

# G-CSF誘導体 ナルトグラスチムの開発

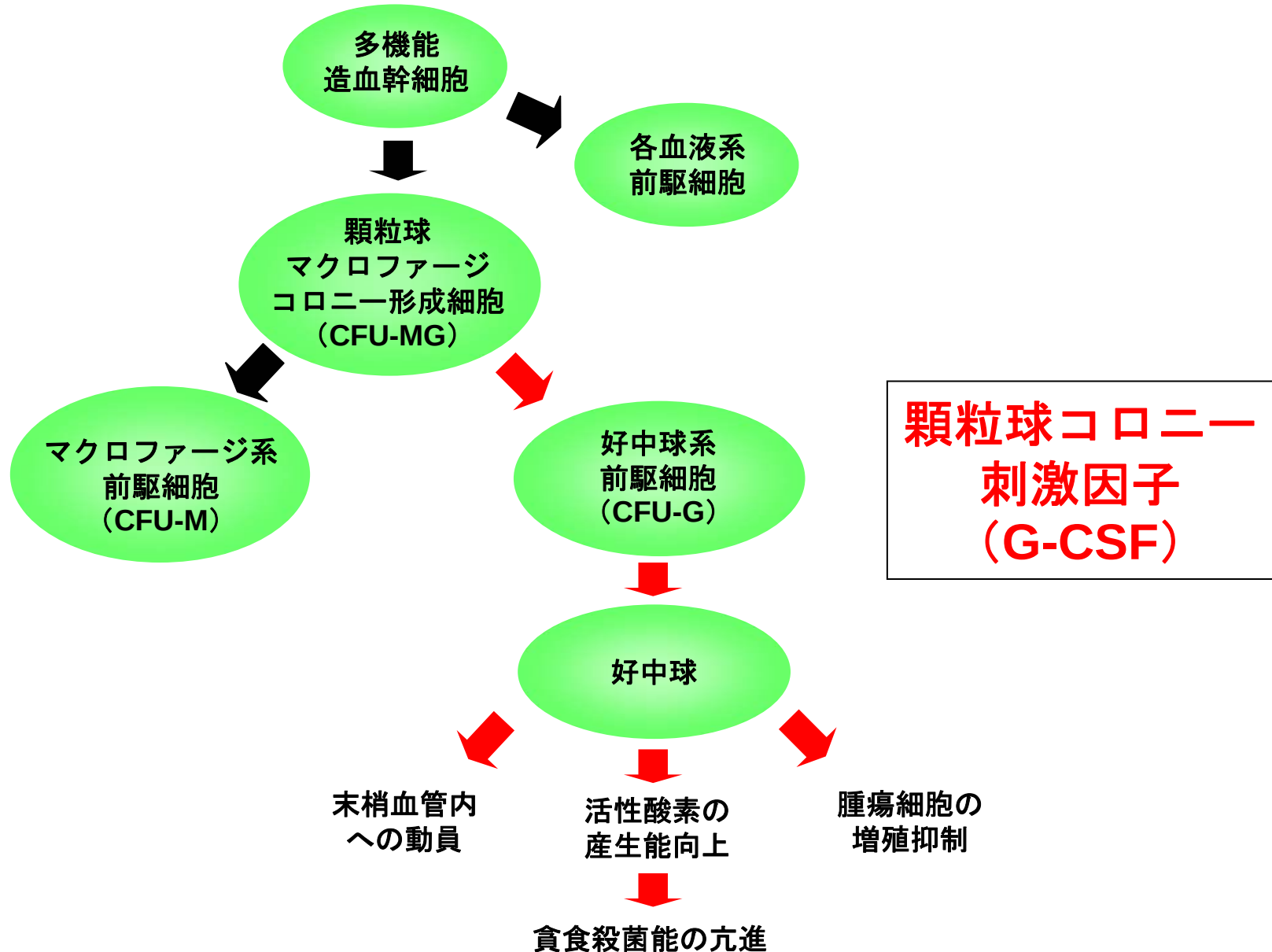
---

協和発酵工業株式会社  
医薬研究センター 安全性研究所  
栗原 隆

# 開発の経緯

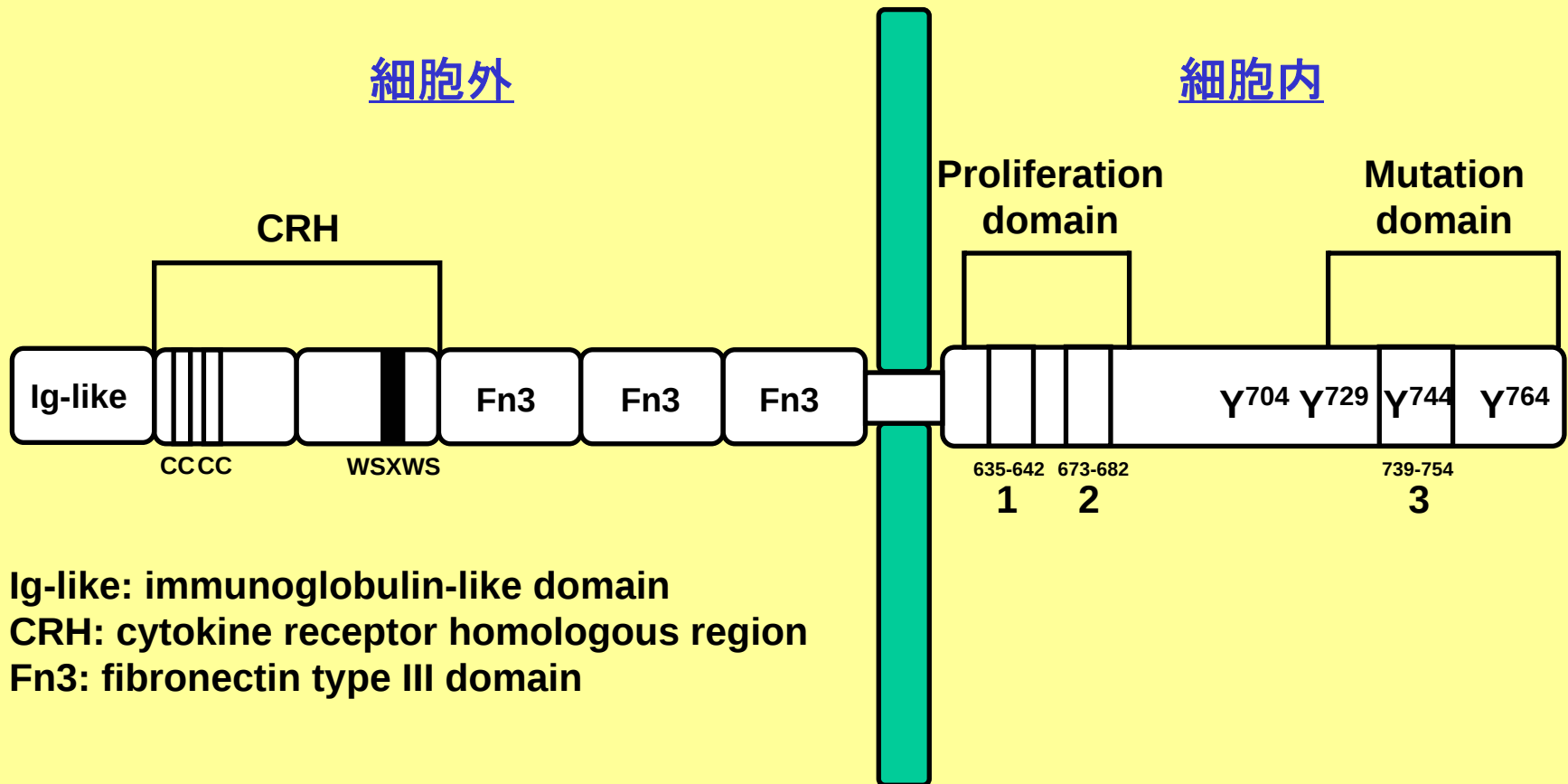
- 1985年: ヒト正常細胞(マクロファージ)からcDNAのクローニングに成功
- 1986年: 大腸菌による組換えhG-CSFの量産に成功
- 1986年: *In vitro*スクリーニング開始
- 1987年: ナルトグラスチム選定
- 1988年: 第1相試験
- 1988年: 第2相試験
- 1990年: 第3相試験
- (1991年: フィルグラスチム・レノグラスチム製造承認)
- 1994年: ナルトグラスチム製造承認

# G-CSFの作用部位

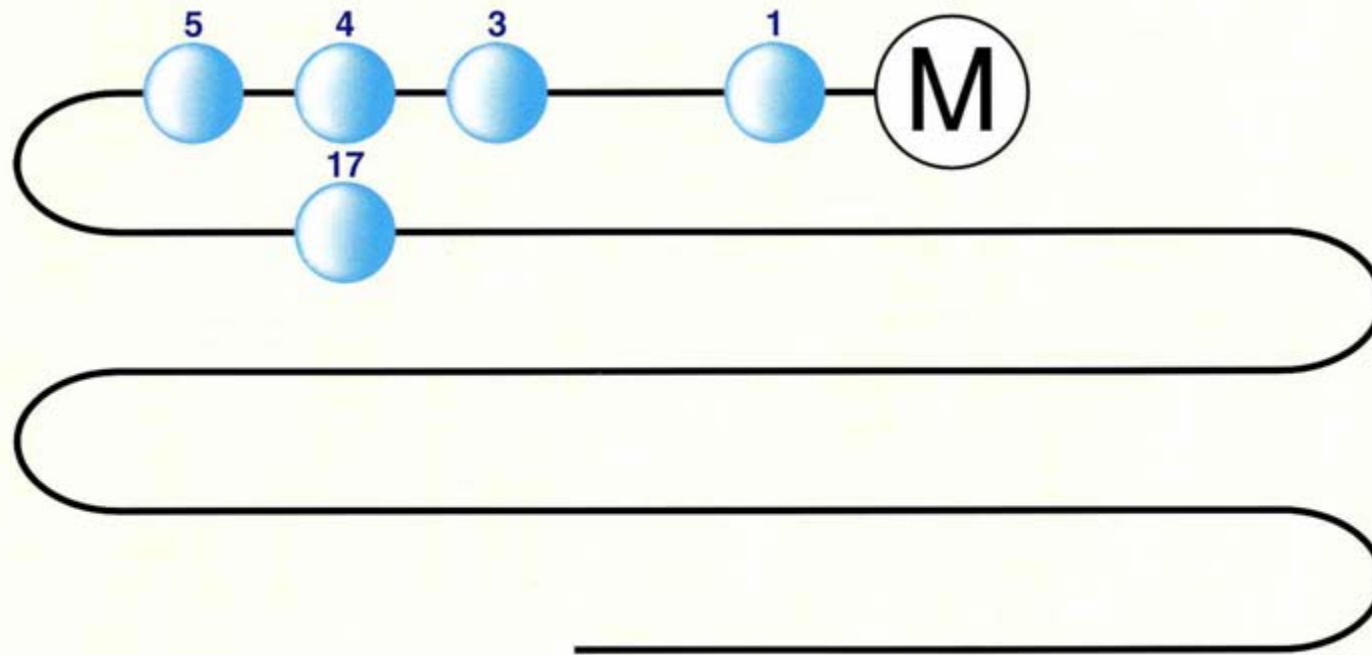


# G-CSFレセプター

- 813個のアミノ酸より構成
- 骨髄細胞、末梢血好中球、血小板、単核球、胎盤、血管内皮などで発現
- 200～1,000個/細胞



# ナルトグラスチムの構造



## 構成アミノ酸の略号

Met : メチオニン  
Ala : アラニン  
Pro : プロリン  
Thr : スレオニン  
Tyr : チロシン  
Arg : アルギニン  
Ser : セリン  
Leu : ロイシン  
Gly : グリシン  
Cys : システイン

● ノイアップの  
N末端側アミノ酸配列

○ 天然型G-CSFの  
N末端側アミノ酸配列

Met — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 17 — 133  
Ala — Pro — Thr — Tyr — Arg ... Ser ... Thr  
Thr — Pro — Leu — Gly — Pro ... Cys ... Thr  
糖鎖

# 開発コンセプト

---

アミノ酸配列改変による  
高活性G-CSFの創製

安全性(抗原性)の克服

# 誘導体のスクリーニング

# 変異G-CSFの生物活性

| 変異部位    | 変異                                   | 活性 |
|---------|--------------------------------------|----|
| 1       | Thr → Ser, Arg or Gly                | +  |
| 1-3     | Thr-Pro-Leu → Ser-Pro-Arg            | +  |
| 1-3     | Thr-Pro-Leu → Ser-Leu-Ser            | +  |
| 1-4     | Deletion                             | +  |
| 1-4/17  | Deletion/Cys → Ser                   | +  |
| 1-6/17  | Deletion/Cys → Ser                   | +  |
| 1-7/17  | Deletion/Cys → Ser                   | +  |
| 1-11/17 | Deletion/Cys → Ser                   | +  |
| 17      | Cys → Ser                            | +  |
| 1-18    | Deletion                             | -  |
| 33-35   | Deletion                             | -  |
| 35      | Deletion                             | -  |
| 35      | Leu → His, Ala, Phe, Asp, Ser or Thr | -  |
| 35-36   | Leu-Cys → Leu-Val-Cys                | -  |
| 36-37   | Cys-Ala → Cys-Asp-Ala                | -  |
| 36-37   | Cys-Ala → Cys-Cys-Ala                | -  |
| 70-89   | Deletion                             | -  |
| 70-89   | Tandem Repeat                        | -  |
| 74-75   | Cys-Leu → Ser-Cys                    | -  |
| 74-76   | Cys-Leu-Ser → Ser-Cys-Cys            | -  |
| 90-106  | Deletion                             | -  |
| 90-106  | Tandem Repeat                        | -  |
| 91      | Ala → Pro or Phe                     | -  |
| 91-97   | Deletion                             | -  |
| 95-97   | Ile-Ser-Pro → Thr                    | -  |
| 107-130 | Deletion                             | -  |
| 107-130 | Tandem Repeat                        | -  |
| 131-157 | Deletion                             | -  |
| 131-157 | Tandem Repeat                        | -  |
| 137-174 | Deletion                             | -  |
| 165-174 | Deletion                             | -  |

*in vitro*スクリーニング\*

N末端の置換体/欠失体  
は活性を保持

N末端1~17の置換は可能

活性消失

\*: マウス骨髄細胞における顆粒球コロニー形成作用  
およびチミジン取り込みでみた増殖促進作用

# N末端変異G-CSFの生物活性

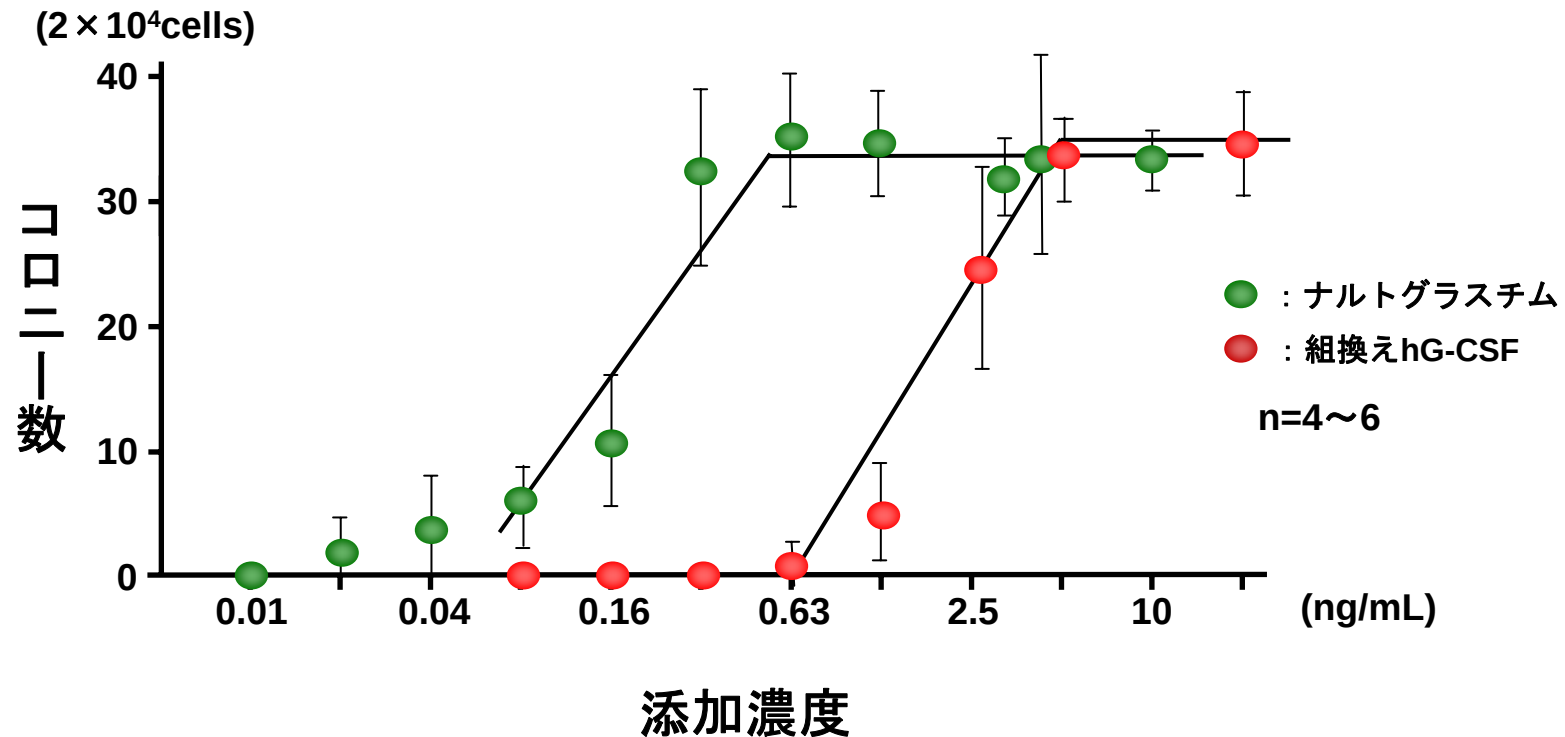
## *in vitro*スクリーニング

| N末端アミノ酸シーケンス |      |      |      |      |      |      |       |     |  | hG-CSF 活性    |            |
|--------------|------|------|------|------|------|------|-------|-----|--|--------------|------------|
|              |      |      |      |      |      |      |       |     |  | 部分精製<br>サンプル | 精製<br>サンプル |
|              | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |       | 17  |  |              |            |
| Met-         | Thr- | Pro- | Leu- | Gly- | Pro- | Ala- | ----- | Cys |  | +            | 1.00       |
|              |      |      |      |      |      | Asn  | ----- | Ser |  | +            | ND         |
| Ala          |      | Thr- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
|              |      | Glu- | Lys- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
| Val          |      | Ile- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
| Cys          |      | Ile- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
| Tyr          |      | Ile- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | 1.86       |
| Arg          |      | Thr- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
|              |      | Thr- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | +            | ND         |
| Asn          |      | Glu- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
| Ile          |      | Thr- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | 3.05       |
| Ser          |      | Thr- | Arg- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
| Ala          |      | Thr- | Asp- | Ser- | Asp  |      | ----- | Ser |  | +            | ND         |
| Ala          |      | Thr- | Tyr- | Arg  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | 3.09       |
| Ala          |      | Ser- | Asp- | Ser  |      |      | ----- | Ser |  | ++           | ND         |
| Ala          |      | Pro- | Asp- | Arg- | Gly  |      | ----- | Ser |  | +            | ND         |

ナルトグラスチムを選定

# 顆粒球コロニー形成刺激作用

## ヒト骨髄細胞 (*in vitro*)

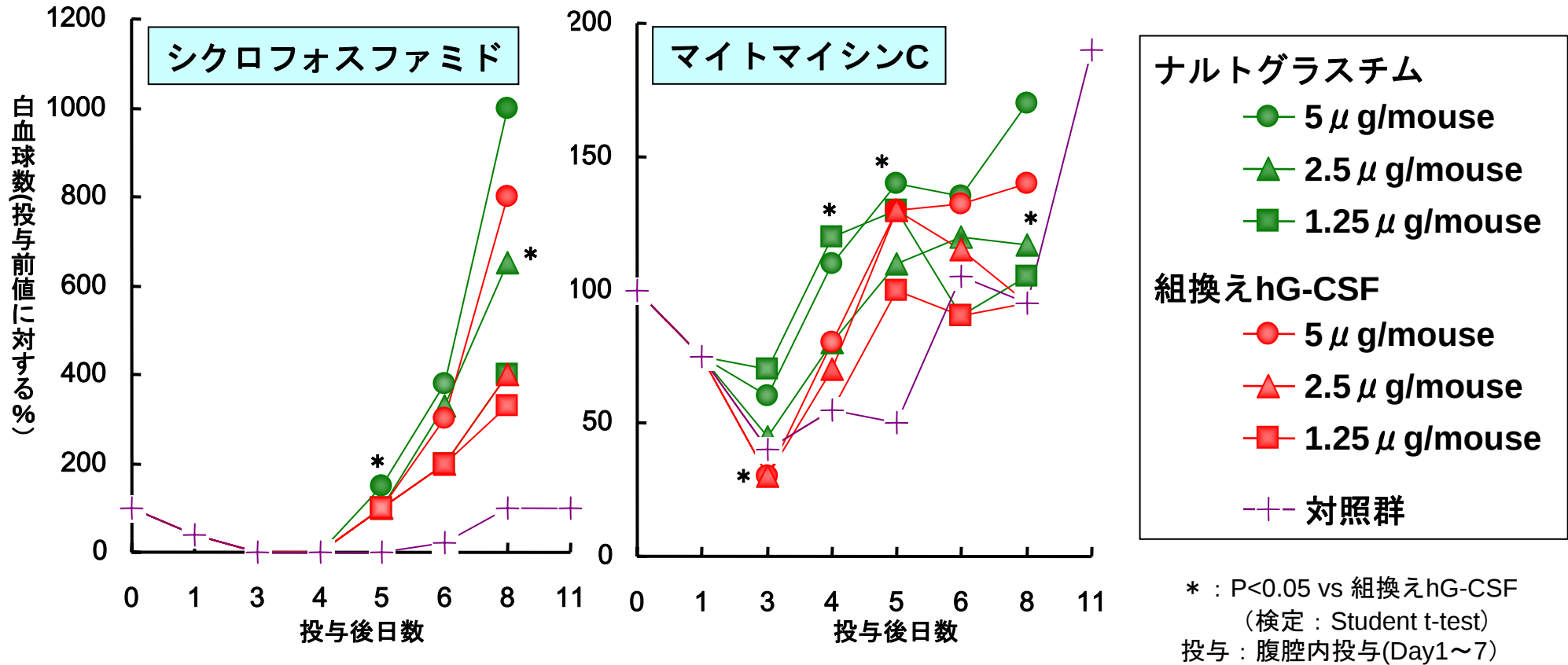


約1/8の濃度で組換えhG-CSFと同程度の作用

生物活性 (*in vivo*)

# 抗癌剤投与後の白血球回復促進作用

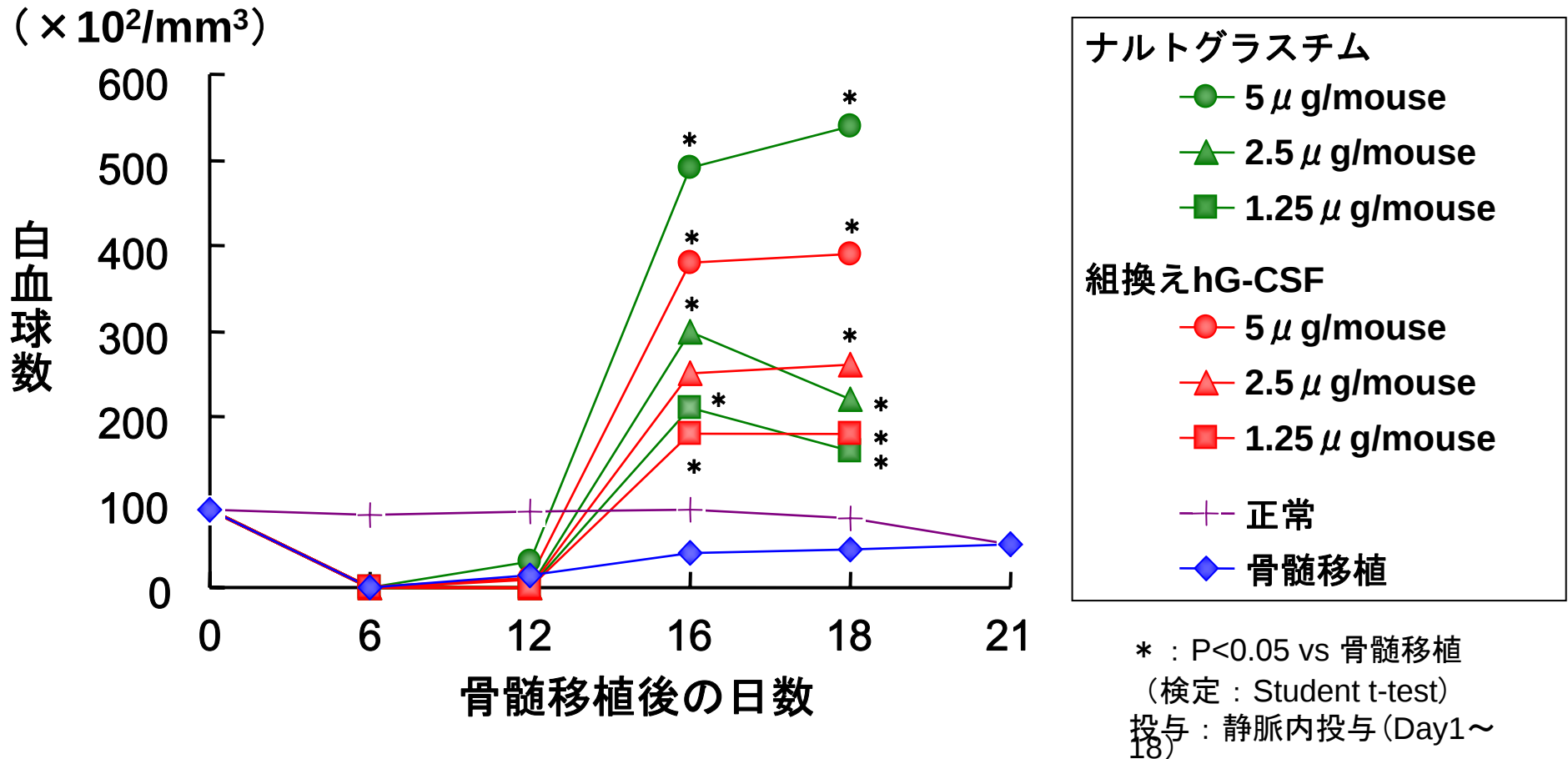
## マウス抗癌剤投与モデル



組換えhG-CSFよりも高い回復促進作用

# 放射線全身照射後の白血球回復促進作用

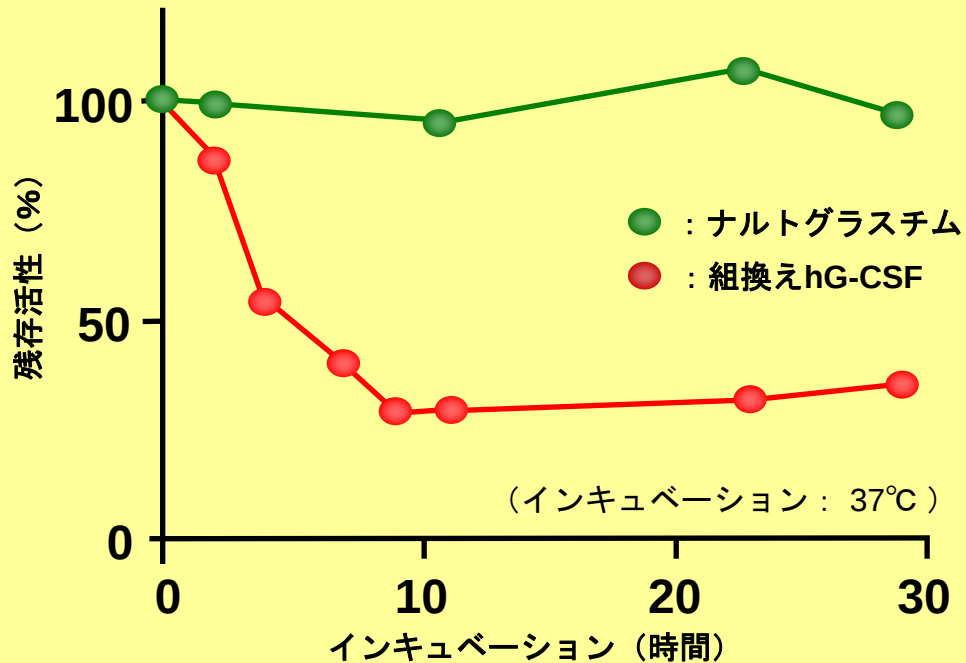
## マウス骨髄移植モデル



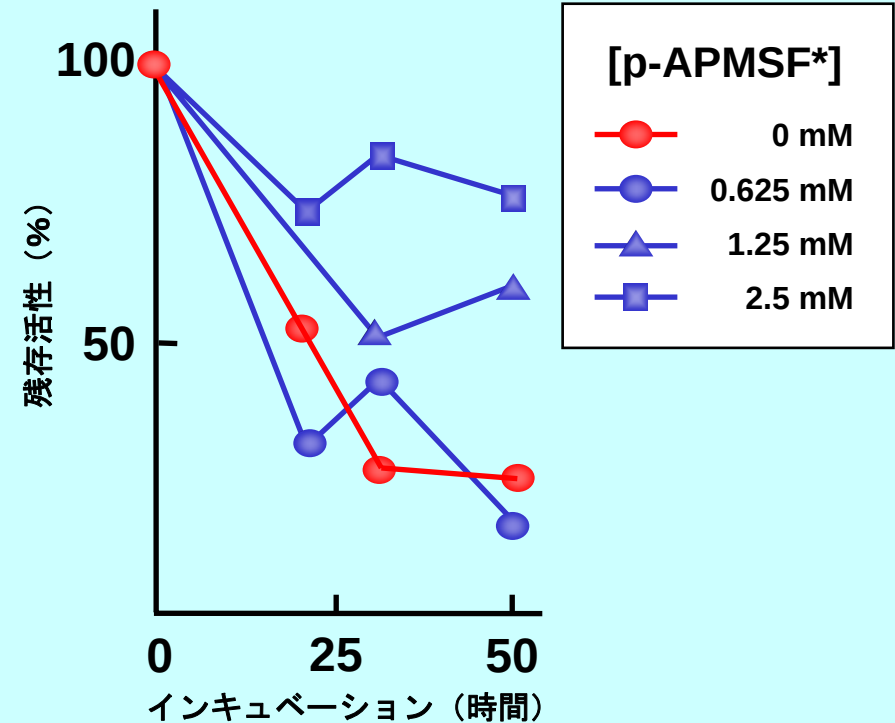
組換えhG-CSFよりも高い回復促進作用

代謝

# 血漿中での安定性 (*in vitro*)



ヒト血漿中での安定性

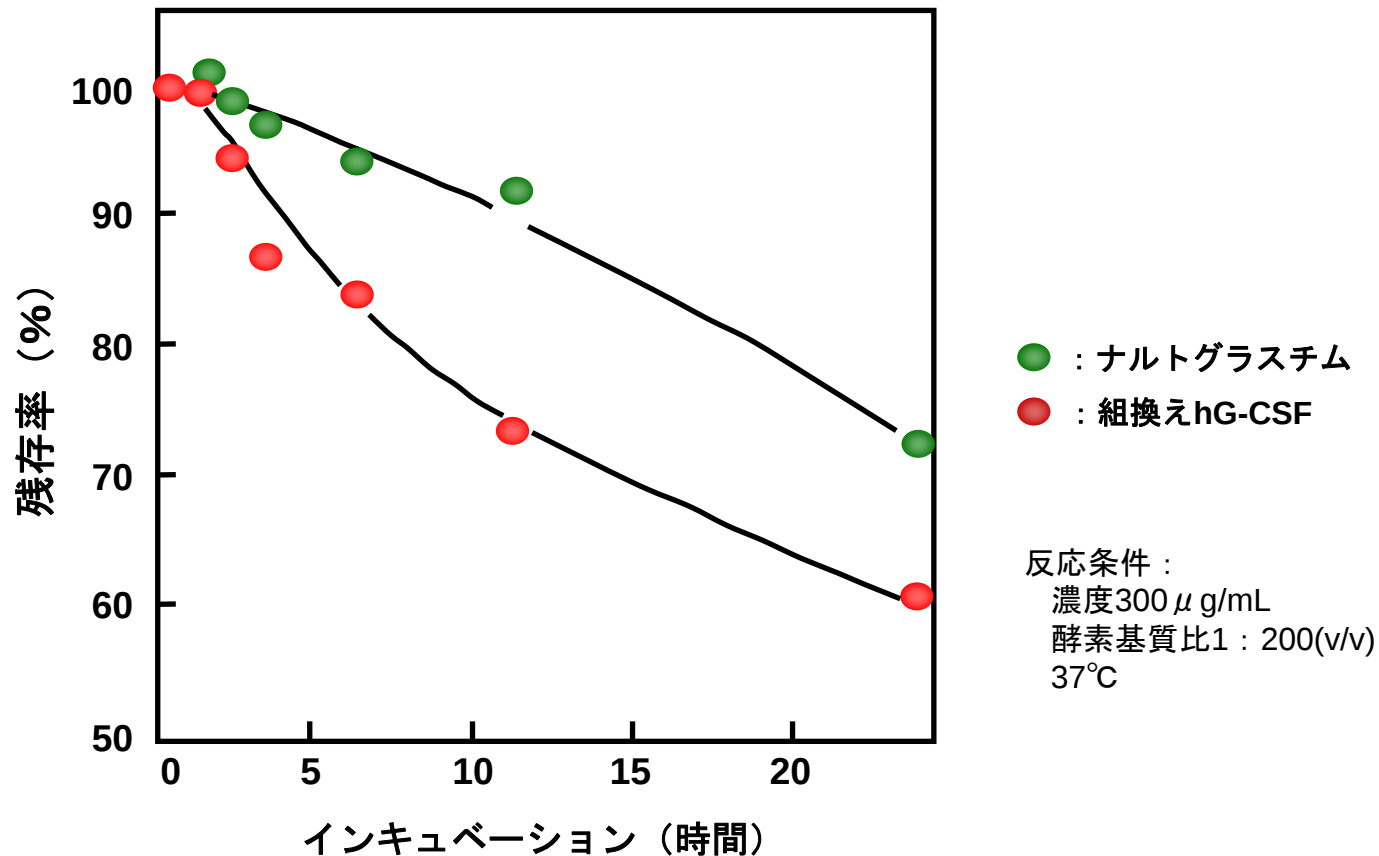


不活性化に対する  
プロテアーゼの影響

\*: *p*-aminophenyl methanesulphonyl fluoride  
(セリン・プロテアーゼ阻害剤)

- ・ ヒト血漿中で組換えhG-CSFよりも安定
- ・ プロテアーゼがhG-CSFの活性低下に関与

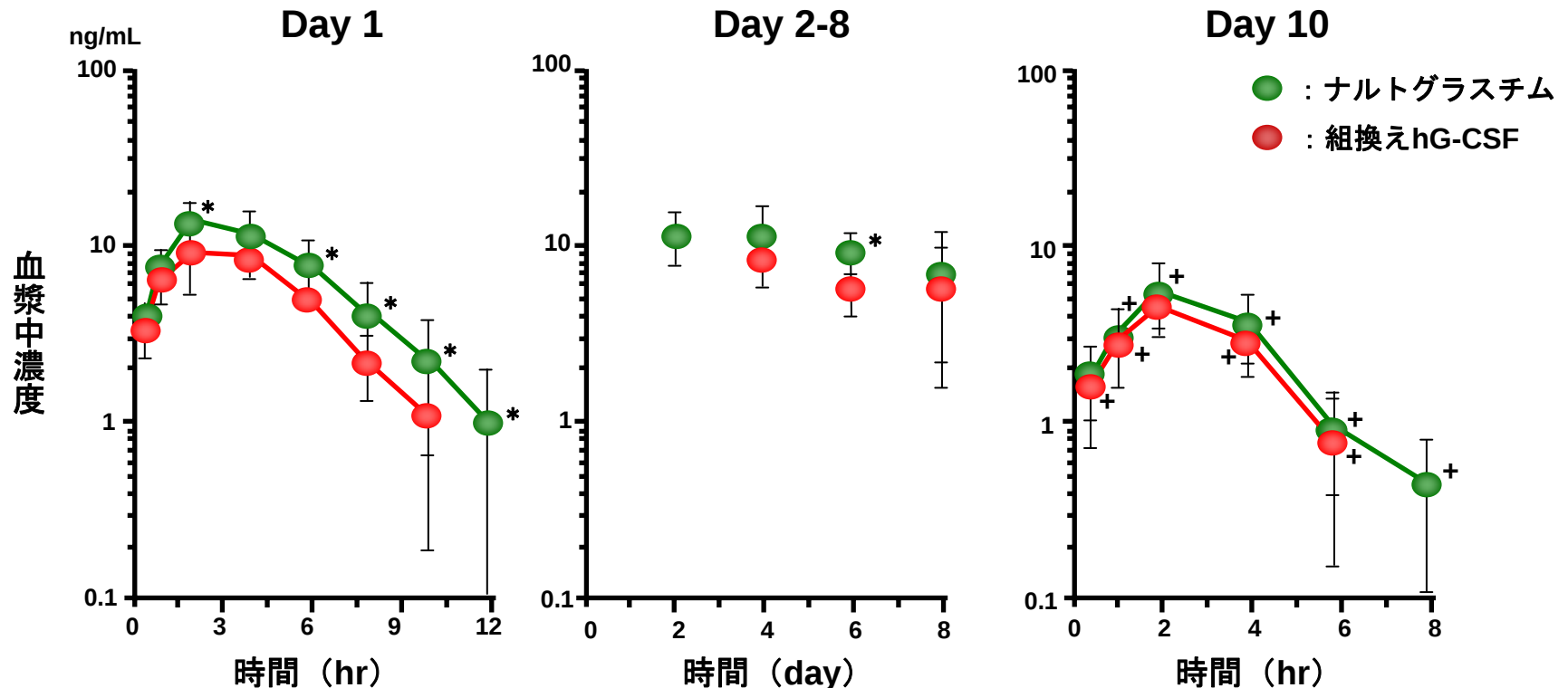
# ヒトプラスミンに対する安定性(*in vitro*)



- 組換えhG-CSFよりも高いプラスミン安定性
- トリプシン、ズブチリシンに対しても同様な傾向

# サル血漿中での安定性 (*in vivo*)

## サルに皮下投与後の血漿中濃度推移



投与量 : 10  $\mu$ g/kg (1回/日、10日間反復)

\* :  $p < 0.05$  対天然型hG-CSF、+ :  $p < 0.05$  対初回投与時点

サル血漿中で組換えhG-CSFよりも安定

# サルにおける薬物動態パラメーター

## 静脈内投与

|               | 薬剤投与量<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | $T_{1/2\alpha}$<br>(hr) | $T_{1/2\beta}$<br>(hr) | MRT<br>(hr) | $V_{\text{dss}}$<br>(L/kg) | $\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}$<br>( $\text{ng}\cdot\text{hr/mL}$ ) | CI<br>(L/hr/mL) |
|---------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|
| ナルトグ<br>ラスチム  | 10                            | 0.43                    | 1.34                   | 1.27        | 0.053                      | 241                                                                   | 0.042           |
| 組換え<br>hG-CSF | 10                            | 0.40                    | 1.11                   | 1.14        | 0.068                      | 169                                                                   | 0.060           |

## 皮下投与

|               | 薬剤投与量<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | $T_{\text{max}}$<br>(hr) | $C_{\text{max}}$<br>( $\text{ng/mL}$ ) | $T_{1/2}$<br>(hr) | MRT<br>(hr) | $V_{\text{dss}}/F^*$<br>(L/kg) | $\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}$<br>( $\text{ng}\cdot\text{hr/mL}$ ) | $\text{CI}/F^*$<br>(L/hr/mL) | BA<br>(%) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------------------|-------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------|
| ナルトグ<br>ラスチム  | 10                            | 2.7                      | 13.2                                   | 2.03              | 4.57        | 0.65                           | 80.4                                                                  | 0.14                         | 33.4      |
| 組換え<br>hG-CSF | 10                            | 3.0                      | 8.96                                   | 1.93              | 4.58        | 0.89                           | 53.3                                                                  | 0.20                         | 31.5      |

\* : F=吸収率

安全性(抗原性)

# モルモット能動性全身アナフィラキシー試験

| 免疫方法                                       | 誘発抗原       | 全身アナフィラキシー<br>(陽性数/検査数) |
|--------------------------------------------|------------|-------------------------|
| —                                          | ナルトグラスチム   | 0/5                     |
| —                                          | 組換えhG-CSF  | 0/5                     |
| —                                          | ヒト赤血球アルブミン | 0/5                     |
| ナルトグラスチム<br>(0.2 mg/animal × 2)            | ナルトグラスチム   | 0/5                     |
| ナルトグラスチム+アジュバント<br>( 0.2 mg/animal × 2 )   | ナルトグラスチム   | 5/5                     |
| 組換えhG-CSF+アジュバント<br>( 0.2 mg/animal × 2 )  | 組換えhG-CSF  | 5/5                     |
| ヒト赤血球アルブミン+アジュバント<br>( 0.2 mg/animal × 2 ) | ヒト赤血球アルブミン | 5/5                     |

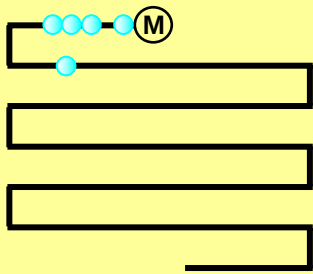
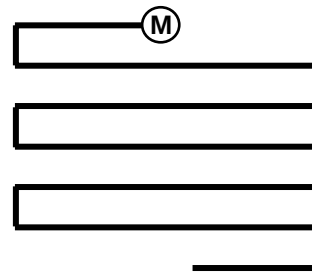
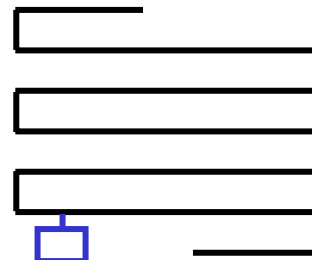
- 単独感作ではアナフィラキシー症状なし
- アジュバントと併用した場合に抗体産生
- 抗原性は組換えhG-CSFと同程度

# 血中抗G-CSF抗体(臨床試験)

| 試験区分           |         |           | 例数  | 結果 |
|----------------|---------|-----------|-----|----|
| 第Ⅰ相試験          |         |           | 34  | —  |
| がん化学療法時の好中球減少症 | 初期第Ⅱ相試験 |           | 45  | —  |
|                | 第Ⅱ相試験   | 非ホジキンリンパ腫 | 22  | —  |
|                |         | 肺癌        | 41  | —  |
|                |         | 尿路性器癌     | 32  | —  |
|                |         | 婦人科悪性腫瘍   | 52  | —  |
|                |         | 小児悪性腫瘍    | 35  | —  |
|                | 第Ⅲ相試験   | 非ホジキンリンパ腫 | 20  | —  |
|                | 第Ⅱ相試験   | 消化器癌      | 14  | —  |
| 骨髄移植           | 第Ⅱ相試験   | 骨髄移植      | 35  | —  |
|                |         | 自家骨髄移植    | 7   | —  |
|                | 第Ⅲ相試験   | 骨髄移植      | 28  | —  |
| 小児期好中球減少症      |         |           | 16  | —  |
| 後天性免疫不全症候群     |         |           | 11  | —  |
| 総計             |         |           | 394 | —  |

臨床における抗体産生なし

# G-CSF 3製剤の概要

|               |                                                                                                                |                                                                                                    |                                                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 一般名           | Nartograstim<br>ナルトグラスチム                                                                                       | Filgrastim<br>フィルグラスチム                                                                             | Lenograstim<br>レノグラスチム                                                                         |
| 販売名<br>(会社)   | ノイアップ<br>(協和発酵)                                                                                                | グラン<br>(キリンビール)                                                                                    | ノイトロジン<br>(中外製薬)                                                                               |
| 由来            | ヒト末梢血中マクロファージ                                                                                                  | ヒト膀胱癌細胞                                                                                            | ヒト口腔癌細胞                                                                                        |
| 産生細胞          | 大腸菌                                                                                                            | 大腸菌                                                                                                | チャイニーズハムスター卵巣細胞                                                                                |
| アミノ酸数<br>分子量  | 175個<br>19,000                                                                                                 | 175個<br>19,000                                                                                     | 174個<br>20,000                                                                                 |
| 構造            |  <p>(M):Met    ●: 変異アミノ酸</p> |  <p>(M):Met</p> |  <p>糖鎖</p> |
| N末端<br>アミノ酸配列 | 1 2 3 4 5 17 133<br>Met-Ala-Pro-The-Tyr-Arg... (Ser) ...Thr                                                    | 1 2 3 4 5 17 133<br>Met-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro... (Gys) ...Thr                                        | 1 2 3 4 5 17 133<br>Thr-Pro-Leu-Gly-Pro... (Gys) ...Thr<br>糖鎖                                  |

# G-CSF 3剤の毒性試験概要

|              |                                                                             |                                                                             |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 一般名          | Nartograstim<br>ナルトグラスチム                                                    | Filgrastim<br>フィルグラスチム                                                      | Lenograstim<br>レノグラスチム                                                      |
| 販売名<br>(会社)  | ノイアップ<br>(協和発酵)                                                             | グラン<br>(キリンビール)                                                             | ノイトロジン<br>(中外製薬)                                                            |
| 単回投与<br>毒性試験 | 致死用量(皮下・静脈内)<br>ラット: $>3,470 \mu\text{g/kg}$<br>サル: $>3,000 \mu\text{g/kg}$ | 致死用量(皮下・静脈内)<br>ラット: $>3,000 \mu\text{g/kg}$<br>サル: $>3,000 \mu\text{g/kg}$ | 致死用量(皮下・静脈内)<br>ラット: $>5,000 \mu\text{g/kg}$<br>イヌ: $>5,000 \mu\text{g/kg}$ |
| 反復投与<br>毒性試験 | 白血球増加<br>赤血球減少<br>アルカリホスファターゼ上昇<br>後肢骨吸収(ラット)                               | 白血球増加<br>赤血球減少<br>アルカリホスファターゼ上昇<br>後肢骨吸収(ラット)                               | 白血球増加<br>赤血球減少<br>アルカリホスファターゼ上昇<br>後肢骨吸収(ラット)                               |
| 生殖発生<br>毒性試験 | 催奇形作用なし                                                                     | 催奇形作用なし                                                                     | 催奇形作用なし                                                                     |
| 抗原性試験        | アジュバント併用で抗体産生<br>(天然型hG-CSFと同等)                                             | アジュバント併用で抗体産生                                                               | アジュバント併用で抗体産生                                                               |
| 変異原性         | 陰性                                                                          | 陰性                                                                          | 陰性                                                                          |
| 局所刺激性        | 生理食塩液と同等                                                                    | 生理食塩液と同等                                                                    | 生理食塩液と同等                                                                    |

3剤の毒性の質に差なし

# G-CSF 3製剤の臨床用量

| 一般名                     | Nartograstim<br>ナルトグラスチム                      | Filgrastim<br>フィルグラスチム                                                                                          | Lenograstim<br>レノグラスチム                        |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 販売名<br>(会社)             | ノイアップ<br>(協和発酵)                               | グラン<br>(キリンビール)                                                                                                 | ノイトロジン<br>(中外製薬)                              |
| 骨髄移植の<br>好中球数増<br>加促進   | 8 $\mu$ g/kg* (静脈内)                           | 300 $\mu$ g/m <sup>2</sup> (静脈内)<br>(約9 $\mu$ g/kg)                                                             | 5 $\mu$ g/kg (静脈内)                            |
| がん化学療<br>法による好<br>中球減少症 | 1 $\mu$ g/kg (皮下)<br>or<br>2 $\mu$ g/kg (静脈内) | 100 $\mu$ g/m <sup>2</sup> (皮下)<br>(約3 $\mu$ g/kg)<br>or<br>200 $\mu$ g/m <sup>2</sup> (静脈内)<br>(約6 $\mu$ g/kg) | 2 $\mu$ g/kg (皮下)<br>or<br>5 $\mu$ g/kg (静脈内) |
| 再生不良性<br>貧血に伴う<br>好中球減少 | 4 $\mu$ g/kg (皮下)<br>or<br>8 $\mu$ g/kg (静脈内) | 400 $\mu$ g/m <sup>2</sup> (静脈内)<br>(約12 $\mu$ g/kg)                                                            | 5 $\mu$ g/kg (皮下)<br>or<br>5 $\mu$ g/kg (静脈内) |

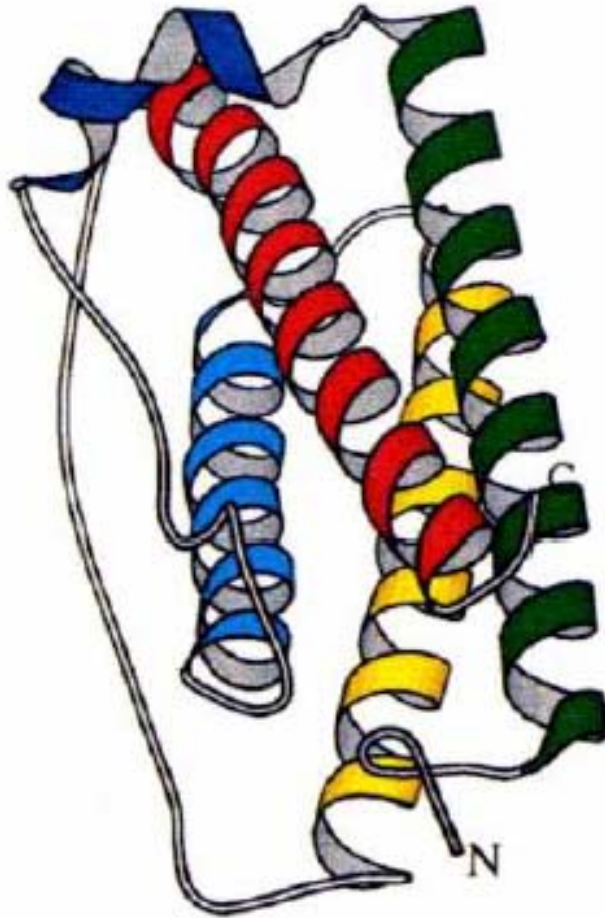
\* : 1日1回

## 投与量

ナルトグラスチム ≒ レノグラスチム < フィルグラスチム

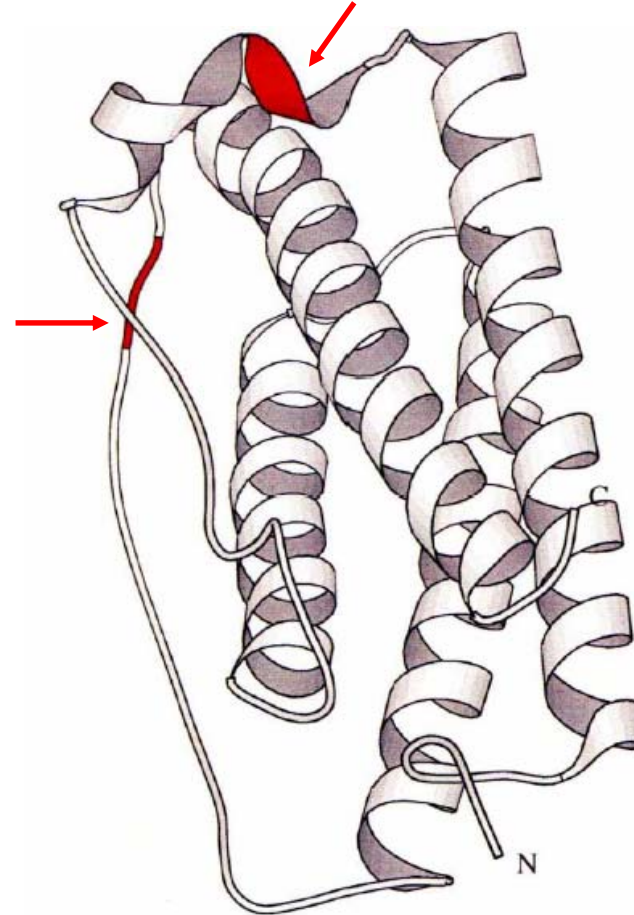
# G-CSFの構造と受容体結合部位

## G-CSFの立体構造



4本の $\alpha$ ヘリックスが束ねられた構造

## 予想受容体結合部位



結合部位：43～46残基、138～140残基部分

# まとめ

## *N*末端変異hG-CSF誘導体の創製

- ・物性

温度、pHの変化に安定

- ・生物活性

組換えhG-CSFよりも高い活性

- ・代謝

組換えhG-CSFよりも高い血漿中（プロテアーゼ）安定性

- ・安全性（抗原性）

組換えhG-CSFと同程度の安全性（抗原性）



本邦初のアミノ酸配列改変G-CSFの開発に成功