

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7629394号
(P7629394)

(45)発行日 令和7年2月13日(2025.2.13)

(24)登録日 令和7年2月4日(2025.2.4)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
請求項の数 14 (全39頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-513344(P2021-513344)	(73)特許権者	514058533
(86)(22)出願日	令和1年9月10日(2019.9.10)		ヴォリューション イミュノ ファーマシ
(65)公表番号	特表2022-500389(P2022-500389		ユーティカルズ エスエイ
	A)		スイス国 1 2 1 1, ジュネーブ 3, プ
(43)公表日	令和4年1月4日(2022.1.4)		レイス デ オー ヴィヴ 6, ケイス ポ
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/074101		スタル 3 4 6 1
(87)国際公開番号	WO2020/053206	(73)特許権者	592017633
(87)国際公開日	令和2年3月19日(2020.3.19)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
審査請求日	令和4年9月1日(2022.9.1)		ション
(31)優先権主張番号	62/729,068		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
(32)優先日	平成30年9月10日(2018.9.10)		ストン フルーツ ストリート 5 5
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		(74)代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 リウマチ性疾患の治療に使用するためのコバーシン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における関節リウマチ（RA）を治療または予防するための薬剤であって、前記薬剤が融合タンパク質または該融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、前記融合タンパク質が：

a) (i) 配列番号2のアミノ酸19～168の配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含むタンパク質、または

(ii) 配列番号2のアミノ酸19～168の配列と少なくとも90%の配列同一性のアミノ酸配列を有するタンパク質の断片、

但し、前記タンパク質又は断片は、C5と結合して、C5コンバーターゼによる補体C5の補体C5aおよび補体C5bへの開裂を防止し、かつ、LTB4に結合する、および

b) PAS配列

を含み、

前記融合タンパク質は、C5と結合して、C5コンバーターゼによる補体C5の補体C5aおよび補体C5bへの開裂を防止し、かつ、LTB4に結合する、前記薬剤。

【請求項2】

RAがRFおよび／または抗CCP陽性RAである、請求項1に記載の薬剤。

【請求項3】

RAが血管炎を伴う、請求項2に記載の薬剤。

【請求項4】

融合タンパク質が、配列番号2のアミノ酸19～168の配列と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むタンパク質を含むものである、請求項1～3のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項5】

融合タンパク質が、配列番号2のアミノ酸19～168の配列を含むまたはそれからなるタンパク質を含むものである、請求項1～4のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項6】

融合タンパク質が、タンパク質の断片を含み、

前記タンパク質は、配列番号2のアミノ酸19～168の配列と少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の配列同一性のアミノ酸配列を有するか、または

前記タンパク質は、配列番号2のアミノ酸19～168の配列を含むまたはそれからなり、

前記断片は、C5と結合して、C5コンバーターゼによる補体C5の補体C5aおよび補体C5bへの開裂を防止し、かつ、LTB4に結合する、請求項1に記載の薬剤。

【請求項7】

薬剤が、皮下または滑液内に投与される、請求項1～6のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項8】

薬剤が、対象に前記薬剤の初期消散レジメン (ablating regimen) として投与され、次いで、前記薬剤の維持用量として投与され、任意選択で初回維持用量および1または2以上のさらなる維持用量がある、請求項1～7のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項9】

薬剤が、第2のリウマチ性疾患治療とともに投与される、請求項1～8のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項10】

第2のリウマチ性疾患治療が、疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD)、抗炎症剤および鎮痛剤から選択される、請求項9に記載の薬剤。

【請求項11】

(a) DMARDが、シクロスポリン、シクロホスファミド、ヒドロキシクロロキン、金塩、メトトレキサート、レフルノミド、ミコフェノレート、スルファサラジン、エタネルセプト、セルトリズマブ ペゴル、ゴリムマブ、インフリキシマブ、およびアダリムマブ、アナキンラ、リツキシマブ、およびアバタセプトから選択され、任意選択で、エタネルセプト、セルトリズマブ ペゴル、ゴリムマブ、インフリキシマブ、およびアダリムマブ、アナキンラ、リツキシマブ、およびアバタセプトから選択される、

(b) 抗炎症剤が、NSAID、もしくはグルココルチコイドである、および／または
(c) 鎮痛薬が、パラセタモール、複合鎮痛薬、およびオピオイド鎮痛薬から選択される、請求項10に記載の薬剤。

【請求項12】

前記融合タンパク質が、ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (配列番号15) ; AAPASPAAPASAPAPAAPS (配列番号16) ; APSSPSPSAPSSPSPASPS (配列番号17)、SAPSSPSPSAPSSPSPASPS (配列番号18)、SSPSAPSPSSPASPSPPA (配列番号19)、AASPAAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (配列番号20) およびASAAAPAAASAAASAPSA (配列番号21) のうちの1つの複数コピー、任意選択で、配列番号15～21のうちの1つの20～30または30コピーを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項13】

前記融合タンパク質が、(a) 配列番号15の30コピーからなるPAS配列および (b) 配列番号2のアミノ酸19～168を含み、(a) が、(b) のN末端と融合されている、請求項1～12のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 14】

前記融合タンパク質が、配列番号 22 の配列を含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リウマチ性疾患、特に関節リウマチを治療および予防する方法に関する。

【0002】

本文中に言及され、本明細書の最後に列挙される全ての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

補体

補体系は、外来侵入に対する身体の自然防御機構の必須部分であり、炎症過程にも関与している。血清中および細胞表面の 30 を超えるタンパク質が、補体系の機能および調節に関与している。最近、有益な過程および病理学的過程の両方に関連する可能性がある補体系の約 35 の公知の成分と同様に、補体系自体が、血管新生、血小板活性化と止血、グルコース代謝、および精子形成のように多様な機能を有する少なくとも 85 の生物学的経路と相互作用することが明らかになった。

【0004】

補体系は、免疫系によって非自己として認識される物質の存在によって活性化される。

(1) IgM および IgG 複合体によって、または糖質の認識によって活性化される古典的経路；(2) 非自己表面（特異的調節分子を欠如する）および細菌エンドトキシンによって活性化される代替経路；ならびに(3) 病原体表面のマンノース残基へのマンナン結合性レクチン (MBL) の結合によって活性化されるレクチン経路という 3 つの活性化経路が存在する。これら 3 つの経路は、細胞表面の類似の C3¹ コンバーターゼおよび C5 コンバーターゼの形成による補体活性化の産生をもたらす、イベントの平行するカスケードを含み、その結果、急性期炎症メディエーター (C3a および C5a) の放出および膜侵襲複合体 (MAC) の形成を生じる。古典的経路（ここでは C1q を介した古典的および MBL を介したレクチンとして定義される）および代替経路に関与する、平行するカスケードを図 1 に示す。（¹ 補体経路の成分を文字「C」に続く「3」などの数字で表し、それにより「C3」が補体タンパク質 C3 を表すようにすることが慣例である。これらの成分の一部は、補体系の活性化時に切断され、切断産物は数字の後に小文字で示される。したがって、C5 は、慣例的に C5a および C5b と呼ばれる断片に切断される。補体タンパク質は、必ずしも数字の順番で作用するわけでないので、数字は、必ずしも作用の順番を示すわけではない。この呼称の慣例が、本出願に使用される。）

【0005】

古典的補体経路、代替補体経路およびレクチン補体経路は、本明細書においてまとめて補体経路と呼ばれる。C5b は、補体活性化の「後期」または「最終」イベントを開始する。これらは、最終補体成分が相互作用して MAC を形成する一連の重合反応を含み、MAC は、一部の病原体の細胞膜に孔を開け、そのことが病原体の死をもたらすか、溶解を引き起こすことなく身体の細胞を活性化する可能性がある。最終補体成分には、C5b（膜侵襲システムの集合を開始する）、C6、C7、C8 および C9 が含まれる。

【0006】

LTB4

ロイコトリエン B4 (LTB4) は、記載された、最も強力な走化性および化学運動性エイコサノイドであり、インテグリンのアップレギュレーションを介して好中球の血管内皮への接着を促進する [1]。それは、また、好中球に関する完全な分泌促進物質であり、その凝集を誘導し、微小血管透過性を増加させる。LTB4 は、ナチュラルキラー細胞、単球および好酸球を動員および活性化する。それは、スーパーオキシドラジカルの形成

10

20

30

40

50

を増加させ [2]、組織の炎症を増強および延長するおそれがある、いくつかの炎症促進性サイトカインおよびメディエーターの産生を含む遺伝子発現をモジュレートする [3,4]。LTB4は、また、適応免疫応答の誘導および管理に役割を果たす。例えば、流入領域リンパ節への樹状細胞輸送の調節 [5,6]、肺T細胞からのTh2サイトカインIL-13の産生 [7]、抗原特異的エフェクターCD8+ T細胞の動員 [8] ならびにヒトBリンパ球の活性化および増殖 [9] である。

【0007】

LTB4およびヒドロキシエイコサノイドは、BLT1およびBLT2 Gタンパク質共役受容体を介してそれらの効果を媒介する [10,11]。ヒトBLT1は、LTB4に特異的な高親和性受容体であり (K_d 0.39~1.5 nM; [12])、競合結合研究で20-ヒドロキシLTB4および12-エピLTB4だけがLTB4と置き換わることができる [13]。ヒトBLT2は、BLT1と比べてLTB4に対して20分の1の親和性 (K_d 23 nM) を有し、12-エピLTB4、20-ヒドロキシLTB4、12 (S)-HETE、15 (S)-HETE、12 (S)-HPETEおよび15 (S)-HPETEを含む、より広い範囲のエイコサノイドと結合することによって活性化される [13]。ヒトBLT2は、ヒトおよびマウスBLT1と45.2および44.6%のアミノ酸同一性を有し、一方で、ヒトおよびマウスBLT2は、92.7%の同一性を有する [11]。

【0008】

ヒトBLT1は、内皮細胞および血管平滑筋細胞で発現すると最近記載されたものの、主として白血球の表面で発現する。ヒトBLT2は、より広い範囲の組織および細胞型で発現する。ヒト好中球の活性化、血管外遊出およびアポトーシスを阻害し [14]、炎症性関節炎 [15] および腎虚血再灌流 [16] のマウスモデルにおいて好中球浸潤によって起こる症状を軽減する、BLT1およびBLT2のいくつかの特異的なアンタゴニストが記載されている。BLT1およびBLT2の両方は、LTB4およびヒドロキシエイコサノイドを介して病的作用を媒介することができるが [17]、BLT1が、マウスにおけるコラーゲン誘発関節炎などのいくつかの病状に疑いなく優位な役割を果たすことが、ますます多くの研究によって示されている [18]。BLT1-/-欠損マウスは、また、炎症応答において好中球の遊走を方向づけることにBLT1が重要であることを強調している。特に、5LO欠損マウスシステムを使用して、好中球上のBLT1のオートクリン活性化が、関節炎を起こした関節への好中球の動員に必要であることが示された [19]。

【0009】

いくつかの市販薬が、エイコサノイドを標的とする。これらには、ホスホリパーゼA2 (PLA2) をモジュレートし、それにより、エイコサノイド前駆体であるアラキドン酸 (AA) の放出を阻害するグルココルチコイド [20] が含まれる。非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) および他のCOX2阻害剤は、プロスタグランジンおよびトロンボキサンの合成を防止する [21]。LTB4合成および他のロイコトリエンに必要な5-LOX酵素を阻害する (ジロートン; [22]) か、またはシステニルロイコトリエンの効果を媒介するCysLT1受容体と拮抗する (ザフィルルカストおよびモンテルカスト) [23] かのいずれかの、いくつかのロイコトリエン (LK) 調節物質もある。LK調節物質は、経口的に利用可能であり、例えば喘息の治療に使用するためにFDAによって承認されている。LTB4またはその受容体に特異的に作用する薬物は、まだ販売されていない。

【0010】

リウマチ性疾患

背景

リウマチ性疾患という用語には、関節および/または結合組織に影響を与える慢性で、頻繁に断続的な痛みを生じる状態が含まれる。リウマチ性疾患として記載され得る少なくとも200の異なる状態のうち、関節リウマチ (RA) は特に周知の例である。

【0011】

特定のリウマチ性疾患は、傷害または感染症によって引き起こされるが、ほとんどは自

10

20

30

40

50

己免疫によって引き起こされる状態である。このような状態には、強直性脊椎炎、再発性多発性軟骨炎、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、痛風、炎症性関節炎、偽痛風、若年性関節炎、シェーグレン症候群、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、ベーチェット病および乾癬性関節炎が含まれる。

【0012】

重症度

確立された関節炎状態の症状には、痛みおよび関節の機能の制限、例えば、関節のこわばり、腫れ、発赤、および熱感が含まれる。発疾患の全身性によって生じる、発熱、倦怠感、および肺、心臓、または腎臓などの臓器の異常からの症状に加えて、炎症を起こした関節の圧痛が存在し得る。

10

【0013】

したがって、炎症は慢性筋骨格系疾患の重要な症状の1つであり、生じた関節および筋肉の痛みが特に衰弱する可能性がある。これらの疾患の多くは慢性かつ進行性であり、長期の薬物療法を必要とする。関節に影響を与えるリウマチ性疾患の例は、多くの形態がある関節炎である。関節リウマチ（RA）は、自己免疫に起因する炎症に関連する特定の例である。

【0014】

長期的な影響があり治療法がない非常に蔓延している慢性疾患であるため、これらの状態の治療のための医療システムへの負担は信じ難いほどのものとなっている。例えば、RAは2015年の時点で約2450万人、すなわち、先進国の成人の0.5~1%に影響を及ぼしている[24]。1990年の28,000人から増加して、2013年において38,000人の死亡をもたらした[25]。

20

【0015】

関節リウマチ（RA）は、炎症性でびらん性の滑膜炎を特徴とする慢性の全身性疾患である。その病理学的診断は、滑膜細胞の過形成、充血、血管壁の肥厚、炎症細胞の浸潤、線維性組織の過形成、透明化、および変性である。滑膜の変化は、炎症性血管組織のパンヌスの形成と維持に重要な役割を果たす、新しい血管の形成（血管新生と呼ばれる）によって特徴づけられる。このパンヌスは関節軟骨を覆って侵食し、最終的に、関節破壊をもたらす。

【0016】

RAの病因は完全には理解されていないものの、影響を受けた組織の病理学的血管新生および炎症に関連する自己免疫疾患と考えられている。

30

【0017】

関節リウマチを関節炎の他の形態と区別する症状は、同時の多くの関節の炎症および軟部組織の腫れである（多発性関節炎）。関節リウマチは、痛みや関節破壊により可動性が顕著に失われる可能性がある、機能障害を引き起こす有痛性の炎症状態である。RAは全身性疾患であり、頻繁に皮膚、血管、心臓、肺、および筋肉を含む、体全体の関節外組織に影響を与える。

【0018】

関節リウマチについて、治療の基本的な目標は痛みと炎症を軽減すること；骨、軟骨、および軟組織の変形を防止すること；ならびに関節の正常な機能を維持することであり；そのことにより、患者の通常の日常活動を可能な限り長期間、維持することである。

40

【0019】

RAの薬理学的治療は、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）、抗炎症剤、鎮痛薬に分けることができる。治療の目標は、痛みや腫れなどの症状を最小限とし、骨の変形（例えば、X線で可視化できる骨の侵食）を防ぎ、日々の機能を維持することである。

【0020】

DMARDは、例えば、症状を改善し、関節損傷を減少させ、全体的な機能的能力を改善することが見出されている。抗炎症薬および鎮痛薬は痛みおよびこわばりを改善するが、関節損傷を防いだり、病気の進行を遅らせたりすることはない。

50

【0021】

D M A R Dの例には、従来の低分子（シクロスポリン、シクロホスファミド、ヒドロキシシクロロキン、金塩メトトレキサート、レフルノミド、メトトレキサート（MTX）、ミコフェノールート、およびスルファサラジン）、ならびに、例えば遺伝子組換えにより製造された、免疫調整特性を有する生物学的薬剤、例えば：腫瘍壊死因子アルファ（TNFα）ブロッカー（エタネルセプト、セルトリズマブ ペゴル、ゴリムマブ、インフリキシマブ、およびアダリムマブ）、インターロイキン-1ブロッカー（アナキンラ）、抗B細胞（CD20）抗体（リツキシマブ）、およびT細胞活性化のブロッカー（アバタセプト）が含まれる。

【0022】

治療用の抗炎症剤には、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID、ほとんどが鎮痛薬としても作用する）およびグルココルチコイドが含まれる。

【0023】

NSAIDは、シクロオキシゲナーゼ（COX）を阻害し、したがって、炎症および痛みの中心的な役割を果たす、プロスタグランジン（PG）の産生を抑制することにより、疾患の初期段階で炎症と痛みを軽減する。NSAIDは関節炎の症状を治療することができるが、病気の進行を防ぐ効果はほとんどない。例としては、アセメタシン、ジクロフェナク、イブプロフェン、インドメタシン、メロキシカム、ケトプロフェン、スリンダク、オーラノフィン、ナプロキセン、ナブメトン、ピロキシカム、メコルフェナミン酸、クロフェナミン酸、メフェナミン酸、ピルプロフェン、フェンブフェン、トルメチン、フルフェナミド酸、フェノプロフェン、メトカルバモール、およびニメスリドが挙げられる。NSAIDは、COX-IおよびCOX-2生成物の生産の阻害に起因する悪影響を引き起こす可能性がある（例えば、胃腸複合症候群、胃のむかつき、腹痛、潰瘍、胃腸出血、ならびに腎臓、肝臓、および血液系の損傷）。

【0024】

コルチコステロイド（コルチゾンやプレドニゾンなどのグルココルチコイド）は効果的な免疫抑制剤であるが、やはり関節炎を治癒することはできない。それらの副作用（感染の増加、骨粗鬆症、および副腎皮質の機能不全を含む）は、投与量および治療の長さが増加するにつれて増加するため、長期薬物療法としての使用には勧められない。

【0025】

鎮痛剤は、関節炎による痛みを治療するために一般的に使用される。それらには、パラセタモール、複合鎮痛薬、およびオピオイド鎮痛薬が含まれる。

【0026】

D M A R DはRAの症状を改善できるが、このクラスの薬は多くの深刻な副作用を有し、患者には許容できない可能性がある。一部の患者における有効性の欠如、非忍容性、および再発性の二次感染は、新しい治療法の開発の必要性を促している要因である。関節リウマチの治療は依然として満たされない臨床的要求であり、関節リウマチ患者の約20～40%が、現在利用可能な治療法のいずれにも適切に反応していない。

【0027】

補体阻害剤

WO2004/106369（Evolutec Limited [26]）は、補体阻害剤に関する。開示される補体阻害剤の特定のサブセットは、C5に方向づけられ、補体活性化経路のいずれかによりC5がC5aおよびC5bに開裂されるのを防止する。このようなC5開裂阻害剤の特定の例は、Ornithodoros moubata種のマダニによって産生されるタンパク質であり、その成熟型は、WO2004/106369の図4に示されるアミノ酸配列のアミノ酸19～168からなるタンパク質である（配列番号2）。その成熟型のアミノ酸配列は、配列番号4に示される。WO2004/106369において、このタンパク質は、名称「EV576」および「OmCIタンパク質」として知られており、より最近には、「コバーシン（Coversin）」として知られている[27]。2019年に、コバーシンは、世界保健機関によって国際一般名として承認

10

20

30

40

50

された後、「ノマコパン (nomacopan)」と名称変更された。このタンパク質は、本明細書において「コバーシン」と称される。

【0028】

マダニにおいて、コバーシンは、成熟コバーシンタンパク質のN末端に、WO2004/106369の図4に示されるアミノ酸配列のアミノ酸1～18を含むリーダー配列を有するプレタンパク質として発現する（配列番号2）。リーダー配列は、発現後に開裂除去される。成熟タンパク質は、WO2004/106369の図4および本出願の図2Aに示されるアミノ酸配列のアミノ酸19～168からなる配列を有する（配列番号2）。その成熟型のアミノ酸配列は、配列番号4に示される。

【0029】

コバーシンは、また、ロイコトリエンB4 (LTB4) 活性を阻害する能力を有する。LTB4と結合する能力は、当技術分野において公知の標準的な *in vitro* アッセイによって、例えば、標識LTB4への結合をめぐって競合するコバーシンと抗LTB4抗体との間の競合ELISAによって、等温滴定熱量測定によって、または蛍光滴定によって、実証される場合がある。

【0030】

WO2007/028968、WO2008/029167、WO2008/029169、WO2011/083317およびWO2016/198133などの、様々な応用におけるコバーシンまたはその機能的等価物の使用に関する、いくつかのさらなる特許出願がある。これらの応用については、RAなどのリウマチ性疾患の治療におけるコバーシンまたはその機能的等価物の有効性を確認する実験的証拠はない。

【0031】

本発明に至る研究において、LTB4に結合し、C5に結合することによって補体経路も阻害する分子コバーシンは、上に議論したように、RAのマウスモデルにおける関節炎の発症を予防し、同モデルにおける確立された関節炎疾患を改善することが示されている。コバーシンは、補体（C5を阻害することにより）およびLTB4の両方を阻害する能力を有するため、特に、単独または他の治療法と組合せにおけるRAなどのリウマチ性疾患の予防および治療において有利である。K/BxN血清トランスファーマウスモデルにおいて、LTB4またはC5aのいずれかのみを阻害すると、関節炎の発症を完全に予防できることが以前から知られていた。同じモデルにおいて、LTB4を阻害すると、確立された関節炎疾患を改善する能力を発揮する。したがって、本研究以前には、C5活性化とLTB4の併用阻害は、治療モデルにおいてLTB4阻害単独と同程度の効果のみだと予想されていた。しかし、予期せぬことに、コバーシンによるC5とLTB4の併用阻害は、治療モデルにおいてLTB4阻害単独よりもはるかに効果的であることが証明された。

【発明の概要】

【0032】

コバーシンは、RAのマウスモデルで関節炎の発症を予防し、同モデルにおいて確立された関節炎疾患を改善することが示された。コバーシンは、補体（C5を阻害することにより）およびLTB4の両方を阻害する能力を有するため、特に、単独または他の治療法との組合せにおけるRAなどのリウマチ性疾患の予防および治療において有利である。実施例1において、疾患の誘発とのコバーシンの投与は、関節炎の発症を完全に予防することが示された。このモデルにおいて、ジロートンは関節炎の発症を部分的にしか改善しないため、ジロートンと比較すると、コバーシンの投与では、より大きな効果が観察され得る。したがって、コバーシンは、このマウスモデルにおける関節炎の発症の予防において、LTB4阻害剤（ジロートン）よりも効果的であるようである。本発明の背景に記したように、ジロートンは、LTB4、およびそのいくつかは抗炎症性である可能性がある他のLKの合成を阻害する。

【0033】

疾患誘発後のコバーシンの投与は、確立された関節炎疾患を改善することも示された（実施例2）。この実験の結果は、C5およびLTB4の両方を標的とするコバーシンの

10

20

30

40

50

二重阻害活性が、関節炎の治療において特に有利であるように見えることを示しているため、特に興味深い。

【0034】

これらの実験では、C5結合活性は低下しているか存在しないが、LTB4結合能力は保持している改変コバシンポリペプチドをコバシンと比較した。この分子（L-コバシンと称される）は、確立された関節炎疾患の改善においてジロートンよりも効果的であったが、コバシンよりも効果が低く、RAなどのリウマチ性疾患の治療におけるコバシンの利点を強調している。

【0035】

したがって、本発明者らは、マダニタンパク質コバシン（当技術分野および本明細書においてEV576およびOmCIとも称される[26]）の投与が、リウマチ性疾患を治療または予防するために使用できることを実証した。

【0036】

したがって、本発明は、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤の治療または予防有効量を投与することを含む、リウマチ性疾患を治療または予防する方法を提供する。

【0037】

本発明は、また、リウマチ性疾患を治療または予防する方法における使用のための、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤を提供する。

【0038】

本発明は、また、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物をコードする核酸分子である薬剤の治療または予防有効量を投与することを含む、リウマチ性疾患を治療または予防する方法を提供する。

【0039】

本発明は、また、リウマチ性疾患を治療または予防する方法における使用のための、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物をコードする核酸分子である薬剤を提供する。

【0040】

本発明は、また、（a）図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤の治療または予防有効量、および（b）第2のリウマチ性疾患治療を投与することを含む、リウマチ性疾患を治療または予防する方法を提供する。

【0041】

本発明は、また、リウマチ性疾患を治療または予防する方法における使用のための、（a）図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤、および（b）第2のリウマチ性疾患治療を提供する。

【0042】

本発明は、また、（a）図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物をコードする核酸分子である薬剤の治療または予防有効量、および（b）第2のリウマチ性疾患治療を投与することを含む、リウマチ性疾患を治療または予防する方法を提供する。

【0043】

本発明は、また、リウマチ性疾患を治療または予防する方法における使用のための、（a）図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物をコードする核酸分子である薬剤、および（b）第2のリウマチ性疾患治療を提供する。

【0044】

10

20

30

40

50

本発明は、また、リウマチ性疾患を治療もしくは予防するために必要とされる第2のリウマチ性疾患治療の量を減少させる、またはリウマチ性疾患を治療もしくは予防するために必要とされる第2のリウマチ性疾患治療による治療期間を減少させる方法であって、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質もしくはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤または前記薬剤をコードする核酸分子の治療または予防有効量および前記第2のリウマチ性疾患治療を投与することを含む方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0045】

疾患

対象は、リウマチ性疾患に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、または発症するリスクがあってもよい。一実施形態では、リウマチ性疾患は、そのサブタイプを含む関節炎である。一実施形態では、リウマチ性疾患は、自己免疫性リウマチ性疾患である。自己免疫性リウマチ性疾患の例には、強直性脊椎炎、再発性多発性軟骨炎、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、痛風、炎症性関節炎、偽痛風、若年性関節炎、シェーグレン症候群、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、ベーチェット病および乾癬性関節炎が含まれる。特定の実施形態では、リウマチ性疾患はRAである。他の実施形態では、RAは血管炎に関連している。

【0046】

関節炎のサブタイプには、変形性関節症、痛風（または痛風性関節炎）、RA、乾癬性関節炎、若年性関節リウマチ、若年性特発性関節炎、およびリウマチ性多発筋痛が含まれる。関節炎財団<https://www.arthritis.org/about-arthritis/types/>による関節炎のタイプのリストを以下に示す：

【0047】

10

20

30

40

50

【表 1】

成人発症ステイル病	
強直性脊椎炎	
背中の痛み	
ベーチェット病	
滑液包炎	
ピロリン酸カルシウム沈着症(CPPD)	
手根管症候群	
膝蓋軟骨軟化症	
慢性疲労症候群	
複合性局所疼痛症候群	
クリオピリン関連周期症候群(CAPS)	10
椎間板変性症	
発達性股関節形成不全	
びまん性特発性骨格骨粗鬆症	
エーラス・ダンロス	
家族性地中海熱	
線維筋痛症	
伝染性紅斑	
巨細胞性動脈炎	
痛風	
多発血管性肉芽腫症	
ヘモクロマトーシス	
感染性関節炎	
炎症性関節炎	20
炎症性腸疾患	
若年性関節炎	
若年性皮膚筋炎(JD)	
若年性特発性関節炎(JIA)	
若年性強皮症	
川崎病	
ループス	
子供および10代のループス	
ライム病	
混合性結合組織病	
筋炎(多発性筋炎、皮膚筋炎を含む)	
変形性関節症	
骨粗鬆症	30
パジエット	
パリンδροーム性リウマチ	
膝蓋大腿痛症候群	
小児リウマチ性疾患	
小児SLE	
リウマチ性多発筋痛	
偽痛風	
乾癬性関節炎	
レイノー現象	
反応性関節炎	
反射性交感神経性ジストロフィー	
ライター症候群	40

リウマチ熱
 リウマチ
 関節リウマチ
 強皮症
 シェーグレン病
 脊柱管狭窄症
 脊椎関節炎
 全身性若年性特発性関節炎
 全身性エリテマトーデス
 子供および10代の全身性エリテマトーデス
 全身性硬化症
 側頭動脈炎
 腱炎
 血管炎

10

【0048】

RAは好ましい疾患である。

【0049】

これらの疾患の存在は、当該技術分野でよく理解されている日常的な診断によって決定することができる。特定の状態の重症度もまた、スコアリング可能であり、特定の治療が効果的か否かを評価することに役立つ。

20

【0050】

例えば、RAについては、臨床スコアリングは、American College of Rheumatology (ACR) によって確立された基準などの臨床的に認められた基準を使用して行われてもよい。一例は、治療後の改善の量の測定を可能にするACRスコアである (<https://www.rheumatoidarthritis.org/treatment/acr-score/>)。ACRスコアは、様々な要因を考慮して、患者の関節リウマチで起きた改善の量を評価するスコアを作成する。ACR基準はまた、圧痛および有痛性の関節数の改善、ならびに以下のパラメーターの5つのうち3つにおける改善を評価して、確立する。(1) 炎症－赤血球沈降速度 (ESR) またはC反応性タンパク質 (CRP) のいずれかを測定する臨床検査で、関節の炎症の量が決定される。(2) 患者の評価－患者は進行状況について自分自身による評価を説明し、決定する。(3) 医師の評価－医師は患者の進行状況を説明し、決定する。(4) 痛みの尺度－患者が日常的に自分の関節にどれだけ痛みを感じるか。(5) 障害／機能性質問票－患者が日常の活動を完結させるために自分の関節をどれだけ容易に使用できるか。

30

【0051】

ACR20のスコアは、その患者の圧痛および有痛性の関節数が20%改善し、上記5つのパラメーターのうち3つを20%改善したことを意味する。ACR20は、20%の改善を28段階で評価する。ACR50およびACR70は、50%および70%の改善に相当する。

40

【0052】

代替法としては、疾患活動性スコア28関節数 (Disease Activity Score 28-joint count; DAS28) がある。一実施形態では、DAS28スコアが5.1を超えると重度、3.2から5.1までは中等症とみなされ、スコアが2.6未満の患者は寛解していると定義される。さらに、治療後のDAS28スコアの減少が0.6以下の場合には反応不良を示すものとみなされ、1.2ポイントを超える減少は、エンドポイントでの個人のDAS28スコアがそれぞれ3.2より上または下であるかによって、中等度のまたは良好な反応を示す。

【0053】

50

さらなる代替法は、臨床疾患活動性インデックス（Clinical Disease Activity Index；CDAI）である。CDAIスコアが10超から22未満では中等度とみなされ、CDAIスコアが22超では重度とみなされ、CDAIが2.8超および10未満では低疾患活動性とみなされ、CDAIが2.8未満では寛解とみなされる。6.5のCDAIの減少は、中等度の改善を表す。さらなる代替的实施形態では、1から3のRAPID3〔28〕スコアは、ほぼ寛解を示し、4から6のスコアは、低重症度を示し、7から12のスコアは中等度とみなされ、13から30のRAPID3スコアは、重度とみなされる。

【0054】

リウマチ性疾患を発症するリスクのある対象は、リウマチ性疾患またはその症状を予防するために、本明細書で言及される薬剤の投与から利益を得る可能性がある。特定のリウマチ性疾患のリスク因子は、以下の表2に記載され、より詳細には〔29〕で議論されている。

【0055】

10

20

30

40

50

【表 2】

疾患	宿主/環境危険因子	遺伝子
関節リウマチ	ダイエット(カフェインおよび地中海ダイエット) 喫煙 ホルモン	<i>PTPN22</i> <i>PADI4</i> <i>CTLA4</i> <i>FCRL3</i> <i>MHC2A</i> <i>HLA DRB1</i>
若年性特発性関節炎		マクロファージ阻害因子(<i>MIF</i>) <i>PTPN22</i> <i>NRAMP1</i> <i>IL-6</i>
乾癬性関節炎	風疹ワクチン接種 医療相談が必要な障害 再発性口内炎 引越し コルチコステロイド 妊娠	<i>CARD15</i> <i>MICA</i> <i>TNF</i> <i>IL</i>
強直性脊椎炎		<i>ARTS1</i> <i>IL-23R</i> <i>IL-1</i> 遺伝子クラスター シトクロム P450 2D6(<i>CYP2D6</i>)遺伝子
全身性エリテマトーデス	母乳育児 初期の自然閉経 口紅	<i>MHC</i> <i>ITGAM</i> <i>IRF5</i> <i>BLK</i> <i>STAT4</i> <i>PTPN22</i> <i>FCGR2A</i>
強皮症	シリカまたは有機溶剤への曝露	家族性リスク <i>HLA-DQA1</i> フィブリリン-1 SNP ハプロタイプ <i>TGF-β</i> <i>CTGF</i> 胎児のマイクロメリズム
変形性関節症	肥満/肥満度指数 身体活動 握力 以前の傷害	<i>IL-1</i> 遺伝子クラスター Frizzled-関連タンパク質-3(<i>FRZB</i>)遺伝子 マトリリン-3 遺伝子 <i>IL-4</i> 受容体 メタロプロテイナーゼ遺伝子 <i>ADAM12</i> アスボリン(<i>ASPN</i>)遺伝子 エストロゲン受容体
痛風	高プリン食 乳製品 高血圧 医薬剤	<i>TNF-α</i> プロモーター
線維筋痛症および慢性的な広範囲の痛み	身体的外傷 身体外傷 健康を求める行動 睡眠不足	セロトニントランスポーター 遺伝子 家族性リスク <i>COMT</i>

【0056】

リウマチ性疾患の治療または予防の観点から、これらのリスク因子の1つまたは複数を有する対象が好ましい。

【0057】

いくつかの実施形態では、対象は、これらのリスク因子のうちの1つまたは複数を有してもよいが、臨床症状を示していなくてもよい。いくつかの実施形態では、対象は、状態、例えばRAのエフェクターフェーズにあり得る。そのような対象において、RAに関連する1つまたは複数の自己抗体は、前記対象において、例えば疾患進捗のリスクを示すレベルで検出され得る。RAのK/B x Nマウスモデルは、RAのエフェクターフェーズの

モデルであり、このフェーズには自己抗体の関与がある。理論に拘束されないが、コバージョンは、自己抗体が存在する場合、またはリウマチ性疾患が自己抗体によって引き起こされ続ける場合の治療に特に効果的である可能性がある。特定の実施形態では、任意の治療方法は、自己抗体の存在に基づく治療について対象を選択するステップをさらに含み得る。

【0058】

RA

特定の実施形態では、リウマチ性疾患はRAである。RA対象は、血清陽性または血清陰性であり得る（検出可能なリウマチ因子（RF）、例えば、凝集反応または腎測定によって決定することができる、ヒトIgGのFc部分に対する抗体の有無による）。シトルリン化アルギニン残基を含む特定のペプチドに対する抗体（抗シトルリン化タンパク質抗体（ACPA））を含む、RAへの特異性を持つ他の抗体も公知である。RA対象は、環状シトルリン化ペプチド（CCP）に対する自己抗体を、追加的または代替的に有し得る（市販の試験を使用して検出することができる）。ACPAにより、非常に早い段階で関節リウマチ（RA）を診断することができ、ACPAテストは、関節リウマチの2010ACR-EULAR分類基準の一部を形成している。

【0059】

したがって、RAは、自己抗体駆動RAと説明してもよく、特に、対象は、RF陽性および／または抗CCP（またはACPA）陽性であり得る。特定の実施形態では、任意の治療方法は、RFおよび／または抗CCP自己抗体（またはACPA）の存在に基づく治療について対象を選択するステップをさらに含んでもよい。

【0060】

血管炎

さらなる実施形態では、RA対象は、RAに関連する血管炎、例えばリウマチ性血管炎、例えば全身性血管炎を有していてもよい。「血管炎」という用語は、血管が炎症状態にあることを示す。血管炎の結果は、関与する血管のサイズ、部位、および数に依存している。血管が供給する組織の梗塞は、小または中サイズの動脈が関与している場合に発生する可能性がある（例えば、冠状動脈血管炎は心臓発作を引き起こす可能性がある）が、毛細血管のような非常に細い血管が関与している場合には、影響はそれほど深刻ではない。例外は、腎臓で発生して糸球体腎炎を引き起こす可能性があるような、広範囲の局所血管炎である。

【0061】

血管炎は、関節リウマチの合併症、例えば小血管炎（例えば、小動脈および細動脈に関与する）として発生する可能性がある。血管炎はまた、関節リウマチで説明されている関節外（「関節の外側」を意味する）症状のほとんどに関連している。これらには、目の炎症（虹彩炎）、心臓と肺の内層の炎症（心膜炎と胸膜炎）、および肺の基部の炎症（線維性肺炎）および心臓ブロックを含む不整脈を含む他の肺と心臓の症状が含まれる。全身性血管炎の対象は通常、血中に高レベルのRFを有する。

【0062】

全身性血管炎はまれであるが、深刻な関節リウマチの合併症であり、この疾患の最も深刻な関節外事象の1つとみなされ得る。例として、中型の動脈および毛細血管の炎症を特徴とするリウマチ性血管炎（RV）は重度であり、血管炎による損傷および／または免疫抑制療法の帰結により、患者の最大40%が5年以内に死亡する。RVは依然として治療が困難であり、高い死亡率を伴う。

【0063】

対象は、以前に1つまたは複数の他のリウマチ性疾患治療（例えば、上で議論した1つまたは複数の治療またはDMARD）で治療されていてもよい。いくつかの実施形態では、以前の治療は、効果的ではなかったか、効果的ではなくなったか、または1つまたは複数の有害事象のために中止された。1つのリウマチ性疾患の治療を中止することは、特にTNF阻害剤においては、比較的一般的である。したがって、特定の実施形態では、対象は以前に1つまたは複数のTNF阻害剤で治療されている。特定の実施形態では、そのよ

うな治療は、効力の欠如または有害作用のために中止された。効力の欠如は、本明細書の他の場所で議論されるように評価され得る。有害作用の例には、咳、頭痛、胸焼け、吐き気または嘔吐、腹痛、脱力感、重篤なアレルギー反応、感染症、癌、例えば腫瘍の発症などが含まれる。

【0064】

タイミング

診断後または発病後の早期に治療を開始することが有利であり得る。本発明の好ましい実施形態では、対象における本発明によるリウマチ性疾患の治療は、最初の診断から約6カ月以内、最初の診断から約12カ月以内、最初の診断から約18カ月以内、最初の診断から約2年以内、最初の診断から約3年以内、最初の診断から約4年以内、最初の診断から約5年以内に開始される。

10

【0065】

本発明の好ましい実施形態では、対象における本発明によるリウマチ性疾患の治療は、約6カ月以下の罹病期間、約12カ月以下の罹病期間、約18カ月以下の罹病期間、約2年以下の罹病期間、約3年以下の罹病期間、約4年以下の罹病期間、約5年以下の罹病期間を有する対象におけるものである。

【0066】

通常、リウマチ性疾患の治療は、疾患の急性期の期間の対象におけるものである。関節リウマチの文脈における「急性期」という用語は、軽度または中等度の炎症のみと異なり、1つまたは複数の関節の重大な炎症を経験している患者を意味すると解釈されるものとする。急性期は、当該技術分野において、「フレア」とも称される。

20

【0067】

投与成績

対象は、治療の結果として、症状の発生率の減少、症状の軽減、症状の発生もしくは再発の阻害もしくは遅延、またはその組合せを有する場合がある。好ましくは、治療は、典型的な疾患状態の症状の軽減をもたらす。例えば、これは、炎症または腫れの量、関節のサイズ、影響を受ける関節の数、もしくは痛みの量の減少、または再発までの間隔の長期化に現れる可能性がある。また、発熱および／または重症度および／または痛む箇所の数が減少する可能性がある。一部の対象は症状が完全に解消し、それ以上再発しない場合がある。

30

【0068】

治療の結果として、対象は、例えば上に引用した方法の1つを使用する臨床スコアの改善を示す場合がある。例えば、対象は、治療後に寛解しているとみなされる場合があるか、または特定の治療期間後に症状の改善を示すスコアを有する場合がある。対象がDAS28、CDAIまたはRAPID3によってスコア付けされるリウマチ性疾患、例えばRAを有する場合、治療は、一実施形態では、DAS28スコア、CDAIまたはRAPID3の改善をもたらす可能性がある。対象は、治療過程の後に、少なくとも0.8または1.0または1.2ポイントのDAS28の減少を有する（好ましくは、エンドポイントでの対象のDAS28スコアが3.2未満である）場合がある。対象は、治療過程の後に、少なくとも6.5のCDAIの減少を有する場合がある。さらなる代替の実施形態では、対象は、治療過程の後に、6未満のRAPID3スコアを有する場合がある。

40

【0069】

換言すれば、対象は、治療過程の後に、ACR20、ACR50またはACR70のスコアを有する場合がある。

【0070】

急性関節リウマチを診断するための方法は当該技術分野で公知であり、赤血球沈降速度（ESR）および／または血清C反応性タンパク質（CRP）レベルの分析を含んでもよく、ここで、例えば50以上のESRは急性とみなされる。対象が急性RAを有する場合、治療は、赤血球沈降速度（ESR）および／または血清C反応性タンパク質（CRP）レベルの減少をもたらす可能性がある。

50

【0071】

対象がRVを有する場合、治療は、上記のような改善および／またはRVの臨床症状（皮膚潰瘍、末梢壊疽、血管神経障害、炎症性眼疾患および内臓梗塞を含む、すなわち、これらの臨床症状の1つもしくは複数が減少するおよび／またはその重症度が減少する可能性がある）の改善をもたらす可能性がある。

【0072】

治療はまた、必要とされる第2のリウマチ性疾患治療の量または期間の減少をもたらす可能性がある。

【0073】

したがって、本発明のさらなる実施形態では、リウマチ性疾患を有する対象における臨床スコアを減少させるか、またはリウマチ性疾患を有する対象における関節炎症を軽減するか、またはリウマチ性疾患を有する対象における関節のこわばりを軽減する方法であって、図2のアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19から168を含むタンパク質もしくはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤、または前記薬剤をコードする核酸分子の治療または予防有効量を投与することを含む方法が提供される。これは、単独であってもよいし、または第2のリウマチ性疾患の治療を伴ってもよい。

【0074】

本発明はまた、図2のアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19から168を含むタンパク質、またはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤、前記薬剤をコードする核酸分子を、リウマチ性疾患を有する対象の臨床スコアを低減させる方法、またはリウマチ性疾患を有する対象の関節炎症を低減する方法、またはリウマチ性疾患を有する対象の関節のこわばりを低減する方法において使用するために提供する。これは、単独であってもよいし、または第2のリウマチ性疾患の治療を伴ってもよい。

【0075】

本発明の薬剤は、上述のように、他のリウマチ性疾患治療と組み合わせて使用することができる。本発明の薬剤と他の（本明細書において「第2の」と称される）リウマチ性疾患治療との組合せは、本発明の薬剤による治療の非存在下で使用される量と比較して、第2のリウマチ性疾患薬剤の量が減少するか、または、本発明の薬剤による治療の非存在下で使用される治療期間と比較して、第2のリウマチ性疾患薬剤による治療の期間が減少するようなものであり得る。これは、特定の公知の治療法の副作用を考慮すると有利である。したがって、治療に使用される第2のリウマチ性疾患治療の量を減少させる方法、または第2のリウマチ性疾患治療による治療の期間を減少させる方法もまた、提供される。

【0076】

好ましくは、第2のリウマチ性疾患治療は、DMARD（例えば、シクロスポリン、シクロホスファミド、ヒドロキシクロロキン、金塩、メトトレキサート、レフルノミド、ミコフェノレート、スルファサラジン、エタネルセプト、セルトリズマブ、ペゴル、ゴリムマブ、インフリキシマブ、およびアダリムマブ、アナキンラ、リツキシマブ、およびアバタセプトの1つまたは複数）、抗炎症剤（例えば、NSAID、またはグルココルチコイド）および鎮痛薬（例えば、パラセタモール、複合鎮痛薬およびオピオド鎮痛薬から選択される）から選択される。

【0077】

本発明の薬剤および第2のリウマチ性疾患治療が使用される場合、それらは一緒にまたは別々に投与され得る。本発明の薬剤は、最初に投与される場合があり、第2のリウマチ性疾患治療が2番目に投与される場合があるか、またはその逆である。

【0078】

したがって、例えば上記の方法において、本発明の薬剤が1つまたは複数の他のリウマチ性疾患治療と組み合わせて使用される場合、これは、第2のリウマチ性疾患治療によりリウマチ性疾患を治療もしくは予防する方法における使用のための、または図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質もしくはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤によりリウマチ性疾患を治療もしくは予防する方法にお

10

20

30

40

50

ける使用のための第2のリウマチ性疾患治療としての、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはこのタンパク質の機能的等価物である薬剤として記載することができる。

【0079】

治療が、第2のリウマチ性疾患治療の量、または治療期間における減少を生じる場合、減少は、本発明の薬剤の非存在下で使用される第2の治療の量と比較して、最大または少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80%であり得る。

【0080】

対象

好ましい対象、薬剤、用量およびその他は、本明細書に開示される通りである。

10

【0081】

任意の減少または増加への任意の参照は、処置の非存在下での前記対象と比較される疾患パラメーターにおける減少または増加である。好ましくは、パラメーターは、定量でき、この場合、増加または減少は、好ましくは統計的に有意である。例えば増加または減少は、治療の非存在下（例えば、前記治療が開始される前）のパラメーターと比較して、少なくとも3、5、10、15、20、30、40、50%またはそれよりも大きい場合がある。

【0082】

本発明の実施において薬剤が投与される対象は、好ましくは哺乳動物であり、好ましくはヒトである。薬剤が投与される対象は、リウマチ性疾患のリスクがある、またはリウマチ性疾患を有する対象である。

20

【0083】

本発明の方法は、また、（i）対象がリウマチ性疾患のリスクがあるまたはリウマチ性疾患を有するかどうかを判定すること、（ii）コバーシンの投与前および／または後に実施され得る、リウマチ性疾患の重症度を決定することの、1つまたは複数の追加的なステップを含む場合がある。

【0084】

本発明に使用すべき薬剤

本発明の一実施形態によると、薬剤は、コバーシン自体またはその機能的等価物である。以下において、「コバーシン型タンパク質」という用語は、「図2に示されるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168を含むタンパク質またはその機能的等価物」についての略記として使用される。

30

【0085】

コバーシンは、マダニ *Ornithodoros moubata* の唾液腺から単離された。コバーシンは、リポカリンファミリーの遠いメンバーであり、補体活性化を阻害することが示された最初のリポカリンファミリーのメンバーである。コバーシンは、C5に結合し、C5コンバーターゼによるC5のC5aおよびC5bへの開裂を防止することによって、古典的補体経路、第二補体経路、およびレクチン補体経路を阻害することで、活性（例えば炎症促進性）ペプチドであるC5aの産生およびMACの形成の両方を阻害する。コバーシンは、ラット、マウスおよびヒト血清中でC5に結合し、C5コンバーターゼによるC5の開裂を約0.02mg/mlのIC50で防止することが実証されている。

40

【0086】

したがって、コバーシン型タンパク質は、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸19～168または図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸1～168を含むまたはそれからなる場合がある。図2に示されるタンパク質配列の最初の18アミノ酸は、C5の結合またはLTB4結合活性に必要とされないシグナル配列を形成するので、これは、必要に応じて、例えば組換えタンパク質産生の効率のために、省かれる場合がある。

【0087】

コバーシンタンパク質は、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用して決定された1nM

50

のK_dでC5に結合することが実証されている[30]。コバーシン型ペプチド（例えば、コバーシタンパク質の機能的等価物）は、好ましくは、好都合には360nM未満、より好都合には300nM未満、最も好都合には250nM未満、好ましくは200nM未満、より好ましくは150nM未満、最も好ましくは100nM未満、さらにより好ましくは50、40、30、20、または10nM未満、有利には5nM未満のK_dでC5と結合する能力を保持し、その際、前記K_dは、好ましくは[30]に記載された方法により、表面プラズモン共鳴を使用して決定される。

【0088】

コバーシンは、古典的補体経路、第二補体経路およびレクチン補体経路を阻害する。好ましくは、コバーシン型タンパク質は、C5の全体的コンフォメーションを安定化するが、3つの活性化経路のC5コンバーターゼによって標的化されるC5開裂部位を直接には遮断しないように、C5に結合する。C5へのコバーシンの結合は、C5の全体的コンフォメーションの安定化を招くが、コンバーターゼ開裂部位を遮断しない。コバーシンの機能的等価物も、好ましくはこれらの特性を共有する。

【0089】

C5は、C5コンバーターゼ酵素によって開裂される（図1）。この開裂の産物は、アナフィラトキシンC5aおよび溶解複合体C5bを含み、これは、膜侵襲複合体（MAC）としても公知の、C5b、C6、C7、C8およびC9の複合体の形成を促進する。C5aは、好中球および好酸球の走化性、好中球の活性化、毛細血管の透過性増加および好中球アポトーシスの阻害を含む多くの病的炎症過程に意味づけられている高度に炎症促進性のペプチドである[31]。

【0090】

C5と結合してそれを阻害するモノクローナル抗体および小分子が、様々な疾患、特に、PNH、乾癬、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスおよび移植片拒絶を治療するために開発されている[32]。しかし、これらのモノクローナル抗体の一部は、C5多型を有する対象からのある特定のC5タンパク質に結合せず、したがって、これらの対象には無効である[33]。好ましくは、コバーシン型タンパク質は、野生型C5だけでなく、C5多型（例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、またはエクリズマブによる治療の効力を減少させるC5多型）を有する対象からのC5にも結合し、その開裂を阻害する。「C5多型」という用語は、野生型C5と比較して、どれも1つもしくは複数であり得る挿入、欠失、アミノ酸置換、フレームシフト、短縮化、またはこれらの変化の1つもしくは複数の組合せによって変化された任意のバージョンのC5を含む。ヒト対象において、野生型C5は、受託番号NP_001726.2；バージョンGI:38016947を有するC5タンパク質と考えられている。C5多型の例には、mAbエクリズマブの有効性を減少させる、アミノ酸位置885での多型、例えば、Arg885Cys（c.2653C>Tによってコードされる）、p.Arg885His（c.2654G>Aによってコードされる）およびArg885Serが含まれる[33]。

【0091】

C5多型、例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、またはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC5多型を有する対象からのC5を含むC5と結合する薬剤の能力は、当技術分野において公知の標準的な*in vitro*アッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴、またはタンパク質をゲル上で標識C5と共にインキュベーションした後のウエスタンブロットにより決定される場合がある。好ましくは、コバーシン型タンパク質は、野生型C5および／またはC5多型、例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、もしくはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC5多型を有する対象からのC5のいずれかであるC5と、360nM未満、より好都合には300nM未満、最も好都合には250nM未満、好ましくは200nM未満、より好ましくは150nM未満、最も好ましくは100nM未満、さらにより好ましくは50、40、30、20、または10nM未満、有利には5nM未満のK_dで結合し、その際、前記K_dは、表面プラズモン共鳴を使用して、好ましくは[30]に記載される方法により決定される。

【0092】

これは、野生型C5およびC5多型、例えばエクリズマブによる治療を無効にする、またはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC5多型を有する対象からのC5に対して、より高い、より低いまたは同じ親和性を示す場合がある。

【0093】

コバーシン型タンパク質が補体活性化を阻害する能力は、また、薬剤が血清中で補体活性化を阻害する能力を測定することによって決定される場合がある。例えば、血清中の補体の活性は、当技術分野において公知または本明細書に記載される任意の手段によって測定することができる。

【0094】

コバーシン型タンパク質は、また、エイコサノイド活性を阻害する機能を有すると定義される場合がある。コバーシンは、また、LTB4と結合すると実証されている。コバーシンタンパク質の機能的等価物もまた、コバーシンタンパク質と類似の親和性でLTB4と結合する能力を保持する場合がある。

【0095】

コバーシン型タンパク質がLTB4と結合する能力は、当技術分野において公知の標準的な*in vitro*アッセイ、例えば、標識LTB4への結合をめぐる競合するコバーシンと抗LTB4抗体との間の競合ELISA、等温滴定熱量測定または蛍光滴定によって決定される場合がある。蛍光滴定を使用して得られるデータは、コバーシンがLTB4に、200から300 pMの間のK_dで結合することを示している。例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)中のLTB4(Cayman Chemicals、Ann Arbor、MI、USA)に対する結合活性は、分光蛍光計、例えば、LS 50 B分光蛍光計(Perkin-Elmer、Norwalk、CT、USA)で定量することができる。これは、以下のように実施され得る：

【0096】

2 mLのPBS中の100 nM精製コバーシン溶液を、磁気スターラーを備える石英キュベット(10 mm経路長; Hellma、Muhlheim、Germany)中に加えた。温度を20 °Cに調整し、平衡に達した後、タンパク質のTyr/Trpの蛍光を280 nmで励起させた(スリット幅：15 nm)。最大発光に対応する蛍光発光を340 nmで測定した(スリット幅：16 nm)。PBS中の30 μM LTB4リガンド溶液を、最大体積20 μL(全試料体積の1%)まで段階的に添加し、30秒インキュベーション後に定常状態の蛍光を測定した。K_D値の計算のために、初期蛍光強度100%に対してデータを規準化し、3 μM N-アセチルトリプトファンアミド溶液の滴定を使用してインナーフィルター効果を補正し、対応するリガンド濃度に対してデータをプロットした。次に、二分子複合体の形成に関する質量作用の法則に基づく非線形最小二乗回帰を使用して、公表された式(Breustedtら、2006) [34]を用いてOriginソフトウェアバージョン8.5(Origin Lab、Northampton、MA、USA)によりデータをフィットした。

【0097】

コバーシンは、1 nM未満、より好都合には0.9 nM未満、最も好都合には0.8 nM未満、好ましくは0.7 nM未満、より好ましくは0.6 nM未満、最も好ましくは0.5 nM未満、さらにより好ましくは0.4 nM未満、有利には0.3 nM未満のK_dでLTB4と結合する場合があり、その際、前記K_dは、蛍光滴定を使用して、好ましくは上記方法により決定される。コバーシン型タンパク質は、好ましくはこれらの特性を共有する。

【0098】

本発明の一実施形態によると、コバーシン型タンパク質は、C5およびLTB4の両方、例えば野生型C5およびC5多型、例えばエクリズマブによる治療を無効にする、またはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC5多型を有する対象からのC5の両方、かつ、LTB4に結合する場合がある。

10

20

30

40

50

【0099】

したがって、コバーシン型タンパク質は、C5コンバーターゼによる補体C5の補体C5aおよび補体C5bへの開裂を防止するように、かつ、またLTB4活性を阻害するように作用する場合がある。C5およびLTB4の両方に結合する薬剤を使用することが特に有利である。C5およびエイコサノイド経路は、両方とも、リウマチ性疾患において観察される病状の原因になり得る。したがって、リウマチ性疾患に関与する複数の経路を阻害する単一薬剤を使用することによって、補体介在性疾患および障害の炎症作用に関与する単一の経路だけを阻害する薬剤を使用することと比較して、増強した効果を達成することができる（例えば、コバーシンとL-コバーシンを比較した実施例2を参照されたい）。さらに、単一の分子を投与することに関連する実用上の利点がある。

10

【0100】

好ましくは、本発明の薬剤は、吸血性節足動物に由来する。「吸血性節足動物」という用語は、適切な宿主から餌として血を吸う、昆虫、マダニ、シラミ、ノミおよびダニなどの全ての節足動物を含む。好ましくは、本薬剤は、マダニ、好ましくは、マダニ*Ornithodoros moubata*に由来する。

【0101】

コバーシンの機能的等価物は、それが野生型C5もしくはC5多型（例えば、上記のArg885Cys、Arg885His、またはArg885Ser多型）を有する対象からのC5のいずれかのC5に結合する能力およびC5コンバーターゼによるC5のC5aおよびC5bへの開裂を防止する能力を保持する、コバーシンの相同体または断片であり得る。その相同体または断片は、また、LTB4と結合する能力を保持する場合がある。

20

【0102】

相同体は、例えば、*Rhipicephalus appendiculatus*、*R. sanguineus*、*R. bursa*、*A. americanum*、*A. cajennense*、*A. hebraeum*、*Boophilus microplus*、*B. annulatus*、*B. decoloratus*、*Demacentor reticulatus*、*D. andersoni*、*D. marginatus*、*D. variabilis*、*Haemaphysalis inermis*、*Ha. leachii*、*Ha. punctata*、*Hyalomma anatolicum anatolicum*、*Hy. dromedarii*、*Hy. marginatum marginatum*、*Ixodes ricinus*、*I. persulcatus*、*I. scapularis*、*I. hexagonus*、*Argas persicus*、*A. reflexus*、*Ornithodoros erraticus*、*O. moubata moubata*、*O. m. porcinus*、および*O. savignyi*を含む他のマダニ種からのコバーシンタンパク質配列を含む、図2に明示的に特定されるコバーシン配列（配列番号2）のパラログおよびオルソログを含む。

30

【0103】

「相同体」という用語は、また、イエカ属（*Culex*）、ハマダラカ属（*Anopheles*）およびヤブカ属（*Aedes*）の種、特に*Culex quinquefasciatus*、*Aedes aegypti*および*Anopheles gambiae*を含むカ種；ノミ種、例えば*Ctenocephalides felis*（ネコノミ）；アブ；スナバエ；ブユ；ツエツエバエ；シラミ；ダニ；ヒル；および扁虫からの同等のコバーシンタンパク質配列を含むことが意味される。ネイティブなコバーシンタンパク質は、*O. moubata*において約18kDaの別の3つの形態で存在すると考えられており、「相同体」という用語は、コバーシンのこれらの代替形態を含むことが意味される。

40

【0104】

図2に示されるコバーシン配列の相同体を同定する方法は、当業者に明らかであろう。例えば、相同体は、公的配列データベースおよび非公的配列データベースの両方の相同性検索によって同定される場合がある。好都合には、公的に入手可能なデータベースが使用される場合がある。とはいえ、非公的または商業的に利用可能なデータベースは、特に、

50

それらが公的データベースに表されていないデータを含むならば、等しく有用である。一次データベースは、一次ヌクレオチド配列または一次アミノ酸配列データの寄託サイトであり、公的または商業的に利用可能な場合がある。公的に利用可能な一次データベースの例には、GenBankデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、EMBLデータベース (<http://www.ebi.ac.uk/>)、DDBJデータベース (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)、SWISS-PROTタンパク質データベース (<http://expasy.hcu.ge.ch/>)、PIR (<http://pir.georgetown.edu/>)、TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>)、TIGRデータベース (<http://www.tigr.org/tdb/index.html>参照)、NRL-3Dデータベース (<http://www.nbrfa.georgetown.edu/>)、Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/pdb/>)、NRDBデータベース (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>)、OWLデータベース (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>) および二次データベースPROSITE (<http://expasy.hcu.ge.ch/sprot/prosite.html>)、PRINTS (<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>)、Profiles (http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html)、Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>)、Identify (<http://dna.stanford.edu/identify/>) およびBlocks (<http://www.blocks.fhcrc.org>) データベースが含まれる。商業的に利用可能なデータベースまたは非公的データベースの例には、PathoGenome (Genome Therapeutics Inc.) およびPathoSeq (以前はIncyte Pharmaceuticals Inc. のもの) が含まれる。

【0105】

典型的には、2つのポリペプチドの間の（好ましくは、活性部位などの特定領域にわたる）30%よりも大きい同一性は、機能的等価性の指標、したがって、2つのタンパク質が相同である指標であると考えられる。好ましくは、相同体であるタンパク質は、図2で特定されるコバーシントタンパク質配列（配列番号2）と60%よりも大きい配列同一性のレベルを有する。より好ましい相同体は、図2に示されるコバーシントタンパク質配列（配列番号2）とそれぞれ70%、80%、90%、95%、98%または99%よりも大きい同一性のレベルを有する。相同体は、図2に示すコバーシントタンパク質配列（配列番号2）と、それぞれ70%を超える、80%を超える、90%を超える、95%を超える、98%を超える、または99%を超える同一性のレベルを有してもよい。いくつかの実施形態では、相同体は、図2に示されるコバーシントタンパク質配列（配列番号2）と90%を超える同一性のレベルを有する。本明細書において言及される同一性パーセンテージは、BLASTバージョン2.1.3を使用して、NCBI (the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) によって明示されるデフォルトパラメーター [Blosum 62 行列; ギャップ開始ペナルティー=11 およびギャップ伸長ペナルティー=1] を使用して決定されるものである。%同一性は、関連参照配列（例えば配列番号2のアミノ酸1～168または配列番号2のアミノ酸19～168）の完全長にわたる場合がある。

【0106】

したがって、コバーシント型タンパク質は、参照配列、例えば図2、配列番号2のアミノ酸19～168または図2、配列番号2のアミノ酸1～168に対するある特定のアミノ酸配列同一性%への参照により、例えば、図2、配列番号2のアミノ酸19～168または図2、配列番号2のアミノ酸1～168と少なくとも60%、70%、80%、90%

、95%、98%または99%の同一性を有する配列を含むまたはそれからなるタンパク質として記載することができる。いくつかの実施形態では、コバーシン型タンパク質は、配列番号4のコバーシンタンパク質配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる。コバーシン型タンパク質が前記配列を含む場合、コバーシン型タンパク質は、融合タンパク質（例えば、第2のタンパク質、例えば、異種タンパク質との）であり得る。適切な第2のタンパク質を下に述べる。

【0107】

本開示の様々な態様および実施形態では、修飾されたコバーシンポリペプチド（例えば、コバーシン型タンパク質）は、配列番号2および配列番号4において、修飾されていないコバーシンポリペプチドと1から50、2～45、3～40、4～35、5～30、6～25、7～20、8～25、9～20、10～15アミノ酸、最大1、2、3、4、5、7、8、9、10、20、30、40、50アミノ酸で異なってもよい。これらは、置換、挿入、または欠失であり得るが、好ましくは置換である。欠失する場合、これらは、好ましくは、1、2、3、4、5、7または10個までのアミノ酸の欠失（例えば、NまたはC末端からの欠失）である。したがって、変異体には、例えばタンパク質の機能または活性に不利に影響しない保存的アミノ酸置換などのアミノ酸置換を含むタンパク質が含まれる。本用語は、また、天然生物学的バリエーション（例えば、コバーシンタンパク質が由来する種内の対立遺伝子バリエーションまたは地理的変異）を含むことが意図される。野生型C5および／もしくはC5多型（例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、もしくはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC5多型）を有する対象からのC5および／またはLTB4と結合する改善された能力を有する変異体は、また、タンパク質配列中の特定の残基の系統的または定方向変異により設計される場合がある。

【0108】

これらの修飾は、配列番号2および配列番号4に記載されるようにコバーシンポリペプチドに対して行われてもよく、分子が有用性を維持し、得られる修飾コバーシンポリペプチドが、配列番号2および配列番号4に記載のコバーシンポリペプチドに匹敵するLTB4結合活性およびC5結合を保持するという条件の下で、機能的変異体であるとみなされ、例えば、本明細書の他の場所で言及されている試験を使用して決定することができる（例えば、これらの各々への結合は、未修飾のコバーシンポリペプチドと比較して、少なくとも80、85、90、95%の結合である）。

【0109】

C5およびLTB4に結合する機能的変異体の要件を考えると、修飾が行われる場合、特定の残基は修飾から除外するべきである。これらには、保存されたシステイン残基が含まれる。他の残基は修飾から除外するかまたは、置換する場合は、保存的修飾のみに供されるべきである。これらは、以下に定義するLTB4結合残基およびC5結合残基である。LTB4とC5の結合が比較的良好に理解されていることを考えると、コバーシンに対して約65%の同一性のパーセンテージを有してもよいが、変更がC5およびLTB4の結合に関与しない残基に限定される分子設計をすることが可能である。

【0110】

いくつかの実施形態では、成熟コバーシン分子の位置6、38、100、128、129、150での6つのシステインアミノ酸の各々（例えば、配列番号4に示されるシグナル配列を含む全長タンパク質の残基19から168に対応するもの）が保持され、以下に記載のLTB4結合残基のうちの少なくとも5、10、または15、または各々、およびC5結合残基のうちの少なくとも5、10、または15、または20、または各々が保持されるか、または保存的修飾が施されている。

【0111】

いくつかの実施形態では、配列番号4の位置6、38、100、128、129、150の6つのシステインアミノ酸の各々が保持され、以下に記載のLTB4結合残基のうちの少なくとも5、10または15または各々およびC5結合残基のうちの少なくとも5、10または15または20または各々が、保持されるか、または保存的修飾に供され、L

T B 4 および C 5 結合残基の最大 2、3、4、5、10、15、20 までが、保存的修飾が施されている。

【0112】

いくつかの実施形態では、配列番号 4 の位置 6、38、100、128、129、150 の 6 つのシステインアミノ酸の各々が保持され、以下に記載の L T B 4 結合残基のうちの少なくとも 5、10 または 15 または各々および C 5 結合残基のうちの少なくとも 5 つ、10、または 15、または 20、または各々が保持されている。

【0113】

いくつかの実施形態では、配列番号 4 の位置 6、38、100、128、129、150 の 6 つのシステインアミノ酸の各々が保持され、以下に記載される L T B 4 結合残基の各々および C 5 結合残基の各々が保持されるか、または保存的修飾が施されている。

10

【0114】

いくつかの実施形態では、配列番号 4 の位置 6、38、100、128、129、150 の 6 つのシステインアミノ酸の各々が保持され、以下に記載の L T B 4 結合残基の各々および C 5 結合残基の各々が、保持されるか、または保存的修飾に供され、C 5 および／または L T B 4 結合残基の最大 2、3、4、5、10、15、20 までが、保存的修飾が施されている。

【0115】

いくつかの実施形態では、配列番号 4 の位置 6、38、100、128、129、150 の 6 つのシステインアミノ酸の各々が保持され、以下に記載される L T B 4 結合残基の各々および C 5 結合残基の各々が保持されている。

20

【0116】

これらの領域外で行われる修飾は、保存的でも非保存的であってもよい。

【0117】

これらの実施形態の各々では、これらの 6 つのシステインアミノ酸残基間の間隔は、分子の全体的な構造を保存するために好ましくは保持されている（例えば、分子は、図 2 のアミノ酸配列のアミノ酸 1～168 に従った配列のアミノ末端からカルボキシル末端に配置された場合、32 アミノ酸離れた、62 アミノ酸離れた、28 アミノ酸離れた、1 アミノ酸離れた、および 21 アミノ酸離れた距離で互いに間隔を置いた 6 つのシステイン残基を含む）。

30

【0118】

L T B 4 結合残基

L T B 4 への結合に関与すると考えられ、好ましくは非修飾形態で保持されるか、または配列番号 2 または配列番号 4 に対して修飾された任意の分子の配列においてのみ保存的变化を受ける残基は、P h e 18、T y r 25、A r g 36、L e u 39、G l y 41、P r o 43、L e u 52、V a l 54、M e t 56、P h e 58、T h r 67、T r p 69、P h e 71、G l n 87、A r g 89、H i s 99、H i s 101、A s p 103、および T r p 115（配列番号 4 に応じた番号付け）である。

【0119】

C 5 結合残基

L T B 4 への結合に関与すると考えられる残基は、好ましくは、配列番号 2 または配列番号 4 に対して修飾された任意の分子の配列において非修飾形態で保持され、V a l 26、V a l 28、A r g 29、A l a 44、G l y 45、G l y 61、T h r 62、S e r 97、H i s 99、H i s 101、M e t 114、M e t 116、L e u 117、A s p 118、A l a 119、G l y 120、G l y 121、L e u 122、G l u 123、V a l 124、G l u 125、G l u 127、H i s 146、L e u 147、および A s p 149（配列番号 4 に応じた番号付け）である。

40

【0120】

L T B 4 および／または C 5 結合残基

L T B 4 および C 5 の両方の結合に関与する 2 つのヒスチジン残基、H i s 99 および

50

H i s 1 0 1がある。したがって、L T B 4および／またはC 5結合に関与する残基のリストは、P h e 1 8、T y r 2 5、V a l 2 6、V a l 2 8、A r g 2 9、A r g 3 6、L e u 3 9、G l y 4 1、P r o 4 3、A l a 4 4、G l y 4 5、L e u 5 2、V a l 5 4、M e t 5 6、P h e 5 8、G l y 6 1、T h r 6 2、T h r 6 7、T r p 6 9、P h e 7 1、G l n 8 7、A r g 8 9、S e r 9 7、H i s 9 9、H i s 1 0 1、A s p 1 0 3、M e t 1 1 4、T r p 1 1 5、M e t 1 1 6、L e u 1 1 7、A s p 1 1 8、A l a 1 1 9、G l y 1 2 0、G l y 1 2 1、L e u 1 2 2、G l u 1 2 3、V a l 1 2 4、G l u 1 2 5、G l u 1 2 7、H i s 1 4 6、L e u 1 4 7、およびA s p 1 4 9（配列番号4に応じた番号付け）である。

【0121】

コバーシンの機能的等価物には、コバーシタンパク質の断片が含まれるが、但し、このような断片は、野生型C 5および／もしくはC 5多型（例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、もしくはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC 5多型）を有する対象からのC 5および／またはL T B 4と結合する能力を保持する。断片には、例えば、150アミノ酸未満、145アミノ酸未満である、コバーシタンパク質配列（または相同体）由来のポリペプチドが含まれる場合があるが、但し、これらの断片は、補体野生型C 5および／もしくはC 5多型（例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、もしくはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC 5多型）を有する対象からのC 5および／またはL T B 4と結合する能力を保持する。断片には、例えば、少なくとも150アミノ酸、少なくとも145アミノ酸であるコバーシタンパク質配列（または相同体）に由来するポリペプチドが含まれる場合があるが、但し、これらの断片は、補体野生型C 5および／もしくはC 5多型（例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、もしくはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC 5多型）を有する対象からのC 5および／またはL T B 4と結合する能力を保持する。

【0122】

任意の機能的等価物またはその断片は、好ましくは、コバーシン中に見出されるシステイン残基のパターンを保持する。例えば、前記機能的等価物は、図2におけるアミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸1～168による配列のアミノ末端からカルボキシル末端に配列したときに32アミノ酸離れた、62アミノ酸離れた、28アミノ酸離れた、1アミノ酸離れたおよび21アミノ酸離れた距離で相互に間隔が空いた6つのシステイン残基を含む。コバーシタンパク質の例示的な断片は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14に開示されている。対応する断片をコードするDNAは、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13に開示されている。

【0123】

本明細書の図2に明示的に特定されるO. m o u b a t aコバーシタンパク質の断片だけでなく、上記のようなこのタンパク質の相同体の断片も、このような断片として含まれる。相同体のこのような断片は、典型的には図2におけるコバーシタンパク質配列の断片と60%よりも大きい同一性を有するが、相同体のより好ましい断片は、図2におけるコバーシタンパク質配列の断片とそれぞれ70%、80%、90%、95%、98%または99%よりも大きい同一性のレベルを示す。好ましくは、このような断片は、上述のシステイン間隔を保持する。改善された特性を有する断片は、もちろん、野生型配列の系統の変異または断片化に続く適切な活性アッセイによって合理的に設計される場合がある。断片は、C 5の野生型もしくは多型バリエーションの一方もしくは両方のC 5および／またはL T B 4に対してコバーシンと類似またはより大きい親和性を示す場合がある。これらの断片は、コバーシタンパク質の断片について上に記載されたサイズであり得る。

【0124】

上記のように、コバーシン型タンパク質は、好ましくは、野生型C 5および／またはC 5多型（例えば、エクリズマブによる治療を無効にする、もしくはエクリズマブによる治療の有効性を減少させるC 5多型）を有する対象からのC 5およびL T B 4の両方に結合

10

20

30

40

50

する。

【0125】

任意の置換は、好ましくは、例えば次の表に応じた保存的置換である。第2列の同じブロック内にあり、好ましくは第3列の同じ行にあるアミノ酸は、互いに置換され得る：

【表3】

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性-非荷電	C S T M
		N Q
	極性-荷電	D E
		K R
芳香族		H F W Y

【0126】

本発明により使用される機能的等価物は、例えば、異種タンパク質配列についてのコード配列のフレーム内に、コバーシタンパク質または機能的等価物をコードするポリヌクレオチドをクローニングすることによって得られる融合タンパク質であり得る。本明細書に使用される「異種」という用語は、コバーシタンパク質またはその機能的等価物以外の任意のポリペプチドを表すことが意図される。可溶性融合タンパク質のN末端またはC末端のいずれかに含まれ得る異種配列の例は、以下：膜結合タンパク質の細胞外ドメイン、免疫グロブリン定常領域（Fc領域）、PASもしくはXTENもしくは類似の構造不定のポリペプチド、多量体化ドメイン、細胞外タンパク質のドメイン、シグナル配列、搬出配列、またはアフィニティークロマトグラフィーによる精製を可能にする配列である。これらの異種配列の多くは、発現プラスミドに入れて市販されており、それは、これらの配列と融合されたタンパク質の特異的生物学的活性を顕著に損なうことなく追加的な特性を提供するために、これらの配列が一般的に融合タンパク質に含まれるからである [35]。このような追加的な特性の例は、体液中により長く持続する半減期（例えば、Fc領域の付加またはPAS化（PASylation） [36] の結果として生じる）、細胞外局在、またはヒスチジン、GST、FLAG、アビジンもしくはHAタグなどのタグによって可能になるような、より簡単な精製手順である。融合タンパク質は、追加的に、リンカー配列（例えば1～50アミノ酸長を含有する場合があります、それにより、構成成分がこのリンカーによって分離される。

【0127】

したがって、融合タンパク質は、コバーシ様タンパク質を含むタンパク質の例であり、これらには、具体例としてPAS配列およびコバーシ型タンパク質配列を含むタンパク質が含まれる。PAS配列は、例えば、[36]、およびEP2173890に記載されており、PAS化コバーシ分子は、Kuhnら [37] に記載されている。PAS化は、タンパク質と、アミノ酸Pro、Ala、および／またはSerから構成されるコンフォメーション的に無秩序なポリペプチド配列との遺伝的融合を説明している。これは、XLProtein (<http://xl-protein.com/>) によって開発された技法であり、大きな流体力学的体積を有する溶媒和したランダム鎖を、それと融合されるタンパク質に結合させる簡単な方法を提供する。ポリペプチド配列は、ランダムコイル構造をとる。したがって、結果として生じる融合タンパク質のみかけの分子量は、融合タンパク質の実際の分子量よりもはるかに大きい。これにより、生体系での腎臓濾過によるクリアランス率が大幅に低下する。適切なPAS配列は、EP2173890ならびに [36] に記載されている。任意の適切なPAS配列が、融合タンパク質に使用され得る。例には、ランダムコイルコンフォメーションを形成し、アラニン、セリンおよびプロリン残基

からなるかまたは本質的にそれからなる（またはプロリンおよびアラニン残基からなるかまたは本質的にそれからなる）少なくとも約100個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列が含まれる。これは、複数のアミノ酸リピートを含む場合があり、その際、前記リピートは、Ala、Ser、およびPro残基（またはプロリンおよびアラニン残基）からなるかまたは本質的にそれからなり、同一アミノ酸残基の連続は、6つ以下である。プロリン残基は、配列のアミノ酸の4%よりも大きく40%未満を構成する場合がある。配列は、ASPAAAPAPASPAAPAPSPAPAA（配列番号15）；AAPASPPAPAAPSPAPAPAAPSP（配列番号16）；APSSPSPSPAPSSPSPASPS（配列番号17）；SAPSSPSPSPAPSSPSPASPS（配列番号18）；SSPSAPSPSSPASPSPSPPA（配列番号19）；AASPAAPSPAPPAASPAAPSPAPPA（配列番号20）およびASAAAPAAASAAASAPSA（配列番号21）

またはこれらの配列の全体もしくは部分としてのこれらの配列の環状並び替えバージョンもしくは多量体から選択されるアミノ酸配列を含む場合がある。例えば、PAS配列中に存在するリピートのうち1つの5～40、10～30、15～25、18～20、好ましくは、20～30または30コピー、すなわち配列番号15～21のうち1つ、好ましくは15個が存在し得る。好ましくは、PAS配列は、配列番号15の30コピーを含むまたはそれからなる。好ましくは、PAS配列は、コバシン型タンパク質のN末端と（直接またはリンカー配列を介して）融合され、ある特定の好ましい実施形態では、コバシン型タンパク質は、配列番号2のアミノ酸19～168を含むまたはそれからなる場合がある（例えば、融合タンパク質は、（a）配列番号15の30コピーからなるPAS配列および（b）配列番号2のアミノ酸19～168を含み、その際、（a）は、（b）のN末端に直接またはリンカー配列を介して融合されている）。例示的な配列が図5および配列番号22に提供されている。

【0128】

融合タンパク質は、リンカー配列（例えば、1～50、2～30、3～20、5～10、2～4、3～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10アミノ酸の長さ）をさらに含む場合があり、それにより、構成成分は、このリンカーによって分離される。一実施形態では、リンカー配列は、単一のアラニン残基であり得る。

【0129】

現在、「PAS-コバシン」は、例えば、上記のように、PAS化されたコバシンの機能的等価物を指すことを意図している。実施例1および2で試験されたPAS-コバシン分子の正確な配列は、図5および配列番号22に示されている。PAS-コバシンには、半減期が長いこと投与頻度が少なく、患者にとってより便利であるという利点がある。したがって、PAS-コバシンは、C5およびLTB4依存性経路の両方を阻害し、しかしコバシンよりも投与頻度が少ないため、投与上の利点があるという点において、コバシンの利点を兼ね備える。

【0130】

タンパク質およびその機能的等価物は、宿主細胞における発現により組換え形態として調製される場合がある。このような発現方法は、当業者に公知であり、[38] および [39] によって詳細に記載されている。コバシンタンパク質およびその機能的等価物の組換え形態は、好ましくは、グリコシル化されていない。好ましくは、宿主細胞は、大腸菌（E. coli）である。

【0131】

コバシンタンパク質およびその機能的等価物は、好ましくは、例えばそれがその中で発現される宿主細胞および／または細胞増殖培地の少なくとも1つの成分から分離された、単離形態である。一部の実施形態では、コバシンタンパク質またはその機能的等価物は、例えば、電気泳動またはクロマトグラフィーによって決定される、少なくとも90%

、95%、または99%の純度に精製される。本発明のタンパク質および断片は、また、タンパク質化学の通例の技法を使用して調製することができる。例えば、タンパク質断片は、化学合成によって調製される場合がある。融合タンパク質を生成する方法は、当技術分野において標準的であり、熟練の読者に公知である。例えば、大部分の一般分子生物学、微生物学、組換えDNA技法および免疫学的技法は、[38] または [40] に見出すことができる。

【0132】

本発明のさらなる実施形態によると、薬剤は、コバーシン型タンパク質をコードする核酸分子であり得る。例えば、対象において関連細胞によるコバーシン型タンパク質の *in vivo* または *ex vivo* のいずれかの内因性産生を引き起こすために遺伝子療法が採用される場合がある。別のアプローチは、治療用遺伝子が血流または筋組織中に直接注射される、「*naked DNA*」の投与である。

【0133】

好ましくは、このような核酸分子は、図2におけるヌクレオチド配列（配列番号1）の塩基55～507を含むまたはそれからなる。このヌクレオチド配列は、シグナル配列を有さない図2におけるコバーシンタンパク質をコードする。図2におけるヌクレオチド配列の最初の54塩基は、補体阻害活性またはLTB4結合活性に必要とされないシグナル配列をコードする。あるいは、核酸分子は、シグナル配列を有するタンパク質をコードする、図2における核酸配列の塩基1～507を含むまたはそれからなる場合がある。

【0134】

投与様式

コバーシン型タンパク質は、投与が実施されるために医療従事者を必要とせず、これらの分子は迅速に吸収される。対照的に、多くの組換え抗体は、非常にゆっくりと吸収されるか、皮下注射または他の投与経路によって投与することができず、結果として長時間かけて（例えば静脈内に）注入する必要がある。したがって、このような分子の投与は、また、医療従事者を必要とする。したがって、コバーシン型タンパク質は、注入を必要とする他の薬剤よりも投与が容易であるという利点も有する。

【0135】

薬剤は、治療または予防有効量で投与される。「治療有効量」という用語は、リウマチ性疾患を治療するために必要な薬剤の量を表す。これに関連して、「治療すること」には、障害の重症度を減少させることが含まれる。

【0136】

本明細書に使用される「予防有効量」という用語は、関連する状態、例えばリウマチ性疾患を予防するために必要な薬剤の量を表す。これに関連して、「予防すること」は、例えば、薬剤の投与が開始される前には障害の存在が検出されない場合に、障害の重症度を減少させることを含む。障害の重症度を減少させることは、例えば、痛み、炎症、関節のこわばり、または発熱のレベルを減少させることであり得る。

【0137】

減少または改善は、投与を行わず、本明細書に記載の薬剤もない場合の結果に対するものである。結果は、このような患者を評価するために使用される標準的な基準により評価される。これを定量できる範囲で、相対基準（例えば、痛み、炎症、関節のこわばり、または発熱のレベル）に少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%の減少または改善がある。

【0138】

好ましくは、コバーシン分子に基づいて計算される用量は、0.1mg/kg/日から10mg/kg/日（患者の質量と比較した薬物の質量）例えば、0.2～5、0.25～2、または0.1～1mg/kg/日である。融合タンパク質（例えば、本明細書で議論されるような）は、コバーシン分子よりも大きいので、等モル量をそのようなタンパク質に使用することができる。したがって、コバーシンの機能的等価物については、上に言及した用量の等モル量を使用することができる。例えば、コバーシンおよび約600アミ

10

20

30

40

50

ノ酸のPAS部分、または本明細書で定義されるPAS部分を含む融合タンパク質については、例えば、PAS-コパーシン) 0.1mg/kg/日の等モル量は0.4mg/kg/日であるため、用量は0.4mg/kg/日から40mg/kg/日(患者の体重に対する薬物の質量)、例えば0.8~20、1~8、または0.4~4mg/kg/日になる可能性がある。あるいは、これらの融合タンパク質のより長い半減期をもたらすために、例えば、1週間の間に、40mg~2g、50mg~1.5g、75mg~1g、例えば週に1または2回のような、例えば、投与で、用量あたりでより多くの量を与えることができ、より少ない頻度で用量を投与することができる。

【0139】

治療または予防有効量は、終末補体の阻害の点からさらに定義することができ、例えば、終末補体活性(TCA)が、治療の非存在下での終末補体活性と比較して少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%減少していることを意味する量であり得る。用量および回数は、終末補体活性を所望のレベルに維持するために調整される場合があり、そのレベルは、治療の非存在下での終末補体活性と比較して例えば10%以下、例えば9、8、7、6、5、4、3、2、1%以下であり得る。

【0140】

治療または予防有効量は、血漿中のLTB4レベルの減少の点からさらに定義することができ、例えば、治療の非存在下での血漿中のLTB4レベルと比較して、血漿中のLTB4レベルが少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%低下することを意味する量、またはLTB4レベルが正常レベルの特定の範囲内になる(例えば、正常の90~110%、正常の85~115%)ような量であり得る。血漿中のLTB4レベルを所望のレベルに維持するために、用量および回数を調整することができ、これは、例えば、治療の非存在下での血漿中のLTB4レベルと比較して、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%以下、例えば9、8、7、6、5、4、3、2、1%以下であってもよいし、または正常レベルの特定の範囲内(例えば、通常の90~110%、通常の85~115%)であってもよい。LTB4レベルは、日常的な方法によって決定され得る(例えば、イムノアッセイ、例えば、順次的競合結合技術に基づく市販のR&Dシステムアッセイを参照されたい[41])。

【0141】

用量が示されるとき、これは、タンパク質またはその機能的等価物である薬剤の用量に関するものである。核酸分子である薬剤に適した用量を使用して、これらのレベルが生じる場合がある。存在する非活性タンパク質の存在をもたらすために用量を変えることができる(例えば、600アミノ酸のPAS部分を有するPAS-コパーシンは、コパーシンの約4倍の分子量を有するので、等モル量はコパーシンの量の約4倍になるであろう)。コパーシンに提供される任意の用量の等モル量は、追加の配列を含むその任意のコパーシン機能的等価物に使用することができる。等モル量は、日常的な方法を使用して計算できる。

【0142】

終末補体活性は、当技術分野において公知の標準的なアッセイによって、例えば、Quidel CH50溶血アッセイおよびヒツジ赤血球溶解CH50アッセイを使用して測定することができる。

【0143】

用量を投与する必要がある回数は、関与する薬剤の半減期に依存する。コパーシンタンパク質またはその機能的等価物は、例えば、1日2回ベース、毎日ベース、または2、3、4、5、6、または7日もしくははより多くの日数毎、例えば、1日2回、毎日ベースに投与される場合がある。延長された半減期バージョン、例えばPAS化コパーシン分子は、より少ない回数で投与することができる(例えば、2、3、4日毎、5、6、7、10、15または20日もしくははより多くの日数毎、例えば、1日1回または2日もしくははよ

10

20

30

40

50

り多くの日数毎、または毎週)。

【0144】

用量の正確な投薬量および回数は、また、投与時での患者の状態に依存する場合がある。投薬量を決定する場合に考慮され得る要因には、治療または予防の必要性、患者における病状の重症度、患者の全身の健康状態、年齢、体重、性別、食事、投与の時間および回数、薬物の組合せ、反応の感受性および治療に対する患者の抵抗性または応答が含まれる。正確な量は、日常的な実験により決定することができるが、最終的には医師の判断に委ねられる可能性がある。

【0145】

投薬レジメンはまた、最初の「消散レジメン (ablating regimen)」とそれに続く1つまたは複数の次の用量 (例えば、維持用量) の形態をとることができる。一般に、消散レジメンはその後の投与量よりも多くなる。コバーシンの例として、これは0.6~1.2 mg/kgの消散レジメンであり、その後8~18、10~14、または11~13時間 (例えば約12時間) 後に0.3~0.6 mg/kg、続いて、0.45~0.9 mg/kgの維持量であって、これは例えば、1日1回投与できる。

【0146】

PAS化バージョン (例えば、PAS-コバーシン、例えば、本明細書の他の場所に記載されているような) については、適切なレジメンは、6~12 mg/kg (例えば、600 mg) の消散レジメン、その後6~12 mg/kg (例えば、600 mg) 3~10、4~8、5~7、例えば約7日後、続いて、4~8 mg/kg (例えば400 mg) の維持用量であってよく、これは例えば1日1回投与され得る。

【0147】

1つまたは複数の消散用量 (ablating dose) は、維持用量の少なくとも1.5倍、2倍、または5倍であってもよい。消散用量は、単回用量として、または特定の時間枠内の1つまたは複数の用量 (例えば、2回の用量) として投与されてもよい。通常、負荷用量は、単一の24時間 (または延長された半減期バージョンの場合は1週間) 中に投与される1、2、3、4、または5用量となろう。維持用量は、規則的な間隔で繰り返される、より低い用量であり得る。維持用量は、12、24、または48時間毎 (または毎週、または延長された半減期バージョンの場合は2週間毎) などの間隔で繰り返すことができる。正確なレジメンは日常的な実験によって決定できるが、最終的には臨床医の判断に委ねられる可能性がある。維持用量は、最初の消散用量の少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90または100%、または最初の消散線量の最大20、30、40、50、60、70、80、90または100%であり得る。

【0148】

さらなる実施形態では、治療経過にわたり同じ用量が使用される (例えば、毎日または1日2回または毎週)。

【0149】

薬剤は、一般に、薬学的に許容される担体と組み合わせて、またはその中で投与される。「薬学的に許容される担体」という用語は、一般に液体であるが、担体自体が毒性作用を誘発しないか、または医薬組成物を受け取る個体に有害な抗体の産生を引き起こさないという条件の下で、他の薬剤を含み得る。薬学的に許容される担体は、例えば、水、食塩水、グリセロール、エタノールなどの液体または湿潤剤もしくは乳化剤などの補助物質、pH緩衝物質およびその他を含有する場合がある。したがって、採用される医薬担体は、投与経路に応じて様々である。薬学的に許容される担体の詳細な議論は[42]で利用可能である。好ましい実施形態では、薬剤は、液体、例えば、水またはPBSの溶液中で投与される。

【0150】

薬剤は、コロイド送達システム (例えば、リポソーム、ナノ粒子、または微粒子 (例えば、[43]で議論されるように)) を使用して任意選択で送達され得る。これらの担体システムの利点には、感受性タンパク質の保護、徐放、投与頻度の減少、患者のコンプライ

10

20

30

40

50

アンス、および制御された血漿レベルが含まれる。

【0151】

リポソーム（例えば、合成および／または天然起源のリン脂質を含む）は、例えば、20 nm 100 または 200 マイクロメートル、例えば小さな単層ベシクル（25～50 nm）、大きな単層ベシクル（100～200 nm）、巨大な単層ベシクル（1～2 μm）または多層ベシクル（MLV；1 μm－2 μm）であってもよい。

【0152】

ナノ粒子（サイズが10～1000 nmのコロイド担体）は、脂質、ポリマー、または金属から製造できる。ポリマーナノ粒子は、天然または合成ポリマー（例えば、キトサン、アルギン酸塩、PCL、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（グリコリド）、PLGA）から作ることができ、ナノスフェア（分子はポリマーマトリックス内に均一に分布されている）またはナノカプセル（高分子膜内に閉じ込められた薬物分子を運ぶ）として生成されてもよい。

【0153】

微粒子、例えば、でんぷん、アルギン酸塩、コラーゲン、ポリ（ラクチド－c o－グリコリド）（PLGA）、ポリカプロラクトン（PCL）から作られているものも使用できる。

【0154】

ヒドロゲルが、代替的または追加的に存在してもよい。

【0155】

例えば融合タンパク質のような、より大きな分子量の分子の場合、ヒアルロニダーゼなどの追加の賦形剤も、例えば、大容量（例：2～20 ml）の投与を可能にするために使用することができる。

【0156】

薬剤は、好ましくは、皮下注射または滑液への注射によって送達される。対象の投与の容易さの観点から、皮下注射が好ましい。いくつかの実施形態では、これは、1日1回または2回の皮下注射を介する。

【0157】

好ましくは、治療経過は、少なくとも1、2、3、4、5もしくは6週間、または少なくとも1、2、3、4、5もしくは6カ月、または少なくとも1、2、3、4、5もしくは6年の間継続される。治療経過は、少なくとも対象の症状が軽減するまで継続することが好ましい。したがって、治療過程は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40週間の薬剤の投与（例えば、毎日、隔日または毎週）であり得る。

【0158】

維持用量（例えば、単回1日または1週間維持用量）は、治療経過全体にわたり一定を維持する場合）または維持用量（例えば、1日維持用量）は、治療経過中に改変（例えば、増加もしくは減少）される場合がある。維持用量は、終末補体活性および血漿LTB4レベルを所望のレベル、例えば、治療の非存在下での前記患者からの血清と比較して、もしくは正常対照血清と比較して、10%以下の終末補体活性、ならびに／または治療の非存在下での前記患者からの血漿と比較して90%以下の血漿LTB4レベルを維持するために、または正常レベルの特定の範囲内にある血漿LTB4レベル（例えば、正常の90～110%、正常の85～115%）を達成するために、変更され得る。あるいは、各維持量は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10週間、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10週間毎日継続してもよい。対象の症状が改善するにつれて、維持量を減らすことができる。対象の症状が改善するにつれて、薬剤の量または薬剤の投与頻度を減らすことができる。

【0159】

したがって、初期消散用量またはレジメンがあり得、その後、上記で定義された維持用量であってもよい初期維持用量（例えば、毎日または毎週の初期維持用量）、および1つ

10

20

30

40

50

または複数のさらなる維持用量（例えば、毎日または毎週のさらなる維持量）、例えば少なくとも2、3、4、5回のさらなる維持用量があり得る。

【0160】

したがって、本発明は、対象に上記で定義された薬剤の初期消散用量またはレジメンを投与し、次に、上記で定義された薬剤の維持用量（例えば、毎日または毎週の維持用量）を投与することを含む、対象におけるリウマチ性疾患を治療または予防する方法をさらに含み、ここで初期維持用量および1つまたは複数のさらなる維持用量がある。

【0161】

したがって、本発明は、対象のリウマチ性疾患を治療または予防する方法で使用するための上記で定義された薬剤、上記で定義された薬剤の初期消散用量またはレジメンを対象に投与する方法、次いで上記で定義された薬剤の維持用量（例えば、毎日または毎週の維持用量）を投与することさらに含み、ここで、初期維持用量および1つまたは複数のさらなる維持用量がある。

【0162】

1つまたは複数のさらなる維持用量は、対象（例えば、対象からの生物学的サンプル）における終末補体活性もしくは血漿LTB4レベルを試験し、終末補体活性のレベルおよび／もしくは血漿LTB4レベルに基づいてさらなる維持用量を決定し、および／または対象の症状を試験し、ならびに症状に基づいてさらなる維持用量を決定することによって決定され得る。この方法は、任意選択で、前記さらなる維持用量を投与することをさらに含み得る。前記さらなる用量は、終末補体活性を所望のレベルに維持するレベルであると計算され得る。

【0163】

生物学的サンプルが採取される場合、これは血液、例えば、全血、血漿または血清サンプルであり得る。この方法は、任意選択で、サンプルを採取するステップをさらに含み、さらに任意選択で、サンプルのTCAを決定するステップおよび／または血漿LTB4レベルを決定するステップを含む。

【0164】

1つまたは複数のさらなる維持用量は、対象（例えば、生物学的サンプル）における終末補体活性および／または血漿LTB4レベルを試験し、終末補体活性のレベルおよび／または血漿LTB4レベルに基づいてさらなる維持用量を決定し、および／または対象の症状を試験し、ならびに症状に基づいてさらなる維持量を決定することによって決定され得る。この方法は、任意選択で、前記さらなる維持用量を投与することをさらに含み得る。前記さらなる用量は、終末補体活性および／または血漿LTB4レベルを所望のレベルに維持するレベルであると計算される場合がある。

【0165】

特定の態様では、所望の補体活性レベルは、治療の非存在下での前記対象からの血清と比較して、または正常対照血清と比較して10%以下であり、および／または血漿LTB4レベルが、治療の非存在下での前記対象からの血清と比較して90%以下であり、および／または血漿LTB4レベルが正常レベルの特定の範囲内にある（例えば、正常の90～110%、正常の85～115%）。

【0166】

特定の態様では、TCAおよび／または血漿LTB4が所望のレベルよりも高い場合、維持用量が増加され、ここで、任意選択で、TCAが5、4、3、2、1%未満である、および／またはLTB4血漿レベルが、治療の非存在下での前記患者からの血漿と比較して90%以下である場合（または血漿LTB4レベルが正常レベルの特定の範囲内（例えば、正常の90～110%、正常の85～115%）にある場合）、用量は維持または減少される。

【0167】

特定の態様では、症状が悪化する場合、維持用量は増加され、任意選択で、症状が改善する場合、用量は維持または減少される。

【0168】

一部の実施形態では、対象は、治療の開始から1カ月以内、治療の開始から2週間以内、治療の開始から1週間以内に検査される。他の実施形態では、対象は、1日1回もしくは1日に少なくとも1回、1週間に1回、もしくは1週間に少なくとも1回、2週間に1回もしくは2週間に少なくとも1回、1カ月に1回または2カ月に1回検査される。

【0169】

投薬レジメンは、また、治療される対象の体重に依存しない固定用量の形態をとる場合がある。固定用量は、単回用量として、または特定の時間枠内の1つもしくは複数の用量として投与され得る。固定用量は、典型的なヒト患者（例えば、体重50kgから100kgの間の患者）について1mg～100mgのコバースン（例えば、配列番号4）であり得る。コバースン型タンパク質の分子量を使用して、機能的等価薬剤の当量の固定用量を計算することができる。一部の実施形態では、固定用量は、1mg～80mg、1mg～50mg、5mg～80mg、5mg～50mg、10mg～60mg、10mg～50mg、20mg～50mg、20mg～40mgまたは25mg～35mgの間のコバースン（例えば、配列番号4）またはコバースン型タンパク質のモル当量である。好ましくは、固定用量は、30mg、または45mgのコバースン（配列番号4）またはコバースン型タンパク質のモル当量である。典型的には、固定用量は、単一の24時間中に投与された1、2、3、4または5用量である。固定用量は、3、4、6、8、12、24、または48時間毎などの間隔で繰り返される場合がある。正確なレジメンは、日常的な実験により決定することができるが、最終的に医師の判断に委ねられる可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0170】

【図1】補体活性化の古典的および代替経路の模式ダイアグラムを示す図である。アナフィラトキシンを星形で囲む。

【図2A】コバースンの一次配列を示す図である。シグナル配列に下線を付ける。システイン残基を太字で示す。ヌクレオチド番号およびアミノ酸番号を右に示す。ヌクレオチド配列は配列番号1であり、アミノ酸配列は配列番号2である。

【図2B】コバースンバリエーションの例を示す図である。

【図3】予防的コバースン、PAS-コバースンまたはジロートンで治療されたマウスに対するビヒクルにおける実験的RAの臨床スコアおよび足幅を示す図である。

【図4】PAS-コバースンで治療したマウスでは、ビヒクル対照群、ジロートン、およびC5に結合しないPAS-Lコバースンと比較して、PAS-コバースンで治療したマウスに対するビヒクルにおける実験的RAの臨床スコアにおいて疾患が改善されていることを示す図である。

【図5】PAS-コバースン配列を示す図である。

【実施例1】

【0171】

K/B_xN血清トランスファーモデルにおけるコバースンの効果（予防的）

K/B_xN血清トランスファー関節炎モデルを使用して、コバースンにより関節炎の発症を予防できるか否かを試験した。このモデルは、関節炎トランスジェニックK/B_xNマウスの血清をナイーブマウスにトランスファーすることによって、関節リウマチ（RA）において発生する免疫学的メカニズムが誘発される周知のマウスモデルである。治療の非存在下で、関節炎の症状は数日後に発生する。このモデルは、特にRAおよびおそらく他の形態の炎症性関節炎の新しい治療標的の前臨床スクリーニングについて、RAに非常に関連していることが認識されている [44]。

【0172】

実験的RAは、[45]に記載されているプロトコルを使用して誘導された。各治療群で5匹のマウスを試験した。

【0173】

0日目に、標準プロトコルを使用して、C57BL/6マウスの臨床スコアおよび足の

厚さを評価した [45]。全てのマウスは、0日目および2日目にK/B x N血清の注射を受けた。各治療は、0日目から14日目まで毎日投与された。血清も注射した日（0日目および2日目）、血清注射の直後に薬物を投与した。臨床スコアおよび足の厚さを1日おきに測定した。

【0174】

治療グループは以下の通りである：

グループ1：PBS（ビヒクル、皮下、q24h）

グループ2：治療（コバシン5mg/kg皮下、q12h）

グループ3：治療（ジロートン50mg/kg経口1日1回）

グループ4：治療（PAS-コバシン20mg/kg皮下、1日1回）

10

【0175】

実験1の結果を図3に示す。コバシン（q12h）およびPAS-コバシン（q24h）が、このモデルで関節炎の発症を完全に抑制することがわかる。ジロートン（5-LOX阻害剤）は、このモデルの関節炎の発症を部分的に改善する。

【0176】

コバシンおよびPAS-コバシンは、このモデルの関節炎の発症を、5-リポキシゲナーゼ阻害剤（5-LOX）経口阻害剤であるN-[1-（1-ベンゾチエン-2-イル）エチル]-N-ヒドロキシ尿素（ジロートン）よりも大幅に減少させた（アラキドン酸カスケードの重要な酵素であり、生理活性ロイコトリエン（LT）の形成に参与している）。

20

【0177】

PAS-コバシンとコバシンの相違は、PAS-コバシンが「PAS化」されていることである。これは、アミノ酸Pro、Ala、および/またはSerで構成される構造的にディスオーダーしたポリペプチド配列とタンパク質の遺伝子融合と表現される。これはXL Protein (<http://xl-protein.com/>) によって開発された技術であり、融合させるタンパク質に大きな流体力学的体積を持つ溶媒和ランダム鎖を結合させる、単純な方法を提供する。ポリペプチド配列はランダムコイル構造をとり、みかけの分子量が大幅に増加し、腎臓濾過によるクリアランス速度が減少する。この実験で使用されたPAS-コバシンの配列は、図5および配列番号22に示されている。

30

【0178】

PAS-Covの分子量は大きいため、20mg/kgのPAS-Covは5mg/kgのコバシンに相当する、そこで、この実験では、等用量の活性コバシン剤は毎日投与するが、コバシンは2倍の頻度で投与する（12時間毎）。この実験では、PAS-コバシンはコバシンと同じように効果的であったが、投与頻度はより少ない。したがって、PASコバシンのようなコバシンのより長い半減期バージョンを治療的に使用することには利点があり得る。

【実施例2】

【0179】

K/B x N血清トランスファーモデルにおけるコバシンの効果（治療）

40

K/B x N血清トランスファー関節炎（STA）モデルを使用して、確立された関節炎疾患がコバシンにより改善できるか否かを試験した。

【0180】

実験的RAは、[45]に記載されるプロトコルを使用して誘導された。各治療群で5匹のマウスを試験した。

【0181】

0日目に、標準プロトコルを使用してC57BL/6マウスの臨床スコアおよび足の厚さを評価した [45]。全てのマウスは、0日目と2日目にK/B x N血清の注射を受けた。治療は4日目から14日目まで毎日行われた。血清も注射した日（0日目および2日目）、血清注射の直後に薬物を投与した。臨床スコアおよび足の厚さを1日おきに測定した。

50

【0182】

治療群は以下の通りである：

グループ1：PBS（ビヒクル）

グループ2：治療（PAS-Lコバーシン20mg/kg皮下1日1回）

グループ3：治療（ジロートン50mg/kg経口1日1回）

グループ4：治療（PAS-コバーシン20mg/kg皮下1日1回）

【0183】

2番目の実験からの臨床スコアの結果を図4に示す。血清注射後にマウスが関節炎を発症したことがわかる。ビヒクルおよびジロートン群では、実験の6日目に最大の臨床スコアが見られた。PAS-L-コバーシン（q24h）およびPAS-コバーシン（q24h）の投与後、PAS-コバーシンおよびPAS-L-コバーシン群の臨床スコアは減少した。PAS-L-コバーシン群については、ビヒクルおよびジロートン治療群よりも臨床スコアが有意に低かった。

【0184】

PAS-コバーシンおよびPAS-L-コバーシンの違いは、L-コバーシン分子において、コバーシン配列が変異しているために、LTB4には結合するものの、C5には結合しないことである（「L-コバーシン」と称される）。L-コバーシン配列の配列は、以下の残基が修飾される成熟コバーシン配列（配列番号4）の変異体である：Ala44をAsnに、Met116をGlnに、Leu117をSerに、Gly121をAlaに、Leu122をAspに、Glu123をAlaに、およびAsp149をGlyに（バリエーション2と称される、配列はdsesdctgsepvdafqafsegkeayvlvrs tdpkardclk gepNgekqdn tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnl tqnre vvydsqsh hc hvd kvekev p dyemwQ Sdag ADAveveccr qklee lasgr nqmyph lk Gc（配列番号23）、ここで、配列番号4のネイティブなコバーシン配列と比べた変化は大文字で示す）。

【0185】

PAS-L-コバーシンは、RAの改善においてPAS-コバーシンほど効果的ではなかったが、ジロートンよりも効果的であった。このことは、コバーシンの二重阻害活性（C5およびLTB4阻害）により、改善された治療効果がこのモデルにもたらされることを示唆する。C5活性化およびLTB4の同時阻害は、治療モデルにおいてLTB4単独阻害と同程度でしか効果的ではないと予想されていた。しかしながら、予期せぬことに、コバーシンによるC5およびLTB4の同時阻害は、L-コバーシンと比較したコバーシンの改善された効果で示されるように、治療モデルにおいてLTB4単独阻害よりもはるかに効果的であることがわかった。

【0186】

参考文献

- [1] Hoover et al, 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 2191-2193
- [2] Harrison and Murphy, 1995, J. Biol. Chem. 270, 17273-17276
- [3] Ford-Hutchinson, 1990, Crit. Rev. Immunol. 10, 1-12
- [4] Showell et al., 1995, J. Pharm. Exp. Ther. 273, 176-184
- [5] Klaas et al, 2005 J. Exp. Med. 201, 1281-1292
- [6] Del Prete et al, 2007 Blood, 109, 626-631
- [7] Miyahara et al, 2006 Allergol Int. 55, 91-7
- [8] Taube et al, 2006 J. Immunol. 176, 3157-3164
- [9] Yamaoka et al, 1989 J. Immunol. 143, 1996-2000
- [10] Yokomizo et al, 1997 Nature 387, 620-624
- [11] Yokomizo et al, 2000 J. Exp. Med. 192, 421-432
- [12] Tager and Luster, 2003 Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 69, 123-134

- [13] Yokomizo et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 12454-12459
- [14] Kim, N. D. and Luster, A.D. (2007) The Scientific World Journal 7, 1307-1328.
- [15] Kim et al., 2006. J. Exp. Med. 203, 829-835
- [16] Noiri et al., 2000 Proc Nat Acad Sci USA 97, 823-828
- [17] Lundeen et al., 2006 . J. Immunol. 177, 3439-3447
- [18] Shao et al, 2006 . J. Immunol. 176, 6254-6261
- [19] Chen et al., 2006 . J. Exp. Med. 203, 837-842
- [20] Sebaldt et al., 1990 Proc Natl Acad Sd. U.S.A. 8, 6974-6978
- [21] Curry et al., 2005 Journal of the American Animal Hospital Association 41 , 298- 309
- [22] Dube et al., 1998. Zileuton: the first leukotriene inhibitor for use in the management of chronic asthma. In: Drazen JM, Dahlen S, Lee TH, eds. Five-lip oxygenase Products in Asthma. New York, NY: Marcel Dekkar, Inc
- [23] Sharma and Mohammed, 2006 Immunopharmacology 14, 10-16
- [24] GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence, Collaborators. L ancet. 388 (10053): 1545-1602. (2016)
- [25] GBD 2013 Mortality and Causes of Death, Collaborators (17 December 2 014). Lancet. 385 (9963): 117-71.
- [26] WO2004/106369
- [27] Jore, M. M. et al, Nature Structural & Molecular Biology 2016 volume 23 , pages 378-386
- [28] Pincus et al Rheumatology 2008;47:345-349
- [29] Oliver J et al Arthritis Res Ther. 2009; 11(3): 223.
- [30] Roversi, P et al Journal of Biological Chemistry 2013, 288(26) 18789-18802
- [31] Guo, R.F. and P.A. Ward, Annu Rev Immunol, 2005, 23: p. 821-52
- [32] Ricklin D & Lambris J, Nature Biotechnology, 25: 1265-1275 (2007)
- [33] Nishimura, J et al., New Engl J. Med., 30;7: 632-639 (2014)
- [34] Breustedt D.A., Schonfeld D.L., Skerra A. (2006) Comparative ligand-bind ing analysis of ten human lipocalins. Biochim Biophys Acta 1764(2):161-173.
- [35] Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 60: 523-33, 2003
- [36] Schlapschy M, et al Protein Eng Des Sel. 2013 Aug;26(8):489-501
- [37] Kuhn et al Bioconjugate Chem., 2016, 27 (10), pp 2359-2371
- [38] Sambrook et al (2000)
- [39] Fernandez & Hoeffler (1998)
- [40] Ausubel et al. (1991)
- [41] <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/kge006b.pdf>
- [42] Remington's Pharmaceutical Sciences; Mack Pub. Co., N.J. 1991
- [43] Patel et al Ther. Deliv. (2014) 5(3), 337-365
- [44] Christensen, A. et al. Front Immunol. 2016; 7: 213.
- [45] Kim et al JEM 2006; 203(4) 829-835

10

20

30

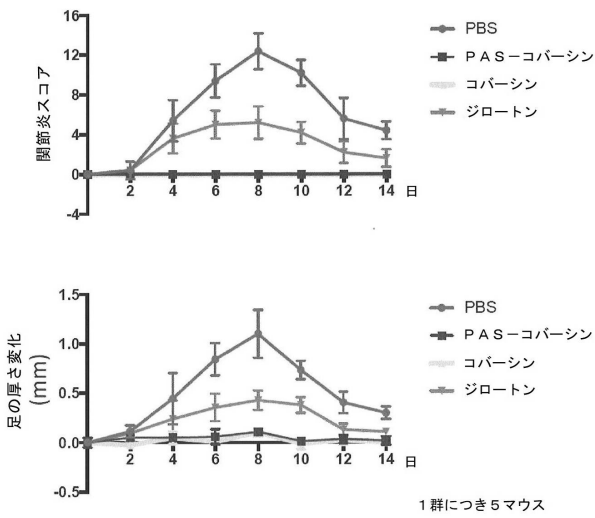
40

50

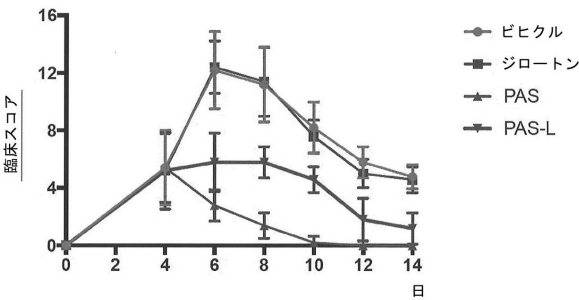
【図 2 B】

配列番号:4 (150 アミノ酸)	dsecdtgse pvdaqfse gkeayvlvrs tdkardcik gepagekqdn tipvmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnire vvydsqshnc hvdkevevp dyemwmldag gleveveccr kkleelasgr nqmyphlkdc
配列番号:6 (149 アミノ酸)	sesdctgse pvdaqfse gkeayvlvrs tdkardcik gepagekqdn tipvmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnire vvydsqshnc hvdkevevp dyemwmldag gleveveccr kkleelasgr nqmyphlkdc
配列番号:8 (148 アミノ酸)	esdctgse pvdaqfse gkeayvlvrs tdkardcik gepagekqdn tipvmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnire vvydsqshnc hvdkevevp dyemwmldag gleveveccr kkleelasgr nqmyphlkdc
配列番号:10 (147 アミノ酸)	sdcctgse pvdaqfse gkeayvlvrs tdkardcik gepagekqdn tipvmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnire vvydsqshnc hvdkevevp dyemwmldag gleveveccr kkleelasgr nqmyphlkdc
配列番号:12 (146 アミノ酸)	dcctgse pvdaqfse gkeayvlvrs tdkardcik gepagekqdn tipvmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnire vvydsqshnc hvdkevevp dyemwmldag gleveveccr kkleelasgr nqmyphlkdc
配列番号:14 (145 アミノ酸)	ctgse pvdaqfse gkeayvlvrs tdkardcik gepagekqdn tipvmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgntqnire vvydsqshnc hvdkevevp dyemwmldag gleveveccr kkleelasgr nqmyphlkdc

【図 3】



【図 4】



【図 5】

ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS
>>.....PAS600.....>>
71 PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA
>.....PAS600.....>
141 ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS
>.....PAS600.....>
211 PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA
>.....PAS600.....>
281 ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS
>.....PAS600.....>
351 PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA
>.....PAS600.....>
421 ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS
>.....PAS600.....>
491 PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA
>.....PAS600.....>
561 ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ASPAAPAPAS PAAPAPSAPA ADSESDCTGS EPVDAQFAS EGKEAYTVLR
>.....PAS600.....>>>.....コバールン.....>>
631 STDPKARDCL KGEAPAGEKQD NTLFVMTFK NGTDWASTDN TETLDGAKVT ATLGNLTQNR EVVYDSQSHH
>.....コバールン.....>
701 CHVDKEVEV PDYEMWMLDA GGLEVEVECC ROKLEELASG RNQMYPHLKDC C
>.....コバールン.....>>>

10

20

30

40

50

【配列表】
0007629394000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	5/44	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	5/44	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
C 0 7 K	14/435	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	C 0 7 K	14/435	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
			A 6 1 P	9/14	

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(72)発明者 ナン, マイルズ

スイス国 ジュネーブ 3, ケイス ポスタル 3 4 6 1-1 2 1 1, プレイス デ オー ヴィヴ 6内

(72)発明者 ラスター, アンドリユー

アメリカ合衆国 0 2 1 1 4, マサチューセッツ州, ボストン, フルーツ ストリート 5 5, マサ
チューセッツ ジェネラル ホスピタル内

(72)発明者 宮部 斉重

アメリカ合衆国 0 2 1 1 4, マサチューセッツ州, ボストン, フルーツ ストリート 5 5, マサ
チューセッツ ジェネラル ホスピタル内

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表 2 0 1 1-5 1 1 6 3 2 (J P, A)

特表 2 0 1 7-5 2 2 8 5 7 (J P, A)

KUHN, Nadine et al., PASylated Coversin, a C5-Specific Complement Inhibitor with Extende
d Pharmacokinetics, Shows Enhanced Anti-Hemolytic Activity in Vitro, Bioconjugate Chemi
stry, 2016年09月06日, Vol. 27, p. 2359-2371, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00369

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 8/1 7

A 6 1 K 3 1/7 0 8 8

A 6 1 K 4 8/0 0

A 6 1 P 1 9/0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)