

(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2008-500275  
(P2008-500275A)

(43) 公表日 平成20年1月10日(2008.1.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/505 (2006.01)	C07K 14/505 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	4C076
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C084
A61K 38/22 (2006.01)	A61K 37/24	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 34 頁) 最終頁に続く

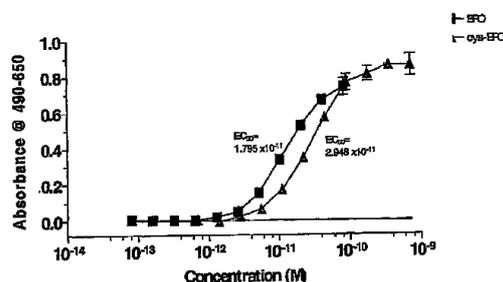
(21) 出願番号 特願2006-547297 (P2006-547297)  
 (86) (22) 出願日 平成16年12月23日 (2004.12.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年8月29日 (2006.8.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/043081  
 (87) 国際公開番号 W02005/065239  
 (87) 国際公開日 平成17年7月21日 (2005.7.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/533, 617  
 (32) 優先日 平成15年12月31日 (2003.12.31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503054122  
 セントカー・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1935  
 5マルバーン・グレートバレイパークウェイ  
 200  
 (74) 代理人 100060782  
 弁理士 小田島 平吉  
 (72) 発明者 プール, チャドラー  
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1934  
 8フェニックスビル・ロシターアベニュー  
 4  
 (72) 発明者 ミルズ, ジュリアン  
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1908  
 6ウオリングフォード・キャメロンドライ  
 ブ119  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N末端の遊離チオールを有する新規な組み換えタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、組み換え法により製造することができそしてさらなる化学誘導体化の準備が整ったN末端遊離チオールを有する新規な修飾タンパク質に関する。特に、本発明は改変された生化学的、物理化学的および薬物動態学的特性を有するエリスロポエチンコンジュゲート化合物に関する。さらに特に、本発明の1つの態様は、式：  
 $(M)_n - X - A - cys - EPO(I)$  [式中、EPOは、エリスロポエチンもしくは野生型ヒトEPOと異なる少なくとも1個のアミノ酸を有するエリスロポエチンバリエーション、または骨髄細胞に赤血球の生成を増加させる生物学的特性を有するその任意の製薬学的に許容しうる誘導体から選択されるエリスロポエチン部分であり；cysはアミノ酸システインを表し、そしてエリスロポエチン部分のアミノ酸配列に対して位置-1に存在し；Aは-1Cysのチオール基にXを化学的に結合するために用いられる残基部分の構造を示し；Xはポリアルキレングリコールもしくは他のポリマーのような水溶性ポリマーであり；Mは構築物の循環半減期を増加する有機分子（ペプチドおよびタンパク質を包含する）であり



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療用タンパク質の N 末端のシステインに結合したポリマーを有する治療用タンパク質コンジュゲートを製造する方法であって、ここで、該システイン残基のチオールが：

- a) 該治療用タンパク質の核酸配列を得ること、
  - b) 細胞における該タンパク質の発現のためのシグナル配列を選択することおよび該シグナル配列のための核酸配列を得ること、
  - c) (a) のタンパク質配列に (b) のシグナル配列を該シグナル配列がコドン T G T の上流であるようにそれらの間にコドン T G T を介挿して設計することにより構築物の形成を導くこと、
  - d) 該構築物が細胞において発現されるようにすること、
  - e) 該構築物によりコードされるポリペプチドを回収すること、ならびに
  - f) 該ポリペプチドを N 末端のシステインでポリマーに結合すること
- を含んでなる該コンジュゲートの共有結合の形成に関与する方法。

10

## 【請求項 2】

導く段階がオリゴヌクレオチド特異的 (oligonucleotide-directed) 突然変異誘発である請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

選択する段階が公的に利用可能なコンピューター法の使用を包含する請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

可能なシグナル配列がヒト成長ホルモンリーダー (配列番号：2)、抗体重鎖リーダー配列 (配列番号：3)、抗体軽鎖リーダー配列 (配列番号：4)、ヒトインターフェロンデルタ 1 リーダー配列 (配列番号：12) およびヒトインターフェロンオメガ 1 配列 (配列番号：13) よりなる群から選択される請求項 3 の方法。

20

## 【請求項 5】

式

$(M)_n - X - A - cys - EPO \quad (I)$

[ 式中、EPO はエリスロポエチンもしくは野生型ヒト EPO と異なる少なくとも 1 個のアミノ酸を有するエリスロポエチンバリエーション、または骨髓細胞に赤血球の産生を増加させる生物学的特性を有するその任意の製薬学的に許容しうる誘導体から選択されるエリスロポエチン部分であり；cys はアミノ酸システインを表し且つエリスロポエチン部分のアミノ酸配列に対して位置 - 1 に存在し；A はチオール反応性部分の残基であり；X は親水性ポリマーであり且つ任意であり；M は該部分の循環半減期を増加することができる有機分子であり；そして n は 0 ~ 15 の整数である ]

30

の部分を含んでなる、骨髓細胞に赤血球の生成を増加させる生物学的特性を有するエリスロポエチン (erythropoietic) コンジュゲート。

## 【請求項 6】

骨髓細胞に赤血球の産生を増加させ、そして該増加が非結合エリスロポエチンの投与後に見られるものよりも長い期間にわたって該エリスロポエチンコンジュゲートの投与後に持続される請求項 3 のエリスロポエチンコンジュゲート。

40

## 【請求項 7】

持続効果が非修飾哺乳類エリスロポエチンよりも増加した血清半減期によるものである請求項 4 のエリスロポエチンコンジュゲート。

## 【請求項 8】

部分 M が脂肪酸基、脂肪酸エステル基、脂質もしくはリン脂質から各々独立して選択される 1 ~ 約 6 個の有機部分を含んでなる請求項 3 のエリスロポエチンコンジュゲート。

## 【請求項 9】

親水性ポリマーがポリアルキレンオキシドである請求項 4 のエリスロポエチンコンジュゲート。

## 【請求項 10】

50

該エリスロポエチンもしくはエリスロポエチン部分が組み換えおよび非組み換え哺乳類エリスロポエチンから選択される請求項3のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項11】

ポリアルキレンオキシドが置換されたポリエチレンオキシドである請求項7のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項12】

ポリアルキレンオキシドがポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、アルキル-ポリエチレンオキシド、ビスポリエチレンオキシドおよびポリアルキレンオキシドのコポリマーもしくはブロックコポリマーから選択される請求項7のエリスロポエチンコンジュゲート。

10

【請求項13】

該ポリアルキレンオキシドが約200～約100,000の間の分子量を有するポリエチレングリコールホモポリマーである請求項7のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項14】

該親水性ポリマーが線状もしくは分岐状ポリアルカングリコール鎖、炭水化物鎖、アミノ酸鎖またはポリビニルピロリドン鎖であり、そして該親水性ポリマーが約800～約120,000ダルトンの分子量を有する請求項3のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項15】

該親水性ポリマーが2,000ダルトンより大きい分子量を有する線状もしくは分岐状ポリアルカングリコール鎖である請求項12のエリスロポエチンコンジュゲート。

20

【請求項16】

該親水性ポリマーが線状もしくは分岐状ポリエチレングリコール鎖または線状もしくは分岐状の置換されたポリエチレングリコール鎖であり、そして有機部分Mがアルキル基、 $C_6 \sim C_{40}$ 脂肪酸基、 $C_6 \sim C_{40}$ 脂肪酸エステル基、脂質基およびリン脂質基から選択される請求項12のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項17】

該親水性ポリマーがアルキル基、 $C_6 \sim C_{40}$ 脂肪酸基、 $C_6 \sim C_{40}$ 脂肪酸エステル基、脂質基もしくはリン脂質基から選択される有機部分で末端が置換される線状もしくは分岐状ポリエチレングリコール鎖である請求項14のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項18】

該有機部分がパルミトイルである請求項15のエリスロポエチンコンジュゲート。

30

【請求項19】

有機部分がジステロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)である請求項15のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項20】

Aがエチルであり、XがPEGもしくは他のポリマーであり且つ任意であり、そしてMがビオチン、ダンシル、または研究、診断もしくは治療目的のために有用である生物物理学的特性をEPOに与える他の部分である請求項3のコンジュゲート。

【請求項21】

Aがエチルである請求項3のコンジュゲート。

40

【請求項22】

EPOがa)位置28から少なくとも位置165の配列番号:1、b)配列番号:1と異なる少なくとも1個のアミノ酸を有するエリスロポエチンバリエーション、またはc)(a)もしくは(b)の任意の製薬学的に許容しうる誘導体よりなる群から選択されるエリスロポエチン部分であり;そしてcysがアミノ酸システインを表し且つ配列番号:1もしくはバリエーションのアミノ酸番号28に対してN末端の位置に存在し;Aがチオール反応性部分の残基を示し;Xが親水性ポリマーであり;そしてMがアルキル基、 $C_6 \sim C_{40}$ 脂肪酸基、 $C_6 \sim C_{40}$ 脂肪酸エステル基、脂質基もしくはリン脂質基であり;そしてnが0～15の整数である請求項3のエリスロポエチンコンジュゲート。

【請求項23】

50

N末端にシステイン残基を有する  $cys - EPO$  部分を式  $Y - X - (M)_n$  (式中、 $Y$  はチオール反応性部分であり、このチオール反応性部分は、残基  $A$  を含有するかもしくは  $EPO - cys$  - ポリマーコンジュゲートが形成されるような条件下で残基  $A$  になる) の事前に構築した親水性ポリマー - 有機部分複合体と接触させることを含んでなる請求項 3 のエリスロポエチンコンジュゲートを製造する方法。

【請求項 2 4】

該ポリマーがポリアルキレンオキシドである請求項 2 1 の方法。

【請求項 2 5】

該ポリアルキレンオキシドがアルファ置換されたポリアルキレンオキシドである請求項 2 2 の方法

10

【請求項 2 6】

該ポリアルキレンオキシドがポリエチレングリコールである請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 7】

チオール反応性部分がスルホンである請求項 2 1 の方法。

【請求項 2 8】

チオール反応性部分がエチルスルホンである請求項 2 5 の方法。

【請求項 2 9】

チオール反応性部分がジスルフィドである請求項 2 1 の方法。

【請求項 3 0】

チオール反応性部分がマレイミドである請求項 2 1 の方法。

20

【請求項 3 1】

$X$  がペプチドもしくはタンパク質であり、そして  $A$  が  $Cys - 1$  とチオエステルもしくはエステル部分との反応生成物である請求項 2 1 の方法。

【請求項 3 2】

チオール反応性部分がヨードアセトアミドである請求項 2 1 の方法。

【請求項 3 3】

$A$  がエチルであり、 $X$  が  $PEG$  もしくは他の水溶性ポリマーであり且つ任意であり、そして  $M$  がビオチン、ダンシル、または研究、診断もしくは治療目的のために有用である生物物理学的特性を  $EPO$  に与える他の部分である請求項 2 1 の方法。

【請求項 3 4】

請求項 3 のコンジュゲートの治療的に有効な量を投与することを含んでなる貧血の処置方法。

30

【請求項 3 5】

該コンジュゲートが、非結合エリスロポエチンと比較して増加した血清半減期を特徴とする請求項 3 2 の方法。

【請求項 3 6】

遊離アルファアミンを有するシステイン残基が、反応性遊離チオールを提供するために組み換え、酵素的もしくは化学的手段により付加されており、そして該反応性遊離チオールがタンパク質フォールディング、分泌もしくは生物活性を妨げず、そして該チオールが誘導体化されることができそれにより該エリスロポエチンタンパク質の循環半減期を増加させるかもしくはそうでなければ生物活性を改善する組み換えもしくは非組み換え哺乳類エリスロポエチンを含有するエリスロポエチンタンパク質もしくはタンパク質コンジュゲート。

40

【請求項 3 7】

式： $Z - cys - EPO$  [ 式中、 $EPO$  はエリスロポエチンもしくは野生型ヒト  $EPO$  と異なる少なくとも 1 個のアミノ酸を有するエリスロポエチンバリエーション、または骨髓細胞に赤血球の産生を増加させる生物学的特性を有するその任意の製薬学的に許容しうる誘導体から選択されるエリスロポエチン部分であり、 $cys$  はアミノ酸システインを表し且つエリスロポエチン部分のアミノ酸配列に対して位置 - 1 に存在し；そして  $Z$  は異種シグナル配列である ] の部分。

50

## 【請求項 38】

異種シグナル配列がヒト成長ホルモンリーダー配列（配列番号 2）である請求項 35 の部分。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、組み換え法により製造することができそしてさらなる化学誘導体化の準備が整った新規な修飾タンパク質に関する。特に、本発明は、改変された生化学的、物理化学的および薬物動態学的特性を有するエリスロポエチンコンジュゲート化合物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

エリスロポエチン（EPO）は、コロニー刺激因子として機能しそして赤血球合成の調節に参与する主要因子として働く天然で形成される糖タンパク質である。エリスロポエチンは、骨髄における前駆細胞を刺激してそれらを分裂させそして成熟赤血球に分化させることにより作用する。この過程は、循環からの赤血球の破壊もしくは除去が新たな細胞形成の速度により調和がとれるように体内で厳重に制御される。天然に存在する EPO は、腎臓において生産される糖タンパク質である（非特許文献 1）。従って、骨髄における前駆体による低いかもしくは不十分な赤芽球生成の症状に加えて、末期の腎臓病のような、腎臓機能が障害を起こすかもしくは破壊される任意の症状は、エリスロポエチン応答性症状に相当する。

## 【0003】

多様な細胞タイプが EPO を生産することが示されており、そして毛細管内皮細胞および脳内を包含する、赤血球前駆細胞に加えて多数の細胞が EPO 受容体を発現する。星状細胞は低酸素状態に应答して EPO を生産し（非特許文献 2）、そして外因性 EPO は動物モデルにおいて虚血性障害から近くのニューロン細胞を防御することができ（非特許文献 3）、従って、EPO は神経学的障害もしくは疾患からの防御および回復において役割を有し得る。さらに最近では、エリスロポエチンは、急性虚血 - 再灌流障害から網膜ニューロンを防御し（非特許文献 4）、そして実験的脊髄損傷からの神経学的回復を高める（非特許文献 5）ことが見出されている。神経系におけるニューロン細胞もしくはグリア細胞を冒す病的神経症状は、虚血、アポトーシス、壊死、酸化のもしくはフリーラジカル損傷および興奮毒性に起因し得る。神経学的病状には、例えば、脳および脊髄虚血、急性脳損傷、脊髄損傷、網膜疾患、ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病および ALS のような神経変性疾患が包含される。従って、外因性 EPO は、現在、これらの症状のいくつかもしくは全てにおいて防御するかもしくは予防すると考えられている。

## 【0004】

実際に、EPO は心筋組織（非特許文献 6）および胃腸組織（非特許文献 7）を包含する様々な細胞および組織タイプにおいて内分泌（ホルモンの）、自己分泌および傍分泌機能（自己および隣接する細胞タイプへの活性化もしくは刺激作用）を示す（概説には非特許文献 8 を参照）。従って、投与される EPO の潜在的治療適応症は、腎不全および貧血をはるかに越えて拡大している。

## 【0005】

エリスロポエチンは、EPO 遺伝子のクローニングおよびチャイニーズハムスター卵巣細胞における発現によって組み換え DNA 技術を用いて製造されている（特許文献 1）。組み換えで製造された EPO は、慢性腎不全と関連する貧血を包含する様々な形態の貧血、ジドブジン処置した HIV 感染患者および骨髄抑制化学療法を受けている癌患者の処置において有効な治療薬として或る間（for some time）市販されている。EPO 糖タンパク質は、担体としてヒト血清アルブミン（HSA）を含有する通常の緩衝水溶液における静脈内（IV）もしくは皮下（SC）注射のいずれかとして、非経口投与される。そのような製剤は、米国においてエポゲン（EPOGEN）<sup>(R)</sup> およびプロクリ

10

20

30

40

50

ット (PROCRIT)<sup>(R)</sup> の商品名で販売される。これらの製品は、防腐剤の入っていない 1 ml の単回用量もしくは 2 ml の複数回用量保存バイアルにおいてエリスロポエチン含有する。

【0006】

これらの製剤は非常にうまくいくことが証明されているが、ある種の不都合がこれらの製品と関連する。現在、エリスロポエチンのようなタンパク質治療法の生物活性の期間は、短い血漿半減期およびプロテアーゼ分解を受けやすいことにより限定される。EPO のような治療用タンパク質の短い半減期 (4 時間) は、最大臨床効能のために頻繁な投与を必要とする。これは、慢性症状の処置には不都合であり、そして低い患者のコンプライアンスをもたらす可能性があり、それ故に最適な結果とはいえない。従って、EPO の血漿半減期を増加しようとして試みられている。

10

【0007】

最近では、ポリエチレングリコール (PEG) のような非抗原性の水溶性ポリマーが治療的および診断的に重要なポリペプチドの共有結合修飾に使用されている。例えば、インターロイキン (非特許文献 9 ; 非特許文献 10)、インターフェロン (非特許文献 11)、カタラーゼ (非特許文献 12)、スーパーオキシドジスムターゼ (非特許文献 13) およびアデノシンデアミナーゼ (非特許文献 14) のような治療用ポリペプチドへの PEG の共有結合は、インビボでそれらの半減期を延ばし、そして / もしくはそれらの免疫原性および抗原性を減少することが報告されている。

【0008】

誘導体化 PEG 化合物は、以前に開示されている (特許文献 2)。翻訳後誘導体化の方法はまた、EPO にも適用されている。例えば、特許文献 3 は、PEG が酸化された炭水化物を介して連結されるエリスロポエチン活性を有する炭水化物修飾ポリマーコンジュゲートを開示する。特許文献 4 は、EPO を包含する、リシン欠失 (lysine-depleted) ポリペプチドバリエーションのポリアルキレンオキシド結合を開示する。特許文献 5 はモノメトキシ-PEG-EPO (mPEG-EPO) の製造を記述し、ここで、EPO は遺伝子工学により導入されたシステイン残基を含有し、それに特定の PEG 試薬が共有結合される。他の PEG-EPO 組成物は、特許文献 6、特許文献 7、特許文献 8 および特許文献 9 に開示される。

20

【0009】

出願人の同時係属出願 (特許文献 10) は、PEG での抗体および抗体フラグメントの修飾を開示し、そして PEG がマウスおよび霊長類における循環半減期を増加できることを示す。誘導体化 PEG は、抗体 c7E3 の Fab フラグメントの修飾に使用された。循環半減期は、PEG の分子量に直接比例して増加される。PEG の分子量が増加するにつれて、インビトロで ADP により誘発される血小板凝集を阻害する化合物の能力は減少され、一方、精製された GPIIb / IIIa への結合は、BIAcore により測定した場合、影響を受けない。PEG への脂肪酸もしくは脂質の付加 (PEG<sub>3,4K</sub>-DSP E [ジステロイルホスファチジルエタノールアミン]) は、PEG<sub>5K</sub> より大きい循環半減期をもたらした。c7E3 Fab に対して c7E3 Fab' (PEG<sub>5K</sub>)<sub>2</sub> のインビトロ活性の減少があるが、c7E3 Fab' - (PEG<sub>3,4K</sub>-DSP E)<sub>2</sub> の活性は c7E3 Fab と同等である。

30

40

【0010】

出願人の別の同時係属出願 (特許文献 11) は、親水性ポリマーのみの付加により達成できるものよりも組成物の循環血清半減期を増加する有機分子に共有結合された非抗原性親水性ポリマーに EPO が共有結合される EPO を修飾する方法を開示する。該方法は、糖タンパク質にポリマーを結合するための連結基を有する実質的に非抗原性の官能化親水性ポリマーと赤血球生成活性を有するタンパク質もしくは糖タンパク質を反応させる段階を含む。製造方法は、EPO 上の官能基と反応するポリアルキレンオキシドの活性型と EPO を反応させることを含む。これには、活性エステル、ヒドラジド、ヒドラジン、セミカルバジド、チオセミカルバジド、マレイミドもしくはハロアセチルポリアルキレンオキ

50

シドのような活性化ポリアルキレンオキシドが包含される。

【0011】

純粹に化学的方法を用いてPEGへの結合(「PEG化(PEGylation)」)によりタンパク質を修飾する多数の方法の多くの場合に制限する特性は、到達可能なリシン残基上に存在し得るアミン基および/もしくはタンパク質のN末端のアミンとの無差別なそして不完全であることが多い反応である。他の化学的方法は、修飾戦略の一部として炭水化物基の酸化を必要とし、同様に不完全なもしくは一貫性のない反応および定義されない生成物組成をもたらす。従って、利用可能な現在の選択肢を考慮すると、穏やかな部位特異的な方法でEPOのような治療用タンパク質を修飾する方法は有利である。

【0012】

天然に存在する分子へのモチーフの修飾もしくは付加は、治療用タンパク質の提供および製造方法の目的のために遺伝子工学を当該技術に実施する者に周知である多数の危険を伴う。これらの影響のうち最も明らかであるのは、生物活性の喪失もしくは部分的喪失である。別の場合では、構築された発現ベクターからの発現レベルは、生産細胞系から受け入れ難いほど低い。別の潜在的な不都合は、天然に存在するタンパク質からでも異種配列のカップリングもしくは融合が、抗原性エピトープを生み出しそして被験体において好ましくない免疫反応を引き起こす可能性があり、それは治療用タンパク質の長期の効果を最終的に限定することである。さらに、最も反応性の官能基、リシンを攻撃する化学的方法を用いるタンパク質の修飾はまた、タンパク質の構造および活性に影響を与え得るタンパク質の等電点およびpKaも変える。従って、活性の、安全なそして経済的に製造される製品を提供することが目的である場合、これらの制限を理解することは重要である。

【0013】

システイン残基の導入は、部位特異的修飾のためにタンパク質上に独特な部位を導入する有効な手段であることが示されている(非特許文献15)。N末端のシステインは、特に独特な生化学的特性を有する。アルファ-アミンおよび側鎖チオールの近接近のために、N末端のシステイン残基はエステル部分と反応して安定なアミド結合を形成する(非特許文献16)。これは、非常に選択的なそして安定した方法でタンパク質のN末端へのペプチド、タンパク質および他の分子の結合を可能にする。システイン上の遊離アルファ-アミンの存在はまた、局所pHをよりアルカリ性にし、内部のシステイン上に存在するチオールに対してN末端のチオールのより高い反応性ももたらす。結果として、別の利点は、結合反応がより低いpHで行われることができ、タンパク質の非特異性が低い誘導体化をもたらすことである。チオエステルへのシステインのチオール基の転化のさらなる利点は、それがそのシステインの等電点もしくは電荷の変化をもたらさないことである。

【0014】

しかしながら、分泌タンパク質において、システイン残基は一般にジスルフィドシステインとして存在し、そしてタンパク質の三次構造の安定化に寄与する。追加のシステイン残基を付加することは、タンパク質の安定性を損なう危険性がある。例えば、EPOは全てジスルフィド架橋に関与する4個のシステイン残基を含有する。従って、N末端での5番目のシステイン残基の導入は、適切なフォールディング、従って受容体認識を妨げ得る可能性がある。

【0015】

成熟N末端でのアミノ酸の導入は、分泌タンパク質を修飾する場合に興味深い挑戦、すなわち、シグナル配列切断部位の破壊を与える。分泌タンパク質の大部分は、生合成が始まるN末端に追加領域(シグナルもしくはリーダー配列と呼ばれる)を有して翻訳され、それはタンパク質を小胞体(ER)にターゲティングする。シグナル配列は、ある種の特徴を共有し;それらは通常約20~25アミノ酸であり、N末端で塩基性であり、中央で非常に疎水性であり、そしてシグナルペプチダーゼによる切断の部位の前に小さい非荷電残基を有する。疎水性領域は、ER受容体複合体との相互作用に必須であり、そして酸化環境における翻訳およびフォールディングを促進する。膜からの分泌の際に、シグナル配列は、タンパク質における唯一の遊離アルファアミンになるタンパク質の機能性成熟N

10

20

30

40

50

末端アミノ酸で酵素的に切断される。シグナル部分は保持され、そして細胞の内部で分解される。従って、新しいN末端アミノ酸になる前駆体タンパク質配列へのアミノ酸の付加は、シグナル配列と通常の成熟N末端の間に追加の残基を置くこと、それにより切断および分泌の効率への未知の影響を有して生来の切断部位を変えることを必要とする。ヒトEPO前駆体ポリペプチドは、27アミノ酸のシグナル配列を有する。いったん細胞のERコンパートメントに入ると、シグナルペプチドはシグナルペプチドのグリシン27と成熟EPO鎖のアラニン28の間で切断される。

## 【0016】

遺伝子工学法は、核酸コーディング配列を付加することもしくは変えることによりタンパク質にアミノ酸を付加することもしくは変えるために使用することができる。従って、当業者は、標準的な技術を用いてコーディング配列もしくはcDNAを操作することにより天然に存在するN末端アミノ酸残基のN末端にシステイン残基を有する新規な治療用タンパク質配列を作り出す可能性を認識する。設計されたタンパク質のN末端がシステインである確率を上げるために、一般に、内因性シグナル配列は、タンパク質をERにターゲティングするのに効率がよい上に適当な切断部位をもたらすことが既知であるもので置換されなければならない。

10

## 【0017】

異種シグナル配列は、例えば、酵母（特許文献12および非特許文献17）および哺乳類細胞（非特許文献18）におけるEPO発現のために代替のシグナル配列を用いて、タンパク質の成熟N末端を設計するために成功裡に使用されている。しかしながら、治療用タンパク質のN末端設計形態を分泌するために使用されている異種シグナル配列の報告はない。

20

【特許文献1】Lin, US 5 618 698 明細書

【特許文献2】US 5 438 040 明細書

【特許文献3】WO 94 / 28024 明細書

【特許文献4】US 4 904 584 明細書

【特許文献5】WO 90 / 12874 明細書

【特許文献6】EP 605 693 明細書

【特許文献7】US 6,077,939 明細書

【特許文献8】WO 01 / 02017 明細書

30

【特許文献9】EP 539 167 明細書

【特許文献10】US SN 09 / 431,861 明細書

【特許文献11】U.S. 第60 / 377,946号明細書

【特許文献12】US 4 775 622 明細書

【非特許文献1】Jacobs, et al. Nature 313 (6005), 806 - 810 (1985)

【非特許文献2】Masuda, S. et al. 1994 J Biol Chem 269: 19488 - 19493

【非特許文献3】Sakanaka M., et al. 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95: 4635 - 4640

40

【非特許文献4】Junk, et al. 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 10659 - 10664

【非特許文献5】Gorio et al., 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 9450 - 9455

【非特許文献6】Parsa, C. J. et al, 2003, J Clin Invest. 112 (7): 999 - 1007

【非特許文献7】Fatouros, M. S., 2003, Eur J Surgery 165 (10): 986 - 992

【非特許文献8】Lappin, T. R. et al., 2002, Stem Cells 20: 485 - 492

50

【非特許文献9】Knauf, M. J. et al., J. Biol. Chem. 1988, 263, 15, 064

【非特許文献10】Tsutsumi, Y. et al., J. Controlled Release 1995, 33, 447

【非特許文献11】Kita, Y. et al., Drug Des Delivery 1990, 6, 157

【非特許文献12】Abuchowski, A. et al., J. Biol Chem. 1977, 252, 3, 582

【非特許文献13】Beauchamp, C. O. et al., Anal Biochem. 1983, 131, 25

【非特許文献14】Chen, R. et al., Biochim, Biophys. Acta 1981, 660, 293

【非特許文献15】Kuan, Chien Tsun et al. Journal of Biological Chemistry 269, 7610 - 7616 (1994)

【非特許文献16】Tam, James P. et al. Biopolymers 51, 311 - 332 (2000)

【非特許文献17】Elliot, S. et al. (1989) Gene 79, 167 - 180

【非特許文献18】Kim, Chang H. et al. (1997) Gene 199, 293 - 301

【発明の開示】

【0018】

[発明の要約]

本発明は、生物活性ポリペプチドコンジュゲート組成物を提供し、ここで、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、N末端のシステインを有する結合パートナーペプチドをもたらしように修飾され、そしてこのパートナーは、有機分子に共有結合されることもできる非抗原性親水性ポリマーに共有結合的にそして部位特異的に結合され、その修飾のいずれも組成物の循環血清半減期を増加する。

【0019】

さらに特に、本発明の1つの態様は、従って、式

$(M)_n - X - A - cys - EPO \quad (I)$

[式中、EPOは、エリスロポエチンもしくは野生型ヒトEPOと異なる少なくとも1個のアミノ酸を有するエリスロポエチンバリエーション、または骨髄細胞に赤血球の産生を増加させる生物学的特性を有するその任意の製薬学的に許容しうる誘導体から選択されるエリスロポエチン部分であり；cysはアミノ酸システインを表し且つエリスロポエチン部分のアミノ酸配列に対して位置-1に存在し；Aは-1Cysのチオール基にXを化学的に結合するために用いられる残基部分の構造を示し；Xはポリアルキレングリコールもしくは他のポリマーのような水溶性ポリマーであり；Mは構築物の循環半減期を増加する有機分子（ペプチドおよびタンパク質を包含する）であり；そしてNは0～15の整数である]

により記述されるEPO誘導体に関する。カップリングもしくは価数に適切な官能基を与えるために他の分子がAとXの間もしくはXとMの間に含まれ得る。有機分子Mは任意である。Xは好ましくはポリエチレングリコールのようなポリアルキレンオキシドであり且つ同様に任意である。

【0020】

本発明は、また、貧血または減少した内因性エリスロポエチンもしくは赤血球生成と関連する他の症状または赤血球の増加が所望される症状を処置する方法も提供する。本発明の方法には、また、赤血球生成欠損に直接関係していないが筋肉、粘膜組織、生殖腺機能および認知機能の維持もしくは増大と関連するEPOの抗アポトーシス効果に関係し得る

10

20

30

40

50

症状を処置するための本発明の組成物の使用も包含される。本発明の方法には、さらに、神経組織もしくは他の組織を虚血性、化学的もしくは物理的損傷から防御するか、維持するか、もしくは処置するための本発明の組成物の使用が包含される。本発明のこの態様として、処置には、そのような治療を必要とする哺乳類に本明細書に記述されるコンジュゲートの有効量を投与することが包含される。本発明の結果として、インビボで実質的に長期の赤血球生成活性を有するコンジュゲートおよび該コンジュゲートを製造する方法が提供される。

#### 【0021】

本明細書に開示される技術の利点は、N末端システイン残基を含有するEPOバリアントの発現によって得られる実質的に定義された最終生成物組成およびEPOの増加した半減期である。 10

#### 【0022】

##### [ 詳細な記述 ]

本発明のタンパク質は、治療用タンパク質のN-cysバリアントであり、そして特異的で且つ安定な化学修飾を受けることを可能にするN末端の遊離チオールすなわち「NTFT」を有する。天然に存在するかもしくは組み換えで製造されるタンパク質は、システイン残基が分子の成熟N末端にあるようにプロセシングされることはほとんどない。本発明の方法は、治療的に有益な成熟した天然に存在するヒトタンパク質もしくは設計したタンパク質のN末端で付加されたシステインの提示を「強いる」ために異種シグナル配列を使用する。異種シグナル配列の使用は、内因性リーダーがそのような変化を受け入れることができない場合に起こり得る所望のN末端システイン残基の不正確なもしくは誤ったプロセシングの可能性を防ぐ。不十分なプロセシングもしくは不正確なプロセシングは、a) 不十分な発現率をもたらすシグナル配列の不十分な切断効率あるいはb) システインを全く残さないかまたはそれを+2、+3もしくは+nの位置で残すN末端での不適切な切断をもたらす。後者の場合、タンパク質の化学修飾の特異性および容易さは、システインが成熟タンパク質における+1の位置にある場合ほど最適ではない。 20

#### 【0023】

特定のタンパク質を細胞外分泌にターゲティングするプロセシングもしくは「シグナル」ペプチドを含んでなる前駆体タンパク質は、免疫グロブリンタンパク質について早くも1972年に記載され、そしてさらに最近ではこれらの配列の部分構造ならびに関連するプロセシング段階および酵素がより詳細に研究されている(概説には、Dalbey, et al. (1997) Protein Sci. 6: 1129-1138を参照)。 30

#### 【0024】

1つの特に好ましいシグナル配列は、ヒト成長ホルモンリーダー配列(配列番号: 2)であるが、しかしながら、理論的には、必要とされるN末端を生成することにおいて効率よくそして正確に働き得る多数の哺乳類異種リーダー配列がある。成熟N末端システインタンパク質をもたらすシグナルペプチドを含んでなる他の哺乳類前駆体ポリペプチドは、インターフェロナルファ遺伝子ファミリーと関連するものである。タンパク質がシグナルペプチドとして含んでなる確率および最も可能性が高い切断部位を予測するために加重マトリックス法(EMBOSS)であるSigCleaveおよび隠れマルコフモデル(HMM)に基づくSigPfamのような、インシリコ(in silico)予測アルゴリズムが開発されている。ヒト前駆体タンパク質からの様々なシグナル配列をSignalPバージョン3.0(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/; Bendtsen et al. J. Mol. Biol., 340: 783-795, 2004)を用いて所望の成熟タンパク質としてN-Cys-EPOにカップリングした場合に予測される切断部位と一緒に表1に示す。SignalP v3.0は、実験的に確かめられた切断部位のSwiss-Protデータベースからの真核生物タンパク質に対して訓練されたニューラルネットワーク(NN)およびHMMの両方を与える。これらの予測に基づいて、(表1)は、天然のEPOリーダー配列がN-Cys-EPOのリーダーとして不適当であると予測され、一方、hGHリーダーおよびインターフェ 40 50

ロン (IFN) タンパク質シグナルペプチドの全てではないがいくつかはN末端 c y s を有するタンパク質をもたらすと予測されることを示す。

【 0 0 2 5 】

【 表 1 】

表 1.

シグナル配列	長さ	タンパク質名	NCBI 受託番号	SignalP 3.0 (NN) 最も可能性が 高い	SignalP 3.0 (HM M) 確率
MGVHECPAWL WLLSLLSLP LGLPVLG (配列番号 : 1, 1-27)	27	EPO	P01588	28及び29: LGC-AP	0.476 27と28 の間
MATGSRTSLL LAFGLLCLPW LQEGSA (配列番号: 2)	26	成長ホルモン, アイソフォーム	NP_00050 6	26及び27: GSA-CA	0.490 27と28 の間
MAVWVTLLEFL MAAAQSIQA (配列番号: 3)	19	抗体HC		19及び20: IQA-CA	0.777 19と20 の間
MGIKMETHSQ VFVYMLLWLS GSVEG (配列番号: 4)	25	抗体LC		25及び26: VEG-CA	0.878 25と26 の間
MASPFALLMV LVVLSCKSSC SLG (配列番号: 5)	23	IFNアルファ1	NP_07691 8	23及び24: SLG-CA	0.324 23と24 の間
MALTFALLVA LVVLSCKSSC SVG (配列番号: 6)	23	IFNアルファ2	NP_00059 6	SVG-CA	0.333 20と21 の間
MALSFSLLMA VLVLSYKSIC SLG (配列番号: 7)	23	IFNアルファ4, 10および17	NP_06654 6	23及び24: SLG-CA	0.222 23と24 の間
MALPFVLLMA LVVLNCKSIC SLG (配列番号: 8)	23	IFNアルファ5	NP_00216 0	16及び17: LNC-KS	0.205 22と23 の間
MALPFALLMA LVVLSCKSSC SLD (配列番号: 9)	23	IFNアルファ6	NP_06628 2	24及び25: LDC-AP	0.375 21と22 の間
MALSFSLLMA VLVLSYKSIC SLG (配列番号: 7)	23	IFNアルファ10	NP_00216 2	IFNアルファ4 と同じ	

10

20

30

【 0 0 2 6 】

【表 2】

シグナル配列	長さ	タンパク質名	NCBI 受託番号	SignalP 3.0 (NN) 最も可能性が 高い	Signal IP 3.0 (HM M) 確率
MASPFALLMA LVVLSCKSSC SLG (配列番号 : 10)	23	IFNアルファ13	NP_00883 1	23及び24: SLG-CA	0.324 位置 23と24 の間
MALPFALMMA LVVLSCKSSC SLG (配列番号 : 11)	23	IFNアルファ14	NP_00216 3	23及び24: SLG-CA	0.320 位置 23と24 の間
MALSFSLMA VLVLSYKSSC SLG (配列番号 : 7)	23	IFNアルファ17	NP_06709 1	IFNアルファ4 と同じ	
MAFVLSLLMA LVLVSYGPGG SLG (配列番号 : 12)	23	IFNデルタ1	P37290	23及び24: SLG-CA	0.815 位置 23と24 の間
MALLFPLAA LVMTSYSPVG SLG (配列番号 : 13)	23	IFNオメガ1	NP_00216 8	23及び24: SLG-CA	0.649 位置 23と24 の間

10

20

## 【0027】

様々な哺乳類発現ベクターが、組み換えタンパク質を発現するために成功して使用されている。本発明の方法により製造される典型的な組成物は、強力なウイルスプロモーター、共通コザック配列、興味のあるタンパク質の前駆体をコードするDNA (hHGシグナルペプチド: EPO)、ヘキサヒスタグ、終止コドンおよび例えばSV40 (シミアンウイルス) ポリアデニル化シグナルもしくはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル由来のポリアデニル化シグナルを利用する単純な発現ベクターを含んでなる。

## 【0028】

本発明の組成物を含有する発現ベクターがいったん構築されると、新規なタンパク質は、宿主細胞をトランスフェクションする常法を用いて発現される。一過性トランスフェクションもしくは安定なトランスフェクション方法を用いることができ、そして哺乳類シグナル配列をプロセッシングすることができる任意の宿主細胞 (哺乳類が好ましい) を用いることができる。有用な宿主細胞系の例は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系、W138、293、BHK、COS-7およびMDCK細胞系である。細胞培養物からのタンパク質の回収および精製の方法は当業者に周知であり、そしてヘキサ-ヒスチジンもしくはFLAGのような精製「タグ」 ("tags") と呼ばれる有用なアミノ酸モチーフの追加コーディング領域の付加を含む。

30

## 【0029】

原核生物により発現される場合、ポリペプチドは典型的にN末端メチオニンもしくはホルミルメチオニンを含有し、そしてグリコシル化されず、従って好ましくない。しかしながら、本発明は、特にグリコシル化されたタンパク質を製造することが目的ではない場合に上記の哺乳類シグナルペプチド含有ベクターおよび哺乳類宿主細胞の使用に限定されないことを当業者は認識する。タンパク質の発現および分泌のための細菌システムは既知であり、そして使用される。例えば、スタヒロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) ヌクレアーゼシグナルペプチドコーディング配列は、バシラスにおけるプロインシュリンの製造のための構築物において使用されている、例えばEP0176320A1を参照。様々な分泌シグナルペプチド配列は、バシラスにおいて有用であり、そして操作を受けることができ、本発明のN末端システインポリペプチドを製造することができる。そのような分泌コーディング配列には、バシラス・アミロリキファシ

40

50

エンス (*B. amyloliquifaciens*) のアルファ - アミラーゼシグナルペプチド配列、バシラス・セレウス (*B. cereus*) の 0 - ラクタマーゼ I 型シグナルペプチド配列、バシラス・サブチリス (*B. subtilis*) レバンスクラーゼシグナルペプチド配列およびバシラス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquifaciens*) サブチリシンシグナルペプチド配列が包含されるが、これらに限定されるものではない。上記の分泌コーディング配列は、ベクターの転写および翻訳活性化配列と機能性 N 末端システインポリペプチドをコードする配列との間に適切に連結されることのできる。

#### 【0030】

##### EPO

EPO は、肝臓において主に生産され、そして前駆細胞上の受容体ダイマーへの結合によって機能し、赤血球への分化およびその後の増殖をもたらす (Livnah, O. et al. *Science* 1999, 283, 987-990)。EPO は 2 つの結合面を介して受容体に結合し、その一方はもう一方より受容体に対する高い親和性を有する。EPO の結晶構造は、解明されている (Syed, et al. *Nature* 395 (6701), 511-516 (1998); Cheetham, J. C. et al. *Human Erythropoietin, NMR minimized average structure*. 8-Sep-1998. タンパク質データベース ID 1BUY)。その受容体に結合する EPO の結晶構造もまた記述されている (Stroud, R. M. and Reid, S. W., *Erythropoietin complexed with extracellular domains of erythropoietin receptor*. タンパク質データベース ID 1CN4 を参照)。

#### 【0031】

エリスロポエチン遺伝子は、193 アミノ酸のプロ - ポリペプチド (配列番号: 1) をコードする 5 個のエキソンを有する。27 アミノ酸のリーダー配列は、プロ - ポリペプチドのアミノ末端から切断して除かれ、機能性の 166 アミノ酸ポリペプチドをもたらす。しかしながら、チャニーズハムスター卵巣細胞において発現された組み換えヒトエリスロポエチンは 165 アミノ酸のみを含有し、arg 166 を喪失していた。このメカニズムは定義されておらず、そして血漿中を循環するエリスロポエチンもまた arg 166 を欠くかどうかもしくはさらなる C 末端のトランケーションは不明である。エリスロポエチンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は両方とも、哺乳類間で非常に保存されている。

#### 【0032】

本発明の EPO の生物活性型への修飾のための出発材料は、好ましくは、ヒトエリスロポエチン (配列番号 1) もしくは des-166 Arg 配列番号: 1、または生物活性を有することが既知である他のバリエーション、または骨髓細胞に網状赤血球および赤血球の生成を増加させる生物学的特性を有するその他の誘導体である。EPO 糖タンパク質は、自然源から得られるかもしくは引用することにより本明細書に組み込まれる U. S. 4, 703, 008; 5, 441, 868; 5, 547, 933; 5, 618, 698 および 5, 621, 080 に開示されるような既知の方法を用いて組み換えで製造されることができ。野生型ヒト EPO において、位置 24、38 および 83 の Asn 残基は、3 個の天然に存在する N 結合型グリコシル化部位に相当する。これら 3 個の位置および 1 個の O 結合型部位 (Ser 123) でのグリコシル化は、天然のおよび哺乳類細胞培養物において生産される組み換え EPO の両方の重量の約 40% を占める。遺伝子操作されたバリエーションは、より多いか、より少ないかもしくは異なるグリコシル化部位を有して作製されている。所望の生物活性を有するエリスロポエチンタンパク質の非グリコシル化形態、低グリコシル化もしくは高グリコシル化形態もまた、本発明の組成物において用いることができる。非グリコシル化タンパク質は原核生物により製造され、従って、エシェリキア・コリのような原核細胞を用いる発現系における哺乳類タンパク質のコドン適合した核酸配列の使用は、非グリコシル化タンパク質産物を製造する能力をもたらす。そのような方法は、WO 00/32772 に教示される。生物活性を有する位置 24、38 もしくは 83 の A

10

20

30

40

50

s n 残基のいずれかのアミノ酸交換により製造される改変されたグリコシル化パターンを有する他のバリエーションもまた、記述されている (Yamaguchi, K., et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 20434 - 20439)。

#### 【0033】

高グリコシル化 EPO を製造する方法は、WO 0249673 および EP 640619 に教示される。追加の N 結合型炭水化物鎖を rHuEPO 分子に付加することができる。哺乳類細胞において、N 結合型炭水化物は、炭水化物付加の共通配列 (Asn - X - Ser / Thr) (ここで、X は Pro もしくは Asp 以外のアミノ酸である) でポリペプチド骨格に付けられる。このプロセスは、細胞の小胞体において起こり、そして膜結合型オリゴ糖転移酵素により触媒される。認識共通配列の知識は、クローン化される DNA の配列において必要な変更を行うことによりポリペプチド骨格に新たな炭水化物結合部位を導入するために遺伝子工学者により利用されている。もちろん、共通配列は、炭水化物付加と適合する位置、例えば、受容体結合を妨げないかまたは分子のフォールディング、構造もしくは安定性を危うくしない位置で知的に付加されなければならない。エリスロポエチンアナログ、NE SP は、2つの成功裡にグリコシル化された4鎖アナログの炭水化物付加部位を1つの分子に合わせることで作製された。NE SP のアミノ酸配列は、5つの位置でヒトエリスロポエチンのものと異なり (Ala30Asn、His32Thr、Pro87Val、Trp88Asn および Pro90Thr)、位置30および88のアスパラギン残基で追加のオリゴ糖結合を可能にする (Elliot et al. Blood 96: 82a (2000))。特許出願公開 WO 0181405 に開示される高グリコシル化バリエーションは、30、53 および 88 ; 30、55 および 114 ; もしくは 30、88 および 114 で3個の追加の N 結合型グリコシル化部位を有するものである。

10

20

#### 【0034】

改変されたグリコシル化を有する PEG 付加 EPO バリエーションもまた記述されており (US 6583272 および US 6340742)、ここで、付加されるグリコシル化共通配列は、主に位置30、57、59、67、88、89、136 および 138 にある。

#### 【0035】

タンパク質を設計し直す方法

本発明のポリペプチドバリエーションもしくはその機能性フラグメントは、当該技術分野において既知であるいくつかの方法のいずれかを用いて作製することができる。オリゴヌクレオチド特異的 (oligonucleotide-directed) 突然変異誘発は、突然変異をそれらの表現型に関係なく体系的に導入するための周知のそして効率のよい方法であり、そしてそれ故にタンパク質工学への定方向進化方法に適している。該方法論は柔軟性があり、正確な突然変異が制限酵素の使用なしに導入されることを可能にし、そして比較的安価である。ポリメラーゼ連鎖反応および他の増幅方法論を包含する、組み換えおよび酵素合成は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) に、そして Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999) に記述されていることが見出されることができ

30

40

#### 【0036】

オリゴヌクレオチド選択的突然変異誘発を用いて合成される突然変異ポリペプチドの効率のよい合成および発現の方法を行うことができ、そして引用することにより本明細書に組み込まれる Adelmann et al., (1983) DNA, 2: 183 および Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 488 - 492 (1985) により記述されるように当該技術分野において周知である。

#### 【0037】

50

また、例えば、単一もしくは複数アミノ酸突然変異をPCRに基づく部位特異的突然変異誘発（例えば、QuickChange™, Stratagene）において利用されるような突然変異アミノ酸（1つもしくは複数）をコードするオリゴヌクレオチドを用いて作製することができる。野生型もしくは親タンパク質をコードするcDNAの部位特異的突然変異誘発もまた、引用することにより本明細書に組み込まれる、Higuchi et al., Nucleic Acids Res. 16: 7351-7367 (1988)により記述される技術を用いて成し遂げることができる。一般に、この方法は2組のプライマー：突然変異させるタンパク質の全cDNAに隣接しそしてそれ故にPCR増幅の際にcDNAの全長コピーを生成する第一の対、および相互に相補的でありそして所望の突然変異を含有する第二の対の使用を必要とする。これらのプライマーは最初に2組の生成物、3'末端の近くに導入された突然変異を有するもの、および5'末端の近くに導入された突然変異を有するものを生成する。しかしながら、これら2つの生成物は相互にならびにPCRプライマーにも相補的であるので、これら2つの生成物は両方向に伸長される重複する二本鎖を形成することができる。従って、2つのプライマー組の存在下でのcDNAのPCR増幅を用いて図1に示されるような所望の構築物をコードする全長cDNA（配列番号：14）を作製することができる。

10

#### 【0038】

遺伝子もしくは遺伝子フラグメントを製造する合成のもしくは最低でも無細胞の方法もまた、既知の当該技術分野の十分に範囲内である。オリゴヌクレオチドの順次アニーリングにより大きい核酸ポリマーを合成する方法は、例えば、両方ともEvansへのPCT出願第WO99/14318号にそして米国特許第6,521,427号に記述されていることが見出されることができる。インビトロ法を用いて改変された遺伝子もしくは完全なコーディング配列を合成する方法は、以前にヒトEPOに適用されている：例えば；US6159687およびUS6537746を参照。改変された特性を有するEPOおよび他のタンパク質を製造するためにインビボで突然変異を導く方法は、EPO843725およびUS6444441に教示される。

20

#### 【0039】

EPOもしくはEPOバリエーションポリペプチドのような活性タンパク質のN末端でシステインを付加する本発明の方法は、所望の生物活性を有するタンパク質のバリエーションもしくは突然変異体型のいずれかを用いて実施することができる。該方法は、真核細胞系を用いて発現される糖タンパク質、特にEPOに実施することができ、またはアシアル化（asialated）もしくは完全にアグリコシル化（aglycosylated）タンパク質もしくはEPOに実施することができる。

30

#### 【0040】

水溶性ポリマー

特に好ましい水溶性ポリマーは、PEGの数種の1つである。PEGは塩基性炭素単位、HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OHからなり、そして名称：ポリエチレングリコール（様々な分子量）；PEG200；PEG（様々な分子量）；ポリエチレンオキシド；カーボワックス；アルファ-ヒドロ-オメガ-ヒドロキシポリ（オキシ-1,2-エタンジイル）；エトキシ化1,2-エタンジオール；ポリオキシエチレンエーテル；エムカポール（Emkapol）200；ガファノール（Gafanol）e200；プルリオールe200；ポリジオール200；ポリオックスWSR-301；マクロゴール；およびポリオキシエトレンイン（polyoxyethylene In）の下で様々な形態で販売される。PEGに基づくポリマーが使用される本発明の態様として、それらは約200～約100,000ダルトンの間、そして好ましくは約2,000～約20,000ダルトンの間の平均分子量を有することが好ましい。2,000～12,000ダルトンの分子量が最も好ましい。

40

#### 【0041】

代わりの水溶性ポリマー物質には、デキストラン、ポリビニルピロリドン、多糖、澱粉、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドもしくは他の同様の非免疫原性ポリマーの

50

ような物質が包含される。当業者は、前述のものが単に事例であり、そして本発明における使用に適切な非抗原性ポリマーのタイプを限定するものではないことを認識する。

【0042】

インビボにおける延長された薬物動態学的半減期を与える有機分子

半減期を増加するために親水性ポリマーに結合することができる有機分子には、脂肪酸、ジカルボン酸、ジカルボン酸のモノエステルもしくはモノアミド、飽和脂肪酸を含有する脂質、不飽和脂肪酸を含有する脂質、飽和および不飽和脂肪酸の混合物を含有する脂質、単純炭水化物、複合炭水化物、炭素環（ステロイドのような）複素環（アルカロイドのような）、アミノ酸鎖、タンパク質、酵素、酵素補因子またはビタミンが包含される。

【0043】

1つの態様として、親水性ポリマー基は1～約6個のアルキル、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂質もしくはリン脂質基で置換される（本明細書、例えば式Iに記述されるように）。好ましくは、置換された親水性ポリマー基は線状もしくは分岐状PEGである。好ましくは、置換された親水性ポリマー基は、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂質もしくはリン脂質基または炭化水素で末端置換される線状PEG（例えばPEGジアミン）である。アルキル、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂質もしくはリン脂質基で置換される親水性ポリマーは、適当な方法を用いて製造することができる。例えば、修飾剤は、単一保護された（monoprotected）PEGジアミンを活性化脂肪酸（例えば、塩化パルミトイル）と反応させることにより製造することができる。得られる生成物は、脂肪酸基で置換されるPEGを含んでなる修飾されたEPOを製造するために用いることができる。様々な他の適当な合成スキームを用いることができる。例えば、アミン含有ポリマーを本明細書に記述されるような脂肪酸もしくは脂肪酸エステルにカップリングすることができ、そして脂肪酸もしくは脂肪酸エステル上の活性化カルボキシレート（例えば、N,N'-カルボニルジイミダゾールで活性化される）をポリマー上のヒドロキシル基にカップリングすることができる。このようにして、所望の特定を有する多数の適当な直鎖状および分枝鎖状マルチマー構造を構築し、そして最終的にトランスグルタミナーゼアミンドナーとして働く第一級アミンを含有するように連結するかもしくは修飾することができる。

【0044】

本発明における使用に適切な脂肪酸および脂肪酸エステルは飽和していることができ、または1個もしくはそれ以上の不飽和単位を含有することができる。好ましい態様として、脂肪酸および脂肪酸エステルは、約6～約40個の炭素原子もしくは約8～約40個の炭素原子を含んでなる。本発明の方法においてEPOを修飾するのに適当なEPOには、例えば、n-ドデカノエート（C12、ラウレート）、n-テトラデカノエート（C14、ミリステート）、n-ヘキサデカノエート（C16、パルミテート）、n-オクタデカノエート（C18、ステアレート）、n-エイコサノエート（C20、アラキデート）、n-ドコサノエート（C22、ベヘネート）、n-トリアコンタノエート（C30）、n-テトラコンタノエート（C40）、シス-9-オクタデカノエート（C18、オレエート）、全てシス-5,8,11,14-エイコサテトラエノエート（C20、アラキドネート）、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸などが包含される。適当な脂肪酸エステルには、線状もしくは分岐状低級アルキル基を含んでなるジカルボン酸のモノエステルが包含される。低級アルキル基は、1～約12個、好ましくは1～約6個の炭素原子を含んでなることができる。本発明のタンパク質を修飾するのに適当な脂肪酸エステルには、例えば、オクタデカン酸メチル、オクタデカン酸エチル、オクタデカン酸プロピル、ドデカン酸ブチル、ドデカン酸sec-ブチル、ドデカン酸tert-ブチル、テトラデカン酸ネオペンチル、テトラデカン酸ヘキシル、シス-9-オクタデカン酸メチルなどが包含される。

【0045】

N末端Cysポリペプチドへの転移のための基質の製造

求電子試薬に連結された2もしくは3成分またはそれ以上を含んでなる組成物は、本発明の方法における適当な結合基質として機能することができる。

10

20

30

40

50

## 【0046】

基質の製造は、好ましくは段階的に行われ、そして最終段階において単一のチオール反応性化合物をもたらす。DTTのような還元剤により切断されるジスルフィド結合およびチオエステル結合、ならびに還元条件下で切断可能でないチオエーテル結合は、本発明の組成物において用いることができる。

## 【0047】

ジスルフィド結合の形成は、チオール含有基質もしくは活性化ジスルフィド、すなわち、PEG-オルトピリジル-ジスルフィドを用いて行われる(C. Woghiren, B. Sharma, S. Stein, Protected thiol-polyethylene glycol: a new activated polymer for reversible protein modification, Bioconjugate Chem 4 (1993) 314)。チオエーテル結合は、マレイミド活性化基質を用いてもしくはPEG-ヨードアセトアミドで都合よく形成される。PEG-ビニルスルホン二重結合へのチオール付加に基づく、比較的新しい試薬もまた示されている(M. Morpurgo, O. Schiavon, P. Caliceti, F. M. Veronese, Covalent modification of mushroom tyrosinase with different amphiphilic polymers for pharmaceutical and biocatalysis applications, Appl Biochem Biotechnol 56 (1996) 59-72)。ポリマーに有機分子を結合する他の方法は周知であり、そしてチオールと反応する薬剤、例えば、アクリロイル、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール(TNB-チオール)などの使用が包含される。

## 【0048】

反応基は、親水性ポリマー、コンジュゲート複合体に直接もしくはリンカー部分、例えばC1~C12ヒドロカルビル基を介して結合することができる。本明細書において用いる場合、「ヒドロカルビル基」は、1個もしくはそれ以上の炭素原子が場合により酸素、窒素もしくは硫黄のようなヘテロ原子で置換されていてもよい炭化水素鎖をさす。適当なリンカー部分には、例えば、テトラエチレングリコール、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-および-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH-NH-が包含される。

## 【0049】

水溶性ポリマーXと親油性薬剤Mの連結は、タンパク質のN末端システインへの最終基質の結合の前に行われ、そして当該技術分野において既知である任意の化学的もしくは酵素的な方法を用いることができる。従って、例えば、アミン反応基がトシレート、メシレート、ハロ(クロロ、プロモ、ヨード)、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)、置換されたフェニルエステル、ハロゲン化アシルなどのような求電子性基を含み、水溶性ポリマーと有機分子をカップリングするために使用される場合、大部分の場合において第一級アミンは保護されなければならない。ポリマーに有機分子を結合する他の方法は周知であり、そしてチオールと反応することができる薬剤、例えば、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロイル、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール(TNB-チオール)などの使用が包含される。アルデヒドもしくはケトン官能基は、アミンもしくはヒドラジド含有分子にカップリングすることができ、そしてアジド基は3価のリン基と反応してホスホルアミデートもしくはホスホルイミド結合を形成することができる。そのようなチオール反応基を分子に導入するために適当な方法は、当該技術分野において既知である(例えば、Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)を参照)。反応基は、親水性ポリマー、コンジュゲート複合体に直接もしくはリンカー部分、例えばC1~C12ヒドロカルビル基を介して結合することができる。本明細書において用いる場合、「ヒドロカルビル基」は、1個もしくはそれ以上の炭素原子が場合により酸素、窒素もしくは硫黄のようなヘテロ原子で置換されていてもよ

10

20

30

40

50

い炭化水素鎖をさす。システインと基質との間に使用されるような適当なリンカー部分はまた、基質組成物の成分の間でも使用されることができ、そして例えば、テトラエチレングリコール、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$  および  $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-NH-$  が包含される。

#### 【0050】

リンカー部分を含んでなる修飾剤は、例えば、モノ-Boc-アルキルジアミン（例えば、モノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン）を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)の存在下で脂肪酸と反応させて遊離アミンと脂肪酸カルボキシレートとの間でアミド結合を形成することにより製造することができる。Boc保護基をトリフルオロ酢酸(TFA)での処理により生成物から除いて第一級アミンを露出させることができ、それを記述されているように別のカルボキシレートにカップリングすることができ、もしくは無水マレイン酸と反応させることができ、そして得られる生成物を環化して脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成せしめることができる（例えば、Thompson, et al., WO 92/16221を参照、その全教示は引用することにより本明細書に組み込まれる）。

10

#### 【0051】

ポリペプチドのN末端Cysへの基質の結合

いったんポリマー部分がポリペプチドのN末端Cysへの結合用に選択され、そして合成で製造されると、まだ活性化されていない場合、ポリマー基質は、ポリペプチドのN末端に連結されることが所望される位置でチオール反応基で活性化されなければならない。

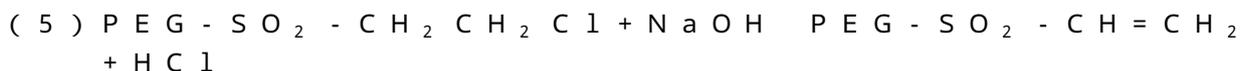
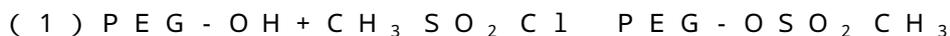
20

#### 【0052】

スルホン

ポリ(エチレングリコール)および関連ポリマーの活性スルホンを製造するために用いられる合成経路は、引用することによりその全部が本明細書に組み込まれるUS 5 446 090 (Shearwater)に教示される。該特許における教示によれば、該方法は、硫黄がポリマー分子に結合され、そして次に一連の反応によって活性スルホン官能基に転化される少なくとも4つの段階を含んでなる。さらなる反応(5)は、塩基性条件下でのビニルスルホンへのハロアルキルスルホンの転化である。各段階における使用に特に好ましい試薬を以下に本明細書に示すが、他の試薬もまた用いることができる：

30



#### 【0053】

段階1は、親水性ポリマー上の利用可能なヒドロキシルの「活性化」である。ヒドロキシル部分は、当業者に明らかなはずであるように他の方法が利用可能であるが、典型的には2つの経路、ヒドロキシルエステル化もしくは置換の一方により活性化される。ヒドロキシルエステル化は、酸もしくは酸ハロゲン化物のような酸誘導体をPEGと反応させて反応性エステルを生成せしめることにより成し遂げられる。典型的なエステルは、スルホン酸エステル、カルボン酸エステルおよびリン酸エステルである。本発明を実施することにおける使用に適当なスルホン酸ハロゲン化物には、塩化メタンスルホンおよび塩化p-トルエンスルホンが包含される。

40

#### 【0054】

置換において、親水性ポリマーの-OH基は、より反応性の部分、典型的にはハロゲン化物で置換される。例えば、 $\text{SOCl}_2$ として構造的に表される塩化チオニルをPEGと反応させてより反応性の塩素置換されたPEGを生成せしめることができる。

50

## 【 0 0 5 5 】

段階 2 は、ポリマーにおける炭素原子に直接硫黄を連結しそして同様の反応特性を有するエチルスルホンもしくはエチルスルホン誘導体を生成せしめることである。スルホン基から離れている鎖における第二の炭素原子がスルホンとチオール部分との連結の反応部位を与えるように 2 炭素「エチル」部分が必要とされる。

## 【 0 0 5 6 】

段階 3 は、炭素に結合している硫黄のスルホン基 - S O<sub>2</sub> への限定酸化を伴う。過酸化水素および過ホウ酸ナトリウムを包含する、多数のそのような酸化剤がある。タングステン酸のような触媒は、有用であることができる。

## 【 0 0 5 7 】

段階 4 として、第二段階において付加されたヒドロキシル部分を反応順序における第一段階と同様に、ヒドロキシル基の活性化によってもしくはより反応性の基でのヒドロキシル基の置換によって、より反応性の形態に転化する。

## 【 0 0 5 8 】

得られるポリマー活性化エチルスルホンは、安定で、単離可能であり、そしてチオール選択的カップリング反応に適している。例えば、PEG クロロエチルスルホンは、約 7 以下の pH で水において安定であるが、それにもかかわらず少なくとも約 pH 9 までの塩基性 pH の条件でチオール選択的カップリング反応に都合よく用いることができる。PEG ビニルスルホンもまた安定で且つ単離可能であり、そしてチオール選択的、加水分解に安定な結合を形成することができる。

## 【 0 0 5 9 】

段階 5 は、チオール選択的カップリング反応において使用するビニルスルホンもしくはその活性誘導体の 1 つに活性化エチルスルホンを転化するために、合成に加えることができる。ポリマービニルスルホンは、そのエチルスルホン対応物よりチオールと迅速に反応し、そして約 11 未満の pH の水において加水分解に対して少なくとも数日間安定である。

## 【 0 0 6 0 】

反応は、エチルもしくはビニル炭素が最終コンジュゲートの一部として残る生成物を生成すると予想される。US 5 4 4 6 0 9 0 およびその中の教示は、任意の分子量の、そして線状もしくは分岐状であることができ、置換されるかもしくは非置換であることができる活性 PEG スルホンを提供する。加水分解に対するスルホン部分の安定性は、それを二官能性もしくはヘテロ二官能性用途に特に有用にする。

## 【 0 0 6 1 】

ポリマービニルスルホンならびにその前駆体および誘導体は、チオール部分を有する表面および分子への直接結合に用いることができる。しかしながら、より典型的には、一方の位置、典型的にはポリマーの末端近くでエチルスルホン部分、そして反対側末端で異なる官能性部分の両方を有する PEG のようなヘテロ二官能性親水性ポリマー。一方の末端でスルホン部分そしてもう一方の末端でアミン特異的部分を有するヘテロ二官能性 PEG は、例えば、同じもしくは異なるタンパク質のシステインおよびリシン部分の両方に結合することができる。あるいはまた、ヘテロ二官能化分子は、安定なアミン結合が未反応のスルホン部分の反応の前に形成されることのできる限り、本明細書に記述されるような第二の有機部分を導入するために用いることができる。

## 【 0 0 6 2 】

ヘテロ二官能性活性化 PEG の他の活性基は、多種多様な化合物の中から選択することができる。生物学および生物工学的用途には、置換基は、典型的に、アルデヒド、トレシレートと呼ばれることもあるトリフルオロエチルスルホネート、n - ヒドロキシルスクシンイミドエステル、塩化シアヌル、フッ化シアヌル、アジ化アシル、スクシネート、p - ジアゾベンジル基、3 - ( p - ジアゾフェニルオキシ ) - 2 - ヒドロキシプロピルオキシ基、マレイミドなどのような PEG を活性化するために PEG 化学において典型的に使用される反応性部分から選択される。

10

20

30

40

50

## 【0063】

N末端システインを含有するEPOへのペプチド、タンパク質、PEGおよび他のポリマーの結合はまた、エステル化学によって成し遂げられることもできる。ペプチドおよびタンパク質の場合には、両方ともそれらのC末端でエステル部分(好ましくはチオエステル)を含有するように合成されるかもしくは発現されることができる。穏やかな水性条件下でチオエステル化合物を次にN末端システインを含有するEPOと反応させることができ、最終生成物は、システイン残基の $\alpha$ -アミノ基と該チオエステルのカルボキシル炭素の間で形成されるアミド結合によって該チオエステル化合物に結合されたEPOからなる(Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 12485-12489 (1995))。

10

## 【0064】

本発明の誘導体化エリスロポエチン化合物の例は、次のとおりである：

M-PEG-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；Mは脂質、炭水化物、多糖、脂肪酸、脂肪酸誘導体、脂肪アルコールもしくはタンパク質であり；そしてAは担体もしくは求電子性チオール反応基、好ましくはマレイミドの反応生成物を表す)。

## 【0065】

(M-PEG)<sub>2</sub>-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；M-PEGはA上の2つの異なるカルボキシル基にエステル化され、そしてAは担体もしくは求電子性チオール反応基、好ましくはマレイミドの反応生成物を表す部分をさらに含んでなり；そしてMは脂質、炭水化物、多糖、脂肪酸、脂肪酸誘導体、脂肪アルコールもしくはタンパク質である)。高級マルチプル(higher multiple)も同様に包含される。

20

## 【0066】

(M-PEG)<sub>2</sub>-R-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；Aは担体もしくは求電子性チオール反応基、好ましくはマレイミドの反応生成物を表し；(M-PEG)<sub>2</sub>-Rは、A上の2つの異なるカルボキシル基に結合しており；Mは脂質、炭水化物、多糖、脂肪酸、脂肪酸誘導体、脂肪アルコールもしくはタンパク質であり、そしてRは価数増大構築物である)。高級マルチプルも同様に包含される。

30

## 【0067】

M-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；Mはタンパク質もしくはペプチドであり、そしてAは該タンパク質もしくはペプチド上の遊離システイン側鎖である)。

## 【0068】

M-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；Mは脂質であり、そしてAは担体もしくは求電子性チオール反応基、好ましくはマレイミドの反応生成物を表す)。

## 【0069】

M-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；Mはビオチン、ダンシル、または研究、診断もしくは治療目的のために有用な生物物理学的特性をEPOに与える他の部分であり；そしてAは担体もしくは求電子性チオール反応基、好ましくはマレイミドの反応生成物を表す)。ビオチンもしくは既知の結合パートナーを有する別の部分がコンジュゲートに導入される場合、該コンジュゲートは、ビオチン-アビジン複合体におけるようなその既知の結合パートナーとの複合体で研究、診断もしくは治療において用いることができると予想される。

40

## 【0070】

M-A-Cys-EPO(ここで、Cysは生物活性エリスロポエチンアミノ酸配列に対してCys<sub>1</sub>を表し；Mはタンパク質、ペプチド、または研究、診断もしくは治療目的のために有用な独特な特性をEPOに与える他の部分であり；そしてAはエステルもし

50

くはチオエステル基とCys<sub>1</sub>との間の反応の生成物を表す)。

【0071】

治療的投与

本発明のNTFTエリスロポエチンコンジュゲートは、慢性腎不全と関連する貧血を包含する様々な形態の貧血、ジドブジン処置したHIV感染患者および化学療法を受けている癌患者のような低いかもしくは障害のある赤血球生成を特徴とする血液疾患を処置することにおける非経口製剤として有用である。それはまた、鎌状赤血球病、ベータ-サラセミア、嚢胞性線維症、妊娠および生理不順、未熟児の初期貧血、脊髄損傷、宇宙飛行、急性失血、老化などのような様々な病状、疾患および血液学的異常の状態の処置において用途を有することもできる。それはまた、手術前の患者におけるような赤血球の増加が所望される状況において用途を有することもできる。好ましくは、本発明のNTFTエリスロポエチンコンジュゲート組成物は、非経口(例えば、IV、IM、SCもしくはIP)投与される。

10

【0072】

有効投薬量は、処置する症状および投与の経路によりかなり異なると予想されるが、0.1~100μg/kg体重(約7~7000U)の活性物質の範囲であると予想される。貧血症状の処置の好ましい用量は、週に3回約50~約300ユニット/kgである。

【0073】

本発明のNTFTエリスロポエチンコンジュゲート製剤は、神経学的病状、特に脳および脊髄虚血、急性脳損傷、脊髄損傷、網膜疾患、ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病およびALSのような神経変性疾患が包含されるがこれらに限定されるものではない中枢神経系のものを処置することにおいて有用である。神経学的病状に加えて、本発明のEPO製剤は、梗塞心臓(infracted heart)のような虚血性もしくは低酸素ストレスの結果として損傷を受けた他の組織、結合組織および臓器損傷を包含する外科的介入の結果としての軟組織損傷、ならびに外傷もしくは免疫媒介性炎症の結果としての組織損傷の疾患を処置するかもしくはその治癒を高めることにおいて有用である。

20

【0074】

製薬学的組成物

本発明に従って製造される治療用NTFTタンパク質コンジュゲートは、当該技術分野において既知である方法により製薬学的に許容しうる担体もしくは賦形剤とともに注射に適切な製薬学的組成物において製造することができる。例えば、適切な組成物は、W097/09996、W097/40850、W098/58660およびW099/07401に記述されている。本発明の生成物を調合するための好ましい製薬学的に許容しうる担体の中には、ヒト血清アルブミン、ヒト血漿タンパク質などがある。本発明の化合物は、等張化剤、例えば132mMの塩化ナトリウムを含有するpH7の10mMリン酸ナトリウム/カリウムバッファーにおいて調合することができる。場合により製薬学的組成物は、防腐剤を含有することができる。製薬学的組成物は、異なる量のエリスロポエチン生成物、例えば10~2000μg/ml、例えば50μgもしくは400μgを含有することができる。

30

40

【0075】

組成物の安定性は、トコフェロール、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール、パルミチン酸アスコルビル、もしくは例えばエデト酸二ナトリウムのようなエデト酸塩のような酸化防止剤の添加によりさらに高めることができ、エデト酸塩はさらに場合により存在する重金属を結合する。安定性は、安息香酸ならびにパラベン、例えばメチルパラベンおよびノもしくはプロピルパラベンのような防腐剤の添加によりさらに高めることができる。

【0076】

低いかもしくは障害のある赤血球生成を特徴とする血液疾患を処置すること

本発明の1つの態様として、本発明のNTFTエリスロポエチンコンジュゲートの投与

50

は、ヒトにおける増加した赤血球形成をもたらすことに関する。従って、N T F T エリスロポエチンコンジュゲートの投与は、赤血球の生成において重要な天然に存在するE P Oタンパク質の機能を補充するかもしくはその代わりをする。N T F T エリスロポエチンコンジュゲートを含有する製薬学的組成物は、単独でまたは症状もしくは疾患の一部として、低いもしくは障害のある赤血球生成を特徴とする血液疾患に悩むヒト患者への様々な手段による投与に有効な強度で調合されることができる。製薬学的組成物は、皮下、静脈内もしくは筋肉内注射によるような注射により投与することができる。N T F T エリスロポエチンコンジュゲートの平均量は異なることができ、そして特に有資格医師の推奨および処方に基づくべきである。コンジュゲートの正確な量は、処置する症状の正確なタイプ、処置する患者の症状、ならびに組成物における他の成分のような因子に従う好みの問題である。例えば、 $0.01 \sim 10 \mu\text{g} / \text{kg}$  体重、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{g} / \text{kg}$  体重を例えば週に1回投与することができる。

#### 【0077】

本発明の別の態様として、本発明のN T F T エリスロポエチンコンジュゲート製剤の使用は、脳および脊髄虚血、急性脳損傷、脊髄損傷、網膜疾患、ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病およびALSのような神経変性疾患のために低下するか、障害が起きるかもしくは失われた神経組織、特に中枢神経系のもの、および機能を防御するか、回復させるか、もしくは増強するために介入を必要とするヒト患者を処置することに関する。本発明のN T F T エリスロポエチンコンジュゲート製剤の使用はまた、梗塞心臓のような虚血性もしくは低酸素ストレスの結果として損傷を受けた他の組織、結合組織および臓器損傷を包含する外科的介入の結果としての軟組織損傷、ならびに外傷もしくは免疫媒介性炎症の結果としての組織損傷を防御するか、回復させるか、もしくはその治癒を高めるために介入を必要とするヒト患者を処置することにも関することができる。

#### 【0078】

本願の全体にわたって、様々な公開が参考文献として記載されている。これらの公開における開示は、最新技術をさらに十分に記述するために引用することにより本明細書に組み込まれる。

#### 【0079】

本発明は、本発明の化合物および組成物の製造を示すが限定しない目的のために提示される以下の実施例によりさらに説明される。

#### 【実施例1】

#### 【0080】

##### c y s - E P O のクローニング

E P O の N 末端は受容体結合に関与せず、そしてE P O - 受容体複合体から離れて向くように位置する。このために、E P O の N 末端は、受容体結合にそしてそれ故に生物活性にも最小の立体効果を有するはずである化学修飾を導入するための理想的な位置を提供する。従って、N末端でのシステイン残基の導入は、受容体結合を破壊せずにE P O の部位特異的修飾を可能にする。

#### 【0081】

従って、E P O 遺伝子配列もしくはc D N A を操作することによりアラニン残基のN末端にシステイン残基を有するh E P O 配列の作製を行った。しかしながら、インシリコ分析により、E P O 前駆体コーディング配列にシステインコドンに単に付加することは、推定切断部位をシグナルペプチドにおけるプロリン24とバリン25の上流にシフトして新たなN末端残基としてv a l 25を残すかもしくはc y s ( - 1 ) と a l a 1 との間の切断を引き起こして付加されたシステインを完全に効率よく取り除き得ることが示唆される ( S i g n a l P 3 . 0 ; w w w . c b s . d t u . d k / s e r v i c e s / S i g n a l P / ) 。設計したE P O のN末端がシステインである確率を上げるために、E R にタンパク質をターゲティングするのに効率がよいことが既知であるもの、例えばヒト成長ホルモンの最初の26アミノ酸で内因性h E P O シグナルペプチドを置換することが提示された ( M o r r i s , A . E . e t a l . ( 1 9 9 9 ) J o u r n a l o f

Biological Chemistry 274, 418-423)。コンピューターモデルにより分析した場合に、この異種タンパク質(図1、配列番号:3)は、N末端システインを有する成熟タンパク質をもたらすと予測された。

【0082】

N末端に追加のシステインを有するヒトEPOを発現するために用いることができる構築物の製造を成し遂げるために、ヒト成長ホルモンリーダー配列を、新規なタンパク質の発現用のベクターにシステインコドンと一緒に設計した。

【0083】

EPOの核酸配列は、pEG15から増幅した。hGHシグナル配列の核酸配列は、pXGH5(Nichols Diagnostic)に由来するベクターから増幅した。hGH-EPO構築物をpSUEプラスミドと称するプラスミドに連結した。配列番号:3(図1)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを作製するために用いる方法を以下に記述する。

【0084】

プライマー設計

第一のPCRプライマー対(配列番号:15および16)を用いてHindIII-コザック-hGH-CYS-ApaLIを含有する107bpフラグメントを生成せしめた。

【0085】

【表3】

5'.HindIII.Kozac.hGH 5'-ATG CAA GCT TGC CAC CAT GGC TAC

AG-3'

3'.hGH.cys.ApaLIB 5'-GTG GTG GTG CAC AGG CAC TGC CCT

C-3'

【0086】

第二のPCRプライマー対(配列番号:17および18)を用いてCYS-ApaLI-EPO-BamHIを含有する518bpフラグメントを生成せしめた。

【0087】

【表4】

5'.cys.ApaLIEPO 5'-ATG CGC ATG TGC ACC ACC ACG CCT

C-3'

3'EPO.BamHI 5'-GCA TGG ATC CTC TGT CCC CTG-3'

【0088】

クローニング

第一のプライマー対を用いて最終構築物のhGHシグナル配列フラグメント(配列番号:2)を生成せしめた。PCR勾配条件は、95 x 2分、続いて95 x 2分、50 ~ 60 30秒間、72 30秒間の30サイクル、続いて72 で3分間の最終伸長、そして次に4 保持であった。第二のプライマー対を用いて最終構築物のEPOフラグメントを生成せしめた。PCR条件は、94 2分間、次に94 x 30秒、60 x 30秒、72 x 3分の30サイクル、72 で7分間の最終伸長で終わり、そして4 保持であった。増幅後に、10 μLの各PCR反応物を1 μLの10 Xローディング色素と合わせ、そして1%のSeaKemゲル(Bio-Rad, Hercules, CA)上で1 Kbラダー(Invitrogen, Carlsbad, CA)とともに泳動した。hGH PCR反応により各温度で約100bpの位置に移動するバンドが生成され;これらのバンドを切り出し、一緒にプールし、そしてQIAquickゲル抽出カラム(Qiagen, Valencia, CA)の説明書に従って抽出し、そして30 μLのdH<sub>2</sub>

10

20

30

40

50

Oにおいて溶出した。約500bpの位置に移動するEPOバンドを同様に切り出し、抽出した。

#### 【0089】

EPOフラグメントをBamHIおよびApaLIで消化し、hGHフラグメントをHindIIIおよびApaLIで消化し、そしてベクターpSUEをHindIIIおよびBamHIで消化した。10μLのpSUE消化物を上記のように1%のSeaKemゲル上で泳動した。~10kbのベクターバンドを切り出し、上記のように抽出した。全30μLの溶出液を仔ウシ腸アルカリホスファターゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)で処理し、次にQIAquick PCR精製カラム(Qiagen)の説明書に従って精製し、そして30μLのdH<sub>2</sub>Oにおいて溶出した。フラグメント消化物をQIAquick PCR精製カラムで精製し、そして30μLのdH<sub>2</sub>Oにおいて溶出した。

10

#### 【0090】

個々のフラグメントおよびベクターのライゲーションは、Roche Rapidライゲーションキット(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用いて行った。ライゲーション反応物をTOP10 OneShot化学的コンピテント細胞(Invitrogen)に形質転換し、そして100μg/mLのアンプシリン(Teknova, Half Moon Bay, CA)を含有するルリア-ベルターニ(LB)プレート上で平板培養した。個々のコロニーを選択液体LB培地に取り、そして225rpmで振盪しながら37°Cで一晩培養した。プラスミドDNAをQiagen Spin Miniprepキット(Qiagen)を用いて抽出し、そして75μLのdH<sub>2</sub>Oに溶出した。全てのクローンを制限酵素で消化してインサートについてスクリーニングした。陽性クローンは、ベクターの内部のプライマーで蛍光色素-ターミネーターおよびABI3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いてシーケンシングした。2個の陽性クローンがシーケンシングにより同定され；しかしながら、両方ともhGHシグナル配列に突然変異を含有する(Q22R)。この突然変異は、C末端システインでの予測される切断に影響を及ぼさない。最終プラスミドをpSUEcysEPOと称した。

20

#### 【0091】

本研究では、強力なウイルスプロモーター、共通コザック配列、興味のある遺伝子(EPO)、ヘキサヒスタグ、終止コドンおよびウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリアダニル化シグナルを利用する単純な発現ベクターを使用している。あるいはまた、cys-EPOを発現する安定な哺乳類細胞系が、遺伝子産物を発現するために作製されている。HEK293E細胞を使用した。しかしながら、哺乳類シグナル配列をプロセッシングすることができる任意の宿主細胞(哺乳類が好ましいが、必須ではない)を使用することができる。

30

#### 【実施例2】

#### 【0092】

cys-EPOの発現

DNAが哺乳類細胞により取り込まれ、核に運ばれ、そして転写される一過性トランスフェクションを用いて新規なEPOタンパク質を発現させた。この技術を用いて、タンパク質発現のパルス(pulse)が迅速な方法で達成された。トランスフェクションの5日後にならし培地から生成物、cys-EPOを集め、そしてタンパク質のC末端に位置するヘキサヒスタグを用いて精製した。

40

#### 【0093】

陽イオン性脂質試薬(LF2K)を用いてcys-EPOをコードするDNA(pSUEcysEPO)をHEK293E細胞にトランスフェクションした。次に、細胞を10段(10-tier)セルファクトリーにおいて無血清培地(293-SFMI)中で培養し、そして4日後にならし培地を回収し、そしてTALON IMACを用いてcys

50

s - E P O を精製した。透析および濃縮後に、精製された生成物を純度について S D S P A G E ( 図 2 )、N 末端シーケンシングおよび U T - 7 バイオアッセイ ( 図 3 ) により分析した。

【 0 0 9 4 】

バイオアッセイでは、U T - 7 細胞をアッセイの前に 2 4 . 5 時間 E P O なしに L - g l u および 5 % F B S を有する I M D M において飢餓状態にした。細胞を洗浄し、そしてウェル当たり 3 0 , 0 0 0 細胞で平板培養した。E P O ( 2 . 5 ~ 0 . 0 0 2 4 n g / m L ) および c y s - E P O ( 2 0 ~ 0 . 0 1 9 5 2 n g / m L ) を二重反復で加えた。3 7 ° C で 4 7 . 2 時間後にウェル当たりの細胞数を P r o m e g a の M T S 溶液を用いて測定し、O D の読み取りを 1、2 および 3 時間間隔で行った。値を S o f t M a x P r o 10  
でバックグラウンド補正し、そして平均バックグラウンドは 0 . 3 2 7 O D ユニットであった ( 図 3 ) 。

【 0 0 9 5 】

c y s - E P O が上清から回収されたことは、細胞にトランスフェクションした核酸からのタンパク質の成功した発現を裏づけ、そして該タンパク質がヒト成長ホルモンシグナル配列により E R にターゲティングされ、正しくフォールディングされ、そして分泌されることを示した。

【 0 0 9 6 】

物質のクーマシー染色した S D S P A G E ( 図 2 ) は、ヒトにおいてそして哺乳類細胞により生産される天然のグリコシル化生成物によって生じる 3 4 k D a とよくマッチする約 3 1 k D a の主要なバンドを示す。対照的に、グリコシル化されていない E P O は、約 1 8 k D a である。 20

【 0 0 9 7 】

N 末端シーケンシングは、通常成熟アラニン 1 残基の上流の単一アミノ酸の存在を裏付けた。このバンドから取り除いた物質の N 末端配列が示され、そして \* は下記のように説明される：システイン残基は N 末端シーケンシング法により容易に認識されないため、タンパク質がなんらかの方法で誘導体化されない限り、N 末端のアミノ酸 ( 括弧中の N ) は存在するとして表される、すなわち、シーケンサーにより「コールされる」ことができるだけであり、従って、該タンパク質が、ブロックされた N 末端を有さないことを示す。さらに、h G H シグナル配列の C 末端由来のアミノ酸は、シーケンシング法により同定 30  
することができるアラニン ( A ) であるので ( N ) はそれではないと決定することができる。さらに、最初のコール ( N ) の後の一連のアミノ酸は、成熟ヒト E P O 遺伝子 ( A P P など ) に対応する。

【 0 0 9 8 】

該構築物をコードする核酸配列を配列番号：19 に示す。

【 実施例 3 】

【 0 0 9 9 】

C y s - E P O の化学修飾

【 0 1 0 0 】

実験 1

1 m M のエチレンジアミン四酢酸 ( E D T A ) を有する p H 7 . 0 のリン酸緩衝食塩水 ( P B S ) に対してバッファー交換を C y s - E P O に行った。C y s - E P O ( P B S + 1 0 0 m M リン酸塩、p H 6 . 8 中 0 . 7 m g / m l ) および E P O ( P B S + 1 0 0 m M リン酸塩、p H 6 . 8 中 0 . 7 m g / m l ) を 0 m M、1 5 m M、2 0 m M および 2 5 m M の b - メルカプトエチルアミン ( M E A ) ( P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , I n c . , R o c k f o r d , I L ) と 3 7 ° C で 2 時間インキュベーションした。次に、製造業者の説明書に従ってリン酸バッファー ( 5 0 m M、p H 6 . 8 ) で平衡化した B i o s p i n - 6 脱塩カラム ( B i o r a d L a b o r a t o r i e s , H e r c u l e s , C A ) でサンプルから M E A を除いた。次に、サンプルを 0 . 7 5 m M のマレイミド - P E G ( 平均分子量：5 9 6 0 ) ( N e k t a r , H u n t s v i l l e , A 40  
40

10

20

30

40

50

L)と周囲温度で1時間インキュベーションした。1時間後に、システインを0.75 mMの濃度になるように加え、そして周囲温度で20分間インキュベーションした。次に、サンプルを4~12% SDS-PAGEゲル上に載せ、泳動した。サンプルはまた、シナピン酸(sinapic acid)のマトリックスを用いてそして製造業者の推奨に従って製造したH-4逆相チップ上でSELDI質量分析(Ciphergen, Fullton, CA)によっても分析した。野性型EPOを同様に処理した。

#### 【0101】

EPOサンプルのゲル(図4)は、調べた条件のいずれでもEPOの認識可能なPEG付加が起こらなかったことを示す。これは、非修飾のEPO標準に対する分子量シフトを表す任意のバンドの欠如により示される。サンプルのSELDI-MS(図6)もまた、分子量の違いがないことを示し、これらの条件下でPEG付加が起こらなかったことを同様に示す。

#### 【0102】

cys-EPOサンプルのゲル(図5)は、調べた条件の各々でcys-EPOの認識可能なPEG付加が起こったことを示す。これは、非修飾のcys-EPO標準に対する分子量シフトを表すバンド(白い矢印で示される)により示される(cys-EPO標準は、不純物の存在をよりよく示すためにより高い濃度で載せられたこと、および記述される分子量シフトは、標準について認められる主要バンドに関してであることに留意すべきである)。

#### 【0103】

サンプルのSELDI質量スペクトル分析(図6および7)において、約28,000のピークは非修飾のEPOもしくはcys-EPOに対応する。PEG付加生成物に予想されるものに比例する分子量の違い、図7における5,960 MW PEGの付加に対応するピークの存在に留意すべきである。EPO上のPEGおよびグリコシル化の不均一性のために、これらのピークはかなり幅広く、そして分子量は概算と見なされなければならない。しかしながら、相対分子量は、還元されていないおよび還元されたCys-EPOの両方へのPEGの結合を示し、cys-EPOのPEG付加がこれらの条件下で起こることを同様に示す。また、PEG付加の程度は、還元に使用するMEAの濃度に対して増加するようである。これは、cys-EPO上のN末端システインの少なくともいくらかがシステインもしくはグルタチオンのような別のチオールにジスルフィド架橋されることおよびこのジスルフィドを本明細書に記述される条件を用いて選択的に還元できることを示す。総合すると、これらのデータは、cys-EPO上のN末端チオールが到達可能であり、そしてマレイミド-PEGのようなチオール特異的試薬により修飾できることを示す。

#### 【0104】

##### 実験2

1 mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を有するpH 7.0のリン酸緩衝食塩水(PBS)に対してバッファー交換をCys-EPOに行う。この溶液にマレイミドと脂質との間に分子量14~20,000のポリマーリンカー(PEGのような)を含有する3倍モル過剰のマレイミド活性化ジステロイルホスファチジルエタノールアミン(mal-PEG-DSPe)を加える。反応混合物を20~25の間で1時間インキュベーションする。次に、反応混合物をzorbax GF-250 XLサイズ排除HPLCカラム上に載せ、そして2 ml/分の流速でPBSで溶出する。次に、得られる修飾タンパク質ピークを含有する画分をプールし、そして生物活性について試験する。

#### 【0105】

##### 実験3

28.7 mlのジメチルホルムアミド(DMF)中0.5 MのHOBt/HBTU(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール/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リン酸)に14.35 mlの2 Mジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、続いて5 g(14.35 mmol)の3-(S

10

20

30

40

50

、トリチル) -メルカプトプロピオン酸 (Bachem, King of Prussia, PA) を加える。溶液を 5 g の MBHA 樹脂 (0.8 mmol/g) (Bachem) に加え、そして 30 分間攪拌する。樹脂を数容量の DMF、DCM およびメタノールで連続して洗浄し、そして真空中で乾燥させる。得られる樹脂を標準的な Boc 化学でペプチド合成に使用する。2 ~ 50 残基の長さのペプチドを標準的な Boc 化学を用いて合成し、そして切断を 90% の HF、10% の p-クレゾール、-5、1.5 時間において行う。ペプチドをエーテルにおいて沈殿させ、凍結乾燥させ、そして分取逆相 HPLC (RP-HPLC) により精製する。次に、ペプチドを PBS (pH 7.0) + 1 mM EDTA において Cys-EPO と 12 ~ 48 時間インキュベーションする。反応を分析サイズ排除クロマトグラフィー HPLC (SEC-HPLC)、SDS ゲル電気泳動および / もしくは SELDI 質量分析でモニターする。次に、最終コンジュゲートを Zorbax GF-250 XL サイズ排除 HPLC カラム上に載せ、そして 2 ml / 分の流速で PBS で溶出する。次に、得られる修飾タンパク質ピークを含有する画分をプールし、そして生物活性について試験する。

10

#### 【実施例 4】

##### 【0106】

#### UT7 細胞増殖アッセイ

UT7 は、EPO 依存性になるように適応されているヒト白血病細胞系である (Komatsu, N., et al. Blood 82 (2), 456-464, 1993)。UT7 細胞を PBS において 3 回洗浄し、そしてアッセイの前に 24 時間 EPO に関して 20 飢餓状態にする。L-グルタミンおよび 5% で FBS を添加した IMDM 培地 (I5Q) において UT-7 細胞を飢餓状態にした。細胞を 50 mL の DPBS において 1 回洗浄し、そして DPBS に懸濁したままで計数し、そして適切な培地に  $6 \times 10^5$  細胞 / mL (ウェル当たり 30,000 細胞の最終濃度をもたらす) の最終濃度になるように懸濁する。EPO 標準は、EPO ストック (1.7 mg/mL) を  $0.85 \mu\text{g} / \text{mL}$  (4 mL の培地中  $2 \mu\text{L}$ ) に希釈することにより調製する。ストック溶液を I5Q 培地において  $5 \text{ ng} / \text{mL}$  まで 2:340 希釈し、続いて  $0.0098 \text{ ng} / \text{mL}$  の濃度まで 1:2 連続希釈する。得られる希釈物は、 $2.5 \text{ ng} / \text{mL} \sim 0.0024 \text{ ng} / \text{mL}$  の濃度の標準を与える。試験サンプルを同様に希釈する。UT-7 細胞懸濁液の  $50 \mu\text{L}$  のアリコートに対応するウェルに移し、そしてプレートを 37 で 48 時間インキュベーションした。細胞増殖は、ウェル当たり  $20 \mu\text{L}$  を加えて、Promega の MTS 溶液 (Promega, Madison, WI) を用いて評価する。読み取りは、MTS 添加後 1 時間で始まる。

20

30

##### 【0107】

図 3 は、修飾されていないおよび N 末端 cys で修飾された EPO に対して行った UT7 細胞アッセイにおける EPO 物質の濃度依存性のグラフを示す。修飾されていない EPO のデータから計算される  $EC_{50}$  は  $1.795 \times 10^{-11} \text{ M}$  であり、そして修飾された EPO ののは  $2.948 \times 10^{-11} \text{ M}$  である。これらのデータは、分泌された物質が活性であることを示す。

#### 【実施例 5】

##### 【0108】

#### マウスにおける造血の刺激

約 18 ~ 20 グラムの重さがある、Charles Rivers Laboratories (Raleigh, NC) から入手した BDF1 メスマウスをフィルタートッププラスチックケージにおいてグループ飼育する (ケージ当たり 10 匹)。

##### 【0109】

研究の -5 日目に、動物を各グループに 15 匹の動物で 3 処置グループ (PBS コントロール、EPO および M-PEG-A-Cys-EPO) の 1 つに割り当てる。動物を  $\text{CO}_2$  で麻酔し、そしてベースラインレベルを定めるために血液サンプルを  $0.05 \text{ mL} / \text{サンプル}$  の目標血液容量で後眼窩洞を介して EDTA 被覆ガラスチューブに採取する。血

40

50

液を市販されているEDTA調合微小遠心管に入れる。アリコートヘマトクリット管に入れ、そしてチューブを粘土で密封し、そして5分間遠心分離する。赤血球沈殿容積(PCV/ヘマトクリット)は、市販されているヘマトクリット測定カード(determinator card)上でヘマトクリット管を読み取ることから得られる。ヘモグロビンレベルは、10 $\mu$ lの血液を使用して、Coulter<sup>TM</sup>カウンターを用いて決定する。0および2日目に、動物にPBSにおける実施例4)のUT-7アッセイにより調整されるような生物活性において同等である量の0.94mL(112.8mL/kg)のPBS(pH7.4)、EPO(PBS中0.333 $\mu$ g/mL)もしくは本発明のM-PEG-A-Cys-EPO組成物のいずれかの腹腔内注射を与える。4、7、10、14、17および21日目に血液サンプルを採取し、そしてヘマトクリット管に等分し、粘土で密封し、そして5分間遠心分離する。赤血球沈殿容積(PCV/ヘマトクリット)は、市販されているヘマトクリット決定カード上でヘマトクリット管を読み取ることにより得られる。ヘモグロビンレベルは、10 $\mu$ lのサンプルを使用してCoulter<sup>TM</sup>カウンターを用いて決定する。

10

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】166アミノ酸のヒト型に基づきそして-cys残基をボックス中に示しそしてシグナル配列をボールド体で示す設計し直した前駆体エリスロポエチン分子のアミノ酸配列を示す。

【図2】精製されたcys-EPOの染色したSDS PAGE分析および化学的方法により決定した場合の精製されたcys-EPOのN末端配列を示し、(N)はブレースホルダーを示す。

20

【図3】cys-EPOをEPOと比較するUT-7細胞増殖アッセイの結果を示すグラフである。

【図4】レーン：(1)分子量マーカー；(2)EPO+0mM MEA；(3)EPO+0mM MEA+マレイミド-PEG；(4)EPO+15mM MEA；(5)EPO+15mM MEA+マレイミド-PEG；(6)EPO+20mM MEA；(7)EPO+20mM MEA+マレイミド-PEG；(8)EPO+25mM MEA；(9)EPO+25mM MEA+マレイミド-PEG；(10)EPO標準に示されるようなサンプルの4~12% SDS-PAGEゲルを示す。

30

【図5】レーン：(1)分子量マーカー；(2)Cys-EPO+0mM MEA；(3)Cys-EPO+0mM MEA+マレイミド-PEG；(4)Cys-EPO+15mM MEA；(5)Cys-EPO+15mM MEA+マレイミド-PEG；(6)Cys-EPO+20mM MEA；(7)Cys-EPO+20mM MEA+マレイミド-PEG；(8)Cys-EPO+25mM MEA；(9)Cys-EPO+25mM MEA+マレイミド-PEG；(10)Cys-EPO標準に示されるようなサンプルの4~12% SDS-PAGEゲルを示す。PEGに結合されたCys-EPOに対応するバンドは、白い矢印で示されることに留意すべきである。

【図6】EPO、EPO+0mM MEA+マレイミド-PEGおよびEPO+25mM MEA+マレイミド-PEGのSELDI質量スペクトルである。約28,000のピークは、修飾されていないEPOに対応する。

40

【図7】Cys-EPO、Cys-EPO+0mM MEA+マレイミド-PEGおよびCys-EPO+25mM MEA+マレイミド-PEGのSELDI質量スペクトルである。約28,000のピークは、修飾されていないcys-EPOに対応し、5,960MW PEGの付加に対応するピークが存在する。

【 図 1 】

Fig. 1

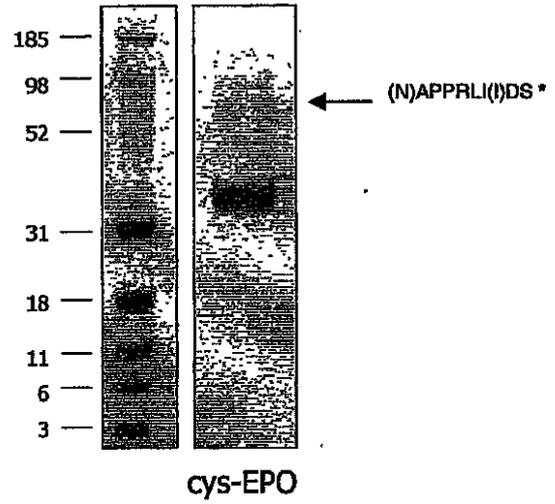
```

MATGSRITLL LAFGLLCLFW LRNGSA(N)APP RLICDSRVLE RYLLEAKKAE NITTCABHC
60
SLNENITVPD TKVNFYAWKR NEVGGQAVEV WQGLALLSEA VLRGALLVN SSQFWEPQLL
120
HVKAVSGLR SLITLLRALG AQKEAISFPD AASAAPLRKI TADYFRKLEF VYSNLRGKL
180
KLYTGACRT GDR
193

```

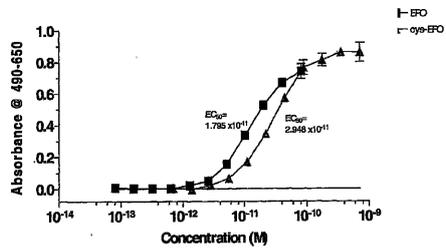
【 図 2 】

Fig. 2



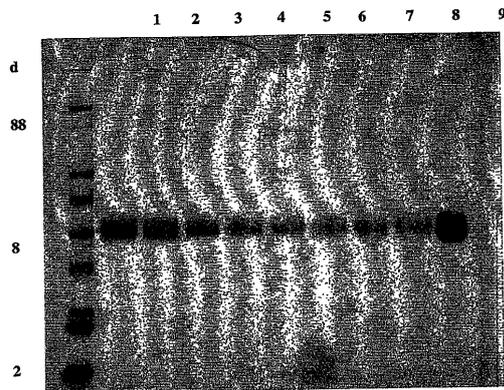
【 図 3 】

Fig. 3



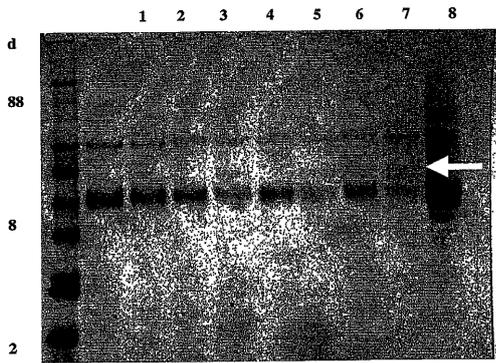
【 図 4 】

Fig. 4



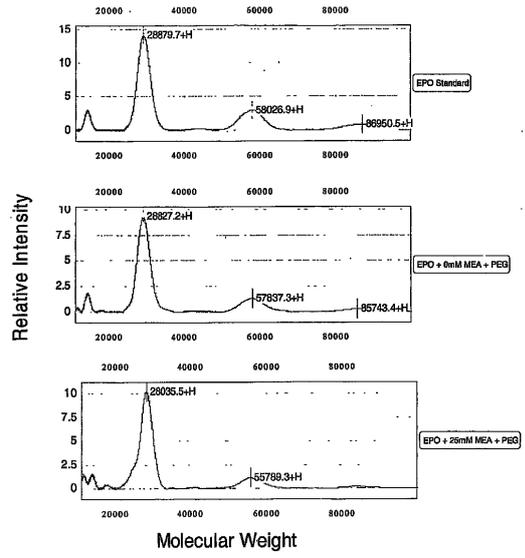
【 5 】

Fig. 5



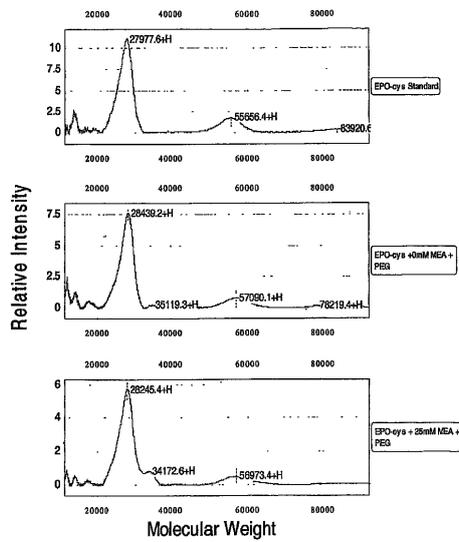
【 6 】

Fig. 6



【 7 】

Fig. 7



【配列表】

2008500275000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/43081
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12N 9/96; C07K1/00, 14/505 US CL : 435/188; 530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/188; 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,766,897 (BRAXTON) 16 June 1998 (16.06.1998), see entire document	1-36
A	US 5,206,344 (KATRE et al) 27 April 1993 (27.04.1993), see entire document	1-36
A	US 4,775,622 (HITZEMAN et al) 04 October 1988 (04.10.1998) see entire document.	1-36
A	US 2003/0158333 A1 (ROBERTS et al) 21 August 2003 (21.08.2003), see entire document.	1-36
A	KIM et al., "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells", Gene, 1997, Vol. 199, pages 293-301, see entire document.	1-36
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 25 July 2005 (25.07.2005)		Date of mailing of the international search report 03 OCT 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Jennifer D. Vogel</i> Nancy T. Vogel Telephone No. (703) 308-0196

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US04/43081

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
EAST, STN files Medline, Caplus, Embase, Biosis  
search terms: cysteine, N-terminal, amino-terminal, signal sequence, EPO, erythropoietin, conjugate, polymer

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 7/06 (2006.01)</b>		A 6 1 P 7/06	
<b>A 6 1 K 47/48 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/48	
<b>A 6 1 K 47/12 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/12	
<b>A 6 1 K 47/14 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/14	
<b>A 6 1 K 47/24 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/24	
<b>A 6 1 K 47/34 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/34	
<b>A 6 1 K 47/32 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/32	

(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, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 カニンガム, マーク

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 4 8 ケネットスクエア・ガーデンドライブ 7 1 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA03 CA04 CA09 DA02 EA04 FA18  
 4B064 AG18 CA10 CA19 CC24 DA01  
 4C076 AA94 AA95 CC30 DD41A DD44A DD63A EE16A EE23A FF31 FF34  
 4C084 AA02 AA06 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA44 DB56 NA14  
 ZA512  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA50 BA55 BA57 CA40 DA13 EA24  
 FA74 FA81

## 【要約の続き】

;そしてNは0 ~ 15の整数である]のエリスロポエチンコンジュゲート化合物に関する。