> <li>貯蔵:4℃</li> </ul>
ヨウ化組換えヒトエリスロポエチン	<ul style="list-style-type: none"> <li>名称:(3[<sup>125</sup>I]ヨードチロシル)エリスロポエチン、ヒト組換え、高比活性、370kBq、10 μCi</li> <li>供給者:Amersham Biosciences(米国ニュージャージー州ヒスカウエイ)</li> <li>カタログ番号:IM219-10 μCi</li> <li>ロット番号:</li> <li>貯蔵:4℃</li> </ul>
プロテインGセファロース	<ul style="list-style-type: none"> <li>名称:プロテインGセファロース4ファーストフロー</li> <li>供給者:Amersham Biosciences(米国ニュージャージー州ヒスカウエイ)</li> <li>カタログ番号:17-0618-01</li> <li>ロット番号:</li> <li>貯蔵:4℃</li> </ul>
アッセイ緩衝液	<ul style="list-style-type: none"> <li>0.1%ウシ血清アルブミン及び0.1%ナトリウムアザイドを含むリン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.4</li> <li>貯蔵:4℃</li> </ul>

10

## 【 0 2 1 3 】

20

## B. 適当な受容体濃度の決定

ヒト IgG1 の Fc 部分に融合された組換え EPO r 細胞外ドメインの凍結乾燥品の、1本の50 μgバイアルを、1 mLのアッセイ緩衝液で再構成する。アッセイで使用する正しい受容体量を決定するために、この受容体調製物の100 μL希釈系列を、200 μLのヨウ素化組換えヒトエリスロポエチン (<sup>125</sup>I-EPO) 中の約20,000 cpmと、12×75 mmポリプロピレン試験管で混合する。チューブに蓋をして、Lab Quake回転式振とう機上、4 で終夜、穏やかに混合する。

## 【 0 2 1 4 】

30

翌日、50 μLの、プロテインGセファロースの50%スラリーを、各チューブに加える。次にチューブを、穏やかに混合しながら、4 で2時間インキュベートする。次にチューブを4000 RPM (3297×G) で15分間遠心分離して、プロテインGセファロースをペレット化する。上清を注意深く取り出して捨てる。1 mLの4 アッセイ緩衝液で3回洗浄した後、ペレットをWallac Wizardガンマカウンタでカウントする。次に結果を解析し、最大結合値の50%に達するのに要求される希釈を計算する。

## 【 0 2 1 5 】

C. ペプチドの IC<sub>50</sub> 決定

ペプチド I の IC<sub>50</sub> を決定するために、ペプチドの100 μL希釈系列を、100 μLの組換えエリスロポエチン受容体 (100 pg / チューブ) と、12×75 mmポリプロピレン試験管中で混合する。次に、100 μLのヨウ素化組換えヒトエリスロポエチン (<sup>125</sup>I-EPO) を各チューブに加え、チューブに蓋をして、4 で終夜、穏やかに混合する。

40

## 【 0 2 1 6 】

翌日、結合している <sup>125</sup>I-EPO を上述のように定量する。結果を解析し、GraphPad Software, Inc. (カリフォルニア州サンディエゴ) の GraphPad Prism バージョン 4.0 を使って IC<sub>50</sub> 値を算出する。合計3回又はそれ以上反復して IC<sub>50</sub> を決定するために、各被験ペプチドごとに、アッセイを2回又はそれ以上繰り返す。

【表 2】

化合物名	ペプチドダイマー	レポーター EC50 (pM)	増殖 EC50 (nM)	IC50 (pM)	C/BFU-e EC90 (nM)
ペプチドII (配列番号:3)	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH-CH2-CH2-C(=O)-NH-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CH2-CH2-NH-C(=O)-O-PEG30K</p>	---	---	110	2.2
ペプチドIII (配列番号:3)	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH-CH2-CH2-C(=O)-NH-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CH2-CH2-NH-C(=O)-O-PEG20K</p>	150	72	---	2.7

表2: ペプチダイマーに関するインビトロ活性アッセイ

### 【实施例 4】

【 0 2 1 7 】

## インビボ活性アッセイ

この実施例では、本発明の EPO-R アゴニストペプチドの活性及び力価を評価するのに役立つ種々のインビボアッセイを説明する。EPO-R アゴニストペプチドダイマーは

実施例 1 又は実施例 2 に記載の方法に従って製造される。これらのペプチドモノマー及びダイマーのインビボ活性は、低酸素多血マウスバイオアッセイ及び網状赤血球アッセイを含む一連のアッセイを使って評価される。これら 2 つのアッセイを以下にさらに詳しく説明する。

#### 【0218】

##### 1. 低酸素多血マウスバイオアッセイ

試験ペプチドのインビボ活性を、Cotes and Bangham (1961), Nature 191:1065-1067 に記載の方法を改変した低酸素多血マウスバイオアッセイでアッセイする。このアッセイでは、EPO ミメティックとして機能する（すなわち EPO-R を活性化して新しい赤血球合成を誘導する）試験ペプチドの能力を調べる。赤血球合成は、合成された赤血球のヘモグロビンへの放射標識鉄の取り込みに基づいて定量される。

10

#### 【0219】

BDF1 マウスを、7 ~ 10 日間、周囲条件に順応させる。体重を全ての動物について決定し、低体重の動物（< 15 グラム）は使用しない。マウスを、計 14 日間にわたって、低圧室での逐次的条件付けサイクルに供する。各 24 時間サイクルは、 $0.40 \pm 0.02$  % 大気圧での 18 時間と、周囲圧での 6 時間とからなる。条件付けの後、投薬に先だってさらに 72 時間は、マウスを周囲圧に維持する。

#### 【0220】

試験ペプチド又は組換えヒト EPO 標準を PBS + 0.1 % BSA 溶剤（PBS / BSA）で希釈する。ペプチドモノマー原液を、まずジメチルスルホキシド（DMSO）で希釈する。陰性対照群には、PBS / BSA のみを注射した 1 マウス群と、1 % DMSO を注射した 1 マウス群を含める。各用量群は 10 匹のマウスを含む。マウスに、0.5 mL の適する試料を皮下（首筋）注射する。

20

#### 【0221】

試料注射の 48 時間後に、マウスに、用量が約 0.75 マイクロキュリー / マウスになるように、0.2 mL の  $Fe^{59}$ （DuPont, NEN）の腹腔内注射を施す。マウスの体重を  $Fe^{59}$  投与の 24 時間後に決定し、 $Fe^{59}$  投与の 48 時間後にマウスを屠殺する。血液を各動物から心臓穿刺によって収集し、ヘマトクリットを決定する（ヘパリンを抗凝固剤として使用した）。Packard ガンマカウンターを使って、各血液試料（0.2 mL）を  $Fe^{59}$  の取り込みについて解析する。非応答マウス（すなわち放射能取り込み量が陰性対照群よりも少ないマウス）は適正データセットから除外する。陰性対照群の 53 % 未満のヘマトクリット値を有するマウスも除外する。

30

#### 【0222】

結果は、各実験用量ごとに 10 匹のセットから導かれる。各群から得た血液試料に取り込まれた放射能の平均量 [ カウント毎分 (CPM) ] を計算する。

#### 【0223】

##### 2. 網状赤血球アッセイ

正常 BDF1 マウスに、3 日間連続して、EPO 対照又は試験ペプチドのいずれかを投薬する（0.5 mL、皮下注射）。3 日目にはマウスに鉄デキストラン（100 mg / mL）も投薬する（0.1 mL、腹腔内注射）。5 日目にマウスを  $CO_2$  で麻酔し、心臓穿刺によって採血する。各血液試料について、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解析（網状赤血球数プログラム）によって決定する。ヘマトクリットを手作業で決定する。補正された網状赤血球のパーセントは、次の式を使って決定される：

40

$\% RETIC_{補正} = \% RETIC_{実測値} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{個体}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{正常}})$ 。

#### 【0224】

##### 3. 血液学的アッセイ

正常 CD1 マウスに、EPO 陽性対照、試験ペプチド、又は溶剤のいずれかを、4 回の週 1 回静脈内ボラス注射で投薬する。製剤中の活性化化合物濃度を変化させることによ

50

て、ある範囲の陽性対照用量及び試験ペプチド用量 (mg/kg で表したもの) を試験する。注射体積は 5 ml/kg である。溶剤対照群は 12 匹からなり、残りの用量群はそれぞれ 8 匹である。毎日の生存率と、週ごとの体重とを記録する。

#### 【0225】

1 日目 (溶剤対照マウスの場合) 並びに 15 日目及び 29 日目 (4 匹/群/日) に、投薬したマウスを絶食させてから、イソフルランを吸入させて麻酔し、心臓穿刺又は腹部大動脈穿刺によって最終血液試料を収集する。血液を Vacutainer (登録商標) ブランドのチューブに移す。好ましい抗凝固剤はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

#### 【0226】

当分野で周知の自動臨床分析機器 (例えば Coulter, Inc. 製のもの) を使って、赤血球の合成及び生理機能を測定するエンドポイント、例えばヘマトクリット (Hct)、ヘモグロビン (Hgb) 及び総赤血球数 (RBC) について、血液試料を評価する。

#### 【実施例 5】

#### 【0227】

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 EPO-R アゴニストペプチドホモダイマーの合成

ステップ 1 - ペプチドモノマーの合成: ペプチドモノマーは、標準的な Fmoc ケミストリを使用し、ABI 431A ペプチド合成装置で、TG-RAM 樹脂 (0.18 mmol/g、Rapp Polymer e、ドイツ) を使って合成される。アミド化されたカルボキシ末端を有するペプチドモノマーを合成するために、完全に組み立てられたペプチドを、樹脂から、82.5% TFA、5% 水、6.25% アニソール、6.25% エタンジチオールを使って切断する。脱保護された生成物を樹脂から濾過し、ジエチルエーテルで沈殿させる。十分に乾燥した後、生成物を、C18 逆相高速液体クロマトグラフィにより、0.1% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル/水の勾配で精製する。ペプチドの構造をエレクトロスプレー質量分析法で確認する。ペプチドを、DMSO: 水の 1:1 溶液に 1 mg/mL の濃度で溶解することにより、ジスルフィド形成を達成する。生成物を、C18 逆相高速液体クロマトグラフィにより、0.1% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル/水の勾配で精製する。このペプチドモノマーは次のように図解することができる:

#### 【化 72】



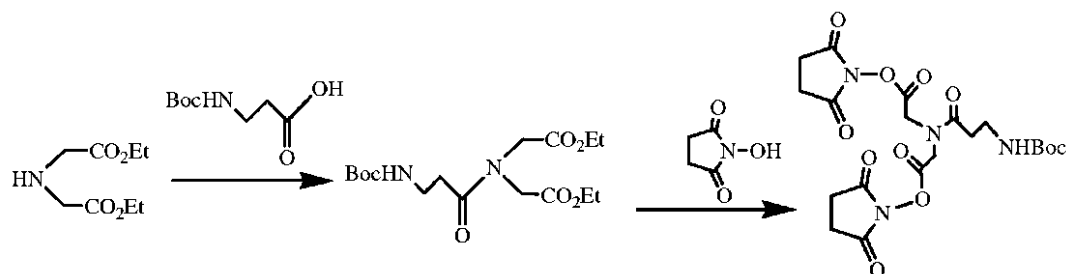
#### 【0228】

ステップ 2 - 三官能性リンカーの合成: 100 mL の DCM に溶解したジエチルイミノアセテート (10.0 g、52.8 mmol) 及び Boc-ベータ-アラニン (10.0 g、52.8 mmol) に、ジイソプロピルカルボジイミド (8.0 mL、51.1 mmol) を、室温で、10 分かけて加えた。反応混合物は添加中に最大約 10 度温まった後、20 分かけて室温まで冷めた。反応混合物を終夜攪拌しておき、沈殿したジイソプロピルウレアを濾去した。溶媒を減圧下で除去してゴム質とし、残渣をエチルアセテートに溶解して、再び濾過することにより、沈殿したウレアをさらに除去した。有機相を分液漏斗に入れ、洗浄し (飽和 NaHCO<sub>3</sub>、ブライン、0.5 N HCl、ブライン)、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で濃縮することにより、ジエステル生成物を無色の油状物として得た。そのジエステルを、MeOH: THF の 1:1 混合物 (100 mL) にとり、これに水 (25 mL) を加えてから、NaOH (5 g、125 mmol) を加えた。pH は > 10 と測定された。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、6 N HCl で pH 1 に酸性化した。水相を NaCl で飽和させ、エチルアセテートで 4 回抽出した。合わせた有機相を洗浄し (ブライン)、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮して、白色半固体を得た。その固体を 50 mL の DCM に溶解し、これに 300 mL のヘキサンを加えたと

ころ、白色スラリーが生成した。溶媒を減圧下で除去することにより、二酸を白色固体として得た（14.7 g、2ステップで収率91.5%）。20 mLのDMFに溶解した二酸（1 g、3.29 mmol）に、N-ヒドロキシスクシンイミド（770 mg、6.69 mmol）及びジイソプロピルカルボジイミド（1.00 mL、6.38 mmol）及び4-ジメチルアミノピリジン（3 mg、0.02 mmol）を加えた。反応混合物を終夜攪拌し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をエチルアセテートにとり、沈殿したウレアを除去するために濾過した。有機相を分液漏斗に入れ、洗浄し（飽和NaHCO<sub>3</sub>、ブライン、0.5 N HCl、ブライン）、乾燥し（MgSO<sub>4</sub>）、濾過し、減圧下で濃縮することにより、ジ-NHSエステル生成物を白色固体として得た（1.12 g、収率68%）。

10

## 【化73】



## 【0229】

20

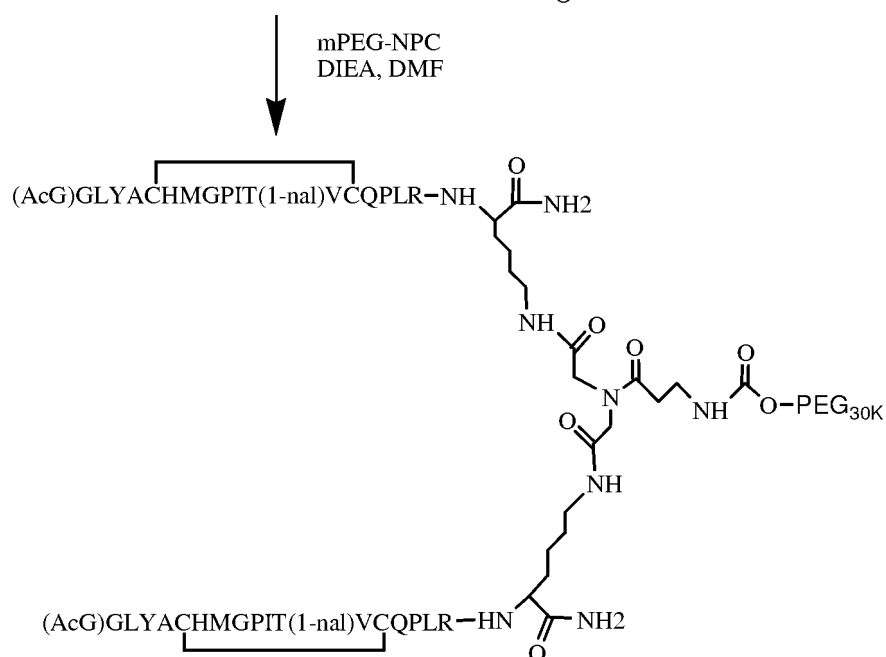
ステップ3 - ペプチドモノマーへの三官能性リンカーのカップリング：リンカーへのカップリングのために、2当量のペプチドを乾燥DMF中で1当量の三官能性リンカーと混合して透明な溶液を得て、2分後に5当量のDIEAを加える。その混合物を周囲温度で14時間攪拌する。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物を80% TFA / DCMに30分間溶解することによってBoc基を除去した後、C18逆相HPLCで精製する。ダイマーの構造をエレクトロスプレー質量分析法によって確認する。このカップリング反応により、リンカーは、各モノマーのリジン残基の - アミノ基の窒素原子に取付けられる。このプロセスを配列番号1を使って次に示す。





[illegible]

10

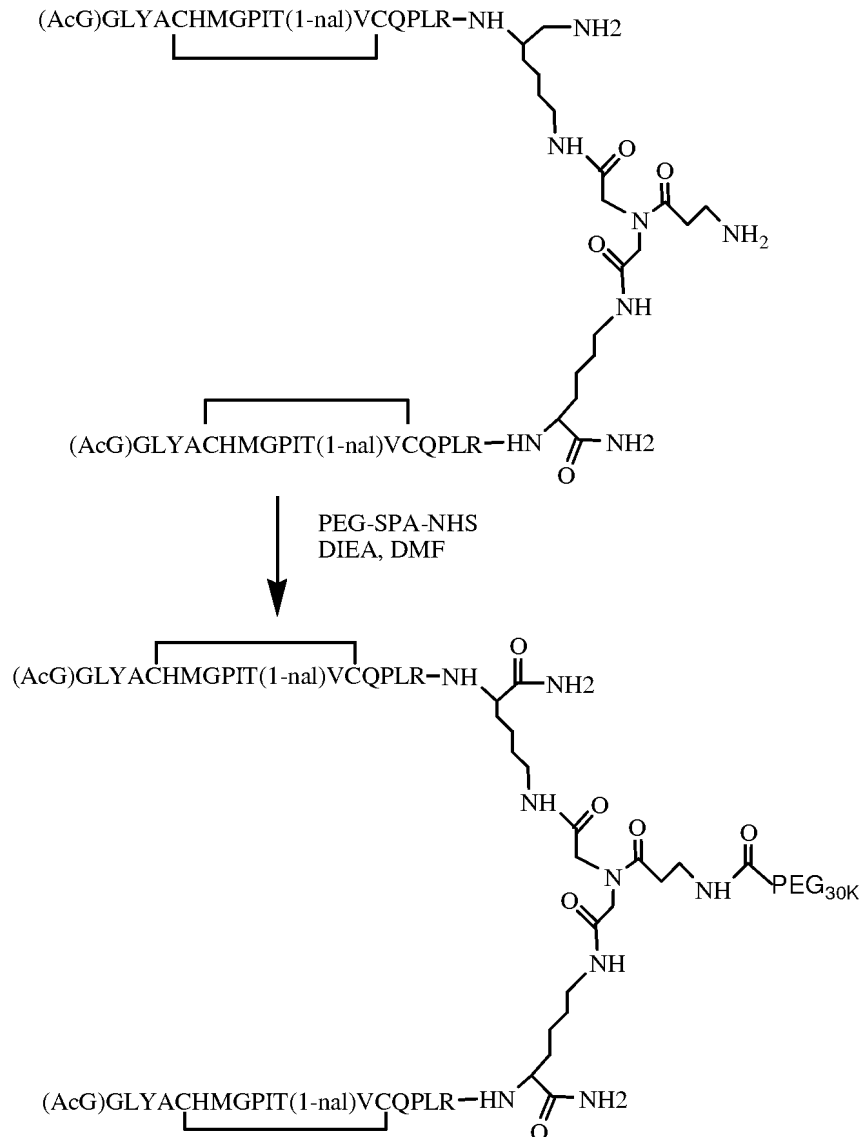


20

30

アミド結合を介したPEG化：ペプチドダイマーを等量（モルベース）の活性化PEG種（Shearwater Corp（米国）のPEG-SPA-NHS）と乾燥DMF中で混合して、透明な溶液を得る。5分後に10当量のDIEAを上記の溶液に加える。その混合物を周囲温度で2時間攪拌した後、C18逆相HPLCで精製する。PEG化ペプチドの構造はMALDI質量で確認した。精製ペプチドを以下に概説する陽イオン交換クロマトグラフィによる精製にも供した。このPEG-SPA-NHS PEG化を、次のスキームに、配列番号1を使って示す。

## 【化 7 6】



## 【 0 2 3 2】

ステップ 5：ペプチドのイオン交換精製：いくつかの交換支持体を、出発ダイマーペプチドを保持するその能力に加えて、上記ペプチド - PEG コンjugate を未反応の（又は加水分解された）PEG から分離するその能力について調査した。イオン交換樹脂（2～3 g）を 1 cm カラムに充填した後、ナトリウム型に変換し（溶出液が pH 14 になるまで 0.2 N NaOH をカラムにロード、約 5 カラム体積）、次に水素型に変換し（溶出液がロードの pH と一致するまで 0.1 N HCl 又は 0.1 M HOAc のいずれかで溶出、約 5 カラム体積）、次に pH 6 になるまで、25% ACN / 水で洗浄した。コンjugेशन前のペプチド又はペプチド - PEG コンjugate を 25% ACN / 水に溶解し（10 mg / mL）、TFA で pH を < 3 に調節してから、カラムにロードした。2～3 カラム体積の 25% ACN / 水で洗浄して、5 mL 画分を集めた後、25% ACN / 水中の 0.1 M NH<sub>4</sub>OAc による溶離で、再び 5 mL 画分を集めながら、ペプチドをカラムから放出させた。HPLC で解析したところ、どの画分が所望のペプチドを含有しているかが明らかになった。エバポレイティブ光散乱検出器（ELSD）で解析したところ、ペプチドがカラム上に保持されて NH<sub>4</sub>OAc 溶液で溶出（一般に画分 4 と画分 10 の間）させた場合は、夾雑物として非コンjugate PEG が観察されないことが示された。ペプチドが最初の洗浄緩衝液（一般に最初の 2 画分）中に溶出した場合、所望の PEG コンjugate と過剰の PEG との分離は観察されなかった。

## 【 0 2 3 3】

10

20

30

40

50

次に挙げるカラムは、ペプチドとペプチド - P E G コンジュゲートをどちらもうまく保持し、ペプチド - P E G コンジュゲートを非コンジュゲートペプチドからうまく精製した。

【表 3】

表3:イオン交換樹脂

支持体	供給元
Mono S HR5/5強カチオン交換 充填済みカラム	Amersham Biosciences
SE53セルロース微粒子 強カチオン交換支持体	Whatman
SPセファローズ・ファースト・7 フロー強カチオン交換支持体	Amersham Biosciences

10

【実施例 6】

【0234】

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) K (配列番号 2) を有するペプチドモノマーの E P O - R アゴニストペプチドホモダイマーの合成

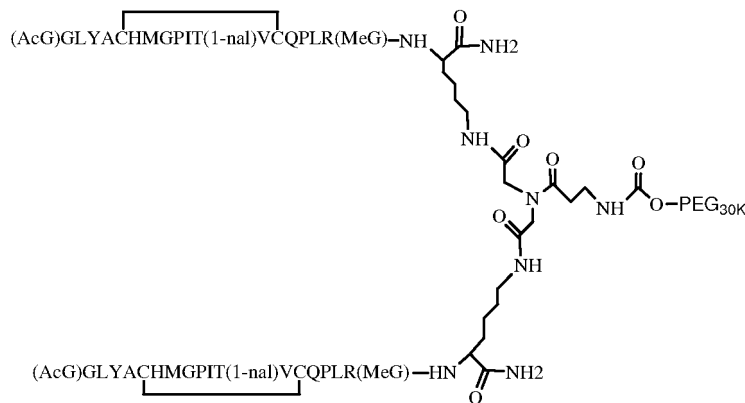
アミノ酸配列 (A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (M e G) K (配列番号 2) を有するペプチドモノマーの E P O - R アゴニストペプチドホモダイマーを、ステップ 1 において、合成されるペプチドモノマーが、(A c G) G L Y A C H M G P I T (1 - n a l) V C Q P L R (M e G) K (配列番号 2) である点以外は、実施例 1 で述べたとおりに合成する。

20

【0235】

P E G をカルバメート結合でリンカーに取付ける場合、配列番号 2 を使ったこの合成の最終生成物は、その構造を次のように図解することができる。

【化 77】



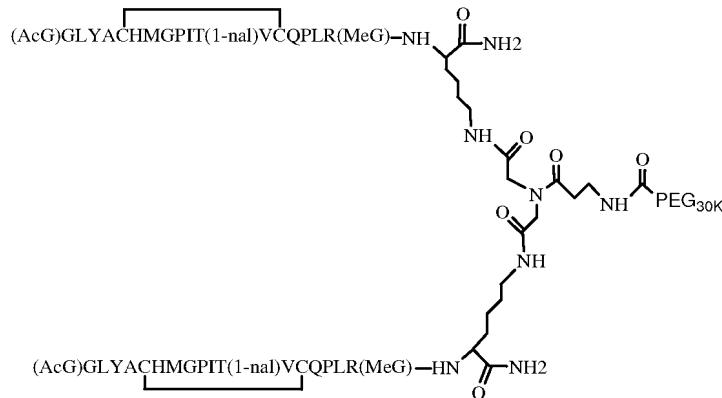
30

【0236】

P E G をアミド結合でリンカーに取付ける場合、配列番号 2 を使ったこの合成の最終生成物は、その構造を次のように図解することができる。

40

## 【化 7 8】



10

## 【実施例 7】

## 【0237】

## インビトロ活性アッセイ

この実施例では、本発明の EPO-R アゴニストペプチドの活性及び力価の評価に役立つ種々のインビトロアッセイを説明する。これらのアッセイの結果によって、本発明の新規ペプチドが EPO-R に結合して EPO-R シグナリングを活性化することが証明される。さらにまた、これらのアッセイの結果から、新規ペプチド組成物は、今までに記載された EPO ミメティックペプチドと比較して、EPO-R 結合アフィニティ及び生物学的

20

## 【0238】

実施例 1 又は実施例 2 に記載の方法に従って EPO-R アゴニストペプチドモノマー及びダイマーを製造する。これらのペプチドダイマーの力価は、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 アッセイを含む一連のインビトロ活性アッセイを使って評価される。これら 4 つのアッセイを以下にさらに詳しく説明する。

## 【0239】

これらインビトロ活性アッセイの結果を表 2 に要約する。

## 【0240】

## 1. レポーターアッセイ

このアッセイは、マウスプレ B 細胞株由来のレポーター細胞 Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux に基づく。このレポーター細胞株は、ヒト GCSF 受容体の細胞内部分に融合したヒト EPO 受容体の細胞外部分を含むキメラ受容体を発現させる。この細胞株には、さらに、fos プロモーター駆動のルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクトがトランスフェクトされる。赤血球生成剤の添加によるこのキメラ受容体の活性化は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現をもたらす。したがってルシフェラーゼ基質ルシフェリンを添加した時には、光の生成をもたらす。こうして、そのような細胞における EPO-R 活性化のレベルは、ルシフェラーゼ活性の測定によって定量することができる。

## 【0241】

Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux 細胞は、10% ウシ胎仔血清 (FBS; Hyclone)、10% WEHI-3 上清 (WEHI-3 細胞、ATCC 番号 TIB-68 の培養物から得た上清)、及びペニシリン/ストレプトマイシンを補足した DMEM/F12 培地 (Gibco) で培養される。アッセイの約 18 時間前に、10% FBS 及び 0.1% WEHI-3 上清を補足した DMEM/F12 培地に細胞を移すことによって、細胞を飢餓状態にする。アッセイの日に、10% FBS を補足した (WEHI-3 上清なしの) DMEM/F12 培地で細胞を 1 回洗浄し、次に 10% FBS を補足した (WEHI-3 上清なしの) DMEM/F12 培地中、既知濃度の試験ペプチドの存在下で、又は陽性対照としての EPO (R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス) と共に、 $1 \times 10^6$  細胞/mL を培養する。このアッセイでは、試験ペプチドの希釈系列が同時に試験される。アッセイプレートを 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C で 4 時間イ

30

40

50

ンキュベートした後、ルシフェリン (Steady - Glo ; Promega、ウィスコンシン州マディソン) を各ウェルに加える。5 分間のインキュベーション後に、Packard Topcount Luminometer (Packard Instrument Co.、イリノイ州ダウナーズグロブ) で、発光を測定する。光カウントを試験ペプチド濃度に対してプロットし、Graph Padソフトウェアを使って解析する。最大半量の発光をもたらす試験ペプチドの濃度を EC 50 として記録する。

#### 【0242】

##### 2. 増殖アッセイ

このアッセイは、ヒト EPO - R を発現するようにトランスフェクトされたマウスブレ B 細胞株 BaF 3 に基づく。その結果生じる細胞株 BaF 3 / Gal 4 / Elk / EPO R の増殖は EPO - R 活性化に依存する。細胞増殖の程度を MTT を使って定量する。この場合、MTT アッセイにおけるシグナルは生細胞の数に比例する。

10

#### 【0243】

BaF 3 / Gal 4 / Elk / EPO R 細胞を、スピナーフラスコ中、10 % FBS (HyClone) 及び 2 % WEHI - 3 上清 (ATCC 番号 TIB - 68) を補足した DMEM / F12 培地 (Gibco) で培養する。培養細胞を、スピナーフラスコ中、 $1 \times 10^6$  細胞 / ml の細胞密度において、10 % FBS 及び 0.1 % WEHI - 3 上清を補足した DMEM / F12 培地で、終夜、飢餓状態に置く。次に、飢餓細胞をダルベッコ PBS (Gibco) で 2 回洗浄し、10 % FBS を補足した (WEHI - 3 上清なしの) DMEM / F12 培地に再懸濁して、密度を  $1 \times 10^6$  細胞 / ml にする。次に、50  $\mu$  L (約 50,000 細胞) ずつの細胞懸濁液を、96 穴アッセイプレートに、3 つ一組にして播種する。10 % FBS を補足した (WEHI - 3 上清なしの) DMEM / F12 培地中、50  $\mu$  L ずつの試験 EPO ミメティックペプチドの希釈系列、又は 50  $\mu$  L の EPO (R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス) 若しくは Aranesp (商標) (ダルベゴエチン、Amgen から市販されている EPO - R アゴニスト) を、96 穴アッセイプレートに加える (最終ウェル液量 100  $\mu$  L)。例えば、試験ペプチド (又は対照 EPO ペプチド) の最終濃度が 810 pM ~ 0.0045 pM の範囲にわたる 12 個の異なる希釈液を試験することができる。次に、播種した細胞を、37 で 48 時間インキュベートする。次に、10  $\mu$  L の MTT (Roche Diagnostics) を各培養皿ウェルに加えてから、4 時間インキュベートしておく。次に、10 % SDS + 0.01 N HCl を加えることによって、反応を停止させる。次に、プレートを 37 で終夜、インキュベートする。次に、595 nm の波長における各ウェルの吸光度を分光測光法で測定する。吸光度の読み 対 試験ペプチド濃度のプロットを構築し、Graph Pad ソフトウェアを使って EC 50 を計算する。最大半量の吸光度をもたらす試験ペプチドの濃度を EC 50 として記録する。

20

30

#### 【0244】

##### 3. 競合結合アッセイ

競合結合計算は、光シグナルが 2 つのピーズ (すなわち、ビオチン化 EPO - R 結合ペプチドトレサを保持するストレプトアビジンドナーピーズと、EPO - R が結合しているアクセプタピーズ) の近接の関数として生成するアッセイを使って行なわれる。光は、光の照射時に一重項酸素が第 1 ピーズから放出され、放出された一重項酸素との接触が第 2 ピーズの発光を引き起こすという、無放射エネルギー移動によって生成する。これらのピーズセットは市販されている (Packard)。ピーズの近接は、EPO - R への EPO - R 結合ペプチドトレサの結合によって生じる。EPO - R への結合に関して EPO - R 結合ペプチドトレサと競合する試験ペプチドはこの結合を妨げることになり、発光の減少を引き起こす。

40

#### 【0245】

さらに詳しく述べると、この方法は次のとおりである。4  $\mu$  L の試験 EPO - R アゴニストペプチドの希釈系列、又は陽性若しくは陰性対照を、384 穴プレートのウェルに加える。次に 2  $\mu$  L / ウェルの受容体 / ピーズカクテルを加える。受容体ピーズカクテルは

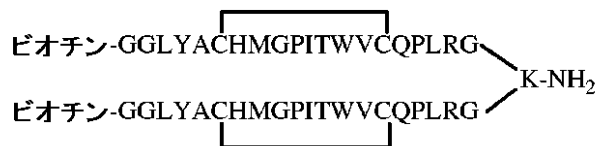
50

、15  $\mu$ Lの5 mg/ml ストレプトアビジンドナービーズ (Packard)、15  $\mu$ Lの5 mg/ml モノクローナル抗体 ab 179 (この抗体は組換え EPO-R に含まれるヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の一部を認識する)、プロテイン A 被覆アクセプタビーズ (プロテイン A は ab 179 抗体に結合することになる; Packard)、112.5  $\mu$ Lの、組換え EPO-R (チャイニーズハムスター卵巣細胞中で、ab 179 ターゲットエピトープを含有するヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の一部に融合された融合タンパク質として生産されるもの)の1:6.6希釈液、及び607.5  $\mu$ LのAlphaquest緩衝液(40 mM HEPES、pH 7.4; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% BSA、0.05% ツィーン 20)からなる。タッピングして混合する。2  $\mu$ L/ウェルのビオチン化 EPO-R 結合ペプチドトレーサを加える(30 nMの最終濃度)。ペプチドトレーサ EPO-R 結合ペプチド(表の「レポーター EC 50 (pM)」を参照)は、実施例 1 に記載の方法に従って、配列番号 4 を使って作製される。

10

【化 79】

ペプチドトレーサー



【0246】

20

混合するために1分間遠心分離する。プレートをPackard Top Sealで封止し、ホイルで包む。室温で終夜インキュベートする。18時間後にAlphaQuestリーダー(Packard)を使って発光を読む。発光対ペプチド濃度をプロットし、Graph Pad又はExcelで解析する。

【0247】

試験ペプチドなしで観察される発光と比較して発光を50%減少させる試験ペプチドの濃度を、IC50として記録する。

【0248】

#### 4. C/BFU-e アッセイ

EPO-R シグナリングは、増殖する赤血球前駆体への骨髄幹細胞の分化を刺激する。このアッセイは初代ヒト骨髄多能性幹細胞からの赤血球前駆体の増殖及び分化を刺激する試験ペプチドの能力を測定する。

30

【0249】

このアッセイのために、試験ペプチドの希釈系列を、10% FBS (Hyclone) を補足したIMDM培地(Gibco)中に調製する。次に、これらの希釈系列、又は陽性対照EPOペプチドを、メチルセルロースに加えて最終体積を1.5 mLにする。次に、そのメチルセルロース及びペプチド混合物を十分にボルテックスする。ヒト骨髄由来CD34+細胞(Poietics/Cambrex)のアリコート(100,000細胞/mL)を解凍する。解凍した細胞を50 mLチューブ中の0.1 mLの1 mg/mL DNase (Stem Cells) に静かに加える。次に、40~50 mLのIMDM培地を細胞に静かに加える。すなわち培地は、最初の10 mLを50 mLチューブの側面に沿って1滴ずつ加えた後、残りの培地をチューブの側面に沿ってゆっくりと分注する。次に細胞を900 rpmで20分間遠心し、培地を静かに吸引することにより、注意深く除去する。細胞を1 mLのIMDM培地に再懸濁し、1 mLあたりの細胞密度を血球計盤スライドでカウントする(スライド上に10  $\mu$ Lの細胞懸濁液、細胞密度は平均数 $\times$ 10,000細胞/mLである)。次に、細胞をIMDM培地に希釈して、細胞密度を15,000細胞/mLにする。次に、100  $\mu$ Lの希釈細胞を各1.5 mLのメチルセルロース+ペプチド試料に加え(アッセイ培地中の最終細胞濃度は1,000細胞/mLである)、その混合物をボルテックスする。混合物中の気泡を消失させた後、鈍針を使って1 mL吸引する。各試料から得た0.25 mLの吸引混合物を、24穴プレート(Falco

40

50

n ブランド) の 4 つのウェルのそれぞれに加える。播種した混合物を、湿潤培養器中、5 %  $\text{CO}_2$  下、37 で、14 日間インキュベートする。位相差顕微鏡 (対物 5  $\times$  ~ 10  $\times$ 、最終倍率 100  $\times$ ) を使って、赤血球系コロニーの存在についてスコア化する。形成されるコロニーの数が、EPO 陽性対照を使って観察される値との比較で、最大の 90 % になる試験ペプチドの濃度を、EC90 として記録する [表 2 : C / B F U - e EC90 参照]。

【表 4】

[illegible]

10

20

30

40

### 【 实施例 8 】

【 0 2 5 0 】

## インビボ活性アッセイ

この実施例では、本発明の EPO-R アゴニストペプチドの活性及び力価を評価するのに役立つ種々のインビボアッセイを説明する。EPO-R アゴニストペプチドモノマー及

50



びダイマーは実施例 1 に記載の方法に従って製造される。これらペプチドモノマー及びダイマーのインビボ活性は、低酸素多血マウスバイオアッセイ及び網状赤血球アッセイを含む一連のアッセイを使って評価される。これら 2 つのアッセイを以下にさらに詳しく説明する。

#### 【0251】

##### 1. 低酸素多血マウスバイオアッセイ

試験ペプチドのインビボ活性を、Cotes and Bangham (1961), Nature 191:1065-1067 に記載の方法を改変した低酸素多血マウスバイオアッセイでアッセイする。このアッセイでは、EPO ミメティックとして機能する（すなわち EPO-R を活性化して新しい赤血球合成を誘導する）試験ペプチドの能力を調べる。赤血球合成は、合成された赤血球のヘモグロビンへの放射標識鉄の取り込みに基づいて定量される。

10

#### 【0252】

BDF1 マウスを、7 ~ 10 日間、周囲条件に順応させる。体重を全ての動物について決定し、低体重の動物（< 15 グラム）は使用しない。マウスを、計 14 日間にわたって、低圧室での逐次的条件付けサイクルに供する。各 24 時間サイクルは、0.40 ± 0.02 % 大気圧での 18 時間と、周囲圧での 6 時間とからなる。条件付けの後、投薬に先だてさらに 72 時間は、マウスを周囲圧に維持する。

#### 【0253】

試験ペプチド又は組み換えヒト EPO 標準を PBS + 0.1 % BSA 溶剤（PBS / BSA）で希釈する。ペプチドモノマー原液を、まずジメチルスルホキシド（DMSO）で可溶化する。陰性対照群には、PBS / BSA のみを注射した 1 マウス群と、1 % DMSO を注射した 1 マウス群を含める。各用量群は 10 匹のマウスを含む。マウスに、0.5 mL の適当な試料を皮下（首筋）注射する。

20

#### 【0254】

試料注射の 48 時間後に、マウスに、用量が約 0.75 マイクロキュリー / マウスになるように、0.2 mL の  $Fe^{59}$ （DuPont, NEN）の腹腔内注射を施す。マウスの体重を  $Fe^{59}$  投与の 24 時間後に決定し、 $Fe^{59}$  投与の 48 時間後にマウスを屠殺する。血液を各動物から心臓穿刺によって収集し、ヘマトクリットを決定する（ヘパリンを抗凝固剤として使用した）。Packard ガンマカウンターを使って、各血液試料（0.2 mL）を  $Fe^{59}$  の取り込みについて解析する。非応答マウス（すなわち放射能取り込み量が陰性対照群よりも少ないマウス）は適正データセットから除外する。陰性対照群の 53 % 未満のヘマトクリット値を有するマウスも除外する。

30

#### 【0255】

結果は、各実験用量ごとに 10 匹のセットから導かれる。各群から得た血液試料に取り込まれた放射能の平均量 [ カウント毎分 (CPM) ] を計算する。

#### 【0256】

##### 2. 網状赤血球アッセイ

正常 BDF1 マウスに、3 日間連続して、EPO 対照又は試験ペプチドのいずれかを投薬する（0.5 mL、皮下注射）。3 日目にはマウスに鉄デキストラン（100 mg / mL）も投薬する（0.1 mL、腹腔内注射）。5 日目にマウスを  $CO_2$  で麻酔し、心臓穿刺によって採血する。各血液試料について、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解析（網状赤血球数プログラム）によって決定する。ヘマトクリットを手作業で決定する。補正された網状赤血球のパーセントは、次の式を使って決定される：

40

$\% RETIC_{補正} = \% RETIC_{実測値} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{個体}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{正常}})$ 。

#### 【0257】

##### 3. 血液学的アッセイ

正常 CD1 マウスに、EPO 陽性対照、試験ペプチド、又は溶剤のいずれかを、4 回の週 1 回静脈内ボラス注射で投薬する。製剤中の活性化化合物濃度を変化させることによ

50

て、ある範囲の陽性対照用量及び試験ペプチド用量 (mg/kg で表したもの) を試験する。注射体積は 5 ml/kg である。溶剤対照群は 12 匹からなり、残りの用量群はそれぞれ 8 匹である。毎日の生存率と、週ごとの体重とを記録する。

#### 【0258】

1 日目 (溶剤対照マウスの場合) 並びに 15 日目及び 29 日目 (4 匹/群/日) に、投薬したマウスを絶食させてから、イソフルランを吸入させて麻酔し、心臓穿刺又は腹部大動脈穿刺によって最終血液試料を収集する。血液を Vacutainer (登録商標) ブランドのチューブに移す。好ましい抗凝固剤はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

#### 【0259】

当分野で周知の自動臨床分析機器 (例えば Coulter, Inc. 製のもの) を使って、赤血球の合成及び生理機能を測定するエンドポイント、例えばヘマトクリット (Hct)、ヘモグロビン (Hgb) 及び総赤血球数 (RBC) について、血液試料を評価する。

#### 【実施例 9】

#### 【0260】

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 EPO-R アゴニストペプチドホモダイマーの合成

ステップ 1 - ペプチドモノマーの合成: ペプチドモノマーは、標準的な Fmoc ケミストリを使用し、ABI 431A ペプチド合成装置で、TG-RAM 樹脂 (0.18 mmol/g, Rapp Polymer e、ドイツ) を使って合成される。アミド化されたカルボキシ末端を有するペプチドモノマーを合成するために、完全に組み立てられたペプチドを、樹脂から、82.5% TFA、5% 水、6.25% アニソール、6.25% エタノールを使って切断する。脱保護された生成物を樹脂から濾過し、ジエチルエーテルで沈殿させる。十分に乾燥した後、生成物を、C18 逆相高速液体クロマトグラフィにより、0.1% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル/水の勾配で精製する。ペプチドの構造をエレクトロスプレー質量分析法で確認する。このペプチドモノマーは次のように図解することができる:

(AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLRK - NH<sub>2</sub> (配列番号 1)。

#### 【0261】

ステップ 2 - 三官能性リンカーの合成: 100 mL の DCM に溶解したジエチルイミニアセテート (10.0 g、52.8 mmol) 及び Boc-ベータ-アラニン (10.0 g、52.8 mmol) に、ジイソプロピルカルボジイミド (8.0 mL、51.1 mmol) を、室温で、10 分かけて加えた。反応混合物は添加中に最大約 10 度温まった後、20 分かけて室温まで冷めた。反応混合物を終夜撹拌しておき、沈殿したジイソプロピルウレアを濾去した。溶媒を減圧下で除去してゴム質とし、残渣をエチルアセテートに溶解して、再び濾過することにより、沈殿したウレアをさらに除去した。有機相を分液漏斗に入れ、洗浄し (飽和 NaHCO<sub>3</sub>、ブライン、0.5 N HCl、ブライン)、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で濃縮することにより、ジエステル生成物を無色の油状物として得た。そのジエステルを、MeOH:THF の 1:1 混合物 (100 mL) にとり、これに水 (25 mL) を加えてから、NaOH (5 g、125 mmol) を加えた。pH は > 10 と測定された。反応混合物を室温で 2 時間撹拌した後、6 N HCl で pH 1 に酸性化した。水相を NaCl で飽和させ、エチルアセテートで 4 回抽出した。合わせた有機相を洗浄し (ブライン)、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮して、白色半固体を得た。その固体を 50 mL の DCM に溶解し、これに 300 mL のヘキサンを加えたところ、白色スラリーが生成した。溶媒を減圧下で除去することにより、二酸を白色固体として得た (14.7 g、2 ステップで収率 91.5%)。20 mL の DMF に溶解した二酸 (1 g、3.29 mmol) に、N-ヒドロキシスクシンイミド (770 mg、6.69 mmol) 及びジイソプロピルカルボジイミド (1.00 mL、6.38 mmol) 及

10

20

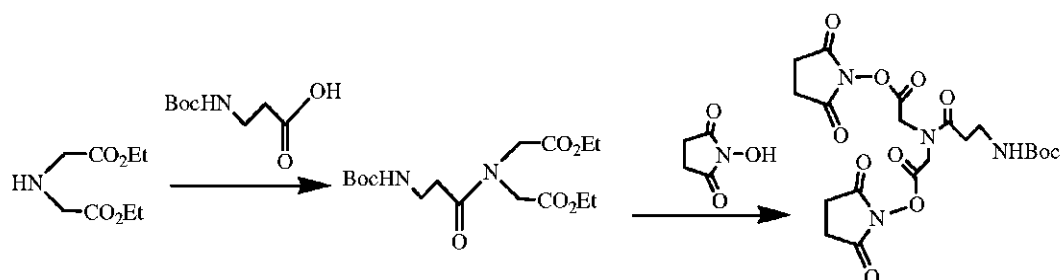
30

40

50

び 4 - ジメチルアミノピリジン ( 3 m g 、 0 . 0 2 m m o l ) を加えた。反応混合物を終夜攪拌し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をエチルアセートにとり、沈殿したウレアを除去するために濾過した。有機相を分液漏斗に入れ、洗浄し ( 飽和  $\text{NaHCO}_3$  、ブライン、0 . 5 N  $\text{HCl}$  、ブライン ) 、乾燥し (  $\text{MgSO}_4$  ) 、濾過し、減圧下で濃縮することにより、ジ-NHSエステル生成物を白色固体として得た ( 1 . 1 2 g 、収率 6 8 % ) 。

【化 8 0】



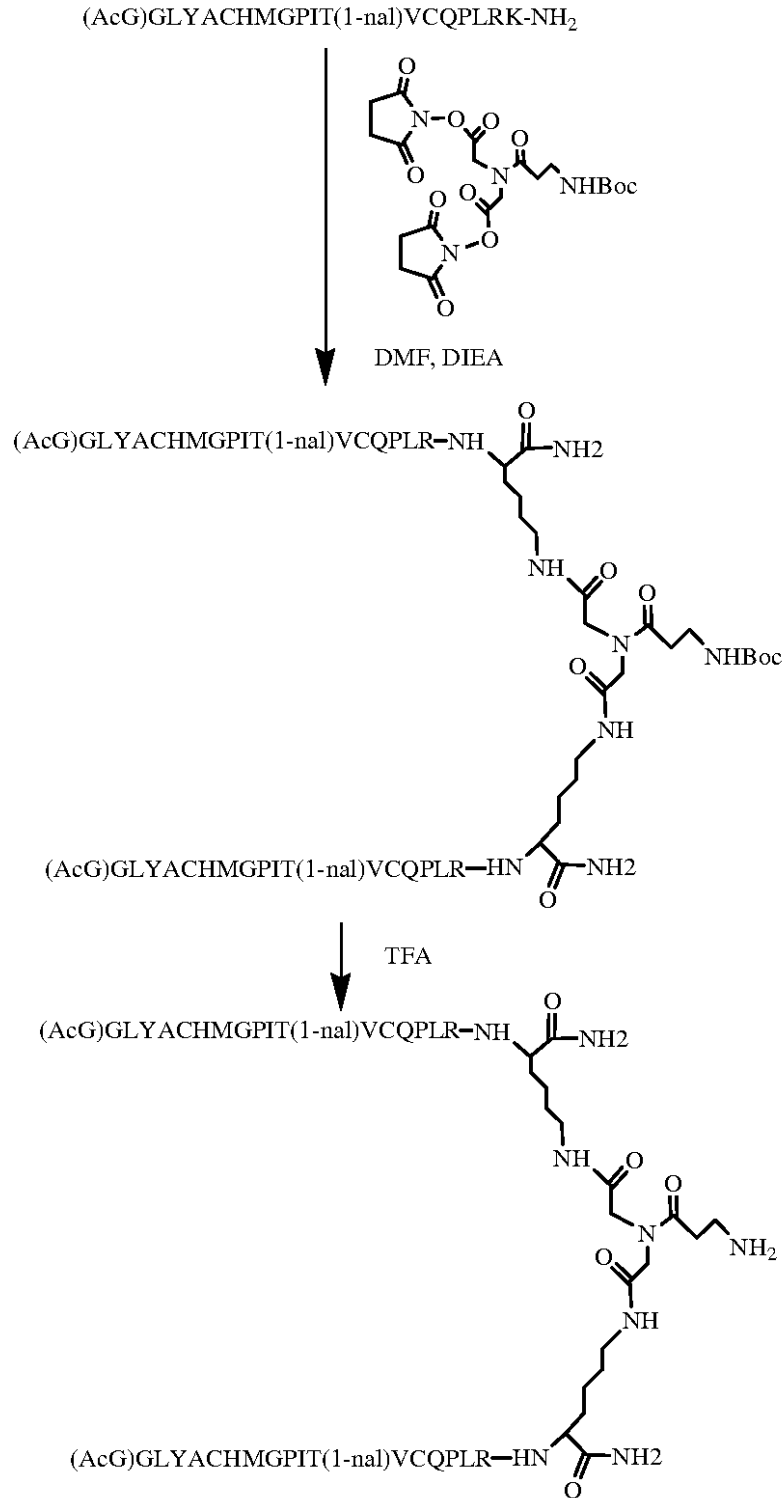
10

【 0 2 6 2】

ステップ 3 - ペプチドモノマーへの三官能性リンカーのカップリング：リンカーへのカップリングのために、2 当量のペプチドを乾燥 DMF 中で 1 当量の三官能性リンカーと混合して透明な溶液を得て、2 分後に 5 当量の DIEA を加える。その混合物を周囲温度で 1 4 時間攪拌する。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物を 80 % TFA / DCM に 3 0 分間溶解することによって Boc 基を除去した後、C 1 8 逆相 HPLC で精製する。ダイマーの構造をエレクトロスプレー質量分析法によって確認する。このカップリング反応により、リンカーは、各モノマーのリジン残基の  $\alpha$  - アミノ基の窒素原子に取付けられる。配列番号 1 を使ったカップリングを次に示す。

20

## 【化 8 1】



10

20

30

40

## 【0263】

ステップ4 - リジンによって連結された2つの線状PEG鎖を含むPEG部分の合成  
mPEG2 - リシノール - NPC

リシノール(市販品を入手することができる)を過剰のmPEG2 - NPCで処理することで、MPEG2 - リシノールとし、次にそれをNPCと反応させることで、mPEG2 - リシノール - NPCを形成させる。

## 【0264】

mPEG2 - Lys - NHS

この生成物は、例えばNektar Therapeutics(アラバマ州3580

50

6 ハンツビル、ディスカバリドライブ490)のMolecular Engineeringカタログ(2003)から(品番アイテム番号2Z3X0T01)、市販品を入手することができる。

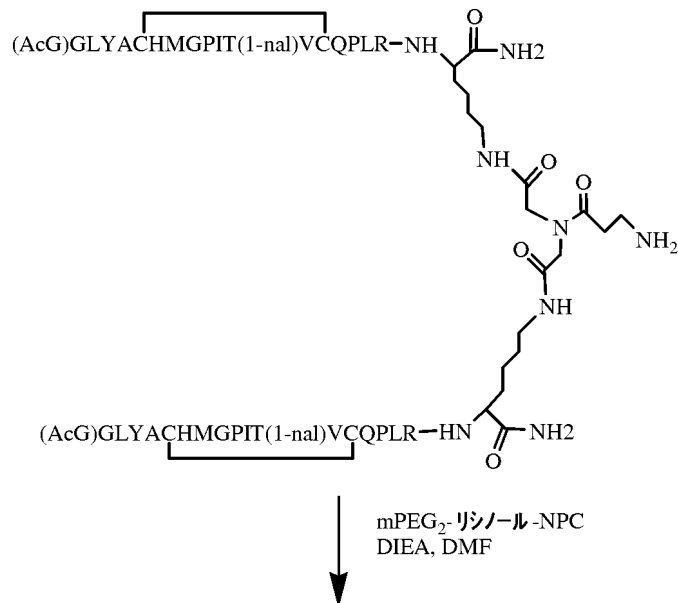
#### 【0265】

ステップ5 - ペプチドダイマーのPEG化：

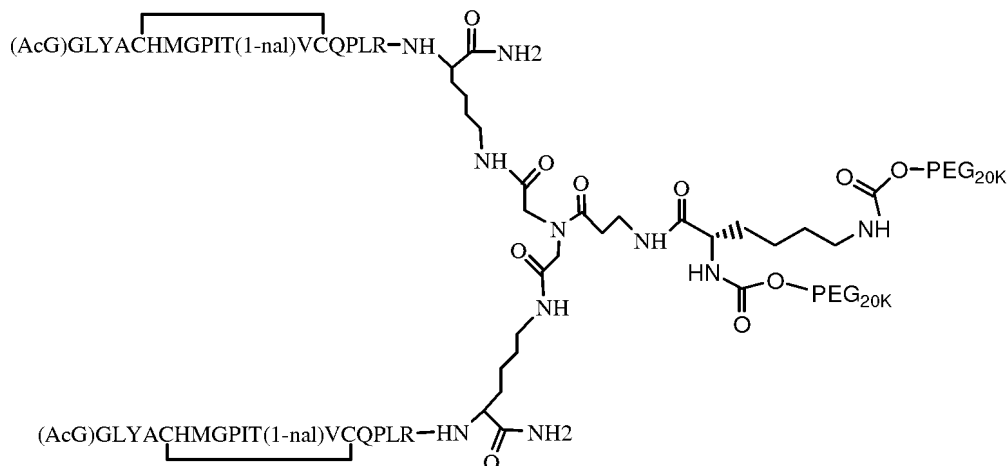
カルバメート結合を介したPEG化：

ペプチドダイマー及びPEG種(mPEG<sub>2</sub>-リシノール-NPC)を、乾燥DMF中、1:2のモル比で混合して、透明な溶液を得る。5分後に4当量のDIEAを上記の溶液に加える。その混合物を周囲温度で14時間撹拌した後、C18逆相HPLCで精製する。PEG化ペプチドの構造をMALDI質量で確認する。精製ペプチドを、以下に概説する陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製にも供した。mPEG-リシノール-NPCを使ったPEG化を、次のスキームに、配列番号1を使って示す。

10



20



30

40

#### 【0266】

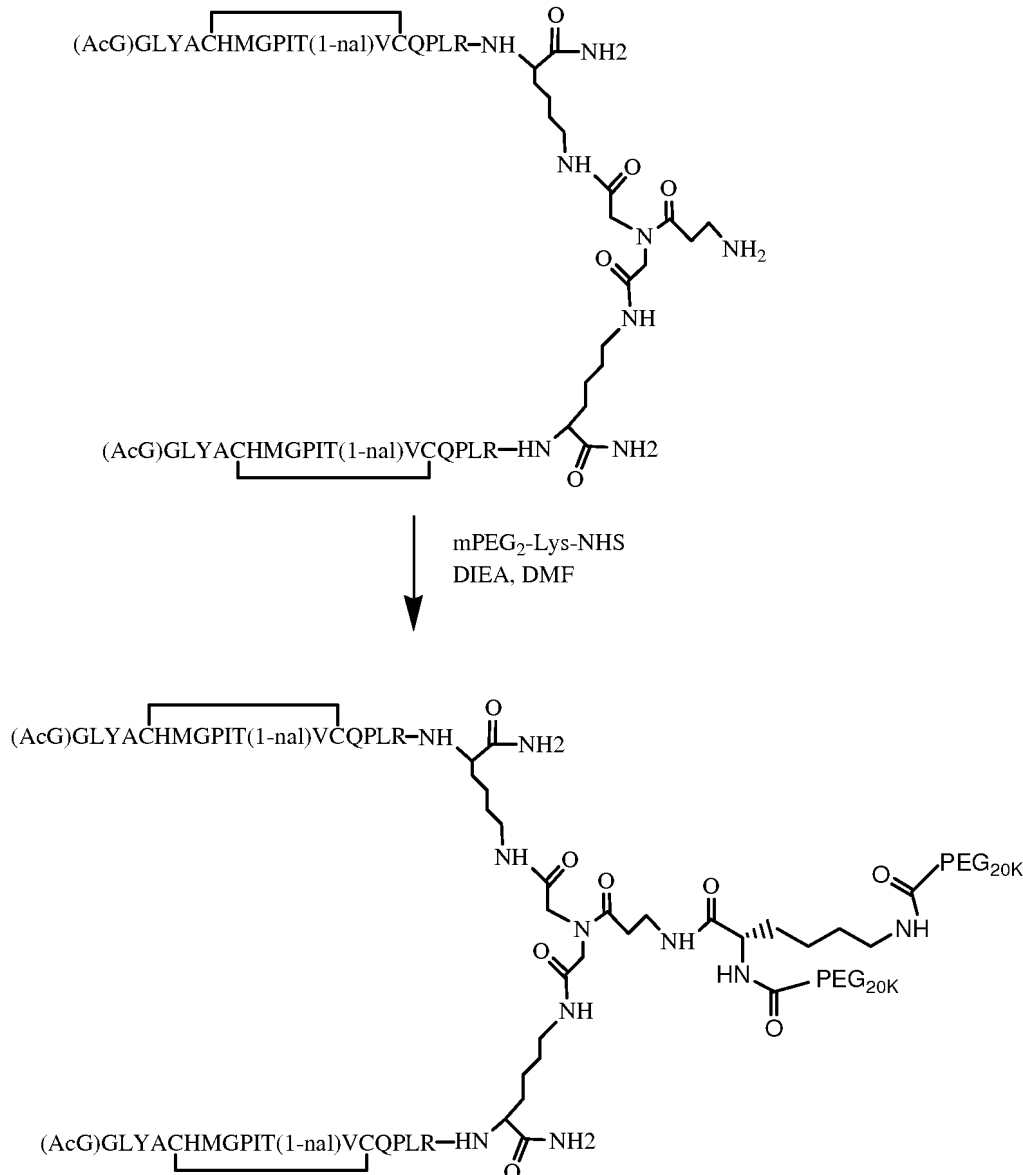
アミド結合を介したPEG化：

ペプチドダイマー及びPEG種(Shearwater Corp(米国)のmPEG<sub>2</sub>-Lys-NHS)を、乾燥DMF中、1:2のモル比で混合して、透明な溶液を得る。5分後に10当量のDIEAを上記の溶液に加える。その混合物を周囲温度で2時間撹拌した後、C18逆相HPLCで精製する。PEG化ペプチドの構造はMALDI質量で確認した。精製ペプチドを以下に概説する陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製にも

50

供した。配列番号 1 を使用し m P E G<sub>2</sub> - L y s - N H S を用いる P E G 化を、次のスキームに示す。

【化 8 3】



10

20

30

40

50

【 0 2 6 7 】

ステップ 6 - ペプチドのイオン交換精製：いくつかの交換支持体を、出発ダイマーペプチドを保持するその能力に加えて、上記ペプチド - P E G コンジュゲートを未反応の（又は加水分解された）P E G から分離するその能力について調査した。イオン交換樹脂（2 ~ 3 g）を 1 c m カラムに充填した後、ナトリウム型に変換し（溶出液が p H 1 4 になるまで 0 . 2 N N a O H をカラムにロード、約 5 カラム体積）、次に水素型に変換し（溶出液がロードの p H と一致するまで 0 . 1 N H C l 又は 0 . 1 M H O A c のいずれかで溶出、約 5 カラム体積）、次に p H 6 になるまで、2 5 % A C N / 水で洗浄した。コンジュゲーション前のペプチド又はペプチド - P E G コンジュゲートを 2 5 % A C N / 水に溶解し（1 0 m g / m L）、T F A で p H を < 3 に調節してから、カラムにロードした。2 ~ 3 カラム体積の 2 5 % A C N / 水で洗浄して、5 m L 画分を集めた後、2 5 % A C N / 水中の 0 . 1 M N H<sub>4</sub> O A c による溶離で、再び 5 m L 画分を集めながら、ペプチドをカラムから放出させた。H P L C で解析したところ、どの画分が所望のペプチドを含有しているかが明らかになった。エバレイティブ光散乱検出器（E L S D）で解析したところ、ペプチドがカラム上に保持されて N H<sub>4</sub> O A c 溶液で溶出（一般に画分 4 と画分 1 0 の間）させた場合は、夾雑物として非コンジュゲート P E G が観察されないことが示された

。ペプチドが最初の洗浄緩衝液（一般に最初の 2 画分）中に溶出した場合、所望の PEG コンjugate と過剰の PEG との分離は観察されなかった。

【0268】

次に挙げるカラムは、ペプチドとペプチド - PEG コンjugate をどちらもうまく保持し、ペプチド - PEG コンjugate を非コンjugate ペプチドからうまく精製した。

【表 5】

表5:イオン交換樹脂

支持体	供給元
Mono S HR5/5強カチオン交換充填済みカラム	Amersham Biosciences
SE53セルロース微粒子性強カチオン交換支持体	Whatman
SPセファロース・ファースト・フロー強カチオン交換支持体	Amersham Biosciences

10

【実施例 10】

【0269】

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 EPO-R アゴニストペプチドホモダイマーの合成

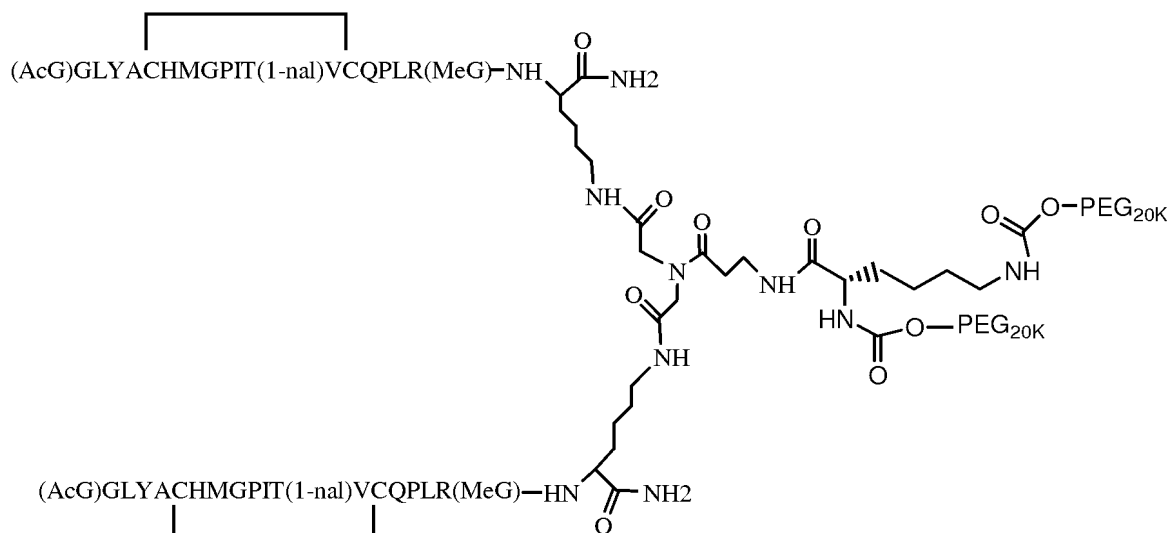
20

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 EPO-R アゴニストペプチドホモダイマーを、ステップ 1 において、合成されるペプチドモノマーが (AcG) GLYACHMGPIT (1-nal) VCQPLR (MeG) K (配列番号 2) である点以外は、実施例 1 で述べたとおりに合成する。

【0270】

PEG をカルバメート結合でスペーサに取付ける場合、配列番号 2 を使ったこの合成の最終生成物は、その構造を次のように図解することができる。

【化 84】



30

40

【0271】

PEG をアミド結合でスペーサに取付ける場合、配列番号 2 を使ったこの合成の最終生成物は、その構造を次のように図解することができる。

C[C@H](CCCCNC(=O)NCC(=O)NCCCNC(=O)CNC(=O)C[C@@H](CCCCNC(=O)N)C(=O)N)[C@@H](CCCCNC(=O)N)C(=O)N

50



、又は陽性対照としてのEPO(R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス)と共に、 $1 \times 10^6$ 細胞/mLを培養する。このアッセイでは、試験ペプチドの希釈系列が同時に試験される。アッセイプレートを5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で4時間インキュベートした後、ルシフェリン(Steady-Glo; Promega、ウィスコンシン州マディソン)を各ウェルに加える。5分間のインキュベーション後に、Packard Topcount Luminometer(Packard Instrument Co.、イリノイ州ダウナーズグローブ)で、発光を測定する。光カウントを試験ペプチド濃度に対してプロットし、Graph Padソフトウェアを使って解析する。最大半量の発光をもたらす試験ペプチドの濃度をEC50として記録する。

【0277】

## 2. 増殖アッセイ

このアッセイは、ヒトEPO-Rを発現するようにトランスフェクトされたマウスブレB細胞株BaF3に基づく。その結果生じる細胞株BaF3/Gal4/Elk/EPORの増殖はEPO-R活性化に依存する。細胞増殖の程度をMTTを使って定量する。この場合、MTTアッセイにおけるシグナルは生細胞の数に比例する。

【0278】

BaF3/Gal4/Elk/EPOR細胞を、スピナーフラスコ中、10%FBS(Hyclone)及び2%WEHI-3上清(ATCC番号TIB-68)を補足したDMEM/F12培地(Gibco)で培養する。培養細胞を、スピナーフラスコ中、 $1 \times 10^6$ 細胞/mLの細胞密度において、10%FBS及び0.1%WEHI-3上清を補足したDMEM/F12培地で、終夜、飢餓状態に置く。次に、飢餓細胞をダルベッコPBS(Gibco)で2回洗浄し、10%FBSを補足した(WEHI-3上清なしの)DMEM/F12培地に再懸濁して、密度を $1 \times 10^6$ 細胞/mLにする。次に、50µL(約50,000細胞)ずつの細胞懸濁液を、96穴アッセイプレートに、3つ一組にして播種する。10%FBSを補足した(WEHI-3上清なしの)DMEM/F12培地中、50µLずつの試験EPOミメティックペプチドの希釈系列、又は50µLのEPO(R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス)若しくはAranesp(商標)(ダルベポエチン、Amgenから市販されているEPO-Rアゴニスト)を、96穴アッセイプレートに加える(最終ウェル液量100µL)。例えば、試験ペプチド(又は対照EPOペプチド)の最終濃度が810pM~0.0045pMの範囲にわたる12個の異なる希釈液を試験することができる。次に、播種した細胞を、37℃で48時間インキュベートする。次に、10µLのMTT(Roche Diagnostics)を各培養皿ウェルに加えてから、4時間インキュベートしておく。次に、10%SDS+0.01N HClを加えることによって、反応を停止させる。次に、プレートを37℃で終夜、インキュベートする。次に、595nmの波長における各ウェルの吸光度を分光測光法で測定する。吸光度の読み対試験ペプチド濃度のプロットを構築し、Graph Padソフトウェアを使ってEC50を計算する。最大半量の吸光度をもたらす試験ペプチドの濃度をEC50として記録する。

【0279】

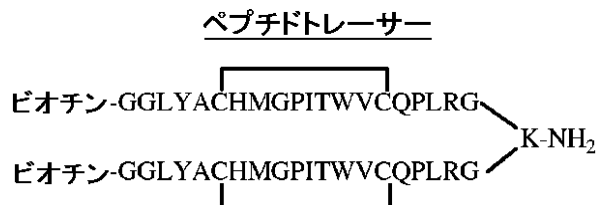
## 3. 競合結合アッセイ

競合結合計算は、光シグナルが2つのビーズ(すなわち、ビオチン化EPO-R結合ペプチドトレーサを保持するストレプトアビジンドナービーズと、EPO-Rが結合しているアクセプタビーズ)の近接の関数として生成するアッセイを使って行なわれる。光は、光の照射時に一重項酸素が第1ビーズから放出され、放出された一重項酸素との接触が第2ビーズの発光を引き起こすという、非放射性エネルギー移動によって生成する。これらのビーズセットは市販されている(Packard)。ビーズの近接は、EPO-RへのEPO-R結合ペプチドトレーサの結合によって生じる。EPO-Rへの結合に関してEPO-R結合ペプチドトレーサと競合する試験ペプチドはこの結合を妨げることになり、発光の減少を引き起こす。

【0280】

さらに詳しく述べると、この方法は次のとおりである。4  $\mu$ L の試験 EPO-R アゴニストペプチドの希釈系列、又は陽性若しくは陰性対照を、384 穴プレートのウェルに加える。次に2  $\mu$ L /ウェルの受容体ノーズカクテルを加える。受容体ノーズカクテルは、15  $\mu$ L の5 mg / ml ストレプトアビジンドナーノーズ (Packard)、15  $\mu$ L の5 mg / ml モノクローナル抗体 ab 179 (この抗体は組換え EPO-R に含まれるヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の一部を認識する)、プロテイン A 被覆アクセプタノーズ (プロテイン A は ab 179 抗体に結合することになる; Packard)、112.5  $\mu$ L の、組換え EPO-R (チャイニーズハムスター卵巣細胞中で、ab 179 ターゲットエピトープを含有するヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の一部に融合された融合タンパク質として生産されるもの) の 1 : 6.6 希釈液、及び 607.5  $\mu$ L の Alphaquest 緩衝液 (40 mM HEPES、pH 7.4; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% BSA、0.05% ツィーン 20) からなる。タッピングして混合する。2  $\mu$ L /ウェルのビオチン化 EPO-R 結合ペプチドトレーサを加える (30 nM の最終濃度)。ペプチドトレーサ EPO-R 結合ペプチド (表の「レポーター EC50 (pM)」を参照) は、実施例 1 に記載の方法に従って、配列番号 4 を使って作製される。

【化 86】



【0281】

混合するために1分間遠心分離する。プレートを Packard Top Seal で封止し、ホイルで包む。室温で終夜インキュベートする。18時間後に AlphaQuest リーダー (Packard) を使って発光を読む。発光対ペプチド濃度をプロットし、Graph Pad 又は Excel で解析する。

【0282】

試験ペプチドなしで観察される発光と比較して発光を50%減少させる試験ペプチドの濃度を、IC50として記録する。

【0283】

4. C / BFU-e アッセイ

EPO-R シグナリングは、骨髄幹細胞から増殖する赤血球前駆体への分化を刺激する。このアッセイは初代ヒト骨髄多能性幹細胞からの赤血球前駆体の増殖及び分化を刺激する試験ペプチドの能力を測定する。

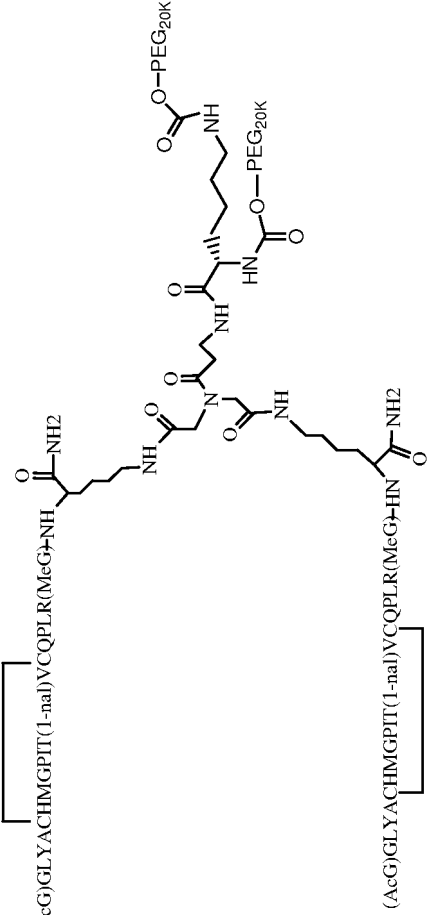
【0284】

このアッセイのために、試験ペプチドの希釈系列を、10% FBS (Hyclone) を補足した IMDM 培地 (Gibco) 中に調製する。次に、これらの希釈系列、又は陽性対照 EPO ペプチドを、メチルセルロースに加えて最終体積を1.5 mLにする。次に、そのメチルセルロース及びペプチド混合物を十分にボルテックスする。ヒト骨髄由来 CD34+ 細胞 (Poietics / Cambrex) のアリコート (100,000 細胞 / mL) を解凍する。解凍した細胞を50 mL チューブ中の0.1 mL の1 mg / mL DNase (Stem Cells) に静かに加える。次に、40~50 mL の IMDM 培地を細胞に静かに加える。すなわち培地は、最初の10 mL を50 mL チューブの側面に沿って1滴ずつ加えた後、残りの培地をチューブの側面に沿ってゆっくりと分注する。次に細胞を900 rpm で20分間遠心し、培地を静かに吸引することにより、注意深く除去する。細胞を1 mL の IMDM 培地に再懸濁し、1 mL あたりの細胞密度を血球計盤スライドでカウントする (スライド上に10  $\mu$ L の細胞懸濁液、細胞密度は平均数  $\times$  10,000 細胞 / mL である)。次に、細胞を IMDM 培地に希釈して、細胞密度を15,000 細胞 / mL にする。次に、100  $\mu$ L の希釈細胞を各1.5 mL のメチルセルロー

ス + ペプチド試料に加え（アッセイ培地中の最終細胞濃度は 1,000 細胞 / mL である）、その混合物をボルテックスする。混合物中の気泡を消失させた後、鈍針を使って 1 mL 吸引する。各試料から得た 0.25 mL の吸引混合物を、24 穴プレート（Falcon ブランド）の 4 つのウェルのそれぞれに加える。播種した混合物を、湿潤培養器中、5% CO<sub>2</sub> 下、37℃ で、14 日間インキュベートする。位相差顕微鏡（対物 5× ~ 10×、最終倍率 100×）を使って、赤血球系コロニーの存在についてスコア化する。形成されるコロニーの数が、EPO 陽性対照を使って観察される値との比較で、最大の 90% になる試験ペプチドの濃度を、EC90 として記録する [表 2 : C / BFU - e EC90 参照]。

【表 6】

表6: ペプチドダイマーに関するインビトロ活性アッセイ

化合物名	ペプチドダイマー	レポーター EC50 (pM)	増殖 EC50 (pM)	放射性 リガンド IC50 (pM)	C/BFU-e EC90 (nm)
ペプチド1 (配列番号:2)	<div><div><div>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)NH<sub>2</sub></div><div>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)NH<sub>2</sub></div></div><div></div></div>	195	165	111	3

【実施例 1 2】

【0 2 8 5】

インビボ活性アッセイ

この実施例では、本発明の E P O - R アゴニストペプチドの活性及び力価を評価するのに役立つ種々のインビボアッセイを説明する。E P O - R アゴニストペプチドモノマー及

10

20

30

40

50

びダイマーは実施例 1 に記載の方法に従って製造される。これらペプチドモノマー及びダイマーのインビボ活性は、低酸素多血マウスバイオアッセイ及び網状赤血球アッセイを含む一連のアッセイを使って評価される。これら 2 つのアッセイを以下にさらに詳しく説明する。

#### 【0286】

##### 1. 低酸素多血マウスバイオアッセイ

試験ペプチドのインビボ活性を、Cotes and Bangham (1961), Nature 191:1065-1067 に記載の方法を改変した低酸素多血マウスバイオアッセイでアッセイする。このアッセイでは、EPO ミメティックとして機能する（すなわち EPO-R を活性化して新しい赤血球合成を誘導する）試験ペプチドの能力を調べる。赤血球合成は、合成された赤血球のヘモグロビンへの放射標識鉄の取り込みに基づいて定量される。

10

#### 【0287】

BDF1 マウスを、7 ~ 10 日間、周囲条件に順応させる。体重を全ての動物について決定し、低体重の動物（< 15 グラム）は使用しない。マウスを、計 14 日間にわたって、低圧室での逐次的条件付けサイクルに供する。各 24 時間サイクルは、0.40 ± 0.02 % 大気圧での 18 時間と、周囲圧での 6 時間とからなる。条件付けの後、投薬に先だてさらに 72 時間は、マウスを周囲圧に維持する。

#### 【0288】

試験ペプチド又は組み換えヒト EPO 標準を PBS + 0.1 % BSA 溶剤（PBS / BSA）で希釈する。ペプチドモノマー原液を、まずジメチルスルホキシド（DMSO）で可溶化する。陰性対照群には、PBS / BSA のみを注射した 1 マウス群と、1 % DMSO を注射した 1 マウス群を含める。各用量群は 10 匹のマウスを含む。マウスに、0.5 mL の適した試料を皮下（首筋）注射する。

20

#### 【0289】

試料注射の 48 時間後に、マウスに、用量が約 0.75 マイクロキュリー / マウスになるように、0.2 mL の  $Fe^{59}$ （DuPont, NEN）の腹腔内注射を施す。マウスの体重を  $Fe^{59}$  投与の 24 時間後に決定し、 $Fe^{59}$  投与の 48 時間後にマウスを屠殺する。血液を各動物から心臓穿刺によって収集し、ヘマトクリットを決定する（ヘパリンを抗凝固剤として使用した）。Packard ガンマカウンターを使って、各血液試料（0.2 mL）を  $Fe^{59}$  の取り込みについて解析する。非応答マウス（すなわち放射能取り込み量が陰性対照群よりも少ないマウス）は適正データセットから除外する。陰性対照群の 53 % 未満のヘマトクリット値を有するマウスも除外する。

30

#### 【0290】

結果は、各実験用量ごとに 10 匹のセットから導かれる。各群から得た血液試料に取り込まれた放射能の平均量 [ カウント毎分 (CPM) ] を計算する。

#### 【0291】

##### 2. 網状赤血球アッセイ

正常 BDF1 マウスに、3 日間連続して、EPO 対照又は試験ペプチドのいずれかを投薬する（0.5 mL、皮下注射）。3 日目にはマウスに鉄デキストラン（100 mg / mL）も投薬する（0.1 mL、腹腔内注射）。5 日目にマウスを  $CO_2$  で麻酔し、心臓穿刺によって採血する。各血液試料について、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解析（網状赤血球数プログラム）によって決定する。ヘマトクリットを手作業で決定する。補正された網状赤血球のパーセントは、次の式を使って決定される：

40

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

#### 【0292】

##### 3. 血液学的アッセイ

正常 CD1 マウスに、EPO 陽性対照、試験ペプチド、又は溶剤のいずれかを、4 回の週 1 回静脈内ボラス注射で投薬する。製剤中の活性化化合物濃度を変化させることによ

50

て、ある範囲の陽性対照用量及び試験ペプチド用量 (mg/kg で表したもの) を試験する。注射体積は 5 ml/kg である。溶剤対照群は 12 匹からなり、残りの用量群はそれぞれ 8 匹である。毎日の生存率と、週ごとの体重とを記録する。

#### 【0293】

1 日目 (溶剤対照マウスの場合) 並びに 15 日目及び 29 日目 (4 匹/群/日) に、投薬したマウスを絶食させてから、イソフルランを吸入させて麻酔し、心臓穿刺又は腹部大動脈穿刺によって最終血液試料を収集する。血液を Vacutainer (登録商標) ブランドのチューブに移す。好ましい抗凝固剤はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

#### 【0294】

当分野で周知の自動臨床分析機器 (例えば Coulter, Inc. 製のもの) を使って、赤血球の合成及び生理機能を測定するエンドポイント、例えばヘマトクリット (Hct)、ヘモグロビン (Hgb) 及び総赤血球数 (RBC) について、血液試料を評価する。

#### 【実施例 13】

#### 【0295】

動物及びヒト正常健常ボランティア (NHV) におけるヘモグロビンレベルの増加

##### 1. 概論

非臨床データ及び臨床データによれば、完全合成 EPO 受容体アゴニストであるペプチド I は、不十分な EPO 産生に続発する貧血を安全且つ効果的に軽減する潜在能力を有する。ペプチド I は、現在利用できる EPO 製品と比較して、次に挙げるものを含むいくつかの潜在的利点を有しうると予想される: 投薬間隔が 3 ~ 4 週間ごとになると予想される持続的な半減期及び薬力学活性 (これは利便性及び服薬遵守の改善につながりうる); 内在性 EPO と共通するアミノ酸配列がないので、抗体による赤芽球癆 (PRCA) の可能性が減少すること; 内在性 EPO と交差反応する市販 EPO に対する抗体が引き起こす PRCA を有する患者を処置できる可能性; 及び室温でタンパク質治療薬よりも長い貯蔵寿命を有する強化された安定性。

#### 【0296】

ペプチド I の一次アミノ酸配列は組換えヒト EPO (rHuEPO) のものとは異なるので、内在性 EPO に対する交差反応性免疫応答を誘発する可能性は低い。極めて稀ではあるが、交差反応性免疫応答は、組換えヒト ESA と内在性 EPO の両方の力価の喪失を伴う重篤な副作用を引き起こす場合がある。加えて、ペプチド I は合成ペプチドなので、その製造において、組換えタンパク質製品では起こりうる宿主細胞物質による薬物の汚染という潜在的リスクが回避される。

#### 【0297】

##### 2. 動物におけるペプチド I の薬物動態

ペプチド I は、赤血球生成の強力な刺激因子であり、マウス、ラット (正常赤血球数ラット及び腎摘ラット)、イヌ、ウサギ及びサルにおける単回又は反復投薬後には、用量依存的活性が観察される。ラット及びサルにおける薬理学的研究は、ヘモグロビンレベルによって測定される網状赤血球 (未熟 RBC) および RBC の上昇が用量比例的であることを示す。

#### 【0298】

ラット、イヌ及びサルにおける薬物動態研究では、現在販売されている rHuEPO 製品と比較して持続的なペプチド I の血漿残留が証明された。消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、ラットにおける 21.5 ~ 30.7 時間から、イヌにおける 73.7 時間までの範囲にわたる。ペプチド I の体内分布は、主として血漿画分への分布である。6 分の 5 腎摘ラットへの 9.87 mg/kg のペプチド I の IV 投与後は、 $t_{1/2}$  が約 48 時間、クリアランスは 0.763 mL/時/kg と (正常赤血球数ラットにおける 1.44 mL/時/kg と比較して) 低く、1.8 の増加した AUC 強度をもたらした。

#### 【0299】

## 2. ヒトにおけるペプチド I の薬力学及び薬物動態

### 2. 1. 概略及び方法

あるフェーズ 1 試験においてペプチド I を 20 人の N H V で試験した。ペプチド I によるこの初めてのヒト試験 (first-in-human study) は、ランダム化、二重盲検、プラセボ対照、単回投与、I V、漸増用量、安全性及び認容性試験だった。この試験の主目標は、ペプチド I の安全性及び薬物動態を評価すること、並びに薬理学的活性用量 (P A D) を確立することだった。各 7 人の男性ボランティアからなるコホートがペプチド I 又はプラセボの単回投与を 5 : 2 の比率で受けるようにスケジュールを設定した。ベースライン値からのヘモグロビンの増加によって決定される P A D が観察されるまで、用量レベルを増加させながらコホートを加えることとし、P A D が観察された時点で、P A D と同定された用量レベルを、もう一つのボランティアのコホートで繰り返す。

10

#### 【0300】

試験は、それぞれ 0.025、0.05、0.1 mg / kg、及び 0.1 mg / kg のペプチド I 用量 (1 コホートあたり単回投与) で、逐次的に登録される 4 つのコホートで開始した。試験の結果は、3 番目のコホートが 0.1 mg / kg のペプチド I を投与された後に、網状赤血球数及びヘモグロビンレベルの増加が達成されることを示した。この用量を 4 番目のコホートで繰り返して、3 番目のコホートで観察された結果を確認した。こうして試験を終了した。非盲検結果を以下に要約する。

#### 【0301】

### 2. 2. 薬力学結果

網状赤血球数 (絶対値及びパーセント) は、ペプチド I 用量の増加に伴って、用量依存的な増加を示した。網状赤血球数は、全ての用量コホートで、投与の約 7 日後に最大に達した。最大網状赤血球応答及び網状赤血球 対 時間曲線 (A U C<sub>0-14 日</sub> 及び A U C<sub>0-28 日</sub>) の比較は、用量群間に有意差を示した ( $p < 0.05$ )。

20

#### 【0302】

投薬後 28 日間にわたるヘモグロビンの応答及びベースラインからの変化 (平均及び最大の両方) は、ペプチド I の用量の増加に伴って用量依存的な増加を示したのに対し、対照群は、試験に関する採血後の経時的なヘモグロビンのわずかな減少が赤血球生成の外因性刺激に付随するものではないこと示した [0.0001 の一元配置分散分析 (A N O V A) p 値]。混合モデルを用いる一元配置共分散分析 (A N C O V A) を使って、4 つの群全ての間で、経時的なベースラインからの個々の変化を比較した。この分析の結果は、4 つの用量群の全ての間で有意な用量応答を示し ( $p = 0.0001$ )、0.025 mg / kg 群と 0.1 mg / kg 群の間 ( $p = 0.0027$ )、並びに 0.05 mg / kg 群と 0.1 mg / kg 群の間 ( $p = 0.0113$ ) に有意差があった。少なくとも 1.0 g / d L というヘモグロビンの増加を伴うペプチド I の P A D は 0.1 mg / kg だった。

30

#### 【0303】

また、コホート 3 及びコホート 4 の被験者 (0.1 mg / kg のペプチド I 又はプラセボ) を、投与後 42 日間にわたって追跡した。42 日目の時点で、平均ヘモグロビンレベルは、0.1 mg / kg のペプチド I で処置した被験者では、ベースラインに戻っていたが、プラセボ被験者では、依然としてベースライン値を下回っていた。このように、42 日目の時点で、試験全体を通してそうであるように、0.1 mg / kg のペプチド I の投与を受けた被験者とプラセボの投与を受けた被験者との間で、ベースラインヘモグロビンからの変化の差は、0.5 g / d L だった。

40

#### 【0304】

血清 E P O レベルは、ペプチド I 用量の増加に伴って、一過性に低下した。他の薬力学パラメータの変化 (赤血球数及びヘマトクリットの増加、フェリチン及び網状赤血球ヘモグロビン含量の一過性の減少、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、並びに E P O の一過性の減少) は、赤血球生成の刺激と合致していた。

#### 【0305】

### 2. 3. 薬物動態結果

50

0.025、0.05及び0.1mg/kgのペプチドIを5分間かけてIV投与した後、薬物濃度は一般に注入開始の5分後から1時間後までの間でピークに達した。0.025mg/kg用量群では、ペプチドI濃度が5分と15分の間でピークに達したが、0.1mg/kg用量の場合、 $t_{max}$ は1時間近くになった。 $C_{max}$ に到達した後、血漿濃度は低下し、一般に、0.025mg/kgの投薬後は96時間まで、0.05mg/kg用量の場合は5日目まで、そして0.1mg/kg用量の場合は7日目まで、定量可能だった(>25ng/mL)。算出される半減期は0.1mg/kg用量で小さな増加を示し、0.025mg/kgの投薬後は16.7~21.9時間(平均19.2時間)、0.05mg/kgの投薬後は15.3~25.1時間(平均18.7時間)、そして0.1mg/kgの投薬後は17.7~33.1時間(平均23.5時間)の範囲だった。

10

#### 【0306】

薬物の分布及び排出は、標準的な1又は2コンパートメント動態には従わないようだった。一次速度が、より低い薬物濃度でしか観察されなかったことから、約400ng/mLを超える血漿濃度では、代謝/排出プロセスの飽和が示唆される。分布容積は用量による変化をほとんど示さなかった(0.025、0.05及び0.1mg/kgの用量で平均はそれぞれ2165、1903、及び2010mL)。血漿クリアランスは、用量と共に小さな低下を示し、0.025、0.05及び0.1mg/kgの用量で幾何平均はそれぞれ78.0、70.7、及び59.2mL/時間だった。用量標準化 $C_{max}$ 及びAUC(0-無限)データのANOVAは、 $C_{max}$ が用量と線形関係にあるらしいことを示した。しかしAUC(0-無限)は、最高用量の0.1mg/kgにおいて、高用量で観察された薬物クリアランスの小さな減少に関連すると思われる非線形性の証拠を示した。

20

#### 【0307】

##### 2.4. 安全性結果

15人の被験者(プラセボの投与を受けた8人のうちの4人及びペプチドIの投与を受けた20人のうちの11人)が合計28件の有害事象(AE)を経験した(プラセボ群で6件、ペプチドI群で22件)。ペプチドIの投与を受けた被験者では、頭痛(4/20、20.0%)及び腹痛(2/20、10.0%)、悪心(2/20、10.0%)及び鼻咽頭炎(2/20、10.0%)が、報告頻度の高い事象だった。1件を除く全てのAEが軽度(グレード1)に類別された。ペプチドI受容者に観察された大半のAE(15/22)は、試験薬ペプチドIには恐らく関係がないと考えられた。AEの頻度、重篤度又はパターンの相違は4つの群間にはなかった。重篤有害事象(SAE)もAEを原因とする試験からの離脱もなかったが、0.025mg/kgのペプチドI用量に割り当てられた1人の被験者については、軽度の薬物反応により、試験薬を中止した。注入の2分後に始まったこの反応は、胸に始まって顔まで拡がった紅潮であり、熱っぽい感覚、不快感及び喉のいがらっぽさを伴った。安全策としてこの被験者については注入を中止した。症状は自発的且つ迅速に消散した。治療的介入は必要なかった。バイタルサインに変化はなかった。実験パラメータは追加の免疫学的検査を含めて正常であったので、この反応の具体的性質を解明することはできない。類似する(又はさらに重篤な)薬物反応が他のESAを含む多くの薬物で観察されている。加えて、ペプチドIのIV投与中は患者を観察すべきである。患者が類似する症状を発現したら、注射を中止すべきである。

30

40

#### 【0308】

1人のプラセボ受容者及び1人のペプチドI受容者には、それぞれ軽度の頭痛及び軽度の腹部痙攣に対する投薬が併用された。バイタルサイン、心電図(ECG)又は検査値に臨床的に有意な変化はなかった。この試験においてペプチドIに特異的な抗体を産生した被験者はいなかった。

#### 【0309】

##### 2.5. 要約

要約すると、ペプチドIは0.025、0.05、又は0.1mg/kgの単回IV投

50



薬後に、安全であり、且つ認容性が高く、プラセボに似た安全性プロファイルを有するようだった。薬物動態結果は約 15 ~ 33 時間の範囲の半減期を示し、0.1 mg / kg 用量では平均が 23.5 時間だった。中央値は全ての用量について同程度であり、注入開始の 15 分後に見られた。 $C_{max}$  は用量と線形関係にあるようであり、 $AUC_{(0-\infty)}$  は 0.1 mg / kg 用量において非線形であるようであった。一次速度が、より低い薬物濃度でしか観察されなかったことから、 $> 400$  ng / mL の血漿濃度では、代謝 / 排出プロセスの飽和が示唆される。ペプチド I は、評価した全ての用量で網状赤血球に対する薬理学的活性を示し、一般に、その応答は用量依存的で、用量の増加と共に、応答も大きく且つ長くなった。0.1 mg / kg 用量群は、臨床的にも統計的にも有意な、ベースラインからのヘモグロビンの増加を伴い、10 人のペプチド I 受容者の間で、 $1.36 \pm 0.39$  g / dL というベースラインからの平均最大増加が見られたので、この用量を NHV における PAD と定めた。他の薬力学パラメータの変化（赤血球数及びヘマトクリットの増加、フェリチン及び網状赤血球ヘモグロビン含量の一過性の減少、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、並びに EPO の一過性の減少）は、赤血球生成の刺激と合致していた。

#### 【0310】

欧州血液学会第 10 回年会（2005 年 6 月 4 日、於ストックホルム）で発表されたポスター及び要旨番号 0470 は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【実施例 14】

#### 【0311】

透析前患者、透析中患者、及び腫瘍患者におけるヘモグロビンレベルの増加

##### 1. 透析前患者

透析を受けておらず、以前に赤血球生成刺激剤（ESA）処置を受けたことがない慢性腎臓疾患（CKD）患者を対象として、ペプチド I 注射の単回静脈内投薬の安全性、薬力学及び薬物動態の、ランダム化、二重盲検、プラセボ対照、逐次的用量増量試験が行なわれる。この試験では透析を受けていない CKD 患者（透析前患者）におけるペプチド I の単回静脈内（IV）用量レベルの安全性プロファイルが評価される。また、この試験では、薬力学パラメータ、例えばヘモグロビン、網状赤血球、及び鉄貯蔵に対するペプチド I の単回投薬の用量応答関係が評価され、透析前患者における静脈内でのペプチド I の単回用量レベルの薬物動態プロファイルが評価され、透析前患者における静脈内での薬理学的活性用量（PAD）（例えば患者の  $> 70\%$  がベースラインから 1 g / dL のヘモグロビン増加を達成することになる用量）が決定される。

#### 【0312】

試験のエンドポイントには次の項目が含まれる：有害事象（AE）；重篤有害事象（SAE）；薬物動態パラメータ（ $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $Vd$ 、及び CL を含む）；薬理学パラメータ（網状赤血球、ヘモグロビン、網状赤血球ヘモグロビン含量、及び鉄貯蔵の血清測定値（例えば血清フェリチン、トランスフェリン飽和度、及びトランスフェリン受容体タンパク質）を含む）；ベースラインからの平均ヘモグロビン変化；ベースラインからの最大ヘモグロビン変化；ベースラインから 1 g / dL のヘモグロビン増加を達成する処置患者の割合；及び赤血球輸血の頻度。

#### 【0313】

この試験に組み入れるために選択される患者は、18 ~ 75 歳の透析前患者であって、慢性腎臓疾患に続発してヘモグロビンが  $9$  g / dL 且つ  $11$  g / dL であり、ESA による処置を以前に受けたことがなく、適格性基準を満たす患者である。9 人の患者からなる各コホートにおいて、ペプチド I（ $n = 7$ ）又はプラセボ（ $n = 2$ ）の単回投与を受けるように、患者をランダムに割り当てる。1 コホートあたり 5 人のペプチド I 処置患者で最低 22 日分のデータを確実に入手することができるように、あるコホート内で 3 人目以降について 22 日目より前に試験を終了する場合、これを補充する。各補充患者は、休薬した患者と同じ処置群に割り当てられる。22 日目以降に試験から離脱した患者は補充しない。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 1 4 】

最大 6 つの用量レベルコホート（最大 4 つの計画的用量レベル及び最大 2 つまで追加される、より低い用量、中間用量、及び / 又は反復 [ 確認 ] 用量レベルに対する L I P ）が、独立安全性監視者（Independent Safety Monitor）、治験責任医師（Investigator）、及び治験依頼者（Sponsor）による決定に応じて、逐次的に組み入れられるように計画する。最大で 5 4 人の評価可能な患者をこの治験に組み入れることができる。

## 【 0 3 1 5 】

この試験において、各患者は、投薬後少なくとも 2 8 日間は参加することが期待される。

## 【 0 3 1 6 】

各患者はペプチド I 又はプラセボの単回投与を受ける。計画される逐次的ペプチド I 用量レベルは、次のとおりである。

## 【 化 8 7 】

ペプチド I 用量(mg/kg)
0.05
0.1
0.2
0.3
追加の確認用量、中間用量又はより低い用量
追加の確認用量、中間用量又はより低い用量

10

20

## 【 0 3 1 7 】

これは、1 コホートあたり 9 人の透析前患者からなる最大 6 個の用量コホートによる、ランダム化、二重盲検、プラセボ対照、逐次的用量増量試験である。各コホートにおいて、患者は 2 9 日目又は有害事象の安定化のどちらか遅い方まで追跡される、ヘモグロビンレベルは、全ての患者において、上昇したレベルがベースラインレベルから 0 . 5 g / d L 以内に戻るまで追跡される。

## 【 0 3 1 8 】

ベースラインヘモグロビン濃度を、試験薬投薬前の直近の 3 つのヘモグロビン値の平均と定める。試験中、コホートの開始又は中止決定のためのヘモグロビンの変化は、次に続くヘモグロビン値による確認を必要とする。

30

## 【 0 3 1 9 】

患者のヘモグロビンレベルが 1 4 g / d L に達した場合は、臨床的に必要であれば、患者を瀉血すべきである。患者のヘモグロビンのレベルが 1 6 g / d L（確認値）に達した場合は、患者を瀉血すべきである。

## 【 0 3 2 0 】

第 1 コホートの投薬後、続いて行なわれる、次の用量レベルの次のコホートの組み入れは、プロトコルに指定された用量増量基準に基づいて行なわれる。次の用量レベルコホートへの用量増量はプロトコルに指定された中止基準に基づいて停止される。非盲検の独立安全性監視者が、非盲検臨床及び検査データを常時審査して、いつ用量増量基準又は中止基準が満たされたかを決定する。

40

## 【 0 3 2 1 】

治験責任医師である臨床要員及び治験依頼者である臨床要員は、個々の患者の処置割り当てや、患者の特定された P K パラメータ、血液学的パラメータ、並びに鉄パラメータ結果（例えばヘマトクリット、ヘモグロビン、M C H C（平均赤血球ヘモグロビン濃度）、M C H（平均赤血球ヘモグロビン量）、M C V（平均赤血球容積）、網状赤血球数、及び網状赤血球ヘモグロビン含量）、又は鉄貯蔵結果（例えばフェリチン、トランスフェリン飽和度、及びトランスフェリン受容体タンパク質）については、知らされない。しかしこれらの要員は、試験の過程で、患者の特定を不可能にした結果を審査することはできる。結果が患者によって特定されると、その結果から、処置割り当てが明らかになる可能性が

50

あるので、これらの要員には、これらのパラメータについて、患者の特定された結果を入手する権限が与えられないようにする。

#### 【0322】

安全上の懸念が認められず、コホート中のどの患者も  $1.0 \text{ g/dL}$  のヘモグロビン増加を達成していないか、又はペプチド I の投与を受けてベースラインから  $> 1.0 \text{ g/dL}$  のヘモグロビン増加を達成した全ての患者が、最低 2 つの時点にわたって安定性（ピークヘモグロビン値から  $0.5 \text{ g/dL}$  以内）又は可逆性（ピークヘモグロビン値からの減少）を示す場合には、コホート中の全ての評価可能な患者（7人以上）が 22 日目に達した時から、次のコホートへの用量増量が許される。

#### 【0323】

次に挙げる基準のいずれかが満たされる場合は、目下のコホートへの新しい患者の組み入れ及び新しい用量への増量が中止される：あるコホート内で 2 人又はそれ以上の患者がグレード 3 又はグレード 4 のペプチド I 関連有害事象を有すること；あるコホート内で、ペプチド I の投与を受けた 2 人以上の患者が、任意の 4 週間にわたって、 $2.0 \text{ g/dL}$  のヘモグロビン増加（ベースラインレベルの上から始まる増加）を有すること；又は、あるコホート内で、ペプチド I の投与を受けた 2 人又はそれ以上の患者が、ヘモグロビンの標的範囲の上限を超えること（ $> 13 \text{ g/dL}$ ）。

#### 【0324】

安全上の懸念が認められない場合は、あるコホート内の全ての評価可能な患者（7人以上）が 22 日目に達した後に、確認（反復）用量、より低い用量、又は中間用量を調べるために、9 人の患者からなる追加のコホートを開始することができる。

#### 【0325】

透析前患者の場合、PAD は  $0.025 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、或いは  $0.05 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、或いは  $0.067 \sim 0.075 \text{ mg/kg}$  であると決定されると予想される。

#### 【0326】

##### 2. 透析患者

慢性血液透析患者における貧血の維持治療のために静脈内投与されるペプチド I 注射の安全性、薬力学、及び薬物動態の、オープンラベル多施設逐次的用量探索試験を行なって、ヘモグロビン値がエポエチンアルファで安定している血液透析患者におけるベースライン値の上下  $1.0 \text{ g/dL}$  以内にヘモグロビン値を維持するような、月 1 回の静脈内投与ペプチド I 用量の範囲を決定する。また、この試験では、血液透析患者に静脈内投与される 3 回までのペプチド I の投薬の安全性プロファイルが評価され、血液透析患者に静脈内投与される 3 回までのペプチド I の投薬の薬物動態プロファイルも評価される（試験患者のサブセットにおける評価）。

#### 【0327】

試験のエンドポイントには次の項目が含まれる：ベースラインからの平均週ヘモグロビン変化；13 週目までヘモグロビンがベースラインの上下  $1.0 \text{ g/dL}$  以内にある患者の数（％）；13 週目までヘモグロビンが  $9.5 \sim 13.0 \text{ g/dL}$  以内に維持される患者の数（％）；試験中に用量調節がなかった患者の数（％）及び試験中に用量の増減があった患者の数（％）；赤血球輸血の頻度；追加の薬理学パラメータ、例えば網状赤血球数（絶対値及び AUC）、網状赤血球ヘモグロビン含量、及び鉄貯蔵の血清測定値（例えば血清フェリチン、トランスフェリン飽和度、及び可溶性トランスフェリン受容体タンパク質）；有害事象；重篤有害事象；並びに薬物動態パラメータ、例えば  $C_{max}$ 、 $AUC_0-t$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $V_d$ 、 $V_{ss}$  及び  $CL$ （試験患者のサブセットにおける評価）。その薬物動態解析及び薬力学解析の結果を使って、エポエチンアルファの週 1 回用量に基づいてペプチド I の月 1 回用量を最適に予測する予備的換算係数が決定される。

#### 【0328】

この試験に組み入れるために選択される患者は、安定用量の市販エポエチンアルファで

10

20

30

40

50

安定したヘモグロビンに維持されている 18 歳又はそれ以上の血液透析患者であって、適格性基準を満たす患者である。1 コホートあたり 15 人の患者からなる、最大 4 つの逐次的用量レベルコホートが、3 ~ 10 ヶ所の臨床施設で組み入れられるように計画する。

#### 【0329】

3 回のペプチド I 投薬を受けた 1 コホートあたり最低 10 人の患者でデータを確実に入手することができるように、あるコホート内で 6 人目及びそれ以降の患者が 3 回目の投薬を受ける前に試験を終了する場合、最大 4 人まで補充する。3 回の投薬を受けた後に試験から離脱した患者は補充しない。

#### 【0330】

2 つの用量レベルコホートが、まず最初に、逐次的に組み入れられるように計画する。観察された安全性プロファイル及び薬理学的応答に応じて、それぞれ 15 人の患者からなる最大 2 つの追加コホートを加えて、より低い用量レベル、中間用量レベル、及び / 若しくは反復（確認）用量レベル、並びに / 又は投与頻度を試験することができる。

10

#### 【0331】

この治験には最低 30 人且つ最大 60 人の評価可能な患者を組み入れることができる。この試験において、各患者は、4 週間のスクリーニング期間後、約 15 週間にわたって参加することが期待される。

#### 【0332】

裏づけとなるデータが入手できるまで、投薬期間をさらに 12 週間延長するための補正を計画する。

20

#### 【0333】

ペプチド I の用量は、透析の最後の 15 分間中に 30 秒間での急速静脈内ボラス注射として、4 週間ごとに合計 3 回、投与される。あるコホート内の各患者には、前もって指定されたエポエチンアルファ / ペプチド I 換算レベルから開始されるオープンラベル用量のペプチド I が投与される。用量は、先のコホートで観察された用量反応関係に基づいて、次のコホートでは、増量又は減量される。計画される開始ペプチド I 用量レベル換算は次のとおりである。

#### 【化 88】

コホート	100U/kg/週のエポエチンアルファから ペプチドI用量(mg/kg/Q4W)への換算係数
開始コホート	0.033
増量又は減量 コホート	0.041 - 0.050 (増量の場合) 0.017 - 0.025 (減量の場合)
中間又は確認 コホート	未定
中間又は確認 コホート	未定

30

40

#### 【0334】

ペプチド I 用量は、個々の患者において、次のように調節することができる。ペプチド I 試験薬の 3 番目の用量から出発して、患者の確認されたヘモグロビンがベースライン値ら  $> 1.0 \text{ g/dL}$  の減少を示すか、又は患者の確認されたヘモグロビンがベースラインに対して  $0.5 \text{ g/dL}$  の減少から  $1.1 \text{ g/dL}$  下のレベルまでの減少を示した場合は、用量を 25 % 増加させる。試験薬の 3 番目の用量から出発して、患者の確認されたヘモグロビンがベースラインから  $> 1.5 \text{ g/dL}$  の増加を示すか、又は患者の確認されたヘモグロビンがベースラインに対して  $0.5 \text{ g/dL}$  の増加から  $1.2 \text{ g/dL}$  上のレベル

50

までの増加を示した場合は、用量を 25 % 減少させる。試験中の任意の時点において、患者の確認されたヘモグロビンが、任意の 2 週間以内で、 $> 1.0 \text{ g/dL}$  の増加（ベースラインの上から始まる増加）を示した場合は、次の用量を 25 % 減少させる。試験中の任意の時点において、患者の確認されたヘモグロビンが  $12.5 \text{ g/dL}$  を超えた場合は、ヘモグロビンが  $12.0 \text{ g/dL}$  に減少するまで次の投薬を遅らせ、用量を 25 % 減少させる。

【0335】

ベースラインヘモグロビン濃度を、試験薬投与前の 3 週間に収集される、直近の 3 つの週半ば透析前ヘモグロビン値の平均と定める。試験中、個々の用量調節又はコホートの開始若しくは中止基準決定のためのヘモグロビンレベルの変化は、7 日以内の任意の時点における反復ヘモグロビン値による確認を必要とする。

10

【0336】

これは、1 コホートあたり 15 人の血液透析患者からなる 2 ~ 4 つの処置コホートによるオープンラベル逐次的用量探索試験である。各患者は、ペプチド I の静脈内投薬を、4 週間ごとに合計 3 回受ける。ペプチド I の最初の投薬を受けた後、患者は試験全体を通して少なくとも週 1 回は診察される。試験中、鉄状態は Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/D O Q I) 治療ガイドラインに従って維持される。

【0337】

患者は、ペプチド I の最後の投与後、最低 42 日間、又は有害事象の安定化のどちらか遅い方まで追跡される。処置の中止後は、ヘモグロビンレベルを、全ての患者で、標的範囲に戻るまで追跡する。

20

【0338】

患者のヘモグロビンレベルが  $14 \text{ g/dL}$ （確認値）に達した場合は、試験責任医師の判断に従って患者を瀉血することができる。患者のヘモグロビンレベルが  $16 \text{ g/dL}$ （確認値）に達した場合は、患者を瀉血する。瀉血の方法は、その施設の標準的臨床実務に従って行なわれる。瀉血された血液の体積を記録しておく。瀉血された患者はペプチド I の受容を中断し、瀉血後の薬力学データは解析から除外する。

【0339】

第 1 コホートの投薬後、続いて行なわれる次のコホートの組み入れは、プロトコルに指定された用量増量又は用量減量基準に基づく。適当な用量レベル換算係数が同定されたら、その換算係数用量レベルを確認コホートで繰り返すことができる。独立安全性監視者及び試験依頼者は、臨床データ及び検査データを常時審査して、いつ用量増量、用量減量、追加コホート、又は中止基準が満たされたかを決定する。

30

【0340】

あるコホートに組み入れられた 6 人又はそれ以上の患者の 7 週目データの審査を起点として、安全上の懸念が独立安全性監視者によって認められず、かつ組み合わされた 6 人又はそれ以上の患者が、7 週目以降、ベースラインからの  $1.0 \text{ g/dL}$  を上回る確認されたヘモグロビンの減少を示す場合には、目下のコホートへの組み入れを中止することができ、次のコホートへの用量増量が許される。

40

【0341】

あるコホートに組み入れられた 6 人又はそれ以上の患者の 7 週目データの審査を起点として、安全上の懸念が独立安全性監視者によって認められず、かつ組み合わされた 6 人又はそれ以上の患者が、7 週目以降に、ベースラインに対して  $> 1.0 \text{ g/dL}$  の増加から  $> 13.0 \text{ g/dL}$  のヘモグロビン値までの確認されたヘモグロビンの増加を示す場合、又は確認されたヘモグロビンが、試験エントリ後、任意の 2 週間以内に、 $> 1.0 \text{ g/dL}$  の増加（ベースラインから上への増加）を示す場合は、目下のコホートへの組み入れを中止することができ、次のコホートへの用量減量が許される。

【0342】

あるコホートに組み入れられた 10 人又はそれ以上の患者の 7 週目データの審査を起点

50

として、安全上の懸念が安全性監視者によって認められない場合は、より低い又は中間（現在試験しているものと先に試験したものとの間）の換算係数、及び／又は投与頻度を試験するために、追加コホートを開始することができる。最大２つの追加コホートを組み入れることができる。

#### 【 0 3 4 3 】

あるコホートに組み入れられた 10 人又はそれ以上の患者の 7 週目データの審査後に、安全上の懸念が独立安全性監視者によって認められず、用量増量規則も用量減量規則も満たされない場合には、同じ換算係数を利用する確認コホートを開始して、同じ換算係数及び／又は投与頻度を繰り返すことができる。

#### 【 0 3 4 4 】

次に挙げる基準が満たされる場合は、目下のコホートへの新しい患者の組み入れ及び新しい用量への増量が中止される：あるコホート内の 3 人の患者がグレード 3 又はグレード 4 のペプチド I 関連有害事象を有すること。

#### 【 0 3 4 5 】

透析患者の場合、PAD は  $0.025 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、或いは  $0.05 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、或いは  $0.067 \sim 0.075 \text{ mg/kg}$  であると決定されると予想される。

#### 【 0 3 4 6 】

### 3. 腫瘍患者

化学療法誘発貧血（CIA）を有する患者におけるヘモグロビン応答に関連する、皮下（SC）注射によって 3 週間ごとに投与されるべきペプチド I 用量を決定するために、化学療法誘発貧血を有する癌患者における皮下投与されたペプチド 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増量試験を行なう。他の目標には、骨髓抑制化学療法を同時に受ける癌患者において 3 週間ごとに皮下投与されるペプチド I の 4 回までの投薬の安全性プロファイルを評価すること；用量レベルが異なるペプチド I で、CIA 患者における Hgb のベースラインからの変化を決定すること；ペプチド I に対して Hgb 応答を示す患者（エンドポイントで定義するもの）の割合を決定すること；CIA 患者において、 $11 \sim 13 \text{ g/dL}$  の標的範囲内にヘモグロビンを増加させて維持するような、皮下投与されるペプチド I の用量を決定すること；CIA 患者において、皮下投与されるペプチド I の 4 回までの投薬の薬物動態プロファイルを評価すること（試験患者のサブセットにおける評価）；及びペプチド I の活性用量における投与頻度及び非経口鉄補充の効果を調査することが含まれる。

#### 【 0 3 4 7 】

試験のエンドポイントには次の項目が含まれる：4 週間、9 週間及び 12 週間の時点で、過去 28 日以内に RBC 輸血を受けずに、ヘモグロビンが  $> 2 \text{ g/dL}$  の増加を示す患者、又は Hgb が  $> 1 \text{ g/dL}$  から少なくとも  $12 \text{ g/dL}$  までの増加を示す患者の、処置群あたりの割合；4 週間、9 週間及び 12 週間の時点で、過去 28 日以内に RBC 輸血を受けずに、ベースラインから  $> 1 \text{ g/dL}$  の Hgb 増加を示す患者の割合；4 週目、9 週目、及び 12 週目に、 $11 \sim 13 \text{ g/dL}$  の標的範囲内の Hgb を有する患者の割合；4 週目後に、 $11 \sim 13 \text{ g/dL}$  の標的範囲内にある Hgb 値の割合；ベースラインからの平均ヘモグロビン変化；赤血球輸血の頻度；追加の薬理学パラメータ、例えば網状赤血球数（絶対値及び AUC）、網状赤血球ヘモグロビン含量、鉄貯蔵の測定値（例えばトランスフェリン飽和度及び血清フェリチン）の変化；有害事象（AE）；重篤有害事象（SAE）；並びに試験患者のサブセットにおける薬物動態パラメータ、例えば  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ （消失半減期）、 $V_d$ （見かけの分布容積）、 $V_{ss}$ （定常状態での分布容積）及び CL（クリアランス）。

#### 【 0 3 4 8 】

この試験のために選択される患者は、化学療法に続発する  $< 9 \text{ g/dL}$  且つ  $< 11 \text{ g/dL}$  のヘモグロビンを有し、過去 90 日以内に ESA による事前の処置を受けておらず、適格性基準を満たす、18～80 歳の固形腫瘍又はリンパ腫を有する患者であり、これらの患者は、メディカルモニタ（Medical Monitor）（MM）によって承認された開始用量

10

20

30

40

50

又はその後の逐次的用量レベルのペプチドⅠに割り当てられる。1処置群あたり最低10人の処置患者で12週間のデータを確実に入手することができるように、ある郡内で6人目及びそれ以降の患者について8週間以前に試験を終了した場合、最大5人まで補充する。各補充患者は、離脱した患者と同じ処置群に割り当てられる。15人の患者からなる最大4つのオープンラベル処置群を、引き続いて加えて、より低い用量レベル、中間用量レベル、及び/若しくは反復用量レベル、並びに/又はペプチドⅠの投与頻度、及び/又はトランスフェリン飽和レベルを25～50%に維持するための非経口鉄補充を試験することができる。考える全ての投薬レジメンを調査する場合は、この治験に最低30人且つ最大90人の患者(補充分を含まない)を組み入れることができる。

#### 【0349】

この試験において、各患者は、4週間までのスクリーニング期間後、最大12週間にわたって参加することが期待される。

#### 【0350】

15人の患者からなる逐次的コホートに、漸増する用量のペプチドⅠを投与する。オープンラベル用量を、3週間ごとに合計4回、SC注射によって投与する(試験1、4、7、10週目)。ペプチドⅠは、典型的には、化学療法サイクルの1日目に投与される。ペプチドⅠの開始用量及び投薬頻度は、健常ボランティアを対象とするフェーズ1データと、ペプチドⅠ及び他の赤血球生成刺激剤(ESA)に対する赤血球生成応答のPK/PDデータからモデル化された予想応答とに基づく。計画されるペプチドⅠ用量レベル及び各群の患者数を表7に示す。

#### 【表7】

表7: ペプチドⅠ用量レベル及び患者数

N	処置	用量(mg/kg) Q3W
15	ペプチドⅠ	0.1 mg/kg
15	ペプチドⅠ	0.2 mg/kg
15	ペプチドⅠ	0.4 mg/kg
15	ペプチドⅠ	0.6 mg/kg

患者を、最後の注射後28日間、又は有害事象の安定化まで、又はヘモグロビン値が11～13 g/dLの間になるまでの、いずれか一番遅い時点まで、追跡する。用量増加は許さない。4週目後、Hgbを標的範囲内に維持するためにRBC輸血が必要な場合は、その患者を試験から外して、標準的な医療に戻し、安全のためにさらに28日間は追跡する。試験中の任意の時点において、患者のヘモグロビンが任意の2週間以内に>1.0 g/dL増加した場合は、ヘモグロビンが安定する(1週間で<0.5 g/dLの増加)まで次の投薬を遅らせ、用量を50%減少させる。ベースラインヘモグロビン濃度を、試験薬投与の前の週に収集される、直近の2つの週ヘモグロビン値の平均と定める(例えばスクリーニング値及びベースライン値)。試験中、コホートの開始又は中止基準決定のためのヘモグロビンレベルの変化は、7日以内の次に続くヘモグロビン値による確認を必要とする。

#### 【0351】

この試験は、1群あたり15人のCIA患者からなる最大6つの処置群によるオープンラベル多施設治験である。最初の処置群では、オープンラベルのペプチドⅠが、3週間ごとに合計4回まで、皮下注射によって投与される。最初の投薬後、患者は試験全体を通して少なくとも週1回は診察される。患者を、試験薬の最後の投与後、最低28日間、又は有害事象の安定化まで、又はヘモグロビン値が11～13 g/dLの間になるまでの、いずれか一番遅い時点まで、追跡する。患者のヘモグロビンレベルが14 g/dL(確認値)に達した場合は、臨床的に必要であれば、患者を瀉血することができ、瀉血体積を記録しておく。瀉血された患者は試験薬の受容を中断し、瀉血後の薬力学データは解析から除外する。メディカルモニタ(MM)及び治験依頼者は、安全性データ及び薬力学データを常時審査して、中止基準が満たされたかどうか、そしていつ中止基準が満たされたかを決

10

20

30

40

50

定する。

#### 【0352】

あるコホートに組み入れられた6人又はそれ以上の患者が、少なくとも6週間（すなわち2回目の投薬後、少なくとも3週間）の経過観察を完了した後は、安全上の懸念がMMによって認められず、6人又はそれ以上の患者が4週目後に輸血を受けるか、又は6週目時点で $< 1 \text{ g / d L}$ の確認されたヘモグロビン増加を示す場合に、目下のコホートへの組み入れを停止することができ、次のコホートへの用量増量が許される。

#### 【0353】

あるコホートに組み入れられた6人又はそれ以上の患者が、少なくとも6週間（すなわち2回目の投薬後、少なくとも3週間）の経過観察を完了した後は、ペプチドIとの関係が疑われる少なくとも3つのグレード3又はグレード4AEの発生があった場合、又はMMがペプチドIに対して何らかの具体的懸念を認めた場合、又は合計6人又はそれ以上の患者が、 $> 13.0 \text{ g / d L}$ の確認されたヘモグロビンレベル（輸血に関係しないもの）若しくは任意の2週間以内に $> 1.0 \text{ g / d L}$ の確認されたヘモグロビン増加（輸血に関係しないもの）を示す場合に、目下のコホートへの組み入れを停止することができ、次のコホートにおいて、より低いレベルへの用量減量を許すことができる。

#### 【0354】

安全上の懸念がMM及び治験依頼者によって認められない場合は、15人の患者からなる最大2つの追加オープンラベル処置群を開始して、より低い用量レベル、中間（現在試験しているものと先に試験したものとの間）用量レベル、又は反復用量レベルを試験することができる。加えて、3週間ごとに投与される活性用量が決定されたら、最大2つの追加コホートを組み入れて、異なる頻度で分割して投与される全部で同じ総用量（例えば、4週間ごとに投与される、3週間ごとの用量の $4/3$ ）の相対的効果を決定することができる。25～50%のトランスフェリン飽和度を達成するための非経口的鉄投与の効果も、別のコホートで調査することができる。

#### 【0355】

腫瘍患者の場合、PADは $0.075 \sim 0.5 \text{ mg / kg}$ 、或いは $0.2 \sim 0.4 \text{ mg / kg}$ 、或いは $0.25 \text{ mg / kg}$ であると決定されると予想される。

#### 【実施例15】

#### 【0356】

慢性腎臓疾患を有する患者を対象とするフェーズII複数回投与試験におけるペプチドIの長期安全性、認容性、及び薬力学

##### 1. 試験方法

ペプチドI（配列番号2）の月1回（Q4W）の皮下（SC）送達 of 複数回投薬の安全性及び薬力学を評価するために、慢性腎臓疾患を有する患者に対して多施設オープンラベル逐次的用量探索フェーズII臨床試験を行なった。合計60人の赤血球生成刺激剤未経験の透析前の慢性腎臓疾患（CKD）患者〔ヘモグロビン（Hgb）レベル $9.0 \sim 10.9 \text{ g / d L}$ 、フェリチン $> 100 \mu \text{g / L}$ 及びトランスフェリン飽和度（TSAT） $> 20\%$ 〕を、3つの用量コホートに組み入れた。患者は最大6回の月1回SC薬物投与を受けた。開始用量は $0.025 \text{ mg / kg}$ （ $n = 15$ ）、 $0.050 \text{ mg / kg}$ （ $n = 30$ ）及び $0.075 \text{ mg / kg}$ （ $n = 15$ ）とした。1回目の投薬後に、患者のHgbレベルに基づいて、用量調整（dose titration）を許した。

#### 【0357】

##### 2. 平均ベースライン特徴及び個別患者用量調節

ベースライン特徴は、表8に示すように、用量群間でよく釣り合わせた。



【表 8】

表8

	用量コホート(範囲)			
	0.025 mg/kg (n=15)	0.050 mg/kg (n=30)	0.075 mg/kg (n=15)	全用量 (n=60)
性別(男:女)	9:6 (60%M)	22:8 (73%M)	11:4 (73%M)	42:18 (73%M)
年齢(歳)	64 (13)	65 (12)	65 (14)	65 (13)
体重(kg)	85 (26)	79 (14)	81 (14)	81 (18)
Hgb (g/dL)	10.2 (0.5)	10.4 (0.5)	10.2 (0.5)	10.3 (0.5)
TSAT (%)	26 (8)	27 (7)	30 (12)	28 (9)
フェリチン(mcg/L)	245 (162)	293 (226)	271 (222)	276 (208)

10

## 【0358】

患者の最初の投薬後に用量調整を許した。用量調節は、測定された患者のヘモグロビン (Hgb) レベルに依存して、先の用量の  $\pm 25\%$  とした。12週目までに用量調整が行なわれた患者 (パーセントで表す) を表9に示す。

【表 9】

表9: 12週目までに用量調整を受けた患者

20

用量調節	用量コホート		
	0.025 mg/kg (n=15)	0.050 mg/kg (n=30)	0.075 mg/kg (n=15)
用量増加	6 (40%)	3 (10%)	0 (0%)
用量減少	1 (7%)	10 (33%)	5 (33%)

## 【0359】

試験の薬力学結果を図1～4に示す。0～12週間でのベースラインからの平均網状赤血球変化を図1に示す。試験0～12週目についてベースラインからの平均ヘモグロビン (Hgb) 変化を図2に示す。用量及び処置継続期間による貧血の補正 (Hgb > 11 g / dL) を図3に示す。試験12～22週目についてベースラインからの平均ヘモグロビン (Hgb) 変化を図4に示す。試験0～12週目について0.05 mg / kg コホートにおける個々の患者に関するベースラインからのヘモグロビン (Hgb) 変化を図5に示す。

30

## 【0360】

## 3. 安全性結果

試験中は有害事象及び重篤有害事象を監視した。11人 (18%) の患者が36件の有害事象を報告した。全ての事象が試験薬とは無関係と評価された。試験離脱につながる有害事象はなく、注射部位反応は報告されなかった。全ての重篤有害事象が試験薬とは無関係と評価された。

40

## 【0361】

## 4. 結論

透析前慢性腎臓疾患 (CKD) 患者は、ペプチドIにより、皮下注射による月1回の投薬で、効果的に処置することができる。複数回の月1回皮下ペプチドI注射は良好な認容性である。月1回の薬物投与により、8週目までに患者における貧血の補正が達成される。この薬物は、慢性腎臓疾患を有する患者に月1回投薬した場合、22週目までヘモグロビン (Hgb) の持続的な増加をもたらす。

## 【実施例16】

## 【0362】

固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫に関連する貧血を患っている患者を対象とするフェーズI

50

## I 複数回投与試験におけるペプチド I の安全性、認容性、及び薬力学

## 1. 試験方法

3週間ごと(Q3W)に皮下(SC)送達で投与される、ペプチド I (配列番号 2) の複数回投与の安全性及び薬力学を評価するために、癌を有する患者に対して多施設オープンラベル逐次的用量探索フェーズ II 臨床試験を行なった。合計 60 人の固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫を有する患者 [患者は 9 週間を越える化学療法を受けており、ベースラインヘモグロビンレベルは 8 g/dL よりは高いが 11 g/dL よりは低く、鉄、葉酸及び B12 貯蔵量は十分だった] を、4 つの用量コホートに組み入れた。患者は、3 週間ごとに 1 回与えられる最大 2 回の SC 薬物投与を受けた。開始用量は 0.05 mg/kg (n = 15)、0.10 mg/kg (n = 15)、0.15 mg/kg (n = 15)、及び 0.20 mg/kg (n = 15) とした。

10

【0363】

## 2. 平均ベースライン特徴及び薬力学結果

4 つの用量コホートにわたって、平均ベースラインヘモグロビン値と、試験を完了した患者のパーセントを、次の表に示す。下記の表 10 には、4 つの用量コホートにわたる 42 人の患者を含む薬力学データセットにおいて、試験の 7 週目にベースラインヘモグロビンからの 1 g/dL の平均増加を示す患者のパーセントも示す。

【表 10】

表 10: 7 週目にベースラインヘモグロビンからの平均増加を示す患者のパーセント

20

	0.05 mg/kg (n=15)	0.10 mg/kg (n=15)	0.15 mg/kg (n=15)	0.20 mg/kg (n=15)
平均ベースラインヘモグロビンレベル(g/dL)	10.1 (±1.07)	10.0 (±0.89)	9.8 (±0.67)	10.1 (±0.69)
試験を完了した患者のおよそのパーセント(%)	79	50	60	92
ベースラインのヘモグロビンから ≥1g/dL の平均増加を示す患者のパーセント(%)	20	70	55	55

30

【0364】

## 3. 安全性結果

試験中は有害事象及び重篤有害事象を監視した。試験薬とは無関係と評価された有害事象により、3 人の患者が試験から離脱した。重篤有害事象により、6 人の患者が試験から離脱した。1 件の重篤有害事象、すなわち血栓性静脈炎は、おそらく試験薬と関係があるが、重篤有害事象の他の 5 件の報告は試験薬に原因があるとは考えられなかった。薬物試験の過程で 3 人の患者が死亡した (2 人は疾患の進行による死亡、1 人は腎不全による死亡)。どの死亡例も試験薬に原因があるとは考えられなかった。

40

【0365】

## 4. 結論

固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫に関連する貧血を患っていて、化学療法も受けている患者は、ペプチド I により、3 週間ごとの皮下注射で、効果的に処置することができる。3 週間ごとのペプチド I の皮下注射は良好な認容性であった。ペプチド I は、試験の 7 週目までに、試験の患者において、ベースラインヘモグロビンからの 1 g/dL の平均増加をもたらした。

50

## 【実施例 17】

## 【0366】

固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫に関連する貧血を患っている患者を対象とするフェーズ I I 複数回投与試験におけるペプチド I の安全性、認容性、及び薬力学

## 1. 試験方法

Q3W SC 送達で投与される、ペプチド I (配列番号 2) の複数回投薬の安全性及び薬力学を評価するために、癌を有する患者に対して多施設オープンラベル逐次的用量探索フェーズ I I 臨床試験を行なった。合計 60 人の固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫を有する患者 [患者は 9 週間を越える化学療法を受けており、ベースラインヘモグロビンレベルは 8 g/dL よりは高いが 11 g/dL よりは低く、鉄、葉酸及び B12 貯蔵量は十分であり、ECOG パフォーマンスステータスは 0 ~ 2 だった] を、4 つの用量コホートに組み入れた。患者は、3 週間ごとに 1 回与えられる少なくとも 2 回の SC 薬物投与を受けた。開始用量は 0.05 mg/kg (n = 15)、0.10 mg/kg (n = 15)、0.15 mg/kg (n = 15)、及び 0.20 mg/kg (n = 15) とした。

## 【0367】

## 2. 平均ベースライン特徴及び薬力学結果

薬力学データセット (n = 49) には、少なくとも 2 回のペプチド I の投薬を受けた患者であって、1 回目の投薬時又は 1 回目の投薬の 6 週間後の少なくとも 2 つのヘモグロビン値がわかる患者を含めた。過去 28 日間に赤血球輸血を受けていない患者で、ヘモグロビン応答を決定した。4 つの用量コホートにわたって試験を完了した患者に関するデモグラフィ特徴及びベースライン特徴を表 11 に示す。

【表 11】

表11: 患者のデモグラフィ特徴及びベースライン特徴

パラメータ	0.05 mg/kg Q3W (N=15)	0.1 mg/kg Q3W (N=15)	0.15 mg/kg Q3W (N=15)	0.2 mg/kg Q3W (N=15)	全患者 (N=60)
性別(男:女)	8:7	7:8	6:9	6:9	27:33
年齢(歳)-平均±SD	58 ± 11	64 ± 7	60 ± 9	59 ± 10	60 ± 9
体重(kg)-平均±SD	71 ± 20	68 ± 10	72 ± 15	76 ± 18	72 ± 16
Hb(g/dL)-平均±SD	10.2 ± 0.9	10.0 ± 0.9	9.6 ± 0.9	10.1 ± 0.7	10.0 ± 0.9
TSAT(%)-平均±SD	25 ± 20	21 ± 7	23 ± 11	23 ± 13	23 ± 13
フェリチン(μg/L)-中央値(範囲)	266 (44-1752)	298 (61-744)	598 (22-3611)	292 (20-2027)	324 (20-3611)
固形腫瘍:リンパ腫	15:0	13:2	11:4	14:1	53:7
白金化合物の使用-n(%)	10 (67%)	5 (33%)	5 (33%)	8 (53%)	28 (47%)
タキサンの使用-n(%)	1 (7%)	1 (7%)	3 (20%)	5 (33%)	10 (17%)

## 【0368】

図 6 は、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、及び 0.2 mg/kg のペプチド I (配列番号 2) の 1 回目の投薬後 6 週間の時点でベースラインから 1 g/dL のヘモグロビンの増加が、それぞれ 17%、73%、55%、及び 47% の患者で観察されたことを表している。図 7 は、試験の 1 回目の投薬後、6 週間目において、2 g/dL のヘモグロビン増加を示すか、又は 1 g/dL の増加と少なくとも 11 g/dL のヘモグロビン値との組合せを示す患者のパーセントが、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、及び 0.2 mg/kg 用量コホートにおいて、それぞれ 8%、73%、55%、及び 40% の患者に見られたことを表している。表 12 に示すように、用量の減少及び投薬の遅延は、0.2 mg/kg コホートでは、より頻繁に起こった。

【表 1 2】

表12

パラメータ	0.05 mg/kg Q3W (N=12)	0.1 mg/kg Q3W (N=11)	0.15 mg/kg Q3W (N=11)	0.2 mg/kg Q3W (N=15)
3回目の投薬時又は3回目の 投薬前に輸血があった患者	2 (17%)	0	1 (9%)	3 (20%)
少なくとも1回の用量減少が あった患者	1 (8%)	2 (18%)	0	5 (33%)
少なくとも1回の投薬遅延が あった患者	1 (8%)	2 (18%)	0	4 (27%)

10

図 8 は、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、及び 0.2 mg/kg 用量コホートの患者が、ベースラインからのヘモグロビンの増加を示したことを表している。

## 【0369】

## 3. 安全性結果

試験中は有害事象及び重篤有害事象を監視した。60人の患者のうち45人が有害事象を報告した。最も高頻度に報告された有害事象は、悪心(22%)、発熱(12%)、嘔吐(12%)、貧血(10%)、呼吸困難(10%)、便秘(8%)、発熱性好中球減少症(8%)だった。8人の患者(13%に相当)には、試験薬と関係があると考えられる1つ又はそれ以上の有害事象があった。2人の患者では、以下の5つの事象が起こった：便秘、悪心、嘔吐、血液学的検査異常、及び網状赤血球数の増加。1人の患者は11の他の関連事象に苦しんだ。

20

## 【0370】

37件の重篤有害事象が18人の患者に報告された。1件の重篤有害事象、すなわち血栓性静脈炎は、おそらく試験薬と関係があるが、他の重篤有害事象の報告は試験薬に原因があるとは考えられなかった。最も高頻度に報告された重篤有害事象には、発熱性好中球減少症(8%)、好中球減少症(5%)、好中球減少性敗血症(5%)、汎血球減少症(5%)、貧血(3%)、及び感染症(3%)が含まれた。薬物試験の過程で起こった重篤有害事象により、3人の患者が死亡した(1人は肺水腫による死亡、1人は疾患の進行による死亡、そして1人は腎不全による死亡)。試験完了後、>1ヶ月経ってから、胸水及びパフォーマンスステータスの低下という重篤有害事象により、4例目の死亡が起こった。どの死亡例も試験薬に原因があるとは考えられなかった。

30

## 【0371】

## 4. 結論

固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫に関連する貧血を患っていて、化学療法も受けている患者は、ペプチドIにより、3週間ごとの皮下注射で、効果的に処置することができる。3週間ごとのペプチドIの皮下注射は良好な認容性であった。ペプチドIは、骨髄抑制化学療法も受けている腫瘍患者において、3週間ごとに皮下注射によって投与される0.1 mg/kg及び0.15 mg/kgの用量で、試験の6週目までに、試験の患者の50%に、1 g/dLのヘモグロビンの増加をもたらした。0.1 mg/kg及び0.15 mg/kg用量コホートにおけるヘモグロビンの増加は、9週間及び12週間にわたって持続的であるようだった。0.05 mg/kg用量は、意味のあるヘモグロビンの増加を生じなかったが、ヘモグロビン値はベースライン近くに維持された。0.2 mg/kg用量コホートの患者の47パーセント(%)は、6週目までに1 g/dLのヘモグロビン増加を示したが、これは持続しなかった。0.2 mg/kg用量コホートでは、0.1 mg/kg又は0.15 mg/kg用量コホートと比較して、経時的に応答率が低くなり平均ヘモグロビンも低くなるという傾向は、いくつかの要因、例えば投薬遅延の数の多さ及び初期の大きなヘモグロビン増加に引き続いて起こる減少などによるものである。

40

## 【0372】

50

癌患者におけるペプチド I 処置の H g b 及び用量解析

化学療法を受けている貧血癌患者における、皮下投与されたペプチド 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増量試験を行なった。この試験の目標は、化学療法を受けている貧血癌患者の 50% における 9 週目での 1 g / d L のヘモグロビン増加に関連する、皮下 ( S C ) 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だった。この試験の時間枠は約 13 週間だった。試験の結果は、試験した 3 つの癌タイプ、すなわち乳癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、及び前立腺癌で結果をグループ分けした表 13 に示すように、要約することができる。さらなる詳細を以下に考察し、表 14 ~ 16 に提示する。

【表 13】

表13:癌患者に関するペプチドI処置結果の要約

		癌のタイプ		
		乳癌	NSCLC	前立腺癌
Hgb	被験者数	8	8	6
	応答者の数 (9週目までに $\geq 1\text{g/dL}$ の、 ベースラインからのHgb変化)	8	4	3
	応答者の割合	100	50	50
用量 (mg/kg)	平均	0.112	0.088	0.156
	最小	0.050	0.050	0.050
	最大	0.200	0.199	0.212

【0373】

試験の他の測定には次の項目を含めた：(1) 同時に骨髄抑制化学療法を受けている癌患者に 3 週間ごとに皮下投与されるペプチド I の 4 回までの投薬の安全性プロファイルの評価、(2) 化学療法を受けている貧血癌患者における、ペプチド I の異なる用量レベルでの、ヘモグロビン ( H g b ) のベースラインからの変化の決定、(3) ペプチド I に対して H g b 応答を示す患者の比率の決定、(4) 化学療法を受けている貧血癌患者においてヘモグロビンを 11 ~ 13 g / d L の標的範囲に増加させてその範囲に維持する、皮下投与されるペプチド I の決定、(5) 化学療法を受けている貧血癌患者において皮下投与されるペプチド I の 4 回までの投薬の薬物動態プロファイルの評価 ( 試験患者のサブセットにおける評価 )、(6) 活性用量のペプチド I における投薬頻度の効果の調査、及び (7) 活性用量のペプチド I における非経口鉄補充の効果の調査。

【0374】

この試験に関する患者選択基準は次のとおりとした：(1) 患者には、この試験の研究的性質が告げられ、施設、現地、及び国家のガイドラインに従って、文書による、証人の署名がなされたインフォームド・コンセントが患者から得られていること；(2) 年齢が 18 歳且つ 80 歳の男性又は女性；閉経前の女性 ( 手術によって不妊となった人は除く ) はスクリーニング時に妊娠検査陰でなければならない；性的に活発な人は試験開始前の少なくとも 2 週間は有効性の高い産児制限方法を実行しなければならない、試験薬の最後の投薬後少なくとも 4 週間は産児制限を実行し続ける意志がなければならない。有効性の高い産児制限方法とは、一貫して正しく使用した場合に低い失敗率 ( すなわち年間 1% 未満 ) をもたらすものと定義され、例えばインプラント、注射剤、混合経口避妊薬、いくつかの I U D、禁欲 ( ライフスタイルとして実行される場合にのみ許容することができ、性的に活発な人が試験の継続期間のみ禁欲を実行する場合には許容することができない )、又は精管切除術を受けたパートナーなどである；(3) 組織学的に確認された固形腫瘍悪性疾患又はリンパ腫を有し、試験中に少なくとも 9 週間の周期的骨髄抑制化学療法を受ける予定になっている患者；(4) 試験薬の投与前 1 週間以内に 8 且つ 11 g / d L のヘモグロビン値；(5) 0 ~ 2 の E C O G パフォーマンスステータス；(6) 試験薬投与前 4 週間以内に 1 回の網状赤血球ヘモグロビン含量 ( C H r ) > 29 p g；(7) 試験薬

10

20

30

40

50

投与前4週間以内に1回のトランスフェリン飽和度 15% ; (8) 試験薬投与前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<sub>12</sub>レベル ; (10) 試験薬投与前1週間以内に1回の絶対好中球数  $> 1.0 \times 10^9 / L$  ; (11) 試験薬投与前1週間以内に1回の血小板数  $> 75 \times 10^9 / L$  ; 及び (12) 平均余命  $> 6$  ヶ月。

#### 【0375】

患者が治験責任医師によって鉄不足とみなされ、IV鉄補充が必要な場合は、ヘモグロビンが前週から  $0.5 g / dL$  を上回る増加を示さなくなるまで、その患者を、毎週、再スクリーニングした (鉄投与の7日後以降)。

#### 【0376】

患者除外基準には次の項目を含めた : (1) 過去90日に何らかの赤血球生成刺激剤 (ESA) による処置 ; (2) ESA処置に应答できなかった病歴 ; (3) 他のESAに対する既知の抗体又は赤芽球癆 (PRCA) の病歴 ; (4) 急性若しくは慢性白血病、骨髓異形成症候群 (MDS)、又は多発性骨髓腫 ; (5) 骨盤又は脊椎のいずれか一方の50%以上に対する過去の放射線治療又はそのような放射線治療の予定 ; (6) 非経口鉄補充に対する既知の不耐性 ; (7) 試験薬投与前4週間以内の赤血球 (RBC) 輸血 ; (8) 既知の異常ヘモグロビン症 (例えばホモ接合鎌状赤血球症、あらゆるタイプのサラセミアなど) ; (9) 既知の溶血 ; (10) 過去2年間に肺塞栓症若しくはDVTの病歴、又は現時点における抗凝固薬の治療的投薬 ; (11) 貧血の原因としての既知の失血 ; (12) 制御されない又は症候性の炎症性疾患 (例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど) ; (13) AST又はALT  $>$  (正常値の上限の2.5倍) ; 肝転移が存在する場合はAST又はALT  $>$  (正常値の上限の5倍) ; (14) クレアチニン  $> 1.75 \mu mol / L$  ; (15) 骨髓又は末梢血細胞移植の病歴 ; (16) 試験薬投与前48時間以内の発熱 / 高熱 39 ; (17) 試験薬投与前4週間以内にコントロール不良の高血圧 (治験責任医師の判断による) (例えば反復測定で収縮期圧  $170 mmHg$  又は拡張期圧  $100 mmHg$ ) ; (18) 試験薬投与前6ヶ月にてんかん発作 ; 進行慢性うつ血性心不全 - ニューヨーク心臓学会クラスIV ; (19) 試験の早期離脱又は中断の高い可能性 (例えば過去3ヶ月以内の心筋梗塞 ; 重症又は不安定冠状動脈疾患 ; 脳卒中 ; 呼吸異常、自己免疫異常、精神神経異常又は神経異常 ; 肝疾患、活動性B型又はC型肝炎を含む ; 活動性HIV疾患 ; 又は過去6ヶ月以内の他の任意の臨床的に有意な医学的疾患又は状態であって、治験責任医師の見解によれば、その患者の評価又は経過観察を妨害しうるもの) ; (20) 試験期間中に予期される待機手術 ; (21) 多剤アレルギーの病歴 ; (22) 試験薬の投与前1ヶ月以内の何らかの治験薬へのばく露、又は試験期間中の受容の予定。

#### 【0377】

表14~16に癌の群別に臨床結果を記載する。データには、ヘモグロビン濃度 (各表の上部分) と、ペプチドIに関する投薬情報 (各表の下部分) が含まれる。これらの表で使用する略号は次のとおりである : 「Hgb」はHgb濃度 (単位  $g / dL$ ) を指す ; 「n」は観察数を示す ; 「std」は標準偏差を指す。「タキサン」は、その患者がタキサン系化学療法剤で処置されていたことを示す。「非タキサン」は、その患者が非タキサン系化学療法剤で処置されていたことを示す。空欄は、データが得られなかったこと、又は投薬が行なわれなかったことを示す。

【表 14 - 1】

表14:乳癌患者群の結果

処置	非々々サン	非々々サン	非々々サン	非々々サン	非々々サン	非々々サン	々々サン	々々サン			
患者ID	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	std	n
週	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb		
-6							10.8				
-5							11.9				
-4							11.2				
-3							10.6				
-2					9.7		11.5	9.3			
スクリーニング (-1週)	9.3	10.3	10.8	8.7	9.8	10.8	10.8	9.2	10.1	0.83	8
投薬1/1週目	9.4	9.4	10.8	8.6	9.9	10.8	10.6	10.8	9.9	0.84	8
2		9.5	10.7	8.8	10.9	11.5	11.4	11.2	10.5	1.03	7
3	9.7	10	11.5	8.9	9.8	11.4	12.8	11.7	10.6	1.31	8
投薬2/4週目	9.5	9.8	11.9	8.5	10.2	12.1	13.7	12.5	10.8	1.78	8
5		10.9		9.2	10.4	13.2	14.2	13.4	11.6	1.99	6
6	10.8	11.3		9.7	10.5	14.2	14	14.3	11.8	1.98	7
投薬3/7週目	11.6	10.1		9.4	11.3	13.7	13.5	13.4	11.6	1.73	7
8	7.9	10.1		10.3	11.1	15		13.6	10.9	2.57	6
9	11.7	11.5			10.3	15.7	13.7	12.3	12.6	1.91	6
投薬4/10週目	12.6	9.9			11.7	13.9	13.2	11.6	12.3	1.41	6
11	12.5	11			11.7	15.6	13.2	11.6	12.8	1.66	6
12	13.1	10.1			12	14.6	13.4	12.1	12.6	1.53	6
13	12.9	10.9				14.7	13.1	11.5	12.9	1.49	5
14	13.3	10.4					12.9	11.8	12.2	1.30	4
15		10.1				13.7	12.4	12.8	12.1	1.53	4
16					12.1	12.6	13.5	12.5			
17							13.3				
18							12.9				
19							12.1				
20							12.3				
21							12.9				
22							12.7				
23							12.4				
ベースライン	9.35	9.85	10.8	8.65	9.85	10.8	10.7	10			
Hgb変化≥1	有	有	有	有	有	有	有	有			
応答者の割合	100										

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

処置	非々々サン	非々々サン	非々々サン	非々々サン	非々々サン	非々々サン	々々サン	々々サン			
患者ID	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	std	n
週	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb		
用量概要(用量計算値、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			
合計投薬数	4	4	1	3	4	2	4	4			
平均	0.112										
最小	0.05										
最大	0.2										



【表 15】

表15: 非小細胞肺癌患者群の結果

処置	非タキサン	非タキサン	非タキサン	非タキサン	非タキサン	非タキサン	非タキサン	非タキサン			
患者ID	9	10	11	12	13	14	15	16	平均	Std	n
週	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb			
-6											
-5											
-4			10.3								
-3					8.9		9.8				
-2						9.6	8.7				
スクリーニング(-1週)	9.1	9.8	10.8	10.8	9.3	10.7	10.3	7.9	10.1	1.03	8
投薬1/1週目	8.9	10.1	10.8	12.3	9.5	9.8	10.8	8	10.3	1.31	8
2	9.9	9.3	10	11.6		9.8	10.8	8.6	10.2	0.97	7
3		8.7	9.8		10.3	8.4	11.9	6.6	9.8	1.81	6
投薬2/4週目	9.6	10	11.4	10.9	11.3	9.4		6.7	10.4	1.62	7
5	10.7		9.3	12	11.2	9.4		9.2	10.5	1.17	6
6	10.7	10.6	10.3	11.3		8.3		9.8	10.2	1.04	6
投薬3/7週目			11	9.7	11.9	9.6		9.4	10.6	1.08	5
8	13.1		10.5	11.5	11.8	9.4		10.2	11.3	1.32	6
9	14.1		10.5	11.5	11.7	9.3		10.3	11.4	1.65	6
投薬4/10週目			10.8	9.7	12.4	8.9			10.5	1.52	4
11				9.7	11.5	6.9			9.4	2.32	3
12			11.3	10.8	11.6	6.1		11.1	10.0	2.30	5
13			10.8	10.6	11.6			11	11.0	0.43	4
14			11.6	10.4	11.7			10.5	10.7	1.10	5
15					11.2				11.2		1
16											
17											
ベースライン	9	9.95	10.8	11.55	9.4	10.25	10.55	7.95			
Hgb変化≥1	有	無	無	無	有	無	有	有			
応答者の割合	50										
用量の概要(用量計算値、mg/kg)											
1週目	0.199	0.156	0.053	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05			
4週目	0.199	0.156	0.053	0.05	0.1	0.05		0.05			
7週目	0.197		0.053	0.05	0.1	0.05		0.05			
10週目			0.053	0.05	0.1	0.05		0.05			
合計投薬数	3	2	4	4	4	4	1	4			
平均	0.08825										
最小	0.05										
最大	0.199										

10

20

30

40

【表 16】

表16:非小細胞肺癌患者群の結果

処置	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ID	17	18	19	20	21	22	平均	Std	n
週	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb	Hgb			
-6									
-5									
-4									
-3									
-2									
スクリーニング (-1週)	10.3	10.2	10.3	10.6	9.7	9.7	10.2	0.36	6
投薬1/1週目	10.5	10	10.1	10.5	9.5	10.3	10.1	0.38	6
2	11.8	10.1	10.1	11		8.8	11.1	1.33	6
3		9.9	10.1	10.7		8.8	10.6	1.00	5
投薬2/4週目	12.6	10	10.6	11.5		8.9	11.1	1.27	6
5		10.5	12.2	11.7		8.7	11.5	1.56	4
6		10.1	10.5		10.4	8.7	10.3	0.83	4
投薬3/7週目	11.9	10.3	10.9	12	9.8	8.9	11.0	1.21	6
8		11.2	12.7	13.1	9.4	9.1	11.6	1.83	5
9		9.9	11		9.3	8	10.1	1.25	4
投薬4/10週目		10.9		13.8	8.1		10.9	2.85	3
11		10	10.9	13.7	7.6		10.6	2.52	4
12		9.7	11.4	13			11.4	1.56	4
13		9.4	11.2				10.3	1.27	2
14		9.8	11.2				10.5	0.99	2
15				12.9			11.0	2.69	2
16									
ベースライン	10.4	10.1	10.2	10.55	9.6	10			
Hgb変化≥1	有	無	有	有	無	無			
応答者の割合	50								
用量概要(用量計算値、mg/kg)									
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				
合計投薬数	1	4	4	4	4	3			
平均	0.156167								
最小	0.05								
最大	0.212								

【 0 3 7 8 】

[ 配列表 ]

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> synthetic peptide

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is N-acetylglycine 10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (13)..(13)  
<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<400> 1

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15 20

Pro Leu Arg Lys  
20

<210> 2  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> artificial

<220> 30  
<223> synthetic protein

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is N-acetylglycine

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (13)..(13) 40  
<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa is N-methylglycine

<400> 2

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln 50

1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> synthetic protein

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is N-acetylglycine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is N-methylglycine

<400> 3

30

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa  
20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

40

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> biotinylated

<400> 4

50

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
 20

<210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT 10  
 <213> artificial

<220>  
 <223> synthetic peptide

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is N-acetylglycine 20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Y side chain tBu protected

<400> 5

Xaa Gly Leu Tyr Ala  
 1 5 30

<210> 6  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> synthetic peptide

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE 40  
 <222> (1)..(1)  
 <223> NH2 protected by Fmoc

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> side chain Acn protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE 50

<222> (2)..(2)  
<223> side chain Trt protected

<400> 6

Cys His Met Gly

1

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> NH2 protected by Fmoc

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> side chain tBu protected

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> side chain Acn protected

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<400> 7

Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro

1

5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220>  
<223> synthetic peptide

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> side chain Pbf protected

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa is N-methylglycine

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> COOH Bn protected

20

<400> 8

Leu Arg Xaa  
1

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> artificial

30

<220>  
<223> synthetic peptide

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa is N-acetylglycine

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> side chain tBu protected

40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> side chain Acn protected

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

50

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<400> 9

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> NH2 protected by Fmoc

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> side chain tBu protected

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> side chain Acn protected

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> side chain Trt protected

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> side chain Pbf protected

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is N-methylglycine

10

20

30

40

50



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> COOH Bn protected

<400> 10

Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro Leu Arg Xaa  
 1 5 10

10

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> synthetic peptide

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is N-acetyl glycine

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> side chain tBu protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> side chain Acn protected

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> side chain Trt protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> side chain tBu protected

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa is 1-naphthylalanine

<220>

50

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> side chain Acn protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> side chain Trt protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> side chain Pbf protected

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa is N-methylglycine

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> COOH Bn protected

20

<400> 11

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa  
 20

30

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> synthetic peptide

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is N-acetylglycine

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> side chain tBu protected

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> side chain Acn protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> side chain Trt protected

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> side chain tBu protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa is 1-naphthylalanine

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> side chain Acn protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> side chain Trt protected

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> side chain Pbf protected

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa is N-methylglycine

40

<400> 12

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa  
 20

<210> 13  
 <211> 20

50

<212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> synthetic peptide  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa is N-acetyl glycine 10  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> side chain tBu protected  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> side chain Trt protected 20  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> side chain tBu protected  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa is 1-naphthylalanine 30  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> side chain Trt protected  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> side chain Pbf protected 40  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa is N-methyl glycine  
  
 <400> 13

Xaa Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1

5

10

15

50

Pro Leu Arg Xaa

20

\*

\*

\*

【 0 3 7 9 】

本発明は、本明細書に記載した特定の実施形態によって、その範囲を限定されないものとする。実際、本明細書に記載された実施形態の他にも、本発明のさまざまな変更実施形態が、上述の説明及び添付の図面から、当業者には明白になるだろう。そのような変更実施形態は、添付の特許請求の範囲に包含されるものとする。

【 0 3 8 0 】

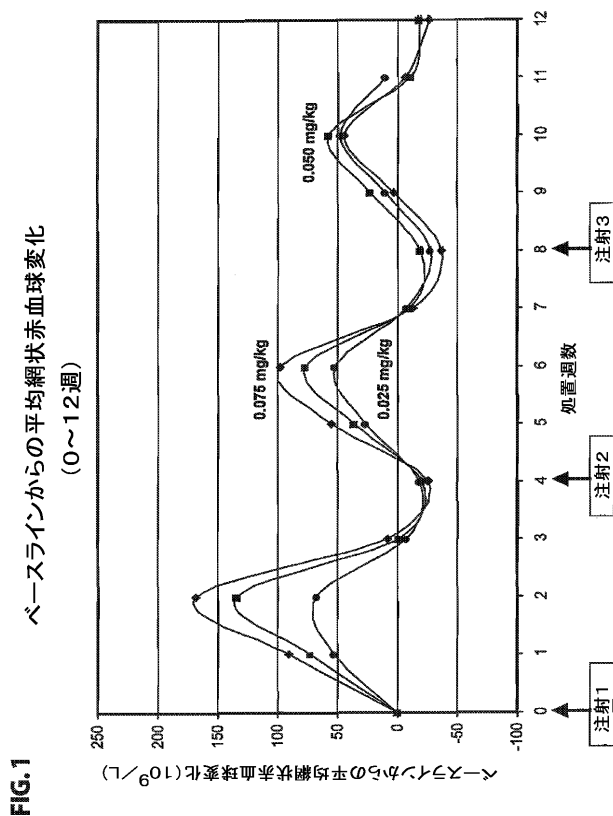
また、全ての値は近似値であり、説明のために記載されていると理解すべきである。

【 0 3 8 1 】

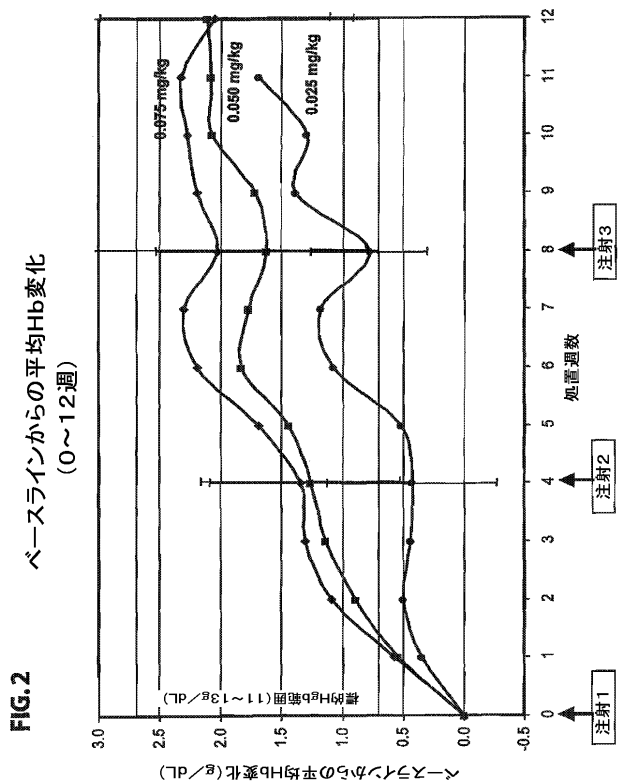
数多くの参考文献、例えば特許、特許出願、及び種々の刊行物が、本発明の説明では引用され、考察される。そのような参考文献の引用及び／又は考察は、単に本発明の説明を明解にするためになされたものであり、そのような参考文献のいずれかが本発明の「先行技術」であるという承認ではない。本明細書において引用し考察する参考文献は全て、各参考文献が個別に参照により本明細書に組み込まれた場合と同じ程度に、参照によりその全体が、本明細書に組み込まれる。

10

【 図 1 】



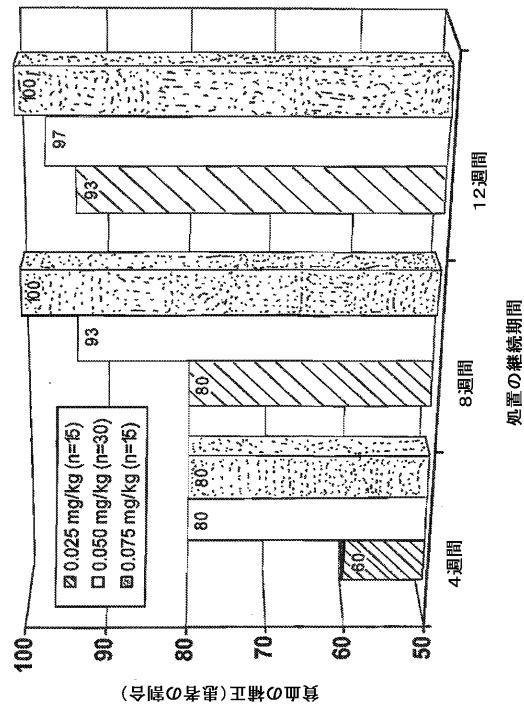
【 図 2 】



【 図 3 】

用量及び処置継続期間による  
貧血の補正 ( $Hb \geq 11 g/dL$ )

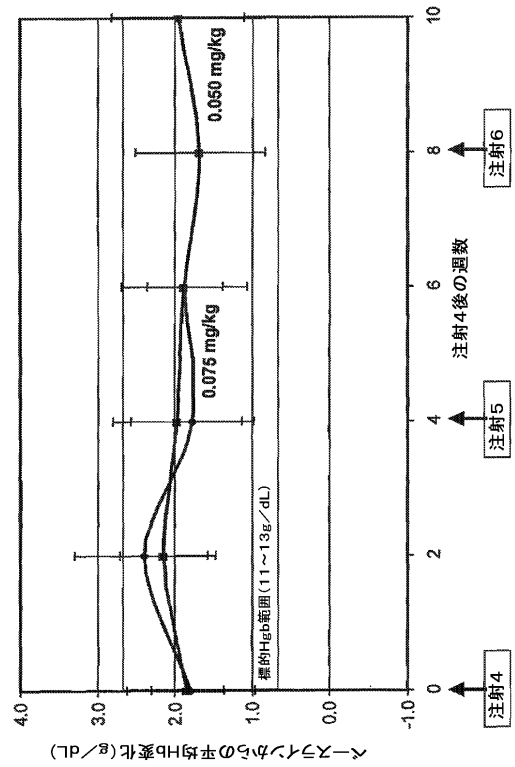
FIG. 3



【 図 4 】

ベースラインからの平均Hb変化  
(12~22週)

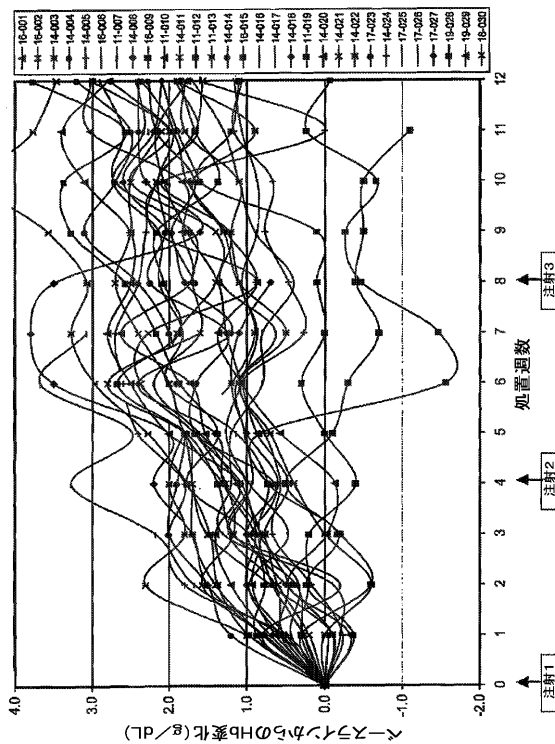
FIG. 4



【 図 5 】

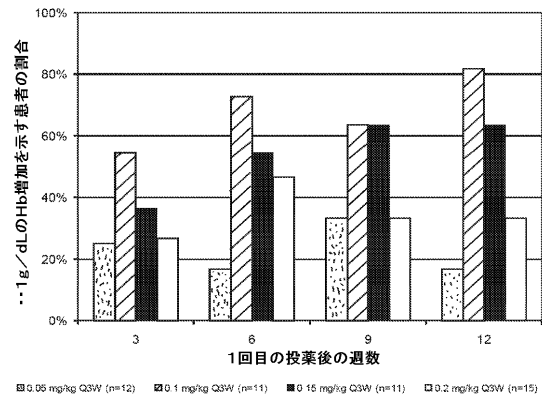
0.05mg/kgコホートにおける個々の患者の  
ベースラインからのHb変化 (0~12週)

FIG. 5



【 図 6 】

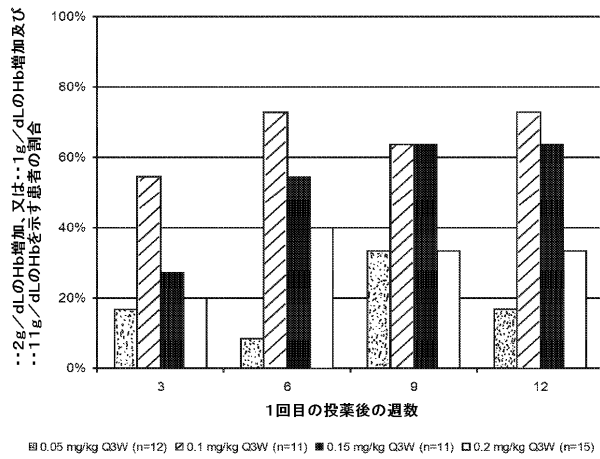
Figure 6:  $\geq 1 g/dL$ のヘモグロビン増加を示す患者の割合



【 図 7 】

Figure 7:

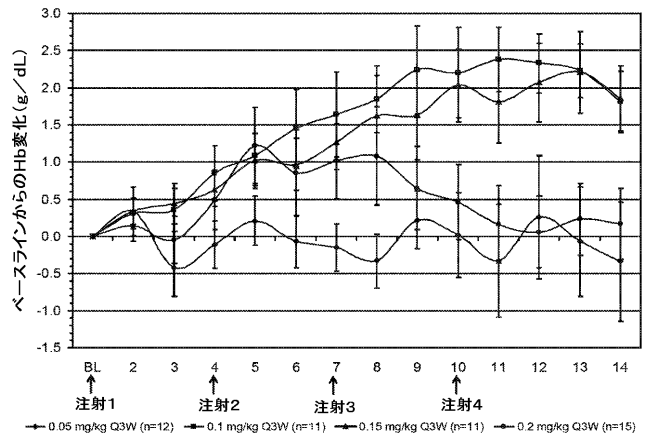
…2g/dLのHb増加、又は…1g/dLのHb増加と少なくとも  
11g/dLのHb値との組合せを示す患者の割合



【 図 8 】

Figure 8:

用量及び週数によるベースラインからの平均Hb変化±SE



【 配 列 表 】

2010536858000001.xml

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US 08/70943

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/00 (2008.04) USPC - 514/13 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/13 IPC- A61K 38/00 (2008.04)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/9; 530/324		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST, Google Scholar: erythropoietin receptor, ligand, peptide, bind, affinity, 1-naI, compound, composition, polyethylene glycol, PEG, dialysis, renal failure, inject, dosage, week, solid tumor, lymphoma, cancer, malignancy, milligram, mg, kilogram, kg, administer		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0027074 A1 (HOLMES et al.) 01 Feb 2007 (01.02.2007), Claim 36, SEQ ID NOs 6, 15; para [0002], [0018], [0027], [0030], [0036], [0041], [0045], [0111], [0114], [0142], [0171]	1-19
A	US 2006/0040858 A1 (HOLMES et al.) 23 Feb 2006 (23.02.2006)	1-19
A	US 2005/0137329 A1 (HOLMES et al.) 23 Jun 2005 (23.06.2005)	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 10 December 2008 (10.12.2008)		Date of mailing of the international search report <b>23 DEC 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774



## 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

(72)発明者 ドゥリエゲ, アニー マリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3, パロ アルト, ルイス ロード 2 1 2 5

(72)発明者 ステッド, リチャード

アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 0 4, ベルビュー, エスイー, 9 6 ティーエイチ アベニュー 6 9 1

(72)発明者 レウザー, ケルスティン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 4 8, サン ジョゼ, クインビー ロード 4 8 0 5

(72)発明者 ウッドバーン, キャスリン, ウィン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 0 8, キャンベル, カプリ ドライブ 1 1 7 1

(72)発明者 ナソ, ロバート, パーネット

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 2 5, メンロ パーク, サンタ クロス アベニュー 2 0 5 9

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA18 BA26 BA37 CA59 DB56 NA14 ZA552

ZA812 ZB262 ZC412

4H045 AA10 AA30 BA09 BA17 CA40 DA13 EA20 EA23 FA34