

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-547948

(P2022-547948A)

(43)公表日 令和4年11月16日(2022.11.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	A 6 1 P	25/04	Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 P	25/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/06		4 C 0 8 6
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P	3/02 (2006.01)	A 6 1 P	3/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全112頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-515624(P2022-515624)	(71)出願人	399019892		
(86)(22)出願日	令和2年9月9日(2020.9.9)		ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ		
(85)翻訳文提出日	令和4年4月18日(2022.4.18)		THE UNIVERSITY OF C		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/070511		H I C A G O		
(87)国際公開番号	WO2021/051130		アメリカ合衆国 6 0 6 3 7 イリノイ州シ		
(87)国際公開日	令和3年3月18日(2021.3.18)		カゴ、サウス・エリス・アベニュー 5 8		
(31)優先権主張番号	62/897,686		0 1 番		
(32)優先日	令和1年9月9日(2019.9.9)	(71)出願人	522091092		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		スーラ セラピューティクス		
(31)優先権主張番号	62/946,122		アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州		
(32)優先日	令和1年12月10日(2019.12.10)		シカゴ イースト フィフティースード		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100102978		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 清水 初志		
		(74)代理人	100102118		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 片頭痛の処置のための併用療法

(57)【要約】

本開示は、片頭痛およびある特定の疼痛関連障害を併用療法で処置するための方法および組成物を提供することにより、当技術分野における必要性に対処する。したがって、本開示の局面は、片頭痛、外傷後頭痛、または慢性疼痛症候群の患者を処置するための方法であって、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤を患者に投与する段階を含む該方法に関する。さらなる局面は、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)およびCGRP阻害剤を含む組成物に関する。患者において線維筋痛症または慢性疲労症候群を処置するための方法であって、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子を患者に投与する段階を含む該方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

慢性疼痛症候群患者を処置するための方法であって、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子を該患者に投与する段階を含み；慢性疼痛症候群が、線維筋痛症または慢性疲労症候群を含む、該方法。

【請求項 2】

IGFR活性化因子が、少なくとも1週間の期間にわたって1週間当たりに1～2回投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤の投与をさらに含む、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

片頭痛、外傷後頭痛、または慢性疼痛症候群の患者を処置するための方法であって、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤を患者に投与する段階を含む、該方法。

【請求項 5】

CGRP阻害剤が、CGRP抗体、CGRP受容体抗体、CGRP抗体もしくはCGRP受容体抗体由来の抗原結合断片、CGRP阻害性融合タンパク質、CGRP生体中和剤(bionetrizing agent)、CGRP受容体アンタゴニスト、小分子阻害剤、またはポリペプチド阻害剤を含む、請求項3または4記載の方法。

【請求項 6】

前記方法が片頭痛患者を処置する段階を含み、片頭痛が、慢性、急性、突発性、高頻発性、前庭性、眼性、複雑性、月経性、無痛性、ホルモン性、ストレス性、群発性、または血管性としてさらに定義される、請求項4または5記載の方法。

【請求項 7】

患者が片頭痛の症状に苦しんでいる、請求項4～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

患者が、急性片頭痛、突発性片頭痛、頻発性片頭痛、および慢性片頭痛の1つまたは複数に苦しんでいる、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

前記方法が慢性疼痛症候群患者を処置する段階を含み、慢性疼痛症候群が、神経学的疼痛、筋骨格痛、胃腸痛、線維筋痛症、慢性疲労症候群、または亢進した疼痛反応を含む、請求項3～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

IGFR活性化因子が、IGF-1またはインスリンを含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

IGFR活性化因子が、IGF-1である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

CGRP阻害剤が、CGRP抗体またはCGRP受容体抗体を含む、請求項3～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

CGRPまたはCGRP受容体抗体が、阻害性抗体を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

患者が、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子、ならびにCGRPまたはCGRP受容体抗体からの重鎖可変領域および軽鎖可変領域の一方または両方を含むCGRPまたはCGRP受容体抗体抗原結合断片を投与される、請求項3～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

前記重鎖可変領域が、CGRPもしくはCGRP受容体抗体の重鎖可変領域からのHCDR1

10

20

30

40

50

、HCDR2、およびHCDR3を含み、ならびに/または前記軽鎖可変領域が、CGRPもしくはCGRP受容体抗体の軽鎖可変領域からのLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む、請求項14記載の方法。

【請求項16】

前記重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域が、CGRPまたはCGRP受容体抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む、請求項15記載の方法。

【請求項17】

前記抗体または抗原結合断片が、フレマネズマブ、エレヌマブ、ガルカネズマブ、エプチネズマブ、またはそれらの抗原結合断片を含む、請求項12～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

CGRP阻害剤が50～800 mgの用量で投与される、請求項1～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

CGRP阻害剤が毎月投与される、請求項1～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

CGRP阻害剤が小分子を含む、請求項3～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

小分子が、ウブロゲパント、リメゲパントまたはアトゲパントを含む、請求項20記載の方法。

【請求項22】

IGFR活性化因子および/またはCGRP阻害剤が、非経口的に、経口的に、および/または局所的に投与される、請求項1～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

IGFR活性化因子およびCGRP阻害剤が、同じ組成物中にある、請求項4～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

第2のIGFR活性化因子を投与する段階をさらに含み、任意で、第2のIGFR活性化因子がインスリンを含んでもよい、請求項1～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

IGFR活性化因子およびCGRP阻害剤の一方または両方が、患者に鼻腔内投与される、請求項3～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

CGRP阻害剤が皮下投与される、請求項3～25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

IGFR活性化因子が鼻腔内投与される、請求項1～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

約0.1 ngから約2.0 gのIGFR活性化因子が患者に投与される、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

患者に、1用量あたりにIGFR活性化因子および/またはCGRP阻害剤を含む組成物が最大で約10 ml投与される、請求項3～28のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

最大で1日4回まで患者にIGFR活性化因子およびCGRP阻害剤の一方または両方を投与する段階をさらに含む、請求項3～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

患者が4～8時間ごとにIGFR活性化因子およびCGRP阻害剤の一方または両方を投与される、請求項3～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項32】

患者が毎日、毎週、毎月、四半期ごとに、または毎年、IGFR活性化因子およびCGRP

10

20

30

40

50

阻害剤の一方または両方を投与される、請求項3～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

患者にIL-11および/またはインターフェロン γ を投与する段階をさらに含む、請求項1～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

前記組成物が、患者の中枢神経系を変化させる、請求項1～33のいずれか一項記載の方法。

【請求項35】

患者が、4週間の期間で1回または複数回の片頭痛を経験している、請求項4～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項36】

患者が、投与前の過去24時間において少なくとも3時間持続する少なくとも1回の片頭痛を経験している、請求項4～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

患者が、18歳またはそれ以上であるヒト患者である、請求項1～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

片頭痛が、前兆を伴う片頭痛としてさらに定義される、請求項4～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

患者が、視覚障害、しびれ、めまい、言語障害、運動失調、構音障害、回転性めまい、耳鳴り、聴力低下、複視、意識低下、異痛症、および片側性視覚障害を含む1つまたは複数の症状を有する患者としてさらに定義される、請求項1～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項40】

症状が、頭または首の一側面にあるものとしてさらに定義されている、請求項39記載の方法。

【請求項41】

前兆または症状が、頭痛が始まる前に始まる、請求項38～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

患者が、虚血と診断されていなかったか、または診断されていない、請求項1～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

片頭痛が、前兆を伴わない片頭痛としてさらに定義される、請求項4～37または39～42のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

患者が、抗片頭痛薬もまた投与される、請求項4～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項45】

抗片頭痛薬が、IGFR活性化因子および/またはCGRP阻害剤と同じ組成物中にある、請求項44記載の方法。

【請求項46】

患者に、組成物を投与されてから24時間以内に抗片頭痛薬が投与される、請求項44または45記載の方法。

【請求項47】

追加の薬剤を投与する段階をさらに含む、請求項1～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項48】

追加の薬剤が、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)、血管作動性腸ペプチド(VIP)、PACAP/VIP受容体(PAC1、VPAC1およびVPAC2)を活性化または阻害する、請求項47記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

追加の薬剤が、PACAP、VIP、PACAP受容体、およびVIP受容体の阻害剤の1つまたは複数を含む、請求項48記載の方法。

【請求項 50】

追加の薬剤が、一過性受容体電位(TRP)チャネルを活性化または阻害する、請求項47記載の方法。

【請求項 51】

追加の薬剤が、TRPおよびTRP受容体の阻害剤の1つまたは複数を含む、請求項50記載の方法。

【請求項 52】

IGFR活性化因子、CGRP阻害剤、抗片頭痛薬、および/または追加の薬剤が、同時投与される、および/または同じ組成物中にある、請求項47～51のいずれか一項記載の方法。

【請求項 53】

追加の薬剤が、ポリペプチド、核酸、または小分子を含む、請求項47～52のいずれか一項記載の方法。

【請求項 54】

処置することが、脳の過興奮を低減すること、拡張性抑制を低減すること、および/または酸化ストレスを低減することを含む、請求項1～53のいずれか一項記載の方法。

【請求項 55】

処置することが、三叉神経系における酸化ストレスを低減することを含む、請求項1～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 56】

拡張性抑制が、皮質拡張性抑制を含む、請求項54または55記載の方法。

【請求項 57】

IGF-1およびCGRP阻害剤を含む組成物。

【請求項 58】

鼻腔内、非経口、経口、および/または局所投与用に製剤化される、請求項57記載の組成物。

【請求項 59】

追加の抗片頭痛薬または追加の薬剤をさらに含む、請求項57または58記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年9月9日付で出願された米国特許仮出願第62/897,686号、および2019年12月10日付で出願された米国特許仮出願第62/946,122号の優先権の恩典を主張するものであり、これらは全て参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府支援の声明

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号NS019108およびNS108824の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

I. 発明の分野

本発明は広くは、医学および神経学に関する。具体的には、態様は、片頭痛および関連する神経学的障害の処置を対象にする。

【背景技術】

【0004】

II. 背景

片頭痛は、医学で最も一般的な病状の1つである、複雑で再発性の障害である。米国では、年間3,000万人以上が1つまたは複数の片頭痛を患っている。片頭痛を経験する全て

10

20

30

40

50

の人のおよそ75%が女性である。

【0005】

片頭痛は、頭蓋内血管収縮とそれに続くリバウンド血管拡張に起因する血管現象と以前は考えられていた。しかし、現在、神経血管理論では、片頭痛は主に脳灌流の二次的変化を伴う神経原性プロセスと記述されている。神経血管理論では、複雑な一連の神経および血管イベントが片頭痛を引き起こすと考えている。

【0006】

前兆を伴う片頭痛の神経学的メカニズムを説明するために、皮質拡張性抑制(CSD)の理論が提起されている。CSDは、最初の神経興奮とそれに続く神経沈黙、その後再びその起源部位から広がる皮質灰白質領域で正常に戻る興奮の明確に定義された波である。この一過性の細胞脱分極は、一次皮質現象または前兆相を引き起こすと理解されている；次に、それは三叉神経線維を活性化し、頭痛段階を引き起こす。同様の変化は、前兆の有無にかかわらず片頭痛による痛みを引き起こすと理解されている。CSDは、電気生理学的活動亢進の波とそれに続く抑制の波であり、視覚野で最も頻繁に見られる。ヒトでの片頭痛の閃輝暗点(視覚的前兆)は、Leaoの拡張性抑制と称される神経生理学的現象に関連している可能性がある。

【0007】

片頭痛の処置には、急性(頓挫)および予防(防護)療法が含まれる。頻繁な発作を有する患者は両方を必要としうる。急性処置は、頭痛の進行を止めることもしくは防ぐこと、または始まった頭痛を元に戻すことを目的としている。頭痛がない場合でも行われる予防処置は、片頭痛発作の頻度と重症度を軽減し、急性発作を頓挫療法に対してより敏感にし、おそらく患者の生活の質を改善することを目的としている。新しいCGRP抗体は、片頭痛を処置するための追加の治療アプローチに当たる。しかし、これらの治療法はすべての患者に効果があるわけではない。機械感受性一次求心性髄膜侵害受容体の活性化に対する影響の違いから、CGRP抗体が全ての患者に効果があるわけではない理由が説明され始める可能性がある。もう1つの考慮すべき重要なことは、これらの薬剤が三叉神経系の痛みに関連するCGRPを遮断することで侵害受容体活性化を低減する一方で、片頭痛の根本的な原因である脳の過興奮と酸化ストレスに影響を与えることなくそうすることである。したがって、追加の有効性を提供しうる改善された治療法または併用処置が当技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

本開示は、片頭痛およびある特定の疼痛関連障害を併用療法で処置するための方法および組成物を提供することにより当技術分野における必要性に対処する。したがって、本開示の局面は、片頭痛、外傷後頭痛、または慢性疼痛症候群の患者を処置するための方法であって、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤を患者に投与する段階を含む該方法に関する。さらなる局面は、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)およびCGRP阻害剤を含む組成物に関する。

【0009】

さらなる局面は、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤を患者に投与する段階を含む、患者における拡張性抑制を処置するための方法に関する。いくつかの態様において、拡張性抑制は、拡張性抑制に関連する脱髄としてさらに定義される。いくつかの態様において、拡張性抑制に関連する脱髄は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、急性もしくは慢性外傷後脳損傷、筋萎縮性側方硬化症、ハンチントン病、うつ病、統合失調症、放射線誘発性脳炎、または酸素欠乏誘発性脳炎で起こるか、またはそれらに関連する拡張性抑制脱髄を含む。さらなる局面は、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤を患者に投与する段階を含む、虚血性脳卒中、毒素誘発性脳症、感染性因子誘発性脳症、または急性脳浮腫を処置するための方法に関する。いくつかの態様において、拡張性抑制は、拡張性抑制に関連する脱髄としてさ

10

20

30

40

50

らに定義される。いくつかの態様において、患者を処置することは、患者における拡張性抑制を処置または阻止することを含む。

【0010】

さらなる局面は、慢性疼痛症候群患者を処置するための方法であって、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子を患者に投与する段階を含み；ここで慢性疼痛症候群が線維筋痛症または慢性疲労症候群を含む、該方法に関する。

【0011】

いくつかの態様において、CGRP阻害剤は、CGRP抗体、CGRP受容体抗体、CGRP抗体もしくはCGRP受容体抗体由来の抗原結合断片、CGRP阻害性融合タンパク質、CGRP生体中和剤(bionutralizing agent)、CGRP受容体アンタゴニスト、小分子阻害剤、またはポリペプチド阻害剤を含む。いくつかの態様において、抗体断片は、scFv、ダイアボディ、または単ドメイン抗体を含む。いくつかの態様において、抗体断片は、本明細書において記述される抗体断片を含む。いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二価抗体、またはキメラ抗体を含む。いくつかの態様において、抗体は、本明細書において記述される抗体の態様によってさらに定義される。

【0012】

いくつかの態様において、片頭痛は、慢性、急性、突発性、前庭性、眼性、複雑性、月経性、無痛性、ホルモン性、ストレス性、群発性、または血管性としてさらに定義される。いくつかの態様において、片頭痛は慢性として定義される。いくつかの態様において、片頭痛は急性として定義される。いくつかの態様において、片頭痛は突発性として定義される。いくつかの態様において、片頭痛は群発性または群発性頭痛として定義される。いくつかの態様において、片頭痛は高周波片頭痛としてさらに定義される。

【0013】

「急性片頭痛」という用語は、単一の発作として定義され、通常、片頭痛の「急性」処置を論じる場合に用いられる。「急性」処置は、所与の発作を止めるために頓挫性である；「予防的薬物投与(prophylactic medication)」が次の発作の傾向を低減するために(すなわち、高頻度または慢性の片頭痛患者において)用いられる。したがって、本開示の態様において、本開示の組成物は、予防的薬物投与としてさらに定義されうる。いくつかの態様において、本開示の組成物は、急性処置としてさらに定義されうる。「突発性片頭痛」という用語は、1ヶ月当たり平均0~14回の頭痛日を経験する、経験した、または経験する患者での片頭痛をいう。慢性片頭痛は、1ヶ月当たり平均15回の頭痛日またはそれ以上を経験する、経験した、または経験する患者での片頭痛として定義される。「高周波片頭痛」という用語は、1ヶ月当たり平均4~14回の頭痛を経験する、経験した、または経験する患者での片頭痛または頭痛をいう。

【0014】

いくつかの態様において、患者は片頭痛の症状に苦しんでいる。いくつかの態様において、患者は急性片頭痛に苦しんでいる。いくつかの態様において、患者は突発性片頭痛に苦しんでいる。いくつかの態様において、患者は頻発性片頭痛に苦しんでいる。いくつかの態様において、患者は慢性片頭痛に苦しんでいる。

【0015】

いくつかの態様において、慢性疼痛症候群は、神経学的疼痛、筋骨格痛、胃腸痛、線維筋痛症、慢性疲労症候群、または亢進した疼痛反応を含む。

【0016】

いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、IGF-1またはインスリンを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、IGF-1を含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、SEQ ID NO:1~5のいずれか1つのポリペプチドを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、SEQ ID NO:1のポリペプチドまたはSEQ ID NO:1と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、SEQ ID NO:2のポリペプチドまたはSEQ ID NO:2と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、

SEQ ID NO:3のポリペプチドまたはSEQ ID NO:3と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、SEQ ID NO:4のポリペプチドまたはSEQ ID NO:4と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、SEQ ID NO:5のポリペプチドまたはSEQ ID NO:5と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、メカセルミンを含む。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、SEQ ID NO:1~5の1つと少なくとも75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100% (またはその中で導出可能な任意の範囲)の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

10

【0017】

いくつかの態様において、CGRP阻害剤は、CGRP抗体またはCGRP受容体抗体を含む。いくつかの態様において、CGRPまたはCGRP受容体抗体は、阻害性抗体を含む。いくつかの態様において、患者は、有効量のインスリン成長因子受容体(IGFR)活性化因子、ならびにCGRPまたはCGRP受容体抗体からの重鎖可変領域および軽鎖可変領域の一方または両方を含むCGRPまたはCGRP受容体抗体抗原結合断片を投与される。いくつかの態様において、重鎖可変領域は、CGRPもしくはCGRP受容体抗体の重鎖可変領域からのHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含み、ならびに/または軽鎖可変領域は、CGRPもしくはCGRP受容体抗体の軽鎖可変領域からのLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む。いくつかの態様において、重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域は、CGRPまたはCGRP受容体抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、フレマネズマブ、エレヌマブ、ガルカネズマブ、エプチネズマブ、またはそれらの抗原結合断片を含む。いくつかの態様において、抗体は、フレマネズマブを含む。いくつかの態様において、抗体は、フレマネズマブ由来の抗原結合断片を含む。

20

【0018】

いくつかの態様において、CGRP阻害剤は小分子を含む。いくつかの態様において、小分子はゲパントを含む。いくつかの態様において、阻害剤は、アトゲパント、BI 44370、MK-3207、BMS-927711、オルセゲパント、リメゲパント、テルカゲパント、およびウブロゲパントの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、小分子は、ウブロゲパント、リメゲパント、アトゲパント、またはそれらの組み合わせを含む。

30

【0019】

いくつかの態様において、IGFR活性化因子および/またはCGRP阻害剤は、非経口的に、経口的に、および/または局所的に投与される。いくつかの態様において、IGFR活性化因子およびCGRP阻害剤は、同じ組成物中にある。いくつかの態様において、IGFR活性化因子およびCGRP阻害剤は、異なる組成物中にある。いくつかの態様において、本方法は、第2のIGFR活性化因子を投与する段階をさらに含み、任意で、第2のIGFR活性化因子はインスリンを含んでもよい。いくつかの態様において、組成物は第2のIGFR活性化因子を含み、任意で、第2のIGFR活性化因子はインスリンを含んでもよい。いくつかの態様において、IGFR活性化因子およびCGRP阻害剤の一方または両方が、患者に鼻腔内投与される。いくつかの態様において、CGRP阻害剤は皮下投与される。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は鼻腔内投与され、CGRP阻害剤は皮下投与される。いくつかの態様において、CGRP阻害剤は非経口投与される。

40

【0020】

いくつかの態様において、約0.1 ngから約2.0 gのIGFR活性化因子が患者に投与される。いくつかの態様において、少なくとも0.1 ng、0.5 ng、1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng、25.0 ng、50 ng、75 ng、100 ng、125 ng、150 ng、175 ng、200 ng、225 ng、250 ng、275 ng、300 ng、325 ng、350 ng、375 ng、400 ng、425 ng、450 ng、575 ng、600 ng、625 ng、650 ng、675 ng、700 ng、725 ng、750 ng、775 ng、800 ng、825 ng、850 ng、875 ng、900 ng、925 ng

50

、950 ng、975 ng、1 µg、10 µg、20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、60 µg、70 µg、80 µg、90 µg、100 µg、125 µg、150 µg、175 µg、200 µg、225 µg、250 µg、275 µg、300 µg、325 µg、350 µg、375 µg、400 µg、425 µg、450 µg、475 µg、500 µg、525 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、800 µg、825 µg、850 µg、875 µg、900 µg、925 µg、950 µg、975 µg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg、175 mg、200 mg、225 mg、250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg、625 mg、650 mg、675 mg、700 mg、725 mg、750 mg、775 mg、800 mg、825 mg、850 mg、875 mg、900 mg、1 g、1.5 g、もしくは2 g (またはその中で導出可能な範囲)、多くとも0.1 ng、0.5 ng、1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng、25.0 ng、50 ng、75 ng、100 ng、125 ng、150 ng、175 ng、200 ng、225 ng、250 ng、275 ng、300 ng、325 ng、350 ng、375 ng、400 ng、425 ng、450 ng、575 ng、600 ng、625 ng、650 ng、675 ng、700 ng、725 ng、750 ng、775 ng、800 ng、825 ng、850 ng、875 ng、900 ng、925 ng、950 ng、975 ng、1 µg、10 µg、20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、60 µg、70 µg、80 µg、90 µg、100 µg、125 µg、150 µg、175 µg、200 µg、225 µg、250 µg、275 µg、300 µg、325 µg、350 µg、375 µg、400 µg、425 µg、450 µg、475 µg、500 µg、525 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、800 µg、825 µg、850 µg、875 µg、900 µg、925 µg、950 µg、975 µg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg、175 mg、200 mg、225 mg、250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg、625 mg、650 mg、675 mg、700 mg、725 mg、750 mg、775 mg、800 mg、825 mg、850 mg、875 mg、900 mg、1 g、1.5 g、もしくは2 g (またはその中で導出可能な範囲)、あるいは約0.1 ng、0.5 ng、1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng、25.0 ng、50 ng、75 ng、100 ng、125 ng、150 ng、175 ng、200 ng、225 ng、250 ng、275 ng、300 ng、325 ng、350 ng、375 ng、400 ng、425 ng、450 ng、575 ng、600 ng、625 ng、650 ng、675 ng、700 ng、725 ng、750 ng、775 ng、800 ng、825 ng、850 ng、875 ng、900 ng、925 ng、950 ng、975 ng、1 µg、10 µg、20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、60 µg、70 µg、80 µg、90 µg、100 µg、125 µg、150 µg、175 µg、200 µg、225 µg、250 µg、275 µg、300 µg、325 µg、350 µg、375 µg、400 µg、425 µg、450 µg、475 µg、500 µg、525 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、800 µg、825 µg、850 µg、875 µg、900 µg、925 µg、950 µg、975 µg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg

、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg、175 mg、200 mg、225 mg、250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg、625 mg、650 mg、675 mg、700 mg、725 mg、750 mg、775 mg、800 mg、825 mg、850 mg、875 mg、900 mg、1 g、1.5 g、もしくは2 g (またはその中で導出可能な範囲)。

【0021】

いくつかの態様において、約0.1 ngから約2.0 gのCGRP阻害剤が患者に投与される。いくつかの態様において、少なくとも0.1 ng、0.5 ng、1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng、25.0 ng、50 ng、75 ng、100 ng、125 ng、150 ng、175 ng、200 ng、225 ng、250 ng、275 ng、300 ng、325 ng、350 ng、375 ng、400 ng、425 ng、450 ng、575 ng、600 ng、625 ng、650 ng、675 ng、700 ng、725 ng、750 ng、775 ng、800 ng、825 ng、850 ng、875 ng、900 ng、925 ng、950 ng、975 ng、1 µg、10 µg、20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、60 µg、70 µg、80 µg、90 µg、100 µg、125 µg、150 µg、175 µg、200 µg、225 µg、250 µg、275 µg、300 µg、325 µg、350 µg、375 µg、400 µg、425 µg、450 µg、475 µg、500 µg、525 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、800 µg、825 µg、850 µg、875 µg、900 µg、925 µg、950 µg、975 µg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg、175 mg、200 mg、225 mg、250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg、625 mg、650 mg、675 mg、700 mg、725 mg、750 mg、775 mg、800 mg、825 mg、850 mg、875 mg、900 mg、1 g、1.5 g、もしくは2 g (またはその中で導出可能な範囲)、多くとも0.1 ng、0.5 ng、1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng、25.0 ng、50 ng、75 ng、100 ng、125 ng、150 ng、175 ng、200 ng、225 ng、250 ng、275 ng、300 ng、325 ng、350 ng、375 ng、400 ng、425 ng、450 ng、575 ng、600 ng、625 ng、650 ng、675 ng、700 ng、725 ng、750 ng、775 ng、800 ng、825 ng、850 ng、875 ng、900 ng、925 ng、950 ng、975 ng、1 µg、10 µg、20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、60 µg、70 µg、80 µg、90 µg、100 µg、125 µg、150 µg、175 µg、200 µg、225 µg、250 µg、275 µg、300 µg、325 µg、350 µg、375 µg、400 µg、425 µg、450 µg、475 µg、500 µg、525 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、800 µg、825 µg、850 µg、875 µg、900 µg、925 µg、950 µg、975 µg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg、175 mg、200 mg、225 mg、250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg、625 mg、650 mg、675 mg、700 mg、725 mg、750 mg、775 mg、800 mg、825 mg、850 mg、875 mg、900 mg、1 g、1.5 g、もしくは2 g (またはその中で導出

10

20

30

40

50

可能な範囲)、あるいは約0.1 ng、0.5 ng、1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng、25.0 ng、50 ng、75 ng、100 ng、125 ng、150 ng、175 ng、200 ng、225 ng、250 ng、275 ng、300 ng、325 ng、350 ng、375 ng、400 ng、425 ng、450 ng、575 ng、600 ng、625 ng、650 ng、675 ng、700 ng、725 ng、750 ng、775 ng、800 ng、825 ng、850 ng、875 ng、900 ng、925 ng、950 ng、975 ng、1 µg、10 µg、20 µg、30 µg、40 µg、50 µg、60 µg、70 µg、80 µg、90 µg、100 µg、125 µg、150 µg、175 µg、200 µg、225 µg、250 µg、275 µg、300 µg、325 µg、350 µg、375 µg、400 µg、425 µg、450 µg、475 µg、500 µg、525 µg、550 µg、575 µg、600 µg、625 µg、650 µg、675 µg、800 µg、825 µg、850 µg、875 µg、900 µg、925 µg、950 µg、975 µg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、19 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、24 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg、175 mg、200 mg、225 mg、250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg、625 mg、650 mg、675 mg、700 mg、725 mg、750 mg、775 mg、800 mg、825 mg、850 mg、875 mg、900 mg、1 g、1.5 g、もしくは2 g (またはその中で導出可能な範囲)。

10

20

【0022】

いくつかの態様において、CGRP阻害剤はエプチネズマブを含み、100 mg、300 mg、または100～300 mgの用量で投与される。いくつかの態様において、エプチネズマブの用量は、3ヶ月ごとに投与される。いくつかの態様において、CGRP阻害剤はエレヌマブを含み、70 mg、140 mg、または70～140 mgの用量で投与される。いくつかの態様において、エレヌマブの用量は、1ヶ月ごとに投与される。いくつかの態様において、CGRP阻害剤はフレマネズマブを含み、225 mg、675 mg、または225～675 mgの用量で投与される。いくつかの態様において、フレマネズマブの用量は、1ヶ月ごとにまたは3ヶ月ごとに投与される。いくつかの態様において、初期用量675 mgのフレマネズマブが初期用量として投与され、225 mgの投与が毎月の用量としてまたは3ヶ月ごとに続けられる。いくつかの態様において、CGRP阻害剤はガルカネズマブを含み、120 mg、240 mg、または120～240 mgの用量で投与される。いくつかの態様において、ガルカネズマブの用量は、1ヶ月ごとに投与される。本明細書において投与される用量などの、CGRP阻害剤の用量は、本明細書において記述される方法および組成物においてIGF R活性化因子と同時投与される場合、少なくとも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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、もしくは80 % (またはその中で導出可能な任意の範囲)だけ低減されうることも企図される。

30

40

【0023】

いくつかの態様では、患者に、1用量あたりにIGF R活性化因子および/またはCGRP阻害剤を含む組成物が最大で約10 ml投与される。いくつかの態様では、患者に、最大で約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75、3.0、3.25、3.5、3.75、4.0、4.25、4.5、4.75、5.0、5.25、5.5、5.75、6.0、6.25、6.5、6.75、7.0、7.25、7.5、7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0、9.25、9.5、9.75、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20

50

10

20

30

40

50

4、45、46、47、48、49、もしくは50回、またはその中で導出可能な任意の範囲で投与される。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は患者に、毎週、毎日、または毎月の単位で少なくとも1、2、3、4、5、6、もしくは7日間または1、2、3、もしくは4週間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月間(またはその中で導出可能な任意の範囲)投与される。

【0026】

いくつかの態様において、CGPR阻害剤は、毎日患者に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、もしくは8回、またはその中で導出可能な任意の範囲、多くとも1、2、3、4、5、6、7、もしくは8回、またはその中で導出可能な任意の範囲、あるいは正確に1、2、3、4、5、6、7、もしくは8回、またはその中で導出可能な任意の範囲で投与されるか、1週間で、または1週間あたりに患者に少なくとも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、もしくは28回、またはその中で導出可能な任意の範囲、多くとも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、もしくは28回、またはその中で導出可能な任意の範囲、あるいは正確に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、もしくは28回、またはその中で導出可能な任意の範囲で投与される。いくつかの態様において、CGPR阻害剤は、1ヶ月で、または1ヶ月あたりに患者に少なくとも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、もしくは50回、またはその中で導出可能な任意の範囲、多くとも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、もしくは50回、またはその中で導出可能な任意の範囲、あるいは正確に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、もしくは50回、またはその中で導出可能な任意の範囲で投与される。いくつかの態様において、CGPR阻害剤は患者に、毎週、毎日、または毎月の単位で少なくとも1、2、3、4、5、6、もしくは7日間または1、2、3、もしくは4週間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月間(またはその中で導出可能な任意の範囲)投与される。

【0027】

いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、少なくとも2、4、6、8、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)ごとに、多くとも2、4、6、8、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)ごとに、あるいは約2、4、6、8、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)ごとに投与される。いくつかの態様において、CGPR阻害剤は、少なくとも2、4、6、8、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)ごとに、多くとも2、4、6、8、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)ごとに、あるいは約2、4、6、8、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)ごとに投与される。いくつかの態様において、IGFR活性化因子およびCGPR阻害剤は、同時に、または互いに約5、10、15、20、30、60、90、もしくは120時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)以内に投与される。いくつかの態様において、IGFR活性化因子は、CGPR阻害剤の少なくとも1、2、3、4、8、12、18、もしくは24時間、または1、2、3、4、5、6、7日(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも1、2、3、4、8、12、18、もしくは24時間、または1、2、3、4、5、6、7日(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)、あるいは約1、2、3、4、8、12、18、もしくは24時間、または1、2、3、4、5、6、7日(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)前に投与される。いくつかの態様において、CGPR阻害剤は、IGFR活性

化因子の少なくとも1、2、3、4、8、12、18、もしくは24時間、または1、2、3、4、5、6、7日(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも1、2、3、4、8、12、18、もしくは24時間、または1、2、3、4、5、6、7日(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)、あるいは約1、2、3、4、8、12、18、もしくは24時間、または1、2、3、4、5、6、7日(あるいはその中で導出可能な任意の範囲)前に投与される。いくつかの態様において、患者は毎日、毎週、毎月、四半期ごとに、または毎年、IGFR活性化因子およびCGPR阻害剤の一方または両方を投与される。

【0028】

いくつかの態様において、本方法は、患者にIL-11および/またはインターフェロン γ を投与する段階をさらに含む。いくつかの態様において、組成物は、IL-11および/またはインターフェロン γ をさらに含む。いくつかの態様において、本方法は、患者の中樞神経系を変化させる。いくつかの態様において、組成物は、患者の中樞神経系を変化させる。

10

【0029】

いくつかの態様において、患者は、4週間の期間でまたは1ヶ月で1回または複数回の片頭痛を経験している。いくつかの態様において、患者は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間(またはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間(またはその中で導出可能な任意の範囲)、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間(またはその中で導出可能な任意の範囲)あるいは少なくとも1もしくは2ヶ月、多くとも1もしくは2ヶ月、または約1もしくは2ヶ月あるいは少なくとも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もしくは40日(またはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも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もしくは40日(またはその中で導出可能な任意の範囲)の期間において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、もしくは30回(またはその中で導出可能な任意の範囲)超、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、もしくは30回(またはその中で導出可能な任意の範囲)未満、または約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、もしくは30回(またはその中で導出可能な任意の範囲)の片頭痛を経験している。いくつかの態様において、患者は、投与前の過去24時間において少なくとも3時間持続する少なくとも1回の片頭痛を経験している。いくつかの態様において、患者は、投与前の過去0.5、1、2、3、4、5、6、もしくは7日(またはその中で導出可能な任意の範囲)において少なくとも0.5、1、2、3、4、5、もしくは6時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)持続する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14回または多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14回の片頭痛を経験している。いくつかの態様において、患者は、平均して、1ヶ月以内に14回またはそれ以下の片頭痛を経験する患者である。いくつかの態様において、患者は、1ヶ月以内に14回またはそれ以下の片頭痛を経験するか、または経験している患者である。

20

30

40

【0030】

いくつかの態様において、患者は、18歳またはそれ以上であるヒト患者である。いくつかの態様において、患者は、18歳未満の小児患者である。いくつかの態様において、患者は50よりも若い。いくつかの態様において、患者は50よりも年上である。いくつかの態様において、患者は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

50

13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、45、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、もしくは80歳(またはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも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、45、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、もしくは80歳(またはその中で導出可能な任意の範囲)、あるいは約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、45、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、もしくは80歳(またはその中で導出可能な任意の範囲)である。

10

【0031】

いくつかの態様において、患者はヒト患者である。いくつかの態様において、患者はイヌ、ネコ、マウス、ラット、ウマ、ブタ、またはウサギである。

【0032】

20

いくつかの態様において、片頭痛は、前兆を伴う片頭痛としてさらに定義される。いくつかの態様において、患者は、視覚障害、しびれ、めまい、言語障害、運動失調、構音障害、回転性めまい、耳鳴り、聴力低下、複視、意識低下、異痛症、および片側性視覚障害を含む1つまたは複数の症状を有する患者としてさらに定義される。いくつかの態様において、症状は、頭または首の一側面にあるものとしてさらに定義されている。いくつかの態様において、前兆または症状は、頭痛が始まる前に始まる。いくつかの態様において、前兆または症状は、頭痛が始まる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)あるいは多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12時間(またはその中で導出可能な任意の範囲)前に始まる。いくつかの態様において、患者は、虚血と診断されていなかったか、または診断されていない。いくつかの態様において、片頭痛は、前兆を伴わない片頭痛としてさらに定義される。

30

【0033】

いくつかの態様において、患者は、抗片頭痛薬もまた投与される。いくつかの態様において、組成物は抗片頭痛薬をさらに含む。いくつかの態様において、抗片頭痛薬は、5-HT_{1F} (ダイタン)受容体アゴニストを含む。いくつかの態様において、抗片頭痛薬は、アルニジタン、ラスミジタン(COL-144)、およびLY-334370の1つまたは複数を含む。

【0034】

いくつかの態様において、抗片頭痛薬は、IGFR活性化因子と同じ組成物中にある。いくつかの態様において、抗片頭痛薬は、CGPR阻害剤と同じ組成物中にある。いくつかの態様において、抗片頭痛薬は、アセトアミノフェンまたはイブプロフェンを含む。いくつかの態様において、患者は、組成物を投与されてから24時間以内に抗片頭痛薬を投与される。

40

【0035】

いくつかの態様において、本方法は、追加の薬剤を投与する段階をさらに含む。いくつかの態様において、組成物は追加の薬剤を含む。いくつかの態様において、追加の薬剤は、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)、血管作動性腸ペプチド(VIP)、PACAP/VIP受容体(PAC1、VPAC1およびVPAC2)を活性化または阻害する。いくつかの態様において、追加の薬剤は、PACAP、VIP、PACAP受容体、およびVIP受容体の阻害剤の1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、追加の薬剤は、一過性受容体

50

電位(TRP)チャネルを活性化または阻害する。いくつかの態様において、追加の薬剤は、TRPおよびTRP受容体の阻害剤の1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、IGF R活性化因子、CGRP阻害剤、抗片頭痛薬、および/または追加の薬剤は、同時投与される、および/または同じ組成物中にある。いくつかの態様において、追加の薬剤は、ポリペプチド、核酸、または小分子を含む。いくつかの態様において、処置することは、脳の過興奮を低減すること、拡張性抑制を低減すること、および/または酸化ストレスを低減することを含む。いくつかの態様において、処置することは、三叉神経系における酸化ストレスを低減することを含む。拡張性抑制は、皮質拡張性抑制としてさらに定義されうる。

【0036】

いくつかの態様において、本開示の組成物は、鼻腔内、非経口、経口、皮下、静脈内、および/または局所投与用に製剤化される。いくつかの態様において、本開示の組成物は、本明細書において記述される投与経路用に製剤化される。

【0037】

いくつかの態様において、本開示の組成物または方法は、追加の抗片頭痛療法または追加の療法を除外する。本開示のいくつかの態様において、組成物および方法はEPOを除外する。本開示のいくつかの態様において、組成物および方法は、特許請求の範囲において列挙される治療薬に加えて薬剤を除外する。例えば、本開示の組成物および方法は、サイトカイン、成長因子、阻害剤、抗体由来の抗原結合断片、または鎮痛剤の1つまたは複数を除外しうる。この除外は、特許請求の範囲において列挙される要素および治療薬に加えて適用される。例えば、特許請求の範囲は、本開示の方法における抗体の投与を列挙しうるが、本開示の方法において列挙されていない追加の抗体の投与を除外しうる。

【0038】

本出願の全体を通じて、「約」という用語は、値にはその値を決定するために利用される装置または方法に対しての誤差の標準偏差が含まれることを示すために、細胞分子生物学の分野におけるその平易で通常の意味にしたがって用いられる。

【0039】

「含む(comprising)」という用語とともに用いられる時には、「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語の使用は、「1つ」を意味しうるが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは2つ以上」の意味とも一致している。

【0040】

本明細書において用いられる場合、「または」および「および/または」という用語は、複数の構成要素を組み合わせて、または互いに排他的に記述するために利用される。例えば、「x、y、および/またはz」は、「x」のみ、「y」のみ、「z」のみ、「x、y、およびz」、「(xおよびy)またはz」、「xまたは(yおよびz)」または「xまたはyまたはz」をいうことができる。x、y、またはzが態様から特に除外されることが特に企図される。

【0041】

「含む(comprising)」(ならびに「含む(comprise)」および「含む(comprises)」などの、含む(comprising)の任意の形態)、「有する(having)」(ならびに「有する(have)」および「有する(has)」などの、有する(having)の任意の形態)、「含む(including)」(ならびに「含む(includes)」および「含む(include)」などの、含む(including)の任意の形態)、「によって特徴付けられる」(および「として特徴付けられる」などの、含む(including)の任意の形態)または「含有する(containing)」(ならびに「含有する(contains)」および「含有する(contain)」などの、含有する(containing)の任意の形態)という単語は、包括的または非制限的であり、さらなる、引用していない要素または方法の段階を除外しない。

【0042】

その使用のための組成物および方法は、本出願の全体に開示されている成分または段階のいずれか「を含む」、「から本質的になる」または「からなる」ことができる。「から

10

20

30

40

50

なる」という語句は、指定されていない任意の要素、段階、または成分を除外する。「から本質的になる」という語句は、記述された主題の範囲を、特定の材料または段階およびその基本かつ新規の特徴に実質的に影響を与えないものに限定する。「含む(comprising)」という用語の文脈のなかで記述された態様はまた、「からなる(consisting of)」または「から本質的になる(consisting essentially of)」という用語の文脈のなかで実施されることが企図される。

【0043】

本発明の1つの態様に関して論じられた任意の制限が、本発明の他の任意の態様に適用されることが特に企図される。さらに、本発明の任意の組成物が本発明の任意の方法において用いられてもよく、本発明の任意の組成物を作製または利用するために本発明の任意の方法が用いられてもよい。実施例に記載された態様の局面はまた、異なる実施例中の他所にまたは本出願中の他所に、例えば発明の概要、態様の詳細な説明、特許請求の範囲、および図の凡例の説明に論じられている態様の文脈において実施されうる態様である。

【0044】

本発明の他の目標、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体的な例は、本発明の特定の態様を示しているが、この詳細な説明から当業者には本発明の趣旨および範囲のなかで種々の変更および修正が明らかになると考えられるので、単なる例示として与えられるものと理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0045】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明のある特定の局面をさらに実証するために含まれている。本発明は、これらの図面の1つまたは複数を本明細書に提示した具体的な態様の詳細な説明と併せて参照することによってよりよく理解されうる。

【0046】

【図1】図1A～B：経鼻IGF-1により、三叉神経節(TG)におけるCGRPのレベルが有意に低減された。ラット(n=5/群)をイソフルランで麻酔し、50 μ L中のIGF-1 (150 μ g)またはコハク酸緩衝液(偽薬)で処置した。24時間後に動物を再麻酔し、脳を採取し、TGのCGRP免疫染色のために処理した。各動物から画像を取得し、画像の蛍光強度をデジタル画像化戦略によって定量化した。動物1匹につき3枚の画像を測定し、平均値を記録した。経鼻送達および画像処理を、条件に対して盲検化された状態で完了した。実験、免疫染色および画像化は、バラツキの可能性を減らすために対(すなわち、偽薬およびIGF-1)で行った。0が差なしに対応し、0未満の値はIGF-1がCGRPを低減したことを意味するように、およびt検定を使用して対数の差が0から有意に変化したかどうかを判定できるように、染色比(IGF-1/偽薬)を自然対数に変換した(Kraig et al., J Neurosci, 1991)。代表的な結果は、(A) コハク酸偽薬TG CGRP免疫染色および(B) 経鼻IGF-1後のCGRP染色の低減を示す。この低減は有意であった(p < 0.001; アルファ = 0.05; 検出力1.00)。スケールバー = 50 μ m。

【図2】インビトロおよびインビボ研究からのIGF-1の結果の概略図。海馬の脳スライス培養を用いて行われた最初の研究は、IGF-1がミクログリア活性化ならびにTNF α および活性酸素種(ROS)の放出を無効にすることによって拡張性抑制(SD)を抑制することを示す。インビボでのSDは、CGRPのレベルを増加させることが知られている三叉神経系の活性化をもたらすことが示されている。IGF-1の経鼻送達は、三叉神経節のCGRP発現を低減させるため、SD誘発性のCGRP、ひいては片頭痛も低減させる可能性が高い。

【図3】鼻から脳へのIGF-1は低血糖を引き起こさなかった。非絶食ラット(日中; n=4/群)をイソフルランで麻酔し、Bayer Contour Next EZ血糖測定器を用いた血中グルコース分析のために尾部サンプルを採取した(0時間)。次に、動物を鼻腔内コハク酸緩衝液(黒色)またはIGF-1 (赤色)で20分かけて処置した。予想通り、イソフルランの継続により、処置終了時にグルコースは上昇した。しかしながら、0.3時間の時点(*p < 0.001)を除きANOVAに加えて事後Holm-Sidakにより比較した場合、処置対(t検定)または0時

10

20

30

40

50

間(灰色) vs 他の値で有意差は認められなかった。認められた最低のIGF-1グルコース関連レベルは、114 mg/dL [対照(132 mg/dL; 時間0)と比較して]であり、これはWistarラットの正常範囲内[85~132 mg/dL (Kohn DF and Clifford CB, 2002)]である。点線は正常なグルコース範囲を示す。低血糖を定義するグルコースレベルは可変であるが、1 mMの低下は低血糖とはみなされない。さらに、IGF-1-グルコースレベルは低血糖ではなかった。結果は平均±SDとして示されている。

【図4】KCl刺激からの代表的な拡張性抑制(SD)応答。記録はSDの典型的な大きな細胞外電圧の偏向を示す。IGF-1 (またはビヒクル)の鼻から脳への投与が行われた。24時間後、SDは、尾側新皮質からの電気生理学的微小電極記録によって確立されたSDの確認とともに、吻側新皮質へのnL量の0.5 M KClの加圧間欠的マイクロインジェクションを介して90分間10分ごとに誘導された。代表的なSDの穏やかな電気的变化を示す。10 mVスケールバーは下向きを陰性(negative down)としている。SD刺激直後、三叉神経節および尾側三叉神経核における三叉神経系の活性化の程度を判定するために組織を採取した。

【図5】図5A~C: 三叉神経節IGF-1受容体の分布。代表的な画像は、IGF-1が、成体ラットの三叉神経節全体に見られるその同族受容体を介して、直接的なリガンドと受容体との相互作用を持ちうることを示す[(A) V1, 眼神経; (B) V2, 上顎神経; および(C) V3, 下顎枝]。スケールバー = 50 μm。

【図6】IGF-1による鼻から脳への(N2B)処置は低血糖を引き起こさなかった。血清中グルコースを処置直前(薄灰色)と比較して、ビヒクル(黒色)またはIGF-1 (赤色)のN2B送達後、短時間イソフルラン麻酔下の非絶食ラットにおいて測定した。予想通り、イソフルラン曝露の継続により、N2B処置終了時にグルコースは上昇した。しかしながら、0.3時間の時点(* * * p < 0.001)を除きANOVAに加えて事後Holm-Sidakにより比較した場合、処置対(t検定)または0時間(薄灰色) vs 他の値で有意差は認められなかった。認められた最低のIGF-1グルコース関連レベルは、114 mg/dL [対照(132 mg/dL; 時間0)と比較して]であり、これはWistarラットの正常範囲内[85~132 mg/dL]である。点線は正常なグルコース範囲を示す。低血糖を定義するグルコースレベルは可変であるが、1 mMの低下は低血糖とはみなされない。さらに、IGF-1グルコースレベルは低血糖ではなかった。結果は平均±SEMとして示されている。

【図7】図7A~B: IGF-1の鼻から脳への(N2B)送達は、ナイーブ動物の三叉神経節におけるCGRPレベルを有意に低減させた。代表的な画像は、(A) IGF-1または(B)ビヒクルによる処置後の三叉神経節のV1領域のCGRP免疫染色を示す。N2B処置後の免疫染色レベルの自然対数比レベル(IGF-1/偽薬)から、IGF-1が75%だけCGRPレベルを有意に(p < 0.001)低減させることが示された。スケールバー = 25 μm。

【図8】図8A~B: IGF-1の鼻から脳への(N2B)送達は、再発性拡張性抑制後の三叉神経節における酸化ストレスを有意に低減させた。代表的な画像は、(A) IGF-1または(B)ビヒクルによる前処置と、その1日後に90分間の再発性拡張性抑制を行った後の三叉神経節V1領域のマロンジアルデヒド免疫染色を示す。N2B処置後の免疫染色の自然対数比レベル(IGF-1/偽薬)から、IGF-1が82%だけマロンジアルデヒドレベルを有意に(p < 0.001)低減させることが示された。スケールバー = 25 μm。

【図9】図9A~B: IGF-1の鼻から脳への(N2B)送達は、再発性拡張性抑制後の三叉神経節におけるCGRPレベルを有意に低減させた。代表的な画像は、(A) IGF-1または(B)ビヒクルによる前処置と、その1日後に90分間の再発性拡張性抑制を行った後の三叉神経節V1領域のCGRP免疫染色を示す。N2B処置後の免疫染色の自然対数比レベル(IGF-1/偽薬)から、IGF-1が44%だけCGRPレベルを有意に(p < 0.001)低減させることが示された。スケールバー = 25 μm。

【図10】図10A~C: IGF-1の鼻から脳への(N2B)送達は、再発性拡張性抑制後の尾側三叉神経核c-fos標識化を有意に低減させた。代表的な画像は、(A) IGF-1または(B)コハク酸緩衝液による前処置と、その1日後に90分間の再発性拡張性抑制を行った後の尾側三叉神経核のラミナIおよびII内の(関心対象の赤色領域)門の尾側-4.5 mmでのc-fos

10

20

30

40

50

免疫染色を示す。(C) このレベルでのc-fos陽性核の数、拡張性抑制からの活性化の主要な尾側三叉神経核領域は、48%だけ有意に($**p = 0.003$)低減された。スケールバー = 200 μm 。

【図11】図11A~B: 経鼻IGF-1データとラットでモデル化された片頭痛に対する抗CGRPの影響とその関係の概要。(A) ラット海馬の脳スライス培養を用いた研究では、IGF-1が、ミクログリア腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)産生および活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)、つまりそれ以外に拡張性抑制を促進する因子(Grinberg et al., 2017)を選択的に低減することにより、片頭痛のモデルである拡張性抑制を有意に抑制することが示された。(B) 第二段階の開発では、嗅覚神経と三叉神経経路を経由して速やかに脳に入ることが知られているIGF-1の経鼻送達により、全動物において拡張性抑制が有意に抑制された。

10

【図12】図12A~D: 拡張性抑制(SD)後の三叉神経系の活性化に対するヒト組換えIGF-1の鼻腔内送達の影響に関する研究のためのパラダイム。(A) IGF-1 (150 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) [またはビヒクル(偽薬)]を吸入イソフルラン麻酔下に、ラットに横臥位で20分かけて投与した。(B) 24時間後、SDは、尾側新皮質からの電気生理学的微小電極記録によって確立されたSDの確認とともに、吻側新皮質へのnL量の0.5 M KClの加圧間欠的マイクロインジェクションを介して90分間9~10分ごとに誘導された。代表的なSDを示す。SD直後に、OS脂質過酸化マーカーであるマロンジアルデヒドを用いた三叉神経節における三叉神経系の活性化、ならびにCGRP (C)および尾側三叉神経核におけるc-fos (D)の免疫染色評価のために組織を採取した。

20

【図13】IGF-1の全身投与は低血糖を引き起こさなかった。

【図14】Melo-Carrilloら(JNS, 2019)から適応された概略図は、経鼻IGF-1が複数のレベルで片頭痛に影響を与えうることを例示している。

【図15】図15A~B: IGF-1の鼻腔内送達は、ナイーブ動物の三叉神経節におけるCGRPレベルを有意に低減させる。ラット($n=5$ /群)をイソフルランで麻酔し、50 μL 中のIGF-1 (150 μg)またはコハク酸緩衝液(偽薬)で処置した。24時間後に動物を再麻酔し、脳を採取し、三叉神経節のCGRP免疫染色のために処理した。各動物から画像を取得し、画像の蛍光強度をデジタル画像化戦略によって定量化した。動物1匹につき3枚の画像を測定し、平均値を記録した。経鼻送達および画像処理を、条件に対して盲検化された状態で完了した。実験、免疫染色および画像化は、バラツキの可能性を減らすために対(すなわち、偽薬およびIGF-1)で行った。0が差なしに対応し、0未満の値はIGF-1がCGRPを低減したことを意味するように、およびt検定を使用して対数の差が0から有意に変化したかどうかを判定できるように、染色比(IGF-1/偽薬)を自然対数に変換した(Kraig et al., J Neurosci, 1991)。代表的な画像は、(A) IGF-1または(B) ビヒクルによる処置後の三叉神経節のV1領域のCGRP免疫染色を示す。鼻腔内処置後の免疫染色レベルの自然対数比レベル(IGF-1/偽薬)から、IGF-1が75%の低減だけCGRPレベルを有意に($p < 0.001$)低減させることが示された。スケールバー = 25 μm 。Won and Kraig, 2020からのデータ。

30

【図16】皮質拡張性抑制。ヒストグラムは、各群の90分にわたり誘発された皮質拡張性抑制の数を示す。群間に有意差はなかった($p = 0.127$)。

40

【図17】図17A~I: 再発性SDおよび高用量(150 μg)鼻腔内IGF-1による前処置後の三叉神経系の活性化。(上パネル) IGF-1の鼻腔内送達は、再発性SD後の三叉神経節におけるOSを有意に低減させた。代表的な画像は、(A) IGF-1または(B) ビヒクルによる前処置と、その1日後に90分間の再発性CSDを行った後の三叉神経節V1領域のマロンジアルデヒド免疫染色を示す。(C) 鼻腔内処置後の免疫染色の自然対数比レベル(IGF-1/偽薬)から、IGF-1がマロンジアルデヒドレベルを有意に($***p < 0.001$)低減させ、これは、比率に差がない場合(すなわち、 $\text{Ln} = 0$)と比較して83%の低減を反映していることが示された。スケールバー = 25 μm 。(中パネル) 代表的な画像は、(D) IGF-1または(E) ビヒクルによる前処置と、その1日後に90分間の再発性CSDを行った後の三叉神経節V1領域のCGRP免疫染色を示す。(F) 鼻腔内処置後の免疫染色の自然対数比レベル(

50

IGF-1/偽薬)から、IGF-1がCGRPレベルを有意に($***p < 0.001$)低減させ、これは、比率に差がない(ND)場合(すなわち、 $Ln = 0$)と比較して59%の低減を反映していることが示された。スケールバー = 25 μm 。(下パネル) 代表的な画像は、(G) IGF-1または(H) コハク酸緩衝液による前処置と、その1日後に90分間の再発性CSDを行った後の三叉神経頸髄複合体のラミナIおよびII内の門の尾側-4.5 mmでのc-fos免疫染色を示す。スケールバー = 200 μm 。(I) 自然対数比(IGF-1/偽薬)から、経鼻IGF-1がc-fos陽性細胞を有意に($***p < 0.001$)低減させ、これは、比率に差がない(ND)場合(すなわち、 $Ln = 0$)と比較して45%の低減を反映していることが示された。Won and Kr

【図18】図18A~D: 処置およびその後の再発性CSD後の代表的な三叉神経頸髄c-fos免疫染色。門(上)に対して-4.5 mmおよび門下)から6.0 mmの位置の表在性ラメラ(囲んだ領域)における代表的な三叉神経頸部c-fos免疫染色(黒点)。画像は、(A) 経鼻コハク酸とそれに続く静脈内生理食塩水による偽処置後の90分間(すなわち、9分ごとに90分間CSD刺激が送達された)のCSDの繰り返し活性化の結果を、(B) 経鼻IGF-1とそれに続く静脈内生理食塩水および(C) 経鼻IGF-1とそれに続く静脈内抗CGRP抗体と比較して示す。統計結果を(D)に示す。経鼻IGF-1 (その後の静脈内生理食塩水有りまたは無しによる処置は、比率に差がないの(ND)と比較して再発性CSDからのc-fos活性化に対する有意な($***p < 0.001$; 検出力 = 1.00)保護をもたらした。経鼻IGF-1とそれに続く抗CGRP抗体による静脈内処置も、比率のNDと比較して再発性CSDからのc-fos活性化の有意な($***p < 0.001$)低減を引き起こした。しかしながら、後者の処置は、経鼻IGF-1処置単独と比較して、c-fos活性化の有意な($###p = 0.007$)低減をも引き起こした。これらの結果は、経鼻IGF-1と抗CGRPとの併用処置が、経鼻IGF-1単独よりも片頭痛に対して効果的でありうるという示唆を支持するものである。

【図19】図19A~D: 三叉神経節V1領域マロンジアルデヒド(MDA)免疫染色。代表的な画像は、(A) 経鼻コハク酸処置および後続の静脈内生理食塩水処置の後、9分ごとに誘発される90分間の再発性CSD後のV1領域MDA免疫染色を示す。(B) MDA免疫染色の低減は、経鼻IGF-1に加えて静脈内生理食塩水とそれに続く再発性CSDの後に明らかである。(C) しかしながら、経鼻IGF-1による処置とそれに続く抗CGRP mAb (4901)の静脈内注射により、三叉神経V1 MDAが増加した。この場合、増加した免疫染色はサテライトグリア(ニューロンを包む細胞)に局在しているように見える。スケールバー = 100 μm 。3群の統計的処理(ANOVA)により、経鼻IGF-1は、それがなければ再発性CSDについて見られるであろうMDA染色のln比(すなわち、IGF-1/コハク酸ビヒクル)の有意な($***p < 0.001$)減少が引き起こされることが示された。経鼻IGF-1および静脈内抗CGRPによる併用処置は、比率に差がないの(ND)と比較してMDA染色の有意でない上昇に対してのこの低減を消し去った。しかしながら、併用処置によるMDAのこの増加は、IGF-1に加えて静脈内処置のみで見られた低減よりも非常に有意($###p < 0.001$)であった(D)。これらの結果は、CGRPが酸化ストレスを低減できることを示唆する証拠と一致している。

【図20】BIOSEBのBIO-EVF5システム。ビデオに基づくBIOSEB (Vitrolles cedex France)の電氣的フォンフライシステムを示している。このシステムは、肢引っ込み閾値を試験するために用いられるセンサーチップとビデオカメラを備えたハンドヘルド刺激装置ハンドルを用いて、機械的疼痛感受性閾値の正確な判定を可能にする。各測定値はソフトウェアとラップトップコンピュータを介して登録され、永続的な記録が作成される。また、結果は実験帳に手動で記録される。

【図21】フォンレイ後肢引っ込み試験用の個々の動物囲い。画像は、下にあるワイヤーメッシュを介して左右の後肢に近づくために使われるハンドヘルド刺激装置を用いて、電氣的フォンフライユニットを介して後肢引っ込み試験を開始する前に動物を30分間収容する6つの個別のラット囲いを示している。測定は動物ごとに左肢、次いで右肢から行われ、全ての動物について5回繰り返される。

【図22】電氣的フォンフライ(BIOSEB)システムソフトウェアのスクリーンショット。

【図23】生理食塩水注射に対する電氣的フォンフライ測定による後肢反応の実証(実験FM-6)。データは、ベースライン(BA)時ならびに生理食塩水(pH 4.0 - 白四角形およびpH 7.2 黒四角形) 1、3、6および9日後の右(注射と同側)および左(注射と反対側)の後肢引っ込み反応($n = 5$ 測定/肢)を示す。酸性生理食塩水注射は、同側および対側の両方の肢引っ込み閾値の持続的かつ有意な低減をもたらした(**対応する時点でのpH 7.2に対して $p < 0.01$ 、時点当たりのt検定 $n = 3$ 動物/群)、両側T検定/時点の対。

【図24】FM-7実験からのIGF-1 vs コハク酸(ビヒクル)による経鼻処置の影響。データは、酸性生理食塩水痛覚過敏モデルにおけるビヒクル(白四角形)またはIGF-1 (黒四角形)の経鼻投与後の右(注射と同側)および左(注射と反対側)の後肢引っ込み反応($n = 5$ 測定/肢)を示す。***対応する時点でのビヒクルに対して $p < 0.001$ 、 $n = 3$ /群、両側T検定/時点の対。

10

【図25】FM-8実験からのIGF-1 vs コハク酸(ビヒクル)による経鼻処置の影響。データは、酸性生理食塩水痛覚過敏モデルにおけるビヒクル(白四角形)またはIGF-1 (黒四角形)の経鼻投与後の右(注射と同側)および左(注射と反対側)の後肢引っ込み反応($n = 5$ 測定/肢)を示す。** $p < 0.01$ - ***対応する時点でのビヒクルに対して $p < 0.001$ 、 $n = 3$ /群、両側T検定/時点の対。

【発明を実施するための形態】

【0047】

発明の詳細な説明

1. IGF-1活性化因子

20

インスリン様成長因子1 (IGF-1)は、ソマトメジンCまたはメカノ成長因子としても知られており、「硫酸化因子」または「非抑制性インスリン様活性物質」(NSILA)ともいわれている。インスリン様成長因子ファミリーは、2つのリガンドIGF-1およびIGF-2、2つの細胞膜受容体IGF-1RおよびIGF-2R、ならびに6つのIGF-1結合タンパク質IGFBP 1~6を含む。ヒトにおいて、IGF-1タンパク質はIGF1遺伝子によってコードされる。インスリン様成長因子1は、IGF-1受容体(IGF1R)およびインスリン受容体と相互作用することが示されている。

【0048】

IGF-1アミノ酸配列の例は、GenBankアクセッション番号CAA01955:
MALCLLTFTSSATAGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGI
VDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA
GNKNYRM (SEQ ID NO:1)

30

において見出される。IGF-1アミノ酸配列のさらなる例は、
MGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGMVDECCFRSCDLR
RLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:2)

を含む。IGF-1のさらなる例は、以下の配列:

40

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL
EMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:5)

を含むポリペプチドを含む。ある特定の局面は、IGF-1の1つまたは複数の機能、特に本明細書において記述される治療効果を保持するIGF-1のアイソフォームおよびバリエーションを対象にする。

【0049】

インスリンは、体内での炭水化物および脂肪代謝の調節の中心となるホルモンである。インスリンは膵臓において、ランゲルハンス島のβ細胞内で合成される。インスリンは脳

50

内で産生されることも示されている。インスリンのプロインスリン前駆体は、INS遺伝子によってコードされる。インスリンはインスリン受容体と相互作用することが示されている。インスリンアミノ酸配列の例は、GenBankアクセッション番号AAA59172: MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR REAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN (SEQ ID NO:3)

およびGenBankアクセッション番号AAA59179: MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR REAEVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN (SEQ ID NO:4)

10

において見出される。

【0050】

ある特定の局面は、インスリンの1つまたは複数の機能、特に本明細書において記述される治療効果を保持するインスリンのアイソフォームおよびバリエーションを対象にする。インスリンペプチドまたはポリペプチドは、SEQ ID NO:3または4において提供されるものと同様のアミノ酸配列の全部または一部を含むことができる。

20

【0051】

II. 抗体

本開示の局面は、CGRP抗体の重鎖および/もしくは軽鎖を含む抗体、またはその断片に関する。「抗体」という用語は、標的抗原への特異的結合についてインタクトな抗体と競合できる任意のアイソタイプのインタクトな免疫グロブリン、またはその断片をいい、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、および二重特異性抗体を含む。本明細書において用いられる場合、「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は互換的に用いられ、IgG、IgD、IgE、IgA、IgMおよび関連タンパク質を含めて、動物の免疫応答の一部として機能する構造的に関連するタンパク質のいくつかのクラスのいずれか、ならびに抗原結合活性を保持する抗体CDRドメインを含むポリペプチドをいう。

30

【0052】

「抗原」という用語は、抗体などの、選択的結合剤によって結合されうる分子または分子の一部分をいう。抗原は、異なる抗体と相互作用することができる1つまたは複数のエピトープを保有する。

【0053】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に結合することによって免疫応答を誘発することができる分子の任意の領域または部分を含む。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基などの化学的に活性な表面基を含み、特定の三次元構造特性および/または特定の電荷特性を有する。一般に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、複合混合物内の標的抗原上のエピトープを選択的に認識する。

40

【0054】

所与のポリペプチドのエピトープ領域は、X線結晶構造解析、核磁気共鳴分光法、部位特異的変異誘発マッピング、タンパク質ディスプレイレイを含む、当技術分野において周知である多くの異なるエピトープマッピング技法を用いて同定することができ、例えば、Epitope Mapping Protocols, (Johan Rockberg and Johan Nilvebrant, Ed., 2018) Humana Press, New York, N.Y.を参照されたい。そのような技法は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号; Geysen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1984); Geysen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182 (1985); Geysen et al. Molec. Immunol. 23:709-7

50

15 (1986)を参照されたい。さらに、タンパク質の抗原性領域は、標準的な抗原性および疎水性プロットを用いて予測および同定することもできる。

【0055】

「免疫原性配列」という用語は、分子が適切な宿主における抗体の産生を刺激することができるように、少なくとも1つのエピトープのアミノ酸配列を含む分子を意味する。「免疫原性組成物」という用語は、少なくとも1つの免疫原性分子(例えば、抗原または炭水化物)を含む組成物を意味する。

【0056】

インタクトな抗体は一般に、2本の全長重鎖および2本の全長軽鎖で構成されるが、場合によっては、重鎖のみを含みうるラクダ科動物に天然に存在する抗体のような、より少ない鎖を含みうる。本明細書において開示される抗体は、単一の供給源のみに由来しうるか、または「キメラ」でありえ、すなわち、抗体の異なる部分が2つの異なる抗体に由来しうる。例えば、可変領域またはCDR領域は、ラットまたはマウス供給源に由来しうるが、定常領域はヒトなどの、異なる動物供給源に由来する。抗体または結合断片は、ハイブリドーマにおいて、組換えDNA技法によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断によって産生されうる。特に指示のない限り、「抗体」という用語は、その誘導体、バリエーション、断片、およびムテインを含み、その例は以下に記述されている(Sela-Culang et al. Front Immunol. 2013; 4: 302; 2013)。

【0057】

「軽鎖」という用語は、結合特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する全長軽鎖およびその断片を含む。全長軽鎖は、25,000ダルトン前後の分子量を有し、可変領域ドメイン(本明細書においてVLと略される)、および定常領域ドメイン(本明細書においてCLと略される)を含む。カップ(?)およびラムダ(?)と特定される、軽鎖の分類が2つある。「VL断片」という用語は、CDRを含む、軽鎖可変領域の全部または一部を含むモノクローナル抗体の軽鎖の断片を意味する。VL断片は、軽鎖定常領域配列をさらに含むことができる。軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にある。

【0058】

「重鎖」という用語は、結合特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する全長重鎖およびその断片を含む。全長重鎖は、50,000ダルトン前後の分子量を有し、可変領域ドメイン(本明細書においてVHと略される)、および3つの定常領域ドメイン(本明細書においてCH1、CH2、およびCH3と略される)を含む。「VH断片」という用語は、CDRを含む、重鎖可変領域の全部または一部を含むモノクローナル抗体の重鎖の断片を意味する。VH断片は、重鎖定常領域配列をさらに含むことができる。重鎖定常領域ドメインの数は、アイソタイプに依存するであろう。VHドメインはポリペプチドのアミノ末端にあり、CHドメインはカルボキシ末端にあり、CH3は-COOH末端に最も近い。抗体のアイソタイプは、IgM、IgD、IgG、IgA、またはIgEであることができ、5つの分類:それぞれミュー(μ)、デルタ(δ)、ガンマ(?), アルファ(α)、またはイプシロン(ϵ)鎖が存在する重鎖により定義される。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むが、これらに限定されない、いくつかのサブタイプを有する。IgMサブタイプはIgM1およびIgM2を含む。IgAサブタイプはIgA1およびIgA2を含む。

【0059】

A. 抗体のタイプ

抗体は、任意のアイソタイプもしくは分類の全免疫グロブリン、キメラ抗体、または2つもしくはそれ以上の抗原に対する特異性を有するハイブリッド抗体であることができる。それらはまた、ハイブリッド断片を含む断片(例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fvなど)でありうる。免疫グロブリンは、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のように作用する、天然タンパク質、合成タンパク質、または遺伝子操作されたタンパク質も含む。抗体という用語は、遺伝子操作された、または他の方法で改変された形態の免疫グロブリンを含む。

【0060】

10

20

30

40

50

「単量体」という用語は、Igユニットを1つだけ含む抗体を意味する。単量体は抗体の基本的な機能単位である。「二量体」という用語は、抗体重鎖の定常ドメイン(Fc領域または断片結晶化可能な領域)を介して互いに結合した2つのIgユニットを含む抗体を意味する。複合体は、連結(J)鎖タンパク質によって安定化されうる。「多量体」という用語は、抗体重鎖の定常ドメイン(Fc領域)を介して互いに結合した2つ超のIgユニットを含む抗体を意味する。複合体は、連結(J)鎖タンパク質によって安定化されうる。

【0061】

「二価抗体」という用語は、2つの抗原結合部位を含む抗体を意味する。2つの結合部位は、同じ抗原特異性を有してもよく、またはそれらは二重特異性であってもよく、2つの抗原結合部位が異なる抗原特異性を有することを意味する。

【0062】

二重特異性抗体は、2つまたはそれ以上の異なるエピトープに対する異なる結合部位を有する2つのパラトープを持つ抗体のクラスである。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、バイパラトピックであることができ、ここで、二重特異性抗体は、同じ抗原からの異なるエピトープを特異的に認識しうる。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、「ナノボディ」と称される一対の異なる単ドメイン抗体から構築することができる。単ドメイン抗体は、軟骨魚類およびラクダ科動物から供給され、改変されている。ナノボディは、当業者にとっては通常の技法を用いリンカーによって一緒に連結されうる；ナノボディの選択および連結のためのそのような方法は、PCT公開番号WO2015044386A1、同番号WO2010037838A2、およびBever et al., Anal Chem. 86:7875-7882 (2014)に記述されており、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。

【0063】

二重特異性抗体は、IgG全体、Fab'2、Fab'PEG、ダイアボディとして、または代わりにscFvとして構築することができる。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインのみを用いFc領域なしで構築できるため、抗イディオタイプ反応の影響を低減できる可能性がある。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含むが、これらに限定されない、種々の方法によって産生されうる。例えば、Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照されたく、それらはそれぞれ参照によりその全体が具体的に組み入れられる。

【0064】

ある特定の局面において、抗原結合ドメインは、異なる抗原に結合するVHおよびVL領域対と多量体化することにより、多重特異的または異種特異的でありうる。例えば、抗体は、(a) 細胞表面抗原、(b) エフェクタ細胞の表面上のFc受容体、または(c) 少なくとも1つの他の成分に結合するか、またはそれらと相互作用しうる。したがって、局面には、エピトープにおよびエフェクタ細胞上のFc受容体などの他の標的に向けられる、二重特異性、三重特異性、四重特異性、および他の多重特異性抗体またはそれらの抗原結合断片が含まれうるが、これらに限定されることはない。

【0065】

いくつかの態様において、多重特異性抗体は、当技術分野において公知の常法を用いて、使用され、短い可動性のポリペプチド鎖を介して直接連結されうる。そのような例の1つは、VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖で発現され、同鎖上のドメイン間の対合を可能にするには短すぎ、それによってドメインを別鎖の相補的ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作り出す二価の、二重特異性抗体であるダイアボディである。リンカー機能性は、トリアボディ、テトラボディ、およびさらに高次の抗体多量体の態様に適用可能である。(例えば、Hollinger et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Polijak et al., Structure 2:1121-1123 (1994); Todorovska et al., J. Immunol. Methods 248:47-66 (2001)を参照のこと)。

【0066】

二重特異性全抗体とは対照的に、二重特異性ダイアボディもまた、大腸菌(*E. coli*)において容易に構築および発現されうるため、有利でありうる。適切な結合特異性のダイアボディ(および抗体断片などの他のポリペプチド)は、ライブラリからのファージディスプレイ(WO94/13804)を用いて容易に選択することができる。ダイアボディの一方の腕部が一定に保たれている場合、例えば、タンパク質に対する特異性が保たれている場合、他方の腕部を変化させ、適切な特異性の抗体を選択するライブラリが作製されうる。二重特異性全抗体は、Ridgewayら(Protein Eng., 9:616-621, 1996)およびKrahら(N Biotechnol. 39:167-173, 2017)に記述されているように代替の操作方法によって作製されてもよく、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0067】

ヘテロコンジュゲート抗体は、異なる特異性を有する2つの共有結合したモノクローナル抗体で構成されている。例えば、参照により全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,010,902号を参照されたい。

【0068】

抗原のエピトープに高い特異性で結合する抗体分子のFv断片の部分は、本明細書において「パレート」といわれる。パレートは、抗原のエピトープと接触して抗原認識を促進するアミノ酸残基からなる。抗体の2つのFv断片の各々は、二量体化された構成での、2つの可変ドメインVHおよびVLで構成されている。可変ドメインの各々の一次構造は、フレームワーク領域(FR)により区切られ、隣接される3つの超可変ループを含む。超可変ループは、任意の哺乳動物からの抗体分子間で一次配列の変動性が最も大きい領域である。超可変ループという用語は、「相補性決定領域(CDR)」という用語と互換的に用いられることがある。超可変ループ(またはCDR)の長さは、抗体分子によって異なる。所与の哺乳動物からの全ての抗体分子のフレームワーク領域は、高い一次配列類似性/コンセンサスを有する。フレームワーク領域のコンセンサスは、フレームワーク領域と、フレームワーク領域の間に散在する超可変ループ(またはCDR)の両方を識別するために当業者によって使用されうる。超可変ループには、ポリペプチド内での位置と、それらが発生するドメインを区別する識別名が付けられている。VLドメイン中のCDRは、L1、L2、およびL3として識別され、L1が最遠位端に存在し、L3がCLドメインの最も近くに存在する。CDRには、CDR-1、CDR-2、およびCDR-3という名前も付されうる。L3(CDR-3)は一般に、所与の生物によって産生される全ての抗体分子の中で最も変動性の高い領域である。CDRは、一次構造において直線的に配置され、フレームワーク領域によって互いに分離されたポリペプチド鎖の領域である。VL鎖のアミノ末(N末)端はFR1と名付けられている。FR2として識別される領域は、L1とL2超可変ループの間に存在する。FR3はL2とL3超可変ループの間に存在し、FR4領域はCLドメインに最も近い。この構造および命名法が、H1、H2およびH3として識別される3つのCDRを含むVH鎖に対して繰り返される。可変ドメイン、またはFv断片(VHおよびVL)におけるアミノ酸残基の大部分は、フレームワーク領域の一部(およそ85%)である。抗体分子の三次元または三次構造は、フレームワーク領域が分子のより内部にあり、分子の外面にCDRを備えた、構造の大部分を提供するようなものである。

【0069】

これらの領域の各々を構成する正確なアミノ酸を特定するために、いくつかの方法が開発されており、当業者によって用いられうる。これは、フレームワーク領域を構成する保存されたアミノ酸残基を特定する、いくつかの複数の配列アライメント方法およびアルゴリズムのいずれかを用いて行われ、それゆえ、長さが異なりうるが、フレームワーク領域間に位置するCDRを特定することができる。抗体のCDRの特定のために、一般的に使用される3つの方法が開発されている: Kabat (T. T. Wu and E. A. Kabat, 「AN ANALYSIS OF THE SEQUENCES OF THE VARIABLE REGIONS OF BENZENE JONES PROTEINS AND MYELOMA LIGHT CHAINS AND THEIR IMPLICATIONS FOR ANTIBODY COMPLEMENTARITY」, J Exp Med, vol. 132, no. 2, pp. 211-250, Aug. 1970に記述の通り); Chothia (C. Chothia et al., 「Conformations of

10

20

30

40

50

immunoglobulin hypervariable regions」, Nature, vol. 342, no. 6252, pp. 877-883, Dec. 1989に記述の通り); およびIMGT (M.-P. Lefranc et al., 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」, Developmental & Comparative Immunology, vol. 27, no. 1, pp. 55-77, Jan. 2003に記述の通り)。これらの方法は各々、可変領域を構成するアミノ酸残基の特定のための固有の付番システムを含む。大部分の抗体分子において、抗原のエピトープと実際に接触するアミノ酸残基はCDRに存在するが、場合によっては、フレームワーク領域内の残基が抗原結合に寄与する。

【0070】

当業者は、抗体のパラトープを決定するために、いくつかの方法のいずれかを用いることができる。これらの方法は以下を含む。

1) 抗体可変領域のアミノ酸配列の化学的性質およびエピトープの組成に基づく抗体/エピトープ結合相互作用の三次構造の計算による予測。

2) 水素-重水素交換および質量分析。

3) ポリペプチドの全長から複数の重複するペプチド断片を作製し、これらのペプチドのエピトープに対する結合親和性を評価する、ポリペプチド断片化およびペプチドマッピングアプローチ。

4) 哺乳動物の抗体Fab断片コード遺伝子が、ファージのコートに組み込まれるようにバクテリオファージによって発現される抗体ファージディスプレイライブラリ分析。次に、このFab発現ファージの集団が、固定化されているか、または異なる外因性発現系によって発現されうる抗原と相互作用させられる。非結合Fab断片は洗い流され、それによって特異的結合Fab断片のみが抗原に付着したままになる。結合Fab断片は容易に単離することができ、それらをコードする遺伝子を決定することができる。このアプローチは、必要に応じてFv断片または特定のVHおよびVLドメインを含むFab断片のさらに小さな領域にも用いることができる。

【0071】

ある特定の局面において、親和性成熟抗体は、それらの改変を保有しない親抗体と比較して、標的抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、その1つまたは複数のCDRにおける1つまたは複数の改変で増強される。ある特定の親和性成熟抗体は、標的抗原に対するナノモルまたはピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において公知の手順により産生され、例えば、Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)には、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟が記述されており、ファージディスプレイにおいて利用されるCDRおよび/またはフレームワーク残基のランダム変異誘発が、Tiller et al., Front. Immunol. 8:986 (2017)に実証されている計算方法と組み合わせてRajpal et al., PNAS. 24: 8466-8471 (2005)およびThie et al., Methods Mol Biol. 525:309-22 (2009)により記述されている。

【0072】

キメラ免疫グロブリンは、異なる種に由来する融合遺伝子の産物である; 「ヒト化」キメラは一般に、ヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域(FR)を有し、1つまたは複数のCDRは非ヒト供給源からのものである。

【0073】

ある特定の局面において、重鎖および/または軽鎖の部分は、別の特定の種からのまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する対応配列と同一または相同であるが、鎖の残部は、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、および所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片における対応配列と同一または相同である。米国特許第4,816,567号; およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)。キメラ抗体に関する方法については、例えば、米国特許第4,816,567号; およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1985)を参照されたく、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。CDRグラフト化は、例えば、米国特許第6,180,370号、同

10

20

30

40

50

第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、および同第5,530,101号に記述されており、これらは全て、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【0074】

いくつかの態様において、非ヒト種からの抗体ポリペプチド配列を最小化することで、キメラ抗体機能が最適化され、免疫原性が低減される。非ヒト抗体の非抗原認識領域からの特定のアミノ酸残基は、ヒト抗体またはアイソタイプにおける対応残基と相同であるように改変される。1つの例は「CDRグラフト化」抗体であり、ここで該抗体は、特定の種からのまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する1つまたは複数のCDRを含むが、抗体鎖の残部は、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一または相同である。ヒトにおいて用いるためには、非ヒト免疫グロブリンからの軽鎖および重鎖変動領域の両方のCDR1、CDR2、および部分的CDR3で構成されるV領域が、ヒト抗体フレームワーク領域でグラフト化され、ヒト抗体の天然抗原受容体を非ヒトCDRに置き換える。場合によっては、対応する非ヒト残基がヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域残基に置き換わる。さらに、ヒト化抗体は、性能をさらに精緻化するために、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含みうる。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含みうる。例えば、Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 (1992); Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.* 1:105 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23; 1035 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428 (1994); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-36 (1988)を参照されたい。

【0075】

イントラボディは、細胞外空間中の抗原に結合する分泌抗体とは対照的に、細胞内抗原に結合する細胞内に局在する免疫グロブリンである。

【0076】

ポリクローナル抗体調製物は、通常、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含む。ポリクローナル抗体を産生するために、ウサギまたはヤギなどの宿主を、一般にアジュバントとともに、必要に応じて、担体に結合させて、抗原または抗原断片で免疫する。その後、抗原に対する抗体を宿主の血清から回収する。ポリクローナル抗体を抗原に対してアフィニティー精製し、それを単一特異性に行うことができる。

【0077】

モノクローナル抗体または「mAb」は、唯一の親細胞からの均一な抗体の集団から得られた抗体をいい、例えば、集団は、少量で存在しうる天然変異を除いて同一である。各モノクローナル抗体は、単一の抗原決定基に対するものである。

【0078】

B. 機能的抗体断片および抗原結合断片

1. 抗原結合断片

ある特定の局面は、抗原に結合する抗体断片などの、抗体断片に関する。機能的抗体断片という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の抗原結合断片を含む。これらの断片は、可変領域重鎖(VH)および/または軽鎖(VL)のさまざまな配置で構成されており;いくつかの態様において、定常領域重鎖1(CH1)および軽鎖(CL)を含む。いくつかの態様において、それらは、重鎖2(CH2)および3(CH3)ドメインで構成されるFc領域を欠いている。抗原結合断片およびその改変の態様は、以下を含みうる: (i) VL、VH、CL、およびCH1ドメインで構成されるFab断片タイプ; (ii) VHおよびCH1ドメインで構成されるFd断片タイプ; (iii) VHおよびVLドメインで構成されるFv断片タイプ; (iv) 単一のVHまたはVLドメインで構成される単一ドメイン断片タイプdAb (Ward, 1989; McCafferty et al., 1990; Holt et al., 2003); (v) 単離された相補性決定領域(CDR)領域。そのような用語は、例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Lab*

oratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989); Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., Cell Biophysics, 22: 189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989)およびDay, E. D., Advanced Immunochimistry, 2d ed., Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y. (1990); Antibodies, 4:259-277 (2015)に記述されており、これらの各々が参照により組み入れられる。

【0079】

抗原結合断片は、軽鎖可変領域からの正確に、少なくとも、または多くとも1つ、2つ、または3つの相補性決定領域(CDR)を保持する抗体の断片も含む。Fc領域(またはそのCH2もしくはCH3領域)へのCDR含有配列の融合は、例えば、本明細書に含まれるFc領域に、直接的または間接的に融合されたscFvを含めて、この定義の範囲内に含まれる。

10

【0080】

Fab断片という用語は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインを含む抗体の一価の抗原結合断片を意味する。Fab'断片という用語は、Fab断片よりも大きいモノクローナル抗体の一価の抗原結合断片を意味する。例えば、Fab'断片は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインならびにヒンジ領域の全部または一部を含む。F(ab')₂断片という用語は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab'断片を含むモノクローナル抗体の二価の抗原結合断片を意味する。F(ab')₂断片は、例えば、2つのVHおよびVLドメインの全部または一部を含み、2つのCLおよびCH1ドメインの全部または一部をさらに含むことができる。

20

【0081】

Fd断片という用語は、CDRを含む、VHの全部または一部を含むモノクローナル抗体の重鎖の断片を意味する。Fd断片は、CH1領域配列をさらに含むことができる。

【0082】

Fv断片という用語は、VLおよびVHの全部または一部を含み、CLおよびCH1ドメインのない、モノクローナル抗体の一価の抗原結合断片を意味する。VLおよびVHは、例えば、CDRを含む。一本鎖抗体(sFvまたはscFv)は、VL領域およびVH領域が可動性のリンカーによりつながれて、抗原結合断片を形成する、単一のポリペプチド鎖を形成するFv分子である。一本鎖抗体は、国際特許出願公開番号WO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号に詳細に論じられており、それらの開示は参照により本明細書に組み入れられる。(scFv)₂という用語は、ヒンジ領域によってsFvから分離された、C末端にオリゴマー化ドメインを含む二価または二重特異性のsFvポリペプチド鎖を意味する(Pack et al. 1992)。オリゴマー化ドメインは、自己会合性 α -ヘリックス、例えば、ロイシンジッパーを含み、これをさらなるジスルフィド結合によってさらに安定化することができる。(scFv)₂断片は、「ミニ抗体」または「ミニボディ」としても公知である。

30

【0083】

単一ドメイン抗体は、VHまたはVLドメインのみを含む抗原結合断片である。場合によっては、2つまたはそれ以上のVH領域がペプチドリンカーで共有結合されて、二価ドメイン抗体を作製する。二価ドメイン抗体の2つのVH領域は、同じまたは異なる抗原を標的とする。

40

【0084】

2. 断片結晶化可能領域, Fc

Fc領域は、抗体のCH2およびCH3ドメインを含む2つの重鎖断片を含む。2つの重鎖断片は、2つまたはそれ以上のジスルフィド結合によっておよびCH3ドメインの疎水性相互作用によって一緒に保持されている。本明細書において用いられる「Fcポリペプチド」という用語は、抗体のFc領域に由来するポリペプチドの天然型およびムテイン型を含む。二量体化を促進するヒンジ領域を含むそのようなポリペプチドの切断型が含まれる。

【0085】

50

C. 抗体CDRおよびCDRを提示する足場ドメインを有するポリペプチド

相補性決定領域(CDR)などの、抗原結合ペプチド足場は、態様にしたがってタンパク質結合分子を作製するために用いられる。一般に、当業者は、少なくとも1つのCDRをグラフト化するタンパク質足場のタイプを決定することができる。足場は、最適には、良好な系統発生的保存; 公知の三次元構造; 小さいサイズ; 転写後修飾がほとんどもしくは全くない; 生成、発現、および精製することが容易であるなどの、いくつかの基準を満たさなければならないことが知られている。Skerra, J Mol Recognit, 13:167-87 (2000)。

【0086】

タンパク質足場は、フィブロネクチンIII型FN3ドメイン(「モノボディ」として知られる)、フィブロネクチンIII型ドメイン10、リポカリン、アンチカリン、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のプロテインAのZドメイン、チオレドキシンAまたは「アンキリンリピート」、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質から供給することができるが、これらに限定されることはない。そのようなタンパク質は、米国特許出願公開第2010/0285564号、同第2006/0058510号、同第2006/0088908号、同第2005/0106660号、およびPCT公開番号W02006/056464に記述されており、それらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。サソリ、昆虫、植物、軟体動物などからの毒素に由来する足場、およびニューロンNO合成酵素のタンパク質阻害剤(PIN)も用いられる。

【0087】

D. 抗体結合

「選択的結合剤」という用語は、抗原に結合する分子をいう。非限定的な例としては、抗体、抗原結合断片、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体、ペプチド、ペプチド断片およびタンパク質が挙げられる。

【0088】

「結合」という用語は、例えば、塩橋および水橋などの相互作用を含む、共有結合性、静電性、疎水性、およびイオン性ならびに/または水素結合相互作用による、2つの分子間の直接的な会合をいう。「免疫学的に反応性」とは、関心対象の選択的結合剤または抗体が、生物学的サンプルに存在する抗原と結合することを意味する。「免疫複合体」という用語は、抗体または選択的結合剤が抗原上のエピトープに結合するときに形成される組み合わせをいう。

【0089】

1. 親和性/結合力

「親和性」という用語は、抗体または選択的結合剤がエピトープに結合する強度をいう。抗体結合反応では、これは任意の所与の抗体または選択的結合剤に対する親和性定数(会合定数といわれることもある K_a または k_a)として表される。親和性は、無関係のアミノ酸配列に対する抗体の結合強度に対する、その抗原に対する抗体の結合強度の比較として測定される。親和性は、例えば、抗体のその抗原に対する結合能力が、無関係のアミノ酸配列に対する結合能力の20倍大きいと表すことができる。本明細書において用いられる場合、「結合力」という用語は、希釈後の解離に対しての2つまたはそれ以上の薬剤の複合体の耐性をいう。「免疫反応性」および「選択的に結合する」という用語は、抗体および/または選択的結合剤に関して本明細書において互換的に用いられる。

【0090】

任意の所与の抗体または選択的結合剤のその抗原に対する結合親和性を評価するために当業者が用いることができるいくつかの実験方法が存在する。これは通常、式 $KD = k_{off} / k_{on} = [A][B] / [AB]$ を用いて、平衡解離定数(KDまたは K_d)を測定することにより行われる。 k_{off} という用語は、単位時間あたりの抗体と抗原との間の解離速度であり、平衡状態にある非結合型として溶液中に存在する抗体と抗原の濃度に関連する。 k_{on} という用語は、単位時間あたりの抗体と抗原の会合速度であり、平衡状態にある結合した抗原-

抗体複合体の濃度に関連する。KDの測定に用いられる単位は、mol/L (モル濃度、もしくはM)、または濃度である。抗体のKaはKDの反対であり、式 $Ka = 1/KD$ により決定される。KD値を決定するために使用できるいくつかの実験方法の例は、酵素結合免疫測定法(ELISA)、等温滴定熱量測定(ITC)、蛍光偏光測定、表面プラズモン共鳴(SPR)、およびアフィニティーキャピラリー電気泳動(ACE)である。抗体の親和定数(Ka)はKDの反対であり、式 $Ka = 1/KD$ により決定される。

【0091】

ある特定の態様において有用であると見なされる抗体は、約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは 10^{10} Mまたはその中で導出可能な任意の範囲、少なくとも約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは 10^{10} Mまたはその中で導出可能な任意の範囲、あるいは多くとも約 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは 10^{10} Mまたはその中で導出可能な任意の範囲の親和性定数(Ka)を有する。同様に、いくつかの態様において、抗体は、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、もしくはその中で導出可能な任意の範囲、少なくとも約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、もしくはその中で導出可能な任意の範囲または多くとも約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、もしくはその中で導出可能な任意の範囲の解離定数を有する。これらの値は、本明細書において論じられる抗体について報告されており、同じアッセイ法を用いて、そのような抗体の結合特性を評価することができる。本発明の抗体は、解離定数(KD)が $<10^{-8}$ Mである場合、その標的抗原に「特異的に結合する」と言われる。抗体は、KDが $<5 \times 10^{-9}$ Mである場合に「高い親和性」で、およびKDが $<5 \times 10^{-10}$ Mである場合に「非常に高い親和性」で抗原に特異的に結合する。

10

20

【0092】

2. エピトープ特異性

抗原のエピトープは、抗体が結合親和性を有する抗原の特定の領域である。タンパク質またはポリペプチド抗原の場合、エピトープは、抗体が高い親和性で結合する特定の残基(または特定のアミノ酸またはタンパク質セグメント)である。抗体は必ずしもタンパク質内のすべての残基に接触するわけではない。また、タンパク質内のすべての単一アミノ酸の置換または欠失が必ずしも結合親和性に影響を与えるわけではない。本明細書および添付の特許請求の範囲の目的のために、「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は、Bおよび/またはT細胞が応答または認識する抗原上の部位をいうように互換的に用いられる。ポリペプチドエピトープは、ポリペプチドの三次折畳みによって並置された隣接アミノ酸および非隣接アミノ酸の両方から形成することができる。エピトープは、通常、固有の空間コンフォメーション中に少なくとも3個、通常は5~10個のアミノ酸を含む。

30

【0093】

抗体のエピトープ特異性は、さまざまな方法で決定することができる。例えば、1つのアプローチでは、タンパク質の全配列にまたがり、少数のアミノ酸(例えば、3~30アミノ酸)の増分が異なる約15アミノ酸の重複ペプチドのコレクションを試験することを伴う。ペプチドは、マイクロタイターディッシュの別々のウェルに固定化される。固定化は、例えば、ペプチドの一方の末端をビオチン化することによって達成することができる。このプロセスは、エピトープに対する抗体の親和性に影響を与えうるため、同じペプチドの異なるサンプルをN末端とC末端でビオチン化し、比較のために別々のウェルに固定化することができる。これは、末端特異的抗体を同定するのに有用である。任意で、関心対象の特定のアミノ酸で終結する追加のペプチドを含めることができる。このアプローチは、内部断片に対する末端特異的抗体を同定するのに有用である。抗体または抗原結合断片は、さまざまなペプチドの各々に結合するかスクリーニングされる。エピトープは、抗体が高親和性結合を示す全てのペプチドに共通するアミノ酸のセグメントと定義される。

40

【0094】

3. 抗体抗原結合ドメインの修飾

本発明の抗体は、それらが抗体ポリペプチド配列またはその断片と実質的に同一であり、それでも本発明のエピトープに結合するように修飾されうるものと理解される。ポリペ

50

ブチド配列は、デフォルトのギャップウェイトを使いClustal Omega、IGBLAST、GAPまたはBESTFITのようなプログラムを用いて最適に整列され、それらが少なくとも80%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%の配列同一性もしくは少なくとも99%の配列同一性またはその中の任意の範囲の配列同一性を共有する場合に「実質的に同一」である。

【0095】

本明細書において論じられる場合、抗体またはその抗原結合領域のアミノ酸配列のわずかな差異は、アミノ酸配列の差異が少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98% および最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を維持することを条件として、本発明により包含されるものと企図される。特に、保存的アミノ酸置換が企図される。

【0096】

保存的置換は、その側鎖において関連するアミノ酸のファミリー内で行われる置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は、一般的に側鎖の化学的性質に基づいてファミリーに分けられる：例えば、酸性(アスパラギン酸、グルタミン酸)、塩基性(リジン、アルギニン、ヒスチジン)、非極性(アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、および非荷電極性(グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン)。例えば、ロイシン部位をイソロイシンまたはバリン部位に単独で置換しても、またはアミノ酸を同じファミリー内の構造的に関連したアミノ酸に同様に置換しても、特に置換がフレームワーク部位内のアミノ酸に関与しない場合は、得られる分子の結合または特性に大きな影響を与えないと予想するのは合理的である。アミノ酸の変化が機能的なペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の特異的活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。当業者は標準的なELISA、表面プラズモン共鳴(SPR)、または他の抗体結合アッセイ法を実施して、未修飾抗体と、当業者が利用できるいくつかの方法のいずれかによって作られた保存的置換を有する任意のポリペプチド誘導体との間の抗原結合親和性の定量的比較を行うことができる。

【0097】

抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体は、当業者によって容易に調製することができる。断片または類似体の好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界近くに存在する。構造的および機能的ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを公開または独自の配列データベースと比較することによって同定することができる。好ましくは、コンピュータ化された比較方法を用いて、既知の構造および/または機能の他のタンパク質に存在する配列モチーフまたは予測されるタンパク質コンフォメーションドメインを同定する。既知の三次元構造に折り畳まれるタンパク質配列を同定するための標準的な方法は、当業者に利用可能である；Dill and McCallum, Science 338:1042-1046 (2012)。タンパク質構造およびこれらをコードする遺伝子配列を予測するためのいくつかのアルゴリズムが開発されており、これらのアルゴリズムの多くは、全米バイオテクノロジー情報センターで(ワールド・ワイド・ウェブの ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/ で)およびバイオインフォマティクスリソースパネルで(ワールド・ワイド・ウェブの expasy.org/proteomics で)見出すことができる。したがって、前記の例は、当業者が、本発明による構造的および機能的ドメインを定義するために用いられうる配列モチーフおよび構造的コンフォメーションを認識できることを実証している。

【0098】

例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系列の配列に「逆変異させること」によって免疫原性を低下させるように、抗体にフレームワーク修飾を行うことができる。

【0099】

10

20

30

40

50

同じ抗原(多価)または異なる抗原(多重特異性)のいずれかに結合するVHおよびVL領域対で抗原結合ドメインを多量体化することにより、抗原結合ドメインが多重特異性または多価でありうることも企図される。

【0100】

E. 抗体の化学修飾

いくつかの局面において、グリコシル化部位の数および/またはタイプが親ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して改変されている、抗体のグリコシル化バリエーションも企図される。ポリペプチドのグリコシル化は、例えば、ポリペプチド配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を修飾して、抗原に対するポリペプチドの親和性を高めることにより改変することができる(米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号)。ある特定の態様において、抗体タンパク質バリエーションは、天然抗体よりも多いまたは少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列: Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrにより特徴付けられ、ここでXとして指定されるアミノ酸残基は、プロリンを除く任意のアミノ酸残基でありうる。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N-結合型糖鎖の付加のための潜在的な新しい部位を提供する。あるいは、この配列を排除または改変する置換は、天然ポリペプチドに存在するN-結合型糖鎖の付加を妨げるであろう。例えば、グリコシル化は、Asnの欠失によりまたはAsnを異なるアミノ酸で置換することにより低減することができる。他の態様において、1つまたは複数の新しいN-結合型グリコシル化部位が作り出される。抗体は通常、Fc領域中にN-結合型グリコシル化部位を有する。

10

20

【0101】

追加の抗体バリエーションは、親または天然のアミノ酸配列中の1つまたは複数のシステイン残基が欠失されているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されているシステインバリエーションを含む。システインバリエーションは、とりわけ抗体を生物学的に活性なコンフォメーションに再び折り畳む必要がある場合に、有用である。システインバリエーションは、天然抗体よりも少ないシステイン残基を有し、通常、偶数のシステイン残基を有して、対になっていないシステインに起因する相互作用を最小限に抑えうる。

【0102】

いくつかの局面において、ポリペプチドは、1つまたは複数のPEG基がポリペプチドに結合するようになる条件の下で、ポリペプチドをポリエチレングリコール(PEG)またはPEGの反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体と反応させることによりペグ化して、生物学的半減期を増加させることができる。ポリペプチドペグ化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性重合体)を用いたアシル化反応またはアルキル化反応によって実行される。タンパク質をペグ化するための方法は当技術分野において公知であり、抗体のペグ化誘導体を得るために本発明のポリペプチドに適用することができる。例えば、EP 0 154 316およびEP 0 401 384を参照されたい。いくつかの局面において、抗体は、トランスサイレチン(TTR)またはTTRバリエーションにコンジュゲートされているか、そうでなければ連結されている。TTRまたはTTRバリエーションは、例えば、デキストラン、ポリ(n-ビニルピロリドン)、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモ重合体、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される化学物質で化学的に修飾することができる。本明細書において用いられる場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されてきた任意の形態のPEGを包含することが意図される。

30

40

【0103】

1. コンジュゲーション

本明細書において記述される抗体および抗原結合断片の誘導体も提供される。誘導体化された抗体またはその断片は、抗体または断片に所望の特性を付与する任意の分子または物質を含みうる。誘導体化された抗体は、例えば、検出可能な(または標識)部分(例えば、放射性、比色、抗原性、もしくは酵素的分子、または検出可能なビーズ)、別の分子に

50

結合する分子(例えば、ビオチンもしくはストレプトアビジン)、治療的もしくは診断的部分(例えば、放射性、細胞毒性、もしくは薬学的に活性な部分)、または特定の使用(例えば、ヒト対象などの対象への投与、または他のインビボもしくはインビトロでの使用)に対する抗体の適合性を高める分子を含むことができる。

【0104】

任意で、抗体または抗体の免疫学的部分は、他のタンパク質との融合タンパク質に化学的にコンジュゲートさせてもよく、または他のタンパク質との融合タンパク質として発現させてもよい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、結果として生じる分子の半減期を増加させるために、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質にポリペプチドをコンジュゲートまたは融合することによって化学的に修飾されうる。例えば、EP 0322094 および EP 0486525 を参照されたい。いくつかの局面において、ポリペプチドは、診断薬にコンジュゲートされ、診断的に、例えば、疾患の発症または進行をモニターし、所与の処置レジメンの効力を判定するために用いられうる。いくつかの局面において、ポリペプチドは、ポリペプチドの治療効果と組み合わせて治療を提供するために治療薬にコンジュゲートされてもよい。追加の適当なコンジュゲート分子は、リボヌクレアーゼ(RNase)、DNase I、アンチセンス核酸、siRNA分子などの阻害性RNA分子、免疫刺激性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列を含む。機能性核酸分子は、標的分子が保有する特定の活性のエフェクタ、阻害因子、調節因子、および刺激因子として作用しうるか、または機能性核酸分子は、任意の他の分子とは独立した新規活性を保有しうる。

【0105】

いくつかの局面において、抗体コンジュゲートまたはペイロードを形成するために少なくとも1つの薬剤に連結される抗体および抗体様分子が開示される。診断薬または治療薬としての抗体分子の効力を高めるために、少なくとも1つの所望の分子または部分を連結するか、共有結合するか、または複合体化するものが従来である。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクタまたはレポーター分子でありうるが、これらに限定されることはない。エフェクタ分子は、所望の活性、例えば、細胞毒性活性を有する分子を含む。エフェクタ分子の非限定的な例としては、毒素、治療用酵素、抗生物質、放射性標識ヌクレオチドなどが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイ法を用いて検出されうる任意の部分と定義される。抗体にコンジュゲートされたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光性分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子、またはリガンドが挙げられる。

【0106】

2. コンジュゲートタイプ

抗体コンジュゲートのある特定の例は、抗体が検出可能な標識に連結されているコンジュゲートである。「検出可能な標識」は、その特定の機能特性、および/または化学的特徴によって検出できる化合物および/または要素であり、その使用によって抗体を検出することが可能になり、および/または必要に応じてさらに定量化することが可能になる。検出可能な標識の例としては、放射性同位体、蛍光体、半導体ナノ結晶、化学発光体、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド(例えば、ビオチン、ストレプトアビジンまたはハプテン)などが挙げられるが、これらに限定されることはない。標識の特定の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、フルオレセイン、FITC、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、ジメチルアクリジニウムエステル(DMAE)、テキサスレッド、ルミノール、NADPHおよび α -または β -ガラクトシダーゼであるが、これらに限定されることはない。抗体コンジュゲートには、抗体が二次結合リガンドおよび/または酵素に連結されて、発色基質と接触すると着色生成物を生成する、主にインビトロでの使用を目的としたものが含まれる。適当な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(西洋ワサビ)水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが挙げられるが、これらに限定されることはない。好ましい二次結合リガンドは、ビオチンならびに/またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物

である。そのような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号および同第4,366,241号に記述されており；各々が参照により本明細書に組み入れられる。アジド基を含む分子は、低強度の紫外線によって生成される反応性ニトレン中間体を通じてタンパク質への共有結合を形成するためにも使用されうる(Potter & Haley, 1983)。

【0107】

いくつかの局面において、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素的に活性な毒素、またはその断片)、または放射性同位体(すなわち、放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートされた抗体またはその抗原結合断片を含む免疫コンジュゲートが企図される。このようにして、関心対象の薬剤は、細胞表面抗原を担持する細胞に直接標的化されうる。抗体および薬剤は、静電力などの非共有相互作用を通じて、または共有結合によって結び付けられうる。免疫コンジュゲートを形成するために、当技術分野において公知のさまざまなリンカーを利用することができる。さらに、免疫コンジュゲートは、融合タンパク質の形態で提供することができる。1つの局面において、細胞表面抗原を標的化するために、抗体はさまざまな治療用物質にコンジュゲートされうる。コンジュゲート剤の例としては、金属キレート錯体、薬物、毒素ならびに他のエフェクタ分子、例えばサイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、免疫調節因子、放射線増感剤、アスパラギナーゼ、カルボラン、および放射性ハロゲンが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0108】

抗体薬物コンジュゲート(ADC)においては、抗体(Ab)がリンカー(L)を通じて1つまたは複数の薬物部分(D)にコンジュゲートされる。ADCは、以下：(1) 抗体の求核基と二価リンカー試薬とを共有結合により反応させてAb-Lを形成後、薬物部分Dと反応させること；および(2) 薬物部分の求核基と二価リンカー試薬とを共有結合により反応させてD-Lを形成後、抗体の求核基と反応させることを含め、当業者に公知の有機化学の反応、条件および試薬を利用し、いくつかの経路によって調製されうる。抗体薬物コンジュゲートは抗体の修飾によって、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応しうる求電子性部分を導入することにより生成されてもよい。あるいは、抗体および細胞毒性剤を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技法またはペプチド合成によって作製されてもよい。DNAの長さは、互いに隣接しているか、またはコンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されているかのいずれかの、コンジュゲートの2つの部分をコードするそれぞれの領域を含みうる。さらに別の局面において、抗体は、腫瘍またはがん細胞プレ標的化において利用するために「受容体」(ストレプトアビジンなどの)にコンジュゲートされてもよく、ここでは抗体-受容体コンジュゲートが患者に投与された後に、結合していないコンジュゲートがクリアリング剤により循環から除去され、次に細胞毒性剤(例えば、放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートされている「リガンド」(例えば、アビジン)の投与が行われる。

【0109】

当業者に公知の抗体薬物コンジュゲートの例は、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、すなわち、がんの処置において腫瘍細胞を死滅化するまたは阻害する薬物の局所送達に有用なプロドラッグである(Syrigos and Epenetos, *Anticancer Res.* 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172 (1997); 米国特許第4,975,278号)。対照的に、これらのコンジュゲートされていない薬剤の全身投与は、標的腫瘍細胞だけでなく正常細胞に対しても許容できないレベルの毒性をもたらしうる(Baldwin et al., *Lancet* 1:603-5 (1986); Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review」, In: *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera et al., (eds.) pp. 475-506)。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方が、これらの戦略において有用であると報告されている(Rowland et al., *Cancer* 1

mmunol. Immunother. 21:183-87 (1986))。

【0110】

ある特定の局面において、ADCは、抗体ポリペプチドのN末端またはC末端に融合された異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現によるなどの、他のタンパク質またはポリペプチドとの、抗体またはその抗原結合断片の共有結合性または凝集性コンジュゲートを含む。例えば、コンジュゲートペプチドは、異種シグナル(またはリーダー)ポリペプチド、例えば、酵母アルファ因子リーダー、またはエピトープタグ(例えば、V5-His)などのペプチドでありうる。抗体を含む融合タンパク質は、抗体の精製または同定を容易にするために付加されたペプチド(例えば、ポリ-His)を含みうる。Hopp et al., Bio/Technology 6:1204 (1988)、および米国特許第5,011,912号に記述されているように、抗体ポリペプチドをFLAG(登録商標)(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.)ペプチドに連結することもできる。1つまたは複数の抗体ポリペプチドを含むオリゴマーが、アンタゴニストとして利用されてもよい。オリゴマーは、共有結合的に連結されたまたは非共有結合的に連結された二量体、三量体、またはより高次のオリゴマーの形態でありうる。2つまたはそれ以上の抗体ポリペプチドを含むオリゴマーが、使用のために企図される。他のオリゴマーは、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ四量体、ヘテロ四量体などを含む。ある特定の局面において、オリゴマーは、抗体ポリペプチドに融合されたペプチド部分間の共有結合性または非共有結合性の相互作用を介してつながれた複数の抗体ポリペプチドを含む。そのようなペプチドは、ペプチドリンカー(スペーサー)、またはオリゴマー化を促進する特性を有するペプチドでありうる。ロイシンジッパーおよび抗体に由来するある特定のポリペプチドは、以下でより詳細に記述されるように、それに付着された抗体ポリペプチドのオリゴマー化を促進できるペプチドのうちの1つである。

【0111】

3. コンジュゲーション方法論

抗体のそのコンジュゲート部分への付着またはコンジュゲーションのためのいくつかの方法が、当技術分野において公知である。いくつかの付着方法は、例えば、抗体に付着されたジエチレントリアミン五酢酸無水物(DTPA); エチレントリアミン四酢酸; N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド; および/またはテトラクロロ-3,6-ジフェニルグライコウリル-3などの有機キレート剤を利用した金属キレート錯体の使用を伴う(各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号)。また、モノクローナル抗体は、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応されうる。また、コンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHClなどの)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなどの)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなどの)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなどの)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ボス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなどの)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネートなどの)、および二活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなどの)を用いて作製されうる。いくつかの局面において、抗体結合部位を変化させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域中にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法論によって作製された抗体コンジュゲートは、改善された耐用性(longevity)、特異性、および感受性を示すことが開示されている(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,196,066号)。レポーターまたはエフェクタ分子がFc領域中の炭水化物残基にコンジュゲートされる、エフェクタまたはレポーター分子の部位特異的付着も、文献に開示されている(O'Shannessy et al., 1987)。

【0112】

III. タンパク質

本明細書において用いられる場合、「タンパク質」または「ポリペプチド」は、少なくとも5つのアミノ酸残基を含む分子をいう。本明細書において用いられる場合、「野生型

」という用語は、生物において天然に存在する分子の内因性バージョンをいう。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドの野生型バージョンが利用されるが、しかし、本開示の多くの態様において、免疫応答をもたらすために修飾されたタンパク質またはポリペプチドが利用される。上記の用語は互換的に用いられうる。「修飾タンパク質」または「修飾ポリペプチド」または「バリエーション」は、その化学構造、特にそのアミノ酸配列が野生型タンパク質またはポリペプチドに対して改変されているタンパク質またはポリペプチドをいう。いくつかの態様において、修飾/バリエーションタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つの修飾された活性または機能を有する(タンパク質またはポリペプチドが複数の活性または機能を有しうることを認識する)。修飾/バリエーションタンパク質またはポリペプチドは、1つの活性または機能に関して改変されうるが、免疫原性などの、他の点において野生型の活性または機能を保持しうるものが特に企図される。

10

【0113】

タンパク質が本明細書において具体的に言及される場合、それは一般に、天然(野生型)もしくは組換え(修飾)タンパク質または、任意で、任意のシグナル配列が除去されたタンパク質への言及である。タンパク質は、それが天然である生物から直接単離され、組換えDNA/外因性発現法により産生され、または固相ペプチド合成(SPPS)もしくは他のインビトロ法により産生されうる。特定の態様においては、ポリペプチド(例えば、抗体またはその断片)をコードする核酸配列を組み込んだ単離された核酸セグメントおよび組換えベクターがある。「組換え」という用語は、ポリペプチドまたは特定のポリペプチドの名称と組み合わせ用いられうるが、これは一般に、インビトロで操作されたまたはそのような分子の複製産物である、核酸分子から産生されるポリペプチドをいう。

20

【0114】

ある特定の態様において、タンパク質またはポリペプチド(野生型または修飾型)のサイズは、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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500個のアミノ酸残基もしくはそれ以上、およびその中で導出可能な任意の範囲、または本明細書において記述もしくは言及される対応するアミノ酸配列の誘導体を含みうるが、これらに限定されることはない。ポリペプチドは、トランケーションにより変異され、対応するその野生型の形態よりも短くされることもあり、また、異種タンパク質またはポリペプチド配列を特定の機能(例えば、標的化または局在化のための、免疫原性の増強のための、精製目的のためなどの)と融合またはコンジュゲートすることにより改変されうるものが企図される。本明細書において用いられる場合、「ドメイン」という用語は、タンパク質またはポリペプチドの任意の別個の機能的または構造的単位をいい、一般に、当業者によって認識可能な構造または機能を有するアミノ酸の配列をいう。

30

40

【0115】

本開示のポリペプチド、タンパク質、またはそのようなポリペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、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、もしくは50個(またはその中で導出可能な任意の範囲)またはそれ以上のバリエーションアミノ酸または核酸置換を含みうるか、あるいはSEQ ID No:1~5の、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19

50

、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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個もしくはそれ以上の隣接するアミノ酸もしくは核酸、またはその中で導出可能な任意の範囲あるいは多くとも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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000個もしくはそれ以上の隣接するアミノ酸もしくは核酸、またはその中で導出可能な任意の範囲と少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100% (またはその中で導出可能な任意の範囲) 類似、同一、または相同でありうる。

10

20

30

40

50

【0116】

いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドは、SEQ ID NO:1~5のアミノ酸番号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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、

101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113
、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、12
6、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、1
39、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、
152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164
、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、17
7、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、1
90、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、
203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215
、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、22
8、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、2
41、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、
254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266
、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、27
9、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、2
92、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、
305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317
、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、33
0、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、3
43、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、
356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368
、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、38
1、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、3
94、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、
407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419
、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、43
2、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、4
45、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、
458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470
、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、48
3、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、4
96、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、
509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521
、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、53
4、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、5
47、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、
560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572
、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、58
5、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、5
98、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、
611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623
、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、63
6、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、6
49、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、
662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674
、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、68
7、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、7
00、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、
713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725
、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、73

10

20

30

40

50

8、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、もしくは1000（またはその中で導出可能な任意の範囲）を含みうる。

10

20

30

40

50

【0117】

いくつかの態様において、タンパク質、ポリペプチド、または核酸はSEQ ID NO:1～5の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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、3

57、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、
370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382
、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、39
5、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、4
08、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、
421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433
、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、44
6、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、4
59、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、
472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484
、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、49
7、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、5
10、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、
523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535
、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、54
8、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、5
61、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、
574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586
、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、59
9、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、6
12、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、
625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637
、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、65
0、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、6
63、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、
676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688
、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、70
1、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、7
14、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、
727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739
、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、75
2、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、7
65、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、
778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790
、791、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、80
3、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、8
16、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、
829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841
、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、85
4、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、8
67、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、
880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892
、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、90
5、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、9
18、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、
931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943
、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、95
6、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、9
69、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、
982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994

10

20

30

40

50

、995、996、997、998、999、もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)の隣接するアミノ酸を含みうる。

【0118】

いくつかの態様において、ポリペプチド、タンパク質、または核酸はSEQ ID NO:1～5の1つと少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100% (またはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100% (またはその中で導出可能な任意の範囲)、あるいは約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100% (またはその中で導出可能な任意の範囲)類似、同一、または相同であるSEQ ID NO:1～5の少なくとも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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449

10

20

30

40

50

、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103

10

20

30

40

50

、 104、 105、 106、 107、 108、 109、 110、 111、 112、 113、 114、 115、 116、 117、 118、 119、 120、 121、 122、 123、 124、 125、 126、 127、 128、 129、 130、 131、 132、 133、 134、 135、 136、 137、 138、 139、 140、 141、 142、 143、 144、 145、 146、 147、 148、 149、 150、 151、 152、 153、 154、 155、 156、 157、 158、 159、 160、 161、 162、 163、 164、 165、 166、 167、 168、 169、 170、 171、 172、 173、 174、 175、 176、 177、 178、 179、 180、 181、 182、 183、 184、 185、 186、 187、 188、 189、 190、 191、 192、 193、 194、 195、 196、 197、 198、 199、 200、 201、 202、 203、 204、 205、 206、 207、 208、 209、 210、 211、 212、 213、 214、 215、 216、 217、 218、 219、 220、 221、 222、 223、 224、 225、 226、 227、 228、 229、 230、 231、 232、 233、 234、 235、 236、 237、 238、 239、 240、 241、 242、 243、 244、 245、 246、 247、 248、 249、 250、 251、 252、 253、 254、 255、 256、 257、 258、 259、 260、 261、 262、 263、 264、 265、 266、 267、 268、 269、 270、 271、 272、 273、 274、 275、 276、 277、 278、 279、 280、 281、 282、 283、 284、 285、 286、 287、 288、 289、 290、 291、 292、 293、 294、 295、 296、 297、 298、 299、 300、 301、 302、 303、 304、 305、 306、 307、 308、 309、 310、 311、 312、 313、 314、 315、 316、 317、 318、 319、 320、 321、 322、 323、 324、 325、 326、 327、 328、 329、 330、 331、 332、 333、 334、 335、 336、 337、 338、 339、 340、 341、 342、 343、 344、 345、 346、 347、 348、 349、 350、 351、 352、 353、 354、 355、 356、 357、 358、 359、 360、 361、 362、 363、 364、 365、 366、 367、 368、 369、 370、 371、 372、 373、 374、 375、 376、 377、 378、 379、 380、 381、 382、 383、 384、 385、 386、 387、 388、 389、 390、 391、 392、 393、 394、 395、 396、 397、 398、 399、 400、 401、 402、 403、 404、 405、 406、 407、 408、 409、 410、 411、 412、 413、 414、 415、 416、 417、 418、 419、 420、 421、 422、 423、 424、 425、 426、 427、 428、 429、 430、 431、 432、 433、 434、 435、 436、 437、 438、 439、 440、 441、 442、 443、 444、 445、 446、 447、 448、 449、 450、 451、 452、 453、 454、 455、 456、 457、 458、 459、 460、 461、 462、 463、 464、 465、 466、 467、 468、 469、 470、 471、 472、 473、 474、 475、 476、 477、 478、 479、 480、 481、 482、 483、 484、 485、 486、 487、 488、 489、 490、 491、 492、 493、 494、 495、 496、 497、 498、 499、 500、 501、 502、 503、 504、 505、 506、 507、 508、 509、 510、 511、 512、 513、 514、 515、 516、 517、 518、 519、 520、 521、 522、 523、 524、 525、 526、 527、 528、 529、 530、 531、 532、 533、 534、 535、 536、 537、 538、 539、 540、 541、 542、 543、 544、 545、 546、 547、 548、 549、 550、 551、 552、 553、 554、 555、 556、 557、 558、 559、 560、 561、 562、 563、 564、 565、 566、 567、 568、 569、 570、 571、 572、 573、 574、 575、 576、 577、 578、 579、 580、 581、 582、 583、 584、 585、 586、 587、 588、 589、 590、 591、 592、 593、 594、 595、 596、 597、 598、 599、 600、 601、 602、 603、 604、 605、 606、 607、 608、 609、 610、 611、 612、 613、 614、 615、 616、 617、 618、 619、 620、 621、 622、 623、 624、 625、 626、 627、 628、 629、 630、 631、 632、 633、 634、 635、 636、 637、 638、 639、 640、 641、 642、 643、 644、 645、 646、 647、 648、 649、 650、 651、 652、 653、 654、 655、 656、 657、 658、 659、 660、 661、 662、 663、 664、 665、 666、 667、 668、 669、 670、 671、 672、 673、 674、 675、 676、 677、 678、 679、 680、 681、 682、 683、 684、 685、 686、 687、 688、 689、 690、 691、 692、 693、 694、 695、 696、 697、 698、 699、 700、 701、 702、 703、 704、 705、 706、 707、 708、 709、 710、 711、 712、 713、 714、 715、 716、 717、 718、 719、 720、 721、 722、 723、 724、 725、 726、 727、 728、 729、 730、 731、 732、 733、 734、 735、 736、 737、 738、 739、 740、 7

10

20

30

40

50

41、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、
754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766
、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、77
9、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、7
92、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、
805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817
、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、83
0、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、8
43、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、
856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868
、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、88
1、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、8
94、895、896、897、
898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910
、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、92
3、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、9
36、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、
949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961
、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、97
4、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、9
87、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、
もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)、あるいは正確に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、3
9、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、
56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72
、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、8
9、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104
、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、11
7、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、1
30、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、
143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155
、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、16
8、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、1
81、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、
194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206
、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、21
9、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、2
32、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、
245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257
、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、27
0、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、2
83、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、
296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308
、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、32
1、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、3
34、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、
347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359
、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、37
2、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、3

10

20

30

40

50

85、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、
398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410
、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、42
3、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、4
36、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、
449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461
、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、47
4、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、4
87、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、
500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512
、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、52
5、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、5
38、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、
551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563
、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、57
6、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、5
89、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、
602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614
、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、62
7、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、6
40、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、
653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665
、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、67
8、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、6
91、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、
704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716
、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、72
9、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、7
42、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、
755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767
、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、78
0、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、7
93、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、
806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818
、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、83
1、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、8
44、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、
857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869
、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、88
2、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、8
95、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、
908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920
、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、93
3、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、9
46、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、
959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971
、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、98
4、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、9
97、998、999、もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)の隣接する
アミノ酸を含みうる。

10

20

30

40

50

【0119】

いくつかの局面においては、SEQ ID NO:1～5のいずれかの位置番号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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640

10

20

30

40

50

、 641、 642、 643、 644、 645、 646、 647、 648、 649、 650、 651、 652、 653、 654、 655、 656、 657、 658、 659、 660、 661、 662、 663、 664、 665、 666、 667、 668、 669、 670、 671、 672、 673、 674、 675、 676、 677、 678、 679、 680、 681、 682、 683、 684、 685、 686、 687、 688、 689、 690、 691、 692、 693、 694、 695、 696、 697、 698、 699、 700、 701、 702、 703、 704、 705、 706、 707、 708、 709、 710、 711、 712、 713、 714、 715、 716、 717、 718、 719、 720、 721、 722、 723、 724、 725、 726、 727、 728、 729、 730、 731、 732、 733、 734、 735、 736、 737、 738、 739、 740、 741、 742、 743、 744、 745、 746、 747、 748、 749、 750、 751、 752、 753、 754、 755、 756、 757、 758、 759、 760、 761、 762、 763、 764、 765、 766、 767、 768、 769、 770、 771、 772、 773、 774、 775、 776、 777、 778、 779、 780、 781、 782、 783、 784、 785、 786、 787、 788、 789、 790、 791、 792、 793、 794、 795、 796、 797、 798、 799、 800、 801、 802、 803、 804、 805、 806、 807、 808、 809、 810、 811、 812、 813、 814、 815、 816、 817、 818、 819、 820、 821、 822、 823、 824、 825、 826、 827、 828、 829、 830、 831、 832、 833、 834、 835、 836、 837、 838、 839、 840、 841、 842、 843、 844、 845、 846、 847、 848、 849、 850、 851、 852、 853、 854、 855、 856、 857、 858、 859、 860、 861、 862、 863、 864、 865、 866、 867、 868、 869、 870、 871、 872、 873、 874、 875、 876、 877、 878、 879、 880、 881、 882、 883、 884、 885、 886、 887、 888、 889、 890、 891、 892、 893、 894、 895、 896、 897、 898、 899、 900、 901、 902、 903、 904、 905、 906、 907、 908、 909、 910、 911、 912、 913、 914、 915、 916、 917、 918、 919、 920、 921、 922、 923、 924、 925、 926、 927、 928、 929、 930、 931、 932、 933、 934、 935、 936、 937、 938、 939、 940、 941、 942、 943、 944、 945、 946、 947、 948、 949、 950、 951、 952、 953、 954、 955、 956、 957、 958、 959、 960、 961、 962、 963、 964、 965、 966、 967、 968、 969、 970、 971、 972、 973、 974、 975、 976、 977、 978、 979、 980、 981、 982、 983、 984、 985、 986、 987、 988、 989、 990、 991、 992、 993、 994、 995、 996、 997、 998、 999、 もしくは1000で始まり、かつSEQ ID NO:1～5のいずれかの少なくとも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、 60、 61、 62、 63、 64、 65、 66、 67、 68、 69、 70、 71、 72、 73、 74、 75、 76、 77、 78、 79、 80、 81、 82、 83、 84、 85、 86、 87、 88、 89、 90、 91、 92、 93、 94、 95、 96、 97、 98、 99、 100、 101、 102、 103、 104、 105、 106、 107、 108、 109、 110、 111、 112、 113、 114、 115、 116、 117、 118、 119、 120、 121、 122、 123、 124、 125、 126、 127、 128、 129、 130、 131、 132、 133、 134、 135、 136、 137、 138、 139、 140、 141、 142、 143、 144、 145、 146、 147、 148、 149、 150、 151、 152、 153、 154、 155、 156、 157、 158、 159、 160、 161、 162、 163、 164、 165、 166、 167、 168、 169、 170、 171、 172、 173、 174、 175、 176、 177、 178、 179、 180、 181、 182、 183、 184、 185、 186、 187、 188、 189、 190、 191、 192、 193、 194、 195、 196、 197、 198、 199、 200、 201、 202、 203、 204、 205、 206、 207、 208、 209、 210、 211、 212、 213、 214、 215、 216、 217、 218、 219、 220、 221、 222、 223、 224、 225、 226、 227、 228、 229、 230、 231、 232、 233、 234、 235、 236、 237、 238、 239、 240、 241、 242、 243、 244、 245、 246、 247、 248、 249、 250、 251、 252、 253、 254、 255、 256、 257、 258、 259、 260、 261、 262、 263、 264、 265、 266、 267、 268、 269、 270、 271、 272、 273、 274、 275、 276、 277、 278、 279、 280、 281、 282、 283、 284、 285、 286、 287、 288、 289、 290、 291、 292、 293、 2

94、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、
307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319
、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、33
2、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、3
45、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、
358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370
、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、38
3、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、3
96、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、
409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421
、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、43
4、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、4
47、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、
460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472
、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、48
5、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、4
98、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、
511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523
、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、53
6、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、5
49、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、
562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574
、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、58
7、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、6
00、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、
613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625
、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、63
8、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、6
51、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、
664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676
、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、68
9、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、7
02、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、
715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727
、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、74
0、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、7
53、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、
766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778
、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、79
1、792、793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、8
04、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、
817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829
、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、84
2、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、8
55、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、
868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880
、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、89
3、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、9
06、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、
919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931

10

20

30

40

50

、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)、多くとも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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578

10

20

30

40

50

、 579、 580、 581、 582、 583、 584、 585、 586、 587、 588、 589、 590、 591、 592、 593、 594、 595、 596、 597、 598、 599、 600、 601、 602、 603、 604、 605、 606、 607、 608、 609、 610、 611、 612、 613、 614、 615、 616、 617、 618、 619、 620、 621、 622、 623、 624、 625、 626、 627、 628、 629、 630、 631、 632、 633、 634、 635、 636、 637、 638、 639、 640、 641、 642、 643、 644、 645、 646、 647、 648、 649、 650、 651、 652、 653、 654、 655、 656、 657、 658、 659、 660、 661、 662、 663、 664、 665、 666、 667、 668、 669、 670、 671、 672、 673、 674、 675、 676、 677、 678、 679、 680、 681、 682、 683、 684、 685、 686、 687、 688、 689、 690、 691、 692、 693、 694、 695、 696、 697、 698、 699、 700、 701、 702、 703、 704、 705、 706、 707、 708、 709、 710、 711、 712、 713、 714、 715、 716、 717、 718、 719、 720、 721、 722、 723、 724、 725、 726、 727、 728、 729、 730、 731、 732、 733、 734、 735、 736、 737、 738、 739、 740、 741、 742、 743、 744、 745、 746、 747、 748、 749、 750、 751、 752、 753、 754、 755、 756、 757、 758、 759、 760、 761、 762、 763、 764、 765、 766、 767、 768、 769、 770、 771、 772、 773、 774、 775、 776、 777、 778、 779、 780、 781、 782、 783、 784、 785、 786、 787、 788、 789、 790、 791、 792、 793、 794、 795、 796、 797、 798、 799、 800、 801、 802、 803、 804、 805、 806、 807、 808、 809、 810、 811、 812、 813、 814、 815、 816、 817、 818、 819、 820、 821、 822、 823、 824、 825、 826、 827、 828、 829、 830、 831、 832、 833、 834、 835、 836、 837、 838、 839、 840、 841、 842、 843、 844、 845、 846、 847、 848、 849、 850、 851、 852、 853、 854、 855、 856、 857、 858、 859、 860、 861、 862、 863、 864、 865、 866、 867、 868、 869、 870、 871、 872、 873、 874、 875、 876、 877、 878、 879、 880、 881、 882、 883、 884、 885、 886、 887、 888、 889、 890、 891、 892、 893、 894、 895、 896、 897、 898、 899、 900、 901、 902、 903、 904、 905、 906、 907、 908、 909、 910、 911、 912、 913、 914、 915、 916、 917、 918、 919、 920、 921、 922、 923、 924、 925、 926、 927、 928、 929、 930、 931、 932、 933、 934、 935、 936、 937、 938、 939、 940、 941、 942、 943、 944、 945、 946、 947、 948、 949、 950、 951、 952、 953、 954、 955、 956、 957、 958、 959、 960、 961、 962、 963、 964、 965、 966、 967、 968、 969、 970、 971、 972、 973、 974、 975、 976、 977、 978、 979、 980、 981、 982、 983、 984、 985、 986、 987、 988、 989、 990、 991、 992、 993、 994、 995、 996、 997、 998、 999、 もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)、あるいは正確に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、 60、 61、 62、 63、 64、 65、 66、 67、 68、 69、 70、 71、 72、 73、 74、 75、 76、 77、 78、 79、 80、 81、 82、 83、 84、 85、 86、 87、 88、 89、 90、 91、 92、 93、 94、 95、 96、 97、 98、 99、 100、 101、 102、 103、 104、 105、 106、 107、 108、 109、 110、 111、 112、 113、 114、 115、 116、 117、 118、 119、 120、 121、 122、 123、 124、 125、 126、 127、 128、 129、 130、 131、 132、 133、 134、 135、 136、 137、 138、 139、 140、 141、 142、 143、 144、 145、 146、 147、 148、 149、 150、 151、 152、 153、 154、 155、 156、 157、 158、 159、 160、 161、 162、 163、 164、 165、 166、 167、 168、 169、 170、 171、 172、 173、 174、 175、 176、 177、 178、 179、 180、 181、 182、 183、 184、 185、 186、 187、 188、 189、 190、 191、 192、 193、 194、 195、 196、 197、 198、 199、 200、 201、 202、 203、 204、 205、 206、 207、 208、 209、 210、 211、 212、 213、 214、 215、 216、 217、 218、 219、 220、 221、 222、 223、 224、 225、 226、 227、 228、 229、 230、 231、 2

32、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、
245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257
、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、27
0、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、2
83、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、
296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308
、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、32
1、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、3
34、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、
347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359
、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、37
2、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、3
85、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、
398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410
、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、42
3、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、4
36、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、
449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461
、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、47
4、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、4
87、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、
500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512
、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、52
5、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、5
38、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、
551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563
、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、57
6、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、5
89、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、
602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614
、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、62
7、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、6
40、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、
653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665
、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、67
8、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、6
91、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、
704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716
、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、72
9、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、7
42、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、
755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767
、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、78
0、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、7
93、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、
806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818
、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、83
1、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、8
44、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、
857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869

10

20

30

40

50

、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999、もしくは1000個(またはその中で導出可能な任意の範囲)の隣接するアミノ酸またはヌクレオチドを含む核酸分子またはポリペプチドがある。

10

【0120】

さまざまな遺伝子のヌクレオチドならびにタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド配列は以前に開示されており、認識されているコンピュータ化されたデータベースにおいて見出されうる。一般的に使用される2つのデータベースは、全米バイオテクノロジー情報センターのGenbankおよびGenPeptデータベース(ワールド・ワイド・ウェブのncbi.nlm.nih.gov/)ならびにユニバーサルプロテインリソース(UniProt; ワールド・ワイド・ウェブのuniprot.org)である。これらの遺伝子のコード領域は、本明細書において開示される技法を用いて、または当業者に公知であるように、増幅および/または発現されうる。

20

【0121】

本開示の組成物において、1 ml当たり約0.001 mgから約10 mgの総ポリペプチド、ペプチド、および/またはタンパク質が存在するものと企図される。組成物中のタンパク質の濃度は、約0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 mg/mlもしくはそれ以上(またはその中で導出可能な任意の範囲)、少なくとも約0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 mg/mlもしくはそれ以上(またはその中で導出可能な任意の範囲)あるいは多くとも約0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 mg/mlもしくはそれ以上(またはその中で導出可能な任意の範囲)であることができる。

30

【0122】

A. バリエーションポリペプチド

以下は、等価なまたは場合によっては改善された、第二世代のバリエーションポリペプチドまたはペプチドを作製するためにタンパク質のアミノ酸サブユニットを変化させることについての考察である。例えば、ある特定のアミノ酸が、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などの構造との相互作用結合能のかなりの喪失を伴うまたは伴わないように、タンパク質またはポリペプチド配列中の他のアミノ酸の代わりに用いられる。タンパク質の機能活性を規定するのはタンパク質の相互作用能および性質であることから、タンパク質配列の中におよび対応するそのDNAコード配列の中にある特定のアミノ酸置換を施し、それでも、類似のまたは望ましい特性を有するタンパク質を産生させることができる。このように、タンパク質をコードする遺伝子のDNA配列において、その生物学的有用性または活性をさほど失わないようにさまざまな変化が施されうるものと本発明者らは企図している。

40

【0123】

「機能的に等価なコドン」という用語は、アルギニンに対する6種類の異なるコドンなどの、同じアミノ酸をコードするコドンをいうように、本明細書において用いられる。生

50

物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンの変化をいう「中性置換」または「中性変異」も考慮される。

【0124】

本開示のアミノ酸配列バリエーションは、置換バリエーション、挿入バリエーション、または欠失バリエーションであることができる。本開示のポリペプチドの変異は、野生型と比較して、タンパク質またはポリペプチドの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個、またはそれ以上の非連続または連続アミノ酸に影響を与えうる。バリエーションは、本明細書において提供または言及される任意の配列と、間にある全ての値および範囲を含めて、少なくとも50%、60%、70%、80%、または90%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。バリエーションは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の置換アミノ酸を含むことができる。

10

【0125】

アミノ酸および核酸の配列は、タンパク質の発現が関与している生物学的タンパク質活性の維持を含む上記の基準を満たす限り、それぞれ、さらなるN末端もしくはC末端アミノ酸、または5'もしくは3'配列などのさらなる残基を含むこともあり、それでも本明細書において開示されている配列の1つに記載の通り本質的に同一でありうることも理解され则认为される。末端配列の付加は核酸配列に特に当てはまり、例えば、コード領域の5'部分または3'部分のいずれか一方に隣接する種々の非コード配列を含むことができる。

20

【0126】

欠失バリエーションは、典型的には、天然または野生型タンパク質の1つまたは複数の残基を欠損している。個々の残基を欠失させてもよく、またはいくつかの隣接アミノ酸を欠失させてもよい。終止コドン(置換または挿入により)コード化核酸配列に導入して、切断型タンパク質を作製することができる。

【0127】

挿入変異体は、典型的には、ポリペプチドにおける非末端点でのアミノ酸残基の付加を伴う。これには1つまたは複数のアミノ酸残基の挿入を含めることができる。末端付加体を作製することも可能であり、これらは、本明細書において記述または参照される1つまたは複数のペプチドまたはポリペプチドの多量体または鎖状体である融合タンパク質を含むことができる。

30

【0128】

置換バリエーションは、典型的には、タンパク質またはポリペプチド内の1つまたは複数の部位での1つのアミノ酸と別のアミノ酸との交換を含み、他の機能または特性を失ってかまたは失うことなく、ポリペプチドについての1つまたは複数の特性を修飾するようにデザインされてもよい。置換は保存的であってもよく、すなわち、1つのアミノ酸が、類似の化学的特性のアミノ酸に置換されてもよい。「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸クラスの成員と同じクラスの別の成員との交換を伴いうる。保存的置換は当技術分野において周知であり、これには、例えば、アラニンのセリンへの、アルギニンのリジンへの、アスパラギンのグルタミンまたはヒスチジンへの、アスパラギン酸のグルタミン酸への、システインのセリンへの、グルタミンのアスパラギンへの、グルタミン酸のアスパラギン酸への、グリシンのプロリンへの、ヒスチジンのアスパラギンまたはグルタミンへの、イソロイシンのロイシンまたはバリンへの、ロイシンのバリンまたはイソロイシンへの、リジンのアルギニンへの、メチオニンのロイシンまたはイソロイシンへの、フェニルアラニンのチロシン、ロイシンまたはメチオニンへの、セリンのスレオニンへの、スレオニンのセリンへの、トリプトファンのチロシンへの、チロシンのトリプトファンまたはフェニルアラニンへの、および、バリンのイソロイシンまたはロイシンへの変化が含まれる。保存的アミノ酸置換は、天然に存在しないアミノ酸残基を包含してもよく、それらは、通常、生物学的システムでの合成によってではなく化学的ペプチド合成によって組み入れられ

40

50

る。これらには、ペプチド模倣体または他の逆型もしくは反転型のアミノ酸部分が含まれる。

【0129】

あるいは、置換はポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように「非保存的」であってもよい。非保存的变化は、典型的には、非極性アミノ酸または非荷電アミノ酸の代わりに極性アミノ酸または荷電アミノ酸を用いておおよそその逆など、1つのアミノ酸残基を化学的に異なる残基に置換することを含む。非保存的置換は、アミノ酸クラス1つの成員と別のクラスからの成員との交換を伴う。

【0130】

B. 置換の考慮事項

当業者は、周知の技法を用いて、本明細書において記載されるようなポリペプチドの適当なバリエーションを決定することができる。当業者は、活性にとって重要であるとは考えられていない領域を標的化することにより、活性を破壊することなく変えられうる分子の適当な領域を同定する。当業者はまた、類似のタンパク質またはポリペプチド間で保存されているアミノ酸残基および分子の部分の同定することができるであろう。さらなる態様において、生物学的活性にとってまたは構造にとって重要でありうる領域は、生物学的活性を有意に変化させることなく、またはタンパク質もしくはポリペプチド構造に悪影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換を受けうる。

【0131】

そのような変化を加える際には、アミノ酸のヒドロパシー指数が考慮されうる。タンパク質のヒドロパシープロファイルは、各アミノ酸に数値(「ヒドロパシー指数」)を割り当て、次にペプチド鎖に沿ってこれらの値を繰り返し平均することによって計算される。各アミノ酸には、その疎水性および電荷特性に基づいて値が割り当てられている。それらは、イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); スレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸(-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸(-3.5); アスパラギン(-3.5); リシン(-3.9); およびアルギニン(-4.5)である。相互作用的な生物機能をタンパク質に付与する際のヒドロパシーアミノ酸指数の重要性が当技術分野において一般に理解されている(Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-131 (1982))。アミノ酸の相対的なヒドロパシー特徴は、結果として生じるタンパク質またはポリペプチドの二次構造に寄与し、その結果として、これが、タンパク質またはポリペプチドと、他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を定義すると受け入れられている。ある特定のアミノ酸は、類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され、それでも、類似の生物学的活性を保持しうることも知られている。ヒドロパシー指数に基づいて変化を加える際には、ある特定の態様において、ヒドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれる。本発明のいくつかの局面において、±1以内であるものが含まれ、および本発明の他の局面において、±0.5以内のものが含まれる。

【0132】

親水性に基づいて、類似するアミノ酸を効果的に置換することも当技術分野において理解される。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号には、隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性(greatest local average hydrophilicity)はタンパク質の生物学的特性と相関関係にあることが述べられている。ある特定の態様において、隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性は、その免疫原性および抗原結合と、すなわち、タンパク質の生物学的特性として相関関係にある。これらのアミノ酸残基には以下の親水性値が割り当てられている: アルギニン(+3.0); リジン(+3.0); アスパラギン酸(+3.0±1); グルタミン酸(+3.0±1); セリン(+0.3); アスパラギン(+0.2); グルタミン(+0.2); グリシン(0); スレオニン(-0.4); プロリン(-0.5±1); アラニン(-0.5); ヒスチジン(-0.5

10

20

30

40

50

); システイン(-1.0); メチオニン(-1.3); バリン(-1.5); ロイシン(-1.8); イソロイシン(-1.8); チロシン(-2.3); フェニルアラニン(-2.5); およびトリプトファン(-3.4)。

類似の親水性値に基づいて変化を加える際には、ある特定の態様において、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれ、他の態様において、±1以内であるものが含まれ、およびさらに他の態様において、±0.5以内のものが含まれる。場合によっては、親水性に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープを同定することもできる。これらの領域は「エピトープコア領域」ともいわれる。アミノ酸は、類似の親水性値を有する別のアミノ酸に置換され、それでも、生物学的に等価かつ免疫学的に等価なタンパク質をもたらすものと理解される。

【0133】

さらに、当業者は、活性または構造にとって重要である類似のポリペプチドまたはタンパク質中の残基を同定する構造機能研究を再考することができる。そのような比較の見地から、類似のタンパク質の活性または構造に重要なアミノ酸残基に対応するタンパク質中のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者は、そのような予測される重要なアミノ酸残基に対しての化学的に類似したアミノ酸置換を選択しうる。

【0134】

当業者は、類似のタンパク質またはポリペプチドにおけるその構造との関連で三次元構造およびアミノ酸配列を分析することもできる。そのような情報を考慮して、当業者は、その三次元構造に関して抗体のアミノ酸残基のアライメントを予測しうる。当業者は、タンパク質の表面にあると予測されるアミノ酸残基については、そのような残基が他の分子との重要な相互作用に関与している可能性があるため、変化を加えないという選択をすることもある。さらに、当業者は、各所望のアミノ酸残基の位置に単一のアミノ酸置換を含む試験バリエーションを作製することが可能である。これらのバリエーションを次に、結合および/または活性についての標準的なアッセイ法を用いてスクリーニングし、かくしてそのような日常的な実験から収集された情報を得ることができ、それにより、当業者は、単独でまたは他の変異との組み合わせでさらなる置換を避けるべきアミノ酸位置を決定することが可能になる。二次構造を決定するために利用できるさまざまなツールは、ワールド・ワイド・ウェブのexpasy.org/proteomics/protein_structureで見出すことができる。

【0135】

本発明のいくつかの態様において、(1) タンパク質分解に対する感受性を低減する、(2) 酸化に対する感受性を低減する、(3) タンパク質複合体を形成するための結合親和性を改変する、(4) リガンドもしくは抗原結合親和性を改変する、および/または(5) そのようなポリペプチドに対して他の物理化学的または機能的特性を付与もしくは修飾する、アミノ酸置換が行われる。例えば、単一または複数のアミノ酸置換(ある特定の態様において、保存的アミノ酸置換)が、天然に存在する配列において行われうる。分子間接触を形成するドメインの外側にある抗体のその部分において置換を行うことができる。そのような態様において、タンパク質またはポリペプチドの構造的特徴を実質的に変化させない保存的アミノ酸置換(例えば、天然抗体を特徴付ける二次構造を破壊しない1つまたは複数の置換アミノ酸)を用いることができる。

【0136】

IV. 核酸

ある特定の態様において、核酸配列は、以下のような種々の例で存在することができる: 抗体の片鎖もしくは両鎖、またはその断片、誘導体、ムテインもしくはバリエーションをコードする、組み込まれた配列または組換えポリヌクレオチドの単離されたセグメントおよび組換えベクター、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定、分析、変異または増幅するためのハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマーまたは配列決定プライマーとして用いるのに十分なポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドの発現を阻害するためのアンチセンス核酸、ならびに本明細書において記述される前述の相補配列。本明細書において提供されるある特定の抗体に対するエピトープをコードする核酸も提供される

10

20

30

40

50

。これらのペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸も提供される。核酸は一本鎖または二本鎖であることができ、RNAおよび/またはDNAヌクレオチドならびにそれらの人工バリエーション(例えば、ペプチド核酸)を含むことができる。

【0137】

「ポリヌクレオチド」という用語は、組換えであるか、または、全ゲノム核酸から単離されているかのいずれかの核酸分子をいう。「ポリヌクレオチド」という用語の範囲内に含まれるのは、オリゴヌクレオチド(長さが100残基またはそれ以下の核酸)、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む、組換えベクターである。ポリヌクレオチドは、ある局面において、天然の遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に単離されている、調節配列を含む。ポリヌクレオチドは、一本鎖(コーディングもしくはアンチセンス)または二本鎖であってよく、RNA、DNA(ゲノム、cDNAもしくは合成)、その類似体、またはその組み合わせであってよい。ポリヌクレオチドのなかにさらなるコーディングまたは非コーディング配列が存在してもよいが、存在しなくてもよい。

【0138】

この点において、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、または「核酸」という用語は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸(適切な転写、翻訳後修飾または局在化に必要とされる任意の配列を含む)をいうように用いられる。当業者に理解される通り、この用語はゲノム配列、発現カセット、cDNA配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質、および変異体を発現するかまたは発現するように適合せられる、遺伝子操作されたもっと小さな核酸セグメントを包含する。ポリペプチドの全部または一部をコードする核酸は、そのようなポリペプチドの全部または一部をコードする連続核酸配列を含むことができる。また、特定のポリペプチドは、わずかに異なる核酸配列を有するがそれでも同じまたは実質的に類似のタンパク質をコードする、変動を含む核酸によってコードされうることも考えられる。

【0139】

ある態様には、本明細書において開示される配列と実質的同一性を有するポリヌクレオチドバリエーションがあり;該バリエーションは、本明細書において記述される方法(例えば、標準パラメータによるBLAST解析)を用い本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列と比べて、以下の間の全ての値および範囲を含む少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%、またはそれ以上の配列同一性を含む。ある局面において、単離されたポリヌクレオチドは、配列の全長にわたり、本明細書において記述されるアミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは95%、およびそれ以上の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列;または該単離されたポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0140】

核酸セグメントは、コード配列それ自体の長さにかかわらず、プロモーター、ポリ阿德ニル化シグナル、付加的な制限酵素部位、マルチクローニング部位、他のコードセグメントなどのような、他の核酸配列と組み合わせてもよく、したがってその全長はかなり変化することがある。核酸は任意の長さであることができる。それらは、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1000、1500、3000、5000もしくはそれ以上のヌクレオチド長であることができ、および/または1つもしくは複数の追加の配列、例えば、調節配列を含むことができ、および/またはさらに大きな核酸、例えばベクターの一部であることができる。それゆえ、ほぼすべての長さの核酸断片を使用することができ、その全長は精製の容易さによっておよび意図された組換え核酸プロトコルにおける用途によって制限されることが好ましいものと考えられる。場合によっては、核酸配列は、例えば、ポリペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後修飾を可能にするための、または標的化もしくは有効性などの治療的有用性を可能にするための、さらなる異種コード配列を有するポリペプチド配列をコードすることができる。先に論じられる通り、タグまたは他の異種ポリペプチドを、修飾されたポリペプチドをコードする配列に付加することができ、「異種」

とは、修飾されたポリペプチドと同じものではないポリペプチドをいう。

【0141】

A. ハイブリダイゼーション

特定のハイブリダイゼーション条件下で他の核酸にハイブリダイズする核酸。核酸をハイブリダイズさせるための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6を参照されたい。本明細書において定義されるように、中等度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、 $5\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0)を含有するプレ洗浄溶液、約50%ホルムアミド、 $6\times$ SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、および55℃のハイブリダイゼーション温度(または42℃のハイブリダイゼーション温度を用い、約50%ホルムアミドを含有するものなどの、他の類似のハイブリダイゼーション溶液)、ならびに $0.5\times$ SSC、0.1% SDS中60℃の洗浄条件を用いる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、45℃にて $6\times$ SSC中でハイブリダイズを行い、引き続き68℃にて $0.1\times$ SSC、0.2% SDS中で1回または複数回の洗浄を行う。さらに、当業者は、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件を操作して、互いに少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸が、通常、互いにハイブリダイズしたままであるようにハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増大または低下させることができる。

10

20

【0142】

ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与えるパラメータおよび適当な条件を考案するためのガイダンスは、例えば、Sambrook、Fritsch、およびManiatis(ともにあらゆる目的のために参照により全体が本明細書に組み入れられるMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11 (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4 (1995))により記載されており、例えば、DNAの長さおよび/または塩基組成に基づいて当業者により容易に決定されうる。

30

【0143】

B. 変異

変化を変異によって核酸に導入し、それによって、核酸がコードするポリペプチド(例えば、抗体または抗体誘導体)のアミノ酸配列の変化をもたらすことができる。当技術分野において公知の任意の技法を用いて、変異を導入することができる。1つの態様において、1つまたは複数の特定のアミノ酸残基は、例えば、部位特異的変異誘発プロトコルを用いて変えられる。別の態様において、1つまたは複数のランダムに選択された残基が、例えば、ランダム変異誘発プロトコルを用いて変えられる。どのように作製されたとしても、変異体ポリペプチドを発現させ、所望の特性についてスクリーニングすることができる。

40

【0144】

変異は、核酸がコードするポリペプチドの生物学的活性を著しく変化させることなく、核酸に導入することができる。例えば、非必須アミノ酸残基の位置でアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換を行うことができる。あるいは、1つまたは複数の変異を、核酸がコードするポリペプチドの生物学的活性を選択的に変化させる核酸に導入することができる。例えば、Romain Studer et al., Biochem. J. 449:581-594 (2013)を参照されたい。例えば、変異は生物学的活性を定量的または定性的に変化させることができる。定量的変化の例としては、活性の増大、低減または排除が挙げられる。定性的変化の例としては、抗体の抗原特異性の改変が挙げられる。

【0145】

C. プローブ

50

別の局面において、核酸分子は、核酸配列の検出用のプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして用いるのに適している。核酸分子は、全長ポリペプチドをコードする核酸配列の一部分、例えば、プローブもしくはプライマーとして使用できる断片、または所与のポリペプチドの活性部分をコードする断片のみを含むことができる。

【0146】

別の態様において、核酸分子は、特定の抗体配列のためのプローブまたはPCRプライマーとして用いられうる。例えば、診断方法において核酸分子プローブが用いられうるか、またはとりわけ、抗体の可変ドメインの産生で用いるための核酸配列を単離するために使われうるDNAの領域を増幅するために核酸分子PCRプライマーが用いられうる。例えば、Gaily Kivi et al., BMC Biotechnol. 16:2 (2016)を参照されたい。好ましい態様において、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。より好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、関心対象の抗体の重鎖および軽鎖の非常に可変な領域に由来する。さらにより好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のCDRの全部または一部をコードする。

10

【0147】

核酸の所望の配列に基づくプローブを用いて、核酸または類似の核酸、例えば、目的のポリペプチドをコードする転写産物を検出することができる。プローブは標識基、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子を含むことができる。そのようなプローブを用いて、ポリペプチドを発現する細胞を同定することができる。

20

【0148】

V. 抗体産生

A. 抗体産生

診断アッセイおよび検出アッセイで用いるための、精製のための、ならびに治療用物質として用いるための抗体を調製および特徴付けするための方法は、例えば、米国特許第4,011,308号; 同第4,722,890号; 同第4,016,043号; 同第3,876,504号; 同第3,770,380号; および同第4,372,745号(例えば、参照により本明細書に組み入れられるAntibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと)に開示されているように当技術分野において周知である。これらの抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体調製物、単一特異性抗血清、ヒト抗体、ハイブリッドもしくはキメラ抗体、例えばヒト化抗体、改変抗体、F(ab')₂断片、Fab断片、Fv断片、単ドメイン抗体、二量体もしくは三量体抗体断片構築体、ミニボディ、または当該の抗原に結合するその機能的断片でありうる。ある特定の局面において、さまざまな態様で用いるためのポリペプチド、ペプチド、およびタンパク質ならびにその免疫原性断片は、従来の技法によって溶液中または固体支持体上で合成することもできる。例えば、Stewart and Young, (1984); Tarn et al, (1983); Merrifield, (1986); およびBarany and Merrifield (1979)を参照されたく、各々が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0149】

簡単に言えば、ポリクローナル抗体は、抗原またはその一部分で動物を免疫し、その免疫された動物から抗血清を収集することによって調製される。抗原は、自然界に見られる抗原配列と比較して改変されうる。いくつかの態様において、バリエーションまたは改変された抗原性ペプチドもしくはポリペプチドが、抗体を作製するために利用される。接種材料は、典型的には、抗原性組成物を生理学的に耐容される希釈剤中に分散させて水性組成物を形成することにより調製される。その後、抗血清を当技術分野において公知の方法によって収集し、血清をそのままさまざまな用途に用いてもよく、あるいはアフィニティークロマトグラフィーなどの、周知の方法によって所望の抗体画分を精製してもよい(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual 1988)。

40

【0150】

モノクローナル抗体を作製する方法も当技術分野において周知である(あらゆる目的のために参照により全体が本明細書に組み入れられるKohler and Milstein, 1975; Ha

50

rlow and Lane, 1988, 米国特許第4,196,265号)。典型的には、この技法は、選択された免疫原性組成物、例えば、精製されたまたは部分的に精製されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたはドメインで適切な動物を免疫することを伴う。次に、免疫された動物から得られた抗体産生B細胞、または引き離した全脾細胞を、不死化された細胞株由来の細胞と融合させてハイブリドーマを形成するように誘導する。ハイブリドーマ産生融合手順で用いるのに適した骨髓腫細胞株は好ましくは、非抗体産生性であり、高い融合効率と、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの増殖を支持する特定の選択培地中で増殖することができなくなる酵素欠損とを有する。典型的には、融合パートナーは、結果として得られたハイブリドーマの選択を、特定の培地を用いて可能にする特性を含む。例えば、融合パートナーは、ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン(HAT)感受性であることができる。抗体産生脾臓またはリンパ節細胞および骨髓腫細胞のハイブリッドを作製するための方法は、通常、細胞膜の融合を促進する薬剤(化学的または電氣的)の存在下で体細胞を骨髓腫細胞と混合することを含む。次に、ハイブリドーマの選択を、マイクロタイタープレート中での単クローン希釈によって細胞を培養し、引き続き個々のクローン上清を(約2~3週間後に)所望の反応性について試験することにより実施することができる。ハイブリドーマを作製するための融合手順、免疫プロトコル、および融合用の免疫脾細胞の単離のための技法は、当技術分野において公知である。

10

【0151】

モノクローナル抗体を産生するための他の技法は、Bリンパ球のウイルス性もしくは腫瘍性形質転換、核酸もしくはポリペプチドを作製するために用いられうる分子クローニングアプローチ、選択リンパ球抗体法(SLAM)(例えば、Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)を参照のこと)、免疫動物の脾臓から単離されたRNA由来のコンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリの調製および適切な抗体を発現するファージミドの選択、またはCre媒介部位特異的組換えを用いて改変された免疫グロブリン遺伝子座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を産生すること(例えば、米国特許第6,091,001号参照)を含む。

20

【0152】

モノクローナル抗体は、ろ過、遠心分離、およびHPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーなどのさまざまなクロマトグラフィー法を用いてさらに精製されうる。モノクローナル抗体は、特異性、結合力、半減期、免疫原性、結合会合、結合解離、または感染症の処置であることに関連した全体的な機能特性に関連する特性について、さらにスクリーニングまたは最適化されうる。したがって、モノクローナル抗体は、挿入、欠失、または保存されたもしくは保存されていないアミノ酸による置換を含めて、CDRのアミノ酸配列の変化を有しうる。

30

【0153】

特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる免疫応答の非特異的刺激剤の使用により増強することができる。態様によって用いられうるアジュバントは、IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、-インターフェロン、GM-CSF、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDPおよびnor-MDPなどの、MDP化合物、CGP(MTP-PE)、リピドA、ならびにモノホスホリルリピドA(MPL)を含むが、これらに限定されることはない。例示的なアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント(死滅化された結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)を含む免疫応答の非特異的刺激因子)、不完全フロイントアジュバント、および/または水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられうる。アジュバントに加えて、生物学的反応修飾物質(BRM)、例えば、限定されるものではないが、シメチジン(CIM; 1200 mg/d)(Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド(CYP; 300 mg/m²)(Johnson/ Mead, NJ)、サイトカイン、例えばβ-インターフェロン、IL-2、もしくはIL-12、またはB-7などの、免疫ヘルパー機能に関与するタンパク質をコードする遺伝子を同時投与することが望ましい場合もある。ファージディスプレイシステムを用いて、インビトロで抗体分子集団を拡張することができる。Saiki, et al., Nature 324:163 (1986); Scharf et al., Science 233:1076 (1986); 米国特許

40

50

第4,683,195号および同第4,683,202号; Yang et al., J Mol Biol. 254:392 (1995); Barbas, III et al., Methods: Comp. Meth Enzymol. (1995) 8:94; Barbas, III et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991)。

【0154】

B. 完全ヒト抗体の産生

完全ヒト抗体を作製するための方法が利用可能である。完全ヒト抗体を用いることで、ヒトに非ヒトモノクローナル抗体を治療剤として投与することにより引き起こされうる免疫原性およびアレルギー性反応を最小限に抑えることができる。1つの態様において、ヒト抗体は、非ヒトトランスジェニック動物、例えば、V-D-J組換えおよびアイソタイプ・スイッチングを起こすことによりタンパク質に対するヒト抗体の複数のアイソタイプ(例えば、IgG、IgA、および/またはIgE)を産生することができるトランスジェニックマウスにおいて産生されうる。したがって、この局面は、抗体、抗体断片、およびその薬学的組成物だけでなく、非ヒトトランスジェニック動物、B細胞、宿主細胞、およびモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマにも適用される。ヒト化抗体の用途は、インビボまたはインビトロのいずれかで予想されるタンパク質を発現する細胞を検出すること、本発明の抗体を含有する薬学的調製物、および抗体を投与することによって障害を処置する方法を含むが、これらに限定されることはない。

【0155】

完全ヒト抗体は、内因性免疫グロブリン産生がなくてもヒト抗体のレパートリーを産生できるトランスジェニック動物(通常はマウス)を免疫することによって産生することができる。この目的のための抗原は、通常、6つまたはそれ以上の隣接するアミノ酸を有し、任意で、ハプテンなどの担体にコンジュゲートされる。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)を参照されたい。一例を挙げれば、トランスジェニック動物は、その中のマウス重および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座を無力化し、ヒト重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座を含むヒトゲノムDNAの大きな断片をマウスゲノムに挿入することにより作製される。次に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の完全な補体に満たない、部分的に改変された動物を交雑させて、所望の免疫系改変の全てを有する動物を得る。免疫原を投与すると、これらのトランスジェニック動物は、免疫原に対して免疫特異的であるが、可変領域を含むマウスのアミノ酸配列ではなくヒトのアミノ酸配列を有する抗体を産生する。そのような方法のさらなる詳細については、例えば、国際特許出願公開番号WO 96/33735およびWO 94/02602を参照されたく、これらは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。ヒト抗体を作製するためのトランスジェニックマウスに関連する追加の方法は、米国特許第5,545,807号; 同第6,713,610号; 同第6,673,986号; 同第6,162,963号; 同第6,300,129号; 同第6,255,458号; 同第5,877,397号; 同第5,874,299号および同第5,545,806号; 国際特許出願公開番号WO 91/10741およびWO 90/04036; ならびに欧州特許番号EP 546073B1およびEP 546073A1に記述されており、これらは全て、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0156】

本明細書において「HuMAb」マウスといわれる、上記のトランスジェニックマウスは、内因性 μ および κ 鎖遺伝子座を不活化する標的変異とともに、再構成されていないヒト重(μ および κ)鎖ならびに λ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含む(Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994))。したがって、マウスはマウスIgMまたは λ 鎖の発現の低減を示し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチングおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgG?モノクローナル抗体を作製する(Lonberg et al., 前記; Lonberg and Huszar, Intern. Ref. Immunol. 13:65-93 (1995); Harding and Lonberg, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546 (1995))。HuMAbマウスの調製は、Taylor et

al., Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 (1992); Chen et al., Int. Immunol. 5: 647-656 (1993); Tuailon et al., J. Immunol. 152:2912-2920 (1994); Lonberg et al., supra; Lonberg, Handbook of Exp. Pharmacol. 113:49-101 (1994); Taylor et al., Int. Immunol. 6:579-591 (1994); Lonberg and Huszar, Intern. Ref. Immunol. 13:65-93 (1995); Harding and Lonberg, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546 (1995); Fishwild et al., Nat. Biotechnol. 14:845-851 (1996)に詳細に記述されており; 前記の参考文献は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。さらに、米国特許第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,789,650号; 同第5,877,397号; 同第5,661,016号; 同第5,814,318号; 同第5,874,299号; 同第5,770,429号; および同第5,545,807号; ならびに国際特許出願公開番号WO 93/1227; WO 92/22646; およびWO 92/03918を参照されたく、これらの全ての開示は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。また、これらのトランスジェニックマウスにおいてヒト抗体を産生するために利用される技術は、WO 98/24893、およびMendez et al., Nat. Genetics 15:146-156 (1997)に開示されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。例えば、HCo7およびHCo12トランスジェニックマウス系統を用いてヒト抗体を作製することができる。

10

【0157】

ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する抗原特異的ヒト化モノクローナル抗体を、上記のものなどのトランスジェニックマウスから産生および選択することができる。そのような抗体は適当なベクターおよび宿主細胞を用いてクローニングおよび発現されうるか、または抗体は培養されたハイブリドーマ細胞から収集することができる。また、完全ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリ(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227:381 (1991); およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)に開示されている)に由来することができる。そのような技法の1つは、そのようなアプローチを用いたMPL-受容体およびmsk-受容体に対する高親和性および機能的アゴニスト抗体の単離について記述している、国際特許出願公開番号WO 99/10494 (参照により本明細書に組み入れられる)に記述されている。

20

【0158】

C. 抗体断片産生

30

関心対象の抗原を認識する能力を保持する抗体断片も、本明細書での使用が見出されるであろう。インタクトな抗体分子の免疫学的結合特性を示すことができる抗原結合部位を含むいくつかの抗体断片が当技術分野において公知であり、その後、当技術分野において公知の方法によって修飾されうる。重鎖および軽鎖の可変領域のみを含む機能的断片は、免疫グロブリン分子の組換え産生または選択的タンパク質分解切断などの標準的な技法を用いて産生することもできる。これらの断片はFvとして公知である。例えば、Inbar et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662 (1972); Hochman et al., Biochem. 15:2706-2710 (1976); およびEhrlich et al., Biochem. 19:4091-4096 (1980)を参照されたい。

【0159】

40

一本鎖可変断片(scFv)は、2つの可変ドメインポリペプチド(VLおよびVH)をコードするDNA間でペプチドリinkerをコードするDNAを融合することにより調製されうる。scFvは抗原結合単量体を形成することができ、またはscFvは2つの可変ドメイン間の可動性リンカーの長さに依り、多量体(例えば、二量体、三量体もしくは四量体)を形成することができる(Kortt et al., Prot. Eng. 10:423 (1997); Kort et al., Biomol. Eng. 18:95-108 (2001))。異なるVLおよびVHを含むポリペプチドを組み合わせることにより、異なるエピトープに結合する多量体scFvを形成することができる(Kriangkum et al., Biomol. Eng. 18:31-40 (2001))。抗原結合断片は、典型的には、当業者に公知の組換えDNA法によって産生される。Fv断片の2つのドメインVLおよびVHは別々の遺伝子によりコードされているが、一本鎖ポリペプチド(一本鎖Fv (sFvまたはscFv)

50

として知られる)として作製されることを可能にする合成リンカーによる組換え法を用いて、それらをつなぎ合わせることができる;例えば、Bird et al., Science 242:423-426 (1988); およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)を参照されたい。デザイン基準としては、片鎖のC末端と他鎖のN末端との間の距離に及ぶ適切な長さを決定することが含まれ、ここでリンカーは一般に、コイルまたは二次構造を形成する傾向がない小さな親水性アミノ酸残基から形成されている。適当なリンカーは一般に、グリシンおよびセリン残基の交互セットのポリペプチド鎖を含み、溶解性を高めるために挿入されたグルタミン酸およびリジン残基を含みうる。抗原結合断片は、インタクトな抗体と同じ方法で有用性をスクリーニングされる。そのような断片はアミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失により得られる断片を含み、ここで残りのアミノ酸配列は、例えば、完全長cDNA配列から推定される天然配列中の対応する位置と実質的に同一である。

10

【0160】

また、抗体は、鑄型ペプチドの特性に類似した特性を有する非ペプチド化合物からなりうる本明細書において開示されるエピトープ決定基のペプチド類似体を用いて作製されうる。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体(peptide mimetics)」または「ペプチド模倣体(peptidomimetics)」と称される。Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); およびEvans et al., J. Med. Chem. 30:1229 (1987)。また、Liuら(2003)には、簡素化された抗体として作用し、血清中半減期がさらに長く、合成方法がそれほど面倒ではないというある特定の利点を有するペプチドである「抗体様結合ペプチド模倣体」(ABiP)が記述されている。これらの類似体は、ペプチド、非ペプチドまたはペプチド領域と非ペプチド領域の組み合わせであることができる。Fauchere, Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger, TINS p. 392 (1985); およびEvans et al., J. Med. Chem. 30:1229 (1987)、これらはあらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。治療的に有用なペプチドと構造的に類似しているペプチド模倣体を用いて、同様の治療効果または予防効果を生み出すことができる。そのような化合物は、コンピュータ化された分子モデリングの助けを借りて開発されることが多い。一般に、本発明のペプチド模倣体は、タンパク質に結合する能力などの、所望の生物学的活性を示す抗体に構造的に類似しているが、しかし1つまたは複数のペプチド結合が、当技術分野において周知の方法により以下から選択される結合によって置換されていてもよいタンパク質である: $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH-CH-$ (シスおよびトランス)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、ならびに $-CH_2SO-$ 。本発明のある特定の態様において同じタイプのD-アミノ酸でのコンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ酸の系統的な置換(例えば、L-リジンの代わりにD-リジン)を用いて、より安定なタンパク質を作製することができる。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列変異を含む制約された(constrained)ペプチドが、当技術分野において公知の方法(参照により本明細書に組み入れられるRizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992))により、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を追加することにより作製されうる。

20

30

40

【0161】

作製されたら、ファージディスプレイライブラリは、既知の技法を用いてFab分子の免疫学的結合親和性を改善するために用いることができる。例えば、Figini et al., J. Mol. Biol. 239:68 (1994)を参照されたい。ファージディスプレイライブラリから選択されたFab分子の重鎖および軽鎖部分のコード配列を、単離または合成し、発現のために任意の適当なベクターまたはレプリコンにクローニングすることができる。任意の適当な発現系を用いることができる。

【0162】

VI. コードされた抗体の取得

いくつかの局面においては、抗体ポリペプチド(例えば、重鎖もしくは軽鎖、可変ドメ

50

インのみ、または完全長)をコードする核酸分子がある。これらは、当技術分野において公知の方法により作製され、例えば、免疫および単離されたマウスのB細胞から単離され、任意の適当な組換え発現系においてファージディスプレイ発現され、アSEMBルして抗体分子を形成することが可能とされうる。

【0163】

A. 発現

核酸分子は、大量の組換え抗体を発現するために、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、イムノアドヘシン、ダイアボディ、変異抗体、および他の抗体誘導体を産生するために用いられうる。核酸分子が非ヒト、非トランスジェニック動物に由来する場合、核酸分子は抗体のヒト化のために用いられうる。

【0164】

B. ベクター

いくつかの局面において、所望の配列のポリペプチドまたはその一部分(例えば、1つもしくは複数のCDRまたは1つもしくは複数の可変領域ドメインを含む断片)をコードする核酸分子を含む発現ベクターが企図される。核酸分子を含む発現ベクターは、重鎖、軽鎖、またはその抗原結合部分をコードしうる。いくつかの局面において、核酸分子を含む発現ベクターは、融合タンパク質、修飾された抗体、抗体断片、およびそれらのプローブをコードしうる。転写および翻訳を統制する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能も果たす核酸配列を含みうる。

【0165】

抗体またはその抗原結合断片を発現させるため、遺伝子領域が転写および翻訳制御配列に機能的に連結されるように部分的または完全な長さの軽鎖および重鎖をコードするDNAを発現ベクターに挿入する。いくつかの局面においては、任意のVHまたはVL配列が容易に挿入および発現されうるように操作された適切な制限部位を有する機能的に完全なヒトCHまたはCL免疫グロブリン配列をコードするベクター。典型的には、宿主細胞のいずれかで用いられる発現ベクターは、プラスミドまたはウイルスの維持のための、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。まとめて「フランキンギング配列」といわれるそのような配列は、典型的には、以下の機能的に連結されたヌクレオチド配列の1つまたは複数を含む: プロモーター、1つまたは複数のエンハンサー配列、複製の起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能なマーカー要素。そのような配列およびそれを使用する方法は、当技術分野において周知である。

【0166】

1. 発現系

上記の発現ベクターの少なくとも一部または全部を含む多数の発現系が存在する。原核生物および/または真核生物に基づく系を1つの態様で用いるために利用して、核酸配列、またはその同族ポリペプチド、タンパク質およびペプチドを産生することができる。商業的かつ広範に利用可能な系は、細菌、哺乳動物、酵母、および昆虫細胞の系を含むが、これらに限定されることはない。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的な機構を有する。発現された外来タンパク質の的確な修飾およびプロセッシングを確実にするために、適切な細胞株または宿主系を選択することができる。当業者は、適切な発現系を用いベクターを発現させて、核酸配列またはその同族ポリペプチド、タンパク質もしくはペプチドを産生させることができる。

【0167】

2. 遺伝子移入の方法

組成物の発現をもたらすための核酸送達に適した方法は、本明細書において記述されるようにまたは当業者に公知であるように、核酸(例えば、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含む、DNA)を細胞、組織または生物に導入することができる実質的に任

10

20

30

40

50

意の方法を含むものと見込まれる。そのような方法は、マイクロインジェクション(参照により本明細書に組み入れられるHarland and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号)を含む、注入(それぞれ参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、同第5,656,610号、同第5,589,466号および同第5,580,859号)による; エレクトロポレーション(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,384,253号)による; リン酸カルシウム沈殿(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990)による; DEAEデキストラン、続けてポリエチレングリコールの使用(Gopal, 1985)による; 直接音波負荷(Fechheimer et al., 1987)による; リポソーム媒介トランスフェクション(Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991)による; 微小発射体衝撃(PCT出願番号WO 94/09699および95/06128; 米国特許第5,610,042号、同第5,322,783号、同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号および同第5,538,880号、ならびにそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる)による; 炭化ケイ素繊維を用いた攪拌(それぞれ参照により本明細書に組み入れられるKaeppler et al., 1990; 米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号)による; アグロバクテリウムを介した形質転換(それぞれ参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,591,616号および同第5,563,055号)による; またはプロトプラストのPEG媒介形質転換(それぞれ参照により本明細書に組み入れられるOmirulleh et al., 1993; 米国特許第4,684,611号および同第4,952,500号)による; 乾燥/阻害を介したDNA取込み(Potrykus et al., 1985)によるようなDNAの直接送達を含むが、これらに限定されることはない。他の方法は、レンチウイルスまたはレトロウイルス形質導入による遺伝子移入などの、ウイルス形質導入を含む。

【0168】

3. 宿主細胞

別の局面において、組換え発現ベクターが導入された宿主細胞の使用が企図される。抗体は種々の細胞型で発現させることができる。抗体をコードする発現構築体は、当技術分野において公知の種々の方法によって細胞にトランスフェクトすることができる。ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技法を介して原核細胞または真核細胞に導入することができる。いくつかのベクターは、原核細胞と真核細胞の両方で複製および/または発現されることを可能にする制御配列を利用する。ある特定の局面において、抗体発現構築体は、T細胞活性化に関連するプロモーター、例えば、ともにT細胞活性化時に活性化されうる転写因子であるNFAT-1またはNF-??によって制御されるものの制御下に配置することができる。抗体発現の制御により、腫瘍標的化T細胞などのT細胞は、その周囲を感知し、T細胞自体と周囲の内因性免疫細胞の両方において、サイトカインシグナル伝達のリアルタイム調節を実施することが可能になる。当業者は、宿主細胞をインキュベートしてそれらを維持し、ベクターの複製を可能にする条件を理解するであろう。また、ベクターの大規模な産生、ならびにベクターによってコードされる核酸およびその同族ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの産生を可能にする技法および条件も理解され、知られている。

【0169】

哺乳動物細胞の安定したトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技法に依り、細胞のごく一部のみが外来DNAをそのゲノムに組み込みうるということが知られている。これらの組み込み体を同定および選択するために、選択可能なマーカー(例えば、抗生物質に対する耐性のための)が一般に、関心対象の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、当技術分野において公知の他の方法の中でもとりわけ、薬物選択によって同定することができる(例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生き残るが、他の細胞は死滅する)。

【0170】

C. 単離

抗体の重鎖および軽鎖全体またはその可変領域の一方または両方をコードする核酸分子は、抗体を産生する任意の供給源から得られうる。抗体をコードするmRNAを単離する方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al., 前記を参照されたい。ヒト重鎖および軽鎖定常領域遺伝子の配列も当技術分野において公知である。例えば、Kabat et al., 1991, 前記を参照されたい。次に、全長の重鎖および/または軽鎖をコードする核酸分子が、それらを導入した細胞において発現され、抗体が単離されうる。

【0171】

VII. 治療用組成物の投与

本明細書において提供される治療法は、第1のがん治療法および第2のがん治療法などの、治療剤の組み合わせの投与を含みうる。治療法は、当技術分野において公知の任意の適当な方法で投与されうる。例えば、第1および第2のがん処置は、連続的に(異なる時間に)または同時に(同じ時間に)投与されうる。いくつかの態様において、第1および第2のがん処置は、別々の組成物中で投与される。いくつかの態様において、第1および第2のがん処置は、同じ組成物中である。

【0172】

本開示の態様は、治療用組成物を含む組成物および方法に関する。異なる治療法は、1つの組成物中、または2つの組成物、3つの組成物もしくは4つの組成物などの、2つ以上の組成物中で投与されうる。薬剤のさまざまな組み合わせが利用されうる。

【0173】

本開示の治療剤は、同じ投与経路によりまたは異なる投与経路により投与されうる。いくつかの態様において、がん治療法は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植により、吸入により、髄腔内に、脳室内に、または鼻腔内に投与される。いくつかの態様において、抗生物質は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植により、吸入により、髄腔内に、脳室内に、または鼻腔内に投与される。適切な投与量は、処置される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、個体の臨床状態、個体の病歴および処置に対する応答、ならびに主治医の裁量に基づいて決定されうる。

【0174】

処置はさまざまな「単位用量」を含みうる。単位用量は、治療用組成物の所定量を含有すると定義される。投与される量、ならびに特定の経路および製剤化は、臨床分野におけるものの決定スキルの範囲内である。単位用量は、単回注射として投与される必要はないが、設定された期間にわたる持続注入を含みうる。いくつかの態様において、単位用量は、単一の投与可能な用量を含む。

【0175】

投与される量は、処置の数および単位用量の両方に応じて、望まれる処置効果に依存する。有効用量とは、特定の効果を達成するために必要な量をいうと理解されている。ある特定の態様における実践において、10 mg/kgから200 mg/kgの範囲の用量が、これらの薬剤の保護能力に影響を及ぼしうるものと企図される。したがって、用量は、約0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、および200、300、400、500、1000 $\mu\text{g/kg}$ 、 mg/kg 、 $\mu\text{g/日}$ 、もしくは mg/日 またはその中で導出可能な任意の範囲の用量を含むものと企図される。さらに、そのような用量は複数回1日の間に、および/または複数の日、週もしくは月に投与することができる。

【0176】

ある特定の態様において、薬学的組成物の有効用量は、約1 μM から150 μM の血中レベルを提供することができるものである。別の態様において、有効用量は、約4 μM から100 μM .; もしくは約1 μM から100 μM ; もしくは約1 μM から50 μM ; もし

くは約1 μM から40 μM ; もしくは約1 μM から30 μM ; もしくは約1 μM から20 μM ; もしくは約1 μM から10 μM ; もしくは約10 μM から150 μM ; もしくは約10 μM から100 μM ; もしくは約10 μM から50 μM ; もしくは約25 μM から150 μM ; もしくは約25 μM から100 μM ; もしくは約25 μM から50 μM ; もしくは約50 μM から150 μM ; もしくは約50 μM から100 μM (またはその中で導出可能な任意の範囲)の血中レベルを提供する。他の態様において、用量は、対象に投与される治療剤から生じる以下の血中レベルの薬剤を提供することができる: 約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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100 μM またはその中で導出可能な任意の範囲、少なくとも約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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100 μM またはその中で導出可能な任意の範囲、あるいは多くとも約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、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100 μM またはその中で導出可能な任意の範囲。ある特定の態様において、対象に投与される治療剤は、体内で代謝された治療剤に代謝され、その場合、血中レベルはその薬剤の量をいう。あるいは、治療剤が対象により代謝されない範囲で、本明細書において論じられる血中レベルは、代謝されていない治療剤をいう。

10

20

30

【0177】

治療用組成物の的確な量も、医師の判断に依存し、各個人に特有である。用量に影響を与える要因は、患者の身体的および臨床的状态、投与経路、意図した処置目標(症状の緩和 vs 治療)、ならびに対象が受けている可能性のある特定の治療用物質または他の治療法の効力、安定性および毒性を含む。

【0178】

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重または mg/kg 体重の投与量単位は変換され、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または mM (血中レベル)、例えば4 μM から100 μM の同等の濃度単位で表現されることが当業者には理解され、認識されるであろう。取込みは種および器官/組織に依存することも理解される。取込みおよび濃度測定に関してなされる適用可能な変換係数および生理学的仮定は周知であり、当業者が、ある濃度測定を別の濃度測定に変換し、本明細書において記述される用量、効力および結果に関して合理的な比較および結論を下すことを可能にするであろう。

40

【0179】

VIII. キット

本発明のある特定の局面はまた、本発明の組成物または本発明の方法を実施するための組成物を含むキットに関する。いくつかの態様において、キットを用いて、1つまたは複数のバイオマーカーを評価することができる。ある特定の態様において、キットは、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

50

、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、100、500、1,000もしくはそれ以上のプローブ、プライマーもしくはプライマーセット、合成分子もしくは阻害剤、またはその中で導出可能な任意の値もしくは範囲および組み合わせを含むか、少なくとも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、100、500、1,000もしくはそれ以上のプローブ、プライマーもしくはプライマーセット、合成分子もしくは阻害剤、またはその中で導出可能な任意の値もしくは範囲および組み合わせを含むか、あるいは多くとも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、100、500、1,000もしくはそれ以上のプローブ、プライマーもしくはプライマーセット、合成分子もしくは阻害剤、またはその中で導出可能な任意の値もしくは範囲および組み合わせを含む。いくつかの態様においては、細胞におけるバイオマーカー活性を評価するためのキットがある。

10

【0180】

キットは、チューブ、ボトル、バイアル、注射器、または他の適当な容器手段などの、容器の中に個別に包装または配置されうる構成要素を含みうる。

【0181】

個々の構成要素は、濃縮された量でキット中に提供されてもよい；いくつかの態様において、構成要素は、他の構成要素との溶液中にあるのと同じ濃度で個別に提供される。構成要素の濃度は、1倍、2倍、5倍、10倍もしくは20倍またはそれ以上として提供される。

20

【0182】

予後診断または診断用途のための本開示のプローブ、合成核酸、非合成核酸、および/または阻害剤を使用するためのキットが、本開示の一部として含まれる。特に企図されるのは、本明細書において同定される任意のバイオマーカーに対応する任意のそのような分子であり、これには、バイオマーカーの非コード配列およびバイオマーカーのコード配列を含みうるバイオマーカーの全部または一部と同一または相補的である核酸プライマー/プライマーセットおよびプローブが含まれる。

30

【0183】

ある特定の局面において、陰性および/または陽性対照核酸、プローブ、および阻害剤は、いくつかのキットの態様に含まれる。さらに、キットは、1つまたは複数のバイオマーカーのメチル化の陰性または陽性対照であるサンプルを含みうる。いくつかの態様において、対照は、少なくとも1つのCpGを含む核酸、またはCpGメチル化部位を同定することができる核酸を含む。

【0184】

本明細書において記述される任意の方法または組成物を、本明細書において記述される任意の他の方法または組成物に関して実施できること、および異なる態様が組み合わせられうることが企図される。もともと出願された特許請求の範囲は、出願された特許請求の範囲のいずれかまたは出願された特許請求の範囲の組み合わせに複合的に依存する特許請求の範囲を網羅することが企図される。

40

【0185】

名称による特定のバイオマーカーを含む本開示の任意の態様は、配列が特定の核酸の成熟配列と少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一であるバイオマーカーを含む態様を網羅することも企図される。

【0186】

本開示の態様は、適切な容器手段の中に、2つまたはそれ以上のバイオマーカープローブを含むサンプルのバイオマーカープロファイルを評価することによる病理学的サンプル

50

の分析のためのキットを含み、ここでバイオマーカープロブは、本明細書において同定されるバイオマーカーの1つまたは複数を検出する。キットは、サンプル中の核酸を標識するための試薬をさらに含むことができる。キットは、アミン修飾ヌクレオチド、ポリ(A)ポリメラーゼ、およびポリ(A)ポリメラーゼ緩衝液の少なくとも1つを含む、標識化試薬も含みうる。標識化試薬は、アミン反応性色素を含むことができる。

【実施例】

【0187】

IX. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技法は、本発明者らが発見した技法が本発明の実践において十分に機能することを示し、したがって、その実践に好ましい様式を構成すると考えられると当業者に理解されるはずである。しかしながら、本開示を考慮すれば、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、開示された特定の態様において多くの変更を加えることができ、それでもなお類似または同様の結果を得ることができると当業者に理解されるはずである。

【0188】

実施例1: ラットでモデル化された片頭痛に対する抗CGRP mAbとIGF-1の組み合わせを用いた相乗効果の探索

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が片頭痛の侵害受容シグナル伝達に関与しているという証拠があり、この前臨床および臨床データが、片頭痛を処置するためのCGRPモノクローナル抗体(CGRP-mAb)の開発につながった。それでも、CGRP-mAbが片頭痛に影響を与える機構は、まだ定義され始めたばかりである。

【0189】

最近の研究では、他者らにより、CGRP-mAb [フレマネズマブ(TEV-48125)]が髄膜知覚線維を選択的に調節することが実証されている(Melo-Carrillo et al., 2017a)。片頭痛とそれに関連する過剰興奮性のモデルとして広く受け入れられている皮質拡張性抑制(CSD)を用いて、他者らにより、TEV-48125がCSD後の高閾値三叉神経系ニューロンの活性化および感受性を時間とともに阻害したことが示されている。さらに、TEV-48125は、ナイーブな高閾値ニューロンを阻害し、顔の皮膚または角膜ではなく、頭蓋内硬膜の刺激後にその活性化を低減した。しかしながら、TEV-48125は尾側三叉神経核の広作動域ニューロンに影響を与えなかった。その後の研究では、TEV-48125はCSDを直接阻害しなかったが、三叉神経節のC線維求心性の活性化ではなくAδ線維のCSDに基づく活性化を低減したことが実証された(Melo-Carrillo et al., 2017b)。

【0190】

著者らは、機械感受性一次求心性髄膜侵害受容器の活性化に対するこの異なる影響により、CGRP-mAbが全ての患者において有効ではない理由が説明されうることを示唆している。著者らは、C線維が三叉神経節でのCGRPの供給源であり、活性化されると(例えば、CSDから、さらには片頭痛によって)CGRPを放出することに注目している。対照的に、Aδ線維はCGRPに応答して活性化され、これはTEV-48125によって阻害される効果である。

【0191】

インスリン様成長因子-1 (IGF-1)の添加は、片頭痛治療用物質としてのTEV-48125の効力を大幅に改善すると仮定される。本発明者らは、新規の天然片頭痛処置としてIGF-1を開発している。IGF-1は、CSDを誘発するために必要な過興奮性および酸化ストレスを低減するものであり、本発明者らは、片頭痛のモデルを用いて三叉神経系で発生することが知られている過興奮性および酸化ストレスを論理的に考える。本発明者らの研究は、身体的および知的活動の増加(すなわち、環境エンリッチメント)がCSDに対する感受性をどのように低減させるかを理解することに関する研究に基づいている。ヒトでは、身体活動の増加は片頭痛への感受性を低減させる。IGF-1は環境エンリッチメントとともに増加し、感覚刺激による神経活動の増加とともに脳に入る。片頭痛のインビトロおよびインビボモデルの両方を用いて、本発明者らは、IGF-1がCSDに対して有意に保護的である

ことを示す。この効果には、CSDの発症に必要な過興奮バースト(hyperexcitability burst)を誘発するミクログリア由来の酸化ストレスの抑制が関与している。また、IGF-1は、成体ラットにインビボで鼻から脳(N2B)に投与後、CSDを有意に防ぐ(Grinberg et al., 2017)。

【0192】

本発明者らの研究室の研究では、N2B IGF-1が三叉神経節でのナイーブレベルのCGRPをおよそ75%だけ有意に低減させることを示した(以下参照)。最近完了した研究において、本発明者らはこれらの結果を拡張して、N2Bが再発性CSDからの三叉神経系の活性化も有意に低減させたことを示した(以下参照)。

【0193】

したがって、皮下CGRP-mAb阻害剤とIGF-1のN2B送達による併用処置は、いずれかの薬剤単独と比較して、三叉神経系の活性化を軽減すると考えられる。本研究は、片頭痛の全身NTGモデルを用いて行われる。一次的な目的は、三叉神経節の活性化レベル(すなわち、CGRP発現、酸化ストレスマーカー)を決定することである。二次的な目的は、三叉神経尾側核の活性化(すなわち、c-fos)の並行測定を行い、CGRPの血中レベルを測定することである。

【0194】

A. 結果

本発明者らは、再発性CSDからの三叉神経系の活性化を低減させるN2B IGF-1の能力を調べる完全な長さの研究を完了した(Won and Kraig 2019a,b, 2020)。以下に列挙するポイントは、IGF-1と代表的なCGRP-mAbを併用療法として組み合わせる有用性を強調している。1) IGF-1の成体ラットへのN2B投与は、そのような送達が低身長のため全身性IGF-1処置を受けた患者の最大5%に見られる副作用である頭痛を引き起こす場合に予想された、三叉神経核の侵害受容性活性化を誘発しなかった。代わりに、鼻から脳へのIGF-1送達は有意に($p < 0.001$; $n = 5$ /群)、CGRPの三叉神経節レベルを75%だけ低減させることが見出された(図1)。この新しいデータは、片頭痛の新しい治療物質としてIGF-1を提案するために用いられた基礎的な生物学に関する本発明者らの(インビトロおよびインビボの研究からの)理解を例示する概略図に組み入れられている(図2)。2) IGF-1の経鼻投与は低血糖を誘発しなかった(図3)。

【0195】

B. 意義

片頭痛は、米国だけでも年間300億ドルもの費用がかかる莫大な医療負担である。新しいCGRP-mAbは、多くの患者において片頭痛の影響を軽減するための治療的手段となる。しかし、機械感受性一次求心性髄膜侵害受容体の活性化に対する影響の違いから、CGRP-mAbが全ての患者に効果があるわけではない理由が説明され始める可能性がある。もう1つの考慮すべき重要なことは、これらの薬剤が三叉神経系の痛みに関連するCGRPを遮断することで侵害受容体活性化を低減する一方で、片頭痛の根本的な原因である脳の過興奮と酸化ストレスに影響を与えることなくそうすることである。したがって、CGRP-mAbの基本的な生理学から発展した治療法の改善が必要される。本発明者らは、CGRP-mAbと他の抗片頭痛剤とを組み合わせることにより、単独での個々の薬剤と比較してさらなる緩和が提供されうること示唆するものである。

【0196】

本プロジェクトでは、片頭痛に関連する三叉神経系の活性化に対する治療法として、代表的なCGRP-mAbによる処置とIGF-1の経鼻送達の組み合わせの有用性を判定する。

【0197】

C. 方法

片頭痛は、ラットでのニトログリセリン(NTG)の腹腔内注射によってモデル化される(Moye and Pradhan, 2017)。NTG処置2日前に、動物にCGRP-mAb (30 mg/kg)またはアイソタイプ抗体対照を皮下投与する。次に、NTG注射の前日に、ラットを吸入イソフルラン[体温($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$)および動脈血酸素($95 \sim 100$ mm Hg)]をモニタリングしな

10

20

30

40

50

がら鼻マスクを介して酸素中およそ5%]で麻酔し、20分かけて50 μ Lのコハク酸緩衝液中のヒト組換えIGF-1 (150 μ g)またはビヒクル(コハク酸緩衝液50 μ L)を鼻腔内投与する(Grinberg et al., 2017)。その後、ラットを単一動物の標準的な収容場所に戻す。24時間後、ラットを短時間拘束し、NTGの腹腔内注射を行う。30%アルコール、30%プロピレングリコール、および水中5 mg/mLの医薬品等級NTGのストック液を、0.9%生理食塩水により毎日、新鮮希釈して0.9%生理食塩水中において6%アルコール、6%プロピレングリコール中1 mg/mLのNTGの終濃度を得る。マウスの慢性片頭痛研究のビヒクルとして用いられる場合に、痛みに関連する指標(機械的感度)に影響を与えない低アルコールおよびプロピレングリコール濃度を達成するために、NTGストック液の希釈が必要とされる[Moye And Pradhan, 2017)。対照的に、30% ETOHおよび30%プロピレングリコールで構成された場合には、羞明および自発運動に及ぼすビヒクルの影響が報告された(Harris et al., (2017)。ラットをNTG注入後2時間、個別のケージ内で回復させた後に、ケタミン/キシラジンで腹腔内麻酔し、心臓内灌流固定により安楽死させ、組織学的分析のために組織を採取する。動物群およびエンドポイントを以下に定義する。【0198】

10

D. デザイン

動物群

本発明者らのこれまでの研究から、CSDおよび三叉神経系の活性化を伴う動物全体の実験について、0.80を超え1.00に近い等しい検出力で統計的有意性に達するには5/群で十分であることが明らかである。それゆえ、本発明者らは、ここでは群当たりn = 5匹の動物を用いることを見込んでいる。動物群は以下からなる: 1) ナイーブ対照; 2) IP NTGによる処置; 3) IP NTGビヒクルによる処置; 4) IP NTGおよびSQ CGRP-mAbによる処置; 5) IP NTGおよびSQアイソタイプ抗体対照による治療; 6) IP NTGおよび経鼻的に送達されたIGF-1による処置; 7) IP NTGおよび経鼻的に送達されたコハク酸緩衝液による処置; 8) IP NTGおよびSQ CGRP-mAbに加えて経鼻的に送達されたIGF-1による処置; 9) IP NTGおよびSQ CGRP-mAbに加えて経鼻投与されたコハク酸緩衝液による処置; ならびに10) IP NTGおよびSQアイソタイプ抗体対照に加えて経鼻的に送達されたIGF-1による処置。【0199】

20

エンドポイント

本プロジェクトのエンドポイントは、NTG注射4時間後に固定液で灌流した後、免疫組織化学的分析のために脳および三叉神経節組織を採取することである。三叉神経節の測定は、CGRPおよび酸化ストレスの免疫組織化学的アッセイを予定している。尾側三叉神経核の測定は、表在性薄層c-fos免疫染色のアッセイを予定している。灌流固定の直前に、CGRPレベルを目的に心臓穿刺から血液を採取する。【0200】

30

統計手順:

全てのデータ分析は、STAIRおよびARRIVEの基準にしたがい、処置に対して盲検化して行い、必要に応じてANOVAおよび事後検定またはt検定により統計的に処理して行う。【0201】

40

【0201】

SigmaPlot (v.12.5; Systat Software, Inc., San Jose, CA)を用いて全てのデータを分析する。全てのデータを正規性検定(棄却するp値: 0.05)、等分散検定(棄却するp値: 0.05)、および検出力($1 - \beta$:) 0.8)に供した。データを実験データと対照データの自然対数比として提示する。この方法では、「0」の値は対照からの変化がないことを反映することになり、正の対数は増加、負の対数は減少を示すことになる。本発明者らは、コンピュータに基づく半定量的免疫組織化学分析にこの統計的方法を用いた(Kraig et al, 1991)。

【0202】

参考文献

50

以下の参考文献は、それらが本明細書において記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

1. Melo-Carrillo A. et al., Nosedá R, Nir RR, Schain AJ, Stratton J, Strassman AM, Burstein R (2017a) Selective Inhibition of Trigemino-vascular Neurons by Fremanezumab: A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody. *J Neurosci.* 37:7149-7163.
2. Melo-Carrillo A, Strassman AM, Nir RR, Schain AJ, Nosedá R, Stratton J, Burstein R (2017b) Fremanezumab-A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody-Inhibits Thinly Myelinated (A δ) But Not Unmyelinated (C) Meningeal Nociceptors. *J Neurosci.* 37:10587-10596. 10
3. Grinberg YY, Zitzow LA, Kraig RP (2017) Intranasally administered IGF-1 inhibits spreading depression in vivo. *Brain Res.* 1677:47-57.
4. Kraig RP, Dong LM, Thisted R, Jaeger CB (1991) Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosci.* 11:2187-98.
5. Kohn DF, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: JG Fox, LC Anderson, FM Lowe, F Quimby, editors. *Laboratory Animal Medicine*. New York: Academic Press, 2002. pp. 121-167. 20
6. Cohen JM, Dodick DW, Yang R, Newman LC, Li T, Aycardi E, Bigal ME (2017) Fremanezumab as Add-On Treatment for Patients Treated With Other Migraine Preventive Medicines. *Headache.* 57:1375-1384
7. Moye LS & Pradhan AAA (2017). Animal model of chronic migraine-associated pain. *Current Protocols in Neuroscience*, 80, 9.60.1–9.60.9. doi: 10.1002/cpns.33.
8. Harris HM, Carpenter JM, Black JR, Smitherman TA, Sufka KJ (2017) The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification. *J Neurosci Methods.* 284:63-70. 30
9. Won L, Kraig RP (2019a) Development of nasal insulin-like growth factor-1 as a treatment for migraine. *American Headache Society.* 59: (Supplement 1) P221LB.
10. Won L, Kraig RP (2019b) Nose-to-brain delivery of IGF-1 abrogates trigeminal system activation including oxidative stress and CGRP from recurrent spreading depression. *Soc. Neurosci.* 45: #3725. 40
11. Won L, Kraig RP. (2020) Insulin-like growth factor-1 inhibits spreading depression-induced trigeminal calcitonin gene related peptide, oxidative stress & neuronal activation in rat. *Brain Res.* 1732:146673. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146673. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31978377. PMCID: 6733989.

【 0 2 0 3 】

実施例2：インスリン様成長因子-1はラットにおいて拡張性抑制による三叉神経カルシト

ニン遺伝子関連ペプチド、酸化ストレスおよびニューロン活性化を抑制する

片頭痛患者は脳の過興奮および酸化ストレスの増大を示す。過興奮は酸化ストレスを増強し、酸化ストレスは過興奮を促進するので、この悪循環のフィードバックループを絶つことが片頭痛の新しい治療法につながる可能性がある。片頭痛の前兆と恐らく痛みの原因である可能性が最も高い拡張性抑制は、拡張性抑制に関与する皮質領域においてだけでなく、片頭痛の疼痛経路活性化に重要な位置を占める三叉神経系においても酸化ストレスを誘発する。さらに、酸化ストレスは三叉神経カルシトニン遺伝子関連ペプチド放出の増加を引き起こし、酸化ストレスは拡張性抑制の閾値を低減させる可能性がある。以前、本発明者らは、インスリン様成長因子-1が酸化ストレスを低減することにより、インビトロで拡張性抑制を有意に防ぐことを明らかにした。さらに、インスリン様成長因子-1は、成体ラットにインビボで鼻腔投与した後に拡張性抑制を有意に防ぐ。

10

【0204】

方法/結果:

ここでは、本発明者らは、成熟雄性ラットを用いて、本研究を、インスリン様成長因子-1受容体が高発現している三叉神経系に広げる。インスリン様成長因子-1の経鼻送達により、三叉神経節カルシトニン遺伝子関連ペプチドのナイーブレベルが有意に低減され、全身送達とは異なり、血中グルコースレベルに及ぼす影響は生じなかった。さらに、再発性皮質拡張性抑制(CSD)前日のインスリン様成長因子-1の経鼻送達により、三叉神経節の酸化ストレスおよびカルシトニン遺伝子関連ペプチドレベルに加えて尾側三叉神経核c-fos活性化が有意に低減された。

20

【0205】

本研究は、インスリン様成長因子-1の経鼻送達が、動物でモデル化された片頭痛の拡張性抑制に関連する原因だけでなく、三叉神経系における侵害受容の結果も軽減できることを示す強力な証拠を提供するものである。

【0206】

A. 導入

CNS過興奮は、片頭痛患者(1)において、酸化ストレス(OS)レベルの上昇とともに起こる(2, 3)。過興奮はOSを増強し、OSは過興奮を促進するため、特に三叉神経系(TS)に関連するこの悪循環を解明することで、片頭痛の新しい治療法につながる可能性がある(4, 5)。Shatilloおよび同僚ら(6)は、片頭痛の前兆と恐らく痛みの原因である可能性が最も高い新皮質拡張性抑制(SD)(7, 8)が、SDに関与する皮質領域においてだけでなく、片頭痛の疼痛経路活性化に重要な位置を占めるTSにおいてもOSを誘発する(9)ことを明らかにしている。彼らはまた、OSが後根神経節ニューロンにおけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の放出を増加させうることにも注目している(6)。片頭痛の痛みを遮断するためにデザインされた抗CGRP生物学的製剤が利用可能になり、片頭痛処置に重要な改善をもたらしつつある。しかしながら、それらは片頭痛の根本的な原因を防ぐことはできず(10, 11)、既存の治療法よりも効果的とはいえない可能性がある(12)。したがって、頻発性片頭痛の患者をより効果的に処置するための治療法に対する満たされていない必要性が存在している。

30

【0207】

本実施例において、本発明者らは、IGF-1のN2B送達が、再発性SDからのTSの侵害受容性活性化を有意に防ぐことを示す。本研究は予備的な形で発表され(22, 23)、現在では完全版の原稿として公開されている(51)。

40

【0208】

B. 方法

1. 動物

成体(250~450 g)雄性Wistarラット(n = 80)(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)を本研究において使用し、手術後に動物を1匹/ケージで飼育するまで最初は2匹/ケージで飼育した。この最初の概念実証研究(すなわち、N2B IGF-1が再発性SDからの三叉神経系(TS)活性化を低減させるか)において、本発明者らは雄のみの

50

使用に焦点を合わせた。今後の研究には雌も含める予定である。飼育には、コーンコブの敷材、Enviro-dri 巣材 (Shepard Specialty Papers, Watertown, TN)、エンリッチメントのためのネストレッツ (Ancare Corporation, Bellmore, NY) を入れた静圧式マイクロアイソレーター ケージの使用を含めた。ラットは、中央動物施設で湿度と温度を制御して、12 時間の明暗サイクルで維持された。ラットは実験の間中、食料と水を自由に摂取でき、通常の摂食、身づくろいおよび歩行活動の証拠がないか少なくとも毎日観察された。

【0209】

研究者の近くの研究室において下記のように N2B 処置および外科的処置のために、中央施設から動物を持ち出した。処置と最初の手術 (下記参照) の後に目覚めたら、それらを中央動物施設に戻した。翌日、再び動物を SD の誘導、続いて脳の採取のために研究者らの研究室に持ち込んだ。実験は、明サイクルの中間部分の間に実施された。全ての処置およびデータ分析は、盲検条件の下で完了された。

【0210】

以前の研究と一致して、どの動物にも処置の悪影響は見られなかった (21, 51)。全ての動物が、通常通り食餌し、身づくろいし、歩行し、飲水し続けた。

【0211】

2. 鼻から脳 (N2B) の処置

コハク酸ナトリウム緩衝液 50 μ L 中でのヒト組換え IGF-1 (#191-G1; R&D Systems, Minneapolis, MN) 150 μ g の N2B 送達には、自発換気を伴うイソフルラン麻酔下の記録研究室において Liu と共同研究者 (24) の技法に基づく既述のアプローチ (21, 51) を踏襲した。

【0212】

a. 血中グルコース分析

動物の一部において血中グルコースをモニタリングした。N2B 処置の直前、麻酔をかけている間に、滅菌した 27 ゲージの皮下注射針を用いて尾の先端を穿刺し、時間ゼロで血中グルコースをサンプリングした。穿刺からの 2 滴目の血液をグルコース測定に用いた (Contour Next EZ; Ascensia Diabetes Care, US, Inc.; Parsippany, NJ)。N2B 処置 (IGF-1 または ビヒクル) 後、動物を短時間再麻酔させ、経時的に (すなわち、0.3、3、6、および 24 時間) 採血するごとに上記のように維持した。

【0213】

b. 拡張性抑制

再発性 SD の誘導は、本発明者らの研究室から既刊した無菌技法 (8, 13, 21, 25, 26, 51) を踏襲した (図 4)。動物を 5% イソフルランで麻酔し、その後、手順中に酸素中 1.5% 吸入イソフルランに減らし、N2B IGF-1 による前処置後の再発性 SD の影響を評価するための以前の手順を踏襲した (21, 51)。

【0214】

N2B 処置と手術の翌日、動物を再び酸素中 5% イソフルランで麻酔し、これを CSD の記録中に 1.5% に減らした後、既述のように 10 分ごとに 90 分間再発性 CSD を誘発する手順を行った (図 4) (21, 51)。CSD は 0.5 M KCL を吻側微小電極からナノリットル注入し、より尾側の第二微小電極から SD の発生を確認しながら誘発した (21, 51)。SD 誘発/記録セッション終わりに、動物を腹腔内ケタミン/キシラジン添加でより深く麻酔し、脳と三叉神経の採取のために灌流固定によって安楽死させた。

【0215】

3. 免疫染色

免疫染色は検証された手順を用いて完了した (13, 20~23, 25, 26, 48)。各動物の同側 (左) から CSD 三叉神経節を、クリオスタット (#3050S; Leica, Buffalo Grove, IL) を用いて厚さ 20 μ m の連続縦断面に切断し、ゼラチンコートしたスライドに 1 切片としてマウントした。三叉神経節の V1 (眼) 分枝を含む切片を同定し、OS のマーカーであるマロンジアルデヒド (MDA) (27)、および CGRP 免疫組織化学的検査のために、各動物

10

20

30

40

50

から少なくとも40 μm 間隔の3つの切片を選択した。

【0216】

三叉神経節のMDA免疫組織化学的検査のための切片を、0.3% Triton X-100 (希釈緩衝液)を含む10%正常口バ血清中で室温にて1時間ブロッキングし、その後、希釈緩衝液中の一次抗体(表1)の中で4℃にて終夜インキュベートした。切片をPBSでリンスし、二次抗体(表1)中で室温にて1時間インキュベートした。

【0217】

三叉神経節のCGRP免疫染色の場合、切片を冷アセトン(-20℃)で10分間前処理し、PBSでリンスした後、0.1% Triton X-100を含有するPBS (PBS-T)中で15分間インキュベートした。切片を5%正常ヤギ血清/PBS中で室温にて1時間ブロッキングした後に、1%ウシ血清アルブミンおよび3%正常ヤギ血清を含有するPBS-T中で希釈したウサギ抗CGRP (表1)の中で4℃にて終夜インキュベーションした。次に切片を、1%ウシ血清アルブミンを含有するPBS-T中で希釈した2°抗体(表1)の中で室温にて1時間インキュベートした。

【0218】

三叉神経核のc-fos免疫染色の場合、クリオスタットを用いて脳幹/頸髄を厚さ40 μm の冠状切片に切断した。既述(8, 26)のように、頸髄を介して門(0 mm)から尾側へ1.5 mmごとに(すなわち、-1.5 mm、-3.0 mm、-4.5 mm、6.0 mm) 6連続切片を採取した。動物ごとに、各脳幹/脊髄レベルから3つの切片を無作為に選択し、c-fosの発現に向けて処理した。c-fos免疫組織化学的検査は、0.3% Triton X-100を含有する10%正常口バ血清中で室温にて1時間、その後に希釈緩衝液中のウサギ抗c-fos (表1)の中で4℃にて終夜インキュベートすることにより自由浮遊切片にて実施した。切片をPBSでリンスし、2°抗体(表1)中で室温にて1時間インキュベートした。切片をPBSでリンスし、ゼラチンコートしたスライドにマウントした。

【0219】

免疫染色された切片を含むスライドに、Prolong(商標) Gold Antifade封入剤(#P36930; Life Technologies, Eugene, OR)とともにカバーガラスを載せた。免疫標識の特異性は、一次抗体を省略し、二次抗体のみの染色を用いることによって検証した。

【0220】

4. コンピュータに基づくデジタル画像の定量化

本発明者らは、N2B IGF-1がTS活性化に影響を与える能力を試験するために、免疫染色指標のコンピュータに基づいた盲検半定量デジタル定量化を用いた。実験間のバラツキを低減するのを助けるために、免疫染色は、全てのマーカー(MDA、CGRPおよびc-fos)について、対(例えば、偽および実験)サンプル切片にて実施された。

【0221】

画像処理は、Photometrics社の自己校正式デジタルカメラQuantEM-512SCカメラ(500×500ピクセル; Photometrics, Tucson, AZ)を用い、盲検条件下(既述(13, 20~22)のように) MetaMorphソフトウェア(v. 7.0.4; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上で実行された。画像露出、カメラゲインおよび閾値化は、各画像指標(すなわち、MDA、CGRPおよびc-fos)について実験群と偽群に均一に(すなわち、等価に設定された。得られた画像はTIFFファイルとしてデジタル保存され、その後の分析ではMDAおよびCGRPについてMetaMorphソフトウェアを用いて画像統合蛍光強度を登録し、盲検条件下で継続された。

【0222】

c-fos画像分析のため、デジタル保存された5×TIFFファイルを6,400×6,400ピクセルに電子的に拡大して、細胞計数を容易にし、Image J (v. 1.43i; National Institutes of Health public access)を用いて実験群対の間で同等に輝度/コントラストを調整した。c-fos標識核は、実験条件に盲検とされた観察者により手動で計数された。強く染色された円形または楕円形の核のみがラミナI-IIで計数された[門から-6.0 mmまで、動物ごとの各解剖学的レベルでn = 3切片(技術的複製)の平均を記録した(n $\geq$ 5生物

学的複製/群)]]。

【0223】

5. CGRP血漿アッセイ

血液は21ゲージ注射針を用いた心臓穿刺により採取し、BD Vacutainer K3 EDTA採血管(366450, Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ)に移し入れた。サンプルを4℃で1,500 g×10分間回転させた。血漿を滅菌した2.0 mL、スクリーキャップ、ポリプロピレンチューブに移し、分析まで-80℃で保存した。ELISA法を用いたCGRP含有量の分析のために、Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan)に血漿サンプルを送った。供給業者によれば、検出限界は10 pg/mL未満である。

10

【0224】

6. 統計的手法

本発明者らは、MDAおよびCGRPの免疫染色の潜在的な実行間バラツキを低減するさらなる手段として、免疫染色の比率(実験/偽)を定量化する検証済みの方法を用い(25)、c-fos陽性細胞の細胞数の正規化は他の形で用いられた。これらの操作は、測定の変動を減らすうえで非常に成功した。

【0225】

MDAおよびCGRPの画像は盲検下で分析され、その後、実験/偽画像の積算光強度の比にデコードされた。この指標は、面積だけでなく、関連画像の蛍光のピクセル強度も考慮した感度の高い指標である。免疫染色の比率が1の場合は、実験条件と偽条件の間に差がないことを示し、一方、比率が1未満の場合は、実験的処置により偽のものと比較して免疫染色が低減されたことを示す。これらの比率は自然対数に変換され、0は実験条件と偽条件の間に差がないことに対応し、t検定(両側)を用いて対数の差が0から有意に変化するかどうかを決定することができた。本文中で、本発明者らは関連対数比率統計検定のp値および検出力を報告している(25)。さらに、強度比の変化率のより一般的ナリストが示されている。

20

【0226】

c-fos陽性細胞の定量化は、検証済みの方法論(8, 26)などを用いて盲検条件下でも実施された。表在性ラメラの最大尾側三叉神経核の変化は、門の尾側-4.5 mmで明らかであるため、本発明者らは、このレベルでの定量的測定値を本文で報告している。

30

【0227】

画像対(実験および偽)をAdobe Photoshopによって均等に調整し、CorelDrawとともに最終的な図の構築に用いた。SD記録のデジタル電子ファイルは、まずO Origin (2019; Microcal, Northhampton, MA)で処理し、CorelDrawとPhotoshopを用いて最終形態に配置された。データはSigmaPlotソフトウェア(v. 12.5; Systat Software, Inc. San Jose, CA)を用いて分析した。全てのデータは正規性検定(棄却するp値: 0.05)および等分散検定(棄却するp = 値: 0.05)および検出力(1-β: > 0.8)に合格した。c-fos染色の偽薬対照を1.00に設定し、実験データを比例的にスケールリングした。動物群は、5以上の生物学的複製から構成された。

40

【0228】

C. 結果

1. IGF-1のN2B送達は、低血糖またはTS活性化を誘発しない

IGF-1がSD後のTS活性化にどのように影響しうるかの探求を始めるために、本発明者らは一連の予備的実験を実施した。本発明者らは、IGF-1受容体が三叉神経節に広く分布していることを確認し(図5)、他者らによって以前に示された証拠と一致していた(28)。

【0229】

IGF-1 (インクレレックス(登録商標))は、小児における原発性 IGF-1 欠損症による低身長症の非経口処置としてのみ FDA に承認されている(29)。この患者集団では、高用量の全身性IGF-1を投与された小児のサブセットが、低血糖および頭痛を示す(29)。したがって、本発明者らは、N2B IGF-1の血中グルコースレベルへの影響を探った。放

50

放射性標識IGF-1の証拠がN2B送達後の血液の中に見出されうるという事実にもかかわらず(30)、本発明者らは、IGF-1のN2B送達後に低血糖の証拠を認めなかった(図6)。コハク酸緩衝液(偽薬)群およびIGF-1処置群についての特定の時間に基づく血中グルコースレベル(0時間で $n = 8$ /群、それ以外は $n = 4$ /群)はそれぞれ、以下の通りであった: 0時間: 132 ± 11 ; 0.3時間: 213 ± 26 および 196 ± 22 ; 1.0時間: 167 ± 42 および 139 ± 24 ; 3.0時間: 130 ± 30 および 114 ± 14 ; 6.0時間: 139 ± 12 および 134 ± 7 ; 24時間: 135 ± 12 および 150 ± 40 mg/dL。一致した時間対間の有意($p > 0.1 \sim 0.99$)差(t 検定)は認められなかった。0.3時間で見られた血中グルコースの系統的な上昇は、初期レベルより一過性ではあるが有意であり(ANOVA, $p < 0.001$, 検出力 = 1.00)、その上昇は、N2B投与に必要な20分間イソフルラン麻酔に曝されたことによる予想される副作用を反映している可能性が最も高い(31)。見られた最も低いIGF-1グルコース関連レベルは 114 mg/dL [対照(132 mg/dL; 時間0)と比較して]であり、これはWistarラットの正常範囲内[$85 \sim 132$ mg/dL (32)]である。低血糖を定義するグルコースレベルは可変であるが、 1 mMの低下は低血糖とはみなされない。

10

20

30

40

50

【0230】

IGF-1で全身処置した患者の5%までが頭痛を訴える可能性があるので、本発明者らは、頭痛を反映しうるN2B IGF-1後の侵害受容性TS活性化の証拠について探った(図7)。選択された動物研究は、IGF-1の全身投与が、末梢感覚ニューロンの活性化を増加させることを示した(33)。しかしながら、脳に直接投与された場合、IGF-1は抗侵害受容性である(34)。したがって、本発明者らは、CGRPがTS疼痛シグナル伝達に関与することが広く知られていることから、三叉神経節活性化の指標としてCGRP免疫染色を用いた(35)。本発明者らの結果は、N2B IGF-1が頭痛と一致するCGRPレベルの増加を引き起こさず、代わりにナイーブ動物におけるCGRPレベルの非常に有意な75%の減少を示したことを初めて実証した($p < 0.001$, 検出力 = 1.00, $n = 7$ /群)。具体的な自然対数比(IGF-1/偽薬)は -1.66 ± 0.32 ($n = 7$ /群)であった。

【0231】

コハク酸単独での処置(すなわち、コハク酸/対照の対数比)は対照動物と比較して、ベースラインのCGRPレベルに対する有意な影響を示さなかった。具体的な対数比は -0.022 ± 0.19 , $p = 0.916$, 検出力 = 0.052, $n = 7$ /群)であった。これらのナイーブ動物のCGRP測定ならびにSD後の三叉神経節におけるCGRPおよびMDAの測定について、 p 値はIGF-1/偽免疫染色積算強度の対数比と0との比較に基づくものである。

【0232】

2. N2B IGF-1は再発性SD後の三叉神経節活性化を抑制する

次に、本発明者らは、IGF-1 N2B処置が再発性SD後の三叉神経節活性化にどのような影響を与えるかを判定した。SDは計9回のCSDについて10分ごとに誘発された。Shatilloと共同研究者の結果(6)と一致して、再発性SDは三叉神経節においてOSを誘発した。しかしながら、再発性SD後の三叉神経節におけるMDA免疫染色を介して測定したOSは、IGF-1による前処置から82%だけ有意に($p < 0.001$, 検出力1.00)低減された(図8)。具体的な自然対数比(IGF-1/偽薬)は -1.37 ± 0.40 ($n = 5$ /群)であった。同様に、N2B IGF-1による前処置は、再発性CSD後の三叉神経節におけるCGRPレベルの44%の有意な($p < 0.001$, 検出力 = 1.00)低減を引き起こした(図9)。具体的な対数比の値は -0.90 ± 0.15 ($n = 5$ /群)であった。しかしながら、血中CGRPレベルの有意な($p = 0.347$, 検出力 = 0.136)変化は、再発性SDに先立ちIGF-1 (またはビヒクル)による前処置の後では見られなかった。具体的な値は、2サンプルが検出限界未満($n = 6$ /群; ビヒクル前処置)で 12.1 ± 3.4 pg/mL、および3サンプルが検出限界未満($n = 6$ /群; IGF-1前処置)で 7.7 ± 1.6 pg/mLであった。

【0233】

3. N2B IGF-1は再発性SD後の尾側三叉神経核の活性化を抑制する

本発明者ら(8, 26)および他者ら(5)は、再発性CSDが尾側三叉神経核の表在性ラメラにおけるニューロンを活性化することを示した。本発明者らは、CSDからのこの三叉神

経核の活性化を用いて、IGF-1のN2B送達による前処置の影響を試験した(図10)。三叉神経核c-fos陽性細胞数は、相対的細胞数だけで正規性および等分散試験に合格するのに十分であるように、動物間でバラツキが少なかった。したがって、相対的な細胞数を提示する。結果から、IGF-1によるN2B前処置が、門から-4.5 mmの位置における三叉神経核表在性ラメラでのc-fos陽性細胞の有意な($p = 0.003$, 検出力 = 0.97) 48%の低減を引き起こしたことが明らかである。IGF-1 vs 偽薬対照の具体的な相対細胞数は、 0.52 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.06 ($n = 6$ /群)であった。

【0234】

D. 考察

1. 概要

本研究は、IGF-1のN2B送達が、CSDを用いラットにおいてモデル化された片頭痛に関連するTS活性化を抑制する非常に有効な手段であることを示す。重要なことに、N2B IGF-1処置は低血糖を引き起こさず、IGF-1の全身送達を受けた一部の患者に見られる副作用である頭痛の増加の兆候を示さなかった。その代わりに、IGF-1は三叉神経節細胞CGRPのナイーブなレベルの有意な低減を引き起こした。これは、提案した片頭痛薬により、この疼痛関連ペプチドが放出されて侵害受容に関与する前に、インビボで三叉神経節CGRPレベルを低減させることができるという最初の証拠である。侵害受容活性化前のこのCGRP低減の潜在的影響は、N2B IGF-1が再発性CSD後のTS活性化をも有意に低減させたという結果によって強化されている。

【0235】

2. N2B送達

治療用物質のN2B送達は、神経学的障害を処置するための安全かつ効果的な手段であると認識されつつある(36)。N2B投与されたIGF-1は、嗅覚器官、重要なことには、三叉神経経路を通して数分以内に脳に素早く入る。IGF-1のN2B送達は、脳細胞死に対して保護的であり、虚血からの梗塞の大きさを低減させることが証拠から明らかである(24)。N2BのIGF-1送達はまた、ニューロンの過興奮性を低減させることができるので、脳機能に有意にプラスの影響を与える。ここでは、本発明者らは、N2B IGF-1が再発性SDにより増加したTSのニューロン活性化を同様に抑制することを示すことによって、IGF-1のこの静穏化の影響をニューロン電気活動に広げた。

【0236】

IGF-1は嗅覚神経および三叉神経に沿って脳内に入り、脳脊髄液に移行する(30, 37)。その後、可溶性薬剤は細胞間隙流により脳脊髄液腔を迅速に移動し、血管周囲腔からの流れにより脳実質に入るようである(30, 37)。この提案された移行経路は、生体内分布研究によって支持されている(30, 37)。

【0237】

Thorne研究室は、N2B送達後の放射性標識IGF-1の生体内分布を研究している(30)。N2B送達後、最も高いレベルの追跡子が三叉神経節で見られたのは注目に値する。三叉神経節でのレベルは、投与30分以内に嗅球でのレベル(30)よりもおよそ10倍高い。多くが、N2B送達データをラットからヒトに外挿することの技術移転の有用性に疑問を呈している。この懸念は、送達された薬剤が横断すると予想される鼻の構造および嗅粘膜の大きさがげっ歯類とヒトとの間で異なることに起因している。恐らく、この一点集中型のN2B送達は、三叉神経の潜在的な役割をより積極的に検証するために拡大する必要がある。実際、治療用物質のN2B送達による脳への導管として三叉神経およびTSに焦点を合わせることは、三叉神経節がN2B関連の脳への通路の「最初の停止点」であることから、片頭痛治療用物質の開発に特に適している可能性がある。

【0238】

3. IGF-1および酸化ストレス

IGF-1が三叉神経節におけるOSを低減させる機構の解明は、本研究の範囲外である。しかしながら、既存の文献から、潜在的な機構を示唆するいくつかの方向性を提供することができる。

【0239】

本発明者らは、片頭痛を有する患者が非片頭痛患者と比較して脳の電氣的興奮性の上昇(1)を、OSレベルの上昇(2, 3)とともに示すことを前述した。過興奮はOSを増強し、OSは過興奮を促進するため、片頭痛の発症のみならずTSの活性化にも関わるこの脳内悪循環を解明することは、新しい片頭痛治療用物質の開発にとって有望な戦略であると思われる。しかしながら、OSの発生源およびOSの緩和に対するIGF-1の影響には、重要な違いが伴われうる。そのような違いは、潜在的な片頭痛治療用物質としてのIGF-1の全体的な有用性に寄与しうる。再発電気刺激による過興奮によって誘発されるSDは、ミクログリアとその活性化を必要とし、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α と活性酸素種の放出を促進し、これらが一緒になってSDの開始を助ける(13, 19, 20)。逆に、IGF-1による処置は、このミクログリアのOSと炎症活性化を無効にし、その結果、SDの開始を抑制する(19, 20)。

10

【0240】

一方、再発性CSD後の三叉神経節におけるOSでは、脂質過酸化の産物であるMDAを増加させてニューロンに形態的に類似した細胞を伴う(6)。TSにおけるこのMDA産生亢進は、片頭痛患者の血液中に検出されうるほど強固であり(2, 3)、片頭痛処置のための潜在的バイオマーカーとしてのその使用が示唆される。活性化したニューロンは活性酸素種を発生させ、活性酸素の発生が抗酸化レベルを上回るとOSを引き起こす可能性がある。ニューロンにはミトコンドリアが集中していることを考えると、MDAはミトコンドリア機能障害を引き起こす可能性があり、これが活性酸素種の産生を直接的に促進する可能性がある(38)。注目すべきは、N2B IGF-1は、三叉神経節MDAレベルを82%だけ低減させた(図7)。さらに、インビトロの脳スライス培養物を用いて、本発明者らは、ミトコンドリア阻害剤であるメナジオン曝露からのOSが、IGF-1によって有意に低減されることを示す(19, 20)。実際、IGF-1は、活性酸素種のナイーブ培養レベルを対照のそれよりも有意に低下させる[図7, (20)]。これにより、本発明者らは、N2B IGF-1が再発性SD後の三叉神経節におけるMDAレベルを抑制する原理的手段は、ミトコンドリア機能に対する作用が関与している可能性が高いという仮説が立てられる。

20

【0241】

4. CGRPとのIGF-1の相互作用

ミトコンドリア機能障害によるものを含むOSもまた、CGRP産生の増加のための重要な刺激である可能性がある。さまざまな前臨床モデルを用いて、他者らは、片頭痛の誘発および治療的処置後の尾側三叉神経核における三叉神経節CGRPレベルおよび関連するc-fos活性化が、本明細書で報告したそれぞれ44%および48%の保護効果に類似していることを示している(7, 39~43)。

30

【0242】

では、N2B IGF-1の潜在的な利点は何であろうか？ 第一に、N2B IGF-1は、例えば、KClからのSDに対して2倍以下のレベルの保護(44)を提供する、トピラメートによる前処置と比較して、偽処置のおよそ27倍SDを効果的に抑止する(21)。KCl注入量は、SDが発生し、TS活性化が確実に測定されうることを確かにするように、閾値超(すなわち、SDを誘発するのに必要な値よりもおよそ10倍高い)に増やされた。したがって、CSDおよびTS活性化に対する実際の防御は、SDの抑制により、本明細書で報告されたものよりも高い可能性がある。第二に、これは、推定される片頭痛治療用物質による処置により、片頭痛の痛みに関与するとされる三叉神経節CGRPのナイーブレベルを有意に(例えば、75%)低減させられることを示す最初の研究成果である。これらの結果は、本発明者らに、N2B IGF-1が、片頭痛の原因(すなわち、SDおよび三叉神経節CGRPを誘発するために必要な脳の過興奮性が、痛みを引き起こす前に放出される)と、動物でモデル化した片頭痛の結果(すなわち、三叉神経節OSおよびCGRPならびに三叉神経核c-fosの発現上昇)を止めることに関与していることを示唆するよう促すものである。

40

【0243】

N2B IGF-1処置の第三の潜在的利点は、Burstein研究室の研究から得られたもので

50

ある。Melo-Carilloは、抗CGRP剤がA δ 三叉神経電気活性および関連する高閾値三叉神経核ニューロンを選択的に遮断することを示している(45)。一方、CGRPを含み、三叉神経核における広動作範囲ニューロンを活性化するC線維は抑制されない。著者らは、このTSへの部分的な影響が、抗CGRP剤による片頭痛患者の処置で見られる部分的な効力の説明になりうると示唆している(45)。恐らく、N2B IGF-1処置は、片頭痛関連の病態生理に対するそのより全体的な影響のため、より広範囲の効果を及ぼすのであろう。

【0244】

片頭痛に対するN2B IGF-1処置の第四の、恐らく最も重要な潜在的利点は、OSを低減させるIGF-1の能力に関わる。活性酸素種は、TRPA1チャンネル活性化を介してTS侵害受容活性化を促進する(6)。TRPA1シグナル伝達が増加するとSDが促進されることから、TRPA1チャンネルの遮断は、OSを低減させる能力により、片頭痛処置の改善のための潜在的標的となりうることを示唆された(41)。既存の片頭痛予防薬のほとんどは、ある程度の抗酸化作用を示し(46, 47)、片頭痛処置においてOSを標的化することをさらに裏付けるものとなっている。しかしながら、TRPA1チャンネルは治療用物質の開発のための有望な標的であると思われるが、かなりのハードルが残っている(47)。一方、N2B IGF-1は、再発性SD後の三叉神経節MDAレベルの82%の低減を含め、TRPA1チャンネルの遮断で期待されるようなOSの遮断を示した。

【0245】

5. 結論

IGF-1の産生増加は、動物においてEEに対する自然発生的な適応応答であり、これはモデル化された片頭痛に対して保護的である。その結果、ヒトの状況に置き換えることができれば、EEに基づく科学の基本教義(すなわち、生理的ストレスに続いて適応期間が繰り返される(48))と一致し、特に段階的に送達される場合、脳の治療用物質として高い利益/リスク比を有しうる。IGF-1は、三叉神経を介した優勢である可能性が高い移行経路のため、片頭痛に向けたN2B送達に特に適しているようである。その結果、N2B IGF-1送達は、(SDを用いてモデル化した)片頭痛に対する脳の感受性、過興奮性およびTS活性化を低減させるだけでなく、OSおよびTS CGRPレベルの低下も引き起こす。恐らく、N2B IGF-1は、片頭痛で見られる、この障害の悪化につながる抗酸化物質の枯渇を緩和するであろう(2, 3, 49, 50)。

【0246】

重要なポイント:

1) 片頭痛患者は脳の過興奮および酸化ストレスの増大を示す。2) 過興奮は酸化ストレスを増強し、酸化ストレスは過興奮を促進するので、このフィードバックループを絶つことが片頭痛の新しい治療法につながる可能性がある。3) 他の研究により、IGF-1は成体ラットにインビボで鼻から脳に投与されると、拡張性抑制を防ぐことが示されている。4) 本研究では、同様の処置により、ラットでモデル化された片頭痛に関連する三叉神経系の活性化が抑制されることが示される。5) このデータは、鼻から脳へのIGF-1が、動物でモデル化した片頭痛の過興奮性に関連する原因だけでなく、三叉神経系における侵害受容の結果も緩和することを示す強力な証拠を提供するものである。

【0247】

(表1) 免疫組織化学的検査に用いた抗体の記述

10

20

30

40

50

	名称	カタログ番号	宿主	希釈	検出	供給業者
1° Ab	c-fos	ABE457	ウサギ	1/10,000	c-fosの N末端	Millipore, Temecula, CA
	CGRP	C8198	ウサギ	1/1,000	ラット CGRP	Sigma, St. Louis, MO
	MDA	ab6463	ウサギ	1/500	ラット MDA	AbCam, Cambridge, MA
	名称	カタログ番号	以下に対する	希釈	検出	供給業者
2° Ab	Alexa 594 (goat)	ab150084	ウサギ	1/500 (CGRP) 1/700 (c-fos, MDA)	AbCam, Cambridge, MA	

10

【 0 2 4 8 】

E. 参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書において記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

1. Aurora SK, Cao Y, Bowyer SM, et al. The occipital cortex is hyperexcitable in migraine: experimental evidence. Headache. 1999; 39: 469-476.
2. Bernecker C, Ragginer C, Fauler G, et al. Oxidative stress is associated with migraine and migraine-related metabolic risk in females. Eur J Neurol. 2011; 18: 1233-1239.
3. Tuncel D, Tolun FI, Gokce M, et al. Oxidative stress in migraine with and without aura. Biol Trace Elem Res. 2008; 126: 92-97.
4. Borkum JM. Migraine triggers and oxidative stress: A narrative review and synthesis. Headache. 2016; 56: 12-35.
5. Goadsby PJ, Holland PR, Martins-Oliveira M, et al. Pathophysiology of migraine: A disorder of sensory processing. Physiol Rev. 2017; 97: 553-622.
6. Shatillo A, Koroleva K, Giniatullina R, et al. Cortical spreading depression induces oxidative stress in the trigeminal nociceptive system. Neuroscience. 2013; 253: 341-349.
7. Chen SP and Ayata C. Spreading depression in primary and secondary headache disorders. Curr Pain Headache Rep. 2016; 20: 44.
8. Moskowitz MA, Nozaki K and Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. J Neurosci. 1993; 13: 1167-1177.

20

30

40

50

9. Mitsikostas DD and Sanchez del Rio M. Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 35: 20-35.
10. Hansen JM, Thomsen LL, Olesen J, et al. Calcitonin gene-related peptide does not cause migraine attacks in patients with familial hemiplegic migraine. *Headache.* 2011; 51: 544-553.
11. Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, et al. CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache.* 2012; 52: 1411-1427. 10
12. Mitsikostas DD and Reuter U. Calcitonin gene-related peptide monoclonal antibodies for migraine prevention: comparisons across randomized controlled studies. *Curr Opin Neurol.* 2017; 30: 272-280.
13. Pusic KM, Pusic AD, Kemme J, et al. Spreading depression requires microglia and is decreased by their M2a polarization from environmental enrichment. *Glia.* 2014; 62: 1176-1194.
14. Irby MB, Bond DS, Lipton RB, et al. Aerobic exercise for reducing migraine burden: mechanisms, markers, and models of change processes. *Headache.* 2016; 56: 357-369. 20
15. Lemmens J, De Pauw J, Van Soom T, et al. The effect of aerobic exercise on the number of migraine days, duration and pain intensity in migraine: a systematic literature review and meta-analysis. *J Headache Pain.* 2019; 20: 16.
16. Ciucci F, Putignano E, Baroncelli L, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One.* 2007; 2: e475.
17. Brown SM, Peters R and Lawrence AB. Up-regulation of IGF-1 in the frontal cortex of piglets exposed to an environmentally enriched arena. *Physiol Behav.* 2017; 173: 285-292. 30
18. Nishijima T, Piriz J, Duflot S, et al. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron.* 2010; 67: 834-846.
19. Grinberg YY, Dibbern ME, Levasseur VA, et al. Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF-alpha responses to spreading depression. *J Neurochem.* 2013; 126: 662-672.
20. Grinberg YY, van Drongelen W and Kraig RP. Insulin-like growth factor-1 lowers spreading depression susceptibility and reduces oxidative stress. *J Neurochem.* 2012; 122: 221-229. 40

21. Grinberg YY, Zitzow LA and Kraig RP. Intranasally administered IGF-1 inhibits spreading depression in vivo. *Brain Res.* 2017; 1677: 47-57.
22. Won L and Kraig RP. Nose-to-brain delivery of IGF-1 abrogates trigeminal system activation including oxidative stress and CGRP from recurrent spreading depression. *Soc Neurosci.* 2019; in press.
23. Won L and Kraig RP. Development of nasal insulin-like growth factor-1 as a novel treatment for migraine. *Am Headache Soc.* 2019; in press.
24. Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, et al. Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci.* 2001; 187: 91-97.
25. Kraig RP, Dong LM, Thisted R, et al. Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosci.* 1991; 11: 2187-2198.
26. Kunkler PE and Kraig RP. Hippocampal spreading depression bilaterally activates the caudal trigeminal nucleus in rodents. *Hippocampus.* 2003; 13: 835-844.
27. Chen SP, Qin T, Seidel JL, et al. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain.* 2017; 140: 1643-1656.
28. Wang H, Qin J, Gong S, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor-mediated inhibition of A-type K(+) current induces sensory neuronal hyperexcitability through the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways, independently of Akt. *Endocrinology.* 2014; 155: 168-179.
29. Ipsen Biopharmaceuticals I. INCRELEX, <http://www.increlex.com/pdf/patient-full-prescribing-information.pdf> (2016).
30. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, et al. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience.* 2004; 127: 481-496.
31. Zuurbier CJ, Keijzers PJ, Koeman A, et al. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. *Anesth Analg.* 2008; 106: 135-142.
32. Kohn DF and Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: Fox JG, Anderson LC, Lowe FM and Quimby F, (eds.). *Laboratory Animal Medicine.* second ed. New York: Academic Press, 2002, p. 121-167.

10

20

30

40

50

33. Zhang Y, Qin W, Qian Z, et al. Peripheral pain is enhanced by insulin-like growth factor 1 through a G protein-mediated stimulation of T-type calcium channels. *Sci Signal*. 2014; 7: ra94.
34. Bitar MS, Al-Bustan M, Nehme CL, et al. Antinociceptive action of intrathecally administered IGF-I and the expression of its receptor in rat spinal cord. *Brain Res*. 1996; 737: 292-294.
35. Russo AF. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015; 55: 533-552. 10
36. Djupesland PG, Messina JC and Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther Deliv*. 2014; 5: 709-733.
37. Lochhead JJ, Wolak DJ, Pizzo ME, et al. Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35: 371-381.
38. Long J, Liu C, Sun L, et al. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochem Res*. 2009; 34: 786-794. 20
39. Filiz A, Tepe N, Eftekhari S, et al. CGRP receptor antagonist MK-8825 attenuates cortical spreading depression induced pain behavior. *Cephalalgia*. 2019; 39: 354-365.
40. Greco MC, Capuano A, Navarra P, et al. Lacosamide inhibits calcitonin gene-related peptide production and release at trigeminal level in the rat. *Eur J Pain*. 2016; 20: 959-966.
41. Jiang L, Ma D, Grubb BD, et al. ROS/TRPA1/CGRP signaling mediates cortical spreading depression. *J Headache Pain*. 2019; 20: 25.
42. Ramachandran R, Bhatt DK, Ploug KB, et al. Nitric oxide synthase, calcitonin gene-related peptide and NK-1 receptor mechanisms are involved in GTN-induced neuronal activation. *Cephalalgia*. 2014; 34: 136-147. 30
43. Sixt ML, Messlinger K and Fischer MJ. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist olcegepant acts in the spinal trigeminal nucleus. *Brain*. 2009; 132: 3134-3141.
44. Ayata C, Jin H, Kudo C, et al. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006; 59: 652-661.
45. Melo-Carrillo A, Nosedá R, Nir RR, et al. Selective inhibition of trigeminovascular neurons by fremanezumab: A humanized monoclonal anti-CGRP antibody. *J Neurosci*. 2017; 37: 7149-7163. 40

46. Benemei S and Dussor G. TRP channels and migraine: Recent developments and new therapeutic opportunities. Pharmaceuticals (Basel). 2019; 12.
47. Skerratt S. Recent progress in the discovery and development of TRPA1 modulators. Prog Med Chem. 2017; 56: 81-115.
48. Kraig RP, Mitchell HM, Christie-Pope B, et al. TNF-alpha and microglial hormetic involvement in neurological health & migraine. Dose Response. 2010; 8: 389-413.
49. Aytac B, Coskun O, Alioglu B, et al. Decreased antioxidant status in migraine patients with brain white matter hyperintensities. Neurol Sci. 2014; 35: 1925-1929.
50. Malkki H. Headache: Chronic migraine linked to reduced antioxidant capacity. Nat Rev Neurol. 2015; 11: 426.
51. Won L, Kraig RP. (2020) Insulin-like growth factor-1 inhibits spreading depression-induced trigeminal calcitonin gene related peptide, oxidative stress & neuronal activation in rat. Brain Res. 1732:146673. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146673. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31978377. PMCID: 6733989.

10

20

【 0 2 4 9 】

実施例3：鼻から脳へのインスリン様成長因子-1は、拡張性抑制からの三叉神経系の活性化を抑制する

片頭痛は医療上の重荷であり、治療法の改善を必要としている。この穴は、片頭痛に伴って三叉神経系(TS)から放出される炎症性分子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)に焦点を合わせるにより埋められ始めている。新しい抗CGRP薬は、循環しているCGRPを阻害または吸収して、TSの侵害受容活性化を遮断するようにデザインされた抗体である。そのため、それらは片頭痛の原因[すなわち、根本的な脳の過興奮性(HE)およびTSの過活動]に影響を与えるのではなく、代わりに、片頭痛に対するその部分的な影響の主な原因となりうる結果(すなわち、CGRP放出)に影響を与える。

30

【 0 2 5 0 】

本発明者らは、IGF-1が、脳切片培養における拡張性抑制(SD)を用いてモデル化された片頭痛に関連する脳のHEを低減させることを示した。さらに、IGF-1の鼻から脳への(N2B)送達、全動物においてSDを防ぐ。本明細書で、本発明者らは、その研究を拡張して、TS活性化に及ぼす再発性SD前日のN2B IGF-1前処置の影響を判定した。N2B IGF-1は、SD誘発性の三叉神経節酸化ストレス(OS)、マロンジアルデヒド免疫染色を介して測定した]およびCGRPの免疫染色を、それぞれ82%および44%だけ有意に($p < 0.001$)低減させた。実際、IGF-1はビヒクルと比較して、ナイーブ動物(SD活性化なし)の三叉神経節におけるCGRPを75%だけ低減させた。このように、N2B IGF-1処置は、IGF-1の全身的な使用から懸念される頭痛を誘発することはないようである。また、N2B IGF-1は、低血糖の証拠を示さなかった。最後に、IGF-1のN2B投与は、尾側三叉神経核の活性化(すなわち、c-fos免疫染色)を有意に($p = 0.003$)低減させた。

40

【 0 2 5 1 】

これらの結果は、N2B IGF-1が(SDを用いてモデル化した)片頭痛に関連するTS活性化を抑制する有効な手段であることを初めて示している。この送達方法は、ヒトの状況に置き換えるのによく適している可能性がある。さらに、片頭痛に対するN2B IGF-1処置の保護的影響の具体的な機構はまだ解明されていないが、本発明者らのデータは、重要な機構としてOSを遮断することを強く支持している。恐らく、N2B IGF-1は、片頭痛患者に見られる、この障害の悪化につながる抗酸化物質の枯渇を緩和するであろう。

50

【0252】

A. 背景

片頭痛患者は脳の過興奮および酸化ストレス(OS)の増大を示す。過興奮はOSを増強し、OSは過興奮を促進するので、このフィードバックループを絶つことが片頭痛の新しい治療法につながる可能性がある。片頭痛の前兆と恐らく痛みの原因である可能性が最も高い拡張性抑制(SD)は、SDに関与する皮質領域においてだけでなく、片頭痛の疼痛経路活性化に重要な位置を占める三叉神経系においてもOSを誘発する。OSは、侵害受容に関連する炎症性神経ペプチドである三叉神経カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の放出を増加させ、OSはSD閾値を低減させることができる。

【0253】

本発明者らは、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)が、酸化ストレスを低減することにより、インビトロにおいて拡張性抑制を有意に防ぐことを示した。さらに、IGF-1は、成体ラットへのインビボでの鼻腔内投与後、拡張性抑制を有意に防ぐ(図11)。

【0254】

現在の片頭痛治療用物質は、部分的な保護しか提供しておらず、したがって片頭痛をより効果的に処置するための薬剤に対する満たされていない要求が存在している。本発明者らは、新規の片頭痛治療用物質として経鼻投与IGF-1を開発している。

【0255】

IGF-1がインビトロおよびインビボでSDに対して有意に神経保護的であることを考えると、本研究は、IGF-1受容体が豊富に発現している三叉神経系のSD活性化に対する鼻腔内IGF-1の影響を判定するために拡張される。

【0256】

本研究は、IGF-1の経鼻送達、動物でモデル化された片頭痛の拡張性抑制に関連する原因を緩和できるだけでなく、片頭痛に関連する三叉神経系の活性化を無効にする効果的な手段でもあることを示す強力な証拠を提供する。

【0257】

B. 方法

拡張性抑制(SD)後の三叉神経系の活性化に対するヒト組換えIGF-1の鼻腔内送達の影響に関する研究のためのパラダイム(図12)。(A) IGF-1 (150 mg/mL) [またはビヒクル(偽薬)]を吸入イソフルラン麻酔下に、ラットに横臥位で20分かけて投与した。(B) 24時間後、SDは、尾側新皮質からの電気生理学的微小電極記録によって確立されたSDの確認とともに、吻側新皮質へのnL量の0.5 M KClの加圧間欠的マイクロインジェクションを介して90分間9~10分ごとに誘導された。代表的なSDを示す。SD直後に、OS脂質過酸化マーカーであるマロンジアルデヒドを用いた三叉神経節における三叉神経系の活性化、ならびにCGRP (C)および尾側三叉神経核におけるc-fos (D)の免疫染色評価のために組織を採取した。

【0258】

C. 結果

低身長処置のためのIGF-1の全身投与は、低血糖および頭痛を誘発するが、本発明者らはどちらの効果の証拠も見い出さなかった。IGF-1の経鼻送達は低血糖を引き起こさなかった(図13)。点線は、成体非空腹ラットでの正常なグルコース範囲を示す。偽薬(ビヒクル; 黒色)処置とIGF-1処置(赤色)した処置群の間に有意差($n = 4$ /群)は見られなかった(t 検定)。予想通り、グルコースは、経鼻処置を行うために用いられた20分の長時間麻酔から一時的に有意に増加した($***p < 0.001$)。

【0259】

IGF-1の経鼻投与により、偽薬と比較して三叉神経節CGRPの基本的発現の有意な(75%, $p < 0.001$, $n = 7$ /群)減少が引き起こされた。代表的な画像を図1 [(IGF-1 (右), 偽薬, (左); スケールバー = 25 μ m)]に示す。これらの結果は、IGF-1による経鼻処置が頭痛を誘発しないことを強く示唆する。

【0260】

本発明者らは次に、再発性SD (n=5~7/群)90分後の三叉神経節[OS (マロンジアルデヒド)およびCGRP)]ならびに尾側三叉神経核(c-fos)の活性化に対する経鼻IGF-1 (vs 偽薬)の影響を調べた。全ての場合において、IGF-1処置で有意な低減(* * * p < 0.001 または * * p < 0.01)が見られた。代表的な画像を以下に示す。図:8~10: IGF-1 (A)および偽薬(B)、スケールバー=25 μ m。図14はMelo-Carrilloら(JNS, 2019)から適応された概略図を示し、経鼻IGF-1が複数のレベルで片頭痛に影響を与えうることを例示している。

【0261】

実施例4: 片頭痛の新規処置としての経鼻インスリン様成長因子-1の開発

背景:

片頭痛は莫大な医療負担である。高頻度かつ慢性片頭痛に対する既存の治療用物質は、適応外で使用されることが多く、恐らく片頭痛の病態生理に効果的に影響を与えないため、部分的な保護しか供与しない。

【0262】

CNS過興奮(HE)は、片頭痛患者において、酸化ストレス(OS)レベルの上昇とともに起こる。HEはOSを増強し、OSはHEを促進するため、特に三叉神経系(TS)に関連するこのCNS循環を解明することで、片頭痛の新しい治療法につながる可能性がある。片頭痛の前兆と恐らく痛みの原因である可能性が最も高い拡張性抑制(SD)が、SDに関与する皮質領域においてだけでなく、片頭痛の疼痛経路活性化に重要な位置を占めるTSにおいてもOSを誘発する。OSはTS系においてカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)放出を増加させる。さらに、TRPA1チャネルの遮断は、OSを低減させる能力のために片頭痛の潜在的な標的としてますます重視されているが、問題によってこの開発が妨げられている。

【0263】

近年、抗CGRP生物製剤は、CGRP放出後の侵害受容を遮断することによって有望とされている。しかしながら、処置を受けた患者は依然として頻繁に片頭痛を経験し、これらの薬物が片頭痛の根本的な原因を防ぐことはない。したがって、頻発性片頭痛の患者をより効果的に処置するための治療法に対する満たされていない必要性が存在している。

【0264】

目的:

本発明者らは、新規の片頭痛治療用物質として鼻から脳への(N2B)インスリン様成長因子-1 (IGF-1)を開発している。身体的および知的活動(EEと称される)は、SDへの感受性を低減させる。ヒトでは、身体活動の増大が片頭痛への感受性を低減させる。IGF-1は環境エンリッチメント(EE)によって上昇し、感覚刺激によって脳に入る。本発明者らは、先に、片頭痛のインビトロおよびインビボモデルを用いてIGF-1がSDに対して有意に保護的であることを示した。この効果には、SDの発症に必要なHEバーストを誘発する、ミクログリア活性化およびOSの抑制が関与している。さらに、N2B IGF-1は、ラットにおいてSDを有意に防ぐ。

【0265】

方法/結果:

本明細書で本発明者らは、IGF-1を用いたN2B前処置が、TS活性化(三叉神経節OSおよびCGRPレベルによって証明される; n $\geq$ 5/群)に加えて三叉神経尾側核活性化も再発性SD後(p < 0.003)に有意(p < 0.001)に低減したことを示す。重要なことに、N2B IGF-1は、三叉神経節におけるCGRPのナイーブレベルを75%だけ低減させると同時に、血糖低下作用を持たない。低身長に向けたIGF-1の全身送達では、5%以上の頭痛発生率および低血糖の発生頻度がより高いことが明らかであることから、これらの後者の結果は、IGF-1のN2B直接送達の有用性を支持するものである。

【0266】

結論:

N2B IGF-1送達は、片頭痛の誘発に関与しているHE (本明細書でSDとしてモデル化)を抑制するだけでなく、放出されて痛みを引き起こす前にCGRPを含むTSの活性化も抑

10

20

30

40

50

制する有効な手段である。したがって、N2B IGF-1は片頭痛の結果(すなわち、CGRP放出)だけでなく、原因に作用している可能性がある。げっ歯類においてN2B IGF-1後の三叉神経節に最も高いレベルのIGF-1が存在しているので、この送達方法は、ヒトの状況に置き換えるのによく適している可能性がある。IGF-1は天然に存在するEE模倣体であり、これは片頭痛の過興奮性に関連する脳およびTSのOSを低減させるという見込みを果たし、そうすることでこの病気の新しい治療法となる。

【0267】

実施例5: 抗CGRP-mAbとIGF-1の組み合わせによるラットでモデル化された片頭痛に対する相乗効果の探索

本発明者らは、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)の添加が片頭痛治療用物質としての抗CGRP-mAbの効力を有意に改善すると仮定した。CNS過興奮は、酸化ストレスのレベルの上昇とともに片頭痛患者に発生する。過興奮は酸化ストレスを増強し、酸化ストレスは過興奮を促進するので、特に三叉神経系に関連するこのCNSの悪循環を絶つことが片頭痛の新しい治療法につながる可能性がある。片頭痛の前兆と恐らく痛みの原因である可能性が最も高い皮質拡張性抑制(CSD)は、CSDに関与する皮質領域においてだけでなく、片頭痛の疼痛経路活性化に重要な、三叉神経経路においても酸化ストレスを誘発する。酸化ストレスは三叉神経節でのCGRPの増加を引き起こすことができ、酸化ストレスはCSD閾値を低減させることができる。

【0268】

IGF-1は、CSDを誘発するために必要な過興奮性および酸化ストレスを低減するものであり、本発明者らは、片頭痛のモデルを用いて三叉神経系で発生することが知られている過興奮性および酸化ストレスを論理的に考えた。本研究は、身体的および知的活動の増加[すなわち、環境エンリッチメント(EE)]がCSDに対する感受性をどのように低減させるかを理解することに関する研究に基づいている。ヒトでは、身体活動の増加は片頭痛への感受性を低減させる。IGF-1は環境エンリッチメントとともに増加し、感覚刺激による神経活動の増加とともに脳に入る。片頭痛のインビトロおよびインビボモデルの両方を用いて、本発明者らは、IGF-1がCSDに対して有意に保護的であることを示す。この効果には、CSDの発症に必要な過興奮バースト(hyperexcitability burst)を誘発するミクログリア由来の酸化ストレスの抑制が関与している。また、IGF-1は、成体ラットにインビボで経鼻投与(これは鼻から脳への直接送達を含む)後、CSDを有意に防ぐ(Grinberg et al., 2017)。

【0269】

本発明者らは、IGF-1の経鼻投与が三叉神経節でのナイーブレベルのCGRPをおよそ75%だけ有意に低減させたことを示した(図15)。また、本発明者らは、IGF-1の経鼻投与により、再発性CSDからの三叉神経系の活性化が有意に低減されることも示した。

【0270】

したがって、本発明者らは、マウス抗ラットCGRPの静脈内投与(ab81887 [4901]; Zeller et al., 2008)と経鼻IGF-1との併用処置が、いずれかの薬剤単独と比較して三叉神経系の活性化をどの程度緩和するかを定義しようとした。本研究は再発性CSD (Grinberg et al., 2017, Won and Kraig, 2019a,b, 2020)を用いて行う予定である。主な目的は、三叉神経節の活性化レベル[すなわち、CGRPおよび酸化ストレス(マロンジアルデヒド)レベル]を決定すること、ならびに三叉神経頸髄複合体活性化(すなわち、c-fos)の並行測定値を決定することである。

【0271】

本発明者らは、再発性CSDからの三叉神経系の活性化を低減させるIGF-1経鼻送達的能力を調べる完全な長さの研究を完了した(Won and Kraig 2019a,b; Won and Kraig, 2020)。本研究は、IGF-1の経鼻送達(50 μ l中150 μ g)が、三叉神経節CGRPおよび酸化ストレス(すなわち、マロンジアルデヒドのレベル)レベルを有意に低減させることを示している。さらに、三叉神経頸髄複合体c-fos陽性細胞は再発性CSD (10分ごとに90分間誘発)後、偽薬(すなわち、コハク酸緩衝液50 μ lの経鼻送達)と比較して有意

に低減された。

【0272】

図11および14は、経鼻IGF-1が、CSDを用い動物でモデル化された片頭痛の発症を抑制するだけでなく、三叉神経系の活性化の結果も抑制するという示唆を支持する本発明者らの結果を要約する。

【0273】

本研究は、IGF-1が抗CGRP-mAbの上流で働き、CSDによってモデル化された片頭痛に関連するCNSの過興奮性および関連する酸化ストレスを低減し、類似した保護効果を三叉神経系に対して有すると思われる証拠に基づいている。本研究は、片頭痛に関連する三叉神経系の活性化に対する治療法として、抗CGRP-mAbとIGF-1経鼻送達との併用処置の有用性を実証するものである。

10

【0274】

片頭痛は雌性ラットに多く見られ、雌性ラットはCSDに対してより感受性が高いが、本発明者らは、CSD感受性に影響を与えうる、月経周期の変動による混乱を避けるため、初期の研究では雄性Wistarラット(300 gm)を使用する。今後の研究では、再発性CSD後の雌性ラットにおける抗CGRP-mAbおよび経鼻IGF-1処置の影響を調べる。

【0275】

片頭痛は、再発性CSD (Grinberg et al., 2019; Won and Kraig 2019a,b; Won and Kraig, 2020)を用いてモデル化される。簡単に言えば、再発性CSDの前日に、動物を酸素中の吸入イソフルラン(2~5%)で麻酔し、鼻腔内IGF-1 (コハク酸緩衝液50 μ l中150 μ g)で処置する。

20

【0276】

麻酔をかけた動物を次に、2~5%のイソフルラン吸入麻酔下で標準的な脳定位固定装置に移す。眼球に人工涙液を塗布し、頭部の毛を剃り、ベタジンで洗浄した後、0.25%ブピバカイン0.1 mLを5分後に行う頭部正中線左側切開の両側に皮下注射する。下層の頭蓋骨から軟部組織をこすり取り、骨蠟で止血する。ブレグマの前方+3 mmと正中線の外側2 mmの位置にドレメルツールにより穴を開けて1~2 mmの開頭を2回行う(CSDを開始するために用いた0.5 M KCl 10~30 nLの加圧注入のため。2回目の開頭術は、ブレグマの尾側6 mmおよび正中線の外側4.5 mmの位置に配置して行う(CSD記録のため。手術部位をベタジンで拭き、3個の創傷クリップで切開部を閉鎖する。動物を覚醒させてから、終夜標準的な動物飼育施設に戻す。

30

【0277】

翌日(すなわち20~24時間後)、動物を再び上記のように吸入イソフルランで麻酔し、抗体注入のために左大腿静脈にカニューレ挿入する。動物の選択群(下記参照)を、通常生理食塩水0.5~0.6 mL中1 mg/kgの抗CGRP (ab81887)またはアイソタイプIgG2a対照のいずれかの静脈内注入で処置する。注入後、大腿切開部を創傷クリップで閉鎖する。表1は、前臨床片頭痛研究において抗CGRP-mAbを用いた研究の比較公開された文献を示す。表2は、抗CGRP-mAb (ab81887)およびアイソタイプ対照の使用で予想されるコストを示す。

【0278】

注: 本発明者らは、ブピバカインの皮下注射がCSD感受性に悪影響を及ぼすといういくつかの証拠があるため、2日目にブピバカインの皮下注射を用いないことを選択した。

40

【0279】

動物を頭部抜糸後、麻酔(酸素中1.5%イソフルラン)下で1時間安定させ、眼球に人工涙液を塗布し、動物をCSDの開始および記録に向けて酸素中さらに濃い(5%)イソフルランの下で準備を整え、その後、CSD記録中は酸素中1.5%のイソフルランまで低下させる。抗体注入1~4時間後、上記のようにCSDを開始させる。全ての動物に9回のKCl注射を行う。次に、イソフルランを5%に上げ、動物を腹腔内ケタミンおよびキシラジンで麻酔し、その後にヘパリン(1000単位/mL) 0.1 mL、次に通常生理食塩水250 mL、最後に0.2 Mリン酸緩衝液中4%のパラホルムアルデヒド250 mLで心内灌流により迅速に安楽

50

死させる。三叉神経頸髄複合体におけるc-fos免疫染色ならびにCSDと同側の三叉神経節におけるCGRPおよび酸化ストレス(マロンジアルデヒド)レベルの測定のために脳に加えて上部頸髄および三叉神経節を採取する。動物群およびエンドポイントを以下に定義する。

【0280】

本発明者らの以前の研究は、CSDおよび三叉神経系の活性化を含む全動物実験について5匹/群が、0.80超かつ1.00に近いまたは等しい検出力で統計的有意性に到達するのに十分であることを示している。それゆえ、本発明者らは本明細書で、1群あたりn = 5匹の動物を使用することを予想する。動物群は以下からなる: 1) 経鼻IGF-1 + 静脈内抗CGRP-mAbによる処置; 2) 経鼻IGF-1による処置; 3) 静脈内抗CGRP-mAbによる処置; 4) 経鼻IGF-1 + 静脈内アイソタイプ対照による処置; 5) 静脈内アイソタイプ対照による処置; および6) 経鼻コハク酸緩衝液による処置。

10

【0281】

本発明者らは、1 mg/kg 抗CGRP-mAb、2 mg/kg 抗CGRP-mAb、または対照CSDによる静脈内処置後のエンドポイントに及ぼす抗CGRP-mAb投薬(n=3/群)の影響を試験する。

【0282】

このプロジェクトのエンドポイントは、固定液での灌流後に免疫組織化学的分析のために脳および三叉神経節組織を採取することである。三叉神経節の測定は、CGRPおよび酸化ストレスの免疫組織化学的アッセイである。三叉神経頸髄複合体の測定は、ラミナIおよびII c-fos免疫染色のアッセイである。

20

【0283】

全てのデータ分析は、ARRIVEの基準にしたがい、処置に対して盲検化して行い、必要に応じてANOVAおよび事後検定またはt検定により統計的に処理して行う。さらに、Provost's Officeとの合意により、シカゴ大学の神経学教授であるAnthony Reder博士は、Lisa Won博士により行われる、全ての作業の適切なコーディングと盲検化を確実にするための外部モニターであり、Kraig博士が盲検動物実験を行い、Kraig博士が盲検分析を行い、Won博士が染色手順とc-fos細胞計数の盲検分析を行った。研究者全員が関連刊行物の著者となる。

【0284】

SigmaPlot (v.12.5; Systat Software, Inc., San Jose, CA)を用いて全てのデータを分析する。全てのデータを正規性検定(棄却するp値: 0.05)、等分散検定(棄却するp値: 0.05)、および検出力($1 - \beta$): > 0.8)に供した。データを実験データと対照データの自然対数比として提示する。この方法では、「0」の値は対照からの変化がないことを反映することになり、正の対数は増加、負の対数は減少を示すことになる。本発明者らは、コンピュータに基づく半定量的免疫組織化学分析にこの統計的方法を用いた(Kraig et al, 1991)。

30

【0285】

まず、本発明者らは、誘発されたCSDの数に群間で有意差がないことを確認した(図16)。偽経鼻送達、イソフルラン吸入麻酔下(Won and Kraig, 2020)の間、報告された通りとした(すなわち、コハク酸緩衝液50 μ lをアリコート5 μ lとして2分ごとに交互に鼻孔に送達した)。1日後、0.5M KClのマイクロインジェクションを介して、9分ごとに計90分間CSDを誘発した(Won and Kraig, 2020)。

40

【0286】

同様に、他の動物はまず鼻腔内IGF-1で処置し、1日後に通常生理食塩水(1 ml)の静脈内注射で処置した。後者の1時間後に、既述(Won and Kraig, 2020)のようにCSDを誘発し、三叉神経節および三叉神経頸髄複合体の分析のために、心内灌流固定により麻酔下で動物からの摘出を行った。第3群の動物は、鼻腔内IGF-1で処置し、1日後にCGRP阻害剤[1 mg/kg; Abcamマウスモノクローナル抗CGRP抗体(4901) 1 ml中; Zeller et al., 2008]の静脈内注射を行った。1時間後に、以前に行われたように(Won and

50

Kraig, 2020)、CSDを9分ごとに90分間誘発させた。具体的なCSDの回数は、偽薬(Won and Kraig, 2020より)、 8.2 ± 0.49 , $n = 5$; 経鼻IGF-1+静脈内生理食塩水, 7 ± 0.41 , $n = 3$; および経鼻IGF-1+静脈内抗CGRP抗体, 7 ± 0 , $n = 3$ であった。

【0287】

2. 第二に、本発明者らは、図17にデータの取り扱いを例示し、以下に記述する。IGF-1の経鼻送達に加えて静脈内処置(すなわち、1 mlの生理食塩水または抗CGRP抗体)の後、90分間の誘発CSD)に向けた全ての動物を、既述(Won and Kraig, 2020)のように、三叉神経頸髄複合体c-fos免疫染色および三叉神経節マロンジアルデヒド免疫染色について分析した。

【0288】

本発明者らは、マロンジアルデヒド、CGRPおよびc-fos陽性細胞の免疫染色における潜在的な実行間バラツキを低減するさらなる手段として、免疫染色の対数比(実験/偽)を定量化する検証済みの方法を用いた(Won and Kraig, 2020)。マロンジアルデヒドおよびCGRPの画像は、面積だけでなく関連する画像蛍光の画素強度も考慮した高感度メトリックである実験/偽画像統合光強度の比率にいったんデコードして変換できるように、盲検化された対で分析された。免疫染色の比率が1の場合は、実験条件と偽条件の間に差がないことを示し、一方、比率が1未満の場合は、実験的処置が偽処置と比較して免疫染色を低減させたことを示す。これらの比率は自然対数に変換され、0は実験条件と偽条件の間に差がないことに対応し、t検定(両側)を用いて対数の差が0から有意に変化するかどうかを判定することができる。

【0289】

c-fos陽性細胞の定量化は、マロンジアルデヒドおよびCGRPの免疫染色に用いたのと同様のパターンを踏襲した。具体的には、c-fos陽性細胞数を比率(例えば、IGF-1/偽薬)に変換し、結果の自然対数を「ゼロ」と比較して統計的に定量化した(すなわち、差のない比率1.00または $\ln = 0$)。表在性ラミナ(superficial laminae)における最大の三叉神経頸髄複合体の変化は、門の尾側-4.5 mmの位置で明らかであるため、本発明者は、初期の研究においてはこのレベルでの定量測定結果を報告している(Won and Kraig, 2020)。本明細書で、c-fos測定の感度を高めるために、本発明者らは、門の尾側-4.5および6.0 mmからの計数を含めた。というのは、これらの2つのレベルがCSDからの最大変化を示すことが知られているからである(Moskowitz et al., 1993)。

【0290】

画像対(実験および偽)をAdobe Photoshopによって均等に調整し、これをCorelDrawとともに最終的な図の構築に用いた。CSD記録のデジタル電子ファイルを、まずOrigin (2019; Microcal, Northampton, MA)で処理し、CorelDrawおよびPhotoshopを用いて最終形態に配置した。SigmaPlotソフトウェア(v. 12.5; Systat Software, Inc. San Jose, CA)を用いて、データを分析した。全てのデータは正規性検定(棄却するp値: 0.05)および等分散検定(棄却するp値: 0.05)および検出力($1 - \beta > 0.8$)に合格した。

【0291】

3. 経鼻IGF-1単独による処置と比較した経鼻IGF-1および静脈内生理食塩水による処置の影響から、9分ごとに誘発されるCSDを90分行った後の三叉神経頸髄c-fos免疫染色に差がない($p = 0.127$; 検出力: 0.254)ことが示された。具体的な結果は次の通りであった: オリジナルのWon and Kraig, 2020報告データより、 $\ln -0.56 \pm 0.08$, $n = 5$; および生理食塩水の静脈内送達による新しいデータ) $\ln -0.548 \pm 0.16$, $n = 3$ 。

【0292】

これらの群間に有意差はなかったため($p = 0.97$ 、検出力 = 0.054)、それらを以下の比較のために、経鼻IGF-1に加えて静脈内抗CGRP (ab81887)による処置と組み合わせた。

【0293】

結果は図18に示されており、予想の通り(Won and Kraig, 2020)、経鼻IGF-1処置

10

20

30

40

50

単独(この場合、静脈内生理食塩水の処置による)は、90分間9分ごとに誘発される再発性CSDからのc-fos免疫染色を有意に低減させたことを例示している。しかしながら、IGF-1による経鼻処置に続いて、1日後に抗CGRP抗体(ab81887)による静脈内処置で、再発性CSDからのc-fos活性化がさらにかつ有意に低減された。

【0294】

図18に示す実験結果に対する具体的な自然対数値および有意性検定は、以下の通りである: 対照(0.00 ± 0.00 , $n = 10$); 経鼻IGF-1に加えてその後の静脈内生理食塩水ln -0.547 ± 0.11 , $n = 10$ [すなわち、先行文献(Won and Kraig, 2020)からの $n = 7$ に加えて静脈内生理食塩水を含めた新しい検定($n = 3$)]); およびln -1.077 ± 0.18 ($n = 3$)という結果となった、経鼻IGF-1に加えてその後の抗CGRPモノクローナル抗体(ab81887)による処置。

10

【0295】

これらの変化の有意性が図18に記載されており、それらは経鼻IGF-1(その後の静脈内生理食塩水有りまたは無し)後の再発性CSDからの三叉神経頸髄c-fos活性化の45%の低減を反映している。これは、経鼻IGF-1およびその後の静脈内抗CGRP抗体を用いた前処置による再発性CSDからのc-fos活性化の66%低減という付加的な保護になぞらえられる。

【0296】

さまざまな前臨床モデルを用いて、他者らは、片頭痛の誘発および治療的処置後の三叉神経頸髄複合体におけるc-fos活性化が、経鼻IGF-1単独による経鼻処置後に報告された、保護的な45%効果と同様であることを示している(Chen et al., 2017; Filiz et al., 2019; Greco et al., 2016; Huang et al., 2018; Jiang et al., 2019; Kilinc et al., 2018; Ramachandran et al., 2014; Sixt et al., 2009)。注目すべきは、経鼻IGF-1および静脈内抗CGRP抗体による併用療法により、三叉神経頸髄c-fos活性化の66%低減が生じたことである。

20

【0297】

4. 次に、本発明者らは、三叉神経節マロンジアルデヒド(MDA)発現に及ぼす経鼻IGF-1に加えて静脈内抗CGRP処置の影響を探った(図19)。既報(Won and Kraig, 2020)のように、経鼻IGF-1単独では -1.76 ± 0.29 ($n = 5$)のln比(すなわち、経鼻IGF-1単独)をもたらし、経鼻IGF-1に加えて静脈内生理食塩水による処置は、 -1.75 ± 0.56 ($n = 3$)のln比の低減を引き起こした。t検定により、これらの2群間に有意差はないことが示された($p = 0.982$ 、検出力: 0.05)。したがって、経鼻IGF-1および静脈内抗CGRPによる併用療法とのその後の比較のために、この2群を組み合わせた。

30

【0298】

対数比で差なし(ND; 0 ± 0 , $n = 8$)と比較した場合、IGF-1による経鼻処置、その後に静脈内生理食塩水(1 ml)注射、その後に再発性CSD / 静脈内生理食塩水注射有りまたは無しの経鼻コハク酸、その後に再発性CSDのln比は、 -1.76 ± 0.39 ($n = 8$)であった。経鼻IGF-1および静脈内抗CGRPによる処置、その後に再発性CSD / 静脈内生理食塩水注射有りまたは無しの経鼻コハク酸のln比は、 0.67 ± 0.15 ($n = 3$)であった。

【0299】

抗CGRP剤による処置後の三叉神経節V1領域のMDA免疫染色のこの増加は、これまでに三叉神経節において指摘されたことはなかったが、既刊文献と一致している。例えば、Luoと共同研究者ら(2020)は、CGRPがSrc/STAT3シグナル伝達経路を介してアンジオテンシンII誘導NADPHオキシダーゼ依存性ROSを抑制することを示している。Schaefferと共同研究者ら(2003)は、CGRPがERK1/2 MAPKの活性化を介して、酸化ストレスにより誘導されるアポトーシスから培養平滑筋細胞を部分的に保護することに留意している。Sueurと共同研究者ら(2005)はRAMP1/CRLR複合体を介して、H9c2心筋細胞における酸化ストレス誘発性傷害に及ぼすCGRPの抗アポトーシス効果を報告している。最後に、Wuと共同研究者ら(2015)は、レンチウイルスを介したCGRPの過剰発現が、シュワン細胞株における酸化ストレスを抑制することを示している。

40

50

【 0 3 0 0 】

三叉神経節V1に対する抗CGRP mAbのこのユニークな結果は、本明細書の実験で用いた抗CGRP剤(4901)が静脈内経路を介して効果的に投薬され、生体機能に影響を与えたという示唆を支持している。

【 0 3 0 1 】

A. 参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書において記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

1. Melo-Carrillo A, Nosedá R, Nir RR, Schain AJ, Stratton J, Strassman AM, Burstein R (2017a) Selective Inhibition of Trigeminovascular Neurons by Fremanezumab: A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody. J Neurosci. 37:7149-7163.

10

20

30

40

50

2. Melo-Carrillo A, Strassman AM, Nir RR, Schain AJ, Nosedá R, Stratton J, Burstein R (2017b) Fremanezumab-A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody-Inhibits Thinly Myelinated (A δ) But Not Unmyelinated (C) Meningeal Nociceptors. *J Neurosci.* 37:10587-10596.
3. Grinberg YY, Zitzow LA, Kraig RP (2017) Intranasally administered IGF-1 inhibits spreading depression in vivo. *Brain Res.* 1677:47-57.
4. Kraig RP, Dong LM, Thisted R, Jaeger CB (1991) Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosci.* 11:2187-98. 10
5. Kohn DF, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: JG Fox, LC Anderson, FM Lowe, F Quimby, editors. *Laboratory Animal Medicine*. New York: Academic Press, 2002. pp. 121-167.
6. Cohen JM, Dodick DW, Yang R, Newman LC, Li T, Aycardi E, Bigal ME (2017) Fremanezumab as Add-On Treatment for Patients Treated With Other Migraine Preventive Medicines. *Headache.* 57:1375-1384.
7. Harris HM, Carpenter JM, Black JR, Smitherman TA, Sufka KJ (2017) The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification. *J Neurosci Methods.* 284:63-70. 20
8. Won L, Kraig RP (2019a) Nose-to-brain delivery of IGF-1 abrogates trigeminal system activation including oxidative stress and CGRP from recurrent spreading depression. *Soc. Neurosci.* 45: #3725.
9. Won L, Kraig RP (2019b) Development of nasal insulin-like growth factor-1 as a treatment for migraine. *American Headache Society.* 59: (Supplement 1) P221LB.
10. Won L, Kraig RP. (2020) Insulin-like growth factor-1 inhibits spreading depression-induced trigeminal calcitonin gene related peptide, oxidative stress & neuronal activation in rat. *Brain Res.* 1732:146673. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146673. Epub 2020 Jan 21. 30
11. Zeller J, Poulsen KT, Abdiche YN, Collier S, Chopra R, Garcia CA, Pons J, Rosenthal A, Shelton DL (2008) CGRP function-blocking antibodies inhibit neurogenic vasodilation without affecting heart rate or arterial blood pressure in the rat. *Brit J Pharmacol.* 155:1093-1103.
12. Moskowitz MA, Nozaki K and Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci.* 1993; 13: 1167-1177. 40

13. Chen SP, Qin T, Seidel JL, Zheng Y, Eikermann M, Ferrari MD, van den Maagdenberg A, Moskowitz MA, Ayata C, Eikermann-Haerter K. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain* 2017;140(6):1643-1656.
14. Filiz A, Tepe N, Eftekhari S, Boran HE, Dilekoz E, Edvinsson L, Bolay H. CGRP receptor antagonist MK- 8825 attenuates cortical spreading depression induced pain behavior. *Cephalalgia* 2019;39(3):354-365.
15. Greco MC, Capuano A, Navarra P, Tringali G. Lacosamide inhibits calcitonin gene-related peptide production and release at trigeminal level in the rat. *Eur J Pain* 2016;20(6):959-966. 10
16. Huang P, Kuo PH, Lee MT, Chiou LC, Fan PC. Age-dependent anti-migraine effects of valproic acid and topiramate in rats. *Front Pharmacol* 2018;9:1095.
17. Jiang L, Ma D, Grubb BD, Wang M. ROS/TRPA1/CGRP signaling mediates cortical spreading depression. *J Headache Pain* 2019;20(1):25.
18. Kilinc E, Dagistan Y, Kukner A, Yilmaz B, Agus S, Soyler G, Tore F. Salmon calcitonin ameliorates migraine pain through modulation of CGRP release and dural mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018;45(6):536-546. 20
19. Ramachandran R, Bhatt DK, Ploug KB, Hay-Schmidt A, Jansen-Olesen I, Gupta S, Olesen J. Nitric oxide synthase, calcitonin gene-related peptide and NK-1 receptor mechanisms are involved in GTN-induced neuronal activation. *Cephalalgia* 2014;34(2):136-147.
20. Sixt ML, Messlinger K, Fischer MJ. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist olcegepant acts in the spinal trigeminal nucleus. *Brain* 2009;132(Pt 11):3134-3141.
21. Luo H-M, Wu X Xian X, Wang L-Y, Zhu L-Y, Sun H-Y, Yang L, Liu W-x. Calcitonin gene-related peptide inhibits angiotensin II-induced NADPH oxidase-dependent ROS via the Src/STAT3 signaling pathway. *J cell Mol Med* 2020; doi:10.1111/jcmm.15288.
22. Schaeffer C, Vandroux D, Thomassin L, Athias P, Rochette L, Connat J-L. Calcitonin gene-related peptide partly protects cultured smooth muscle cells from apoptosis induced by an oxidative stress via activation of ERK1/2 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1643:65-73. 30
23. Sueur S, Pesant M, Rochette L, Connat J-L. Anti-apoptotic effect of calcitonin gene-related peptide on oxidative stress-induced injury in H9c2 cardiomyocytes via RAMP1/CRLR complex. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39:955-963.
24. Wu Y, Hao G-M, He J, Lv T-T, Wang H-L, Mao Y-Q, Wang X, Wang W, Han J. Lentivirus mediated over expression of CGRP inhibited oxidative stress in Schwann cell line. *Neurosci Lett* (2015); 598:52-58. 40

【 0 3 0 2 】

実施例 6：線維筋痛症の処置

本発明者らは、IGF-1の鼻腔内送達の治療的特性が慢性疼痛、特に線維筋痛症に見られるような広範囲の筋骨格系疼痛にまで及ぶかどうかを調べた。結果から、IGF-1の経鼻送達線が線維筋痛症のラットモデルにおいて、疼痛関連行動(触覚刺激に対する後肢引っ込み)の有効かつ継続的な低減を引き起こすことが明らかである。

【 0 3 0 3 】

髄腔内IGF-1は痛みを軽減することができる(Bitar et al., 1996)。しかしながら、線維筋痛症/慢性疲労症候群を含む慢性疼痛を処置するために、経鼻経路を介してIGF-1

を送達することを提案した者はいなかった。

【0304】

FM/CFSの処置のために成長ホルモンの投与が提案されている(Xu et al., 2019; Cuatrecasas et al., 2014)が、恐らく損傷後のIGF-1の全身送達は痛覚過敏を高めうる(Xu et al., 2020; Cuatrecasas et al., 2014; Stemkowski et al., 2014)ため、IGF-1の使用は注目されていない。

【0305】

A. 方法

動的熱勾配試験カップリング(dynamic thermal gradient testing coupled)が、慢性全身疼痛を評価するために用いられている(DeSantana et al., 2013; Deuis et al., 2017; Barrot, 2012; Bardin et al., 2009)。10

【0306】

しかし、その簡便さと再現性のため、慢性的な広範囲の筋肉痛のような行動を模倣する、広く用いられている非炎症性げっ歯類モデルを利用した。この線維筋痛症モデルは、腓腹筋に酸性の生理食塩水を片側2回注射することからなり、これによって運動障害または組織学的に観察される組織損傷なしに、両側で4週間まで長期間続く機械的痛覚過敏を引き起こすものである(Sluka et al., 2001)。電気的フォンフライ装置を用いて得られた後肢引っ込み閾値を「推定疼痛」の尺度として用いた。

【0307】

電気的フォンフライ(図20)は、痛みの感受性(侵害受容)の行動学的読み出しとして、機械的刺激に対する肢引っ込み反射(paw withdrawal response)の変化を測定するツールを提供する。後肢引っ込み閾値は、まずベースライン時に評価し、その後、治療的介入の有無にかかわらず損傷後に経時的にモニタリングすることができる。処置を開始する前に、全ての実験群が同様の平均ベースライン引っ込み閾値を示すことが重要である。侵害受容応答の変化は、各個体の実験時およびベースライン時の引っ込み閾値の測定値の差として測定される(Martinov et al., 2013)。20

【0308】

電気的フォンフライ法は、毒液誘発性炎症(Martinov et al., 2013)、オキシプラチン処置から生じる末梢神経障害(Ferrier et al., 2013)およびレセルピン誘発性線維筋痛症(Fusco et al., 2019)を含めていくつかのげっ歯類侵害受容モデルにおける後肢触覚感度の変化を評価するために用いられている。30

【0309】

ここでの実験手順は、酸性生理食塩水誘発性の線維筋痛症モデルに関連する痛みの処置のために鼻腔内IGF-1を利用して記述されている。ラットをドラフト内で、2~5%吸入イソフルラン、残りは酸素で麻酔し、腓腹筋の位置を容易にするために右下後肢を剃毛する。注射部位をベタジンで洗浄し、27G×1/2インチの滅菌皮下注射針を用いてpH 4.0の滅菌生理食塩水100 μlを右内側腓腹筋に注射する(0日目)。動物を回復させ、その後、個々のケージ内の通常の飼育場に戻す。5日後(5日目)、同じ筋肉への注射手順を繰り返す。対照動物には、滅菌生理的(pH 7.2)食塩水を用いて同様の筋肉注射を行う。生理的食塩水ではなく、酸性の生理食塩水を注射された動物は2回目の注射24時間後に、最大4週間続く両側の機械的痛覚過敏を示す(Sluka et al., 2001)。40

【0310】

機械的痛覚過敏は、後肢の機械的刺激に対する閾値(肢引っ込み閾値)の低減(感度の上昇)と本明細書で定義される。電気的フォンフライ装置(図20)を用いて、左および右後肢の足底面を刺激する(下記のプロジェクト詳細の行動訓練を参照)。行動試験は、標準的なスケジュールにしたがって動物が収容されている同じ室内で実施される(表2)。

【0311】

(表2)

	Hab1	Hab2	BA	D-0	D-5	PD1	PD2	PD3	PD4	PD5	PD6	PD7	PD8	PD9
PWT			✓			✓		✓			✓			✓
生理食塩水 (i.m.)				✓	✓									
Succ/IGF-1							✓			✓			✓	

10

【0312】

動物をまず、実験保持設定(図21)に30分×2日間、順応させる(Hab-1および2)。次に、肢引っ込め閾値(PWT)の処置前測定を、最初の酸性生理食塩水筋肉注射の前日に実施する(ベースライン; BA)。

【0313】

動物に0日目(D0)および5日目(D5)に生理食塩水を注射する。2回目の酸性生理食塩水注射24時間(PD-1)後に、機械的痛覚過敏の誘導を確認する。さらなる研究のために、痛覚過敏の増加を有する動物のみを含める(図22)。

【0314】

生理的食塩水(pH 7.2, 対照)を2回注射したラットは機械的痛覚過敏を示さないはずであり、電気的フォンフライシステムで試験される(図23)。PD-2日目に、およびその後3日ごとに(PD-5とPD-8に)、機械的痛覚過敏を示す酸性生理食塩水注入ラットに、既述(Won and Kraig, 2020)のように50 µl容量のIGF-1 (150 µg/用量)またはコハク酸緩衝液(ビヒクル)のいずれかを鼻腔内投与する。

20

【0315】

実験エンドポイント

これらの実験の一般的な目的は、酸性生理食塩水誘発性の線維筋痛症モデルにおいて、経鼻IGF-1が機械的痛覚過敏を減弱させるかどうかである。エンドポイントは、機械的痛覚過敏の誘発後、繰り返しIGF-1投薬に続いて肢引っ込め閾値をモニタリングすることである。酸性生理食塩水筋肉注射の手順は、雄性ラットおよび雌性ラットの両方で機械的痛覚過敏を誘発する。ヒト女性は筋骨格系疼痛(線維筋痛症)の発生率が高い傾向があるので、まず雌性ラットで経鼻IGF-1用量反応実験を行い、雄性ラットでの実験に最適なIGF-1用量を選択する。コハク酸緩衝液の鼻腔内投与を、各IGF-1用量による鼻腔内処置に対する対照とする。

30

【0316】

実験群:

A) 雌性: 1) pH 7.2 生理食塩水, 筋肉内(i.m.); 2) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内; 3) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻コハク酸緩衝液; 4) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻IGF-1 (37.5 µg/用量); 5) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻コハク酸緩衝液; 6) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻IGF-1 (75 µg/用量); 7) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻コハク酸緩衝液; 8) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻IGF-1 (150 µg/用量); B) 雄性: 1) pH 7.2 生理食塩水, 筋肉内; 2) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内; 3) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻コハク酸緩衝液; 4) pH 4.0 生理食塩水, 筋肉内 + 経鼻IGF-1 (最適用量)。

40

【0317】

行動訓練の目標:

長期にわたる広範囲の筋肉痛(線維筋痛症)の非炎症性モデルにおいて、IGF-1の鼻腔内投与が機械的痛覚過敏を減弱させるかどうかを判断すること。試験方法は、痛みの代替指標となり、電気的フォンフライ装置(図20)を用いて評価される機械的感度閾値(肢引っ込

50

め閾値)を評価することである。

【0318】

試験は、高架ワイヤーメッシュグリッド床上に置かれたアクリルケージモジュール[23 cm×24 cm×14.6 cm (W×L×H)]にラットを配置することからなる(図21)。ケージは底部が開いており、ラット間の相互作用を減らすために不透明な壁を備えた2つのコンパートメント(ラット1匹/コンパートメント)に分割されている。後肢刺激に対する機械的感度を評価するために、電気的フォンフライ装置が使われる。この装置は、カメラが埋め込まれた携帯型の力変換器と、刺激装置のハンドルにある剛性のあるプラスチックフィラメントプローブからなる。カメラにより、肢の下でのビデオの記録と表示が可能になる。フィラメントの先端をワイヤーグリッドの下から後肢の足底面(足蹠の中心)に連続的に適用し、肢引っ込みが誘発される(すなわち、肢を舐めるまたは振る)まで力を増加させる。この反応が起こるときの力は、電子装置により自動的に記録され、肢引っ込み閾値とされる(図22)。

10

【0319】

馴化:

ベースライン測定を行う前に、ラットを2日間試験環境に順応させる[馴化(Hab1およびHab2)]。2日間のそれぞれで、ラットをケージの囲いに30分間入れて順応させた後、そのホームケージに戻る。別バッチの動物を馴化させる前に、囲いとワイヤーメッシュを70%エタノールで洗浄する。

20

【0320】

試験(ベースライン):

ラットを試験用囲いの中で30分間順応させる。フォンフライプローブの先端を足蹠の中央に当て、肢の明確な引っ込みが観察されるまで徐々に圧力を上げる(およそ15 g/秒)。正常な、健常ラットは、50~80グラムの肢引っ込み閾値を有する。両後肢を試験し(左右交互に)、同じ後肢の登録刺激間に5分超の間隔をあける。ラットごとに各後肢について最低5回の測定結果を得る。別バッチの動物を試験する前に、囲いとワイヤーメッシュを70%エタノールで洗浄する。

【0321】

A. 図/結果

電気的フォンフライ試験に用いた実験設定およびスケジュールを図20~22および表1に示す。図23~25は、年齢を一致させた偽薬対照と比較した、酸誘発性の疼痛閾値離脱反応の結果を示す。

30

【0322】

成体(約230 g)雌性Wistarラット(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)を本研究において使用し、最初はラットの標準的な動物飼育条件下で1ケージに動物1匹を収容した。

【0323】

飼育には、コーンコブの敷材、Enviro-dri巣材(Shepard Specialty Papers, Watertown, TN)、エンリッチメントのためのネストレッツ(Ancare Corporation, Bellmore, NY)を入れた静圧式マイクロアイソレーターケージの使用を含めた。ラットは、本発明者らの中央動物施設で湿度と温度を制御して、12時間の明暗サイクルで維持された。ラットは実験の間中、食料と水を自由に摂取でき、通常の摂食、身づくろいおよび歩行活動の証拠がないか毎日観察された。全ての動物手順は、シカゴ大学の施設内動物管理使用委員会により承認され、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関するガイド(2011)のガイドラインにしたがって実施され、ARRIVEガイドラインに倣ってパターン化された。

40

【0324】

全ての実験に研究者2名が使われた。1名の研究者が全ての肢刺激を与え、実験的処置について盲検化された。もう1名の研究者が、Martinov et al., 2013によって報告された実験戦略に倣ったモデル化された手順で、肢引っ込み閾値(PWT)カレベルを記録し

50

た。さらに、全ての実験(FM-6、FM-7およびFM-8; $n = 6$ ラット/実験)において、ベースライン(BA)閾値引っ込め反応は、Martinov et al., 2013によって概説されたように最初に確立された(表1)。

【0325】

具体的には、実験処置の前に動物6匹/実験について、肢引っ込め閾値(PWT)のベースライン(BA)測定値を決定した。経鼻IGF-1またはビヒクル(コハク酸緩衝液)処置の場合、2回の酸性生理食塩水の注射後、ベースライン(BA)とPD1時の肢引っ込め閾値(PWT)との差[すなわち、(BA)-(PWT)]を均等に分配することに基づいて、群内の動物を2つのサブグループ($n = 3$ /群)に分けた(表1)。この操作により、酸注射後の平均的な肢引っ込め閾値(PWT)が群間で類似していることを確実にした(Martinov et al., 2013)。実験FM-6、FM-7およびFM-8の全ての肢引っ込め閾値(PWT)測定結果(すなわち、図23~25)は、肢引っ込めを誘発するために必要な閾値力の絶対平均値である。実験には測定実行ごとに、経鼻IGF-1およびビヒクル処置動物を含めた。

10

【0326】

図23は、酸性生理食塩水(pH 4.0)またはビヒクル(pH 7.2生理食塩水)注射の間で肢引っ込め閾値(PWT)を比較した実験FM-6の結果を示す。肢引っ込め閾値の反応から、酸性生理食塩水注射により、PD 1、PD 3、PD 6およびPD 9時に測定された肢引っ込め閾値の持続的かつ有意な($**p < 0.01$)低減が引き起こされたことが明らかである。このことから、本明細書で記述した実験において用いられた後肢酸性生理食塩水注射(すなわち、線維筋痛症モデル)戦略の有用性および再現性が確認される。

20

【0327】

次に、経鼻IGF-1 (またはコハク酸ビヒクル)による繰り返し処置の影響を、酸性生理食塩水痛覚過敏モデルにおける肢引っ込め閾値(PWT)に対して試験した(図24~25)。両方の実験において、痛覚過敏の有効な誘導(すなわち、肢引っ込め閾値の低減)は、PD-1時に最初に確立された。次に、動物を3回(すなわち、PD-2、PD-5およびPD8)経鼻IGF-1 (またはビヒクル)で処置した(表1)。各処置の1日後(すなわち、PD-3、PD-6およびPD-9)に、肢引っ込め閾値(PWT)の測定を完了した。

【0328】

1実験群あたり $n = 3$ 匹の動物を用いた2つの別々の実験[(FM-7およびFM-8) 図24および25]において、IGF-1処置は、酸誘発性の後肢痛覚過敏に対して有意な($**p < 0.01$ - $***p < 0.001$)保護を誘発した。このデータは、慢性疼痛症候群および慢性疲労症候群を含む線維筋痛症の処置に有効な治療法として、経鼻IGF-1の開発を強く支持するものである。

30

【0329】

B. 参考文献:

40

50

Bitar MS, Al-Bustan M, Nehme CL, et al. Antinociceptive action of intrathecally administered IGF-I and the expression of its receptor in rat spinal cord. *Brain Res.* 1996; 737: 292-294.

Xu J, Casserly E, Yin Y, Cheng J. A Systematic Review of Growth Hormone in Pain Medicine: From Rodents to Humans. *Pain Med.* 2020 Jan 1;21(1):21-31. doi: 10.1093/pm/pny280.

Ciucci F, Putignano E, Baroncelli L, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One.* 2007; 2: e475.

10

Bjersing JL, Larsson A, Palstam A, Ernberg M, Bileviciute-Ljungar I, Löfgren M, Gerdl B, Kosek E, Mannerkorpi K. Benefits of resistance exercise in lean women with fibromyalgia: involvement of IGF-1 and leptin. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017 Mar 14;18(1):106. doi: 10.1186/s12891-017-1477-5.

Mannerkorpi K, Landin-Wilhelmsen K, Larsson A, Cider Å, Arodell O, Bjersing JL. Acute effects of physical exercise on the serum insulin-like growth factor system in women with fibromyalgia. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017 Jan 25;18(1):37. doi: 10.1186/s12891-017-1402-y.

20

Cuatrecasas G1, Alegre C, Casanueva FF. GH/IGF1 axis disturbances in the fibromyalgia syndrome: is there a rationale for GH treatment *Pituitary.* 2014 Jun;17(3):277-83. doi: 10.1007/s11102-013-0486-0.

Won L, Kraig RP. (2020) Insulin-like growth factor-1 inhibits spreading depression-induced trigeminal calcitonin gene related peptide, oxidative stress & neuronal activation in rat. *Brain Res.* 1732:146673. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146673.

DeSantana JM, da Cruz KM, Sluka KA. Animal models of fibromyalgia *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):222.

30

Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci.* 2017 Sep 6;10:284. doi: 10.3389/fnmol.2017.00284. eCollection 2017.

Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 2012 Jun 1;211:39-50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.

Bardin L1, Malfetes N, Newman-Tancredi A, Depoortère R. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 28;205(2):360-6. doi: 10.1016/j.bbr.2009.07.005.

40

Sluka KA, Kalra A, Moore SA Muscle Nerve. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. Muscle Nerve 2001. 24:37-46.

Stemkowski PL, Zamponi GW. The role of IGF-1: insulin-like growth factor receptor activation increases pain by enhancing T-type calcium channel activity. Sci Signal. 2014 Oct 7;7(346):pe23. doi: 0.1126/scisignal.2005826.

Ferrier, J., Bayet-Robert, M., Pereira, B., Daulhac, L., Eschalier, A., Pezet, D., Moulinoux, J-P. & Balayssac, D. A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. 2013. *PLoS ONE* 8(10), e77828, doi:10.1371/journal.pone.0077828.

Fusco, R., Siracusa, R., D'Amico, R., Peritore, A.F., Cordaro, M., Gugliandolo, E., Crupi, R., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., & Di Paola, R. Melatonin plus folic acid treatment ameliorates reserpine-induced fibromyalgia: an evaluation of pain, oxidative stress, and inflammation. 2019. *Antioxidants* 8, 628, doi:10.3390/antiox8120628.

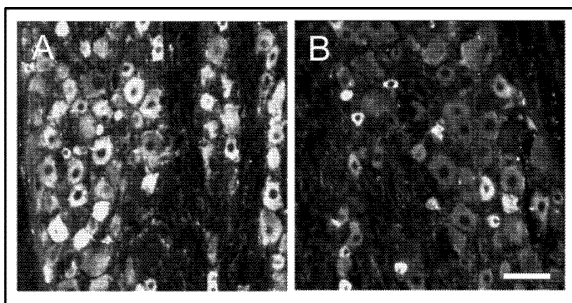
Martinov, T., Mack, M., Sykes, A. & Chatterjea, D. Measuring changes in tactile sensitivity in the hind paw of mice using an electronic von Frey apparatus. 2013. *J. Vis. Exp.* 82, e51212, doi:10.3791/51212.

【 0 3 3 0 】

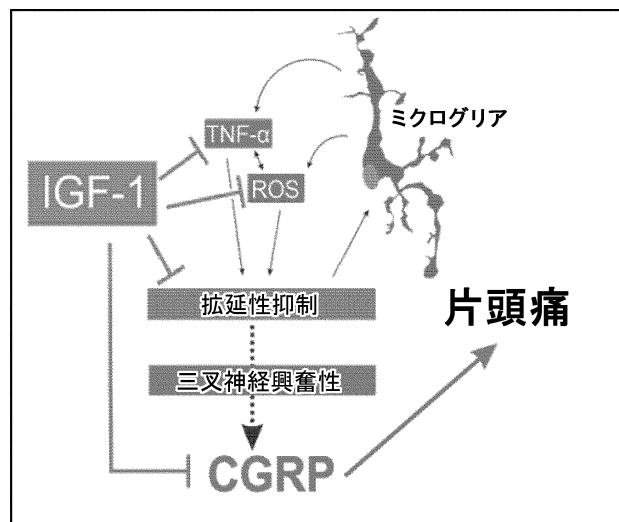
本明細書において開示および主張される方法は全て、本発明を考慮すれば過度の実験なく作られおよび実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して記述してきたが、本発明の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記述される方法および本明細書において記述される方法の段階または段階の順序に変更を加えることができることは当業者に明らかである。さらに具体的には、本明細書において記述される薬剤の代わりに、化学的および生理学的に関連している、ある特定の薬剤を用いることができ、それと同時に、同一の結果または類似の結果が得られることが明らかである。当業者に明らかな、このような類似の代用および変更は全て、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の趣旨、範囲、および概念の範囲内だと考えられる。

【 図面 】

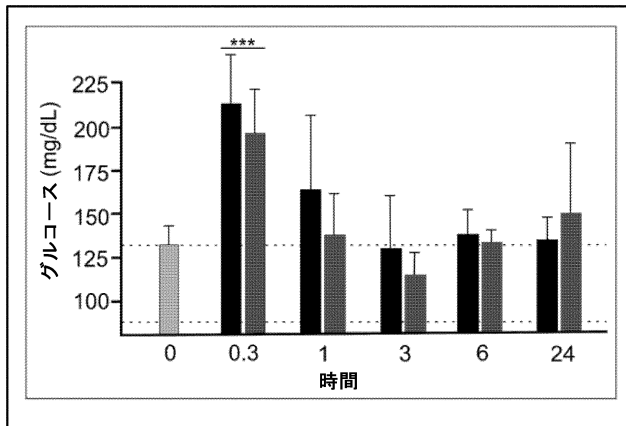
【 図 1 】



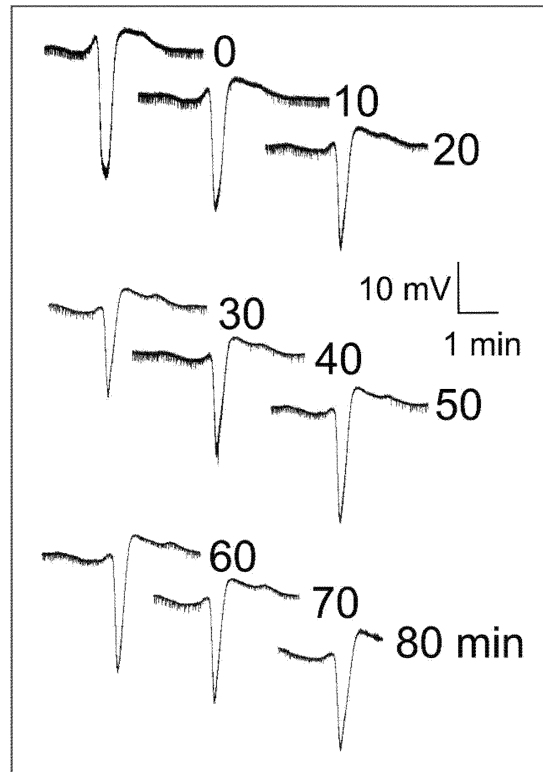
【 図 2 】



【図 3】



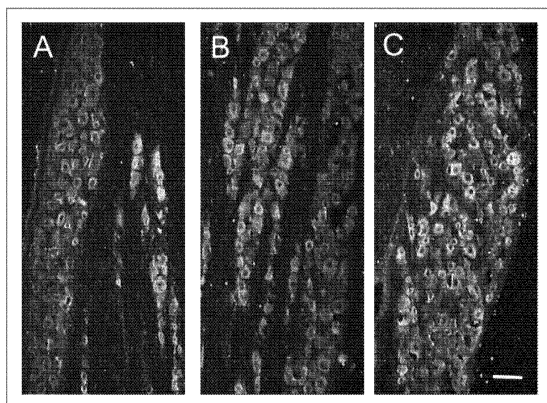
【図 4】



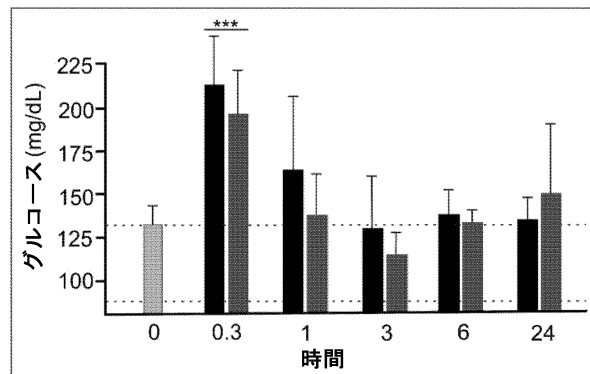
10

20

【図 5】



【図 6】

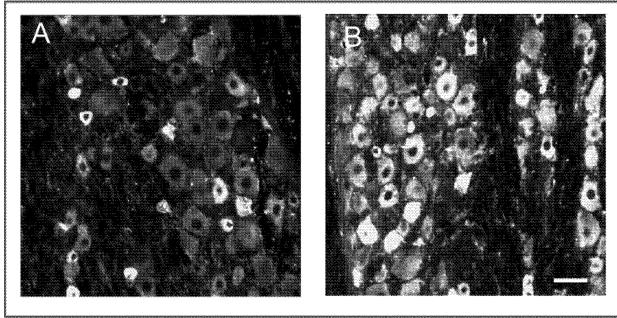


30

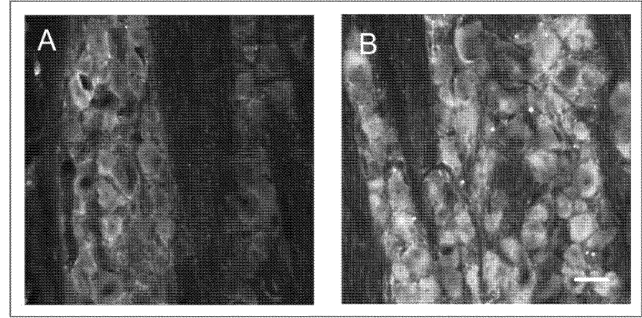
40

50

【図 7】

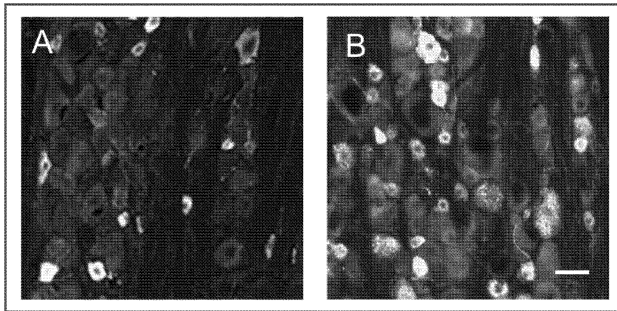


【図 8】

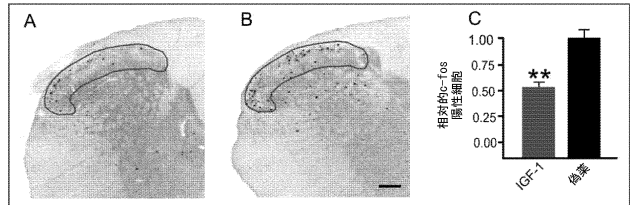


10

【図 9】

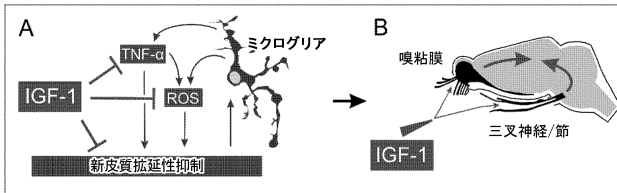


【図 10】

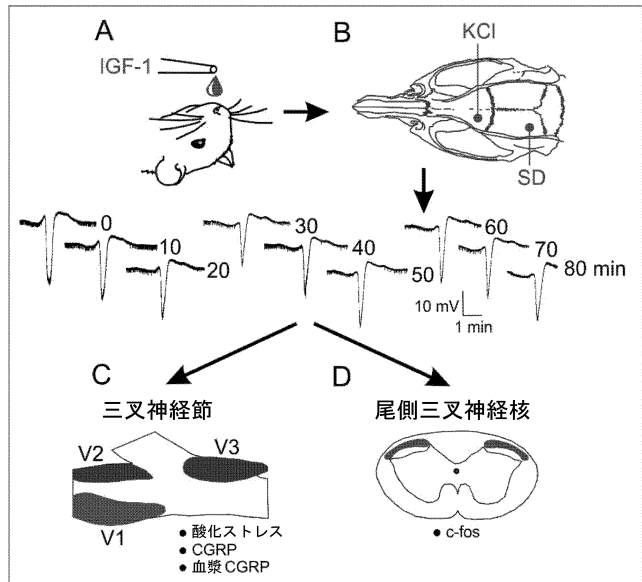


20

【図 11】



【図 12】

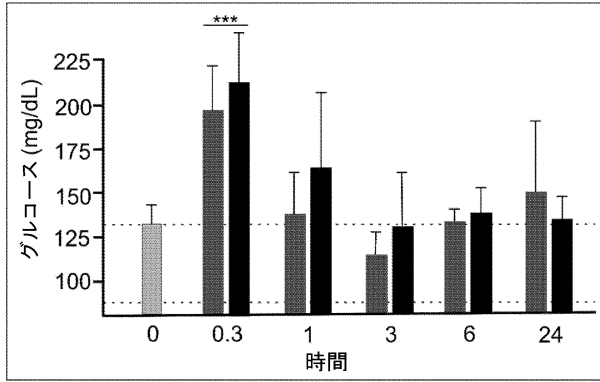


30

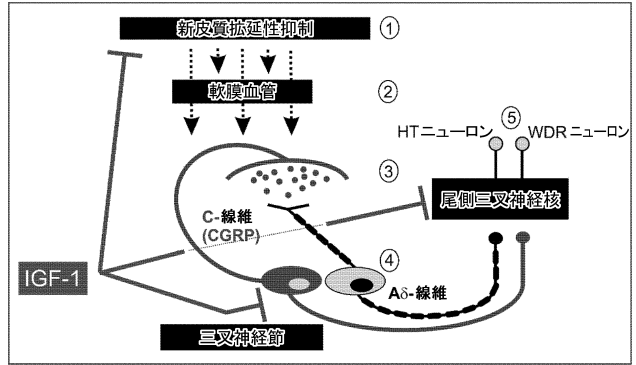
40

50

【図 1 3】

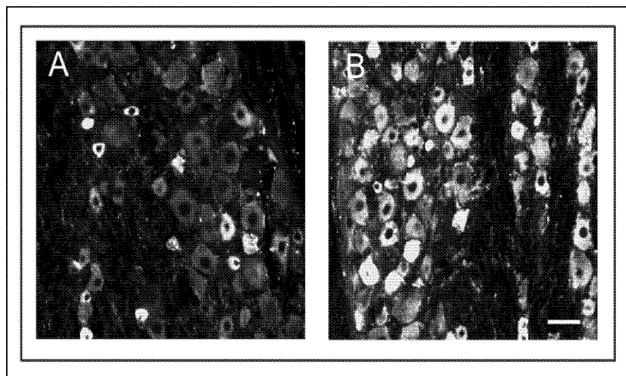


【図 1 4】

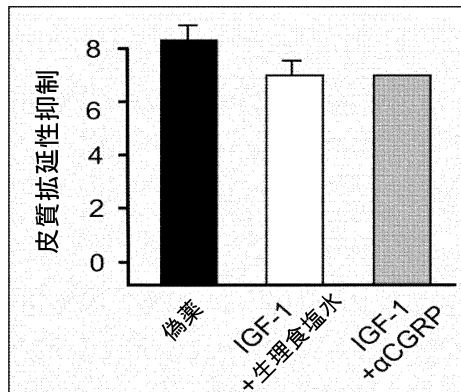


10

【図 1 5】



【図 1 6】



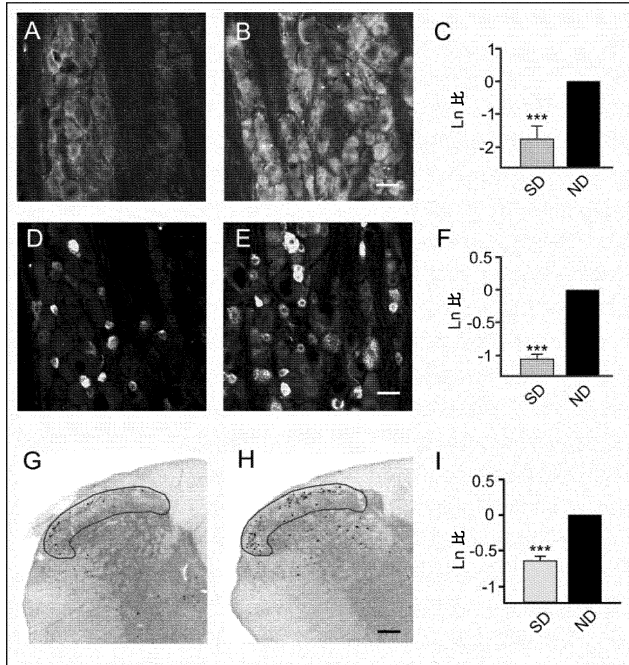
20

30

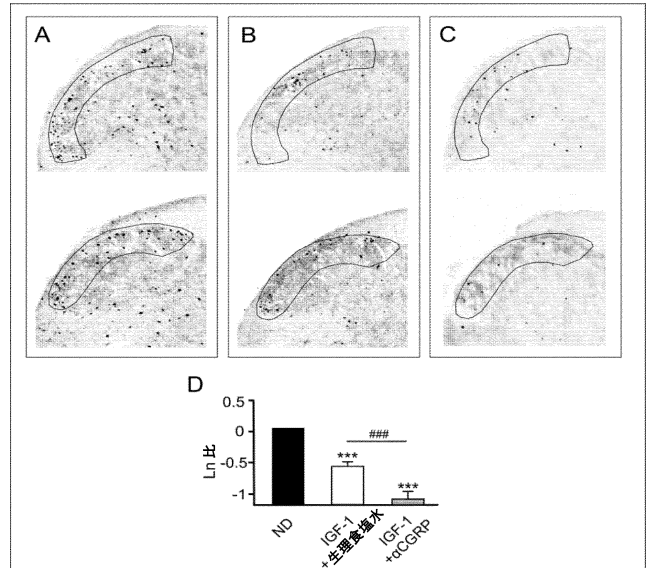
40

50

【図 17】



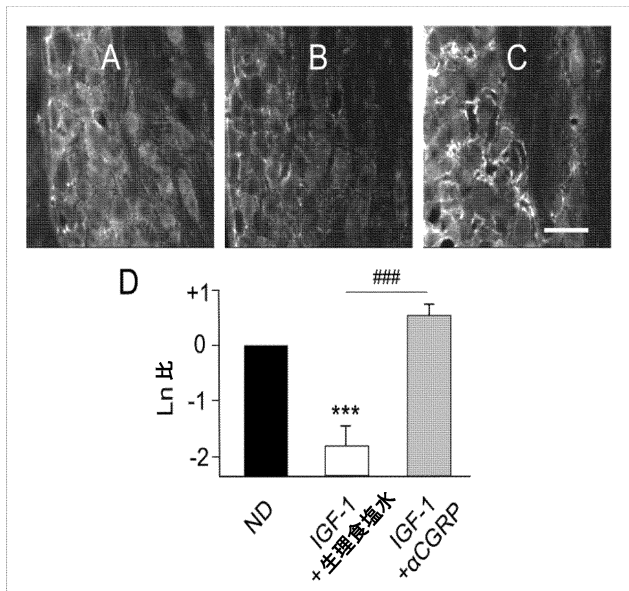
【図 18】



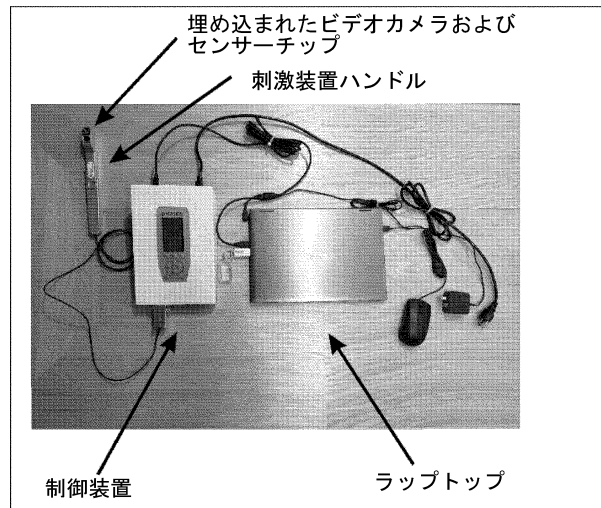
10

20

【図 19】



【図 20】

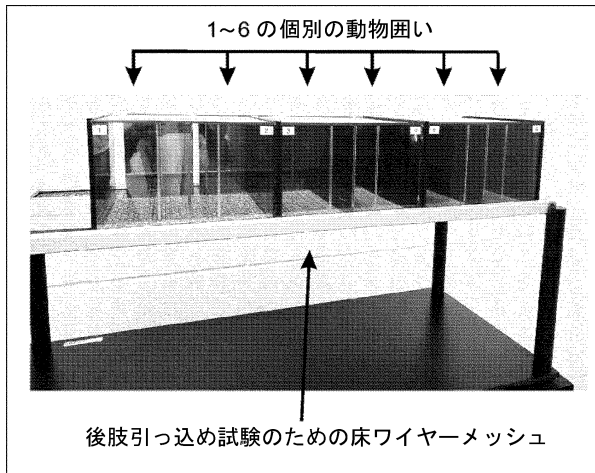


30

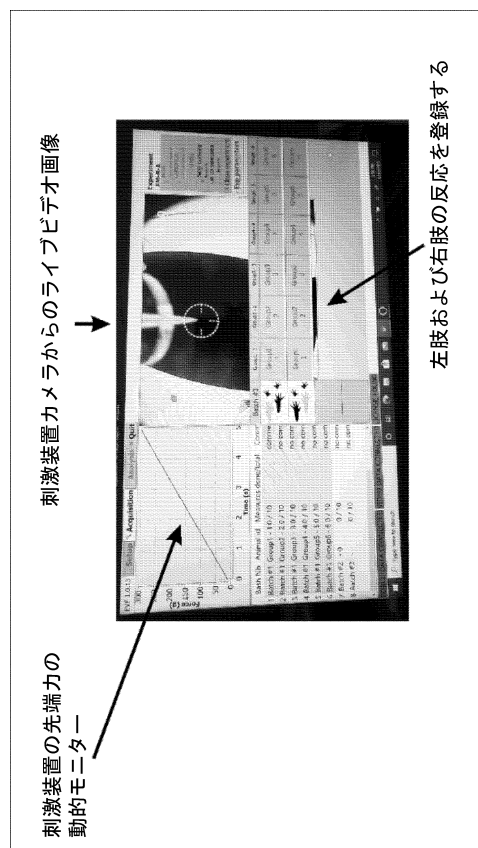
40

50

【図 2 1】



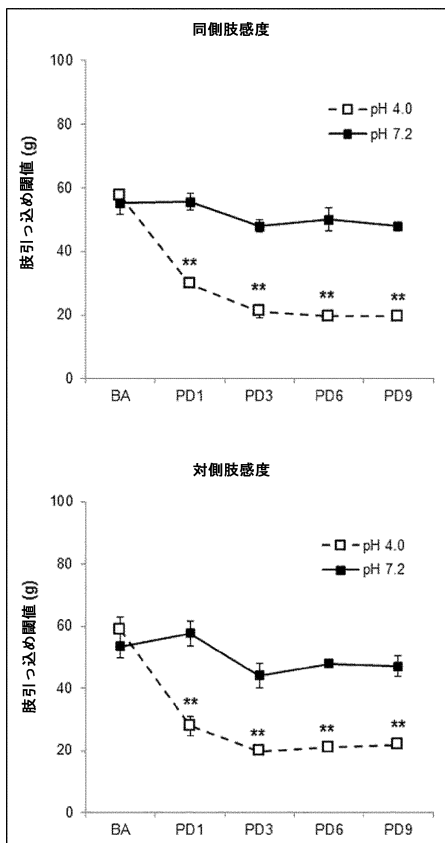
【図 2 2】



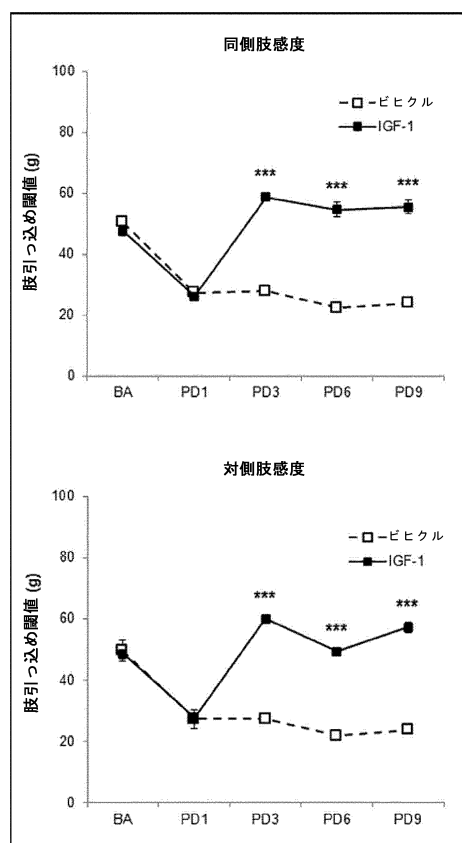
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】

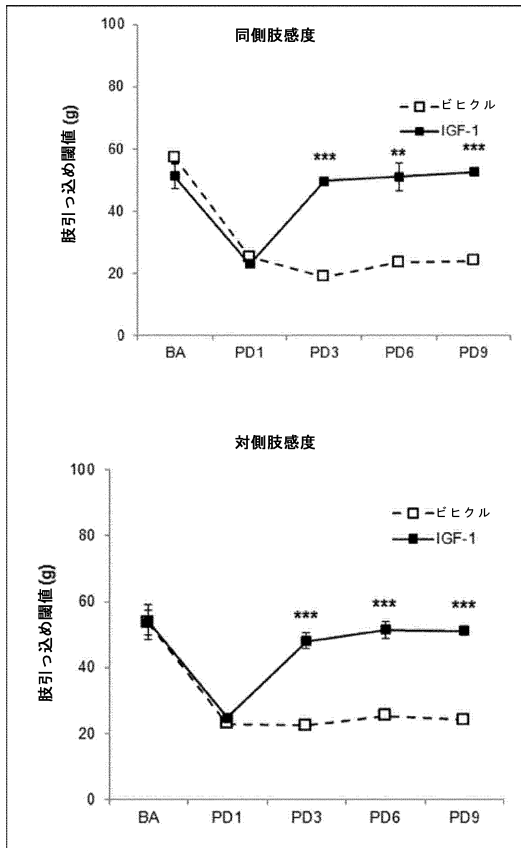


30

40

50

【図 25】



10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和4年5月18日(2022.5.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2022547948000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

PCT/US2020/070511 17.02.2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/70511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 31/00, A61K 38/30, A61P 25/00, A61K 45/06, A61K 38/28, A61K 38/18 (2021.01)

CPC - A61K 9/0043, C07K 16/18, A61K 39/395, A61P 25/06

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0294761 A1 (KRAIG et al.) 2 October 2014 (02.10.2014) Abstract; Claim 17; Claim 18; Claim 19; Claim 21; para [0006]; para [0014]; para [0025]	1-4, 57-59
Y	US 2008/0194553 A1 (GILLESSEN) 14 August 2008 (14.08.2008) Abstract; para [0008]	1-3
Y	US 2018/0162931 A1 (ZELLER et al.) 14 June 2018 (14.06.2018) Abstract; Claim 1; Claim 19; para [0009]	3-4, 57-59

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 2021

Date of mailing of the international search report

17 FEB 2021

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 Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

PCT/US2020/070511 17.02.2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/70511

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

PCT/US2020/070511 17.02.2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/70511

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.: 5-56
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/06 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4545 (2006.01)
 C 0 7 K 14/62 (2006.01)
 C 0 7 K 14/65 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/16 (2006.01)
 C 1 2 N 15/23 (2006.01)
 C 1 2 N 15/24 (2006.01)
 C 0 7 K 14/57 (2006.01)
 C 0 7 K 14/54 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 K 45/06
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 31/4545
 C 0 7 K 14/62
 C 0 7 K 14/65
 C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 16/18
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/16
 C 1 2 N 15/23
 C 1 2 N 15/24
 C 0 7 K 14/57
 C 0 7 K 14/54

,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,D
 K,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),O
 A(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,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
 W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 クレイグ リチャード

アメリカ合衆国 6 0 6 3 7 イリノイ州 シカゴ サウス ドレクセル アベニュー 6 0 5 4 スイ
 ート 4 0 5 ユニバーシティ オブ シカゴ ポルスキー センター内

(72)発明者 ウォン リサ

アメリカ合衆国 60637 イリノイ州 シカゴ サウス ドレクセル アベニュー 6054 スイ
ート 405 ユニバーシティ オブ シカゴ ポルスキー センター内
(72)発明者 プシック カエ
アメリカ合衆国 60637 イリノイ州 シカゴ サウス ドレクセル アベニュー 6054 スイ
ート 405 ユニバーシティ オブ シカゴ ポルスキー センター内
(72)発明者 プシック アヤ
アメリカ合衆国 60637 イリノイ州 シカゴ サウス ドレクセル アベニュー 6054 スイ
ート 405 ユニバーシティ オブ シカゴ ポルスキー センター内
(72)発明者 サンダース マーティン
アメリカ合衆国 60615 イリノイ州 シカゴ イースト フィフティーサード ストリート 14
52 セカンド フロア スーラ セラピューティクス内
F ターム (参考) 4C084 AA17 AA20 AA24 MA02 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59 MA63
MA66 NA05 NA14 ZA081 ZA082 ZA941 ZA942 ZC022 ZC211 ZC212 ZC412
ZC751
4C085 AA13 AA14 BB11 CC23 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04
GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 CB05 MA02 MA04 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59
MA63 MA66 NA05 NA14 ZA08 ZA94 ZC02 ZC21 ZC41 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA38 DA76 EA20 EA21
FA74