

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-523274

(P2016-523274A)

(43) 公表日 平成28年8月8日 (2016. 8. 8)

| (51) Int. Cl.                        | F I              | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|------------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 38/55 (2006. 01)</b>      | A 6 1 K 37/64    | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 48/00 (2006. 01)</b>      | A 6 1 K 48/00    | 4 C 0 8 5   |
| <b>A 6 1 K 35/76 (2015. 01)</b>      | A 6 1 K 35/76    | 4 C 0 8 7   |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b>     | A 6 1 K 39/395 D | 4 H 0 4 5   |
| <b>A 6 1 P 43/00 (2006. 01)</b>      | A 6 1 K 39/395 N |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 224 頁) 最終頁に続く |                  |             |

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2016-522321 (P2016-522321) | (71) 出願人 | 513309199             |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年6月26日 (2014. 6. 26)     |          | ザイジェン インフラメーション リミテッド |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成27年11月30日 (2015. 11. 30)   |          | キプロス共和国 3030 リマソール、   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2014/001736            |          | アーチ. マカリオウ ザ サード 19   |
| (87) 国際公開番号   | W02014/206563                |          | 5, ネオクレウス ハウス         |
| (87) 国際公開日    | 平成26年12月31日 (2014. 12. 31)   | (74) 代理人 | 100078282             |
| (31) 優先権主張番号  | PCT/EP2013/001881            |          | 弁理士 山本 秀策             |
| (32) 優先日      | 平成25年6月26日 (2013. 6. 26)     | (74) 代理人 | 100113413             |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                   |          | 弁理士 森下 夏樹             |
| (31) 優先権主張番号  | PCT/EP2013/001896            | (74) 代理人 | 100181674             |
| (32) 優先日      | 平成25年6月27日 (2013. 6. 27)     |          | 弁理士 飯田 貴敏             |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                   | (74) 代理人 | 100181641             |
|               |                              |          | 弁理士 石川 大輔             |
| 最終頁に続く        |                              |          |                       |

(54) 【発明の名称】 種々の疾患を処置するための J N K シグナル伝達経路の新規の細胞透過性ペプチド阻害剤の使用

## (57) 【要約】

本発明は、蛋白質キナーゼ阻害剤の使用に関し、より具体的には、蛋白質キナーゼである c - J u n アミノ末端キナーゼの阻害剤、J N K 阻害剤配列、キメラペプチド、またはこれらをコードする核酸のほか、これらを含む薬剤組成物の、J N K シグナル伝達に強く関連する多様な疾患または障害を処置するための使用に関する。被験体における J N K シグナル伝達に強く関連する種々の炎症性または非炎症性疾患を処置するための薬剤組成物を調製するための、150 個未満のアミノ酸の長さを典型的に含む J N K 阻害剤配列の使用を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための、150個未満のアミノ酸の長さを含むJNK阻害剤配列の使用であって、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する該疾患または障害が、以下の群の炎症性疾患または非炎症性疾患：

(a) 加齢黄斑変性 (AMD: age-related macular degeneration)、特に、加齢黄斑変性の滲出型および萎縮型、ならびに白内障、

(b) 特に、ぶどう膜炎、強膜炎、角膜手術、結膜炎、非感染性角膜炎、虹彩炎、脈絡網膜炎、眼の網膜を損傷する炎症性疾患 (網膜症)、特に、糖尿病性網膜症、動脈性高血圧症誘発性高血圧性網膜症、放射線誘発性網膜症、太陽光誘発性日光網膜症、外傷誘発性網膜症、例えば、プルチエル網膜症、未熟児網膜症 (ROP)、および過粘稠度関連網膜症から選択される、眼の炎症性疾患、

(c) アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症、抗リン脂質症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性多内分泌症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、バロー同心円性硬化症、水疱性類天疱瘡、キャスルマン病、癬痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症疾患、補体成分2欠損関連疾患、クッシング症候群、デゴス病、有痛脂肪症、好酸球性肺炎、後天性表皮水疱症、新生児の溶血性疾患、寒冷グロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形成症、消化器性類天疱瘡、グッドパスチャー症候群、橋本脳症、妊娠性類天疱瘡、ヒューズーストローヴィン症候群、低ガンマグロブリン血症、ランバートーイトン筋無力症候群、硬化性苔癬、限局性強皮症、急性痘瘡状苔癬状皰癬疹、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋緊張病、オブソクロヌスミオクロヌス症候群、傍腫瘍性小脳変性、発作性夜間血色素尿症、パリーーロンベルク症候群、悪性貧血、POEMS症候群、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レイノー現象、むずむず脚症候群、後腹膜線維症、2型自己免疫性多内分泌症候群、スティッフパーソン症候群、スザック症候群、熱性好中球性皮膚病、シドナム舞踏病、血小板減少症、および白斑、

(d) 関節炎、特に、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎および関節リウマチ、ならびに関節症、ならびに骨関節炎、

(e) 特に、乾癬、湿疹、皮膚炎、座瘡、口腔内潰瘍、紅斑、扁平苔癬、サルコイドーシス、血管炎、成年性線状IgA疾患から選択される、皮膚疾患、

(f) タウオパシー、アミロイドーシス、およびプリオン病、

(g) ポリープ、

(h) 口腔または顎骨の炎症性疾患、特に、歯髄炎、インプラント周囲炎、歯周炎、歯肉炎、口内炎、粘膜炎、剥離性障害、顎関節障害、

(i) 骨壊死、

(j) 脳脊髄炎、特に、急性播種性脳脊髄炎、脊椎炎、特に、強直性脊椎炎、抗シンセターゼ症候群、皮膚炎、特に、アトピー性皮膚炎または接触性皮膚炎、肝炎、特に、自己免疫性肝炎、自己免疫性末梢神経障害、膵炎、特に、自己免疫性膵炎、ベーチェット病、ビッカースタッフ型脳炎、ブラウ症候群、セリアック病、シャーガス病、多発性神経障害、特に、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、骨髄炎、特に、慢性再発性多巣性骨髄炎、チャーグーストラウス症候群、コーガン症候群、巨細胞性動脈炎、CREST症候群、血管炎、特に、皮膚小血管性血管炎および蕁麻疹様血管炎、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、全身性強皮症、ドレスラー症候群、薬物誘発性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、腱付着部炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸炎、結節性紅斑、特発性肺線維症、胃炎、グレーブス病、ギランーバレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホーシェンライン紫斑病、汗腺膿瘍、特発性炎症性脱髄性疾患、筋炎、特に、封入体筋炎、膀胱炎、特に、間質性膀胱炎、川崎病、扁平苔癬、ルポイド肝炎、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管

10

20

30

40

50

炎、混合性結合組織疾患、脊髄炎、特に、視神経脊髄炎、甲状腺炎、特に、オールド甲状腺炎、リウマチ、特に、回帰性リウマチ、パーソンネージターナー症候群、尋常性天疱瘡、静脈周囲性脳脊髄炎、結節性多発動脈炎、多発筋痛症、特に、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、肝硬変、特に、原発性胆汁性肝硬変、胆管炎、特に、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性神経障害、ラスムッセン脳炎、再発性多発性軟骨炎、関節炎、特に、反応性関節炎（ライター病）および関節リウマチ、リウマチ熱、サルコイドーシス、シュニッツラー症候群、血清病、脊椎関節症、高安動脈炎、トロサーハント症候群、横断性脊髄炎、およびウェゲナー肉芽腫症、

（k）特に、肺線維症、心臓線維症、肝臓線維症、骨髄線維症、縦隔線維症、後腹膜線維症、皮膚線維症、腸線維症、関節線維症、および肩線維症から選択される、線維性疾患および／または線維性障害、

（l）特に、糸球体腎炎一般、特に、膜性増殖性糸球体腎炎、メサングウム増殖性糸球体腎炎、急性進行性糸球体腎炎、腎症一般、特に、膜性腎症または糖尿病性腎症、腎炎一般、特に、ループス腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、尿細管間質性腎炎、慢性腎炎または急性腎炎、および微小変化群、ならびに巣状分節状糸球体硬化症から選択される、腎疾患および／または腎障害、

（m）交感性眼炎、

（n）皮膚、腎臓、心臓、肺、脾臓、肝臓、血液細胞、骨髄、角膜、偶発的に切断された四肢、特に、指、手、足、顔面、鼻梁、骨、心弁、血管、または腸の移植片拒絶反応、

（o）大脳皮質基底核変性症、進行性核上麻痺、統合失調症、遺伝性クロイツフェルトーヤコブ病、運動ニューロン病、脊髄小脳性運動失調／脊髄小脳萎縮、認知症、特に、前頭側頭型認知症、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、遺伝性痙攣性対麻痺、フリードライヒ運動失調症、シャルコーマリーートゥース病、および

（p）特に、炭水化物代謝の代謝性障害、例えば、糖原病、アミノ酸代謝障害、例えば、フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、グルタル酸血症Ⅰ型、尿素サイクル障害または尿素サイクル欠損症、例えば、カルバモイルリン酸シンセターゼⅠ欠損症、有機酸代謝障害（有機酸尿症）、例えば、アルカプトン尿症、脂肪酸酸化障害およびミトコンドリア代謝障害、例えば、中鎖アシル-CoA脱水素欠損症（MCAD）と略記されることが多い）、ポリフィリン代謝障害、例えば、急性間欠性ポリフィリン症、プリン代謝障害またはピリミジン代謝障害、例えば、レッシューナイハン症候群、ステロイド代謝障害、例えば、先天性リポイド副腎過形成、または先天性副腎過形成、ミトコンドリア機能障害、例えば、カーンズ-セイヤー症候群、ペルオキシソーム機能障害、例えば、ツェルウェーガー症候群、またはリソソーム蓄積症、例えば、ゴーシェ病またはニーマン-ピック病の群から選択される遺伝性または非遺伝性の代謝性疾患、から選択される使用。

【請求項 2】

前記障害／疾患が、AMD または白内障である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記障害／疾患が、網膜症、特に、糖尿病性網膜症である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記疾患／障害が、乾癬である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 5】

前記障害／疾患が、移植片拒絶または移植拒絶反応、特に、腎臓移植、脾臓移植、皮膚移植、または心臓移植における移植片拒絶である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

前記疾患／障害が、糸球体腎炎である、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 7】

組織移植片または臓器移植片の移植の前に該組織移植片または臓器移植片を処置するための、150 個未満のアミノ酸の長さを含む JNK 阻害剤配列の使用。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

前記移植片が、腎臓、心臓、肺、脾臓、肝臓、血液細胞、骨髄、角膜、偶発的に切断された四肢、特に、指、手、足、顔面、鼻梁、骨、心弁、血管、または腸の移植片である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記 JNK 阻害剤配列が、5～150 個の範囲のアミノ酸残基、より好ましくは、10～100 個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは、10～75 個のアミノ酸残基、および最も好ましくは、10～50 個の範囲のアミノ酸残基を含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の JNK 阻害剤配列の使用。

【請求項 10】

前記 JNK 阻害剤配列が、c-jun アミノ末端キナーゼ (JNK) に結合する、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の JNK 阻害剤配列の使用。

10

【請求項 11】

前記 JNK 阻害剤配列が JNK を発現させる細胞内に存在する場合に、該配列が、JNK に標的化される少なくとも 1 つの転写因子の活性化を阻害する、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の JNK 阻害剤配列の使用。

【請求項 12】

前記 JNK に標的化される転写因子が、c-Jun、ATF2、および Elk1 からなる群から選択される、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の JNK 阻害剤配列の使用。

【請求項 13】

前記 JNK 阻害剤配列は、該ペプチドが JNK を発現させる細胞内に存在する場合に、JNK 効果を変化させる、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の JNK 阻害剤配列の使用。

20

【請求項 14】

前記 JNK 阻害剤配列が、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または、これらの組み合わせから構成されており、少なくとも 1 またはさらには 2 個、好ましくは少なくとも 3、4、または 5 個、より好ましくは少なくとも 6、7、8、または 9 個、およびさらにより好ましくは、少なくとも 10 個またはそれ超の、D-アミノ酸および／または L-アミノ酸を含むことが好ましく、該 D-アミノ酸および／または L-アミノ酸が、該 JNK 阻害剤配列において、ブロック状、非ブロック状、または交互になった様式に、配置されていてよい、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の使用。

30

【請求項 15】

前記 JNK 阻害剤配列が、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、または配列番号 105 に記載の配列のいずれかにより規定またはコードされたとおりの、ヒト IB1 配列またはラット IB1 配列の断片、改変体、またはこのような断片の改変体を含む、先行する請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項 16】

前記 JNK 阻害剤配列が、配列番号 1～4、13～20、および 33～100 に記載の少なくとも 1 つのアミノ酸配列、またはそれらの断片、誘導体、もしくは改変体を含むか、または、これから構成される、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の使用。

【請求項 17】

共有結合によって連結された、少なくとも 1 つの第 1 のドメインおよび少なくとも 1 つの第 2 のドメインを含むキメラペプチドの使用であって、該第 1 のドメインが、輸送配列を含み、該第 2 のドメインが、被験体における JNK シグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための、請求項 1 から 16 のいずれかに規定される JNK 阻害剤配列を含み、被験体における JNK シグナル伝達に強く関連する該疾患または障害が、請求項 1 から 8 のいずれかにおいて規定される、キメラペプチドの使用。

40

【請求項 18】

前記キメラペプチドが、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または、これらの組み合わせから構成されており、少なくとも 1 またはさらには 2 個、好ましくは少なくとも 3、4、ま

50

たは5個、より好ましくは少なくとも6、7、8、または9個、およびさらにより好ましくは、少なくとも10個またはそれ超の、D-アミノ酸および／またはL-アミノ酸を含むことが好ましく、該D-アミノ酸および／またはL-アミノ酸が、該キメラペプチドにおいて、ブロック状、非ブロック状、または交互になった様式に、配置されていてよい、請求項14に記載のキメラペプチドの使用。

【請求項19】

前記輸送配列が、ヒト免疫不全ウイルスTATポリペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項17または18のいずれかに記載のキメラペプチドの使用。

【請求項20】

前記輸送配列が、配列番号5、6、7、8、21、または22のアミノ酸配列から構成されるかこれらを含む、請求項17から19のいずれかに記載のキメラペプチドの使用。

10

【請求項21】

前記輸送配列が、前記ペプチドの細胞内への取り込みを増進させる、請求項17から20のいずれかに記載のキメラペプチドの使用。

【請求項22】

前記輸送配列が、前記ペプチドを核局在化に向ける、請求項17から21のいずれかに記載のキメラペプチドの使用。

【請求項23】

前記キメラペプチドが、配列番号9～12および23～32のいずれかのアミノ酸配列、またはそれらの断片もしくは改変体から構成されるかこれらを含む、請求項17から22のいずれかに記載のキメラペプチドの使用。

20

【請求項24】

前記キメラペプチドが、配列番号9または11のアミノ酸配列から構成されるかこれらを含む、請求項17から23のいずれかに記載のキメラペプチドの使用。

【請求項25】

請求項1から20のいずれかに規定されるJNK阻害剤配列、または請求項17から24のいずれかに規定されるキメラペプチドをコードする単離核酸の、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための使用であって、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する該疾患または障害が、請求項1から8のいずれかにおいて規定される、使用。

30

【請求項26】

請求項25に規定される核酸を含むベクターの、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための使用であって、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する該疾患または障害が、請求項1から8のいずれかにおいて規定される、使用。

【請求項27】

請求項26に規定されるベクターを含む細胞の、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための使用であって、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する該疾患または障害が、請求項1から8のいずれかにおいて規定される、使用。

40

【請求項28】

請求項1から16のいずれかに記載のJNK阻害剤配列に、または請求項17から24のいずれかに記載のキメラペプチドに免疫特異的に結合する抗体の、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための使用であって、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する該疾患または障害が、請求項1から8のいずれかにおいて規定される、使用。

【請求項29】

前記薬剤組成物が、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、皮内経路、経皮経路を含む非経口経路、経口経路、直腸経路を含む経腸経路、経鼻経路、鼻腔内経路を含む局所経路、および表皮送達またはパッチ送達を含む他の経路からなる群から選択される投与経路によ

50

り投与される、先行する請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項30】

前記JNK阻害剤配列および／またはキメラペプチドの用量（体重1kg当たり）が、10mmol/kgまで、好ましくは、1mmol/kgまで、より好ましくは、100μmol/kgまで、さらにより好ましくは、10μmol/kgまで、さらにより好ましくは、1μmol/kgまで、さらにより好ましくは、100nmol/kgまで、最も好ましくは、50nmol/kgまでの範囲にある、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

【請求項31】

前記JNK阻害剤配列および／またはキメラペプチドの用量が、約1pmol/kg～約1mmol/kg、約10pmol/kg～約0.1mmol/kg、約10pmol/kg～約0.01mmol/kg、約50pmol/kg～約1μmol/kg、約100pmol/kg～約500nmol/kg、約200pmol/kg～約300nmol/kg、約300pmol/kg～約100nmol/kg、約500pmol/kg～約50nmol/kg、約750pmol/kg～約30nmol/kg、約250pmol/kg～約5nmol/kg、約1nmol/kg～約10nmol/kg、または前記値のうちの任意の2つの値の組み合わせの範囲にある、先行する請求項のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛋白質キナーゼ阻害剤の使用に関し、より具体的には、蛋白質キナーゼであるc-Junアミノ末端キナーゼの阻害剤、JNK阻害剤配列、キメラペプチド、またはこれらをコードする核酸のほか、これらを含む薬剤組成物の、JNKシグナル伝達に強く関連する、多様な新規の疾患または障害を処置するための使用に関する。

【背景技術】

【0002】

c-Junアミノ末端キナーゼ（JNK）は、マイトジェン活性化蛋白質（MAP）キナーゼのストレス活性化グループの1つのメンバーである。このキナーゼは、細胞成長および細胞分化の制御、より一般的にいうと細胞の環境刺激物に対する応答に、関連している。JNKシグナル伝達経路は、環境ストレスに反応して、且つ、幾つかのクラスの、細胞表面レセプターの関与によって、活性化される。これらのレセプターには、サイトカインレセプター、セルペンチンレセプター、およびレセプターチロシンキナーゼが含まれ得る。哺乳類細胞では、JNKは、発癌性形質転換、および環境ストレスへの適応反応を媒介するといった生物学的プロセスに関与している。JNKはまた、免疫細胞の成熟および分化を含む免疫応答の調整に関連していると共に、免疫システムによって破壊のために識別された細胞におけるプログラム細胞死を引き起こすことに関連している。この固有の特性は、JNKシグナル伝達を、薬理的介入を開発するための有力な標的とする。幾つかの神経障害のうち、JNKシグナル伝達は、特に、虚血性脳卒中およびパーキンソン病だけでなく、以下にさらに説明する他の疾患に関連している。さらに、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）p38αは、JNK-cJun経路を中和することによって細胞増殖に負の調節をすることが示された。従って、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）p38αは、正常および癌細胞の増殖の抑制においてアクティブであると考えられ、さらに、癌疾患におけるJNKの関与を示している（例えば、Hui et al., Nature Genetics, Vol 39, No. 6, (2007年6月)を参照）。c-JunN-末端キナーゼ（JNK）が、脊髄神経ライゲーション（SNL）によって発生する神経障害性の痛みに関係があることも示されている。ここで、SNLは、JNK、特にJNK1のゆっくり且つ持続する活性化を誘導するが、p38マイトジェン活性化プロテインキナーゼの活性化は、SNLの後の脊髄小膠細胞において見出され、21日間でほとんど基礎レベルまで低下

10

20

30

40

50

した (Zhuang et al., The Journal of Neuroscience, 2006年3月29日, 26(13):3551-3560) )。

【0003】

従って、JNKシグナル伝達経路を阻害または妨害すること、特に、JNKシグナル伝達経路の阻害剤を供給することは、JNKシグナル伝達に強く関連する障害を戦う有効な手段であると考えられる。しかし、現在のところ、幾つかのJNKシグナル伝達経路の阻害剤だけが知られている。

【0004】

従来技術において既に知られているJNKシグナル伝達経路の阻害剤は、特に、例えば、上流側のキナーゼ阻害剤 (例えば、CEP-1347) は、例えばプロテインキナーゼのATP-結合部位と競合することによって、キナーゼ活性に直接作用するJNKの低分子の化学阻害剤 (SP600125およびAS601245)、および、JNKとその基質 (D-JNKIおよびI-JIP) との間の相互作用のペプチド性阻害剤を含む (例えば、Kuan et al., Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders, 2005年2月, vol. 4, no. 1, pp. 63-67 (5) を参照)。

【0005】

上流側のキナーゼ阻害剤CEP-1347 (KT7515) とは、混合系統キナーゼファミリーの半合成の阻害剤である。CEP-1347 (KT7515) は、栄養の供与を停止した後の一次胚培養物および分化したPC12細胞において、並びに、1-メチル-4-フェニルテトラヒドロピリジンで処置したマウスにおいて、c-Junアミノ末端キナーゼ (JNK) の活性化を阻害する量でニューロンの生存を促進する。さらに、CEP-1347 (KT7515) が、培養されたニワトリ胚後根神経節、交感神経ニューロン、毛様体ニューロン、および運動ニューロンの長期生存を促進することが可能である (例えば、Borasio et al., Neuroreport, 9(7) 1435-1439 (1998年5月11日) を参照)。

【0006】

この低分子の化学JNK阻害剤SP600125は、c-Junリン酸化のレベルを低減し、ドーパミン作動性ニューロンをアポトーシスから保護し、C57BL/6NマウスにおけるMPTP-誘発PDのドーパミンのレベルを部分的に回復させることが見出された (Wang et al., Neurosci Res. 2004年2月; 48(2); 195-202)。これらの結果は、JNK経路が、インビボのMPTPの神経毒性作用の主な媒介体であることをさらに示しており、JNK活性を阻害することは、PDを処置するための新規且つ効果的な戦略を示し得る。

【0007】

低分子の化学JNK阻害剤のさらなる例は、上述のJNK-阻害剤AS601245である。AS601245は、JNKシグナル伝達経路を阻害し、大脳虚血後の細胞生存を促進する。インビボでは、AS601245は、広範囲の一過性虚血のアレチネズミモデルにおいて、海馬CA1ニューロンの遅延損失に対する有意な保護を提供した。この作用は、JNK阻害によって、従ってc-Jun発現およびリン酸化によって、媒介される (例えば、Carboni et al., J Pharmacol Exp Ther. 2004年7月; 310(1) 25-32. Epub 2004年2月26日を参照)。

【0008】

JNKシグナル伝達経路の阻害剤の第3のクラスは、上述のように、JNKとその基質との間の相互作用のペプチド性阻害剤を示している。このようなJNK阻害剤ペプチドの構築の開始点として、天然に存在するJNK蛋白質の配列アラインメントを用いてもよい。典型的には、これらの蛋白質は、JNK結合ドメイン (JBD) を含み、IB1またはIB2といった種々なインスリン結合 (IB) 蛋白質に存在する。このような典型的な配列アラインメントの結果は、例えば、IB1 [配列番号13]、IB2 [配列番号14]

、c-Jun [配列番号15]、およびATF2 [配列番号16]のJNK結合ドメイン間の配列アラインメントである（例えば、図1A～1Cを参照）。このようなアラインメントによって、部分的に保存された8つのアミノ酸配列（例えば、図1Aを参照）が明らかにされる。IB1のJBDとIB2のJBDとの間の比較により、これら2つの配列間で高度に保存された、7つのアミノ酸および3つのアミノ酸の2つのブロックが明らかになる。

#### 【0009】

このようなアラインメントに基づいて構築された配列は、例えば、WO01/27268号公報またはWO2007/031280号公報に開示されている。WO2007/031280号公報およびWO01/27268号公報は、低分子の細胞透過性融合ペプチドを開示している。このペプチドは、HIV-TAT蛋白質の基本的な輸送配列に由来するいわゆるTAT細胞浸透配列と、IB1の最小20個のアミノ酸の阻害配列とを含む。どちらの成分も、互いに共有結合している。WO2007/031280号公報およびWO01/27268号公報の両方に開示された、MAPK-JNKシグナル伝達経路の典型的な（且つ現在のところ唯一の）阻害剤は、例えば、L-JNKI1（Lアミノ酸から構成されるJNK-阻害剤ペプチド）、またはプロテアーゼ耐性D-JNKI1ペプチド（非ネイティブDアミノ酸から構成されるJNK-阻害剤ペプチド）である。これらのJNK-阻害剤（JNKI）ペプチドは、JNK（JNK1、JNK2、およびJNK3）に特異的である。上述のこれらの低分子の化合物阻害剤とは対照的に、WO2007/031280号公報またはWO01/27268号公報の阻害剤配列、例えば、JNKI1は、むしろ、JNKとその基質との間の相互作用を阻害する。融合ペプチドは、TATに由来するその輸送配列によって、細胞の中に効率よく輸送される。輸送成分によって得られるこの新規の特性によって、融合ペプチドは、細胞の中に能動的に輸送され、該細胞において、これら融合ペプチドは、蛋白質分解されるまで、有効に維持される。

#### 【0010】

しかし、WO2007/031280号公報またはWO01/27268号公報に係るペプチドは、限られた数の疾患、特に非一悪性の疾患または免疫学的に関連する細胞増殖性疾患といった疾患において有効であることが示されただけである。

#### 【0011】

従って、本発明の一目的は、JNK阻害剤ペプチドで戦うことが可能なさらなる疾患を特定することにある。本発明の他の一目的は、新規のJNK阻害剤ペプチドおよびその誘導体（の使用）を、上述の疾患、およびJNKシグナル伝達に強く関連することがまだ知られていない、または既に知られている疾患の処置のために、提供することにある。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0012】

【特許文献1】国際公開第01/27268号

【特許文献2】国際公開第2007/031280号

#### 【非特許文献】

#### 【0013】

【非特許文献1】Hui et al., Nature Genetics, Vol 39, No. 6, (2007年6月)

【非特許文献2】Zhuang et al., The Journal of Neuroscience, 2006年3月29日, 26(13):3551-3560)

【非特許文献3】Kuan et al., Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders, 2005年2月, vol. 4, no. 1, pp. 63-67(5)

【非特許文献4】Borasio et al., Neuroreport. 9(7) 1435-1439 (1998年5月11日)

【非特許文献5】Wang et al., Neurosci Res. 2004年2月; 48(2); 195-202

【非特許文献6】Carboni et al., J Pharmacol Exp Ther. 2004年7月; 310(1)25-32. Epub 2004年2月26日

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

この目的は、被験体におけるJNKシグナル伝達に強く関連する種々の炎症性または非炎症性疾患を処置するための薬剤組成物を調製するための、150個未満のアミノ酸の長さを典型的に含む、好ましくは、本明細書において規定される、JNK阻害剤配列の使用であって、疾患または障害が、以下の群：

(a) 脳脊髄炎、特に、急性播種性脳脊髄炎、脊椎炎、特に、強直性脊椎炎、抗シンセターゼ症候群、皮膚炎、特に、アトピー性皮膚炎または接触性皮膚炎、肝炎、特に、自己免疫性肝炎、自己免疫性末梢神経障害、膵炎、特に、自己免疫性膵炎、ベーチェット病、ビッカースタッフ型脳炎、ブラウ症候群、セリアック病、シャーガス病、多発性神経障害、特に、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、骨髄炎、特に、慢性再発性多巣性骨髄炎、チャークーストラウス症候群、コーガン症候群、巨細胞性動脈炎、CREST症候群、血管炎、特に、皮膚小血管性血管炎および蕁麻疹様血管炎、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、全身性強皮症、ドレスラー症候群、薬物誘発性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、腱付着部炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸炎、結節性紅斑、特発性肺線維症、胃炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホシェーンライン紫斑病、汗腺膿瘍、特発性炎症性脱髄性疾患、筋炎、特に、封入体筋炎、膀胱炎、特に、間質性膀胱炎、川崎病、扁平苔癬、ルポイド肝炎、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織疾患、脊髄炎、特に、視神経脊髄炎、甲状腺炎、特に、オールド甲状腺炎、リウマチ、特に、回帰性リウマチ、パーソンネージターナー症候群、尋常性天疱瘡、静脈周囲性脳脊髄炎、結節性多発動脈炎、多発筋痛症、特に、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、肝硬変、特に、原発性胆汁性肝硬変、胆管炎、特に、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性神経障害、ラスムッセン脳炎、再発性多発性軟骨炎、関節炎、特に、反応性関節炎（ライター病）および関節リウマチ、リウマチ熱、サルコイドーシス、シュニッツラー症候群、血清病、脊椎関節症、高安動脈炎、トロサーハント症候群、横断性脊髄炎、およびウェゲナー肉芽腫症、

(b) 特に、ぶどう膜炎、強膜炎、角膜手術、結膜炎、非感染性角膜炎、虹彩炎、脈絡網膜炎、眼の網膜を損傷する炎症性疾患（網膜症）、特に、糖尿病性網膜症、動脈性高血圧症誘発性高血圧性網膜症、放射線誘発性網膜症、太陽光誘発性日光網膜症、外傷誘発性網膜症、例えば、プルチェル網膜症、未熟児網膜症（ROP）、および過粘稠度関連網膜症から選択される、眼の炎症性疾患、

(c) アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis）、抗リン脂質症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性多内分泌症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、バロー同心円性硬化症、水疱性類天疱瘡、キャッスルマン病、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症疾患、補体成分2欠損関連疾患、クッシング症候群、デゴス病（Dagosa disease）、有痛脂肪症、好酸球性肺炎、後天性表皮水疱症、新生児の溶血性疾患、寒冷グロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形成症、消化器性類天疱瘡、グッドパスチャー症候群、橋本脳症、妊娠性類天疱瘡、ヒューズストーヴィン症候群、低ガンマグロブリン血症、ランバートーイトン筋無力症候群、硬化性苔癬、限局性強皮症、急性痘瘡状苔癬状靴糠疹、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋緊張病、オプソクロノスミオクロノス症候群、傍腫瘍性小脳変性、発作性夜間血色素尿症、パリ

10

20

30

40

50

ーロンベルク症候群、悪性貧血、P O E M S 症候群、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、レイノー現象、むずむず脚症候群、後腹膜線維症、2 型自己免疫性多内分泌症候群、スティッフパーソン症候群、スザック症候群、熱性好中球性皮膚病、シドナム舞蹈病、血小板減少症、および白斑、

(d) 関節炎、特に、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎および関節リウマチ、ならびに関節症、ならびに骨関節炎、

(e) 特に、乾癬、湿疹、皮膚炎、座瘡、口腔内潰瘍、紅斑、扁平苔癬 ( l i c h e n p l a n )、サルコイドーシス ( s a r c o i d o s e )、血管炎 ( v a s c u l a r i t i s )、成年性線状 I g A 疾患から選択される、皮膚疾患、

(f) タウオパシー、アミロイドーシス ( a m y l o i d o s e s )、およびプリオン病、

(g) ポリープ、

(h) 口腔または顎骨の炎症性疾患、特に、歯髓炎、インプラント周囲炎、歯周炎、歯肉炎、口内炎、粘膜炎、剥離性障害、顎関節障害、

(i) 骨壊死、

(j) 加齢黄斑変性 ( A M D : a g e - r e l a t e d m a c u l a r d e g e n e r a t i o n )、特に、加齢黄斑変性の滲出型および萎縮型、ならびに白内障、

(k) 特に、肺線維症、心臓線維症、肝臓線維症、骨髄線維症、縦隔線維症、後腹膜線維症、皮膚線維症、腸線維症、関節線維症、および肩線維症から選択される、線維性疾患および／または線維性障害、

(l) 特に、糸球体腎炎一般、特に、膜性増殖性糸球体腎炎、メサングウム増殖性糸球体腎炎、急性進行性糸球体腎炎、腎症 ( n e p h r o p h a t h i e s ) 一般、特に、膜性腎症または糖尿病性腎症、腎炎一般、特に、ループス腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、尿管間質性腎炎、慢性腎炎または急性腎炎、および微小変化群、ならびに巣状分節状糸球体硬化症から選択される、腎疾患および／または腎障害、

(m) 交感性眼炎、

(n) 腎臓、心臓、肺、脾臓、肝臓、血液細胞、骨髄、角膜、偶発的に切断された四肢、特に、指、手、足、顔面、鼻梁、骨、心弁、血管、または腸の移植片拒絶反応、

(o) 大脳皮質基底核変性症、進行性 ( p r o g r e s s i v e ) 核上麻痺、統合失調症、遺伝性クロイツフェルトーヤコブ病、運動ニューロン病 ( m o t o r n e u r o n e d i s e a s e )、脊髄小脳性運動失調／脊髄小脳萎縮 ( a t r o p h i e )、認知症、特に、前頭側頭型認知症、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、遺伝性痙性対麻痺、フリードライヒ運動失調症 ( F r i e d r e i c h ' s a t a x i e a )、シャルコーマリートウス病 ( C h a r c o t M a r i e t o o t )、および

(p) 特に、炭水化物代謝の代謝性障害、例えば、糖原病、アミノ酸代謝障害、例えば、フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、グルタル酸血症 1 型、尿素サイクル障害または尿素サイクル欠損症、例えば、カルバモイルリン酸シンセターゼ I 欠損症、有機酸代謝障害 (有機酸尿症)、例えば、アルカプトン尿症、脂肪酸酸化障害およびミトコンドリア代謝障害、例えば、中鎖アシルーコエンザイム A デヒドロゲナーゼ欠損症 ( M C A D D と略記されることが多い)、ポルフィリン代謝障害、例えば、急性間欠性ポルフィリン症、プリン代謝障害またはピリミジン代謝障害、例えば、レッシューナイハン症候群、ステロイド代謝障害、例えば、先天性リポイド副腎過形成、または先天性副腎過形成、ミトコンドリア機能障害、例えば、カーンズーセイヤー症候群、ペルオキシソーム機能障害、例えば、ツェルウェーガー症候群、またはリソソーム蓄積症、例えば、ゴーシェ病またはニーマン・ピック病の群から選択される、遺伝性または非遺伝性の代謝性疾患から選択される、使用によって解決される。

【0015】

好ましい一実施形態によれば、処置される障害／疾患は、滲出型または萎縮型の A M D、ならびに白内障である。

【0016】

10

20

30

40

50

好ましい一実施形態によれば、処置される障害／疾患は、網膜症、特に、糖尿病性網膜症である。

【0017】

好ましい一実施形態によれば、処置される障害／疾患は、乾癬である。

【0018】

別の好ましい実施形態によれば、処置される障害／疾患は、移植片拒絶または移植拒絶反応、特に、肝臓移植、肺移植、腎臓移植、膵臓移植、皮膚移植、または心臓移植における移植片拒絶、例えば、移植片対宿主または宿主対移植片の移植片拒絶である。

【0019】

さらに別の好ましい実施形態によれば、処置される障害／疾患は、糸球体腎炎である。

10

【0020】

さらに、以下では、処置されるさらなる疾患も開示される。

【0021】

本発明のJNK阻害剤は、例えば、例えば、急性炎症のほか、慢性炎症を含む炎症性疾患を処置するために使用することができる。本発明のJNK阻害剤を使用して、任意の種類の組織炎症、例えば、眼における炎症、口腔における炎症、特に、肺を含む呼吸器系の炎症、皮膚の炎症、心血管系内の炎症、脳の炎症、耳における炎症などを処置することができる。このような炎症性疾患状況についての幾つかの非限定的な例は、粘膜炎、口内炎、インプラント周囲炎、網膜炎、脈絡膜炎、乾燥性角結膜炎、炎症性腸疾患（IBD）、ぶどう膜炎（例えば、前部ぶどう膜炎、中間部ぶどう膜炎、後部ぶどう膜炎）、歯周炎、COPD、喘息、歯髄炎、関節リウマチ、骨関節炎、クローン病、乾癬性関節炎、血管炎、間質性膀胱炎；感染部位または創傷部位の急性炎症、髄膜炎、脳炎、肺炎、咽頭炎、扁桃炎、耳炎（中耳炎を含む）、血管炎、滑膜炎、腸炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植片拒絶などである。

20

【0022】

本明細書において開示されるJNK阻害剤は、例えば、耳疾患（特に、内耳の疾患）、聴覚喪失（特に、急性聴覚喪失）、有毛細胞不動毛の傷害、有毛細胞のアポトーシス、騒音性外傷、耳炎、中耳炎などの処置法において使用することができる。聴覚喪失および関連する有毛細胞のアポトーシスは、細胞に対するストレス状況から生じる障害であって、JNK阻害により、ストレス応答を調整し、例えば、アポトーシスを遮断し得る障害についての非限定的な例である。

30

【0023】

本発明のJNK阻害剤はまた、代謝性障害を処置するために、例えば、糖尿病（1型または2型、特に、1型）、ファブリー病、ゴーシェ病、低体温症、高体温症、低酸素症、脂質性組織球増殖症、リポドーシス、異染性白質萎縮症、ムコ多糖症、ニーマンピーク病、肥満、およびウォルマン病を処置するためにも使用することができる。低体温症、高体温症、および低酸素症はまた、細胞に対するストレス状況であって、JNK阻害により、ストレス応答を調整し、例えば、アポトーシスを遮断し得るストレス状況についての非限定的な例でもある。

【0024】

同様に、本発明のJNK阻害剤は、神経疾患、神経細胞疾患、および／または神経変性疾患のそれぞれを処置するために使用することもできる。このような疾患についての例は、例えば、アレクサンダー病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、卒中、毛細血管拡張性運動失調、切断または他の形による軸索の破断、軸索切断、脳病変、CMT（シャルコーマリートゥース病）、大脳皮質基底核変性症、認知症、神経系の疾患または障害、ジストニア、てんかん、ファーマー病、フリードライヒ失調症（SCA）、ガングリオシドーシス、ギランバレー症候群、遺伝性痙攣性対麻痺、ヒルシュブルング病、ヒト免疫不全ウイルス性認知症、ハンチントン病、脳梗塞、虚血性脳卒中、クラッペ病、レノックス・ガストー症候群、脳回欠損、多発性硬化症、骨髄異形成症候群、脊髄症、AIDS関連神経変性疾患、神経線維腫症2型（NF-2）、神経ラチリズム（neu

40

50

rolatyerism)、ニューロンアポトーシス、ニューロン死、神経障害性疼痛、神経障害、化学療法誘発性神経障害、糖尿病誘発性神経障害、NMDA誘発性神経毒性、疼痛、パーキンソン病、パーキンソニズム、ピック病、多発性神経障害、進行性核上性麻痺、サンドホフ病、脊椎披裂、脳卒中、テイーサックス病、TBI（びまん性軸索傷害）、例えば、炎症性疼痛により誘発されるダークニューロンの処置、ウェスト症候群、脊髄筋萎縮症などである。

#### 【0025】

自己免疫性障害に関し、本発明のJNK阻害剤ペプチドを、例えば、CNSの自己免疫性疾患、自己炎症性疾患、セリアック病；シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスなどの処置法において使用することができる。

10

#### 【0026】

本発明のJNK阻害剤で処置されうる骨疾患についての例は、例えば、関節炎、椎間板ヘルニア、進行性骨化性線維異形成症（FOP）、骨関節炎、大理石骨病、骨粗鬆症、特に、糖尿病誘発性骨粗鬆症、ページェット病、関節リウマチなどである。

#### 【0027】

本発明のJNK阻害剤で処置されうる皮膚疾患についての例は、例えば、乾癬およびエリテマトーデスである。

#### 【0028】

本発明のJNK阻害剤で処置されうる眼疾患は、例えば、加齢黄斑変性（AMD）；網膜色素線条；前部虚血性視神経障害；前部ぶどう膜炎；白内障、特に、加齢白内障；中心性滲出性脈絡網膜症；中心性漿液性脈絡網膜症；霰粒腫；先天性脈絡膜欠如（chorioderemia）；脈絡膜炎（chorioiditis）；脈絡膜硬化症；結膜炎；毛様体炎；糖尿病性網膜症；ドライアイ症候群；眼内炎；上強膜炎；眼感染症；白点状眼底；脈絡膜および網膜の脳回転状萎縮症；麦粒腫；眼瞼（blephara）の炎症性疾患；脈絡膜の炎症性疾患；毛様体の炎症性疾患；結膜の炎症性疾患；角膜の炎症性疾患；虹彩の炎症性疾患；涙腺の炎症性疾患；眼窩骨の炎症性疾患；強膜の炎症性疾患；硝子体の炎症性疾患；ぶどう膜の炎症性疾患；網膜の炎症性疾患；中間部ぶどう膜炎；虹彩炎（irititis）；角膜炎；レーバー病；多巣性脈絡膜炎；眼筋の筋炎；新生血管黄斑症（例えば、強度の近視、傾斜乳頭症候群、脈絡膜骨腫などにより引き起こされる）；NMDA誘発性網膜毒性；非慢性または慢性の炎症性眼疾患；小口病；視神経疾患；眼窩蜂巣炎；汎眼球炎（panophthalmitis）；全ぶどう膜炎；後囊混濁；後発白内障（PCO）（白内障の術後合併症）；後部ぶどう膜炎；増殖性硝子体網膜症；網膜動脈閉塞症；網膜剥離、網膜疾患；網膜傷害；網膜細動脈瘤；網膜色素上皮剥離；網膜静脈閉塞症；網膜炎；色素性網膜炎；白点状網膜炎；網膜症、特に、未熟児網膜症および糖尿病網膜症；強膜炎；スターガルト病；炎症性眼創傷および／または眼創縁の処置；眼手術後または眼外傷後における眼内炎症の処置；ぶどう膜炎；および卵黄様黄斑ジストロフィーなどを包含する。

20

30

#### 【0029】

本明細書において開示されるJNK阻害剤で処置されうる例示的な口腔疾患は、歯周炎、特に、慢性歯周炎；粘膜炎、口腔剥離性障害、口腔扁平苔癬（oral lichen planus）、尋常性天疱瘡、歯髄炎；口内炎；顎関節障害、インプラント周囲炎などである。

40

#### 【0030】

本発明はまた、膀胱機能の喪失（例えば、尿失禁、過活動膀胱、間質性膀胱炎、または膀胱がん）をもたらす疾患の処置における使用にも適する。

#### 【0031】

使用の別の分野は、疼痛、特に、神経障害性疼痛、偶発性疼痛、突出痛、心因性疼痛、または幻肢痛（これらの疼痛の種類の全てが急性形態または慢性形態である）の処置である。

#### 【0032】

50

同様に、本発明の J N K 阻害剤は（既にかつて、他の J N K 阻害剤について提起された通り）、聴神経腫瘍、肺癌；急性リンパ球性白血病（L 1、L 2、L 3）；急性リンパ性白血病（A L L）；急性骨髄性白血病（A M L）；腺癌；肛門癌；気管支癌；子宮頸癌；子宮頸がん；星状細胞腫；基底細胞腫；B c r - A b l 形質転換を伴うがん；膀胱がん；線維芽細胞腫；骨がん；脳転移；脳腫瘍；乳がん；バーキットリンパ腫；カルチノイド；子宮頸がん；慢性リンパ球性白血病（C L L）；慢性骨髄性白血病（C M L）；結腸がん；結腸癌；子宮体癌；頭蓋咽頭腫（c r a n i o p h a r y n g e o m a s）；C U P 症候群；ウイルス誘発性腫瘍；E B V 誘発性 B 細胞性リンパ腫；子宮内膜癌；赤白血病（M 6）；食道がん（e s o p h a g u s c a n c e r）；胆嚢がん；消化器がん；消化管間葉系腫瘍；消化器腫瘍；尿生殖器がん；緑内障；神経膠芽腫；神経膠腫；頭頸部腫瘍；B 型肝炎誘発性腫瘍；肝細胞癌（h e p a t o c e l l c a r c i n o m a または h e p a t o c e l l u l a r c a r c i n o m a）；肝細胞癌；ヘルペスウイルス誘発性腫瘍；ホジキン症候群；H T L V - 1 誘発性リンパ腫；H T L V - 2 誘発性リンパ腫；インスリノーマ；腸がん；カポジ肉腫；腎臓がん；腎臓癌；喉頭がん；白血病；眼瞼腫瘍；肝臓がん；肝転移；肺がん；リンパ球がん；リンパ腫；悪性黒色腫；乳癌；マントル細胞リンパ腫；髄芽腫；巨核芽球性白血病（M 7）；黒色腫、特に、悪性黒色腫；髄膜腫；中皮腫；単球性白血病（M S）；多発性骨髄腫；菌状息肉腫；骨髄芽球性白血病（M 1）；骨髄芽球性白血病（M 2）；骨髄単球性白血病（M 4）；神経鞘腫（n e u r i n o m a）；非ホジキンリンパ腫；非小細胞癌；肺非小細胞癌；食道がん（o e s o p h a g e a l c a n c e r）；食道癌；希突起神経膠腫；卵巣がん；卵巣癌；膵臓がん；膵臓癌；パピローマウイルス誘発性癌；陰茎がん；脳下垂体腫瘍；形質細胞腫；前骨髄球性白血病（M 3）；前立腺がん；前立腺腫瘍；直腸腫瘍；直腸癌；腎細胞癌；網膜芽細胞腫；肉腫；シュネーベルガー病；小細胞肺癌；小腸がん；小腸腫瘍；軟組織腫瘍；棘細胞腫；扁平上皮癌；胃がん；精巣がん；咽頭がん；胸腺腫；甲状腺がん；甲状腺癌；舌がん；未分化 A M L（M O）；尿道がん；子宮がん；膣がん；フォンヒッペル＝リンダウ病；外陰がん；ウィルムス腫瘍；色素性乾皮症など、がんおよび腫瘍性疾患などの増殖性疾患を処置するために使用することもできる。

### 【0033】

J N K シグナル伝達はまた、多くの心血管疾患および障害にも関与しているので、このような疾患の処置における J N K 阻害剤の使用は、既に過去にも示唆されている。したがって、本発明の阻害剤は、例えば、動脈性高血圧症；動脈硬化症；動脈硬化性病変；ベーチェット症候群；血管分岐；心肥大；心血管肥大；心筋症、特に、化学療法誘発性心筋症；脳虚血；冠動脈性心疾患；腹部大動脈の拡張；限局性脳虚血；全脳虚血；心臓肥大；腎臓下動脈瘤（i n f r a r e n a l a n e u r i s m）性高血圧症；虚血；心筋梗塞、特に、急性心筋梗塞；心筋炎；再灌流；再狭窄；血管炎；ウェゲナー肉芽腫症などの心血管疾患を処置するために使用することができる。

### 【0034】

本発明の J N K 阻害剤はまた、心血管疾患の文脈で、冠動脈バイパス移植術（C A B G 術）；経皮的冠動脈形成術（P T C A）；および／またはステント処置に対して補完的に使用して、例えば、前記（手術）処置から生じる内膜過形成を予防または処置することもできる。

### 【0035】

本発明の J N K 阻害剤で効果的に処置されうる呼吸器系疾患、および、特に、肺疾患は、例えば、急性呼吸窮迫症候群（A R D S）；喘息；呼吸器系を侵す慢性疾患；慢性閉塞性肺疾患（C O P D）；嚢胞性線維症；炎症性肺疾患；肺炎；肺線維症などである。

### 【0036】

先行技術における阻害剤と同様、本発明の阻害剤もまた、腸管疾患、例えば、大腸炎（例えば、非定型大腸炎、化学物質性大腸炎（c h e m i c a l c o l i t i s）；コラーゲン性大腸炎、遠位大腸炎、空置大腸炎；劇症性大腸炎、分類不能大腸炎、感染性大腸炎、虚血性大腸炎、リンパ球性大腸炎、または顕微鏡的大腸炎）、クローン病、胃腸炎、

10

20

30

40

50

ヒルシュブルグ病、炎症性消化器疾患；炎症性腸疾患（IBD）、モルブスクローン病、非慢性消化器疾患または慢性消化器疾患、非慢性または慢性炎症性消化器疾患；限局性腸炎；潰瘍性大腸炎などを処置するのに使用することができる。

#### 【0037】

本発明のJNK阻害剤はまた、例えば、細菌感染またはウイルス感染から生じる感染性疾患を処置するための処置剤としても用いられうる。本明細書において開示されるJNK阻害剤は、例えば、前記感染により引き起こされる炎症反応を予防または改善することができる。このような疾患状況についての、限定的であるとは考えないものとする例は、ウイルス性脳炎；ウイルス誘発性がん（例えば、上記で言及されたとおり）、ヒト免疫不全ウイルス性認知症、髄膜炎、髄膜脳炎、脳脊髄炎、扁桃炎などである。

10

#### 【0038】

本発明のJNK阻害剤を処置として使用しうる、他の多くの疾患、疾患状況、および障害であって、例えば、アールスコグ症候群、アセトアミノフェンによる肝毒性；アルダーレイリー異常症；円形脱毛症；アルファ<sub>1</sub>-アンチトリプシン欠損症；アナフィラキシー；アポトーシス；アポトーシス性細胞死；非定型溶血性尿毒症症候群；好塩基球減少症；好塩基球増加症；双極性障害；火傷；細胞へのせん断応力；チェディアック-東症候群（Chediak-Higashi syndrome）；化学療法薬に起因するDNA傷害；胆汁うっ滞；第11染色体（11q）の部分的モノソミー；第22染色体のモザイク型トリソミー；慢性肉芽腫症；慢性肝炎または劇症肝炎などの肝炎；臨床的うつ病；分類不能型低ガンマグロブリン血症；先天性C3欠損症；活性化誘導細胞死（AICD）からのCTLの保護；難聴；抑うつおよび抑うつ障害（特に、サイトカイン誘発疾病行動のバックグラウンドにおいて発症する抑うつ障害の予防）、ディジョージ症候群；アポトーシスの欠陥により引き起こされる疾患；肝疾患；脊椎疾患；子宮疾患；DNA傷害剤および／またはイオン化放射線への曝露に起因する疾患状況および症状、ならびに結果として生じる細胞ストレス；ダウン症候群；デュシェンヌ筋ジストロフィー；外胚葉異形成症；子宮内膜症；好酸球減少症；好酸球増加症；興奮毒性（excitotoxic）細胞死；胎児性アルコール症候群；線維症；線維性疾患；線維性組織の形成；フリーラジカル（細胞ストレスをもたらす）；移植片拒絶；移植片対宿主病、特に、皮膚移植片対宿主病；脱毛；溶血性尿毒症症候群；肝毒性；糖尿病誘発性痛覚過敏などの痛覚過敏；高体温症；低血糖症；甲状腺機能低下症；特発性好酸球増加症候群；IgA腎症；小児性染色体連鎖無ガンマグロブリン血症；炎症性疼痛；腎臓下動脈瘤（infrarenal aneurysm）；臍島再生；臍島移植；ヨブ症候群（高IgE症候群）；怠惰白血球症候群；白血球グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症；白質萎縮症；白血球減少症；リンパ球性白血球増加症；リンパ球減少症；リンパ球増加症；大うつ病；躁病；躁うつ病；マルファン症候群；肥満細胞症；メイ-ヘグリン異常症；II型膜性増殖性子球体腎炎；単球減少症；単球増加症；良性ミエロペルオキシダーゼ欠損症；ミオパシー；好中球減少症；好中球増加症；ネゼロフ症候群；臓器移植；酸化ストレスによる傷害；ペルグルフェット核異常；多嚢胞性腎疾患；透析後症候群；放射線症候群；放射線治療；腎疾患；腎不全；活性化誘導細胞死からのCTLのレスキュー；重度の複合型免疫不全疾患；移植拒絶；移植；トリソミー；単極性うつ病；UV誘発性傷害；ウィスコット-アルドリッチ症候群；創傷治癒などの疾患、疾患状況、および障害も存在する。

20

30

40

#### 【0039】

本発明の発明者らは、顎関節障害、粘膜炎、口内炎、口腔扁平苔癬（oral lichen planus）（剥離性障害）、尋常性天疱瘡（剥離性障害）、歯周炎、慢性歯周炎、歯髓炎、インプラント周囲炎、ぶどう膜炎（前部ぶどう膜炎、中間部ぶどう膜炎、後部ぶどう膜炎）、乾燥性角結膜炎（ドライアイ症候群）、冠動脈バイパス移植術（CABG術）、急性心筋梗塞、経皮的冠動脈形成術（PTCA）後における内膜過形成の予防、ステント留置後における内膜過形成の予防、アテローム性動脈硬化、COPD、喘息、関節リウマチ、骨関節炎、クローン病、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬、糖尿病、脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、全身性エリテマトーデス、および血管炎、特に、

50

ウェゲナー肉芽腫症は特に、本発明の J N K 阻害剤による処置に有用であると考える。

#### 【0040】

本発明の別の態様によれば、組織移植片または臓器移植片を、その移植の前に、（インビトロで）処置するための、150個未満のアミノ酸の長さを含む阻害剤配列。通例、脳死ドナーに由来する移植片は、W I T をかけず、8～12時間の C I T（調達病院から単離ラボへの輸送に必要とされる時間）にあることが典型的である。このような移植片は、宿主へと移植されるまで、それらの生存率および機能性を改善するために、本発明による J N K 阻害剤で前処置しうることが判明した。本発明のこの態様では、移植片は、腎臓、心臓、肺、膵臓、肝臓、血液細胞、骨髄、角膜、偶発的に切断された四肢、特に、指、手、足、顔面、鼻梁、骨、心弁、血管、または腸の移植片、好ましくは、腎臓、心臓、膵臓、または皮膚の移植片である。

10

#### 【0041】

当該技術分野において公知の J N K 阻害剤配列は、限られた数の疾患にしか有用性が証明されていないので、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列が、上述の J N K シグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するために使用可能であると共に該処置に適していることは、驚くべき所見であった。J N K 阻害剤配列は、概して、当該技術分野において公知であったが、上記のことは、従来技術によって明白でもなかったし示唆されるものでもなかった。

#### 【0042】

典型的に、上記で規定された J N K 阻害剤配列は、ヒトまたはラット I B 1 配列に由来し、好ましくは、配列番号 102（ラットからの I B 1 c D N A 配列およびその予測されるアミノ酸配列を示す）、配列番号 103（r I B 1 遺伝子—スプライス供与体のエキソーン—イントロン境界によってコードされたラットからの I B 1 蛋白質配列を示す）、配列番号 104（ホモサピエンスからの I B 1 蛋白質配列を示す）、または、配列番号 105（ホモサピエンスからの I B 1 c D N A 配列を示す）に記載の配列のうちのいずれかによって規定された、またはコードされたアミノ酸配列に由来し、より好ましくは、配列番号 104（ホモサピエンスからの I B 1 蛋白質配列を示す）、または、配列番号 105（ホモサピエンスからの I B 1 c D N A 配列を示す）に記載の配列のうちのいずれかによって規定された、またはコードされたアミノ酸配列に由来し、または、これらの任意の断片または改変体に由来してよい。換言すると、J N K 阻害剤配列は、ヒト若しくはラット I B 1 配列の断片、改変体、または、このような断片の改変体を含む。ヒトまたはラット I B 配列は、それぞれ、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、または配列番号 105 に記載の配列によって規定またはコードされる。

20

30

#### 【0043】

好ましくは、本明細書において用いられるような J N K 阻害剤配列は、全部で、150個よりも短い長さのアミノ酸残基、好ましくは、5～150個の範囲の長さのアミノ酸残基、より好ましくは10～100個の範囲のアミノ酸残基、さらにより好ましくは10～75個の範囲の長さのアミノ酸残基、および最も好ましくは10～50個の範囲の長さのアミノ酸残基、例えば、10～30個、10～20個、または、10～15個の長さのアミノ酸残基を含む。

40

#### 【0044】

より好ましくは、このような J N K 阻害剤配列および上述の範囲は、上述の配列のうちのいずれかから、さらにより好ましくは、配列番号 104 に従って規定された、または配列番号 105 によってコードされたアミノ酸配列から選択され、さらにより好ましくは、配列番号 105 のヌクレオチド 420 と 980 の間の領域において、または、配列番号 104 のアミノ酸 105 と 291 との間の領域において、および最も好ましくは、配列番号 105 のヌクレオチド 561 と 647 との間の領域において、または配列番号 104 のアミノ酸 152 と 180 との間の領域において、選択され得る。

#### 【0045】

具体的な一実施形態によれば、本明細書において使用される J N K 阻害剤配列は、典型

50

的には、J N Kを結合し、および／または、少なくとも1つのJ N K活性化転写因子、例えば、c - J u nまたはA T F 2（例えば、各配列番号15および16を参照）、またはE l k 1の活性化を阻害する。

#### 【0046】

同様に、本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、好ましくは、配列番号1～4、13～20、および33～100のいずれか1つに記載の少なくとも1つのアミノ酸配列、または、その断片、誘導体、若しくは改変体を含むか、または、これから構成される。より好ましくは、本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載のアミノ酸配列、またはその改変体、断片、または誘導体の、1、2、3、4、またはさらにそれより多くのコピーを含んでいてよい。1つより多いコピーが存在するならば、本明細書において使用される、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載のこれらのアミノ酸配列、またはその改変体、断片、若しくは誘導体は、いかなるリンカー配列も無しに、または1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸を含むリンカー配列を介して、直接互いに連結し得る。リンカー配列を形成するアミノ酸は、好ましくは、アミノ酸残基としてのグリシンまたはプロリンから選択されている。より好ましくは、本明細書において使用される、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載のこれらのアミノ酸配列、または、その断片、改変体、若しくは誘導体は、2つ、3つ、またはそれより多くのプロリン残基のヒンジによって互いに分離され得る。

#### 【0047】

本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、L - アミノ酸、D - アミノ酸、または、これらの組み合わせから構成されていてよい。好ましくは、本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、少なくとも1またはさらに2個、好ましくは少なくとも3、4または5個、より好ましくは少なくとも6、7、8、または9個、およびさらにより好ましくは、少なくとも10個またはそれより多くの、D - アミノ酸および／またはL - アミノ酸を含み、ここで、D - アミノ酸および／またはL - アミノ酸は、本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列において、ブロック状、非ブロック状、または交互になった様式に、配置されていてよい。

#### 【0048】

好ましい一実施形態によれば、本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、L - アミノ酸だけから構成されていてよい。本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、さらにまた、配列番号1または3に記載の、少なくとも1つの「ネイティブJ N K阻害剤配列」を含むか、またはこれから構成されていてよい。これに関して、「ネイティブ」または「ネイティブJ N K阻害剤配列」という用語は、本明細書において使用されるように全体がL - アミノ酸から構成された、配列番号1または3のいずれかに記載の変換されていないJ N K阻害剤配列を指す。

#### 【0049】

従って、本明細書において使用されるJ N K阻害剤配列は、少なくとも1つの（ネイティブ）アミノ酸配列 $\text{NH}_2 - \text{X}_n^b - \text{X}_n^a - \text{RPTTLXLXXXXXXQD} - \text{X}_n^b - \text{COOH}$ （L - I Bジェネリック（s））[配列番号3]、および／または、I B 1のJ N K結合ドメイン（J B D） $\text{XRPTTLXLXXXXXXQDS} / \text{TX}$ （L - I B（ジェネリック））[配列番号19]を含むか、またはこれから構成されていてよい。これに関して、各Xは、典型的には、好ましくは任意の（ネイティブ）アミノ酸残基から選択されたアミノ酸残基を示す。 $\text{X}_n^a$ は、典型的には、好ましくは、セリンまたはトレオニンを除く任意のアミノ酸残基から選択された1つのアミノ酸残基を示す。ここで、n（Xの繰り返しの数）は、0または1である。さらに、各 $\text{X}_n^b$ は、任意のアミノ酸残基から選択されていてよく、ここでn（Xの繰り返しの数）は、0～5、5～10、10～15、15～20、20～30、またはそれより多くてよいが、それは、 $\text{X}_n^a$ のn（Xの繰り返しの数）が0である場合に、 $\text{X}_n^b$ は、好ましくは、そのC末端においてセリンまたはトレオニンを含まず、この位置においてセリンまたはトレオニンを回避することを

条件とする。好ましくは、 $X_n^b$ は、配列番号1または3に由来するペプチド残基の連続したストレッチを示す。 $X_n^a$ および $X_n^b$ は、Dアミノ酸またはLアミノ酸のいずれかを示す。さらに、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列は、IB1のJNK結合ドメイン DTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT (L-IB1) [配列番号17]を含む群から選択される少なくとも1つの(ネイティブ)アミノ酸配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。より好ましくは、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列はさらに、少なくとも1つの(ネイティブ)アミノ酸配列 $NH_2-RPKRPTTLNLFPPQVPRSQD-COOH$  (L-IB1(s)) [配列番号1]を含むか、またはこれから構成されていてよい。さらに、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列は、IB1のJNK結合ドメインであるL-IB1(s1) ( $NH_2-TTLNLFPPQVPRSQD-COOH$ , 配列番号33); L-IB1(s2) ( $NH_2-TTLNLFPPQVPRSQ-COOH$ , 配列番号34); L-IB1(s3) ( $NH_2-PTTLNLFPPQVPRS-COOH$ , 配列番号35); L-IB1(s4) ( $NH_2-RPKRPTTLNLFPPQVPR-COOH$ , 配列番号36); L-IB1(s5) ( $NH_2-KRPTTLNLFPPQVP-COOH$ , 配列番号37); L-IB1(s6) ( $NH_2-PRPKRPTTLNLFPPQV-COOH$ , 配列番号38); L-IB1(s7) ( $NH_2-RPKRPTTLNLFPPQ-COOH$ , 配列番号39); L-IB1(s8) ( $NH_2-LNLFPPQVPRSQD-COOH$ , 配列番号40); L-IB1(s9) ( $NH_2-TTLNLFPPQVPRSQ-COOH$ , 配列番号41); L-IB1(s10) ( $NH_2-TTLNLFPPQVPRS-COOH$ , 配列番号42); L-IB1(s11) ( $NH_2-PTTLNLFPPQVPR-COOH$ , 配列番号43); L-IB1(s12) ( $NH_2-RPKRPTTLNLFPPQVP-COOH$ , 配列番号44); L-IB1(s13) ( $NH_2-KRPTTLNLFPPQV-COOH$ , 配列番号45); L-IB1(s14) ( $NH_2-PRPKRPTTLNLFPPQ-COOH$ , 配列番号46); L-IB1(s15) ( $NH_2-RPKRPTTLNLFPP-COOH$ , 配列番号47); L-IB1(s16) ( $NH_2-LNLFPPQVPRSQD-COOH$ , 配列番号48); L-IB1(s17) ( $NH_2-LNLFPPQVPRSQ-COOH$ , 配列番号49); L-IB1(s18) ( $NH_2-TTLNLFPPQVPRS-COOH$ , 配列番号50); L-IB1(s19) ( $NH_2-PTTLNLFPPQVPR-COOH$ , 配列番号51); L-IB1(s20) ( $NH_2-PTTLNLFPPQVP-COOH$ , 配列番号52); L-IB1(s21) ( $NH_2-RPKRPTTLNLFPPQV-COOH$ , 配列番号53); L-IB1(s22) ( $NH_2-KRPTTLNLFPPQ-COOH$ , 配列番号54); L-IB1(s23) ( $NH_2-PRPKRPTTLNLFPP-COOH$ , 配列番号55); L-IB1(s24) ( $NH_2-RPKRPTTLNLF-COOH$ , 配列番号56); L-IB1(s25) ( $NH_2-LFPQVPRSQD-COOH$ , 配列番号57); L-IB1(s26) ( $NH_2-LNLFPPQVPRSQ-COOH$ , 配列番号58); L-IB1(s27) ( $NH_2-LNLFPPQVPRS-COOH$ , 配列番号59); L-IB1(s28) ( $NH_2-TTLNLFPPQVPR-COOH$ , 配列番号60); L-IB1(s29) ( $NH_2-TTLNLFPPQVP-COOH$ , 配列番号61); L-IB1(s30) ( $NH_2-PTTLNLFPPQV-COOH$ , 配列番号62); L-IB1(s31) ( $NH_2-RPKRPTTLNLFPPQ-COOH$ , 配列番号63); L-IB1(s32) ( $NH_2-KRPTTLNLFPP-COOH$ , 配列番号64); L-IB1(s33) ( $NH_2-PRPKRPTTLNLF-COOH$ , 配列番号65); およびL-IB1(s34) ( $NH_2-RPKRPTTLNLF-COOH$ , 配列番号66)を含む群から選択される少なくとも1つの(ネイティブ)アミノ酸配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。

#### 【0050】

さらに、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列は、IB1の(ロング)JNK結合ドメイン(JBD) PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT (IB1-ロング) [配列番号13]と、IB2の(ロング)JNK結合ドメイン I

P S P S V E E P H K H R P T T L R L T T L G A Q D S ( I B 2-ロング) [配列番号 14] と、c-Jun の JNK 結合ドメイン G A Y G Y S N P K I L K Q S M T L N L A D P V G N L K P H (c-Jun) [配列番号 15] と、ATF2 の JNK 結合ドメイン T N E D H L A V H K H K H E M T L K F G P A R N D S V I V (ATF2) [配列番号 16] とを含む群から選択される少なくとも 1 つの (ネイティブ) アミノ酸配列を含むか、またはこれから構成されていてよい (例えば、図 1 A ~ 1 C を参照)。これに関して、部分的に保存された 8 つのアミノ酸配列 (例えば図 1 A を参照) が、アラインメントによって明らかにされ、I B 1 の JBD と I B 2 の JBD とをさらに比較することによって、これら 2 つの配列間で高度に保存された、7 つのアミノ酸および 3 つのアミノ酸の 2 つのブロックが明らかにされた。

10

#### 【0051】

他の好ましい一実施形態によれば、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、部分的に、上記で規定された D-アミノ酸から構成される、または全くこれのみから構成されていてよい。より好ましくは、D-アミノ酸から構成されるこれらの JNK 阻害剤配列は、上述の (ネイティブ) JNK 阻害剤配列の非ネイティブ D レトロインベルソ配列である。「レトロインベルソ配列」という用語は、配列の方向が逆であり各アミノ酸残基の対掌性が反転された、直線状のペプチド配列の異性体 (例えば、Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994) を参照) を指す。D-鏡像異性体と逆合成とを組み合わせることの利点は、各アミド結合内のカルボニル基の位置とアミノ基の位置とが交換され、各アルファ炭素内の側鎖基の位置が維持される点である。他に特別な記載がない限り、本発明に従って使用される所定の任意の L-アミノ酸配列またはペプチドは、対応するネイティブ L-アミノ酸配列またはペプチドに、逆の配列またはペプチドを合成することによって、D レトロインベルソ配列またはペプチドに変換可能であると推測される。

20

#### 【0052】

本明細書において使用されると共に上記で規定された D レトロインベルソ配列は、種々な有用な特性を有している。例えば、本明細書において使用される D レトロインベルソ配列は、本明細書において使用される L-アミノ酸配列と同じ程度、効率良く細胞の中に侵入する。その一方で、本明細書において使用される D レトロインベルソ配列は、対応する L-アミノ酸配列よりも安定している。

30

#### 【0053】

従って、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、アミノ酸配列  $\text{NH}_2 - \text{X}_n^b - \text{DQXXXXXLXLTPR} - \text{X}_n^a - \text{X}_n^b - \text{COOH}$  (D-IB1 ジェネリック (s)) [配列番号 4] および/または  $\text{XS/TDQXXXXXLXLTPR} - \text{X}_n^a - \text{X}_n^b - \text{COOH}$  (D-IB (ジェネリック)) [配列番号 20] に記載の、少なくとも 1 つの D レトロインベルソ配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。これに関して用いられるように、X、 $\text{X}_n^a$ 、および  $\text{X}_n^b$  は、上記で規定された通りであり (好ましくは、D アミノ酸を示す)、 $\text{X}_n^b$  は、好ましくは配列番号 2 または 4 に由来する残基の連続したストレッチを示す。さらに、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、I B 1 の JNK 結合ドメイン (JBD) T D Q S R P V Q P F L N L T T P R K P R Y T D (D-IB1) [配列番号 18] を含むアミノ酸配列に記載の少なくとも 1 つの D レトロインベルソ配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。より好ましくは、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、アミノ酸配列  $\text{NH}_2 - \text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPR} - \text{COOH}$  (D-IB1 (s)) [配列番号 2] に記載の少なくとも 1 つの D レトロインベルソ配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。さらに、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、I B 1 の JNK 結合ドメイン (JBD) である D-IB1 (s1) ( $\text{NH}_2 - \text{QPFLNLTTPRKPR} - \text{COOH}$ , 配列番号 67); D-IB1 (s2) ( $\text{NH}_2 - \text{VQPFLNLTTPRKPR} - \text{COOH}$ , 配列番号 68); D-IB1 (s3) ( $\text{NH}_2 - \text{PVQPFLNLTTPRK} - \text{COO}$

40

50

H, 配列番号 69); D-IB1 (s 4) ( $\text{NH}_2$ -RPVQPFLNLTTTPR-COOH, 配列番号 70); D-IB1 (s 5) ( $\text{NH}_2$ -SRPVQPFLNLTTTP-COOH, 配列番号 71); D-IB1 (s 6) ( $\text{NH}_2$ -QSRPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 72); D-IB1 (s 7) ( $\text{NH}_2$ -DQSRPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 73); D-IB1 (s 8) ( $\text{NH}_2$ -PFLNLTTTPRKPR-COOH, 配列番号 74); D-IB1 (s 9) ( $\text{NH}_2$ -QPFLNLTTTPRKPR-COOH, 配列番号 75); D-IB1 (s 10) ( $\text{NH}_2$ -VQPFLNLTTTPRK-COOH, 配列番号 76); D-IB1 (s 11) ( $\text{NH}_2$ -PVQPFLNLTTTPR-COOH, 配列番号 77); D-IB1 (s 12) ( $\text{NH}_2$ -RPVQPFLNLTTTP-COOH, 配列番号 78); D-IB1 (s 13) ( $\text{NH}_2$ -SRPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 79); D-IB1 (s 14) ( $\text{NH}_2$ -QSRPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 80); D-IB1 (s 15) ( $\text{NH}_2$ -DQSRPVQPFLNL-COOH, 配列番号 81); D-IB1 (s 16) ( $\text{NH}_2$ -FLNLTTTPRKPR-COOH, 配列番号 82); D-IB1 (s 17) ( $\text{NH}_2$ -PFLNLTTTPRKPR-COOH, 配列番号 83); D-IB1 (s 18) ( $\text{NH}_2$ -QPFLNLTTTPRK-COOH, 配列番号 84); D-IB1 (s 19) ( $\text{NH}_2$ -VQPFLNLTTTPR-COOH, 配列番号 85); D-IB1 (s 20) ( $\text{NH}_2$ -PVQPFLNLTTTP-COOH, 配列番号 86); D-IB1 (s 21) ( $\text{NH}_2$ -RPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 87); D-IB1 (s 22) ( $\text{NH}_2$ -SRPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 88); D-IB1 (s 23) ( $\text{NH}_2$ -QSRPVQPFLNL-COOH, 配列番号 89); D-IB1 (s 24) ( $\text{NH}_2$ -DQSRPVQPFLN-COOH, 配列番号 90); D-IB1 (s 25) ( $\text{NH}_2$ -DQSRPVQPFL-COOH, 配列番号 91); D-IB1 (s 26) ( $\text{NH}_2$ -QSRPVQPFLN-COOH, 配列番号 92); D-IB1 (s 27) ( $\text{NH}_2$ -SRPVQPFLNL-COOH, 配列番号 93); D-IB1 (s 28) ( $\text{NH}_2$ -RPVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 94); D-IB1 (s 29) ( $\text{NH}_2$ -PVQPFLNLTT-COOH, 配列番号 95); D-IB1 (s 30) ( $\text{NH}_2$ -VQPFLNLTTTP-COOH, 配列番号 96); D-IB1 (s 31) ( $\text{NH}_2$ -QPFLNLTTTPR-COOH, 配列番号 97); D-IB1 (s 32) ( $\text{NH}_2$ -PFLNLTTTPRK-COOH, 配列番号 98); D-IB1 (s 33) ( $\text{NH}_2$ -FLNLTTTPRKPR-COOH, 配列番号 99); および、D-IB1 (s 34) ( $\text{NH}_2$ -LNLTTTPRKPR-COOH, 配列番号 100) を含むアミノ酸配列に記載の少なくとも 1 つの D レトロインペルソ配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。

#### 【0054】

本明細書において使用される、および上記で開示された JNK 阻害剤配列は、表 1 (配列番号 1~4、13~20、および 33~100) に示されている。この表は、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列の名前およびその配列識別番号、その長さ、並びにアミノ酸配列を示している。さらに、表 1 は、例えば、配列番号 1、2、5、6、9、および 11、並びに、配列番号 3、4、7、8、10、および 12 の、配列とその一般式とをそれぞれ示す。表 1 はさらに、キメラ配列である配列番号 9~12 および 23~32 (以下を参照)、L-IB1 配列である配列番号 33~66、並びに、D-IB1 配列である配列番号 67~100 を開示している。

【表 1 - 1】

| 配列/ペプチド名              | 配列番号 | AA | 配列                                                                                                                                                                    |
|-----------------------|------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L-IB1(s)              | 1    | 19 | RPKRPTTLNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)                                                                                                      |
| D-IB1(s)              | 2    | 19 | DQSRPVQPFNLITPRKPR<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFNLITPRKPR-COOH)                                                                                                      |
| L-IB (ジェネリック) (s)     | 3    | 19 | NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -RPTTLXLXXXXXXQD-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH                                          |
| D-IB (ジェネリック) (s)     | 4    | 19 | NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -DQXXXXXXXXLXLITPR-X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH                                        |
| L-TAT                 | 5    | 10 | GRKKRRQRRR<br>(NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRR-COOH)                                                                                                                      |
| D-TAT                 | 6    | 10 | RRRQRRKKRG<br>(NH <sub>2</sub> -RRRQRRKKRG-COOH)                                                                                                                      |
| L-ジェネリック-TAT (s)      | 7    | 11 | NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RKKRRQRRR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH                                                                             |
| D-ジェネリック-TAT (s)      | 8    | 11 | NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RRRQRRKKR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH                                                                             |
| L-TAT-IB1(s)          | 9    | 31 | GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)                                                                              |
| L-TAT-IB (ジェネリック) (s) | 10   | 29 | NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RKKRRQRRR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -RPTTLXLXXXXXXQD-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH   |
| D-TAT-IB1(s)          | 11   | 31 | DQSRPVQPFNLITPRKPRPPRRRQRRKKRG<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFNLITPRKPRPPRRRQRRKKRG-COOH)                                                                              |
| D-TAT-IB (ジェネリック) (s) | 12   | 29 | NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -DQXXXXXXXXLXLITPR-X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RRRQRRKKR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH |
| IB1-long              | 13   | 29 | PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT<br>(NH <sub>2</sub> -PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH)                                                                                  |
| IB2-long              | 14   | 27 | IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTLGAQDS<br>(NH <sub>2</sub> -IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTLGAQDS-COOH)                                                                                      |
| c-Jun                 | 15   | 29 | GAYGYSNPILKQSMTLNADPVGNLKPH<br>(NH <sub>2</sub> -GAYGYSNPILKQSMTLNADPVGNLKPH-COOH)                                                                                    |
| ATF2                  | 16   | 29 | TNEDHLAVHKKHEMTLKFGRNDSVIV<br>(NH <sub>2</sub> -TNEDHLAVHKKHEMTLKFGRNDSVIV-COOH)                                                                                      |
| L-IB1                 | 17   | 23 | DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT<br>(NH <sub>2</sub> -DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH)                                                                                              |

10

20

30

【表 1 - 2】

|                   |    |    |                                                                                                                            |
|-------------------|----|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| D-IB1             | 18 | 28 | TDQSRPVQPFLNLITPRKPRYTD<br>(NH <sub>2</sub> -TDQSRPVQPFLNLITPRKPRYTD-COOH)                                                 |
| L-IB (ジェネリック)     | 19 | 19 | XRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX<br>(NH <sub>2</sub> -XRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX-COOH)                                                   |
| D-IB (ジェネリック)     | 20 | 19 | XS/TDQXXXXXXXXLXLITPRX<br>(NH <sub>2</sub> -XS/TDQXXXXXXXXLXLITPRX-COOH)                                                   |
| L-ジェネリック<br>・TAT  | 21 | 17 | XXXXRKKRRQRRRXXXX<br>(NH <sub>2</sub> -XXXXRKKRRQRRRXXXX-COOH)                                                             |
| D-ジェネリック<br>・TAT  | 22 | 17 | XXXXRRRQRRKKRXXXX<br>(NH <sub>2</sub> -XXXXRRRQRRKKRXXXX-COOH)                                                             |
| L-TAT-IB1         | 23 | 35 | GRKKRRQRRRPPDTPRKRPTTLNLFQVPRSQDT<br>(NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRRPPDTPRKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH)                             |
| L-TAT-IB (ジェネリック) | 24 | 42 | XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX<br>(NH <sub>2</sub> -XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX-COOH) |
| D-TAT-IB1         | 25 | 35 | TDQSRPVQPFLNLITPRKPRYTDPPRRRQRRKKRG<br>(NH <sub>2</sub> -TDQSRPVQPFLNLITPRKPRYTDPPRRRQRRKKRG-COOH)                         |
| D-TAT-IB (ジェネリック) | 26 | 42 | XT/SDQXXXXXXXXLXLITPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXX<br>(NH <sub>2</sub> -XT/SDQXXXXXXXXLXLITPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXX-COOH)       |
| L-TAT-IB1(s1)     | 27 | 30 | RKKRRQRRRPPRPRKRPTTLNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -RKKRRQRRRPPRPRKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)                                   |
| L-TAT-IB1(s2)     | 28 | 30 | GRKKRRQRRRX <sub>n</sub> -RPRKRPTTLNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRRX <sub>n</sub> -RPRKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)     |
| L-TAT-IB1(s3)     | 29 | 29 | RKKRRQRRRX <sub>n</sub> -RPRKRPTTLNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -RKKRRQRRRX <sub>n</sub> -RPRKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)       |
| D-TAT-IB1(s1)     | 30 | 30 | DQSRPVQPFLNLITPRKPRPPRRRQRRKKR<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLITPRKPRPPRRRQRRKKR-COOH)                                   |
| D-TAT-IB1(s2)     | 31 | 30 | DQSRPVQPFLNLITPRKPRX <sub>n</sub> -RRRQRRKKRG<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLITPRKPRX <sub>n</sub> -RRRQRRKKRG-COOH)     |
| D-TAT-IB1(s3)     | 32 | 29 | DQSRPVQPFLNLITPRKPRX <sub>n</sub> -RRRQRRKKR<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLITPRKPRX <sub>n</sub> -RRRQRRKKR-COOH)       |
| L-IB1(s1)         | 33 | 13 | TLNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -TLNLFQVPRSQD-COOH)                                                                       |
| L-IB1(s2)         | 34 | 13 | TTLNLFQVPRSQ<br>(NH <sub>2</sub> -TTLNLFQVPRSQ-COOH)                                                                       |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

|            |    |    |                                                      |
|------------|----|----|------------------------------------------------------|
| L-IB1(s3)  | 35 | 13 | PTTLNLFQVPRS<br>(NH <sub>2</sub> -PTTLNLFQVPRS-COOH) |
| L-IB1(s4)  | 36 | 13 | RPTTLNLFQVPR<br>(NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFQVPR-COOH) |
| L-IB1(s5)  | 37 | 13 | KRPTTLNLFQVP<br>(NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFQVP-COOH) |
| L-IB1(s6)  | 38 | 13 | PKRPTTLNLFQV<br>(NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFQV-COOH) |
| L-IB1(s7)  | 39 | 13 | RPKRPTTLNLFQ<br>(NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLFQ-COOH) |
| L-IB1(s8)  | 40 | 12 | LNLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -LNLFQVPRSQD-COOH)   |
| L-IB1(s9)  | 41 | 12 | TLNLFQVPRSQ<br>(NH <sub>2</sub> -TLNLFQVPRSQ-COOH)   |
| L-IB1(s10) | 42 | 12 | TTLNLFQVPRS<br>(NH <sub>2</sub> -TTLNLFQVPRS-COOH)   |
| L-IB1(s11) | 43 | 12 | PTTLNLFQVPR<br>(NH <sub>2</sub> -PTTLNLFQVPR-COOH)   |
| L-IB1(s12) | 44 | 12 | RPTTLNLFQVP<br>(NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFQVP-COOH)   |
| L-IB1(s13) | 45 | 12 | KRPTTLNLFQV<br>(NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFQV-COOH)   |
| L-IB1(s14) | 46 | 12 | PKRPTTLNLFQ<br>(NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFQ-COOH)   |
| L-IB1(s15) | 47 | 12 | RPKRPTTLNLF<br>(NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLF-COOH)   |
| L-IB1(s16) | 48 | 11 | NLFQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -NLFQVPRSQD-COOH)     |
| L-IB1(s17) | 49 | 11 | LNLFQVPRSQ<br>(NH <sub>2</sub> -LNLFQVPRSQ-COOH)     |
| L-IB1(s18) | 50 | 11 | TLNLFQVPRS<br>(NH <sub>2</sub> -TLNLFQVPRS-COOH)     |
| L-IB1(s19) | 51 | 11 | TTLNLFQVPR<br>(NH <sub>2</sub> -TTLNLFQVPR-COOH)     |
| L-IB1(s20) | 52 | 11 | PTTLNLFQVP<br>(NH <sub>2</sub> -PTTLNLFQVP-COOH)     |
| L-IB1(s21) | 53 | 11 | RPTTLNLFQV<br>(NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFQV-COOH)     |
| L-IB1(s22) | 54 | 11 | KRPTTLNLFQ<br>(NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFQ-COOH)     |

10

20

30

40

【表 1 - 4】

|            |    |    |                                                          |
|------------|----|----|----------------------------------------------------------|
| L-IB1(s23) | 55 | 11 | PKRPTTLNLFP<br>(NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFP-COOH)       |
| L-IB1(s24) | 56 | 11 | RPKRPTTLNLFP<br>(NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLFP-COOH)     |
| L-IB1(s25) | 57 | 10 | LFPQVPRSQD<br>(NH <sub>2</sub> -LFPQVPRSQD-COOH)         |
| L-IB1(s26) | 58 | 10 | NLFPQVPRSQ<br>(NH <sub>2</sub> -NLFPQVPRSQ-COOH)         |
| L-IB1(s27) | 59 | 10 | LNLFQVPRS<br>(NH <sub>2</sub> -LNLFQVPRS-COOH)           |
| L-IB1(s28) | 60 | 10 | TLNLFPQVPR<br>(NH <sub>2</sub> -TLNLFPQVPR-COOH)         |
| L-IB1(s29) | 61 | 10 | TTLNLFPQVP<br>(NH <sub>2</sub> -TTLNLFPQVP-COOH)         |
| L-IB1(s30) | 62 | 10 | PTTLNLFPQV<br>(NH <sub>2</sub> -PTTLNLFPQV-COOH)         |
| L-IB1(s31) | 63 | 10 | RPTTLNLFPQ<br>(NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFPQ-COOH)         |
| L-IB1(s32) | 64 | 10 | KRPTTLNLFP<br>(NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFP-COOH)         |
| L-IB1(s33) | 65 | 10 | PKRPTTLNLFP<br>(NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFP-COOH)       |
| L-IB1(s34) | 66 | 10 | RPKRPTTLNL<br>(NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNL-COOH)         |
| D-IB1(s1)  | 67 | 13 | QPFLNLITPRKPR<br>(NH <sub>2</sub> -QPFLNLITPRKPR-COOH)   |
| D-IB1(s2)  | 68 | 13 | VQPFLNLITPRKP<br>(NH <sub>2</sub> -VQPFLNLITPRKP-COOH)   |
| D-IB1(s3)  | 69 | 13 | PVQPFLNLITPRK<br>(NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLITPRK-COOH)   |
| D-IB1(s4)  | 70 | 13 | RPVQPFLNLITPR<br>(NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLITPR-COOH)   |
| D-IB1(s5)  | 71 | 13 | SRPVQPFLNLITP<br>(NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNLITP-COOH)   |
| D-IB1(s6)  | 72 | 13 | QSRPVQPFLNLIT<br>(NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLNLIT-COOH)   |
| D-IB1(s7)  | 73 | 13 | DQSRPVQPFLNLIT<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLIT-COOH) |
| D-IB1(s8)  | 74 | 12 | PFLNLITPRKPR<br>(NH <sub>2</sub> -PFLNLITPRKPR-COOH)     |

10

20

30

40

【表 1 - 5】

|            |    |    |                                                      |
|------------|----|----|------------------------------------------------------|
| D-IB1(s9)  | 75 | 12 | QPFLNLTPRKP<br>(NH <sub>2</sub> -QPFLNLTPRKP-COOH)   |
| D-IB1(s10) | 76 | 12 | VQPFLNLTPRK<br>(NH <sub>2</sub> -VQPFLNLTPRK-COOH)   |
| D-IB1(s11) | 77 | 12 | PVQPFLNLTPR<br>(NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTPR-COOH)   |
| D-IB1(s12) | 78 | 12 | RPVQPFLNLTP<br>(NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLTP-COOH)   |
| D-IB1(s13) | 79 | 12 | SRPVQPFLNLTT<br>(NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNLTT-COOH) |
| D-IB1(s14) | 80 | 12 | QSRPVQPFLNLT<br>(NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLNLT-COOH) |
| D-IB1(s15) | 81 | 12 | DQSRPVQPFLNL<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNL-COOH) |
| D-IB1(s16) | 82 | 11 | FLNLTPRKPR<br>(NH <sub>2</sub> -FLNLTPRKPR-COOH)     |
| D-IB1(s17) | 83 | 11 | PFLNLTPRKP<br>(NH <sub>2</sub> -PFLNLTPRKP-COOH)     |
| D-IB1(s18) | 84 | 11 | QPFLNLTPRK<br>(NH <sub>2</sub> -QPFLNLTPRK-COOH)     |
| D-IB1(s19) | 85 | 11 | VQPFLNLTPR<br>(NH <sub>2</sub> -VQPFLNLTPR-COOH)     |
| D-IB1(s20) | 86 | 11 | PVQPFLNLTP<br>(NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTP-COOH)     |
| D-IB1(s21) | 87 | 11 | RPVQPFLNLTT<br>(NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLTT-COOH)   |
| D-IB1(s22) | 88 | 11 | SRPVQPFLNLT<br>(NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNLT-COOH)   |
| D-IB1(s23) | 89 | 11 | QSRPVQPFLNL<br>(NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLNL-COOH)   |
| D-IB1(s24) | 90 | 11 | DQSRPVQPFLN<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLN-COOH)   |
| D-IB1(s25) | 91 | 10 | DQSRPVQPFL<br>(NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFL-COOH)     |
| D-IB1(s26) | 92 | 10 | QSRPVQPFLN<br>(NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLN-COOH)     |
| D-IB1(s27) | 93 | 10 | SRPVQPFLNL<br>(NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNL-COOH)     |
| D-IB1(s28) | 94 | 10 | RPVQPFLNLT<br>(NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLT-COOH)     |

10

20

30

40

【表 1 - 6】

|            |     |    |                                                  |
|------------|-----|----|--------------------------------------------------|
| D-IB1(s29) | 95  | 10 | PVQPFLNLTT<br>(NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTT-COOH) |
| D-IB1(s30) | 96  | 10 | VQPFLNLITP<br>(NH <sub>2</sub> -VQPFLNLITP-COOH) |
| D-IB1(s31) | 97  | 10 | QPFLNLITPR<br>(NH <sub>2</sub> -QPFLNLITPR-COOH) |
| D-IB1(s32) | 98  | 10 | PFLNLITPRK<br>(NH <sub>2</sub> -PFLNLITPRK-COOH) |
| D-IB1(s33) | 99  | 10 | FLNLITPRKP<br>(NH <sub>2</sub> -FLNLITPRKP-COOH) |
| D-IB1(s34) | 100 | 10 | LNLITPRKPR<br>(NH <sub>2</sub> -LNLITPRKPR-COOH) |

10

## 【0055】

他の好ましい一実施形態によれば、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、上記で規定された、配列番号 1～4、13～20、および 33～100 に記載のネイティブまたは非ネイティブアミノ酸配列の、少なくとも 1 つの改変体、断片、および／または、誘導体を含むか、またはこれから構成される。好ましくは、これらの改変体、断片、および／または、誘導体は、本明細書において使用される、上記で開示されたネイティブまたは非ネイティブの JNK 阻害剤配列、特に、配列番号 1～4、13～20、および 33～100 に記載のネイティブまたは非ネイティブアミノ酸配列の生物活性、すなわち、JNK を結合する、および／または、少なくとも 1 つの JNK 活性化転写因子（例えば c-Jun、ATF2、または Elk1）の活性化を阻害する生物活性を保持する。機能性は、種々な試験によって、例えば、ペプチドをその標的分子に結合させる試験、または、生物物理学的方法（例えば、分光法、コンピュータモデリング法、構造解析法など）によって、試験され得る。特に、上記で規定された、JNK 阻害剤配列、またはその改変体、断片、および／または、誘導体は、親水性分析（例えば、Hopp and Woods, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78 3824-3828 を参照）によって分析され得る。この親水性分析を利用して、ペプチドの疎水性領域および親水性領域を特定し、これによって、例えば結合実験または抗体合成といった実験的操作のための、基質の設計を支援することが可能である。第 2 の構造解析法を行って、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列の、または、その改変体、断片、および／または、誘導体の、特定の構造モチーフを想定する領域を特定してもよい（例えば、Chou and Fasman, 1974, Biochem 13 222-223 を参照）。操作、翻訳、二次構造予測、親水性プロファイルおよび疎水性プロファイル、オープンリーディングフレーム予測およびプロットイング、並びに、配列相同性の決定は、当該技術分野において入手可能なコンピュータソフトウェアプログラムを用いて行うことが可能である。他の、例えば、X線結晶学（例えば、Engstrom, 1974. Biochem Exp Biol 11 7-13 を参照）、質量分析法、およびガスクロマトグラフィー法（例えば、METHODS IN PROTEIN SCIENCE, 1997, J. Wiley and Sons, New York, NY 参照）、およびコンピュータモデリング法（例えば、Fletterick and Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, In CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY を参照）を含む構造解析法を用いてもよい。

20

30

40

## 【0056】

従って、本明細書において使用される JNK 阻害剤配列は、配列番号 1～4、13～2

50

0、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸配列の少なくとも1つの改変体を含むか、またはこれから構成されていてよい。本発明の文脈において、「配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸配列の改変体」とは、好ましくは、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の配列のいずれかに由来する配列である。ここで、改変体は、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載のアミノ酸配列のアミノ酸変換を含む。このような変換は、典型的には、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載のアミノ酸の1～20個、好ましくは1～10個、およびより好ましくは、1～5個の置換、付加、および／または、欠失を含む。この場合、この改変体は、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の配列のいずれかと、少なくとも約30

10

#### 【0057】

上記に規定されていると共に本明細書において使用されるような、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸配列の改変体が、特定のアミノ酸を置換することによって得られるならば、このような置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換を含む。保存的アミノ酸の置換には、グループ内の同義アミノ酸残基が含まれ得る。この同義アミノ酸残基は、十分に相似した物理化学的特性を有しているため、そのグループのメンバー間の置換では分子の生物活性が保存される（例えば、Grant ham, R. (1974), Science 185, 862-864 参照）。上記で規定された配列において、特に、挿入および／または欠失が、わずかな数の、例えば20個よりも少ない、および好ましくは10個よりも少ないアミノ酸だけを含み、かつ機能的活性に重要なアミノ酸を除去または置き換えない場合、それらの機能を変更することなく、アミノ酸を挿入および／または欠失させることも可能であることは、当業者には明らかである。さらに、本明細書において使用される改変体においては、ホスホリラーゼ、好ましくはキナーゼに接近可能なアミノ酸の位置において、さらなるトレオニンを導く置換を回避して、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列の、または本明細書において使用されるキメラペプチドの、不活化をインビボまたはインビトロにおいて回避する必要がある。

20

#### 【0058】

好ましくは、同じグループに分類され、典型的には、保存的アミノ酸の置換によって交換可能である同義アミノ酸残基を、表2に規定する。

30

【表 2】

類似アミノ酸残基の好ましいグループ

| アミノ酸 | 同等残基                                |
|------|-------------------------------------|
| Ser  | Ser, Thr, Gly, Asn                  |
| Arg  | Arg, Gln, Lys, Glu, His             |
| Leu  | Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu        |
| Pro  | Gly, Ala, (Thr), Pro                |
| Thr  | Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr   |
| Ala  | Gly, Thr, Pro, Ala                  |
| Val  | Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val        |
| Gly  | Ala, (Thr), Pro, Ser, Gly           |
| Ile  | Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile        |
| Phe  | Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe   |
| Tyr  | Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr   |
| Cys  | Ser, Thr, Cys                       |
| His  | Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His        |
| Gln  | Glu, Lys, Asn, His, (Thr), Arg, Gln |
| Asn  | Gln, Asp, Ser, Asn                  |
| Lys  | Glu, Gln, His, Arg, Lys             |
| Asp  | Glu, Asn, Asp                       |
| Glu  | Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu   |
| Met  | Phe, Ile, Val, Leu, Met             |
| Trp  | Trp                                 |

10

20

## 【0059】

本明細書において使用される配列番号1～4、13～20、および33～100の改変体の特別な形態は、本明細書において使用される配列番号1、1～4、13～20、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸配列の断片である。この断片は、典型的には、配列番号1～4、13～20、および33～100と比べて、少なくとも1つの欠失によって変換されている。好ましくは、1つの断片は、配列番号1～4、13～20、および33～100のいずれかの少なくとも4つの連続したアミノ酸を含み、その長さは、典型的には、これらの配列のいずれかからのエピトープを特異的に認識するために十分な長さである。さらにより好ましくは、この断片は、配列番号1～4、13～20、および33～100のうちのいずれかの、4～18個、4～15個、または最も好ましくは4～10個の連続したアミノ酸を含む。ここで、下限範囲は、4、または、5、6、7、8、9、または、10個である。アミノ酸の欠失は、配列番号1～4、13～20、および33～100の任意の位置において、好ましくはN-末端またはC-末端に、存在し得る。

30

40

## 【0060】

さらに、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸配列の断片は、上述のように、本明細書において使用される配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の配列のいずれかと、少なくとも約30%、50%、70%、80%、90%、95%、98%、またはさらに99%の配列同一性を共有する配列として規定され得る。

## 【0061】

本明細書において使用されるJNK阻害剤配列は、上記で規定された、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸

50

配列の少なくとも1つの誘導体をさらに含む、またはこれから構成され得る。これに関して、「配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の（ネイティブまたは非ネイティブ）アミノ酸配列の誘導体」とは、好ましくは、配列番号1～4、13～20、および33～100に記載の配列のいずれかに由来するアミノ酸配列であり、ここで、誘導体は、（非天然アミノ酸（複数可）を形成する）少なくとも1つの修飾されたL-またはD-アミノ酸、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、およびさらにより好ましくは1～5個の修飾されたL-またはD-アミノ酸を含む。改変体または断片の誘導体も、本発明の範囲である。

#### 【0062】

これに関して、「修飾されたアミノ酸」とは、例えば、種々な生物において異なるグリコシル化によって、リン酸化によって、または特異的アミノ酸を標識化することによって変換された、任意のアミノ酸であってよい。このようなラベルは、典型的には、次の(i)～(vi)から構成されるラベルの群から選択される：

- (i) 放射性ラベル、すなわち、放射性リン酸化、または硫黄、水素、炭素、窒素などによる放射性ラベル、
- (ii) 着色された色素（例えば、ジゴキシゲニン（digoxigenin）など）、
- (iii) 蛍光基（例えば、フルオレセインなど）、
- (iv) 化学発光基、
- (v) 固相における固定化のための基（例えば、Hisタグ、ビオチン、streptタグ、flagタグ、抗体、抗原など）、および、
- (vi) (i)～(v)のもとに記載したラベルのうちの2つ以上のラベルの組み合わせ。

#### 【0063】

これに関して、本発明の照会アミノ酸配列と少なくとも、例えば95%の「配列同一性を共有する」配列を有するアミノ酸配列とは、対象となるアミノ酸配列が、照会アミノ酸配列の各100アミノ酸当たり最大5つのアミノ酸の変換を含み得ることを除いて、照会配列と同一であることを意味することを意図するものである。換言すると、照会アミノ酸配列と少なくとも95%同一である配列を有するアミノ酸配列を得るためには、対象となる配列のアミノ酸残基の最大5%（100個のうちの5個）に、別のアミノ酸が挿入若しくは置換されているか、または対象となる配列のアミノ酸残基の最大5%（100個のうちの5個）が欠失されていてもよい。

#### 【0064】

正確に対応していない配列では、第1の配列の「%同一性」は、第2の配列に対して決定され得る。概して、比較されるこれら2つの配列は、配列間の最大相関性を提供するように、位置合わせされている。これは、1つまたは両方の配列に、「ギャップ」を挿入して、アラインメントの程度を強化することを含み得る。その後、%同一性は、特に同一または類似の長さの配列に適した、比較される各配列の全長にわたって（いわゆるグローバルアラインメント）決定されるか、または、不等の長さにより適した、かなり短い、規定の長さにわたって（いわゆるローカルアラインメント）決定され得る。

#### 【0065】

特に本明細書において使用される、2つ以上の配列の同一性および相同性を比較する方法は、当該技術において周知である。すなわち、例えば、ウィスコンシン配列分析パッケージ、バージョン9.1において入手可能なプログラム（Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12, 387-395）である、例えば、プログラムBESTFITおよびGAPを用いて、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、および、2つのポリペプチド配列間の%同一性および%相同性を決定することが可能である。BESTFITは、（Smith and Waterman (1981), J. Mol. Biol. 147, 195-197）の「局所的相同性」アルゴリズムを用い、2つの配列間の単一の最も類似した領域を発見するものである。配列間の同一性および／または類似性を決定するための他のプログラムも、当該技

術では公知である。例えば、NCBIのホームページであるワールドワイド・ウェブサイト(ncbi.nlm.nih.gov)を介してアクセス可能なプログラム(Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410)のBLASTファミリー、および、FASTA(Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63-98; Pearson and Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85, 2444-2448)である。

#### 【0066】

本発明に従って用いられると共に上記で規定されたJNK-阻害剤配列は、当該技術分野において周知の方法、例えば、化学合成法によって、または以下に説明する遺伝子工学法によって、得られる、または生成され得る。例えば、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列の一部に相当する、該JNK阻害剤配列の所望の領域を含むペプチド、または、所望の活性をインビトロまたはインビボで媒介するペプチドは、ペプチドシンセサイザを使用することによって合成可能である。

#### 【0067】

本明細書で用いられると共に上記で規定されたJNK阻害剤配列はまた、本明細書で用いられると共に上記で規定されたJNK阻害剤配列が、細胞の中に効率良く輸送されることを可能にする輸送配列によって修飾され得る。このような修飾されたJNK阻害剤配列は、好ましくは、キメラ配列として提供および使用される。

#### 【0068】

従って、第2の態様によれば、本発明は、少なくとも1つの第1のドメインおよび少なくとも1つの第2のドメインを含むキメラペプチドを、被験体における、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するために、使用することを提供する。ここで、キメラペプチドの第1のドメインは、輸送配列を含むが、キメラペプチドの第2のドメインは、上記で規定されたJNK阻害剤配列、好ましくは配列番号1~4、13~20、および33~100に記載の配列のいずれかのJNK阻害剤配列、またはその誘導体若しくは断片を含む。

#### 【0069】

典型的には、本発明に従って用いられるキメラペプチドは、少なくとも25個の長さのアミノ酸残基、例えば、25~250個の長さのアミノ酸残基、より好ましくは、25~200個の長さのアミノ酸残基、さらにより好ましくは25~150個の長さのアミノ酸残基、25~100個の長さのアミノ酸残基、および最も好ましくは25~50個の長さのアミノ酸残基を有している。

#### 【0070】

本明細書において使用されるキメラペプチドは、第1のドメインとして、好ましくは、輸送配列を含む。輸送配列は、典型的には、(該輸送配列が存在する)ペプチドを所望の細胞目的地に向けるアミノ酸の任意の配列から選択されている。従って、本明細書において使用されるような輸送配列は、典型的には、ペプチドを、形質膜を横切って、例えば、細胞の外側から形質膜を通して、細胞質へと向ける。代わりにまたは追加的に、輸送配列は、ペプチドを、細胞内の所望の位置、例えば、核、リボソーム、小胞体(ER)、リソソーム、またはペルオキシソームに向けることも可能である。これは、例えば、2つの成分(例えば、細胞透過性のための成分と、核の位置のための成分と)を混合することによって、または、例えば、細胞膜を輸送する特性、および標的とされた、例えば核内輸送を行う特性を有する、単一の成分によって行うことが可能である。輸送配列は、さらに、細胞質成分または細胞の他の任意の成分若しくは区画(例えば、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置(golgi apparatus)、リゾソーム小胞)を結合することが可能な他の成分を含み得る。従って、例えば、第1のドメインの輸送配列および第2のドメインのJNK阻害剤配列は、細胞質、または、細胞の他の任意の区画に局在化され得る。これによって、取り込まれると、細胞におけるキメラペプチドの局在性を決定することが可能である。

10

20

30

40

50

## 【0071】

好ましくは、輸送配列（本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる）は、5～150個の長さのアミノ酸配列、より好ましくは、5～100個の長さの、および最も好ましくは5～50個、5～30個、またはさらに5～15個の長さのアミノ酸を有している。

## 【0072】

より好ましくは、（本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる）輸送配列は、第1のドメイン内に、連続したアミノ酸配列ストレッチとして生じることにも可能である。あるいは、第1のドメイン内の輸送配列は、2つ以上の断片に分割されていてもよい。この場合、これらの断片の全ては、輸送配列全体と類似しており、輸送配列自体が上記で開示されたような担体特性を保持している限り、1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸によって互いに分離されていてよい。輸送配列の断片を分離させるこれらのアミノ酸は、例えば、輸送配列とは異なるアミノ酸配列から選択されていてよい。あるいは、第1のドメインは、1つより多い成分から構成される輸送配列を含み得、各成分は、第2のドメインのカーゴJNK阻害剤配列を、例えば、特定の細胞の区画に輸送するそれ自身の機能を有し得る。

## 【0073】

上記で規定された輸送配列は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または両者の組み合わせから構成されていてよい。好ましくは、（本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる）輸送配列は、少なくとも1またはさらに2個、好ましくは少なくとも3、4または5個、より好ましくは少なくとも6、7、8、または9個、およびさらにより好ましくは少なくとも10個またはそれより多くの、D-アミノ酸および／またはL-アミノ酸を含んでいてよい。ここで、D-アミノ酸および／またはL-アミノ酸は、JNK輸送配列内に、ブロック状、非ブロック状、または、交互になった様式に配置されていてよい。

## 【0074】

代替の一実施形態によれば、本明細書において使用されるキメラペプチドの輸送配列は、L-アミノ酸のみから構成されていてよい。より好ましくは、本明細書において使用されるキメラペプチドの輸送配列は、上に規定されるとおりの、少なくとも1つの「ネイティブ」輸送配列を含むか、またはこれから構成されている。これに関して、「ネイティブ」という用語は、全体的にL-アミノ酸から構成された変換されていない輸送配列を指す。

## 【0075】

他の代替の実施形態によれば、本明細書において使用されるキメラペプチドの輸送配列は、D-アミノ酸のみから構成されていてよい。より好ましくは、本明細書において使用されるキメラペプチドの輸送配列は、上記で示された配列のDレトロインベルソペプチドを含んでいてよい。

## 【0076】

本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメインの輸送配列は、天然に存在する源から得られ得るか、または、遺伝子工学技術または化学合成法（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照）を用いて生成可能である。

## 【0077】

第1のドメインの輸送配列には、例えば、天然蛋白質、例えばTAT蛋白質（例えば米国特許第5,804,604号および同第5,674,980号に記載されているとおりであり、これらの文献の各々は、参照により本明細書に組み込まれる）、VP22（WO第97/05265号；Elliot and O'Hare, Cell 88

10

20

30

40

50

223-233 (1997) に記載されている)、非-ウイルス蛋白質 (Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 10691-10695 (1992)) を含むソースを用いてもよい。輸送配列は、アンテナペディア (例えば、アンテナペディア担体配列) に由来するか、または塩基性ペプチド (例えば、5~15個の長さのアミノ酸、好ましくは10~12個の長さのアミノ酸を有すると共に、少なくとも80%、より好ましくは、85%、またはさらに90%の、例えばアルギニン、リジン、および/または、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を含むペプチド) に由来する。さらに、輸送配列として用いられる天然蛋白質のうちの1つについての改変体、断片、および誘導体とともに本明細書に開示する。改変体、断片、および誘導体に関しては、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列について上に示した規定を参照されたい。これに応じて、改変体、断片、および誘導体は、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列について上記したように規定される。特に、輸送配列との関係では、改変体または断片または誘導体は、上記で規定された輸送配列として用いられる天然蛋白質のうちの1つと、少なくとも約30%、50%、70%、80%、90%、95%、98%、またはさらに99%の配列同一性を共有する配列として規定され得る。

10

#### 【0078】

本明細書において使用されるキメラペプチドの好ましい一実施形態では、第1のドメインの輸送配列は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 1 TAT蛋白質に由来する配列、特に、TAT蛋白質を構成する86アミノ酸のうちの幾つかまたは全てを含むか、またはこれから構成されている。

20

#### 【0079】

(本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる) 輸送配列では、TAT蛋白質の機能的に有効な断片を形成する、すなわち、細胞内への侵入および取り込みを媒介する領域を含むTATペプチドを形成する、全長TAT蛋白質の部分配列が用いられ得る。このような配列がTAT蛋白質の機能的に効果的な断片であるかどうかについては、公知の技術 (例えば、Franked et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86 7397-7401 (1989)) を参照) を用いて決定可能である。従って、本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメインにおける輸送配列は、TAT蛋白質配列の機能的に有効な断片または一部に由来してよい。この機能的に有効な断片または一部は、86個よりも少ないアミノ酸を含み、細胞内への取り込み、および任意により、細胞核内への取り込みを示す。より好ましくは、担体として用いられ、キメラペプチドを、細胞膜を横切って浸透させることを媒介する、TATの部分配列 (断片) は、全長TATの塩基性の領域 (アミノ酸48~57個、または49~57個) を含むように意図されている。

30

#### 【0080】

より好ましい一実施形態によれば、(本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる) 輸送配列は、TAT残基48~57または49~57、および最も好ましくはジェネリックTAT配列 $\text{NH}_2 - \text{X}_n^b - \text{RKKRRQRRR} - \text{X}_n^b - \text{COOH}$  (L-ジェネリック-TAT(s)) [配列番号7]、および/または、 $\text{XXXRKKRRQR} - \text{RRRXXXX}$  (L-ジェネリック-TAT) [配列番号21] を含むアミノ酸配列を含むか、またはこれから構成されていてよい。ここで、Xまたは $\text{X}_n^b$ は、上記で規定された通りである。さらに、配列番号8の「 $\text{X}_n^b$ 」残基の数は、示されている数に制限されず、上述のように変動し得る。あるいは、本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる輸送配列は、例えば、アミノ酸配列 $\text{NH}_2 - \text{GRKKRRQRRR} - \text{COOH}$  (L-TAT) [配列番号5] を含むペプチドを含むか、またはこれから構成され得る。

40

#### 【0081】

他のより好ましい一実施形態によれば、(本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン内に含まれる) 輸送配列は、上記に示された配列のDレトロインベルソペプチドを含むことが可能であり、すなわち、配列 $\text{NH}_2 - \text{X}_n^b - \text{RRRQRRKK}$

50

$R-X_n^b-COOH$  (D-ジェネリック-TAT(s)) [配列番号 8]、および／または、 $XXXXRRRQRRKKRXXXX$  (D-ジェネリック-TAT) [配列番号 22] を有するジェネリック TAT 配列の D レトロインベルソ配列を含むことが可能である。ここでも、 $X_n^b$  は上記で規定された通りである（好ましくは D アミノ酸を示す）。さらに、配列番号 8 内の「 $X_n^b$ 」残基の数は、示されている数に制限されず、上述のように変動し得る。最も好ましくは、本明細書において使用される輸送配列は、D レトロインベルソ配列  $NH_2-RRRQRRKKRG-COOH$  (D-TAT) [配列番号 6] を含んでいてよい。

#### 【0082】

他の一実施形態によれば、本明細書において使用されるキメラペプチドの第 1 のドメイン内に含まれる輸送配列は、上記で規定された輸送配列の改変体を含むか、またはこれから構成されていてよい。「輸送配列の改変体」は、好ましくは、上記で規定された輸送配列に由来する配列であり、ここで改変体は、上記で規定された輸送配列内に存在する少なくとも 1 つのアミノ酸の修飾を含む。修飾の例には、付加、（断片を導く）（内部）欠失、および／または、置換が含まれる。このような修飾（複数可）は、アミノ酸の、典型的には 1～20 個、好ましくは 1～10 個、およびより好ましくは 1～5 個の、置換、付加、および／または、欠失を含む。さらに、改変体は、好ましくは、上記で規定された輸送配列と、より好ましくは配列番号 5～8、または 21～22 のいずれかと、少なくとも約 30%、50%、70%、80%、90%、95%、98%、またはさらに 99% の配列相同性を示す。

#### 【0083】

好ましくは、本明細書において使用されるキメラペプチドの第 1 のドメイン内に含まれる、このような輸送配列の修飾は、安定性が増大された、または、低減された輸送配列をもたらす。あるいは、輸送配列の改変体は、本明細書において使用されるキメラペプチドの細胞内の局在化を調節するように設計されていてよい。外因的に付加される場合、上記で規定されたこのような改変体は、典型的には、細胞に侵入するという輸送配列の能力が保持されるように（すなわち、輸送配列の改変体の細胞内への取り込みは、輸送配列として用いられるネイティブ蛋白質の取り込みと実質的に類似するように）設計されている。例えば、核局在化にとって重要であると考えられていた塩基性領域の変換（例えば、Dang and Lee, J. Biol. Chem. 264 18019-18023 (1989); Hauber et al., J. Virol. 63 1181-1187 (1989); et al., J. Virol. 63 1-8 (1989) を参照）は、結果的に、輸送配列の、従って本明細書において使用されるキメラペプチドの成分としての JNK 阻害剤配列の、細胞質位置または部分的に細胞質位置を生じさせ得る。これに加えて、例えばコレステロールまたは他の脂質成分を輸送配列に連結させて、例えば、膜可溶性が高い輸送配列を生成することによって、さらなる修飾を改変体内に導入することも可能である。本明細書において使用されるキメラペプチドの第 1 のドメイン内に含まれる輸送配列の、上記に開示した改変体のいずれかは、典型的には当業者に公知の技術を用いて生成可能である（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照）。

#### 【0084】

第 2 のドメインとして、本明細書において使用されるキメラペプチドは、典型的には、上記で規定された JNK 阻害剤配列のいずれかから選択された JNK 阻害剤配列（これらの JNK 阻害剤配列の改変体、断片、および／または、誘導体を含む）を含む。

#### 【0085】

両方のドメイン、すなわち、本明細書において使用されるキメラペプチドの第 1 のドメイン（複数可）および第 2 のドメイン（複数可）は、機能ユニットを形成するように連結

され得る。第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）とを連結する、一般に、当該技術分野において公知の任意の方法を用いてもよい。

#### 【0086】

一実施形態によれば、本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）は、共有結合によって連結されていることが好ましい。本明細書において規定される共有結合は、例えば、上記で規定されたキメラペプチドを、融合蛋白質として発現することによって得られ得るペプチド結合であってよい。本明細書に記載される融合蛋白質は、以下に説明する標準的な組み換えDNA技術と類似の方法、または該技術から容易に適合可能な方法で、形成および使用可能である。しかしながら、両方のドメインは、側鎖を介して連結されていてもよいし、または、化学的リンカー部分によって連結されていてもよい。

10

#### 【0087】

本明細書において使用されるキメラペプチドの第1のドメインおよび／または第2のドメインは、該キメラペプチド内の1つ以上のコピーにおいて生じ得る。両方のドメインが単一のコピーで存在するならば、第1のドメインは、第2のドメインのN-末端またはC-末端のいずれかに連結されてよい。複数のコピーで存在するならば、第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）は、可能な任意の順番に配置されてよい。例えば、第1のドメインは、本明細書において使用されるキメラペプチド内に、複数のコピーの数で、例えば、2、3、またはそれより多くのコピーで、存在してよく、これらのコピーは、連続する順番で配置されていることが好ましい。次いで、第2のドメインは、第1のドメインを含む配列のN-末端またはC末端において生じる単一のコピーで存在し得る。あるいは、第2のドメインが、複数のコピー数で、例えば、2、3、またはそれより多くのコピーで存在し得、第1のドメインが、単一のコピーで存在し得る。これらの両方のどちらか一方によれば、第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）は、連続した配置における任意の位置をとることが可能である。典型的な配置を以下に示す：例えば、第1のドメイン-第1のドメイン-第1のドメイン-第2のドメイン、第1のドメイン-第1のドメイン-第2のドメイン-第1のドメイン、第1のドメイン-第2のドメイン-第1のドメイン-第1のドメイン、または、例えば、第2のドメイン-第1のドメイン-第1のドメイン-第1のドメイン。これらの例は説明のためであって、本発明の範囲がこれらの例に限定されるものではないことを、当業者は明確に理解できよう。従って、コピーおよび配置の数は、当初に規定したように変化し得る。

20

30

#### 【0088】

好ましくは、第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）は、任意のリンカー無しに互いに直接連結されていてもよい。あるいは、これらは、1～10、好ましくは1～5のアミノ酸を含むリンカー配列を介して互いに連結されていてもよい。リンカー配列を形成するアミノ酸は、アミノ酸残基としてのグリシンまたはプロリンから選択されていることが好ましい。より好ましくは、第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）は、第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）との間の2つ、3つ、またはそれより多くのプロリン残基のヒンジによって互いに分離されてよい。

40

#### 【0089】

上記で規定され本明細書において使用される、少なくとも1つの第1のドメインおよび少なくとも1つの第2のドメインを含むキメラペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、またはこれら両方の組み合わせから構成されてよい。ここでは、各ドメイン（および用いられるリンカー）は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、またはこれら両方の組み合わせ（例えば、D-TATとL-IB1（複数可）との組み合わせ、または、L-TATとD-IB1（複数可）との組み合わせなど）から構成されてよい。好ましくは、本明細書において使用されるキメラペプチドは、少なくとも1またはさらに2個、好ましくは少なくとも3、4、または5個、より好ましくは少なくとも6、7、8、または9個、およびさらにより好ましくは少なくとも10個またはそれより多くの、D-アミノ酸および

50

／またはL-アミノ酸を含んでいてよい。ここで、D-アミノ酸および／またはL-アミノ酸は、本明細書において使用されるキメラペプチド内に、ブロック状、非ブロック状、または交互になった様式に、配置されていてよい。

#### 【0090】

具体的な一実施形態によれば、本明細書において使用されるキメラペプチドは、ジェネリックL-TAT-IBペプチド $\text{NH}_2-\text{X}_n^b-\text{RKKRRQRRR}-\text{X}_n^b-\text{X}_n^a-\text{RPTTLXLXXXXXXQD}-\text{X}_n^b-\text{COOH}$  (L-TAT-IB (ジェネリック) (s)) [配列番号10]に記載のL-アミノ酸キメラペプチドを含むか、またはこれから構成されており、ここで、X、 $\text{X}_n^a$ 、および $\text{X}_n^b$ は、好ましくは、上記で規定された通りである。より好ましくは、本明細書において使用されるキメラペプチドは、L-アミノ酸キメラペプチド $\text{NH}_2-\text{GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFPPQVPRSQD}-\text{COOH}$  (L-TAT-IB1 (s)) [配列番号9]を含むか、またはこれから構成される。代わりにまたは追加的に、本明細書において使用されるキメラペプチドは、L-アミノ酸キメラペプチド配列 $\text{GRKKRRQRRRPPDTPYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT}$  (L-TAT-IB1) [配列番号23]、または、 $\text{XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXQDS/TX}$  (L-TAT-IBジェネリック) [配列番号24]を含むか、またはこれから構成されており、ここでも、Xは、好ましくは上記で規定された通りである。あるいは、本明細書において使用されるキメラペプチドは、L-アミノ酸キメラペプチド配列 $\text{RKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFPPQVPRSQD}$  (L-TAT-IB1 (s1)) [配列番号27]、 $\text{GRKKRRQRRRX}_n^c\text{RPKRPTTLNLFPPQVPRSQD}$  (L-TAT-IB1 (s2)) [配列番号28]、または、 $\text{RKKRRQRRRX}_n^c\text{RPKRPTTLNLFPPQVPRSQD}$  (L-TAT-IB1 (s3)) [配列番号29]を含むか、またはこれから構成される。これに関して、各Xは、典型的には、上記で規定されたアミノ酸残基を示し、より好ましくは、 $\text{X}_n^c$ は、ペプチド残基の連続したストレッチを示し（各Xは、互いに無関係に、グリシンまたはプロリンから選択されている）、例えば、単調なグリシンストレッチ、または単調なプロリンストレッチを示す。ここで、n ( $\text{X}_n^c$ の繰り返しの数)は、典型的には、0~5、5~10、10~15、15~20、20~30、またはさらにはそれより多く、好ましくは0~5または5~10である。 $\text{X}_n^c$ は、Dアミノ酸またはLアミノ酸のいずれかを示す。

#### 【0091】

代替の具体的な一実施形態によれば、本明細書において使用されるキメラペプチドは、上記で開示されたL-アミノ酸キメラペプチドのD-アミノ酸キメラペプチドを含むか、またはこれから構成される。本発明に記載の典型的なDレトロインベルソキメラペプチドは、例えば、ジェネリックD-TAT-IBペプチド $\text{NH}_2-\text{X}_n^b-\text{DQXXXXXXXLXLTTTPR}-\text{X}_n^a-\text{X}_n^b-\text{RRRQRRKKR}-\text{X}_n^b-\text{COOH}$  (D-TAT-IB (ジェネリック) (s)) [配列番号12]である。ここで、X、 $\text{X}_n^a$ 、および $\text{X}_n^b$ は、好ましくは、上記で規定された通りである（好ましくは、Dアミノ酸を示す）。より好ましくは、本明細書において使用されるキメラペプチドは、TAT-IB1ペプチド $\text{NH}_2-\text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPRPPRRRQRRKKRG}-\text{COOH}$  (D-TAT-IB1 (s)) [配列番号11]に記載のD-アミノ酸キメラペプチドを含むか、またはこれから構成される。代わりにまたは追加的に、本明細書において使用されるキメラペプチドは、D-アミノ酸キメラペプチド配列 $\text{TDQSRPVQPFLNLTTPRKPRYTDPPIRRRQRRKKRG}$  (D-TAT-IB1) [配列番号25]、または、 $\text{XT/SDQXXXXXXXXXLXLTTTPRXXXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXXX}$  (D-TAT-IBジェネリック) [配列番号26]を含むか、またはこれから構成されるか（ここでも、Xは、好ましくは、上記で規定された通りである）、または、本明細書において使用されるキメラペプチドは、D-アミノ酸キメラペプチド配列 $\text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPRPPRRRQRRKKR}$  (D-TAT-IB1 (s1)) [配列番号30]、 $\text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPRX}$

$X_n^c$  RRRRQRRKKRG (D-TAT-IB1 (s2)) [配列番号31]、または、  
DQSRPVQPFLNLTTPRKPRX $X_n^c$  RRRRQRRKKR (D-TAT-IB1 (s3)) [配列番号32] を含むか、またはこれから構成される。 $X_n^c$  は、上記で規定された通りであってよい。

#### 【0092】

上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）は、当該技術において公知の任意の好適な方法で行われる化学的または生化学的結合によって、例えば、第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）との間にペプチド結合を形成することによって、例えば第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）を、融合蛋白質として発現することによって、または、例えば上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）とを架橋させることによって、互いに連結され得る。

#### 【0093】

上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）とを化学的に架橋させるために適した公知の多くの方法は、非特異的であり、すなわち、これらの方法は、結合点を、輸送ポリペプチドまたはカーゴ高分子上の任意の特定の部位に向かわせない。結果として、非特異的な架橋剤の使用は、機能的部位に作用する、または、活性部位を立体的に遮断して、複合蛋白質を生物学的に不活性にし得る。したがって、第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）とをさらに特異的に結合することが可能な、このような架橋法を用いることが好ましい。

#### 【0094】

これに関して、結合特異性を増大させる1つの方法は、架橋される第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）の一方または両方に、1回または数回だけ存在する官能基に、直接化学的に結合させることである。例えば、チオール基を含有する唯一の蛋白質アミノ酸であるシステインは、多くの蛋白質において数回だけ生じる。また、例えば、ポリペプチドが、リジン残基を含まない場合、第一級アミンに特異的な架橋剤は、このポリペプチドのアミノ末端にとって選択的である。結合特異性を増大させるためにこの方法の使用を成功させるには、ポリペプチドが、分子の生物活性を失うことなく変更されることが可能な分子の領域において、好適な程度の稀な且つ反応性の残基を有していることが求められる。システイン残基は、システイン残基が架橋反応に関与すると生物活性を妨げる傾向があるポリペプチド配列の一部に生じた場合には、置き換えてもよい。システイン残基を置き換える場合、典型的には、ポリペプチドの折り畳みに結果として生じる変化を最小化することが望ましい。ポリペプチドの折り畳みにおける変化は、この置き換えがシステインに化学的且つ立体的に類似している場合に、最小化される。こういった理由のため、システインの置き換えとしては、セリンが好ましい。以下の実施例において示すように、システイン残基を、架橋のために、ポリペプチドのアミノ酸配列の中に導入し得る。システイン残基を導入するときには、アミノ末端若しくはカルボキシ末端における導入、または、アミノ末端若しくはカルボキシ末端の近傍への導入が好ましい。従来の方法は、このようなアミノ酸配列修飾の場合に利用可能であり、ここで、対象となるポリペプチドは、化学合成によってまたは組換えDNAの発現を介して、生成される。

#### 【0095】

上記で規定され本明細書において使用される、キメラペプチドの第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）との結合は、カップリング剤または結合剤（conjugating agent）によって行うことも可能である。利用可能な分子間架橋剤が幾つか存在する（例えば、Means and Feeney, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 1974, pp. 39-43を参照）。これらの分子間架橋剤には、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）またはN,N'-（1,3-フェニレン）ビスマレイミド（これらは両方とも、スルフヒドリル基に高度に特異的であり、不可逆リンケージを形成する）や、N,N'-エチレンビス-（ヨードアセ

トアミド)または(スルフヒドリル基に比較的特異的である)6~11の炭素メチレンブリッジを有する他のそのような架橋剤、および、(アミノ基およびチロシン基と不可逆リンケージを形成する)1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンがある。この目的のために有用な他の架橋剤には、アミノ基およびフェノール基と不可逆性の架橋を形成するp,p'-ジフルオロ-m,m'-ジニトロジフェニルスルホン)、(アミノ基に特異的な)アジプイミド酸ジメチル、(主にアミノ基と反応する)フェノール-1,4-ジスルホニルクロリド、ヘキサメチレンジイソシアネート、若しくは(主にアミノ基と反応する)ジイソチオシアネート、またはアゾフェニル-p-ジイソシアネート、(幾つかの種々の側鎖と反応する)グルタルアルデヒド、および(チロシンおよびヒスチジンと主に反応する)ジスジアゾベンジジン(disdiazobenzidine)が含まれる。

10

#### 【0096】

上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン(複数可)と第2のドメイン(複数可)とを架橋させるために用いられる架橋剤は、ホモ二機能性であってよく、すなわち、同じ反応をする2つの官能基を有している。好ましいホモ二機能性架橋剤は、ビスマレイミドヘキサシラン(BMH)である。BMHは、マイルドな条件(pH6.5~7.7)下でスルフヒドリル含有化合物と特異的に反応する2つのマレイミド官能基を含有する。これらの2つのマレイミド基は、炭化水素鎖によって接続されている。従って、BMHは、システイン残基を含むポリペプチドを不可逆架橋させるために有用である。

#### 【0097】

上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン(複数可)と第2のドメイン(複数可)とを架橋させるために用いられる架橋剤はまた、ヘテロ二機能性であってもよい。ヘテロ二機能性架橋剤は、2つの異なる官能基、例えば、アミン-反応性基およびチオール-反応性基を有している。これらの官能基は、遊離アミンおよびチオールを有する2つの蛋白質とを架橋させる。ヘテロ二機能性架橋剤の例には、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサシラン-1-カルボキシレート(SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、および、MBSの伸長鎖アナログであるスクシンイミド4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)がある。これらのクロスリンカーのスクシンイミジル基は、第一級アミンと反応し、チオール-反応性マレイミドは、システイン残基のチオールと共有結合を形成する。

20

30

#### 【0098】

上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン(複数可)と第2のドメイン(複数可)とを架橋させるために好適な架橋剤は、水溶性が低い場合が多い。従って、その水溶性を改善するために、スルホン酸基といった親水性の部分が架橋剤に付加される。これに関して、水溶性について改変された架橋剤の例は、スルホ-MBSおよびスルホ-SMCCであり、これらを、本発明に従って用いてもよい。

#### 【0099】

同様に、多くの架橋剤は、基本的には、細胞条件下では開裂不可能なコンジュゲートを実現する。しかし、上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン(複数可)と第2のドメイン(複数可)とを架橋させることに特に適した幾つかの架橋剤は、細胞条件下で開裂させることが可能な、ジスルフィドなどの共有結合を含む。例えば、トラウト試薬(Traut's reagent)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、および、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)が、周知の開裂可能なクロスリンカーである。開裂可能な架橋剤の使用は、カーゴ部分を標的細胞内に送達した後に、輸送ポリペプチドから分離させることを可能にする。直接的なジスルフィドリンケージも有用であり得る。

40

#### 【0100】

上記で論じた架橋剤を含む多くの架橋剤が、市販されている。これらの使用のための詳細な指示は、商業的供給元から容易に入手可能である。蛋白質架橋およびコンジュゲート調製に関して一般的に参照されるのは、「Wong, CHEMISTRY OF PR

50

OT E I N C O N J U G A T I O N A N D C R O S S L I N K I N G , C R C  
P r e s s ( 1 9 9 1 ) 」である。

【0101】

上記で規定されたキメラペプチドの第1のドメイン（複数可）と第2のドメイン（複数可）とを化学的に架橋させることは、スパーサーアームの使用を含み得る。スパーサーアームは、分子内たわみ性を提供するか、または、コンジュゲートした部分間の分子内距離を調節し、これによって、生物活性を保持することを補助し得る。スパーサーアームは、スパーサーアミノ酸、例えば、プロリンを含むポリペプチド部分の形をしていて良い。あるいは、スパーサーアームが、「長鎖SPDP」（Pierce Chem. Co., Rockford, IL., cat. No. 21651 H）におけるなど、架橋剤の一部であってよい。

10

【0102】

さらに、上記で開示されたキメラペプチドのうちの1つについての改変体、断片、または誘導体をここで、用いてもよい。断片および改変体に関しては、一般に、JNK阻害剤配列に関して上に記載した規定が参照される。

【0103】

特に、本発明の関連では、「キメラペプチドの改変体」とは、好ましくは、配列番号9～12および23～32に記載の配列のいずれかに由来する配列である。ここで、キメラ改変体は、本明細書において使用される、配列番号9～12および23～32に記載のキメラペプチドのアミノ酸変換を含む。このような変換は、典型的には、配列番号9～12および23～32に記載のアミノ酸の、1～20個、好ましくは1～10個、およびより好ましくは1～5個の置換、付加、および／または、（断片をもたらず）欠失を含む。ここで、本明細書において使用される、変換されたキメラペプチドは、配列番号9～12および23～32に記載の配列のいずれかと、少なくとも約30%、50%、70%、80%、または95%、98%、またはさらに99%の配列同一性を示す。好ましくは、これらの改変体は、本明細書において使用されるキメラペプチドに含まれる第1のドメイン（複数可）および第2のドメイン（複数可）の生物活性を保持する。すなわち、上記で開示された第1のドメインの輸送活性と、第2のドメインの、JNKを結合するため、および／または、少なくとも1つのJNK活性化転写因子の活性化を阻害するための活性とを保持する。

20

30

【0104】

従って、本明細書において使用されるキメラペプチドはまた、上記で開示されたキメラペプチドの断片、特に、配列番号9～12および23～32のいずれかに記載のキメラペプチド配列の断片を含む。従って、本発明の関連において、「キメラペプチドの断片」とは、好ましくは、配列番号9～12および23～32に記載の配列のいずれかに由来する配列である。ここで、断片は、配列番号9～12および23～32のいずれかの少なくとも4つの連続したアミノ酸を含む。この断片は、好ましくは、これらの配列のいずれかからのエピトープを特異的に認識することを十分に可能にすると共に、当該配列を細胞、核、またはさらなる所望の位置の中まで輸送するのに十分な長さを含む。さらにより好ましくは、断片は、配列番号9～12および23～32のいずれかの、4～18個、4～15個、または最も好ましくは4～10個の連続したアミノ酸を含む。本明細書において使用されるキメラペプチドの断片はさらに、配列番号99～12および23～32のいずれかに記載の任意の配列のいずれかと、少なくとも約30%、50%、70%、80%、または95%、98%、またはさらに99%の配列同一性を共有する配列と規定され得る。

40

【0105】

最終的に、本明細書において使用されるキメラペプチドはまた、上記で開示されたキメラペプチドの誘導体、特に、配列番号9～12および23～32のいずれかに記載のキメラペプチド配列の誘導体を含む。

【0106】

本発明はさらに、上記で規定されたJNK阻害剤配列、上記で規定されたすべての、キ

50

メラペプチドもしくはそれらの断片、改変体、または誘導体をコードする核酸配列の、被験体における、上記に規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するための、使用に関する。本明細書において使用されるJNK阻害剤配列をコードする好ましい好適な核酸は、典型的には、ヒトIB1核酸(GenBankアクセッション番号(AF074091))、ラットIB1核酸(GenBankアクセッション番号AF108959)、若しくはヒトIB2(GenBankアクセッション番号AF218778)から、または、上記で規定された配列のうちのいずれかをコードする任意の核酸配列、すなわち、配列番号1~26に記載の任意の配列から、選択される。

#### 【0107】

本明細書において使用されるJNK阻害剤配列をコードする核酸、または本明細書において使用されるメラペプチドをコードする核酸は、当該技術分野において公知の任意の方法によって(例えば、配列の3'-末端および5'-末端にハイブリダイゼーション可能な合成プライマーを用いたPCR増幅によって、および/または、所定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチド配列を用いて、cDNAまたはゲノムライブラリーからクローニングすることによって)、得られ得る。

#### 【0108】

さらに、本明細書には、ストリンジェントな条件において、上記で規定された(ネイティブ)JNK阻害剤配列またはメラペプチドをコードする適切な鎖とハイブリダイズする核酸配列も開示される。好ましくは、このような核酸配列は、特異的なハイブリダイゼーションを十分に可能にする長さを有する、少なくとも6つの(連続した)核酸を含む。より好ましくは、このような核酸配列は、6~38、さらにより好ましくは6~30、および最も好ましくは6~20または6~10の(連続した)核酸を含む。

#### 【0109】

「ストリンジェントな条件」とは、配列に依存しており、異なる環境下では異なる。該して、ストリンジェントな条件は、所定のイオン強度およびpHにおける、特異的配列の熱融点(TM)よりも約5℃低く選択されていてよい。TMは、標的配列の50%が、完全に適合するプローブにハイブリダイズする温度(所定のイオン強度およびpH下)である。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩の濃度がpH7において少なくとも約0.02モル濃度であり、温度が少なくとも約60℃である条件である。他の因子が、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー(特に、塩基組成、および相補鎖のサイズを含む)、有機溶媒の存在、および塩基のミスマッチの範囲に影響を与え得るので、任意のパラメータの絶対測定値よりも、パラメータの組み合わせがより重要である。

#### 【0110】

「高ストリンジェンシー条件」とは、次のステップを含んでいてよい。例えば、ステップ1では、DNAを含むフィルターを、6×SSC、50mMのトリス-HCl(pH7.5)、1mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のフィコール、0.02%のBSA、および500μg/mlの変性サケ精子DNAから構成される緩衝剤中で、65℃で8時間から一晩にわたって前処理する。ステップ2では、100mg/mlの変性サケ精子DNAおよび5~20×10<sup>6</sup>cpmの<sup>32</sup>P-標識プローブを加えた、上述の事前のハイブリダイゼーション混合物において、フィルターを65℃で48時間ハイブリダイズする。ステップ3では、2×SSC、0.01%のPVP、0.01%のフィコール、および0.01%のBSAを含む溶液において、フィルターを37℃で1時間洗浄する。その後、0.1×SSCにおける洗浄を、50℃で45分間行う。ステップ4では、フィルターを、オートラジオグラフィーに曝す。高ストリンジェンシーの、使用可能な他の条件は、当該技術分野において周知である(例えば、Ausubel et al., (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY; and Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, a Laboratory Manual, Stockton

10

20

30

40

50

Press, NYを参照)。

#### 【0111】

「中程度のストリンジェンシー条件」とは、次のステップを含んでよい。ステップ1では、DNAを含むフィルターを、 $6\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハルト溶液、0.5%のSDS、および $100\text{mg/ml}$ の変性サケ精子DNAを含む溶液中で、 $55^{\circ}\text{C}$ で6時間前処理する。ステップ2では、同じ溶液に、 $5\sim 20\times 10^6\text{cpm}$   $^{32}\text{P}$ -標識プローブを加えたものにおいて、フィルターを $55^{\circ}\text{C}$ で18~20時間ハイブリダイズする。ステップ3では、 $2\times\text{SSC}$ 、0.1%のSDSを含む溶液において、フィルターを $37^{\circ}\text{C}$ で1時間洗浄し、その後、 $1\times\text{SSC}$ および0.1%のSDSを含む溶液において $60^{\circ}\text{C}$ で30分間洗浄することを、2回行う。ステップ4では、フィルターをドライプロットングして、オートラジオグラフィーに曝す。中程度のストリンジェンシーの、使用可能な他の条件は、当該技術分野において周知である（例えば、「Ausubel et al., (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY; および Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, a Laboratory Manual, Stockton Press, NY」を参照）。

#### 【0112】

最後に、「低ストリンジェンシー条件」には、次のステップを含むことが可能である。ステップ1では、DNAを含むフィルターを、35%のホルムアミド、 $5\times\text{SSC}$ 、50 mMのトリス-HCl (pH 7.5)、5 mMのEDTA、0.1%のPVP、0.1%のフィコール、1%のBSA、および $500\mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNAを含む溶液において、 $40^{\circ}\text{C}$ で6時間前処理する。ステップ2では、同じ溶液に、0.02%のPVP、0.02%のフィコール、0.2%のBSA、 $100\mu\text{g/ml}$ のサケ精子DNA、10% (wt/vol) の硫酸デキストラン、および $5\sim 20\times 10^6\text{cpm}$   $^{32}\text{P}$ -標識プローブを加えたものにおいて、フィルターを $40^{\circ}\text{C}$ で18~20時間ハイブリダイズする。ステップ3では、フィルターを、 $2\times\text{SSC}$ 、25 mMのトリス-HCl (pH 7.4)、5 mMのEDTA、および0.1%のSDSを含む溶液において、 $55^{\circ}\text{C}$ で1.5時間洗浄する。この洗浄溶液を、新鮮な溶液で置き換え、 $60^{\circ}\text{C}$ においてさらに1.5時間インキュベートする。ステップ4では、フィルターをドライプロットングして、オートラジオグラフィーに曝す。必要に応じて、フィルターを $65\sim 68^{\circ}\text{C}$ で3回目の洗浄を行い、フィルムに再び曝す。低ストリンジェンシーの、使用可能な他の条件は、当該技術分野において周知である（例えば、異種間ハイブリダイゼーションに用いられるような条件）。例えば「Ausubel et al., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY; および Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY」を参照されたい。

#### 【0113】

上記で規定された本発明に係る核酸配列を用いて、ペプチドを発現させることが可能である。すなわち、上記で規定された本発明に係る核酸配列を用いて、分析、特徴づけ、または治療上の使用のために本明細書において使用されるJNK阻害剤配列または本明細書において使用されるキメラペプチドを、（本明細書において使用される）対応するペプチドが（組織分化若しくは発生の構成的または特別な段階において、または疾患状態において）優先的に発現される組織についてのマーカーとして発現させることが可能である。これらの核酸の他の使用には、例えば、核酸のゲル電気泳動ベースの分析における分子量マーカーとしての使用が含まれる。

#### 【0114】

本発明のさらなる一実施形態によれば、上記で規定された、1つ以上のJNK阻害剤配

列および／またはキメラペプチドの組み換え型に発現させるという上述の目的のために、発現ベクターを用いてもよい。「発現ベクター」という用語は、本明細書では、二本鎖または一本鎖のいずれかである、環状または線形のDNAまたはRNAのいずれかを示すために用いられる。発現ベクターはさらに、宿主細胞または単細胞のまたは多細胞の宿主生物内に移入される、上記で規定された少なくとも1つの核酸を含む。本明細書において使用される発現ベクターは、好ましくは、本明細書において使用されるJNK阻害剤配列またはその断片若しくは改変体、あるいは、本明細書において使用されるキメラペプチド、または、その断片若しくは改変体をコードする、上記で規定された核酸を含む。さらに、本発明に係る発現ベクターは、好ましくは、種々な調節要素を含む、発現を支援するための適切な要素を含む。これらの種々な調節要素の例には、宿主細胞内に挿入されたポリヌクレオチドの発現を駆動するウイルス源、細菌源、植物源、哺乳類の源、および他の真核細胞の源からのエンハンサー／プロモーターが挙げられる。これらの要素の例には、インスレーター、境界要素 (boundary elements)、LCR (例えば、Blackwood and Kadonaga (1998), Science 281, 61-63によって記載されている)、または、マトリクス／スカフォード結合領域 (例えば、Li, Harju and Peterson, (1999), Trends Genet. 15, 403-408によって記載されている) などが挙げられる。幾つかの実施形態では、調節要素は、異種要素である (すなわち、ネイティブ遺伝子プロモーターではない)。あるいは、遺伝子および／またはフランキング領域のネイティブプロモーターによって、必要な転写信号および翻訳信号が、供給されてもよい。

10

20

#### 【0115】

「プロモーター」という用語は、本明細書における使用では、DNAの領域であって、上記で規定された1つ以上の核酸配列の転写を制御するように機能すると共に、DNA-依存性RNAポリメラーゼの結合部位の存在、および、プロモーターの機能を調節するために相互作用する他のDNA配列の存在によって、構造的に特定される領域を指す。機能的な発現を促進するプロモーターの断片は、プロモーターとしての活性を保持する、短縮された、または、トランケート型のプロモーター配列である。プロモーター活性は、当該技術分野において公知の任意のアッセイ (例えば、Wood, de Wet, Dewji, and DeLuca, (1984), Biochem Biophys Res Commun. 124, 592-596; Seliger and McElroy, (1960), Arch. Biochem. Biophys. 88, 136-141を参照されたい)、またはPromega (登録商標) からの市販品) によって測定可能である。

30

#### 【0116】

本明細書に規定された発現ベクターにおいて使用される「エンハンサー領域」とは、典型的には、1つ以上の遺伝子の転写を増加させるように機能する、DNAの領域を指す。より詳細に言うと、「エンハンサー」という用語は、本明細書における使用では、遺伝子の発現を、その位置および配向に無関係に、発現される遺伝子に対して、増強、増大、改善、または、向上させるDNA調節要素であり、1つより多くのプロモーターの発現を増強、増大、改善、または、向上させることであり得る。

40

#### 【0117】

本明細書に規定される発現ベクターにおいて使用されるプロモーター／エンハンサー配列は、植物、動物、昆虫、または、真菌の調節配列を利用してよい。例えば、酵母および他の真菌由来のプロモーター／エンハンサー要素 (例えば、GAL4プロモーター、アルコール脱水素酵素プロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター) を用いてもよい。代わりにまたは追加的に、これらは、動物の転写制御領域を含んでいてよい。動物の転写制御領域の例には、(i) 脾臓ベータ細胞の内部において活性のインスリン遺伝子制御領域 (例えば、Hanahan, et al., 1985. Nature 315 115-122を参照)、(ii) リンパ球様細胞の内部において活性の免疫グロブリン遺伝子制御領域 (例えば、Gross

50

chedl, et al., 1984, Cell 38 647-658を参照)、(iii)肝臓の内部において活性のアルブミン遺伝子制御領域(例えば、Pinker, et al., 1987. Genes and Dev 1 268-276を参照)、(iv)脳希突起膠細胞の内部において活性のミエリン塩基性蛋白質遺伝子制御領域(例えば、Readhead, et al., 1987, Cell 48 703-712を参照)、および、(v)視床下部の内部において活性の性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域(例えば、Mason, et al., 1986, Science 234 1372-1378を参照)などが挙げられる。

#### 【0118】

さらに、本明細書において規定される発現ベクターは、増幅マーカを含んでいてよい。この増幅マーカは、例えば、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、多剤耐性遺伝子(MDR)、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)、およびN-(ホスホンアセチル)-L-アスパラギン酸耐性(CAD)から成る群から選択され得る。

#### 【0119】

本発明に適した典型的な発現ベクターまたはその誘導体には、特に、例えば、ヒトまたは動物のウイルス(例えば、ワクシニアウイルスまたはアデノウイルス)、昆虫ウイルス(例えばバキュロウイルス)、酵母ベクター、バクテリオファージベクター(例えば、ラムダファージ)、プラスミドベクター、およびコスミドベクターが含まれる。

#### 【0120】

本発明はさらに、上記で規定された核酸のペプチドコード配列(複数可)を発現することが可能な、種々な宿主ベクター系を利用してよい。これらの宿主ベクター系には、(i)ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどに感染した哺乳類細胞系、(ii)バキュロウイルスなどに感染した昆虫細胞系、(iii)酵母ベクターを含有する酵母、または(iv)バクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNAで形質転換されたバクテリアが含まれるが、これらに限定されない。利用される宿主ベクター系に応じて、多数の好適な転写要素および翻訳要素のうちの任意の1つを用いてよい。

#### 【0121】

このような宿主ベクター系に適した宿主細胞株であって、対象となる挿入された配列の発現を調整する宿主細胞株、または、該配列が特定の所望の方法でコードした、発現されたペプチドを変更若しくは処理する宿主細胞株が、選択されることが好ましい。さらに、特定のプロモーターからの発現は、選択された宿主株において、特定のインデューサーの存在下で強化され、従って、遺伝子工学により生産されたペプチドの発現の制御を促進することが可能である。さらに、種々な宿主細胞は、発現されたペプチドの翻訳プロセッシングおよびポスト翻訳プロセッシング、並びに修飾(例えば、グリコシル化、リン酸化など)の特性および特別のメカニズムを有している。従って、外来ペプチドの所望の修飾およびプロセッシングを確実にを行うために、適切な細胞株または宿主系が選択され得る。例えば、バクテリア系内のペプチド発現を用いて、グリコシル化されていないコアペプチドを生成することが可能である。その一方で、哺乳類細胞の内部における発現は、異種のペプチドの「ネイティブ」グリコシル化を確実に行う。

#### 【0122】

本発明は、さらに、上述のJNK阻害剤配列および/またはキメラペプチドに対する抗体を、本明細書において規定されるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を処置するための薬剤組成物を調製するために使用することを提供する。さらに、本発明に係るJNK阻害剤配列に特異的、またはこのような阻害剤配列を含むキメラペプチドに特異的な抗体を生成するために有効な手段が記載され、この目的のために用いられ得る。

#### 【0123】

本発明によれば、本明細書において規定された、JNK阻害剤配列および/またはキメラペプチド、並びに、その断片、改変体、または誘導体を、これらのペプチド成分を免疫特異的に結合させる抗体を生成する免疫原として利用してもよい。このような抗体には、

例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、F a b断片、およびF a b発現ライブラリーが含まれる。具体的な一実施形態では、本発明は、上記で規定された、キメラペプチドまたはJ N K阻害剤配列に対する抗体を提供する。これらの抗体の製造には、当該技術分野で公知の種々な方法を用いてよい。

#### 【0124】

一例として、上記で規定された任意のキメラペプチドまたはJ N K阻害剤配列を注射することによって、種々な宿主動物に、ポリクローナル抗体を生成させるための免疫を行うことが可能である。それによって免疫応答を向上させるための種々な補佐剤を用いることが可能である。補佐剤には、フロインドアジュバント（完全および不完全）、鋳物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、C p G、ポリマー、プルロニック、および、ヒト補佐剤（例えばカルメットゲラン桿菌およびコリネバクテリウムパルヴム）が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0125】

上記で規定されたキメラペプチドまたはJ N K阻害剤配列に対するモノクローナル抗体の調製には、連続細胞株培養によって抗体分子の生成を提供する、任意の技術を利用してよい。このような技術には、ハイブリドーマ技術（Kohler and Milstein, 1975. Nature 256 495-497を参照）、トリオーマ技術、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor, et al., 1983, Immunol Today 4 72を参照）、および、ヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBVハイブリドーマ技術（Cole, et al., 1985. In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照）が含まれるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用可能であり、ヒトハイブリドーマの使用によって（Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80 2026-2030を参照）、または、ヒトB-細胞をエプスタインバーウイルスによってインビトロで形質転換することによって（Cole, et al., 1985. In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)を参照）生成可能である。

#### 【0126】

本発明によれば、本明細書において規定されたJ N K阻害剤配列および／またはキメラペプチドに特異的な一本鎖抗体を生成するための技術を採用してもよい（例えば、米国特許第4, 946, 778号を参照）。さらに、F a b発現ライブラリーを構成するための方法（例えば、Huse et al., 1989. Science 246 1275-1281を参照）を採用して、これらのJ N K阻害剤配列および／またはキメラペプチドにとって所望の特異性を有するモノクローナルF a b断片の迅速且つ効率のよい同定を可能にすることもできる。非-ヒト抗体を当該技術分野において周知の技術によって、「ヒト化」してもよい（例えば、米国特許第5, 225, 539号を参照）。本明細書において規定されるJ N K阻害剤配列および／またはキメラペプチドに対してイディオタイプを含有する抗体断片を、当該技術分野において公知の技術によって生成してもよい。この抗体断片の例には、(i) 抗体分子をペプシン消化することによって生成されるF (a b')<sub>2</sub>断片、(ii) F (a b')<sub>2</sub>断片のジスルフィドブリッジを還元することによって生成されるF a b断片、(iii) 抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって生成されるF a b断片、および、(iv) F v断片が挙げられる。

#### 【0127】

本発明の一実施形態では、抗体をスクリーニングするために用いられ得る方法であって、所望の特異性を有する方法には、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、および他の、当該技術分野において公知の免疫媒介性技術が含まれるが、これらに限定されない。具体的な一実施形態では、本明細書において規定されるJ N K阻害剤配列および／またはキ

メラペプチド（例えば、典型的には5～20個、好ましくは8～18個、および最も好ましくは8～11個のアミノ酸の長さを含むその断片）の特定のエピトープに対して特異的な抗体の選択は、このようなエピトープを有する、本明細書において規定されるJNK阻害剤配列および／またはキメラペプチドの断片に結合するハイブリドーマの生成によって促進される。上記で規定されたエピトープに特異的なこれらの抗体も、本明細書において提供される。

#### 【0128】

本明細書で規定される抗体を、JNK阻害剤配列（および／または、上記で規定されたキメラペプチドに対応して）の局在化および／または数量化に関する当該技術分野で公知の方法において、用いてもよい。これは、例えば、適切な生理学的試料内のペプチドのレ

10

#### 【0129】

本発明に従って規定される、JNK阻害剤配列、キメラペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、および／または、抗体は、本明細書において規定される疾患のうちのいずれかの予防または処置において、特に、本明細書において規定されるJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害の予防または処置において適用され得る薬剤組成物に製剤化することが可能である。典型的には、このような本発明に従って用いられる薬剤組成物は、有効成分として、例えば、(i) 任意の1つ以上の、上記で規定されたJNK阻害剤配列および／またはキメラペプチド、および／または、その改変体、断片、若しくは誘導体、特に、配列番号1～4および13～20および33～100の配列のうちのいずれかに記載のJNK阻害剤配列、および／または、配列番号9～12および23～32の配列のいずれかに記載のキメラペプチド、および／または、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載のJNK阻害剤配列であって、配列番号5～8および21～22のいずれかに記載の輸送配列、または上記の規定の範囲内のその改変体若しくは断片を含むJNK阻害剤配列、および／または、(ii) 上記で規定されたJNK阻害剤配列および／またはキメラペプチド、および／または、その改変体若しくは断片をコードする核酸、および／または、(iii) 上記で規定された、JNK阻害剤配列および／またはキメラペプチド、および／または、その改変体、断片、若しくは誘導体の任意の1つ以上を含む細胞、および／または、(iv) 上記で規定されたJNK阻害剤配列および／またはキメラペプチド、および／または、その改変体若しくは断片をコードする、ベクター、および／または、核酸でトランスフェクトされた細胞、を含む。

20

30

#### 【0130】

好ましい一実施形態によれば、このような、本発明に従って使用される薬剤組成物は、典型的には、安全且つ有効な量の、上記で規定された成分、好ましくは、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのJNK阻害剤配列、および／または、配列番号9～12および23～32の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのキメラペプチド、および／または、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのJNK阻害剤配列であって、配列番号5～8および21～22のいずれかに記載の輸送配列、または上記の規定の範囲内のその改変体若しくは断片を含むJNK阻害剤配列、または、これをコードする少なくとも1つの核酸、または、上記で規定された、少なくとも1つのベクター、宿主細胞、若しくは抗体、を含む。

40

#### 【0131】

本発明の発明者は、本明細書においてそれぞれ規定されるJNK阻害剤配列およびキメラペプチドが、本発明の疾患に関連する細胞内への特に良好な取り込み率を示すことを、さらに発見した。従って、被験体に投与される薬剤組成物内の、各JNK阻害剤配列およびキメラペプチドの量は、非常に低い用量を有してよい（これに限定されない）。このため、その用量は、当該技術分野において公知のペプチド薬剤、例えばDTS-108 (Florence Meyer-Losic et al., Clin Cance

50

r Res., 2008, 2145-53) よりも大幅に低くてよい。これは、例えば、潜在的な副作用の低減、および、費用の低減といった、幾つかの有利な面を有している。

#### 【0132】

好ましくは、この用量 (kg 体重当たり) は、最大  $10 \text{ mmol/kg}$ 、好ましくは最大  $1 \text{ mmol/kg}$ 、より好ましくは最大  $100 \text{ } \mu\text{mol/kg}$ 、さらにより好ましくは最大  $10 \text{ } \mu\text{mol/kg}$ 、さらにより好ましくは最大  $1 \text{ } \mu\text{mol/kg}$ 、さらにより好ましくは最大  $100 \text{ nmol/kg}$ 、最も好ましくは最大  $50 \text{ nmol/kg}$  の範囲内である。

#### 【0133】

10

従って、この用量の範囲は、好ましくは、約  $1 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $1 \text{ mmol/kg}$ 、約  $10 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $0.1 \text{ mmol/kg}$ 、約  $10 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $0.01 \text{ mmol/kg}$ 、約  $50 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $1 \text{ } \mu\text{mol/kg}$ 、約  $100 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $500 \text{ nmol/kg}$ 、約  $200 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $300 \text{ nmol/kg}$ 、約  $300 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $100 \text{ nmol/kg}$ 、約  $500 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $50 \text{ nmol/kg}$ 、約  $750 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $30 \text{ nmol/kg}$ 、約  $250 \text{ pmol/kg}$  ~ 約  $5 \text{ nmol/kg}$ 、約  $1 \text{ nmol/kg}$  ~ 約  $10 \text{ nmol/kg}$ 、またはこれらの値のうちの任意の2つの値の組み合わせであってよい。

#### 【0134】

20

これに関して、上述の薬剤組成物を用いる場合の、処置の処方、例えば投薬量の決定などは、典型的には、一般開業医や他の医師の責任の範囲内にあり、典型的には、処置される障害、個々の患者の状態、送達の部位、投与方法、および、開業医に公知の他の要因が考慮される。上述の技術およびプロトコルの例は、「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol,

A. (ed), 1980」に見出すことが可能である。従って、本発明に従って使用される、上記で規定された薬剤組成物の成分の「安全且つ有効な量」とは、これらの成分の各または全ての、本明細書において規定される JNK シグナル伝達に強く関連する疾患または障害の良好な改変を有意に誘発するのに十分な量を意味する。しかし、同時に、「安全且つ有効な量」は、深刻な副作用を回避するために十分に少ない量であり、すなわち、利点と危険との間の実用的な関係を可能にする量である。これらの限度の決定は、典型的には、実用的な医学的判断の範囲内にある。このような成分の「安全且つ有効な量」は、処置される特定の状態、およびまた処置される患者の年齢および健康状態、状態の重篤度、処置の期間、付随する療法の性質、用いられる特定の薬学的に許容され得る担体の性質、および、担当する医師の知識および経験の範囲内である類似の要因に関連して変動する。本発明に係る薬剤組成物は、本発明に従って、ヒトへの医学目的およびまた動物への医学目的に用いることが可能である。

30

#### 【0135】

本発明に従って用いられる薬剤組成物は、さらに、これらの物質のうちの1つに加えて、(適合性の) 薬学的に許容され得る担体、賦形剤、緩衝剤、安定剤、または、当業者に周知の他の材料を含む。

40

#### 【0136】

これに関して、「(適合性の) 薬学的に許容され得る担体」という表現は、好ましくは、液体または非液体ベースの組成物を含む。「適合性の」という用語は、通常の使用条件下で組成物の薬学的有効性を実質的に低減する相互作用が生じないような様式で、本明細書において使用される薬剤組成物の構成物質が、上記で規定された薬学的に活性な成分、および1つの他の成分と混合されることが可能であることを意味している。薬学的に許容され得る担体は、処置されるヒトへの投与に適したようにするには、当然ながら、純度が十分に高く、且つ、毒性が十分に低くなければならない。

#### 【0137】

本明細書において使用される薬剤組成物が、液体形態で提供されるならば、薬学的に許

50

容され得る担体は典型的には、1つ以上の（適合性の）薬学的に許容され得る液体担体を含む。この組成物は、（適合性の）薬学的に許容され得る液体担体として、例えば、パイロジェンフリー水、等張食塩水または緩衝化（水）溶液（例えばリン酸塩、クエン酸塩など、緩衝化溶液、植物油（例えば、ラッカセイ油、綿実油、胡麻油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびシオブローマからの油など）、ポリオール（例えば、ポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなど）、アルギン酸などを含んでいてよい。特に、本明細書において使用される薬剤組成物を注射する場合、緩衝剤、好ましくは水性緩衝液を用いてもよい。

#### 【0138】

本明細書において使用される薬剤組成物が固体形態で提供されるならば、薬学的に許容され得る担体は、典型的には、1つ以上の（適合性の）薬学的に許容され得る固形の担体を含む。この組成物は、（適合性の）薬学的に許容され得る固形の担体として、例えば、1つ以上の適合性の固体若しくは液体の充填剤または希釈剤またはヒトへの投与に適しているカプセルに包まれた化合物を用いてもよい。このような（適合性の）薬学的に許容され得る固体の担体の幾つかの例は、例えば、糖質（例えば、ラクトース、グルコース、およびサッカロース）、でんぷん（例えば、トウモロコシでんぷんまたはジャガイモでんぷんなど）、セルロースおよびその誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロースなど）、粉状のトラガカント、モルト、ゼラチン、獣脂、固体の滑剤（*glidant*）（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムなど）、硫酸カルシウムなどが挙げられる。

#### 【0139】

（適合性の）薬学的に許容され得る担体または他の材料の正確な特性は、投与経路に依存し得る。従って、（適合性の）薬学的に許容され得る担体の選択は、原則的に、本発明に従って用いられる薬剤組成物が投与される方法によって決定され得る。本発明に従って用いられる薬剤組成物は、例えば、全身的に投与され得る。投与経路には、例えば、（例えば注射を介した）非経口経路（例えば静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、皮内経路、または、経皮経路など）、経腸経路（例えば、経口または直腸経路など）、局所経路（例えば経鼻、または鼻腔内経路など）、または他の経路（例えば表皮経路、またはパッチ送達）が含まれる。

#### 【0140】

用いられる薬剤組成物の好適な量を、動物モデルを用いた常習的な実験によって決定することが可能である。このようなモデルには、うさぎ、ひつじ、マウス、ラット、イヌ、および非ヒトの霊長類モデルが含まれるが、これらに限定されることを意図するものではない。注射のための好ましい単位用量の形態は、滅菌水溶液、生理食塩水、またはこれらの混合物が含まれる。このような溶液のpHは、約7.4に調整されている必要がある。注射のための好適な担体には、ヒドロゲル、制御放出または遅延放出のためのデバイス、ポリ乳酸、およびコラーゲンマトリクスが含まれる。局所適用に好適な薬学的に許容され得る担体には、ローション、クリーム、ゲルなどにおける使用に適した担体が含まれる。化合物が、経口的に投与されるならば、錠剤、カプセルなどが、好ましい単位剤形である。経口投与に使用可能な、単位剤形の調製のための薬学的に許容され得る担体は、従来技術において公知である。この担体の選択は、味、費用、および貯蔵性などの二次的な検討条件に依存する。この選択は、本発明の目的には重要ではなく、当業者が容易に選択することが可能である。

#### 【0141】

経口投与用の薬剤組成物は、錠剤、カプセル、粉末、または液体形態であってよい。錠剤は、上記で規定された固体の担体、例えばゼラチン、および、任意により補佐剤を含んでいてよい。経口投与用の液状薬剤組成物は、一般的には、上記で規定された液体担体、例えば水、石油、および、動物油若しくは植物油、鉱物油、または、合成油を含んでいてよい。生理食塩水溶液、デキストロース若しくは他の糖類溶液、またはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）が含

まれていてもよい。

#### 【0142】

静脈内、皮膚若しくは皮下注射、または、苦痛を有する部位への注射の場合、有効成分は、非経口的に受容可能な水溶液の形態であり、この水溶液は、パイロジェンフリーであると共に、好適なpH、等張性、および安定度を有している。当業者は、好適な溶液を、例えば、等張性ビヒクル（例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、乳酸加リンガー注射液）を用いて、十分に調製可能である。必要に応じて、保存剤、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤、および／または、他の添加物が含まれていてもよい。個体に投与されるものが、ポリペプチド、ペプチドであろうと、核酸分子、本発明に係る薬学的に有用な他の化合物であろうと、投与は、好ましくは「予防的に有効な量」、または、「治療的に有効な量」（場合によっては）である。この量は、個体に対する利益を示すために十分な量である。投与される実際の量、および、投与の速度および時間的経過は、処置されるものの性質および重篤度に依存する。

10

#### 【0143】

本明細書において規定される疾患の予防および／または処置には、典型的には、上記で規定された薬剤組成物の投与が含まれる。「調整する」という用語は、上述の疾患のいずれかにおいてJNKが過剰に発現した時に、JNKの発現を抑制することを含む。「調整する」という用語はまた、例えば、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのJNK阻害剤配列、および／または、配列番号9～12および23～32の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのキメラペプチド、および／または、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのJNK阻害剤配列であって、配列番号5～8および21～22のいずれかに記載の輸送配列、または上記規定の範囲内のその改変体若しくは断片を含むJNK阻害剤配列を、天然のc-jun、ATF2、およびNFAT4結合部位の競合阻害剤として細胞内で用いることによって、上述の疾患のいずれかにおいて、c-jun、ATF2、またはNFAT4のリン酸化を抑制することを含む。「調整する」という用語は、また、c-jun、ATF2、またはNFAT4、およびそれらの関連するパートナーから構成される（これらに限定されない）転写因子のヘテロマー複合体およびホモマー複合体、例えばc-jun、ATF2、およびc-fosから構成されるAP-1複合体など、の抑制を含む。上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害が、JNK過剰発現と関連付けられる場合、このような抑制力のあるJNK阻害剤配列を、細胞に導入することが可能である。ある場合には、「調整する」は、例えば、IBペプチド特異抗体の使用により、IBペプチドがJNKに結合することを阻止して、これによって、IB関連ペプチドによるJNK阻害を防止することによって、JNK発現を増加させることを含む。

20

30

#### 【0144】

被験体を、上記で開示された薬剤組成物で予防および／または処置することは、典型的には、一定の（「治療的に有効な」）量の上記薬剤組成物を被験体に投与する（インビボ）ことによって実現され得る。ここで、被験体とは、例えば任意の、哺乳類、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、または豚であってよい。「治療的に有効な」という用語は、薬剤組成物の有効成分が、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を十分に改善するのに十分な量のものであることを意味する。

40

#### 【0145】

従って、上記で規定されたような任意のペプチド、例えば、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのJNK阻害剤配列、および／または、配列番号9～12および23～32の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのキメラペプチド、および／または、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載の少なくとも1つのJNK阻害剤配列であって、配列番号5～8および21～22のいずれかに記載の輸送配列、または上述の規定の

50

範囲内のその改変体若しくは断片を含むJNK阻害剤配列を、本発明の具体的な一実施形態において用いて、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害を、例えば、活性化されたJNKシグナル伝達経路を調整することにより、処置することが可能である。

#### 【0146】

しかしながら、上記で規定されたペプチドは、また、核酸によってコードされていてよく、その後、例えば遺伝子療法における使用のために、本発明に係る薬剤組成物の一部を形成することが可能である。これに関して、遺伝子療法とは、上記で規定された特異的な核酸を、例えば上記で規定された薬剤組成物として、被験体に投与することによって行われる療法を指す。ここで、核酸（複数可）は、L-アミノ酸だけを含む。本発明の本実施形態では、核酸は、そのコードされたペプチド（複数可）を生成し、該コードされたペプチド（複数可）は、その後、疾患または障害を調節する機能によって、治療効果を発揮するように機能する。本発明の実施においては、当該技術内で利用可能な遺伝子療法に関する任意の方法のいずれか（例えば、Golds piel, et al., 1993. Clin Pharm 12 488-505を参照）を用いてよい。

#### 【0147】

好ましい一実施形態では、上記で規定され遺伝子療法に用いられる核酸は、好適な宿主内の、上記で規定された任意の1つ以上のIB-関連ペプチドをコードすると共に発現する発現ベクターの一部である。上記で規定された任意の1つ以上のIB-関連ペプチドとは、すなわち、配列番号1~4、および13~20、および33~100の配列のいずれかに記載のJNK阻害剤配列、および／または、配列番号9~12および23~32の配列のいずれかに記載のキメラペプチド、および／または、配列番号1~4、および13~20、および33~100の配列のいずれかに記載のJNK阻害剤配列であって、配列番号5~8および21~22のいずれかに記載の輸送配列、または上述の規定の範囲内のその改変体若しくは断片を含むJNK阻害剤配列である。具体的な一実施形態では、このような発現ベクターは、JNK阻害剤配列のコーディング領域（複数可）に動作可能に連結されたプロモーターを有している。このプロモーターは、上述のように、例えば、誘導的または構成的、および、任意により組織特異的であると規定され得る。

#### 【0148】

具体的な別の実施形態では、上記で規定されたような核酸分子が、遺伝子療法に用いられる。ここでは、上記で規定された核酸分子のコーディング配列（およびその、任意の他の所望の配列）が、ゲノム内の所望の部位において相同的組み換えを促進し、これらの核酸の染色体内発現を提供する領域によって挟まれている（例えば、Koller and Smithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86 8932-8935を参照）。

#### 【0149】

本発明によれば、上記で規定された核酸を、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する特に上述の疾患または障害の関連で、遺伝子療法の目的で、患者へと送達することは、直接的（すなわち、患者が核酸、または核酸-含有ベクターに直接曝される）であってもよいし、または、間接的（すなわち、最初に、核酸によって細胞をインビトロで形質転換させ、その後、患者に移植する）であってもよい。これら2つの方法は、それぞれ、インビボ遺伝子療法、または生体外遺伝子療法として公知である。本発明の具体的な一実施形態では、核酸を、直接インビボで投与する。ここで、核酸は、コードされた産生物を生成するために、発現する。これは、当該技術分野において公知の多数の方法のうちのいずれかによって実現され得る。これらの公知の方法には、例えば、核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築する方法、および、細胞内に来るように核酸を投与する方法（例えば、欠損若しくは弱毒化レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いて感染させることによって；米国特許第4,980,286号を参照）、微粒子銃（microparticle bombardment）を用いて裸のDNAを直接注射する方法（例えば、「Gene Gun」、Biolistic、DuPont）、核酸を脂質で被

覆する方法、関連する細胞表面レセプター／トランスフェクション剤を用いた方法、リボソーム、微粒子、またはマイクロカプセル内に封入する方法、それを、核に侵入することが分かっているペプチドへ連結させて投与する方法、または、それを、レセプター媒介性のエンドサイトーシスおこし易いリガンドへ連結して投与する方法（対象となるレセプターを特異的に発現する種類の細胞を「標的」とするために用いられ得る）（例えば、Wu and Wu, 1987. J Biol Chem 262 4429-4432を参照）などが挙げられる。

#### 【0150】

本発明の実施における遺伝子療法のさらなる方法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、ウイルス感染などのような方法によって、（上記で規定されたような核酸を含む）遺伝子をインビトロ組織培養物中の細胞へと移入する方法を含む。概して、移入の方法は、同時に、選択可能なマーカーを細胞に移入することを含む。細胞はその後、選択圧（例えば、抗生物質耐性）下に置かれ、このため、移入された遺伝子を取り上げて発現する細胞の分離を促進させる。これらの細胞は、その後、患者に送達される。具体的な一実施形態では、結果として生じる組み換え細胞をインビボで投与する前に、当該技術内の公知の任意の方法（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、対象となる核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介性遺伝子導入、マイクロセル媒介性遺伝子導入、スフェロプラスト融合、および、受容細胞の必要な発生および生理学的機能がこの移入によって妨げられないことを確実にする類似の方法を含む）により、核酸を細胞内に移入する。例えば、Loeffler and Behr, 1993. Meth Enzymol 217 599-618を参照。選択された技術は、核酸が細胞によって発現可能であるように、細胞への核酸の安定した移入を提供すべきである。好ましくは移入された核酸は、遺伝性であり、細胞後代によって発現可能である。

#### 【0151】

本発明の好ましい実施形態では、結果として生じる組み換え細胞は、例えば、上皮細胞への注射（例えば皮下注射）、植皮としての組み換え皮膚細胞の患者への適用、および、組み換え血液細胞（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）の静脈内注射を含む、当該技術内の公知の種々な方法によって、患者に送達され得る。使用が想定される細胞の総量は、所望の作用、患者の状態などに依存し、当業者によって決定され得る。遺伝子療法のために核酸が導入され得る細胞は、任意の、所望の利用可能な細胞の種類を包含し、異種、異種遺伝子的、同系、または自己的（autogeneic）であってよい。細胞の種類には、分化した細胞、例えば、上皮細胞、内皮細胞、ケラチン生成細胞、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞、および血液細胞、または、種々な幹細胞若しくは前駆細胞、特に、胎児心筋細胞、肝臓幹細胞（国際特許公開WO94/08598号）、神経幹細胞（Stemple and Anderson, 1992, Cell 71 973-985）、例えば、骨髄、臍帯血液、末梢血、胎児の肝臓から得られる造血幹細胞若しくは前駆細胞などが含まれるが、これらに限定されない。好ましい一実施形態では、遺伝子療法に利用されるこれらの細胞は、患者の自己細胞である。

#### 【0152】

代わりにおよび／または追加的に、本明細書に記載される疾患の処置のために、ターゲティング療法を用いて上記で規定された、JNK阻害剤配列、キメラペプチド、および／または、核酸を、（標的）抗体または細胞特異的リガンドのような標的システムを用いることによって、ある特定の種類の細胞により特異的に送達することができる。ターゲティングのために用いられる抗体は、典型的には、以下に規定する疾患のいずれかに関連する細胞の細胞表面蛋白質に特異的である。一例として、これらの抗体は、例えば、MHCクラスII DR蛋白質、CD18（LFA-1ベータ鎖）、CD45RO、CD40若しくはBgp95、または、例えばCD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD10、CD13、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、C

D 2 4、C D 2 5、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 3 9、C D 4、C D 4 3、C D 4 5、C D 5 2、C D 5 6、C D 6 8、C D 7 1、C D 1 3 8 などから選択された細胞表面蛋白質などのような、B 細胞に関連付けられた表面蛋白質などの細胞表面抗体に向けられ得る。ターゲティング構築物は、典型的には、本明細書において規定された、本発明に係る J N K 阻害剤配列、キメラペプチド、および核酸を、細胞表面蛋白質に特異的な抗体に共有結合させることによって、または、細胞特異的リガンドに結合させることによって、調製され得る。蛋白質は、例えば、ペプチド結合によってまたは化学的カップリング、化学的架橋などによって、このような抗体に結合され (b o u n d) 得る、または、このような抗体に結合され (a t t a c h e d) 得る。その後、ターゲティング療法は、ターゲティング構築物を、薬学的に有効な量で、以下に規定する投与経路のいずれか、例えば、腹腔内経路、経鼻経路、静脈内経路、経口経路、およびパッチ送達経路によって、患者に投与することによって行われ得る。好ましくは、上記で規定されたターゲティング抗体または細胞特異的リガンドに結合される、本発明に係る、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列、キメラペプチド、または核酸は、例えば、共有結合の加水分解によって、ペプチダーゼによって、または、任意の他の好適な方法によって、インビトロまたはインビボにおいて放出され得る。あるいは、本発明に係る、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列、キメラペプチド、または核酸が、小細胞特異的リガンドに結合されるならば、リガンドの放出は、行われない可能性がある。細胞表面に存在する場合、キメラペプチドは、その輸送配列の活性によって、細胞に侵入する。ターゲティングは、種々な理由のため、例えば、本発明に係る、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列、キメラペプチド、および核酸が、許容できないような毒性である場合、または、極めて多い投薬量を必要とするような場合に望ましい場合がある。

10

20

#### 【0153】

本発明に係る、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列、および／または、キメラペプチドを直接的に投与する代わりに、これらを、細胞内に導入されたコード化遺伝子から、例えば、投与されるウイルスベクターから発現させることによって、標的細胞内に生成することも可能である。ウイルスベクターは、典型的には、本発明に係る、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列および／またはキメラペプチドをコードする。このベクターは、処置される特異的細胞に標的化され得る。さらに、このベクターは、調節要素を含むことが可能である。この調節要素は、多かれ少なかれ、選択的に、所定の調節によって、標的細胞によって切替えられる。この技術は、成熟蛋白質をその前駆体形態の代わりに利用する V D E P T 技術の改変体 (ウイルスー指向性酵素プロドラッグ療法) を示す。

30

#### 【0154】

あるいは、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列および／またはキメラペプチドを、抗体またはウイルスを用いることによって、前駆体形態で投与してもよい。これらの J N K 阻害剤配列および／またはキメラペプチドは、その後、処置される細胞内に生成された活性化剤、または処置される細胞に標的化された活性化剤によって、活性形態に変換され得る。この種の方法は、A D E P T (抗体ー指向性酵素プロドラッグ療法) または V D E P T (ウイルスー指向性酵素プロドラッグ療法) としても知られている。A D E P T は、細胞ー特異抗体にコンジュゲートすることによって、活性化剤を細胞に標的化することを含み、V D E P T は、活性化剤、例えば、J N K 阻害剤配列またはキメラペプチドを、ウイルスベクター内のコード化 D N A から発現させることによって、ベクターで生成することを含む (例えば、E P - A - 4 1 5 7 3 1 号公報および W O 9 0 / 0 7 9 3 6 号公報を参照)。

40

#### 【0155】

さらなる一実施形態によれば、J N K 阻害剤配列、キメラペプチド、核酸配列、または、本明細書において規定される J N K 阻害剤配列若しくはキメラペプチド (例えば、配列番号 1 ~ 4、および 1 3 ~ 2 0、および 3 3 ~ 1 0 0 の配列のいずれかに記載の J N K 阻害剤配列、および／または、配列番号 9 ~ 1 2 および 2 3 ~ 3 2 の配列のいずれかに記載

50

のキメラペプチド、および／または、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載のJNK阻害剤配列であって、配列番号5～8および21～22のいずれかに記載の輸送配列、または上述の規定の範囲内のその改変体若しくは断片を含むJNK阻害剤配列)に対する抗体を、(インビトロ)アッセイ(例えば、免疫学的検定)において用いて、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害から選択された様々な状態および病状を検出、予測、診断、または監視するか、または、その処置を監視することが可能である。この免疫学的検定は、患者に由来する試料を、免疫特異的結合が生じ得る条件下で、上記で規定されたJNK阻害剤配列、キメラペプチド、または核酸配列に対する抗体に接触させ、その後、該抗体によって、任意の免疫特異的結合の量を検出または測定することを含む方法によって、行うことが可能である。10  
具体的な一実施形態では、JNK阻害剤配列、キメラペプチド、または核酸配列に特異的な抗体を用いて、患者からの組織または血清試料の、JNKまたはJNK阻害剤配列の存在を分析することが可能である。ここでは、異常なレベルのJNKが、疾患状態を示している。用いられ得る免疫学的検定には、ウエスタンブロット、放射免疫学的検定(RIA)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、「サンドイッチ」免疫学的検定、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光免疫測定法、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、および、蛋白質-A免疫学的検定などといった技術を用いた、競合アッセイシステムおよび非競合アッセイシステムが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、JNK阻害剤配列、キメラペプチド、核酸配列、または上記で規定されたJNK阻害剤配列またはキメラペプチドに対する抗体を、典型的には、例えば、培養された動物細胞、ヒト細胞、または微生物から選択された標的細胞に送達して、細胞応答を、典型的には当業者に知られた生物物理学的方法によって監視することによって、(インビトロ)アッセイを行ってもよい。典型的には、本明細書において用いられる標的細胞は、培養された細胞(インビトロ)、またはインビボ細胞、すなわち、生きた動物若しくはヒトの臓器または組織、または生きた動物若しくはヒト内に見出される微生物を含む細胞であってよい。20

#### 【0156】

本発明はさらに、診断目的または治療目的のキットの使用、特に、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害の処置、予防、または監視のためのキットの使用を提供する。ここで、このキットは、1つ以上の容器を備えており、該容器は、JNK阻害剤配列、キメラペプチド、核酸配列、および／または、上記で規定されたこれらのJNK阻害剤配列またはキメラペプチドに対する抗体、例えば、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載のJNK阻害剤配列に対する、配列番号9～12および23～32の配列のいずれかに記載のキメラペプチドに対する、配列番号1～4、および13～20、および33～100の配列のいずれかに記載のJNK阻害剤配列であって、配列番号5～8および21～22のいずれかに記載の輸送配列、または上述の規定の範囲内のその改変体または断片を含むJNK阻害剤配列に対する、抗-JNK阻害剤配列抗体、または、このような抗-JNK阻害剤配列抗体、および任意により、該抗体への、標識化された結合パートナーを含む。それにより抗体へと組み込まれるラベルには、化学発光部分、酵素部分、蛍光部分、比色分析部分、または放射性部分が含まれ得るが、これらに限定されない。他の具体的な一実施形態では、上記で規定されたJNKシグナル伝達に強く関連する疾患または障害の処置、予防、または監視における診断使用のためのキットが、提供される。このキットは、上記で規定されたJNK阻害剤配列および／またはキメラペプチドをコードする核酸、あるいは、上記で規定されたJNK阻害剤配列および／またはキメラペプチドを補完する核酸を含む1つ以上の容器を備えており、任意により、これらの核酸に対して標識化された結合パートナーも提供されている。具体的な代替の一実施形態では、このキットを、上述の目的のために、1つ以上の容器、および、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR;例えば、Innis, et al., 1990. PCR PROTOCOLS, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照)、リガーゼ連鎖反応、循環プローブ反応(30  
40  
50

cyclic probe reaction)、または、上記で規定された核酸との関連で用いられる当該技術内で公知の他の方法のための増幅プライマーとして機能することが可能である、一対のオリゴヌクレオチドプライマー（例えば、各々6～30ヌクレオチド長）を含むキットとして用いてもよい。このキットは、上述の目的のためのアッセイにおいて、診断、基準、またはコントロール（対照）としての使用のために、任意により、所定の量の、上記で規定された精製されたJNK阻害剤配列、上記で規定されたキメラペプチド、またはこれらをコードする核酸をさらに含むことが可能である。

#### 【0157】

本発明の範囲は、本明細書に記載の具体的な実施形態によって限定されるものではない。むしろ、本明細書に記載されるこれらの実施形態に加えて、本発明の様々な変形が、当業者には、上述の記載および添付の図面から明らかとなろう。このような変形例は、添付の特許請求の範囲に含まれる。

#### 【0158】

本明細書には、種々な文献を引用している。これらの文献の開示内容を、引用することによって、その全体を援用する。

#### 【0159】

他に規定されない限り、本明細書において使用される全ての技術的且つ科学的用語は、本発明が属する当該技術分野の知識を有する当業者によって通常理解される意味と同じ意味を有している。本明細書に記載された方法および材料に類似または等しい方法および材料を、本発明の実施または試験において用いてもよいが、好適な方法および材料については、後に記載する。本明細書に記載される、全ての文献、特許出願、特許、および他の引用文献は、引用によって、その全体を援用する。係争時には、規定を含む本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および実施例は、単に、例示的なものであり、限定するものであることを意図するものではない。本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲より明らかとなろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0160】

【図1】図1A～Cは、示される転写因子における、保存されたJBDドメイン領域のアラインメントを示す図である。ここで用いられるJNK阻害剤配列は、配列アラインメントを実施することによって同定される。このアラインメントの結果が、図1のA～Cに例示的に示されている。図1のAは、IB1、IB2、c-Jun、およびATF2のJBDの間で、最も相溶性が高い領域を示す図である。パネルBは、L-IB1(s)のJBDおよびL-IB1のJBDのアミノ酸配列を、比較のために示す図である。完全に保存された残基は、星印で示されており、GFP-JBD<sub>23Mut</sub>ベクター内のAlaに変換された残基は、白丸で示されている。図1のCは、JNK阻害剤配列および輸送配列を含むキメラ蛋白質のアミノ酸配列を示す図である。図示された実施例では、輸送配列は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)TATポリペプチドに由来し、JNK阻害剤配列は、IB1(s)ポリペプチドに由来する。パネルBおよびCでは、ヒト、マウス、およびラットの配列は同一である。

#### 【0161】

【図2】図2は、ヒト、マウス、およびラットからのジェネリックTAT-IB融合ペプチドの配列を示す図である。

#### 【0162】

【図3】図3は、ワンウェルアプローチにおいて、配列番号9および11に記載の融合ペプチドを用いた、HepG2細胞における内因性のJNK-活性の阻害の結果を示す図である。図3から、特に図3のパネルdから明らかのように、配列番号11に記載のD-TAT-IB1(s)（ここでは、D-JNKIと省略されている）は、JNK-活性を、配列番号9に記載のL-TAT-IB1(s)（ここでは、L-JNKIと略記）よりもさらに良好に効果的に阻害する。

#### 【0163】

【図4】図4は、XG-102とも呼ばれる、配列番号11に記載のキメラJNK阻害剤配列の、細胞毒性アッセイの結果を示す図である（実施例12を参照）。図示されるように、XG-102（配列番号11）は、HFFに対して細胞毒性ではない。HFFを、96ウェル組織培養プレート内に播種した。DMSO（5  $\mu$ Mの薬剤と同じレベル）、または1、2、および5  $\mu$ MのXG-102を含有する培地を添加し、24時間保持した。ニュートラルレッドを手短に添加し、細胞を固着させ、その後、色素を抽出した。540 nmにおいて、吸光度を測定した。DMSOと、1  $\mu$ MのXG-102との間には、差異は観察されなかった。

【0164】

【図5】図5は、XG-102とも呼ばれる、配列番号11に記載のキメラJNK阻害剤配列の、水痘带状疱疹ウイルス（VZV）に対する活性を試験するために行ったプラーク減少アッセイの結果を示す図である（実施例12を参照）。図示されるように、XG-102（配列番号11）は、特に0.5  $\mu$ Mおよび1  $\mu$ Mの濃度において、水痘带状疱疹ウイルス（VZV）の強力な阻害剤である。

【0165】

【図6】図6は、XG-102とも呼ばれる、配列番号11に記載のキメラJNK阻害剤配列を用いた、培養されたヒト線維芽細胞における水痘带状疱疹ウイルス（VZV）の阻害の結果を示す図である（実施例12を参照）。図示されるように、VZVは、XG-102（配列番号11）に対して有意な感受性を示している。VZV複製は、陰性コントロール（XG-100、Tatペプチドのみ）の存在下において、正常であった。従って、XG-102（配列番号11）は、試験された最も低い濃度である0.25  $\mu$ Mにおいても、VZV複製を阻止した。

【0166】

【図7】図7は、ブレオマイシン誘発性急性肺炎の動物モデルを用いた、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の処置において、肺のホモジナイゼーションにおけるMPOを用いて、XG-102（配列番号11）の、肺における細胞動員に対する活性を示す図である。図示されているように、MPOは、ブレオマイシンの投与後には、有意には誘導されなかった。従って、XG-102（配列番号11）は、肺のMPOのレベルにわずかな影響しか有していなかった。

【0167】

【図8】図8は、ブレオマイシン誘発性急性肺線維症の動物モデルを用いた、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の処置において、XG-102（配列番号11）の、TNFのレベルに対する活性を示す図である。TNFのレベルを測定すると、BLMモデルでは、XG-102（配列番号11）の投与後に、BALFにおいて、TNFのレベルが減少する傾向が観察された。BLMの後には、TNFのレベルは極めて低い。

【0168】

【図9】図9は、ブレオマイシン誘発性急性肺線維症の動物モデルを用いた、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の処置において、XG-102（配列番号11）の、気管支肺泡洗浄空間内の細胞動員に対する活性を示す図である。0.1 mg/kgにおいて、XG-102（配列番号11）は、リンパ球動員を有意に低減させ、この点で、リンパ球動員によって特徴付けられる炎症段階の間に動員される全ての細胞の数を低減させる。0.1 mg/kgにおいて、XG-102（配列番号11）は、リンパ球動員を増大させるか、または気管支肺泡の空間に動員される全ての細胞の数を増大させる（n = 群当たり5匹のマウス；\*, p < 0.05；\*\*, p < 0.001）。

【0169】

【図10】図10は、ブレオマイシン誘発性急性肺線維症の動物モデルを用いた、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の処置における、組織構造の結果を示す図である。肺の3  $\mu$ mの切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。BLM投与の10日後に、炎症細胞の集積、線維性の区域、肺構造の欠損が、観察された。図示されているように、これらのパラメータの低減は、高投与量（0.1 mg/kg）ではなく、低投与量（0.001 m

10

20

30

40

50

g/kg) の XG-102 を投与した後に、観察された。

【0170】

【図11】図11は、XG-102（配列番号11）による処置が、ELISAによって決定された脳のアβ<sub>1-40</sub>およびアβ<sub>1-42</sub>のレベルに与える効果を示す図である。これらのグラフは、トリトン40およびトリトン42による異なる脳のホモジネート画分における、ELISAによって決定されたアβ<sub>1-40</sub>（左）およびアβ<sub>1-42</sub>（右）のレベルを示すものである。データは、分散した点プロットとして、個々の値（黒）および群平均値±SEMと共に、示されている。有意差に星印を付けている（\*p<0.05；\*\*p<0.01）。群間の有意差は、アβ<sub>1-42</sub>のトリトンX-100画分においてのみ観察された。

10

【0171】

【図12】図12は、XG-102（配列番号11）による処置が、ELISAによって決定されたCSFのアβ<sub>1-40</sub>およびアβ<sub>1-42</sub>のレベルに与える効果を示す図である。これらのグラフは、CSFにおける、ELISAによって決定されたアβ<sub>1-40</sub>（左）およびアβ<sub>1-42</sub>（右）のレベルを示している。データは、分散した点プロットとして、個々の値（黒）および群の平均値±SEMと共に、示されている。有意差に星印を付けている（\*p<0.05；\*\*p<0.01）。両方の投与量のXG-102（配列番号11）による処置は、CSFにおけるアβ<sub>1-40</sub>およびアβ<sub>1-42</sub>の有意な減少をもたらした。

【0172】

20

【図13】図13は、hAPP Tgマウスにおける、チオフラビンS染色剤で視覚化されたプラークの数への、処置効果を示す図である。これらのグラフは、皮質および海馬における、チオフラビンSで染色されたプラークのmm<sup>2</sup>当りの数を示している。XG-102（配列番号11）処置は、海馬において、プラークの数を、負の用量依存的に低減させた。データは、平均値±SEMとして示されている。群当たりN=8。\*…p<0.05；\*\*…p<0.01。

【0173】

【図14】図14は、hAPP Tgマウスにおける、チオフラビンSで視覚化されたプラーク面積[%]に与える、処置効果を示す図である。これらのグラフは、皮質および海馬における、チオフラビンSにポジティブなプラークのプラーク面積[%]を示している。XG-102（配列番号11）は、海馬において、プラークによって得られる面積を有意に低減させた。データは、平均値±SEMとして示されている。群当たりN=8。

30

【0174】

【図15】図15は、XG-102（配列番号11）の投与が、2型糖尿病の動物モデルにおける空腹時血糖値（絶対値および相対値）に与える結果を示す図である。群AおよびCにおいて、空腹時血糖を、68日目まで3日ごとに測定し、111日目の終了日まで、定期的に測定した。本発明者らは、XG-102（配列番号11）（10mg/kg）で処置された糖尿病のdb/dbマウスの空腹時血糖値が、ビヒクルコントロールと比べて、明らか且つ有意に減少すること（p<0.001）を観察した。XG-102（配列番号11）（10mg/kg）で処置したマウスの空腹時血糖値は、およそ5mmol/Lの低いプラトーに達した。この効果は、投与の14日後に現れ、調査中はずっと、従って21日目から111日目までのウォッシュアウト期間の間もずっと、持続した。これとは異なり、本発明者らは、低投与量のXG-102（配列番号11）（1mg/kg）では、投与を続けた28日間において、効果がないことを観察した。

40

【0175】

【図16】図16は、10mg/kgのXG-102（配列番号11）の投与が、2型糖尿病の動物モデルの体重に与える結果を示す図である。本発明者らは、XG-102（配列番号11）（10mg/kg）で処置したマウスにおいて、体重増加が、ビヒクルコントロールと比べて、明らか且つ有意に抑制されたこと（p<0.001）を観察した。この効果は、投与の28日目から現れ、終了日111日まで持続した。これとは異なり、本

50

発明者らは、低投与量の X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 m g / k g) では、投与を続けた 2 8 日間において、体重について効果がなかったことを観察した。

【0176】

【図 1 7】図 1 7 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、調査 6 8 日目に代謝ケージにおいて測定される、2 4 時間での飼料および水摂取、および、尿および糞の生成に与える影響を、図 1 7 において (g) にて示す図である。本発明者らは、飼料摂取および尿生成が減少する傾向を観察したものの、測定したこれらのパラメータのいずれにおいても、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、ビヒクルコントロールと比べて顕著な影響を有していなかったことを観察した。

10

【0177】

【図 1 8】図 1 8 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、調査 6 8 日目に代謝ケージにおいて測定される、2 4 時間での飼料および水摂取、および、尿および糞の生成に与える影響を、図 1 8 において (体重の g に正規化された) 示す図である。本発明者らは、食料摂取および尿生成が減少する傾向を観察したものの、測定したこれらのパラメータのいずれにおいても、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、ビヒクルコントロールと比べて有意な影響を有していなかったことを観察した。

【0178】

【図 1 9】図 1 9 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、5 7 日目、7 7 日目、および 1 0 8 日目に測定された、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) の効果を示す図である。図 1 9 は、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、インスリン、M C P - 1、および I L - 6 の血漿レベルに与える効果を示す。本発明者らは、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、ビヒクルコントロールと比べて、測定されたパラメータのいずれにも有意な効果を有していなかったことを観察した。

20

【0179】

【図 2 0】図 2 0 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、5 7 日目、7 7 日目、および 1 0 8 日目に測定された、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) の効果を示す図である。図 2 0 は、t P A I - 1、T N F、およびレジスチンの血漿レベルに与える効果を示す。本発明者らは、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、ビヒクルコントロールと比べて、血漿レジスチンのレベルを除く、測定されたパラメータのいずれにも有意な効果を有していなかったことを観察した。その血漿レジスチンレベルは、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) で処置した動物において、7 7 日目および 1 0 8 日目に、有意に高かった。

30

【0180】

【図 2 1】図 2 1 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、副睾丸脂肪パッド、鼠径部皮下脂肪パッド、および、後腹膜脂肪パッドの組織重量に与える影響を示す図である。本発明者らは、X G - 1 0 2 で処置したマウスにおいて、ビヒクルコントロールと比べて、副睾丸 (p < 0 . 0 5) および後腹膜 (p < 0 . 0 1) の脂肪質量が有意に減少したことを観察した。

40

【0181】

【図 2 2】図 2 2 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、脳、脾臓、および心臓の組織重量に与える影響を示す図である。本発明者らは、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、ビヒクルコントロールと比べて、これらのパラメータに有意に影響がないことを観察した。

【0182】

【図 2 3】図 2 3 は、2 型糖尿病の動物モデルにおいて、ビヒクルまたは X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) (1 0 m g / k g) が、腎臓および肝臓の組織重量に与える影響を示す図である。本発明者らは、X G - 1 0 2 (配列番号 1 1) で処置したマウスにおいて、腎臓

50

( $p < 0.05$ ) および肝臓 ( $p < 0.01$ ) の質量が、ビヒクルコントロールと比べて、有意に減少したことを観察した。

【0183】

【図24】図24は、初代培養されたマクロファージを、XG-102（配列番号11）とともにインキュベートし、その後、広範囲にわたって洗浄したものを示す図である。XG-102（配列番号11）の存在は、XG-102に対する特異抗体を用いて明らかにした。XG-102は、初代マクロファージにしっかりと組み込まれている。

【0184】

【図25】図25は、 $C^{14}$ （1mg/kg）で放射性標識されたペプチドを、3つの異なる経路（s. c.、i. v.、i. p.）を介して投与することによって、マウスを処置したものを示す図である。動物を、注射の72時間後に屠殺し、免疫ラジオグラフィーを施した。矢状断面（sagittal section）を露出させ、主に肝臓、脾臓、および骨髄にXG-102ペプチドが蓄積することを明らかにした（XG-102：配列番号11）。

10

【0185】

【図26】図26は、1mg/kgのXG-102をi. v. 注射したラットの肝臓内のXG-102（配列番号11）に対する免疫染色を示す図である。動物を、注射の24時間後に屠殺した。DAB基質を用いて顕色を行った。この図も、肝臓、および特にクッパー細胞（マクロファージ）内にXG-102が著しく蓄積していることを示している。

【0186】

【図27】図27は、2つの細胞株における、サイトカインおよびケモカインの放出の阻害を示す図である。XG-102（配列番号11）が、骨髄性細胞株およびリンパ球様細胞株の両方におけるサイトカインの放出を阻害して、THP-1細胞（パネルA～C）における、LPS誘導TNF $\alpha$ 、IL-6、およびMCP-1の放出を低減し、ジャークット細胞（パネルD～F）におけるPMAおよびイオノマイシン誘導IFN $\gamma$ 、IL-6、およびIL-2の産生を低減する。コントロール（XG-101）は、安定度が悪い

20

【0187】

【図28】図28は、は、一次細胞におけるサイトカインの放出の阻害を示す図である。XG-102（配列番号11）はまた、一次リンパ球様細胞および骨髄性細胞におけるサイトカインの放出を阻害して、マウスのマクロファージ（パネルA～C）におけるLPS誘導TNF $\alpha$ 、IL-6、およびランテス放出を低減すると共に、マウスのT細胞（パネルD～E）におけるPMAおよびイオノマイシン誘導TNF $\alpha$ 、およびIFN $\gamma$ の産生を低減する。細胞に傷害を与えない濃度のXG-102において、効果が生じる（パネルF）。

30

【0188】

【図29-1】図29は、ラットからのIB1 cDNA配列、およびその予測されるアミノ酸配列（配列番号102）を示す図である。

【図29-2】図29は、ラットからのIB1 cDNA配列、およびその予測されるアミノ酸配列（配列番号102）を示す図である。

40

【0189】

【図30-1】図30は、rIB1遺伝子スプライス供与体のエクソン-イントロン境界によってコードされた、ラットからのIB1蛋白質配列（配列番号103）を示す図である。

【図30-2】図30は、rIB1遺伝子スプライス供与体のエクソン-イントロン境界によってコードされた、ラットからのIB1蛋白質配列（配列番号103）を示す図である。

【図30-3】図30は、rIB1遺伝子スプライス供与体のエクソン-イントロン境界によってコードされた、ラットからのIB1蛋白質配列（配列番号103）を示す図である。

50

## 【0190】

【図31-1】図31は、ホモサピエンスからのIB1蛋白質配列（配列番号104）を示す図である。

【図31-2】図31は、ホモサピエンスからのIB1蛋白質配列（配列番号104）を示す図である。

【図31-3】図31は、ホモサピエンスからのIB1蛋白質配列（配列番号104）を示す図である。

## 【0191】

【図32-1】図32は、ホモサピエンスからのIB1 cDNA配列（配列番号105）を示す図である。

【図32-2】図32は、ホモサピエンスからのIB1 cDNA配列（配列番号105）を示す図である。

## 【0192】

【図33】図33は、臍島単離のJNK/p38の活性化に対する効果を示す図である。この実験は、単離工程自体により引き起こされる、JNKまたはp38などに対する任意の効果を同定するようにデザインした。コントロールとして、チューブリン検出を使用した。消化時間（分）の関数としてのウェスタンブロット染色を示す。

## 【0193】

【図34】図34は、単離の間における、XG-102の、JNKの活性化に対する効果を示す図である。

## 【0194】

【図35】図35は、単離の間における、XG-102の、JNKの活性化に対する効果を示す図である。

## 【0195】

【図36】図36は、単離の間における、XG-102の、OCR/DNAに対する効果を示す図である。

## 【0196】

【図37】図37は、HPLC解析による、XG-102（DJNK阻害剤）の、ATP/蛋白質Jに対する効果を示す図である。

## 【0197】

【図38】図38は、XG-103が、7日間の培養後に測定された臍島の生存率（OCR/DNA）を有意に上昇させることを示す図である。

## 【0198】

【図39】図41（A）は、フルオレセイン注射の10分後における、フルオレセインによる血管造影評価（平均スコア）を示す図である。平均スコアは、14日目および21日目の5つの群（300マイクログラム（microgramm）/mlのXG-102、3mg/mlのXG-102、Kencort retard、0.9%のNaCl溶液、非処置）について提示する。図41（B）は、フルオレセイン注射の10分後における、フルオレセインによる血管造影評価（平均スコア）の比率を、5つの群（300マイクログラム/mlのXG-102、3mg/mlのXG-102、Kencort retard、0.9%のNaCl溶液、非処置）について、14日目および21日目において示す図である。図41（C）は、フルオレセイン注射の10分後における、ChNV形成の発生率を、14日目および21日目において、5つの群（300マイクログラム/mlのXG-102、3mg/mlのXG-102、Kencort retard、0.9%のNaCl溶液、非処置）について示す図である。図41（D）は、フルオレセイン漏出の発生率が、14日目および21日目において、5つの群（300マイクログラム/mlのXG-102、3mg/mlのXG-102、Kencort retard、0.9%のNaCl溶液、非処置）について増加すること示す図である。

## 【0199】

【図40】図40は、アドリアマイシン誘発性腎症の誘発による、XG-102の、腎組

10

20

30

40

50

織に対する効果を評価するための実験のデザインを示す図である。ラット群およびそれらの処置レジメンが示される。

【0200】

【図41】図41は、XG-102が、蛋白尿症に関する、いかなる有害作用も引き起こさないことを示す図である。ELISAアッセイを使用して、アルブミン濃度を、群1、群4、および群5について、観察期間（5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、25、38、41日目）の関数として決定した。

【0201】

【図42】図42は、実験開始の8日後における組織学的解析を示す図である。群1（左図）の、アドリアマイシンで処置されたラットと、群4（右図）の、アドリアマイシンおよびXG-102で処置されたラットとの比較である。

10

【0202】

【図43】図43は、実験開始の14日後における組織学的解析を示す図である。群1（左図）の、アドリアマイシンで処理されたラットと、群4（右図）の、アドリアマイシンおよびXG-102で処置されたラットとの比較である。

【0203】

【図44】図44は、実験開始の19日後における組織学的解析を示す図である。群1（左図）の、アドリアマイシンで処置されたラットと、群4（右図）の、アドリアマイシンおよびXG-102で処置されたラットとの比較である。

【0204】

20

【図45】図45は、実験開始の41日後における組織学的解析を示す図である。群1（左図）の、アドリアマイシンで処置されたラットと、群4（右図）の、アドリアマイシンおよびXG-102で処置されたラットとの比較である。

【0205】

【図46】図46は、実験開始の8日後における、c-jun発現の組織学的解析（染色）を示す図である。左図：アドリアマイシンで処置された組織学的調製物、中央図：アドリアマイシンおよびXG-102で処置された組織学的調製物（間質内のc-jun発現の有意な低減をもたらす）、および右図：コントロールである。

【0206】

【図47】図47は、実験開始の14日後における、c-jun発現の組織学的解析（染色）を示す図である。左図：アドリアマイシンで処置された組織学的調製物、中央図：アドリアマイシンおよびXG-102で処置された組織学的調製物（間質内のc-jun発現の有意な低減をもたらす）、および右図：コントロールである。

30

【0207】

【図48】図48は、ADR投与後8、14、29、41、および56日目の、アドリアマイシン（ADR: adriamycin）誘発性腎症モデルにおけるラットの、蛋白血（protidemia）（A）および尿素レベル（B）により評価された腎機能を示す図である。群1（「ADR」）および群2（「ADR+XG-102」）は、0日目において、ADRで処置して、腎症（necropathy）を誘発したが、群3（「NaCl」）および群4（「XG-102」）には、0.9%のNaClを施した。さらに、群2および4は、0日目において、XG-102で処置したが、群1および3には、ビヒクル（0.9%のNaCl）を施した。

40

【0208】

【図49】図49は、過ヨウ素酸-シッフ（PAS: periodic acid-Schiff）で染色された、アドリアマイシン（ADR）誘発性腎症モデルにおけるラットの腎切片を示す図である（元の拡大率：40倍）。左欄に示された切片については、ADR投与後8日目において、ラットを屠殺したが、右欄（left column）に示された切片については、ラットを56日目に屠殺した。ADRは、「ADR」群および「ADR+XG102」群のみに投与し、「NaCl」群には、0.9%のNaClのみを施した。「ADR+XG102」群は、0日目において、XG-102で処置したが、他の

50

群（「A D R」および「N a C l」）には、ビヒクル（0.9%のN a C l）を施した。

#### 【0209】

【図50】図50は、0日目においてA D Rおよびビヒクルで処置された「A D R」群（上パネル）、および0日目においてA D RおよびX G - 1 0 2で処置された「A D R + X G 1 0 2」群（下パネル）について、A D R投与後8日目（左の4つのパネル）および56日目（右の4つのパネル）において、マッソントリクローム（青色）で評価された、A D R腎症における腎線維症を示す図である。元の拡大率：10倍を、左パネルに、それぞれの日について示し、元の拡大率：40倍を、右パネルに、それぞれの日について示す。

#### 【0210】

【図51】図51は、X G - 1 0 2の、ピューロマイシン（puromycine）アミノヌクレオシド（PAN：puromycine aminonucleoside）誘発性腎症に対する効果を調査する、実験の試験デザインを示す図である。0日目および14日目に、PANまたはそのビヒクルを、腎症を誘発するために注射した。0日目および14日目には、PANをまず投与した後で、X G - 1 0 2を投与した。0日目～42日目には、X G - 1 0 2またはそのビヒクルを、上記で記載した通り、i. v. 経路により1週間に1回投与した。56日目には、動物を屠殺し、サンプル（血液および腎臓）を回収した。

#### 【0211】

【図52】図52は、X G - 1 0 2の、ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）誘発性腎症における、糸球体硬化症による傷害に対する効果を示す図である。X G - 1 0 2（凡例には「c p d」と表示する）は、群3～6に投与した。群2と群6とは、実施例20の試験計画において言明されている通り、i v注射の回数に関して異なる。群2についてのスコアは、同じ実験プロトコルを使用して、N a j a k i m aら（2010年）により報告されたスコアに極めて類似することに注意されたい。\*\*\*：対応のないスチューデントのt検定を使用して、群1に対して $P < 0.001$ ；###：一元ANOVAを使用した後で、ニューマン-コイルス検定を使用して、群2に対して $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ ；§§§：対応のないスチューデントのt検定を使用して、群2に対して $P < 0.001$ 。

#### 【0212】

【図53】図53は、X G - 1 0 2の、ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）誘発性腎症における、糸球体損傷に対する効果を示す図である。X G - 1 0 2（凡例には「c p d」と表示する）は、群3～6に投与した。群2と群6とは、実施例20の試験計画において言明されている通り、i v注射の回数に関して異なる。\*\*\*：対応のないスチューデントのt検定を使用して、群1に対して $P < 0.001$ ；###：一元ANOVAを使用した後で、ニューマン-コイルス検定を使用して、群2に対して $P < 0.001$ ；§§§：対応のないスチューデントのt検定を使用して、群2に対して $P < 0.001$ 。

#### 【0213】

【図54】図54は、糖尿病性腎症のラットモデルにおいて、X G - 1 0 2の長期投与の効果进行调查する、実施例21の試験スケジュールを示す図である。動物には、到着の直後に、高脂肪食餌を施した。群E内および群F内の動物には、ベースライン相以後の各日において、毎日投与する。

#### 【0214】

【図55】図55は、糖尿病性腎症のラットモデルにおける、X G - 1 0 2の長期投与の、ラットの体重に対する効果を示す図である。S T Z非処置ラットのみが、体重の増加を示した。X G - 1 0 2で処置されたラットは、S T Zモデルにおいて、ビヒクルで処置されたラットと比較して、体重の差を示さなかった。しかし、陽性基準物質（ロサルタン）で処置されたラットの体重は、有意に少なかった。

#### 【0215】

【図56】図56は、X G - 1 0 2が、脾臓単離／脾臓移植における、X G - 1 0 2に対

10

20

30

40

50

する用量反応関係を評価する実験（実施例 2 2）での、15 分間の阻血により誘導される、JNK（A）およびPAF2（B）のリン酸化を、用量依存的に減少させたことを示す図である。ラット膵島の単離は、動物屠殺直後または15 分間にわたる温阻血後のいずれかに実行した。JNKの活性化は、単離工程の終了時において、ウェスタンブロットにより評価した。陰性コントロールとして、JNKの活性化を、未処理のラット膵臓において評価した。

#### 【0216】

【図 5 7】図 5 7 は、XG-102 の、15 分間の阻血ラットおよび非阻血ラットから単離された、ラット膵島の機能および生存率に対する効果を示す図である。静的インスリン分泌試験（基礎分泌またはグルコースを使用して刺激された分泌）を、膵島単離の直後および 37℃における培養の 18 時間後に実施した。単離は、膵島機能に影響を及ぼし、これにより、基礎インスリン分泌は、いずれの条件でも、単離の直後に使用された膵島において、18 時間にわたりインキュベートされた膵島と比較して高度であった。しかし、培養後において、阻血および阻害剤 XG-102 は、この実験における膵島機能に対して影響を及ぼさなかった。

#### 【0217】

【図 5 8】図 5 8 は、阻血を 30 分間まで伸ばし、XG-102 を 100 マイクロモル濃度で使用した、別の実験を示す図である。インスリン分泌試験を単離の直後に実施したところ、やはり、高度な基礎分泌が観察される。さらに、30 分間の阻血は、膵島機能に対して負の影響を及ぼした。これらの予備的結果は、30 分間の阻血が、15 分間の阻血より、JNKの活性化を誘導するのに良好なモデルであると考えられることを示唆した。阻血ラットに由来する膵島を単離し、XG-102 と共にインキュベートしたところ、グルコース誘導性インスリン分泌は、阻血ラットと比較して高度であった。

#### 【0218】

【図 5 9】図 5 9 は、XG-102 の単回結膜下注射の有効性および安全性を、術後眼内炎症において、デキサメタゾン点眼剤と比較して評価する、実施例 2 7 の試験、すなわち、無作為化、二重盲検、並行群間、比較、多施設試験（臨床フェーズ I I）に組み入れられた患者の内訳を示す図である。

#### 【0219】

【図 6 0】図 6 0 は、実施例 2 7 の試験について、試験処置の結膜下注射投与の 28 日までの平均前房細胞グレードを、90 μg XG-102、900 μg XG-102、およびデキサメタゾンの 3 つの処置群についての、PP 解析集団について示す図である。垂直方向の線は、標準偏差（SD: standard deviation）を表す。

#### 【0220】

【図 6 1】図 6 1 は、実施例 2 7 の試験について、主要転帰の結果を、第 1 の副次的転帰の結果に加えて、28 日目における前房細胞グレード：信頼区間および非劣性マージンに関する、PP データセットおよび FAS データセットの両方について示す図である。

#### 【0221】

【図 6 2】図 6 2 は、実施例 2 7 の試験について、試験処置の結膜下注射投与後の 28 日目までに得られた前房フレアグレード（FAS について）を、90 μg XG-102、900 μg XG-102、およびデキサメタゾンの 3 つの処置群について示す図である。垂直方向の線は、標準偏差（SD）を表す。

#### 【0222】

【図 6 3】図 6 3 は、実施例 2 7 の試験について、28 日目までの試験を通して、規定された時点で得られた LFM（レーザーフレアメーター: Laser Flare Meter）測定値を、FAS について示す図である。垂直方向の線は、標準偏差（SD）を表す。

#### 【0223】

【図 6 4】図 6 4 は、実施例 2 7 の試験について、報告された有害事象（重篤な有害事象および重篤ではない有害事象）の、投与群ごとの大要を示す図である。

## 【0224】

【図65】図65は、実施例27の試験について、3つの試験群のいずれかへと無作為化された患者の少なくとも2%について報告された、AE (MedDRA SOCおよびMedDRA PTの用語により分類された) の概要を示す図である。

## 【0225】

【図66】図66は、実施例27の試験について、報告された重篤な有害事象 (SAE: serious adverse event) の概要を示す図である。

## 【0226】

【図67】図67は、実施例28について、XG-102 (図では、「D-JNKI1」と称する) またはPBSで処置されたMapk14<sup>f/f</sup>マウスおよびMapk14<sup>Δ1</sup>i\*マウス (左パネル)、ならびにXG-102 (すなわち、「D-JNKI1」) で処置されたMapk14<sup>f/f</sup>Jun<sup>f/f</sup>マウスおよびMapk14<sup>Δ1</sup>i\*Jun<sup>Δ1</sup>i\*マウス (右パネル) における、肝細胞の増殖を示す図である。マウスに、該当する場合、DEN処置の前に、XG-102 (体重1kg当たり20mg) またはPBSのいずれかを注射した。肝細胞の増殖は、DEN処置の48時間後において、Ki67染色により解析した。Ki67陽性細胞定量化が示される。

## 【0227】

【図68】図68は、 $3 \times 10^6$  個のHuh7ヒト肝臓がん細胞を、4週齢のヌードマウスの両側腹部領域へと皮下注射した (実施例29) ことを示す図である。ヌードマウスに、Huh7の注射後、5mg/kgのXG-102を、1週間に2回腹腔内処置した。腫瘍体積を1週間に2回測定した。マウスは、異種移植の4週間後に死なせた。ドットされた丸 (dotted cycle) は、異種移植された腫瘍を示す。

## 【0228】

【図69】図69は、実施例30について、同所性に注射されたHEPG2腫瘍を保有するマウスの、平均体重曲線および平均体重変化曲線を示す図である。マウスを、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、注射1回当たり1mg/kg XG-102でIV処置した。これに応じて、図70には、それぞれの統計学的データを提示する。

## 【0229】

【図70】図70は、実施例30について、マウスの、XG-102に対する忍容性を示す図である。平均体重およびMBWC±SDが示される。MBWC%は、対象日と第1の処置日 (10日目) との間の平均体重の変動に対応する。統計学的解析は、ビヒクル処置群を基準とするボンフェローニードン検定により実施した。

## 【0230】

【図71】図71は、実施例30について、屠殺日 (185日目) までの、群ごとの生存マウスの比率を示す、マウスの長期生存曲線を示す図である。マウスは、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、表示の用量のXG-102で処置した。

## 【0231】

【図72】図72は、実施例31について、マウスの、単独または組合せによる、XG-102処置およびXG-414処置に対する忍容性を示す図である。平均体重および平均体重変化±SDが示される。MBWC%は、対象日と第1の処置日 (10日目) との間の平均体重の変動に対応する。

## 【0232】

【図73】図73は、実施例31について、屠殺日 (171日目) までの、群ごとの生存マウスの比率を示す、マウスの長期生存曲線を示す図である。67日目に剖検のために屠殺されたマウスは、計算から除外した。マウスは、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、表示の用量のXG-102で処置した。

## 【0233】

10

20

30

40

50

【図 7 4】図 7 4 は、実施例 3 1 について、6 7 日目または 6 7 日目と最終的な屠殺との間に屠殺されたマウスの顕微鏡的評価により観察される腫瘍の浸潤を、ヒストグラム表示として示す図である。腫瘍生着のレベルを、図の凡例で指定される、4 つの異なるカテゴリーに分類した。

【0 2 3 4】

【図 7 5】図 7 5 は、実施例 3 2 について、抗腫瘍活性実験の間の、P C - 3 腫瘍を保有するマウスの平均腫瘍体積を示す図である。3 3 日目に、動物 5 匹ずつの 3 つの群を、ビヒクルおよび X G - 1 0 2（注射 1 回当たり 0. 1 m g / k g および 1 m g / k g、4 日ごとに 1 回ずつ 4 回にわたる）で処置した。

【0 2 3 5】

【図 7 6】図 7 6 は、実施例 3 3 について、H C T 1 1 6 腫瘍をマウス盲腸に異種移植した 2 6 日後において、毎日 1 回ずつ 1 4 回にわたる処置スケジュールに従い、投与 1 回当たり 0. 1 m g / k g および 1 m g / k g のビヒクルまたは X G - 1 0 2 で P O 処置または S C 処置された異なる群内の、肝臓またはその周縁部（門）において観察される、転移性腫瘍の浸潤のヒストグラム表示を示す図である。顕微鏡的観察の分類は、凡例に記載の通りに実施した。

【0 2 3 6】

【図 7 7】図 7 7 は、実施例 3 4 について、アルビノラットの右眼における、網膜電図検査（E R G : e l e c t r o r e t i n o g r a p h y）による測定値を示す図である。

【実施例】

【0 2 3 7】

実施例 1 : J N K 阻害剤配列の同定

J N K との効果的な相互作用のために重要なアミノ酸配列を、公知の J N K 結合ドメイン J B D 間の配列アラインメントによって同定した。I B 1 [配列番号 1 3]、I B 2 [配列番号 1 4]、c - J u n [配列番号 1 5]、および A T F 2 [配列番号 1 6] の J B D 間の配列を比較することにより、低度で保存された 8 つのアミノ酸配列（図 1 A を参照）を規定した。J N K を結合させることにおいて、I B 1 および I B 2 の J B D が、c - J u n または A T F 2 の J B D よりも約 1 0 0 倍効果的であるため（D i c k e n s e t a l . S c i e n c e 2 7 7 : 6 9 3（1 9 9 7））、最大の結合を与えるためには、当然、I B 1 と I B 2 との間に保存された残基が重要であることは間違いない。I B 1 の J B D と I B 2 の J B D との間の比較により、これら 2 つの配列間で高度に保存された、7 つのアミノ酸および 3 つのアミノ酸の 2 つのブロックを規定した。

【0 2 3 8】

これら 2 つのブロックは、L - I B 1 ( s ) [配列番号 1] 内の 1 9 のアミノ酸のペプチド配列内に含まれており、比較のために、I B 1 [配列番号 1 7] に由来する 2 3 a a ペプチド配列内に示されている。これらの配列は、図 1 B に示されており、L - I B 1 配列内の破線は、保存された残基を L - I B 1 ( s ) と揃えるために、配列内のギャップを示すものである。

【0 2 3 9】

実施例 2 : J N K 阻害剤融合蛋白質の調製

配列番号 1 の C - 末端を、2 つのプロリン残基から成るリンカーを介して、H I V - T A T 4 g 5 7 ( V i v e s e t a l . , J B i o l . C h e m . 2 7 2 : 1 6 0 1 0（1 9 9 7））に由来する配列番号 5 に記載の 1 0 個のアミノ酸の長さの担体ペプチドの N - 末端に共有結合させることによって、配列番号 9 に記載の J N K 阻害剤融合蛋白質を合成した。このリンカーは、最大のたわみ性を可能にして、望ましくない二次構造変化を回避するために用いたものである。この塩基性構築物を調製して、L - I B 1 ( s ) (配列番号 1) および L - T A T [配列番号 5] をそれぞれ指定した。

【0 2 4 0】

配列番号 1 1 に記載の全ての D レトロインペルソペプチドを、これに応じて合成した。この塩基性構築物を調製して、D - I B 1 ( s ) [配列番号 2] および D - T A T [配

10

20

30

40

50

列番号 6」をそれぞれ指定した。

#### 【0241】

配列番号 9、10、11、および 12 に記載の全ての D および L 融合ペプチドを、従来の Fmoc 合成法によって産生し、さらに、質量分析法によって分析した。最終的に、これらの融合ペプチドを、HPLC によって精製した。プロリンリンカーの効果を決定するために、2 種類の TAT ペプチドを産生した。これら 2 種類の TAT ペプチドのうち、一方は 2 つのプロリンを有しており、他方は全く有していない。2 つのプロリンを付加することは、TAT ペプチドを細胞の内部に侵入させること、または TAT ペプチドを細胞の内部において局在化させることを変更することはないようであった。保存されたアミノ酸残基を示すジェネリックペプチドは、図 2 に示されている。

10

#### 【0242】

実施例 3：JBD19 による細胞死の阻害

IB1(s) の 19aa の長さの JBD 配列が、JNK 生物活性に与える影響を調査した。この 19aa 配列を、N-末端で、緑色蛍光蛋白質 (GFP-JBD19 構築物) に結合させ、この構築物が IL1 によって誘導された膵臓ベータ細胞アポトーシスに与える効果を評価した。この形態のアポトーシスは、JBD<sub>1-280</sub> でトランスフェクションすることによって阻止されることが既に示されているが、当該技術分野において公知の ERK1/2 または p38 の特異的阻害剤は、これを、保護しなかった。

#### 【0243】

19 アミノ酸の保存された配列、および、完全に保存された領域において変異した配列を有する、JBD19 に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、(Clontech 社からの) 緑色蛍光蛋白質 (GFP) をコードする pEGFP-N1 ベクターの EcoRI および SalI 部位の中に、方向を定めて挿入した。10% のウシ胎仔血清、100 μg/mL のストレプトマイシン、100 単位/mL ペニシリン、および 2 mM のグルタミンを補充した RPMI 1640 培地において、インスリンを生成する TC-3 細胞を培養した。インスリンを生成する TC-3 細胞を、上記に示されたベクターでトランスフェクトし、この細胞培養基に、IL-1 (10 ng/mL) を添加した。IL-1 を添加して 48 時間後に、アポトーシス細胞の数を、倒立蛍光顕微鏡を用いて計数した。アポトーシス細胞を、細胞質の「水疱形成」特性によって正常細胞から選別し、2 日後に計数した。

20

#### 【0244】

GFP は、コントロールとして用いられる緑色蛍光蛋白質発現ベクターである。JBD19 は、IB1 の JBD に由来する 19aa 配列に結合されたキメラ GFP を発現するベクターであり、JBD19 Mut は、GFP-JBD19 と同じベクターであるが、1 つの JBD は、図 1B として示される 4 つの保存された残基において、変異しており、JBD<sub>1-280</sub> は、全 JBD (aa 1-280) に結合された GFP ベクターである。GFP-JBD19 を発現する構造は、全 JBD<sub>1-280</sub> と同じ程度に効果的に、IL-1 誘導膵臓細胞アポトーシスを妨げた。

30

#### 【0245】

さらなるコントロールとして、完全に保存された IB1(s) 残基において変異した配列は、アポトーシスを妨げる能力を著しく低下させた。

40

#### 【0246】

実施例 4：TAT-IB1(s) ペプチドの細胞インポート

TAT および TAT-IB1(s) ペプチド (「TAT-IB ペプチド」) の L-および D-鏡像異性体形態の、細胞の中に侵入する能力を評価した。フルオレセインにコンジュゲートされたグリシン残基の N-末端を付加することによって、L-TAT、D-TAT、L-TAT-IB1(s)、および D-TAT-IB1(s) ペプチド [それぞれ、配列番号 5、6、9、および 12] を標識化した。標識化されたペプチド (1 μM) を TC-3 細胞培養物に添加し、これを、実施例 3 に記載したように維持した。所定の時間に何回か、細胞を PBS で洗浄し、氷冷したメタノール-アセトン (1:1) において、5 分間固定させた後に、蛍光顕微鏡下で検査した。フルオレセイン-標識化した BSA (1

50

$\mu\text{M}$ , 12モル/モル BSA) をコントロールとして用いた。フルオレセインで標識化した全ての上記のペプチドは、一旦、培養基に添加されると、細胞に、効果的且つ迅速(5分以内)に侵入するという結果が示された。逆に、フルオレセインで標識化したウシ血清アルブミン( $1\mu\text{M}$  BSA, 12モルのフルオレセイン/モル BSA)は、細胞には侵入しなかった。

#### 【0247】

時間経過検査では、L-鏡像異性体ペプチドについての蛍光信号の強度は、24時間の期間の後に、70%減少したことが示された。48時間では、信号はほとんどもしくは全く存在しなかった。逆に、D-TATおよびD-TAT-IB1(s)は、細胞の内部において極めて安定していた。

#### 【0248】

これら全てのDレトロインベルソペプチドからの蛍光信号は、1週間後でも、極めて強力であり、信号は、プロセッシング後2週間経って漸く、わずかに減少した。

#### 【0249】

実施例5：c-JUN、ATF2、およびElk1リン酸化のインビトロ阻害

ペプチドが、これらの標的転写因子のJNK-媒介性リン酸化に与える影響を、インビトロで調査した。活性化されていない、組み換えJNK1、JNK2、およびJNK3を、転写および翻訳ウサギ網赤血球溶解物キット(TRANSCRIPTION AND TRANSLATION rabbit reticulocyte lysate kit)(Promega)を用いて産生し、基質としてc-Jun、ATF2、およびElk1を、単独、または、グルタチオン-S-転移酵素(GST)に融合させて用いる、固相キナーゼアッセイにおいて使用した。反応緩衝液(20mMのトリス-アセテート、1mMのEGTA、10mMのp-ニトロフェニル-リン酸塩(pNPP)、5mMのピロリン酸ナトリウム、10mMのp-グリセロリン酸塩、1mMのジチオスレイトール)中で、組み換えJNK1、JNK2、またはJNK3キナーゼに、L-TATまたはL-TAT-IB1(s)ペプチド(0-25 $\mu\text{M}$ )を20分間混ぜ合わせて、用量反応検査を行った。その後、10mMの $\text{MgCl}_2$ および5pCi  $^{33}\text{P}$ -dATP、並びに1 $\mu\text{g}$ の、GST-Jun(aa 1~89)、GST-ATF2(aa 1~96)、またはGST-ELK1(aa 307~428)のいずれかを添加することによって、キナーゼ反応を開始させた。GST-融合蛋白質は、Stratagene社(La Jolla, CA)から購入したものである。

#### 【0250】

この混合物に、10 $\mu\text{L}$ のグルタチオン-アガロースビーズも添加した。その後、反応生成物を、10%のポリアクリルアミド変性ゲル上でSDS-PAGEによって分離した。ゲルを乾燥させて、次にX線フィルム(Kodak)に曝した。2.5 $\mu\text{M}$ 程の少ない投与量のTAT-IB(s)ペプチドにおいて、JNKによるc-Jun、ATF2、およびElk1リン酸化のほぼ完全な阻害が、観察された。しかし、顕著な例外は、Elk1のJNK3リン酸化のTAT-IB(s)が阻害されなかったことであった。全体的に、TAT-IB1(s)ペプチドは、これらの標的転写因子のJNKファミリーのリン酸化を阻害することにおいて、著しい効果を示した。D-TAT、D-TAT-IB1(s)、およびL-TAT-IB1(s)ペプチド(0-250 $\mu\text{M}$ 用量検査)の、組み換えJNK1、JNK2、およびJNK3によって、GST-Jun(aa 1~73)リン酸化を阻害する能力を上記のように分析した。全体的に、D-TAT-IB1(s)ペプチドは、c-JunのJNK-媒介性リン酸化を減少させるが、そのレベルは、L-TAT-IB1(s)よりも約10-20倍、効率が悪かった。

#### 【0251】

実施例6：活性化されたJNKによるc-JUNリン酸化の阻害

本明細書において規定されたL-TATまたはL-TAT-IB1(s)ペプチドが、ストレス性刺激によって活性化されたJNKに与える影響を、UV-光が照射されたHeLa細胞またはIL-1処理されたPTC細胞からJNKをブルダウンするGST-Ju

10

20

30

40

50

nを用いて、評価した。PTC細胞を上述のように培養した。10%のウシ胎仔血清、100  $\mu$ g/mLのストレプトマイシン、100単位/mLのペニシリン、および2mMのグルタミンが補充されたDMEM培地中で、HeLa細胞を培養した。細胞抽出物の調製に用いる1時間前に、PTC細胞を上述のIL-1で活性化し、その一方で、HeLa細胞をUV光(20 J/m<sup>2</sup>)によって活性化した。細胞培養物を、溶解緩衝液(20mMのトリス-アセテート、1mMのEGTA、1%のトリトンX-100、10mMのp-ニトロフェニル-リン酸塩、5mMのピロリン酸ナトリウム、10mMのP-グリセロリン酸塩、1mMのジチオスレイトール)において掻爬することによって、コントロールである、UV光を照射させたHeLa細胞、およびIL-1処理されたTC-3細胞から、細胞抽出物を調製した。SS-34ベックマンローターにおいて15,000rpmで5分間遠心分離を行うことによって、破片を除去した。100  $\mu$ gの抽出物を、1  $\mu$ gのGST-jun(アミノ酸1~89)および10  $\mu$ Lのグルタチオン-アガロースビーズ(Sigma)により、室温で1時間インキュベートした。次に、掻爬緩衝液(scrapping buffer)で4回洗浄し、L-TATまたはL-TAT-IB1(s)ペプチド(25  $\mu$ M)を補充した同じ緩衝液中で、ビーズを20分間再懸濁させた。その後、10mMのMgCl<sub>2</sub>および5pCi<sup>33</sup>P-ガンマ-dATPを添加することによってキナーゼ反応を開始させ、30°Cで30分間インキュベートした。

#### 【0252】

反応生成物を、その後、10%ポリアクリルアミド変性ゲル上で、SDS-PAGEによって分離させた。ゲルを乾燥させて、次に、X線フィルム(Kodak)に曝した。これらの実験では、TAT-IB(s)ペプチドは、活性化されたJNKによって、c-Junのリン酸化を効果的に妨げた。

#### 【0253】

実施例7：本明細書において規定されたTAT-IB(s)ペプチドによる、c-JUNリン酸化のインビボ阻害

本明細書において規定された細胞透過性のペプチドが、JNKシグナル伝達をインビボで阻止することができるかどうかを決定するために、本発明者らは、異種のGAL4システムを用いた。上述の通りに培養されたHeLa細胞を、5xGAL-LUCレポーターベクターと、GAL4DNA-結合ドメインに結合されたc-Jun(アミノ酸1~89)の活性化ドメインを含むGAL-Jun発現構築物(Stratagene)とで共トランスフェクトした。JNKの活性化を、すぐ上流のキナーゼMKK4およびMKK7を発現するベクターを共トランスフェクション(Whitmarsh et al., Science 285: 1573 (1999))を参照することによって、実現した。つまり、3x10<sup>5</sup>細胞に、3.5cmの皿内のプラスミドを、DOTAP(Boehringer Mannheim)を製造者の取扱説明に従って用いて、トランスフェクトした。GAL-Junを含む実験のために、20ngのプラスミドに、1  $\mu$ gのレポータープラスミドpFR-Luc(Stratagene)および、0.5  $\mu$ gの、MKK4またはMKK7のいずれかを発現するプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの3時間後、細胞培地を変化させて、TATおよびTAT-IB1(s)ペプチド(1  $\mu$ M)を添加した。16時間後に、蛋白質含有量に正規化した後のPromegaの「Dual Reporter System」を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。TAT-IB1(s)ペプチドの添加により、c-Junの活性化が阻止され、それに続く、MKK4およびMKK7-媒介性のJNKの活性化が阻止された。HeLa細胞は、JNK1およびJNK2アイソフォームを発現するが、JNK3を発現しないため、本発明者らは、細胞をJNK3でトランスフェクトした。ここでも、TAT-IB(s)ペプチドは、c-JunのJNK2-媒介性活性化を阻害した。

#### 【0254】

実施例8：全てのDレトロインベルソIB(s)ペプチドおよびその改変体の合成

本発明のペプチドは、逆合成され、天然の蛋白質分解を妨げる全てのDアミノ酸ペプチド(すなわち全てのDレトロインベルソペプチド)であってよい。本発明の全てのDレ

10

20

30

40

50

トロローインベルソペプチドは、ネイティブペプチドに似た機能的特性を有するペプチドを提供することになる。ここで、アミノ酸成分の側鎖は、ネイティブペプチドアラインメントに対応しているが、プロテアーゼ耐性の骨格を保持している。

#### 【0255】

本発明のレトロローインベルソペプチドは、D-アミノ酸を用いて合成された類縁物質である。この合成は、アミノ酸をペプチド鎖の中に結合させて、レトロローインベルソペプチド類縁物質におけるアミノ酸の配列が、モデルとして機能する選択されたペプチドにおける配列と正確に反対となるようにすることによって行われる。例えば、(L-アミノ酸から形成された)天然に存在するTAT蛋白質が、配列GRKKRRQRRR [配列番号5]を有しているならば、この(D-アミノ酸から形成された)ペプチドのレトロローインベルソペプチド類縁物質は、配列RRRQRRKKRG [配列番号6]を有していることになる。D-アミノ酸の鎖を合成して、レトロローインベルソペプチドを形成するための手順は、当該技術分野において知られている(例えば、Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994); Guichard et al., J. Med. Chem. 39, 2030-2039 (1996)を参照)。特に、配列番号2、4、6、8、11~12、18、20、22、および、25~26に記載のレトロペプチドを、従来のFmoc合成法によって生成し、さらに質量分析法によって分析した。最終的に、これらをHPLCによって精製した。

#### 【0256】

天然のプロテアーゼによる分解および固有の免疫原性が、ネイティブペプチド特有の問題であるため、本発明のヘテロ二価またはヘテロ多価化合物は、所望のペプチドの「レトロローインベルソ異性体」を含むように調製される。従って、ペプチドを天然の蛋白質分解から保護することは、半減期を延長することおよび、ペプチドをアクティブに破壊することに向けた免疫応答の範囲を減少させることの両方によって、特異的ヘテロ二価またはヘテロ多価化合物の効果を増大させるはずである。

#### 【0257】

実施例9：全てのDレトロローインベルソIB(s)ペプチドおよびその改変体の長期生物活性

ペプチドヘテロ結合体(上述のキメラ配列を参照)を含むD-TAT-IB(s)レトロローインベルソの、ネイティブL-アミノ酸類縁物質と比較して長期の生物活性が予測されている。これは、D-TAT-IB(s)ペプチドが、実施例5に示されるように、ネイティブプロテアーゼによる分解から保護されているからである。

#### 【0258】

D-TAT-IB1(s)ペプチドによる、IL-1誘導脾臓ベータ細胞死の阻害を分析した。TC-3細胞を、上述の通りに、示されたペプチド(1 μM)を単回添加して30分間インキュベートした後、IL-1(10 ng/ml)を添加した。

#### 【0259】

その後、IL-1によるインキュベーションの2日後に、アポトーシス細胞を、ヨウ化プロピジウムおよびHoechst 33342核染色剤を用いて計数した。各実験につき、最小1,000細胞を計数した。平均値の標準誤差(SEM)が示されている(n=5)。D-TAT-IB1ペプチドは、IL-1誘導アポトーシスを、L-TAT-IBペプチドと同様の範囲まで減少させた。

#### 【0260】

D-TAT-IB1ペプチドによるIL-1P誘導細胞死の長期阻害も分析した。TC-3細胞を、上述の通りに、示されるペプチド(1 μM)を単回添加して30分間インキュベートした後、IL-1(10 ng/ml)を添加し、その後、2日毎にサイトカインを添加した。IL-1とともにインキュベートした15日後に、アポトーシス細胞を、ヨウ化プロピジウムおよびHoechst 33342核染色剤を用いて計数した。TAT-IB1ペプチドの単回添加が、長期の保護を与えるものではないことに留意されたい。各

実験につき、最小1, 000細胞を計数した。結果的に、D-T A T-I B 1 (s) は、長期(15日間)の保護を提供することが可能であったが、L-T A T-I B 1 (s) は不可能であった。

#### 【0261】

実施例10：本発明に従って用いられるL-T A T-I B 1 (s) ペプチドによるJ N K転写因子の抑制

A P-1ダブル標識プローブ(5'-C G C T T G A T G A G T C A G C C G G A A-3' (配列番号101))を用いて、ゲルリターデーションアッセイを行った。示されるとおり、5 ng/mlのT N F-アルファで1時間処理された、または処理されていないH e L a細胞核抽出物。本発明に従って用いられるT A TおよびL-T A T-I B 1 (s) ペプチドを、T N F-アルファの処理の30分前に添加した。特異的A P-1 D N A複合体を有するゲルの一部だけが示されている(標識化されていない特異的および非特異的競合物質との競合実験によって示されるように)。

10

#### 【0262】

本発明に従って用いられるL-T A T-I B 1 (s) ペプチドは、T N F-アルファの存在下において、A P-1 D N A結合複合体の形成を減少させる。

#### 【0263】

実施例11：オールインワンウェルアプローチを用いたH e p G 2細胞における内因性J N K活性の阻害(図3を参照)

#### 【0264】

実験の前日に、H e p G 2細胞を、3, 000細胞/ウェルで播種した。その後、濃度が増大されたインターロイキン-1 [I L-1 ベータv)] または腫瘍壊死因子 [T N Fアルファ] (a) を添加して、J N Kを30分間活性化させた。細胞を、20 mMのヘペス(H e p e s)、0.5%のトゥイーン(T w e e n) (p H 7.4) において溶解させ、アルファスクリーン(A l p h a S c r e e n) J N Kを処理した。(b) 10 ng/mlのI L-1によって誘導されたJ N K活性のZ'が、384ウェル/プレート(n=96)において測定された。(c) 化学的J N K阻害剤[s t a u r o s p o r i nおよびS P 6 0 0 1 2 5]による内因性I L-1ベータ誘導J N K活性の阻害。(d) 配列番号9に記載のペプチド性阻害剤L-T A T-I B 1 (s) [ここでは、L-J N K i(v)と略記されている)および配列番号11に記載のD-T A T-I B 1 (s) (ここではD-J N K iと略記されている)およびJ B D (L-J N K Iに対応しているが、T A T配列を有さない)の、I L-1に依存するJ N K活性に与える影響。全てのパネルは、3つの独立した実験(n=3)を示すものである。

20

30

#### 【0265】

方法：アルファスクリーンキナーゼアッセイ 原理：アルファスクリーンとは、マイクロプレートフォーマットの生体分子相互作用を検査するために用いられる非放射性ビーズベースの技術である。頭文字A L P H Aは、A m p l i f i e d L u m i n e s c e n c e P r o x i m i t y H o m o g e n o u s A s s a y (増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ)を表す。これは、「供与体」ビーズおよび「受容体」ビーズを近接させ、その後、化学的反応のカスケードが、増幅された信号を生成するように機能する生物学的相互作用を含む。680 nmにおけるレーザ励起によって、「供与体」ビーズ内の光応答性物質(フタロシアニン)が、周囲酸素を、励起一重項状態に変換する。その4 μ秒半減期内に、一重項酸素分子が、約200 nmまで溶液中に拡散することが可能であり、受容体ビーズがその近傍内にある場合、一重項酸素は、「受容体」ビーズ内のチオキセン誘導体と反応して、370 nmで化学発光を生成する。この化学発光は、さらに、同一の「受容体」ビーズ内に含まれる蛍光団を活性化する。励起した蛍光団は、次に、520~620 nmで発光する。受容体ビーズが存在しない場合、一重項酸素は、基底状態まで降下し、信号は生成されない。

40

#### 【0266】

最初に、キナーゼ試薬(B-G S T-c J u n、抗P-c J u n抗体およびアクティブ

50

JNK3)を、キナーゼ緩衝液(20mMのトリス-HCl(pH7.6)、10mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、100μMのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、0.01%のTween-20)において希釈して、ウェル(15μl)に添加した。その後、反応物を、10μMのATPの存在下で23℃において1時間インキュベートした。検出緩衝液(20mMのトリス-HCl(pH7.4)、20mMのNaCl、80mMのEDTA、0.3%のBSA)中で希釈された10μlのビーズ混合物(蛋白質A受容体20μg/mlおよびストレプトアビジン供与体20μg/ml)を添加することによって、検出を行い、その後、暗所において、23℃でさらに1時間インキュベートした。JNK内因性活性を測定するために、キナーゼアッセイを行った。このキナーゼアッセイは、上述のとおりに行ったが、アクティブなJNK3を、細胞溶解物で置き換え、細胞溶解後に、反応キナーゼ成分を添加した点が変わった。B-GST-cjunおよびP-cJun抗体は同じ濃度で用いたが、ATPは、10μMではなく、50μM用いた。アルファスクリーン信号を、Fusion装置またはEnVision装置上で、直接分析した。

10

#### 【0267】

実施例12：水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)によるウイルス感染の処置における、全ての、DレトロインベルソIB(s)ペプチドおよびその改変体の活性の決定

培養された宿主細胞(ヒト包皮線維芽細胞(HFF))において、JNK阻害剤ペプチドXG-102(配列番号11)を試験化合物として用いて、本発明に従って使用されるIB(s)ペプチドおよび全てのDレトロインベルソIB(s)ペプチドの活性の決定を、試験した。ウイルスは、偏性細胞内寄生体であり、それらの生活サイクルを完結するためには機能している細胞環境を必要とする。すなわち、瀕死の細胞は、ウイルス複製を支援しない。さらに、細胞機能の阻害剤は、細胞に対して毒性を有している可能性があり、ウイルスの成長を非特異的に防止することが可能である。従って、病気または瀕死の宿主細胞は、非特異的に減少されたウイルス力価を示すことが可能である。このことが結果を変造し得るため、最初に、細胞毒性アッセイを行い、培養細胞の、試験化合物に対する耐性を決定した。次に、プラーク減少アッセイを行い、その後、JNK阻害剤ペプチドXG-102(配列番号11)の、感染した細胞における、ウイルス性帯状疱疹ウイルス(VZV)に対する活性を試験した。

20

#### 【0268】

A)全てのDレトロインベルソIB(s)ペプチドの細胞毒性の判定 毒性の判定のために、培養細胞(ヒト包皮線維芽細胞(HFF))を、96ウェル組織培養プレート内に播種した。DMSO(5μMのXG-102(配列番号11)と同じレベル)、または、XG-102(配列番号11)を含有する培地を、幾つかの濃度(1、2、および5μM)で添加し、24時間保持した。次に、ニュートラルレッドアッセイを行った。次の(Taylor et al, 2004, J. Virology, 78:2853-2862)において行われているような有効性アッセイのための最高投与量を設定するために、細胞毒性アッセイのためのニュートラルレッド比色アッセイ(6つの反復のセットで)を用いた。生きた細胞は、ニュートラルレッドを吸収するため、吸光度のレベルは、細胞の生存率および数の定量的尺度となる。ニュートラルレッドの取り込みは、細胞の数に正比例しており、正常なエンドサイトーシスを反映する。従って、ニュートラルレッドを短いパルスで、0時間、または24時間において、上記培地に添加した。固定および抽出後、色素を添加し、各試料における色素の量を、540nmにおいて、ELISAプレートリーダーで測定した(図4を参照)。いずれの量のXG-102(配列番号11)でも、細胞毒性は観察されず、細胞の成長は、DMSO希釈剤だけの場合(コントロール)と比べて、制限されなかった。従って、標準的な濃度である1μMは、HFF細胞に明確には作用しておらず、より高い投与量でも、十分耐容性であろう。

30

40

#### 【0269】

B) XG-102(配列番号11)の、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に対する抗ウイルス作用を評価するためのプラーク減少アッセイ

XG-102(配列番号11)が、投与量に依存した抗ウイルス作用を有していたかど

50

うかを決定するために、標準的な  $1 \mu\text{M}$  の投与量付近の濃度範囲を試験した。このプラーク減少アッセイでは、24-ウェルプレート内のコンフルエントなヒト包皮線維芽細胞 (HFF) を、VZV に感染した HFF と共に、 $1:100$  (感染多重度 MOI (Multiplicity of Infection) =  $0.01$ ) の比率で植え付け、細胞に2時間吸収させた。過剰のウイルスを洗浄により排除し、XG-102 (配列番号 11) を  $0 \mu\text{M}$  (DMSO だけ)、 $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、または  $2 \mu\text{M}$  含有する培地を添加した。この時点にて、1つの試料を取り出し、感染の初期レベルを測定した。ここで、各ウェルは、約  $150 \text{ pfu}$  を含有していた。24時間後、2つ組のウェルを、トリプシンで処理し、その後、上記細胞サスペンションを、3つ組の MeWo 細胞単層上で滴定して、各試料の VZV に感染した細胞の数を決定した。成長が制限されていない間、VZV は、通常、1日で10倍に増加する。これは、VZV が、細胞-細胞拡散によって増殖するからである。上記10倍に増加する増殖は、DMSO だけで処理された培養物にて観察されたものであり、 $1200 \pm 430 \text{ pfu}$  を生じた (図 5)。上記定量の結果は、次の表の通りである。

10

【表 3】

| XG-102 (配列番号 11)       | VZV (pfu) の拡散 $\pm$ SD |
|------------------------|------------------------|
| $0 \mu\text{M}$ (DMSO) | $1233 \pm 432$         |
| $0.5 \mu\text{M}$      | $260 \pm 53$           |
| $1.0 \mu\text{M}$      | $212 \pm 48$           |
| $2.0 \mu\text{M}$      | $312 \pm 79$           |

20

## 【0270】

従って、XG-102 (配列番号 11) は、試験した全ての濃度において、強い抗ウイルス作用を有していた。ここで、VZV は、ほぼ  $200 \sim 300 \text{ pfu}$  を生じている。これらの  $\text{EC}_{50}$  を内挿する結果のグラフを用いることによって、およそ  $0.3 \mu\text{M}$  の XG-102 (配列番号 11) が、VZV の収量を  $50\%$  減少させることが計算された。

## 【0271】

細胞毒性および有効性のデータから、 $5.0 \mu\text{M} / 0.3 \mu\text{M}$  の、予備的な選択指数 (preliminary Selective Index) ( $\text{Tox} / \text{EC}_{50}$ ) を計算した。上記選択指数は、約 17 の値を提供する。ここで、XG-102 (配列番号 11) の濃度は、細胞の  $50\%$  を殺傷する程度には達していないので、実際の SI は、より高いと考えられる。

30

## 【0272】

C) XG-102 (配列番号 11) による、ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) 内の水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 複製の測定

ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) 内の水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 複製を XG-102 (配列番号 11) によって防止する、XG-102 の最小有効量を決定するために、HFF のコンフルエントな単層に VZV-BAC-Luc 菌株で2時間接種し、その後、 $0.25 \mu\text{M}$ 、 $0.5 \mu\text{M}$ 、若しくは  $1.0 \mu\text{M}$  の濃度の XG-102 (配列番号 11)、または陰性コントロール (XG-100,  $1.0 \mu\text{M}$ ) で、24時間処理した。ウイルス収量を、ルシフェラーゼアッセイによって測定した。試料は3つ組であり、平均ルミネセンスを示す。エラーバーは、平均値からの標準偏差を示すものである。

40

## 【0273】

結果として、VZV 複製は、陰性コントロール (Tat ペプチドのみ) の存在下では、正常であった。XG-102 (配列番号 11) は、試験した最も低い濃度である  $0.25 \mu\text{M}$  において、VZV 複製を防止した。本実験では、最小有効量は決定されなかった。なぜ VZV が感染中の JNK-活性に依存しているかは、まだ分かっていないが、この酵素には、クリティカルな要件が存在するものと思われる。従って、培養における VZV の拡散 (spread) を完全に阻止するためには、低濃度 ( $0.25 \mu\text{M}$ ) の XG-102 (配列番号 11) で十分である。この量の XG-102 (配列番号 11) が、感染された細胞内の全ての JNK 分子に結合することが、この作用の1つの説明である。あるいは

50

、0.25  $\mu$ MのXG-102（配列番号11）は、JNK-活性を、VZV複製に最適な閾値レベルよりも下に低下させ得る。この実験の結果は、図6にまとめられている。

#### 【0274】

実施例13：慢性閉塞性肺疾患（COPD）の処置における、全てのDレトロインベルソIB（s）ペプチドおよびその改変体の活性の決定

慢性閉塞性肺疾患（COPD）の処置における、典型的な全てのDレトロインベルソIB（s）ペプチドXG-102（配列番号11）の活性を決定するために、XG-102（配列番号11）を、ブレオマイシン誘発性急性肺炎および線維症の動物モデルにおいて用いる。ブレオマイシン誘発性炎症および線維症のプロトコルについては、既に、文献に記載されている。本実験の目的は、皮下（s.c.）経路によるXG-102（配列番号11）が、気管支肺胞洗浄（BAL）、並びにブレオマイシン誘発性炎症および線維症の肺における、好中球の動員（recruitment）に与える影響を、

－ブレオマイシンの単回投与（10mg/kg）の1日後、

－および、線維症を発症した10日目に、

調査することであった。

#### 【0275】

##### 1）方法および実験的アプローチ

ブレオマイシンを鼻腔内単回投与し、2つの投与量の試験化合物XG-102（配列番号11）、およびビヒクルコントロールを、s.c.で与えたマウスを、1日後および10日後に分析した。モデルに用いた動物は、群当たり10匹のC57BL/6マウス（8週齢）であった。実験群は、ビヒクル、0.001mg/kgのXG-102（配列番号11）、および0.1mg/kgのXG-102（配列番号11）を含み、処置は、ブレオマイシンの投与の前に、XG-102（配列番号11）を、3日ごとに繰り返し皮下投与することから構成された。急性肺炎を、BAL洗浄物、細胞学、細胞計数、および肺ミエロペルオキシダーゼ活性によって、24時間監視した。化合物の効果を、ビヒクルコントロールと比較した。肺線維症を、ブレオマイシンの単回投与の10日後に、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を用いて、組織学的に評価した。

#### 【0276】

##### 1. 1）ブレオマイシンの投与

ケタミン-キシラジンの軽い麻酔の状態で、Bellon Laboratories社（Montrouge、フランス）からの生理食塩水中の硫酸ブレオマイシン（10mg/kg体重）、または生理食塩水を、容積40  $\mu$ Lの鼻注入法によって、気道を介して与えた。ブレオマイシン誘発性炎症および線維症のためにブレオマイシンを投与した群には、ビヒクル、0.001mg/kgのXG-102（配列番号11）、および0.1mg/kgのXG-102（配列番号11）が含まれる。ブレオマイシン誘発性炎症の経路は、皮下（s.c.）経路であり、投与は、単回投与として行った。ブレオマイシン誘発性線維症のための経路は、皮下（s.c.）経路であり、投与は、10日間で3回行った。

#### 【0277】

##### 1. 2）気管支肺胞洗浄液（BALF）

気管を切開した後に、プラスチックのカニューレを挿入し、37°Cに加熱した0.3mlのPBS溶液を用いて、気腔を洗浄した。採取した試料を、直ちに2つの部分に分けた。一方の第1の部分（上記2つの部分の第1の洗浄に相当する1ml）は、媒介物質の測定のために用い、他方の第2の部分は、細胞の測定に用いた（4ml）。最初の部分を、遠心分離し（600gで10分間）、上清を分別し、媒介物質の測定まで、-80°Cで保存した。その後、細胞ペレットを、0.4mlの滅菌NaCl（0.9%）中に再懸濁させ、第2の部分と共にプールし、細胞計数に用いた。

#### 【0278】

##### 1. 3）肺のホモジナイゼーション

BALの後、肺全体を取り出し、1mlのPBSを有するマイクロチューブ（Lys i

10

20

30

40

50

ng matrix D, Q Bio Gene, Illkrich、フランス)の中に置いた。Fastprep (登録商標) システム (FP120, Q Bio Gene, Illkrich、フランス) を用いて、全ての肺組織抽出物を調製した。その後、この抽出物を遠心分離し、上清を、媒介物質の測定、およびSircolコラーゲンアッセイ (France Biochem Division、フランス) を用いたコラーゲンアッセイを行うまで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 【0279】

##### 1. 4) 細胞計数および細胞判定

細胞の総数を、BAL液において、マラッセ (Malassez) 血球計を用いて決定した。MGG Diff-quick (Dade Behring AG) で染色した後に、鑑別細胞計数をサイトスピン調製物 (サイトスピン3、Thermo Shandon) 上で行った。標準的な形態基準を用いて、200の細胞について、鑑別細胞計数を行った。

10

#### 【0280】

##### 1. 5) TNF測定

BALF中のTNFのレベルを、ELISAアッセイキット (Mouse DuoSet, R&D system、ミネアポリス、米国) を製造社の取扱説明に従って用いて、決定した。結果をpg/mlで報告する。

#### 【0281】

##### 1. 6) MPO測定

XG-102を投与したときのMPOレベルを測定した。本実験において、ブレオマイシンの後には、MPOは、有意に誘導されなかった。さらに、XG-102は、肺のMPOレベルに影響しなかった。

20

#### 【0282】

##### 1. 7) 組織構造

BALおよび肺灌流の後、標準的な顕微鏡分析のために、大葉を、4%の緩衝ホルムアルデヒド中で固定させた。3-mmの切片をヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。

#### 【0283】

##### 2.) 結果

##### A) 第1の調査：ブレオマイシン (BLM) 誘発性急性肺炎症

群：ビヒクル、XG-102 (配列番号11) 0.001mg/kg、およびXG-102 (配列番号11) 0.1mg/kg

経路：s.c. 経路、単回投与

30

#### 【0284】

##### a) 気管支肺胞洗浄空間における細胞動員

0.1mg/kgにおいて、XG-102 (配列番号11) は、好中球動員、および炎症段階中に動員された細胞の総数を有意に低減させる。0.001mg/kgでは、XG-102 (配列番号11) は、好中球の動員、または、他の種類の細胞が気管支肺胞腔の中に動員することに全く作用しない (代表的な一実験では、群当たりn=5匹のマウス； $p < 0.05$ ；\*\* $p < 0.001$ )。

40

#### 【0285】

##### b) 肺のホモジナイゼーションにおける、MPOを用いた肺の細胞動員

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、宿主防御システムにおいて、重要な役割を果たしている。53kDaの2つの重鎖と15kDaの2つの軽鎖とから構成される、この140kDaの蛋白質は、1960年代に最初に発見された。MPOが、白血球の活性化に応答して、好中球および単球の顆粒から放出されることは、過酸化水素および塩化物イオンを、強力な酸化剤である次亜鉛素酸 (HOC1) に変換させることを可能にする。MPOは、防御システムにおける重要な目的を果たすが、MPOは、また幾つかの炎症状態に役割を果たすことを、様々な研究が示している。ここで、例えば、MPOレベルの上昇は

50

、冠動脈疾患に関連していることが示されている。さらに、組織MPOのレベルは、好中球の活性化の状態を反映しており、好中球の組織への浸透の徴候を示す。

#### 【0286】

本実験では、ブレオマイシンの投与後、MPOは、有意に誘導されなかった。従って、XG-102（配列番号11）は、肺内のMPOレベルに全く影響がなかった。（図7参照）。

#### 【0287】

##### c) TNF測定

TNFのレベルを測定すると、XG-102（配列番号11）を投与した後は、BALF中のTNFのレベルは、減少する傾向が観察され、BLMの投与後は、TNFのレベルは非常に低かった（図8参照）。

#### 【0288】

##### d) 結論

0.1mg/kgにおいて、XG-102（配列番号11）は、好中球および全細胞の気管支肺胞腔内への動員を減少させ、TNFのレベルの減少傾向を生じることが観察できた。さらに、組織学的スライドの本調査は、気管支の周辺空間において、炎症細胞の集積が減少していることを示した。従って、XG-102（配列番号11）が、ブレオマイシン誘発性炎症を減少させるという結論付けが可能である。

#### 【0289】

得られた結果に従って、本実験を、さらに、線維症モデルにおいても行った。

#### 【0290】

##### B) 第2の調査：ブレオマイシン（BLM）誘発性肺線維症

群：ピヒクル、XG-102（配列番号11）0.001mg/kg、およびXG-102（配列番号11）0.1mg/kg

経路：s.c.経路、10日間で3回

#### 【0291】

##### a) 気管支肺胞洗浄空間への細胞動員

0.001mg/kgにおいて、XG-102（配列番号11）は、リンパ球動員を有意に低減させ、この時点ではリンパ球動員によって特徴付けられる炎症段階中に動員された細胞の総数を有意に低減させた。0.1mg/kgでは、XG-102（配列番号11）は、全く効果がなかった（群当たりn=5匹のマウス；\*，p<0.05；\*\*，p<0.001）（図9参照）。

#### 【0292】

##### a) 組織構造

3μmの肺の切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。BLM投与の10日後に、炎症細胞の集積、線維性の区域、肺構造の欠損を観察した。XG-102を低投与量（0.001mg/kg）で投与した後は、これらのパラメータの減少が、観察されたが、高投与量（0.1mg/kg）で投与した後は観察されなかった（図10参照）。

#### 【0293】

##### b) 結論

0.001mg/kgの低投与量で3回にわたって投与されたXG-102（配列番号11）が、ブレオマイシン誘発性後期炎症、特に、この時点で観察されるリンパ球動員を低減するという結論付けが可能である。さらに、当該投与量で3回にわたって投与された試験物質が、ブレオマイシン誘発性線維症を弱める。肺構造がより良好に保存された、ほとんど広がっていない線維性の区域が、観察できた。

#### 【0294】

実施例14：アルツハイマー病の処置における、全てのDレトロインベルソIB（s）ペプチドおよびその改変体の活性の決定

アルツハイマー病における、典型的な全てのDレトロインベルソIB（s）ペプチド

10

20

30

40

50

XG-102（配列番号11）の活性を決定するために、ロンドン型変異およびスウェーデン型変異のAPP751を過剰発現するhAPP-遺伝子導入マウスモデルにおいて、XG-102（配列番号11）を、モリス水迷路の行動試験と、プラーク負荷を測定する免疫組織学的試験と、マウスの脳内の $\beta$ -アミロイド $_{1-40}$ および $\beta$ -アミロイド $_{1-42}$ レベルを測定するELISA試験とを用いて評価した。

#### 【0295】

##### a) 方法

##### i) イントロダクション

本調査は、5ヶ月齢（ $\pm 2$ 週齢）の雌のhAPPTgマウスを用いて、試験物質（XG-102，配列番号11）の、行動マーカー、生化学的マーカー、および組織学的マーカーについての有効性を評価するようにデザインされた。このために、マウスを、4ヶ月間、2週間または3週間ごとに処置し、処置期間の終わりに、行動を、モリス水迷路において評価した。屠殺したマウスの、脳、CSF、および血液を採取した。Tgマウスの異なる4つの脳のホモジネート画分およびCSFにおいて、A $\beta$ 40およびA $\beta$ 42のレベルを決定した。処置群当たり8匹のTg動物の皮質および海馬におけるプラーク負荷を、定量した。

#### 【0296】

##### ii) 動物

C57BL/6xDBAのバックグランドを有する、5ヶ月齢（ $\pm 2$ 週齢）の雌のTgマウスを、処置群1～3（ $n=12$ ）にランダムに割当てた。動物に、ビヒクルまたは2つの異なる濃度のXG-102（配列番号11）を、生後5ヶ月から始まって4ヶ月間継続して、2週または3週ごとに皮下（s.c.）に適用して投与した。本調査に用いた全ての動物は、黒い目をしており、MWMプールの外の目印を知覚した可能性があった。しかし、視力が弱い動物は除外する必要があるがあった。これは、いわゆる予備試験である可視プラットフォームのトレーニングにおいて管理した。処置開始前、予備を含む全ての動物を、調査のために隔離した（enclosed）。特定の動物の視覚障害が確認された場合、当該マウスは、本調査から除去される。

#### 【0297】

##### iii) 動物の識別および収容

各マウスは、耳標によって識別された。これらのマウスは、個々の換気式ケージ（IVC）内の、Rettenmaier（登録商標）によって提供された標準化齧歯類敷床の上に収容された。各ケージには、最大5匹のマウスが収容された。マウスは、国際基準に基づいて記載されたJSW標準操作手順（SOP GEN011）に従って飼育した。各ケージは、調査番号、性別、マウスの個体登録番号（IRN）、出生日、および、スクリーニング日、並びに、処置群の割当てを示す色付きのカードで識別した。調査中の温度は、約24°Cに維持し、相対湿度は、約40～70%に維持した。動物を、一定の光サイクル（12時間ごとの明／暗）下で収容した。動物は、自由に、通常の水道水を利用可能であった。

#### 【0298】

##### iv) 処置

40匹の雌のhAPP遺伝子導入マウスを、4ヶ月にわたり、異なる2つの投与量の試験物質XG-102（配列番号11）で、2週間ごとに0.1mg/kg（b.w.）で、または、3週間ごとに10mg/kg（b.w.）のいずれかで、処置するか（群当たり $n=12$ ）、または、3週間に1度、ビヒクル（ $n=12$ ）（s.c.）で処置した。

#### 【0299】

##### v) モリス水迷路（MWM）

モリス水迷路（MWM）タスクを、直径100cmの黒い円形プールにおいて行った。温度が22 $\pm$ 1°Cの水道水を充填し、プールを、視覚的に4つのセクターに分割した。水の表面の真下約0.5cmに、透明のプラットフォーム（直径8cm）を置いた。予備試験を除く、全試験セッションの間、プラットフォームを、プールの南西の四分区間内に

10

20

30

40

50

置いた。4日間続くトレーニングセッションの前日に、動物は、いわゆる「予備試験」（60秒続く試験を2回）を行って、各マウスの視覚能力が正常であることを確認する必要があった。このタスクを満たした動物だけを、MWM試験に用いた。MWMタスクでは、各マウスは、4日連続して、3つの試験を行わなければならなかった。単一の試験は、最大1分間かかった。この時間の間、マウスは、隠された透明の標的を探す機会を有した。動物が、水から「道」を探すことができなければ、試験担当者が、マウスをプラットフォームに導くか、またはプラットフォーム上に載せた。各試験後、マウスは、10～15秒間、プラットフォーム上で休息を許された。この時間の間に、マウスは、環境における位置確認を行うことが可能であった。追跡調査システムが悪影響することを回避するために、薄暗い照明条件下で調査を行った（Kaminski; PCS, Biomedical Research Systems）。プールを取り囲む壁の上には、黒、太字の幾何学記号（例えば、円および四角形）が記載されたポスターを貼った。このポスターは、マウスが、位置確認のためにこれらの記号を目印として使用することができた。試験あたりの、1つの水泳群は、5～6匹のマウスから構成されている。そのため、試験と試験との間の時間として、約5～10分を確保した。逃避潜時（マウスが、隠されたプラットフォームを見つけるため、従って、水から逃避するために必要とした時間[秒]）、経路（標的に達するための軌道[メートル]の長さ）、および、ゴールの四分区間における居住の定量化のために、コンピュータによる追跡調査システムを用いた。コンピュータは、プール中央の上方に設置されたカメラに接続した。カメラは、マウスの尻尾の上に、小さなヘアピンで固定させた発光ダイオード（LED）の信号を検出した。4日目の最後の試験の1時間後に、マウスは、いわゆるプローブ試験を実行しなければならなかった。この時点で、プラットフォームをプールから除去して、この1分間のプローブ試験の間に、実験担当者は、元の標的位置を越えたマウスの数を計数した。さらに、この四分区間内にいるマウスと、他の3つの四分区間内にいるマウスの数を算定した。この試験の間はずっと、マウスは、プラットフォームについての、どんな性質のいかなる手がかりも、得ることはできなかった。

#### 【0300】

##### v i) 組織サンプリング

処置期間の終わり、且つ、全ての行動試験の後に、残った全てのマウス（ $n = 28$ ）を屠殺した。このために、全てのマウスを、SOP MET 030に記載される標準の吸入麻酔（Isofluran, Baxter）によって沈静させた。大後頭孔の鈍的切開および露出により、脳脊髄液（CSF）を得た。露出させて、大後頭孔の中に、パステルピペットを、約0.3～1mmの深さまで挿入した。CSFを、流れが完全に停止するまで、吸引および毛管作用によって採取した。各試料の2つのアリコートをし、直ちに冷凍し、ELISA技術によるさらなる分析に用いるまで、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保持した。CSFのサンプリングの後、各マウスを仰向けに置いて、胸部を切開し、1ccの注射器に取り付けられた26ゲージ注射針を、右心室腔の中に挿入した。この針を軽く吸引して、EDTAの中に血を採血し、続いて、血漿を得るために用いた。血漿を得るために、各マウスからの血液サンプルを、遠心分離機（GS-6R Beckman）において、スイングバケット（swing buckets）を有するローター（GH-3.8 BECKMAN）を用いて、1,750rpm（700g）で10分間回転させた。血漿を冷凍して、さらなる分析まで、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。血液サンプリングの後、遺伝子導入マウスは、0.9%の塩化ナトリウムで心臓内灌流した。脳を、素早く取り出し、小脳を切除した。全てのマウスの右脳半球を、新たに作製した4%のパラホルムアルデヒド/PBS（pH 7.4）中において、室温で1時間、液浸固定させた。その後、脳を、15%のスクロースPBS溶液に24時間移して、凍結防止を確保した。次の日に、脳を、イソペンタン中で冷凍し、組織調査（SOP MET 042）に用いるまで、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。左脳半球の重量を計測し、液体窒素中で冷凍し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で、生化学分析用に保存した。

#### 【0301】

v i i)  $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  の測定

各 T g マウスの 4 つの異なる脳ホモジネート画分、および C S F 試料における、 $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  のレベルを、E L I S A 技術によって評価した。高感度の  $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  E L I S A 試験キットを、The Genetics Company (商標), スイス (S O P M E T O 5 8) から購入した。C S F を、上記のとおり調製した。脳ホモジネートのために、冷凍した脳半球を、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する T R I S 緩衝食塩水 (T B S) - 緩衝液 (5 m l) 中で、ホモジナイズした。1. 2 5 m l のこの初期の脳 T B S ホモジネートを、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。1. 2 5 m l をさらに調査した。残りの脳ホモジネート (2. 5 m l) を遠心分離にかけ、結果として生じた上清 (= T B S 画分) を等分し、E L I S A 測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。ペレットを、トリトン X-100 (2. 5 m l) 中に懸濁させ、遠心分離を行い、上清 (= トリトン X-100 画分) を等分し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保持した。これらのステップを、S D S (2. 5 m l) で繰り返した。S D S 画分からのペレットを、次の遠心分離にかける前に、70% の蟻酸 (0. 5 m l) 中で懸濁させた。得られた上清を 1 M の T R I S (9. 5 m l) で中和し、等分して  $-20^{\circ}\text{C}$  で保持した (= F A 画分)。4 つの脳ホモジネート画分 (T B S、トリトン X-100、S D S、および F A) の試料を、E L I S A 技術による  $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  測定に用いた。E L I S A 試験キットは、The Genetics Company (商標), スイス (S O P M E T O 6 2) から購入した。T B S およびトリトン X-100 が、単量体構造物からオリゴマー構造物までを溶解すると推測可能であった。前原線維および水不溶性の原線維のようなポリマーは、S D S および F A に溶解可能であった。これに関して、4 つの全画分の調査は、A 重合化状態への洞察も提供する。

## 【0302】

## v i i i) 脳形態の評価

調査した全 T g 動物の脳組織は、本手順のばらつきによる偏りを回避するために、正確に同じ方法で処理した。24 匹の T g マウス (各群 8 匹) の脳の半分から、各層 (全部で 5 層) 当り、20 の凍結切片を、各 10  $\mu\text{m}$  の厚さ (L e i c a C M 3050S) で矢状に切断し、5 つ (各層から 1 つずつ) を処理し、プラーク負荷の定量化を評価した。矢状の 5 つの層は、Paxinos and Franklin の形態アトラス「The Mouse Brain」(第 2 版) に記載の、図 104~105、107~108、111~112、115~116、および 118~119 に対応していた。第 1 の層は、領域 C A 1、C A 2、C A 3、G D l b、および G D m b の全海馬を含む要件によって特定されていた。海馬および皮質における免疫反応性を、モノクローナルヒト  $A\beta$  - 特異抗体 6 E 1 0 (S i g n e t) およびチオフラビン S 染色剤を用いて、定量的に評価した。用いられなかった残りの脳半球または組織は、本プロジェクトが終了するまで、J S W C N S において、保存および貯蔵した。

## 【0303】

## b) 評価

## i) 行動

モリス水迷路試験では、水泳路の長さ、逃避潜時、スイミング速度を、および、先のプラットフォームを越えるプローブ試験では、各 T g 動物について、位置、およびプールの各四分区間で過ごす時間を、特別なコンピュータソフトウェアで測定した。

## 【0304】

## i i) 生化学的評価

全ての T g マウスからの、C S F 試料、および脳調製物からの試料を、市販の  $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  E L I S A で分析した。適切な標準品の測定を同時に行った。脳調製物からの試料を 2 つ組で分析した。試料の量が少ないため、C S F 試料は、単一の測定のみで分析した。

## 【0305】

## i i i) 組織構造

i 1) アミロイド沈着およびプラーク負荷の測定

6 E 1 0 免疫組織化学のために、次の評価手順を用いた。

【0306】

a a) スライス境界の視覚化のための画像を、画像にコントラストを適用せずに、対比する。

【0307】

b b) 皮質の輪郭の相互作用の描写および、その後の皮質面積（＝領域面積）を測定する。

【0308】

c c) 染色された対象が、ある特定の強度に基づいた閾値（各画像で同一）よりも上、且つ、 $8\mu\text{m}^2$ のサイズよりも上で検出される、対象となる面積（A O I）の相互作用を描写する。

【0309】

d d) 信号／ノイズ比（各画像で同一）を向上させるための滑らかなコントラストティングの後、各対象の面積、すなわち、A O I 内の染色された面積の合計、および、対象の総数を測定する。

【0310】

e e) 海馬についても、a a)－d d)を繰り返す。

【0311】

f f) 平均プラーク寸法（＝「プラークの総面積／プラークの総数」）、相対プラーク数および面積（＝「プラークの数／領域面積」および「プラークの総面積／領域面積＊100」）を計算する。

【0312】

g g) E x c e l のスプレッドシートに、「画像の名称、領域面積、プラークの数、プラークの総面積、プラークの相対数、相対プラーク面積、および平均プラーク寸法」といったパラメータを含むデータを自動転送する。画質および除外基準をそれぞれ記録するために、備考欄のフィールドを用いた。除外基準は、スライスの欠損部分、多くの皺、顕著な傷、または、（例えば、ブロッキング試薬の完全な反応を阻害し得る膨張による）染色の不整合であった。

【0313】

h h) （未加工データを未加工のまま維持するために）画像を保存せずに閉じる。

【0314】

c) 結果

i) 一般的観察

全部で40匹の雌のh A P P T g マウスを、調査の対象とした。これらのマウスのうち、12匹の動物が、処置期間が終了する前に、原因不明により死亡した。

【0315】

i i) 行動的結果

M W Mにおける空間的学習は、X G－102（配列番号11）の処置によっては、大きく影響されないままであった。0.1mg/kgで処置したマウスは、1日目と4日目との間において、学習実績が悪いという傾向を示した。1日目および4日目の平均実績の二元配置A N O V Aにより、全ての群（ $p < 0.001$ ）にとって、有意の高い学習を示しただけでなく、因子処理の有意の影響（ $p = 0.045$ ）も示した。しかし、ボンフェローニのポストテストは、有意点まで達しなかった。

【0316】

i i i) 生化学的結果

a a) 脳ホモジネート画分のA $\beta$ レベル

試験化合物X G－102（配列番号11）による処置は、脳ホモジネートA $\beta_{1-40}$ レベルに影響を与えなかった（図11参照）。A $\beta_{1-42}$ レベルの群間の差異は、トリトンX－100画分において現れただけであった。トリトンX－100画分では、低投与

10

20

30

40

50

量の試験化合物 XG-102（配列番号 11）（0.1 mg/kg）で処置された動物は、ビヒクル群（ $p < 0.05$ ）および高投与量の群（ $p < 0.01$ ）と比べて、有意な低下を示した。

#### 【0317】

b b) CSF の A $\beta$  レベル

試験物質 XG-102（配列番号 2）による処置の後、CSF の A $\beta_{1-40}$  および A $\beta_{1-42}$  レベルは、ビヒクル群と比べて、有意に低下した。どちら群も、A $\beta_{1-40}$  および A $\beta_{1-42}$  の  $p$  値は、高投与量（10 mg/kg）では  $p < 0.01$  であり、XG-102（配列番号 2）の低投与量では  $< 0.05$  であった（図 12 参照）。

#### 【0318】

i v) 脳組織構造および免疫組織化学の結果

a a) アミロイド沈着およびプラーク負荷

プラーク負荷を、異なる 2 つの方法によって定量化した。一方では、主にヒトアミロイドペプチドの A $\beta_{1-17}$  に対する 6E10 を用いた IHC 染色法を行った。他方では、成熟した神経炎症性プラークのベーターシート構造およびコアを標識化するチオフラビン S 染色法を行った。まず第一に、測定された領域面積、皮質および海馬は、全ての群を通して極めて一定であったが、これは、切開および IHC 手順における問題、および処置によってある程度誘発される萎縮症を排除することが可能であることを示していた（ $> 5\%$  の変化がこの方法によって検出可能である）。6E10 およびチオフラビン S の定量化は、XG-102（配列番号 11）の処置の後の、プラークの中心における、ベーターシート構造が選択的に低減され、その一方で、残留したヒトアミロイドは、この処置からは影響を受けないままであるか、または、わずかに増大したことを示していた。詳細に言うと、皮質の 6E10 I R プラーク負荷は、10 mg/kg の XG-102（配列番号 11）で処置したマウスにおいて、ビヒクルと比べて、増大した。しかし、海馬プラークの数では、有意水準に達した。図 13 および 14 は、6E10 IHC と異なり、XG-102（配列番号 11）の処置により、海馬のチオフラビン S にポジティブなプラークの数、および、面瀬の比率（プラークの数：10 mg/kg の XG-102（配列番号 11）の場合  $p < 0.05$ 、0.1 mg/kg の XG-102（配列番号 11）の場合  $p < 0.01$ ）が、負の用量依存性低減をもたらしたことを示している。0.1 mg/kg の XG-102（配列番号 11）の処置は、また、平均プラーク寸法を減少させた。しかし、この効果は、ANOVA（対応のない両側 T 検定： $p = 0.074$ ）では、有意水準に達しなかった。皮質よりも海馬において、十中八九後のプラークの病変の発症に起因する環境において、皮質のプラークでは、これらの作用は生じなかった。5 ヶ月齢において処置を開始することは、海馬におけるプラーク沈着の時点に正確に適合するが、その一方で、皮質のプラークは、3 ヶ月齢において、定量化のために用いられる倍率において視認可能になり始める。質的には、チオフラビン S で染色されたプラークに対する、6E10 の比率は増大し、2 重に標識化されたスライスに見られるようなベーターシートのプラークコアの寸法は、小さくなる。まとめると、これらのデータは、XG-102（配列番号 11）の処置が、プラーク沈着の初期段階におけるベーターシート形成、および、プラークコアにおけるベーターシート形成に、それぞれ、作用することを、裏付けている。

#### 【0319】

d) 効果のまとめ、および結論

・モリス水迷路において測定された空間的ナビゲーションは、治療から大きく影響を受けないままであった。0.1 mg/kg の XG-102（配列番号 11）の治療により、学習実績は、結果的に、トレーニングの第 1 日目と最終日との間で、わずかにより乏しくなった。

#### 【0320】

・0.1 mg/kg の XG-102（配列番号 11）群のトリトン X-100 画分が減少したことを除いて、A $\beta_{1-40}$  および A $\beta_{1-42}$  脳レベルは、安定した状態を維持した。

10

20

30

40

50

## 【0321】

・CSFでは、両方の投与量および両方の画分について、A $\beta$ レベルの減少が検出可能であった。

## 【0322】

・6E10の定量化において、XG-102（配列番号11）の処置が、高投与量群のヒトアミロイドベータを、増大させる傾向があった。このことは、A $\beta$  ELISAにおいて得られたデータに適合している。

## 【0323】

・これとは異なり、チオフラビンS染色法によって検出された海馬のベーターシート負荷は、XG-102（配列番号11）の処置後、投与量に依存して低減し、低投与量である0.1 mg/kgのXG-102（配列番号11）において、大きく低減したが、皮質のプラーク負荷は、不変のままであった。処置開始時における、年齢に依存した、海馬内のプラーク沈着の開始に従って、これは、プラーク沈着の初期の段階におけるベーターシート形成に対する初期の作用を示唆している。

## 【0324】

実施例15：2型糖尿病の処置における、全てのDレトロインペルソIB（s）ペプチドおよびその改変体の活性の決定

実施例15は、2型糖尿病の処置において、IB（s）ペプチド、並びに、全てのDレトロインペルソIB（s）ペプチド、およびその改変体の活性を決定すること、特に、2型糖尿病のdb/dbマウスモデルにおけるXG-102（配列番号11）による慢性的処置の効果を、空腹時血糖値を3日ごとに（28日間）に評価することによって、決定するようにデザインする。

## 【0325】

材料および方法

## i) 動物

全部で二十（20）匹の雄のdb/dbマウス（8週齢）を、Charles River（ドイツ）から入手した。他の記載がない限り、到着後、動物は、群ごとに（群当たりn=6~7）収容し、げっ歯類用の標準食（Altromin standard #1324 chow; C. Petersen, Ringsted, デンマーク）および水を、自由に与えた。

## 【0326】

これらのマウスを、温度および湿度が制御された部屋に、（4：00に点灯し、16：00に消灯する）12：12のL/D周期の下で、収容した。

## 【0327】

## ii) 群およびランダム化

－4日目に、マウスを、血糖値（空腹時；Biosen S line分析器（EKF diagnostic, ドイツ）上で測定した血糖）に従ってランダム化して、次の薬剤処置群（n=6）のうちの1つに参加させた。

1) ビヒクルコントロール、S. C.（生理食塩水）

2) XG-102（配列番号11）、1mg/kg、s. c.

3) XG-102（配列番号11）、10mg/kg、s. c

列挙した全ての投与量は、遊離塩基で計算した。薬剤の純度：95.28%，ペプチド含有量：78.0%。全ての化合物を、3ml/kgの容積で、皮下（s. c.）投与した。ビヒクルコントロールおよびXG-102（配列番号11）の製剤説明は、次のとおりである。

## 【0328】

まず、XG-102（配列番号11）をビヒクル中に溶解させた。製剤（1mg/kg および10mg/kgの投与量にそれぞれ対応する、濃度0.33および3.3mg/ml）を、以下に詳述する手順に従って調製した。試験品目の純度およびペプチド含有量を考慮して、濃度を計算し、表示した（乗算係数は1.346であった）。

・ 原液の調製：冷凍－乾燥させた試験化合物 X G－1 0 2（配列番号 1 1）を、最低 1 時間、解凍し、1 m M（3. 8 2 3 m g / m L に相当）の、ビヒクル中の原液として調製した。アリコートをし、処置日ごとに調製し、約－8 0 ° C で保存した。この原液を、処置日ごとに、所望の濃度まで希釈した。

- ・ 原液の保存：約－8 0 ° C ；
- ・ 希釈した調製物の保存：室温で最大 2 4 時間。

#### 【0 3 2 9】

溶解する前に、粉末を、－2 0 ° C で保存した。原液の安定性は、約－8 0 ° C で 3 ヶ月である。動物に投与するための希釈した製剤の安定性は、室温で 2 4 時間である。未使用の希釈材料は、4 ～ 8 ° C で保存されているならば、最大 7 日間保存可能であった。

10

#### 【0 3 3 0】

##### c) 実験の手順

8 日間の環境順化の後、マウスを、アウトライン群に従って、2 1 日間、毎日午前 8 時に、午後 4 時の消灯の 8 時間前に S C 投与することによって、処置した。その後、調査 2 1 日目に、最も高濃度の X G－1 0 2（配列番号 2）（1 0 m g / k g）の投与を停止し、その一方で、調査 2 8 日目まで、毎日のビヒクルコントロールおよび X G－1 0 2（配列番号 2）（1 m g / k g）の投与を継続した。2 8 日目から 1 1 1 日目の終了日まで、ビヒクルおよび X G－1 0 2（配列番号 2）（1 0 m g / k g）で処置されたマウスを、ウォッシュアウト期間（投与なし）において観察し、その一方で、X G－1 0 2（配列番号 2）（1 m g / k g）で処置したマウスを、2 8 日間の処置後に、終結させた。

20

#### 【0 3 3 1】

##### i) 血糖

投与の 6 時間後に、7 時間の空腹状態の動物からの血糖を、尾静脈からの 1 0 μ l の血液試料を、ヘマトクリット管に採取することによって測定し、次に、B i o s e n s e r l i n e 分析器（E K F－d i a g n o s t i c、ドイツ）で分析した。

#### 【0 3 3 2】

##### i i) 代謝ケージ

群 1 + 3：マウスを代謝ケージの中に置いて、2 4 時間の食料および水摂取、並びに、2 4 時間の尿および糞の生成を記録した。マウスを、n = 6 ～ 7 の 2 つのサブチームに分類し、続いて、調査 7 1 ～ 7 2 日目に、代謝の特性付けを行った。

30

#### 【0 3 3 3】

##### i i i) アディポカインパネル

群 1 + 3：3 つのケース（調査 5 7 日目、6 6 日目、および 1 0 8 日目）において、血液を、尾静脈から、E D T A が被覆されたヘマトクリット管（1 0 0 μ l）を用いて採取した。その後、血液の遠心分離を行い、血漿を採取し、－2 0 ° C で、測定まで保存した。その後、次のアディポカイン／サイトカインのパネルを、L u m i n e x に基づいた 7－p l e x、すなわち、レプチン、レジスチン、M C P－1、P A I－1、T N F、インスリン、およびインターロイキン－6（I L－6）を用いて決定した。

#### 【0 3 3 4】

##### i v) 終了

40

群 1 + 3（1 1 1 日目）：次の臓器、すなわち、鼠径部皮下脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、脳、肝臓、腎臓、脾臓、および心臓を切除し、重量を量った。ここに記載の全ての臓器は、場合によっては行われる将来の組織病理学検査のための 4 % P F A 中の試料であった。また、脾臓（全体）を、場合によっては行われる立体学的且つ免疫組織化学分析のためにサンプリングし、目を、場合によっては後に行う網膜症の分析のためにサンプリングした。群 2（2 8 日目）：組織も血漿も採集しなかった。

#### 【0 3 3 5】

##### c) 結果

##### i) 一般的観察

急性の投与期間の間、動物は、正常レベルの敏捷さおよび活動を示しており、薬剤で処

50

置した動物において、鎮静作用の徴候はなかった。ビヒクルで処置した動物間では、食料および水摂取は、正常範囲内であった。しかし、およそ2週間の投与の後、皮下組織において、結節性線維症が、高投与量のXG-102（配列番号2）化合物に対する反応として、観察された。これらの結節状線維症は、群Cの全てのマウスにおいて、開放創に進行した。群Bでは、軽い結節状線維症が観察された。結果として、注射部位の変更を行った。動物への投与が完了した後、これらの動物は治癒し、結節状線維症も、徐々に消滅した。ビヒクルで処置された動物では、何の臨床的作用も観察されなかった。

### 【0336】

#### i i) 血糖

空腹時血糖値（絶対および相対）が、図15に示されている。群AおよびCにおいて、空腹時血糖を、68日目まで3日ごとに測定し、111日目の終了日まで、定期的に測定した。XG-102（配列番号2）（10mg/kg）で処置された糖尿病のdb/dbマウスの空腹時血糖値において、ビヒクルコントロールと比べて、明らか且つ有意の（ $p < 0.001$ ）減少が観察された。XG-102（配列番号2）（10mg/kg）で処置したマウスの空腹時血糖値は、約5mmol/Lの低いプラトーに達した。この効果は、投与の14日後に明らかであり、調査の間ずっと、従って、21日目～111日目までのウォッシュアウト期間の間、持続した。これとは異なり、低投与量のXG-102（配列番号2）（1mg/kg）では、投与した28日間の間、何の作用も観察されなかった。

10

### 【0337】

#### i i i) 体重

体重の測定（絶対および相対）が、図16に示されている。XG-102（配列番号2）（10mg/kg）で処置したマウスにおいて、体重増加が、ビヒクルコントロールと比べて、明らか且つ有意（ $p < 0.001$ ）に防止されたことが観察された。この効果は、投与の28日目から明らかであり、終了日である111日目まで持続した。これとは異なり、低投与量のXG-102（配列番号2）（1mg/kg）では、投与した28日間の間、体重に何の効果も観察されなかった。

20

### 【0338】

#### i v) 代謝ケージ

ビヒクルまたはXG-102（配列番号2）（10mg/kg）の、調査68日目の代謝ケージにおいて、測定される、24時間の食料および水摂取、並びに、尿および糞の生成に与える作用が、図17（g）および図18（体重のgに対して正規化された）に示されている。XG-102（配列番号2）（10mg/kg）は、食料摂取および尿の生成を減少させる傾向があったが、ビヒクルコントロールと比べて、測定されたパラメータのいずれにも有意の作用が認められなかったことが、観察された。

30

### 【0339】

#### v) アディポカイン

57日目、77日目、および108日目に測定されたビヒクルまたはXG-102（配列番号2）（10mg/kg）が、インスリン、MCP-1、およびIL-6の血漿レベルに与える作用が、図19に示されており、tPAI-1、TNF、およびレジスチンの血漿レベルに与える作用が、図20に示されている。XG-102（配列番号2）で処置された動物の77日目および108日目において、血漿レジスチンのレベルが有意に高かったことを除いて、XG-102（配列番号2）（10mg/kg）は、ビヒクルコントロールと比べて、測定されたパラメータのいずれにも、有意の作用を与えなかったことが観察された。

40

### 【0340】

#### v i) 終結時の組織重量

ビヒクルまたはXG-102（配列番号2）（10mg/kg）の、副睾丸脂肪パッド、鼠径部皮下脂肪パッド、および後腹膜脂肪パッドの組織重量に与える効果が、図21に示されている。XG-102で処置されたマウスでは、ビヒクルコントロールと比べて、

50

副睾丸 ( $p < 0.05$ ) および後腹膜 ( $p < 0.01$ ) の脂肪質量における有意な減少が、観察された。ビヒクルまたは XG-102 (配列番号 2) ( $10 \text{ mg/kg}$ ) が、脳、脾臓、および心臓の組織重量に与える作用が、図 22 に示されている。XG-102 (配列番号 2) ( $10 \text{ mg/kg}$ ) が、ビヒクルコントロールと比べて、これらのパラメータに何の有意な作用も与えないことが観察された。最終的に、ビヒクルまたは XG-102 (配列番号 2) ( $10 \text{ mg/kg}$ ) が、腎臓および肝臓の組織重量に与える作用が、図 23 に示されている。XG-102 (配列番号 2) で処置したマウスにおいて、ビヒクルコントロールと比べて、腎臓 ( $p < 0.05$ ) および肝臓 ( $p < 0.01$ ) の質量が有意に減少したことが観察された。

#### 【0341】

10

これらの結果をまとめると、 $10 \text{ mg/kg}$  の XG-102 (配列番号 11) の投与は、血糖値の有意な減少をもたらすようであり、従って、XG-102 (配列番号 11) は、糖尿病の処置および上昇した血糖値のための、有望な新規の手段であると考えられる。

#### 【0342】

(実施例 16)

無作為化、二重盲検、プラセボコントロール、用量漸増 (escalating) フェーズ I 試験において、健常男性ボランティアへと投与された、10、40、および  $80 \mu\text{g/kg}$  の XG-102 (配列番号 11) の単回静脈内注入の、安全性、忍容性、および薬物動態

試験の主要目的は、XG-102 の単回漸増 (escalating) 用量の、健常男性ボランティアへの静脈内 (iv: intravenous) 注入の後における、XG-102 の安全性および忍容性を評価することであった。試験の副次的目的は、XG-102 の単回漸増 (escalating) 用量の、健常男性ボランティアへの iv 注入の後における、XG-102 の薬物動態を評価することであった。用量は、60 分間の iv 注入として投与した。コントロールの目的で、プラセボの iv 注入を、コントロールの被験体に対して行った。

20

#### 【0343】

これは、単一施設、無作為化、二重盲検、プラセボコントロール、単回用量漸増 (ascending)、逐次群試験であった。XG-102 の 3 つの投与レベル (10、40、および  $80 \mu\text{g/kg}$ ) を、用量の昇順で試験した。各群内では、6 例の被験体には、XG-102 を施し、2 例の被験体には、プラセボを施すように、被験体を無作為化した。スクリーニングは、投与の前の 3 週間にわたり実施した。投与は、0 日目において、各被験体に対して行った。治験責任医師は、CRU からの被験体の退院 (投与の 24 時間後における) の前に、全ての被験体の健康について点検した。被験体は、試験後評価のために、投与の  $8 \pm 2$  日後および  $28 \pm 5$  日後に、CRU へと帰院した。

30

#### 【0344】

8 例ずつ 3 つの群に合計 24 例の被験体 (18 ~ 45 歳の健常男性の被験体)。24 例の被験体が、試験に参加し、これを完了した。全ての被験体についてのデータを、安全性解析に組み入れ、XG-102 を施された全ての被験体についてのデータを、薬物動態解析に組み入れた。

40

要約:

薬物動態の結果:

XG-102 の薬物動態パラメータを、以下の表に提示する。

【表 4】

| パラメータ                                             | 10 µg/kg<br>(N=6)  | 40 µg/kg<br>(N=6)  | 80 µg/kg<br>(N=6)  |
|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| AUC <sub>0-last</sub><br>(ng・時間/mL)               | 24.7 (26.1)        | 134 (15.2)         | 431 (41.0)         |
| AUC <sub>0-∞</sub><br>(ng・時間/mL)                  | 36.8 (23.4)        | 146 (17.5)         | 443 (41.0)         |
| AUCextrap <sup>a</sup> (%)                        | 34.1 (18.6~49.7)   | 6.7 (4.2~12.9)     | 2.9 (1.9~3.4)      |
| C <sub>max</sub><br>(ng/mL)                       | 31.3 (24.4)        | 146 (16.7)         | 362 (34.9)         |
| tmax <sup>a</sup> (時間)                            | 1.00 (1.00 - 1.05) | 1.00 (1.00 - 1.00) | 1.00 (1.00 - 1.00) |
| AUC <sub>0-last</sub> (正規化)<br>(ng・時間/mL)/(µg/kg) | 3.10 (29.3)        | 3.64 (13.8)        | 5.91 (41.8)        |
| AUC <sub>0-∞</sub> (正規化)<br>(ng・時間/mL)/(µg/kg)    | 4.61 (24.8)        | 3.96 (15.7)        | 6.07 (41.8)        |
| C <sub>max</sub> (正規化)<br>(ng/mL)/(µg/kg)         | 3.93 (28.0)        | 3.98 (15.9)        | 4.97 (35.6)        |
| MRT(時間)                                           | 1.00 (29.9)        | 0.76 (11.0)        | 1.02 (14.7)        |
| t <sub>1/2</sub> (時間)                             | 0.57 (44.6)        | 0.36 (22.3)        | 0.65 (38.8)        |
| CL(mL/時間)                                         | 17537 (23.9)       | 18399 (16.4)       | 13217 (43.5)       |
| CL(mL/時間/kg)                                      | 217 (24.8)         | 253 (15.7)         | 165 (41.8)         |
| V <sub>ss</sub> (mL)                              | 17536 (36.8)       | 14040 (15.7)       | 13500 (30.5)       |
| V <sub>ss</sub> (mL/kg)                           | 217 (27.5)         | 193 (13.7)         | 168 (29.8)         |

幾何平均(CV%)データを提示する

N=試験された被験体の数

(正規化)=用量および体重について正規化された

a 中央値(最小 最大)

## 【0345】

観察値の  $t_{1/2}$  は、短かった。C<sub>max</sub>により測定されるピーク曝露量およびAUC<sub>0-last</sub>により測定される累積曝露量のいずれも、用量と共に増加した。用量に応じたC<sub>max</sub>の増加は、グラフによる検査と、最大用量である80 µg/kgの投与の後では、他の用量についての90%の信頼区間を上回る、その用量正規化値の幾何平均(geometric mean of its dose normalized values)とに基づくと、線形比例を超えると考えられる。その幾何平均の用量正規化値についての90%の信頼区間は、他の試験した用量の投与後における90%の信頼区間と重なり合わないで、用量に応じたAUC<sub>0-last</sub>の増加は、40~80 µg/kgでは、明らかに線形比例を超えるのに対し、10 µg/kg投与後の値と40 µg/kg投与後の値とを比較すると、90%の信頼区間は重なり合うが、10 µg/kg投与後における、その幾何平均の用量正規化値は、40 µg/kg投与後における、対応する90%の信頼区間内の全ての値より小さい。

10

20

30

40

50

## 【0346】

XG-102は、10、40、または80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の、健常男性の被験体への単回 i v 用量として投与したところ、安全であり、良好に忍容された。XG-102を施された被験体における有害事象の発生率は、プラセボを施された被験体における発生率と同様であった。臨床検査室データ、バイタルサイン、ECG、身体検査、または眼検査（眼底検査およびIOP検査）において、臨床的に重要な所見は見られなかった。

## 【0347】

XG-102の静脈内注入の終了後、その血漿濃度は、急速に低下し、最長でも10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のXG-102の i v 注入開始の2時間後までの、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のXG-102の i v 注入開始の3時間後までの、および最長でも80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のXG-102の静脈内注入開始の7時間後までの、定量下限を下回る値をもたらした。測定された  $t_{1/2}$  値およびMRT値は、短く、投与レベル当たりの幾何平均値は、それぞれ、0.36～0.65時間および0.76～1.02時間の範囲である。

10

## 【0348】

XG-102のAUC<sub>0-last</sub>は、試験用量範囲内で、用量に応じた線形比例性を超えて増加し、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間の用量において、その幾何平均の用量正規化値についての90%の信頼区間は重なり合わず、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間でも、その幾何平均の用量正規化値についての90%の信頼区間の間の重なり合いは、限定的であるに過ぎなかった。

20

## 【0349】

XG-102のC<sub>max</sub>は、40～80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ において、用量に応じた線形比例性を超えて増加するようである。80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与群における幾何平均の用量正規化C<sub>max</sub>は、他の投与群における幾何平均の用量正規化C<sub>max</sub>より大きく、これについての90%の信頼区間の外にあるが、幾何平均の用量正規化C<sub>max</sub>についての90%の信頼区間は、全ての投与レベル間で重なり合う。

## 【0350】

XG-102薬物動態パラメータの被験体間における変動は、10および40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で処置された被験体では、中程度であった（大半のパラメータについて、幾何平均のCV%は、ほぼ15～30%の範囲にあったが、例外は、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与群における  $t_{1/2}$  および総V<sub>s</sub>であった）が、80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与群ではより大きく、MRT（14.7%）以外については約29～44%の範囲であった。このより大きな変動は、サンプルサイズが小さいことの効果である可能性もあり、この用量では明らかな非線形性が観察されたことの帰結である可能性もある。

30

## 【0351】

（実施例17）

ブタ腓島単離の転帰を改善する、XG-102（配列番号11）の使用

目的は、（a）腓島単離の間に生じる、細胞ストレスおよび細胞死をもたらすJNKの大規模な活性化を遮断し、（b）腓島死を低減させて、単離後における腓島の生存率の改善をもたらす、XG-102の能力を、ブタモデルを使用して評価することであった。

## 【0352】

ブタ腓島の単離は、腓島単離手順開始の約20分後において、組織サンプル中でまず観察される、劇的なJNKの活性化をもたらす（図33）。既存のデータの解析は、調達および単離ラボへの移送の間における、腓臓レベルでのXigen XG-102 JNK阻害剤の添加、および単離の間における、腓島単離溶液中のXigen XG-102 JNK阻害剤の添加（10マイクロモル濃度）は、JNKの活性化を遮断し（図34）、c-fos遺伝子の相対発現を低減し（図35）、OCR/DNA（図36）およびATP/蛋白質〔総細胞蛋白質〕（図37）により測定される場合の、単離されたばかりの腓島の生存率に対して、統計学的に有意で重要な効果を有することを裏付ける。比較は常に、同じ腓臓ドナーに由来する、対応する非処置コントロールに対して行った。図36および図37において提示される、腓島の生存率についてのデータは、単離の間において典型

40

50

的に観察される J N K の活性化の低減（図 3 3）、および結果として生じる c - f o s 遺伝子の発現の低減（図 3 5）と符合する。生存率、J N K の活性化、および c - f o s の発現の差異は、培養の 7 日後には小さくなった。

#### 【0353】

単離 6 例中の 6 例（100%）が、カットオフを上回る O C R / D N A 値をもたらし、N H P における移植に成功した（図 3 8）。これにより、このモデルでは、軽微な生存率の改善であってもなお、調製物の移植能力に対して深甚な効果を有しうることが確認される。入手可能なデータに基づく、X G - 1 0 2 は、臨床ヒト膵島の単離またはブタ膵島の単離のために使用されるのに優れた薬剤であることが分かった。

#### 【0354】

ブタモデルは、以下の理由のために適切である：（1）ブタ膵臓のサイズは、ラット膵臓またはイヌ膵臓よりヒト膵臓のサイズに近いこと、（2）ブタ膵臓は、将来的な臨床における膵島の異種移植のための実行可能な選択肢である（したがって、火急に必要とされるブタ膵臓単離の改善は、最終的にも、臨床的に適切でありうる）と考えられる。

#### 【0355】

脳死ドナーに由来する、臨床における膵島の同種移植のためのヒト膵臓は、W I T をかけず、8 ~ 1 2 時間の C I T（調達病院から単離ラボへの輸送に必要とされる時間）にあることが典型的である。

#### 【0356】

心停止ドナーに由来するヒト膵臓は、15 分間の W I T へと曝露され、現在のところ、W I T に起因する損傷についての懸念のために、日常的には活用されておらず、これらはまた、8 ~ 1 2 時間の C I T も経ることになる。

#### 【0357】

膵島の自己移植のために慢性膵炎患者から摘出された臓器は、W I T および限定的な（1 ~ 2 時間の）C I T を経る可能性がある。慢性膵炎患者に由来する膵臓は典型的に、炎症を伴い、既にストレス下にあるため、下記のブタモデルについて報告された改善は、臨床における自己移植の症例でなお大きいことが期待される。これはまた、冷阻血時間が遷延する、臨床の同種症例にも当てはまることが予測され、これは、異なる J N K 阻害剤を使用する他の研究グループにより報告されている。J N K の活性化は、膵臓調達時からの C I T と共に増加し、J N K 阻害剤による J N K 活性化の遮断は、膵島の収量、生存率、および移植転帰を改善し、これは、試験した冷阻血時間を最長としたときに最も顕著である。

#### 【0358】

（実施例 18）

ラットアルゴンレーザー誘導性脈絡膜血管新生モデルを使用する、脈絡膜血管新生の低減における、X G - 1 0 2（配列番号 11）の有効性

#### 【0359】

本実施例の目的は、2つの用量での X G - 1 0 2 の 2 回にわたる硝子体内投与が、レーザー誘導性脈絡膜血管新生（C h N V : c h o r o i d a l n e o v a s c u l a r i z a t i o n）のラットモデルにおいて、脈絡膜血管新生の低下をもたらすのかどうかを決定することであった。このモデルは、加齢黄斑変性を処置するための、試験化合物の潜在的な使用について予測を行うことを可能とする。

#### 【0360】

有色 B r o w n N o r w a y ラット 40 匹（+補欠 10 匹）を、各群 8 匹ずつの動物による 5 つの群へと分けた。532 nm のアルゴンレーザー光凝固装置（6 つの 75 μ m サイズのスポットとし、150 mW で、100 ミリ秒にわたる）を、右眼に使用して、脈絡膜血管新生を誘導した。0 日目（誘導の直後）および 7 日目に、試験物質（t e s t i t e m）、基準物質、およびコントロール物質を、硝子体内注射により投与した。血管造影は、誘導後 14 および 21 日目に、フルオレセイン（トレーサー）皮下注射の 10 分後に、処置動物および非処置動物に対して実施した。

10

20

30

40

50

## 【0361】

23日目における屠殺後、全ての動物に由来する、処置された右眼をサンプリングし、脈絡膜のフラットマウントを作製した。試験依頼者の要望により、ChNVの体積の定量化は、実施しなかった。

## 【0362】

実験の用意：

XG-102：3,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ （眼1つ当たり15  $\mu\text{g}$ に相当する）および300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ （眼1つ当たり1.5  $\mu\text{g}$ に相当する）。コントロール基準物質としてのKenacort（登録商標）Retard（4%のトリウムシノロンアセトニド）。コントロールビヒクル：生理食塩液（0.9%のNaCl）。

動物

種：ラット。これは、この実験モデルにおいて最も一般に使用される種である。

系統：Brown Norway（有色）。

週齢：約8週齢。

体重：175～200 g（注文時）。

性別／数：雄50匹（試験：40匹；補欠：10匹）。

飼育元：「HARLAN FRANCE」（FR-03800 GANNAT）。

## 【0363】

試験デザイン

Brown Norway系統に由来する有色ラット40匹（＋補欠10匹）を、動物8匹（＋補欠2匹）ずつによる5つの群へと分けた。532 nmのアルゴンレーザー光凝固装置（6つの75  $\mu\text{m}$ サイズのスポットとし、150 mWで、100ミリ秒にわたる）を、右眼に使用して、脈絡膜血管新生を誘導した。

## 【0364】

0日目（同じ麻酔下で、血管新生の誘導後において）および7日目において、試験物質（2つの用量、群1～2）、ビヒクル、および基準物質（5  $\mu\text{l}$ ）を、硝子体内注射により、右眼に投与した。眼底部における新生血管は、14および21日目において、処置動物および非処置動物について、ハイデルベルグ網膜血管造影（Heidelberg's Retinal Angiography）（HRA）を右眼に使用して評価した。

## 【0365】

下記の表は、処置群内の動物の割付けをまとめる。

## 【表5】

| 群番号 | 処置                           | 用量                            | 投与経路                                     | 動物番号                    |
|-----|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|
| 1   | XG-102                       | 3 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IVT(0日目および7日目において、右眼に5 $\mu\text{l}$ ずつ) | 14、17、38、26、28、31、23、S8 |
| 2   |                              | 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$   |                                          | 24、40、19、21、S5、6、39、18  |
| 3   | 生理食塩液                        | -                             |                                          | 37、12、22、S3、4、3、33、35   |
| 4   | Kenacort<br>(登録商標)<br>Retard | 4%のトリウムシノロンアセトニド              |                                          | 10、3、15、S1、32、8、16、9    |
| 5   | 非処置                          | -                             | -                                        | 29、7、20、36、S9、27、1、11   |

## 【0366】

動物の選択

## 【0367】

本試験には、40匹の動物+10匹の補欠動物を参加させた。眼欠損の目視可能な徴候を伴わない動物のみを選択した。次いで、Excel（登録商標）ソフトウェアのランダム関数によって、処置群内の割付けを行った。50匹の動物を誘導し、追跡調査した。処置群内の無作為割付けにより、群ごと8匹ずつの動物および補欠動物を決定した。後者の補欠動物は、正常で参加させた1または2匹の動物が、死亡したか、投与手順において水晶体に影響を受けたか、または角膜混濁（麻酔の反復に起因する）を有した場合に限り、結果の計算に組み入れた。

#### 【0368】

##### 血管新生の誘導

0日目において、キシラジン／ケタミンミックスの筋肉内注射により、動物に麻酔をかけた。0.5%のトロピカミド1滴の滴下により右眼の瞳孔を散大させた。次いで、アルゴンレーザー光凝固装置（532nm；150mW；100ミリ秒）を使用して、主血管枝の間の視神経乳頭の周囲において、接触レンズを伴う細隙灯を介して、6カ所の脈絡膜火傷（75μmのスポットサイズ）を施した。レーザー処置時における気泡の生成により、ブルッフ膜の破断が確認された。

#### 【0369】

##### 投与経路および投与法

キシラジン／ケタミンミックスの筋肉内注射により、動物に麻酔をかけた。0日目および7日目に、試験物質、基準物質、およびビヒクル（5μl）を、右眼に硝子体内注射した。注射は、手術用顕微鏡下で実施した。

#### 【0370】

0日目にスケジュールされた硝子体内注射は、血管新生の誘導後において、同じ麻酔下で施した。

#### 【0371】

硝子体内注射は、側頭上部領域内の毛様体輪に位置取りし、10μlのHamiltonに取り付けられた30Gの注射針を使用して実施した。次いで、充填されたシリンジを、UltraMicroPump IIIへと取り付けて、マイクロリットル範囲の正確な注射を達成した。

#### 【0372】

##### 体重

全ての動物の体重は、試験の開始前、次いで、1週間に1回記録した。誘導および処置の前（ベースライン）、次いで、7、14、および21日目において記録された動物の体重は全て、ベースラインでは、正常な範囲内：180.6±12.3g（平均値±SD、n=40）にあった。21日目においても、試験物質群、ビヒクル群、および非処置群の間で、関連する差異は観察されなかった。動物は、ビヒクル群および非処置群のそれぞれについての+56g（+31%）および+59g（+34%）と対比して、300μg/mlのXG-102群および3000μg/mlのXG-102群のそれぞれについての+53g（+29%）および+62g（+34%）と体重が増加した。

#### 【0373】

Kenacort（登録商標）retardで処置された動物は、ベースラインと誘導後21日目との間で、+21g（+12%）と体重が増加した。

#### 【0374】

##### フルオレセインによる血管造影

フルオレセインによる血管造影は、HRAを使用して、14および21日目に実施した。キシラジン／ケタミンミックスの筋肉内注射による麻酔および散瞳の後、26Gのインスリン用シリンジを使用して、体重100g当たり250μlの10%フルオレセインナトリウムを皮下注射し、色素注射の10分後にフルオレセイン写真を記録した。

#### 【0375】

本研究は、Brown Norwayラット40匹に対して実行した。アルゴンレーザーを使用して、右眼にChNVを誘導した。ChNVの発症は、フルオレセインによる血

10

20

30

40

50

管造影（FA：fluorescein angiography）により評価した。処置（試験物質、基準物質、およびコントロール物質）は、誘導後0および7日目において、硝子体内投与により施した。血管造影は、誘導後14および21日目において、フルオレセイン（トレーサー）注射の10分後に実施した。グレード付けは、各病変内のフルオレセインの最大強度に基づき、漏出領域のサイズによっては決定しなかった。

#### 【0376】

結果は、時点ごとの群の平均スコアとして、かつ、各処置および両方の時点の各々について得られる強度スコアに対応するスポット数の発生率により表した。マンローホイトニー検定を使用して、処置群とコントロール群との間で、FAスコアの統計学的有意差が見られるのかどうかを決定した。統計学的有意性は、マンローホイトニーU検定により  $p < 0.05$  が得られた場合に考えられた。

図39Aは、フルオレセイン漏出の強度（平均スコア±SD）を示し、図39Bは、両方の時点における、試験物質で処置された眼内の漏出スポットの比率を例示する。図39Cおよび39Dは、それぞれ、漏出スポット（スコア>0）および最大漏出スポット（スコア=3）の百分率を例示する。

#### 【0377】

フルオレセインによる血管造影による評価

血管造影図上のフルオレセインの漏出は、2名の検査者により、盲検的に評価し、以下の通り：スコア0、漏出なし；スコア1、わずかな染色；スコア2、中程度の染色；スコア3、強い染色にグレード付けした。特定の病変へと割り当てられた2つのスコアが一致しない場合は、大きい方のスコアを解析に使用した。

#### 【0378】

フラットマウント調製物上の標識化を介する、イソレクチンB<sub>4</sub>によるChNVの評価（任意選択の定量化）

23日目において、Dolethal（登録商標）のi.p.注射による安楽死の後、処置された右眼を採取し、室温で1時間にわたり、4%のバラホルムアルデヒド溶液中で固定した。洗浄後、網膜、脈絡膜、および強膜を切り出した。網膜を、注意深く剥離させた。強膜－脈絡膜をフラットマウントし、FITC－イソレクチンB<sub>4</sub><sup>1</sup>抗体によるブロッキングの後、インキュベートした。

#### 【0379】

統計学的解析

全てのパラメータについて、群の平均値および標準偏差を計算した。多様な濃度の試験物質とビヒクルとの間の差異の統計学的有意性を評価するため、マンローホイトニーU検定を使用した。

#### 【0380】

結果

(1) 基準化合物であるKenacort群対ビヒクル群および非処置群

以下の表は、14および21日目の10分後におけるFA（群ごとn=8の動物、右眼）の結果をまとめる。

10

20

30

【表 6】

| 処置                                                                        | 用量   | 時点    | フルオレセイン漏出の<br>平均スコア   |                         | 発生率(スコアが x であるスポット%) |          |          |          |
|---------------------------------------------------------------------------|------|-------|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------|----------|----------|
|                                                                           |      |       | 平均値±SD                | ビヒクル<br>と対比し<br>た低減%    | スコア<br>0             | スコア<br>1 | スコア<br>2 | スコア<br>3 |
| 非処置                                                                       | -    | 14 日目 | 2.1 ± 1.0<br>(n = 48) | -                       | 10                   | 19       | 25       | 46       |
|                                                                           |      | 21 日目 | 2.1 ± 0.9<br>(n = 48) | -                       | 4                    | 21       | 38       | 38       |
| ビヒクル<br>(NaCl):0 日目、<br>7 日目における<br>IVT                                   | 0.9% | 14 日目 | 2.9 ± 0.5<br>(n = 48) | -                       | 0                    | 4        | 6        | 90       |
|                                                                           |      | 21 日目 | 2.2 ± 1.0<br>(n = 48) | -                       | 6                    | 21       | 23       | 50       |
| Kenacort(登録<br>商標) retard(ト<br>リアムシノロン<br>アセトニド):0<br>日目、7 日目に<br>おける IVT | 4%   | 14 日目 | 0.1 ± 0.3<br>(n = 46) | 97 %<br>( $p < 0.001$ ) | 87                   | 13       | 0        | 0        |
|                                                                           |      | 21 日目 | 0.3 ± 0.5<br>(n = 45) | 86 %<br>( $p < 0.001$ ) | 69                   | 31       | 0        | 0        |

数値データは、提示のために概数とする場合があり、したがって、手作業による再計算では、わずかな異なる値が得られる場合があることに注意されたい。

## 【0381】

14 日目において、非処置右眼では、スポットの 90 % が漏出していたことから、ChNV の形成が示された。平均スコアは、 $2.1 \pm 1.0$  (n = 48) であった。21 日目において、非処置動物は、96 % の漏出スポットおよび  $2.1 \pm 0.9$  (n = 48) の平均スコアを示したことから、ChNV の遷延が示された。

## 【0382】

14 日目において、ビヒクル処置眼では、スポットの 100 % が漏出しており、平均スコアは、 $2.9 \pm 0.5$  (n = 48) であったことから、ChNV の形成および重症度が示された。21 日目まで、漏出スポットの発生率に、関連する変化はなく、漏出するスポットは 94 % であり、平均スコアは、 $2.2 \pm 1.0$  (n = 48) であったことから、ChNV の遷延が示された。

## 【0383】

FA のスコア付けは、Kenacort (登録商標) retard が、0 および 7 日目の 2 回にわたる硝子体内投与後の 14 日目において、ビヒクル群についての  $2.9 \pm 0.5$  と対比した、 $0.1 \pm 0.3$  の平均スコア (n = 46) により示される通り、フルオレセイン漏出を、ビヒクルと比較して 97 % ( $p < 0.001$ 、マン-ホイットニー U 検定) と有意に低減することを明らかにした。

## 【0384】

14 日目において、漏出スポットの発生率は、Kenacort (登録商標) retard 群において低減され、100 % の漏出スポットを示すビヒクル処置動物と比較して、13 % の漏出スポットであった。

## 【0385】

21 日目まで、Kenacort (登録商標) retard で 2 回にわたり処置された動物は、それぞれ、 $0.3 \pm 0.5$  (n = 45) 対  $2.2 \pm 1.0$  の平均スコアにより示される通り、ビヒクル処置動物と比較して、血管漏出の、86 % という関連する低減を示した ( $p < 0.001$ 、マン-ホイットニー検定)。

## 【0386】

21 日目における、ビヒクル群と比較した漏出スポットの比率は、ビヒクルについての 94 % と対比した、Kenacort (登録商標) retard についての 31 % の漏出

10

20

30

40

50

スポットにより示される通り、変化しなかった。

【0387】

(2) XG-102 処置群対ビヒクル群

以下の表は、14および21日目の10分におけるFAの結果（群ごとn=8の動物、右眼）をまとめる。

【表7】

| 処置                         | 用量         | 時点   | フルオレセイン漏出の平均スコア   |                           | 発生率(スコアがxであるスポット%) |      |      |      |
|----------------------------|------------|------|-------------------|---------------------------|--------------------|------|------|------|
|                            |            |      | 平均値±SD            | ビヒクルと対比した低減%              | スコア0               | スコア1 | スコア2 | スコア3 |
| XG-102:0日目、7日目におけるIVT      | 300 µg/ml  | 14日目 | 2.4±0.9<br>(n=44) | 17%<br>( <i>p</i> <0.05)  | 7                  | 9    | 18   | 66   |
|                            |            | 21日目 | 2.4±0.8<br>(n=44) | -9%                       | 5                  | 9    | 32   | 55   |
|                            | 3000 µg/ml | 14日目 | 1.7±0.7<br>(n=43) | 41%<br>( <i>p</i> <0.001) | 0                  | 44   | 44   | 12   |
|                            |            | 21日目 | 2.3±0.7<br>(n=43) | -5%                       | 0                  | 14   | 47   | 40   |
| ビヒクルであるNaCl:0日目、7日目におけるIVT | 0.9%       | 14日目 | 2.9±0.5<br>(n=48) | -                         | 0                  | 4    | 6    | 90   |
|                            |            | 21日目 | 2.2±1.0<br>(n=48) | -                         | 6                  | 21   | 23   | 50   |

数値データは、提示のために概数とする場合があり、したがって、手作業による再計算では、わずかな異なる値が得られる場合があることに注意されたい。

【0388】

結果の概要を、図39に提示する。

【0389】

動物の全般的挙動は、いずれの用量のXG-102の硝子体内投与の後でも変化しなかった。臨床における追跡調査期間中に、関連する合併症は、見出されなかった。

【0390】

動物の体重は、ビヒクル群および非処置群のそれぞれについての、+56 g (+31%) および+59 g (+34%) と対比して、300 µg/ml のXG-102群および3000 µg/ml のXG-102群のそれぞれについて、+53 g (+29%) および+62 g (+34%) と、試験期間中に増加した。Kenacort（登録商標）で処置された動物は、21 g (+12%) の体重増加を示した。

【0391】

ビヒクル群では、誘導された眼は、レーザーによる傷害の14および21日後において、一定のフルオレセイン漏出を示した。14日目において、平均フルオレセイン漏出は、2.9±0.5 (n=48の影響例 (impact)) であり、漏出スポットは100%であったことから、ChNVの形成および重症度が示された。21日目において、ChNVの形成は、94%の漏出スポットおよび2.2±1.0の平均フルオレセイン漏出 (n=48の影響例) を一貫して維持した。

【0392】

0および7日目における、Kenacort（登録商標）（投与1回当たり200 µg）の、2回にわたる硝子体内投与は、誘導後14および21日目におけるChNVの形成の発生を阻害し、14および21日目における平均スコアは、それぞれ、ビヒクルについての2.9±0.5および2.2±1.0と対比して、Kenacort（登録商標）retardについての0.1±0.3 (*p*<0.001) および0.3±0.5 (*p*<0.001) であった。14日目において、基準物質で処置された群では、漏出を示す病変

が13%であるのに対し、ビヒクル群では、100%が漏出を示した。21日目まで、漏出スポットの発生率は、Kenacort（登録商標）retardにより、ビヒクル（94%）と比較した低減（31%）を維持した。

#### 【0393】

300  $\mu$ g/mLおよび3000  $\mu$ g/mLのXG-102で処置された動物は、14日目において、ビヒクルと比較して、低用量のXG-102については、平均スコアが2.4 $\pm$ 0.9である17%（ $p < 0.05$ ）、および高用量のXG-102については、平均スコアが1.7 $\pm$ 0.7である41%（ $p < 0.001$ ）と、血管漏出の有意な低減を示した。21日目において、いずれの用量のXG-102も、ビヒクルと比較して、関連する血管漏出の低減を示さなかった。

10

#### 【0394】

ビヒクル群について、90%のスポットがスコア3であるのと比較して、低濃度のXG-102および高濃度のXG-102のそれぞれについて、スコア3は66%および12%であることにより示される通り、300  $\mu$ g/mLのXG-102群および3000  $\mu$ g/mLのXG-102群については、14日目において、スコア3を有するスポットの比率の低減が記録された。

#### 【0395】

ChNVを測定する解剖学的計量法および機能的計量法を使用したところ、かつ、所与の実験条件下において、300および3000  $\mu$ g/mLで硝子体内投与されたXG-102は、最終回の投与後7日間にわたり（試験の14日目まで）、血管漏出を阻害した。

20

#### 【0396】

（実施例19）

XG-102のアドリアマイシン誘発性腎症に対する効果

本実施例の目的は、XG-102の、炎症性腎疾患である腎症に対する効果を試験することであった。アドリアマイシンによる処置は、ラットおよびマウスにおける糸球体疾患を誘発し、ヒト巣状分節状糸球体硬化症（FSGS：focal segmental and glomerular sclerosis）を模倣する。このモデルでは、疾患経過中において、重度の蛋白尿症に部分的に起因する、尿細管性炎症性病変および間質性炎症性病変が生じる。治療の非存在下では、腎疾患は、8週間以内に、末期腎不全へと進行する。有足細胞の傷害は、糸球体硬化症をもたらす継起の初期段階の1つである。試験の目的は、XG-102が、腎病変および腎不全の発症を予防しうるのかどうかを調査することであった。

30

#### 【0397】

XG-102（コントロール：0.9%のNaCl）を、ラットへとi.v.投与した。合計50匹のラットを処置したが、ここでは、3つの群（ラット10匹ずつによる）に、XG-102（低用量（20  $\mu$ g/kg）、中程度の用量（200  $\mu$ g/kg）、および高用量（2000  $\mu$ g/kg））を施した。これらの3つの群の全て（およびプラセボ群）を、0日目において、10mg/kgのアドリアマイシンで処置した。10匹の動物による第5群には、アドリアマイシンを施さず、NaClコントロールで処置した。組織学的調製物は、8、14、29、および41日目に用意した。

40

#### 【0398】

これらの組織学的調製物は、XG-102が（全観察期間にわたり）、アドリアマイシン誘発性腎症に対して、有意に明確な効果を及ぼすことを明らかに示した。腎組織は、細胞喪失から有意にレスキューされる（図42～45を参照されたい）。XG-102による処置を伴わない場合またはXG-102による処置を伴う場合の、c-junの発現に対する効果を、それぞれ、図46および47に提示する。

#### 【0399】

さらなる試験では、雄Sprague-Dawleyラット（Charles River）40匹を使用した（4つの群へと10匹ずつのラットを分けた）。腎症は、0日目において、10mg/kgのアドリアマイシンの単回静脈内注射により誘発した。0日目

50

において、X G - 1 0 2（配列番号 1 1；2 m g / k g；0.9%のN a C l中）を、尾静脈に静脈内投与した。投与容量は、0.2 m lであった。

下記の表は、無作為割付けをまとめる。

【表 8】

| 群番号 | ADR(0日目)  | 処置(0日目)        | 投与容量/投与経路 | 投与濃度    | 動物数 |
|-----|-----------|----------------|-----------|---------|-----|
| 1   | 10 mg/kg  | 0.9%のNaCl      | 0.2ml、IV  | 0       | 10  |
| 2   | 10 mg/kg  | XG-102(2mg/kg) | 0.2ml、IV  | 1 mg/ml | 10  |
| 3   | 0.9%のNaCl | 0.9%のNaCl      | 0.2ml、IV  | 0       | 10  |
| 4   | 0.9%のNaCl | XG-102(2mg/kg) | 0.2ml、IV  | 1 mg/ml | 10  |

10

20

#### 【0400】

各日において、全ての動物の全般的挙動および外観を観察した。動物の健康をモニタリングした（瀕死の動物、異常で重要な体重の喪失、物質の大きな非忍容性など・・・）。除外されるラットはなかった。

#### 【0401】

血液は、群ごと4匹ずつのラットの尾静脈から、7、14、28、42、および56日目において回収した。Advia Chemistry 1650（Bayer Healthcare AG、Leverkusen、Germany）の適切なキットを使用して、血清中クレアチニン濃度、血中尿素、および蛋白血を測定した。群ごと2匹ずつのラットを、7、14、28、42、および56日目の麻酔後において屠殺した。動物を屠殺した後、両方の腎臓を回収した。組織病理学的検査のために、固定された組織検体を、段階希釈されたアルコール溶液中で脱水し、トルエン中で清浄化し、パラフィン中に包埋した。切片（4 μm）は、過ヨウ素酸－シッフ（PAS）で染色し、マッソントリクロム染色を実施して、コラーゲン沈着を検出した。糸球体硬化症および尿細管間質性硬化症を、顕微鏡下で定量化した。

30

#### 【0402】

結果は、Microsoft Excel（登録商標）ソフトウェアを使用して、個々のデータ表および要約されたデータ表の形態で表した。数値による結果は、平均値±平均値の標準誤差（SEM）として表した。試験した動物数が少ないため、統計学的解析は、実施しなかった。

40

#### 【0403】

疾患進行の間における、X G - 1 0 2の腎機能に対する効果：

尿素およびクレアチニンの血清レベルを測定して、腎疾患の経過中における腎機能を試験した。クレアチニンは、熱量測定における投与量（calorimetric dosage）に干渉するため、腎機能の好適な指標である尿素のみを解析した。尿素の血清レベルは、非処置ラットでは、顕著に安定だった（5 mmol / lを下回った）が、ADRは、尿素レベルの漸進性の増加を誘導し、28日目から急激に、41日目に25 mmol / lまで上昇し、次いで、56日目に48 mmol / lまで上昇し、これは、末期腎不全を反映していた（図38B）。他方、X G - 1 0 2で処置されたラットは、疾患の経過を

50

通して、 $10\text{ mmol/l}$ を下回る尿素の血清レベルを示した（図48B）。他方、XG-102で処置されたラットは、疾患の経過を通して、 $10\text{ mmol/l}$ を下回る尿素の血清レベルを示した（図48B）。XG-102単独で処置されたラットの腎機能は、 $0.9\%$ のNaClで処置されたラットと同様であった。これらの結果は、XG-102が、腎疾患および腎不全への進行を予防することを示唆する。

#### 【0404】

組織病理学的所見（PASおよびマッソントリクローム染色）：

ADR誘導性の構造的変化は、光学顕微鏡下で評価した。生理食塩液で処置されたコントロールラットは、形態学的に正常な糸球体および尿細管を示した。8日目において、光学顕微鏡による検査は、ADRネフローゼ群において、巣状分節状糸球体硬化症および蛋白質性円柱を伴う幾つかの領域を示した。これに対し、XG-102で処置されたラットでは、幾つかの尿細管は、蛋白質で満たされているが、糸球体は、メサングウム細胞過形成が存在しないかまたは孤立する、正常なアーキテクチャーを示し、尿細管性構造および間質は、病理学的変化を示さなかった（図49）。14日目までに、ADRで処置されたラットは、進行性糸球体硬化症、ヒアリン沈着、尿細管拡張、および円柱形成を示した。この群では、糸球体硬化症の程度は劇的に悪化し、29および41日目までに、大半の糸球体において、糸球体係蹄とボーマン腔との間の明白な接着を有して、びまん性となり、それは、重度の尿細管萎縮および間質性線維症と関連していた。56日目において、びまん性糸球体硬化症は、全ての糸球体において観察された（図50）。しかし、XG-102で処置されたラットは、8日目においても比較的正常な外観を呈し、56日目においても、ADRで処置されたラットと比較して、巣状分節状糸球体硬化症および尿細管間質性線維症をほとんど発症しなかった。まとめると、これらの結果は、XG-102が、糸球体線維症および尿細管間質性線維症の発症を予防することを強く示唆し、この群における腎機能の保存を説明し得る。

#### 【0405】

試験結果は、XG-102が、ADRにより誘発された、糸球体傷害および尿細管間質性傷害の進行を予防することの証拠を提示する。さらに、この分子は、腎機能を保存する。

#### 【0406】

（実施例20）

XG-102の、ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）誘発性腎症に対する効果

本試験の目的は、XG-102の、ラットにおける、慢性ピューロマイシンアミノヌクレオシド誘発性腎症に対する効果を、56日間にわたり評価することであった。ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）は、有足細胞による足突起の喪失および融合を誘発する、有足細胞毒素である。PAN誘発性腎症は、ヒト特発性腎炎症候群および巣状分節状糸球体硬化症の、十分に記載されたモデルである（Pippin JW、2008年）。PANネフローゼを伴うラットにおいて見られる糸球体の形態学的変化は、ヒト微小変化群（MCD：minimal change disease）および巣状分節状糸球体硬化症（FSGS）における形態学的変化に酷似する。ラットにおけるPANの腹腔内投与は、蛋白尿症、低アルブミン血症、および高コレステロール血症（急性期）を特徴とする、腎炎症候群の急速な発生をもたらす。これは、ヒトMCDの十分に確立された動物モデルである。巣状分節状糸球体硬化症の病理学的病変は、腹腔内PAN注射の反復により誘発された慢性PANネフローゼにおいて観察された（Nakajima, T., Kanozawa, K. およびMitarai, T. (2010年). Effects of edaravone against glomerular injury in rats with chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. J Saitama medical university、37巻（1号））。傷害の機構によれば、PANは、慢性期における糸球体硬化症および間質性線維症（Hewitson TD、2012年）を含む、反

応性酸素分子種（ROS）の産生を介する直接的なDNA損傷および組織損傷を引き起こす。

#### 【0407】

この実験では、雄Wistarラット（Charles River, France）90匹を使用した（15匹ずつのラットによる6つの群へと分けた）。腎症を誘発するために、ピューロマイシンアミノヌクレオシド（PAN）を、0日目において、130mg/kg（5ml/kg）の用量で腹腔内投与し、14日目において、60mg/kg（5ml/kg）の用量で腹腔内投与した（Nakajima, T., Kanozawa, K. およびMitarai, T.（2010年）. Effects of edaravone against glomerular injury in rats with chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. J Saitama medical university、37巻（1号））。コントロールラット（群1）には、0日目および14日目に、等量の生理食塩液をi.pで施した。XG-102またはそのビヒクル（0.9%のNaCl）を、0日目における初回のPAN注射から始めて、1週間に1回（群1～5）、0、7、14、21、28、35、および42日目における合計7回の注射にわたり、尾静脈へと（i.v.）投与した。個別の実験群（群6）では、XG-102を、0日目におけるPAN注射の後、21日目から始めて、1週間に1回、21、28、35、および42日目における合計4回の注射にわたり、尾静脈へと（i.v.）投与した。

#### 【0408】

XG-102を投与するために、XG-102の粉末を、0.9% NaClのビヒクル中に、試験した最高濃度で溶解させた。ここで、最高濃度は、より低い濃度のための原液を表した。各原液は、濾過（0.2μm）滅菌した。投与されるより低い濃度の溶液は、ろ過した原液を、i.v.注射のための容量に応じて、生理食塩液（0.9%のNaCl）中で希釈することにより調製した。

#### 【0409】

下記の表は、実験群をまとめる。

#### 【表9】

| 群 | PAN (i.p.) | 処置 (i.v.)        | i.v.投与の回数 | 群ごとの動物数 |
|---|------------|------------------|-----------|---------|
| 1 | なし         | ビヒクル             | 7         | 15      |
| 2 | あり         | ビヒクル             | 7         | 15      |
| 3 | あり         | XG-102 (1 mg/kg) | 7         | 15      |
| 4 | あり         | XG-102 (2 mg/kg) | 7         | 15      |
| 5 | あり         | XG-102 (4 mg/kg) | 7         | 15      |
| 6 | あり         | XG-102 (4 mg/kg) | 4         | 15      |

#### 【0410】

試験デザインを、図51に示す。略述すると、腎症を誘発するために、0日目および14日目において、PANまたはそのビヒクル（生理食塩液）を注射した。0日目および14日目には、PANをまず投与した後で、XG-102を投与した。0日目～42日目には、XG-102またはそのビヒクル（0.9%のNaCl）を、上記で記載した通り、i.v.経路により1週間に1回投与した。

#### 【0411】

動物を、1週間に1回秤量した。PANで処置された動物は全て、体重の減少を示した。しかし、PANで処置された動物は全て、体重について均一であった、すなわち、XG-102の、体重に対する、PAN／生理食塩液群（群2）と比較した作用は、観察されなかった。

#### 【0412】

56日目には、動物を屠殺し、サンプル（血液および腎臓）を回収した。特に、血液および腎臓をサンプリングするため、ペントバルビタール（60mg/kg；Ceva Sante Animale；Libourne、France）の注射により、動物に麻酔をかけた。血液サンプルは、腹部静脈から回収し、凝固のために試験管（EDTA 3K；30分間、4℃）へと移し、次いで、血漿を回収するために遠心分離した（10分間、3000rpm、4℃）。血漿は、クレアチニンアッセイおよび尿素アッセイに使用するまで、-20℃で保存した。腎臓を摘出し、全ての結合組織および被膜を除去し、電子天秤（Mettler、Toledo）上で秤量した。腎臓サンプルは、10%のホルマリン溶液（Sigma Aldrich、France）中で、24～72時間、特に、48時間にわたり固定し、次いで、パラフィン中に包埋した。1ブロック当たり、3つの切片（3～5μm）を作製した。スライドは、形態学的変化の組織学的評価、糸球体硬化症および間質性線維症の定量化のために、それぞれ、ヘマトキシリン／エオシン（HE：hematoxylin/eosin）、PAS－メテナミン銀、およびSirius Redで染色した。全てのスライドは、浜松ホトニクス株式会社（日本）製のNanozoomer 2.0 HTを使用して、20倍でデジタル化した。組織学的調製およびイメージングは、Histalim（Montpellier、France）により実施した。血漿中クレアチニンおよび血漿中尿素は、Phenotypage platform of Genotoul（Rangueil Hospital、Toulouse、France）によるABX Pentra 400 Clinical Chemistry analyzer（HORIBA）を使用して定量化した。

#### 【0413】

結果は、組織病理学専門医の評価に従う半定量的スコアリングにより表す。糸球体硬化症を組織学的に検査するために、参照により本明細書に組み込まれる、Nakajima, T.、Kanozawa, K. およびMitarai, T.（2010年）.

Effects of edaravone against glomerular injury in rats with chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. J Saitama medical university、37巻（1号）により記載される通りに、半定量的スコアリングシステムを使用して、糸球体の変化を評価した。略述すると、糸球体傷害の程度は、腎切片1つ当たりの糸球体25個ずつ（動物1匹当たりの切片2つずつ）において、動物1匹当たりの糸球体の合計50個について評価した。個々の糸球体における傷害の程度は、糸球体の罹患百分率に基づき、0～4のスケール：

スコア0：正常、

スコア1：25%までの糸球体における病変、

スコア2：25～50%の間の糸球体における病変、

スコア3：50～75%の間の糸球体における病変、および

スコア4：75～100%の間の糸球体における病変

を使用してグレード付けした。

#### 【0414】

全てのデータは、平均値±平均の標準誤差（s.e.m.：standard error of the mean）として計算した。統計学的解析は、GraphPad Prism、version 4（GraphPad Software Inc.、LaJolla、USA）を使用して実施した。体重の結果についての全ての群の比較は、二元ANOVAの後で、Bonferroni事後検定を使用して実施した。群1（生理食塩液／生理食塩液）と群2（PAN／生理食塩液）との間の比較は、対応のないスチュ

ーデントの t 検定を使用して実施した。ビヒクルの効果と X G - 1 0 2 の効果とは、一元 A N O V A の後で、ニューマン-コイルス検定を使用して比較した。P < 0 . 0 5 の値を、統計学的有意性として許容した。群 2 ( P A N / ビヒクル) と群 6 ( P A N / X G - 1 0 2 : 4 m g / k g の 4 回にわたる i v ) との間の比較は、対応のないスチューデントの t 検定を使用して実施した。

#### 【0415】

糸球体硬化症による傷害の結果を、図 5 2 に示す。本試験の主要な目的の 1 つは、糸球体硬化症による傷害を、ラットにおけるピューロマイシンアミノヌクレオシド注射の反復により誘発された、巣状分節状糸球体硬化症 ( F S G S ) の、十分に確立されたモデルにおいて評価することであった。結果は、X G - 1 0 2 の 7 回にわたる i v 注射が、P A N 誘発性糸球体硬化症を、用量依存的に、有意に軽減することを示した。しかし、1 m g / k g の用量では、この病理学的特徴に対して効果を有さなかった。4 m g / k g の用量で、2 1 日目から始める、X G - 1 0 2 の、4 回にわたる i v 注射は、P A N により誘発された糸球体硬化症の軽減における、X G - 1 0 2 の強力な効果をもたらした ( 図 5 2 ) 。

#### 【0416】

糸球体損傷の結果を、図 5 3 に示す。本試験の主要な目的の 1 つは、X G - 1 0 2 の、ラットにおける P A N 注射の反復により誘発された糸球体損傷に対する効果を評価することであった。結果は、( i ) 2 および 4 m g / k g の用量で 7 回にわたる i v 注射が、病変の重症度 ( 糸球体傷害スコア ) に関して、P A N 誘発性糸球体硬化症を有意に軽減したが、また、糸球体損傷の発生率 ( 傷害を受けた糸球体の百分率 ) も有意に減少させたという点で、X G - 1 0 2 は、予防効果を有し、( i i ) P A N 投与後において、4 m g / k g の用量で、2 1 日目から始める、X G - 1 0 2 の、4 回にわたる i v 注射が、病変の重症度 ( 糸球体傷害スコア ) および糸球体損傷の発生率 ( 傷害を受けた糸球体の百分率 ) のいずれに関しても、糸球体硬化症に対する強力な効果をもたらすという点で、X G - 1 0 2 は、治癒効果も有することを示した。

#### 【0417】

##### ( 実施例 2 1 )

糖尿病性腎症のラットモデルにおける、X G - 1 0 2 の長期投与の効果

本試験の目的は、J N K 阻害剤ペプチドである X G - 1 0 2 の長期投与 ( 毎週 1 、 2 、 4 m g / k g ずつ、9 週間にわたる静脈内投与 ) の効果を、糖尿病性腎症のラットモデルにおいて評価することであった。ロサルタンを、陽性コントロールとして使用した。

#### 【0418】

C h a r l e s R i v e r ( M a r g a t e , K e n t ) 製の、雄 S p r a g u e - D a w l e y ラット 7 4 匹 ( 2 0 0 ~ 2 5 0 g ; 4 匹の控え動物を含む ) を使用した。ラットは、ポリプロピレンケージ内で、常時、高脂肪食餌 ( k c a l の 6 0 % が脂肪に由来する、D 1 2 4 9 2 ) および水道水を自由に摂取させて、2 匹 1 組で収容した。食餌は、R e s e a r c h D i e t s , N e w J e r s e y , U S A から購入した。全ての動物は、2 1 ± 4 ° C および 5 5 ± 2 0 % の湿度、通常の光 ( 点灯 : 0 7 : 0 0 ~ 1 9 : 0 0 ) で維持した。

#### 【0419】

試験スケジュールを、図 5 4 に示す。動物は、試験を通して、2 匹 1 組で収容した。3 週間にわたり、この期間中、動物は毎週秤量するが、食餌および水は、3 週目 ( すなわち、月曜日および木曜日における S T Z 投与の前の週 ) の間に 2 回のみ秤量する。飼育の 3 週目の間に、携帯型グルコースメーター ( O n e T o u c h U l t r a 2 ) を使用して、血液サンプルを、食餌自由摂取状態の外側尾静脈から採取した。血液サンプリングは、9 : 0 0 頃に開始した。

#### 【0420】

試験のサイズのために、動物は、7 2 時間ずらした、2 つの別個のコホート ( 可能な限りにおいて、2 匹 1 組の収容のために、各コホートの n = 4 または 6 ) として実施した ( 図 5 4 を参照されたい ) 。約 4 0 匹の動物を、コホート A へと割り当て、残りの 3 0 匹を

、コホート B へと割り当て、可能な限りにおいて、体重、血漿中グルコース、ならびに食餌および水の摂取について均衡させた。糖尿病を誘発するため、ストレプトゾトシン（STZ：streptozotocin）を使用した。STZ を投与された動物の糖尿病の表現型は、STZ のパッチに大きく依存するので、最適の STZ 用量（35 または 45 mg/kg；ip）を確認するために、パイロット試験を行った。図 54 に詳しく示す通り、動物に、約 3 週間にわたり給餌を維持した後、STZ またはビヒクルを施した。控えの動物にも、STZ を投与する（コホート 1 つ当たりの動物 1 組）。

【表 10】

| 群   | 投与(ip)                  | コホート A | コホート B |
|-----|-------------------------|--------|--------|
| A   | ビヒクル0.05M クエン酸 pH4.5 ip | 4      | 6      |
| B~G | STZ(パイロットから選択された) ip    | 36     | 24     |

10

## 【0421】

各組の動物には、同じ処置または処置を施した（すなわち、2 匹ともビヒクルで処置するか、または 2 匹とも STZ で処置する）。STZ 投与後 7 日間にわたり、動物を毎日秤量し、食餌および水の摂取を毎週 2 回ずつ決定した。残りの試験期間にわたり、動物を秤量し、水および食餌の摂取を毎週 2 回ずつ評価した（常に、静脈内投与の当日において評価し、典型的には、水の補充日に評価した）。その後、下記で詳述される通り、投与レジメンの差異に照らして、STZ 後における、体重ならびに入手可能な食餌および水の摂取に基づき、動物を、群 B ~ F に割り付けた。

20

【表 11】

| 群   | 投与(ip) | コホート A | コホート B |
|-----|--------|--------|--------|
| B-E | IV投与   | 24     | 16     |
| F-G | PO投与   | 12     | 8      |

## 【0422】

STZ 処置（またはビヒクル処置）の 1 週間後において、グルコメーター（One Touch Ultra 2）を使用して、血液サンプルを、食餌自由摂取状態の外側尾静脈から採取した（血液サンプルの採取は、9：00 頃に開始した）。その後、群 A ~ E 内の動物に、静脈内経路により、ビヒクルを投与し、群 F ~ G 内の動物に、経口経路により、1% のメチルセルロースを投与した。群 F ~ G 内の動物には、各日 9：00 頃に開始して、毎日 1 回ずつの投与を継続した。動物を投与の前に秤量した（この体重を記録した）。食餌および水も、静脈内群（A ~ E）と同日に限り記録した。

30

## 【0423】

このベースライン期を、1 週間にわたり持続させた。週末に、血中グルコース、入手可能な体重ならびに食餌および水の摂取データに基づき、動物を、薬物処置へと割り付けた。割付けは、下記の表に詳述した。

40

【表 1 2】

| 群 | 群                     | STZ | コホート<br>A | コホート<br>B | 総例数  |
|---|-----------------------|-----|-----------|-----------|------|
| A | ビヒクル(生理食塩液):STZを伴わない  | なし  | 4         | 6         | 9~10 |
| B | ビヒクル(生理食塩液:毎週のiv)     | STZ | 6         | 4         | 9~10 |
| C | XG-102(1mg/kg:毎週のiv)  | STZ | 6         | 4         | 9~10 |
| D | XG-102(2mg/kg:毎週のiv)) | STZ | 6         | 4         | 9~10 |
| E | XG-102(4mg/kg:毎週のiv)  | STZ | 6         | 4         | 9~10 |
| F | ビヒクル(メチルセルロース:毎日のpo)  | STZ | 6         | 4         | 9~10 |
| G | ロサルタン(25mg/kg:毎日のpo)  | STZ | 6         | 4         | 9~10 |

10

## 【0 4 2 4】

投与は、9週間にわたり持続させた（合計9回の投与、図54を参照されたい）。群FおよびG内の動物を秤量し、毎日9:00頃に投与した。群A～E内の動物には、1週間に1回ずつ、静脈内経路により投与した（図54で詳述する通り）。全ての群において、食餌および水の摂取を、毎週2回ずつ決定した（iv投与の当日および水の補充日において）。血中グルコースは、毎月決定した。サンプルは、既に詳述した通り、グルコメーター（One Touch Ultra 2）により回収した。血液サンプルは、食餌自由摂取状態において採取した（9:00頃に開始して）。動物には、その直後に、それぞれの経路により、定時のスケジュールに従い投与した。投与の後、各動物を、24時間にわたり、食餌および水を自由に摂取させる代謝ケージに入れた。蒸発を低減するため、ガラス製採尿器を、氷で満たしたポリスチレン容器（Scanonline、UK）に入れた。STZにより、毎日の尿容量の増加が予測されたため、尿を、ある間隔を置いて（例えば、8時間ごと）回収して（そして、冷凍保存して）、各代謝ケージについて、24時間にわたる総尿容量を記録しうることを確認した。動物1匹当たり単一の24時間サンプルが回収されるように、各時点におけるアリコートプールした。プールした24時間尿から300μlずつ10のアリコートを採取し、-80℃で凍結させた。COBAS C111および関連の試薬を使用して、尿サンプルについて、クレアチニン、グルコース、尿素、総蛋白質、および電解質（Na、K、Cl、およびCa）を決定した（全ての尿被検体について、n=2）。尿回収セッションのために、ケージに入れるときおよびケージから取り出すときに、ラットを秤量した。また、摂取された食餌および飲まれた水も計算した。血中グルコースおよび尿パラメータ（クレアチニン、グルコース、尿素、総蛋白質、および電解質）はまた、既に記載した通り（図54を参照されたい）、さらに1カ月間にわたる投与の後でも決定した。

20

30

## 【0 4 2 5】

処置の8週目（図54を参照されたい）の間に、FITC-インスリン法を使用して、動物の糸球体濾過量（GFR: glomerular filtration rate）を評価した。これは、参照により本明細書に組み込まれる、Stridh, S., Sallstrom, J. ら（2009年）: 「C-Peptide Normalizes Glomerular Filtration Rate in Hyperfiltrating Conscious Diabetic Rats」 Oxygen Transport to tissue XXX. Advances in experimental medical and biology. 645巻: 219~25頁による方法に基づき実施した。具体的には、FITC-インスリン（1.5%）を、生理食塩液中に溶解させ、0.45μmのシリンジフィルターを介して濾過した。残留遊離FITCを除去するために、1000Daのカットオフ透析膜（Spectra Por 6、Fisher、UK製）を使用して、溶液を、光から保護して生理食塩液2000ml中4℃で一晩にわたり透析した。透析されたインスリンを、使用前に、0

40

50

． 22  $\mu\text{m}$  のシリジフィルターを介して濾過した。各動物に、1 ml (15 mg) の FITC-イヌリンを、尾静脈を介して投与した（すなわち、静脈内）。投与の 2、5、9、15、24、35、55、80 分後において、血液サンプル (80  $\mu\text{l}$ ) を、リチウムヘパリン回収試験管 (Sarstedt CB300 LH) へと採取した。各血液サンプルを、冷却された遠心分離器内で遠心分離にかけ、後続の、496 nm の励起および 520 nm の発光における蛍光の決定のために、血漿サンプルを、清浄なアリコートバイアルへと分注した。

#### 【0426】

終了時において、動物ならびに食餌および水を秤量した。次いで、動物を死なせ、終了時における血液サンプル (EDTA でコーティングされた試験管内に約 4.5 mL) を、心穿刺により採取した。血液サンプルを、冷却された遠心分離器内でスピンド、アリコート (0.5 mL ずつのアリコート 5 つ) 凍結保存した ( $-80^{\circ}\text{C}$ )。剖検時において、左右の腎臓を摘出し、秤量した。各腎臓を、矢状に二等分に切断し、10% の中性緩衝ホルマリンのポットに入れ、約 5 日間にわたり固定した。次いで、腎臓を、蠟中包埋し、各腎臓に由来する半分を、各カセットに入れて、後続の処理のための 1 つの蠟ブロック（すなわち、1 ブロックは、右腎の半分および左腎の半分の伴う）を作製し、残りの腎臓の半分は処分した。蠟ブロックでは、全ての組織は、Tissue Tek VIP プロセッサ（脱水のための段階希釈されたアルコールおよび清浄剤としてのキシレンを使用する）を使用して調製した。次いで、ブロックに、パラフィン histowax を含浸させてから、新鮮な histowax 中に包埋した。腎臓組織を、約 4~5  $\mu\text{m}$  で切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E: Haematoxylin and Eosin) および過ヨウ素酸シッフ (PAS) のための方法を使用して染色した。その後、スライドを、病理学者による評価のために送付する（例えば、Harlan Laboratories Ltd. UK へと）。病理学者は、H&E および PAS で染色された全てのスライドを、糸球体硬化症、尿細管萎縮、および間質拡大について、「+、++、+++」システム（または同様のシステム）を使用して、半定量的に評価した。

#### 【0427】

XG-102 は、市販の滅菌生理食塩液中に 1 ml/kg の容量で投与した。この目的で、初回投与の前に、滅菌生理食塩液を添加することにより、XG-102 を調合し、これにより、最大用量 (4 mg/ml) を調合し、低用量は、この 4 mg/ml の原液を希釈することにより調製した。次いで、各投与セッションのためのアリコートを調製し、使用まで凍結保存した ( $-80^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 3 カ月間にわたり安定である)。投与日の朝、各アリコートを、冷凍庫から取り出し、投与の前に室温で解凍した（例えば、30 分間にわたり）。解凍した溶液は、投与の前に、反転により混合した。全ての投与は、解凍の後、可能な限り速やかに完了させたが、試験物質は、室温の生理食塩液中、10  $\mu\text{g/ml}$  ~ 50 mg/ml の濃度では、8 時間にわたり安定であるので、いずれの場合も、8 時間以内に完了させた。滅菌ポリプロピレンプラスチック（ピペットチップを含む）を使用した。原液は、使用の前および低用量への希釈の前に、濾過滅菌 (0.2  $\mu\text{m}$ ) する。ロサルタンカリウムは、化学物質供給元（例えば、Tocris UK）から購入し、毎朝の投与のために、1% のメチルセルロースのビヒクル中、5 ml/kg の容量で調製した。適切な場合は、投与係数 (dosing factor) を適用した。

#### 【0428】

試験の終了時において、体重ならびに食餌ボトルおよび水ボトルの重量を解析した。結果は、体重、最初の 4 週間については 1 週間当たりの体重の変化、およびそれ以後は 4 週間当たりの体重の変化、および薬物投与期間の全体にわたる体重の変化、試験の終了時における体重の低減%、ならびにコントロール群と比較した薬物処置、食餌および水の摂取量、累積食餌摂取量、ならびに最初の 4 週間については、1 週間当たりの平均食餌摂取量および平均水摂取量、ならびにそれ以後は 4 週間当たりの平均食餌摂取量および平均水摂取量、ならびに給餌試験の持続期間にわたる平均食餌消費量および平均水消費量として表した。異なる処置の、体重および食餌、累積食餌摂取および累積水摂取に対する効果は、

処置およびコホートを因子とし、ベースライン（1日目の体重、または-6～0日目における平均食餌摂取量もしくは平均水摂取量）を共変量とする二元共分散分析の後で、各群を、適切なS T Zビヒクル群と比較する、適切な多重比較検定（両側）により解析した。血中グルコースは、処置およびコホートを因子とし、ベースラインの体重、採血順序、および試験前の血漿レベルを共変量とする一般線形モデルにより解析した。適切な変換および／または頑健な回帰法を使用して、異常値の影響を低減することができる。適切な多重比較検定（両側）を使用して、各群を、適切なS T Zビヒクル群と比較した。尿中のクレアチニン、グルコース、尿素、総蛋白質、および電解質は、処置群平均値±S E Mとして表した。解析は、処置およびコホートを因子とする一般線形モデルによった。適切な変換および／または頑健な回帰法を使用して、異常値の影響を低減することができる。適切な多重比較検定（両側）を使用して、各群を、適切なS T Zビヒクル群と比較した。腎臓重量は、処置およびコホートを因子とし、1日目の体重を共変量とする一般線形モデルにより解析した。体重の変化により引き起こされた効果に加えた効果を決定するため、解析は、処置およびコホートを因子とし、終了時における体重を共変量とする一般線形モデルによった。適切な場合は、対数変換および／または頑健な回帰法を使用した。適切な多重比較法を使用して、各群を、適切なS T Zビヒクル群と比較した。病理学評価のために、各処置を、正確ウィルコクソンランクサム検定により、適切なS T Zビヒクル群と比較した。

10

#### 【0429】

G F Rは、F I T C イヌリンの用量／A U C<sub>0-∞</sub>として計算した。A U C（F I T C イヌリン濃度の）は、2～5分線を0分へと外挿する対数線形台形規則（S t r i d h）、および24～80分の終末相の間の対数変換データの線形回帰により計算した。計算されたG F R値は、処置およびコホートを因子とする二元分散分析により解析した。適切な場合は、対数変換および／または頑健な回帰法を使用した。

20

#### 【0430】

ベースライン週の間の、異なる経路による投与は、共変量として使用されるベースライン値に影響を及ぼしうるので、G F Rを除く全ての解析において、i v投与された動物は、p o投与された動物と別個に解析した。非S T Z群は、上記で記載した全ての解析から除外した。解析内の全ての群を含む、非S T Z群との比較のためには、別個の解析を実施したが、投与前の週の間の共変量ではなく、S T Zによる処置の前のベースライン共変量を使用した。全ての解析において、0.05未満のp値を、統計学的に有意と考える。

30

#### 【0431】

この糖尿病性腎症のラットモデルにおける、X G-102の、ラットの体重に対する長期投与の効果を、図55に示す。S T Z非処置ラットのみが、体重の増加を示した。X G-102で処置されたラットは、S T Zモデルにおいて、ビヒクルで処置されたラットと比較して、体重の差異を示さなかった。しかし、陽性基準物質であるロサルタンで処置されたラットの体重は、有意に低値であった。これらの結果は、X G-102が、十分に忍容されるが、陽性基準物質であるロサルタンが、体重の有意な減少をもたらしたことを示す。

#### 【0432】

40

##### （実施例22）

膵島単離／膵島移植における、X G-102に対する用量反応関係の評価

本試験は、膵島単離についての先行試験（実施例17を参照されたい）およびN o g u c h iらによる刊行物（N o g u c h i, H., S. M a t s u m o t oら（2009年）. 「D u c t a l i n j e c t i o n o f J N K i n h i b i t o r s b e f o r e p a n c r e a s p r e s e r v a t i o n p r e v e n t s i s l e t a p o p t o s i s a n d i m p r o v e s i s l e t g r a f t f u n c t i o n .」 H u m G e n e T h e r 20巻（1号）： 73～85頁）に基づく。これらの試験は、ブタ膵島単離モデルにおいて、膵島が、膵島単離手順の開始20分後までに始まる、劇的なJ N Kの活性化を経ることを示した。この活性化は、既

50

に脆弱な組織に対して、温阻血、酵素による消化、および機械的応力を組み合わせる方法の結果である。実施例 17 の試験は、調達時においてブタ膵臓へと流し入れる保存溶液への XG-102 ( $10 \mu\text{M}$ ) の血管内添加が、酸素消費速度 (OCR: oxygen consumption rate) および ATP 濃度により評価される、膵島細胞の生存率および機能性に対して有意な影響を有し、JNK の活性化および c-fos 遺伝子の発現の低下と相関することを示した。Noguchi らは、異なる阻害剤を使用し、これを、同じモル濃度で、調達の直後に、膵管へと添加した。ブタ膵臓およびヒト膵臓が使用された。Noguchi らは、ATP 濃度により評価される膵島の生存率に対して同様の効果を示したが、また、糖尿病マウスの腎被膜下の移植後における糖尿病の逆転に対するインビボの影響も示した。本実験セットの目的は、XG-102 の用量反応関係曲線および膵島単離において使用するための最適濃度を決定することであった。この問いに答えるために、齧歯動物モデルを活用した。ヒト膵臓および膵島と、齧歯動物の膵臓および膵島との差異を認めながらも、その単純さと費用効果の高さのために、このモデルを選択した。これらの実験の目的は、必要とされる XG-102 の最適用量の決定に限られるので、ラットモデルは、妥当であるようである。主要な目的は、臨床における同種膵島細胞移植の転帰を改善するための、ヒト膵臓における JNK 阻害であるので、これらの実験では、阻害剤の膵管内注射を行った。これは、実際、化合物が臨床状況で使用される、最も可能性の高い方式である。

10

#### 【0433】

単離後における、ラット膵島における JNK の活性化を評価するため、コラゲナーゼを使用する古典的な酵素法により、ランゲルハンス島を、Lewis ラットから単離した。単離は、動物屠殺直後または 15 分間にわたる温阻血後のいずれかで実行した。JNK の活性化は、単離工程の終了時において、ウェスタンブロットにより評価した。JNK の活性化を、陰性コントロールとしての、未処理のラット膵臓において評価した。実験は、阻血の各状態のための 3 匹ずつのラットに加えて、陰性コントロールのための 1 匹のラットに対しても行い、3 回にわたり反復した。これは、のべ 21 匹の Lewis ラットを表す。図 56 に示される結果は、XG-102 が、JNK (図 56A) および PAF2 (図 56B) の、15 分間の阻血により誘導されるリン酸化を、用量依存的に減少させたことを示す。

20

#### 【0434】

XG-102 の、膵島の生存率に対する効果を試験するため、阻血の持続時間 (温阻血なし対 15 分間にわたる温阻血) についての最良のモデル、すなわち、JNK 阻害後の差異を示す可能性が最も高いモデルを、かつての実験の結果に基づき選択した。単離は、コラゲナーゼ溶液中で希釈された、定められた濃度の XG-102 またはビヒクルを使用して実行し、酵素により膵臓を消化する前に、膵管へと注射した。活用される多様な洗浄溶液または精製溶液および培養培地において、単離手順全体にわたって、同じモル濃度の XG-102 またはビヒクルを使用した。単離膵島は、RPMI ベースの培養培地中で、一晚にわたり培養した。各実験セットのために、以下の XG-102 濃度:  $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、および  $100 \mu\text{M}$  を活用した。各濃度のための各群では、3 匹ずつの動物を活用し、実験は、結果に応じて、2~3 回にわたり反復した。これは、のべ 60~90 匹の Lewis ラットを表す。膵島収量を決定した。以下の膵島生存率の評価: JNK の活性化、OCR、ATP 濃度、カスパーゼ放出などを実施した。

30

40

#### 【0435】

XG-102 の、インビボにおける膵島機能に対する効果を試験するため、インビボにおける膵島機能に対する JNK 阻害の効果を評価するための補完的な単離を行った。上記で詳述したインビトロ実験において最も有効な XG-102 のモル濃度またはビヒクルを使用して単離された膵島のみを用いて、インビボ実験を行った。膵島の単離は、上記の通りに実施した。各単離につき、1000~2000 IEQ ずつを、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病の免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。糖尿病を逆転する動物の比率および糖尿病の逆転に必要な時間を、XG-102 で処置された膵島を移植された動物、または

50

コントロールの膵島を移植された動物の間に比較した。移植は、3回にわたり反復した。必要とされる動物の数は、約30匹のLewisラットおよび24匹のNOD-scidマウスである。

#### 【0436】

図57に示される通り、XG-102の、ラット膵島の機能および生存率に対する効果を試験するために、膵島を、15分間の阻血ラットおよび非阻血ラットから単離した。静的インスリン分泌試験（基礎分泌またはグルコースを使用して刺激された分泌）を、膵島単離の直後および37℃における培養の18時間後に実施した。単離は、膵島機能に影響を及ぼすことを観察することができる。実際、基礎インスリン分泌は、いずれの条件でも、単離の直後に使用された膵島において、18時間にわたりインキュベートされた膵島と比較して高度であった。これらの基礎レベルの高さは、膵島の窮迫を反映する。しかし、培養後において、阻血および阻害剤XG-102は、この実験における膵島機能に対して影響を及ぼさなかった。

#### 【0437】

かつての実験で、15分間の阻血ラットに由来する膵島が、グルコースに応答して、コントロールラットに由来する膵島と同量のインスリンを分泌することが示されたため、阻血を30分間まで伸ばし、JNK阻害剤XG-102を100マイクロモル濃度で使用する、新たな実験を実施した（図58）。この実験では、インスリン分泌試験を単離の直後に実施した場合の、高度な基礎分泌が、やはり観察される。さらに、30分間の阻血は、膵島機能に対して負の影響を及ぼした。これらの予備的結果は、30分間の阻血が、15分間の阻血より、JNKの活性化を誘導するのにより良好なモデルのようであることを示唆した。阻血ラットに由来する膵島を単離し、XG-102と共にインキュベートしたところ、グルコース誘導性インスリン分泌は、阻血ラットと比較して高度であった（図58）ことから、XG-102の、膵島機能に対する明確な効果が示唆された。

#### 【0438】

（実施例23）

結膜下注射後のラットレーザー誘導性脈絡膜血管新生（CNV）モデルにおける、XG-102（配列番号11）の有効性

本試験の目的は、レーザー誘導性脈絡膜血管新生（CNV：choroidal neovascularization）のモデルにおいて、ラットへの結膜下注射により投与された場合の、JNK阻害剤であるXG-102の有効性を決定することであった。実施例18の文脈で概括した通り、このモデルは、化合物の、加齢黄斑変性（AMD）を処置するための潜在的な使用についての予測を可能とする。結膜下投与経路はヒトにおける投与に好ましい別の経路であるため、実施例18において記載した試験とは対照的に、本試験のためには、結膜下投与経路を選択した。

以下の実験群を割り当てた。

【表13】

| 群番号 | 試験材料1      | 投与レベル(眼1つ当たりのμg) | 投与容量(眼1つ当たりのμL) | 投与濃度       | 動物数 |
|-----|------------|------------------|-----------------|------------|-----|
|     |            |                  |                 |            | 雄   |
| 1   | ビヒクルコントロール | 0                | 5               | 0 mg/mL    | 8   |
| 2   | XG-102     | 0.15             | 5               | 0.03 mg/mL | 8   |
| 3   | XG-102     | 1.5              | 5               | 0.3 mg/mL  | 8   |
| 4   | XG-102     | 15               | 5               | 3 mg/mL    | 8   |
| 5   | 基準物質2      | 200              | 5               | 4%         | 8   |

#### 【0439】

ビヒクルコントロールである0.9%のNaClは、受領された通りの状態で投与した

。4%のトリウムシノロンアセトニドは、「基準物質2」として用い、これもまた、受領された通りの状態で投与した。XG-102を調製するために、最大投与レベルと同等の原液を、ビヒクルである、注射用0.9%塩化ナトリウム中で調製し、0.22  $\mu\text{m}$ のポリビニリデンジフルオリド(PVDF)フィルターにより滅菌濾過した。より低い投与レベルは、原液を直接希釈することにより調製した。投与製剤(dose formulation)は、投与量レベルの要件を満たすのに適切な濃度で、一度に調製した。全ての希釈液は、原液をビヒクルで直接希釈することにより調製した。2つの投与アリコート(1および8日目)を調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$ を維持するように設定された冷凍庫内で保存した。各投与レベルのアリコートを、各投与日において、周囲温度で解凍し、溶液を、最長6時間にわたり、室温で維持した。

10

#### 【0440】

雄Brown Norwayラット(Charles River; 10週齢) 44匹を使用した。動物を実験室環境へと順応させるために、動物の受領と処置の開始との間に、14日間にわたる最小限の馴化期間を与えた。動物を、同様の群平均体重を達成するようにデザインされた、層別化した無作為化スキームにより、群へと割り当てた。健康状態が悪い、または体重範囲の両端の動物は、群へと割り当てなかった。投与の開始前において、試験における使用に適さないと考えられた任意の割り当てられた動物は、同じ配送物から得られ、同じ環境条件下で維持された代替動物で置きかえた。投与の開始後も、万一、偶発的傷害、試験品目以外と関連する健康問題、または類似の状況の場合は、試験動物を、置きかえ期間の間に、代替動物で置きかえた。代替動物は、3日以内に、試験における置きかえとして使用した。到着したら、無作為化するまで、動物を個別に収容した。無作為化後、動物は、自動式の給水弁を備えた、ステンレス鋼製で、床に穿孔を施したケージ内で、群として収容した(同じ投与群の動物3匹までを一緒にして)。動物は、指定の手順/活動の間に分離した。PMI Nutrition International Certified Rodent Chow No. 5CR4(14%の蛋白質)を、指定の手順の間を除き、試験を通して、自由に提供した。逆浸透および紫外線照射による処理後における都市水道水は、自動式給水システムを介して、各動物に自由に摂取可能とした(指定の手順の間を除く)。動物は、試験手順/活動の間を除き、心的/環境的充実のために集団で収容し、身を隠すチューブおよび噛む対象などの品目を施された。

20

#### 【0441】

試験の1日目には、レーザー誘導性脈絡膜血管新生(CNV)手順を実施した。CNV手順の前に、散瞳点眼剤(1%のトロピカミド)を、両眼に適用した。さらなる適用は、獣医眼科専門医により適切と考えられる場合に実施した。動物には、手順の前および手順中において、イソフルラン/酸素ミックスで麻酔をかけた。麻酔下において、初期の電力設定を300 mW(気泡形成のためには、レーザー出力を増加させることができる)、初期スポットサイズを80  $\mu\text{m}$ 、および持続時間を0.1秒間とする、810 nmのダイオードレーザーを使用して、各眼の視神経乳頭周囲の主要な網膜血管の間に、4スポットのパターンを作製した。レーザーパラメータは、ブルッフ膜の破断(気泡形成と関連する)を確認するように、必要に応じて調整した。万一、特定のスポットについてブルッフ膜の破断が確認されない場合は、これを記録した。この場合または出血の場合であって、獣医眼科専門医により適切と考えられる場合は、さらなるスポットを追加することができる。網膜出血など、いかなる著明な事象も、各レーザースポットについて記録した。出血が重度に過ぎる場合は、動物を、試験から除外し、取り替えた。眼の保水は、必要に応じて、手順の間に、生理食塩液および/または1.0%のカルボキシメチルセルロースナトリウムで維持した。

30

40

#### 【0442】

ビヒクルコントロール物質、試験物質、または基準物質は、上記の実験デザインで示される通り、1および8日目に、結膜下注射により、各動物の左眼および右眼へと投与する。委員会により認定された獣医眼科専門医により実施される用量投与のために、動物に麻酔をかけた(イソフルラン)。局所抗生剤(ゲンタマイシンの眼科用溶液)を、両眼へと

50

、処置の前日において2回、注射後において2回、および注射の翌日において少なくとも1回適用した。投与の前に、散瞳点眼剤（1%のトロピカミドおよび／または2.5%のフェニレフリン）を、各眼へと適用した（さらなる適用は、獣医眼科専門医により適切と考えられる場合に実施することができる）。投与中は、動物を、イソフルラン／酸素ガスによる麻酔下で維持する。結膜は、USPの注射用0.9%塩化ナトリウムで洗った。0.5ccのTerumoインスリン用シリンジへと取り付けた、29ゲージ、2分の1インチの注射針を、各回の結膜下注射（処置1回当たりの群ごとシリンジ1本）のために使用した。1および8日目に、XG-102、ビヒクルコントロール、または基準物質を、各動物の眼へと、眼1つ当たりの投与容量50μLで投与した。いずれの眼も、各処置の直後に検査して、投与手順により引き起こされるいかなる異常も記録した。

10

#### 【0443】

下記に列挙される、生存中の手順、観察、および測定を実施した。適切と考えられる場合は、より高頻度の観察に着手することができる。午前1回および午後1回の毎日2回にわたり、試験を通して、「死亡／瀕死点検」を実施し、これにより、動物を、全般的健康／死亡および瀕死について観察した。可能な所見の同定または確認に必要でない限り、観察の間に動物をケージから取り出さなかった。－1週目に始めて、毎日1回ずつ「ケージサイド観察」を実施し、これにより、可能な所見の同定または確認に必要でない限り、観察の間に動物をケージから取り出さなかった。－1週目に始めて、毎週「詳細な臨床観察」を実施し、これにより、動物を検査のためにケージから取り出した。－2週目に始めて、毎週、健康のモニタリングのみを目的として、「体重」を記録し、これにより、動物を個別に秤量した。処置前期間の最終週の間に始めて、スケジュールされた安楽死の当日を除き、毎週、健康のモニタリングのみを目的として、「食餌消費量」を定量的に測定した。試験前に1回、スクリーニングを目的として「眼検査」を実施し、これにより、全ての動物を、眼底検査（倒像眼底検査）および生体顕微鏡（細隙灯）検査に供した。使用された散瞳剤は、1%のトロピカミドであった。試験前に1回、ならびに1、2、および3週目の終わりに「フルオレセインによる血管造影」を実施し、これにより、散瞳点眼剤（1%のトロピカミド）を、各眼へと、試験の少なくとも10分前に適用した（さらなる適用は、必要と考えられる場合に施行することができる）。眼の保水は、生理食塩液を用いる高頻度の灌流により維持した。動物は、必要に応じて、イソフルラン／酸素ミックス下で、かつ／または鎮静剤カクテル（75mg/kgのケタミン；7.5g/kgのキシラジン）を用いて維持した。血管造影のための基準画像として役立つように、赤外モードおよび／またはレッドフリーモード（red free mode）による単一の眼底画像および／またはART眼底画像を得た。USPの注射用10%フルオレセインナトリウム0.2mlを、急速尾静脈注射を介して（abbothにより）投与した後で、0.5mlの生理食塩液による洗浄を施した。両眼に由来する静止画像も、フルオレセイン注射後の少なくとも2分およびフルオレセイン注射後の5分以内に記録した。評価のために、静止画像上の個別のレーザースポットを、漏出について、2名の独立の読み取り者が0～4のスケールで半定量的に評価した。該読み取り者はその後コンセンサススコアを決定する。

20

30

#### 【0444】

フルオレセインによる血管造影図のスコアリング手順ではまず、「血管造影」画像（JPG画像またはBMP画像）を、HRA2からエクスポートし、CD上または他の適切なメディア上にコピーし、適切なコンピュータ上で精査した。「グレード付け」手順では、グレード付けに適切な焦点レベルで画像を選択した（全てのレーザースポットをグレードづけするために、眼1つ当たり複数の画像を必要とする場合がある）。血管造影図は、2名の科学の専門家が独立にグレード付けし、レーザースポットの各々についてのグレードを記録した。各専門家によるグレード付けの完了後、グレードを比較し、任意の不一致を両者が精査し、グレードについて合意し、記録した。グレード付けスケールは、下記に示される0～4：

40

#### 【0445】

50

0 = 漏出なし（レーザーによる瘢痕またはびまん性の大きな、目視可能な小過蛍光領域に限られる）

【0446】

1 = 最小限の漏出（レーザー誘導性欠損領域内に一般に残存する、びまん性または充実性の小過蛍光領域）

【0447】

2 = 軽度の漏出（レーザー誘導性欠損領域の境界内に一般に残存する、半充実性の過蛍光）

【0448】

3 = 中程度の漏出（レーザー誘導性欠損領域の境界内に一般に残存する、半充実性～充実性の過蛍光）

【0449】

4 = 実質的な漏出（レーザー誘導性欠損領域の境界を越えて拡大する、充実性の過蛍光領域）

である。

【0450】

試験中に動物が死亡するか、またはこれを安楽死させる場合、剖検は行わず、死骸は廃棄した。スケジュールされた安楽死まで生存する動物は、終了時における体重を記録した。動物は、イソフルランによる麻酔の後における、腹部大動脈からの瀉血を受ける。可能な場合、1日（または複数日）を通して、コントロールを含む各群に由来する同様の数の動物が剖検されるように、投与群全体にわたり交替で（rotating）動物を安楽死させた。そうでないことが示されない限り、下記の「組織の回収および保存」表で同定された組織の代表的サンプルを、全ての動物から回収し、10%の中性緩衝ホルマリン中で保存した。

【表14】

| 組織    | 重量 | 回収 | 顕微鏡的評価 | 注釈                                                                                               |
|-------|----|----|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 動物の識別 | -  | X  | -      | -                                                                                                |
| 眼     | -  | X  | -      | 両側;Davidson固定液中で24～48時間にわたり固定し、70%のエタノール中に少なくとも18時間にわたり移し、処理するまで、70%のエタノール中で保存した(安楽死させた動物に限られる)。 |
| 視神経   | -  | X  | -      | 両側;Davidson固定液中で24～48時間にわたり固定し、70%のエタノール中に少なくとも18時間にわたり移し、処理するまで、70%のエタノール中で保存した(安楽死させた動物に限られる)。 |

X = 実行された手順; - = 該当なし

【0451】

試験では、以下の重要なコンピュータ化システムを使用した。

【表 1 5】

| システム名                                                       | 収集および/または解析されたデータについての記載                                                            |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Provantis                                                   | 投与用量、体重、食餌消費量、臨床観察、臨床観察の発生率、臨床生化学、血液学、凝固、尿検査、眼科検査、および巨視的病理学                         |
| Dispense                                                    | 試験物質の受領ならびに/または、試験物質および/もしくはビヒクルおよび/もしくは基準物質（複数可）の説明責任（a c c o u n t a b i l i t y） |
| SRS(SAS により構築された、PCS-MTL 自家製アプリケーション)および Windows 用 SAS システム | 生存中および終末期の数値データの統計学的解析                                                              |
| EyeExplorer を 伴 う 、 Heidelberg HRA 2/Heidelberg Spectralis  | フルオレセインによる血管造影                                                                      |

10

## 【 0 4 5 2 】

平均値および標準偏差は、体重、食餌消費量、およびフルオレセインによる血管造影について計算した。他のデータは、個体ベースで報告した。

## 【 0 4 5 3 】

20

（実施例 2 4）

J N K 阻害剤である X G - 1 0 2 の、ラット歯周炎モデルにおける炎症性応答に対する阻害性効果

本試験の目的は、X G - 1 0 2（配列番号 1 1）の、ラット歯周炎モデルにおいて誘発された炎症に対する影響を調査することである。

## 【 0 4 5 4 】

本試験では、30匹のラットを使用した（4つの群へと10匹ずつのラットを分けた）。実験的歯周炎は、0日目において、第一大臼歯（動物1匹当たり1本の大白歯）の周囲に結紮を施すことにより誘発する。2または4mg/kgの単回投与を歯肉内に（I G V : i n t r a g i n g i v a l l y）施行する。

30

## 【 0 4 5 5 】

下記の表は、無作為割付けをまとめる。

【表 1 6】

| 群番号 | 結紮(0日目) | 処置                 | 投与経路 | 動物数 |
|-----|---------|--------------------|------|-----|
| 1   | -       | -                  | IGV  | 10  |
| 2   | あり      | 0.9%のNaCl          | IGV  | 10  |
| 3   | あり      | XG-102(2または4mg/kg) | IGV  | 10  |

40

## 【 0 4 5 6 】

各日において、全ての動物の全般的挙動および外観を観察する。動物の健康が、試験の継続に適合しない場合（瀕死の動物、異常で重要な体重の喪失、物質の大きな非忍容性など・・・）は、動物を、試験責任者の責任下における倫理的判断により屠殺する。歯周炎の炎症の態様は、歯肉組織の肉眼的観察により解析する。プラーク指数および歯肉炎症指数は、歯周臨床指数として測定する。

## 【 0 4 5 7 】

約17日目において、動物を屠殺し、サンプルを回収する。炎症性細胞を評価するために、組織形態計測により、炎症性細胞の定量化を実施する。炎症性蛋白質レベルを評価す

50

るために、歯肉組織ホモジネートに由来する炎症性蛋白質のレベル（p-JNK、TNF、IL-1、IL-10、MMP-8、MMP-9）を測定する。組織破壊を評価するために、放射線解析（マイクロCT）により、群ごと3匹ずつの動物について、骨組織破壊を評価する。歯周複合体破壊は、組織学的解析により評価する。骨の微細構造を評価するために、骨の小柱測定値（厚さ、間隔）を、放射線解析（マイクロCT）により評価する。口腔内細菌を同定するため、歯周ポケット内の細菌集団を、9つの歯周病原体についてのDNAプローブ（リアルタイムPCR）により同定する。コラーゲンフレームワークについては、偏光顕微鏡法を使用して、総コラーゲン量の測定を実施する。コラーゲンI／コラーゲンIII比は、組織形態計測解析により評価する。

#### 【0458】

（実施例25）

ストレプトゾトシン処置ラットによる糖尿病性網膜症の予防試験における、XG-102（配列番号11）（IVT）の効果

本試験の目的は、ストレプトゾトシン（STZ）で処置された（高血糖性）ラットへと、硝子体内注射により投与された場合の、糖尿病性網膜症を予防するXG-102の能力を決定することであった。

#### 【0459】

試験デザインは、以下の通りであった。

#### 【表17】

| 群番号/識別                | -7日目における<br>STZ(mg/kg) | 1、8、15日目における<br>XG-102の投与レベル(眼1つ当たりのμg) | 投与容量(μL) | 投与濃度(mg/mL) | 動物数 |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------------------|----------|-------------|-----|
|                       |                        |                                         |          |             | 雄   |
| 1/非誘発ビヒクル             | 0                      | 0                                       | 5        | 0           | 3   |
| 2/XG-102(眼1つ当たり0.2μg) | 55                     | 0.2                                     | 5        | 0.04        | 8   |
| 3/XG-102(眼1つ当たり2μg)   | 55                     | 2                                       | 5        | 0.4         | 8   |
| 4/ビヒクル                | 55                     | 0                                       | 5        | 0           | 5   |

#### 【0460】

群2、3、4の全ての動物に、-7日目において、STZ 55mg/kgの静脈内（IV）投与を施した。

#### 【0461】

0.0412gの誘発剤（STZ）を含有する滅菌バイアルを、あらかじめ秤量し、密封し、-7日目において、群2～4の動物および控えの動物へと投与するために、投与室へと移した。空の、適切にラベルを貼った滅菌バイアルの2連セットを用意した。投与のために、再構成されたSTZ溶液を、これらのバイアルへと濾過した。基準物質である0.9%のNaClは、受領された通りの状態で投与した。XG-102は、1.383の補正係数を使用して調製した。最大投与レベルと同等の原液を、ビヒクルである、注射用0.9%塩化ナトリウム中で調製し、0.22μmのポリビニリデンジフルオリド（PVDF）フィルターにより滅菌濾過した。より低い投与レベルは、原液を直接希釈することにより調製した。投与製剤は、投与量レベルの要件を満たすのに適切な濃度で、一度に調製した。全ての希釈液は、原液をビヒクルで直接希釈することにより調製した。3つの投与アリコート（1、8、および15日目）を調製し、-20℃を維持するように設定された冷凍庫内で保存した。各投与レベルのアリコートを、各投与日において、周囲温度で解凍させ、溶液を、最長6時間にわたり、室温で維持した。

#### 【0462】

雄 Brown Norway ラット 60 匹は、Charles River Labs, Inc.、Portage, Il から受領した。動物は、約 8 週齢であり、166～228 g の間の重量があった。Brown Norway ラットは、STZ 誘発性糖尿病性網膜症モデルにおける使用に許容された種であるので、本試験のための動物モデルとして選択した。本試験で使用される動物の総数は、試験物質の効果を適正に特徴付けるのに必要とされる最小限の数であると考えられた。本試験は、その目的を達成するのに不必要な数の動物を必要としないようにデザインした。動物を実験室環境へと順応させるために、動物の受領と処置の開始との間に、20 日間にわたる最小限の馴化期間を与えた。動物を、同様の群平均体重を達成するようにデザインされた、層別化された無作為化スキームにより、群へと割り当てた。健康状態が悪い、または体重範囲の両端の動物は、群へと割り当てなかった。投与の開始前において、試験における使用に適さないと考えられた任意の割り当てられた動物は、同じ配送物から得られ、同じ環境条件下で維持された代替動物で置きかえた。代替動物は、開始 3 日以内に、試験における置きかえとして使用した。到着したら、無作為化するまで、動物を個別に収容した。無作為化後、動物は、自動式の給水弁を備えた、ステンレス鋼製で、床に穿孔を施したケージ内で、群として収容した（同じ投与群の動物 3 匹までを一緒にして）。動物を保持する部屋は、試験記録に記録した。動物は、指定の手順／活動の間に分離した。30%～70%の相対湿度を伴う、19℃～25℃の温度を維持した。指定の手順で中断される場合を除き、12 時間にわたる明／12 時間にわたる暗周期を維持した。PMI Nutrition International Certified Rodent Chow No. 5CR4（14%の蛋白質）を、指定の手順の間を除き、試験を通して、自由に提供した。逆浸透および紫外線照射による処理後における都市水道水は、自動式給水システムを介して、各動物に自由に摂取可能とした（指定の手順の間を除く）。動物は、試験手順／活動により中断される場合を除き、心的／環境的充実のために集団で収容し、身を隠すデバイスおよび噛む対象などの品目を施された。

10

20

#### 【0463】

誘発剤を投与する（群 2～4、－7 日目）ために、動物（控えの動物を含む）1 匹当たり 1 バイアルの STZ を、注射の 3 分以内に、27.5 mg/mL の濃度をもたらすように、1.5 mL の USP の注射用滅菌水で再構成した。バイアルを反転または回転させて、STZ を溶解させた。結果として得られる溶液を、0.22 μm の Millex-GV フィルターを介して、適切に表示された空の滅菌バイアルへと濾過した。STZ（55 mg/kg）は、－7 日目において、処方 3 分以内に、シリンジを介して、静脈内注射により投与した。投与容量は、2 mL/kg であり、実際の用量投与は、各動物の最近の実際の体重に基づいた。注射の間は、動物を動かないようにした。

30

#### 【0464】

「実験デザイン」表で示される通り、1、8、および 15 日目において、試験物質または基準物質を、硝子体内注射により、各動物の左眼および右眼へと投与した。委員会により認定された獣医眼科専門医により実施される用量投与のために、動物に麻酔をかけた（イソフルラン）。局所抗生剤（ゲンタマイシンの眼科用溶液）を、両眼に、処置の前日において 2 回、注射後において 2 回、および注射の翌日において少なくとも 1 回適用した。投与の前に、散瞳点眼剤（1%のトロピカミドおよび／または 2.5%のフェニレフリン）を、各眼に適用した（獣医眼科専門医により適切と考えられる場合は、さらなる適用を実施した）。投与中は、動物を、イソフルラン／酸素ガスによる麻酔下で維持した。結膜は、USP の注射用 0.9%塩化ナトリウムで洗浄した。32 ゲージ、2 分の 1 インチの注射針を伴う、10 μL の Hamilton シリンジを、各回の硝子体内注射のために使用した（処置 1 回当たりの群ごとシリンジ 1 本）。投与容量は、眼 1 つ当たり 5 μL であった。各処置の直後に、両眼を、細隙灯生体顕微鏡法および／または倒像眼底検査で検査して、投与手順により引き起こされる、いかなる異常（とりわけ、水晶体、硝子体、および網膜に対する）も記録した。角膜混濁は、麻酔を含む実験手順に続発すると考えられた。これらの混濁の一部はまた、角膜血管形成とも関連した。他の眼所見も記載されたが、

40

50

一般に発生率が低いか、もしくは群全体にわたって散発性であり、かつ／または遷延しなかった。これらの所見には、多巣性／びまん性角膜混濁、硝子体内気泡、限局性／びまん性／多巣性硝子体混濁、および限局性網膜混濁が含まれたが、これらに限定されなかった。

#### 【0465】

ストレプトゾトシンを、静脈内注射により投与して、ラットにおいて、糖尿病性網膜症を誘発した。硝子体内注射経路はヒトにおいて意図される投与経路であるため、試験物質のために、硝子体内注射経路を選択した。投与レベルは、かつての概念実証試験のほか、I V T投与経路を使用するM T D毒性試験により得られた情報に基づき選択した。

#### 【0466】

試験動物のための、下記に列挙される、生存中の手順、観察、および測定を実施した。試験を通して、午前1回および午後1回の毎日2回にわたり、動物を、全般的健康／死亡および瀕死について観察した。可能な所見の同定または確認に必要でない限り、観察の間に動物をケージから取り出さなかった。－1週目の間に始めて、毎週、動物をケージから取り出し、詳細な臨床観察を実施した。－1週目の間に始めて、毎週2回ずつ、動物を個別に秤量した。処置前期間の最終週の間に始めて、毎週、食餌消費量を定量的に測定した。全ての動物を、処置前に1回、およびまた、22日目にも、眼底検査（倒像眼底検査）および生体顕微鏡（細隙灯）検査に供した。使用された散瞳剤は、1%のトロピカミドであった。眼内圧は、Tonovet（商標）リバウンド眼圧計を使用して、試験前に1回および22日目の、各眼科検査後において測定した。処置前における眼圧測定の読み取りは、日周変動を低減するため、最終回の測定に予期される時間と同じ時間に実施した。

#### 【0467】

網膜電図評価を、処置前に1回、ならびに6、13、および20日目に、フルオレセインによる血管造影前に実施した。動物を、ERG記録の前に、一晚にわたり暗順応させ、次いで、75 mg/kgのケタミンおよび7.5 mg/kgのキシラジンの筋肉内注射により麻酔をかけた。トロピカミド（1%）を、各眼へと、試験の前に適用した（さらなる適用は、必要と考えられる場合に施行した）。瞼を開瞼器により開いたままにし、接触レンズまたは金製ループ電極を、各眼の表面に配置した。ニードル電極を、各眼下の皮膚に（基準電極）および額の後方の頭部または尾の基部（接地電極）に配置した。カルボキシメチルセルロース（1%）点眼液を接触レンズ電極の内側表面に適用してから、それらを眼に配置した。各ERG時期は、以下の一連の、暗順応単発閃光刺激：

- 1) -30 dBの単発の閃光、a波の振幅および待ち時間、平均5回の単発の閃光、閃光間が10秒間、
  - 2) -10 dBの単発の閃光、a波およびb波の振幅および待ち時間、平均5回の単発の閃光、閃光間が15秒間、
  - 3) 0 dB、平均2回の単発の閃光、a波およびb波の振幅および待ち時間、閃光間が約120秒間（より長い期間も許容可能である）、
- から構成された。

#### 【0468】

暗順応応答を評価した後、動物を、約5分間（より長い期間も許容可能であった）にわたり、約25～30 cd/m<sup>2</sup>のバックグラウンド光へと順応させた後に、1 Hz（a波およびb波の振幅および待ち時間）での平均20スイープの明順応白色フリッカー、次いで、29 Hz（b波の振幅および待ち時間）での20スイープの明順応フリッカーを施した。a波およびb波の振幅および待ち時間について、波形を解析し、0 dBの暗順応刺激に由来する律動様小波（OP）1～4を、振幅および待ち時間について、フィルタリングおよび解析した。

#### 【0469】

フルオレセインによる血管造影評価を、処置前に1回、ならびに7、14、および21日目に、網膜電図検査後に実施した。イソフルラン／酸素ミックスを、手順の前および手

順中において、麻酔として使用した。散瞳剤である 1 % のトロピカミドを、必要に応じて使用した。眼の保水は、必要に応じて、生理食塩液を用いる灌流により維持した。U. S. P. の注射用 10 % フルオレセインナトリウム 0.2 mL を、急速尾静脈注射を介して投与した後で、0.5 mL の生理食塩液による洗浄を施した。両眼に由来する眼底の静止画像も、フルオレセイン注射の 10 ~ 15 分後の間において記録した。画像はまず、右眼から撮影した後で、左眼からも撮影した。無刺激の局所眼科軟膏を、血管造影後における眼へと投与した。画像は、血管の完全性／びまん性漏出について、定性的に評価した。

#### 【0470】

「血中グルコースレベルの決定」は、STZ 処置前に 1 回、-6 日目（STZ 投与の翌日）、およびそれ以後に 1 週間に 3 回（全ての動物）であった。必要に応じて、さらなる血中グルコース測定を実施して、動物の健康状態をモニタリングすることも可能であった。レベルは、尾静脈から採取された血液の液滴を使用してグルコメーターにより決定した。値は、mmol/L 単位で測定し、報告を目的として、18 を乗じることにより、mg/dL へと変換した。「尿中グルコースレベルの決定」は、-1 週目の間に始めて、毎週、一晚にわたる回収の後で行った。動物は、回収期間中において、食餌および水の摂取が可能であった。尿中グルコースは、P800 解析器を使用して、臨床検査部門が測定した。イソフルランによる麻酔の後における、腹部大動脈からの。可能な場合、1 日を通して、同様の時点において、コントロールを含む各群に由来する同様の数の動物が剖検されるように、投与群全体にわたり交替で動物を安楽死させた。

#### 【0471】

主要試験動物は、完全剖検による検査を受けさせ、これには、死骸および筋骨格系；全ての外表面および開口部；頭蓋内腔および脳の外表面；ならびにそれらの関連する臓器および組織を伴う胸腔、腹腔、および骨盤腔の評価が含まれた。剖検手順は、動物解剖学および巨視的病理学における適切な訓練および経験を有する有資格者により実施された。獣医科病理学者または他の適切な有資格者も任用可能であった。

#### 【0472】

そうでないことが示されない限り、下記で同定された組織の代表的サンプルを、全ての動物から回収し、10 % の中性緩衝ホルマリン中で保存した。

#### 【表 18】

組織の回収および保存

| 組織      | 重量 | 回収 | 顕微鏡的評価 | 注釈                                    |
|---------|----|----|--------|---------------------------------------|
| 動物の識別   | -  | X  | -      | -                                     |
| 眼       | -  | X  | -      | 両側;Davidson 固定液中で固定した(安楽死させた動物に限られる)。 |
| 巨視的病変/塊 | -  | X  | -      | -                                     |
| 視神経     | -  | X  | -      | 両側;Davidson 固定液中で固定した(安楽死させた動物に限られる)。 |

X = 実行された手順; - = 該当なし

#### 【0473】

本試験では、以下のパラメータおよび評価項目：死亡、臨床徴候、体重、体重変化、食餌消費量、眼科検査、眼内圧、網膜電図検査（ERG）、フルオレセインによる血管造影、血中グルコースおよび尿中グルコースの決定、巨視的剖検による検査を評価した。

#### 【0474】

高血糖症関連死、状態を悪化させる臨床徴候、および体重の減少、体重の増加、食餌消費量の増加、ならびに血中グルコースレベルおよび尿中グルコースレベルの重度の上昇が見られることは、糖尿病性網膜症ラットモデルと符合した。STZ 誘発群で注目される複数の眼の変化は、高血糖性状態、とりわけ、前皮質白内障の性質に続発した。試験中に、XG-102 関連死は見られなかった。XG-102 に関連する臨床徴候、または体重、体重の増加、もしくは食餌消費量に対する効果は見られなかった。フルオレセインによる

血管造影画像 ( i m a g e r y ) は、いかなる血管漏出も明らかでなく、剖検において明らかな X G - 1 0 2 関連肉眼的所見も見られなかった。

【 0 4 7 5 】

6、13、および20日目において、眼1つ当たり $\leq 2 \mu\text{g}$ のX G - 1 0 2を施された動物についての、暗順応E R G評価および明順応E R G評価の一部の振幅は、S T Zで処置されたコントロール動物に照らして、軽微に増加するかまたは同等であったが、これらの応答は一般に、依然としてコントロールの変動内にあった。X G - 1 0 2群の待ち時間は、同等であり、依然として、コントロールの変動内および／または処置前の変動内にあった。眼1つ当たり $\leq 2 \mu\text{g}$ のX G - 1 0 2を施された動物を、S T Zで処置されたコントロールと比較したところ、幾つかの散発性の律動様小波振幅の差異が見られた。

10

【 0 4 7 6 】

以下の表には、全てのE R G刺激についての振幅の概要が、時期（それぞれ、処置前、ならびに6、13、および20日目）ごとに含まれる。値は、群の平均値および標準偏差（下方の値）を表す。

【表 19】

| 律動様小波 1:暗順応単発閃光(0dB:B 波) |         |      |       |       |
|--------------------------|---------|------|-------|-------|
| 群                        | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                          | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                      | 54      | 50   | 34    | 41    |
| ビヒクル                     | 9       | 11   | 12    | 7     |
| XG-102                   | 46      | 49   | 37    | 36    |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)         | 10      | 12   | 17    | 18    |
| XG-102                   | 58      | 40   | 33    | 26    |
| (眼 1 つ当たり 2μg)           | 14      | 11   | 15    | 7     |
| ビヒクル                     | 53      | 40   | 14    | 35    |
|                          | 21      | 4    | 11    | 12    |
| 律動様小波 2:暗順応単発閃光(0dB:B 波) |         |      |       |       |
| 群                        | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                          | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                      | 180     | 129  | 107   | 84    |
| ビヒクル                     | 14      | 32   | 40    | 8     |
| XG-102                   | 167     | 98   | 63    | 70    |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)         | 34      | 28   | 25    | 33    |
| XG-102                   | 226     | 93   | 92    | 49    |
| (眼 1 つ当たり 2μg)           | 49      | 17   | 31    | 14    |
| ビヒクル                     | 180     | 98   | 124   | 58    |
|                          | 88      | 27   | 39    | 12    |
| 律動様小波 3:暗順応単発閃光(0dB:B 波) |         |      |       |       |
| 群                        | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                          | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                      | 376     | 273  | 214   | 195   |
| ビヒクル                     | 26      | 68   | 80    | 18    |
| XG-102                   | 326     | 219  | 165   | 164   |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)         | 64      | 82   | 58    | 63    |
| XG-102                   | 428     | 239  | 219   | 137   |
| (眼 1 つ当たり 2μg)           | 77      | 33   | 55    | 35    |
| ビヒクル                     | 348     | 251  | 239   | 164   |
|                          | 149     | 58   | 54    | 37    |
| 律動様小波 4:暗順応単発閃光(0dB:B 波) |         |      |       |       |
| 群                        | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                          | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                      | 219     | 162  | 136   | 142   |
| ビヒクル                     | 26      | 39   | 24    | 14    |
| XG-102                   | 172     | 147  | 129   | 116   |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)         | 33      | 64   | 45    | 38    |
| XG-102                   | 219     | 182  | 160   | 130   |
| (眼 1 つ当たり 2μg)           | 32      | 27   | 49    | 50    |
| ビヒクル                     | 162     | 178  | 143   | 136   |
|                          | 52      | 31   | 45    | 35    |

10

20

30

40

【表 20 - 1】

| 暗順応単発閃光(-30dB:B 波) |         |      |       |       |
|--------------------|---------|------|-------|-------|
| 群                  | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                    | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                | 434     | 311  | 308   | 170   |
| ビヒクル               | 35      | 113  | 47    | 60    |
| XG-102             | 360     | 269  | 270   | 240   |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)   | 90      | 120  | 143   | 136   |
| XG-102             | 417     | 270  | 292   | 166   |
| (眼 1 つ当たり 2μg)     | 68      | 140  | 142   | 108   |
| ビヒクル               | 369     | 224  | 197   | 136   |
|                    | 85      | 77   | 71    | 47    |
| 暗順応単発閃光(-10dB:A 波) |         |      |       |       |
| 群                  | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                    | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                | -217    | -152 | -124  | -109  |
| ビヒクル               | 23      | 39   | 31    | 30    |
| XG-102             | -191    | -151 | -128  | -129  |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)   | 39      | 64   | 59    | 56    |
| XG-102             | -254    | -124 | -152  | -84   |
| (眼 1 つ当たり 2μg)     | 48      | 46   | 75    | 40    |
| ビヒクル               | -206    | -104 | -111  | -96   |
|                    | 57      | 26   | 38    | 30    |
| 暗順応単発閃光(0dB:A 波)   |         |      |       |       |
| 群                  | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                    | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                | -355    | -244 | -188  | -188  |
| ビヒクル               | 37      | 57   | 96    | 77    |
| XG-102             | -303    | -209 | -203  | -198  |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)   | 70      | 73   | 78    | 74    |
| XG-102             | -394    | -205 | -261  | -147  |
| (眼 1 つ当たり 2μg)     | 75      | 74   | 142   | 61    |
| ビヒクル               | -323    | -177 | -208  | -142  |
|                    | 110     | 38   | 67    | 43    |
| 暗順応単発閃光(0dB:B 波)   |         |      |       |       |
| 群                  | 振幅 (μV) |      |       |       |
|                    | 処置前     | 6 日目 | 13 日目 | 20 日目 |
| 非誘導                | 899     | 415  | 640   | 180   |
| ビヒクル               | 99      | 161  | 201   | 80    |
| XG-102             | 739     | 421  | 442   | 433   |
| (眼 1 つ当たり 0.2μg)   | 169     | 176  | 209   | 224   |
| XG-102             | 944     | 383  | 524   | 278   |
| (眼 1 つ当たり 2μg)     | 176     | 177  | 132   | 202   |
| ビヒクル               | 755     | 283  | 468   | 255   |
|                    | 250     | 103  | 194   | 83    |

10

20

30

40

【表 20-2】

| 明順応フリッカー(1Hz:A波)  |         |     |      |      |
|-------------------|---------|-----|------|------|
| 群                 | 振幅 (μV) |     |      |      |
|                   | 処置前     | 6日目 | 13日目 | 20日目 |
| 非誘導               | -3      | -2  | -7   | -5   |
| ビヒクル              | 1       | 2   | 4    | 4    |
| XG-102            | -2      | -3  | -4   | -2   |
| (眼1つ当たり 0.2μg)    | 2       | 2   | 4    | 3    |
| XG-102            | -3      | -3  | -6   | -2   |
| (眼1つ当たり 2μg)      | 2       | 3   | 6    | 3    |
| ビヒクル              | -4      | -2  | -2   | -6   |
|                   | 2       | 2   | 2    | 5    |
| 明順応フリッカー(1Hz:B波)  |         |     |      |      |
| 群                 | 振幅 (μV) |     |      |      |
|                   | 処置前     | 6日目 | 13日目 | 20日目 |
| 非誘導               | 133     | 72  | 95   | 40   |
| ビヒクル              | 15      | 21  | 36   | 8    |
| XG-102            | 112     | 63  | 71   | 70   |
| (眼1つ当たり 0.2μg)    | 29      | 25  | 34   | 32   |
| XG-102            | 146     | 69  | 91   | 45   |
| (眼1つ当たり 2μg)      | 31      | 28  | 27   | 28   |
| ビヒクル              | 100     | 61  | 100  | 32   |
|                   | 14      | 20  | 39   | 16   |
| 明順応フリッカー(29Hz:B波) |         |     |      |      |
| 群                 | 振幅 (μV) |     |      |      |
|                   | 処置前     | 6日目 | 13日目 | 20日目 |
| 非誘導               | 22      | 13  | 16   | 12   |
| ビヒクル              | 4       | 3   | 4    | 5    |
| XG-102            | 18      | 9   | 14   | 10   |
| (眼1つ当たり 0.2μg)    | 6       | 4   | 6    | 4    |
| XG-102            | 27      | 11  | 17   | 9    |
| (眼1つ当たり 2μg)      | 6       | 4   | 7    | 4    |
| ビヒクル              | 19      | 11  | 19   | 13   |
|                   | 9       | 3   | 7    | 7    |

## 【0477】

これらのデータから取り出され得る通り、XG-102が、波の振幅の減少を逆転する傾向が見られる。

## 【0478】

(実施例26)

ストレプトゾトシンで処置されたアルビノラットによる糖尿病性網膜症の予防試験における、XG-102(配列番号11)(結膜下)の効果

本試験の目的は、ストレプトゾトシン(STZ)で処置された(高血糖性)ラットへと、結膜下注射により、3週間にわたり、毎週投与された場合の、糖尿病性網膜症を予防するXG-102の能力を決定することであった。

## 【0479】

実験デザインを、以下に示す。

10

20

30

40

【表 2 1】

| 群番号/識別              | -7 日目における<br>STZ(mg/kg) | 試験物質の<br>投与レベル<br>(1 週間当たり<br>眼 1 つ当<br>たりの $\mu\text{g}$ ) | 投与容<br>量( $\mu\text{L}$ ) | 投与濃度<br>(mg/mL) | 動物数 |
|---------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------|-----|
|                     |                         |                                                             |                           |                 | 雄   |
| 1/非誘発、ビヒクル          | 0                       | -                                                           | 50                        | 0               | 8   |
| 2/誘発、ビヒクル           | 55                      | -                                                           | 50                        | 0               | 10  |
| 3/XG-102(低用量)       | 55                      | 2                                                           | 50                        | 0.04            | 8   |
| 4/XG-102(中程度用<br>量) | 55                      | 20                                                          | 50                        | 0.4             | 8   |
| 5/XG-102(高用量)       | 55                      | 200                                                         | 50                        | 4               | 8   |

-7日目において、群2～5の全ての動物に、55mg/kgのSTZ静脈内(IV)投与を施す。

## 【0 4 8 0】

ナীব Long Evans ラット（雄動物 42 匹；投与時において 10 週齢；Charles River, St. Constant, QC）を使用した。Long Evans ラットは、STZ 誘発性糖尿病性網膜症モデルにおける使用に許容された種であるので、本試験のための動物モデルとして選択した。本試験で使用される動物の総数は、試験物質の効果を適正に特徴付けるのに必要とされる最小限の数であると考えられ、その目的を達成するのに不必要な数の動物を必要としないようにデザインされた。現時点では、実験室動物による試験は、ヒトへの外挿に利用可能な最良の基礎を提供する。現在のところ、生存動物を使用しない許容可能なモデルは存在しない。代替動物の始動予定は、4 日目である。動物は、ステンレス鋼製ケージ内に収容する。PMI Nutrition International Certified Rodent Chow No. 5 CR4（14%の蛋白質）は、動物のサイズおよび週齢に適切な量で毎日施した。逆浸透濾過を介して処理され、UV 光処理を通した都市水道水を、各動物に自由に摂取可能とした。動物は、試験手順／活動の間を除き、心的／環境的充実のために集団（ケージ 1 つ当たり 3 匹までの動物）で収容し、身を隠すチューブおよび噛む対象などの品目を施された。試験における使用に適することが決定された動物のみを割り当てた。到着したら、無作為化するまで、動物を個別に収容した。無作為化後、動物は集団とする。

## 【0 4 8 1】

0.0412 g の誘発剤（STZ）を含有する滅菌バイアルを、あらかじめ秤量し、密封し、-7 日目において、群 2～5 の動物および選択された控えの動物へと投与するために、投与室へと移す。空の、適切に表示した滅菌バイアルの 2 連セットを用意する。投与のために、再構成された STZ 溶液を、これらのバイアルへと濾過する。試験物質である XG-102 は、提示された補正係数を使用して調製した。最大投与レベルと同等の原液を、ビヒクルである、注射用 0.9% 塩化ナトリウム中で調製し、0.22  $\mu\text{m}$  のポリビニリデンジフルオリド（PVDF）フィルターにより滅菌濾過した。より低い投与レベルは、この原液を生理食塩液で直接希釈することにより調製した。投与アリコート調製し、-20℃を維持するように設定された冷凍庫内で保存した。各投与レベルのアリコートを、各投与日において、周囲温度で解凍させ、溶液を、最長 6 時間にわたり、室温で維持した。ビヒクルである、注射用 0.9% 塩化ナトリウムは、受領された通りの状態で投与した。動物（控えの動物を含む）1 匹当たり 1 バイアルの STZ を、注射の 3 分以内に、27.5 mg/mL の濃度をもたらすように、1.5 mL の USP 注射用滅菌水で再構成した。バイアルを反転または回転させて、STZ を溶解させた。再構成された STZ 溶液を、0.22  $\mu\text{m}$  の Millex-GV フィルターを介して投与のための空の滅菌バイアルへと濾過した。STZ は、-7 日目において、処方 3 分以内に、シリンジを介して、静脈内注射により投与した。投与容量は、2 mL/kg であり、実際の用量投与は、各動物の最近の実際の体重に基づいた。注射の間は、動物を動かないようにする。STZ で処

置された動物は、血中グルコースレベルが、 $\geq 250 \text{ mg/dL}$ であれば、糖尿病と考えられた。1、8、および15日目において、ならびにまた、24日目（Rep 1）、23日目（Rep 2および3）、22日目（Rep 4）、および34日目（Rep 1）33日目（Rep 2および3）、および32日目（Rep 4）において、試験物質またはビヒクルを、結膜下注射により、各動物の左眼および右眼へと投与した。委員会により認定された獣医眼科専門医により実施される用量投与のために、動物に麻酔をかけた（イソフルラン）。局所抗生剤（0.3%のトブラマイシン軟膏）を、両眼へと、処置の前日において2回、注射後において2回、および注射の翌日において少なくとも1回適用した。投与の前に、散瞳点眼剤（1%のトロピカミドおよび／または2.5%のフェニレフリン）を、各眼に適用した（さらなる適用は、獣医眼科専門医により適切と考えられる場合に実施することができる）。投与中は、動物を、イソフルラン／酸素ガスによる麻酔下で維持した。結膜は、USPの注射用0.9%塩化ナトリウムで洗浄した。0.5ccのTerumoインスリン用シリンジへと取り付けた、29ゲージ、2分の1インチの注射針を、各回の結膜下注射（処置1回当たりの群ごとシリンジ1本）のために使用した。試験物質または基準物質を、各動物の眼へと、眼1つ当たりの投与容量 $50 \mu\text{L}$ で投与した。いずれの眼も、各処置の直後に検査して、投与手順により引き起こされるいかなる異常も記録した。ストレプトゾトシンをIV投与して、ラットにおいて、糖尿病性網膜症を誘発する。結膜下経路はヒトにおいて意図される投与経路であるため、試験物質のために、結膜下経路を選択した。投与レベルは、かつての概念実証試験のほか、結膜下投与経路を使用するMTD毒性試験により得られた情報に基づき選択した。少なくとも毎日2回（午前および午後）にわたり、罹患率／死亡率点検を実施した。毎日1回ずつ、ケージサイド観察を実施した。毎週、詳細な臨床検査を実施した。毎週、食餌消費量の定量的測定を実施した。毎週2回ずつ、体重を記録した。試験前に1回、ならびにまた、37日目（Rep 1）、36日目（Rep 2および3）、および35日目（Rep 4）において、眼検査を実施した。全ての動物を、眼底検査（倒像眼底検査）および生体顕微鏡（細隙灯）検査に供した。使用される散瞳剤は、1%のトロピカミドである。眼内圧は、試験前に1回、および37日目（Rep 1）、36日目（Rep 2および3）、および35日目（Rep 4）に測定した。処置前における眼圧測定の読み取りは、日周変動を低減するため、最終回の測定に予期される時間と同じ時間に実施した。眼内圧は、Tonovet（商標）リバウンド眼圧計を使用して、眼科検査後において測定した。

#### 【0482】

処置前に1回、および7、14、21日目において、ならびに36日目（Rep 1）、35日目（Rep 2および3）、および34日目（Rep 4）において、網膜電図評価を実施した。動物を、ERG記録の前に、一晚にわたり暗順応させ、次いで、 $75 \text{ mg/kg}$ のケタミンおよび $7.5 \text{ mg/kg}$ のキシラジンの筋肉内注射により麻酔をかけた。トロピカミド（1%）を、各眼へと、試験の前に適用した（さらなる適用は、適切と考えられる場合に実施することができる）。瞼を開瞼器により開いたままにし、接触レンズまたは金製ループ電極を、各眼の表面に配置した。ニードル電極を、各眼下の皮膚に（基準電極）および額の後方の頭部または尾の基部（接地電極）に配置した。カルボキシメチルセルローズ（1%）点眼液を接触レンズ電極の内側表面に適用してから、それらを眼に配置した。

- 1)  $-30 \text{ dB}$ の単発の閃光、平均5回の単発の閃光、閃光間が10秒間
- 2)  $-10 \text{ dB}$ の単発の閃光、平均5回の単発の閃光、閃光間が15秒間
- 3)  $0 \text{ dB}$ 、平均2回の単発の閃光、閃光間が120秒間（より長い期間も許容可能である）、。

#### 【0483】

暗順応応答を評価した後で、動物を、約5分間（より長い期間も許容可能である）にわたり、約 $25 \sim 30 \text{ cd/m}^2$ のバックグラウンド光へと順応させた後で、 $1 \text{ Hz}$ での平均20スイープの明順応白色フリッカー、次いで、 $29 \text{ Hz}$ での20スイープの明順応フリッカーを施した。a波およびb波の振幅および待ち時間について、波形を解析し、0 d

Bの暗順応刺激に由来する律動様小波1～4を、振幅および待ち時間について、フィルタリングおよび解析する。

#### 【0484】

インドシアニンググリーンによる血管造影評価を、処置前に1回（－2または－1日目）、ならびに8、15、22日目、および35日目（Rep1）、34日目（Rep2および3）、および33日目（Rep4）において実施した。イソフルラン／酸素ミックスを、手順の前および手順中において、麻酔として使用した。必要に応じて使用された散瞳剤は、1%のトロピカミドであった。眼の保水は、必要に応じて、生理食塩液を用いる灌流により維持した。0.5%のインドシアニンググリーン0.2mLを、急速尾静脈注射を介して投与した後で、0.5mLの生理食塩液による洗浄を施した。両眼に由来する眼底の静止画像も、ICG注射の10～15分後の間において記録した。画像はまず、右眼から撮影した後で、左眼からも撮影した。無刺激の局所眼科軟膏を、血管造影後における眼へと投与した。画像は、血管の完全性／びまん性漏出について、定性的に評価した。

#### 【0485】

血中グルコースレベルを、STZ処置前に1回、－6日目（STZ投与の翌日）、およびまた、－1日目に測定した。必要に応じて、さらなる血中グルコース測定を実施して動物の健康状態をモニタリングすることも可能である。レベルは、尾静脈から採取された血液の液滴を使用してグルコメーターにより決定した。値は、mmol/L単位で測定し、報告を目的として、18を乗じることにより、mg/dLへと変換した。

#### 【0486】

スケジュールされた安楽死まで生存した主要な試験動物は、イソフルランによる麻酔の後における、腹部大動脈からの瀉血により安楽死させた。可能な場合、1日を通して、同様の時点において、コントロールを含む各群に由来する同様の数の動物が剖検されるように、投与群全体にわたり交替で動物を安楽死させた。そうでないことが示されない限り、組織（眼、視神経）の代表的サンプルを、全ての動物から回収し、10%の中性緩衝ホルマリン中で保存した。眼および視神経を、両側から回収し、Davidson固定液中で、24～48時間にわたり固定し、次いで、70%のエタノール中で保存した（安楽死させた動物に限られる）。

#### 【0487】

（実施例27）

XG-102の単回結膜下注射の有効性および安全性を、術後眼内炎症において、デキサメタゾン点眼剤と比較して評価する、無作為化、二重盲検、並行群間、比較、多施設試験（臨床フェーズII）

眼手術の技術的進歩にも関わらず、この手順による物理的外傷は、依然として処置を是認する術後眼炎症を誘発している。眼組織内で、アラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼ（COX：cyclooxygenase）により、最も重要な脂質由来の炎症メディエーターである、プロスタグランジン（PG：prostaglandin）へと代謝される1。手術による外傷は、アラキドン酸カスケードの作動を引き起こし、これは、次にはCOX-1およびCOX-2の活性化により、PGを生成させる。細胞膜内のリン脂質は、アラキドン酸を生成させるホスホリパーゼAの基質であり、アラキドン酸から、化学的に異なるPGおよびロイコトリエンのファミリーが産生される2。眼炎症を処置するための「ゴールドスタンダード」は、局所コルチコステロイドおよび／または非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）である。（短期にわたる）コルチコステロイド使用について報告されている副作用には、白内障の形成、眼内圧（IOP：intraocular pressure）の上昇、ウイルス感染に対する感受性の増大、角膜上皮および間質における創傷治癒の遅延が含まれる3、4。加えて、コルチコステロイドによる処置の遷延は、グルコース障害、高血圧症、緑内障の発症、視力の減退、視野の喪失、および後嚢下白内障の形成などの全身性副作用を誘発することが公知である5。調査下にある治験薬（IMP）（XG-102）は、c-Jun N末端キナーゼ（JNK：c-jun N-terminal kinase）活性を、非アデノシン三リン酸（ATP：adenosine

10

20

30

40

50

ne triphosphate) 競合的な様式で、選択的に阻害するプロテアーゼ耐性ペプチドである。XG-102は、グリシン(非キラルである)を除く、D-立体配置にある全てのアミノ酸を伴う、31個のD-アミノ酸によるJNK阻害剤ペプチドである。この選択は、通例それらを投与した直後にペプチドを分解する、プロテアーゼに対する化合物の耐性を増加させるようになされた。JNKの活性化は、アクチベーター蛋白質1(AP-1)転写因子ファミリー、および自己免疫性疾患および炎症性疾患に關与している他の細胞因子のリン酸化および活性化をもたらすので、JNK経路を阻害する化合物は、示される治療的価値を有し得る。ラットおよびウサギにおける眼のMTD(maximum tolerated dose)試験のほか、ウサギにおける眼の局所的忍容性は、XG-102が、結膜下投与、硝子体内(IVT: intravitreal)投与、および静脈内(iv)投与の後において、十分に忍容されることを示した。結膜下投与後のラットおよびウサギにおける眼のMTD試験は、無毒性量(NOEL)が、ラットにおいて、約20μgであり、ウサギにおいて、約600μgであることを示した。単回結膜下投与および反復結膜下投与(7日間にわたり毎日)の後における眼内薬物動態を、ウサギにおいて試験したところ、XG-102は、投与の7日後においても、眼構造に応じて、1~4時間の間のtmaxで、脈絡膜内、眼球結膜内、および虹彩-毛様体内にやはり存在するが、血漿中では、いずれの時点でも検出可能でないことが示された。(術後)眼内炎症を処置するための、現行の「ゴールドスタンダード」の有害な副作用を踏まえると、一方では、炎症を軽減するのに有効であるが、他方では、コルチコステロイドの使用と關連する(有害な)副作用を有さない、他の代替処置法を見出すことが、臨床的に正当化される。XG-102は、現在実施されている前臨床試験およびフェーズI/Ib試験の両方において、有望な結果を示している。

10

20

#### 【0488】

先行の試験は、術後眼内炎症または外傷後眼内炎症を有する患者における、「通例の」術後抗炎症治療に加えて投与される、XG-102の単回結膜下注射の安全性および忍容性を評価するようにデザインされた、オープンラベル、単一施設の、用量漸増/用量設定試験であった。調査されたXG-102の用量は、45、90、450、および900μgであった。本試験では、合計20例の患者(各投与群内に5例ずつの患者)を登録した。先行試験の結論は、最近の術後眼内炎症または外傷後眼内炎症を有する患者における結膜下注射として投与されるXG-102は、安全であり、良好に忍容されることであった。完了した先行試験の成功後、眼内炎症におけるXG-102の開発を継続し、本試験を実施することが決定された。この試験の目的は、手術直後に投与されたXG-102の単回結膜下用量の有効性および安全性を、前房内細胞(chamber cell)グレードにより評価される、術後眼内炎症の進展において、デキサメタゾン点眼剤と比較して評価することであった。これは、術後眼内炎症の進展における単剤治療として投与された場合のXG-102の有効性を調査する、最初の試験である。

30

#### 【0489】

SDD-1002-035試験の目的は、手術手順の終了後最長で3時間以内に投与された、90または900μg XG-102の単回結膜下注射の有効性および安全性を、1日4回ずつ21日間にわたり投与されたデキサメタゾン点眼剤と比較して、術後眼内炎症において評価することであった。

40

#### 【0490】

SDD-1002-035試験の主要目的は、900μg XG-102の単回結膜下注射が、1日4回ずつ21日間にわたり投与されたデキサメタゾン点眼剤による処置に対して非劣性であるかを、術後眼内炎症の進展において評価することであった。本試験の主要目的に従い、主要転帰は、試験処置の結膜下注射の投与後28日目における平均前房細胞グレードにより、900μg XG-102を、デキサメタゾン点眼剤と比較して評価した。

副次的目的は、90μg XG-102または900μg XG-102いずれかの単回結膜下注射の効果を、デキサメタゾン点眼剤(1日4回ずつ21日間にわたり投与され

50

る)と比較して、

有効性の転帰パラメータ：

- a) 28日目における前房細胞グレード (90  $\mu$ g XG-102 対デキサメタゾン)
- b) 7日目および14日目における前房細胞グレード (900  $\mu$ g XG-102 対デキサメタゾン)
- c) 7日目および14日目における前房細胞グレード (90  $\mu$ g XG-102 対デキサメタゾン)
- d) 7日目、14日目、および28日目における前房フレアグレード (900  $\mu$ g XG-102 対デキサメタゾン)
- e) 7日目、14日目、および28日目における前房フレアグレード (90  $\mu$ g XG-102 対デキサメタゾン)
- f) レスキュー薬物治療の使用
- g) 時間経過にわたる眼内炎症の進展

10

#### 【0491】

安全性および忍容性の転帰パラメータ：

- a) E T D R S 法による視力
- b) 細隙灯検査の所見
- c) 眼底検査の結果
- d) 眼内圧 (I O P) 測定
- e) バイタルサイン (血圧 (B P)、脈拍数 (P R)、および律動)
- f) 血液検査室検査および化学検査室検査の結果
- g) 有害事象の発生
- h) 患者のサブセット (約30例) 内の試験処置の投与の1時間後における、XG-102の血漿中の存在 (または非存在)

20

について評価することであった。

#### 【0492】

本試験は、同等なサイズの3つの並行群を伴う、無作為化 (1:1:1)、比較、二重盲検、多施設の、非劣性臨床試験であった。施設によりブロック化された無作為化は、ウェブベースの、セキュリティ保護された無作為化システムを使用して実施した。適格な患者は、>18歳であり、以下の眼手術：(a) 白内障および網膜剥離、白内障および黄斑上膜、ならびに／もしくは白内障および黄斑部孔のための手術が含まれうる、前区と後区とを組み合わせた手術、または (b) 緑内障手術、または (c) 複合後区手術、または (d) 糖尿病性網膜症と関連した白内障手術および／もしくは網膜剥離のための複合眼手術が含まれうる、複雑な眼内手術の1つを受けた、男性または女性 (閉経後の女性または卵管結紮もしくは子宮摘出により不妊の女性) であった。以下の除外基準：

30

#### 【0493】

1. 試験処置の投与前12週間以内における、任意の治験薬の投与。

#### 【0494】

2. デキサメタゾン点眼剤の処方に対する禁忌の存在。

#### 【0495】

3. 抗感染処置に対して不応性の、遷延性の真菌性または細菌性の眼感染症の存在。

40

#### 【0496】

4. コルチコステロイドの使用により引き起こされたことが公知である、眼内高血圧症の病歴。

#### 【0497】

5. 角膜潰瘍、角膜穿孔、または不完全な再上皮化と関連する病変の存在。

。

#### 【0498】

6. 治験責任医師が本試験に干渉し得ると判断する、任意の手術または医学的状態の存在

。

50

## 【0499】

7. 蛋白質型の薬物またはワクチンに対する、任意の重篤な有害反応または過敏性の病歴。

## 【0500】

8. 現在、季節性アレルギー反応（例えば、花粉症、喘息）のため処置を受けていること。

## 【0501】

9. 出産の潜在的可能性がある女性。

## 【0502】

10. 試験中の28日目（すなわち、最後の来院が行われた日付）まで、男性に、非閉経女性パートナーに対して有効な避妊法（例えば、避妊用ピルまたはバリア型避妊法を組み合わせた）を使用する意思がないこと。

## 【0503】

11. 患者に、本プロトコールの条項を遵守する意思がないこと。

のいずれかが、無作為化の時点において存在する場合、患者は、参加に適格でなかった。

## 【0504】

試験プロトコールでは、138例の患者を無作為化し、試験処置の結膜下注射を投与することが計画された。試験プロトコールではまた、無作為化された患者であって、試験処置の結膜下注射が投与されなかった患者は、置きかえられることも言明された。患者は、眼手術の終了後最長で3時間以内に250  $\mu$ lの単回結膜下注射として投与される、90  $\mu$ g XG-102もしくは900  $\mu$ g XG-102のいずれか、または1日4回ずつ21日間にわたり滴下される、デキサメタゾン点眼剤へと無作為に割り付けた。初回の試験処置の点眼剤は、試験処置の結膜下注射後、最長で15分以内に滴下した。盲検化を維持するために、XG-102群へと無作為化された患者には、0.9%のNaClの溶液を含有する点眼剤を施し、デキサメタゾン群へと無作為化された患者には、0.9%のNaClを含有する結膜下注射を投与した。患者は、試験処置の結膜下注射投与後、合計28（ $\pm$ 5）日間にわたり追跡調査された。試験プロトコールにより、必要に応じて、来院／調査を実施するために、患者を外来診療所へと帰院させた。下記の表は、各回の来院時に実行される手順／調査に加えて、計画された来院スケジュールも示す。試験プロトコールでは、患者の安全性の監視に、データ安全性モニタリング委員会（DSMB：data safety and monitoring board）が責任を負うことを計画した。これは、試験中に累積患者データを精査することに加えて、重篤な有害事象（SAE）を、それらが生じたときに精査することにより達成するものであった。データ精査のタイミングに関する詳細は、DSMBの認可において詳述された。

10

20

30

【表 2 2】

| 評価                          | スクリーニング来院:眼手術の前  | 1回目の来院:結膜下注射の21時間(±3時間)後 | 2回目の来院:結膜下注射の7日(±1日)後 | 3回目の来院:結膜下注射の14(±2)日後 | 4回目の来院:結膜下注射の28(±5)日後 |
|-----------------------------|------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 説明同意文書                      | x <sup>a</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 人口学的データ、眼科病歴、MH             | x <sup>b</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 身長、体重                       | x <sup>b</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 併用処置                        | x <sup>b</sup>   | x                        | x                     | x                     | x                     |
| 着座時バイタルサイン                  | x <sup>b</sup>   | x                        |                       |                       | x                     |
| 眼底                          | x <sup>b</sup>   | x                        | x                     | x                     | x                     |
| 眼内圧                         | x <sup>b</sup>   | x                        | x                     | x                     | x                     |
| レーザーフレアメーターを伴うかまたは伴わない細隙灯検査 | x <sup>b</sup>   | x                        | x                     | x                     | x                     |
| 視力検査(ETDRS法による)             | x <sup>b</sup>   | x                        | x                     | x                     | x                     |
| 血液サンプリング                    | x <sup>b,c</sup> | x                        |                       |                       | x                     |
| 最終的な組入れ/除外基準の精査             | x <sup>b</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 無作為化                        | x <sup>d</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 試験処置用シリンジの調製                | x <sup>e</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 試験処置の投与                     | x <sup>f</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| XG-102定量化のための血液サンプリング       | x <sup>g</sup>   |                          |                       |                       |                       |
| 有害事象の報告                     | x <sup>h</sup>   | x                        | x                     | x                     | x                     |

a.インフォームドコンセントは、手術手順が実施される前であり、かつ、試験に関連する任意の手順が実施される前に得た。

b.眼手術が実施される前に行った。

c.以下の血液サンプルを、手術手順が実施される前に実施した。実施される化学的血液サンプルは、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、C反応性蛋白質(CRP)、クレアチンキナーゼ(CK)、グルコース、クレアチニンおよびガンマ-グルタミルトランスフェラーゼであった。血液学サンプル:ヘモグロビン(Hb)、ヘマトクリット(HCT)、および全白血球カウント。

d.手術手順を実施する前に、患者の適格性を決定した。手術手順を開始する前に、ウェブベースのシステムを使用して、適格な患者を無作為化した。

e.結膜下注射の少なくとも1時間前に、試験処置バイアルを、冷凍庫から取り出した。試験処置用シリンジを調製する前に、バイアルを、周囲温度の安全な場所に置いて解凍した。試験処置の点眼剤も、試験処置バイアルと同時に、薬局から戻した。

f.試験処置の投与(結膜下注射および点眼剤)は、手術手順の終了後最長で3時間以内に行った。結膜下注射をまず投与した後で、5～15分後に点眼剤を投与した。

g.試験処置の投与の1時間後に、Hotel Dieu病院から募集された約30例の患者において行った。

h.試験処置の投与を開始してから速やかに、有害事象の発生についての観察を開始した。

患者は、3つの試験群：

1.  $90\mu\text{g}$  XG-102の単回結膜下注射+1日4回ずつ21日間にわたるプラセボの点眼剤、または
  2.  $900\mu\text{g}$  XG-102の単回結膜下注射+1日4回ずつ21日間にわたるプラセボの点眼剤、または
  3. 0.9%のNaClの単回結膜下注射+1日4回ずつ21日間にわたるデキサメタゾン点眼剤
- の1つへと無作為化した。

#### 【0506】

施設によりブロック化された無作為化は、ウェブベースの（すなわち、e-SOCDA TTM）無作為化システムを使用して、一元的に行った。

#### 【0507】

試験生成物であるXG-102は、 $90$ および $900\mu\text{g}$ の用量で使用した（ $250\mu\text{l}$ の単回投与）。投与方式は、単回結膜下注射であった。処置の持続期間は、1の（one）単回投与（結膜下注射）であった。（製造バッチ番号XG-102  $90\mu\text{g}$ ：PF. 243. CRおよび製造バッチ番号XG-102  $900\mu\text{g}$ ：PF. 245. CR）。

#### 【0508】

基準生成物であるデキサメタゾン（Dexafree（登録商標））は、 $1\text{mg}/\text{ml}$ の用量で使用した。投与方式は、点眼（1日4回ずつ、21日間）であった。処置の持続期間は、21日間（1日4回ずつ）（バッチ番号：X750およびZ472）であった。

#### 【0509】

プラセボのNaClは、0.9%の用量で使用した。投与方式は、単回結膜下注射（ $250\mu\text{L}$ ）または点眼（1日4回ずつ、21日間）であった。処置の持続期間は、1つの（one）単回投与（結膜下注射）および点眼では21日間（1日4回ずつ）であった。製造バッチ番号：Y479（点眼）および1139512112（結膜下注射）。

#### 【0510】

先行試験から得られた安全性データおよび予備的有効性データに加えて、前臨床の薬理学試験および毒性学試験に基づき、2つの用量（ $90\mu\text{g}$  XG-102および $900\mu\text{g}$  XG-102）を、本試験のために選択した。SDD-1002-023試験では、 $90\mu\text{g}$ および $900\mu\text{g}$ の用量の安全性プロファイルは、同様であった。加えて、コルチコステロイド点眼剤と組み合わせた眼内炎症低減の挙動は、いずれの投与群においても同様であった。この試験のために講じられる予防措置（DSMBの役割、および炎症が遷延する場合に、オープンラベルの抗炎症処置を導入する可能性）を考慮すれば、この試験のために選択されたXG-102の用量は、一方で、患者の安全性を損なわないように考えられているが、他方で、この試験の目的にかなう有意なデータをもたらすのに十分な程度に高用量であった。結膜下投与経路は、安全性および有効性のいずれもが、この投与経路を使用する動物およびヒトにおいて示されているので、調査下にある診断がなされた患者にとって意図された投与経路の1つである。この試験のために選択された使用のための、デキサメタゾンの、頻度（すなわち、1日4回の点眼）および持続期間（すなわち、21日間）に加えた用量（すなわち、 $1\text{mg}/\text{ml}$ で $0.4\text{ml}$ の点眼）は、術後眼炎症のための臨床慣行において使用されるデキサメタゾン点眼のための、標準的な使用用量/使用持続期間である。

#### 【0511】

試験プロトコールは、試験処置の結膜下注射は、眼手術の終了から最長で3時間以内に投与し、これに続き、最長で15分以内に、初回の試験処置の点眼剤の滴下を行うべきことを規定した。眼手術の終了時における試験処置の投与は、この試験の組み込みの一部である眼手術手順に続く抗炎症処置の投与のための標準的な日常作業に後続させた。

#### 【0512】

治験責任医師、患者、CC（Coordinating Center）における実施

10

20

30

40

50

チーム、治験依頼者職員（医薬品安全性監視スタッフ以外の）のいずれにも、無作為化計画は閲覧不可能であった。XG-102溶液を含有する試験処置バイアルまたはプラセボ（すなわち、0.9%のNaClの溶液）を含有するバイアルは、外観および粘稠性が同一であった。デキサメタゾン溶液または0.9%のNaClのいずれかを含有する単回投与用容器内の点眼剤溶液も、外観および粘稠性が同一であった。試験処置のパッケージングおよび表示は、GMP（医薬品の製造および品質管理に関する基準）およびGCP（医薬品の臨床試験の実施の基準）に準拠して実施した。加えて、試験処置パック上に貼付された表示の内容は、臨床試験のための地域ごとの規制にも準拠した。各患者には、番号づけが同一の2つの試験処置パックを配布した。1つの試験処置「パック」は、1バイアルのXG-102溶液（90または900  $\mu$ g）または1バイアルのプラセボ（0.9%のNaCl）を含有し（患者が無作為化された処置群に応じて）、第2の「パック」は、点眼剤溶液を、1日4回ずつ21日間にわたる処置を可能とするのに十分な供給量を伴うデキサメタゾンまたはプラセボ（0.9%のNaCl）のいずれかを含有する単回投与用容器内に含有した。患者へと割り当てられた試験処置パック番号は、別の患者へは割り当てなかった。患者の試験識別番号（すなわち、患者識別番号）は、ラベル上に、試験処置を配る職員の手で書き込まれた。試験処置の外箱のサイズおよび形状は、XG-102溶液とプラセボ溶液とで同一であった。患者の試験処置への割付けの知識が、該当する患者に対するさらなる医学的管理を決定するのに必要となる救急状況では、または患者の処置への割付けの知識が、規制機関への報告の目的で必要とされる場合には、盲検化された治験責任医師または治験依頼者により委任された医薬品安全性監視員のそれぞれは、e-SOCDATTM内の、セキュリティー保護された、ウェブベースの、試験に特化した処置割付けシステムを介して、該当する患者についての試験処置コードに対するユーザーアクセス権が与えられた。任意の1名の患者についての該処置コードがアクセスされた場合は、試験処置コードのアクセスに関する全ての情報（すなわち、処置コードにアクセスした職員の氏名、理由、日時、およびコードがアクセスされた患者）を追跡調査し、ウェブベースのシステム内で保存する。

#### 【0513】

主要目的は、試験処置の結膜下投与の、投与後28日目における平均前房細胞グレードにより評価した。主要目的の評価のための基準は、

a. 28日目における前房細胞グレード（900  $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）であった。

#### 【0514】

副次的目的の評価のための基準は、

- a. 28日目における前房細胞グレード（90  $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）
- b. 7日目および14日目における前房細胞グレード（900  $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）
- c. 7日目および14日目における前房細胞グレード（90  $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）
- d. 7日目、14日目、および28日目における前房フレアグレード（900  $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）
- e. 7日目、14日目、および28日目における前房フレアグレード（90  $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）
- f. レスキュー薬物治療の使用
- g. 眼炎症の除去により評価される、時間経過にわたる眼内炎症の進展であった。

#### 【0515】

各回の来院時に実行される手順に加えて、来院のタイミングおよび頻度も示すフローチャートは、上記の表において見出すことができる。眼科検査は、ベースラインにおいて実施した（すなわち、手術の当日であるが、手術の前に実施した）。その後、結膜下注射を投与した21（ $\pm$ 3）時間後、次いで、7（ $\pm$ 1）、14（ $\pm$ 2）、および28（ $\pm$ 5）

日後に患者を診察した。実施者間変動を低減するために、施設には、可能な場合、同じ実施者が、試験を通して、同じ患者について、全ての眼科検査を実施すべきことを指示した。眼科検査の測定は、試験に特化した指示書に準拠して実施した。指示書は、初回来院の間および各回のモニタリング来院の間に、施設ごとのチームにより精査され、論じられた。細胞／フレアカウントおよび細胞／フレアグレードを決定するために、SUN Working Groupによる規定（「Standardization of Uveitis Nomenclature for Reporting Clinical Data. Results of the First International Workshop」、American Journal of Ophthalmology、140巻、3号、509～516頁、2005年）を使用する施設により、SUN Working Groupによる総意が使用された。

10

**【0516】**

安全性の評価のための基準は、

- a. E T D R S法による視力
- b. 細隙灯検査の所見
- c. 眼底検査の結果
- d. 眼内圧（I O P）測定値
- e. バイタルサイン（血圧（B P）、脈拍数（P R）、および律動）
- f. 血液検査室検査および化学検査室検査の結果
- g. 有害事象の発生
- h. 患者のサブセット（約30例）内の試験処置の投与の1時間後における、X G - 1 0 2の血漿中の存在（または非存在）

20

であった。

**【0517】**

有害事象についての規定は、

<有害事象（A E：a d v e r s e e v e n t）とは、医薬生成物を投与された患者における、任意の有害な医学的事態であって、この処置との因果関係を必ずしも有さない医学的事態と規定される。したがって、A Eとは、任意の不適切で意図されない徴候、症状、または疾患であって、医薬生成物と関連すると考えられるのであれ、そうでないのであれ、医薬生成物の使用と時間的に関連した、徴候、症状、または疾患である。>

30

であった。

A Eは、その事象が、

- ・死をもたらした
- ・生命を脅かした
- ・自主入院または既存の入院の長期化を必要とした
- ・障害／無力の遷延または有意な障害／無力をもたらした
- ・処置期間中に懐胎された子供に先天性異常／出産時欠損をもたらした
- ・医学的に重大であった、かつ患者を危険にさらすか、または上記の転帰の1つを予防

するのに介入を必要とする

のであれば、重篤であると考えられた。

40

**【0518】**

「重篤」の定義における「生命を脅かす」という用語は、事象の時点において、被験体に、死の危険性がある事象を指すものであり、より重度であるなら、仮説的に死を引き起こし得る事象を指すものではなかった。S U S A R（S u s p e c t e d U n e x p e c t e d S e r i o u s A d v e r s e R e a c t i o n）とは、処置と関連することが疑われる有害反応であって、予測外（すなわち、投与される試験処置の予測される転帰と符合しない）であり、かつ、重篤である有害反応と規定した。

**【0519】**

X G - 1 0 2の血漿中の定量化（血漿）は、1つの施設に配置された32例の患者のサブセット内で評価した。静脈血サンプル（2 m l）は、試験処置の結膜下投与の60分後

50

において、L i ーヘパリン試験管を使用して得た。サンプリングを実施した正確な時間を、e-CRF上に用意された記入欄に入力した。血液サンプルは、室温、2,500RPMで10分間にわたり遠心分離した。遠心分離後、ピペットを使用して、血漿を、1.5mlのクライオチューブ2本へと移した。次いで、クライオチューブを、-80℃の冷凍庫に入れ、次いで、その後、温度データロガーを伴うドライアイス中、解析に責任を負う中央検査室へと送付した。中央検査室で受領されたら、解析するまで、サンプルを-80℃で保存した。

#### 【0520】

統計学的方法：主要目的は、900μg XG-102と、デキサメタゾン点眼剤との、試験処置の結膜下注射後28日目における前房細胞グレードについての非劣性比較であった。主要転帰は、プロトコール適合(per-protocol)(PP)集団について解析し、感度の理由で最大の解析対象集団(full analysis set)(FAS)について反復した。900μg XG-102の、デキサメタゾンに照らした非劣性は、推定差上下の95%のCIの上限が、前房細胞グレード0.5を下回る場合に明言され得た。第1の副次的評価項目(90μg XG-102と、デキサメタゾンとを比較した、28日目における前房細胞グレード)を、主要転帰についての場合と同じ様式で解析した。他の全ての副次的転帰は、0.005の両側アルファ値を使用するFASについての優位性検定により評価した。安全性解析は、FAS群について、施された処置ごとに実施した。

#### 【0521】

本試験に組み入れられた患者の内訳を、図59に示す。最初の患者が説明同意文書を提出したのは、2012年7月18日であった。最後の患者が無作為化されたのは、2013年9月2日であり、最後の患者において最終回の来院が実施されたのは、2013年10月3日であった。合計157例の患者が説明同意文書を提出し、これらのうちの151例を無作為化した。無作為化された患者151例のうち、6例には、試験処置の結膜下注射を投与しなかった。試験プロトコール中の要件に従い、これらの無作為化された患者を置きかえた。合計145例の患者に、試験処置(すなわち、XG-102またはプラセボ)の結膜下注射を投与し、144例の患者は、試験プロトコールにより計画される通り、試験を完了した。合計で1例の患者については、追跡調査を中止した。以下の表は、3つの試験群についての追跡調査が完全であることを示す。

【表23】

|                            | 90 μg XG-102<br>(N=47) | 900 μg XG-102<br>(N=48) | デキサメタゾン<br>(N=50) |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
|                            | 患者#(%)                 | 患者#(%)                  | 患者#(%)            |
| 無作為化                       | 50                     | 50                      | 51                |
| 無作為化されたが、試験txを投与されなかった     | 3                      | 2                       | 1                 |
| 無作為化され、試験txを投与された          | 47 (100.0%)            | 48 (100.0%)             | 50 (100.0%)       |
| 試験txの点眼剤の早期中止              | 10 (21.3%)             | 8 (16.7%)               | 3 (6.0%)          |
| 追跡調査の早期中止                  | 0 (0.0%)               | 1 (2.1%)                | 0 (0.0%)          |
| プロトコールで計画された通りに実施された4回目の来院 | 47 (100.0%)            | 47 (97.9%)              | 50 (100.0%)       |
| 追跡調査への不参加                  | 0 (0.0%)               | 1 (2.1%)                | 0 (0.0%)          |

データは、患者数(%)である。N=各群内の患者数、#=数、μg=マイクログラム、%=百分率、tx=処置。

#### 【0522】

FAS(full analysis set)は、試験処置の結膜下注射が開始/投与される、全ての無作為化された患者を含んだ。FASセットは、ITT(intent

i o n - t o - t r e a t ) の原則に従い解析した、すなわち、施された処置に関わらず、患者が無作為化された処置群内で患者を評価した。加えて、許容される時間窓の外で実施された来院についても、データを、F A S 解析セットから除外した。

#### 【0523】

P P 解析セットは、F A S のサブセットであった。無作為化後に大きな違反がなされた場合、および／または追跡調査期間中にオープンラベルの抗炎症処置が導入された場合は、患者を、P P 解析データセットから除外した。加えて、許容される時間窓の外で実施された来院についても、データを、P P 解析セットから除外した。

#### 【0524】

安全性セットには、試験処置の結膜下注射が開始／投与される、全ての無作為化された患者を組み入れた。患者は、処置された通りに、すなわち、患者に施された処置に従い解析した。安全性セットは、安全性解析のための主要解析セットであった。

#### 【0525】

ベースラインにおける特徴および併存疾患は、F A S および P P 集団のいずれについても、3つの処置群の間で均衡させた。下記の表は、ベースラインにおける主要な併存疾患の幾つかを、P P 解析集団について、処置群ごとに示す。網膜剥離を有する患者の百分率は、90 μg X G - 102 群 (52%) へと割り付けられた患者において、900 μg X G - 102 群 (41%) およびデキサメタゾン群 (40%) と比較して高かったが、糖尿病を有する患者の百分率は、900 μg X G - 102 群 (33%) へと無作為化された患者において、90 μg X G - 102 群 (22%) およびデキサメタゾン群 (26%) と比較して高かった。

#### 【表24】

|            | 90 μg XG-102<br>(N=46) | 900 μg XG-102<br>(N=46) | デキサメタゾン<br>(N=50) |
|------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
|            | 患者#(%)                 | 患者#(%)                  | 患者#(%)            |
| 網膜剥離       | 24 (52.2%)             | 19 (41.3%)              | 20 (40.0%)        |
| 緑内障        | 6 (13.0%)              | 6 (13.0%)               | 6 (12.0%)         |
| 糖尿病性網膜症    | 5 (10.9%)              | 6 (13.0%)               | 4 (8.0%)          |
| 高血圧症       | 16 (34.8%)             | 25 (54.3%)              | 24 (48.0%)        |
| 糖尿病        | 10 (21.7%)             | 15 (32.6%)              | 13 (26.0%)        |
| 高コレステロール血症 | 17 (37.0%)             | 20 (43.5%)              | 21 (42.0%)        |

データは、患者数(%)である。N=各群内の患者数、#=数、μg=マイクログラム、%=百分率。

#### 【0526】

以下の表は、P P 解析集団について、処置群ごとに、実施された手術の種類に加えて、ベースラインにおける、眼手術に対する適応も示す。複合後区手術を受けた患者の百分率は、90 μg X G - 102 群 (50%) へと割り付けられた患者において、900 μg X G - 102 群 (46%) およびデキサメタゾン群 (42%) へと割り付けられた患者と比較して高かった。ベースラインにおいて実施された手術の間に、ガス (S F 6 または C 2 F 6) を注入された患者の、各処置群内の百分率は、それぞれ、43% (90 μg X G - 102)、37% (900 μg X G - 102)、および38% (デキサメタゾン) であった。

【表 2 5】

|                 | 90 µg XG-102 | 900 µg XG-102 (N=46) | デキサメタゾン (N=50) |
|-----------------|--------------|----------------------|----------------|
|                 | 患者#(%)       | 患者#(%)               | 患者#(%)         |
| <b>眼手術の種類</b>   |              |                      |                |
| 前区と後区とを組み合わせた手術 | 18 (39.1%)   | 22 (47.8%)           | 26 (52.0%)     |
| 緑内障の手術          | 5 (10.9%)    | 3 (6.5%)             | 3 (6.0%)       |
| 複合後区手術surgery   | 23 (50.0%)   | 21 (45.7%)           | 21 (42.0%)     |
| <b>対象眼</b>      |              |                      |                |
| 左               | 17 (37.0%)   | 23 (50.0%)           | 25 (50.0%)     |
| 右               | 29 (63.0%)   | 23 (50.0%)           | 25 (50.0%)     |
| <b>眼手術の適応</b>   |              |                      |                |
| 白内障             | 19 (28.8%)   | 22 (31.4%)           | 25 (31.6%)     |
| 黄斑上膜            | 8 (12.1%)    | 8 (11.4%)            | 10 (12.7%)     |
| 網膜上膜            | 4 (6.1%)     | 6 (8.6%)             | 10 (12.7%)     |
| 中心窩分離症          | 0 (0.0%)     | 0 (0.0%)             | 1 (1.3%)       |
| 硝子体内出血          | 5 (7.6%)     | 4 (5.7%)             | 3 (3.8%)       |
| 黄斑部孔            | 2 (3.0%)     | 6 (8.6%)             | 2 (2.5%)       |
| 血管新生緑内障         | 1 (1.5%)     | 0 (0.0%)             | 0 (0.0%)       |
| 眼内圧の緩和          | 5 (7.6%)     | 3 (4.3%)             | 3 (3.8%)       |
| 網膜剥離            | 22 (33.3%)   | 19 (27.1%)           | 20 (25.3%)     |
| 眼内レンズの亜脱臼       | 0 (0.0%)     | 1 (1.4%)             | 0 (0.0%)       |
| 水晶体の亜脱臼         | 0 (0.0%)     | 0 (0.0%)             | 1 (1.3%)       |
| 硝子体黄斑牽引         | 0 (0.0%)     | 1 (1.4%)             | 4 (5.1%)       |
| <b>ガスの種類</b>    |              |                      |                |
| SF6             | 11 (55.0%)   | 11 (64.7%)           | 12 (63.2%)     |
| C2F6            | 9 (45.0%)    | 6 (35.3%)            | 7 (36.8%)      |

10

20

30

データは、患者数(%)である。N=各群内の患者数、#=数、µg=マイクログラム、%=百分率、SD=標準偏差。入手可能Nr.=データが入手可能な患者の数。

## 【0 5 2 7】

28日目における前房細胞グレード（900 µg XG-102対デキサメタゾン）：

主要評価項目は、補正反復測定モデルを使用して、900 µg XG-102投与群を、デキサメタゾン群と比較して、28日目における前房細胞グレードの平均差異として解析した。反復モデルでは、7、14、および28日目の来院について回収されたデータのみを使用した。主要解析は、PP解析データセットについて実施し、感度解析は、FASデータセットについて実施した。第1の副次的転帰（すなわち、28日目における前房細胞グレード（90 µg XG-102対デキサメタゾン））についての非劣性は、前房細胞グレード0.5の、同じ非劣性マージンを使用して、主要評価項目についての場合と同じ様式で決定した。PP解析集団についての、試験処置の結膜下注射投与の28日後までの平均前房細胞グレードを、図60に、3つの処置群（すなわち、90 µg XG-102群、900 µg XG-102群およびデキサメタゾン群）について示すが、統計学的モデルの結果は、以下の表に示す。

40

【表 2 6】

| 投与群 | モデルにより補正<br>された平均<br>[95%CI] | 投与群の比較 | 推定差 [95%CI] | P値(非劣性) | P値(優位性) |
|-----|------------------------------|--------|-------------|---------|---------|
|-----|------------------------------|--------|-------------|---------|---------|

2回目の来院(試験tx投与の7日±2日後)

|               |                  |                             |                          |  |       |
|---------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|--|-------|
| 90 µg XG-102  | 1.05 [0.84～1.26] | 90µg XG-102対デキサメ<br>タゾン     | 0.142<br>[-0.142～0.425]  |  | 0.327 |
| 900 µg XG-102 | 0.96 [0.76～1.16] | 900µg XG-102対デキサ<br>メタゾン    | 0.056<br>[-0.222～0.333]  |  | 0.694 |
| デキサメタゾン       | 0.91 [0.72～1.10] | 900µg XG-102対90µg<br>XG-102 | -0.086<br>[-0.377～0.205] |  | 0.561 |

10

3回目の来院(試験tx投与の14日±3日後)

|               |                  |                             |                          |  |       |
|---------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|--|-------|
| 90 µg XG-102  | 0.80 [0.58～1.01] | 90µg XG-102対デキサメ<br>タゾン     | 0.009<br>[-0.278～0.296]  |  | 0.948 |
| 900 µg XG-102 | 0.77 [0.56～0.98] | 900µg XG-102対デキサ<br>メタゾン    | -0.017<br>[-0.300～0.266] |  | 0.906 |
| デキサメタゾン       | 0.79 [0.60～0.98] | 900µg XG-102対90µg<br>XG-102 | -0.026<br>[-0.323～0.271] |  | 0.862 |

20

4回目の来院(試験tx投与の28日±8日後)

|               |                  |                             |                          |         |       |
|---------------|------------------|-----------------------------|--------------------------|---------|-------|
| 90 µg XG-102  | 0.58 [0.36～0.81] | 90µg XG-102対デキサメ<br>タゾン     | 0.086<br>[-0.214～0.385]  | 0.003   | 0.573 |
| 900 µg XG-102 | 0.44 [0.23～0.66] | 900µg XG-102対デキサ<br>メタゾン*   | -0.054<br>[-0.350～0.242] | <0.001* | 0.720 |
| デキサメタゾン       | 0.50 [0.30～0.70] | 900µg XG-102対90µg<br>XG-102 | -0.140<br>[-0.453～0.174] |         | 0.381 |

30

CI=信頼区間、µg=マイクログラム、%=百分率、tx=処置。

\*主要比較

## 【0 5 2 8】

主要転帰の結果を、第1の副次的転帰の結果に加えて、図61に、PPデータセットおよびFASデータセットの両方について示す。28日目における前房細胞グレードにより評価される通り、900 µg XG-102は、術後眼内炎症の進展において、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であった（前房細胞グレードで-0.054の差異、95%の信頼区間（CI: confidence interval）:-0.350～0.242、 $p < 0.001$ ）。同じ解析を、FASについて反復したところ、900 µg XG-102は、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であることが見出された（細胞グレードで-0.032の差異、95%のCI:-0.301～0.238、 $p < 0.001$ ）。FAS解析セットおよびPP解析セットについて、上限がゼロと交差することを踏まえると、900 µg XG-102は、28日目における前房細胞グレードについて、デキサメタゾン点眼剤に照らして優位性ではなかった（FAS解析セットについて $p = 0.818$ であり、PP解析セットについて $p = 0.720$ であった）。

40

50

## 【0529】

28日目における前房細胞グレード（90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン）：

90 $\mu$ g XG-102をデキサメタゾン点眼剤と比較する副次的評価項目に関して、90 $\mu$ g XG-102は、術後眼内炎症の進展において、デキサメタゾンに照らして非劣性であった（前房細胞グレードで0.086の差異、95%のCI：-0.214～0.385、 $p=0.003$ ）。同じ解析を、FASについて反復したところ、90 $\mu$ g XG-102は、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であることが見出された（前房細胞グレードで0.053の差異、95%のCI：-0.215～0.321、 $p<0.001$ ）。

## 【0530】

90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾンおよび900 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾンについての、7日目および14日目における前房細胞グレード：

## 【0531】

90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾンおよび900 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾンについての、7日目および14日目における前房細胞グレードについての統計学的解析を、FASデータセットについて実施した。7日目または14日目のいずれかにおける、90 $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間、および900 $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間で、前房細胞グレードの統計学的有意差はなかった。

## 【0532】

90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾンおよび900 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾンについての、7日目、14日目、および28日目における前房フレアグレード：

## 【0533】

28日目までに得られた前房フレアグレード（FASについて）を、図62に示し、モデルの結果を、下記の表に示す。7日目または14日目または28日目のいずれかにおける、90 $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間、および900 $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間で、前房フレアグレードの統計学的有意差はなかった。

【表27】

| 投与群 | モデルにより補正された平均値<br>[95%CI] | 投与群の比較 | 推定差 [95%CI] | P値 |
|-----|---------------------------|--------|-------------|----|
|-----|---------------------------|--------|-------------|----|

2回目の来院(試験tx投与の7日±2日後)

|                    |                  |                                      |                       |       |
|--------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------|
| 90 $\mu$ g XG-102  | 0.93 [0.73～1.14] | 90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン            | 0.133 [-0.154～0.420]  | 0.363 |
| 900 $\mu$ g XG-102 | 0.80 [0.60～1.00] | 900 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン           | -0.003 [-0.284～0.278] | 0.983 |
| デキサメタゾン            | 0.80 [0.60～1.00] | 900 $\mu$ g XG-102対90 $\mu$ g XG-102 | -0.136 [-0.424～0.152] | 0.353 |

3回目の来院(試験tx投与の14日±3日後)

|                    |                  |                                      |                      |       |
|--------------------|------------------|--------------------------------------|----------------------|-------|
| 90 $\mu$ g XG-102  | 0.72 [0.52～0.92] | 90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン            | 0.142 [-0.140～0.424] | 0.322 |
| 900 $\mu$ g XG-102 | 0.80 [0.59～1.00] | 900 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン           | 0.220 [-0.061～0.502] | 0.125 |
| デキサメタゾン            | 0.58 [0.38～0.77] | 900 $\mu$ g XG-102対90 $\mu$ g XG-102 | 0.078 [-0.210～0.366] | 0.595 |

4回目の来院(試験tx投与の28日±8日後)

|                    |                  |                                      |                       |       |
|--------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------|
| 90 $\mu$ g XG-102  | 0.48 [0.28～0.69] | 90 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン            | 0.027 [-0.255～0.309]  | 0.851 |
| 900 $\mu$ g XG-102 | 0.44 [0.23～0.64] | 900 $\mu$ g XG-102対デキサメタゾン           | -0.017 [-0.301～0.267] | 0.906 |
| デキサメタゾン            | 0.46 [0.26～0.65] | 900 $\mu$ g XG-102対90 $\mu$ g XG-102 | -0.044 [-0.333～0.245] | 0.764 |

CI=信頼区間、 $\mu$ g=マイクログラム、%=百分率、tx=処置。

10

20

30

40

50

## 【0534】

眼炎症の除去：

時間経過にわたる眼炎症の評価は、眼炎症の除去により評価した。眼炎症の除去とは、眼炎症スコアの合計が、前房細胞グレード＝0および前房フレアグレード＝0として規定されるグレード0である、被験体の比率と規定した。この転帰は、7日目、14日目、および28日目において、900  $\mu$ g XG-102をデキサメタゾンと比較し、90  $\mu$ g XG-102をデキサメタゾンと比較して評価した。FAS集団およびPP集団についての統計学的結果の概要を、下記の表に示す。FASについて、通例の治療群と比較して実施された解析に関して、900  $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者についての、炎症が除去されているオッズは、術後7日目において、0.76（95%のCI：0.25～2.28）であり、術後14日目において、1.25（95%のCI：0.47～3.32）であり、術後28日目において、1.13（95%のCI：0.49～2.60）であった。90  $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者群に関して、通例の治療群と比較して、炎症が除去されているオッズは、術後7日目において、0.52（95%のCI：0.15～1.83）であり、術後14日目において、0.85（95%のCI：0.30～2.40）であり、術後28日目において、1.24（95%のCI：0.54～2.87）であった。PP解析セットについて、通例の治療群と比較して実施された解析に関して、900  $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者についての炎症が除去されているオッズは、術後7日目において、0.84（95%のCI：0.28～2.46）であり、術後14日目において、1.12（95%のCI：0.41～3.05）であり、術後28日目において、1.26（95%のCI：0.52～3.04）であった。90  $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者群に関して、通例の治療群と比較して、炎症が除去されているオッズは、術後7日目において、0.56（95%のCI：0.16～1.97）であり、術後14日目において、0.97（95%のCI：0.34～2.77）であり、術後28日目において、1.45（95%のCI：0.58～3.61）であった。

10

20

【表 28】

| 最大の解析対象集団                     |                         |                   | プロトコール適合               |                         |                   |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| 90 µg XG-102<br>(N=47)        | 900 µg XG-102<br>(N=48) | デキサメタゾン<br>(N=50) | 90 µg XG-102<br>(N=46) | 900 µg XG-102<br>(N=46) | デキサメタゾン<br>(N=50) |
| 患者#(%)                        | 患者#(%)                  | 患者#(%)            | 患者#(%)                 | 患者#(%)                  | 患者#(%)            |
| <b>1回目の来院(試験tx投与の21時間後)</b>   |                         |                   |                        |                         |                   |
| 入手可能Nr.(%)                    | 47 (100.0%)             | 48 (100.0%)       | 49 (98.0%)             | 46 (100.0%)             | 46 (100.0%)       |
| あり                            | 2 (4.3%)                | 2 (4.2%)          | 4 (8.2%)               | 2 (4.3%)                | 2 (4.3%)          |
| <b>2回目の来院(試験tx投与の7日±2日後)</b>  |                         |                   |                        |                         |                   |
| 入手可能Nr.(%)                    | 42 (89.4%)              | 47 (97.9%)        | 48 (96.0%)             | 39 (84.8%)              | 44 (95.7%)        |
| あり                            | 5 (11.9%)               | 7 (14.9%)         | 9 (18.8%)              | 5 (12.8%)               | 7 (15.9%)         |
| <b>3回目の来院(試験tx投与の14日±3日後)</b> |                         |                   |                        |                         |                   |
| 入手可能Nr.(%)                    | 45 (95.7%)              | 43 (89.6%)        | 49 (98.0%)             | 37 (80.4%)              | 40 (87.0%)        |
| あり                            | 8 (17.8%)               | 10 (23.3%)        | 10 (20.4%)             | 8 (21.6%)               | 9 (22.5%)         |
| <b>4回目の来院(試験tx投与の28日±8日後)</b> |                         |                   |                        |                         |                   |
| 入手可能Nr.(%)                    | 45 (95.7%)              | 43 (89.6%)        | 48 (96.0%)             | 33 (71.7%)              | 34 (73.9%)        |
| あり                            | 18 (40.0%)              | 17 (39.5%)        | 17 (35.4%)             | 14 (42.4%)              | 15 (44.1%)        |

10

20

データは、患者数(%)である。N=各群内の患者数、#=数、µg=マイクログラム、%=百分率、tx=処置。

\*\*眼炎症の除去とは、0個の細胞（すなわち、細胞グレードが0）であり、かつ、フレアなし（すなわち、フレアグレードが0）であると規定される。

## 【0535】

レーザーフレアメーター（LFM）：

試験を通して、規定された時点で得られたLFM測定値を、FASについての、時間経過にわたる、28日目までのLFM測定値として、図63に示す。

試験プロトコールでは、レスキュー薬物治療とは、治験責任医師により判断された眼炎症の遷延のために、追跡調査期間の間に患者のために処方される、任意のオープンラベルの抗炎症眼処置として規定された。試験プロトコールは、試験処置の点眼剤を、オープンラベルの抗炎症眼処置の導入時に中止すべきであるということを規定した。90 µg XG-102群内で、レスキュー薬物治療を導入された患者の百分率は、デキサメタゾン群と比較した場合に、統計学的に異なった（90 µg XG-102群およびデキサメタゾン群について、それぞれ、21.3%対4.0%（ $p=0.013$ ））が、900 µg XG-102群とデキサメタゾン群との差異（2つの群について、それぞれ、14.6%および4.0%）は、統計学的に有意でなかった（ $p=0.88$ ）。

## 【0536】

血漿中の薬物動態：

XG-102を定量化するための血液サンプリングは、Hotel Dieu病院（Paris）で募集された32例の患者のサブセット内で、XG-102の結膜下投与の60分後に行った。XG-102の血漿中の定量化についての解析報告は、XG-102が、任意の患者について、血漿中サンプルで検出されなかったことを示す（以下の表を参照されたい）。

30

40

【表 2 9】

|                  | 90 $\mu$ g XG-102<br>(N=11) | 900 $\mu$ g XG-102<br>(N=9) | デキサメタゾン<br>(N=12) |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                  | 患者#(%)                      | 患者#(%)                      | 患者#(%)            |
| サンプルが<LLOQである患者# | 11 (100.0%)                 | 9 (100.0%)                  | 12 (100.0%)       |
| <LLOQ*           | 11 (100.0%)                 | 9 (100.0%)                  | 12 (100.0%)       |

データは、患者数(%)である。N=XG-102の定量化サンプルが得られた患者数、#=数、 $\mu$ g=マイクログラム、%=百分率。

LLOQ=定量限界未満。\*LLOQを下回る値(すなわち、<10ng/mL)は、「検出不可能」と考えられた。

## 【0 5 3 7】

まとめると、900  $\mu$ g XG-102は、術後眼内炎症の進展において、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であった（前房細胞グレードで-0.054の差異、95%のCI：-0.350~0.242、 $p < 0.001$ ）。同じ解析を、FASについて反復したところ、900  $\mu$ g XG-102は、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であることが見出された（細胞グレードで-0.032の差異、95%のCI：-0.301~0.238、 $p < 0.001$ ）。FAS解析セットおよびPP解析セットについて、上限がゼロに交差することを踏まえると、900  $\mu$ g XG-102は、28日目における前房細胞グレードについて、デキサメタゾン点眼剤に照らして優位性ではなかった（FAS解析セットについて $p = 0.818$ であり、PP解析セットについて $p = 0.720$ であった）。

## 【0 5 3 8】

90  $\mu$ g XG-102をデキサメタゾン点眼剤と比較する副次的評価項目に関して、90  $\mu$ g XG-102は、術後眼内炎症の進展において、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であった（前房細胞グレードで0.086の差異、95%のCI：-0.214~0.385、 $p = 0.003$ ）。同じ解析を、FASについて反復したところ、90  $\mu$ g XG-102は、デキサメタゾン点眼剤に照らして非劣性であることが見出された（前房細胞グレードで0.053の差異、95%のCI：-0.215~0.321、 $p < 0.001$ ）。

## 【0 5 3 9】

7日目または14日目のいずれかにおける、90  $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間、および900  $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間で、前房細胞グレードの統計学的有意差はなかった。7日目または14日目または28日目のいずれかにおける、90  $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間、および900  $\mu$ g XG-102とデキサメタゾンとの間で、前房フレアグレードの統計学的有意差はなかった。

## 【0 5 4 0】

時間経過にわたる眼炎症の評価は、眼炎症の除去により評価した。眼炎症の除去とは、眼炎症スコアの合計が、前房細胞グレード=0および前房フレアグレード=0として規定されるグレード0である、被験体の比率と規定した。この転帰は、7日目、14日目、および28日目において、900  $\mu$ g XG-102をデキサメタゾンと比較し、90  $\mu$ g XG-102をデキサメタゾンと比較して評価した。FASについて、通例の治療群と比較して実施された解析に関して、900  $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者についての、炎症が除去されているオッズは、術後7日目において、0.76（95%のCI：0.25~2.28）であり、術後14日目において、1.25（95%のCI：0.47~3.32）であり、術後28日目において、1.13（95%のCI：0.49~2.60）であった。90  $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者群に関して

10

20

30

40

50

、通例の治療群と比較して、炎症が除去されているオッズは、術後7日目において、0.52（95%のCI：0.15～1.83）であり、術後14日目において、0.85（95%のCI：0.30～2.40）であり、術後28日目において、1.24（95%のCI：0.54～2.87）であった。

#### 【0541】

安全性評価

曝露の程度：

本試験は、二重盲検試験であった。無作為化され、結膜下注射が開始された、全ての患者を、投与群ごとに、安全性解析に組み入れる。処置により発生するAE、すなわち、試験処置の結膜下注射の開始後に生じたAEのみを解析した。試験処置の点眼剤を、早期に（すなわち、21日目以前に）中止した場合は、試験プロトコルに従い、該当する患者を、28日目まで追跡調査し続けた。合計145例の患者に、試験処置の結膜下注射を投与し、このうち、47例の患者に、90 µg XG-102を投与し、48例の患者に、900 µg XG-102を投与し、デキサメタゾン群へと割り付けられた50例の患者に、0.9%のNaClを投与した。試験処置の結膜下注射が開始された全ての患者に、試験処置の全量（すなわち、250 µL）を投与した。

#### 【0542】

患者群による試験処置の点眼剤の曝露を、下記の表に示す。試験処置の点眼剤に関して、試験プロトコルにより必要とされる、試験処置の点眼剤の滴下に対する全般的な遵守は、3つの試験群内で>90%であった。XG-102処置群へと割り付けられた患者の、試験処置の点眼剤の滴下に対する遵守（90 µg XG-102群および900 µg XG-102群について、それぞれ、95%および94%）は、遵守が91%であるデキサメタゾン群へと割り付けられた患者と比較してわずかに高かった。50例の患者に、平均20日間（6～21日間、最小～最大）にわたり、デキサメタゾン点眼剤を施し、最大累積用量は81滴（81×0.05 mg = 4.05 mg）であった。

#### 【表30】

|                 | 90 µg XG-102<br>(N=47) | 900 µg XG-102<br>(N=48) | デキサメタゾン<br>(N=50)     |
|-----------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
|                 | 平均値(最小～最大)             | 平均値(最小～最大)              | 平均値(最小～最大)            |
| 処置の点眼剤を受けた日数    | 18 (1～21)              | 19 (1～21)               | 20 (6～21)             |
| 試験処置の点眼剤に対する遵守* | 95.3%<br>(75.3%～100%)  | 93.8%<br>(33.3%～100%)   | 90.6%<br>(33.3%～100%) |

脚注:試験処置の点眼剤を早期に中止した患者について、遵守は、(使用/計画)×100[式中、計画=4×(開始から中止までの日数)]として計算した。試験処置の点眼剤をプロトコルにより計画された通りに使用した患者について、遵守は、((81-使用されなかった点眼剤ボトル)/81)×100として計算した。

#### 【0543】

有害事象

投与群ごとの有害事象の概要：

報告された有害事象（重篤な有害事象および重篤ではな有害事象）の概要を、図64に、投与群ごとに示す。AEが報告された患者の数に関して、90 µg XG-102群とデキサメタゾン群との間、および900 µg XG-102群とデキサメタゾン群との間で、統計学的有意差はなかった。90 µg XG-102群へと割り付けられた患者については、この群へと割り付けられた患者47例中31例（66%）について、のべ78例のAEが報告され、900 µg XG-102群へと割り付けられた患者については、患者48例中32例（67%）について、のべ69例のAEが報告された。デキサメタゾン群へと割り付けられた患者については、患者50例中29例（58%）について、のべ55例のAEが報告された。試験処置投与後24時間以内にAEを経験した患者の百分率は、3つの試験処置群の間で同様（すなわち、90 µg XG-102群、900 µg X

G-102群、およびデキサメタゾン群について、それぞれ、34%、27%、および30%）であった。

【0544】

重症度および投与群ごとに報告されたA Eの分布を、下記の表に示す。報告されたA Eの大部分（約70%）は、3つの投与群について、治験責任医師により、「軽度」と考えられた。

【表31】

| 投与群                | 重症度        |            |            |
|--------------------|------------|------------|------------|
|                    | 軽度         | 中等度        | 重度         |
| 90 $\mu$ g XG-102  | 55 (70.5%) | 6 (7.7%)   | 17 (21.7%) |
| 900 $\mu$ g XG-102 | 49 (71.0%) | 12 (17.4%) | 8 (11.6%)  |
| デキサメタゾン            | 42 (76.4%) | 9 (16.4%)  | 4 (7.3%)   |

データは、事象の数(報告された事象の%)である。

10

【0545】

試験処置の点眼剤の中断をもたらしたA Eのまとめの概要を、投与群ごとに、以下の表に示す。

【表32】

| 投与群                | 試験処置の中断をもたらした有害事象 |
|--------------------|-------------------|
| 90 $\mu$ g XG-102  | 11 (14.1%)        |
| 900 $\mu$ g XG-102 | 8 (11.6%)         |
| デキサメタゾン            | 3 (5.5%)          |

データは、事象の数(報告された事象の%)である。

20

【0546】

90 $\mu$ g XG-102投与群へと割り付けられた患者については、11例の事象（この投与群内で報告された全てのA Eの14%）が、試験処置の早期の中止をもたらしたが、900 $\mu$ g XG-102投与群およびデキサメタゾン投与群では、試験処置の点眼剤は、それぞれ、8例の事象（この投与群内で報告された全てのA Eの12%）および3例の事象（この投与群内で報告された全てのA Eの6%）について中断された。

【0547】

治験責任医師は、報告された各A Eの、試験処置のいずれかに対する関係性を評価した（盲検化された様式で）。治験責任医師が、この問いへの答えとして、「疑いがある」かまたは「ほぼ確実である」とチェックした場合、事象は、試験処置と関連すると考えられた。加えて、治験責任医師は、試験処置の（すなわち、XG-102またはデキサメタゾン）のいずれに、事象が関連すると考えられるのかも指定しなかった（下記の表を参照されたい）。A Eは、治験責任医師（盲検化された評価）により、90 $\mu$ g XG-102群内の患者について報告された18例の事象について、900 $\mu$ g XG-102群内の患者について報告された13例の事象について、およびデキサメタゾン群内の患者について報告された15例の事象について、試験薬物治療と関連する疑いがあるか、またはこれと関連することがほぼ確実であると考えられた（下記の表を参照されたい）。報告されたS A Eのいずれも、治験責任医師により、試験処置のいずれとも関連する疑いがあるとも、これと関連することがほぼ確実であるとも考えられなかった。

30

40

【表 3 3】

|                               | 90 µg XG-102<br>(N=47) | 900 µg XG-102<br>(N=48) | デキサメタゾン (N=50) |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------|----------------|
| 治験責任医師により評価された、試験処置との関係       | 事象総#                   | 事象総#                    | 事象総#           |
| 関連する疑いがあるかまたは関連することがほぼ確実である   | 18                     | 13                      | 15             |
| 治験責任医師によりXG-102と関連すると考えられるAE  | 16 (20.5%)             | 12 (17.4%)              | 13 (23.64%)    |
| 治験責任医師によりデキサメタゾンと関連すると考えられるAE | 2 (2.6%)               | 1 (1.5%)                | 2 (3.6%)       |

データは、事象数である。N=各群内の患者数、#=数、µg=マイクログラム、%=百分率。

## 【0548】

有害事象の提示：

治験責任医師が、e-CRFにおける「試験処置との関連」という問いへの答えとして、「疑いがある」かまたは「ほぼ確実である」とチェックした場合、報告された事象は、試験処置と関連すると考えられた。3つの試験群のいずれかへと無作為化された患者の少なくとも2%について報告された、AE（MedDRAのSOCおよびPT用語により分類された）の概要は、図65において見出すことができる。

## 【0549】

有害事象の解析

全般的に、AEが報告された患者の数に関して、XG-102投与群のいずれかとデキサメタゾン投与群との間で、統計学的有意差はなかった。90 µg XG-102群へと割り付けられた患者については、この群へと割り付けられた患者47例中31例（66%）について、のべ78例のAEが報告され、900 µg XG-102群へと割り付けられた患者については、患者48例中32例（67%）について、のべ69例のAEが報告された。デキサメタゾン群へと割り付けられた患者については、患者50例中29例（58%）について、のべ55例のAEが報告された。試験処置投与後24時間以内にAEを経験した患者の百分率は、3つの試験処置群の間で同様（すなわち、90 µg XG-102群、900 µg XG-102群、およびデキサメタゾン群について、それぞれ、34%、27%、および30%）であった。

## 【0550】

最も高頻度で報告されたAEは、SOC中の「眼障害」であった。このSOC中で、49例の事象が、90 µg XG-102へと割り付けられた患者26例（55%）について報告され、43例の事象が、900 µg XG-102へと割り付けられた患者24例（50%）について報告され、30例の事象が、デキサメタゾンへと割り付けられた患者16例（32%）について報告された。このSOC中の事象が報告された患者の数に関して、90 µg XG-102群とデキサメタゾン群との間で、統計学的有意差があった（ $p=0.025$ ）。炎症を示唆する事象（「眼炎症」、「角膜浮腫」、「眼瞼浮腫」など）は、90 µg XG-102投与群へと割り付けられた患者について、900 µg XG-102投与群またはデキサメタゾン投与群へと割り付けられた患者と比較して高頻度で報告された。眼痛は、900 µg XG-102群へと割り付けられた患者について、より高頻度で報告され、デキサメタゾン群と比較した場合、この事象が報告された患者の数の差異は、統計学的に有意であった（ $p=0.029$ ）。SOC中の「検査」、「眼内圧の上昇」は、90 µg XG-102群へと割り付けられた患者（23%）について、900 µg XG-102群およびデキサメタゾン群についての、それぞれ、10%およ

10

20

30

40

50

び14%と比較した場合に、より高頻度で報告された。この事象が報告された患者の数の差異(90 $\mu$ g XG-102群とデキサメタゾン群との差異)は、統計学的に有意ではなかった。試験処置の点眼剤は、90 $\mu$ g XG-102へと割り付けられた患者11例について、900 $\mu$ g XG-102へと割り付けられた患者8例について、およびデキサメタゾンへと割り付けられた患者3例について、AEのために中断された。図65は、無作為化群に関わらず、少なくとも2%の患者に生じた、AE(MedDRAのSOCおよび基本語(PT: preferred term)の用語により分類された)の概要を示す。

#### 【0551】

##### 重篤な有害事象

該当する重篤な有害事象を、図66に列挙する。のべ9例のSAEが、9例の患者について(すなわち、90 $\mu$ g XG-102投与群へと無作為化された患者4例について、900 $\mu$ g XG-102投与群へと無作為化された患者3例について、およびデキサメタゾン投与群へと無作為化された患者2例について)報告された。のべ1例のSAE(90 $\mu$ g XG-102投与群へと無作為化された患者1例について)は、試験処置の結膜下注射投与後の最初の24時間以内に報告された。報告されたSAEのいずれも、治験責任医師により、試験処置と関連するとは考えられなかった。報告された全てのSAEの「重篤性の理由」は、「入院」であった。報告されたSAEの概要を、図66に示す。

#### 【0552】

##### 臨床検査室における評価

試験のために実施された血液学アッセイおよび化学アッセイを、以下の表に示す。全ての検査室検査は、地域ごとに実施した。

#### 【表34】

|      |                                                                                         |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 血液学: | ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球カウント(WBC)、好中球、好塩基球、好酸球、単球、およびリンパ球                                     |
| 化学:  | クレアチニン、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ(ガンマ-GT)、グルコース、CK、CRP |

#### 【0553】

##### 安全性についての結論

全般的に、90 $\mu$ g XG-102および900 $\mu$ g XG-102は、複合眼手術を受けた患者において、良好に忍容された。試験処置の点眼剤は、90 $\mu$ g XG-102へと無作為化された患者11例について、900 $\mu$ g XG-102へと無作為化された患者8例について、およびデキサメタゾンへと無作為化された患者3例について、早期に中止された。試験処置の早期の中止の理由は主に、治験責任医師の意見で抗炎症処置の強化が必要とされた眼炎症の遷延のためであった。該当する患者には、オープンラベルの抗炎症眼処置による処置が開始された。

#### 【0554】

この試験では、致死性の事象は、報告されなかった。のべ9例のSAEが、9例の患者について報告されたが、これらの事象のいずれも、試験処置と関連するとは考えられなかった。

#### 【0555】

報告されたAEの全般的な数については、AEが報告された患者の数に関して、XG-102投与群のいずれかとデキサメタゾン群との間で、統計学的有意差はない。90 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者については、この群へと割り付けられた患者4

10

20

30

40

50

7例中31例(66%)について、のべ78例のAEが報告され、900 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者については、患者48例中32例(67%)について、のべ69例のAEが報告された。デキサメタゾン群へと割り付けられた患者については、患者50例中29例(58%)について、のべ55例のAEが報告された。試験処置投与後24時間以内にAEを経験した患者の百分率は、3つの試験処置群の間で同様(すなわち、90 $\mu$ g XG-102群、900 $\mu$ g XG-102群、およびデキサメタゾン群について、それぞれ、34%、27%、および30%)であった。眼炎症を示唆するAEを経験した患者の数は、90 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者において、900 $\mu$ g XG-102群およびデキサメタゾン群と比較して高かったことから、90 $\mu$ g XG-102は、複合眼手術に続発する眼炎症の処置において、それほど有効ではない可能性があることが示唆される。眼痛を示唆するAEを経験した患者の数は、900 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者において、90 $\mu$ g XG-102群およびデキサメタゾン群と比較して高かった。90 $\mu$ g XG-102群内の2例の患者について、眼痛は、試験処置の結膜下注射後24時間未満において報告された(これらの患者のうちの1例については、術後の鎮痛処置は、処方されなかった)。これらの患者のうちの1例について、眼痛はまた、35日後において、AEとして再度報告されたが、これは、患者のIOPが上昇していると報告されたのと同じ時点であった。

10

#### 【0556】

900 $\mu$ g XG-102群内の3例の患者(すなわち、患者FR-02-0013、FR-03-003、およびFR-05-0060)について、眼痛は、試験処置の結膜下注射後24時間未満において報告され、これらの患者のうちの1例(すなわち、患者FR-02-0013)について、眼痛はまた、5日後において、AEとして再度報告された。同じ投与群内の4例の患者(すなわち、患者FR-04-0108、FR-05-0127、FR-05-0152、およびFR-05-0155)について、眼痛は、試験処置の結膜下注射後>24時間において、相伴って報告されたこれらの患者のうちの3例(すなわち、患者FR-02-0113、FR-05-0127、およびFR-05-0155)について、眼痛は、他のAEと相伴なって報告された。眼痛は、デキサメタゾン群内の1例の患者(すなわち、FR-03-0087)については、試験処置の結膜下注射後>24時間において、相伴って報告された。この事象は、他のAEと相伴なって報告された。複合手術を実施したことを踏まえると、眼痛はまた、手術後における縫合の存在とも関連し得た。

20

30

#### 【0557】

##### 要約

遵守：試験処置の結膜下注射が開始された全ての患者に、全量(すなわち、250 $\mu$ L)を投与した。3つの試験処置群内で、試験処置の点眼剤に対する全般的な遵守は、>90%であった。

#### 【0558】

安全性：有害事象が報告された患者の数に関して、XG-102投与群のいずれかとデキサメタゾン群との間で、統計学的有意差はなかった。90 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者については、この群へと割り付けられた患者47例中31例(66%)について、のべ78例の有害事象が報告され、900 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられた患者については、患者48例中32例(67%)について、のべ69例の有害事象が報告された。デキサメタゾン群へと割り付けられた患者については、患者50例中29例(58%)について、のべ55例の有害事象が報告された。試験処置投与後24時間以内に有害事象を経験した患者の百分率は、3つの試験処置群の間で同様(すなわち、90 $\mu$ g XG-102群、900 $\mu$ g XG-102群、およびデキサメタゾン群について、それぞれ、34%、27%、および30%)であった。90 $\mu$ g XG-102群へと割り付けられたより多くの患者が、900 $\mu$ g XG-102群およびデキサメタゾン群と比較して、眼炎症を示唆する有害事象を経験したことから、90 $\mu$ g XG-102は、複合眼手術に続発する眼炎症の処置において、それほど有効ではない(900 $\mu$ g投与

40

50

群およびデキサメタゾン投与群と比較して) 可能性があることが示唆され得る。眼痛を示唆する有害事象を経験した患者の数は、 $900\mu\text{g}$  XG-102群へと割り付けられた患者において、 $90\mu\text{g}$  XG-102群およびデキサメタゾン群と比較して多かった。眼痛は、手術後における縫合の存在と関連し得る。「眼内圧の上昇」は、 $90\mu\text{g}$  XG-102群へと割り付けられた患者(23%)について、 $900\mu\text{g}$  XG-102群およびデキサメタゾン群についての、それぞれ、10%および14%と比較した場合に、より高頻度で報告された。この事象が報告された患者の数の差異( $90\mu\text{g}$  XG-102群とデキサメタゾン群との差異)は、統計学的に有意ではなかった。

#### 【0559】

報告された全ての有害事象(AE)の大部分(約70%)は、治験責任医師により、軽度であると考えられた。合計AEは、治験責任医師(盲検化された評価)により、 $90\mu\text{g}$  XG-102群内の患者について報告された18例の事象について、 $900\mu\text{g}$  XG-102群内の患者について報告された13例の事象について、およびデキサメタゾン群内の患者について報告された15例の事象について、試験薬物治療と関連する疑いがあるか、またはこれと関連することがほぼ確実であると考えられた。この試験では、致死性の事象は、報告されなかった。のべ9例のSAEが、9例の患者について報告されたが、これらの事象のいずれも、試験処置と関連するとは考えられなかった。

#### 【0560】

XG-102の定量化は、32例の患者のサブセット内で実施した。血液サンプルは、試験処置の結膜下注射の1時間後において得た。得られた全てのサンプルについて(かつ、割り当てられた投与群に関わらず)、XG-102濃度を、 $<10\text{ng/ml}$ の定量下限(LLoQ: lower limit of quantification)を下回ると解析した。

#### 【0561】

本発明者らの非劣性の規定に従い、単回結膜下注射として投与された $900\mu\text{g}$  XG-102および $90\mu\text{g}$  XG-102のいずれも、複合眼手術を受けた患者における前房細胞グレードにより評価される通り、術後眼内炎症の処置において、1日4回ずつ21日間にわたり滴下されたデキサメタゾン点眼剤による処置に照らして非劣性であった。

#### 【0562】

全般的に、 $90\mu\text{g}$  XG-102および $900\mu\text{g}$  XG-102は、良好に忍容された。報告された有害事象のいずれも、忍容不可能であるかまたは不可逆的なXG-102の副作用であることが示唆されなかった。 $90\mu\text{g}$  XG-102において報告された、眼炎症を示唆する事象の数が多かったことは、この用量が、複合眼手術後の患者における術後眼内炎症の処置では、それほど有効ではないことを示唆する。これはまたおそらく、 $90\mu\text{g}$  XG-102群内の眼炎症の遷延に起因する、レスキュー薬物治療を導入された患者の百分率によっても裏付けられる。試験処置の結膜下注射の投与の1時間後において評価された、血漿中XG-102の定量化により、XG-102の全身への移行がないことが実証された。

#### 【0563】

(実施例28)

p-38 (Mapk14) 欠損マウスにおける、XG-102の、インビボの肝臓癌に対する効果

p-38としてもまた公知のMapk14は、細胞増殖および腫瘍形成に対する、周知の負の調節物質である。この試験では、Mapk14<sup>f/f</sup>マウスおよびMapk14<sup>Δ1i</sup>\*マウスのほか、Mapk14<sup>f/f</sup>Jun<sup>f/f</sup>マウスおよびMapk14<sup>Δ1i</sup>\*Jun<sup>Δ1i</sup>\*マウスも使用した。本明細書では、「Mapk14<sup>Δ1i</sup>\*」および「Mapk14<sup>Δ1i</sup>\*Jun<sup>Δ1i</sup>\*」は、それぞれ、polyICで処置されたMxcre/Mapk14<sup>f/f</sup>マウスおよびMxcre欠失Mapk14<sup>f/f</sup>Jun<sup>f/f</sup>マウスを意味し、したがって、それぞれ、Mxcreプロセスによる、それぞれ、Mapk14「欠失」およびJun欠失をもたらす、すなわち、それぞれ、「Mapk1

10

20

30

40

50

4 - / -」マウスおよび「Mapk14 - / - Jun - / -」マウスをもたらす。

#### 【0564】

肝細胞および肝臓の腫瘍細胞のジエチルニトロソアミン (DEN) 誘導性過剰増殖 (Hui L. ら, p38a suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. Nature Genetics, 2007年; 39巻: 741~749頁を参照されたい) に対するその効果を試験するために、XG-102を、20mg/kgの用量で1週間に2回腹腔内投与した。PBSを、コントロールとして使用した。具体的には、Mapk14<sup>f/f</sup>マウスおよびMapk14<sup>Δ1i</sup>\*マウスに、DEN処置の前において、PBSまたはXG-102 (体重1kg当たり20mg) のいずれかを注射した。次いで、マウスにおける肝細胞の増殖を、DEN処置の48時間後において、Ki67染色により解析し、定量化した。

10

#### 【0565】

図67は、左パネルにおいて、XG-102 (図では、「D-JNKI1」と称する) またはPBS処置されたMapk14<sup>f/f</sup>マウスおよびMapk14<sup>Δ1i</sup>\*マウスにおける肝細胞の増殖 (Ki67陽性細胞の定量化) を示す。PBS条件 (コントロール) 下では、Mapk14 (p38) による、細胞増殖および腫瘍形成に対する負の調節が存在しないので、Mapk14<sup>-/-</sup>細胞 (Mapk14<sup>Δ1i</sup>\*) は、Mapk14<sup>+/-</sup>細胞 (Mapk14<sup>f/f</sup>) より大幅に増殖している。XG-102の投与は、このMapk14の「非活性」 (Mapk14<sup>-/-</sup>細胞において) を、XG-102 (DJNKI1) の活性により逆転させる。

20

#### 【0566】

図67の右パネルでは、XG-102 (図では、「D-JNKI1」と称する) で処置されたMapk14<sup>f/f</sup> Jun<sup>f/f</sup> (Mapk14<sup>+/-</sup> Jun<sup>+/-</sup>を意味する) マウスおよびMapk14<sup>Δ1i</sup>\* Jun<sup>Δ1i</sup>\* (Mapk14<sup>-/-</sup> Jun<sup>-/-</sup>を意味する) マウスにおける肝細胞の増殖 (Ki67陽性細胞の定量化) を示す。結果は、PBS条件下のMapk14<sup>f/f</sup>マウスおよびXG-102 (DJNKI1) 条件下のMapk14<sup>Δ1i</sup>\*マウスの結果と同等であり、これらを模倣する。したがって、XG-102活性は、細胞系内のJun遺伝子の欠失と「同等」である。

#### 【0567】

30

まとめると、これらの結果は、XG-102が、がん細胞系の成長に対して活性を有し (Mapk14の欠失により誘導された過剰成長を逆転する)、これはおそらく、Junにより媒介されることを確認している。

#### 【0568】

(実施例29)

XG-102の、インビボのヒト肝臓がん細胞 (植え込まれた) に対する効果

XG-102の、インビボのヒト肝臓がん細胞に対する効果を試験するため、3×10<sup>6</sup>個のHuh7ヒト肝臓がん細胞を、4週齢のヌードマウスの両側腹部領域へと皮下注射した。ヌードマウスを、Huh7の注射後、5mg/kgのXG-102で、1週間に2回腹腔内処置した。腫瘍体積を1週間に2回測定した。マウスは、異種移植の4週間後に死なせた。

40

#### 【0569】

図68に示される通り、ヌードマウスにおけるヒト肝細胞癌の皮下注射の後に、毎週2回ずつ腹腔内投与されたXG-102は、5mg/kgの用量で、腫瘍成長を顕著に低減した。

#### 【0570】

(実施例30)

同所性HEP G2ヒト肝臓癌を保有するSwissヌードマウスにおける、1mg/kg XG-102の抗腫瘍活性

本試験の目的は、1mg/kg XG-102の抗腫瘍活性を、同所性Hep G2ヒ

50

ト肝臓癌を保有するSWISSヌードマウスモデルにおいて決定することであった。

#### 【0571】

健常雌SWISSヌードマウス20匹を、Charles River (L'Arbresles, France) から得た。動物実験は、European ethical guidelines of animal experimentationおよびEnglish guidelines for welfare of animals in experimental neoplasiaに準拠して実施した。動物を、温度 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ )、湿度 ( $45 \pm 5\%$ )、光周期 (12時間明期/12時間暗期)、および換気の制御条件下にある室内で維持した。動物を、SPF条件下および室温で維持し、湿度は、持続的にモニタリングした。空調システムは、再循環を伴わない、1時間当たり14回の換気にプログラムした。新鮮な外気は、各部屋へと均等に拡散させる前に、一連のフィルターを通す。実験室内では、高圧 ( $20 \pm 4\text{ Pa}$ ) を維持して、マウスコロニー内の病原体による汚染または病原体の拡散を予防した。SPF条件下で作業する全ての職員は、動物飼育領域に入るときは、衛生状態および着衣に関する特別なガイドラインに従った。動物は、食餌および水を供給するよう備えた、ポリカーボネート製のケージ (UAR, Epinay sur Orge, France) 内に収容した。使用するケージの標準面積は、 $800\text{ cm}^2$  とし、内部標準操作手順に従い、ケージ1つ当たり最大10匹のマウスとした。動物の敷きわらは、滅菌おがくず (SERLAB, Cergy-Pontoise, France) とし、1週間に1回取り替えた。動物の食餌は、SERLAB (Cergy-Pontoise, France) から購入した。滅菌制御顆粒の種類は、DIETEXとした。食餌は、ケージの上部の金属製の蓋に入れて、自由に摂取できるようにした。水もまた、ゴム製の止栓およびシッパチューブを備えた給水ボトルから自由に給水できるようにした。給水ボトルは清浄化し、濾過により滅菌された水で満たし、1週間に2回取り替えた。

#### 【0572】

XG-102を投与するために、原液を、滅菌水 (WFI, Aguettant) 中に  $10\text{ mM}$  ( $38.22\text{ mg/ml}$  に対応する) で調製した。各処置日用のアリコート調製し、約  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。この原液の、WFIによる、 $0.2\text{ mg/ml}$  への希釈を、各処置日用に実施し、 $2 \sim 4^\circ\text{C}$  で最長24時間にわたり保存した。原液の安定性は、約  $-80^\circ\text{C}$  で100日間を超え、動物への投与のための希釈処方物の安定性は、 $2 \sim 4^\circ\text{C}$  で24時間である。希釈処方物は、使用まで氷上で維持し、使用されなかった希釈材料は廃棄した。XG-102の処置用量は、注射1回当たり  $1\text{ mg/kg}$  で注射した。注射は、10日目、14日目、18日目、22日目、41日目、45日目、49日目、および53日目に ( [4日ごとに1回ずつ4回]  $\times 2$  ) で実施した。XG-102物質は、マウスの尾静脈を介して、 $5\text{ ml/kg}$  で静脈内 (IV) 注射した。注射容量は、直近のマウスの個別体重に応じて適合させた。

#### 【0573】

腫瘍細胞系および培養培地は、購入し、Oncodesignから提供された。

#### 【表35】

| 細胞系    | 種類    | 種  | 由来    | 参考文献 |
|--------|-------|----|-------|------|
| Hep G2 | ヒト肝臓癌 | ヒト | ATCC* | 4    |

\*American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

#### 【0574】

Hep G2細胞系は、肝細胞癌を有する15歳のアルゼンチン人の少年の腫瘍組織から、1975年に樹立された (ADEN D. P. ら、Nature、282巻: 615~616頁、1979年)。腫瘍細胞は、加湿雰囲気 ( $5\%$  の  $\text{CO}_2$ 、 $95\%$  の空気) 中、 $37^\circ\text{C}$  で付着性単層として成長させた。培養培地は、 $2\text{ mM}$  のL-グルタミン (型番BE12-702F, Lonza, Verviers, Belgium) を含有し、 $10\%$

のFBS（型番DE14-801E、Lonza）を補充したRPMI 1640であった。実験における使用のために、細胞を、5分間にわたるトリプシン-バーゼン液（型番02-007E、Cambrex）による処理によって培養フラスコからはがし、カルシウムまたはマグネシウムを含まないハンス培地（型番BE10-543F、Cambrex）中で希釈し、完全培養培地を添加することにより中和した。細胞を血球計によりカウントし、それらの生存率を、0.25%トリパンブルー排除法により評価した。マイコプラズマの検出は、製造元の指示に従い、MycAlert（登録商標）マイコプラズマ検出キット（型番LT07-318、Lonza）を使用して実施した。MycAlert（登録商標）アッセイは、マイコプラズマの酵素の活性を利用する、選択的な生化学試験である。生存可能なマイコプラズマを溶解させ、該マイコプラズマの酵素がMycAlert（登録商標）基質と反応し、ADPからATPへの変換を触媒する。MycAlert（登録商標）基質の添加前および添加後の両方における、サンプル中のATPレベルを測定することにより、マイコプラズマの存在または非存在を示す比を得ることができる。マイコプラズマ試験は、細胞系の培養物上清から二連でアッセイし、陰性コントロールおよび陽性コントロール（MycAlert（登録商標）アッセイコントロールセット、型番LT07-518、Lonza）と比較した（内部標準操作手順番号：TEC-007/002；データは示さないが、取得した）。

#### 【0575】

実験デザイン：

腫瘍を誘発する24時間前に、雌SWISSヌードマウス20匹に、 $\gamma$ 線源（2.5 Gy、Co60、INRA、Dijon、France）を照射した。0日目において、Hep G2腫瘍を、雌SWISSヌードマウス20匹に同所性に誘発した。麻酔下では、無菌条件下の正中切開により動物の腹部を切開した。50  $\mu$ lのRPMI 1640培養培地中に懸濁させたHep G2腫瘍細胞1000万（ $10^7$ ）個を、肝臓の被膜下領域内に注射した。その後、腹腔を、5-0縫合糸による2層で閉合した。

#### 【0576】

10日目において、処置の開始前に、それらの体重に従い、マウス10匹ずつの2つの群を形成するように、マウスを無作為化した。各群の体重は、他の群の体重と統計学的に差がなかった（分散分析）。群1に由来するマウスには、注射1回当たり5ml/kgで、ビヒクルのIV注射1回を、10日目、14日目、18日目、22日目、41日目、45日目、49日目、および53日目に（[4日ごとに1回ずつ4回]×2で）施し、群2に由来するマウスには、注射1回当たり1mg/kgで、XG-102のIV注射1回を、10日目、14日目、18日目、22日目、41日目、45日目、49日目、および53日目に（[4日ごとに1回ずつ4回]×2で）施した。

#### 【表36】

| 群 | 数 | 処置     | 用量 | 経路 | 処置              |
|---|---|--------|----|----|-----------------|
| 1 | 8 | ビヒクル   | -  | IV | [4日ごとに1回ずつ4回]×2 |
| 2 | 7 | XG-102 | 1  | IV | [4日ごとに1回ずつ4回]×2 |

#### 【0577】

185日目に、生存するマウスを屠殺した。

#### 【0578】

マウスは、試験を通して毎日、挙動および生存についてモニタリングした。体重は、全てのマウスについて、試験を通して1週間に2回、モニタリングした。Isoflurane（登録商標）Forene（Centravet、Bondoufle、Franc

e) を使用して、細胞の注射、I V 処置、および屠殺の前において、動物に麻酔をかけた。実験の経過中において、以下：

- ・罹患の徴候（悪液質、体力減退、運動または摂食の困難）、
- ・化合物の毒性（円背位（hunching）、痙攣）、
- ・連続3日間の間の20%の体重減少または任意の日における25%の体重減少

のいずれかが生じた場合は、動物を、Isoflurane（登録商標）による麻酔下で、頸椎脱臼により死なせた。

#### 【0579】

症例ごとに剖検（autopsy）を実施した。マウスが瀕死に見える場合は、それらを屠殺し、剖検した（necropsied）。肝臓を回収し、秤量した。

10

#### 【0580】

体重解析のために、マウスの体重曲線を作成した。平均体重変化（MBWC：mean body weight change）：グラム単位による処置された動物の平均体重変化（X日目における体重－10日目における体重）を計算した。

#### 【0581】

有効性パラメータは、パーセント（T/C%）として表した。Tは、薬物で処置された動物の中央値生存期間であり、Cは、ビヒクルで処置されたコントロール動物の中央値生存期間である。生存システムは、T/Cパーセントが125を超える場合に、ある程度の成功を示した。T/C%は、以下： $T/C\% = [T/C] \times 100$ の通りに表された。マウスの生存曲線を作成した。平均生存期間は、各処置群について、死までの平均日数として計算した。中央値生存期間は、各処置群について、死までの日数の中央値として計算した。ログランク（カプランマイヤー）検定を使用して、生存曲線を比較した。体重およびMBWCの統計学的解析を実施するのに、StatView（登録商標）ソフトウェア（Abacus Concept、Berkeley、USA）を使用するボンフェローニ/ダン検定（ANOVAによる比較）を使用した。p値<0.05を、有意と考える。全ての群は、互いと比較した。

20

#### 【0582】

図69には、同所性に注射されたHEP G2腫瘍を保有するマウスの、平均体重曲線および平均体重変化曲線を示す。マウスを、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、注射1回当たり1mg/kg XG-102でI V処置した。図69に示される通り、体重について明らかな差異は生じなかったことから、XG-102は、良好に忍容されたことが示された。これに応じて、図70には、それぞれの統計学的データを提示する。

30

#### 【0583】

図71は、屠殺日（185日目）までの、群ごとの生存マウスの比率を示す、マウスの長期生存曲線を示す。マウスは、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、表示の用量のXG-102で処置した。これらのデータは、XG-102で処置されたマウスについての生存の延長を明らかに示す。これに応じて、統計学的データを下記に提示する（HEP G2腫瘍を異種移植され、XG-102で処置されたマウスの生存解析）。

40

【表 3 7】

| 処置(10日目および<br>41日目、4日ごとに<br>1回ずつ4回にわたる<br>) | 中央値生存期間<br>±SD(日) | 平均生存期間(日) | T/C (%) |
|---------------------------------------------|-------------------|-----------|---------|
| ビヒクル                                        | 102 ± 8           | 102       | -       |
| XG-102(1mg/kg)                              | 111 ± 14          | 123       | 120     |

| 群              | カイ     | df | p      | 有意性 |
|----------------|--------|----|--------|-----|
| XG-102(1mg/kg) | 5.1550 | 1  | 0.0232 | S   |

10

## 【0 5 8 4】

マウスの生存期間は、T / C ( % ) 値 ( 処置群の死までの日数の中央値と、腫瘍を保有する非処置コントロール群の死までの日数の中央値との比 ) としての中央値生存期間として表した。統計学的解析は、ビヒクル処置群を基準とするログランク検定により実施した。

## 【0 5 8 5】

まとめると、これらのデータは、X G - 1 0 2 の投与が、H e p G 2 腫瘍を異種移植されたマウスの生存期間を延長することを示す。

## 【0 5 8 6】

20

( 実施例 3 1 )

同所性 H E P G 2 ヒト肝臓癌を保有する S w i s s ノードマウスにおける、X G - 1 0 2 の抗腫瘍活性 ( 用量 / 反応関係 )

## 【0 5 8 7】

この試験の目的は、X G - 1 0 2 の抗腫瘍活性 ( 用量 / 反応関係 ) を、同所性 H e p G 2 ヒト肝臓癌腫瘍を保有する S W I S S ノードマウスモデルにおいて決定することであった。

## 【0 5 8 8】

健常雌 S W I S S ノードマウス 3 2 匹を、C h a r l e s R i v e r ( L ' A r b r e s l e s 、 F r a n c e ) から得た。動物実験は、E u r o p e a n e t h i c a l g u i d e l i n e s o f a n i m a l e x p e r i m e n t a t i o n および E n g l i s h g u i d e l i n e s f o r w e l f a r e o f a n i m a l s i n e x p e r i m e n t a l n e o p l a s i a に準拠して実施した。動物を、温度 ( 2 3 ± 2 ° C ) 、湿度 ( 4 5 ± 5 % ) 、光周期 ( 1 2 時間明期 / 1 2 時間暗期 ) 、および換気の制御条件下にある室内で維持した。動物を、S P F 条件下および室温で維持し、湿度は、持続的にモニタリングした。空調システムは、再循環を伴わない、1 時間当たり 1 4 回の換気にプログラムした。新鮮な外気は、各部屋へと均等に拡散させる前に、一連のフィルターを通した。実験室内では、高圧 ( 2 0 ± 4 P a ) を維持して、マウスコロニー内の病原体による汚染または病原体の拡散を予防した。S P F 条件下で作業する全ての職員は、動物飼育領域に入るときは、衛生状態および着衣に関する特別なガイドラインに従った。動物は、食餌および水を供給するよう備えた、ポリカーボネート製のケージ ( U A R 、E p i n a y s u r O r g e 、F r a n c e ) 内に収容した。使用するケージの標準面積は、8 0 0 c m 2 とし、内部標準操作手順に従い、ケージ 1 つ当たり最大 1 0 匹のマウスとした。動物の敷きわらは、滅菌おがくず ( S E R L A B 、C e r g y - P o n t o i s e 、F r a n c e ) とし、1 週間に 1 回取り替えた。動物の食餌は、S E R L A B ( C e r g y - P o n t o i s e 、F r a n c e ) から購入した。滅菌制御顆粒の種類は、D I E T E X とした。食餌は、ケージの上部の金属製の蓋に入れて、自由に摂取できるようにした。水もまた、ゴム製の止栓およびシッパチューブを備えた給水瓶から自由に給水できるようにした。給水瓶は清浄化し、濾過により滅菌された水で満たし、1 週間に 2 回取り替えた。

30

40

50

## 【0589】

XG-102を投与するために、XG-102を、滅菌水(WFI、Aguettant、France)により、1mg/mlの濃度で調製した(preparecl)。次いで、それを(Lt)、滅菌水により、0.2および0.02mg/mlの濃度で希釈した(cliluted)。これらの全てのステップは、マウスへの注射前1時間以内に実施した。XG-102を、注射1回当たり0.1、1、および5mg/kgで注射した。4回の注射は、各回を4日間ずつ隔てて(4日ごとに1回ずつ4回にわたり)実施した。XG-102物質は、マウスの尾静脈を介して、5ml/kgで静脈内(IV)注射した。注射容量は、直近のマウスの個別体重に応じて適合させた。

## 【0590】

腫瘍細胞系および培養培地は、購入し、Oncodesignから提供された。

## 【表38】

| 細胞系    | 種類    | 種  | 由来    | 参考文献 |
|--------|-------|----|-------|------|
| Hep G2 | ヒト肝臓癌 | ヒト | ATCC* | 4    |

\*American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

## 【0591】

Hep G2細胞系は、肝細胞癌を有する15歳のアルゼンチン人の少年の腫瘍組織から、1975年に樹立された(ADEN D. P. ら、Nature、282巻:615~616頁、1979年)。腫瘍細胞は、加湿雰囲気(5%のCO<sub>2</sub>、95%の空気)中、37℃で付着性単層として成長させた。培養培地は、2mMのL-グルタミン(型番BE12-702F、Lonza、Verviers、Belgium)を含有し、10%のFBS(型番DE14-801E、Lonza)を補充したRPMI 1640であった。実験における使用のために、細胞を、5分間にわたるトリプシン-バーゼン液(型番02-007E、Cambrex)による処理によって培養フラスコからはがし、カルシウムまたはマグネシウムを含まないハックス培地(型番BE10-543F、Cambrex)中で希釈し、完全培養培地を添加することにより中和した。細胞を血球計によりカウントし、それらの生存率を、0.25%トリパンブルー排除法により評価した。マイコプラズマの検出は、製造元の指示に従い、MycAlert(登録商標)マイコプラズマ検出キット(型番LT07-318、Lonza)を使用して実施した。MycAlert(登録商標)アッセイは、マイコプラズマの酵素の活性を利用する、選択的な生化学試験である。生存可能なマイコプラズマを溶解させ、該マイコプラズマの酵素がMycAlert(登録商標)基質と反応し、ADPからATPへの変換を触媒する。MycAlert(登録商標)基質の添加前および添加後の両方における、サンプル中のATPレベルを測定することにより、マイコプラズマの存在または非存在を示す比を得ることができる。マイコプラズマ試験は、細胞系の培養物上清から二連でアッセイし、陰性コントロールおよび陽性コントロール(MycAlert(登録商標)アッセイコントロールセット、型番LT07-518、Lonza)と比較した(内部標準操作手順番号:TEC-007/002)。

## 【0592】

実験デザイン:

腫瘍を誘発する24時間前に、雌SWISSヌードマウス32匹に、γ線源(2.5Gy、Co<sup>60</sup>、INRA、Dijon、France)を照射した。0日目において、Hep G2腫瘍を、雌SWISSヌードマウス32匹に同所性に誘発した。麻酔下では、無菌条件下の正中切開により動物の腹部を切開した。50μlのRPMI 1640培養培地中に懸濁させたHep G2腫瘍細胞1000万(10<sup>7</sup>)個を、肝臓の被膜下領域内に注射した。その後、腹腔を、5-0縫合糸による2層で閉合した。

## 【0593】

10日目において、処置の開始前に、それらの体重に従い、マウス8匹ずつの4つの群

10

20

30

40

50

を形成するように、マウスを無作為化した。各群の体重は、他の群の体重と統計学的に差がなかった（分散分析）。群 1 に由来するマウスには、注射 1 回当たり 5 m l / k g で、ビヒクルの I V 注射 1 回を、4 日ごとに 1 回ずつ 4 回反復して（4 日ごとに 1 回ずつ 4 回にわたり）施し、群 2 に由来するマウスには、注射 1 回当たり 0. 1 m g / k g で、X G - 1 0 2 の I V 注射 1 回を、4 日ごとに 1 回ずつ 4 回反復して（4 日ごとに 1 回ずつ 4 回にわたり）施し、群 3 に由来するマウスには、注射 1 回当たり 1 m g / k g で、X G - 1 0 2 の I V 注射 1 回を、4 日ごとに 1 回ずつ 4 回反復して（4 日ごとに 1 回ずつ 4 回にわたり）施し、群 4 に由来するマウスには、注射 1 回当たり 5 m g / k g で、X G - 1 0 2 の I V 注射 1 回を、4 日ごとに 1 回ずつ 4 回反復して（4 日ごとに 1 回ずつ 4 回にわたり）施した。

10

【表 3 9】

| 群 | 数 | 処置     | 用量  | 経路 | 処置              |
|---|---|--------|-----|----|-----------------|
| 1 | 8 | ビヒクル   | -   | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |
| 2 | 8 | XG-102 | 0.1 | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |
| 3 | 8 | XG-102 | 1   | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |
| 4 | 8 | XG-102 | 5   | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |

20

## 【0 5 9 4】

1 7 1 日目に、生存するマウスを屠殺した。

## 【0 5 9 5】

マウスは、試験を通して毎日、挙動および生存についてモニタリングした。体重は、全てのマウスについて、試験を通して 1 週間に 2 回、モニタリングした。I s o f l u r a n e（登録商標）F o r e n e（C e n t r a v e t、B o n d o u f l e、F r a n c e）を使用して、細胞の注射、I V 処置、および屠殺の前において、動物に麻酔をかけた。実験の経過中において、以下：

30

- ・罹患の徴候（悪液質、体力減退、運動または摂食の困難）、
- ・化合物の毒性（円背位、痙攣）、
- ・連続 3 日間の間の 2 0 % の体重減少または任意の日における 2 5 % の体重減少

のいずれかが生じた場合は、動物を、I s o f l u r a n e（登録商標）による麻酔下で、頸椎脱臼により死なせた。

## 【0 5 9 6】

症例ごとに剖検を実施した。

## 【0 5 9 7】

6 7 日目に、肉眼的発生を観察するために、無作為化の間に群ごと 3 匹ずつ無作為に選択したマウスを屠殺した。各群内の残りのマウスは、生存をモニタリングするために保持した。最終的な屠殺は、1 7 1 日目に実施した。屠殺された動物から、原発腫瘍および肝臓を回収し、秤量した。各肝臓は、1 0 % の中性緩衝ホルマリン（f o n n a l i n）中で固定した。回収の 4 8 時間後、それらをパラフィン（H i s t o s e c（登録商標））中に包埋し、解剖病理学的解析のために使用した。組織学的解析により、マウス肝臓内の転移性浸潤を評価するために、パラフィン包埋された切片（5 μ m）を、キシレン中で脱パラフィン処理し、1 0 0 %、9 5 %、および 7 0 % のエタノール中の段階インキュベーションにより再水和させた。全ての切片は、組織学的解析のために、ヘマトキシリンおよびエオシン（H E）（型番：S 3 3 0 9、D a k o c y t o m a t i o n、T r a p p e s、F r a n c e）で染色した。カバースリップを、水性封入剤（A q u a t e x、型番 1. 0 8 5 6 2、M e r c k）でマウントし、切片を、光学顕微鏡（D M R B L e i c

40

50

a) 下で検査した。組織学切片は、病理学専門医が解析して、肝臓内の転移性浸潤を決定した。

#### 【0598】

体重解析のために、マウスの体重曲線を作成した。平均体重変化 (MBWC) : グラム単位による処置された動物の平均体重変化 (X日目における体重 - 10日目における体重) を計算した。

#### 【0599】

有効性パラメータは、パーセント (T/C%) として表した。Tは、薬物で処置された動物の中央値生存期間であり、Cは、ビヒクルで処置されたコントロール動物の中央値生存期間である。生存システムは、T/Cパーセントが125を超える場合に、ある程度の成功を示した。T/C%は、以下:  $T/C\% = [T/C] \times 100$  の通りに表された。マウスの生存曲線を作成した。平均生存期間は、各処置群について、死までの平均日数として計算した。中央値生存期間は、各処置群について、死までの日数の中央値として計算した。ログランク (カプラン-マイヤー) 検定を使用して、生存曲線を比較した。体重およびMBWCの統計学的解析を実施するのに、Stat View (登録商標) ソフトウェア (Abacus Concept, Berkeley, USA) を使用するボンフェローニ/ダン検定 (ANOVAによる比較) を使用した。p値<0.05を、有意と考える。全ての群は、互いと比較した。

#### 【0600】

図72は、同所性に注射されたHEP G2腫瘍を保有するマウスの平均体重曲線および平均体重変化曲線に関する統計学的データを示す。マウスは、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、XG-102でIV処置した。図72に示される通り、体重について明らかな差異は生じなかったことから、XG-102は、良好に忍容されたことが示された。

#### 【0601】

図73は、屠殺日 (171日目) までの、群ごとの生存マウスの比率を示す、マウスの長期生存曲線を示す。67日目に剖検のために屠殺されたマウスは、計算から除外した。マウスは、10日目および41日目の2回にわたり反復される、4日ごとに1回ずつ4回にわたる処置スケジュールに従い、表示の用量のXG-102で処置した。これらのデータは、XG-102で処置されたマウスについての生存の延長を、用量依存的な様式で明らかに示す。これに応じて、統計学的データを下記に提示する (HEP G2腫瘍を異種移植され、XG-102で処置されたマウスの生存解析)。

#### 【表40】

| 処置(10日目および41日目、4日ごとに1回ずつ4回にわたる) | 中央値生存期間(日間) | T/C (%) | 統計学的解析 |
|---------------------------------|-------------|---------|--------|
| ビヒクル                            | 86          | -       | -      |
| XG-102(0.1mg/kg)                | 105         | 123     | NS     |
| XG-102(1mg/kg)                  | 138         | 161     | NS     |
| XG-102(5mg/kg)                  | 118         | 137     | NS     |

#### 【0602】

剖検のために67日目に屠殺されたマウスは、計算から除外した。マウスの生存期間は、T/C (%) 値 (処置群の死までの日数の中央値と、腫瘍を保有する非処置コントロール群の死までの日数の中央値との比) としての中央値生存期間として表した。T/C%の値>125%は、抗腫瘍有効性を示す。

#### 【0603】

以下の表は、HEP G2がん細胞による、肝臓への腫瘍の発生を示す。肝臓における腫瘍塊の検出は、171日目に屠殺されたマウスにおけるHE染色の後における顕微鏡的観

10

20

30

40

50

察により実施した。

【表 4 1】

| 群                | 動物ID                 | 観察                                    |
|------------------|----------------------|---------------------------------------|
| ビヒクル             | 933                  | 肝臓における腫瘍                              |
| XG-102(0.1mg/kg) | 8665<br>2925         | 肝臓における腫瘍(1.3cm)<br>腫瘍の検出なし            |
| XG-102(1mg/kg)   | 8631<br>8641<br>2929 | 腫瘍の検出なし<br>腫瘍の検出なし<br>肝臓における腫瘍(1.9cm) |
| XG-102(5mg/kg)   | 2931<br>2765<br>2767 | 腫瘍の検出なし<br>腫瘍の検出なし<br>腫瘍の検出なし         |

10

【0604】

図 7 4 には、6 7 日目または 6 7 日目と最終的な屠殺との間に屠殺されたマウスの顕微鏡的評価により観察される腫瘍の浸潤を、ヒストグラム表示として示す。腫瘍生着のレベルを、図の凡例で指定される、4 つの異なるカテゴリーに分類した。

【0605】

(実施例 3 2)

皮下 PC-3 ヒト前立腺腫瘍を保有する Balb/c ノードマウスにおける、XG-102 の抗腫瘍活性

20

この試験の目的は、皮下 PC-3 ヒト前立腺腫瘍を保有する Balb/c ノードマウスモデルにおいて、XG-102 の抗腫瘍活性（用量／反応関係）を決定することであった。

【0606】

健常雄 Balb/c ノードマウス 15 匹は、Charles River (L'Arbresles, France) から得た。動物実験は、European ethical guidelines of animal experimentation および English guidelines for welfare of animals in experimental neoplasia に準拠して実施した。動物を、温度 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ )、湿度 ( $45 \pm 5\%$ )、光周期 (12 時間明期 / 12 時間暗期)、および換気の制御条件下にある室内で維持した。動物を、SPF 条件下および室温で維持し、湿度は、持続的にモニタリングした。空調システムは、再循環を伴わない、1 時間当たり 14 回の換気にプログラムした。新鮮な外気は、各部屋へと均等に拡散させる前に、一連のフィルターを通す。実験室内では、高圧 ( $20 \pm 4\text{ Pa}$ ) を維持して、マウスコロニー内の病原体による汚染または病原体の拡散を予防した。SPF 条件下で作業する全ての職員は、動物飼育領域に入るときは、衛生状態および着衣に関する特別なガイドラインに従った。動物は、食餌および水を供給するよう備えた、ポリカーボネート製のケージ (UAR, Epinay sur Orge, France) 内に収容した。使用するケージの標準面積は、 $800\text{ cm}^2$  とし、内部標準操作手順に従い、ケージ 1 つ当たり最大 10 匹のマウスとした。動物の敷きわらは、滅菌おがくず (SERLAB, Cergy-Pontoise, France) とし、1 週間に 1 回取り替えた。動物の食餌は、SERLAB (Cergy-Pontoise, France) から購入した。滅菌制御顆粒の種類は、DIETEX とした。食餌は、ケージの上部の金属製の蓋に入れて、自由に摂取できるようにした。水もまた、ゴム製の止栓およびシッパチューブを備えた給水瓶から自由に給水できるようにした。給水瓶は清浄化し、濾過により滅菌された水で満たし、1 週間に 2 回取り替えた。

30

40

【0607】

XG-102 を投与するために、XG-102 を、滅菌水 (WFI, Aguettant, France) により、 $0.2\text{ mg/ml}$  の濃度で調製した。次いで、それを、滅菌

50

水により、 $0.02 \text{ mg/ml}$  の濃度へと希釈した。これらの全てのステップは、マウスへの注射前1時間以内に実施した。XG-102を、注射1回当たり $0.1$ および $1 \text{ mg/kg}$ で注射した。4回の注射は、各回を4日間ずつ隔てて（4日ごとに1回ずつ4回にわたり）実施した。XG-102物質は、マウスの尾静脈を介して、 $5 \text{ ml/kg}$ で静脈内（IV）注射した。注射期間中に尾が壊死している場合は、腹腔内（IP）経路を使用した。注射容量は、直近のマウスの個別体重に応じて適合させた。

#### 【0608】

腫瘍細胞系および培養培地は、購入し、Oncodesignから提供された。

#### 【表42】

| 細胞系  | 由来      | 供給源   | 参考文献                                          |
|------|---------|-------|-----------------------------------------------|
| PC-3 | ヒト前立腺腺癌 | ATCC* | Bissery M.C.ら、Bull. Cancer、1991年、78巻:587～602頁 |

\*American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

#### 【0609】

PC-3は、62歳の白人男性による前立腺腺癌のグレードIVの骨転移に由来した（Volenec F. J. ら、J Surg Oncol 1980年；13巻（1号）：39～44頁）。腫瘍細胞は、加湿雰囲気（5%のCO<sub>2</sub>、95%の空気）中、37℃で付着性単層として成長させた。培養培地は、2mMのL-グルタミン（型番BE12-702F、Lonza、Verviers、Belgium）を含有し、10%のFBS（型番DE14-801E、Lonza）を補充したRPMI 1640であった。実験における使用のために、細胞を、5分間にわたるトリプシン-バーゼン液（型番02-007E、Cambrex）による処理によって培養フラスコからはがし、カルシウムまたはマグネシウムを含まないハンクス培地（型番BE10-543F、Cambrex）中で希釈し、完全培養培地を添加することにより中和した。細胞を血球計によりカウントし、それらの生存率を、0.25%トリパンブルー排除法により評価した。マイコプラズマの検出は、製造元の指示に従い、MycAlert（登録商標）マイコプラズマ検出キット（型番LT07-318、Lonza）を使用して実施した。MycAlert（登録商標）アッセイは、マイコプラズマの酵素の活性を利用する、選択的な生化学試験である。生存可能なマイコプラズマを溶解させ、該マイコプラズマの酵素がMycAlert（登録商標）基質と反応し、ADPからATPへの変換を触媒する。MycAlert（登録商標）基質の添加前および添加後の両方における、サンプル中のATPレベルを測定することにより、マイコプラズマの存在または非存在を示す比を得ることができる。マイコプラズマ試験は、細胞系の培養物上清から二連でアッセイし、陰性コントロールおよび陽性コントロール（MycAlert（登録商標）アッセイコントロールセット、型番LT07-518、Lonza）と比較した（内部標準操作手順番号：TEC-007/002）。

#### 【0610】

実験デザイン：

腫瘍を誘発する48時間前に、雄Balb/cヌードマウス15匹に、 $\gamma$ 線源（2.5 Gy、Co<sup>60</sup>、INRA、Dijon、France）を照射した。0日目において、200  $\mu$ lのRPMI培地中に懸濁させたPC-3細胞2000万（ $2 \times 10^7$ ）個を、雄Balb/cヌードマウス60匹の右側腹部に皮下注射した。

#### 【0611】

平均腫瘍体積が、 $80 \pm 38 \text{ mm}^3$ に達したら、処置の開始前に、それらの腫瘍体積に従い、マウス5匹ずつの3つの群を形成するように、マウスを無作為化した。各群の腫瘍体積は、他の群の腫瘍体積と統計学的に差がなかった（分散分析）。

#### 【0612】

10

20

30

40

50

試験物質の処置スケジュールは、以下の通りであった。群1に由来するマウスには、注射1回当たり5ml/kgで、ビヒクルのIV注射1回を、4日ごとに1回ずつ4回反復して（4日ごとに1回ずつ4回にわたり）施し、群2に由来するマウスには、注射1回当たり0.1mg/kgで、XG-102のIV注射1回を、4日ごとに1回ずつ4回反復して（4日ごとに1回ずつ4回にわたり）施し、群3に由来するマウスには、注射1回当たり1mg/kgで、XG-102のIV注射1回を、4日ごとに1回ずつ4回反復して（4日ごとに1回ずつ4回にわたり）施した。

【表43】

| 群 | 数 | 処置     | 用量  | 経路 | 処置              |
|---|---|--------|-----|----|-----------------|
| 1 | 5 | ビヒクル   | -   | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |
| 2 | 5 | XG-102 | 0.1 | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |
| 3 | 5 | XG-102 | 1   | IV | 4日ごとに1回ずつ4回にわたる |

10

## 【0613】

腫瘍が、2000mm<sup>3</sup>の最大体積に達したら、マウスを屠殺した。

## 【0614】

20

マウスは、試験を通して毎日、挙動および生存についてモニタリングした。体重および腫瘍体積は、全てのマウスについて、試験を通して1週間に2回、モニタリングした。Isoflurane（登録商標）Forene（Centravet、Bondoufle、France）を使用して、細胞の注射、IV処置、および屠殺の前において、動物に麻酔をかけた。実験の経過中において、以下：

- ・罹患の徴候（悪液質、体力減退、運動または摂食の困難）、
- ・化合物の毒性（円背位、痙攣）、
- ・連続3日間の間の20%の体重減少または任意の日における25%の体重減少、
- ・2000mm<sup>3</sup>を超える腫瘍体積

のいずれかが生じた場合は、動物を、Isoflurane（登録商標）による麻酔下で、頸椎脱臼により死なせた。

30

## 【0615】

症例ごとに剖検を実施した。

## 【0616】

体重解析のために、マウスの体重曲線を作成した。少なくとも1つの群内で、40%を超えるマウスの死が記録されたら、曲線を中止した。平均体重変化（MBWC）：グラム単位による処置された動物の平均体重変化（X日目における体重－33日目における体重）を計算した。

## 【0617】

腫瘍体積は、以下の式： $TV = (長さ \times 幅^2) / 2$  [式中、長さは、最大の腫瘍直径に対応し、幅は、最小の腫瘍直径に対応する] により計算した。腫瘍成長曲線は、平均腫瘍体積（MTV：mean tumor volume）±SDを使用して作成した。40%を超えるマウスが死んだら、曲線を中止した。個体の腫瘍体積曲線もまた作成した。下記に示す通りに異なる時点で計算された相対腫瘍体積（RTV：relative tumor volume）を使用して、相対腫瘍体積曲線も作成した。40%を超えるマウスが死んだら、曲線を中止した。RTVは、式：

40

$RTV = (X日目における腫瘍体積) / (33日目における腫瘍体積) \times 100$  に従い計算した。

## 【0618】

指数関数的腫瘍成長期の間、200%のMTVに到達するのに必要とされる期間として

50

規定される、腫瘍倍加時間 (DT: doubling time) は、Vivo Manager (登録商標) ソフトウェアを使用して計算した。V に到達するまでの時間を計算した。体積 V とは、実験データから推定される標的体積と規定され、腫瘍成長の指数関数期において選択される。体積 V は、各群の全てのマウスについて、可能な限り近接させて選択し、この体積 V に到達するまでの時間は、実験データから推定した。処置群の中央値腫瘍体積の、ビヒクル処置群と対比した比として規定される腫瘍成長阻害 (T/C%) を計算した。NCI 基準に準拠した、T/C% 比のための有効判定基準 (effective criteria) は、約 42% である (BISSERY M. C. ら、Bull. Cancer 1991 年、78 巻: 587~602 頁)。全ての統計学的解析は、Vivo Manager (登録商標) ソフトウェアを使用して実施した。処置の毒性および効能 (BWC、MBWC、TV、RTV、TTRV、および DT) の統計学的解析は、ボンフェローニ/ダン検定 (ANOVA による比較) を使用して実施した。全ての群は、互いと比較した。

10

#### 【0619】

図 75 には、抗腫瘍活性実験の間の、PC-3 腫瘍を保有するマウスの平均腫瘍体積を示す。33 日目に、動物 5 匹ずつの 3 つの群を、ビヒクルおよび XG-102 (注射 1 回当たり 0.1 および 1 mg/kg、4 日ごとに 1 回ずつ 4 回にわたる) で処置した。これらのデータは、時間経過にわたる腫瘍体積の低減を、XG-102 処置について、用量依存的な様式で示し、この場合、効果は、1 mg/kg XG-102 についてより顕著であった。

20

#### 【0620】

(実施例 33)

XG-102 の、同所性 HCT 116 ヒト結腸腫瘍を保有する SCID マウスにおける腫瘍成長に対する効果

この試験の目的は、XG-102 の、SCID マウスに同所性に異種移植された HCT 116 ヒト結腸腫瘍の成長に対する効果を決定することであった。

#### 【0621】

健常雌 SCID マウス 80 匹を、Charles River (L'Arbresles, France) から得た。動物実験は、European ethical guidelines of animal experimentation および English guidelines for welfare of animals in experimental neoplasia に準拠して実施した。動物を、温度 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ )、湿度 ( $45 \pm 5\%$ )、光周期 (12 時間明期/12 時間暗期)、および換気の制御条件下にある室内で維持した。動物を、SPF 条件下および室温で維持し、湿度は、持続的にモニタリングした。空調システムは、再循環を伴わない、1 時間当たり 14 回の換気にプログラムした。新鮮な外気は、各部屋へと均等に拡散させる前に、一連のフィルターを通す。実験室内では、高圧 ( $20 \pm 4\text{ Pa}$ ) を維持して、マウスコロニー内の病原体による汚染または病原体の拡散を予防した。SPF 条件下で作業する全ての職員は、動物飼育領域に入るときは、衛生状態および着衣に関する特別なガイドラインに従った。動物は、食餌および水を供給するよう備えた、ポリカーボネート製のケージ (UAR, Epinay sur Orge, France) 内に収容した。使用するケージの標準面積は、 $800\text{ cm}^2$  とし、内部標準操作手順に従い、ケージ 1 つ当たり最大 10 匹のマウスとした。動物の敷きわらは、滅菌コーンコブ敷きわら (LAB COB 12, SERLAB, Cergy-Montoise, France) とし、1 週間に 1 回取り替えた。動物の食餌は、DIETEX から購入した。滅菌制御顆粒の種類は、DIETEX とした。食餌は、ケージの上部の金属製の蓋に入れて、自由に摂取できるようにした。水もまた、ゴム製の止栓およびシッパチューブを備えた給水瓶から自由に給水できるようにした。給水瓶は清浄化し、濾過により滅菌された水で満たし、1 週間に 2 回取り替えた。

30

40

#### 【0622】

50

XG-102を投与するために、必要量のXG-102を、ビヒクル中に溶解させた。処方物は、下記で詳述する手順に従い調製した。濃度を計算し、試験物質の純度およびペプチド含量を考慮に入れて表した（乗算係数は、74.6%であった）。XG-102を解凍させた後、原液を、滅菌水（WFI、バッチ：500 111 00 J、Aguettant、France）中に10mM（38.22mg/mlに対応する）で調製し、最短で20分間にわたり、室温へと平衡化させた。アリコートは、各処置日用に調製し、約-80℃で保存した。この原液の、必要な濃度への希釈を、各処置日に行い、2～4℃で最長24時間にわたり保存した。原液の安定期間は、約-80℃で100日間を超える。動物への投与のための希釈処方物の安定期間は、2～4℃で24時間である。希釈溶液は、使用まで氷上で維持した。使用されなかった材料は廃棄した。XG-102は、注射1回当たり0.1および1mg/kgで、毎日1回ずつのべ14回の連続投与にわたり（毎日1回ずつ14回にわたり）注射した。物質投与の経路は、注射1回当たり5ml/kgの皮下（SC）注射、カニユーレを介する投与1回当たり5ml/kgの経口強制投与によるマウスへの経口（PO：per os）投与であった。注射および投与容量は、毎日のマウスの個別体重に応じて適合させた。

腫瘍細胞系および培養培地は、購入し、Oncodesignから提供された。

【表44】

| 細胞系    | 由来     | 供給源   | 参考文献                                            |
|--------|--------|-------|-------------------------------------------------|
| HTC116 | ヒト結腸腺癌 | ATCC* | Brattain M.G.ら、Cancer Res., 1981年、41巻：1751M1756 |

\*American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

#### 【0623】

HTC 116 改変体細胞系は、男性患者の単一の結腸癌の初代細胞培養物から単離された（BRATTAIN M. G. ら、Cancer Res. 1981年、41巻：1751M1756）。

#### 【0624】

腫瘍細胞は、加湿雰囲気（5%のCO<sub>2</sub>、95%の空気）中、37℃で付着性単層として成長させた。培養培地は、2mMのL-グルタミン（型番BE12-702F、Lonza、Verviers、Belgium）を含有し、10%のFBS（型番DE14-801E、Lonza）を補充したRPMI 1640であった。実験における使用のために、細胞を、5分間にわたるトリプシン-バーゼン液（型番02-007E、Cambrex）による処理によって培養フラスコからはがし、カルシウムまたはマグネシウムを含まないハンクス培地（型番BE10-543F、Cambrex）中で希釈し、完全培養培地を添加することにより中和した。細胞を血球計によりカウントし、それらの生存率を、0.25%トリパンブルー排除法により評価した。マイコプラズマの検出は、製造元の指示に従い、MycAlert（登録商標）マイコプラズマ検出キット（型番LT07-318、Lonza）を使用して実施した。MycAlert（登録商標）アッセイは、マイコプラズマの酵素の活性を利用する、選択的な生化学試験である。生存可能なマイコプラズマを溶解させ、該マイコプラズマの酵素がMycAlert（登録商標）基質と反応し、ADPからATPへの変換を触媒する。MycAlert（登録商標）基質の添加前および添加後の両方における、サンプル中のATPレベルを測定することにより、マイコプラズマの存在または非存在を示す比を得ることができる。マイコプラズマ試験は、細胞系の培養物上清から二連でアッセイし、陰性コントロールおよび陽性コントロール（MycAlert（登録商標）アッセイコントロールセット、型番LT07-518、Lonza）と比較した（内部標準操作手順番号：TEC-007/002）。

#### 【0625】

実験デザイン：

腫瘍を誘発する24～48時間前に、SCIDマウス5匹に、γ線源（1.8Gy、C

Co<sup>60</sup>、INRA、Dijon、France)を照射した。200μlのRPMI培地中に懸濁させたHCT 116細胞1000万(10<sup>7</sup>)個を、雌SCJDマウス5匹の右側腹部に皮下注射した。腫瘍が、1000~2000mm<sup>3</sup>に達したら、マウスを屠殺した。腫瘍を、動物から、手術により切除して、新鮮な腫瘍断片(20~30mg)を得、0日目にマウス75匹の盲腸に同所性に植えこんだ。

#### 【0626】

腫瘍を植え込む24~48時間前に、SCJDマウス75匹に、γ線源(1.8Gy、Co<sup>60</sup>、INRA、Dijon、France)を照射した。手術は、午後に、7回目のXG-102処置後、最低でも2時間遅らせて実施した。麻酔をかけた動物の腹部を、無菌条件下の正中切開により切開した。盲腸を露出させ、小さな損傷部を盲腸壁に形成した。腫瘍断片を、損傷部に配置し、6/0縫合糸で固定した。その後、腹腔を、4/0縫合糸による2層で閉合した。

#### 【0627】

ー7日目において、処置の開始前に、それらの体重に従い、マウス15匹ずつの5つの群を形成するように、マウスを無作為化した。各群の体重は、他の群の体重と統計学的に差がなかった(分散分析)。処置は、ー7日目において、以下の処置スケジュール：

- ・群1に由来するマウスには、注射1回当たり5ml/kgで、XG-102ビヒクルのPO投与1回を、毎日1回ずつのべ14回の連続(consecutive)投与にわたり(毎日1回ずつ14回にわたり)施し、

- ・群2に由来するマウスには、注射1回当たり0.1mg/kgで、XG-102のPO投与1回を、毎日1回ずつのべ14回の連続投与にわたり(毎日1回ずつ14回にわたり)施し、

- ・群3に由来するマウスには、注射1回当たり1mg/kgで、XG-102のPO投与1回を、毎日1回ずつのべ14回の連続投与にわたり(毎日1回ずつ14回にわたり)施し、

- ・群4に由来するマウスには、注射1回当たり0.1mg/kgで、XG-102のSC注射1回を、毎日1回ずつのべ14回の逐次(successive)投与にわたり(毎日1回ずつ14回にわたり)施し、

- ・群5に由来するマウスには、注射1回当たり1mg/kgで、XG-102のSC注射1回を、毎日1回ずつのべ14回の連続投与にわたり(毎日1回ずつ14回にわたり)施す

に従って開始した。

#### 【表45】

| 群 | 数  | 処置     | 経路 | 用量(注射1回当たりのmg/kg) | 処置スケジュール      |
|---|----|--------|----|-------------------|---------------|
| 1 | 15 | ビヒクル   | po | -                 | 毎日1回ずつ14回にわたる |
| 2 | 15 | XG-102 | po | 0.1               | 毎日1回ずつ14      |
| 3 | 15 | XG-102 | po | 1                 | 毎日1回ずつ14      |
| 4 | 15 | XG-102 | sc | 0.1               | 毎日1回ずつ14      |
| 5 | 15 | XG-102 | sc | 1                 | 毎日1回ずつ14      |

#### 【0628】

マウスは、試験を通して毎日、挙動および生存についてモニタリングした。体重および腫瘍体積は、全てのマウスについて、試験を通して1週間に2回、モニタリングした。Isoflurane(登録商標)Forene(Centravet、Bondoufle、France)を使用して、細胞の注射、手術(surgery)(同所腫瘍植込み)、および屠殺の前において、動物に麻酔をかけた。

SC腫瘍増幅の間、腫瘍体積を、全てのマウスについて、試験を通して1週間に2回、

モニタリングした。

#### 【0629】

26日目にマウスを屠殺した。全ての動物について、肝臓および腫瘍を回収し、秤量した。腫瘍小節による肝臓の浸潤は、肉眼的に評価した。肝臓および腫瘍は、10%の中性緩衝ホルマリン中で固定した。回収の48時間後、それらをパラフィン(Histosec(登録商標))中に包埋し、組織学解析のために使用した。2枚のスライドは、各腫瘍のコア内の2つの異なる部分に由来した。各スライドは、マウス識別番号により同定した。1枚のスライドは肝臓に由来し、その中心部に限局した。スライドは、マウス識別番号により同定した。Ki67マーカーにより増殖指標を決定するために、パラフィン包埋された切片(5 $\mu$ m)を、キシレン(型番:11699027、Labonord、Templemars、France)中で脱パラフィン処理し、100%、95%、および70%のエタノール(型番:13099500、Labonord)中の段階インキュベーションにより再水和させた。内因性ペルオキシダーゼは、一次抗体を添加する前に、組織を、過酸化水素含有溶液中で、室温で10分間にわたりインキュベートすることにより阻害した。ビオチンブロッキング系を使用して、バックグラウンドを低減した。一次抗体を添加する前に、切片を、室温で20分間、PBS(1倍濃度)中3%のウシ血清アルブミン(BSA)で処理し、3%のヤギ血清で完了させて、交差反応を阻害した。組織切片を、室温で1時間にわたり、マウス抗ヒトKi-67クローンMIB-1モノクローナル抗体(型番M7240、Dakocytomation;1:100の希釈率、80 $\mu$ g/ml)と共にインキュベートした。非関連のビオチニル化マウスIgG1抗体(型番X0931、Dakocytomation、1:120の希釈率、100 $\mu$ g/ml)を陰性コントロールスライドとして使用して、反応の特異性を確保した。切片を、ビオチンへとカップリングさせたヤギ抗マウス二次抗体(型番:89904、Sigma)と共に、さらにインキュベートした。次いで、組織切片を、室温で30分間にわたり、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲート(型番PK-6100、Vector Laboratories、1:50の希釈率)と共にインキュベートした。DABペルオキシダーゼ基質(型番SK-4100、Vector Laboratories)は、反応を視覚化する色原体として使用した。切片は、組織学的試験のために、マイヤーヘマトキシリンで対比染色した。各インキュベーションの後、切片を、1倍濃度のPBSで、2回にわたり洗浄した。カバースリップを、水性封入剤でマウントし、切片を、光学顕微鏡(DMRB Leica)下で視覚化した。

#### 【0630】

組織学的解析によりマウス肝臓内の転移を検出するために、パラフィン包埋された切片(5 $\mu$ m)を、キシレン中で脱パラフィン処理し、100%、95%、および70%のエタノール中の段階インキュベーションにより再水和させた。全ての切片は、組織学的解析のために、ヘマトキシリンおよびエオシン(HE)(型番:83309、Dakocytomation、Trappes、France)で染色した。カバースリップを、水性封入剤(Aquatex、型番1.08562、Merck)でマウントし、切片を、光学顕微鏡(DMRB Leica)下で(undet)検査した。組織学切片は、経験豊富な病理学者が解析して、肝臓内の転移性浸潤を決定した。

#### 【0631】

体重解析のために、マウスの体重曲線を作成した。少なくとも1つの群内で、40%を超えるマウスの死が記録されたら、曲線を中止した。平均体重変化(MBWC):グラム単位による処置された動物の平均体重変化(X日目における体重-[7]日目における体重)を計算した。

#### 【0632】

腫瘍重量を計算した。腫瘍成長阻害(T/C%)とは、処置群の中央値腫瘍重量の、ピヒクル処置群の中央値腫瘍重量に対する比と規定した。NCI基準に準拠した、T/C%比のための有効判定基準は、 $\leq 42\%$ である。増殖指標(Ki-67染色)を半定量化するため、染色された腫瘍切片の数値画像を盲検化して解析し、染色なし(染色された領域

10

20

30

40

50

がないことに対応するレベル0)、低度の染色(10%未満の染色された領域に対応するレベル1)、中程度の染色(10~30%の染色された領域に対応するレベル2)、および強力な染色(30%を超える染色された領域に対応する(c o r r e s p o n d i n g)レベル3)として分類した。代表的写真を撮影した。肝臓内の転移を検出するために、平均肝臓重量を測定し、肝臓1つ当たりの転移の数を、肝臓全体において肉眼的に推定し、かつ、切片上で組織学的解析により推定した。結果を、表で報告した。代表的写真を撮影した。全ての統計学的解析は、V i v o m a n a g e r (登録商標)ソフトウェアを使用して実施し、処置の毒性および効能(MBWC、TV、体積V、Vに到達するまでの時間、DT)の統計学的解析は、ボンフェローニ/ダン検定(ANOVAによる比較)を使用して実施した。全ての群は、互いと比較した。

10

#### 【0633】

1000万( $10^7$ )個のHCT 116細胞を、照射した雌SCIDマウス5匹にSC注射した。細胞にマイコプラズマは検出されず、細胞の生存率は、注射前に99%であった。平均腫瘍体積が $864 \pm 426 \text{ mm}^3$ となった39日後、マウスを屠殺した。マウスの腫瘍を単離し、約20~30mgの小片へと切断した。これらの小片を、0日目において、処置された動物75匹の盲腸へと植え込んだ。0~9日目において、腫瘍の植込み(i t n p l a n t a t i o n)に起因する手術合併症により、ビヒクル処置群内の33%のマウスの死が誘発された。処置群では、死亡百分率は、40%、34%、47%、および40%であり、用量に関連する効果はなかった。XG-102による処置が、致死性を、ビヒクル処置群と比較して有意に変化させなかったという事実は、処置が動物により

20

#### 【0634】

加えて、手術前のMBWCと手術後のMBWCとを比較したところ、たとえ手術により引き起こされる有意な低下は、全ての群について観察されたものの、手術の後、ビヒクルで処置された群と、異なる用量のXG-102で処置された群との間で、MBWCの差異は観察されなかった。

30

#### 【0635】

26日目に屠殺されたマウスにおける平均肝臓重量は、ビヒクル処置群における $0.82 \pm 0.17 \text{ g}$ から $0.1 \text{ mg/kg}$ でPO処置された群における $0.91 \pm 0.17 \text{ g}$ の間に(b e t w e c n)分布した。これらは、有意には異ならなかった。ビヒクル処置群では、20%は、肝臓内の転移を発生しなかった。図76に示される通り、このコントロール群は、肝臓内で複数の転移を発生するマウスの数が最も多い(40%)群であった。処置群では、このスコアは、 $1 \text{ mg/kg}$ でPO処置された群についての12.5%から $0.1 \text{ mg/kg}$ でPO処置された群または $1 \text{ mg/kg}$ でSC処置された群についての25%の間に分布した。注目すべきことに、 $1 \text{ mg/kg}$ でPO処置された群は、肝臓転移を伴わないマウスの数が最大であったことから、XG-102は、HCT 116同

40

#### 【0636】

(実施例34)

ラット(AMDモデル)の、光による光受容体損傷の軽減における、XG-102の有効性の評価

この試験の目的は、XG-102の、光誘導性光受容体細胞死に対する投与効果を調査することであった。

#### 【0637】

雄ラット50匹(Sprague-Dawley(アルビノラット);約8週齢;200~250g(注文時))を使用した。ラットは、この実験モデルにおいて最も一般に使

50

用されている。試験前に動物を検査し、眼に特別の注意を払った。動物は、それらの到着後2週間にわたり、観察下に保持された。動物は、疾病の徴候について毎日観察された。眼の異常のない健常動物のみが、実験における使用に許容された。動物は、標準的なケージ（420×270×190mm）<sup>2</sup>内で個別に収容された。全ての動物は、同一の環境条件下で収容された。温度は、22±2℃に保持され、相対湿度は、55±10%に保持された。部屋は、持続的に換気された（1時間当たり15回）。12時間にわたる明（200～300lx）および12時間にわたる暗の周期は、自動的に制御された。これらのパラメータは、持続的に制御され、記録された。試験を通して、動物は、食餌および水を自由に摂取できた。動物は、標準的な乾燥ペレット食餌を給餌された。水道水は、プラスチック製ボトルから自由に摂取できた。

10

### 【0638】

試験デザイン：

48匹のラットを、動物8匹ずつの6つの群に無作為に分けた。試験物質（XG-102：30mg/ml、3mg/ml、および0.3mg/ml）およびビヒクル（0.9%のNaCl）を、誘導の前日において、硝子体内注射により、右眼に投与した。基準物質（フェニル-N-tert-ブチルニトロソ（PBN：phenyl-N-tert-butyl nitroson）（50mg/kg））およびビヒクルを、誘導の30分前において、腹腔内注射し、次いで、12時間の光曝露中に3回にわたり腹腔内注射し、次いで、誘導後において1回腹腔内注射した。動物を、24時間にわたり、一定の光（7000ルクス）の下に置いた。網膜電図（ERG）を、光処理の前、ならびに誘導後9、16、および23日目において記録した。次いで、組織学および外核層（ONL：outer nuclear layer）厚の評価のために、眼を採取した。下記の表は、処置群内の動物の割付けをまとめる。

20

### 【表46】

| 群番号 | 処置     | 用量                              | 投与経路<br>(容量)                | 投与時点                                                           | 動物の識別                          |
|-----|--------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1   | XG-102 | 30 000 µg/mL<br>眼1つ当たり<br>150µg | i.v.t. (5 µl)               | 誘導の前日<br>(0日目)                                                 | 13, 38, 9, 35, 2, 23, 25, 36   |
| 2   |        | 3 000 µg/mL<br>眼1つ当たり<br>15 µg  |                             |                                                                | 18, 28, 5, 27, 16, 12, 30, 1   |
| 3   |        | 300 µg/mL<br>眼1つ当たり<br>1.5 µg   |                             |                                                                | 3, 11, 8, 17, 31, 7, 22, 15    |
| 4   |        | -                               |                             |                                                                | 6, 29, 24, 21, 40, 32, 14, 37  |
| 5   | PBN    | 50 mg/kg                        | i.p.<br>(2.5 ml/kg)<br>(5回) | 誘導の30分前、次いで、誘導の2時間後、4時間後、6時間後(光への曝露中:1日目)、および24時間後(曝露の中止時:2日目) | 4, 39, 19, 33, 10, 26, 34, 20  |
| 6   | ビヒクル   | -                               |                             |                                                                | 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 |

30

40

### 【0639】

この試験では、50匹中48匹の動物を使用した。眼欠損の目視可能な徴候のない動物のみを選択した。次いで、処置群内の無作為化は、Excel（登録商標）ソフトウェアのランダム関数によって行った。

### 【0640】

投与経路および投与法

硝子体内注射のために、キシラジン／ケタミンの混合物の筋肉内注射により、動物に麻酔をかけた。試験物質（5µl）およびビヒクル（5µl）を右眼に注射した。注射は、手術用顕微鏡下で、50µlのHamiltonに取り付けられた33Gの注射針を使用

50

して、側頭上部領域内の毛様体輪において実施した。充填されたシリンジを、U l t r a M i c r o P u m p I I Iへと取り付けて、マイクロリットル範囲の正確な注射を達成した。1 m lのシリンジに取り付けられた30 Gの注射針を使用して、基準物質およびビヒクルを、2.5 m l / k gの投与容量で腹腔内注射した。

#### 【0641】

光への曝露：一晩にわたり暗順応させたラットを、透明なプラスチック製ケージ内で、24時間にわたり、連続白色蛍光（7000 lx）へと曝露した。各ケージは、1匹ずつのラットを含有した。曝露の後、ラットを、飼養のための周期的光条件へと戻した。

#### 【0642】

全ての動物の体重は、試験の開始前、次いで、試験の終了時において記録した。各日において、全ての動物の全般的挙動および態様を観察した。

10

#### 【0643】

ERGは、誘導前、ならびに曝露を中止した7、14、および21日後（9、16、および23日目）に、暗順応させ、麻酔をかけた動物の右眼において記録した。各回のERGでは、待ち時間（a波およびb波の）およびa波およびb波の振幅を測定したが、待ち時間は、ミリ秒単位で表し、a波およびb波は、光曝露の前に得られたベースライン値に対する百分率として表した。測定の15分前、散瞳のために、10  $\mu$  lのM y d r i a t i c u m（登録商標）（0.5%のトロピカミド）を滴下した。

ERGパラメータ：

- ・色：最大限の白色
- ・最大強度：2.6 c d 秒 / m<sup>2</sup>（0 d B）；持続期間：0.24 ミリ秒；閃光の回数：1
- ・フィルター：50 H z
- ・インピーダンス閾値：90 k  $\Omega$ 。

20

#### 【0644】

ONL厚の測定：ERG試験の後、過剰用量のペントバルビタールにより動物を安楽死させ、右眼を摘出し、パラフィン中に固定および包埋した。切片（5  $\mu$  mの厚さ）は、垂直子午線に沿って作製し、マッソントリクロームで染色した。垂直子午線には、視神経が含まれた。「ONL厚」は、標準的な顕微鏡（L e i c a）を使用して、網膜下部の、視神経から500～3500  $\mu$  mの間に、500  $\mu$  mごとに（7点で）測定した。

30

#### 【0645】

結果は、M i c r o s o f t E x c e l（登録商標）ソフトウェアを使用して、個々のデータ表および要約されたデータ表の形態で表した。群の平均値および標準偏差を計算した。マン・ホイットニー統計学検定を使用して、対応のある群間の差異を評価した。各ビヒクル群内の時点間の比較のためには、フリードマン検定を使用した。

#### 【0646】

結果

全般的挙動および外観は、全ての動物において正常であった。

#### 【0647】

ベースラインにおいて、動物の体重は全て、正常な範囲内：379  $\pm$  13 g（平均値  $\pm$  S D；n = 48）にあった。屠殺日（23日目）において、被験品目とビヒクルとの間で、目視可能な差異は観察されなかった。各群について、試験の開始直前（ベースライン）および安楽死の当日において記録された平均体重は、正常な範囲内にあり、体重の増加は、約31  $\pm$  5 %（平均値  $\pm$  S D；n = 48）であった。

40

#### 【0648】

網膜電図

光受容体に対する保護効果を調査するため、試験物質、ビヒクル、および基準物質を、光誘導性光変性モデルにおいて評価した。網膜の機能的状態は、網膜電図検査により評価した。網膜電図検査波の振幅は、ベースライン値に対して正規化し、ベースラインに対するパーセントとして表した。図77は、異なる群についての回復の時間経過を示す。

50

アルビノラットを光誘導性光受容体死から保護することが示されている合成の抗酸化剤である、フェニル-N-tert-ブチルニトロンを、アッセイにおける基準として使用した。3つのXG-102の用量：眼1つ当たり1.5 $\mu$ g（0.3mg/ml、低用量）、眼1つ当たり15 $\mu$ g（3mg/ml、中程度用量）および眼1つ当たり150 $\mu$ g（30mg/ml、高用量）について調べた。a波およびb波の振幅についての平均値（%による；平均値 $\pm$ SD）を、以下の表にまとめる。

【表47】

| A波                            | 曝露開始後の時間      |       |      |               |       |      |               |       |      |
|-------------------------------|---------------|-------|------|---------------|-------|------|---------------|-------|------|
|                               | 9日目           |       |      | 16日目          |       |      | 23日目          |       |      |
|                               | 平均値           | $\pm$ | SD   | 平均値           | $\pm$ | SD   | 平均値           | $\pm$ | SD   |
| ビヒクル(IVT)                     | 5.7           | $\pm$ | 4.9  | 13.2          | $\pm$ | 9.7  | 22.5          | $\pm$ | 9.6  |
| XG-102(igt、眼1つ当たり1.5 $\mu$ g) | 39.5 $\delta$ | $\pm$ | 19.0 | 47.5 $\delta$ | $\pm$ | 16.5 | 48.3 $\delta$ | $\pm$ | 15.2 |
| XG-102(igt、眼1つ当たり15 $\mu$ g)  | 35.7 $\delta$ | $\pm$ | 22.0 | 51.1 $\delta$ | $\pm$ | 18.9 | 41.8          | $\pm$ | 23.6 |
| XG-102(igt、眼1つ当たり150 $\mu$ g) | 23.6          | $\pm$ | 25.3 | 24.1          | $\pm$ | 28.1 | 23.7          | $\pm$ | 27.2 |
| ビヒクル(ip)                      | 9.0           | $\pm$ | 19.2 | 13.6          | $\pm$ | 24.0 | 18.6          | $\pm$ | 22.0 |
| PBN (ip, 50mg/kg)             | 70.4 $\delta$ | $\pm$ | 16.2 | 79.6 $\delta$ | $\pm$ | 9.4  | 76.2 $\delta$ | $\pm$ | 13.1 |

$\delta$ 試験処置対ビヒクルについての、マン-ホイットニー検定による  $p<0.05$ 。

| B波                            | 曝露開始後の時間      |       |      |                |       |      |                |       |      |
|-------------------------------|---------------|-------|------|----------------|-------|------|----------------|-------|------|
|                               | 9日目           |       |      | 16日目           |       |      | 23日目           |       |      |
|                               | 平均値           | $\pm$ | SD   | 平均値            | $\pm$ | SD   | 平均値            | $\pm$ | SD   |
| ビヒクル(IVT)                     | 15.3          | $\pm$ | 11.4 | 24.8           | $\pm$ | 15.9 | 30.6           | $\pm$ | 13.8 |
| XG-102(igt、眼1つ当たり1.5 $\mu$ g) | 55.3 $\delta$ | $\pm$ | 23.8 | 61.7 $\delta$  | $\pm$ | 19.7 | 73.5 $\delta$  | $\pm$ | 22.0 |
| XG-102(igt、眼1つ当たり15 $\mu$ g)  | 60.6 $\delta$ | $\pm$ | 32.8 | 62.3 $\delta$  | $\pm$ | 18.5 | 56.5           | $\pm$ | 29.8 |
| XG-102(igt、眼1つ当たり150 $\mu$ g) | 31.9          | $\pm$ | 42.6 | 38.9           | $\pm$ | 51.5 | 37.1           | $\pm$ | 54.4 |
| ビヒクル(ip)                      | 15.6          | $\pm$ | 29.3 | 17.3           | $\pm$ | 30.6 | 24.9           | $\pm$ | 33.9 |
| PBN (ip, 50mg/kg)             | 100 $\delta$  | $\pm$ | 18.6 | 103.6 $\delta$ | $\pm$ | 12.1 | 102.4 $\delta$ | $\pm$ | 11.0 |

$\delta$ 処置対ビヒクルについての、マン-ホイットニー検定による  $p<0.05$ 。

## 【0649】

これもまた図77に示される通り、腹腔内注射または硝子体内注射によりビヒクルを注射された誘導群における平均a波振幅は、9、16、および23日目において、ベースラインにおけるコントロール値と比較して低減を示した。a波は、9日目（ $p<0.01$ ）、16日目（ $p<0.01$ ）、および23日目（ $p<0.05$ ）において、コントロール

値の50%未満まで低減された。b波も、9日目 ( $p < 0.01$ ) および16日目 ( $p < 0.01$ ) において、コントロール値の50%未満まで、有意に低減された。23日目において、低減は、統計学的に有意ではなかった。PBNで処置され、損傷光へと曝露された群では、網膜機能は大部分保存された。a波の回復は、9日目 ( $p < 0.01$ )、16日目 ( $p < 0.01$ )、および23日目 ( $p < 0.01$ ) において、ビヒクルと比較して有意に改善され、それぞれ、70.4%、79.6%、および76.2%であった。同様に、b波の回復も、9、16、および23日目において、それぞれ、ビヒクルより有意に大きく ( $p < 0.01$ )、100%、103.6%および102.4%であった。

#### 【0650】

眼1つ当たり15  $\mu$ gまでの異なる用量の硝子体内XG-102で処置され、損傷光へと曝露されたラットは、9、16、および23日目において、ビヒクルと比較して大きな程度で、網膜機能の保存を示した。a波の回復は、低用量および中程度用量について、それぞれ、16日目において、47.5% ( $p < 0.01$ ) および51.1% ( $p < 0.01$ ) であり、23日目において、48.3% ( $p < 0.01$ ) および41.8% ( $p < 0.05$ ) であった。同様に、b波の回復も、ビヒクルより大きく、低用量および中程度用量について、それぞれ、9日目において、55.3%および60.6%であり、16日目において、61.7%および62.3%であり、23日目において、73.5%および56.5%であった。他方、高用量（眼1つ当たり150  $\mu$ gの群）XG-102は、光損傷の予防において、効果を示さなかった。a波の回復は、9、16、および23日目において、それぞれ、ビヒクル群についての5.7%、13.2%、および22.5%と対比して、23.6%、24.1%、および23.7%であった。同様に、b波の回復も、9、16、および23日目において、それぞれ、ビヒクル群についての15%、24.8%、および30.6%と対比して、31.9%、38.9%、および37.1%であった。

#### 【0651】

##### ONL厚

光受容体の構造を保存する処置の能力を評価するため、ONLの厚さを、曝露中止の21日後（23日目）において評価した。平均値を、以下の表にまとめる。

#### 【表48】

| 処置                            | ONL厚<br>( $\mu$ m)    | ONL厚の減少<br>(非誘導コントロール眼との比較%) |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 非誘導眼(内部データ)                   | 40.6 $\pm$ 4.6        | -                            |
| ビヒクル(IVT)                     | 13.94 $\pm$ 3.35      | 66%                          |
| XG-102(ivt、眼1つ当たり1.5 $\mu$ g) | 24.89 $\pm$ 4.01 $\S$ | 39%                          |
| XG-102(ivt、眼1つ当たり15 $\mu$ g)  | 24.42 $\pm$ 5.99 $\S$ | 40%                          |
| XG-102(ivt、眼1つ当たり150 $\mu$ g) | 18.95 $\pm$ 9.17      | 53%                          |
| ビヒクル(ip)                      | 12.56 $\pm$ 8.15      | 69%                          |
| PBN (ip, 50 mg/kg)            | 34.05 $\pm$ 4.00 $\S$ | 16%                          |

$\S$ 試験処置対ビヒクルについての、マン-ホイットニー検定による $p < 0.05$ (ivt, ip)。

#### 【0652】

ONL厚の減少は、ビヒクルで処置されたラットの眼において観察された。曝露後のビヒクル処置眼では、非処置眼と比較して、66%~69%の平均ONL厚の喪失が観察された。PBNの投与は、ビヒクル群と比較して有意な保護を示した（ivtおよびip、 $p < 0.001$ ）。ラットをPBNで処置したところ、ONLは保存された。正常状態にある非処置眼（40.6  $\pm$  4.6  $\mu$ m、内部データ）と比較して観察された減少は、ごく

わずか（１６％）であった。低用量および中程度用量のXG-102で処置されたラットでは、ONL厚の減少が阻害された（ビヒクルと比較して、 $p < 0.01$ ）。高用量のXG-102では、保護は、観察されなかった。低用量および中程度用量のXG-102で処置された眼では、平均ONL厚の４０％の減少が観察された。

したがって、これらの実験条件下では、以下のことを明示できる：

・ビヒクル処置群（２つの投与経路：i.v.t、i.p）では、明光曝露により、網膜機能の低下および光受容体の喪失が誘導された。曝露の２３日後、a波の回復は、１８．６％（i.p）および２２．５％（i.v.t）であり、６９％（i.p）および６６％（i.v.t）の平均ONL厚の喪失が観察された。

・PBNの全身投与（i.p.）は、網膜を、光損傷から有意に保護する。PBN処置群は、a波の７６．２％を維持し、観察された平均ONL厚の喪失はごくわずか（１６％）であった。

・眼１つ当たり１．５および１５μgのXG-102の硝子体内注射は、網膜を、光損傷から有意に保護する。XG-102処置群は、a波の４８．３％および４１．８％を維持し、４０％の平均ONL厚の喪失が観察された。

### 【0653】

まとめると、統計学的解析によれば、XG-102の硝子体内注射（眼１つ当たり１．５および１５μg）は、網膜機能を保護するのに効果的であった。これらの実験条件下の結果により、眼１つ当たり１．５μgおよび１５μgの用量でのIVTによるXG-102は、網膜の構造および機能を、光誘導性の急性損傷から保護することが示される。

【図１】

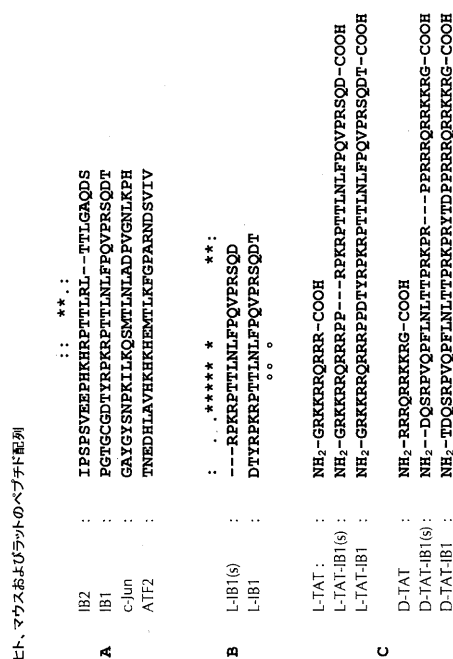


Fig. 1

【図２】

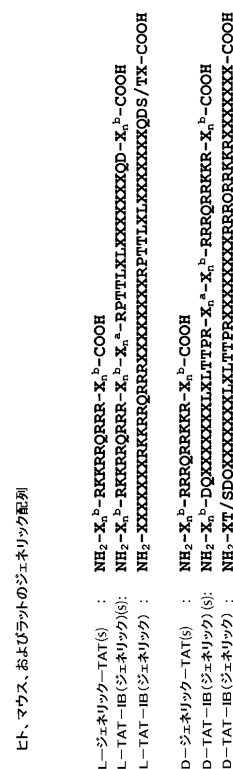


Fig. 2

【図 3】

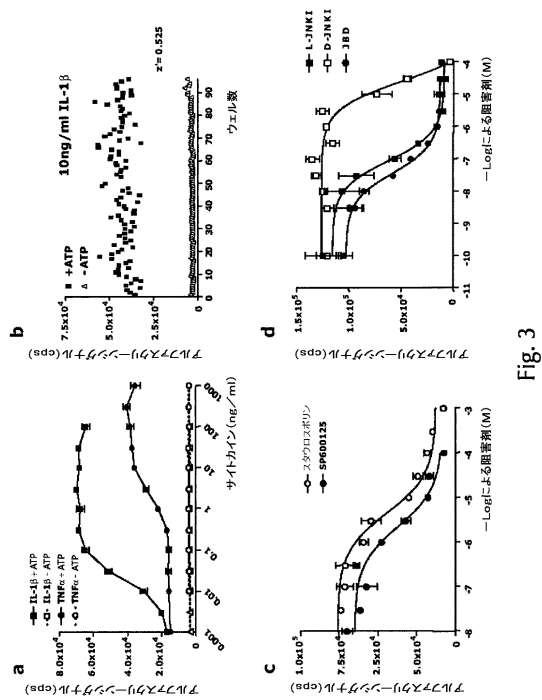


Fig. 3

【図 4】

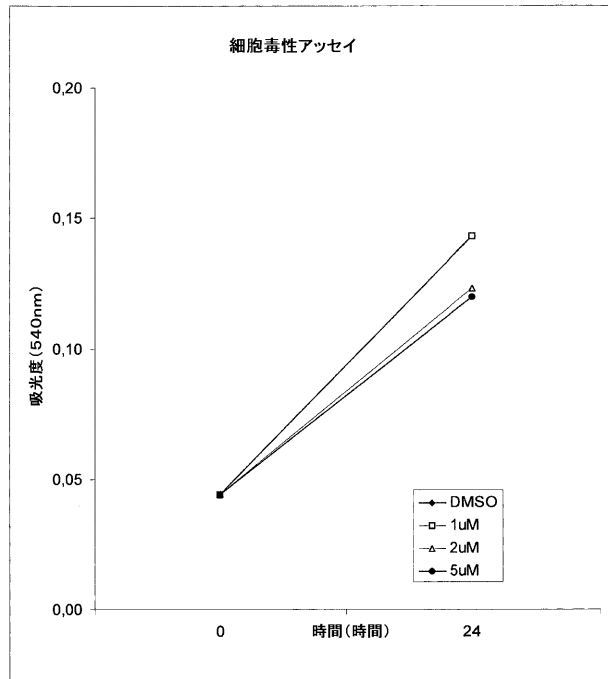


Fig. 4

【図 5】

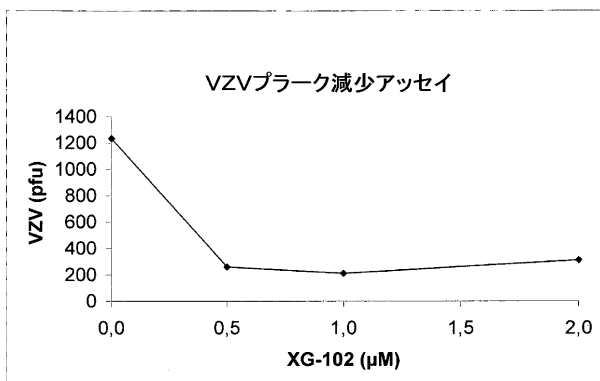


Fig. 5

【図 6】

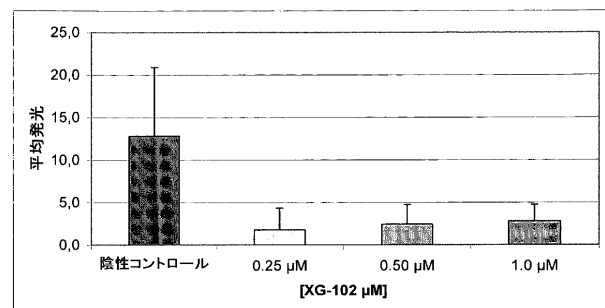


Fig. 6

【図 7】

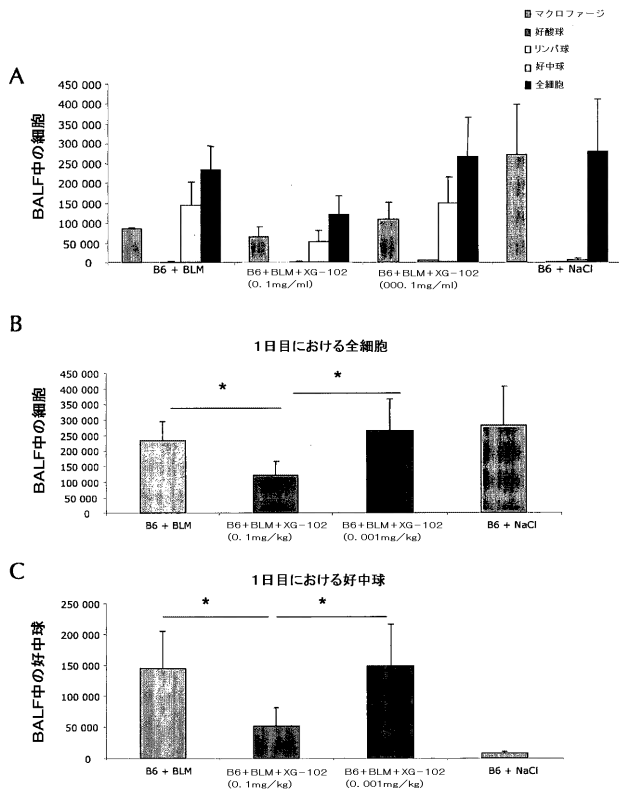


Fig. 7

【図 9】

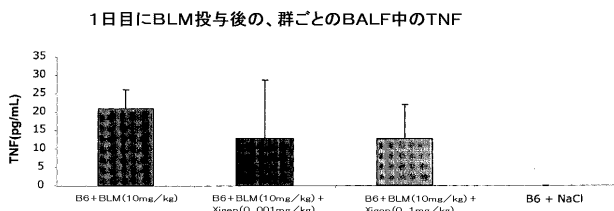


Fig. 9

【図 8】

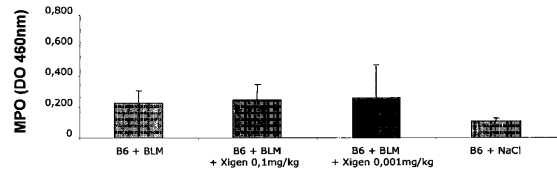


Fig. 8

【図 10】

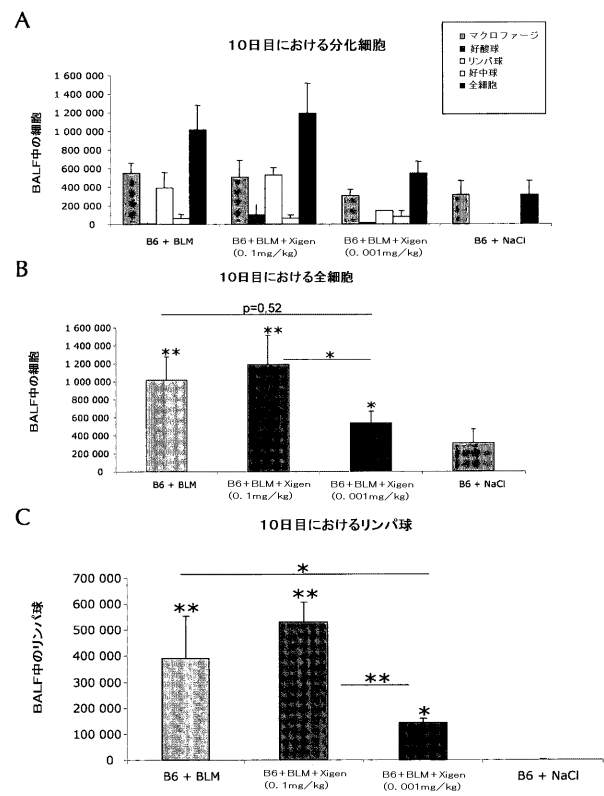


Fig. 10

【図 1 1】

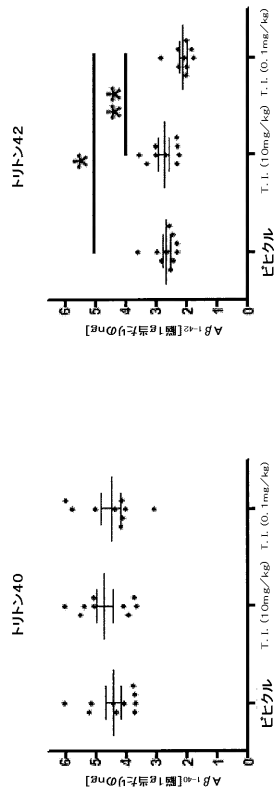


Fig. 11

【図 1 2】

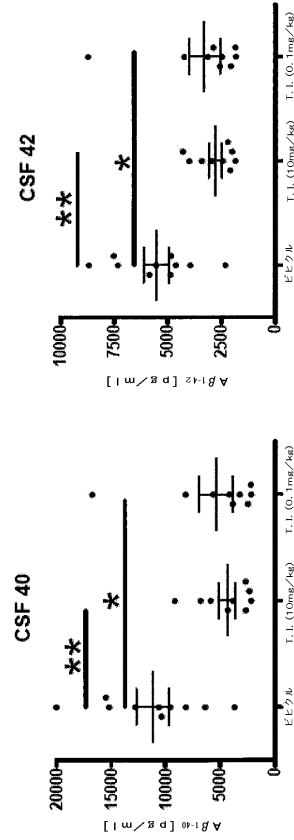


Fig. 12

【図 1 3】

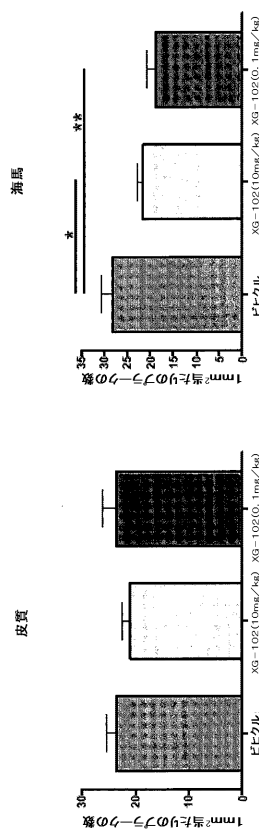


Fig. 13

【図 1 4】

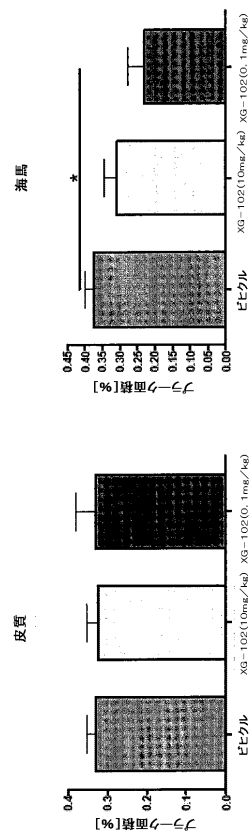


Fig. 14

【図 15】

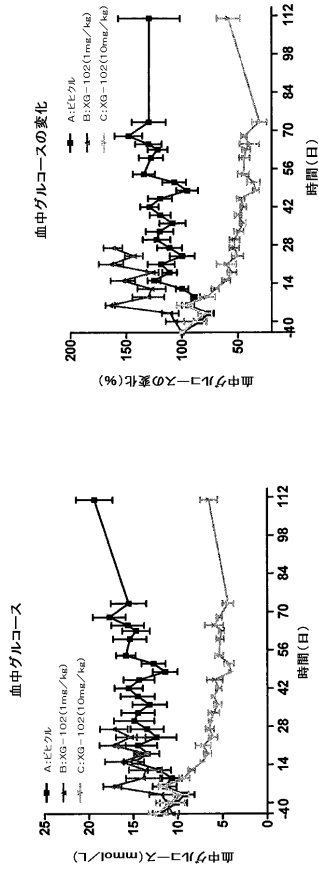


Fig. 15

【図 17】

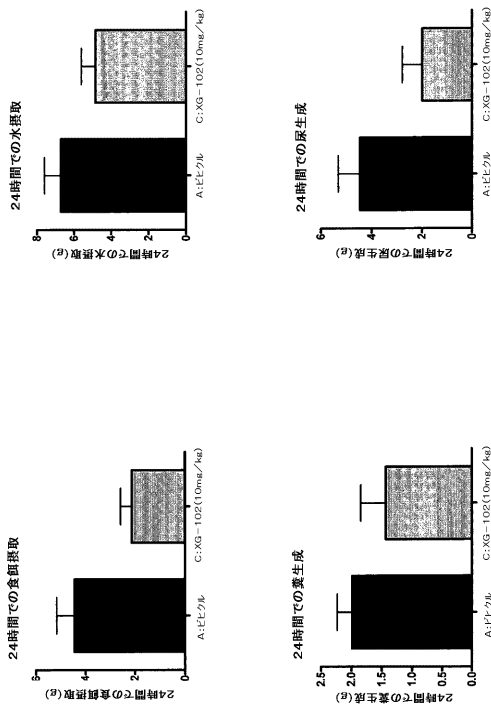


Fig. 17

【図 16】

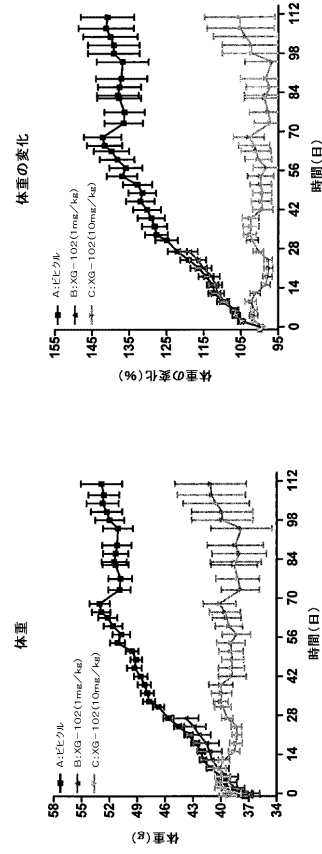


Fig. 16

【図 18】

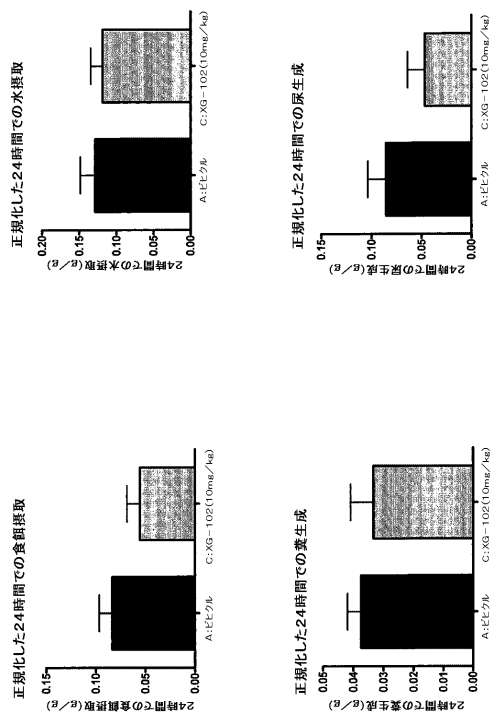


Fig. 18

【図 19】

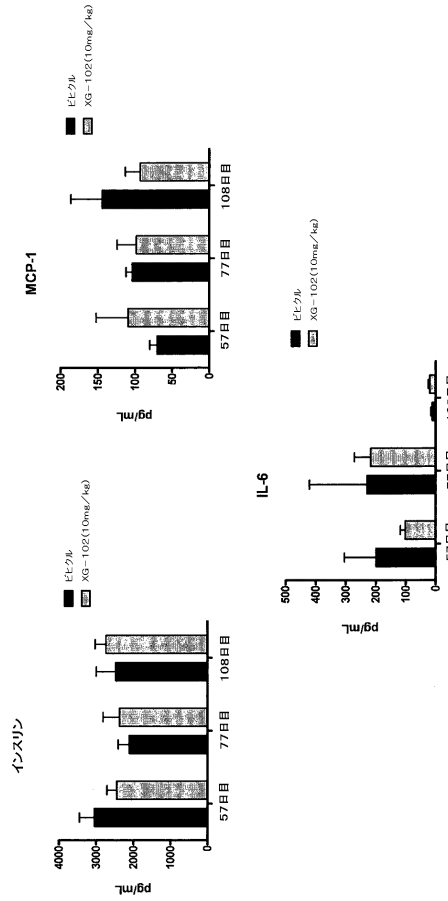


Fig. 19

【図 20】

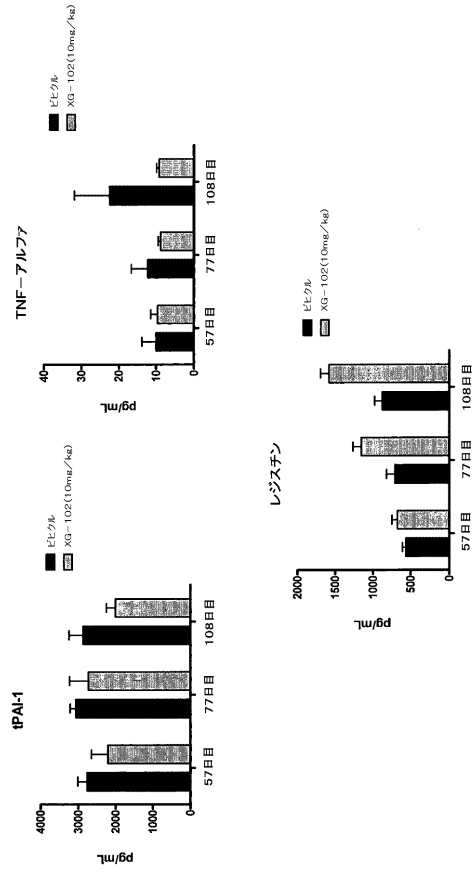


Fig. 20

【図 21】

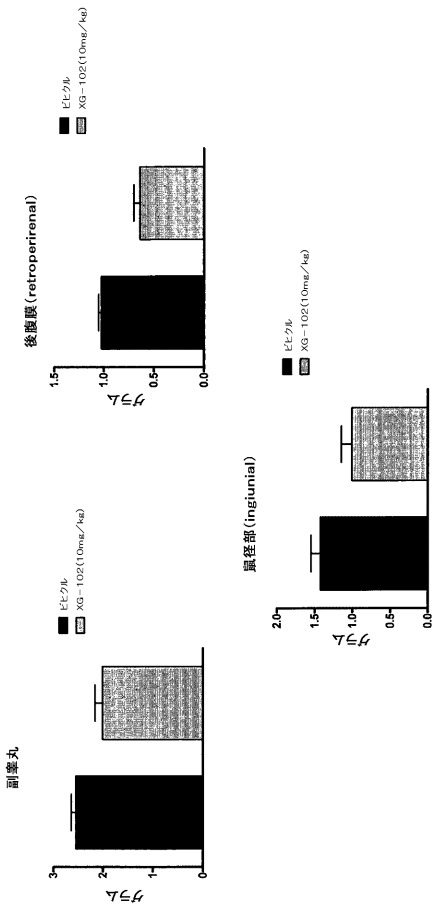


Fig. 21

【図 22】

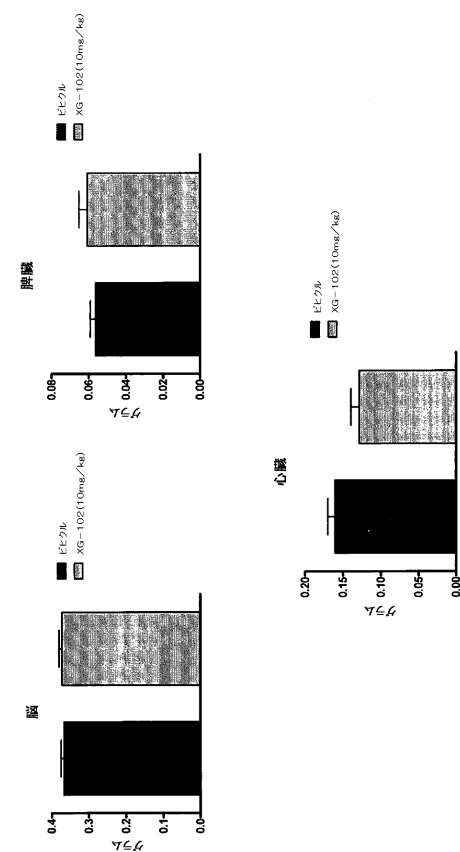


Fig. 22

【 図 2 3 】

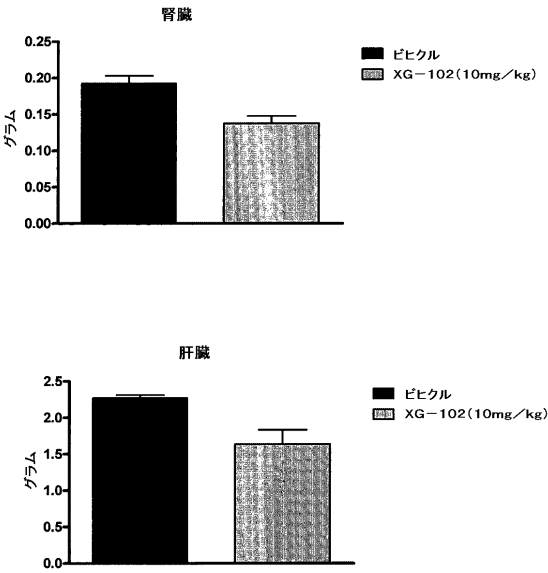


Fig. 23

【 図 2 4 】

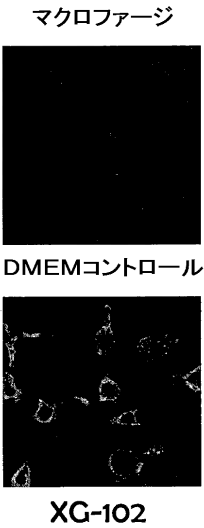


Fig. 24

【 図 2 5 】

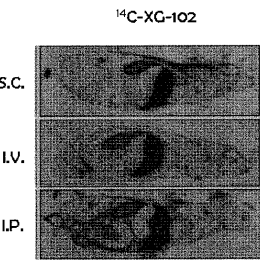


Fig. 25

【 図 2 6 】

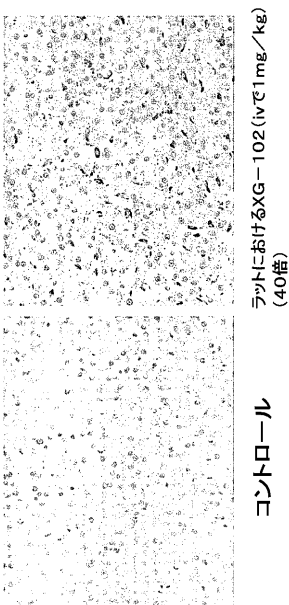


Fig. 26

【図 27】

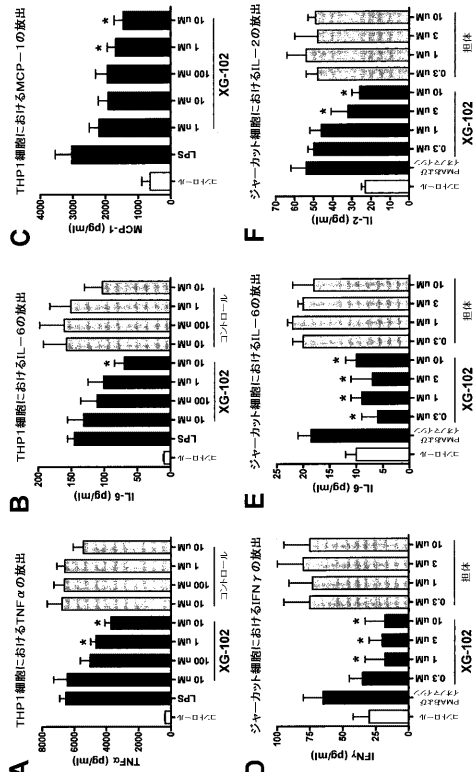


Fig. 27

【図 28】

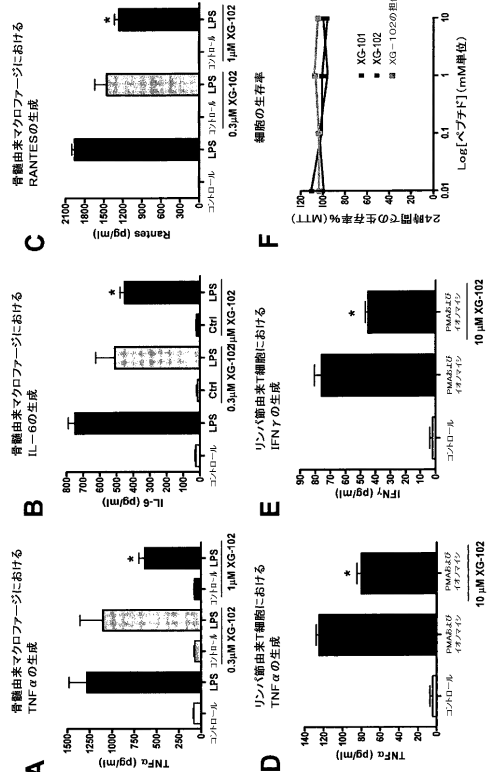


Fig. 28

【図 29 - 1】

cgccccagc tcagtcgaa cccgcggcg cgcgcggctt cctccacag cctccaccc  
 cgcgcgcgc cgcgcgcgc cgcgcgcgc cgcgcgcgc cgcgcgcgc cgcgcgcgc  
 gcccggaaat gcccgaagc gaagagcgc tgagcgggg tgccgcgtcc ccacgcggc  
 cttcccatc cctgggactg cacatcgct cgcctcccaa ttccagctc accatgata  
 tcagcctgga ggaatttgag tggaagacc ttccggagat cactgagag ttggtgatc  
 gctgcagtg caaagacac ttgtctctcc ggcggcgcg cgcggggcta ctgtctgcg  
 gtgacgagc tagcgcggg agcgggctgc agcggagat gctgcagatg gacgtgatc  
 acgcgcaag tgacactcc ggcggcgag agcaggaaga gacgacgac gagctcgctg  
 cccaacggcc aggagtgagg cctccaaag ctagctctgg ccaggagcg gctgtcgca  
 gccagggtca gggcaggag cccggcacag gctgcggaga cactaccg cccaaggagc  
 ctaccagct caactcttt cgcgaggtgc cgcgtctca ggaacgctg aataataact  
 ctttaggcaa aaagcacagt tggcaggacc gtgtgtctgc atcatctcc ccttgaaga  
 caggggagca gacgcctca catgaacata ctgctgag tgatgagctg cgcggcagg  
 gcagctctgt tccacccag gatctggca cttccacga cagccttgt cgcgtactg  
 cagcaccaca gatggcact ccaagtgttc cccctgcaac tgcactggt ggcggggcc  
 actcccatc agatcggtc atactagcag atgtcggtc caggcgact gaggagatc  
 acctgaccc agtgcaagg ccccgacac ctgcagaacc cactccacc ttctgccc  
 ccactgagag cggagtgct gtagctcgg atctgaccc tgcgcttac tctgtaactg  
 caggcgacac gcaacttcc atcagtgaag aggatgagg cttcgactgt ctgtcatcc  
 cagagcaagc tgagccacca ttggggagg ggcggggaag cctcggggag ccaccaecgc  
 cttccacggc ctagctgagc tggacacca ggcagctgc ctagactct gtaactaca  
 cactggtgtt ggaagagat gccagctgt agttggtgag cctgcggcca tgttttgag  
 attacagtga cgaagcagc ttgcccactg tctatgacaa ctgtgctctt gctctcgc  
 cctacgagtc agcatttgt gaggatagt agagggccc tcaaccccg cctccacct  
 gctgtcaga ggaactcaca cggatgagc ctgacgtcca cttctctaa agttttctg  
 atgtctcat gagtggcgc tctgctctt ccagtgccga gtcctttgg ctgtctctt  
 gtgtcatcaa tggggaggag catgacaaa cccatcgggc tatattcagg ttgtgcctc  
 gcatgaaga tgaacttgag ctggaagtg acgacctct gctgttgag ctgacggag

Fig. 29

【図 29 - 2】

aagactattg gtatgaggcc tataacatgc gactggagc cctgtgtgtc ttctcgtct  
 actatgcat tgaggtcacc aaggagcctg agcatatgc agccttgcg aaaaacagc  
 actgatttga ccagttccg gtgaagttcc tgggctctgt ccaggttctc tatcacaag  
 gcaatgatgt cctctgtgtc gctatgcaa agatgcgcc caccgcggc ctcaccgtgc  
 actttaacc gccctccagc tgtgtcctg aaatcagct taggggtgtc aagatagtg  
 tcaaagctga tgaagctcag gaggccaagg gaaataaat tagccacttt ttccagctaa  
 aaaaacatc ttctgtggg taccatccaa agaacaaca gacttttgg ttatcacta  
 agcaccctgc tgaccacgg ttgctctgcc atgtctttgt gtctgaagat tccaccaag  
 ccttgccaga gctgtggg cgtgatttc agcagttcta caagcaattt gtggaatata  
 cctgtctac agaagatct tacttgagat agcagcaacc cccctctct cagccctca  
 gccccaggg agtactaga cagctgactg ctgacagatg gtgtactgc cagcagagaa  
 tgggggagtg agggctgtt gggctgggg gcaagggtt ggggagagc agatgcagtt  
 tattgtaata tatggggtta gattaacta tggaggacag tacaggctct ctcggggctg  
 gggaaggga gggctgggt ggggttcagg catctggcca caaagggtt ccttagggac  
 agaggcgct caccatctg ggtctgttt atactagag ccttggttt ctggtctgt  
 ggtcctgct gtacaaagc cagccactg gaagtgtac cttcctgtt ccactcacc  
 cagtgccctg agctcatgt gagcccaag acctccgaag gactttccag taaggaaatg  
 gcaacatgt acagtgagc cctgttctca tctgtgggg tccggcagc cgcacccca  
 gctgtggag cagctgacc ctggcaagct tgtgtgttca aagaaggaga gggccacagc  
 aagcctgtgc tgccaggga ggttccctct cagctggccc cagccaaact gtaactgtc  
 tgtcacctgg ctactactat taagtgtcca ttctgtgtc gaaaaaaaa aaaaaaaac  
 aaaaaaactc gag

Fig. 29 (続き)

## 【図 30 - 1】

Met Ala Arg Leu Ser Pro Gly Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Leu Ser  
1 5 10 15  
Gly Gly Ala Ala Ser Pro Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His  
20 25 30  
Ile Ala Ser Pro Pro Asn Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu  
35 40 45  
Glu Phe Glu Asp Glu Asp Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile  
50 55 60  
Ser Leu Gln Cys Lys Asp Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly  
65 70 75 80  
Leu Leu Ser Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala  
85 90 95  
Glu Met Leu Gln Met Asp Leu Ile Asp Ala Ala Ser Asp Thr Pro Gly  
100 105 110  
Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp Asp Glu Leu Ala Ala Gln Arg Pro  
115 120 125  
Gly Val Gly Pro Ser Lys Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg  
130 135 140  
Ser Gln Gly Gln Gly Gln Gly Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr  
145 150 155 160  
Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg  
165 170 175  
Ser Gln Asp Thr Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp  
180 185 190  
Gln Asp Arg Val Ser Arg Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln  
195 200 205  
Thr Pro Pro His Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln  
210 215 220  
Gly Ser Pro Val Pro Thr Gln Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro  
225 230 235 240  
Cys Arg Arg Thr Ala Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Ser Gly Pro Pro  
245 250 255

Fig. 30

## 【図 30 - 2】

Ala Thr Ala Pro Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ser Ile  
260 265 270  
Ser Ala Asp Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro  
275 280 285  
Val Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Glu Pro Thr Ser Thr Phe Leu Pro  
290 295 300  
Pro Thr Glu Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala  
305 310 315 320  
Tyr Ser Val Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Asp  
325 330 335  
Glu Gly Phe Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Gln Ala Glu Pro Pro Gly  
340 345 350  
Gly Gly Trp Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Arg Ala  
355 360 365  
Ser Leu Ser Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr  
370 375 380  
Thr Leu Val Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg  
385 390 395 400  
Pro Cys Phe Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr  
405 410 415  
Asp Asn Cys Ala Ser Ala Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu  
420 425 430  
Glu Tyr Glu Glu Ala Pro Gln Pro Arg Pro Pro Thr Cys Leu Ser Glu  
435 440 445  
Asp Ser Thr Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu  
450 455 460  
Asn Val Phe Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ala Glu Ser Phe  
465 470 475 480  
Gly Leu Phe Ser Cys Val Ile Asn Gly Glu Glu His Glu Gln Thr His  
485 490 495  
Arg Ala Ile Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Leu  
500 505 510

Fig. 30 (続き)

## 【図 30 - 3】

Glu Val Asp Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp  
515 520 525  
Tyr Glu Ala Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala  
530 535 540  
Tyr Tyr Ala Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu  
545 550 555 560  
Ala Lys Asn Ser Asp Trp Ile Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly  
565 570 575  
Ser Val Gln Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala  
580 585 590  
Met Gln Lys Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro  
595 600 605  
Pro Ser Ser Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly  
610 615 620  
Val Lys Ala Asp Glu Ala Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His  
625 630 635 640  
Phe Phe Gln Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn  
645 650 655  
Asn Lys Tyr Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe  
660 665 670  
Ala Cys His Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu  
675 680 685  
Ser Val Gly Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr  
690 695 700  
Thr Cys Pro Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu  
705 710

Fig. 30 (続き)

## 【図 31 - 1】

Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Ala Ser Pro  
1 5 10 15  
Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His Ile Ala Ser Pro Asn  
20 25 30  
Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu Glu Phe Glu Asp Glu Asp  
35 40 45  
Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile Ser Leu Gln Cys Lys Asp  
50 55 60  
Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly Leu Leu Ser Ala Gly Gly  
65 70 75 80  
Gly Gly Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala Glu Met Leu Gln Met Asp Leu  
85 90 95  
Ile Asp Ala Thr Gly Asp Thr Pro Gly Ala Glu Asp Asp Glu Asp  
100 105 110  
Asp Asp Glu Glu Arg Ala Ala Arg Pro Gly Ala Gly Pro Pro Lys  
115 120 125  
Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg Gly Gln Gln Ser Gln  
130 135 140  
Gly Gln Ser Gln Gly Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg  
145 150 155 160  
Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr  
165 170 175  
Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp Gln Asp Arg Val  
180 185 190  
Ser Arg Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln Thr Pro Pro His  
195 200 205  
Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln Ser Gly Pro Ala  
210 215 220  
Pro Thr Thr Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro Cys Arg Arg Ser  
225 230 235 240  
Thr Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Gly Gly Pro Pro Ala Ala Pro Pro  
245 250 255

Fig. 31

## 【図 3 1 - 2】

Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ile His Tyr Gln Ala Asp  
260 265 270

Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro Val Gln Arg  
275 280 285

Pro Pro Asp Ala Ala Glu Pro Thr Ser Ala Phe Leu Pro Pro Thr Glu  
290 295 300

Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala Tyr Pro Ser  
305 310 315 320

Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Gly Phe  
325 330 335

Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Glu Pro Pro Gly Gly Tyr Trp  
340 345 350

Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Arg Ala Ser Leu Ser  
355 360 365

Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr Thr Leu Val  
370 375 380

Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg Pro Cys Phe  
385 390 395 400

Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr Asp Asn Cys  
405 410 415

Ala Ser Val Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu Glu Tyr Glu  
420 425 430

Glu Ala Pro Arg Pro Gln Pro Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asp Ser Thr  
435 440 445

Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu Asn Val Phe  
450 455 460

Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ser Ala Glu Ser Phe Gly Leu Phe  
465 470 475 480

Ser Cys Ile Ile Asn Gly Glu Glu Gln Glu Gln Thr His Arg Ala Ile  
485 490 495

Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu Glu Val Asp  
500 505 510

Fig. 31 (続き)

## 【図 3 1 - 3】

Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp Tyr Glu Ala  
515 520 525

Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala Tyr Tyr Ala  
530 535 540

Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu Ala Lys Asn  
545 550 555 560

Ser Asp Trp Val Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly Ser Val Gln  
565 570 575

Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala Met Gln Lys  
580 585 590

Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro Pro Ser Ser  
595 600 605

Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly Val Lys Ala  
610 615 620

Asp Asp Ser Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His Phe Phe Gln  
625 630 635 640

Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn Asn Lys Tyr  
645 650 655

Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe Ala Cys His  
660 665 670

Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu Ser Val Gly  
675 680 685

Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr Thr Cys Pro  
690 695 700

Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu  
705 710

Fig. 31 (続き)

## 【図 3 2 - 1】

atggcggagc gagaagcgg cggcctggga gggggggcgg cgtccccgcc cgcgcctcc 60  
ccgttctcgg ggcgtcacat cgttcgcct ccgaatttca ggctcaccca tgacatcagc 120  
ctggaggaagt ttgaggaatga agacctctcg gaggatctctg atgagtgtgg catcagetta 180  
cagtgcagaag acacctgttc ctacggccc ccgctgcctcg ggctgtcttc tgcggcgccg 240  
ggcggcgccg ggaagcgggt gcagcccgag atgtgtcaga tggactctgat cgaagcgacg 300  
ggggacactc ccggggccga ggacgcagag gaggagcagc acgaggagcg cgcggcccg 360  
cggccgggag cggggccgcc caagccgag tcggcgccagc agccggcgct ccgcgccag 420  
ggccagagcc aagccagag ccaggcccg ggcagcggg acacgtaccg gcccaaagcg 480  
cccaccacgc tcaacctctt tccgcagggt ccgcgtcttc aggaacactt gaataataat 540  
tctctgggca aaaagcacag ttggcaggat cgggtgtctc gatcatcttc accctgaag 600  
acaggggagc agacaccacc gcatgaacac atctgcctga gcgatgagct gcccccag 660  
agcggcccg cccccacc agatcgagc acctccaccg acagcccttg ccgcccagc 720  
acagccacc agatggcacc tccgggtgtt cccctgtctg cccgcctgg gggctggggc 780  
cactgcctc gagaccgaat ccaactaccg gccgatgtgc gactagagc cactgaggag 840  
atctacctga cccagtgca gaggcccca gacgtgcag agccacctc cgccttctg 900  
ccgcccactg agagccgat gtcagtgcg tccgatccag acctgcgc ctaccctcc 960  
acggcaggc ggccgaccc cctcatcagt gaagagaag agggcttga ctgcctgtcg 1020  
tcccagagc gggctgagcc cccaggcga ggggtgcgg ggagcctgg ggagccgcg 1080  
ccactccac gggcctctt gactcggac accagcgccc tgctctatga ctctgtcaag 1140  
tacagctgg tggtagatga gcatgcacag ctggagctgg tgagcttgc gccgtcttc 1200  
ggagactaca gtgacgagag tgactctgcc accgtctatg acaactgtgc ctccgtctc 1260  
tcgcccctatg agtcggcat cggagaggaa tatgaggagg ccccgcgcc ccagccccct 1320  
gcctgcctct ccgaggaact cagcctgat gaaccgagc tccatttctc caagaaattc 1380  
ctgaagctct teatgagtg ccgctccgc tctctcagtg ctgagctctt cggctgttc 1440  
tctgtcatc tcaacgggga ggagcaggag cagaccacc gggccatatt caggttgtg 1500  
cctgcacac aagacgaact tgagctggaa gtgagatgacc ctctgtagt ggagctccag 1560  
gtgaagact actgttacga ggcctacaac atgcgactg gtgccgggg tctcttctc 1620  
gcctattacg ccacgaaggt caccagagc cccgagcaca tggcagccct ggccaaaac 1680  
agtgaagtg tggaccagtt ccgggtgaag tctctgggt cagtcaggt tccctatcac 1740

Fig. 32

## 【図 3 2 - 2】

aagggaatg acgtctctg tgctgtctg caaaagattg ccaccaccg ccggtcacc 1800  
gtgcacttta accgccctc cagctgtgtc ctggagatca gcgtgcggg tgtgaagata 1860  
ggcgtcaagg ccgatgact ccaggaggcc aaggggaata aatgtagcca ctttttcag 1920  
ttaaaaaaca tcttttctg cggatatcat ccaagaaca acaagtactt tgggttcac 1980  
accaagcacc ccgcccacca ccggtttgct tgcacgtct tttgtctga agactccacc 2040  
aaagcccttg cagatccgt ggggagagca ttccagcagt tctacaagca gtttgtggag 2100  
tacacctgcc ccacagaaga tatctacctg gactag 2136

Fig. 32 (続き)

【図 3 3】

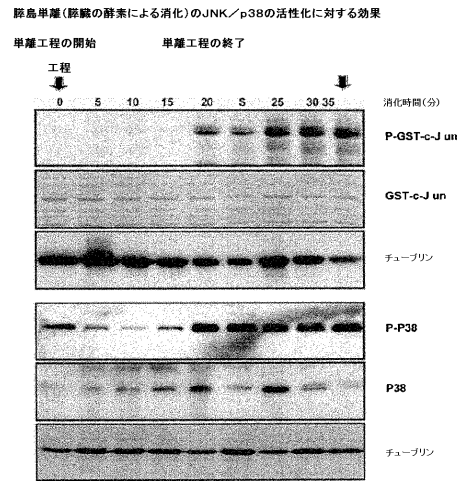


Fig. 33

【図 3 4】

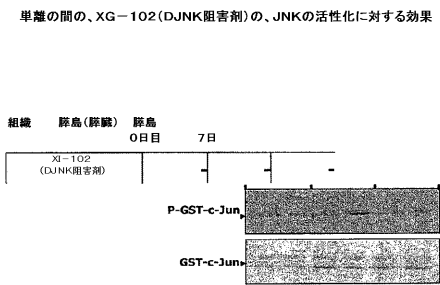


Fig. 34

【図 3 5】

XG-102(DJNK阻害剤)の、c-fos遺伝子発現に対する効果  
(リアルタイムRT-PCRにより測定される)

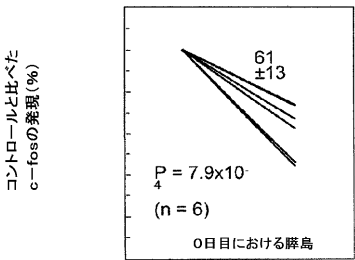


Fig. 35

【図 3 6】

XI-102(DJNK阻害剤)の、OCR/DNA  
に対する効果

0日目における肝臓

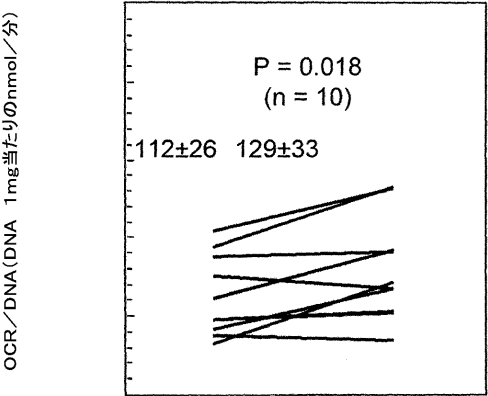


Fig. 36

【図 37】

XI-102 (DJNK阻害剤) の、ATP/蛋白質に対する効果

0日目における豚島

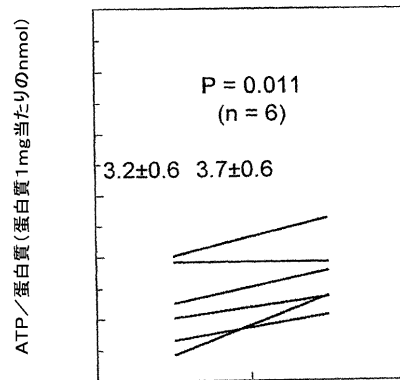
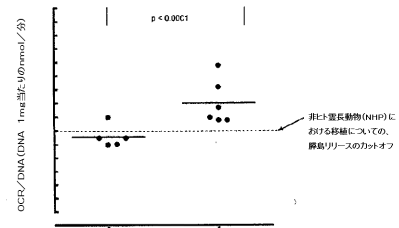


Fig. 37

【図 38】

XG-102は、7日間の培養の後に測定された豚島の生存率(OCR/DNA)を増加させる

75



\*\*各点は、異なる単離を表す。

\*\*\*DJNKを伴わない場合、5回にわたる逐次の単離のうち、リリース基準を満たしたのは1回(20%)であった。DJNKを伴う場合、6回にわたる逐次の単離のうち、リリース基準を満たしたのは6回(100%)であり、NHPへの移植に成功した。

Fig. 38

【図 39】

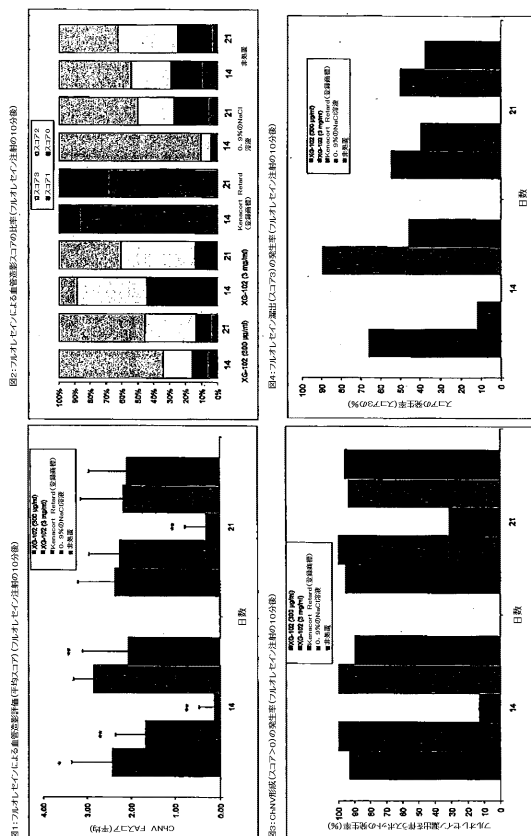


Fig. 39

【図 40】

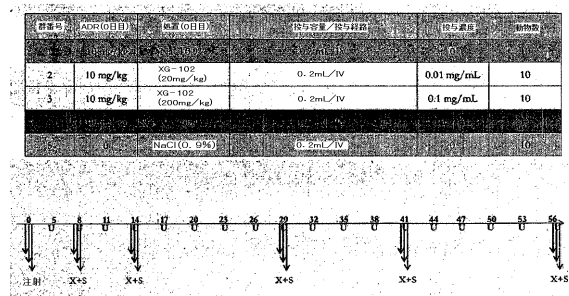


Fig. 40

\*0.05%のNaCl溶液と比較して、 $p < 0.05$   
 \*\*0.01%のNaCl溶液と比較して、 $p < 0.01$

【図 4 1】

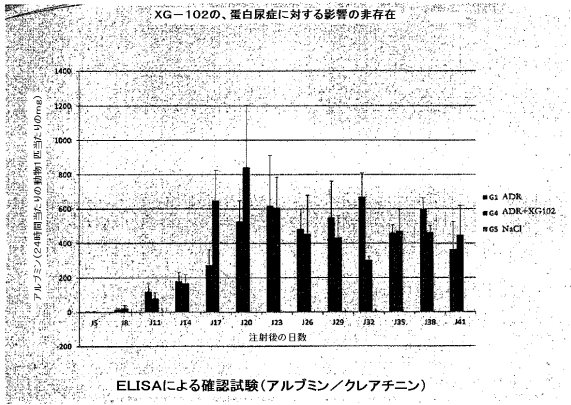


Fig. 41

【図 4 2】

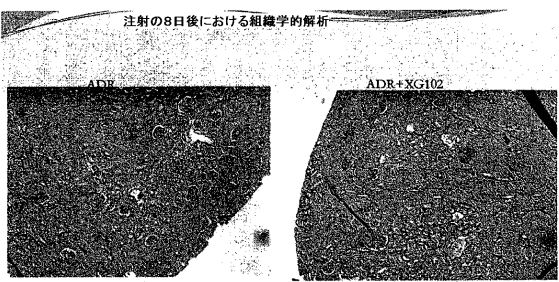


Fig. 42

【図 4 3】

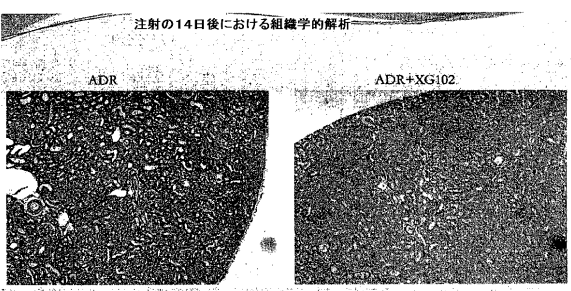


Fig. 43

【図 4 4】

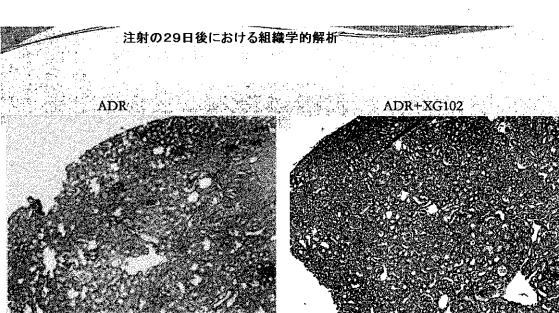


Fig. 44

【図 45】

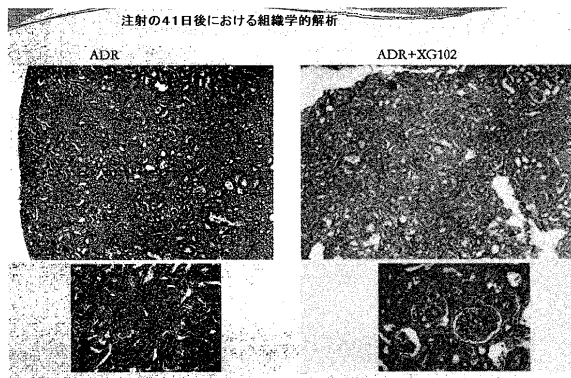


Fig. 45

【図 46】

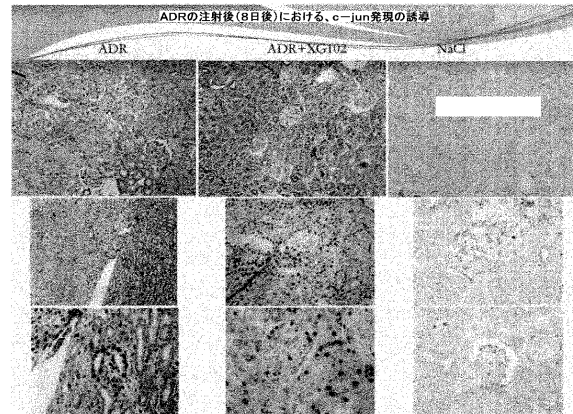


Fig. 46

【図 47】

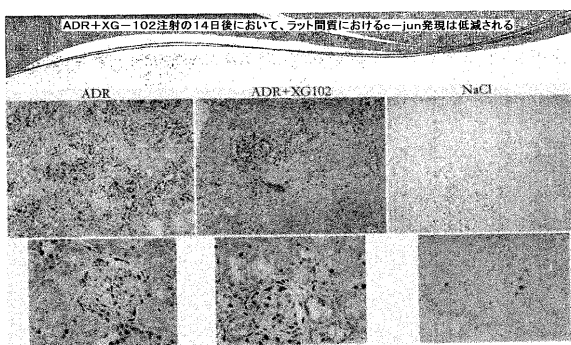


Fig. 47

【図 48】

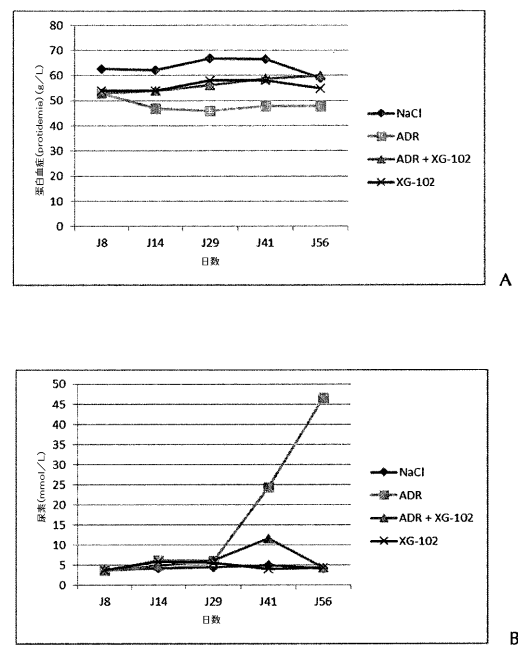


Fig. 48

【図 49】

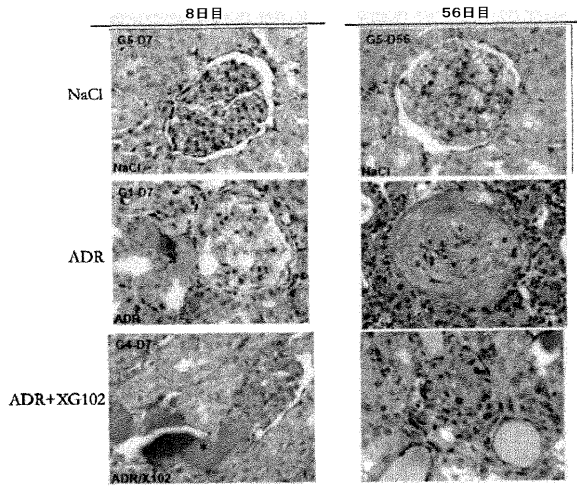


Fig. 49

【図 50】

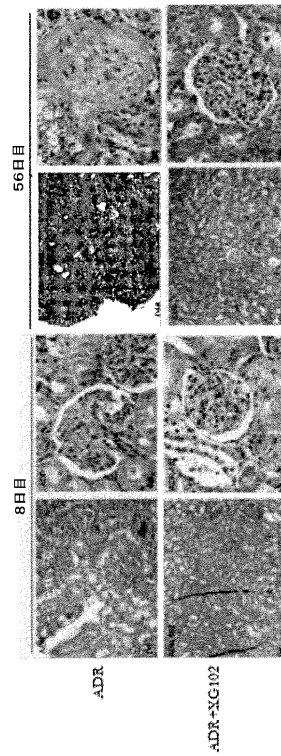


Fig. 50

【図 51】

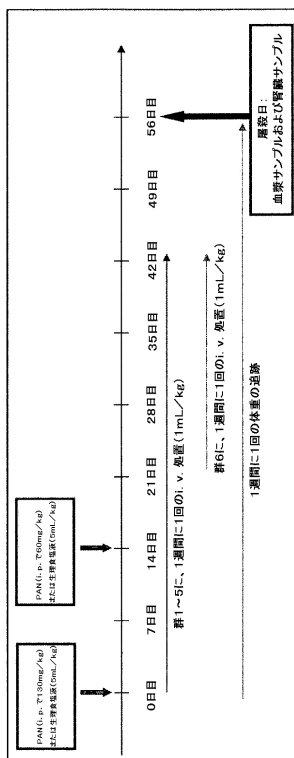


Fig. 51

【図 52】

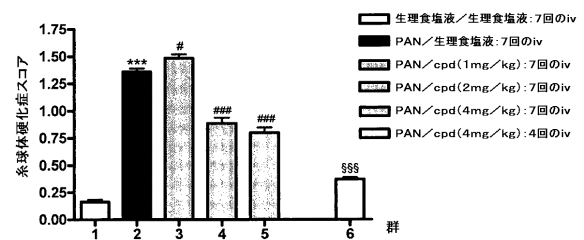


Fig. 52

【图 5 3】

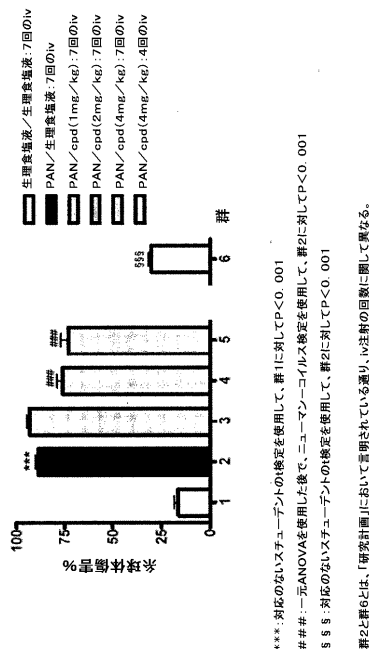


Fig. 53

【図 5 4】

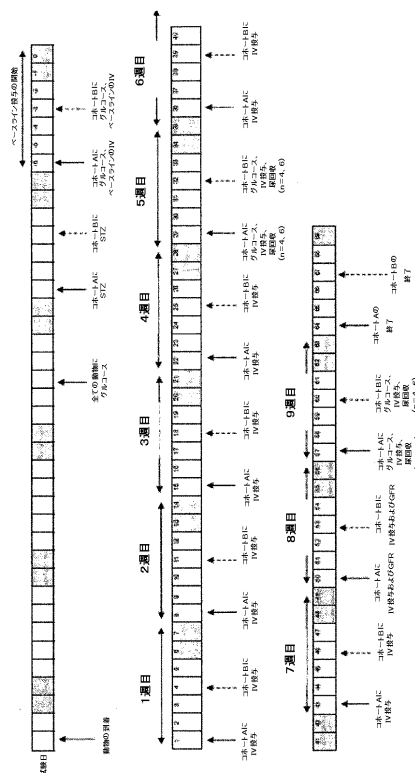


Fig. 54

【図 5 5】

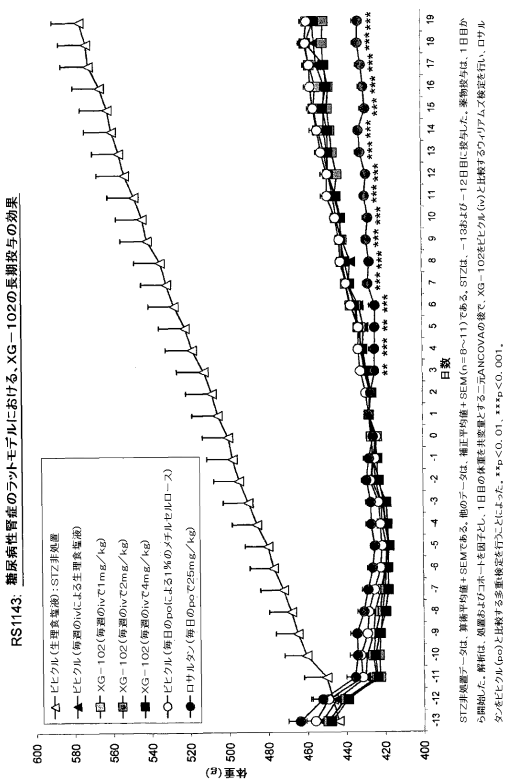


Fig. 55

【図 5 6】

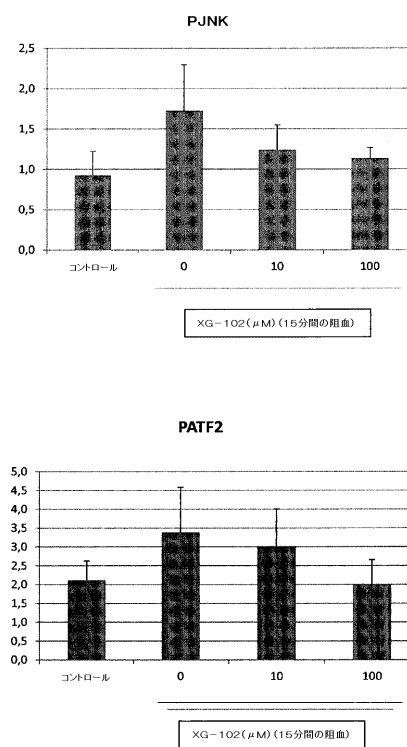


Fig. 56

【図 57】

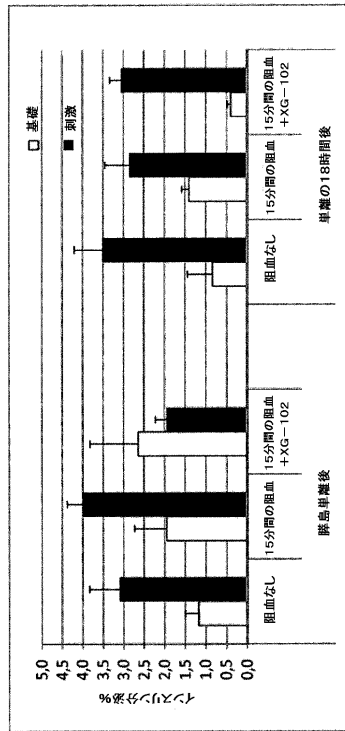


Fig. 57

【図 58】

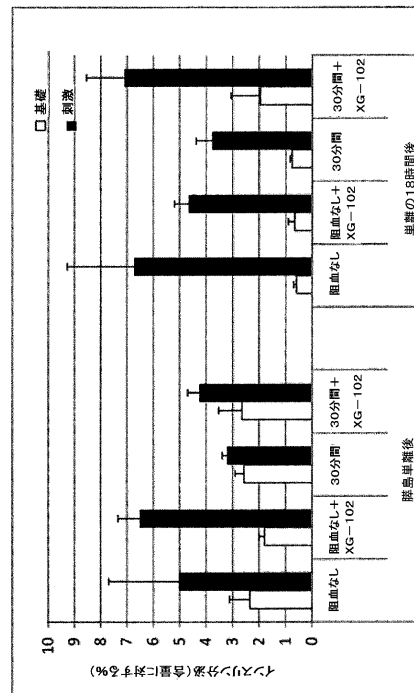


Fig. 58

【図 59】

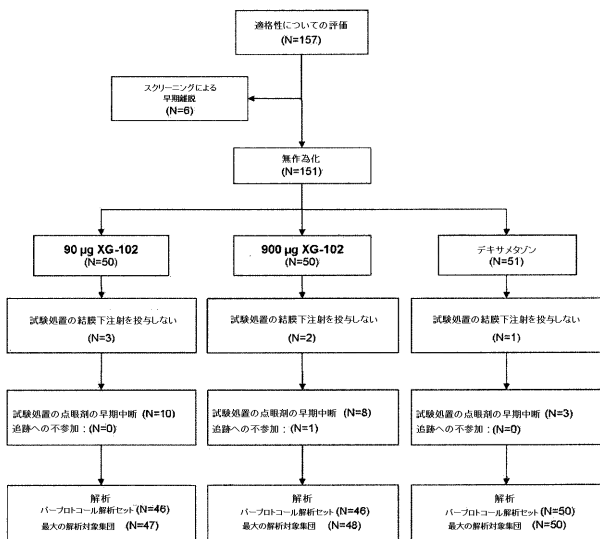


Fig. 59

【図 60】

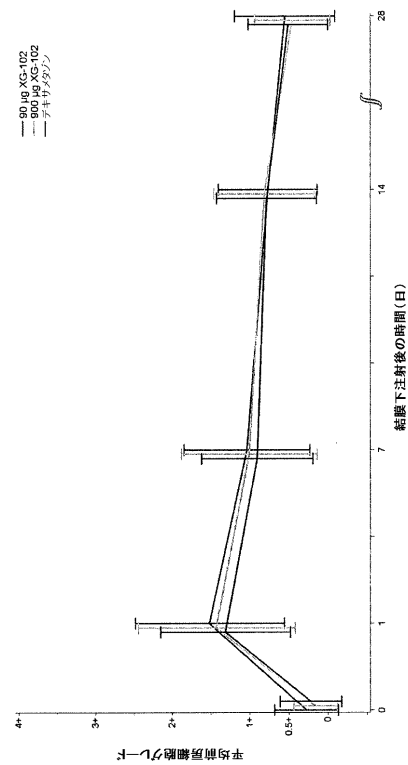


Fig. 60

【図 6 1】

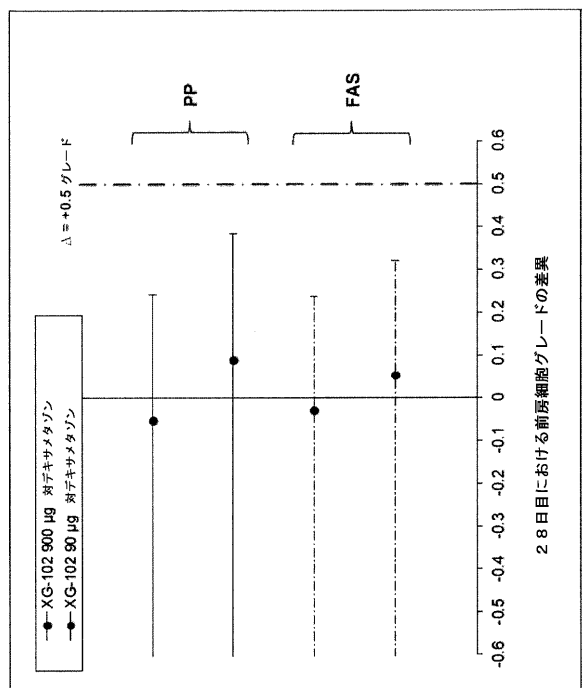


Fig. 61

【図 6 2】

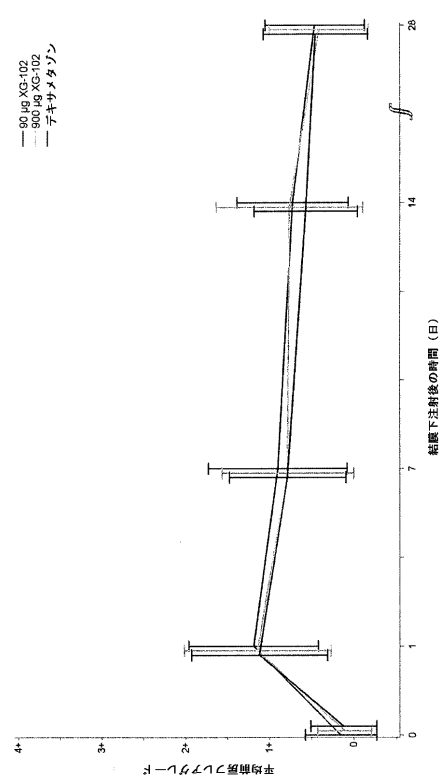


Fig. 62

【図 6 3】

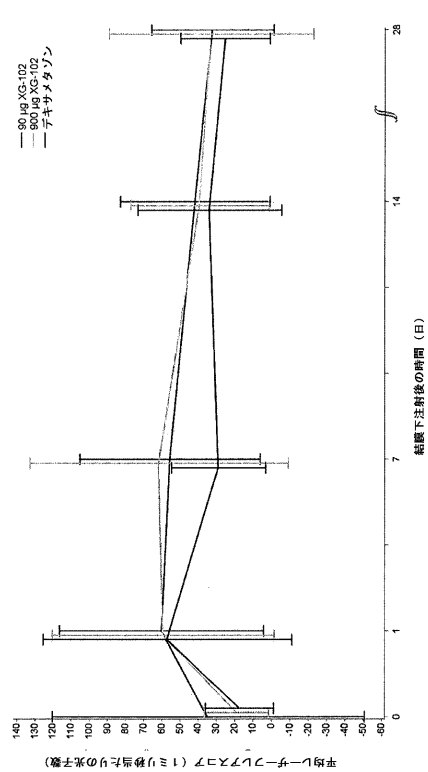


Fig. 63

【図 6 4】

|                                 | 90 μg XG-102 (N=47) |            | 900 μg XG-102 (N=48) |            | デキサメタゾン (N=50) |            | 正確なカイニ酸検定のP値           |                         |
|---------------------------------|---------------------|------------|----------------------|------------|----------------|------------|------------------------|-------------------------|
|                                 | 患者# (%)             | 症例# (%)    | 患者# (%)              | 症例# (%)    | 患者# (%)        | 症例# (%)    | 90 μg XG-102 対 デキサメタゾン | 900 μg XG-102 対 デキサメタゾン |
| 有害事象の概要                         | 78                  | 31 (66.0%) | 69                   | 33 (66.7%) | 55             | 29 (58.0%) | 0.531                  | 0.410                   |
| 試験期間の結膜下注射後の2.4時間までに発生した有害事象    | 31                  | 16 (51.6%) | 19                   | 13 (68.4%) | 19             | 15 (78.9%) | 0.828                  | 0.825                   |
| 試験期間の結膜下注射後の2.4時間後に発生した有害事象     | 47                  | 27 (57.4%) | 50                   | 24 (48.0%) | 36             | 19 (52.8%) | 0.068                  | 0.369                   |
| 重症な有害事象の概要                      | 4                   | 4 (10.0%)  | 3                    | 3 (6.3%)   | 2              | 2 (4.0%)   | 0.425                  | 0.674                   |
| 試験期間の結膜下注射後の2.4時間までに発生した重症な有害事象 | 1                   | 1 (2.1%)   | 0                    | 0 (0.0%)   | 0              | 0 (0.0%)   | 0.485                  | 0.309                   |
| 試験期間の結膜下注射後の2.4時間後に発生した重症な有害事象  | 3                   | 3 (6.8%)   | 3                    | 3 (6.3%)   | 2              | 2 (4.0%)   | 0.671                  | 0.674                   |

Fig. 64



【図 69】

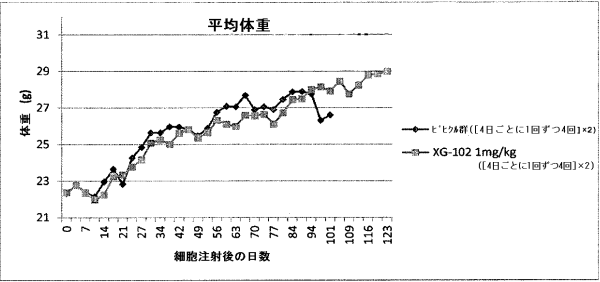


Fig. 69

【図 70】

| 群 | 物質     | 投与量<br>(注射回/当たり)<br>(mg/kg) | 投与経路 | 処置<br>スケジュール<br>(Q4D×4)×2 | 体重 ± SD (g) |            |            |            |            | MBWC ± SD (%)     |               |
|---|--------|-----------------------------|------|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|---------------|
|   |        |                             |      |                           | 0 日目        | 10 日目      | 42 日目      | 94 日目      | 100 日目     | 100 日目～<br>106 日目 | 106 日目～123 日目 |
| 1 | ビヒクル   | -                           | IV   | (Q4D×4)×2                 | 22.4 ± 1.2  | 22.1 ± 1.6 | 25.9 ± 1.4 | 27.8 ± 3.4 | 27.7 ± 9.7 | +25.7 ±           | 15.9          |
| 2 | XG-102 | 1                           | IV   | (Q4D×4)×2                 | 22.4 ± 1.0  | 22.0 ± 1.7 | 25.6 ± 1.7 | 28.0 ± 0.9 | +17.1 ±    | 10.1              | 11.9          |

| 群             | 体重 ± SD (g) |       |       |       |        | MBWC ± SD (%) |    |
|---------------|-------------|-------|-------|-------|--------|---------------|----|
|               | 0 日目        | 10 日目 | 42 日目 | 94 日目 | 106 日目 | 106 日目～123 日目 | NS |
| XG-102 1mg/kg | NS          | NS    | NS    | NS    | NS     | NS            | NS |

Fig. 70

【図 71】

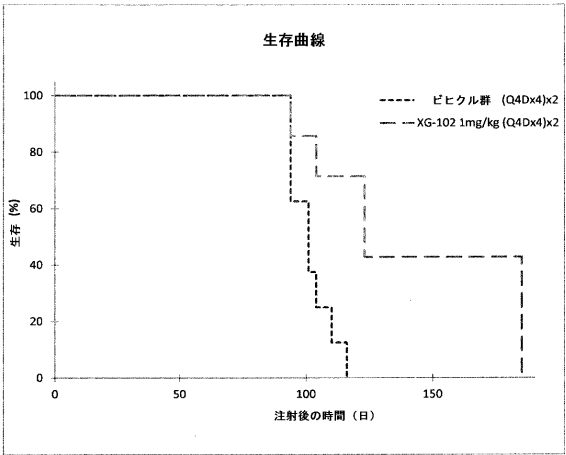


Fig. 71

【図 72】

| 群 | 物質     | 投与量<br>(注射回/当たり)<br>(mg/kg) | 投与経路 | 処置<br>スケジュール<br>(Q4D×4)×2 | 体重 ± SD (g) |            |            |            |             | MBWC ± SD (%)     |               |
|---|--------|-----------------------------|------|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------------|---------------|
|   |        |                             |      |                           | 0 日目        | 10 日目      | 41 日目      | 67 日目      | 100 日目      | 100 日目～<br>106 日目 | 106 日目～123 日目 |
| 1 | ビヒクル   | 0.1                         | IV   | (Q4D×4)×2                 | 19.7 ± 1.4  | 20.9 ± 1.5 | 23.4 ± 1.8 | 23.6 ± 1.8 | +11.7 ± 3.1 | +13.0 ± 5.8       |               |
| 2 | XG-102 | 0.1                         | IV   | (Q4D×4)×2                 | 19.4 ± 1.2  | 21.0 ± 1.3 | 23.3 ± 1.1 | 23.9 ± 1.1 | +11.4 ± 3.9 | +15.0 ± 4.1       |               |
| 3 | XG-102 | 1                           | IV   | (Q4D×4)×2                 | 19.4 ± 1.2  | 21.0 ± 1.3 | 23.4 ± 1.5 | 25.1 ± 1.7 | +11.2 ± 5.0 | +21.7 ± 6.8       |               |
| 4 | XG-102 | 5                           | IV   | (Q4D×4)×2                 | 19.6 ± 1.1  | 21.1 ± 1.3 | 23.8 ± 1.4 | 25.2 ± 1.4 | +12.8 ± 3.2 | +19.6 ± 7.4       |               |

Fig. 72

【図 7 3】

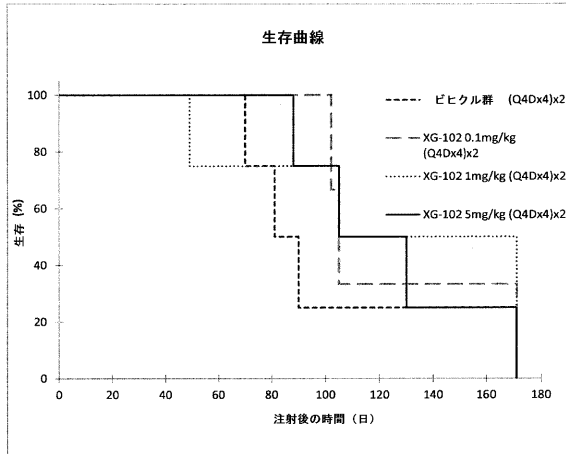


Fig. 73

【図 7 4】

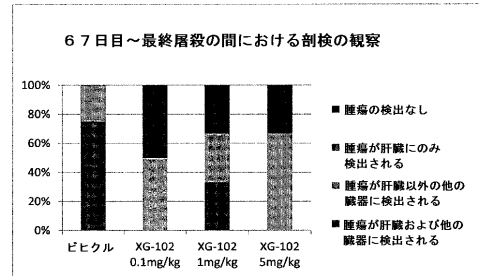
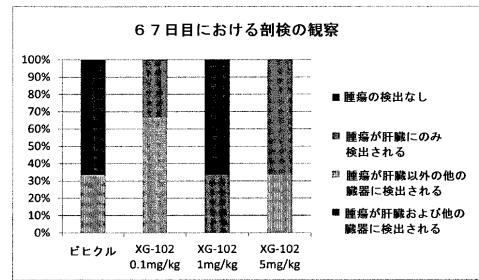


Fig. 74

【図 7 5】

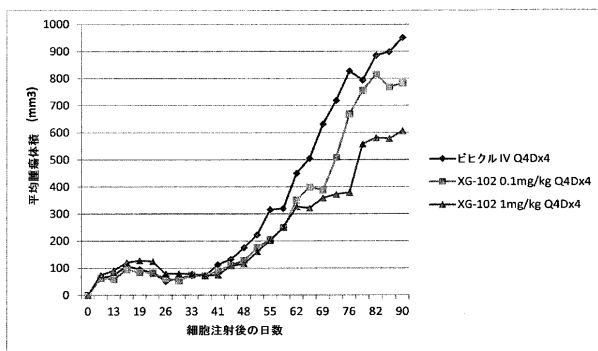


Fig. 75

【図 7 6】

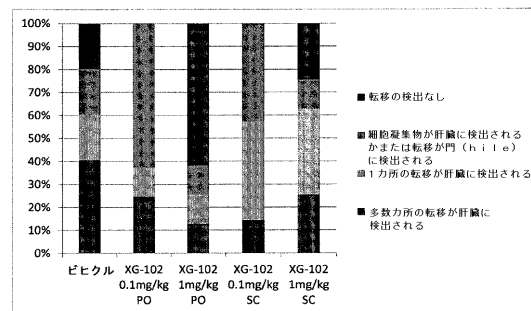


Fig. 76

【図 77】

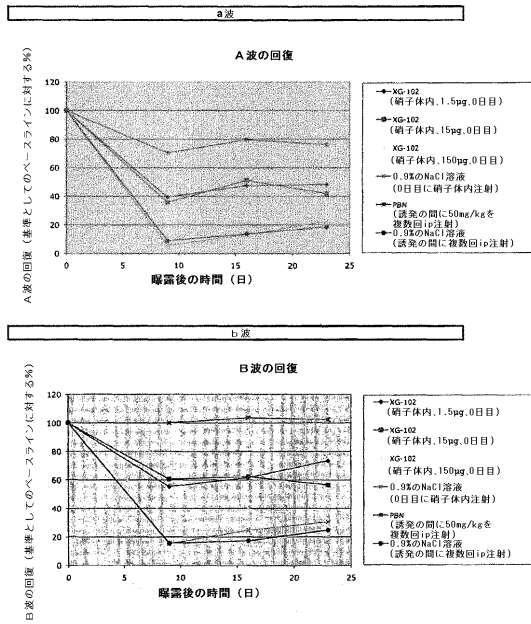


Fig. 77

【配列表】

20165232740000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/001736

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17 C07K14/47 A61K48/00 C07K16/40 C12N15/00  
 A61P25/28 A61P3/10 A61P41/00 A61P13/12

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 2012/101046 A1 (HIRAI SHIN-ICHIRO [JP]<br>ET AL) 26 April 2012 (2012-04-26)                                                                                                                      | 1,2,9-31              |
| Y         | paragraphs [0001], [0002], [0022],<br>[0024], [0027], [0047], [0060],<br>[0062], [0067]                                                                                                             | 1,9-31                |
| X         | -----<br>WO 2009/143865 A1 (XIGEN SA [CH]; BONNY<br>CHRISTOPHE [CH])                                                                                                                                | 1,2,7-31              |
| Y         | 3 December 2009 (2009-12-03)<br>page 4, line 31 - page 5, line 27<br>page 5, line 29 - line 33<br>page 34, line 4 - page 39, line 7; claim 6<br>page 47, line 21 - page 49, line 8<br>-----<br>-/-- | 1,9-31                |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier application or patent but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2015

Date of mailing of the international search report

02/02/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pilling, Stephen

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/001736

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
| X                                                    | WO 2004/037196 A2 (SANGSTAT MEDICAL CORP [US]; IYER SUHASINI [US]; BUELOW ROLAND [US]; LA) 6 May 2004 (2004-05-06)                                                                                                                                                                                                               | 1,9-31                |
| Y                                                    | paragraphs [0042], [0053], [0080]; claims 1,11; example 1                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1,9-31                |
| A                                                    | -----<br>WO 2010/065850 A2 (UNIV MASSACHUSETTS [US]; DAVIS ROGER J [US]; BUZO GUADALUPE SABIO [ES]) 10 June 2010 (2010-06-10)<br>page 29, line 3 - line 13                                                                                                                                                                       | 1,2,9-31              |
| X,P                                                  | -----<br>WO 2013/091670 A1 (XIGEN SA [CH]; COMBETTE JEAN-MARC [FR]; DELOCHE CATHERINE [CH]) 27 June 2013 (2013-06-27)<br>abstract<br>page 36, line 42 - line 24                                                                                                                                                                  | 1,2,6-31              |
| X,P                                                  | -----<br>WO 2013/091896 A1 (XIGEN INFLAMMATION LTD; COMBETTE JEAN-MARC [FR]; DELOCHE CATHERINE [CH]) 27 June 2013 (2013-06-27)<br>abstract<br>page 36, line 32 - page 42, line 24                                                                                                                                                | 1,2,6-31              |
| A                                                    | -----<br>US 2006/094753 A1 (PANG IOK-HOU [US] ET AL) 4 May 2006 (2006-05-04)<br>paragraphs [0016], [0021]                                                                                                                                                                                                                        | 1,2,6-31              |
| A                                                    | -----<br>DU HONGJUN ET AL: "JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 110, no. 6, February 2013 (2013-02), pages 2377-2382, XP002728439, ISSN: 0027-8424<br>abstract | 1,2,6-31              |
| X                                                    | -----<br>WO 99/20624 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 29 April 1999 (1999-04-29)                                                                                                                                                                                                                                                      | 1,9-31                |
| Y                                                    | page 98, line 10 - line 18                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,9-31                |
| X                                                    | -----<br>WO 98/49188 A1 (UNIV MASSACHUSETTS [US]) 5 November 1998 (1998-11-05)                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,9-31                |
| Y                                                    | page 10, line 29 - page 11, line 5<br>example 11                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1,9-31                |
| X                                                    | -----<br>WO 2007/031098 A1 (XIGEN SA [CH]; BONNY CHRISTOPHE [CH]) 22 March 2007 (2007-03-22)                                                                                                                                                                                                                                     | 1,9-31                |
| Y                                                    | page 40, line 9 - line 17; claim 20                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1,9-31                |
|                                                      | -----<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/001736

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
| X                                                    | WO 01/27268 A2 (UNIV LAUSANNE [CH]; BONNY CHRISTOPHE [CH])<br>19 April 2001 (2001-04-19)                                                                                                                                                                                         | 1,2,7-31              |
| Y                                                    | page 5, line 1 - line 5<br>page 23, line 29 - page 25, line 14<br>-----                                                                                                                                                                                                          | 1,9-31                |
| X                                                    | IYER S ET AL: "RDP58, a rationally designed peptide, inhibits multiple forms of pathogenic inflammation through the inhibition of p38MAPK and JNK", BIOPOLYMERS, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 71, no. 3, 061, January 2003 (2003-01), page 298, XP002388632, ISSN: 0006-3525 | 1,9-31                |
| Y                                                    | abstract<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                | 1,9-31                |
| X                                                    | WO 2008/094208 A2 (UNIV NORTHWESTERN [US]; WATTERSON D MARTIN [US]; VAN ELDIK LINDA J [US]) 7 August 2008 (2008-08-07)                                                                                                                                                           | 1,9-31                |
| Y                                                    | abstract<br>page 27, line 3 - line 4<br>-----                                                                                                                                                                                                                                    | 1,9-31                |
| X                                                    | US 2007/015779 A1 (GRIFFIN JOHN [US] ET AL) 18 January 2007 (2007-01-18)                                                                                                                                                                                                         | 1,9-31                |
| Y                                                    | paragraphs [0128], [0361]<br>-----                                                                                                                                                                                                                                               | 1,9-31                |
| X                                                    | WO 2006/021458 A2 (GPC BIOTECH AG [DE]; KLEBL BERT [DE]; BAUMANN MATTHIAS [DE]; HOPPE EDM) 2 March 2006 (2006-03-02)                                                                                                                                                             | 1,9-31                |
| Y                                                    | page 36, line 27 - line 36<br>page 39, line 11 - line 19<br>-----                                                                                                                                                                                                                | 1,9-31                |
| X                                                    | WO 2008/095943 A1 (EISAI LONDON RES LAB LTD [GB]; GRACZYK PIOTR PAWEL [GB]; DIMOPOULOS PA) 14 August 2008 (2008-08-14)                                                                                                                                                           | 1,6,9-31              |
| Y                                                    | abstract<br>page 12, line 21 - page 14, line 11<br>-----                                                                                                                                                                                                                         | 1,9-31                |
| X                                                    | US 2012/258982 A1 (CHEUNG ADRIAN WAI-HING [US] ET AL) 11 October 2012 (2012-10-11)                                                                                                                                                                                               | 1,6,9-31              |
| Y                                                    | abstract<br>paragraph [0008]<br>-----                                                                                                                                                                                                                                            | 1,9-31                |
| X                                                    | WO 2004/060318 A2 (CELGENE CORP [US]; ZELDIS JEROME B [US])<br>22 July 2004 (2004-07-22)                                                                                                                                                                                         | 1-6,9-31              |
| Y                                                    | abstract<br>page 4, line 26 - page 5, line 13<br>-----                                                                                                                                                                                                                           | 1,9-31                |
|                                                      | -----<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                    |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/001736

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | NOGUCHI H ET AL: "Effect of JNK Inhibitor During Islet Isolation and Transplantation", TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ELSEVIER INC, ORLANDO, FL; US, vol. 40, no. 2, March 2008 (2008-03), pages 379-381, XP023904315, ISSN: 0041-1345, DOI: 10.1016/J.TRANSPROCEED.2008.01.055 [retrieved on 2008-03-26]                                                                             | 7-31                  |
| Y         | abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1,9-31                |
| X         | HIROFUMI NOGUCHI ET AL: "Cell Permeable Peptide of JNK Inhibitor Prevents Islet Apoptosis Immediately After Isolation and Improves Islet Graft Function", AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, vol. 5, no. 8, August 2005 (2005-08), pages 1848-1855, XP055161653, ISSN: 1600-6135, DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.00985.x abstract                                                  | 1,7-31                |
| X         | EP 1 676 574 A2 (JOHNSON & JOHNSON VISION CARE [US]) 5 July 2006 (2006-07-05)                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 7-31                  |
| Y         | abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1,9-31                |
| A         | WO 94/04686 A1 (BIOGEN INC [US]; BARSOUM JAMES G [US]; FAWELL STEPHEN E [US]; PEPINSKY) 3 March 1994 (1994-03-03) abstract                                                                                                                                                                                                                                                          | 1,2,6-31              |
| A         | VIVÈS E ET AL: "A truncated JIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma embrane and accumulates in the cell nucleus", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 272, no. 25, 20 June 1997 (1997-06-20), pages 16010-16017, XP002172260, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.272.25.16010 abstract | 1,2,6-31              |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2014/001736**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
  
6-8(completely); 1, 2, 9-31(partially)
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating age-related macular degeneration (AMD), in particular the wet or the dry form of age-related macular degeneration

---

2. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating cataract

---

3. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating uveitis

---

4. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating scleritis

---

5. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

preparation of a pharmaceutical composition for treating  
corneal surgery

---

6. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
conjunctivitis

---

7. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
non-infectious keratitis

---

8. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
iritis

---

9. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
chorioretinal inflammation

---

10. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

preparation of a pharmaceutical composition for treating inflammatory diseases damaging the retina of the eye (retinopathy), in particular diabetic retinopathy, arterial hypertension induced hypertensive retinopathy, radiation induced retinopathy, sun-induced solar retinopathy, trauma-induced retinopathy, e.g. Purtscher's retinopathy, retinopathy of prematurity (ROP) and hyperviscosity-related retinopathy

---

## 11. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Addison's disease

---

## 12. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Agammaglobulinemia

---

## 13. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Alopecia areata

---

## 14. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Amyotrophic lateral sclerosis

---

## 15. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Antiphospholipid syndrome  
---

16. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Atopic allergy  
---

17. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune aplastic anemia  
---

18. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune cardiomyopathy  
---

19. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune enteropathy  
---

20. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune hemolytic anemia  
---

21. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune inner ear disease  
---

22. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune lymphoproliferative syndrome  
---

23. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune polyendocrine syndrome  
---

24. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune progesterone dermatitis  
---

25. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Idiopathic thrombocytopenic purpura  
---

26. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune urticaria  
---

27. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Balo concentric sclerosis  
---

28. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Bullous pemphigoid  
---

29. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Castleman's disease  
---

30. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Cicatricial pemphigoid  
---

31. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Cold agglutinin disease  
---

32. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Complement component 2 deficiency associated disease  
---

33. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Cushing's syndrome  
---

34. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Dagos disease  
---

35. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Adiposis dolorosa  
---

36. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Eosinophilic pneumonia  
---

37. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Epidermolysis bullosa acquisita  
---

38. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Hemolytic disease of the newborn  
---

39. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Cryoglobulinemia  
---

40. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Evans syndrome  
---

41. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Fibrodysplasia ossificans progressive  
---

42. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Gastrointestinal pemphigoid  
---

43. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Goodpasture's syndrome  
---

44. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Hashimoto's encephalopathy  
---

45. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Gestational pemphigoid

---

46. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Hughes-stovin syndrome

---

47. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Hypogammaglobulinemia

---

48. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Lambert-eaton myasthenic syndrome

---

49. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Lichen sclerosus

---

50. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Morphea

---

51. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta

---

52. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Myasthenia gravis

---

53. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Narcolepsy

---

54. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Neuromyotonia

---

55. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Opsoclonus myoclonus syndrome  
---

56. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Paraneoplastic cerebellar degeneration  
---

57. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria  
---

58. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Parry-romberg syndrome  
---

59. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Pernicious anemia  
---

60. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating POEMS syndrome  
---

61. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Pyoderma gangrenosum  
---

62. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Pure red cell aplasia  
---

63. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Raynaud's phenomenon  
---

64. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Restless legs syndrome  
---

65. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Retroperitoneal fibrosis

---

66. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Autoimmune polyendocrine syndrome type 2

---

67. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Stiff person syndrome,

---

68. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Susac's syndrome

---

69. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Febrile neutrophilic dermatosis

---

70. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Sydenham's chorea  
---

71. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Thrombocytopenia  
---

72. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating vitiligo  
---

73. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating arthritis, in particular juvenile idiopathic arthritis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis, and arthrosis, and osteoarthritis,  
---

74. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating psoriasis  
---

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

75. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating eczema

---

76. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating dermatitis

---

77. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating acne

---

78. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating mouth ulcers

---

79. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating erythema

---

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

80. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating lichen plan

---

81. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating sarcoidose

---

82. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating vascularitis

---

83. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating adult linear IgA disease

---

84. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating tauopathies

---

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

85. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating amyloidoses

---

86. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating prion diseases

---

87. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating polypes

---

88. claims: 1, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating inflammatory diseases of the mouth or the jaw bone, in particular pulpitis, periimplantitis, periodontitis, gingivitis, stomatitis, mucositis, desquamative disorders, temporomandibular joint disorder,

---

89. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

preparation of a pharmaceutical composition for treating  
osteonecrosis

---

90. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
encephalitis or encephalomyelitis, in particular acute  
disseminated encephalomyelitis,

---

91. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
spondylitis, in particular ankylosing spondylitis

---

92. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
antisyntetase syndrome

---

93. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or  
an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the  
preparation of a pharmaceutical composition for treating  
hepatitis, in particular autoimmune hepatitis

---

94. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150  
amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK  
inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic  
acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating autoimmune peripheral neuropathy  
---

## 95. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating pancreatitis, in particular autoimmune pancreatitis  
---

## 96. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Behcet's disease  
---

## 97. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Bickerstaff's  
---

## 98. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Blau syndrome  
---

## 99. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Coeliac disease  
---

## 100. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Chagas disease  
---

## 101. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating polyneuropathy, in particular chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy,  
---

## 102. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating osteomyelitis, in particular chronic recurrent multifocal osteomyelitis,  
---

## 103. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Churg-Strauss syndrome  
---

## 104. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Cogan syndrome

---

105. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating giant-cell arteritis

---

106. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating CREST syndrome

---

107. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating vasculitis, in particular cutaneous small-vessel vasculitis and urticarial vasculitis,

---

108. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating dermatomyositis

---

109. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating systemic scleroderma

---

110. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Dressler's syndrome

---

111. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating drug-induced lupus erythematosus or discoid lupus erythematosus

---

112. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating enthesitis

---

113. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating eosinophilic fasciitis

---

114. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating eosinophilic gastroenteritis  
---

**115. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating erythema nodosum  
---

**116. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Idiopathic pulmonary fibrosis, gastritis  
---

**117. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Grave's disease  
---

**118. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Guillain-barre syndrome  
---

**119. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Hashimoto's thyroiditis  
---

**120. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Henoch-Schonlein purpura  
---

**121. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Hidradenitis suppurativa  
---

**122. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Idiopathic inflammatory demyelinating diseases  
---

**123. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating myositis, in particular inclusion body myositis  
---

**124. claims: 1, 9-31(all partially)**

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating cystitis, in particular interstitial cystitis

---

125. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Kawasaki disease

---

126. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Lichen planus

---

127. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating lupoid hepatitis

---

128. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Majeed syndrome

---

129. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Meniere's disease

---

130. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating microscopic polyangiitis

---

131. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating mixed connective tissue disease

---

132. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating myelitis, in particular neuromyelitis optica

---

133. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating thyroiditis, in particular Ord's thyroiditis

---

134. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating rheumatism, in particular palindromic rheumatism  
---

## 135. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Parsonage-Turner syndrome  
---

## 136. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating pemphigus vulgaris  
---

## 137. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating polyarteritis nodosa  
---

## 138. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating polymyalgia, in particular polymyalgia rheumatica  
---

## 139. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating polymyositis

---

140. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating cirrhosis, in particular primary biliary cirrhosis

---

141. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating cholangitis, in particular primary sclerosing cholangitis

---

142. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating progressive inflammatory neuropathy

---

143. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating relapsing polychondritis

---

144. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating arthritis, in particular reactive arthritis (Reiter disease) and rheumatoid arthritis

---

145. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating rheumatic fever

---

146. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating sarcoidosis

---

147. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Schnitzler syndrome

---

148. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating serum sickness

---

149. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating spondyloarthritis

---

150. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Takayasu's arteritis

---

151. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Tolosa-Hunt syndrome

---

152. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating transverse myelitis

---

153. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Wegener's granulomatosis

---

154. claims: 1-6, 9-31(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating fibrotic diseases and/or disorders particularly selected from lung, heart, liver, bone marrow, mediastinum, retroperitoneum, skin, intestine, joint, and shoulder fibrosis,

---

**155. claims: 1, 6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating kidney diseases and/or disorders in particular selected from glomerulonephritis in general, in particular membrano-proliferative glomerulonephritis, mesangio-proliferative glomerulonephritis, rapidly progressive glomerulonephritis, nephrophathies in general, in particular membranous nephropathy or diabetic nephropathy, nephritis in general, in particular lupus nephritis, pyelonephritis, interstitial nephritis, tubulointerstitial nephritis, chronic nephritis or acute nephritis, and minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis

---

**156. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating sympathetic ophthalmia

---

**157. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating skin, kidney, heart, lung, pancreas, liver, blood cell, bone marrow, cornea, accidental severed limb, in particular

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

fingers, hand, foot, face, nose, bone, cardiac valve, blood vessel or intestine transplant rejection reaction,

---

158. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the preparation of a pharmaceutical composition for treating Corticobasal degeneration

---

159. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of progresive supranuclear palsy

---

160. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of schizophrenia

---

161. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of inherited Kreutzfeld Jacob

---

162. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of motor neurone disease

---

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

163. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of spinocerebellar ataxia/atrophie

---

164. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of dementia, in particular frontotemporal dementia, dementia with lewy bodies

---

165. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of multiple system atrophy

---

166. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of hereditary spastic paraparesis

---

167. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of Friedreich's ataxia

---

168. claims: 1-6, 9-31(all partially)

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK

International Application No. PCT/ EP2014/ 001736

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of

---

**169. claims: 1-6, 9-31(all partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of hereditary or non-hereditary metabolic disease, in particular selected from the group of metabolic disorders of the carbohydrate metabolism, e.g., glycogen storage disease, disorders of amino acid metabolism, e.g., phenylketonuria, maple syrup urine disease, glutaric acidemia type 1, urea Cycle Disorder or urea Cycle Defects, e.g., carbamoyl phosphate synthetase I deficiency, disorders of organic acid metabolism (organic acidurias), e.g., alcaptonuria, disorders of fatty acid oxidation and mitochondrial metabolism, e.g., medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency (often shortened to MCADD.), disorders of porphyrin metabolism, e.g. acute intermittent porphyria, disorders of purine or pyrimidine metabolism, e.g., Lesch-Nyhan syndrome, Disorders of steroid metabolism, e.g., lipoid congenital adrenal hyperplasia, or congenital adrenal hyperplasia, disorders of mitochondrial function, e.g., Kearns-Sayre syndrome, disorders of peroxisomal function. e.g., Zellweger syndrome, or lysosomal storage disorders, e.g., Gaucher's disease or Niemann Pick disease

---

**170. claims: 7, 8(completely); 9-31(partially)**

use of a JNK inhibitor peptide comprising less than 150 amino acids or a chimeric peptide comprising this JNK inhibitor peptide and a trafficking sequence or a nucleic acid encoding this JNK inhibitor peptide/chimeric peptide or an antibody binding to the JNK inhibitor peptide for the treatment of a tissue or organ transplant prior its transplantation

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001736

| Patent document<br>cited in search report |  | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|--|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2012101046 A1                          |  | 26-04-2012          | CA 2756864 A1              | 07-10-2010          |
|                                           |  |                     | CN 102365093 A             | 29-02-2012          |
|                                           |  |                     | EA 201171188 A1            | 30-05-2012          |
|                                           |  |                     | EP 2415478 A1              | 08-02-2012          |
|                                           |  |                     | JP 2010254672 A            | 11-11-2010          |
|                                           |  |                     | KR 20120022721 A           | 12-03-2012          |
|                                           |  |                     | US 2012101046 A1           | 26-04-2012          |
|                                           |  |                     | WO 2010113753 A1           | 07-10-2010          |
| -----                                     |  |                     |                            |                     |
| WO 2009143865 A1                          |  | 03-12-2009          | AR 070864 A1               | 12-05-2010          |
|                                           |  |                     | AU 2009253346 A1           | 03-12-2009          |
|                                           |  |                     | CA 2725545 A1              | 03-12-2009          |
|                                           |  |                     | CN 102112149 A             | 29-06-2011          |
|                                           |  |                     | CN 104147591 A             | 19-11-2014          |
|                                           |  |                     | DK 2296684 T3              | 25-03-2013          |
|                                           |  |                     | DK 2489361 T3              | 30-06-2014          |
|                                           |  |                     | DK 2491942 T3              | 13-01-2014          |
|                                           |  |                     | EP 2296684 A1              | 23-03-2011          |
|                                           |  |                     | EP 2489361 A1              | 22-08-2012          |
|                                           |  |                     | EP 2491942 A1              | 29-08-2012          |
|                                           |  |                     | EP 2650007 A1              | 16-10-2013          |
|                                           |  |                     | EP 2650008 A1              | 16-10-2013          |
|                                           |  |                     | ES 2400988 T3              | 16-04-2013          |
|                                           |  |                     | ES 2443347 T3              | 19-02-2014          |
|                                           |  |                     | ES 2481915 T3              | 31-07-2014          |
|                                           |  |                     | HK 1150305 A1              | 16-05-2013          |
|                                           |  |                     | HK 1174839 A1              | 11-07-2014          |
|                                           |  |                     | HK 1175102 A1              | 07-02-2014          |
|                                           |  |                     | JP 5485265 B2              | 07-05-2014          |
|                                           |  |                     | JP 2011524861 A            | 08-09-2011          |
|                                           |  |                     | JP 2014111646 A            | 19-06-2014          |
|                                           |  |                     | PT 2489361 E               | 29-05-2014          |
|                                           |  |                     | PT 2491942 E               | 23-12-2013          |
|                                           |  |                     | US 2011183888 A1           | 28-07-2011          |
|                                           |  |                     | WO 2009143865 A1           | 03-12-2009          |
|                                           |  |                     | WO 2009144037 A1           | 03-12-2009          |
| -----                                     |  |                     |                            |                     |
| WO 2004037196 A2                          |  | 06-05-2004          | AU 2003286611 A1           | 13-05-2004          |
|                                           |  |                     | US 2004186052 A1           | 23-09-2004          |
|                                           |  |                     | WO 2004037196 A2           | 06-05-2004          |
| -----                                     |  |                     |                            |                     |
| WO 2010065850 A2                          |  | 10-06-2010          | US 2010183633 A1           | 22-07-2010          |
|                                           |  |                     | WO 2010065850 A2           | 10-06-2010          |
| -----                                     |  |                     |                            |                     |
| WO 2013091670 A1                          |  | 27-06-2013          | AU 2012359164 A1           | 29-05-2014          |
|                                           |  |                     | CA 2855226 A1              | 27-06-2013          |
|                                           |  |                     | CN 104080469 A             | 01-10-2014          |
|                                           |  |                     | EA 201491221 A1            | 28-11-2014          |
|                                           |  |                     | KR 20140108308 A           | 05-09-2014          |
|                                           |  |                     | WO 2013091670 A1           | 27-06-2013          |
|                                           |  |                     | WO 2013091896 A1           | 27-06-2013          |
| -----                                     |  |                     |                            |                     |
| WO 2013091896 A1                          |  | 27-06-2013          | AU 2012359164 A1           | 29-05-2014          |
|                                           |  |                     | CA 2855226 A1              | 27-06-2013          |
|                                           |  |                     | CN 104080469 A             | 01-10-2014          |
|                                           |  |                     | EA 201491221 A1            | 28-11-2014          |
|                                           |  |                     | KR 20140108308 A           | 05-09-2014          |
|                                           |  |                     | WO 2013091670 A1           | 27-06-2013          |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001736

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
|                                           |                     | WO 2013091896 A1           | 27-06-2013          |
| US 2006094753 A1                          | 04-05-2006          | AR 051472 A1               | 17-01-2007          |
|                                           |                     | AU 2005302511 A1           | 11-05-2006          |
|                                           |                     | BR P10518247 A2            | 11-11-2008          |
|                                           |                     | CA 2582316 A1              | 11-05-2006          |
|                                           |                     | CN 101048156 A             | 03-10-2007          |
|                                           |                     | CN 102166358 A             | 31-08-2011          |
|                                           |                     | EP 1804790 A2              | 11-07-2007          |
|                                           |                     | EP 2248521 A1              | 10-11-2010          |
|                                           |                     | JP 2008518922 A            | 05-06-2008          |
|                                           |                     | KR 20070070208 A           | 03-07-2007          |
|                                           |                     | TW I377940 B               | 01-12-2012          |
|                                           |                     | US 2006094753 A1           | 04-05-2006          |
|                                           |                     | US 2010280089 A1           | 04-11-2010          |
|                                           |                     | WO 2006050045 A2           | 11-05-2006          |
|                                           |                     | ZA 200703990 A             | 25-09-2008          |
| WO 9920624 A1                             | 29-04-1999          | AT 267200 T                | 15-06-2004          |
|                                           |                     | AU 745579 B2               | 21-03-2002          |
|                                           |                     | AU 9749998 A               | 10-05-1999          |
|                                           |                     | BR 9812944 A               | 08-08-2000          |
|                                           |                     | CA 2306870 A1              | 29-04-1999          |
|                                           |                     | CN 1279682 A               | 10-01-2001          |
|                                           |                     | CO 4980857 A1              | 27-11-2000          |
|                                           |                     | DE 69824029 D1             | 24-06-2004          |
|                                           |                     | DE 69824029 T2             | 12-05-2005          |
|                                           |                     | EP 1025102 A1              | 09-08-2000          |
|                                           |                     | ES 2221213 T3              | 16-12-2004          |
|                                           |                     | HR P20000209 A2            | 30-04-2001          |
|                                           |                     | HU 0100348 A2              | 28-08-2001          |
|                                           |                     | ID 27124 A                 | 01-03-2001          |
|                                           |                     | JP 3579350 B2              | 20-10-2004          |
|                                           |                     | JP 2001520227 A            | 30-10-2001          |
|                                           |                     | KR 100378937 B1            | 09-05-2003          |
|                                           |                     | MA 26555 A1                | 20-12-2004          |
|                                           |                     | NO 20001940 A              | 13-04-2000          |
|                                           |                     | NZ 503685 A                | 31-05-2002          |
|                                           |                     | PE 120999 A1               | 01-12-1999          |
|                                           |                     | PL 340412 A1               | 29-01-2001          |
|                                           |                     | RU 2219178 C2              | 20-12-2003          |
|                                           |                     | TR 200001079 T2            | 21-07-2000          |
|                                           |                     | TW I224596 B               | 01-12-2004          |
|                                           |                     | US 6316464 B1              | 13-11-2001          |
|                                           |                     | US 2001044538 A1           | 22-11-2001          |
|                                           |                     | US 2002013354 A1           | 31-01-2002          |
|                                           |                     | US 2003139462 A1           | 24-07-2003          |
|                                           |                     | WO 9920624 A1              | 29-04-1999          |
|                                           |                     | YU 22000 A                 | 31-01-2003          |
| WO 9849188 A1                             | 05-11-1998          | AU 7167298 A               | 24-11-1998          |
|                                           |                     | EP 1017710 A1              | 12-07-2000          |
|                                           |                     | US 6043083 A               | 28-03-2000          |
|                                           |                     | US 6410693 B1              | 25-06-2002          |
|                                           |                     | US 2002119135 A1           | 29-08-2002          |
|                                           |                     | US 2007003517 A1           | 04-01-2007          |
|                                           |                     | WO 9849188 A1              | 05-11-1998          |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001736

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2007031098 A1                          | 22-03-2007          | AU 2006291541 A1           | 22-03-2007          |
|                                           |                     | BR P10616824 A2            | 05-07-2011          |
|                                           |                     | CA 2621337 A1              | 22-03-2007          |
|                                           |                     | CN 101263157 A             | 10-09-2008          |
|                                           |                     | DK 1928903 T3              | 20-08-2012          |
|                                           |                     | EA 200800680 A1            | 30-12-2008          |
|                                           |                     | EP 1928903 A2              | 11-06-2008          |
|                                           |                     | EP 2418217 A1              | 15-02-2012          |
|                                           |                     | ES 2388076 T3              | 08-10-2012          |
|                                           |                     | HK 1118841 A1              | 08-03-2013          |
|                                           |                     | HR P20120598 T1            | 31-08-2012          |
|                                           |                     | JP 5386169 B2              | 15-01-2014          |
|                                           |                     | JP 2009507502 A            | 26-02-2009          |
|                                           |                     | JP 2012095657 A            | 24-05-2012          |
|                                           |                     | KR 20080052586 A           | 11-06-2008          |
|                                           |                     | PT 1928903 E               | 02-07-2012          |
|                                           |                     | RS 52379 B                 | 31-12-2012          |
|                                           |                     | SI 1928903 T1              | 28-09-2012          |
|                                           |                     | US 2009305968 A1           | 10-12-2009          |
|                                           |                     | US 2014200187 A1           | 17-07-2014          |
|                                           |                     | WO 2007031098 A1           | 22-03-2007          |
|                                           |                     | WO 2007031280 A2           | 22-03-2007          |
|                                           |                     | ZA 200800848 A             | 27-05-2009          |
| WO 0127268 A2                             | 19-04-2001          | AT 411388 T                | 15-10-2008          |
|                                           |                     | AT 541929 T                | 15-02-2012          |
|                                           |                     | AT 548455 T                | 15-03-2012          |
|                                           |                     | AU 784845 B2               | 06-07-2006          |
|                                           |                     | CA 2387184 A1              | 19-04-2001          |
|                                           |                     | DK 1303600 T3              | 12-01-2009          |
|                                           |                     | DK 1811033 T3              | 07-05-2012          |
|                                           |                     | DK 1905830 T3              | 02-07-2012          |
|                                           |                     | EP 1303600 A2              | 23-04-2003          |
|                                           |                     | EP 1811033 A1              | 25-07-2007          |
|                                           |                     | EP 1895005 A1              | 05-03-2008          |
|                                           |                     | EP 1905830 A1              | 02-04-2008          |
|                                           |                     | EP 1914310 A2              | 23-04-2008          |
|                                           |                     | ES 2313906 T3              | 16-03-2009          |
|                                           |                     | ES 2381206 T3              | 24-05-2012          |
|                                           |                     | ES 2383824 T3              | 26-06-2012          |
|                                           |                     | HK 1100958 A1              | 15-06-2012          |
|                                           |                     | HK 1111732 A1              | 14-12-2012          |
|                                           |                     | JP 5490343 B2              | 14-05-2014          |
|                                           |                     | JP 2003511071 A            | 25-03-2003          |
|                                           |                     | JP 2008024710 A            | 07-02-2008          |
|                                           |                     | JP 2011155990 A            | 18-08-2011          |
|                                           |                     | JP 2013081479 A            | 09-05-2013          |
|                                           |                     | PT 1303600 E               | 23-12-2008          |
|                                           |                     | PT 1811033 E               | 02-03-2012          |
|                                           |                     | US 6610820 B1              | 26-08-2003          |
|                                           |                     | US 2002127676 A1           | 12-09-2002          |
|                                           |                     | US 2003220480 A1           | 27-11-2003          |
|                                           |                     | US 2005043241 A1           | 24-02-2005          |
|                                           |                     | US 2010216716 A1           | 26-08-2010          |
|                                           |                     | WO 0127268 A2              | 19-04-2001          |
| WO 2008094208 A2                          | 07-08-2008          | US 2008051410 A1           | 28-02-2008          |
|                                           |                     | US 2010016587 A1           | 21-01-2010          |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001736

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date         |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                           |                     | US 2011166153 A1           | 07-07-2011                  |
|                                           |                     | WO 2008094208 A2           | 07-08-2008                  |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| US 2007015779                             | A1                  | 18-01-2007                 | NONE                        |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| WO 2006021458                             | A2                  | 02-03-2006                 | CA 2578122 A1 02-03-2006    |
|                                           |                     | EP 1786781 A2              | 23-05-2007                  |
|                                           |                     | JP 2008510766 A            | 10-04-2008                  |
|                                           |                     | US 2008187575 A1           | 07-08-2008                  |
|                                           |                     | WO 2006021458 A2           | 02-03-2006                  |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| WO 2008095943                             | A1                  | 14-08-2008                 | EP 2125801 A1 02-12-2009    |
|                                           |                     | JP 2010517980 A            | 27-05-2010                  |
|                                           |                     | US 2010069358 A1           | 18-03-2010                  |
|                                           |                     | WO 2008095943 A1           | 14-08-2008                  |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| US 2012258982                             | A1                  | 11-10-2012                 | CA 2828297 A1 11-10-2012    |
|                                           |                     | CN 103476754 A             | 25-12-2013                  |
|                                           |                     | EP 2694480 A1              | 12-02-2014                  |
|                                           |                     | JP 2014510123 A            | 24-04-2014                  |
|                                           |                     | KR 20140040710 A           | 03-04-2014                  |
|                                           |                     | US 2012258982 A1           | 11-10-2012                  |
|                                           |                     | WO 2012136684 A1           | 11-10-2012                  |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| WO 2004060318                             | A2                  | 22-07-2004                 | AU 2003300466 A1 29-07-2004 |
|                                           |                     | BR 0317909 A               | 29-11-2005                  |
|                                           |                     | CA 2512056 A1              | 22-07-2004                  |
|                                           |                     | EP 1587440 A2              | 26-10-2005                  |
|                                           |                     | JP 2006512143 A            | 13-04-2006                  |
|                                           |                     | KR 20050091047 A           | 14-09-2005                  |
|                                           |                     | MX PA05006999 A            | 18-08-2005                  |
|                                           |                     | US 2005019366 A1           | 27-01-2005                  |
|                                           |                     | WO 2004060318 A2           | 22-07-2004                  |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| EP 1676574                                | A2                  | 05-07-2006                 | NONE                        |
| -----                                     |                     |                            |                             |
| WO 9404686                                | A1                  | 03-03-1994                 | AT 173016 T 15-11-1998      |
|                                           |                     | AU 667244 B2               | 14-03-1996                  |
|                                           |                     | AU 5083293 A               | 15-03-1994                  |
|                                           |                     | CA 2135642 A1              | 03-03-1994                  |
|                                           |                     | DE 656950 T1               | 14-03-1996                  |
|                                           |                     | DE 69321962 D1             | 10-12-1998                  |
|                                           |                     | DE 69321962 T2             | 01-07-1999                  |
|                                           |                     | DK 0656950 T3              | 19-07-1999                  |
|                                           |                     | EP 0656950 A1              | 14-06-1995                  |
|                                           |                     | EP 0903408 A2              | 24-03-1999                  |
|                                           |                     | EP 2000536 A2              | 10-12-2008                  |
|                                           |                     | ES 2123062 T3              | 01-01-1999                  |
|                                           |                     | FI 945248 A                | 05-01-1995                  |
|                                           |                     | HK 1012678 A1              | 15-09-2000                  |
|                                           |                     | JP 2702285 B2              | 21-01-1998                  |
|                                           |                     | JP 2869396 B2              | 10-03-1999                  |
|                                           |                     | JP H1033186 A              | 10-02-1998                  |
|                                           |                     | JP H07503617 A             | 20-04-1995                  |
|                                           |                     | NO 944273 A                | 17-02-1995                  |
|                                           |                     | NZ 255831 A                | 24-04-1997                  |
|                                           |                     | WO 9404686 A1              | 03-03-1994                  |
| -----                                     |                     |                            |                             |

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 27/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 43/00  | 1 1 1       |  |
| A 6 1 P 27/12 (2006.01)  | A 6 1 P | 27/02  |             |  |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01)   | A 6 1 P | 27/12  |             |  |
| A 6 1 P 5/38 (2006.01)   | A 6 1 P | 9/10   |             |  |
| A 6 1 P 7/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 5/38   |             |  |
| A 6 1 P 17/14 (2006.01)  | A 6 1 P | 7/00   |             |  |
| A 6 1 P 21/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 17/14  |             |  |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 21/02  |             |  |
| A 6 1 P 37/06 (2006.01)  | A 6 1 P | 9/00   |             |  |
| A 6 1 P 7/06 (2006.01)   | A 6 1 P | 37/06  |             |  |
| A 6 1 P 7/04 (2006.01)   | A 6 1 P | 7/06   |             |  |
| A 6 1 P 17/04 (2006.01)  | A 6 1 P | 7/04   |             |  |
| A 6 1 P 17/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 17/04  |             |  |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 17/02  |             |  |
| A 6 1 P 21/04 (2006.01)  | A 6 1 P | 11/00  |             |  |
| A 6 1 P 21/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 21/04  |             |  |
| A 6 1 P 25/14 (2006.01)  | A 6 1 P | 21/00  |             |  |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 25/14  |             |  |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 19/02  |             |  |
| A 6 1 P 1/02 (2006.01)   | A 6 1 P | 29/00  | 1 0 1       |  |
| A 6 1 P 37/08 (2006.01)  | A 6 1 P | 1/02   |             |  |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 29/00  |             |  |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01)  | A 6 1 P | 37/08  |             |  |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01)  | A 6 1 P | 37/02  |             |  |
| A 6 1 P 25/18 (2006.01)  | A 6 1 P | 13/12  |             |  |
| A 6 1 P 3/00 (2006.01)   | A 6 1 P | 25/28  |             |  |
| A 6 1 P 3/08 (2006.01)   | A 6 1 P | 25/18  |             |  |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 3/00   |             |  |
| C 0 7 K 14/155 (2006.01) | A 6 1 P | 3/08   |             |  |
| C 0 7 K 14/47 (2006.01)  | C 0 7 K | 19/00  | Z N A       |  |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01)  | C 0 7 K | 14/155 |             |  |
|                          | C 0 7 K | 14/47  |             |  |
|                          | C 1 2 N | 15/00  | A           |  |

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コンベット, ジャンーマルク

フランス国 エフー7 4 1 4 0 サン セルグ, ルート ドゥ テレ, 5 1 5

(72)発明者 デローシュ, カトゥリーヌ

スイス国 ツェーハー 1 2 0 7 ジュネーブ, アベニュー ウィリアム・ファヴル, 2 2  
F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 DC32 MA16 MA17 MA28 MA32 MA35  
MA37 MA43 MA52 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA01 ZA02  
ZA14 ZA15 ZA33 ZA36 ZA51 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66 ZA67  
ZA75 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13  
ZB15 ZC20 ZC21 ZC35  
4C085 AA13 AA14 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10  
4C087 AA01 AA02 CA12 MA16 MA17 MA28 MA32 MA35 MA37 MA43  
MA52 MA55 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA01 ZA02 ZA14  
ZA15 ZA33 ZA36 ZA51 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66 ZA67 ZA75  
ZA81 ZA92 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZC20 ZC21  
ZC35  
4H045 AA30 BA41 CA05 CA40 DA55 EA20 FA74