

(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2008-542399

(P2008-542399A)

(43) 公表日 平成20年11月27日(2008.11.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/08 (2006.01)	A 6 1 P 7/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-514966 (P2008-514966)	(71) 出願人	503210245
(86) (22) 出願日	平成18年6月5日 (2006.6.5)		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20年2月4日 (2008.2.4)		A f f y m a x , I n c .
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/021845		アメリカ合衆国、94304 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02006/133144		ニア州、パロ・アルト、ミランダ・アベニ
(87) 国際公開日	平成18年12月14日 (2006.12.14)		ュ、4001
(31) 優先権主張番号	60/687,655	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成17年6月3日 (2005.6.3)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			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】 エリスロポエチンレセプターペプチドの処方および使用

(57) 【要約】

本発明は、エリスロポエチンレセプター (EPO-R) のアゴニストであるペプチド化合物に関する。本発明はまた、不十分な、または欠陥のある赤血球産生に関連する障害を治療するための、そのようなペプチド化合物を使用した治療方法に関する。本発明のペプチド化合物を含む医薬組成物および用量も提供される。

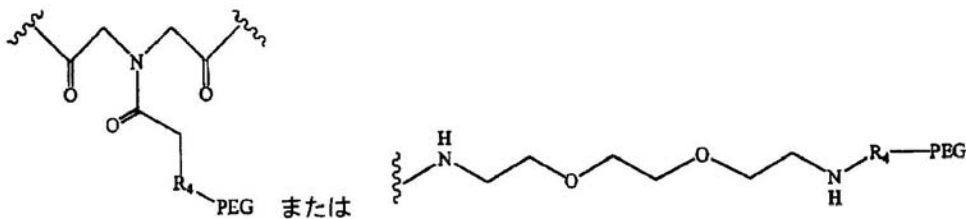
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エリスロポエチンレセプター（EPO-R）に結合して活性化する治療上有効量の化合物を患者に投与することを含む、エリスロポエチンの欠乏または少ないもしくは欠陥のある赤血球集団によって特徴づけられる障害を有する患者を治療する方法であって、ここで、前記治療上有効量は、患者の体重 1 kg 当たり前記化合物 0.025～0.5mg の用量であり、ここで、前記化合物は、

- (a) 第 1 ペプチドモノマーおよび第 2 ペプチドモノマーを含み、ここで、前記第 1 および第 2 ペプチドモノマーはアミノ酸配列 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR を含む、ペプチドダイマー部分と；
- (b) 前記ペプチドモノマーを共有結合するリンカー部分と；
- (c) 10,000～60,000 ダルトンの分子量を有する直鎖状で分岐していないポリ（エチレングリコール）（PEG）を含む PEG 部分と；
- (d) 前記 PEG 部分を前記リンカー部分に共有結合させ、以下の式を有するスペーサー部分であって、

【化 1】



ここで、 R_4 は NH、NHCO、CO、COO および NHC(O)O から成る群から選択されるものを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記アミノ酸配列が、(MeG)、K または (MeG)K を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アミノ酸配列が (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アミノ酸配列が (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記アミノ酸配列が (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記スペーサーがイミノ二酢酸リンカーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記スペーサーが原子 10 個 -PEG(2,2'-(エチレンジオキシ(ビス(エチルアミン)))である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記リンカーがリジンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 PEG が 10,000～60,000 ダルトンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 PEG が 20,000～40,000 ダルトンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法が、薬学的に許容可能なキャリアを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記障害が腎不全または透析である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記治療上有効量が、患者の体重 1 kg 当たり前記化合物 0.025～0.2mg の用量である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記用量が、患者の体重 1 kg 当たり前記化合物 0.05～0.1mg である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記障害が悪性腫瘍に関連した貧血症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記治療上有効量が、患者の体重 1 kg 当たり前記化合物 0.075～0.5mg の用量である、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記用量が、患者の体重 1 kg 当たり前記化合物 0.2～0.4mg である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

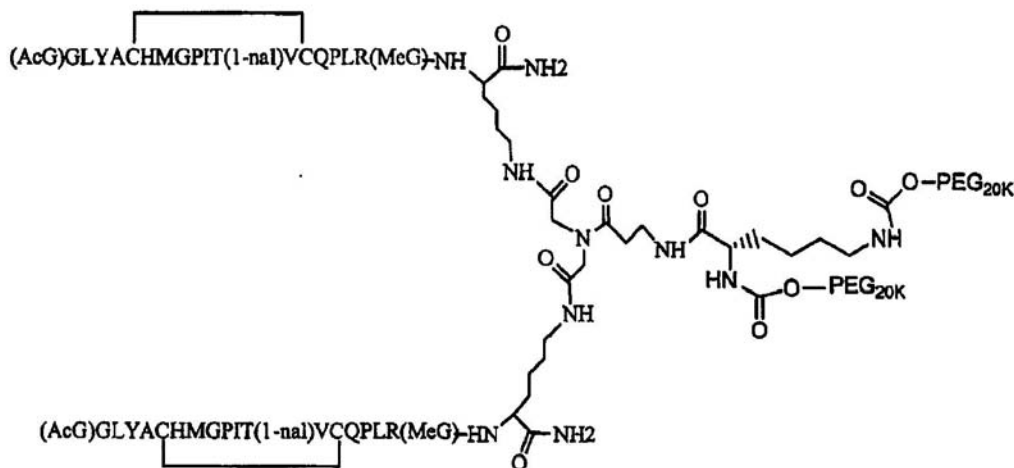
前記治療上有効量が 3～4 週間に 1 回投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記化合物が以下：

【化 2】

20



30

である、請求項 1、2、5、6、8－18 のうちのいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

2005年6月3日に出願した米国仮出願番号60/687,655に対して優先権を主張する。この優先出願の内容は、その全体を引用することによって、本開示の一部となす。

【0002】

(発明の分野)

40

本発明は、エリスロポエチンレセプター (EPO-R) のアゴニストであるペプチド化合物に関する。本発明はまた、不十分な、または欠陥のある赤血球産生に関連する障害を治療するための、そのようなペプチド化合物を使用した治療方法に関する。本発明のペプチド化合物を含む医薬組成物も提供される。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

エリスロポエチン (EPO) は、165個のアミノ酸からなる糖タンパク質ホルモンであり、約34キロダルトン (kD) の分子量を有し、好ましい糖鎖付加部位は、第24位、第38位、第83位および第126位である。はじめに、23個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを有す

50

る前駆タンパク質として産生される。EPOは3つの型、すなわち α 型、 β 型およびアシアロ型において存在し得る。 α 型と β 型では、糖鎖成分がわずかに異なるが、効力、生物活性、および分子量は等しい。アシアロ型は、 α 型または β 型から末端糖鎖（シアル酸）が除去されたものである。EPOをコードする複数のDNA配列が報告されている（米国特許第4,703,008号（Lin）参照）。

【0004】

EPOは、赤血球前駆細胞の有糸分裂および分化を促進し、それによって赤血球が確実に産生される。EPOは、低酸素状態が広がったときに腎臓で産生される。EPOに誘導される赤血球前駆細胞の分化の間、グロビン合成が誘導され、ヘム複合体の合成が促進され、フェリチンレセプターの数が増加する。これらの変化によって、細胞が、より多くの鉄分を取り込み、機能的なヘモグロビンを合成することが可能となり、機能的なヘモグロビンは、成熟赤血球内において酸素と結合する。このようにして、赤血球とその中のヘモグロビンは、体に酸素を供給する上で重要な役割を果たす。これらの変化は、EPOと、赤血球前駆細胞の細胞表面上の適切なレセプターとの相互作用によって開始される（例えば、Grab erおよびKrantz (1978) Ann. Rev. Med. 29. 51-66参照）。

【0005】

体が健康な状態にある場合、EPOは血漿内において非常に低い濃度で存在し、組織は、既存の多数の赤血球から十分な酸化を受ける。この正常な低濃度は、普通に老化によって失われた赤血球の交代を刺激するのに十分である。

【0006】

血液の循環において血液細胞による酸素の移送が減少する場合、低酸素条件下で血液の循環におけるEPOの量は増加する。低酸素症は、例えば、出血による実質的な血液の喪失、過度の放射線照射による赤血球の破壊、高い標高または長期の意識不明を原因とする酸素摂取の減少、あるいは種々の形態の貧血によって引き起こされる場合がある。このような低酸素ストレスに応じて、EPOのレベルが高まり、赤血球前駆細胞の増殖を刺激することによって赤血球の産生が増加する。正常な組織の酸素需要量のために必要とされるよりも多くの赤血球が血液を循環する場合、循環内のEPOのレベルは下げられる。

【0007】

EPOは赤血球形成の過程において必須であるので、このホルモンは、少ないまたは欠陥のある赤血球産生によって特徴づけられる血液の障害の診断および治療の両方において潜在的に有用な用途がある。最近の研究は、種々の病状、障害、および血液学的に不規則な状態のためのEPO療法の有効性の予測の基礎を提供しており、それらには以下のものが含まれる：ベータサラセミア（Vedovato, et al. (1984) Acta. Haematol. 71:211-213参照）；嚢胞性線維症（Vichinsky, et al. (1984) J. Pediatric 105:15-21参照）；妊娠および月経不順（Cotes, et al. (1993) Brit. J. Obstet. Gynaecol. 90:304-311参照）；早期の未熟児貧血（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）；老化（Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med. 103:574-580および581-588並びにLipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509参照）；異常な赤血球生成を伴う種々の腫瘍性の病状（Dainiak, et al. (1983) Cancer 5:1101-1106およびSchwartz, et al. (1983) Otolaryngol. 109:269-272参照）；および腎不全（Eschbach, et al. (1987) N. Eng. J. Med. 316:73-78参照）。

【0008】

精製された均質のEPOは特徴づけされている（米国特許第4,677,195号（Hewick））。EPOをコードするDNA配列を精製し、クローニングし、発現させて天然のEPOと同じ生化学的、免疫学的特性を有する組み換えポリペプチドを生成した。天然のEPOのものと同一のオリゴ糖を有する組み換えEPO分子も生成されている（Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:12059-12076参照）。

【0009】

EPOの生物学的効果は、部分的に、細胞膜に結合したレセプターとの相互作用に媒介されるようである。初期の研究では、マウスの脾臓から単離した未成熟な赤血球系細胞を使用しており、EPO結合細胞表面タンパク質は、それぞれ約85,000および100,000ダルトンの分子量を有する2つのポリペプチドを含むことを示唆した (Sawyer, et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694)。EPO結合部位の数を数えたところ、細胞表面当たり平均で約800~1000個であった。これら結合部位のうち約300個は、約90pM (ピコモル) の K_d でEPOに結合した一方で、残りは、低下した親和性の約570pMでEPOに結合した (Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562)。フレンド白血病ウイルスの貧血性の株 (FVA) を注射したマウスから調製したEPO反応性の脾臓の赤芽球が、全部で約400個の高および低親和性EPO結合部位を有し、その K_d 値がそれぞれ約100pMおよび800pMであることを、ある独自の研究が示唆した (Landschulz, et al (1989) Blood 73:1476-1486)。

10

【0010】

それに続く研究では、2種類の形態のEPOレセプター (EPO-R) が単一の遺伝子によりコードされることを示した。この遺伝子はクローニングされている (例えばJones, et al. (1990) Blood 76, 31-35; Noguchi, et al (1991) Blood 78:2548-2556; およびMaouche, et al. (1991) Blood 78:2557-2563参照)。マウスおよびヒトEPO-Rタンパク質のDNA配列およびコードされたペプチド配列は、例えばD'Andreaらの国際公開第W090/08822号に記載されている。現在のモデルは、EPOがEPO-Rに結合する結果2つのEPO-R分子の二量体化および活性化が起こり、その結果、続いてシグナル変換のステップに進むことを示唆している (例えばWatowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144参照)。

20

【0011】

EPO-Rのクローニングされた遺伝子を利用できることは、この重要なレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストの調査を促進する。組み換えレセプタータンパク質を利用することにより、種々のランダムおよびセミランダムなペプチドの多様性を生成するシステムにおいて、レセプターとリガンドの相互作用を研究することが可能となる。これらのシステムは以下のものを含む: 「プラスミド上のペプチド」システム (米国特許第6,270,170号に記載); 「ファージ上のペプチド」システム (米国特許第5,432,018号およびCwirila, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382に記載); 「コードされた合成ライブラリ」 (ESL) システム (1992年9月16日出願の米国特許出願番号946,239号に記載); および「超大規模固定化ポリマー合成」システム (米国特許第5,143,854号; 国際公開第W090/15070号; Fodor, et al. (1991) Science 251:767-773; DowerおよびFodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180; および米国特許第5,424,186号に記載)。

30

【0012】

EPO-Rと少なくともある程度相互作用するペプチドは識別されており、例えば以下の文献に記載されている: Wrightonらの米国特許第5,773,569号、第5,830,851号および第5,986,047号; Wrightonらの国際公開第W096/40749号; JohnsonおよびZivinの米国特許第5,767,078号および国際公開第W096/40772号; Baluの国際公開第W001/38342号; およびSmith-Swintoskyらの国際公開第W001/91780号。特に、あるペプチドモチーフを含有するペプチドのグループが識別されており、そのメンバーは、EPO-Rに結合し、EPO依存型の細胞増殖を刺激する。しかし、モチーフを含有する今日までに識別されているペプチドは、EPO依存型の細胞増殖をインビトロで刺激し、EC50値は約20~250ナノモル (nM) である。従って、EPOに刺激される細胞増殖の最大値の50%を刺激するために、20~250nMのペプチド濃度が必要である。EPOレセプターに結合する更にその他のペプチドおよびその構成体が、以下の文献に記載されている: 2003年5月12日出願された米国仮出願番号60/470,244、60/470,245および60/469,993; 2004年11月11日出願された米国仮出願番号60/627,432および60/627,433; 2004年5月12日出願された米国非仮出願番号10/844,968; および2004年5月12日出願された国際出願番号PCT/US2004/14886およびPCT/US2004/014889 (それぞれ国際公開第W02004/101611号および国際公開第W02004/101606号として公開)。これらの出

40

50

願のそれぞれは、その全体を引用することによって、本明細書の一部となす。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

EPO-Rアゴニストの計り知れない潜在力を考えると、このレセプターに媒介される重要な生物学的活性の研究に関しても、病気の治療に関しても、強化された効力および活性を有するペプチドEPO-Rアゴニストの識別に対するニーズが依然としてある。本発明は、そのような化合物を提供する。

【0014】

このセクション中および明細書全体を通じての引例についての引用および／または考察は、単に本発明に関する記述を明確にするために提供したものであって、そのような引例のいずれかが本発明の「先行技術」とであると認めるものではない。

【課題を解決するための手段】

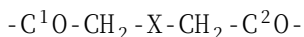
【0015】

(発明の要旨)

本発明は、劇的に強化された効力および活性を有するEPO-Rアゴニストである新規の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、またはアミノ酸配列(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、アミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)(配列番号3)を有するペプチドモノマーのホモダイマーであり、ここで、各アミノ酸は標準的な一文字の略記によって示す。「(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-メチルグリシンであってサルコシンとしても知られている。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おける分子内ジスルフィド結合を含有する。

【0016】

ペプチドモノマーは、分岐している第3級アミドリinkerに共有結合されることによって二量化されてよい。第3級アミドリinkerは、



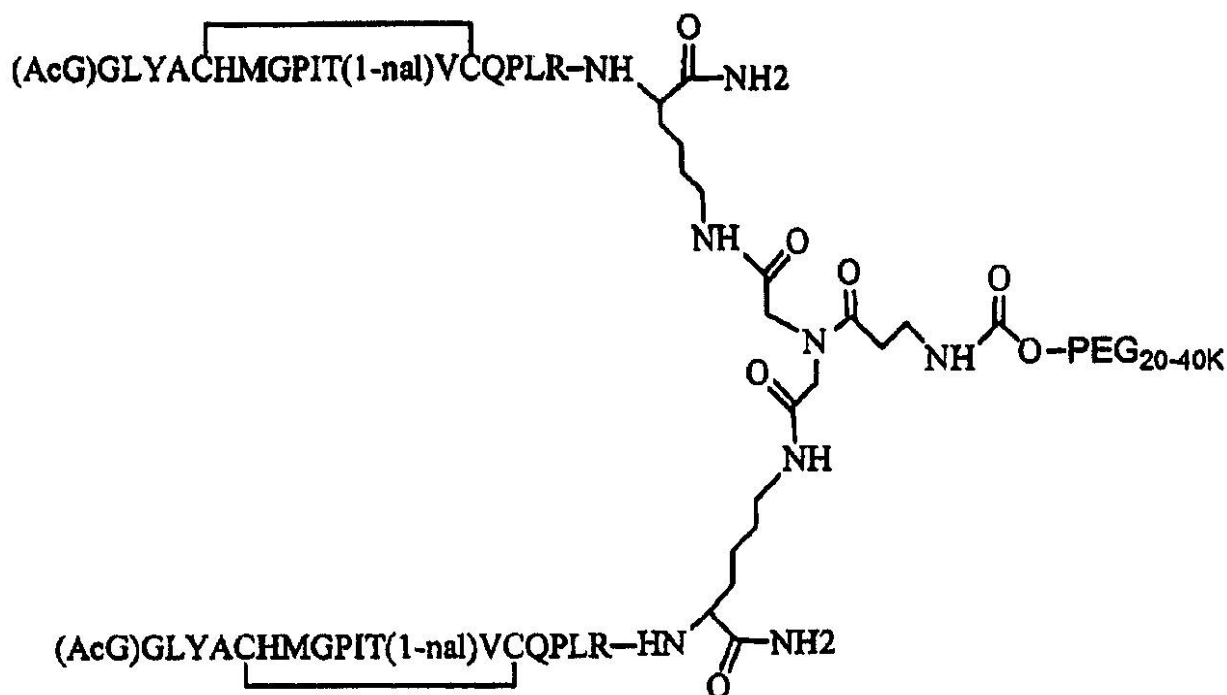
と表すことができ：

ここで、Xは $NCO-(CH_2)_2-N^1H-$ 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εアミノ基と共に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εアミノ基と共にアミド結合を形成し；Xの N^1 は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合し、ここで、PEGの分子量は約20,000~40,000ダルトンである(用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す)。

【0017】

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^1 がカルバメート結合を通じて活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 3】



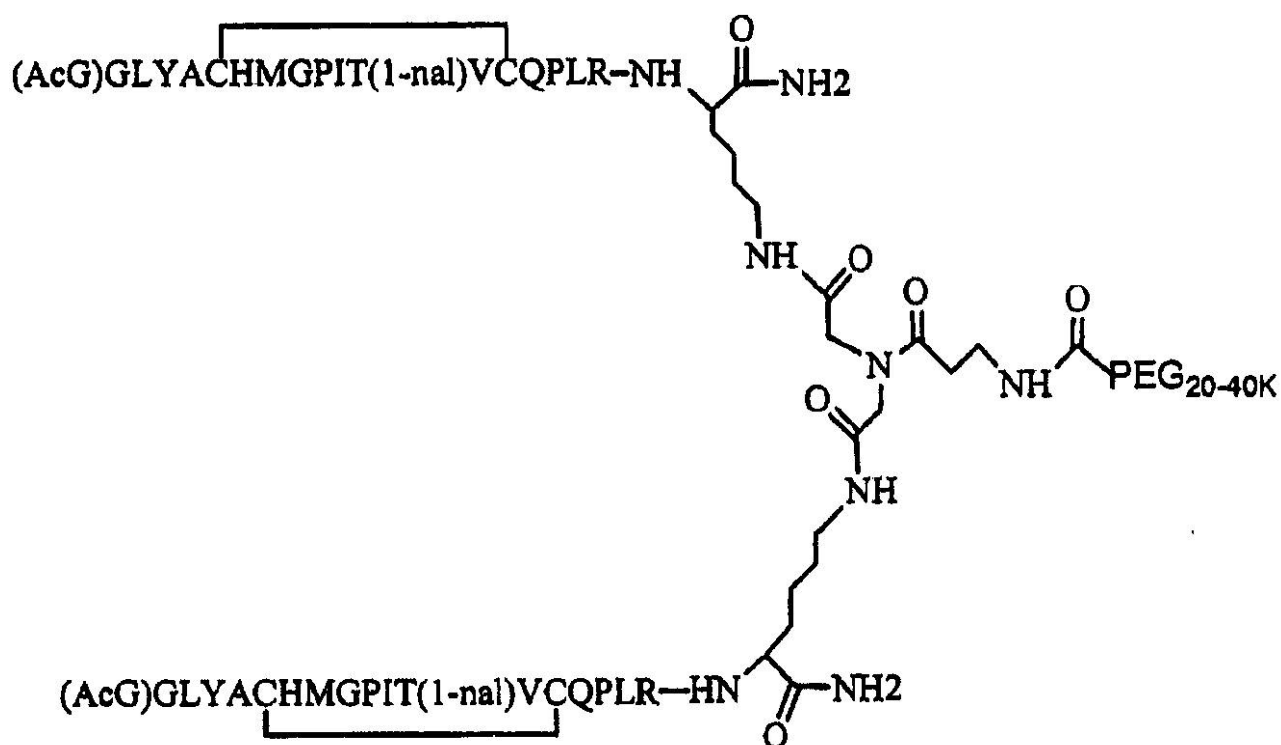
10

20

【0018】

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N¹がアミド結合を通じて活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 4】



30

40

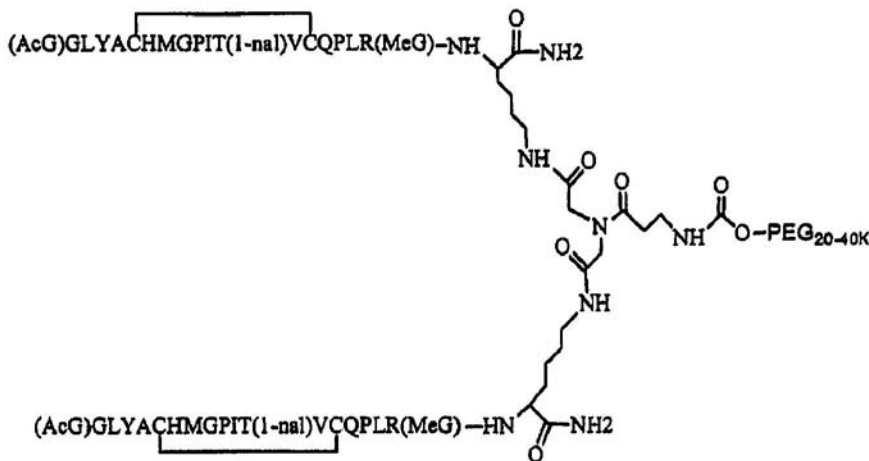
【0019】

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N¹がカルバメート結合を通じて活性化ポリエチレングリコール(PEG)部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すこと

50

ができる：

【化 5】



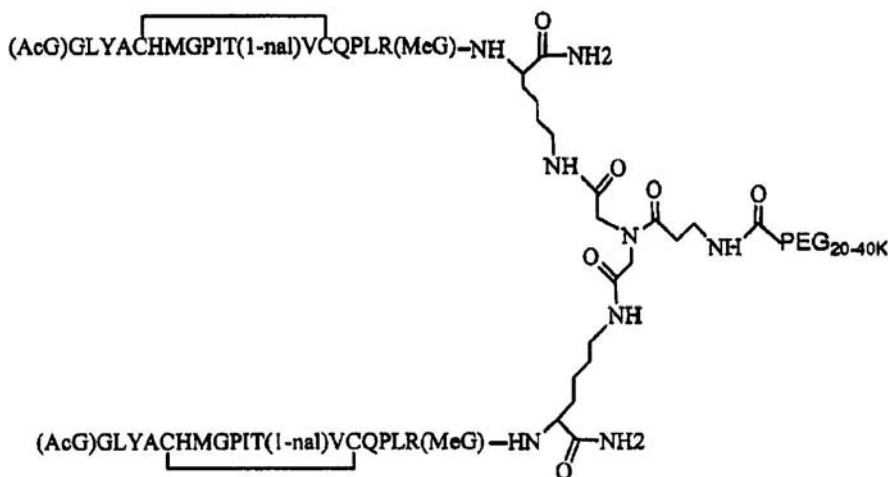
10

【 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)VCQPLR(MeG)K (配列番号 2) を有し、リンカーの N¹ がアミド結合を通じて活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

20

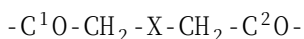
【化 6】



30

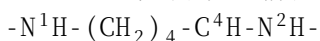
【 0 0 2 1 】

ペプチドモノマーは、分岐している第 3 級アミドリンカーに共有結合されることによって二量化されてもよい。第 3 級アミドリンカーは、



と表すことができ：

ここで、X は $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$ であり；リンカーの C¹ は、第 1 ペプチドモノマーの C 末端リジン残基の ε アミノ基と共にアミド結合を形成し；リンカーの C² は、第 2 ペプチドモノマーの C 末端リジン残基の ε アミノ基と共にアミド結合を形成する。本発明のペプチドダイマーは、以下の構造：



を有するスペーサー部分を更に含み：

ここで、スペーサーの C⁴ は、X の C³ に共有結合し；スペーサーの N¹ は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に共有結合し；スペーサーの N² は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて活性化 PEG 部分に共有結合し、ここで、PEG の分子量は約 10,000～50,000 ダルトンである（用語「約」とは、PEG の調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す

40

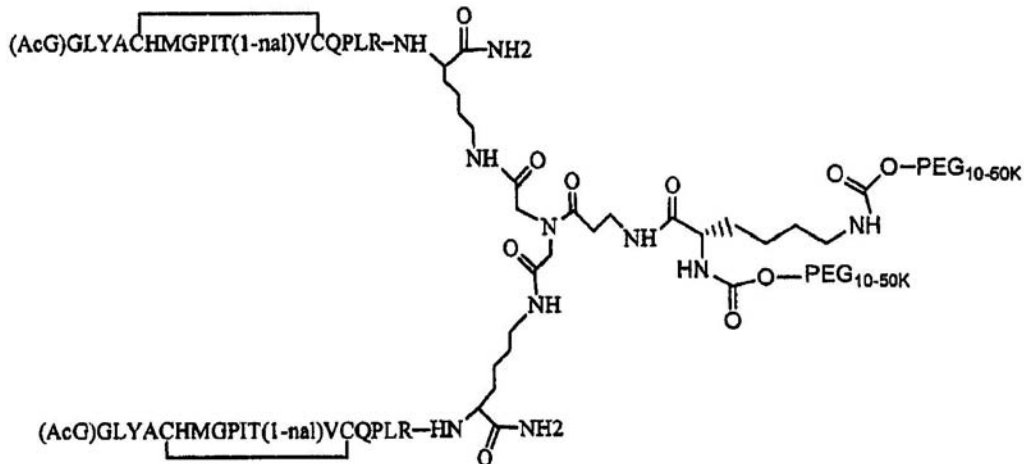
50

）。各PEG部分は、それぞれ10,000ダルトン(10kD)、20kD、30kD、40kDまたは50kDであってよい。

【0022】

ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLRK(配列番号1)を有し、スパーサーのN¹とN²の両方がカルバメート結合を通じて活性化PEG部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

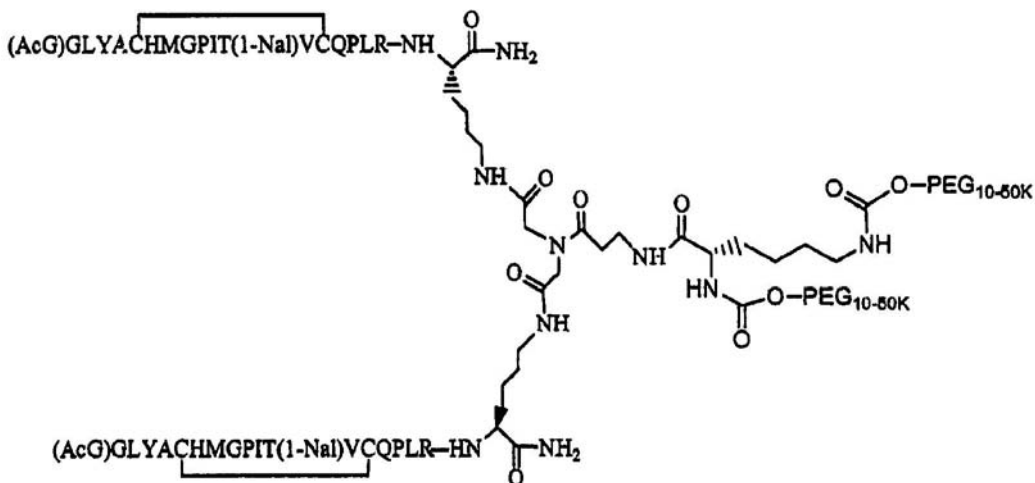
【化7】



【0023】

好ましい実施形態において、2つのペプチドモノマーのC末端リジンはL-リジンである。また、当業者は上記の化学式から理解するであろうが、2つの直鎖状のPEG部分はリジンによって結合され(例えばmPEG₂-Lys-NHSまたはmPEG₂-リシノール-NPCとして)、このリジンもまた好ましくはL-リジンであり、以下の立体化学を生み出す。

【化8】



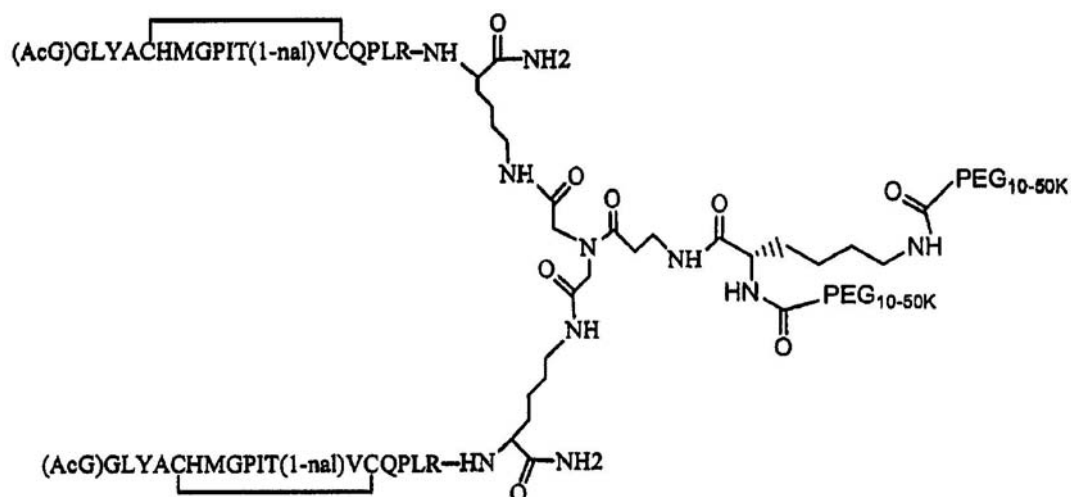
【0024】

あるいは、1つ以上のリジン残基がD-リジンであってもよく、代替の立体化学を生み出すが、当業者はこれを容易に理解するであろう。

【0025】

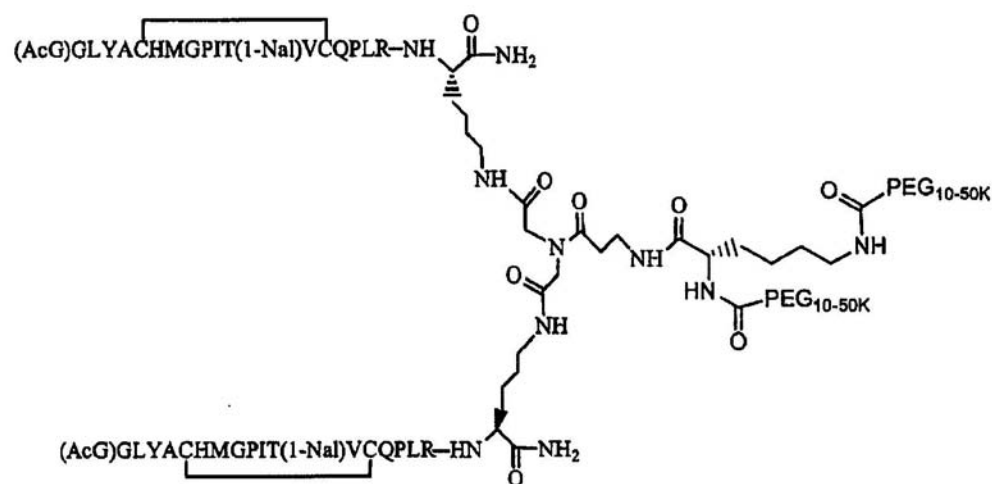
ホモダイマーの各モノマーがアミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLRK(配列番号1)を有し、スパーサーのN¹とN²の両方がアミド結合を通じて活性化PEG部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

10



20

30



【 0 0 2 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、スペーサーのN¹とN²の両方がカルバメート結合を通じて活性化PEG部分に共有結合し、ここで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以下のように示すことができる：

10

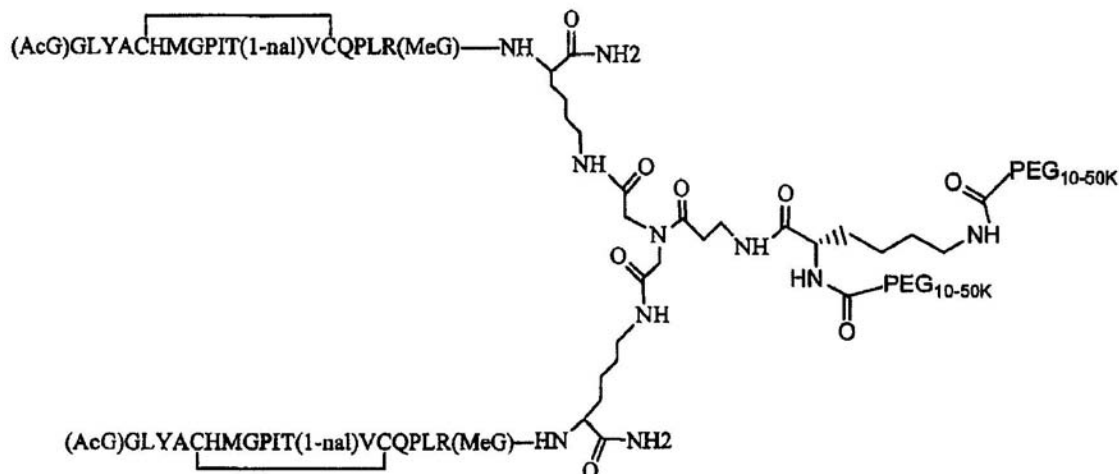


30

あるいは、1つ以上のリジン残基がD-リジンであってもよく、代替の立体化学を生み出すが、当業者はこれを容易に理解するであろう。

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、スパーサーのN¹とN²の両方がアミド結合を通じて活性化PEG部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

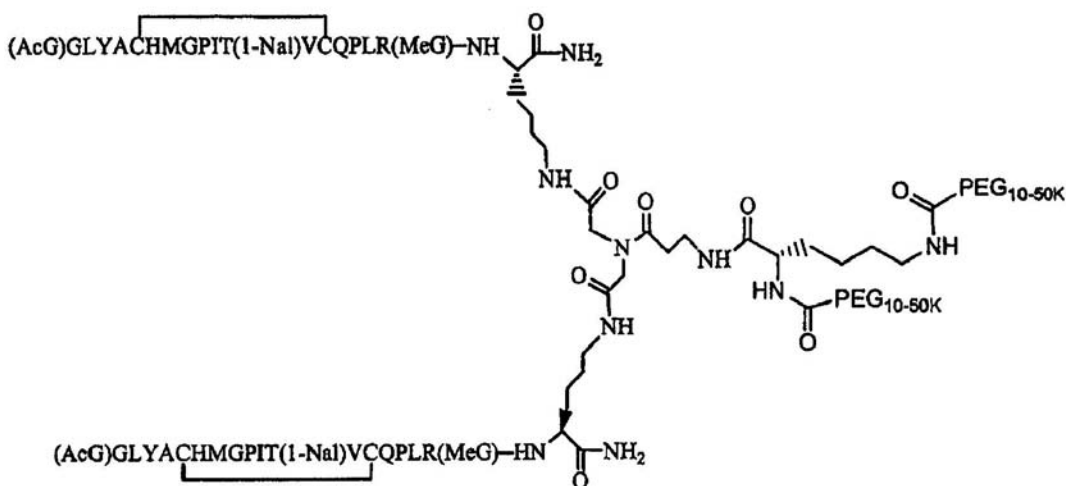
【化 1 3】



10

好ましくは、この分子のペプチドモノマーと直鎖状のPEG部分とを結合するリジン残基は、全てL-リジンであり、以下の立体化学を生み出す。

【化 1 4】



20

30

その他の実施形態において、1つ以上のリジン残基がD-リジンであってもよく、代替の立体化学を生み出すが、当業者はこれを容易に理解するであろう。

【0029】

ペプチドモノマーはまた、リジンリンカーへの結合によって二量化することができ、それによって、第1ペプチドモノマーはそのC末端においてリジンのεアミノ基に結合され、第2ペプチドモノマーはそのC末端においてリジンのαアミノ基に結合される。

【0030】

本発明のペプチドダイマーは、以下の構造：



を有するスペーサー部分を更に含む。

一方の端部において、スペーサーのN¹は、アミド結合を通じてリジンリンカーのカルボニル炭素に結合する。反対側の端部において、スペーサーのN²は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合し、ここで、PEGの分子量は約20,000～40,000ダルトンである（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。

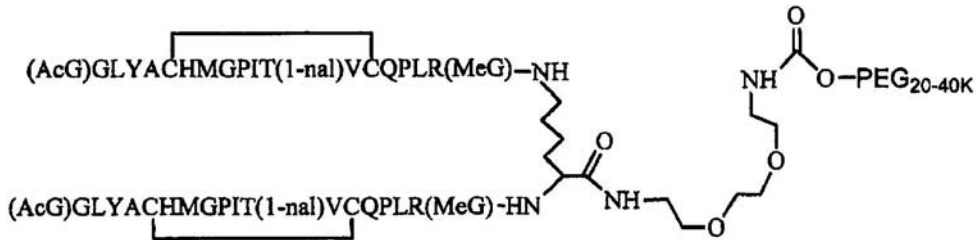
【0031】

スペーサーが、カルバメート結合を通じて活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物（配列番号3）は以下のように示すことができる：

40

50

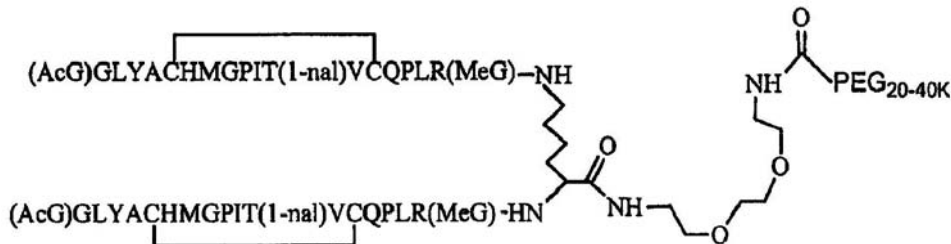
【化 1 5】



【 0 0 3 2】

スパーサーが、アミド結合を通じて活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物（配列番号 3）は以下のように示すことができる：

【化 1 6】



【 0 0 3 3】

本発明は、このようなペプチド化合物を使用して種々の病状を治療する方法を更に提供する。方法は、治療上有効量の上記化合物のうちの 1 つを患者に投与することによって、エリスロポエチンの欠乏または少ないもしくは欠陥のある赤血球集団によって特徴づけられる障害を有する患者を治療することを含む。ある実施形態において、障害は以下のものである：末期腎不全または透析；AIDS、自己免疫疾患または悪性腫瘍に関連した貧血；ベータサラセミア；嚢胞性線維症；早期の未熟児貧血；慢性炎症性疾患に関連した貧血；脊髄損傷；急性失血；老化；あるいは異常な赤血球生成を伴う種々の腫瘍性の病状。更に、ある実施形態において、障害は腎不全または透析であり、治療上有効量は、患者の体重 1 kg 当たり化合物 0.025～0.2mg の用量である。その他の実施形態において、障害は腎不全または透析であり、治療上有効量は、患者の体重 1 kg 当たり化合物 0.05～0.1mg の用量である。ある実施形態において、障害は悪性腫瘍に関連した貧血であり、治療上有効量は、患者の体重 1 kg 当たり化合物 0.075～0.5mg の用量である。その他の実施形態において、障害は悪性腫瘍に関連した貧血であり、治療上有効量は、患者の体重 1 kg 当たり化合物 0.2～0.4mg の用量である。治療上有効量は、3～4 週間に 1 回投与できる。

【 0 0 3 4】

本発明は、このようなペプチド化合物で構成される医薬組成物を更に提供する。ある実施形態において、PEG の分子量は約 20,000 ダルトンである。その他の実施形態において、医薬組成物は、上記化合物のうちのいずれか 1 つおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 5】

（発明の詳細な説明）

定義：

ペプチドにおけるアミノ酸残基は、以下のように略記する：フェニルアラニンは Phe または F；ロイシンは Leu または L；イソロイシンは Ile または I；メチオニンは Met または M；バリンは Val または V；セリンは Ser または S；プロリンは Pro または P；トレオニンは Thr または T；アラニンは Ala または A；チロシンは Tyr または Y；ヒスチジンは His または H；グルタミンは Gln または Q；アスパラギンは Asn または N；リジンは Lys または K；アスパラギン酸は Asp または D；グルタミン酸は Glu または E；システインは Cys または C；トリプトファンは

10

20

30

40

50

TrpまたはW；アルギニン(Arg)またはR；グリシン(Gly)またはG。ペプチドにおける非従来型のアミノ酸は以下のように略記する：1-ナフチルアラニンは1-nalまたはNp、N-メチルグリシン（サルコシンとしても知られる）はMeGまたはSc；アセチル化グリシン（N-アセチルグリシン）はAcG。

【0036】

本明細書において、用語「ポリペプチド」または「タンパク質」とは、アミド結合を通じて共に結合するαアミノ酸であるアミノ酸モノマーからなるポリマーのことを言う。従って、ポリペプチドの長さは少なくとも2アミノ酸残基長であり、通常はより長い。一般的に、用語「ペプチド」とは、長さが2～3アミノ酸残基長しかないポリペプチドのことを言う。本発明の新規のEPO-Rアゴニストペプチドの長さは、好ましくは約50アミノ酸残基長しかない。より好ましくは、約17～40アミノ酸残基長である。ペプチドとは対照的に、ポリペプチドは、任意の数のアミノ酸残基を含んでいて良い。従って、用語「ポリペプチド」は、ペプチドと共により長い配列を有するアミノ酸をも含む。

【0037】

本明細書において、フレーズ「薬学的に許容可能な」とは、「一般的に安全と考えられる」（例えば、ヒトに投与したときに、生理学的に許容でき、異常亢進、めまい等のアレルギー反応または類似の有害反応を典型的に起こさない）分子の実体および組成物のことを言う。好ましくは、本明細書において、用語「薬学的に許容可能な」とは、動物、特にヒトにおける使用について、連邦政府または州政府の規制機関が許可している、あるいは、米国薬局方またはその他の一般的に承認された薬局方においてリストアップされていることを意味する。用語「キャリア」とは、化合物が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルのことを言う。このような薬学的キャリアは、石油、動物、植物、または合成由来のものを含む水および油等の殺菌した液体であって良い（例えばピーナツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油等）。水または水溶液、食塩水、水性デキストロース溶液および水性グリセロール溶液が、特に注射可能な溶液用のキャリアとして好ましく用いられる。適切な薬学的キャリアは、E. W. Martin著「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

【0038】

本明細書において、用語「アゴニスト」とは、相補的な生物学的に活性のレセプターに結合し、レセプターにおける生物学的反応を引き起こすため、またはレセプターの既存の生物学的活性を高めるために生物学的に活性のレセプターを活性化する、生物学的に活性のリガンドのことを言う。

【0039】

EPO-Rアゴニストである新規ペプチド

本発明は、劇的に強化された効力および活性を有するEPO-Rアゴニストである新規の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、またはアミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K(配列番号2)を有するペプチドモノマーのホモダイマーであり、ここで、各アミノ酸は標準的な一文字の略記によって示す。「(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-メチルグリシンであってサルコシンとしても知られている。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おける分子内ジスルフィド結合を含有する。このようなモノマーは、以下のように図式的に示すことができる：

【化17】

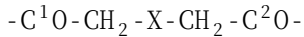
(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK または (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK ; および (配列番号1)

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K または (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (配列番号2)

【0040】

これらの単量体ペプチドは、二量化されて、強化されたEPO-Rアゴニスト活性を有する

ペプチドダイマーを提供する。リンカー (L_k) 部分は、分岐鎖の第3級アミドであり、各モノマーのC末端リジン残基への同時結合によって、2つのペプチドモノマーのC末端を架橋する。第3級アミドリリンカーは、

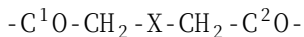


と表すことができ：

ここで、Xは $NCO-(CH_2)_2-N^1H-$ 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 ϵ アミノ基と共に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 ϵ アミノ基と共にアミド結合を形成し；Xの N^1 は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合し、ここで、PEGの分子量は約20,000～40,000ダルトンである（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。 10

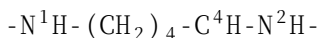
【0041】

第3級アミドリリンカーは、



と表すことができ：

ここで、Xは $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$ 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 ϵ アミノ基と共に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 ϵ アミノ基と共にアミド結合を形成する。本発明のペプチドダイマーは、以下の構造：



を有するスペーサー部分を更に含み：

ここで、スペーサーの C^4 は、Xの C^3 に共有結合し；スペーサーの N^1 は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、活性化PEG部分に共有結合し；スペーサーの N^2 は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて活性化PEG部分に共有結合し、ここで、PEGの分子量は約10,000～60,000ダルトンである（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。 20

【0042】

従って、本発明の新規ペプチドは、PEG部分も含有することができ、PEG部分は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、ペプチドダイマーの第3級アミドリリンカーに共有結合する。PEGは、薬学的に許容可能な水溶性ポリマーである。本発明において使用するためのPEGは、約20キロダルトン (20K) ～約60Kの分子量を有する直鎖状で分岐していないPEGであってよい（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。最も好ましくは、PEGの分子量は約30K～40Kである。当業者は、以下についての考慮に基づいて、所望のポリマーサイズを選択することができるであろう：所望の用量；循環する時間；タンパク質分解への耐性；もしあれば、生物学的活性に対する効果；取り扱い易さ；抗原性の程度または欠如；および治療用ペプチドに対するその他に知られているPEGの効果。 30

【0043】

本発明のペプチド、ペプチドダイマーおよびその他のペプチドベースの分子は、水溶性ポリマーを分子のレセプター結合部分に結合させる（例えばペプチド＋スペーサー）種々の化学反応のうちのいずれかを使用して、水溶性ポリマー（例えばPEG）に結合させることができる。典型的な実施形態は、水溶性ポリマーとレセプター結合部分の共有結合のために単一の結合点を用いるが、別の実施形態では、複数の結合点を使用することができる。これには更なるバリエーションが含まれ、ここで、異なる種類の水溶性ポリマーが、異なる結合点においてレセプター結合部分に結合する。これには、スペーサーおよび／または一方もしくは両方のペプチド鎖への共有結合点が含まれていて良い。いくつかの実施形態において、ダイマーまたはより高次のマルチマーは、異なる種類のペプチド鎖（すなわちヘテロダイマーまたはその他のヘテロマルチマー）を含むであろう。一例を挙げると（これに限定されるものではない）、ダイマーは、PEG結合点を有する第1ペプチド鎖を含んでいて良く、第2ペプチド鎖は、PEG結合点を欠いているか、または第1ペプチド鎖と 40 50

異なる結合の化学反応を利用して良く、また、いくつかのバリエーションにおいて、スパーサーは、PEG結合点を含有するか、または欠いていて良く、該スパーサーは、PEG化されている場合、第1および／または第2ペプチド鎖のものと異なる結合の化学反応を利用して良い。別の実施形態は、レセプター結合部分のスパーサー部分に結合するPEGと、分子のペプチド部分のアミノ酸の1つの側鎖に結合する異なる水溶性ポリマー（例えば炭水化物）とを用いる。

【0044】

レセプター結合部分のPEG化（ペプチド＋スパーサー）には、幅広い種類のポリエチレングリコール（PEG）が使用できる。実質的に任意の適切な反応性PEG試薬が使用できる。好ましい実施形態において、反応性PEG試薬は、レセプター結合部分に結合してカルバメート結合またはアミド結合を形成することになる。適切な反応性PEGの種類は、日油株式会社（150-6019 東京都渋谷区恵比寿4-20-3 恵比寿ガーデンプレイスタワー）の薬物送達システムカタログ（2003）、およびNektar Therapeutics社（35806 アラバマ州ハンツビル ディスカバリードライブ490）の分子工学カタログ（2003）に掲載され市販されているものを含むがこれらに限定されない。例を挙げると（これらに限定されるものではない）、以下のPEG試薬が、種々の実施形態において多くの場合に好ましい：mPEG2-NHS；mPEG2-ALD；マルチ-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、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL）；PEGアクリレート（ACRL-PEG-NHS）；PEG-リン脂質（例えばmPEG-DSPE）；当業者が選択した、化学反応によって活性化グリセリンベースのPEGのGLシリーズを含むSUNBRITEシリーズの分岐したPEG；SUNBRITE活性化PEGのいずれか（カルボキシル-PEG、p-NP-PEG、Tresyl-PEG、アルデヒドPEG、アセタール-PEG、アミノ-PEG、チオール-PEG、マレイミド-PEG、ヒドロキシル-PEG-アミン、アミノ-PEG-COOH、ヒドロキシル-PEG-アルデヒド、カルボン酸無水物タイプ-PEG、官能化されたPEG-リン脂質を含むがこれらに限定されない）；および特定の適用および用法向けに当業者が選択したその他の類似のおよび／または適切な反応性PEG。

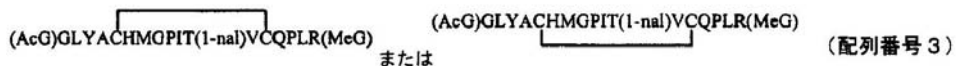
【0045】

本発明の新規ペプチドは、カルバメート結合またはアミド結合を通じてスパーサー部分に共有結合する2つのPEG部分をも含有していて良く、ここで、スパーサー部分は、ペプチドダイマーの第3級アミドリinkerに共有結合する。本発明のこのような実施形態において使用される2つのPEG部分のそれぞれは、直鎖状であって良く、単一の結合点で共に結合されて良い。各PEG部分の分子量は、好ましくは約10キロダルトン（10K）～60Kである（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。直鎖状のPEG部分が特に好ましい。より好ましくは、2つのPEG部分のそれぞれの分子量は約20K～40Kであり、更に好ましくは約20Kと約40Kの間である。更に好ましくは、2つのPEG部分のそれぞれの分子量は約20Kである。当業者は、以下についての考慮に基づいて、所望のポリマーサイズを選択することができるであろう：所望の用量；循環する時間；タンパク質分解への耐性；もしあれば、生物学的活性に対する効果；取り扱い易さ；抗原性の程度または欠如；および治療用ペプチドに対するその他に知られているPEGの効果。

【0046】

本発明はまた、アミノ酸配列(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)（配列番号3）を有するペプチドモノマーのホモダイマーであるペプチドアゴニストを含み、ここで、各アミノ酸は標準的な一文字の略記によって示す。「(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-メチルグリシンであってサルコシンとしても知られている。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おける分子内ジスルフィド結合を含有する。このようなモノマーは、以下のように図式的に示すことができる：

【化 18】

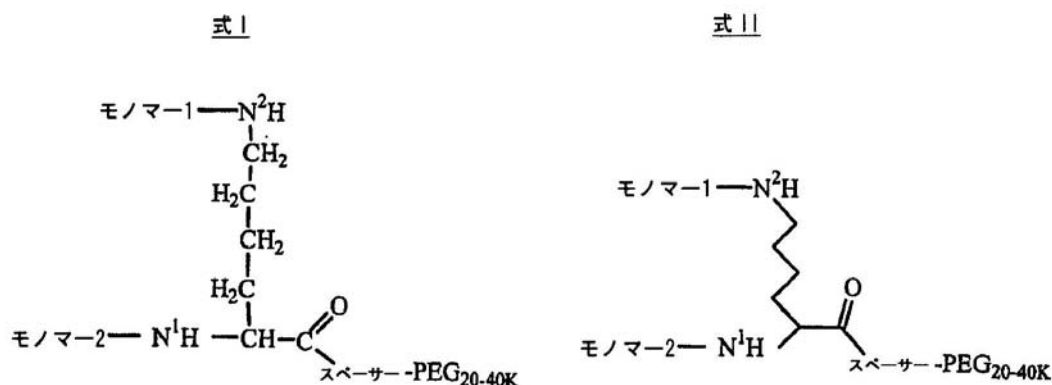


【0047】

これらの単量体ペプチドは、二量化されて、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を提供する。リンカー（ L_k ）部分はリジン残基であり、各モノマーのC末端アミノ酸への同時結合によって、2つのペプチドモノマーのC末端を架橋する。1つのペプチドモノマーは、そのC末端においてリジンの ϵ アミノ基に結合し、2つ目のペプチドモノマーは、そのC末端においてリジンの α アミノ基に結合する。例えば、ダイマーは式Iのように構造的に示すことができ、式IIのように要約できる：

10

【化 19】



20

式Iおよび式IIにおいて、 N^2 はリジンの ϵ アミノ基の窒素原子を表し、 N^1 はリジンの α アミノ基の窒素原子を表す。

【0048】

本発明のペプチドダイマーは、以下の構造：



を有するスペーサー部分を更に含む。

一方の端部において、スペーサーの N^1 は、アミド結合を通じてリジンリンカーのカルボニル炭素に結合する。反対側の端部において、スペーサーの N^2 は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合し、ここで、PEGの分子量は約10,000～60,000ダルトンである（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。より好ましくは、PEGの分子量は約20,000～40,000ダルトンである。

30

【0049】

従って、本発明の新規ペプチドは、PEG部分も含有し、PEG部分はペプチドダイマーに共有結合する。PEGは、薬学的に許容可能な水溶性ポリマーである。本発明において使用するためのPEGは、約20キロダルトン（20K）～約60Kの分子量を有する直鎖状で分岐していないPEGであってよい（用語「約」とは、PEGの調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す）。最も好ましくは、PEGの分子量は約20K～約40Kであり、更に好ましくは、分子量は約30K～約40Kである。当業者は、以下についての考慮に基づいて、所望のポリマーサイズを選択することができるであろう：所望の用量；循環する時間；タンパク質分解への耐性；もしあれば、生物学的活性に対する効果；取り扱い易さ；抗原性の程度または欠如；および治療用ペプチドに対するその他に知られているPEGの効果。

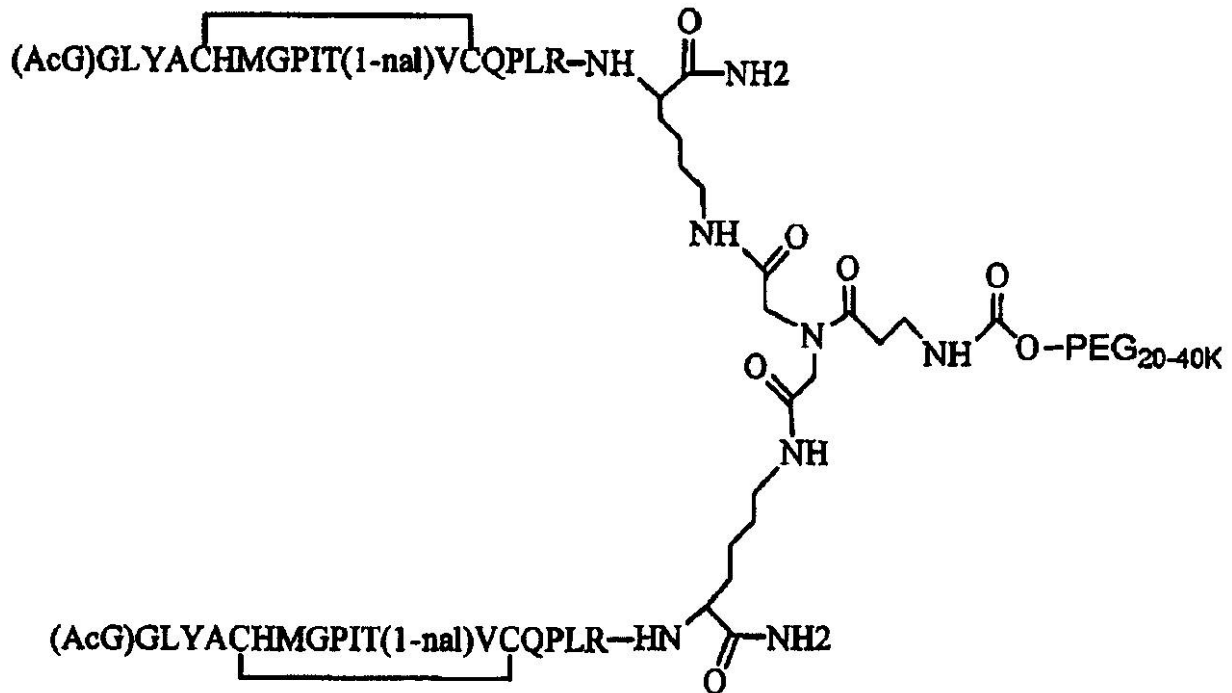
40

【0050】

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^1 がカルバメート結合を通じて活性化ポリエチレングリコール（PEG）部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

50

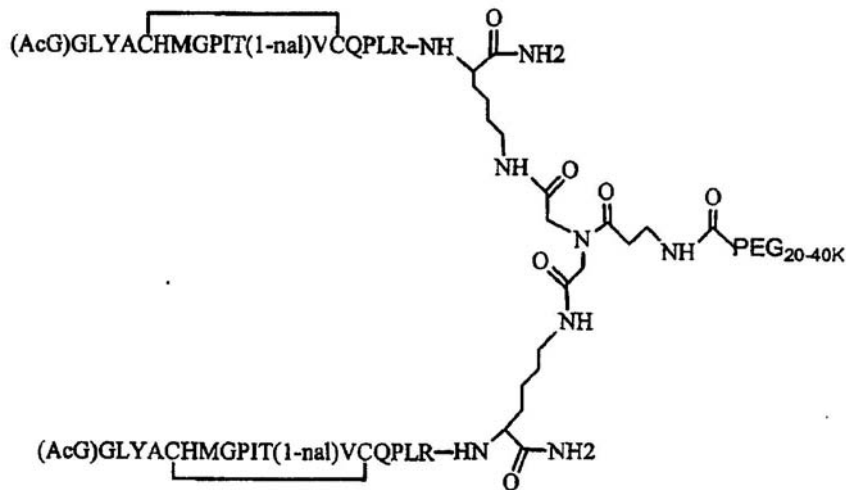
【化 2 0】



【 0 0 5 1】

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N¹がアミド結合を通じて活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 2 1】

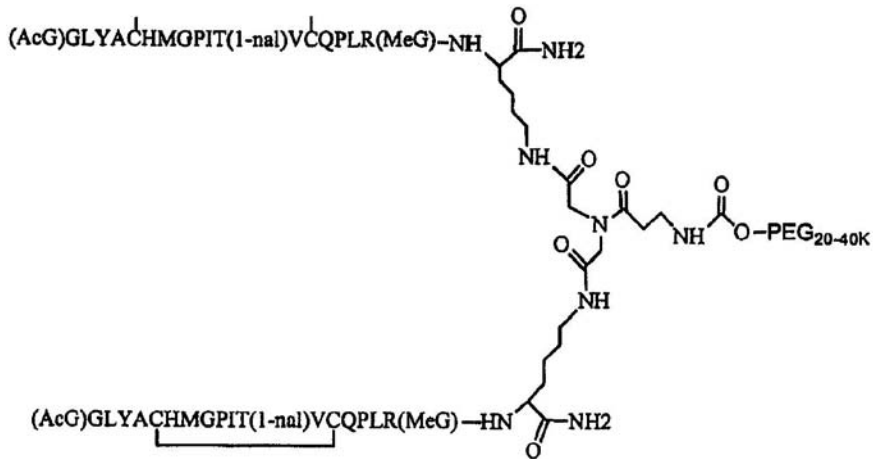


【 0 0 5 2】

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N¹がカルバメート結合を通じて活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

40

【化 2 2】

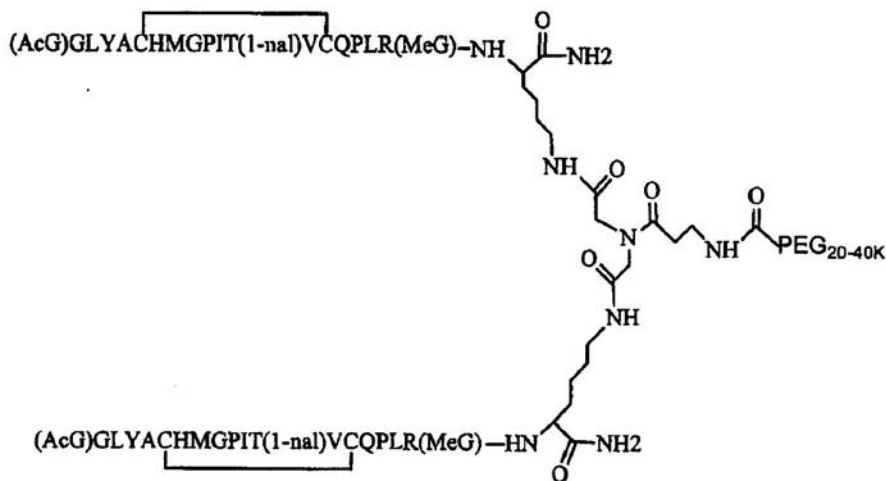


10

【 0 0 5 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、リンカーの N¹ がアミド結合を通じて活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 2 3】



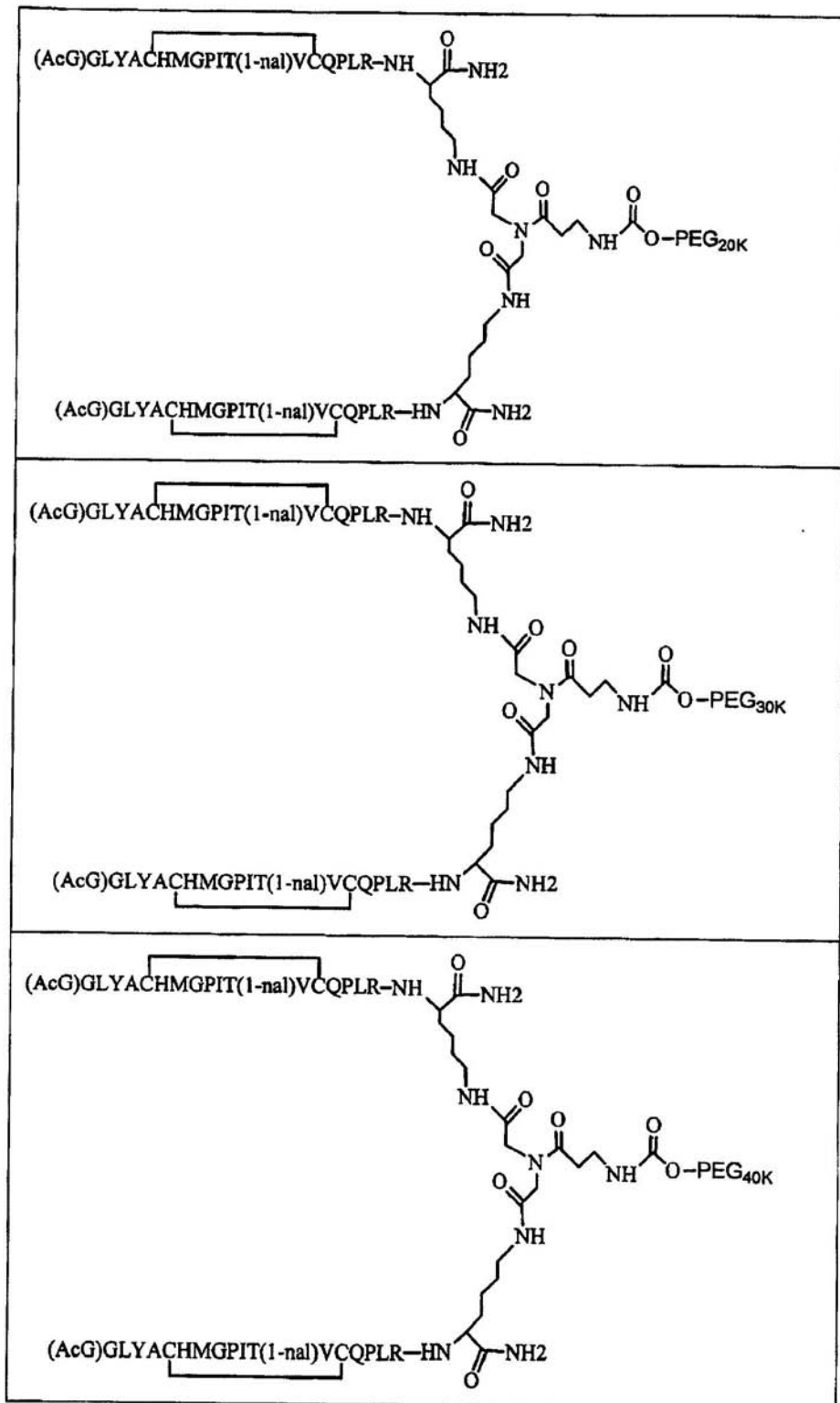
20

30

【 0 0 5 4】

本発明の好ましいペプチドダイマーは、以下を含むがこれらに限定されない：

【化 2 4】



(配列番号 1)

10

(配列番号 1)

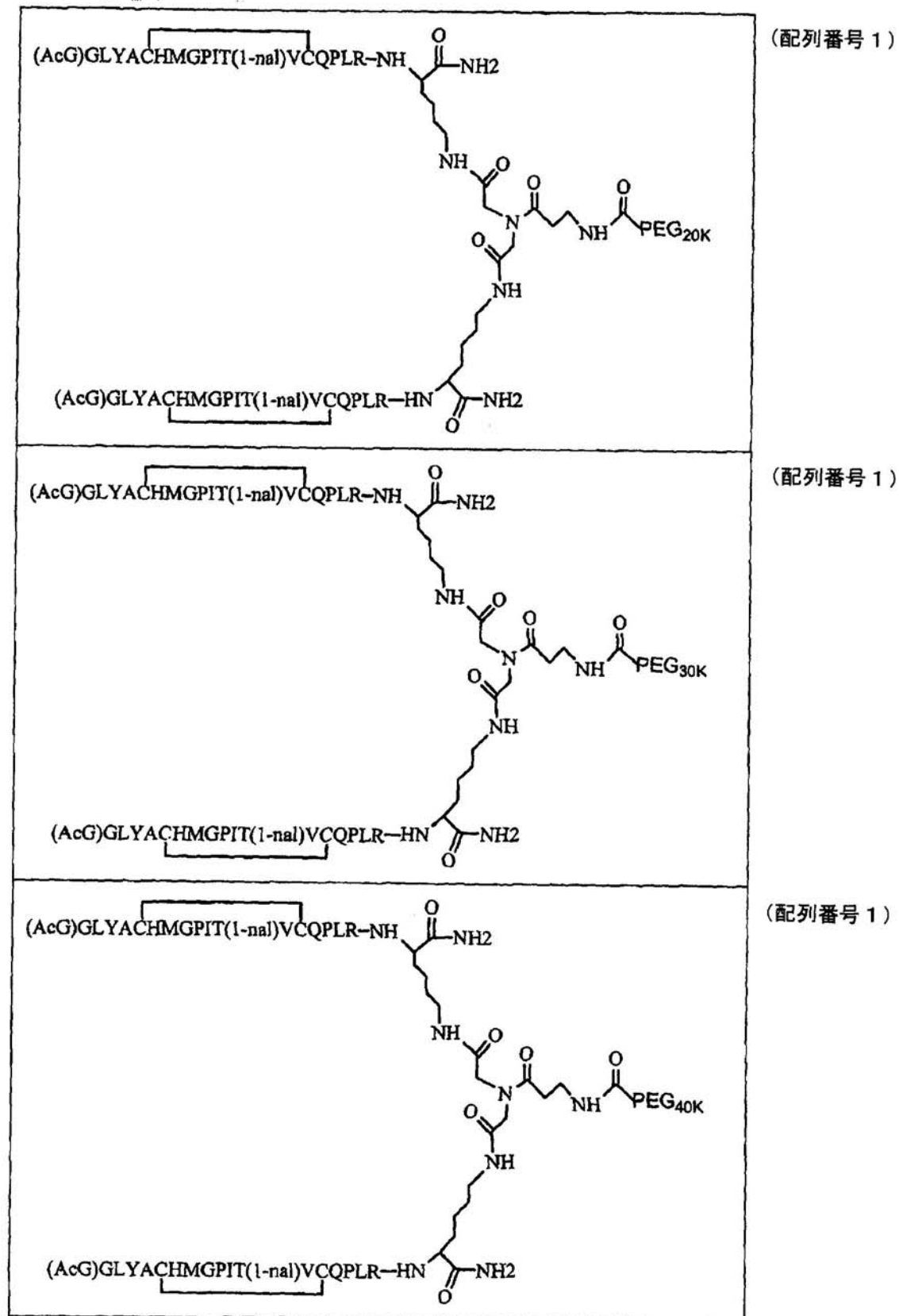
20

(配列番号 1)

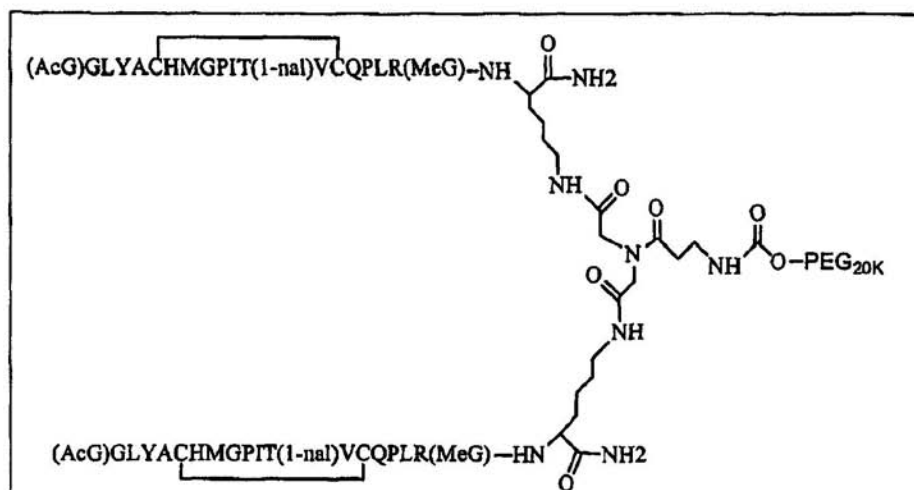
30

40

【化 2 5】

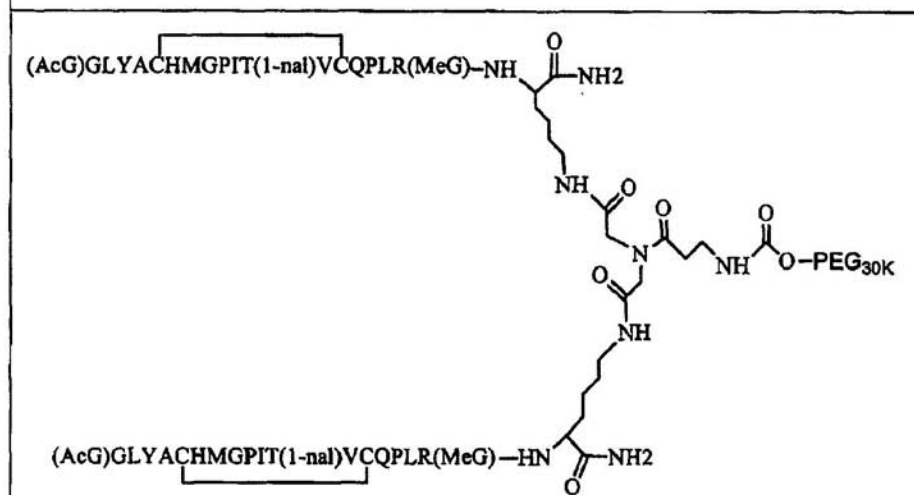


【化 2 6】



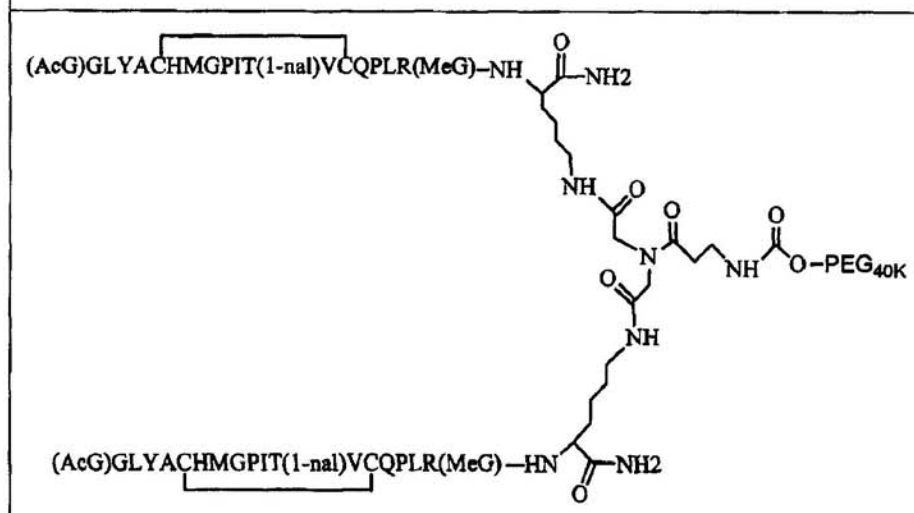
(配列番号 2)

10



(配列番号 2)

20

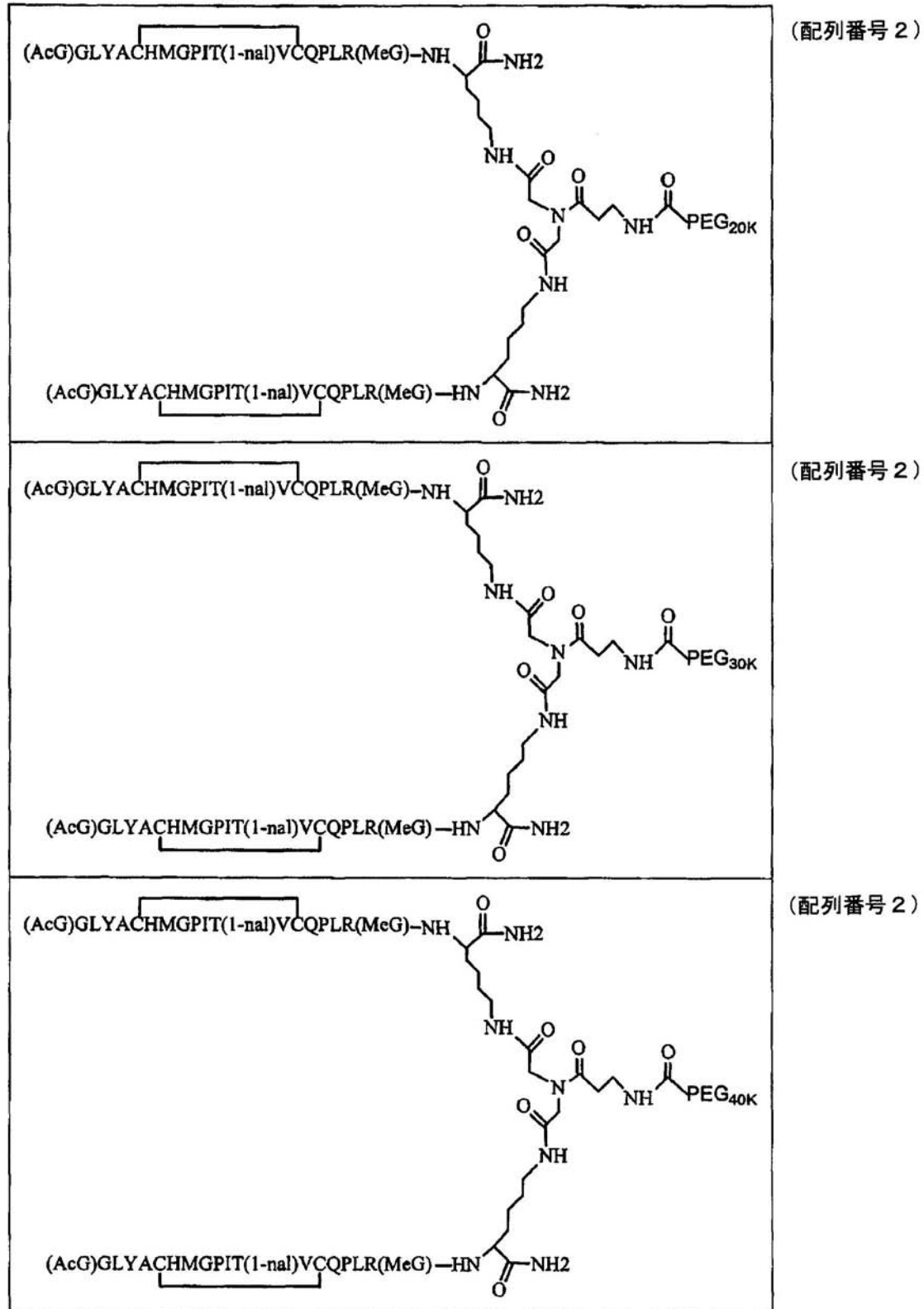


(配列番号 2)

30

40

【化 2 7】

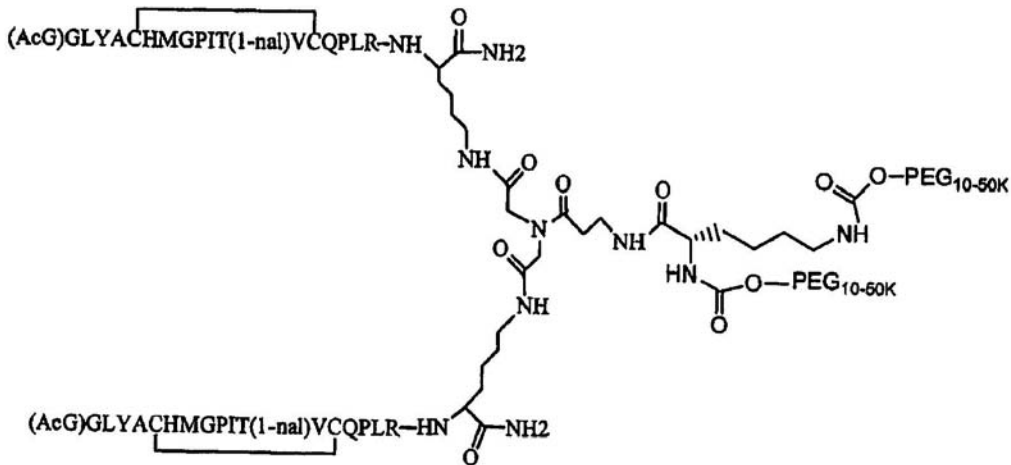


40

【0055】

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、スパーサーのN¹とN²の両方がカルバメート結合を通じて活性化PEG部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 2 8】

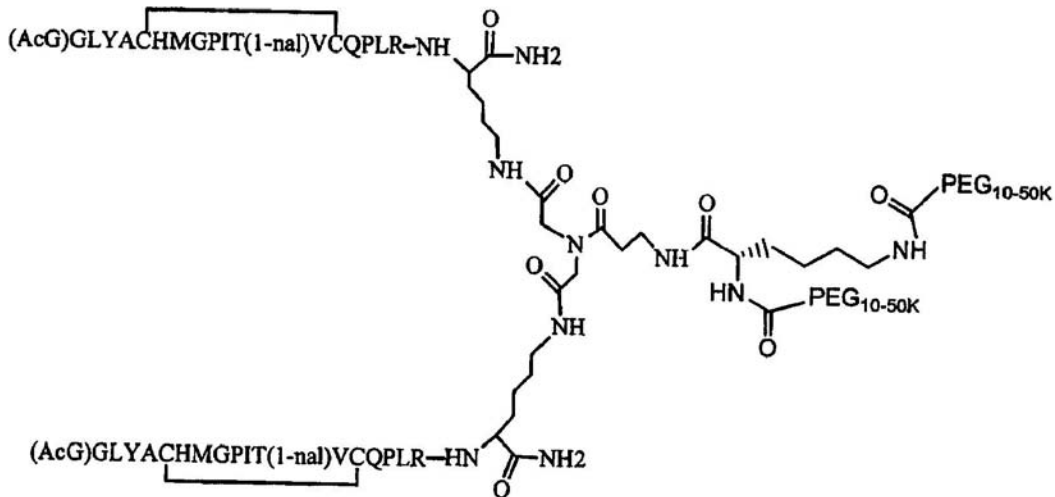


10

【 0 0 5 6】

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、スペーサーのN¹とN²の両方がアミド結合を通じて活性化PEG部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 2 9】



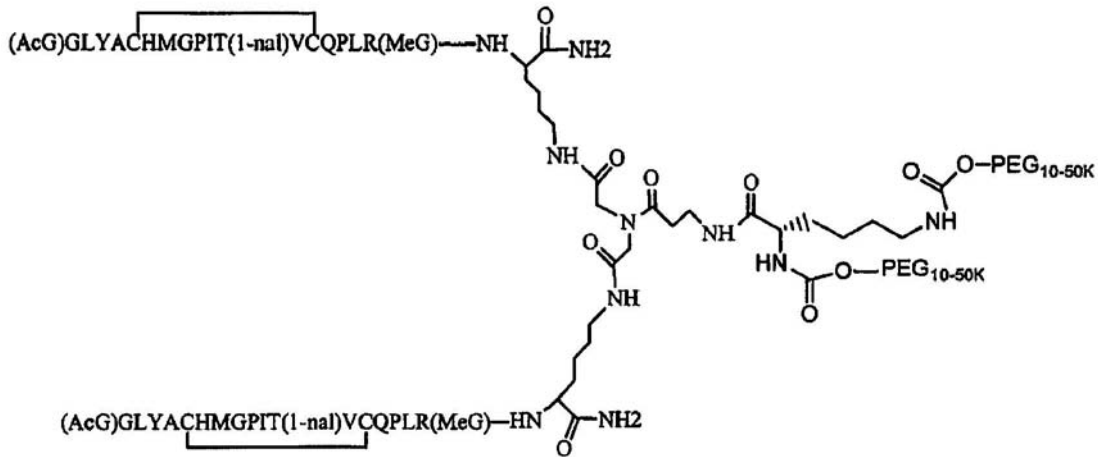
20

30

【 0 0 5 7】

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、スペーサーのN¹とN²の両方がカルバメート結合を通じて活性化PEG部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 3 0】

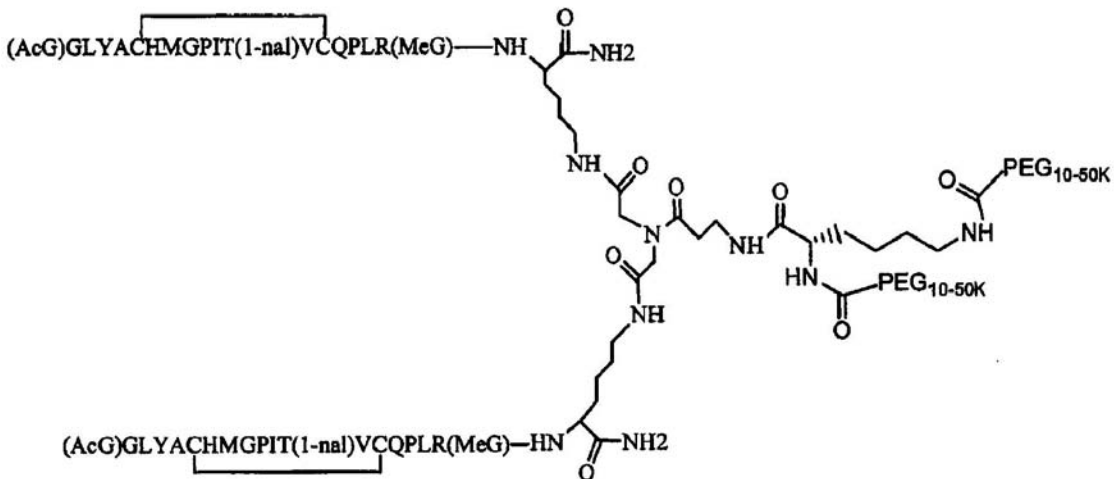


10

【 0 0 5 8】

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、スパーサーの N¹ と N² の両方がアミド結合を通じて活性化 PEG 部分に共有結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物は以下のように示すことができる：

【化 3 1】



20

30

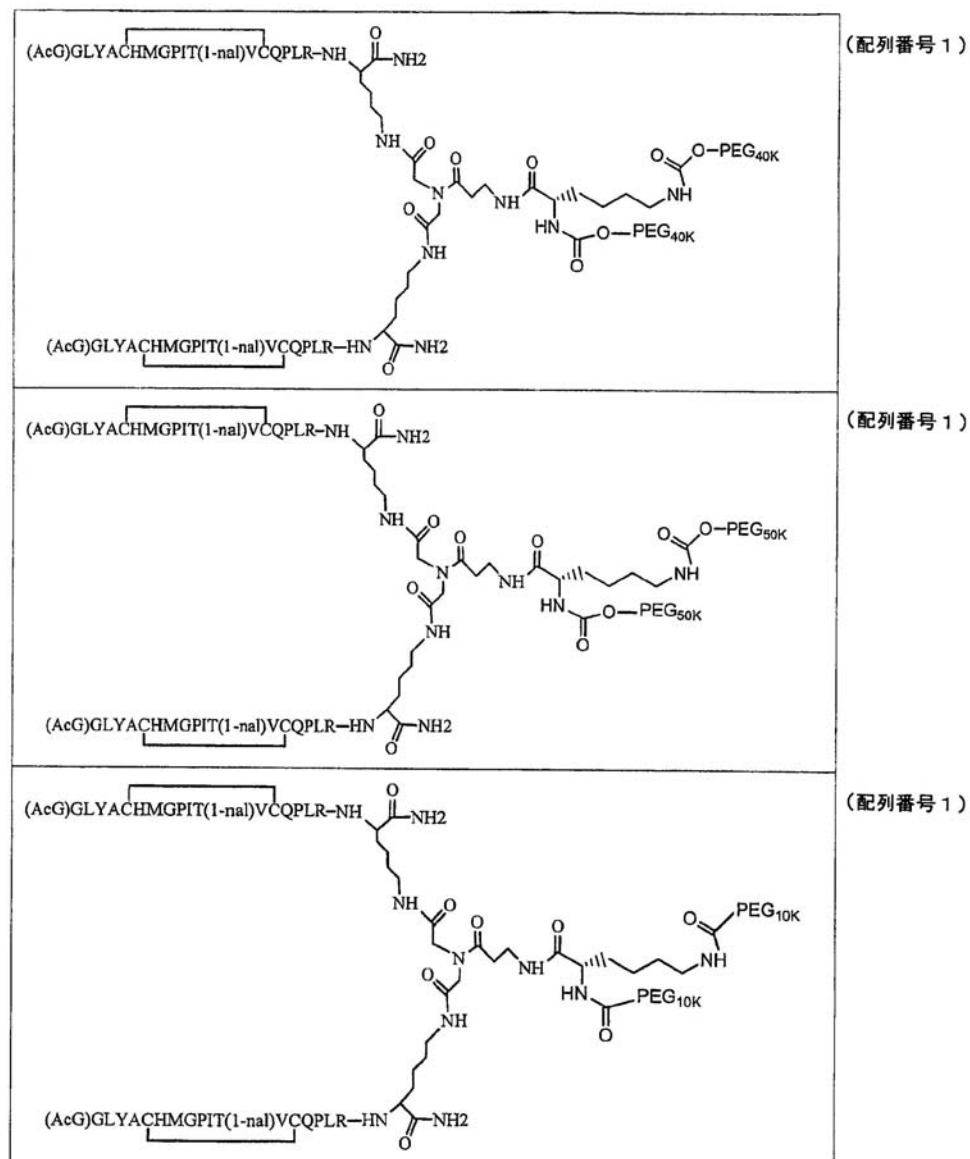
【 0 0 5 9】

本発明の好ましいペプチドダイマーは、以下を含むがこれらに限定されない：

10



【化 3 3】



10

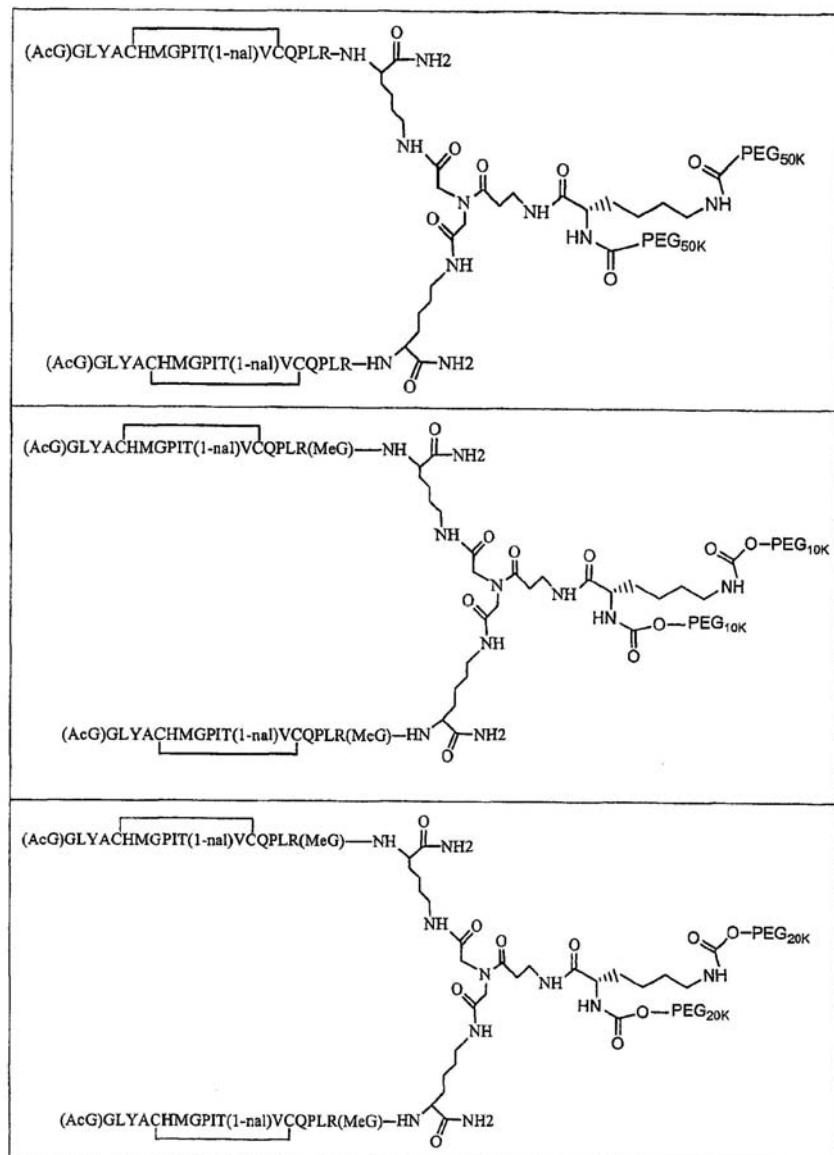
20

30

10



【化 3 5】

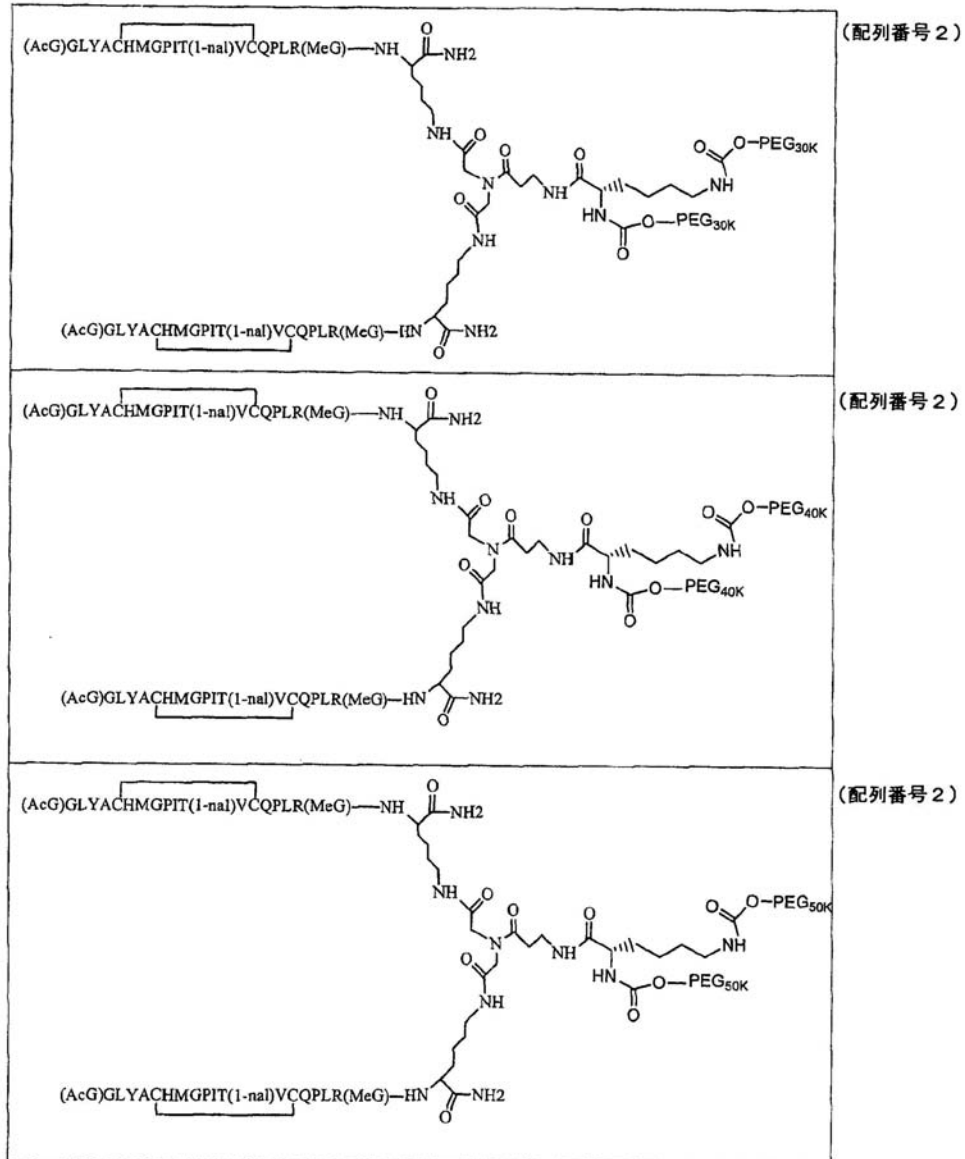


10

20

30

【化 3 6】



10

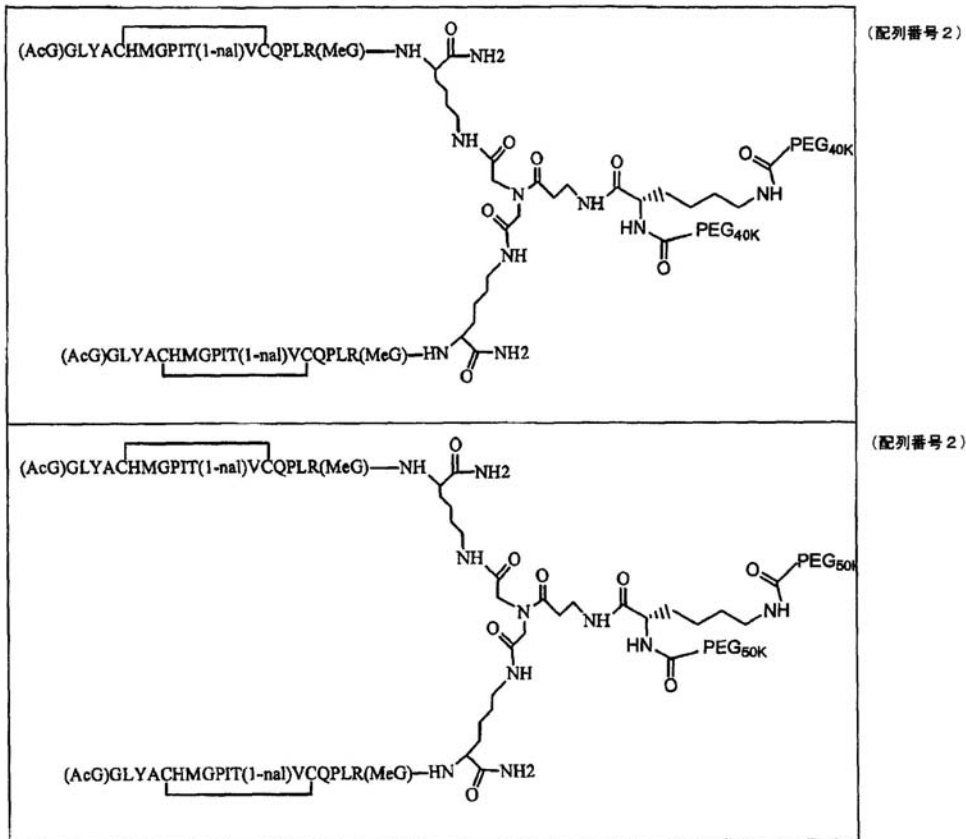
20

30

10



【化 3 8】



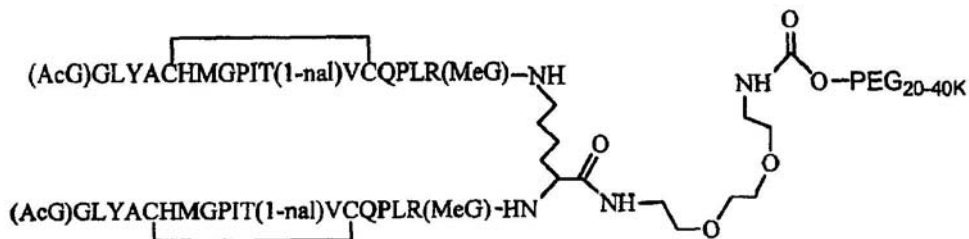
10

20

【 0 0 6 0】

スペーサーが、カルバメート結合を通じて活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物 (配列番号 3) は以下のように示すことができる：

【化 3 9】

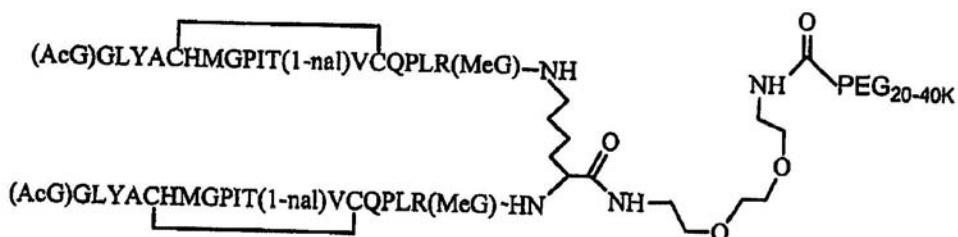


30

【 0 0 6 1】

スペーサーが、アミド結合を通じて活性化ポリエチレングリコール (PEG) 部分に結合する場合、本発明の新規ペプチド化合物 (配列番号 3) は以下のように示すことができる：

【化 4 0】



40

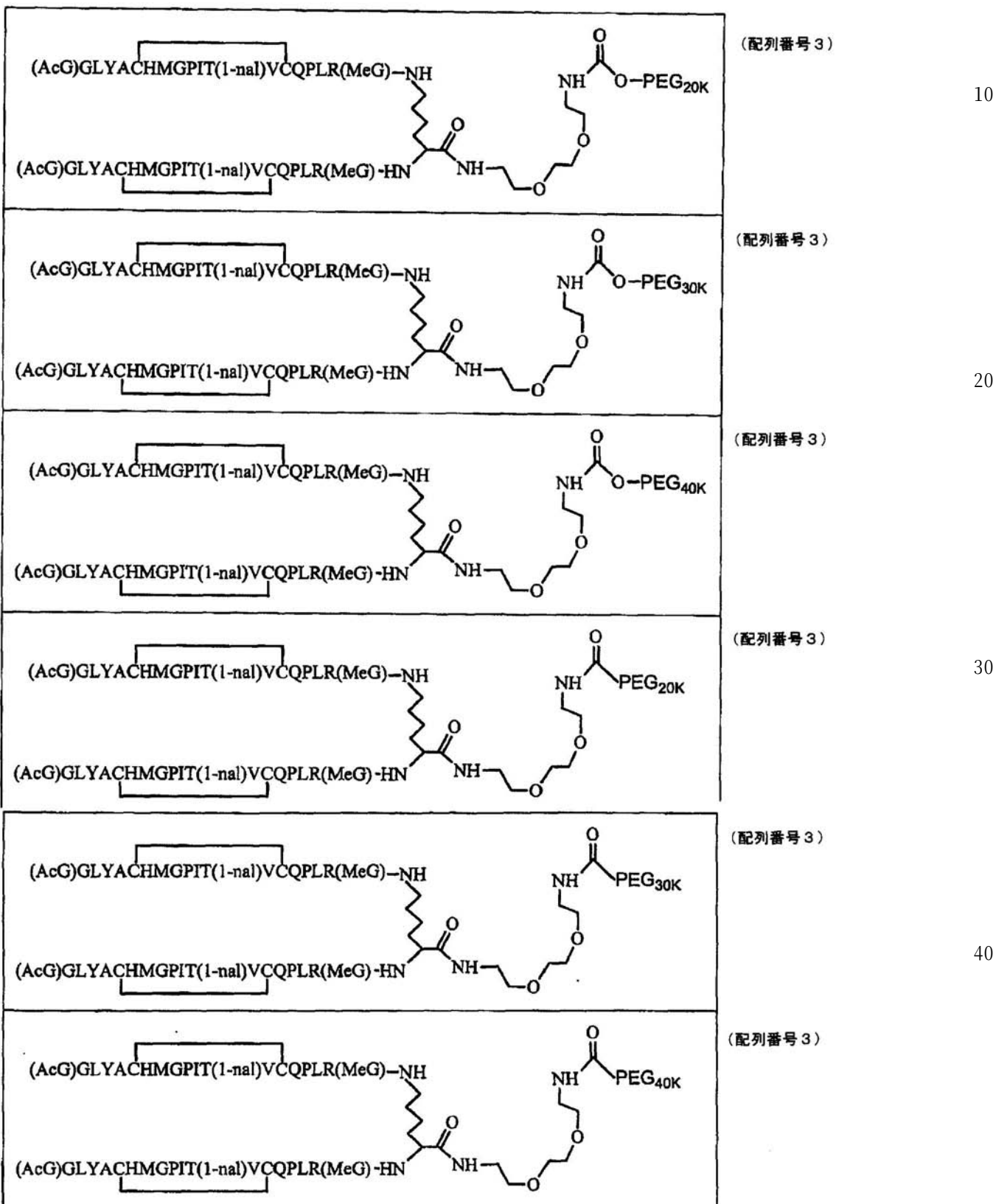
【 0 0 6 2】

この二量体構造は、[Ac-ペプチド、ジスルフィド]₂Lys-スペーサー-PEG_{20-40K}と書くことができ、以下を示す：リジンの α アミノ基および ε アミノ基の両方に結合する N 末端が

50

【 0 0 6 3 】

【化 4 1】



50

20種類の従来のアミノ酸の立体異性体（例えばD-アミノ酸）、 α,α -二置換アミノ酸等の非天然のアミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、およびその他の従来のものではないアミノ酸も、本発明の化合物の適切な成分であり得る。従来のものではないアミノ酸の例は、以下のものを含むがこれらに限定されない： β -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；並びにその他の類似のアミノ酸およびイミノ酸。その他の変異も可能であり、例えば以下が含まれる：アミノ末端の変異；カルボキシ末端の変異；1つ以上の天然の遺伝的にコードされるアミノ酸の、従来のものではないアミノ酸による置換；1つ以上のアミノ酸残基の側鎖の変異；ペプチドのリン酸化反応等。

10

【0065】

本発明のペプチド配列は、単独で、またはペプチド鎖のN末端および／またはC末端の延長部と結合して存在することができる。このような延長部は、非天然の配列を任意に伴う、または実質的に伴わない天然にコードされるペプチド配列であって良い。延長部は、当業者が所望するように、任意の付加、欠失、点突然変異、あるいはその他の配列の変異または組合せを含んでいて良い。一例を挙げると（これに限定されるものではない）、天然の配列は全長であっても部分長であっても良く、側鎖結合を通じて炭水化物、PEG、またはその他のポリマー等を結合する部位を提供するためのアミノ酸置換を含み得る。あるバリエーションにおいて、アミノ酸置換の結果、配列がヒト化されてヒト免疫系に適合する。非免疫グロブリンのスペーサー配列を伴う、または伴わない本発明のEPO-R活性化配列に隣接する、または近接する免疫グロブリン配列を含む、全てのタイプの融合タンパク質が提供される。実施形態の1つのタイプは、重鎖および／または軽鎖の可変（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。

20

【0066】

本発明のペプチド化合物の調製

（ペプチド合成）

本発明のペプチドは、当技術分野において知られている古典的方法によって調製できる。これらの標準的方法は、排他的固相合成、部分的固相合成、フラグメント縮合、古典的な溶液合成、およびDNA組み換え技術を含む（例えばMerrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149参照）。

30

【0067】

1つの実施形態において、ペプチドダイマーのペプチドモノマーは個々に合成され、合成の後で二量化される。

【0068】

別の実施形態において、ダイマーのペプチドモノマーは、ペプチド合成の開始部位として機能することが可能な2つの官能基と、別の分子部分（例えば固体支持体表面上に存在する場合がある）への結合を可能にする第3官能基（例えばカルボキシル基またはアミノ基）とを有する分岐している第3級アミドリinker-L_K部分によってC末端を通じて結合する。この場合、固相合成技術のあるバリエーションにおいて、2つのペプチドモノマーはリンカー-L_K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。このような合成は、逐次であっても同時であっても良い。

40

【0069】

別の実施形態において、固相合成技術のあるバリエーションにおいて、2つのペプチドモノマーはリンカー-L_K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。このような合成は、逐次であっても同時であっても良い。この実施形態においては、ペプチド合成の開始部位として機能することが可能な2つのアミノ基と、別の分子部分（例えば固体支持体表面上に存在する場合がある）への結合を可能にする第3官能基（例えばリジンのカルボキシル基；またはリジンアミドのアミノ基、カルボキシル基がアミド部分-CONH₂に変換されているリジン残基）とを有するリジンリンカー（L_K）部分を使用する。

【0070】

50

ダイマーのペプチド鎖のリンカー上への逐次合成を行うべきである場合、リンカー分子上の2つのアミン官能基は、2つの異なる直交除去型アミン保護基で保護される。保護されたリンカーは、リンカーの第3官能基を通じて固体支持体に結合される。第1アミン保護基が除去され、ダイマーの第1ペプチドが第1脱保護アミン部分上に合成される。次に第2アミン保護基が除去され、ダイマーの第2ペプチドが第2脱保護アミン部分上に合成される。例えば、リンカーの第1アミノ部分はAllocで保護されて良く、第2アミノ部分はFmocで保護されて良い。この場合、Fmoc基（Alloc基ではない）は、弱塩基（例えばジメチルホルムアミド(DMF)中の20%ピペリジン）による処理によって除去することができ、第1ペプチド鎖が合成される。その後で、Alloc基を適切な試薬（例えばPd(PPh₃)/4-メチルモルホリンおよびクロロホルム）を使用して除去することができ、第2ペプチド鎖が合成される。ジスルフィド結合の形成を制御するために異なるシステインのチオール保護基を使用すべきである場合（以下に述べる）、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、この技術を使用する必要があることに留意されたい。

10

20

30

40

50

【0071】

ダイマーのペプチド鎖のリンカー上への同時合成を行うべきである場合、リンカー分子の2つのアミン官能基は、同一の除去可能なアミン保護基で保護される。保護されたリンカーは、リンカーの第3官能基を通じて固体支持体に結合される。この場合、リンカー分子の2つの保護された官能基は同時に脱保護され、脱保護されたアミン上に2つのペプチド鎖が同時に合成される。この技術を使用すると、ダイマーのペプチド鎖の配列が同一になり、システイン残基のチオール保護基が全て同一であることに留意されたい。

【0072】

ペプチド合成のための好ましい方法は、固相合成である。固相ペプチド合成手順は当技術分野において周知である（例えばStewart Solid Phase Peptide Syntheses (Freeman and Co.: サンフランシスコ) 1969; 米国サンディエゴのNovabiochem社の2002/2003 General Catalog; およびGoodman Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl、シュトゥットガルト) 2002参照)。固相合成において、合成は、典型的には、 α アミノ保護樹脂を使用してペプチドのC末端の端から開始する。適切な出発原料は、例えば、クロロメチル化された樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ポリスチレン樹脂、またはベンズヒドリルアミン樹脂等に、必要な α アミノ酸を付着させることによって調製できる。このようなクロロメチル化された樹脂の1つは、BIO-BEADS SX-1という商品名で市販されている（カリフォルニア州リッチモンド、Bio Rad Laboratories社製）。ヒドロキシメチル樹脂の調製は記載されている（Bodonszky, et al. (1966) Chem. Ind. London 38:1597）。ベンズヒドリルアミン（BHA）樹脂は記載されており（Pietta and Marshall (1970) Chem. Commun. 650）、塩酸塩の形態はBeckman Instruments社（カリフォルニア州パロ・アルト）より市販されている。例えば、Gisin (1973) Helv. Chim. Acta 56:1467に記載の方法に従えば、重炭酸セシウム触媒の助けを借りて、 α アミノ保護アミノ酸をクロロメチル化された樹脂に結合することができる。

【0073】

最初の結合後、例えば室温で有機溶媒中のトリフルオロ酢酸（TFA）または塩酸（HCl）溶液を使用して、 α アミノ保護基を除去する。その後、 α アミノ保護アミノ酸を、増えていく支持体結合ペプチド鎖に連続して結合させる。 α アミノ保護基は、ペプチドの段階的合成の分野において有用であることが知られているものであり、以下を含む：アシル型保護基（例えばホルミル、トリフルオロアセチル、アセチル）；芳香族ウレタン型保護基（例えばベンジルオキシカルボイル（Cbz）および置換された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）；アルキル型保護基（例えばベンジル、トリフェニルメチル）；フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）；アリルオキシカルボニル（Alloc）；および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）。

【0074】

側鎖保護基（典型的にはエーテル、エステル、トリチル、PMC等）は、結合中は無傷の

ままであり、アミノ末端保護基の脱保護中またはカップリング中は分離されない。側鎖保護基は、最後のペプチドの合成が完了したときに除去可能でなければならず、反応条件下において標的ペプチドを変えない。Tyrの側鎖保護基は、テトラヒドロピラニル、tert-ブチル、トリチル、ベンジル、Cbz、Z-Br-Cbz、および2,5-ジクロロベンジルを含む。Aspの側鎖保護基は、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル、メチル、エチルおよびシクロヘキシルを含む。ThrおよびSerの側鎖保護基は、アセチル、ベンゾイル、トリチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、2,6-ジクロロベンジルおよびCbzを含む。Argの側鎖保護基は、ニトロ、トシル(Tos)、Cbz、アダマンチルオキシカルボニルメシトイルスルホニル(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)またはBocを含む。Lysの側鎖保護基は、Cbz、2-クロロベンジルオキシカルボニル(2-Cl-Cbz)、2-ブロモベンジルオキシカルボニル(2-Br-Cbz)、TosまたはBocを含む。

10

【0075】

αアミノ保護基の除去後、残りの保護されたアミノ酸は所望の順番で段階的に結合される。各保護されたアミノ酸は、一般的に、溶液(例えば塩化メチレン(CH_2Cl_2)、N-メチルピロリドン、ジメチルホルムアミド(DMF)、またはそれらの混合液)中の、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)またはジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)等の適切なカルボキシル基活性化剤を使用して、約3倍過剰で反応させる。

【0076】

所望のアミノ酸配列の完成後、所望のペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)またはフッ化水素(HF)等の試薬による処理によって樹脂の支持体から分離され、ペプチドが樹脂から切り離されるのみならず、残りの側鎖保護基も全て切り離される。クロロメチル化された樹脂を使用する場合、フッ化水素による処理の結果、遊離ペプチド酸が形成される。ベンズヒドリルアミン樹脂を使用する場合、フッ化水素による処理の結果、遊離ペプチドアミドが直接的に得られる。あるいは、クロロメチル化された樹脂を採用する場合、ペプチド樹脂をアンモニアで処理することによって側鎖が保護されたペプチドを脱カップリングすることができ、所望の側鎖が保護されたアミドが与えられる。または、アルキルアミンで処理することによって、側鎖が保護されたアルキルアミドまたはジアルキルアミドが与えられる。次に、側鎖の保護は、フッ化水素を使用する処理によって通常の方法で除去され、遊離型アミド、アルキルアミド、またはジアルキルアミドが与えられる。

20

30

【0077】

本発明のエステルの調製においては、ペプチド酸を調製するために使用された樹脂が使用され、側鎖が保護されたペプチドが、塩基および適切なアルコール(例えばメタノール)を使用して切断される。次に側鎖保護基が、フッ化水素を使用した処理によって通常の方法で除去され、所望のエステルが得られる。

【0078】

これらの手順は、本発明の化合物のいずれかのペプチドであって、20種類の天然の遺伝的にコードされるアミノ酸以外のアミノ酸が1箇所、2箇所またはそれ以上の箇所において置換されているものを合成するためにも使用できる。本発明のペプチドに置換によって挿入できる合成アミノ酸は、以下を含むがこれらに限定されない：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；δアミノ酸(L-δ-ヒドロキシリシルおよびD-δ-メチルアラニル等)；L-α-メチルアラニル；βアミノ酸；およびイソキノリル。D-アミノ酸および非天然の合成アミノ酸も、本発明のペプチドに組み込むことができる。

40

【0079】

ペプチドの改変

また、本発明のペプチド化合物のアミノ末端および／またはカルボキシ末端を変異させて、その他の本発明の化合物を生成することもできる。例えば、アミノ末端は、酢酸またはハロゲン化されたその誘導体(α-クロロ酢酸、α-ブロモ酢酸、またはα-ヨード酢酸

50

等)を使用してアセチル化できる。

【0080】

20種類の遺伝的にコードされたアミノ酸(または立体異性体のD-アミノ酸)の天然の側鎖は、以下のもので置換できる:その他の側鎖、例えばアルキル、低級アルキル、4、5、6または7員環の環状アルキル、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、カルボキシおよびその低級エステル誘導体等の基;並びに4、5、6または7員環の複素環。特に、プロリン残基の環の大きさが、5員環から4、6または7員環に改変されているプロリンアナログを採用することができる。環状基は飽和されていても不飽和でも良く、不飽和の場合、芳香族でも非芳香族でも良い。複素環基は、好ましくは、1つ以上の窒素、酸素および/または硫黄のヘテロ原子を含有する。このような基の例は以下を含む: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)、ピペリジル(例えば1-ピペリジル、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)、およびトリアゾリル。これらの複素環基は、置換されていてもされていなくても良い。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、あるいは、置換されたまたは置換されていないフェニルであって良い。

10

【0081】

また、リン酸化反応およびその他の方法によって、ペプチドを容易に改変させることができる(例えばHruby, et al. (1990) Biochem J.268:249-262に記載)。

20

【0082】

本発明のペプチド化合物は、類似の生物学的活性を有する非ペプチド性化合物の構造モデルとしての役割も果たす。リードペプチド化合物と同一のまたは類似の所望の生物学的活性を有するが、溶解度、安定性ならびに加水分解およびタンパク質分解への感受性に関してはリード化合物よりも好ましい活性を有する化合物を構築するために、種々の技術を利用可能であることを、当業者は認識している(Morgan and Gainor (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243-252参照)。これらの技術は、ホスホン酸塩、アミデート、カルバメート、スルホンアミド、第二級アミンおよびN-メチルアミノ酸で構成される主鎖でペプチドの主鎖を置換することを含む。

30

【0083】

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。こ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できる。

【0084】

1つの実施形態において、システイン結合の形成の制御は、所望の異性体の最適な形成に効果的なタイプおよび濃度の酸化剤を選択することによって行われる。例えば、2つの分子内ジスルフィド結合(各ペプチド鎖に1つ)を形成するためのペプチドダイマーの酸化は、酸化剤がDMSOまたはヨウ素(I_2)である場合に優先的に達成される(分子内ジスルフィド結合の形成よりも)。

40

【0085】

その他の実施形態において、システイン結合の形成は、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所望である場合、第1モノマーペプチド鎖が、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)、および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)等)で保護されたコア配列の2つのシステイン残基を用いて合成され、次に、第2モノマーペプチドが、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)等)で保護されたコア配列の2つのシステイン残基を用いて合成される。その後、第1チオール保護基が除去され

50

て、第1モノマーの二硫化物の環化を生じさせ、次に第2チオール保護基が除去されて、第2モノマーの二硫化物の環化を生じさせる。

【0086】

本発明のその他の実施形態は、これらのジスルフィド誘導体のアナログを提供し、その中において、硫黄原子のうちの1つがCH₂基またはその他の硫黄の異性体(isotere)で置換されている。これらのアナログは、本発明の化合物から調製することができ、ここで、各ペプチドモノマーは、少なくとも1つのCまたはホモシステイン残基を含有し、当技術分野において知られている方法を使用した分子内または分子間の置換により、第2C残基がα-アミノ-γ-酪酸で置換されている(例えばBarker, et al. (1992) J. Med. Chem. 35:2040-2048; およびOr, et al. (1991) J. Org. Chem. 56:3146-3149参照)。この置換はα-アミノ-γ-酪酸のその他のホモログおよびホモシステインを使用しても起こり得ることを、当業者は容易に理解するであろう。

【0087】

前述の環化方法に加え、その他の非ジスルフィドペプチド環化の方法も使用できる。このようなその他の環化方法は、例えば、アミド-環化の方法や、チオ-エーテル結合の形成を伴うものを含む。従って、本発明の化合物は、分子内アミド結合または分子内チオ-エーテル結合のいずれかを有する環化形態で存在することができる。例えば、コア配列の1つのシステインがリジンで置換され、2つ目のシステインがグルタミン酸で置換される形で、ペプチドを合成して良い。その後、これら2つの残基の側鎖間のアミド結合を通じて環状モノマーを形成して良い。あるいは、コア配列の1つのシステインがリジン(またはセリン)で置換される形でペプチドを合成して良い。そして、コア配列のリジン(またはセリン)残基の側鎖と2つ目のシステイン残基の側鎖との間のチオ-エーテル結合を通じて環状モノマーを形成して良い。このように、本発明の化合物を環化するために、ジスルフィド環化方法に加え、アミド環化方法およびチオ-エーテル環化方法のいずれをも容易に使用することができる。あるいは、α置換酢酸でペプチドのアミノ末端にキャップをすることができ、ここで、α置換基は、αハロ酢酸等の離脱基である(例えばα-クロロ酢酸、α-ブromo酢酸、またはα-ヨード酢酸)。

【0088】

分岐している第3級アミドリンカーの追加

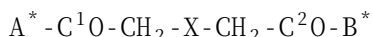
ペプチドモノマーは、分岐している第3級アミドリンカー部分によって二量化できる。1つの実施形態において、リンカーは、ペプチド合成中にペプチドに組み込まれる。例えば、リンカーL_K部分が、ペプチド合成の開始部位として機能可能な2つの官能基と、1つ以上のその他の分子部分への結合を可能とする1つ以上のその他の官能基(例えばカルボキシル基またはアミノ基)とを含有する場合、リンカーは、固体支持体に結合させることができる。その後、固相合成技術のバリエーションにおいて、2つのペプチドモノマーを、リンカーL_K部分の2つの反応性窒素基上に直接合成させて良い。

【0089】

代替の実施形態において、リンカーは、ペプチド合成後に、ペプチドダイマーの2つのペプチドモノマーに結合させることができる。このような結合は、当技術分野において十分に確立されている方法によって達成できる。1つの実施形態において、リンカーは、合成されたペプチドモノマーの標的官能基への結合に適切な2つの官能基を含有する。例えば、事前に活性化されているか、または適切なカップリング試薬の存在下で、2つのカルボキシル基を含有するリンカーを、2つのペプチドモノマーそれぞれの標的リジン側鎖のアミン基と反応させることができる。

【0090】

例えば、ペプチドモノマーを、第3級アミドリンカー：



に化学的に結合させることができ、ここで：

XはNCO-(CH₂)₂-NH-Yであり、Yは適切な保護基であり(t-ブチルオキシカルボニル(Boc)保護基等)；A*は適切な官能基であって(N-オキシスクシンイミド等)、リンカーのC¹を第

10

20

30

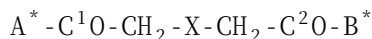
40

50

1 ペプチドモノマーのC末端リジン残基の ϵ アミノ基に結合させるために使用され； B^* は適切な官能基であって（N-オキシスクシンイミド等）、リンカーのC²を第2ペプチドモノマーのC末端リジン残基の ϵ アミノ基に結合させるために使用される。

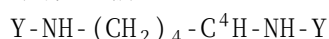
【0091】

加えて、例えば、ペプチドモノマーは、第3級アミドリinker：



に化学的に結合させることができ、ここで：

Xは $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$ であり、 A^* は適切な官能基であって（N-オキシスクシンイミド等）、リンカーのC¹を第1ペプチドモノマーのC末端リジン残基の ϵ アミノ基に結合させるために使用され； B^* は適切な官能基であって（N-オキシスクシンイミド等）、リンカーのC²を第2ペプチドモノマーのC末端リジン残基の ϵ アミノ基に結合させるために使用され；第3級アミドリinkerは、スペーサー部分：



に化学的に結合され、ここで、

XのC³はスペーサーのC⁴に共有結合し、Yは適切な保護基（t-ブチルオキシカルボニル(Boc)保護基等）である。

【0092】

リジンリンカーの追加

ペプチドモノマーは、リジンリンカー L_K 部分によって二量化できる。1つの実施形態において、リジンリンカーは、ペプチド合成中にペプチド内に組み込まれる。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可能な2つの官能基と、別の分子部分への結合を可能とする第3官能基（例えばカルボキシル基またはアミノ基）とを含有する場合、リンカーは、固体支持体に結合させることができる。その後、固相合成技術のバリエーションにおいて、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直接合成させて良い。

【0093】

ペプチドダイマーがリジンリンカー L_K 部分によって二量化される場合における代替の実施形態において、リンカーは、ペプチド合成後に、ペプチドダイマーの2つのペプチドモノマーに結合させることができる。このような結合は、当技術分野において十分に確立されている方法によって達成できる。1つの実施形態において、リンカーは、合成されたペプチドモノマーの標的官能基への結合に適切な少なくとも2つの官能基を含有する。例えば、リジンの2つの遊離型アミノ基は、2つのペプチドモノマーそれぞれのC末端カルボキシル基と反応させることができる。

【0094】

スペーサーの追加

本発明のペプチド化合物は、スペーサー部分を更に含む。1つの実施形態において、スペーサーは、ペプチド合成中にペプチド内に組み込まれて良い。例えば、スペーサーが、1つの遊離型アミノ基と、別の分子部分への結合を可能とする第2官能基（例えばカルボキシル基またはアミノ基）とを含有する場合、スペーサーを、固体支持体に結合させることができる。

【0095】

1つの実施形態において、2つの官能基を含有するスペーサーは、はじめに第1官能基を通じて固体支持体に結合される。次に、ペプチド合成の開始部位として機能可能な2つの官能基と、別の分子部分への結合を可能とする第3官能基（例えばカルボキシル基またはアミノ基）とを有するリジンリンカー L_K 部分が、スペーサーの第2官能基およびリンカーの第3官能基を通じてスペーサーに結合される。その後、固相合成技術のあるバリエーションにおいて、2つのペプチドモノマーはリンカー L_K 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。例えば、遊離型アミノ基を有する固体支持体に結合されたスペーサーは、リンカーの遊離型カルボキシル基を通じてリジンリンカーと反応させて良い。

【0096】

10

20

30

40

50

代替の実施形態において、スペーサーは、ペプチド合成後にペプチドダイマーに結合させることができる。このような結合は、当技術分野において十分に確立されている方法によって達成できる。1つの実施形態において、リンカーは、合成されたペプチドの標的官能基への結合に適切な少なくとも1つの官能基を含有する。例えば、遊離型アミン基を有するスペーサーは、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。別の例において、遊離型カルボキシル基を有するリンカーは、リジンアミドの遊離型アミン基と反応させることができる。

【0097】

ポリエチレングリコール (PEG) の結合

近年、ポリエチレングリコール (PEG) 等の水溶性ポリマーが、治療上および診断上の重要性を有するペプチドの共有結合修飾に使用されてきている。このようなポリマーの結合は、生物学的活性を強化し、血液循環時間を引き延ばし、免疫原性を低下させ、水溶性を高め、プロテアーゼ消化への耐性を高めると考えられている。例えば、治療用ポリペプチド (例えばインターロイキン (Knauf, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:15064; および 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)、およびアデノシンデアミナーゼ (Chen, et al. (1981) Biochim. Biophys. Acta 660:293) 等) に対する PEG の共有結合は、それらのインビボでの半減期を引き延ばし、および/または、それらの免疫原性および抗原性を低下させることが報告されている。

【0098】

本発明のペプチド化合物は、カルバメート結合またはアミド結合を通じて、分岐している第3級アミドリリンカーまたはペプチドダイマーのスペーサーに共有結合されるポリエチレングリコール (PEG) 部分を含んでいて良い。本発明において使用される PEG の例は、約20キロダルトン (20K) ~ 約40K の分子量を有する直鎖状で分岐していない PEG である (用語「約」とは、PEG の調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す)。好ましくは、PEG は、約30K ~ 約40K の分子量を有する。

【0099】

本発明において使用される別の PEG の例は、約10K ~ 約60K の分子量を有する直鎖状の PEG である (用語「約」とは、PEG の調製において、記載された分子量よりも大きい分子もあれば小さい分子もあることを示す)。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。

【0100】

PEG を共有結合する方法 (PEG 化) の例を以下に述べる。これらの例示的記述によって限定する意図はない。広範囲の PEG を共有結合する多様な方法が、当技術分野において十分に確立されていることを、当業者は理解するであろう。従って、当技術分野において知られている多数の結合方法のうちのいずれかによって PEG が結合されているペプチド化合物が、本発明に包含される。

【0101】

例えば、活性化 PEG 分子を結合できる反応基 (例えば遊離型のアミノ基またはカルボキシル基) を通じて、PEG をリンカーに共有結合させることができる。異なる反応部分を有するメトキシル化された PEG (mPEG) を使用して、PEG 分子をアミノ基に結合させることができる。このようなポリマーは、mPEG-スクシンイミジルスクシネート、mPEG-スクシンイミジルカーボネート、mPEG-イミデート、mPEG-4-ニトロフェニルカーボネート、および mPEG-塩化シアヌルを含む。同様に、遊離型アミン基 (mPEG-NH₂) を有するメトキシル化された PEG を使用して、PEG 分子をカルボキシル基に結合させることができる。

【0102】

いくつかの実施形態において、リンカーまたはスペーサーは、末端アミノ基 (すなわちスペーサーの末端に位置する) を含有する。この末端アミノ基は、安定した共有カルバメ

ート結合を作成するために、適切に活性化されたPEG分子（mPEG-パラ-ニトロフェニルカルボネート（mPEG-NPC）等）と反応させることができる。あるいは、この末端アミノ基は、安定した共有カルバメート結合を作製するために、反応性N-ヒドロキシル-スクシンイミド（NHS）基を含有する適切に活性化されたPEG分子（例えばmPEG-スクシンイミジルブチレート（mPEG-SBA）またはmPEG-スクシンイミジルプロピオネート（mPEG-SPA）等）と反応させることができる。その他の実施形態において、リンカー反応基は、適切な反応条件下で活性化されてアミン含有PEG分子と共有結合を形成することが可能なカルボキシル基を含有する。適切なPEG分子は、mPEG-NH₂を含み、適切な反応条件は、カルボジイミドに媒介されたアミド形成等を含む。

【0103】

EPO-Rアゴニスト活性のアッセイ

インビトロでの機能アッセイ

インビトロ競合結合アッセイは、EPO-Rへの結合に関してのEPOに対する試験ペプチドの競争力を定量する。例えば（例えば米国特許第5,773,569号に記載）、ヒトEPO-Rの細胞外ドメイン（EPO結合タンパク質、EBP）は、大腸菌中で組み換え技術により生成することができ、組み換えタンパク質は、固体支持体（マイクロタイタープレートまたは合成ビーズ等）に結合される（例えばPierce Chemical社（イリノイ州ロックフォード）製のスルホリンク（Sulfolink）ビーズ等）。次に、固定化されたEBPを、標識された組み換えEPO、または標識された組み換えEPOおよび試験ペプチドと共にインキュベートする。このような実験には、試験ペプチドの連続希釈が採用される。追加される試験ペプチドのないアッセイポイントが、EPOのEBPへの結合の総量を定義する。試験ペプチドを含有する反応物について、結合されたEPOの量を定量し、コントロール（総量＝100％）の結合の割合で示す。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％減少させる試験ペプチドの濃度として定義される（すなわちEPO結合の50％阻害）。

【0104】

異なるインビトロ競合結合アッセイは、近接する2つのビーズ、すなわちEPOに結合されたビーズおよびEPO-Rに結合されたビーズの機能として産生された光シグナルを測定する。ビーズの近接は、EPOのEPO-Rへの結合によって生み出される。EPO-Rへの結合においてEPOと競合する試験ペプチドは、この結合を妨げ、光の放射の減少を引き起こす。光の放射を50％減少させる結果となった試験ペプチドの濃度を、IC₅₀値として定義する。

【0105】

本発明のペプチドは、EPO-Rへの結合について、非常に効率的にEPOと競合する。この強化された機能は、実質的により低い濃度のペプチドでのEPOの結合を阻害する能力（すなわち非常に低いIC₅₀値を有すること）によって示される。

【0106】

EPOレセプターに特異的に結合する本発明の単量体または二量体のペプチドEPO-Rアゴニストの生物学的活性および効力は、インビトロでの細胞ベースの機能アッセイを使用して測定できる。

【0107】

1つのアッセイは、ヒトEPO-Rを発現し、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構築物で更にトランスフェクトされる、マウスプレB細胞株に基づく。EPOまたは別のEPO-Rアゴニストに曝されると、このような細胞は、ルシフェラーゼを合成することによって反応する。ルシフェラーゼは、基質であるルシフェリンが追加されると光の放射を引き起こす。従って、このような細胞内での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、試験ペプチドの連続希釈物を細胞に加え、次にこれを4時間インキュベートすることによって測定される。インキュベート後、ルシフェリン基質を細胞に加え、光の放射が測定される。最大値の半分の光の放射となった試験ペプチドの濃度をEC₅₀として記録する。

【0108】

本発明のペプチドは、このアッセイにおいてEPO-Rシグナル伝達依存性ルシフェラーゼ

10

20

30

40

50

発現を促進する、劇的に高められた能力を示す。この高められた機能は、実質的により低い濃度のペプチドで、ルシフェラーゼ活性の最大値の半分を生み出す能力（すなわち非常に低いEC50値を有すること）によって示される。本発明のEPO-Rアゴニストペプチドの効力および活性を見積もる上で、このアッセイが好ましい方法である。

【0109】

別のアッセイは、FDC-P1/ER細胞 (Dexter, et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047)、すなわち、十分に特徴づけされた形質転換されていないマウス骨髄由来細胞株であって、中にEPO-Rが安定にトランスフェクトされているものを使用して行うことができる。これらの細胞は、EPO依存性の増殖を示す。

【0110】

1つのこのようなアッセイにおいて、細胞は、必要な成長因子の存在下、半ば固定した密度まで成長する（例えば米国特許第5,773,569号に記載）。次に、細胞をPBS内で洗浄し、成長因子不含の全体培地中で、16~24時間飢餓状態にする。細胞の生存率を測定後（例えばトリパンブルー染色によって）、原液（成長因子不含の全体培地中）を作製して50 μ L当たり約 10^5 個の細胞とする。試験すべきペプチドEPO-Rアゴニスト化合物の連続希釈物（典型的には、ファージに結合されている、あるいは他の結合されているまたは固定されているペプチドとは対照的に、遊離型の液相ペプチドである）を、96ウェル組織培養プレートに作製し、最終的な量をウェル当たり50 μ Lとする。細胞（50 μ L）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、ネガティブコントロールは死滅するか、または休眠しているはずである）。次に、当技術分野において知られている技術によって、細胞増殖を測定する（例えばMTTアッセイ：細胞増殖の指標として、 H^3 -チミジンの取り込みを測定する）（Mosmann (1983) J. Immunol. Methods 65:55-63参照）。ペプチドは、EPO-Rを発現する細胞株においても、発現しない親細胞株においても評価する。細胞増殖の最大値の半分を生み出すのに必要な試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する。

【0111】

本発明のペプチドは、このアッセイにおいてEPO依存性の細胞増殖を促進する、劇的に高められた能力を示す。この高められた機能は、実質的により低い濃度のペプチドでの細胞増殖刺激活性の最大値の半分を生み出す能力（すなわち非常に低いEC50値を有すること）によって示される。本発明のEPO-Rアゴニストペプチドの効力および活性を見積もる上で、このアッセイが好ましい方法である。

【0112】

別のアッセイにおいて、細胞は、EPOを補った培地中で定常期まで成長させ、採取し、次にEPO不含の培地中で更に18時間培養する。細胞を、等しい細胞密度を有する3つのグループに分ける。1つのグループは、更なる因子を追加せず（ネガティブコントロール）、1つのグループはEPOを有し（ポジティブコントロール）、実験用グループは、試験ペプチドを有する。次に、培養した細胞を種々の時点で採取し、固定し、DNA結合蛍光色素（例えばヨウ化プロピジウムまたはヘキスト染色、どちらもSigma社より入手可能）で染色する。次に、例えばFACS Scan Flowサイトメトリーを使用して、蛍光を測定する。次に、細胞周期の各フェーズにおける細胞のパーセンテージを、例えば、CellFITソフトウェアのSOBRモデル（Becton Dickinson社製）を使用して測定することができる。EPOまたは活性ペプチドで処理された細胞は、ネガティブコントロールグループに比べ、S期においてより高い割合の細胞を示す（DNA含量の増加の指標としての蛍光の増加によって測定される）。

【0113】

FDCP-1（例えばDexter et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047参照）またはTF-1（Kitamura, et al. (1989) Blood 73:375-380）の細胞株を使用して、類似のアッセイを実施できる。FDCP-1は、WEHI-3馴化培地（IL-3（ATCC番号TIB-68）を含有する培地）を補った場合、増殖するが分化はしない、成長因子依存性のマウス多能性初期造血前駆細胞株である。このような実験用に、FDCP-1細胞株をヒトまたはマウスEPO-Rでトランスフェク

10

20

30

40

50

トして、それぞれFDCP-1-hEPO-RまたはFDCP-1-mEPO-R細胞株を調製する。これらは、EPOの存在下で増殖できるが、分化はしない。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、EPO依存性の細胞株であるTF-1も使用できる。

【0114】

更に別のアッセイにおいては、本発明の化合物がEPOアゴニストとして機能する能力を確かめるために、Krystal (1983) Exp. Hematol 11:649-660に記載されているH³-チミジンの脾臓細胞への取り込みをベースにしたマイクロアッセイ用の手順を採用できる。手短に言えば、B6C3F₁マウスに、フェニルヒドラジン(60mg/kg)を2日間注射する。3日目に、脾臓細胞を除去し、24時間にわたる増殖能力を、MTTアッセイを使用して確かめる。

【0115】

エリスロポエチン反応性の細胞株におけるEPOのEPO-Rへの結合は、レセプター、並びにShc、vavおよびJAK2キナーゼを含む多数の細胞内タンパク質のチロシンリン酸化を誘導する。従って、別のインビトロアッセイは、本発明のペプチドの、EPO-Rおよび下流の細胞内シグナル伝達物質であるタンパク質のチロシンリン酸化を誘導する能力を測定する。上述の結合アッセイおよび増殖アッセイによって識別される活性ペプチドは、エリスロポエチン反応性細胞におけるEPOの場合とほぼ同一のリン酸化パターンを引き起こす。このアッセイ用に、FDC-P1/ER細胞 (Dexter, et al. (1980) J Exp Med 152:1036-47) を、EPOを補った培地中で維持し、定常期まで成長させる。次に、これらの細胞を、EPOなしの培地中で24時間培養する。次に、定義された数のこのような細胞を、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を有する細胞のコントロール試料についても、各アッセイを実施する。次に、処理した細胞を遠心分離によって採取し、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を実施する。ゲル内の電気泳動されたタンパク質をニトロセルロースに移し、プロット上のタンパク質を含有するホスホチロシンを、標準的な免疫学的技術によって視覚化する。例えば、プロットは、抗ホスホチロシン抗体 (例えばUpstate Biotechnology, Inc.社製のマウス抗ホスホチロシンIgG) で調べ、洗浄し、そして第2抗体 (例えば, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.社 (ワシントンDC) 製のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG) で調べることができる。その後、ホスホチロシンを含有するタンパク質を、標準的な技術 (比色分析、化学発光アッセイ、蛍光分析を含む) によって視覚化できる。例えば、化学発光アッセイは、Amersham社のECLウェスタンブロッティングシステムを使用して実施できる。

【0116】

本発明のペプチドの活性を評価するために使用できる別の細胞ベースのインビトロアッセイは、マウスの骨髄またはヒトの末梢血細胞を使用したコロニーアッセイである。マウスの骨髄は、マウス的大腿骨から得ることができ、ヒトの末梢血の試料は、健康なドナーから得ることができる。末梢血の場合、はじめに、例えばフィコール-ハイパック濃度勾配 (Stem Cell Technologies, Inc.社 (カナダ国バンクーバー州)) による遠心分離によって、単核球を血液から単離する。このアッセイ用に、オリジナルの試料内の有核細胞の数および濃度を確立するために、有核細胞をカウントする。製造者の指示 (Stem Cell Technologies, Inc.社 (カナダ国バンクーバー州)) に従って、定義された数の細胞をメチルセルロース上に置く。実験的なグループは試験ペプチドで処理し、ポジティブコントロールグループはEPOで処理し、ネガティブコントロールグループはいかなる処理も行わない。次に、定義されたインキュベーション期間 (一般的に10日および18日) 後、各グループの成長するコロニーの数をスコアする。活性ペプチドは、コロニーの形成を促進することとなる。

【0117】

本発明の化合物の活性を実証するために使用できるその他のインビトロ生物学的アッセイは、以下の文献に開示されている: Greenberger, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2935 (EPO依存性の造血前駆細胞株); Quelle and Wojchowski (1991) J. Biol. Chem. 266:609-614 (B6SUt.EP細胞におけるタンパク質のチロシンリン酸化); Dusanter-Fourt, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:10670-10678 (ヒトEPO反応性細胞

10

20

30

40

50

におけるEPOレセプターのチロシンリン酸化) ; Quelle, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:17055-17060 (FDC-ER細胞におけるサイトゾルタンパク質、pp100のチロシンリン酸化) ; Worthington, et al. (1987) Exp. Hematol. 15:85-92 (ヘモグロビンの比色分析) ; Kaiho and Miuno (1985) Anal. Biochem. 149:117-120 (2,7-ジアミノフルオレンを用いたヘモグロビンの検出) ; Patel, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:21300-21302 (c-mycの発現) ; Witthuhn, et al. (1993) Cell 74:227-236 (JAK2の関連およ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) ; およびAndo, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9571-9575 (D2およびD3の循環によるG₁遷移の調節)。

【0118】

種々のレセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストの効果を測定するために、マイクロフィジオメーターとして知られているMolecular Devices社が設計した機器を用いるとうまくいくことが報告されている。この機器の基礎は、レセプターの活性化に応じた細胞外培地の酸性化速度の変化の測定である。

【0119】

インビボでの機能的アッセイ

試験ペプチドの効力を評価するために使用できるインビボでの機能的アッセイの1つは、赤血球増加性・過低酸素症 (exhypoxic) マウスのバイオアッセイである。このアッセイのために、マウスに対し、交互のコンディショニングサイクルを数日間適用する。このサイクルにおいて、低圧条件の期間と周囲圧力条件の期間を、マウスに交互に適用する。その後、試験ペプチドを投与する前に、周囲圧力において2〜3日間マウスを維持する。試験ペプチド試料、またはポジティブコントロールマウスの場合はEPOスタンダードを、調節したマウスに皮下注射する。2日後に、放射性標識を施した鉄 (例えば⁵⁹Fe) を投与し、その2日後に血液試料を採取する。そして、標準的な技術により、各血液試料についてヘマトクリット値および放射能を測定する。活性の試験ペプチドを注射したマウスの血液試料は、試験ペプチドもEPOも注射されなかったマウスよりも多い放射能を示すことになる (赤血球のヘモグロビンによるFe⁵⁹の結合による)。

【0120】

試験ペプチドの効力を評価するために使用できる別のインビボでの機能的アッセイは、網状赤血球のアッセイである。このアッセイのために、EPOまたは試験ペプチドのいずれかを、正常な未処理のマウスに3日間連続で皮下注射する。3日目に、デキストラン鉄をマウスに腹腔内注射する。5日目に、血液試料をマウスから採取する。チアゾールオレンジによる染色およびフローサイトメトリ (flow cytometer) 分析 (網状赤血球数カウントプログラム) によって、血液中の網状赤血球の割合 (%) を測定する。更に、ヘマトクリット値を手動で測定する。訂正された網状赤血球の割合を、以下の式を使用して決定する：

$$\% \text{ RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{ RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{NORMAL}})$$

活性の試験化合物は、試験ペプチドもEPOも注射されなかったマウスに比べて、% RETIC_{CORRECTED} のレベルがより高いであろう。

【0121】

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の生成およびEPOのEPO-Rへの結合に影響を与える、およびそれによって影響されると考えられる多数の要因 (例えばEPO/ EPO-Rシグナル変換/ レセプター活性化のメカニズム) の評価を含む、EPOの生物学的役割を理解するためのツールとして、インビトロで有用である。本発明のペプチドは、EPO-Rに結合するその他の化合物の開発においても有用である。なぜならば、本発明の化合物は、開発を促進する重要な構造と活性の関係についての情報を提供するからである。

【0122】

更に、本発明のペプチドは、EPO-Rへの結合能に基づき、生きている細胞；固定した細胞；生物学的液体；組織のホモジェネート；精製された天然の生物学的材料等においてEP

O-Rを検出するための試薬として使用することができる。例えば、このようなペプチドを標識することにより、EPO-Rをその表面に有する細胞を識別することができる。更に、本発明のペプチドは、EPO-Rへの結合能に基づき、インサイチュ染色、FACS（蛍光活性化細胞分類）による分析、ウェスタンブロッティング、ELISA（酵素免疫測定吸着法）等において使用できる。更に、本発明のペプチドは、EPO-Rへの結合能に基づき、レセプターの精製または細胞表面上（または透過性細胞内）のEPO-Rを発現する細胞の精製において使用できる。

【0123】

本発明のペプチドは、種々の医学研究および診断の目的のために、商用の試薬として利用することもできる。このような使用は、以下を含むことができるがこれらに限定されない：（1）多様な機能的アッセイにおける候補EPO-Rアゴニストの活性を定量するための校正基準としての使用；（2）ランダムペプチドスクリーニングにおける遮断試薬としての使用。すなわち、EPO-Rペプチドリガンドの新しいファミリーを探す際に、本発明のEPOペプチドの回収を遮断するために、ペプチドを使用できる；（3）EPO-Rとの共結晶化における使用。すなわち、EPO-Rに結合される本発明のペプチドの結晶を形成することができ、X線結晶学によるレセプター／ペプチド構造の測定を可能にする；（4）赤血球前駆細胞誘導グロビン合成およびヘム複合体合成の生産量を測定するため、および分化を開始することによってフェリチン受容体の数を増加させるための使用；（5）EPO依存性の細胞株（FD CP-1-mEPO-RおよびTF-1細胞株等）の増殖を維持するための使用；（6）本発明のペプチドを放射性の発色団で標識することに関連した使用；ならびに（7）EPO-Rが好ましくは活性化され、またはこのような活性化が、知られている量のEPO-Rアゴニストに対して都合よく測定される、その他の研究および診断への適用等。

【0124】

本発明の別の局面において、治療方法およ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、EPOのEPO-Rに対する結合をインビボで刺激するために、温血動物（ヒトを含む）に投与することができる。従って、本発明は、EPOの欠乏に関連した傷害を治療する方法を含有し、このような方法は、EPO-Rを刺激し、インビボにおいてEPOの欠乏に関連した症状を緩和するのに十分な量の本発明のペプチドを投与することを含む。例えば、本発明のペプチドは、以下を治療する際に使用できる：腎不全および／または末期腎不全／透析；AIDSに関連した貧血；慢性炎症性疾患（例えば関節リウマチおよび慢性腸炎）および自己免疫疾患に関連した貧血；ならびに手術前に患者の赤血球数を高めること。本発明のペプチドの投与によって治療できるその他の病状、障害、および血液学的に不規則な状態は、以下を含む：ベータサラセミア；嚢胞性線維症；妊娠および月経不順；早期の未熟児貧血；脊髄損傷；宇宙飛行；急性失血；老化；発作、虚血（CNSおよび心臓の両方）；および異常な赤血球生成を伴う種々の腫瘍性の病状。

【0125】

その他の実施形態において、本発明のペプチド化合物は、例えば輸血前の前治療として、少ないまたは不足している赤血球によって特徴づけられない障害を治療するために使用できる。更に、本発明の化合物を投与すると、出血する時間が減少する結果となり、従って、手術前に、または出血が予想されとの兆候に対し、患者への投与に使用できる。更に、本発明の化合物は、巨核球の活性化においても使用できる。

【0126】

EPOが、血管内皮細胞に対する細胞分裂促進作用および走化性効果、並びに中央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およびKonishi, et al. (1993) Brain Res. 609:29-35参照）、本発明の化合物は、種々の血管障害の治療（例えば創傷治癒の促進；側副冠状動脈（collateral coronary blood vessel）の成長の促進（心筋梗塞後に起こり得るもの等）；外傷の治療；および血管移植後の治療等）にも使用することができる。本発明の化合物は、その他の神経作動性物質（例えば神経伝達物質）に比べて低いアセチルコリンの絶対値または低いアセチルコリンの相対値によって一般的に特徴づけ

られる、多様な神経学的障害の治療においても使用できる。

【0127】

医薬組成物

本発明の別の局面において、上述の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。このような組成物の投与によって緩和または調節される状態は、上述のものを含む。このような医薬組成物は、経口的、非経口的（筋肉内、腹腔内、静脈内(IV)または皮下注射）、経皮的（受動的に、あるいはイオントフォoresisまたはエレクトロポレーションを使用）、経粘膜的（鼻、膣、直腸、または舌下）な経路による投与のため、あるいは生体内分解性の挿入物の使用のためであって良く、各投与経路に適切な投薬形態に処方することができる。一般的に、本発明は、有効量の本発明のEPO-Rアゴニストペプチドまたは誘導体生成物と共に、薬学的に許容可能な希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび／またはキャリアを含む医薬組成物を包含する。そのような組成物は以下を含む：種々の緩衝液（例えばTris-HCl、アセテート、リン酸塩）の希釈液、pHおよびイオン強度；洗浄剤および可溶化剤等の添加剤（例えばTween20、Tween80、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）、防腐剤（例えばチメルゾル、ベンジルアルコール）および膨張性物質（例えばラクトース、マンニトール）；高分子化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸等）の微粒子調製物、またはリポソームへの材料の組み込み。ヒアルロン酸も使用できる。このような組成物は、本発明のタンパク質および誘導体の物理的状态、安定性、インビボでの放出速度、およびインビボでのクリアランスの速度に影響を与え得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版（1990, Mack Publishing Co.（ペンシルバニア州18042イーストン）） pp. 1435-1712参照（引用することにより本明細書の一部をなす）。組成物は、液体の形態、または乾燥粉末の形態（例えば凍結乾燥される）に調製できる。

【0128】

経口送達

本明細書は、経口的固体の投薬形態の使用を意図しており、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 1990 (Mack Publishing Co.（ペンシルバニア州18042イーストン））の第89章にそれらの概要が述べられている（引用することにより本明細書の一部をなす）。固体の投薬形態は以下を含む：錠剤；カプセル；丸薬；トローチまたは薬用キャンデー；カシェ剤；ペレット剤；粉末；あるいは顆粒。また、本発明の組成物を処方するために、リポソームまたはプロテノイドによるカプセル化も使用できる（例えば米国特許第4,925,673号において報告されているプロテノイドミクロスフェア）。リポソームによるカプセル化を使用でき、リポソームは種々のポリマーで誘導体化できる（例えば米国特許第5,013,556号）。治療用の可能な固体の投薬形態は、Marshall, K., Modern Pharmaceutics, G.S. BankerおよびC.T. Rhodes編 第10章 1979に記載されており、引用することにより本明細書の一部をなす。一般的に、処方は、EPO-Rアゴニストペプチド（またはその化学的に修飾された形態）、並びに、胃の環境に対する保護および腸における生物学的活性材料の放出を可能にする不活性成分を含む。

【0129】

経口投与のための液体の投薬形態の使用も本明細書は意図しており、それには薬学的に許容可能な乳剤、溶液、懸濁液、およびシロップが含まれ、それらは以下を含むその他の成分を含有できる：不活性希釈剤；湿潤剤等のアジュバント；乳化剤および懸濁化剤；並びに甘味剤、香料添加剤および香料（perfuming agent）。

【0130】

誘導体の経口送達が有効であるように、ペプチドを化学修飾することができる。一般的に、意図される化学修飾は、成分の分子自体に少なくとも1つの部分を結合するものであり、ここで、この部分は：（a）タンパク質分解の阻害；および（b）胃または腸から血流への取り込みを可能にする。また、成分（1つまたは複数）の全体的な安定性の増加および体内を循環する時間の増加も所望されている。上述のように、薬学的な使用のためには、PEG化が好ましい化学修飾である。使用できるその他の部分は、以下を含む：プロピレ

ングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、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-ジオキソランおよびポリ-1,3,6-チオキソカン（例えばAbuchowskiおよびDavis (1981), *Enzymes as Drugs*, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," HoenbergおよびRoberts編 (Wiley-Interscience (ニューヨーク州ニューヨーク) pp. 367-383; およびNewmark, et al. (1982) *J. Appl. Biochem.* 4:185-189参照)。

【0131】

経口の処方物について、放出の位置は胃、小腸（十二指腸、空腸または回腸）、または大腸であって良い。当業者は、胃では溶解しないが十二指腸または腸において材料を放出する、入手可能な処方物を有する。好ましくは、放出によって、ペプチド（または誘導体）の保護あるいはペプチド（または誘導体）の放出によって、胃の環境を越えて（小腸の中等）胃の環境の悪影響を避けることになる。

【0132】

完全な胃への抵抗を確保するために、少なくともpH 5.0まで不浸透性であるコーティングが必須である。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以下の通りである：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)、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、セルロースアセテートフタレート (CAP)、Eudragit L、Eudragit S、およびShellac。これらのコーティングは、混合膜として使用できる。

【0133】

コーティングまたはコーティングの混合は、錠剤にも使用することができ、胃に対する保護を意図しない。これには、糖衣、または錠剤をのみ込みやすくするコーティングが含まれる。カプセルは、乾燥した治療薬（すなわち粉末）を送達するための硬い殻（ゼラチン等）から成っていて良く、液体の形態については、軟らかいゼラチンの殻を使用できる。カシェ剤の殻の材料は、濃いデンプンまたはその他の食用紙であって良い。丸薬、薬用キャンデー、成形タブレットまたは粉薬錠剤については、湿らせて固める技術が使用できる。

【0134】

ペプチド（または誘導体）は、粒径が約1mmの顆粒またはペレットの形態における細かい多数の微粒子 (multiparticulate) として、処方物内に含ませることができる。カプセル投与用の材料の処方は、粉末、軽く圧縮したプラグ、または錠剤としてでも良い。これらの治療薬は、圧縮によって調製できる。

【0135】

着色剤および／または香料添加剤も含むことができる。例えば、ペプチド（または誘導体）を処方し（リポソームまたはミクロスフェアによるカプセル化等により）、その後更に食用生成物、例えば着色剤および香料添加剤を含有する冷却された飲料内に含有させることができる。

【0136】

ペプチド（または誘導体）の容量を、不活性材料で希釈するまたは増加させることができる。これらの希釈剤は以下を含むことができる：炭水化物(特にマンニトール)、αラクトース、無水乳糖、セルロース、スクロース、修飾されたデキストランおよびデンプン。ある無機塩類も充填剤として使用することができ、それらには以下のものが含まれる：カルシウム三リン酸塩、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウム。市販されている希釈剤として、Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、EmcompressおよびAvicellが挙げられる。

【0137】

治療薬を固体の投薬形態に処方する際に、崩壊剤を含ませることができる。崩壊剤として使用される材料は、デンプン（デンプンをベースにした市販の崩壊剤であるエキスプロタブを含む）を含むが、これらに限定されない。以下のものも全て使用できる：デンプングリコール酸ナトリウム、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、ウルトラミロベクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸カルボキシ

10

20

30

40

50

メチルセルロース、天然のスポンジおよびベントナイト。崩壊剤は、不溶性のカチオン交換樹脂であっても良い。崩壊剤および結合剤として粉末のゴムも使用することができ、寒天、カラヤまたはトラガカント等の粉末のゴムを含むことができる。崩壊剤として、アルギン酸およびそのナトリウム塩も有用である。

【0138】

ペプチド（または誘導体）の薬剤を保持して硬い錠剤を形成するために、結合剤を使用することができ、結合剤には、アラビアゴム、トラガカント、デンプンおよびゼラチン等の天然の生成物由来の材料が含まれる。その他には、メチルセルロース(MC)、エチルセルロース(EC)およびカルボキシメチルセルロース(CMC)が含まれる。ペプチド（または誘導体）を粒状にするために、アルコール溶液中でポリビニルピロリドン(PVP)およびヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)のどちらも使用することができる。

10

【0139】

処方工程中の付着を防ぐために、ペプチド（または誘導体）の処方において抗摩擦剤を含ませることができる。ペプチド（または誘導体）とダイ壁との間の層として滑剤を使用でき、これらは以下を含み得るがこれらに限定されない：ステアリン酸（そのマグネシウム塩およ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、植物油およびワックス。水溶性の滑剤（ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、種々の分子量のポリエチレングリコール、カーボワックス4000および6000等）も使用できる。

【0140】

処方中に薬物の流動特性を改善することができ、圧縮中に再配列を助ける流動促進剤を添加することができる。流動促進剤は、デンプン、タルク、焼成シリカおよび水和シリコアルミネートを含み得る。

20

【0141】

水溶性の環境へのペプチド(または誘導体)の溶解を助けるために、界面活性剤を湿潤剤として加えることができる。界面活性剤は、陰イオン洗浄剤（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およびジオクチルソジウムスルホネート等）を含み得る。陽イオン洗浄剤も使用でき、これは、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンズエソミウム（benzethonium）を含み得る。界面活性剤として処方物に含ませ得る潜在的な陰イオン洗浄剤のリストは以下の通りである：ラウロマクロゴール400；ステアリン酸ポリオキシル40；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50および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および80；ショ糖脂肪酸エステル；メチルセルロース；並びにカルボキシメチルセルロース。これらの界面活性剤は、単独で、または多様な割合での混合物として、タンパク質または誘導体の処方物において存在することができる。

30

【0142】

ペプチド（または誘導体）の取り込みを潜在的に強化する添加剤は、例えば、脂肪酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸である。

【0143】

放出制御経口用処方物が望ましいであろう。ペプチド（または誘導体）は、拡散または浸出機構（例えばゴム）によって放出を可能にする不活性マトリックスに組み込ませることができる。ゆっくり変性するマトリックスも、処方物に組み込ませることができる。いくつかの腸溶コーティングも、放出を遅らせる効果を有する。放出制御の別の形態は、Or os治療薬システム（Alza社）に基づく方法によるものである。すなわち、水を通し、浸透圧の効果による単一の小さな開口部を通じて薬物を外に押し出す半透性の膜内に、薬物を入れる。

40

【0144】

処方の際にその他のコーティングを使用することができる。これらには、コーティングパンにおいて適用できる多様な糖類が含まれる。また、ペプチド（または誘導体）は、膜でコートされた錠剤内に与えることができ、この場合に使用される材料は、2つのグルー

50

ブに分かれる。1つ目は、非腸溶性の材料であって以下を含む：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、プロピドンおよびポリエチレングリコール。2つ目のグループは、一般的にフタル酸のエステル類である腸溶性の材料から成る。

【0145】

最適な膜コーティングを提供するために、材料の混合を使用できる。膜コーティングは、パン塗布装置または流動床において、あるいは圧縮コーティングによって行うことができる。

【0146】

非経口投与

本発明の非経口投与用製剤は、殺菌した水溶性または非水溶性の溶液、懸濁液、または乳剤を含む。非水溶性溶剤またはビヒクルの例は以下の通りである：プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；植物油（オリーブオイルおよびトウモロコシ油等）；ゼラチン；および注射可能な有機エステル（オレイン酸エチル等）。このような投薬形態は、アジュバント（保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤等）も含有することができる。それらは、例えば、細菌保持フィルターによるろ過、組成物内への滅菌剤の組み入れ、組成物への放射線照射、または組成物の加熱によって殺菌できる。また、使用の直前に滅菌水またはその他の殺菌した注射可能な培地を使用しても製造できる。

【0147】

直腸または膣投与

直腸または膣投与用の組成物は、好ましくは、活性物質に加えて賦形剤（ココアバターまたは坐薬用ワックス等）を含み得る座剤である。経鼻または舌下投与用の組成物も、当技術分野において周知の標準的な賦形剤と共に調製される。

【0148】

肺送達

本明細書は、EPO-Rアゴニストペプチド（またはその誘導体）の肺送達も意図している。ペプチド（または誘導体）は、吸入中に哺乳動物の肺まで送達され、肺の上皮層を通して血流まで至る（例えば以下を参照：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, p. 206-212（ α 1-抗トリプシン）；Smith, et al. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146（ α 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*（組み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- γ および腫瘍壊死因子 α ）；およびPlatzらの米国特許第5,284,656号（顆粒球コロニー刺激因子）。全身的作用のための薬物の肺送達のための方法および組成物は、Wongらの米国特許第5,451,569号に記載されている。

【0149】

治療薬の肺送達用に設計された広範囲の機械装置を、本発明の実施において使用することが意図されており、それらには、噴霧器、定量吸入器、および粉末吸入器が含まれるがこれらに限定されず、これらの全てが当業者のよく知るものである。本発明の実施に適切な市販されている機器の具体例としては、Ultravent噴霧器(Mallinckrodt社（ミズーリ州セントルイス））、Acorn II噴霧器(Marquest Medical Products社（コロラド州エーグルウッド））、Ventolin定量吸入器(Glaxo社（ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク））、およびSpinhaler粉末吸入器（Fisons社、マサチューセッツ州ベッドフォード）がある。

【0150】

これらの機器は全て、ペプチド（または誘導体）の調剤に適切な処方を使用を必要とす

10

20

30

40

50

る。典型的には、各処方は、採用する機器のタイプに特異的であり、治療に有用な通常の希釈剤、アジュバントおよび／またはキャリアに加え、適切な推進材料の使用を伴うことができる。また、リポソーム、マイクロカプセルまたはミクロスフェア、包接錯体、あるいはその他のタイプのキャリアの使用が意図されている。化学修飾のタイプまたは採用する機器のタイプに依存して、化学的に修飾したペプチドを異なる処方で調製することもできる。

【0151】

ジェット型または超音波型いずれにおいても、噴霧器と共に使用するのに適切な処方物は、典型的には、溶液1mLに対して生物学的に活性のタンパク質約0.1~25 mgの濃度で水に溶解させたペプチド（または誘導体）を含む。処方物は、緩衝液および単糖を含むことができる（例えば、タンパク質の安定化および浸透圧の調節のために）。噴霧器用の処方物はまた、エアロゾルの形成において溶液の噴霧によって引き起こされる表面に誘起されたペプチド（または誘導体）の凝集を減少させるまたは防ぐために、界面活性剤を含有することができる。

10

【0152】

定量吸入器と共に使用するための処方物は、一般的に、界面活性剤の助けを借りて推進剤内に懸濁させたペプチド（または誘導体）を含有する微粉化した粉末を含む。推進剤は、この目的で採用される任意の従来の材料であって良い。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、ハイドロフルオロカーボン、または炭化水素等（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および1,1,1,2-テトラフルオロエタン、またはそれらの組合せを含む）。適切な界面活性剤は、ソルビタントリオレエートおよび大豆レシチンを含む。オレイン酸も、界面活性剤として有用であり得る。

20

【0153】

粉末吸入機器からの投薬のための処方物は、ペプチド（または誘導体）を含有する微粉化した乾燥粉末を含み、膨張性薬剤（ラクトース、ソルビトール、スクロースまたはマンニトール等）も含むことができ、その量は、機器からの粉末の分散を促進する量である（例えば処方物の50~90wt%）。ペプチド（または誘導体）は、最も有利に微粒子の形態に調製すべきであり、肺の末端まで最も効果的に送達するために、平均粒径は10 μ m（またはミクロン）未満、最も好ましくは0.5~5 μ mである。

30

【0154】

経鼻送達

本明細書は、EPO-Rアゴニストペプチド（または誘導体）の経鼻送達も意図している。経鼻送達は、治療薬を鼻に投与したすぐ後に、ペプチドが血流まで行き着くことを可能にし、治療薬を肺に堆積させる必要が無い。経鼻送達用の処方物は、デキストランまたはシクロデキストランを有するものを含む。

【0155】

本発明のペプチドと共に、経鼻送達を促進するために使用されるその他の経皮吸収促進剤を使用することも意図されている（2003年12月17日に出版された国際公開第2004/056314号等に記載されており、その全体を引用することによって、本明細書の一部となす）。

40

【0156】

用量

ペプチド化合物全てについて、更なる研究が実施され、種々の患者における種々の状態を治療するための適切な用量についての情報が提供される。投薬を受ける者の治療の状況、年齢、および総体的な健康状態を考慮すれば、当業者は、適切な投薬用量を突き止めることができるであろう。選択される用量は、所望の治療効果、投与経路、および所望の治療期間に依存する。一般的には、哺乳動物に対し、体重1kg当たり0.001~10mgの用量を毎日投与する。一般的に、静脈内注射または注入用については、用量を少なくすることができる。

【0157】

50

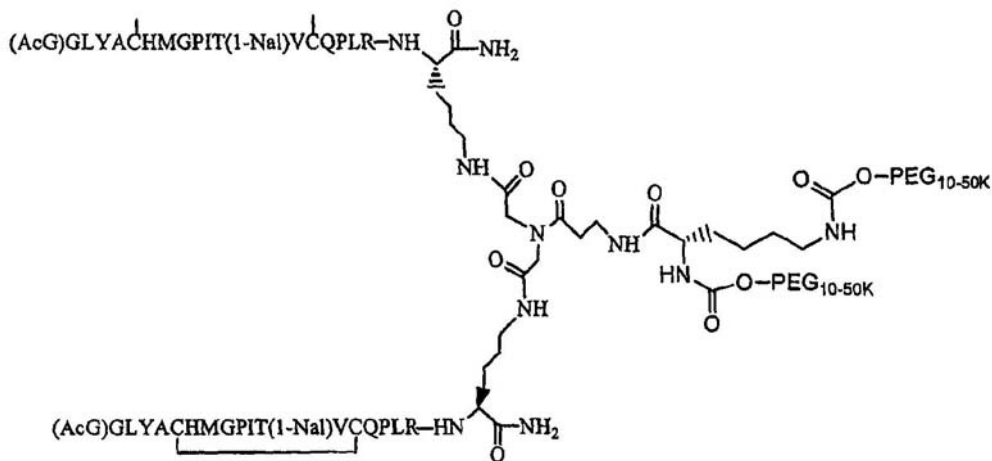
ある実施形態においては、透析前または透析中の腎不全を有する個体（透析未経験の患者または透析患者）を治療するために、本発明のペプチドのいずれかを使用することができる。この実施形態における投薬用量の範囲は、個体の体重1キログラム（kg）に対して化合物0.025～0.2ミリグラム（mg）（0.025～0.2mg/kg）であって良い。より具体的には、投薬用量の範囲が0.05～0.1mg/kgであるのが好ましい。更に、医師は、0.025mg/kgの用量から始めて、治療している個体それぞれについて個体それぞれのヘモグロビン反応に基づいて、約0.025mg/kgづつ用量を増量していくことができる。このように、医師は、適切なヘモグロビン反応が得られるまで、個体それぞれの用量を増量していくことができる。透析未経験の患者または透析患者である個体の場合、適切なヘモグロビン反応とは、ほぼ正常なヘモグロビンレベル（14～15g/dL）を得ること、または、医師が定める別のヘモグロビンレベルを得ることであろう。この実施形態において、個々の透析未経験の患者または透析患者についての薬理的に活性な用量(PAD)は、0.067～0.075mg/kgであると予測される。この実施形態の利点は、現在の他の赤血球生成促進剤（ESA）の場合は週に1度の投与であるのに対し、個々の患者に対して3～4週間に1度の頻度で投与することによる、より低い投薬用量であると予測される。多数の投与経路が使用できる（上述の通り、経口投与、静脈内投与等）。透析患者向けの好ましい投与経路は、静脈内投与である。透析未経験の患者向けの好ましい投与経路は、皮下投与である。その他のある実施形態において、悪性腫瘍と関連した貧血症を有する個体（癌患者）を治療するために、上述の化合物のうちの1つを使用することができる。この実施形態における投薬用量の範囲は、透析未経験の患者または透析患者についての範囲の3～5倍であると予測される（すなわち0.075～0.5mg/kg）。より具体的には、投薬用量の範囲が0.2～0.4mg/kgであるのが好ましい。上述のように、癌患者を治療する医師は、0.075mg/kgの用量から始めて、適切なヘモグロビン反応が得られるまで、約0.075mg/kgづつ用量を増量していくことができる。個々の癌患者のPADは、約0.25mg/kgであると予測される。この場合においても、個々の患者に対して3～4週間に1度の頻度で、用量がより低いという利点が予測される。更に、癌患者におけるその他の利点は、化学療法の前に（例えばその3～5日前に）投薬できること、または、網状赤血球の刺激とヘモグロビンの増加の間の遅滞期中におけるヘモグロビンの減少を防ぐために、化学療法と共に投与することができることである。多数の投与経路が使用できる（上述の通り、経口投与、静脈内投与等）。癌患者向けの好ましい投与経路は、皮下投与であろう。透析未経験の患者、透析患者、または癌患者の治療に使用するための好ましい化合物は、以下に示すものを含む。

【0158】

カルバメート結合；サルコシン無し；PEGの重量の範囲（ここでは配列番号1を示す）

:

【化42】

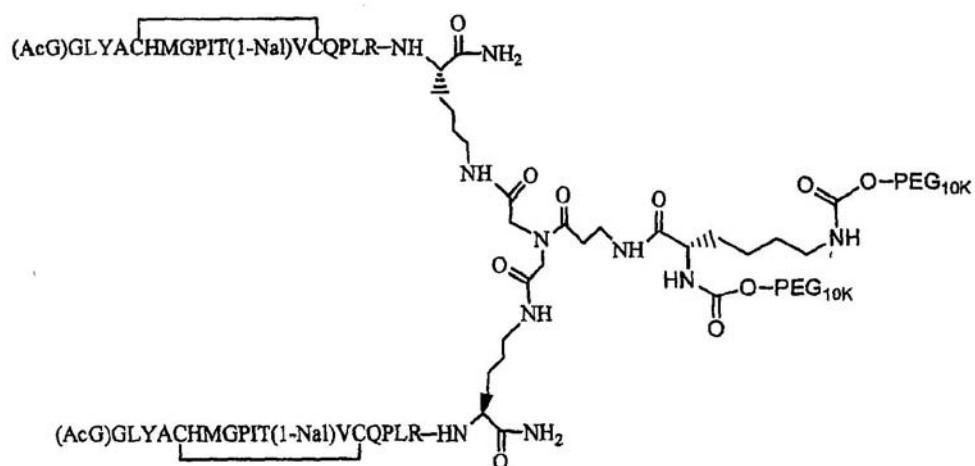


【0159】

カルバメート結合；サルコシン無し；好ましいPEGの重量（ここでは配列番号1を示す）

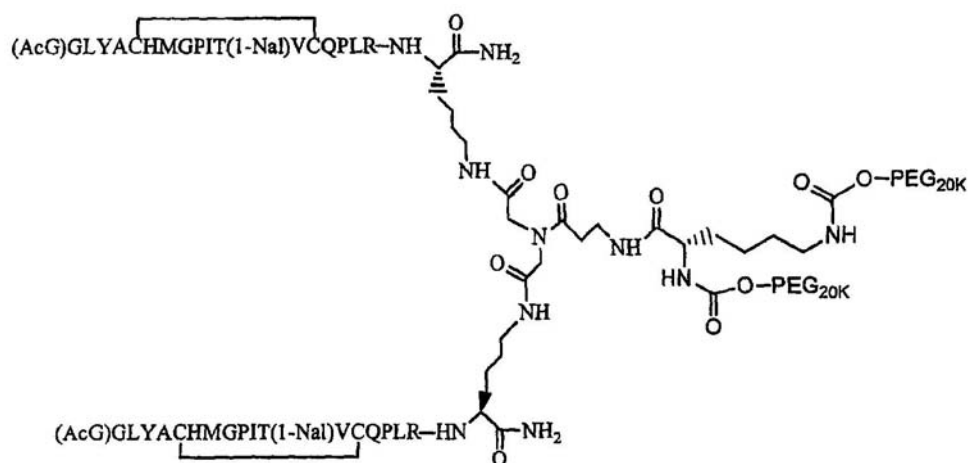
) :

【化 4 3】



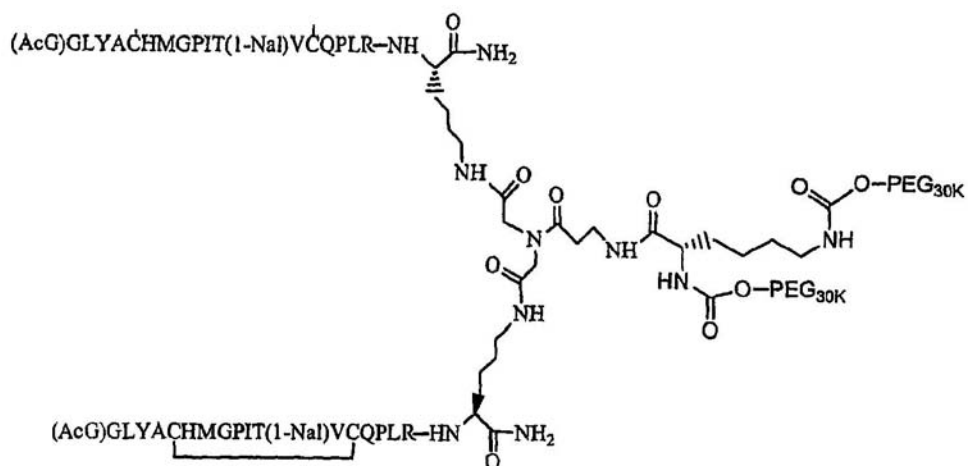
10

【化 4 4】



20

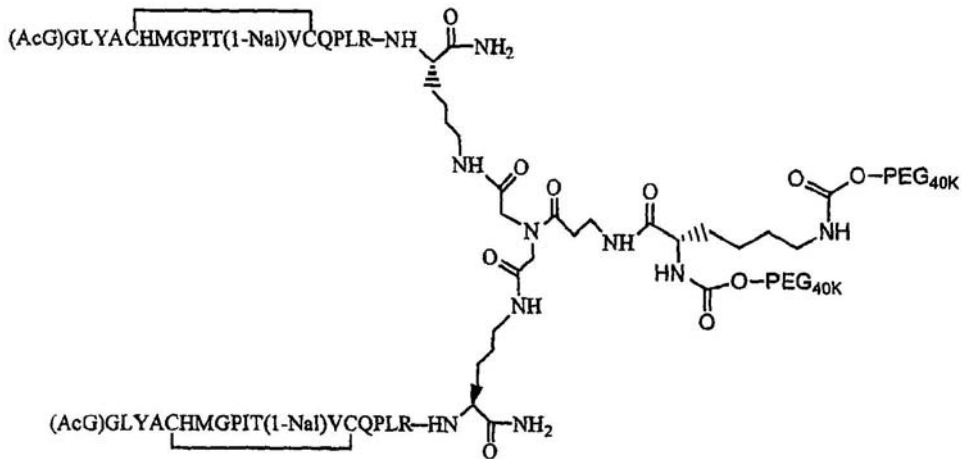
【化 4 5】



30

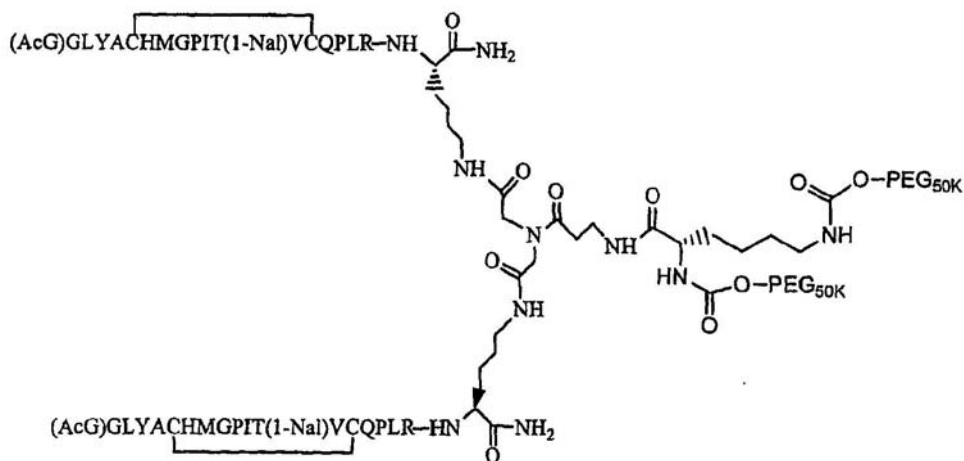
40

【化 4 6】



10

【化 4 7】



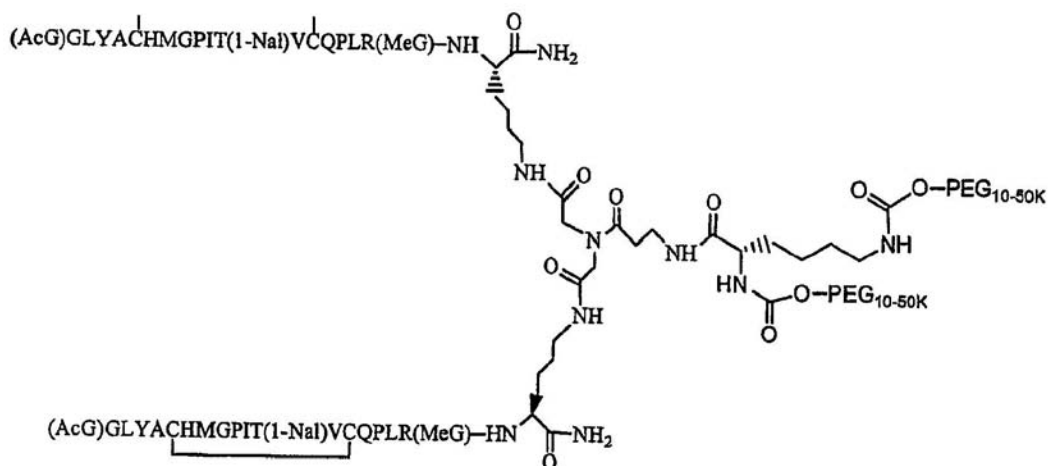
20

【 0 1 6 0】

カルバメート結合；サルコシン有り；PEGの重量の範囲（ここでは配列番号2を示す）

30

【化 4 8】

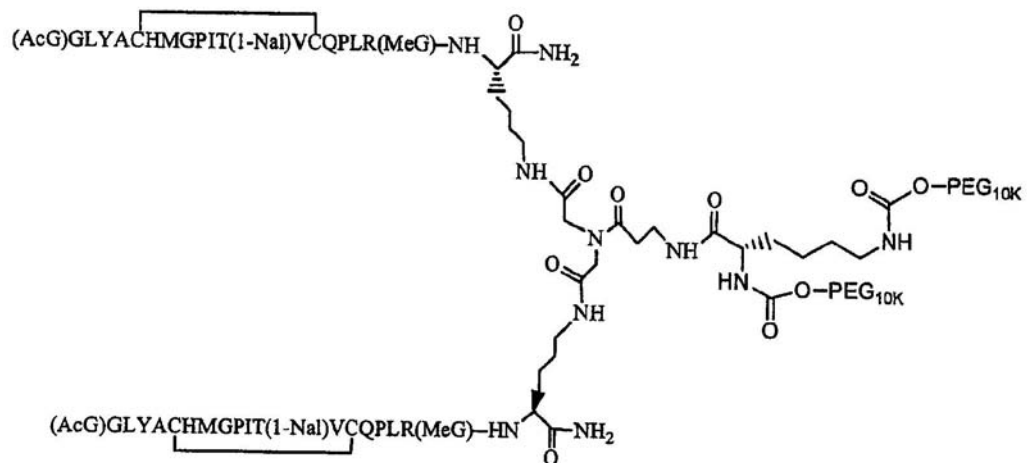


40

【 0 1 6 1】

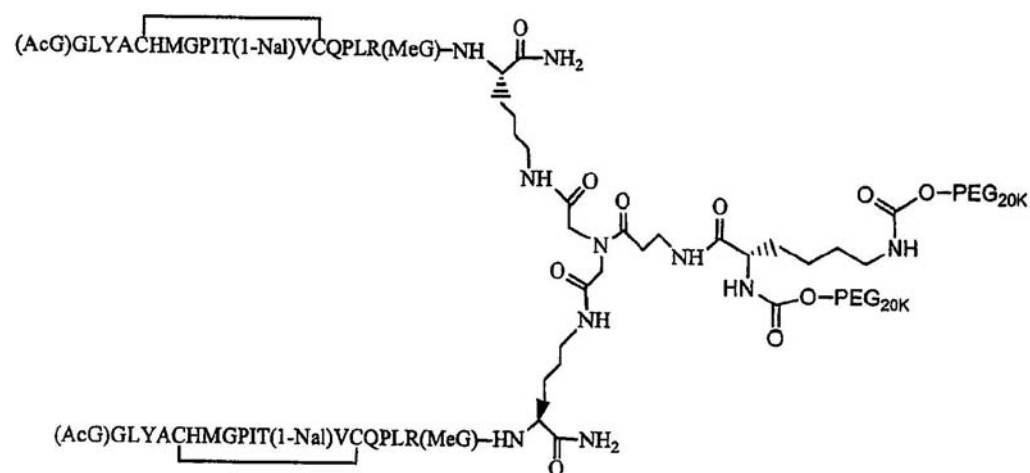
カルバメート結合；サルコシン有り；好ましいPEGの重量（ここでは配列番号2を示す）：

【化 4 9】



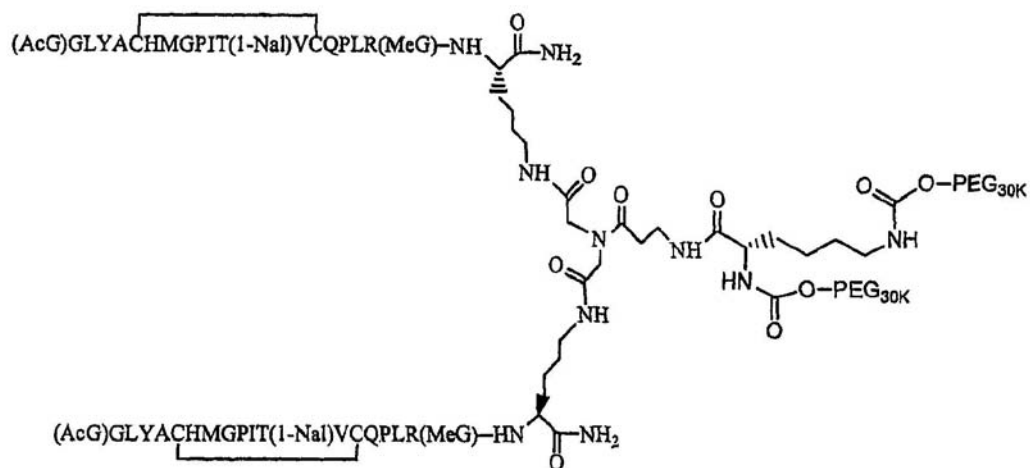
10

【化 5 0】



20

【化 5 1】



30

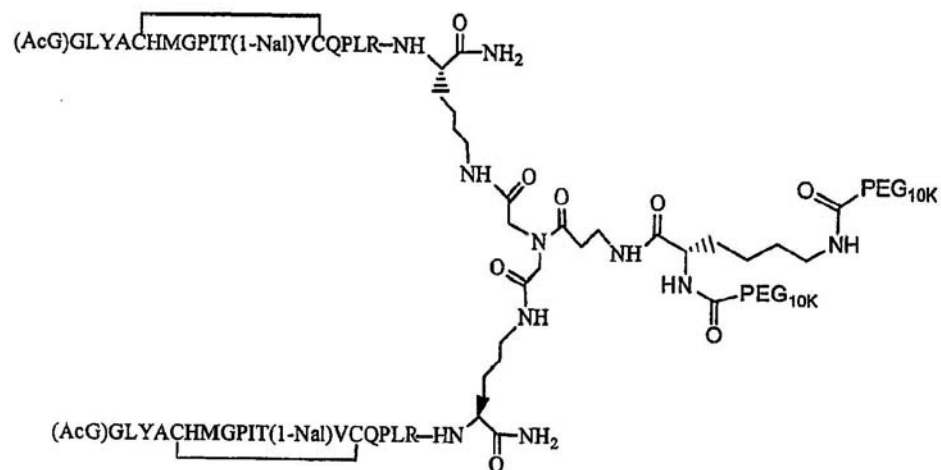
40

The chemical structure shows a dimeric peptide. Each monomer consists of an N-terminal sequence (AcG)GLYACHMGPIT(1-Nal)VCQPLR(MeG)-NH- attached to a chiral center. This center is also bonded to a hydrogen atom (wedge bond) and a side chain (dashed bond). The side chain is a long alkyl chain ending in a PEG40K group. The two monomers are linked via a peptide bond between the C-terminal amino group of one monomer and the N-terminal amino group of the other monomer.

Chemical structure of a dimeric protein-PEG conjugate. The structure shows two identical protein-PEG units linked by a disulfide bond. Each protein unit consists of a peptide chain (AcG)GLYACHMGPIT(1-Nal)VCQPLR-NH- attached to a cysteine residue. The cysteine residue is part of a disulfide bridge. The protein chain is linked to a PEG chain via an amide bond. The PEG chain is labeled PEG_{10-50K}.

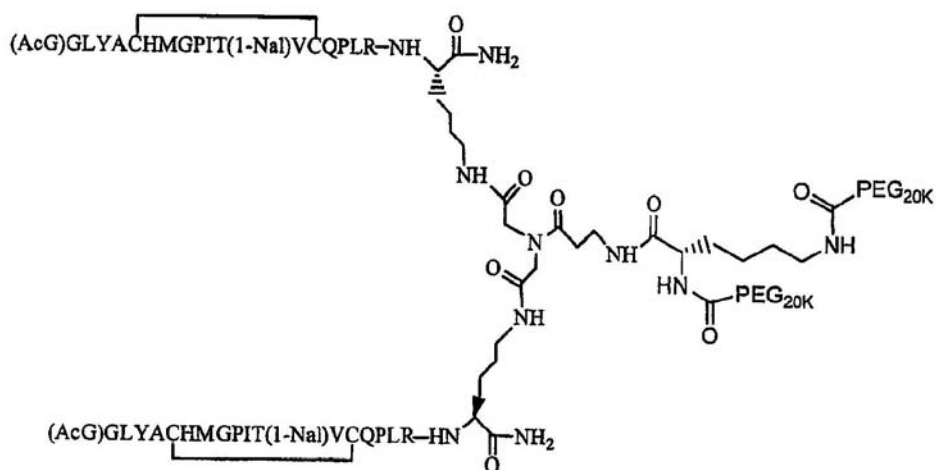
アミド結合；サルコシン無し；好ましいPEGの重量（ここでは配列番号1を示す）：

【化 5 5】



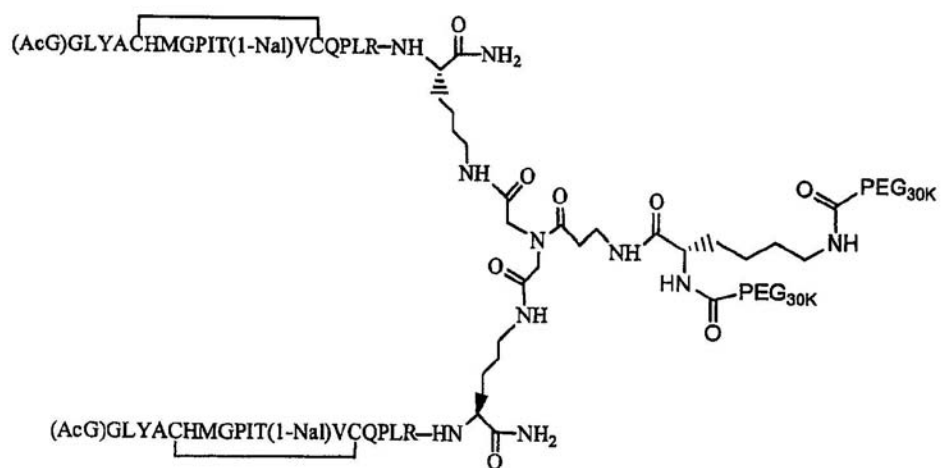
10

【化 5 6】



20

【化 5 7】



30

40

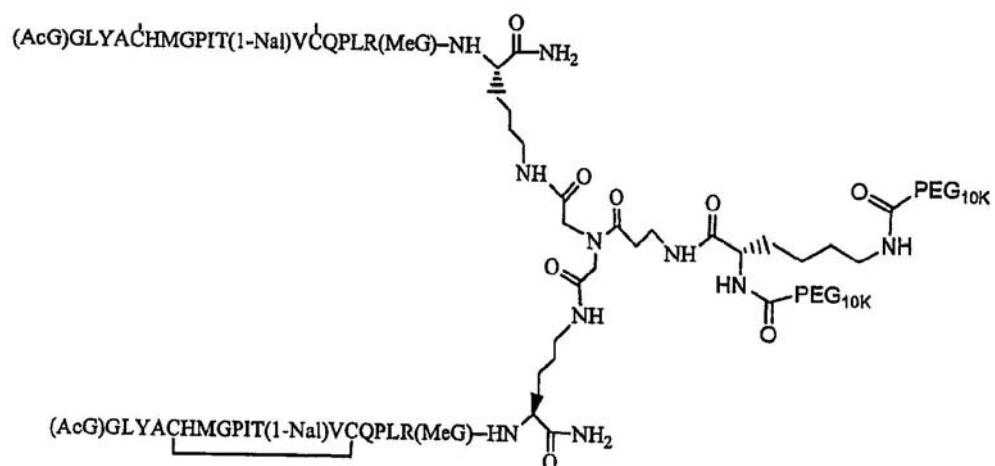
Chemical structure of a dimeric protein-PEG conjugate. The structure shows two identical protein units, each consisting of a peptide chain (AcG)GLYACHMGPIT(1-Nal)VCQPLR-NH₂, linked by a disulfide bond. The protein units are connected to a central PEG_{50K} linker via amide bonds. The PEG_{50K} linker is represented as a long, flexible chain with terminal amide groups.

アミド結合；サルコシン有り；PEGの重量の範囲（ここでは配列番号2を示す）：

The chemical structure shows a dimeric peptide. Each monomer consists of an N-terminal (AcG)GLYACHMGPIT(1-Nal)VCQPLR(MeG)-NH- group, followed by a chiral center (indicated by a wedge bond) with an amide group (-NH-C(=O)-NH₂). This is linked via a long chain to a central amide group (-NH-C(=O)-). The central amide group is further linked to a side chain containing a PEG_{10-50K} group. The side chain also includes a chiral center (indicated by a wedge bond) and another amide group (-NH-C(=O)-NH₂). The two monomers are connected by a central amide bond.

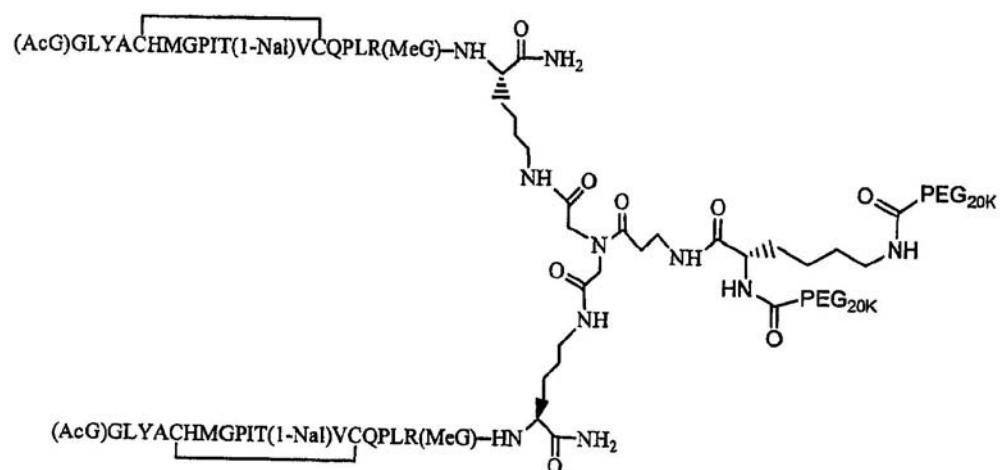
アミド結合；サルコシン有り；好ましいPEGの重量（ここでは配列番号2を示す）：

【化 6 1】



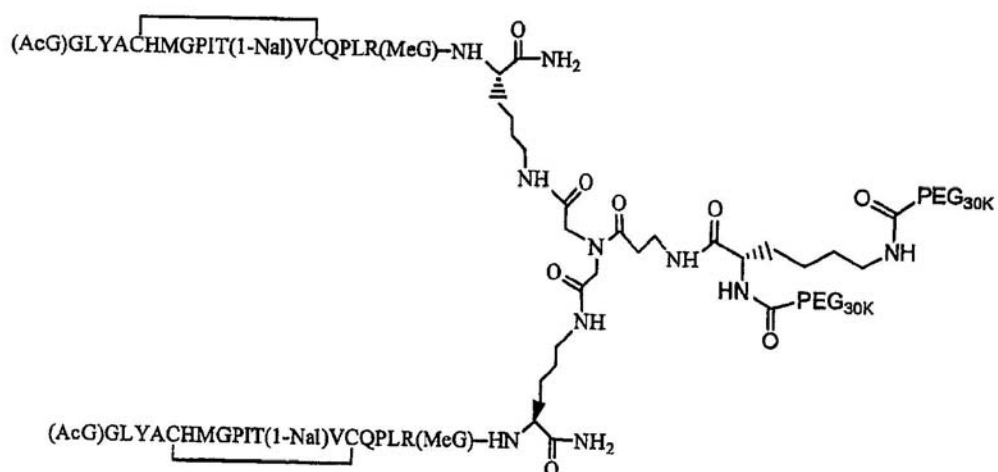
10

【化 6 2】



20

【化 6 3】



30

40

Chemical structure of the dimeric peptide $(\text{AcG})\text{GLYAC}^{\text{I}}\text{HMGPI}^{\text{I}}\text{T}(\text{1-Nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})\text{-NH}$ linked via a disulfide bond. The structure shows two identical peptide chains connected by a disulfide bond between the cysteine residues (Cys1 and Cys2). Each chain contains a hydrophobic core (HMGPI) and a hydrophilic tail (VCQPLR) with a terminal amide group. The side chains include an acetyl group (AcG), a Nal residue, and a MeG residue. The structure is labeled with $\text{PEG}_{40\text{K}}$ groups, indicating the presence of polyethylene glycol (PEG) linkers.

10

Chemical structure of a dimeric protein-PEG conjugate. The structure shows two identical protein units linked by a disulfide bond. Each protein unit consists of a peptide chain (AcG)GLYACHMGPIT(1-Nal)VCQPLR(MeG)-NH- attached to a cysteine residue, which is part of a disulfide bridge. The cysteine residue is also linked to a PEG50K chain via a carbamate linkage.

20

本発明のペプチド（またはその誘導体）は、1つ以上の更なる有効成分または医薬組成物と共に投与することができる。

30

实施例

次に、本発明について、以下の実施例を基に説明する。しかし、これらの実施例および明細書中に記載のその他の例は、単に実例として挙げただけであり、本発明または任意の例示された形態の範囲および意味を限定するものではない。同様に、本発明は、本明細書に記載されたいかなる特定の好ましい実施形態にも限定されない。実際には、本明細書を読めば、本発明の多数の変更およびバリエーションが、当業者にとって明らかであろうし、本発明の精神および範囲から逸脱することなく作成することができる。従って、本発明は、請求項が請求するものと同等の内容の範囲全部と共に、添付された特許請求の範囲にける用語によってのみ限定される。

40

【 0 1 6 8 】

固相合成によるEP0-Rアゴニストペプチドダイマーの合成

工程 1 - Cbz-TAP の合成：

無水DCM (100ml) 中の市販のジアミン (Aldrich Chemical社製の「TAP」) (10g、67.47mmol) を含有する溶液を0℃まで冷却した。無水DCM (50ml) 中のクロロギ酸ベンジル (4.82ml、33.7mmol) の溶液を、滴下漏斗を通して6~7時間かけてゆっくりと加え、反応混合物の温度を0℃に維持しておき、そして室温まで (25℃まで) 上昇させておいた。更に16時間後、真空下でDCMを除去し、3N HClとエーテルとの間で残液を分配した。水層を回収

50

し、50%NaOH水溶液を用いてpH8~9まで中和し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水Na₂SO₄で乾燥し、真空下で濃縮して粗モノ-Cbz-TAP (5g、収率約50%)を調製した。この化合物は、更なる精製を加えずに次の反応に使用した。

【化 6 6】



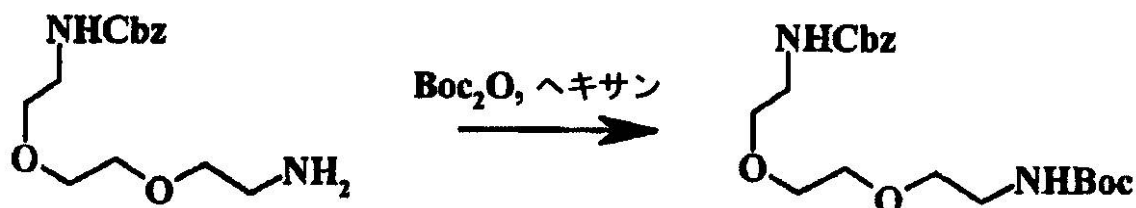
10

【0169】

工程 2 - Cbz-TAP-Boc の合成：

ヘキサン(25ml)中Cbz-TAP (5g、17.7mmol) の激しく攪拌した懸濁液に、Boc₂O (3.86g、17.7mmol) を加え、室温で一晩攪拌を継続した。反応混合物をDCM(25ml)で希釈し、10%クエン酸水溶液(2倍)、水(2倍)およびブラインで洗浄した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥し、真空下で濃縮した。粗生成物(収量5g)を、次の反応に直接使用した。

【化 6 7】



20

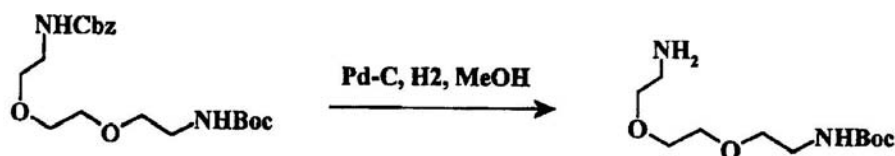
【0170】

工程 3 - Boc-TAP の合成：

先の反応で得られた粗生成物をメタノール(25ml)に溶解し、炭素(5% w/W)上の5% Pdの存在下、バルーン圧力下で16時間水素化した。混合物をろ過し、メタノールで洗浄し、ろ液を真空内で濃縮し、粗H-TAP-Boc生成物(収量3.7g)を調製した。工程1~3終了後のBoc-TAPのおおよその総収率は、44%であった(使用したCbz-Clの量に基づいて計算)。

30

【化 6 8】



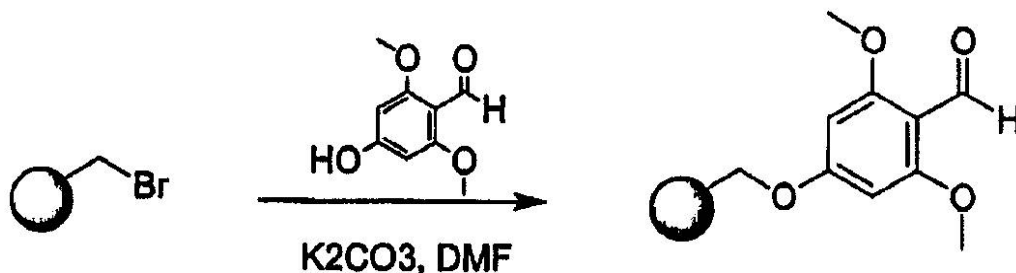
【0171】

工程 4 - TentaGel-リンカーの合成：

TentaGelブロミド(2.5 g、0.48mmol/g、Rapp Polymere社(ドイツ国)製)、フェノール酸リンカー(5倍当量)およびK₂CO₃(5倍当量)を、20mLのDMF中で14時間、70℃まで加熱した。室温まで冷却後、樹脂を洗浄し(0.1 N HCl、水、ACN、DMF、MeOH)、乾燥して琥珀色の樹脂を得た。

40

【化 6 9】



【0172】

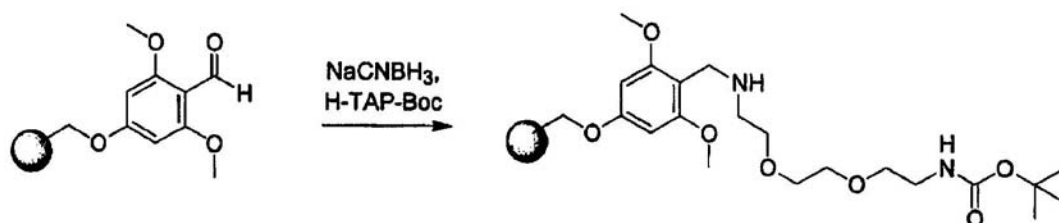
10

工程 5 -TentaGel- リンカー-TAP(Boc) の合成：

2.5gmの上記の樹脂、H-TAP-Boc (1.5gm、5倍当量) および氷AcOH ($34\mu l$ 、5倍当量) を1:1の割合のMeOH-THFの混合物中に入れ、一晚シェイクした。これにTHF中の1Mシアノ水素化ほう素ナトリウム溶液 (5倍当量) を加え、別途7時間シェイクした。樹脂をろ過、洗浄 (DMF、THF、0.1 N HCl、水、MeOH)、および乾燥した。少量の樹脂を、DCM中のBz-ClおよびDIEAでベンゾイル化し、70% TFA-DCMで切断し、LCMSおよびHPLCによってチェックした。

【化 7 0】

20



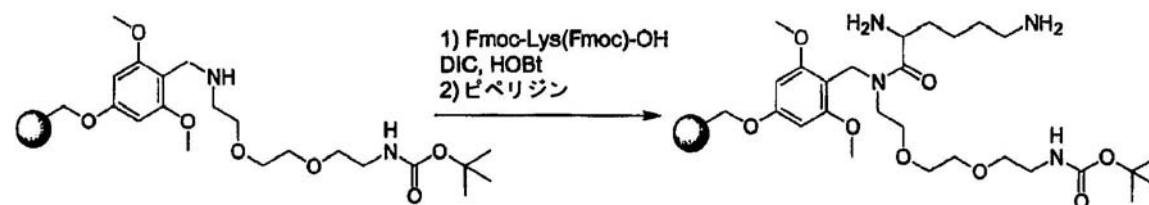
【0173】

工程 6 -TentaGel- リンカー-TAP-Lys の合成：

上記の樹脂を、活性化Fmoc-Lys(Fmoc)-OH溶液 (5倍当量のアミノ酸および5倍当量のHATUをDMF中に0.5Mで溶解し、その後に10倍当量のDIEAを加えることによって調製) で処理し、14時間静かにシェイクした。樹脂を洗浄し (DMF、THF、DCM、MeOH)、乾燥して、保護された樹脂を産生した。DCM中の10%無水酢酸および20%ピペリジンの溶液で樹脂を20分間処理することによって、残余のアミン基にキャップをし、その後、上記のように洗浄した。DMF中の30%ピペリジンにおいて20分間樹脂を静かにシェイクすることによってFmoc基を除去し、その後洗浄し (DMF、THF、DCM、MeOH)、乾燥した。

30

【化 7 1】



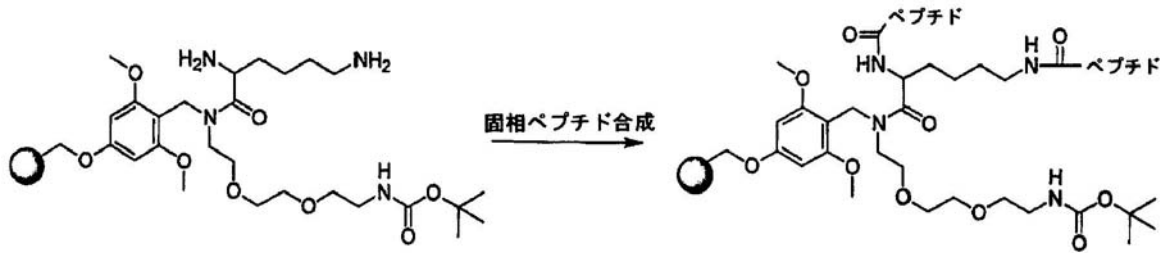
40

【0174】

工程 7 -TentaGel- リンカー-TAP-Lys (ペプチド)₂ の合成：

上記の樹脂を、HBTU/HOBt活性化を伴うFmoc-アミノ酸結合のサイクルの繰り返しに適用し、ピペリジンを用いてFmocを除去し、両方のペプチド鎖を同時に構築した。これは、Applied Biosystems社より入手可能なABI 433自動ペプチド合成器を用いて便利に実施した。最後のFmocの除去後、DMF中の無水酢酸 (10倍当量) およびDIEA (20倍当量) で20分間、末端アミン基をアシル化し、その後、上記のように洗浄した。

【化 7 2】

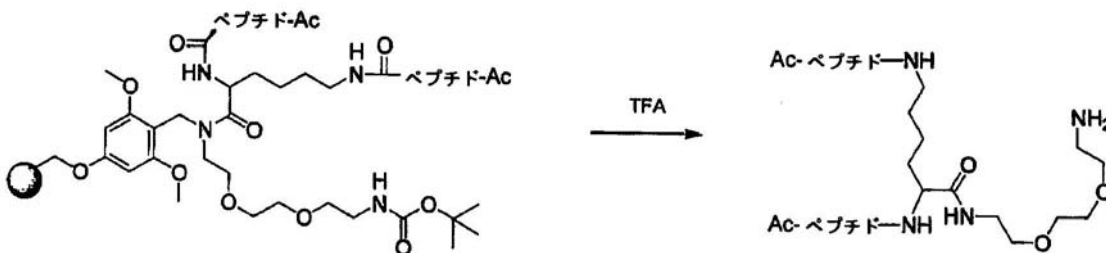


【0175】

工程 8 - 樹脂からの切断：

上記の樹脂を、TFA (82.5%)、フェノール(5%)、エタンジチオール(2.5%)、水(5%) およびチオアニソール(5%)の溶液に3時間室温で懸濁した。代わりの切断用カクテル (TFA (95%)、水(2.5%)およびトリイソプロピルシラン(2.5%)等) も使用することができる。TFA溶液を5℃まで冷却し、Et₂Oに注ぎ込んでペプチドを沈殿させた。減圧下のろ過および乾燥により、所望のペプチドを得た。C18カラムを用いた調製HPLCによる精製により、純粋なペプチドを得た。

【化 7 3】

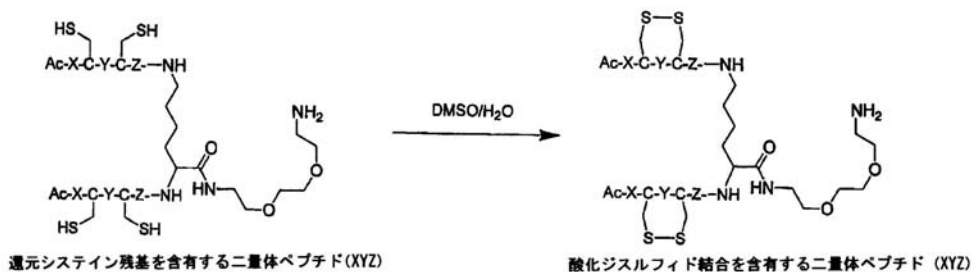


【0176】

工程 9 - 分子内ジスルフィド結合を形成するためのペプチドの酸化：

20% DMSO/水中にペプチドダイマーを溶解し(1mg乾燥重量ペプチド/mL)、室温で36時間静置した。C18 HPLCカラムに反応混合物を装填することにより、ペプチドを精製し(Waters Delta-Pak C18、粒径15ミクロン、孔径300オングストローム、長さ40mm×200mm)、その後、直線的勾配法(ACN/水/0.01% TFA; ACNを5%から95%まで)を40分行った。所望のペプチドを含有する画分を凍結乾燥(lyophilization)することにより、ふわふわした白色の固体の生成物が得られた。

【化 7 4】



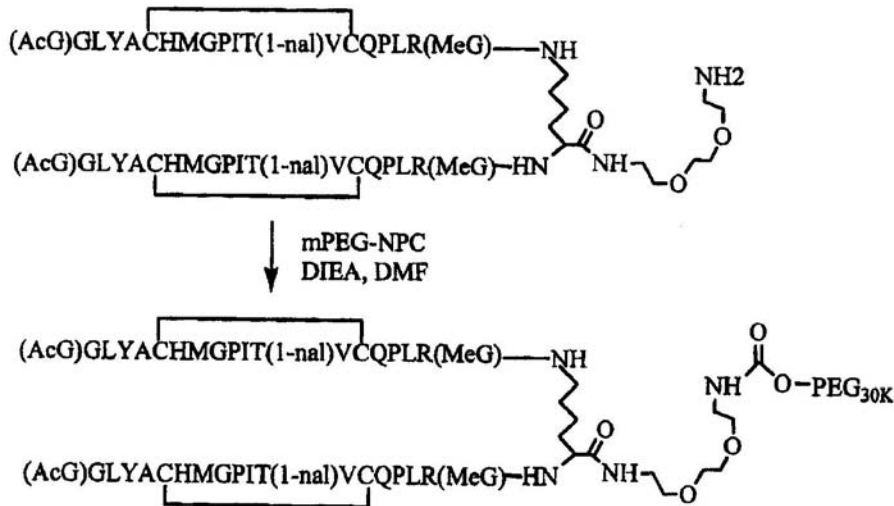
【0177】

工程 10 - 末端-NH₂基のPEG化：

カルバメート結合を通じたPEG化：

ペプチドダイマーを、乾燥DMF中1.5倍当量(モルベース)の活性化PEG種(日油株式会社(日本)製のmPEG-NPC)と混合し、澄んだ溶液を得た。5分後、上記溶液に4倍当量のDIEAを加えた。混合物を周囲温度で14時間攪拌し、その後、C18逆相HPLCで精製した。PEG化されたペプチドの構造を、MALDI質量分析法によって確認した。精製されたペプチドにも、以下に概要を述べる通りの陽イオン交換クロマトグラフィーを通じた精製を適用した。以下の図式は、配列番号3を使用したmPEG-NPCのPEG化を示す。

【化 7 5】



10

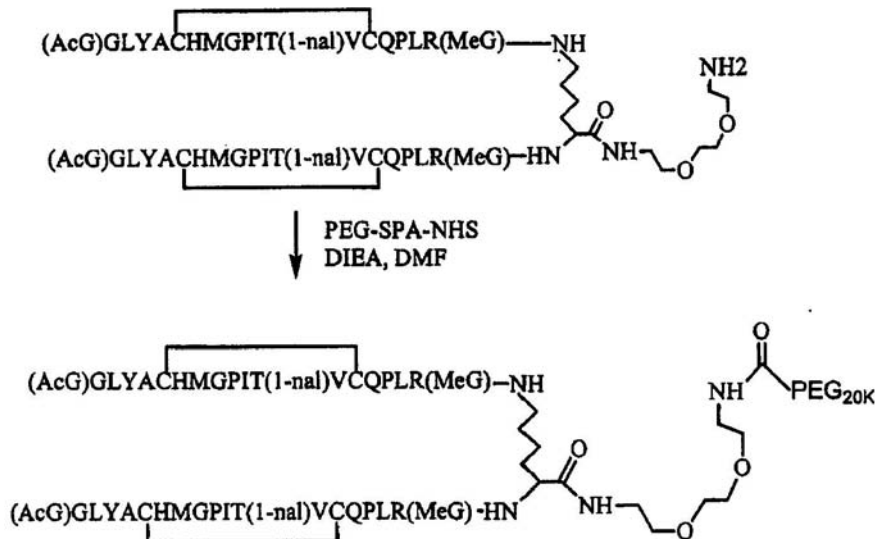
【 0 1 7 8 】

アミド結合を通じたPEG化：

ペプチドダイマーを、乾燥DMF中1倍当量の活性化PEG種（Shearwater社（米国）製のPEG-SPA-NHS）の1.5倍当量（モルベース）と混合し、澄んだ溶液を得た。5分後、上記溶液に10倍当量のDIEAを加えた。混合物を周囲温度で2時間攪拌し、その後、C18逆相HPLCで精製した。PEG化されたペプチドの構造を、MALDI質量分析法によって確認した。精製されたペプチドにも、以下に概要を述べる通りの陽イオン交換クロマトグラフィーを通じた精製を適用した。以下の図式は、配列番号3を使用したPEG-SPA-NHSのPEG化を示す。

20

【化 7 6】



30

【 0 1 7 9 】

工程 1 1 - イオン交換による精製：

いくつかの交換用支持体について、出発二量体ペプチドを保持する能力に加え、未反応の（または加水分解された）PEGから上記のペプチド-PEG結合を分離する能力を調査した。イオン交換樹脂（2～3g）を1cmカラムに装填し、次にナトリウム型に変換し（溶離液のpHが14になるまで0.2 N NaOHをカラムに装填した；約5カラム容積）、次に水素型に変換し（溶離液が充填pHにマッチするまで0.1 N HClまたは0.1 M HOAcのいずれかで溶離した；約5カラム容積）、次に、pHが6になるまで25% ACN/水で洗浄した。結合前のペプチドまたはペプチド-PEG結合を、25% ACN/水（10mg/mL）に溶解し、TFAでpHを3未満に調節し、次に、カラムに装填した。2～3カラム容積の25% ACN/水で洗浄し、5mLの画分を回収した後、25% ACN/水中0.1 M NH₄OAcで溶離することにより、ペプチドをカラムから離し、

40

50

再び5mLの画分を回収した。HPLCによる分析により、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)を使用した分析は、ペプチドをカラム上に保持し、 NH_4OAc 溶液で溶離した場合（一般的に画分4～10の間）、混入物質として非結合のPEGは観察されなかったことを示した。ペプチドを最初の洗浄緩衝液で溶離したとき（一般的に最初の2画分）、所望のPEG結合および過剰なPEGの分離は観察されなかった。

【0180】

以下のカラムは、ペプチドおよびペプチド-PEG結合の両方を保持することに成功し、結合されていないペプチドからペプチド-PEG結合を精製することに成功した。

【0181】

【表1】

表1：イオン交換樹脂

支持体	供給元
Mono S HR 5/5 強陽イオン交換事前装填カラム	Amersham Biosciences社
SE53 セルロース、微粒状強陽イオン交換用支持体	Whatman社
SPセファロース高速流強陽イオン交換用支持体	Amersham Biosciences社

【実施例2】

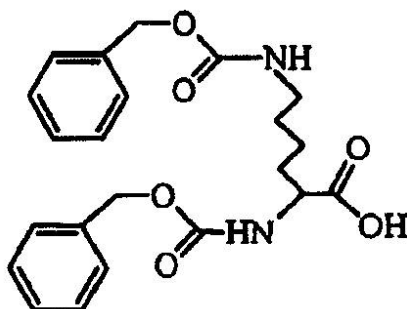
【0182】

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

工程1：(Cbz)₂-Lysの合成

標準条件下で、リジンをクロロギ酸ベンジル溶液と反応させ、その2つのアミノ基においてCbz基で保護されたリジンを得る。

【化77】



【0183】

工程2：Boc-TAPの合成

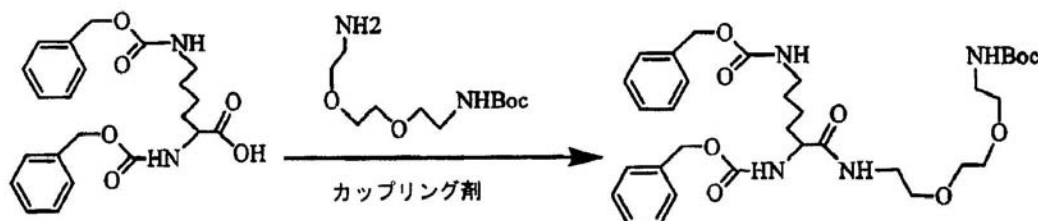
実施例1の工程1～3に記載されているようにして、Boc-TAPを合成する。

【0184】

工程3：(Cbz)₂-LysおよびBoc-TAPの結合

標準結合条件下で、(Cbz)₂-LysとBoc-TAPを結合させ、(Cbz)₂-Lys-TAP-Bocを得る。

【化78】



【0185】

工程4：Lys-TAP-Boc

10

20

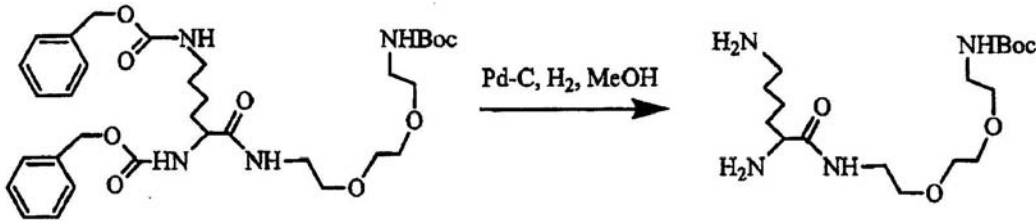
30

40

50

先の反応で得られた粗生成物をメタノール(25ml)に溶解し、炭素(5% w/W)上の5% Pdの存在下、バルーン圧力下で16時間水素化した。混合物をろ過し、メタノールで洗浄し、ろ液を真空内で濃縮し、粗Lys-TAP-Boc生成物を調製した。

【化79】



10

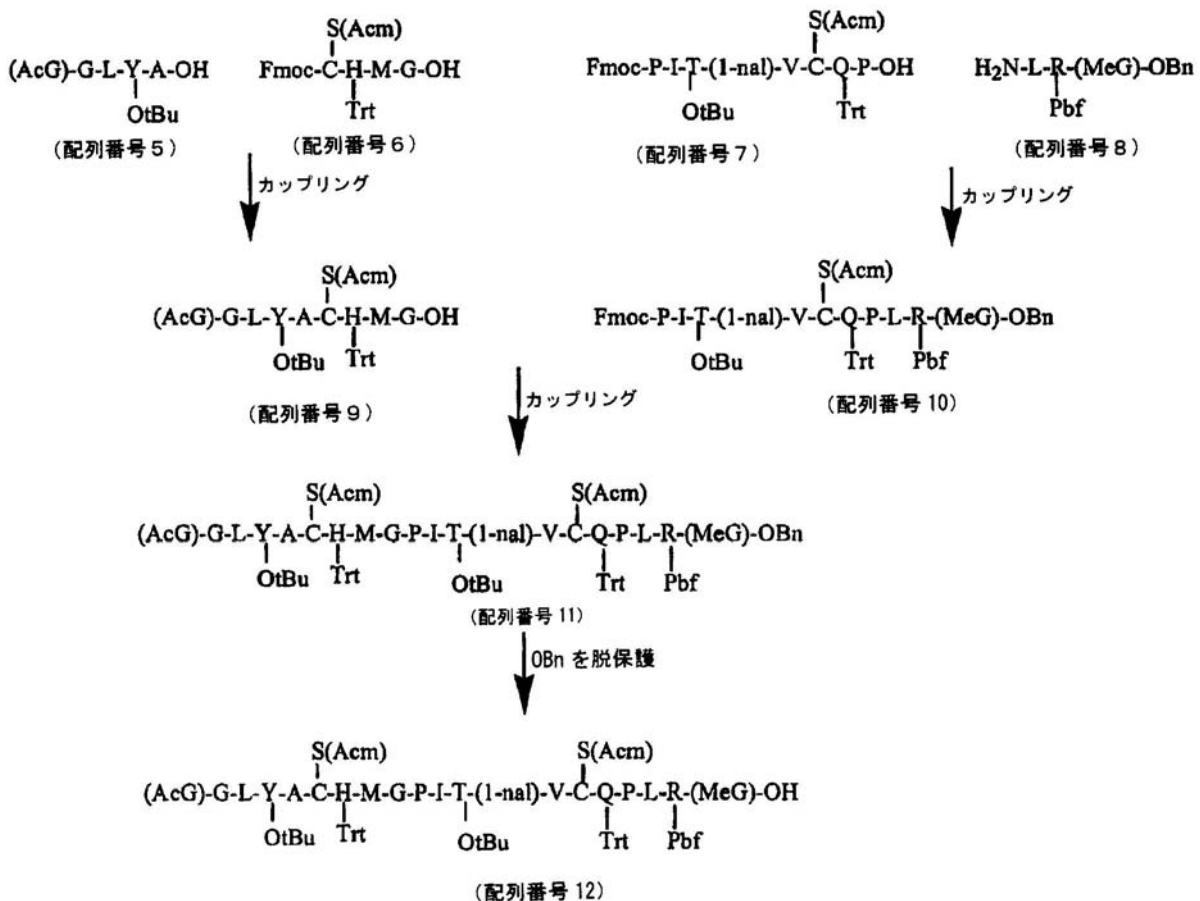
【0186】

工程5：フラグメント縮合によるペプチドモノマーの合成

標準的な技術により、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合成する。これらの部分的に保護されたフラグメントは、次に、2つの独立した結合の過程に適用される。第1過程においては、N末端のモノマーの半分を、ペプチドフラグメントのうちの2つを結合することによって形成し、一方で、C末端のモノマーの半分は、その他の2つのペプチドフラグメントを結合させることによって形成する。結合の第2過程において、N末端の半分とC末端の半分を結合して、完全に保護されたモノマーを形成する。次にモノマーは、標準的な技術によってOBnが脱保護される。

【化80】

20



30

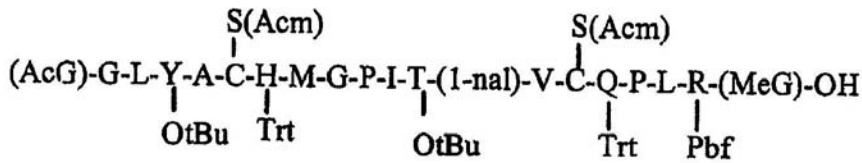
40

【0187】

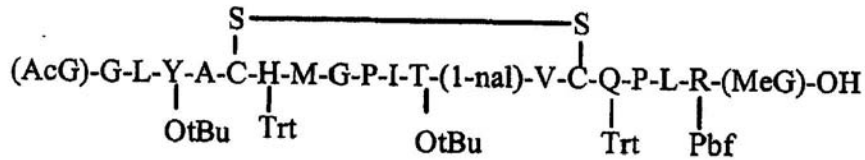
工程6：分子内ジスルフィド結合を形成するためのペプチドモノマーの酸化

次に、OBnが脱保護され、縮合されたペプチドモノマー（配列番号12）をヨウ化物で酸化し、モノマーのAcmで保護されたシステイン残基間に分子内ジスルフィド結合を形成する。

【化 8 1】



(配列番号 12)

I₂による酸化

(配列番号 13)

10

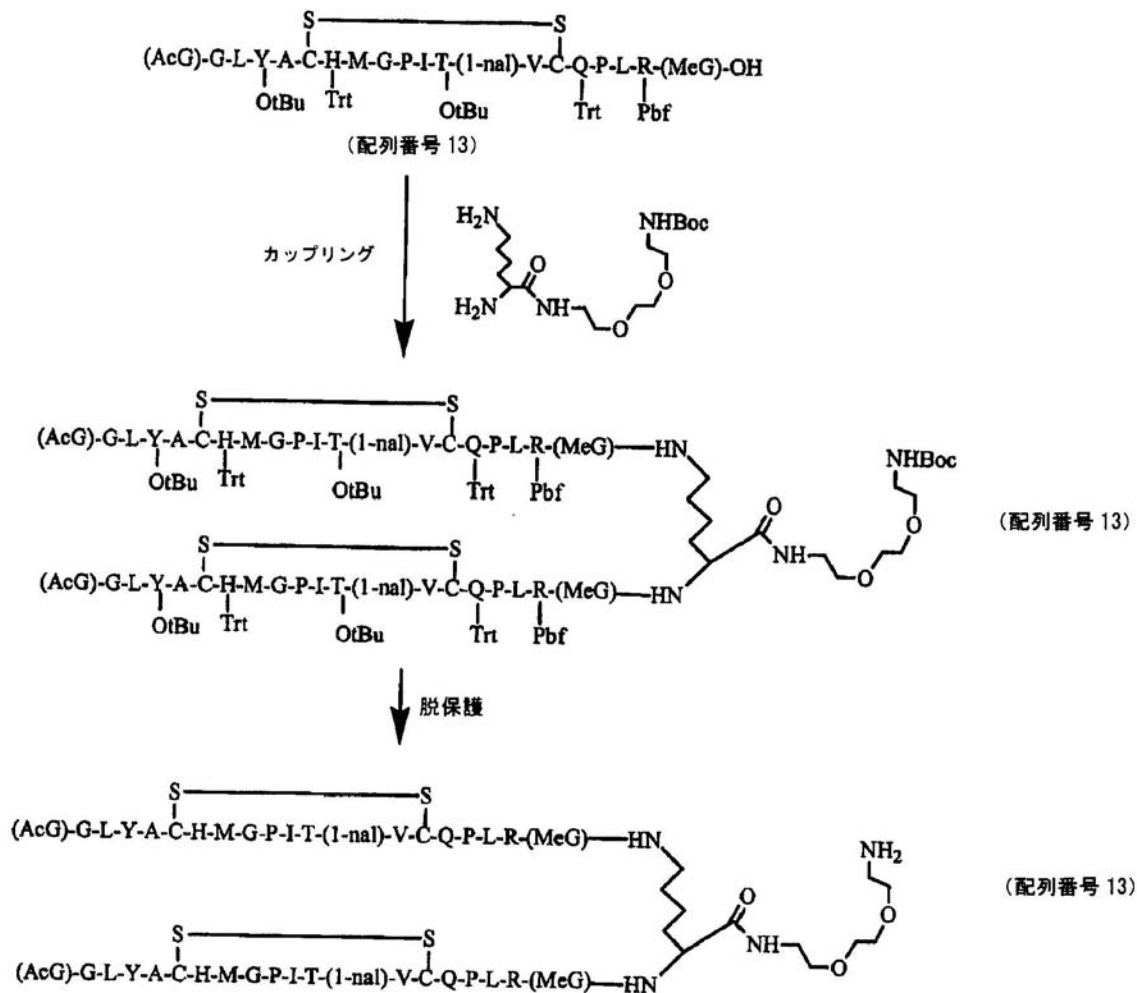
【0188】

工程 7：ペプチドダイマーを形成するための酸化され、OBnが脱保護されたモノマーへのLys-TAP-Bocの結合

20

標準条件下で、Lys-TAP-Bocを、2倍モル過剰の酸化され、OBnが脱保護されたモノマーに結合し、ペプチドダイマーを形成する。次に、標準条件下で、ペプチドダイマーを脱保護する。

【化 8 2】



【0189】

工程 8：脱保護されたダイマーの PEG 化

次に、実施例 1 の工程 10 に記載されるように、脱保護されたペプチドダイマーを PEG 化する。

【0190】

工程 9：イオン交換による精製

次に、実施例 1 の工程 11 に記載されるように、PEG 化されたペプチドダイマーを精製する。

【実施例 3】

【0191】

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および効力を評価する際に有用な種々のインビトロアッセイについて述べる。これらのアッセイの結果は、本発明の新規のペプチドが EPO-R に結合し、EPO-R のシグナル伝達を活性化することを実証する。更に、これらのアッセイの結果は、新規ペプチド組成物において、以前に記載されていた EPO 擬似ペプチドに比べて、EPO-R 結合親和性および生物学的活性が驚くほど増加することを示す。

【0192】

実施例 1 または 2 で提供された方法に従って、EPO-R アゴニストペプチドダイマーを調製する。一連のインビトロ活性アッセイ（レポーターアッセイ、増殖アッセイ、結合タンパク競合アッセイ、および C/BFU-e アッセイを含む）を使用して、これらペプチドダイマーの効力を評価する。これら 4 つのアッセイについては、以下に更なる詳細を述べる。

これらインビトロ活性アッセイの結果は、表2にまとめてある。

【0193】

1. レポーターアッセイ

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EPOレセプターの細胞外部分からヒトGCSFレセプターの細胞内部分までを含むキメラレポーターを発現する。この細胞株は、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構築物で更にトランスフェクトされる。赤血球生成剤を加えることによってこのキメラレポーターが活性化される結果、ルシフェラーゼレポーター遺伝子が発現する。従って、ルシフェラーゼ基質であるルシフェリンが加えられると、光が生成される。よって、こ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できる。

10

【0194】

Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS; Hyclone社)、10% WEHI-3上清(WEHI-3細胞の培養物由来の上清; ATCC番号TIB-68)、およびペニシリン/ストレプトマイシンを補ったDMEM/F12培地(Gibco社)において培養する。アッセイの約18時間前に、10%FBSおよび0.1% WEHI-3上清を補った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を補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地で細胞を一回洗浄し、次に、10%FBSを補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地において、知られている濃度の試験ペプチドの存在下で、または、EPO(R & D Systems社(ミネソタ州ミネアポリス))をポジティブコントロールとして使用して、細胞(1×10^6 個/mL)を培養する。このアッセイにおいては、試験ペプチドの連続希釈物を同時に試験する。37°Cで4時間、5% CO₂雰囲気においてアッセイプレートをインキュベートし、その後、各ウェルに対してルシフェリン(Steady-Glo; Promega社(ウィスコンシン州マディソン))を加える。5分間のインキュベーション後、Topcount Luminometer(Packard Instrument社(イリノイ州ダウナーズグロブ))を使用して光の放射を測定する。光のカウント(light count)を、試験ペプチド濃度に対してプロットし、Graph Pad社のソフトウェアを使用して分析する。最大値の半分の光の放射となった試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する(表2参照; レポーター-EC50)。

20

【0195】

2. 増殖アッセイ

このアッセイは、トランスフェクトされてヒトEPO-Rを発現する、マウスブレB細胞株、Baf3に基づく。得られる細胞株、BaF3/Gal4/Elk/EPORの増殖は、EPO-Rの活性化に依存する。MTTを使用して細胞増殖の程度を定量する。この際、MTTアッセイにおけるシグナルは、生存細胞の数に比例する。

30

【0196】

スピナーフラスコ中、10%FBS(Hyclone社)および2% WEHI-3上清(ATCC番号TIB-68)を補ったDMEM/F12培地(Gibco社)において、BaF3/Gal4/Elk/EPOR細胞を培養する。スピナーフラスコ中、10%FBSおよび0.1% WEHI-3上清を補ったDMEM/F12培地において、細胞密度 1×10^6 個/mlで、培養した細胞を一晩飢餓状態にする。次に、リン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's PBS; Gibco社)で、飢餓状態の細胞を2回洗浄し、10%FBSを補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地において、 1×10^6 個/mlの細胞密度まで再懸濁する。次に、50 μ Lアリコート(細胞が $\sim 50,000$ 個)の細胞懸濁液を、96ウェルアッセイプレートに3つ組で平板培養する。10%FBSを補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地中の50 μ Lアリコートの試験用EPO擬似ペプチドの連続希釈物、あるいは、50 μ LのEPO(R & D Systems社(ミネソタ州ミネアポリス))またはAranesp(登録商標)(ダルベポエチン α ; Amgen社より市販されているEPO-Rアゴニスト)を、96ウェルアッセイプレートに加える(最終ウェル容量: 100 μ L)。例えば、試験ペプチド(またはコントロールEPOペプチド)の最終濃度が810pM $\sim$ 0.0045pMの範囲である、12の異なる希釈物を試験することができる。そして、平板培養した細胞を、37°Cで48時間インキュベートする。次に、10 μ LのMTT(Roche Diagnostics社)を各培養プレートのウェルに加え、4時間インキュベートする。次に、10% SDS+

40

50

0.01N HClを加えることにより、反応をストップさせる。そして、プレートを37℃で一晩インキュベートする。次に、波長595nmでの各ウェルの吸光度を、分光測光法によって測定する。吸光度の読み取り値に対する試験ペプチド濃度のプロットを構築し、Graph Pad社のソフトウェアを使用して、EC50を計算する。最大値の半分の吸光度となった試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する（表2参照；増殖EC50）。

【0197】

3. 結合タンパク競合アッセイ

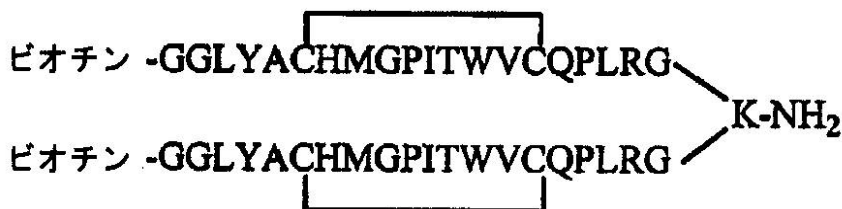
2つのビーズ（ビオチニル化したEPO-R結合ペプチドトレーサーを有するストレプトアビジンドナービーズおよびEPO-Rが結合するアクセプタービーズ）が近接する機能として光シグナルが産生されるアッセイを使用して、競合的結合の計算を行う。光は、非放射エネルギー伝達によって産生される。光が照射されると、一重項酸素が第1ビーズから放出され、放出された一重項酸素との接触により、第2ビーズからの光の放出が引き起こされる。これらのビーズのセットは市販されている（Packard社製）。ビーズの近接は、EPO-R結合ペプチドトレーサーのEPO-Rへの結合によって生み出される。EPO-Rへの結合について、EPO-R結合ペプチドトレーサーと競合する試験ペプチドが、この結合を防ぐことになり、光の放出の減少を引き起こす。

【0198】

より詳細には、方法は以下の通りである。4μLの試験EPO-Rアゴニストペプチド、あるいはポジティブまたはネガティブコントロールの連続希釈物を、384ウェルプレートのウェルに加える。その後、2μL/ウェルのレポーター/ビーズのカクテルを加える。レセプタービーズカクテルは以下のものより成る：15μLの5mg/mlストレプトアビジンドナービーズ（Packard）；15μLの5mg/mlモノクローナル抗体abl79（この抗体は、組み換えEPO-Rに含有されるヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の部分を認識する）；タンパク質Aでコーティングされたアクセプタービーズ（タンパク質Aは、abl79抗体に結合する；Packard社）；112.5μLの1:6.6で希釈した組み換えEPO-R（abl79標的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部分に対し、融合タンパク質としてチャイニーズハムスター卵巣細胞内で生成）；および607.5μLのAlphaquest緩衝液（40mM HEPES、pH 7.4；1mM MgCl₂；0.1% BSA、0.05% Tween 20）。軽くたたいて混合する。2μL/ウェルのビオチニル化したEPO-R結合ペプチドトレーサーを加える（最終濃度：30nM）。配列：ビオチン-GGLYACHMGPITWVCQPLRG（配列番号4）を使用し、実施例1に記載の方法に従って、ペプチドトレーサーであるEPO-R結合ペプチド（表の「レセプターEC50(pM)」参照）を作製する。

【化83】

ペプチドトレーサー



【0199】

1分間遠心分離にかけて混合する。プレートをPackard社のTop Sealでシールし、ホイルで包む。室温で一晩インキュベートする。18時間後、AlphaQuest読み取り器（Packard社）を使用して、光の放出を読み取る。ペプチドの濃度に対する光の放出をプロットし、Graph PadまたはExcelで分析する。

【0200】

試験ペプチド無しの場合と比べて、光の放出が50%減少する結果であった試験ペプチドの濃度を、IC50として記録する（表2参照：AQ IC50）。

【0201】

4. C/BFU-eアッセイ

EPO-Rのシグナル伝達は、骨髄幹細胞が分化し、赤血球前駆体が増殖するように刺激する。このアッセイは、一次ヒト骨髄多能性幹細胞からの赤血球前駆細胞の増殖および分化を刺激する試験ペプチドの能力を測定する。

【0202】

このアッセイ用に、10% FBS (Hyclone社) を補充したIMDM培地 (Gibco社) 中、試験ペプチドの連続希釈物を調製する。次に、これらの連続希釈物、またはポジティブコントロールEPOペプチドを、メチルセルロースに加えて最終容積を1.5mLとする。次に、メチルセルロースとペプチドの混合物を、完全にボルテックスする。ヒト骨髄由来のCD34⁺細胞 (Poietics社/Cambrex社) のアリコート (細胞100,000個/mL) を解凍する。50mLチューブに、0.1mLの1mg/ml DNase (Stem Cells) に対して解凍した細胞を静かに加える。次に、細胞に対して40~50mLのIMDM培地を静かに加える。培地は、最初の10mLについては、50mlチューブの側面に沿って一滴ずつ加え、残りの培地は、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900rpmで20分間回転させ、静かに吸引することによって培地を注意深く除去する。1mlのIMDM培地に細胞を再懸濁し、1ml当たりの細胞密度を血球計スライド上で測る (スライド上に10 μ Lアリコートの細胞懸濁液; 細胞密度は、平均数 $\times$ 細胞10,000個/mLである)。次に、IMDM培地で細胞を希釈し、細胞密度を15,000個/mLとする。次に、100 μ Lの希釈した細胞を、各1.5 mLのメチルセルロースとペプチド試料に加え (アッセイ培地における最終的な細胞濃度は1,000個/mL)、混合物をボルテックスする。混合物内の泡を無くし、先のとがっていない針を使用して1mLを吸引する。各試料から吸引した0.25mLの混合物を、24ウェルプレート (Falcon社製) の4つのウェルそれぞれに加える。平板培養した混合物を、多湿のインキュベータ内において5% CO₂下、37°Cで14日間インキュベートする。位相差顕微鏡 (5~10倍; 最終倍率100倍) を使用して、赤血球コロニーの存在をスコアする。形成されたコロニーの数が、EPOポジティブコントロールで観察された数と比べて最大数の90%であった試験ペプチド濃度を、EC90として記録する (表2参照; C/BFU-e EC90)。

【0203】

5. 放射性リガンド競合結合アッセイ

あるいは、本発明のペプチドのIC₅₀値を測定するために、放射性リガンド競合結合アッセイも使用することができる。このアッセイは、¹²⁵I-EPOのEPORへの結合を測定する。アッセイは、好ましくは、以下の典型的なプロトコルに従って実施される。

【0204】

【表 2】

A. 材料

組み換えヒトEPO R/Fc キメラ	・識別：組み換えヒトEPO R/Fcキメラ ・供給者：R & D Systems社（米国ミネソタ州ミネアポリス） ・カタログ番号：963-ER ・ロット番号：EOK033071 ・保管：4℃	
ヨウ化組み換えヒトエ リスロポエチン	・識別：(3[¹²⁵I]ヨードチロシル) エリスロポエチン、ヒト組み 換え、高比活性、370kBq、10 μ Ci ・供給者：Amersham Biosciences社(米国ニュージャージー州ピスカ タウェイ) ・カタログ番号：IM219-10 μ Ci ・ロット番号： ・保管：4℃	10
タンパク質-Gセファロ ース	・識別：タンパク質-Gセファロース4高速流 ・供給者：Amersham Biosciences社(米国ニュージャージー州ピスカ タウェイ) ・カタログ番号：17-0618-01 ・ロット番号： ・保管：4℃	20
アッセイ緩衝液	・リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、pH 7.4、0.1%ウシ血清アルブ ミンおよび0.1%アジ化ナトリウム含有 ・保管：4℃	

30

【0205】

B. 適切なレセプター濃度の測定

ヒトIgG1のFc部分に融合させた凍結乾燥した組み換えEPOr細胞外ドメインの1本の50 μ gバイアルを、1mLのアッセイ緩衝液中に戻す。アッセイで使用するためのレセプターの正しい量を測定するために、このレセプター調製物の100 μ Lの連続希釈物を、12×75mmポリプロピレン試験管中、200 μ Lのヨウ化組み換えヒトエリスロポエチン（¹²⁵I-EPO）と、約20,000cpmで結合させる。チューブにキャップをし、LabQuake回転シェーカーを用いて4℃で一晩静かに混合する。

【0206】

次の日に、50 μ L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、静かに混合しながら4℃で2時間、チューブをインキュベートする。次に、4000RPM（3297×G）で15分間、チューブを遠心分離にかけて、プロテイン-Gセファロースをペレット状にする。上清を注意深く除去して廃棄する。1mLの4℃アッセイ緩衝液で3回洗浄後、Wallac Wizardガンマカウンターでペレットをカウントする。そして結果を分析し、結合の最大値の50%に達するのに必要な希釈度を計算する。

40

【0207】

C. ペプチドについてのIC₅₀の測定

ペプチドIのIC₅₀を測定するために、100 μ Lのペプチドの連続希釈物を、12×75mmポリプロピレン試験管中、100 μ Lの組み換えエリスロポエチンレセプター（100pg/チューブ）と結合させる。次に、100 μ Lのヨウ化組み換えヒトエリスロポエチン（¹²⁵I-EPO）を各チ

50

【 0 2 0 8 】

【 0 2 0 9 】

表2: ペプチドダイマーのインビトロ活性アッセイ

化合物 名称	ペプチダイマー	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	$ \begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACHMGPIIT(1-naI)VCQPLR(MeG)-NH} \\ \boxed{\hspace{10em}} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPIIT(1-naI)VCQPLR(MeG)-HN} \\ \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C(=O)---NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---} \\ \text{NH---C(=O)---O---PEG}_{30K} \end{array} $	--	--	110	2.2
ペプチドIII 配列番号3	$ \begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACHMGPIIT(1-naI)VCQPLR(MeG)-NH} \\ \boxed{\hspace{10em}} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPIIT(1-naI)VCQPLR(MeG)-HN} \\ \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C(=O)---NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---} \\ \text{NH---C(=O)---PEG}_{20K} \end{array} $	150	72	--	2.7

【0210】

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および効力を評価する際に有用な種々のインビボアッセイについて述べる。EPO-Rアゴニストペプチドダイマーは、実施例1または2で提供された方法に従って調製される。これらペプチドモノマーおよびダイマーのインビボ活性は、連続アッセイ（赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイおよび網状赤血球アッセイを含む）を使用して評価する。これら2つのアッセイについて、以下に更なる詳細を述べる。

【0211】

1. 赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイ

CotesおよびBangham (1961), Nature 191 : 1065-1067に記載されている方法を適用させた赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイにおいて、試験ペプチドのインビボ活性についてアッセイする。このアッセイでは、試験ペプチドがEPO模倣剤として機能する、すなわち、EPO-Rを活性化し、新しい赤血球合成を誘導する能力を試験する。赤血球合成は、合成された赤血球のヘモグロビン内への放射性標識された鉄の取り込みに基づいて定量する。

【0212】

BDF1マウスを、7~10日間かけて周囲条件に順応させる。すべてのマウスの体重を測定し、低体重のマウス（<15グラム）は使用しない。マウスは、トータルで14日間、低圧室において、連続した調整サイクルに適用する。各24時間のサイクルは、18時間の0.40±0.02%大気圧および6時間の周囲圧力より成る。調整後、マウスは、投薬前に更に72時間、周囲圧力で維持する。

【0213】

試験ペプチドまたは組み換えヒトEPOスタンダードを、PBS+0.1% BSAビヒクル(PBS/BSA)で希釈する。ペプチドモノマー原液は、最初にジメチルスルホキシド(DMSO)中に可溶化する。ネガティブコントロールグループは、PBS/BSAのみを注射したマウスの1つのグループと、1% DMSOを注射したマウスの1つのグループとを含む。各グループは、10匹のマウスを含む。0.5 mLの適切な試料をマウスに皮下注射する（首筋）。

【0214】

試料を注射してから48時間後、0.2 mLの Fe^{59} (Dupont NEN社)をマウスに腹腔内注射する（用量：マウス1匹当たり約0.75 μ キュリー）。 Fe^{59} を投与してから24時間後、マウスの体重を測定し、 Fe^{59} の投与から48時間後、マウスを屠殺する。心穿刺によって各マウスから血を回収し、ヘマトクリット値を測定する（抗凝血剤としてヘパリンを使用）。Packard社のガンマカウンターを使用して、各血液試料（0.2 mL）の Fe^{59} の取り込みについて分析する。反応のないマウス（すなわち、放射性の取り込みがネガティブコントロールグループよりも少なかったマウス）は、適切なデータセットから除外する。ヘマトクリット値がネガティブコントロールグループの53%よりも少ないマウスも除外する。

【0215】

結果は、各実験用量について、10匹のマウスのセットから得る。各グループから得られた血液試料に取り込まれた放射能の量の平均（分当たりのカウント（CPM））を計算する。

【0216】

2. 網状赤血球アッセイ

正常なBDF1マウスに、3日間連続して、EPOコントロールまたは試験ペプチドのいずれかを投与する（用量：0.5mL、皮下注射）。3日目に、鉄デキストラン(100mg/mL)をマウスに投与する（用量：0.1mL、腹腔内注射）。5日目に、マウスにCO₂で麻酔をかけ、心穿刺によって出血させる。各血液試料における網状赤血球の割合（%）は、チアゾールオレンジによる染色およびフローサイトメトリ分析（網状赤血球数カウントプログラム）によって測定する。ヘマトクリット値を手動で測定する。訂正された網状赤血球の割合は、以下の式を使用して決定する：

$\% \text{RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{NORMAL}})$

【0217】

3. 血液学的アッセイ

正常なCD1マウスに、EPOポジティブコントロール、試験ペプチド、またはビヒクルのいずれかを、4週間の静脈内ボラス注射によって投与する。ポジティブコントロールおよび試験ペプチドの用量の範囲 (mg/kgで示す) は、処方における活性化合物濃度を変えることにより、試験する。注射する量は5 mg/kgである。ビヒクルコントロールグループは12匹より成り、残りの各用量のグループはそれぞれ8匹より成る。毎日の生存能力および週毎の体重を記録する。

【0218】

投与したマウスは絶食させ、1日目 (ビヒクルコントロールマウス) 並びに15日目および29日目 (4匹/グループ/日) に、イソフルレン吸入によって麻酔をかけ、心穿刺または腹大動脈穿刺によって末端の血液試料を回収する。血液をVacutainer (登録商標) チューブに移す。好ましい抗凝血剤はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

【0219】

血液試料は、当技術分野において周知の自動臨床分析機器 (例えばCoulter社製の機器) を使用して、赤血球合成および生理学を測定する評価項目 (ヘマトクリット値(Hct)、ヘモグロビン(Hgb)および総赤血球数(RBC)等) について評価を行う。

【実施例5】

【0220】

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

工程1: ペプチドモノマーの合成

ペプチドモノマーは、ABI 431Aペプチド合成器上で、TG-RAM樹脂(0.18mmol/g、Rapp Polymere社 (ドイツ国)) を使用して、標準的なFmoc化学反応を用いて合成する。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の合成用に、82.5%のTFA、5%の水、6.25%のアニソール、6.25%のエタンジチオールを用いて、完全に組み立てられたペプチドを樹脂から切り離す。脱保護された生成物を樹脂からろ過し、ジエチルエーテルを用いて沈殿させる。完全に乾燥後、生成物は、0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル/水の勾配を使用したC18逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製する。ペプチドの構造は、エレクトロスプレー質量分析によって確認する。ペプチドを、DMSO: 水が1:1の溶液に1mg/mLの濃度で溶解し、ジスルフィド形成を起こさせる。生成物は、0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル/水の勾配を使用したC18逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製する。ペプチドモノマーは、以下のように示すことができる:

【0221】

【化84】



(配列番号1)

【0222】

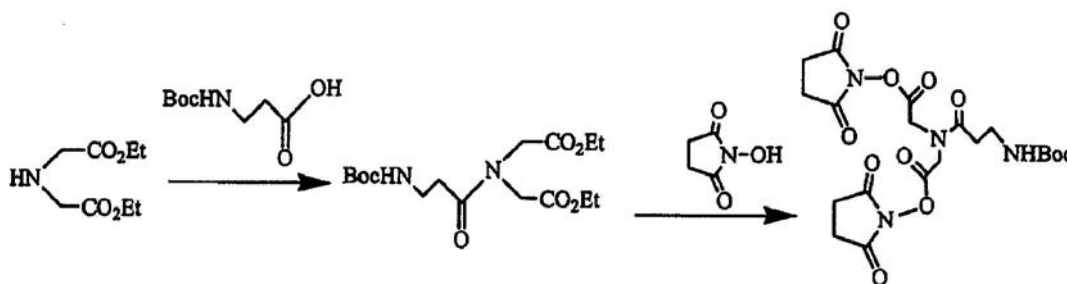
工程2: 三官能性リンカーの合成

100mLのDCM中のジエチルイミノアセテート(10.0g、52.8mmol)およびBoc-ベータ-アラニン(10.0g、52.8 mmol)の溶液に対し、ジイソプロピルカルボジイミド(8.0mL、51.1mmol)を10分間かけて室温で加えた。加える間、反応混合物を10度まで暖め、20分かけて冷却して室温まで戻した。反応混合物を一晩攪拌し、沈殿させたジイソプロピル尿素をろ過した。減圧下で溶媒を除去してゴムを与え、残渣をエチルアセテートに溶解して再びろ過し、更に沈殿した尿素を除去した。有機相を分液漏斗内に配置し、洗浄し(sat. NaHCO₃、ブライン、0.5N HCl、ブライン)、乾燥し(MgSO₄)、ろ過し、減圧下で濃縮して、無色油

としてジエステル生成物を得た。ジエステルを、MeOH：THFが1：1の混合物(100mL)に混ぜ、これに水(25mL)、次にNaOH(5g、125mmol)を加えた。pHを測定して>10となるようにした。反応混合物を室温で2時間攪拌し、6N HClでpH1まで酸性化した。水相をNaClで飽和させ、エチルアセテートを用いて4回抽出を行った。結合されている有機相を洗浄し(ブライン)、乾燥し(MgSO₄)、減圧下で濃縮して、白色の半固体を得た。固体を50mLのDCMに溶解し、これに300mLのヘキサンを加えて白色のスラリーを作製した。溶媒を減圧下で除去し、白色の固体として二塩基酸を得た(14.7g、2工程における収率91.5%)。20mLのDMF中の二塩基酸の溶液(1g、3.29mmol)に対し、N-ヒドロキシスクシンイミド(770mg、6.69mmol)、ジイソプロピルカルボジイミド(1.00mL、6.38mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(3mg、0.02mmol)を加えた。反応混合物を一晩攪拌し、減圧下で溶媒を除去した。残渣をエチルアセテートに混ぜ、ろ過して沈殿した尿素を除去した。有機相を分液漏斗内に配置し、洗浄し(sat.NaHCO₃、ブライン、0.5N HCl、ブライン)、乾燥し(MgSO₄)、ろ過し、減圧下で濃縮して、白色の固体としてジ-NHSエステル生成物(1.12g、収率68%)を得た。

【0223】

【化85】



【0224】

工程3：ペプチドモノマーへの三官能性リンカーの結合

リンカーの結合のために、乾燥DMFにおいて2倍当量のペプチドを1倍当量の三官能性リンカーと混合して澄んだ溶液を得て、2分後に5倍当量のDIEAを加える。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DCM中の80%TFAに30分間溶解してBoc基を除去し、次にC18逆相HPLCによって精製する。ダイマーの構造をエレクトロスプレー質量分析によって確認する。この結合反応により、リンカーは、各モノマーのリジン残基のεアミノ基の窒素原子に結合される。配列番号1を使用した工程を以下に示す。

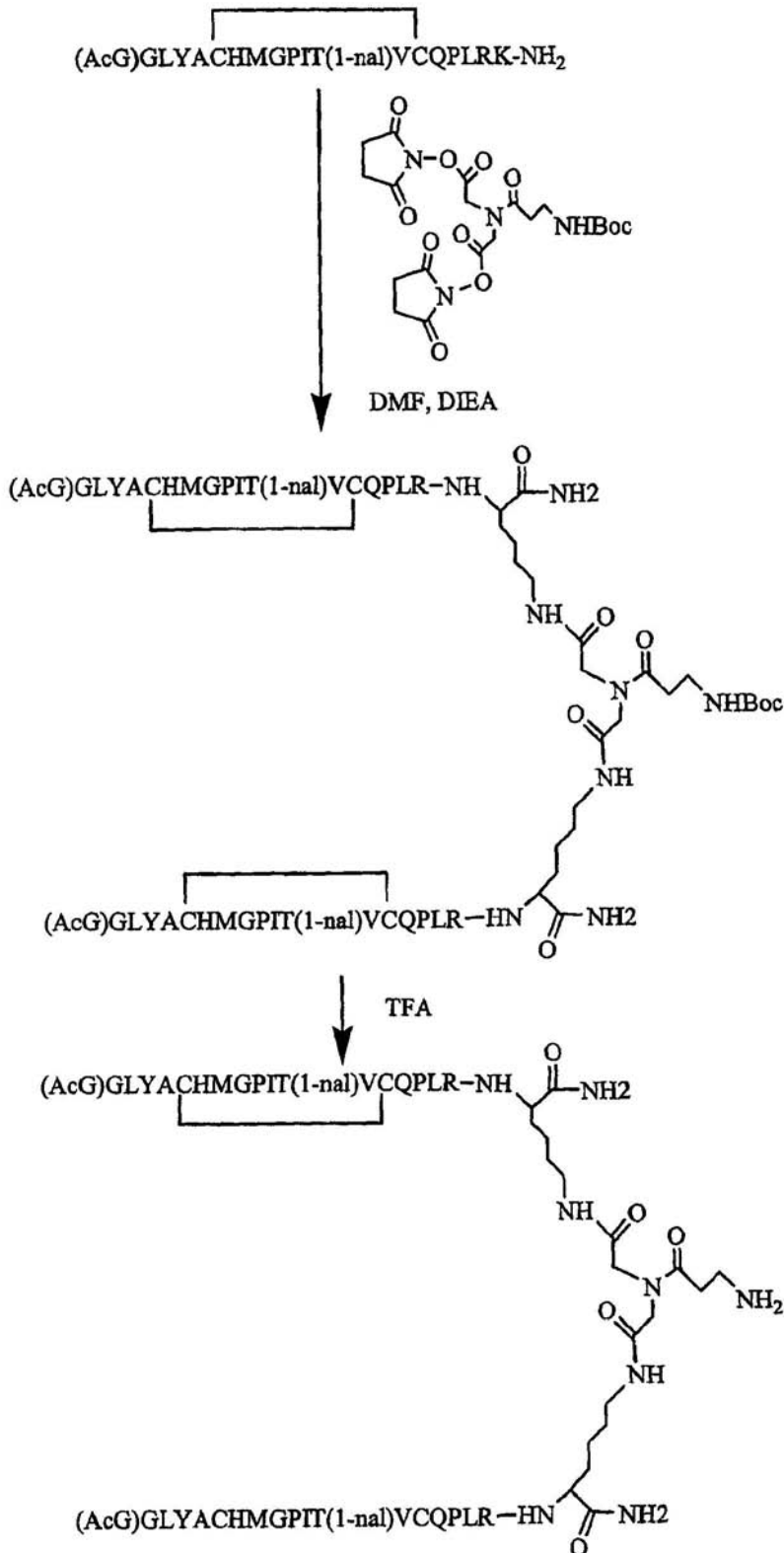
【0225】

10

20

30

【化 8 6】



【 0 2 2 6】

工程 4：ペプチドダイマーの PEG 化

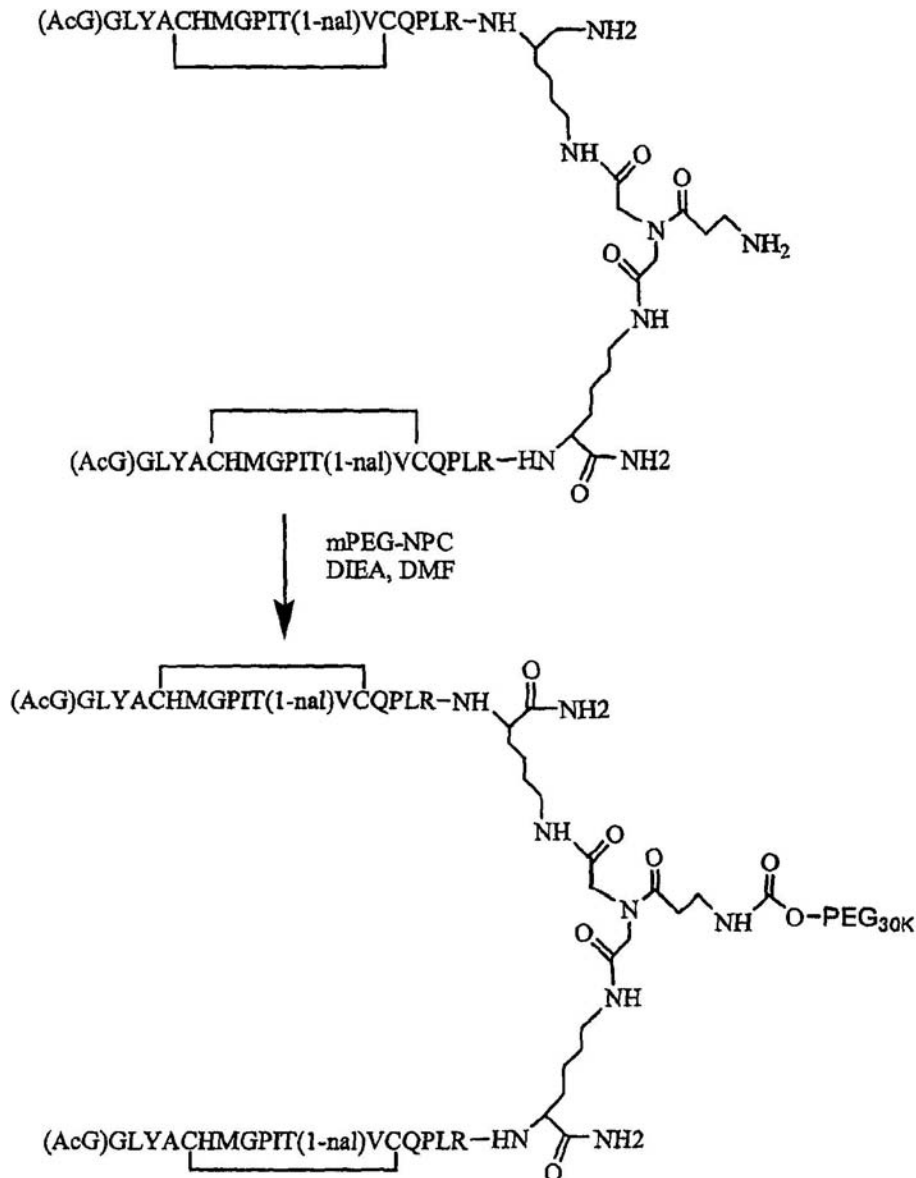
カルバメート結合を通じた PEG 化

乾燥 DMF において、ペプチドダイマーを当量（モルベース）の活性化 PEG 部分（日油株式会社（日本）製の mPEG-NPC）と混合して、澄んだ溶液を得る。5 分後に、この溶液に対して 4 倍等量の DIEA を加える。混合物を周囲温度で 14 時間攪拌し、次に C18 逆相 HPLC によって精製する。PEG 化されたペプチドの構造を、MALDI 質量分析法によって確認する。精製され

たペプチドも、以下に概略を述べるように、陽イオン交換クロマトグラフィーを通じた精製に適用した。配列番号 1 を使用した mPEG-NPC の PEG 化を以下に示す。

【0227】

【化 87】



【0228】

アミド結合を通じたPEG化

乾燥DMFにおいて、ペプチドダイマーを当量（モルベース）の活性化PEG部分（Shearwater社（米国）製のPEG-SPA-NHS）と混合して、澄んだ溶液を得る。5分後に、この溶液に対して10倍当量のDIEAを加える。混合物を周囲温度で2時間攪拌し、次にC18逆相HPLCによって精製する。PEG化されたペプチドの構造を、MALDI質量分析法によって確認した。精製されたペプチドも、以下に概略を述べるように、陽イオン交換クロマトグラフィーを通じた精製に適用した。配列番号 1 を使用した PEG-SPA-NHS の PEG 化を以下に示す。

【0229】

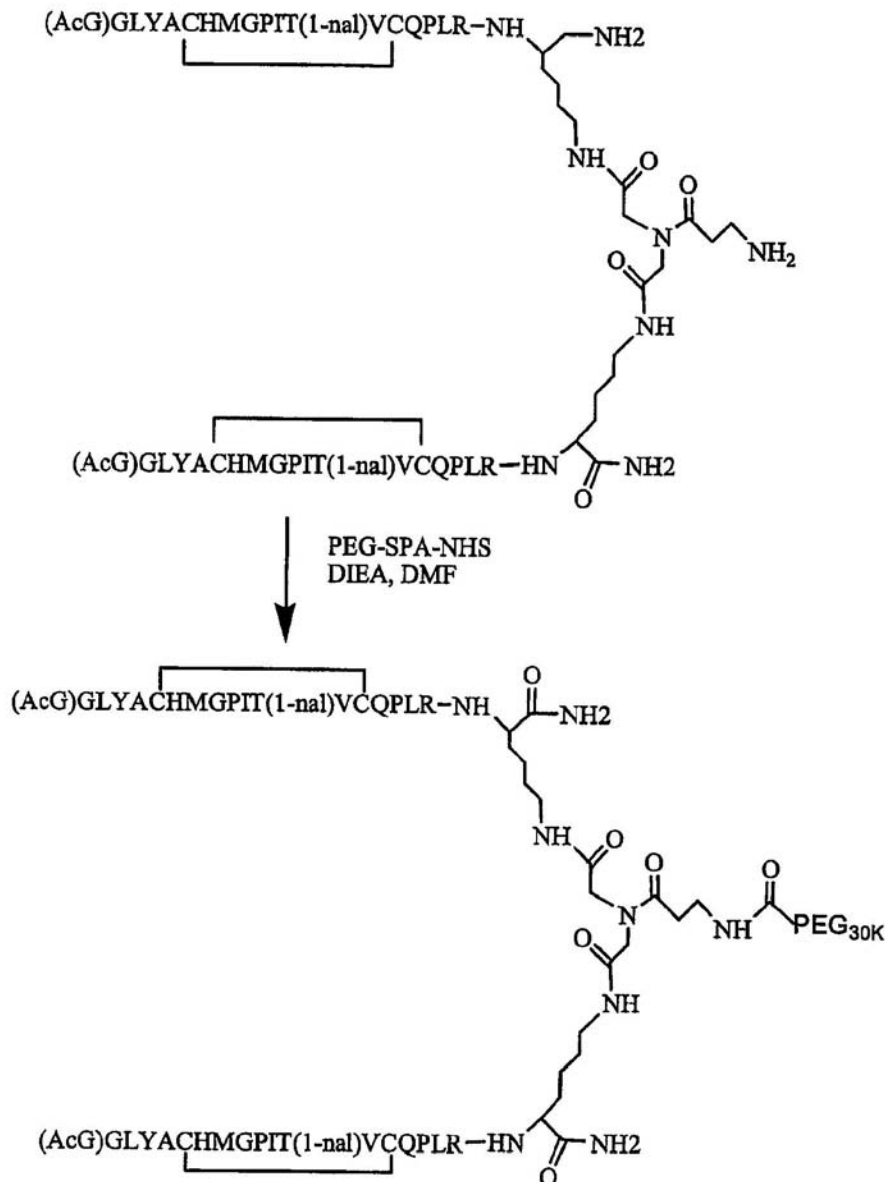
10

20

30

40

【化 8 8】



【 0 2 3 0】

工程 5：ペプチドのイオン交換による精製

いくつかの交換用支持体について、出発二量体ペプチドを保持する能力に加え、未反応の（または加水分解された）PEGから上記のペプチド-PEG結合を分離する能力を調査した。イオン交換樹脂（2～3g）を1cmカラムに装填し、次にナトリウム型に変換し（溶離液のpHが14になるまで0.2 N NaOHをカラムに装填した；約5カラム容積）、次に水素型に変換し（溶離液が充填pHにマッチするまで0.1 N HClまたは0.1 M HOAcのいずれかで溶離した；約5カラム容積）、次に、pHが6になるまで25% ACN/水で洗浄した。結合前のペプチドまたはペプチド-PEG結合を、25% ACN/水（10mg/mL）に溶解し、TFAでpHを3未満に調節し、次に、カラムに装填した。2～3カラム容積の25% ACN/水で洗浄し、5mLの画分を回収した後、25% ACN/水中0.1 M NH₄OAcで溶離することにより、ペプチドをカラムから離し、再び5mLの画分を回収した。HPLCによる分析により、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)を使用した分析は、ペプチドをカラム上に保持し、NH₄OAc溶液で溶離した場合（一般的に画分4～10の間）、混入物質として非結合のPEGが観察されなかったことを示した。ペプチドを最初の洗浄緩衝液で溶離したとき（一般的に最初の2画分）、所望のPEG結合および過剰なPEGの分離は観察されなかった。

【 0 2 3 1】

以下のカラムは、ペプチドおよびペプチド-PEG結合の両方を保持することに成功し、結合されていないペプチドからペプチド-PEG結合を精製することに成功した。

【0232】

【表4】

表3：イオン交換樹脂

支持体	供給元
Mono S HR 5/5 強陽イオン交換事前装填カラム	Amersham Biosciences社
SE53 セルロース、微粒状強陽イオン交換用支持体	Whatman社
SPセファロース高速流強陽イオン交換用支持体	Amersham Biosciences社

10

【実施例6】

【0233】

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

工程1において、合成されたペプチドモノマーが：

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K(配列番号2)

であることを除いては、実施例1に記載されているようにして、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合成する。

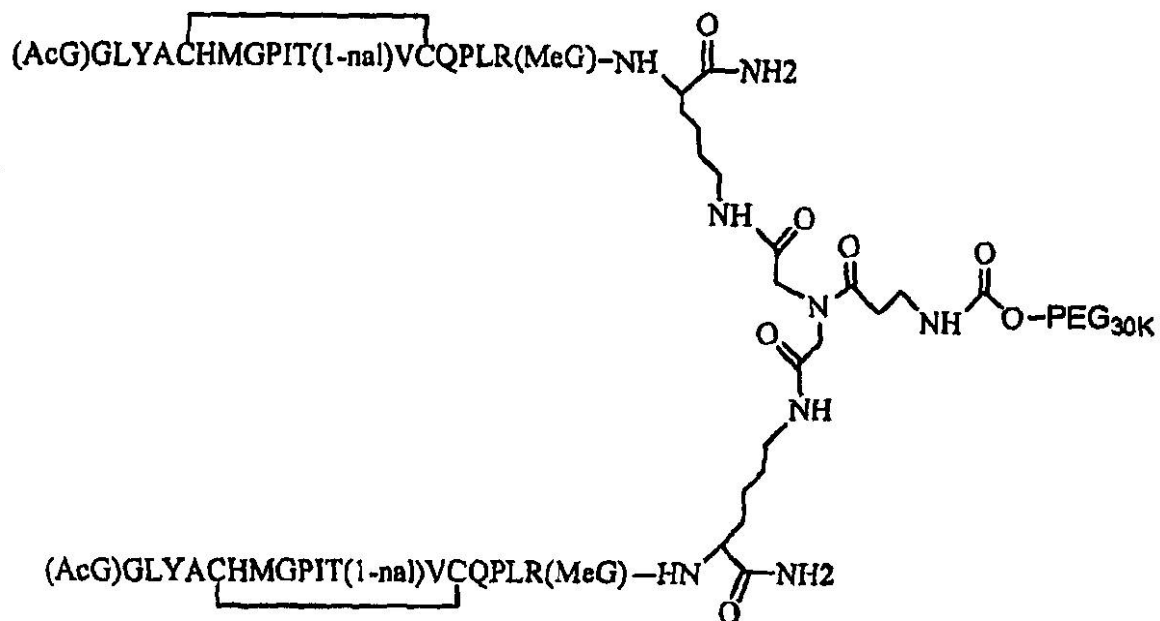
20

【0234】

カルバメート結合を通じてPEGをリンカーに結合する場合、配列番号2を使用したこの合成の最終生成物は、以下のように構造的に示すことができる：

【0235】

【化89】



30

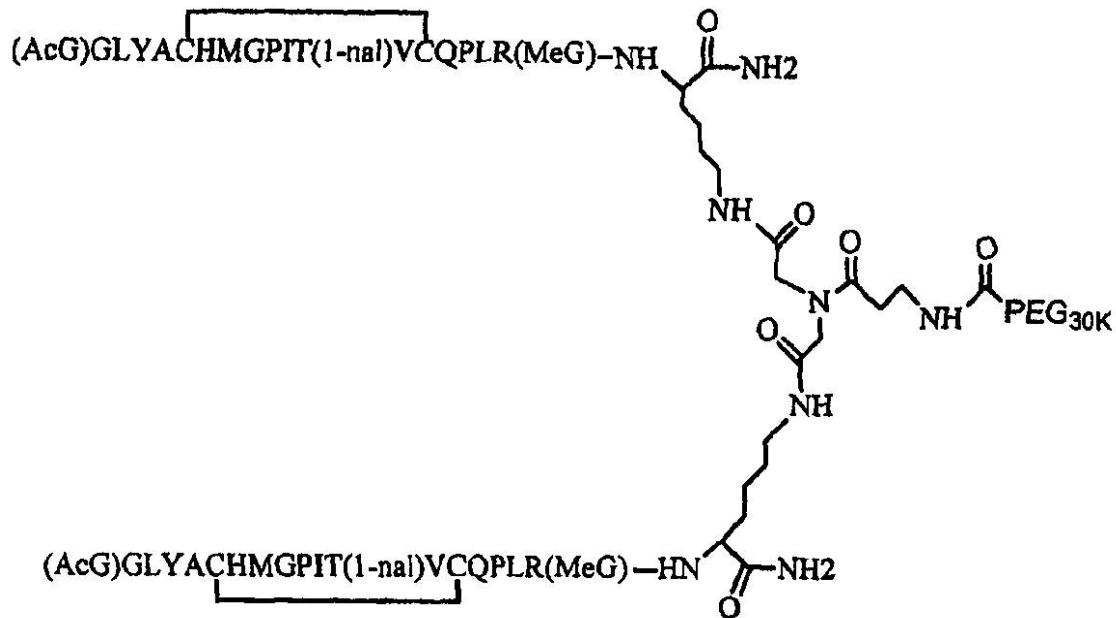
40

【0236】

アミド結合を通じてPEGをリンカーに結合する場合、配列番号2を使用したこの合成の最終生成物は、以下のように構造的に示すことができる：

【0237】

【化 90】



10

【実施例 7】

【0238】

20

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および効力を評価する際に有用な種々のインビトロアッセイについて述べる。これらのアッセイの結果は、本発明の新規のペプチドがEPO-Rに結合し、EPO-Rのシグナル伝達を活性化することを実証する。更に、これらのアッセイの結果は、新規ペプチド組成物において、以前に記載されていたEP0擬似ペプチドに比べて、EPO-R結合親和性および生物学的活性が驚くほど増加することを示す。

【0239】

実施例1または2で提供された方法に従って、EPO-Rアゴニストペプチドモノマー/ダイマーを調製する。一連のインビトロ活性アッセイ（レポーターアッセイ、増殖アッセイ、結合タンパク競合アッセイ、およびC/CFU-eアッセイを含む）を使用して、これらペプチドダイマーの効力を評価する。これら4つのアッセイについては、以下に更なる詳細を述べる。

30

これらインビトロ活性アッセイの結果は、表2にまとめてある。

【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EPOレセプターの細胞外部分からヒトGCSFレセプターの細胞内部分までを含むキメラレポーターを発現する。この細胞株は、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構築物で更にトランスフェクトされる。赤血球生成剤を加えることによってこのキメラレポーターが活性化される結果、ルシフェラーゼレポーター遺伝子が発現する。従って、ルシフェラーゼ基質であるルシフェリンが加えられると、光が生成される。よって、こ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できる。

40

【0241】

Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS; Hyclone社)、10% WEHI-3上清(WEHI-3細胞の培養物由来の上清; ATCC番号TIB-68)、およびペニシリン/ストレプトマイシンを補ったDMEM/F12培地(Gibco社)において培養する。アッセイの約18時間前に、10%FBSおよび0.1% WEHI-3上清を補った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を補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地

50

で細胞を一回洗浄し、次に、10%FBSを補った（WEHI-3上清は無い）DMEM/F12培地において、知られている濃度の試験ペプチドの存在下で、または、EPO（R & D Systems社（ミネソタ州ミネアポリス））をポジティブコントロールとして使用して、細胞（ 1×10^6 個/mL）を培養する。このアッセイにおいては、試験ペプチドの連続希釈物を同時に試験する。37℃で4時間、5% CO₂雰囲気においてアッセイプレートインキュベーターし、その後、各ウェルに対してルシフェリン（Steady-Glo；Promega社（ウィスコンシン州マディソン））を加える。5分間のインキュベーション後、Topcount Luminometer（Packard Instrument社（イリノイ州ダウナーズグロブ））を使用して光の放射を測定する。光のカウント（light count）を、試験ペプチド濃度に対してプロットし、Graph Pad社のソフトウェアを使用して分析する。最大値の半分の光の放射となった試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する。

10

【0242】

2. 増殖アッセイ

このアッセイは、トランスフェクトされてヒトEPO-Rを発現する、マウスブレB細胞株、Baf3に基づく。得られる細胞株、BaF3/Gal4/Elk/EPORの増殖は、EPO-Rの活性化に依存する。MTTを使用して細胞増殖の程度を定量する。この際、MTTアッセイにおけるシグナルは、生存細胞の数に比例する。

【0243】

スピナーフラスコ中、10%FBS（Hyclone社）および2% WEHI-3上清（ATCC番号TIB-68）を補ったDMEM/F12培地（Gibco社）において、BaF3/Gal4/Elk/EPOR細胞を培養する。スピナーフラスコ中、10%FBSおよび0.1% WEHI-3上清を補ったDMEM/F12培地において、細胞密度 1×10^6 個/mLで、培養した細胞を一晩飢餓状態にする。次に、リン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco's PBS；Gibco社）で、飢餓状態の細胞を2回洗浄し、10%FBSを補った（WEHI-3上清は無い）DMEM/F12培地において、 1×10^6 個/mLの細胞密度まで再懸濁する。次に、50 μ Lアリコート（細胞が $\sim 50,000$ 個）の細胞懸濁液を、96ウェルアッセイプレートに3つ組で平板培養する。10%FBSを補った（WEHI-3上清は無い）DMEM/F12培地中の50 μ Lアリコートの試験用EPO擬似ペプチドの連続希釈物、あるいは、50 μ LのEPO（R & D Systems社（ミネソタ州ミネアポリス））またはAranesp（登録商標）（ダルベポエチン α ；Amgen社より市販されているEPO-Rアゴニスト）を、96ウェルアッセイプレートに加える（最終ウェル容量：100 μ L）。例えば、試験ペプチド（またはコントロールEPOペプチド）の最終濃度が810pM $\sim$ 0.0045pMの範囲である、12の異なる希釈物を試験することができる。そして、平板培養した細胞を、37℃で48時間インキュベーターする。次に、10 μ LのMTT（Roche Diagnostics社）を各培養プレートのウェルに加え、4時間インキュベーターする。次に、10% SDS + 0.01N HClを加えることにより、反応をストップさせる。そして、プレートを37℃で一晩インキュベーターする。次に、波長595nmでの各ウェルの吸光度を、分光測光法によって測定する。吸光度の読み取り値に対する試験ペプチド濃度のプロットを構築し、Graph Pad社のソフトウェアを使用して、EC50を計算する。最大値の半分の吸光度となった試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する。

20

30

【0244】

3. 結合タンパク競合アッセイ

2つのビーズ（ビオチニル化したEPO-R結合ペプチドトレーサーを有するストレプトアビジンドナービーズおよびEPO-Rが結合するアクセプタービーズ）が近接する機能として光シグナルが産生されるアッセイを使用して、競合的結合の計算を行う。光は、非放射エネルギー伝達によって産生される。光が照射されると、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により、第2ビーズからの光の放出が引き起こされる。これらのビーズのセットは市販されている（Packard社製）。ビーズの近接は、EPO-R結合ペプチドトレーサーのEPO-Rへの結合によって生み出される。EPO-Rへの結合について、EPO-R結合ペプチドトレーサーと競合する試験ペプチドが、この結合を防ぐことになり、光の放出の減少を引き起こす。

40

【0245】

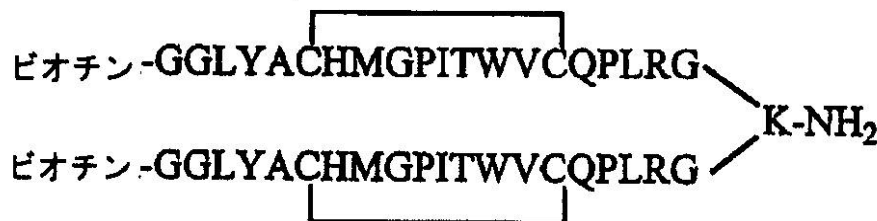
50

より詳細には、方法は以下の通りである。4 μ Lの試験EPO-Rアゴニストペプチド、あるいはポジティブまたはネガティブコントロールの連続希釈物を、384ウェルプレートのウェルに加える。その後、2 μ L/ウェルのレポーター/ビーズのカクテルを加える。レセプタービーズカクテルは以下のものより成る：15 μ Lの5mg/ml ストレプトアビジンドナービーズ (Packard)；15 μ Lの5mg/ml モノクローナル抗体abl79（この抗体は、組み換えEPO-Rに含有されるヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の部分認識する）；タンパク質Aでコーティングされたアクセプタービーズ（タンパク質Aは、abl79抗体に結合する；Packard社）；112.5 μ Lの1:6.6で希釈した組み換えEPO-R（abl79標的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部分に対し、融合タンパク質としてチャイニーズハムスター卵巣細胞内で生成）；および607.5 μ LのAlphaquest緩衝液（40mM HEPES、pH 7.4；1mM $MgCl_2$ ；0.1% BSA, 0.05% Tween 20）。軽くたたいて混合する。2 μ L/ウェルのビオチニル化したEPO-R結合ペプチドトレーサーを加える（最終濃度：30nM）。配列番号4を使用し、実施例1に記載の方法に従って、ペプチドトレーサーであるEPO-R結合ペプチド（表の「レセプターEC50(pM)」参照）を作製する。

【0246】

【化91】

ペプチドトレーサー



【0247】

1分間遠心分離にかけて混合する。プレートをPackard社のTop Sealでシールし、ホイルで包む。室温で一晩インキュベートする。18時間後、AlphaQuest読み取り器（Packard社）を使用して、光の放出を読み取る。ペプチドの濃度に対する光の放出をプロットし、Graph PadまたはExcelで分析する。

【0248】

試験ペプチド無しの場合と比べて、光の放出が50%減少する結果であった試験ペプチドの濃度を、IC50として記録する。

【0249】

4. C/CFU-eアッセイ

EPO-Rのシグナル伝達は、骨髄幹細胞が分化し、赤血球前駆体が増殖するように刺激する。このアッセイは、一次ヒト骨髄多能性幹細胞からの赤血球前駆細胞の増殖および分化を刺激する試験ペプチドの能力を測定する。

【0250】

このアッセイ用に、10% FBS (Hyclone社)を補充したIMDM培地 (Gibco社)中、試験ペプチドの連続希釈物を調製する。次に、これらの連続希釈物、またはポジティブコントロールEPOペプチドを、メチルセルロースに加えて最終容積を1.5mLとする。次に、メチルセルロースとペプチドの混合物を、完全にボルテックスする。ヒト骨髄由来のCD34⁺細胞 (Poietics社/Cambrex社)のアリコート (細胞100,000個/mL)を解凍する。50mLチューブに、0.1mLの1mg/ml DNase (Stem Cells) に対して解凍した細胞を静かに加える。次に、細胞に対して40~50mLのIMDM培地を静かに加える。培地は、最初の10mLについては、50mLチューブの側面に沿って一滴ずつ加え、残りの培地は、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900rpmで20分間回転させ、静かに吸引することによって培地を注意深く除去する。1mLのIMDM培地に細胞を再懸濁し、1mL当たりの細胞密度を血球計スライド上で測る (スライド上に10 μ Lアリコートの細胞懸濁液；細胞密度は、平均数×細胞10,000個/mLである)。次に、IMDM培地で細胞を希釈し、細胞密度を15,000個/mLとする。次

に、100 μ Lの希釈した細胞を、各1.5 mLのメチルセルロースとペプチド試料に加え（アッセイ培地における最終的な細胞濃度は1,000個/mL）、混合物をボルテックスする。混合物内の泡を無くし、先のとがっていない針を使用して1mLを吸引する。各試料から吸引した0.25mLの混合物を、24ウェルプレート（Falcon社製）の4つのウェルそれぞれに加える。平板培養した混合物を、多湿のインキュベータ内において5% CO₂下、37℃で14日間インキュベートする。位相差顕微鏡（5～10倍；最終倍率100倍）を使用して、赤血球コロニーの存在をスコアする。形成されたコロニーの数が、EPOポジティブコントロールで観察された数と比べて最大数の90%であった試験ペプチド濃度を、EC90として記録する（表2 参照；C/BFU-e EC90）。

【 0 2 5 1 】

【表 5】

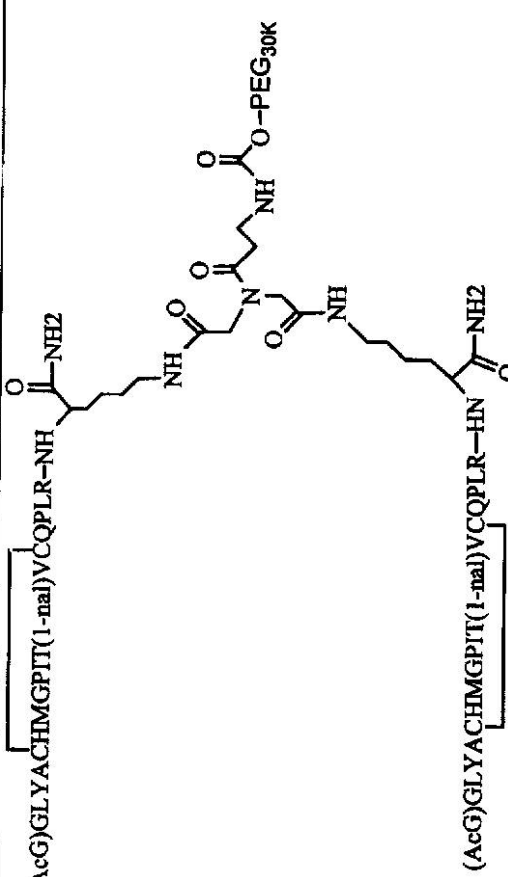
化合物名 称	ペプチドダイマー	レポーター EC50 (pM)	増殖 EC50 (pM)	AQ IC50 (nM)	C/BFU-c EC90 (nM)
ペプチドV 配列番号1	 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH₂ (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH₂	—	---	---	6.2

表4: ペプチドダイマーのインビトロ活性アッセイ

【実施例 8】

【0252】

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および効力を評価する際に有用な種々のインビボアッセイについて述べる。EPO-Rアゴニストペプチドモノマーおよびダイマーは、実施例1で提供された方法に従って調製される。これらペプチドモノマーおよびダイマーのインビボ活性は、連続アッセイ（赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイおよび網状赤血球アッセイを含む）を使用して評価する。これら2つのアッセイについて、以下に更なる詳細を述べる。

【0253】

1. 赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイ

CotesおよびBangham (1961), Nature 191 : 1065-1067に記載されている方法を適用させた赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイにおいて、試験ペプチドのインビボ活性についてアッセイする。このアッセイでは、試験ペプチドがEPO模倣剤として機能する、すなわち、EPO-Rを活性化し、新しい赤血球合成を誘導する能力を試験する。赤血球合成は、合成された赤血球のヘモグロビン内への放射性標識された鉄の取り込みに基づいて定量する。

【0254】

BDF1マウスを、7~10日間かけて周囲条件に順応させる。すべてのマウスの体重を測定し、低体重のマウス（<15グラム）は使用しない。マウスは、トータルで14日間、低圧室において、連続した調整サイクルに適用する。各24時間のサイクルは、18時間の $0.40 \pm 0.02\%$ 大気圧および6時間の周囲圧力より成る。調整後、マウスは投薬前に更に72時間、周囲圧力で維持する。

【0255】

試験ペプチドまたは組み換えヒトEPOスタンダードを、PBS+0.1% BSAビヒクル(PBS/BSA)で希釈する。ペプチドモノマー原液は、最初にジメチルスルホキシド(DMSO)中に可溶化する。ネガティブコントロールグループは、PBS/BSAのみを注射したマウスの1つのグループと、1% DMSOを注射したマウスの1つのグループとを含む。各グループは、10匹のマウスを含む。0.5 mLの適切な試料をマウスに皮下注射する（首筋）。

【0256】

試料を注射してから48時間後、0.2 mLの Fe^{59} (Dupont NEN社)をマウスに腹腔内注射する（用量：マウス1匹当たり約 $0.75 \mu\text{Ci}$ ）。 Fe^{59} を投与してから24時間後、マウスの体重を測定し、 Fe^{59} の投与から48時間後、マウスを屠殺する。心穿刺によって各マウスから血を回収し、ヘマトクリット値を測定する（抗凝血剤としてヘパリンを使用）。Packard社のガンマカウンターを使用して、各血液試料（0.2 mL）の Fe^{59} の取り込みについて分析する。反応のないマウス（すなわち、放射性の取り込みがネガティブコントロールグループよりも少なかったマウス）は、適切なデータセットから除外する。ヘマトクリット値がネガティブコントロールグループの53%よりも少ないマウスも除外する。

【0257】

結果は、各実験用量について、10匹のマウスのセットから得る。各グループから得られた血液試料に取り込まれた放射能の量の平均（分当たりのカウント（CPM））を計算する。

【0258】

2. 網状赤血球アッセイ

正常なBDF1マウスに、3日間連続して、EPOコントロールまたは試験ペプチドのいずれかを投与する（用量：0.5mL、皮下注射）。3日目に、鉄デキストラン(100mg/mL)をマウスに投与する（用量：0.1mL、腹腔内注射）。5日目に、マウスに CO_2 で麻酔をかけ、心穿刺によって出血させる。各血液試料における網状赤血球の割合（%）は、チアゾールオレンジによる染色およびフローサイトメトリ分析（網状赤血球数カウントプログラム）によって測定する。ヘマトクリット値を手動で測定する。訂正された網状赤血球の割合は、以下の式を使用して決定する：

$$\% \text{RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{NORMAL}})$$

10

20

30

40

50

【0259】

3. 血液学的アッセイ

正常なCD1マウスに、EPOポジティブコントロール、試験ペプチド、またはビヒクルのいずれかを、4週間の静脈内ボラス注射によって投与する。ポジティブコントロールおよび試験ペプチドの用量の範囲 (mg/kgで示す) は、処方における活性化化合物濃度を変えることにより、試験する。注射する量は5 mg/kgである。ビヒクルコントロールグループは12匹より成り、残りの各用量のグループはそれぞれ8匹より成る。毎日の生存能力および週毎の体重を記録する。

【0260】

投与したマウスは絶食させ、1日目 (ビヒクルコントロールマウス) 並びに15日目および29日目 (4匹/グループ/日) に、イソフルレン吸入によって麻酔をかけ、心穿刺または腹大動脈穿刺によって末端の血液試料を回収する。血液をVacutainer (登録商標) チューブに移す。好ましい抗凝血剤はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

10

【0261】

血液試料は、当技術分野において周知の自動臨床分析機器 (例えばCoulter社製の機器) を使用して、赤血球合成および生理学を測定する評価項目 (ヘマトクリット値(Hct)、ヘモグロビン(Hgb)および総赤血球数(RBC)等) について評価を行う。

【実施例9】

【0262】

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

20

工程1: ペプチドモノマーの合成

ペプチドモノマーは、ABI 431Aペプチド合成器上で、TG-RAM樹脂(0.18mmol/g、Rapp Polymere社 (ドイツ国)) を使用して、標準的なFmoc化学反応を用いて合成する。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の合成用に、82.5%のTFA、5%の水、6.25%のアニソール、6.25%のエタンジチオールを用いて、完全に組み立てられたペプチドを樹脂から切り離す。脱保護された生成物を樹脂からろ過し、ジエチルエーテルを用いて沈殿させる。完全に乾燥後、生成物は0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル/水の勾配を使用したC18逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製する。ペプチドの構造は、エレクトロスプレー質量分析によって確認する。ペプチドモノマーは、以下のように示すことができる：

30

【0263】

【化92】

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK-NH₂ (配列番号1)

【0264】

工程2: 三官能性リンカーの合成

100mLのDCM中のジエチルイミノアセテート(10.0g、52.8mmol)およびBoc-ベータ-アラニン(10.0g、52.8 mmol)の溶液に対し、ジイソプロピルカルボジイミド(8.0mL、51.1mmol)を10分間かけて室温で加えた。加える間、反応混合物を10度まで暖め、20分かけて冷却して室温まで戻した。反応混合物を一晩攪拌し、沈殿させたジイソプロピル尿素をろ過した。減圧下で溶媒を除去してゴムを与え、残渣をエチルアセテートに溶解して再びろ過し、更に沈殿した尿素を除去した。有機相を分液漏斗内に配置し、洗浄し (sat. NaHCO₃、ブライン、0.5N HCl、ブライン)、乾燥し (MgSO₄)、ろ過し、減圧下で濃縮して、無色油としてジエステル生成物を得た。ジエステルを、MeOH: THFが1: 1の混合物(100mL)に混ぜ、これに水(25mL)、次にNaOH(5g、125mmol)を加えた。pHを測定して>10となるようにした。反応混合物を室温で2時間攪拌し、6N HClでpH1まで酸性化した。水相をNaClで飽和させ、エチルアセテートを用いて4回抽出を行った。結合されている有機相を洗浄し (ブライン)、乾燥し (MgSO₄)、減圧下で濃縮して、白色の半固体を得た。固体を50mLのDCM

40

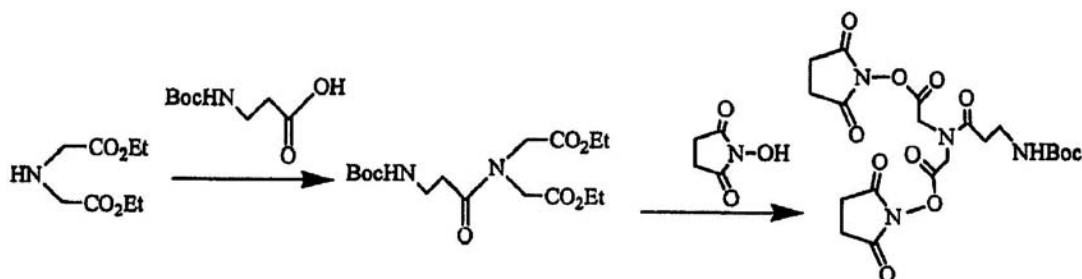
50

に溶解し、これに300mLのヘキサンを加えて白色のスラリーを作製した。溶媒を減圧下で除去し、白色の固体として二塩基酸を得た(14.7g、2工程における収率91.5%)。20mLのDMF中の二塩基酸の溶液(1g、3.29mmol)に対し、N-ヒドロキシスクシンイミド(770mg、6.69mmol)、ジイソプロピルカルボジイミド(1.00mL、6.38mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(3mg、0.02mmol)を加えた。反応混合物を一晩攪拌し、減圧下で溶媒を除去した。残渣をエチルアセテートに混ぜ、ろ過して沈殿した尿素を除去した。有機相を分液漏斗内に配置し、洗浄し(sat.NaHCO₃、ブライン、0.5N HCl、ブライン)、乾燥し(MgSO₄)、ろ過し、減圧下で濃縮して、白色の固体としてジ-NHSエステル生成物(1.12g、収率68%)を得た。

【0265】

【化93】

10



【0266】

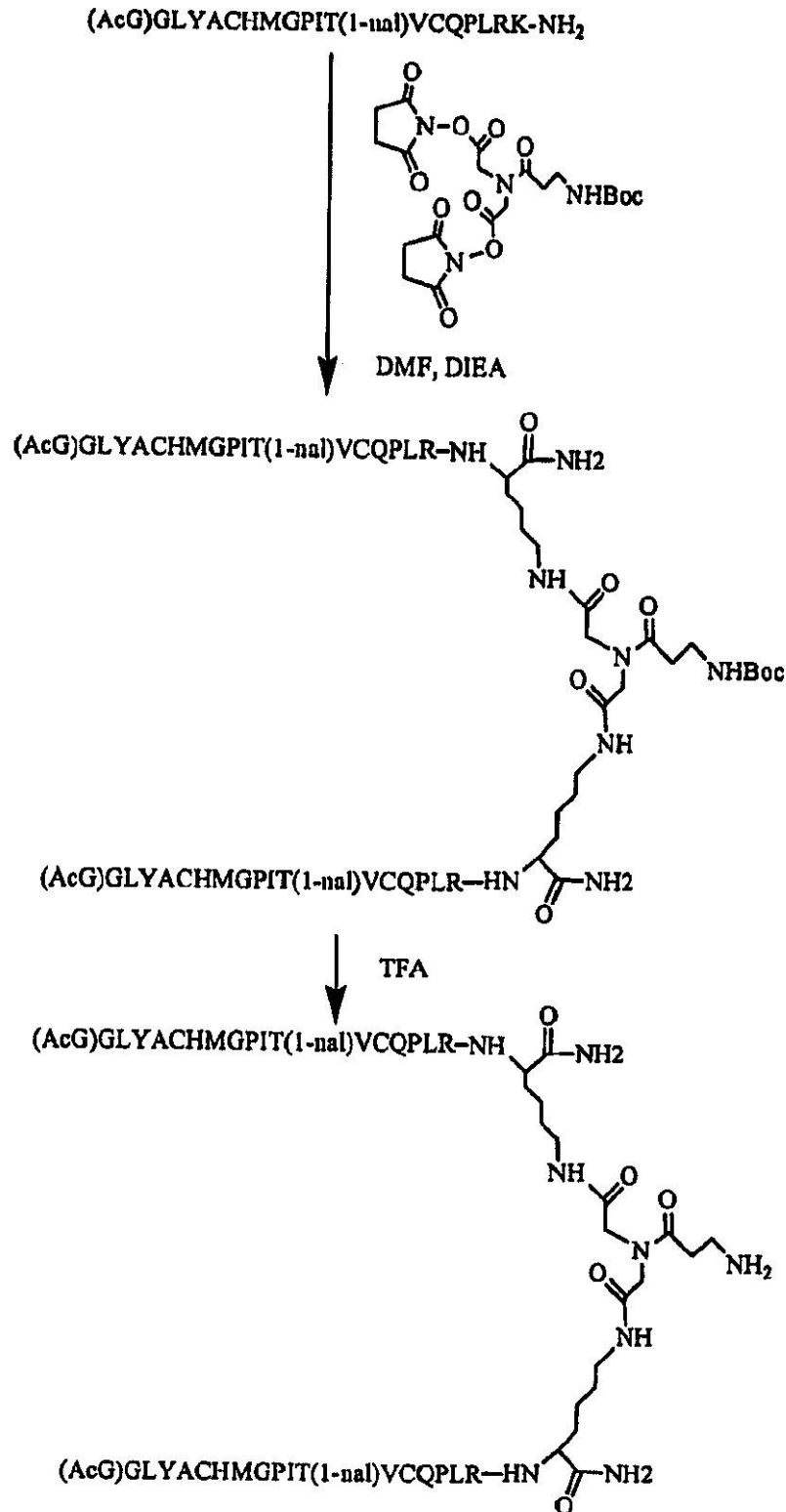
20

工程3：ペプチドモノマーへの三官能性リンカーの結合

リンカーの結合のために、乾燥DMFにおいて2倍当量のペプチドを1倍当量の三官能性リンカーと混合して澄んだ溶液を得て、2分後に5倍当量のDIEAを加える。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DCM中の80%TFAに30分間溶解してBoc基を除去し、次にC18逆相HPLCによって精製する。ダイマーの構造をエレクトロスプレー質量分析によって確認する。この結合反応により、リンカーは、各モノマーのリジン残基のεアミノ基の窒素原子に結合される。配列番号1を使用した結合を以下に示す。

【0267】

【化 9 4】



【 0 2 6 8】

工程 4：リジンが結合する2つの直鎖状のPEG鎖を含むPEG部分の合成
 mPEG2-リシノール-NPC

市販のものを入手できるリシノールを、過剰のmPEG2-NPCで処理してMPEG2-リシノールを得、これを次にNPCと反応させてmPEG2-リシノール-NPCを形成する。

mPEG2-Lys-NHS

この生成物は、例えば、Nektar Therapeutics社（35806 アラバマ州ハンツビル ディスカバリードライブ490）の分子工学カタログ（2003）のアイテム番号2Z3X0T01等、市販

のものを入手することができる。

【0269】

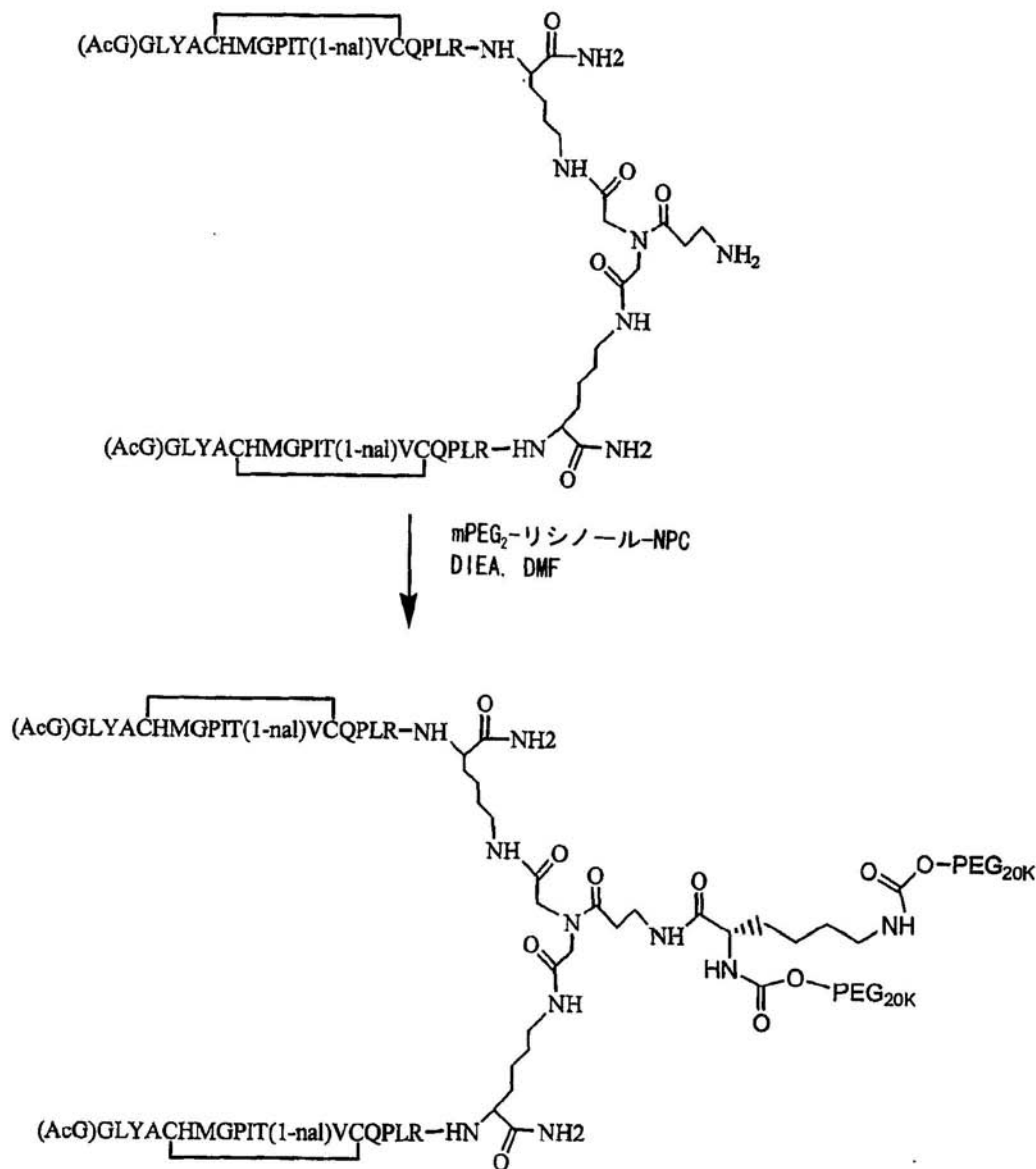
工程5：ペプチドダイマーのPEG化

カルバメート結合を通じたPEG化

ペプチドダイマーおよびPEG種（mPEG₂-リシノール-NPC）を、乾燥DMFにおいて1：2のモル比で混合して澄んだ溶液を得る。5分後に、この溶液に対して4倍等量のDIEAを加える。混合物を周囲温度で14時間攪拌し、次にC18逆相HPLCによって精製する。PEG化されたペプチドの構造を、MALDI質量分析法によって確認する。精製されたペプチドも、以下に概略を述べるように、陽イオン交換クロマトグラフィーを通じた精製に適用した。配列番号1を使用し、mPEG-リシノール-NPCを使用したPEG化を以下に示す。

【0270】

【化95】



【0271】

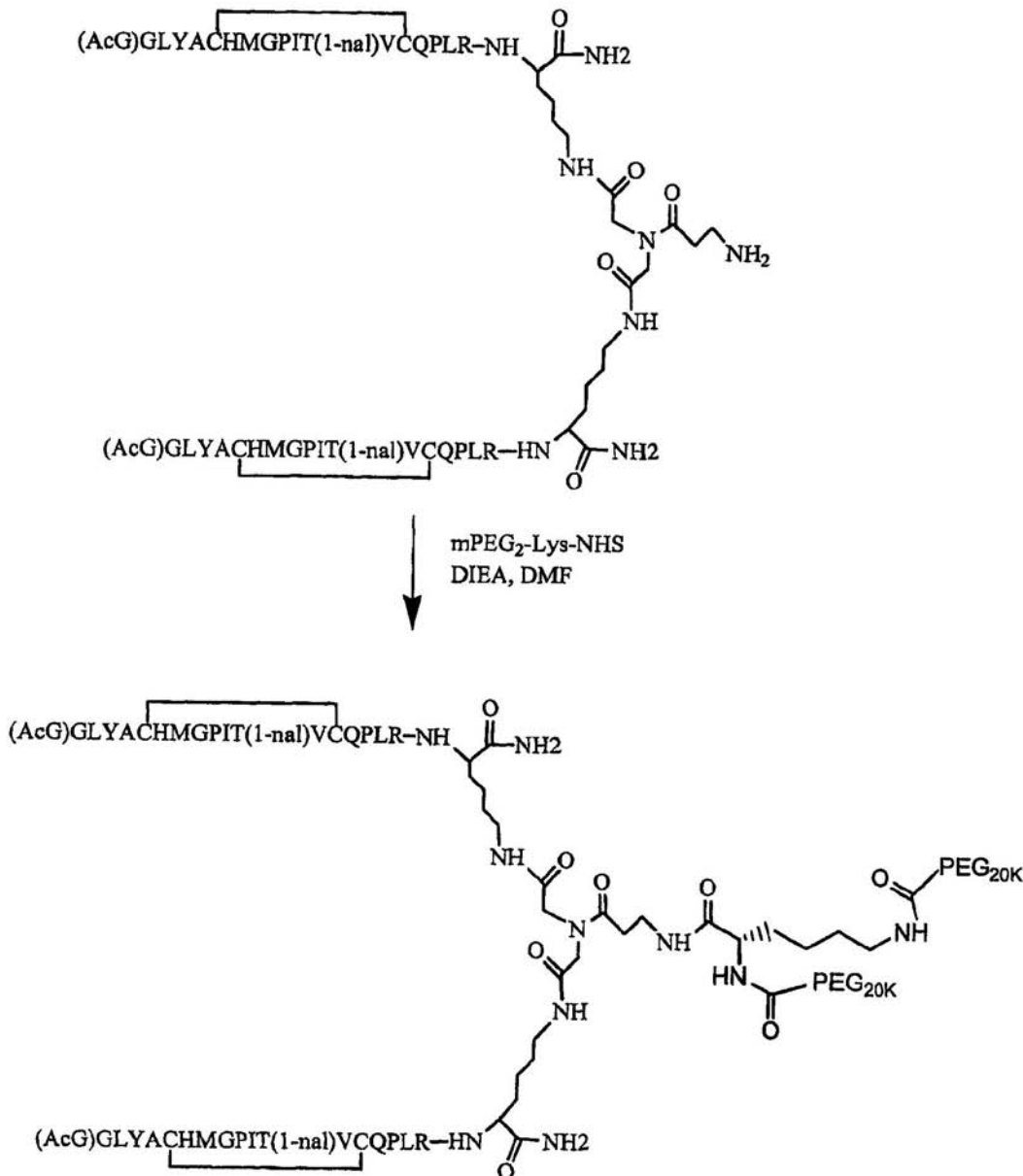
アミド結合を通じたPEG化

ペプチドダイマーおよびPEG種（Shearwater社（米国）製のmPEG₂-Lys-NHS）を、乾燥DMFにおいて1：2のモル比で混合して澄んだ溶液を得る。5分後に、この溶液に対して10倍当量のDIEAを加える。混合物を周囲温度で2時間攪拌し、次にC18逆相HPLCによって精製する。PEG化されたペプチドの構造を、MALDI質量分析法によって確認した。精製されたペプチ

ドも、以下に概略を述べるように、陽イオン交換クロマトグラフィーを通じた精製に適用した。配列番号 1 を使用し、mPEG₂-Lys-NHS を使用した PEG 化を以下に示す。

【 0 2 7 2 】

【 化 9 6 】



【 0 2 7 3 】

工程 6：ペプチドのイオン交換による精製

いくつかの交換用支持体について、出発二量体ペプチドを保持する能力に加え、未反応の（または加水分解された）PEG から上記のペプチド-PEG 結合を分離する能力を調査した。イオン交換樹脂（2～3g）を 1cm カラムに装填し、次にナトリウム型に変換し（溶離液の pH が 14 になるまで 0.2 N NaOH をカラムに装填した；約 5 カラム容積）、次に水素型に変換し（溶離液が充填 pH にマッチするまで 0.1 N HCl または 0.1 M HOAc のいずれかで溶離した；約 5 カラム容積）、次に、pH が 6 になるまで 25% ACN/水で洗浄した。結合前のペプチドまたはペプチド-PEG 結合を、25% ACN/水（10mg/mL）に溶解し、TFA で pH を 3 未満に調節し、次に、カラムに装填した。2～3 カラム容積の 25% ACN/水で洗浄し、5mL の画分を回収した後、25% ACN/水中 0.1 M NH₄OAc で溶離することにより、ペプチドをカラムから離し、再び 5mL の画分を回収した。HPLC による分析により、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) を使用した分析は、ペプチドをカラム上に保持し、NH₄OAc 溶液で溶離した場合（一般的に画分 4～10 の間）、混

入物質として非結合のPEGが観察されなかったことを示した。ペプチドを最初の洗浄緩衝液で溶離したとき（一般的に最初の2画分）、所望のPEG結合および過剰なPEGの分離は観察されなかった。

【0274】

以下のカラムは、ペプチドおよびペプチド-PEG結合の両方を保持することに成功し、結合されていないペプチドからペプチド-PEG結合を精製することに成功した。

【0275】

【表6】

表5：イオン交換樹脂

支持体	供給元
Mono S HR 5/5 強陽イオン交換事前装填カラム	Amersham Biosciences社
SE53 セルロース、微粒状強陽イオン交換用支持体	Whatman社
SPセファロース高速流強陽イオン交換用支持体	Amersham Biosciences社

10

【実施例10】

【0276】

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

工程1において、合成されたペプチドモノマーが：

(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K（配列番号2）

であることを除いては、実施例1に記載されているようにして、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合成する。

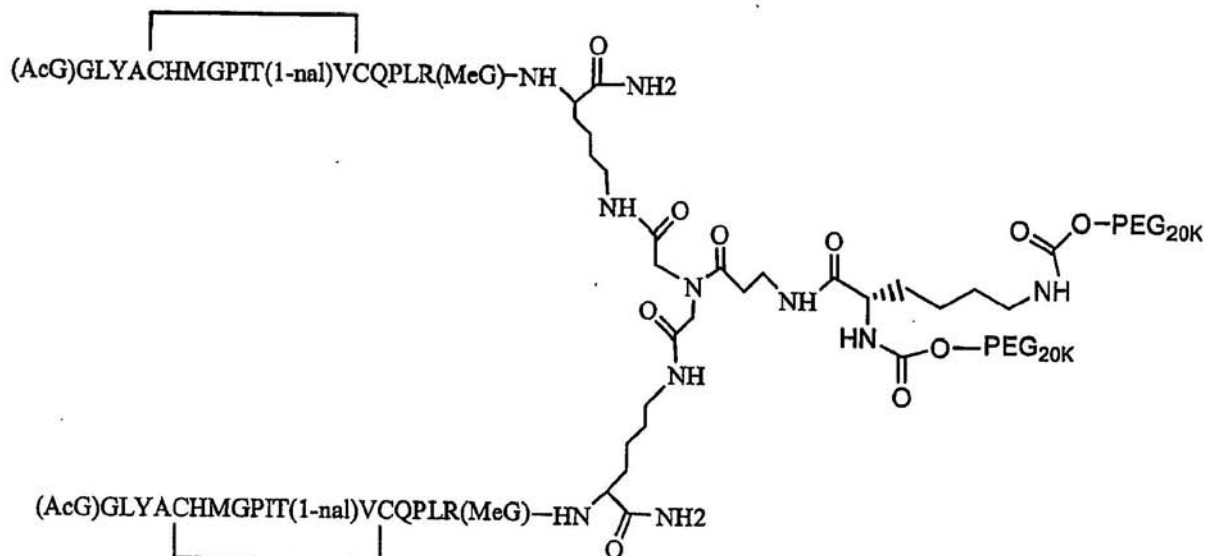
【0277】

カルバメート結合を通じてPEGをスパーサーに結合する場合、配列番号2を使用したこの合成の最終生成物は、以下のように構造的に示すことができる：

【0278】

【化97】

30



40

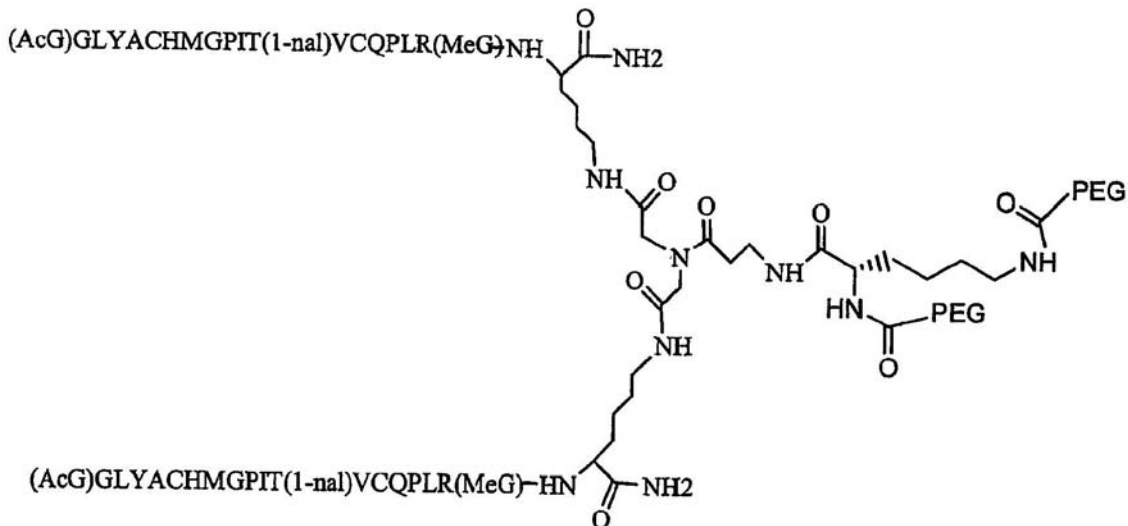
【0279】

アミド結合を通じてPEGをスパーサーに結合する場合、配列番号2を使用したこの合成の最終生成物は、以下のように構造的に示すことができる：

【0280】

50

【化 9 8】



10

【実施例 1 1】

【0 2 8 1】

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および効力を評価する際に有用な種々のインビトロアッセイについて述べる。これらのアッセイの結果は、本発明の新規のペプチドがEPO-Rに結合し、EPO-Rのシグナル伝達を活性化することを実証する。更に、これらのアッセイの結果は、新規ペプチド組成物において、以前に記載されていたEPO擬似ペプチドに比べて、EPO-R結合親和性および生物学的活性が驚くほど増加することを示す。

20

【0 2 8 2】

実施例 1 または 2 で提供された方法に従って、EPO-Rアゴニストペプチドモノマー/ダイマーを調製する。一連のインビトロ活性アッセイ（レポーターアッセイ、増殖アッセイ、結合タンパク競合アッセイ、およびC/BEU-eアッセイを含む）を使用して、これらペプチドダイマーの効力を評価する。これら4つのアッセイについては、以下に更なる詳細を述べる。

30

これらインビトロ活性アッセイの結果は、表 2 にまとめてある。

【0 2 8 3】

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EPOレセプターの細胞外部分からヒトGCSFレセプターの細胞内部分までを含むキメラレポーターを発現する。この細胞株は、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構築物で更にトランスフェクトされる。赤血球生成剤を加えることによってこのキメラレポーターが活性化される結果、ルシフェラーゼレポーター遺伝子が発現する。従って、ルシフェラーゼ基質であるルシフェリンが加えられると、光が生成される。よって、こ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できる。

40

【0 2 8 4】

Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS; Hyclone社)、10% WEHI-3上清(WEHI-3細胞の培養物由来の上清; ATCC番号TIB-68)、およびペニシリン/ストレプトマイシンを補ったDMEM/F12培地(Gibco社)中で培養する。アッセイの約18時間前に、10%FBSおよび0.1% WEHI-3上清を補った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を補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地で細胞を一回洗浄し、次に、10%FBSを補った(WEHI-3上清は無い)DMEM/F12培地において、知られている濃度の試験ペプチドの存在下で、または、EPO(R & D Systems社(ミネソタ州ミネアポリス))をポジティブコントロールとして使用して、細胞(1×10⁶個/mL)を培

50

養する。このアッセイにおいては、試験ペプチドの連続希釈物を同時に試験する。37℃で4時間、5% CO₂雰囲気においてアッセイプレートをインキュベートし、その後、各ウェルに対してルシフェリン (Steady-Glo; Promega社 (ウィスコンシン州マディソン)) を加える。5分間のインキュベーション後、Topcount Luminometer (Packard Instrument社 (イリノイ州ダウナーズグロブ)) を使用して光の放射を測定する。光のカウント (light count) を、試験ペプチド濃度に対してプロットし、Graph Pad社のソフトウェアを使用して分析する。最大値の半分の光の放射となった試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する。

【0285】

2. 増殖アッセイ

このアッセイは、トランスフェクトされてヒトEPO-Rを発現する、マウスプレB細胞株、Baf3に基づく。得られる細胞株、BaF3/Gal4/Elk/EPORの増殖は、EPO-Rの活性化に依存する。MTTを使用して細胞増殖の程度を定量する。この際、MTTアッセイにおけるシグナルは、生存細胞の数に比例する。

【0286】

スピナーフラスコ中、10%FBS (Hyclone社) および2% WEHI-3上清(ATCC番号TIB-68) を補ったDMEM/F12培地(Gibco社) 中で、BaF3/Gal4/Elk/EPOR細胞を培養する。スピナーフラスコ中、10%FBSおよび0.1% WEHI-3上清を補ったDMEM/F12培地において、細胞密度 1×10^6 個/mlで、培養した細胞を一晩飢餓状態にする。次に、リン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's PBS; Gibco社) で、飢餓状態の細胞を2回洗浄し、10%FBSを補った (WEHI-3上清は無い) DMEM/F12培地に、 1×10^6 個/mlの細胞密度まで再懸濁する。次に、50 μ Lアリコート (細胞が $\sim 50,000$ 個) の細胞懸濁液を、96ウェルアッセイプレートに3つ組で平板培養する。10%FBSを補った (WEHI-3上清Iは無い) DMEM/F12培地中の50 μ Lアリコートの試験用EPO擬似ペプチドの連続希釈物、あるいは、50 μ LのEPO (R & D Systems社 (ミネソタ州ミネアポリス)) またはAranesp (登録商標) (ダルベポエチン α ; Amgen社より市販されているEPO-Rアゴニスト) を、96ウェルアッセイプレートに加える (最終ウェル容量: 100 μ L)。例えば、試験ペプチド (またはコントロールEPOペプチド) の最終濃度が810pM $\sim$ 0.0045pMの範囲である、12の異なる希釈物を試験することができる。そして、平板培養した細胞を、37℃で48時間インキュベートする。次に、10 μ LのMTT (Roche Diagnostics社) を各培養プレートのウェルに加え、4時間インキュベートする。次に、10% SDS+0.01N HClを加えることにより、反応をストップさせる。そして、プレートを37℃で一晩インキュベートする。次に、波長595nmでの各ウェルの吸光度を、分光測光法によって測定する。吸光度の読み取り値に対する試験ペプチド濃度のプロットを構築し、Graph Pad社のソフトウェアを使用して、EC50を計算する。最大値の半分の吸光度となった試験ペプチドの濃度を、EC50として記録する。

【0287】

3. 結合タンパク競合アッセイ

2つのビーズ (ビオチニル化したEPO-R結合ペプチドトレーサーを有するストレプトアビジンドナービーズおよびEPO-Rが結合するアクセプタービーズ) が近接する機能として光シグナルが産生されるアッセイを使用して、競合的結合の計算を行う。光は、非放射エネルギー伝達によって産生される。光が照射されると、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により、第2ビーズからの光の放出が引き起こされる。これらのビーズのセットは市販されている (Packard社製)。ビーズの近接は、EPO-R結合ペプチドトレーサーのEPO-Rへの結合によって生み出される。EPO-Rへの結合について、EPO-R結合ペプチドトレーサーと競合する試験ペプチドが、この結合を防ぐことになり、光の放出の減少を引き起こす。

【0288】

より詳細には、方法は以下の通りである。4 μ Lの試験EPO-Rアゴニストペプチド、あるいはポジティブまたはネガティブコントロールの連続希釈物を、384ウェルプレートのウェルに加える。その後、2 μ L/ウェルのレポーター/ビーズのカクテルを加える。レセプタ

10

20

30

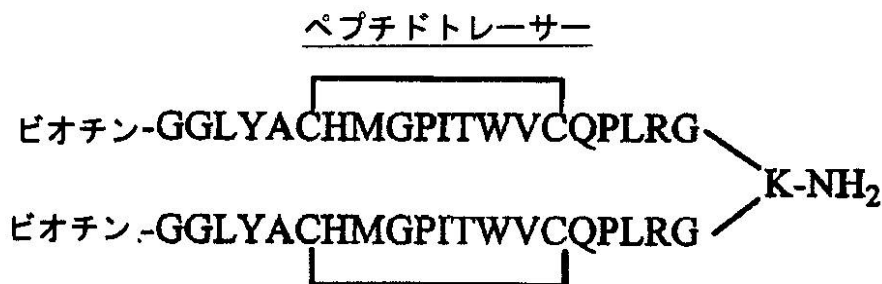
40

50

ービーズカクテルは以下のものより成る：15 μ Lの5mg/ml ストレプトアビジンドナービーズ (Packard)；15 μ Lの5mg/ml モノクローナル抗体abl79（この抗体は、組み換えEPO-Rに含有されるヒト胎盤アルカリホスファターゼタンパク質の部分を認識する）；タンパク質Aでコーティングされたアクセプタービーズ（タンパク質Aは、abl79抗体に結合する；Packard社）；112.5 μ Lの1:6.6で希釈した組み換えEPO-R（abl79標的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部分に対し、融合タンパク質としてチャイニーズハムスター卵巣細胞内で生成）；および607.5 μ LのAlphaquest緩衝液（40mM HEPES、pH 7.4；1mM $MgCl_2$ ；0.1% BSA、0.05% Tween 20）。軽くたたいて混合する。2 μ L/ウェルのビオチニル化したEPO-R結合ペプチドトレーサーを加える（最終濃度：30nM）。配列番号4を使用し、実施例1に記載の方法に従って、ペプチドトレーサーであるEPO-R結合ペプチド（表の「レセプターEC50(pM)」参照）を作製する。

【0289】

【化99】



【0290】

1分間遠心分離にかけて混合する。プレート Packard社のTop Sealでシールし、ホイルで包む。室温で一晩インキュベートする。18時間後、AlphaQuest読み取り器（Packard社）を使用して、光の放出を読み取る。ペプチドの濃度に対する光の放出をプロットし、Graph PadまたはExcelで分析する。

【0291】

試験ペプチド無しの場合と比べて、光の放出が50%減少する結果であった試験ペプチドの濃度を、IC50として記録する。

【0292】

4. C/BFU-eアッセイ

EPO-Rのシグナル伝達は、骨髓幹細胞が分化し、赤血球前駆体が増殖するように刺激する。このアッセイは、一次ヒト骨髓多能性幹細胞からの赤血球前駆細胞の増殖および分化を刺激する試験ペプチドの能力を測定する。

【0293】

このアッセイ用に、10% FBS (Hyclone社)を補充したIMDM培地 (Gibco社)中、試験ペプチドの連続希釈物を調製する。次に、これらの連続希釈物、またはポジティブコントロールEPOペプチドを、メチルセルロースに加えて最終容積を1.5mLとする。次に、メチルセルロースとペプチドの混合物を、完全にボルテックスする。ヒト骨髓由来のCD34⁺細胞 (Poietics社/Cambrex社)のアリコート（細胞100,000個/mL）を解凍する。50mLチューブに、0.1mLの1mg/mL DNase (Stem Cells) に対して解凍した細胞を静かに加える。次に、細胞に対して40~50mLのIMDM培地を静かに加える。培地は、最初の10mLについては、50mLチューブの側面に沿って一滴ずつ加え、残りの培地は、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900rpmで20分間回転させ、静かに吸引することによって培地を注意深く除去する。1mLのIMDM培地に細胞を再懸濁し、1mL当たりの細胞密度を血球計スライド上で測る（スライド上に10 μ Lアリコートの細胞懸濁液；細胞密度は、平均数×細胞10,000個/mLである）。次に、IMDM培地で細胞を希釈し、細胞密度を15,000個/mLとする。次に、100 μ Lの希釈した細胞を、各1.5 mLのメチルセルロースとペプチド試料に加え（アッセイ培地における最終的な細胞濃度は1,000個/mL）、混合物をボルテックスする。混合物

内の泡を無くし、先のとがっていない針を使用して1mLを吸引する。各試料から吸引した0.25mLの混合物を、24ウェルプレート（Falcon社製）の4つのウェルそれぞれに加える。平板培養した混合物を、多湿のインキュベータ内において5% CO₂下、37℃で14日間インキュベートする。位相差顕微鏡（5～10倍；最終倍率100倍）を使用して、赤血球コロニーの存在をスコアする。形成されたコロニーの数が、EPOポジティブコントロールで観察された数と比べて最大数の90%であった試験ペプチド濃度を、EC90として記録する（表2参照；C/BFU-e EC90）。

【0294】

【表 7】

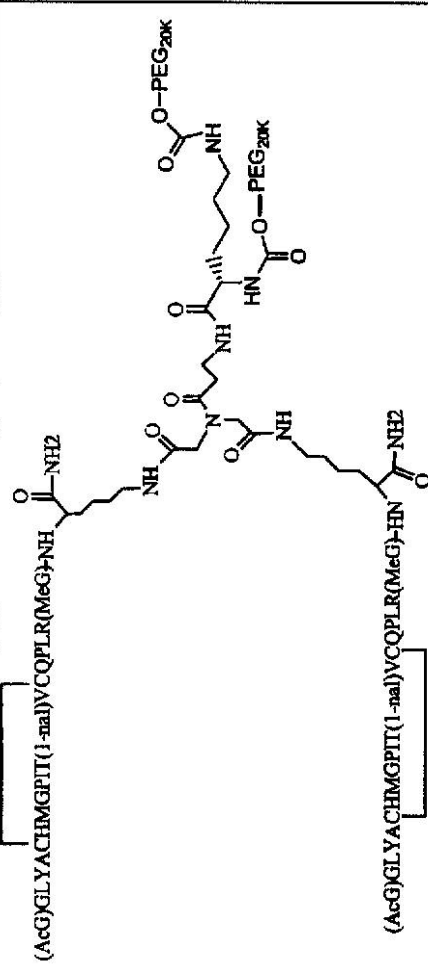
化合物 名称	ペプチドダイマー	レポーター EC50 (pM)	増殖 EC50 (pM)	放射リガンド IC50 (pM)	C/BFU-a EC90 (nm)
ペプチドI 配列番号2		195	165	111	3

表6:ペプチドダイマーのインビトロ活性アッセイ

【実施例 12】

【0295】

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および効力を評価する際に

10

20

30

40

50

有用な種々のインビボアッセイについて述べる。EPO-Rアゴニストペプチドモノマーおよびダイマーは、実施例1で提供された方法に従って調製される。これらペプチドモノマーおよびダイマーのインビボ活性は、連続アッセイ（赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイおよび網状赤血球アッセイを含む）を使用して評価する。これら2つのアッセイについて、以下に更なる詳細を述べる。

【0296】

1. 赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイ

CotesおよびBangham (1961), Nature 191 : 1065-1067に記載されている方法を適用させた赤血球増加性・過低酸素症（Exhypoxic）マウスのバイオアッセイにおいて、試験ペプチドのインビボ活性についてアッセイする。このアッセイでは、試験ペプチドがEPO模倣剤として機能する、すなわち、EPO-Rを活性化し、新しい赤血球合成を誘導する能力を試験する。赤血球合成は、合成された赤血球のヘモグロビン内への放射性標識された鉄の取り込みに基づいて定量する。

【0297】

BDF1マウスを、7~10日間かけて周囲条件に順応させる。すべてのマウスの体重を測定し、低体重のマウス（<15グラム）は使用しない。マウスは、トータルで14日間、低圧室において、連続した調整サイクルに適用する。各24時間のサイクルは、18時間の $0.40 \pm 0.02\%$ 大気圧および6時間の周囲圧力より成る。調整後、マウスは、投薬前に更に72時間、周囲圧力で維持する。

【0298】

試験ペプチドまたは組み換えヒトEPOスタンダードを、PBS+0.1% BSAビヒクル(PBS/BSA)で希釈する。ペプチドモノマー原液は、最初にジメチルスルホキシド(DMSO)中に可溶化する。ネガティブコントロールグループは、PBS/BSAのみを注射したマウスの1つのグループと、1% DMSOを注射したマウスの1つのグループとを含む。各グループは、10匹のマウスを含む。0.5 mLの適切な試料をマウスに皮下注射する（首筋）。

【0299】

試料を注射してから48時間後、0.2 mLの Fe^{59} (Dupont NEN社)をマウスに腹腔内注射する（用量：マウス1匹当たり約 $0.75 \mu\text{Ci}$ ）。 Fe^{59} を投与してから24時間後、マウスの体重を測定し、 Fe^{59} の投与から48時間後、マウスを屠殺する。心穿刺によって各マウスから血を回収し、ヘマトクリット値を測定する（抗凝血剤としてヘパリンを使用）。Packard社のガンマカウンターを使用して、各血液試料（0.2 mL）の Fe^{59} の取り込みについて分析する。反応のないマウス（すなわち、放射性の取り込みがネガティブコントロールグループよりも少なかったマウス）は、適切なデータセットから除外する。ヘマトクリット値がネガティブコントロールグループの53%よりも少ないマウスも除外する。

【0300】

結果は、各実験用量について、10匹のマウスのセットから得る。各グループから得られた血液試料に取り込まれた放射能の量の平均（分当たりのカウント（CPM））を計算する。

【0301】

2. 網状赤血球アッセイ

正常なBDF1マウスに、3日間連続して、EPOコントロールまたは試験ペプチドのいずれかを投与する（用量：0.5mL、皮下注射）。3日目に、鉄デキストラン(100mg/mL)をマウスに投与する（用量：0.1mL、腹腔内注射）。5日目に、マウスに CO_2 で麻酔をかけ、心穿刺によって出血させる。各血液試料における網状赤血球の割合（%）は、チアゾールオレンジによる染色およびフローサイトメトリ分析（網状赤血球数カウントプログラム）によって測定する。ヘマトクリット値を手動で測定する。訂正された網状赤血球の割合を、以下の式を使用して決定する：

$$\% \text{RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{ヘマトクリット}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{ヘマトクリット}_{\text{NORMAL}})$$

【0302】

3. 血液学的アッセイ

正常なCD1マウスに、EPOポジティブコントロール、試験ペプチド、またはビヒクルのいずれかを、4週間の静脈内ボラス注射によって投与する。ポジティブコントロールおよび試験ペプチドの用量の範囲（mg/kgで示す）は、処方における活性化化合物濃度を変えることにより試験する。注射する量は5 mg/kgである。ビヒクルコントロールグループは12匹より成り、残りの各用量のグループはそれぞれ8匹より成る。毎日の生存能力および週毎の体重を記録する。

【0303】

投与したマウスは絶食させ、1日目（ビヒクルコントロールマウス）並びに15日目および29日目（4匹/グループ/日）に、イソフルレン吸入によって麻酔をかけ、心穿刺または腹大動脈穿刺によって末端の血液試料を回収する。血液をVacutainer（登録商標）チューブに移す。好ましい抗凝血剤はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

【0304】

血液試料は、当技術分野において周知の自動臨床分析機器（例えばCoulter社製の機器）を使用して、赤血球合成および生理学を測定する評価項目（ヘマトクリット値(Hct)、ヘモグロビン(Hgb)および総赤血球数(RBC)等）について評価を行う。

【実施例13】

【0305】

動物およびヒトの正常で健康なボランティア（NHV）におけるヘモグロビンレベルの増加

1. 概要

非臨床的および臨床的なデータに基づくと、完全に合成のEPOレセプターアゴニストであるペプチドIは、不適切なEPO生成の影響による貧血を安全かつ効果的に軽減する潜在性を有する。ペプチドIは、現在入手可能なEPO生成物を超える、いくつかの潜在的な利点を有し得ると予測され、それには以下が含まれる：予期される投薬のインターバルが3～4週間毎での、半減期の延長および薬力学的活性。これは利便性およびコンプライアンスが改善される結果となり得る；内因性EPOと共有する共通のアミノ酸配列がないことによる、抗体に媒介される赤芽球癆（PRCA）の潜在性の減少；内因性EPOと交差反応する市販のEPOに対する抗体によって引き起こされるPRCAを有する患者を治療する潜在性；およびタンパク質治療よりも長い室温での貯蔵寿命の安定性の強化。

【0306】

ペプチドIの一次アミノ酸配列は、組み換えヒトEPO（rHuEPO）のものと異なっている。内因性EPOに対する交差反応性の免疫反応を誘導する可能性は低い。非常にまれではあるが、交差反応性の免疫反応は、組み換えヒトESAおよび内因性EPOの両方の効力の喪失に関連した重篤な副作用を引き起こし得る。更に、ペプチドIは合成ペプチドであるので、その生成は、組み換えタンパク質生成物において起こり得る、薬剤に宿主細胞物質が混入する潜在的なリスクを避ける。

【0307】

2. 動物におけるペプチドIの薬物動態

ペプチドIは、赤血球生成を強力に刺激するものであり、マウス、ラット（正常赤血球の（normocythemetic）、および腎摘出術を行った）、イヌ、ウサギおよびサルにおいて1回または繰り返し投薬した後に、用量依存的な活性が観察される。ラットおよ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する網状赤血球（未成熟なRBC）およびRBCの増加が、用量に比例することを示す。

【0308】

ラット、イヌおよびサルにおける薬物動態の研究は、現在市販されているrHuEPO生成物に比べ、ペプチドIの血漿の持続性の方が長いことを実証している。排出半減期（ $t_{1/2}$ ）の範囲は、ラットにおいて21.5～30.7時間であり、イヌにおいて～73.7時間である。ペプチドIの生体内分布は、主として血漿画分に対してである。5～6匹の腎摘出術を受けたラットに対してペプチドIを9.87mg/kgで静脈内投与した後、 $t_{1/2}$ は約48時間であり、クリアランスは0.763mL/h/kgと低く（正常赤血球（normocythemetic）マウスでは1.44mL/h/kgであ

ったのに比べ)、結果としてAUCの大きさが1.8と増加した。

【0309】

2. ヒトにおけるペプチドIの薬力学および薬物動態

2. 1. 概略および方法

1つの第一相治験において、20NHVのペプチドIを試験している。このヒトでは初めてのペプチドIを使用した治験は、ランダム二重盲検式で、プラセボを対照とし、単回投与で、静脈内投与で、用量を増やしていく、安全性および耐性の試験であった。この治験の主な目的は、ペプチドIの安全性および薬物動態を評価すること、および薬理学的に活性な用量(PAD)を確立することであった。7人の男性のボランティアの集団について、5:2の割合でペプチドIまたはプラセボの単回投与を受けるようにスケジュールを組んだ。PAD(ベースライン値を超えるヘモグロビンの増加によって決定)が観察されるまで、増加する用量レベルにおいて集団を追加することとし、用量レベルがPADとして確認されたポイントにおいて、別のボランティアの集団において繰り返す。

【0310】

治験は、連続的に登録された4つの集団において開始し、ペプチドIの用量はそれぞれ0.025、0.05、0.1mg/kgおよび0.1mg/kgであった(集団当たり単回投与)。治験の結果は、第3の集団が0.1mg/kgのペプチドIを投与された後に、網状赤血球数およびヘモグロビンのレベルが増加したことを示した。この用量を第4の集団において繰り返し、第3の集団において観察された結果を確認した。こうして、治験を終了した。非盲検の結果の概要を以下に示す。

【0311】

2. 2. 薬力学的結果

網状赤血球数(絶対数およびパーセント)は、ペプチドIの用量を増やしていくと、用量依存的な増加を示した。網状赤血球数は、すべての用量の集団において、投与から約7日後に最大値に到達した。最大の網状赤血球の反応、および網状赤血球対時間の曲線(AUC_{0-14日}およびAUC_{0-28日})の比較は、用量の異なる集団間における有意な差を示した($p < 0.05$)。

【0312】

投薬後28日間におけるヘモグロビン反応およびベースラインからの変化(平均値および最大値の両方)は、ペプチドIの用量を増やしていくと、用量依存的な増加を示した。一方で、コントロールグループは、赤血球生成の付随する外因性の刺激なしに、治験に関連した採血のための時間経過によるヘモグロビンのわずかな減少を示した(一元配置分散分析(ANOVA)の p 値:0.0001)。4つの集団全ての間における時間経過によるベースラインからのそれぞれの変化を比較するために、混合モデルを使用した一元配置共分散分析(ANCOVA)を使用した。この分析の結果は、4つの用量の異なる集団全てにおける有意な用量反応を示し($p=0.0001$)、0.025 mg/kgと0.1 mg/kgの集団間($p=0.0027$)、および0.05mg/kgと0.1mg/kgの集団間($p=0.0113$)において有意な差があった。ヘモグロビンにおける少なくとも1.0g/dLの増加に関連していたペプチドIのPADは0.1mg/kgであった。

【0313】

更に、集団3および集団4の被検体(0.1mg/kgのペプチドIまたはプラセボ)について、投与後42日間フォローを続けた。42日目に、0.1mg/kgのペプチドIで治療した被検体において、ヘモグロビンレベルの平均値がベースラインまで戻っていたが、プラセボを与えた被検体においては、まだベースライン値より低かった。このように、治験全般を通して、42日目において、0.1mg/kgのペプチドIを投与した被検体とプラセボを投与した被検体の間におけるヘモグロビンのベースライン値からの変化における差は、 ≥ 0.5 g/dLであった。

【0314】

血清EPOレベルは、ペプチドIの用量を増やしていくと、一過的に減少した。その他の薬力学的パラメータにおける変化(赤血球数およびヘマトクリットの増加;フェリチンおよび網状赤血球のヘモグロビン含有量の一過性の減少;水溶性トランスフェリンレセプター

タンパク質の一過性の増加；およびEPOの一過性の減少）は、赤血球生成の刺激と一致していた。

【0315】

2. 3. 薬物動態学的結果

5分間かけて0.025、0.05および0.1mg/kgの用量のペプチドIを静脈内投与した後、薬物の濃度は、一般的に、注入開始後5分～1時間の間においてピークになった。用量が0.025mg/kgの集団においては、ペプチドIの濃度は、5分～15分の間においてピークになったが、一方で、0.1mg/kgの用量では、 t_{max} が1時間に近づいた。 C_{max} が得られた後、血漿濃度は減少し、0.025mg/kgを投与後は96時間まで、0.05mg/kgを投与後は5日目まで、そして0.1mg/kgを投与後は7日目まで、一般的に定量化することができた（ $>25\text{ng/mL}$ ）。計算された半減期は、用量が0.1mg/kgにおいて少々の増加を示し、その範囲は以下の通りであった：0.025mg/kgを投与後16.7～21.9時間（平均19.2時間）；0.05mg/kgを投与後15.3～25.1時間（平均18.7時間）；および0.1mg/kgを投与後17.7～33.1時間（平均23.5時間）。 10

【0316】

薬物の分布および排出は、標準的な1つまたは2つのコンパートメント動力学に従わないようであった。一次速度式は、薬物の濃度がより低い場合のみ観察され、約400ng/mLを超える血漿濃度での代謝／排出工程の飽和を示唆している。分布の量は、用量が変わってもほとんど変化しなかった（用量0.025、0.05および0.1mg/kgにおいて、それぞれ平均で2165mL、1903mLおよび2010mL）。血漿のクリアランスは、用量の変化につれ少々減少した（用量0.025、0.05および0.1mg/kgにおいて、それぞれ幾何平均で78.0mL/時間、70.7mL/時間および59.2mL/時間）。用量が標準化された C_{max} のANOVAおよび $AUC_{(0-\infty)}$ のデータは、 C_{max} が用量と直線関係にあるらしいことを示した。しかし、 $AUC_{(0-\infty)}$ は、最も多い用量である0.1mg/kgにおける非直線性の証拠を示した。これは恐らく、より多い用量において観察された薬物のクリアランスにおける少々の減少と関連していると思われる。 20

【0317】

2. 4. 安全性の結果

15人の被検体（8人のうち4人にプラセボ、20人のうち11人にペプチドIを投与）が、全部で28の有害事象（AE）を経験した（プラセボグループで6、ペプチドIグループで22）。ペプチドIを投与したグループについては、頭痛（4/20、20.0%）、腹痛（2/20、10.0%）、悪心（2/20、10.0%）および鼻咽頭炎（2/20、10.0%）が、より頻繁に報告された事象であった。1つを除き全てのAEのランクが軽度（mild、グレード1）であった。ペプチドIを投与された者において観察されたほとんどのAE（15/22）は、治験薬であるペプチドIには恐らく関係していないと考えられた。4つのグループ内において、AEの頻度、重症度またはパターンにおける相違はなかった。重篤有害事象（SAE）もAEを原因とする治験からの離脱もなかったが、用量0.025mg/kgのペプチドIのグループに指定されていた1人の被検体については、軽度の薬物反応が原因で治験薬投与を中止した。この反応は、注入してから2分以内に始まり、赤らみが胸から始まって顔まで広がり、暑さ、不快感および喉がいがらっぽい感覚を伴うものであった。安全措置として、この被検体については注入を中止した。諸症状は、自然にかつ迅速に消散した。治療的介入の必要はなかった。バイタルサインに変化はなかった。実験パラメータは、更なる免疫学的試験を含め、正常であった。従って、この反応の特異的性質を解明することはできない。その他のESAを含めた多数の薬物について、類似の（またはより重症の）薬物反応が観察されている。更に、ペプチドIを静脈内投与する間は、患者を観察するべきである。患者に似たような症状が現れた場合は、注射を中止するべきである。 30 40

【0318】

プラセボを投与された1人およびペプチドIを投与された1人については、それぞれ、軽度の頭痛および軽度の腹部痙攣に対する投薬を同時に行った。バイタルサイン、心電図（ECG）および検査値における臨床的に有意な変化はなかった。この試験における被検体の誰においても、ペプチドIに特異的な抗体は作り出されなかった。

【0319】

2. 5. 要約

要約すると、ペプチドIを0.025mg/kg、0.05mg/kgまたは0.1mg/kgの用量で静脈内に単回投与した後は、安全で、かつ十分な耐性があり、安全性プロファイルはプラセボに類似しているようであった。薬物動態学的結果は、用量が0.1mg/kgの場合における半減期の範囲が約15～33時間であり、平均が23.5時間であることを示した。中央値はすべての用量において類似しており、注入開始後15分で得られた。 C_{max} は用量と直線関係を有するようであり、 $AUC_{(0-\infty)}$ は、用量が0.1mg/kgの場合に直線ではないようであった。一次速度式は、薬物の濃度がより低い場合のみ観察され、約400ng/mLを超える血漿濃度での代謝／排出工程の飽和を示唆している。ペプチドIは、評価された全ての用量において網状赤血球に対する薬理学的活性を示した。一般的に、反応は用量依存的であり、用量を増やすとより大きくより長い反応になった。0.1mg/kgの用量のグループは、NHVにおいてPADとして定義された。なぜならば、ヘモグロビンのベースライン値からの臨床的および統計学的に有意な増加に関連しており、ペプチドIを投与された10人の間で、ベースライン値からの最大の増加の平均は 1.36 ± 0.39 g/dLであったからである。その他の薬力学的パラメータにおける変化（赤血球数およびヘマトクリットの増加；フェリチンおよび網状赤血球のヘモグロビン含有量の一過性の減少；水溶性トランスフェリンレセプタータンパク質の一過性の増加；およびEPOの一過性の減少）は、赤血球生成の刺激と一致していた。

10

【0320】

2005年6月4日にストックホルムで開催された第10回欧州血液学会議において発表されたポスターおよび要約番号0470は、その全体を引用することによって、本明細書の一部となす。

20

【実施例14】

【0321】

透析前、透析中および腫瘍を有する患者におけるヘモグロビンレベルの増加

1. 透析前の患者

透析を受けておらず、赤血球生成促進剤（ESA）による治療を以前に受けていない、慢性腎疾患（CKD）を有する患者におけるペプチドIの静脈内注射による単回投与の安全性、薬力学および薬物動態について、ランダム二重盲検式で、プラセボを対照とし、用量を順次的に増やしていく治験を行う。この治験では、透析を受けていないCKD患者（透析前の患者）におけるペプチドIの静脈内（IV）単回投与のレベルの安全性プロファイルの評価する。また、この治験は：ヘモグロビン、網状赤血球、および鉄貯蔵を含む薬力学的パラメータにおけるペプチドIの単回投与の用量と反応との関係の評価し；透析前の患者におけるペプチドIの静脈内単回投与の用量レベルの薬物動態的プロファイルの評価し；透析前の患者における静脈内投与での薬理学的に活性な用量（PAD）を決定する（例えば、70%を超える患者において、ヘモグロビンがベースライン値から1g/dL以上増加する結果となる用量）。

30

【0322】

治験における評価項目は、以下を含む：有害事象（AE）；重篤有害事象（SAE）；薬物動態的パラメータ（ C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 β 、VdおよびCLを含む）；薬理学的パラメータ（網状赤血球、ヘモグロビン、網状赤血球のヘモグロビン含有量、および鉄貯蔵の血清測定（serum measures）（例えば血清フェリチン、トランスフェリン飽和率、およびトランスフェリンレセプタータンパク質等）を含む）；ヘモグロビンのベースライン値からの変化の平均；ヘモグロビンのベースライン値からの変化の最大値；ヘモグロビンがベースライン値から1g/dL以上増加する、治療された患者の割合；および赤血球輸血の頻度。

40

【0323】

治験の対象に選択される患者は、年齢が18～75歳、透析前であって、慢性腎疾患（CKD）が原因でヘモグロビンが9g/dL以上11g/dL以下であり、以前にESAによる治療を受けておらず、適格基準に合致する患者である。9人の患者から成る各集団において、ペプチドI（ $n=7$ ）またはプラセボ（ $n=2$ ）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

50

。1集団当たり5人のペプチドIで処置された患者における最低22日のデータを確実に入手できるように、1集団において、22日目より前に治験が打ち切られた3番目以降の患者については入れ替えを行う。入れ替わった患者をそれぞれ、離脱した患者と同じ処置の集団に割り当てる。22日目以降に治験が打ち切られた患者の入れ替えは行わない。

【0324】

独立した安全性モニター（Independent Safety Monitor）、治験責任医師およびスポンサーによって決定されるように、最大で6つの用量レベルの集団（最大で4つの計画された用量レベルおよび最大で2つの追加的なより低い、中間用量の、および／または反復の（確認の）投与のレベル）を連続して登録するように計画する。最大で54人の評価可能な患者をこの試験に登録することができる。

10

【0325】

治験における各患者は、投薬後少なくとも28日間参加することが期待される。

各患者は、ペプチドIまたはプラセボの単回投与を受ける。計画される連続的なペプチドIの用量レベルは以下の通りである：

【表8】

ペプチドIの用量 (mg/kg)
0.05
0.1
0.2
0.3
追加的な確認の、中間用量の、またはより低い用量
追加的な確認の、中間用量の、またはより低い用量

20

【0326】

この治験は、ランダム二重盲検式で、プラセボを対照とし、用量を連続的に増やしていくものであり、集団当たり9人の透析前の患者から成る、最大用量がGの複数の集団で行う。各集団において、29日目まで、または有害事象が安定するまでのいずれか遅い方まで、患者をフォローする。ヘモグロビンのレベルについて、上昇したレベルがベースラインレベルの0.5g/dL以内に返るまで、全ての患者のレベルをフォローする。

30

【0327】

ベースラインのヘモグロビン濃度は、治験薬投与前において最も最近のヘモグロビン値の3つの平均によって定義する。治験中、集団の開始または中止の決定のためのヘモグロビンの変化は、次の連続するヘモグロビン値による確認が必要である。

【0328】

患者のヘモグロビンレベルが14g/dLに到達した場合、臨床的に必要であれば、患者を静脈切開するべきである。患者のヘモグロビンのレベルが16g/dL（確認されたもの）に到達した場合、患者を静脈切開するべきである。

40

【0329】

第1集団への投与後、次の用量レベルにおける次の集団の連続的な登録は、プロトコルに特定された用量漸増基準に基づく。次の用量レベルの集団に対する用量漸増は、プロトコルに特定された中止基準に基づいて中止する。非盲検の独立した安全性モニターは、非盲検の臨床上および検査上のデータを継続的に検討して、いつ用量漸増基準または中止基準に合致したかを決定する。

【0330】

臨床担当の治験責任医師およびスポンサーの臨床担当は、個々の患者の処置への割り当てについては知らされず、患者は、PK、血液学、および鉄のパラメータの結果（ヘマトクリット、ヘモグロビン、MCHC（平均赤血球ヘモグロビン濃度）、MCH（平均赤血球ヘモグ

50

ロビン量)、MCV(平均赤血球容積)、網状赤血球数、および網状赤血球のヘモグロビン含有量を含む)、または鉄貯蔵の結果(フェリチン、トランスフェリンの飽和、およびトランスフェリンレセプタータンパク質を含む)によって識別される。しかし、これらの担当者は、治験過程において、これらのパラメータについての識別された結果を検討することができる。これらの担当者は、これらのパラメータについての患者が識別された結果へのアクセス権を有さない。なぜならば、もし結果が患者によって識別された場合、処置の割り当てについて潜在的に盲検でなくなり得るからである。

【0331】

集団における全ての評価可能な患者(7人以上)が22日目まで達した時、次の場合に、次の集団に対する用量漸増を可能とする:安全性についての懸念がない;および集団におけるどの患者も、ヘモグロビンが1.0g/dL以上増加していない;または、ペプチドI投与を受け、ヘモグロビンがベースライン値から1.0g/dL以上増加した全ての患者が、安定性(ヘモグロビン値のピークの0.5g/dL以内)または最低限2箇所の時点での可逆性(ヘモグロビン値のピークからの減少)のいずれかを実証する。

【0332】

最新の集団への新しい患者の登録および新しい用量への漸増は、もし以下の基準のいずれかに合致した場合には中止する:1つの集団における2人以上の患者が、グレード3または4のペプチドIに関連した有害事象を有する;1つの集団において、ペプチドIの投与を受けた2人以上の患者において、任意の4週間の間にヘモグロビンが2.0g/dL以上増加する(ベースライン値からの増加);または、1つの集団において、ペプチドIの投与を受けた2人以上の患者が、ヘモグロビンの標的範囲の上限を超える(>13g/dL)。

【0333】

もし安全性についての懸念がなければ、集団における全ての評価可能な患者(7人以上)が22日目まで達した後に、確認の(反復の)、より低い、または中間の用量の治験を行うために、9人の患者から成る追加的な集団を開始することができる。

【0334】

透析前の患者については、PADが0.025~0.2mg/kg、あるいは0.05~0.1 mg/kg、あるいは0.067~0.075mg/kgと決定することが予期される。

【0335】

2. 透析患者

長期血液透析を受ける患者における貧血の維持療法のための、静脈内注射によるペプチドI投与の安全性、薬力学および薬物動態を調べるための、非盲検で、マルチセンター、および連続した用量を探す治験を行い、ヘモグロビン値がエポエチンアルファによって安定している血液透析を受けている患者におけるベースライン値の上下1.0g/dL以内にヘモグロビン値を維持する、月毎の静脈内投与されるペプチドIの用量の範囲を決定する。この治験はまた、血液透析を受ける患者に静脈内投与されるペプチドIについて、最大で3つの用量までの安全性プロファイルを評価し、血液透析を受ける患者に静脈内投与されるペプチドIについて、最大で3つの用量までの薬物動態的プロファイルを評価する(治験患者のサブセットにおいて)。

【0336】

治験の評価項目は以下を含む:週毎のヘモグロビンのベースライン値からの変化の平均;13週目までヘモグロビンがベースライン値の上下1.0g/dL以内にある患者の数(%);13週目まで9.5~13.0g/dL以内にヘモグロビンを維持する患者の数(%);治験中に用量の調整のない患者の数(%);および治験中に用量が増加または減少された患者の数(%);赤血球輸血の頻度;追加的な薬理学的パラメータ(網状赤血球数(絶対数およびAUC)、網状赤血球のヘモグロビン含有量、および鉄貯蔵の血清測定(serum measures)(例えば血清フェリチン、トランスフェリン飽和率、および水溶性トランスフェリンレセプタータンパク質等)を含む);有害事象;重篤有害事象;および薬物動態的パラメータ(C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 β 、Vd、VssおよびCLを含む)(治験患者のサブセットにおいて)。薬物動態的および薬力学的分析の結果は、エポエチンアルファの週毎の用量に基

10

20

30

40

50

づいてペプチドIの月毎の用量を最もよく予測する予備的な変換係数を決定するために使用される。

【0337】

治験の対象に選択される患者は、年齢が18歳以上の血液透析を受ける患者であって、安定した用量の市販のエポエチンアルファによって安定なヘモグロビン値が維持され、適格基準に合致する患者である。1集団当たり15人の患者から成る、最大で4つの連続的な用量レベルの集団を、3～10のクリニカルセンターにおいて登録するように計画する。

【0338】

1集団当たり最低10人のペプチドIの投薬を3回受けている患者のデータを確実に入手できるように、1つの集団において3回目の投薬を受ける前に治験を中止した6番目以降の患者については、最大で4人まで入れ替えを行う。3回の投薬を受けた後に治験を中止した患者の入れ替えは行わない。

10

【0339】

2つの用量レベルの集団は、はじめに、連続的に登録するように計画する。観察された安全性プロファイルおよび薬理学的反応に依存して、それぞれが15人の患者から成る最大で2つの更なる集団を加えて、より低い、中間の、および／または反復の（確認の）用量レベル、ならびに／または投与の頻度を研究することができる。

【0340】

この試験には、最低で30人、最高で60人の評価可能な患者を登録することができる。治験における各患者は、4週間のスクリーニング期間に続いて約15週間参加することが期待される。

20

【0341】

裏づけになるデータが入手できるまで、投薬期間を更に12週延長するための修正を計画する。

【0342】

ペプチドIは、4週間毎の迅速な静脈内ボラス注射により、透析の最後の15分間中に30秒かけて、全部で3つの用量を投与する。集団における各患者は、予め特定されたエポエチンアルファからペプチドIへの変換レベルで始まる、非盲検でのペプチドIの投薬を受ける。用量は、前の集団において観察された用量と反応の関係に基づいて、次の集団のために増やして、または減らしていく。計画された開始時のペプチドIの用量レベルの変換は以下の通りである：

30

【表9】

集団	100U/kg/週のエポエチンアルファからペプチドIの用量 (mg/kg/Q4W) への変換係数
開始集団	0.033
増加または減少を行う集団	0.041～0.050の増加 0.017～0.025の減少
中間の、または確認の集団	後で決定
中間の、または確認の集団	後で決定

40

【0343】

ペプチドIの用量は、個々の患者において以下のように調整することができる。ペプチドI治験薬の3番目の用量から、患者の確認されたヘモグロビン値がベースライン値から1.0g/dLを超えて減少した場合、または、患者の確認されたヘモグロビン値がベースライン値から0.5 g/dL以上減少して11g/dLを下回るレベルになった場合、用量を25%増加させる。治験薬の3番目の用量から、患者の確認されたヘモグロビン値がベースライン値から1.5

50

g/dLを超えて増加した場合、または、患者の確認されたヘモグロビン値がベースライン値から0.5 g/dL以上増加して12g/dLを上回るレベルになった場合、用量を25%減少させる。治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値が任意の2週間以内に1.0 g/dLを超えて増加（ベースラインを超えて増加）した場合、次の用量を25%減少させる。治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値が12.5g/dLを超えた場合、ヘモグロビン値が12.0g/dLに減少するまで次の投与を遅らせ、用量を25%減少させる。

【0344】

ベースラインのヘモグロビン濃度は、治験薬投与前の3週間において採取された最も最近の週半ばの透析前のヘモグロビン値3つの平均によって定義する。治験中、個々の用量の調整のためのヘモグロビンレベルの変化あるいは集団の開始または中止の基準の決定は、7日以内の任意の時点におけるヘモグロビン値の繰り返しによる確認が必要である。

【0345】

この試験は、1集団当たり15人の血液透析を受ける患者から成る2～4つの処置集団を使用した、非盲検で、連続した用量を探す内容である。各患者に対し、4週毎に全部で3用量のペプチドIを静脈内投与する。最初の用量のペプチドIを投与された後、治験を通して少なくとも週毎に患者を観察する。治験中、鉄状態を、Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) の治療ガイドラインに従って維持する。

【0346】

患者は、ペプチドIの最後の投与後少なくとも42日間、または有害事象が安定するまでのいずれか遅い方までフォローする。処置を中止後、全ての患者におけるヘモグロビンレベルについて、標的範囲に戻るまでフォローする。

【0347】

患者のヘモグロビンレベルが14g/dLに到達した場合（確認において）、治験責任医師の判断に従って患者を静脈切開することができる。患者のヘモグロビンレベルが16g/dLに到達した場合（確認において）、患者を静脈切開する。静脈切開の方法は、部位における標準的な臨床実践に従って行われる。静脈切開された血液の分量を記録しておく。静脈切開された患者についてはペプチドIの投与を中止し、静脈切開後の薬力学的データは、分析から除外する。

【0348】

第1集団への投与後の次の集団の連続的な登録は、プロトコルに特定された用量漸増および減少基準に基づく。適切な用量レベルの変換係数が一旦識別されると、確認の集団において、この変換係数の用量レベルを繰り返すことができる。独立した安全性モニターおよびスポンサーは、臨床上および検査上のデータを継続的に検討して、用量漸増、用量減少、追加の集団の、または中止の基準にいつ合致したかを決定する。

【0349】

1集団に登録された6人以上の患者についての第7週のデータ検討時以降、安全性についての懸念が独立した安全性モニターによって識別されない場合、および、組み合わせられた6人以上の患者について、第7週以降、ヘモグロビンがベースライン値から1.0g/dLを超えて減少したことが確認された場合、最新の集団への登録を中止することができ、次の集団に対する用量漸増が可能となる。

【0350】

1集団に登録された6人以上の患者についての第7週のデータ検討時以降、安全性についての懸念が独立した安全性モニターによって識別されない場合、および、組み合わせられた6人以上の患者について、第7週以降、ヘモグロビンがベースライン値から1.0g/dLを超えて増加してヘモグロビン値が13.0g/dLを超えたことが確認された場合、または、治験へのエントリー後任意の2週間の期間以内に、ヘモグロビンが1.0g/dLを超えて増加（ベースラインからの増加）したことが確認された場合、最新の集団への登録を中止することができ、次の集団に対する用量減少が可能となる。

【0351】

1集団に登録された10人以上の患者についての第7週のデータ検討時以降、安全性につい

10

20

30

40

50

ての懸念が独立した安全性モニターによって識別されない場合、追加の集団について、より低いまたは中間の（最新の値とその前に試験した値との間の）変換係数、および／または投与の頻度に関する治験を開始することができる。最大で2つの追加的な集団を登録することができる。

【0352】

1集団に登録された10人以上の患者についての第7週のデータ検討後、安全性についての懸念が独立した安全性モニターによって識別されない場合、および、用量漸増基準にも用量減少基準にも合致していない場合、同じ変換係数を利用する確認の集団について開始し、同じ変換係数および／または投与の頻度を繰り返すことができる。

【0353】

以下の基準に合致した場合は、最新の集団への新しい患者の登録および新しい用量への漸増を中止する：1集団における3人の患者が、グレード3または4のペプチドIに関連した有害事象を有する。

【0354】

透析患者については、PADが0.025～0.2mg/kg、あるいは0.05～0.1mg/kg、あるいは0.067～0.075mg/kgと決定することが予期される。

【0355】

3. 癌患者

化学療法に誘導される貧血（CIA）を有する癌患者にペプチドIを皮下投与した際の安全性、薬力学および薬物動態について、非盲検で、マルチセンターの、用量を漸増させる治験を行い、化学療法に誘導される貧血を有する患者におけるヘモグロビン反応に関連して、皮下（SC）注射によって3週毎に投与するべきペプチドIの用量を決定する。その他の目的は以下を含む：付随する骨髄抑制化学療法を受ける癌患者において、最大で4つの用量のペプチドIを3週毎に皮下投与した場合の安全性プロファイルを評価する；異なる用量レベルでペプチドIを投与した場合の、CIAを有する患者のHgbにおけるベースライン値からの変化を測定する；ペプチドIに対するHgb反応（評価項目において定義されるような）を有する患者の割合を測定する；CIAの患者において、11～13g/dLの標的範囲内までヘモグロビンを増加させ、維持する、皮下投与によるペプチドIの用量を測定する；CIAの患者において、最大で4つの用量のペプチドIを皮下投与した場合の、薬物動態的プロファイルを評価する（治験患者のサブセットにおいて）；および、ペプチドIの活性用量における投与回数および非経口による鉄置換の効果を調べる。

【0356】

治験の評価項目は、以下を含む：第4週、第9週および第12週において、その前の28日間にRBC輸血を受けずに、ヘモグロビンが2g/dLを超えて増加した患者、または、Hgbが1g/dLを超えて増加して少なくとも12g/dLまで達した患者の、各処置集団における割合；第4週、第9週および第12週において、その前の28日間にRBC輸血を受けずに、Hgbがベースライン値から1g/dLを超えて増加した患者の割合；第4、9、12週において、Hgbが11～13g/dLの標的範囲内にあった患者の割合；第4週後に11～13g/dLの標的範囲内にあったHgb値の割合；ヘモグロビンのベースライン値からの変化の平均；赤血球輸血の頻度；追加的な薬理学的パラメータ（網状赤血球数（絶対数およびAUC）、網状赤血球のヘモグロビン含有量、鉄貯蔵の測定における変化（例えばトランスフェリン飽和率および血清フェリチン等）を含む）；有害事象（AE）；重篤有害事象（SAE）；および、治験患者のサブセットにおける薬物動態的パラメータ（ C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-無限}$ 、 $t_{1/2\beta}$ （排出半減期）、Vd（分布の見かけ容積）、Vss（定常状態の容積）およびCL（クリアランス）を含む）。

【0357】

治験の対象に選択される患者は、年齢が18～80歳の固形腫瘍またはリンパ腫を有する患者であって、化学療法が原因でヘモグロビン値が9g/dL～11g/dLの範囲であり、過去90日以内にESAによる治療を受けておらず、適格基準に合致する患者であって、メディカルモニター（Medical Monitor(MM)）によって承認された開始用量およびまたはその次の連続した用量レベルでペプチドIを投与するように割り当てられる。1処置集団当たり最低で10

10

20

30

40

50

人の処置された患者の12週間のデータを確実に入手できるように、1集団において第8週の前に治験を中止した6番目以降の患者については最大で5人まで入れ替えを行う。入れ替わった患者をそれぞれ、離脱した患者と同じ処置の集団に割り当てる。15人の患者から成る最大で4つの非盲検の処置集団を連続して追加し、より低い、中間の、および／または繰り返しの用量レベル、並びに／あるいはペプチドIの投与頻度、並びに／あるい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による鉄置換について調べることができる。全ての可能な投与計画を調べる場合、最低30人、最高で90人の患者（入れ替えた患者は含まない）をこの試験に登録することができる。

【0358】

治験における各患者は、最大で4週間のスクリーニング期間に続き、最大で12週間参加することが期待される。

【0359】

15人の患者から成る連続する集団が、漸増する用量のペプチドI投与を受ける。非盲検の全部で4つの用量を、3週毎に皮下（SC）注射で投与する（治験第1、4、7、10週）。典型的には、ペプチドIは、化学療法サイクルの第1日に投与する。ペプチドIの開始用量および投与の頻度は、健康なボランティアの第一相のデータと共に、ペプチドIおよびその他の赤血球生成促進剤（ESA）に対する赤血球生成性の反応に関するPK/PDデータをモデルとして予測した反応に基づく。計画されるペプチドIの用量レベルおよび各集団における患者の数は、以下の通りである：

【表10】

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

【0360】

最後の注射後28日間、または有害事象が安定するまで、またはヘモグロビン値が11～13 g/dLの間になるまでのうちの一番遅い方まで、患者をフォローする。用量の増加は認められない。第4週後、Hgbを標的範囲内に維持するためにRBC輸血が必要である場合、治験薬投与から患者を外して標準的な治療に戻し、安全のために更に28日間フォローする。治験中任意の時点において、任意の2週間以内に患者のヘモグロビンが1.0g/dLを超えて増加した場合、ヘモグロビンが安定するまで（1週間で0.5g/dLを下回る増加）次の投与を遅らせ、用量を50%減少させる。ベースラインのヘモグロビン濃度は、治験薬投与前に採取された2つの最も最近の週毎のヘモグロビン値の平均として定義する（例えばスクリーニング値およびベースライン値）。治験中、集団の開始または中止の基準の決定のためのヘモグロビンレベルの変化は、7日以内の次の連続するヘモグロビン値による確認が必要である。

【0361】

この試験は、1集団当たり15人のCIAを有する患者から成る最大で6つの処置集団による、非盲検でマルチセンターの試験である。最初の処置集団において、最大で計4つの用量のペプチドIを3週毎に皮下注射によって非盲検で投与する。最初の用量を投与後、治験中を通して少なくとも週毎に患者を診る。治験薬の最後の投与後最低28日間、または有害事象が安定するまで、またはヘモグロビン値が11～13g/dLの間になるまでのうちの一番遅い方まで、患者をフォローする。患者のヘモグロビンレベルが14g/dL（確認されたもの）に到達した場合、臨床的に必要であれば、患者を静脈切開することができ、静脈切開の分量を記録しておく。静脈切開された患者については、治験薬の投与を中止し、静脈切開後の薬力学的データを分析から除外する。メディカルモニター（Medical Monitor(MM)）およ

びスポンサーは、継続的に安全性および薬力学的のデータを検討して、中止基準に合致しているかどうか、および何時合致しているかを決定する。

【0362】

ある集団に登録された6人以上の患者が、少なくとも6週間のフォローアップを完了した後（すなわち、2番目の用量の投与から少なくとも3週間）、最新の集団への登録を中止することができ、以下の場合、次の集団に対する用量の漸増が可能である：安全性についての懸念がMMによって識別されない場合；および、第4週後に6人以上の患者に輸血した場合、または、6人以上の患者において、第6週において1g/dLを下回るヘモグロビンの増加が確認された場合。

【0363】

6人以上の患者を1つの集団に登録し、少なくとも6週間のフォローアップを完了した後（2番目の用量の投与から少なくとも3週間）、最新の集団への登録を中止し、以下の場合、次の集団に対するより低いレベルへの用量の減少が可能である：ペプチドIに関連している可能性のある少なくとも3つのグレード3またはグレード4のAEが起こった場合、または、ペプチドIに対する任意の特異的な懸念をMMが認識した場合；あるいは、全部で6人以上の患者において、ヘモグロビンレベルが13.0g/dLを超えることが確認された場合（輸血に関係なく）、または、任意の2週間以内にヘモグロビンが1.0g/dLを超えて増加したことが確認された場合（輸血に関係なく）。

【0364】

安全性についての懸念がMMおよびスポンサーによって識別されない場合、15人の患者から成る最大で2つの追加的な非盲検の処置集団の治験を開始して、より低い、中間の（最新の値とその前に試験した値との間の）、または繰り返しの用量レベルを調べることができる。更に、3週毎に投与される活性用量を一旦決定すれば、最大で2つの追加的な集団に登録して、異なる頻度で分割して投与される全部で同一の用量の比較影響を測定することができる（例えば、3週毎における用量の4/3の分量を、4週毎に投与する）。25～50%のトランスフェリン飽和率を得るための鉄の非経口投与の効果も、別個の集団において調べることができる。

【0365】

癌患者については、PADが0.075～0.5mg/kg、あるいは0.2～0.4mg/kg、あるいは0.25mg/kgと測定されることが予想される。

【0366】

本発明は、本明細書に記載された特定の実施形態によって範囲を限定されてはならない。実際には、本明細書に記載されたものに加え、本発明の種々の変更が、前述の明細書および付随する図面から、当業者に明らかになるであろう。このような変更は、添付の請求項の範囲内にあることが意図される。

【0367】

更に、全ての値がおおよそのものであり、記載のために提供されたものであることも理解されるべきである。

特許、特許出願および種々の出版物を含めた多数の引例が、本発明に関する説明において引用され、考察されている。このような引例の引用および／または考察は、単に本発明の説明を明確にするために提供されたものであり、このような引例のいずれかが本発明の「先行技術」とであると認めるものではない。本明細書において引用され考察されている全ての引例は、その全体を引用することによって本明細書の一部となし、各引例を引用することによって個々に本明細書の一部となすことと同等の効力を有する。

【配列表】

2008542399000001.app

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C O 7 K 14/505 (2006.01) C O 7 K 14/505 Z N A

(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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,
CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L
R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY
,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ダリージ, アンーマリー
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94303, パロ アルト, ルイス ロード 2125
(72)発明者 ステッド, リチャード
アメリカ合衆国, ワシントン州 98004, ベルビュー, エスイー, 96 アベニュー 691
(72)発明者 ルーサー, カースティン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 95148, サン ホセ, クインバイ ロード 4805
(72)発明者 ウッドバーン, キャサリン, ワイン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 95008, キャンベル, カプリ ドライブ 1171
(72)発明者 ナソ, ロバート, バーネット
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94025, メンロー パーク, サンタ クルス アベニ
ュー 2059

Fターム(参考) 4C076 AA12 AA95 BB13 CC14 CC17 CC41 EE23Q EE59Q FF31 FF63
FF68
4C084 AA02 BA01 BA08 BA19 BA42 CA59 DB65 MA66 NA03 NA13
ZA522 ZA552 ZA812
4H045 AA10 AA30 BA09 BA50 BA57 CA40 DA13 EA24 FA34 FA41
FA52 FA61