

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6923528号
(P6923528)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年8月2日(2021.8.2)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 ZMDM

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 U

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

C 0 7 K 16/28 Z N A

請求項の数 13 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2018-532040 (P2018-532040)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月15日(2016.12.15)
 (65) 公表番号 特表2018-538309 (P2018-538309A)
 (43) 公表日 平成30年12月27日(2018.12.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/081286
 (87) 国際公開番号 W02017/103003
 (87) 国際公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)
 審査請求日 令和1年12月16日(2019.12.16)
 (31) 優先権主張番号 15200281.2
 (32) 優先日 平成27年12月15日(2015.12.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 16306537.8
 (32) 優先日 平成28年11月22日(2016.11.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 518210384
 オーセ イミュノセラピューティクス
 OSE IMMUNOTHERAPEUT
 ICS
 フランス、44200 ナント、ブルヴァ
 ール ベノニ ゴーリン、22
 22, boulevard Benon
 i Goullin, 44200 Na
 ntes, France
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (74) 代理人 100159385
 弁理士 甲斐 伸二
 (74) 代理人 100163407
 弁理士 金子 裕輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトへの投与のために処方された抗CD28ヒト化抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) C末端がペグ化された配列番号1の第1のタンパク質、及び

(ii) 配列番号2の第2のタンパク質

のヘテロ二量体からなる抗CD28Fab'抗体断片を含む、T細胞の免疫応答を阻害することによって改善又は予防されやすい病状の治療の為の医薬組成物であって、前記病状が、移植組織拒絶、慢性同種移植脈管症、移植片対宿主病、T-リンパ球媒介性自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化、炎症性疾患又はタイプ4過敏症であり、前記治療が、治療有効量の前記抗CD28Fab'抗体断片を該治療を必要とするヒト患者へ投与されることを含み、前記治療有効量が、1週間毎に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、若しくは6週間毎に一度、7週間毎に一度、8週間毎に一度、又は8週間以上毎に一度の投薬計画で0.05~1.5mg/kg体重の間である、医薬組成物。

【請求項2】

前記治療有効量が、1週間毎に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度の投薬計画で投与される0.05~0.5mg/kg体重の間である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記治療有効量が、1週間毎に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、又は5週間毎に一度の投与計画で投与される0.05~0.2mg/kg体重の間で

ある、請求項 1 又は請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記治療有効量が、 0.5 mg/kg については少なくとも 4 週間毎に一度、 1 mg/kg については少なくとも 8 週間毎に一度、そして 1 mg/kg 以上の量については 8 週間以上毎に一度の投薬計画で投与される $0.5 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 体重の間である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記治療有効量が、2 週間毎に一度の投薬計画で投与される $0.5 \pm 10\% \text{ mg/kg}$ 体重である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記治療有効量が、2 週間毎に一度の投薬計画で投与される 0.5 mg/kg 体重である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記治療有効量が、4 週間毎に一度の投薬計画で投与される $1.5 \pm 10\% \text{ mg/kg}$ 体重である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記治療有効量が、4 週間毎に一度の投薬計画で投与される 1.5 mg/kg 体重である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

(a) 前記治療有効量が、1 週間毎に一度の投薬計画で投与される $0.2 \pm 10\% \text{ mg/kg}$ 体重であるか、又は

(b) 前記治療有効量が、1 週間毎に一度の投薬計画で投与される 0.2 mg/kg 体重であるか、又は

(c) 前記治療有効量が、2 週間毎に一度の投薬計画で投与される $0.2 \pm 10\% \text{ mg/kg}$ 体重であるか、又は

(d) 前記治療有効量が、2 週間毎に一度の投薬計画で投与される 0.2 mg/kg 体重であるか、又は

(e) 前記治療有効量が、4 週間毎に一度の投薬計画で投与される $1 \pm 10\% \text{ mg/kg}$ 体重であるか、又は

(f) 前記治療有効量が、4 週間毎に一度の投薬計画で投与される 1 mg/kg 体重であるか、又は

(g) 前記治療有効量が、6 週間毎に一度の投薬計画で投与される $1.5 \pm 10\% \text{ mg/kg}$ 体重であるか、又は

(h) 前記治療有効量が、6 週間毎に一度の投薬計画で投与される 1.5 mg/kg 体重である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記治療有効量の抗 CD28 Fab' 抗体断片が、その二回の投与の間の期間にわたって少なくとも 80% の CD28 受容体占有率を誘導する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記病状が、自己免疫性脳脊髄炎、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎又はタイプ 1 糖尿病からなる群より選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記抗 CD28 Fab' 抗体断片が前記患者の静脈内、皮下、筋肉内若しくは局所に、又は髄膜内注射により投与される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含む注射器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

発明の分野

本出願は免疫療法の分野に属する。より明確には、本発明は、既に「F R 1 0 4」(Poirier et al., 2012)と記載されるペグ化されたヒト化抗C D 2 8 F a b '抗体断片のための新規で有利な投薬計画を提供する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

C D 2 8は有力なT細胞陽性共刺激分子である。F R 1 0 4は重鎖のC末端がペグ化されたヒト化一価抗C D 2 8 F a b '抗体断片である(WO 2011/101791, US 8,785,604 B2)。F R 1 0 4はC D 2 8 . 3と呼ばれるマウス抗体のヒトに適應させたものから由来する。この抗体はF a b 'の形式での、C D 8 0のC D 2 8への結合に対する強いアンタゴニスト活性及び標的エピトープが(スーパーアゴニズムの為に必須である事が示されている(Poirier et al., 2012a))C D 2 8のC ' ' D抗原性ループの外側にあるため抗原非依存性T細胞活性化(スーパーアゴニストと呼ばれるプロセス)を本来的に誘導できないことを基準として選択された(Vanhove et al., 2003)。

【 0 0 0 3 】

F R 1 0 4はヒト及びヒトでない霊長類のC D 2 8と結合し(しかしマウス、ラット、ウサギのC D 2 8にも、イヌのC D 2 8にも結合しない)、そしてC D 2 8とその補受容体であるC D 8 0 / C D 8 6との結合に拮抗する。C D 8 0 / C D 8 6補受容体は、それゆえ有力な陰性共刺激である細胞毒性T - リンパ球抗原4 (C T L A - 4)とプログラム細胞死1リガンド1 (P D L - 1)(これらは、エフェクターT細胞を阻害しT細胞調節性の機能抑制機能に必須である)と自由に相互作用し、F R 1 0 4の作用機序はそれ故二重である：

1) 直接様式では、F R 1 0 4はT細胞のC D 2 8 仲介シグナルをブロックし、
2) 間接様式では、F R 1 0 4はC T L A - 4 及び P D L - 1 仲介シグナルを促進する。
この作用機序は、C D 8 0 及び C D 8 6 に結合し、陽性及び陰性両方の共刺激分子の機能をブロックする(C D 2 8、C T L A - 4 若しくは P D L - 1 への接近をブロックすることによって)アパタセプト(登録商標オレンシア)若しくはベラタセプト(登録商標ヌロジックス)のような、T細胞の共刺激のブロックを目的とする既存の治療とは異なる。

【 0 0 0 4 】

一価の性質、F cドメインの欠如並びにスーパーアゴニスト抗体(例えばT G N 1 4 1 2)の標的エピトープの外側にある標的エピトープのため、F R 1 0 4は抗薬物抗体の存在下でさえもヒトのT細胞を刺激することができないアンタゴニスト抗体である(Poirier et al., 2012)。入手可能な臨床前データは、ヒト化マウスにおいて、インビボ及びトランスビボで、またヒトのようにT細胞は抗C D 2 8抗体スーパーアゴニストとの相互作用の後、サイトカインを放出する種である(Poirier et al., 2014)ヒヒにおいてインビボでヒトT細胞に対するアゴニスト及びスーパーアゴニストの特性の欠如を証明している。

【 0 0 0 5 】

F R 1 0 4はこれらの全ての状態でアンタゴニストにとどまっていた。たとえF R 1 0 4が二次抗体で覆われ、架橋されても、又は抗C D 3抗体の存在下でも、増殖もサイトカインの分泌も観測されなかった(Poirier et al., 2012)。逆に、ヒトP B M Cが抗C D 3抗体によって刺激された場合、F R 1 0 4は用量依存的にT細胞の増殖を阻害した。これらのアッセイにおいて、ポジティブコントロールとしての抗C D 2 8抗体スーパーアゴニストは一貫してヒトT細胞の増殖及び/又はサイトカインの放出を誘導した。

【 0 0 0 6 】

エフェクターT細胞へ向けられたその選択的な免疫抑制性の活性の為に、F R 1 0 4は先ずリウマチ性関節炎並びに移植(腎臓移植受容者及び幹細胞移植後の移植片対宿主病[G V H D])での使用について調べられる。無調節の自己免疫又は同種免疫反応を有する患者についてF R 1 0 4の直接期待される利益が存在し、それは、T細胞の免疫抑制の

10

20

30

40

50

効力の改善、及び免疫調節機構の保存に起因するT及びB細胞の病的応答の長期的な治療の制御から本質的になる。腎臓移植患者ではこれは早期の拒絶事象を減らし、長期転帰を改善するはずである。異質遺伝子型の造血幹細胞移植後の中程度から重度のGVHDで苦しむ患者のために、これはエフェクターT細胞の同種反応性を鈍くするはずである。リウマチ性関節炎で苦しむ患者のために、これは臨床上の症状の早期の改善並びに頻繁な再発の減少へと変えるはずである。有効な臨床前の評価は、霊長類の腎臓移植 (Poirier et al., 2015)、並びにヒト化マウス (Poirier et al., 2012) 及び霊長類 (Kean et al., 2014) のGVHD、並びに自己免疫性脳脊髄炎の実験モデル (Haanstra et al., 2015)、並びにヒト乾癬の霊長類モデルの皮膚炎症 (Poirier et al., 2015) (Poirier et al., Experimental Dermatol. 2015)、並びにリウマチ性関節炎のモデルである霊長類のコラーゲン誘導性関節炎 (Vierboom et al., 2015) における効力の証明を含む。

10

【0007】

機械論的には、FR104がCTLA-4依存様式での同種反応性を阻害することが証明され、このことにより理論上の作用機構は実際にインビボで機能しているのが確認されている (Poirier et al., 2012)。

【0008】

FR104はチャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞中で伝統的な組換え技術によって生産される。

これは、

(i) C末端がペグ化された配列番号1の第1のタンパク、及び

20

(ii) 配列番号2の第2のタンパク

からなるヒト化ペグ化Fab'抗体断片である。精製後、それは血中濃度半減期を増加させるためにポリエチレングリコール (PEG) 部分と化学的に結合させる。CH1ドメインのC末端はモノペグ化に適応するために設計された。PEG残基はマレイミド環を介してC末端のシステインと結合した2×20 kDaの二つの分岐である。全ての生産、精製そしてガラス瓶に入れる過程はGMP条件下で行われた。

【0009】

Poirierら (2012) は、プラズモン共鳴分析によって、FR104のCD28との解離定数がおよそ4.6 nMであることを示した。推定最小薬理作用量 (MABEL) の計算、並びにFR104のファーストインヒューマン (FIH) 臨床試験のための投与量の選択はPoirierら (2012) によって公開されたデータに基づいた。

30

【発明の概要】

【0010】

下記の実験部分に記載されているように、臨床試験の第一実験によって得られたデータはとても驚くべきもので、発明者は結論として真の K_D 値はインビトロで測定された4.6 nMの値よりも少なくとも10倍低いと導いた。

【0011】

発明者は、これらの調査に従って、得られたPKと受容体占有率 (RO) データをとらえるための薬物動態 / 標的関与 (PK / TE) モデルを再検討した。この再検討モデルに基づいて：

40

- 0.05 mg / kg の投与量は2 - 3週間の間80%以上の平均RO%を達し得、
- 0.2 mg / kg の投与量は4 - 5週間の間80%以上の平均RO%を達し得る。

【0012】

したがって本発明は、治療を必要とするヒト患者へのFR104の治療有効量の投与によるT細胞の免疫応答の阻害により、改善、若しくは予防されやすい病状を治療する為の、前記FR104の治療有効量が週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度の投薬計画で0.05 ~ 1.5 mg / kg 体重の間である、FR104の使用に関する。これらの投与は長い期間 (数ヶ月から数年) の間行うことも、又は1度若しくは2, 3度の投与後終了することもできる。それらはしばらくの間 (2, 3ヶ月から数年) 中断し、ヒト患者の状態が新しい治療を正当化する

50

ならば再開することもできる。

【0013】

本発明は、

(i) C末端がペグ化された配列番号1の第1のタンパク、及び

(ii) 配列番号2の第2のタンパク

のヘテロ二量体からなり、

T細胞の免疫応答の阻害によって改善あるいは予防されやすい病状の治療に用いられる抗CD28Fab'抗体断片であって、治療有効量の前記抗CD28Fab'抗体断片が治療を必要とする患者へ投与され、前記抗CD28Fab'抗体断片の治療有効量が週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度、7週間毎に一度、8週間毎に一度、又は8週間以上の投薬計画で、0.05~1.5mg/kg体重の間である、抗CD28Fab'抗体断片を提供する。いくつかの実施形態では、治療有効量は週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度の投薬計画で0.05~0.5mg/kg体重以下で投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量は週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度の投薬計画で0.05~0.2mg/kg体重で投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量は0.5mg/kgについては少なくとも4週間毎に一度、1mg/kgについては少なくとも8週間毎に一度、そして1mg/kg以上の量については8週間以上に一度、0.5~1.5mg/kg体重の間での投薬計画で投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量の抗CD28Fab'抗体断片が前記抗CD28Fab'抗体断片の二回の投与の間の期間にわたって少なくとも80%のCD28受容体占有率を誘導する。いくつかの実施形態では、T細胞の免疫応答の阻害によって改善あるいは予防されやすい病状は前記患者の移植臓器、組織若しくは細胞の機能不全、T-リンパ球媒介の自己免疫疾患、アテローム性の動脈硬化若しくは炎症性の疾患である。いくつかの実施形態では、T細胞の免疫応答の阻害によって改善あるいは予防されやすい病状は腎臓移植拒絶反応、慢性同種移植脈管症、移植片対宿主病、自己免疫性脳脊髄炎、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、アテローム性の動脈硬化、タイプ1糖尿病、又はタイプ4過敏症である。いくつかの実施形態では、抗CD28Fab'抗体断片は前記患者の静脈内、皮下、筋肉内、若しくは局所に、または髄膜内注射により投与される。

【0014】

本発明の別の面は、治療を必要とするヒト患者におけるT細胞の免疫応答の阻害のための医薬組成物であり、FR104を3から120mgの間の量で含み、好ましくは一投薬あたり35mg以下であり、1つ又はより多くの医薬上許容できる賦形剤をともに含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は3から14mgの間の前記抗CD28Fab'抗体断片を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は静脈内、皮下、筋肉内、局所又は髄膜内投与に適する。いくつかの実施形態では、医薬組成物はヒト組換えヒアルロニダーゼを含む。

【0015】

上記医薬組成物を含む注射器もまた本発明の一部である。注射器は皮下使用のために適合できる。

本発明は毎月の投薬量のFR104を含み、FR104の各投薬量が3から120mgであるキットにもまた属する。

【0016】

図の説明

図1: FR104の薬物動態の研究とCD28受容体占有率。A、次に記す異なるFR104濃度を受けたボランティアの血清中のFR104濃度の時間的経過: グループ1(黒円)は0.005mg/kgを受けた。グループ2(黒四角)は0.05mg/kgを受けた。グループ3(黒上向きの三角)は0.2mg/kgを受け、グループ4(黒下向きの三角)0.5mg/kgを受けた。B、FR104を受けたそれぞれのグループ(上

10

20

30

40

50

記参照)のそれぞれのボランティアの受容体占有率の時間的経過。

図2: CD28受容体占有率の予測値対観測値。A、インピトロで計算したKdを用いて決定した、FR104の各濃度について20週の時間的経過にわたってあらかじめ予測したROの割合。B、Kdの再計算に基づいて修正したROの予測した割合とROの観測された濃度との時間的経過の比較。

図3: FR104の注入後の受容体の発現。FR104を受けた各グループの、ボランティアの血清中のCD28発現は経時的にフローサイトメトリーによって分析された。グループ1(黒円)は0.005mg/kgを受けた。グループ2(黒四角)は0.05mg/kgを受けた。グループ3(黒上向きの三角)は0.2mg/kgを受け、グループ4(黒下向きの三角)0.5mg/kgを受けた。

10

図4: 抗KLH(IgG)抗体測定。プラセボ、0.02mg/kg、0.2mg/kg、0.5mg/kg又は1.5mg/kgのFR104を受けた5つの異なるグループの最初の注入から15日後のボランティアの血清中の抗KLH抗体の割合。この割合は血清中の1日目(最初の注入)と15日との間での血清中の抗体濃度の比を表す。

図5: 薬物動態と薬力学のデータ。A、投薬前から実験の終わりまでの平均血清FR104濃度±SEM(セミログスケール)。示した治療グループは: 上昇量の単回投薬(黒塗り記号)、上昇量の単回投薬+KLH免疫(白抜き記号)、上昇量の複数回投薬(MAD、陰付き記号)である。LLOQ: 定量下限。N=治療グループ毎に3-5人の被検者である。B、投薬前から実験の終わりまでのAに示したFR104治療グループの平均CD28受容体占有率±SEM。N=治療グループ毎に3-5人の被検者である。プラセボを投与した被検者の受容体占有率の評価は0から5%の範囲のバックグラウンドシグナルを生じた。

20

図6: 安定化した全血試料についてのCD28発現レベル、Tリンパ球部分集団の頻度並びに活性化したT細胞の頻度のフローサイトメトリー分析。T細胞の部分集団は次のCD45+CD3+細胞においてゲーティングストラテジーを使うことによって定義された。: ナチュラルTreg(nTreg): CD25+CD127ローCD4+; 活性化は: CD69+又はCD25+; 記憶T細胞: CD45RO+; ナイブ: CD45RO-CCR7+; セントラルメモリ(CM): CD45RO+CCR7; エフェクターメモリ(EM): CD45RO-CCR7-; TEMRA: CD45RO-CCR7-。記号は図1Aで定義されたグループを参照。加えて

30

★

線はプールしたプラセボ被検者(n=12)である。データは平均±SEMである。

図7: 投薬前から実験の終わりまでのFR104投与被検者及びプラセボ投与被検者の血清IFN-、TNF-、IL-6、IL-8、IL-10サイトカイン。点線: 定量下限。データは平均値±SEM。SAD: 上昇量の単回投薬。SAD+KLH、KLHで免疫された上昇量の単回投薬を受けた被検者。MAD: 上昇量の複数回投薬。記号は図1Aで定義されたグループを参照。加えて

★

線はSAD(n=6)、SAD+KLH(n=8)、MAD(n=4)グループ中のプラセボ被検者である。他の評価されたサイトカイン(IL-12p70、IL-1、IL-2、IL-4)は全ての標本が陰性だった(データ示さず)。

40

図8: 全血液培養物(TruCulture 登録商標)中でのSEB+LPSによる血液細胞のエキソピボ刺激。A、ベースラインの血液試料はSEB+LPSで刺激されず、又は刺激されて培養状態で24h維持された。血漿中のサイトカインはその後、ELISA法によって評価された。点は個々の被検者を表す。B、示した投薬レベルのFR104を受ける上昇量の単回投薬グループ(KLH刺激あり若しくはなし)において示した時点で抜き取ったSEB+LPS刺激された血液試料のIL-2分泌の測定。本研究で試験され、ベースラインでの刺激への十分な応答(>100pg/ml)を示した提供者の培養物のみを分析に含ませた: プラセボ(n=9)、0.02mg/kg(n=5)、0.20mg/kg(n=9)、0.50mg/kg(n=9)及び1.50mg/kg(n=9)及び

50

n = 3)。データはT 0時点に対して規格化した平均IL - 2濃度、±SEMである。* : p < 0.05; **** : p < 0.0001である。

図9：治療グループによる経時的な抗KLH IgG (ng/mL)レベル。血清試料は示された時点で抜き取り、抗KLH ELISAによって評価した。データは平均±SEMを意味する。点線：定量下限。

図10：投薬前から実験の終わりまでのEBV状態を追跡する。EBVウイルス量を、示された時点でPCRにより血液中で評価した。EBVカプシド抗原(VCA)に対するIgM抗体もまた血清中で評価して抗EBV免疫反応性を測定した。データは平均±SEM。点線：定量下限。

【図面の簡単な説明】

10

【0017】

【図1】：FR104の薬物動態の研究とCD28受容体占有率。

【図2】：CD28受容体占有率の予測値対観測値。

【図3】：FR104の注入後の受容体の発現。

【図4】：抗KLH (IgG)抗体測定。プラセボ、0.02mg/kg、0.2mg/kg、0.5mg/kg又は1.5mg/kgのFR104を受けた5つの異なるグループの最初の注入から15日後のボランティアの血清中の抗KLH抗体の割合。

【図5】：薬物動態と薬力学のデータ。

【図6】：安定化した全血試料についてのCD28発現レベル、Tリンパ球部分集団の頻度並びに活性化したT細胞の頻度のフローサイトメトリー分析。

20

【図7】：投薬前から実験の終わりまでのFR104投与被検者及びプラセボ投与被検者中の血清IFN-、TNF-、IL-6、IL-8、IL-10サイトカイン。

【図8】：全血液培養物(TruCulture 登録商標)中でのSEB+LPSによる血液細胞のエキソピボ刺激。

【図9】：治療グループによる経時的な抗KLH IgG (ng/mL)レベル。

【図10】：投薬前から実験の終わりまでのEBV状態を追跡する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

好ましい実施形態の詳細な説明

本文中、次の様に定義した。

30

FR104

「FR104」は

(i) C末端がペグ化された配列番号1の第1のタンパク、及び

(ii) 配列番号2の第2のタンパク

のヘテロ二量体からなる抗CD28Fab'抗体断片を示す。

特定の実施形態によれば、FR104は

(i) C末端がペグ化された配列番号3の第1のタンパク、及び

(ii) 配列番号4の第2のタンパク

のヘテロ二量体からなる抗CD28Fab'抗体断片である。例えば、二つに分岐した2×20kDaのPEGが、マレイミド環を介してCH1ドメインC末端のシステインと結合し得る。

40

【0019】

治療

ここで使われる「治療する(treat又はtreating)」及び、「治療(treatment又はtreating)」という用語は、病気の進行、重症度、並びに/又は羅病期間の軽減又は改善をいう。例えば、リウマチ性関節炎のような病理では、1つ又はより多くのリウマチ性関節炎の症状の軽減は治療として考えられる。

他の定義は必要ときに下記に記す。

【0020】

本発明の第1の面は、T細胞の免疫応答の阻害によって改善あるいは予防されやすい病

50

状の治療におけるFR104の使用であって、治療有効量の前記抗CD28Fab'抗体断片が治療を必要とするヒト患者へ投与され、そして抗CD28Fab'抗体断片の治療有効量が、週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度、7週間毎に一度、8週間毎に一度、9週間毎に一度、又は9週間以上に一度の投薬計画で、0.05~1.5mg/kg体重の間である、FR104の使用である。

【0021】

治療を必要とするヒト患者におけるT細胞免疫応答の阻害方法もまた本発明の一部である。この方法によると、治療有効量のFR104が患者に投与され、前記治療有効量は週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度、7週間毎に一度、8週間毎に一度、9週間毎に一度、又は9週間以上に一度の投薬計画で、0.05~1.5mg/kg体重の間である。

【0022】

上記のとおり、本発明による治療は、患者の状態に応じて、長期間にわたって投与され（数ヶ月から数年）、又は1度若しくは2、3度の投与後に止められ得る。治療はしばらくの間（2、3月若しくは2、3年）中断し、患者の状態がFR104のさらなる投与を正当化するならば再開し得る。本発明の特定の実施形態によると、治療有効量は、週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度の0.05~0.5mg/kg体重以下の間の投薬計画で投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量は0.05~0.5mg/kg体重の間であり、週に一度の投薬計画で投与され、例えば0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg（任意に±10%）、0.4mg/kg（任意に±10%）、0.3mg/kg（任意に±10%）、又は0.25mg/kg（任意に±10%）である。いくつかの実施形態では、治療有効量は0.05~0.5mg/kg体重の間であり、2週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg（任意に±10%）、0.4mg/kg（任意に±10%）、0.3mg/kg（任意に±10%）、又は0.25mg/kg（任意に±10%）である。いくつかの実施形態では、治療有効量は0.05~0.5mg/kg体重の間であり、3週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg（任意に±10%）、0.4mg/kg（任意に±10%）、0.3mg/kg（任意に±10%）、又は0.25mg/kg（任意に±10%）である。いくつかの実施形態では、治療有効量は0.05~0.5mg/kg体重の間であり、4週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg（任意に±10%）、0.4mg/kg（任意に±10%）、0.3mg/kg（任意に±10%）、又は0.25mg/kg（任意に±10%）である。いくつかの実施形態では、治療有効量は0.05~0.5mg/kg体重の間であり、5週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg（任意に±10%）、0.4mg/kg（任意に±10%）、0.3mg/kg（任意に±10%）、又は0.25mg/kg（任意に±10%）である。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、治療有効量は $0.05 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、6週間毎に一度、例えば $0.1 - 0.45 \text{ mg/kg}$ 、 $0.15 - 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.2 - 0.35 \text{ mg/kg}$ 、 $0.25 - 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 - 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 - 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 0.5 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.4 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.3 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、又は 0.25 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。

【0023】

本発明の別の特定の実施形態によると、治療有効量は、週に一度、2週間毎に一度、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、 $0.05 \sim 0.2 \text{ g/kg}$ 体重の間の投薬計画で投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量は $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、週に一度の投薬計画で投与され、例えば $0.05 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 0.05 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.1 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.15 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、又は 0.2 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。いくつかの実施形態では、治療有効量は $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、2週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば $0.05 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 0.05 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.1 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.15 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、又は 0.2 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。いくつかの実施形態では、治療有効量は $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、3週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば $0.05 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 0.05 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.1 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.15 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、又は 0.2 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。いくつかの実施形態では、治療有効量は $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、4週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば $0.05 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 0.05 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.1 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.15 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、又は 0.2 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。いくつかの実施形態では、治療有効量は $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、5週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば $0.05 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.1 - 0.15 \text{ mg/kg}$ 、 0.05 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.1 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.15 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、又は 0.2 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。

【0024】

$0.5 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 体重の間の量が投与されるとき、薬物摂取の頻度は好ましく減少する。これらの投薬量では、月に一度の投薬又はそれ以下の頻度の投薬で有利に規定される。本発明の更に別の特定の実施形態によると、治療有効量は、3週間毎に一度、4週間毎に一度、5週間毎に一度、又は6週間毎に一度、7週間毎に一度、8週間毎に一度、9週間毎に一度、又は9週間以上に一度、 $0.5 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 体重の間の投薬計画で投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量は $0.5 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 体重の間であり、4週間毎に一度の投薬計画で投与され、例えば $0.6 - 1.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.7 - 1.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.8 - 1.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.9 - 1.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 1.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 1.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 1.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 1.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 1.0 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 0.9 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 0.8 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 0.7 \text{ mg/kg}$ 、 $0.5 - 0.6 \text{ mg/kg}$ 、 0.5 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.6 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.7 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.8 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 0.9 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 1.0 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 1.1 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 1.2 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 1.3 mg/kg (任意に $\pm 10\%$)、 1.4 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) 又は 1.5 mg/kg (任意に $\pm 10\%$) である。いくつかの実施形態では、治療有効量は5週間毎に一度、 $0.5 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ 体重の間

10

20

30

40

50

50

0 %)、1 . 1 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 2 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 3 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 4 m g / k g (任意に ± 1 0 %) 又は 1 . 5 m g / k g (任意に ± 1 0 %) である。いくつかの実施形態では、治療有効量は9週間以上毎に一度、0 . 5 ~ 1 . 5 m g / k g 体重の間での投薬計画で投与され、例えば0 . 6 - 1 . 4 m g / k g、0 . 7 - 1 . 3 m g / k g、0 . 8 - 1 . 2 m g / k g、0 . 9 - 1 . 1 m g / k g、0 . 5 - 1 . 4 m g / k g、0 . 5 - 1 . 3 m g / k g、0 . 5 - 1 . 2 m g / k g、0 . 5 - 1 . 1 m g / k g、0 . 5 - 1 . 0 m g / k g、0 . 5 - 0 . 9 m g / k g、0 . 5 - 0 . 8 m g / k g、0 . 5 - 0 . 7 m g / k g、0 . 5 - 0 . 6 m g / k g、0 . 5 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、0 . 6 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、0 . 7 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、0 . 8 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、0 . 9 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 0 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 1 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 2 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 3 m g / k g (任意に ± 1 0 %)、1 . 4 m g / k g (任意に ± 1 0 %) 又は 1 . 5 m g / k g (任意に ± 1 0 %) である。

【 0 0 2 5 】

インビトロデータから想定する治療投与量が、0 . 5 m g / k g ~ 8 . 0 m g / k g の間であったことに留意することが重要である。下記実験部分に開示されているように、ファーストインヒューマンフェーズ1研究の第1の実験から得られたデータは、このファーストインヒューマン研究の開始の前に入手可能であったデータに基づいて計算した薬物動態 / 標的関与 (P K / T E) モデルと一致しなかった。インビボのデータは、効果が0 . 0 5 m g / k g 程度の低い投与量で観測されることを示し、このことは全く予想しないものであった。このことが発明者に薬物動態 / 標的関与 (P K / T E) モデルを修正させ、ヒト C D 2 8 に関する F R 1 0 4 の親和性を再考 (K_D 値は 4 . 6 n M ではなく約 0 . 3 n M である) させる。結果として、現在考えられる F R 1 0 4 の最大投与量は 1 . 5 m g / k g であり、0 . 0 5 m g / k g 程度の低い投与量は治療的に効果的であると考えられる。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、F R 1 0 4 投与量は 1 2 0 ~ 2 4 0 時間の間の、例えば 1 3 0 ~ 2 3 0 時間、1 4 0 ~ 2 2 0 時間の間の、又は 1 5 0 ~ 2 1 0 時間の間のヒトにおける半減期を持つ。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、ヒト患者への F R 1 0 4 の投与後の I F N γ、T N F α 並びに I L - 8 血清レベルは 5 0 0 0 p g / m l より下であり、例えば 4 0 0 0 p g / m l より下であり、3 0 0 0 p g / m l より下であり、2 0 0 0 p g / m l より下であり、1 0 0 0 p g / m l より下であり、8 0 0 p g / m l より下であり、6 0 0 p g / m l より下であり、4 0 0 p g / m l より下であり、又は 2 0 0 p g / m l より下である。

【 0 0 2 8 】

よって、本発明に従う投薬計画は、以下に開示されたファーストインヒューマン研究の前に利用できたデータから予想されたものとは、大幅に異なる。投薬計画のこの変化は、例えば治療費の減少、副作用の減少、投与頻度の減少並びに有効成分として F R 1 0 4 を含む医薬組成物を製剤化するための難度の低下などいくつかの利点を有する。実際、多量の医薬溶液 (2 m l 以上) を被検者に、特に皮下経路を通して投与することは、常には可能又は好都合ではない。

【 0 0 2 9 】

現在、F R 1 0 4 で医薬上効果的な治療を得るためには少なくとも 8 0 % の受容体占有率が必要であると考えられている。本発明の好ましい実施形態によると、被検者に投与される F R 1 0 4 量は二度の前記抗 C D 2 8 F a b ' 抗体断片の投与の間の期間にわたって、少なくとも 8 0 % の C D 2 8 受容体占有率を誘導する。本発明による高い投与量 (すなわち投与毎に 0 . 5 から 1 . 5 m g / k g) の投与は下記に開示されたフェーズ I 研究の開始前に入手できたインビトロデータから予想され得た。しかし、8 0 % の C D 2 8 受容

体占有率を得るためには、当業者は2週間毎に一度の頻度で0.5mg/kgを投与するが(表2を参照)、本発明によると、同じ投与量は4週間毎に一度又はそれ以下の頻度で投与し得る。さらに下記の表2を参照すると、1mg/kgの投与量を使用すると月毎の投与を必要とすることは明白であるが、本発明の枠組みでは、8週間毎の1mg/kgの投与で十分である。同じ事が1.5mg/kgの投与量についてもいえ、最小頻度は5週間毎に一度から2ヶ月又はそれ以上に一度の頻度に変化する。もちろん、当業者は、過度の高い投与量を投与することなしに、二回の投与の間にわたって少なくとも80%のCD28受容体占有率を得るために、投与頻度を投与する薬物量に適應させる。単位投与量を高い量で投与すればするほど、投与の頻度は低くなる。0.5から1mg/kgの投与量が、一月に一度から二月に一度の頻度で投与される。

10

【0030】

本発明に従うFR104での治療によるT細胞免疫応答の阻害によって改善あるいは予防されやすい病状の例は、移植臓器、組織又は細胞の機能不全(移植臓器の拒絶反応、特に腎臓移植拒絶反応、慢性同種移植脈管症、及び移植片対宿主病を含む)、T-リンパ球媒介の自己免疫疾患、アテローム性の動脈硬化、炎症性の疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病のような炎症性の腸疾患を含む)、並びにタイプ4過敏症である。本発明によって治療し得る自己免疫疾患は、特に自己免疫性脳脊髄炎、リウマチ性関節炎、乾癬、タイプ1糖尿病、並びに多発性硬化症を挙げることができる。さらなる病状は、乾癬性関節炎である。他の自己免疫疾患も本発明によって有利に治療し得る；これは、水疱性類天疱瘡、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、強直性脊椎症、抗リン脂質抗体症候群(APS)、自己免疫性卵巣炎、セリアック病、妊娠性類天疱瘡、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギランバレー症候群(GBS)、急性炎症性脱髄性多発神経障害、急性特発性多発性神経根炎、急性特発性多発性神経炎若しくはランドリー上行性麻痺とも呼ばれる)、橋本病、特発性血小板減少性紫斑病、川崎病、エリテマトーデス、重症筋無力症、オブソクロヌス・ミオクロヌス症候群(OMS)、視神経炎、オード甲状腺炎、天疱瘡、ライター症候群、シェーグレン症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎(巨細胞性動脈炎としても知られる)、並びにウェゲナー肉芽腫症についてもそうである。自己免疫性ぶどう膜炎並びに円形脱毛症はさらに治療し得る自己免疫疾患である。

20

【0031】

既に言及しているとおり、発明による新規投薬計画は治療施術を容易にするために特に有利である。モノクローナル抗体は通常、数年にわたる長期の治療期間にわたって静脈内へ投与される。薬の皮下投与は、例えば真性糖尿病のようないくつかの慢性病に確立された選択療法であり、リウマチ性関節炎のための新たな投与経路である(Weinblatt et al., 2013)(Melichar et al., 2014)。モノクローナル抗体の皮下アプローチの主な障害は、投与量の制限である。痛みなく注入できる量の上限はおおよそ2mlだけである。より多い量の注入は患者への痛みと不快感を引き起こし得る。患者に注入される溶液量の制限のため、高濃度のモノクローナル抗体溶液を調整しうる。しかし、これは医薬製剤化に特定の要求を課す(Bowen et al., 2012)。

30

【0032】

インビトロデータに基づいて前もって規定した治療投薬量では皮下注入は可能ではなかった。本発明によるFR104の治療投薬量は、この投薬経路、例えば、乾癬又はリウマチ性関節炎のような病状を治療するための投薬経路を考えることで十分に小さな液量(おおよそ2ml)に含ませ得る。

40

【0033】

本発明の特定の実施形態によると、FR104の治療有効量は投与を必要とする被検者に、静脈内、皮下、筋肉内、局所又は髄膜内注射を経て投与される。

注入部位からの抗体の拡散は、特に、抗体が皮下注入を経て投与されるときに問題となり得る。主な進歩はヒアルロニダーゼの導入物と関連づけられている。ヒアルロン分子は、容積が細胞外マトリックスに広がるのを防ぐ重要な機能的バリアの構成要素である。ヒアルロンは常に更新されるので、一過性の攪乱は深刻な機能の問題をもたらさない。

50

組換えヒトヒアルロニダーゼは免疫原性の問題を回避する (Shpilberg and Jackisch, 2013)。組換えヒトヒアルロニダーゼ (rHuPH20、Hylenex登録商標) は他の物質の皮下投与を促すアジュバントとしてFDAによって認可されている。本発明の特定の実施形態によると、投与を必要とするヒト患者に投与される組成物は、FR104に加えて、組換えヒトヒアルロニダーゼを含む。

【0034】

本発明は、それを必要とするヒト患者のT細胞の免疫応答を阻害するための医薬組成物に関し、該組成物はFR104を3~120mg、例えば3~100mg、3~80mg、3~60mg、又は3~40mg、好ましくは35mg以下、例えば30mg以下、25mg以下、20mg以下、例えば3~14mgの間の量で、1つ又はより多くの医薬上許容できる賦形剤と共に含む。本発明による医薬組成物は、医者によって決められた頻度 (しかし、1週間に一度より高くはない) でそれを必要とする被検者へ投与しうる単位投薬量としての使用が予定されている。例えば、本発明による医薬組成物は月に一度の単位投薬量である。正確な投与量並びに臨床的状況 (患者の体重及び全身の状態、疾患の性質など) に依存して、本発明による医薬組成物は週に一度、又は2, 3, 4, 5若しくは6週毎に一度投与され得る。本発明による医薬組成物はFR104を35mg若しくはそれ以上、すなわち、35mg~120mg、例えば35~60mg、35~80mg、35mg~100mg、40~120mg、60~120mg、80~120mg、又は100~120mg含むとき、それは好ましくは3, 4, 5若しくは6週毎に一度投与される。

10

20

【0035】

本発明による医薬組成物は静脈内、皮下、筋肉内、局所又は髄膜内投与に適するように製剤化され得る。上記に言及されているように、本発明による医薬組成物は組換えヒトヒアルロニダーゼを、特に皮下投与用に製剤化されているときに含み得る。

本発明の別の対象は、複数回の投薬量、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15回又はより多くの回の投薬量のFR104を含むキットであり、前記各投薬量が3~120mgのFR104量、例えば3~100mg、3~80mg、3~60mg、又は3~40mg、好ましくは35mg以下、例えば30mg以下、25mg以下、20mg以下、例えば3~14mgの間である。キットにおいてこれらの投薬量は週に一度の投薬量として、又は2、3、4、5、又は6週間毎に摂取する投薬量として記載されうる。

30

本発明の特定の実施形態によると、それらは月に一度の投薬量である。上記に記載されたキットと医薬組成物の特定の実施形態によると、医薬組成物又はキット中に存在する各投薬量は、注射器中、または静脈内、皮下、筋肉内、若しくは髄膜内経路を通しての投与を可能にする他の任意のデバイス中に含まれる。

【0036】

本発明のその他の特徴もまた、本発明の枠組み内で実行され、必要な実験的サポートを提供する (が、本発明の範囲を制限しない) 生物学的アッセイ及びファーストインヒューマン研究に従う説明の間で明白になる。

【実施例】

【0037】

実施例1: ヒトにおけるFR104の薬物動力学、薬力学、並びに生成物代謝

この研究を始める前は、ヒトにおけるFR104の薬物動力学、薬力学、並びに生成物代謝について利用可能なデータはなかった。

けれども、ならびに推定最小薬理作用量 (MABEL) を決定するために、カニクイザル及びヒヒのPK及びPDの研究データを集めてプールし、ポピュレーション PK/PDによって分析しヒトのための非比例的にスケールアップした。ヒヒ及びカニクイザルのPK及びROデータは一貫しており、それゆえ一緒にモデル化した。

【0038】

MABELと臨床上の投薬レベルの評価

推定最小薬理作用量 (MABEL) はFR104のファーストインヒューマン試験にお

40

50

ける最初の投薬レベルとして選ばれた (EMA 2007: Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-humans clinical trials with investigational medicinal products, EMEA/CHMP/SWP/28367/07; FDA 2005: Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers)。

推定最小薬理作用量 (MABEL) は最大薬理学活性のおよそ 10 から 20 %を生じる投薬量として通常見積られ、通常インビトロデータに基づいて見積られる。ヒヒで観測された非常に明確なインビボ用量応答を示した FR 104 のインビボデータが用いられた。

【0039】

モデルの開発

10

FR 104 の異なる量を与えられたヒトについて CD 28 受容体占有率を経時的にシミュレートするために、これまでにカニクイザルとヒヒの研究で得られた全ての PK 並びに PD データ (ヒヒ: 0.1、1、10 並びに 20 mg/kg の単回投薬 IV; カニクイザル: 1、2、7 mg/kg の単回投薬 IV; カニクイザル: 20、50、100 mg/kg の複数回投薬 IV) とポピュレーションアプローチを用いて分析した。

【0040】

以下の面が考慮された:

構成的な薬物動態 / 標的関与 (PK / TE) モデルはヒトへの効果的な投薬計画を予測するために使われる。

インビボで 10 %の RO を生じる、薬物濃度の信頼できる換算を可能にするには不十分な、低量レベル及び低い薬物濃度での PK 及び RO データ。

20

より高い信頼モデリング及びシミュレーションを可能にするに十分な、より高い薬物濃度についての PK 及び RO データ。

【0041】

mAb 標的相互作用の K_d に基づいた最大受容体占有率を計算するための式は MABEL を評価するために使われた (Duff, 2006)。mAb ターゲット相互作用の K_d に基づいた最大受容体占有率を計算するために使われた次の式は MABEL を評価するために使われた (Duff, 2006)。

【0042】

【数 1】

30

$$RO (\%) = \frac{[投薬量 / V_1]}{K_D + [投薬量 / V_1]} \times 100$$

【0043】

異なる投薬レベルで計算した RO と下記表に示す。

【表 1】

投薬量 (μg/kg)	初期 RO (%)
1.3	7
3	15
5	23
10	37
15	47
20	54
30	64
50	75
500	97

10

表 1：推定の初期 CD 28 RO %

【 0 0 4 4 】

従来のインビトロ K_d 値 (4 . 6 n M) 並びにヒト血漿量 (V_1 、 0 . 0 4 L / k g) が使われた。しかし、インビボ K_d はインビトロ K_d よりも低くなり得る。標的介在性の薬物動態 (T M D D) モデルは F R 1 0 4 についての $V_1 = 0 . 0 4 5 L / k g$ と見積もった (下記参照)。

20

次の主要モデル仮説はこの P K / T E T M D D 分析のために用いられた：

- ・準平衡近似は F R 1 0 4 と C D 2 8 の間の相互作用の記述に適している。
- ・ F R 1 0 4 治療は C D 2 8 の合成及び分解の速度を変化させず、 C D 2 8 発現細胞の消耗ももたらさず、 F R 1 0 4 の結合は C D 2 8 の内在化速度を変えない ($k_{deg} = k_{int}$)。

最大フローサイトメトリーシグナルは F R 1 0 4 の注入後変化しなかった。

F R 1 0 4 投与後に末梢のリンパ球又は C D 4 + T 細胞は低下しなかった。

- ・ C D 2 8 受容体レベルは、提供され、その後モデルフィッティングにおいて固定された (R 0) 情報に基づいて計算された。

30

- ・ C D 2 8 は C D 3 + C D 4 + T 細胞中でのみ発現すると仮定され、他の細胞タイプでの発現は考えない。

- ・ 標的に関連したパラメータ (K_d 、 K_{deg} 、 R 0) はヒヒとカニサルの間で同じであると仮定した。

- ・ 動物の個々の体重は、また関連パラメータについて、 0 . 7 5 (C L 及び Q について) 及び 1 (V_1 及び V_2 について) の指数を有する共変量として扱われる。

【 0 0 4 5 】

血液量に対して標準化した時のサルにおける C D 2 8 受容体濃度の理論上の計算値は次のデータに基づいた。

- ・ 研究報告中、 C D 3 + C D 4 + 細胞の細胞毎の受容体数は 2 0 0 0 0 から 6 0 0 0 0 の範囲である。

40

- ・ モデルフィッティングでは、受容体濃度は 0 . 4 n M に固定した。

- ・ その他の受容体濃度 (例えば 0 . 2 n M) は固定され、 K_{deg} 推定には逆比例で影響する一方、特定の範囲でモデルフィッティングに対する影響は少なかった。

【 0 0 4 6 】

次の式が用いられ、受容体占有率についての正確なフィッティングをもたらした (図 2 A)。

(式 2)

抗原濃度 (n M) = (細胞毎の受容体数 × 血液細胞密度 × 10^9) / ($6 . 0 2 3 \times 10^{23}$)

50

ヒトにおける F R 1 0 4 R O の予測

P K における関連パラメータはアロメトリックスケーリングを用いてサルからヒトへスケーリングした（下記参照）。指数は分配量のためには 1 に等しいと仮定した。指数は全身 C L 並びに分配 C L のためには 0 . 7 5 に等しいと仮定した（Q）。ヒトの平均体重 7 0 k g、並びにカニクイザルの平均体重 2 . 9 k g は単回及び複数回の投薬研究におけるサルの平均体重に基づいて使われた。

・ C D 2 8 の K d e g 並びに K d（K o n 及び K o f f に影響される）はヒトと動物種間で同じであると仮定した。

・ C D 3 + C D 4 + T 細胞数（体重での規格化後）はヒトとサルとの間で同程度であった。

・ C D 2 8 受容体密度はカニクイザル / ヒヒと比較して 1 . 6 5 倍高いと仮定した。

【 0 0 4 7 】

より詳細な単回投薬シミュレーションは、次のとおりの異なる投薬量の F R 1 0 4 についてヒトにおいて予測される最大受容体占有率プロフィールを示す。：

【表 2】

時間 (週)	0.005 mg/kg	0.05 mg/kg	0.2 mg/kg	0.5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg
0	13	61	86	94	97	98	99	100
1	3	28	70	87	93	97	98	99
2	1	12	54	81	90	95	98	99
3	0	5	34	71	86	93	97	98
4	0	2	17	56	80	91	96	98
6	0	0	3	19	54	80	91	96
8	0	0	0	3	17	55	81	92
10	0	0	0	0	3	18	57	82
12	0	0	0	0	0	3	20	61

表 2：F R 1 0 4 の種々の単回 i . v . 投与（0 . 0 0 5 から 8 m g / k g）後の種々の観察期間（週）後のヒトにおける C D 2 8 占有 % のシミュレーション

【 0 0 4 8 】

結論

P K / T E モデリングアプローチを使用して、図 2 A に示すように選択された、M A B E L 投与量である 0 . 0 0 5 m g / k g の投与量がヒトにおいて 1 3 % の C D 2 8 受容体占有率を導くはずであることが決定された。

【 0 0 4 9 】

実施例 2：研究計画

2 . 1 原理

【 0 0 5 0 】

例 1 に記載されているように、M A B E L として選択された投薬量はおおよそ 1 3 % の C D 2 8 受容体占有率に相当する 5 μ g / k g である。

単回投与研究の投薬上昇セグメントを行うことを決定した。F R 1 0 4 の投与後の循環血液 T リンパ球上での C D 2 8 受容体占有率持続期間は投薬量に依存する。カニクイザルの毒性研究では、感染 / リンパ腫が主に発症し、循環血液 T リンパ球上での 1 0 0 % の C D 2 8 受容体占有率はそれぞれ少なくとも 8 / 1 1 週間であった。

【 0 0 5 1 】

危険性を減らすために、出願人は、まずヒトのために非比例的に適応させた非臨床デー

10

20

30

40

50

タのPK/PDポピュレーションモデリングに基づいて、低い投与量で血液Tリンパ球上での4週間未満の100%CD28受容体占有率(RO)を、並びに8週間で最大約50%のROを誘導する非常に低い投与量を試験することを決めた(表2を参照)。

安全策として、より高い投与量並びに繰り返し投与へ移行する前に、0.5mg/kgの投薬量が研究の持続並びにPK/PDの実行若しくは安全な分析を行うために選択された。

このシミュレーションによると、投与後8週間でおおよそ50%のROの規定に従うために、次の投与量として、1並びに2mg/kgが適していた。任意の更なる投与量も試験され得る。その投与量も投与後8週間でおおよそ50%のROの規則に従うものである。

【0052】

2.2 材料と方法

試験品、投与量、投与の形態

FR104は全ての投与量レベルについて、リンガー乳酸液中の正確な濃度に希釈後、100mLを少なくとも30分かけた注入により、静脈内に投与された。

6つの投薬グループが、パート1、コホートAで計画された(増加する6つの単回投薬量、このうちの4つのみが最終的に行われた)。次の上昇スケールは、推定最小薬理作用量(MABELアプローチ)に基づく: 0.005, 0.050, 0.200, 0.500, 1.0, 2.0mg/kg(最後の2つのものはグループ1-4から得られたPK/PDの結果の分析後に中止した)。

パート1、コホートBについて2回投薬グループは、当初は0.5及び1.0mg/kgで計画され、下記に説明しているように、0.5及び0.2mg/kgに変更された。

【0053】

研究薬物の物性的記述

GMP FR104は4%マンニトール+0.02%Tween80中に100mgのFR104を含む、5mLの抽出可能容量のバイアル(20mg/mL)内で現場に供給された。

全ての研究対象品は、現行のGCPにより要求されているとおりに、求められるGMPに従って製造した。

【0054】

本研究の他に投与された医薬品

適合したプラセボの注射はビヒクル(リンガー乳酸溶液)を含む。プラセボの投与には、100mLのビヒクルが投与された。

【0055】

薬物動態の計算

薬物動態の計算はフェニックス ウィンノンリン 6.2又は上位版(ファースイト社、パロアルト、カリフォルニア、アメリカ)を使うことで行われた。

次の個々のPKパラメーターは、適切な場合には、個々の血清中の濃度-時間プロフィールからFR104の為にノンコンパートメント法を用いて決められた:

C_{max} : 最大の観測された血清濃度

T_{max} : C_{max} の発生時間

AUC_{inf} : $AUC_{0-t} + (C_t / \lambda_z)$ (式中、 C_t は最後に観察された定量可能な濃度であり、 λ_z は第一次の終端速度定数である)から計算された、時間0から無限大までの血清濃度対時間曲線下の面積

AUC_{0-28d} : 線形対数台形公式によって計算された、投薬インターバル(すなわち28日)にわたる血清薬物濃度-時間曲線下面積。

$t_{1/2}$: $(\ln 2) / \lambda_z$ から計算された終端半減期。

R_{ac} : $AUC_{0-28d} \text{ Day } 29 / AUC_{0-28d} \text{ Day } 1$ として計算された蓄積率(パート2のみ)

CL: 投薬量($i.v.$) / AUC_{inf} として計算された、全身クリアランス。

V_z : CL / λ_z として計算された分配容量。

10

20

30

40

50

投薬量に対して規格化したパラメータ (C_{\max} / 投薬量、 C_{avg} / 投薬量、 AUC_{0-28d} / 投薬量) が評価された。

他のPKパラメータは適切と考えられるように計算された。

【0056】

薬力学

CD28 受容体占有率

主なPD変数は分化抗原群 (CD) 28 の経時的ROであり、目的に向いていると妥当な方法を用いて、研究中の各時点で、集めた血液試料中のFR104によるROとして評価されるものである。

【0057】

キーホールリンペットヘモシアニンチャレンジ

パート1について、コホートBのみ。

血清中のヒト抗KLH Abは酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 法を用いて検出された。

1.5 ml の血液試料が静脈穿刺により又は前腕の留置カニューレを経て標準的な血清チューブ中に集められた。

【0058】

ELISAによる抗KLH抗体測定

血清研究試料の分析はアルファ ダイアグノスティック インターナショナル社の市販キット「ヒト抗KLH IgG」カタログ番号700-140-KLGをもちいることで行われた。定量の下限及び上限は7.20並びに86.0 U/mlであると決められた。このELISAキットはマイクロウェル上に固定されたKLH抗原へ試料中のヒト抗KLH抗体が結合することに基づき、そして抗KLH IgG抗体はHRP酵素結合抗ヒトIgG特異的抗体によって決められた。洗浄工程後、発色性基質 (TMB) は反応を終わらせるために加えられ、その後吸光度450 nmがELISAマイクロウェルリーダーを用いて測定される。

【0059】

血液 / 血清試験

全血試料は種々の提供者から得られ、ならびにK2-EDTA又はK3-EDTAヴァーキュテイナー血液採集管に集められた。FR104 PK並びにCD28受容体占有率を決めるための試料は次の時点で採集された血液から得られた。

一日目、投薬前と、注入開始の0.5、0.75、1、2、4、そして8時間後

二日目、注入開始の24時間後

三日目、注入開始の48時間後

五日目、注入開始の96時間後

八日目、注入開始の1週間後

十五日目、注入開始の2週間後

二十九日目、注入開始の3週間後

四十三日目、注入開始の6週間後、(0.5 mg/kg (グループ4 コホートAについてのみ)

五十七日目、注入開始の8週間後、(投与量 < 0.2 mg/kg の場合には行わない)

八十五日目、注入開始の12週間後、(投与量 < 0.2 mg/kg の場合には行わない)

百十三日目、注入開始の16週間後 (投薬量 1 mg/kg のグループについてのフォローアップ通院)

【0060】

ELISAによるFR104-PEG濃度測定

FR104 (抗CD28.3 Fab) 分子はCD28Fc被覆プレート中でインキュベートした。次いで、結合FR104はPEG (メトキシ基) に対するウサギモノクローナル抗体で検出され、該ウサギ抗体はペルオキシダーゼで標識された抗ウサギポリクローナル抗体によって明らかにされた。

10

20

30

40

50

【0061】

試薬と緩衝液

- CD28 - Ig (CD28 / Fc キメラ、R & D システム # 342
- CD - 200、PBS中200 μ g / mlに再構成される)
- 被覆緩衝液: NaHCO_3 0.05 M pH9.2 (80 mL Na_2CO_3 0.05 M + 920 mL NaHCO_3 0.05 M、pH9.2)
- BSA (シグマ # A - 7906)
- Tween 20 (シグマ # P7949)
- 試料
- 標準物: FR104 # CAA - 1 (0.5 mg / ml)
- ウサギ抗PEG (メトキシ基) モノクローナル抗体 (エピトミクス # 2061 - 1、0.97 mg / ml)
- ヤギ抗ウサギポリクローナル標識ペルオキシダーゼ (ジャクソン イムノリサーチ # 111 - 035 - 144、0.8 mg / ml)
- 基質: TMB (シグマ # T8665)
- H_2SO_4 (VWR 20704.292)

10

【0062】

プレートは0.05 M pH9.2炭酸緩衝液(50 μ l / ウェル)中1 μ g / mlのCD28 Igで被覆し、並びに37 で2時間若しくは4 で一夜インキュベートした。ウェルは空にされ、並びに三度連続して200 μ L PBS - 0.05% Tween で洗浄した。100 μ L PBS 0.1% Tween 1% BSAが加えられ、並びにプレートは37 で1時間インキュベートした。

20

【0063】

標準物: FR104 # L27221 / G1 / 2 (10.01 mg / ml)を第1点目については100 μ g / mlに希釈し、以後の7点については、二重で、五倍に連続希釈した。血清(50 μ l)はPBS - 0.1% Tween中に少なくとも1 / 10に希釈し、並びに37 で1時間インキュベートした。ウェルは空にされ、及び三度連続して200 μ L PBS - 0.05% Tweenで洗浄し、並びに希釈した。50 μ l / ウェルのPBS - 0.1% Tween中の1 / 500ウサギ抗PEGモノクローナル抗体が加えられ、続けて4 で1時間インキュベートした。ウェルは空にされ、及び三度連続して200 μ L PBS - 0.05% Tweenで洗浄した。PBS - 0.1% Tween中の1 / 2000ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ(抗Rb PO)(50 μ l / ウェル)が加えられ、4 で1時間インキュベートした。(洗浄工程)TMB(50 μ L / ウェル)が加えられ、並びに室温暗所で10分間インキュベートした。停止緩衝液が加えられた(50 μ L / ウェル0.5 M H_2SO_4)。次いで吸光度450 nmの測定は、(ref 630 nm)は、マイクロタイタープレート(ヌンク イムノプレート、ヌンク、# 442404)を用いて得られた。ソフトマックスプロプログラムを分析に使い、並びに試料中のFR104濃度を決めた。

30

【0064】

フローサイトメトリーによる受容体発現測定

40

受容体占有率の測定:

各血液試料は半分に分けられ、並びにFR104抗体と混合し、又は混合しなかった。赤血球溶解後直ぐに、FR104のCD28への結合は、フローサイトメトリーによって、FITC結合抗CD3抗体で染色されたリンパ球について、抗PEGウサギモノクローナル抗体並びにAlexa fluor 405結合抗ウサギ二次抗体の連続的な使用により調べられた。このように、PEG染色の平均蛍光強度(MFI)は、FR104抗体過剰量を補充された、同じ提供者からの第2の血液半量を含む両方のウェルにおいて決められた。次いで、FR104促進CD28飽和は、各血液提供者について、両方のウェル(FR104過剰量なし / あり)のMDIの間の比をとることによって算出された。

【0065】

50

作業溶液ならびに緩衝液

【表 3】

試薬	供給者	参照	保存条件
塩化アンモニウム	シグマ	A9434	RT
炭酸水素カリウム	シグマ	60339	RT
Na ₂ -EDTA	シグマ	E1644	RT
アジ化ナトリウム	シグマ	S2002	RT
塩酸	メルク	1.09063.1000	RT
PBS(w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺)1X	ギブコ	14190-094	開封前RT、開封後直ぐにRF
BSA-7.5%	シグマ	A8412	RF
Alexa Fluor 405 ヤギ 抗ウサギ IgG	モルキュラー プローブズ	A31556	RF
FITC マウス 抗ヒトCD3 IgG	BD バイオサイエンス	556611	RF
ウサギ抗PEGモノクローナルIgG	アビカム	51257	FZ
BD C&ST ビーズ	BD バイオサイエンス	650621	RF
FACS リンス液	BD バイオサイエンス	340346	RT
FACS 洗浄液	BD バイオサイエンス	340345	RT
FACS フローシース液	BD バイオサイエンス	342003	RT

RF:冷蔵庫(+5°C±5°C)、RT:室温、FZ:(-24°C±6°C)

10

【 0 0 6 6 】

試薬と溶液の調製

20

【表 4】

溶液と緩衝液	成分	調製	保存条件
1X 赤血球 溶解液	塩化アンモニウム、 炭酸水素カリウム、 Na ₂ -EDTA、 dd-水	1.658g 塩化アンモニウム、 0.2g 炭酸水素カリウム、 0.00744g Na ₂ -EDTA、 200 mL dd-水、 pHを7.2から7.4の間に調整	4 週間まで +5°C±5°C
FACS 緩衝液	DPBS(w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺)1X、 ウシ血清アルブミン、 アジ化ナトリウム	40 mL の7.5%BSA溶液、 0.3g アジ化ナトリウム s.q.f 300 mL DPBS 1X	4 週間まで +5°C±5°C

30

【 0 0 6 7 】

希釈抗体溶液の調製

【表 5】

希釈抗体溶液	成分	調製	保存条件
ウサギ抗PEG IgG 希釈溶液	抗ウサギPEG IgG 貯蔵溶液、 FACS 緩衝液	5 μl ウサギ抗PEG IgG、 254 μl FACS 緩衝液	保存せず、 新たに調製する

40

【 0 0 6 8 】

【表 6】

抗体作業溶液の調製

抗体作業溶液	成分	調製	保存条件
FITC マウス抗ヒトCD3 IgG/ ウサギ抗PEG IgG 作業溶液	ウサギ抗PEG IgG 希釈溶液、 マウス抗ヒトCD3 FITC標識IgG貯蔵溶液、 FACS 緩衝液	90 μ L ウサギ抗PEG IgG、 240 μ L マウス抗ヒトCD3 FITC標識IgG貯蔵溶液、 270 μ L FACS 緩衝液	保存せず、 新たに調製する
ウサギ抗PEG IgG 作業溶液	ウサギ抗PEG IgG 希釈溶液、 FACS 緩衝液	90 μ L ウサギ抗PEG IgG、 510 μ L FACS 緩衝液	保存せず、 新たに調製する
Alexa Fluor 405 ヤギ 抗ウサギ IgG 作業溶液	Alexa Fluor 405 ヤギ 抗ウサギ IgG 貯蔵溶液、 FACS 緩衝液	3 μ L ヤギ 抗ウサギ IgG 貯蔵溶液、 597 μ L FACS 緩衝液	保存せず、 新たに調製する

10

【 0 0 6 9 】

【表 7】

FR104希釈表

管	濃度(μ g/mL)	初め	初濃度(μ g/mL)	μ L	DPBSの容量(μ L)	終量(μ L)	細胞を用いるアッセイに おける終濃度(μ g/mL)
S2	500	S1	21000	3	123	126	-
CO1	50	S2	500	20	180	200	5

20

表は 21 mg / mL の F R 1 0 4 保存溶液 (S 1) について与えられ、その後 F R 1 0 4 バッチ貯蔵濃度に応じて調整し得る。

C O : 濃度

【 0 0 7 0 】

F R 1 0 4 飽和用量 (5 μ g / mL) で処理し、又は処理していない試験試料について三連でアッセイを行った。試料は 96 ウェルプレートに分注した。

F R 1 0 4 溶液は 50 μ g / mL の適切な量に調整され、E D T - 処理血液管中で穏やかにホモジナイズした。50 μ L の各ヒト全血試料は 96 穴 V 底ウェルプレートの 6 ウェルにプレーティングされた。5.5 μ L の F R 1 0 4 (D - P B S 中の 50 μ g / mL) が最初の 3 ウェルに加えられ、並びに 5.5 μ L の D - P B S が次の 3 ウェルに加えられた。穏やかにホモジナイズした後、プレートは室温 (R T) で 15 分間インキュベートされた。1 ウェル毎に 150 μ L の赤血球溶解溶液が加えられ、次に 1 分間 1200 g で遠心分離した。上清を捨て、並びに 1 ウェル毎に 150 μ L の赤血球溶解溶液が加えられた。室温で 5 分後、プレートは 1 分間 1200 g で遠心分離した (三回繰り返した) 。次に、150 μ L の F A C S 緩衝液が加えられ、そして遠心分離した。1 ウェル毎に 30 μ L の F I T C マウス抗ヒト C D 3 I g G / ウサギ抗 P E G I g G 作業溶液の混合溶液が加えられ、並びに暗所、4 で 15 分間インキュベートした。細胞は F A C S 緩衝液で洗浄され、そして遠心分離され、この工程を二回繰り返した。1 ウェル毎に 30 μ L の A l e x a F l u o r 405 ヤギ抗ウサギ I g G 作業溶液が加えられ、並びに暗所、4 で 15 分間インキュベートした。細胞は F A C S 緩衝液で二回洗浄された。細胞は次に F A C S 分析のために 300 μ L の F A C S 緩衝液に再懸濁された。

30

40

【 0 0 7 1 】

2.3 研究計画

この F R 1 0 4 フェーズ 1 研究計画は注意深く設計されたものであり、並びに治験薬を用いるファーストインヒューマン臨床計画の為に欧州ガイドラインに沿っている (E M E A / C H M P / S W P / 2 8 3 6 7 / 0 7) 。

この研究は、健康な被検者において、単回及び複数回の静脈内投薬量 (漸増量) の F R 1 0 4 を評価するファーストインヒューマン、フェーズ 1、無作為化、二重盲検、プラセボ制御、単一施設研究である。

71 人までの健康な男性と女性の被検者が参加・排除基準により選択され、すなわち、

50

パート1では57人の被検者である(SAD:それぞれ36人の被検者[コホートA]、14被検者[コホートB]、7被検者[任意選択のコホートC]の3コホート)が選択された。予定された総研究期間は9ヶ月(36週)であった。

すべてのFR104の投薬は、少なくとも30分間の緩徐な注入で静脈内に投与された。時差的アプローチが全ての投薬レベル内で遵守した。全ての投薬レベルの間で少なくとも14日の間隔(最後の投薬から最初の投薬まで)の観測を遵守した。同一日に投薬する個々の被検者は少なくとも60分隔てて投薬された。

【0072】

投薬量選択

計画したファーストインヒューマン研究の第1投薬量は、人に対して非比例的に適合させた非臨床データのPK/PDポピュレーションモデリングによって決めたMABELに基づいた(詳細については上記実施例1を参照)。選択された投薬量は、推定でおよそ13%のCD28受容体占有率(RO)に相当する5 µg/kgであった。

研究の投薬量増量セグメントは単回投薬で行われた。危険性を減らすために、1 mg/kgの投薬レベル後、すなわち(ポピュレーションPK/PDモデルによれば)4週間又はそれ以上の期間にわたって100%のCD28ROが誘導されると考えられる投薬レベルの開始前におよそ12週間の休止が計画された。この4週間の期間は、ウイルスの再活性化が何らかの病理をもたらす可能性をヒトにおいて非常に低くするのに十分短いと考えられた。12週間の休止は、当初計画された1, 2 mg/kgの高投薬量に移行する前にPK/PD及び安全面の評価を可能にした。

シミュレーションによると、1及び2 mg/kgの投薬量はそれぞれ、4週間で84及び92%のRO、並びに8週間で18及びおよそ50%のROを誘導すると考えられた。安全策として、0.5 mg/kgの投薬量がより高い投薬量に移行する前にこの研究を休止してPK/PD及び安全性分析を行うために選ばれた。

【0073】

パート1 単回の増量投薬(SAD)パート

代表研究者(若しくは指名された共同研究者)によって判断した病歴並びに健康状態に基づいて被検者を募集した。各処理期間、被検者は投薬前日(-1日目)から5日目まで研究センターに収容された。食事は居住期間の間、標準化した。グループ1-4(0.005; 0.05; 0.2及び0.5 mg/kg)には、8日目、15日目、29日目、並びに57日目の来診が計画された。グループ4(0.5 mg/kg)には、43日目の追加の来診が計画された。最終来診後、85日目(12週目)にフォローアップの来診を続けて行った。グループ5及び6は1及び最大2 mg/kgのFR104がそれぞれ投薬されるはずであったがより低い投薬量で得られた結果により研究者はこれらの投薬を中止した。

【0074】

コホートA

22人の被検者がコホートAの4つの投薬レベルグループの1つに登録された。一連(投薬レベル)の健康な被検者グループは、漸増投薬量のFR104のIV投与を受けた。

最初の2つの投薬レベルグループ(グループ1~2)では、各4人の被検者は、無作為にFR104又はプラセボのいずれかに3:1の比で振り分けた。結果として、3人の被検者はFR104を、1人の被検者はプラセボを受けた。

時差的投薬アプローチが適用された、すなわち、ある1人の被検者の投薬に続いて48時間遅れて二番目の被検者に投薬し、その投薬レベルグループの残りの2人被検者は二番目の被検者の48時間後に投薬された(計5日):

一日目: n = 1

三日目: n = 1

五日目: n = 2。

【0075】

グループ3並びに4では、各7人の被検者は、無作為にFR104又はプラセボのい

れかを5：2の比で振り分けられ、結果として、5人の被検者はF R 1 0 4を、2人の被検者はプラセボを受けた。無作為化は第1のグループの2人の被検者のうち1人はF R 1 0 4を、ならびに1人はプラセボを受けることを保証した。

時差的な投薬アプローチが適用された、すなわち、二人の被検者の投薬に続いて48時間後に二人の被検者が投薬され、並びにその投薬レベルグループの残りの三人の被検者は4番目の被検者の48時間後に投薬された（計5日）：

一日目：n = 2

三日目：n = 2

五日目：n = 3。

【0076】

同じプロトコルがグループ5並びに6（それぞれ1mg/kg及び2mg/kgの投薬レベルで各7人の被検者）に計画された。しかし最初の4グループについてのデータ分析後に中止した。

【0077】

【表8】

単一増量投薬

コホートA	投薬量 (mg/kg)	F R 1 0 4 被検者数	プラセボ被検者数
グループ1	0.005	3	1
グループ2	0.050	3	1
グループ3	0.200	5	2
グループ4	0.500	5	2
P K、P D、並びに安全性評価の為に約12週間休止した			

【0078】

コホートB

14人の被検者がコホートBの2つの投薬レベルグループ（各グループに7人ずつ）の1つに登録された。

被検者は無作為にF R 1 0 4又はプラセボのいずれかに5：2の比で振り分けられた、その結果5人の被検者はF R 1 0 4を受け、並びに二人の被検者はプラセボを受けた。無作為化は第1のグループの2人の被検者のうち1人はF R 1 0 4を、ならびに1人はプラセボを受けることを保証した。

共通の評価項目に加えて、このコホートの被検者はF R 1 0 4注入日にキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）チャレンジを受けた。

時差的投薬アプローチが適用された。すなわち、二人の被検者の投薬に続いて48時間後に二人の被検者が投薬され、並びにその投薬レベルグループの残り3人の被検者は4番目の被検者の48時間後に投薬された（計5日）：

一日目：n = 2

三日目：n = 2

五日目：n = 3。

【0079】

当初の計画は以下の通りであった：

KLHチャレンジ、単回投薬。

【表 9】

K L Hチャレンジを含む、S A Dの為の当初の計画

パート 1		増量単回投薬	
コホート B	投薬量 (m g / k g)	F R 1 0 4 被検者数	プラセボ被検者数
グループ 7 *	0.500	5	2
グループ 8 *	1.000	5	2
*° K L Hに対してナイブである健康な被検者はK L Hチャレンジを受ける			

10

【 0 0 8 0 】

この計画はグループ 1 - 4 で得られた結果を考慮して改定される：

K L Hチャレンジ、単回投薬。

【表 1 0】

S A Dを含むK L H免疫性テストのための改変計画

コホート B	投薬量 (m g / k g)	F R 1 0 4 被検者数	プラセボ被検者数
グループ 7 *	0.50	5	2
グループ 8 *	0.20	5	2
グループ 9 *	1.50	5	2
グループ 9 - 2 *	0.02	5	2
*K L Hに対してナイブである健康な被検者はK L Hチャレンジを受ける			

20

【 0 0 8 1 】

試験対象被検者基準

基準を全て満たしている被検者は次の本研究に参加する資格がある。

1 . 男性又は女性、1 8 歳から 6 0 歳（両端を含む）；

2 . 病歴、バイタルサイン、臨床検査、並びにスクリーニング時に行った総合健康診断に基づいて決められる良好な健康状態 [医学上安定] ；

30

注記：臨床検査の値が被検者の適格性を決める領域外の場合、再検査が行われうる。再検査は好ましくは計画外の来院時に行われるべきである。再検査の結果が被検者の適格性についても考慮される。再検査が正常の基準範囲外であれば、被検者は、研究者が当該異常値が臨床上有意でないと判断した場合に限り参加させてもよい。

3 . 心電図 (E C G) が正常の範囲内か、又は研究者により判断される臨床上意義のある逸脱がない事を示す；

注記：E C G 値が、被検者の適格性を判断する範囲の外である場合の再検査が行われ得る。

4 . 体重は少なくとも 5 0 k g で 1 0 0 k g 以上を超えず肥満度指数 (B M I) が正常の範囲内である ($1 8 \leq B M I < 3 0 \text{ k g / m}^2$) ；

40

5 . スクリーニング時に選択した依存性薬物について陰性尿検査；

6 . スクリーニング時に陰性アルコール呼気試験；

7 . 女性の被検者は閉経後又は外科的不妊（子宮切除、両側卵巣摘出術、若しくは卵管結紮術を受けている）である；

8 . 女性被検者はスクリーニング時に妊娠検査について陰性である；

9 . 出産能力のある女性配偶者を持つ非精管切除男性被検者は、被検薬最終投与後 9 0 日までは効果的な避妊法を使うことに同意しなければならない；

1 0 . 男性の被検者は被研究薬の最終投与後 9 0 日までは精子の提供をしないことに同意しなければならない；

50

11. このプロトコルに明記した禁止事項並びに制限事項を遵守する意思；
12. いずれの研究に関連した手順が行われる前に、自由意思で署名したインフォームドコンセント書類（ICF）、被検者の目的の理解並びに研究のために必要な手順の理解並びに研究に参加する意思を示す；
13. 被検者はPCRにより、EBV陽性であるべきである；
14. 非喫煙者又はたばこを少し吸う人、すなわち一日に最大5本の紙巻きタバコ（若しくは3本の葉巻タバコ若しくは充満状態で3回分のパイプ）の喫煙、並びに臨床研究施設に拘束されている間及び通院している間禁煙する能力、並びに意思；
- パート1の為に、コホートB限定で；
15. 被検者はKLHチャレンジを経験していなかった。

10

【0082】

実施例3：本研究の増量単回投薬（SAD）パートの初期結果

FR104濃度はELISA法によって被検者の血液中で測定され、並びに受容体占有率のレベルは増量単回投薬量の0、1、2、5、8、15及び29日にフローサイトメトリーを用いて測定された。薬物動態の結果は、図1において血漿中のFR104がng/ml単位で表され、並びに薬力学の結果は標的のCD3+T細胞上でのCD28受容体の占有率（%）として表される。図1Aは、0.005、0.05、0.02及び0.5mg/kgのFR104を、単回i.v.注射により30分間にわたって投与した後のFR104濃度を示し、測定したピーク血漿濃度は注射後2時間で 117 ± 11 、 1012 ± 48 、 4922 ± 853 及び 11620 ± 1076 ng/mlにそれぞれ達した。最初の

一ヶ月間に渡って測定された血漿濃度から、半減期は用量依存性であることが示され、0.05mg/kgの投与で3.4日、0.2mg/kgの投与で5.7日、並びに0.5mg/kgの投与で7.9日の値であった。図1Bは、驚くべきことに、0.005mg/kgのFR104について予想された約13%のRO以上に、0.005mg/kgのFR104の単回i.v.注射後に80%の受容体占有率に達し、並びに0.05又は0.2mg/kgのFR104の単回i.v.注射後に100%の受容体占有率に達することを示している。CD28受容体は0.005mg/kgのi.v.注射の15日後完全に脱飽和し、並びに0.05、0.2、及び0.5mg/kgのi.v.注射の、28、56及び84日後に完全に脱飽和した。

20

【0083】

図2はインビトロの結果を用いて前もって決められた種々のFR104濃度での種々のRO率（図2A）を臨床試験後に観測したRO率と比較して示す。図2Bは、臨床研究の第1のコホートAの分析後に修正したFR104のKdで決めた予測RO率と、材料と方法中に説明したフローサイトメトリーによって計算された観測RO率との比較している。この図は、両方の状況の完全な相関関係を示しており、Poirier（2012）らがインビトロで測定したKdはヒトでの使用のためには、過小に見積もられており、並びにFR104の解離定数は4.6nMではなくて約0.3nM（10倍低い）であることを確認している。これらの結果はヒトではない霊長類モデルで決めたRO率が予測ととてもよく一致しているため予測できなかった。臨床前研究の為に2012年に算出されたFR104の治療投薬量は、よい効果を示し、並びに豊富に公開されている（（Haanstra et al, JI 2015）（Poirier et al, JI 2015）（Poirier et al, Experimental Dermatol. 2015）（Vierboom et al, Clinical and experimental immunol 2015））。

30

40

【0084】

次に、T細胞表面のCD28の発現は、フローサイトメトリーによってFR104注入後一ヶ月の間に分析された。図3は、細胞表面のCD28受容体の存在を反映するベグ化したFR104の蛍光平均値を示す。結果は、FR104を受けたボランティアの4つの異なるグループにおいて、CD28がFR104の結合後でさえもT細胞の表面にまだ存在していることを示しており、このことは、FR104が受容体の内在化を誘導せず、ダウンレギュレーションも誘導しないことの根拠となる。

【0085】

50

K L Hチャレンジはヒト中のK L H抗原への免疫応答のテストのためのF R 1 0 4の単回投薬量注入(0.02、0.2、0.5及び1.5 mg / kgの改変濃度)について行われた。抗K L H抗体濃度は市販キットを使うE L I S Aによって分析された。図4は抗K L H抗体反応を表す。この結果は、プラセボを受けたボランティアと比較して、F R 1 0 4の用量依存性の抗K L H反応阻害を示す。0.2 mg / kgの投薬量から、反応はダウンレギュレートした。0.5 mg / kgのF R 1 0 4を受けた、ボランティアについては100%の阻害が観測された。新しい治療上のF R 1 0 4の投薬は免疫システムの阻害に0.02 mg / kgから効果的である。

【0086】

実施例4：ファーストインマン研究報告

方法

研究計画

この研究は、健康な被検者においての単回及び複数回静脈内投薬量(漸増量)のF R 1 0 4を評価するファーストインヒューマン、フェーズ1、無作為化、二重盲検、プラセボ制御、単一施設研究である。それはズィークンホイスネットワークアントウェルペン独立倫理委員会(Protocol Number FR104-CT01; EudraCT Number 2015-000302-19; Clinical-Trials.gov identifier: NCT02800811)によって認可された。本研究は、S G Sライフサイエンスサービス、(臨床薬理学ユニット、アントワープ - アントワープ、ベルギー)、で全薬品臨床試験実施(G C P)ガイドライン並びにヘルシンキ宣言の原則に従って行った。

【0087】

参加者

資格のある男女の被検者は、書面によるインフォームドコンセントを提出し、並びに健康状態にあった。主要な試験対象被検者基準は、全身の健康、18 - 60歳、50 kg以上で100 kg以下の体重及び18 - 30 kg / m²のBMIであった。除外基準は重大な過去の病歴又は異常な臨床試験検査結果であった。

【0088】

介入

試験薬はF R 1 0 4(O S E イムノセラベウティクスS A、ナント、フランス)で、比較薬(適合するプラセボ)はリンガー乳酸溶液であった。F R 1 0 4はF R 1 0 4 100 mgを含む5 mL溶液(20 mg / mL)で供給され、並びに2 - 8 (36 - 46 ° F)で遮光保存された。適切な希釈物又はプラセボを含む注射器はS G Sファーマシーによって準備され二重盲検様式で研究者に提供された投薬量は、当初は、非ヒト霊長類データ(非比例的に適合した)のポピュレーションPK - PDモデリングに基づいて選択され、ヒトのデータは、その後暫定的な分析後に含ませた。初期投薬量(M A B E L、0.005 mg / kg)はおおよそ20%のC_{max}でモデル化したC D 2 8のR Oに相当した。

【0089】

投薬レベルが0.05 mg / kgでは、F R 1 0 4は少なくとも30分間で、希釈後の正確な濃度のリンガー乳酸溶液10 mLのIV注入によって投薬された。他の投薬レベルでは、F R 1 0 4は少なくとも30分間で、希釈後の正確な濃度のリンガー乳酸溶液100 mLのIV注入によって投薬された。

【0090】

処置計画

50人の被検者がパート1(S A D : 22人の被検者[コホートA]及び28人)の[コホートB]の2つのコホート)に選ばれ、ならびに14人がパート2(M A D)に選ばれる予定とした。各処置期間の間に、被検者は投薬前日(-1日)から5日目まで研究施設に収容された。時差的な投薬アプローチが適用された、すなわち、1又は2人の被検者の投薬(一日目)に続いて1又は2人の被検者の48時間後には投薬され(三日目)、並びに3人の残ったその投薬レベルグループの残った3人の被検者は四番目の被検者の48時間後に投薬された。本研究の総持続期間は最後の反復投薬後の11週間のフォローアップ

プを含む36週間であった。少なくとも14日の間隔（最後の投薬から最初の投薬まで）が全ての投薬レベルの間に与えられた。同じ日に投薬する個々の被検者は少なくとも60分間離して投薬された。

【0091】

パート1：増量単回投薬パート（SAD） -

22人の被検者がコホートAの4つの投薬レベルグループ、：0.005 mg/kgのグループ1、0.050 mg/kgのグループ2、0.200 mg/kgのグループ3、0.500 mg/kgのグループ4の1つに登録される予定であった。グループ1及び2では、各4人の被検者はFR104又はプラセボのいずれかに3：1の比で振り分けられ、結果として3人の被検者はFR104を1人の被検者はプラセボを受けた。グループ3から4では、各7人の被検者が無作為にFR104又はプラセボのいずれか1つを5：2の比で振り分けられ、結果として5人の被検者はFR104を2人の被検者はプラセボを受けた。無作為化は第1のグループの2人の被検者のうち1人はFR104を、ならびに1人はプラセボを受けることを保証した。暫定PK、PD並びに安全性評価（これらに基づいて次の投与量レベルの決定が行われた）のために、グループ4に投薬後約12週間の所定の休止がなされた。28人の被検者はコホートBの4つの投薬レベルグループ（各グループに7人）：0.500 mg/kgのグループ7、0.200 mg/kgのグループ8、1.5 mg/kgのグループ9、並びに0.020 mg/kgのグループ9-2の1つに登録される予定であった。被検者はFR104又はプラセボのいずれかに5：2の比で振り分けられた。共通の評価項目に加え、このコホートの被検者はKLHチャレンジをFR104注入日に受けた。

【0092】

パート2：増量多数回投薬パート（MAD） -

14人の被検者はパート2の2つの投薬レベルグループ（各グループに7人）：0.2 mg/kgのグループ10、並びに0.5 mg/kgのグループ11の1つに登録される予定であった。各被検者はFR104又はプラセボの2回の投薬を28日間のインターバルで受けた。

【0093】

サイトカイン評価

血液試料は投薬前並びに投薬後1、2、4、8、24（二日目）に集められた。試料は15、43、57、85、113日目にもまた集められた。サイトカインはIFN- γ 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70並びにTNF- α は市販キットPro Inflammatory Panel I V-plex assay（#K15049G メソスケールディスクバリー、ロックビル、マサチューセッツ）を用いて有効なECLIA法を用いて血清に投薬された。MULTI-SPOT登録商標プレートは捕捉抗体であらかじめ被覆された。試料は、電気化学発光標識（MSD SULFO-TAGTM）と結合した検出抗体を含む溶液とウェルにロードされた。試料中の被分析物は、作用電極表面上に固定された捕捉抗体と結合する；結合した被分析物による検出抗体の補充によってサンドイッチが完了する。MSDリーディングバッファの添加後、プレート電極により電圧が与えられ、十分なSULFO-TAGTM標識抗体がプレートに結合していれば光の放射が生ずる。この装置は放射された光の強さを測定し試料中の被分析物の量の定量値を捕捉する。

【0094】

PK分析

PK評価の為の連続血液試料は注入開始時間から次の時点で集められた：

投薬前並びに投薬後0.5、0.75、1、2、4、8、24（二日目）、48（三日目）時間、5、8、15、29、43、57、85、113日（0.5 mg/kg以上の投薬量グループのみ）。血清中のFR104濃度はMSD Sector Imager 6000（MSD、ゲーサズバーグ、メリーランド、アメリカ）での電気化学発光免疫吸着剤アッセイ（ECLIA）を含む有効な方法を用いて決められた。薬物動力学計算はフ

エニックス ウィンノンリン 6.2 並びにより高位機種 (ファーサイトコーポレーション、パロ アルト、カリフォルニア、アメリカ) を使う S G S - L S S によって行われた。このアッセイについての定量の下限並びに上限 (L L O Q 及び U L O Q) はそれぞれ 1 0 0 並びに 2 0 0 0 n g / m L であった。品質管理及び標準の全体的精度及び正確性はそれぞれ 2 0 % 以下および $\pm 2 0 %$ 以内である。フィットさせた曲線からの内挿によって試料濃度を推定することを可能にする標準曲線を構築した。

【 0 0 9 5 】

P D 分析

血液試料は、サイトフルオロメトリーを含む部分的に有効な方法を用いて、C D 2 8 受容体占有率 (R O) について P K 分析用と同じ時点で集められた。処理すべき各血液試料は半分に分けられ、並びに 1 つの試料は過剰な F R 1 0 4 と混合された。赤血球溶解の際に、C D 2 8 と結合する F R 1 0 4 は、F I T C 結合抗 C D 3 抗体で染色されたリンパ球において、抗 P E G ウサギモノクローナル抗体並びに A l e x a f l u o r 4 0 5 結合抗ウサギ二次抗体を順次用いてフローサイトメトリーによって調べられた。このように、R O は過剰な F R 1 0 4 が存在しないウェルの M F 1 と過剰な F R 1 0 4 存在下のウェルの M F I との比をとることで算出された。この方法の感度は $0.25 \mu g / m L$ であった。提供者内再現精度は 1 % から 9 % (C V) の範囲であり、並びに、提供者間精度は 1 6 ~ 2 2 % (C V) の間の範囲であった。C D 2 8 発現レベルは F R 1 0 4 過剰条件の M F I によって測定された。

【 0 0 9 6 】

末梢 T リンパ球の亜集団並びに活性化状態はトランスフィックス / E D T A 真空血採集管 (サイトマーク、バッキングラム、イギリス) を用いて安定化させた全血のフローサイトメトリーによって評価された。C D 4 5、C D 3、C D 2 8、C D 4 5 R O、C D 4、C D 8、C D 2 5、C D 1 2 7、C D 6 9 並びに C C R 7 マーカーは C D 4 + 及び C D 8 + 区画において次の亜集団：

ナイーブ T 細胞、活性化 T 細胞、メモリ T 細胞、セントラルメモリ T 細胞、エフェクターメモリ T 細胞及び T E M R A

を定義するために測定された。n T r e g もまた記録された。

【 0 0 9 7 】

E B V P C R 並びに E B V I g G 及び I g M 抗体を含む全ての他の臨床装置は標準手順を用いて、治験施設の臨床生物学研究部によって行われた。

血液細胞の免疫反応性はエクス - ビボで調べられた。血液試料は、S E B + L P S 刺激物質含む T r u C u l t u r e 登録商標血液採集管 (ミリアド R B M、オースティン、テキサス) 及びコントロール管中へ、前腕の静脈穿刺により又は留置カニューレを介して集められた。管を 3 7 で 2 4 時間維持した後血漿が機械的に抽出され、I L - 2、I F N g 及び I L - 8 サイトカインの分析まで凍結された。サイトカインは血清中のサイトカインを評価するのに使われた同じ E L I S A 法を用いて分析された。

【 0 0 9 8 】

免疫評価

抗 F R 1 0 4 抗体検出のための血液試料はスクリーニング時並びに 1 日目 (投入前)、1 5 日、2 9 日、5 7 日、8 5 日及び / 若しくは 1 1 3 日に集められた。血清中の抗 F R 1 0 4 抗体の滴定は有効な電気化学発光、架橋免疫原性アッセイを用いて行われた。その方法は血清試料の酸処理を用いて必要なときに F R 1 0 4 / F R 1 0 4 - A D A の解離を可能とし、続いて単工程アッセイブリッジングフォーマットを用い、それによって抗 F R 1 0 4 抗体 (A D A) はビオチン化形態及びスルホ - T A G 標識形態の F R 1 0 4 の組み合わせによって溶液中に捕捉される。複合体形成はその後 M S D プラットフォームに対する E C L によって検出された。このアッセイの感度は $3.46 n g / m l$ (3 1 % の C V) 並びに薬物許容量の平均値は $179 \mu g / m l$ (2 6 % の C V) であった。

【 0 0 9 9 】

K L H 免疫

抗 K L H 抗体検出の為の血液試料はスクリーニング時並びに 15 日、29 日、57 日、85 日、及び / 若しくは 113 日に集められた。抗 K L H 抗体は市販キット “ ヒト抗 K L H I g G ” (# 700 - 140 K L G アルファダイアグノスティックスインターナショナル、サンアントニオ、テキサス) を用いる血清中での定量 E L I S A によって投薬された。

【 0 1 0 0 】

統計学上の方法

この研究のためのサンプルサイズは、計画が類似する他のフェーズ 1 研究による先例並びに医薬品医療製品規制庁 (イギリス)、ドイツ連邦医薬品評価院 (ドイツ)、連歩医薬品局 (ベルギー)、欧州医薬品局 (E M A) との協議に基づいて決められた。64 人の健康なボランティアはその手順の目的に合致するに十分であると判断された。全ての統計学上の計算は統計計算のための S A S (バージョン 9 . 2) ソフトウェア及び描画目的のための S A S を用いることで行われた。

10

【 0 1 0 1 】

結果

参加者の流れ

本研究は 1 つの臨床施設で 2015 年 3 月 27 日から 2016 年 2 月 19 日まで行われた。総数 65 人の被検者が 2 つの研究パートに分けられた。パート 1 では、37 人の被検者が単回 I V 投薬量 (0 . 005 から 1 . 5 m g / k g の範囲) の F R 104 を投与され、並びに 14 人の被検者が単回 I V 投薬量のプラセボを投与された。パート 2 では、10 人の被検者が F R 104 (0 . 200 から 0 . 500 m g / k g の範囲) の二度の投薬並びに 4 人の被検者は二度のプラセボを I V 投薬処置され、投薬間隔は 28 日間離された。(パート 1、コホート A、グループ 2 の) 1 人以外の全ての被検者は計画どおり研究薬を受けた (前記参考)。全ての被検者は無作為化されて処置された。全ての被検者は研究を完結し、並びに安全性分析に含まれた。1 人の被検者 (パート 1、コホート A、グループ 2) は注入ポンプの機能障害に関連したプロトコルの逸脱のため P K 並びに P D L - 1 分析から除かれた。この不正確な投薬処置のため、1 人の追加の被検者がグループ 2 に含まれた。パート 2 の 1 人の被検者は、処置と無関係な A E 後に、禁止された規定外の薬物治療を受けたために 0 . 5 m g / k g の F R 104 の二度目の投薬を受けなかった。この被検者はプロトコルに応じた全ての来診を完遂した。この被検者は P K 並びに P D ポピュレーションから除外しなかった。しかし 29 日後に得たデータは分析から除外された。研究者又はスポンサーによって盲検性を破られた被検者はいなかった。

20

30

【 0 1 0 2 】

ベースラインデータ

被検者の個体群統計は表 11 に示されている。全ての処置グループで白人が最も多い被検者であった。全ての被検者の年齢、体重と B M I はプロトコルに定義された試験対象被検者基準内であった。

【 0 1 0 3 】

【表 1 1】

ベースラインの被検者の個体群統計

	プラセボ	総 F R 1 0 4
安全性解析対象集団	18	47
性別、n(%)		
男性	12(67)	26(55)
女性	6	21
年齢 (年)		
平均値(SD)	52.7(9.28)	52.1(7.88)
中央値	56.7	55.5
範囲	20;60	22;60
人種、n(%)		
白人	17(94)	46(98)
アジア人	1(6)	0
黒人／アフリカ系アメリカ人	0	1(2)
BMI(kg/m ²)		
平均値(SD)	25.04(2.25)	25.64(2.196)
中央値	24.88	25.78
範囲	20.2;28.8	19.9;29.7

【 0 1 0 4 】

薬物動力学

0.005、0.020並びに0.050 mg/kgの低用量のFR104は信頼できるPK変数推定の為には不十分な測定可能濃度を生じた。図5Aに図解しているのは残りの投薬グループのFR104濃度-時間データである。コホートA（グループ1-4、KLH免疫なし、FR104を0.005から0.5 mg/kg投薬している）において、FR104の薬物動力学は、0.200 mg/kg用量からほぼ線形であり、と $T_{1/2}$ が146（0.200 mg/kg）から182時間（0.500 mg/kg）であった。コホートB（集団7-9の2、KLH免疫）においては、コホートAと同様に、FR104の薬物動力学は0.200 mg/kg用量からほぼ線形であり、 $T_{1/2}$ が150（0.200 mg/kg）から210時間（1.500 mg/kg）であった。FR104の C_{max} 平均値は0.004から1.5 mg/kg投薬後、117から37700 ng/mlの範囲であり、並びに AUC_{inf} は0.2 - 1.5 mg/kg投薬後、0.705から7.010 mg/mlの範囲であった。

【 0 1 0 5 】

FR104のPKは28日離し投与された0.2並びに0.5 mg/kgの2つのFR104の注入後に評価された（パート2）。薬物動力学はほぼ線形であり $T_{1/2}$ が169から203時間の範囲であった。PK変数はFR104の0.200 mg/kgの注入後1日目並びに29日目で似ていた。血清濃度の蓄積は0.500 mg/kgのFR104の注入後観測され、投薬量-標準化 AUC_{0-28d} 並びに AUC_{inf} がおおよそ20%上昇した。

【 0 1 0 6 】

薬力学

10

20

30

40

50

FR104の注入後、末梢血中のT細胞上の用量依存性CD28ROが観測された(図5B)。CD28受容体は0.020mg/kg並びにより高い濃度の投薬量のFR104の注入後第1のサンプリング時点(0.5時間)で飽和された。0.500mg/kgと1.500mg/kgの投薬量のFR104の注入後29日でROはまだ50%以上であった。CD28 ROは、15日目(0.020mg/kg)から85日目(1.500mg/kg)までに、投薬量依存的に50%に戻った。CD28 ROは、FR104血清濃度が定量下限値(<100ng/mL)をちょうど超える場合に50%以上であり、200ng/mL以上のFR104血清濃度の際に80%以上であった。このことは、FR104がその受容体に対してインビボで高い親和性を有し低濃度のFR104でさえ薬理的に活性であり得ることを示唆している。0.200mg/kgの第2の投薬注入後、受容体は再び飽和になり、60日以上継続して50%以上飽和した。28日間離した0.500mg/kgの二度の投薬から60日以上受容体を100%飽和する結果を得た。

10

【0107】

総リンパ球数、及びナイーブT細胞、記憶T細胞及びTreg細胞を含むリンパ球サブセットは、FR104のどの投薬量及びどの投薬計画によっても有意な変化が引き起こされず、およびこれらのサブセットのレベルはどのグループでも研究間に有意に変化しなかった。MFIの測定で評価したリンパ球サブセットによるCD28の発現レベルも影響がなかった(図6)。

【0108】

20

以前、ヒトへのスーパーアゴニスト又は二価アンタゴニストである抗CD28mAbの投薬後サイトカインの放出が生じていたために、サイトカイン放出の可能性を厳密に追跡調査した。どのボランティアの血清中でもサイトカインの上昇は観測されなかった。背景レベルのみが記録され、それらは臨床的に関係がないと考えられた(図7及び図8A)。このバラツキのため、アッセイは、0.100mg/kg以上の容量でのFR104の投与後2並びに96時間時点でのみIL-2合成誘導の有意な阻害を捉え、しかし他の時点では捉えられなかった(図8B)。SEB+LPS誘導性のINF並びにIL-8(これらは非T細胞によっても分泌されるサイトカインである)の合成は、どのグループのFR104での処理によっても調節されなかった。

【0109】

30

抗KLH抗体の抑制

KLHチャレンジへの応答に対するFR104の効果は、抗KLH抗体の測定により評価された。抗KLH抗体の生成は顕著に遅れ、並びにFR104の投薬量を上昇させてもその程度は低かった。0.020mg/kgの単回投薬後、抗KLH抗体の生産の減少はKLH免疫後15日ですでに可視的であり、29日目でプラセボグループの平均50%に達した。抗KLH反応は最終観測日(85日)まで、プラセボグループと比較してそのレベルが維持された。0.200mg/kgの単回投薬後、抗KLH抗体の生成の平均減少量は、プラセボグループの応答と比較して15日及び29日で約85%、並びに57日及び85日でそれぞれ70%及び60%であった。0.500mg/kgの単回投薬後、抗KLH抗体の生成の平均減少量は15日及び29日に90%以上、57日及び85日でそれぞれ約80%及び75%であった。最も高い投薬レベル(FR104 1.500mg/kg)で、抗KLH抗体の生成は実質的に57日まで抑制された。85日又は113日は、けれども、いくらかの反応(およそ75%の減少)が記録された(図9)。

40

【0110】

免疫原性

パート1のコホートA(KLH免疫なし)では、0人(0%)、2人(50%)、3人(60%)、及び1人(20%)の被検者は、それぞれの0.005mg/kg、0.050mg/kg、0.200mg/kg、及び0.500mg/kgでのFR104の注入後の最後の試料(85日)でFR104に対する抗体(ADA)陽性として報告された。パート1コホートB(KLH免疫)では、1人(20%)、3人(60.0%)、4人

50

(80.0%)及び2人(40%)の被検者がFR104をそれぞれ0.020mg/kg、0.200mg/kg、0.500mg/kg(85日)及び1.500mg/kg(113日)注入後の最終試料でFR104に対する抗体を持っていた。パート2(繰り返し投薬)では、3被検者(60%)が、0.200mg/kg、及び0.500mg/kgの両方のFR104注入後の最終試料(113日)でFR104に対する抗体を持っていた。最も早い抗FR104抗体はパート1の29日(コホートA及びB)並びにパート2の57日から検出された。およそ半分のADA+被検者(10/22)は比較的低い力価(<30)であった。彼らはAEを誘導せず、サイトカインの放出もまた修飾しなかった。抗FR104抗体が、存在する場合、全ての被検者において血液中のFR104の消失後にのみ現れたことを考慮すると、PKに対する潜在的な影響についての結論は得られない。

10

【0111】

安全性

FR104 0.500mg/kgの注入とならびにKLHチャレンジ後に、研究者により研究薬とは関係しないと考えられたSAE腎結石症が報告された1人の被験者を除いて、死者はなく、そしてまたSAEも研究の間に起きなかった。処置中に発生した有害事象(TEAE)による研究薬又は研究の継続ができなくなる被検者はいなかった。パート2の1人の被検者はAEである筋肉痛のための禁止薬物(イブプロフェン、パラセタモール及びトラマドール)を受けたためにFR104 0.500mg/kg、29日目の二度目の投薬を受けられなかった。被検者は研究から離脱せず、プロトコルどおりの全ての研究来診を完了した。全ての報告されたTEAEは軽度又は中程度の重症性であった(表12)。研究者が治験薬に少なくとも関連している可能性があると考えたTEAEは、FR104注入後のTEAEを報告した10人の被検者のうちの5人で報告されプラセボ注入後の被検者のうちのいずれにも報告されなかった。FR104注入後に最も頻繁に報告されたTEAEは、背痛、頭痛、および嘔吐であった。FR104注入後の処置に関連した事象である可能性があるものは頭痛、嘔吐、アフタ性口内炎、口腔ヘルペス、口渇、悪心、鼻咽頭炎、疲労、歯肉炎、味覚不全、下痢、視力ばけおよびインフルエンザ様の病気であった。

20

【0112】

研究臨床検査、ウイルス検査、バイタルサイン、酸素飽和度、並びにECGパラメータの中央値の臨床上関連する変化も一貫する変化も、いずれのボランティアにおいても、研究薬の投与後に測定されなかった。

30

【0113】

ベースライン後のEBVウイルス量は陰性若しくは弱陽性(1人の被検者を除いて)の結果であり、ならびにベースライン後のEBVカプシドIgM抗体は陰性若しくは研究中の全ての被検者であいまいな結果であった(図10)。EBVカプシド及び核抗原IgG抗体は全ての被検者で陽性であり(そのことが試験対象被検者基準に属しているため)、及びその基準線レベルで研究中維持された(データ未掲載)。2回のプラセボのIV投薬を受けた1人の被験者は、15日目に陽性EBVウイルス量の結果を示し、ウイルス量はlog3.83IU/mlであった。この値は、例えば、移植場面では、臨床的に懸念されるほど高いと考えられる。次の29日の時点では、試験は陰性であった。その後の評価は、43日目は陰性で、57日目では2.71logIU/mlウイルス量を有する陽性で、85日は陰性で並びに113日は2.5以下のlogIU/mlウイルス量の陽性であった。

40

【0114】

研究の間、450ms以上のQTcF間隔、及び基準線からの30ms以上のQTcF変化はプラセボ注入及びKLHチャレンジ後のコホートBの1人の被検者で報告された。パート2では、1人の被検者は0.200mg/kgのFR104の注入後450ms以上のQTcF間隔が報告され、1人の被検者は0.200mg/kgのFR104の注入後に基準線からの60ms以上のQTcF変化を、並びに1人及び3人の被検者はそれぞれ0.200mg/kg及び0.500mg/kgのFR104の注入後に基準線から3

50

0 m s 以上の Q T c F 変化が報告された。臨床上的重大なバイタルサイン、脈動酸素測定又は E C G 異常はパート 1 (コホート A 及び B) 並びにパート 2 では観測されなかった。

【 0 1 1 5 】

コホート A の 2 被検者並びにパート 2 の 3 被検者を除き研究の間に身体検査の異常は報告されなかった。これら 5 人の被検者について、異常は臨床的であると考えられ、コホート A では鼻咽頭炎、及び結膜炎が、パート 2 では上気道感染症、筋肉痛、及び痛風が観察されて T E A E として報告された。：

【 0 1 1 6 】

【表 1 2】

パート 1 (コホート A 及び B) 並びにパート 2 中の処置毎の T E A E の要約

パート1、コホートA						
	プラセボ	FR104 0.005 mg/kg	FR104 0.050 mg/kg	FR104 0.200 mg/kg	FR104 0.500 mg/kg	FR104 全被検者
下記のうち少なくとも 1つを有する被験者の数						
TEAE	2(33.3)	1(33.3)	3(75.0)	4(80.0)	2(40.0)	10(58.8)
SAE	0	0	0	0	0	0
死に至るTEAE	0	0	0	0	0	0
軽度なTEAE(重症性が最も高いもの)	1(16.7)	0	3(75.0)	1(20.0)	0	4(23.5)
中度のTEAE(重症性が最も高いもの)	1(16.7)	1(33.3)	0	3(60.0)	2(40.0)	6(35.3)
重度のTEAE(重症性が最も高いもの)	0	0	0	0	0	0
研究薬を継続しなかったTEAE	0	0	0	0	0	0
少なくとも処置に関連する可能性があるTEAE	0	0	1(25.0)	3(60.0)	1(20.0)	5(29.4)

パート1、コホートB						
	プラセボ	FR104 0.020 mg/kg	FR104 0.200 mg/kg	FR104 0.500 mg/kg	FR104 1.500 mg/kg	FR104 全被検者
下記のうち少なくとも 1つを有する被験者の数						
TEAE	7(87.5)	3(60.0)	3(60.0)	3(60.0)	1(20.0)	10(50.0)
SAE	0	0	0	1(20.0)	0	1(5.0)
死に至るTEAE	0	0	0	0	0	0
軽度なTEAE(重症性が最も高いもの)	6(75.0)	2(40.0)	2(40.0)	1(20.0)	1(20.0)	6(30.0)
中度のTEAE(重症性が最も高いもの)	1(12.5)	1(20.0)	1(20.0)	2(40.0)	0	4(20.0)
重度のTEAE(重症性が最も高いもの)	0	0	0	0	0	0
研究薬を継続しなかったTEAE	0	0	0	0	0	0
少なくとも処置に関連する可能性があるTEAE	2(25.0)	1(20.0)	1(20.0)	1(20.0)	0	3(15.0)

パート2				
	プラセボ	FR104 0.200 mg/kg	FR104 0.500 mg/kg	FR104 全被検者
下記のうち少なくとも 1つを有する被験者の数				
TEAE	3(75.0)	5(100.0)	4(80.0)	9(90.0)
SAE	0	0	0	0
死に至るTEAE	0	0	0	0
軽度なTEAE(重症性が最も高いもの)	2(50.0)	2(40.0)	3(60.0)	5(50.0)
中度のTEAE(重症性が最も高いもの)	1(25.0)	3(60.0)	1(20.0)	4(40.0)
重度のTEAE(重症性が最も高いもの)	0	0	0	0
研究薬を継続しなかったTEAE	0	0	0	0
少なくとも処置に関連する可能性があるTEAE	1(25.0)	2(40.0)	3(60.0)	5(50.0)

【 0 1 1 7 】

考察

この試験は F R 1 0 4 ヒト化ペグ化 F a b ' s 抗体断片である C D 2 8 のアンタゴニストのヒトに対する初めての投薬である。F R 1 0 4 は全ての投薬量で十分に許容され、最

10

20

30

40

50

も一般的に処置中に発生した A E は頭痛であった。F R 1 0 4 の投薬はサイトカイン放出症候群とも T 細胞の活性化とも関連しなかった。C D 2 8 を標的にするための抗 C D 2 8 モノクローナル抗体 (T G N 1 4 1 2 (Suntharalingam et al)、F K 7 3 4 (Shiao et al)) を用いた以前の試みでは、サイトカインの放出が誘導されることによって臨床開発は困難となった。F R 1 0 4 はこのような困難とは関係ないので、この一価のアнтаゴニスト抗体を用いる C D 2 8 の標的化は、共刺激の阻害のための魅力的な治療戦略のままである。

【 0 1 1 8 】

ヒトの血清中のサイトカインの評価は、反復投薬後でさえ、いずれの用量の F R 1 0 4 のアゴニスト活性もスーパーアゴニスト活性も完全に欠失していることを証明した。ベースライン、又は F R 1 0 4 の投与後 (図 7) に記録した何人かの被検者中の背景又は背景に近いレベルの I F N γ 、T N F α 及び I L - 8 は、T G N 1 4 1 2 の投与後に測定したレベル (これら 2 つのサイトカインについて 5 0 0 0 p g / m l でピークに達するもの (Suntharalingam et al)) よりはるかに低い。抗薬物抗体 (A D A) は、存在する場合、ほとんどの被検者において、血漿から F R 1 0 4 の除去後初めて明白になった。それゆえ、P K 及び P D パラメーター並びに特にサイトカインに対する A D A の効果を評価することは難しい。1 人の被検者では、けれども、A D A は C D 2 8 R O がまだ測定できた間に明白になる (パート 2、0 . 2 m g / k g の M A D)。この被検者ではサイトカイン放出もなかった。このことは、F R 1 0 4 が、A D A 存在下で I g G 形態の抗 C D 2 8 抗体のアゴニスト特性を再現しないという臨床前の観測を支持する。注目すべきは、比較的高い頻度で発生する F R 1 0 4 の免疫原性は、認可された生物製剤のシムジア登録商標 (セルトリズマブ ペゴル)、ペグ化 F a b ' 抗体断片並びにレミケード及びヒュミラ ; (シムジア 臨床薬理学 B L A 1 2 5 1 6 0 / 0) のようないくつか他の生物製剤で報告された範囲と似ている。F R 1 0 4 は総リンパ球数もリンパ球サブセットを変えなかった。T 細胞表現型もまた改変されなかった。C D 2 8 がまた標的組織への刺激を受けた T 細胞の移動を調整し得る事を考えると、これらのデータはサイトカインの放出の欠如並びに標的の T 細胞の活性化の欠如と合わせて F R 1 0 4 の純粋なアンタゴニスト活性を補強する。

【 0 1 1 9 】

F R 1 0 4 の P K は 0 . 2 0 0 m g / k g 以上の投薬でほぼ線形と考えられる。t_{1/2} 及び A U C_{inf} 並びに関連するパラメーターのわずかなばらつきのみが同じ投薬量のグループ (S A D 及び M A D) の間で観測された。

【 0 1 2 0 】

参考文献

【 0 1 2 1 】

Bowen, M., Armstrong, N., and Maa, Y.-F. (2012). Investigating high-concentration monoclonal antibody powder suspension in nonaqueous suspension vehicles for subcutaneous injection. J. Pharm. Sci. 101, 4433-4443.

Findlay L, Eastwood D, Stebbings R, Sharp G, Mistry Y, Ball C, et al. Improved in vitro methods to predict the in vivo toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412. J Immunol Methods. 2010;352:1-12.

Haanstra KG., Dijkman K., Bashir N., et al. Selective Blockade of CD28-Mediated T Cell Costimulation Protects Rhesus Monkeys against Acute Fatal Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol. 2015 Jan 14. pii: 1402563. [Epub ahead of print].

Haley PJ. Small molecule immunomodulatory drugs: challenges and approaches for balancing efficacy with toxicity. Toxicol Pathol. 2012;40(2):261-266.

Jackisch, C., Muller, V., Maintz, C., Hell, S., and Ataseven, B. (2014). Subcutaneous Administration of Monoclonal Antibodies in Oncology. Geburtshilfe Frauenheilkd. 74, 343-349.

10

20

30

40

50

Kean L. et al, T cell Costimulation Blockade in Transplantation. Oral communication at the Nantes Actualites Transplantation Meeting, June 5-6, 2014, Nantes, France

Melichar, B., Studentova, H., Kalabova, H., and Vitaskova, D. (2014). Role of subcutaneous formulation of trastuzumab in the treatment of patients with HER2-positive breast cancer. *Immunotherapy* 6, 811-819.

Ohresser M, Olive D, Vanhove B, Watier H. Risk in drug trials. *Lancet*. 2006 368(9554):2205-6.

Poirier, N., Dilek, N., Mary, C., et al. FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody, Prevents Alloimmunization and Allows Calcineurin Inhibitor Minimization in Nonhuman Primate Renal Allograft. *Am J Transplant*. 2015 (1):88-100.

10

Poirier, N., Mary, C., Dilek, N. et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody. *Am J Transplant*. 2012 (10):2630-40.

Poirier, N., Mary, C., Le Bas-Bernadet, S., N. et al. Advantages of Papio anubis for preclinical testing of immunotoxicity of candidate therapeutic antagonist antibodies targeting CD28. *MAbs*. 2014 (3):697-707.

Shiao SL, McNiff JM, Masunaga T, Tamura K, Kubo K, and Pober JS. Immunomodulatory properties of FK734, a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities. *Transplantation*. 2007;83(3):304-13.

20

Shpilberg, O., and Jackisch, C. (2013). Subcutaneous administration of rituximab (MabThera) and trastuzumab (Herceptin) using hyaluronidase. *Br. J. Cancer* 109, 1556-1561.

Stebbing R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. 'Cytokine storm' in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve pre-clinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol*. 2007;179:3325-3331.

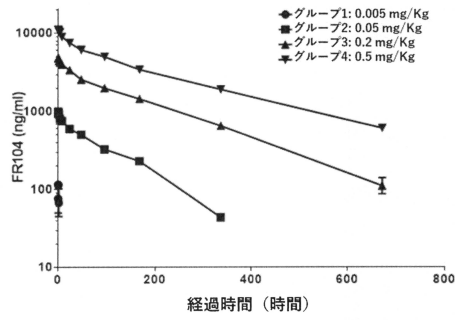
Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, and Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006;355(10):1018-28.

30

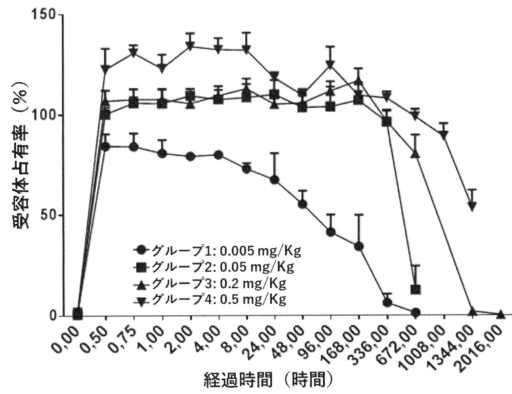
Vierboom et al., Clinical efficacy of a new CD28-targeting antagonist of T cell co-stimulation in a non-human primate model of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2015.

Weinblatt, M.E., Schiff, M., Valente, R., van der Heijde, D., Citera, G., Zhao, C., Maldonado, M., and Fleischmann, R. (2013). Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: findings of a phase IIIb, multinational, prospective, randomized study. *Arthritis Rheum*. 65, 28-38.

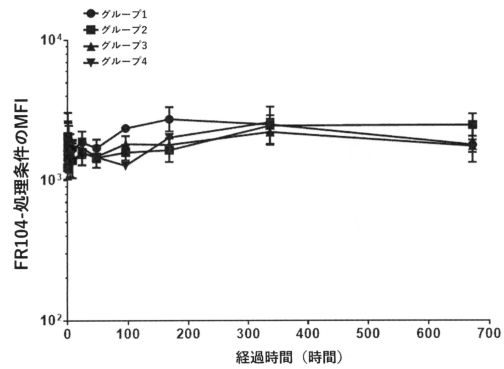
【図 1 A】



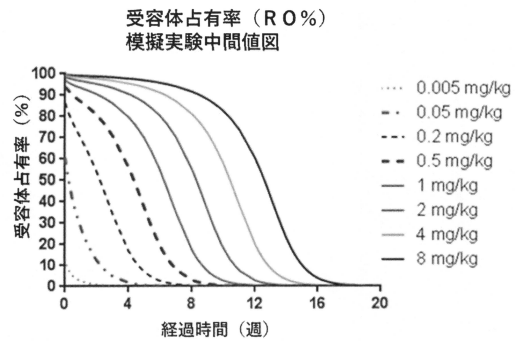
【図 1 B】



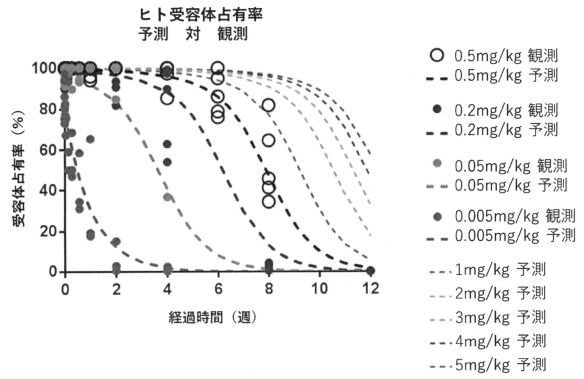
【図 3】



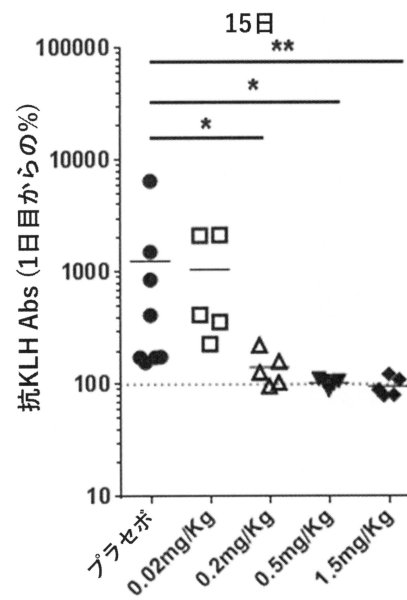
【図 2 A】



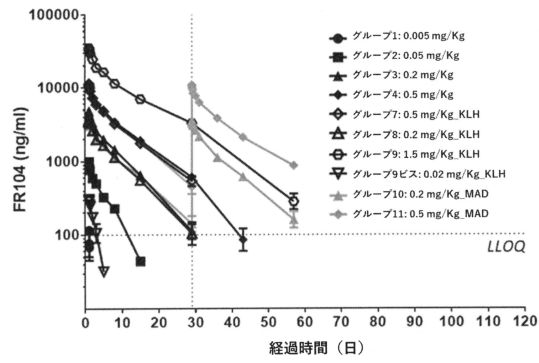
【図 2 B】



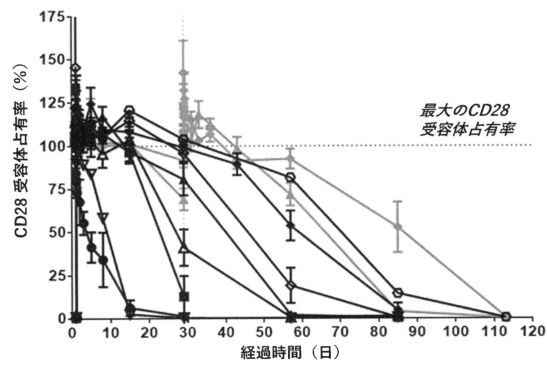
【図 4】



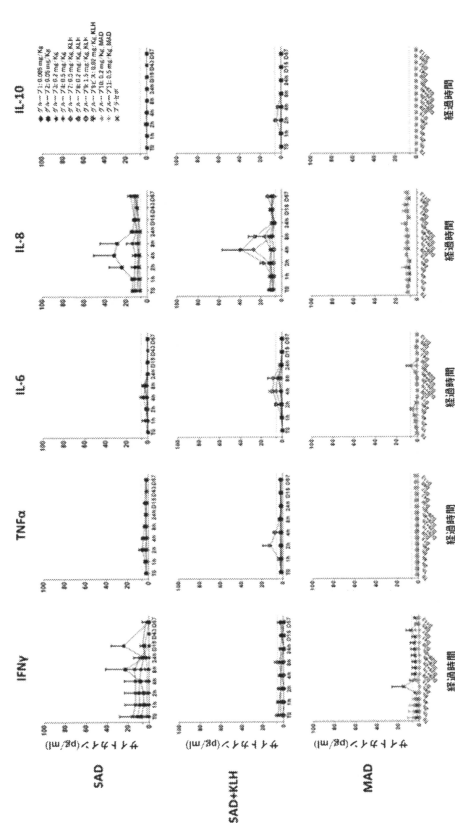
【図 5 A】



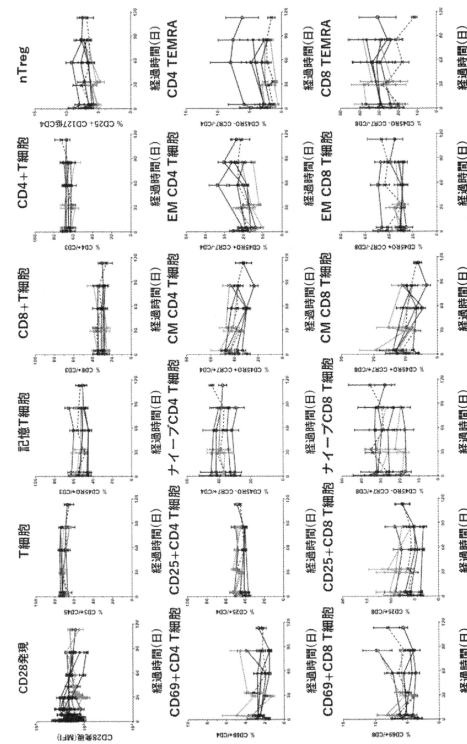
【図 5 B】



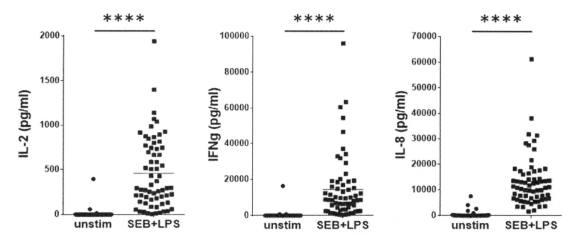
【図 7】



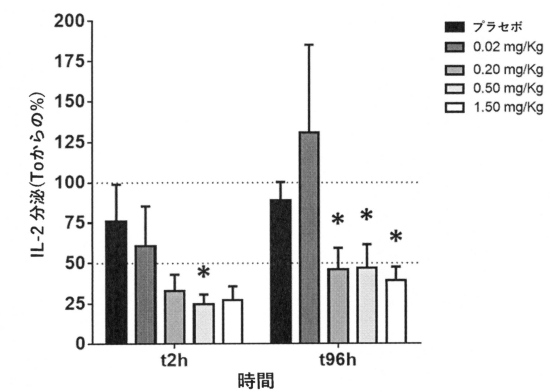
【図 6】



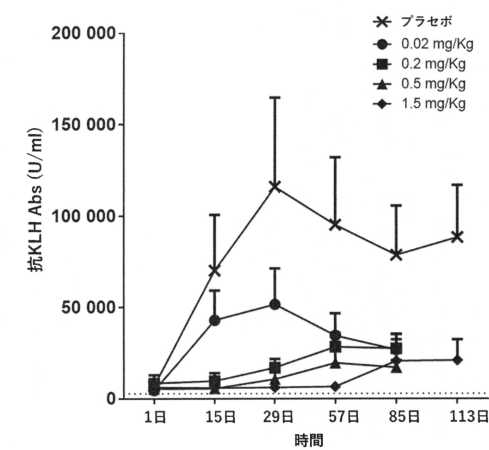
【図 8 A】



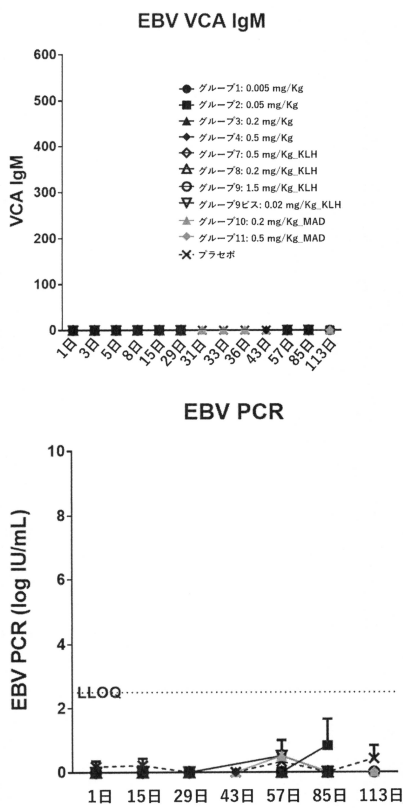
【図 8 B】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 配列表 】

0006923528000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 ヴァンホーフ、ベルナル

フランス、4 4 4 0 0 ルゼ、リュ アンリ バルビュッス、7 2 ビス

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 1 9 3 8 9 (J P , A)

11th WORLD CONGRESS ON INFLAMMATION THE ABSTRACTS , International Association of Inflammation Societies , 2 0 1 3 年 9 月 , p. 75

The Journal of Immunology , 2 0 1 5 年 1 1 月 2 3 日 , Vol. 196 , p. 274-283

The Journal of Immunology , 2 0 1 5 年 1 月 1 4 日 , Vol. 194 , p. 1454-1466

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K、A 6 1 P、C 0 7 K

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

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