

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-211027

(P2007-211027A)

(43) 公開日 平成19年8月23日(2007.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/38 (2006.01)	A 6 1 K 47/38	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-136048 (P2007-136048)	(71) 出願人	507166977
(22) 出願日	平成19年5月22日 (2007.5.22)		アムジェン インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平9-528741の分割		アメリカ合衆国 コロラド 80301,
原出願日	平成9年2月10日 (1997.2.10)		ボウルダー, ウォールナット ストリート 3200
(31) 優先権主張番号	60/011, 419	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成8年2月9日 (1996.2.9)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	デイビッド エス. コリンズ
(31) 優先権主張番号	60/032, 789		アメリカ合衆国 コロラド 80026,
(32) 優先日	平成8年12月6日 (1996.12.6)		ラファイエット, ワナカ レイク トレイル 1607
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マイケル ビー. ベピラクァ
(31) 優先権主張番号	60/036, 241		アメリカ合衆国 コロラド 80301,
(32) 優先日	平成9年1月23日 (1997.1.23)		ボウルダー, ウェストリッジ ドライブ 5383
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	08/798, 414		
(32) 優先日	平成9年2月7日 (1997.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-1 インヒビターおよび制御放出ポリマーを含む組成物

(57) 【要約】

【課題】 インターロイキン-1 (I L-1) 媒介性炎症性疾患の処置のための治療方法および組成物を提供すること。

【解決手段】 本明細書において記載されるような、インターロイキン-1 (I L-1) 媒介性疾患に罹患した患者を処置するための方法。インターロイキン-1 (I L-1) 媒介性疾患に罹患した患者を処置するための方法であって、上記方法は、それを必要とする患者に、治療有効量の、制御放出ポリマーおよびタンパク質性インターロイキン-1 インヒビターを含む組成物を投与する工程を包含する、方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書において記載されるような、I L-1 媒介性疾患に罹患した患者を処置するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、炎症の分野に関する。より詳細には、本発明は、炎症性疾患の予防または処置の目的のための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

炎症は、機械的損傷、感染、または抗原刺激により引き起こされる傷害のような傷害に対する身体の防御である。炎症反応は、炎症が、自己抗原のような不適切な刺激により誘導される、病的に拡大された様式で発現される、または傷害性薬剤の除去の十分後に持続する場合に、病理学的に発現され得る。

【0003】

炎症の病因はあまり理解されていないが、かなりの情報が、最近、炎症の分子的局面に関して得られている。この研究は、炎症の媒介において顕著に現れると考えられている特定のサイトカインの同定に導いた。サイトカインは、細胞（特に、サイトカインの合成および放出の隣接する領域における細胞）の挙動を修飾する細胞外タンパク質である。インターロイキン-1（I L-1）は、かつて発見された最も強力な炎症サイトカインの1つであり、そして「インターロイキン-1 媒介性疾患」と称する多数の疾患および医学的状态における重要なメディエーターであると考えられているサイトカインである。I L-1（これは、マクロファージ/単球系列の細胞により（排他的ではないが）生産される）は、以下の2つの形態で産生される：I L-1 α および I L-1 β。

【0004】

自発的もしくは実験的疾患もしくは医学的状态が体液もしくは組織における高レベルのI L-1に関連する場合、または身体から取られた細胞もしくは組織が培養物中で高レベルのI L-1を産生する場合、疾患または医学的状态は「インターロイキン-1 媒介性疾患」と考えられる。多くの場合、そのようなインターロイキン-1 媒介性疾患はまた、以下のさらなる2つの状態により認識される：（1）疾患または医学的状态に関連する病理学的知見が、I L-1の投与により動物において実験的に模倣され得る；および（2）疾患または医学的状态の実験動物モデルにおいて誘導される病状が、I L-1の作用を阻害する薬剤での処置により阻害または廃止され得る。大部分のインターロイキン-1 媒介性疾患において、3つの状態の少なくとも2つが合致し、そして多くのインターロイキン-1 媒介性疾患において、3つ全ての状態が合致する。急性および慢性インターロイキン-1（I L-1）媒介性炎症性疾患の非排他的リストは、以下を包含するが、それらに限定されない：急性膵炎；A L S；アルツハイマー病；悪液質/食欲不振；喘息；アテローム性動脈硬化症；慢性疲労症候群、発熱；糖尿病（例えば、インスリン糖尿病）；糸球体腎炎；対宿主性移植片拒絶；出血性ショック；痛覚過敏、炎症性腸疾患；関節の炎症性状態（変形性関節症、乾癬性関節炎、および慢性関節リウマチを含む）；虚血性傷害（大脳性虚血（例えば、外傷、てんかん、出血、または発作の結果としての脳外傷）を含む、その各々が神経変性に導き得る）；肺疾患（例えば、A R D S）；多発性骨髄腫；多発性硬化症；骨髄性白血病（例えば、A M L および C M L）およびその他の白血病；筋障害（例えば、筋肉タンパク質代謝（特に、敗血症における））；骨粗鬆症；パーキンソン病；疼痛；早産；乾癬；再灌流傷害；敗血性ショック；放射線療法からの副作用、一時性下顎関節疾患、腫瘍転移；または、挫傷、捻挫、軟骨損傷、外傷、整形外科手術、感染、もしくはその他の疾患プロセスから生じる炎症性状態。

10

20

30

40

50

【0005】

関節の炎症性状態は、世界中の何百万の人々を、異なる程度に、患わせ、そして不具にする慢性関節疾患である。慢性関節リウマチは、軟骨および骨が、パンヌス（これは、滑膜に由来する）と称する増殖性侵襲性結合組織により徐々に侵食される関節の疾患である。この疾患は、囊のような関節周囲構造、腱鞘および腱ならびに関節外組織（例えば、浅在筋膜）、心血管系、肺、脾臓、リンパ節、骨格筋、神経系（中枢および末梢）ならびに眼に関わり得る（Silberberg（1985）、Anderson's Pathology, Kissane（編）、II：1828）。変形性関節症は、関節軟骨の変性変化および関節周辺の骨および軟骨の反応性増殖により特徴付けられる一般的な関節疾患である。変形性関節症は、異化的および同化的刺激に対する軟骨細胞の不適切な応答から生じ得る細胞媒介性活性プロセスである。関節軟骨のいくつかのマトリックス分子における変化は、伝えられる所によれば、早期の変形性関節症において生じる（Thonarら、（1993）、Rheumatic disease clinics of North America, Moskowitz（編）、19：635-657およびShinmeiら、（1992）、Arthritis Rheum., 35：1304-1308）。

【0006】

慢性関節リウマチは、免疫遺伝学的に感受性の宿主への関連抗原の呈示から生じると考えられている。慢性関節リウマチを生じる免疫応答を潜在的に開始させ得る抗原は、内因性または外因性であり得る。可能な内因性抗原としては、コラーゲン、ムコ多糖、およびリウマチ因子が挙げられる。外因性抗原としては、マイコプラズマ（mycoplasmas）、マイコバクテリア、スピロヘータおよびウイルスが挙げられる。免疫反応の副産物は滑膜に炎症を起こさせ（すなわち、プロスタグランジンおよび酸素ラジカル）、そして破壊的関節変化を引き起こす（すなわち、コラゲナーゼ）。

【0007】

広範囲の疾患重篤度が存在するが、緩慢に進行性の関節破壊および変形の全体的なパターンをとまなう多数の患者は間欠性再発および寛解の過程を経る。臨床的症状としては、疼痛をとまなう末梢関節の対称性多発性関節炎、圧痛、罹患関節の腫脹および機能損失；早朝硬直（morning stiffness）；ならびに軟骨の損失、骨物質の侵食、および持続性炎症後の関節の亜脱臼が挙げられ得る。関節外症状としては、リウマチ小結節、リウマチ性血管炎、胸膜肺炎症、強膜炎、乾燥症候群、フェルティ症候群（巨脾腫症および好中球減少症）、骨粗鬆症、ならびに体重損失が挙げられる（Katz（1985）、Am. J. Med., 79：24ならびにKraneおよびSimon（1986）、Advances in Rheumatology, Synderman（編）、70（2）：263-284）。臨床的症状は、患者の日常生活の妨害を生じる高度の病的状態を生じる。

【0008】

関節炎におけるインターロイキン-1の関与は、2つの異なる線の証拠により関連付けられている。第1に、高レベルのインターロイキン-1およびそれをコードするmRNAは、滑膜組織および関節液において見出されている。例えば、Buchanら、「Third Annual General Meeting of the British Society for Rheumatology」, London, England, 1988年11月19-21日, J. Rheumatol., 25（2）；Fontanaら、（1982）、Rheumatology Int., 2：49-53；ならびにDuffら、（1988）、Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines, M. Pownallら（編）、387-392頁（Alan R. Liss, Inc.）。

【0009】

第2に、インターロイキン-1の健常関節組織への投与は、多数の場合に、軟骨および骨の侵食を生じることが示されている。1つの実験において、IL-1のウサギへの関節

内注射は、インビボにおいて軟骨破壊を引き起こすことが示された (Pettipherら、(1986), Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A., 83:8749-8753)。その他の研究において、IL-1は組織外植片における軟骨および骨の両方の分解を引き起こすことが示された (Saklatavalaら、(1987), Development of Diseases of Cartilage and Bone Matrix, SenおよびThornhill (編), 291-298頁 (Alan R. Liss, Inc.) ならびにStashenkoら (1987), The American Association of Immunologists, 183:1464-1468)。IL-1と関節炎との間の因果関係を説明するために用いられる1つの一般に受け入れられている理論は、IL-1が、種々の細胞型 (例えば、線維芽細胞および軟骨細胞) を、プロスタグランジンE₂ およびメタロプロテイナーゼのような前炎症性または分解性化合物を産生または分泌するように刺激するというものである。

10

【0010】

インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) は、インターロイキン-1の天然のインヒビターとして作用するヒトタンパク質である。IL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) は、IL-1媒介性疾患の臨床的処置における使用のための潜在的薬剤として開示されている (豪州特許第649245号)。しかし、IL-1raは、比較的短い半減期を有する。それゆえ、IL-1raを制御放出処方物中で投与して、IL-1媒介性疾患を処置することが有利である。

20

【0011】

制御放出処方物において有用な1つの物質は、ヒアルロン酸である。ヒアルロン酸は、非分岐鎖においてD-グルコン酸およびN-アセチル-D-グルコサミンの残基からなる天然に生じるムコ多糖である。ポリマーは、 $(5 \sim 6) \times 10^6$ の平均分子量を有し、優れた生体適合性を示す。関節軟骨において、ヒアルロン酸は、プロテオグリカンとの凝集により軟骨マトリックスの構築における重要な役割を担う。さらに、慢性関節リウマチ、変形性関節症、および感染性関節炎のような病理学的条件下において、関節におけるヒアルロン酸の濃度および分子量は変化し、そして滑液の性質の変化を引き起こす。

【0012】

ヒアルロン酸の化学的架橋および誘導体化の両方は、その流動学的特性を増強するか、または特定の薬物の分解時間を増加させるために使用されている (Cortivoら、(1991), Biomaterials, 2:727-730; Benedettiら、(1990), J. Controlled Release, 13:33-41およびHuntら、(1990), J. Controlled Release, 12:159-169)。

30

【0013】

高分子量ヒアルロン酸誘導体の注射が関節軟骨表面上の損傷されたヒアルロン酸層を回復し得、そして臨床的および基礎的試験におけるいくつかの種類の関節状態を処置するために有効であり得ることが示された。関節状態の処置のためのヒアルロン酸誘導体のそのような使用を記載する科学的刊行物の例としては、以下が挙げられる: NizolekおよびWhite (1981), Cornell Vet., 71:355-375; Namikiら、(1982), Int. J. Chem. Pharmacol., Therapy and Toxicol., 20:501-507; AsheimおよびLindblad (1976), Acta Vet Scand, 17(4):379-394; Svanstrom (1978), Proceedings of the 24th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, St Louis, MO., 345-348頁; Wigrenら、(1975), Upsala J Med Sci Suppl, 17:1-20; ならびにGingerichら、(1980), Res Vet Sci, 30

40

50

：192-197。ヒト関節におけるヒアルロン酸の使用は、Peyronら、(1974), *Pathologie Biologie*, 22(8):731-736により報告されている。ウマ関節におけるヒアルロン酸の関節内使用は、PharmaciaのHylartilTMおよびHylartin VTM製品ならびにSterivetのSynacidTM製品との関連で商業的に促進されている。しかし、疼痛および硬直(stiffness)のような症状は関節疾患の処置における深刻な問題となるが、ヒアルロン酸はそのような症状を直接的には改善しない。

【0014】

さらに、ヒアルロン酸は薬物送達のために使用されている。種々の動物(特にウマ)の関節におけるヒアルロン酸の使用(単独およびコルチゾンとの併用の両方)を記載する1つの科学的刊行物は、Rydelら、(1971), *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 80:25-32である。別の科学的刊行物は、ヒアルロン酸エステル由来のマイクロスフェアの調製物がインスリンの鼻送達のために使用されたことを記載する(Illumら、(1994), *J. Controlled Release*, 29:133-141)。ブランクスフェア(blank sphere)は、乳化/溶媒蒸発技術により調製され、インスリン溶液に1時間曝露され、次いで凍結乾燥された。ヒツジに投与された場合、平均生物学的利用能は、皮下経路により投与されたインスリンと比較して、11%であると見出された。この系はまた、神経成長因子の送達デバイスとして使用されている(Ghezra、(1992), *Int. J. Pharm.*, 87:21-29)。しかし、イヌのひざに放射活性アルブミンと混合した生理学的濃度(3mg/ml)の高分子量($M_r 6 \times 10^6$)または低分子量($M_r 5 \times 10^5$)ヒアルロン酸を注射した場合、アルブミン分布容積およびクリアランス速度は、高分子量ヒアルロン酸の濃度(0.03 mg/ml)または低分子ヒアルロン酸の濃度(0.3 mg/ml)が減少したひざにおけるアルブミン分布容積およびクリアランス速度をわずかに超えた(MyersおよびBrandt (1995), *J. Rheumatol.*, 22:1732-1739)。この参考文献は、ヒアルロン酸とタンパク質(例えば、IL-1ra)との組み合わせが、炎症性疾患の処置において、特に関節内注射を介して投与された場合、ヒアルロン酸単独以上には有効でないことを示唆する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の目的は、IL-1媒介性炎症性疾患の処置のための治療方法および組成物を提供することである。本発明のこの目的およびその他の目的は、本明細書中以下の記載から明らかとなる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明の要旨

本発明は、IL-1媒介性炎症性疾患を処置するための薬剤として、制御放出ポリマー(例えば、ヒアルロナン)およびタンパク質性IL-1インヒビター(例えば、IL-1ra)を含む薬学的組成物に関する。本明細書中で言及される処置の型は、哺乳動物(ヒトを含む)について意図される。

【0017】

本発明は、下記を提供する：

- ・項目1. IL-1媒介性疾患に罹患した患者を処置するための方法であって、該方法は、それを必要とする患者に、治療有効量の、制御放出ポリマーおよびタンパク質性インターロイキン-1インヒビターを含む組成物を投与する工程を包含する、方法。
- ・項目2. 上記制御放出ポリマーがヒドロゲルエステルである、項目1に記載の方法。
- ・項目3. 上記ヒドロゲルエステルがヒアルロナンまたはその塩である、項目2に記載の方法。

10

20

30

40

50

- ・項目 4. 上記ヒアルロナンがヒアルロン酸である、項目 3 に記載の方法。
- ・項目 5. 上記ヒアルロナンがヒランである、項目 3 に記載の方法。
- ・項目 6. 上記ヒアルロナンがヒアルロン酸ナトリウムである、項目 3 に記載の方法。
- ・項目 7. 上記ヒドロゲルエステルがポリ（ビニルピロリドン）である、項目 2 に記載の方法。
- ・項目 8. 上記ヒドロゲルエステルがセルロースである、項目 2 に記載の方法。
- ・項目 9. 上記セルロースがカルボキシメチルセルロースである、項目 8 に記載の方法。
- ・項目 10. 上記タンパク質性インターロイキン-1 インヒビターが I L-1 レセプターアンタゴニスト（I L-1 r a）である、項目 1 に記載の方法。
- ・項目 11. 上記 I L-1 r a がグリコシル化されている、項目 10 に記載の方法。 10
- ・項目 12. 上記 I L-1 r a がグリコシル化されていない、項目 10 に記載の方法。
- ・項目 13. 上記 I L-1 r a がメチオニル I L-1 r a である、項目 10 に記載の方法。
- ・項目 14. 上記 I L-1 r a が組換え D N A 方法により産生される、項目 10 に記載の方法。
- ・項目 15. 上記疾患が、慢性関節リウマチ、変形性関節症、および挫傷、捻挫、外傷、感染、軟骨損傷、または整形外科手術から生じる他の炎症性状態からなる群より選択される関節の炎症性疾患である、項目 1 に記載の方法。
- ・項目 16. 上記組成物が関節内投与または皮下投与により投与される、項目 1 に記載の方法。 20
- ・項目 17. 有効量の、制御放出ポリマーとタンパク質性インターロイキン-1 インヒビターとの組み合わせを含む、薬学的組成物。
- ・項目 18. 上記制御放出ポリマーがヒアルロナンまたはその塩である、項目 17 に記載の組成物。
- ・項目 19. 上記ヒアルロナンがヒアルロン酸である、項目 18 に記載の組成物。
- ・項目 20. 上記タンパク質性インターロイキン-1 インヒビターが I L-1 レセプターアンタゴニスト（I L-1 r a）である、項目 18 に記載の組成物。
- ・項目 21. 上記 I L-1 r a がグリコシル化されている、項目 20 に記載の組成物。
- ・項目 22. 上記 I L-1 r a がグリコシル化されていない、項目 20 に記載の組成物。
- ・項目 23. 上記 I L-1 r a がメチオニル I L-1 r a である、項目 20 に記載の組成物。 30
- ・項目 24. 上記 I L-1 r a が組換え D N A 方法により産生される、項目 20 に記載の組成物。
- ・項目 25. 関節腔中への投与のために適切な調製物形態である、項目 17 に記載の組成物。
- ・項目 26. 上記ヒアルロナンが 0. 1 ～ 5 % w / v の範囲で存在する、項目 18 に記載の組成物。
- ・項目 27. 上記 I L-1 r a の濃度が 0. 1 ～ 2 0 0 m g / m l の範囲で存在する、項目 20 に記載の組成物。
- ・項目 28. 上記ヒアルロナンが 0. 1 ～ 5 % w / v の範囲で存在し、そして上記 I L-1 r a が 0. 1 ～ 2 0 0 m g / m l の範囲で存在する、項目 18 に記載の組成物。 40
- ・項目 29. 上記ヒアルロナンが約 2 % w / v の濃度で存在し、そして上記 I L-1 r a が約 1 0 0 m g / m l の濃度で存在する、項目 18 に記載の組成物。
- ・項目 30. I L-1 媒介性疾患を処置するための薬物の調製における、有効量の、制御放出ポリマーとタンパク質性インターロイキン-1 インヒビターとの組み合わせを含む、薬学的組成物の使用。
- ・項目 31. 上記 I L-1 媒介性疾患が関節の炎症性疾患である、項目 30 に記載の使用。
- ・項目 32. 上記関節の炎症性疾患が、慢性関節リウマチ、変形性関節症、および挫傷、捻挫、外傷、感染、軟骨損傷、または整形外科手術から生じる他の炎症性状態から選択さ 50

れる、項目 31 に記載の使用。

・項目 33. 上記薬学的組成物が関節内投与される、項目 30～32 のいずれかに記載の使用。

・項目 34. 上記制御放出ポリマーがヒアルロナンまたはその塩である、項目 30～33 のいずれかに記載の使用。

・項目 35. 上記ヒアルロナンがヒアルロン酸である、項目 34 に記載の使用。

・項目 36. 上記 IL-1 インヒビターが IL-1ra である、項目 30～35 のいずれかに記載の使用。

・項目 37. 上記 IL-1ra が、IL-1ra α 、IL-1ra β 、および IL-1rax からなる群由来の少なくとも 1 つの化合物を含む、項目 36 に記載の使用。

・項目 38. 上記 IL-1 インヒビターがヒト組換え IL-1ra である、項目 37 に記載の使用。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

詳細な説明

本発明の薬学組成物は、制御放出ポリマー（例えば、ヒアルロナン）およびタンパク質性 IL-1 インヒビター（例えば、IL-1ra）の混合物を含有する。特定の実施態様では、本発明は、ヒアルロナンおよびタンパク質性 IL-1 インヒビター（例えば、IL-1ra）を含有する薬学的処方物を投与することに関し、これは IL-1ra レベルの比較的長期にわたる上昇を導く。仮出願の送信レターにおいて「COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES」20 として表題を付けられた、Collins によって 1996 年 2 月 9 日に 出願された米国仮特許出願第 60/011, 419 号（代理人記録番号 A-365P）、仮出願の送信レターにおいて「COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES」20 として表題を付けられた、Collins および Bevilacqua によって 1996 年 12 月 6 日に 出願された米国仮特許出願第 60/032, 789 号（代理人記録番号 A-365A-P）、および仮出願の送信レターにおいて「COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES」30 として表題を付けられた、Collins および Bevilacqua によって 1997 年 1 月 2 3 日に 出願された米国仮特許出願第 号（代理人記録番号 A-365B-P）の教示、これらの開示は参考として本明細書中に援用される。

20

30

【0019】

インターロイキン-1 インヒビターは、IL-1 に対する細胞レセプターの活性化を特異的に阻止し得る任意のタンパク質であり得る。インターロイキン-1 インヒビターのクラスは以下を含む：以下に記載されるような、IL-1ra のようなインターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト；抗-IL-1 レセプターモノクローナル抗体（EP 623674）；可溶性 IL-1 レセプターのような IL-1 結合タンパク質（米国特許第 5, 492, 888 号、同第 5, 488, 032 号、同第 5, 464, 937 号、同第 5, 319, 071 号、および同第 5, 180, 812 号）；抗-IL-1 モノクローナル抗体（WO 9501997、WO 9402627、WO 9006371、U.S. 4, 935, 343、EP 364778、EP 267611、および EP 220063）；および IL-1 レセプターアクセサリタンパク質（WO 96/23067）、これらの開示は参考として本明細書中に援用される。

40

【0020】

好ましい IL-1ra（グリコシル化および非グリコシル化の両方）、ならびにそれらを作製および使用する方法が、米国特許第 5, 075, 222 号（'222 特許として本明細書中で言及される）；WO 91/08285；WO 91/17184；AU 9173636；WO 92/16221 および WO 96/22793 に記載されている。これらの開示は、参考として本明細書中に援用される。

50

【0021】

詳細には、3つの有用な形態のIL-1ra (IL-1ra α 、IL-1ra β 、およびIL-1rax) およびそれらの改変体が、'222特許に開示および記載されている。IL-1ra α は、約4.8の等電点を有してSDS-PAGEにおいて22~23kD分子として特徴付けられ、Tris緩衝液、pH 7.6において約52mM NaClでMono Q FPLCカラムから溶出される。IL-1ra β は、22~23kDタンパク質として特徴付けられ、48mM NaClでMono Qカラムから溶出される。IL-1ra α およびIL-1ra β は両方ともグリコシル化されている。IL-1raxは、20kDタンパク質として特徴付けられ、48mM NaClでMono Qカラムから溶出され、そしてグリコシル化されていない。これらの3つのインヒビターの全ては、同様の機能的および免疫学的活性を保有する。

10

【0022】

IL-1raを産生するための1つの開示された方法は、ヒト単球からIL-1raを単離することからなる。ここでそれらは天然に産生される。第2の開示された方法は、IL-1raをコードする遺伝子を単離する工程、適切なベクターおよび細胞型にその遺伝子をクローン化する工程、その遺伝子を発現させてインヒビターを産生させる工程、そのインヒビターを収集する工程を包含する。後者の方法（一般的な組換えDNA法の例示である）は好ましい方法である。組換えDNA法は部分的に好ましい。なぜなら、それらが比較的より高い純度のより多い量のタンパク質を達成し得るからである。従って、本発明はまた、E. coliのような原核生物細胞における発現の結果として、N末端のメチオニル基を含有するIL-1raを含む。

20

【0023】

上記のように、本発明はまた改変形態のIL-1raを含む。本明細書中で用いられるIL-1raの改変形態は、アミノ酸が（1）IL-1raのアミノ酸配列内の残基から欠失されている（欠失改変体）、（2）IL-1raのアミノ酸配列内の残基に挿入されている（付加改変体）、または（3）IL-1raのアミノ酸配列内の残基を置換している（置換改変体）改変体ポリペプチドを含む。

【0024】

IL-1ra欠失改変体に関して、各ポリペプチドは、代表的には、約1~30残基、より代表的には、約1~10の残基、そして最も代表的には約1~5の連続した残基の範囲のアミノ配列欠失を有し得る。N末端、C末端、および内部の配列内欠失が意図される。IL-1raアミノ酸配列内の欠失は、IL-1ファミリーの他のメンバーの配列と低い相同性を有する領域内に作製され得る。IL-1raアミノ酸配列内の欠失は、IL-1ファミリーの他のメンバーの配列と実質的な相同性を有する領域内に作製され得、そして生物学的活性を有意に改変するようである。

30

【0025】

IL-1ra付加改変体に関して、各ポリペプチドは1残基から100以上の残基までの長さの範囲のアミノーおよび／またはカルボキシルー末端の融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の内部の配列内挿入を含み得る。内部の付加は、代表的には、1~10アミノ酸残基、より代表的には1~5アミノ酸残基、そして最も代表的には約1~3アミノ酸残基の範囲であり得る。

40

【0026】

アミノー末端付加改変体は、メチオニン（例えば、細菌の組換え細胞培養におけるタンパク質の直接発現の人為産物として）または付加アミノ酸残基あるいは配列の付加を含む。アミノ末端挿入のさらなる例は、シグナル配列と（ならびに／または）他のプレプロ配列との融合を含み、組換え宿主細胞からのタンパク質の分泌を容易にする。各ポリペプチドは、宿主細胞により認識およびプロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ように選択されるシグナル配列を含み得る。天然のIL-1raシグナル配列を認識もプロセスもしない原核生物宿主に関して、各ポリペプチドは、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダー

50

一の群から選択される原核生物シグナル配列を含み得る。酵母細胞に関して、各ポリペプチドは、例えば、酵母インベルターゼ、アルファ因子、または酸ホスファターゼリーダー配列の群から選択されるシグナル配列を有し得る。哺乳動物細胞発現に関して、各ポリペプチドは I L - 1 r a の天然のシグナル配列を有し得、一方、他の哺乳動物シグナル配列は、例えば他の I L - 1 ファミリーメンバーに由来する適切な配列であり得る。

【0027】

カルボキシ末端付加改変体はキメラタンパク質を含み、ここで各々は I L - 1 r a とヒト免疫グロブリンの H 鎖または L 鎖の定常ドメインの全部または一部との融合物を含む。このようなキメラタンパク質が好ましく、ここで各々の免疫グロブリン部分は、ヒト免疫グロブリンの H 鎖の定常領域の第 1 のドメイン以外の全てのドメイン（例えば、I g G、I g A、I g M、または I g E（特に I g G、例えば、I g G 1 または I g G 3））を含む。I L - 1 r a が I L - 1 レセプターを依然として拮抗し、そして免疫グロブリン部分が 1 以上のその特徴的な特性を示す限り、各免疫グロブリン部分の任意のアミノ酸が 1 以上のアミノ酸で欠失または置換され得るか、または 1 以上のアミノ酸が付加され得ることを、当業者は理解する。

10

【0028】

I L - 1 r a 置換改変体に関して、各々のこのようなポリペプチドは、I L - 1 r a の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が除去されており、そしてその位置に挿入された異なる残基を有する。置換改変体は対立遺伝子改変体を含み、これはアミノ酸変化を生じるかもしれないし、生じないかもしれない種集団における天然に存在するヌクレオチド配列変化によって特徴付けられる。当業者は、可能な変異位置の選択において、ポリペプチドの結合または活性部位に関して既知の任意の情報を使用し得る。代表的な置換改変体は、W O 9 1 / 1 7 1 8 4、W O 9 2 / 1 6 2 2 1、および W O 9 6 / 0 9 3 2 3 に教示されている。

20

【0029】

タンパク質の変異誘発のためのアミノ酸残基または領域を同定する 1 つの方法は「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる（C u n n i n g h a m および W e l l s （1989）, S c i e n c e , 2 4 4 : 1 0 8 1 - 1 0 8 5、この開示は参考として本明細書中に援用される）。この方法において、タンパク質のアミノ酸残基または標的残基の基が同定され（例えば、A r g、A s p、H i s、L y s、および G l u のような荷電残基）、そして中性または負に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）によって置換され、アミノ酸と細胞の内部または外部の周囲の水性環境との相互作用に影響を及ぼす。次いで、置換に対して機能的感受性を示す残基は、置換の部位に付加的なまたは代替の残基を導入することにより洗練される。従って、アミノ酸配列改変を導入するための部位が予め決定され、そして所定の部位での変異の出来映えを最適化するために、アラニンスキャニングまたはランダム変異誘発が行われ得、そして得られる改変体ポリペプチドは、所望の活性および活性の程度の至適な組み合わせについてスクリーニングされる。

30

【0030】

置換的変異誘発に関する最も興味深い部位としては、I L - r a において見い出されるアミノ酸が、側鎖バルク、電荷、および／または疎水性の点で I L - 1 r a 様タンパク質（例えば、他の種々の種または I L - 1 ファミリーの他のメンバーの I L - 1 r a）とは実質的に異なる部位が挙げられる。他の目的の部位としては、I L - 1 r a の特定の残基がそのような I L - 1 r a 様タンパク質と同一である部位が挙げられる。このような位置は、タンパク質の生物学的活性に対して一般に重要である。最初に、これらの部位は、比較的保存的な様式での置換によって改変される。このような保存的な置換は、「好ましい置換」の見出しで表 1 に示される。このような置換が生物学的活性における変化を生じる場合、より実質的な変化（代表的置換）が導入され、そして／または他の付加／欠失が作製され得、そして得られるポリペプチドはスクリーニングされる。

40

【0031】

50

【表 1】

表 1
アミノ酸置換

<u>本来の残基</u>	<u>好ましい置換</u>	<u>例示的置換</u>
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe;
Leu (L)	Ile	ノルロイシン ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

10

20

30

40

I L-1 r aのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードする核酸配列に対する対応する改変）は、同様の機能的および化学的特徴を有するタンパク質を産生することが

50

予期される。対照的に、I L-1 r aの機能的および／または化学的特徴における実質的な改変は、(a)置換の領域内のポリペプチド骨格の構造（例えば、シートまたはらせん状コンホメーション）、(b)標的部位におけるタンパク質電荷または疎水性、あるいは(c)側鎖のバルクを維持することに対するそれらの効果において有意に異なる置換を選択することによって達成され得る。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づく群に分けられる：

- 1) 疎水性：N o r l o y s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- 2) 中性の疎水性：C y s、S e r、T h r；
- 3) 酸性：A s p、G l u；
- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；
- 5) 芳香族：T r p、T y r、P h e；および
- 6) 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o。

10

【0032】

非保存的置換は、これらの群の1つのメンバーの別のものへの交換を含み得る。このような置換された残基は、他のI L-1ファミリーメンバーと相同または非相同であるI L-1 r aの領域に導入され得る。

【0033】

I L-1 r aの配列中の特定の変異は、N末端、C末端、またはN結合またはO結合した炭水化物の付加によって改変されたタンパク質の任意の部位の、非天然アミノ酸の置換を含み得る。このような改変は、例えば、アミノ酸（システイン）の付加において特に有用であり得る。システインは、下記のように、誘導体を形成するための水溶性ポリマーの結合に有利である。さらに、I L-1 r aの配列は、グリコシル化部位を付加するように、あるいはN結合またはO結合したグリコシル化部位を欠失するように改変され得る。アスパラギン結合グリコシル化認識部位は、適切な細胞性グリコシル化酵素によって特異的に認識されるトリペプチド配列を含む。これらのトリペプチド配列は、A s n-X a a-T h rまたはA s n-X a a-S e rのいずれかであり、ここでX a aはP r o以外の任意のアミノ酸であり得る。

20

【0034】

特定の実施態様において、改変体は、実質的に、I L-1 r a（配列番号2）のアミノ酸と相同である。本明細書中で使用される用語「実質的に相同」とは、相同性の程度が、好ましくは70%を超過し、より好ましくは80%を超過し、さらに好ましくは90%を超過し、または最も好ましくは95%であることを意味する。本明細書中で記載される相同性の割合は、Dayhoff in Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:124 (1972), National Biochemical Research Foundation, Washington, D. C.（その開示は、本明細書によって参考として援用される）に記載のように、その整列を助けるために100アミノ酸の長さにおいて4つのギャップが導入され得る場合、比較される配列中の同一のアミノ酸残基と整列する、2つの配列のより小さい配列において見出されるアミノ酸残基の割合として計算される。配列番号2のアミノ酸配列に対する抗体との交叉反応性によって単離され得るかまたはその遺伝子が配列番号1のDNAまたはそのセグメントとのハイブリダイゼーションを介して単離され得るI L-1 r aの改変体はまた、実質的な相同性として含まれる。

30

40

【0035】

I L-1 r aの改変体の産生は以下でさらに詳細に記載される。このような改変体は、適切なヌクレオチド改変をI L-1 r aの改変体をコードするDNAに導入することによってまたはI L-1 r aの所望の改変体のインビトロ化学合成によって調製され得る。I L-1 r aの最終的な改変体が生物学的に活性であるという条件で、欠失、挿入、および置換の多くの組合せがなされ得ることは当業者によって理解される。

【0036】

1つ以上の選択されたアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失の変異形成技術は、当業

50

者に周知である（例えば、米国特許第4,518,584号（その開示は、本明細書によって参考として援用される）。各アミノ酸配列改変体の構築における2つの主要な変数が存在する、変異部位の位置および変異の性質。各改変体を設計するにおいて、各変異部位の位置および各変異の性質は、改変される生物学的な特性に依存する。各変異部位は、個々にまたは連続して、例えば、（1）達成される結果に依存して、まず保存的なアミノ酸選択で置換し、次いでよりラジカルな選択で置換することによって（2）標的アミノ酸残基を欠失することによって、または（3）位置づけられる部位に隣接する1つ以上のアミノ残基を挿入することによって改変され得る。

【0037】

本明細書中の開示が与えられれば、IL-1raの化学的に改変された誘導体およびIL-1raの改変体は、当業者によって調製され得る。結合物は、グリコシル化、非グリコシル化、または脱グリコシル化IL-1raおよびIL-1raの改変誘導体を使用して調製され得る。代表的には、非グリコシル化IL-1raおよびIL-1raの改変体を使用される。IL-1raの誘導体およびIL-1raの改変体に適切な化学部分は、水溶性ポリマーを含む。

10

【0038】

水溶性ポリマーは、各々に結合されているタンパク質が生理学的環境のような水性環境において沈殿しないので望ましい。好ましくは、ポリマーは、治療的な産物または組成物の調製のために薬学的に受容可能である。当業者は、ポリマー／タンパク質結合物が治療的に使用されるかどうかについての考慮に基づいて所望のポリマーを選択し得る、そして

20

【0039】

適切な、臨床的に受容可能な、水溶性ポリマーとしては、；ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、モノメトキシポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソレン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリ（ β -アミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、ポリ（ n -ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー（PPG）、および他のポリアキレンオキシド、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール（POG）（例えば、グリセロール）、および他のポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトール、またはポリオキシエチル化グルコース、コロニック酸（colonic acid）、または他の炭水化物ポリマー、Ficollまたはデキストラン、およびその混合物が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0040】

本明細書中で使用されるポリエチレングリコールは他のタンパク質を誘導体化するために使用される任意の形態（例えば、モノ-（C1-C10）アルコキシ、またはアリールオキシポリエチレングリコール）を含むことを意味される。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水におけるその安定性のために製造するにおいて利点を有し得る。

40

【0041】

各水溶性ポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝状または非分枝状であり得る。各水溶性ポリマーは、代表的には、約2kDa～約100kDaの間の平均分子量を有する（用語「約」は水溶性ポリマーの調製物においていくつかの分子が記載の分子量より重いまたはいくらか軽いことを意味する）。各水溶性ポリマーの平均分子量は、好ましくは約5kDa～約50kDa、より好ましくは約12kDa～約25kDaの間、そして最も好ましくは、約20kDaである。一般的に、より分子量が高ければ高いほど、またはより分枝が多ければ多いほど、ポリマー：タンパク質比は高くなる。所望の治療的プロフィール（例えば、徐放の期間；もしあれば、生物学的な活性に対する影響；取扱いにお

50

ける容易さ；抗原性の程度または欠如および治療的タンパク質に対する水溶性ポリマーの他の公知の影響）に依存して他のサイズが使用され得る。

【0042】

各水溶性ポリマーは、タンパク質の機能ドメインまたは抗原性ドメインに対する影響を考慮してタンパク質に結合されるべきである。一般に、化学誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。ポリマーを活性部分に連結するために使用され得る活性基としては：スルフォン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジジリン、オキシラン、および5-ピリジルが挙げられる。

【0043】

各水溶性ポリマーは、一般に、アミノ酸の α -もしくは ϵ -アミノ基または反応性チオール基でタンパク質に結合されるが、水溶性基が、適切な反応条件下で水溶性基に結合するに十分に反応性であるタンパク質の任意の反応基に結合され得ることがまた意図される。従って、水溶性ポリマーは、反応基（例えば、遊離のアミノ基、またはカルボキシル基）を介してタンパク質に共有結合し得る。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基は、リジン残基およびN末端アミノ酸残基を含み得る。遊離カルボキシル基を有するアミノ酸残基は、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC-末端アミノ酸残基を含み得る。反応性チオール基を有するアミノ酸残基は、システイン残基を含む。

【0044】

水溶性ポリマーと結合させたタンパク質を調製するための方法は、各々、一般に、（a）タンパク質が1つ以上の水溶性ポリマーに結合する条件下で水溶性ポリマーとタンパク質を反応させる工程、および（b）反応産物を得る工程を含む。各結合体についての反応条件は、当業者に公知の任意の反応条件または引き続き開発された反応条件から選択され得るが、反応条件（例えば、改変すべきタンパク質を不活化する温度、溶媒、およびpHレベル）への曝露を避けるかまたは限定することが選択されるべきである。一般に、反応についての最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて個別的に決定される。例えば、水溶性ポリマー：タンパク質結合物のより大きな比、結合生成物のより大きな割合。最適な比（過剰な未反応タンパク質またはポリマーが存在しない点において反応の効率の点から）は、誘導体の所望の程度（例えば、モノー、ジマー、トリマーなど）、選択されるポリマーの分子量、ポリマーが分枝状または非分枝状であるか、および使用される反応条件のような因子によって決定され得る。水溶性ポリマー（例えば、PEG）対タンパク質の比は、一般に、1：1～100：1の範囲にある。1つ以上の精製された結合物は、標準的な精製技術によって各混合物から調製され得る。これは、とりわけ、透析、脱塩、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および電気泳動を含む。

【0045】

N末端化学改変タンパク質が特に所望され得る。分子量、分枝など、反応混合物中のタンパク質（またはペプチド）分子に対する水溶性ポリマーの比率、行われるべき反応の型、および選択されたN末端化学改変タンパク質を得る方法などによって水溶性ポリマーは選択され得る。N末端化学改変タンパク質調製物を得る方法（すなわち、必要ならば、他のモノ誘導体化部分からこの部分を分離する工程）は、化学的改変タンパク質分子の集団からN末端化学改変タンパク質物質の精製により得る。選択的なN末端化学改変は、特定のタンパク質における誘導体化のために利用可能な一次アミノ基（リジン対N末端）の異なる型の異なる反応性を利用する還元的アルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下で、カルボニル基含有ポリマーとのN末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化は達成される。例えば、水溶性ポリマーは、リジン残基の ϵ -アミノ基とタンパク質のN末端残基の α -アミノ基間のpKa差を利用することを可能にするpHで反応を行うことによってタンパク質のN末端に選択的に結合され得る。このような選択的な誘導体化によって、タンパク質への水溶性ポリマーの結合は制御される：ポリマーへの結合は、タンパク質のN末端で優先的に起こり、そして他の反応基（例えば、リジン側鎖アミノ基）の

10

20

30

40

50

有意な改変は起こらない。還元的アルキル化を使用して、水溶性ポリマーは上記の型であり得、そしてタンパク質にカップリングするための単一の反応性アルデヒドを有するべきである。単一の反応アルデヒドを含有するポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドが使用され得る。

【0046】

本発明は、詳細には、モノーまたはポリマー（例えば、2～4）PEG部分を含む化学的誘導体化タンパク質を意図する。PEG化は、当該分野において公知の任意のPEG化反応によって行われ得る。PEG化タンパク質生成物を調製するための方法は、一般に、以下の工程を含む（a）タンパク質生成物を、タンパク質が1つ以上のPEG基と結合する条件下でポリエチレングリコール（例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、および（b）反応産物を得る工程。一般に、反応のための最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて個別に決定される。

10

【0047】

当業者に利用可能な多くの結合方法が存在する。例えば、EP 0 401 384を参照のこと、その開示は、本明細書によって参考として援用される；また、Malikら（1992），Exp. Hematol.，20：1028-1035；Francis（1992），Focus on Growth Factors，3（2）：4-10，（Mediscrypt，Mountain Court，Frier Barnet Lane，London N20 0LD，UK）；EP 0 154 316；EP 0 401 384；WO 92/16221；WO 95/34326；およびPEG化に関連する本明細書中で記載される他の出版物も参照のこと、その開示は本明細書によって参考として援用される。

20

【0048】

詳細には、PEG化は、反応性ポリエチレングリコール分子とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われ得る。従って、本発明に従うタンパク質の生成物は、PEG基が、アシル基またはアルキル基を介して結合されるPEG化タンパク質を含む。このような生成物は、モノーPEG化またはポリマーPEG化（例えば、2～6、好ましくは2～5のPEG基を含む）であり得る。一般に、PEG基は、アミノ酸の α -または ϵ -アミノ基でタンパク質に結合される。しかし、PEG基は適切な反応条件下でPEG基に結合するに十分に反応性であるタンパク質に結合される任意のアミノ基に結合され得ることも意図される。

30

【0049】

アシル化によるPEG化は、一般に、タンパク質とポリエチレングリコール（PEG）の活性エステル誘導体を反応する工程を包含する。アシル化反応のために、選択されるポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。任意の反応性PEG分子または引き続いて開発された反応性PEG分子は、PEG化反応を行うために使用され得る。好ましい活性化PEGエステルは、N-ヒドキシスクシンイミド（NHS）にエステル化される。本明細書中で使用される「アシル化」は、治療的タンパク質と水溶性ポリマー（例えば、PEG）との間の以下の型の連結を含むことが意図されるが、これらに限定されない：アミド、カルバメート、ウレタンなど（Chamow（1994），Bioconjugate Chem.，5（2）：133-140を参照のこと）。反応条件は、PEG化において公知の任意の反応条件または引き続き開発された反応条件から選択され得るが、改変すべきタンパク質を不活化する温度、溶媒、およびpHのような条件は避けるべきである。

40

【0050】

アシル化によるPEG化は、一般に、ポリマーPEG化タンパク質を生じる。好ましくは、接続連結は、アミドである。さらに好ましくは、得られる産物が実質的に、ただ（例えば、>95%）モノー、ジマー、またはトリマーPEG化される。しかし、より高度なPEG化を有するいくつかの種が、使用される特定の反応条件に依存する量で形成され得る。所望ならば、より精製されたPEG化種が、混合物（特に未反応種）から標準的な精製技術

50

をによって分離され得る。これは、とりわけ、透析、脱塩、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および電気泳動を含む。

【0051】

一般に、アルキル化によるPEG化は、PEGの末端アルデヒド誘導体を還元試薬の存在下でタンパク質と反応させる工程を含む。還元的アルキル化反応のために、選択されるポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。例示的な反応性PEGアルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（水溶性）であるか、またはそのモノC1-C10アルコキシもしくはアリールオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0052】

アルキル化によるPEG化はまた、ポリPEG化タンパク質を生じ得る。さらに、タンパク質のN末端の α -アミノ基でのみPEG化（すなわち、モノPEG化タンパク質）を実質的に支持するために反応条件を操作し得る。モノPEG化またはポリPEG化のいずれかの場合において、PEG基は、好ましくは、 $-CH_2-NH-$ 基を介してタンパク質に結合される。 $-CH_2-$ 基への特定の参照のために、この型の連結は、本明細書において「アルキル」連結という。

【0053】

モノポリマー／タンパク質産物の実質的に同種の集団を生成する還元的アルキル化は、一般に、以下の工程を含む：（a）タンパク質を還元的アルキル化条件下で、上記のタンパク質のアミノ末端の α -アミノ基の選択的な改変を可能にするに適切なpHで反応性PEG分子と反応させる工程、および（b）反応生成物を得る工程。モノPEG化生成物を産生する還元的アルキル化を介する誘導体化は、リジンアミノ基とN末端の α -アミノ基との間のpKa差を利用する（pKaは、50%のアミノ基がプロトン化され、そして50%がプロトン化されていないpHである）。

【0054】

反応を、リジン残基の ϵ -アミノ基とタンパク質のN末端残基の α -アミノ基との間のpKa差を利用することを可能にするpHで行う。一般に、pHが低ければ、タンパク質に対してより多くの過剰なポリマーが望まれる（すなわち、N末端 α -アミノ基の反応性が低ければ、最適な条件を達成するためにより多くのポリマーが必要とされる。pHがより高ければ、ポリマー：タンパク質比は、それほど大きくする必要はない。（すなわち、より反応性の基が利用可能であるほど、必要とされるポリマー分子はより少なくなる）。本発明の目的のために、pHは、一般に、3～9、好ましくは3～6の範囲にある。還元的アルキル化のために、還元試薬は、水溶液中で安定であるべきであり、好ましくは還元的アルキル化の最初のプロセスにおいて形成されるシッフ塩基のみを還元し得るべきである。適切な還元試薬は、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン、およびピリジンボランから選択され得る。特に適切な還元試薬は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。他の反応パラメーター、例えば、溶媒、反応時間、温度、および生成物の精製方法は、水溶性ポリマーを用いるタンパク質の誘導体化に関連する公表された情報に基づいて個別に決定され得る。

【0055】

このような選択的誘導体化によって、タンパク質への水溶性ポリマー（アルデヒドのような反応基を含む）の結合は以下のように制御される：ポリマーとの結合は、タンパク質のN末端で優先的に生じ、そして他の反応性基（例えば、リジン側鎖アミノ基）の有意な改変が生じない。調製物は、代表的には、90%モノポリマー／タンパク質結合体より大きく、そしてより代表的には95%モノポリマー／タンパク質結合体より大きく、観察可能な分子の残りは未反応である（すなわち、ポリマー部分を欠くタンパク質）。

【0056】

PEG化はまた、具体的には、ヒドロキシル基を反応性Michaelアクセプターに変換し、それによって向上した生物学的に活性な結合体を提供するために種々のタンパク質を改変するに有用な「活性化リンカー」を形成する反応性カルボニル、ニトリル、また

10

20

30

40

50

はスルホン基を有する試薬と反応させ得る少なくとも1つの反応性ヒドロキシル基を有する水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）を介して行われ得る。「反応性カルボニル、ニトリル、またはスルホン」は、カルボニル基、ニトリル基、またはスルホン基からの第2の炭素上にチオール特異的カップリングのための反応性部位を有する、2つの炭素基が結合されるカルボニル基、ニトリル基、またはスルホン基を意味する（WO 92/16221）。

【0057】

活性化リンカーは、単官能性、二官能性、多官能性であり得る。この方法において使用され得る反応性スルホン基を有する有用な試薬は、クロロスルホン、ビニルスルホン、およびジビニルスルホンを含むが、これらに限定されない。

10

【0058】

特定の実施態様において、水溶性ポリマーは、Michaelアクセプターで活性化される。WO 95/13312は、とりわけ、分子上および表面上でのアミノ部分の代わりにチオール部分でのカップリングに高度に選択的である水溶性スルホン活性化PEGを記載する。これらのPEG誘導体は、およそ11以下のpHでの含水環境中にて延長された期間の加水分解に対して安定であり、そして加水分解にも安定である結合体を形成する分子との連結を形成し得る。PEGと生物学的に活性な分子とがカップリングされる連結は、チオール部分にカップリングされるスルホン部分を含み、そして構造PEG-SO₂-CH₂-CH₂-S-Wを有し、ここでWは生物学的に活性な分子を表し、そしてここでスルホン部分は、ビニルスルホンまたは活性エチルスルホンである。2つの特に有用なホモ二官能性誘導体は、PEG-ビスクロロスルホンおよびPEG-ビスビニルスルホンである。

20

【0059】

米国特許出願第08/473,809号（1995年6月7日出願）（その開示は、本明細書によって参考として援用される）は、反応性ヒドロキシル基を有する化合物を得、そして変換のための溶媒としてテトラヒドロフラン（THF）を使用して、活性化リンカーを形成する反応性Michaelアクセプターにヒドロキシル基を変換することによってスルホン活性化リンカーを作製する方法を教示する。米国特許出願第08/611,918号（1996年3月6日出願）（その開示は、本明細書によって参考として援用される）は、活性化リンカーを精製するためのプロセスが、サイズおよび末端基の官能性に基づいてリンカーを分離する疎水的相互作用クロマトグラフィーを利用することを教示する。

30

【0060】

ポリヌクレオチド

本発明はさらに、IL-1raおよびIL-1raの改変体をコードするポリヌクレオチドを提供する。本明細書中の記載に基づき、そして汎用のコドン表を用いて、当業者は、IL-1raおよびIL-1raの改変体のアミノ酸配列をコードする核酸配列の全てを容易に決定し得る。

【0061】

以下の記載の説明にしたがって行われる組換え発現技術は、これらのポリヌクレオチドを産生し、そしてコードされるタンパク質を発現するために求められ得る。例えば、IL-1raまたはIL-1raの改変体をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は容易に大量の所望のヌクレオチド配列を産生し得る。次いで、これらの配列は、検出プローブまたは増幅プライマーを生成するために用いられ得る。あるいは、IL-1raまたはIL-1raの改変体をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクター中に挿入し得る。適切な宿主に発現ベクターを導入することによって、所望のタンパク質を大量に産生し得る。

40

【0062】

本明細書中にさらに記載されるように、所望の核酸配列の増殖および／または所望のタンパク質の産生のために利用可能な多数の宿主／ベクター系が存在する。これらには、プ

50

ラスミドベクター、ウイルスベクター、および挿入ベクターならびに原核生物宿主および真核生物宿主が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、異種DNAを増殖または発現し得る宿主／ベクター系を適合させて、本発明の配列を産生または発現し得る。

【0063】

さらに、本発明の開示に鑑みて、核酸配列には、図5に示す配列を有するIL-1raをコードする縮重核酸配列およびこれらの核酸配列の相補物に（好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で）ハイブリダイズする核酸配列（Maniatisら、（1982）、Molecular Cloning（A Laboratory Manual）、Cold Spring Harbor Laboratory、387-389頁）が含まれることが当業者に理解される。代表的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、62～67℃で4×SSC、続いて62～67℃で0.1×SSC中での約1時間の洗浄におけるハイブリダイゼーションである。あるいは、代表的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、40～45℃での45～55%ホルムアミド、4×SSCにおけるハイブリダイゼーションである。また、配列番号1に示される核酸配列の相補物に緩和したハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、そしてIL-1raの改変体をコードするDNA配列が含まれる。このような緩和したストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、45～55℃での4×SSC、または40～45℃での30～40%ホルムアミドでのハイブリダイゼーションである。

10

【0064】

ベクターDNAを所望のタンパク質をコードするDNA配列とともに含む組換えDNA構築物もまた、本発明によって提供される。このような各DNA構築物において、所望のタンパク質（シグナルペプチドを有するかまたは有さない）をコードする核酸配列は、選択された宿主において所望のタンパク質の複製および／または発現を指向することが可能な適切な発現制御配列または発現調節配列と作動可能に会合している。

20

【0065】

組換え発現

ポリヌクレオチドの調製

IL-1raまたはIL-1raの改変体をコードする核酸配列は、化学合成、cDNAもしくはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および／またはcDNAのPCR増幅を含むがこれらに限定されない種々の様式で容易に得られ得る。このような核酸配列を単離するために有用なこれらおよび他の方法は、Sambrookら（1989）、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら（1994）による、編、Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press; およびBergerおよびKimmel（1987）、Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, 152刊、Academic Press, Inc., San Diego, CAに記載され、これらの開示は本明細書中で参考として援用される。

30

40

【0066】

核酸配列の化学合成は、当該分野で周知の方法（例えば、Engelsら（1989）、Angew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734およびWellsら（1985）、Gene, 34:315、これらの開示は本明細書中で参考として援用される）を用いて達成され得る。これらの方法には、とりわけ核酸配列合成のホスホトリエステルの、ホスホラミダイト、およびH-ホスホネート法が含まれる。大きい核酸配列、例えば約100ヌクレオチド長より大きいものは、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、フラグメントは一緒に連結され、所望のタンパク質をコードする核酸配列を形成する。好ましい方法は、標準的なホスホラミダイト化学を用いるポ

50

リマーに支持された合成である。

【0067】

あるいは、適切な核酸配列は、適切な cDNA ライブラリー（すなわち、タンパク質を発現すると考えられる 1 つ以上の組織供給源から調製されるライブラリー）またはゲノムライブラリー（全ゲノム DNA から調製されるライブラリー）のスクリーニングによって得られ得る。cDNA ライブラリーの供給源は、代表的には所望のタンパク質を適当な量で発現すると考えられている任意の種由来の組織である。ゲノムライブラリーの供給源は、所望のタンパク質をコードする遺伝子を有すると考えられる任意の哺乳動物または他の種由来の任意の組織であり得る。

【0068】

ハイブリダイゼーション媒体は、ライブラリーに存在する cDNA または遺伝子に選択的にハイブリダイズする 1 つ以上の核酸プローブ（クローン化された cDNA または遺伝子に対する受容可能なレベルの相同性を有するオリゴヌクレオチド、cDNA、またはゲノム DNA フラグメント）を用いて所望のタンパク質をコードする DNA の存在についてスクリーニングされ得る。このようなスクリーニングに代表的に用いられるプローブは、ライブラリーが作製される種と同一または類似の種由来の DNA 配列の小領域をコードする。あるいは、プローブは、本明細書中で議論されるように、縮重であり得る。

【0069】

ハイブリダイゼーションは、代表的には、非特異的結合を防止するがプローブまたはプライマーとの有意なレベルの相同性を有するクローンの結合を可能にするストリンジェンシーの条件下で、オリゴヌクレオチドプローブまたは cDNA をクローンにアニーリングすることによって達成される。代表的なハイブリダイゼーションおよび洗浄ストリンジェンシー条件は、cDNA またはオリゴヌクレオチドプローブのサイズ（例えば、長さにおいてヌクレオチドの数）およびプローブが縮重であるか否かに部分的に依存する。クローンを同定する可能性はまた、ハイブリダイゼーション媒体を設計するにおいて考慮される（例えば、cDNA またはゲノムライブラリーのいずれがスクリーニングされるか）。

【0070】

DNA フラグメント（例えば、cDNA）がプローブとして用いられる場合、代表的なハイブリダイゼーション条件は、Ausubel ら（1994）、編、前出に示される条件を含む。ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイゼーション媒体は、いくつかの因子（例えば、プローブのサイズ、クローンに対するプローブの予想される相同性、スクリーニングされるハイブリダイゼーション媒体、スクリーニングされるクローンの数など）に依存する適切なストリンジェンシーで洗浄される。通常低イオン強度であり、そして比較的高温で用いられるストリンジェントな洗浄溶液の例は、以下のとおりである：1 つのこのようなストリンジェント洗浄は、55～65℃で 0.015M NaCl, 0.005M クエン酸ナトリウム、および 0.1% SDS；別のこのようなストリンジェントな洗浄は、約 40～50℃で 1mM Na₂EDTA, 40mM NaHPO₄, pH 7.2 および 1% SDS；および一つの他のストリンジェントな洗浄は、約 50～65℃で 0.2×SSC および 0.1% SDS である。

【0071】

オリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイゼーション媒体をスクリーニングするために用いられる場合、ストリンジェントな洗浄条件についての代表的なプロトコルもまた存在する。例えば、第一のプロトコルは、6×SSC を 0.05% のピロリン酸ナトリウムと、プローブの長さに依存しつつ約 35℃と 63℃との間の温度で使用する。例えば、14塩基プローブを 35～40℃、17塩基プローブを 45～50℃、20塩基プローブを 52～57℃、そして 23塩基プローブを 57～63℃で洗浄する。温度は、バックグラウンド非特異的結合が高く現れる場合には、2～3℃上昇し得る。第二のプロトコルは、テトラメチルアンモニウムクロライド（TMAC）を洗浄に用いる。1 つのこのようなストリンジェントな洗浄溶液は、3M TMAC、50mM Tris-HCl、pH 8.0、および 0.2% SDS である。

10

20

30

40

50

【0072】

適切な核酸配列を得るための別の適切な方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素逆転写酵素を用いてポリ（A）+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、所望のタンパク質をコードするcDNA（オリゴヌクレオチド）の2つの別々の領域に相補的である）を、cDNAにポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）とともに付加し、そしてポリメラーゼは2つのプライマーの間のcDNA領域を増幅する。

【0073】

プローブまたはプライマーとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、スクリーニングまたはPCR増幅の間に起こり得る非特異的結合の量を最小化するように、長さが適切でありそして十分に明確であるべきである。プローブまたはプライマーの実際の配列は、通常保存されたまたは高度に相同な配列または領域に基づいている。必要に応じて、プローブまたはプライマーは、完全にまたは部分的に縮重であり得（すなわち、プローブ／プライマーの混合物を含み得る）、すべてが同一のアミノ酸配列をコードするが、そうなるような異なるコドンを用いる。縮重プローブを調製に対する代替として、種によって異なるコドン位置のいくつかまたは全てにイノシンを配置することが挙げられる。オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーは、上記のように、DNAの化学合成法によって調製され得る。

【0074】

ベクター

所望のタンパク質をコードするDNAは、さらなるクローニングのために（DNAの増幅）または発現のためにベクター中に挿入され得る。適切なベクターは、市販されており、またはベクターは特別に構築され得る。適切なベクターの選択または構築は、以下に依存する：（1）それがDNA増幅のために用いられるかまたはDNA発現のために用いられるか否か、（2）ベクター中に挿入されるDNAのサイズ、および（3）ベクターを用いて形質転換される目的の宿主細胞。

【0075】

各ベクターは、選択された宿主細胞によって所望のタンパク質の発現を指向し、制御し、またはさもなくば効果的であり得る発現制御または調節配列の1つ以上に作動可能に連結した所望のタンパク質をコードする核酸配列を含む。各ベクターは、その機能（DNAの増幅またはDNAの発現）および目的の宿主細胞とのその適合性に依存して種々の成分を含む。ベクター成分は、一般に以下の1つ以上を含むがこれらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1つ以上の選択またはマーカー遺伝子、プロモーター、エンハンサーエレメント、転写終結配列など。これらの成分は、天然の供給源から得られ得るか、または公知の手順によって合成され得る。

【0076】

適切な原核生物クローニングベクターの例には、バクテリオファージ（例えば、λ誘導体）またはE. coli. 由来のプラスミド（例えば、pBR322、col E1、pUC、F因子、およびBluescript^(R)プラスミド誘導体（Stratagene, LaJolla, CA））が含まれる。以下に記載の宿主細胞について多くの型が当該分野で公知である他の適切な発現ベクターもまた、この目的のために用いられ得る。

【0077】

シグナル配列

シグナル配列をコードする核酸は、所望のタンパク質をコードする配列の5'に挿入され得る（例えば、それはベクターの成分であり得るかまたは所望のタンパク質をコードする核酸の一部であり得る）。例えば、IL-1raの天然のシグナル配列をコードする核酸は公知である（米国特許第5,075,222号）。

【0078】

複製起点

10

20

30

40

50

発現およびクローニングベクターは、それぞれ一般に、1つ以上の選択された宿主細胞においてベクターが複製することを可能にする核酸配列を含む。クローニングベクターにおいて、この配列は、代表的にはベクターが宿主染色体DNAとは独立して複製することを可能にし、そして複製起点または自己複製配列を含む配列である。このような配列は周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適しており、種々の起源（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、またはBPV）が哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点は哺乳動物発現ベクター（例えば、ただSV40起点は初期プロモーターを含むためにしばしば用いられる）にとって必要ではない。

【0079】

10

選択遺伝子

各発現およびクローニングベクターは代表的には、選択遺伝子を含む。この遺伝子は、形質転換された宿主細胞が選択培養培地にて増殖された場合、形質転換された宿主細胞の生存または増殖のために必要である「マーカー」タンパク質をコードする。ベクターで形質転換されない宿主細胞は選択遺伝子を含まず、そしてそれゆえそれらは培養培地において生存しない。代表的な選択遺伝子は、（a）抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリン）に耐性を与えるタンパク質；（b）栄養要求性欠乏を相補するタンパク質、または（c）培養培地から利用可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0080】

20

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために用いられ得る。増幅は、増殖にとって重要なタンパク質の産生のためにより多く必要とされる遺伝子が、組換え細胞の後継の世代の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞のための適切な選択マーカーの例には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが含まれる。細胞形質転換体は、ベクター中に存在するマーカーにより形質転換体のみが単独で適合して生存する選択圧力下におかれる。選択圧力は、培地中の選択薬剤の濃度が連続的に変化する条件下で、形質転換された細胞を培養し、それにより選択遺伝子および所望のタンパク質をコードするDNAの両方の増幅を導くことによってかけられる。結果として、所望のタンパク質の増加した量が増幅されたDNAから合成される。

【0081】

30

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、まずDHFRの競合的アンタゴニストであるメトトレキセートを含む培養培地において形質転換体の全てを培養することによって同定される。野生型DHFRが用いられる場合に適切な宿主細胞は、DHFR活性を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞株である（UrlaubおよびChasin（1980），Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77（7）：4216-4220、この開示は本明細書中に参考として援用される）。次いで、形質転換された細胞は、メトトレキセートの増大したレベルに曝される。これにより、複数のコピーのDHFR遺伝子、および同時に発現ベクター中に存在する複数のコピーの他のDNA（例えば、所望のタンパク質をコードするDNA）の合成が導かれる。

【0082】

40

プロモーター

各発現およびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物体によって認識されそして所望のタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結されているプロモーターを含む。プロモーターは、特定の核酸配列（例えば、所望のタンパク質をコードする配列）の転写および翻訳を制御する構造遺伝子の開始コドンの（5'）側上流（一般に約100～1000bp以内）に位置する非翻訳配列である。プロモーターは従来的に2つのクラス（誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター）の1つに分類され得る。誘導性プロモーターは、培養条件の何らかの変化（例えば、栄養素の存在もしくは非存在または温度変化）に応答してその制御下でDNAからの転写のレベルの増大を開始させる。種々の潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。プロモーターは、供給

50

源DNAからのプロモーターを制限酵素消化によって除去し、そして所望のプロモーター配列を挿入することによって所望のタンパク質をコードするDNAに作動可能に連結され得る。天然のIL-1 α プロモーター配列は、所望のタンパク質をコードするDNAの増幅および／または発現を指向するために用いられ得る。しかし、天然のプロモーターと比較して発現されるタンパク質のより大きい転写およびより高い収率を可能にする場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合は、異種プロモーターが好ましい。例えば、他のIL-1ファミリーメンバーの天然のプロモーター配列の任意の1つが、所望のタンパク質をコードするDNAの増幅および／または発現を指向させるために使用され得る。

【0083】

10

原核細胞宿主で用いるために適切なプロモーターには、 β ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーター系；細菌ルミネセンス（luxR）遺伝子系およびtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーターが含まれる。他の公知の細菌プロモーターもまた適している。それらのヌクレオチド配列は公開されており、これにより任意の必要な制限部位を供給することが必要な場合当業者はリンカーまたはアダプターを用いてそれらを所望のDNA配列に連結することを可能にしている。

【0084】

酵母宿主で用いるために適切なプロモーター配列はまた、当該分野で周知である。哺乳動物宿主細胞で用いるために適切なプロモーターは、周知であり、そしてポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましくはシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターを含む。他の適切な哺乳動物プロモーターには、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が含まれる。

20

【0085】

エンハンサーエレメント

各発現およびクローニングベクターは、代表的には、所望のタンパク質をコードするDNA配列の高等真核生物による転写を増大させるエンハンサー配列を含む。エンハンサーは、DNAのシス作用性エレメント（通常長さが約10～300bp）であり、プロモーターに作用してその転写を増大させる。エンハンサーは、方向および位置に比較的非依存性である。これらは、転写ユニットに対して5'および3'に見出されている。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターとともに有利に用いられる。哺乳動物遺伝子から得られるいくつかのエンハンサー配列は公知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α フェトタンパク質、およびインスリン）。さらに、ウイルスエンハンサー（例えば、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサー）は、真核生物プロモーターの活性化のための代表的なエンハンシングエレメントである。エンハンサーは、所望のタンパク質をコードするDNAに対して5'または3'でベクターにスプライスされ得る一方、代表的にはプロモーターから5'の部位に位置している。

30

40

【0086】

転写の終結

真核生物宿主細胞において用いられる発現ベクターはそれぞれ、代表的には、転写の終結およびmRNAの安定化のために必要な配列を含む。このような配列は、一般に、真核生物DNAまたはcDNAの5'非翻訳領域から、そしてときどき3'非翻訳領域から得られる。これらの領域は、所望のタンパク質をコードするmRNAの非翻訳部分のポリアダニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

ベクター構築物

適切なベクター（各々1つ以上の先に列挙された成分を（所望のタンパク質をコードす

50

るコード配列とともに) 含む) の構築は、標準的連結技術によって達成され得る。単離されたプラスミドまたはDNAフラグメントは、所望の順序で切断され、調整され、そして再連結されて、必要なベクターを生成する。正確な配列が構築されたことを確認するために、連結混合物はE. coli を形質転換するために使用され得、そして首尾良い形質転換体を上記の公知の技術によって選択し得る。次いで、多量の形質転換体からのベクターを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析し、そして/または配列決定されて所望の構築物の存在が確認される。

【0087】

哺乳動物細胞において所望のタンパク質をコードするDNAの一過性の発現を提供するベクターがまた使用され得る。一般に、一過性の発現は、宿主細胞において効率的に複製し得、その結果宿主細胞が発現ベクターの多数のコピーを蓄積し、次いで発現ベクターによってコードされる高レベルの所望のタンパク質を合成する発現ベクターの使用を含む。適切な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一過性の発現系の各々は、クローン化されたDNAによってコードされるタンパク質の簡便な陽性同定、ならびに所望の生物学的または生理学的特性についてのこのようなタンパク質の迅速なスクリーニング(すなわち、生物学的に活性なIL-1raタンパク質の改変体の同定)を可能にする。

【0088】

宿主細胞

各々が所望のタンパク質を発現することにおける使用のための核酸配列を含む、任意の種々の組換え宿主細胞はまた、本発明により提供される。例示的な原核生物および真核生物宿主細胞としては、細菌細胞、哺乳動物細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または植物細胞が挙げられる。

【0089】

原核生物宿主細胞には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物のような真正細菌(例えば、E. coli (HB101、DH5a、DH10、およびMC1061)); Bacilli (例えば、B. subtilis); Pseudomonas (例えば、P. aeruginosa); Streptomyces spp.; Salmonella typhimurium; または Serratia marcescans) が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施態様の場合、所望のタンパク質が、E. coli において発現され得る。

【0090】

原核生物宿主細胞に加えて、糸状菌または酵母のような真核生物微生物は、所望のタンパク質の発現のために適切な宿主であり得る。Saccharomyces cerevisiae または一般のパン酵母は、下等原核生物宿主微生物の間で最も一般的に使用されるが、多数の他の属、種、および株が周知であり、そして市販されている。

【0091】

所望のタンパク質は、多細胞性生物に由来する多数の適切な宿主細胞のいずれかにより、グリコシル化形態で発現され得る。このような宿主細胞は複合体プロセッシングが可能であり、そしてグリコシル化活性である。原則として、任意の高等真核生物細胞培養物が使用され得る。このような培養物としては、脊椎動物または無脊椎動物細胞(植物および昆虫細胞を含む)が挙げられる。特定の実施態様の場合、所望のタンパク質は、バキュロウイルス細胞において発現され得る。

【0092】

培養(組織培養)における脊椎動物細胞の増殖が周知の手順であるので、脊椎動物細胞が使用され得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7)、ヒト胎児腎臓株(293細胞または懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞、およびチャイニーズハムスター卵巣細胞が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な哺乳動物細胞株としては、HeLa、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-c、またはNIHマウス由来の3T3株、およびBHKまたはHaKハムスター細胞株が挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されない。特定の実施態様の場合、所望のタンパク質は、C O S 細胞において発現され得る。

【0093】

宿主細胞は、核酸配列の発現を可能にする適切な条件下において、所望の核酸でトランスフェクトおよび好ましくは形質転換され得る。形質転換、培養、増幅、スクリーニング、ならびに産物の産生および精製のための適切な宿主細胞および方法の選択は、当該分野において周知である (G e t h i n g および S a m b r o o k (1981)、N a t u r e , 293:620-625、あるいはK a u f m a n ら (1985)、M o l . C e l l . B i o l . , 5 (7):1750-1759、もしくは米国特許第4,419,446号、これらの開示は、本明細書中で参考として援用される)。例えば、細胞壁を有さない哺乳動物細胞について、リン酸カルシウム沈殿法が使用され得る。エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、および他の公知の技術もまた、使用され得る。

10

【0094】

所望のタンパク質が、相同組換えにより、または所望のタンパク質をコードするDNAを既に含む細胞に導入された制御エレメントを利用する組換え産生方法を用いて、産生され得ることもまた可能である。相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するように、標的遺伝子のために本来開発された技術である (K u c h e r l a p a t i (1989)、P r o g . i n N u c l . A c i d R e s . a n d M o l . B i o l . , 36:301、これらの開示は、本明細書中で参考として援用される)。基礎的な技術は、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入する方法として (T h o m a s ら、(1986)、C e l l , 44:419-428; T h o m a s および C a p e c c h i (1987)、C e l l , 51:503-512、ならびに D o e t s c h m a n ら (1988)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 85:8583-8587、これらの開示は本明細書中で参考として援用される)、または欠陥遺伝子内の特定の変異を矯正するために (D o e t s c h m a n ら、(1987)、N a t u r e , 330:576-578、この開示は本明細書中で参考として援用される)、開発された。例示的な技術は、米国特許第5,272,071号; W O 92/01069; W O 93/03183; W O 94/12650 および W O 94/31560 に記載され、これらは本明細書中で参考として援用される。

20

【0095】

相同組換えを介して、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、このDNA配列を標的DNAに付着させることにより目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的(相同)であるDNAである。ゲノムの特定の領域に相補的である標的DNAの小部分は、DNA複製プロセスの間、親鎖と接して置かれる。細胞に挿入されているDNAの一般的な特性は、共有される相同領域を介して内因性DNAの他の部分とハイブリダイズし、従ってそれと組換えすることである。この相補鎖が変異またはDNAの異なる配列を含むオリゴヌクレオチドに接着する場合、これもまた組換えの結果として新たに合成された鎖へ組み込まれる。校正機能の結果として、DNAの新しい配列がテンプレートとして作用することが可能である。従って、移送されたDNAは、ゲノムへ組み込まれる。

30

40

【0096】

特定の遺伝子の配列(例えば、所望のタンパク質の核酸配列)が公知である場合、発現制御配列(遺伝子の選択された領域に相補的であるDNAの一部)は合成され得るか、そうでなければ、例えば、目的の領域に結合する特定の認識部位でのネイティブなDNAの適切な制限により得られ得る。この部分は、細胞への挿入に際して標的配列として作用し、そしてゲノム内のその相同領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションがDNA複製の間にかかる場合、このDNAの部分およびそれに付着する任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そして新たに合成されたDNAの娘鎖に返し縫い(b a c k s t i t c h)される。

【0097】

50

標的DNAのこれらの部分へ、所望のタンパク質の発現と相互作用し得るDNAの領域が付着される。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサー、または外因性転写調節エレメントが、所望のタンパク質をコードするDNAの転写に影響するに十分な近接性および方向で、意図された宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは所望のタンパク質をコードしないが、代わりに宿主細胞ゲノムにおいて存在するDNAの部分の制御する。従って、所望のタンパク質の発現は、所望のタンパク質をコードするDNAのトランスフェクションにより達成されないかもしれないが、むしろ内因性遺伝子配列に所望のタンパク質の転写のための認識可能なシグナルを提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA（目的の内因性遺伝子と相同性の領域を含む）の使用より達成される。

10

【0098】

宿主細胞の培養

所望のタンパク質の産生のために1つ以上の組換え宿主細胞の各々を培養する方法は、多数の因子および考慮に依存して変化する；所定の状況についての最適な産生手順は、最小の実験を介して当業者に明らかである。このような組換え宿主細胞は、適切な培地において培養され、そして次いで発現されたタンパク質は、必要に応じて、当業者に公知の適切な手段により、培養培地から（または、細胞内で発現される場合、細胞から）、回収され、単離され、そして精製される。

【0099】

詳細には、所望のタンパク質を産生するために使用される組換え細胞の各々は、プロモーターを誘導するか、適切な組換え宿主細胞を選択するか、または所望のタンパク質をコードする遺伝子を増幅するために適切な培地において培養され得る。培地は、必要な場合、ホルモンおよび／または他の成長因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子）、塩類（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、緩衝液（例えば、HEPES）、ヌクレオシド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、ゲンタマイシン）、トレースエレメント（μモル濃度の範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される）、ならびにグルコースまたは別のエネルギー供給源を補充され得る。当業者により理解されるように、他の補充物もまた、適切な濃度で含まれ得る。適切な培養条件（例えば、温度、pHなど）もまた、選択された宿主細胞での使用について、当業者に周知である。

20

30

【0100】

次いで、得られる発現産物を、当該分野で公知の手順を使用することにより、ほとんど均質に精製され得る。例示的な精製技術は、米国特許第5,075,222号およびWO 91/08285において教示される。好ましくは、発現産物は、実質的に純粋な形態で産生される。「実質的に純粋」とは、Hannumら（1990）、Nature, 343:336-340およびEisenbergら（1990）、Nature, 343:341-346（これら両方は特に、本明細書中で参考として援用される）において規定されるように、好ましくは約150,000~500,000レセプター単位/mgの範囲で比較的高い比活性を有する非修飾形態のIL-1raを意味する。しかし、IL-1raの改変体は異なる比活性を有し得ることが理解され得る。

40

【0101】

薬学的組成物

一般的に、薬学的組成物はそれぞれ、代表的に、IL-1ra、IL-1raの改変体、またはその化学的誘導體（本明細書中でこの後、集合的に「IL-1ra産物」という）の少なくとも1つの治療的有効量および制御放出物質を、必要に応じてビヒクル中に含む。ビヒクルは、好ましくは、IL-1ra産物と制御放出物質とを有する混合物中に、一つ以上の薬学的および生理学的に受容可能な処方物の物質を含む。

【0102】

制御放出ポリマーは、バルク浸食（bulk erosion）ポリマー（例えば、ポリ（乳酸-α-グリコール酸）（PLGA）コポリマー、PLGAポリマーのブレンド

50

、PEGのブロックコポリマー、ならびに乳酸およびグリコール酸、ポリ（シアノアクリレート）；表面浸食ポリマー（例えば、ポリ（無水物）およびポリ（オルトエステル））；ヒドロゲルエステル（例えば、プルロニックポリオール（*pluronic polyol*）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、無水マレイン酸-アルキルビニルエステルコポリマー、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（*pHEMA*）、メタクリル酸（*MAA*）、*pHEMA*と*MAA*とのブレンド、セルロース（例えば、カルボキシメチルセルロース）、ヒアルロナン、アルギネート、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、ならびにデンプンおよびデキストラン）ならびにその組成物系；またはリポソームまたはマイクロスフェアの調製物から選択され得る。このような組成物は、本発明のタンパク質および誘導体の物理的状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。所望のタンパク質のための至適な薬学的処方物は、投与の経路および所望の投与量に依存して当業者により決定される。例示的な薬学的組成物は、*Gombotz*および*Pettit*（1995）、*Bioconjugate Chem.* , 6 : 332-351ならびに*Remington's Pharmaceutical Sciences* , 第18版（1990）、*Mack Publishing Co.* , *Easton, PA* 18042, 1435-1712頁（これらの開示は、本明細書中で参考として援用される）に開示される。特定の制御放出組成物は、以下の供給源から入手可能である：*DepoTech Corp.* , *San Diego, CA*（*Depof foamTM*、多小胞リポソーム（*multivesicular liposome*））および*Alkermes, Inc.* , *Cambridge, MA*（*ProLeaseTM*、*PLGA*マイクロスフェア）。

10

20

【0103】

特定の実施態様において、本発明は、可溶性または非可溶性の架橋形態のヒアルロナンベースの薬物送達システムに関する。本明細書中で使用される場合、ヒアルロナンは、ヒアルロナン、ヒアルロン酸、その塩（例えば、ヒアルロン酸ナトリウム）、ヒアルロン酸のエステル、エーテル、酵素的誘導体、および架橋ゲル、ならびにヒアルロン酸の化学的に修飾した誘導体（例えば、ヒラン（*hyal*an））を含むことが意図される。修飾されていないまたは修飾されたヒアルロン酸は、システムからの薬物の緩徐な放出を提供するビヒクルとして作用する。

【0104】

ヒアルロナンは、このような目的のために有用であると既に認識されている任意のタイプのヒアルロナンであり得る。これは、種々の制限されない物質（例えば、雄鳥のとさかもしくは臍帯）から、または細菌培養物（例えば、溶血群（*hemolytic group*）*A*または*C*の*streptococci*の培養物）から抽出され得る。ヒアルロナンの例示的な形態は、*Peyron*および*Balazs*（1974）、*Path. Biol.* , 22（8）：731-736；*Isdale*ら（1991）、*J. Drug Dev.* , 4（2）：93-99；*Larsen*ら（1993）、*Journal of Biomedical Materials Research* , 27 : 1129-1134；*Namiki*ら（1982）、*International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology* , 20（11）：501-507；*Meyer*ら（1995）、*Journal of Controlled Release* , 35 : 67-72；*Kikuchi*ら（1996）、*Osteoarthritis and Cartilage* , 4 : 99-110；*Sakakibara*ら（1994）、*Clinical Orthopaedics and Related Research* , 299 : 282-292；*Meyers*および*Brandt*（1995）、22（9）：1732-1739；*Laurent*ら（1995）、*Acta Orthop Scand* , 66（266）：116-120；*Cascone*ら（1995）、*Biomaterials* , 16（7）：569-574；*Yerashalmi*ら（1994）、*Archives of Biochemistry and Biophysics* , 313（2）：267-273

30

40

50

; Bernatchezら(1993)、Journal of Biomedical Materials Research, 27(5): 677-681; Tanら(1990)、Australian Journal of Biotechnology, 4(1): 38-43; GombotzおよびPettit(1995)、Bioc conjugate Chem., 6: 332-351; 米国特許第4, 582, 865号、同第4, 605, 691号、同第4, 636, 524号、同第4, 713, 448号、同第4, 716, 154号、同第4, 716, 224号、同第4, 772, 419号、同第4, 851, 521号、同第4, 957, 774号、同第4, 863, 907号、同第5, 128, 326号、同第5, 202, 431号、同第5, 336, 767号、同第5, 356, 883号; 欧州特許出願第0 507 604 A2号および同第0 718 312 A2号; およびWO 96/05845 (これらの開示は、本明細書中で参考として援用される) に開示される。

【0105】

ヒアルロナンは、処置される哺乳動物において有害反応または毒性反応を誘発することを避けるのに十分に純粋であるべきである。これは、実質的な免疫応答を誘発しないように、ヒアルロナンが発熱物質を有さず、そして十分に低いレベルのタンパク質および/または核酸(これに、ヒアルロナンが天然に会合する)を有することを意味する。適切な精製手順は、米国特許第4, 141, 973号、米国特許第5, 411, 874号、米国特許第5, 442, 053号、米国特許第5, 559, 104号、米国特許第5, 563, 051号ならびに日本国特許出願第14594/1977号、同第67100/1979号、および同第74796/1980号(これらの開示は本明細書中に参考として援用される)に記載される。

【0106】

ヒアルロナンは、遊離酸の形態であるかまたは任意の薬理学的に受容可能な塩の形態であり得る。また、塩の場合は、アルカリ金属塩(例えば、ナトリウム塩またはカリウム塩)およびアルカリ土類金属塩(例えば、カルシウム塩またはマグネシウム塩)に言及され得る。ヒアルロナンの好ましい供給源は、適切な微生物の培養物である。

【0107】

広範囲の分子量を有するヒアルロナンが、本発明において使用され得る。ヒアルロナンの分子量は、一般に 0.1×10^6 と 1×10^7 との間、好ましくは 0.5×10^6 と 5×10^6 との間、より好ましくは 1×10^6 と 5×10^6 との間、そして最も好ましくは 1×10^6 と 4×10^6 との間(例えば、 1×10^6 と 2×10^6 との間)である。

【0108】

架橋によるヒアルロナンの分子量の増加は、多数の方法で達成されている。米国特許第4, 716, 224号において、Sakuriaらは、ヒアルロン酸またはその塩を多官能性のエポキシドで架橋することにより調製した、架橋されたヒアルロン酸またはその塩を開示する。米国特許第4, 863, 907において、Sakuriらは、グリコサミノグリカンまたはその塩を多官能性エポキシ化合物で架橋することにより調製した、架橋されたグリコサミノグリカンまたはその塩を開示する。欧州特許出願第0 507 604 A2において、Huangらは、イオンの(ionically)架橋されたカルボキシル基含有多糖類を開示する(ここで、架橋剤は3価のカチオンを有する化合物である)。米国特許第4, 716, 154号および米国特許第4, 772, 419号において、Malsonらは、ヒアルロン酸を、二官能性もしくは多官能性のエポキシドまたはそれらの対応するハロヒドリン、エピハロヒドリン(epihalohydrin)またはハライド、およびジビニルスルホンで架橋する工程を開示する。米国特許第4, 957, 744号において、della Valleらは、ヒアルロン酸のカルボキシル基をエステル化することにより調製したヒアルロン酸のエステルを多価アルコールで架橋する工程を開示する。米国特許第4, 582, 865号、同第4, 605, 691号、同第4, 636, 524号において、Balazsらは、ヒアルロン酸およびその塩、ならびに他の多糖類を、ジビニルスルホンを用いる反応により架橋する工程を開示する。米国特許第5,

128, 326号および同第4, 582, 865号において、Balazsらは、ヒアルロン酸を、ホルムアルデヒド、エポキシド、ポリアジリジル化合物、およびジビニルスルホンで架橋する工程を開示する。米国特許第4, 713, 448号において、Balazsらは、ヒアルロン酸を、アルデヒド（例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、およびグリオキサル）を伴う反応により化学的に修飾する工程を開示し、そして架橋が生じた可能性を教示する。米国特許第5, 356, 883号において、Kuorahは、ヒアルロン酸をビスカルボジイミドを用いる反応により架橋する工程を開示する。EP 0718 312 A2において、Nguyenは、ヒアルロン酸またはその塩、および他の多糖類を、ジ酸無水物またはポリ酸無水物を用いる反応により架橋する工程を開示する。

10

【0109】

可溶性ポリマーベースの産物中のヒアルロナン濃度は、産物の最終の用途に依存して、約0.05重量%から約5重量%およびより高い重量%、好ましくは0.1重量%～4重量%の間、より好ましくは1重量%～3重量%の間の範囲であり得る。IL-1インヒビターの濃度は、非常に広範な範囲にわたり変化し得、好ましくはIL-1インヒビターの溶解性、その薬理学的活性、最終産物の所望の効果などに依存して選択されるべきである。

【0110】

架橋されたヒアルロナンは、通常、注射針を通過するに十分なこのような粘度まで溶媒（例えば、生理食塩水）中に溶解される。低粘度の物質は、例えば、実際的なサイズ用量における濃縮された水性ヒアルロナン溶液の使用を可能にすることにより、注入を非常に容易にする。従って、例えば、その粘性が37℃で約200c/s未満である場合（ASTM D 445およびD 2515における手順に従って、Cannon-Manning Semi-Micro Viscometerを使用して測定される）、ヒアルロナンの1%水溶液は、約10mlの注入用量（これは約100mgの活性成分をそれぞれ含む）のために容易に利用され得る。

20

【0111】

本発明による薬物送達システムは以下を含む：

- 1) 薬物物質が溶解または分散しているヒアルロナン溶液；
- 2) 薬物物質が分散している、高分子の「ケージ」を形成する架橋ヒアルロナンゲル；
- 3) 薬物物質が分散している、ヒアルロナンおよび少なくとも1つの他の親水性ポリマーの架橋混合ゲル；および
- 4) ヒアルロン酸の高分子または他のポリマーに共有結合している薬物物質を含む、ヒアルロナンまたはヒアルロナンの架橋混合ゲル、および少なくとも1つの他の親水性ポリマーの架橋ゲル。

30

【0112】

薬物をゲルと結合するためにいくつかの方法が存在し、そしてそれ故、いくつかのタイプの得られ得る産物がある。

【0113】

方法の1つは、ゲルを薬物の溶液中に置くとき、ゲル中に薬物を拡散する工程を包含する。通常、この拡散プロセスは緩慢で、そして薬物濃度、溶液の温度、ゲル粒子のサイズなどに依存する。この方法により得られる産物は、薬物物質が一様に分散しているゲルである。

40

【0114】

同じタイプの産物が、ヒアルロナンゲルを脱水和し、および薬物溶液中でそれを再膨潤することにより得られ得る。ゲルを脱水和するために水-混和性有機溶媒を使用し得、または、その代わりにゲルからの水を乾燥により除去し得る。しかし、溶媒を用いることが好ましい。何故なら、低温または高温での乾燥後は、ゲルはその初期の程度の膨潤まで再膨潤し得ないからである。一方、溶媒を用いて脱水和した後は、ゲルは、それが処置の前に有していたと同じ容量まで膨潤する。好ましい溶媒は、エタノールおよびイソプロパノ

50

ール、およびアセトンのようなケトンであるが、他の溶媒もまた用いられ得る。

【0115】

なお別の方法を用いてこのタイプの産物が得られ得る。この方法は、ヒアルロナンの相対的に濃縮された溶液中に先に実施された架橋反応から得られる濃縮ヒアルロン酸ゲルを、薬物物質の溶液中で膨潤させる工程を包含する。

【0116】

これら3つの方法はすべて、本質的には同じである産物を生じるが、各々の方法は、任意の特定の産物に対する他の方法と比べたとき特定の利点を有し、そしてそれ故、方法の選択は、薬物の性質、系中の薬物の所望の濃度、送達速度などのようなパラメーターを考慮してなされるべきである。

10

【0117】

薬物物質が溶解または分散されるヒアルロナン溶液を得るために、任意の従来法が用いられ得る。任意の供給源由来のヒアルロナンは、水中または生理食塩水中に所望の濃度に溶解され、次いで、得られる溶液中に薬物が溶解または分散される。あるいは、薬物の溶液または分散物は、ヒアルロナン溶液と混合され得る。ポリマー濃度は、産物の最終用途およびヒアルロナンの分子量に依存して選択される。薬物濃度は、産物の所望の活性に依存して選択される。

【0118】

拡散プロセスを用いて架橋膨潤ゲルに薬物を充填するため、ゲルを薬物溶液中に配置し得る。このプロセスの終了のための時間は、ゲル粒子サイズ、ゲル膨潤率、プロセスの温度、攪拌、溶液中の薬物濃度などに依存する。これらのパラメーターの適切な組み合わせにより、膨潤ゲルは、比較的短時間で薬物で充填され得る。

20

【0119】

架橋ゲルを溶媒で脱水和するため、ゲルを任意の形態（即ち、微粒子としてまたは膜として）で、溶媒、好ましくは揮発性溶媒（例えばイソプロパノール）中に配置することで十分であり、そしてそれを、ゲルから水を除去するに十分な時間の間、溶媒中に維持する。水除去の程度は、粒子のサイズまたは膜の厚さ、ゲル／溶媒比などに依存する。溶媒を用いた処置は、所望であれば、数回繰り返され得る。ゲルからの溶媒は、通常圧力下または真空下、室温または高温で乾燥することにより除去され得る。このように脱水和されたゲルは、薬物溶液中に置かれたとき、初期膨潤率に再膨潤する。

30

【0120】

特定のヒアルロナン組成物は、次の供給者から入手可能である：BioMatrix, Inc. Ridgefield, NJ (SynviscTM、ヒラン流体およびヒランゲルの90:10混合物)；Fidia S.p.A.、Abano Terme, Italy (HyalganTM、雄鶏とさか由来のヒアルロン酸（分子量～500,000から～700,000）のナトリウム塩)；Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.、Tokyo, Japan (ArtzTM、雄鶏とさか由来のヒアルロン酸、分子量～700,000の1%溶液)；Pharmacia AB, Stockholm, Sweden (HealonTM、雄鶏とさか由来のヒアルロン酸、分子量～ 4×10^6)；Genzyme Corporation, Cambridge, MA (SurgicoatTM、組換えヒアルロン酸)；Pronova Biopolymer, Inc. Portsmouth, NH (Hyaluronic Acid FCH、Streptococcus zooepidemicusの培養から調製された高分子量（例えば、分子量～ $1.5 - 2.2 \times 10^6$ ）のヒアルロン酸)；Sodium Hyaluronate MV、分子量～ $1.0 - 1.6 \times 10^6$ および Sodium Hyaluronate LV、分子量～ $1.5 - 2.2 \times 10^6$ ；Calbiochem-Novabiochem AB, Lautelfingen, Switzerland (Streptococcus sp. から調製されたヒアルロン酸、ナトリウム塩（1997 会社カタログ番号385908）)；Intergen Company, Purchase, NY（雄鶏とさか由来のヒアルロン酸、分子量> 1×10^6 ）

40

50

); Diosynth Inc.、Chicago、IL; Amerchol Corp.、Edison、NJおよびKyowa Hakko Kogyo Co.、Ltd.、Tokyo、Japan。

【0121】

ビヒクル中の主要な溶媒は、事実上水性または非水性のいずれかであり得る。さらに、ビヒクルは、pHを、好ましくは、6.0と7.0との間に、より好ましくは6.5に改変または維持するために、他の薬学的に受容可能な賦形剤（例えば、クエン酸、リン酸のような緩衝液およびグリシンのようなアミノ酸）；凍結乾燥処方物用のバルキング剤（例えば、マンニトールおよびグリシン）；浸透圧調製剤（例えば、マンニトールおよび塩化ナトリウム）；界面活性剤（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、トリトン、およびプルロニクス）；粘度調整剤；清澄剤；色素；殺菌剤；安定化剤（例えばスクロースおよびソルビトール）；抗酸化剤（例えば、亜硫酸ナトリウムおよび亜硫酸水素ナトリウム）；保存剤（例えば、安息香酸およびサリチル酸）；香り処方物；フレーバリングおよび希釈剤；溶解速度促進剤（例えば、アルコール類、ポリエチレングリコール類および塩化ナトリウムのような可溶化剤または可溶化薬剤）；放出速度促進剤；乳化剤；懸濁剤；溶媒；フィルター；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および／または薬学的アジュバントを含み得る。所望のタンパク質に対する最適の薬学的処方物は、投与の経路および所望の投与量に依存して当業者により決定される（例えば、本明細書に参考として援用されるRemington's Pharmaceutical Sciences、第18版（1990）、MacK Publishing Co.、Easton、PA 18042、1435-1712頁を参照のこと）。詳細な薬学的処方物は以下の通りである：水中pH6.5の10ミリモラーのクエン酸ナトリウム、140ミリモルの塩化ナトリウム、0.5ミリモラーのEDTA、0.1%のポリソルベート80（w/w）（「クエン酸緩衝液処方物」）；および水中pH6.5の、10ミリモラーのリン酸ナトリウム、140ミリモラーの塩化ナトリウム、0.1%（wt/wt）と0.01%（w/w）の間のポリソルベート80、そして必要に応じて0.5ミリモラーEDTA（「リン酸緩衝液処方物」）。

【0122】

本発明の好適な実施態様では、微細に分割された粒子形態のIL-1raが、乾燥粉末として、または水もしくは水性溶媒中（例えば、水溶性ナトリウム塩のような生理食塩水、3～5%のグルコース溶液および3～5%のキシリトール溶液およびクエン酸またはリン酸緩衝液処方物）で、0.1～5% w/vのヒアルロナンまたはその塩（例えば、ヒアルロナンナトリウム）の溶液中に溶解または懸濁される。ヒアルロナンおよびIL-1raは、IL-1ra溶液を、1つのシリンジから、ヒアルロナンを含む第2のシリンジに注入し出し入れすることによる、または攪拌による、または微細流動化によるなどの手段を用いて混合され得る。このIL-1ra混合物は、このタンパク質の分解または凝集なしに0～5℃で貯蔵され得る。ヒアルロナン濃度は、0.1～5% w/vの範囲であり得るが、好ましい濃度は2%である。同様に、調製物中のIL-1ra最終濃度は、0.1～200 mg/mlであり得るが、好ましい濃度は、100 mg/mlである。得られる溶液または懸濁液は、好ましくは、pH値が6.0～7.5であるように調整される。

【0123】

一旦薬学的調製物が処方されると、各々は、滅菌バイアル中に、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和または凍結乾燥粉末として貯蔵され得る。このような組成物は、使用容易な形態または投与前に再調製を必要とする（例えば凍結乾燥された）形態のいずれかで貯蔵され得る。このような処方物の好ましい貯蔵は、少なくとも4℃で、そして好ましくは-70℃でのような低い温度である。IL-1raを含むこのような処方物はまた、生理学的pHまたはその近傍で貯蔵および投与されることが好ましい。高pHで（即ち8以上）、または低pH（即ち5以下）における処方物中の貯蔵および投与は望ましくなく、pHは好ましくは6.0と7.0との間が好ましく、そしてpH6.5がより好ましいと現在考えられている。

【0124】

特定の実施態様では、本発明は、単一投与量の投与単位を生成するキットに関する。このキットの各々は、乾燥タンパク質を有する第1のコンテナおよび水性処方物を有する第2のコンテナの両方を備え得る。本発明の範囲内に含まれるキットは、単一および複数チャンバーの予め充填されたシリンジである；例示の予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジ、および2チャンバーの予め充填された溶解シリンジであるLyoo-Ject^(R)のような溶解シリンジ）は、Vetter GmbH、Ravensburg、Germanyから入手可能である。

【0125】

IL-1インヒビター（例えば、IL-1ra産物）の各々は、関節の炎症症状を含む上記のようなIL-1介在疾患（例えば、乾癬性関節炎および慢性関節リウマチ）の処置のために治療的に有効な量で、患者に投与され得る。用語「患者」は、動物（例えば、ネコ、イヌおよびウマ）およびヒトを包含することが意図される。

【0126】

さらに、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の各々は、制限されずに、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩、心臓内、真皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、脳室内および胸骨内注射および注入を含む、局所、経腸または非経口投与を経由して投与され得る。IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）はまた、全身送達のために、経口投与または粘膜を通じて、即ち、鼻腔内、舌下、経頬または経直腸的に投与され得る。IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）は、関節内、皮下、筋肉内または静脈内注射を経由して投与されることが好ましい。制限されずに例示により、1つの特定の実施態様では、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）は、慢性関節リウマチおよび変形性関節炎の処置のために関節内に投与され得る。制限されずに例示により、1つの別の特定の実施態様では、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）は、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、多発性骨髄症、または骨髄性（例えば、AMLおよびCML）および他の白血病の処置のために皮下または筋肉内に投与され得る。制限されずに例示により、なおさらなる特定の実施態様では、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）は、損傷、てんかん、出血または卒中の結果としての脳損傷の処置のためか、または移植片対宿主疾患の処置のために静脈内に投与され得るか；または損傷の結果として脳損傷の処置のために脳室内に投与され得る。

【0127】

投与の様式に拘わらず、IL-1介在疾患の処置は、有効量の、即ち、関節軟骨の分子成分であるプロテオグリカンの分解により引き起こされる関節の進行性軟骨破壊を防ぐような、疾患の症状を防ぐか、低減するかまたは軽減するために有効な、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の投与量または合計投与量養生法を必要とする。ヒアルロナンおよびIL-1raは、哺乳動物中に天然に存在する物質であるので、許容し得る投与量に本質的な上限はないと考えられる。しかし、すべての医薬処置におけるように、所望の効果を達成するために必要であるより多くを使用しないことが賢明である。

【0128】

詳細な投与量は、患者のほぼ体重または表面積に従って計算される。適切な投与量を決定することにおける他の因子は、処置または予防されるべき疾患または症状、疾患の重症度、投与の経路、および年齢、性別および患者の医療状態を含み得る。処置のための適切な投与量を決定するために必要な計算のさらなる洗練は、当業者により、特に、本明細書に開示された投与量の情報およびアッセイを考慮して日常的になされる。投与量はまた、適切な投与量-応答データと組み合わせて用いられる投与量を決定するための既知のアッ

セイの使用を通じて決定され得る。

【0129】

投与の頻度は、患者の疾患および症状、ならびに処方物に用いられる I L - 1 インヒビター（例えば、好ましくは I L - 1 r a 産物そしてより好ましくは I L - 1 r a）の薬物動力学的パラメーター、および投与の経路に依存する。I L - 1 インヒビター（例えば、好ましくは I L - 1 r a 産物そしてより好ましくは I L - 1 r a）は、1 度投与され得るか、または重症および長引く障害の場合には、より少ない頻度の投与量で毎日投与され、または初期の連続投与量または持続送達を伴うボーラス投与量で投与され得る。他の様式の連続または連続に近い投与が実施され得ることもまた予期され得る。例えば、化学的誘導体化は、決定された投与量養生法に基づく予測可能な量の、血流中の連続的存在の効果 10

【0130】

I L - 1 介在疾患の処置のための I L - 1 r a 産物を用いる好ましい様式は、A U 9 1 7 3 6 3 6 に呈示される慢性関節リウマチおよび乾癬性関節炎のような関節の炎症性症状を含む。これらの様式は以下を含む：（1）関節炎の勃発を予防または救済するために必要な周期的に与えられる I L - 1 r a の単回関節内注射、および（2）I L - 1 r a 産物の周期的皮下注射。非経口的に投与されるとき、単位投与量は、2 0 0 m g まで、一般的には 1 5 0 m g まで、そしてより一般的には 1 0 0 m g までであり得る。関節腔中に投与されるとき、好ましくは、薬学的組成物は、等張のリン酸緩衝液生理食塩水中に溶解された、2 0 0 m g / m l まで、一般的には 1 5 0 m g まで、そしてより一般的には、1 0 0 m 20 g までの I L - 1 産物投与量を含む 3 ~ 1 0 m l シリンジからの単回注射として投与される。調製物は、7 ~ 1 0 日毎の頻度で関節腔中に投与される。このような方法で、投与は、必要であれば、投与量を変化させて 4 ~ 5 回連続的に行われる。

【0131】

本発明の薬学的組成物は、処置される徴候に適切な他の治療薬とともに投与され得る。I L - 1 インヒビター産物（例えば、好ましくは I L - 1 r a 産物そしてより好ましくは I L - 1 r a）および 1 つまたはそれ以上の付加的な抗炎症性薬物は、別々にまたは組み合わせ投与され得る。以下の化合物に関する情報は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」、第 16 版、Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck 30 & Co., Rahway, NJ (1992) および「Pharmaprojects」、PJB Publications Ltd. に見出され得る。

【0132】

急性および関節の炎症状態（例えば慢性関節リウマチ）のような慢性炎症を含む上記で規定されたような、I L - 1 介在疾患の現在の処置は、非ステロイド、抗炎症性薬物（NSAID）として分類される、痛みおよび炎症の制御のための第 1 の系統の薬剤を含む。第 2 の処置は、緩慢に作用する抗リウマチ薬物（SARD）または疾患改変（DM）薬物であるコルチコステロイドを含む。

【0133】

特定の実施態様では、本発明は、急性および関節の炎症性症状（例えば、変形性関節炎 40、乾癬性関節炎および／または慢性関節リウマチ）のような慢性炎症を含む、上記で規定されたような、I L - 1 介在疾患；および移植片対宿主疾患の処置のための、I L - 1 インヒビター（例えば、好ましくは I L - 1 r a 産物そしてより好ましくは I L - 1 r a）および 1 つまたはそれ以上の任意の NSAID の使用に関する。NSAID は、少なくとも部分的には、それらの抗炎症性作用を、プロスタグランジン合成の阻害によっている（Goodman および Gilman「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、MacMillan 第 7 版（1985））。NSAID は 9 つのグループに特徴付けられ得る：（1）サリチル酸誘導体；（2）プロピオン酸誘導体；（3）酢酸誘導体；（4）フェナム酸（fenamic acid）誘導体；（5）カルボン酸誘導体；（6）酪酸誘導体；（7）オキシカム（oxicam 50

）；（８）ピラゾールおよび（９）ピラズロン。

【０１３４】

特定の実施態様では、本発明は、ＩＬ－１インヒビター（例えば、好ましくはＩＬ－１ α 産物そしてより好ましくはＩＬ－１ α ）の、任意の１つまたはそれ以上のサリチル酸誘導体、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との使用に関する。このようなサリチル酸誘導体、プロドラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：アセトアミノサロール、アロキシプリン、アスピリン、ベノリレート、ブ
ロモサリゲニン、カルシウムアセチルサリチレート、コリンマグネシウムトリサリチレ
トジフルシナル、エテルサレート、フェンドサル、ゲンチジン酸、グリコールサリチレ
ト、イミダゾールサリチレート、リジン、アセチルサリチレート、メサルアミン、モルホ
リンサリチレート、１－ナフチルサリチレート、オルサラジン、パルサルミド、フェニル
アセチルサリチレート、フェニルサリチレート、サルアセトアミド、サリチルアミド
酢酸、サルサレートおよびスルファサラジン。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構
造的に関連するサリチル酸誘導体もまた、この群に包含されることが意図される。

10

【０１３５】

特定の実施態様では、本発明は、ＩＬ－１インヒビター（例えば、好ましくはＩＬ－１ α 産物そしてより好ましくはＩＬ－１ α ）の、任意の１つまたはそれ以上のプロピオン酸誘導体、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。プロピオン酸誘導体、プロド
ラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：アルミノプロフェン、
ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、デキシンドプロフェン、フェノ
プロフェン、フルノキサプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、フルクロプロ
フェン、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロキサム、インドプロフ
ェン、イソプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン、ミロプロフェン、ナプロキ
セン、オキサプロジン、ピケトプロフェン、ピメプロフェン、ピルプロフェン、プラノ
プロフェン、プロチジン酸、ピリドキシプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸およ
びチオサプロフェン。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するプロピ
オン酸誘導体もまた、この群に包含されることが意図される。

20

【０１３６】

特定の実施態様では、本発明は、ＩＬ－１インヒビター（例えば、好ましくはＩＬ－１ α 産物そしてより好ましくはＩＬ－１ α ）の、任意の１つまたはそれ以上の酢酸誘導
体、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。酢酸誘導体、プロドラッグエステルお
よびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：アセメタシン、アルクロフェナック、ア
ムフェナック、ブフェキサマック、シンメタシン、クロピラック、デルメタシン、ジクロ
フェナックナトリウム、エトドラック、フェルビナック、フェンクロフェナック、フェン
クロラック、フェンクロジン酸、フェンチアザック、フロフェナック、グルカメタシン、
イブフェナック、インドメタシン、イソフェゾラック、イソキセパック、ロナゾラック、
メチアジン酸、オキサメタシン、オキシピナック、ピメタシン、プログルメタシン、スル
リンダック、タルメタシン、チアルアミド、チオピナック、トルメチン、ジドメタシンお
よびゾメピラック。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連する酢酸誘導
体もまた、この群に包含されることが意図される。

30

40

【０１３７】

特定の実施態様では、本発明は、ＩＬ－１インヒビター（例えば、好ましくはＩＬ－１ α 産物そしてより好ましくはＩＬ－１ α ）の、任意の１つまたはそれ以上のフェナム
誘導体、プロドラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備
処置、後処置または同時処置）における使用に関する。フェナム酸誘導体、プロドラッグ
エステルまたはその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：エンフェナム酸、エトフェナ
メート、フルフェナム酸、イソニキシン、メクロフェナム酸、メクロフェナメートナトリ
ウム、メドフェナム酸、メフェナム酸、ニフルム酸、タルニフルメート、テロフェナメー

50

ト、トルフェナム酸およびウフェナメート。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するフェナム酸誘導体もまた、この群に包含されることが意図される。

【0138】

特定の実施態様では、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上のカルボン酸誘導体、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。使用され得るカルボン酸誘導体、プロドラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：クリダナック、ジフルニサル、フルフェニサル、イノリジン、ケトロラックおよびチノリジン。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するカルボン酸誘導体もまた、この群に包

10

【0139】

特定の実施態様では、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上の酪酸誘導体、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。酪酸誘導体、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：ブマジゾン、ブチブフェン、フェンブフェンおよびキセンブシン。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するカルボン酸誘導体もまた、この群に包含されることが意図される。

【0140】

特定の実施態様では、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上のオキシカム（oxi cam）、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。オキシカム、プロドラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：ドロキシカム、エノリカム、イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、テノキシカムおよび4-ヒドロキシ-1, 2-ベンゾチアジン1, 1-ジオキシド4-(N-フェニル)-カルボキシアミド。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するオキシカムもまた、この群に包含されることが意図される。

20

【0141】

特定の実施態様では、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上のピラゾール、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。使用され得るピラゾール、プロドラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：ジフェンアミゾールおよびエピリゾール。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するピラゾールもまた、この群に包含されることが意図される。

30

【0142】

特定の実施態様では、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上のピラズロン、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。使用され得るピラズロン、プロドラッグエステルおよびその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：アパゾン、アザプロパゾン、ベンズピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、モラゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピペブゾン、プロピルフェナゾン、ラミフェナゾン、スキシブゾンおよびチアゾリノブタゾン。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するピラズロンもまた、この群に包含されることが意図される。

40

【0143】

特定の実施態様では、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上の以下のN

50

S A I Dとの組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）の使用に関する：ε-アセトアミドカブロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン、アントラフェニン、ベンダザック、ベンダザックリジネート、ベンジダミン、ベプロジン、プロペラモール、ブコローム、ブフェゾラック、シプロクアゾン、クロキシメート、ダジダミン、デボキサメット、デトミジン、ジフェンピラミド（d i f e n p i r a m i d e）、ジフェンピラミド（d i f e n p y r a m i d e）、ジフィサラミン、ジタゾール、エモルファゾン、ファネチゾールメシレート、フェンフルミゾール、フロクタフェニン、フルミゾール、フルニキシン、フルプロクアゾン、フォピルトリン、フォスフォサル、グアイメサル、グアイアゾレン、イソニキシルン、レフエトアミンH C l、レフルノミド、ロフェミゾール、ロチファゾール、リジנקロニキシネート、メセクラゾン、ナブメトン、ニクチンドール、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシン、オキサセプロルム、オキサパドール、パラニリン、ペリソキサール、ペリソキサールシトレート、ピフォキシメ、ピプロキセン、ピラゾラック、ピルフェニドン、プロクアゾン、プロキサゾール、チエラビンB、チフラミゾール、チメガジン、トレクチン、トルパドール、トリプタミドおよび480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、AI77B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN 127、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNT E I 6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ONO3144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIRI133、SPAS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60、TAI-901（4-ベンゾイル-1-インダンカルボン酸）、TVX2706、U60257、UR2301およびWY41770のような製造会社のコード番号で呼ばれるこれらのもの。上記のNSAIDと同様の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するNSAIDもまた、この群に包含されることが意図される。

【0144】

特定の実施態様では、本発明は、急性および関節の炎症性症状（例えば、変形性関節炎、乾癬性関節炎および／または慢性関節リウマチ）のような慢性炎症を含む、上記で規定されたような、IL-1介在疾患；移植片対宿主疾患および多発性硬化症の処置のための、IL-1インヒビター（例えば、好ましくはIL-1ra産物そしてより好ましくはIL-1ra）の、任意の1つまたはそれ以上のコルチコステロイド、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。コルチコステロイド、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類は、ハイドロコルチゾン、および以下のハイドロコルチゾン由来の化合物を含む：21-アセトキシプレグネノロン、アルクロメラゾン、アルゲストン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ベタメタゾンバレレート、ブデソニド、クロロプレドニゾン、クロベタゾル、クロベタゾルプロピオネート、クロベタゾン、クロベタゾンプチレート、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチコステロン、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコン、デソニド、デソキシメラソン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドネート、エノキソロン、フルアザコート、フルクロロニド、フルメタゾン、フルメタゾンピバレート、フルニゾリド、フルシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、フルオロコルトロンヘキサノエート、ジフルコルトロンバレレート、フルオロメトロン、フルペロロンアセテート、フルプレドニデンアセテート、フルプレドニゾロン、フルランデノリド、ホルモコルタール、ハルシノニド、ハロメタゾン、ハロプレドンアセテート、ハイドロコルタメート、ハイドロコルチゾン、ハイドロコルチゾンアセテート、ハイドロコルチゾンプチレート、ハイドロコルチゾンホスフェート、ハイドロコルチゾン21-ナトリウムスクシネート、ハイドロコルチゾンテブテート、マジプレドン、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニコロン、メモタゾン、フロエート、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾロン、プレドニゾロン21-ジエドリミノアセテート

ト、プレドニゾロンナトリウムホスフェート、プレドニゾロンナトリウムスクシネート、プレドニゾロンナトリウム 21-*m*-スルフォベンゾエート、プレドニゾロンナトリウム 21-ステアログリコレート、プレドニゾロンテブテート、プレドニゾロン 21-トリメチルアセテート、プレドニゾン、プレドニバル、プレドニリデン、プレドニリデン 21-ジエチルアミノアセテート、チキソコルトール、トリウムシノロン、トリウムシノロンアセトニド、トリウムシノロンベネトニドおよびトリウムシノロンヘクスアセトニド。同様の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連するコルチコステロイドもまた、この群に包含されることが意図される。

【0145】

特定の実施態様では、本発明は、急性および関節の炎症性症状（例えば、変形性関節炎、乾癬性関節炎および／または慢性関節リウマチ）のような慢性炎症を含む、上記で規定されたような、IL-1 介在疾患；移植片対宿主疾患および多発性硬化症の処置のための、IL-1 インヒビター（例えば、好ましくは IL-1 *ra* 産物そしてより好ましくは IL-1 *ra*）の、任意の 1 つまたはそれ以上の緩慢作用抗リウマチ薬物（S A A R D）または疾患改変抗リウマチ薬物（D M A R D）、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。S A A R D または D M A R D、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類は以下を含む：アロクブレイドナトリウム、アウラノフィン、アウロチオグルコース、アウロチオグリカニド、アザチオプリン、ブレキナーナトリウム、ブシラミン、カルシウム 3-アウロチオ-2-プロパノール-1-スルホネート、クロランブシル、クロロキン、クロブザリット、クプロキシリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ダブゾン、15-デオキシスペルグアリン、ジアセレイン、グルコサミン、金塩類（例えば、シクロキン金塩、金ナトリウムチオマレート、金ナトリウムチオサルフェート）、ヒドロキシクロロキン、ヒドロキシウレア、ケブゾン、レバミゾール、ロベンザリット、メリチン、6-メルカプトプリン、メトトレキセート、ミゾリビン、ミコフェノレートモフェチル、ミオラル、ナイトロジャンマスタード、D-ペニシラミン、S K N F 8 6 0 0 2 および S B 2 0 3 5 8 0 のようなピリジノールイミダゾール、ラパマイシン、チオール類、チモポイエチンおよびピンクリスチン。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連する S A A R D または D M A R D もまた、この群に包含されることが意図される。

【0146】

特定の実施態様では、本発明は、急性および慢性炎症の処置のための、IL-1 インヒビター（例えば、好ましくは IL-1 *ra* 産物そしてより好ましくは IL-1 *ra*）の、任意の 1 つまたはそれ以上の COX 2 インヒビター、それらのプロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類との組み合わせ（予備処置、後処置または同時処置）における使用に関する。COX 2 インヒビター、プロドラッグエステルまたはその薬学的に受容可能な塩類は、例えば、セレコキシブを含む。類似の鎮痛および抗炎症性性質を有する構造的に関連する COX 2 インヒビターもまた、この群に包含されることが意図される。

【0147】

特定の実施態様において、本発明は、急性および慢性炎症の処置のための、IL-1 インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1 *ra* 産物、およびより好ましくは、IL-1 *ra*）の、抗菌剤、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩の 1 つ以上の任意のものとの組み合わせ（前処置、後処置、または同時処置）での使用に関する。抗菌剤、プロドラッグエステル、および薬学的に受容可能なその塩としては、例えば、アンピシリン、アモキシリン、オーレオマイシン、バシトラシン、セフトジジム、セフトリアキソン、セフォタキシム、セファクロル（c e p h a c h l o r）、セファレキシン、セフラジン、シプロフロキサシン、クラブラン酸、クロキサシリン、ジクロキサシラン（d i c l o x a c i l l a n）、エリスロマイシン、フルクロキサシラン（f l u c l o x a c i l l a n）、ゲンタマイシン、グラミシジン、メチシリン（m e t h i c i l l a n）、ネオマイシン、オキサシリン（o x a c i l l a n）、ペニシリン、およびバンコマイシンが挙げられる。類似の鎮痛性および抗炎症性特性を有する構造的に関連する抗菌

剤もまた、この群により包含されることが意図される。

【0148】

特定の実施態様において、本発明は、上で定義されるようなIL-1媒介性疾患の処置のための、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物、およびより好ましくは、IL-1ra）の、1つ以上のTNFインヒビターの任意のものとの組み合わせ（前処置、後処置、または同時処置）での使用に関する。IL-1媒介性疾患としては、以下が挙げられる：関節の炎症性状態のような急性および慢性炎症（例えば、変形性関節症、乾癬性関節炎、および／または慢性関節リウマチ）；外傷、てんかん、出血、または発作の結果としての脳損傷；ならびに移植片対疾患（graft versus disease）。そのようなTNFインヒビターとしては、TNFのインビボ合成または細胞外放出をブロックする化合物またはタンパク質が挙げられる。特定の実施態様において、本発明は、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物、およびより好ましくは、IL-1ra）の、1つ以上の以下のTNFインヒビターの任意のものとの組み合わせ（前処置、後処置、または同時処置）での使用に関する：TNF結合タンパク質（可溶性TNFレセプター）、抗TNF抗体、顆粒球コロニー刺激因子；サリドマイド；BN 50730；テニダブ；E 5531；チアパファント（tiapafant）PCA 4248；ニメスリド；パナビール（panavir）；ロリプラム；RP 73401；ペプチドT、MDL 201, 449A；（1R, 3S）-シス-1-[9-(2, 6-ジアミノプリニル)]-3-ヒドロキシ-4-シクロペンテンハイドロクロリド；（1R, 3R）-トランス-1-[9-(2, 6-ジアミノ)プリン]-3-アセトキシシクロペンタン；（1R, 3R）-トランス-1-[9-アデニル]-3-アジドシクロペンテンハイドロクロリド、および（1R, 3R）-トランス-1-[6-ヒドロキシプリン-9-イル]-3-アジドシクロペンタン。

【0149】

TNF結合タンパク質は当該分野において開示されている（EP 308 378、EP 422 339、GB 2 218 101、EP 393 438、WO 90/13575、EP 398 327、EP 412 486、WO 91/03553、EP 418 014、JP 127, 800/1991、EP 433 900、米国特許第5, 136, 021号、GB 2 246 569、EP 464 533、WO 92/01002、WO 92/13095、WO 92/16221、EP 512 528、EP 526 905、WO 93/07863、EP 568 928、WO 93/21946、WO 93/19777、EP 417 563、米国仮特許出願第60/021, 443号、1996年7月9日にFisher、EdwardsおよびKieftにより出願、仮出願送達レターにおける題「TUMOR NECROSIS FACTOR BINDING PROTEINS」（代理人照会番号A-415P）、米国仮特許出願第 号、1996年12月6日にFisher、EdwardsおよびKieftにより出願、仮出願送達レターにおける題「LOW MOLECULAR WEIGHT TUMOR NECROSIS FACTOR BINDING PROTEINS」（代理人照会番号A-415A-P）、米国仮特許出願第 号、1997年1月23日にFisher、EdwardsおよびKieftにより出願、仮出願送達レターにおける題「LOW MOLECULAR WEIGHT TUMOR NECROSIS FACTOR BINDING PROTEINS」（代理人照会番号A-415B-P）、ならびに米国仮特許出願第 号、1997年2月7日にFisher、EdwardsおよびKieftにより出願、仮出願送達レターにおける題「LOW MOLECULAR WEIGHT TUMOR NECROSIS FACTOR BINDING PROTEINS」（代理人照会番号A-415C-P）、これらの開示は本明細書により参考として援用される）。

【0150】

例えば、EP 393 438およびEP 422 339は、「30kDa TNFインヒビター」（p55レセプターとしても知られる）および「40kDaインヒビター

」(p 75 レセプターとしても知られる)ならびにそれらの改変形態(例えば、フラグメント、機能的誘導体、および改変体)のアミノ酸および核酸配列を教示する。EP 393 438 および EP 422 339 はまた、インヒビターのコードを担う遺伝子を単離し、遺伝子を適切なベクターおよび細胞型中にクローン化し、そして遺伝子を発現させてインヒビターを産生するための方法を開示する。さらに、上記のTNFインヒビターの多価形態(すなわち、1つより多い活性部分を含む分子)もまた開示されている。1つの実施態様において、多価形態は、例えば、少なくとも1つのTNFインヒビターおよび別の部分を任意の臨床的に受容可能なリンカー(例えば、ポリエチレングリコール)と化学的にカップリングすることにより(WO 92/16221 および WO 95/34326)、ペプチドリinkerにより(Nev eら、(1996), Cytokine, 8 (5): 365-370)、ビオチンへ化学的にカップリングし、次いでアビジンへ結合することにより(WO 91/03553)、ならびに最後に、キメラ抗体分子を構築することにより(米国特許第5,116,964号、WO 89/09622、WO 91/16437 および EP 315062)構築され得る。

【0151】

抗TNF抗体としては、MAK 195F Fab抗体(Hollerら、(1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147); CDP 571抗TNFモノクローナル抗体(Rankinら、(1995), British Journal of Rheumatology, 34:334-342); BAY X 1351マウス抗腫瘍壊死因子モノクローナル抗体(Kieftら、(1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 9); CentNF cA2抗TNFモノクローナル抗体(Elliottら、(1994), Lancet, 344:1125-1127 および Elliottら、(1994), Lancet, 344:1105-1110)が挙げられる。

【0152】

特定の実施態様において、本発明は、上で定義されるようなIL-1媒介性疾患の処置のための、IL-1インヒビター(例えば、好ましくは、IL-1ra産物、およびより好ましくは、IL-1ra)の、可溶性組換えヒトFas抗原またはその組換え型との組み合わせ(前処置、後処置、または同時処置)での使用に関する。IL-1媒介性疾患としては、以下が挙げられる: 関節の炎症性状態のような急性および慢性炎症(例えば、変形性関節症、乾癬性関節炎、および/または慢性関節リウマチ); ならびに対宿主性移植片疾患。可溶性組換えヒトFas抗原、およびその改変体(例えば、fas融合タンパク質)、可溶性組換えヒトFas抗原のコードを担う遺伝子を単離するための方法、遺伝子を適切なベクターおよび細胞型中にクローン化するための方法、ならびに遺伝子を発現させてインヒビターを産生するための方法は公知である(WO 96/20206 および Mountzら、J. Immunology, 155:4829-4837、これらの開示は本明細書中に参考として援用される)。

【0153】

上記は例であり、そして、当業者に公知である、または本明細書中に記載の指針を用いて当業者により到達され得る、これらの抗関節炎化合物と同時に使用されるべきその他の処置を事前に排除しない。

【0154】

さらなる抗炎症化合物の組成物を、投与の簡便さおよび投薬の一様性のために、投薬単位形態で処方することは、特に有利である。本明細書中で用いられる「投薬単位形態」は、処置されるべき哺乳動物被験体のための単一投薬として適する物理的に分離した単位をいい、各単位は、必要とされる薬学的キャリアと共同して、所望の治療効果を生成するように算出された、事前に決定された量のさらなる抗炎症化合物を含有する。本明細書中で用いられる場合、「薬学的に受容可能なキャリア」としては、有効成分と、そして投与の

様式および処方物のその他の成分と適合性であり、そしてレシピエントに有害でない、任意のそして全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。そのような媒質および薬剤の使用は、当該分野において周知である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18版, (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, 1435-1712頁を参照のこと）。例示的な薬学的に受容可能なキャリアは、リン酸緩衝化生理食塩水である。補充的有效成分もまた、組成物中に取り込まれ得る。

【0155】

経口治療投与については、さらなる抗炎症化合物は、賦形剤とともに取り込まれ得、そして摂取可能錠剤、パッカル錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、カシェ剤などの形態で使用され得るか、またはさらなる抗炎症化合物は、食事において直接的に食物に取り込まれ得る。錠剤、トローチ、丸剤、カプセルなどはまた、以下を含み得る：トラガカントガム、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンのような結合剤；ジカルシウムホスフェートのような賦形剤；コーンスターチ、アルギン酸などのような崩壊剤；マグネシウムステアレートのような潤滑剤；スクロース、ラクトース、またはサッカリンのような甘味剤；またはペパーミント、ウィンターグリーン油、またはチェリーもしくはオレンジ香料のような着香剤。投薬単位形態がカプセルである場合、それは、上記の型の物質に加えて、液体キャリアを含有し得る。種々のその他の物質が、コーティングとして、またはそうでなければ投薬単位の物理的形態を改変するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルは、シェラック、糖またはその両方でコートされ得る。もちろん、任意の投薬単位形態の調製において使用される任意の物質は、薬学的に純粋であり、そして用いられる量において実質的に非毒性でなければならない。さらに、さらなる抗炎症化合物は、制御放出調製物および処方物中に取り込まれ得る。そのような治療的に有用な組成物におけるさらなる抗炎症化合物の量は、適切な投薬が得られるような量である。

【0156】

非経口治療的投与については、各々の抗炎症化合物は、無菌注射用溶液に取り込まれ得る。無菌注射用溶液は、さらなる抗炎症化合物を、必要とされる量で、適切な薬学的に受容可能なキャリア中で、以下に列举される（必要とされる）種々のその他の成分とともに取り込み、続いて滅菌濾過することにより調製され得る。分散液の場合、各々は、さらなる抗炎症化合物を、基本的分散媒および上記で列举されるものからの必要とされるその他の成分を含む無菌ビヒクル中に取り込むことにより調製され得る。無菌注射用溶液の場合、各々は、少なくとも1つのさらなる抗炎症化合物の粉末、および必要に応じて、以前に滅菌濾過したその溶液由来の任意のさらなる必要とされる成分を取り込むことにより調製され得る。ここで、粉末は、任意の適切な技術（例えば、真空乾燥および凍結乾燥）により調製される。

【0157】

さらなる抗炎症化合物の特定の用量は、患者のおよその体重または表面積に従って算出される。適切な投薬の決定におけるその他の因子としては、処置または予防されるべき急性または慢性炎症性疾患もしくは症状、疾患の重篤度、投与経路、ならびに患者の年齢、性別、および健康状態が挙げられ得る。各々の上で言及した処方物を含む処置のための適切な投薬を決定するために必要な算出のさらなる洗練は、当業者により慣習的になされる。投薬はまた、適切な用量応答データとともに使用される投薬を決定するための公知のアッセイの使用を介して決定され得る。

【0158】

従って、例えば、特定の急性または慢性炎症性疾患を処置するために選択されたさらなる抗炎症化合物の用量が、所望の治療効果を達成するために変動し得ることは、本発明の範囲内である。さらなる抗炎症化合物の1つが副作用を有する場合、それは患者に組み合わせ治療の交互の処置期間の間に与えられ得る。例えば、慢性メトトレキセート処置は、

胃腸、肝臓、骨髄、および肺毒性を伴う (Sandovalら、(1995), British Journal of Rheumatology, 34:49-56)。

【0159】

疾患の改善をモニターするための試験としては、例えば、炎症に対する全身性応答の決定に関する特定の試験が挙げられ得、これは、赤血球沈降速度 (ESR) および急性期反応物質 (APR) を含む。観察は、罹患した身体部分の腫脹などからなる。患者の硬直、および握り (grip) (適用可能な場合) の改善、ならびに疼痛の減少もまた観察される。患者の状態が安定な場合は、彼は、毎週同じ投薬で再処置され、そして毎週評価される。患者の状態が安定であれば、処置は継続され得る。処置の6ヶ月後、骨格の解剖学的変化は、放射線画像化により、例えば、X線撮影により決定される。

10

【0160】

各時期の終わりに、患者を再度評価する。前処置および後処置の放射線学的評価 (ESR および APR) の比較は、処置の効力を示す。処置の効力および患者の状態に従って、投与量は、処置の期間の間増大され得るか、または一定に維持され得る。

【0161】

好ましくは、本発明は、上記のような IL-1 媒介性疾患 (急性または慢性炎症 (例えば、関節の炎症状態 (例えば、乾癬性関節炎および慢性関節リウマチ) およびそれに関連した徴候を包含する) を処置または予防するために、必要に応じて、以下の組み合わせの1つと共に IL-1ra を使用することを包含する方法に関する: IL-1ra 産物 (例えば、IL-1ra) およびメトトレキセート; IL-1ra 産物 (例えば、IL-1ra) ならびにメトトレキセート、スルファサジン、およびヒドロキシクロロキノンのいずれか1つ以上; IL-1ra 産物 (例えば、IL-1ra)、メトトレキセートおよびヒドロキシクロロキノン; IL-1ra 産物 (例えば、IL-1ra)、メトトレキセートおよびスルファサジン; ならびに IL-1ra 産物 (例えば、IL-1ra)、メトトレキセート、および TNF インヒビター、好ましくは、TNFbp。

20

【0162】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、関節炎 (例えば、変形性関節症、乾癬性関節炎および/または慢性関節リウマチ) およびそれに関連した徴候) を処置するために、必要に応じてメトトレキセートおよび/または TNFbp と組み合わせた (前処置、後処置または同時処置)、IL-1 インヒビター (例えば、好ましくは、IL-1ra 産物およびより好ましくは制御放出ポリマー (例えば、ヒアルロナン (hyaluronan)) と共に処方された IL-1ra) の投与 (例えば、関節内、皮下または筋内) を包含する。

30

【0163】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、外傷、てんかん、出血または梗塞 (これらの各々は、神経変性に至り得る) の結果としての脳傷害を処置するために、必要に応じて組織プラスミノゲンアクチベーターおよび/または TNFbp と組み合わせた (前処置、後処置または同時処置)、IL-1 インヒビター (例えば、好ましくは、IL-1ra 産物およびより好ましくは制御放出ポリマー (例えば、ヒアルロナン) と共に処方された IL-1ra) の投与 (例えば、静脈内または脳室内) を包含する。

40

【0164】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、多発性硬化症を処置するために、必要に応じてコルチコステロイド、シクロスポリン、インターフェロン (例えば、 α インターフェロン、 β インターフェロン、 γ インターフェロンまたはコンセンサスインターフェロン) および/または TNFbp の1つ以上と組み合わせた (前処置、後処置または同時処置)、IL-1 インヒビター (例えば、好ましくは、IL-1ra 産物およびより好ましくは制御放出ポリマー (例えば、ヒアルロナン) と共に処方された IL-1ra) の投与 (例えば、皮下または筋内) を包含する。

【0165】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、対宿主性移植片病を処置するために、必要に

50

応じてメトトレキセート、コルチコステロイド、FK-506、シクロスポリン、可溶性fasタンパク質および／またはTNFbpの1つ以上と組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物およびより好ましくは制御放出ポリマー（例えば、ヒアルロナン）と共に処方されたIL-1ra）の投与（例えば、静脈内）を包含する。

【0166】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、炎症性腸疾患を処置するために、必要に応じてG-CSFおよび／またはTNFbpと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物およびより好ましくは制御放出ポリマー（例えば、ヒアルロナン）と共に処方されたIL-1ra）の投与（例えば、皮下または筋内）を包含する。 10

【0167】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、多発性骨髄腫または骨髄性（例えば、AMLおよびCML）および他の白血病を処置するために、必要に応じてインターフェロン（例えば、 α インターフェロン、 β インターフェロン、 γ インターフェロンまたはコンセンサスインターフェロン）と組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物およびより好ましくは制御放出ポリマー（例えば、ヒアルロナン）と共に処方されたIL-1ra）の投与（例えば、皮下または筋内）を包含する。

【0168】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、アルツハイマー病を処置するために、必要に応じてNSAID（例えば、インドメタシン）および／またはTNFbpと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物およびより好ましくは制御放出ポリマー（例えば、ヒアルロナン）と共に処方されたIL-1ra）の投与（例えば、皮下、脳室内またはくも膜下腔内）を包含する。 20

【0169】

特定の好ましい実施態様では、本方法は、側頭下顎関節病を処置するための、IL-1インヒビター（例えば、好ましくは、IL-1ra産物およびより好ましくは制御放出ポリマー（例えば、ヒアルロナン）と共に処方されたIL-1ra）の投与（例えば、局所注射、皮下または筋内）を包含する。 30

【0170】

以下の実施例は、本発明をより完全に説明するために包含される。改変は、本発明の意図から逸脱することなく記載の手順においてなされ得ることが理解される。

【実施例】

【0171】

以下の実施例において記載の手順の多く、または適切な代替手順についての標準的な方法は、広く認識されている分子生物学マニュアルにおいて提供されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) および Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York (1990) に挙げられる。全ての化学物質は、分析グレードまたはUSPグレードのいずれかであった。 40

【0172】

実施例1

サンプル調製：米国特許第5,075,222号の教示に従って一般的に調製したE.coli由来ヒト組換えIL-1レセプターアンタゴニスト(rhuIL-1ra)を、10mMクエン酸ナトリウム、140mM塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、水中0.1%ポリソルベート(w/w)、pH6.5(CSEP)中に処方した。次いで、 50

処方 IL-1ra を含有する注射器を、二方活栓によって、以下の制御放出材料の 1 つを含有する注射器に連結した：H-10^{T M} ヒラン液 (Biomatrix, Inc., Ridgefield, Inc.)、架橋結合ヒアルロン酸、($M_r \geq 4 \times 10^6$) (乾燥粉末または PBS 中に再構成した乾燥粉末のいずれかとして)；乾燥粉末としての Streptococcus zooepidemicus 培養物由来の PBS 中のヒアルロン酸 ($M_r \geq 570,000$) (カタログ番号 H9390、Sigma, Inc., St. Louis, MO)；乾燥粉末としてのポリビニルピロリドン ($M_r 1.3 \times 10^6$) (カタログ番号 43,719-0、Aldridge Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI)；および乾燥粉末としてのカルボキシメチルセルロース (カルボキシメチルセルロース (カタログ番号 06139、Polysciences, Inc., Warrington, PA)。次いで、IL-1ra を、rhIL-1ra 溶液をヒアルロン酸を含有する注射器に注入し、そして内容物を前後に数回注入して完全に混合することにより、制御放出材料と混合した。

10

【0173】

従って、以下の処方物を調製した：(1) IL-1ra (100 mg/ml) / 2% H-10^{T M} ヒラン；(2) IL-1ra (100 mg/ml) / 1% ヒアルロン酸；(3) IL-1ra (100 mg/ml) / 0.5% H-10^{T M} ヒラン；(4) IL-1ra (100 mg/ml) / 2% ヒアルロン酸；(5) IL-1ra (100 mg/ml) / 4% ポリビニルピロリドン；および (6) IL-1ra (100 mg/ml) / 3% カルボキシメチルセルロース。

20

【0174】

種々の処方物を、雌 Lewis ラット (200~250 g、Charles River, Portage, MI) に皮下注射した。注射後種々の時点で、血液を動物の頸静脈に挿入したカテーテルを介して採取した。血液を遠心分離して血液細胞を除去し、残りの血漿を、製造者の指針に従って ELISA キット (Quantikine^{T M} ヒト IL-1ra 免疫アッセイ、R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて IL-1ra についてアッセイした。データを、表 2 および図 1 中に示すように、注射後の時間に対する血漿 IL-1ra ($\mu\text{g/ml}$ IL-1ra (血漿中)) として表す。

【0175】

30

【表 2】

表 2: 皮下注射後の血漿IL-1ra (μg/ml)

注射後時間 (時間)	IL-1ra 単独	IL-1ra (100 mg/ml) / H-10™ ヒラン (2% w/v)	IL-1ra (100 mg/ml) / H-10™ ヒラン (1% w/v)	IL-1ra (100 mg/ml) / H-10™ ヒラン (0.5% w/v)	IL-1ra (100 mg/ml) / ヒアルロン酸 (Mr≥ 5.7x10 ⁵) (2% w/v)	IL-1ra (100 mg/ml) / PVP (4% w/v)	IL-1ra (100 mg/ml) / CMC (3% w/v)
0	0.0682± 0.023	0.027± 0.012	0.007± 0.002	0.02± 0.008	0.007± 0.004	0.502± 0.311	ND*
0.167	4.186± 0.082	2.515± 0.429	1.65± 0.147	3.085± 0.492	2.341± 0.278	1.623± 0.247	ND*
0.25	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	1.93± 0.58
0.5	7.658± 0.267	4.429± 0.567	4.096± 0.395	7.167± 0.656	4.489± 0.309	2.642± 0.712	2.46± 0.57
1	13.659± 2.21	5.98± 0.825	5.881± 0.865	9.23± 0.417	6.217± 0.551	4.809± 1.936	3.54± 0.56
2	9.813± 1.135	6.201± 0.697	6.708± 0.534	11.225± 0.759	5.704± 0.714	5.461± 0.899	5.05± 0.91
4	5.252± 0.055	6.12± 0.834	5.532± 0.852	9.225± 0.948	6.495± 0.945	7.248± 1.186	4.49± 0.62
8	1.082± 0.142	3.354± 0.279	4.744± 0.716	5.146± 0.449	3.438± 0.546	8.447± 2.406	4.27± 0.53
12	0.043± 0.01	2.024± 0.231	1.896± 0.1	ND*	4.559± 0.322	2.231± 0.825	2.37± 0.22
24	0.01± 0.003	0.345± 0.073	0.252± 0.059	0.07± 0.016	0.112± 0.016	0.04± 0.005	0.46± 0.08
48	ND*	0.061± 0.032	0.012± 0.005	0.01± 0.004	0.013± 0.006	ND*	0.19± 0.12
72	ND*	ND*	0.008± 0.003	0.008± 0.003	0.004± 0.003	ND*	0.85± 0.42

*データは示さず

表 2 および図 1 に示すように、IL-1ra のヒアルロン酸、ポリビニルピロリドンおよびカルボキシメチルセルロースへの取り込みにより、IL-1ra 単独投与に比較して、IL-1ra 血漿レベルの長期の上昇が得られる。

10

20

30

40

50

【0176】

実施例 2

CSEP中IL-1raを $\text{Na} [^{125}\text{I}]$ で放射性標識し、次いで、上記のように、 $\text{H}-10^{\text{T M}}$ ヒラン液中に取り込ませた（最終2%）。放射性IL-1raまたはIL-1ra/ $\text{H}-10^{\text{T M}}$ ヒラン混合物をモルモット（Charles River, Portage, MI）の後膝に関節内注射した。注射後種々の時点で、動物を屠殺し、膝関節を摘出し、van Lentら（1989）、J. Rheumatol, 16: 1295-1303に記載のようにガンマカウンターで計数した。各時点で関節中に残っているIL-1raの量を図2に示す。3つの異なるヒアルロナン処方物のIL-1raの関節内半減期を図2のようなグラフから算定した。これを表3に示す。

10

【0177】

【表3】

表3：関節内注射後のモルモットにおけるIL-1ra処方物の関節半減期

処方物 (a)	比 (b)	半減期 (時間)
IL-1ra 単独	NA	1.36
IL-1ra/ヒアルロナン	90/10	3.54
IL-1ra/ヒアルロナン	80/20	2.45
IL-1ra/ヒアルロナン	50/50	1.45

20

(a) IL-1ra濃度100mg/ml。適用時、ヒアルロナン濃度2% (w/v)。

。

(b) 処方物におけるゲル（架橋）ヒアルロナンに対する液（非架橋）ヒアルロナンの比。

【0178】

表3および図2に示すように、IL-1raのヒアルロナンへの取り込みにより、関節内投与後の膝関節におけるIL-1raの長期保持が得られる。保持の程度は、処方物における非架橋（液）ヒアルロナンに対する架橋（ゲル）ヒアルロナンの比により制御され得る。

30

【0179】

実施例 3

CSEP中のIL-1raまたはIL-1ra (100mg/ml) / 2% $\text{H}-10^{\text{T M}}$ ヒランの処方物（上記）をウサギ（Charles River, Portage, MI）の後膝に関節内注射した。注射後種々の時点で、動物を屠殺し、膝をPBSで洗浄して滑液を回収した。回収した滑液中のIL-1raの濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を、製造者の説明書に従ってELISA (QuantikineTM, ヒトIL-1ra免疫アッセイ、R&D Systems) により測定した。データを表4および図3に示す。

【0180】

40

【表 4】

表 4：関節内注射後のウサギ後膝におけるIL-1ra処方物の関節半減期

注射後時間 (時間)	IL-1ra 単独	IL-1ra (100 mg/ml)/ ヒアルロナン (2% w/v)
0.5	2280	2440
0.5	11000	6200
0.5	5000	2410
0.5	8090	ND*
1	1400	5150
1	3450	6830
1	3090	7180
1	1840	2620
4	56.98	224
4	31.24	1600
4	62.43	3250
4	ND*	237
8	0.0641	575
8	0.0312	55.98
8	ND*	125
8	ND*	ND*
24	ND*	0.5644
24	ND*	0.1539
24	ND*	0.8852

10

20

30

★ データは示さず。

【0181】

このデータは、IL-1raのヒアルロナン処方物が関節内注射後の滑液へのインタクトIL-1raの長期放出を可能にすることを示す。

【0182】

実施例 4

雌Lewisラット(200~250g、Charles River, Portage, MI)を、0日目および7日目に、ウシII型コラーゲン(Elastin Products, Owensville, MO)で免疫した。関節炎は、12~13日目に発達し始めた。ラット(8匹/群)を、初回免疫後15日目および18日目に、CSEP中H-10TMヒラン液(50μl/膝;総量1mgヒアルロナン)またはIL-1ra(100mg/ml)/2%H-10TMヒラン(50μl/膝;5mg IL-1ra/1mgヒアルロナン)のいずれかで関節内注射した。関節炎コントロール群には注射を与えなかった。初回免疫後20日目に、ラットを屠殺し、そして膝関節を疾患重度の組織化学的評価のために採集した。表5および図4に示すように：(a) IL-1raでの処理は、軟骨および骨の損傷を有意に抑制し、そして滑膜炎に対する適度の効果を有した；(b) 全関節損傷は、コントロールに比較して70%減少した；および(c) ヒアルロナン単独での処置は、疾患コントロールに比較して有益な効果を有さなかった。

40

50

【0183】

【表5】

表5：関節内注射後の滑液中のIL-1ra濃度

処方物	滑液	パンヌス	軟骨全体	骨損傷	関節全体
未処理	3.25±0.14	1.5±0.16	17.69±2.27	1.44±0.16	23.88±2.57
ヒアルロナン (2% w/v)	2.88±0.39	1.44±0.22	16.88±3.14	1.31±0.25	22.5±3.87
IL-1ra (100 mg/ml) / ヒアルロナン (2% w/v)	2.06±0.28	0.5±0.18	4.69±1.77	0.19±0.14	7.53±2.33

10

実施例5

20

雌Lewisラット（200～250g、Charles River, Portage, MI）を、0日目および7日目に3つの部位（250μlづつ）で尾の付け根および背中にわたって不完全フロイントアジュバント（Difco Laboratories, Inc., Ann Arbor, MI）中の2mg/mlのウシII型コラーゲン（Elastin Products, Owensville, MO）で免疫した。12日目に、これらラットに3mg/mlのエンドトキシン（LPS型L-3129、Sigma）の腹腔内注射を与えた。関節炎の発症は、次の5日にわたって生じた。ラットが疾患を発達させるにつれて、これらを実験群（6～8匹/群）に無作為化し、そして処置を開始させた。ラットを6日間処置（背中の背側にIL-1ra（100mg/ml）／2% H-10^TM ヒラン液（上記）の皮下注射）し、次いで足重量測定および組織採集のために関節炎の7日目に屠殺した。

30

【0184】

足首関節幅のカリパス測定を、関節炎の発症前、無作為化した日、および関節炎7日目における実験終了までの続く各実験日に行った。次いで、関節炎の持続期間にわたるコントロールからの阻害%を決定する目的で、データを曲線下の面積として表した。終了時、脛付節を、炎症の別の尺度としての最終足重量の測定のために、内果および外果のレベルで横切開した。足首関節を、組織学的評価のためにホルマリン中に採集した。

【0185】

組織学的評価：足首関節を、10%中性緩衝化ホルマリン中に、Surgipath decalcifier I（Surgipath, Grayslake, IL）中に約1週間配置する前に少なくとも24時間採集した。脱灰を完了したとき、指を整え、足首関節をおよそ等分になるように縦断面で横切開した。これらをパラフィン包埋のために処理し、細断し、そして以下の基準に従って、炎症および骨損傷の一般評価のためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、かつ軟骨変化の特異的評価のためにトルイジンブルーで染色した：

40

炎症

0 = 正常

1 = 関節周囲組織中に炎症細胞の最小浸潤

2 = 軽度の浸潤

3 = 中程度の浸潤（中程度の浮腫を伴う）

50

4 = 顕著な浸潤（顕著な浮腫を伴う）

5 = 重篤な浸潤（重篤な浮腫を伴う）

軟骨損傷

0 = 正常

1 = トリジンブルー染色の最小から軽度の損失（明らかな軟骨細胞損失またはコラーゲン破壊が見られない）

2 = トリジンブルー染色の軽度の損失（限局性の軽度の（表在性の）軟骨細胞損失および／またはコラーゲン破壊が見られる）

3 = トリジンブルー染色の中程度の損失（多巣性の中程度の（中間層までの深さ）軟骨細胞損失および／またはコラーゲン破壊が見られる）

4 = トリジンブルー染色の顕著な損失（多巣性の顕著な（深層までの深さ）軟骨細胞損失および／またはコラーゲン破壊が見られる）

5 = トリジンブルー染色の重篤に拡散した損失（多巣性の重篤な（潮標識（tide mark）までの深さ）軟骨細胞損失および／またはコラーゲン破壊が見られる）

骨再吸収

0 = 正常

1 = 再吸収面積は最小である、低倍率では容易に見られない、破骨細胞は希少

2 = 軽度は、より多い再吸収面積を有する、低倍率では容易に見られない、破骨細胞はやや多い

3 = 中程度は、皮質において全厚欠損を生じることなく髓様小柱および皮質骨の明らかな再吸収を有する、いくらかの髓様小柱が損失、低倍率で病巣が見られる、破骨細胞はやや多い、

4 = 顕著は、皮質骨において全厚欠損を有する、しばしば残りの皮質表面の輪郭が歪曲している、髓様が顕著に損失、多数の破骨細胞、

5 = 重篤は、皮質骨において全厚欠損を有する、しばしば残りの皮質表面の輪郭が歪曲している、遠位頸骨の髓様骨が顕著に損失、多数の破骨細胞、再吸収は、より小さな足根骨にも存在

統計学的解析：足首幅の臨床データを、続く分散分析と共に、用量曲線下の面積を測定することにより解析した。各群についての足重量（平均±SE）をスチューデントのT検定を用いて差異について解析した。

【0186】

1日1回100mg/kg用量の、CSEP中IL-1raを与えても効率がなかったことに対し、1日1回（qd）皮下（SQ）用量のIL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液の投与は、経時的に足腫脹の62%阻害および最終足重量の74%阻害を生じた（図6および7）。これらの結果は、CSEP中IL-1raに対するIL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液の日投与の優れた臨床効果を明らかに示す。さらに、足首関節切片の組織学的分析は、IL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液で処置したラットにおいて炎症の顕著な減少、パネマス形成、および軟骨および骨損傷の顕著な減少を示したが、CSEP中IL-1raで処置したラットにおいては示さなかった（図8）。

【0187】

1日1回皮下用量のIL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液が、疾患進行を調整し得たことを確認した後、効果の持続を決定するための実験を行った。IL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液で毎日処置したラットは、経時的に足腫脹の53%阻害および最終足重量の78%阻害を有した（図9および10）。IL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液で隔日処置した関節炎ラットは、経時的に足腫脹の35%阻害および最終足重量の62%阻害を有した。IL-1ra（100mg/ml）/2% H-10^{T M} ヒラン液で3日毎に処置した関節炎ラットは、経時的に腫脹の27%阻害（有意でない）および最終足重量の19%阻害を有した。これらの結果は再度、IL-1がモデルにおける病原で作動している期間にわたり少

10

20

30

40

50

なくとも 200 ng/ml の最小血液レベルを維持することの重要性を示す。IL-1 レセプターの遮断は、より少ない効力を断続的に生じる。3 日ごとに処置したラットには、関節炎の 1 日目および 4 日目に投与した。興味深いことに、投与の 24 時間後に行ったカリパス測定（2 日目および 5 日目）は、関節炎進行の抑制を示す（図 9）。しかし、ラットに次の投与を与える前に投与後 2 または 3 日後に行った測定は、おそらくその期間中の至適未満の血液レベルの結果として、疾患進行を反映している。

【0188】

本発明を、一般的にかつ好ましい実施態様によって上述してきたが、上述の説明を考慮して他の変更および改変が当業者に行われることが理解される。

【図面の簡単な説明】

10

【0189】

本発明の多数の局面および利点は、図面の検閲により明らかになる。ここで：

【図 1】図 1 は、クエン酸緩衝液（CSEP）中の IL-1ra 単独または CSEP 中のヒアルロン酸と混合された IL-1ra のいずれかの皮下注射の後の IL-1ra の血清レベルを示す。

【図 2】図 2 は、CSEP 中の IL-1ra 単独または CSEP 中のヒアルロン酸と混合された IL-1ra のいずれかの関節内注射の後のモルモット関節に残留する IL-1ra の量を示す。

【図 3】図 3 は、CSEP 中の IL-1ra 単独または CSEP 中のヒアルロン酸と混合された IL-1ra のいずれかの関節内注射の後のウサギの回収された滑膜液中の IL-1ra の濃度を示す。

20

【図 4】図 4 は、CSEP 中のヒアルロン酸単独または CSEP 中のヒアルロン酸と混合された IL-1ra のいずれかの関節内注射の後の、ウシ II 型コラーゲンで免疫化されたラットの膝関節における疾患重症度の組織学的評価を示す。

【図 5】図 5 は、組換えヒト IL-1ra（rhIL-1ra）をコードする核酸配列（配列番号 1）を示す。rhIL-1ra のアミノ酸配列（配列番号 2）もまた示され、最初のアミノ酸は M_n である。ここで n は 0 または 1 に相当する。

【図 6】図 6 は、確立された II 型コラーゲン関節炎を有するラットの足首関節直径に対する、CSEP 中の IL-1ra または CSEP 中のヒアルロン酸または CSEP 単独と比較して示される CSEP 中のヒアルロン酸と混合した IL-1ra の 1 日に 1 回の注射（QD）の経時的な効果を示す。

30

【図 7】図 7 は、確立された II 型コラーゲン関節炎を有するラットの最終足重量に対する、CSEP 中の IL-1ra または CSEP 中のヒアルロン酸または CSEP 単独と比較して示される CSEP 中のヒアルロン酸と混合した IL-1ra の 1 日に 1 回の注射（QD）の効果を示す。

【図 8】図 8 は、確立された II 型コラーゲン関節炎を有するラットの炎症、パンス形成、ならびに軟骨および骨損傷における、CSEP 中の IL-1ra または CSEP 中のヒアルロン酸または CSEP 単独と比較して示される CSEP 中のヒアルロン酸と混合した IL-1ra の 1 日に 1 回の注射（QD）の効果を示す。

【図 9】図 9 は、確立された II 型コラーゲン関節炎を有するラットの足首関節直径に対する、CSEP 中のヒアルロン酸（QD）または処置なしと比較して示される CSEP 中のヒアルロン酸と混合した IL-1ra の 1 日に 1 回（QD）、1 日おき（Q2D）または 2 日おき（Q3D）の注射の経時的な効果を示す。

40

【図 10】図 10 は、確立された II 型コラーゲン関節炎を有するラットの最終足重量に対する、CSEP 中のヒアルロン酸（QD）または処置なしと比較して示される CSEP 中のヒアルロン酸と混合した IL-1ra の 1 日に 1 回（QD）、1 日おき（Q2D）または 2 日おき（Q3D）の注射の効果を示す。

【0190】

（配列表）

【0191】

50

【表 6】

配列表

(I) 一般的情報：

(i) 出願人：アムジェン インコーポレイテッド

(ii) 発明の名称：インターロイキン-1 インヒビターおよび制御放出ポリマーを含む組成物

(iii) 配列数：2

10

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：アムジェン インコーポレイテッド

(B) 番地：デ ハービルランド ドライブ 1840

(C) 市：サウザンド オークス

(D) 州：カリフォルニア

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：91320-1789

(v) コンピューター読み出し形態：

20

(A) 媒体型：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.30

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：US 未定

(B) 出願日：1997年2月7日

(C) 分類：

30

(vi) 先願データ：

(A) 出願番号：US 60/011,419

(B) 出願日：1996年2月9日

(vi) 先願データ：

(A) 出願番号：US 60/032,789

(B) 出願日：1996年12月6日

(vi) 先願データ：

(A) 出願番号：US (Atty Dkt# A-365B-P)

(B) 出願日：1997年1月23日

40

(viii) 代理人／事務所情報：

(A) 氏名：ジンドリック，トーマス デイー.

(B) 登録番号：32,185

(C) 照会／記録番号：A-365C

(2) 配列番号 1 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：462塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：1..462

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc feature

(B) 存在位置：1..3

(D) 他の情報：/注＝「最初のメチオニンは任意である。」

(xi) 配列：配列番号 1：

ATG CGA CCC TCT GGG AGA AAA TCC AGC AAG ATG CAA GCC TTC AGA ATC	48
Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile	
1 5 10 15	
TCG GAT GTT AAC CAG AAG ACC TTC TAT CTG AGG AAC AAC CAA CTA GTT	96
Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val	
20 25 30	
GCT GGA TAC TTG CAA GGA CCA AAT GTC AAT TTA GAA GAA AAG ATA GAT	144
Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp	
35 40 45	
GTG GTA CCC ATT GAG CCT CAT GCT CTG TTC TTG GGA ATC CAT GGA GGG	192
Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly	
50 55 60	
AAG ATG TGC CTG TCC TGT GTC AAG TCT GGT GAT GAG ACC AGA CTC CAG	240
Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln	
65 70 75 80	
CTG GAG GCA GTT AAC ATC ACT GAC CTG AGC GAG AAC AGA AAG CAG GAC	288
Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp	
85 90 95	
AAG CGC TTC GCC TTC ATC CGC TCA GAC AGT GGC CCC ACC ACC AGT TTT	336
Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe	
100 105 110	

10

20

30

40

GAG TCT GCC GCC TGC CCC GGT TGG TTC CTC TGC ACA GCG ATG GAA GCT 384
 Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
 115 120 125

GAC CAG CCC GTC AGC CTC ACC AAT ATG CCT GAC GAA GGC GTC ATG GTC 432
 Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val
 130 135 140

ACC AAA TTC TAC CTC CAG GAG GAC GAG TAG 462
 Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu *
 145 150

10

(2)配列番号2の情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 154アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: タンパク質

(ix)配列の特徴:

(xi)配列: 配列番号2:

Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile
 1 5 10 15

Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val
 20 25 30

Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp
 35 40 45

Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly
 50 55 60

Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp
 85 90 95

Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe
 100 105 110

Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
 115 120 125

Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val
 130 135 140

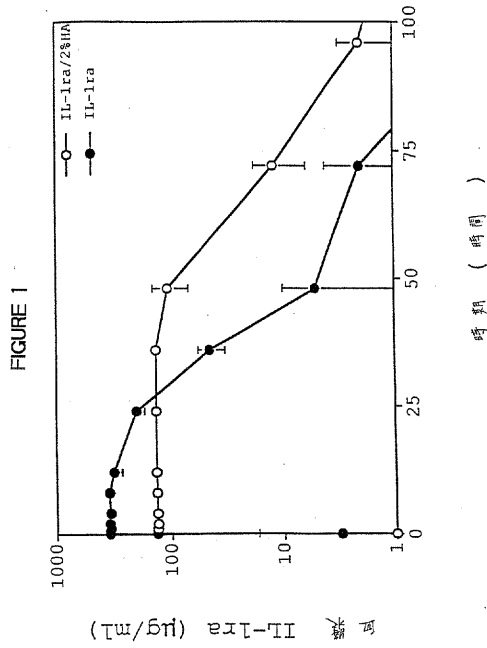
Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu *
 145 150

20

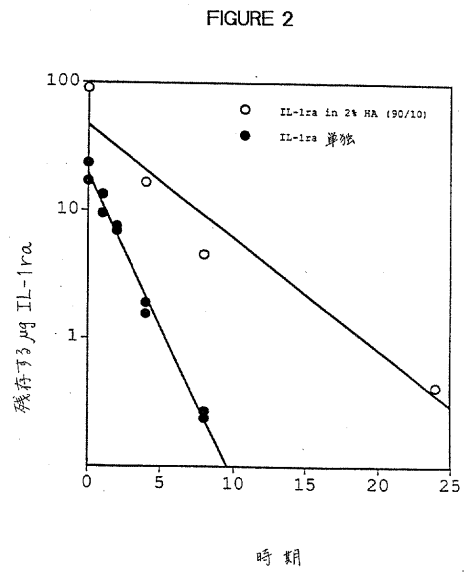
30

40

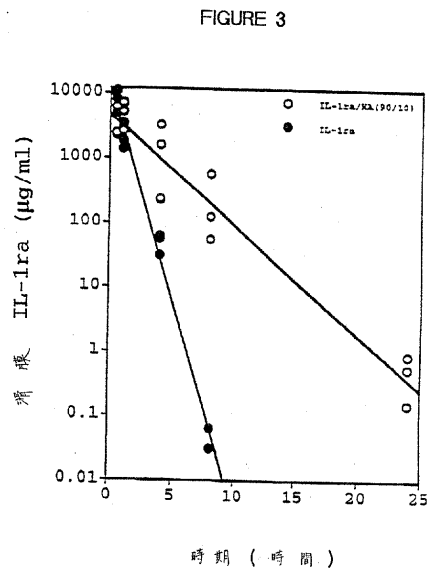
【図 1】



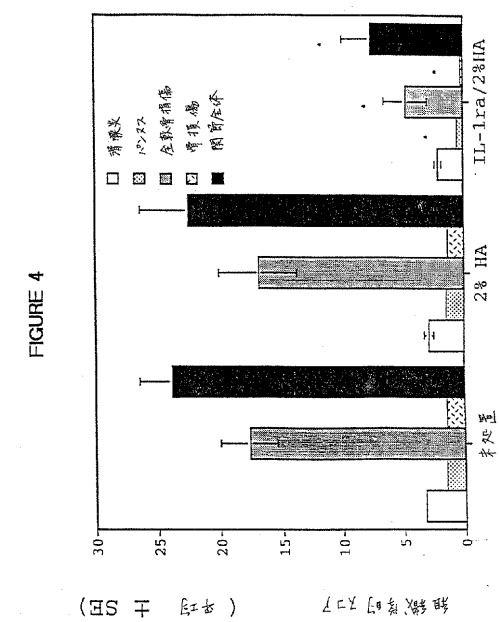
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

FIGURE 5

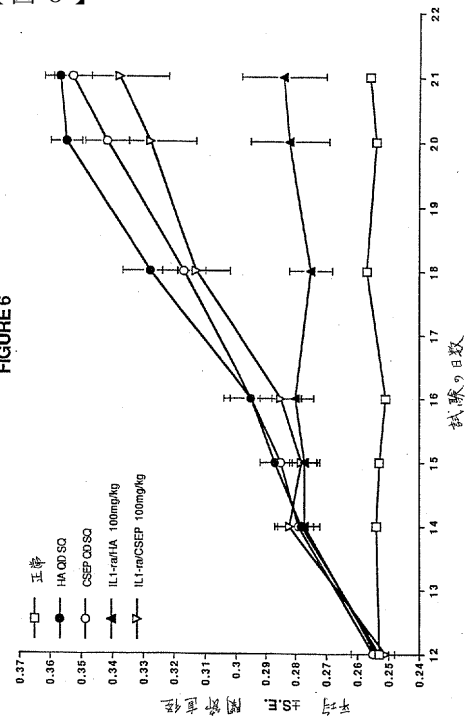
```

1  ATGCGAGCCCTCTGGGAGAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAAATCTGGGATGTTAAC  60
   M R P S G R K S S K M Q A P R I W D V N
61  CAGAAGACCTCTATCTGAGGACAAACCACTAGTTGCTGGATCTGCAAGGACCAAT
   Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G F N
121 GTCAATTAGAGAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTGTCTGGGA
   V N L E E K I D V V P I E P H A L F L G
181 ATCCATGGAGGAGAGATGCTGCTGTCTGCTCAAGTCTGCTGATGAGACGAGACTOCAG
   I H S G R K M C L S C V K S G D E T R L Q
241 CTGGAGGCAGTTAATCATCTGACCTGAGCGAGACAGAAAGCAGGACAAAGCCTTCGCC
   L E A V N I T D L S E N R K Q D K R F A
301 TTCATGCGCTCAGACAGTGGCCCAACACAGTTTGAAGTCTGCGCGCTGCGCGGTTGG
   F I R S D S G P T T S F E S A A C F G W
361 TTCTCTGTCACAGGATGGAAGCTGACCGAGCCCTCAGCCTCACCAATATGGCTGAGGAA
   F L C T A M E A D Q P V S L T N M F D E
421 GCGCTCATGCTCACCAAAATCTACTTCCAGGAGAGCAGTAG
   G V M V T K F Y F O E D E *

```

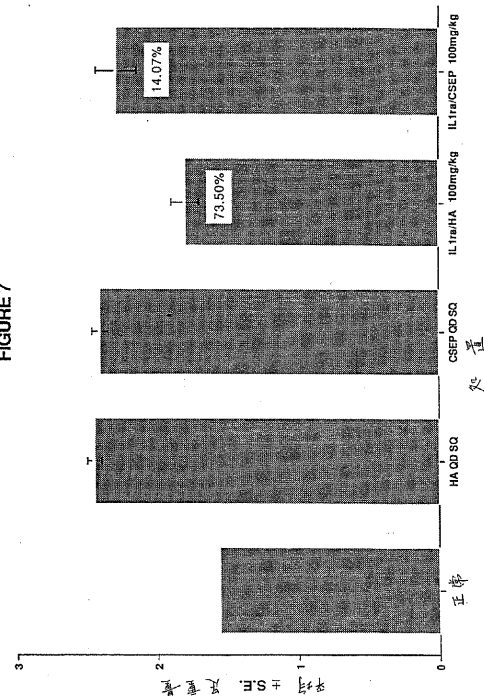
【図 6】

FIGURE 6



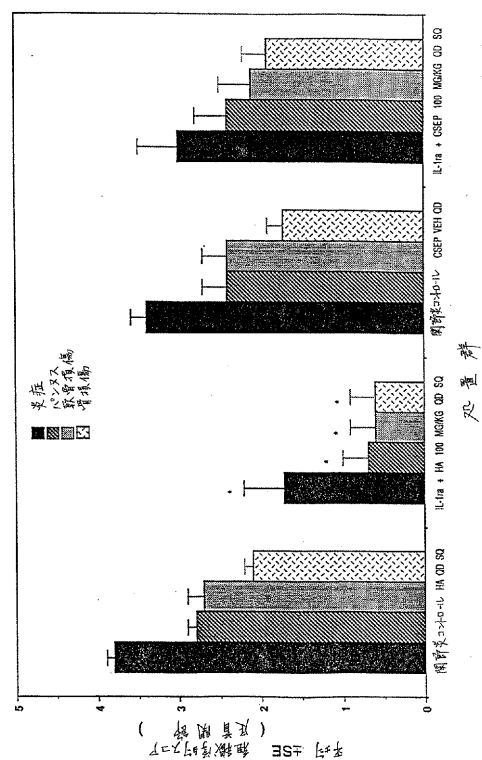
【図 7】

FIGURE 7



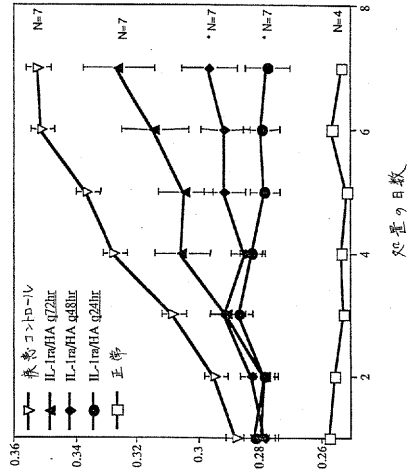
【図 8】

FIGURE 8



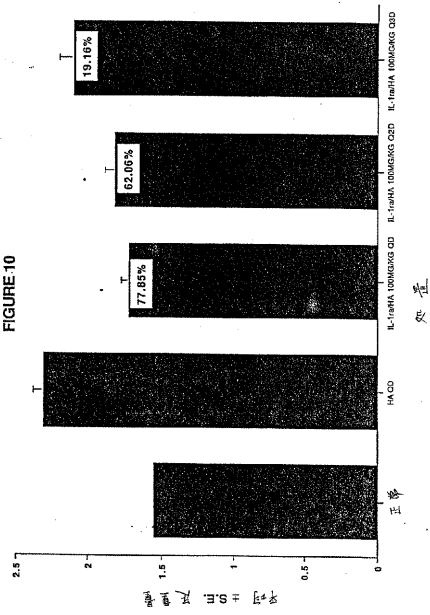
【図 9】

FIGURE 9



【図 10】

FIGURE 10



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 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/04	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
			A 6 1 P	31/04	

F ターム(参考) 4C076 AA94 CC01 CC03 CC04 CC07 CC11 CC15 CC16 CC19 CC27
 EE16 EE30 EE32 EE33 FF31
 4C084 AA02 DC50 ZA061 ZA071 ZA081 ZA151 ZA161 ZA451 ZA591 ZA661
 ZA681 ZA811 ZA891 ZA961 ZA971 ZB081 ZB151 ZB261 ZB271 ZC021
 ZC211 ZC351