

(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2017-501980

(P2017-501980A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 K 9/113 (2006.01)	A 6 1 K 9/113	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-533693 (P2016-533693)	(71) 出願人	514082631
(86) (22) 出願日	平成26年12月23日 (2014.12.23)		キネタ ワン リミテッド ライアビリテ
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月22日 (2016.7.22)		ィ カンパニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/072253		K I N E T A O N E, L L C
(87) 国際公開番号	W02015/100370		アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン
(87) 国際公開日	平成27年7月2日 (2015.7.2)		州 シアトル テリー アベニュー ノー
(31) 優先権主張番号	61/920, 383		ス 2 1 9 スイート 3 0 0 ワシント
(32) 優先日	平成25年12月23日 (2013.12.23)		ン リミテッド ライアビリティ カンパ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ニー
		(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100156122
			弁理士 佐藤 剛
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療タンパク質の徐放型デポー製剤、およびその使用

(57) 【要約】

治療タンパク質を含むデポー製剤を提供する。治療タンパク質は、毒素系治療タンパク質とすることができる。デポー製剤は、単一投与後少なくとも1ヶ月間、治療タンパク質を持続した有効レベル内で放出する。毒素系治療タンパク質は、ShK-系タンパク質を含むことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i)

(a) 配列番号：217または配列番号：218の治療タンパク質、緩衝液および塩類を含む内部水性相、ここに粒子の内部水性相は6.0～8.5のpHを有し；および

(b) ポリ（ラクチド-co-グリコリド）（PLG）2Aを含むポリマー相

からなる粒子；および

(ii) ポリ（ビニルアルコール）（PVA）界面活性剤を含む粒子を囲む水性相；
からなるデポー製剤であって、ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、デポー製剤。

10

【請求項 2】

(i)

(a) 配列番号：217または配列番号：218の治療タンパク質、緩衝液および塩類を含む内部水性相、ここに粒子の内部水性相は6.0～8.5のpHを有し；および

(b) カルボキシー末端化中分子量PLGを含むポリマー相

からなる粒子；および

(ii) 界面活性剤を含む粒子を囲む水性相；
からなるデポー製剤であって、ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、デポー製剤。

20

【請求項 3】

(i)

(a) 少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、または少なくとも3のジスルフィド架橋を有する治療タンパク質、緩衝液および塩類を含む内部水性相、ここに粒子の内部水性相は6.0～8.5のpHを有し、および

(b) PLG2Aを含むポリマー相

からなる粒子；および

(ii) PVA界面活性剤を含む粒子を囲む水性相；
からなるデポー製剤であって、
ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、デポー製剤。

30

【請求項 4】

(i)

(a) 少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、または少なくとも3のジスルフィド架橋を有する治療タンパク質、緩衝液、および塩類を含む内部水性相、ここに粒子の内部水性相は6.0～8.5のpHを有し、および

(b) カルボキシー末端化中分子量PLGを含むポリマー相

からなる粒子；および

(ii) 界面活性剤を含む粒子を囲む水性相
からなるデポー製剤であって；
ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、デポー製剤。

40

【請求項 5】

(i)

(a) デポー製剤の1.2% w/wで存在する配列番号：1～260のいずれか1の毒素系治療タンパク質、

(b) リン酸、クエン酸、酢酸、ヒスチジン、またはそれらの組合せを含む緩衝液、および

(c) NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、(NH₄)₂CO₃、またはそれらの組合せから選択される塩類
を含む内部水性相、ここに内部水性相は5.0～8.5のpHを有し；

50

(ii) カルボキシー末端化中分子量PLGポリマー系固相／油相；および
(iii) デポー製剤の0.01～0.1% w/wで存在するPVA界面活性剤を含む外部水性相
から実質的になるデポー製剤であって、
ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク
質の徐放を提供する、デポー製剤。

【請求項6】

(i)
(a) デポー製剤の1.2% w/wで存在する配列番号：1～260のいずれか1の毒素系治療タン
パク質、
(b) リン酸、クエン酸、酢酸、ヒスチジン、またはそれらの組合せを含む緩衝液、およ
び
(c) NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、(NH₄)₂CO₃、またはそれらの組合せから選択される塩
類
を含む内部水性相、ここに内部水性相は5.0～8.5のpHを有し；

(ii) PLG2Aポリマー系固相／油相；および
(iii) デポー製剤の0.01～0.1% w/wで存在するPVA界面活性剤を含む外部水性相、
から実質的になるデポー製剤であって、
ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク
質の徐放を提供する、デポー製剤。

【請求項7】

(i) デポー製剤の1.2% w/wで存在する配列番号：1～260のいずれか1の毒素系治療タン
パク質；(ii) PLG2Aポリマー；および(iii) デポー製剤の0.01～0.1% w/wで存在す
るPVA界面活性剤、から実質的になるデポー製剤であって；ここにデポー製剤は単一投与
後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク質の徐放を提供する、デポー
製剤。

【請求項8】

(i)
(a) デポー製剤の1.2 w/wで存在する毒素系治療タンパク質、および
(b) リン酸、クエン酸、酢酸、ヒスチジン、またはそれらの組合せを含む緩衝液
を含む内部水性相、ここに内部水性相は5.0～8.5のpHを有し；
(ii) PLG2Aポリマー系固相／油相；および
(iii) デポー製剤の0.01～0.10% w/wで存在するPVA界面活性剤を含む外部水性相、
から実質的になるデポー製剤であって、
ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク
質の徐放を提供する、デポー製剤。

【請求項9】

(i) 毒素系治療タンパク質；(ii) PLG2Aポリマー；および(iii) PVA界面活性剤から
実質的になるデポー製剤であって、ここにデポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の
有効レベル内の毒素系治療タンパク質の徐放を提供する、デポー製剤。

【請求項10】

(i) 凍結乾燥デポー製剤の0.025%～5% w/wで存在する治療タンパク質を含む内部水性
相；(ii) ポリマー系固相／油相；および(iii) 凍結乾燥デポー製剤の0.01%～1% w/w
で存在する界面活性剤を含む外部水性相、から実質的になるデポー製剤であって、ここに
デポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提
供する、デポー製剤。

【請求項11】

ポリマーがポリ（ラクチド）、ポリ（グリコリド）、PLG、ポリ（乳酸）、ポリ（グリ
コール酸）、ポリ（乳酸-co-グリコール酸）、PLG-グラフト・ポリエチレングリコー
ル（PEG）、またはそれらのブレンドまたはコポリマーから選択される、請求項10に記載
のデポー製剤。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

ポリマーが1：1のラクチド：グリコリド比を有するPLGである、請求項11に記載のデポー製剤。

【請求項 1 3】

治療タンパク質がデポー製剤の0.025 w/wで存在する；デポー製剤の0.25% w/wで存在する；またはデポー製剤の2.5% w/wで存在する、請求項10に記載のデポー製剤。

【請求項 1 4】

界面活性剤がポリソルベート、PEG、エチレンープロピレンオキサイド（PEO-PP0）ブレンド、ポロキサマー、ジオクチルースルホサキシネート、PVA、ポリビニルピロリドン（PVP）、またはそれらの組合せから選択される、請求項10に記載のデポー製剤。

10

【請求項 1 5】

治療タンパク質が少なくとも20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも22アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも26アミノ酸、少なくとも27アミノ酸、少なくとも28アミノ酸、少なくとも29アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも31アミノ酸、少なくとも32アミノ酸、少なくとも33アミノ酸、少なくとも34アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも36アミノ酸、少なくとも37アミノ酸、少なくとも38アミノ酸、少なくとも39アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも41アミノ酸、少なくとも42アミノ酸、少なくとも43アミノ酸、少なくとも44アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも46アミノ酸、少なくとも47アミノ酸、少なくとも48アミノ酸、少なくとも49アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも51アミノ酸、少なくとも52アミノ酸、少なくとも53アミノ酸、少なくとも54アミノ酸、または少なくとも55アミノ酸を有する、請求項10に記載のデポー製剤。

20

【請求項 1 6】

治療タンパク質が少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、少なくとも3のジスルフィド架橋、少なくとも4のジスルフィド架橋、または少なくとも5のジスルフィド架橋を有する、請求項10に記載のデポー製剤。

【請求項 1 7】

治療タンパク質が毒素系治療タンパク質である、請求項10に記載のデポー製剤。

【請求項 1 8】

治療タンパク質が電位開口型カリウムチャネルを阻害するShK一系タンパク質である、請求項10に記載のデポー製剤。

30

【請求項 1 9】

阻害された電位開口型カリウムチャネルがKv1.1、Kv1.3、Kv1.5、Kv1.3/1.5、Kv1.6、Kv3.2、またはKCa3.1チャネルである、請求項18に記載のデポー製剤。

【請求項 2 0】

治療タンパク質が配列番号：1～260のいずれか1に記載の配列を有する、請求項10に記載のデポー製剤。

【請求項 2 1】

治療タンパク質が配列番号：208、配列番号：217、配列番号：257、配列番号：210、配列番号：219、配列番号：218、配列番号：221、またはそれらの塩である、請求項10に記載のデポー製剤。

40

【請求項 2 2】

治療タンパク質が配列番号：217である、請求項21に記載のデポー製剤。

【請求項 2 3】

治療タンパク質が配列番号：218である、請求項21に記載のデポー製剤。

【請求項 2 4】

治療タンパク質が配列番号：210である、請求項21に記載のデポー製剤。

【請求項 2 5】

デポー製剤が単一投与後少なくとも40日間の、少なくとも41日間の、少なくとも42日間の、少なくとも43日間の、少なくとも44日間の、少なくとも45日間の、少なくとも46日間

50

の、少なくとも47日間の、少なくとも48日間の、少なくとも49日間の、少なくとも50日間の、少なくとも51日間の、少なくとも52日間の、少なくとも53日間の、少なくとも54日間の、少なくとも55日間の、または少なくとも56日間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、請求項10に記載のデポー製剤。

【請求項 2 6】

ポリマーがPLG1A、PLG2A、PLG3A、PLG5E、またはPLG7Eである、請求項10に記載のデポー製剤。

【請求項 2 7】

(i) 凍結乾燥デポー製剤の0.025% w/w~5% w/wで中に分散した治療タンパク質を含むポリマー系固相/油相；(ii) 凍結乾燥デポー製剤の0.01%~5% w/wで存在する界面活性剤；および(iii) 凍結乾燥デポー製剤の0.5~90% w/wで存在する糖質から実質的になる凍結乾燥デポー製剤であって、ここに凍結乾燥デポー製剤を元に戻した後に、元に戻したデポー製剤が単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、凍結乾燥デポー製剤。

10

【請求項 2 8】

糖質がスクロース、マンニトール、トレハロース、デキストロース、またはそれらの組合せである、請求項27に記載の凍結乾燥デポー製剤。

【請求項 2 9】

糖質がスクロースである、請求項28に記載の凍結乾燥デポー製剤。

【請求項 3 0】

ポリマーがポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、PLG、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)、PLG-グラフトPEG、またはそれらのブレンドまたはコポリマーから選択される、請求項27に記載の凍結乾燥デポー製剤。

20

【請求項 3 1】

ポリマーが1:1のラクチド:グリコリド比を有するPLGである、請求項30に記載の凍結乾燥デポー製剤。

【請求項 3 2】

治療タンパク質が凍結乾燥デポー製剤の0.025% w/wで存在する；凍結乾燥デポー製剤の0.25% w/wで存在する；または凍結乾燥デポー製剤の2.5% w/wで存在する、請求項27に記載の凍結乾燥デポー製剤。

30

【請求項 3 3】

界面活性剤がポリソルベート、PEG、エチレン-プロピレンオキサイド・ブレンド、ポロキサマー、ジオクチルスルホサキシネート、PVA、PVP、またはそれらの組合せから選択される、請求項27に記載の凍結乾燥デポー製剤。

【請求項 3 4】

治療タンパク質が少なくとも20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも22アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも26アミノ酸、少なくとも27アミノ酸、少なくとも28アミノ酸、少なくとも29アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも31アミノ酸、少なくとも32アミノ酸、少なくとも33アミノ酸、少なくとも34アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも36アミノ酸、少なくとも37アミノ酸、少なくとも38アミノ酸、少なくとも39アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも41アミノ酸、少なくとも42アミノ酸、少なくとも43アミノ酸、少なくとも44アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも46アミノ酸、少なくとも47アミノ酸、少なくとも48アミノ酸、少なくとも49アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも51アミノ酸、少なくとも52アミノ酸、少なくとも53アミノ酸、少なくとも54アミノ酸、または少なくとも55アミノ酸を有する、請求項27に記載の凍結乾燥デポー製剤。

40

【請求項 3 5】

治療タンパク質が少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、少なくとも3のジスルフィド架橋、少なくとも4のジスルフィド架橋、または少なくとも5のジスルフィド架橋を有する、請求項27に記載の凍結乾燥デポー製剤。

50

【請求項 3 6】

治療タンパク質が毒素系治療タンパク質である、請求項27に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 3 7】

治療タンパク質が電位開口型カリウムチャネルを阻害するShK系タンパク質である、請求項27に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 3 8】

阻害される電位開口型カリウムチャネルがKv1.1、Kv1.3、Kv1.5、Kv1.3/1.5、Kv1.6、Kv3.2、またはKCa3.1チャネルである、請求項37に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 3 9】

治療タンパク質が配列番号：1～260のいずれか1に記載の配列を有する、請求項27に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 4 0】

治療タンパク質が配列番号：208、配列番号：217、配列番号：257、配列番号：210、配列番号：219、配列番号：218、配列番号：221、またはそれらの塩である、請求項27に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 4 1】

元に戻したデポ製剤が単一投与後少なくとも40日間の、少なくとも41日間の、少なくとも42日間の、少なくとも43日間の、少なくとも44日間の、少なくとも45日間の、少なくとも46日間の、少なくとも47日間の、少なくとも48日間の、少なくとも49日間の、少なくとも50日間の、少なくとも51日間の、少なくとも52日間の、少なくとも53日間の、少なくとも54日間の、少なくとも55日間の、または少なくとも56日間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、請求項27に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 4 2】

ポリマーがPLG1A、PLG2A、PLG3A、PLG5E、またはPLG7Eである、請求項27に記載の凍結乾燥デポ製剤。

【請求項 4 3】

請求項1～42のいずれか1に記載のデポ製剤を対象に投与し、それによって対象における治療タンパク質の徐放を得ることを含む、対象における治療タンパク質の徐放を得る方法。

【請求項 4 4】

徐放が、(1) 単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の放出；(2) C_{max} に対する $C_{average}$ の比が単一投与後少なくとも1ヶ月間、5を超えないまたは3を超えない有効レベル内の放出；(3) 単一投与後少なくとも56日間の有効レベル内の放出；および/または(4) C_{max} に対する $C_{average}$ の比が単一投与後少なくとも56日間、5を超えないまたは3を超えない有効レベル内の放出、によって証明される、請求項43に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本願はそのすべての内容を出典明示して本明細書の一部とみなす、2013年12月23日に出版した米国仮特許出願番号61/920,383に基づく優先権を主張する。

【0002】

本願明細書は、少なくとも1個のジスルフィド架橋を有する毒素系治療タンパク質を含む、治療タンパク質の徐放用の製剤に関する。製剤を創製し、使用方法も開示する。単一投与後に、製剤は少なくとも1ヶ月間、持続した有効レベルの治療タンパク質を対象において達成する。

【背景技術】

【0003】

一般的に、治療医薬は医薬の治療濃度域として知られている最低有効用量と最大耐用量

10

20

30

40

50

との間の許容できる有効レベルの範囲を有している。治療濃度域内に医薬を維持することは、最大耐用量を超えることなく医薬の有効レベルを維持することを必要とする。

【0004】

治療タンパク質の場合、最大耐用量を超えることなく持続した有効レベルを達成することは、頻回非経口注射によってなされる場合がある。しかしながら、頻回注射の必要性は不便であり、低い対象の順応性につながり、対象における治療タンパク質のレベルの変動を引き起こし、潜在的に有害なレベルを引き起こし得る。

【0005】

別の頻回注射へのアプローチは、対象に投与した治療タンパク質の経時的な放出をモジュレートする生分解性材料を用いることである。カプセル化の方法および相互作用が治療タンパク質の制御された徐放に通じる分子手配は理論的には持続した上昇したレベルのタンパク質を達成し得る。記載したアプローチが理論上はよく作用するが、かかる放出系は投与後に迅速に多量の治療タンパク質が逃れることを許容する「バースト (burst)」と呼ばれる非常に高い初期速度の放出を示す場合があることが判明している。このバーストは治療濃度域を超えるタンパク質濃度を作り出す場合があり、望ましくない副作用を引き起こし、その後有効レベルを持続する放出系において不十分な量とする場合がある。また、かかる組成物は経時的に一定でない治療に通じる血中濃度の望ましくないピークおよび谷を作り出す場合がある。

【0006】

生理学的温度、生体分子の環境および制御放出型組成物の投与に対する免疫応答のようなファクターは、低いバイオアベイラビリティに寄与する分解や凝集のような機構を介して治療タンパク質の性質を望ましくない方向に変化させる可能性がある。これらの天然のプロセスは組成物の望ましい放出プロファイルや有効性を妨害する可能性がある。特に、タンパク質は、分解および排除のために膨大な規定の経路で本来は不安定な分子だからである。

【0007】

投与後1~3ヶ月間の徐放を示すリュープロリド（ならびにブセレリン、ヒストレリン、ゴセレリン、ナファレリン、およびトリプトレリンを含む関連化合物）のような性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) アゴニストを含む制御放出型組成物が首尾良く創製されている（米国特許第5,980,945；6,036,976；6,337,618号）。黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) アゴニストも制御放出型組成物に組み合わされている（米国特許第3,853,837、4,008,209、3,972,859、4,086,219、4,124,577、4,253,997、および4,317,815；英国特許第1423083）。しかしながら、これらの製剤中の有効化合物は非常に短く（~9アミノ酸）、かつ二次構造要素（ α -ヘリックスおよび β -シートのような）、および三次構造要素のような治療タンパク質活性と関連する高次構造要素を欠いている。例えば、NMR構造は、せいぜい1型または2型の β ターンしか示していない。さらに、構造要素はこれらの化合物の治療効力に必要なでないようである。単純な線状アナログが、MCF-7乳癌系統細胞のような適切な標的に対して効力活性を示すからである。

【0008】

より複雑な治療タンパク質の徐放型デポー製剤を創製することと関連した課題を取り扱う試行において多くの作業がなされている（例えば、Allison, Expert Opin. Drug Deliv. 5: 615-28, 2008; Xuら, Acta Pharmaceutica Sinica, 42: 1-7, 2007; Jungら, Arch. Pharm. Res. 32: 359-65, 2009; Bouissouら, Pharm. Res. 23: 1295-305, 2006; Luanら, Eur. J. Pharm. Biopharm. 63: 205-14, 2006; Duncanら, J. Control Release, 110: 34-48, 2005; Leachら, J. Pharm. Sci. 94: 56-69, 2005; Yeoら, Arch. Pharm. Res. 27: 1-12, 2004; Yehら, J. Microencapsul. 24: 82-93, 2007; Costantinoら, J. Pharm. Sci. 93: 2624-2634, 2004; Yeoら, Arch Pharm Res., 27: 1-12, 2004; Peanら, J. Control Release, 56: 175-187, 1998; 米国特許第5,891,478号; Carrasquillo, J. Control Release, 76: 199-208, 2001; Castellanosら, J. Pharm. Pharmacol., 53: 1099-1107, 2001; Leeら, J. Biol. Chem., 256: 7193-7201, 1981; Perezら, J

10

20

30

40

50

. Pharm. Pharmacol., 54:301-313, 2002; およびTaylorら, Diabetes, 51 (Suppl 2): A85, 2002を参照されたい)。しかしながら、この分野における膨大な作業にもかかわらず、少数のペプチドしか制御放出型組成物に首尾良く製剤化されていない。

【0009】

タンパク質放出の初期バーストを制御および低下させる試みの従前の例は大部分は失敗し：牛血清アルブミン (BSA) (Samadiら, Biomacromolecules 14:1044-53 2013); α -キモトリプシン (Flores-Fernandezら, Results Pharma, Sci. 2:46-51, 2012); 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (Zhangら, J. Microencapsul. 28:743-51, 2011); インターフェロン α -2b (Liら, Int. J. Pharm. 410:48-53, 2011); 組織壊死因子 α (TNF- α) (Kimら, J. Control Release. 150:63-9, 2011); エリスロポイエチン、神経成長因子、およびヒト成長因子 (Yeら, J Control Release. 146:241-60, 2010)、およびヒト成長ホルモン (米国特許第5,891,478号) が含まれる。顕著な初期バーストを示す製剤もよく調べられている (例えば、Zhengら, Drug Deliv. 17:77-82, 2010)。

【0010】

治療タンパク質の徐放を達成することに関連するさらなる試みには、カプセル化タンパク質の安定化および／または組成物からの治療タンパク質の不完全な放出が含まれる (Yeら, Arch Pharm Res, 27:1-12, 2004)。安定化賦形剤 (Leeら, J. Biol. Chem., 256:7193-7201, 1981)、コア-シェル構造 (Yuanら, Int. J. Nanomedicine 7:257-270, 2012)、および有効成分の分子エンジニアリング (Luckeら, Pharm. Res., 19:175-181, 2002) を含む、これらの問題の各々を取り扱う多くのアプローチが試みられている。これらのすべてのアプローチおよび試行にもかかわらず、治療タンパク質は大部分が首尾良い製剤を徐放系から回避させる。例えば、Paiら, AAPS J. 11 (1):88-98, March 2009; PMCID: PMC2664882を参照されたい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

頻回注射を必要とすることなくタンパク質の有効レベルの徐放を達成する形態で治療タンパク質を投与する能力に対する要望が存在する。GnRHアゴニストまたはLH-RHのような複雑な構造を欠く以前に製剤化された短いタンパク質よりもより複雑である治療タンパク質を投与する能力に対する要望が特に存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願明細書は、毒素系治療タンパク質を含む治療タンパク質の徐放のための製剤を提供することによってこれらの要望を取り扱う。タンパク質は少なくとも1のジスルフィド架橋を含むことができる。該製剤は、単一投与後少なくとも1ヶ月間、持続した有効レベルの治療タンパク質を提供する。製剤を製造し、使用方法も開示する。

【0013】

特に、本願明細書は、少なくとも1つの治療タンパク質を含む徐放型デポー製剤を提供する。さらに特に、徐放型デポー製剤には、治療タンパク質を含む内部水性相、生分解性となることができるポリマーを含む第2の相 (油／固体相)、および中に粒子が分散する第3の外部水性相が含まれる。内部水性相は、特定の治療タンパク質の天然および活性なコンホメーションを保持し、および経時的なタンパク質の徐放を達成するように第2の相のポリマーとの親和性を許容するようにpH、塩濃度、溶媒、安定剤、および放出モディファイアーが選択された特別に化学的に修飾した微小環境とすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、ポリマー型PLG1A、PLG2A、PLG3A、PLG5E、およびPLG7E (異なる分子量および末端キャップ基のポリ (ラクチド-co-グリコリド) (PLG) の範囲を表す) を用いた製剤の、機械攪拌を用いた37°Cにおける水性2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDD

S) 媒体へのin vitro放出の製剤のプロットである。

【0015】

【図2A】および

【図2B】図2Aおよび2Bは、動的光散乱によって測定したPLG2A製剤の3の別々のバッチについての分散サイズを示す。図2Aは、強度によってプロットしたShK-186徐放型デポー製剤のサイズ分布を示し；図2Bは、動的光散乱によって測定した製剤中の粒子の体積加重分布を示す。

【0016】

【図3】図3は、治療タンパク質-負荷PLG2Aポリマー製剤についてのゼータ電位（電気泳動移動度によって測定されるような粒子表面の電荷）の測定である。アニオン性の表面層は、水性懸濁液に分散の安定性を付与するのを助ける。ゼータ電位測定は、-75、-72および-72 mVの電荷を有するアニオン性粒子の同様の、緊密にクラスター化したアニオン性粒子を示し、静電的反発を介したコロイドの安定性に寄与するクーロン相互作用を提供している。

【0017】

【図4】図4は、製剤（PLG2A）の光学顕微鏡像であり、製剤内の粒子の形状および略均一で、幾何学的寸法の形状を示している。この図は、ShK-186をカプセル化しているPLGポリマーの光学顕微鏡（100X）像を示し、1 μ mのサイズを有する丸い（おそらく球形）粒子を示している。

【0018】

【図5A】および

【図5B】図5Aおよび5Bは、Sprague-Dawleyラットに種々の製剤を単一皮下（SC）注射した後の40,000 μ g/kgで投与したShK-186のin vivo放出速度を示す。懸濁液は、PLG1A、PLG2AおよびPLG3Aを用いて作成した。図5Aは線形スケールでこのデータを示し、図5Bは対数（Log）スケールを表している。

【0019】

【図6A】および

【図6B】図6Aおよび6Bは、PLG2Aを用いて製剤化したShK-186の異なる用量（高 = 40,000 μ g/kg、中 = 20,000 μ g/kg、低 = 10,000 μ g/kg）についてのin vivo放出のプロットである。ShK-186の血中血清レベルは、Sprague-Dawleyラットにおいて比較的狭い範囲の濃度で30日を超えて維持された。図6Aは線形スケールを示す。図6Bは対数スケールを示す。

【0020】

【図7A】および

【図7B】図7Aおよび7Bは、単一SC注射後のSprague-Dawleyラットにおける10,000 μ g/kgで投与したShK-192についてのin vivo放出のプロットである。達成した最大濃度はほぼt=12日であり、惹起するPLG2A徐放型デポー製剤からの治療タンパク質の徐放、30日にわたって比較的スムーズに続くプロセスを示唆している。図7Aは線形スケールである。図7Bは対数スケールである。

【0021】

【図8】図8は、PLG2A製剤についてSprague-Dawleyラットにおいて20,000 μ g/kgで1のSC注射で投与したShK-186のin vivo放出のグラフであり、t=2日における C_{max} および56日にわたってよく延びている長期の徐放テイルを示している。

【発明を実施するための形態】

【0022】

多くのタンパク質が治療医薬として有用である。それらがin vivoで示す生物活性のためである。しかしながら、治療学としてこれらのタンパク質を使用しようとすると、注射を介した頻繁な投与なしにタンパク質の持続した有効レベルを達成することは困難とされている。

【0023】

10

20

30

40

50

頻回注射に対する別のアプローチは、経時的な治療タンパク質の放出をモジュレートする生分解性材料中にカプセル化されている治療タンパク質を投与することである。このアプローチは理論的にはよく機能するが、かかる制御放出型組成物は達成することが困難であることが判明している。例えば、多くのかかる制御放出型組成物は、治療濃度域を超える薬剤濃度を作り出すバーストを示し、それによって望ましくない副作用の潜在性を高め、最終的に、期間の後期には有効レベルを維持するための組成物中の治療タンパク質を不十分な量にさせる。生理学的温度、生体分子の環境、および制御放出型組成物の投与に対する免疫応答のようなファクターも、治療タンパク質の性質を好ましくなくに変化し得る。

【0024】

本願明細書に記載する徐放型デポー製剤は、本明細書に引用する文献に記載されているような以前の試みの失敗を克服する。本明細書に記載する製剤は、投薬の容易性（頻回注射の回避）および望ましくない副作用の軽減を介して患者の順応性を増すことができる。

【0025】

特定の実施形態において、本明細書に記載する製剤は、最小限のバースト効果および5未満または3未満に等しい C_{max} に対する $C_{average}$ の比を有する放出プロファイルを示す。これらの比は、分子構造、製剤相互作用、および構造感受性の生体分析を用いてin vitroおよびin vivoの両方で測定して安定化した治療タンパク質の比較的均一な放出を達成するプロセスの相乗的態様の首尾良い組合せを示唆している。第1の最大値に対する第2の最大値のサイズ（三相コンポーネント、Luanら, Eur. J. Pharm. BioPharm. 63:205-14, 2006）および谷の深さを含む放出プロファイルの特徴を制御して、長期間、例えば1ヶ月を超えて少なくとも56日、にわたって顕著に安定である血中血清レベルが作り出されている。したがって、本明細書に開示する徐放型デポー製剤は、単一投与後1ヶ月以上にわたって治療タンパク質の好適な放出プロファイル（ほぼゼロ次元の放出動態学のような）を達成する。

【0026】

「徐放」とは：（1）単一投与後少なくとも1ヶ月間、有効レベル内の放出；または（2） C_{max} に対する $C_{average}$ の比が5を超えない、または単一投与後少なくとも1ヶ月間、3を超えない有効レベル内の放出を含むと解釈すべきである。「徐放」は：（1）単一投与後少なくとも56日間の有効レベル内の放出；または（2） C_{max} に対する $C_{average}$ の比が5を超えないまたは単一投与後少なくとも56日間は3を超えない有効レベル内の放出を含むとも解釈することができる。

【0027】

「有効レベル」とは、意図しない副作用を生じることなく、意図する予防治療および療法治療を達成する特定のタンパク質の治療濃度域内のレベルである。

【0028】

「デポー製剤」には、投与後に周囲の組織に治療タンパク質の徐放を提供する治療タンパク質送達系が含まれる。

【0029】

記載するデポー製剤は、特定の実施形態において、マイクロカプセル化、生分解性微粒子の分散を創製するプロセスにおいて治療タンパク質および賦形剤の組合せを介して達成される。

【0030】

特定の実施形態において、本願明細書は、少なくとも1の治療タンパク質を含むデポー製剤を含む。より詳細には、デポー製剤は治療タンパク質を含む内部水性相、ポリマー（油／固相；特定の実施形態において、ポリマーは生分解性とすることができる）を含む第2中間相および中で粒子が分散している第3の外部水性相を含むことができる。内部水性相は特別に化学的に修飾された微小環境であり、その中では特定の治療タンパク質の天然および活性なコンホメーションを保持するように、かつ経時的なタンパク質の徐放を達成するように第2のポリマーとの親和性を許容するように、pH、塩濃度、溶媒、安定剤および

10

20

30

40

50

放出モディファイアーが選択される。

【0031】

本明細書に開示する実施形態は：(i) 治療タンパク質を含む内部水性相、ここに該治療タンパク質はデポー製剤の重量の0.025% 重量/重量(w/w)～5% w/wで存在し；(ii) ポリマー系の油/固相；および(iii) デポー製剤の重量の0.01% w/w～1% w/wで存在する界面活性剤を含む外部水性相を含むことができ、ここに該デポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間、有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する。

【0032】

種々の実施形態において、デポー製剤には、内部水性相およびポリマー相から構成される粒子が含まれる。種々の実施形態において、デポー製剤は内部水性相およびポリマー相からなる粒子を含み、それは水性相によって取り囲まれている。

10

【0033】

ポリマー、本願明細書に開示するデポー製剤に使用した特定のポリマー組成物および調製物は、生理学的条件下で構造からの治療タンパク質の徐放を許容する構造を作り出す化学的微小環境を提供する。特定の実施形態において、徐放は、水和型ポリマーマトリクスを介しての拡散のようなプロセスを落として起こる。

【0034】

ポリマーは典型的に水にやや溶け難いまたは不溶性とすることができ；ならびに対象に投与した後に生体親和性で生分解性とすることができる。「やや溶け難い」とは、ポリマーが水中で3% w/wを超えて可溶性でないことを意味する。本願明細書に開示するデポー製剤で用いるポリマーの平均分子量は、一般的に3,000ダルトン(Da)～100,000 Daの範囲であり、特定の実施形態においては、3,000～20,000 Da付近である。これらのポリマーの多分散度は典型的に1.1～4.0の範囲である。特定のデポー製剤に使用する生体親和性ポリマーおよび量は、治療タンパク質の薬理活性の強さおよびその放出の望ましい速度に依存する。

20

【0035】

ポリマーの化学的性質には、酸、脂肪族ポリエステル(ポリ(乳酸)のようなホモポリマー)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)のようなコポリマー、ヒドロキシカルボン酸、 α -ヒドロキシ酸、ポリ(アミノ酸)、および/またはポリ(シアノアクリル酸)エステルが含まれる。最も好ましいのは、乳酸および/またはグリコール酸のエステル、すなわちポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、および/またはPLGである。本願明細書に開示するデポー製剤は、親水性(カルボキシル終止)およびより疎水性(エステル終止)末端キャップ構造を含むこれらのポリマーのペグ化、エトキシル化および他の誘導化版も含むことができる。

30

【0036】

特定の実施形態において、例示的なポリマーには、望ましいラクチド：グリコリド比、平均分子量、多分散度、および末端基化学のポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、ポリ(カプロラクトン)、およびポリ(ラクチド)-co(グリコリド)(PLG)を含む生分解性ポリマーが含まれる。

【0037】

種々の実施形態において、使用するポリマーは、カルボキシル終止中分子量PLGとすることができる。「低分子量」は、1,000 Da～10,000 Daの分子量を有するポリマーをいう。「中分子量」は、10,000 Da～25,000 Daの分子量を有するポリマーをいう。「高分子量」は、25,000 Daより大きい分子量を有するポリマーをいう。

40

【0038】

特定の実施形態において、使用するポリマーは、PLG1A、PLG2A、PLG3A、PLG5E、またはPLG7Eとすることができる。PLG1Aは、5.9 kDaの分子量を有するカルボキシル末端化PLGポリマーである。PLG2Aは、13.6 kDaの分子量を有するカルボキシル末端化PLGポリマーである。PLG3Aは、32 kDaの分子量を有するカルボキシル末端化PLGポリマーである。PLG5Eは、75 kDaの分子量を有するエステル化PLGポリマーである。PLG7Eは、68 kDaの分子量を有

50

するエステル化PLGポリマーである。種々の等級を用いて異なる比で異なるポリマーの型をブレンドすることは、寄与するポリマーの各々から借りる特性を生じ得る。したがって、ブレンドおよびコポリマーも用いることができる。ブレンドには、異なるポリマーの混合物が含まれる。コポリマーには、少なくとも2の異なる構成モノマーからなるものが含まれる。

【0039】

溶媒および賦形剤．ポリ（D，L－ラクチド－co－グリコリド）のエステル結合の加水分解を通して創製した非常に酸性の微小環境は、治療タンパク質の安定性に負に影響する過酷な環境を示す。これらの試行を克服するため、本願明細書に開示するデポー製剤の内部水性相は、緩衝液および塩類溶液によってpH制御することができる。内部水性相は、酢酸、炭酸、ホスホン酸、およびリン酸水素ナトリウム、塩酸、水酸化ナトリウム、アルギニン、およびリシンのような塩類を含むpH緩衝液種および賦形剤の組合せによって安定化することができる。特定の実施形態において、140 mM塩化ナトリウム塩を含むリン酸緩衝水溶液を用いる。特定の実施形態において、これらの緩衝系は、デポー製剤の内部水性相のpHを6を超えて維持されるように設計する。

【0040】

特定の実施形態において、内部水性相は、6.0、7.0、7.4、または8.0（リン酸緩衝液）；5.0または6.0（ヒスチジン）；4.5、5.0、または6.0（クエン酸）；4.5、5.0、または5.5（酢酸）のpH、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ を有することができる。内部水性相のイオン強度は、NaCl、KCl、および／または CaCl_2 を用いて0～200 mMとすることができる。

【0041】

内部水性相は、アルブミン、ゼラチン、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸アンモニウムナトリウム、デキストリン、硫酸ナトリウム（sodium hydrosulfate）、ポリ（エチレングリコール）のようなポリオールのようなタンパク質安定剤、および／またはp－ヒドロキシトルエン、p－ヒドロキシ安息香酸エステル（メチルパラベン、プロピルパラベン）、ベンジルアルコール、クロロブタノール、およびチメロサールのような保存剤も含むことができる。

【0042】

異なる溶媒（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、トリアセチン、N－メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、フェノール、またはそれらの組合せ）の使用により、粒子のサイズおよび構造を変化させて放出特性をモジュレートすることができる。他の有用な溶媒には、水、エタノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N－メチル－2－ピロリドン（NMP）、アセトン、メタノール、イソプロピルアルコール（IPA）、安息香酸エチル、および安息香酸ベンジルが含まれる。

【0043】

界面活性剤、洗浄剤、内部相増粘剤、錯化剤、表面活性分子、共溶媒、キレート剤、安定剤、セルロースの誘導体、（ヒドロキシプロピル）メチルセルロース（HPMC）、酢酸HPMC、酢酸セルロース、プルロニック（例えば、F68／F127）、ポリソルベート、Span（登録商標）（Croda Americas, Wilmington, Delaware）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、Brij（登録商標）（Croda Americas, Wilmington, Delaware）、スクロース酢酸イソブチル（SAIB）、塩、および緩衝液のような放出モディファイアーは、デポー製剤からの治療タンパク質放出の特性を変化する。

【0044】

ポリソルベート、ジオクチルスルホサクシネート、ポロキサマー、およびPVAを含む界面活性剤のような、デポー製剤内の粒子の外部相境界に分配される賦形剤も、粒子の安定性および侵食速度、水和およびチャネル構造、界面の輸送および動力学を好ましい様式で変化することができる。（例えば、内部水性相を囲むポリマー固形物／油相によって形成することができる）粒子の外部相境界は、粒子を取り囲む外部水性相に近接する粒子の一部である。

【0045】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、外部水性相は5.5～8.5の範囲のpHを有することができ、0～200 mMの範囲でリン酸、クエン酸、およびNaCl、KCl、および／またはCaCl₂を含む塩を含むことができる。

【0046】

種々の界面活性剤種を用いて、本願明細書に開示するデポー製剤ならびに記載するエマルジョンを安定化することもできる。例示的な界面活性剤には、エチレンープロピレンオキサイド（PEO-PPG）ジエーおよびトリブロックコポリマー、Tween（登録商標）（Croda Americas, Wilmington, Delaware）のようなソルビタンエステル、Span（登録商標）、PVA、Brij（登録商標）、Eudragit（登録商標）（Evonik Rohm GmbH, Darmstadt, Germany）、ポロキサマー、ドクサートナトリウム、およびSDDSが含まれる。

10

【0047】

開示するデポー製剤のさらなるプロセスを用いて、Tris、クエン酸、またはヒスチジンのような緩衝液中のポリソルベート、PVA、およびジオクチルスルホサキシネートのような他の成分とともにマンニトール、スクロース、トレハロース、およびグリシンを含む賦形剤を安定化することができる。元の懸濁液と同様のサイズおよび性能の特徴に戻す非常に低湿度の粉体を生成するサイクルを用いることもできる。

【0048】

治療タンパク質 本明細書に記載するデポー製剤の一部として提供される治療タンパク質は、以前の制御放出型組成物に見出されるよりも長さにおいてより長くおよび／またはより構造的に複雑であるタンパク質を含むことができる。

20

【0049】

例示的な治療タンパク質は、毒素系治療タンパク質である。本明細書に開示するデポー製剤に使用する毒素系治療タンパク質の特定の例は、電位開口型チャンネルに結合する。例示的な電位開口型チャンネルには、Kv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4、Kv1.5、Kv1.6、Kv1.7、Kv2.1、Kv3.1、Kv3.2、Kv11.1、Kc1.1、Kc2.1、Kc3.1、Nav1.2、Nav1.4、およびCav1.2チャンネルが含まれる。

【0050】

毒素タンパク質は種々の生物によって産生され、イオンチャンネルおよび受容体に結合するように進化した。ヘビ、サソリ、クモ、ハチ、巻き貝およびイソギンチャクからの天然の毒素タンパク質は、典型的に10～80アミノ酸長であり、コンパクトな分子構造を作る2～5のジスルフィド架橋を含む。これらのタンパク質は、少数の構造フレームワークから進化しているように思える。タンパク質は、本発明のデポー製剤を創製する場合にすべてが極めて重要である要素である効力、安定性、および選択性に寄与する三次元構造を維持するために、システイン／ジスルフィドループ構造を通して保存されるフォールディングパターンのファミリーにクラスター化する（Penningtonら、Biochemistry, 38, 14549-14558（1999）；Tudorら、Eur. J. Biochem., 251, 133-141（1998）；およびJaravineら、Biochemistry, 36, 1223-1232,（1997））。

30

【0051】

「毒素系治療タンパク質」には、表1の毒素系タンパク質（またはそれらの変異型、D-置換型アナログ、カルボキシ末端アミド、修飾物、誘導体または医薬上許容される塩）、および表2のShK-系タンパク質（またはそれらの変異型、D-置換型アナログ、カルボキシ末端アミド、修飾物、誘導体、または医薬上許容される塩）が含まれる。毒素系治療タンパク質は、合成物または天然物とすることができる。

40

【0052】

「毒素系タンパク質」には、いずれかの合成物のまたは天然物の公知の毒素タンパク質および表1に開示するタンパク質、ならびにそれらの変異型、D-置換型アナログ、カルボキシ末端アミド、修飾物、誘導体、および医薬上許容される塩が含まれる。本明細書に開示するデポー製剤および方法に使用する特に例示的な毒素系治療タンパク質には、表1に掲載する毒素系タンパク質、および配列番号：225～256として配列表に示されているものが含まれる。

50

【表 1 - 1】

表 1 : 例示的な毒素系タンパク質		
配列／構造	簡略表記 ID	配列番号 :
LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKCINRMCKCYGC	Pi1	225
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi2	226
TISCTNEKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKCKCFGR	Pi3	227
IEAIRC GGSRDCYRPCQKRTGCPNAKCINKTCKCYGCS	Pi4	228
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC	HsTx1	229
GVPINVSTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx2	230
GVPINVKCTGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx1	231
GVIINVKCKISRQCLEPCKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	OSK1	232
ZKECTGPQHCTNFCRKNKCTHGKCMNRKCKCFNCK	Anuroctoxin	232
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	NTx	234
TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH	HgTx1	235

10

20

【表 1 - 2】

QFTNVSCSTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKRCYS	ChTx	236
VFINAKCRGSPECLPKCKEAIKGAAGKCMNGKCKCYP	Titistoxin-Ka	237
VCRDWFKETACRHAQSLGNCRSTQKYRANCAKTCELC	BgK	238
VGINVCKHSGQCLPKCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPKG	BmKTx	239
QFTDVKCTGSKQCPVCKQMFQKPNGKCMNGKRCYS	BmTx1	240
VFINVKCRGSKECLPACKAAVGKAAGKCMNGKCKCYP	Tc30	241
TGPQTTCQAAMCEAGCKGLGKSMESCQGDTCCKA	Tc32	242
AAAI SCVGSPECPPKCRAQGCKNGKCMNRKCKCYC-アミド	Vm24	243
RTCKDLIPVSECTDIRCRTSMKYRLNLCRKTGSC	HmK	244
GCKDNFSANTCKHVKANNNCGSQKYATNCAKTGKC	Aek	245
ACKDNFAAATCKHVKENKNCGSQKYATNCAKTGKC	AsKS	246
TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	MgTx	247
GVEINVKCSGSPQCLPKCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	KTx1	248
VRIPVSCKHSGQCLPKCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK	KTx2	249
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC	MTx	250
QFTDVCDSVSKECWSVCKDLFGVDRGKCMGKKRCY	IbTx	251
GVPTDVKCRGSPQCIQPKCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK	ODK2	252
GVPINVKCRGSPQCIQPCRDAGMRFGKCMNGKCHCTPQ	Bs6	253
GVPINVKCRGSRDCLDPCKKAGMRFGKCINSKCHCTP	BoiTx1	254
GVPINVPTGSPQCIKPKCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	AgTx3	255
VGIPVSCKHSGQCIKPKCKDAGMRFGKCMNRKCDCTPK	KTx3	256

【0053】

ShKは非常に構造化された、3のジスルフィド架橋によって架橋された35残基のタンパク質であり、その活性はその三次元構造に極めて依存する。この治療タンパク質の効力を維持するデポー製剤は、以前の製剤化試行では必要とされなかったかまたは取り扱われなかった高次構造の安定化および保持を必要とし、したがって療法治療における改善を提供する。

【0054】

ShKタンパク質は、本明細書に開示するデポー製剤および方法に使用することができる毒素タンパク質のサブタイプである。ShKタンパク質は、元々、カリブ海イソギンチャク *Stichodactyla helianthus* から単離された。ShKタンパク質は、Kv1.3チャネルのインヒターとして役立つ。Kv1.3チャネルを阻害することにより、ShKタンパク質は、特定の実施形態において、ピコモル濃度で、エフェクターメモリー細胞 (T_{EM}) のまたはそれによる

活性化、増殖、および／またはサイトカイン産生を抑制することができる。

【0055】

「インヒビター」とは、生合成および／または触媒活性を含む受容体と化合物の相互作用に基づき、受容体、またはシグナル伝達経路活性、遺伝子の転写または翻訳、細胞タンパク質輸送ほかを含む、通常生じる生物活性を低下または排除する毒素系治療タンパク質である。

【0056】

天然のShKタンパク質は、例えば、Penningtonら、Int. J. Pept. Protein Res., 46, 354-358 (1995) に記載されている。本願明細書の範囲内に入る例示的なShK構造は、Beetonら、Mol. Pharmacol., 67, 1369-1381 (2005) ; 米国特許出願公開2008/0221024 ; PC T国際公開番号WO/2012/170392 ; および米国特許第8,080,523および8,440,621号にも記載されている。

10

【0057】

「ShK-系タンパク質」には、いずれの合成または天然の公知のShKタンパク質、ならびにその変異型、D-置換型アナログ、カルボキシ末端アミド、修飾物、誘導体、および医薬上許容される塩が含まれる。

【0058】

本願明細書に開示するデポ製剤に使用する特定の例示的なShK-系タンパク質には、表2に掲載するもの、および配列番号：1~224および配列番号：257~260として配列表に示すものが含まれる。本明細書に開示する特定の実施形態において使用するShK-系タンパク質には、配列番号：1、配列番号：49、配列番号：208、配列番号：257、配列番号：223、配列番号：210、配列番号：217、配列番号：218、および配列番号：221のものが含まれる。

20

【表 2 - 1】

表 2 : 例示的 ShK-系タンパク質

配列／構造	簡略表記 ID	配列番号：
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK	1
RSCIDTIPKSRCTAFQSKHSMKYRLSFCRKTSGETC	ShK-S17／S32	2
RSSIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTS	ShK-S3／S35	3
SSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-S1	4
(N-アセチル R) SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-N-アセチル arg1	5
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-d1	6
CIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-d2	7
ASCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A1	8
QCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q2 d1	9
ACIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A2 d1	10
TCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2 d1	11
RQCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q2	12
RACIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A2	13
RTCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2	14
AQCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q2	15
AACIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A1／A2	16
ATCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A1／T2	17

10

20

30

【表 2 - 2】

RSCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A1/A4	18
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4/A15	19
RSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25	20
RSCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A6	21
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-T6	22
RSCIDYIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y6	23
RSCIDLIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-L6	24
RSCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A7	25
RSCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4	26
RSCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A8	27
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9	28
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9	29
RSCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q9	30
RSCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A10	31
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11	32
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11	33
RSCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q11	34
RSCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A13	35
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15	36
RSCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-W15	37
RSCIDTIPKSRCTA [X (s1)] QCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-X15	38

10

20

30

【表 2 - 3】

RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTGTC	ShK-A15/A25	39
RSCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A16	40
RSCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E16	41
RSCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A18	42
RSCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E18	43
RSCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A19	44
RSCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-K19	45
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A20	46
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTGTC	ShK-A21	47
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS [X (s2)] KYRLSFCRKTGTC	ShK-X21	48
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (N1e) KYRLSFCRKTGTC	ShK-N1e21	49
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A22	50
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMYRLSFCRKTGTC	ShK-E22	51
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYRLSFCRKTGTC	ShK-R22	52
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM [X (s3)] YRLSFCRKTGTC	ShK-X22	53
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (N1e) YRLSFCRKTGTC	ShK-N1e22	54
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Orn) YRLSFCRKTGTC	ShK-Orn22	55
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Homocit) YRLSFCRKTGTC	ShK-Homocit22	56
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Dap) YRLSFCRKTGTC	ShK-ジアミノ-プロピオン酸 22	57
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTGTC	ShK-A23	58
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTGTC	ShK-S23	59

10

20

30

【表 2 - 4】

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23	60
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK [X (s4)] RLSFCRKTCGTC	ShK-X23	61
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (ニトロ F) RLSFCRKTCGTC	ShK-ニトロ phe23	62
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (アミノ F) RLSFCRKTCGTC	ShK-アミノ phe23	63
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (ベンジル F) RLSFCRKTCGTC	ShK-ベンジル phe23	64
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24	65
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFRCRKTCGTC	ShK-E24	66
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25	67
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26	68
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27	69
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLS [X (s27)] CRKTCGTC	ShK-X27	70
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29	71
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATCGTC	ShK-A30	72
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31	73
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGAC	ShK-A34	74
SCADTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4d1	75
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A4/A15d1	76
SCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A4/A15/A25d1	77
SCIDAIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A6d1	78
SCIDTAPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A7d1	79
SCIDTIAKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A8d1	80

10

20

30

【表 2 - 5】

SCIDTIPASRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9d1	81
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E9d1	82
SCIDTIPQSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q9d1	83
SCIDTIPKARCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A10d1	84
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A11d1	85
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E11d1	86
SCIDTIPKSQCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q11d1	87
SCIDTIPKSRCAAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A13d1	88
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A15d1	89
SCIDTIPKSRCTAWQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-W15d1	90
SCIDTIPKSRCTA [X (s15)] QCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-X15d1	91
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A15/A25d1	92
SCIDTIPKSRCTAFACKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A16d1	93
SCIDTIPKSRCTAFECKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E16d1	94
SCIDTIPKSRCTAFQCAHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A18d1	95
SCIDTIPKSRCTAFQCEHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-E18d1	96
SCIDTIPKSRCTAFQCKASMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A19d1	97
SCIDTIPKSRCTAFQCKKSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K19d1	98
SCIDTIPKSRCTAFQCKHAMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A20d1	99
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSAKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A21d1	100
SCIDTIPKSRCTAFQCKHS [X (s2)] KYRLSFCRKTCGTC	ShK-X21d1	101

10

20

30

【表 2 - 6】

SCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYLSFCRKTCGTC	ShK-Nle21d1	102
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYLSFCRKTCGTC	ShK-A22d1	103
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMYLSFCRKTCGTC	ShK-E22d1	104
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMRYLSFCRKTCGTC	ShK-R22d1	105
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM[X (s3)]YLSFCRKTCGTC	ShK-X22d1	106
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Nle) YLSFCRKTCGTC	ShK-Nle22d1	107
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Orn) YLSFCRKTCGTC	ShK-Orn22d1	108
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Homocit) YLSFCRKTCGTC	ShK-Homocit22 d1	109
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSM (Dap) YLSFCRKTCGTC	ShK-Dap22d1	110
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKARLSFCRKTCGTC	ShK-A23d1	111
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKSRLSFCRKTCGTC	ShK-S23d1	112
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKFRLSFCRKTCGTC	ShK-F23d1	113
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK[X (s4)]RLSFCRKTCGTC	ShK-X23d1	114
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (ニトロ F) RLSFCRKTCGTC	ShK-ニトロ phe23d1	115
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (アミノ F) RLSFCRKTCGTC	ShK-アミノ phe23d1	116
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMK (ベンジル F) RLSFCRKTCGT	ShK-ベンジル phe23d1	117
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYALSFCRKTCGTC	ShK-A24d1	118
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYELSFCRKTCGTC	ShK-E24d1	119
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-A25d1	120
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLAFCRKTCGTC	ShK-A26d1	121
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSACRKTCGTC	ShK-A27d1	122

10

20

30

【表 2 - 7】

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLS [X (s5)] CRKTCGTC	ShK-X27d1	123
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCAKTCGTC	ShK-A29d1	124
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRATCGTC	ShK-A30d1	125
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKACGTC	ShK-A31d1	126
SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGAC	ShK-A34d1	127
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y1	128
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K1	129
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-H1	130
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1	131
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	PP-ShK	132
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	M-ShK	133
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	G-ShK	134
YSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Y1/A22	135
KSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K1/A22	136
HSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-H1/A22	137
QSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1/A22	138
PPRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	PP-ShK-A22	139
MRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	M-ShK-A22	140
GRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	G-ShK-A22	141
RSCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A22	142
SCIDTIPASRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/A22d1	143

10

20

30

【表 2 - 8】

RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9	144
RSCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/A22	145
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9d1	146
SCIDTIPVSRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/A22d1	147
RSCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E9/A22	148
SCIDTIPESRCTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E9/A22d1	149
RSCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A11/A22	150
SCIDTIPKSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A11/A22d1	151
RSCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/A22	152
SCIDTIPKSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/A22d1	153
RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-D14	154
RSCIDTIPKSRCTDFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-D14/A22	155
SCIDTIPKSRCTDFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-D14d1	156
SCIDTIPKSRCTDFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-D14/A22d1	157
RSCIDTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A15/A22	158
SCIDTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A15/A22d1	159
RSCIDTIPKSRCTAIQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-I15	160
RSCIDTIPKSRCTAIQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-I15/A22	161
SCIDTIPKSRCTAIQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-I15d1	162
SCIDTIPKSRCTAIQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-I15/A22d1	163
RSCIDTIPKSRCTAVQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V15	164

10

20

30

【表 2 - 9】

RSCIDTIPKSRCTAVQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15/A22	165
SCIDTIPKSRCTAVQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15d1	166
SCIDTIPKSRCTAVQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V15/A22d1	167
RSCIDTIPKSRCTAFRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16	168
RSCIDTIPKSRCTAFRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16/A22	169
SCIDTIPKSRCTAFRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16d1	170
SCIDTIPKSRCTAFRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-R16/A22d1	171
RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16	172
RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16/A22	173
SCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16d1	174
SCIDTIPKSRCTAFKCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-K16/A22d1	175
RSCIDTIPASECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11	176
RSCIDTIPASECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11/A22	177
SCIDTIPASECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11d1	178
SCIDTIPASECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-A9/E11/A22d1	179
RSCIDTIPVSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11	180
RSCIDTIPVSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/A22	181
SCIDTIPVSECTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11d1	182
SCIDTIPVSECTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/A22d1	183
RSCIDTIPVSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11	184
RSCIDTIPVSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/A11/A22	185

10

20

30

【表 2 - 1 0】

SCIDTIPVSACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/A11d1	186
SCIDTIPVSACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/A11/A22d1	187
RSCIDTIPASACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A9/A11	188
RSCIDTIPASACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A9/A11/A22	189
SCIDTIPASACTAFQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-A9/A11d1	190
SCIDTIPASACTAFQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-A9/A11/A22d1	191
RSCIDTIPKSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/D14/I15/R16	192
RSCIDTIPKSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/D14/I15/R16/A22	193
SCIDTIPKSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/D14/I15/R16d1	194
SCIDTIPKSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-E11/D14/I15/R16/ A22d1	195
RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16	196
RSCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16/ A22	197
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16 d1	198
SCIDTIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/R16/ A22 d1	199
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15	200
RSCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/A22	201
SCIDTIPVSECTDIQCKHSMKYRLSFCRKTGTC	ShK-V9/E11/D14/I15 d1	202

10

20

30

【表 2 - 1 1】

SCIDTIPVSECTDIQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-V9/E11/D14/I15/A22 d1	203
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14 /I15/R16	204
RTCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14 /I15/R16/A22	205
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14 /I15/R16 d1	206
TCKDLIPVSECTDIRCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-T2/K4/L6/V9/E11/D14 /I15/R16/A22 d1	207
(L-ホスホ Tyr) -AEEAc- RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK (L5)	208
(L-Tyr) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK (L4)	209
(L-Tyr) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC-ア ミド	ShK-198	210
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1/A4/A15	211
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1/A4/A15/A22	212
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM (Dap) YRLSFCRKTCGTC	ShK-Q1/A4/A15/Dap22	213
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMKYRASFCRKTCGTC	ShK-Q1/A4/A15/A25	214
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSMAYRASFCRKTCGTC	ShK-Q1/A4/A15/A22/A25	215
QSCADTIPKSRCTAAQCKHSM (Dap) YRASFCRKTCGTC	ShK-Q1/A4/A15/Dap22/A25	216
(L-ホスホ Tyr) -AEEAc- RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-186	217

10

20

30

【表 2 - 1 2】

(パラ-ホスホノ-Phe) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-192	218
(ホスホノメチル-Phe) -AEEAc- RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-191	219
(ホスホノメチル-Phe) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-191/Nle21	220
<u>DOTA-アミノヘキサ酸- (L-Tyr) -AEEAc-</u> RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-221	221
(パラ-ホスホノ-Phe) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC-アミド	ShK-223	222
(パラ-ホスホノ-Phe) -AEEAc- RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC -アミド	ShK-190	223
RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) (Dap) YRLSFCRKTCGTC		224
(L-ホスホ Tyr) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC		257
(L-Tyr) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC		258
(L-ホスホ Tyr) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC-アミド		259

10

20

30

【表 2 - 1 3】

(L-Tyr) -AEEAc-RSCIDTIPKSRCTAFQCKHS (Nle) KYRLSFCRKTCGTC-アミド	260
注記：	
X (s1) 、 X (s2) 、 X (s3) ほかは各々独立して非官能性アミノ酸残基をいう	
N-アセチル R とは N-アセチルアルギニンをいう	
Nle とはノルロイシンをいう	
Orn とはオルニチンをいう	
Homocit とはホモシトルリンをいう	
ニトロ F とはニトロフェニルアラニンをいう	
アミノ F とはアミノフェニルアラニンをいう	
ベンジル F とはベンジルフェニルアラニンをいう	
AEEAc とはアミノエチルオキシエチルオキシ酢酸をいう	
Dap とはジアミノプロピオン酸をいう	
DOTA とは、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸をいう	

【 0 0 5 9】

当業者であれば、公知の配列を用いたアライメント介在突然変異導入に基づくアラニン
 スキャンニング、合理的デザイン、および／または分子モデリングのような高められた特
 性を有する毒素系治療タンパク質をデザインする技術に気付く。例えば、毒素系治療タン
 パク質は、プロテアーゼ切断部位（例えば、KまたはR残基のトリプシン切断部位および／
 またはF、Y、またはW残基のキモトリプシン切断部位）を除去するようにデザインするこ
 とができる。非加水分解リン酸置換も、リン酸基に対する安定化効果、ならびにホスファ
 ターゼ酵素に対する安定性を付与する。非加水分解リン酸基には、4-ホスホノメチル
 フェニルアラニン（Pmp）、4-ホスホノジフルオロメチルフェニルアラニン（F2Pmp）、パ
 ラホスホノフェニルアラニン、モノフルオロホスホノメチルフェニルアラニン、スルホ（
 ジフルオロメチル）フェニルアラニン（F2Smp）およびヒドロキシルホスホノメチル
 フェニルアラニンのようなホスホチロシンのホスホネートアナログが含まれる。他の実施形態
 において、BurkeおよびLee, Acc. Chem. Res., 36, 426-433（2003）に記載されている
 ようにリン酸官能基を複製するためにカルボン酸基を用いるOMT、FOMT、および他のアナ
 ログのようなホスホチロシン模倣物を用いることができる。さらなる実施形態において、
 非加水分解アナログには、メチルー、アリールオキシ、およびチオエチルホスホン酸
 が含まれる。未ださらなる実施形態において、非加水分解リン酸誘導体には、ジフルオ
 ロメチレンホスホン酸およびジフルオロメチレンスルホン酸が含まれる。

【 0 0 6 0】

毒素系治療タンパク質の構造の薬物動態学および薬力学的（PK/PD）特性を改善す
 るために、分解特性に感受性である残基を置換、交換または修飾することができる。アミド
 でのC-末端酸機能の修飾は、安定性も付与することができる。毒素系治療タンパク質の
 一次構造に対するこれらの変化は、N-末端のアニオン性基と組み合わせさせて、安定かつ
 選択的なKv1.3ブロッカーを生成し得る。高いin vivo半減期を有する毒素系治療タンパク

質を生成するために、タンパク質の変異型または修飾物を調製することができ、その場合、鍵タンパク質加水分解部位を置換してプロテアーゼ感受性を減少することができる。これには、保存的な等配電子的な置換での（例えば、LysからLys（アセチル）またはGln）および中性の置換での（Ala）非必須残基の置換が含まれる場合がある。

【0061】

本明細書に開示する毒素系治療タンパク質の「変異型」には、本明細書に開示する毒素系またはShK-系タンパク質と比較して1またはそれを超えるアミノ酸の付加、欠失、終結ポジション、または置換を有するタンパク質が含まれる。

【0062】

アミノ酸の置換は、保存的または非-保存的置換とすることができる。本明細書に記載する毒素系治療タンパク質の変異型は、1またはそれを超える保存的アミノ酸置換を有するものを含むことができる。「保存的置換」には、以下の保存的置換の1に見出される置換が含まれる：グループ1：アラニン（Ala；A）、グリシン（Gly；G）、セリン（Ser；S）、トレオニン（Thr；T）；グループ2：アスパラギン酸（Asp；D）、グルタミン酸（Glu；E）；グループ3：アスパラギン（Asn；N）、グルタミン（Gln；Q）；グループ4：アルギニン（Arg；R）、Lysine（Lys；K）、ヒスチジン（His；H）；グループ5：イソロイシン（Ile；I）、ロイシン（Leu；L）、メチオニン（Met；M）、バリン（Val；V）；およびグループ6：フェニルアラニン（Phe；F）、チロシン（Tyr；Y）、トリプトファン（Trp；W）。

【0063】

さらに、アミノ酸は、同様の機能、化学構造、または組成（例えば、酸性、塩基性、脂肪族、芳香族、または含硫）によって保存的置換グループにグループ分けすることができる。例えば、脂肪族のグループ分けは置換の目的で、Gly、Ala、Val、Leu、およびIleを含むことができる。他のものへの保存的置換と考えられるアミノ酸を含む他のグループ分けには：含硫：MetおよびCys；酸性：Asp、Glu、Asn、およびGln；小さな脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro、およびGly；極性の、マイナス荷電残基およびそれらのアミド：Asp、Asn、Glu、およびGln；極性の、プラス荷電残基：His、Arg、およびLys；大きな脂肪族、非極性残基：Met、Leu、Ile、Val、およびCys；および大きな芳香族残基：Phe、Tyr、およびTrpが含まれる。さらなる情報は、Creighton（1984）Proteins, W.H. Freeman and Companyに見出される。

【0064】

本願明細書に開示する毒素系治療タンパク質の変異型には、本明細書に記載するタンパク質配列に対して少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、または少なくとも99%の配列同一性を有するタンパク質も含まれる。

【0065】

本願明細書に開示する毒素系タンパク質をベースとするデボー製剤に使用するための毒素系治療タンパク質の変異型には、：配列番号：225～256のいずれかと70%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと75%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと80%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと81%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと82%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと83%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと84%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと85%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと86%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと87%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと88%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと89%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと90%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと91%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと92%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと93%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと94%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと95%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと96%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれか

と97%の配列同一性；配列番号：225～256のいずれかと98%の配列同一性；または配列番号：225～256のいずれかと99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。

【0066】

ShK-系タンパク質をベースとする本願明細書に開示するデポ製剤に使用するための毒素系治療タンパク質の変異型には：配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と80%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と81%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と82%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と83%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と84%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と85%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と86%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と87%の配列同一性；配列番号：1～224のいずれかと88%の配列同一性および／または配列番号：257～260；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と89%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と90%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と91%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と92%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と93%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と94%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と95%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と96%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と97%の配列同一性；配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と98%の配列同一性；または配列番号：1～224および／または配列番号：257～260のいずれか1と99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。

【0067】

特定の例示的な実施形態には毒素系治療タンパク質が含まれ、ここに該タンパク質は、配列番号：208と80%の配列同一性、85%の配列同一性、86%の配列同一性、87%の配列同一性、88%の配列同一性、89%の配列同一性、90%の配列同一性、91%の配列同一性、92%の配列同一性、93%の配列同一性、94%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を共有する。もう1つの実施形態において、変異型には、配列番号：209と80%の配列同一性、85%の配列同一性、86%の配列同一性、87%の配列同一性、88%の配列同一性、89%の配列同一性、90%の配列同一性、91%の配列同一性、92%の配列同一性、93%の配列同一性、94%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。もう1つの実施形態において、変異型には、配列番号：210と80%の配列同一性、85%の配列同一性、86%の配列同一性、87%の配列同一性、88%の配列同一性、89%の配列同一性、90%の配列同一性、91%の配列同一性、92%の配列同一性、93%の配列同一性、94%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。もう1つの実施形態において、変異型には、配列番号：218と80%の配列同一性、85%の配列同一性、86%の配列同一性、87%の配列同一性、88%の配列同一性、89%の配列同一性、90%の配列同一性、91%の配列同一性、92%の配列同一性、93%の配列同一性、94%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。もう1つの実施形態において、変異型には、配列番号：208と80%の配列同一性、85

%の配列同一性、86%の配列同一性、87%の配列同一性、88%の配列同一性、89%の配列同一性、90%の配列同一性、91%の配列同一性、92%の配列同一性、93%の配列同一性、94%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。もう1つの実施形態において、変異型には、配列番号：257と80%の配列同一性、85%の配列同一性、86%の配列同一性、87%の配列同一性、88%の配列同一性、89%の配列同一性、90%の配列同一性、91%の配列同一性、92%の配列同一性、93%の配列同一性、94%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性、または99%の配列同一性を共有するタンパク質が含まれる。

【0068】

「%配列同一性」とは、配列を比較することによって決定する2またはそれを超える配列間の関係性をいう。当該技術分野において、「同一性」とはかかる配列のストリング間の合致によって決定されるタンパク質間の配列関連性の程度も意味する。「同一性」（「類似性」という場合もある）は：Computational Molecular Biology (Lesk, A. M.編) Oxford University Press, NY (1988) ; Biocomputing : Informatics and Genome Projects (Smith, D. W.編) Academic Press, NY (1994) ; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., およびGriffin, H. G.編) Humana Press, NJ (1994) ; Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G.編) Academic Press (1987) ; および Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. およびDevereux, J.編.) Oxford University Press, NY (1992) に記載されているものを含む公知の方法によって容易に計算できる。配列同一性を決定する好ましい方法を設計して、試験した配列間の最良の合致を得る。配列同一性および類似性を決定する方法は、公共的に入手可能なコンピュータプログラムにコード化されている。配列アライメントおよびパーセント同一性の計算は、LASERGENE bioinformatics computing suiteのMegalignプログラム (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) を用いて行うことができる。配列の多重アライメントは、デフォルトパラメータ (GAP PENALTY=10、GAP LENGTH PENALTY=10) でアライメントのClustal法を用いて行うことができる (HigginsおよびSharp CABIOS, 5, 151-153 (1989))。適切なプログラムには、プログラムのGCG suite (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin) ; BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschulら, J. Mol. Biol. 215 : 403-410 (1990)) ; DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) ; およびSmith-Watermanアルゴリズムを取り入れたFASTAプログラム (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor (s) : Suhai, Sandor. Publisher : Plenum, New York, N.Y. も含まれる。本明細書の記載の文脈内で、解析に配列解析ソフトウェアを用いる場合、解析の結果は参照したプログラムの「デフォルト値」に基づくことは理解される。「デフォルト値」とは、最初にイニシャライズした場合のソフトウェアで元々ロードされるいずれかのセットの値またはパラメータを意味する。

【0069】

「D-置換型アナログ」には、D-アミノ酸で置換された1のさらなるL-アミノ酸を有する本明細書に記載する毒素系治療タンパク質が含まれる。D-アミノ酸はタンパク質配列に見出されるものと同じアミノ酸の型とすることができ、あるいは異なるアミノ酸とすることができる。したがって、D-アナログも変異型である。

【0070】

「修飾物」には、1またはそれを超えるアミノ酸が非-アミノ酸成分で置き換えられた、またはアミノ酸が機能性基にコンジュゲートしているもしくはそうでなければ機能性基がアミノ酸またはタンパク質と会合している、毒素系治療タンパク質が含まれる。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン標識アミノ酸、脂肪基にコンジュゲートしたアミノ酸、ヒト血清アルブミンにコンジュゲートしたアミノ酸、または有機誘導化剤にコンジュゲートしたアミノ酸としてもよい。修飾アミノ酸の存在は、例えば以下の点で有利になり得る：

(a) タンパク質血清半減期および／またはin vivo機能性半減期の増大、(b) タンパク質抗原性の低下、(c) タンパク質保存安定性の増大、(d) タンパク質安定性の増大、(e) 延長する循環時間、および／または(f) バイオアベイラビリティの増大、例えば、曲線下面積の増大(AUCsc)。アミノ酸(または複数)は、例えば、組換え体作製の間に翻訳と同時または翻訳後に修飾することができ(例えば、哺乳動物細胞における発現の間のN-X-S/TモチーフにおけるN-リンクグリコシル化)、または合成法によって修飾することができる。修飾アミノ酸は配列内または配列末端部に存在することができる。修飾には、その他、本願明細書に記載する誘導体を含むことができる。

【0071】

C-末端はカルボン酸またはアミド基とすることができ、好ましくは毒素系治療タンパク質の各々についてカルボン酸基とすることができ、本願明細書は(i) Tyr、ヨード-Tyr、蛍光タグのようなC-末端に行った付加、または(ii) Tyr、ヨード-Tyr、ピログルタメート、または蛍光タグのようなN-末端に行った付加によってさらに修飾された毒素系治療タンパク質にも関する。

【0072】

また、安定性を改善することが当業者に知られている残基または残基の基をC-末端および／またはN-末端に付加することができる。また、経口アベイラビリティを改善することが当業者に知られている残基または残基の基をC-末端および／またはN-末端に付加することができる。

【0073】

特定の実施形態において、C-末端は、酸(例えば、COOH)またはアミド(例えば、CONH₂)である。「アミド」とは、NH₂をいい、特定の実施形態において、タンパク質のC-末端に結合する。種々の実施形態において、酸のC-末端ヒドロキシル基(OH)はアミドで置換する。かかる置換は、「-Cys-NH₂」において「アミド」なる用語または「C-末端アミノ酸-NH₂」として示される。

【0074】

種々の治療タンパク質の安全性、効力、および特異性を精査し、ついでタンパク質をアニオン性電荷を有する有機または無機の化学基に結合することが医薬組成物で使用するための安定性を改善することが示された。結合の部位はN-末端とすることができるが、修飾はこの部位の結合に限定されない。

【0075】

適当な化学基の例には、L-Pmp(OH₂) ; D-Pmp(OH₂) ; D-Pmp(OHEt) ; Pmp(Et₂) ; D-Pmp(Et₂) ; L-Tyr ; L-Tyr(PO₃H₂) (p-ホスホチロシン) ; L-Phe(p-NH₂) ; L-Phe(p-CO₂H) ; L-アスパルテート ; D-アスパルテート ; L-グルタメート ; およびD-グルタメートが含まれる。用いる着後は以下のように定義する：Pmp(p-ホスホメチルフェニルアラニン) ; およびPpa(p-ホスファチジルフェニルアラニン)。PmpおよびPpaの代替物には、Pfp(p-ホスホ(ジフルオロメチル)フェニルアラニン) およびPkp(p-ホスホメチルフェニルアラニン)が含まれる。

【0076】

例示的な化学基は、アミノエチルオキシエチルオキシアセチル酸リンカー(本明細書中においてAEEAcという)のようなリンカーによって、またはいずれか他の適当な手段によって結合することができる。化学基／リンカーの組合せの例には、AEEAc-L-Pmp(OH₂) ; AEEAc-D-Pmp(OH₂) ; AEEAc-D-Pmp(OHEt) ; AEEAc-L-Pmp(Et₂) ; AEEAc-D-Pmp(Et₂) ; AEEAc-L-Tyr ; AEEAc-L-Tyr(PO₃H₂) ; AEEAc-L-Phe(p-NH₂) ; AEEAc-L-Phe(p-CO₂H) ; AEEAc-L-アスパルテート ; AEEAc-D-アスパルテート ; AEEAc-L-グルタメート ; およびAEEAc-D-グルタメートが含まれる。アミノ酸残基がキラル中心を有する場合の化学基においては、一般的に、アミノ酸残基のDおよび／またはL-エナンチオマーを用いることができる。

【0077】

本明細書に記載するすべての毒素系治療タンパク質は、AEEAcのN-末端結合および／ま

10

20

30

40

50

たはC-末端のアミド結合によって修飾することができる（例えば、ShK-186（配列番号：217）およびShK-192（配列番号：218））。AEEAcは、形成工程の間のリンカーを記載するために用いる場合は、アミノエチルオキシエチルオキシ酢酸およびFmoc-アミノエチルオキシエチルオキシ酢酸と相互交換可能にいうことができる。最終的な状態で特定のタンパク質におけるリンカーをいうために用いる場合は、その語はアミノエチルオキシエチルオキシ酢酸という。

【0078】

本明細書に記載するすべての毒素系治療タンパク質は、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒト血清アルブミン、抗体、脂肪酸、FabおよびFc領域を含む抗体フラグメント、ヒドロキシエチルスターチ、デキストラン、オリゴ糖、ポリシアル酸、ヒアルロン酸、デキストリン、ポリ（2-エチル 2-オキサゾロン）、ポリグルタミン酸（PGA）、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HPMA）、特にアミノ酸Ala、Glu、Gly、Ser、およびThrを含むアミノ酸の非構造化親水性配列の付加物、ならびにSchmidt, S.R. (ed), Fusion Protein Targeting for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, John Wiley and Sons: Hoboken New Jersey, 2013に記載されているような多くの他のリンカーおよび付加物によって修飾することができる。PEG基は：（a）PEGスクシンイミジルカーボネート、（b）PEGベンゾトリアゾールカーボネート、（c）PEGジクロロトリアジン、（d）PEGトレシレート（tresylate）、（e）PEG p-ニトロフェニルカーボネート、（f）PEGトリクロロフェニルカーボネート、（g）PEGカルボニルイミダゾール、および（h）PEGスクシンイミジルサクシネートを用いてリシンのεアミノ基に結合することができる。PEG基は、ベンジルウレタンのパラ-またはオルト-ジスルフィドを含む分解性リンカーによってシステインに結合することができる。PEGの部位特異的導入は、PEG-アルデヒドを用いた還元的アルキル化によって、またはシアノ水素化ホウ素ナトリウム存在下のアルファ-アミノ基のグリセルアルデヒド修飾によって行うことができる。PEG化法は、Robertら, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 459-476 (2002)を含む多くの刊行物に記載されている。オリゴ糖はN-結合型またはO-結合型とすることができる。ポリシアル酸を含むN-結合型オリゴ糖は、Asn-Xxx-Ser/Thr（式中のXxxはプロリン以外のいずれか）のコンセンサス配列に結合することによって生成するセルラインによって付加する。O-結合型オリゴ糖は、SerまたはThrに結合する。

【0079】

特定の実施形態には、アニオン性電荷を有する有機または無機化学基がAEEAcを介して結合した配列番号：1~260の毒素系治療タンパク質が含まれる。

【0080】

毒素系治療タンパク質のもう1の例は、ShK-186のShK-系DOTA-コンジュゲートである（ShK-221という）。「DOTA」とは、アミノヘキサン酸を介して本明細書に開示する治療タンパク質のN-末端に結合することができる1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸をいう。DOTAコンジュゲーションは、インジウムまたはガドリニウムのような錯体金属原子に部位を提供する。本明細書に記載する治療タンパク質にコンジュゲートすることができる他の分子には、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、ニトリロ三酢酸ナトリウム（NTA）、エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）、イミノ二酢酸（IDA）、エチレングリコール四酢酸（EGTA）、1,2-ビス（o-アミノフェノキシ）エタン-N, N', N'-四酢酸（BAPTA）、1,4,7-トリアザシクロノナン-N, N', N''-三酢酸（NOTA）、および関連分子が含まれる。

【0081】

本願明細書はさらに開示する毒素系治療タンパク質の誘導体にも指向される。「誘導体」には、環状配列変形が天然タンパク質の天然の橋かけパターンを保持しているアシリック（acyclic）配列変形を有する毒素系治療タンパク質が含まれる。1の実施形態において、環化毒素系治療タンパク質には、線状毒素系治療タンパク質のN-およびC-末端がタンパク質リンカーを介して結合してアミド環化タンパク質骨格を形成する線状毒素系治療タンパク質およびタンパク質リンカーが含まれる。幾つかの実施形態において、タンパク質

リンカーには、Gly、Ala、およびそれらの組合せから選択されるアミノ酸が含まれる。

【0082】

種々の環化法を本明細書に記載する毒素系治療タンパク質に適用することができる。本明細書に記載する毒素系治療タンパク質は、BOC-法を用いて容易に環化してAla、Gly、またはAla/Glyブリッジ、ならびにそれらの組合せまたはSchnolzerら、Int J Pept Protein Res., 40, 180-193 (1992) によって記載されているような他の残基に導入することができる。毒素系治療タンパク質の環化は、毒素系治療タンパク質のその特定の標的に対するアフィニティーに影響することなく、その安定性、経口バイオアベイラビリティを改善することができ、およびタンパク質加水分解に対する感受性を減じることができる。

【0083】

本明細書に開示する各々の毒素系治療タンパク質には、本明細書に記載する毒素系治療タンパク質配列のポジション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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60を含むいずれかのポジションにおける付加、欠失、終結ポジション、置換、置換、コンジュゲーション、会合、または配列変形も含むことができる。したがって、特定の実施形態において、各々の毒素系治療タンパク質の各アミノ酸ポジションをXaaのポジションとすることができ、ここにXaaは特定のポジションにおけるアミノ酸の付加、欠失、終結ポジション、置換、置換、コンジュゲーション、会合、または配列変形を示す。特定の実施形態において、各々の毒素系治療タンパク質は、1またはそれを超えるポジション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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60に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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60のXaaポジションを有する。

【0084】

毒素系治療タンパク質は1を超える変化（付加、欠失、終結ポジション、置換、置換、コンジュゲーション、会合、または配列変形）を有することができ、および変異型、D-置換型アナログ、カルボキシ末端アミド、修飾物、および/または誘導体の1またはそれを超えるものとして資格を与えることができる。すなわち、変異、D-置換型アナログ、カルボキシ末端アミド、修飾物、および/または誘導体の1の分類に含まれることが他の分類に含まれることを排除するものではなく、本明細書中ではすべてを集合的に「毒素系治療タンパク質」という。1の例には配列番号：1が含まれ、そこではポジション21のアミノ酸はNleであり、および/またはポジション22のアミノ酸はジアミノプロピオン酸で置換されている。

【0085】

ポジション21がMetであるいずれかのタンパク質では、そのMetを置換して酸化に対する安定化効果を付与することができる。1の実施形態において、ポジション21のMetはNleで置換される。ポジション21にMetを有する配列番号：1~256のいずれかにおいては、このMetはNleで置換することができる。ポジション22にLysを有する配列番号：1~256のいずれかにおいては、このLysをジアミノプロピオン酸で置換することができる。したがって、1の本願明細書に開示する実施形態には、ポジション21のMetがNleで置換され、アミドがC-末端に存在し、および/またはアニオン性基がN-末端に存在する配列番号：1が含まれる。

【0086】

「非官能性アミノ酸残基」とは、酸性、塩基性、または芳香族基を欠く側鎖を有するD-またはL-形のアミノ酸残基をいう。例示的な非官能性アミノ酸残基には、Meg、Gly、Ala、Val、Ile、Leu、およびNleが含まれる。

10

20

30

40

50

【0087】

本願明細書に開示する特定の実施形態において、治療タンパク質は、少なくとも20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも22アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも26アミノ酸、少なくとも27アミノ酸、少なくとも28アミノ酸、少なくとも29アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも31アミノ酸、少なくとも32アミノ酸、少なくとも33アミノ酸、少なくとも34アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも36アミノ酸、少なくとも37アミノ酸、少なくとも38アミノ酸、少なくとも39アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも41アミノ酸、少なくとも42アミノ酸、少なくとも43アミノ酸、少なくとも44アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも46アミノ酸、少なくとも47アミノ酸、少なくとも48アミノ酸、少なくとも49アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも51アミノ酸、少なくとも52アミノ酸、少なくとも53アミノ酸、少なくとも54アミノ酸、少なくとも55アミノ酸、少なくとも56アミノ酸、少なくとも57アミノ酸、少なくとも58アミノ酸、少なくとも59アミノ酸、少なくとも60アミノ酸、少なくとも61アミノ酸、少なくとも62アミノ酸、少なくとも63アミノ酸、少なくとも64アミノ酸、少なくとも65アミノ酸、少なくとも66アミノ酸、少なくとも67アミノ酸、少なくとも68アミノ酸、少なくとも69アミノ酸、少なくとも70アミノ酸、少なくとも71アミノ酸、少なくとも72アミノ酸、少なくとも73アミノ酸、少なくとも74アミノ酸、少なくとも75アミノ酸、少なくとも76アミノ酸、少なくとも77アミノ酸、少なくとも78アミノ酸、少なくとも79アミノ酸、または少なくとも80アミノ酸を有する。

10

【0088】

さらなる実施形態において、治療タンパク質は、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸、43アミノ酸、44アミノ酸、45アミノ酸、46アミノ酸、47アミノ酸、48アミノ酸、49アミノ酸、50アミノ酸、51アミノ酸、52アミノ酸、53アミノ酸、54アミノ酸、55アミノ酸、56アミノ酸、57アミノ酸、58アミノ酸、59アミノ酸、60アミノ酸、61アミノ酸、62アミノ酸、63アミノ酸、64アミノ酸、65アミノ酸、66アミノ酸、67アミノ酸、68アミノ酸、69アミノ酸、70アミノ酸、71アミノ酸、72アミノ酸、73アミノ酸、74アミノ酸、75アミノ酸、76アミノ酸、77アミノ酸、78アミノ酸、79アミノ酸、または80アミノ酸を有する。

20

30

【0089】

本願明細書に開示するさらなる実施形態において、治療タンパク質は、少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、少なくとも3のジスルフィド架橋、少なくとも4のジスルフィド架橋、または少なくとも5のジスルフィド架橋を有する。

【0090】

さらなる実施形態において、治療タンパク質は、1のジスルフィド架橋、2のジスルフィド架橋、3のジスルフィド架橋、4のジスルフィド架橋、または5のジスルフィド架橋を有する。

【0091】

本願明細書に開示するデポー製剤に使用するのにも好適である治療タンパク質には、500~50,000ダルトンの分子量を有するものが含まれる。

40

【0092】

特に適当な治療タンパク質には、 Na^+ 、 K^+ 、または Ca^{2+} チャネルのようなカチオンチャネル、 Cl^- チャネルのようなアニオンチャネル、またはニコチン性アセチルコリン受容体 (NACHR) のようなリガンド開口型チャネルに対して作用するものが含まれる。これらのチャネルには、細胞外および/または細胞内に存在するリガンドーおよび電位依存性イオンチャネルの両方が含まれる。細胞外のチャネルまたは受容体には、カネート (kanate) ; α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (AMPA) ; N-メチル-D-アスパルテート (NMDA) およびアセチルコリン受容体 ($\alpha 9/\alpha 10$ サブタイプ (nAChR) のような) ; セロトニン (5-ヒドロキシトリプタミン、5-HT) 受容体

50

；およびグリシンおよびγ-酪酸（GABA）受容体が含まれる。細胞内受容体は、サイクリックAMP（cAMP）、サイクリックGMP（cGMP）、Ca²⁺、およびG-タンパク質の受容体を含むことができる。

【0093】

本願明細書に開示するデポー製剤と共に有用な治療タンパク質の具体的な例には、電位開口型チャネルを標的とするShKタンパク質を含む毒素タンパク質が含まれる。例示的な電位開口型チャネルには、Kv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4、Kv1.5、Kv1.6、Kv1.7、Kv2.1、Kv3.1、Kv3.2、Kv11.1、Kc1.1、Kc2.1、Kc3.1、Nav1.2、Nav1.4、およびCav1.2チャネルが含まれる。

【0094】

本明細書に記載する治療タンパク質のプロドラッグも用いることができる。「プロドラッグ」なる語は、対象の中で生体内変換（例えば、自然または酵素のいずれか）を受けて、（例えば、酵素的に、機械的に、電磁気学的に、ほか）活性なまたはより活性な形態のタンパク質を放出または変換する治療タンパク質をいう。プロドラッグを用いて、安定性、毒性、特異性の欠如、または限定されたバイオアベイラビリティと関連する問題を克服することができる。例示的なプロドラッグには、活性タンパク質および化学的マスキング基（例えば、タンパク質の活性を可逆的に抑制する基）が含まれる。幾つかの好ましいプロドラッグは、代謝条件下で切断可能な配列を有するタンパク質の変異型または修飾物である。例示的なプロドラッグは、生化学的変換（例えば、リン酸化、水素化、脱水素化、グリコシル化、ほか）を受けた場合にin vivoまたはin vitroで活性になるまたはより活性になる。プロドラッグは、溶解性、組織親和性または遅延型の放出（例えば、Bundgaard, Design of Prodrugs, pp.7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam (1985)；およびSilverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, pp. 352-401, Academic Press, San Diego, CA (1992)を参照されたい）の利点を提供する場合がある。

【0095】

初期のバーストは典型的に水ベースのビヒクルで投与した場合に前記した治療タンパク質の水溶性種で起こるため、かかる水溶性種と一緒にPLG-系の本願明細書に開示するデポー製剤を用いることが有利である。かかるタンパク質のオクタノール-水の分配係数（Kow）は1以下であるが、0.1より高い。特に分子がアミノ残基のような塩基性基を有する場合には、タンパク質は塩形態で製剤化することができる。塩形態は、塩酸、硫酸、硝酸、ならびに炭酸およびコハク酸のような有機酸のような酸の付加物とすることができる。

【0096】

本願明細書に開示するデポー製剤と共に用いる治療タンパク質は、分子設計して強固な酸安定性を示すことができる。詳細には、C-末端アミド化、非-酸化性Nle置換、および／またはN-末端の非-加水分解性L-ホスホチロシン置換を行って、治療タンパク質をデポー製剤で付されるであろう酸性微小環境および生理的環境に適合させることができる。

【0097】

治療タンパク質の適当な量はそのタンパク質の性質に依存するが、通常、デポー製剤に使用する生分解性ポリマーの組成物に基づいて0.001%～90% w/wの範囲に入る。さらなる実施形態には、w/wで、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%が含まれる。

【0098】

デポー製剤を形成する方法。本願明細書に開示するデポー製剤の製造例の方法に関しては、治療タンパク質を捕捉するいずれの公知の微小カプセル化方法も用いることができ、それには水乾（drying-in-water）法、噴霧乾燥法、コアセルベーション法、またはそれらの等価物が含まれる。

【0099】

特定の実施形態において、水可溶性または分散性の治療タンパク質は、塩類、緩衝液、

ポリオール、糖質、アミノ酸、界面活性剤、安定化剤、および放出モディファイアーのような賦形剤と合し、ついでポリマーおよび溶媒と混同し、均質化、噴霧乾燥、コアセルベーション、超音波、および／または顕微溶液化を介してマイクロエマルジョンに機械的に変換することができる多相系を生成する。ついで、この一次水／油（w/o）エマルジョンを界面活性剤および緩衝液のような安定化剤を含む水性連続相に添加し、さらに分散させて、溶媒蒸発および攪拌／混合を介して経時的に硬化または熟したポリマー粒子を含む水中油中水型（w/o/w）エマルジョンを形成した。

【0100】

水性懸濁液は、遠心分離のような方法を用いることによってさらに濃縮して、さらに高密度の相（主にポリマー粒子）を富化させ、その後上部（透明または僅かに濁った）溶液層を適当な体積まで除去して目的の濃度とした。このアプローチは、外部の水性相を目的のpH、モル浸透圧濃度、イオン強度、および緩衝液の組成物にするのにも用いることができる。同様に、懸濁液は、塩類溶液、リン酸緩衝食塩水、糖質溶液、塩、緩衝液、および他の賦形剤を含む水性組成物にさらに希釈して、望ましい濃度（重量％固形物、pH、浸透性、または総薬物用量）を達成し、または凍結－乾燥（凍結乾燥）工程またはさらなる加工のために賦形剤に希釈することができた。

【0101】

以下の実施例にさらに記載するように、治療タンパク質は最終的な望ましい濃度まで水に溶解することができ、緩衝液塩類および界面活性剤を含む賦形剤を用いることができる。全部のw/o エマルジョンは媒体ボトルに注ぐことができる；ボトルは20 mLの0.5%DSS、20mMリン酸 pH 7.0、0.05%のPVA水溶液で満たした。混合物は剪断設定（26,000回転／分（rpm））で5分間ホモジナイズすることができ、その間にボトルは溶解する水（0℃）と熱的に接触させた。発生器プローブを浸漬し続けて液体の泡立ちおよびこぼれを制限することができる。エマルジョンは乳白色に変わる（1%ミルクのように）。pHは試験することができ、ついで必要に応じて5<pH<7.5の範囲に調整することができる。製剤は剪断から外して、緩くキャップしてゆっくりと蒸発させ、ついでドラフトチャンバー中、室温にて一晚攪拌して溶媒（ジクロロメタン）を蒸発させた。ついで、製剤はスクリーンを通して濾過することができる。エマルジョンは、穏やかに混合しながら室温にて保存して沈殿／凝集を回避することができる。あるいは、溶液は4℃に保存することができ、またはより長い保存性のために凍結乾燥することができる。多くの適当な凍結乾燥技術は、当業者によって知られている。

【0102】

使用の方法． 本明細書に記載する方法には、本願明細書に開示するデポー製剤、その塩またはプロドラッグを用いて治療タンパク質の徐放を行う、対象（ヒト、獣医学動物（イヌ、ネコ、爬虫類、鳥類、ほか）、家畜（ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ほか）、および実験用動物（サル、ラット、マウス、魚類、ほか））を治療することが含まれる。徐放は、治療上有効量の治療タンパク質、その塩またはプロドラッグを対象に送達することができる。治療上有効量には、有効量または有効レベル（先に定義した）を提供するものが含まれる。

【0103】

"有効量"は、対象において目的の生理学的変化を生じるのに必要な治療タンパク質の量である。有効量は、研究目的で投与する場合がある。本明細書に開示する有効量は、免疫系の障害の存在または活性を減少、制御または排除するおよび／または免疫系の障害の望ましくない副作用を減少、制御または排除する。

【0104】

"予防処置"には、免疫系の障害をさらに進行させるリスクをなくす、防ぐまたは低下する目的で処置が投与されるように、免疫系の障害の兆候もしくは症状を示していない対象に投与する処置または免疫系の障害の早期の兆候または症状のみを示す対象に投与する処置が含まれる。したがって、予防処置は免疫系の障害に対して予防的な処置として機能する。

10

20

30

40

50

【0105】

"治療処置"には、免疫系の障害の症状または兆候を示す対象に投与する処置および免疫系の障害の兆候または症状を減じるまたは排除する目的で対象に投与する処置が含まれる。治療処置は、免疫系の障害の存在または活性を減少、制御または排除し、および／または免疫系の障害の副作用を減少、制御または排除することができる。

【0106】

特定の実施形態において、本明細書に開示する治療タンパク質は、障害または自己免疫疾患を含む免疫系の症状の治療処置のためにデポー製剤に製剤される。特定の実施形態において、自己免疫疾患または症状は、乾癬、乾癬性関節炎、多発性硬化症、IPEX、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、1型糖尿病、2型糖尿病、アディソン病、セリアック病、皮膚筋炎、グレーブス病、橋本病、重症筋無力症、悪性貧血、慢性関節リウマチ、多発血管炎性肉芽腫症（ウェグナー病）、好中球自己抗体（ANCA）血管炎、炎症性腸疾患、アルツハイマー病、アレルギー、喘息、アトピー性皮膚炎、移植片対宿主病、組織または臓器の移植、心血管疾患、血管炎、小血管血管炎、巨細胞性動脈炎、ぶどう膜炎、ベーチェット症候群、NASHを含む非アルコール性脂肪性肝疾患、自己免疫性肝疾患、またはシェーグレン症候群である。

【0107】

1の例示的な実施形態において、免疫系の疾患は乾癬である。治療のインパクトは、病斑体表面積（%BSA）、乾癬の面積および重症度（PASI）の要素、および研究者による皮膚症状の重症度の包括的な評価尺度（IGA、5ポイントのスケール）乾癬の包括的な評価尺度、患者の皮膚障害に対する主観的評価（DLQI）、および乾癬特異的QOL指標（PDI）を含むパラメータを用いて評価することができる。乾癬病斑に対する治療のインパクトは、アプローチを用いて注射後15日、30日、またはそれを超える日に採取した生検を以下に記載するような評価によって判定することができる：H&E染色による病斑の組織化学および病理学者による評価；IFN γ 、TNF α 、iNOS、IL-4、8、10、17A、17F、17A/F、20、21、22、23、CCL20、プソリアシン、K16、および他のサイトカインを含む前炎症性サイトカインについてのqPCRによる遺伝子発現；細胞の活性化／集合（KRT16およびKi67）の免疫組織化学的特徴；および／または単核細胞浸潤の単核細胞測定（CD3、HLA-DR、CD11c⁺、CD68、CD163、Kv1.3）。

【0108】

さらなる実施形態において、疾患の間の全身自己免疫／炎症の状態は、下記のような当該技術分野で知られている技術を用いて測定したパラメータによって評価することができる：IL-17A、IL-17F、IL-17A/Fおよび他のサイトカイン／ケモカインを含む血漿／血清バイオマーカーの測定；全血中の全RNAにおける遺伝子発現；および／または末梢血液単核細胞集合の分析（CD4⁺ T細胞：天然のセントラルメモリー、またはエフェクターメモリーT細胞；CD8⁺ T細胞；天然のセントラルメモリーT細胞またはエフェクターT細胞；制御性T細胞）。

【0109】

投与のために、「治療上有効量」（本願明細書では用量という場合もある）は、in vitroアッセイおよび／または動物モデル実験からの結果に基づいて最初に概算することができる。かかる情報を用いて、関心のある対象における有用な用量をより正確に決定することができる。

【0110】

デポー製剤における治療タンパク質の量および濃度、ならびに対象に投与するデポー製剤の量は、臨床上適切な因子、デポー製剤中の治療タンパク質の溶解性、治療タンパク質の効力および活性、およびデポー製剤の投与様式に基づいて、医師、獣医師または研究者によって選択することができる。治療有効量の明細書に開示する治療タンパク質、その医薬上許容される塩またはプロドラッグを含むデポー製剤は、デポー製剤の1またはそれを超える別の投与を含む臨床的に安全かつ有効な様式で自己免疫疾患を治療するために対象に投与することができる。投与用量当たりの量および投与の合計量は、他の考慮すべき

事柄を含む、標的、体重、症状の重篤度、自己免疫疾患の型、以前または同時の治療的介入、対象の突発性疾患および投与の経路を含む、対象の身体的、生理学および心理的な要素にも依存する。

【0111】

有用な用量は0.1~40,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または0.5~1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲とすることができる場合がある。別の例において、有用な用量は0.1~1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.1~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.1~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.1~1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.1~10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.1~20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10~1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10~10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10~20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10~30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100~1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100~10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100~20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100~30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1,000~10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1,000~20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1,000~30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10,000~20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10,000~30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、または20,000~30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とすることができる場合がある。別の例において、用量は0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、550 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、650 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、850 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、950 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、6,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、6,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、7,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、7,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、9,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、9,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、11,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、11,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、12,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、12,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、13,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、13,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、14,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、14,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、15,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、15,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、16,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、16,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、17,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、17,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、18,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、18,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、19,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、19,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、21,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、21,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、22,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、22,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、23,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、23,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、24,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、24,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、26,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、26,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、27,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、27,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、28,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、28,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、29,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、29,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、31,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、31,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、32,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、32,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、33,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、33,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、34,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、34,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、35,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、35,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、36,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、36,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、37,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、37,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、38,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、38,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、39,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、39,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、または40,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を含むことができる。

【0112】

別の例において、用量は1 mg/kg 、5 mg/kg 、10 mg/kg 、15 mg/kg 、20 mg/kg 、25 mg/kg 、30 mg/kg 、35 mg/kg 、40 mg/kg 、45 mg/kg 、50 mg/kg 、55 mg/kg 、60 mg/kg 、65 mg/kg 、70 mg/kg 、75 mg/kg 、80 mg/kg 、85 mg/kg 、90 mg/kg 、95 mg/kg 、100 mg/kg 、150 mg/kg 、200 mg/kg 、250 mg/kg 、350 mg/kg 、400 mg/kg 、450 mg/kg 、500 mg/kg 、550 mg/kg 、600 mg/kg 、650 mg/kg 、700 mg/kg 、750 mg/kg 、800 mg/kg 、850 mg/kg 、900 mg/kg 、950 mg/kg 、1000 mg/kg 、またはそれを超えることができる。

【0113】

治療上有効量は、治療様式の過程（例えば、毎週、2ヶ月毎、3ヶ月毎、毎月、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、7ヶ月毎、8ヶ月毎、9ヶ月毎、10ヶ月毎、11ヶ月毎、または毎年）の間に投与することによって達成することができる。特定の実施形態において、単一投与のみが必要である。さらなる実施形態において、投与は、30日毎または60日毎に提供する。

【0114】

本願明細書に開示するデポー製剤を使用する適当な方法に関するさらなる情報は、国際出願番号PCT/US2014/020771およびPCT/US2014/047691、ならびに米国特許出願番号14/124,669に見出すことができる。

【0115】

デポー製剤は、注射；非経口注射；点眼；または軟質組織、体腔、または時によっては血管への細い針を介した注射を用いた埋め込みを含むいずれか適当な経路を介して投与することができる。

【0116】

実施例 以下の実施例は本願明細書の特定の実施形態を説明することを含む。当業者であれば、本願明細書に鑑みて、多くの変化を特定の本願明細書に開示する実施形態に対して行うこと、および本明細書の趣旨から逸脱することなく似たまたは同様の結果が得られることは認識する。

1. (i) 治療タンパク質を含む内部水性相、ここに治療タンパク質はデポー製剤の0.025%~5% w/wで存在し；(ii) ポリマー系の固相/油相；および(iii) 中で粒子が分散している外部水性相を含むデポー製剤であって、ここに外部水性相はデポー製剤の0.01%~1% w/wで存在する界面活性剤を含み、デポー製剤は単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供するデポー製剤。

2. ポリマーがポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド-グラフトPEG)、またはそれらのブレンドまたはコポリマーから選択される、実施形態1のデポー製剤。

3. ポリマーが1:1のラクチド:グリコリド比を有するポリ(ラクチド-co-グリコリド)である、実施形態1または2のデポー製剤。

4. 治療タンパク質がデポー製剤の0.025% w/w；デポー製剤の0.25% w/w；またはデポー製剤の2.5% w/wで存在する、実施形態1、2、または3のいずれか1に記載のデポー製剤。

5. 界面活性剤がポリソルベート、ポリ(エチレングリコール)、エチレン-プロピレンオキサイド(PEO-PPO)ブレンド、ポロキサマー、Span(登録商標)、Brij(登録商標)、ジオクチルスルホサクシネート、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、PVP、またはそれらの組合せから選択される、実施形態1、2、3、または4のいずれか1に記載のデポー製剤。

6. 治療タンパク質が少なくとも20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも22アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも26アミノ酸、少なくとも27アミノ酸、少なくとも28アミノ酸、少なくとも29アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも31アミノ酸、少なくとも32アミノ酸、少なくとも33アミノ酸、少なくとも34アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも36アミノ酸、少なくとも37アミノ酸、少なくとも38アミノ酸、少なくとも39アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも41アミノ酸、少なくとも42アミノ酸、少なくとも43アミノ酸、少なくとも44アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも46アミノ酸、少なくとも47アミノ酸、少なくとも48アミノ酸、少なくとも49アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも51アミノ酸、少なくとも52アミノ酸、少なくとも53アミノ酸、少なくとも54アミノ酸、または少なくとも55アミノ酸を有する、実施形態1、2、3、4、または5のいずれか1に記載のデポー製剤。

7. 治療タンパク質が20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸、43アミノ酸、44アミノ酸、45アミノ酸、46アミノ酸、47アミノ酸、48アミノ酸、49アミノ酸、50アミノ酸、51アミノ酸、52アミノ酸、53アミノ酸、54アミノ酸、または55アミノ酸を有する、実施形態1、2、3、4、または5のいずれか1に記載のデポー製剤。

8. 治療タンパク質が少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、少なくとも3のジスルフィド架橋、少なくとも4のジスルフィド架橋、または少なくとも5のジスルフィド架橋を有する、実施形態1、2、3、4、5、6、または7のいずれか1に記載のデポー製剤。

9. 治療タンパク質が1のジスルフィド架橋、2のジスルフィド架橋、3のジスルフィド架橋、4のジスルフィド架橋、または5のジスルフィド架橋を有する、実施形態1、2、3、4、5、6、または7のいずれか1に記載のデポー製剤。

10. 治療タンパク質が毒素系治療タンパク質である、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、または9のいずれか1に記載のデポー製剤。

11. 治療タンパク質がShK系タンパク質である、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のいずれか1に記載のデポー製剤。 10

12. 治療タンパク質が電位開口型カリウムチャネルを阻害するShK系タンパク質である、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11のいずれか1に記載のデポー製剤。

13. 阻害する電位開口型カリウムチャネルがKv1.1、Kv1.3、Kv1.5、Kv1.3/1.5、Kv1.6、Kv3.2、またはKCa3.1チャネルの1またはそれを超えるものである、実施形態12のデポー製剤。

14. 治療タンパク質が配列番号：1~260のいずれか1の配列を有する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13のいずれか1に記載のデポー製剤。

15. 治療タンパク質が配列番号：1~224または配列番号：257~260のいずれか1の配列を有する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14のいずれか1に記載のデポー製剤。 20

16. 治療タンパク質が1またはそれを超える配列番号：208、配列番号：217、配列番号：257、配列番号：210、配列番号：219、配列番号：218、配列番号：221、配列番号：258、配列番号：259、配列番号：260、またはそれらの塩を有する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のいずれか1に記載のデポー製剤。

17. 治療タンパク質が配列番号：217または配列番号：218である、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16のいずれか1に記載のデポー製剤。

18. 治療タンパク質が配列番号：210である、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、または16のいずれか1に記載のデポー製剤。 30

19. デポー製剤が単一投与後少なくとも40日間の、単一投与後少なくとも41日間の、単一投与後少なくとも42日間の、単一投与後少なくとも43日間の、単一投与後少なくとも44日間の、単一投与後少なくとも45日間の、単一投与後少なくとも46日間の、単一投与後少なくとも47日間の、単一投与後少なくとも48日間の、単一投与後少なくとも49日間の、単一投与後少なくとも50日間の、単一投与後少なくとも51日間の、単一投与後少なくとも52日間の、単一投与後少なくとも53日間の、単一投与後少なくとも54日間の、単一投与後少なくとも55日間の、または単一投与後少なくとも56日間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18のいずれか1に記載のデポー製剤。 40

20. デポー製剤が単一投与後40日間の、単一投与後41日間の、単一投与後42日間の、単一投与後43日間の、単一投与後44日間の、単一投与後45日間の、単一投与後46日間の、単一投与後47日間の、単一投与後48日間の、単一投与後49日間の、単一投与後50日間の、単一投与後51日間の、単一投与後52日間の、単一投与後53日間の、単一投与後54日間の、単一投与後55日間の、または単一投与後56日間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18のいずれか1に記載のデポー製剤。

21. デポー製剤が単一投与後少なくとも2ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19のいずれか1に記載のデポー製剤。 50

22. デポー製剤が単一投与後2ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18のいずれか1に記載のデポー製剤。

23. デポー製剤が単一投与後少なくとも3ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または21のいずれか1に記載のデポー製剤。

24. デポー製剤が単一投与後3ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19のいずれか1に記載のデポー製剤。

25. (i) 凍結乾燥デポー製剤の0.025%~5% w/wで中に分散された治療タンパク質を含むポリマー系の外部固形物/油相; (ii) 凍結乾燥デポー製剤の0.01%~5% w/wの界面活性剤; および (iii) 凍結乾燥デポー製剤の0.5~90% w/wの糖質を含む凍結乾燥デポー製剤であって、ここに凍結乾燥デポー製剤を元に戻した後に、元に戻したデポー製剤が単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、凍結乾燥デポー製剤。

26. 糖質がスクロース、マンニトール、トレハロース、デキストロース、またはそれらの組合せである、実施形態25の凍結乾燥デポー製剤。

27. 糖質がスクロースである、実施形態25または26の凍結乾燥デポー製剤。

28. ポリマーがポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド-グラフトPEG)、またはそれらのブレンドまたはコポリマーから選択される、実施形態25、26、または27のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

29. ポリマーが1:1のラクチド:グリコリド比を有するポリ(ラクチド-co-グリコリド)である、実施形態25、26、27、または28のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

30. 治療タンパク質が凍結乾燥デポー製剤の0.025% w/wで; 凍結乾燥デポー製剤の0.25% w/wで; または凍結乾燥デポー製剤の2.5% w/wで存在する、実施形態25、26、27、28、または29のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

31. 界面活性剤がポリソルベート、ポリ(エチレングリコール)、エチレンプロピレンオキサイドブレンド、ポロキサマー、Span(登録商標)、Brij(登録商標)、ジオクチルスルホサキシネート、PVA、PVP、またはそれらの組合せから選択される、実施形態25、26、27、28、29、または30のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

32. 治療タンパク質が少なくとも20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも22アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも26アミノ酸、少なくとも27アミノ酸、少なくとも28アミノ酸、少なくとも29アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも31アミノ酸、少なくとも32アミノ酸、少なくとも33アミノ酸、少なくとも34アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも36アミノ酸、少なくとも37アミノ酸、少なくとも38アミノ酸、少なくとも39アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも41アミノ酸、少なくとも42アミノ酸、少なくとも43アミノ酸、少なくとも44アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも46アミノ酸、少なくとも47アミノ酸、少なくとも48アミノ酸、少なくとも49アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも51アミノ酸、少なくとも52アミノ酸、少なくとも53アミノ酸、少なくとも54アミノ酸、または少なくとも55アミノ酸を有する、実施形態25、26、27、28、29、30、または31のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

33. 治療タンパク質が20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、40アミノ酸、41アミノ酸、42アミノ酸、43アミノ酸、44アミノ酸、45アミノ酸、46アミノ酸、47アミノ酸、48アミノ酸、49アミノ酸、50アミノ酸、51ア

10

20

30

40

50

ミノ酸、52アミノ酸、53アミノ酸、54アミノ酸、または55アミノ酸を有する、実施形態25、26、27、28、29、30、または31のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

34. 治療タンパク質が少なくとも1のジスルフィド架橋、少なくとも2のジスルフィド架橋、少なくとも3のジスルフィド架橋、少なくとも4のジスルフィド架橋、または少なくとも5のジスルフィド架橋を有する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、または33のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

35. 治療タンパク質が1のジスルフィド架橋、2のジスルフィド架橋、3のジスルフィド架橋、4のジスルフィド架橋、または5のジスルフィド架橋を有する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、または33のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

36. 治療タンパク質が毒素系治療タンパク質である、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

37. 治療タンパク質がShK-系タンパク質である、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

38. 治療タンパク質が電位開口型カリウムチャネルを阻害するShK-系タンパク質である、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35の凍結乾燥デポー製剤。

39. 阻害された電位開口型カリウムチャネルがKv1.1、Kv1.3、Kv1.5、Kv1.3/1.5、Kv1.6、Kv3.2、またはKCa3.1チャネルである、実施形態38の凍結乾燥デポー製剤。

40. 治療タンパク質が配列番号：1~260のいずれか1に記載の配列を有する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、または39のいずれか1に記載の凍結乾燥デポー製剤。

41. 治療タンパク質が配列番号：1~224または配列番号：257~260のいずれか1の配列を有する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

42. 治療タンパク質が配列番号：208、配列番号：217、配列番号：257、配列番号：210、配列番号：219、配列番号：218、配列番号：221、またはそれらの塩である、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、または41のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

43. 元に戻したデポー製剤が、単一投与後少なくとも40日間の、単一投与後少なくとも41日間の、単一投与後少なくとも42日間の、単一投与後少なくとも43日間の、単一投与後少なくとも44日間の、単一投与後少なくとも45日間の、単一投与後少なくとも46日間の、単一投与後少なくとも47日間の、単一投与後少なくとも48日間の、単一投与後少なくとも49日間の、単一投与後少なくとも50日間の、単一投与後少なくとも51日間の、単一投与後少なくとも52日間の、単一投与後少なくとも53日間の、単一投与後少なくとも54日間の、単一投与後少なくとも55日間の、または単一投与後少なくとも56日間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、または42のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

44. 元に戻したデポー製剤が、単一投与後40日間の、単一投与後41日間の、単一投与後42日間の、単一投与後43日間の、単一投与後44日間の、単一投与後45日間の、単一投与後46日間の、単一投与後47日間の、単一投与後48日間の、単一投与後49日間の、単一投与後50日間の、単一投与後51日間の、単一投与後52日間の、単一投与後53日間の、単一投与後54日間の、単一投与後55日間の、または単一投与後56日間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、または42のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

45. 元に戻したデポー製剤が、単一投与後少なくとも2ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、または43のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

46. 元に戻したデポー製剤が、単一投与後2ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、または42のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

47. 元に戻したデポー製剤が、単一投与後少なくとも3ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または45のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

48. 元に戻したデポー製剤が、単一投与後3ヶ月間の有効レベル内の治療タンパク質の徐放を提供する、実施形態25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、または43のいずれか1の凍結乾燥デポー製剤。

49. 対象に実施形態1~48のいずれか1の治療有効量のデポー製剤を投与し、それによって対象を治療することを含む、自己免疫疾患を有する対象を治療する方法。

50. 凍結乾燥デポー製剤の0.0.25%~5% w/wで存在するように中に分散したKv1.3チャンネルインヒビタータンパク質を有する生体親和性ポリマー、およびデポー製剤の0.1~10% w/wで存在するように界面活性剤を含む治療有効量のデポー製剤を投与し、それによって対象を治療することを含む、自己免疫疾患を有する対象を治療する方法であって、ここにデポー製剤はKv1.3チャンネルインヒビタータンパク質の放出の速度を変化させるさらなる成分を含まないことを特徴とする方法。

51. 自己免疫疾患が多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、ループス、ループス腎炎、組織移植拒絶反応、ぶどう膜炎、ドライアイ、または自己免疫性腸疾患である、実施形態49または50の方法。

52. 投与が注射による、実施形態49、50、または51のいずれか1に記載の方法。

53. 注射が単一注射である、実施形態52に記載の方法。

54. (i) デポー製剤の1.2% w/wで存在する毒素系治療タンパク質；(ii) PLG1A、PLG2A、PLG3A、PLG5E、またはPLG7Eポリマー；および(iii) デポー製剤の0.1% w/wで存在するPVA界面活性剤を含むデポー製剤であって、ここにデポー製剤が単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク質の徐放を提供するデポー製剤。

55. (i) 毒素系治療タンパク質およびリン酸、クエン酸、酢酸、ヒスチジン、またはそれらの組合せを含む1またはそれを超える緩衝液を含む内部水性相、ここに毒素系治療タンパク質はデポー製剤の1.2% w/wで存在し、ここに内部水性相は5.0~8.5のpHを有し；(ii) PLG1A、2A、3A、5E、または7Eポリマー系固相/油相；および(iii) デポー製剤の0.01~0.10% w/wで存在するPVA界面活性剤を含む外部水性相を含むデポー製剤であって、ここにデポー製剤が単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク質の徐放を提供するデポー製剤。

56. (i) デポー製剤の1.2% w/wで存在する配列番号：1~260の毒素系治療タンパク質；(ii) PLG1A、2A、3A、5E、または7Eポリマー；および(iii) デポー製剤の0.01~0.1% w/wで存在するPVA界面活性剤を含むデポー製剤であって、ここにデポー製剤が単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク質の徐放を提供するデポー製剤。

57. (i) デポー製剤の1.2% w/wで存在する配列番号：1~260の毒素系治療タンパク質；リン酸、クエン酸、酢酸、ヒスチジン、またはそれらの組合せを含む1またはそれを超える緩衝液；およびNaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、(NH₄)₂CO₃、またはそれらの組合せを含む1またはそれを超える塩類を含む内部水性相、ここに内部水性相は5.0~8.5のpHを有し；(ii) PLG1A、2A、3A、5E、または7Eポリマー系固相/油相；および(iii) デポー製剤の0.01~0.1% w/wで存在するPVA界面活性剤を含む外部水性相を含むデポー製剤であって、ここにデポー製剤が単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の毒素系治療タンパク質の徐放を提供するデポー製剤。

58. 実施形態1~48または54~57のいずれか1のデポー製剤を対象に投与し、それによって対象における治療ペプチドの徐放を得ることを含む、対象において治療ペプチドの徐放を得る方法。

59. 徐放が(1) 単一投与後少なくとも1ヶ月間の有効レベル内の放出；(2) 単一投与後少なくとも1ヶ月間のC_{max}に対するC_{average}の比が5を超えないまたは3を超えない有効レベル内の放出；(3) 単一投与後少なくとも56日間の有効レベル内の放出；および/または(4) 単一投与後少なくとも56日間のC_{max}に対するC_{average}の比が5を超えないまた

は3を超えない有効レベル内の放出によって証明される、実施形態58に記載の方法。

【0117】

実施例1. 治療タンパク質のデポー製剤の調製.

ポリマー、溶媒、水性相、緩衝液、賦形剤、および共溶媒の重量／体積および比率は以下のとおりとした：1.0グラムのポリマーを5.0 mLのジクロロメタンに溶解した。ついで、0.5 mLの20 mMのリン酸緩衝塩類溶液（PBS；pH 6.0）中の100 mg/mLのShK-186（またはShK-192）を添加した。10 x 195 mmプローブを用い、20,000 rpmで一次エマルジョンを2分間ホモジナイズした。ついで、一次エマルジョンを20 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）、0.5% ジオクチルスルホサキシネート（DDS）、および0.05% PVAの水性溶液に添加し；20 x 195 mmプローブを用いて26,000 rpmで2分間ホモジナイズした。二重エマルジョンに攪拌バーを加え、ついで懸濁液をドラフト中で一晚攪拌して揮発性の溶媒を蒸発させた。後日、懸濁液を325メッシュのスクリーンを通して濾過した。濾過した材料を遠心して沈降させ（20,000g、5分間）および上清を引き抜き、ついでタンパク質（ShK-186またはShK-192）含量について高速液体クロマトグラフィー（HPLC）およびピシニコニン酸（BCA）を含む方法によって分析してカプセル化効率を決定した。

10

【0118】

本実施例で調べた異なるデポー製剤を調製するために選択したポリマーとしては、PLG1Aのような低分子量（MW）PLG、PLG2Aのような中分子量PLGおよびPLG3Aのような高分子量PLGを含め、それらはすべて親水性で、カルボキシ末端化されたものである（Hシリーズ）。試験したさらなるポリマーはLG5EおよびPLG7Eであり、両方ともエステル化されたものである（Eシリーズ）。本実施例で用いたポリマーはLakeshore Biomaterials社から購入した。

20

【0119】

実施例2. 徐放型デポー製剤からの治療タンパク質のカプセル化、質量バランス、およびin vitro放出の測定.

%カプセル化は、典型的に、遠心のような分離法の後に上清の遊離タンパク質含量をアッセイし、以下の式（1）：

$$\% \text{カプセル化} = (\text{合計ShK} - \text{上清ShK}) / \text{合計ShK}$$

を用いることによって製剤化の直後に測定した。

【0120】

典型的なカプセル化効率は60～90%の範囲であった。

30

【0121】

質量バランスは、ポリマーのガラス転移温度を超えた加熱、濃縮したSDDSのような界面活性剤の添加、機械攪拌、超音波、アルカリまたは酸加水分解、またはこれらの加速放出法の種々の組合せを介してShKタンパク質をほぼ完全に放出するまでシステムに圧力をかけることによって確立することができる。典型的なin vitro放出曲線は、種々の時点および異なる条件下で上清をサンプリングし、ついで以下の式（2）：

$$\% \text{放出} = \text{上清ShK} / \text{合計ShK}$$

にあてはめることによって得ることができる。

【0122】

in vitro放出を測定するために、溶液を脱イオン水、2% w/v界面活性剤 SDDS（水溶液）、1X PBS、および20 mMリン酸緩衝液（pH 7）で置き換えた。異なる試料を軌道運動振盪台上でかき混ぜ、37°Cの温度にて保持した。経時的なタンパク質の放出は、種々の時点、典型的にはt=0日～t=15日、に抜き取った上清のBCAまたは逆相（RP）-HPLC分析によって測定した。

40

【0123】

図1は5の異なるデポー製剤のShK-186のin vitro放出を示す。製剤は、実施例1に記載したように異なる分子量および末端キャップ基の範囲のPLGを用いて製造した。結果は、治療タンパク質との相互作用によるものと思われる、末端（末端をキャップした）基が長期の放出をモジュレートする効果を示している。かかる測定の差および絶対的特徴は、in

50

vitro/in vivo相関を確立するのを助けることができる。この場合、エステルキャップしたポリマーPLG5EおよびPLG7Eを用いて製造した製剤からの治療タンパク質のより迅速な初期の放出は、カルボキシー末端化系ポリマーから観察された放出と比較して示す（PLG1A、2A、および3A）。

【0124】

実施例3. デポー製剤物理学的特性の特徴付け. 標準的な分析特徴付け方法を用いて、本明細書に記載するおよびPLG2Aポリマーを用いて実施例1の方法に従って形成したデポー製剤の物理学的および化学的特性を分析した。サイズおよび電気泳動移動度は、Malvern ナノサイザーを用いる光散乱によって測定した。形態／均一性は、光学顕微鏡によって測定した。結果を図2～4に示す。

【0125】

図2Aおよび2Bは、動的光散乱によって測定した、3の異なるバッチのデポー製剤の分散サイズを示す。図2Aおよび2Bは、動的光散乱によって測定した製剤懸濁液について強度（図2A）および体積（図2B）によってプロットしたデポー製剤のサイズ分布を示す。

【0126】

図3は、デポー製剤についてのゼータ電位（電気泳動によって測定した、粒子の表面電荷の測定である。アニオン性の表面は、水性懸濁液中の分散物の安定性の付与を助ける。ゼータ電位測定は、 -75 、 -72 および -72 mVの電荷を有するアニオン性粒子の同様のタイトなクラスター化が静電反発力を介してコロイドの安定性に寄与するクーロン相互作用を提供することを示した。

【0127】

図4は、PLG製剤の形状およびほぼ均一な形態寸法を示すデポー製剤の光学顕微鏡像である。図は、 $1\mu\text{m}$ のサイズを有するまわり（おそらく球形の）粒子を示す、ShK-186をカプセル化するPLG製剤の光学顕微鏡像（100X）を示す。

【0128】

要約すると、本実施例では、本実施例に記載するデポー製剤が1ミクロンの平均サイズを有すること（図4）、球体の表面／界面境界が電気泳動移動度によって測定して、コロイド安定性を示す -75 mV $\sim$ -72 mVの正味の電荷を有すること（図3）、および製剤が均一な球形形状を示すこと（図4）を示している。

【0129】

実施例4. in vivoでのデポー製剤の評価. 以下のプロセスを本実施例に記載するデポー製剤を作製した後に行った。 1.0 gのPLGポリマー（1A、2Aまたは3A）を、 10 mLビーカー中でポリマーが完全に溶解するまで低速で攪拌しつつ 5.0 mLのジクロロメタンに溶解した。 $500\mu\text{L}$ のShK-186（ 140 mM NaClを含む 20 mMリン酸ナトリウム水性緩衝液（pH 6.0）中、 20 mg/mL タンパク質の最終濃度になる）を添加し、 10×195 mmプローブを用いて、 $26,000$ rpmで2分間ホモジナイズした。すべてのw/oエマルジョンを、 20 mLの 0.5% w/w DSS、 20 mM リン酸（pH 7.0）、および 0.05% w/w PVA水溶液を満たした 100 mL Pyrex（登録商標）（Corning, Inc., Corning, New York）1395媒体ボトルに注いだ。

【0130】

その混合物を、溶解する水（ 0°C ）とビーカーを接触させつつ、同じ剪断設定（ $26,000$ rpm）で5分間ホモジナイズした。ジェネレータープローブは液体に完全に浸漬したまま維持して、材料の泡立ちおよびこぼれるのを制限した。エマルジョンはコロイド散乱により乳白色に変化した。水性（外部）相のpHを確認し、必要に応じて $5 < \text{pH} < 7.5$ に調節した。製剤を剪断から取り除き、ドラフト中、室温で攪拌して溶媒を蒸発させた（ジクロロメタン）。媒体ボトルを軽くカバーして一晩の過剰な水の蒸発を避けた。

【0131】

次の日に、懸濁液を325メッシュのスクリーンを通して濾過した。メッシュのスクリーンによって非常に少量（ $<5\%$ ）の固形材料を除去した。ついで、懸濁液をくるくる回して混合しながら室温で保存して沈殿／凝集を回避した。 $\%$ カプセル化は、懸濁液を遠心し、上清相を引き抜き、ついでBCAまたはHPLCのような方法によってShK-186含量についてア

10

20

30

40

50

ッセイすることを介して測定した。カプセル化効率は、PLG1A、2A、および3Aについて各々88%、87%、および82%であった。

【0132】

注射によって使用する直前に、製剤は適当な体積を用いて、4℃、2,000 gにて8分間遠心した。底部に沈殿した固形粒子、ほぼ透明またはわずかに濁った上清をデカンテーションし、つづいて適当な体積および組成（緩衝液、pH、およびイオン強度）の対溶液で置換し、その後に機械的に混合して（必要ならばボルテックス攪拌）粒子を再懸濁して均一な自由流動性の分散液を得た（乳白色）。

【0133】

Sprague-Dawleyラット（雄性、8～16週齢、条件当たり $n = 1$ ）に、23-ゲージ針を用いて示したデポー製剤1 mLをSC注射した。注射後種々の時点で採血し、酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）によってShK-186についてアッセイした。

【0134】

この工程の後に作成したデポー製剤からのin vivo放出プロファイルの例を図5A（線形濃度）および図5B（Log濃度）に示す。15分間以内に C_{max} に達し、一定して低下し、その日のうちに非常に低レベルまで排除された治療タンパク質の塩類溶液に対して、ShK-186およびPLGポリマー1Aおよび2Aを用いて形成したデポー製剤は4日にも検出可能なタンパク質を生じ、PLG2Aのそれも18日目まで検出可能であった。PLG3A系の製剤はin vivoにおいて薬物の低レベルの徐放を生じた。

【0135】

実施例5. PLG2Aと共にShK-186およびShK-192を用いたデポー製剤のin vivo用量応答。デポー製剤の調製は以下のように行った：1.0 gのPLG2Aを、ポリマーが完全に溶解するまで機械的に攪拌しながら5.0 mLのジクロロメタンに溶解した。3レベルのShK-186（最終濃度40、20、および10 mg/mL；140 mMのNaClを含む20mMリン酸ナトリウム水性緩衝液（pH 6.0）中）を含む500 μ Lの体積を、3の別々のPLG2A調製物に別々に添加し、10 x 195 mmプローブ（26,000 rpm）を用いて2分間ホモジナイズした。ついで、w/oエマルジョンを、20 mLの0.5% w/w DSSおよび20mM リン酸（pH 7.0）水溶液を満たした100 mL Pyrex（登録商標）1395媒体ボトルに注いだ。その混合物を、融水と熱接触（0℃）させながら同じ剪断設定（26,000 rpm）で5分間ホモジナイズした。水性（外部）相のpHを確認し、必要により5.0 <pH< 7.5に調節した。

【0136】

ついで、製剤を剪断から取り出し、ドラフト中、室温にて一晩攪拌して溶媒を蒸発させた。翌日の午前に、懸濁液を325メッシュのスクリーンを通して濾過し、およびくるくる回して混合しながら室温にて保存して、沈殿／凝集を防いだ。注射によって使用する直前に、製剤を適当な体積を用いて4℃、2,000 gにて8分間遠心した。底部に沈殿した固形粒子を残してほぼ透明な上清をデカンテーションし、つづいて適当な体積および組成物（例えば、PBS）で水溶液を置き換え、つづいて機械的に混合して粒子を再懸濁した。

【0137】

Sprague-Dawleyラット（雌性、8～16週齢、 $n=3$ ）に1 mLの示したデポー製剤をSC注射した。種々の時点で採決し、ELISA法によってShK-186についてアッセイした。

【0138】

図6Aおよび6Bは、PLG2Aを用いて製剤化したShK-186の異なる用量（高用量 = 40,000 μ g/kg、中用量 = 20,000 μ g/kg、低用量 = 10,000 μ g/kg）についてのin vivo放出を示す（図6Aは線形濃度を示し、図6BはLog濃度を示す）。ShK-186の血液血清レベルは、比較的狭い濃度の範囲で30日を超えて維持されている。図6Aおよび6Bに示すように、放出プロファイルの相対的形状は形状的に似ているが、ShK-186の総用量に対する曲線下面積によってスケール化している。これらの結果は、長期作用型デポー製剤を製剤化して、循環レベルの生物学的に有効かつ天然のShK-186を長期間にわたって維持できたことを示している。

【0139】

本実施例の次の部を行って、長期間にわたるShK-192の製剤化およびin vivo放出を試験した。ShK-186に用いた方法と同様に、1.0 gのPLG2Aをポリマーが完全に溶解するまで機械攪拌しながら、5.0 mLのジクロロメタンに溶解した。低用量のShK-192 (10 mg/mL 最終濃度；140 mM NaClを含む20mMリン酸ナトリウム水性緩衝液 (pH 6.0) 中) を含む500 μ Lの体積を、10 x 195 mmプローブ (26,000 rpm) を用いて2分間ホモジナイズすることによって製剤化した。ついで、w/oエマルジョンを20mM リン酸水溶液 (pH 7.0) を含む20 mLの0.5% w/w DSSを満たした100 mL Pyrex (登録商標) 1395媒体ボトルに満たした。

【0140】

混合物を氷水 (0°C) と熱接触しながら保持し、ついで水性 (外部) 相の最終pHを確認し5.0<pH<7.5に調節しながら、26,000 rpmにて5分間ホモジナイズした。ついで、製剤を均質化から取り出し、ついでドラフト中、室温にて機械的に攪拌して溶媒を蒸発させた。翌日、懸濁液を325メッシュのスクリーンを通して最初に濾過し、ついでくるくる回して混合して沈殿/凝集を最小限化しながら室温にて保存した。in vivoで使用する直前に、適当な体積を用いて製剤を4°C、2,000 gにて8分間遠心した。ほぼ透明な上清をデカンテーションして固形粒子をボトルに移し、つづいて適当な体積および組成の水性緩衝液 (例えば、PBS) で水溶液を置き換え、つづいて機械的攪拌して粒子を再懸濁した。ついで、懸濁液 (1 mL) を引き抜き、ついで23-ゲージ針を用いてラット (n=3) にSC注射した。血液を種々の時点に採取し、ELISAアッセイを用いてShK-192についてアッセイした。

【0141】

図7Aおよび7Bは、Sprague-Dawleyラットにおいて単一のSC注射後に10,000 μ g/kgで投与したShK-192についてのin vivo放出のプロットである (図7Aは線形濃度を示し、図7BはLog濃度を示す)。最高濃度にt=12日付近に達したことは、デポー製剤からの治療タンパク質の徐放を示唆しており、30日を超えて方法が比較的スムーズに続くことを示唆している。要約すると、図7はy-軸誤差限界としてプロットした標準誤差を含む、Sprague-DawleyラットにおけるShK-192についての血液血清レベルの経時的变化を示す。このグラフは、異なる生物分子活性なKv1.3チャネルインヒビターを製剤化して1ヶ月を超える長期間にわたって徐放および有効な血液血清濃度が得られることを示している。

【0142】

繰り返し実験において、ShK-186の血液レベルをモニターした期間を延長した。図8に観ることができるように、Sprague-Dawleyラットにおいて20,000 μ g/kgにて単一SC用量 (1 mL) 中にPLG2Aで製剤化したShK-186のin vivo放出は、少なくとも56日間持続した。

【0143】

実施例6. 遅延型過敏症ラットモデルを含む自己免疫疾患の動物モデルにおけるShK-186およびShK-192デポー製剤の治療効力. 0日目に、完全Freundアジュバント (CFA) に1:1 (v/v) で混合した100 μ gの卵白アルブミン (OVA/CFA、200 μ L体積) をLewisラットの尾の基部に20G x 1 $\frac{1}{2}$ 針を用いたSC投与によってワクチン接種した。遅延型の過敏症 (DTH) は、29G x 1針を用いてイソフルラン-麻酔した動物の耳の耳介に10 μ L中の20 μ g OVAの注射によって7日目に耳に誘導した。DTHはマイクロメータ (キャリパー) を用いて抗原注射部位の硬結を測定することによって、8日目および9日目に評価した。ShK-186またはShK-192を用いた対照治療には、0~7日目に投与する100 μ g/kg、10 μ g/kg、3 μ g/kgまたは1 μ g/kgのShK-186またはShK-192のSC注射が含まれる (最初の免疫接種から毎日)。対照の処置は、0日目 (免疫の時間) に与えた1,000 μ g/kg、5,000 μ g/kg、10,000 μ g/kg、20,000 μ g/kg、または40,000 μ g/kgの用量のPLGポリマー系 (1例として、PLG2A) の徐放製剤を用いたShK-186またはShK-192のデポー製剤の単一注射と比較した。

【0144】

ShK-186またはShK-192のデポー製剤は、両方とも緩衝液 P6N (注射用水中の10mMリン酸ナトリウム、0.8% (w/v) のNaCl、0.05% (w/v) のポリソルベート20、pH=5) 中のShK-186またはShK-192の毎日のSC注射の結果として得たものに匹敵するまたはさらなるレ

ベルまで硬結（炎症応答）を減少するであろうという点で単一注射として与えた場合に有意の治療効果を示すことが予想される。

【0145】

実施例7. 慢性再発性／緩解性自己免疫脳脊髄炎ラットモデルを含む自己免疫疾患の動物モデルにおけるShK-186およびShK-192デポー製剤の治療効力. 慢性再発性／緩解性自己免疫脳脊髄炎（CR-EAE）は、脊髄ホモジネート（Bioreclamation, Inc.）およびCFAのダークオゴーチラット（Harlan）へのSC注射によって誘導する。動物は、典型的に、CR-EAEの開始後30日までに回復する。ラットは、免疫化によるCR-EAEの誘導の前または後に、毎日、1日おき、2日おきまたは3日おきのSC注射の異なる量のShK-186またはShK-192（1、3、5、10、および100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）で処理した。これらの様式を、実験の開始時（免疫注射時、予防モデル）および疾患の開始後（すなわち、ラットが1以上の臨床スコアを有した後（治療モデル））に与えた1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、または40,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量のデポー製剤の単一注射と比較する（PLG2Aを用いたShK-186またはShK-192）。

【0146】

治療の効力は、日々のデポー製剤－処理ラットにおけるCR-EAEの程度の臨床スコアによって測定する。疾患は、脊髄ホモジネート／CFAエマルジョンのSC注射後の設定した時間に毎日2回以下のスコアリングシステムを用いてモニターし、スコアする：（0）疾患なし；（0.5）遠位のぐったりした尾；（1）ぐったりした尾；（2）中度の不全対麻痺、運動失調症；（3）中度の不全対麻痺、時間から時間までのラットのつまずき；（3.5）1の後脚が不随、他方の脚は動く；（4）完全に後脚不随；（5）完全に後脚不随および失禁；および（6）瀕死の状態、呼吸困難、非摂食または非飲水／直ちに安楽死。実験の特定の時点で一部のラットを殺して、組織を収集し、または全血試料を採取した。

【0147】

ShK-186またはShK-192のデポー製剤は、有意な治療効果、例えば、予防および治療モデルの両方において単一注射として与えた場合の臨床スコアの低下、を示すことが予想される。これらの効果は、ShK-186またはShK-192を緩衝液 P6N中で毎日与える場合の試験した異なる薬物投与様式によって観察された効果に匹敵するまたはより良好であると予想される。

【0148】

実施例8. 乾癬の治療. 自己免疫疾患乾癬は、エフェクターメモリーT細胞が疾患に関与していることが示されており、ShK-186の標的、カリウムチャネル、Kv1.3を発現している自己免疫疾患である。乾癬の患者には本明細書に記載するデポー製剤を1回投薬し、ついで投薬後の異なる時点で評価して治療タンパク質（例えば、ShK-186、ShK-192）の治療効果をモニターした。評価すべき用量には、0.1、1、10、100、1000、10,000、20,000、または30,000 mcg/Kg が含まれる。評価の時点には、投薬1、2、3、4、6、8、12、16、24週間後が含まれる。デポー製剤の単一注射後の治療タンパク質暴露を評価するために、患者から血液試料を注射後望ましい時点で収集し、循環中の薬物の量を確立された生物分析法によって検出する。乾癬の臨床スコアもモニターする。治療タンパク質（複数可）の徐放および改善された臨床スコアが期待される。

【0149】

当業者によって理解されるように、各々の本願明細書に開示する実施形態は、その特に言及した要素、工程、成分またはコンポーネントを含み、実質的にそれらからなり、またはそれらからなることができる。したがって、「～を含む」または「～を含む」なる語は、「～を含む、～からなる、または～実質的にからなる」を引用すると解釈すべきである。移行性の用語「含む」または「含む」は、限定するものではないが、主要な量ではないとしても、特定していない要素、工程、成分またはコンポーネントを含むことを意味し、かつ、それらを含むことを許容する。移行性の句「からなる」は、特定していないいずれの要素、工程、成分またはコンポーネントも排除する。移行性の句「実質的にからなる」とは、実施形態の範囲を特定した要素、工程、成分またはコンポーネントおよび実施形態

に実質的に影響しないものに限定する。物質の効果は、特定の実施形態が本明細書に定義する「徐放」として治療タンパク質の徐放を達成することを妨げる。

【0150】

別段指摘しない限り、本明細書および特許請求の範囲中で用いるすべての数字は、「約」なる語によってすべての例において修飾されると理解される。したがって、別段指摘しない限り、本明細書および添付する請求項に記載する数値パラメータは、本発明によって求められる望ましい特性に依存して変化し得る。なにはともあれ、かつ、特許請求の範囲に対して均等論の適用を制限するつもりはなく、各数値パラメータは、少なくとも多数の報告されている数字に鑑みておよび通常の端数処理技術を適用することによって解釈すべきである。さらに明確性が要求される場合、「約」なる語は、記載する数値または数値範囲と結合して用いた場合に当業者によってそれを合理的に記載している意味を有する。すなわち、記載する値の±20%；記載する値の±19%；記載する値の±18%；記載する値の±17%；記載する値の±16%；記載する値の±15%；記載する値の±14%；記載する値の±13%；記載する値の±12%；記載する値の±11%；記載する値の±10%；記載する値の±9%；記載する値の±8%；記載する値の±7%；記載する値の±6%；記載する値の±5%；記載する値の±4%；記載する値の±3%；記載する値の±2%；または記載する値の±1%の範囲内まで、記載する値または範囲よりも幾分多いまたは幾分少ないことを示している。

10

【0151】

発明の広い範囲を記載する数値範囲および数値パラメータは近似値であるにもかかわらず、特定の例に記載する数値は可能な限り正確に報告している。しかしながら、いずれの数値も、固有に、それらの各々の試験測定に見出される標準偏差から必然的に生じるある種の誤差を含む。

20

【0152】

「a」、「an」、「the」および本発明を記載する文章（特に、以下の特許請求の範囲の文章）中に用いられる同様の指示物は、そこに別段指摘していなければまたは文章によって明らかに否定されていなければ、単数および複数の両方をカバーすると解釈される。本明細書中の数値範囲の引用は、単に、範囲内に入る各々別々の値に個々に言及する簡略表記法として作用することを意図している。本明細書中で別段指摘しない限り、それらが個々に本明細書中で引用されているかのように個々の値が本明細書に取り込まれている。本明細書に記載するすべての方法は、別段指摘しない限り、または、文章によって明らかに否定していなければ、いずれの好適な順番で行うこともできる。本明細書に記載するいずれかおよびすべての実施例または例示的（例えば、「～の様な」）な用語の使用は、単に本発明をより良好に説明することを意図するものであって、特許請求する以外の発明の範囲に対して限定を課するものではない。本明細書中のいずれの文章も、本発明の実施に必須であるいずれかの特許請求しない要素を示すと解釈してはならない。

30

【0153】

本明細書に記載する本発明の別の要素または実施形態のグルーピングは、限定とし解釈してはならない。各グループのメンバーは、個々にまたは本明細書に見出されるグループの他のメンバーまたは他の要素とのいずれかの組合せとし得る。グループの1またはそれを超えるメンバーが、都合のためおよび／または特許性の理由のためにグループに含まれまたはグループから削除され得ることは予想される。いずれかかかる含めるまたは削除することが起こる場合、明細書は修飾したグループを含むとみなされ、したがって添付する特許請求の範囲で用いるすべてのマーカッシュグループの記載を実行する。

40

【0154】

本発明のある種の実施形態を本明細書に記載するが、これには発明を実施するにつき発明者に知られているベストモードが含まれる。勿論、これらの記載した実施形態の変形は、先の記載を読めば当業者に明らかになるであろう。発明者は当業者がかかる変形を適当に用いることを期待し、かつ発明者は本明細書に具体的に記載した以外の方法で発明が実施されるべきことを意図している。したがって、本発明は、適用可能な法律によって許される限り本明細書に添付する請求項に引用する特徴事項のすべての修飾および均等を含む

50

。また、すべての可能な変形において記載した要素のいずれの組合せも別段指摘がなければまたは文章において明らかに否定されていなければ、本発明によって包含される。

【0155】

さらに、本明細書を通して刊行物、特許および／または特許出願に対して膨大な参照を行っている（集合的に「参考文献」）。引用した参考文献は各々、それらが特に引用した教示に参照することによって個々に本明細書に取り込まれる。

【0156】

本明細書に示す特定のものは例示であり、本発明の好ましい実施形態を説明的に論じるためだけのものである。また、何が最も有用であるかを考え、本発明の種々の実施形態の原理的および概念的な態様の記載を容易に理解するために示されるものである。これに関して、発明の基本的な理解のために必要であるよりもより詳細に発明の構造上の詳細を示そうとはしておらず、図面および／または例と明細書とを一緒にすれば、どのようにして発明の幾つかの形態を実際に具現化し得るかが当業者に明らかとなる。

10

【0157】

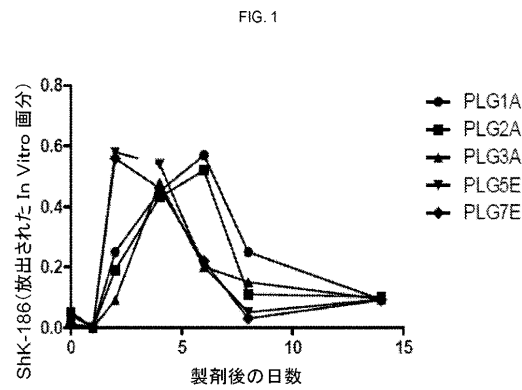
本願明細書中で用いる定義および説明は、明らかかつ一義的に実施例で修飾しない限りまたは意味の適用がいずれかの構成を無意味または実質的に無意味とするする限りは、いずれかの将来の構成においてコントロールすることを意味し、意図するものである。用語の構成がそれを無意味または実質的に無意味とする場合、定義は、Webster's Dictionary、3rd EditionまたはOxford Dictionary of BiochemistryおよびMolecular Biology (Ed . Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004) のような当業者に知られている辞書から採用するべきである。

20

【0158】

最後に、本明細書に記載する発明の実施形態が本発明の原理を説明するものであることは理解されるべきである。使用することができる他の修飾も発明の範囲内に入る。したがって、例えば、限定するものでないが、本発明の別の形態を本明細書の教示によって利用することができる。したがって、本発明は示し、記載するものに正確に限定されない。

【 図 1 】



【 図 2 A 】

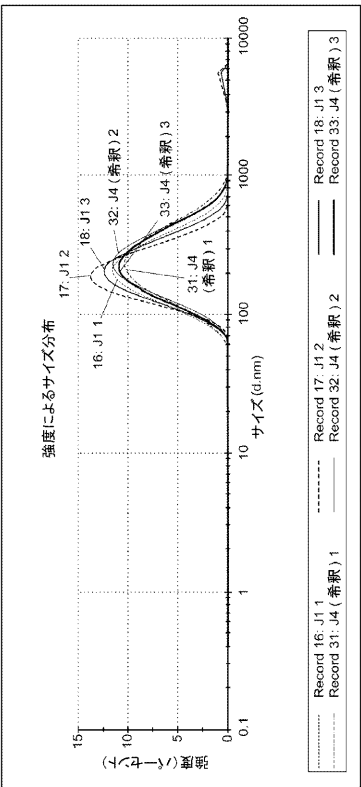


FIG. 2A

【 図 2 B 】

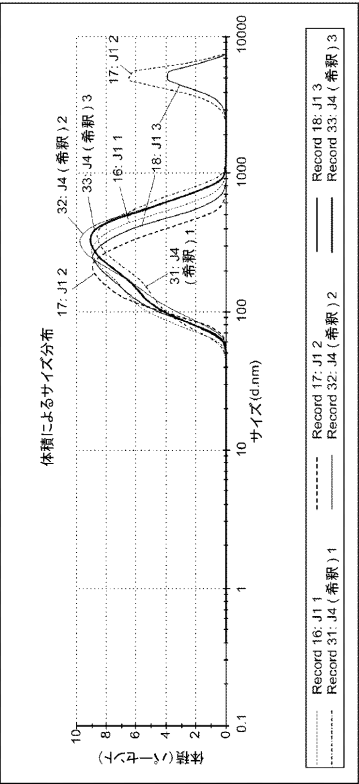


FIG. 2B

【 図 3 】

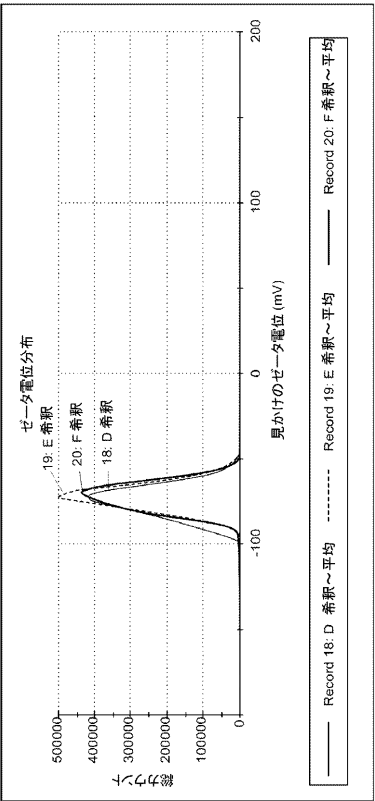
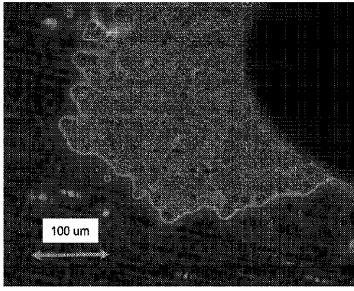


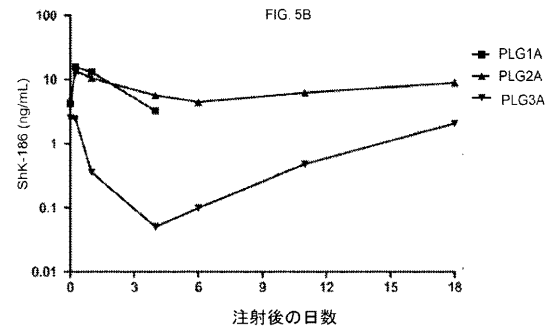
FIG. 3

【図 4】

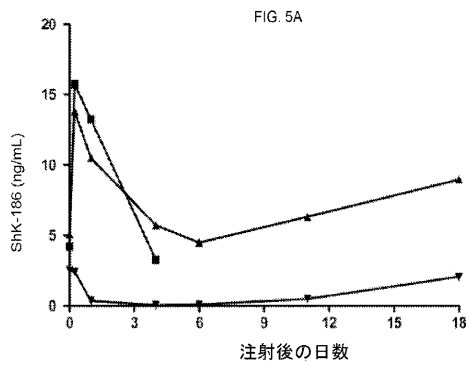
FIG. 4



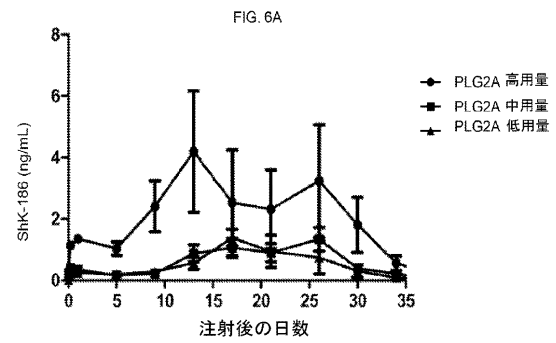
【図 5 B】



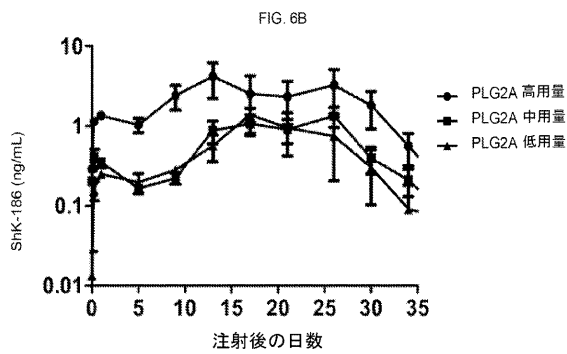
【図 5 A】



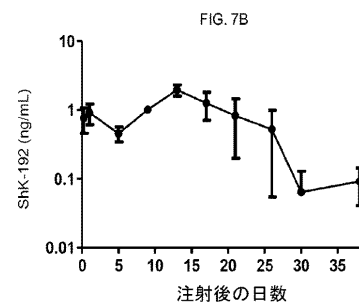
【図 6 A】



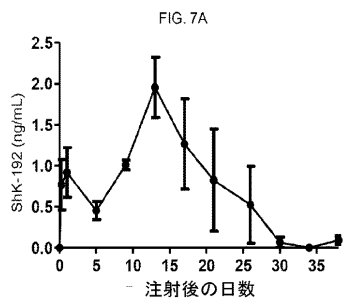
【図 6 B】



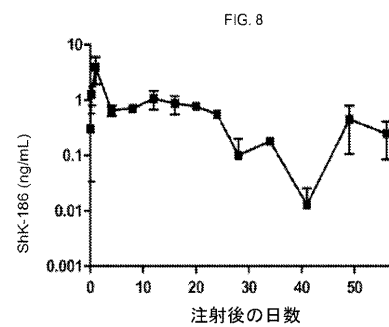
【図 7 B】



【図 7 A】



【図 8】



【配列表】

2017501980000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 14/72253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/16, A61K 9/52 (2015.01) CPC - A61K 9/1647, A61K 9/5073 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) - A61K 9/16, A61K 9/52 (2015.01) CPC - A61K 9/1647, A61K 9/5073 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 9/14, A61K 9/1694 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: depot, formulation, sustained, delayed, release, toxin, particle, carrier, nanocarrier, nanoparticle, poly(lactide-co-glycolide), (PLG)2A, PGL 2A, PLG2A, PLGA, poly(vinyl alcohol), PVA, polyvinyl alcohol, PVOH, NaCl, KCl, CaCl2, MgCl2, (N		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0163469 A1 (LITTLE et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0014], [0038], [0042], [0053], [0054], [0076]	1-2, 5-9, (43-44)/(1-2,5-9)
Y	US 2009/0263462 A1 (KING et al.) 22 October 2009 (22.10.2009) para [0013], [0016], [0022], [0110], [0187]	1-2, 5-9, (43-44)/(1-2,5-9)
Y	US 8,080,523 B2 (BEETON et al.) 20 December 2011 (20.12.2011) abstract; Claim 20; SEQ ID NO: 3	1-2, 5-8, (43-44)/(1-2,5-8)
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 May 2015 (29.05.2015)		Date of mailing of the international search report 25 JUN 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/72253

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 extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.: 1-2, 5-9 and (43-44)(in part) limited to SEQ ID NO: 217

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/US 14/72253

Continuation of: 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.

Group I+: Claims 1-2, 5-9, and (43-44)(in part), directed to a depot formulation comprising a toxin-based therapeutic protein. The depot formulation will be searched to the extent that the toxin-based therapeutic protein encompasses the toxin-based therapeutic protein of SEQ ID NO:217. It is believed that claims 1-2, 5-9, and (43-44)(in part) limited to SEQ ID NO: 217 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a depot formulation comprising the toxin-based therapeutic protein of SEQ ID NO: 217. Additional toxin-based therapeutic protein sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected toxin-based therapeutic protein sequences. 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 are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a depot formulation comprising the toxin-based therapeutic protein of SEQ ID NO:218, i.e. claims 1-2, 5-9 and (43-44)(in part) limited to SEQ ID NO: 218.

Group II: Claims 3-4 and (43-44)(in part), drawn to a depot formulation having a protein with disulfide bridges

Group III: Claims 10-42 and (43-44)(in part), drawn to a depot formulation having a therapeutic protein (claim 10), wherein the formulation can be lyophilized (claim 27)

The inventions listed as Groups I+, II, and III do not relate to a single general 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:

Special Technical Features

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific toxin-based therapeutic protein sequence recited therein. Significant structural similarities cannot readily be ascertained among the toxin-based therapeutic protein sequences. Each invention of Group I+ requires a toxin-based therapeutic protein sequence, not required by any of the other inventions of Group I+. Further, a toxin-based therapeutic protein is not required by Groups II and III.

Group II requires a therapeutic protein with at least one, two, or three disulfide bridges, not required by Groups I+ or III.

Group III requires a lyophilized depot formulation comprising a sugar, not required by Groups I+ and II.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I+, II, and III is a depot formulation consisting essentially of:

- (i) an internal aqueous phase comprising a therapeutic protein;
- (ii) a polymer-based solid/oil phase; and
- (iii) an external aqueous phase comprising a surfactant, wherein the depot formulation provides sustained release of the therapeutic protein within effective levels for at least one month following a single administration.

An additional feature shared by Group I+ and II is a particle consisting of:

- (a) an internal aqueous phase comprising a therapeutic protein, a buffer, and a salt, wherein the internal aqueous phase of the particle has a pH of 6.0-8.5, and
- (b) a polymer phase comprising a carboxy-terminated medium molecular weight PLG (such as PLG2A).

An additional feature shared by Group I+ and III is an internal aqueous phase comprising a therapeutic protein present at 0.025% to 5% w/w of the depot formulation, and an external aqueous phase comprising a surfactant present at 0.01 % to 1 % w/w of the depot formulation.

An additional feature shared by Group I+ is a depot formulation consisting essentially of:

- (i) an internal aqueous phase comprising:
 - (a) a toxin-based therapeutic protein present at 1.2% w/w of the depot formulation,
 - (b) a buffer comprising phosphate, citrate, acetate, histidine, or combinations thereof, and
 - (c) a salt selected from NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, (NH₄)₂CO₃, or combinations thereof,
 wherein the internal aqueous phase has a pH of 5.0-8.5;
 - (ii) a carboxy-terminated medium molecular weight PLG polymer-based solid/oil phase (such as PLG2A); and
 - (iii) an external aqueous phase comprising a PVA surfactant present at 0.01-0.1 % w/w of the depot formulation,
- wherein the depot formulation provides sustained release of the toxin-based therapeutic protein within effective levels for at least one month following a single administration.

—please see continuation on next extra sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/72253

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2011/0163469 A1 to Little et al. (hereinafter "Little") in view of US 2009/0263462 A1 to (King).

Little discloses a formulation (para [0014] "microparticle formulations") consisting essentially of:

(i) an internal aqueous phase comprising a therapeutic protein (para [0014] "an emulsion of an agent-bearing phase"; para [0038] "The agents being incorporated into the microparticles may be any therapeutic, diagnostic, or prophylactic agent. ... The agent may be a ... protein, peptide");

(ii) a polymer-based solid/oil phase (para [0014] "an immiscible solution ... containing a polymer (e.g., PLGA, poly(beta-amino ester), etc."); and

(iii) an external aqueous phase comprising a surfactant (para [0014] "a second phase containing a surfactant (e.g., polyvinyl alcohol (PVA)"; para [0034] "The second aqueous phase optionally includes a surfactant").

Little further teaches that delayed release from its formulations can be obtained by adjusting the amount of polymer added to the formulation (para [0076]), but does not specifically teach that the formulation is a depot formulation, wherein the depot formulation provides sustained release of the therapeutic protein within effective levels for at least one month following a single administration. However, King discloses a depot formulation (para [0013] "implantable drug depot") comprising a therapeutic agent (para [0013] "drug ... clonidine"), a polymer (para [0013] "biodegradable polymer"; para [0022] "poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)"), and a surfactant (para [0110] "polyvinyl alcohol (PVA)"), wherein the depot formulation provides sustained release of the therapeutic protein within effective levels for at least one month following a single administration (para [0013] "The drug depot is capable of releasing clonidine over a period of 5 to 135 days").

One of ordinary skill in the art would have found it obvious that the formulation of Little can be modified into a depot formulation for sustained release, as taught by King, since Little suggests the modification to obtain delayed release (para [0076]), and sustained release formulations would enable a therapeutic agent to be administered once for continual release thereby avoiding the inconvenience of having to re-administer the therapeutic agent several times to the subject.

Little further teaches a particle (para [0014] "microparticles") consisting of:

(a) an internal aqueous phase comprising a therapeutic protein, a buffer, and a salt (para [0014] "an emulsion of an agent-bearing phase"; para [0038] agent may be a "protein, peptide"; para [0053] "The agent to be incorporated in the microparticles using the inventive method is dissolved in an aqueous solution. The solution may contain ... buffers, salts"), and

(b) a polymer phase comprising a carboxy-terminated medium molecular weight PLG (such as PLG2A) (para [0014] "an immiscible solution ... containing a polymer (e.g., PLGA, poly(beta-amino ester), etc.)").

Although Little does not specifically teach wherein the internal aqueous phase of the particle has a pH of 6.0-8.5, this would have been obvious to one of ordinary skill in the art since Little does teach that an acid, base, or buffer can be added to the aqueous solution to maintain its neutral pH (pH 7) and enhance stability of the agent (para [0053] "In certain embodiments, an acid, base, or buffer is added to the solution. These other chemical compounds may enhance the stability of the agent(s) being incorporated into the microparticles. For example, when an acidic agent is being loaded into the microparticles, a basic compound such as NaOH, Mg(OH)₂, sodium acetate, etc. may be used to neutralize the acidic agent.").

King further teaches a therapeutic agent present at 0.025% to 5% w/w of the depot formulation (para [0215] "The formulations containing clonidine loads having 3.54 wt. %, 7.38 wt. %, 5.0 wt. %, or 3.8 wt. %"), and Little further teaches an external aqueous phase comprising a surfactant present at 0.01 % to 1 % w/w of the depot formulation (para [0062] "The concentration of the surfactant in the second aqueous phase may range from 0.001% to 10%").

Little further teaches a formulation consisting essentially of:

(i) an internal aqueous phase comprising:

(a) a toxin-based therapeutic protein (para [0042] "Prophylactic agents may be combined with .. adjuvants such as colera toxin"), (b) a buffer comprising phosphate, citrate, acetate, histidine, or combinations thereof (para [0053] "buffer ... sodium acetate"), and (c) a salt selected from NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, (NH₄)₂CO₃, or combinations thereof (para [0053] "a salt (e.g., NaCl, Na₂SO₄, NaI, KCl, CaCl₂, MgCl₂)").

(ii) a carboxy-terminated medium molecular weight PLG polymer-based solid/oil phase (such as PLG2A) (para [0054] "a synthetic polymer (e.g., poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)"); and

(iii) an external aqueous phase comprising a PVA surfactant present at 0.01-0.1 % w/w of the depot formulation (para [0014] "a second phase containing a surfactant (e.g., polyvinyl alcohol (PVA)"; para [0062] "The concentration of the surfactant in the second aqueous phase may range from 0.001% to 10%").

Although Little does not specifically teach wherein the internal aqueous phase of the particle has a pH of 5.0-8.5, this would have been obvious to one of ordinary skill in the art since Little does teach that an acid, base, or buffer can be added to the aqueous solution to maintain its neutral pH (pH 7) and enhance stability of the agent (para [0053] "In certain embodiments, an acid, base, or buffer is added to the solution. These other chemical compounds may enhance the stability of the agent(s) being incorporated into the microparticles. For example, when an acidic agent is being loaded into the microparticles, a basic compound such as NaOH, Mg(OH)₂, sodium acetate, etc. may be used to neutralize the acidic agent.").

Little does not teach that the toxin-based therapeutic protein is present at 1.2% w/w of the formulation. However, Little does teach that the primary emulsion, which contains the therapeutic protein, is combined with a far larger volume of the second aqueous phase, where the ratio of the primary emulsion to the secondary external aqueous phase is from 1:10 to 1:100. Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the toxin-based therapeutic protein is present in the formulation at very low levels, such as for example at 1.2% w/w of the formulation.

Little also does not teach a depot formulation, wherein the depot formulation provides sustained release of the toxin-based therapeutic protein within effective levels for at least one month following a single administration. However, King discloses a depot formulation (para [0013] "implantable drug depot") comprising a therapeutic agent (para [0013] "drug ... clonidine"), a polymer (para [0013] "biodegradable polymer"; para [0022] "poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)"), and a surfactant (para [0110] "polyvinyl alcohol (PVA)"), wherein the depot formulation provides sustained release of the therapeutic protein within effective levels for at least one month following a single administration (para [0013] "The drug depot is capable of releasing clonidine over a period of 5 to 135 days").

—please see continuation on next extra sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/72253

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

One of ordinary skill in the art would have found it obvious that the formulation of Little can be modified into a depot formulation for sustained release, as taught by King, since Little suggests the modification to obtain delayed release (para [0076]), and sustained release formulations would enable a therapeutic agent to be administered once for continual release thereby avoiding the inconvenience of having to re-administer the therapeutic agent several times to the subject.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+, II, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32
A 6 1 K	47/20	(2006.01)	A 6 1 K	47/20
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/19
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A

(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

(72)発明者 ショーン・ピー・アイアドナト
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州シアトル、テリー・アベニュー・ノース 2 1 9 番、スイート 3 0 0

(72)発明者 エルネスト・ジェイ・ムニョス
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州シアトル、テリー・アベニュー・ノース 2 1 9 番、スイート 3 0 0

(72)発明者 ジェイムズ・チェスコ
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州シアトル、テリー・アベニュー・ノース 2 1 9 番、スイート 3 0 0

(72)発明者 エリック・ジェイ・ターチャ
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州シアトル、テリー・アベニュー・ノース 2 1 9 番、スイート 3 0 0

F ターム (参考) 4C076 AA18 AA94 CC03 CC18 CC29 DD09E DD57E DD67 DD69 EE06E
EE06M EE16E EE23E EE24M FF15 FF31 FF32 FF61
4C084 AA02 AA03 BA01 BA19 BA23 CA59 MA22 MA44 NA12 ZB081
ZB082 ZB111 ZB112 ZC411 ZC412