

(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2012-515222
(P2012-515222A)

(43) 公表日 平成24年7月5日(2012.7.5)

(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 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-546399 (P2011-546399)
 (86) (22) 出願日 平成22年1月15日 (2010. 1. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年8月26日 (2011. 8. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/021241
 (87) 国際公開番号 W02010/083439
 (87) 国際公開日 平成22年7月22日 (2010. 7. 22)
 (31) 優先権主張番号 61/145, 436
 (32) 優先日 平成21年1月16日 (2009. 1. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/145, 440
 (32) 優先日 平成21年1月16日 (2009. 1. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511173228
 テバ ファーマシューティカル インダストリーズ リミテッド
 イスラエル国 ペタク チクヴァ パーゼルス トリート 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子融合タンパク質の安定な製剤

(57) 【要約】

白血球数の低下を特徴とする症状および病気の治療、予防、および改善のための組成物および方法を開示する。本明細書に記載の方法および組成物は、ヒト血清アルブミンタンパク質(「HSA」)およびヒト顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)から形成された融合ポリペプチドを含む。

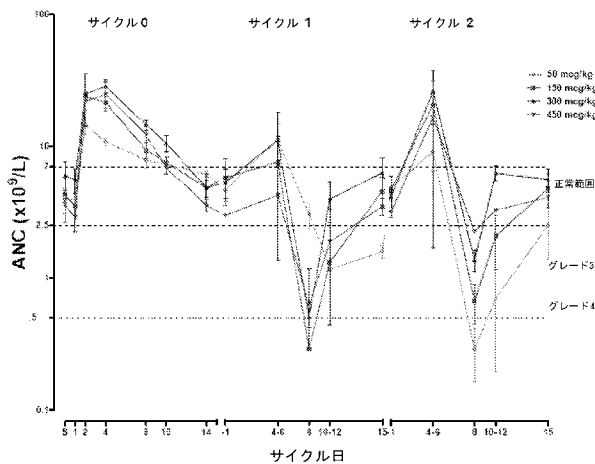
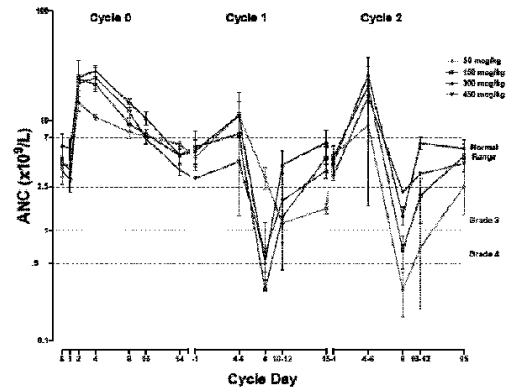


FIGURE 7A



【特許請求の範囲】

【請求項1】

好中球減少症を示しているかまたは好中球減少症を発症する危険性のあるヒト被験者に、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与する段階を含む、ヒト被験者における好中球減少症を治療するまたは予防する方法。

【請求項2】

白血球減少症を示しているかまたは白血球減少症を発症する危険性のあるヒト被験者に、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与する段階を含む、ヒト被験者における白血球減少症を治療するまたは予防する方法。

10

【請求項3】

ヒト被験者が、非脊髄性の悪性腫瘍を患っており、臨床的に有意な発生率の発熱性好中球減少症を伴う少なくとも一種類の骨髄抑制性抗癌剤が投与されている、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

非脊髄性の悪性腫瘍を患っており、臨床的に有意な発生率の発熱性好中球減少症を伴う少なくとも一種類の骨髄抑制性抗癌剤が投与されているヒト被験者における、発熱性好中球減少症により顕在化する感染症の発生率を減少させる方法であって、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を被験者に投与する段階を含む、方法。

20

【請求項5】

- (a) 被験者におけるグレード4好中球減少症がなくなる；
- (b) 被験者におけるグレード4好中球減少症が減少する；
- (c) 被験者において重度の好中球減少症の持続期間が短縮される；
- (d) 被験者におけるグレード4好中球減少症の持続期間が5日未満になる；
- (e) 被験者におけるグレード3好中球減少症の持続期間がなくなる；
- (f) 被験者におけるグレード3好中球減少症の持続期間が短縮される；または
- (g) これらの任意の組み合わせである、

請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項6】

組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の投与が、白血球(WBC)の増加をもたらす、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

- (a) 被験者において好中球数が増加する；
- (b) 被験者において好中球数の減少が抑制される；
- (c) 被験者において最下点の絶対好中球数(ANC)が増加する；
- (d) 被験者において回復ANCが増加する；
- (e) 被験者においてANC回復までの時間が短縮される；または
- (f) これらの任意の組み合わせである、

請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項8】

被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量が、

- (a) 約50 μ g/kgから約450 μ g/kgまで；
- (b) 約50 μ g/kg；
- (c) 約150 μ g/kg；
- (d) 約300 μ g/kg；
- (e) 約450 μ g/kg；
- (f) 約30mgから約60mgまで；
- (g) 約30mg；

50

(h) 約40mg;

(i) 約50mg;

(j) 約60mg; または

(k) これらの任意の組み合わせ

からなる群より選択される、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

好中球減少症が、原発性好中球減少症、急性好中球減少症、重度の慢性好中球減少症(S
CN)、重度の先天性好中球減少症(コストマン症候群)、重度の小児遺伝性無顆粒球症、良
性好中球減少症、周期性好中球減少症、慢性特発性好中球減少症、続発性好中球減少症、
好中球減少症関連症候群、および免疫媒介好中球減少症からなる群より選択される、請求
項1~8のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項10】

好中球減少症が、放射線、アルコール依存症、薬物、アレルギー性疾患、再生不良性貧
血、自己免疫疾患、T-リンパ増殖性疾患(T-LPD)、脊髄形成異常、骨髄繊維症、異常
ガンマグロブリン血症、発作性夜間血色素尿症、癌、ビタミンB₁₂欠乏症、葉酸欠乏症、
ウイルス感染症、細菌感染症、脾臓障害、血液透析もしくは移植、白血病、骨髄腫、リン
パ腫、骨髄を浸潤し置換する転移性固形腫瘍、毒素、骨髄機能不全、シュワヒマン-ダイ
アモンド症候群、軟骨毛髪形成不全症、先天性角化異常症、IB型糖原貯蔵障害、任意の原
因の脾腫、骨髄細胞もしくはその前駆体の内在性異常を原因とするかまたはそれらに関連
するものである、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項11】

組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子が、

(a) 骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも12時間後;

(b) 骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも18時間後;

(c) 骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも24時間後

からなる群より選択される時期に投与される、請求項3に記載の方法。

【請求項12】

骨髄抑制性抗癌薬の前に組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与す
ることがWBCの増加をもたらす、請求項11記載の方法。

【請求項13】

化学療法前に組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与することがANC
の上昇をもたらす、請求項11または12のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項14】

非脊髄性の悪性腫瘍が乳癌を含む、請求項3または11~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

骨髄抑制性抗癌剤がドキソルピシンおよびドセタキセルを含む、請求項3または11~14
のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

ドキソルピシン約50mg/m²およびドセタキセル約75mg/m²が、少なくとも一つの治療サイ
クルの同じ日に静脈点滴により順次投与される、請求項15記載の方法。

40

【請求項17】

ドキソルピシン約60mg/m²およびドセタキセル約75mg/m²が、少なくとも一つの治療サイ
クルの同じ日に静脈点滴により順次投与される、請求項15記載の方法。

【請求項18】

ANCおよびWBCが、

(a) 化学療法後10日目;

(b) 化学療法後11日目;

(c) 化学療法後12日目;

(d) 化学療法後13日目;

(e) 化学療法後14日目; または

50

(f) 化学療法後15日目

からなる群より選択される時期までに正常に戻る、請求項3または11～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

化学療法剤の投与後14日目において、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子で治療された患者のANCの上昇が、等価量のペグフィルグラスチムで治療された患者のANCの上昇よりも低い、請求項3または11～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の投与が、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、またはこれらの任意の組み合わせの増加をもたらす、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項21】

被験者において、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、またはこれらの任意の組み合わせが増加する、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

被験者において、リンパ球数、単球数、好酸球数、または好塩基球数の減少が抑制される、請求項1～21のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2009年1月16日に出願された米国特許仮出願第61/145,440号および2009年1月16日に出願された米国特許仮出願第61/145,436号の恩典を主張する。米国特許仮出願第61/145,440号および米国特許仮出願第61/145,436号の内容は、その全体において参照により本明細書に組み入れられる。

20

【背景技術】

【0002】

背景

白血球減少症は、循環する白血球(WBC)の減少であり、多くの場合、WBC数4000/mL未満と規定される。白血球減少症に關与する主な細胞は、好中球である。しかしながら、リンパ球、単球、好酸球、または好塩基球の数の減少も総白血球数の低下に寄与する場合がある(メルクママニュアル17版(非特許文献1))。

30

【0003】

好中球減少症は、しばしば細菌感染や真菌感染に対する感受性の増加につながる、血中好中球数の減少を特徴とする。好中球減少症は、好中球数および相対感染危険度により次のように分類される。軽度(1000から1500/mL)、中程度(グレード3、500から1000/mL)、または重度(グレード4、<500/mL)。急性かつ重度の好中球減少症は、患者が急速に死に至る感染症に罹患しやすくなるので、生命にかかわる疾患である(メルクママニュアル17版(非特許文献1))。

【0004】

好中球減少症は、骨髓中の好中球産生の低下または好中球破壊が加速することにより引き起こされ得る。急性好中球減少症は、好中球の消費が速く、産生が著しく低下すると数日にわたって起きる場合がある。慢性好中球減少症は、何か月もの間持続する場合があり、しばしば脾臓における好中球産生の減少または好中球の捕捉によって引き起こされる。好中球減少症は、骨髓細胞に対して外因性の因子に副次的に生じるかどうか、あるいは内因性の欠陥が骨髓性前駆細胞中に存在するかどうかによって分類される場合がある(メルクママニュアル17版(非特許文献1))。

40

【0005】

好中球減少症およびその感染性合併症は、細胞毒性化学療法ならびに、放射線治療、生物療法、標的化治療、および骨髓移植などの他の癌治療の最も一般的で重篤な副作用の一つである。細胞毒性化学療法(成長の速い細胞を破壊することにより作用する)は、好中球

50

前駆体の増殖速度が速くかつ血中好中球のターンオーバーが速いので、好中球減少症をもたらす(メルクマニュアル17版(非特許文献1))。化学療法を受けている患者における好中球減少症の最も一般的な症状としては、発熱、口腔潰瘍、および耳部感染が挙げられる。重度の好中球減少症の患者は、しばしば、敗血症、皮膚の蜂巣炎、肝膿瘍、フルンケル症、肺炎、口内炎、歯肉炎、直腸周囲炎、大腸炎、副鼻腔炎、および中耳炎などの化膿性感染症を患う。身体がより多くの好中球を産生できるまで、化学療法を遅延させなければならない場合があり、そしてより低用量で投与されなければならない場合があり、治療の効果が低下してしまう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0006】

【非特許文献1】メルクマニュアル17版

【発明の概要】

【0007】

概要

正常より低い白血球数を特徴とする症状の治療、改善、および予防に有用な方法および組成物を本明細書に記載する。このような症状としては、白血球減少症および好中球減少症が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0008】

第一の態様では、好中球減少症を示しているかまたは好中球減少症を発症する危険性のあるヒト被験者に、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与することを含む、ヒト被験者における好中球減少症を治療するまたは予防する方法が記載される。例示される態様では、ヒト被験者は、非脊髄性の悪性腫瘍を患っており、臨床的に有意な発生率の発熱性好中球減少症を伴う少なくとも一種類の骨髄抑制性抗癌剤が投与されていてもよい。

20

【0009】

第二の態様では、白血球減少症を示しているかまたは白血球減少症を発症する危険性のあるヒト被験者に、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与することを含む、ヒト被験者における白血球減少症を治療するまたは予防する方法が記載される。

30

【0010】

第三の態様では、非脊髄性の悪性腫瘍を患っており、臨床的に有意な発生率の発熱性好中球減少症を伴う少なくとも一種類の骨髄抑制性抗癌剤が投与されているヒト被験者における、発熱性好中球減少症により顕在化する感染症の発生率を減少させる方法であって、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を被験者に投与することを含む方法が記載される。

【0011】

いくつかの方法では、本明細書に記載の化合物は、感染症、例えば、発熱性好中球減少症により顕在化する感染症の発生率を減少させるために有用である。いくつかの態様では、組成物および方法は、ヒト血清アルブミンタンパク質(「HSA」)およびヒト顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)から形成された融合ポリペプチドを含む。当該融合ポリペプチドは、長さがアミノ酸759個であって、当該融合物のアミノ酸1~585は成熟型HSAからのアミノ酸に対応し、当該融合物のアミノ酸586~759は成熟型ヒトG-CSFのアミノ酸に対応する。融合タンパク質のアミノ酸配列を図1に示す。Neugranin(商標)(「NEUG」)と命名された融合ポリペプチドは、白血球減少症もしくは好中球減少症を発症するまたは発症する危険性のある患者に投与される。例えば、いくつかの態様では、方法は、被験者を治療するのに有効な量で組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与することにより、ヒト被験者における白血球減少症または好中球減少症を治療することを含む。

40

【0012】

いくつかの態様では、好中球減少症は、原発性好中球減少症、急性好中球減少症、重度

50

の慢性好中球減少症(SCN)、重度の先天性好中球減少症(コストマン症候群)、重度の小児遺伝性無顆粒球症、良性好中球減少症、周期性好中球減少症、慢性特発性好中球減少症、続発性好中球減少症、好中球減少症関連症候群、または免疫媒介好中球減少症である。

【0013】

別の態様では、好中球減少症は、放射線、アルコール依存症、薬物、アレルギー性疾患、再生不良性貧血、自己免疫疾患、T-リンパ増殖性疾患(T-LPD)、脊髄形成異常、骨髄繊維症、異常ガンマグロブリン血症、発作性夜間血色素尿症、癌、ビタミンB₁₂欠乏症、葉酸欠乏症、ウイルス感染症、細菌感染症、脾臓障害、血液透析、移植、白血病、骨髄腫、リンパ腫、骨髄を浸潤し置換する転移性固形腫瘍、毒素、骨髄機能不全、シュワヒマン-ダイヤモンド症候群、軟骨毛髪形成不全症、先天性角化異常症、IB型糖原貯蔵障害、任意の原因の脾腫、および骨髄細胞またはその前駆体の内在性異常を原因とするかそれらに関連するものである。いくつかの態様では、好中球減少症は、細胞毒性を有する化学療法を原因とするかまたはそれに関連するものである。

10

【0014】

いくつかの態様では、ヒト被験者は、非脊髄性の悪性腫瘍(例えば乳癌)を患っており、細胞毒性を有する化学療法を受けている。例えば、いくつかの態様では、患者は、臨床的に有意な発生率の発熱性好中球減少症を伴う少なくとも一種類の骨髄抑制性抗癌剤が投与されている。いくつかの態様では、骨髄抑制性抗癌剤は、ドキシソルピシンおよびドセタキセルである。さらなる態様では、ドキシソルピシン約50mg/m²およびドセタキセル約75mg/m²が、少なくとも一つの治療サイクルの同じ日に静脈点滴により順次投与される。さらに別の態様では、ドキシソルピシン約60mg/m²およびドセタキセル約75mg/m²が、少なくとも一つの治療サイクルの同じ日に静脈点滴により順次投与される。

20

【0015】

別の態様では、方法は、ヒト被験者における発熱性好中球減少症により顕在化する感染症の発生率を減少させることを含む。いくつかの態様では、ヒト被験者は、非脊髄性の悪性腫瘍を患っており、臨床的に有意な発生率の発熱性好中球減少症を伴う少なくとも一種類の骨髄抑制性抗癌剤が投与されていてもよい。いくつかの態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子は、被験者における好中球減少症を治療するのに有効な量で被験者に投与される。

【0016】

いくつかの態様では、好中球減少症の持続期間もしくは重症度が減少するかまたは被験者の好中球減少症がなくなる。例えば、いくつかの態様では、被験者におけるグレード4またはグレード3好中球減少症がなくなる。別の態様では、グレード4またはグレード3好中球減少症の持続期間が短縮する。例えば、いくつかの態様では、被験者におけるグレード4好中球減少症の持続期間が5日未満になり;いくつかの態様では、被験者におけるグレード4好中球減少症の持続期間が、4日未満、3日未満、または2日未満になる。別の態様では、被験者におけるグレード3好中球減少症の持続期間がなくなり、かつ/またはヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を用いた治療を受けない被験者と比較して被験者におけるグレード3好中球減少症の持続期間が短縮する。

30

【0017】

いくつかの態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の投与は、被験者において白血球(「WBC」)の増加をもたらすかまたはWBCの喪失を減少させる。例えば、いくつかの態様では、被験者において好中球数が増加する;被験者において好中球数の減少が抑制される、被験者において最下点の絶対好中球数(「ANC」)が増加する、被験者において回復ANCが増加する、かつ/または被験者においてANC回復までの時間が短縮する。

40

【0018】

いくつかの態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は約40 μg/kgから約500 μg/kgであり;別の態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は約50 μg/kgから約450 μg/kgであ

50

る。さらに別の態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、約50 µg/kg、約100 µg/kg、約150 µg/kg、約200 µg/kg、または約250 µg/kgである。さらなる態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、約300 µg/kg、約350 µg/kg、または約400 µg/kgである。他の態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、450 µg/kgである。また別の態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、約20から約100mgである。さらなる態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、約30mgから約60mgである。さらなる態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、約30mg、約40mg、約50mg、または約60mgである。

10

【0019】

いくつかの態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子は、化学療法(例えば、骨髄抑制性抗癌剤の投与)後に投与される。例えば、いくつかの態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子は、化学療法中に投与されるか、または化学療法剤の投与の2時間以内、4時間以内、6時間以内、12時間以内、18時間以内、24時間以内、もしくは48時間以内に投与される。

【0020】

本発明の他の態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子は、骨髄抑制性抗癌剤の投与後に投与することができる。例えば、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子は、(a)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも2時間後;(b)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも4時間後;(c)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも6時間後;(d)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも12時間後;(e)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも18時間後;(f)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも24時間後;(g)骨髄抑制性抗癌剤投与の少なくとも48時間後;または(h)骨髄抑制性抗癌剤の投与中もしくは投与と実質的に同時、からなる群より選択される時期に投与することができる。

20

【0021】

いくつかの態様では、化学療法での治療中またはその後に組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子を投与することは、WBCの増加をもたらしかつ/またはANCの増大をもたらす。例えば、いくつかの態様では、ANCおよびWBCは、化学療法後10日目までに正常に戻る。別の態様では、ANCおよびWBCは、化学療法後11日目までに、化学療法後12日目までに、化学療法後13日目までに、化学療法後14日目までに、または化学療法後15日目までに正常に戻る。いくつかの態様では、化学療法剤の投与後の14日目に、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子で治療された患者のANCの上昇は、等価量のペグフィルグラスチムで治療された患者のANCの上昇よりも低い。

30

【0022】

いくつかの態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の投与は、リンパ球、単球、好酸球、または好塩基球の増加をもたらす。例えば、いくつかの態様では、被験者において、リンパ球数、単球数、好酸球数、または好塩基球数が増加する。別の態様では、被験者において、リンパ球数、単球数、好酸球数、または好塩基球数の減少が抑制される。

40

【0023】

いくつかの態様では、特に好中球減少症の治療または予防の方法に関して、達成される結果は、(a)被験者におけるグレード4好中球減少症がなくなる;(b)被験者におけるグレード4好中球減少症が減少する;(c)被験者において重度の好中球減少症の持続期間が短縮される;(d)被験者におけるグレード3好中球減少症の持続期間がなくなる;(e)被験者におけるグレード3好中球減少症の持続期間が短縮される;または(f)これらの任意の組み合わせ、からなる群より選択され得る。

【0024】

いくつかの態様では、特に好中球減少症の治療または予防方法に関して、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の投与は、白血球(WBC)の増加を引き起こす。さら

50

に別の態様では、特に好中球減少症の治療または予防の方法に関して、達成される結果は、(a)被験者において好中球数が増加する；(b)被験者において好中球数の減少が抑制される；(c)被験者において最下点の絶対好中球数(ANC)が増加する；(d)被験者において回復ANCが増加する；(e)被験者においてANC回復までの時間が短縮される；または(f)これらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される。

【0025】

いくつかの態様では、被験者に投与される組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の量は、(a)約50 μ g/kgから約450 μ g/kgまで；(b)約50 μ g/kg；(c)約150 μ g/kg；(d)約300 μ g/kg；(e)約450 μ g/kg；(f)約30mgから約60mgまで；(g)約30mg；(h)約40mg；(i)約50mg；(j)約60mg；または(k)これらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される。

10

【0026】

いくつかの態様では、治療されるかまたは予防されるべき好中球減少症は、原発性好中球減少症、急性好中球減少症、重度の慢性好中球減少症(SCN)、重度の先天性好中球減少症(コストマン症候群)、重度の小児遺伝性無顆粒球症、良性好中球減少症、周期性好中球減少症、慢性特発性好中球減少症、続発性好中球減少症、好中球減少症関連症候群、および免疫媒介好中球減少症からなる群より選択される。さらに、好中球減少症は、例えば、放射線、アルコール依存症、薬物、アレルギー性疾患、再生不良性貧血、自己免疫疾患、T-リンパ増殖性疾患(T-LPD)、脊髄形成異常、骨髄繊維症、異常ガンマグロブリン血症、発作性夜間血色素尿症、癌、ビタミンB₁₂欠乏症、葉酸欠乏症、ウイルス感染症、細菌感染症、脾臓障害、血液透析もしくは移植、白血病、骨髄腫、リンパ腫、骨髄を浸潤し置換する転移性固形腫瘍、毒素、骨髄機能不全、シュワヒマン-ダイヤモンド症候群、軟骨毛髪形成不全症、先天性角化異常症、IB型糖原貯蔵障害、任意の原因の脾腫、骨髄細胞もしくはその前駆体の内在性異常を原因とするかまたはそれらに関連するものであり得る。

20

【0027】

ヒト被験者が非脊髄性の悪性腫瘍を患う本発明の態様では、非脊髄性の悪性腫瘍は乳癌を含み得る。

【0028】

骨髄抑制性抗癌剤が投与される本発明の態様では、骨髄抑制性抗癌剤は、ドキソルピシンおよびドセタキセルを含み得る。例えば、ドキソルピシン約50mg/m²およびドセタキセル約75mg/m²が、少なくとも一つの治療サイクルの同じ日に静脈点滴により順次投与され得る。あるいは、ドキソルピシン約60mg/m²およびドセタキセル約75mg/m²が、少なくとも一つの治療サイクルの同じ日に静脈点滴により順次投与され得る。

30

【0029】

本発明のいくつかの態様では、治療後、ANCおよびWBCは、(a)化学療法後10日目；(b)化学療法後11日目；(c)化学療法後12日目；(d)化学療法後13日目；(e)化学療法後14日目；または(f)化学療法後15日目からなる群より選択される期間までに、正常に戻る。さらに他の態様では、化学療法剤投与後の14日目において、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子で治療された患者のANCの上昇は、等価量のペグフィルグラスチムで治療された患者のANCの上昇よりも低い。

40

【0030】

本発明のいくつかの態様では、組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子の投与は、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、またはこれらの任意の組み合わせの増加をもたらす。別の態様では、被験者において、リンパ球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、またはこれらの任意の組み合わせが増加する。本発明のまたさらなる態様では、被験者において、リンパ球数、単球数、好酸球数、または好塩基球数の減少が抑制される。

【0031】

上の概要および次の図面の簡単な説明および詳細な説明はいずれも例示および説明のためのものであり、請求項に記載の本発明をさらに説明することを意図するものである。その他の目的、利点、および新規な特徴は、以下の本発明の詳細な説明から当業者には容易

50

に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1A-図1C:図1Aは、「Neugranin(商標)」「NEUG」と呼ばれる組換えヒトアルブミン-顆粒球コロニー刺激因子(「rHA-G-CSF」)融合タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示し;図1Bは、ヒトG-CSFのアミノ酸配列を示し;図1Cは、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列を示す。

【図2】第I相における被験者の絶対好中球数(「ANC」)を示すグラフである。被験者は、試験化学療法に続いてサイクル1においてNEUGを300 μ g/kg(n=19)、NEUGを450 μ g/kg(n=20)、またはペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))を6mg(n=9)投与された。

10

【図3】ヒト被験者における第I相試験でのNEUGの薬物動態を示すグラフである。記載の用量(450 μ g/kg、300 μ g/kg、または150 μ g/kg)で皮下投与したNEUGの血清濃度を、化学療法の非存在下で乳癌被験者において測定した。正方形:450 μ g/kgサイクル0;三角形:300 μ g/kgサイクル0;円:150 μ g/kgサイクル0。

【図4】化学療法のサイクル1におけるNEUGの薬物動態/薬力(「PK/PD」)を示すグラフである(第I相試験)。患者は、サイクル1においてドキソルビシン/ドセタキセル投与の1日後にNEUGを450 μ g/kg投与された。ANCは白抜きひし形により示され;NEUG濃度は黒い正方形により示される。好中球減少症グレード3およびグレード4のカットオフを破線で示す。NEUGの定量下限(「LLOQ」)は、6ng/mlにて点線で示す。

【図5】化学療法のサイクル1を開始した1日後にNEUGを30mgまたはペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))を6mg投与された患者のANCプロファイルを示すグラフである(第II相試験)。グレード3およびグレード4好中球減少症カットオフ値を破線で示す。

20

【図6】第I相試験の化学療法サイクルを示す。

【図7】図7Aおよび図7Bは、第I相試験における被験者のANC数および白血球(「WBC」)数を示すグラフである。

【図8】NEUG(Albugranin)またはNeupogen(登録商標)のいずれかを用いたNSF-60細胞増殖のグラフを示す。

【図9】NEUGまたはNeulastaのいずれかを用いたNSF-60細胞増殖のグラフを示す。

【図10】NEUG(Albugranin)およびNeupogenの単回SC投与後のBDF-1マウスにおける末梢血好中球(Gr.1+)レベルのグラフを示す(時間経過)。Gr.1+細胞の総数は、群平均 \pm SEMとして表される。

30

【図11】NEUG(Albugranin)およびNeupogenの単回SC投与後の末梢血造血前駆細胞(c-kit+)レベルのグラフを示す(時間経過)。c-kit+細胞の総数は、群平均 \pm SEMとして表される。

【図12】図12Aおよび図12Bは、BDF-1マウスにおけるNEUG(Albugranin)またはNeulasta(登録商標)の単回皮下(「SC」)投与後の末梢血顆粒球(Gr.1+)レベルを示すグラフである。図12Aは、NeulastaまたはNEUGの単回投与後の反応の時間経過を示し、図12Bは、NEUGまたはNeulastaの相対効力を示す。

【図13】第I相で用いたNEUG製剤の組成を示す表である。

【図14】第II相で用いたNEUG製剤の組成を示す表である。

40

【図15】NEUG(Albugranin)またはNeulasta(登録商標)の単回皮下投与後の末梢血造血前駆細胞(c-kit+)レベルを示すグラフである(時間経過)。c-kit+の総数は、各群について計算した平均値および平均値の標準誤差として表される。治療群間の差異は、異分散t検定を用いて分析した。

【図16】5-FU(150 μ g/kg)IP注射の1日後のNEUG(Albugranin)またはNeulastaの単回皮下投与後の末梢血好中球(Gr.1+)レベルを示すグラフである。毎日計測したGR.1+細胞の総数は、各群について計算した平均値および平均値の標準誤差として表される。治療群間の差異は、不等分散を用いた二標本t検定で評価した。ビヒクル対照と比較して、すべての用量レベルにおいていずれの薬剤を用いた治療も好中球数の統計的に有意な増加をもたらした。

50

【図17】末梢血好中球の相対パーセントに対するNEUG(Albugranin)の効果を示すグラフである。各試験日の好中球の相対パーセントは、群平均値 \pm -SEMとして表される。NEUG100 μ g/kgQ7の8日目および9日目からのデータは、他の群との比較をしやすいするために、9日目および10日目としてそれぞれ示される。対照は、x4で4日毎にSC投与した食塩水ビヒクルまたはx14で毎日SC投与したNeupogen(登録商標)であった。治療期間は1~14日と考えられ、回復期間は15~28日と考えられる。

【図18】サルにおける好中球動員に関するNEUG(Albugranin)SC、NEUG IV、またはNeulasta(登録商標)SCの反復投与の比較を示すグラフである。各試験日から22日目の好中球数($K/\mu l$)は、群平均値 \pm -SEMとして表される。矢印は投与を示す。NEUGは、1.0mg/kg/投与でSC(n=6)またはIV(n=6)投与し、Neulastaは、0.22mg/kg/投与(1.0mg/kgのNEUGに対する等モル量)でSC(n=6)投与した。NEUGビヒクルを対照(n=2)としてSC投与した。

10

【図19】図19Aおよび図19Bは、インビボ薬物動態試験の概略を示す表である。

【図20】安全性データを提供するインビボ非臨床試験の概略を示す表である。

【図21】NEUGの発酵および精製の概略例を示すフローチャートである。

【図22】治療から14日目までの、第I相A部(サイクル0すなわち前化学療法)における被験者のメジアン絶対好中球数(ANC)を示すグラフである。4日目において、線は、一番上から一番下に向かって、300 μ g/kg、450 μ g/kg、150 μ g/kg、および50 μ g/kgである。

【図23】図23Aおよび図23Bは、0日目から15日目に得られたANC値に基づく、第I相B部で治療された各被験者の曲線下面積(AUC)である。図23Aはグラフであり;図23Aからのデータを表(23B)にまとめる。

20

【図24】サイクル1における0日目から15日目に得られたANC値に基づく、第II相において治療した被験者の曲線下面積(AUC)を示すグラフである(固定用量コホート)。第II相での被験者全員について、 $AUC_{ANC}(0\sim 15日目)$ を計算した。Neugraninで治療した患者には、0.3mg/kgから1mg/kg(ベースライン体重で割った用量として計算)までの範囲の用量を投与した。体重調整用量範囲を四分割し、 AUC_{ANC} に対してプロットした(左のパネル)。ペグフィルグラスチム(N=112)、Neugranin30mg(N=10)、40mg(N=105)、または50mg(N=105)で治療した被験者全員についても、 AUC_{ANC} を計算し比較した。データは平均値 \pm -SEMで示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

詳細な説明

30

本明細書には、白血球数の低下を特徴とする症状および病気を治療、予防、および改善する組成物および方法が開示される。本明細書に記載の方法および組成物は、ヒト血清アルブミンタンパク質(「HSA」)およびヒト顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)から形成された融合ポリペプチドを含む。好ましい一態様では、融合ポリペプチドはアミノ酸759個の長さがあり、当該融合物のアミノ酸1~585は、成熟型HSAからのアミノ酸に対応し、当該融合物のアミノ酸586~759は、成熟型ヒトG-CSFのアミノ酸に対応する。融合タンパク質のアミノ酸配列を図1に示す。

【0034】

本発明はまた、G-CSFの変種または断片を含む融合タンパク質とアルブミンまたはアルブミンの断片もしくは変種とを含む融合タンパク質を包含する。本発明はまた、本発明の治療用アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、治療用アルブミン融合タンパク質、組成物、薬学的組成物、製剤、およびキットを包含する。治療用アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞も本発明に包含され、当該ポリヌクレオチドおよび/または宿主細胞を使用して本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する方法もまた包含される。

40

【0035】

一態様では、本発明によるアルブミン融合タンパク質は、保存期間が長い。

【0036】

第二の態様では、本発明によるアルブミン融合タンパク質は、対応する未融合のG-CSF分子よりも安定している。

50

【0037】

本発明は、本発明の核酸分子を含むように修飾された(好ましくは本発明のアルブミン融合タンパク質を発現するように修飾された)、遺伝子組換え生物をさらに含む。

【0038】

本発明は概して、アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド;アルブミン融合タンパク質;ならびにアルブミン融合タンパク質またはアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを使用して病気や疾患を治療、予防、または改善する方法に関する。本明細書では、「アルブミン融合タンパク質」とは、少なくとも1個のアルブミン(またはその断片もしくは変種)分子の、少なくとも1個のG-CSF(またはその断片もしくはその変種)分子に対する融合により形成されたタンパク質を指す。本発明のアルブミン融合タンパク質は、遺伝子融合により互いに会合した、少なくともG-CSFの断片または変種と少なくともヒト血清アルブミンの断片または変種とを含む(すなわち、アルブミン融合タンパク質は、G-CSFの全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドがインフレームでアルブミンの全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドと結合した核酸の翻訳により生じる)。一旦アルブミン融合タンパク質の一部となったG-CSFおよびアルブミンタンパク質は、それぞれ、アルブミン融合タンパク質の「部分(portion)」、「領域」、または「部分(moiety)」と呼ばれる場合がある(例えば、「G-CSFタンパク質部分」または「アルブミンタンパク質部分」)。非常に好ましい態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質は、G-CSFの分子またはその断片もしくは変種(成熟型G-CSFタンパク質が挙げられるが、これに限定されるわけではない)を少なくとも1個とアルブミンの分子またはその断片もしくは変種(成熟型アルブミンが挙げられるが、これに限定されるわけではない)を少なくとも1個とを含む。

10

20

【0039】

さらに好ましい態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質は、宿主細胞によりプロセシングされ、周囲の培地へ分泌される。発現に使用される宿主の分泌経路で発生する新生アルブミン融合タンパク質のプロセシングとしては、シグナルペプチド切断;ジスルフィド結合の形成;適切な折り畳み;糖質の付加およびプロセシング(例えば、N結合およびO結合によるグリコシル化);特異的タンパク質切断;および多量体タンパク質への組み立てが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。本発明のアルブミン融合タンパク質は、好ましくはプロセシングされた形態である。最も好ましい態様では、「アルブミン融合タンパク質のプロセシングされた形態」とは、N末端シグナルペプチド切断を経たアルブミン融合タンパク質産物を意味し、本明細書ではまた「成熟アルブミン融合タンパク質」とも呼ばれる。

30

【0040】

一態様では、本発明は、G-CSFおよび血清アルブミンタンパク質を含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。さらなる態様では、本発明は、G-CSFタンパク質および血清アルブミンタンパク質を含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。別の態様では、本発明は、G-CSFタンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物学的活性がありかつ/または治療上活性がある断片を含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。別の態様では、本発明は、G-CSFタンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物学的活性がありかつ/または治療上活性がある変種を含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい態様では、アルブミン融合タンパク質の血清アルブミンタンパク質成分は、血清アルブミンの成熟部分である。本発明は、これらアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。

40

【0041】

さらなる態様では、本発明は、G-CSFタンパク質と、血清アルブミンの生物学的活性がありかつ/または治療上活性がある断片とを含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。さらなる態様では、本発明は、G-CSFタンパク質と、血清アルブミンの生物学的活性がありかつ/または治療上活性がある変種とを含むかあるいはそれ

50

らからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分は、G-CSFタンパク質の成熟部分である。さらに好ましい態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分は、G-CSFタンパク質の細胞外可溶性ドメインである。他の態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分は、活性型G-CSFタンパク質である。本発明は、これらアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。

【0042】

さらなる態様では、本発明は、G-CSFタンパク質の生物学的活性がありかつ/または治療上活性がある断片または変種と、血清アルブミンの生物学的活性がありかつ/または治療上活性がある断片または変種とを含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい態様では、本発明は、G-CSFタンパク質の成熟部分および血清アルブミンの成熟部分を含むかあるいはそれらからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。本発明は、これらアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。

10

【0043】

I. 定義

本明細書では、「ポリヌクレオチド」は、少なくとも1個の顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)分子(またはその断片もしくは変種)にインフレイムで結合した少なくとも1個のアルブミン分子(またはその断片もしくは変種)を含むかあるいはそれらからなる融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子を指す。

20

【0044】

本明細書では、「アルブミン融合コンストラクト」は、少なくとも1個のG-CSF(またはその断片もしくは変種)分子をコードする少なくとも1個のポリヌクレオチドにインフレイムで結合した少なくとも1個のアルブミン分子(またはその断片もしくは変種)をコードするポリヌクレオチドを含むかあるいはそれらからなり、さらに例えば一種類以上の次の要素を含む、核酸分子を指す:(1)機能性の自己増殖ベクター(シャトルベクター、発現ベクター、組込み型ベクター、および/または複製系が挙げられるが、これらに限定されるわけではない)、(2)転写開始領域(例えば、調節的または誘導的プロモーター、構成的プロモーターなどのプロモーター領域)、(3)転写の終了領域、(4)リーダー配列、および(5)選択マーカー。一旦アルブミン融合コンストラクトの一部となったG-CSFおよびアルブミンタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ、アルブミン融合コンストラクトの「部分(portion)」、「領域」、または「部分(moiety)」と呼ばれる場合がある。

30

【0045】

「治療活性」を示すG-CSFポリペプチドまたは「治療上活性のある」G-CSFタンパク質とは、G-CSFタンパク質に伴う一つ以上の公知の生物学的および/または治療的な活性を有するG-CSFポリペプチドを意味する。非限定的な例として、「G-CSF治療タンパク質」は、病気、症状、もしくは疾患を治療、予防、または改善するのに有用なG-CSFタンパク質である。非限定的な例として、「G-CSF治療タンパク質」は、特定の細胞型(正常(例えばリンパ球)または異常(例えば癌細胞))に特異的に結合するものであってもよく、したがって、化合物(薬剤または細胞毒性薬)が当該細胞型を特異的に標的にするように使用されてもよい。

40

【0046】

II. 顆粒球コロニー刺激因子

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は、好中球の産生を促す造血成長因子である。刺激される生存前駆細胞がある場合、G-CSFの投与は、好中球の増加を迅速に誘導する。G-CSFの他の重要なインビボ活性は、末梢血中への造血前駆細胞の動員である(Duhrsen et al., 1988; Molineux et al, 1999; Roberts et al, 1994)。この効果は、好中球系統だけを含むものではなく、他の単一系統および多系統前駆細胞ならびに造血多能性幹細胞にまで及ぶ(Molineux et al, 1999)。G-CSFはまた、好中球をプライミングすることによって感染に対する防衛機構の一部である細胞事象を高め、これによって、オプソニン化黄色ブドウ

50

球菌に対する食作用および抗菌作用の両方が高まる。G-CSFはまた、好中球および単球の走化性および好中球の接着性を誘導する(Yuo et al., 1989; Wang et al., 1988)。

【 0 0 4 7 】

組換えG-CSF産物は現在、好中球の増殖および分化を促すために多数の臨床上の適応症に関して承認されている。臨床試験では、フィルグラスチム(組換えメチオニルヒトG-CSF;ニューボジェン(登録商標)、アムジェン社、サウサンドオークス、カリフォルニア州)は、末梢好中球の数を増やし、このため骨髄抑制性の化学療法後の好中球減少症の期間を短縮させた。組換えG-CSF(フィルグラスチム)は、毎日の皮下(SC)注射によって投与される。

【 0 0 4 8 】

G-CSFの別の組換え型はペグフィルグラスチム、すなわちポリエチレングリコール共役rG-CSF(Neulasta(登録商標))であり、これは、毎日のrG-CSF投与に代わるサイクル毎に一回投与される代替物として、骨髄抑制性の抗癌剤が投与される患者における発熱性好中球減少症の発生率を減少させるのに安全かつ効果的であることが証明されている(Holmes, O'Shaughnessy et al, 2002; Green et al, 2003;Neulasta(登録商標)SmPC 2007)。

【 0 0 4 9 】

G-CSFを用いた一次予防は、年齢、病歴、病気の特徴、および化学療法レジメンの骨髄毒性に基づくリスクが高い患者における発熱性好中球減少症の防止に推奨される。米国臨床腫瘍学会および欧州癌研究治療機関は、発熱性好中球減少症のリスクが約20%ある場合、G-CSFの利用を推奨している。発熱性好中球減少症のリスクが10%から20%である場合、米国総合癌センターネットワークは、G-CSFによる予防を任意で適用することを推奨し、発熱性好中球減少症のリスクが少なくとも20%である場合、G-CSFによる予防を確実に適用することを推奨している(Smith et al, 2006, Vogel et al., 2005, Timmer-Bonte et al 2006., NCCN Guidelines)。

【 0 0 5 0 】

コロニー刺激因子を用いた予防が、特定の化学療法レジメンの毒性を緩和するために推奨される。しかしながら、当該治療のコストが増加することは、米国においてそして特にEUの一部において重要な検討事項であり、予防的なG-CSF治療の利用が不十分になる可能性があり、また高用量化学療法レジメンに対する患者の適格性が制限される可能性がある(Timmer-Bonte et al, 2006; Adams et al, 2006, NCCN Guidelines)。

【 0 0 5 1 】

G-CSFタンパク質は、野生型ポリヌクレオチド配列(例えば、完全長または成熟型のいずれか)によりコードされてもよく、またいくつかの場合においては、当該配列は、野生型ポリヌクレオチド配列の変種であってもよい(例えば、野生型G-CSFタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドのDNA配列は、例えば、特定の種における発現のために最適化されている;あるいは野生型G-CSFタンパク質の変種をコードするポリヌクレオチド(すなわち、部位特異的変異体;対立遺伝子多型)。

【 0 0 5 2 】

III. ヒト血清アルブミン

ヒト血清アルブミン(HSAまたはHA)は、ヒト循環系で最も一般的な天然の血液タンパク質であり、1リットル当たり約40グラムのアルブミンが測定され、20日以上の間循環系に存続する。アルブミンは、生理的濃度で最小限の活性を有する担体タンパク質である。HSAは、酵素的または免疫的な機能を有さないが、生体内に広く分布し、血液中で様々な物質(例えば、ホルモン、脂肪酸、非抱合ビリルビンなど)の担体となることが知られている(Yeh et al., 1992)。HSAおよび組換えHA(rHA)はいずれも、ヒトにおいて同様の長い血中半減期を有する。

【 0 0 5 3 】

ヒトアルブミンに遺伝子的に融合した治療用タンパク質は、アルブミンの血中半減期特性を獲得し得ることが研究で示されている(Syed et al, 1997)。例えば、ウサギでは、アルブミンに融合したCD4の半減期が、未融合のCD4よりも140倍長いことが示されている(Ye

10

20

30

40

50

h et al, 1992)。

【 0 0 5 4 】

成熟型では585個のアミノ酸からなるタンパク質であるヒト血清アルブミン(米国特許第7,592,010号の図1に示される)は、血清の浸透圧の大部分を担っており、また内因性および外因性リガンドの担体として機能する。現在、臨床で使用されるHAは、ヒトの血液から抽出されて製造される。微生物中の組換えHA(rHA)の産生は、EP 330 451およびEP 361 991に開示されている。

【 0 0 5 5 】

IV. ポリペプチドならびにポリヌクレオチドの断片および変種

A. 断片

本発明はさらに、G-CSFタンパク質の、アルブミンタンパク質の、および/または本発明のアルブミン融合タンパク質の断片に関する。本発明はまた、G-CSFタンパク質の、アルブミンタンパク質の、および/または本発明のアルブミン融合タンパク質の断片をコードするポリヌクレオチドに関する。タンパク質のN末端から1個以上のアミノ酸が欠失して、G-CSFタンパク質、アルブミンタンパク質、および/または本発明のアルブミン融合タンパク質の1つ以上の生物学的機能が修飾または喪失しても、他の治療的活性および/または機能的活性(例えば、生物学的活性、多量体化能、リガンド結合能)はなお保持され得る。例えば、完全型または成熟型のポリペプチドを認識する抗体を誘導しかつ/またはそれに結合するN末端欠失を有するポリペプチドの能力は、N末端から除去される完全型ポリペプチドの残基が過半数未満であれば、一般に保持される。完全型のポリペプチドのN末端が欠失した特定のポリペプチドが、そのような免疫学的活性を保持するかどうかは、本明細書に記載されるかまたは当技術分野で公知である常法によって容易に決定することができる。N末端アミノ酸残基が多数欠失した変異タンパク質が、一定の生物学的または免疫原的活性を保持している可能性がある。事実、わずか6個のアミノ酸残基からなるペプチドがしばしば免疫反応を誘発する場合がある。

【 0 0 5 6 】

したがって、本発明のアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFタンパク質の断片は、完全長のタンパク質、ならびに参照ポリペプチド(reference polypeptide)のアミノ酸配列のアミノ末端から1個以上の残基が欠失したポリペプチド(つまり、G-CSFタンパク質、あるいはポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされるアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分)を含む。特に、N末端欠失は、一般式 $m \sim q$ で記すことができ、式中、 q は、参照ポリペプチド(例えば、G-CSFタンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分)中のアミノ酸残基の総数を表す整数であり、 m は、 $2 \sim q$ マイナス6までの範囲の任意の整数として規定される。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【 0 0 5 7 】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応する血清アルブミンポリペプチドの断片は、完全長のタンパク質、ならびに参照ポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ末端から1個以上の残基が欠失したポリペプチド(つまり、血清アルブミン、またはアルブミン融合タンパク質の血清アルブミン部分)を含む。好ましい態様では、N末端欠失は、一般式 $m \sim 585$ により記すことができ、式中、585は、成熟ヒト血清アルブミン中のアミノ酸残基の総数を表す整数であり、 m は、2から579までの範囲の任意の整数として規定される。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。さらなる態様では、N末端の欠失は、一般式 $m \sim 609$ により記すことができ、式中609は、完全長のヒト血清アルブミン中のアミノ酸残基の総数を表す整数であり、 m は、2から603までの範囲の任意の整数として規定される。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【 0 0 5 8 】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質の断片は、完全長のアルブミン融合タンパク質、ならびにアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端から1個以上の残

10

20

30

40

50

基が欠失したポリペプチドを含む。特に、N末端欠失は、一般式 $m \sim q$ により記すことができ、式中、 q は、アルブミン融合タンパク質中のアミノ酸残基の総数を表す整数であり、 m は、 $2 \sim q$ マイナス6までの範囲の任意の整数として規定される。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【0059】

また、上記のように、参照ポリペプチド(例えば、G-CSFタンパク質;血清アルブミンタンパク質;または本発明のアルブミン融合タンパク質)のN末端またはC末端から1個以上のアミノ酸が欠失して、当該タンパク質の1つ以上の生物学的機能が修飾または喪失しても、他の機能的活性(例えば、生物学的活性、多量体化能、リガンド結合能)および/または治療的活性はなお保持され得る。例えば、完全型または成熟型のポリペプチドを認識する抗体を誘導しかつ/またはそれに結合するC末端欠失を有するポリペプチドの能力は、C末端から除去される完全型または成熟型のポリペプチドの残基が過半数未満であれば、一般に保持される。参照ポリペプチドのN末端および/またはC末端が欠失した特定のポリペプチドが治療的活性を保持するかどうかは、本明細書に記載および/またはそうでなければ当技術分野で公知である常法によって容易に決定することができる。

10

【0060】

本発明はさらに、本発明のアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ末端から1個以上の残基が欠失したポリペプチドを提供する。特に、C末端欠失は、一般式 $1 \sim n$ で記すことができ、式中、 n は、 $6 \sim q$ マイナス1までの範囲の任意の整数であり、 q は、参照ポリペプチド(例えば、G-CSFタンパク質、あるいはポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされるアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分)中のアミノ酸残基の総数を表す整数である。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

20

【0061】

さらに、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ末端から1個以上の残基が欠失したポリペプチドを提供する。特に、C末端欠失は、一般式 $1 \sim n$ で記すことができ、式中、 n は、6から584までの範囲の任意の整数であり、584は成熟型ヒト血清アルブミン中のアミノ酸残基の総数を表す整数から1を引いたものである。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。特に、C末端欠失は、一般式 $1 \sim n$ で記すこと

30

【0062】

さらに、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質のカルボキシ末端から1個以上の残基が欠失したポリペプチドを提供する。特に、C末端欠失は、一般式 $1 \sim n$ で記すことができ、式中、 n は、 $6 \sim q$ マイナス1までの範囲の任意の整数であり、 q は本発明のアルブミン融合タンパク質中のアミノ酸残基の総数を表す整数である。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【0063】

さらに、上記NまたはC末端欠失のうちの任意のものを、NおよびC末端欠失参照ポリペプチドを製造するために組み合わせてもよい。本発明はまた、参照ポリペプチド(例えば、G-CSFタンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分、または血清アルブミン、または本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分、またはアルブミン融合タンパク質、または本発明のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合コンストラクトによりコードされるアルブミン融合タンパク質)の残基 m から n (n および m は、上に記載の整数である)を有すると一般に記載される場合がある、アミノ末端およびカルボキシル末端の両方から1個以上のアミノ酸が欠失したポリペプチドを提供する。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

40

【0064】

50

本願はまた、本明細書に記載の参照G-CSFポリペプチドまたは参照アルブミンポリペプチドあるいはそれらの断片と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるポリペプチドを含むタンパク質に関する。好ましい態様では、本願は、上記のNおよびC末端欠失のアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドと少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるポリペプチドを含むタンパク質に関する。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【0065】

好ましい本発明のポリペプチド断片は、G-CSFタンパク質または血清アルブミンタンパク質のポリペプチド配列の治療的活性および/または機能的活性(例えば、生物学的活性)を示すアミノ酸配列を含むかあるいはそれからなる断片であり、当該タンパク質のアミノ酸配列が断片である。

【0066】

他の好ましいポリペプチド断片は、生物学的に活性のある断片である。生物学的に活性のある断片は、本発明のポリペプチドの活性に類似しているが必ずしも同一ではない活性を示すものである。当該断片の生物学的活性には、所望の活性の向上、または望ましくない活性の減少が含まれてもよい。

【0067】

B. 変種

「変種」は、参照核酸またはポリペプチドとは異なるがそれらの本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたは核酸を指す。一般的に、変種は、全体として密接に類似し、多くの領域で参照核酸またはポリペプチドと同一である。

【0068】

本明細書では、「変種」は、本発明のアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分、または本発明のアルブミン融合タンパク質を指し、これらは、G-CSFタンパク質、アルブミンタンパク質、および/またはアルブミン融合タンパク質それぞれと配列が異なるが、本明細書の他の部分に記載するかまたはそうでなければ当技術分野で公知であるその少なくとも1つの機能的および/または治療的性質を保持する。一般に、変種は、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFタンパク質、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質、および/またはアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列に全体として非常に類似し、多くの領域で同一である。当該変種をコードする核酸も、本発明に包含される。

【0069】

本発明はまた、例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFタンパク質、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質、および/またはアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%同一であるアミノ酸配列を含むかあるいはそれからなるタンパク質に関する。これらのポリペプチドの断片も提供される。本発明により包含されるさらなるポリペプチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下(例えば、6xの塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45にて、フィルターに結合したDNAにハイブリダイゼーションさせ、次いで0.2xのSSC、0.1%SDS中で約50から65にて1回以上洗浄する)、非常にストリンジェントな条件下(例えば、6xの塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45にて、フィルターに結合したDNAにハイブリダイゼーションさせ、次いで0.1xのSSC、0.2%SDS中で約68にて1回以上洗浄する)、または当業者に公知の他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下(例えば、Ausubel, F. M. et al., eds., 1989 Current protocol in Molecular Biology, Green publishing associates, Inc.およびJohn Wiley & Sons Inc., New York, 6.3.1-6.3.6および2.10.3頁参照)で本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子の補体にハイブ

10

20

30

40

50

リダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドである。当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【0070】

問い合わせアミノ酸配列に少なくとも、例えば、95%「同一の」アミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象ポリペプチド配列が、問い合わせアミノ酸配列のアミノ酸100個当たりアミノ酸改変を最大で5個まで含み得るということを除いて、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が問い合わせ配列と同一であることが意図される。言い換えれば、問い合わせアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るため、対象配列のアミノ酸残基の最大5%までが、他のアミノ酸で、挿入、欠失、置換されてもよい。参照配列の当該改変は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間の任意の場所において、参照配列における残基が個々にまたは参照配列内の1つ以上の隣接する群で点在して起こってもよい。

10

【0071】

実際問題としては、任意の特定のポリペプチドが、本発明のアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列またはその断片(例えば、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分またはアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分)に対して少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるかどうかは、公知のコンピュータプログラムを用いて従来通りに決定することができる。グローバル配列アラインメントとも呼ばれる、問い合わせ配列(本発明の配列)と対象配列との間の最大の全体の整合性を決定する好ましい方法は、Brutlagらのアルゴリズムに基づいたFASTDBコンピュータプログラムを用いて決定することができる(Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990))。配列アラインメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列は両方がヌクレオチド配列であるかまたは両方がアミノ酸配列のいずれかである。グローバル配列アラインメントの結果では、同一性はパーセントで表される。FASTDBアミノ酸アライメントにおいて使用される好ましいパラメータは次のとおりである。Matrix=PAM 0, k-tuple=2, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Window Size=sequence length, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.05, Window Size=500または対象アミノ酸配列の長さのどちらか短い方。

20

【0072】

対象配列が、内部欠失のせいではなくNまたはC末端欠失により問い合わせ配列より短い場合、結果をマニュアル補正しないとイケない。これは、全体的な同一性をパーセントで計算する際に、FASTDBプログラムは対象配列のNおよびC末端切断を考慮しないからである。NおよびC末端で切断された対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性のパーセントは、対象配列のNおよびC末端側であり、対応する対象残基と一致/アライメントしない、問い合わせ配列の残基の数を、問い合わせ配列の塩基全体のパーセントとして計算することにより補正される。残基が一致/アライメントするかどうかはFASTDB配列アラインメントの結果により決定される。次にこのパーセントは、特定のパラメータを用いた上記のFASTDBプログラムにより計算された同一性のパーセントから減じられ、最終的なパーセント同一性スコアに達する。この最終的なパーセント同一性スコアは、本発明の目的に使用されるものである。問い合わせ配列と一致/アライメントしない対象配列のNおよびC末端側に対する残基のみ、パーセント同一性スコアをマニュアル補正する目的のために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いNおよびC末端残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

30

40

【0073】

例えば、90個のアミノ酸残基を有する対象配列は、同一性のパーセントを決定するために100個の残基を有する問い合わせ配列とアライメントされる。対象配列のN末端にて欠失が起こり、したがって、FASTDBアライメントは、N末端で最初の10残基の一致/アライメントを示さない。10個の不对残基は、配列の10%に相当し(一致しないNおよびC末端における残基数/問い合わせ配列中の残基の総数)、したがって、FASTDBプログラムにより計算されたパーセント同一性スコアから10%減じられる。残りの90残基が完全に一致する場合は、

50

最終的なパーセント同一性は90%になる。別の例では、90残基の対象配列は、100残基の問い合わせ配列と比較される。このとき、欠失は内部欠失であり、したがって、対象配列のNまたはC末端には、問い合わせ配列と一致/アライメントしない残基はない。この場合、FASTDBにより計算されたパーセント同一性は、マニュアル補正されない。再び、FASTDBアライメントで示されるように、問い合わせ配列と一致/アライメントしない対象配列のNおよびC末端の外側の残基位置のみ、マニュアル補正される。本発明の目的のためには、他のマニュアル補正は行われぬ。

【0074】

変種は、変種と同じ長さである正常HAまたはG-CSFタンパク質の長さ少なくとも約75% (他の態様では、少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%)の配列同一性を通常有する。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列レベルでの相同性または同一性は、配列類似性検索のために作られた、blastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxプログラムにより利用されるアルゴリズムを用いて、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)分析により決定される(Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990)およびAltschul, J. Mol. Evol. 36: 290-300 (1993)、全体として参照により組み入れられる)。

10

【0075】

BLASTプログラムにより使用される手法は、まず問い合わせ配列とデータベース配列との間の類似のセグメントを検討し、次に、同定された一致すべての統計的有意性を評価し、最後に、所定の重要性の閾値を満たす一致のみをまとめる。配列データベースの類似性検索に関する基本的な事柄の考察については、Altschulら(Nature Genetics 6: 119-129 (1994))参照。本書は全体として参照により組み入れられる。histogram、descriptions、alignments、expect(すなわち、データベース配列に対する一致を報告するための統計的有意性の閾値)、cutoff、matrix、およびfilterに対する探索パラメータは初期値である。blastp、blastx、tblastn、およびtblastxにより用いられるデフォルトスコアリングマトリクスは、BLOSUM62マトリクスである(Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992)、この文献は、全体として参照により組み入れられる)。blastnについては、スコアリングマトリクスは、N(すなわち、ミスマッチ残基のペナルティスコア)に対するM(すなわち、一对の一致する残基のリワードスコア)の比であり、ここで、MおよびNの初期値は、それぞれ5および-4である。4つのblastnパラメータは、以下のように調整されてもよい。Q=10(ギャップ生成ペナルティ);R=10(ギャップ伸張ペナルティ);wink=1(問い合わせに沿ってwinkth位置でワードヒットを生じる);およびgapw=16(これは分離したアラインメントが生成されるウィンドウ幅を設定する)。等価のBlastpパラメータ設定は、Q=9;R=2;wink=1;およびgapw=32である。GCGパッケージバージョン10.0で利用可能である、配列間のBestfit比較は、DNAパラメータGAP=50(ギャップ形成ペナルティ)およびLEN=3(ギャップ延長ペナルティ)を用い、タンパク質の比較における等価な設定は、GAP=8およびLEN=2である。

20

30

【0076】

本発明のポリヌクレオチド変種は、コード領域、非コード領域、または両方において改変を含んでもよい。特に好ましいものは、サイレント置換、付加、または欠失を生ずるが、コードされたポリペプチドの特性や活性を改変しない改変を含むポリヌクレオチド変種である。遺伝コードの縮重によるサイレント置換により産生したヌクレオチド変種が好ましい。さらに、50個未満、40個未満、30個未満、20個未満、10個未満、または5~50個、5~25個、5~10個、1~5個、または1~2個のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失、あるいは付加したポリペプチド変種も好ましい。ポリヌクレオチド変種は、例えば、特定の宿主に対してコドン発現を最適化するため(酵母または大腸菌などの細菌宿主に好まれるコドンにヒトmRNA中のコドンを変化させるため)などの種々の理由で産生され得る。

40

【0077】

好ましい態様では、アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分をコードする本発明のポリヌクレオチドは、酵母または哺乳類細胞における発現のために最適化される。さらな

50

る好ましい態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分をコードする本発明のポリヌクレオチドは、酵母または哺乳類細胞における発現のために最適化される。またさらに好ましい態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、酵母または哺乳類細胞における発現のために最適化される。

【0078】

別の態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、本明細書に記載のようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下ではG-CSFタンパク質をコードする野生型ポリヌクレオチドにはハイブリダイズしない。さらなる態様では、アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、本明細書に記載のようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下ではアルブミンタンパク質をコードする野生型ポリヌクレオチドにはハイブリダイズしない。他の態様では、アルブミン融合タンパク質をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、本明細書に記載のようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下ではG-CSFタンパク質部分またはアルブミンタンパク質部分をコードする野生型ポリヌクレオチドにはハイブリダイズしない。

10

【0079】

さらなる態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分をコードするポリヌクレオチドは、そのG-CSFタンパク質の天然に存在する配列を含まないかあるいはそれから成り立っていない。さらなる態様では、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンタンパク質の天然に存在する配列を含まないかあるいはそれから成り立っていない。別の態様では、アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、G-CSFタンパク質部分またはアルブミンタンパク質部分の天然に存在する配列を含まないかあるいはそれから成り立っていない。

20

【0080】

本発明のポリペプチドの特徴を向上または改変させるために、タンパク質工学および組換えDNA技術の公知の方法を使用して、変種を発生させてもよい。例えば、1個以上のアミノ酸を、生体機能の本質的な喪失を伴わないで本発明のポリペプチドのN末端またはC末端から欠失させることができる。

【0081】

好ましい態様では、本発明の変種は同類置換を有してもよい。「同類置換」とは、脂肪族または疎水性アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIleの置換；水酸基残基SerおよびThrの置換；酸性残基AspおよびGluの置換；アミド残基AsnおよびGlnの置換、塩基性残基Lys、Arg、およびHisの置換；芳香族残基Phe、Tyr、およびTrpの置換、ならびに低分子アミノ酸Ala、Ser、Thr、Met、およびGlyの置換などのグループ内での交換を指す。

30

【0082】

表現型的にサイレントなアミノ酸置換を行う方法に関する指針は、例えば、Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," *Science* 247:1306-1310 (1990)に提供されており、ここで著者らは、変化に対するアミノ酸配列の耐性を研究するには2つの主な戦略があることを示している。

【0083】

第一の戦略は、進化の過程での自然淘汰によるアミノ酸置換に対する耐性を利用する。異なる種におけるアミノ酸配列の比較により、保存されたアミノ酸を同定することができる。保存されたアミノ酸は、タンパク質機能にとって重要であると考えられる。対照的に、自然淘汰によって置換が許容されてきたアミノ酸の位置は、当該位置がタンパク質機能にとって重要でないことを示す。したがって、タンパク質の生物学的活性を維持しつつ、アミノ酸の置換が許容される位置が修飾され得る。

40

【0084】

第二の戦略は、タンパク質機能に重要な領域を同定するために、クローン化遺伝子の特定位置にアミノ酸の変更を導入する遺伝子工学を使用する。例えば、部位特異的変異誘発またはアラニン走査突然変異誘発(分子中の残基毎に単一アラニン変異を導入する)を使用

50

することができる。Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)参照。次いで、得られた変異体分子の生物学的活性を試験することができる。

【0085】

著者らが述べるように、これらの二つの戦略は、タンパク質がアミノ酸置換に対して驚くほど耐性があることを示した。著者らは、さらに、どのアミノ酸の変更が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容される可能性があるかを示す。例えば、最も深く埋まった(タンパク質の三次構造内で)アミノ酸残基は、非極性の側鎖を必要とする一方で、表面の側鎖の特徴は一般にほとんど保存されない。さらに、許容される同類アミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸Ala、Val、Leu、およびMetの置換;水酸基残基SerおよびThrの置換;酸性残基AspおよびGluの置換;アミド残基AsnおよびGlnの置換、塩基性残基Lys、Arg、およびHisの置換;芳香族残基Phe、Tyr、およびTrpの置換、ならびに低分子アミノ酸Ala、Ser、Thr、Met、およびGlyの置換を伴う。同類アミノ酸置換の他に、本発明の変種としては、(i)一種類以上の非保存アミノ酸残基の置換を含むポリペプチドであって、置換アミノ酸残基が遺伝コードによりコードされたものであってもなくてもよいポリペプチド、あるいは(ii)置換基を有する一種類以上のアミノ酸残基の置換を含むポリペプチド、あるいは(iii)ポリペプチドの安定性および/または溶解性を高める化合物(例えば、ポリエチレングリコール)などの他の化合物と融合したかまたは化学的に共役したポリペプチド、あるいは(iv)例えば、IgG Fc融合領域ペプチドなどのさらなるアミノ酸を含むポリペプチドが挙げられる。このような変種ポリペプチドは、本明細書の教示から当業者の範疇にあると見なされる。

10

20

【0086】

例えば、電荷を有するアミノ酸の、電荷を有するか中性の他のアミノ酸とのアミノ酸置換を含むポリペプチド変種は、改善した特徴(例えば、凝集しにくい)を有するタンパク質を産生する場合がある。医薬製剤の凝集は、凝集体の免疫原的活性によって、活性の低下およびクリアランスの増加の両方を起こす。Pinckard et al, Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al, Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)参照。

【0087】

特定の態様では、本発明のポリペプチドは、アルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列、G-CSFタンパク質のアミノ酸配列、および/またはヒト血清アルブミンの断片または変種を含むかあるいはそれからなり、ここで、当該断片または変種は、参照アミノ酸配列と比較すると、1~5、5~10、5~25、5~50、10~50、または50~150のアミノ酸残基の付加、置換、および/または欠失を有する。好ましい態様では、アミノ酸置換は同類的である。当該ポリペプチドをコードする核酸も本発明に包含される。

30

【0088】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または修飾ペプチド結合(すなわちペプチド同配体)により互いに連結されたアミノ酸からなることができ、20個の遺伝子コード化アミノ酸とは別のアミノ酸を含んでもよい。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、または当技術分野で周知の化学的修飾技術により修飾されてもよい。このような修飾は、基礎的な教科書やさらに詳しい学術論文、また多数の研究文献に十分に記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノもしくはカルボキシル末端を含むポリペプチド中の任意の場所で起こり得る。なお、同じタイプの修飾が、所与のポリペプチド中のいくつかの部位において同一または異なった程度で存在する場合がある。また、所与のポリペプチドは、様々なタイプの修飾を含む場合がある。ポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果、分岐してもよく、ポリペプチドは、分岐の有無にかかわらず環状であってもよい。環状、分岐、および環状分岐ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセスに起因してもよいし、人工的な方法により作製されてもよい。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質の誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol)の共有結合、架橋、環化、

40

50

ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合による架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、トランスファーRNAが仲介するタンパク質へのアミノ酸の付加(例えば、アルギニル化)、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al, Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:4862 (1992)参照)。

10

【0089】

C. 機能的活性

「機能的活性を有するポリペプチド」は、完全長、前駆タンパク質、および/または成熟型G-CSFタンパク質に関連する1つ以上の公知の機能的活性を示すことができるポリペプチドを指す。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性[抗ポリペプチド抗体に結合する(または結合をめぐってポリペプチドと競合する)能力]、免疫原性(本発明の特定のポリペプチドに結合する抗体を生じる能力)、本発明のポリペプチドで多量体を形成する能力、およびポリペプチドの受容体またはリガンドに結合する能力が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0090】

「生物学的活性を有するポリペプチド」は、用量依存性に関わらず、特定のバイオアッセイ中で測定される、本発明のG-CSFタンパク質(成熟型を含む)の活性に類似(必ずしも同一ではない)した活性を示すポリペプチドを指す。

20

【0091】

好ましい態様では、本発明のアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合していない場合のG-CSFタンパク質部分(またはその断片もしくは変種)に関連する少なくとも1つの生物学的および/または治療的活性を有する。

【0092】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、当技術分野で公知のアッセイや本明細書に記載のアッセイを使用するかまたは常法によって変更して、機能的活性(例えば、生物学的活性)を分析することができる。さらに、当業者であれば、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFタンパク質の断片を常法によって測定し得る。さらに、当業者であれば、当技術分野で公知のおよび/または下記の実施例部分に記載のアッセイを使用して、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質の断片の活性を常法によって測定し得る。

30

【0093】

例えば、一態様では、アルブミン融合タンパク質の、抗G-CSFポリペプチド抗体および/または抗アルブミン抗体へ結合する能力、あるいはそれらへの結合をめぐってG-CSFタンパク質と競合する能力を測定する場合、当技術分野において公知の様々な免疫測定法を使用することができるが、それらに限定されるわけではない:放射免疫測定、ELISA(酵素結合免疫吸着測定)、「サンドイッチ」免疫測定、免疫放射線測定、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散測定、インサイチュー免疫測定(例えば、コロイド金、酵素、または放射性同位体標識を使用)、ウエスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ(例えば、ゲル凝集測定、赤血球凝集反応測定)、補体結合測定、免疫蛍光測定、プロテインA測定、および免疫電気泳動法測定などの技術を使用した拮抗的および非拮抗的アッセイ系が挙げられる。一態様では、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することにより検出される。別の態様では、一次抗体は、一次抗体への二次抗体または試薬の結合を検出することにより検出される。さらなる態様では、二次抗体が標識される。免疫測定における結合を検出するための多くの手段が当技術分野において公知であり、当該手段は本発明の範囲内である。

40

【0094】

50

好ましい態様では、G-CSFタンパク質の結合相手(例えば、受容体またはリガンド)が同定される場合、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分として当該G-CSFタンパク質を含むアルブミン融合タンパク質による当該結合相手への結合は、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティープロットングなどの当技術分野において周知の手段によりアッセイすることができる。一般的にはPhizicky et al., Microbiol. Rev. 59:94-123 (1995)参照。他の態様では、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFポリペプチドの受容体に結合する、アルブミン融合タンパク質の生理学的相関物の能力は、当技術分野において公知の技術を使用して常法によって測定することができる。

【0095】

別の態様では、アルブミン融合タンパク質が多量体を形成する能力が評価される場合、多量体の他の成分との会合は、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティープロットングなどの当技術分野において周知の手段によりアッセイすることができる。一般的には上述のPhizickyら参照。

【0096】

タンパク質の結合、交差反応性、または同一性を分析するために使用することができる免疫測定法としては、下記のもものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない: ウエスタンブロット、放射免疫測定、ELISA(酵素結合免疫吸着測定)、「サンドイッチ」免疫測定、免疫沈降測定、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散測定、凝集測定、補体結合測定、免疫放射線測定、蛍光免疫測定、およびプロテインA免疫測定などの技術を使用した拮抗的および非拮抗的アッセイ系が挙げられる。このようなアッセイは、当技術分野において常法であり周知である(Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York参照。当該文献はその全体において参照により本明細書に組み入れられる)。

【0097】

アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分に対応するG-CSFタンパク質に結合する抗体も、所与のタンパク質または抗原、好ましくは抗体が特異的に結合する抗原、に対する結合親和性の点から説明または規定されてもよい。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 未満の解離定数またはKdが挙げられる。より好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、もしくは 10^{-8}M 未満の解離定数またはKdが挙げられる。さらに好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、もしくは 10^{-15}M 未満の解離定数またはKdが挙げられる。さらに、本明細書に記載されているかそうでなければ当技術分野で公知のアッセイが、アルブミン融合タンパク質ならびにその断片、変種、および誘導体の、アルブミン融合タンパク質のG-CSFタンパク質部分および/またはアルブミン部分のいずれかに関連する生物学的活性および/またはG-CSF活性を誘発(インビトロやインビボのいずれかで)する能力を測定するために慣例的に適用され得る。他の方法も当業者には公知であり、本発明の範囲内である。

【0098】

V. G-CSFとHSAとの融合タンパク質

組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子(rHA-G-CSF)はG-CSFアナログである。rHA-G-CSFの例は、米国特許第5,665,863号および米国特許第7,041,478号に記載されており、これらはいずれも参照により本明細書に組み入れられる。

【0099】

rHA-G-CSFの別の例は、Teva Biopharmaceuticals USA LTDにより開発されたNeugranin(商標)(「NEUG」)である。NEUGは、約85 kDaの分子量を有する融合ポリペプチドである。NEUGは、759個のアミノ酸の一本鎖ポリペプチドであり、残基1~585は成熟型HSAに対応し、残基586~759は成熟型ヒトG-CSFに対応する。NEUG融合タンパク質のアミノ酸配列を図1

10

20

30

40

50

に示す。

【0100】

VI. 融合タンパク質の産生

rHA-G-CSFの合成方法の例は、米国特許出願番号第11/929,828号に記載されており、これはその全体において参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様では、NEUGは、NEUG融合タンパク質を発現するように遺伝子操作された酵母宿主系(例えば、サッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*))を用いて産生される。NEUGは、酵母培養物の発酵培地から集菌され、当技術分野で周知の方法を用いて精製される(例えば、一連のクロマトグラフィーおよび過工程、例えば、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなど)。

10

【0101】

非限定的な一例では、NEUG融合コンストラクトは以下のように開発された。完全長アルブミンcDNAは、英国オックスフォード大学にてF. E. Baralle博士の実験室でヒトcDNAライブラリーから単離された。このクローンは、プラスミドpAT153ALBとして、英国ノッティンガムのDelta Biotechnology Limitedへ送付された。さらに、6-アミノ酸HSAプロペプチド(RGVFRR)は、酵母(RSLDKR)でのより効率的なプロセッシングを促進するように修飾された。

【0102】

NEUG産生プラスミド、すなわち修飾pSAC35に基づいた発現ベクターは、野生型サッカロミセス・セレビジエで発見された2 μ プラスミドに基づいている。pSAC35に基づいた発現ベクター(欧州特許286 424 B、米国特許第5,637,504号)は、S・セレビジエ産生宿主のロイシン欠乏を補完する選択マーカーとしてサッカロミセス・セレビジエからのLEU2遺伝子を含む。この産生プラスミドはまた、強力な酵母プロモーターであるPRB1ならびに大腸菌におけるクローニングおよび増殖を可能にするプラスミドpUC9からの配列を含む。さらに、このプラスミドは、酵母に形質転換されると、大腸菌における増殖に必要なpUC9由来配列を排除する。これは、酵母においては、隣接するFLP認識標的(FRT)とプラスミドからの酵母FLPリコンビナーゼの発現により達成される。したがって、NEUGの産生に使用される生体中には細菌DNAは存在しない。これは、マスターセルバンクを作成した後、酵母からの2 μ mプラスミドのレスキュー実験および配列決定により確認される。

20

【0103】

上に記載のように、CID1643(pSAC35:HSA.GCSF(T31-P204))と命名されたNEUG産生プラスミドは、pSAC35に基づいた発現ベクターに由来した。ヒトG-CSFのT31-P204に対応する領域は、HSAオープンリーディングフレームの3'末端へのシームレスな融合を可能にするために適切な5'および3'制限部位を加えながら、PCRにより増幅した。

30

【0104】

メリーランド州ロックビルのHuman Genome Sciences, Inc.(HGS)では、cGMPマスターセルバンクを作成するためにNEUGシードバイアルを使用した。NEUGマスターセルバンクの試験および特性評価は、ICHガイドラインQ5D(Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biologicals Products)に従ってCharles River Laboratories(マルバーン、ペンシルベニア州、米国)およびLark Technologies(ヒューストン、テキサス州、米国)にて行われた。

40

【0105】

次いで、このマスターセルバンクに由来したcGMPのワーキングセルバンクが、Charles River Laboratories(マルバーン、ペンシルベニア州、米国)にて作成され試験された。

【0106】

NEUG細胞株バンクの製造で使用した培地成分はすべて、合成されたか、生合成されたか、または植物由来のものであった。細胞株または細胞バンク作成の際には、動物またはヒト起源の成分は使用されなかった。

【0107】

セルバンクは、めねじ付の蓋を有する予め殺菌した1.8mL Nuncポリプロピレンチューブ

50

において低温保存培地中で<-135にて保存される。

【0108】

医薬用途向けのrHSA-G-CSF融合タンパク質の単離、精製、および調製方法の非限定的な例を、図21に示す。製剤化した原薬は、オートクレーブ滅菌したテフロン瓶へ0.2µmフィルタを用いて無菌ろ過する。液体の原薬は、約-80にて凍結した状態で保存される(公称値、保存温度の許容範囲は約-65である)。

【0109】

輸送や臨床現場での保存のための製剤のロバスト性を向上させるため、ならびに期待される長期保存性を有する安定した製品を提供するため、NEUGは、当技術分野で周知の方法により凍結乾燥してもよい。

【0110】

VII. 白血球減少症および好中球減少症の典型的な原因

上に記載のように、白血球減少症は循環する白血球(WBC)数の減少であり、好中球減少症は血中好中球数の減少を特徴とし、しばしば細菌感染や真菌感染に対する感受性の増加につながる。以下は、白血球減少症または好中球減少症を発症するリスクにヒト被験者をさらす可能性のある因子の非包括的なリストである:薬剤(例えば、フェニトイン、クロラムフェニコール、サルファ剤、および化学療法剤);ビタミンB12または葉酸欠乏症;過剰な飲酒;骨髄に關与する癌またはその他の病気(例えば、再生不良性貧血、異常ガンマグロブリン血症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、ヘモグロビン血症、脊髄形成異常、骨髄異形成症候群、骨髄繊維症、白血病、骨髄腫、リンパ腫、または骨髄を浸潤し置換する転移性固形腫瘍);ウイルス感染症(例えば、インフルエンザ、HIV、早期伝染性単核球症、幼年期ウイルス性疾患);細菌感染症(例えば、結核);放射線;毒素(例えば、ベンゼンおよび殺虫剤);骨髄機能不全(例えば、シュワヒマン-ダイアモンド症候群、軟骨毛髪形成不全症、先天性角化異常症、IB型糖原貯蔵障害);脾臓障害、何らかの原因による脾腫;骨髄細胞またはその前駆体の内在性異常;アレルギー性疾患;自己免疫疾患;T-リンパ増殖性疾患(T-LPD);血液透析または移植;毒素。

【0111】

化学療法レジメン(例えば、細胞毒性を有する化学療法レジメン)などの様々な薬剤は、発熱性好中球減少症の高い危険性(例えば、>20%危険性)を伴う。いくつかの化学療法レジメンでは、G-CSF治療の非存在下での発熱性好中球減少症の発生率は、約40%(例えば、静脈内ドキソルピシンおよびドセタキセルの化学療法レジメン)である。発熱性好中球減少症の危険性を伴う様々な癌および治療レジメンの非限定的な例を下記表1に記載する。いくつかの態様では、そのような薬物治療剤の投与に関連する好中球減少症を予防、治療、または改善するために、図1のHSA-G-CSF融合タンパク質が患者に投与される。

【0112】

(表1) 発熱性好中球減少症を伴う癌および治療レジメンの例

10

20

30

癌	治療剤
膀胱がん	MVAC(メトトレキサート、ビンブラスチン、ドキソルビシン、シスプラチン)(ネオアジュバント、アジュバント、転移性)
乳癌	ドセタキセル+トラスツズマブ(転移性または再発性) 投与集中AC-T(ドキソルビシン、シクロホスファミド、パクリタキセル)(アジュバント) AT(ドキソルビシン、パクリタキセル)(転移性または再発性) AT(ドキソルビシン、ドセタキセル)(転移性または再発性) TAC(ドセタキセル、ドキソルビシン、シクロホスファミド)(アジュバント)
食道癌および胃癌	ドセタキセル/シスプラチン/フルオロウラシル
非ホジキンリンパ腫	ICE(イホスファミド、カルボプラチン、エトポシド)(びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、セカンドライン、サルベージ) RICE(リツキシマブ、イホスファミド、カルボプラチン、エトポシド) CHOP-14(シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾン) MINE(メスナ、イホスファミド、ノバントロン、およびエトポシド)(びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、セカンドライン、難治性) DHAP(デキサメタゾン、シスプラチン、シタラビン)(末梢T細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、セカンドライン) ESHAP(エトポシド、メチルプレドニゾン、シスプラチン、シタラビン)(びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、セカンドライン、再発性) BEACOPP(プレオマイシン、エトポシド、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾン) HyperCVAD+リツキシマブ(シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、デキサメタゾン+リツキシマブ)(バーキットリンパ腫)
メラノーマ	ダカルバジンに基づいた組み合わせ(ダカルバジン、シスプラチン、ビンブラスチン)(進行性、転移性、または再発性) IL-2、インターフェロン α とのダカルバジンに基づいた組み合わせ(ダカルバジン、シスプラチン、ビンブラスチン、IL-2、インターフェロン α)(進行性、転移性、再発性)
骨髄異形成症候群	デシタビン
卵巣癌	トポテカン パクリタキセル

10

20

30

癌	治療剤
	ドセタキセル
膵臓癌	ゲムシタビン/ドセタキセル
肉腫	MAID(メスナ、ドキソルビシン、イホスファミド、ダカルバジン) ドキソルビシン
肺小細胞癌	トポテカン
精巣癌	VeIP(ビンブラスチン、イホスファミド、シスプラチン) VIP(エトポシド、イホスファミド、シスプラチン) BEP(プレオマイシン、エトポシド、シスプラチン) TIP(パクリタキセル、イホスファミド、シスプラチン)

40

【 0 1 1 3 】

小細胞肺癌に対する細胞毒性治療レジメン(例えば、エトポシドとシスプラチン、なら

50

びにCAE)も、発熱性好中球減少症と関連している。

【0114】

様々な好中球減少症が公知であり、いくつかの態様では、図1のHSA-G-CSF融合タンパク質は、化学療法誘発性好中球減少症、原発性好中球減少症、急性好中球減少症、重度の慢性好中球減少症(SCN)、重度の先天性好中球減少症(コストマン症候群)、重度の小児遺伝性無顆粒球症、良性好中球減少症、周期性好中球減少症、慢性特発性好中球減少症、続発性好中球減少症、好中球減少症関連症候群、または免疫媒介好中球減少症を含むがこれらに限定されない一種類以上の好中球減少症を予防、治療、あるいは改善するために使用される。

【実施例】

10

【0115】

VIII. 実験例

以下の実施例は本発明を例証するものである。しかしながら、本発明は、当該実施例に記載の特定の条件または詳細に限定されるものではないことを理解されたい。限定されるものではないが米国特許を含む本明細書で参照する公開されている文献はいずれも参照により本明細書に組み入れられる。

【0116】

以下の非限定的な実施例において、Neugranin(商標)(「NEUG」)は細胞上ならびにマウスおよびサルにおいて試験し、乳癌の治療のための薬物治療(例えば、化学療法)が原因となったヒト被験者における好中球減少症および/または白血球減少症を予防、治療、または改善するためにも使用した。

20

【0117】

NEUGは、活性を有するG-CSF部分のヒト血清アルブミンに対する融合に起因して血漿クリアランス率が減少したG-CSFアナログである。結果として生じる完全に組換えられたタンパク質は、インビボでG-CSFの薬理活性を保持している、つまり、骨髄から末梢血流へ好中球および造血幹細胞の動員を促す。このタンパク質の活性は、マウスおよびサルにおいて評価した(下記の実験例を参照)。観察される好中球数および造血前駆細胞数の増加の開始は迅速であり、一回の投与後、数日間持続した。当該効果は用量依存的であり、より低い用量と比較すると、より高い用量では、NEUGに対する反応の程度および期間がより大きかった。NEUGのクリアランスは、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)より遅かった。NEUGの単回投与および反復投与後の血液好中球増加症の反応速度(kinetics)は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)で治療された動物で観察されたものとほぼ同じであった。NEUGは、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)よりも4.5倍大きい(質量基準で)ので、より大きな用量(重量基準で)であるが等モル量のNEUGは、インビボにおいて類似の効果を達成するために使用することができる。サルでは、等モル量のNEUGはペグフィルグラスチムと同等の効果があり、マウスでは、1.5倍多い量のNEUGは、同等のAUC_{ANC}を達成することが示された。これらの試験では、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)1mgが、NEUG4.5~7.7mgと効果において等価だった。この文脈に関連して、サルにおいて示されたNEUGの無毒性量(「NOAEL」)は、1mg/kg/週を上回った。サルにおける1mg/kgの用量は、0.45mg/kgのNEUGが投与されたヒト患者で観察されたものよりも約12倍高い曝露(C_{max}およびAUC)をもたらした。したがって、サルで示されたNOAELは、NEUGの臨床評価に使用された用量範囲より高い(下記参照)。

30

40

【0118】

全体としては、試験は、等モル量のNEUGがNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)に類似の薬理効果をもたらし、ヒトにおける顆粒球集団に対する類似の効果を有することを示す。

【0119】

A. NEUGのインビトロおよびインビボ試験

NEUGのインビトロおよびインビボ試験の結果を次のようにまとめ、下記実験例で詳述する。

50

【 0 1 2 0 】

インビトロ薬理試験は次のことを示した：

1. NEUGは、用量依存的にNFS-60細胞の増殖を誘導する。
2. NEUGは、インビトロで、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)の約1/3の効能である。
3. NEUGは、モル基準で評価するとNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)と効力が等しい(Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)1mgは、NEUG4.5mgと効果が等しい)。

【 0 1 2 1 】

インビボ薬理試験により、以下のNEUGの特性が示された：

1. NEUGは、マウスおよびカニクイザルにおいて耐容性が良好であった。 10
2. マウスでは、NEUGの単回投与は、末梢血中の好中球および造血前駆細胞の用量依存的で迅速かつ持続的な増加を誘導した。現在の市販されているG-CSF製品と比較すると、好中球数および前駆細胞数の増加は、等モル量のNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)により達成されるものよりも持続期間が長く、等モル量のNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)での持続期間および程度に類似していた。
3. マウスでは、等価量およびAUC_{ANC}は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)よりも7.7倍高いミリグラム用量のNEUGで達成された。
4. 等モル量のNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の単回注射投与は、5-FU誘発性好中球減少症のマウスでは、類似の反応速度および効果の程度で、効果的に好中球の回復を促進した。 20
5. NEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の単回および反復(毎週1回)投与は、サルにおける末梢好中球数の類似の増加を誘導する。等モル量では、サルにおける好中球増加の程度および持続期間のいずれにおいても、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)で治療された動物とNEUGで治療された動物とで類似した。
6. マウスおよびサルのいずれにおいても、IVまたはSC投与されると、NEUGは、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)よりも、クリアランスが遅く、終末相半減期が長く、かつ平均滞留時間が長い。
7. カニクイザルでは、SC注射後、NEUGの終末相半減期(12.6時間)は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)のもの(9.49時間)よりも約33%長く、NEUGのクリアランス対バイオアベイラビリティ(「CL/F」)は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の約半分である。 30
8. NEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)両方のクリアランスは、正常なマウスよりも5-FU誘発性血球減少症を経たマウスで遅く、これは両方のタンパク質の受容体仲介性クリアランスがそれらのクリアランスに寄与することを示唆している。
9. 腎排泄(ラットで評価)は、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)のクリアランスに有意に寄与し、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)に若干影響し、NEUGのクリアランスに実質的に寄与しない。
10. NEUG(ヒト血清アルブミンおよびヒトコロニー刺激因子からなるヒトタンパク質)は、マウスおよびカニクイザルにおいて免疫原性がある。Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)は、サルにおいて類似の発生率および抗体力価を誘導した。NEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)で処理された数匹のサルからの抗体は、インビトロで中和性であり、NEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)のいずれも、繰り返し曝露されるにつれて好中球反応は減少したが、抗体陽性動物は、回復の際に、抗体陰性動物と類似の好中球の基礎レベルを有していた。 40

【 0 1 2 2 】

これらをもとにすると、NEUGのインビトロおよびインビボ薬理的性質は、NEUGが、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)およびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)と類似した様式で作用し、血流中への好中球および造血細胞の動員を同様に促進するということを示唆する。非限定的なインビトロおよびインビボ実験例を下に記載する。

【 0 1 2 3 】

実施例1:NFS-60細胞増殖

NSF-60は、G-CSF活性の測定のためにバイオアッセイ中で慣例的に使用される細胞株である。この細胞株は、G-CSFに反応して増殖速度が増加する。組換えG-CSF(Neupogen(登録商標)、フィルグラスチム)およびNEUGの相対効力を比較した。

【0124】

NFS-60細胞増殖を刺激するNEUGおよびNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)の効果を測定するため、様々な濃度のこれらアナログへの24時間の曝露後に³H-チミジン取込み反応を測定した。EC₅₀値を得て、質量単位(ng/ml)で表した。

【0125】

簡潔に説明すると、記載の量のNEUG(Albugraninとも呼ばれる)またはNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)を含む200 μl最終容量の完全培地に、1x10⁵のNFS-60細胞/ウェルで、96ウェルプレートに播種した。試料はすべて三つ組で測定を行った。細胞は30で24時間インキュベーションし、最後の4時間は0.5 μCiの³H-チミジン/ウェルでパルス化した。チミジンの取り込みは増殖の指標として使用した(図8)。

10

【0126】

NEUGおよびNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)は、用量依存的に増殖を刺激した。このアッセイでは、質量基準で比較すると、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)は、NEUGよりも15倍効力があつた。NEUGは、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)よりも約4.5倍多く(質量で)、したがって、モル基準で表すと、このアッセイでは、NEUGは、インビトロで、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)の約1/3の効能であつた。

20

【0127】

Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)は組換えG-CSFの重量に基づいてバイアルに入れられ、ここでポリエチレングリコール修飾の質量は用量計算には含まれていない。NEUGは、HSAが質量的に寄与するため、組換えG-CSFよりも4.5x大きく、したがってNFS-60細胞増殖を誘導するNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の能力を比較するためには、等モル量のNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の力価を比較し、EC₅₀をモル濃度として表した。簡潔に説明すると、記載の量のNEUG(Albugranin)またはNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)を含む200 μl最終容量の完全培地に、1x10⁵のNFS-60細胞/ウェルで、96ウェルプレートに播種した。試料はすべて三つ組で測定を行った。細胞は37で20時間インキュベーションし、最後の4時間は0.5 μCiの³H-チミジン/ウェルでパルス化した。チミジンの取り込みは増殖の指標として使用した。結果を図9に示す。

30

【0128】

実施例2:BDF-1マウスにおけるNEUGおよびNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)の比較

この試験の目的は、BDF-1マウスにおける末梢血好中球および造血幹細胞に対するNEUGの単回皮下投与の効果を評価することであつた。BDF-1マウスは、NEUGを3種類の用量レベル(0.25mg/kg、1.25mg/kg、もしくは5.0mg/kg)で、またはNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)を2種類の用量レベル(0.25mg/kgおよび1.25mg/kg)で、単回投与で皮下注射(「SC」)した。末梢顆粒球(Gr.1+)および造血前駆細胞(c-kit+)は、1日目から5日目まで毎日フローサイトメトリーにより定量し、ビヒクルで処置した動物で得られたレベルと比較した。

40

【0129】

ビヒクルで処置した動物と比較すると、NEUGおよびNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)はいずれも、末梢好中球数を増加させたが、反応の速度および程度は異なつていた(図10)。Neupogen(登録商標)(ペグフィルグラスチム)群では、1日目に最大で3倍の好中球数の増加が起こり、2日目までに好中球は正常なレベルに戻つた。対照的に、NEUGの単回投与は、同等量のNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)に類似した程度にまで好中球数を上昇させた一方で、好中球数は、NEUG群では上昇を続け、用量依存的に反応速度および程度がピークに達した。0.25、1.25、および5.0mg/kgのNEUG用量では、ビヒクルで処置した動物で得られた好中球数の5.4、10、および24倍のピーク好中球数になつた。低いほう

50

の2種類の用量では2日目に好中球数の上昇がピークに達した一方で、試験した最も高い用量では4日目にピークに達した。好中球は、NEUG 0.25、1.25、および5.0mg/kgでそれぞれ、3、4、および5日目に正常なレベルに戻った(図10)。図10に示すように、NEUGに誘導された末梢血好中球の増加は、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)に誘導されたものよりも程度が大きくかつ期間が長かった。

【0130】

この試験における末梢造血(c-kit+)幹細胞数に対するNEUGおよびNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)治療の結果は、末梢好中球に関して得られた結果に非常に類似していた(図11)。NEUGの効果は用量依存的であり、1日目は同等量のNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)に類似していたが、2~4日目に上昇を続け、全治療群で、5日目までにビヒクルにより規定されたベースラインまで戻った。図11に示すように、NEUGに誘導されたc-kit+細胞の増加は、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)に誘導されたものよりも程度が大きくかつ期間が長かった。

10

【0131】

実施例3:BDF-1マウスにおけるNEUGとNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)との比較

この試験の目的は、BDF-1マウスの末梢血中の末梢血好中球および造血前駆細胞に対するNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の単回皮下(SC)注射の効果を比較することであった。これは、NEUGを5mg/kgまたは10mg/kgの1回量でBDF-1マウス(n=5)に注射することにより評価した。NEUGの効果と、単回投与として投薬した等モル量のペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))(1.12mg/kgおよび2.24mg/kg)の効果と比較した。Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)およびNEUGのこれらの2種類の用量はほぼ等モルである。

20

【0132】

結果を図12に示す。NEUG(5mg/kgおよび10mg/kg)またはNeulasta(登録商標)(1.12mg/kgおよび2.24mg/kg)の単回投与は、BDF-1マウスにおける末梢顆粒球数および造血前駆細胞数を効果的に増加させた。この実験では、末梢顆粒球の動員が、NEUG5mg/kgで3日目に、NEUG10mg/kgで4日目に最大となった。顆粒球は、NEUG治療後6日目に正常なレベルに戻った。1回量のNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)を投与したマウスでは、顆粒球の動員が4日目に最大となった。2.25mg/kgでNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)が投与されたマウスにおけるANCは、薬剤投与後6日目でもベースラインよりなお有意に高かった(p=0.036)一方、1.12mg/kg投与されたマウスにおける絶対好中球数(ANC)は、6日目に正常に戻った(図12A)。

30

【0133】

マウスでの相対効力を評価するために、PD曲線下面積(AUC_{ANC})対等モル量(nmol/kg)を計算した(図12B)。用量反応を示す線は並行であり、これはAUC_{ANC}がこのモデルにおいて適切な比較手段を提供していることを示唆している。AUC_{ANC}は、両方のG-CSFアナログに関しては明らかに用量依存的であった。この実験では、重量基準でのNEUGに対するNeulastaの相対効力は7.7であった。すなわち、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)1mg(rhG-CSF重量に基づいて病院で投与される)は、NEUG7.7mgと効果が同等である。これは、NEUGとNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)との間の4.5倍の分子量差よりも約1.5倍高い。

40

【0134】

NEUGまたはNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の単回投与は、末梢血中の造血前駆細胞の総数を有意に(p<0.05)増加させた(図15)。NEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)で治療された群の両方で、造血前駆細胞の動員が4日目に最大となった。NEUGが10mg/kgおよびNeulastaが1.12mg/kgおよび2.24mg/kgでは、c-kit+細胞の同様な増加を誘導した(p<0.0001)。5mg/kg用量のNEUGは、HSA対照と比較して、統計的に有意(p<0.0001)なc-kit+細胞の増加をもたらしたが、この増加は、両方のNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)群で観察されたものよりも約50%少なく、2倍高い用量では最大c-k

50

it+細胞数が増加したので準最大(sub-maximal)のようであった(図15)。

【0135】

実施例4:5-FU誘発性好中球減少症BDF-1マウスにおけるNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の比較

G-CSF製品は、骨髄抑制性化学療法後に好中球の回復を促進するために臨床使用される。この試験の目的は、致死未満量の5-FU(150mg/kg)により好中球減少症が誘導されたモデルにおける好中球の回復に対するNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の単回皮下(SC)注射の効果を比較することであった。BDF1マウスに、NEUGを5mg/kgまたは10mg/kg単回投与した。NEUGの効果は、Neulasta(1.12mg/kg、NEUG5mg/kgに対する等モル量)の単回投与の効果と比較した。薬剤はいずれも5-FU単回投与の1日後に投与した。末梢血好中球数は、6日目から10日目まで毎日測定した。この期間では、5-FUが投与されたマウスは、好中球の最下点に続く遅い回復期によって特徴付けられる。実験は、好中球回復の時間および程度に対するNEUGの効果を測定するように設計された。

10

【0136】

5-FU投与の1日後にピヒクル対照またはHSAを注射されたマウスは、6日目までに好中球が最下点に達した(図16)。好中球レベルは、10日目までに回復し始めた。対照的に、マウスは、5-FU投与後1日目にNEUGまたはNeulastaのいずれかで治療されると、好中球減少症からの回復が促進された。ピヒクル対照と比較して、すべての用量レベルにおいてどちらの薬剤を用いた治療も、統計的に有意な好中球数の増加をもたらした。9日目では、5mg/kgで投与したNEUGの効果は、等モル量のNeulasta(1.12mg/kg)により達成された効果と比較すると、低かった(p=0.0048)。しかしながら、10日目までに、両方の薬剤は、末梢好中球の総数の同様な増加をもたらした。

20

【0137】

マウス試験データをまとめると、正常なマウスにNEUGを単回投与すると、末梢血中の好中球(Gr.1+細胞)および造血前駆細胞(c-kit+)の用量依存的で迅速かつ持続性の増加を効果的に誘導した。NEUGに対する反応は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)により誘導された反応と類似していたが、この試験では、NEUGに対する最大反応は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)と比べて僅かに遅かった。Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)の単回投与は、末梢血中の好中球数および造血前駆細胞数の一過性の増加のみ引き起こした。IP注射した致死未満量の5-FUが骨髄抑制および末梢好中球減少症を誘導した臨床的に関連する血球減少症のマウスモデルを使用すると、NEUGまたはNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の単回投与は、効果的に好中球の回復を改善した。

30

【0138】

実施例5:カニクイザルにおけるNEUG試験

NEUGの反復投与の効果を測定するためにカニクイザルを選択した。NEUGの反復投与後に血液学的な連続評価を行い、サルでの2種類の試験、すなわちNEUGおよびNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)の皮下投与を比較する2週間の薬理試験、ならびに皮下および静脈内NEUGの効果と皮下Neulasta(登録商標)(フィルグラスチム)の効果とを比較する、より長い(5か月)免疫原性試験を行った。試験はいずれも、NEUGが、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)と類似する効力および薬力学的プロファイルで、サルにおいて末梢血好中球の持続的な増加をもたらすことを示す。

40

【0139】

実施例6:サルにおけるNEUGの2週間にわたる薬理試験

サルにおけるNEUGの薬力を評価するために、効能評価項目として血液学的パラメータを用いて2週間にわたる反復用量試験を行った。実験的に未処理(experimentally naive)のカニクイザルのオスおよびメス20匹を、無作為に各群オス2匹およびメス2匹の5治療群へ分けた。サルは、肩甲部の中央に、ピヒクル、NEUG、またはNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)を皮下(「SC」)注射した。試験の14日間の治療期間の間、ピヒクルは4日毎(Q4D)に投与され、NEUGは4日毎(Q4D)に25 µg/kgまたは4日もしくは7日毎(それぞれQ4DもしくはQ7D)に100 µg/kg投与され、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)は毎日5 µg/kg投

50

与された。

【0140】

NEUGは、25 µg/kgまたは100 µg/kgで4日毎の頻度で投与されてカニクイザルによって良好な耐容性が示され、副作用は無かった。血液学的な変化は主に、NEUG誘発性末梢血好中球増加からなり、末梢血単核球増加は顕著でなかった。100 µg/kgのSC投与の24時間後に好中球の増加はピークを迎えた(図17)。NEUGを4日毎に25 µg/kgまたはNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)を毎日5 µg/kg投与すると、好中球の中程度の増加をもたらし、これは投与第2週ではビヒクルと比較すると有意であった。NEUGに起因する血液学的変化はすべて、処置を行わない2週間の回復期間中に完全に回復した。

【0141】

他の所見

単核細胞数はG-CSFに反応して末梢にて増加することが報告されているが、好中球で観察されるよりも程度は劣る。この試験では、4日毎に投与された100 µg/kgのNEUGだけが、単核球の絶対数の増加を誘導した。末梢血リンパ球の絶対数は、NEUGまたはNeupogen(登録商標)(フィルグラスチム)のどちらで治療しても影響されなかった。

【0142】

実施例7:サルにおけるIVおよびSC NEUGのSC Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)との比較。

カニクイザルにおけるNEUGの非GLP反復用量投与試験は、主に免疫原性を評価する目的で行った(Covance Study No. 6962-129)。血液学的パラメータは、試験評価項目として評価し、この試験はまた、等モル量のNEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)を比較するのに有用な薬理情報を提供する。NEUGおよびNeulastaはいずれも、毎週1回3週間投与された。図18は、NEUGまたはNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の最初の3回の投与後のANCを示す。

【0143】

この試験では、SCおよびIV投与されたNeugraninならびに等モル量でSC投与されたNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)は、末梢血好中球の有意な増加をもたらした(ビヒクルと比較して <0.0001)。好中球反応の程度および速度はいずれも、これらの3つの群でほとんど同じであった。

【0144】

実施例8:薬物動態

NEUGの薬物動態は、正常BDF-1マウスにおいて単回IVまたはSC注射後に、そして5-FUで治療された好中球減少症BDF-1マウスにおいてSC注射後に、そして腎摘出を受けたラットにおいてIV注射後に、そしてカニクイザルにおいて単回および複数回IVおよびSC注射後に評価した。さらに、rhG-CSF(Neupogen(登録商標))のPKおよびペグ化rhG-CSF(Neulasta(登録商標))のPKを比較した。これらの試験を下記にまとめる。

【0145】

すべての試験において、血漿NEUG濃度は、G-CSFを捕捉しHSAを検出する「サンドイッチ」ELISAにより測定した。このアッセイフォーマットによって、内因性のG-CSFおよびアルブミンの干渉または交差反応なしに未変化のNEUGを定量することができる。薬物動態試験を図19において表形式でまとめる。

【0146】

これらの試験では、BDF-1マウスにIVまたはSC投与すると、NEUGは、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)よりも、クリアランスが遅くかつ終末相半減期および平均滞留時間(MRT)が長い。NEUGのクリアランスは、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)のクリアランスより約8倍遅く、MRT(11.2~20.7時間)は約4倍長い。NEUGおよびNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の両方のクリアランスは、正常マウスよりも、5-FU誘発性血球減少症を経たマウスにおいて遅い。これは、G-CSFのクリアランスに役割を果たす好中球の数がより少ない(5-FU治療後)ことによる可能性が最も高い。カニクイザルでは、NEUGのMRTは、17.9~27.2時間である。さらに、毎週5回のSC投与の最後の投与後のCmaxは、最初の

10

20

30

40

50

投与後のCmaxと比較して減少しているようである。カニクイザルにおけるNEUGのSCバイオアベイラビリティは約22%である。カニクイザルでは、SC注射後、NEUGの終末相半減期(12.6時間)は、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)のもの(9.49時間)よりも約33%長い。腎クリアランスは、NEUGの除去に有意な役割を果たさないようである(ラットで測定)。

【0147】

実施例9:非臨床毒性の概要

NEUGは、マウスおよびサルにおいて良好な耐容性があった。4週間毎週1回100、500、または1000 µg/kg/投与でNEUGを皮下投与されたサルでは有害な所見はなかった。NEUG治療に対する薬力学的反応は、カニクイザルにおいて複数回のSCまたはIV投与後に観察され、以前に報告されたG-CSFの効果と一致していた。NEUGは、顕著で用量依存的な白血球増多症および好中球増加症を一貫して誘導し、単球、好酸球、および好塩基球の増加は顕著でなく、リンパ球の増加は一貫性がなかった。サルにおけるNEUGの無作用量(NOEL)は、GLPまたは非GLP試験では確認されなかったため、皮下投与については25 µg/kg/投与未満であると考えられる。副作用はSCでNEUG処理されたサルでは観察されなかったため、サルにおけるNEUGの皮下投与に関する無毒性量(NOEL)は、1000 µg/kg/投与よりも大きい。NEUGの薬理作用と一致するさらなる所見としては、脾臓重量の増加、骨髄増生の顕微鏡的証拠、および白血球増多症が挙げられる。

10

【0148】

非臨床安全性試験を図20の表にまとめる。

20

【0149】

実施例10:免疫原性

NEUGは、患者において、G-CSFに対して中和性である免疫反応を(理論的には)誘導し得た。HSAに対する抗体も可能性はあるが、血液(40mg/mL)中でHSAは非常に高濃度であるので当該抗体の臨床有意性は不明である。NEUGの全成分に対する抗体を検出することができ、一連の非常に高感度なアッセイを使用して、ヒトでの免疫原性を評価した。

【0150】

NEUGの安全性および毒性を測定するため、免疫原性をいくつかの試験で評価した。これらの試験は、ヒトG-CSF(Neulasta(登録商標)、ペグフィルグラスチム)、ヒトアルブミン、およびNEUGがサルにおいてすべて免疫原性であることを実証する。Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)治療群を含む免疫原性試験では、週1回のNEUGのIVまたはSC投与で治療された動物のほとんどは、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)に対する抗体を生じた。NEUG(またはNeulasta(登録商標)ペグフィルグラスチム)に対する抗体は、22日目(3回目の週1回投与後)にまたはその後初めて検出された。多くの場合、当該抗体は、インビトロアッセイにおいて中和作用があったが、中和抗体の存在は、好中球減少症の原因とならず、サルでのNEUGまたはNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)の薬理効果の妨げにはならなかった。さらに、2か月と2週間の休薬期間後、すべての群のANCは正常範囲内であり、抗体状態にかかわらずANCプロファイルに有意差はなかった。

30

【0151】

ほとんどのヒトタンパク質と同様に、ヒトアルブミンは、動物において免疫原性である。別のアルブミン融合タンパク質での経験から、サルでの免疫原性は、ヒトにおける免疫原性の発生(または結果)を予測するものではないことが示されている。例えば、Albuferon(登録商標)(ヒト血清アルブミンおよびインターフェロン からなる融合タンパク質)は、サルにおいて非常に免疫原性があり(単回注射後では12匹中10匹のサルが抗体に陽性であった)、免疫反応は、中和性でありかつ実質的に曝露に影響した。対照的に、最近行われた患者458人のAlbuferon(登録商標)第2相試験では、治療の最初12週間は、出現した抗体の割合は非常に低く、ペグ化インターフェロン治療群(18%)と比較してAlbuferon(登録商標)治療群では有意に低かった(3%)。さらに、抗体は明確な影響がなかった。

40

【0152】

NEUGに対する抗体は、NEUGを最大で3回投与されたヒト患者では観察されていない(例え

50

ば、下記第I相5.cおよび第II相5.eセクション参照)。NEUGリスク評価に関して、利用可能なヒトおよび動物データは、G-CSFの中和が、G-CSFの薬理量に対する反応の妨げとはならず、また感染病原体による攻撃に対する正常な反応の妨げとはならないことを示唆する。G-CSFが除去されたマウスモデルでは、感染病原体による攻撃に反応して好中球増加症がなお発生し得ることが示されており、これは顆粒球形成系において過剰であることを示唆している。さらに、フェルティ症候群および全身性エリテマトーデスの症例でG-CSFに対する自己抗体を有するヒトについての報告がある。当該患者は好中球減少症を発症するが、G-CSFまたはGM-CSFを用いた治療は大多数の患者になお有効である。

【0153】

要約すると、インビトロおよびインビボデータならびにNEUGの薬物動態に関する特徴は、骨髄抑制性抗腫瘍治療を受ける患者における発熱性好中球減少症に対する単回投与予防薬としてのNEUGの使用を支持する。単回投与後に末梢血中で高レベルの造血前駆細胞を誘導するNEUGの能力はまた、自己由来造血幹細胞および同種造血幹細胞の両方の移植の患者またはドナーにおいて有益である可能性がある。

【0154】

B. ヒトでのNEUG試験

次の実施例は、「第I相」および「第II相」と題した2つのメインセクションにおいて記載する。各相は、2つの部分、即ちA部およびB部を含む。第I相および第II相の実施例は、下記表2にまとめる。

【0155】

(表2) ヒト臨床NEUG試験の概要

実験	(部) / 腫瘍タイプ	目的	化学療法剤	被験者数	治療群
第I相	(A)/乳癌	化学療法剤の非存在下での最初の用量設定	無し	13	50, 150, 300, 450 µg/kg NEUG
	(B)/乳癌	化学療法剤の存在下での最初の用量設定	ドキソルビシン ドセタキセル 2サイクル	51	300 or 450 µg/kg NEUG vs. 6 mg ペグフィルグラスチム
第II相	(A)/乳癌	固定量のNeugraninの用量設定	ドキソルビシン ドセタキセル 4サイクル	78	30, 40, 50 mg NEUG vs. 6 mg ペグフィルグラスチム
	(B)/乳癌	ペグフィルグラスチムに対してNEUGが劣っていないことの実証	ドキソルビシン ドセタキセル 4サイクル	256	40 and 50 mg NEUG vs. 6 mg ペグフィルグラスチム

【0156】

各相は、1)目的、2)患者の特徴、3)試験薬剤、4)試験の特徴、および5)A部およびB部の結果という5つのセクションに分かれる。

【0157】

実施例11: 第I相

1. 目的

第I相A/B、第II相A/B試験は、骨髄抑制性化学療法剤(ドキソルビシン/ドセタキセル)が投与された被験者における、皮下投与したNeugranin(商標)(「NEUG」)(組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子)の安全性、耐容性、免疫原性、薬物動態、および薬力を評価するために行った。

【0158】

10

20

30

40

50

第I相では、第一の試験目的は、治療により発現した有害事象の頻度、重度、および継続時間を測定し、これらをNEUG投与の時間および用量と関連させることにより、ペグフィルグラスチムと比較して、一連の可能性のある治療用量にわたって皮下投与されたNEUGの安全性プロファイルを評価することであった。

【0159】

第二の試験目的は、NEUGの薬物動態および免疫原性を評価すること、ならびにドキソルピシン/ドセタキセルが投与される患者における、好中球減少症の罹患率、重症度、および継続期間に対するNEUG投与の効果をペグフィルグラスチムと比較することである。

【0160】

第I相は、上記表2に記載のように、A部およびB部という二部構成で行った。

10

【0161】

2. 患者の特徴

第I相では、患者は、下記の特徴またはパラメータに基づいてスクリーニングされた。

【0162】

採用：

1. ドキソルピシンおよびドセタキセルを投与される予定の組織学的に確認された乳癌患者。

2. 18歳以上。

3. 十分な血液学的機能。

4. $ANC > 1500/mm^3$

20

5. 血小板 $> 100,000/mm^3$

6. 十分な肝機能および腎機能：

7. 血清クレアチニン $< 2.0 \times$ 正常上限値

8. 検査室 (local laboratory) での正常範囲内 (WNL) の総ビリルビン

9. 血清トランスアミナーゼ (SGOT/SGPT) $< 1.5 \times$ 正常上限値

10. アルカリフォスファターゼ $< 2.5 \times$ 正常上限値

11. ECOG一般状態0または1

12. 正常範囲内の左心室駆出分画 (LVEF) に基づいたドキソルピシン投与を受ける資格。

13. 試験条件を理解する能力を有すること、書面によるインフォームドコンセント (研究に関連する健康情報の使用および開示に関する同意書を含む) を提供すること、ならびに試験プロトコル手順を順守すること。

30

【0163】

不採用：

1. 過去に1を超える化学療法レジメン (過去12か月以内に行われたのであればアジュバント療法も含む)；試験開始に先立つ4週間以内の任意の化学療法/免疫療法；この試験におけるドキソルピシンの2度の全量サイクルを除く累積的なアントラサイクリン投与。

2. 試験化学療法の6週間以内の事前のニトロソウレア (BCNU、CCNU) またはマイトマイシンCのいずれかの使用。

3. アントラサイクリンに基づいた化学療法レジメンの使用を除く、研究者の見解における心臓の病歴、兆候、または症状。

40

4. 試験化学療法の2週間以内の事前の手術または放射線治療。

5. 骨盤に対するまたは骨髄支持面積の20%を超える面積に対する、または骨髄障害に対する事前の広範囲照射。

6. 造血幹細胞移植による事前の高用量化学療法。

7. 試験化学療法の4週間以内の骨髄性 (G-CSFまたはGM-CSF) 成長因子の事前使用。

8. 試験化学療法の4週間以内のエリスロポエチンの事前使用。

9. 骨髄性の悪性腫瘍または脊髄形成異常の病歴。

10. 既知の脳転移 (十分に治療 (手術または放射線療法) され、最低3週間の観察で進行が見られず、抗癌薬およびステロイドを使用しないで神経学的に安定している場合を除く)。

50

11. 既知の鎌状赤血球症。
12. 成人型呼吸窮迫症候群 (ARDS) の診断。
13. 静脈内または経口抗生物質を必要とする現行の感染症。
14. 酵母由来製品に対するアレルギーの既知の履歴。
15. 大腸菌由来タンパク質、ペグフィルグラスチム、フィルグラスチム、またはペグフィルグラスチムの任意の他の成分 (第2相のみ) に対する既知の過敏症。
16. 妊娠女性または授乳中の女性 (試験期間中は、女性は全員、確実性が90%を超える避妊法を実施するか、不妊または閉経後でなければならない)。
17. HIV陽性または活動性肝炎が既知 (未知の状態の患者は試験されない)。
18. 試験期間中および試験薬剤の最後の投与後30日間効果的な避妊を使用することに合意しない男性。

10

【 0 1 6 4 】

次の理由で被験者をさらなる治療から外した:

1. 疾患進行
2. 最善の治療にもかかわらず容認できない毒性
3. 研究者の裁量による併発性の病気
4. ドキソルピシンレジメン-寿命中で許容される最大蓄積量に到達 (適格基準参照)
5. 同意の撤回
6. 経過観察への非遵守/喪失
7. 妊娠

20

【 0 1 6 5 】

NEUGによる治療を停止した場合、被験者は試験にとどまり、予定した安全性およびPK評価のために任意の試験薬の最後の投与後少なくとも30日間経過観察した。

【 0 1 6 6 】

3. 試験薬剤

NEUG (組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子、rHSA-G-CSF) は、成熟型HSAに対応する残基1~585および成熟型ヒトG-CSFに対応する残基586~759を含む一本鎖に繋がった約85kDaの分子量を有する融合タンパク質である。NEUGの治療有効部分は、組換えヒトDNA由来G-CSFである。

【 0 1 6 7 】

NEUGは、使い捨てのタイプ1ガラスバイアル中で無菌の凍結乾燥製剤として供給され、2~8 で保存される。注射用滅菌水1.1mLで再構成する際、各バイアルは、pH7.2の10mMリン酸ナトリウム、200mMマンニトール、60mMトレハロース無水物、0.01%(w/v)ポリソルベート80中に、NEUGを15mg/ml (バイアル毎に15mgが送達可能) 含む。

30

【 0 1 6 8 】

第I相で使用したNEUG製剤の組成を図13に示す。

【 0 1 6 9 】

市販のNeulasta (登録商標) (ペグフィルグラスチム) は、皮下注射用0.6ml充填済みシリンジで供給された。各シリンジは、注射用水中に酢酸塩 (0.35mg)、ソルビトール (30.0mg)、ポリソルベート20 (0.02mg)、ナトリウム (0.102mg) を含む無菌、透明、無色、防腐剤無添加の溶液 (pH4.0) にペグフィルグラスチムを6mg (タンパク質重量に基づく) 含む。USP。

40

【 0 1 7 0 】

NEUG (50、150、300、もしくは450 µg) またはNeulasta (登録商標) (ペグフィルグラスチム) (6mg) を皮下投与した。

【 0 1 7 1 】

4. 試験の特徴

a. 試験スケジュールおよび継続期間

この試験は、ドキソルピシン/ドセタキセルを投与される予定である乳癌患者62人において行われた、ヒト初回投与、多施設、非盲検、非対照、逐次用量漸進試験であり、続いて対照無作為化試験を行った。この試験は、二部構成であった。A部は、13人の被験者、4

50

つの用量コホート(50、150、300、または450 µg/kg)における逐次用量漸進試験であり、50、150、および450 µg/kgのコホートのそれぞれには3人の被験者で、300 µg/kgのコホートには4人の被験者で、無作為化の実験B部を行う前に安全性を評価した。

【0172】

A部では、被験者は、細胞毒性を有する化学療法剤の非存在下で、安全性および好中球絶対数(「ANC」)に対する効果の初期評価のために、化学療法の開始(サイクル0)の少なくとも2週間前にNEUGの最初の投与を受けた。最低2週間の経過観察後、被験者は、サイクル0のNEUGに関連すると考えられる用量制限的な有害事象がなく、被験者がすべての適格基準を満たす場合、サイクル1およびサイクル2において化学療法後に同じ用量でNEUGの投与を受けた。

【0173】

A部では、用量制限毒性(DLT)は、グレード2骨痛を除いて、試験薬剤と、場合によっては関連する、恐らく関連する、または明確に関連すると考えられるグレード2以上の臨床的に有意な有害事象として規定された。各A部コホート内では、実験に参加した各被験者に対する最初の試験薬剤の投与は、急性有害事象をモニタリングするために、最低24時間隔てた。

【0174】

次の用量レベルまで漸進させる決定は、所与のコホート中の被験者全員についてNEUGの最初の投与後少なくとも7日間の安全データの検討に基づいて行った。被験者3人がだれもDLTを経験しない場合は、次の用量レベルにおいて被験者3人を加えて用量漸進を続けた。所与のコホートにおいて被験者3人の1人がDLTの兆候を示した場合、別の被験者3人をその用量レベルで補充し、1コホート当たり全部で6人の被験者になる。被験者6人の1人のみにDLTが起こった場合、用量漸進を続けた。被験者6人の2人にDLTが起きた場合、用量漸進を停止し、それ以上NEUG治療薬は投与しなかった。

【0175】

残りの被験者は、予定された安全性、薬物動態、および薬力学的評価を完了した。

【0176】

最初のA部コホートにおいて安全性が実証された後、B部を行った。B部では、被験者は3つの無作為化並行治療群の1つに分けられ、NEUG300 µg/kg(n=20)、NEUG450 µg/kg(n=21)、または承認された用量であるペグフィルグラスチム6mg(n=10)を試験化学療法の約24時間後に投与した。

【0177】

下記表3および表4は、第I相A部およびB部における被験者の割付をまとめたものである。図6は、第I相A部およびB部の化学療法サイクルを示す。

【0178】

(表3)第I相における被験者の割付

A部	用量	N (NEUG /ペグフィルグラスチム)
逐次用量漸進	NEUG 50 µg/kg	3 / 0
	NEUG 150 µg/kg	3 / 0
	NEUG 300 µg/kg	4 / 0
	NEUG 450 µg/kg	3 / 0
B部	用量	N (NEUG /ペグフィルグラスチム)
並行無作為化	NEUG 300 µg/kg	20 / 5
	NEUG 450 µg/kg	21 / 5

【0179】

(表4)第I相における被験者の割付

10

20

30

40

治療	A部(N)	B部(N)	合計
Neulasta(登録商標) (ペグフィルグラスチム)	0	10	10
NEUG 50	3	0	3
NEUG 150	3	0	3
NEUG 300	4	20	23
NEUG 450	3	21	24
合計	13	51	64

【 0 1 8 0 】

10

b. 第I相A部およびB部中の併用療法

化学療法

この実験の化学療法レジメンは、最大2回までの21日サイクルを、治療の1日目に静脈注射により逐次投与するドキソルピシン50mg/m²およびドセタキセル75mg/m²からなった。

【 0 1 8 1 】

療法の各サイクルを受ける前に、被験者は、好中球絶対数(ANC)が $>1.5 \times 10^9/L$ であり、血小板が $>100 \times 10^9/L$ でなければならなかった。血液学的な回復のため、最大2週間まで治療を遅らせることもあり得た。

【 0 1 8 2 】

ドキソルピシンおよびドセタキセルの組み合わせは、乳癌患者において有意な臨床上の活性を有すると報告されている。しかしながら、この組み合わせは、骨髄抑制性であり、他の標準的なレジメンよりも高い割合でグレード3またはグレード4の好中球減少症が起きる。

20

【 0 1 8 3 】

CSFを添加しても、ドキソルピシンおよびドセタキセルの組み合わせは、患者の79%にグレード4好中球減少症誘発し、9~18%の割合で発熱性好中球減少症を誘発する。このドキソルピシン/ドセタキセルレジメンは、好中球減少症およびその合併症を予防するための新規な薬剤の研究に使用されている。したがって、ドキソルピシンおよびドセタキセルの組み合わせは、NEUGのような新規の薬剤の可能性を研究するのに適切な化学療法レジメンである。

30

【 0 1 8 4 】

ドキソルピシン薬理学的データ

塩酸ドキソルピシンは、DNAおよびDNA依存RNA合成ならびにタンパク質合成を阻害するストレプトミセス・ペウセティウス var カエシウス(*Streptomyces peucetius* var *caesi*us)から得られるアントラサイクリン系抗生物質である。ドキソルピシンは、細胞周期のどの期においても活性があるが、S期において最も細胞毒性がある。当該薬物の排出は、主に肝臓によるものであり、腎クリアランスは小さい。

【 0 1 8 5 】

医薬データ

前記薬物は、10、20、50、100、または200mgバイアル中で市販されている。凍結乾燥製剤は、注射用滅菌水、5%デキストロース溶液、または0.9%注射用生理食塩水で再構成されてもよい。

40

【 0 1 8 6 】

副作用および毒性

約10~14日間に最下点を有する骨髄抑制(主に白血球減少症)、ならびにまれな急性心嚢炎心筋炎症候群および累積的な容量に伴う後発性の心筋症を含む心毒性が、ドキソルピシンの用量制限毒性である。著しい脱毛症および中程度の悪心/嘔吐は、予想される毒性である。偶発的な溢出の部位での局所的な皮膚および組織損傷を生ずる溢出反応、口内炎、皮膚(特に爪床)の色素過剰症、ならびに過去に照射した部位での「メモリ」現象が報告さ

50

れている。

【0187】

ドセタキセル

薬理学的データ

ドセタキセルは、遊離チューブリンに結合する半合成タキソイドであり、安定した微小管の構築を促進し、有糸分裂および細胞複製(M期に特異的な細胞周期)を妨害する。ドセタキセルは、タンパク質に広く結合し、肝臓において多くは代謝され、7日以内に用量の約75%が糞便中に排泄される。

【0188】

医薬データ

ドセタキセル(Taxotere(商標)、Sanofi Aventis)は、80mg/2mLまたは20mg/0.5mLの単回投与バイアル中に提供され、希釈剤(注射用水中13%エタノール)バイアルが付帯される。Taxotereは1ml毎にドセタキセル(無水)を40mgおよびポリソルベート80を1080mg含む。

【0189】

副作用および毒性

ドセタキセルは、ドセタキセルまたはエトポシドおよびビタミンEなどのポリソルベート80と調製された他の薬剤に対して激しい過敏反応の既往歴のある患者には投薬すべきではない。

【0190】

激しい過敏反応を経験する患者には再投薬すべきではない。下に概説するように、ドセタキセルが投与される患者には、コルチコステロイドを前投与するのがよい。

【0191】

軽度から中程度の肝機能障害では、代謝が27%遅延し、全身暴露(AUC)が38%増加する。ドセタキセルは、SGOTおよび/またはSGPTが正常範囲の>1.5倍、およびアルカリフォスファターゼが正常範囲の>2.5倍の患者には投与すべきではない。体液鬱滞が、コルチコステロイドを前投与したにもかかわらず、第III相試験における患者の17%(中程度)および6%(重度鬱滞)で起こった。重度の知覚神経症(感覚異常、錯感覚、疼痛)が観察されている。

【0192】

予想される副作用としては、最下点が約9日間あり15~21日目までには回復する骨髄抑制(主に白血球減少症)が挙げられる。脱毛症、爪および皮膚の変化、口内炎、筋肉痛/関節痛、悪心/嘔吐、ならびに低血圧が報告されている。

【0193】

化学療法剤の用量、投与、および用量の変更

各治療サイクルの1日目に、化学療法剤(ドキソルピシンに続いてドセタキセル)を投与した。

【0194】

ドキソルピシンは、管外溢出による傷害を回避するため、点滴用静脈ラインまたは中心静脈カテーテルのサイドアームを介してIVボラスにより50mg/m²の用量で投与した。

【0195】

75mg/m²のドセタキセルは、0.9%食塩水または5%デキストロス溶液250mLで希釈し、ポリエチレンライニングを有する輸液セットを介して約1時間にわたって静脈内投与した。バイタルサインは、ドセタキセル点滴の直前および直後に得た。

【0196】

療法の各サイクルを受ける前に、被験者は、好中球絶対数(ANC)が>1500/mm³であり、血小板が>100,000/mm³でなければならなかった。血液学的な回復のため、最大2週間まで治療を遅らせることもあり得た。グレード3~4の非血液毒性、グレード3~4の感染エピソード、またはグレード4の血小板減少症に対しては化学療法剤の用量を25%減少させた。

【0197】

化学療法のさらなるサイクルの妨げになる重度の過敏反応または非血液毒性を経験する被験者は試験治療から除外されたが、経過観察は完了した。

10

20

30

40

50

【0198】

化学療法剤の前投薬

経口(必要であればIV)コルチコステロイド(例えば、デキサメタゾン8mgBID)を、体液鬱滞および過敏反応の発生および重篤さを低下させるため、ドセタキセル投与の1日前に開始して3日間投与した。

【0199】

制吐薬または他の前投薬(例えば、H₂拮抗薬)の使用および選択は、治療を行う医師の裁量に任せた。

【0200】

禁止薬剤

被験者は、この試験中および下に規定するさらなる期間中は、次の薬剤および/または処置のいずれも受けないのがよい。

1. 試験薬剤の開始の30日以内および実験期間中における他の治験薬。
2. 後続の化学療法サイクルは、NEUGの投与後14日まで開始すべきではない。
3. 持続性または発熱性の好中球減少症が起こらない限り、実験期間中におけるサイトカイン、他の造血成長因子、および予防用抗生物質。被験者が、スクリーニング期間から0日目の間の任意の時点でG-CSFで治療された場合、NEUGの投与に適格ではなく、試験を中断した。

【0201】

許可薬剤

被験者にベースライン薬剤を継続させた。可能であれば、試験全体にわたって各薬剤の一日量を維持した。何らかの理由で研究者によって必要であると認められた場合、さらなる薬剤、または用量、薬剤、投与経路の変更を必要とした被験者、および薬剤が投与された適応症は、CRFの適切なページに記録した。

【0202】

抗生物質

被験者は全員、感染の可能性を減らすため、化学療法の各コースに続いて予防用経口抗生物質(例えば、シプロフロキサシン)を投与された。発熱性好中球減少症または持続性の重度の好中球減少症(ANC<0.5×10⁹/L、5日)が起こった場合、被験者は、治療不成功と考えられ、試験から除外され、経過観察を完了し、研究者の裁量による成長因子支持を含む標準的な支持療法すべてを受けた。

【0203】

化学療法のさらなるサイクルの妨げになる重度の過敏反応または非血液毒性を経験する被験者も試験治療から除外され、そして経過観察を完了した。

【0204】

c. 安全性評価

NEUGの安全性は、有害事象(「AE」)の種類、頻度、および重度の評価、臨床検査(血液学および臨床化学)の変化、免疫原性、身体検査、ならびに継続的なバイタルサインのモニタリングにより評価した。AEおよび実験室毒性はすべて、国立癌研究所有害事象共通用語基準に基づいて等級分けした(NCI-CTCAEバージョン3.0、2003年12月12日)。有害事象(重度有害事象「SAE」を含む)は、試験薬剤の投与開始から任意の試験薬剤の最後の投与後30日まで記録した。実験的評価は、評価スケジュール(Schedule of Assessments)で概説されているように得た。グレード4好中球減少症毒性の場合には、ANCが>500になるまで毎日実験的評価を得た。被験者の次の治療サイクルが遅延した場合(そして最後の処置サイクルの後)、ANCが>1500になるまで、鑑別を伴う全血球計算(CBC)を毎週少なくとも2回行った。

【0205】

5. 第I相A部およびB部の結果

a. 概論

統計的方法：

10

20

30

40

50

安全性、薬物動態(PK)、薬力(PD)、および免疫原性パラメータに関連するデータは、記述統計法を用いて分析した。

【0206】

有害事象の頻度および重度、ならびに実験室毒性の等級分けに関して、数および割合を示す。

【0207】

効能分析には、グレード4およびグレード3~4の好中球減少症の発生率および持続期間、最下点ANC、最下点ANCまでの時間、回復するまでの時間(ANC>0.5x10⁹/LおよびANC>1.0x10⁹/Lまで)、ならびに発熱性好中球減少症の発生率が含まれた。

【0208】

この試験には、サンプルサイズを選ぶためには厳密な統計的検出力要件は使用しなかった。5%有意水準でペグフィルグラスチムと比較してNEUGが劣っていないことを示す80%検出力を用いた試験では、一治療群当たり被験者約37人を必要とすると計算された。これは、主に安全性に関して行った第1/2a相試験であったので、効果が検出されるために必要なサンプルサイズは適切なものよりも大きいと決定された。このように、効能傾向を評価した。

【0209】

内訳/個体群統計:

合計13人の被験者が、A部(実験において用量が逐次的に漸進する部分)に参加した。合計51人の被験者がB部に参加し、無作為にNEUG300 μg/kg(n=20)、NEUG450 μg/kg(N=21)、またはペグフィルグラスチム6mg(n=10)に分けられた。

【0210】

b. 試験結果

最初の用量設定試験では、化学療法剤の非存在下で、NEUGは、良好な耐容性を示し、予想されたようにANCが上昇し、これは2日目と4日目の間にピークに達し、14日目までに正常に戻った(図22)。

【0211】

A部では、50 μg/kgNEUG投与群中の被験者3人全員および450 μg/kgNeugranin投与群中の被験者1人が、5日を超えて継続する発熱性好中球減少症または重度の好中球減少症になった。B部では、300 μg/kgNEUG投与群中の被験者1人および450 μg/kgNEUG投与群中の被験者2人が、5日を超えて継続する発熱性好中球減少症または重度の好中球減少症になった。ペグフィルグラスチム群中の被験者1人が、5日を超えて継続する発熱性好中球減少症または重度の好中球減少症になった。

【0212】

c. 免疫原性

NEUGが投与される被験者において、NEUGに対する抗体の血清試料は、毎NEUGサイクルの1日目での投与前および治療訪問の終わり(最後の投与の少なくとも15日後)に得た。被験者が試験中の任意の時点で陽性の抗NEUG抗体反応を生じた場合、最後のNEUG投与の約6か月後に反復試料を得た。

【0213】

A部およびB部の両方の治療の終わりをもって被験者全員に対する試験を完了した。試料はすべて、NEUGに対する抗体には陰性であった。

【0214】

d. 有害事象

A部では、用量制限毒性(DLT)は、グレード2髄骨痛を除いて、試験薬剤と、場合によっては関連する、恐らく関連する、または明確に関連すると考えられるグレード2以上の臨床的に有意な有害事象として規定された。

【0215】

A部のコホートのいずれもサイクル0ではDLTに達しなかった。NEUG投与に関連して、骨痛と既存の高血圧の悪化(後者はNEUG投与の7日後に起きた)という2つの有害事象のみ報告

10

20

30

40

50

された。いずれの事象も後遺症なく解消した。

【0216】

NEUG治療被験者41人のうち31人は少なくとも1つの有害事象を経験した。NEUGおよびペグフィルグラスチム治療被験者中のAEの発生率は同程度であった(それぞれ75.6%および70%)。

【0217】

B部で一般に報告される有害事象(被験者全員のうちの5%以上のAE)をまとめたものを表5に示す。

【0218】

(表5)第1相B部集団における治療関連有害事象のまとめ

10

医薬品規制用語集 優先使用語	NEUG 300 (N=20)	NEUG 450 (N=21)	ペグフィルグラスチム (N=10)
<u>関連AE¹:</u>			
骨痛	1 (4.5%)	3 (14.3%)	0 (0%)
<u>非関連AE²:</u>			
悪心	3 (15%)	3 (14.3%)	3 (30%)
嘔吐	1 (5%)	3 (14.3%)	3 (30%)
下痢	1 (5%)	1 (4.8%)	1 (10%)
口内炎	0 (0%)	3 (14.3%)	0 (0%)
疲労	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)
咽頭炎	2 (10%)	0 (0%)	1 (10%)
脱毛症	4 (20%)	7 (33%)	2 (20%)
血小板減少症	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)
頭痛	0 (0%)	1 (4.8%)	1 (10%)
低カリウム血症	0 (0%)	2 (10%)	1 (10%)
ビタミンD欠乏症	3 (15%)	0 (0%)	1 (10%)
高血圧	0 (0%)	1 (4.8%)	1 (10%)

20

30

¹ 関連=場合によっては関連している、恐らく関連している、または明確に関連していると考えられる

² 非関連=恐らく関連していないか、関連していないと考えられる

【0219】

NEUGに関連すると考えられる最も多く報告される有害事象は、すべてのG-CSF製品に伴う典型的な有害反応である骨痛であり、これは上記表に記載の4人および450 µg/kg投与されるA部被験者1人の5人の患者において報告された。すべての事例で、骨痛は、強度がNCI-CTCAEグレード1~2であり、持続期間としては一過性で、後遺症なく解消した。アルカリフォスファターゼおよび尿酸におけるグレード1上昇は、サイクル0におけるNEUGの投与後に起こり;これらの事象は、研究者によって臨床的に有意でないと考えられ、処置せずに解消した。これらは、G-CSF(例えば、Neulasta(登録商標))を投与される患者における予想される作用である。

40

【0220】

化学療法サイクル中の他の一般に報告される有害事象(悪心、嘔吐、脱毛症、口内炎)は、ドキソルピシン/ドセタキセルレジメンが投与される患者において予想される有害事象と一致していた。

50

【 0 2 2 1 】

大多数の報告されたAEは、NCI CTCグレード1またはグレード2の重篤度であった。4つのAEは、重篤な有害事象として報告された。被験者2人(1人は150 µg/kg投与されもう1人は450 µg/kg投与された)は嘔吐のために入院し、これらの被験者の1人は、次の化学療法サイクルで二度目のSAEを経験した；嘔吐の程度は軽かったが、入院の原因となったかまたは入院を長引かせた。450 µg/kg投与された3人目の被験者は、発熱性好中球減少症のため入院した。当該事象は、NEUGと無関係であると考えられた。

【 0 2 2 2 】

e. 薬物動態

NEUGが投与される被験者は全員、試験期間中に渡って血清NEUG濃度をサンプリングされた。薬剤は、NEUG特異的なサンドイッチ酵素結合免疫吸着測定(ELISA)を用いて検出した。血清薬剤濃度時間データは、ノンコンパートメントまたはモデルベース分析を用い、WinNonlin Enterprise Edition(バージョン4.1以上)を用いてPK分析に供した。

【 0 2 2 3 】

以下のPKパラメータを得た：曲線下面積(AUC_{0-∞})、クリアランス(CL/F)、分布容積(V_z/F)、最大濃度(C_{max})、吸収半減期(t_{1/2, abs})、排出半減期(t_{1/2, elim})、および平均滞留時間(MRT)。薬物動態データは、プロトコル中で用いた用量範囲にわたって直線性について評価した。

【 0 2 2 4 】

サイクル0(化学療法前)からの薬物動態パラメータは表6にまとめてあり、サイクル0のPKプロファイルは図3に示してある。

【 0 2 2 5 】

(表6) ヒト被験者におけるNeugranin薬物動態(第1相サイクル0)

パラメータ	NEUG	NEUG	NEUG
用量(mcg/kg)	150 µg/kg	300 µg/kg	450 µg/kg
被験者数	3	4	3
AUC (hr*ng/mL) (平均 ± SD)	1758 ± 1675	3390 ± 2003	10131 ± 9563
t _{1/2,term} (hr) (平均 ± SD)	14.4 ± 4.0	23.5 ± 10	29 ± 9.3
C _{max} (ng/mL) (平均 ± SD)	72.7 ± 59.7	108.9 ± 50.5	294 ± 351
t _{max} (hr) (平均)	12	15	18

【 0 2 2 6 】

最大血清NEUG濃度および時間濃度曲線下面積により測定される薬物暴露は、用量依存的に増加した。最初の50 µg/kg用量コホート中の被験者の血清濃度は、一貫して量子化の下限(6.3ng/mL)未満であった。T_{max}は、150から450 µg/kgまでのすべての用量で6~24時間の範囲であった。C_{max}は、150 µg/kgの用量で72.7 ± 59.7(平均 ± SD)ng/mLから450 µg/kgの用量で294 ± 351ng/mLまでであった。対応して、AUC_{0-∞}は、150mcg/kgの用量で1758 ± 1675ng/mL*hrから450 µg/kgの用量で10131 ± 9563ng/mL*hrであった。サイクル1の範囲は類似していた。NEUGの平均排出半減期は、14~30時間の範囲であった。

【 0 2 2 7 】

「試験の特徴」(上のセクション4)で記載したように、A部の被験者は、細胞毒性を有する化学療法の非存在下で、安全性および好中球絶対数(「ANC」)に対する影響の初期評価のために、化学療法の開始(サイクル0)の少なくとも2週間前にNEUGの最初の投与を受けた。最低2週間の経過観察後、サイクル0においてNEUGに関連すると考えられる用量制限的な有害事象がなく、被験者がすべての適格基準をみたす場合は、被験者は、サイクル1およびサイクル2における化学療法後に、同じ用量のNEUGの投与を受けた。NEUGは、化学療法剤投与の24時間後に投与された。図7は、サイクル1およびサイクル2中でNEUGが投与された被験者のANCおよびWBCを示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 8 】

f. B部の用量の薬力学および設定

試験の第I相A部からのデータの分析によって次の所見が得られた:

1. NEUGは、サイクル0(化学療法前)においてWBCおよびANCの用量依存的な上昇を誘導する(図7におけるサイクル0データ参照)。
2. サイクル0におけるANCの増加は、等モル量のペグフィルグラスチムの病歴データと同程度であった
3. 予想されたように、化学療法後にWBCおよびANCは低下する
4. 最下点ANCからの回復は、用量依存依存的であると考えられる
5. ANCおよびWBCは、15日目までに正常値まで回復した

10

【 0 2 2 9 】

A部でのすべての用量レベルでの安全性のこれらの所見および実証に基づいて、B部の評価のための選択した用量は300および450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。上に記載のように、被験者は、NEUG300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、NEUG450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、またはペグフィルグラスチムを認可された固定投与量である6mgに無作為に分けた。被験者は、ドキソルビシン/ドセタキセルの投与1日後にNEUGまたはペグフィルグラスチムを投与された(2サイクルにわたる投与、21日隔てて)。B部のデータは、集団のサイクル1ANCプロファイルを含む。結果を図2および下記表5にまとめる。

【 0 2 3 0 】

グレード3およびグレード4好中球減少症の発生率およびサイクル1中のANCプロファイルは、下記表7に示すように、治療した被験者51人中の48人で測定された。なお、予防的なG-CSF治療が無いと、ドキソルビシン/ドセタキセルで治療した患者の70~80%が平均で5日間の持続期間を有するグレード4好中球減少症になる。

20

【 0 2 3 1 】

(表7)化学療法のサイクル1後の第I相B部におけるグレード4好中球減少症の発生率および持続期間

治療	NEUG		ペグフィルグラスチム
	300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	450 $\mu\text{g}/\text{kg}$	6 mg
被験者数	20	21	10
グレード4好中球減少症	9	6	3
グレード4好中球減少症の%	45.0%	28.6%	30.0%
平均(日)	1.1	1.0	0.7
SD (日)	1.33	1.67	1.16
範囲(日)	0-4	0-5	0-3

30

【 0 2 3 2 】

治療群の平均ANC曲線を図2に示す。

【 0 2 3 3 】

NEUGは、グレード3、グレード4、および発熱性好中球減少症の治療に効果がある。この化学療法レジメンに対してG-CSF治療がないと、発熱性好中球減少症の発生率は約40%になる。ANCの用量相関性の上昇およびドキソルビシン/ドセタキセルで予想されるよりも低い好中球減少症の割合がNEUGの投与後に観察された。NEUGに起因する予想外または重篤な有害事象はなかった。

40

【 0 2 3 4 】

グレード3およびグレード4好中球減少症の発生率は、ペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))が投与された患者よりも300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のNEUGが投与された患者でより高く、正常なANCまで回復する速度も、ペグフィルグラスチムが投与される被験者よりもNEUGが300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与される患者でより遅いようであった。NEUGが450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与される患者のANCプロファイルは、ペグフィルグラスチムが投与される患者と類似していたが、好中球減少症からの回復の際のANCは、ペグフィルグラスチムが投与される患者よりもNEUGが投与される

50

患者において一般により低かった。要約すると、これらの用量のNEUGは、ペグフィルグラスチムと同様の効果をもたらすようである。

【0235】

g. PK/PDプロファイル、第I相、B部

乳癌治療のサイクル1におけるドキシソルピシン/ドセタキセル投与の1日後にNEUGが450 μ g/kg投与された患者からのPK/PDプロファイルを図29に示す。NEUGのCmaxは、投与の1日以内に達成され、10日目までに検出できないレベルにまで徐々に低下した。NEUGの投与後に、ANCは4日目までにピークにまで上昇し、ANCは、ドキシソルピシン/ドセタキセルおよびG-CSF治療を受ける患者において予想される通りに、8日目に最下点まで低下し、10日目に正常値にまで戻る。12日目までには、ANC値は正常範囲にあり、NEUGは検出できない。なお、

10

【0236】

h. NEUGとペグフィルグラスチムとの間のさらなる差異

好中球減少症からの回復を促進させる効果における試験用量でのNEUGとペグフィルグラスチムとの間のより詳細な差異は、治療のサイクル1における個々のANCプロファイルを比較すれば明らかである。すべての群のピークANCは非常に類似しており、NEUGが300 μ g/kg投与された被験者の最下点ANCは、NEUGが450 μ g/kg投与された被験者より低く、ペグフィルグラスチムが投与された被験者のANC最下点は平均して最も高かった。最下点ANCからベースラインまでの回復がすべての治療群で14日目までに起きたが、NEUGが450 μ g/kg投与された被験者よりもNEUGが300 μ g/kg投与された被験者では遅く、ペグフィルグラスチムが投与された被験者で最も速かった。

20

【0237】

類似の化学療法前の投与を伴うペグフィルグラスチム実験の入手可能な公表済みデータを、予定したサイクル0(化学療法前)までの第I相を完了した患者からNEUGのPK/PDデータと比較した。この比較の結果は以下のとおりであった：

1. NEUG用量が150 μ g/kgのEmax(最大観測ANC)は、サイクル0におけるペグフィルグラスチム用量30 μ g/kg(確認された有効なペグフィルグラスチム用量である100 μ g/kgに対して効能で劣ることが後に示された用量)と一致する。

30

2. Neugranin用量が300および450 μ g/kgのEmaxは、ペグフィルグラスチム用量が100 μ g/kgのサイクル0レベルとより一致していた。

3. NEUG300 μ g/kgおよび450 μ g/kgのCmaxのメジアンおよびEmaxのメジアンはほぼ同じであり、したがって、Cmaxによって引き続きEmaxが予測される。

4. ANC増加は、等モル量のペグフィルグラスチムの出版済みデータと同程度であった。

【0238】

上に記載したように、動物およびヒトにおけるPK/PD評価は、等モル基準で投与したNEUGおよびペグフィルグラスチム用量等価性の推定値と一致していた。マウスでは、同等のAUC_{ANC}が、ペグフィルグラスチムより7.7倍高い用量で達成された。アルブミンがNEUGの分子量に著しく寄与し、Neulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)が、rhG-CSFの重量(ペグフィルグラスチム中のポリエチレングリコールの寄与を含まない)に基づいて投与されるので、4.5倍の用量のNEUG(重量基準)は、等量のNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)と同程度に効果的であると予測される。動物における効能データは、ペグフィルグラスチムの4.5~7.7倍と一致した(ペグフィルグラスチム1mg=NEUG4.5~7.7)。非臨床上の安全性および効果のデータは、この用量推定値と一致しており、入手可能な臨床データと検討すると、臨床評価のための用量を選ぶ際の根拠になる。

40

【0239】

i. 第I相の結果

第I相薬物動態評価の結果は次のとおりである。

50

NEUGは、サイクル0およびサイクル1で、150 μg/kg、300 μg/kg、および450 μg/kgの用量にてNEUGで処理されたすべての被験者からの血清試料において検出された。

サイクル1では、NEUGは、150mg/kg、300 μg/kg、および450 μg/kg用量群において、ほとんどの被験者(45/50でサンプリングされた)で最大144時間まで検出された。実質的に、サイクル間での薬剤蓄積は観察されなかった。

薬物暴露は、各用量群でサイクル1およびサイクル0(前化学療法)においてより高かった。サイクル1におけるNEUGへの暴露の増加は、受容体が仲介するG-CSFクリアランスにおいて役割を果たす好中球の数の減少による可能性がある。

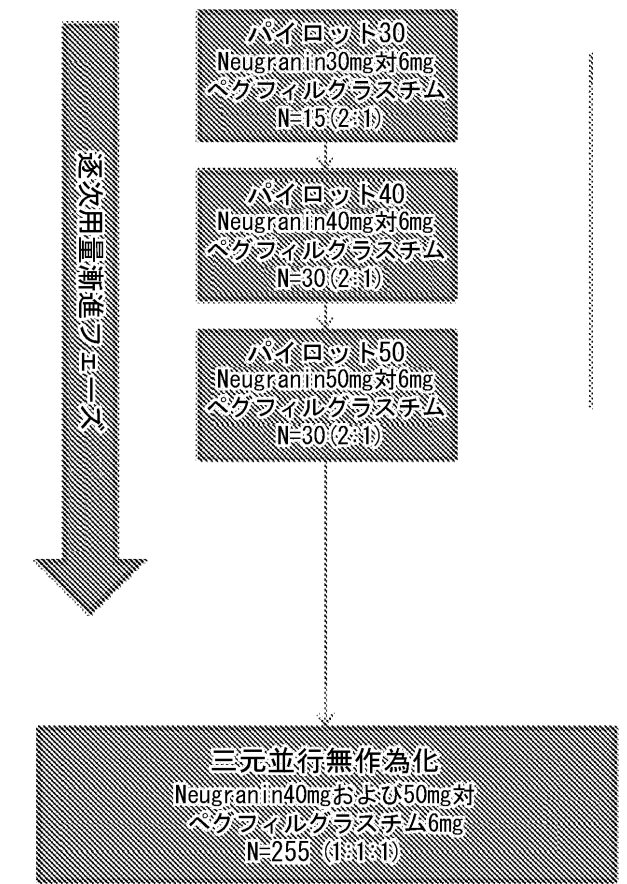
サイクル1におけるNEUGの排出半減期のメジアンは、300 μg/kg用量群で約36時間であり、450 μg/kg用量群で30時間であった。排出半減期は、フィルグラスチムで3~4時間であり、PEGフィルグラスチムで、用量に応じて42~67.5時間であると報告されている。

用量間の統計的有意差は、最大血清濃度(t_{max})までの時間および吸収半減期($t_{1/2, abs}$)に見られた。これらのパラメータはいずれも、NEUG用量の増加と共に増加した。他の用量正規化PKパラメータは、用量間の統計的有意差を示さなかった。

【 0 2 4 0 】

実施例12: 第II相

試験の第II相は、ドキソルピシン/ドセタキセルを最大4回まで投与した乳癌を有する被験者334人で行われた対照無作為化試験であった。試験は、臨床現場約45カ所で行われ、皮下投与したNEUGとPEGフィルグラスチムとの安全性および効果を評価するための二元配置無作為化パイロットフェーズ、その後の、被験者がパイロットフェーズに基づいて選ばれるPEGフィルグラスチムおよび2つの良好な耐性用量のNEUGに無作為に分けられる(1:1:1)メインフェーズからなった。主要評価項目である化学療法サイクル1中の重度(グレード4)の好中球減少(DSN)の持続期間に関してPEGフィルグラスチムに対してNEUGが劣っていないことを実証するため、メインフェーズのサンプルサイズを検出した。試験の設計を下に概略的に示す。



【 0 2 4 1 】

1. 目的

第II相の第一の目的は、ペグフィルグラスチムに対して同等の効果を示すNEUG用量を選択すること、およびNEUGでの治療後の化学療法のサイクル1において重度の好中球減少(DSN)の持続期間を評価することであった。第二の目的は、サイクル2~4におけるDSNを評価すること、好中球絶対数が回復するまでの時間およびサイクル1~4における発熱性好中球減少症の割合を評価すること;ならびにNEUGの安全性、耐容性、薬物動態(サイクル1において)、および免疫原性を評価することであった。

【0242】

2. 患者の特徴

第II相に関連して、患者は、下記の特徴またはパラメータに基づいてスクリーニングされた。

【0243】

採用:

1. ドキソルビシンを $60\text{mg}/\text{m}^2$ およびドセタキセルを $75\text{mg}/\text{m}^2$ 投与される予定の組織学的に確認された乳癌患者。

2. 18歳以上

3. 十分な血液学的機能:

4. $\text{ANC} > 1500/\text{mm}^3$

5. $\text{血小板} > 100,000/\text{mm}^3$

6. 十分な肝機能および腎機能:

7. 血清クレアチニン $< 1.5 \times$ 正常上限値

8. 検査室(local laboratory)での正常範囲内(WNL)の総ビリルビン

9. 血清トランスアミナーゼ(SGOT/SGPT) $< 1.5 \times$ 正常上限値

10. アルカリフォスファターゼ $< 2.5 \times$ 正常上限値

11. 米国東海岸癌臨床試験グループ(「ECOG」)一般状態0~2

12. 正常範囲内の左心室駆出分画(LVEF)に基づいたドキソルビシン投与を受ける資格

13. 試験条件を理解する能力を有すること、書面によるインフォームドコンセント(研究に関連する健康情報の使用および開示に関する同意書を含む)を提供すること、ならびに試験プロトコル手順を順守すること。

【0244】

不採用:

1. 過去に1を超える化学療法レジメン(過去12か月以内に行われたのであればアジュバント療法も含む)

2. この試験におけるドキソルビシンの4度の全量サイクルを除く累積的なアントラサイクリン投与

3. 試験化学療法剤の30日以内の事前の化学療法/免疫療法(ニトロソウレア(BCNU、CCNU)またはマイトマイシンCの試験化学療法剤の6週間以内)

4. トラスツズマブ(ハーセプチン)併用療法

5. 過去30日での試験薬の投与

6. アントラサイクリンに基づいた化学療法レジメンの使用を除く、研究者の見解における心臓の病歴、兆候、または症状

7. 試験化学療法の2週間以内の事前手術

8. 試験化学療法の4週間以内の事前手術(骨転移のためのスポット照射を除く)

9. 造血幹細胞移植による事前の高用量化学療法

10. 試験化学療法の4週間以内のG-CSF、GM-CSF、またはエリスロポエチンの事前使用

11. 試験化学療法の72時間以内の抗生物質の全身投与

12. 骨髄性の悪性腫瘍または脊髄形成異常の病歴

13. 既知の脳転移(十分に治療(手術または放射線療法)され、最低3週間の観察で進行が見られず、抗癌薬およびステロイドを使用しないで神経学的に安定している場合を除く)。

10

20

30

40

50

14. 既知の鎌状赤血球症
 15. 成人型呼吸窮迫症候群 (ARDS) の診断
 16. 酵母由来製品に対するアレルギーの既知の履歴
 17. 大腸菌由来タンパク質、ペグフィルグラスチム、フィルグラスチム、またはペグフィルグラスチムの任意の他の成分に対する既知の過敏症
 18. 妊娠女性または授乳中の女性。(子宮が無傷である女性は全員スクリーニングされて血清妊娠テストが陰性でなければならない。不妊でないかまたは非閉経前の女性は全員、試験期間中および試験薬剤の最後の投与後の30日間医学的に認められた避妊法を実施しなければならない。)
 19. 試験期間中および試験薬剤の最後の投与後30日間効果的な避妊を使用することに同意しない男性 10
 20. HIV陽性または活動性肝炎が既知(未知の状態の患者は試験されない)

【0245】

次の理由で被験者をさらなる治療から外した:

1. 疾患進行
2. 最善の治療にもかかわらず容認できない毒性
3. 研究者の裁量による併発性の病気
4. ドキソルビンレジメン-寿命中で許容される最大蓄積量に到達(適格基準参照)
5. 同意の撤回
6. 経過観察への非遵守/喪失 20
7. 妊娠

【0246】

試験薬剤による治療を停止した場合、試験にとどまった被験者は、予定した安全性およびPK評価のために試験薬剤の最後の投与後少なくとも30日間経過観察した。

【0247】

3. 研究薬剤

NEUG(組換えヒトアルブミン-ヒト顆粒球コロニー刺激因子、rHSA-GCSF)は、成熟型HSAに対応する残基1~585および成熟型ヒトG-CSFに対応する残基586~759を含む一本鎖に繋がった約85kDaの分子量を有する融合タンパク質である。NEUGの治療有効部分は、組換えヒトDNA由来G-CSFである。 30

【0248】

NEUGは、使い捨てのタイプ1ガラスバイアル中で無菌の凍結乾燥製剤として供給され、2~8℃で保存される。注射用滅菌水1.0mlで再構成する際、各バイアルは、20mMリン酸ナトリウム、180mMマンニトール、60mMトレハロース無水物、0.01%(w/v)ポリソルベート80、pH6.0中に、NEUGを50mg/ml(バイアル毎に50mgが送達可能)含む。NEUGは、液体状態でバイアルまたは充填済シリンジ中で提供されてもよいことに注意されたい。

【0249】

第II相で使用した製剤の組成を図14に示す。第I相および第II相で使用したNEUG製剤間の差異を下記表8に示す。

【0250】

(表8)cGMP製剤の比較 40

賦形剤の性質	第I相の製剤	第II相の製剤	変更の論理的根拠
API	15.0 mg/mL	50 mg/mL	注射の容量を減らすためにAPI濃度を増加した
リン酸ナトリウム	10 mM	20 mM	より高いイオン強度が濃度依存凝集を減少させる
マンニトール	200 mM	180 mM	等浸透圧溶液を提供するために還元した
トレハロース二水和物	60 mM	60 mM	無変化-ロバストな抗凍結剤として作用する
ポリソルベート80	0.01%	0.01%	無変化-非特異的な凝集および吸着を阻害する
pH	7.2	6.0	より低いpHは濃度依存凝集を減少させる

10

【0251】

第I相で使用された製剤はきわめて安定しており、少なくとも2年間の保存期間を有していた。試験により、より大きなイオン強度およびより低いpHが、より高い濃度(>25mg/mL)でAPIを安定させることが示された(データ示さず)。このために、第II相の製剤は、より低いpH(6.0対7.2)およびより高いリン酸塩濃度(20対10 mM)を有する。強制分解試験は、この製剤が、激しい振とう、凍結融解の繰り返し、および濃度により誘導される凝集から液体状態の薬剤成分を保護することを示した。第II相の製剤の凍結乾燥はまた、良好に形成されたケーキを生じる。

20

【0252】

市販のNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)は、皮下注射用0.6ml充填済みシリンジで供給される。各シリンジは、注射用水中に酢酸塩(0.35mg)、ソルビトール(30.0mg)、ポリソルベート20(0.02mg)、ナトリウム(0.102mg)を含む無菌、透明、無色、防腐剤無添加の溶液(pH4.0)にペグフィルグラスチムを6mg(タンパク質重量に基づく)含む。USP。

30

【0253】

NEUG(30、40、50、もしくは60mg)またはNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)(6mg)を皮下投与した。

【0254】

用量の論理的根拠

第I相からのデータは、300および450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のNEUG用量が安全であり良好な耐容性があることを示した。さらに、ペグフィルグラスチムの承認された固定用量と比較して、NEUGのいずれの用量も、細胞毒性を有する化学療法を受ける乳癌患者におけるANCプロファイルに対して同様の効果をもたらした。ANCプロファイルのAUCは、効果の一点計測値(single-point measure of effect)としての役割を果たす。AUC_{ANC}についてはこれらの治療群間で統計的有意差はなかったが、450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群のAUCは、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で観察されたものよりもわずかに高く、ペグフィルグラスチム群で観察されたものとほとんど同じである(図23)。入手可能なデータに基づくと、NEUGは、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ではペグフィルグラスチムより効果が低く、450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でペグフィルグラスチムと同様の効果を与えるためのおおよその最小必要用量であると推定された。

40

【0255】

固定用量の目的は、患者の体重にかかわらず効能および安全性をもたらすのに十分な用量を患者に提供する用量を確認することである。第I相の結果に基づくと、NEUGは450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でペグフィルグラスチムと類似の効果を与える最小必要用量であり得ると推定され、>3

50

00 µg/kgが第II相でさらに評価するための最小量として設定された。NEUGの固定用量を選択するため、第II相の患者集団(乳癌)をモデリングした。40~100kgの体重範囲を用いて、最も重い患者には30mgの固定用量で最小量(300 µg/kgまたは0.3mg/kg)が与えられる一方で、約75%の患者には、40mgの固定用量で、少なくとも標的用量である450mg/kgが投与された。したがって、第II相での評価に選択した用量は、30mg、40mgおよび50mgであった。これらの用量は、平均70kgの患者にそれぞれ0.42、0.57、および0.71mg/kgの用量を提供する。

【0256】

この実験で評価された固定用量に基づいたキログラム当たりの等価用量を表9に示す。

【0257】

(表9)予測される被験者体重範囲のキログラム当たりの等価用量

	50 kg	60 kg	70 kg	80 kg	90 kg	100 kg
30 mg	0.600	0.500	0.429	0.375	0.333	0.300
40 mg	0.800	0.667	0.571	0.500	0.444	0.400
50 mg	1.000	0.833	0.714	0.625	0.556	0.500
60 mg	1.200	1.000	0.857	0.750	0.666	0.600

【0258】

NEUGの非臨床安全性は、これらの用量での安全性の予想に対するさらなるサポートを提供する。これらの固定用量(AUCおよびCmax)での患者の暴露は、サルで良好な耐性がある用量での暴露より低いと予想される。例えば、良好な耐性用量である1mg/kgでのサルにおけるCmaxおよびAUCは、0.45mg/kgでの患者における暴露より12倍高く、これは、患者におけるより高い用量評価およびサルにおける反復用量毒性試験でさらなる安全域が存在することを示唆しており、10mg/kg以下の用量で良好な耐性があった。0.3mg/kgもの高いペグフィルグラスチム用量が患者において安全であることが示されている。

【0259】

4. 試験の特徴

a. 試験スケジュールおよび継続時間

この試験は、ドキシソルピシン/ドセタキセルが最大4回まで投与される予定の乳癌患者被験者約330人で行われた対照無作為化試験であった。45カ所の臨床現場で行ったこの試験は、パイロットフェーズおよびメインフェーズの2相からなった。

【0260】

パイロットフェーズ(A部)は、二元配置無作為化試験からなり、次の用量を順次行ってNEUG対ペグフィルグラスチムの安全性および効果を評価した:NEUG30mg(N=10)対ペグフィルグラスチム(N=5);NEUG40mg(N=20)対ペグフィルグラスチム(N=10)、およびNEUG50mg(N=20)対ペグフィルグラスチム(N=10)。さらなる試験では、NEUG60mg(N=20)対ペグフィルグラスチム(N=10)も検査し得る。A部パイロットフェーズでは、被験者は、30mgコホート中に全部で被験者10人および他の各コホートに被験者20人で、NEUGとペグフィルグラスチムとに2:1の割合で無作為に分けた。NEUGまたはペグフィルグラスチムは、各サイクルの化学療法治療の24時間後に被験者に投与した。被験者は、体重(<50kg、50kg-<80kg、または80kg)、事前の化学療法暴露、および地球上の位置に基づいて治療群中でバランスをとるために層別無作為化を用いて、治療群に割り振られた。

【0261】

パイロットフェーズに続いて、被験者255人を、ペグフィルグラスチム、およびパイロットフェーズにおいてよりもペグフィルグラスチムにより類似する効果を有する2つの良好な耐性用量のNEUGに無作為に分類した(1:1:1)(3治療群、平衡、並行無作為化相)。NEUGまたはペグフィルグラスチムは、各サイクルの化学療法治療の24時間後に投与した。被験

10

20

30

40

50

者は、体重(<50kg、50kg-<80kg、または80kg)に基づいて治療群中でバランスをとるために層別無作為化を用いて、治療群に割り振られた。

【0262】

パイロットフェーズ中、有害事象は継続的に評価した。継続的なデータの評価によって安全性の懸念が示唆されなければ、30から50mgまで用量を増加させた。Neugranin40mgのサイクル1ANCプロファイルが、ペグフィルグラスチム患者に見られるプロファイルより劣っていると考えられ、Neugraninが50mgで安全である場合、さらなる治療群を、コホート中の患者総勢30人で、Neugranin60mgとペグフィルグラスチムとを2:1の割合で無作為に分けてもよい。

【0263】

NEUGの各用量レベルを、安全性および効能についてペグフィルグラスチムと比較する。表10は、第II相のA部およびB部の患者の割付をまとめたものである。

【0264】

(表10)第II相A部およびB部における被験者の割付

フェーズ	NEUG 30 mg	NEUG 40 mg	NEUG 50 mg	ペグフィルグラスチム 6 mg
パイロット 30	10	-	-	5
パイロット 40	-	20	-	10
パイロット 50	-	-	20	10
三治療群 無作為化	-	85	85	85
合計	10	105	105	110

【0265】

安全性評価:

NEUGの安全性は、AEの種類、頻度、および重症度の評価、臨床検査(血液学および臨床化学)の変化、免疫原性、身体検査、ならびに継続的なバイタルサインのモニタリングにより評価した。AEおよび実験室毒性はすべて、国立癌研究所有害事象共通用語基準(NCI-CTCAEバージョン3.0、2003年12月12日)に基づいて等級分けした。

【0266】

有害事象は、試験薬剤の投与開始から任意の試験薬剤の最後の投与後30日まで記録した。重篤な有害事象(SAE)は、同意時から任意の試験薬剤の最後の投与後30日まで記録した。実験室評価は、評価スケジュールで概説されているように入手した。

【0267】

c. 併用療法

化学療法

この実験の化学療法レジメンは、最大4回の21日サイクルを、治療の1日目に静脈注射により逐次的に投与するドキソルピシン60mg/m²およびドセタキセル75mg/m²からなった。

【0268】

療法の各サイクルを受ける前に、被験者は、好中球絶対数(ANC)が>1000/mm³であり、血小板が>100,000/mm³でなければならなかった。血液学的な回復のため、最大2週間まで治療を遅らせることができた。グレード3~4の非血液毒性、グレード3~4の感染エピソード、またはグレード4の血小板減少症に対して、化学療法剤の用量を25%減少させることが可能であった。予防用抗生物質または他の造血成長因子の使用は試験に参加している間は禁止された。

【0269】

ドキソルピシンおよびドセタキセルの組み合わせは、乳癌患者において有意な臨床上的活性を有すると報告されている。しかしながら、この組み合わせは、骨髄抑制性であり、他の標準的なレジメンよりも高い割合でグレード3またはグレード4の好中球減少症が起き

る。

【0270】

CSFを添加しても、ドキシソルピシンおよびドセタキセルの組み合わせは、患者の79%にグレード4好中球減少症を誘発し、9~18%の割合で発熱性好中球減少症を誘発する。このドキシソルピシン/ドセタキセルレジメンは、好中球減少症およびその合併症を予防するための新規な薬剤の研究に使用されている。したがって、ドキシソルピシンおよびドセタキセルの組み合わせは、NEUGのような新規の薬剤の可能性を研究するのに適切な化学療法レジメンである。

【0271】

ドキシソルピシン

薬理学的データ

塩酸ドキシソルピシンは、DNA塩基対に直接結合し(インターカレートし)、DNA合成およびDNA依存RNA合成ならびにタンパク質合成を阻害するストレプトミセス・ペウセティウス var カエシウスから得られるアントラサイクリン系抗生物質である。ドキシソルピシンは、細胞周期のどの期においても活性があるが、S期において最も細胞毒性がある。当該薬物の排出は、主に肝臓によるものであり、腎クリアランスは小さい。

【0272】

医薬データ

前記薬物は、10、20、50、100、または200mgバイアル中で市販されている。凍結乾燥製剤は、注射用滅菌水、5%デキストロース溶液、または0.9%注射用生理食塩水で再構成されてもよい。

【0273】

副作用および毒性

約10~14日間に最下点を有する骨髄抑制(主に白血球減少症)、ならびにまれな急性心嚢炎心筋炎症候群および累積的な容量に伴う後発性の心筋症を含む心毒性が、ドキシソルピシンの用量制限毒性である。

【0274】

著しい脱毛症および中程度の悪心/嘔吐は、予想される毒性である。偶発的な溢出の部位での局所的な皮膚および組織損傷を生ずる溢出反応、口内炎、皮膚(特に爪床)の色素過剰症、ならびに過去に照射した部位での「メモリ」現象が報告されている。

【0275】

ドセタキセル

薬理学的データ

ドセタキセルは、遊離チューブリンに結合する半合成タキソイドであり、安定した微小管の構築を促進し、有糸分裂および細胞複製(M期に特異的な細胞周期)を妨害する。ドセタキセルは、タンパク質に広く結合し、肝臓において多くは代謝され、7日以内に用量の約75%が糞便中に排泄される。

【0276】

医薬データ

ドセタキセル(Taxotere(商標)、Sanofi Aventis)は、80mg/2mLまたは20mg/0.5mLの単回投与バイアル中に提供され、希釈剤(注射用水中13%エタノール)バイアルが付帯される。Taxotereは1ml毎にドセタキセル(無水)を40mgおよびポリソルベート80を1080mg含む。

【0277】

副作用および毒性

ドセタキセルは、ドセタキセルまたはエトポシドおよびビタミンEなどのポリソルベート80と調製された他の薬剤に対して激しい過敏反応の既往歴のある患者には投薬すべきではない。

【0278】

激しい過敏反応を経験する患者には再投薬すべきではない。下に概説するように、ドセタキセルが投与される患者には全員、コルチコステロイドを前投与するのがよい。

10

20

30

40

50

【0279】

軽度から中程度の肝機能障害では、代謝が27%遅延し、全身暴露(AUC)が38%増加する。ドセタキセルは、SGOTおよび/またはSGPTが正常範囲の>1.5倍、およびアルカリフォスファターゼが正常範囲の>2.5倍の患者には投与すべきではない。体液鬱滞が、コルチコステロイドを前投与したにもかかわらず、第III相試験における患者の17%(中程度)および6%(重度鬱滞)で起こった。重度の知覚神経症(感覚異常、錯感覚、疼痛)が観察されている。

【0280】

予想される副作用としては、最下点が約9日間あり15~21日目までには回復する骨髄抑制(主に白血球減少症)が挙げられる。脱毛症、爪および皮膚の変化、口内炎、筋肉痛/関節痛、悪心/嘔吐、ならびに低血圧が報告されている。

10

【0281】

化学療法剤の用量、投与、および用量の変更

各治療サイクルの1日目に、化学療法剤(ドキシソルピシンに続いてドセタキセル)を投与した。

【0282】

ドキシソルピシンは、管外溢出による傷害を回避するため、点滴用静脈ラインまたは中心静脈カテーテルのサイドアームを介してIVボラスにより60mg/m²の用量で投与した。

【0283】

75mg/m²のドセタキセルは、0.9%食塩水または5%デキストロース溶液250mlで希釈し、ポリエチレンライニングを有する輸液セットを介して約1時間にわたって静脈内投与した。バイタルサインは、ドセタキセル点滴の直前および直後に得た。

20

【0284】

化学療法のさらなるサイクルの妨げになる重度の過敏反応または非血液毒性を経験する被験者は試験治療から除外され、経過観察を完了することになっていた。

【0285】

化学療法剤の前投薬

経口(必要であればIV)コルチコステロイド(例えば、デキサメタゾン8mgBID)を、体液鬱滞および過敏反応の発生および重篤さを低下させるため、ドセタキセル投与の1日前に開始して3日間投与した。

【0286】

制吐薬または他の前投薬(例えば、H₂拮抗薬)の使用および選択は、治療を行う医師の裁量に任せられた。

30

【0287】

禁止薬剤

被験者は、この試験中および下に規定するさらなる期間中は、次の薬剤および/または処置のいずれも受けてはならない。

1. サイクル1化学療法の72時間以内の抗生物質の全身投与。
2. 試験薬剤の開始の30日以内および実験期間中における他の治療薬。
3. 後続の化学療法サイクルは、NEUGの投与後14日まで開始すべきではない。
4. 持続性または発熱性の好中球減少症が起こらない限り、実験期間中におけるサイトカイン、他の造血成長因子、および予防用抗生物質。被験者が、スクリーニング期間から0日目の間の任意の時点でG-CSFで治療される場合、NEUGの投与に適格ではなく、試験を中断する。

40

【0288】

許可薬剤

被験者にベースライン薬剤を継続させた。可能であれば、試験全体にわたって各薬剤の一日量を維持した。何らかの理由で研究者によって必要であると認められた場合、さらなる薬剤、または用量、薬剤、投与経路の変更を必要とした被験者、および薬剤が投与された適応症、を記録した。

【0289】

50

化学療法のさらなるサイクルの妨げになる重度の過敏反応または非血液毒性を経験した被験者は試験治療から除外され、経過観察を完了した。

【0290】

d. 薬物動態

NEUGが投与される被験者は全員、サイクル1中に血清NEUG濃度をサンプリングされた。薬剤は、NEUG特異的なサンドイッチ酵素結合免疫吸着測定(ELISA)を用いて検出した。血清薬剤濃度時間データは、ノンコンパートメントまたはモデルベース分析を用い、WinNon lin Enterprise Edition(バージョン5.0以上)を用いてPK分析に供した。次のPKパラメータを測定した: 曲線下面積($AUC_{0-\infty}$)、クリアランス(CL/F)、分布容積(V_z/F)、最大濃度(C_{max})、吸収半減期($t_{1/2, abs}$)、排出半減期($t_{1/2, elim}$)、および平均滞留時間(MRT)。

10

【0291】

e. 免疫原性

NEUGが投与される被験者において、NEUGに対する抗体の血清試料は、毎NEUGサイクルの1日目における投与前および治療訪問の終わり(最後の投与の約30日後)に得た。被験者が試験中の任意の時点で陽性の抗NEUG抗体反応を生じた場合、最後のNEUG投与の約6か月後に反復試料を得、この試料が陽性であった場合、12か月目に試料を得た。プロトコルは、被験者全員からの6か月および12か月免疫原性試料を必要とするようにその後修正された。

【0292】

5. 結果

20

a. 概論

統計的方法

サイクル1における重度の好中球減少(DSN)の平均持続期間の主要評価項目に関連してペグフィルグラスチムに対してNEUGが劣っていないことを実証するため、この実験のメインフェーズ(B部)における1治療群当たり被験者約85人のサンプルサイズは、非劣性マージンが1日で、複数回の試験(Hochberg法による)のために調整した片側有意水準が全体で0.025で、91%の検出を提供するように選択した。サンプルサイズは、2つの独立群に対する正規近似、サイクル1 DSNの治療内標準偏差として推定1.6日、およびサイクル1 DSNの主要評価項目に関して評価できない最高率20%に基づいて計算した。

【0293】

30

3治療群無作為化フェーズ(A部)中の被験者に基づいて、2つの選択されたNEUG用量(40mgと50mgのいずれか)およびペグフィルグラスチムの効能を比較した。

【0294】

第二の効能分析は、化学療法サイクル2から4のそれぞれにおけるDSN、サイクル1から4のそれぞれにおける最下点ANCの低さ、サイクルによるそしてすべてのサイクルにわたるFN(その時の口腔相当温度 >38.2 で $ANC < 0.5 \times 10^9/L$ と規定)の割合、および全サイクルにおいてANCが $>1.5 \times 10^9/L$ に回復するまでの時間を含む。

【0295】

第二の効能分析に関連するデータは、適切な統計的方法を用いて分析した。安全性、PKおよび、免疫原性パラメータは記述統計法を用いて分析した。

40

【0296】

有害事象の頻度および重度、ならびに実験室毒性の等級分けに関して、数および割合を示す。

【0297】

効能の測定

全血球計算値(「CBC」)は、1日目、3日目、そして5日目以降、最下点後にANCが $>2.0 \times 10^9/L$ になるまで、その後、週2回、および治療の終わりに得た。

【0298】

b. 第II相のA部の効能

試験のパイロットフェーズに参加した被験者78人のうち、被験者13人が試験を完了せず

50

、3人(27.3%)がNEUG30mgで治療され、3人(14.3%)がNEUG40mgで治療され、3人(15.0%)がNEUG50mgで治療され、4人(15.4%)がペグフィルグラスチムで治療された。早期中断の最も多い理由は、同意の撤回(被験者7人)および研究者の判断によるもの(被験者3人)であった。NEUGを30mg投与した被験者の1人は、有害事象(糖尿病性足病変)によるとりやめであった。

【0299】

重度の好中球減少症の発生率および重度の好中球減少(DSN)の平均継続期間は、各化学療法サイクルの治療群にわたって類似していたが、ANC回復までの時間および発熱性好中球減少症の発生率は、NEUG30mgが、NEUG40mg、NEUG50mg、またはペグフィルグラスチムほど効果的ではないことを示唆した。

10

【0300】

サイクル1中に、発熱性好中球減少症を経験する被験者の割合は、NEUG30mg、40mg、50mg、およびペグフィルグラスチム群でそれぞれ20.0%、9.5%、10.0%、および8.0%であった。発熱性好中球減少症は、サイクル2~4においてさらに被験者3人のみに観察された(NEUG30mg、NEUG40mg、およびペグフィルグラスチム群で1人ずつ)。図5は、NEUG30またはペグフィルグラスチムのいずれかを投与された患者のサブセットで、後にグレード4好中球減少症を発症した者のANCプロファイルを示す。

【0301】

サイクル1では、平均DSNは、NEUG30mg(0.9日)、NEUG50mg(1.1日)、およびペグフィルグラスチム(0.9日)に関しては類似していた。平均DSNは、NEUG40mgでは他の3つの治療よりもわずかに長かった(1.6日)が、治療間の違いはすべて1日未満で、メインフェーズにおいて同等な治療を検討する基準である。DSN中間値は、4つの治療群すべてで0日または1日であった。

20

【0302】

グレード3またはグレード4好中球減少症の発生率および持続期間に関する要約データは、類似のパターンをたどる、つまり、NEUG30mg、NEUG50mg、およびペグフィルグラスチム群は、類似の結果になった。その一方で、グレード3またはグレード4好中球減少症の発生率および持続期間は、NEUG40mg群で他の治療群よりわずかに高かった。パイロットフェーズ(A部)の被験者数はきわめて少なく、観察された差異は統計的に有意ではなかった。NEUG40mgおよびNEUG50mgは、B部(試験の3治療群無作為化フェーズ)におけるさらなる評価のために選択された。

30

【0303】

c. 第II相のB部の効能

試験のメインフェーズに参加した被験者256人のうち、被験者18人が試験を完了せず、10人(11.6%)がNEUG40mgで治療され、5人(6.0%)がNEUG50mgで治療され、3人(3.5%)がペグフィルグラスチムで治療された。早期中断の最も多い理由は、同意の撤回(被験者7人)および2人の死者を含むAE(被験者4人)であった。研究者は、AEはすべて、試験薬剤または化学療法と関連しないと見なした。メインフェーズでは、NEUG40mgが投与された被験者の1人(1.2%)が、試験薬剤で治療される前に除かれた。

【0304】

サイクル1における重度の好中球減少症の発生率および持続期間を表11にまとめている。

40

【0305】

(表11)第II相B部:サイクル1における重度の好中球減少症の発生率および持続期間

	Neugranin				95% CI 97.5% CI
	40 mg (N=85)	50 mg (N = 84)	すべてNeug. (N = 169)	pegfilgrastim (N = 86)	
重度の好中球減少症の 発生率 n (%) NEUG 50 mg - NEUG 40 mg NEUG 40 mg - pegfilgrastim NEUG 50 mg - pegfilgrastim	50 (58.8%)	55 (65.5%)	105 (62.1%)	50 (58.1%)	(-7.94; 21.24) (-14.09; 15.45) (-7.23; 21.90)
重度の好中球減少症の 持続期間(日) n 平均 (SD) メジアン Min/Max	84 1.0 (1.09) 1 0/4	84 1.3 (1.22) 1 0/5	168 1.2 (1.16) 1 0/5	86 1.2 (1.34) 1 0/5	
NEUG 50 mg - NEUG 40 mg NEUG 40 mg - pegfilgrastim NEUG 50 mg - pegfilgrastim					95% CI (-0.07; 0.58) (-0.57; 0.15) (-0.31; 0.41)
NEUG 50 mg - NEUG 40 mg NEUG 40 mg - pegfilgrastim NEUG 50 mg - pegfilgrastim					97.5% CI (-0.12; 0.63) (-0.62; 0.21) (-0.37; 0.46)

10

20

30

40

【0306】

重度の好中球減少症の発生率は、pegfilgrastim群で58.1%からNEUG50mg群で65.5%の範囲であった。治療効果は、統計的に有意ではなかった(p=0.559)。治療群は、サイクル1 DSNに関して、NEUG40mg、NEUG50mg、およびpegfilgrastim群でそれぞれ平均値が1.0、1.3および1.2日であり同程度であった。NEUGとpegfilgrastimとの差異の95%および97.5%両側信頼区間は、両方のNEUG用量で正確に1日未満だった。この分析は、pegfilgrastimに対してNEUGが劣っていないことを実証した。治療サイクルにわたって、重度の好中球減少症およびグレード3またはグレード4好中球減少症の発生率は、サイクル1においてよりもサイクル2~4において低かった。グレード3またはグレード4好中球減少症の平均DSNおよび平均持続期間は、サイクル1においてよりもサイクル2~4において小さかった。治療サイクル内では、治療は類似しており、処理効果は、任意の化学療法サイクルにおけるこれらパラメータのどれについても有意な差異はなかった。

【0307】

体重で四分した患者でDSNを比較して、NEUGの固定用量がすべての体重の患者に十分なサポートを提供するかどうかを決定した。当該結果は、体重サブグループの平均DSNにおける有意差は無く(表12)、すべての体重群で十分にサポートされたことを示す。

【0308】

(表12) 体重別の、重度の好中球減少症のサイクル1での持続期間(日数)

		ベースライン体重(kg)			
		40-62	63-71	72-80	81-127
ペグフィルグラスチム 6 mg	平均(SD)	1.1 (1.3)	1.3 (1.4)	1.5 (1.6)	1.0 (1.0)
	N	16	21	26	23
Neugranin 40 mg	平均(SD)	1.0 (1.0)	1.0 (1.2)	0.9 (1.0)	1.4 (1.4)
	N	22	21	21	21
Neugranin 50 mg	平均(SD)	1.3 (1.1)	1.0 (1.4)	1.4 (1.3)	1.5 (1.1)
	N	15	26	20	23

10

【0309】

すべてのサイクルにおける発熱性好中球減少症を表13にまとめる。サイクル1中、発熱性好中球減少症を経験する被験者の割合は、NEUG40mg、NEUG50mg、およびペグフィルグラスチム群でそれぞれ、被験者2人(3.5%)、被験者5人(6.0%)、および被験者2人(2.3%)であった。発熱性好中球減少症は、サイクル2~4中でさらに被験者3人のみ観察された(NEUG40mg群で被験者2人およびペグフィルグラスチム群で被験者1人)。治療効果は、どの化学療法サイクルでも統計的に有意ではなかった。

【0310】

(表13) サイクル1~4における好中球減少症の発生率

20

治療	全体	サイクル1	サイクル2	サイクル3	サイクル4
Neugranin 40 mg	4.7% (4/85)	3.5%	0.0%	2.4%	0.0%
Neugranin 50 mg	6.0% (5/85)	6.0%	0.0%	0.0%	0.0%
ペグフィルグラスチム	3.5% (3/86)	2.3%	0.0%	0.0%	1.2%

【0311】

サイクル2~4において重度の好中球減少症の持続期間中の治療間で有意差はなかった(表14)。

30

【0312】

(表14) サイクル2~4における重度の好中球減少症の平均持続期間

治療	サイクル2	サイクル3	サイクル4
Neugranin 40 mg	0.5	0.4	0.4
Neugranin 50 mg	0.4	0.5	0.6
ペグフィルグラスチム	0.5	0.4	0.6

【0313】

ANC回復($>1.5 \times 10^9 / L$)までの平均時間は、Neugranin40mg、NEUG50mg、およびペグフィルグラスチム群でそれぞれ、2.0、2.1、および2.6日であった(表15)。ANC最下点の低さまたは最下点までの時間に関して治療群間で有意差はなかった。

40

【0314】

(表15) ANC最下点、ANC最下点までの時間、および回復までの時間

パラメータ	Neugranin			pegfilgrastim (N = 86)	95% CI	p値
	40 mg (N=85)	50 mg (N = 84)	すべてNeug. N = 169)			
最下点ANC (10 ⁹ /L)						
n	85	84	169	86		0.423
平均(SD)	0.7 (0.88)	0.6 (0.68)	0.6 (0.79)	0.7 (1.04)		
メジアン	0	0	0	0		
Min/Max	0/5	0/3	0/5	0/7		
最下点ANCまでの 時間 (日)						
n	85	84	169	86		0.610
平均(SD)	604 (1.38)	6.7 (2.62)	6.5 (2.09)	6.5 (2.05)		
メジアン	6	6	6	6		
Min/Max	5/18	5/20	5/20	4/17		
ANCの回復> 1500までの 時間 (日)						
N	71	73	144	72		0.005
平均(SD)	2.0 (0.94)	2.1 (1.03)	2.0 (0.98)	2.6 (1.23)		
メジアン	2	2	2	2		
Min/Max	1/6	1/6	1/6	1/6		
治療の比較						
NEUG 50 mg - NEUG 40 mg					(-0.31;0.39)	
NEUG 40 mg - pegfilgrastim					(-0.88;-0.17)	
NEUG 50 mg - pegfilgrastim					(-0.84; -0.13)	

10

20

30

【 0 3 1 5 】

d. 第II相B部の薬物動態

血清Neugranin濃度は、6.312ng/mLの定量範囲の下限値(LLQ)で、有効なサンドイッチELISAを用いて測定した。薬物動態パラメータは、吸収半減期以外はノンコンパートメントモデル法を用いて計算し、吸収半減期は、一次吸収、一次排出1コンパートメントモデルを用いて測定した。モデリングは、WinNonlin Professional(バージョン5.0.1)を用いて行った。血清NEUG濃度は、第II相においてNEUGで治療されたすべての被験者における化学療法サイクル1で測定した。第II相A部では、NEUGの排出半減期の中間値は、30mg投与群で33時間であり、40mg投与群で46時間であり、50mg投与群で18時間であった(表16)。B部では、NEUGの排出半減期の中間値は、40mg投与群で40時間であり、50mg投与群で39時間であった(表17)。A部中は、PKサンプリングは、B部と比較して(投与前、3日目、5~8日目)、より頻繁に行われた(投与前、3時間、6時間、12時間、24時間、3日目、5~9日目、11日目)。

40

【 0 3 1 6 】

(表16) 第II相A部の治療による排出半減期の中間値

	NEUG 30 mg	NEUG 40 mg	NEUG 50 mg	PEGFILGRASIM 6 mg
被験者数	10	20	20	26
排出半減期を評価した被験者数	3	12	16	19
半減期 (時) のメジアン	33	46	18	40

【 0 3 1 7 】

(表 1 7) 第II相B部の治療による排出半減期の中間値

	NEUG 40 mg	NEUG 50 mg	PEGFILGRASIM 6 mg
被験者数	85	84	84
排出半減期を評価した被験者数	48	54	52
半減期 (時) のメジアン	40	39	50

10

【 0 3 1 8 】

血清PEGフィルグラスチム濃度は、第II相において、PEGフィルグラスチムで治療された被験者全員における化学療法サイクル1で、有効なサンドイッチELISAを用いて測定した。A部では、PEGフィルグラスチムの排出半減期の中間値は、約40時間であった。B部では、PEGフィルグラスチムの排出半減期の中間値は、約50時間であった。排出半減期は、フィルグラスチムで3~4時間、PEGフィルグラスチムで42~67.5時間(用量に応じて)であると報告される。

20

【 0 3 1 9 】

e. 免疫原性

試験参加者間で、Neugraninで治療された被験者において、確認された抗G-CSF/新エピトープ抗体反応1つおよびPEGフィルグラスチム治療群において抗G-CSF反応が1つ、すなわちそれぞれ0.5%および0.9%があった(表18)。どちらの場合も、被験者は、前投与試料中で非特異的結合の上昇があった。

【 0 3 2 0 】

(表 1 8) NEUGおよびPEGフィルグラスチムに対するG-CSFに特異的な治療により発現した免疫反応の概要

30

	NEUG 陽性反応 / 被験者数	PEGFILGRASIM 陽性反応 / 被験者数
第II相A部 (最大4サイクル)	0/50	0/26
第II相B部 (最大4サイクル)	1/169	1/86
総被験者数	1/219	1/112

40

【 0 3 2 1 】

NEUG治療後、患者において、非常に低レベルの確認された陽性抗体が見られ、反復投与後の応答の程度に明確な増加はなかった(データ示さず)。PEGフィルグラスチムで治療された患者では、異常に高い非特異的バックグラウンド結合が観察されたが、サイクル2治療後は確認された一過性抗体反応のみが見られた(データ示さず)。抗体反応は中和的ではなかった。

【 0 3 2 2 】

抗HSA抗体はこの集団において低レベルで天然に存在し、6.9%の被験者が投与前評価でHSA抗体に陽性であった。治療により発現した抗HSA抗体は、NEUG治療被験者4人(1.8%)で観

50

察された(表19)。反応はすべて一過性で弱かった。最初の治療サイクル後に3つの反応が現われ、サイクル2、3、および4の後は検出できなかった。3度目の治療後に反応が1つ起きたが、4度目の治療後の30日の経過観察では検出できなかった(データ示さず)。

【0323】

(表19)NEUGに対するHSAに特異的な治療により発現した免疫反応の概要

	NEUG 陽性反応 / 被験者数
第II相A部 (最大4サイクル)	0/50
	NEUG 陽性反応 / 被験者数
第II相B部 (最大4サイクル)	4/169
総被験者数	4/219

10

【0324】

f. 第II相B部における治療により発現した有害事象

第II相B部では、各治療群中の被験者の>90%が、治療により発現した有害事象(TEAE)を少なくとも1つ経験し、試験薬剤と関連する少なくとも1つのTEAEを有する被験者のパーセントは、ペグフィルグラスチム群で23.1%からNeugranin50mg群で35.0%の範囲であった。少なくとも1つのSAEを有する被験者のパーセントは、NEUG30mg群で最も高かった(30%)が、他の3つの治療群では約15%であった。SAEはどれも試験薬剤と関連していなかった。患者1人(NEUG30mg)は、糖尿病性足病変により試験から除かれ、これは試験薬剤とは関連しないと考えられた。B部では、被験者8人(NEUG40mg2人、NEUG50mg3人、ペグフィルグラスチム3人)以外はみな少なくとも1つのTEAEを有した。試験薬剤と関連する少なくとも1つのTEAEを有する被験者のパーセントは、NEUG50mg群で20.2%、NEUG 40mg群で22.4%、ペグフィルグラスチムが投与される被験者で22.1%であった。被験者2人(NEUG 40mg 1人、ペグフィルグラスチム1人)が試験中に死亡し、各治療群の被験者6~8人がSAEを少なくとも1つ経験した。死亡やSAEは試験薬剤と関連しないと考えられた。

20

【0325】

NEUG30mg用量についてサンプルサイズを考慮すると、TEAEの総数は、A部およびB部の治療群にわたって類似していた。A部およびB部の両方において、CTCグレード3以上のTEAEのパーセントは、試験薬剤に関連するTEAEのパーセントと同様に、NEUGおよびペグフィルグラスチムの場合で類似していた。

30

【0326】

g. 用量反応

第II相の結果は、NEUGの40および50mg固定用量がいずれも、骨髄毒性の化学療法で治療される乳癌被験者においてペグフィルグラスチム6mgと同等の安全性および効果をもたらすことを実証した。40mg治療群の平均DSNは、50mg群の平均DSNよりわずかに低かったが、これらの差異は統計的に有意ではなかった。用量応答は、体重により調整した用量を考慮した場合と固定用量コホートに対してとの両方でAUC_{ANC}について観察した(サイクル1における0~15日目)(図24)。30mgコホートのAUC_{ANC}は、ペグフィルグラスチムのそれよりわずかに低く、これは、30mg固定用量がこの研究では効果が劣るが、40mgおよび50mgコホートのAUC_{ANC}は用量相関性があり、ペグフィルグラスチム治療被験者のAUC_{ANC}よりも高い(有意ではないが)ことを示している。上の分析から、NEUGが体重調節基準(mg/kg)で投与されると、用量反応が明らかである。しかしながら、第II相B部のサイクル1におけるDSNの比較によって、治療群(40および50mgNEUGおよびペグフィルグラスチム)において、そして体重調節用量(mg/kg)で、DSNが有意に異ならなかったため、体重で四分した患者はすべて十分にサポートされることが示唆された。さらに、関連する有害事象(特に骨痛;データ示さず)の発生率および重症度が、体重1キログラム当たりに投与される用量と相関せず、また

40

50

ペグフィルグラスチムでの有害事象と差異はなかったので、固定用量が、より低体重の患者において安全性プロファイルに変更をもたらす可能性があるという証拠はなかった。

【0327】

本発明の趣旨または範囲から逸脱することなく、本発明の方法および組成物において多くの改変および変更をなし得ることが当業者には明らかである。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲およびその同等物の範囲内であれば、本発明の改変および変更を包含することが意図される。

【図1A-1】

1 GATGCACACAAGAGTGGGTTGCTCATCGGTTAAAGATTGGGAGAAGAAAATTCAAA 60
 1 D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K 2C

61 GCCTTGGTGTGGATTCCTTTCCTCAGTATCTTCAGGAGTGGCCATTTGAAGATCATGTA 12C
 21 A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D H V 4C

121 AAAATGATGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTGCTGATGAGTCAGCTGAA 18C
 41 K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E 6C

181 AATTGTGACAAATCACTTCATACCCCTTTTGGAGACAAATATGCACAGTTGCAACTCTT 24C
 61 N C D K S L H T L P G D K L C T V A T L 8C

241 CCTGAAACCTATGCTGAAAATGCTCCTCTCCAAAACAACACCTGACACAAATGAA 30C
 81 R E T Y G E M A D C C A K Q E P E R N E 10C

301 TGCTTCTTGCACAACAAGATGACAACCCAAACCTCCCGGATTTGGTGAGACAGAGGTT 36C
 101 C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V 12C

361 GATGTGATGTGCACGTCTTTTCATGACAATGAAGACACATTTTGAATAAACTACTATAT 42C
 121 D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y 14C

421 GAAATGCCAGAGACATCTTACTTTTATGCCCGGAACCTCTTCTTTGCTAAAAGG 48C
 141 E I A R R H P Y F Y A F E L L F P A K R 16C

481 TATAAAGCTGCTTTTACAGAAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCCTGCTTGGCA 54C
 161 Y K A A F T E C C Q A A D K A A C L L P 18C

541 AAGCTCGATGACTTCGGGATGAAAGGGAAGGCTTCCTGCTCCAAACAGAGACTCAAGTGT 60C
 181 K L D E L R D E G K A S S A K Q R L K C 20C

601 GCCAGTCTCCAAAATTTGAGAAAGAGCTTCAAAGCATGGGCACTAGCTGGCCTGAGC 66C
 201 A S L Q X F G E R A F K A W A V A R L S 22C

661 CAGAGATTTCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAA 72C
 221 Q R F P K A E F A E V S K L V T D L T K 24C

721 GTCACACGGGATGCTCCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGCGGACCTT 78C
 241 V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L 26C

781 GCCAAGTATATCTGTGAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGAAATGCTCTGAA 84C
 261 A K Y I C E N Q D S I S S K L K E C C E 28C

841 AAACCTCTGTTGGAAAATCCCACTGCATTTGCGGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCT 90C
 281 K P L L F E K S H C T A A F V R N D F M P A 30C

901 GACTTGCCTTCACTAGCTGCTGATTTTCTTCAAAAGTAAAGGATCTTTGCAAAAATCACT 96C
 301 D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A 32C

961 GAGGCAAGGATGCTTTCCTGGGCGATTTTGTGATGAATGCAAGAAGGCACTCCTGAT 102C
 321 E A K D V F L G M F L Y E Y A R R H P D 34C

1021 TACTCTGTGCTGCTGCTGAGACTTGCAGACATATGAAAACCACTTAGAGAAGTGC 108C
 341 Y S V V L L L R L A K T Y E T T L E X C 36C

【図1A-2】

1081 TGTCCGCTGCAGATCCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTT 1140
 361 C A A A D P H E C Y A K V P D E F K P L 380

1141 CTGGAGAGCCTCAGAAATTAATCAACAAAATTTGTGAGCTTTTTCAGCAGCTTGGAGAG 1200
 381 V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E 400

1201 TACAATTCAGAAATCCCTATTAATGCTTTCACCCAGGAAACTACCCCACTGTCAACT 1260
 401 Y K P Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T 420

1261 CCAACTCTGTAGAGGCTCAAGAAACCTTAGGAAAATGGGCAGCAAAATTTGTAACAT 1320
 421 P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H 440

1321 CCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTCCAGAAAGACTATCTATCCCTGCTCCTGAACAGTFA 1380
 441 P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L 460

1381 TGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAACTGACAGAGTACCAAAATGCTGCACAGAAATCC 1440
 461 C V L H E K T P V S D R V T K C C T E S 480

1441 TPGTGAACAGKCGACCATGCTTTTTCAGCTCTGGAAGTGTGATGAAACATACGTTCCCAA 1500
 481 L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K 500

1501 GAGTITTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAAGATATATGCACACTTTCGAGAGGAG 1560
 501 R F N A R T P T F H A D I C T I S E K R E 520

1561 AGACAAATCAAGAAACAACCTGCACITGTTGAGCTTCGTAAGCAACAAGCCCAAGGCAACA 1620
 521 R Q I K K Q T A L V E L V K H K P X A T 540

1621 AAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGATGATTTCCGAGCTTTTGTAGAGAACTGCTGCAAG 1680
 541 K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K 560

1681 GCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGTTAAAAAATTTGTTGCTGCAAGTCAA 1740
 561 A D D K E T C F A E E G K K L V A A S Q 580

1741 GCTGCTTACGCTTAAACCCCTTGGGCTTCCAGCTTCCCTGCCCAGAGCTTCCCTGCTC 1800
 581 A A L G L T P L G F A S S L F Q S P L L 60C

1801 AAGTGTTTAGAGCAAGTGAAGAGATCAGAGGCTGAGGCTGAGGCTTCCAGAGAAAGCTG 1860
 601 K C L E Q V R K I Q G D G A A L Q E K L 62C

1861 TGTGCCACCTACAGCTGTGCTCACCCTCCGAGGAGCTGGTGTGCTGCTGAGCACTCTCTGGC 1920
 621 C A T Y K I C H P R R L V L L G H S L G 64C

1921 ATCCCTGGGCTCCCTGAGCAGCTGCCACCCAGGAGGCTGAGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1980
 641 I P W A P L S S C P S Q A L Q L A G C L 66C

1981 AGCCAACTCCATAGCGGCTTTTCTCTTACCAGGGCTCTGCGAGGCTTGGAAAGGATC 2040
 661 S Q L H S C L F L Y Q G L L Q A L E C I 68C

2041 TCCCCGAGTGGGCTCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGAGCTGCGGACTGCGGACTTTGCCAC 2100
 681 S P E L G F T L D T L Q L D V A D F A T 70C

2101 ACCATCTGCGCAGATGGAAGAACTGGAAATGGCCCTGCTGCTGAGCCACCCAGGCT 2160
 701 T I W Q Q M E R E L G M A P A I Q P T Q G 72C

2161 GCCATGCCGCTTGGCTCTGCTTTTCAGGCGCGGAGGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2220
 721 A M P A F A S A F Q R R A G G V L V A S 74C

【 図 1 A - 3 】

2221 CATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTCCCGAGCC 2280
741 H I Q S P I F V S Y R V I R H I A Q P 759

図1Aキー:

G-CSFのアミノ酸配列に下線を付す
cDNA配列:A=アデニン、C=シトシン、G=グアニン、T=チミジン
アミノ酸配列: A = Ala, C = Cys, D = Asp, E = Glu, F = Phe, G = Gly, H = His, I = Ile, K = Lys, L = Leu, M = Met, N = Asn, P = Pro, Q = Gln, R = Arg, S = Ser, T = Thr, V = Val, W = Trp, Y = Tyr

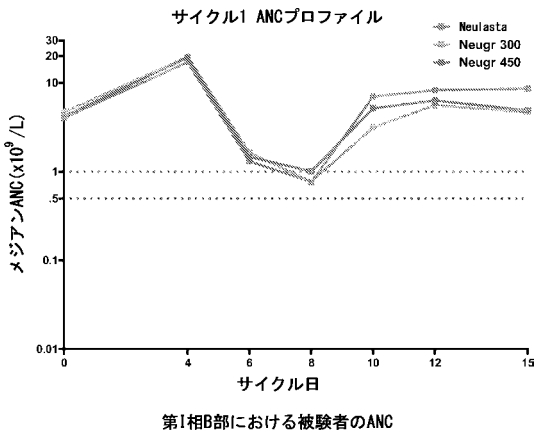
【 図 1 B 】

1 MAGPATQSPM KLMALQLLW HSALWTVQEA CPLGPASSLP QSFLLKCLEQ
VRXIQGUGAA
61 LQEKLCATYK LCHPEELVLL GHSLGIPWAP LSSCPSQALQ LAGCLSQLHS
GLFLYQGLLQ
121 ALKGISPELG PFLDPLQLDV ADFATTIWQQ MEELGMAPAL QPTQGAMPAF
ASAFQRRAGG
181 VLVASHLQSF LEVSYRVLRH LAQP

【 図 1 C 】

1 MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRRAHKSE VAHRFKDLCE ENFKALVLIA
FAQYLQCCPF
61 EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE
MADCCAKQSP
121 ERNECFIQHK DDNPNL PRLV RPEVDVMTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH
PYFYAPELLF
181 FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPLDLELR DEBKASSAKQ RLKCAQLQKF
GERAFKAWAV
241 ARLSQRFPKA EFAEVSRLVT DLTQVHTGCC HGDLLLECADD RADLAKYICE
NQDSISSKIK
301 ECCEKPLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVQ KNVAEAKDVF
LGMFLYEVAR
361 RHPDYSVWLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFE FKPLVEEPQN
LIKQNCLEPE
421 QLGEYKFNQA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM
PCAEDYLSVV
481 LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVKRRP CFSALEVDET YVPKEFNAT
PDPHADICTL
541 SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCCKAADKKE
CFAEEGKLV
601 AASQAALGL

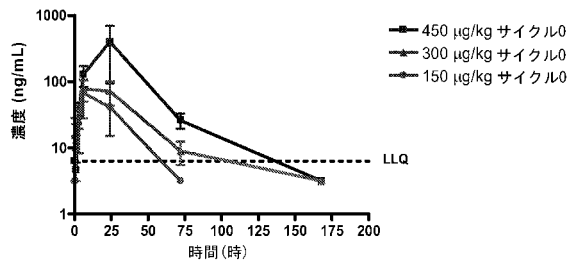
【 図 2 】



第I相B部における被験者のANC

被験者は、試験化学療法後にサイクル1において300mcg/kg (n=19)、450mcg/kg (n=20)、またはベグフィルグラステム (n=9) を投与された

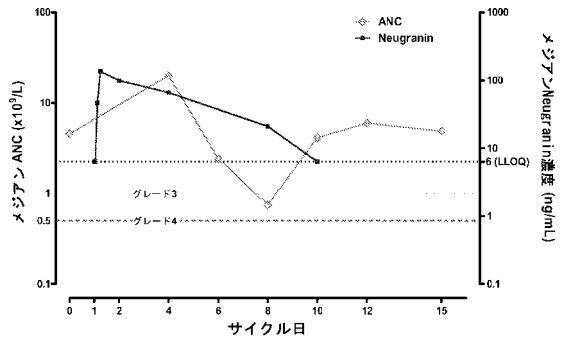
【 図 3 】



第I相ヒト被験者(サイクル0)におけるNeugraninの薬物動態

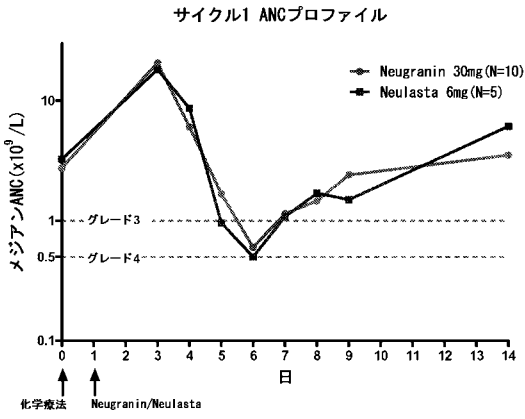
記載の用量で皮下投与したNEUGの血清濃度を、化学療法の非存在下で、乳癌被験者において測定した。

【 図 4 】



化学療法のサイクル1におけるNeugraninのPK/PD
第I相B部 (450 µg/kg Neugranin)

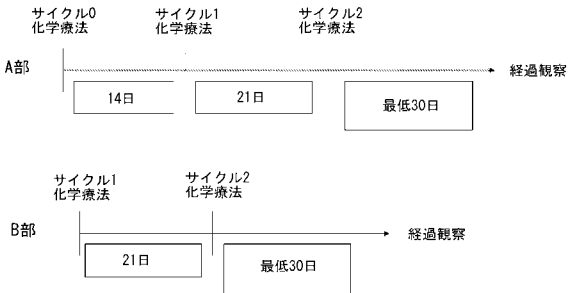
【 図 5 】



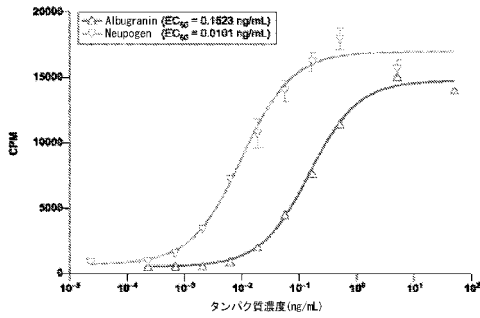
Neugraninを投与したグレード4好中球減少症患者の4/10
Neulastaを投与したグレード4好中球減少症患者の2/5

第11相、コホート1、サイクル1 ANCプロファイル

【 図 6 】

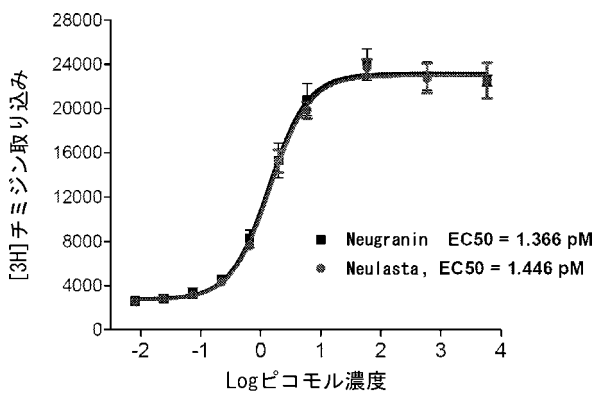


【 図 8 】

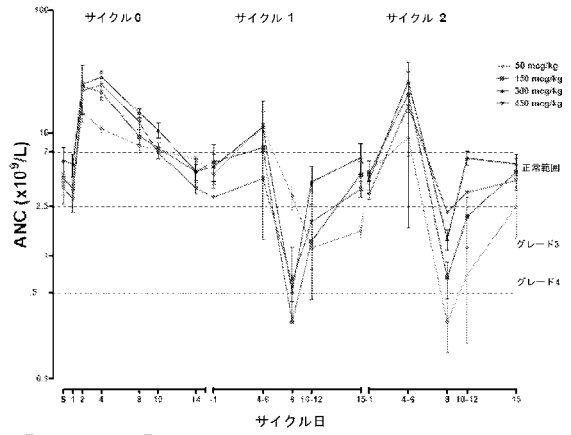


Albugranin=Neugranin (NEUG)

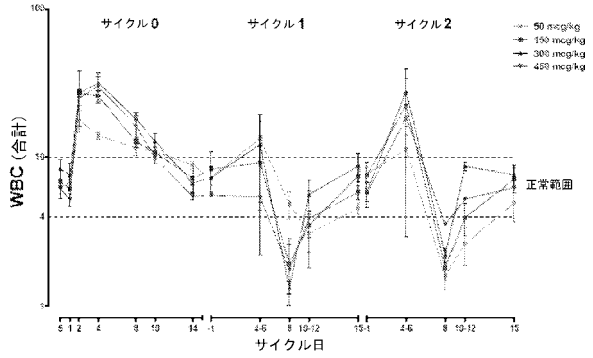
【 図 9 】



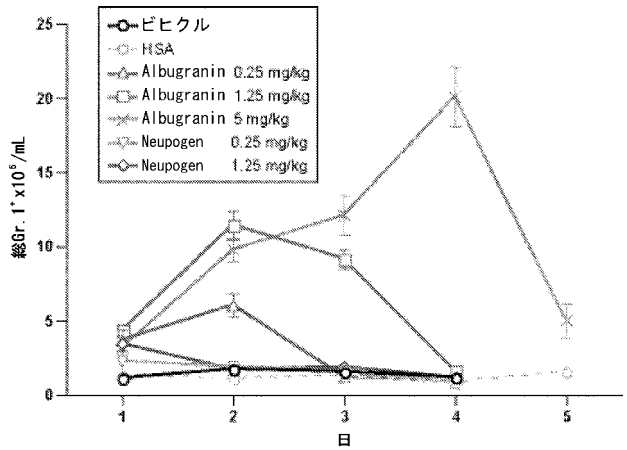
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

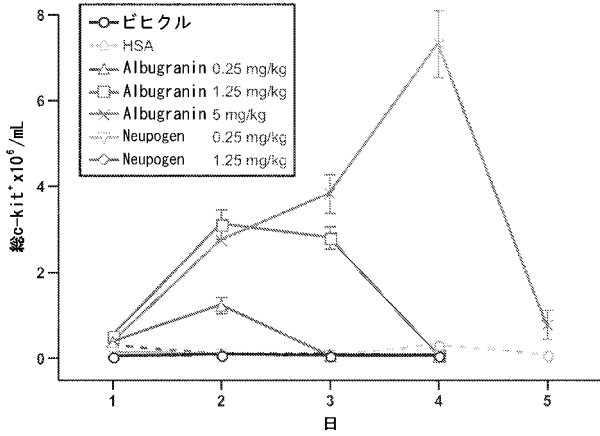


【 図 10 】



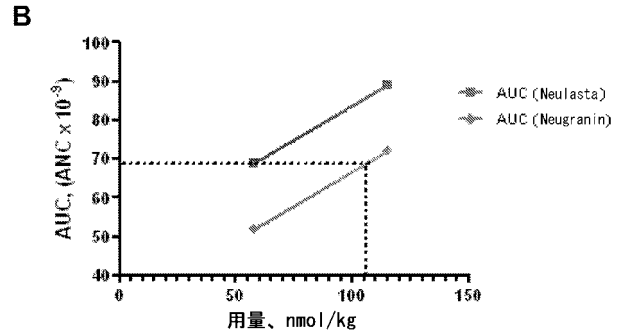
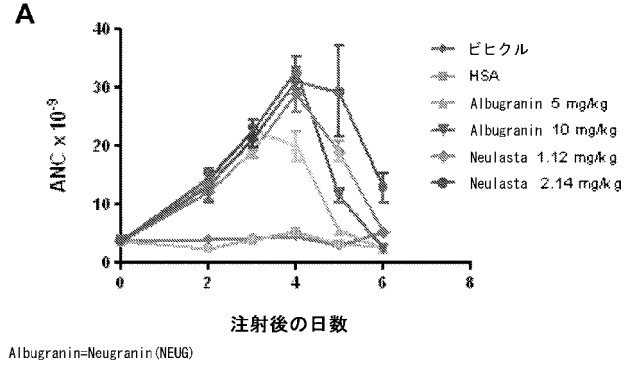
Albugranin=Neugranin (NEUG)

【 図 1 1 】



Albugranin=Neugranin (NEUG)

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

成分	濃度	バイアル毎に 送達可能な 量 ^a	グレード	目的
Neugranin	15.0 mg/mL	15.0 mg		API
リン酸ナトリウム	0.44 mg/mL (3.03M)	2.42 mg	USP, 複数の公定書	緩衝剤
リン酸二ナトリウム	0.97 mg/mL (7.04M)	0.35 mg	USP, 複数の公定書	緩衝剤
マンニトール	36.4 mg/mL (200 mM)	32.79 mg	USP, 複数の公定書	増量剤
トレハロース二水和物	22.70 mg/mL (60 mM)	22.70 mg	高純度	抗凍結剤
ポリソルベート80	0.1 mg/mL (0.01%)	0.1 mg	USP, 複数の公定書	凝集の阻害
注射用滅菌水	1.0mLで再構成	1.0 mL	USP	希釈剤

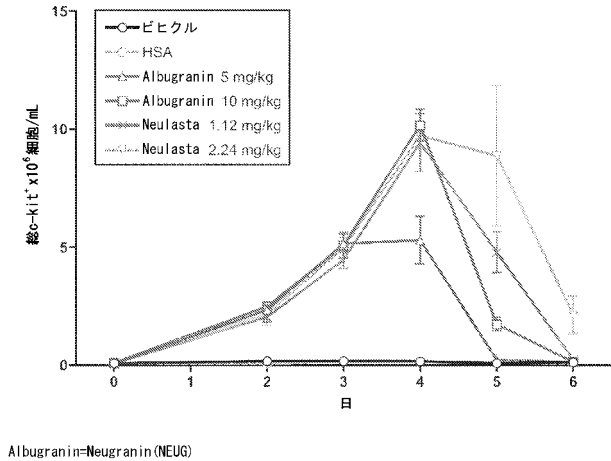
^a各バイアルは、1.0mL送達可能容量を確保するため0.16mL過剰に含む。

【 図 1 4 】

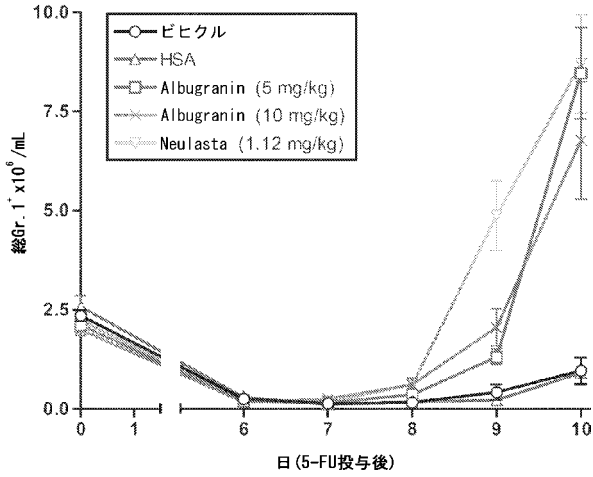
成分	濃度	バイアル毎に 送達可能な 量 ^a	グレード	目的
Neugranin (NEUG)	50.0 mg/mL	50.0 mg		API
リン酸ナトリウム	2/42 mg/mL (17.4 mM)	2.42 mg	USP, 複数の公定書	緩衝剤
リン酸二ナトリウム	0.35 mg/mL (2.5 mM)	0.35 mg	USP, 複数の公定書	緩衝剤
マンニトール	32.79 mg/mL (180 mM)	32.79 mg	USP, 複数の公定書	増量剤
トレハロース二水和物	22.70 mg/mL (60 mM)	22.70 mg	高純度	抗凍結剤
ポリソルベート80	0.1 mg/mL (0.01%)	0.1 mg	USP, 複数の公定書	凝集の阻害
注射用滅菌水	1.0mLで 再構成	1.0 mL	USP	希釈剤

^a各バイアルは、1.0mL送達可能容量を確保するため0.11mL過剰に含む。

【 図 1 5 】

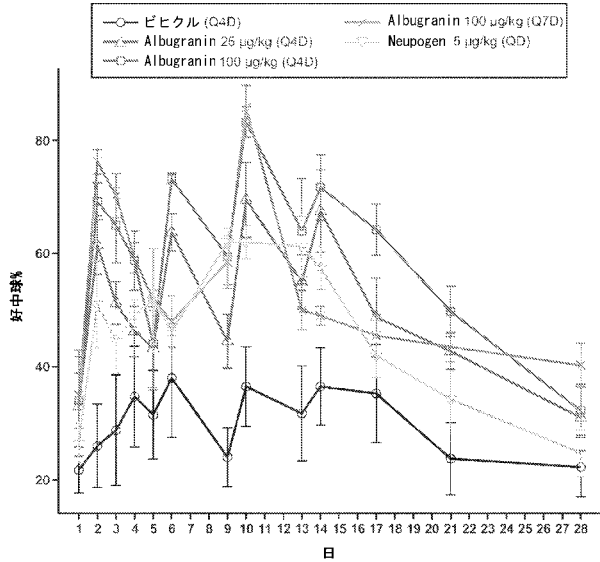


【 図 1 6 】



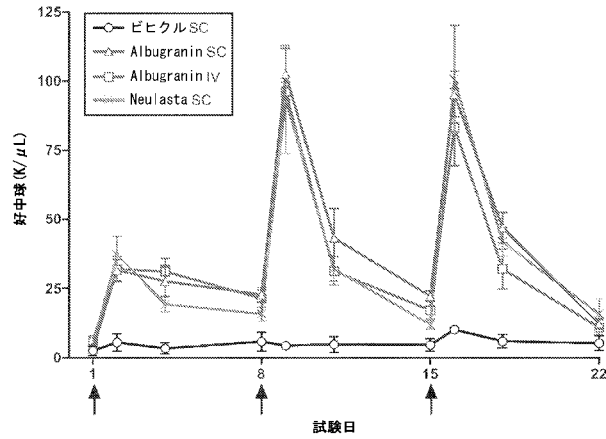
Albugranin=Neugranin (NEUG)

【 図 1 7 】



Albugranin=Neugranin (NEUG)

【 図 1 8 】



Albugranin=Neugranin (NEUG)

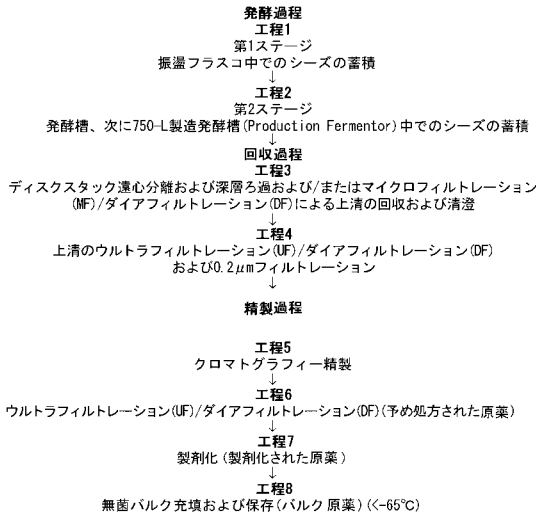
【 図 1 9 A 】

試験番号	試験計画またはモデル	種類	性別	匹数	持続期間 (日)	投与およびスケジュール	関連する知見
HG4300 (CNC-001)	単回IVまたはSC投与後のBPF1マウスおよびNeulastaの薬物動態	BPF1マウス	M	135 (単点値 (n=3匹))	3	IVおよびSC単回投与でNeugraninを1.25mg/kg、Neugraninを2.5mg/kg、Neulastaを0.75mg/kg、ビヒクルを0.0mg/kg IVおよびSC投与	Neugraninと比較して、Neugraninは、マウスのBPF1マウスに与えられた投与量と投与頻度が増加し、AlbugraninのCLは、IVおよびSCの両方の投与量の増加に伴って低下するようであり、これは、マウスにおけるNeugraninのSC/IVおよびIV/IVマウスにおけるNeugraninのSC/IVおよびIV/IVは0.25mg/kgおよび0.125mg/kgそれぞれ39%および61%である。
HG4300 (CNC-001)	BPF1マウスにおけるAlbugraninおよびNeulastaの薬物動態	BPF1マウス	M	135 (単点値 (n=3匹))	3	IVおよびSC単回投与でNeugraninを1.25mg/kg、Neulastaを0.75mg/kg、ビヒクルを0.0mg/kg IVおよびSC投与	BPF1マウスでは、IVおよびSCの両方の投与頻度について、NeugraninはNeulastaと比較して、半減期が長く、NeugraninのSC/IVおよびIV/IVは、Neulastaのものよりも低い(26%対74%)。
HG4300 (CNC-002)	5-FUで処理したBPF1マウスにおけるNeugraninの薬物動態	BPF1マウス	M	135 (単点値 (n=3匹))	4	5-FUの3、または5日後にNeugraninを5.0mg/kgでSC単回投与	正常なマウスと比較して、5-FU誘発性血小板減少症のマウスにおけるNeugraninのクリアランスは速い。これは、6-OSFのクリアランスに重要な役割を果たす好中球の数の減少に伴って、Neugraninのクリアランスに重要な役割を果たす好中球の数の減少による。
HG4300 (CNC-003)	血小板減少症のBPF1マウスにNeulastaを投与してSC単回投与	BPF1マウス	M	120 (単点値 (n=3匹))	6	5-FUまたはビヒクルの1日後にNeugraninを5.0mg/kgまたはNeulastaを0.75mg/kgでSC単回投与	これは、6-OSFのクリアランスに重要な役割を果たす好中球の数の減少による。

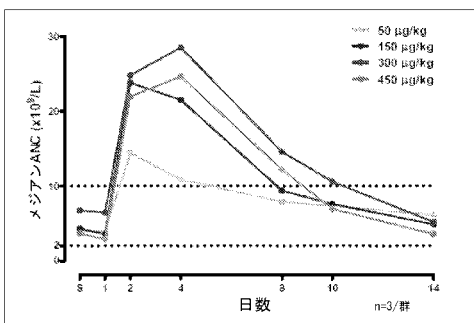
【 図 19 B 】

試験番号	試験科目またはモデル	種類	性別	匹数	特許期間(日)	試験およびスケジュール	関連する知見
HE4591/ONC.0.04	西側の病巣を切除したラットにおけるNeuramin、NeuraminaseおよびNeugogenの薬物動態	Sprague-Dawleyラット	M	グループ毎に4匹	4	Neuraminを1.2mg/kg、Neurastaseを0.27mg/kg、Neugogenを0.11mg/kgで、11時間経過後	病巣の切除後Neuraminのクリアランスに変化は無い。しかしながら、Neuraminの排出は腎クリアランスはあまり変わらなことを示しているようにある。このモデルでは、Neuraminのクリアランスは、NeuraminaseとNeugogenのクリアランスにほぼ等しい。したがって、Neuraminの排出は、腎クリアランスの(Neugogenのクリアランスの約2倍)に等しい。これは、Neuraminaseのクリアランスの約2倍であることを示している。
HE4591/ONC.0.07 Covance社(ONC.0.12)	皮下および静注によるNeuraminase、NeuraminaseおよびNeugogenの薬物動態	カニクイサル	M/F	グループ毎に3M/3F対照	5か月	IVおよびSCで連日の注射。その後、59日目Neuraminaseを1000μg/kg(1VおよびDSC)およびNeuraminaseを250μg/kg(300の2F)で注射	カニクイサルにおけるNeuraminaseのSCでの半減期は、NeuraminaseのSCでの半減期よりも約30%短い。NeuraminaseのC ₁ 、C ₂ 、C ₃ の値は、カニクイサルにおけるNeuraminaseのSCでの半減期と一致している。また、NeuraminaseのSCでの半減期は、NeuraminaseのSCでの半減期の約2倍であることを示している。また、NeuraminaseのSCでの半減期は、NeuraminaseのSCでの半減期の約2倍であることを示している。

【 図 2 1 】



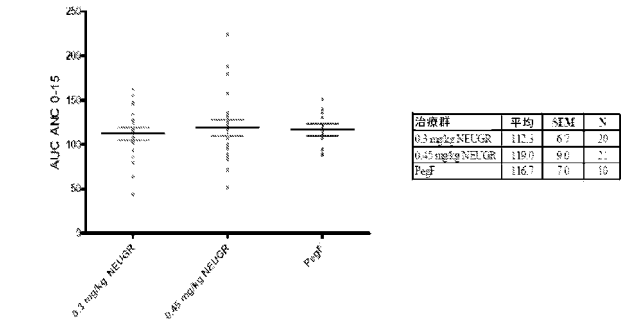
【 図 2 2 】



【 図 2 0 】

試験/種別	性別	種別	数/性別	治療(投与)	用量レベル	スケジュール	関連する知見
サルにおけるHEQP症候群の薬効薬理評価(ONC.123-109)	グループ毎に2M/2F	カニクイサル	グループ毎に2M/2F	Neuramin (SC) Neugogen (SC)	25および1mg/kg 5 mg/kg	4または7日毎(2週間)	死亡や重篤な副作用が観察されなかった。また、投与量依存性が増加した。2日目までにNeuraminで治療されたサル(2匹)は、8日目までにNeuraminで治療されたマウス(3匹)よりも速に回復した。Neuramin(30)で治療されたサルにおいて、一部のサルは回復が観察されたが、一部のサルは回復が観察されなかった。
HE4591/ONC.0.04 Covance社(ONC.0.12)	20 F	BALB/c マウス	20 F	Neuramin (SC)	0.25および1.25 mg/kg	2-4週間	死亡や重篤な副作用が観察されなかった。また、投与量依存性が増加した。2日目までにNeuraminで治療されたマウス(3匹)は、8日目までにNeuraminで治療されたマウス(3匹)よりも速に回復した。Neuramin(30)で治療されたサルにおいて、一部のサルは回復が観察されたが、一部のサルは回復が観察されなかった。
サルにおけるHEQP症候群の薬効薬理評価(ONC.0.016)	グループ毎に5M/5F	カニクイサル	グループ毎に5M/5F	Neuramin (SC)	0.100、0.25、および1.000 mg/kg	1, 8, 15, 22, 28, 35日目	死亡や重篤な副作用が観察されなかった。また、投与量依存性が増加した。2日目までにNeuraminで治療されたサル(3匹)は、8日目までにNeuraminで治療されたサル(3匹)よりも速に回復した。Neuramin(30)で治療されたサルにおいて、一部のサルは回復が観察されたが、一部のサルは回復が観察されなかった。
サルにおけるHEQP症候群の薬効薬理評価(ONC.0.018)	グループ毎に3M/3F(対照には1M/1F)	カニクイサル	グループ毎に3M/3F(対照には1M/1F)	Neuramin (SC) Neugogen (IV) Neulasta (SC)	1000 μg/kg (Neuramin) 1000 μg/kg (Neulasta)	1, 8, 15, 22, 28, 35日目	死亡や重篤な副作用が観察されなかった。また、投与量依存性が増加した。2日目までにNeuraminで治療されたサル(3匹)は、8日目までにNeuraminで治療されたサル(3匹)よりも速に回復した。Neuramin(30)で治療されたサルにおいて、一部のサルは回復が観察されたが、一部のサルは回復が観察されなかった。

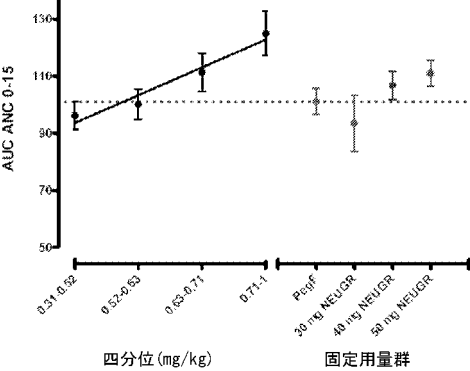
【 図 2 3 】



A

B

【 図 2 4 】



四分位 (mg/kg)

固定用量群

【手続補正書】

【提出日】平成23年9月16日(2011.9.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2012515222000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/021241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61K38/19 A61P43/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HALPERN WENDY ET AL: "Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys." PHARMACEUTICAL RESEARCH NOV 2002 LNKD-PUBMED:12458679, vol. 19, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 1720-1729, XP002589130 ISSN: 0724-8741 the whole document	1-22
Y	WO 93/15199 A1 (RHONE POULENC RORER SA [FR]) 5 August 1993 (1993-08-05) the whole document pages 32,33; examples 9,11	1-22
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2010		Date of mailing of the international search report 15/07/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Orlando, Michele

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/021241

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/021241

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/153751 A1 (ROSEN CRAIG A [US] ET AL) 26 June 2008 (2008-06-26) the whole document claims; examples 19-24 -----	1-22
Y	US 5 665 863 A (YEH PATRICE [FR]) 9 September 1997 (1997-09-09) the whole document column 12; claims 1-4,13; figures 7,8; examples -----	1-22
Y	Dave Mead: "Novozymes Biopharma - Rethinking Tomorrow" October 2008 (2008-10), XP002589546 Retrieved from the Internet: URL: http://www.biopharma.novozymes.com/Admin/Public/DWSDownload.aspx?File=%2FFiles%2FFiler%2FPresentations%2FBPE08_DaveMead_Oct08.pdf [retrieved on 2010-06-29] Slides 14, 16 -----	1-22
Y	US 2003/118612 A1 (NISSEN TORBEN LAUESGAARD [US] ET AL) 26 June 2003 (2003-06-26) the whole document examples 16,20,21 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/021241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9315199	A1	05-08-1993	AT 276361 T 15-10-2004
			CA 2126091 A1 05-08-1993
			DE 69333622 D1 21-10-2004
			DE 69333622 T2 27-10-2005
			EP 0624195 A1 17-11-1994
			ES 2230541 T3 01-05-2005
			FI 943563 A 29-07-1994
			FR 2686899 A1 06-08-1993
			JP 7503368 T 13-04-1995
			JP 2003235589 A 26-08-2003
			JP 2007306939 A 29-11-2007
			NO 942839 A 22-09-1994
			PT 624195 E 31-12-2004
			US 2005239167 A1 27-10-2005
US 2008153751	A1	26-06-2008	US 2007244047 A1 18-10-2007
US 5665863	A	09-09-1997	CA 2125979 A1 05-08-1993
			EP 0624200 A1 17-11-1994
			FI 943564 A 29-07-1994
			FR 2686900 A1 06-08-1993
			WO 9315211 A1 05-08-1993
			JP 7503844 T 27-04-1995
			NO 942858 A 01-08-1994
US 2003118612	A1	26-06-2003	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/535 (2006.01)	C 0 7 K 14/535	
C 0 7 K 14/76 (2006.01)	C 0 7 K 14/76	

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

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ボック ジェイソン ベンジャミン

アメリカ合衆国 メリーランド州 ノース ポトマック セクルーディド レーン 1 4 2 0 0

(72) 発明者 ベル アダム カール

アメリカ合衆国 メリーランド州 ジャーマンタウン レッド アドミラル ウェー 1 2 1 3 5

(72) 発明者 ヘルプスト ジェフリー

アメリカ合衆国 メリーランド州 エリコット シティ オータム ウッズ ウェー 4 6 0 5

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA01 BA02 BA22 BA41 BA44 CA53 DA19 DA36

MA02 NA06 NA14 ZA511 ZA512 ZB262

4C086 AA01 AA02 BA02 EA10 MA02 MA04 NA06 ZB26

4H045 BA10 BA41 CA40 DA11 DA70 EA20