

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4210113号
(P4210113)

(45) 発行日 平成21年1月14日(2009.1.14)

(24) 登録日 平成20年10月31日(2008.10.31)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48

請求項の数 12 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-534832 (P2002-534832)	(73) 特許権者	503133715
(86) (22) 出願日	平成13年10月11日(2001.10.11)		ユニバーシティー オブ サウス カロライナ
(65) 公表番号	特表2004-533598 (P2004-533598A)		アメリカ合衆国 29208 サウス カロライナ州, コロンビア, アドミニストラティブ ビルディング, オフィス オブ ジェネラル カウンセル
(43) 公表日	平成16年11月4日(2004.11.4)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/031599		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02002/031498	(74) 代理人	100096183
(87) 国際公開日	平成14年4月18日(2002.4.18)		弁理士 石井 貞次
審査請求日	平成16年10月6日(2004.10.6)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/239, 268		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成12年10月12日(2000.10.12)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホストが介在する不活性化からの治療組成物の保護

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ホストが介在する治療剤の不活性化を予防するために該治療剤の修飾条件を決定する方法であって、以下：

(1) 第1の修飾型治療剤を非ヒト被験体に投与した後に該第1の修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイし、ここで該第1の修飾型治療剤はポリエチレングリコール(PEG)を用いて修飾され；

(2) 少なくとも1回の該第1の修飾型治療剤の追加免疫投与を該非ヒト被験体に行った後に該第1の修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイし；

(3) 該第1の修飾型治療剤とは異なる修飾を施与した更なる修飾型治療剤を用いて(1)および(2)を実施し、ここで該更なる修飾型治療剤は生体適合性ポリマーを用いて修飾され；そして

(4) 該第1の修飾型治療剤の生物学的活性を該更なる修飾型治療剤の生物学的活性と比較する

ことを含み、ここで該治療剤はグルタミナーゼ - アスパラギナーゼである、上記方法。

【請求項2】

該更なる修飾型治療剤がポリエチレングリコール(PEG)で修飾される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

該PEGがモノメトキシスクシンイミジルブタノエート(SBA)-PEG、スクシン

10

20

イミジルカーボネート (S C) - P E G 、アルデヒド (A L D) - P E G 、およびスクシンイミジルプロピオネート (S P A) - P E G から成る群から選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

該更なる修飾型治療剤が該第 1 の修飾型治療剤と同じ程度まで修飾される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

ホストが介在する不活性化を予防する医薬組成物の調製法であって、請求項 1 記載の方法によって治療剤の修飾条件を確認し、該修飾条件に従って該治療剤を修飾することを含む、上記方法。

10

【請求項 6】

該医薬組成物が添加剤を更に含有する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

該添加剤が凍結乾燥の際に該治療剤を保護する、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

該治療剤がシュードモナス (Pseudomonas) グルタミナーゼ - アスパラギナーゼである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

該医薬組成物がスクシンイミジルカーボネートポリエチレングリコール 5 0 0 0 (S C - P E G 5 0 0 0) で修飾されたグルタミナーゼ - アスパラギナーゼを含有し、該グルタミナーゼ - アスパラギナーゼが S C - P E G 5 0 0 0 で 3.1% 修飾され、そして該組成物がホストが介在する不活性化を予防する、請求項 5 記載の方法によって調製される医薬組成物。

20

【請求項 10】

該医薬組成物がモノメトキシスクシンイミジルブタノエートポリエチレングリコール 5 0 0 0 (S B A - P E G 5 0 0 0) で修飾されたグルタミナーゼ - アスパラギナーゼを含有し、該グルタミナーゼ - アスパラギナーゼが S B A - P E G 5 0 0 0 で 3.5% 修飾され、そして該組成物がホストが介在する不活性化を予防する、請求項 5 記載の方法によって調製される医薬組成物。

【請求項 11】

30

該医薬組成物がアルデヒドポリエチレングリコール 2 0 0 0 (A L D - P E G 2 0 0 0) で修飾されたグルタミナーゼ - アスパラギナーゼを含有し、該グルタミナーゼ - アスパラギナーゼが A L D - P E G 2 0 0 0 で 5.1% から 6.6% まで修飾され、そして該組成物がホストが介在する不活性化を予防する、請求項 5 記載の方法によって調製される医薬組成物。

【請求項 12】

該医薬組成物がスクシンイミジルプロピオネートポリエチレングリコール 5 0 0 0 (S P A - P E G 5 0 0 0) で修飾されたグルタミナーゼ - アスパラギナーゼを含有し、該修飾されたグルタミナーゼ - アスパラギナーゼが S P A - P E G 5 0 0 0 で 5.5% 修飾され、そして該組成物がホストが介在する不活性化を予防する、請求項 5 記載の方法によって調製される医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、ホストが介在する不活性化から治療組成物を保護するような修飾条件を決定する方法に関する。本発明はまた、ホストが介在する不活性化から防護される修飾型治療剤にも関する。

【0002】

(技術背景)

ホストがその循環において外来物質に遭遇すると、ホストの免疫系が免疫応答を開始しう

50

る。この応答には物質を不活性化する抗体の産生があり、これによって細網内皮組織系による循環からの物質の除去も可能となる。従って、投与された非ヒト物質の治療有効期間は、多くの場合ホストの免疫系によって制限される。更に、ホストが介在する防御の問題によって、一般に循環中に見られない、または異種の系で組換えDNA法を使用して生成されたヒトタンパク質の有用性が制限される (Nucci, ML, Short, RおよびAbuchowski, A., 1991. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 6:133-151)。

【0003】

これらの物質を保護するための戦略の1つは、それらを炭水化物または生体適合性を有するポリマー、例えばポリエチレングリコール (“PEG”) のような物質との共有結合で修飾することである。例えばタンパク質の “PEG化” はそれらのタンパク質を免疫系から防護するために使用されてきた (Nucci, ML, Short, RおよびAbuchowski, A., 1991. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 6:133-151; Zalipsky, S. 1995. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16:157-182)。PEG化によってタンパク質の安定性が向上し (Nucci, ML, Short, RおよびAbuchowski, A., 1991. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 6:133-151)、また *in vitro*での免疫学的方法による測定で、それらの抗原性 (PEG化したタンパク質に対する、未修飾タンパク質に対して産生された抗体の反応の程度によって測定) および免疫原性 (処理動物においてPEG化したタンパク質に対する抗体産生の程度によって測定) が著しく低下する (Abuchowski, A., Van, Es, T., Palczuk, NCおよびDavids, FF., 1977. *Journal of Biol. Chem.*, 11:3578-3581)。

【0004】

しかしながら、PEG化によるタンパク質の修飾の1つの欠点は、多くの場合PEG化によって物質の生物学的活性が低下することである。低下の程度は使用する活性化型PEGのタイプおよび物質に結合させるポリエチレングリコール部分の数によって変化する。生物学的活性は、物質を特定のPEGでどの程度まで修飾するかによっても影響される。

【0005】

現在、使用する活性化型PEGの選択およびPEG化の程度は以下の2つの主な基準に基づく: 許容される治療活性の喪失 (Francis, GE, Delgado, C, Fisher, D, Malik, FおよびAgrawal, AK., 1996. *J. Drug Targeting*, 3:321-340) および物質の抗原性および免疫原性の低下。しかしながら、これらの基準に従った所定の物質のPEG修飾の評価は、多くの場合、独断的な結果となる。そのような独断的な例では、SC-PEG5000を使用してシュードモナス7Aグルタミナーゼ - アスパラギナーゼ (PGA) を74%まで修飾すると、20%未満の活性の喪失が起こる (米国特許第5,808,096号; 5,612,460号; 5,324,844号; 5,122,614号)。

【0006】

使用する活性化型PEGおよびPEG化の程度を決定するための既存の基準 (抗原性、免疫原性、および許容される生物活性の喪失) は、例えば物質を長期間にわたって患者に投与する場合、それらの物質の修飾を確認するには不十分である。上記の基準はいずれも、PEG化した物質をホストに投与した後の物質の生物学的活性に対するホストの応答の影響を考慮に入れていないため、これは事実である。結果として、前述の基準だけに依存すると、ホストの免疫系または他の *in situ*の不活性化から最適に保護されていない物質が生成される。

【0007】

従って、当業者が長期の治療期間中に患者に投与される所定の物質に関するPEG化の程度を決定できるような戦略が、現在非常に必要とされている。本発明者らは、新規の生理学的に適切な最適化のスキームを適用し、修飾剤がポリエチレングリコールである場合に、これらの修飾 (“PEG化”) の範囲は、治療活性、抗原性、および免疫原性の喪失をモニタリングする *in vitro*アッセイを使用して決定される最も好適なPEG化の範囲と同程度ではないことを発見した。現在、好適なPEG化の範囲を決定するこれらの *in vitro*法は、当業界で報告されている唯一存在する方法である。本発明者らの発見は、物質の過剰PEG化、並びに任意の修飾剤での物質の過剰修飾によって物質の2次および/または

10

20

30

40

50

3次構造が崩壊し、それによって新たな抗原決定基が免疫系に暴露されうることを示唆している。理解されるようにこの観察は、治療剤の有効循環半減期を向上するために使用される他の生体適合性を有するポリマーまたは物質にも同様に適用される。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、ホストが介在する治療剤の不活性化を予防するために該治療剤の修飾条件を決定する方法に関し、方法は以下を含む：(1)第1の修飾型治療剤を被験体に投与した後、該第1の修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイする；(2)少なくとも1回の第1の修飾型治療剤の追加免疫投与を該被験体に行った後、第1の修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイする；(3)第1の修飾型治療剤と異なる修飾を行った更なる修飾型治療剤を用いて(1)および(2)を実施する；そして(4)第1の修飾型治療剤の生物学的活性を更なる修飾型治療剤の生物学的活性と比較する。

10

【0009】

本発明は、長期間にわたる被験体への治療的投与に好適なグルタミンアゼ - アスパラギナーゼ(GA)およびポリエチレングリコール(PEG)を含有する修飾型治療組成物で、GAが約21%から49%の間でPEG化され、PEGがSC-PEG5000であるものに関する。

【0010】

本発明はまた、長期間にわたる被験体への治療的投与に好適なGAおよびPEGを含有する修飾型治療組成物で、GAが約25%から58%の間でPEG化され、PEGがSBA-PEG5000であるものに関する。

20

【0011】

本発明は更に、長期間にわたる被験体への治療的投与に好適なGAおよびPEGを含有する修飾型治療組成物で、GAが約45%から65%の間でPEG化され、PEGがALD-PEG2000であるものに関する。

【0012】

本発明は更に、長期間にわたる被験体への治療的投与に好適なGAおよびPEGを含有する修飾型治療組成物で、GAが約25%から65%の間でPEG化され、PEGがSPA-PEG5000であるものに関する。

【0013】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、ホストが介在する治療剤の不活性化を予防するために該治療剤の修飾条件を決定する方法に関し、方法は以下を含む：(1)第1の修飾型治療剤を被験体に投与した後、第1の修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイする；(2)少なくとも1回の第1の修飾型治療剤の追加免疫投与を被験体に行った後、第1の修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイする；(3)第1の修飾型治療剤と異なる修飾を行った更なる修飾型治療剤を用いて(1)および(2)を実施する；そして(4)第1の修飾型治療剤の生物学的活性を更なる修飾型治療剤の生物学的活性と比較する。

30

【0014】

ここで使用する、ホストが介在する不活性化の予防とは、治療剤に対する被験体の正常な自己防衛反応またはその効果が低減することを言う。自己防衛反応には、物質を不活性化する抗体の産生(これによって細網内皮組織系による循環からの物質の除去が可能となる)、並びに解毒機構の誘導(治療剤を治療的に不活性化化合物に変換する作用をする)が含まれうる。ホストの自己防衛機構のために、多くの場合、投与される非ヒト物質の治療有効期間は制限される。従って本発明は、物質がホストの自己防衛機構を回避し、その結果としてホストにおける治療剤の治療有効期間が延長されるような治療剤の修飾条件を確認する直接的なin vivoの機能的方法を提供する。予防とは、修飾型治療剤に対するホストの正常な不活性化機構の有効性が完全に、または部分的に低下し、それによって物質の治療有効期間が未修飾の、または既に修飾された治療剤より増加されることを意味しうる。

40

50

【 0 0 1 5 】

本発明の方法では、第 1 の治療剤および更なる治療剤は同一の活性成分または構造的に関係する類似体であるが、少なくとも 1 つの態様ではそれらは異なって修飾されている。ある実施形態では、治療剤は同一であり、修飾剤は同一であるが、治療剤に結合する修飾剤の量または程度が異なる。別の実施形態では、治療剤は同一であるが、修飾剤は異なる。ここで使用する“更なる”とは 1 つ以上を意味し、従ってここで記載する方法は 1 つ以上の修飾型治療剤を第 1 の修飾型治療剤と比較することを含む。

【 0 0 1 6 】

修飾条件とは、治療剤に結合または連結する修飾剤のタイプ並びに修飾の程度および条件を言う。本発明の面で理解されるように、治療剤の修飾の程度もしくは度合い、または量は、修飾剤で修飾された治療剤のアミノ酸残基の数を修飾可能なアミノ酸の総数で割って、パーセントで表したものを意味するのに使用される。例えば 20% “PEG 化された”物質（これは物質がポリエチレングリコール（PEG）をそれに結合させることによって修飾されていることを意味する）とは、PEG が治療剤のリジン残基の 20% に連結または結合していることを意味する。修飾条件の他のパラメーターには、それに限定される訳ではないが以下がある：使用される修飾剤のタイプ（例えば生体適合性ポリマー）、修飾を行う際のバッファー、pH、圧力、および温度、治療剤のコンフォメーション状態、使用される治療剤のタイプ（例えば構造的に関連する類似体のいずれかに対する親化合物）、および修飾剤または治療剤の物理的状態（限定される訳ではないが、液体、固体、および気体状態、マトリクスに結合した状態、製品（product）の基質に結合した状態、凍結乾燥した固体、凍結した液体、または凝縮した気体）。

【 0 0 1 7 】

例えばポリペプチドの修飾パーセントは種々の従来技術の一つによって測定できる。ある実施形態によれば、修飾したポリペプチドをポリペプチドの特定の遊離アミノ酸を検出するアッセイを使用してアッセイし、ここで遊離アミノ酸は選択した修飾剤と反応するアミノ酸のタイプを表す。例えば、フルオレスカミンは未修飾のリジン基と反応して蛍光誘導体を生成する。フルオレスカミンを含むアッセイは、例えば興味のあるポリペプチドをリジンに対する親和性を有する修飾剤と反応させるような条件下で使用するのに好適なアッセイである。修飾されていないポリペプチドと修飾されたポリペプチド間の蛍光誘導体の生成の偏差を比較することによって、当業者は特定のポリペプチドに関係する修飾の程度を確認することができる。

【 0 0 1 8 】

メルカプトまたはスルフヒドリル基特異的 PEG の PEG 化の程度は分光光度法によって決定できる。代表的な方法は利用可能なシステインスルフヒドリル基を定量し、これらの官能基を 2, 2'-ジピリジルジスルフィドと反応させ、2-チオピリドンを生じさせて表す。pH 7.2 で、2-チオピリドンは 343 nm で吸収し（adsorbs）、 $\epsilon = 7060$ である。別の有効な方法では、エルマン試薬 [5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）] を 2, 2'-ジピリジルジスルフィドの代わりに使用する。別の実施形態では、ポリペプチドの修飾の程度はマトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（Matrix-assisted-laser-desorption-ionization mass spectrometry; MALDI）によって測定できる。MALDI によって約 100,000 ダルトンまでの高分子のフラグメント化していない単荷電（singly-charged）分子イオンの質量が得られ、そのため PEG コンジュゲート（例えば PEG 化したポリペプチド）の分子イオンの質量の測定の大きな助けとなる。更に、異なる数の PEG を含有する PEG 化反応産物の組成物（例えば“一量体（one-mer）”、“二量体（two-mer）”など）を、MALDI 技術を使用して確立することができる。従って、本発明は物質が修飾される程度またはパーセントを推測するための種々の技術を企図する。

【 0 0 1 9 】

出発物質としての特定の物質または他の好適な治療組成物の修飾のパーセントは本発明の範囲から逸脱することなく変化しうる。例えば、まず物質を約 25% から約 75% 間での

10

20

30

40

50

間で修飾し、次いでここに開示する方法に従って被験体に投与することができる。

【0020】

本発明のある実施形態によれば、一度特定の治療剤または組成物を選択すれば、この物質または組成物に修飾手順（例えばPEG化）を施し、被験体に投与するための物質または組成物の修飾条件を決定してもよい。もちろん、所定の物質または治療組成物に関する修飾条件は、使用する修飾剤のタイプおよび物質または組成物の特性によって変化する。ある実施形態では、選択した修飾剤を特定の物質と反応させた後、修飾された物質を被験体に投与する。好ましい実施形態では、まず物質または治療組成物を精製し、液体（例えば標準的なバッファ溶液）の懸濁液に溶解し（dissolved in a suspension of fluid）、その後修飾剤と反応させる。最終的に物質または組成物の分離した画分を得る。その後、当業者が同修飾剤の修飾の度合いの確認を試みるなら、例えば選択したPEGの濃度を各画分に添加するが、修飾剤の濃度はそれぞれの画分で変化させる。物質または組成物と修飾剤の反応は、修飾剤または組成物の濃度の一部が物質に共有結合して物質または組成物を修飾するように行う。従って、各画分は、修飾された物質または組成物の他の画分に関連する修飾パーセンテージとは異なるパーセンテージで修飾された物質または組成物を含有する。治療剤または組成物が核酸を含有するベクターの場合、修飾剤を、例えば表面抗原決定基のリジンアミノ基または他の官能基（単数または複数）に結合させてもよい。

10

【0021】

本発明によれば、好適な治療剤には、限定される訳ではないが、アミノ酸、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、または小分子（例えば薬剤）がある。更に、治療剤は被験体または患者に治療的利益を与える能力のある物質である。物質または化合物（compound）という用語は、ここでは互換性を持って使用する。本発明の企図としては、“治療的利益”という用語は、状態または疾病の治療を必要とする患者において状態または疾病の症状を緩和、低減、および除去する物質への生理学的または細胞応答を意味することを意図する。また治療的利益は、患者が“治癒する”、または、患者が罹患している状態の原因物質もしくは因子が除去、破壊、もしくは矯正されるような物質に対する生理学的または細胞応答も意味する。ある実施形態では、本発明は治療剤としてのポリペプチドの使用を企図する。更なる実施形態では、このポリペプチドは約300から約300,000ダルトンの単量体分子量を含む。

20

【0022】

ある実施形態では、治療剤または組成物を使用してそれらの治療を必要とする被験体において癌を治療することができる。本発明に従って治療できる多くのタイプの癌があり、それらには例えば前立腺癌、卵巣癌、およびグリア芽腫がある。治療しうる他のタイプの癌には以下がある：慢性および急性白血病、骨、脳、胸部軟骨、子宮頸（cervix）、食道、腎臓、喉頭、肝臓、肺、膵臓、および子宮の癌。更に、本発明の物質または組成物をホジキン病、リンパ腫、黒色腫、多発性骨髄腫、結腸直腸癌、および睾丸癌の治療（combat）に使用してもよい。

30

【0023】

別の実施形態では、治療剤または組成物を使用してそれらの治療を必要とする被験体におけるウィルス感染を治療することができる。従って、本発明の修飾された物質または組成物はこれらの3つの主な群のウィルスに対して有効であり得る。本発明に従って治療できる特定のウィルスには、限定される訳ではないがヒト呼吸系発疹ウィルス（RSV）、単純疱疹ウィルス（HSV）、およびヒト免疫不全ウィルス（HIV）がある。

40

【0024】

他の治療可能なウィルスには以下の密接に関係するウィルスがある。呼吸系発疹ウィルスはパラミクソウィルス科に属する。他のヒトに感染しうる、パラミクソウィルス科に属するウィルスには以下がある：パラインフルエンザウィルス1、2、3、4（上気道疾患、気管支炎/細気管支炎、肺炎を誘引する）、流行性耳下腺炎ウィルス、および麻疹ウィルス。パラミクソウィルス科はラブドウィルス科およびフィロウィルス科と非常に近い関係にあるが、これはそれらの科に属するウィルスがセグメント化されていない、膜に封入さ

50

れた (enveloped) 1 本鎖 RNA (ネガティブセンス) ゲノムを含有するためである。ラ
ブドウィルス科に属するヒト感染性ウィルスは水疱性口内炎インディア、ニュージャージ
ー、球菌ウィルス、チャンディブラウィルス、ピリウィルス、Isfahanウィルス、狂犬病
ウィルス、Mokolaウィルス、およびDuvenhageウィルスである。フィロウィルス科に属す
るヒト感染性ウィルスにはマールブルグウィルスおよびエボラウィルスがある。より広範
には、呼吸系発疹ウィルスはRNAウィルスである。

【0025】

ヒト感染症の原因となる他のRNAウィルスには以下がある：ポリオウィルス1、2、お
よび3；コクサッキーウィルスB1-B6；ヒト・エコーウィルス1-9、11-27、お
よび29-34；ヒト・エンテロウィルス1-113；ノーウォークウィルスおよびヒトに
10 おいて胃腸炎を誘引するカリチウィルス (Caliciviruses) 科に属する同様のウィルス；
東部ウマ脳炎ウィルス；西部ウマ脳炎ウィルス；ベネズエラウマ脳炎ウィルス；チクング
ニヤウィルス；オニオンニオンウィルス；ロスリパーウィルス；マヤロウィルス；風疹ウ
ィルス；黄熱病ウィルス；デング熱ウィルス；西部ナイルウィルス；セントルイス脳炎ウ
ィルス；日本脳炎ウィルス；マーレーバレー脳炎ウィルス；Rocioウィルス；ダニ媒介性
脳炎ウィルス；ヒト・コロナウィルス229-EおよびOC43；上気道感染症、おそら
くは肺炎、ことによると胃腸炎；インフルエンザA、B、およびCウィルス；ブンヤムウ
エラウィルス；ブワンバウィルス；オリボカウィルス；オロポーシェウィルス；グワマ (Gwama)
ウィルス；カリフォルニア脳炎ウィルス；ラクロスウィルス；タヒナウィルス；
20 ネパール砂バエ熱ウィルス；クリミアコンゴ出血熱ウィルス；Hantaanウィルス (韓国出
血熱、腎症候性出血熱、流行性ネフロパシー (nephropalthis epidemica))；リンパ球
性脈絡髄膜炎 (LCM) ウィルス；ラッサウィルス；Machupaウィルス (ポリビア出血熱
)
；フニンウィルス (アルゼンチン出血熱)；レオウィルス1、2、および3；Orungoウ
ィルス (ナイジェリアおよびウガンダにおける熱性疾患)；ケメロボウィルス (ロシアお
よびエジプトにおける熱性疾患)；ヒト・ロタウィルス、コロラドダニ熱ウィルス。

【0026】

マウス・ラウシャー白血病ウィルスはレトロウィルス・ファミリーに属する。このファミ
リ
ーに属するウィルスは1本鎖 (ポジティブセンス) のセグメント化されていない、膜に
封入されたゲノムを有するが、それらは複製においてDNA段階を伴う。このファミリ
ー
に属するヒト感染性ウィルスにはC型腫瘍ウィルス、例えばヒトTリンパ球好性 (lympho
30 tropic) ウィルス1 (HTLV-I、成人T細胞白血病) およびヒトTリンパ球好性 (lym
photropic) ウィルス2 (HTLV-II、おそらくヘアリーセル白血病と関係する)、後天
性免疫不全症候群 (AIDS) の原因となるヒト免疫不全ウィルス1および2 (HIV1
およびHIV2)、そしてAIDS様疾患の原因となるHIV1およびHIV2に関連す
る他のウィルスがある。

【0027】

単純疱疹ウィルスはヘルペスウィルス科に属する。ヘルペスウィルス科に属するウィルス
は2本鎖の膜に封入されたゲノムを有し、ポックスウィルス科およびイリドウィルス科に
属するウィルスと共有する特性を有する。ヘルペスウィルス科に属するヒト感染性ウィ
ルスには以下がある：単純疱疹ウィルス1および2、セルコピルテシン (cercopithecine
40)、ヘルペスウィルス1 (B-ウィルス)、水痘・帯状疱疹ウィルス、ヒト・サイトメガ
ロウィルス、EBウィルス、およびヒト・ヘルペスウィルス6。ポックスウィルス科に属
するヒト感染性ウィルスには痘瘡ウィルス (天然痘、アラストリム)、ワクシニアウィ
ルス、サル痘ウィルス、牛痘ウィルス、羊鷲口瘡ウィルス (感染性膿疱性皮膚炎)、偽牛痘
(搾乳者小結節) ウィルス、ヤナ痘ウィルス、タナ痘ウィルス、および伝染性軟腫ウ
ィルスがある。より広範には、単純疱疹ウィルスはDNAウィルスであり、このカテゴリー
の他のヒト感染性ウィルスは以下である：B型肝炎ウィルス；ヒト・パルボウィルスB-
19、パルボウィルスRA-1、および胃腸炎の原因となる他のパルボウィルス；ヒト乳
頭腫ウィルス (HPV) 1-48；ポリオーマウィルス (例えばJC、SV40、および
BK)；およびアデノウィルス (例えばマストアデノウィルスh1-h49)。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

前記のように、治療剤はポリペプチドでもよい。“タンパク質”、“ペプチド”、および“ポリペプチド”という用語は互換性を持って使用する。好適なポリペプチドの例には、それらに限定される訳ではないが以下がある：酸化還元酵素、例えば酸素酸化還元酵素（1.7.3.3；“ウリカーゼ”）、過酸化水素酸化還元酵素（1.11.1.6；“カタラーゼ”）、および酸素酸化還元酵素（20-ベータ-水酸化）（1.14.1.9；“コレステロール20-ヒドロキシラーゼ”）；転移酵素、例えばグルクロニルトランスフェラーゼ（2.4.1.17；“UDPグルクロニルトランスフェラーゼ”）、および-D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ（2.7.7.12）；加水分解酵素、例えばムコペプチドN-アセチルムラミルヒドロラーゼ（3.2.1.17；リゾチーム）、トリプシン（3.4.4.4）、およびL-アスパラギン・アミノヒドロラーゼ（3.5.1.1；“アスパラギナーゼ”）；リアーゼ、例えばフルクトース-1,6-ジホスフェートD-グリセルアルデヒド-3-ホスフェート-リアーゼ（4.1.2.12；“アルドラーゼ”）；イソメラーゼ、例えばD-キシロースケトール・イソメラーゼ（5.3.1.5、キシロースイソメラーゼ）；およびリガーゼ、例えばL-アスパラギン酸リガーゼ（AMP）（6.3.4.5）。いくつかのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、および酵素は治療活性を有することが明らかになっている。

10

【 0 0 2 9 】

他のポリペプチドの中でも、本発明においては以下のような治療的に有用な酵素（天然および組換え）が企図される：炭水化物特異的酵素、タンパク分解酵素、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、およびリガーゼ。治療的酵素の例には、限定される訳ではないが以下がある：アスパラギナーゼ、グルタミナーゼ-アスパラギナーゼ、例えばシュードモナス7Aグルタミナーゼ-アスパラギナーゼ（“PGA”）、アルギナーゼ、アルギニンデイミナーゼ、アルギニンデカルボキシラーゼ、リジンデカルボキシラーゼ、ヒスチジンアンモニアリアーゼ、アデノシンデアミナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、DNアーゼ、エンドトキシナーゼ、カタラーゼ、キモトリプシン、リパーゼ、ウリカーゼ、アデノシンジホスファターゼ、チロシナーゼ、ビルルピンオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルコウロニダーゼ、血栓溶解剤アクチパーゼ（Activase）、（アルテプラーゼ）、ストレプターゼ（ストレプトキナーゼ）、アボキナーゼ（ウロキナーゼ）、およびエミナーゼ（アニストレプラーゼ）、凝固因子VII、VIII、およびIX、血液凝固剤レフルダグン、アンチトロンピン、およびインテグリン、-アンチトリプシン、ウリエートオキシダーゼ、インドリル-3-アルケン-ヒドロキシラーゼ（IAH）、メチオニナーゼ、ノイラミニダーゼ、フェニルアラニン（phenylalanine）アンモニアリアーゼ、およびリパーゼ。

20

30

【 0 0 3 0 】

他のポリペプチドには、限定される訳ではないが以下がある：ホルモンおよび成長因子、例えばインスリン、エリスロポエチンおよびエリスロポエチン様の活性を有するホルモン、成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、インスリン様成長因子、血小板由来成長因子（PDGF）、ホスホリパーゼ活性化タンパク質（PLAP）、トランスフォーミング成長因子-ベータ（TGF-β）、組織成長因子 および、上皮成長因子、線維芽細胞成長ホルモン、ケラチン細胞成長ホルモン、レプチン（leptin）、神経成長因子、骨形態形成因子、幹細胞因子、稔性ホルモン、ヒト副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、プロラクチン、絨毛性性腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、血管内皮成長因子、アムリン（amlin）、インスリノトロピン（insulintropin）、グルカゴン、エンドスタチン（endostatin）、アンギオスタチン（angiostatin）、ソマトメジン、色素ホルモン；酵素、例えばアスパラギナーゼ、グルタミナーゼ-アスパラギナーゼ；サイトカイン、例えばインターフェロン-α、インターフェロン-β、インターフェロン-γ、腫瘍壊死因子-α（TNF-α）、腫瘍壊死因子受容体、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子、インターロイキン1から15、骨髄性progenitor阻害因子1、インターロイキン受容体アンタ

40

50

ゴニスト (IL-1ra)、TNF受容体融合タンパク質、T細胞阻害タンパク質、ヘモグロビン、血清タンパク質、例えばVII、VIII、およびIX因子、免疫グロブリン(ヒトまたは他の哺乳動物)、例えばIgG、IgE、IgM、IgA、IgD、およびそれらのフラグメント(FabおよびscFvを含む)、および植物タンパク質(例えばレクチンおよびリシン)。

【0031】

本発明はまた、ある実施形態では、抗微生物活性(例えば抗真菌活性および抗細菌活性)を示す物質の使用も企図する。本発明によれば、親抗微生物性ポリペプチドの例には以下がある: 真菌属クブラリア由来の殺真菌活性ポリペプチド(例えばW094/01459号に記載される); 抗細菌性ポリペプチド(例えばヨーロッパ特許第403,458号に記載される); *Mirabilis*の種子から単離された抗微生物性タンパク質(例えばW092/15691号に記載される); ブタ小腸の抽出物から単離された抗細菌性ポリペプチド(W092/22578号に記載される); ハンゼヌラ種の酵母に蓄積されるような酵母致死作用を有するポリペプチド(例えば日本特許出願公開第60-130599号に記載される); 抗菌物質として使用できる *Phytolacca insularis* 抗ウィルスタンパク質(米国特許第5,348,865号に記載される); ノカルジオプシス・ダッソンビレイ(*Nocardiosis dassonvillei*)由来の溶菌酵素標品(例えば米国特許第5,354,681号に記載される)。本発明で企図される他の抗微生物性ポリペプチドの更なる例には以下がある: マガニン(maganin)、プロテグリン(protegrin)、デフェンシン(defensin)、シュードマイシン(pseudomycin)、ムタノリシン(mutanolysin)、およびN-アセチルノイラミダーゼ(N-acetylneuramidase)。

【0032】

本発明は更に、天然から入手できるポリペプチド、並びに組換えDNA技術を使用して生成されるポリペプチドの使用を企図する。それらのポリペプチドには非グリコシル化ポリペプチドおよび翻訳後修飾(例えばリン酸化、グリコシル化など)によって修飾されていないポリペプチドがある。本発明はまた、生体活性を有する部分ペプチド、並びに2つ以上の官能基を結合させた融合タンパク質を企図する。

【0033】

別の実施形態では、本発明は更なる治療剤、例えば核酸の使用を含む。核酸を被験体に直接投与するか、またはプラスミドまたはウィルスベクターの一部として投与することができる。被験体へのそれらの投与はここに記載する方法に従って行うべきである。本発明によれば、好適なベクターにはレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス、ヘルペスウィルス、レンチウィルス、または遺伝子治療に有用な他のウィルスがある。ベクターが宿主細胞に遺伝子を運搬する能力があれば、このベクターは遺伝子治療に“有用”である。ある実施形態によれば、ベクターはある核酸配列を含有し、後にその配列から興味のあるポリペプチドが転写される。別の実施形態では、核酸を使用して、それらの治療を必要とする被験体においてウィルス感染、例えばヒト免疫不全ウィルス(HIV)の治療を行う。更なる実施形態では、核酸を使用して、それらの治療を必要とする被験体において癌を利用する。

【0034】

本発明において提供する方法は、治療剤の修飾条件の決定を、動物または被験者への投与後に修飾された物質の生物学的活性を評価することによって行う。“生物学的活性”とは、その物質が直接的または間接的に誘引する細胞または生理学的応答または反応を意味する。生物学的活性はin vivo、in vitro、またはin situで評価することができる。生物学的活性の例には、限定される訳ではないが反応を触媒する酵素、受容体または抗体に結合する分子、受容体介在型反応(例えばイオンの内向き流束/外向き流束または第2メッセンジャーの生成)の仲介、受容体介在型反応の拮抗または阻害、アポトーシスの誘導、および神経伝達物質またはホルモンの放出または取り込みがある。生物学的活性は薬剤が被験体に施与する治療的利点と同一の活性である必要はない。例えば、当業者はin vitroまたはin situで修飾型治療剤の受容体への結合能力を測定し、治療剤が治療的利点に寄与していることを証明することができた。しかしながら、使用するアッセイのタイプは投与

10

20

30

40

50

される治療剤のタイプに従って変化する。好適なアッセイは治療剤の生物学的活性を検出することができるいずれかのアッセイである。例えば、投与される物質がグルタミナーゼ活性を有するならば、この場合に好適なアッセイはそれらのグルタミナーゼ活性を検出できるものである (Roberts, J., 1976. Journal of Biological Chemistry, 251:2119-2123)。投与される治療剤が (例えば生物学的活性を有するポリペプチドを転写する能力のある) 核酸配列を含有するベクターである場合、好適なアッセイは転写されたポリペプチドの生物学的活性を検出できるアッセイである。投与された治療剤が血清中での生物学的活性を測定するための簡易なアッセイを有さない場合、免疫学的アッセイを使用して血清中の治療組成物の量を定量することができる。

【0035】

この初期投与量のアッセイに続いて、修飾型治療剤を被験体に1以上の追加免疫投与量で投与する。ここで使用する“追加免疫投与量”は慣例的な治療的投与量計画に従って被験体に投与される治療剤の量を擬態する傾向のある投与量である。追加免疫投与量は上記のような初期投与量以上、未満、またはそれと同量であることが可能である。好ましい実施形態では、追加免疫投与量は初期投与量より低い濃度である。“治療的投与計画”とは、治療的利点を被験体にもたらずのに十分な治療剤の量を言う。

【0036】

ここで使用する被験体、患者、および動物という用語は互換性を持って使用する。本発明によれば、好適な被験体には哺乳動物、特に齧歯動物、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、非ヒト霊長類、およびヒトがある。好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【0037】

ここで使用する“修飾型治療剤”とは、修飾剤を治療剤に結合または連結させた治療剤を意味する。修飾剤とは、治療剤に対する被験体の免疫原性または抗原性応答を、修飾されていない同治療剤に対する被験体の免疫原性または抗原性応答に比較して低下させる物質または化合物を意味する。修飾剤の例には、限定される訳ではないが生体適合性ポリマーがある。例えば、ポリエチレングリコール (PEG) のようなポリマーを薬剤またはポリペプチドに付加することができ、これによって、被験体への利点は与えられたまま、ポリペプチドに対する被験体の免疫応答が低下する。付加されたPEGが存在しなければ、薬剤またはポリペプチドは被験体の免疫系によって中和され、薬剤またはポリペプチドが被験体に施与する生物学的活性の一部または全部が喪失しうる。

【0038】

本発明によれば、好適な生体適合性ポリマーには以下がある：モノアルキルでキャップされたポリアルキレンオキシドのホモポリマー、コポリマー、およびブロック・コポリマー (それぞれ直鎖または分枝鎖であってもよい)。本発明によれば、モノアルキルでキャップされたポリアルキレンオキシドにはポリエチレングリコール (“PEG”) ホモポリマーおよびポリプロピレングリコールホモポリマーがある。本発明によれば、使用に好適な他の生体適合性ポリマーはデキストラン、ポリビニルピロピドン、およびDLアミノ酸である。好ましい実施形態では、生体適合性ポリマーの一端を末端キャッピングして交差誘導体化 (cross derivatization) の防止を補助する。好適な“キャッピング”基には直鎖または分枝鎖の低級アルコキシ基；好ましくはモノメトキシ基がある。

【0039】

ある実施形態では、生体適合性ポリマーを活性化した後にカップリング反応を行い、共有結合の形成を可能にする。この実施形態によれば、活性化に好適な水酸基を、物質に面する生体適合性ポリマーの末端に結合させる。本発明は共有結合のために選択されるアミノ酸によって、生体適合性ポリマーを活性化するいくつかの方法を提供する。

【0040】

好ましい実施形態では、生体適合性ポリマーはPEGホモポリマーである。PEGの分子量は約300から約60,000ダルトンまでの範囲であることが可能であり、より好ましくは1,000から20,000の間である。特定のPEGの分子量の選択は、PEGで修飾する特定の物質の性質を考慮して行うことができる。特に考慮すべき事柄には、修

10

20

30

40

50

飾に利用できるような、物質のアミノ基または他の官能基の数がある。本発明の特に好ましいPEGホモポリマーはモノメトキシポリエチレングリコール(mPEG)およびその誘導体である。

【0041】

特定の実施形態では、選択されるPEGは以下であることが可能である：モノメトキシスクシンイミジルブタノエート(SBA)-PEG、スクシンイミジルカーボネート(SC)-PEG、アルデヒド(ALD)-PEG、mPEGスクシンイミジルスクシネート、mPEGスクシンイミジルスクシンアミド、mPEGスクシンイミジルプロピオネートSPA-(SPA-PEG)、スクシンイミジルブタノエート、mPEGのスクシンイミジルカーボネート、カルボキシメチル化したmPEGのスクシンイミジレステル、mPEG-オキシカルボニルイミダゾール、mPEGニトロフェニルカーボネート、mPEGトリクロロフェニルカーボネート、mPEGトレシレート(tresylate)、mPEG無水マレイン酸およびmPEGメチルマレイン酸無水物、mPEGスクシネートの混合無水物、mPEG酢酸またはmPEGプロピオン酸、mPEGアルデヒド、mPEGマレイミド、mPEGビニルスルホンおよびmPEG-オルトピリジルジスルフィド、そしてフェニルグリオキサールのmPEG誘導体。

10

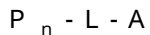
【0042】

本発明はまた、米国特許第5,612,460号、5,808,096号、5,643,575号、5,672,662号、5,990,237号(全て参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるPEGの使用を提供する。

20

【0043】

本発明のある態様では、以下の式に相当するPEGポリマーを提供する：



式中、(P)はPEGであり；(n)は少なくとも1、2、または3であり；(L)は各(P)に共有結合する結合部分であり；そして(A)は求核置換されることが可能な活性官能基を表す。(A)は、例えば結合能力のある生物学的に活性な求核試薬または部分と結合する能力のある基であることが可能である。このポリマーは他のタイプの物質の中でも、ポリペプチドと結合する能力がある。

【0044】

ポリペプチドへのポリマーの結合位置は、例えば官能基(A)に依存する。例えば、(A)はリジンのイプシロンアミノ基と反応するスクシンイミジルスクシネートまたはカーボネートであることが可能である。慣例的な化学を使用してPEGポリマーを活性化し、生物学的に活性な物質上に見られる第1級もしくは第2級アミノ基、チオール基、カルボン酸基、または反応性カルボニル基と結合させることもできる。他の活性化基には当業者に明らかなものがある。

30

【0045】

また本発明は、物質にPEGを結合させる種々の結合部分の使用も企図する。ある実施形態では、結合部分は18個まで、より好ましくは1-10個の炭素原子鎖を含有する脂肪族基である。ヘテロ原子、例えば窒素、酸素、または硫黄をアルキル鎖内に含んでもよい。アルキル鎖は炭素または窒素原子で分岐していてもよい。本発明の別の態様では、(L)は1個の窒素原子である。より詳細には、好適な脂肪族には置換されたアルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステル、およびマロン酸エステル誘導体がある。本発明によれば、結合部分は好ましくは非平面であり、ポリマー鎖は強く固定されていない。また、結合部分(L)は複数のPEG、または“分枝”を(A)に結合させるための手段である。

40

【0046】

結合部分(L)および各(P)は好ましくは(P)および(L)の両方の求核官能基間の反応によって結合する。各(P)を機能化して求核置換を行い、(L)と結合させてもよい。この機能化の工程は慣例的な技術に従って容易に実施することができる。

【0047】

50

広範な結合が (P) および (L) 間で企図される。Larwoodら (Labeled Compounds Radiopharm., 21:603-614(1984)) の報告によれば、ウレタン結合は種々の生理学的条件下で非常に安定であるため、ウレタン (カーバメート) 結合は好ましい。(P) および (L) 間のカーバメート結合は、例えばアミノ基 (例えば 1 , 3 -ジアミノ - 2 -プロパノール) をメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルカーボネートと反応させることによって生成することができ、これは米国特許第5,122,614号に記載されている (本開示は参照により本明細書に組み入れられる)。アミド結合も (P) および (L) 間の結合として企図され、これはamino-terminated非抗原性ポリマー (例えばメトキシポリエチレングリコールアミン (m P E G アミン) を塩化アシル官能基と反応させて生成することができる。

【 0 0 4 8 】

(P) および (L) 間の他の結合の例にはエーテル、アミン、尿素、そしてそれらのチオおよびチオール類似体、並びに上記のウレタンおよびアミド結合のチオおよびチオール類似体がある。これらの結合は当業者に十分理解される方法によって生成する。更なる好適な結合、並びにその生成は、米国特許第4,179,337号 (参照により本明細書に組み入れる) を参照して決定することができる。

【 0 0 4 9 】

部分 (A) は、ここに記載する P E G ポリマーを “ 活性化し ”、これらのポリマーと1つ以上の生物学的に活性な物質 (例えば薬剤または治療組成物) とのコンジュゲートを提供する基を示す。従って、(A) は以下から選択される部分であることが可能である：

I . アミノ基と反応する能力のある官能基。例えば：

a) カーボネート、例えば p -ニトロフェニル、もしくはスクシンイミジル； b) カルボニルイミダゾール； c) アズラクトン； d) 環状イミドチオン；または e) イソシアネートもしくはイソチオシアネート；

II . カルボン酸基および反応性カルボニル基と反応する能力のある官能基。

例えば：

a) 第1級アミン；および b) ヒドラジンおよびヒドラジド官能基、例えばアシルヒドラジド、カーバゼート (carbazates)、セミカーバメート、チオカーバゼート (thiocarbazates) ；

III . メルカプトまたはスルフヒドリル基と反応する能力のある官能基。例えば：

フェニルグリオキサール。この種類の官能基は例えば米国特許第5,093,531号に開示されており、この開示は参照により本明細書に組み入れられる；または

IV . 求電子中心と反応する能力を有する他の求核試薬。限定される訳ではないがヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、チオール基、および活性メチレンがある。

【 0 0 5 0 】

(A) 部分は脂肪族結合部分 (L) に近接する位置に “ スペーサー ” を含むことができる。スペーサー部分は、例えば18個までの炭素原子を含むヘテロアルキル、アルコキシ、アルキル、または更なるポリマー鎖であってもよい。これらのスペーサー部分は慣例的な合成技術を使用して付加することができる。当然、(A) 部分は生物学的に活性な求核試薬以外の他の部分と反応することもできる。

【 0 0 5 1 】

ある実施形態では、本発明は医薬組成物の調製法を提供し、組成物における活性な治療剤の修飾の度合いまたは程度をここに提供する方法によって確認する。

【 0 0 5 2 】

修飾された治療剤を既知の方法に従って生成し、それらの物質またはその機能的誘導体を製薬上許容される担体賦形剤 (carrier vehicle) と混合する、医薬的に有用な組成物を調製することができる。好適な添加剤およびその生成 (ヒト・タンパク質、例えばヒト血清アルブミンを含む) は、例えばレミントンの薬学 (第16版、Osol, A., 編, Mack, Easton PA (1980)) に記載されている。有効な投与に好適な製薬上許容されるを調製するために、同組成物は有効量の本発明の1つ以上の薬剤を好適な量の担体賦形剤と共に含有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

本発明に従って使用するための医薬組成物は、1つ以上の生理学的に許容される担体または添加剤を使用して慣例的な方法で調製してもよい。従って、化合物および生理学的に許容されるその塩および溶媒和化合物は吸入もしくは通気（口または鼻を通して）、または経口、口腔内（buccal）、非経口、もしくは直腸投与による投与のために調製してもよい。ある実施形態では、選択される添加剤は、凍結乾燥の際、治療組成物（すなわち医薬品）を保護する能力を有する。添加剤は、例えばCaCl₂、グルタミン酸ナトリウム、またはスクロース、アルギニン、もしくはマンニトールであることができる。

【 0 0 5 4 】

経口投与には、医薬組成物は例えば慣例的な方法によって医薬上許容される以下のような添加剤と共に調製される錠剤またはカプセル剤の形態であってもよい：結合剤（例えば化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えばラクトース、微結晶セルロース、またはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ）；崩壊剤（例えばジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸エステルナトリウム）；または湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）。錠剤は当該分野で周知の方法によってコーティングしてもよい。経口投与のための液体製剤は、例えば液体、シロップ、もしくは懸濁液の形態であってもよく、または、乾燥粉末であって使用前に水もしくは他の好適な媒質と共に調合してもよい。それらの液体製剤は慣例的な方法によって、例えば以下のような製薬上許容される添加剤と共に調製してもよい：懸濁化剤（例えばソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂）；乳化剤（例えばレシチンまたはアカシア）；非水性媒質（例えば扁桃油、油性エステル、エチルアルコール、または精製（fractionated）植物油）；および保存剤（例えばp-オキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、またはソルビン酸）。製剤は必要によりバッファ塩、着香剤、着色剤、および甘味剤を含有してもよい。

【 0 0 5 5 】

経口投与のための製剤は、活性化合物を制御放出するのに好適に調製してもよい。口腔（buccal）投与では、組成物は慣例的な方法で調製した錠剤またはトローチ剤の形態であってもよい。

【 0 0 5 6 】

吸入による投与では、本発明に従って使用する化合物を、好適な噴霧剤（例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の好適な気体）を使用して、加圧パック（pressurized packs）または噴霧器からのエアロゾルスプレーの形態で慣例的に運搬してもよい。加圧エアロゾルの場合、測定された量を運搬するためのバルブを提供して投与単位を決定してもよい。吸入器または注入器で使用するための（例えばゼラチンの）カプセルおよびカートリッジは、化合物および好適な粉末基剤（例えばラクトースまたはデンプン）の粉末混合物を含有して調製してもよい。

【 0 0 5 7 】

化合物を、例えば大量注射または持続注入（continuous infusion）による注射による非経口投与のために調製してもよい。注射用製剤は、保存剤を添加して（例えばアンブルまたは多投与（multi-dose）容器中の）単位投与量の形態であってもよい。組成物は油性または水性媒体中の懸濁液、溶液、または乳濁液の形態であってもよく、また懸濁化剤、安定化剤、および/または分散剤のような調合剤（formulatory agents）を含有してもよい。あるいはまた、活性成分は粉末の形態であって、使用前に好適な媒体（例えば発熱性物質を含有しない無菌水）と共に調合してもよい。

【 0 0 5 8 】

化合物はまた、（例えば慣例的な座薬基剤（例えばココア脂または他のグリセリド）を含有する）座薬または停留浣腸のような直腸用組成物として調製してもよい。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

前記の製剤に加え、化合物をデポ製剤として調製してもよい。それらの長時間作用性製剤を（例えば皮下または筋肉内の）インプランテーションまたは筋肉内注射によって投与してもよい。従って、例えば化合物を好適なポリマー物質もしくは疎水性物質（例えば許容される油中の乳濁液として）もしくはイオン交換樹脂と共に、または僅かに可溶性誘導体（例えば僅かに可溶性塩）として調製してもよい。

【0060】

組成物は、必要により、活性成分を含有する1つ以上の単位投与形態を含有するパックまたはディスペンサー装置であってもよい。例えばパックは、プリスターパックのように金属またはビニール性のホイル（例えば）を含んでよい。パックまたはディスペンサー装置に投与のための説明書を添付してもよい。

10

【0061】

従って、本発明はグルタミナーゼ - アスパラギナーゼ（GA）およびポリエチレングリコール（PEG）を含有する被験体への長期間にわたる治療投与に好適な医薬組成物を提供し、ここでGAは約21%から49%の間でPEG化され、PEGはSC-PEG5000である。ある実施形態では、GAはSC-PEG5000で約26%から36%PEG化される。好ましい実施形態では、GAはSC-PEG5000で約31%PEG化される。PEG化の程度は本発明の方法によって確認する。

【0062】

本発明はまた、GAおよびPEGを含有する被験体への長期間にわたる治療投与に好適な医薬組成物を提供し、ここでGAは約25%から58%PEG化され、PEGはSBA-PEG5000である。ある実施形態では、GAはSBA-PEG5000で約30%から40%PEG化される。好ましい実施形態では、GAはSBA-PEG5000で約35%PEG化される。PEG化の程度は本発明の方法で確認する。

20

【0063】

本発明はまた、GAおよびPEGを含有する被験体への長期間にわたる治療投与に好適な医薬組成物を提供し、ここでGAは約45%から65%PEG化され、PEGはALD-PEG2000である。PEG化の程度は本発明の方法で確認する。

【0064】

本発明はまた、GAおよびPEGを含有する被験体への長期間にわたる治療投与に好適な医薬組成物を提供し、ここでGAは約25%から65%PEG化され、PEGはSPA-PEG5000である。ある実施形態では、GAはSPA-PEG5000で約40%から55%PEG化される。PEG化の程度は本発明の方法で確認する。

30

【0065】

（基本的方法論）

本発明の基本方法は修飾された治療剤または組成物を被験体へ投与することを伴う。次に、被験体の血液を治療剤の生物学的活性についてアッセイする。次いで被験体を、治療的に有用なレベルである修飾された物質または組成物の1回以上の投与で治療する。被験体の血液を、治療剤または組成物の生物学的活性について再びアッセイする。最初の測定とその後の測定からの活性の低下を確認する。上記を複数回反復してもよい。また、修飾の程度が異なる別のロットの治療剤を用いて方法を反復してもよい。修飾の理想的なレベルは、投与間で生物学的活性の低下が最も低くなるものである。

40

【0066】

被験体に投与される修飾型物質または組成物の量、並びに投与方法は、本発明の範囲から逸脱することなく変化しうる。一般に、投与される修飾型物質の最初の量は、好適なアッセイによって物質または組成物の生物学的活性を検出するのに十分な量である。好ましくは、治療剤は修飾型治療剤の投与後、約12から48時間で検出可能である。

【0067】

最初の治療の後、血液、血清、または他の体液において、投与された修飾型治療剤の生物学的活性をアッセイする。当業者は修飾型治療剤の投与および投与された修飾型治療剤の生物学的活性のアッセイの好適な期間を確認することができる。ある実施形態では、投与

50

の約30分後および約10日後に生物学的活性をアッセイする；しかしながら、治療剤の投与とその生物学的活性に関するアッセイの間の期間は本発明の範囲から逸脱することなく変化しうる。生物学的活性が検出される場合、1回以上の追加免疫投与を、ここに記載する方法論に従って被験体に行ってもよい。この追加免疫投与の治療計画を行った後、被験体に修飾型物質の3回目の投与を、投与された治療剤の生物学的活性をアッセイするのに十分な量となる濃度で、一般にはこの用量の投与の少なくとも約30分後から10日後に行ってもよい。その後、投与された治療剤の生物学的活性を好適なアッセイで測定する。この投与計画は(1)被験体に修飾型治療剤または組成物の追加免疫投与を1回以上行い、(2)好適なアッセイによって物質または組成物の生物学的活性を検出するのに十分な濃度の修飾型物質を投与し、その後(3)投与された物質または組成物の生物学的活性をアッセイすることを含むが、これを更に反復することができる。

10

【0068】

有意義な比較データを得るために、本発明は同治療剤を使用する上記の方法論の反復を企図するが、ここで治療剤は異なるレベルで修飾される。投与計画、すなわち被験体への(1)1回以上の修飾型物質の追加免疫投与、それに次ぐ(2)好適なアッセイによって物質または組成物の生物学的活性を検出するのに十分な濃度の修飾型物質の投与、その後の(3)投与された物質の生物学的活性のアッセイにより、この物質の生物学的活性がこの修飾型物質を投与した被験体において検出可能なままである期間が明らかとなる。当然、本発明はこの過程の反復を提供するが、興味のある物質は既知の、しかし異なるパーセンテージで修飾する。

20

【0069】

別の実施形態では、本発明は同治療剤を2ロット以上使用する上記の方法論の反復を企図するが、ここで治療剤は各ロットで同一の、または実質的に同様のレベルまで修飾される。本質的に上記のような投与/アッセイ方法論の反復により、被験体に投与される治療剤の生物学的活性を延長するのに最も有益である修飾剤が明らかになる。特定の修飾剤の選択後、本発明は上記の投与/アッセイ投与計画のように、選択した修飾剤を使用して同治療剤の理想的な修飾の程度を決定するための投与計画を提供する。

【0070】

所定の物質に関する修飾条件を決定する工程は多くの場合、一群の物質の中での特定のパーセンテージまたはその範囲の選択を必要とし、そのそれぞれは既知の、しかし互いに異なるパーセンテージまで修飾されたものである。異なる、しかし既知のパーセンテージまで修飾されているこれらの物質間のデータを比較することによって、当業者は特定の物質に関する理想的なレベルを推測することができる。一般に、本発明の方法により本発明の物質または組成物の循環レベルが増加し、それによって循環半減期が増加する。

30

【0071】

治療的有効量の決定は十分に臨床医の範囲内であり、物質または組成物の正確な同一性、修飾剤、および患者の特徴に大きく依存する。一般的な手引きは、例えばInternational Conference on Harmonisationの文献に見られる。それらの決定は、特に本発明の化合物の毒性および有効性の概要に依存する。

【0072】

最初の臨床試験では、治療を必要とする患者または健康なボランティアに修飾型物質または組成物を特定の用量(通常は低用量)で、一定期間にわたって特定の感覚で投与する。臨床医による確認で有害反応がなければ、この処置を物質または組成物の用量を連続的に増加させて反復してもよい。このように、可能性のある有毒な副作用およびパラメーター(たとえば生物学的利用能)を、当該分野で容易に知れる方法を使用して確認してもよい。モニターされる一般的な前臨床または臨床パラメーターのいくつかはレミントンの第27章および28章(484-528ページ)に見られる。

40

【0073】

企図する毒性学的研究の結果を用いて、有効性に関する臨床試験を行ってもよい。例えば、医薬品で治療される患者に修飾型物質または組成物を投与する。周知の方法によって医

50

薬品または組成物の循環レベルを測定できる。この循環レベルを試験投与量の関数 (function) として分析することにより、臨床医はいずれかの医薬品または組成物に関連して修飾型治療剤または組成物の有効で非毒性の投与量を容易に決定できる。

【0074】

上の詳しい記述および以下の実施例は本発明の代表的な好ましい実施形態を明らかにするものであるが、限定的な実施形態として意図するものではない。提示される (presented) 物質の観点から、通常の技術を有する当業者は本発明の範囲内に含まれる更なる実施形態を認識するであろう。

【0075】

以下の実施例は本発明を例証するために提供するものであり、いかなる様にも本発明を制限するものと解釈するべきではない

(実施例)

実施例 1 : フルオレスカミン (Fluorescamine) アッセイを使用する PEG 化の程度の決定

フルオレスカミン・アッセイによってシュードモナス 7A グルタミナーゼ - アスパラギナーゼ (PGA) の PEG 化の程度を決定する。フルオレスカミンは未修飾のリジン基と反応して蛍光誘導体を生成する。アッセイを行うために、タンパク質サンプル (未修飾の PGA または PEG 修飾されたもの) を希釈して 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液 (約 2 ml の溶液) を調製した。5 本の試験管のセットに溶液を一部ずつ (in portion) 添加した: 1 番目には 0.1 ml、2 番目には 0.2 ml など。各試験管を 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) で 2.0 ml まで希釈した。2.0 ml のバッファーのみを含有する第 6 の試験管をブランクとして含めた。フルオレスカミン溶液 (0.3 mg/ml アセトン) の 1 ml を、激しく攪拌しながらサンプルに添加した。5 分後、蛍光分光光度計で励起波長を 390 nm、蛍光波長を 475 nm にセットしてサンプルをアッセイした。

【0076】

実施例 2 : PEG 化したシュードモナス 7A グルタミナーゼ - アスパラギナーゼ (PGA) に対する不活性化抗体産生を検出するためのアッセイ

治療の状態に非常に類似したモデルを使用して、我々はタンパク質、シュードモナス 7A グルタミナーゼ - アスパラギナーゼ (PGA) の有効な PEG 化の方法を開発した。PEG 化によって治療酵素は免疫系、およびそれによって不活性化から保護または保護される。PEG 化の程度は重要である。少なすぎればタンパク質はカバーされず、抗体を介する不活性化がまだ起こりうる。PEG 化しすぎればタンパク質の 3 次構造が崩壊し、それによって免疫系に対する新たな抗原決定基が暴露されうる。以下に我々が PGA の有効な PEG 化を試験するために使用した方法を記載する。

【0077】

マウスに初期投与量の PGA を注射し、18 時間後に後眼窩放血 (retro-orbital bleeding) の方法によって放血させた。PEG 化した PGA の 1 回目の注射後の血清についてグルタミナーゼアッセイを実施し、血清から回収された PGA の活性を測定した。初期注射に次いで、有意により低い投与量の追加注射を 1 日おきに行った。各週の後にグルタミナーゼアッセイを実施するのに好適な用量で別の注射をし、18 時間後にマウスを出血させて血清を回収し、上記のようにアッセイを反復した。血清中に活性が検出されない場合は実験を終了した。PEG 化しない場合は PGA に対する抗体が 8 日間以内に産生され、PGA は、ネガティブマウスでの半減期が 48 時間を越えるのに対して、数時間で血中で不活性化される。

【0078】

実施例 3 : 酵素結合免疫吸着剤アッセイ

抗体産生の程度を測定する他の方法は、長期治療の際の治療タンパク質の保護における PEG 化の有効性を予測できないことが証明されている。酵素結合免疫吸着剤アッセイ (ELISA) を実施して血清中に存在する抗シュードモナス 7A グルタミナーゼ - アスパラギナーゼ (PGA) 抗体の程度を測定した。プレートを PGA の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液で被

10

20

30

40

50

覆した。処置の2週間後の種々のPEG化された形態のPGAの注射の18時間後に出血させたマウスから単離された血清をウェルに添加した。アルカリホスファターゼにコンジュゲートさせた抗マウスIgG + IgMを2次抗体として添加した。その後、比色分析を行って処理マウスの血清中の抗PGA抗体のレベルを測定した。ELISAの結果は、血清中の抗体の検出可能レベルに関わらず、PEG-PGAのある標品(SBA-PGA)は通常半減期レベルで血清中に酵素活性を保持することができることを示した。しかしながら以下の表に示すように、ALD-PGA標品のいくつかは、酵素は血清からうまく除去されたが、ELISAで検出可能な抗体の産生が示されなかった。

【0079】

【表1】

10

a. サンプル	平均A405測定値 (ELISA)	b. 酵素活性を有する マウスの% in vivo法を使用
ブランク	0.096	NA
PGA溶性対照	1.250	0%
SPA-PGA標品1	0.202	100%
SBA-PGA標品1	0.700	100%
SBA-PGA標品2	0.882	80%
SBA-PGA標品3	0.812	25%
SBA-PGA標品4	1.019	20%
ALD-PGA標品3	0.095	100%
ALD-PGA標品4	0.094	40%

20

従って、ELISAでは活性の消失を予測することはできず、種々のPEG化方法の成功を確認するために、血清についてグルタミナーゼアッセイ(または他の物質についての関係する生物学的活性)を行わなければならない。

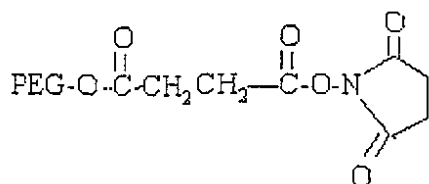
【0080】

実施例4：スクシンイミジルスクシネート(SS)PEGを使用するPEG化の最適化

PEGスクシネートのN-ヒドロキシスクシンイミジル(またはNHS)活性エステル(SS-PEG)はPEGをタンパク質またはペプチドに結合させるのに一般的に使用される。この誘導体は温和な条件下で短時間内に(約30分、pH8.5)タンパク質上のアミノ基と反応して広範に修飾され、しかし活性を有するコンジュゲートを生成する。この誘導体で起こりうる問題は骨格のエステル結合が加水分解による開裂を受けやすいことである。SS-PEGは以下の構造を有する：

30

【化1】



40

SS-PEGによるPEG化を行うために、精製したPGAタンパク質を50mMリン酸ナトリウムバッファー(pH8.0)に溶解して8.0mg/mlの濃度とした。SS-PEGの2つの標品は以下のように生成した：標品1：10mgのSS-PEG5000を200μlの8.0mg/mlPGA溶液に添加。標品2：20mg/200μl。これらの標品を未修飾のPGAと共に、実施例2の方法に従ってマウスにおいて長期治療の際の安定性について評価した。治療の6日後、未修飾PGA並びに標品1および2で処理した動物からPGA活性が回収された。治療の2週間後、未修飾PGAまたは標品2で処理した動物からは活性が回収されなかった。治療の3週間後には、いずれの標品で処理

50

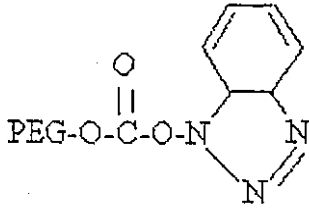
した動物の血清にも活性は残存しなかった。結果を図1に要約する。これらの知見は上記のSS-PEG骨格の加水分解による開裂による可能性が最も高い。

【0081】

実施例5：ベンゾトリアゾールカーボネート（BTC）PEG5000を使用するPEG化の最適化

N-ヒドロキシスクシンイミジル（NHS）活性エステルのごく同程度の反応性はないが、BTC-PEGはペプチドおよびタンパク質のアミノ基の有効な調節剤である。BTC-PEGは温和な条件下で短時間内に広範な修飾型PEGタンパク質を生成するのに十分な反応性を有する。BTC-PEGは以下の構造を有する：

【化2】



BTC-PEGによるPEG化を行うために、精製したPGAタンパク質を50mMリン酸ナトリウムバッファーに溶解して8.0mg/mlの濃度とした。pH6.5およびpH8.0のリン酸ナトリウムバッファーを使用してPEG化を実施したところ、同様の結果を得た。PEGを2.5mg/200μl PGA溶液から20mg/200μlの範囲の量で添加した。反応混液を室温で60分間攪拌してPEG化反応を行った。未結合のPEGを除去するために、50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH7.5）に対して透析した。BTC-PEGを用いてPEG化したPGAは5mg/200μl PGA溶液で16.5%のPEG化となり、10mg/200μlでは26%のPEG化となった。15および20mg/200μlでのPEG化では、それぞれ57%および65%のPEG化となった。しかしながら、より高濃度でのPEG化は約75%の酵素活性が喪失した。

【0082】

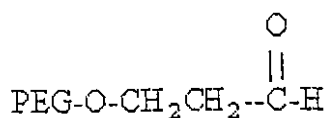
BTC-PEGは血清におけるPGAの半減期を延長した。ホストによるPGAに対する不活性化抗体の産生の遅延は見られなかった（図2）。試験した全てのPEG濃度において、両PEG化pH値（6.5、8.0）で、処理のわずか2週間後に不活性化抗体の産生が起こった。

【0083】

実施例6：アルデヒド（ALD）PEGを使用するPEG化の最適化

アルデヒド基を有するPEGは、ナトリウムシアノボロハイドライドの存在下で第1級アミンとの還元的アミノ化反応を受ける。他の求電子的に活性化された基とは異なり、アルデヒドはアミンとしか反応しない。このように修飾したタンパク質はアミン基および溶液中での関係する電荷を保持し、このことはタンパク質のコンフォメーションおよび活性を維持するのに重要でありうる。更に、抗原性部位として作用する、あるいは損傷の際に毒性を引き起こすようなPEGおよびタンパク質間のリンカーが存在しない。このPEGはShearwater Polymers社から販売されており、以下の構造を有する：

【化3】



ALD-PEGを使用するPEG化は、精製/凍結乾燥したPGAを50mMリン酸ナトリウム（pH6.5）に溶解して8.0mg/mlの濃度として行った。次いでALD-

10

20

30

40

50

PEG 2000を以下の濃度で添加した：標品1：2.5 mg / 200 μ l；標品2：7.5 mg / 200 μ l；標品3：10 mg / 200 μ l；そして標品4：12.5 mg / 200 μ l。その後ナトリウムシアノボロハイドライド(31.5 mg / ml)を1 ml 当たり50 μ lで添加した。PEGを溶解し、溶液を室温で18から24時間攪拌した。標品1は31%、標品2は51%、標品3は66%、そして標品4は74% PEG化された。ALD-PEG標品のいずれも、酵素活性を有意に喪失しなかった。

【0084】

標品2および3は長期治療に最も適していることが確認された。1ヶ月の治療後、標品3を投与した5検体のマウスの全て、および標品2を投与した5検体のマウス中4検体は、注射の18時間後に酵素活性を保持していた。結果は、ALD-PEG 2000を使用する場合、PGAのPEG化のパーセントは45-65%の範囲内とする必要があることを示している。これらの結果を図3に示す。それぞれ標品1および4でのような、より低い、またはより高い量のPEG化では長期治療の経過中に血清中の酵素が不活性化した。アルデヒドPEGを使用するPEG化は他の活性化したPEGを使用するPEG化より優れており、これは活性の喪失がより少なく、広範なPEG化範囲にわたって有効であり、リジン基のみが修飾されるためである。

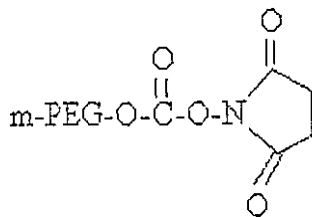
10

【0085】

実施例7：スクシンイミジルカーボネート(SC)PEGを使用するPEG化の最適化
シュードモナス7Aグルタミナーゼ・アスパラギナーゼ(PGA)のPEG化についての
広範な実験を、Shearwater Polymers社から販売されているSC-PEG、並びにMironお
よびWilchek(Miron, TおよびM. Wilchek., 1993. Bioconjugate Chemistry, 4:568-569
)に記載される方法に従って製造したSC-PEGを使用して行った。このPEGは相対
的に反応性がないが、それでもタンパク質の有効な修飾物質である。それらのコンジュ
ゲートの生物学的活性は、一般に十分保存されている。SC-PEGおよびアミノ含有分子
間の反応によってウレタン結合が生成され、これは加水分解に対して安定である。SC-
PEGは以下の構造を有する：

20

【化4】



30

PEG化の手順は、精製したタンパク質を50 mM炭酸水素ナトリウムバッファー(pH 8.8)に溶解して約8.0 mg / mlの濃度とすることから成るものであった。SC-PGAの4つの標品を以下の方法で生成した。200 μ lの8.0 mg / ml溶液にSC-PEGを以下の量で添加した：標品1は2.5 mg、標品2は5 mg、標品3は7.5 mg、そして標品4は10 mg。標品1は31%のPEG化で酵素失活は30%となった。標品2は49%のPEG化で41%の失活となった。標品3は55%のPEG化で44%の失活であった。標品4は61%のPEG化で56%の失活となった。標品1のSC-PEGを投与したマウスは全て、3週間後の注射の18時間後で循環PGA活性を保持しており、5検体中4検体のマウスは10週間の治療後でも、注射の18時間後に循環PGA活性を維持していた。PEG化のパーセンテージが高いにも関わらず、標品2、3、および4は3週間の治療で数検体のマウスにおいて、注射後18時間の循環酵素活性を維持するのに有効ではなかった。これらの結果を図4に示す。従って、SC-PEG 5000を使用して、31%が最適なPGAの修飾程度である。

40

【0086】

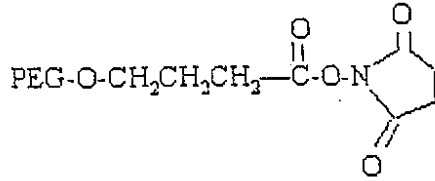
実施例8：モノメトキシスクシンイミジルブタノエートポリ(エチレングリコール)(SBA-PEG 5000)を使用するシュードモナス7Aグルタミナーゼ・アスパラギナー

50

ゼ (PGA) に対する不活性化抗体産生の阻害

我々はモノメトキシポリ(エチレングリコール)ブタン酸のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(MW5000、SBA-PEG5000)を使用してシュードモナス7Aグルタミナーゼ-アスパラギナーゼ(PGA)を修飾した。SBA-PEGは以下の構造を有する：

【化5】



10

リジン、末端アミン、および活性エステル間の反応によって安定なアミド結合が生成される。PEGの骨格にエステル結合が存在しないことによって、より安定となる。このPEGはShearwater Polymers社から販売されている。PGAをいくつかの比率でSBAでPEG化し、理想的な比率を確認した。PEG化の手順は、精製したタンパク質を50mM炭酸水素ナトリウムバッファー(pH9.5)に溶解して約8.0mg/mlの濃度とすることから成るものであった。SBA-PEGを以下の量で添加した：標品1：3mg/200μl；標品2：5mg/200μl；そして標品3：10mg/200μl。版の右近液を室温で90分間攪拌した。次いで、PEG化されたPGAを50mMリン酸ナトリウム(pH7.5)に対して透析した。他のPEGを使用する場合は有意な活性の喪失がしばしば観察されるが、使用した最も高い比率のPEGの場合でも、PEG化によって酵素活性の喪失はほとんど起こらなかった。実施例1に記載したフルオレスカミンアッセイに従って、標品1は35%、標品2は58%、そして標品3は71%のPEG化という結果を得た。グルタミナーゼは実施例2に従って処理した動物の血清では、標品2および3を使用した場合、2週間の治療で不活性化されなかった；しかしながら、標品1を使用した場合、血清グルタミナーゼ活性は、8週間の治療後でも高かった。従ってmSBA-PEG5000を使用してPGAを35%PEG化するのが、長期治療の際にタンパク質を保護するのに最適である。結果を図5に要約する。

20

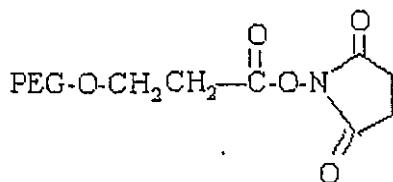
【0087】

30

実施例9：スクシンイミジルプロピオネート(SPA)PEGを使用するPEG化の最適化

SBA-PEGと同様に、SPA-PEGはPEGの骨格にエステル結合が存在しないことから、非常に安定である。2つの化合物のタンパク質に対する反応性は非常に類似しており、SPAのほうがわずかに反応性が高い。SPA-PEGは以下に示す構造を有する：

【化6】



40

SPA-PEGを使用するPEG化はSBA-PEGと同様に、精製したタンパク質を50mM炭酸水素ナトリウムバッファー(pH9.5)に溶解して約10mg/mlの濃度として行った。次いでSPA-PEGを以下の量で添加した：標品1：2mg/200μl；標品2：3mg/200μl；そして標品3：4mg/200μl。反応混液を室温で60分間攪拌した。その後、PEGされたPGAを50mMリン酸ナトリウム(pH7.5)に対して透析した。標品1は約40%、標品2は約50%、そして標品3は約55%までPEG化された。標品3は、長期の治療後でも、注射18時間後の循環PGA活性を保持するのに有効であった。標品3のマトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析法

50

(Matrix-assisted-laser-desorption-ionization mass spectrometry; MALDI)での分析により、標品3はPEG化されたPGAの分子量が単量体あたり70,000から110,000ダルトンの間であることが明らかになった(図6)。標品3は、5検体中4検体の動物で60日間の治療後も高い循環酵素活性を保持するPEG化であることが観察された(図7)。

【0088】

実施例10: PEG化されたPGAの調製

PEG化されたPGAの凍結乾燥は酵素活性に有意に作用し、不活性化抗体産生を阻害するPEG化の能力を損なうことが明らかとなった。種々の化合物を試験し、いずれの化合物が加熱の影響に対してPGAに更なる安定性を与えるかを観察した。その後、最も好結果であった化合物(CaCl₂、グルタミン酸ナトリウム、およびスクロース)を、凍結乾燥の際のPEG化PGAの保護物質として作用するその能力について試験した。以前は、凍結乾燥は活性を約50%低下させ、不活性化抗体産生を阻害するPEG化の能力を低下させることが見いだされた。SBA-PGA1:3を5mMリン酸カリウムバッファ中、10mMスクロース、10mMグルタミン酸ナトリウム、そして10mMの両化合物の組み合わせを使用して凍結乾燥した。活性の有意な低下は見られなかった。5mMリン酸カリウムの単独、または10mMスクロースとの組み合わせでの存在下で凍結乾燥したSBA-PGAで2週間処理した動物では、注射18時間後に酵素活性は回収されなかった。しかしながら、10mMのグルタメートは凍結乾燥の際にSBA-PGAを保護する効果を有し、10週間の治療後も注射後18時間後に良好な循環PGA活性を有した(図8)。

【0089】

更なる実験を行って、SPA-PEG5000でPEG化したPGAを凍結乾燥時に最も保護する添加剤(excipients)を確認した。以下の添加剤を試験した:(i)10mMMSG単独、(ii)10mMMSG+5mMCaCl₂、(iii)10mMMSG+10%スクロース、(iv)10mMMSG+5mMCaCl₂+10%スクロース。上記の添加剤を含有するPEG-PGAを以下のように凍結乾燥した:段階1-20で2時間、凍結(shelf freeze)した;段階2-20で4時間、1次乾燥した;段階3-4で12時間、2次乾燥した;そして段階4-20で3時間、3次乾燥した。凍結乾燥したタンパク質を更なる使用まで、デシケーター中で、4で保存した。4標品を動物で試験し、添加剤によって凍結乾燥の際にSPA-PEG5000でPEG化したPGAに施与される保護について研究したが、これは実施例2に記載される方法に従って行った。図9に見られるように、10mMMSG+5mMCaCl₂は凍結乾燥の際のSPA-PEG5000でPEG化したPGAの安定化に最も良好な添加剤の組み合わせであった。これらの添加剤を使用して我々のスケールアップした研究、および動物での毒性実験およびヒトの臨床試験のためのPEG-PGAの製造を行った。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、SS-PEGで修飾したPGAを用いた動物実験を表すグラフである。

【図2】 図2は、BTC-PEGで修飾したPGAを用いた動物実験を表すグラフである。

【図3】 図3は、ALD-PEGで修飾したPGAを用いた動物実験を表すグラフである。

【図4】 図4は、SC-PEGで修飾したPGAを用いた動物実験を表すグラフである。

【図5】 図5は、SBA-PEGで修飾したPGAを用いた動物実験を表すグラフである。

【図6】 図6は、SPA-PEGで修飾したPGAのMALDI分析を表すグラフである。

【図7】 図7は、SPA-PEGで修飾したPGAを用いた動物実験を表すグラフであ

10

20

30

40

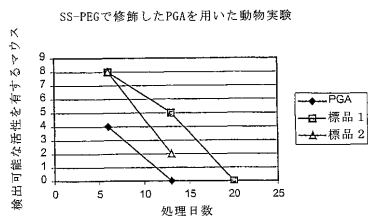
50

る。

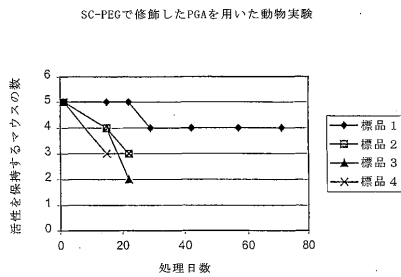
【図8】 図8は、PGA凍結乾燥の際の化合物の保護能力を表すグラフである。

【図9】 図9は、SPA-PEGで修飾したPGAを用いた製剤開発の動物実験を表すグラフである。

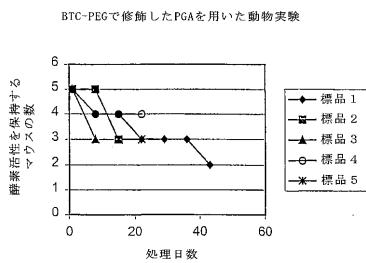
【図1】



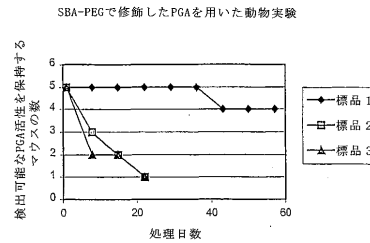
【図4】



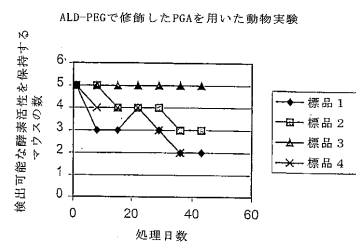
【図2】



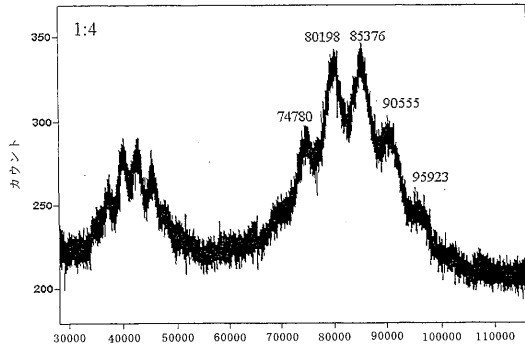
【図5】



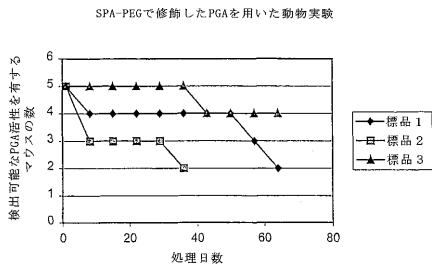
【図3】



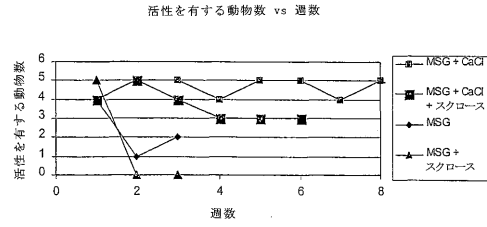
【 図 6 】



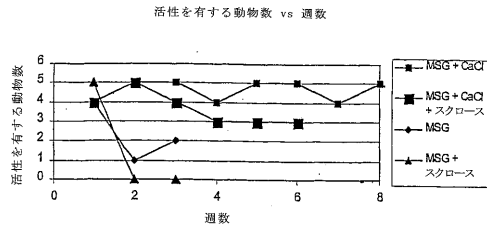
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00

(72)発明者 ロバーツ, ヨゼフ
 アメリカ合衆国 2 9 2 2 3 サウス カロライナ州, コロンビア, サンターフ サークル 6

(72)発明者 セサラマン, ナタラジャン
 アメリカ合衆国 2 9 2 1 0 サウス カロライナ州, コロンビア, パイン スプリングス ロード 8 0 5

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 Francis, G.E. et al., PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques, International Journal of Hematology, 1998年, Vol.68, p1-18
 Roberts, M.J. & Harris, J.M., Attachment of degradable poly(ethylene glycol) to proteins has the potential to increase therapeutic efficacy, Cancer Treatment Reports, 1998年, Vol.87, No.11, p.1440-1445

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

G01N 33/15

A61K 38/00

A61K 38/46

A61K 47/34

A61K 47/48

A61K 48/00

A61P 3/00

A61P 31/12

A61P 35/00

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)