(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2017-519009
(P2017-519009A)
(43)公表日　平成29年7月13日(2017.7.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/16	(2006.01)	A61K	38/16		4B064
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C076
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04		4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C085
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 144 頁）　最終頁に続く

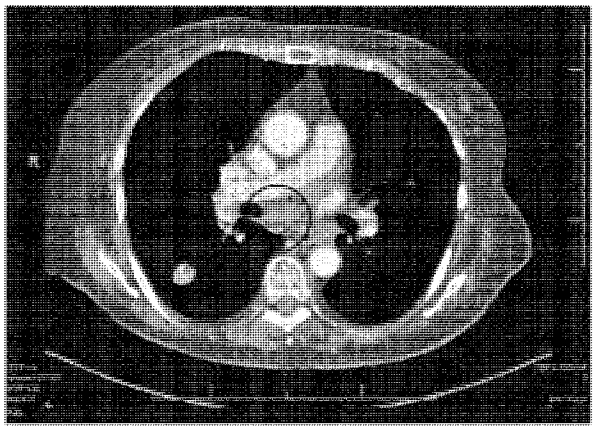
(21)出願番号　特願2016-572730 (P2016-572730)
(86)(22)出願日　平成27年6月15日 (2015.6.15)
(85)翻訳文提出日　平成29年2月10日 (2017.2.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/035818
(87)国際公開番号　WO2015/192127
(87)国際公開日　平成27年12月17日 (2015.12.17)
(31)優先権主張番号　62/047,995
(32)優先日　平成26年9月9日 (2014.9.9)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/058,789
(32)優先日　平成26年10月2日 (2014.10.2)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/012,104
(32)優先日　平成26年6月13日 (2014.6.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　515210226
サンタ　マリア　バイオセラピューティクス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　９４０８０　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ゲートウェイ　ブールバード　６１１　スイート　９００
(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】製剤化された受容体ポリペプチドおよび関連する方法

(57)【要約】
例えば固形腫瘍を処置するための、アクチビン受容体IIBに基づく組成物および関連する使用方法が、本明細書において開示される。化合物および製剤を製造する方法も開示される。



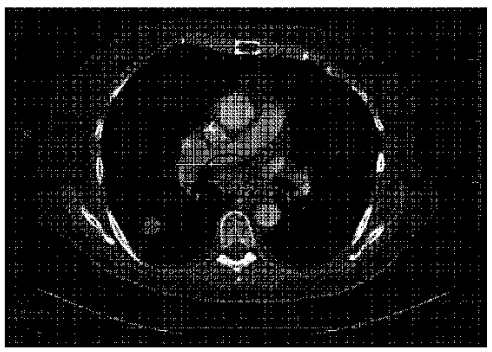


Figure 7

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質、賦形剤、緩衝液、および界面活性剤の溶液を含む組成物であって、該組成物が、pH4～12を含み、該タンパク質が、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能なポリペプチドを含み、該ポリペプチドが：
（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド；および
（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド
からなる群より選択され；
該組成物中の該タンパク質が、2～8℃または5℃で保存されたとき、期間の開始時（0ヶ月）の該組成物中の該タンパク質に比べて、または-20℃もしくは-70℃で1ヶ月よりも長い間、他の点では同一の条件で保存された同一のタンパク質に比べて、溶液中で1ヶ月よりも長い期間、少なくとも80％の安定性を保持し；かつ
化学療法剤または第2の治療剤をさらに含んでいてもよい、
組成物。
【請求項２】
前記タンパク質が、濃度70mg/mLのSEQ ID NO:10に示される配列からなり、前記賦形剤が、8.8％重量／体積(w/v)スクロースであり、前記緩衝液が、10mMリン酸カリウム緩衝液であり、前記界面活性剤が、0.006％(w/v)ポリソルベート20であり、かつ前記組成物が、pH6.7を含み；かつ該組成物中の該タンパク質が、2～8℃または5℃で保存されたとき、期間の開始時（0ヶ月）の該組成物中の該タンパク質に比べて、または-20℃もしくは-70℃で6ヶ月よりも長い間、他の点では同一の条件で保存された同一のタンパク質に比べて、溶液中で6ヶ月よりも長い期間、少なくとも90％の安定性を保持する、請求項1記載の組成物。
【請求項３】
任意でpHが、4～10、4～8、または5～7であり、任意でpHが、少なくとも6～7であり、任意でpHが、少なくとも6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、または7.0である、少なくとも4、5、6、7、8、または9のpHを含む、請求項1記載の組成物。
【請求項４】
前記賦形剤が糖を含み、該糖はスクロースであってもよく、前記組成物中の該賦形剤の濃度が、少なくとも7～11、8～10、8～9、8.8、7、8、9、10、11、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.9、または9.0％重量／体積(w/v)であってもよい、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項５】
前記緩衝液がリン酸塩を含み、該リン酸塩はリン酸カリウムであってもよく、前記組成物中の該緩衝液の濃度が、少なくとも7～13、8～12、9～11、8、9、10、11、または12mMであってもよい、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項６】
前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であり、該非イオン性界面活性剤はポリソルベートであってもよく、該ポリソルベートはポリソルベート20であってもよく、該界面活性剤の濃度が、0.001～0.10、0.05～0.10、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.010、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、または0.10％(w/v)であってもよい、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項７】
前記組成物中の前記タンパク質が、2～8℃または5℃で保存されたときに、期間の開始

時（0ヶ月）での該組成物中の該タンパク質に比べて、溶液中で1～54、6～48、12～36、24～36、1、2、3、6、12、18、24、36、48、または54ヶ月よりも長い期間、少なくとも99.5～80％、90～85％、99.5％、99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、または80％の安定性を保持する、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項８】

前記組成物中の前記タンパク質が、2～8℃または5℃で保存されたときに、-20℃または-70℃で同等の期間、他の点では同一の条件で保存された同一のタンパク質に比べて、溶液中で1～54、6～48、12～36、24～36、1、2、3、6、12、18、24、36、48、または54ヶ月よりも長い期間、少なくとも99.5～80％、90～85％、99.5％、99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％または80％の安定性を保持する、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項９】

前記組成物中の前記タンパク質が、2～8℃または5℃で保存されたときに、期間の開始時（0ヶ月）での該組成物中の該タンパク質に比べて、溶液中で1～54、6～48、12～36、24～36、1、2、3、6、12、18、24、36、48、または54ヶ月よりも長い期間、少なくとも99.5～80％、90～85％、99.5％、99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、または80％の活性を保持し、活性は、細胞に基づくバイオアッセイを使用して決定されてもよい、前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１０】

前記組成物中の前記タンパク質が、2～8℃または5℃で保存されたときに、-20℃または-70℃で同等の期間、他の点では同一の条件で保存された同一のタンパク質に比べて、溶液中で1～54、6～48、12～36、24～36、1、2、3、6、12、18、24、36、48、または54ヶ月よりも長い期間、少なくとも99.5～80％、90～85％、99.5％、99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％または80％の活性を保持し、活性は、細胞に基づくバイオアッセイを使用して決定されてもよい、前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１１】

前記組成物中の前記タンパク質の安定性パーセントが：外観、モル浸透圧濃度、pH、体積、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（SE-HPLC）、イメージキャピラリー等電点電気泳動（icIEF）、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（CE-SDS）、非還元条件（nrCE-SDS）、還元条件CE-SDS、酵素結合免疫特異的検定法（ELISA）、細胞に基づくバイオアッセイ、エンドトキシンレベル、無菌性、肉眼不可視の粒子、およびポリソルベート20濃度の1つまたは複数によって決定される、前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１２】

前記ペプチドが、SEQ ID NO:6に示されるアミノ酸配列からなる、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１３】

前記タンパク質が、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列からなる、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１４】

前記タンパク質が、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列からなり、前記賦形剤が、スクロースであり、前記緩衝液が、リン酸カリウム緩衝液であり、かつ前記界面活性剤が、ポリソルベート20である、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１５】

前記タンパク質の濃度が、少なくとも50～90、60～80、65～70、70～75、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80mg/m

Lである、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１６】
前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:6に示される配列を含み、前記賦形剤が、8.8％(w/v)スクロースであり、前記緩衝液が、10mMリン酸カリウム緩衝液であり、前記界面活性剤が、0.006％(w/v)ポリソルベート20であり、かつpHが、6.7である、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１７】
前記タンパク質が、濃度70mg/mLのSEQ ID NO:10で示されるアミノ酸配列からなり、前記賦形剤が、8.8％(w/v)スクロースであり、前記緩衝液が、10mMリン酸カリウム緩衝液であり、前記界面活性剤が、0.006％(w/v)ポリソルベート20であり、かつpHが、6.7である、請求項2を除く前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１８】
化学療法剤ドキソルビシンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１９】
対象における固形腫瘍の成長を阻害する、または対象における固形腫瘍を処置する、または対象における悪液質を阻害、軽減、もしくは処置する方法であって、前記組成物の請求項のいずれか一項記載の組成物の一用量を対象に投与する段階を含む、方法。
【請求項２０】
少なくとも0.1mg/kgから20mg/kgの範囲の固定用量のタンパク質を対象に投与する段階を含む、対象における固形腫瘍の成長を阻害する、または対象における固形腫瘍を処置する方法であって、該タンパク質が：
（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド；および
（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド
からなる群より選択される、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能なポリペプチドを含む、
方法。
【請求項２１】
前記用量が、少なくとも0.1～10mg/kg、0.25～5mg/kg、1～4mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、または5mg/kgである、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２２】
前記用量が、1～5、2～4、1、2、3、または4週間毎に少なくとも1回対象に投与される、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２３】
前記用量が、対象に静脈内（IV）投与される、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２４】
前記タンパク質が、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列からなる、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２５】
前記タンパク質が、前記組成物の請求項のいずれか一項に従って製剤化されている、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２６】
ドキソルビシンを対象に投与する段階をさらに含む、前記方法の請求項のいずれか一項

記載の方法。
【請求項２７】
ドキソルビシンが、少なくとも40mg/m^{2}の注入液として対象に投与される、請求項26記載の方法。
【請求項２８】
ドキソルビシンが、リポソームドキソルビシンである、請求項26記載の方法。
【請求項２９】
ドキソルビシンが、前記タンパク質の前、前記タンパク質の後、または前記タンパク質と同時に投与される、請求項26記載の方法。
【請求項３０】
ドキソルビシンが、少なくとも4週間毎に任意で6サイクルまたはそれ未満で、対象に投与される、請求項26記載の方法。
【請求項３１】
固形腫瘍が、ミオスタチン、アクチビンA、アクチビンB、および／またはGDF-11を発現する、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３２】
固形腫瘍が：顆粒膜細胞、明細胞、漿液性、類内膜、および胚細胞腫瘍を含めた卵巣癌、卵管癌、子宮内膜癌、副腎皮質腫瘍、胆嚢癌、膵腺房癌、頭頸部癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、膵癌、前立腺癌、小腸腫瘍、結腸癌、腎細胞癌、腺様嚢胞癌、胃癌、食道癌、腺様嚢胞癌（ACC）、皮膚癌を含めた扁平上皮癌、黒色腫、乳癌、膀胱癌、肝細胞癌、ならびに子宮内膜、子宮頸、平滑筋腫、外陰、および膣癌を含めた子宮癌からなる群より選択される、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３３】
固形腫瘍が、卵巣癌である、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３４】
対象が、少なくとも1つの基準に基づき選択または除外される、前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３５】
前記基準が、投与について対象を選択するために使用され、かつ該基準が：年齢≧18歳の男性および閉経後女性、癌を確定する組織学的診断を有する進行固形腫瘍の存在、対象の腫瘍に利用可能な全ての標準的な処置に抗療性もしくは不耐性と見なされる再発転移性もしくは局所進行性疾患の存在、または標準的な処置が利用不可能な腫瘍を有する対象、少なくとも1つの白金系化学療法レジメンを以前に受け、その後の無白金間隔が＜12ヶ月である、白金系療法の間に進行した、もしくは白金系療法の後に持続性疾患を有すると定義される、白金抗療性／抵抗性と見なされる漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔、顆粒膜細胞腫瘍もしくは明細胞腫瘍を有する対象、毒性が原因でさらなる白金を受け入れ不能と定義される白金不耐性の対象、固形癌の治療効果判定のためのガイドライン（RECIST 1.1）基準を使用して測定可能な疾患、Eastern Cooperative Oncology Group（ECOG）のパフォーマンスステータスが0もしくは1、他人の介助なしに少なくとも30メートル歩行可能（杖もしくは歩行器のような介助用具の使用が許される）、閉経後女性における12ヶ月の自然無月経、閉経後女性におけるFSH＞40IU/Lを有する6ヶ月の自然無月経、および／または閉経後女性における子宮摘出を伴うもしくは伴わない術後両側卵巣摘出の1つまたは複数である、請求項34記載の方法。
【請求項３６】
前記基準が、投与から対象を除外するために使用され、かつ該基準が：プロトコールの遵守を制限するもしくは対象を極度の危険にさらす、併発した重篤な制御不能もしくは未解決の医学的状態（例えば感染）、以前の抗癌療法からの、脱毛症を除くCTCAE（4.03版）グレード≧2の未解決の毒性であって、例えば運動性もしくは感覚性神経障害である、毒性、処置開始の6ヶ月以内に消化管出血の病歴、QTcF＞470msecの存在、遺伝性QT間隔延長の病歴もしくはQT間隔の評価を妨げる任意の不整脈（例えば脚ブロック）、心筋梗塞、

サイクル1の1日目の6ヶ月以内の不安定狭心症、もしくはNew York Heart Association ≧II度のうっ血性心不全、総ビリルビン＞1.5×正常値上限（ULN；対象がジルベール病を有すると実証されていない場合）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）もしくはアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）＞3.0×ULN（既知の肝転移を有する対象について、ASTもしくはALT＞5×ULN）を含めた、肝機能検査値の上昇、クレアチニン＞1.5×ULNおよび推定クレアチニンクリアランス＜60mL/min（コッククロフト・ゴールト（Cockcroft-Gault）式を使用）、ヘモグロビン＜9g/dL；血小板＜100×10^9/L；絶対好中球数（ANC）＜1.5×10^9/L（処置開始の2週間以内に顆粒球コロニー刺激因子の支援なし）、処置開始の3週間以内の化学療法、ホルモン療法、もしくは放射線療法、処置開始の5半減期もしくは4週間以内（どちらでも長い方）の抗体／生物学的療法、処置開始の8週間以内の大手術もしくは4週間以内の小手術、現在の腸閉塞、脳転移、頻繁な（週1回を超える）医学的介入を要する腹水もしくは胸水の存在、門脈静脈シャント装置の存在もしくは広範囲肝切除の手術歴（1区域を越える）、既知のヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、活動性BもしくはC型肝炎感染、処置開始の4週間以内の任意の治験薬を用いた以前の処置、植込剤、注射剤、複合経口避妊薬、一部の子宮内避妊装置、禁欲、もしくは精管切除されたパートナーのような、一貫して正確に使用したときに高度に有効な避妊法（すなわち、年間1％未満の妊娠を生じる方法）を使いたくない、妊娠する可能性がある女性、もしくは女性パートナーが妊娠する可能性のある男性、ドキソルビシンHClの従来製剤もしくはリポソームドキソルビシンの成分に対する過敏反応、以前のドキソルビシンHClの累積用量＞300 mg/m^2、もしくは以前のエピルビシンの累積用量＞500mg/m^2、処置開始の28日以内のMUGAスキャンもしくは心エコー（ECHO）により正常値下限未満に減少した心駆出分画、ならびに／または授乳中の女性の1つまたは複数である、請求項34記載の方法。

【請求項３７】

ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能なポリペプチドを含むタンパク質を産生する方法であって、該ポリペプチドが、（a）SEQ ID NO:4、6、12および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド、および（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチドからなる群より選択され、該方法が：

細胞培養物中にタンパク質を発現するように操作されたCS9チャイニーズハムスター卵巣細胞系を培養する段階；

培養物からタンパク質を回収する段階；および

タンパク質を精製する段階

を含む、方法。

【請求項３８】

培養する段階が、少なくとも部分的にバイオリアクター中で行われる、請求項37記載の方法。

【請求項３９】

回収する段階が、清澄化および／または濾過を含む、前記製造方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項４０】

精製段階が、プロテインAクロマトグラフィー、低pHウイルス不活化、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ウイルス濾過、および／または限外濾過を含む、前記製造方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項４１】

精製段階が、クロマトグラフィー、微生物不活化、および／または濾過の使用を含む、前記製造方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項４２】
無菌水溶液中でタンパク質を製剤化する段階をさらに含む、前記製造方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４３】
前記組成物請求項のいずれか一項に従ってタンパク質を製剤化する段階をさらに含む、前記製造方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４４】
少なくとも0.1mg/kgから20mg/kgの範囲の固定用量のタンパク質を対象に投与する段階を含む、対象における悪液質を阻害、軽減、または処置する方法であって、該タンパク質が、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能なポリペプチドを含み、該ポリペプチドが：
（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド；および
（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有する、ポリペプチド
からなる群より選択される、
方法。
【請求項４５】
前記用量が、少なくとも0.1～10mg/kg、0.25～5mg/kg、1～4mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、または5mg/kgである、請求項44記載の方法。
【請求項４６】
前記固定用量が、1～5、2～4、1、2、3、または4週間毎に少なくとも1回対象に投与される、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４７】
前記固定用量が、対象に静脈内（IV）投与される、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４８】
前記タンパク質が、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列からなる、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４９】
前記タンパク質が、前記組成物の請求項のいずれか一項に従って製剤化されている、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５０】
ドキソルビシンを対象に投与する段階をさらに含む、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５１】
ドキソルビシンが、少なくとも40mg/m^2の注入液として対象に投与される、請求項50記載の方法。
【請求項５２】
ドキソルビシンが、リポソームドキソルビシンである、請求項50記載の方法。
【請求項５３】
ドキソルビシンが、前記タンパク質の前、前記タンパク質の後、または前記タンパク質と同時に投与される、請求項50記載の方法。
【請求項５４】
ドキソルビシンが、少なくとも1、2、3、または4週間毎に対象に投与される、請求項50

記載の方法。
【請求項５５】
対象が腫瘍を有し、該腫瘍は固形腫瘍であってもよく、該腫瘍は卵巣癌であってもよい、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５６】
腫瘍が、ミオスタチン、アクチビンA、アクチビンB、および／またはGDF-11を発現する、請求項55記載の方法。
【請求項５７】
腫瘍が：顆粒膜細胞、明細胞、漿液性、類内膜、および胚細胞腫瘍を含めた卵巣癌、卵管癌、子宮内膜癌、副腎皮質腫瘍、胆嚢癌、膵腺房癌、頭頸部癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、膵癌、前立腺癌、小腸腫瘍、結腸癌、腎細胞癌、腺様嚢胞癌、胃癌、食道癌、腺様嚢胞癌（ACC）、皮膚癌を含めた扁平上皮癌、黒色腫、乳癌、膀胱癌、肝細胞癌、ならびに子宮内膜、子宮頸、平滑筋腫、外陰、および膣癌を含めた子宮癌からなる群より選択される固形腫瘍である、請求項55記載の方法。
【請求項５８】
腫瘍が卵巣癌である、請求項55記載の方法。
【請求項５９】
対象が、少なくとも1つの基準に基づき選択または除外される、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６０】
投与の有効性が、少なくとも1つの測定方法を使用することによって分析され、該測定方法が、除脂肪体重、脂肪量、骨塩密度、脂質プロファイル、空腹時血糖および／もしくはインスリン、恒常性モデル評価（homeostatic model assessment）（HOMA）、ヘモグロビンA1c（HbA1c）、または6分間歩行距離の測定を含む、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６１】
投与が、対象の除脂肪体重、脂肪量、骨塩密度、脂質プロファイル、空腹時血糖および／もしくはインスリン、恒常性モデル評価（HOMA）、ヘモグロビンA1c（HbA1c）、または6分間歩行距離の少なくとも1つにおける改善を招く、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６２】
除脂肪体重、脂肪量、骨塩密度、脂質プロファイル、空腹時血糖および／もしくはインスリン、恒常性モデル評価（HOMA）、ヘモグロビンA1c（HbA1c）、または6分間歩行距離の測定を含む、少なくとも1つの測定方法の使用をさらに含む、前記の、悪液質を阻害、軽減、または処置する方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６３】
対象における肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法であって、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも1つを阻害するタンパク質の有効用量を対象に投与する段階を含み、任意で肥満に関連する疾患が、遺伝的肥満症候群、プラダー・ウィリー症候群、視床下部障害、家族性高コレステロール血症、バルデー・ビードル症候群、プラダー・ウィリー症候群、15q11-13上の刷り込み遺伝子の喪失に起因する症候群、アルストレーム症候群、コーエン候群、オルブライト遺伝性骨ジストロフィー（偽性副甲状腺機能低下症）、カーペンター症候群、MOMO症候群、ルビンスタイン・タイビー症候群、6q16、1p36、2q37、および9q34の少なくとも1つの欠失に起因する症候群、14番染色体の母性片親性ダイソミー、脆弱X症候群、アテローム動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝炎、内臓脂肪沈着が1つまたは複数の有害転帰を招く疾患、脳血管疾患、脂肪肝、ならびにベルエソン・フォルスマン・レーマン症候群の少なくとも1つである、方法。
【請求項６４】

対象が、それを必要とするヒト対象である、請求項63記載の方法。
【請求項６５】
前記タンパク質が抗体または融合タンパク質であり、該融合タンパク質はActRIIB融合タンパク質であってもよく、該ActRIIB融合タンパク質は、SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を含んでもよく、該融合タンパク質はFcを含んでもよく、FcはIgGであってもよく、IgGはヒトIgGであってもよく、ActRIIBおよびFcは、リンカーによって連結されていてもよい、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６６】
前記タンパク質が、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも2つを阻害し、任意で該タンパク質が、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11を阻害する、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６７】
前記タンパク質が、アクチビンを阻害する、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６８】
前記用量が、少なくとも0.1～10mg/kg、0.25～5mg/kg、1～4mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、または5mg/kgである、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６９】
前記用量が、1～5、2～4、1、2、3、または4週間毎に少なくとも1回対象に投与される、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７０】
前記用量が、対象に静脈内（IV）投与される、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７１】
前記タンパク質が、SEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７２】
前記タンパク質が、前記組成物の請求項のいずれか一項に従って製剤化されている、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７３】
前記化合物が、賦形剤と共に薬学的組成物として製剤化されている、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７４】
対象が、遺伝的肥満症候群、プラダー・ウィリー症候群、視床下部障害、家族性高コレステロール血症、バルデー・ビードル症候群、プラダー・ウィリー症候群、15q11-13上の刷り込み遺伝子の喪失に起因する症候群、アルストレーム症候群、コーエン症候群、オルブライト遺伝性骨ジストロフィー（偽性副甲状腺機能低下症）、カーペンター症候群、MO

MO症候群、ルビンスタイン・タイビー症候群、6q16、1p36、2q37、および9q34の少なくとも1つの欠失に起因する症候群、14番染色体の母性片親性ダイソミー、脆弱X症候群、アテローム動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝炎、内臓脂肪沈着が1つまたは複数の有害転帰を招く疾患、脳血管疾患、脂肪肝、ならびにベルエソン・フォルスマン・レーマン症候群の少なくとも1つを有する、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項７５】

総脂肪量、皮下脂肪量、および内臓脂肪量の少なくとも1つを減少させる、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項７６】

総脂肪量における減少パーセントに比べてより大きな減少パーセントを内臓脂肪量にもたらす、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項７７】

除脂肪体重および体肢除脂肪体重の少なくとも1つを増加させる、または除脂肪体重および体肢除脂肪体重の少なくとも1つを維持する、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項７８】

除脂肪体重および体肢除脂肪体重の少なくとも1つに少なくとも1～50％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％またはそれ以上の増加をもたらす、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項７９】

総脂肪量、皮下脂肪量、および内臓脂肪量の少なくとも1つに少なくとも1～99％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％またはそれ以上の減少をもたらす、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項８０】

対象が、インスリン抵抗性、慢性腎疾患、癌、および異化状態の少なくとも1つを有する、前記の、肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法の請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項８１】

使用説明書が前記方法の請求項のいずれか一項記載の方法を含んでいてもよい、前記組成物の請求項のいずれか一項記載の組成物および使用説明書を含むキット。

【請求項８２】

前記組成物を含むバイアルをさらに含む、請求項81記載のキット。

【請求項８３】

バイアルが、2～8℃での保管用に設計されている、請求項82記載のキット。

【請求項８４】

バイアルを2～8℃で保管することができる、請求項82記載のキット。

【請求項８５】

バイアルが栓を有し、かつ前記組成物が任意で実質的にタンパク質の安定性に影響することなく該栓と接触していることができる、請求項82記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、2014年6月13日に出願された米国特許仮出願第61/012,104号、2014年9月9日に出願された米国特許仮出願第62/047,995号、2014年10月2日に出願された米国特許仮出願第62/058,789号、および2015年4月3日に出願された米国特許仮出願第62/142,812号の恩典を主張し、これらの仮出願のそれぞれの全開示は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。
【０００２】
配列表
本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、配列表はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。2015年6月10日に作成された該ASCIIコピーは、名称が29502PCT_CRF_sequencelisting.txtであり、サイズが83,907バイトである。
【背景技術】
【０００３】
背景
トランスフォーミング増殖因子β（TGF-β）ファミリータンパク質には、トランスフォーミング増殖因子-β（TGF-β）、アクチビン、骨形成タンパク質（BMP）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、および増殖／分化因子（GDF）が含まれる。これらのファミリーのメンバーは、細胞増殖、分化、および他の機能を含めた、広範囲に及ぶ生物学的過程の調節に関与する。
【０００４】
ミオスタチンとも呼ばれる増殖分化因子8（GDF-8）は、大部分が発生中の骨格筋組織および成体骨格筋組織の細胞中に発現されるTGF-βファミリーのメンバーである。ミオスタチンは、骨格筋の成長を負制御することに不可欠な役割を演じるように見える（McPherron et al., Nature (London) 387, 83-90 (1997) (非特許文献1), Zimmers et al., Science 296:1486-1488 (2002) (非特許文献2)）。ミオスタチンと拮抗することは、動物での除脂肪筋肉量を増加させることが示されている。
【０００５】
TGF-βファミリータンパク質の別のメンバーは、関連する増殖／分化因子の増殖／分化因子11（GDF-11）である。GDF-11は、ミオスタチンのアミノ酸配列と約90％の配列同一性を有する。GDF-11は、発生中の動物における軸パターン形成に役割を演じ（Oh et al., Genes Dev 11:1812-26 (1997) (非特許文献3)）、また骨格筋の発生および成長に役割を演じるようにも見える。
【０００６】
アクチビンA、BおよびABは、それぞれ2つのポリペプチド鎖βAおよびβBのホモ二量体およびヘテロ二量体である（Vale et al., Nature 321, 776-779 (1986) (非特許文献4), Ling et al., Nature 321, 779-782 (1986) (非特許文献5)）。アクチビンは、本来、卵胞刺激ホルモンの合成調節に関与する性腺ペプチドとして発見されたものであり、今やいくつかの生物学的活性の調節に関与すると考えられている。アクチビンAは、主要な形態のアクチビンである。
【０００７】
アクチビン、ミオスタチン、GDF-11および他のメンバーのTGF-βスーパーファミリーは、共に膜貫通セリン／トレオニンキナーゼであるアクチビンII型およびアクチビンIIB型受容体の組み合わせを経由して結合し、かつシグナル伝達する（Harrison et al., J. Biol. Chem. 279, 28036-28044 (2004) (非特許文献6)）。架橋研究によって、ミオスタチンがアクチビンII型受容体ActRIIAおよびActRIIBとインビトロで結合可能であると判定された（Lee et al., PNAS USA 98:9306-11 (2001) (非特許文献7)）。GDF-11がActRIIAおよびActRIIBの両方と結合するという証拠もある（Oh et al., Genes Dev 16:2749-54 (2002) (非特許文献8)）。

【０００８】
TGF-βタンパク質の発現は、多様な疾患および障害に関連することが公知である。したがって、いくつかのTGF-βタンパク質に同時に拮抗することが可能な治療用分子は、これらの疾患および障害を処置するために特に有効であり得る。
【０００９】
関連出願には：2009年11月25日に出願された米国特許出願第12/626,375号(特許文献1)、2008年3月5日に出願された米国特許出願第12/074,877号(特許文献2)、2011年12月19日に出願された米国特許出願第13/329,897号(特許文献3)、2006年10月31日に出願された米国特許出願第11/590,962号(特許文献4)、2014年2月3日に出願されたPCT/US2014/014490 (特許文献5)、および2015年1月14日に出願されたPCT/US2015/011396 (特許文献6)が含まれ、これらの出願のそれぞれは、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【特許文献１】米国特許出願第12/626,375号
【特許文献２】米国特許出願第12/074,877号
【特許文献３】米国特許出願第13/329,897号
【特許文献４】米国特許出願第11/590,962号
【特許文献５】PCT/US2014/014490
【特許文献６】PCT/US2015/011396
【非特許文献】
【００１１】
【非特許文献１】McPherron et al., Nature (London) 387, 83-90 (1997)
【非特許文献２】Zimmers et al., Science 296:1486-1488 (2002)
【非特許文献３】Oh et al., Genes Dev 11:1812-26 (1997)
【非特許文献４】Vale et al., Nature 321, 776-779 (1986)
【非特許文献５】Ling et al., Nature 321, 779-782 (1986)
【非特許文献６】Harrison et al., J. Biol. Chem. 279, 28036-28044 (2004)
【非特許文献７】Lee et al., PNAS USA 98:9306-11 (2001)
【非特許文献８】Oh et al., Genes Dev 16:2749-54 (2002)
【発明の概要】
【００１２】
概要
タンパク質、賦形剤、緩衝液、および界面活性剤の溶液を含む組成物が本明細書において開示され、その際、組成物は、pH4～12を含み、タンパク質は、ミオスタチン、アクチビン、またはGDF-11の少なくとも1つと結合することが可能なポリペプチドを含み、任意でポリペプチドは：（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、および（d）SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を有するポリペプチドからなる群より選択され；組成物中のタンパク質は、2～8℃または5℃で保存されたときに、期間の開始時（0ヶ月）での組成物中のタンパク質に比べて、または-20℃もしくは-70℃で1ヶ月よりも長い間、他の点では同一の条件で保存された同一のタンパク質に比べて、溶液中で

1ヶ月よりも長い期間、少なくとも80％の安定性を保持し；任意で組成物は、化学療法剤または第2の治療剤をさらに含む。

【００１３】

少なくとも0.1mg/kg～20mg/kgの範囲の固定用量のタンパク質を対象に投与する段階を含む、対象における固形腫瘍の成長を阻害するまたは対象における固形腫瘍を処置する方法も、本明細書において開示され、その際、タンパク質は、ミオスタチン、アクチビン、またはGDF-11の少なくとも1つと結合することが可能なポリペプチドを含み、任意でポリペプチドは：（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、および（d）SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を有するポリペプチドからなる群より選択される。

【００１４】

少なくとも0.1mg/kg～20mg/kgの範囲の固定用量のタンパク質を対象に投与する段階を含む、対象における悪液質を阻害、軽減、または処置する方法も、本明細書において開示され、その際、タンパク質は、ミオスタチン、アクチビン、またはGDF-11の少なくとも1つと結合することが可能なポリペプチドを含み、任意でポリペプチドは：（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、（c）（a）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、および（d）SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を有するポリペプチドからなる群より選択される。

【００１５】

対象における肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増加させるもしくは維持する、または脂肪量を減少させる方法であって、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも1つを阻害するタンパク質の有効量を対象に投与する段階を含む方法も本明細書において開示され、任意でその際、肥満に関連する疾患は、遺伝的肥満症候群、プラダー・ウィリー症候群、視床下部障害、家族性高コレステロール血症、バルデー・ビードル症候群、プラダー・ウィリー症候群、15q11-13上の刷り込み遺伝子の喪失に起因する症候群、アルストレーム症候群、コーエン症候群、オルブライト遺伝性骨ジストロフィー（偽性副甲状腺機能低下症）、カーペンター症候群、MOMO症候群、ルビンスタイン・タイビー症候群、6q16、1p36、2q37、および9q34の少なくとも1つの喪失に起因する症候群、14番染色体の母性片親性ダイソミー、脆弱X症候群、アテローム動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝炎、内臓脂肪沈着が1つまたは複数の有害転帰を招く疾患、脳血管疾患、脂肪肝、ならびにベルエソン・フォルスマン・レーマン症候群の少なくとも1つであり、任意でポリペプチドは：（a）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（b）（a）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド

、（ｃ）（ａ）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、および（ｄ）SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を有するポリペプチドからなる群より選択される。

【００１６】

ミオスタチン、アクチビン、またはGDF-11の少なくとも1つと結合することが可能なポリペプチドを含むタンパク質を産生する方法も、本明細書において開示され、任意でその際、ポリペプチドは：（ａ）SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；（ｂ）（ａ）と少なくとも90％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、（ｃ）（ａ）と少なくとも95％の配列同一性を有するポリペプチドであって、SEQ ID NO:2に示される配列の位置28に対応する位置にWまたはYを有し、かつSEQ ID NO:2に示される配列の位置44に対応する位置にTを有するポリペプチド、および（ｄ）SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を有するポリペプチドからなる群より選択され、該方法は：細胞培養物中にタンパク質を発現するように操作されたCS9チャイニーズハムスター卵巣細胞系を培養する段階；培養物からタンパク質を回収する段階；およびタンパク質を精製する段階を含む。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

これらおよび他の特徴、局面、および利点は、以下の説明および添付の図面に関してよりよく理解される。

【図１】STM434を製造するための細胞培養工程の概要を示す。

【図２】STM434のための精製工程の概要を示す。

【図３】STM434を調製およびパッケージするための流れ図を示す。

【図４】用量0.25mg/kgのSTM434の投与後に、対象3人中2人でFSHレベルが減少したことを示す。

【図５】ヒトにおけるSTM434についての中間PK分析を示す。

【図６】腫瘍を円の中に指し示すベースラインスキャンを示す。

【図７】再度腫瘍を円の中に指し示す、サイクル4の開始時に取得した後続のスキャンを示す。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

詳細な説明

組成物

安定化ヒトアクチビンIIB受容体（svActRIIB）ポリペプチドを含む単離タンパク質および関連製剤が、本明細書において記載される。タンパク質およびポリペプチドは、それらが3種のTGF-βタンパク質であるミオスタチン（GDF-8）、アクチビンA、またはGDF-11の少なくとも1種と結合して、これらのタンパク質の少なくとも1種の活性を阻害し、任意で他のActRIIB可溶性受容体に比べて改善された製造可能性質を有するそれらの能力によって特徴付けることができる。安定化ヒトアクチビンIIB受容体ポリペプチドは、SEQ ID NO:2に示されるActRIIBの細胞外ドメインに関連して位置E28およびS44の両方でのアミノ酸置換によって特徴付けることができる。一態様では、安定化ヒトアクチビンIIB受容体ポリペプチドは、SEQ ID NO:2に関して位置64にアラニンのさらなる置換を有することができる。一部の局面では、タンパク質は、抗体、ActRIIBに基づくタンパク質、および／ま

たはFc融合タンパク質である。一部の局面では、Fc融合タンパク質は、ActRIIB Fc融合タンパク質である。一部の局面では、ActRIIBタンパク質は、SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を含み、任意でその際、FcはIgGであり、任意でIgGはヒトIgGである。一部の局面では、ActRIIBタンパク質は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:10に示される配列を含む、またはそれからなる。一部の局面では、ActRIIBタンパク質は、SEQ ID NO:6に示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を含む。一部の局面では、ActRIIBタンパク質は、SEQ ID NO:6に示される配列と、1～2、1、2、3、4、または5つ未満のアミノ酸が異なる配列を含む。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも2種を阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11を阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビンを阻害する。

【００１９】

本明細書において使用される用語「TGF-βファミリーのメンバー」または「TGF-βタンパク質」は、アクチビンおよび増殖分化因子（GDF）タンパク質を含めたトランスフォーミング増殖因子ファミリーの構造関連増殖因子を指す（Kingsley et al. Genes Dev. 8: 133-146 (1994), McPherron et al., Growth factors and cytokines in health and disease, Vol. 1B, D. LeRoith and C. Bondy. ed., JAI Press Inc., Greenwich, Conn, USA: pp 357-393)。

【００２０】

ミオスタチンとも呼ばれるGDF-8は、骨格筋組織の負の調節因子である（McPherron et al. PNAS USA 94:12457-12461 (1997)）。ミオスタチンは、ヒトについてGenBankアクセッション番号:AAB86694を有する約375アミノ酸長の不活性タンパク質として合成される。前駆タンパク質は、4塩基プロセシング部位でのタンパク質分解的切断により活性化されて、N末端不活性プロドメインおよびアミノ酸約109個のC末端タンパク質を産生し、C末端タンパク質は二量体化して、約25kDaのホモ二量体を形成する。このホモ二量体は、成熟した生物学的活性タンパク質である（Zimmers et al., Science 296, 1486 (2002)）。

【００２１】

本明細書において使用される用語「プロドメイン」または「プロペプチド」は、切断されて活性C末端タンパク質を放出する不活性N末端タンパク質を指す。本明細書において使用される用語「ミオスタチン」または「成熟ミオスタチン」は、単量体、二量体または他の形態の成熟した生物学的活性C末端ポリペプチドに加えて、アレル変異体、スプライス変異体、ならびに融合ペプチドおよびポリペプチドを含めた生物学的活性フラグメントまたは関連ポリペプチドを指す。成熟ミオスタチンは、ヒト、マウス、ニワトリ、ブタ、シチメンチョウ、およびラットを含めた多くの種の間で100％の配列同一性を有すると報告されている（Lee et al., PNAS 98, 9306 (2001)）。

【００２２】

本明細書において使用されるGDF-11は、SwissprotアクセッションO95390を有するBMP（骨形成タンパク質）、ならびにそのタンパク質の変異体および種相同体を指す。GDF-11は、中軸骨格の前／後パターン形成の調節に関与する（McPherron et al, Nature Genet. 22 (93): 260-264 (1999); Gamer et al, Dev. Biol. 208 (1), 222-232 (1999)）が、出生後の機能は未知である。

【００２３】

アクチビンAは、ポリペプチド鎖βAのホモ二量体である。本明細書において使用される用語「アクチビンA」は、GenBankアクセッション番号:NM_002192を有するアクチビンタンパク質を指す。アクチビンA、B、およびABは、それぞれ2種のポリペプチド鎖βAおよびβBのホモ二量体およびヘテロ二量体である。本明細書において使用される「アクチビン」は、アクチビンA、B、およびAB、ならびにそのタンパク質の変異体および種相同体を指す

。

【００２４】

受容体ポリペプチド

本明細書において使用される用語アクチビンIIB型受容体（ActRIIB）は、アクセッション番号NP_001097を有するヒトアクチビン受容体またはその変異体、例えば位置64のアルギニンをアラニンで置換された変異体を指す。可溶性ActRIIB（野生型）という用語は、ActRIIBの細胞外ドメイン、例えばアミノ酸1～134（シグナル配列あり）、またはSEQ ID NO:2のアミノ酸19から134まで（シグナル配列なし）、またはSEQ ID NO:2のアミノ酸20、21、22、23、24、または25から134まで（シグナル配列なし）を指す。

【００２５】

安定化受容体ポリペプチド

安定化ActIIB受容体ポリペプチド（本明細書において「svActRIIBポリペプチド」と称される）を含む単離されたタンパク質も、本明細書において提供される。本明細書において使用される用語「svActRIIBタンパク質」は、安定化ActRIIBポリペプチドを含むタンパク質を指す。これらのポリペプチドおよびタンパク質は、改善された製造可能性質を有することに加えて、アクチビンA、ミオスタチン、またはGDF-11の任意の1種と結合し、その活性を阻害する能力を有すると特徴付けられている。

【００２６】

安定化ActRIIBポリペプチドは、SEQ ID NO:2に関して位置28および44の両方にアミノ酸置換を有することによって特徴付けることができる。一貫性を保つために、安定化ActRIIBポリペプチドおよびタンパク質上のアミノ酸位置は、ポリペプチドが成熟型または切断型かどうかにかかわらず、SEQ ID NO:2における位置に関して言及される。本明細書において使用される用語「成熟型」は、そのシグナル配列を有さないポリペプチドまたはペプチドを指す。本明細書において使用される用語「切断型」は、N末端アミノ酸またはC末端アミノ酸が除去されたポリペプチドを指す。

【００２７】

一態様では、単離された安定化アクチビンIIB受容体ポリペプチド（svActRIIB）は、SEQ ID NO:2に示されるポリペプチド配列を有する。別の態様では、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸19から134までに示される配列を有する。別の態様では、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸23から134までに示される配列を有する。別の態様では、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸25から134までに示される配列を有する。別の態様では、ポリペプチドは、上記ポリペプチドの任意の1種と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％または99％の同一性を有するアミノ酸配列を有する。一態様では、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。一態様では、単離された安定化アクチビンIIB受容体ポリペプチド（svActRIIB）は、SEQ ID NO:2のアミノ酸19～24、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％または99％の同一性を有する配列を含む。

【００２８】

一態様では、単離された安定化アクチビンIIB受容体ポリペプチド（svActRIIB）は、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2に示されるポリペプチド配列を有し、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換は、Tである。別の態様では、ポリペプチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2のアミノ酸19から134までに示される配列を有し、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換は、Tである。別の態様では、ポリペプチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2のアミノ酸23から134までに示される配列を有し、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換は、Tである。別の態様では、ポリペプチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2のアミノ酸25から134までに示される配列を有し、その際、位置28での置換は、WまたはYよ

り選択され、位置44での置換は、Tである。別の態様では、ポリペプチドは、上記ポリペプチドの任意の1種と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％または99％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、その際、ポリペプチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を有し、任意でその際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換は、Tであり、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。一態様では、上記ポリペプチドの位置28での置換はWであり、位置44での置換はTであり、その際ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。

【００２９】

一態様では、svActRIIBポリペプチドは、シグナル配列、例えば、SEQ ID NO:4、8、12、および16に示される配列を含む。しかし、様々なシグナルペプチドを本出願のポリペプチドの調製に使用することができる。シグナルペプチドは、例えばSEQ ID NO:4のアミノ酸1～19に示される配列を有することができる。svActRIIBポリペプチドを発現させるために有用な任意の他のシグナルペプチドを使用することができる。他の態様では、シグナル配列は除去され、成熟ペプチドが残される。シグナル配列を欠如するsvActRIIBポリペプチドの例には、例えば、SEQ ID NO:6、10、14および18に示される配列が含まれる。

【００３０】

一態様では、タンパク質は、安定化アクチビンIIB受容体ポリペプチドを含み、その際ポリペプチドは、SEQ ID NO:4、6、12および14からなる群に示される配列を有するポリペプチドからなる群より選択される。これらのポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸25～134を表し、その際、ポリペプチドは、位置28にアミノ酸置換および位置44にアミノ酸置換を有し、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換はTであり、ポリペプチドは、SEQ ID NO:2に示されるものと異なるシグナル配列を有しておよび有さずに、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。別の態様では、タンパク質は、SEQ ID NO:4、6、12または14と少なくとも80～100％、90～100％、85～95％、90～95％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、任意でその際、ポリペプチドは、位置28にWまたはYを有し、かつ位置44にTを有し、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。一態様では、位置28での置換はWであり、位置44での置換はTであり、その際、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンAまたはGDF-11と結合することが可能である。

【００３１】

さらなる一態様では、svActRIIBタンパク質は、異種タンパク質をさらに含む。一態様では、異種タンパク質は、Fcドメインである。さらなる一態様では、Fcドメインは、ヒトIgG Fcドメインである。一態様では、タンパク質は、SEQ ID NO:8、10、16および18からなる群に示される配列を有するポリペプチドを含む。別の態様では、タンパク質は、SEQ ID NO:8、10、16または18に示される配列と少なくとも80～100％、90～100％、85～95％、90～95％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するポリペプチドを含み、任意でその際、ポリペプチドは、位置28にWまたはYを有し、かつ位置44にTを有し、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。一態様では、位置28での置換はWであり、位置44での置換はTであり、その際、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンAまたはGDF-11と結合することが可能である。特定の局面では、タンパク質は、SEQ ID NO:10に示される配列を含む、またはそれからなる。特定の局面では、配列は、グリコシル化されている。

【００３２】

さらなる一態様では、svActRIIBタンパク質は、実施例記載のSTM434である。

【００３３】

さらなる一態様では、タンパク質は、上記ポリペプチドの任意の1種を含み、その際、位置64でのアミノ酸残基はアラニンである。

【００３４】

別の態様では、svActRIIBポリペプチドおよびタンパク質という用語は、NおよびC末端切断を含めた、SEQ ID NO:2、4、6、12および14のフラグメントを含むタンパク質を包含し、その際、位置28はWまたはYであり、位置44はTであり、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンAまたはGDF-11と結合することが可能である。

【００３５】

本明細書において使用される、svActRIIBポリペプチドの「誘導体」という用語は、共有結合型または凝集型コンジュゲートを形成するための、グリコシル基、脂質、アセチル基、またはC末端もしくはN末端融合ポリペプチドのような、少なくとも1つの追加的な化学的部分または少なくとも1つ追加的なポリペプチドの結合（attachment）、PEG分子とのコンジュゲーション、および下により十分に記載される他の改変を指す。安定化ActRIIB受容体ポリペプチドは、哺乳動物細胞、大腸菌（E. coli）、酵母および他の組み換え宿主細胞のような様々な細胞型での発現が原因のプロセシングから生じるCおよびN末端への改変を含めた、追加的な改変および誘導体も含むことができる。

【００３６】

svActRIIBタンパク質は、svActRIIBポリペプチドに直接またはリンカーを経由してのいずれかで結合して融合タンパク質を形成する異種ポリペプチドをさらに含むことができる。本明細書において使用される用語「融合タンパク質」は、異種ポリペプチドをsvActRIIBのような別のポリペプチドに結合させたタンパク質を指す。異種ポリペプチドには、非限定的に、例えば参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第00/29581号記載の安定化ActRIIBポリペプチドのオリゴマー化およびさらなる安定化を促進するための、Fcポリペプチド、hisタグ、およびロイシンジッパードメインが含まれる。一態様では、異種ポリペプチドは、Fcポリペプチドまたはドメインである。一態様では、Fcドメインは、ヒトIgG1 Fc（SEQ ID NO:23）、改変IgG1 Fc、IgG2 Fc（SEQ ID NO:22）、およびIgG4 Fc（SEQ ID NO:24）ドメインより選択される。SvActRIIBタンパク質は、IgG1、IgG2、またはIgG4のヒンジ配列の全部または一部をさらに含むことができる。例示的なsvActRIIBポリペプチドは、SEQ ID NO:8、10、16および18に示される配列からなるポリペプチド、ならびにこれらの配列と実質的な類似性を有するポリペプチドであって、位置28および44での置換が保持されているポリペプチドより選択される。本明細書において使用される「実質的な類似性」は、SEQ ID NO:8、10、16、および18のいずれかと少なくとも80～100％、90～100％、85～95％、90～95％、80％同一の、85％同一の、90％同一の、95％同一の、96％同一の、97％同一の、98％同一の、99％同一の配列を表し、その際、ポリペプチドは、位置28にWまたはYを保持し、かつ位置44にTを保持し、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンAまたはGDF-11と結合することが可能である。一態様では、位置28での置換はWであり、位置44での置換はTであり、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンAまたはGDF-11と結合することが可能である。

【００３７】

svActRIIBポリペプチドは、任意で「リンカー」をさらに含むことができる。リンカーは、主に、ポリペプチドと第2の異種ポリペプチドもしくは他の種類の融合との間、または2つ以上の安定化ActRIIBポリペプチドの間のスペーサーとして役立つ。一態様では、リンカーは、ペプチド結合により一緒に連結したアミノ酸、好ましくはペプチド結合によって連結した1～20個のアミノ酸から構成され、その際、アミノ酸は、20種の天然アミノ酸より選択される。当業者によって理解されるように、これらのアミノ酸の1つまたは複数は、グリコシル化されることができる。一態様では、1～20個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、およびリシンより選択することができる。一態様では、リンカーは、グリシンおよびアラニンのような立体障害されていない大部分のアミノ酸から構成されている。例示的なリンカーは、ポリグリシン、特に$(Gly)_5$（SEQ ID NO:51）、$(Gly)_8$（SEQ ID NO:52）、ポリ（Gly-Ala）、およびポリアラニンである。適切なリンカーの一例は、$(Gly)_4Ser$（SEQ ID NO:25）である。さらなる一態様では、svActRIIBは、SEQ ID NO:27に例示されるように、IgGのヒンジ領域または部分ヒンジ領域に隣接して提供されるリンカー配列である「ヒンジリンカー」を含むことができる。ヒ

ンジ配列には、IgG2Fc、IgG1Fc、およびIgG4Fcが含まれる。

【００３８】

ヒンジリンカー配列を、svActRIIB-Fcタンパク質の製造可能性および安定性を改善するように設計することもできる。一態様では、SEQ ID NO:27、38、40、42、44、45、および46のヒンジリンカーは、svActRIIBポリペプチドと結合させたときに、IgG2 Fc（SEQ ID NO:22）を用いた製造可能性を改善するように設計される。一態様では、ヒンジリンカー配列は、svActRIIBポリペプチドをヒトIgG1 Fc（SEQ ID NO:23）または改変ヒトIgG1 Fcと結合させたときに、製造可能性を改善するように設計される。

【００３９】

リンカーは、非ペプチドリンカーであることもできる。例えば、-NH-(CH_2)s-C(O)-［式中、s=2～20］のようなアルキルリンカーを使用することができる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル（例えば、C_1-C_6）低級アシル、ハロゲン（例えば、Cl、Br）、CN、NH_2、フェニルなどのような任意の立体障害を受けない基によってさらに置換され得る。

【００４０】

本明細書開示のsvActRIIBポリペプチドは、分解を減少させるおよび／もしくは半減期を増加させる、毒性を減少させる、免疫原性を減少させる、ならびに／またはsvActRIIBポリペプチドの生物学的活性を増加させるような、所望の性質を与えるための非ポリペプチド分子にも結合させることができる。例示的な分子には、非限定的に、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリリシン、デキストランのような直鎖ポリマー；脂質；コレステロール群（例えばステロイド）；炭水化物、またはオリゴ糖分子が含まれる。

【００４１】

svActRIIBタンパク質およびポリペプチドは、他のActRIIB可溶性ポリペプチドに比べて改善された製造可能性質を有することができる。本明細書において使用される用語「製造可能性」は、特別なタンパク質を組み換え発現および精製する間のそのタンパク質の安定性を指す。製造可能性は、発現および精製条件での分子の固有の性質が原因であると考えられている。改善された製造可能性特徴の例には、タンパク質の均一なグリコシル化、細胞タイターの増加、タンパク質の組み換え産生の間の成長およびタンパク質発現、改善された精製性質、および低pHでの改善された安定性が含まれる。svActRIIBタンパク質およびポリペプチドは、インビトロおよびインビボ活性の保持に加えて、他の可溶性ActRIIBポリペプチドに比べて改善された製造可能性を示す。さらに、追加的なヒンジリンカー配列は、追加的な製造可能性の利益を与えることができる。

【００４２】

本明細書において使用される、「svActRIIBポリペプチドの活性」または「可溶性ActRIIBポリペプチドの生物学的活性」という用語は、svActRIIBポリペプチドの1つまたは複数のインビトロまたはインビボ活性を指す。svActRIIBポリペプチドの活性には、非限定的に、ミオスタチンまたはアクチビンAまたはGDF-11と結合する能力、およびミオスタチンまたはアクチビンAまたはGDF-11の活性を阻害または中和する能力が含まれる。本明細書において使用される、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と「結合することが可能な」という用語は、KinExA（商標）法などの当技術分野において公知の方法によって測定される結合を指す。ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11のインビトロ阻害は、例えばpMARE C2C12細胞に基づくアッセイを使用して測定することができる。インビボ活性は、マウスモデルにおける増加した除脂肪筋肉量によって実証される。svActRIIBポリペプチドおよびタンパク質のインビボ活性には、非限定的に、漸増する体重、漸増する除脂肪筋肉量、および脂肪量に対する除脂肪筋肉量の漸増する比が含まれる。治療活性には、特定種類の腫瘍によって起こる悪液質を軽減または予防すること、特定種類の腫瘍の成長を予防すること、および特定の動物モデルの生存を増加させることがさらに含まれる。svActRIIBタンパク質およびポリペプチドの活性のさらなる論考を下に提供する。

【００４３】

別の局面では、svActRIIBポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離さ

れた核酸分子が提供される。

【００４４】

一態様では、ポリヌクレオチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2に示される配列を有するポリペプチドをコードし、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換はTである。別の態様では、ポリヌクレオチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2のアミノ酸19から134までに示される配列を有するポリペプチドをコードし、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換はTである。別の態様では、ポリヌクレオチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2のアミノ酸23から134までに示される配列を有するポリペプチドをコードし、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換はTである。別の態様では、ポリヌクレオチドは、位置28でのアミノ酸置換および位置44でのアミノ酸置換を除き、SEQ ID NO:2のアミノ酸25から134までに示される配列を有するポリペプチドをコードし、その際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換はTである。別の態様では、ポリヌクレオチドは、上記ポリペプチドの任意の1種と少なくとも80～100％、90～100％、85～95％、90～95％、80％、85％、90％、95％、98％または99％同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、その際、ポリペプチドは、位置28に単一のアミノ酸置換および位置44にアミノ酸置換を有し、任意でその際、位置28での置換は、WまたはYより選択され、位置44での置換はTであり、その際、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合することが可能である。一態様では、上記態様のポリヌクレオチドは、位置28での置換がWであり、位置44での置換がTである、ポリペプチドをコードする。

【００４５】

一態様では、単離された核酸分子は、SEQ ID NO:4、6、12、および14からなる群に示される配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。別の態様では、核酸は、SEQ ID NO:4、6、12または14と少なくとも80～100％、90～100％、85～95％、90～95％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、任意でその際、ポリペプチドは、位置28にWまたはYを有し、かつ位置44にTを有し、その際、ポリペプチドは、アクチビンA、GDF-11、またはミオスタチンと結合することが可能である。一態様では、上記態様のポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードし、その際、位置28での置換はWであり、位置44での置換はTであり、その際、ポリペプチドは、アクチビンA、GDF-11またはミオスタチンと結合することが可能である。

【００４６】

別の態様では、単離された核酸分子は、少なくとも1種の異種タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。一態様では、異種タンパク質はFcドメインであり、さらなる一態様では、FcドメインはヒトIgG Fcドメインである。別の態様では、核酸分子は、例えばSEQ ID NO:25、27に示されるリンカーおよびヒンジリンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【００４７】

一態様では、核酸分子は、SEQ ID NO:8、10、16および18からなる群に示される配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。別の態様では、核酸は、SEQ ID NO:8、10、16および18からなる群と少なくとも80～100％、90～100％、85～95％、90～95％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、任意でその際、ポリペプチドは、位置28にWまたはYを有し、かつ位置44にTを有し、その際、ポリペプチドは、アクチビンA、GDF-11、またはミオスタチンと結合することが可能である。一態様では、上記態様のポリヌクレオチドは、位置28での置換がWであり、位置44での置換がTである、ポリペプチドをコードし、その際、ポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンAまたはGDF-11と結合することが可能である。

【００４８】
一態様では、単離された核酸分子は、SEQ ID NO:3、5、11もしくは13からなる群より選択される配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補体を含む。別の態様では、単離された核酸分子は、配列SEQ ID NO:7、9、15および17からなる群より選択される配列を有するポリヌクレオチド、またはその相補体を含む。さらなる一態様では、単離された核酸分子は、ストリンジェントな条件または中程度の条件でSEQ ID NO:3、5、7、9、11、13、15または17とハイブリダイズし、その際、コードされるポリペプチドは、SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、または18に実質的に類似し、任意でその際、ポリペプチドは、位置28にWまたはYを有し、かつ位置44にTを有するアミノ酸配列を含み、その際、コードされるポリペプチドは、アクチビンA、ミオスタチンまたはGDF-11と結合またはそれを阻害することが可能である。
【００４９】
核酸分子には、1本鎖および2本鎖形態の両方のDNAならびにそのRNA相補体が含まれる。DNAには、例えばcDNA、ゲノムDNA、合成DNA、PCRにより増幅されたDNA、およびそれらの組み合わせが含まれる。ゲノムDNAは、SEQ ID NO:3、5、11もしくは13のDNAまたはその適切なフラグメントをプローブとして使用することによるような従来技法により単離され得る。ActRIIBポリペプチドをコードするゲノムDNAは、いくつかの種について入手可能なゲノムライブラリーから得られる。合成DNAは、コード領域およびフランキング配列の部分または全部を再構成するための重複するオリゴヌクレオチドフラグメントの化学合成に続くフラグメントの集合から入手可能である。RNAは、T7プロモーターおよびRNAポリメラーゼを使用するベクターのような、mRNAの高レベル合成を指令する原核生物発現ベクターから得られ得る。cDNAは、ActRIIBを発現する様々な組織から単離されたmRNAから調製されたライブラリーから得られる。DNA分子には、完全長遺伝子ならびにそのポリヌクレオチドおよびフラグメントが含まれる。完全長遺伝子には、N末端シグナル配列をコードする配列も含まれ得る。
【００５０】
上記核酸分子も提供され、その際、ポリヌクレオチドは、転写または翻訳調節配列に機能的に連結されている。
【００５１】
別の局面では、核酸分子およびポリヌクレオチドを含む発現ベクターも提供され、そのようなベクターで形質転換された宿主細胞およびsvActRIIBポリペプチドを産生する方法も提供される。「発現ベクター」という用語は、ポリヌクレオチド配列からポリペプチドを発現するためのプラスミド、ファージ、ウイルスまたはベクターを指す。svActRIIBポリペプチドの発現のためのベクターは、最低で、ベクターの増殖のためおよびクローニングされた挿入物の発現のために必要な配列を含む。発現ベクターは、（1）遺伝子発現に調節的な役割を有する1種または複数種の遺伝要素、例えばプロモーターもしくはエンハンサー、（2）mRNAに転写およびタンパク質に翻訳されるべき、svActRIIBポリペプチドおよびタンパク質をコードする配列、および（3）適切な転写開始および終結配列、の集合体を含む転写ユニットを含む。これらの配列は、選択マーカーをさらに含み得る。宿主細胞中の発現に適したベクターは、容易に入手可能であり、核酸分子は、標準的な組み換えDNA技法を使用してベクター内に挿入される。そのようなベクターは、目標となるヒト細胞または動物細胞におけるsvActRIIBポリペプチドの発現のための、特定の組織において機能するプロモーターおよびウイルスベクターを含むことができる。svActRIIBの発現に適した例示的な発現ベクターは、svActRIIBポリヌクレオチドを含むpDSRa（参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第90/14363号に記載）およびその誘導体、ならびに当技術分野において公知または下記の、任意の追加的な適切なベクターである。
【００５２】
ポリペプチド
一部の態様では、本明細書開示の組成物は、本明細書開示のアミノ酸配列と100％未満同一のポリペプチドを含む。一部の態様では、ポリペプチドは、本明細書開示の配列と80

%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99から100%の間で同一である。

【００５３】

2つ以上のアミノ酸または核酸配列に関連する「同一パーセント」という用語は、下記の配列比較アルゴリズム（例えばBLASTPおよびBLASTNまたは当業者に入手可能な他のアルゴリズム）の1つを使用してまたは目視検査により測定された最大一致のために比較およびアライメントされたとき、同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基を特定パーセンテージ有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。適用に応じて、同一パーセントは、比較されている配列の一領域にわたり、例えば機能ドメインにわたり存在することができるか、またはその代わりに、比較されるべき2つの配列の全長にわたり存在することができる。

【００５４】

配列比較について、典型的には一方の配列が、被験配列と比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、被験配列および参照配列がコンピューターに入力され、必要に応じて部分配列の座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターが指定される。次に、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムのパラメーターに基づき参照配列に対する被験配列の配列同一パーセントを計算する。

【００５５】

比較に最適な配列アライメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性探索法、これらのアルゴリズムのコンピューター実装(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.の中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）、または目視検査（一般的にAusubel et al.、下記参照）によって行うことができる。

【００５６】

配列同一および配列類似パーセントを決定するために適したアルゴリズムの一例は、Altschulら、J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information（www.ncbi.nlm.nih.gov/）から公的に入手可能である。

【００５７】

変異体

本明細書記載の組成物は、本明細書記載のポリペプチドの変異体も包含する。本明細書において使用される用語「変異体」は、本来のアミノ酸配列に挿入、欠失または置換された1つまたは複数のアミノ酸残基を有するポリペプチドであって、本明細書記載のポリペプチドの機能の少なくとも一部を保持するポリペプチドを指す。本明細書において使用されるポリペプチドのフラグメントは、「変異体」の定義の中に含まれる。任意の所与のペプチドまたはペプチボディー（peptibody）が1または2または3種全ての変異体を含み得ることが理解される。挿入および置換変異体は、天然アミノ酸、および非天然アミノ酸またはその両方を含み得る。変異体は、例えばリーダーまたはシグナル配列を含むポリペプチド；追加的なアミノ末端残基、例えばMet1またはLys2を有するポリペプチド；発現タグ、例えばヒスチジンタグを有するポリペプチド；および融合タンパク質として発現されるポリペプチドを含むことができる。

【００５８】

本明細書記載のポリペプチドの変異体は、アミノ酸置換を含むことができる。20種の従来型（天然）アミノ酸の立体異性体（例えばD-アミノ酸）、α-,α-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、および他の非定型アミノ酸のような非天然アミノ酸も、本発明のポリペプチドに適した構成要素であり得る。非天然アミノ酸の例には、例えば:アミノアジピン酸、ベータ-アラニン、ベータ-アミノプロピオン酸、アミノ酪酸、ピペリジン酸、アミノカプロン酸、アミノヘプタン酸、アミノイソ酪酸、アミノピメリン酸、ジアミノ

酪酸、デスモシン、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ヒドロキシリシン、アロ-ヒドロキシリシン、ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルグリシン、サルコシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オリチン（orithine）、4-ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸塩、ε-N,N,N-トリメチルリシン、ε-N-アセチルリシン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、σ-N-メチルアルギニン、ならびに他の類似のアミノ酸およびアミノ酸（例えば4-ヒドロキシプロリン）が含まれる。

【００５９】

天然残基は、共通の側鎖性質に基づき、（重複する）クラスに類別され得る:

1）中性疎水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp、Met、Phe；

2）中性極性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Tyr、Gly；

3）酸性:Asp、Glu；

4）塩基性:His、Lys、Arg；

5）鎖の配向に影響する残基:Gly、Pro；および

6）芳香族:Trp、Tyr、Phe。

【００６０】

天然アミノ酸による置換は、保存的または非保存的であることができる。保存的アミノ酸置換は、上記クラスの1つのメンバーを同じクラスの別のメンバーに交換することを伴う。保存的変化は、典型的には生体系における合成の代わりに化学ペプチド合成により組み入れられる非定型アミノ酸残基を包含し得る。これらには、ペプチド模倣体および他の逆転（reversed）または反転（inverted）形態のアミノ酸部分が含まれる。

【００６１】

製造方法

svActRIIBポリペプチドを製造する方法も提供される。多様な他の発現／宿主系が利用され得る。これらの系には、非限定的に、組み換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌のような微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）をトランスフェクトされた、または細菌発現ベクター（例えばTiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは動物細胞系が含まれる。組み換えタンパク質産生に有用な哺乳動物細胞には、非限定的に、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系、または無血清培地中で成長するVeggie CHOおよび関連細胞系（Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31参照）もしくはDHFRを欠損するCHO株DX-B11（Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20参照）のようなそれらの派生物、COS-7系統サル腎臓細胞（ATCC CRL 1651）のようなCOS細胞（Gluzman et al., 1981, Cell 23:175参照）、W138、BHK、HepG2、3T3（ATCC CCL 163）、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、L細胞、C127細胞、BHK（ATCC CRL 10）細胞系、アフリカミドリザル腎臓細胞系CV1（ATCC CCL 70）由来のCV1/EBNA細胞系（McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821参照）、293、293 EBNAまたはMSR 293のようなヒト胎児腎臓細胞、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換霊長類細胞系、正常2倍体細胞、初代組織、初代外植片のインビトロ培養由来の細胞株、HL-60、U937、HaKまたはJurkat細胞が含まれる。哺乳類での発現は、成長培地から回収され得る分泌性または可溶性ポリペプチドの産生を可能にする。

【００６２】

適切な宿主-ベクター系を使用して、核酸分子を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、産生を可能にする条件で培養することによって、svActRIIBポリペプチドが組み換え産生される。長期の高収率ポリペプチド産生のために形質転換細胞を使用することができる。そのような細胞が、選択マーカーおよび所望の発現カセットを含むベクターで形質転換された後、細胞を強化培地中で成長させ、例えばその後選択培地に移すことがで

きる。選択可能マーカーは、導入された配列をうまく発現する細胞の成長および回収を可能にするように設計される。用いられた細胞系に適した組織培養技法を使用して、安定に形質転換された細胞の抵抗性集塊（resistant clump）を増殖させることができる。組み換えタンパク質の発現の概要は、Methods of Enzymology, v. 185, Goeddell, D.V., ed., Academic Press (1990)に見出される。

【００６３】

場合によっては、例えば原核細胞系を使用する発現において、生物学的に活性であるために、発現されたポリペプチドを適正な三次構造に「再フォールディング」させ、酸化してジスルフィド結合を生成させることが必要な場合がある。再フォールディングは、当技術分野において周知のいくつかの手順を使用して達成することができる。そのような方法は、例えば可溶化ポリペプチドを、カオトロピック剤の存在下で通常7を超えるpHに暴露することを含む。カオトロープの選択は、封入体の可溶化のために使用される選択に類似するが、カオトロープは、典型的にはより低い濃度で使用される。例示的なカオトロピック剤は、グアニジンおよび尿素である。ほとんどの場合、再フォールディング／酸化溶液は、また、還元剤に加えてその酸化型を特定の比で含有して、システイン架橋の形成のためにジスルフィドシャッフルが起こることを可能にする特別な酸化還元電位を発生する。一部の通例使用される酸化還元カップルには、システイン／シスタミン、グルタチオン／ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオスレイトールDTT／ジチアンDTT、および2-メルカプトエタノール(bME）／ジチオ-bMEが含まれる。多くの場合、再フォールディングの効率を増加させるために共溶媒が使用され得る。通例使用される共溶媒には、様々な分子量のグリセロール、ポリエチレングリコール、およびアルギニンが含まれる。

【００６４】

加えて、ポリペプチドを、従来技法に従って溶液中または固体支持体上で合成することができる。様々な自動合成装置が市販されており、公知のプロトコールに従って使用することができる。例えば、Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d.Ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., J Am Chem Soc, 105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany and Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany et al., Int J Pep Protein Res, 30:705-739 (1987)を参照されたい。

【００６５】

ポリペプチドおよびタンパク質は、当業者に周知のタンパク質精製技法に従って精製することができる。これらの技法は、あるレベルで、タンパク質性および非タンパク質性画分を粗分画することを伴う。ペプチドまたはポリペプチドを他のタンパク質から分離してから、クロマトグラフィー技法および電気泳動技法を使用して関心対象のペプチドまたはポリペプチドをさらに精製して部分精製または完全精製（すなわち均一までの精製）を達成することができる。本明細書において使用される「単離されたポリペプチド」または「精製ポリペプチド」という用語は、他の成分から単離可能な組成物を指すことが意図され、その際、ポリペプチドは、その自然に得られる状態に比べて任意の程度まで精製される。したがって、精製ポリペプチドは、それが自然に存在し得る環境を有さないポリペプチドも指す。一般的に、「精製された」は、様々な他の成分を除去するために分画に供されたポリペプチド組成物であって、その発現された生物学的活性を実質的に保持するポリペプチド組成物を指す。「実質的に精製された」という用語が使用される場合、この呼称は、中のポリペプチドまたはペプチドが、ペプチドまたはポリペプチド組成物の主成分を形成する、例えば組成物中のタンパク質の約50％、約60％、約70％、約80％、約85％、または約90％以上を構成する組成物を指す。単離されたという用語は、ポリペプチドのような合成成分を含むことができる。

【００６６】

精製に使用するために適した様々な技法が、当業者に周知である。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体（免疫沈降）などを用いた沈殿または熱変性による沈殿に続く遠心分離；アフィニティークロマトグラフィー（プロテインAカラム）、イオン交

換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイト、疎水性相互作用クロマトグラフィーのようなクロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル電気泳動、およびこれらの技法の組み合わせが含まれる。当技術分野において一般的に公知のように、様々な精製段階を行う順序は変わる場合があり、または特定の段階が省略される場合があり、それでも実質的に精製されたポリペプチドの調製に適した方法を招くと考えられている。例示的な精製段階は、下の実施例に提供される。

【００６７】

ポリペプチドの精製度を定量するための様々な方法は、本開示に照らして当業者に公知である。これらは、例えば、活性画分の特異的結合活性を決定すること、またはSDS/PAGE分析により画分内のペプチドもしくはポリペプチドの量を評価することを含む。ポリペプチド画分の純度を評価するための好ましい方法は、画分の結合活性を計算すること、それを最初の抽出物の結合活性と比較すること、およびこのように本明細書において「精製倍率」によって評価される精製度を計算することである。結合活性の量を表すために使用される実際の単位は、もちろん、精製に続いて選ばれる特別なアッセイ技法およびポリペプチドまたはペプチドが検出可能な結合活性を示すかどうかに依存する。

【００６８】

処置方法

インビボおよびインビトロでミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11の少なくとも1つの量または活性を減少させるまたは中和するための方法、タンパク質、および組成物も提供される。svActRIIBポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビンA、およびGDF-11に対して高い結合親和性を有し、かつミオスタチン、アクチビンAおよびGDF-11の少なくとも1つの生物学的活性を減少させるおよび阻害することが可能である。一部の局面では、タンパク質は、抗体またはFc融合タンパク質である。一部の局面では、Fc融合タンパク質はActRIIB Fc融合タンパク質である。一部の局面では、ActRIIB Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を含み、任意でその際、FcはIgGであり、任意でその際、IgGはヒトIgGである。一部の局面では、ActRIIB Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:10に示される配列を含むまたはそれからなる。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも2つを阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11を阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビンを阻害する。

【００６９】

一局面では、svActRIIB組成物の有効投薬量を対象に投与することによる、そのような処置を必要とする対象におけるミオスタチン関連および／またはアクチビンA関連障害の処置のための方法および試薬が提供される。本明細書において使用される用語「対象」は、ヒトを含めた哺乳類のような任意の動物を指す。

【００７０】

組成物は、対象における除脂肪筋肉量を増加させるために有用である。組成物は、脂肪量に対する除脂肪筋肉量を増加させることで、対象における体重のパーセンテージとしての脂肪量を減少させるためにも有用であり得る。

【００７１】

svActRIIBにより処置することができる障害には、非限定的に、様々な形態の筋消耗に加えて、糖尿病および関連障害のような代謝障害、ならびに骨粗鬆症のような骨変性疾患が含まれる。

【００７２】

筋消耗障害には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、進行性筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、デジェリン-ランドジー筋ジストロフィー、エルブ筋ジストロフィー、および乳児神経軸索筋ジストロフィーのようなジストロフィーも含まれる。追加的な筋消耗障害は、筋萎縮性側索硬化症、うっ血性閉塞性肺疾患、癌、AIDS、腎不全、臓器

萎縮、アンドロゲン欠乏、および関節リウマチのような慢性疾患または障害から生じる。

【００７３】

ミオスタチンおよび／またはアクチビンの過剰発現は、悪液質、重症筋消耗症候群の一因となり得る。悪液質は、癌に起因し、また関節リウマチ、糖尿病性腎症、腎不全、化学療法、火傷、および他の原因によっても生じる。別の例では、ミオスタチン免疫反応性タンパク質の血清および筋肉内濃度は、AIDS関連の筋消耗を示している男性で増加していることが見出され、除脂肪体重と逆相関した（Gonzalez-Cadavid et al., PNAS USA 95: 14938-14943 (1998)）。ミオスタチンレベルは、火傷に応答して増加し、異化筋肉効果を招くことも示されている（Lang et al, FASEB J 15, 1807-1809 (2001)）。筋消耗を招く追加的な状態は、車椅子への拘束、脳卒中、病気、脊髄損傷、骨折または外傷が原因の長期床上安静、および微小重力環境（宇宙飛行）での筋萎縮のような能力障害が原因の不活動に起因し得る。例えば、血漿ミオスタチン免疫反応性タンパク質は、長期床上安静後に増加することが見出された（Zachwieja et al. J Gravit Physiol. 6(2):11(1999)。スペースシャトルの飛行の間に微小重力環境に暴露されたラットの筋肉は、暴露されなかったラットの筋肉に比べて増加した量のミオスタチンを発現したことも見出された（Lalani et al., J.Endocrin 167 (3):417-28 (2000)）。

【００７４】

加えて、筋肉に対する脂肪の比の加齢関連増加および加齢関連筋萎縮は、ミオスタチンに関係するように見える。例えば、平均血清ミオスタチン免疫反応性タンパク質は、若齢（19～35歳）、中年（36～75歳）、および老齢（76～92歳）男女の群において年齢と共に増加したが、一方、平均筋量および除脂肪体重は、これらの群において年齢と共に減少した（Yarasheski et al. J Nutr Aging 6(5):343-8 (2002)）。加えて今やミオスタチンは、心筋に低レベルで発現されることが見出されており、発現は、梗塞後の心筋細胞においてアップレギュレーションされる（Sharma et al., J Cell Physiol. 180 (1):1-9 (1999)）。したがって、心筋におけるミオスタチンレベルを減少させることは、梗塞後の心筋の回復を改善し得る。

【００７５】

ミオスタチンは、2型糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、高血糖、および肥満を含めた代謝障害に影響するようにも見える。例えば、ミオスタチンの喪失は、2つのマウスモデルの肥満および糖尿病表現型を改善することが示されている（Yen et al. FASEB J. 8: 479 (1994)。本開示のsvActRIIBポリペプチドは、そのような代謝障害を処置するために適している。したがって、組成物を投与することは、適切な対象における糖尿病、肥満、および高血糖状態を改善する。加えて、svActRIIBポリペプチドを含有する組成物は、肥満個体における食物摂取量を減少させることができる。

【００７６】

安定化ActRIIBポリペプチドを投与することは、骨の強度を改善し、骨粗鬆症および他の変性骨疾患を軽減することができる。例えば、ミオスタチン欠損マウスが、マウス上腕骨のミネラル含量および密度の増加ならびに筋肉が付着する領域での海綿骨および皮質骨の両方のミネラル含量の増加ばかりでなく、筋量増加も示したことが見出されている（Hamrick et al. Calcif Tissue Int 71(1):63-8 (2002)）。加えて、svActRIIBは、例えば前立腺癌の処置のために使用されるアンドロゲン欠乏療法のような場合に、アンドロゲン欠乏の影響を処置するために使用することができる。

【００７７】

食用動物にsvActRIIBタンパク質の有効投薬量を投与することによって該動物における筋量を増加させるための方法および組成物も提供される。成熟C末端ミオスタチンポリペプチドは、全ての被験種で類似または同一であるので、svActRIIBポリペプチドは、ウシ、ニワトリ、シチメンチョウ、およびブタを含めた任意の農業的に重要な種における除脂肪筋肉量を増加させ、脂肪を減少させるために有効であると予想される。

【００７８】

一部の局面では、対象における肥満もしくは肥満に関連する疾患を処置する、筋量を増

加させる、または脂肪量を減少させる方法であって、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも1つを阻害するタンパク質の有効用量を対象に投与する段階を含む方法が、本明細書において開示される。

【００７９】

一部の局面では、肥満に関連する疾患は、遺伝的肥満症候群、プラダー・ウィリー症候群、視床下部障害、家族性高コレステロール血症、バルデー・ビードル症候群、プラダー・ウィリー症候群、15q11-13上の刷り込み遺伝子の喪失に起因する症候群、アルストレーム症候群、コーエン症候群、オルブライト遺伝性骨ジストロフィー（偽性副甲状腺機能低下症）、カーペンター症候群、MOMO症候群、ルビンスタイン・タイビー症候群、6q16、1p36、2q37、および9q34の少なくとも1つの欠失に起因する症候群、14番染色体の母性片親性ダイソミー、脆弱X症候群、アテローム動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝炎、内臓脂肪沈着が1つまたは複数の有害転帰を招く疾患、脳血管疾患、脂肪肝、ならびにベルエソン・フォルスマン・レーマン症候群の少なくとも1つである。

【００８０】

一部の局面では、対象は、処置または投与を必要とするヒト対象である。一部の局面では、対象は、遺伝的肥満症候群、プラダー・ウィリー症候群、視床下部障害、家族性高コレステロール血症、バルデー・ビードル症候群、プラダー・ウィリー症候群、15q11-13上の刷り込み遺伝子の喪失に起因する症候群、アルストレーム症候群、コーエン症候群、オルブライト遺伝性骨ジストロフィー（偽性副甲状腺機能低下症）、カーペンター症候群、MOMO症候群、ルビンスタイン・タイビー症候群、6q16、1p36、2q37、および9q34の少なくとも1つの欠失に起因する症候群、14番染色体の母性片親性ダイソミー、脆弱X症候群、アテローム動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝炎、内臓脂肪沈着が1つまたは複数の有害転帰を招く疾患、脳血管疾患、脂肪肝、ならびにベルエソン・フォルスマン・レーマン症候群の少なくとも1つを有する。一部の局面では、対象は、インスリン抵抗性、慢性腎疾患、癌、および異化状態の少なくとも1つを有する。

【００８１】

一部の局面では、タンパク質は、抗体またはFc融合タンパク質である。一部の局面では、Fc融合タンパク質はActRIIB Fc融合タンパク質である。一部の局面では、ActRIIB Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を含み、任意でその際、FcはIgGであり、任意でその際、IgGはヒトIgGである。一部の局面では、ActRIIB Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:10に示される配列を含むまたはそれからなる。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも2つを阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11を阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビンを阻害する。

【００８２】

一部の局面では、本明細書開示の方法は、総脂肪量、皮下脂肪量、および内臓脂肪量の少なくとも1つを減少させる。一部の局面では、本明細書開示の方法は、総脂肪質量の減少パーセントと比較して、内臓脂肪量のより大きなパーセント減少をもたらす。一部の局面では、本明細書開示の方法は、除脂肪体重および体肢除脂肪体重の少なくとも1つを増加させる。一部の局面では、本明細書開示の方法は、除脂肪体重および体肢除脂肪体重の少なくとも1つにおける少なくとも1～50％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％またはそれ以上の増加を招く。一部の局面では、本明細書開示の方法は、総脂肪量、皮下脂肪量、および内臓脂肪量の少なくとも1つにおける少なくとも1～99％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％またはそれ以上の減少を招く。

【００８３】

svActRIIBポリペプチドおよび組成物はまた、下記インビトロアッセイに示されるように、アクチビンA活性を拮抗する。アクチビンAは、特定種類の癌、特に卵巣癌のような性腺腫瘍に発現されること、および重症悪液質を引き起こすことが公知である。（Ciprano et al. Endocrinol 141 (7):2319-27 (2000), Shou et al., Endocrinol 138 (11):5000-5 (1997); Coerver et al, Mol Endocrinol 10(5):534-43 (1996); Ito et al. British J Cancer 82(8):1415-20 (2000), Lambert-Messerlian, et al, Gynecologic Oncology 74:93-7 (1999)。したがって、本開示の組成物は、特定の癌からの悪液質および特定の性腺型腫瘍の処置のような、アクチビンAの過剰発現およびミオスタチンの発現に関連する状態を処置するために使用され得る。

【００８４】

加えて、svActRIIBポリペプチドは、任意の数のアッセイにおいてミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11を検出および定量するために有用である。概して、安定化ActRIIBポリペプチドは、例えばAsai, ed., Methods in Cell Biology, 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993)に記載のアッセイに類似した多様なアッセイにおいて、ミオスタチン、アクチビンA、またはGDF-11と結合し、それらを固定化するための捕捉剤として有用である。ポリペプチドは、ある方法で標識し得、またはミオスタチンを検出および定量できるように標識された抗体のような第3の分子と反応し得る。例えば、ポリペプチドまたは第3の分子を、ビオチンのような検出可能な部分を用いて改変することができ、次にその部分を、酵素標識ストレプトアビジンまたは他のタンパク質のような第4の分子によって結合させることができる(Akerstrom, J Immunol 135:2589 (1985); Chaubert, Mod Pathol 10:585 (1997))。

【００８５】

一部の局面では、本開示の組成物を、固形腫瘍のような癌を処置するために使用することができる。「癌」および「癌性」という用語は、哺乳類における典型的には未制御の細胞成長によって特徴付けられる生理学的状態を指すまたは説明する。癌の例には、非限定的に、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫（髄芽細胞腫および網膜芽細胞腫を含む）、肉腫（脂肪肉腫および滑膜細胞肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍（カルチノイド腫瘍、ガストリノーマ、および膵島細胞癌を含む）、中皮腫、神経鞘腫（聴神経腫を含む）、髄膜腫、腺癌、黒色腫、および白血病またはリンパ系腫瘍が含まれる。そのような癌のより特別な例には、扁平上皮癌（例えば上皮性扁平上皮癌）、小細胞肺癌（SCLC）、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃癌（gastricまたはstomach cancer）、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌（転移性乳癌を含む）、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（kidneyまたはrenal cancer）、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆道腫瘍、ならびに頭頸部癌が含まれる。一部の局面では、本開示の組成物を、これらまたは卵巣癌（顆粒膜細胞、明細胞、漿液性、類内膜、胚細胞腫瘍）、頭頸部癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、膵癌、前立腺癌、小腸腫瘍、結腸癌、腎細胞癌、腺様嚢胞癌、胃癌、食道癌、扁平上皮癌（皮膚）、黒色腫、乳癌、膀胱癌、肝細胞癌、および／または子宮癌（子宮内膜、子宮頸、平滑筋腫、外陰、膣）のような癌を処置するために使用することができる。

【００８６】

本明細書記載のタンパク質およびポリペプチド用の投薬量は、0.1～10、0.25～5、1～3、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1、2、3、4、5であることができる、または5mg/kgより大きくあることができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、各投薬量は、1～10、2～9、3～8、4～7、5～6、1、1、2、3、4、5、6、7、8週間未満毎、または8週間超毎に投与することができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、各投薬量は、1～10、2～9、3～8、4～7、5～6、1、1、2、3、4、5、6、7日未満毎に投与することができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、各投薬量はIV投与される。一部の局面では、対象は、少なくとも1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20用量を投

与される（記載の数字を含む）。一部の局面では、複数用量の少なくとも1つの量は、少なくとも0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mg/kgである（記載の数字を含む）。一部の局面では、複数用量のそれぞれの量は、少なくとも0.1～30、0.25～20、0.25～10、1～5、1～3、0.1～1、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mg/kgである（記載の数字を含む）。一部の局面では、各用量は、少なくとも毎日、毎週、または毎月投与される。一部の局面では、各用量は、少なくとも1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、または31日毎に投与される（記載の数字を含む）。一部の局面では、処置は、少なくとも1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、もしくは31日間；少なくとも1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20週間；または少なくとも1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしく20ヶ月間継続する（記載の数字を含む）。

【００８７】

一部の局面では、癌の処置について、選択基準または除外基準のような特定の基準を使用して対象を選択することができる。

【００８８】

一部の局面では、基準は選択基準である。一部の局面では、選択基準は：≧18歳の男性および閉経後女性、癌を確定する組織学的診断を伴う進行性固形腫瘍の存在、少なくとも1つの以前の標準的処置方針（利用可能な場合）の失敗後の再発転移性もしくは局所進行性疾患の存在、固形癌の治療効果判定のためのガイドライン（RECIST 1.1）基準を使用して測定可能な疾患、Eastern Cooperative Oncology Group（ECOG）のパフォーマンスステータスが0もしくは1、他人の介助なしに少なくとも30メートル歩行可能（杖もしくは歩行器のような介助用具の使用は許される）、閉経後女性における12ヶ月の自然無月経、閉経後女性におけるFSH＞40IU/Lを有する6ヶ月の自然無月経、閉経後女性における子宮摘出を伴うもしくは伴わない術後両側卵巣摘出、白金系化学療法レジメンによる以前の処置、および／または白金系化学療法を受けることができないとの実証を含むことができる。

【００８９】

一部の局面では、基準は除外基準である。一部の局面では、除外基準は：プロトコールの遵守を制限するもしくは対象を極度の危険にさらす、併発した重篤な制御不能もしくは未解決の医学的状態（例えば感染）、以前の抗癌療法からの、脱毛症を除くCTCAE(4.03版）グレード≧2の未解決の毒性であって、例えば運動性もしくは感覚性神経障害である、毒性、処置開始の6ヶ月以内に消化管出血の病歴、QTcF＞470msecの存在、遺伝性QT間隔延長の病歴もしくはQT間隔の評価を妨げる任意の不整脈（例えば脚ブロック）、心筋梗塞、サイクル1の1日目の6ヶ月以内の不安定狭心症、もしくはNew York Heart Association ≧II度のうっ血性心不全、総ビリルビン＞1.5×正常値上限（ULN；対象がジルベール病を有すると実証されていない場合）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）もしくはアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）＞3.0×ULN（既知の肝転移を有する対象について、ASTもしくはALT＞5×ULN）を含めた肝機能検査値の上昇、クレアチニン＞1.5×ULNおよび推定クレアチニンクリアランス＜60mL/min（コッククロフト・ゴールト（Cockcroft-Gault）式を使用）、ヘモグロビン＜9g/dL；血小板＜100×10^9/L；絶対好中球数（ANC）＜1.5×10^9/L（処置開始の2週間以内に顆粒球コロニー刺激因子の支援なし）、処置開始の3週間以内の化学療法、ホルモン療法、もしくは放射線療法、処置開始の4週間以内の抗体／生物学的療法、処置開始の8週間以内の大手術もしくは4週間以内の小手術、現在の腸閉塞、脳転移、頻繁な（週1回を超える）医学的介入を要する腹水もしくは胸水の存在、門脈静脈シャント装置の存在もしくは広範囲肝切除の手術歴（1区域を越える）、既知のヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、活動性BもしくはC型肝炎感染、処置開始の4週

間以内の任意の治験薬を用いた以前の処置、植込剤、注射剤、複合経口避妊薬、一部の子宮内避妊装置、禁欲、もしくは精管切除されたパートナーのような、一貫して正確に使用したときに高度に有効な避妊法（すなわち、年間1％未満の妊娠を生じる方法）を使いたくない、妊娠する可能性がある女性、もしくは女性パートナーが妊娠する可能性のある男性、ドキソルビシンHClの従来製剤もしくはリポソームドキソルビシンの成分に対する過敏反応、以前のドキソルビシンHClの累積用量＞300mg/m^2、もしくは以前のエピルビシンの累積用量＞500mg/m^2、処置開始の28日以内のMUGAスキャンもしくは心エコー（ECHO）により正常値下限未満に減少した心駆出分画、ならびに／または授乳中の女性を含むことができる。

【００９０】

薬学的組成物および製剤

本明細書開示のタンパク質およびポリペプチドを含有する薬学的組成物も提供される。一部の局面では、タンパク質は、抗体またはFc融合タンパク質である。一部の局面では、Fc融合タンパク質はActRIIB Fc融合タンパク質である。一部の局面では、ActRIIB Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:2のアミノ酸19～25、19、20、21、22、23、24、または25から130～134、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134までに示される配列と少なくとも80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％の同一性を有する配列を含み、任意でその際、FcはIgGであり、任意でその際、IgGはヒトIgGである。一部の局面では、ActRIIB Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:10に示される配列を含む、またはそれからなる。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11の少なくとも2つを阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビン、ミオスタチン、およびGDF-11を阻害する。一部の局面では、タンパク質は、アクチビンを阻害する。

【００９１】

そのような組成物は、薬学的に許容される材料および生理的に許容される製剤材料と混合した、治療上または予防上有効な量のポリペプチドまたはタンパク質を含む。薬学的組成物は、例えばpH、モル浸透圧濃度、粘度、清澄度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解または放出速度、組成物の吸着または浸透を、改変する、維持するまたは保存するための製剤材料を含有し得る。適切な製剤材料には、非限定的に、アミノ酸（例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシン）；抗菌薬；抗酸化剤（例えばアスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムもしくは亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝液（例えばホウ酸塩、重炭酸塩、トリス-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、他の有機酸）；増量剤（例えばマンニトールもしくはグリシン）、キレート剤（例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA））；錯化剤（例えばカフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリンもしくはヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン）；充填剤；単糖；二糖および他の炭水化物（例えばグルコース、マンノース、もしくはデキストリン）；タンパク質（例えば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン）；着色料；香味料および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（例えばポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成性対イオン（例えばナトリウム）；保存料（例えばベンザルコニウム塩化物、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）；溶媒（例えばグリセリン、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えばマンニトールもしくはソルビトール）；懸濁化剤；界面活性剤もしくは湿潤剤（例えばプルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート20、ポリソルベート80のようなポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール（tyloxapal））；安定性強化剤（スクロースもしくはソルビトール）；張性強化剤（アルカリ金属ハロゲン化物（好ましくは塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトール）；送達媒体；希釈剤；賦形剤および／または薬学的佐剤が含まれる。（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990）。

【００９２】
本明細書において使用される用語「緩衝液」は、液体のpH、すなわちその酸性度またはアルカリ度のいずれかを安定化する物質を意味することが意図される。本明細書において使用されるような該用語は、その共役塩基と平衡状態にある酸のような、緩衝物質を有する溶液を表すことが意図される。本明細書開示の製剤に有用な、例示的な緩衝液には、リン酸カリウム緩衝液が含まれる。本発明の緩衝液に含まれることができる緩衝液の例示的な塩形態には、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、有機アミノまたはマグネシウム塩が含まれる。本明細書において使用される「緩衝液」という用語は、当業者に周知の、治療用ポリペプチドのような生物製剤での使用に適用できるリン酸カリウム緩衝液以外の全ての緩衝液を含むことも意図される。本明細書提供の教示および案内から判断して、当業者は、治療用ポリペプチドの安定性を維持または強化するために、本発明の製剤においてリン酸カリウム緩衝液以外の緩衝液で等しく代用できることを理解している。当技術分野において周知の任意の多種多様な緩衝液成分を本発明の製剤中に使用することができる。そのような緩衝液成分には、例えば、酢酸、グルタミン酸、コハク酸、プロピオン酸、マレイン酸、グルコン酸塩、ヒスチジンもしくは他のアミノ酸、クエン酸塩、リン酸塩、またはそれらの塩形態が含まれる。例えば他の有機酸を含めた多種多様な他の緩衝液は、当技術分野において周知であり、本発明の製剤中の緩衝液成分として同様に使用することができる。本明細書提供の教示および案内から判断して、当業者は、上記緩衝液成分または当技術分野において周知の他の成分の任意のものを選択して、製剤の所望のpHおよびもしあれば製剤中に含まれる賦形剤が決められた本発明の製剤中に使用することができることを分かっている。緩衝液成分を、緩衝系に多様な異なる形態で供給することができる。一部の局面では、製剤は、1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、19、20、または20mMより大きい緩衝液を含むことができる（記載の数字を含む）。

【００９３】
本明細書において使用される「賦形剤」という用語は、治療不活性物質を意味することが意図される。賦形剤は、例えば希釈剤、媒体、緩衝液、安定化剤、等張化剤、増量剤、界面活性剤、凍結保護物質、凍結乾燥保護剤（lyoprotectant）、抗酸化剤、金属イオン源、キレート剤および／または保存料としてを含めた、多種多様な目的で製剤中に含まれることができる。賦形剤には、例えばソルビトールまたはマンニトールのようなポリオール；スクロース、ラクトースまたはデキストロースのような糖；ポリエチレングリコールのようなポリマー；NaCl、KClまたはリン酸カルシウムのような塩、グリシン、メチオニンまたはグルタミン酸のようなアミノ酸、界面活性剤、金属イオン、プロピオン酸塩、酢酸塩またはコハク酸塩のような緩衝塩、保存料およびヒト血清アルブミンのようなポリペプチド、ならびに食塩水および水が含まれる。本発明の特に有用な賦形剤には、糖アルコール、還元糖、非還元糖および糖酸を含めた糖が含まれる。賦形剤は、当技術分野において周知であり、例えば、Wang W., Int. J. Pharm. 185:129-88 (1999)およびWang W., Int. J. Pharm. 203:1-60 (2000)に記載されているのを見出すことができる。非還元糖は、アセタールであるアノマー炭素を含み、実質的にアミノ酸またはポリペプチドと反応してメイラード反応を開始することはない。フェーリング液またはトレンス試薬を還元する糖も、還元糖として公知である。非還元糖の具体例には、スクロース、トレハロース、ソルボース、スクラロース、メレジトースおよびラフィノースが含まれる。緩衝液の賦形剤は、製品の有効期間を通して液体製剤のpHを維持し、例えば凍結乾燥工程の間および再構成時に凍結乾燥製剤のpHを維持する。概して、賦形剤は、それらが様々な化学および物理ストレスに対してタンパク質を安定化させるメカニズムに基づき選ぶことができる。

【００９４】
本明細書記載のように、特定の賦形剤は、特異的なストレスの影響を緩和するためにまたは特異的なポリペプチドの特別な感受性を調節するために含むことが有益である。他の賦形剤は、タンパク質の物理的安定性および共有結合安定性により全般的な効果を有するので、含むことが有益である。特に有用な賦形剤には、製剤の安定性質を最適化するため

に、化学的および機能的に無害な、または水性緩衝液およびポリペプチドと適合性の賦形剤が含まれる。様々なそのような賦形剤は、本発明の水性製剤との化学的適合性およびそのような製剤中に含まれるポリペプチドとの機能的適合性を示している例示的な賦形剤として本明細書において記載されている。当業者は、例示された賦形剤に関して本明細書において提供される教示および案内が、当技術分野において周知の広範囲な他の賦形剤の使用に等しく適用可能であることを理解している。例えば、製剤内のポリペプチドの安定性を強化または付与するために選ばれる最適な賦形剤には、ポリペプチド上の官能基と実質的に反応しない賦形剤が含まれる。この点で、還元糖および非還元糖の両方を本発明の製剤中の賦形剤として使用することができる。しかし、還元糖は、ヘミアセタール基を含むので、還元糖はポリペプチドのアミノ酸側鎖上のアミノ基と反応して付加物または他の修飾物を形成することができる（すなわちグリコシル化）。同様に、クエン酸塩、コハク酸塩またはヒスチジンのような賦形剤もアミノ酸側鎖と付加物を形成することができる。本明細書提供の教示および案内から判断して、当業者は、所与のポリペプチドについての安定性のより大きな保持が、還元糖よりも、または上に例示した賦形剤のような他のアミノ酸反応性賦形剤よりも、非還元糖を選ぶことによって達成できることを分かっている。最適な賦形剤はまた、本発明の水性製剤についての投与様式に関連して安定化を強化または提供するように選ばれる。例えば、製造、保管および投与の間に製剤の全成分が物理的および化学的安定性を維持する場合に、非経口経路である静脈内（IV）、皮下（SC）または筋肉内（IM）投与がより安全で有効であることができる。当業者は、例えば特別な製造もしくは保管条件または特別な投与様式から判断して、活性型ポリペプチドの最大安定性を維持する1種または複数種の賦形剤を用いることが分かっている。製剤中に使用するための本明細書例示の賦形剤は、これらおよび他の特徴を示す。

【００９５】

本発明の製剤に使用するための賦形剤の量または濃度は、例えば製剤中に含まれるポリペプチドの量、所望の製剤中に含まれる他の賦形剤の量、希釈剤が望ましいまたは必要かどうか、製剤の他の成分の量または体積、製剤内の成分の合計量、ポリペプチドの比活性および達成されるべき所望の張性またはモル浸透圧濃度に応じて変動する。賦形剤濃度についての具体例は、下にさらに例示される。さらに、異なる種類の賦形剤を組み合わせて製剤にすることができる。したがって、本発明の製剤は、1種の賦形剤、2、3、または4種またはそれ以上の異なる種類の賦形剤を含有することができる。賦形剤の組み合わせは、2種以上の異なるポリペプチドを含有する製剤と併用すると特に有用であることができる。賦形剤は、類似または異なる化学的性質を表すことができる。本明細書提供の教示および案内から判断して、当業者は、ポリペプチドの安定性の保持を促進する本発明の製剤を達成するために、どの量またはどの範囲の賦形剤を任意の特別な製剤中に含ませることができるかを分かっている。例えば、本発明の製剤中に含ませるべき塩の量および塩の種類は、最終溶液の所望のモル浸透圧濃度（すなわち等張、低張または高張）ならびに製剤中に入れられるべき他の成分の量およびモル浸透圧濃度に基づき選択することができる。同様に、製剤中に含まれるポリオールまたは糖の種類に関連する例示により、そのような賦形剤の量は、そのモル浸透圧濃度に依存する。約5％のソルビトールを含ませることで等張性を達成することができ、一方で等張性を達成するために約9％のスクロース賦形剤が必要である。本発明の製剤内に含ませることができる1種または複数種の賦形剤の濃度の量または範囲の選択は、塩、ポリオールおよび糖を参照することにより上に例示されている。しかし、当業者は、本明細書において記載され、特定の賦形剤を参照することによりさらに例示された考察が、例えば塩、アミノ酸、他の等張化剤、界面活性剤、安定化剤、増量剤、凍結保護物質、凍結乾燥保護剤、抗酸化剤、金属イオン、キレート剤および／または保存料を含めた賦形剤の全ての種類および組み合わせに等しく適用可能であることを理解している。

【００９６】

賦形剤を、一般的に約1～40％(w/v)の間、約5～35％(w/v)の間、約8～30％(w/v)の間、約8～25％(w/v)の間または約8％(w/v)の濃度範囲で本発明の製剤中に含ませることができ

る。場合によっては、約45％(w/v)、50％(w/v)、または50％(w/v)より大きい程度の高濃度を本発明の製剤に用いることができる。例えば、ある場合に、本発明の高張製剤を産生するために、最大60％(w/v)または75％(w/v)の濃度を含ませることが望ましいことがありうる。所望により使用前に、そのような高張溶液を希釈して等張製剤を産生することができる。他の有用な濃度範囲には、約1～20％の間、特に約2～18％(w/v)の間、より詳細には約4～16％(w/v)の間、なおより詳細には約6～14％(w/v)の間もしくは約8～12％(w/v)の間または約10％(w/v)が含まれる。これらの範囲未満、範囲を超えるまたは範囲の間の賦形剤の濃度および／または量も、本発明の製剤に使用することができる。例えば、約1％(w/v)未満を構成する1種または複数種賦形剤を、製剤中に含ませることができる。同様に、製剤は、約40％(w/v)を超える濃度の1種または複数種の賦形剤を含有することができる。したがって、例えば1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20％(w/v)またはそれ以上（記載の数字を含む）を含めた、本質的に任意の所望の濃度または量の1種または複数種の賦形剤を含有する本発明の製剤を産生することができる。

【００９７】

本発明の製剤の緩衝液成分は、1種または複数種の賦形剤を含むことができる。前記のように、含まれる賦形剤の1つの役割は、製造、輸送および保管の間に起こる可能性があるストレスに対するポリペプチドの安定化を提供することである。この役割を達成するために、少なくとも1種の賦形剤は、緩衝液、安定化剤、等張化剤、増量剤、界面活性剤、凍結保護物質、凍結乾燥保護剤、抗酸化剤、金属イオン源、キレート剤および／または保存料として機能することができる。加えて、少なくとも1種の賦形剤はまた、希釈剤および／もしくは媒体として機能することができ、または高濃度製剤の送達を可能にし、かつ／もしくは患者の便益を高めるために、高濃度製剤における粘度を低下させるために用いることができる。同様に、少なくとも1種の賦形剤は、追加的に、本発明の製剤に1つよりも多くの上記機能を与えることができる。あるいは、1つよりも多くの上記または他の機能を遂行するために、本発明の製剤に2種以上の賦形剤を含ませることができる。例えば、製剤のモル浸透圧濃度を変更、調整または最適化するために、賦形剤を本発明の製剤中の成分として含ませることによって、張性調節剤（tonicifier）として作用することができる。同様に、モル浸透圧濃度を調整することおよび凝集を制御することの両方のために、張性剤および界面活性剤の両方を本発明の製剤中に含ませることができる。賦形剤、それらの使用、製剤および特徴は、当技術分野において周知であり、例えばWang W., Int. J. Pharm. 185:129-88 (1999)およびWang W., Int. J. Pharm. 203:1-60 (2000)に記載されているのを見出すことができる。

【００９８】

液体製剤中に入れられた等張化剤および／または安定化剤は、例えば、製剤が投与に適するように、製剤に等張性、低張性または高張性を提供するために使用することができる。そのような賦形剤はまた、例えば、ポリペプチドの構造の維持を促進し、かつ／または静電的な溶液のタンパク質-タンパク質相互作用を最小限にするために使用することができる。等張化剤および／または安定化剤の具体例には、ポリオール、塩および／またはアミノ酸が含まれる。凍結乾燥製剤中に入れられる等張化剤および／または安定化剤を、例えば、凍結ストレスからポリペプチドを守るための凍結保護物質として、または凍結乾燥状態のポリペプチドを安定化するための凍結乾燥保護剤として使用することができる。そのような凍結保護剤および凍結乾燥保護剤の具体例には、ポリオール、糖およびポリマーが含まれる。

【００９９】

本明細書において使用される「界面活性剤」という用語は、それが溶解される液体の表面張力を低下させるように機能する物質を意味することが意図される。界面活性剤は、例えば、液体製剤中の凝集、粒子形成および／もしくは表面吸着を防止もしくは制御すること、または凍結乾燥製剤中の凍結乾燥および／もしくは再構成工程の間のこれらの現象を防止もしくは制御することを含めた多様な目的で、製剤中に含ませることができる。界面

活性剤には、例えば有機溶媒および水溶液の両方に部分溶解性を示す両親媒性有機化合物が含まれる。界面活性剤の一般的な特徴には、それらが水の表面張力を減少させる、油と水との間の界面張力を減少させる、およびミセルを形成する能力も含まれる。本発明の界面活性剤には、非イオン性およびイオン性界面活性剤が含まれる。界面活性剤は、当技術分野において周知であり、例えばRandolph T. W. and Jones L. S., Surfactant-protein interactions. Pharm Biotechnol. 13:159-75 (2002)に記載されているのを見出すことができる。簡潔には、非イオン性界面活性剤には、例えばアルキルポリ（エチレンオキシド）、オクチルグルコシドのようなアルキルポリグルコシドおよびデシルマルトシド、セチルアルコールおよびオレイルアルコール、コカミドMEA、コカミドDEA、およびコカミドTEAのような脂肪アルコールが含まれる。非イオン性界面活性剤の具体例には、例えばポリソルベート20、ポリソルベート28、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート65、ポリソルベート80、ポリソルベート81、ポリソルベート85などを含めたポリソルベート；例えばポロキサルコルまたはポリ（エチレンオキシド）-ポリプロピレンオキシドとしても公知のポロキサマー188、ポロキサマー407またはポリエチレン-ポリプロピレングリコールなどを含めたポロキサマー、およびポリエチレングリコール(PEG）が含まれる。ポリソルベート20は、TWEEN 20、ソルビタンラウリン酸モノエステルおよびポリオキシエチレンソルビタンラウリン酸モノエステルと同義である。

【０１００】

本発明の製剤に含ませるために最適な界面活性剤は、例えば、凝集および／または吸着を防止または減少させることによってポリペプチドの安定性の保持を高めるまたは促進するように選ぶことができる。例えば、ポリソルベートのようなソルビタン脂肪酸エステルは、広範囲の親水性特徴および乳化特徴を示す界面活性剤である。それらを個別にまたは他の界面活性剤と組み合わせて使用して、広範囲の安定化の必要性に対応することができる。そのような特徴は、特にポリペプチドでの使用に適しているが、その理由は、ポリペプチドの広範囲の疎水性特徴および親水性特徴に対応するようにそれらを合わせることができるからである。界面活性剤を選択するための考察には、概して賦形剤に関連して前に記載されたもの、および界面活性剤の疎水性および臨界ミセル濃度が含まれる。本明細書において例示された界面活性剤および当技術分野において周知の他多数を本発明の製剤に使用することができる。

【０１０１】

本発明の製剤についての界面活性剤の濃度範囲には、概して賦形剤に関連して前に記載された濃度範囲が含まれ、特に有用な濃度は、約1%(w/v)未満である。この点で、界面活性剤の濃度は、一般的に約0.0001～0.10%(w/v)の間、特に約0.002～0.05%(w/v)の間、より詳細には約0.003～0.01%(w/v)の間、なおより詳細には約0.004～0.008%(w/v)の間、または約0.005～0.006%(w/v)の間の範囲で使用することができる。これらの範囲未満、範囲を超える、または範囲の間の界面活性剤の濃度および／または量も、本発明の製剤に使用することができる。例えば、約0.001%(w/v)未満を構成する1種または複数種の界面活性剤を製剤中に含ませることができる。同様に、製剤は、約0.10%(w/v)を超える濃度の1種または複数種の界面活性剤を含有することができる。したがって、例えば0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.010、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09または0.10%(w/v)またはそれ以上（記載の数字を含む）を含めた、本質的に任意の所望の濃度または量の1種または複数種の界面活性剤を含有する本発明の製剤を産生することができる。本発明の製剤中の賦形剤として有用な様々な界面活性剤が、以前に記載されている。本発明の液体製剤または凍結乾燥製剤のいずれかに有用な他の界面活性剤には、例えば、ラウリン酸（C12）、パルミチン酸（C16）、ステアリン酸（C18）のエステル、マクロゴールセトステアリルエーテル、マクロゴールラウリルエーテル、マクロゴールオレイルエーテル、マクロゴールオレエート、マクロゴールステアレート、マクロゴールグリセロールリシノレエート、マクロゴールグリセロールヒドロキシステアレートのような糖エステル；オクチルグルコシドおよびデシルマルトシドのようなアルキルポリグルコシド；セチルアルコールおよびオレイルアルコールのような

脂肪アルコール、ならびにコカミドMEA、DEA、TEAのようなコカミド、他の非イオン性界面活性剤および他のイオン性界面活性剤が含まれる。

【０１０２】

本発明の液体製剤を含めた本発明の製剤の安定性は、製剤内でのポリペプチドの構造および／または機能の保持を指す。本発明の製剤中のポリペプチドは、安定性または機能に影響する変化または悪化に対する抵抗性のような特質を示し、それゆえ経時的に一貫した機能的特徴を維持する。

【０１０３】

本発明の製剤の緩衝液成分は、賦形剤として1種または複数種の界面活性剤も含むことができる。前記のように、本発明の製剤中の界面活性剤の1つの役割は、表面誘発分解のような凝集および／または吸着を防止または最小化することである。十分な濃度、一般的におよそ界面活性剤の臨界ミセル濃度で、界面活性剤分子の表層は、タンパク質分子が界面で吸着するのを防止するために役立つ。それによって表面誘発分解が最小化される。界面活性剤、それらの使用、製剤化および製剤化のための特徴は、当技術分野において周知であり、例えばRandolph and Jones、前記、(2002)に記載されているのを見出すことができる。

【０１０４】

別の態様では、本発明の製剤内のポリペプチドの安定性には、例えば物理および／または化学安定性の保持が含まれる。ポリペプチドの安定性は、例えば、ポリペプチドがその構造の化学的改変を含めた前記の経路のような物理的分解および／または化学的分解経路に供されたかどうかを決定することによって評価することができる。本発明の製剤中のポリペプチドの安定性の保持には、例えば、最初の時点でのポリペプチドの安定性に比べた、またはより低い温度、例えばセ氏-70度に保たれた同一の対照と比較した、約80～100％、85～99％、90～98％、92～96％または94～95％の間の物理的または化学的安定性の保持が含まれる。したがって、本発明の製剤内のポリペプチドの安定性には、最初の時点でのポリペプチドの安定性に比べた、またはより低い温度、例えばセ氏-70度に保たれた同一の対照と比較した、99.5％よりも大きい、少なくとも約99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％または80％の安定性の保持が含まれる（記載の数字を含む）。

【０１０５】

さらなる一態様では、本発明の製剤内のポリペプチドの安定性には、例えば活性の保持が含まれる。ポリペプチドの活性は、例えば、ポリペプチドの機能を指し示すインビトロアッセイ、インビボアッセイおよび／またはインサイチューアッセイを使用して評価することができる。本発明の製剤中のポリペプチドの安定性の保持には、例えば、アッセイの変動性に応じて約50～100％以上の間の活性の保持が含まれる。例えば、安定性における保持は、最初の時点でのポリペプチドの活性に比べた約60～90％または70～80％の間の活性の保持を含むことができる。したがって、本発明の製剤内のポリペプチドの安定性は、少なくとも約50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％または100％の活性の保持を含み、かつ、最初の時点でのポリペプチドの活性に比べて100％よりも大きい、例えば105％、110％、115％、120％、125％または150％またはそれより大きい活性測定値を含むことができる（記載の数字を含む）。一般的に、最初の時点は、ポリペプチドが最初に本発明の製剤として調製されるまたは最初に品質検査される（すなわち発売規格を満たす）時間であるように選択される。最初の時点は、ポリペプチドが本発明の製剤に再製剤化される時間も含むことができる。再製剤化は、例えば、最初の調製よりも高い濃度、より低い濃度、または同じ濃度であることができる。

【０１０６】

本発明の製剤は、参照溶液または流体（すなわち血清）と等張であるように調製することができる。等張溶液は、その中にその周りのものに比べて実質的に類似量の溶解済み溶質を有することにより、浸透圧的に安定である。一定の溶液または流体と明白に比較されない限り、等張または等張性は、ヒト血清（例えば300mOsmol/kg）を参照することにより

本明細書において例示的に使用される。したがって、本発明の等張製剤は、実質的に類似の濃度の溶質を含有し、またはヒト血液と実質的に類似の浸透圧を示す。概して、等張溶液は、ヒトおよび多くの他の哺乳類について生理食塩水とおよそ同じ濃度の溶質を含有し、それは、水溶液中に約0.9重量パーセント（0.009g/ml）の塩（例えば0.009g/ml NaCl）である。本発明の製剤は、低張または高張溶液調剤も含むことができる。

【０１０７】

最適な薬学的組成物は、例えば意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に応じて当業者により決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、前記を参照されたい。そのような組成物は、ポリペプチドの物理的状態、安定性、インビボ放出速度、およびインビボクリアランス速度に影響し得る。例えば、適切な組成物は、注射用水、非経口投与用の生理食塩水溶液であり得る。イオン性界面活性剤には、例えば陰イオン性、陽イオン性および両性イオン性界面活性剤が含まれる。陰イオン性界面活性剤には、例えばセッケン、脂肪酸塩、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ラウリル硫酸アンモニウムおよび他のアルキル硫酸塩のようなスルホン酸塩系またはカルボン酸塩系界面活性剤が含まれる。陽イオン性界面活性剤には、例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）、他のアルキルトリメチルアンモニウム塩のような四級アンモニウム系界面活性剤、塩化セチルピリジニウム、ポリエトキシル化獣脂アミン（POEA）およびベンザルコニウム塩化物が含まれる。両性イオン性または両性界面活性剤には、例えば、ドデシルベタイン、ドデシルジメチルアミンオキシド、コカミドプロピルベタインおよびココアンフォグリシネート（coco ampho glycinate）が含まれる。

【０１０８】

薬学的組成物中の一次媒体または担体は、事実上、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切な媒体または担体は、おそらくは、非経口投与用組成物中に一般的な他の物質を補充された、注射用水、生理食塩水溶液または人工脳脊髄液であり得る。中性緩衝食塩水または血清アルブミンと混合された食塩水は、さらなる例示的な媒体である。他の例示的な薬学的組成物は、トリス緩衝液、または酢酸塩緩衝液を含み、それらは、ソルビトールまたはその適切な代替品をさらに含み得る。一態様では、組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を、任意の製剤化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences、前記）と混合することによって、保存のために凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で調製され得る。さらに治療用組成物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化され得る。

【０１０９】

製剤を、多様な方法で、例えば吸入療法により、経口的にまたは注射により送達することができる。非経口投与が予想される場合、治療用組成物は、薬学的に許容される媒体中に所望のポリペプチドを含む、無発熱物質の非経口的に許容される水溶液の形態であり得る。非経口注射に特に適する媒体は、無菌蒸留水であり、その中にポリペプチドが適正に保存された無菌等張溶液として製剤化される。なお別の調製は、製品の制御放出または持続放出に備える注射用マイクロスフェア、生体分解可能な粒子、ポリマー性化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、ビーズ、またはリポソームのような薬剤を用いた所望の分子の製剤化を伴うことができ、それは、次に蓄積注射により送達され得る。ヒアルロン酸も使用される場合があり、これは、循環における持続期間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入に適した他の手段には、植え込み可能な薬物送達装置が含まれる。

【０１１０】

別の局面では、注射投与に適した薬学的製剤は、水溶液、好ましくは生理学的に適合する緩衝液、例えばハンクス液、リンゲル液、または生理学的緩衝食塩水の中に製剤化され得る。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランのような懸濁液の粘度を増加させる物質を含有し得る。追加的に、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射用懸濁液として調製され得る。適切な親油性溶媒または媒体には、ゴマ油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルのような合成脂肪酸エステル、トリグリセリド、またはリポソームが含まれる。非脂質ポリカチオン性アミノポリマ

ーも送達のために使用され得る。任意で懸濁液はまた、適切な安定化剤または化合物の溶解性を増加させる薬剤も含有する場合があり、高濃縮溶液の調製を可能にする場合がある。別の態様では、薬学的組成物は、吸入用に製剤化され得る。吸入溶液はまた、エアロゾル送達用の噴射剤と共に製剤化され得る。なお別の態様では、溶液は噴霧され得る。肺内投与は、化学的に改変されたタンパク質の肺内送達を記載しているPCT出願番号PCT/US94/001875にさらに記載されている。

【０１１１】

一部の局面では、タンパク質は、タンパク質を50～100、60～80、65～75、60～70、70～80、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、もしくは80mg/mL、リン酸カリウム緩衝液を1～30、5～20、5～10、10～20、15～20、1～5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、19、20もしくは20mMよりも多く、スクロースを1～10、5～10、5、5、6、7、8、8.8、9、10未満もしくは10％(w/v)よりも多く、および／またはポリソルベート20を0.006未満、0.006、もしくは0.006％(w/v)よりも多く、pHを4～12、5～6、5～7、6～7、5、6、6.7、7、もしくは8含有する無菌水溶液として製剤化することができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、タンパク質は、タンパク質、リン酸カリウム緩衝液、スクロース、および／またはポリソルベート20を含有する無菌水溶液として製剤化することができる。一部の局面では、タンパク質は、リン酸カリウム緩衝液、スクロース、および／またはポリソルベート20を用いて製剤化することができる。一部の局面では、タンパク質は、IV投与用に製剤化することができる。一部の局面では、タンパク質は、中性pHで製剤化することができる。一部の局面では、タンパク質は、pH約4～12、5～6、5～7、6～7、5、6、6.7、7、または8で製剤化することができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、本明細書記載のタンパク質は、例えば非天然賦形剤のような非天然成分を用いて製剤化することができる。

【０１１２】

特定の製剤が経口投与され得ることも予想される。一態様では、この方式で投与される分子は、錠剤およびカプセル剤のような固体投薬形態の調剤に習慣的に使用される担体を用いてまたは用いずに製剤化することができる。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティーが最大化され、かつ全身循環前の分解が最小化される場合に、消化管における箇所で製剤の活性部分を放出するように設計され得る。治療用分子の吸収を促進するために、追加的な薬剤を含ませることができる。希釈剤、香味料、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および結合剤も用いられ得る。経口投与用の薬学的組成物も、経口投与に適した投薬量で、当技術分野において周知の薬学的に許容される担体を使用して製剤化することができる。そのような担体は、薬学的組成物を、患者による経口摂取用の錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー、懸濁剤などとして製剤化できるようにする。

【０１１３】

経口用薬学的調製物は、活性化合物を固体賦形剤と組み合わせ、結果として生じた顆粒混合物（任意で粉砕の後）を処理して、錠剤または糖衣丸の中核を得ることにより得ることができる。所望であれば、適切な補助物質を添加することができる。適切な賦形剤には、炭水化物またはタンパク質充填剤、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、およびソルビトールを含めた糖；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを含めたゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質が含まれる。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、およびアルギン酸またはアルギン酸ナトリウムのようなその塩のような崩壊剤または可溶化剤が添加され得る。

【０１１４】

糖衣丸の中核は、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール（carbopol）ゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物も含有し得る濃縮糖溶液のような適切なコーティ

ング剤と共に使用され得る。製品の特定のために、または活性化合物の量、すなわち投薬量を特徴付けるために、錠剤または糖衣丸のコーティング剤に染料または色素を添加し得る。

【０１１５】

経口使用できる薬学的調製物は、ゼラチン製押し込み型カプセルに加えてゼラチン製密封軟カプセルおよびグリセロールまたはソルビトールのようなコーティングも含む。押し込み型カプセルは、ラクトースまたはデンプンのような充填剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤、および任意で安定化剤と混合された活性成分を含有することができる。軟カプセルでは、活性化合物は、安定化剤と共にまたは安定化剤なしに、脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体中に溶解または懸濁され得る。

【０１１６】

徐放または制御送達製剤中にポリペプチドを含む製剤を含めた、追加的な薬学的組成物は、当業者に明らかである。リポソーム担体、生体分解可能な微粒子または多孔質ビーズおよび蓄積注射のような多様な他の徐放送達手段または制御送達手段を製剤化するための技法も、当業者に公知である。例えば、薬学的組成物の送達のための多孔質ポリマー性微粒子の制御放出を記載しているPCT/US93/00829を参照されたい。徐放調製物の追加的な例には、造形品の形態の半透性ポリマーマトリックス、例えばフィルムまたはマイクロカプセルが含まれる。徐放マトリックスには、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸とガンマ-エチル-L-グルタミン酸とのコポリマー（Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); Langer et al., Chem. Tech.,12:98-105(1982)）、エチレンビニルアセテート（Langer et al.、前記）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（EP133,988）が含まれ得る。徐放組成物には、当技術分野において公知のいくつかの方法のいずれかによって調製できるリポソームも含まれる。例えば、Eppstein et al., PNAS (USA), 82:3688 (1985); EP36,676; EP88,046; EP143,949を参照されたい。

【０１１７】

インビボ投与のために使用されるべき薬学的組成物は、典型的には無菌でなければならない。これは、無菌濾過メンブレンを通した濾過により達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行われ得る。非経口投与用組成物は、凍結乾燥形態でまたは溶液の状態で保管され得る。加えて非経口組成物は、一般的に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針により刺通することができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアル中に入れられる。

【０１１８】

薬学的組成物が製剤化された後、それは、溶液、懸濁液、ゲル、乳剤、固体、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として無菌バイアル中に保管され得る。そのような製剤は、すぐに使える形態または投与前に再構成を要する（例えば凍結乾燥）形態のいずれかで保管され得る。

【０１１９】

具体的な一態様では、用量投与ユニットを産生するためのキットが提供される。キットは、それぞれ、乾燥されたタンパク質を有する第1の容器および水性製剤を有する第2の容器の両方を内蔵し得る。単一区画および多区画の充填済みシリンジ（例えば液体シリンジおよびリオシリンジ（lyosyringe））を内蔵するキットも、本発明の範囲内に含まれる。

【０１２０】

治療的に用いられる薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の状況および目標に依存する。したがって、当業者は、処置に適した投薬量レベルが、送達される分子、ポリペプチドが使用されている適応、投与経路、患者のサイズ（体重、体表面または臓器のサイズ）および状態（年齢および全身の健康状態）に部分的に依存して変動することを認識してい

る。したがって、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を用量設定し、投与経路を改変し得る。典型的な投薬量は、上に言及された要因に応じて、約0.1mg/kgから最大約100mg/kgまでまたはそれ以上の範囲であり得る。ポリペプチド組成物は、好ましくは静脈内（IV）に注射または投与され得る。長時間作用性薬学的組成物は、特別な製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて、3～4日毎、1週間毎、または2週間毎に投与され得る。投薬頻度は、使用される製剤中のポリペプチドの薬物動態パラメーターに依存する。典型的には、組成物は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで投与される。したがって、組成物は、経時的に1回量、もしくは複数回量として（同じまたは異なる濃度の投薬量で）、または連続注入として投与され得る。さらに、適切な投薬量の精密化は、日常的に行われる。適切な投薬量は、適切な用量-反応データの使用により確認され得る。

【０１２１】

本明細書記載のタンパク質およびポリペプチド用の投薬量は、0.1～10、0.1～5、0.25～5、0.25～3、1～3、0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1、2、3、4、5または5mg/kgより大きくあることができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、各投薬量は、1～10、2～8、2～5、1～4、1、1、2、3、4、5、6、7、8週間未満毎に、または8週間より多い間隔毎に投与することができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、各投薬量を、1～10、2～8、2～5、1～4、1、1、2、3、4、5、6、7日未満毎に投与することができる（記載の数字を含む）。一部の局面では、各投薬量は、IV投与される。

【０１２２】

薬学的組成物の投与経路は、公知の方法、例えば経口的、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内経路、髄内、クモ膜下腔内、心室内、経皮、皮下、もしくは腹腔内による注射を経由する；鼻腔内、経腸、局所、舌下、尿道、膣、もしくは直腸手段による、徐放システムによる、または植込装置による。所望の場合、組成物は、ボーラス注射により、または注入もしくは植込装置により連続的に投与され得る。代替的または追加的に、組成物は、上に所望の分子が吸収または封入されているメンブレン、スポンジ、または別の適切な材料の植え込みを介して局所的に投与され得る。植込装置が使用される場合、装置は、任意の適切な組織または臓器中に植え込まれ得、所望の分子の送達は、拡散、持続放出（timed-release）ボーラス、または連続投与であり得る。

【０１２３】

一部の例では、svActRIIBポリペプチドを発現および分泌するように本明細書記載の方法のような方法を使用して遺伝的に操作された特定の細胞を植え込むことによって、該ポリペプチドを送達することができる。そのような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、かつ自己、異形、または異種であり得る。任意で、細胞は不死化されている場合がある。免疫応答の機会を減少させるために、細胞を封入して周辺組織の浸潤が回避され得る。封入材料は、典型的には、ポリペプチド産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるまたは周辺組織から他の有害因子による細胞破壊を防止する、生体適合性半透ポリマー性エンクロージャーまたはメンブレンである。

【０１２４】

svActRIIBまたはsvActRIIBの誘導体をコードする核酸分子が対象に直接導入されるインビボsvActRIIB遺伝子療法も構想されている。例えば、svActRIIBをコードする核酸配列が、アデノ随伴ウイルスベクターのような適切な送達ベクターを用いるまたは用いない核酸構築物の局所注射により目標細胞に導入される。代替的なウイルスベクターには、非限定的に、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスおよびパピローマウイルスウイルスベクターが含まれる。ウイルスベクターの物理的移入は、所望の核酸構築物または所望の核酸配列を含む他の適切な送達ベクターの局所注射、リポソーム介在性移入、直接注射（ネイキッドDNA）、または微粒子銃（遺伝子銃）によりインビボで達成され得る。

【０１２５】

本開示の組成物は、例えばそれらの治療効果を増強するためまたは潜在的な副作用を減少させるために、単独でまたは他の治療剤と組み合わせて使用され得る。一部の局面では、ドキソルビシンを組み合わせて投与することができる。一部の局面では、ドキソルビシンは、リポソームドキソルビシンである。一部の局面では、ドキソルビシンは、40mg/m^2で与えられる。一部の局面では、ドキソルビシンは、5～200、10～150、25～100、30～50、35～45、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、または150 mg/m^2で与えられる（記載の数字を含む）。

【０１２６】

本発明の製剤は、製剤中にポリペプチドの組み合わせも含むことができる。例えば、本発明の製剤は、1つまたは複数の状態の処置のためのポリペプチドを含むことができる。本発明の製剤は、2種以上の異なるポリペプチドも含むことができる。本発明の製剤中への複数種のポリペプチドの使用は、例えば同じまたは異なる適応症を対象とすることができる。同様に、複数種のポリペプチドを本発明の製剤中に使用して、例えば一次処置により引き起こされる病態および1つまたは複数の副作用の両方を処置することができる。例えば同時処置および病態の進行の監視を含めた異なる医学的目的を達成するために、複数種のポリペプチドを本発明の製剤中に含ませることもできる。1つの製剤が示唆された一部または全ての処置および／または診断に十分であることができるので、上に例示されたような複数の同時療法および当技術分野において周知の他の組み合わせは、患者の服薬遵守に特に有用である。当業者は、多種多様な組み合わせ療法のために混合できるポリペプチドを分かっている。同様に、本発明の製剤は、小分子医薬品および1種または複数種の小分子医薬品と一緒になった1種または複数種のポリペプチドの組み合わせと共に使用することもできる。したがって、本発明は、1～10、2～5、1、2、3、4、5または6種またはそれ以上の異なるポリペプチドを含有する本発明の製剤および1種または複数種の小分子医薬と組み合わせた1種または複数種のポリペプチドを提供する。

【０１２７】

本発明の製剤は、当技術分野において周知の1種または複数種の保存料および／または添加剤も含むことができる。同様に、本発明の製剤を、任意の様々な公知の送達製剤にさらに製剤化することができる。例えば、本発明の製剤は、滑沢剤、乳化剤、懸濁化剤、ヒドロキシ安息香酸メチルおよびヒドロキシ安息香酸プロピルのような保存料、甘味剤および香味剤を含むことができる。そのような任意の成分、それらの化学的および機能的特徴は、当技術分野において周知である。同様に当技術分野において周知であるものは、投与後にポリペプチドの急速放出、徐放または遅延放出を促進する製剤である。当技術分野において周知のこれらまたは他の製剤成分を含むように、本発明の製剤を産生することができる。

【０１２８】

本発明の製剤は、例えば水性液体以外の状態で産生することもできる。例えば凍結乾燥製剤として。凍結乾燥製剤は、一般的に、例えば増量剤または粘結剤（caking agent）および無定形安定化剤を含有する。

【０１２９】

本発明の製剤が本明細書記載のように調製された後、製剤中に含有される1種または複数種のポリペプチドの安定性を、当技術分野において周知の方法を使用して評価することができる。そのような方法のいくつかは、さらに下の実施例に例示され、それには、サイズ排除クロマトグラフィーおよび粒子の計数が含まれる。例えば結合活性、他の生化学活性および／または生理活性を含めた任意の多様な機能アッセイを2つ以上の異なる時点で評価して、本発明の緩衝製剤中のポリペプチドの安定性を決定することができる。

【０１３０】

本発明の製剤は、医薬規格に従って、かつ医薬等級の試薬を使用して調製される。同様に、本発明の製剤は、概して、無菌試薬を使用して無菌製造環境中で調製され、または調製後に滅菌される。無菌注射用溶液は、当技術分野において周知の手順を使用して調製することができる。例えば、所要量の1種または複数種のポリペプチドを、本明細書記載の

製剤成分の1種または組み合わせと共に酢酸、グルタミン酸もしくはコハク酸緩衝液または本発明の賦形剤中に組み入れ、続いて無菌マイクロ濾過を行うことによって調製することができる。無菌注射用溶液の調製用の無菌粉末の具体的な態様では、特に有用な調製方法には、例えば、前記のような真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）が含まれる。そのような乾燥方法により、以前に無菌濾過されたその溶液から任意の追加的な所望の成分と一緒に1種または複数種のポリペプチドの粉末が得られる。

【０１３１】

キット

本明細書開示のタンパク質を含むバイアルおよび使用説明書を含むキットも、本明細書において記載されている。タンパク質は、本明細書記載の任意の適切な薬学的組成物、例えばIV注入に適した液体懸濁剤の状態であることができる。あるいは、タンパク質は、使用前に再懸濁するために適した凍結乾燥状態であることができる。使用説明書は、保管説明書、患者の選択、投薬量、投与方法、使用期間、臨床評価項目などを含むことができる。一部の局面では、説明書は、本明細書開示の方法を行うための説明書を含む。

【０１３２】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに他のことを指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【実施例】

【０１３３】

具体的な態様の実施例を下に示す。これらの実施例は、例証のためだけに提供されるのであって、本発明の範囲をいかなる方法でも限定すると意図されない。使用される数（例えば量、温度など）に関して正確さを確保するよう努力してきたが、当然いくらかの実験誤差および偏差が許容されるべきである。

【０１３４】

特に指し示さない限り、本発明の実施は、当業者の技能の範囲内のタンパク質化学、生化学、組み換えDNA技法および薬理学の従来法を用いることができる。そのような技法は、文献に十分に説明されている。例えば、T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992)を参照されたい。

【０１３５】

実施例1：STM434の発現および精製

細胞培養工程

STM434原薬を無血清CS9チャイニーズハムスター卵巣細胞系により発現させた。STM434の配列をSEQ ID NO:10に示すが、その際、STM434は、SEQ ID NO:10に示される配列のホモ二量体である。

【０１３６】

STM434を発現するマスターセルバンク（MCB）の作出をAMG 434 MCBと命名した。種培養および細胞培養産生は、動物由来原材料を有さない化学的に定義された培地を利用する。工程管理を含めた細胞培養工程の詳細を下に説明し、図1に工程を図示する。特定のパラメータには、プロテインA HPLCにより決定された産物濃度、混入MMV DNAを検出するためのQ PCR、細菌エンドトキシン、マイコプラズマ、外来性ウイルス、および合計好気性微生物数が含まれる。加えて、2つのロットを以前に製造したが（Lot 0010039909および0010039910）、それらを、CMC Biologicsによって製剤化バルク原薬（Lot 13-0066および13-0067）にさらに加工した。

【０１３７】
解凍および初回増殖（ステージN-7～N-4）
AMG 434 MCBのバイアルを1本解凍し、その内容物を、36.0±1.0℃に予温した、300nMメトトレキサート（MTX）および100μg/Lインスリン様増殖因子1（IGF-1）を含有する成長培地IMX5.0(59±1mL)を収容する250mL振盪フラスコに移した。次に、接種後の振盪フラスコを、ベント型キャップを使用して5%CO_2雰囲気中にて36.0±1.0℃でインキュベートし、155±5毎分回転数（rpm）の間で72±12時間撹拌した。図1に定義されたように細胞培養物を分析した後、細胞培養物の一部を500mL振盪フラスコの中の予温した成長培地に接種して目標体積120mLおよび目標密度4×10^5個/mLにした。振盪フラスコを上記と同じ条件で72±12時間インキュベートした。細胞培養物を分析した後、細胞培養物の一部を1L振盪フラスコの中の予温した成長培地に接種して目標体積240mLおよび目標密度4×10^5個/mLにし、振盪フラスコを上記と同じ条件で72±12時間インキュベートした。

【０１３８】
1Lフラスコからの細胞培養物を分析した後、この細胞培養物を使用して、予温した成長培地を収容する2L振盪フラスコ2個に、それぞれ目標体積600mLおよび目標密度4×10^5個/mLで接種した。両方の振盪フラスコを、ベント型キャップを使用して5%CO_2雰囲気中にて36.0±1.0℃でインキュベートし、150～160rpmで72±12時間撹拌した。2Lフラスコのインキュベーションが完了したとき、各フラスコからの試料を分析し（図1）、その後、2つのフラスコの内容物を合わせた。合わせたプールの細胞密度を測定し、次にプールを10Lガラス継代容器の中の予温した成長培地中に接種して目標5Lおよび目標密度4×10^5個/mLにした。プールした時間から90分未満で開始する次の工程段階の前に、この培養物を90±5rpmで混合し続けた。

【０１３９】
中間シードトレイン（ステージN-3～N-1）
N-3中間シードトレインステージは、50L Waveバイオリアクターバッグ（GE Healthcare）の中で実行した。Waveバッグを膨らませた後、プール細胞培養物5Lをバッグ内に移した。表1に挙げた条件でインキュベーションを開始した。試料を毎日抜き取り、図1記載のように分析した。3日目に生細胞密度および生存パーセント（それぞれ最小1.6×10^6個/mLおよび90%）を評価した後、300nM MTXおよび100μg/L IGF-1を含有する成長培地IMX5.0を、Opticap XL03無菌フィルター（Millipore）を通してWaveバッグ中に移行させ、細胞密度4×10^5個/mLを達成した。このボーラス流加後の合計細胞培養体積は、概して20～25Lであった。インキュベーションを同じ条件で（表1）さらに3日間継続し、図1記載のように試料を分析用に毎日採取した。回収前に、生細胞密度および生存率は、それぞれ1.6×10^6個/mLおよび90%以上という基準を満たすと予想される。

【０１４０】
（表１）50L Waveバイオリアクターの工程パラメーター

パラメーター	設定ポイント
Waveバッグの容量	50 L
細胞培養物の体積	5 L
温度	36.0°C
ロッカー速度	22 rpm
ロッカー角度	7°
CO_2 オーバーレイ	毎分0.3リットル（LPM）で5%

【０１４１】
第2および第3中間シードトレインステージ（N-2およびN-1）を、それぞれ60Lおよび300Lバイオリアクター中で行った。増殖培地（100μg/L IGF-1含有およびMTX不含のIMX5.0）45.0±1.0Lを移した後、バイオリアクターを表2記載のパラメーターに設定した。次に、出発細胞密度4×10^5個/mLを達成するために必要な最終的なWaveバッグ細胞培養物の±3%の範囲内の体積をバイオリアクターに接種した。60Lバイオリアクターの内容物を、表2記載の条件に従って3日間インキュベートした。図1記載のように試料を分析用に毎日採取し

た。インキュベーションの間、pH制御のために1.0M炭酸ナトリウムを自動的に添加した。回収前に、生細胞密度および生存率は、それぞれ2.0×10^6個/mLおよび90％以上の基準を満たすと予想される。

【０１４２】

（表２）60Lバイオリアクターの工程パラメーター

パラメーター	設定ポイント	範囲
温度	36.0°C	35.0-37.0°C
撹拌	83 rpm	78-88 rpm
圧力	2.0 psig	1.0-3.0 psig
pH	7.00	6.90–7.10
溶存酸素 (DO)	48.0 mmHg	28.0-220.0 mmHg

【０１４３】

60Lバイオリアクターのインキュベーションが完了した後、300Lバイオリアクター中に増殖培地245.0±2.0Lを移し、バイオリアクターを表3記載のパラメーターに定めることによってバイオリアクターを接種用に準備した。次に、出発細胞密度4×10^5個/mLを達成するために必要な最終的な60Lバイオリアクター培養物の±3％の範囲内の体積をバイオリアクターに接種した。300Lバイオリアクターの内容物を、表3記載の条件に従って3日間インキュベートした。図1記載のように試料を分析用に毎日採取した。インキュベーションの間、pH制御のために1.0M炭酸ナトリウムを自動的に添加した。回収前に、生細胞密度および生存率は、それぞれ2.3×10^6個/mLおよび90％以上の基準を満たすと予想される。

【０１４４】

（表３）300Lバイオリアクターの工程パラメーター

パラメーター	設定ポイント	範囲
温度	36.0°C	35.0-37.0°C
撹拌	80 rpm	75-85 rpm
圧力	2.0 psig	1.0-3.0 psig
pH	7.00	6.90–7.10
DO	48.0 mmHg	28.0-220.0 mmHg

【０１４５】

生産用バイオリアクター

STM434の上流の処理における最終的な生産用バイオリアクターは、公称容量2000Lを有する。この生産ステージを開始するために、慣例的な成分を含み、その配合表が表4に見出される化学的に定義された培地である生産用培地ABM025-004 1100.0±5.0Lをバイオリアクターに仕込んだ。次に、バイオリアクターを表5に定義されるパラメーターに定めて接種の準備をした。次に、出発細胞密度5×10^5個/mLを達成するために必要な最終的な300Lバイオリアクター培養物の±3％の範囲内の体積をバイオリアクターに接種した。2000Lバイオリアクターの内容物を、表5記載の条件に従って11日間インキュベートした。インキュベーションの間、pH制御のために1.0M炭酸ナトリウムを自動的に添加した。生産用バイオリアクター運転の3、6、および8日目に、初回培養物の8％で生産用培地AFM028-001（表4）のボーラス流加を行った。バイオリアクターに消泡剤として毎日1％シメチコン溶液を添加した（100グラムの量で）。図1記載のように、AFM028-001のボーラス流加の前後の試料を含めて、試料を分析用に毎日採取した。グルコース濃度が4.0g/L未満に低下した場合、50％グルコース溶液を添加してバイオリアクター中の濃度を8g/Lにした。この工程段階のための工程内検査を表13に記載する。

【０１４６】

（表４）生産用バイオリアクターの培地の配合表

生産用培地	成分	濃度
ABM0025-004 (目標 pH: 6.9 ± 0.1)	WFI	QS
	ABM025 (慣例的な培地)	11.04 g/L
	ASM003 (慣例的な培地)	7.68 g/L
	L-チロシン二ナトリウム二水和物	1.15 g/L
	L-グルタミン	1.25 g/L
	重炭酸ナトリウム	1.2 g/L
	塩化ナトリウム	1.0 N/A
	塩化カリウム	1.0 g/L
	デキストロース	5.5 g/L
	スペルミン四塩酸塩 (100 mM)	100.0 µL/L
	10 N 水酸化ナトリウム	550.0 µL/L
	6 N 塩酸	必要に応じて
	IGF-1 (1 mg/mL) [濾過前に添加]	100.0 µL/L
AFM028-001 (目標 pH: 6.8 ± 0.1)	WFI	QS
	AFM023 (慣例的な培地)	11.1 g/L
	AFM028 (慣例的な培地)	74.0 g/L
	L-チロシン二ナトリウム二水和物	0.8 g/L
	重炭酸ナトリウム	1.2 g/L
	L-グルタミン	3.0 g/L
	10 N 水酸化ナトリウム	4.0 mL/L
	6 N 塩酸	必要に応じて

【０１４７】

（表５）2000L生産用バイオリアクターの工程パラメーター

パラメーター	設定ポイント	範囲
温度	36.5°C	36.0-37.0°C
撹拌	74 rpm	69-79 rpm
圧力	2.0 psig	1.0-3.0 psig
pH	7.05	7.0–7.1
DO	48.0 mmHg	28.0-220.0 mmHg

【０１４８】

細胞培養回収物の清澄化および濾過

生産用バイオリアクター運転の終わりに試料採取が行われた後に、圧力を8.0～12.0psigに調整してバイオリアクターを10～15℃に冷却した。遠心分離機から遠心分離物収集タンクへの出口ラインと一緒に、2000Lバイオリアクターと CSC-20ディスクスタック遠心分離機（Westfalia）の間に移送ラインを配置した。バイオリアクター内容物の充填細胞体積を測定し、この値を使用してショット間隔（shot interval）の値を決定し、図1に示す他のパラメーターと共にそれを遠心分離機のプログラミングに含めた。バイオリアクターと遠心分離機との間のラインを開き、遠心分離を開始した。遠心分離が完了した後、遠心分離機のボウルをフラッシュし、25mMトリス、100mM塩化ナトリウム溶液（pH7.4）（トリス緩衝食塩水；TBS）で産物を遠心分離物収集タンクに流し出した。遠心分離の操作パラメーターを表6に要約する。

【０１４９】

（表６）回収遠心分離の操作パラメーター

パラメーター	設定ポイント
供給速度	12 LPM
背圧	75 psig
目標ショット質量	4.0 ±1.0 kg
速度	8400 rpm

【０１５０】

遠心分離操作の後、回収プールを、2つのフィルターの直並列を通した深層濾過に供した。各列中の第1のフィルターは、無菌深層濾過用のSartopore 2 0.2μm Maxicapカートリッジ（Sartorius；メンブレン面積1.2m^2）であった。第2のフィルターは、核酸レベルを減少させるためのZeta Plus Maximizer 120ZAカプセル（Cuno；メンブレン面積1.84m^2）であった。フィルターをTBSでフラッシュした後、表7に示す条件に従って遠心分離物収集タンクの内容物を、フィルター列を通して濾液収集タンク中に注ぎ込んだ。濃縮物が完全に移行した後、TBS 220Lを遠心分離物収集タンクに添加し、その後各フィルター列を通して100Lを濾液収集タンク中に押し入れる。空気を各フィルター列に押し通し、濾液収集タンク中に液体を収集することによって濾過工程を完了した。濾過の終わりに、泡立たないように濾液プールを混合した。濾液プールを2～8℃で72時間以下保ち、表13に従う分析のために試料を採取した。

【０１５１】

（表７）深層濾過の操作パラメーター

パラメーター	設定ポイント
流速	≤12.3 LPM
入口圧力	≤30 psig
Sartoporeフィルターの圧力差	≤20 psig
Zeta Plusフィルターの圧力差	≤20 psig
濾液タンクの撹拌	中程度；300Lを収集後に開始
空気押し通しの間の圧力差	≤20 psig
濾液プールの混合	中程度；≥20分

【０１５２】

精製工程

STM434の下流の精製工程は、3つのカラムクロマトグラフィー段階、低pHウイルス不活化段階、ウイルス濾過段階、および接線流濾過を使用する最終製剤化段階を含む。具体的に言及した場合を除き、この工程の全ての段階を環境温度で行った。図2にSTM434の精製工程を示す。各細胞培養運転のために、精製工程の運転を行った。STM434原薬の最終製剤は、目標タンパク質濃度70mg/mLで10mMリン酸カリウム、8.8％(w/v)スクロース、0.006％(w/v)ポリソルベート20（pH6.7）であった。精製工程は、2種のモデルウイルス（xMuLVおよびMMV）を使用するウイルス浄化のための2つ頑健なオルトゴナル法を含む。

【０１５３】

プロテインAクロマトグラフィー

Fcドメインに対するプロテインAの親和性により、STM434のような抗体およびFc融合タンパク質を捕獲するために、プロテインAクロマトグラフィーを使用した。STM434精製工程は、MabSelect SuReプロテインA樹脂（GE Healthcare）を利用する。プロテインAアフィニティー精製段階は、潜在的なウイルスに加えて、宿主細胞のタンパク質およびDNAの広範囲な減少を提供する。プロテインAクロマトグラフィー段階のための操作パラメーターを、表8に記載する。2つのcGMP精製運転のために、樹脂体積39.3Lのカラムを利用した。負荷密度20g/Lに基づき、プロテインA段階をサイクルで運転し、サイクル数および各サイクルにおいて負荷された清澄化細胞培養回収物の体積を、2つのバイオリアクター運転のそれぞれの最終清澄化回収物中のSTM434の合計質量により決定した。

【０１５４】

平衡緩衝液（TBS）でフラッシュすることにより、プロテインAカラムを処理用に準備した。清澄化細胞培養回収物の第1のボーラスをカラム上に負荷し、続いてカラムを平衡緩衝液最低80Lで洗浄した。次に、カラムを25mMトリス、500mM塩化カルシウム（pH7.5）の最低160Lで洗浄した。この段階は、宿主細胞DNAの追加的な除去を提供するために導入した。次に、任意の残留塩化カルシウムを除去するために平衡緩衝液最低120Lでカラムを洗浄した。次に、100mM酢酸ナトリウム（pH3.6）でSTM434をカラムから溶出させた。カラム溶出液の吸光度に基づく収集基準を表8に提供する。溶出プールを2～8℃に維持したタンク中に保存した。溶出段階の後に、100mMリン酸最低120Lでカラムをストリップ（strip）

した。全ての清澄化細胞培養回収物が消費されるまでこのサイクルを繰り返した。最終サイクルが完了した後、カラムを平衡緩衝液最低40Lに続いて300mM水酸化ナトリウム最低120Lでフラッシュし、樹脂を再生した。運転の合間、2%ベンジルアルコール、50mMクエン酸塩（pH5.0）中でカラムを保管した。表13記載のように、複数の試料をこのユニット操作から収集した。

【０１５５】

（表８）プロテインAクロマトグラフィーの操作パラメーター

パラメーター	設定ポイント
ベッド高	25 ± 2 cm
最大負荷密度	STM434 20.0g/L樹脂
流速	≤6.6 LPM (目標: 250 cm/時間)

【０１５６】

低pHでのウイルス不活化

合わせたプロテインAプールを、低pHの使用によりウイルス不活化に供した。プールを温度20±2℃にし、その後10%(v/v)酢酸をゆっくりと添加することによってpH3.6±0.1に調整した。滴定後のプールを低pHに60～90分間保持した。不活化期間の後に、2.0Mトリス塩基をゆっくりと添加することによってプールをpH5.0±0.1に調整した。

【０１５７】

次に、ウイルス不活化プールに、3つの異なる種類のフィルターを含むフィルター列を通過させた。最初のフィルターは、酸処理の間に形成したであろう粒子を除去するMillistak + HC Pod（Millipore；メンブレン面積1.1m^2）であった。列中の第2のフィルターは、3つの30インチカプセルが並列配置されたSartobind Q（Sartorius；メンブレン面積1.98m^2）であった。このイオン交換体は、核酸および他の負荷電不純物をさらに減少させるために役立つ。最後のフィルターは、Express SHC Opticap XL 10 0.5μm/0.2μmカプセル（Millipore；メンブレン面積049m^2）であった。流速6.6L/分以下で濾過を行った。濾過後のウイルス不活化プール（FVIP）をタンク中に収集した。濾過前のウイルス不活化プールがその保持器の底に近いとき、残りに、50mM酢酸ナトリウム、70mM塩化ナトリウム（pH5.0）の最低40LをFVIP収集タンクの中に追加した。表13に記載するように、このユニット操作からFVIPの複数の試料を収集した。

【０１５８】

最初の2回のcGMP運転のために、原薬中間体（DSI）と称されるFVIPを無菌20L Flexboyバッグ（Sartorius）中に保管し、それらを-30℃で保存した。DSIの最初のロット（Lot # 0010039909）の部分量をポリカーボネートボトル中に保管し、-30℃で保管し、長期保管が製品の品質に及ぼす潜在的影響を評価するための安定性試料として役立てた。24および35ヶ月安定性試験の結果は、-30℃で35ヶ月間保管されたDSIの品質がその保管期間にわたり保持されたこと、およびDSIがDemo DSのロットによるcGMP原薬の製造に使用するための適性を評定するために使用することもできることを示している。

【０１５９】

陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）の使用によりSTM434 DSIをさらに処理したが；この段階を、EMD Fractogel SO3樹脂（Merck）を使用して通過（flow through）モードで行った。他の潜在的不純物に加えて宿主細胞DNAおよびタンパク質を減少させるために、この段階を開発し、この段階が、より高度にシアリル化された形態のSTM434のレベルを増加させることが可能であることも示された。CEX段階のための操作パラメーターを表9に説明する。2回のcGMP精製の運転のために、カラム体積33.6Lに対応する充填樹脂高21.5cmのカラムを利用した。75～125g/Lの負荷密度範囲に基づき、CEX段階をサイクルで運転した。

【０１６０】

クロマトグラフィーの操作を開始する前に、凍結STM434 DSIを2～8℃で4～6日間静置解

凍し、続いて環境温度で一晩保管した。最初に最低3カラム容積（CV）の50mM酢酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム（pH5.0）を、続いて最低3CVの50mM酢酸ナトリウム、70mM塩化ナトリウム（pH5.0）流すことによって、CEXカラムを使用のために準備した。次に、解凍したSTM434 DSIをカラムに負荷した。2回のcGMP精製運転のために、異なる合計体積のSTM434 DSIをCEXカラムに負荷し、その際、各ロットは異なる上流の工程運転に由来した。最初の運転におけるSTM434 DSI lot 0010039909の合計体積は、STM434の合計質量2907グラムに対して260.6L（Flexboyが22個）であった。2回目の運転におけるSTM434 DSI lot 0010039910の合計体積は、STM434の合計質量3376グラムに対して294L（Flexboyが25個）であった。

【０１６１】

280nmでのUV吸光度がOD 0.50±0.1に達したとき、無菌フィルターを通過して無菌収集バッグ方向に溶出液流をスイッチすることによって、産物含有溶出液の収集を開始した。全てのDSIをカラムに負荷した後、次にCEXカラムを50mM酢酸ナトリウム（pH5.0）で洗浄した。産物含有溶出液の収集（CEXプール）は、280nmでのUV吸収がOD 0.50±0.1に達するまで継続する。最低3CVの洗浄緩衝液にカラムを通過させて、その後、50mM酢酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム（pH5.0）にスイッチし戻してカラムをストリップし、続いてカラムサニタイゼーションのために最低3CVの0.5N水酸化ナトリウムを、続いてカラム保管のために最低3CVの0.1N水酸化ナトリウムを流した。表13に記載するように、工程内検査のためにCEXプールを無菌的に試料採取し、環境温度で一晩保存した。

【０１６２】

（表９）陽イオン交換クロマトグラフィーの操作パラメーター

パラメーター	目標範囲
ベッド高	20 ± 2 cm
負荷密度	STM434 75～125g/L樹脂
流速	≤ 4.7 LPM (目標: 250 cm/時間)
負荷前のpH	17～25℃でpH4.8～5.2
負荷前の導電率	9-11 mS/cm

【０１６３】

疎水性相互作用クロマトグラフィー

STM434 CEXプールを疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）に供した；この段階を、フェニルセファロースFF High Sub樹脂（GE Healthcare）を使用して通過モードで行った。産物の凝集物および他の潜在的工程不純物の減少のためにこの段階を開発した。HIC段階のための操作パラメーターを表10に記載する。2回のcGMP精製運転のために、カラム容積42.2Lに対応する充填樹脂高27.0cmのカラムを利用した。最大負荷密度50g/Lに基づき、各ロットについてHIC段階を2サイクルで行った。

【０１６４】

750mM硫酸ナトリウム、250mM酢酸ナトリウム、69.5mMトリス塩基（pH10.5）からなる希釈緩衝液でプールをコンディショニングすることによってHIC段階用にCEXプールを準備した。コンディショニングの比は、CEXプール4部あたり希釈緩衝液1部であった。コンディショニング後のCEXプールを混合している間に、最低3CVの150mM硫酸ナトリウム、50mM酢酸ナトリウム（pH5.5）を流すことによってHICカラムを平衡化した。表10に言及するようにカラム溶出液の開始pHおよび導電率を満たした後、コンディショニング後のCEXプールの半分（HIC負荷）をカラムに負荷した。280nmでのUV吸光度がOD 0.2±0.1に達したとき、溶出液流を収集バッグの方向にスイッチすることによって産物含有溶出液（HICプール）の収集を開始した。HIC負荷全量をカラムに負荷した後、次にHICカラムを150mM硫酸ナトリウム、50mM酢酸ナトリウム（pH5.5）で洗浄した。280nmでのUV吸光度がOD 1.50±0.1に達するまでHICプールの収集を継続し、そのODに達したときに溶出液を廃液収集にスイッチし戻した。最低3CVの洗浄緩衝液をカラムにポンプ送出し、続いて最低3CVの0.5N水酸化ナトリウムをポンプ送出してカラムをストリップした。次に、最低3CVのWFIでカラムを

洗浄して第1サイクルを完了した。再生段階の間、第1サイクルのHICプールを混合して均一性を確保し、次に無菌フィルターを通して無菌バイオプロセスバッグに移した。

【０１６５】

WFIカラムの洗浄を完了後、HIC平衡化工程を繰り返し、続いて上記のようにHIC負荷の残り半分のHIC処理を行った。第2サイクルのHICプールを混合し、次に無菌フィルターを通して、第1サイクルのHICプールを収容するバイオプロセスバッグに移した。合わせたHICプールを一晩保管するために環境温度で保存した。0.5N水酸化ナトリウムでカラムをストリップした後、最低3CVをカラムにポンプ送出することによってHICカラムを0.1N水酸化ナトリウム中で保管した。工程内検査用の複数の試料を表13記載のように収集した。

【０１６６】

（表１０）疎水性相互作用クロマトグラフィーの操作パラメーター

パラメーター	目標範囲
ベッド高	25 ± 2 cm
最大負荷密度	STM434 50g/L樹脂
流速	≤ 4.7 LPM
負荷前のpH	17～25℃でpH5.4～5.6
負荷前の導電率	23-27 mS/cm

【０１６７】

ウイルスの濾過

合わせたHICプールを、オルトゴナルのウイルス減少段階としてPlanova 20Nフィルター（Asahi Kasei Bioprocess；メンブレン面積4.0m^2）を通して濾過した。産物含有プールを処理する前に、入口圧力13.5～14.0psigでフィルターの漏れ検査を行った。漏れ検査に合格した時点で0.2μm Sartopore 2カプセル（Sartorius；メンブレン面積0.2m^2）をウイルスフィルターの上流に設置し、表11に挙げたパラメーターに従って150mM硫酸ナトリウム、50mM酢酸ナトリウム（pH5.5）40kg±2kgでフラッシュすることによってこのシステムを平衡化した。混合および試料採取した後、合わせたHICプールを、目標圧12±2psigでウイルスフィルターにポンプ送出した。フィルター列を無菌バイオプロセスバッグに直接接続することによりウイルス濾液を収集した。合わせたHICプールの濾過が完了した後、残りの産物にフィルターおよび移送ラインから150mM硫酸ナトリウム、50mM酢酸ナトリウム（pH5.5）16kg以上を追加した。運転が完了した後、0.2μmフィルターは、完全性検査（バブルポイント検査を使用）を受け、ウイルスフィルターを0.25N水酸化ナトリウム、0.5％(v/v)トリトンX-100最低16Lに続いて、WFI最低32Lでフラッシュした。これらのフラッシュに続いて、孔径分布を確認するためにウイルスフィルターを金粒子検査に供し、続いて使用後漏れ検査に供した。設備の中で最高の陽圧を有し、空気を再循環しない専用空調ユニットも備えるポストウイルススイートにウイルス濾液を移送し、環境温度で保存した。工程内検査用の試料を表13記載のように収集した。

【０１６８】

（表１１）ウイルス濾過の操作パラメーター

パラメーター	設定ポイント
使用前漏れ検査（ウイルスフィルター）	13.5-14.0 psig
操作圧	12 ± 2 psig
フィルター負荷限界	≤ 325 L/m^2
平衡化pH	17～25℃でpH5.4～5.6
平衡化導電率	23-27 mS/cm
使用後完全性検査（0.2μmフィルター）	WFI バブルポイント≥ 46 psig
使用後漏れ検査（ウイルスフィルター）	13.5-14.0 psig

【０１６９】

接線流濾過による限外濾過／透析濾過

STM434ウイルス濾液を限外濾過（UF）および透析濾過（DF）に供して、接線流濾過（TF

F）の使用により原薬の緩衝液交換およびその最終製剤への濃縮を達成した。2種の臨界溶液を使用して、製剤化された原薬バルクを得た。これらの溶液は：（1）10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース（pH6.7）および（2）1%(w/v) Tween-20（ポリソルベート20）であった。これらの溶液を必要に応じて調製した。

【０１７０】

TFF段階のために、4つのPellicon 3 Ultracel TFFメンブレン（Millipore；公称分子量限界10kDa；それぞれメンブレン面積1.14m^2）を使用して、サイクルにおけるウイルス濾液全体を目標負荷400±50g/m^2に基づき処理した。表12記載のように残留液の導電率がその設定ポイント未満になるまで、新しいメンブレンをWFIでフラッシュし、続いて透過液のフラッシュ体積が最低40Lに達するまで0.5N水酸化ナトリウムでフラッシュした。最初のメンブレンフラッシュの後で、および使用されたメンブレンを用いたTFF処理の始めに、残留液および透過液の導電率がそれらの設定ポイント未満になるまで（表12）、WFIでシステムから塩基をフラッシュした。フィルターの完全性検査（規格化された透水検査を使用）を行った後、0.5N水酸化ナトリウム最低40Lをシステムにポンプ送出することによってサニタイゼーションを行い、サニタイゼーション溶液をシステム内に1～24時間保った。サニタイゼーションの後に、残留液のフラッシュ体積が最低40Lに達すると共に、残留液および透過液の導電率がそれらの設定ポイント未満になるまで（表12）、TFFシステムを再度WFIでフラッシュした。

【０１７１】

STM434ウイルス濾液の処理を開始するために、システムを10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース（pH6.7）で平衡化した。透過液のフラッシュ体積が20L以上で残留液および透過液のpHがpH6.5～6.9の目標範囲に到達したとき、平衡化を完了した。ウイルス濾液を混合し、残留液容器の上部および下部から試料採取してタンパク質濃度を測定し、完全に混合していることおよびタンパク質／表面積の比がその目標を満たすことを確実にした（表12）。次に、膜間圧20±5psigを達成するように供給流速を調整して、UFによるタンパク質濃縮を開始した。タンパク質濃度60g/Lに対応する残留液体積に到達したとき、残留液容器の上部および下部から残留液を試料採取してタンパク質濃度を確認した。次に、残留液を10透析体積（diavolume）の10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース（pH6.7）に対するDFに供した。DFが完了した後、残留液濃度を目標の105g/Lにするためにこの濃度を達成する残留液体積に基づきUFを再開した。TFFシステムの残留液側を残留液容器中に排出後、システムを10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース（pH6.7）5Lでフラッシュし、フラッシュ液を残留液容器に加えた。10～15分間混合した後、タンパク質濃度の測定のために残留液の上部および下部から試料を採取して、DF段階の間の産物の十分な混合および濃縮を確実にした。必要に応じて、残留液を10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース（pH6.7）でさらに希釈して、終濃度70.0±3.5g/Lにした。最終製剤化およびバルク充填の前に、保管のために最終TFFプールを無菌濾過してバイオプロセスバッグ内に入れた。工程内検査用の残留液試料を表13記載のように収集した。

【０１７２】

（表１２）接線流濾過の操作パラメーター

パラメーター	設定ポイント
タンパク質／表面積比	≦600 g/ m^2 (目標 ; 400 ± 50 g/m^2)
膜間圧	15-25 psig
供給流	270L/m^2/時間 (LMH)
残留液の導電率（初回WFIフラッシュ）	≦1000 μS/cm
残留液および透過液の導電率 (NaOHフラッシュ後)	≦1000 μS/cm
平衡化後の透過液のpH	pH 6.5-6.9
限外濾過の第1ステージでの濃度目標	60 g/L
透析濾過体積	≧10 透析体積
限外濾過の第2ステージでの濃度目標	105 g/L
濃度目標（最終）	70.0 ± 3.5 g/L

【０１７３】

最終製剤化および原薬の充填

TFF段階の後に、最終製剤化されたSTM434原薬を調製および充填した。十分な体積の1%(w/v)ポリソルベート20溶液をTFFプールに添加して、ポリソルベート20の終濃度0.006%±0.003%(w/v)を得る。界面活性剤の添加後、原薬バルクを10～15分間混合した。充填スイート（suite）での空気層流型フードを清掃し、Opticap XL5 0.22μmフィルターカプセル（Millipore；メンブレン面積0.35m^2）を含む充填装置を設置した。最終製剤化された原薬の濾過前に、フィルターをSTM434製剤化緩衝液（10mMリン酸カリウム、8.8%[w/v]スクロース、0.006%[w/v]ポリソルベート20、pH6.7）30±1Lでフラッシュして、メンブレンにポリソルベート20を飽和させ、製剤化された原薬からそれが除去されることを回避した。製剤化緩衝液をフラッシュした後に、フィルターを製剤化原薬340～360gでフラッシュし、フラッシュ液を捨てた。次に、残りの製剤化された原薬を、10Lポリカーボネート製カルボイ中に濾過して目標体積5500±500mL/カルボイにした。濾過後、フィルターに完全性検査を行った（バブルポイント検査を使用）。最後のカルボイには、製剤化された原薬の目標体積を超えて、しかし一般的には8L以下を充填することができる。工程内検査（単に情報用）およびロット販売検査のために試料を採取し、その後、80in-lbのトルク設定でカルボイの閉塞を確実にした。カルボイにラベルを付け、次に-70℃で保管した。

【０１７４】

STM434精製工程の間の工程内モニタリング

試料を収集し、表13記載のように精製工程の間に評定した。

【０１７５】

（表１３）STM434精製工程の間の工程内モニタリング

検査法	報告したパラメーター	段階／被験試料						
		回収	プロテインAクロマトグラフィー	ウイルス不活化	CEX	HIC	ウイルス濾過	TFF
プロテインA HPLC	STM 434濃度	深層濾液	----	----				
UV吸収によるタンパク質濃度	STM 434濃度	----	全てのサイクルを合わせたプール	FVIP	負荷、プール	両方のサイクル、プール	濾液	残留液
CHO HCP ELISA	HCP 含量	深層濾液	合わせたプール	FVIP	負荷、プール	プール		
CHO DNAについてのQ-PCR	CHO DNA含量	深層濾液	合わせたプール	FVIP	負荷、プール	プール		
残留物のプロテインA ELISA	残留プロテインA含量	----	最初および最後のサイクルを合わせたプール	FVIP	負荷、プール	プール		
膜濾過によるTAMC	生物汚染度	深層濾液	合わせたプール	FVIP	負荷、プール			残留液
膜濾過によるTYMC	生物汚染度	----	----	----	負荷、プール	----		残留液
細菌エンドトキシン含量（カイネティックLAL）	エンドトキシン	深層濾液	合わせたプール	FVIP	負荷、プール			残留液
サイズ排除HPLC	純度	----	合わせたプール	FVIP	負荷、プール	両方のサイクル、プール	濾液	残留液
CE-SDS,還元状態	純度	----	合わせたプール	FVIP	負荷、プール	----		残留液
CE-SDS,非還元状態	純度	----	----	FVIP	負荷、プール	----		
icIEF	純度	----	----	----	負荷、プール	両方のサイクル、プール		残留液
シアル酸含量	純度	----	----	----	負荷、プール	両方のサイクル、プール		

CE-SDS=ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動；CEX=陽イオン交換クロマトグラフィー；CFU=コロニー形成単位；CHO=チャイニーズハムスター卵巣；ELISA=酵素結合免疫吸着検定法；FVIP=濾過されたウイルス不活化プール；HCP=宿主細胞タンパク質；HIC=疎水性相互作用クロマトグラフィー；icIEF=イメージキャピラリー等電点電気泳動；LAL=リムルス（Limulus）アメーバ様細胞溶解物；Q-PCR=定量ポリメラーゼ連鎖反応；TAMC=総好気性微生物数；TFF=接線流濾過；TYMC=酵母-カビの総数

【０１７６】

工程段階収率および全収率

STM434 cGMP原薬の製造運転についての個別の段階収率を表14に提供する。全般的に、工程は再現性があり、第1相臨床試験に十分な材料を提供した。

【０１７７】

（表１４）STM434の段階収率および全収率の計算

Amgenによって行われたユニット操作	DSI Lot 0010039909 体積(L)	濃度 (g/L)	総タンパク質 (g)	段階収率 (%)*	DSI Lot 0010039910 体積 (L)	濃度 (g/L)	総タンパク質 (g)	段階収率 (%)*
回収した培地	1653	2.35	3884.6	-	1790	2.64	4725.6	-
回収した深層濾液	1730	2.06	3562.8	92%	1820	2.36	4295.2	91%
プロテインA クロマトグラフィー負荷物*	216.2	15.2	3286.2	92%	1615	2.36	3811.4	89%*
プロテインA クロマトグラフィープール	216.2	15.2	3286.2	100%	225.9	15.7	3546.6	83%
濾過されたウイルス不活化プール(DSI)	289.8	11.2	3245.8	99%	296.9	11.6	3444.0	97%
			全収率*	84%			全収率*	73%

CMC Biologicsによって行われたユニット操作	DS Lot 13-0066 (DSI Lot 0010039909由来) 体積 (L)	濃度 (g/L)	総タンパク質 (g)	段階収率 (%)**	DS Lot 13-0067 (DSI Lot 0010039910由来 体積 (L)	濃度 (g/L)	総タンパク質 (g)	段階収率 (%)**
CEX 負荷物(DSIに等しい)	259.9	11.256	2925.4	-	294.2	11.472	3375.1	-
CEX プール	269.3	8.844	2381.7	81%	302.8	9.405	2847.8	84%
HIC負荷物(コンディショニング後のCEXプール)	338.8	7.038	2384.5	100%	377.5	7.107	2682.9	94%
HIC プール	442.7	4.882	2161.3	91%	491.7	5.067	2491.4	93%
ウイルス濾液/TFF負荷物	457.3	4.535	2073.9	96%	504.3	4.906	2474.1	99%
TFF プール	28.0	67.416	1887.6	91%	36.7	67.788	2487.8	101%
原薬バルク	28.060	68.800	1930.5	102%	36.640	70.300	2575.8	104%
			CMC Biologicsによる全収率**	66%			CMC Biologicsによる全収率**	76%

*Amgenのために報告された回収パーセンテージは、各製造運転についての細胞培養回収物の初回投入量に基づく。2つの運転における差は、バイオリアクターの収率が異なることおよび目標タンパク質負荷パラメーターを維持しながらプロテインAクロマトグラフィー段階を5サイクルに限定するAmgenの決定のせいである。

**CMC Biologicsのために報告された収率パーセンテージは、DSIの初回投入量に基づき、その利用可能な体積は各製造運転により異なる。表のこの部分に報告されたDSI濃度の値は、CMC Biologicsによって決定された値である。

【０１７８】

実施例2：製造工程および工程管理の説明

ラベルなしの薬物製品に無菌処理するために、製剤化された原薬バルクを凍結輸送し、次にラベルを付け、パッケージングし、臨床実施施設に配分するためにそれを輸送した。各STM434注射剤のロットは、臨床試験に使用可能な充填済みバイアルを最低7000本含む。最終薬物製品工程についての工程流れ図を図3に示す。

【０１７９】

成分および装置の準備

ガラス製造業者のパッケージからバイアルを取り出し、熱い注射用水（WFI）で洗浄した。次に、洗浄後のバイアルを蓋付きステンレススチール製トレーに置き、乾熱滅菌乾燥器内で発熱物質を除去した。滅菌乾燥器の空気をHEPAフィルター処理した。栓を洗浄し、熱いWFIですすぎ、続いてオートクレーブ中で滅菌および乾燥した。全ての滅菌／発熱物質除去された成分を、使用の前に管理された環境中で保管した。

【０１８０】

蒸気滅菌サイクルを開発および検証する上で過剰殺菌アプローチを使用した。使用する

サイクルは、少なくとも1×10^{-6}の滅菌保証レベル（SAL）を提供する。使用する乾熱発熱物質除去サイクルは、最低で3logのエンドトキシン減少を提供する。

【０１８１】

製造工程

受け入れ材料の管理は、同一性検査および製剤化された原薬バルクの分析証明書の容認性の確認を含んでいた。STM434原薬を2～8℃で静置解凍し（7日間以上）、さらに処理するためにこの温度に保った。材料を操作領域に移動し、室温に平衡化させた（30～60分間）。典型的なバッチについて、それぞれ5.5L入カルボイ2つを13Lガラスカルボイ中にプールし、300rpmで10分以上混合した。生物汚染度検査のために試料を収集した。プール操作および混合操作は、ISOクラス7（以前のFS209Eクラス10,000）の管理環境領域中で実施する。次に、プールされた製剤化バルク溶液の容器を製品の濾過滅菌に備えて移送した。このプール容器をオートクレーブ後のフィルターアセンブリーと接続した。フィルターアセンブリー[チューブ]を充填サージ容器とも接続した。孔径等級0.22μmの直列で使用する2つの滅菌グレードのフィルターを通して、溶液を膜濾過により滅菌する。使用前および使用後に、メンブレンフィルターを滅菌し完全性検査した（バブルポイント検査を使用）。規格書に従って試料を検査した。

【０１８２】

次に、プールされた無菌製剤化バルク溶液を収容する充填サージ容器を、充填機と無菌的に接続した。プールされた無菌製剤化バルク溶液を、無菌の発熱物質除去バイアル中に無菌的に充填した。次に、RABSユニット内で各バイアルに無菌の栓およびシールを付けた。適切な服装の訓練された作業者が充填操作を行った。これらの操作を、製品の無菌処理に適した環境条件を提供するように、これらの操作を設計し、装備し、操作した。

【０１８３】

充填操作の間に充填重量のチェックを行った。バイアルに充填、打栓、およびシールした後、全てのバイアルを検査して、眼に見える異質な粒子、沈殿、眼に見える汚染、漏出の証拠、バイアル破損、または許容されない栓もしくはシールがないことを確認した。追加的に、バイアルの全ロットの統計的試料採取を行って、品質部門がそれを検査した。

【０１８４】

この時点でQC検査のために試料バイアルを収集した。全ての許容されるバイアルを-20±5℃～-70±10℃の隔離保管所に置いた。

【０１８５】

空気汚染の可能性を減少させるためにHEPAフィルター処理した空気で陽圧をかけて制御環境領域を維持した。フィルターの性能を定期的にモニターした。充填室へのアクセスは、無菌操作に必要な訓練を完了した、充填操作に関連する職員に限定した。

【０１８６】

充填および打栓のような無菌操作の間、微生物含量および無生物粒子（non viable particulate）含量についてISOクラス5環境をモニターした。生物汚染物および無生物粒子の両方について適切な行動および警戒レベルを確立して、充填環境の空気および重要な表面の適切な品質を確実にした。

【０１８７】

培地充填の検証

充填操作をシミュレートする培地充填を決まった間隔（6ヶ月）で行って、職員、施設、および装置の無菌処理能力の追加的な保証を提供した。承認されたプロトコールにより培地充填を行った。

【０１８８】

薬物製品の製造に使用される特定の濾過、充填、打栓、およびキャップ装填工程を検証するために役立つ工程シミュレーション（培地充填）からのデータは、非限定的に、充填室の表記、容器の閉塞の種類およびサイズ、培地の体積、培地の種類、充填されるユニット数、充填時間および保存期間、インキュベートされるユニット数、陽性ユニット数、インキュベーションのパラメーター、培地充填日、工程の介入、微生物モニタリング、およ

び工程パラメーターを含んでいた。

【０１８９】

培地充填試料バイアルを最初に回転／倒立させて、TSBが全ての内面と接触したことを確実にし、容器を直立させて20° 25℃で7日間（168時間以上）インキュベートし、続いて倒立させて30°～35℃で追加的に7日間（168時間以上）インキュベートした。インキュベーション後に、培地バイアルの代表的な試料に公定書（USP）収載の成長促進試験を行った。インキュベーション後成長促進試験の失敗は、培地充填運転の無効を招く。中止または無効化された全ての培地充填運転を調査により追跡した。最悪の事態および／またはチャレンジ条件を組み入れるように工程シミュレーションを設計した。最悪の事態の容器閉塞の組み合わせの定義のためにブラケッティングの概念を適用した。最悪の事態の形式の定義は、バイアル体積、寸法、開口部、および工程の複雑さ（すなわち液体またはフリーズドライ）に基づいた。凍結乾燥工程の方が複雑さが高いので、フリーズドライ工程は、液体工程の代理となることができる。日常的な介入を各培地充填に行った。

【０１９０】

ラベル付けおよびパッケージング（一次容器）

充填／仕上げ操作に続き、STM434注射剤バイアルを中間保管のためにボール箱に入れた。箱に製品固有およびロット固有の情報のラベルを付け、次に凍結保管した。これらのバイアルの箱を-70±10℃で輸送し、箱の中のバイアルを-20±5℃で保管した。ラベル付け操作は室温スイート中で行った。小バッチのバイアルをスイートに運び、12時間以内にラベル付けし、次に-20±5℃に戻した。残った凝結物を外側から拭き取ることによって、各バイアルをラベル付けのために準備し、次にラベルを貼った。

【０１９１】

マスターラベル毎に内容が適切であることを保証するために印刷要素を点検した。点検が完了した時点で、一次容器に貼って使用するためにラベルを剥離した。ラベル付けおよびパッケージング工程のために承認された手順書を使用した。

【０１９２】

実施例3：STM434用のバッチ処方

STM434注射剤を70mg/mL STM434、10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース、0.006%(w/v)ポリソルベート20（pH6.7）として製剤化した。各5mLバイアルにSTM434原薬公称1.0mL以上を充填した。STM434注射剤の最初の2つのcGMPバッチのそれぞれについて、STM434原薬11LをCMC Biologicsから受け取り、薬物製品の製造を実行した。バッチ1つあたりの各成分の量を定義するために、表155にこの体積を使用する。

【０１９３】

（表１５）STM434注射剤の成分および典型的なバッチサイズ

成分	等級	1mLあたりの量	バッチ1つあたりの量(11 L)
STM 434	S-SPEC-QA-002	70 mg	770 グラム
一塩基性リン酸カリウム	NF, Ph. Eur.	0.714 mg	7.854 グラム
二塩基性リン酸カリウム	USP, Ph. Eur.	0.827 mg	9.097 グラム
スクロース	NF, Ph. Eur., BP, JP	88.0 mg	968 グラム
ポリソルベート20	NF, Ph. Eur., BP	0.06 mg	0.66 グラム
塩酸	NF, Ph. Eur., BP	必要に応じて	必要に応じて
注射用水	USP, Ph. Eur.	目標重量まで適量	目標重量まで適量

【０１９４】

実施例4：STM434の試験プロトコール

試験の目的

試験の主要目的は、卵巣癌または他の進行固形腫瘍を有する対象において単剤療法として、またはリポソームドキソルビシン化学療法と組み合わせて投与されたSTM434の最大耐量（MTD）を定義することである。

【０１９５】

副次的目的は、以下の通りである：

・ MTDなしの場合での第2相推奨用量(RP2D)を定義すること

・ STM434を用いた治療の間の有害事象（AE）の発生率ならびに臨床検査、心電図（ECG）、および生命徴候における臨床的に有意な変化を評価すること

・ 抗STM434抗体形成の発生率を評価すること

・ STM434を用いた治療の間に薬物動態（PK）データを収集すること

・ STM434を用いた治療の間にECGデータを収集すること

・ STM434を用いた治療の間に予備的抗腫瘍有効性のデータを収集すること

・ 抗腫瘍有効性のデータと以下のそれぞれとの関係を評価すること：血清アクチビンA、腫瘍INHBA/ACVR2B mRNAレベル、および明細胞／子宮内膜／顆粒膜腫瘍変異状態

・ STM434を用いた治療の間に除脂肪体重、脂肪量、骨塩密度（骨転移を有さない対象で）、脂質プロファイル、空腹時血糖、空腹時インスリン、恒常性モデル評価（homeostatic model assessment）（HOMA）、ヘモグロビンA1c（HbA1c）、および6分間歩行距離を収集すること

・ バイオマーカー（癌抗原125[CA-125]、前立腺特異抗原[PSA]、糖鎖抗原19-9[CA19-9]、癌胎児抗原[CEA]など）、アクチビンA、卵胞刺激ホルモン（FSH）、エストラジオール、およびテストステロンについてのベースラインおよびオントリートメントデータを収集すること。

【０１９６】

試験の探索的目的は、PKパラメーターとPDパラメーターとの関係、体重、体表面積、除脂肪体重、脂肪量、体肢除脂肪体重、骨塩密度（骨転移を有さない対象で）、脂質プロファイル、空腹時血糖、空腹時インスリン、6分間歩行距離、抗薬物抗体の形成、バイオマーカー、およびECGデータを評価することである。

【０１９７】

試験デザイン

本試験は、卵巣癌または進行固形腫瘍を有する成人対象における多施設オープンラベル単群試験である。試験は、下記のように3部で行われる。試験手順の概要を表16に示す。

【０１９８】

試験の第1部

第1部は、進行固形腫瘍を有する対象における3+3デザインを組み入れているオープンラベル用量漸増試験である。IV STM434の安全性、耐容性、およびPKプロファイルを5つの用量レベル（0.25mg/kg IV、0.5mg/kg IV、1mg/kg IV、2mg/kg IV、および4mg/kg IV）で評定するために、計画された5つの逐次用量コホートに合計15～30人の対象を登録する。用量制限毒性（DLT）評価時間枠の間に安全性シグナルが不在の場合、計画された100％の用量増分でSTM434を増量する。安全性シグナル（臨床的に有意なグレード2のSTM434関連AEが≧2件またはグレード3のSTM434関連毒性が1件）が観察されるなら、過度の毒性を避けるために、コホート間の全てのさらなる用量漸増は、用量増分の≦50％起こるであろうし、追加的な適切な1つまたは複数の用量レベルが試験され得る。各用量レベルを逐次評定し、各用量コホートは、対象3～6人からなる（人数は、DLTが観察されるかどうかに依存する）。

【０１９９】

1つのコホートから次への用量漸増は、治験責任医師と共に治験依頼者によって決定され、コホート内の対象3人全てが28日間の処置を完了した後の、生命徴候、ECG、および入手可能なPKデータを含めた、処置下で発現したAE、臨床検査室データ、理学的検査所見に

基づく。試験処置の最初の28日間の対象のDLTまたはSTM434関連重篤AE（SAE）発生率が＜33％ならば用量漸増が起こる。

【０２００】

所与のコホートにおいて、STM434の初回投与から28日間に対象3人の誰もDLTを経験しないならば、用量漸増が起こり、対象3人を次の用量レベルのコホートに登録する。しかし、臨床的に有意なグレード2のSTM434関連AEが≧2件またはグレード3のSTM434関連AEが1件観察されるならば、全てのさらなる用量漸増を用量増分の≦50％に減らす。コホートにおける対象3人中1人がDLTを経験するならば、追加的な対象3人を同じ用量レベルで登録する。コホート内の対象6人の1人だけが、治療の最初の28日間にDLTまたはSTM434関連SAEを経験するならば、次のコホートが登録を開始し得る。DLTが観察されるならば、全てのさらなる用量漸増を用量増分の≦50％に減らす。コホート内の対象6人の2人以上が、処置の最初の28日間にDLTまたはSTM434関連SAEを経験するならば、この用量を毒性量と見なす。出現している毒性、PK、またはPDデータに基づき、MTDが決定されるまで、より低い用量またはより頻度の低いスケジュールで用量漸増を進める場合がある。観察されたPKデータが予測レベル未満ならば、4週間毎に4mg/kgよりも高い用量が探索され得る。

【０２０１】

試験の第2部

第2部は、進行卵巣／子宮内膜明細胞腫瘍、顆粒膜腫瘍、および卵巣／卵管／原発性腹腔漿液性腫瘍を有する対象において追加的な安全性および探索的有効性データを得るようにデザインされたオープンラベル試験である。試験のこの部分において、2つのコホートに合計24人の対象を登録する。1つのコホートは、明細胞腺癌を有する対象6人および顆粒膜細胞腫瘍を有する対象6人を含み；第2のコホートは、漿液性腫瘍を有する対象12人を含む。全ての対象は、RP2DでIV STM434を受ける。第2部への登録は、第1部におけるRP2Dの確立次第である。

【０２０２】

試験の第3部

第3部は、白金系化学療法レジメンを用いた前処置を受けたことのある、または白金系化学療法を受けることができない、卵巣癌、卵管癌、または原発性腹腔癌を有する対象における、リポソームドキソルビシン化学療法と組み合わせたSTM434の3+3デザイン組み入れオープンラベル用量漸増試験である。第1部が完了し、RP2Dが確立された後に、対象6～12人を第3部に登録する。第2部および第3部は、対象を同時に登録する。それぞれ対象3～6人の用量コホート2つ（コホート1つあたりの対象人数は、DLTが観察されるかどうかに依存する）で第3部における対象を評定する。一方のコホートは、STM434の投与をRP2Dから1用量レベル下で受け、第2のコホートは、STM434の投与をRP2Dで受け；両方のコホートは、リポソームドキソルビシンの投与を40mg/m^2で受ける。

【０２０３】

両方のコホートについて、対象は、STM434の投与を受ける前にリポソームドキソルビシンの注入を受ける。リポソームドキソルビシンの各投与前に、マルチゲート収集（MUGA）スキャンを含む実験室試験を評定する。必要ならば、毒性管理ガイドラインに従って40mg/m^2から30mg/m^2への用量減少を実行することができる。

【０２０４】

リポソームドキソルビシンと同時投与したときのSTM434の安全性、耐容性、およびPKプロファイルを評定する。より低用量のSTM434（すなわちRP2Dから1用量レベル下）を最初に評定する；治験依頼者が治験責任医師と共に用量漸増を決定し、用量漸増は、コホート内の対象3人全てが第1部に概要された3+3デザインを用いる28日間の治療を完了した後の、生命徴候、ECG、および入手可能なPKデータを含めた、処置下で発現したAE、臨床検査室データ、理学的検査所見に基づく。

【０２０５】

用量制限毒性

DLTは、任意の関連するグレード≧3（有害事象共通用語規準[CTCAE]4.03版に従う）の

非血液毒性（無関係の毒性を除く）、または7日間継続する任意のグレード≧4の血液毒性、発熱性好中球減少症、または活動性の出血を有するグレード3の血小板減少症として定義される。

【０２０６】

STM434を用いた治療を再開したいと望む、DLTを経験している対象は、毒性がCTCAEグレード≦1またはベースライン値に回復したときに、対象が疾患の進行を経験していないならば、治験責任医師の裁量で再開し得る。

【０２０７】

最大耐量

MTDは、コホートの対象のDLT発生率が＜33％の最高の用量レベルとして定義される。

【０２０８】

第2相の推奨用量

RP2Dは、MTD、PK、薬力学的バイオマーカーおよび抗腫瘍応答のデータを考慮して定義される。

【０２０９】

無作為化および盲検化

本試験は、オープンラベル非無作為化非盲検試験である。対象は、試験資格を得た順序で用量コホートに割り当てられる。

【０２１０】

対象の選択の基準

選択基準

対象は、以下の選択基準が全て満たされるならば、対象は、本試験に参加するために適格と見なされる：

1．年齢≧18歳の男性および閉経後女性

2．癌と組織学的に確定診断された進行固形腫瘍

3．対象の腫瘍に利用可能な標準的な全ての処置に抗療性もしくは不耐性と見なされる、再発転移性もしくは局所進行性疾患を有する対象、または標準的な処置が利用不可能な腫瘍を有する対象

4．少なくとも1つの白金系化学療法レジメンを以前に受け、その後の無白金間隔が＜12ヶ月である、白金系療法の間に進行した、または白金系療法の後に持続性疾患を有すると定義される、白金抗療性／抵抗性と見なされる漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔腫瘍、顆粒膜細胞腫瘍または明細胞腫瘍を有する対象が適格である。毒性が原因でさらなる白金を受け入れ不能と定義される、不耐性の対象が適格である。

5．固形癌の治療効果判定のためのガイドライン（RECIST 1.1）基準を使用して測定可能な疾患

6．米国東海岸癌臨床試験グループ（ECOG）パフォーマンスステータスが0または1

7．他人の介助なしに少なくとも30メートル歩行可能（杖または歩行器のような介助用具の使用は許される）

8．書面のインフォームドコンセントを提供する意思も能力もある

9．閉経後女性は、以下の1つまたは複数に該当しなければならない：

a．12ヶ月の自然無月経

b．FSH＞40IU/Lを有する6ヶ月の自然無月経

c．子宮摘出を伴うまたは伴わない術後両側卵巣摘出。

【０２１１】

試験の第2部について、以下の追加的な選択基準に該当しなければならない：

10．コホート6について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#4に定義）の卵巣／子宮内膜明細胞癌および卵巣顆粒膜細胞腫瘍を有さなければならない

11．コホート7について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#4に定義）の漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有さなければならない

【０２１２】

試験の第3部について、以下の追加的な選択基準に該当しなければならない：
12. コホート8および9について、対象は、進行した白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#4に定義）の卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有さなければならない。
【０２１３】
除外基準
対象は、以下の基準のいずれかに該当するならば、試験に参加することが不適格である：
1. 感染、プロトコール遵守に制約、または対象を極度の危険にさらすような、併発する重篤な制御不能もしくは未解決の医学的状態
2. 以前の抗癌療法からの、脱毛症を除く運動性もしくは感覚性神経障害のようなCTCAE（4.03版）グレード≧2の未解決の毒性
3. サイクル1の1日目の6ヶ月以内の消化管出血の病歴
4. QTcF＞470msecの存在、遺伝性QT間隔延長またはQT間隔の評価を妨げる任意の不整脈（脚ブロックなど）の病歴
5. サイクル1の1日目の6ヶ月以内の心筋梗塞、不安定狭心症、もしくはNew York Heart Association ≧II度のうっ血性心不全
6. 総ビリルビン＞1.5×正常値上限（ULN；対象がジルベール病を有すると実証されていない場合）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）もしくはアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）＞3.0×ULN（肝転移が既知の対象について、ASTもしくはALT＞5×ULN）を含めた、肝機能検査の上昇
7. クレアチニン＞1.5×ULNおよび推定クレアチニンクリアランス＜60mL/min（コッククロフト・ゴールト式を使用）
8. ヘモグロビン＜9g/dL；血小板＜100×10^9/L（サイクル1の1日目の4週間以内に輸血を受けていてはならない）；絶対好中球数（ANC）＜1.5×10^9/L（サイクル1の1日目の2週間以内に顆粒球コロニー刺激因子の支援なし）
9. サイクル1の1日目の3週間以内に化学療法、ホルモン療法、または放射線療法（注：継続中の性腺刺激ホルモン放出ホルモン療法を受けている対象は適格である）
10. サイクル1の1日目の5半減期または4週間（どちらでも長い方）以内の抗体／生物学的療法
11. サイクル1の1日目の8週間以内の大手術または4週間以内の小手術
12. 現在の腸閉塞（腸閉塞の病歴を有する対象は適格）
13. 脳転移
14. 頻繁な（週1回よりも多い）医学的介入を要する腹水または胸水の存在
15. 門脈静脈シャント装置の存在または広範な肝切除（1つを超える区域）の手術歴
16. 既知のヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染
17. 活動性BまたはC型肝炎感染
18. サイクル1の1日目の4週間以内の任意の治験薬を用いた以前の処置
19. 植込剤、注射剤、複合経口避妊薬、一部の子宮内避妊装置、禁欲、または精管切除されたパートナーのような、一貫して正確に使用したときに高度に有効な避妊法（すなわち、年間1%未満の妊娠を生じる方法）を使いたくない、妊娠する可能性がある女性、または女性パートナーが妊娠する可能性がある男性。本試験に参加している間に女性パートナーと高度に有効な避妊対策を使用したくない、および／またはSTM434を用いた処置を受けている間および最終用量の投与後3ヶ月間に精液を供与することを控えたくない男性。
20. 授乳中の女性
21. サイクル1の1日目の6ヶ月以内の医学的または外科的介入（例えば鼻腔パッキング）を要する鼻出血の病歴
22. 中枢神経系出血の病歴
23. 出血性素因または既知の質的血小板異常（フォンウィレブランド病を含む）の病歴
24. 遺伝性出血性末梢血管拡張症（HHT、オスラー・ウェーバー・ランデュ症候群）の病歴

25. アスピリンまたは抗血小板剤（チクロピジンまたはクロピドグレル）の慢性使用の継続した必要性；アスピリン／抗血小板剤がスクリーニングの間に中止された場合、休薬期間は≧2週間でなければならない

【０２１４】

試験の第3部について、対象が以下の追加的な除外基準のいずれかに該当するならば、対象は不適格である：

26. ドキソルビシンHClの従来製剤またはリポソームドキソルビシンの成分に対する過敏反応

27. 以前のドキソルビシンHClの累積用量＞300mg/m^2、または以前のエピルビシンの累積用量＞500mg/m^2

28. サイクル1の1日目の30日以内にMUGAスキャンまたは心エコー（ECHO）によって正常値下限未満に減少した心駆出分画

【０２１５】

対象の中止基準

試験の完了前に、以下の理由のいずれかから対象への投与が中止され得る：

・ 対象による同意の撤回

・ さらなる参加を妨げるDLTまたは他のAEの発生

・ 適切な医学的管理を行って30日以内にCTCAEグレード1またはそれ未満に戻らない、STM434および／またはリポソームドキソルビシンに関連する持続的副作用（第3部に関してのみ）。個別の臨床的に重要な毒性（STM434またはリポソームドキソルビシンのいずれかによる）が、CTCAEグレード1またはそれ未満に戻らずに30日間を超えて継続するならば、対象の試験を中止することができる

・ 対象の重大なプロトコール不遵守

・ 対象が試験中の薬剤または装置の使用のような禁止処置を受けることを選択

・ 治験責任医師の意見で即時の特定の医学的処置を要する臨床状態の悪化

・ 治験依頼者による試験の早期中止

【０２１６】

治験薬を用いた処置

被験薬の説明および取扱い

製剤

STM434を、70mg/mL STM434、10mMリン酸カリウム緩衝液、8.8%(w/v)スクロース、および0.006%(w/v)ポリソルベート20（pH6.7）を含有する、IV投与が意図される無菌水溶液として製剤化する。

【０２１７】

パッキングおよびラベル付け

製剤化されたSTM434溶液を、13mmフルオロポリマー栓および13mmシールを備える5mLガラスバイアル（1.0mLを送達するための目標充填体積1.2mL）中にパッケージする。各バイアルは、単回使用を意図する。

【０２１８】

保管および取扱い

STM434のバイアルを霜取り不要の冷凍庫中に温度-20℃（±5℃）で保管する。ラベルに提供される情報に従って製品を保管するべきである。

【０２１９】

使用前に、製品を2℃～8℃の冷蔵庫内で一晩解凍するべきである；製品はこの温度に最大7日間保たれ得る。より高い温度への暴露およびバイアルの激しい振盪は、これらの条件がSTM434の効力および構造的完全性の喪失をまねく場合があるため、避けるべきである。解凍後、産物を再凍結するべきではない。

【０２２０】

被験薬供給品の任意の追加的な保管、取扱いまたは最新の安定性データについては調剤マニュアルを参照されたい。

【０２２１】
被験薬の投与
STM434
STM434は、下に規定されるように、各コホートについて計画された用量で投与される。
【０２２２】
第1部において、計画された用量コホートは、以下の通りである：
・ コホート1： STM434を0.25mg/kgでIV、4週間毎
・ コホート2： STM434を0.5mg/kgでIV、4週間毎
・ コホート3： STM434を1mg/kgでIV、4週間毎
・ コホート4： STM434を2mg/kgでIV、4週間毎
・ コホート5： STM434を4mg/kgでIV、4週間毎
【０２２３】
第2部において、計画された用量コホートは、以下の通りである：
・ コホート6：明細胞腺癌を有する対象6人および顆粒膜細胞腫瘍を有する対象6人に4週間毎にSTM434をRP2DでIV
・ コホート7：漿液性卵巣腫瘍を有する対象12人に4週間週間毎にSTM434をRP2DでIV
【０２２４】
第3部において、対象は、STM434およびリポソームドキソルビシンの両方の投与を受ける。対象は、最初にドキソルビシンの注入を受け；次に対象は、この注入の完了後にSTM434のIVを受ける。第3部について計画された用量コホートは、以下の通りである：
・ コホート8： STM434をRP2Dから1用量レベル下でIV+リポソームドキソルビシン（40mg/m^2IV）を4週間毎
・ コホート9： STM434をRP2DでIV+リポソームドキソルビシン（40mg/m^2IV）を4週間毎
【０２２５】
許容されない毒性が観察されない限り、疾患が進行するまで第1、2、および3部での対象をSTM434で処置する。疾患進行は、RECIST 1.1基準に従うX線撮影による測定または腫瘍マーカーの測定に基づく。
【０２２６】
組み合わせ処置の最初の28日間に観察されたDLT以外の任意の理由でリポソームドキソルビシンが保留または中止されるならば、第3部での対象は、STM434の投与を受け続け得る。リポソームドキソルビシンについての用量改変および調整は、この製品に関する処方情報に従う。投与されるリポソームドキソルビシンサイクルの最大数は、6である。
【０２２７】
リポソームドキソルビシン
第3部（コホート8および9）での対象は、最初にリポソームドキソルビシン（40mg/m^2）の注入を受け；この注入が完了すると、対象は、次に対象のSTM434のIV用量を受け入れる。
【０２２８】
最大90mg用量のリポソームドキソルビシンを、5％デキストロース溶液（D5W）250mL中に希釈するべきである。用量≧90mgを、D5W 500mL中に希釈するべきである。リポソームドキソルビシンの最初の注入を、1mg/分の速度で投与するべきである。注入反応が観察されないならば、後続の注入は、1時間かけて投与され得る。
【０２２９】
中等度の催吐性を有する化学療法のための制吐薬は、施設のガイドラインに従って処方されるべきである。
【０２３０】
処置期間
スクリーニングを、投薬（サイクル1の1日目）の最大14日前に開始するが、例外としてX線撮影スキャンを初回の被験薬剤投与の開始から30日前以内に収集できる。許容されない毒性が観察されない限り、第1、2、および3部での対象を疾患進行までSTM434で処置す

る。疾患進行は、RECIST 1.1基準に従うX線撮影による測定または腫瘍マーカーの測定に基づく。CA-125を腫瘍マーカーの尺度として使用する場合、婦人科癌共同研究グループ（Gynecologic Cancer Intergroup）（GCIG）のコンセンサスガイドラインを用いて結果を評定する。PSAを腫瘍マーカーの尺度として使用する場合、前立腺癌ワーキンググループ（Prostate Cancer Working Group）（PCWG）のコンセンサスガイドラインを用いて結果を評定する。

【０２３１】

組み合わせ処置の最初の28日間に観察されたDLT以外の任意の理由でリポソームドキソルビシンが保留または中止される場合、第3部での対象は、STM434の投与を受け続け得る。

【０２３２】

有効性および安全性の評価

各有効性変数および安全性変数を下に説明する。

【０２３３】

薬物動態

血液試料中のSTM434レベルは、中央検査室によって決定される。標準的なノンコンパートメント薬物動態法を使用して、血中レベルから、以下のSTM434のPKパラメーターを推定する：

- 終末相半減期（$t_{1/2}$）
- クリアランス（CL）
- 平均滞留時間（MRT）
- 分布容積（V_d）
- 定常状態容積（V_{ss}）

【０２３４】

加えて、STM434に加えてリポソームドキソルビシンの投与を受ける第3部での対象（コホート8および9）について、血液試料を収集し、ドキソルビシン／ドキソルビシノールレベルの決定のために中央検査室に送る。上記のPKパラメーターを推定する。

【０２３５】

有効性の評価

X線撮影による腫瘍の進行

X線撮影による腫瘍の進行を、RECIST 1.1基準を用いてCT（またはMRI）および骨スキャン（骨転移を有する対象についてのみ）に基づき治験責任医師の評価によって判定する。CTまたはMRI様式の選択は、治験責任医師による。目標病変（存在する場合、対象1人あたり最大5つ）をベースラインで測定し、試験全体にわたり追跡する。X線撮影による奏効期間を、X線撮影による客観的奏効の最初の観察から疾患進行日または死亡日までの時間として記録する。X線撮影による無増悪生存期間を、サイクル1の1日目からX線撮影による疾患進行日または死亡日までの時間として記録する。

【０２３６】

身体組成

除脂肪体重、体肢除脂肪体重、および脂肪量、ならびに脂肪分布（内臓および皮下）を、放射線マニュアルに詳述されるようにDXAにより決定する。DXAスキャンを中央放射線検査室が分析する。

【０２３７】

筋機能検査：6分間歩行検査

説明

6MWTは、対象が6分間かけて平らな地面を歩くときに進む距離を測定する。本試験では、米国胸部学会（American Thoracic Society）（ATS）からのガイドラインに従って6MWTを行う。これらのガイドラインは、進行腫瘍の患者と同様に、心臓または肺の同時罹患を有する場合がある、かつ身体活動のレベルが全体的に低下している場合がある患者のために開発されたものである。したがって、本試験における6MWTのための手順は、ATSガイド

ラインに従って計画されている。
【０２３８】
職員の訓練
治験依頼者／治験依頼者の代表によって訓練された実施施設の職員だけが6MWTを実施し得る。治験依頼者／治験依頼者の代表が、使用されるべき区域を評定し、実施施設の検査実施職員を訓練する前に、実施施設が6MWTの実施を開始してはならない。試験期間に各個別の対象についての全ての評価について同じ区域を使用しなければならない。
【０２３９】
有効性についての臨床検査パラメーター
バイオマーカー
腫瘍バイオマーカー
ベースラインで、および試験全体にわたり、血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125、前立腺癌を有する対象についてのPSA、膵臓癌を有する対象についてのCA19-9、および結腸癌を有する対象についてのCEA）をモニターする。腫瘍マーカーの奏効および腫瘍マーカーの進行（TTTMP）を評価する。腫瘍マーカーの尺度としてCA-125を使用する場合、婦人科癌共同研究グループ（GCIG）コンセンサスガイドラインを用いて結果を評定する。PSAを腫瘍マーカーの尺度として使用する場合、前立腺癌ワーキンググループ（PCWG）のコンセンサスガイドラインを用いて結果を評定する。
【０２４０】
血清腫瘍バイオマーカー（アクチビンA、FSH、エストラジオール、テストステロン）
STM434はアクチビンシグナル伝達を阻害するので、本発明者らは、血清アクチビンレベルがSTM434による目標阻害の程度を反映している薬力学的バイオマーカーであるかどうかを判定する。アクチビンは、FSHおよび性ホルモン（エストラジオール、テストステロン）の放出を刺激している内分泌フィードバック機構の一部であるので、これらの内分泌バイオマーカーも、潜在的な薬力学的有効性バイオマーカーとして評価する。
【０２４１】
アクチビンAの測定は、対象間の比較可能性を保証するために中央検査室によって実施される。現地の検査室が、FSH、エストラジオール、およびテストステロンを評価する。試料の取扱いの説明書を検査マニュアルの中に提供する。
【０２４２】
組織腫瘍バイオマーカー
スクリーニング時およびサイクル4の1日目の来院時に、検証済みRNAScope（登録商標）アッセイを使用して受容体ACVR2BおよびリガンドINHBAについてmRNAを測定することによって（全対象）、オートクリン／パラクリンシグナル伝達についてホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を調べる。FOXL2遺伝子変異状態（顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について）は、スクリーニング時のDNAシーケンシングによって決定する。ARID1A遺伝子変異状態を、次世代シーケンシングによって腫瘍DNAを全血からの体細胞DNAと比較して決定する（明細胞／子宮内膜腫瘍を有する対象について）；このアッセイでマイクロチップ上に存在する他の癌遺伝子の配列も決定し得る。これらのデータの臨床的関連性は、まだ確立されていないので、対象に変異分析の結果を通知しない。検査マニュアル中の説明書に従って試料（組織切片または腫瘍ブロック）を中央検査室に輸送する。
【０２４３】
循環腫瘍細胞
アクチビンシグナル伝達は、癌幹細胞集団を一部の腫瘍型に維持するために必要である。したがって、CTCのレベル低下は、STM434の薬力学的活性を反映し得る。本試験では、スクリーニング時およびサイクル2の1日目に検証済みCellSearch（登録商標）プラットフォームを使用してCTCを計数する。検査マニュアル中の説明書に従って試料を中央検査室に輸送する。
【０２４４】
血清脂質

STM434の抗アクチビンおよび抗ミオスタチン薬理作用が筋量増加に繋がり得るので、本発明者らは、処置された対象において血清脂質レベルが影響されるかどうかを判定する。

【０２４５】

恒常性モデル評価による空腹時血清グルコースおよびインスリン

インスリン抵抗性（IR）および高血糖は、心血管合併症の発生に関するリスク因子である。前臨床試験では、STM434の代用薬であるSTM217は、IRを改善した。正常血糖高インスリンクランプがIRを測定するためのゴールドスタンダードであるものの、この方法の複雑さがその使用を制限している。グルコースおよびインスリンの空腹時レベルを使用するより実用的な方法であるHOMAが、透析している対象において検討されている。HOMAを用いて得られた測定値は、正常血糖高インスリンクランプを使用して得られた値とよく相関する。

【０２４６】

HbA1cは、血糖コントロールの評定のために米国糖尿病協会（American Diabetes Association）により推奨されている。本試験におけるHbA1cの評定は、空腹時血糖検査および空腹時インスリン検査を補完するものであり、グルコースコントロールの経時的積算測定値を提供する。

【０２４７】

統計解析

評価項目

主要

主要評価項目は、以下の通りである：

・　第1部：卵巣癌または他の進行固形腫瘍を有する対象におけるSTM434単剤療法のMTD

・　第2部：卵巣／卵管／原発性腹腔／子宮内膜腫瘍を有する対象におけるAEの発生率ならびに臨床検査、ECG、および生命徴候における臨床的に有意な変化

・　第3部：卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有する対象におけるリポソームドキソルビシン化学療法と組み合わせて投与されたSTM434のMTD

【０２４８】

副次

副次的評価項目（特に注記しない限り、第1、2、および3部）には、以下が含まれる：

・　MTDなしの場合でのRP2D（第1および3部）

・　AEの発生率ならびに臨床検査、ECGおよび生命徴候における臨床的に有意な変化（第1および3部）

・　STM434抗体形成の発生率

・　STM434のPKプロファイル

・　ドキソルビシン／ドキソルビシノールのPKプロファイル（第3部）

・　FACT-NTX神経障害質問表での対象の応答

・　X線撮影による奏効率（rRR）

・　X線撮影による奏効期間（dRR）

・　X線撮影による無増悪生存期間（rPFS）

・　腫瘍マーカー奏効率（TMRR）

・　腫瘍マーカー進行までの期間（TTTMP）

・　ベースラインおよびオントリートメントのアクチビンA血清濃度、INHBA／ACVR2Bについての腫瘍mRNAレベル、および腫瘍変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象で）と抗腫瘍有効性尺度との相関

・　除脂肪体重、体肢除脂肪体重、脂肪量（内臓および皮下）、脂質プロファイル、空腹時血糖、空腹時インスリン、HOMA、HbA1c、および6分間歩行距離でのベースラインからの変化

【０２４９】

探索的

探索的評価項目（第1、2、および3部）は、以下の通りである：

・　PKパラメーターと、抗腫瘍有効性、骨塩密度（骨転移を有さない対象で）、脂質プロファイル、空腹時血糖、空腹時インスリン、HbA1c、6分間歩行距離、抗薬物抗体の形成、バイオマーカー、またはECGデータとの間の相関

【０２５０】

解析集団

有効性、安全性、およびPKのための解析集団を、それぞれ下に記載する。

・　有効性解析集団には、STM434の投与を少なくとも4週間受ける全ての対象が含まれる。STM434の投与を少なくとも12週間受ける全ての対象について、有効性評価項目の二次解析を行う。

・　安全性解析集団には、STM434の投与を少なくとも1回受ける全ての対象が含まれる。

・　PK分析集団には、STM434の投与を少なくとも1回受け、少なくとも1つのPK試料を提供した全ての対象が含まれる。

【０２５１】

有効性の解析

rRR、dRR、およびrPFSをRECIST 1.1に従って定義し、記述統計およびカプラン・マイヤー（Kaplan-Meier）法を使用して解析する。rPFSについて、疾患進行または死亡を経験していない対象を疾患評価のための対象の最終画像スキャン日に打ち切る。

【０２５２】

TMRRおよびTTTMPを適切なコンセンサスガイドラインにより定義し、記述統計およびカプラン・マイヤー法を使用して解析する。

【０２５３】

薬物動態解析

標準的なノンコンパートメントPK法を使用して、STM434単独またはリポソームドキソルビシンと組み合わせたSTM434のPKパラメーターを推定し、記述統計（平均、標準偏差、中央値、最小値および最大値）を使用して要約する。

【０２５４】

抗腫瘍有効性への暴露、除脂肪体重、脂肪量、脂質プロファイル、空腹時血糖、空腹時インスリン、HOMA、HbA1c、6MWT、抗薬物抗体の形成、バイオマーカーまたはECGデータと関連づける探索的解析を、アドホック（ad hoc）またはポストホック（post hoc）で実施し得る。

【０２５５】

安全性解析

安全性の評価は、AE、併用薬、検査結果および生命徴候が含まれる。Medical Dictionary for Regulatory Activitiesを使用して、全ての報告されたAEをコード化し、AEを有する対象の人数およびパーセント、ならびに因果関係（重篤に対して重篤でない、および治験責任医師が報告した関係[無関係、関係する可能性、関係する]）により要約する。処置の初回投与の開始後から最終処置の30日後までに発生するAEだけを表に含める。記述統計を使用して、抗STM434抗体の形成の発生率を要約する。

【０２５６】

標本サイズの決定

最大で合計66人の対象（第1部での対象最大30人、第2部での対象24人、および第3部での対象最大12人からなる）を登録するように試験を計画する。この標本サイズは、検出力（power）の計算に基づくのではなく、むしろ臨床判断および試験の目的が計画された標本サイズに適合する見込みに基づく。

【０２５７】

試験の第2部について、まれな卵巣癌サブタイプである明細胞腫瘍および顆粒膜細胞腫瘍についてのコホートには、臨床試験実施施設での対象数が少ないと見込まれる理由から、各サブタイプの対象6人だけを登録し、一方でより一般的な漿液性卵巣腫瘍のコホートに対象12人を登録する。

【０２５８】

結論

単剤療法として、またはリポソームドキソルビシン化学療法と組み合わせて投与された製剤化STM434は、選ばれた対象において卵巣癌および他の進行固形腫瘍を処置し、副作用は比較的限定的である。

【０２５９】

（表１６）試験手順

	スクリーニング		処置相				
			サイクル１		サイクル2, 3, 5, 6.	サイクル 4, 7, 10.	
評定	−14〜1日目	−1日目	1日目	15日目	1日目	1日目および処置中止時[1]	試験の終わり[2]
サインされた同意文書	X						
医療歴、人口統計、以前の癌治療	X						
理学的検査、身長および体重[3]	X	X[4]		X	X	X	X
便グアヤク試験	X[5]						
生命徴候[6]	X	X[4]		X	X	X	X
ECOG	X	X[4]		X	X	X	X
ECG[7]	X	X			X	X	X
FACT/GOG-NTX[8]	X			X	X	X	X
MUGAまたはECHO	X[9]					X[9]	X[9]
STM 434の投与			X		X	X	
リポソームドキソルビシン投薬投与[10]			X		X	X	
併用薬	X		X	X	X	X	X
有害事象	X[11]		X	X	X	X	X[12]
血液学的検査	X	X[4]		X	X	X	X
凝固パネル(PT, PTT, INR, TT[13], D二量体[13])	X	X[4]		X	X	X	X
血清の化学的検査	X	X[4]		X	X	X	X
空腹時血糖および空腹時インスリン	X					X	
HbA1c[14]	X					X[14]	X
血清脂質	X					X	X
血清腫瘍バイオマーカー[15]	X	X[4]			X	X	X

評定	スクリーニング		処置相				試験の終わり[2]
			サイクル1		サイクル2, 3, 5, 6.	サイクル4, 7, 10.	
	−14〜1日目	−1日目	1日目	15日目	1日目	1日目および処置中止時[1]	
組織腫瘍バイオマーカー[16]	X						
尿検査（ディップスティック）	X						
血清妊娠検査	X						
アクチビンA（遊離および総）	X	X[4]		X	X	X	X
CTCs	X[17]				X[17]		
FSH、エストラジオール（女性対象）、テストステロン（男性対象）	X	X[4]		X	X	X	X
中央検査室 DXA	X[18]					X[19]	
6分間歩行検査	X				X[20]	X	
CT/MRI	X[18]					X[19]	
骨スキャン[21]	X[18]					X[19]	
疾患進行の評価						X	
抗STM434抗体	X	X[4]			X	X	X
投与前PK			X[22]		X[22]	X[22]	
投与後PK			X[22]	X	X[22]		

[1] 処置中止の来院は、適切な場合、任意のスケジュールされた来院またはスケジュールされていない来院で起こる可能性がある。この来院で、進行性疾患または許容されない毒性を確認する証拠資料が判定される。

[2] EOSの来院は、STM434の最終投与の28日後にスケジュールされている。

[3] 各来院時に対象の体重を記録し；スクリーニング来院時に身長を記録する。

[4] ECGホルターモニターを除いて、-1日目にスケジュールされた手順を、サイクル1の1日目の投薬前に行うことができる。

[5] 便グアヤク試験をスクリーニング時に行い、治験責任医師の裁量でベースライン後に繰り返す場合がある。

[6] 生命徴候：耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数、および呼吸数

[7] スクリーニング来院の後に、中央検査室からの装置を使用してECGを収集しなければならない。対象は、-1日目から開始して2日目の来院までホルター（Holter）モニターを連続的に装着する。続いて、中央検査室の機器を用いて12誘導ECGを得る。

[8] 必要ならば、スケジュールされていない来院時にFACT/GOG-NTXを集めて神経障害のAEを評価する場合がある。

[9] 第3部での対象だけが、MUGAまたはECHOを使用してリポソームドキソルビシン投与についての心駆出分画を記録する。MUGAまたはECHOの選択は、治験責任医師の裁量であるが、様式が選択された後は、試験期間全体にわたり対象について同じ方法を使用するべきである。MUGA/ECHOを、スクリーニング時およびサイクル4の1日目に行うべきである。第3部でのドキソルビシン処置対象がサイクル4の1日目の前に中止された場合には、MUGA/ECHOをEOS来院で行う。

[10] リポソームドキソルビシンの投与は、試験の第3部での対象に対するものである。

[11] インフォームドコンセントの文書にサインした時点からサイクル1の1日目での被験薬剤投与までに処置前SAEを報告する。

[12] 因果関係の特質にかかわらず、任意の新規または継続中のAEまたはSAEがあるかどうかを判定するための、STM434の最終投与後30日間のAEの追跡調査。追跡調査を電話により行う場合があり、追跡調査を音源として記録する。
[13] スクリーニングおよびサイクル2の1日目。
[14] HbA1cを、スクリーニング時、サイクル4の1日目、処置中止時、およびEOS時のみに収集および分析する。
[15] 血清腫瘍バイオマーカーは、対象に基づき、必要に応じてCA-125、PSA、CA19-9、CEA、または他のバイオマーカーを含むことができる。
[16] 組織腫瘍バイオマーカーは、ACVR2BおよびINHBA遺伝子発現（全ての対象）ならびに遺伝子変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について）用の腫瘍切片／腫瘍ブロックを含む。
[17] CTCを、スクリーニング時およびサイクル2の1日目に収集する。
[18] サイクル1の1日目の最大30日前に行ったスキャン（DXA、CT、MRI、骨）をベースラインの評価のために使用することができる。脳MRIを使用して任意の脳転移を除外する。
[19] 1日目の来院の±8日以内に試験中のDXA、CT/MRIおよび骨スキャンを行うことができる。
[20] サイクル2の1日目の来院で6分間歩行検査を完了する。
[21] 骨への腫瘍転移を有する対象のために骨スキャン評価を行う。
[22] PK評価のための詳細なスケジュールを本明細書に提示する。

【０２６０】

実施例5：STM434試験についての中間結果

上記プロトコールを使用するSTM434を用いた処置のためにヒト対象3人を選択した。各対象は、進行型の癌：漿液性卵巣癌、顆粒膜卵巣癌または結腸癌を有した。対象1は、漿液性卵巣癌を有し、対象2は、顆粒膜細胞卵巣癌を有し、対象3は、結腸癌を有した。対象1は、2014年1月にステージIVの卵巣癌と診断されていた。患者は、2014年に以前のカルボプラチンおよびパクリタキセルの投与を受けた後、漿液性腺癌腫瘍が進行していた。対象2は、1998年に卵巣癌と診断され、2010年に以前のシスプラチン、エトポシド、ブレオマイシン化学療法、2012年にカルボプラチンおよびパクリタキセル、2013年にベバシズマブ、メドロキシプロゲステロン、アナストロゾール、ならびに2014年にRX-3117（治験用シチジン類似体）の投与を受けた後、顆粒膜細胞腫瘍が進行していた。対象3は、2012年6月にステージIV結腸癌と診断されていた。対象は、2012年に以前の5-フルオロウラシル、ロイコボリン、オキサリプラチン化学療法、2013年にイリノテカン、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、ベバシズマブ、および2014年にパニツムマブの投与を受けた後、結腸腫瘍が進行していた。

【０２６１】

STM434の製剤化、パッキング、および保管

STM434を、70mg/mL STM434、10mMリン酸カリウム緩衝液、8.8%(w/v)スクロース、および0.006%(w/v)ポリソルベート20（pH6.7）を含有する、IV投与が意図される無菌水溶液として製剤化した。製剤化されたSTM434溶液を、13mmフルオロポリマー栓および13mmシールを備える5mLガラスバイアル中にパッケージした。STM434のバイアルを霜取り不要の冷凍庫中に温度-20℃（±5℃）で保管した。使用前に、STM434を2℃～8℃の冷蔵庫内で一晩解凍した。

【０２６２】

STM434の投与

STM434を各対象に0.25mg/kgで約4週間毎にIV投与した。対象1は、2014年10月17日に治療を開始し、2014年11月14日および2014年12月15日に2回の追加的な投与を受けた後、2014年12月30日にさらなる被験処置を中止した。対象2は、2014年10月29日に治療を開始し、2014年11月24日、2014年12月24日、および2015年1月21日に3回の追加的な投与を受け、この対象は、2015年2月17日現在でSTM434の投与を受け続けており、対象3は、2014年11月6日に治療を開始し、2014年12月4日に1つの追加的な投与を受けた後、2015年1月05日にさ

らなる被験処置を中止した。

【０２６３】

STM434のヒト安全性および有効性

STM434投与に関係すると見なされる有害事象はいかなる対象からも観察されなかった。神経障害、出血性事象、または内分泌症状に関係する有害事象は、いかなる対象からも観察されなかった。抗STM434抗体は、いかなる対象からも観察されなかった。対象1は、改善された食欲、エネルギー、および漸増するパフォーマンスステータスを報告した。治験責任医師は、STM434が安全で耐容性良好と見なした。治験責任医師は、次の用量レベルへの漸増を推奨した。

【０２６４】

STM434のインビボのアクチビン阻害

アクチビンは、FSHの放出を刺激している内分泌フィードバック機構の一部であるので、FSHを潜在的な薬力学的有効性バイオマーカーとして評価した。FSHの減少は、STM434によるアクチビン阻害を指し示すと予想される。

【０２６５】

ELISA定量イムノアッセイを使用してFSHを評価した。用量0.25mg/kgのSTM434を投与後に対象3人のうち2人でFSHレベルが減少したと判定した。図4。x軸にプロットした時間に対して、ベースラインからの変化パーセントをy軸にプロットしたが；C1D1は、サイクル1の1日目（処置前のベースライン）を示し、C1D15は、STM434の初回投与の14日後であるサイクル1の15日目を示し、C2D1は、サイクル2の1日目（最初の投与の4週間後のSTM434の2回目の用量投与前の前投与）を示す。C1D15で観察されたFSHの低下は、STM434がヒトにおけるアクチビンシグナル伝達を阻害することを示す。FSHレベルは、およそベースラインに戻り、新規用量のSTM434がヒトにおけるアクチビンシグナル伝達を再抑制するために必要なことを示している。これらの結果は、STM434がヒトにおいてアクチビンを阻害できることを示す。

【０２６６】

STM434のPKの結果

PKをELISA定量イムノアッセイによって決定した。中間PK分析により、サルにおいて163～259時間（7～11日）を示している以前のデータに比べて2倍高いクリアランスおよび111、114、または147時間（4～5日）のT1/2が示された。図5。これは、対象がより頻繁なSTM434の投薬計画、例えば2週間毎または3週間毎のIVから利益を得られ得ると示唆している。

【０２６７】

STM434が誘発する腫瘍梗塞

顆粒膜腫瘍を有する対象1人（対象2）は、ベースラインで、および再びサイクル4の最初（1日目）にCTスキャンを受けた。2回のスキャンの間に12週間および3回の投与があった。図6にベースラインスキャンを示し、腫瘍を円の中に指し示す。図7にサイクル4の最初に取得された後続のスキャンを示し、今回も腫瘍を円の中に指し示す。スキャンの比較から分かることができるように、腫瘍は、実質的な梗塞を受けていた。これは、低用量のSTM434が顆粒膜腫瘍を有する対象を処置する上で有効であることを示している。

【０２６８】

実施例6：改変されたSTM434プロトコール

実施例5の結果に少なくとも部分的に基づいて、実施例4のSTM434プロトコールを改変した。改変されたプロトコールを下の表17、その付表、および関連する補遺に説明する。

【０２６９】

（表１７）

節	変化の説明（取消線=削除した本文；赤=新しい本文）
概要	**試験デザイン：** 第１部は、進行固形腫瘍を有する対象における3+3デザインを組み入れているオープンラベル用量漸増試験である。計画された５つの用量レベル（0.25mg/kg IV、0.5mg/kg IV、1mg/kg IV、2mg/kg IV、および4mg/kg IV）の静脈内（IV）STM434の安全性、耐容性、およびPKプロファイルを評定するために最大で合計39人の対象を登録する。用量制限毒性（DLT）評価時間枠の間に安全性シグナルが不在の場合、下の表に挙げられているように、計画された用量増分の100％でSTM434を漸増する。安全性シグナル（臨床的に有意なグレード2のSTM434関連AEが≧2件またはグレード3のSTM434関連毒性が１件）が観察されたなら、コホート間の全てのさらなる用量漸増が、用量増分の≦50％起こり、過度の毒性を避けるために追加的な適切な１つまたは複数の用量レベルを検討し得る。各用量レベルを逐次評定し、各用量コホートは、対象3～6人を含む（人数は、DLTが観察されるかどうかに依存する）。評定可能な対象が十分な数であることを保証するために、DLTが不在であってもコホート１つあたり最大で４人の対象が登録され得る。 STM434がそれらの腫瘍型（例えば顆粒膜細胞腫瘍）に対して抗腫瘍活性を提供し得るという予備的証拠が試験実施の間にあるならば、自然増加に近い、より高い用量コホートで安全性が評定されている間に、安全委員会が以前に安全で耐容性良好と宣言した最高の投薬コホートに追加的な対象を登録し得る。 前臨床試験からのPKデータに基づいた予測値に比べて短い半減期および増加したクリアランスを示したコホート１からのデータに基づき、４週間に１回（Q4W）よりも２週間に１回（Q2W）または３週間に１回（Q3W）投与されたSTM434が、曝露を最適化し得る。第１部の間に、コホート２（0.5mg/kg IV Q4W）からのPKデータがコホート１(0.25mg/kg IV Q4W)で行われた半減期の観察を確認するならば、かつSTM434がコホート２において安全で耐容性良好ならば、STM434のQ4W投薬（スケジュールA）をQ2W（スケジュールB）に変える。 スケジュールに任意の変更を加える場合には、同じ用量レベルを次のコホートで繰り返す。例えば、コホート2、0.5mg/kg Q4Wの後に投薬頻度を増加させる決定がなされたならば、評定されるべき次のコホートは、コホート3、0.5mg/kg Q2Wである。その後、安全審査委員会が安全性データに応答してより頻度の低い投薬への漸減を推奨しない限り、後続のコホートを新しいQ2Wスケジュールで登録する。漸減について、Q3W（スケジュールC）およびQ4W（スケジュールA）を同じ用量レベルで評定しているコホートの登録は、安全委員会がQ4W（スケジュールA）だけを評定することを勧めない限り、同時に続行し得る。 第１部で計画された用量コホートは以下の通りである： |	スケジュールA	スケジュールB	スケジュールC
---	---	---	---
コホート１	0.25 mg/kg STM 434 IV Q4W	0.25 mg/kg STM 434 IV Q2W	0.25 mg/kg STM 434 IV Q3W
コホート２	0.5 mg/kg STM 434 IV Q4W	0.5 mg/kg STM 434 IV Q2W	0.5 mg/kg STM 434 IV Q3W
コホート３	1 mg/kg STM 434 IV Q4W	1 mg/kg STM 434 IV Q2W	1 mg/kg STM 434 IV Q3W

コホート 4	2 mg/kg STM 434 IV Q4W	2 mg/kg STM 434 IV Q2W	2 mg/kg STM 434 IV Q3W
コホート 5	4 mg/kg STM 434 IV Q4W	4 mg/kg STM 434 IV Q2W	4 mg/kg STM 434 IV Q3W

治験依頼者が治験責任医師と共に 1 つのコホートから次への用量漸増を決定し、用量漸増は、コホート内の全ての対象が 28 日間（またはスケジュール C[Q3W]に従うならば 21 日間）の処置を完了した後の、生命徴候、ECG、および入手可能な PK データを含めた、処置下で発現した AE、臨床検査室データ、理学的検査所見に基づく。被験処置の最初の 28 日（またはスケジュール C[Q3W]に従うならば 21 日）の対象の DLT または STM434 に関連する重篤な AE（SAE）の発生率が＜33%ならば、用量漸増が起こる。

所与のコホートにおいて、STM434 の初回投与後の最初の 28 日間（またはスケジュール C[Q3W]に従うならば 21 日間）に対象の誰も DLT を経験しないならば、用量漸増が起こり、次の用量レベルのコホートに対象 3 人を登録する。しかし、臨床的に有意なグレード 2 の STM434 関連 AE が≧2 件またはグレード 3 の STM434 関連 AE が 1 件観察されるならば（安全性シグナル）、全てのさらなる用量漸増を用量増分の≦50%に減らす。安全性シグナルが観察された場合には、修正された用量レベルおよびスケジュールを連絡する試験メモを全ての実施施設および IRB に提供し、各後続のコホートのためにこの情報を明記する。コホート中の最初の対象 3 または 4 人のうちの 1 人が DLT を経験するならば、追加的な対象 3 人（または 4 人を最初に登録した場合は 2 人）を同じ用量レベルで登録する。処置の最初の 28 日間（またはスケジュール C[Q3W]を評定するならば最初の 21 日間）にコホート内の対象 6 人のうちの 1 人だけが DLT または STM434 関連 SAE を経験するならば、次のコホートが登録を開始し得る。DLT が観察されるならば、全てのさらなる用量漸増を用量増分の≦50%に減らす。処置の最初の 28 日間（またはスケジュール C[Q3W]を評定するならば最初の 21 日間）にコホート内の対象 6 人のうちの 2 人以上が DLT または STM434 関連 SAE を経験するならば、この用量が毒性量と見なされる。新たに出現した毒性、PK、または PD データに基づき、MTD が決定されるまでより低い用量またはより頻度の低いスケジュールで用量漸増を続行する場合がある。観察された PK データが予測レベル未満ならば、用量＞4mg/kg が探索され得る。

第 2 部は、進行卵巣／子宮内膜明細胞腫瘍、顆粒膜腫瘍、および卵巣／卵管／原発性腹腔漿液性腫瘍を有する対象において追加的な安全性および探索的有効性データを得るようにデザインされたオープンラベル試験である。試験のこの部分には、合計 24 人の対象を登録する；対象 6 人は、卵巣／子宮内膜明細胞腺癌を有する対象、対象 6 人は、顆粒膜細胞腫瘍を有する対象、対象 12 人は、漿液性腫瘍を有する対象となっている。全ての対象は、試験の第 1 部での用量漸増データの審査後に推奨スケジュールを使用して STM434 の IV を RP2D で受ける。この情報を連絡する試験メモを、第 2 部の拡大コホートについて全ての実施施設および IRB に提供する。第 2 部への登録は、第 1 部における RP2D の確立次第である。第 2 部において計画されたコホートは、以下の通りである：

- コホート 6：明細胞腺癌を有する対象 6 人および顆粒膜細胞腫瘍を有する対象 6 人に STM434 を RP2D で IV
- コホート 7：漿液性腫瘍を有する対象 12 人に STM434 を RP2D で IV

第 3 部は、白金系化学療法レジメンを用いた以前の処置を受けたことのある、また

は白金系化学療法を受けることができない、卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有する対象における、3+3デザインを組み入れているリポソームドキソルビシン化学療法と組み合わせたSTM434のオープンラベル用量漸増試験である。第1部が完了し、RP2Dおよび投薬頻度が確立された後に、対象6～12人を第3部に登録する。STM434の用量およびスケジュールの情報を連絡する試験メモを、第3部の化学療法組み合わせコホートについて全ての実施施設およびIRBに提供する。このプロトコールではリポソームドキソルビシンがQ4W投与されるので、第1部で確立されたSTM434の推奨投薬頻度がQ3Wの場合には、類似のPK曝露を生じると予測されるQ4W用量が第3部で使用され得る。第2および3部は、対象を同時に登録する。第3部で計画されたコホートは、以下の通りである：

- コホート8：STM434をRP2Dから1用量レベル下でIV+リポソームドキソルビシン（40mg/m^2 IV）Q4W）
- コホート9：STM434をRP2DでIV+リポソームドキソルビシン（40mg/m^2 IV）Q4W）

治験依頼者が治験責任医師と共にコホート8からコホート9への用量漸増を決定し、用量漸増は、コホート内の対象3人全てが、第1部について概略を述べた3+3デザインを使用する28日間の治療を完了した後の、生命徴候、ECG、および入手可能なPKデータを含めた、処置下で発現したAE、臨床検査室データ、理学的検査所見に基づく。コホート8における最初の用量組み合わせが安全かつ耐容性良好ではない場合には、安全委員会は、化学療法と組み合わせてSTM434のより低い用量を追加的なコホートで評定することを推奨し得る。

対象の交代：第1部では、28日間のSTM434処置を完了する前（またはスケジュールC[Q3W]を評定するならば21日間を完了する前）に、対象がDLT以外の任意の理由でコホートから抜けるならば、1つのコホートあたり対象3人が28日間（またはスケジュールC[Q3W]を評定するならば21日間）のSTM434処置を完了するまで交代の対象をコホートに加える。第2部では、対象を試験に登録した後、いかなる理由でも対象を交代しない。第3部では、28日間のSTM434およびリポソームドキソルビシン処置を完了する前に、対象がDLT以外の任意の理由でコホートから抜けるならば、1つのコホートあたり対象3人が28日間のSTM434処置を完了するまで交代の対象をコホートに加える。

DLTの定義：DLTは、任意の関連するグレード≧3（有害事象共通用語規準（Common Terminology Criteria for Adverse Events）[CTCAE]4.03版に従う）の非血液毒性（無関係の毒性を除く）、または7日間継続する任意のグレード≧4の血液毒性、発熱性好中球減少症、または活動性の出血を有するグレード3の血小板減少症として定義される。減少した用量のSTM434を用いた治療を再開したいと望む、DLTを経験している対象は、毒性がCTCAEグレード≦1またはベースライン値に回復したとき、および対象が疾患の進行を経験していないならば、治験責任医師の裁量で再開し得る。

MTDの定義：MTDは、コホートの対象のDLT発生率＜33％の最高の用量レベルとして定義される。

RP2Dの定義：RP2Dは、MTD、PK、薬力学的バイオマーカーおよび抗腫瘍応答データを考慮して定義される。

対象間用量漸増：対象にX線撮影による進行性疾患の証拠がなく、かつ対象がDLT

を有したことがないならば、安全委員会が以前に安全で耐容性良好と宣言した最高の投薬コホートで評定されたレベルに、治験責任医師の裁量で対象間用量漸増が許される。対象間用量漸増の任意の計画は、対象が 28 日間（または Q3W 投薬スケジュールの場合は 21 日間）の DLT 評定期間を完了し、かつベースライン後に X 線撮影による腫瘍の再ステージ決定を完了したことを必要とする。対象間用量漸増は、医療モニター（medical monitor）と議論されなければならない。

試験対象集団：進行卵巣癌および他の固形腫瘍を有する合計最大 75 人の対象を 3～6 ヶ所の試験実施施設で登録する。対象 75 人のうち最大で対象 39 人を第 1 部に、対象 24 人を第 2 部に、最大で対象 12 人を第 3 部に登録する。

選択基準：

3. a. 腫瘍に利用可能な標準的な全ての処置に抗療性もしくは不耐性と見なされる、再発転移性もしくは局所進行性疾患を有する対象、または標準的な処置が利用不可能な腫瘍を有する対象
あるいは
b. 少なくとも 1 つの白金系化学療法レジメンを以前に受け、その後の無白金間隔が＜12 ヶ月である、白金系療法の間に進行した、または白金系療法の後に持続性疾患を有すると定義される、白金抗療性／抵抗性と見なされる漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔腫瘍、顆粒膜細胞腫瘍または明細胞腫瘍を有する対象が適格である。毒性が原因でさらなる白金を受け入れ不能と定義される、不耐性の対象が適格である。

9. コホート 6 について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#3b に定義）の卵巣／子宮内膜明細胞癌または卵巣顆粒膜細胞腫瘍を有さなければならない。

10. コホート 7 について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#3b に定義）の漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有さなければならない。

11. コホート 8 および 9 について、対象は、進行した白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#3b に定義）の卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有さなければならない。

除外基準：

12. クレアチニン＞1.5×ULN および推定クレアチニンクリアランス＜60mL/min（コッククロフト・ゴールト式を使用）の両方を有する対象

15. サイクル 1 の 1 日目の 5 半減期または 4 週間（どちらでも長い方）以内の抗体／生物学的療法（注：以前にベバシズマブの投与を受けている対象については 6 週間の休薬が許容される）

20. 門脈静脈シャント装置または広範な肝切除の手術歴の存在

試験品、用量、および投与様式：

第 1 部では、計画された STM434 注射剤の用量および投与経路は以下の通りである：0.25mg/kg IV、0.5mg/kg IV、1mg/kg IV、2mg/kg IV、および 4mg/kg IV。第 1 部の間の PK および安全性の観察に応じて、STM434 を Q2W、Q3W、または Q4W 投与する。

	第2および3部では、対象は、RP2D（第1部で確立）またはRP2Dから1用量レベル下でSTM434の投与を受ける。第1部の間のPKおよび安全性の観察に応じて、STM434をQ2W、Q3W、またはQ4W投与する。加えて、第3部での対象は、最大で6サイクルのリポソームドキソルビシン（40mg/m^2 Q4W）の投与を受け；リポソームドキソルビシンについての用量改変および調整は、この製品についての処方情報に従う。 **処置期間：** スクリーニングは、投薬（サイクル1の1日目）の最大28日前に開始する。許容されない毒性が観察されない限り、疾患進行まで第1、2、および3部での対象をSTM434で処置する。疾患進行は、RECIST 1.1基準に従うX線撮影による測定に基づく。

1.1.2.3 臨床薬物動態

対象が4週間毎に（Q4W）0.25mg/kgのIV投与を受けた、本試験のコホート1中の進行固形腫瘍を有する対象3人においてSTM434のPKを特徴づけた。コホート1中の対象3人についてのSTM434の経時的な血漿中濃度を上の実施例に論じる。これらの対象からのPKの中間結果は、STM434のクリアランスが約0.29～0.36mL/h/kgの範囲であったことを示し、それは、前臨床種でのPKの結果に基づき予想された値より2.5倍高かった。半減期は、コホート1における対象3人全ての間で類似しており、値は、111から114から147時間の範囲であり、マウス（242～338時間）およびサル（163～259時間）において観察された範囲よりも実質的に短かった。コホート2（0.5mg/kg IV Q4W[スケジュールA]）からのPKの中間結果が、コホート1（0.25mg/kg IV Q4W[スケジュールA]）について観察されたのと類似の半減期を確認するならば、投薬が2週間毎(Q2W;5.2.1節の表2におけるスケジュールB;3.1.1節も参照されたい）に変わることが予期される。毒性が観察されない限り、Q2Wを使用して後続のコホートを評定する。

1.2 開始用量の選択のための根拠

本FIH試験での最高計画用量は、Q2WでIV投与される4.0mg/kgである。この用量で、予測されるヒトC_{max}およびAUC_{0336}は、それぞれ121.3μg/mLおよび12395μg*h/mLであり、これらは、サルにおける4週間毒性試験でのNOAEL用量でのC_{max}およびAUC_{0336}に対して1.8倍および4.9倍の曝露マージンならびにCD-1マウスにおける4週間毒性試験でのSTD10用量でのC_{max}およびAUCに対して0.7倍および1.1倍の曝露マージンによって支持される（表1）。

（表１）マウス（15mg/kg）およびカニクイザル（10mg/kg）への反復（QW）の皮下投与からの曝露（AUC_{0-336}）に比べたヒトへの反復（Q2W）の静脈内投与後のSTM434についての推定曝露マージン

臨床用量 (mg/kg, Q2W)	ヒト薬物動態		マウスに基づくマージン (15 mg/kg)[a]		サルに基づくマージン (10 mg/kg)[b]	
	AUC_{0-336} (μg·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-336} (μg·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-336} (μg·h/mL)	C_{max} (ng/mL)
0.25	774.71	7580	18.1	10.4	78.7	28.8
0.5	1549.42	15160	9.1	5.2	39.4	14.4
1	3098.83	30321	4.5	2.6	19.7	7.2
2	6197.66	60642	2.3	1.3	9.8	3.6
4	12395.32	121285	1.1	0.7	4.9	1.8

[a]参考までに、15mg/kg STM434を投与されたマウスは、AUC_{0-168}=7030μg*h/mLおよびC_{max}=79.1μg/mLを有した。
[b]15mg/kgを投与されたサルは、以下の値を有した：AUC_{0-168}=30500μg*h/mLおよびC_{max}=218μg/mL

3.1.1 試験の第1部

第1部は、進行固形腫瘍を有する対象において3+3デザインを組み入れているオープンラベル用量漸増試験である。5つの用量レベル（0.25mg/kg IV、0.5mg/kg IV、1mg/kg IV、2mg/kg IV、および4mg/kg IV）のIV STM434の安全性、耐容性、およびPKプロファイルを評定するために,最大で合計39人の対象を計画された5つの逐次用量コホート（コホート1～5；表2に定義）に登録する。DLT評価時間枠の間に安全性シグナルが不在の場合、計画された用量増分の100%でSTM434を漸増する。安全性シグナル（臨床的に有意なグレード2のSTM434関連AEが≧2件またはグレード3のSTM434関連毒性が1件）が観察されるなら、コホート間の全てのさらなる

用量漸増が、用量増分の≦50％で起こり、過度の毒性を避けるために追加的な適切な１つまたは複数の用量レベルを試験し得る。各用量レベルを逐次評定し、各用量コホートは、対象3～6人からなる（人数は、DLTが観察されるかどうかに依存する）。評定可能な対象が十分な数であることを保証するために、DLTが不在であってもコホート１つあたり最大で４人の対象が登録され得る。

STM434がそれらの腫瘍型（例えば顆粒膜細胞腫瘍）に対して抗腫瘍活性を提供し得るという予備的証拠が試験実施の間にあるならば、自然増加に近い、より高い用量コホートで安全性が評定されている間に、安全委員会が以前に安全で耐容性良好と宣言した最高の投薬コホートに追加的な対象が登録され得る。

前臨床試験からのPKデータに基づいた予測値に比べて短い半減期および増加したクリアランスを示したコホート１からのPKデータに基づき（1.1.2.3節）、Q4WよりもQ2Wまたは３週間毎（Q3W）に投与されたSTM434が、曝露を最適化し得る。コホート２（0.5mg/kg IV Q4W[スケジュールA]）からのPKの中間結果がコホート１（0.25mg/kg IV[スケジュールA]）で観察された半減期を確認するならば、より頻繁な投薬スケジュールで毒性が観察されない限り、コホート３での投薬は、0.5mg/kg IV Q2W（スケジュールB）である。

スケジュールに任意の変更がある場合には、同じ用量レベルを次のコホートで繰り返す。例えば、コホート２、0.5mg/kg Q4Wの後に投与頻度を増加させる決定がなされたならば、評定されるべき次のコホートは、コホート３、0.5mg/kg Q2Wである。その後、安全審査委員会が安全性データに応答してより頻度の低い投薬への漸減を推奨しない限り、後続のコホートを新しいQ2Wスケジュールで登録する。漸減について、Q3W（スケジュールC）およびQ4W（スケジュールA）を同じ用量レベルで評定しているコホートの登録は、安全委員会がQ4W（スケジュールA）だけを評定することを勧めない限り、同時に続行し得る。任意のスケジュール変更の決定を連絡する試験メモを全ての実施施設および施設内治験審査委員会（IRB）に提供し、各プロトコールコホートで試験されるSTM434の用量および頻度を明記する。

Q4W（スケジュールA）、Q2W（スケジュールB）、およびQ3W（スケジュールC）についての投薬スケジュールを表２（5.2.1節）に定義する。

治験依頼者が治験責任医師と共に１つのコホートから次への用量漸増を決定し、用量漸増は、コホート内の対象３人全てが28日間（またはスケジュールC[Q3W]に従うならば21日間）の処置を完了した後の、生命徴候、ECG、および入手可能なPKデータを含めた、処置下で発現したAE、臨床検査室データ、理学的検査所見に基づく。被験処置の最初の28日間（またはスケジュールC[Q3W]に従うならば21日間）の対象のDLTまたはSTM434に関連する重篤なAE（SAE）の発生率が＜33％ならば、用量漸増が起こる。

所与のコホートにおいて、STM434の初回投与後の28日間（スケジュールC[Q3W]を評定するならば最初の21日間）に対象３人の誰もDLTを経験しないならば、用量漸増が起こり、対象３人を次の用量レベルのコホートに登録する。しかし、臨床的に有意なグレード２のSTM434関連AEが≧２件またはグレード３のSTM434関連AEが１件観察されるならば（安全性シグナル）、全てのさらなる用量漸増を用量増分の≦50％に減らす。安全性シグナルが観察される場合には、修正された用量レベルおよびスケジュールを連絡する試験メモを全ての実施施設およびIRBに提供し、各後続

	のコホートのためにこの情報を明記する。コホート中の最初の対象3または4人のうちの1人がDLTを経験するならば、追加的な対象3人（または4人を最初に登録した場合は2人）を同じ用量レベルで登録する。処置の最初の28日間（またはスケジュールC[Q3W]を評定するならば最初の21日間）にコホート内の対象6人のうちの1人だけがDLTまたはSTM434関連SAEを経験するならば、次のコホートが登録を開始し得る。DLTが観察されるならば、全てのさらなる用量漸増を用量増分の≦50%に減らす。処置の最初の28日間（スケジュールC[Q3W]を評定するならば最初の21日間）にコホート内の対象6人のうちの2人以上がDLTまたはSTM434関連SAEを経験するならば、この用量が毒性量と見なされる。新たに出現した毒性、PK、またはPDデータに基づき、MTDが決定されるまでより低い用量またはより少ない頻度のスケジュールで用量漸増を続行し得る。観察されるPKデータが予測レベル未満ならば、4mg/kgよりも高い用量が探索され得る。
3.1.2 試験の第2部	第2部は、進行卵巣／子宮内膜明細胞腫瘍、顆粒膜腫瘍、および卵巣／卵管／原発性腹腔漿液性腫瘍を有する対象において追加的な安全性および探索的有効性データを得るようにデザインされたオープンラベル試験である。試験のこの部分で合計24人の対象を2つのコホートに登録する。一方のコホート（コホート6と称される）は、明細胞腺癌を有する対象6人および顆粒膜細胞腫瘍を有する対象6人を含み、第2のコホート（コホート7）は、漿液性腫瘍を有する対象12人を含む。全ての対象は、第1部での用量漸増データの審査後に推奨スケジュールを使用してRP2DでSTM434のIV投与を受ける。第2部の拡大コホートのために、この情報を連絡する試験メモを、全ての実施施設およびIRBに提供する。第2部への登録は、第1部におけるRP2Dの確立次第である。
3.1.3 試験の第3部	第3部は、白金系化学療法レジメンを用いた以前の処置を受けたことのある、または白金系化学療法を受けることができない、卵巣、卵管、または原発性腹腔癌を有する対象における、3+3デザインを組み入れているリポソームドキソルビシン化学療法と組み合わせたSTM434のオープンラベル用量漸増試験である。第1部が完了し、RP2Dおよび投薬頻度が確立された後に、対象6～12人を第3部に登録し；第2および3部は、対象を同時に登録する。第3部の化学療法組み合わせコホートのために、STM434の用量およびスケジュールの情報を連絡する試験メモを、全ての実施施設およびIRBに提供する。このプロトコールではリポソームドキソルビシンがQ4W投与されるので、第1部で確立されたSTM434の推奨投薬頻度がQ3Wの場合には、類似のPK曝露を生じると予測されるQ4W用量を第3部に使用し得る。 第3部での対象を、それぞれ対象3～6人の2つの用量コホートで評定する（コホート1つあたりの対象の人数は、DLTが観察されるかどうかに依存する）。一方のコホート（コホート8と称される）は、RP2Dから1用量レベル下でSTM434の投与を受け、第2のコホート（コホート9）は、RP2DでSTM434の投与を受け；両方のコホートは、リポソームドキソルビシンの投与を40mg/m^{2}で受ける。 両方のコホートの対象は、STM434の投与を受ける前にリポソームドキソルビシンの注入を受ける。ベースラインで、およびリポソームドキソルビシンの投与の間に、マルチゲート収集（MUGA）スキャンまたは心エコー（ECHO）含めた臨床検査を評定する(付録1参照)。必要ならば、毒性管理ガイドラインに従って40mg/m^{2}から30mg/m^{2}への用量減少を実行するべきである（5.3.2節参照）。リポソームドキソルビシンと同時投与されたときのSTM434の安全性、耐容性、およびPKプロファイルを評定する。 STM434のより低い用量（すなわちRP2Dから1用量レベル下[コホート8]）を最初に

	評定する。治験依頼者が治験責任医師と共に用量漸増を決定し、用量漸増は、コホート内の対象3人全てが、第1部について概略を述べた3+3デザインを使用する28日間の治療を完了した後の、生命徴候、ECG、および入手可能なPKデータを含めた、処置下で発現したAE、臨床検査室データ、理学的検査所見に基づく。コホート8における最初の用量組み合わせが安全かつ耐容性良好ではない場合には、安全委員会は、追加的なコホートで化学療法と組み合わせてSTM434のより低い用量を評定することを推奨し得る（3.1.1および5.2.1節参照）。
3.2 用量制限毒性	減少した用量のSTM434を用いた治療を再開したいと望む、DLTを経験している対象は、毒性がCTCAEグレード≦1またはベースライン値に回復したとき、および対象が疾患の進行を経験していないならば、治験責任医師の裁量で再開する場合がある。
4.1 選択基準	3. a. 対象の腫瘍に利用可能な標準的な全ての処置に抗療性もしくは不耐性と見なされる、再発転移性もしくは局所進行性疾患を有する対象、または標準的な処置が利用不可能な腫瘍を有する対象 あるいは b. 少なくとも1つの白金系化学療法レジメンを以前に受け、その後の無白金間隔が＜12ヶ月である、白金系療法の間に進行した、または白金系療法の後に持続性疾患を有すると定義される、白金抗療性／抵抗性と見なされる漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔腫瘍、顆粒膜細胞腫瘍または明細胞腫瘍を有する対象が適格である。毒性が原因でさらなる白金を受け入れ不能と定義される、不耐性の対象が適格である。 9. コホート6について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#3bに定義）の卵巣／子宮内膜明細胞癌または卵巣顆粒膜細胞腫瘍を有さなければならない。 10. コホート7について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#3bに定義）の漿液性卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有さなければならない。 11. コホート8および9について、対象は、白金抗療性／抵抗性／不耐性（選択基準#3bに定義）の進行卵巣／卵管／原発性腹腔癌を有さなければならない。
4.2 除外基準	12. クレアチニン＞1.5×ULNおよび推定クレアチニンクリアランス＜60mL/min（コッククロフト・ゴールト式を使用）の両方を有する対象 15. サイクル1の1日目の5半減期または4週間（どちらでも長い方）以内の抗体／生物学的療法（注：以前にベバシズマブの投与を受けている対象については6週間の休薬が許容される） 20. 門脈静脈シャント装置または広範な肝切除の手術歴の存在
4.4 対象の交代	試験の第1部について、28日間のSTM434処置を完了する前（スケジュールC[Q3W]を評定するならば21日間を完了する前）に、対象がDLT以外の任意の理由でコホートから抜けるならば、1つのコホートあたり対象3人が28日間（またはスケジュールC[Q3W]を評定するならば21日間）のSTM434処置を完了するまで必要に応じて交代の対象をコホートに加える。
5.2.1 STM 434	第1部において計画された用量コホートを表1に記載する。コホート1からのPKデータは、Q2WまたはQ3Wのような、Q4Wよりも頻繁な投薬が曝露を最適化し得ることを示した（1.1.2.3節参照）。第1部の間に、コホート2（0.5mg/kg IV Q4W）からのPKデータが、コホート1（0.25mg/kg IV Q4W）で行われた半減期の観察を確認するならば、かつSTM434がコホート2において安全で耐容性良好ならば、STM434

	のQ4W投薬（スケジュールA）をQ2W（スケジュールB）に変更する（表2）。 スケジュールに任意の変更がある場合には、同じ用量レベルを次のコホートで繰り返す。例えば、コホート2、0.5mg/kg Q4Wの後に投薬頻度を増加させる決定がなされたならば、評定されるべき次のコホートは、コホート3、0.5mg/kg Q2Wである。その後、安全審査委員会が安全性データに応答してより頻度の低い投薬への漸減を推奨しない限り、後続のコホートを新しいQ2Wスケジュールで登録する。漸減について、Q3W（スケジュールC）およびQ4W（スケジュールA）を同じ用量レベルで評定しているコホートの登録は、安全委員会がQ4W（スケジュールA）だけを評定することを勧めない限り、同時に続行し得る。任意のスケジュール変更の決定を連絡する試験メモを全ての実施施設およびIRBに提供し、各プロトコールコホートで試験されるべきSTM434の用量および頻度を明記する。 **（表２）第１部で計画される用量コホート** スケジュールA / スケジュールB / スケジュールC コホート1：0.25 mg/kg STM 434 IV Q4W / 0.25 mg/kg STM 434 IV Q2W / 0.25 mg/kg STM 434 IV Q3W コホート2：0.5 mg/kg STM 434 IV Q4W / 0.5 mg/kg STM 434 IV Q2W / 0.5 mg/kg STM 434 IV Q3W コホート3：1 mg/kg STM 434 IV Q4W / 1 mg/kg STM 434 IV Q2W / 1 mg/kg STM 434 IV Q3W コホート4：2 mg/kg STM 434 IV Q4W / 2 mg/kg STM 434 IV Q2W / 2 mg/kg STM 434 IV Q3W コホート5：4 mg/kg STM 434 IV Q4W / 4 mg/kg STM 434 IV Q2W / 4 mg/kg STM 434 IV Q3W 第2部において計画される用量コホートは、以下の通りである： コホート6：明細胞腺癌を有する対象6人および顆粒膜細胞腫瘍を有する対象6人にSTM434をRP2DでIV コホート7：漿液性卵巣腫瘍を有する対象12人にSTM434をRP2DでIV
5.2.1.1 対象間用量漸増	対象にX線撮影による進行性疾患の証拠がなく、かつDLTを有したことがないならば、安全委員会が以前に安全で耐容性良好と宣言した最高の投薬コホートで評定されたレベルに、治験責任医師の裁量で対象間用量漸増が許される。対象間用量漸増の任意の計画は、対象が28日間（またはQ3W投薬スケジュールの場合は21日間）のDLT評定期間を完了し、かつベースライン後のX線撮影による腫瘍の再ステージ決定を完了したことを必要とする。対象間用量漸増は、医療モニターと議論されなければならない。
5.2.2 リポソームドキソルビシン	リポソームドキソルビシンおよびSTM434の両方が第3部で投与されるときの処置日に、リポソームドキソルビシンを最初に与える。第3部の各コホートについてSTM434の用量およびスケジュールを明記している情報を、試験メモとして全ての実施施設およびIRBに提供する。 製造業者の処方情報にならい、施設のガイドラインに従って、リポソームドキソルビシンを投与するべきである。

5.3.1.5 関連毒性について許容されるSTM434の用量減少

（表５）STM434の用量減少

用量レベル	用量減少の指示
0.25 mg/kg STM 434 IV–	1回目の発生:　治療を中止
0.5 mg/kg STM 434 IV	グレード≦1になるまでSTM434を中断、次に： 1回目の発生:　最初の用量よりも1用量レベル下で再開(例えば，0.25 mg/kg STM 434 IV)[a] 2回目の発生:　治療を中止
1 mg/kg STM 434 IV	グレード≦1になるまでSTM434を中断、次に： 1回目の発生:　最初の用量よりも1用量レベル下で再開(例えば，0.5 mg/kg STM 434 IV)[a] 2回目の発生:　最初の用量の2用量レベル下で再開(例えば，0.25 mg/kg STM 434 IV)[a] 3回目の発生:　治療を中止
2 mg/kg STM 434 IV	グレード≦1になるまでSTM434を中断、次に： 1回目の発生:　最初の用量よりも1用量レベル下で再開(例えば，1 mg/kg STM 434 IV)[a] 2回目の発生:　最初の用量の2用量レベル下で再開(例えば，0.5 mg/kg STM 434 IV)[a] 3回目の発生:　治療を中止
4 mg/kg STM 434 IV	グレード≦1になるまでSTM434を中断、次に： 1回目の発生:　最初の用量よりも1用量レベル下で再開(例えば，2 mg/kg STM 434 IV)[a] 2回目の発生:　最初の用量の2用量レベル下で再開(例えば，1 mg/kg STM 434 IV)[a] 3回目の発生:　治療を中止

[a] 対象が処置を再開する用量を医療モニターと確認するべきである。
[b] より低い用量レベルが存在しないならば、治療を中止する。

5.4.1 許容される薬剤／治療法

医学的介入を要する腹水を有する対象は、PK試料採取に及ぼす可能な影響を最小限にするために、サイクル1の1日目およびサイクル3の1日目にSTM434を投薬する前に穿刺を受けるべきである。

6. 試験手順

手順／評価の説明を第7節に提供する。STM434投薬の頻度に基づく試験手順のスケジュールを付録1（Q4W投薬）、付録2（Q2W投薬）、および付録3（Q3W投薬）に提供する。

6.1 STM434 Q4Wの投与を受けている対象のための手順

・以下のスケジュールは、STM434のQ4W投与を受けている対象用である。

6.1.1　スクリーニング

臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、血清脂質、尿検査、血清妊娠検査（妊娠する可能性がある女性のみ）、潜血についての便グアヤク試験、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジ

オール、男性対象についてのテストステロン）、HOMA 計算のための空腹時血清グルコースおよび血清インスリン、HbA1c、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についての CA-125；前立腺癌を有する対象についての PSA；結腸癌を有する対象についての CEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのミュラー管抑制物質[MIS；中央検査室による]）

癌、心臓、および身体組成の放射線による評価（被験薬剤の初回投薬を開始する 30 日前以内）：
CNS 転移を除外するための脳 MRI が好ましい。対象が MRI を受けることができない／望まないならば、オープン型の造影 MRI/CT が許容される。

6.1.2 -1 日目

ECG（中央検査室からのホルター装置を配置し、サイクル 1 の 2 日目試験来院まで装着する）

6.1.3 処置相

6.1.3.1 サイクル 1／1 日目

・特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の 3 日前以内に以下の評価を行うべきである（投与前に臨床検査を完了するべきである）：

ECG（対象は、-1 日目に配置された中央検査室ホルター装置をサイクル 1 の 2 日目の試験来院まで装着し続ける）

臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についての CA-125；前立腺癌を有する対象についての PSA；結腸癌を有する対象についての CEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についての MIS[中央検査室による]）

記載された試料採取時間の±30 分以内の投与後 PK 試料採取（付録 4 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである。

6.1.3.2 サイクル 1／2、3、8 日目

記載された試料採取時間の±4 時間以内の PK 試料採取（付録 4 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである。

6.1.3.3 サイクル 1／15 日目

記載された試料採取時間の±1 日以内の PK 試料採取（付録 4 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである。

6.1.3.4 サイクル 2、4、6…／1 日目

特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の±3 日以内に以下の評価を行うべきである：

臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテ

ストステロン）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125；前立腺癌を有する対象についてのPSA；結腸癌を有する対象についてのCEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのMIS[中央検査室による]）

特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビンA、CTC（サイクル2の1日目のみ）

抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取

記載された試料採取時間の±30分以内の投与後PK試料採取（付録4参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.1.3.5 サイクル3、5、7／1日目（および処置中止時）

臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、脂質パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HOMA計算のための空腹時血清グルコースおよび空腹時血清インスリン、HbA1c（サイクル3の1日目および処置中止時のみ）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA125；前立腺癌を有する対象についてのPSA；結腸癌を有する対象についてのCEA;顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのMIS[中央検査室による]）

特殊臨床検査（中央検査室）：アクチビンA

抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取

記載された試料採取時間の±30分以内の投与後PK試料採取（付録4参照）。処置中止時に、PK試料採取の時間枠は±3日である。PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである。

癌、心臓および身体組成の放射線による評価

1日目の14日前以内の腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の胸部／腹部／骨盤のCT/MRI（C7D1まで；その後、治験責任医師が疾患進行の可能性が低いと見なすならば、治験責任医師は腫瘍のステージ決定のスキャン頻度を4サイクルに1回、すなわちC11、C15に減少し得る）。

腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の骨スキャン（骨転移を有する対象についてのみ；C7D1の後に、治験責任医師が疾患進行の可能性が低いと見なすならば、治験責任医師は腫瘍のステージ決定のスキャン頻度を4サイクルに1回、すなわちC11、C15…に減少し得る）。

1日目の14日前以内の身体組成についての中央検査室のDXA（C7D1まで；その後、4サイクル毎、すなわちC11、C15…にさらなるDXAスキャンを収集）

心機能についての各施設の検査室のMUGAまたはECHO（サイクル3にだけリポソームドキソルビシンの投与を受ける、第3部の対象についてのみ）

筋機能検査：6MWT（スクリーニング時に行われたのと同じ時刻に同じ検査員により本検査を行うようあらゆる努力を尽くすべきである；C7D1の後に、4サイクル毎、すなわちC11、C15…に6MWTを収集する）。

6.1.3.6 サイクル3／2、3、8日目

記載された試料採取時間の±4時間以内のPK試料採取（付録4参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.1.4 試験終了

試験終了（EOS）の来院を、試験を完了した対象についてSTM434の最終投与の28±

	3日後にスケジュールするべきである。試験を完了する前に試験を中止する対象は、中止時にEOSの評価を受けるべきである。EOSの来院で行われるべき評価は、以下の通りである： 特殊臨床検査（中央検査室）：血清アクチビンA
6.2 STM434の投与をQ2Wで受けている対象についての手順	以下のスケジュールは、STM434の投与をQ2Wで受けている対象用である。このスケジュールで、対象は、各28日サイクルの1日目および15日目にSTM434の投与を受ける。 **6.2.1 スクリーニング** 注記した場合を除いて、以下の評価／手順を初回の被験薬剤投与を開始する14日前以内に記録／実施するべきである： 対象による書面のインフォームドコンセント（試験に特有の任意の手順が行われる前に得なければならない） 対象が全ての選択および除外基準を満たすことの検証 BRCA1の状態（卵巣癌および乳癌の対象）を含めた、人口統計および完全な医療歴 理学的検査 身長および体重 肥満度指数（BMI、最新の身長および体重に基づく）のeCRF計算 生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数） ECOGパフォーマンスステータス 併用薬 処置前SAE：インフォームドコンセントの文書にサインした時点から1日目の被験薬剤投与まで報告 PRO：FACT/GOG-NTXサブスケール 12誘導ECG（各施設で実施および読み取り） 臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、血清脂質、尿検査、血清妊娠検査（妊娠する可能性がある女性のみ）、潜血についての便グアヤク試験、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HOMA計算のための空腹時血清グルコースおよび血清インスリン、HbA1c、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125；前立腺癌を有する対象についてのPSA；結腸癌を有する対象についてのCEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのMIS[中央検査室による]） 特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビンA、CTC、ACVR2BおよびINHBA遺伝子発現（全ての対象）用の腫瘍切片／腫瘍ブロック、遺伝子変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について） 抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取 癌、心臓、および身体組成の放射線による評価（被験薬剤の初回投与を開始する30日前以内）： 腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の胸部／腹部／骨盤のCT/MRI CNS転移を除外するための脳MRIが好ましい。対象がMRIを受けることができない／望まないならば、オープン型の造影MRI/CTが許容される。 腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の骨スキャン（骨転移を有する対象についてのみ） 身体組成についての中央検査室のDXA

各施設の検査室のMUGAまたはECHO(リポソームドキソルビシンの投与を受ける、第3部の対象についてのみ)
筋機能検査：6MWT
6MWTを2回行うべきであり、2回の検査の最も良い方をeCRFに記録する
対象は2回の検査の間に少なくとも1時間休息するべきである
同じ時刻に同じ検査員により後続の6MWTを行うようあらゆる努力を尽くすべきである

6.2.2 -1日目

ECG（中央検査室からのホルター装置をサイクル1の2日目の試験来院まで配置および装着する）

6.2.3 処置相

6.2.3.1 サイクル1／1日目

特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の3日前以内に以下の評価を行うべきである（投与前に臨床検査を完了するべきである）：
理学的検査
体重
BMIのeCRF計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOGパフォーマンスステータス
ECG（対象は、-1日目に配置された中央検査室のホルター装置をサイクル1の2日目の試験来院まで装着し続ける）
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125；前立腺癌を有する対象についてのPSA；結腸癌を有する対象についてのCEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのMIS[中央検査室による]）
特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビンA
抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取（中央検査室による）
STM434投与
リポソームドキソルビシンの投与（第3部のみ）
併用薬
有害事象
記載された試料採取時間の±30分以内の投与後PK試料採取（付録5参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.2.3.2 サイクル1／2、3、8日目

ホルターモニターを脱着する（2日目のみ）
記載された試料採取時間の±4時間以内のPK試料採取（付録5参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.2.3.3 サイクル1／15日目

15日±1日目に以下の評価を行うべきである：
理学的検査
体重

BMI の eCRF 計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOG パフォーマンスステータス
STM434 投与
併用薬
有害事象
PRO: FACT/GOG-NTX サブスケール
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）
特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビン A
記載された試料採取時間の 1 日前以内の PK 試料採取（付録 5 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.2.3.4 サイクル 2、4、6…/1 日目

特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の±3 日以内に以下の評価を行うべきである：

理学的検査
体重
BMI の eCRF 計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOG パフォーマンスステータス
STM434 投与
リポソームドキソルビシンの投与（第 3 部のみ）
併用薬
有害事象
PRO: FACT/GOG-NTX サブスケール
12 誘導 ECG（中央検査室の装置を使用）
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についての CA-125；前立腺癌を有する対象についての PSA；結腸癌を有する対象についての CEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についての MIS[中央検査室による]）
特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビン A、CTC（サイクル 2 の 1 日目のみ）
抗 STM434 抗体についての臨床免疫試料採取
記載された試料採取時間の±4 時間以内の PK 試料採取（付録 5 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである
筋機能検査（サイクル 2 のみ）：6MWT（スクリーニング時に行われたのと同じ時刻に同じ検査員によりこの検査を行うようあらゆる努力を尽くすべきである）

6.2.3.5 サイクル 2、4、6…/15 日目

特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の±3 日以内に以下の評価を行うべきである：

理学的検査
体重

BMI の eCRF 計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
STM434 投与
併用薬
有害事象
記載された試料採取時間の 1 日前以内の投与前 PK 試料採取（付録 5 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.2.3.6 サイクル 3、5、7…/1 日目（および処置中止時）

スケジュールされた来院の±3 日以内に以下の評価を行うべきである：

理学的検査
体重
BMI の eCRF 計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOG パフォーマンスステータス
STM434 投与
リポソームドキソルビシン投与（第 3 部のみ）
併用薬
有害事象
PRO: FACT/GOG-NTX サブスケール
ECG（12 誘導，中央検査室の装置を使用）
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、脂質パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HOMA 計算のための空腹時血清グルコースおよび空腹時血清インスリン、HbA1c（サイクル 3 の 1 日目および処置中止時のみ）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についての CA-125；前立腺癌を有する対象についての PSA；結腸癌を有する対象についての CEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についての MIS[中央検査室による]）
特殊臨床検査（中央検査室）：アクチビン A
抗 STM434 抗体についての臨床免疫試料採取
記載された試料採取時間の±30 分以内の投与後 PK 試料採取（付録 5 参照）。処置中止時に、PK 試料採取の時間枠は±3 日である。PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである
癌、心臓および身体組成の放射線による評価
1 日目の 14 日前以内の腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の胸部／腹部／骨盤の CT/MRI（C7D1 まで；その後、治験責任医師が、疾患進行の可能性が低いと見なすならば、治験責任医師は腫瘍のステージ決定のスキャン頻度を 4 サイクルに 1 回、すなわち C11、C15…に減少し得る）
腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の骨スキャン（骨転移を有する対象についてのみ；C7D1 の後に、治験責任医師が、疾患進行の可能性が低いと見なすならば、治験責任医師は腫瘍のステージ決定のスキャン頻度を 4 サイクルに 1 回、すなわち C11、C15…に減少し得る）
1 日目の 14 日前以内の身体組成についての中央検査室の DXA（C7D1 まで；その後、4 サイクル毎、すなわち C11、C15…にさらなる DXA スキャンを収集する）
心機能についての各施設の検査室の MUGA または ECHO（サイクル 3 のみでリポソームドキソルビシンの投与を受ける、第 3 部の対象についてのみ）
筋機能検査：6MWT（スクリーニング時に行われたのと同じ時刻に同じ検査員によ

	り本検査を行うようあらゆる努力を尽くすべきである；C7D1の後、4サイクル毎、すなわちC11、C15…に6MWTを収集する） **6.2.3.7　サイクル3／2、3、8日目** 記載された試料採取時間の±4時間以内のPK試料採取（付録5参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである **6.2.3.8　サイクル3、5、7…／15日目** 特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の±3日以内に以下の評価を行うべきである： 理学的検査 体重 BMIのeCRF計算（最新の体重および身長に基づく） 生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数） STM434投与 併用薬 有害事象 記載された試料採取時間の1日前以内の投与前PK試料採取（付録5参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである **6.2.4　試験終了** EOSの来院を、試験を完了した対象についてSTM434の最終投与の28±3日後にスケジュールするべきである。試験を完了する前に中止する対象は、中止時にEOSの評価を受けるべきである。EOSの来院で行われるべき評価は、以下の通りである： 理学的検査 体重 BMIのeCRF計算（最新の体重および身長に基づく） 生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数） ECOGパフォーマンスステータス 有害事象 PRO：FACT/GOG-NTXサブスケール 12誘導ECG（中央検査室の装置を使用） 臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、脂質パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HbA1c、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125、前立腺癌を有する対象についてのPSA、結腸癌を有する対象についてのCEA） 特殊臨床検査（中央検査室）：血清アクチビンA 抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取
6.3 STM434の投与をQ3Wで受けている対象についての手順	以下のスケジュールは、STM434の投与をQ3Wで受けている対象用である。このスケジュールで、対象は、各21日サイクルの1日目にSTM434の投与を受ける。 **6.3.1　スクリーニング** 注記した場合を除いて、以下の評価／手順を初回の被験薬剤投与を開始する14日前以内に記録／実施するべきである： 対象による書面のインフォームドコンセント（試験に特有の任意の手順が行われる前に得なければならない） 対象が全ての選択および除外基準に該当することの検証

BRCA1の状態（卵巣癌および乳癌の対象）を含めた、人口統計および完全な医療歴
理学的検査
身長および体重
肥満度指数（BMI、最新の身長および体重に基づく）のeCRF計算
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOGパフォーマンスステータス
併用薬
処置前SAE：インフォームドコンセントの文書にサインした時点から1日目の被験薬剤投与まで報告
PRO: FACT/GOG-NTXサブスケール
12誘導ECG（各施設で実施および読み取り）
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、血清脂質、尿検査、血清妊娠検査（妊娠する可能性がある女性のみ）、潜血についての便グアヤク試験、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HOMA計算のための空腹時血清グルコースおよび血清インスリン、HbA1c、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125；前立腺癌を有する対象についてのPSA；結腸癌を有する対象についてのCEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのMIS[中央検査室による]）
特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビンA、CTC、ACVR2BおよびINHBA遺伝子発現（全ての対象）用の腫瘍切片／腫瘍ブロック、遺伝子変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について）
抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取
癌、心臓、および身体組成の放射線による評価（被験薬剤の初回投与を開始する30日前以内）：
腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の胸部／腹部／骨盤のCT/MRI
CNS転移を除外するための脳MRIが好ましい。対象がMRIを受けることができない／望まないならば、オープン型の造影MRI/CTが許容される。
腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の骨スキャン（骨転移を有する対象についてのみ）
身体組成についての中央検査室のDXA
筋機能検査：6MWT
6MWTを2回行うべきであり、2回の検査の最も良い方をeCRFに記録する
対象は2回の検査の間に少なくとも1時間休息するべきである
同じ時刻に同じ検査員により後続の6MWTを行うようあらゆる努力を尽くすべきである

6.3.2 -1日目

ECG（中央検査室からのホルター装置をサイクル1の2日目の試験来院まで配置および装着する）

6.3.3 処置相

6.3.3.1 サイクル1／1日目

特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の3日前以内に以下の評価を行うべきである（投与前に臨床検査を完了するべきである）：
理学的検査

体重
BMI の eCRF 計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候(耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数)
ECOG パフォーマンスステータス
ECG（対象は、-1 日目に配置された中央検査室のホルター装置をサイクル 1 の 2 日目の試験来院まで装着し続ける）
臨床検査(各施設の検査室)：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についての CA-125；前立腺癌を有する対象についての PSA；結腸癌を有する対象についての CEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についての MIS[中央検査室による]）
特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビン A
抗 STM434 抗体についての臨床免疫試料採取（中央検査室による）
STM434 投与
併用薬
有害事象
記載された試料採取時間の±30 分以内の投与後 PK 試料採取（付録 6 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.3.3.2 サイクル 1／2、3、8 日目
ホルターモニターを脱着する（2 日目のみ）
記載された試料採取時間の±4 時間以内の PK 試料採取（付録 6 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.3.3.3 サイクル 1／15 日目
記載された試料採取時間の±1 日以内の PK 試料採取（付録 6 参照）；PK の来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである

6.3.3.4 サイクル 2、4、6…／1 日目
特に下に述べない限り、スケジュールされた来院の±3 日以内に以下の評価を行うべきである：
理学的検査
体重
BMI の eCRF 計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOG パフォーマンスステータス
STM434 投与
併用薬
有害事象
PRO: FACT/GOG-NTX サブスケール
12 誘導 ECG（中央検査室の装置を使用）
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についての CA-125；前立腺癌を有する対象についての PSA；結腸癌を有する対象についての CEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についての MIS[中央検査室による]）

特殊臨床検査（中央検査室による）：血清アクチビンA、CTC（サイクル2の1日目のみ）
抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取
記載された試料採取時間の±4時間以内のPK試料採取（付録6参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである
筋機能検査（サイクル2のみ）：6MWT（スクリーニング時に行われたのと同じ時刻に同じ検査員により本検査を行うようあらゆる努力を尽くすべきである）

6.3.3.5 サイクル3、5、7…／1日目（および処置中止時）

スケジュールされた来院の±3日以内に以下の評価を行うべきである：
理学的検査
体重
BMIのeCRF計算（最新の体重および身長に基づく）
生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数）
ECOGパフォーマンスステータス
STM434投与
併用薬
有害事象
PRO: FACT/GOG-NTXサブスケール
ECG（中央検査室の装置を使用して12誘導）
臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、脂質パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HOMA計算のための空腹時血清グルコースおよび空腹時血清インスリン、HbA1c（サイクル3の1日目および処置中止時のみ）、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125；前立腺癌を有する対象についてのPSA；結腸癌を有する対象についてのCEA；顆粒膜細胞腫瘍を有する対象についてのMIS[中央検査室による]）
特殊臨床検査（中央検査室）：アクチビンA
抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取
記載された試料採取時間の±30分以内の投与後PK試料採取（付録6参照）。処置中止時に、PK試料採取の時間枠は±3日である。PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである
癌、心臓および身体組成の放射線による評価
1日目の14日前以内の腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の胸部／腹部／骨盤のCT/MRI（C7D1まで；その後、治験責任医師が疾患進行の可能性が低いと見なすならば、治験責任医師は腫瘍のステージ決定のスキャン頻度を4サイクルに1回、すなわちC11、C15…に減少し得る）
腫瘍のステージ決定のための各施設の検査室の骨スキャン（骨転移を有する対象についてのみ；C7D1の後に、治験責任医師が疾患進行の可能性が低いと見なすならば、治験責任医師は腫瘍のステージ決定のスキャン頻度を4サイクルに1回、すなわちC11、C15…に減少し得る）
1日目の14日前以内の身体組成についての中央検査室のDXA（C7D1まで；その後、4サイクル毎、すなわちC11、C15…にさらなるDXAスキャンを収集する）
筋機能検査：6MWT（スクリーニング時に行われたのと同じ時刻に同じ検査員により本検査を行うようあらゆる努力を尽くすべきである；C7D1の後、4サイクル毎、すなわちC11、C15…に6MWTを収集する）

	6.3.3.6　サイクル3／2、3、8日目 記載された試料採取時間の±4時間以内のPK試料採取（付録6参照）；PKの来院および試料採取時間は、実際の投薬時間に基づくべきである **6.3.4　試験終了** EOSの来院を、試験を完了する対象についてSTM434の最終投与の28±3日後にスケジュールするべきである。試験を完了する前に中止する対象は、中止時にEOSの評価を受けるべきである。EOSの来院で行われるべき評価は、以下の通りである： 理学的検査 体重 BMIのeCRF計算（最新の体重および身長に基づく） 生命徴候（耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数および呼吸数） ECOGパフォーマンスステータス 有害事象 PRO：FACT/GOG-NTXサブスケール 12誘導ECG（中央検査室の装置を使用） 臨床検査（各施設の検査室）：血清化学、血液学的検査パネル、凝固パネル、脂質パネル、FSH、性ホルモン（女性対象についてのエストラジオール、男性対象についてのテストステロン）、HbA1c、必要に応じて腫瘍型についての血清腫瘍バイオマーカー（例えば、卵巣癌を有する対象についてのCA-125、前立腺癌を有する対象についてのPSA、結腸癌を有する対象についてのCEA） 特殊臨床検査（中央検査室）：血清アクチビンA 抗STM434抗体についての臨床免疫試料採取
7. 有効性および安全性の評価	・有効性および安全性の各変数を下に説明する。全ての評価についてのスケジュールを第6節に記載し、付録1（Q4W投薬[スケジュールA]について）、付録2（Q2W投薬[スケジュールB]について）、および付録3（Q3W投薬[スケジュールC]について）に表形式で提供する。
7.1 薬物動態	・STM434の血漿中濃度は、中央検査室によって決定される（STM434のQ4W、Q2W、およびQ3W投薬についての血液試料採取時間を、それぞれ付録4、付録5、および付録6に記載する）。
7.2.4.1 バイオマーカー	・全てのバイオマーカー検査試料を投薬前に収集するべきである。
7.2.4.1.1 腫瘍バイオマーカー	RECIST 1.1のX線撮影による進行の不在下で、腫瘍マーカーを疾患進行の唯一の証拠として使用するべきでない。
7.2.4.1.2 血清腫瘍バイオマーカー（アクチビンA、FSH、エストラジオール、テストステロン）	顆粒膜細胞腫瘍の患者においてインヒビンバイオマーカーの測定がSTM434の存在下で混同される場合があるので、中央検査室のMISアッセイが行われ得る。
7.2.4.1.3 組織腫瘍バイオマーカ	検証済みRNAScope（登録商標）アッセイを使用するスクリーニングで受容体ACVR2BについてのmRNAおよびリガンドINHBA（全ての対象）を測定することによってホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片をオートクリン／パラクリンシグナル伝達につ

ー	いて調べる。
7.2.4.2 血清脂質	全ての脂質試料を投薬前に収集するべきである。
7.2.4.3 恒常性モデル評価による空腹時血清グルコースおよびインスリン、ならびにHbA1c	全ての空腹時インスリンおよびグルコース試料ならびにHbA1c試料を投薬前に収集するべきである。
7.3 安全性	全ての安全性検査試料を投薬前に収集するべきである。
9.6 標本サイズの決定	合計最大75人の対象（第1部での対象最大39人、第2部での対象24人、および第3部での対象最大12人からなる）を登録するよう試験を計画する。
付録	付録1は、STM434のQ4W投薬に特異的な試験手順に合わせて並べかえたものである 付録2にSTM434のQ2W投薬に特異的な試験手順を要約する 付録3にSTM434のQ3W投薬に特異的な試験手順を要約する 付録4は、STM434のQ4W投薬の間のPK試料採取スケジュールを詳記するために手を加えたものである。 付録5にSTM434のQ2W投薬の間のPK試料採取スケジュールを要約する 付録6にSTM434のQ3W投薬の間のPK試料採取スケジュールを要約する

【０２７０】

付録1．Q4W投与されたSTM434についての試験手順

評定	スクリーニング		処置相								試験終了[2]
			サイクル1			サイクル2、4、6…	サイクル3、5、7…				
	−14～1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±３日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	処置中止[1]	
サインされた同意文書	X										
医療歴、人口統計、以前の癌治療	X										
理学的検査、身長および体重[3]	X		X		X	X	X			X	X
便グアヤク試験	X[4]										
生命徴候[5]	X		X		X	X	X			X	X
ECOG	X		X		X	X	X			X	X
ECG[6]	X	X		X[6]		X	X			X	X
FACT/GOG-NTX[7]	X				X	X	X			X	X
MUGAまたはECHO	X[8]						X[8]			X[8]	
STM 434の投与			X			X	X			X	
リポソームドキソルビシンの投薬投与[9]			X			X	X			X	
併用薬	X		X		X	X	X			X	X
有害事象	X[10]		X		X	X	X			X	X[11]
血液学的検査	X		X		X	X	X			X	X
凝固パネル(PT, PTT, INR, TT[12], D二量体[12])	X		X		X	X	X			X	X
血清化学検査	X		X		X	X	X			X	X
空腹時血糖および空腹時インスリン	X						X			X	

評定	スクリーニング		処置相								試験終了[2]
			サイクル1			サイクル2、4、6…	サイクル3、5、7…				
	−14～1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±３日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	処置中止[1]	
HbA1c[13]	X						X[13]			X[13]	X
血清脂質	X						X			X	X
血清腫瘍バイオマーカー[14]	X		X			X	X			X	X
組織腫瘍バイオマーカー[15]	X										
尿検査(ディップスティック)	X										
血清妊娠検査[16]	X										
アクチビンA(遊離および総)	X		X		X	X	X			X	X
CTCs	X[17]					X[17]					
FSH、エストラジオール(女性対象)、テストステロン(男性対象)	X		X		X	X	X			X	X
中央検査室 DXA	X[18]						X[19]			X[19]	
6分間歩行検査	X					X[20]	X			X	
脳CT/MRIのスクリーニング	X										
胸部/腹部/骨盤CT/MRI	X[18]						X[19]			X[19]	
骨スキャン[21]	X[18]						X[19]			X[19]	
疾患進行の評価[22]							X			X	
抗STM434抗体	X		X			X	X			X	X
投与前PK			X[23]			X[23]	X[23]			X[23]	
投与後PK			X[23]	X[23]	X[23]	X[23]		X[23]	X[23]		

試験手順の脚注

[1] 処置中止の来院は、適切な場合、任意のスケジュールされた来院またはスケジュールされていない来院で起こることができる。この来院で、進行性疾患または許容されない毒性を確認するための証拠資料が必要である。

[2] EOSの来院は、STM434の最終投与の28±3日後にスケジュールするべきである。

[3] 各来院時に対象の体重を記録し；身長はスクリーニング来院時にのみ記録する。

[4] 便グアヤク試験はスクリーニング時に必要であり、ベースライン後に治験責任医師の裁量で繰り返す場合がある。

[5] 生命徴候：耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数、および呼吸数

[6] スクリーニング来院の後に、中央検査室からの装置を使用してECGを収集しなければならない。対象は、-1日目から開始して、ホルターモニターを脱着する時点であるサイクル1/2日目の来院までホルターモニターを連続的に装着する。各後続のサイクルの1日目およびEOSの来院時に、中央検査室の装置を用いて12誘導ECGを得る。

[7] 神経障害のAEを評価するために必要ならば、スケジュールされていない来院でFACT/GOG-NTXを収集する場合がある。

[8] 第3部での対象だけが、リポソームドキソルビシン投与についての心駆出分画を記録するためにMUGAまたはECHOを必要とする。MUGAまたはECHOの選択は、治験責任医師の裁量であるが、様式が選択された後は、試験期間全体にわたり対象について同じ方法を使用する

べきである。MUGA/ECHOを、スクリーニング時およびサイクル3の1日目にのみ行うべきである。第3部でのドキソルビシン処置対象がサイクル3の1日目の前に中止する場合には、MUGA/ECHOを処置中止来院で行うべきである。

[9] リポソームドキソルビシンの投与は、試験の第3部での対象に限られる。

[10] インフォームドコンセントの文書にサインした時点からサイクル1の1日目での被験薬剤投与までに処置前SAEを報告するべきである。

[11] 因果関係の特質にかかわらず、任意の新規または継続中のAEまたはSAEがあるかどうかを判定するために、STM434の最終投与後30日間、AEの追跡調査が必要である。追跡調査を電話により行う場合があり、追跡調査を音源として記録しなければならない。

[12] スクリーニングおよびサイクル2の1日目のみ。

[13] HbA1cを、スクリーニング時、サイクル3の1日目、処置中止時、およびEOS時にだけ収集および分析する。

[14] 血清腫瘍バイオマーカーは、対象の腫瘍型に基づきCA-125、PSA、CA19-9、CEA、または必要に応じて他のバイオマーカーを含むことができる。顆粒膜細胞腫瘍を有する患者について、各サイクルの1日目に中央検査室のMISを行う。

[15] 組織腫瘍バイオマーカーは、ACVR2BおよびINHBA遺伝子発現（全ての対象）ならびに遺伝子変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について）用の腫瘍切片／腫瘍ブロックを含む。

[16] 妊娠する可能性がある女性のみ。

[17] CTCを、スクリーニング時およびサイクル2の1日目にだけ収集する。

[18] サイクル1の1日目の最大30日前に行ったスキャン（DXA、CT、MRI、骨）をベースラインの評価のために使用することができる。

[19] 試験中のDXA、CT/MRIおよび骨スキャンを、1日目の来院の14日前以内に行うことができる。サイクル7の1日目の来院時にスキャンを行った後、治験責任医師が、疾患進行の可能性が低いと見なすならば、後続のスキャンを4サイクル毎に行い得る。

[20] サイクル2の1日目の来院時にようやく6分間歩行検査を完了する。

[21] 例えば対象が骨に転移性の腫瘍を有するならば、治験責任医師の裁量で骨スキャンの評価を行うべきである。

[22] 治験責任医師は、RECIST 1.1に従ってX線撮影によるスキャンを評価するべきである（付録7）

[23] PK評価のための詳細なスケジュールを本プロトコールの付録4に提示する。サイクル1およびサイクル3だけ2、3、および8日目のPK評価を行うことに留意されたい。

【０２７１】

付録2．Q2W投与されたSTM434についての試験手順（各28日サイクルの1および15日目のSTM434投薬）

	スクリーニング		処置相									
			サイクル1			サイクル2、4、6…		サイクル3、5、7…				
評定	−14～1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±3日目)	15日目(±3日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	15日目(±3日目)	処置中止[1]	試験終了[2]
サインされた同意文書	X											
医療歴、人口統計、以前の癌治療	X											
理学的検査、身長および体重[3]	X		X		X	X	X	X		X	X	X
便グアヤク試験	X[4]											

評定	スクリーニング		処置相									試験終了[2]
			サイクル1			サイクル2、4、6…		サイクル3、5、7…				
	−14～1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±3日目)	15日目(±3日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	15日目(±3日目)	処置中止[1]	
生命徴候[5]	X		X		X	X	X	X		X	X	X
ECOG	X		X		X	X		X			X	X
ECG[7]	X	X		X[6]		X		X			X	X
FACT/GOG-NTX[7]	X				X	X		X			X	X
MUGAまたはECHO	X[8]							X[8]			X[8]	
STM 434の投与			X		X	X	X	X		X	X	
リポソームドキソルビシンの投薬投与[9]			X			X		X			X	
併用薬	X		X		X	X	X	X		X	X	X
有害事象	X[10]		X		X	X	X	X		X	X	X[11]
血液学的検査	X		X		X	X		X			X	X
凝固パネル(PT, PTT, INR, TT[12], D二量体[12])	X		X		X	X		X			X	X
血清化学検査	X		X		X	X		X			X	X
空腹時血糖および空腹時インスリン	X							X			X	
HbA1c[13]	X							X[13]			X[13]	X
血清脂質	X							X			X	X
血清腫瘍バイオマーカー[14]	X		X			X		X			X	X
組織腫瘍バイオマーカー[15]	X											
尿検査(ディップスティック)	X											
血清妊娠検査[16]	X											
アクチビンA(遊離および総)	X		X		X	X		X			X	X
CTCs	X[17]					X[17]						

評定	スクリーニング		処置相									試験終了[2]
			サイクル1			サイクル2、4、6…		サイクル3、5、7…				
	−14～1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±3日目)	15日目(±3日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	15日目(±3日目)	処置中止[1]	
FSH、エストラジオール（女性対象）、テストステロン（男性対象）	X		X		X	X		X			X	X
中央検査室DXA	X[18]							X[19]			X[19]	
6分間歩行検査	X					X[20]		X			X	
脳CT/MRIのスクリーニング	X											
胸部/腹部/骨盤CT/MRI	X[18]							X[19]			X[19]	
骨スキャン[21]	X[18]							X[19]			X[19]	
疾患進行の評価[22]								X			X	
抗STM434抗体	X		X			X		X			X	X
投与前PK			X[23]			X[23]	X[23]	X[23]		X[23]	X[23]	
投与後PK			X[23]	X[23]	X[23]	X[23]			X[23]			

試験手順の脚注

[1] 処置中止の来院は、適切な場合、任意のスケジュールされた来院またはスケジュールされていない来院で起こることができる。この来院で、進行性疾患または許容されない毒性を確認するための証拠資料が必要である。

[2] EOSの来院は、STM434の最終投与の28±3日後にスケジュールされるべきである。

[3] 各来院時に対象の体重を記録し；身長はスクリーニング来院時にのみ記録する。

[4] 便グアヤク試験がスクリーニング時に必要であり、治験責任医師の裁量でベースライン後に繰り返す場合がある。

[5] 生命徴候：耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数、および呼吸数

[6] スクリーニング来院の後に、中央検査室からの装置を使用してECGを収集しなければならない。対象は、-1日目から開始して、ホルターモニターを脱着するときであるサイクル1／2日目の来院までホルターモニターを連続的に装着する。各後続のサイクルの1日目およびEOSの来院時に、中央検査室の装置を用いて12誘導ECGを得る。

[7] 神経障害のAEを評価するために必要ならば、スケジュールされていない来院でFACT/GOG-NTXを収集する場合がある。

[8] 第3部での対象だけが、リポソームドキソルビシン投与についての心駆出分画を記録するためにMUGAまたはECHOを必要とする。MUGAまたはECHOの選択は、治験責任医師の裁量であるが、様式が選択された後は、試験期間全体にわたり対象について同じ方法を使用するべきである。MUGA/ECHOを、スクリーニング時およびサイクル3の1日目にのみ行うべきである。第3部でのドキソルビシン処置対象がサイクル3の1日目の前に中止する場合には、MUGA/ECHOを処置中止来院で行うべきである。

[9] リポソームドキソルビシンの投与は、試験の第3部での対象に限られる。

[10] インフォームドコンセントの文書にサインした時点からサイクル1の1日目での被験薬剤投与までに処置前SAEを報告するべきである。

[11] 因果関係の特質にかかわらず、任意の新規または継続中のAEまたはSAEがあるかどうかを判定するために、STM434の最終投与後30日間にAEの追跡調査が必要である。追跡調査を電話により行う場合があり、追跡調査を音源として記録しなければならない。

[12] スクリーニングおよびサイクル2の1日目のみ。

[13] HbA1cを、スクリーニング時、サイクル3の1日目、処置中止時、およびEOS時にだけ収

集および分析する。
[14] 血清腫瘍バイオマーカーは、対象の腫瘍型に基づきCA-125、PSA、CA19-9、CEA、または必要に応じて他のバイオマーカーを含むことができる。顆粒膜細胞腫瘍を有する患者について、各サイクルの1日目に中央検査室のMISを行う。
[15] 組織腫瘍バイオマーカーは、ACVR2BおよびINHBA遺伝子発現（全ての対象）ならびに遺伝子変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について）用の腫瘍切片／腫瘍ブロックを含む。
[16] 妊娠する可能性がある女性のみ。
[17] CTCを、スクリーニング時およびサイクル2の1日目にだけ収集する。
[18] サイクル1の1日目の最大30日前に行ったスキャン（DXA、CT、MRI、骨）をベースラインの評価のために使用することができる。
[19] 試験中のDXA、CT/MRIおよび骨スキャンを、1日目の来院の14日前以内に行うことができる。サイクル7の1日目の来院時にスキャンを行った後、治験責任医師が疾患進行の可能性が低いと見なすならば、後続のスキャンを4サイクル毎に行い得る。
[20] サイクル2の1日目の来院時にようやく6分間歩行検査を完了する。
[21] 例えば対象が骨への腫瘍転移を有するならば、治験責任医師の裁量で骨スキャンの評価を行うべきである。
[22] 治験責任医師は、RECIST 1.1に従ってX線撮影によるスキャンを評価するべきである（付録7）
[23] PK評価のための詳細なスケジュールを本プロトコールの付録5に提示する。2、3、および8日目のPK評価を、サイクル1およびサイクル3でのみ行うことに留意されたい。
【０２７２】
付録3．Q3W投与されたSTM434についての試験手順

評定	スクリーニング		処置相							
			サイクル1			サイクル2、4、6…	サイクル3、5、7…			
	−14〜1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±3日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	処置中止[1]	試験終了[2]
サインされた同意文書	X									
医療歴、人口統計、以前の癌治療	X									
理学的検査、身長および体重[3]	X		X			X	X		X	X
便グアヤク試験	X[4]									
生命徴候[5]	X		X			X	X		X	X
ECOG	X		X			X	X		X	X
ECG[6]	X	X		X[6]		X	X		X	X
FACT/GOG-NTX[7]	X					X	X		X	X
STM 434の投与			X			X	X		X	
併用薬	X		X			X	X		X	X
有害事象	X[8]		X			X	X		X	X[9]
血液学的検査	X		X			X	X		X	X
凝固パネル(PT, PTT, INR, TT[10], D二量体[10])	X		X			X	X		X	X

評定	スクリーニング		処置相							試験終了[2]
			サイクル1			サイクル2、4、6…	サイクル3、5、7…			
	−14～1日目	−1日目	1日目(−3日目)	2、3、8日目	15日目(±1日)	1日目(±3日目)	1日目(±3日目)	2、3、8日目	処置中止[1]	
血清化学検査	X		X			X	X		X	X
空腹時血糖および空腹時インスリン	X						X		X	
HbA1c[11]	X						X[11]		X[11]	X
血清脂質	X						X		X	X
血清腫瘍バイオマーカー[12]	X		X			X	X		X	X
組織腫瘍バイオマーカー[13]	X									
尿検査(ディップスティック)	X									
血清妊娠検査[14]	X									
アクチビンA(遊離および総)	X		X			X	X		X	X
CTCs	X[15]					X[15]				
FSH、エストラジオール(女性対象)、テストステロン(男性対象)	X		X			X	X		X	X
中央検査室 DXA	X[16]						X[17]		X[17]	
6分間歩行検査	X					X[18]	X		X	
脳CT/MRIのスクリーニング	X									
胸部／腹部／骨盤CT/MRI	X[16]						X[17]		X[17]	
骨スキャン[19]	X[16]						X[17]		X[17]	
疾患進行の評価[20]							X		X	
抗STM434抗体	X		X			X	X		X	X
投与前PK			X[21]			X[21]	X[21]		X[21]	
投与後PK			X[21]	X[21]	X[21]	X[21]		X[21]		

試験手順の脚注

[1] 処置中止の来院は、適切な場合、任意のスケジュールされた来院またはスケジュールされていない来院で起こることができる。この来院で、進行性疾患または許容されない毒性を確認するための証拠資料が必要である。

[2] EOSの来院は、STM434の最終投与の28±3日後にスケジュールされるべきである。

[3] 各来院時に対象の体重を記録し；身長はスクリーニング来院時にのみ記録する。

[4] 便グアヤク試験がスクリーニング時に必要であり、治験責任医師の裁量でベースライン後に繰り返す場合がある。

[5] 生命徴候：耳内、経皮または口腔温、座位血圧、心拍数、および呼吸数

[6] スクリーニング来院の後に、中央検査室からの装置を使用してECGを収集しなければならない。対象は、-1日目から開始して、ホルターモニターを脱着する時点であるサイクル1/2日目の来院までホルターモニターを連続的に装着する。各後続のサイクルの1日目およびEOSの来院時に、中央検査室の装置を用いて12誘導ECGを得る。

[7] 神経障害のAEを評価するために必要ならば、スケジュールされていない来院でFACT/GO

G-NTXを収集する場合がある。
[8] インフォームドコンセントの文書にサインした時点からサイクル1の1日目での被験薬剤投与までに処置前SAEを報告するべきである。
[9] 因果関係の特質にかかわらず、任意の新規または継続中のAEまたはSAEがあるかどうかを判定するために、STM434の最終投与後30日間にAEの追跡調査が必要である。追跡調査を電話により行う場合があり、追跡調査を音源として記録しなければならない。
[10] スクリーニングおよびサイクル2の1日目のみ。
[11] HbA1cを、スクリーニング時、サイクル3の1日目、処置中止時、およびEOS時にだけ収集および分析する。
[12] 血清腫瘍バイオマーカーは、対象の腫瘍型に基づきCA-125、PSA、CA19-9、CEA、または必要に応じて他のバイオマーカーを含むことができる。顆粒膜細胞腫瘍を有する患者について、各サイクルの1日目に中央検査室のMISを行う。
[13] 組織腫瘍バイオマーカーは、ACVR2BおよびINHBA遺伝子発現（全ての対象）ならびに遺伝子変異状態（明細胞／子宮内膜／顆粒膜細胞腫瘍を有する対象について）用の腫瘍切片／腫瘍ブロックを含む。
[14] 妊娠する可能性がある女性のみ。
[15] CTCを、スクリーニング時およびサイクル2の1日目にだけ収集する。
[16] サイクル1の1日目の最大30日前に行うスキャン（DXA、CT、MRI、骨）をベースラインの評価のために使用することができる。
[17] 試験中のDXA、CT/MRIおよび骨スキャンを、1日目の来院の14日前以内に行うことができる。サイクル7の1日目の来院時にスキャンを行った後、治験責任医師が、疾患進行の可能性が低いと見なすならば、後続のスキャンを4サイクル毎に行い得る。
[18] サイクル2の1日目の来院時にようやく6分間歩行検査を完了する。
[19] 例えば対象が骨への腫瘍転移を有するならば、治験責任医師の裁量で骨スキャンの評価を行うべきである。
[20] 治験責任医師は、RECIST 1.1に従ってX線撮影によるスキャンを評価するべきである(付録7)
[21] PK評価のための詳細なスケジュールを本プロトコールの付録6に提示する。サイクル1およびサイクル3だけ2、3、および8日目のPK評価を行うことに留意されたい。

【０２７３】

付録4．STM434のQ4W投与についての薬物動態評定スケジュール

サイクルおよび日	第1部（用量漸増）	第2部（単剤療法の用量拡大）	第3部(STM434+リポソームドキソルビシン)	
	STM 434 試料採取[a]	STM 434 試料採取[a]	STM 434 試料採取[a]	ドキソルビシン/ドキソルビシノールの試料採取
サイクル1の1日目	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、3、4、6時間後
サイクル1の2日目	注入の24時間後	-----	注入の24時間後	注入の24時間後
サイクル1の3日目	注入の48時間後	-----	注入の48時間後	注入の48時間後
サイクル1の8日目	注入の168時間後	-----	注入の168時間後	注入の168時間後
サイクル1の15日目	注入の336時間後	注入の336時間後	注入の336時間後	注入の336時間後
サイクル2の1日目	サイクル1の672時間後、サイクル2注入終了時	サイクル1の672時間後、サイクル2注入終了時	サイクル1の672時間後、サイクル2注入終了時	サイクル1終了時/サイクル2投与前、サイクル2注入終了時

サイクル3の1日目	サイクル2の672時間後、サイクル3注入終了時、注入の1、2、6時間後	サイクル2の672時間後、サイクル3注入終了時、注入の1、2、6時間後	サイクル2の672時間後、サイクル3注入終了時、注入の1、2、6時間後	サイクル2終了時/サイクル3投与前、サイクル3の注入終了時、注入の1、2、3、4、6時間後
サイクル3の2日目	注入の24時間後	―	注入の24時間後	注入の24時間後
サイクル3の3日目	注入の48時間後	―	注入の48時間後	注入の48時間後
サイクル3の8日目	注入の168時間後	―	注入の168時間後	注入の168時間後
サイクル3の15日目	注入の336時間後	注入の336時間後	注入の336時間後	注入の336時間後
サイクル4の1日目	サイクル3の672時間後、サイクル4の注入終了時	サイクル3の672時間後、サイクル4の注入終了時	サイクル3の672時間後、サイクル4の注入終了時	サイクル3終了時/サイクル4投与前、サイクル4の注入終了時
サイクル5の1日目	サイクル4の672時間後、サイクル5の注入終了時	サイクル4の672時間後、サイクル5の注入終了時	サイクル4の672時間後、サイクル5の注入終了時	サイクル4の672時間後、サイクル5の注入終了時
処置中止	最終注入の672時間後	―	最終注入の672時間後	最終注入の672時間後

[a] 全てのSTM434試料採取時間は、STM434の投薬に比べたものである。

[b] 全てのドキソルビシン／ドキソルビシノールの試料採取時間は、リポソームドキソルビシンの投薬に比べたものである。

Q4Wの投薬について、投与後のPK試料採取の時間枠は、以下の通りである：

サイクル1　1日目：±30分　2、3、8日目：±4時間　15日目：±1日

サイクル2　1日目：±30分

サイクル3　1日目：±30分　2、3、8日目：±4時間　15日目：±1日

サイクル4　1日目：±30分

サイクル5　1日目：±30分

【０２７４】

付録5．STM434のQ2W投与についての薬物動態評定スケジュール

（各28日サイクルの1日目および15日目にSTM434を投薬）

	第1部（用量漸増）	第2部（単剤療法の用量拡大）	第3部（STM434+リポソームドキソルビシン）	
サイクルおよび日	STM 434 試料採取[a]	STM 434 試料採取[a]	STM 434 試料採取[a]	ドキソルビシン/ドキソルビシノール 試料採取[b]
サイクル1の1日目	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、3、4、6時間後
サイクル1の2日目	注入の24時間後	―	注入の24時間後	注入の24時間後
サイクル1の3日目	注入の48時間後	―	注入の48時間後	注入の48時間後
サイクル1の8日目	注入の168時間後	―	注入の168時間後	注入の168時間後

サイクル1の15日目	投与前	投与前	投与前	投与前
サイクル2の1日目	サイクル2の投与前	サイクル2の投与前	サイクル2の投与前	サイクル2の投与前
サイクル2の15日目	投与前	投与前	投与前	――
サイクル3の1日目	サイクル3の投与前、サイクル3の注入終了時、注入サイクルの1、2、6時間後	サイクル3の投与前、サイクル3の注入終了時、注入サイクルの1、2、6時間後	サイクル3の投与前、サイクル3の注入終了時、注入サイクルの1、2、6時間後	サイクル3の投与前、サイクル3の注入終了時、注入の1、2、3、4、6時間後
サイクル3の2日目	注入の24時間後	――	注入の24時間後	注入の24時間後
サイクル3の3日目	注入の48時間後	――	注入の48時間後	注入の48時間後
サイクル3の8日目	注入の168時間後	――	注入の168時間後	注入の168時間後
サイクル3の15日目	投与前	投与前	投与前	投与前
サイクル4の1日目	サイクル4の投与前	サイクル4の投与前	サイクル4の投与前	サイクル4の投与前
サイクル4の15日目	投与前	投与前	投与前	投与前
サイクル5の1日目	サイクル5の投与前、サイクル5の注入終了時	サイクル5の投与前、サイクル5の注入終了時	サイクル5の投与前、サイクル5の注入終了時	サイクル5の投与前、サイクル5の注入終了時
処置中止	最終注入の672時間後	――	最終注入の672時間後	最終注入の672時間後

[a] 全てのSTM434試料採取時間は、STM434の投薬に対するものである。

[b] 全てのドキソルビシン／ドキソルビシノール試料採取時間は、リポソームドキソルビシンの投薬に対するものである。

Q2Wの投薬について、投与後のPK試料採取の時間枠は、以下の通りである：

サイクル1　1日目：±30分　2、3、8日目：±4時間　15日目：投薬の1日前以内

サイクル2、4　1日目：±4時間　15日目：投薬の1日前以内

サイクル3　1日目：±30分　2、3、8日目：±4時間　15日目：投薬の1日前以内

サイクル5　1日目：±30分

【０２７５】

付録6．STM434のQ3W投与についての薬物動態評定スケジュール

（各21日サイクルの1日目にSTM434を投薬）

サイクルおよび日	第1部（用量漸増） STM 434 試料採取[a]	第2部 （単剤療法の用量拡大） STM 434 試料採取[a]
サイクル1の1日目	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後	投与前、注入終了時、注入の1、2、6時間後
サイクル1の2日目	注入の24時間後	――
サイクル1の3日目	注入の48時間後	――
サイクル1の8日目	注入の168時間後	――
サイクル1の15日目	注入の336時間後	注入の336時間後
サイクル2の1日目	サイクル2投与前	サイクル2投与前
サイクル3の1日目	サイクル3投与前、サイクル3の注入終了時、サイクル3の注入1、2、6時間後	サイクル3投与前、サイクル3の注入終了時、サイクル3の注入1、2、6時間後
サイクル3の2日目	注入の24時間後	――
サイクル3の3日目	注入の48時間後	――

サイクル3の8日目	注入の168時間後	—
サイクル4の1日目	サイクル4の投与前	サイクル4の投与前
サイクル5の1日目	サイクル5の投与前、 サイクル5の注入終了時	サイクル5の投与前、 サイクル5の注入終了時
処置中止	最終注入の672時間後	—

[a] 全てのSTM434試料採取時間は、STM434の投薬に対するものである。
Q3W投薬について、投与後のPK試料採取の時間枠は、以下の通りである：
サイクル1　1日目：±30分　2、3、8日目：±4時間　15日目：±1日
サイクル2　1日目：±4時間
サイクル3　1日目：±30分　2、3、8日目：±4時間
サイクル4　1日目：±4時間
サイクル5　1日目：±30分

【０２７６】

実施例7：STM434の安定性

製剤化されたSTM434の安定性を、様々な条件で様々な時点に様々な方法を使用して決定した。STM434を上に示すように製剤化した（STM434注射剤を70mg/mL STM434、10mMリン酸カリウム、8.8%(w/v)スクロース、0.006%(w/v)ポリソルベート20（pH6.7）として製剤化した）。

【０２７７】

方法

安定性を評価するために使用した分析方法は、以下の通りであった。

【０２７８】

紫外線（UV）吸収による濃度

UV分光光度計を使用することによって薬物製品中のSTM434濃度を測定した。280nm光の吸光度（A280）および280nmでの吸光係数（ε280）1.7mg・mL^{-1}・cm^{-1}を使用して、ベールの法則に基づき濃度を決定した。

【０２７９】

所与の時点および温度でのタンパク質は、濃度が70.0±7.0mg/mLのとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０２８０】

外観

本方法は、STM434注射剤の視覚的評価に備えるものである。バイアルを周辺光で観察し、全体的な外観を可視的粒子、呈色度、および清澄度に関して報告した。

【０２８１】

所与の時点および温度でのタンパク質は、外観が清澄で、無色から微黄色の液体であり、本質的に粒子を有さないとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。

【０２８２】

モル浸透圧濃度

モル浸透圧濃度標準290mOsm/kgに対して較正した凝固点降下浸透圧計を使用してSTM434注射剤のモル浸透圧濃度を測定した。

【０２８３】

所与の時点および温度でのタンパク質は、モル浸透圧濃度が330.0±50.0mOsm/kgであるとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセンテージは、この数に対して計算することもできる。

【０２８４】

pH
米国国立科学技術研究所（National Institute of Science and Technology）（NIST）のトレーサブル標準を用いて較正されたpHメーターを使用してSTM434注射剤のpHを測定した。
【０２８５】
所与の時点および温度でのタンパク質は、25℃でpHが6.7±0.3のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。
【０２８６】
容器中の体積
バイアル中のSTM434注射液の体積を測定した。
【０２８７】
所与の時点および温度でのタンパク質は、容器中の体積が1.0mL以上のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。
【０２８８】
サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（SE-HPLC）
SE-HPLCは、タンパク質を、分子量（MW）におよそ相関するその流体力学的サイズにより分離する方法である。SE-HPLCは、薬物製品中のSTM434の、特に凝集、フラグメント化、および他の不純物に関する分子サイズ分布の分析を可能にする。SE-HPLCによる単量体性STM434の他の種からの分割を、TSKgel G3000SWxl HPLCカラムで均一濃度の移動相100mMリン酸ナトリウム、250mM塩化ナトリウム（pH6.8）を使用して流速0.5mL/minで行った。A280nmでアッセイ運転時間35分かけてタンパク質種を検出した。タンパク質の溶出時間は、それらのMWの対数と逆比例した。アッセイからの結果を総A280ピーク面積に対するA280ピーク面積のパーセントとして報告する。
【０２８９】
所与の時点および温度でのタンパク質は、SE-HPLCの主ピークが≧95.0％のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。
【０２９０】
イメージキャピラリー等電点電気泳動（icIEF）
cIEFは、タンパク質間の等電点（pI）の差に基づく高分解能タンパク質分離技法である。Protein Simple（旧名Convergent Bioscience）iCE280 IEF分析システムは、従来のcIEF機器に必要な移動段階なしに分析を可能にする、キャピラリーゾーン全体をイメージングする検出器を使用する。STM434注射剤に関して、icIEFを純度試験として使用した。
【０２９１】
このicIEF方法では、製品中のシアル酸の様々なレベルによって付与される実質的な複雑さを減らすために、STM434試料をシアリダーゼで処理した。脱シアル化後に、pH勾配を生成させるための担体である両性電解質、電気浸透流を減らすためのメチルセルロース、および280nm光を吸収する、pIが公知のマーカーと、試料を混合した。カートリッジに組み立てられた入口リザーバーと出口リザーバーとの間にUV透過セグメントを有する内部コーティング済みフューズドシリカキャピラリーに混合物を導入した。キャピラリーセグメントに電圧を印加すると、溶液は、試料中の両性電解質、pIマーカー、およびタンパク質種がそれらのそれぞれのpIでフォーカスされるpH勾配を形成する。キャピラリー全体の吸収画像を電荷結合素子カメラで取得し、様々なタンパク質種およびpIマーカーに対応する、キャピラリー中の280nmでフォーカスされたゾーンのモニタリングを可能にした。pIマーカーを含めることで、試料中の様々な種のpI値の再現性のある決定に備えて、キャピラ

リーにおけるpI勾配の較正が可能になる。HPLCに類似して、icIEFの結果をキャピラリー中の泳動距離の関数としてのA280ピークとして提供する。アッセイからの結果を、タンパク質種についての総A280ピーク面積に対するA280ピーク面積のパーセントとして報告する。

【０２９２】

所与の時点および温度でのタンパク質は、icIEFの主ピークが65.0±10.0％のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０２９３】

ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（CE-SDS）-非還元条件（nrCE-SDS）

非還元条件CE-SDSを、STM434注射剤のための純度試験として使用した。この方法は、比較的一定のSDS：ポリペプチド比でポリペプチドと結合する界面活性剤SDSの存在下でタンパク質を熱変性させることを含む。タンパク質と結合している負荷電SDSは、タンパク質をMWに応じて電場内で泳動させる。

【０２９４】

この方法では、非還元条件でSTM434試料を、遊離スルフヒドリル遮断剤であるSDSおよび内部MW標準と共に70℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後に、オートサンプラーに処理後の試料を負荷したが、オートサンプラーは洗浄液および特殊SDSゲルも有する。空のフューズドシリカキャピラリーの逐次洗浄、ゲル負荷、および界面動電試料注入のためにCEシステムをプログラムした。各試料について、検出器のウインドウを通過する移動を含む、MWに基づく分離のために、注入後のタンパク質を電場に供したが、そのウインドウではキャピラリーのコーティングが除去されており、光は、キャピラリーを通過してフォトダイオードアレイ検出器に達した。この方法では、220nmの吸光度（A220）を収集するように検出器を設定した。アッセイからの結果を、タンパク質種についての総A280ピーク面積に対するA220ピーク面積のパーセントとして報告する。

【０２９５】

所与の時点および温度でのタンパク質は、nrCE-SDSの主ピークが≧88.0％のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０２９６】

CE-SDS-還元条件（rCE-SDS）

還元条件CE-SDSを、STM434注射剤のための純度試験として使用した。この方法は、界面活性剤SDSと、ジスルフィド結合を遊離スルフヒドリルに切断する還元剤との存在下で特定濃度のタンパク質を熱変性させることを含み、還元剤は、STM434の場合にホモ二量体の2つのポリペプチド鎖の分離を引き起こす。ポリペプチド鎖と相対的に一定のSDS：ポリペプチド比で結合している負荷電SDSは、ポリペプチドをMWに応じて電場中で泳動させる。

【０２９７】

この方法では、非還元条件でSTM434試料を、SDS、還元剤β-メルカプトエタノールおよび内部MW標準と共に70℃にて10分間インキュベートした。インキュベーション後に、オートサンプラーに処理後の試料を負荷したが、オートサンプラーは洗浄液および特殊SDSゲルも有していた。空のフューズドシリカキャピラリーの逐次洗浄、ゲル負荷、および界面動電試料注入のためにCEシステムをプログラムした。各試料について、検出器のウインドウを通過する移動を含む、MWに基づく分離のために、注入後のタンパク質を電場に供したが、そのウインドウではキャピラリーのコーティングが除去されており、光は、キャピラリーを通過してフォトダイオードアレイ検出器に達した。この方法では、220nmの吸光度（A220）を収集するように検出器を設定した。アッセイからの結果を、タンパク質種についての総A280ピーク面積に対するA220ピーク面積のパーセントとして報告する。

【０２９８】

所与の時点および温度でのタンパク質は、rCE-SDSの主ピークが≧90.0％のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０２９９】

製品特異的ELISA

STM434注射剤の同一性試験に利用される方法は、固相サンドイッチELISAであった。STM217およびSTM434タンパク質は単一のアミノ酸が異なる（STM217ではセリン-20、STM434ではトレオニン-20）ので、STM434に対して高い親和性を有する抗STM217モノクローナル抗体を、マイクロタイターストリップにコーティングした。試料または対照、続いてヒトActR2Bに対して作製したビオチン化モノクローナル抗体、続いてニュートラアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートを順々にウェルに加えた。試料中に存在するSTM434は、固定化捕捉抗体に結合し、ビオチン化二次抗体およびニュートラアビジン-HRPは、ビオチンに対するアビジンの高い親和性により、この複合体に結合する。複合体のHRP部分は、発色基質テトラメチルベンジジン（TMB）から、450nm光を吸収する生成物への変換を触媒する。試料のバックグラウンド補正済みA450をブランクウェルのバックグラウンド補正済みA450で割った値に等しい信号雑音比が10.0以上であった試料において、同一性が確定された。

【０３００】

所与の時点および温度でのタンパク質は、ELISAが、例えば陽性対照に対して、タンパク質の同一性を確定したとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、ELISAによって決定された450nmの数に対して計算することもできる。

【０３０１】

細胞に基づくバイオアッセイ（バイオアッセイ）

C2C12 pMAREクローン#44骨格筋細胞系を使用するレポーター遺伝子発現アッセイでSTM434注射剤の効力を測定した。マウスC2C12細胞にヒトミオスタチン／アクチビン応答性ルシフェラーゼ構築物を安定的にトランスフェクトした。操作された細胞系をリガンドであるミオスタチンと共にインキュベートしたとき、ミオスタチンがアクチビン受容体に結合した後にシグナル伝達が起こった。これは、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性化および結果としてのルシフェラーゼ生成を招いた。ルシフェラーゼとルシフェリンとの反応は、発光を招き、その発光をルミノメーターで測定した。STM434はこのシグナル伝達を用量依存的に阻害する。4パラメーター曲線適合モデルを使用してデータを解析した。参照曲線との平行性／類似性が立証された後、曲線から生物学的濃度を内挿し、参照標準に対する試料の相対効力を計算した。

【０３０２】

所与の時点および温度でのタンパク質は、バイオアッセイが60から140％の相対効力を示すとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃であること以外は同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性または活性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０３０３】

エンドトキシン

STM434注射剤中の細菌エンドトキシンを定量するための方法は、動力学的発色性エンドトキシン検出システムを利用した。エンドトキシン標準の希釈系列、STM434試料、およびシステムの適切性のためのエンドトキシン標準を添加したSTM434試料を調製し、システムの適切性のためのブランクとしての水と共に、96ウェルプレート中に負荷した。プレートを37℃で10分間インキュベート後、p-ニトロアニリン（pNA）で標識したペプチドを含有するカブトガニアメーバ様細胞溶解物（LAL）試薬をウェルに添加した。試料および標準中に存在するエンドトキシンは、LAL中のプロ酵素を活性酵素に変換し、活性酵素は、pNA

を無色のペプチドから切断して、405nmの吸光度でシグナルを発生する（A405）。エンドトキシン標準からのA405をプロットして標準曲線を作成し、STM434試料のエンドトキシン含量を標準曲線に対するそれらのA405の読みから決定した。各試料のEU/mLを決定し、試料のタンパク質濃度（mg/mL）で割った後に、ミリグラムあたりのエンドトキシンユニット（EU/mg）として結果を報告する。

【０３０４】

所与の時点および温度でのタンパク質は、エンドトキシンレベルが≦0.5エンドトキシンユニット（EU）/mgのとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃の他の点では同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０３０５】

無菌性

STM434注射剤の無菌性を決定するための方法は、試験物中のいかなる微生物も保持するためのメンブレン濾過技法を利用した。

【０３０６】

所与の時点および温度でのタンパク質は、製品の無菌性が米国薬局方（United States Pharmacopeia）の要件を満たすとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃の他の点では同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、米国薬局方によって提供される数に対して計算することもできる。

【０３０７】

肉眼不可視の粒子

STM434注射剤中に存在する肉眼不可視の粒子の量を、光遮蔽を使用して決定した。直径10μm以上および直径25μm以上の粒子の数として結果を報告する。

【０３０８】

所与の時点および温度でのタンパク質は、容器1つあたりの≧10μm粒子が6,000個以下であり、かつ容器1つあたりの≧25μm粒子が600個以下のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃の他の点では同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０３０９】

ポリソルベート20の濃度

荷電エアロゾル検出（CAD）による定量検出を用いて、PS20をタンパク質から分離するために逆相モードで運転する混合モードHPLCカラムを利用する方法によって、STM434注射剤中のポリソルベート20（PS20）の濃度を決定した。PS20標準の連続注入は、PS20濃度の関数としてのベースライン補正済みCAD応答に基づく検量線を提供し、検量線は、二次多項式に適合する。報告されるSTM434試料のPS20濃度は、そのベースライン補正済みCAD応答を多項式に代入し、PS20濃度について解くことによって決定した。

【０３１０】

所与の時点および温度でのタンパク質は、ポリソルベート20の濃度が0.006±0.003％（w/v）のとき、ゼロ時間（T0）でのタンパク質と、または-70℃の他の点では同一の条件の同一のタンパク質と等しい安定性を有すると見なされる。所与の時点での所与のタンパク質の安定性パーセントは、この数に対して計算することもできる。

【０３１１】

結果

下の表（表18～39）に、上記の方法を少なくとも部分的に、表示の時点および表示の条件で使用して発生した製剤化STM434の安定性関連データを示す。

【０３１２】

表18に、5℃で最大54ヶ月間保存された製剤化434の試験された特徴が、-70℃で最大54ヶ月間保存された製剤化434に類似していることを示す。表22に、5℃で最大6ヶ月間保存

された製剤化434の試験された特徴が、5℃で0ヶ月保存された製剤化434の特徴に類似していることを示す。表25および30に、2～8℃で最大12ヶ月間保存された製剤化434の試験された特徴が、2～8℃で0ヶ月保存された製剤化434の特徴に類似していることを示す。表36に、2～8℃で最大6ヶ月間正立位置で保存された製剤化434の試験された特徴が、2～8℃で0ヶ月正立位置で保存された製剤化434の特徴に類似していることを示す。表37に、2～8℃で最大6ヶ月間倒立位置で保存された製剤化434の試験された特徴が、2～8℃で0ヶ月、倒立位置で保存された製剤化434の特徴に類似していることを示す。

【０３１３】

このデータは、製剤化STM434が冷蔵温度（例えば2～8℃（2、3、4、5、6、7、8℃）；5℃）で最大54ヶ月間、70mg/mLのような高濃度であっても高度に安定であることを実証している。この安定性レベルは、4℃で典型的には1ヶ月の範囲で保存されたタンパク質から予想される安定性よりもずっと大きい。Pierce Technical Resource TR0043.1, Protein Stability and Storageの表1（http://sites.bio.indiana.edu/~chenlab/protocol_files/protein_storage.pdf）；およびWebster et al., Predicting Long-Term Storage Stability of Therapeutic Proteins, Pharmaceutical Technology, Volume 37, Issue 11 (Nov. 2, 2013）を参照されたい。したがって、製剤化STM434は、冷蔵温度（例えば2～8℃）で1ヶ月を超える、例えば最大3、6、12、18、24、36、48、または54ヶ月またはそれ以上の長期保管できる、高度に安定な組成物である。

【０３１４】

（表１８）434のDP/DS安定性試料の試験結果

	試料	DP, 5°C	DP, -20°C	DP, -70°C	DS, 5°C	DS, -70°C
	Lot #	0010036965	0010036965	0010036965	0010035106	0010035106
方法	時点	54 ヶ月	54 ヶ月	54 ヶ月	54 ヶ月	54 ヶ月
外観		無色、透明、可視的粒子なし	無色、透明、可視的粒子なし	無色、透明、可視的粒子なし	無色、透明、可視的粒子なし	無色、透明、可視的粒子なし
pH		6.7	6.7	6.7	6.8	6.7
タンパク質濃度 (A280)		71.6 mg/mL	71.3 mg/mL	71.8 mg/mL	76.0 mg/mL	71.5 mg/mL
SE-HPLC		98.2% 主 Pk 1.5% HMW 0.3% LMW	98.6% 主 Pk 1.4% HMW 0.0% LMW	98.8% 主 Pk 1.2% HMW 0.0% LMW	98.2% 主 Pk 1.5% HMW 0.3% LMW	98.8% 主 Pk 1.2% HMW 0.0% LMW
icIEF		60.8% 主 Pk 22.9% APG 16.4% BPG	69.9% 主 Pk 14.8% APG 15.3% BPG	72.4% 主 Pk 15.5% APG 12.2% BPG	65.6% 主 Pk 24.7% APG 9.8% BPG	65.8% 主 Pk 20.6% APG 13.7% BPG
nrCE-SDS		94.1% 主 Pk 5.9% 前ピーク	94.2% 主 Pk 5.8% 前ピーク	94.7% 主 Pk 5.3% 前ピーク	94.5% 主 Pk 5.5% 前ピーク	94.4% 主 Pk 5.6% 前ピーク
rCE-SDS		98.0% 主 Pk	98.0% 主 Pk	97.8% 主 Pk	97.7% 主 Pk	97.8% 主 Pk
細胞に基づくバイオアッセイ		87% 相対効力	99% 相対効力	111% 相対効力	101% 相対効力	99% 相対効力

DPは薬物製品であり；DSは原薬である。

【０３１５】

（表１９）STM434注射剤Lot0010036965の安定性データの概要：-70℃

条件：-70℃、正立 開始日：2009年9月9日		期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	0	12	24
外観	色	CL	CL～SY	CL～SY
	粒子	なし	なし	なし
pH	pH	6.72	6.70	6.72
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	98.972	98.905	98.404
	% LMW	1.028	1.095	1.096
	% HMW	0.0	0.0	0.498
SE-HPLC	%主ピーク	98.795	98.843	98.815
	% HMW	1.205	1.156	1.184
	% LMW	0.0	0.0	0.0
cIEF	%主ピーク	68.445	72.046	70.181
	%酸性	16.282	15.191	16.026
	%塩基性	15.273	12.762	13.791
バイオアッセイ	%相対効力	100	100	100
肉眼不可視の微粒子	容器1つあたりの≧10μm	＜10	＜10	＜10
	容器1つあたりの≧25μm	＜10	＜10	＜10

CL=無色；SY=微黄色；HMW=高分子量；LMW=低分子量

【０３１６】

（表２０）STM434注射剤Lot0010036965の安定性データの概要：-20℃

条件：-20℃、正立 開始日：2009年9月9日		期間（ヶ月）								
方法	パラメーター	0	1	3	6	9	12	18	24	30
外観	色	CL	CL～SY	CL～SY	CL～SY	CL～SY	CL～SY	CL～SY	CL～SY	CL～SY
	粒子	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
pH	pH	6.72	6.69	6.70	6.67	6.64	6.73	6.72	6.70	6.68
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	98.972	98.761	98.889	98.964	99.094	98.919	98.968	99.002	98.903
	%LMW	1.028	1.239	1.111	1.036	0.906	1.081	1.031	0.997	1.096
	%HMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SE-HPLC	%主ピーク	98.795	98.777	98.787	98.770	98.744	98.775	98.734	98.742	98.607
	%HMW	1.205	1.223	1.213	1.230	1.255	1.224	1.265	1.254	1.392
	%LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
cIEF	%主ピーク	68.445	68.390	68.516	67.255	71.142	69.844	68.774	70.214	69.094
	%酸性	16.282	17.454	16.285	17.599	16.522	14.354	17.089	15.963	16.242
	%塩基性	15.273	14.156	15.199	15.146	12.337	15.800	14.135	13.822	14.663
バイオアッセイ	%相対効力	100	100	102	95	103	102	102	99	102
肉眼不可視の微粒子	容器1つあたりの≧10μm	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10
	容器1つあたりの≧25μm	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10
無菌性	無菌性	合格	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	合格	N.S.	合格	N.S.

CL=無色；SY=微黄色；HMW=高分子量；LMW=低分子量；N.S.=スケジュールせず

【０３１７】

（表２１）STM434注射剤Lot0010036965の安定性データの概要：5×凍結／解凍

条件：5× F/T 開始日：2009年9月9日		条件	
方法	パラメーター	T = 0	5× F/T
外観	色	CL	CL～SY
	粒子	なし	なし
pH	pH	6.72	6.68
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	98.972	98.544
	% LMW	1.028	1.455
	% HMW	0.0	0.0
SE-HPLC	%主ピーク	98.795	98.787
	% HMW	1.205	1.213
	% LMW	0.0	0.0
cIEF	%主ピーク	68.445	68.255
	%酸性	16.282	18.293
	%塩基性	15.273	13.452
バイオアッセイ	%相対効力	100	100
肉眼不可視の微粒子	容器1つあたりの≧10μm	< 10	< 10
	容器1つあたりの≧25μm	< 10	< 10

CL=無色；SY=微黄色；HMW=高分子量；LMW=低分子量

【０３１８】

（表２２）STM434注射剤Lot0010036965の安定性データの概要：5℃

条件：5℃、正立 開始日：2009年9月9日		期間（ヶ月）				
方法	パラメーター	0	0.5	1	3	6
外観	色	CL	CL～SY	CL～SY	CL～SY	CL～SY
	粒子	なし	なし	なし	なし	なし
pH	pH	6.72	6.70	6.69	6.71	6.67
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	98.972	98.856	98.313	98.945	99.048
	% LMW	1.028	1.144	1.687	1.055	0.952
	% HMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SE-HPLC	%主ピーク	98.795	98.831	98.793	98.824	98.792
	% HMW	1.205	1.169	1.207	1.176	1.208
	% LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
cIEF	%主ピーク	68.445	67.703	67.012	67.239	69.441
	%酸性	16.282	16.196	18.094	17.907	15.290
	%塩基性	15.273	16.101	14.894	14.855	15.269
バイオアッセイ	%相対効力	100	99	100	104	94
肉眼不可視の微粒子	容器1つあたりの≧10μm	< 10	11	< 10	< 10	< 10
	容器1つあたりの≧25μm	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

CL=無色；SY=微黄色；HMW=高分子量；LMW=低分子量；N.S.=スケジュールせず

【０３１９】

（表２３）STM434注射剤Lot0010036965の安定性データの概要：25℃

条件：25℃、正立 開始日：2009年9月9日		期間（ヶ月）	
方法	パラメーター	0	0.25
外観	色	CL	CL～SY
	粒子	なし	なし
pH	pH	6.72	6.71
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	98.972	98.851
	% LMW	1.028	1.150
	% HMW	0.0	0.0
SE-HPLC	%主ピーク	98.795	98.901
	% HMW	1.205	1.099
	% LMW	0.0	0.0
cIEF	%主ピーク	68.445	68.002
	%酸性	16.282	16.670
	%塩基性	15.273	15.328
バイオアッセイ	%相対効力	100	97
肉眼不可視の微粒子	容器1つあたりの≧10μm	< 10	< 10
	容器1つあたりの≧25μm	< 10	< 10

CL=無色；SY=微黄色；HMW=高分子量；LMW=低分子量；N.S.=スケジュールせず

【０３２０】

（表２４）STM434注射剤Lot EG-13-0150の安定性データの概要：-20℃（SPN-643）

条件：-20℃、正立 開始日：2013年12月17日			期間（ヶ月）					
方法	パラメーター	合格基準	0	1	3	6	9	12
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.7	6.6	6.7	6.6	6.6
UVによる濃度	mg/mL	63-77	71.8	68.9	69.6	69.5	68.9	69.2
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	98.8	99.2	99.4 99.3 99.2*	99.1	99.2
CE-SDS, 非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	93.8	93.7	92.7	94.0	93.8	94.0
	%前ピーク	--	6.2	6.3	6.7	6.0	6.2	6.0
	%他	--	N.D.	N.D.	0.6	N.D.	N.D.	0.0
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.7	98.7	98.7	98.7	98.6	98.6
	% HMW	--	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4
	% LMW	--	**≤0.5**	**≤0.5**	**≤0.5**	**≤0.5**	≤0.5	0.0
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	64.8	67.1	61.6	65.1	64.7	66.8
	% APG	--	21.5	22.0	18.5	21.6	19.0	17.9
	% BPG	--	13.9	10.9	20.0	13.3	16.3	15.4
バイオアッセイ	%相対 効力	60-140	99	93.2	94.4	110	99.3	105.0
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	10
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0
容器閉塞性の 完全性	色素侵入	検出可能な 染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず；NDDI=検出可能な染料侵入なし
*逸脱のために3つの値を報告（分析者が注入を3回実行したが、方法は1回を必要としている）

【０３２１】

（表２５）STM434注射剤Lot EG-13-0150安定性データの概要：2～8℃（SPN-644）

条件：2～8℃、正立 開始日：2013年12月17日			期間（ヶ月）					
方法	パラメーター	合格基準	0	1	3	6	9	12
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.7	6.6	6.7	6.6	6.6
UVによる濃度	mg/mL	63-77	71.8	68.9	68.7	69.3	68.5	69.9
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	98.8	99.1	99.1 99.1 98.9*	99.0	99.1
CE-SDS, 非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	93.8	93.7	93.0	94.0	94.3	93.6
	%前ピーク	--	6.2	6.3	6.8	6.0	5.7	6.4
	%他	--	N.D.	N.D.	0.2	N.D.	N.D.	0.0
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.7	98.7	98.7	98.6	98.6	98.5
	% HMW	--	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4
	% LMW	--	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0.1
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	64.8	67.1	57.7	64.4	65.2	66.9
	% APG	--	21.5	22.0	18.5	23.0	19.6	19.3
	% BPG	--	13.9	10.9	23.8	12.7	15.2	13.9
バイオアッセイ	%相対 効力	60-140	99	93.2	99.7	114	102.6	106.5
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	236
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	5
容器閉塞性の 完全性	色素侵入	検出可能な 染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず；NDDI=検出可能な染料侵入なし
*逸脱のために3つの値を報告（分析者が注入を3回実行したが、方法は1回を必要としている）

【０３２２】

（表２６）STM434注射剤Lot EG-13-0150の安定性データの概要：25℃

条件：25℃、正立 開始日：2013年12月17日			期間（ヶ月）	
方法	パラメーター	合格基準	0	1
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.6
UVによる濃度	mg/mL	63-77	71.8	69.4
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	98.7
CE-SDS, 非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	93.8	94.0
	%前ピーク	--	6.2	6.0
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.7	98.5
	% HMW	--	1.3	1.3
	% LMW	--	≤0.5	≤0.5
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	64.8	66.7
	% APG	--	21.5	22.3
	% BPG	--	13.9	11.1
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	86.9

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず

【０３２３】

（表２７）STM434注射剤Lot EG-13-0150の安定性データの概要：5×凍結／解凍

条件：5×凍結／解凍 開始日：2014年2月13日				
方法	パラメーター	合格基準	T＝0	5× F/T
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.7
UVによる濃度	mg/mL	63-77	71.8	70.5
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	98.9
CE-SDS, 非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	93.8	94.4
	%前ピーク	--	6.2	5.6
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.7	98.8
	% HMW	--	1.3	1.2
	% LMW	--	≤0.5	≤0.5
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	64.8	69.4
	% APG	--	21.5	17.0
	% BPG	--	13.9	13.7
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	96

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし

；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず
【０３２４】
（表２８）STM434注射剤Lot FG-13-0230の安定性データの概要：-70℃（SPN-657）

条件：-70℃、正立 開始日：2014年1月31日			期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	合格基準	0	1	3
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	67.5	68.4
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	99.0	98.9
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.6	94.4
	%前ピーク	--	5.6	5.4	5.6
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.9	98.9	98.8
	% HMW	--	1.1	1.1	1.2
	% LMW	--	N.D.	≤0.5	≤0.5
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	68.7	70.4	71.3
	% APG	--	17.5	17.8	17.9
	% BPG	--	13.9	11.9	11.0
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	115	107
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず
【０３２５】
（表２９）STM434注射剤Lot FG-13-0230の安定性データの概要：-20℃（SPN-648）

条件：-20℃、正立 開始日：2014年1月31日			期間（ヶ月）					
方法	パラメーター	合格基準	0	1	3	6	9	12
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5	6.5	6.5	6.5	6.4
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	66.8	68.4	67.5	69.2	70.9
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	99.1	99.1	99.2	99.2	99.5
CE-SDS, 非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	93.9	94.0	93.2	93.8	94.1
	%前ピーク	--	5.6	6.1	6.0	6.8	6.2	5.9
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.9	98.9	98.8	98.6	98.8	98.8
	% HMW	--	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2
	% LMW	--	N.D.	**≤0.5**	**≤0.5**	≤0.5	≤0.5	**0.0**
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	68.7	67.7	69.6	66.0	64.7	70.2
	% APG	--	17.5	19.0	19.2	19.3	16.6	17.7
	% BPG	--	13.9	13.4	11.3	14.8	18.8	12.1
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	100	115	96	94	106
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３２６】

（表３０）STM434注射剤Lot FG-13-0230の安定性データの概要：2～8℃（SPN-649）

条件：2～8℃、正立 開始日：2014年1月31日			期間（ヶ月）					
方法	パラメーター	合格基準	0	1	3	6	9	12
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL	CL	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP	NVP	NVP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5	6.5	6.5	6.4	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	68.1	68.3	67.5	68.1	72.5
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	99.1	99.1	99.2	99.2	99.5
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.4	94.3	93.8	95.1	93.6
	%前ピーク	--	5.6	5.6	5.7	6.2	4.9	6.4
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.9	98.9	98.8	98.8	98.8	98.8
	% HMW	--	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
	% LMW	--	N.D.	**≤0.5**	**≤0.5**	≤0.5	≤0.5	**0.0**
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	68.7	68.5	68.8	65.3	64.2	67.5
	% APG	--	17.5	18.9	19.5	21.2	17.8	18.0
	% BPG	--	13.9	12.6	11.7	13.6	18.2	14.5
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	116	108	93	116	121
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３２７】

（表３１）STM434注射剤Lot FG-13-0230の安定性データの概要：25℃（SPN-650）

条件:25℃、正立 開始日:2014年1月31日			期間（ヶ月）	
方法	パラメーター	合格基準	0	1
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	67.3
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≧90.0%	98.7	99.0
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≧88.0%	94.4	94.4
	%前ピーク	--	5.6	5.6
SE-HPLC	%主ピーク	≧95.0%	98.9	98.9
	% HMW	--	1.1	1.1
	% LMW	--	N.D.	≦0.5
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	68.7	68.6
	% APG	--	17.5	19.8
	% BPG	--	13.9	11.7
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	116
肉眼不可視の微粒子	≧10 μm	容器1つあたり≦6000	2	10
	≧25 μm	容器1つあたり≦600	0	3
容器閉塞性の 完全性	色素侵入	検出可能な 染料侵入なし	N.S.	検出可能な 染料侵入なし

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３２８】

（表３２）STM434注射剤Lot FG-14-0056の安定性データの概要：-20℃（SPN-654）

条件:2～8℃、正立 開始日:2014年2月20日			期間（ヶ月）	
方法	パラメーター	合格基準	0	1
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	68.2
CE-SDS, 還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	98.9
CE-SDS, 非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	93.8
	%前ピーク	--	5.6	5.2
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.9	98.7
	% HMW	--	1.1	1.3
	% LMW	--	N.D.	≤0.5
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	68.7	70.9
	% APG	--	17.5	17.6
	% BPG	--	13.9	11.6
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	117
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３２９】

（表３３）STM434注射剤Lot FG-14-0056の安定性データの概要：2～8℃（SPN-655）

条件:2～8℃、正立 開始日:2014年2月20日			期間（ヶ月）	
方法	パラメーター	合格基準	0	1
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	68.4
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.7	98.8
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	93.4
	%前ピーク	--	5.6	6.6
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.9	98.8
	% HMW	--	1.1	1.2
	% LMW	--	N.D.	≤0.5
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	68.7	67.6
	% APG	--	17.5	19.2
	% BPG	--	13.9	13.3
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	99	102
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３３０】

（表３４）STM434注射剤Lot FG-14-0056の安定性データの概要：25℃（SPN-656）

条件：25℃、正立 開始日：2014年2月20日			期間（ヶ月）	
方法	パラメーター	合格基準	0	1
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	LY	CL
	粒子	EFOP	EFOP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.7	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.7	68.5
CE-SDS,還元条件	%主 ピーク	≥90.0%	98.7	98.7
CE-SDS,非還元条件	%主 ピーク	≥88.0%	94.4	93.7
	%前 ピーク	--	5.6	6.3
SE-HPLC	%主 ピーク	≥95.0%	98.9	98.5
	% HMW	--	1.1	1.3
	% LMW	--	N.D.	0.3
icIEF	%主 ピーク	65.0±10.0	68.7	70.8
	% APG	--	17.5	17.1
	% BPG	--	13.9	12.2
バイオアッセイ	%相対 効力	60-140	99	122
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.
容器閉塞性の 完全性	色素 侵入	検出可能な 染料侵入なし	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３３１】

（表３５）STM434注射剤Lot FG-14-0109の安定性データの概要：-20℃正立（SPN-676）

条件：-20℃、正立 開始日：2014年6月25日			期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	合格基準	0	3	6
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.6	6.5	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.8	67.5	67.2
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.5	98.6	99.2
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.2	93.8
	%前ピーク	--	5.6	5.8	6.4
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.8	98.9	98.8
	% HMW	--	1.2	1.1	1.2
	% LMW	--	N.D.	≤0.5	0.0
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	65.4	65.7	69.1
	% APG	--	23.0	18.7	17.9
	% BPG	--	11.6	15.6	13.1
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	98	96	101
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３３２】

（表３６）STM434注射剤Lot FG--14-0109の安定性データの概要：2～8℃正立（SPN-677）

条件：2～8℃、正立 開始日：2014年6月25日			期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	合格基準	0	3	6
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.6	6.5	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.8	67.3	67.5
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.5	98.7	99.0
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.1	94.0
	%前ピーク	--	5.6	5.9	6.0
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.8	98.9	98.8
	% HMW	--	1.2	1.1	1.2
	% LMW	--	N.D.	≤0.5	0.1
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	65.4	65.7	67.3
	% APG	--	23.0	18.9	19.2
	% BPG	--	11.6	15.5	13.8
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	98	92	107
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３３３】

（表３７）STM434注射剤Lot FG--14-0109の安定性データの概要：2～8℃倒立（SPN-678）

条件：2～8℃、倒立 開始日：2014年6月25日			期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	合格基準	0	3	6
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.6	6.5	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.8	67.7	67.7
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.5	98.8	99.1
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.3	94.0
	%前ピーク	--	5.6	5.7	6.0
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.8	98.9	98.8
	% HMW	--	1.2	1.1	1.2
	% LMW	--	N.D.	≤0.5	0.1
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	65.4	65.5	68.5
	% APG	--	23.0	19.5	18.9
	% BPG	--	11.6	15.1	12.8
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	98	96	112
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	N.S.
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	N.S.
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	N.S.

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず

【０３３４】

（表３８）STM434注射剤Lot FG-14-0109の安定性データの概要：25℃正立（SPN-679）

条件：25℃、正立 開始日：2014年6月25日			期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	合格基準	0	3	6
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.6	6.5	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.8	68.3	67.7
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.5	98.7	98.8
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.3	93.6
	%前ピーク	--	5.6	5.7	6.4
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.8	98.5	98.3
	% HMW	--	1.2	1.2	1.4
	% LMW	--	N.D.	≤0.5	0.3
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	65.4	61.5	62.5
	% APG	--	23.0	22.6	25.1
	% BPG	--	11.6	16.0	12.5
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	98	91	105
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	36
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	2
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず；NDDI=検出可能な染料侵入なし

【０３３５】

（表３９）STM434注射剤Lot FG-14-0109の安定性データの概要：25℃倒立（SPN-680）

条件：25℃、倒立 開始日：2014年6月25日			期間（ヶ月）		
方法	パラメーター	合格基準	0	3	6
外観	清澄度	CLR L	CLR L	CLR L	CLR L
	色	CL～LY	CL	CL	CL
	粒子	EFOP	FOP	NVP	NVP
pH	pH	6.4-7.0	6.6	6.5	6.5
UVによる濃度	mg/mL	63-77	67.8	67.7	67.2
CE-SDS,還元条件	%主ピーク	≥90.0%	98.5	98.7	98.6
CE-SDS,非還元条件	%主ピーク	≥88.0%	94.4	94.2	93.9
	%前ピーク	--	5.6	5.8	6.1
SE-HPLC	%主ピーク	≥95.0%	98.8	98.5	98.3
	% HMW	--	1.2	1.2	1.4
	% LMW	--	N.D.	≤0.5	0.3
icIEF	%主ピーク	65.0±10.0	65.4	62.3	61.5
	% APG	--	23.0	22.5	26.8
	% BPG	--	11.6	15.4	11.8
バイオアッセイ	%相対効力	60-140	98	94	98
肉眼不可視の微粒子	≥10 μm	容器1つあたり≤6000	2	N.S.	7
	≥25 μm	容器1つあたり≤600	0	N.S.	2
容器閉塞性の完全性	色素侵入	検出可能な染料侵入なし	N.S.	N.S.	NDDI

CLR L=清澄な液体；CL=無色；LY=淡黄色；EFOP=本質的に粒子なし；NVP=可視的粒子なし；HMW=高分子量；
LMW=低分子量；APG=酸性ピーク群；BPG=塩基性ピーク群；N.D.=検出されず；N.S.=スケジュールせず；NDDI=検出可能な染料侵入なし

【０３３６】

実施例8：STM434の投与はヒト身体組成を変化させる

実施例4における上記プロトコールを使用する、STM434を用いた処置のためにヒト対象を選択した。対象は、対側腎および骨盤リンパ節に転移した再発性乳頭状腎細胞癌を有する62歳アフリカ系アメリカ人男性であった。彼は、トリーセル（Torisel）、パゾパニブ、ならびにB7-H3 mAb、cMet阻害剤、CHK1阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、および組み換えヒトインターロイキン10を含めた治験薬を用いた8系統の抗腫瘍療法を以前に受けていた。

【０３３７】

STM434製剤、パッキング、および保管

STM434を、70mg/mL STM434、10mMリン酸カリウム緩衝液、8.8%(w/v)スクロース、および0.006%(w/v)ポリソルベート20（pH6.7）を含有する、IV投与を意図される無菌水溶液として製剤化した。製剤化されたSTM434溶液を、13mmフルオロポリマー栓および13mmシールを有する5mLガラスバイアル中にパッケージした。STM434のバイアルを温度-20℃（±5

℃)の霜取り不要の冷凍庫の中で保管した。使用前に、STM434を2℃～8℃の冷蔵庫の中で一晩解凍した。

【０３３８】

STM434の投与およびモニタリング

STM434を0.25mg/kgで約4週間毎に対象にIV投与した（コホート2）。

【０３３９】

最初のDXAスキャンは。2014年12月30日であり；投薬は、2015年1月6日、2015年2月3日、および2015年3月3日であり；経過観察DXAスキャンは2015年3月31日であった。

【０３４０】

除脂肪体重、体肢除脂肪体重、および脂肪量（内臓および皮下）におけるベースラインからの変化

様々な身体組成測定を約3ヶ月間隔で行って、身体組成、例えば筋肉および脂肪に対するSTM434の影響を評価した。除脂肪体重、体肢除脂肪体重、脂肪量、および脂肪分布（内臓および皮下）をDXAスキャンによって決定した。実施施設の放射線科医がDXAスキャンを解析し、中央放射線検査室がIBIS（Imaging Biomarker Information System）ソフトウェアを使用してDXAスキャンを確定して、正確な対象の位置決めおよび機械較正を確認した。

【０３４１】

表40に対象についての測定結果を示す。結果は、比較的低用量のSTM434でわずか約3ヶ月間処置した後に、除脂肪体重における実質的な増加および脂肪量における実質的な減少を実証している。

【０３４２】

（表４０）

年月日	TLBM	ALM	TFM	VFM	SFM	TFDIS	VFDIS	SFDIS	TBMD	RDCOM
2014年12月30日	57398	22492	15793	657	353	20.7	65	35	1.383	N/A
2015年3月31日	64460	24389	8204	4	321	10.8	1.4	98.6	1.365	N/A
%Δ	12.30%	8.40%	-48%	-99%	-9.1%	-47.8%	-97.8%	282%	-1.3%	N/A

TLBM=総除脂肪体重；
ALM=体肢除脂肪体重；
TFM=総脂肪量；
VFM=内臓脂肪量；
SFM=皮下脂肪量；
TBMD=総骨塩密度；
TFDIS=総脂肪分布；
VFDIS=内臓脂肪分布；
SFDIS=皮下脂肪分布；

【０３４３】

好ましい態様および様々な代替的な態様を参照して本発明を詳細に示し、説明したが、本発明の精神および範囲から逸脱せずに、形態および詳細における様々な変更をその中に加えることができることを関連する技術者は理解するであろう。

【０３４４】

本明細書の本文中に引用された全ての参考文献、発行済み特許および特許出願は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０３４５】

配列

SEQ ID NO	説明
1	ActRIIB細胞外ドメイン、ポリヌクレオチド
2	ActRIIB細胞外ドメイン、ポリペプチド
3	svActRIIB (E28W, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列あり
4	svActRIIB (E28W, S44T) ポリペプチド、シグナル配列あり
5	svActRIIB (E28W, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列なし
6	svActRIIB (E28W, S44T) ポリペプチド、シグナル配列なし
7	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列あり
8	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) ポリペプチド、シグナル配列あり
9	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列なし
10	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) ポリペプチド、シグナル配列なし (STM 434)
11	svActRIIB (E28Y, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列あり
12	svActRIIB (E28Y, S44T) ポリペプチド、シグナル配列あり
13	svActRIIB (E28Y, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列なし
14	svActRIIB (E28Y, S44T) ポリペプチド、シグナル配列なし
15	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列あり
16	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) ポリペプチド、シグナル配列あり
17	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) ポリヌクレオチド、シグナル配列なし
18	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) ポリペプチド、シグナル配列なし
19	ActRIIB (E28W) ポリペプチド、シグナル配列なし
20	ActRIIB-Fc (E28W) ポリヌクレオチド、シグナル配列なし
21	ActRIIB-Fc (E28W) ポリペプチド、シグナル配列なし
22	IgG2Fcポリペプチド配列
23	IgG1Fcポリペプチド配列
24	IgG4 Fcポリペプチド配列
25	リンカーアミノ酸配列
26	ヒンジリンカー#1ポリヌクレオチド配列
27	ヒンジリンカー#1ペプチド配列

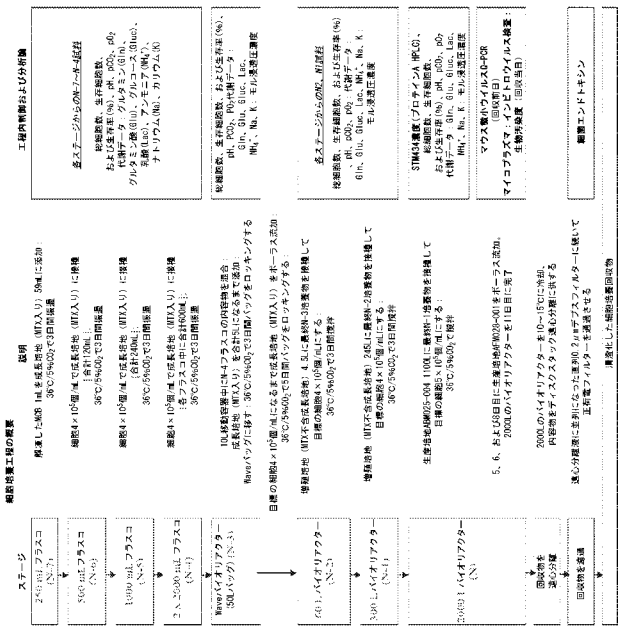
SEQ ID NO	配列
1	ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAGCGCTTCA CTCATTTGCC AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA CC
2	MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPT
3	ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT CCAGTGTGAG ACACGGTGGT GCATCTACTA CAACGCCAAC TGGGAGCTGG AGCGCACCAA CCAGACCGGC CTGGAGCGCT GCGAAGGCGA GCAGGACAAG CGGCTGCACT GCTACGCCTC CTGGCGCAAC AGCTCTGGCA CCATCGAGCT CGTGAAGAAG GGCTGCTGGC TAGATGACTT CAACTGCTAC GATAGGCAGG AGTGTGTGGC CACTGAGGAG AACCCCCAGG TGTACTTCTG CTGCTGTGAG GGCAACTTCT GCAACGAGCG CTTCACTCAT TTGCCAGAGG CTGGGGGCCC GGAAGTCACG TACGAGCCAC CCCCGACAGC CCCCACC
4	MEFGLSWVFL VALLRGVQCE TRWCIYYNAN WELERTNQTG LERCEGEQDK RLHCYASWRN SSGTIELVKK GCWLDDFNCY DRQECVATEE NPQVYFCCCE GNFCNERFTH LPEAGGPEVT YEPPPTAPT
53	GAGACACGGT GGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGACC GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAGGGCAACT TCTGCAACGA GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC
6	ETRWCIYYNA NWELERTNQT GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT
7	ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT CCAGTGTGAG ACACGGTGGT GCATCTACTA CAACGCCAAC TGGGAGCTGG AGCGCACCAA CCAGACCGGC CTGGAGCGCT GCGAAGGCGA GCAGGACAAG CGGCTGCACT GCTACGCCTC CTGGCGCAAC AGCTCTGGCA CCATCGAGCT CGTGAAGAAG GGCTGCTGGC TAGATGACTT CAACTGCTAC GATAGGCAGG AGTGTGTGGC CACTGAGGAG AACCCCCAGG TGTACTTCTG CTGCTGTGAG GGCAACTTCT GCAACGAGCG CTTCACTCAT TTGCCAGAGG CTGGGGGCCC GGAAGTCACG TACGAGCCAC CCCCGACAGC CCCCACCGGA GGGGGAGGAT CTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCACGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTTGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A
8	MEFGLSWVFL VALLRGVQCE TRWCIYYNAN WELERTNQTG LERCEGEQDK RLHCYASWRN SSGTIELVKK GCWLDDFNCY DRQECVATEE NPQVYFCCCE GNFCNERFTH LPEAGGPEVT YEPPPTAPTG GGGSVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
9	GAGACACGGT GGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC

	CAACCAGACC GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAGGGCAACT TCTGCAACGA GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGAGGGGGAG GATCTGTCGA GTGCCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAA
10	ETRWCIYYNA NWELERTNQT GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGGSVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
11	ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT CCAGTGTGAG ACACGGTACT GCATCTACTA CAACGCCAAC TGGGAGCTGG AGCGCACCAA CCAGACCGGC CTGGAGCGCT GCGAAGGCGA GCAGGACAAG CGGCTGCACT GCTACGCCTC CTGGCGCAAC AGCTCTGGCA CCATCGAGCT CGTGAAGAAG GGCTGCTGGC TAGATGACTT CAACTGCTAC GATAGGCAGG AGTGTGTGGC CACTGAGGAG AACCCCCAGG TGTACTTCTG CTGCTGTGAG GGCAACTTCT GCAACGAGCG CTTCACTCAT TTGCCAGAGG CTGGGGGCCC GGAAGTCACG TACGAGCCAC CCCCGACAGC CCCCACC
12	MEFGLSWVFL VALLRGVQCE TRYCIYYNAN WELERTNQTG LERCEGEQDK RLHCYASWRN SSGTIELVKK GCWLDDFNCY DRQECVATEE NPQVYFCCCE GNFCNERFTH LPEAGGPEVT YEPPPTAPT
13	GAGACACGGT ACTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGACC GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAGGGCAACT TCTGCAACGA GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC CACCCCCGAC AGCCCCCACC
14	ETRYCIYYNA NWELERTNQT GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT
15	ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT CCAGTGTGAG ACACGGTACT GCATCTACTA CAACGCCAAC TGGGAGCTGG AGCGCACCAA CCAGACCGGC CTGGAGCGCT GCGAAGGCGA GCAGGACAAG CGGCTGCACT GCTACGCCTC CTGGCGCAAC AGCTCTGGCA CCATCGAGCT CGTGAAGAAG GGCTGCTGGC TAGATGACTT CAACTGCTAC GATAGGCAGG AGTGTGTGGC CACTGAGGAG AACCCCCAGG TGTACTTCTG CTGCTGTGAG GGCAACTTCT GCAACGAGCG CTTCACTCAT TTGCCAGAGG CTGGGGGCCC GGAAGTCACG TACGAGCCAC CCCCGACAGC CCCCACCGGA GGGGGAGGAT CTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCACGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTTGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA

	GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A
16	MEFGLSWVFL VALLRGVQCE TRYCIYYNAN WELERTNQTG LERCEGEQDK RLHCYASWRN SSGTIELVKK GCWLDDFNCY DRQECVATEE NPQVYFCCCE GNFCNERFTH LPEAGGPEVT YEPPPTAPTG GGGSVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
17	GAGACACGGT ACTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGACC GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAGGGCAACT TCTGCAACGA GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGAGGGGGAG GATCTGTCGA GTGCCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAA
18	ETRYCIYYNA NWELERTNQT GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGGSVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
19	ETRWCIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT
20	GAGACACGGT GGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAGGGCAACT TCTGCAACGA GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGAGGAGGAG GATCTGTCGA GTGCCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC

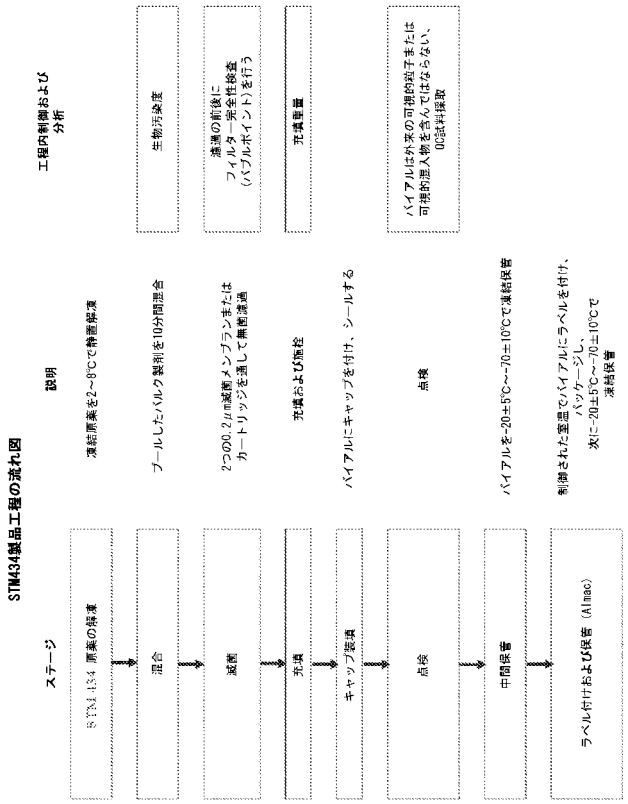
	CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAA
21	ETRWCIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGGSVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
22	APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
23	APELLGGPSV FLFPPKPKDI LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVG GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
24	APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
25	GGGGS
26	GGAGGGGGAG GATCTGTCGA GTGCCCACCG TGCCCA
27	GGGGSVECPP CP

【図１】

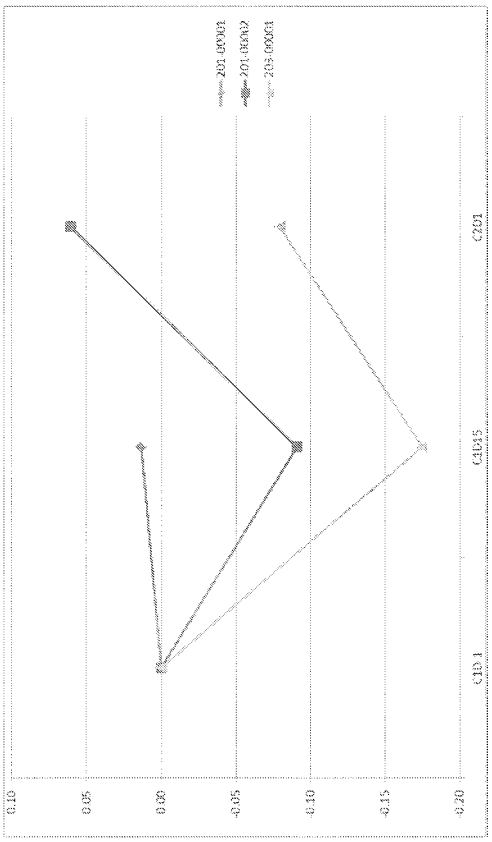


【図２】

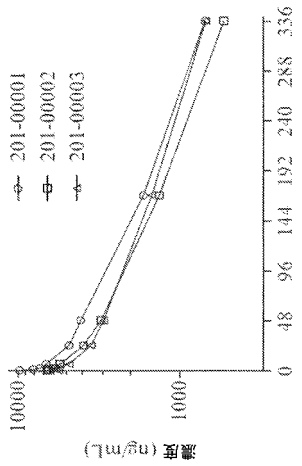
【図３】


STN434製品工程の流れ図
ステージ
説明
工程内制御および分析
STN434 原薬の解凍
凍結原薬を2~8℃で特置解凍
混合
プールしたバルク製剤を10分間混合
生物汚染度
滅菌
2つの0.2μm滅菌メンブランまたはカートリッジを通して無菌濾過
濾過の前後にフィルター完全性検査（バブルポイント）を行う
充填および栓
充填容量
キャップ装填
バイアルにキャップを付け、シールする
点検
バイアルは外来の可視的粒子または可視的混入物を含んではならない、0Cs試料採取
中間保管
バイアルを-20±5℃~-70±10℃で凍結保管
ラベル付けおよび保管（Allnac）
制御された室温でバイアルにラベルを付け、パッケージし、
次に-20±5℃~-70±10℃で
凍結保管

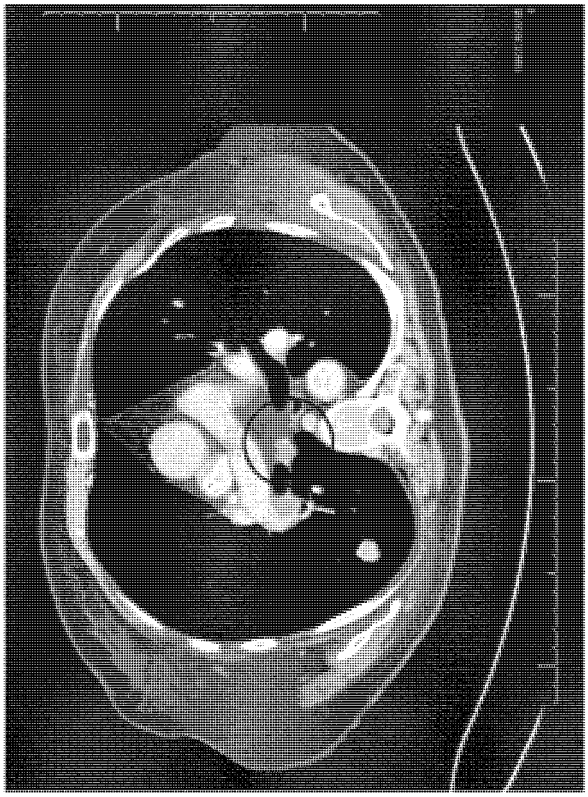
【図４】


0.10
0.05
0.00
-0.05
-0.10
-0.15
-0.20
C10.1
C1045
C201

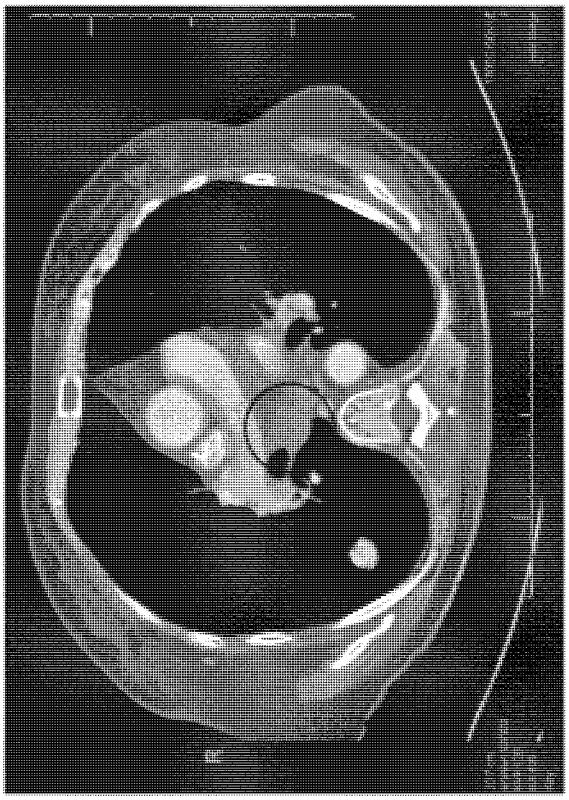
【図５】


201-00001
201-00002
201-00003
濃度（ng/mL）
10000
1000
0
48
96
144
192
240
288
336
時間（時間）

【図６】



【図７】



【配列表】

2017519009000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/35818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/71 (2015.01)
CPC - C07K 14/71, 14/495
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)
IPC(8): C07K 14/71; A61K 39/395; A61P 43/00
CPC: C07K 14/71, 14/495, 2319/30; A61K 9/19, 38/16; A61K 38/10

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)
PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; NCBI/BLAST/PubMed; Dialog ProQuest; peptide, polypeptide, myostatin, 'activin A,' 'GDF-11,' composition, compound, stabilize, stability, month, sucrose, 'potassium phosphate,' 'polysorbate 20,' tumor, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2013/0225484 A1 (AMGEN); August 29, 2013; paragraphs [0011], [0013], [0026], [0057], [0081], [0109], [0124], [0137]; SEQ ID NOs: 4, 10	20, 37-38 --- 1-4
Y	US 2009/0258017 A1 (CALLAHAN, WJ et al.); October 15, 2009; paragraphs [0018], [0019], [0044], [0048], [0369]; Table 40	1-4

☐ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 October 2015 (28.10.2015)	07 DEC 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/35818

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:

-***-Please See Supplemental Page-***-

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 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.:

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.:

-***-Please See Supplemental Page-***-

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/35818

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Groups I+, II+ and III share the technical features including a method of treating; administering to a subject a dose of a protein; at least one of activin, myostatin, and GDF-11; and SEQ ID NO: 2. Groups I+ and II+ share the technical features including: a method of inhibiting or treating a disease or disorder in a subject, comprising administering a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg of a protein to the subject, wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 selected from the group consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in the group consisting of SEQ ID NO: 4, 6, 12, and 14; (b) a polypeptide having at least 90% sequence identity to (a), and the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2, and (c) a polypeptide having at least 95% sequence identity to (a), wherein the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2. Groups I+ share the technical features including: a composition comprising a solution of a protein, an excipient, a buffer, and a surfactant, wherein the composition comprises a pH of 4-12, wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11, wherein the polypeptide is selected from the group consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in the group consisting of SEQ ID NO: 4, 6, 12, and 14; (b) a polypeptide having at least 90% sequence identity to (a), and the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2, and (c) a polypeptide having at least 95% sequence identity to (a), wherein the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2; wherein the protein in the composition retains at least 80% stability for a time period of greater than 1 month in solution when kept at 2-8C or 5C relative to the protein in the composition at the beginning of the time period (0 months) or relative to an identical protein kept under otherwise identical conditions for greater than 1 month at -20C or -70C; and, optionally wherein the composition further comprises a chemotherapeutic agent or a second therapeutic agent; a method of inhibiting a solid tumor growth in a subject or treating a solid tumor in a subject, comprising administering a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg of a protein to the subject, wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 selected from the group consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in the group consisting of SEQ ID NO: 4, 6, 12, and 14; (b) a polypeptide having at least 90% sequence identity to (a), and the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2, and (c) a polypeptide having at least 95% sequence identity to (a), wherein the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2; and a method of producing a protein comprising a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11, wherein the polypeptide is selected from the group consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in the group consisting of SEQ ID NO: 4, 6, 12 and 14; (b) a polypeptide having at least 90% sequence identity to (a), and the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2, and (c) a polypeptide having at least 95% sequence identity to (a), wherein the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2; the method comprising: culturing a CS9 Chinese hamster ovary cell line engineered to express the protein in a cell culture; harvesting the protein from the culture; and purifying the protein. Groups II+ share the technical features including a method of inhibiting, reducing, or treating cachexia in a subject, comprising administering a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg of a protein to the subject, wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 selected from the group consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in the group consisting of SEQ ID NO: 4, 6, 12, and 14; (b) a polypeptide having at least 90% sequence identity to (a), and the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2, and (c) a polypeptide having at least 95% sequence identity to (a), wherein the polypeptide has a W or a Y at the position corresponding to position 28 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2 and a T at the position corresponding to position 44 of the sequence set forth in SEQ ID NO: 2.

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/35818

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0168020 A1 (AMGEN INC.) (hereinafter 'Amgen') and further in view of the publication entitled 'Effect Of Imidazole On The Solubility Of A His-Tagged Antibody Fragment' by Hamilton, et al. (hereinafter 'Hamilton') and the publication entitled 'Cellular Responses To Individual Amino-Acid Depletion In Antibody-Expressing And Parental CHO Cell Lines' by Fomina-Yadlin, et al. (hereinafter 'Fomina-Yadlin').

Amgen discloses a method of treating (a method of treating; paragraph [0026]); administering to a subject a dose of a protein (administering to a subject a dose of a protein; paragraphs [0026], [0090]); at least one of activin, myostatin, and GDF-11 (activin, myostatin, and GDF-11; paragraph [0011]); and SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 2; paragraph [0011], wherein SEQ ID NO: 2 of the Amgen reference is 100% identical to SEQ ID NO: 2 of the instant PCT application); a method of inhibiting or treating a disease or disorder in a subject (a method of inhibiting or treating a disease or disorder in a subject; paragraph [0026]), comprising administering (paragraph [0026]) a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg (a single dose of 0.3 mg/kg, 3 mg/kg or 10 mg/kg (a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg); paragraph [0031]) of a protein to the subject (of a protein to the subject; paragraphs [0026], [0031]), wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 (wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11; paragraph [0011]) consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4); paragraph [0013], wherein SEQ IO NO: 4 of the Amgen reference is 100% identical to SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application): a composition comprising a solution of a protein (paragraph [0078]), an excipient (paragraph [0078]), a buffer (paragraph [0078]), and a surfactant (paragraph [0078]), wherein the composition comprises a pH of 4-12 (wherein the composition comprises physiologically buffered saline (wherein the composition comprises a pH of 4-12); paragraph [0082]), wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11; paragraph [0011]) consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); paragraph [0013], wherein SEQ ID NO: 4 of the Amgen reference is 100% identical to SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); a method of inhibiting a solid tumor growth in a subject or treating a solid tumor in a subject (a method of treating cancer, including a gonadal tumor (a method of inhibiting a solid tumor growth in a subject or treating a solid tumor in a subject); paragraphs [0027], [0106]), comprising administering (comprising administering; paragraph [0027]) a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg (a single dose of 0.3 mg/kg, 3 mg/kg or 10 mg/kg (a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg); paragraph [0031]) of a protein to the subject (of a protein to the subject; paragraphs [0027], [0031]), wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 (wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11; paragraph [0011]) consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); paragraph [0013], wherein SEQ ID NO: 4 of the Amgen reference is 100% identical to SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); and a method of producing a protein (a method of producing a protein; paragraph [0022]) comprising a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11, (wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11; paragraph [0011]) consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); paragraph [0013], wherein SEQ ID NO: 4 of the Amgen reference is 100% identical to SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application; the method comprising: culturing a Chinese hamster ovary cell line (the method comprising: culturing a Chinese hamster ovary cell line; paragraphs [0065], [0066]) engineered to express the protein in a cell culture (transformed with expression vectors that encode the polypeptide (engineered to express the protein in a cell culture); paragraphs [0065], [0066]); harvesting the protein from the cultura (recovering (harvesting) the protein from the culture; paragraph [0065]); and purifying the protein (and purifying the protein; paragraph [0069]); a method of inhibiting, reducing, or treating cachexia in a subject (a method of inhibiting, reducing, or treating cachexia in a subject; paragraphs [0026], [0054]), comprising administering administering (comprising administering; paragraph [0026]) a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg (a single dose of 0.3 mg/kg, 3 mg/kg or 10 mg/kg (a fixed dose ranging from at least 0.1 mg/kg to 20 mg/kg); paragraph [0031]) of a protein to the subject (of a protein to the subject; paragraphs [0026], [0031]), wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11 (wherein the protein comprises a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11; paragraph [0011]) consisting of: (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application (a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); paragraph [0013], wherein SEQ ID NO: 4 of the Amgen reference is 100% identical to SEQ ID NO: 4 of the instant PCT application); and wherein the polypeptide produced may comprise a his tag (wherein the polypeptide produced may comprise a his tag; paregreph [0048]).

Amgen does not disclose wherein the protein in the composition retains at least 80% stability for a time period of greater than 1 month in solution when kept at 2-8C or 5C relative to the protein in the composition at the beginning of the time period (0 months) or relative to an identical protein kept under otherwise identical conditions for greater than 1 month at -20C or -70C; a CS9 Chinese hamster ovary cell line.

Hamilton discloses a polypeptide (an antibody fragment (a polypeptide); abstract) comprising a his-tag (comprising a his-tag; abstract), wherein the protein remains soluble in solution at 4 degrees C in the presence of imidazole, in contrast to the same protein in the absence of imidazole (wherein the protein remains soluble in solution in the presence of imidazole in solution at 4 degrees C, in contrast to the same protein in the absence of imidazole; abstract), further wherein precipitated protein several months old (wherein precipitated protein several months old; abstract) was resolubilized using a composition comprising imidazole (was resolubilized using a composition comprising imidazole; abstrect).

Fomina-Yadlin discloses wherein depletion of nonessential amino acids during CHO expression of a recombinant polypeptide coincided with growth suppression and onset of stationary phase (wherein depletion of nonessential amino acids during CHO expression of a recombinant polypeptide coincided with growth suppression and onset of stationary phase), wherein the CHO cell lines included CS9 (wherein the CHO cell lines included CS9).

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/35818

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the disclosure of Amgen, for including storage of purified his-tagged polypeptides, as previously disclosed by Amgen, in a formulation or composition comprising imidazole, as previously disclosed by Hamilton, wherein the his-tagged polypeptide would have been anticipated to have retained least 80% stability for a time period of greater than 1 month in solution when kept at 2-8 degrees C or 5 degrees C, relative to the protein in the composition at the beginning of the time period (0 months) or relative to an identical protein kept under otherwise identical conditions for greater than 1 month at -20 degrees C or -70 degrees C, based on the capacity of the imidazole-comprising composition to redissolve precipitated protein more than 1 month old, as previously disclosed by Hamilton. Furthermore, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Amgen, for including the use of a CS9 CHO cell line for the production of a polypeptide, as disclosed by Fomina-Yadlin, for enabling the manipulation of growth phases vs. stationary phase by providing or depleting nonessential amino acids, as previously disclosed by Fomina-Yadlin, for controlling the amount of protein produced, and the rate of production.

Since none of the special technical features of the Groups I+-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Amgen, Hamilton and Fomina-Yadlin references, unity of invention is lacking.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US15/35818

-***-Continued from Box No. III: Observations Where Unity Of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-4, 20, 37 and 38 are directed toward a composition comprising a solution of a protein, an excipient, a buffer, and a surfactant; a method of inhibiting a solid tumor growth in a subject or treating a solid tumor in a subject; and a method of producing a protein comprising a polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11.

The composition, method of inhibiting and method of producing will be searched to the extent that the protein consists of an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 4 4 (Homo sapiens amino acid sequence). It is believed that Claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 20 (in-part), 37 (in-part) and 38 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 4 (Homo sapiens amino acid sequence). Applicant is invited to elect additional protein(s) with a SEO ID NO: that does not include any variable amino acids, or fully specified amino acid sequence(s) for each elected protein to be searchad. Additional amino acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees ere to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: SEQ ID NO: 6 (Homo sapiens amino acid sequence).

Groups II+: Claims 44-46 ere directed toward a method of inhibiting, reducing, or treating cachexia in a subject, comprising administering a protein to the subject, wherein the protein comprises e polypeptide capable of binding myostatin, activin A, or GDF-11.

The method of inhibiting, reducing, or treating cachexia can be searched to the extent that the protein consists of an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 4 (Homo sapiens amino acid sequence). It is believed that Claims 44 (in-part), 45 (in-part) and 46 (in-pert) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 4 (Homo sapiens amino acid sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 6 (Homo sapiens amino acid sequence).

Group III: Claims 63-65 are directed toward e method of treating obesity or e disease associated with obesity, increasing or maintaining muscle mass, or decreasing fat mass in a subject, comprising: administering to tha subject en effective dose of e protein that inhibits at least one of activin, myostatin, and GDF-11.

The inventions listed es Groups I+-III do not relate to a single generel inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I + include e composition comprising a pH of 4-12, which is not present in any of Groups II+ or III, the special technical features of Groups II+ include cachexia, which is not present in any of Groups I+ or III, the special technical feetures of Group III include obesity, which is not present in any of Groups I+ or II+.

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 21/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 3/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00		
Ａ６１Ｋ 39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｋ 47/66	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/66		
Ａ６１Ｋ 9/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/08		
Ａ６１Ｋ 47/34	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34		
Ａ６１Ｋ 47/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/04		
Ａ６１Ｋ 47/26	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/26		
Ａ６１Ｋ 9/127	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127		
Ａ６１Ｋ 31/704	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/704		
Ｃ０７Ｋ 14/71	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/71	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	
Ｃ０７Ｋ 19/00	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		

(31)優先権主張番号 62/142,812
(32)優先日 平成27年4月3日(2015.4.3)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,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 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072

弁理士　川本　和弥
(72)発明者　ハック　クリストファー　マイケル
アメリカ合衆国　９４０８０　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ゲートウェイ　ブールバード　６１１　スイート　９００　サンタ　マリア　バイオセラピューティクス　インコーポレイテッド内
(72)発明者　ラティポブ　ラミル
アメリカ合衆国　９１３２０－１７９９　カリフォルニア州　サウザンド　オークス　ワン　アムジエン　センター　ドライブ　アムジエン・インコーポレーテツド内

Ｆターム(参考)　4B064 AG20 CA10 CA19 CC03 CC05 CC06 CC07 CC10 CC12 CC15
CC24 CD02 CD09 CD13 CD21 CE03 CE06 CE10 CE11 CE12
DA05
4C076 AA12 AA19 BB13 CC21 CC27 DD09 DD26Z DD67 EE23
4C084 AA02 AA03 AA06 AA19 BA01 BA08 BA21 BA23 CA56 MA02
MA05 MA17 MA66 NA03 ZA701 ZA702 ZA941 ZA942 ZB261 ZB262
ZC331 ZC332 ZC411 ZC412
4C085 AA14 CC05 DD23 EE01 EE03 GG02
4C086 AA01 AA02 EA10 MA03 MA05 MA24 NA03 NA05 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 BA50 CA40 DA50 EA20 FA74
GA10 GA15 GA23 GA25 GA26