

(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2017-508455

(P2017-508455A)

(43) 公表日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24 Z N A	4 B 0 5 0
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	4 B 0 6 4
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)		

(21) 出願番号 特願2016-553591 (P2016-553591)
(86) (22) 出願日 平成27年3月5日 (2015. 3. 5)
(85) 翻訳文提出日 平成28年10月19日 (2016. 10. 19)
(86) 国際出願番号 PCT/US2015/018859
(87) 国際公開番号 W02015/134696
(87) 国際公開日 平成27年9月11日 (2015. 9. 11)
(31) 優先権主張番号 61/948, 421
(32) 優先日 平成26年3月5日 (2014. 3. 5)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 62/114, 313
(32) 優先日 平成27年2月10日 (2015. 2. 10)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516134291
ウルトラジェニクス ファーマシューティ
カル インク.
ULTRAGENYX PHARMACE
UTICAL INC.
アメリカ国 カリフォルニア 94949
ナヴァト レヴェロニコート60
(74) 代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀
(74) 代理人 100102255
弁理士 小澤 誠次
(74) 代理人 100096482
弁理士 東海 裕作
(74) 代理人 100188352
弁理士 松田 一弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シアル化糖タンパク質組成物及びその使用

(57) 【要約】

本出願は、シアル化糖タンパク質組成物及びさまざまな状態及び障害を処置する際のそれらの使用方法に関する。

【選択図】 図 1

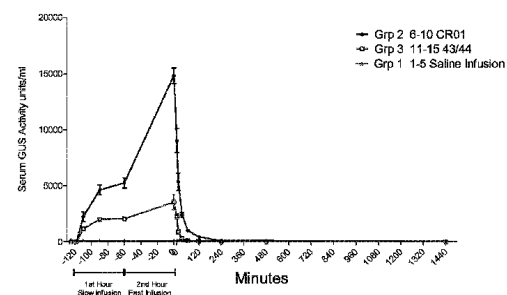


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換え糖タンパク質を含む組成物であって、前記組換え糖タンパク質はヒト β -グルクロニダーゼであり、前記組換え糖タンパク質に対して少なくとも 0.7 mol/mol のシアル化含有量を有する、前記組成物。

【請求項 2】

前記組換え糖タンパク質は、高レベルのマンノース-6-リン酸 (M6P) 部分を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組換え糖タンパク質は、少なくとも 1 mol/mol のシアル化含有量及び前記組換え糖タンパク質の全グリカンの少なくとも $10 \text{ mol\%}$ の高レベルの M6P 部分を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記組換え糖タンパク質は、高レベルの M6P 部分及び 3 nM 以下の前記組換え糖タンパク質のヒト線維芽細胞への M6P 依存性最大半量濃度を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

組換え糖タンパク質の集団の調製物であって、前記組換え糖タンパク質は、ヒト β -グルクロニダーゼであり、前記組換え糖タンパク質の前記集団の少なくとも 10% の割合はシアル化されている、前記調製物。

【請求項 6】

前記組換え糖タンパク質は、前記組換え糖タンパク質に対して少なくとも 0.7 mol/mol のシアル化含有量を有する、請求項 5 に記載の調製物。

【請求項 7】

前記組換え糖タンパク質は、高レベルの M6P 部分を有する、請求項 5 に記載の調製物。

【請求項 8】

前記組換え糖タンパク質は、少なくとも 1 mol/mol のシアル化含有量及び前記組換え糖タンパク質の全グリカンの少なくとも $10 \text{ mol\%}$ の高レベルの M6P 部分を有する、請求項 5 に記載の調製物。

【請求項 9】

前記組換え糖タンパク質は、高レベルの M6P 部分及び 3 nM 以下の前記組換え糖タンパク質のヒト線維芽細胞への最大半量取り込み濃度を有する、請求項 5 に記載の調製物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の組成物の作製方法であって、無血清または無タンパク質培地を用いた細胞培養物中に前記組換え糖タンパク質を発現させることを含む、前記方法。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の調製物の作製方法であって、無血清または無タンパク質培地を用いた細胞培養物中に前記組換え糖タンパク質を発現させることを含む、前記方法。

【請求項 12】

多系統リソソーム蓄積症の処置方法であって、そのような処置を必要とする個体に治療有効量の請求項 1 に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 13】

対象の状態または障害を処置するための方法であって、前記対象に組換え糖タンパク質に対して少なくとも 0.7 mol/mol のシアル化含有量を有する前記組換え糖タンパク質を含む治療計画を施すことを含み、前記施すことは、前記状態または障害の前記処置に統計学的に有意な治療効果をもたらす、前記方法。

【請求項 14】

前記対象はヒトである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記状態または障害は、酵素欠損に関連する、請求項 13 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

酵素欠損に関連する前記状態または障害は、リソソーム蓄積症である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記リソソーム蓄積症は、ムコ多糖症 7 型である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記組換え糖タンパク質は、ヒト組換え β -グルクロニダーゼである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、少なくとも約 0.5 mg/kg の用量で投与される、請求項 18 に記載の方法。 10

【請求項 20】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、約 1 mg/kg から約 8 mg/kg の用量で投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、約 2 mg/kg から約 6 mg/kg の用量で投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、約 4 mg/kg の用量で投与される、請求項 18 に記載の方法。 20

【請求項 23】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、週に 1 回投与される、請求項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、1 週おきに投与される、請求項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、静脈内に投与される、請求項 19～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記ヒト組換え β -グルクロニダーゼは、継続的な注入によって投与される、請求項 19～25 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 27】

ヒト組換え β -グルクロニダーゼの前記治療計画は、抗ヒスタミン療法と同時に、またはそれに続いて施される、請求項 19～26 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014 年 3 月 5 日に提出された米国特許仮出願第 61/948,421 号及び 2015 年 2 月 10 日に提出された米国特許仮出願第 62/114,313 号の優先権を主張するものであり、これらのそれぞれを、あらゆる目的のためにその全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする。 40

【0002】

本発明の分野

本発明は、シアル化糖タンパク質組成物ならびにさまざまな状態及び障害を処置する際にそれらを使用する方法に関する。

【0003】

電子的に提出するテキストファイルの説明

本明細書とともに電子的に提出するテキストファイルの内容は、その全体を参照によっ 50

て本明細書に組み込んだものとする：配列表のコンピュータ読み取り可能な形式の複製（ファイル名：U L P I _ 0 2 0 _ 0 2 W O _ S e q L i s t _ S T 2 5 . t x t、データ記録日：2015年3月2日、ファイルサイズ：9キロバイト）。

【背景技術】

【0004】

近年、市販の治療効果のあるタンパク質の数が劇的に増加してきており、こうしたタンパク質の大半は糖タンパク質である。糖タンパク質にシアル酸があると、吸収、血清半減期及び血清クリアランスならびにそれぞれの糖タンパク質の物理的、化学的及び免疫特性にプラスの影響を与える場合がある。したがって、特定の状況において、薬理学的用途に使用されることが意図される糖タンパク質のシアル酸含有量が増加することが望ましい場合もある。

10

【発明の概要】

【0005】

本発明は、無血清／無タンパク質培地を使用することによって哺乳動物細胞から産生される組換え糖タンパク質が、例えば、組換え糖タンパク質のM6P含有量を低減することなく組換え糖タンパク質のシアル化を向上させるという発見に部分的に基づくものである。

【0006】

本発明の一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して0.05mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して0.1mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して0.5mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して0.7mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して1mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して1.5mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して2mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して5mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して10mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質に対して20mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む。

20

30

【0007】

一部の実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質のガラクトース残基の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%がシアル化されている組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

【0008】

一部の実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質がヒトβ-グルクロニダーゼであり、組換え糖タンパク質に対して少なくとも0.7mol/molのシアル化含有量を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

40

【0009】

一部の他の実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質がヒトβ-グルクロニダーゼであり、組換え糖タンパク質に対して少なくとも0.7mol/molのシアル化含有量及び高レベルのマンノース-6-リン酸（M6P）部分を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

【0010】

一実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質がヒトβ-グルクロニダーゼであ

50

り、組換え糖タンパク質に対して少なくとも 0.7 mol/mol のシアル化含有量及び組換え糖タンパク質の全グリカンの少なくとも $10\text{ mol\%}$ の高レベルのマンノース-6-リン酸 (M6P) 部分を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

【0011】

別の実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質がヒト β -グルクロニダーゼであり、組換え糖タンパク質に対して少なくとも 0.7 mol/mol のシアル化含有量及び例えば、ヒト線維芽細胞 (MPS7) において試験される場合、K取り込みが、約 1 nM から約 3 nM などにおいてその 60% 、 70% 、 80% 、 90% または最大である高レベルのマンノース-6-リン酸 (M6P) 部分を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

10

【0012】

さらに別の実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質がヒト β -グルクロニダーゼであり、組換え糖タンパク質に対して少なくとも 0.7 mol/mol のシアル化含有量及び例えば、糖タンパク質 (例えば、ヒト β -グルクロニダーゼ) が最大取り込みの 50% に達する濃度などの、ヒト線維芽細胞における半最大取り込みが、約 1 nM 以下、 2 nM 以下、 3 nM 以下、 4 nM 以下または 5 nM 以下の高レベルのマンノース-6-リン酸 (M6P) 部分を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

【0013】

一部の実施形態において、本発明は、集団の少なくとも 50 パーセントがシアル化されている組換え糖タンパク質の集団の調製物を提供する。一部の実施形態において、本発明は、集団の少なくとも 60 パーセントがシアル化されている組換え糖タンパク質の集団の調製物を提供する。一部の実施形態において、本発明は、集団の少なくとも 70 パーセントがシアル化されている組換え糖タンパク質の集団の調製物を提供する。一部の実施形態において、本発明は、集団の少なくとも 80 パーセントがシアル化されている組換え糖タンパク質の集団の調製物を提供する。一部の実施形態において、本発明は、集団の少なくとも 90 パーセントがシアル化されている組換え糖タンパク質の集団の調製物を提供する。

20

【0014】

本発明による組成物/調製物を作製する方法も提供される。一部の実施形態において、本方法は、無血清または無タンパク質培地を用いた細胞培養物中に組換え糖タンパク質を発現させることを含む。一部の実施形態において、細胞を増殖させるために無タンパク質既知組成培地が使用されてもよい。一部の実施形態において、培地は、ガラクトース、フルクトース、 n -アセチルマンノサミン、マンノース及びそれらの組み合わせから選択される有効量の糖を含まない。例えば、糖の有効量は、 0.01 mM 、 0.05 mM または 0.1 mM を超える。

30

【0015】

一部の実施形態において、細胞培養物は、哺乳動物細胞を含む。例となる哺乳動物細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、HeLa、VERO、BHK、Cos、MDCK、293、3T3、骨髄腫 (例えば、NSO、NSI) またはWI38細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態において、哺乳動物細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である。

40

【0016】

一部の他の実施形態において、細胞培養物は、植物細胞を含む。例となる植物細胞としては、ニンジン細胞または、例えば、組換えタンパク質産生用に開発された細胞培養に基づくその他の任意の植物細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0017】

さらに、リソソーム蓄積症 (LSD) を処置する方法であって、そのような処置を必要とする個体に治療有効量の本明細書に記載される組成物/調製物を投与することを含む、方法が提供される。例となる実施形態において、本組成物/調製物は、ヒト組換え β -グルクロニダーゼを含む。さらなる例となる実施形態において、LSDは、ムコ多糖症7型

50

(すなわち、MPS 7、MPS VII またはスライ症候群) である。一部の実施形態において、本明細書中で提供されるヒト組換えβ-グルクロニダーゼは、シアル酸含有量が高く、LSD、例えば、MPS 7 を処置する際に特に有用である。

【0018】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の組成物／調製物の治療計画を施すことを含む、対象におけるリソソーム蓄積症 (LSD) を処置するための方法を提供し、この施すことは、LSD の処置に統計学的に有意な治療効果をもたらす。例となる実施形態において、本組成物／調製物は、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼを含む。さらなる例となる実施形態において、LSD は MPS 7 である。

【0019】

定義

本明細書中で使用される場合、「effective」(例えば、「an effective amount」) という用語は、所望の、予測した、または意図した結果を達成するのに十分であることを意味する。有効量は、治療有効量であってもよい。「therapeutically effective amount」とは、対象に投与されたときに、特定の疾患または状態のそのような処置を達成するのに十分な活性成分の量を指す。「therapeutically effective amount」は、例えば、疾患または状態、疾患または状態の重症度及び処置される対象の年齢、体重などに応じて変化することになる。

【0020】

一般に、あらゆる状態、疾患または障害を「treating」または「treatment」とは、一部の実施形態において、状態、疾患または障害を緩和すること(すなわち、疾患の進行またはその臨床症状のうちの少なくとも1つを阻止または低減すること)を指す。一部の実施形態において、「treating」または「treatment」とは、対象が認識できない少なくとも1つの物理的パラメーターを改善することを指す。一部の実施形態において、「treating」または「treatment」とは、物理的(例えば、識別できる症状の安定化)若しくは生理学的(例えば、物理的パラメーターの安定化)のいずれか、またはその両方で状態、疾患または障害を抑制することを指す。一部の実施形態において、「treating」または「treatment」とは、状態、疾患または障害の発症を遅らせることを指す。

【0021】

長きにわたる特許法規則に従い、「a」、「an」及び「the」という用語は、請求項を含む本出願で使用される場合、「一つ以上」を指す。明確に別の選択肢のみを指すことが示されているか、または選択肢が互いに排他的である場合を除いて、請求項における「or」という用語の使用は、「and/or」を意味して使用される。「or」という用語を使用した項目のいかなる列挙も、列挙された任意のそうした項目が関連する実施形態から特に除外されてもよいことを意味することが特に意図される。

【0022】

本出願全体をとおして、「about」という用語は、値を測定するために利用された装置または方法に対する誤差の標準偏差を値が含むことを示すために使用される。

【0023】

糖タンパク質とは、本明細書中で使用される場合、とりわけ、1つ以上の糖残基の付加を含む1つ以上の炭水化物の付加によって修飾されたタンパク質である。

【0024】

本明細書中で使用される場合、「GUS」とは、本発明による典型的な糖タンパク質であるβ-グルクロニダーゼを指す。

【0025】

シアル化は、本明細書中で使用される場合、糖タンパク質であってもよいタンパク質へのシアル酸残基の付加である。シアル酸という用語は、本明細書中で使用される場合、カルボキシル基を含む9個以上の炭素原子を含む糖のファミリーを包含する。シアル酸の既

10

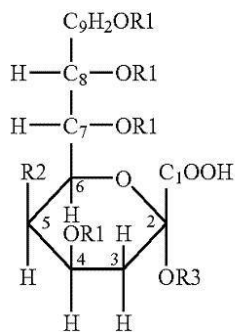
20

30

40

50

知のすべての天然の形態を包含する一般構造を下に示す。



10

【0026】

単一の分子のさまざまな位置にあるR1基は、互いに同じであっても、または異なってもよい。R1は、水素またはアセチル、ラクチル、メチル、硫酸、リン酸、無水、シアル酸、フコース、グルコース若しくはガラクトース基であってもよい。R2は、N-アセチル、N-グリコリル、アミノ、ヒドロキシル、N-グリコリル-O-アセチルまたはN-グリコリル-O-メチル基であってもよい。R3は、糖タンパク質の状況においてシアル酸が結合するオリゴ糖にある上記の糖残基を表わす。R3は、ガラクトース（その3、4または5位に結合）、N-アセチル-ガラクトース（その6位に結合）、N-アセチル-グルコース（その4または6位に結合）、シアル酸（その8または9位に結合）または5-N-グリコリル-ノイラミン酸であってもよい。Essentials of Glycobiology、Ch. 15、Varkiら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク（1999年）。40を超える形態のシアル酸が自然界で発見された。Essentials of Glycobiology、Ch. 15、Varkiら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク（1999年）。シアル酸の一般形態は、N-アセチルノイラミン酸（NANA）であり、その中のすべての位置のR1は水素であり、R2はN-アセチル基である。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0027】

【図1】2段階注入によるラットにおけるヒト組換えβ-グルクロニダーゼ、GUS C R01対GUSロット43/44の薬物動態を比較するグラフである。このデータは、高度にシアル化されたC R01の注入は、さほど急速でないクリアランス及び注入時により高い平均濃度をもたらし、これが、酵素への全曝露を増加させ、処置するのがより難しい組織の浸透を潜在的に高めることを示している。

【図2】GUS C R01対GUSロット43/44のクリアランス段階の注入後のみを示すグラフであり、これを $t_{1/2}$ 値を算出するために使用した。クリアランスの速度のこうした差は、図1に示されるとおりのより高い酵素の血清レベルをもたらすのに十分である。

40

【図3】GUS C R01対GUSロット43/44の薬物動態試験に関する組織中GUSレベルを示す一連のグラフである。シアル化されたヒトβ-グルクロニダーゼ（C R01）の全取り込みがすべての組織においてシアル化の程度が低い酵素（43-44）よりも高いため、ヒトβ-グルクロニダーゼの組織送達及び取り込みが向上したことが示されている。内在性グルクロニダーゼ活性が差し引かれると、治療効果のあるヒトβ-グルクロニダーゼの効果的な送達が2倍からほぼ10倍に増加しており、例外的で驚くべき発見である。

【図4】ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ（rhGUS）を用いて処置した3名の対象の36週間にわたる尿中グリコサミノグリカン（uGAG）レベルの測定値を示すグラフである。急速で持続した用量依存的なuGAGレベルの低下がrhGUSを用いて処置した

50

対象で観察された。

【図5】rhGUSを用いて処置した3名の対象の36週間の評価の間の各投与間隔の終わりにおける尿中グリコサミノグリカン（uGAG）レベルの平均低下を示す。4mg/kg QOWの投薬のuGAGレベルの低下が最も大きかった。

【図6】rhGUSを用いて処置した3名の対象の36週間にわたる血清グリコサミノグリカン（GAG）レベルの測定値を示すグラフである。各対象は、36週間の処置スケジュールの終わりに血清GAGレベルが少なくとも25%低下した。

【図7】rhGUSを用いて処置した対象の肝臓の大きさの測定値を示すグラフである。36週間の処置プロトコルの結果、肝腫大の著しい減少が観察された。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、無血清／無タンパク質培地を使用することによって哺乳動物細胞から産生される組換え糖タンパク質が、組換え糖タンパク質のシアル化及び加えて、組換え糖タンパク質のマノースー6ーリン酸部分のレベルを向上させるというという発見に部分的に基づくものである。

【0029】

シアル化糖タンパク質組成物

本明細書に記載される組成物は、高レベルまたは増加したシアル酸含有量を有する1つ以上の糖タンパク質を含む。

【0030】

シアル酸は、N-アセチルノイラミン酸由来の50を超えるメンバーを含む9個の炭素を有するアミノ糖のファミリーを表わす。シアル酸は、糖タンパク質のグリカンを構築するいくつかの単糖のうちの1つの構成要素にすぎないが、以下のいくつかの理由のために治療効果のある任意の糖タンパク質の品質及び安定性に著しい影響を与える：（I）末端ガラクトース残基は、糖タンパク質の血清半減期を決定する主要因の1つである。血清半減期は、肝臓のアシアロ糖タンパク質レセプターの発現によって調節される。このレセプターは非シアル化糖タンパク質と結合し、結合したアシアロ糖タンパク質はエンドサイトシスによって血清から除去される。結果として、ガラクトース残基の末端シアル酸の発現が血清糖タンパク質の分解を妨げる；（II）シアル酸は、抗原決定基またはエピトープのマスキングに重要である。免疫系のレセプター（T及びB細胞レセプター）は非シアル化構造の方を選ぶ場合が多いことがわかっている。したがって、治療効果のある糖タンパク質に対して抗体が生じる可能性は、そのシアル化の程度と相関する；（III）マイナスに帯電したシアル酸は、熱安定性、タンパク質分解に対する抵抗性またはその溶解度などのタンパク質に固有のパラメーターに影響を与える（Borkら、Increasing the Sialylation of Therapeutic Glycoproteins: The potential of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 98, No. 10, 2009年10月）。

【0031】

一態様において、本発明は、組換え糖タンパク質に対して0.05mol/mol、0.1mol/mol、0.5mol/mol、0.7mol/mol、1mol/mol、1.5mol/mol、2mol/mol、5mol/mol、10mol/molまたは20mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。一部の実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質に対して0.5mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質に対して0.7mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。特定のさらなる実施形態において、本発明は、組換え糖タンパク質に対して1mol/molを超えるシアル酸含有量を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0032】

特定の実施形態において、本組換え糖タンパク質は、ムコ多糖の非還元末端からのβ-D-グルクロン酸残基の加水分解の触媒をつかさどる酵素であるヒトβ-グルクロニダーゼの組換え型である。一部の実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して0.1mol/mol、0.5mol/mol、0.7mol/mol、1mol/mol、1.5mol/mol、2mol/molまたは5mol/molを超えるシアル酸含有量を有する。例となる一実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して0.7mol/molを超えるシアル酸含有量を有する。例となる別の実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して1.0mol/molを超えるシアル酸含有量を有する。さらに別の例となる実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して約1.2mol/molのシアル酸含有量を有する。

【0033】

一部の実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して約0.5mol/molから約2.0mol/molのシアル酸含有量を有する。一実施形態では、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して約0.6mol/molから約1.5mol/molのシアル酸含有量を有する。別の実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して約0.7mol/molから約1.4mol/molのシアル酸含有量を有する。例となる実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して約0.8mol/molから約1.3mol/molのシアル酸含有量を有する。例となる別の実施形態において、本ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)は、rhGUSに対して約1.0mol/molから約1.2mol/molのシアル酸含有量を有する。

【0034】

一部の実施形態において、本発明の組成物は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%のシアル化されているシアル酸結合に適した部位を有する組換え糖タンパク質を含む。一般に、ガラクトースは、シアル酸結合またはシアル化に適した部位である。特定の実施形態において、組成物は、組換え糖タンパク質のガラクトース残基の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%がシアル化されている組換え糖タンパク質を含む。一部の実施形態において、本組成物は、組換え糖タンパク質のガラクトース残基の少なくとも50%がシアル化されている組換え糖タンパク質を含む。さらなる実施形態において、本組成物は、組換え糖タンパク質のガラクトース残基の少なくとも60%がシアル化されている組換え糖タンパク質を含む。特定のさらなる実施形態において、本組成物は、組換え糖タンパク質のガラクトース残基の少なくとも70%がシアル化されている組換え糖タンパク質を含む。

【0035】

特定の実施形態において、本組換え糖タンパク質は、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)である。一部の実施形態において、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)のガラクトース残基の少なくとも40%、50%、60%、70%または80%はシアル化されている。例となる一実施形態において、rhGUSのガラクトース残基の少なくとも50%はシアル化されている。例となる別の実施形態において、rhGUSのガラクトース残基の少なくとも60%はシアル化されている。さらに別の例となる実施形態において、rhGUSのガラクトース残基の少なくとも70%はシアル化されている。さらに別の例となる実施形態において、rhGUSのガラクトース残基の約70%、71%、72%、73%、74%または約75%はシアル化されている。

【0036】

一部の実施形態において、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)のガラクト

ース残基の少なくとも約40%から少なくとも約90%はシアル化されている。一実施形態において、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)のガラクトース残基の少なくとも約50%から少なくとも約80%はシアル化されている。別の実施形態において、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)のガラクトース残基の少なくとも約60%から少なくとも約80%はシアル化されている。例となる実施形態において、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)のガラクトース残基の少なくとも約65%から少なくとも約75%はシアル化されている。

【0037】

別の態様において、本発明は、高レベルのシアル酸含有量ならびに高レベルのマンノース-6-リン酸(M6P)部分を有する組換え糖タンパク質を含む組成物を提供する。本明細書中で使用される場合、M6P部分は、いかなる制限もなく、一リン酸化及び二リン酸化マンノース-6-リン酸を含む、M6Pレセプターと結合することができるか、またはそれによって認識され得るあらゆるマンノース-6-リン酸を含む。一実施形態において、M6P部分は、カチオン非依存性M6Pレセプター(CI-MPR)と結合するあらゆるM6Pを含む。別の実施形態において、M6P部分は、カチオン依存性M6Pレセプター(CD-MRP)と結合するあらゆるM6Pを含む。さらに別の実施形態において、M6P部分は、あらゆる二リン酸化M6Pを含む。

【0038】

本発明によると、高レベルのマンノース-6-リン酸部分としては、例えば、当業者に既知のまたは後に開発される任意の適切な手段を使用して測定され、当業者が高いと考えるあらゆるレベルのM6P部分を挙げることができる。一実施形態において、組換え糖タンパク質のM6P部分の高レベルとしては、組換え糖タンパク質の全グリカンの少なくとも10mol%、11mol%、12mol%、13mol%、14mol%または15mol%のM6P部分レベルが挙げられる。例えば、本組換え糖タンパク質は、M6Pピーク面積を全グリカンピーク面積で割った割合によって求められる、例えば、少なくとも10%、11%、12%、13%、14%または15%の高レベルのM6Pを有してもよい。一部の実施形態において、本組換え糖タンパク質は、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)であり、rhGUSの全グリカンの少なくとも10mol%、11mol%、12mol%、13mol%、14mol%または15mol%のM6P部分レベルを含む。例となる実施形態において、rhGUSは、約13%から約15%のM6P部分レベルを含む。

【0039】

別の実施形態において、組換え糖タンパク質の高レベルのM6P部分としては、高レベルのヒト細胞による組換え糖タンパク質の取り込み、例えば、ヒト線維芽細胞による高い親和性の取り込み量が挙げられる。例えば、本組換え糖タンパク質は、1nM以下、1.1nM以下、1.2nM以下、1.3nM以下、1.4nM以下、1.5nM以下、1.6nM以下、1.7nM以下、1.8nM以下、1.9nM以下、2nM以下、2.1nM以下、2.2nM以下、2.3nM以下、2.4nM以下、2.5nM以下、2.6nM以下、2.7nM以下、2.8nM以下、2.9nM以下、3nM以下、4nM以下または5nM以下の任意の適したヒト細胞、例えば、ヒト線維芽細胞によるM6P依存性K取り込みを有してもよい。一部の実施形態において、本組換え糖タンパク質は、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)であり、5nM未満、4nM未満、3nM未満または2nM未満のM6P依存性K取り込みを有する。例となる実施形態において、rhGUSは、約1.2nMから約1.8nMのM6P依存性K取り込みを有する。

【0040】

さらに別の実施形態において、組換え糖タンパク質中の高レベルのM6P部分としては、ヒト細胞による組換え糖タンパク質の最大取り込みを達成するのに必要とされるより低い濃度、例えば、より低い最大半量濃度が挙げられる。例えば、本組換え糖タンパク質は、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nMまたは1nM未満の濃度で、ヒト細胞、例えば、線維芽細胞による最大取り込みを達成すること

ができる。一部の実施形態において、本組換え糖タンパク質は、5 nM未満、4 nM未満、3 nM未満または2 nM未満の濃度でヒト細胞、例えば、線維芽細胞による最大取り込みを達成することができるヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)である。例となる実施形態において、rhGUSは、約1.2 nMから約1.8 nMの濃度で、ヒト細胞、例えば、線維芽細胞による最大取り込みを達成することができる。

【0041】

さらに別の実施形態では、組換え糖タンパク質中の高レベルのM6P部分は、組換え糖タンパク質そのままのシアル化含有量に関連するM6P部分のレベルに対応する1つ以上のレベルのM6P部分を含む。そのままのシアル化含有量とは、例えば、本出願において開示される方法を使用するなどといったシアル化を促進させるための手段を行う前の組換え糖タンパク質のシアル化含有量のことである。

10

【0042】

本発明によると、一部の実施形態において、本組換え糖タンパク質、例えば、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼまたはその他の任意のリソソーム酵素は、少なくとも1 mol/molのシアル化含有量及び組換え糖タンパク質の全グリカンの少なくとも10 mol%、11 mol%、12 mol%、13 mol%、14 mol%または15 mol%の高レベルのM6P部分を有する。一実施形態において、本組換え糖タンパク質、例えば、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼまたはその他の任意のリソソーム酵素は、少なくとも1 mol/molのシアル化含有量及びヒト細胞、例えば、ヒト線維芽細胞による少なくとも1 nM、1.1 nM、1.2 nM、1.3 nM、1.4 nM、1.5 nM、1.6 nM、1.7 nM、1.8 nM、1.9 nMまたは2 nMの取り込みによる高レベルのM6P部分を有する。別の実施形態において、本組換え糖タンパク質、例えば、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼまたはその他の任意のリソソーム酵素は、少なくとも1 mol/molのシアル化含有量及び本組換え糖タンパク質の10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nMまたは1 nM未満におけるヒト細胞、例えば、ヒト線維芽細胞による最大取り込みによる高レベルのM6P部分を有する。

20

【0043】

さらに別の態様において、本発明は、集団の少なくとも50%、60%、70%、80%または90%がシアル化されている組換え糖タンパク質の集団を含む組成物を提供する。一実施形態において、集団の少なくとも50%、60%、70%、80%または90%が、例えば、シアル化含有量及びM6Pレベルに関して本発明による組換え糖タンパク質である。

30

【0044】

本発明により提供される組換え糖タンパク質は、任意の糖タンパク質であってもよい。例となる組換え糖タンパク質は、以下のタンパク質の1つの全体または一部と同一か、または実質的に類似のアミノ酸配列を含む糖タンパク質が挙げられる：Flt3リガンド(WO94/28391に記載されている)、CD40リガンド(米国特許第6,087,329号に記載されている)、エリスロポエチン、トロンプオエチン、カルシトニン、レプチン、IL-2、アンジオポエチン-2(Maisonpiereら、(1997年)、Science 277(5322):55~60に記載されており、参照によって本明細書に組み込まれる)、Fasリガンド、NF-κB活性化受容体リガンド(RANKL、WO01/36637に記載されている)、腫瘍壊死因子(TNF)関連アポトーシス誘導リガンド(TRL、WO97/01633に記載されている)、胸腺間質性リンパ球新生因子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、オーストラリア特許第588819号に記載されている)、マスト細胞増殖因子、幹細胞増殖因子(例えば、米国特許第6,204,363号に記載されており、参照によって本明細書に組み込まれる)、上皮増殖因子、ケラチノサイト増殖因子、巨核球増殖分化因子、RANTES、成長ホルモン、インスリン、インスリノトロピン、インスリン様増殖因子、副甲状腺ホルモン、αインターフェロン、γインターフェロン及びコンセンサスインターフェロンを含むインターフェロン(参照によって本明細書に組み

40

50

込まれる米国特許第4,695,623号及び同第4,897,471号に記載されているものなど)、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、シナプトタグミン様タンパク質(SLP1~5)、ニューロトロフィン-3、グルカゴン、インターロイキン1から18、コロニー刺激因子、リンホトキシニン-β、腫瘍壊死因子(TNF)、白血病抑制因子、オンコスタチン-M、及び細胞表面分子ELK及びHekに対する各種リガンド(eph関連キナーゼリガンドすなわちLERKなど)。本発明の方法に従って産生され得るタンパク質の説明は、例えば、Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, Vol. II (Aggarwal及びGuterman編、Blackwell Sciences、ケンブリッジ、マサチューセッツ州、1998年); Growth Factors: A Practical Approach (McKay及びLeigh編、Oxford University Press Inc.、ニューヨーク、1993年); 及びThe Cytokine Handbook (A. W. Thompson編、Academic Press、サンディエゴ、カリフォルニア州、1991年)に見出すことができ、そのすべてを参照によって本明細書に組み込んだものとする。

【0045】

本発明の組換え糖タンパク質としては、あらゆるリソソーム酵素、とりわけ酵素補充療法(ERT)に有用なあらゆる酵素を挙げることができる。そのような酵素の例としては、いかなる制限もなく、酸性アルファグルコシダーゼ、酸性ベータグルコシダーゼまたはグルコセレブロシダーゼ、アルファガラクトシダーゼA、酸性ベータガラクトシダーゼ、ベータヘキソサミニダーゼA、ベータヘキソサミニダーゼB、酸性スフィンゴミエリナーゼ、ガラクトセレブロシダーゼ、酸性セラミダーゼ、アリルスルファターゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、イズロネート-2-スルファターゼ、ヘパランN-スルファターゼ、アルファ-N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチル-CoA、アルファグルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-6-スルファートスルファターゼ、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファートスルファターゼ、酸性ベータガラクトシダーゼ、アリルスルファターゼB、酸性アルファマンノシダーゼ、酸性ベータマンノシダーゼ、酸性アルファ-L-フコシダーゼ、シアリダーゼ及びアルファ-N-アセチルガラクトサミニダーゼが挙げられる。

【0046】

特定の例となる実施形態において、本発明の組換え糖タンパク質は、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(rhGUS)である。ヒトβ-グルクロニダーゼは、高マンノース型、複合型及び混成型のさまざまな鎖を含む1分子あたり最大16個のオリゴ糖を含む糖タンパク質である。

【0047】

単離または精製された糖タンパク質ポリペプチドも本明細書に記載される。例えば、単離または精製されたrhGUSポリペプチドが本明細書中で開示される。本開示の単離または精製されたrhGUSポリペプチドは、本明細書中で開示される1つ以上の組成物または方法において使用されてもよい。

【0048】

rhGUSポリペプチドとしては、rhGUSペプチド配列ならびにそのフラグメント、その天然の変異体及びその非天然の変異体を挙げることができる。rhGUS配列は、配列番号:1として提供される。配列番号:1から構成される単離または精製されたポリペプチドが本明細書中で開示される。配列番号:1ならびにそのフラグメントを含む単離または精製されたポリペプチドも本明細書中で開示される。フラグメントは、少なくとも約10、20、50、100、200、300、400または500以上の連続的なアミノ酸であってもよい。配列番号:1のアミノ酸配列をコードすることができるポリヌクレオチド配列から構成されるか、またはそれを含む単離または精製されたポリヌクレオチドも本明細書中で開示される。

【0049】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、r h G U S ポリペプチドは、r h G U S ポリペプチドに対して 0.1 mol/mol 、 0.5 mol/mol 、 0.7 mol/mol 、 1 mol/mol 、 1.5 mol/mol 、 2 mol/mol または 5 mol/mol を超えるシアル酸含有量を有する。一部の実施形態において、本 r h G U S ポリペプチドは、r h G U S ポリペプチドに対して約 0.5 mol/mol から約 2.0 mol/mol のシアル酸含有量を有する。一実施形態において、本 r h G U S ポリペプチドは、r h G U S ポリペプチドに対して約 0.6 mol/mol から約 1.5 mol/mol のシアル酸含有量を有する。別の実施形態において、本 r h G U S ポリペプチドは、r h G U S ポリペプチドに対して約 0.7 mol/mol から約 1.4 mol/mol のシアル酸含有量を有する。例となる実施形態において、本 r h G U S ポリペプチドは、r h G U S ポリペプチドに対して約 0.8 mol/mol から約 1.3 mol/mol のシアル酸含有量を有する。例となる別の実施形態において、本 r h G U S は、r h G U S ポリペプチドに対して約 1.0 mol/mol から約 1.2 mol/mol のシアル酸含有量を有する。

10

【0050】

さらなる実施形態において、r h G U S ポリペプチドのガラクトース残基の少なくとも 40% 、 50% 、 60% 、 70% または 80% はシアル化されている。例となる実施形態において、r h G U S ポリペプチドのガラクトース残基の少なくとも約 65% から少なくとも約 75% はシアル化されている。

【0051】

本明細書に記載されるとおり、本発明の糖タンパク質は、組換えで産生されてもよい。本発明の組換え糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、組換え発現ベクターに導入されてもよい。例となる実施形態において、本組換え糖タンパク質は、r h G U S である。したがって、本出願はまた、r h G U S をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターに関する。一実施形態において、本組換え発現ベクターによって産生される r h G U S タンパク質は、配列番号：1 から構成されるか、またはそれを含む。

20

【0052】

当該技術分野において理解されるとおり、組換えベクターは、当該技術分野において周知の技術を使用して適切な宿主細胞系で発現させられてもよい。したがって、本出願はまた、r h G U S をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関する。一実施形態において、本宿主細胞によって産生される r h G U S タンパク質は、配列番号：1 から構成されるか、またはそれを含む。本発明の r h G U S タンパク質を発現させるために適した宿主細胞としては、タンパク質をグリコシル化することができるあらゆる細胞株、好ましくは、タンパク質を発現するよう遺伝子操作された哺乳動物細胞株を挙げることができる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、HeLa、VERO、BHK、Cos、MDCK、293、3T3、骨髄腫 (例えば、NSO、NSI) または WI38 細胞が使用されてもよい。例となる実施形態において、本組換え糖タンパク質を産生するために使用される細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である。

30

【0053】

さらに別の態様において、本発明は、高レベルまたは増加したシアル酸含有量を有する 1 つ以上の糖タンパク質を含む製剤を提供する。製剤としては、一般に液体形態 (溶液)、例えば、以下に限定されるものではないが、再構成される凍結乾燥物ならびに固体形態、例えば、以下に限定されるものではないが、凍結乾燥された形態、ゲル、マイクロカプセル化粒子及びペーストが挙げられる。本発明の一部の実施形態による製剤は、ゲル、粒子またはペーストと組み合わせて使用される液体製剤、凍結乾燥物及び再構成した凍結乾燥物から調製される液体溶液の組み合わせであってもよい。

40

【0054】

一部の実施形態において、本製剤は、水性バッファー及び本組換え糖タンパク質を含む溶液である。バッファーとしては、リン酸ナトリウム (Na-Pi)、ヒスチジン、アルギニン、グリシルグリシン、酒石酸、リンゴ酸、乳酸、アスパラギン酸、コハク酸またはそれらの任意の組み合わせを挙げることができる。例となる実施形態において、バッファ

50

ーとしては、N a - P i 及びヒスチジンが挙げられる。別の実施形態において、バッファーとしては、n a - P i、ヒスチジン及びアルギニンが挙げられる。

【0055】

一部の実施形態において、バッファーは、以下に限定されるものではないが、塩化ナトリウム (N a C l) ポリオキシエチレン (T w e e n - 2 0)、塩化カリウム及びソルビトール (例えば、D - ソルビトール) などの1つ以上の他の成分をさらに含む。例となる実施形態において、バッファーとしては、N a - P i、ヒスチジン、N a C l 及びT w e e n 2 0が挙げられる。

【0056】

当該技術分野において十分に認識されているとおり、タンパク質の安定性は、製剤のpH及び／またはイオン強度に左右される場合もある。本発明の一部の実施形態によると、製剤のpHは、約9.0から約5.0、例えば、約7.5から約6.0である。一部の実施形態において、pHは、約9.0、約8.0、約7.5、約7.0、約6.5、約6.0、約5.5または約5.0である。本発明は、製剤のpHが低いと、組換え糖タンパク質の安定性が向上するという事を最初に認識した。例えば、実施例2の表6は、pHを7.5から6.0に変えた場合、四量体の割合によって測定すると安定性が向上したことを示している。

【0057】

産生の方法

さらに別の態様において、本発明は、無血清または無タンパク質培地を用いた細胞培養物によって産生される糖タンパク質のシアル化及び加えて糖タンパク質のM6Pレベルを高めるための方法を提供する。

【0058】

一般に、培養培地は、合成培地のレベルに基づいていくつかの部分集合に分けることができる。例えば、培養培地は以下のものであってもよい：1) 血清含有培地 (一般的に10~20%ウシ胎仔血清 (FBS))；2) 血清低減培地 (一般的に1~5% FBS)；3) 無血清培地 (合成培地と同義)；4) 無タンパク質培地 (タンパク質を含まないが植物加水分解産物由来の不確定なペプチドを含む)；5) 既知組成培地 (組換えタンパク質及び／またはホルモンのみを含む)；6) 無タンパク質既知組成培地 (低分子量の構成成分のみを含むが、合成ペプチド／ホルモンを含んでもよい)；及び7) 無ペプチド、無タンパク質既知組成培地 (低分子量の構成成分のみを含む)。

【0059】

本発明の一部の実施形態において、糖タンパク質の発現のために、血清低減培地を使用して細胞を増殖させてもよい。本発明の一部の実施形態において、糖タンパク質の発現のために、無血清培地を使用して細胞を増殖させてもよい。一部の実施形態において、糖タンパク質の発現のために、無タンパク質培地を使用して細胞を増殖させてもよい。一部の実施形態において、糖タンパク質の発現のために、既知組成培地を使用して細胞を増殖させてもよい。一部の実施形態において、実施例1で証明されたとおり、無タンパク質既知組成培地を使用して、細胞を増殖させてもよい。さらに一部の他の実施形態において、糖タンパク質の発現のために、無ペプチド、無タンパク質既知組成培地を使用して細胞を増殖させる。

【0060】

当該技術分野において十分に理解されたとおり、無血清培地は、(血液から精製された) 血清アルブミン、加水分解産物、増殖因子、ホルモン、担体タンパク質及び接着因子などの不確定な動物由来産物を含む場合もある。これらの不確定な動物由来産物は、アルブミンの脂質分などの複雑な混入物を含むことになる。対照的に、既知組成培地は、構成成分のすべてが特定され、既知の正確な濃度を有すると定義される。一部の実施形態において、既知組成培地は、動物由来の構成成分を完全に含まない。一部の実施形態において、既知組成培地は、FBS、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HAS) またはそれらの組み合わせを含まない。これを達成するために、既知組成培地は、一般

的に通常、コメ若しくはE. coli由来の組換え型のアルブミン及び増殖因子またはBSA/HSAの機能の一部を再現することができるポリマーポリビニルアルコールなどの合成化学物質が補われる。

【0061】

一部の実施形態において、本明細書に記載の無タンパク質培地は、生物学的起源のタンパク質または構成成分をまったく含まない。培地にタンパク質がないことは、血液由来若しくはその他の病原体または非ヒトタンパク質による汚染のリスクを解消する。さらに、そのような無タンパク質培地は、通常その成分のすべての同一性及び量に関して完全に規定されており、これは、タンパク質含有培地よりも無比の産生物の一貫性、優れた産生物品質管理特性及びさらに良好な産生物安定性を提供することができる。

10

【0062】

一部の実施形態において、本明細書中で使用される培地は、ガラクトース、フルクトース、n-アセチルマンノサミン、マンノース及びそれらの組み合わせから選択される有効量の糖を含まない。例えば、糖の有効量は、0.01mM、0.05mMまたは0.1mMを超える。

【0063】

一部の実施形態において、本発明は、哺乳動物細胞を培養するための方法を提供し、本方法は、培養で無血清または無タンパク質培地においてタンパク質、例えば、糖タンパク質を産生する哺乳動物細胞を増殖させること含む。本発明の実施に適した細胞としては、タンパク質をグリコシル化することができるあらゆる細胞株、好ましくは、タンパク質を発現するよう遺伝子操作された哺乳動物細胞株が挙げられる。一部の実施形態において、細胞は同種の細胞株である。数々の適した細胞株が当該技術分野において知られている。例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、HeLa、VERO、BHK、Cos、MDCK、293、3T3、骨髄腫（例えば、NSO、NSI）またはWI38細胞が使用されてもよい。例となる実施形態において、本組換え糖タンパク質を産生するために使用される細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。

20

【0064】

本発明の一部の実施形態によると、特に有用な細胞は、CHO細胞であり、これは、組換えタンパク質、例えば、サイトカイン、凝固因子及び抗体の産生に広く使用されている（Braselら、（1996年）、Blood 88：2004～2012；Kaufmanら、（1988年）、J. Biol Chem 263：6352～6362；McKinnonら、（1991年）、J Mol Endocrinol 6：231～239；Woodら、（1990年）、J. Immunol 145：3011～3016）。DXB11またはDG-44などのジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）欠損変異細胞株（Urlaubら（1980年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77：4216～4220）が有用である。それは、効率的にDHFRを選択することができ、増幅することができる遺伝子発現系は、これらの細胞中で高いレベルの組換えタンパク質発現を可能にするためである（Kaufman（1990年）、Meth. Enzymol. 185：527～566）。さらに、これらの細胞は、接着培養または浮遊培養として操作するのが容易であり、比較的良好的な遺伝学的安定性を呈する。CHO細胞及びその中で発現する組換えタンパク質は、広範囲にわたって特徴づけられており、規制当局によって臨床的な商業的製造への使用が認可されている。

30

40

【0065】

一部の実施形態において、細胞は、流加培養様式で増殖させられる。流加培養プロセスは、バイオリアクター中の増殖を高め、高い細胞密度を達成するために培養培地に1つ以上の栄養素（基質）が添加される操作技術と定義される。一般に、制御された様式で栄養素を添加することにより、培養の増殖率及び産生にプラスの効果を与える。一部の実施形態において、バイオリアクターにおいて 10^6 細胞/mL、 10^7 細胞/mL、 2×10^7 細胞/mL、 5×10^7 細胞/mLまたは 10^8 細胞/mLを超える細胞濃度を達成す

50

ることができる。一部の実施形態において、流加培養様式に使用されるバイオリアクターは、少なくとも10 L、20 L、50 L、80 L、100 L、250 L、500 Lまたは1000 Lの容積を有する。細胞は、浮遊培養または接着培養のいずれかで増殖させることができる。例となる実施形態において、懸濁液中で細胞を増殖させる。哺乳動物細胞が好ましく、特定の例となる実施形態において、哺乳動物細胞はチャイニーズハムスター卵巣細胞である。

【0066】

治療的処置

さらに別の態様において、本発明は、状態または障害の処置方法であって、そのような処置を必要とする個体に治療有効量の本明細書に記載される組成物／調製物を投与することを含む、方法を提供する。

10

【0067】

本明細書に記載される組成物／調製物は、単独で、または本明細書に記載の処置方法においてなど、さまざまな目的のための任意の治療用薬剤／組成物とともに使用されてもよい。この点において、この組成物／調製物は、薬学的に許容することができる。

【0068】

一部の実施形態において、処置を必要とする状態または障害は、酵素欠損に関連する。ゴルジ、小胞体及びリソソームなどの細胞内区画における酵素欠損は、多種多様なヒト疾患を引き起こす。例えば、通常、小胞体の内腔にある酵素であるリジルヒドロキシラーゼはコラーゲンの適切なプロセシングに必要とされ、この酵素がないと、重篤な結合組織障害であるエーラス・ダンロス症候群VI型を引き起こす。通常ゴルジに見られるGnT

20

IIはタンパク質の正常なグリコシル化に必要とされ、GnT IIがないと脳発達の欠陥につながる。

【0069】

例となる実施形態において、酵素欠損に関連する状態または障害は、リソソーム蓄積症(LSD)である。リソソームに1つ以上のタンパク質がないことによって、40を超えるリソソーム蓄積症(LSD)が直接的または間接的に引き起こされる。LSDは、スフィンゴ糖脂質、グリコーゲン、ムコ多糖及び糖タンパク質を含むさまざまな基質の異常な代謝から生じる。基質の代謝は、通常リソソーム中で起こり、このプロセスはさまざまな分解酵素によって段階的なプロセスにおいて調整される。したがって、いずれか1つの酵素活性の欠損が、全プロセスを乱し、特定の基質の蓄積をもたらす可能性がある。いくつかのリソソーム蓄積症及び該当する欠損酵素を以下に列挙する：

30

ポンベ病：酸性アルファグルコシダーゼ

ゴーシェ病：酸性ベーターグルコシダーゼまたはグルコセレブロシダーゼ

ファブリー病：アルファガラクトシダーゼA

GM1-ガングリオシドーシス：酸性ベーターガラクトシダーゼ

テイ・サックス病：ベーターヘキソサミニダーゼA

サンドホフ病：ベーターヘキソサミニダーゼB

ニーマン・ピック病：酸性スフィンゴミエリナーゼ

クラッペ病：ガラクトセレブロシダーゼ

40

ファーバー病：酸性セラミダーゼ

異染色性白質ジストロフィー：アシルスルファターゼA

ハーラー・シャイエ病：アルファ-L-イズロニダーゼ

ハンター病：イズロネート-2-スルファターゼ

サンフィリポ病A：ヘパランN-スルファターゼ

サンフィリポ病B：アルファ-N-アセチルグルコサミニダーゼ

サンフィリポ病C：アセチル-COA：アルファグルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ

サンフィリポ病D：N-アセチルグルコサミン-6-スルファートスルファターゼ

モルキオ病A：N-アセチルガラクトサミン-6-スルファートスルファターゼ

50

モルキオ病 B：酸性ベーターガラクトシダーゼ

マロトー・ラミー病：アシルスルファターゼ B

スライ病：ベーターグルクロニダーゼ

アルファマンノース症：酸性アルファーマンノシダーゼ

ベータマンノース症：酸性ベーターマンノシダーゼ

フコシドーシス：酸性アルファ-L-フコシダーゼ

シアリドーシス：シアリダーゼ

シルダー・カンザキ病：アルファ-N-アセチルガラクトサミニダーゼ

【0070】

特定の例となる実施形態において、本発明は、LSDの処置方法であって、そのような処置を必要とする個体に治療有効量の本明細書に記載される組成物／調製物を投与することを含む、方法を提供する。例となる一実施形態において、本組成物／調製物は、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼを含む。例となる別の実施形態において、LSDは、β-グルクロニダーゼの欠損の結果として生じる障害であるムコ多糖症7型（すなわち、MPS7、MPS VIIまたはスライ症候群）である。一部の実施形態において、ヒト組換えβ-グルクロニダーゼは、増加したシアル酸含有量をもち、LSD、例えば、MPS7を処置する際に特に有用である。

10

【0071】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の組成物／調製物の治療計画を施すことを含む、対象の状態または障害を処置するための方法を提供し、この施すことは、状態または障害の処置に統計学的に有意な治療効果をもたらす。一部の実施形態において、対象はヒトである。一部の実施形態において、本組成物／調製物は、増加したシアル酸含有量をもつ組換え糖タンパク質を含む。例となる実施形態において、本組換え糖タンパク質は、組換え糖タンパク質に対して少なくとも0.7mol/molのシアル化含有量を有する。例となる別の実施形態において、本組換え糖タンパク質は、組換え糖タンパク質に対して少なくとも1mol/molのシアル化含有量を有する。一部の実施形態において、状態または障害は、酵素欠損に関連する。例となる実施形態において、酵素欠損に関連する状態または障害は、リソソーム蓄積症（LSD）である。

20

【0072】

したがって、本発明は、本明細書に記載の組成物／調製物の治療計画を施すことを含む、対象におけるリソソーム蓄積症（LSD）を処置するための方法を提供し、この施すことは、LSDの処置に統計学的に有意な治療効果をもたらす。例となる実施形態において、本組成物／調製物は、増加したシアル酸含有量をもつヒト組換えβ-グルクロニダーゼを含む。さらなる例となる実施形態において、LSDは、ムコ多糖症7型（すなわち、MPS7、MPS VIIまたはスライ症候群）である。

30

【0073】

本発明によると、LSDの処置は、あらゆる形態のLSDの処置、例えば、LSDの任意の症状を低減すること、LSDの任意の症状の重症度を低減すること、LSDの1つ以上の症状の期間を短縮すること、LSDと関連する任意の原因若しくは状態を処置若しくは阻害すること、またはLSDの程度若しくは状態の任意の臨床基準若しくは測定値を低減することを含む。

40

【0074】

本発明によると、本発明のヒト組換えβ-グルクロニダーゼは、LSDの処置のための治療計画において投与される。一実施形態において、LSDはMPS7である。そのような治療計画には、1回の投与あたり、1日あたり、2週間あたりの投与量、ならびに処置サイクルあたりの用量の数またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0075】

一般に、本発明のヒト組換えβ-グルクロニダーゼ（rhGUS）は、1kgあたり約0.1mgから20mg、0.2mgから15mg、0.5から12mg、1mgから10mg、1.5mgから8mg、2mgから6mgの用量で投与されてもよい。一部の実

50

施形態において、r h G U S は、1 k g あたり約 0. 1 m g、0. 2 m g、0. 5 m g、1 m g、2 m g、3 m g、4 m g、5 m g、6 m g、7 m g、8 m g、9 m g、1 0 m g、1 1 m g または約 1 2 m g の用量で投与される。例となる実施形態において、r h G U S は、1 k g あたり約 4 m g の用量で投与される。投与量は、それぞれの患者ならびに患者が飲んでいいるその他の薬物の条件に対して調節されてもよい。

【0076】

一部の実施形態において、そのような投与量は、1 時間ごと、毎日、週に 1 回（すなわち、Q W）、2 週間ごと（すなわち、Q O W）または月に 1 回投与される。

【0077】

一部の実施形態において、r h G U S は、時間単位で、約 1 から 2 4 時間、1 から 2 0 時間、1 から 1 6 時間、1 から 1 2 時間、1 から 8 時間、1 から 6 時間、1 から 4 時間、1 から 2 時間ごとまたは毎時間投与される。一部の実施形態において、r h G U S は、約 2、3、4、5 または 6 時間ごとに投与されるか、または約 1 0 分、1 5 分、3 0 分、4 5 分若しくは 6 0 分ごとに投与される。

【0078】

一部の実施形態において、r h G U S は、継続的な注入によって投与されてもよい。一部の実施形態において、r h G U S は、少なくとも約 2、4、6、1 0、1 2 時間以上の処置期間、患者に投与されてもよく、一部の実施形態において、これにより有効性が向上することもある。一部の実施形態において、r h G U S は、1 から 2 4 時間、1 から 2 0 時間、1 から 1 6 時間、1 から 1 2 時間、1 から 1 0 時間、1 から 8 時間、1 から 6 時間、1 から 4 時間から 1 から 2 時間、継続的な注入によって投与される。一部の実施形態において、r h G U S は、約 1 0 分間、1 5 分間、3 0 分間、4 5 分間または 6 0 分間、継続的な注入によって投与される。一部の実施形態において、r h G U S は、約 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、1 0 時間、1 2 時間、2 4 時間以上、継続的な注入によって投与される。例となる実施形態において、r h G U S は、約 4 時間、継続的な注入によって投与される。一部の実施形態において、継続的な注入期間は、非注入期間（すなわち、r h G U S が投与されていない期間）によって切り離される。注入は、任意の適切な手段、例えば、ミニポンプによって行われてもよい。

【0079】

一部の実施形態において、r h G U S は、約 1 から 3 0 日ごと、1 から 2 5 日ごと、1 から 2 0 日ごと、1 から 1 4 日ごと、1 から 1 0 日ごと、1 から 5 日ごとまたは毎日、投与される。

【0080】

一部の実施形態において、r h G U S は、約 1 から 1 2 週間、約 1 から 2 4 週間、約 1 から 3 6 週間、約 1 から 4 8 週間、約 1 から 6 0 週間または約 1 から 7 2 週間、投与される。一部の実施形態において、r h G U S は、約 1 ヶ月、4 ヶ月、8 ヶ月、1 2 ヶ月、1 6 ヶ月、2 0 ヶ月以上投与される。一部の実施形態において、r h G U S は、約 1 年間、2 年間、5 年間、1 0 年間以上投与される。一部の実施形態において、r h G U S は、永続的に投与される（すなわち、長期使用）。

【0081】

r h G U S は、凍結乾燥された形態として提供され、投与に先立って滅菌した（例えば、水性の）希釈液によって再構成されてもよい。r h G U S は、皮下注射、筋肉内注射、静脈注射または注入によって及び経口的になど任意の効果的な経路によって投与されてもよい。特定の例となる実施形態において、r h G U S は、静脈内注入によって投与される。一般に、r h G U S の定期的投薬は、単回用量（例えば、注射）として投与されてもよく、あるいは例えば、継続的な注入若しくは分割用量の繰り返しの注射などによって、または本明細書中で広範囲にわたって記載されるとおり 2 4 時間以下のクールで間隔をあけてもよい。一実施形態において、r h G U S の定期的投薬は、1 回の注射として、または複数回の注射として投与されてもよい。

【0082】

一実施形態において、患者は、LSDの重症度を緩和するために1kgあたり約0.5から12mg（例えば、約1、2、4、8または12mg）の間の用量でおよそ1週おきに（すなわち、QOW）rhGUSの投与を受ける。例となる実施形態において、患者は、1kgあたり約4mgの用量でおよそ1週おきにrhGUSの投与を受ける。本治療計画は、一部の実施形態において、12、24、36、48または60週間または永続的に継続されてもよい（すなわち、長期使用）。

【0083】

本発明によると、本発明の方法に使用されるrhGUSは、単独で若しくはLSDに対する標準治療と組み合わせてのいずれかで、またはLSDに対する標準治療を含む処置計画の一環として投与されてもよい。一部の実施形態において、患者は、rhGUSのそれぞれの注入に先立って予防的な抗ヒスタミン剤が投与されてもよい。別の実施形態において、患者は、rhGUSのそれぞれの注入に先立って解熱薬（例えば、イブプロフェンまたはアセトアミノフェン）が投与されてもよい。

【0084】

本発明の一部の実施形態によると、rhGUSの投与は、統計学的に有意な治療効果をもたらす。一実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、米国若しくはその他の国の1つ以上の規制当局、例えば、FDAが提供する1つ以上の標準または基準に基づいて判定される。別の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、規制当局が認めた臨床試験の計画及び／または手順から得られた結果に基づいて判定される。

【0085】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、無作為化、プラセボ対照、盲検開始単一交差臨床試験計画に基づいて判定される。一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、それぞれが盲検様式で予め定めた異なる時点における異なる処置順序に対応する4群のうちの1つに対象が無作為に選ばれる臨床試験設計からのデータに基づいて判定される。一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、少なくとも4、6、8、10または12名の対象の患者集団のデータに基づいて判定される。例となる実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、12名の対象の患者集団のデータに基づいて判定される。

【0086】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、1週おき（すなわち、QOW）の4mg/kgのrhGUSによる開始処置またはプラセボによる開始処置及び予め定めた異なる時点におけるQOWの4mg/kgのrhGUSへの切り換えのいずれかの4つの処置順序群のうちの1つに1:1:1:1で無作為に選ばれた12名の対象を含む試験に基づいて判定される。一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、4mg/kgのrhGUSまたはプラセボにいずれかをQOWで48週間投与された対象における試験に基づいて判定される。

【0087】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、rhGUSがQOWでおよそ4時間の時間にわたるゆっくりとしたIV注入によって投与される試験に基づいて判定される。一部の実施形態において、患者は、rhGUSのそれぞれの注入に先立って予防的な抗ヒスタミン剤（例えば、セチリジンまたはロラタジン）を予め投薬される。

【0088】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、プライマリーエンドポイントとして尿中グリコサミノグリカン（uGAG）レベルを測定することによって判定される。過去20年にわたってMPS症に対して行われた広範囲な調査により、適度に臨床的な利益を予測する見込みのあるバイオマーカーとしてuGAGレベルの適正を認める重要な関連科学データが提供されている。MPS7の疾患過程及びrhGUSの作用のメカニズムは十分に理解されており、類似の酵素補充療法（ERT）を用いた他の同様のMPS症のデータから、uGAGはMPS症の過程の直接的で病態生理学的に容易に測定されるマーカーであり、uGAGは、MPS症における処置の効果及び臨床的な利益の妥当な予測

因子であることが確認されている。例となる実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、4 mg/kg の rhGUS またはプラセボにより QOW で 48 週間の期間にわたって処置された 12 名の対象が関与する臨床試験における uGAG レベルの測定に基づいて判定される。

【0089】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、多領域の反応指標及び個体の臨床反応の評価などの副次的な有効性基準（すなわち、セカンダリーエンドポイント）を使用して判定される。

【0090】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、多領域の反応指標を使用して判定される。これは、独立した多領域分析同士を組み合わせ、確実に有効性に関する広範な基準を評価することができ、適格な複合エンドポイントを構築しようとする複雑さがない。一部の実施形態において、多領域の反応指標から、MPS7 患者において一般に観察される広範囲の臨床的特徴にわたる rhGUS の有効性の評価を得る。

【0091】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、個体の臨床反応（ICR）を評価することによって判定される。これは、処置に対する各被験者の反応の基準であり、これは、対象／親／世話をする人が報告した事柄、臨床転帰評価を確実に完了する対象の能力及びその個体の機能障害の程度に対する評価基準の関連性に基づいて選択される。ICR の使用は、各対象に対して最も関連性のあると考えられる、前もって指定した個別の臨床転帰の変化を評価し、その後、試験対象母集団に対する全体的な奏効率を判定することによって rhGUS の臨床的な利益の評価を可能にする。一部の実施形態において、副次的な有効性基準（すなわち、セカンダリーエンドポイント）としては、MPS7 の徴候及び対象の日々の生活を最も妨げる症状（すなわち、臨床的な問題評価）に関する処置対象の評価が挙げられる。一部の実施形態において、この評価には、肺の機能の検査、歩行距離の検査、肩屈曲可動域の検査及び微細運動機能の検査が含まれる場合もある。

【0092】

一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、アルファ値が約 0.05、0.04、0.03、0.02 または 0.01 以下のデータに基づいて判定される。一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、信頼区間が 95%、96%、97%、98% または 99% 以上のデータに基づいて判定される。一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、p 値が約 0.05、0.04、0.03、0.02 または 0.01 以下のデータに基づいて判定される。一部の実施形態において、統計学的に有意な治療効果は、本発明によって提供される組成物及び方法の第 III 相臨床試験の例えば、米国の FDA による認可により判定される。

【0093】

一般に、統計分析には、米国若しくは中国またはその他の国の規制当局、例えば、FDA が認めた任意の適した方法が含まれてもよい。一部の実施形態において、統計分析には、非層別分析、ログランク分析、例えば、Kaplan-Meier、Jacobson-Truax、Gulliken-Lord-Novick、Edwards-Nunnally、Hageman-Arrindel 及び階層線形モデル（HLM）ならびに Cox 回帰分析が含まれる。

【0094】

一部の実施形態において、リソソーム蓄積バイオマーカーは、処置の反応を予測する及び／または処置の有効性を判定するために使用することができる。一部の実施形態において、尿中グリコサミノグリカン（uGAG）レベルが測定されてもよく、uGAG レベルの低下は処置のプラスの反応の指標として利用することができる。一部の実施形態において、rhGUS を投与した後に低下する上昇したレベルの uGAG バイオマーカーは、処置の反応を予測するものである。一部の実施形態において、この情報は、rhGUS を使用したリソソーム蓄積症（例えば、MPS7）の処置のための（本明細書に記載の）処置

計画を決定する際に利用することができる。したがって、本発明は、処置計画を決定するための方法を提供し、この方法は、r h G U Sを用いて処置された対象の生物学的サンプル中のL S Dバイオマーカのレベルの低下を検出すること及び生物学的サンプル中の1つ以上の1つ以上のL S Dバイオマーカのレベルの低下に基づいてr h G U Sの処置計画を決定することを含む。一部の実施形態において、L S Dバイオマーカはu G A Gである。一部の実施形態において、低下した、または低減されたレベルのu G A Gは、r h G U Sによる処置の、処置の反応及び／または処置の有効性を示す。一部の実施形態において、所定の標準レベルに対するu G A Gレベルの低下は、r h G U Sを用いた処置の予後がより良好なことを示す。

【実施例】

10

【0095】

実施例1：全シアル酸の産生及び定量化

本発明に従って産生したヒト組換えβ-グルクロニダーゼ(r h G U S)をG U S C R O 1とした。この組換えタンパク質は、バイオリアクター培養系を使用して培養培地に酵素を発現及び分泌するよう操作されたチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞から産生したものである。

【0096】

β-グルクロニダーゼの以前のバッチ(G U Sロット43／44とした)は、同じ細胞株を使用してマイクロキャリアに接着した細胞を連続灌流系において増殖させるプロセスによって産生したものである。一般にウシ胎仔血清(F B S)を含む増殖培地で細胞を増やす。その後、F B Sを洗浄し、加水分解産物を含む培地に交換し、上清を灌流様式で回収した。

20

【0097】

以前に報告された方法とは対照的に、G U S C R O 1を、流加培養様式で懸濁液中において細胞を増殖させる培養系で産生した。別の違いは、以前より使用されている血清含有培地とは対照的に、化学的合成無タンパク質培地でG U S C R O 1を培養したことだけである。

【0098】

R e n t c h l e r B i o t e c h n o l o g i e (R B)の品質管理部門でG U S原薬のリリース試験のために、G U S中の全シアル酸の定量化のための方法が開発された。この方法では、酸加水分解によりr h G U Sグリカン構造からシアル酸残基が遊離する。遊離したシアル酸を、その後、O P D (O-フェニレンジアミン二塩酸塩)で標識し、逆相H P L C分析(R P-H P L C)により分析した。今まで、r h G U Sのロット43／44及び6つのR B産生ロットが全シアル酸に関してR Bにおいて分析された。これらの結果(表1)は、G l y c o S o l u t i o n sで見られた結果と一致している。

30

【0099】

【表 1】

表 1. GUS の全シアル酸分析の結果

ロットGUS	産生方法	シアル酸 (mol/mol GUS 単量体)
ロット 43/44	以前に報告された方法	0.04
PR01	本発明に従う方法	1.0
PR02	本発明に従う方法	0.7
CR01	本発明に従う方法	1.1
GMP1	本発明に従う方法	1.2
GMP2	本発明に従う方法	1.2
GMP3	本発明に従う方法	1.2

10

【0100】

実施例 2：雄 Sprague Dawley ラットにおける薬物動態

20

この実施例では、本発明に従って産生したヒト組換えβ-グルクロニダーゼを、当該技術分野において以前に報告されたとおりに産生されたものと比較した。この試験の目的は、1回の2時間の注入として雄 Sprague Dawley ラットの静脈内に投与したヒト組換えβ-グルクロニダーゼの薬物動態及び組織分布を評価することであった。注入の速度は、第1の時間に全体積の1/3、続いて第2の時間に全体積の2/3とした。患者に使用される投与計画をまねるためにこの投与計画を設計した。

【0101】

材料及び方法

試験物及び注入

この試験には3つの試験物を使用した：非酵素対照として0.9%塩化ナトリウム、GUS CR01及びGUSロット43/44。試験物に関する完全な仕様は表2で確認することができる。

30

【0102】

【表 2】

表 2. 試験物

試験物 1

名称： 注射用 0.9% 塩化ナトリウム、USP（生理的食塩水）

供給者： Baxter Healthcare（マリオン、ノース・カロライナ州）

物理的特性： 透明な液体

識別名／ロット番号： C883827

10

無菌状態： 滅菌

保管条件： 室温

使用期限 2014年4月

試験物 2

名称： GUS CR01

供給者： Ultragenyx Pharmaceutical Inc.（ノバート、カリフォルニア州）

量： 約 32.5 mL

濃度： 2.0 mg/mL

20

GUS 活性 ユニット/mL 10.75 M ユニット/mL

特異的活性 ユニット/mg 5.35 M ユニット/mg

物理的特性： 透明な液体

識別名／ロット番号： CR01

保管条件： 2 から 8℃

使用期限： 未提供

試験物 3

名称： GUS ロット 43/44

供給者： Ultragenyx Pharmaceutical Inc.（ノバート、カリフォルニア州）

30

量： 約 25 mL

濃度： 2.5 mg/mL * (2.18 mg/mL)

GUS 活性 ユニット/mL 11.4 M ユニット/mL

特異的活性 ユニット/mg 5.23 M ユニット/mg

物理的特性： 透明な液体

識別名／ロット番号： 43/44

保管条件： -60 から -80℃

使用期限： 未提供

40

【0103】

これらの試験物を、雄 Sprague-Dawley ラットに 2 つの 1 時間の段階からなる 1 回の注入の間に約 2 mg/Kg 体重の用量で注入した。用量の 3 分の 1 を第 1 の時間にわたって注入し、用量の 3 分の 2 を第 2 の時間の間に注入した（表 3）。

【0104】

【表 3】

表 3. ラット群番号、用量及び注入速度

群 番 号	試験物	性別	n	投 与 経 路	投 与 濃 度 (m g / m L)	投与速度 (m L / 分)	総 用 量 (m g / k g)	実 際 の 用 量* (m g / k g)
1	生 理 的 食 塩 水	雄	5	静 脈 内	n / a	第 1 の 時 間 : 0 . 9 9	n / a	n / a
						第 2 の 時 間 : 1 . 9 8		
2	G U S ロ ッ ト : C R 0 1	雄	5	静 脈 内	0 . 2 0 3	第 1 の 時 間 : 0 . 9 4	約 2 ¹	約 2 ¹
						第 2 の 時 間 : 1 . 8 7		
3	G U S ロ ッ ト : 4 3 / 4 4	雄	5	静 脈 内	0 . 2 5 3	第 1 の 時 間 : 0 . 7 8	約 2 ¹	約 1 . 7 ¹
						第 2 の 時 間 : 1 . 5 7		

¹ 用量は、各群の 5 匹すべてのラットの平均体重に基づくものとした。

* G U S ロット 4 3 / 4 4 に関する用量は、もともと B C A アッセイによって測定された 2 . 5 m g / m l のタンパク質値に基づくものとした。タンパク質濃度が O D 2 8 0 の吸光度及び 2 . 1 2 の吸光係数に基づく場合、実際の用量は $8 4 . 8 \% \times 2 = 1 . 7 \text{ m g / k g}$ であった。

【 0 1 0 5 】

処置前ならびにその後、表 4 で概要を示すスケジュールによるゆっくりとした注入、急速な注入及び注入後の段階の過程の各期間に各ラットから血液サンプルを採取した。血液を凝固させた、血清を分離し、 -80°C で凍結保存し、分析のための出荷待ちにドライアイスで冷した。

【 0 1 0 6 】

10

20

30

【表 4】

表 4. 注入及び採血スケジュール

段階	名目上の期間
	投与前
ゆっくりとした注入	注入開始後 2 分
	注入開始後 1 0 分
	注入開始後 3 0 分
	注入開始後 6 0 分
急速な注入	注入開始後 1 2 0 分
注入後	2 分 (注入の終了後)
	1 0 分 (注入の終了後)
	3 0 分 (注入の終了後)
	6 0 分 (注入の終了後)
	1 2 0 分 (注入の終了後)
	2 4 0 分 (注入の終了後)
	4 8 0 分 (注入の終了後)
	2 4 時間 (注入の終了後)

10

20

【0107】

血清中の GUS 活性

β -グルクロニダーゼ活性を以下のとおりに測定した：0.1 M の酢酸ナトリウム中で 1 : 4 から 1 : 300 に希釈した 25 μ L の血清、pH 4.8 及び 1 mg/mL の結晶 BSA を、0.1 M の酢酸ナトリウム中の 50 μ L の 10 mM の 4-MU- β -D-グルクロニド基質、pH 4.8、1 mg/mL の結晶 BSA と混合した。すべての溶液を、予め 37 $^{\circ}$ C に温め、混合し、その後、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。アッセイを 200 μ L のグリシンカーボネート、pH 10.5 を添加することによって停止させ、366 / 446 nm の励起 / 蛍光波長で Molecular Devices M2^e プレートリーダーにより読み取った。活性は、37 $^{\circ}$ C における 1 ユニット = 1 nmol e 遊離 4 MU / mL / hr として表わした。

30

【0108】

組織中の GUS 活性

組織を剖検で採取し、クライオバイアルに入れ、液体窒素中で瞬間凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保管し、分析のための出荷待ちにドライアイスで冷した。組織中の GUS 活性の分布を以下のとおりに評価した。全部または一部の組織試料を解凍し、10 から 20 倍容量の 25 mM Tris、140 mM NaCl、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、pH 7.2 と混合した。Kinematica Polytron ホモジナイザーを 30 秒間、氷上で使用して組織ホモジネートを調製し、得られたホモジネートを、一旦、凍結 / 解凍して (-80 $^{\circ}$ C)、その後、氷で冷却しながら 20 秒間、超音波処理した。各ホモジネートの 25 μ L の全量を、前に記載したとおり 4 MU- β -グルクロニドを使用して β -グルクロニダーゼに関してアッセイした。ホモジネートのタンパク質濃度を、ビシンコニン酸法によって測定した。組織中 β -グルクロニダーゼレベルを、加水分解された 4 MU / hr / mg タンパク質の nmol e として表わした。

40

【0109】

結果及び考察

50

血漿中におけるGUS CR01対GUSロット43/44の薬物動態

図1は、ゆっくりとした注入段階、急速な注入段階及び注入後段階の間の各注入群のラットの血清中の β -グルクロニダーゼ活性を示している。生理的食塩水のみを注入した群1に関する曲線は、これらのラットの血清中に存在している低い内在性レベルのラット β -グルクロニダーゼを示している。酵素を注入したラットの他の2つのプロットの値から内在性レベルを差し引いた。

【0110】

GUS CR01及びGUSロット43/44の両方のプロットは、酵素活性レベルの経時的な増加を示しており、これは、ゆっくりとした注入期間の終了により定常状態レベルに達し、その後、急速な注入期間の開始に伴って再び増加する。しかしながら、対照的に、GUS CR01は、GUSロット43/44と比較してゆっくりとした注入の終わりに2倍高く、急速な注入期間の終わりに3倍高い血清中レベルに達している。一般にリソソーム酵素の特徴である注入後の両酵素の血清からの急速なクリアランスが止まることも図1からわかる。

【0111】

図2では、両酵素に関する注入後のクリアランス段階を示し、それから $t_{1/2}$ 値を算出した。GUSロット43/44は、4.50分の第1の段階の $t_{1/2}$ で血液循環から除去される。対照的に、GUS CR01は、わずかにゆっくりと5.30分の $t_{1/2}$ で除去される。 $t_{1/2}$ 値を再び算出するために未処理クリアランスデータを異なる方法によって分析した(図4A及びB)。Cmax(GUS CR01の14800対GUSロット43/44の4300)及びAUC-t(18700対5580)も、GUSが3倍高いことを示している(表5)。第2の段階のみを考慮するよう非常に異なる仕方でも $t_{1/2}$ を算出した。GUS CR01に関する第2の段階の $t_{1/2}$ は1.1時間であり、GUSロット43/44に関しては0.967時間である(表5)。

【0112】

【表5】

表5.

群	動物	Cmax (ユニット/ mL)	Tmax (時間)	AUC-t (時間×ユニ ット/mL)	AUC- ∞ (時間×ユニ ット/mL)	半減期 (時間)	クリアランス (分×ユニット/mL) /(mg/kg)	Vz (ユニット/mL) /(mg/kg)
Grp 26-10 CR01	2-6	12900	0	15300	15500	2.05	2.19E-06	0.000389
	2-7	14200	0	16900	16900	9.794	2.01E-06	0.000138
	2-8	14200	0	18300	18400	0.326	1.84E-06	0.000146
	2-9	16700	0	22800	23600	1.03	1.47E-06	0.000132
	2-10	16000	0	20300	20300	0.67	1.66E-06	9.65E-05
	平均	14800	0	18700	18800	1.1	1.84E-06	0.000181
	CV%	10.4		15.7	15.7	50.5	15.3	65.4
	幾何平均	14800		18500	18600	1.01	1.82E-06	0.000159
Grp 311-1543/44	3-11	4640	0	5380	5380	0.577	6.26E-06	0.000367
	3-12	7010	0.03	6940	6950	0.832	4.84E-06	0.000349
	3-13	4870	0	6220	6250	1.02	5.38E-06	0.000476
	3-14	2740	0.03	5420	5430	1.39	6.20E-06	0.000747
	3-15	2270	0	3970	3980	0.913	8.45E-06	0.000568
	平均	4300	0.0133	5580	5600	0.967	6.23E-06	0.000521
	CV%	44	136.9	19.9	19.8	27.8	22.1	34.4
	幾何平均	3970		5490	5510	0.939	6.11E-06	0.000497

【0113】

GUS CR01対GUSロット43/44の組織分布

2つの酵素のクリアランスに加えて、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、脳及び肺におけるGUS

Sロット43／44と比較したGUS CRO1の組織分布を評価した。これらの組織のそれぞれから調製した組織抽出物を、 β -グルクロニダーゼ及びタンパク質に関して方法に記載されているとおりアッセイした。このアッセイの結果を、 β -グルクロニダーゼ活性のユニット／mg組織タンパク質として表した。これらのアッセイの概要は、図4からわかる。この図のそれぞれのグラフでは、内在性ラット β -グルクロニダーゼを含む全酵素レベルが左側に示されている。それぞれのグラフの右側では、全酵素レベルから平均内在性酵素レベルを差し引いてある。各組織の平均内在性 β -グルクロニダーゼレベルは、生理的食塩水を注入した群1の5匹すべてのラットからの値を使用して算出した。

【0114】

GUS CRO1またはGUSロット43／44のいずれかを注入したラットの各組織におけるGUSのレベルは、生理的食塩水を注入したラットよりも高い。内在性GUSレベルを差し引くと、GUS CRO1を注入したラットは、GUSロット43／44を注入したラットよりも少なくとも2倍を超えて高いGUSレベルを含むことが明白になる。

【0115】

この試験は、GUS CRO1及びGUSロット43／44の β -グルクロニダーゼの薬物動態及び組織分布特性を評価するために設計した。本研究は、GUSロット43／44に関する4.50分のより速い $t_{1/2}$ と比較して、GUS CRO1が血液循環から5.30分の第1の段階の $t_{1/2}$ で除去されることを確認した。第2の段階の $t_{1/2}$ もGUS CRO1に関してやや大きい。

【0116】

Cmax、AUC-t及び組織分布に関して、2つの酵素間におけるさらに顕著な差が証明された。GUS CRO1に関する2時間の注入期間の終わりの血清中の β -グルクロニダーゼ活性の最高濃度(Cmax)は14,829ユニット／mlであり、GUSロット43／44によって達成された3537ユニット／mlの濃度の4.2倍であった。Cmaxのこの増加は、注入期間の間、ゆっくりとなくなる酵素が血液中で高い濃度にまで蓄積されることによって説明することができた。図1に示されるとおり、GUSロット43／44に対してGUS CRO1のAUC-tも極めて増加した(3倍超)。

【0117】

最後になるが重要でないということではなく、試験したすべての組織において、GUS CRO1は、GUSロット43／44のレベルよりも最大2倍以上のレベルで組織に送達されたことが観察された。リソソーム酵素の血液循環からのクリアランス特性の変化が組織分布に影響を与えることはわかっている。血液循環中のGUS CRO1の $t_{1/2}$ を遅くすると、選択した組織へのさらに効率的な酵素の分布を可能にするであろうことが予想される。さらに重要なことに、組織分布の変化は、Cmax及びAUC-tの変化と非常によく相関するようである。図3からわかるように、エラーバーは非常に大きい。これは、各研究群の個々のラットで得られる値の幅が大きいことを反映している。選択した組織に対する3回の繰り返しの β -グルクロニダーゼアッセイにより、これらのラットに見られる値の幅が広いのは本当であると考えに至った元の値が確認された。

【0118】

以前に、GUS CRO1の分析は、マンノース6リン酸のレベル及び大半の他の特性は2つの酵素間で非常に似ているが、GUS CRO1のシアル酸含有量はGUSロット43／44のシアル酸含有量の28倍であることを示していた(1.1mol/mol GUS単量体対0.04mol/mol GUS単量体)。表6参照。

【0119】

10

20

30

40

【表 6】

表 6. GUS CR01及びGUSロット43/44の特徴

特徴／アッセイ	単位	G U S C R 0 1	G U S ロ ット 4 3 ／ 4 4	G M P 1	G M P 2	G M P 3 *
力価	m g / L	約 4 0 0	約 5 0	約 4 0 0	約 4 0 0	約 4 0 0
p H	- l o g [H ⁺]	7. 4	7. 5	7. 4	7. 6	6. 0
純度（還元 S D S - P A G E）	%	9 9. 2	> 9 5. 0	9 9. 2	9 8. 8	9 9. 3
四量体（S E - H P L C）	%	9 7. 7	9 9. 0	9 8. 4	9 8. 6	9 9. 1
分子量 四量体	ダルトン	2 9 0, 2 4 9	3 0 0, 0 0 0	3 0 0, 0 0 0	3 0 0, 0 0 0	3 0 0, 0 0 0
質量消散係 数	(m g / m L) - ¹ c m ⁻¹	2. 0 8	---	2. 0	2. 0	2. 1
電荷不均一 性（I E F）	p H 範囲	同等	6. 6 ~ 7. 7	同等	同等	同等
M 6 P N ー グリカン 分析 （ピーク 1 5 ~ 1 7 の 合計）	m o l - %	1 4. 2	同等	1 4	1 4	1 2
シアル酸含 有量	(m o l e s / m o l e 単 量体)	1. 1	0. 0 4	1. 2	1. 2	1. 2
特異的活性	(M U / m g)	3. 6	3. 7 0	3. 9	3. 7	3. 5
細胞取り込 み	K 取り込 み n M	1. 2 ~ 1. 7	1. 4	1. 8	1. 6	1. 4
M P S 7 線 維芽細胞に おける半減	日数 0 ~ 2 1 日 5 ~	2 0. 0 2 1. 6	1 8. 9 2 0. 5	NA	NA	NA

10

20

30

40

期	21日					
---	-----	--	--	--	--	--

*単糖分析は、GMP3 GUSのガラクトース残基の71%がシアル化されていることを示した。

【0120】

10

こうしたデータを合わせると、血管の内壁にある内皮細胞に位置するマンノースレセプターによる血液循環からの糖タンパク質のクリアランスをシアル酸が遅くすることは周知であるため、ここで示されたGUS CR01のより良好な組織分布がそのシアル酸含有量の増加によるものであることが非常に明白になる。高いシアル酸レベルと高い親和性のマンノースー6ーリン酸部分の組み合わせは、高いシアル酸含有量のために他の炭水化物レセプターを介した組織取り込みを低減し、確実に血液循環中の濃度を高くし、その結果、高い親和性のマンノースー6ーリン酸レベルによる標的とする組織における非常に良好な組織取り込みを達成するための最適な組み合わせを提供する。

【0121】

20

実施例3：酵素補充療法を使用したMPS VIIの処置

この実施例の目的は、36週間の臨床試験において、組換えで産生したヒトβーグルクロニダーゼ（rhGUS）を使用したムコ多糖症VII型（すなわち、MPS VII；スライ症候群）に対する酵素補充療法がリソソーム蓄積を低減することを実証することである。

【0122】

この実施例では、MPS VIIと診断された3名の対象にシアル酸含有量が高いrhGUSを投与した。投薬は、以下の36週間のスケジュールに従って実施した：

週1～12：2mg/kg 1週間おき；
週13～20：1mg/kg 1週間おき；
週21～28：4mg/kg 1週間おき；及び
週29～36：2mg/kg 1週間おき。

30

【0123】

rhGUSの安全性及び有効性を、36週間の処置スケジュールの間評価した。rhGUS化合物は、安全で、十分に許容されるようであった。重要なことに、36週まで重篤な有害事象は観察されず、3名の対象にいずれにも薬物関連反応または注入に伴う過敏性反応はなかった。

【0124】

有効性を評価するために、GAGのリソソーム蓄積がGUS欠損の特徴であるため、グリコサミノグリカン（GAG）の尿中及び血清レベルをまず評価した。急速で持続した用量依存的な尿中グリコサミノグリカン（uGAG）の低下がrhGUSを用いて処置した対象で観察された。図4参照。各投薬期間の終わりのuGAGの平均低下を図5に示す。これは、4mg/kg用量のuGAGレベルの低下が最も大きかったことを示している。

40

【0125】

rhGUSを用いて処置した3名すべての対象において血清グリコサミノグリカン（GAG）の累進的な低下も見られた。特に、各対象は、36週間の処置スケジュールの終わりに血清GAGレベルが少なくとも25%低下した。図6参照。

【0126】

最後に、MPS VIIに苦しむ患者には肝臓の大きさの増大が頻繁に観察されるため、rhGUSを用いて処置した対象の肝臓の大きさを評価した。36週間の処置プロトコールの結果として肝腫大が著しく低減された。図7参照。

50

【0127】

別に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術及び科学用語は、本出願が属する分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で示されるものと同様若しくは同等のあらゆる方法及び材料を、本出願の実務または試験に使用することができるが、代表的な方法及び材料を本明細書に記載している。

【0128】

本発明をその特定の実施形態に関連して記載してきたが、当然のことながら、それはさらに改変することができ、本出願は、全般的に本発明の原理に従い、本発明が属する分野の既知または従来の実務内にあり、本明細書の前に記載された必須の特徴に適用されてもよく、添付の特許請求の範囲に従う本開示からのそのような発展を含む本発明のあらゆる変形、使用または適応を範囲に含むことが意図される。

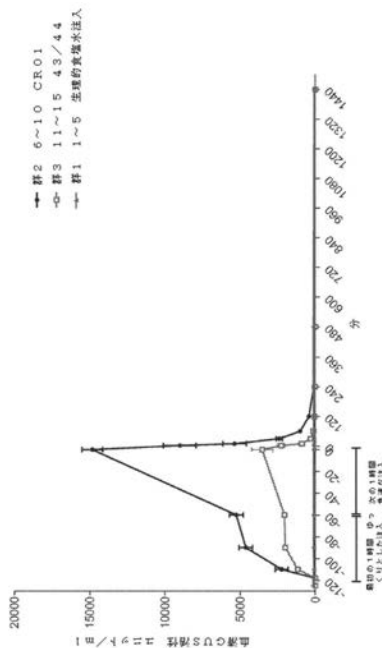
10

【0129】

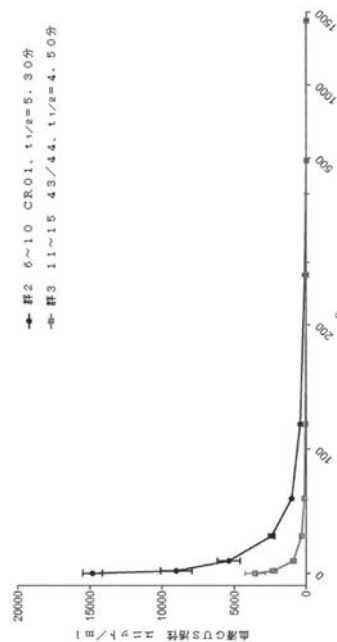
本明細書中で引用したそれぞれ及びすべての特許、特許出願及び刊行物の請求項、図面及び／または図を含む開示は、これらの内容全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする。引用文献と本明細書との間に何らかの矛盾がある場合は、本明細書が統制するものとする。本出願の実施形態を記載する際、明確にするために特定の術語を利用している。ただし、本発明は、そのように選択された特定の術語に限定されることを意図しない。本明細書中の何も本発明の範囲を限定するものと見なされるべきではない。示したすべての例は、代表的なものであり、限定されるものではない。上記の教示を考慮して当業者が理解するとおり、上記の実施形態は、本発明から逸脱することなく改変または変更することができる。

20

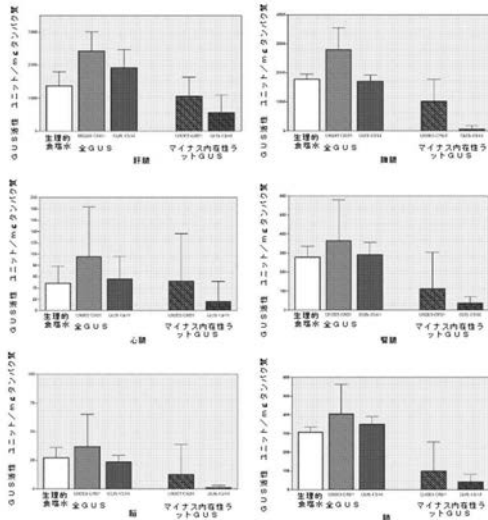
【図1】



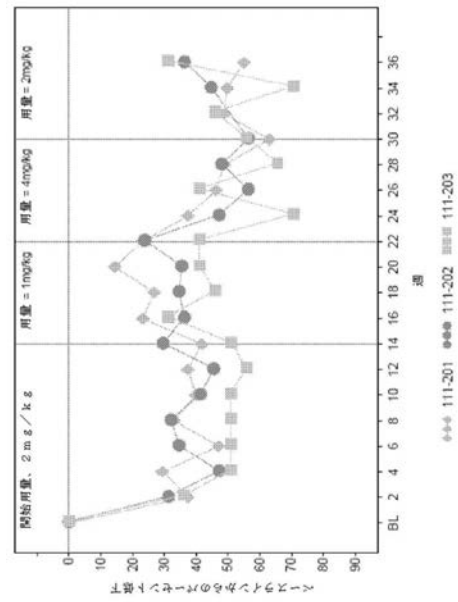
【図2】



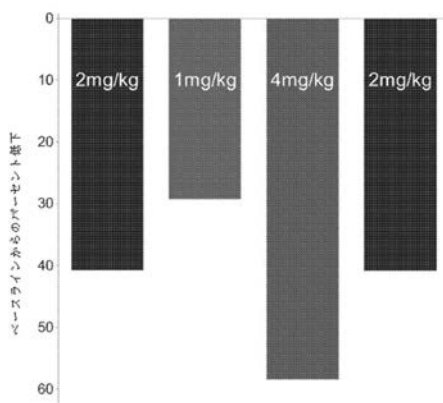
【図 3】



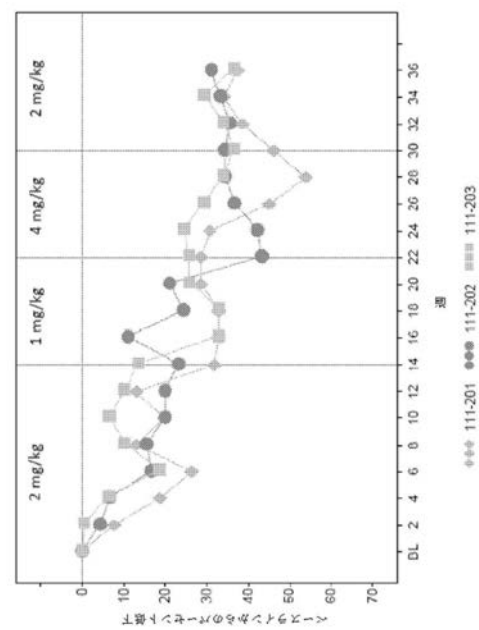
【図 4】



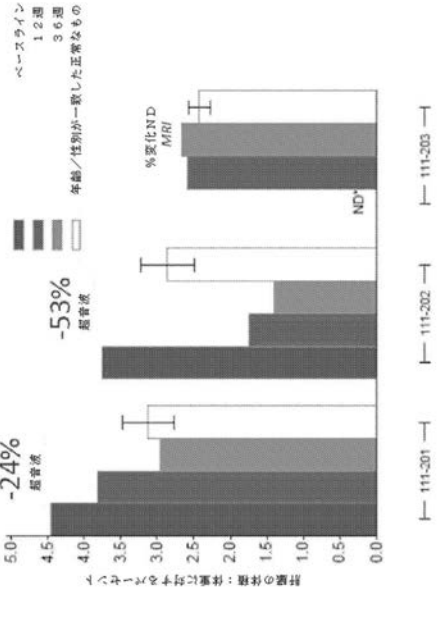
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

2017508455000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/18859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/7012; C12N 15/09 (2015.01) CPC - A61K 31/7012, 38/00; C12N 15/09; C12Y 302/01031 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 31/7012; C12N 15/09 (2015.01) CPC: A61K 31/7012, 38/00; C12N 15/09; C12Y 302/01031; C12P 21/005 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar, EBSCO, PubMed; glycoprotein, 'beta-glucuronidase,' 'N-acetylneuraminic,' 'Neu5ac,' glycan, sialylation, 'sialic acid,' 'M6P,' 'mannose 6 phosphate,' 'mucopolysaccharidosis type 7'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, K et al. A Biochemical And Pharmacological Comparison Of Enzyme Replacement Therapies For The Glycolipid Storage Disorder Fabry Disease. Glycobiology. 2003. Vol. 13, No. 4; pages 305-313; abstract. DOI: 10.1093/glycob/cwg034.	1-4, 6, 8, 10, 12-24
Y	VOLGER, C et al. Overcoming The Blood-Brain Barrier With High-Dose Enzyme Replacement Therapy In Murine Mucopolysaccharidosis VII. PNAS. 11 October 2005. Vol. 102, No. 41; pages 14777-14782. abstract.	1-24
Y	US 2011/0280856 A1 (SELDEN, RF et al.) November 17, 2011; abstract	5-9, 11
Y	SANDO, G N et al. Recognition And Receptor-Mediated Uptake Of A Lysosomal Enzyme, Alpha-L-Iduronidase, By Cultured Human Fibroblasts. November 1977, Vol. 12, No. 3; pages 619-627. MEDLINE. Web. Accessed on 08 May 2015.	4, 9
Y	BEUVERY, EC et al. Animal Cell Technology : Developments Towards The 21st Century. n.p.: Kluwer Acad. Press, 1995. Bibliotheksverbund Bayern. Web. 08 May 2015.	10, 11
A	LAWTON, A. Endocrinologic & Metabolic Drugs Advisory Committee Meeting Fabrazyme (agalsidase beta) Powerpoint. 13 January 2003. Accessed Online <http://www.fda.gov/ohrtms/dockets/ac/03/slides/391751_01_Genzyme.ppt>.	1-24
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 May 2015 (14.05.2015)		Date of mailing of the international search report 25 JUN 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/18859

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 25-27
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100145920
弁理士 森川 聡

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(72)発明者 ジャングルス スティーブン
アメリカ国 カリフォルニア 94949 ナヴァト レヴェロニコート60 ウルトラジェニクス
ファーマシューティカル インク. 気付

(72)発明者 モリス ガブリエル
アメリカ国 カリフォルニア 94949 ナヴァト レヴェロニコート60 ウルトラジェニクス
ファーマシューティカル インク. 気付

(72)発明者 グラブ ジェフ
アメリカ国 カリフォルニア 94949 ナヴァト レヴェロニコート60 ウルトラジェニクス
ファーマシューティカル インク. 気付

(72)発明者 ヴェラード ミカエル
アメリカ国 カリフォルニア 94949 ナヴァト レヴェロニコート60 ウルトラジェニクス
ファーマシューティカル インク. 気付

(72)発明者 カッキス エミル ディー.
アメリカ国 カリフォルニア 94949 ナヴァト レヴェロニコート60 ウルトラジェニクス
ファーマシューティカル インク. 気付

Fターム(参考) 4B050 CC04 DD11 EE02 LL01

4B064 AG01 CA19 CD30 DA01

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA34 BA44 CA53 DC22

MA66 NA05 NA12 NA14 ZC191 ZC192 ZC211 ZC212