

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-537155

(P2017-537155A)

(43) 公表日 平成29年12月14日(2017.12.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C O 7 K 14/715 Z N A	4 C O 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 C O 8 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-547084 (P2017-547084)	(71) 出願人	517191312
(86) (22) 出願日	平成27年12月1日 (2015.12.1)		フェリング・ペー・フェー
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月14日 (2017.7.14)		オランダ・2132・イエー・イクス・ホーフトドルプ・ポラリス・アヴェニュー・144
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/002459	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開番号	W02016/087941		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開日	平成28年6月9日 (2016.6.9)	(74) 代理人	100110364
(31) 優先権主張番号	62/086,054		弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成26年12月1日 (2014.12.1)	(74) 代理人	100133400
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 阿部 達彦
		(72) 発明者	イアン・コティンガム
			スイス・CH-1162・サン・プレクス・シュマン・ドウ・ラ・ヴェルゴーニョーザ・50
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択的 IL-6 トランスシグナル伝達阻害剤の投与

(57) 【要約】

選択的 IL-6-トランスシグナル伝達阻害剤が、炎症性疾患及びがんを含む種々の IL-6 媒介性状態を処置するために使用され得る。この阻害剤は、種々の用量でヒトに安全に投与され得る。更に、この阻害剤は、好中球数、血小板数及び C 反応性タンパク質のレベルを低下させる等の、他の IL-6 阻害剤と関連する有害効果を減らす。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトにおける炎症性疾患又はIL-6媒介性状態の処置における使用のための、2つのモノマーを含むポリペプチドダイマーであって、各モノマーは、配列番号1に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、前記モノマーは、配列番号1の585～595位におけるアミノ酸に対応するgp130のD6ドメイン、配列番号1の609～612位におけるアミノ酸を含むFcドメインヒンジ領域を含み、前記モノマーは、前記gp130部分と前記Fcドメインとの間にリンカーを含まず、前記ポリペプチドダイマーは、0.5mgから5gの用量で投与される、ポリペプチドダイマー。

【請求項 2】

好中球数、血小板数及び/若しくはC反応性タンパク質のレベルを顕著に低下させることなく、又は健康な対象若しくはIL-6媒介性状態に罹患している患者における正常範囲を下回って好中球数、血小板数及び/若しくはC反応性タンパク質のレベルを低下させることなくヒトにおけるIL-6媒介性状態を処置する際の使用のための、2つのモノマーを含むポリペプチドダイマーであって、各モノマーは、配列番号1に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、前記モノマーは、配列番号1の585～595位におけるアミノ酸に対応するgp130のD6ドメイン、配列番号1の609～612位におけるアミノ酸を含むFcドメインヒンジ領域を含み、前記モノマーは、前記gp130部分と前記Fcとの間にリンカーを含まず、好ましくは、前記ポリペプチドダイマーは、0.5mgから5gの用量で投与される、ポリペプチドダイマー。

【請求項 3】

前記モノマーが、配列番号1を有する、請求項1又は2に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 4】

前記モノマーが、配列番号1を有する、請求項1又は2に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 5】

前記用量が、60mgから1gである、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 6】

前記用量が、60mgから600mgである、請求項5に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 7】

7～60日毎に投与される、請求項1から6のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 8】

7～30日毎に投与される、請求項7に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 9】

7～20日毎に投与される、請求項8に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 10】

7日毎に投与される、請求項9に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 11】

14日毎に投与される、請求項9に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 12】

非経口投与される、請求項1から11のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 13】

静脈内投与又は皮下投与される、請求項12に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 14】

前記炎症性疾患又はIL-6媒介性状態が、炎症性腸疾患である、請求項1から13のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 15】

前記炎症性腸疾患が、クローン病又は潰瘍性大腸炎である、請求項14に記載のポリペプチドダイマー。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記処置が、炎症性腸疾患の寛解を誘導する、請求項14に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 17】

前記処置が、炎症性腸疾患の寛解を維持する、請求項14に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 18】

前記炎症性疾患又はIL-6媒介性状態が、関節リウマチ、乾癬、ブドウ膜炎又はアテローム性動脈硬化症である、請求項1から13のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 19】

前記炎症性疾患又はIL-6媒介性状態が、炎症性腸疾患と関連しない大腸炎である、請求項1から13のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 20】

前記大腸炎が、放射線大腸炎、憩室性大腸炎、虚血性大腸炎、感染性大腸炎、セリアック病、自己免疫性大腸炎、又は結腸に影響を与えるアレルギーに起因する大腸炎である、請求項19に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 21】

好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルが、前記ポリペプチドダイマーの投与後に、生理学的に正常な範囲内に維持される、請求項1から20のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 22】

前記処置が、第2の活性剤の投与を更に含む、請求項1から21のいずれか一項に記載のポリペプチドダイマー。

【請求項 23】

前記第2の活性剤が、5-アミノサリチル酸、アザチオプリン、5-メルカプトプリン又はコルチコステロイドである、請求項22に記載のポリペプチドダイマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2014年12月1日出願の米国仮特許出願第62/086,054号の利益を主張し、その内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

IL-6は、例えば、感染及び組織損傷に応答して、造血細胞及び非造血細胞によって産生される多面的サイトカインである。IL-6は、2つの主要なシグナル伝達経路、肝細胞及び特定の白血球上に主に存在する膜結合型IL-6Rを介した、いわゆる古典的リガンド-受容体経路、並びに膜結合型IL-6Rのタンパク分解性切断を起源とする、又は選択的スプライシングを起源とする循環sIL-6Rを介したトランスシグナル伝達経路を介して、その複数の生物学的活性を発揮する。

【0003】

古典的経路では、IL-6は、限定された範囲の細胞型の表面上の膜結合型IL-6Rに直接結合する。IL-6/IL-6R複合体は、シグナル伝達性gp130受容体タンパク質の事前に形成されたダイマーと会合して、gp130ホモダイマーにおける立体上の変化を引き起こし、それによって、細胞内シグナル伝達カスケードを開始させる。古典的シグナル伝達は、急性炎症防御機構及び重大な生理学的IL-6機能、例えば、腸上皮細胞に対する成長及び再生シグナルを担う。

【0004】

IL-6R及びgp130の細胞外ドメインは、選択的スプライシングされたmRNAの翻訳によって膜アンカリングドメインなしに生成されて、sIL-6R及びsgp130バリエーションを生じ得る。更

10

20

30

40

50

に、IL-6Rの細胞外ドメインは、Aディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ(ADAM)ファミリー(ヒトでは、ADAM17)の膜結合型プロテアーゼによって取り除かれて、sIL-6Rを生成し得る。トランスシグナル伝達プロセスでは、sIL-6Rは、IL-6に結合して、膜結合型IL-6Rを発現しない多くの細胞型上に存在する膜貫通gp130ダイマーに結合するアゴニスト複合体を形成し、次いで、シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)によるIL-6シグナル伝達が、IL-6に対して通常は応答しない細胞において誘導される。IL-6/sIL-6R複合体の活性は、膜結合型gp130と効果的に競合する、循環中に存在するsgp130のレベルによって通常は制御される。トランスシグナル伝達は、慢性炎症に主に関与し、疾患促進性粘膜T細胞集団がアポトーシスに進むのを防止することが示されている。

【0005】

10

天然のトランスシグナル伝達阻害剤sgp130を模倣するが、より高い結合親和性及び結果としてより強い阻害活性を有する分子を有することが望ましい。更に、最小の毒性及び免疫原性潜在力を有する、ヒトに投与され得る分子を有することが望ましい。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Al-Gwaiz LA、Babay HH (2007)、「The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections」、Med Princ Pract 16 (5): 344-7頁

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

選択的IL-6-トランスシグナル伝達阻害剤が、広い投薬量範囲にわたっていずれの顕著な有害効果も伴わずにヒトに投与され得ることが、ここで見出されている。更に、驚くべきことに、阻害剤の終末相半減期は、毎週、隔週(即ち、1週間おき)、毎月又は更により低い頻度での投薬を可能にすることが見出されている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

ある特定の実施形態では、本発明は、炎症性疾患又はIL-6媒介性状態の処置のための阻害剤(例えば、本明細書に開示されるポリペプチドダイマー)を含み、ポリペプチドは、0.5mgから5gの用量で投与される。本発明は、阻害剤(例えば、本明細書に開示されるポリペプチドダイマー)を投与することによって、炎症性疾患を処置する方法も含み、阻害剤の用量は、0.5mgから5gまでである。本発明は、示された用量における、炎症性疾患を処置するための医薬の製造におけるかかる阻害剤の使用を更を含む。好ましくは、ヒトが処置される。

30

【0009】

他の実施形態では、本発明は、好中球数、血小板数及び/若しくはC反応性タンパク質のレベルを顕著に低下させることなく、又は健康な対象若しくはIL-6媒介性状態に罹患している患者における正常範囲を下回って好中球数、血小板数及び/若しくはC反応性タンパク質のレベルを低下させることなくIL-6媒介性状態を処置するための本明細書に開示されるポリペプチドダイマーを含む。本発明は、本明細書に開示されるポリペプチドダイマーを投与することによってIL-6媒介性状態を処置する方法も含み、方法は、好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルを顕著には低下させない。本発明は、好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルを顕著に低下させることなくIL-6媒介性状態を処置するための医薬の製造における、かかるポリペプチドダイマーの使用を更を含む。好ましくは、ヒトが処置される。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】IL-6のトランスシグナル伝達経路を示す図である。選択的スプライシングされたmRNA又はタンパク分解性切断から生成されたsIL-6Rは、IL-6に結合して、身体の細胞型の

50

大半上に存在するgp130に結合するIL-6/sIL-6複合体を形成し、細胞内シグナル伝達カスケードを誘導することができる。

【図2】配列番号1の2つのモノマーを含むポリペプチドダイマーは、膜結合型IL-6RへのIL-6結合(古典的シグナル伝達)を妨害しないが、IL-6/sIL-6R複合体に選択的に結合し、トランスシグナル伝達を防止することを示す図である。

【図3】0.75mg、7.5mg、75mg、150mg、300mg、600mg及び750mgでのペプチド1のi.v.注入(左のパネル)並びに60mg(2×2mL)でのs.c.注射(右のパネル)後のプロファイルを示す図である。

【図4】健康な対象(左のパネル)及び臨床的寛解状態にあるCD患者(右のパネル)における75mg、300mg及び750mgでの静脈内投与後のプロファイルを示す図である。

【図5】健康な対象における4週間にわたる1週間に1回の75mg、300mg及び750mgでの静脈内投与後のプロファイルを示す図である。

【図6】試験000115における2-コンパートメント構造のPKモデルを使用するモデル予測(実線)及び観察されたデータ(丸)を示す図である。

【図7】単一のgp130-Fcサブユニットのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図8A】発現プラスミドpFER02のヌクレオチド配列エレメントを示す図である。

【図8B】図8Aの続きである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の好ましい阻害剤は、2つのgp130-Fc融合モノマー(例えば、配列番号1の2つのモノマー)のダイマーを含む。その活性形態では、配列番号1のポリペプチドは、Cys623及びCys626における2つのジスルフィド連結によって連結されたダイマーとして存在する(図2)。配列番号2は、内因性シグナルペプチドを有するgp130-Fc融合モノマーのアミノ酸配列に対応する。シグナルペプチドは、タンパク質合成の間に除去され、配列番号1のポリペプチドの産生を生じる。

【0012】

本明細書に記載されるポリペプチドダイマーは、過剰なトランスシグナル伝達を選択的に阻害し(図1)、複数の炎症性疾患に関与する有害なT細胞のアポトーシスを誘導する。ポリペプチドダイマーは、IL-6/sIL-6R複合体を標的化及び中和し、したがって、所望の治療濃度でIL-6トランスシグナル伝達のみを阻害して、古典的シグナル伝達及びその多くの生理学的機能、並びにその急性炎症防御機構をインタクトなままにすると予測される(図2)。ポリペプチドダイマーは、立体障害に起因して古典的IL-6シグナル伝達を妨害することができないと考えられ、Fc部分は、細胞膜中に挿入することができず、gp130部分を、膜結合型IL-6/sIL-6R複合体への結合に利用できないものにする。したがって、ポリペプチドダイマーは、全般的IL-6遮断(例えば、トシリズマブ、シルクマブ(sirukumab))と類似した効力を有するが、より少ない副作用を有すると予測される。

【0013】

本明細書に記載されるポリペプチドダイマーは、好ましくは、配列番号1に対応する配列を有するgp130-Fcモノマーを含む。ある特定の実施形態では、モノマーは、配列番号2に対応する配列を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドダイマーは、配列番号1又は配列番号2に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。好ましくは、ポリペプチドは、gp130のD6ドメイン(特に、アミノ酸TFTTPKFAQGE:配列番号1のアミノ酸585~595位)、Fcドメインヒンジ領域中のAEGA(配列番号1のアミノ酸609~612位)を含み、gp130部分とFcドメインとの間にリンカーを含まない。好ましい実施形態では、本開示は、配列番号1に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する2つのモノマーを含むポリペプチドダイマーを提供し、アミノ酸配列は、gp130のD6ドメイン、Fcドメインヒンジ領域中のAEGAを含み、gp130部分とFcドメインとの間にはリンカーが存在しない。好ましい実施形態では、本開示は、配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

有する2つのモノマーを含むポリペプチドダイマーを提供し、アミノ酸配列は、gp130のD6ドメイン、Fcドメインヒンジ領域中のAEGAを含み、gp130部分とFcドメインとの間にはリンカーが存在しない。

【0014】

ポリペプチドは、ガラクトース-アルファ-1,3-ガラクトース部分を実質的に含まないことが望ましいが、それは、これらの部分が、免疫原性応答と関連するからである。驚くべきことに、本発明のダイマーは、低レベルのかかる部分を有することが見出された。好ましい実施形態では、ポリペプチドダイマーは、1モルのポリペプチド当たり6%以下のガラクトース-アルファ-1,3-ガラクトースを含有する。好ましくは、ポリペプチドダイマーは、4モル%、3モル%、2モル%、1モル%、0.5モル%、0.2モル%、0.1モル%以下、又は更には検出不能なレベルのガラクトース-アルファ-1,3-ガラクトース(例えば、WAX-HPLC、NP-HPLC又はWAXによって測定される、好ましくは、WAX-HPLCによって決定される)を含有する。他の実施形態では、ポリペプチドダイマーは、質量で、又はモル濃度基準で、グリカンの総量と比較して、6%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%又は更には0.1%未満のガラクトース-アルファ-1,3-ガラクトースを含有する。

10

【0015】

本発明のポリペプチドはまた、シアル化されることが望ましい。これは、本発明のポリペプチドの半減期を増加させる利点を有する。ポリペプチドダイマーの各鎖は、10個のN-グリコシル化部位を含有し、9つのN-グリコシル化部位は、gp130部分中に位置し、1つのN-グリコシル化部位は、Fc部分中に位置する。したがって、ポリペプチドは、合計20個のグリコシル化部位を含有する。ある特定の実施形態では、ポリペプチド上のグリカンの少なくとも52%又は少なくとも54%の平均、例えば52~56%の平均が、シアル酸残基を含む(例えば、WAX-HPLC、NP-HPLC又はWAXによって測定される、好ましくは、WAX-HPLCによって決定される)。好ましくは、本発明のポリペプチドは、220kDaのおよその分子量を有し、各93kDaは、10個のN-グリコシル化鎖に由来する更なる約20kDaの分子量を有する。

20

【0016】

オリゴマー性凝集体を生じる、本明細書でオリゴマー化とも呼ばれる、ポリペプチドが凝集する程度を最小化することが、更に望ましい。「オリゴマー性凝集体」とは、本明細書で使用する場合、活性ダイマー化ペプチドは指さない。その代わりに、この用語は、活性ダイマーのうち少なくとも1つのダイマーを指す。驚くべきことに、本発明のペプチドダイマーは、低レベルの凝集を示すことが見出された。ある特定の実施形態では、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1.5%未満、又は更には1.0%未満のポリペプチドが、オリゴマーとして存在する。オリゴマー含量は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱(SEC-MALS)又はSEC-UVによって測定され得る。

30

【0017】

好ましくは、ポリペプチドダイマーは、その全長形態で存在する(例えば、例えば配列番号1の、2つの全長モノマーを含む)。しかし、細胞培養物は、本明細書で単一gp130形態(SGF)と呼ばれるランケート型バリエーションを産生し得る。SGFは、共有結合した2つの鎖分子であり、一方の鎖は、全長gp130-Fcモノマー(例えば、配列番号1の)を含み、第2の鎖は、ランケート型gp130-Fcモノマー(例えば、配列番号1のランケーション)を含み、第2の鎖は、Fcドメインを含み、gp130ドメインのほとんど又は全てを欠く(例えば、Fc領域に対してリンカー配列の前で終結する)。今日までの研究は、SGFが不均一なアミノ末端を有しないことを実証している。SGFは、バイオリクター中で一貫したレベルで形成され得、一旦形成されると、SGFレベルは、精製、加工又は加速貯蔵条件中に容易には変化しない。SGFレベルは、ポリペプチドダイマーの全長形態と類似した物理的-化学的特性に起因して、精製の間に除去することが困難な場合があり、したがって、SGFを除去するための試みは、収量における顕著な減少を生じ得る。驚くべきことに、本発明のポリペプチドダイマーは、ほぼ常に全長であることが見出された。ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、4.0質量%、3.0質量%、2.0質量%又は更には1.5質量%以下の、配列番号1のポリペプチドに関して配列番号1のポリペプチドのランケート型バリエーションであるポ

40

50

リペプチドを含む、ポリペプチドダイマーを含む。ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、4.0質量%、3.0質量%、2.0質量%又は更には1.5質量%以下の、配列番号2のポリペプチドに関して配列番号2のポリペプチドのランケート型バリエーションであるポリペプチドを含む。

【0018】

投薬

本明細書に記載される用量は、フェーズIデータに基づいて、安全で忍容性を示すと考えられる用量範囲を示す。IL-6R又はIL-6を標的化する他の化合物は、初期臨床試験では、健康な対象及びRAを有する患者の両方において、減少した好中球数及び血小板数並びにより低いレベルのC反応性タンパク質(CRP)をしばしば示した。しかし、本発明のポリペプチドを投薬した健康な対象における好中球数及び血小板数の観察されたレベルは、なおも正常な範囲内であった。フェーズIプログラムの結果から、本発明のポリペプチドは、バイオマーカーに対して、IL-6R又はIL-6を標的化する化合物と同じ影響を示さないようである。

10

【0019】

配列番号1のモノマーを含むポリペプチドダイマーを用いた2つの試験において、対象由来の全血サンプルを、ハイパーIL-6を用いて刺激することによって、STAT3の活性化のレベルを測定するex vivoアッセイを、薬物の活性の評価として使用した。1 μ g/mLを上回る、配列番号1のモノマーを含むポリペプチドの濃度レベルは、二次メッセンジャー(STAT3)アッセイにおけるベースラインに対する抑制されたシグナルと関連すると考えられる。配列番号1のモノマーを含むポリペプチドダイマーのこの濃度レベルは、7.5mg用量のピークレベルに対応する。i.v.注入として投与された75mgの用量は、1週間の投薬間隔について定常状態で1 μ g/mLを上回る濃度を有することが示されている。2週間毎に投与される対応する用量は、300mgである。皮下注射として投与される60mgは、1週間毎の投薬について同じ定常状態を生じると考えられる。

20

【0020】

ある特定の実施形態では、用量は、0.5mgから5gまでのポリペプチドダイマーである。例えば、用量は、5mgから3gまで、10mgから2gまで、60mgから1gまで、又は好ましくは60mgから750mgまでであり得る。

【0021】

ポリペプチドダイマーは、意図した状態について適切な頻度で投与され得る。ある特定の実施形態では、ポリペプチドダイマーは、7~60日毎に1回投薬される。例えば、ポリペプチドダイマーは、7~30日毎又は7~20日毎に1回投薬され得る。好ましい実施形態では、用量は、毎週(7日毎に1回)又は隔週(14日毎に1回)生じる。用量はまた、毎日、又は1週間に2回若しくは3回、生じ得る。用量とは、単回の投薬エピソードを指し、用量は、単位投薬形態であるか、又は一緒に摂取される複数の単位投薬形態(例えば、2つ以上の丸剤の摂取、2回以上の注射を受ける)である。以下で議論するように、用量頻度は、動物研究からは予測できない。ヒト臨床試験は、4.6日から5.5日の平均半減期を見出した。対照的に、カニクイザルは、ポリペプチドダイマーが静脈内投与される場合にはたった0.7日の、皮下投与される場合には1.4~1.5日の半減期を有した。

30

40

【0022】

本発明のポリペプチドダイマーは、典型的には、非経口投与され、例えば、静脈内投与又は皮下投与される。投与は、本明細書に開示される投薬頻度のうち1つに従って生じ得る。

【0023】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドダイマーは、静脈内投与され、60mgから1gまでの用量で、7~60日毎に1回投薬される。

【0024】

ある特定のかかる実施形態では、ポリペプチドダイマーは、静脈内投与され、60mgから1gまでの用量で、7~30日毎に1回投薬される。

50

【 0 0 2 5 】

例示的な一実施形態では、ポリペプチドダイマーは、静脈内投与され、60mgから1gまでの用量で、毎週投薬される。

【 0 0 2 6 】

別の例示的な一実施形態では、ポリペプチドダイマーは、静脈内投与され、60mgから1gまでの用量で、隔週投薬される。

【 0 0 2 7 】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドダイマーは、皮下投与され、60mgから600gまでの用量で、7～60日毎に1回投薬される。

【 0 0 2 8 】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドダイマーは、皮下投与され、60mgから600gまでの用量で、7～30日毎に1回投薬される。

【 0 0 2 9 】

例示的な一実施形態では、ポリペプチドダイマーは、皮下投与され、60mgから600gまでの用量で、毎週1回投薬される。

【 0 0 3 0 】

別の例示的な一実施形態では、ポリペプチドダイマーは、皮下投与され、60mgから600gまでの用量で、隔週で1回投薬される。

【 0 0 3 1 】

安全性

配列番号1のモノマーを含むポリペプチドダイマーは、単回用量として最大750mg、及び4週間にわたって毎週1回600mg投与される。プラセボ群を含む全ての処置群において有害事象がほとんど生じず、全て軽度又は中等度である、ポリペプチドの安全性プロファイルが好ましかった。有害事象の発生率又は頻度における明らかな用量関連の傾向は、観察されなかった。バイタルサイン、ECG又は臨床的化学パラメーターにおける明らかな用量関連の傾向も処置関連の変化もなかった。注入反応の3つの事象が生じ、全て、蕁麻疹及び腫脹等の皮膚症状を伴う軽度/中等度であり、いずれの続発症を起こすことなく迅速に消散した。

【 0 0 3 2 】

全体として、配列番号1のモノマーを含むポリペプチドダイマーは、4週間にわたって毎週1回最大600mg及び単回用量として最大750mgをi.v.投与した場合、安全で十分な忍容性を示した。

【 0 0 3 3 】

またヒトにおける配列番号1のモノマーを含むポリペプチドの潜在的リスクも、IL-6R又はIL-6を標的化する類似の化合物を調査する臨床研究を分析することによって、間接的に対処され得る。今日まで、IL-6又はIL-6Rのいずれかとの個々の任意の相互作用なしに、このポリペプチドダイマーと同じシグナル伝達経路を遮断する、即ち、IL-6/sIL-6R複合体を標的化及び中和してトランスシグナル伝達経路を阻害する、承認された化合物はない。しかし、IL-6受容体を標的化する化合物には経験がある。これらの化合物の1つはトシリズマブであり、これは、欧州及び米国において承認されている。トシリズマブは、可溶性及び膜結合型IL-6受容体の両方に特異的に結合し、sIL-6R及びmIL-6R媒介性のシグナル伝達を阻害することが示されている。

【 0 0 3 4 】

トシリズマブで処置したRA患者において最も一般的な報告された有害薬物反応(5%において生じる)は、上気道感染、上咽頭炎、頭痛、高血圧症及び増加したALTであった。最も重篤な有害薬物反応は、重篤な感染、憩室炎の合併症及び過敏症反応であった。好中球数及び血小板数における減少が、トシリズマブによる処置後に生じた。 $10^9/L$ を下回る好中球数における減少は、トシリズマブ8mg/kgプラス疾患修飾性抗リウマチ薬物(DMARD)で、患者の3.4%において生じた。 $ANC < 10^9/L$ を発生させた患者のおよそ半分が、治療の開始後8週間以内にそうなった。 $5 \times 10^8/L$ を下回る減少は、トシリズマブ8mg/kg及びDMARDを受

10

20

30

40

50

けている0.3%の患者において報告された。重症好中球減少症は、重篤な感染の増加したりリスクと関連し得るが、好中球の減少と重篤な感染の発生との間には、今日までのトシリズマブを用いた臨床試験において、明確な関連はない。注入の間に報告された事象は、主に、高血圧症のエピソードであり、注入の終了の24時間以内に報告された事象は、頭痛及び皮膚反応(発疹、蕁麻疹)であった。これらの事象は、処置制限的ではなかった。トシリズマブと関連し、処置中断を必要とする臨床的に顕著な過敏症反応が、対照及び非盲検臨床研究の間にトシリズマブで処置された3,778人の患者のうち合計13人(0.3%)において報告された。これらの反応は、トシリズマブの2回目から5回目の注入の間に、一般に観察された。主に憩室炎の病歴を有する患者における消化管穿孔が、トシリズマブの臨床試験及び市場流通後の両方において、稀な事象として報告されている。病因は不明であるが、RA患者は、上部GI管及び下部GI管の両方の穿孔について、一般に増加したリスクを有する(DMA RD治療とは関わりなく)。このリスクは、グルココルチコイド治療中の、NSAID中の、又は憩室炎の病歴を有するRA患者において最も高い。致死的なアナフィラキシーが、販売承認後に、トシリズマブによる処置の間に報告されている。RA患者は、交絡因子として他の背景疾患を有し得ることに留意すべきである。

10

20

30

40

50

【0035】

配列番号1のモノマーを含むポリペプチドダイマーは、そのクラスで第1の融合タンパク質であるので、異なる作用機構を有する異なるモノクローナル抗体産物との比較は、価値が限定的である。IL-6活性を完全に遮断する他の産物とは対照的に、このポリペプチドダイマーは、IL-6/sIL-6R複合体だけを妨害し、膜結合型IL-6経路をアクセス可能なままにすると考えられる。

【0036】

IL-6は、身体における免疫応答及び炎症応答への広い関与を有する。可溶性IL-6R及び膜結合型IL-6Rの両方が遮断される場合、感染及び他の免疫依存的疾患並びにあまり顕著でない炎症応答の増加したリスクが、潜在的にある。理論に束縛されることは望まないが、IL-6/sIL-6R複合体のみを標的化する配列番号1のモノマーを含むポリペプチドダイマーによる処置は、IBDにおける慢性腸炎症の永続化を予防し、古典的IL-6シグナル伝達によって活性化される急性期炎症応答を予防し、それによって、日和見感染のリスクを低下させると考えられる。しかし、それより上で古典的IL-6シグナル伝達が影響を受ける本発明のポリペプチドダイマーの濃度があるかどうかは、予測できなかった。したがって、驚くべきことに、本明細書のデータは、IL-6活性を標的化する他の処置と比較して、古典的IL-6シグナル伝達に対する影響がより少ないことを実証している。

【0037】

本明細書に提示されるデータに基づくと、本発明のポリペプチドダイマーの利点は、IL-6を阻害する他の化合物よりも、好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルに対してより少ない影響を有する可能性があることである。ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチドダイマーは、好中球数、血小板数及び/若しくはC反応性タンパク質のレベルを顕著には低下させない、又は健康な対象若しくはIL-6媒介性状態に罹患している患者における正常範囲を下回って好中球数、血小板数及び/若しくはC反応性タンパク質のレベルを低下させない。例えば、本明細書に記載される用量でのポリペプチドダイマーの投与は、好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルを、正常な生理学的範囲内に維持する。ある特定の実施形態では、好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルは、正常な生理学的範囲の下限よりも、50%、40%、30%、20%、15%、10%又は5%以下少ない。好中球数、血小板数及び/又はC反応性タンパク質のレベルの測定は、処置の直後、数日後のある日、処置の3日後、処置の1週間後、処置の2週間後、処置の1カ月後、処置の3カ月後、処置の6カ月後、又は処置の1年後に生じ得る。

【0038】

好中球数、血小板数及びC反応性タンパク質のレベルの決定は、当該分野で周知のあらゆるアッセイによって実施され得る。絶対好中球数(ANC)とも呼ばれる好中球数は、血液中に存在する好中球顆粒球の数の尺度である(例えば、Al-Gwaiz LA、Babay HH (2007)、

「The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections」、Med Princ Pract 16 (5): 344-7頁を参照のこと)。成人の男性及び女性におけるC反応性タンパク質についての正常な生理学的値は、0~5.00mg/L(例えば、比濁法による)である。好中球についての正常な生理学的値は、成人女性では、 $1.61 \sim 6.45 \times 10^9/L$ (絶対値、例えば、レーザーフローサイトメトリーによる)又は37.9~70.5%(計算値)であり、成人男性では、対応する値は、 $1.46 \sim 5.85 \times 10^9/L$ 及び38.2~71.5%である。血小板についての正常な生理学的値は、成人女性では、 $173 \sim 369 \times 10^9/L$ (例えば、高周波インピーダンス測定による)であり、成人男性では、対応する値は、 $155 \sim 342 \times 10^9/L$ である。

【0039】

10

本発明のポリペプチドダイマーは、好ましくは、ヒトにおいて、抗体(例えば、このポリペプチドダイマーに対する抗体)の形成を顕著には誘導しない。なおより好ましくは、抗体は、中和抗体ではない。ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチドダイマーに対する抗体は、処置された対象又は患者の5%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1%又は0.01%未満において、検出可能である。典型的には、検出限界は、およそ9ng/mL血清である。

【0040】

適応症

急性炎症では、IL-6は、肝臓において急性期応答を誘導し、急性期タンパク質、特にCRPのカスケードの放出をもたらすことが示されている。炎症の部位におけるアポトーシス好中球によって取り除かれるsIL-6Rと複合体を形成すること、及び得られたIL-6/sIL-6Rトランスシグナル伝達複合体の、内皮細胞上のシグナル伝達因子gp130への結合によって、IL-6は、単球走化性タンパク質(MCP)-1等のケモカインの発現を誘導し、単核細胞を攻撃する。これは、急性炎症の消散、及び適応免疫応答の開始をもたらす。したがって、急性炎症において、IL-6とsIL-6Rとの複合体は、炎症の初期の優勢に好中球性の段階と、炎症の消散も最終的にもたらす、より持続性の単核細胞流入との間での移行を支持する。

20

【0041】

例えば、クローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)、関節リウマチ(RA)又は乾癬における慢性炎症は、急性炎症期の消散を獲得した後に組織中で存続する、マクロファージ及びリンパ球等の単核細胞の存在と、組織学的に関連する。慢性炎症性疾患のモデルでは、IL-6は、継続的MCP-1分泌、血管増殖(angio-proliferation)、及びT細胞に対する抗アポトーシス機能の誘導を介して、傷害の部位における単核細胞蓄積に好都合な、有害な役割を有すると思われる。

30

【0042】

炎症性腸疾患(IBD)、即ちCD又はUCは、特定の病原体と無関係であると考えられる感受性個体の腸において生じる慢性炎症である。増加した腸透過性を伴う上皮粘膜障壁における変更は、管腔抗原に対する粘膜免疫系の増強された曝露をもたらし、患者における腸免疫系の不適切な活性化を引き起こす。炎症性サイトカインの継続的な過剰な放出を伴う粘膜CD4+Tリンパ球の制御不能な活性化は、病原性胃腸炎症及び組織損傷を誘導する。IBDの病理発生に關与する主要な活性化された免疫細胞は、腸T細胞及びマクロファージであるというコンセンサスがある。

40

【0043】

IL-6は、ヒトにおいて、IBDにおける中心的サイトカインであることが示されている。CD及びUCを有する患者は、対照と比較した場合、増加したレベルのIL-6を産生することが見出されており、IL-6レベルは、臨床的活性と相関する。CD患者は、血清中に、増加したレベルのsIL-6R、及び結果として、IL-6/sIL-6R複合体を有することも見出されている。CD及びUCを有する患者由来の外科的結腸検体から得られた粘膜固有層単核細胞は、CD4+T細胞及びマクロファージの両方が、対照と比較して増加した量のIL-6を産生したことを示した。sIL-6Rは、上昇したレベルのIL-6と関連する増加した産生を伴って、マクロファージ及び単核細胞の表面からの取り除きを介して放出されることが見出された。CDを有する患者では、粘膜T細胞は、STAT3、bcl-2及びbcl-xlの活性化を伴う、IL-6トランスシグナル

50

伝達の強い証拠を示した。IL-6トランスシグナル伝達の遮断は、T細胞アポトーシスを引き起こし、これは、IL-6/sIL-6R系が、CDにおいて、アポトーシスに対するT細胞の耐性を媒介することを示している。

【0044】

したがって、IBD患者では、炎症の永続化をもたらす、粘膜固有層における疾患促進性CD4+T細胞の獲得された蓄積は、抗アポトーシス性IL-6/sIL-6Rトランスシグナル伝達に決定的に依存する。IL-6/sIL-6R複合体に対して作用することによって、本明細書に開示されるポリペプチドダイマーは、CD及び他の炎症性疾患を処置する際に有用であると考えられる。

【0045】

したがって、本発明のポリペプチドダイマーは、IL-6媒介性状態を処置できる。IL-6媒介性状態には、炎症性疾患又はがんが含まれる。これに関して、本明細書に記載されるポリペプチド及び組成物は、炎症性疾患、例えば、若年性特発性関節炎、クローン病、大腸炎(例えば、放射線大腸炎、憩室性大腸炎、虚血性大腸炎、感染性大腸炎、セリアック病、自己免疫性大腸炎、又は結腸に影響を与えるアレルギーに起因する大腸炎を含む、IBDと関連しない大腸炎)、皮膚炎、乾癬、ブドウ膜炎、憩室炎、肝炎、過敏性腸症候群(IRS)、エリテマトーデス、腎炎、パーキンソン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症(MS)、アルツハイマー病、関節炎、関節リウマチ、喘息、並びに種々の心血管疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症及び血管炎を有する対象に投与され得る。ある特定の実施形態では、炎症性疾患は、糖尿病、痛風、クリオピリン関連周期熱症候群及び慢性閉塞性肺障害からなる群から選択される。

【0046】

好ましくは、炎症性疾患又はIL-6媒介性状態は、炎症性腸疾患であり、好ましくは、処置は、炎症性腸疾患の寛解を誘導する。好ましくは、炎症性腸疾患は、クローン病又は潰瘍性大腸炎であり、好ましくは、処置は、炎症性腸疾患の寛解を維持する。好ましくは、炎症性疾患又はIL-6媒介性状態は、関節リウマチ、乾癬、ブドウ膜炎又はアテローム性動脈硬化症である。好ましくは、炎症性疾患又はIL-6媒介性状態は、炎症性腸疾患と関連しない大腸炎であり、好ましくは、大腸炎は、放射線大腸炎、憩室性大腸炎、虚血性大腸炎、感染性大腸炎、セリアック病、自己免疫性大腸炎、又は結腸に影響を与えるアレルギーに起因する大腸炎である。

【0047】

炎症性腸疾患等の炎症性疾患について、処置は、状態の寛解、状態の寛解の維持、又は両方を含み得る。

【0048】

他の実施形態は、多発性骨髄腫、形質細胞白血病、腎細胞癌、カボジ肉腫、結腸直腸がん、胃(gastric)がん、黒色腫、白血病、リンパ腫、神経膠腫、多形神経膠芽腫、肺がん(非小細胞肺がん(NSCLC;腺癌及び扁平上皮癌の両方)が含まれるがこれらに限定されない)、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、形質細胞腫、肉腫、胸腺腫、乳房がん、前立腺がん、肝細胞癌、膀胱がん、子宮がん、膵がん、食道がん、脳がん、頭頸部がん、卵巣がん、子宮頸がん、精巣がん、胃(stomach)がん、食道がん、肝癌、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、T-ALL、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)及び慢性リンパ性白血病(CLL)、唾液腺癌(salivary carcinoma)又は他のがんを含むがこれらに限定されないがんを処置する方法、がんの重症度を低減させる方法、又はがんを予防する方法を提供する。

【0049】

本開示の更なる実施形態は、敗血症、骨吸収(骨粗鬆症)、悪液質、がん関連疲労、乾癬、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、メサングウム増殖性糸球体腎炎、高ガンマグロブリン血症、キャスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫及び自己免疫性インスリン依存型糖尿病からなる群から選択される疾患を処置する方法、疾患の重症度を低減させる方法、又は疾患を予防する方法を提供する。

【0050】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、用語「処置」、「処置する」及び「処置すること」とは、本明細書に記載される疾患若しくは障害、又はその1若しくは複数の症状を回復させること、それを軽減すること、その発病を遅延させること、又はその進行を阻害することを指す。一部の実施形態では、処置は、1又は複数の症状が発症した後に投与され得る。他の実施形態では、処置は、症状の非存在下で投与され得る。例えば、処置は、症状の発病の前に、感受性個体に投与され得る(例えば、症状の病歴の観点から及び/又は遺伝因子若しくは他の感受性因子の観点から)。処置は、例えば、それらの再発を予防する又は遅延させるために、症状が消散した後にも継続され得る。

【0051】

本発明のポリペプチドダイマーは、第2の活性剤と併せて投与され得る。第2の活性剤は、5-アミノサリチル酸、アザチオプリン、5-メルカプトプリン及びコルチコステロイドのうちの1又は複数であり得る。5-アミノサリチル酸、アザチオプリン、5-メルカプトプリン及びコルチコステロイドの投与のための投薬レジームは、当業者に周知である。

【0052】

これらのポリペプチドダイマーは、例えば、細胞において、モノマー、例えば、配列番号1を含むモノマーを発現させることによって、産生され得る。例示的な一実施形態では、配列番号1又は配列番号2をコードする核酸を含むベクターが、細胞中にトランスフェクトされる。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベル等の因子に依存し得る。哺乳動物宿主細胞発現のための調節配列には、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメント、例えば、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス(CMV)(例えば、CMVプロモーター/エンハンサー)、サルウイルス40(SV40)(例えば、SV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、ポリオーマに由来するプロモーター及び/又はエンハンサー、並びに強い哺乳動物プロモーター、例えば、ネイティブの免疫グロブリンプロモーター及びアクチンプロモーターが含まれる。この宿主細胞は、哺乳動物、昆虫、植物、細菌又は酵母細胞であり得、好ましくは、この細胞は、CHO細胞等の哺乳動物細胞である。

【0053】

トランスフェクトされた細胞は、所望のタンパク質を細胞に発現させるために培養される。次いで、細胞及び培養培地が収集され、ポリペプチドダイマーが、例えば、クロマトグラフィーカラム工程(例えば、MABSelect Sure、SP Sepharose、Capto Q)によって精製される。このダイマーはまた、濃縮され得、及び/又はウイルス低減/不活性化工程で処理され得る。次いで、得られたダイマーは、組成物、好ましくは、治療に有用な医薬組成物を調製するために使用され得る。

【実施例】

【0054】

(実施例1)

動物研究

(実施例1a)

マウス薬物動態

体重25~38gの54匹のマウス(27匹の雄性及び27匹の雌性)を含む4つの群は、i.v.(3mg/動物)注射又はs.c.(0.3、3及び30mg/動物)注射のいずれかによって、その活性ダイマー化形態(「ペプチド1」)での、配列番号1のポリペプチドの単回用量を受けた。

【0055】

バイオアベイラビリティは、およそ60%であり、明らかな用量直線性が、AUC、AUC_t及びC_{max}について観察された。8~24時間のt_{max}は、タンパク質について予測された通りであった。ペプチド1は、142mL/日/kgのクリアランスで、全身循環から緩徐に除去された。排出相(V_z)及び一次モーメント曲線(V_{ss})によって推定した分布容積は、それぞれ、397mL/kg及び284mL/kgであり、これは、ペプチド1が、血管床の外側に分布したことを示している。終末相半減期は、1.3~2.3日の範囲であった。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

(実施例1b)

ラット薬物動態

単回用量投与

ペプチド1の単回用量PKを、2つの異なる系統のラット、Sprague Dawley(8匹のラット/群)及びWistar(24匹のラット/群)において、i.v.投与及びs.c.投与の後に調査したところ、いくらか異なる結果が示された。クリアランス(それぞれ、57mL/kg/日及び93mL/kg/日)及び分布容積は、Sprague Dawleyラットにおいてより低いようであり、Wistarラットについてのおよそ30%と比較して、2倍高いバイオアベイラビリティ、60%であった。 T_{max} を、s.c.投与の0.5~1.5日後に観察し、終末相半減期は、1.7~2.7日の範囲で、およそ2日であり、2つの投与経路間には小さな差異のみが存在した。

10

【 0 0 5 7 】

反復用量投与

静脈内投与

ラット(n=18)は、2週間にわたって1週間に2回で、1回当たり10、30及び100mg/kgのi.v.ボラス用量を受けた。1回目の投与後の C_{max} 及びAUCにおける増加は、およそ用量直線的であるようであった。しかし、曝露は、全ての用量レベルにおいて、雌性よりも雄性において一貫してより高いようであった。1回当たり100mg/kgの群は、雄性ラットについて2100 µg/mLの C_{max} レベル、雌性ラットについて1740 µg/mLの C_{max} レベルに達した。AUCt値は、942日 × µg/mL及び642日 × µg/mLであった。

20

【 0 0 5 8 】

2週間後、ラットにおけるペプチド1への全身曝露は、10mg/kg用量群及び30mg/kg用量群について減少した。抗薬物抗体(ADA)応答が、研究の8週目までに全ての動物において確認されたので、経時的な予測された曝露における減少は、ペプチド1のADA媒介性クリアランスに帰せられ得る。

【 0 0 5 9 】

皮下投与

2週間及び4週間の反復用量s.c.研究では、1回目の投与後の C_{max} 及びAUCは、およそ用量直線的に増加するようであった。しかし、最後の用量において、著しくより低い薬物曝露が、おそらくは抗体形成に起因して見られ、試験した全ての動物が、ペプチド1に対する抗体を示した。

30

【 0 0 6 0 】

(実施例1c)

カニクイザル薬物動態

単回用量投与

ペプチド1の単回投与のPKを、0.1~100mg/kg s.c.(n=4)及び1.0mg/kg i.v.(n=4)の用量で、雄性及び雌性のカニクイザルにおいて調査した。バイオアベイラビリティは、s.c.投与後におよそ60%であり、6~24時間の t_{max} であった。クリアランスは98mL/日/kgであり、分布容積はおよそ70~90mL/kgであった。i.v.投与後に決定された半減期は0.68日であり、s.c.投与後に決定された半減期はおよそ1.5日であった。

40

【 0 0 6 1 】

反復用量投与

カニクイザルに、2週間にわたって毎週2回、2(n=4)、10(n=4)、50(n=2)又は100(n=2)mg/kgのペプチド1をs.c.投薬し、4週間にわたって毎週2回、10(n=4)、30(n=4)又は100(n=4)mg/kgのペプチド1をs.c.投薬した。 C_{max} 及びAUCを用いた曝露は、およそ用量直線的に増加し、より高い用量では、1回目の用量との最後の用量との間で、類似の曝露及び最大濃度が、2週間後に観察された。しかし、4週間後、最後に投与された用量は、おそらくは抗体形成に起因して、1回目の投与と比較してより低い薬物曝露を示した。ペプチド1の平均半減期は、異なる処置群において1回目の投与について1.0~1.8日の範囲であり、最後の投与後の半減期はより短かった。

50

【 0 0 6 2 】

(実施例2)

臨床試験000067(単回用量)

設計

これは、単回用量、プラセボ対照、単盲検、用量無作為化、並行群用量漸増試験であった。試験は2つのパートで実施し、パート1は健康な対象を含み、パート2は、臨床的寛解状態にあるCDを有する患者を含んでいた。その目的は、安全性及び忍容性を試験すること、並びに可能な場合には、ペプチド1の単回投与後の薬理学的効果の徴候を得ることであった。

【 0 0 6 3 】

パート1では、64人の対象が含まれ、そのうち48人(44人の男性、4人の女性)は積極的処置を受け、16人(全て男性)がプラセボを受けた。7つの用量を調査し、30分間(0.75mg、7.5mg、75mg)又は1時間(150mg、300mg、600mg及び750mg)にわたるi.v.注入として投与した。更に、6人の対象が、60mgのペプチド1のs.c.用量を受け、2人の対象が、プラセボのs.c.用量を受けた。ペプチド1を、25mMヒスチジン、200mMスクロース及び0.1mg/mLポリソルベート20中15mg/mLで投与した。

10

【 0 0 6 4 】

パート2では、24人の患者が含まれ、そのうち18人(11人の男性、7人の女性)は積極的処置(75mg、300mg及び750mg)を受け、6人(4人の男性、2人の女性)はプラセボを受け、全てi.v.で投与した。

20

【 0 0 6 5 】

結果

ペプチド1のi.v.投与後のPK評価により、0.75mgから750mgの範囲において、AUC及びC_{max}の両方について用量比例性が示され、血漿中のC_{max}濃度は、0.2 µg/mLから170 µg/mLまでの範囲であった(図3)。クリアランスはおよそ0.13L/時間であり、平均終末相半減期はおよそ4.5日であり、分布容積はおよそ20Lであり、後者は、いくらかの血管外分布を示した。60mgのペプチド1のs.c.投与は、2.3日で1.1 µg/mLのC_{max}を示し、5.0日の半減期を示した。ペプチド1のs.c.投与後のバイオアベイラビリティは、およそ50%であると計算された。標的媒介性薬物処分の指標はなかった。

【 0 0 6 6 】

寛解状態にあるCD患者への75、300及び750mgのi.v.投与は、健康な対象と非常に類似した結果を示した(図4)。AUC及びC_{max}は、16、76及び186 µg/mL(健康な対象については16、77及び161 µg/mL)のC_{max}濃度と用量比例的であった。クリアランスはおよそ0.13L/時間であり、平均終末相半減期はおよそ4.6日であり、分布容積はおよそ22Lであった。

30

【 0 0 6 7 】

プラセボ群を含む全ての処置群において有害事象がほとんど生じず、全て軽度又は中等度である、ペプチド1の安全性プロファイルが好ましかった。有害事象の発生率又は頻度における明らかな用量関連の傾向は、観察されなかった。注入を、2人の対象において、1人は軽度(パート1、300mg群)の注入反応に起因し、1人は中等度(パート2、75mg群)の注入反応に起因して、中断した。

40

【 0 0 6 8 】

バイタルサイン、ECG又は臨床的化学パラメーター(好中球数、血小板数又はC反応性タンパク質レベルが含まれる)には、明らかな用量関連の傾向も処置関連の変化もなかった。

【 0 0 6 9 】

300mg群中の1人の健康な対象は、投与の5~6週間後の追跡来診において、非中和性の、処置により発生した抗ペプチド1抗体を示した。

【 0 0 7 0 】

全体として、ペプチド1は、単回のi.v.用量として最大750mgを静脈内投与した場合、及び単回のs.c.用量として60mgを投与した場合、安全で十分な忍容性を示した。

50

【 0 0 7 1 】

(実施例3)

臨床試験000115(複数の漸増用量)

設計

これは、ペプチド1の複数の漸増用量の安全性、忍容性及び薬物動態を調査することを目的とした、プラセボ対照、二重盲検、用量群内無作為化、並行群試験であった。調査した用量は、30分間(75mg)又は1時間(300mg及び600mg)にわたってi.v.注入によって4週間にわたって1週間に1回投与した、75、300及び600mgのペプチド1であった。

【 0 0 7 2 】

24(24)人の健康な対象が含まれ、そのうち18人(11人の男性及び7人の女性)は積極的処置を受け、6人(2人の男性及び4人の女性)はプラセボを受けた。

10

【 0 0 7 3 】

結果

PK評価により、1回目の処置日及び最後の処置日に、単回用量研究における結果と類似した、非常に近い特徴が示された。AUC及びCmaxは、1回目の用量後に19、78及び148 $\mu\text{g/mL}$ のCmax濃度、並びに4回目の用量後に19、79及び142 $\mu\text{g/mL}$ のCmax濃度で、1回目及び4回目の投薬後に、用量比例的であった(健康な対象では、単回用量について16、77及び161 $\mu\text{g/mL}$;図5)。対応するトラフ値は、3つの用量レベルについて、0.66、2.68、4.56 $\mu\text{g/mL}$ 並びに0.98、3.95及び7.67 $\mu\text{g/mL}$ であった。最後の用量後に計算された平均終末相半減期は、およそ5.5日であった。

20

【 0 0 7 4 】

プラセボ群を含む全ての処置群において有害事象がほとんど生じず、全て軽度又は中等度である、ペプチド1の安全性プロファイルが好ましかった。有害事象の発生率又は頻度における明らかな用量関連の傾向は、観察されなかった。1人の対象(600mg群)は、軽度の注入反応に起因して休薬させた。

【 0 0 7 5 】

バイタルサイン、ECG又は臨床的化学パラメーター(好中球数、血小板数又はC反応性タンパク質レベルが含まれる)には、明らかな用量関連の傾向も処置関連の変化もなかった。

【 0 0 7 6 】

抗ペプチド1抗体は、いずれの対象においても検出されなかった。

30

【 0 0 7 7 】

全体として、ペプチド1は、4週間にわたって毎週1回最大600mgをi.v.投与した場合、安全で十分な忍容性を示した。

【 0 0 7 8 】

(実施例4)

薬物動態データのモデル化

000115試験からのPKデータは、2-コンパートメント構造のモデルを使用して適切に記述され得る。75、300及び600mgのペプチド1の予測されたプロファイル並びに観察されたデータを図6中に示し、推定された平均PKパラメーターをTable 1(表1)中に列挙する。

40

【 0 0 7 9 】

【表 1】

Table 1 2-コンパートメント構造の薬物動態モデルを使用したペプチド1についてのモデル推定値

パラメーター	推定値	SE	CV%
V	1.7 L	0.08	4.8
V2	8.8 L	0.32	3.6
CL	3.2 L/日	0.06	1.8
CL2	16.4 L/日	0.24	14.4

10

【0080】

ペプチド1は、ヒトにおいて、IL-6/sIL-6R複合体への130pMの結合親和性を有する。75～600mgの用量で、占有レベルは、結合親和性(KD;130pM)及びIL-6/sIL-6Rレベル(C_{target} ;sIL-6Rに基づいて2.0nM)を使用して、ペプチド1の推定された定常状態レベルにおいて、90%超である。

【0081】

(実施例5)

ペプチド1の調製

CHO/dhfr⁻細胞におけるペプチド1のクローニング及び発現

20

CHO/dhfr⁻細胞は、European collection of cell cultures(ECACC、番号9406067)から得た。接着性CHO/dhfr⁻細胞は、葉酸のジヒドロ葉酸への還元、次いで、テトラヒドロ葉酸への還元を触媒する酵素、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)が欠損している。したがって、CHO/dhfr⁻細胞は、葉酸代謝拮抗薬物、メトトレキサート(MTX)に対する感受性を示す。

【0082】

このCHO/dhfr⁻細胞株は、十分に特徴付けられ試験される。ヒト使用のためのバイオ医薬品の産生のための細胞基質としてのCHO/dhfr⁻親細胞株の安全性は、21 CFRに従って微生物無菌性、マイコプラズマ及び外来性ウイルスについてECACC(Porton Down、UK)が確認した。

30

【0083】

cDNA配列の選択及び構築

ペプチド1(配列番号1のポリペプチド配列)のモノマーのcDNA配列は、gp130の細胞外ドメイン(IL6ST、NCBI遺伝子ID 3572、転写物バリエーション1(NP_002175)、アミノ酸23～617)及びヒトIgG1のFcドメイン(IGHG1、NCBI遺伝子ID 3500、Kabat EU番号付けに従ってアミノ酸221～447)の配列を使用して、GeneArt AG社(Regensburg、Germany)が、単一のDNA断片として合成した。配列を、CHO細胞における最適なコドン使用に向けて最適化した。3つの十分に特徴付けられた点変異を、Fc部分の下部ヒンジ領域中に導入した。

【0084】

元のgp130シグナルペプチドを、CHO細胞発現系における既知の効力のマウスIgG重鎖シグナルペプチドで置き換えることによって、cDNA配列を更に改変した。このシグナルペプチドは、タンパク質合成の間に切断される。Fc領域中のIgG1 Cys-Pro-Pro-Cys配列の存在は、Fc領域上のスルフヒドリル残基を介した、一緒になってペプチド1を形成する2つの同一のgp130-Fcサブユニットのダイマー化を生じる。

40

【0085】

図7は、ペプチド1の形成に使用したgp130-Fcサブユニットのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

【0086】

マスター細胞バンク(MCB)の選択のための発現プラスミドの構築

モノマーcDNAを、以下のように、MTXを用いたトランスフェクタント選択のために、dhf

50

r遺伝子を含むpANTVhG1発現ベクター(Antitope社)中にクローニングした。第1に、発現ベクターをMluI及びEagI制限酵素で消化して、ペプチド1のcDNAの挿入を可能にした。第2に、モノマーコード領域を、OL1425及びOL1426プライマー(Table 2(表2))を使用してPCR増幅し、MluI及びEagI制限酵素を用いて消化した。第3に、消化された断片をゲル精製し、一緒にライゲーションして、pFER02発現ベクターを生成した。モノマーcDNAを、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下に挿入した。

【0087】

Table 3(表3)は、pFER02発現エレメントの機能を示す。図8は、pFER02発現エレメントのヌクレオチド配列を示す。

【0088】

【表2】

Table 2 pANTVhG1 中へのクローニングのためにモノマーコード領域を増幅するために使用したオリゴヌクレオチド配列

プライマー	配列(5'-3')*
OL1425	ctgttgctacgcgtgtccactccGAGCTGCTGGATCCTTGCGGC
OL1426	gcgggggcttgccggccgtggcactcaCTTGCCAGGAGACAGAGACAG

*モノマー1 特異的配列を大文字で示し、ベクター特異的配列を小文字で示し、制限部位に下線を付す。

【0089】

【表3】

Table 3 pFER02 発現エレメント

特色	機能
CMV プロモーター	最初期プロモーター/エンハンサー。組換えタンパク質の効率的な高レベル発現を可能にする
hIgG1 ポリ A	ヒト IgG ポリアデニル化配列
アンピシリン耐性遺伝子(β -ラクタマーゼ)	大腸菌(E. coli)におけるベクターの選択
SV40 初期プロモーター及び起源	ネオマイシン耐性遺伝子の効率的な高レベル発現及びSV40 ラージ T 抗原を発現する細胞におけるエピソーム複製を可能にする
DHFR	CHO dhfr-細胞における安定なトランスフェクタントの選択
SV40 ポリアデニル化シグナル	効率的な転写終結及び mRNA のポリアデニル化

【0090】

最終的なペプチド1産生性クローンをもたらす細胞株選択プロセス

pFER02ベクターを、ベータ-ラクタマーゼ遺伝子中に位置する単一の認識部位を有する平滑末端制限酵素SspIを用いて直鎖化した。直鎖化したプラスミドを、脂質媒介性トラン

10

20

30

40

50

スフェクションを使用して、 5×10^6 のCHO/dhfr⁻細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクション後の24時間に、トランスフェクトされた細胞を、5%透析済胎仔ウシ血清(FCS)及び100nMメトトレキサート(MTX)を補充した培地中で選択した。トランスフェクトされた細胞を、種々の密度でこの培地中に希釈し、96ウェル平底組織培養プレート中に分配した。次いで、細胞を、5% CO₂及び37℃で加湿雰囲気中でインキュベートした。新鮮なMTX選択培地を、インキュベーション時間の間一定の間隔で添加して、MTXレベル及び栄養素レベルが一定のままであることを確実にした。

【0091】

MTX選択を用いた初期細胞株選択

トランスフェクション後数週間にわたって、組織培養プレートを、Genetix CloneSelect(登録商標)Imagerを使用して試験し、>2,000のウェルが、活発に成長しているコロニーを有することが観察された。これらのウェルからの上清をサンプリングし、ELISAによってペプチド1の力価についてアッセイした。このアッセイの結果に基づいて、合計105の最良の発現ウェルを、48ウェルプレート中に拡大増殖させた。合計83の細胞株を、6ウェルプレート又はT-25フラスコ中への拡大増殖のために選択し、これらの細胞株の各々からの上清をサンプリングし、ペプチド1の力価についてアッセイした(ELISA)。これらの結果に基づいて、54の、最適な成長特徴を有する最良の発現細胞株を、T-75又はT-175フラスコ中への拡大増殖のために選択し、コンフルエントなフラスコからの上清をサンプリングし、ペプチド1の力価を定量した(ELISA)。細胞株間の発現レベルの比較により、生産性分析のために選択された38の最良の細胞株の同定が可能になった。生産性を以下のように評価した。

生産性(pg/細胞/日) = $((Th - Ti) / ((Vh + Vi) / 2)) / \text{時間}$
式中、

Thは、回収力価[μg/mL]であり、

Tiは、初期力価[μg/mL]であり、

Vhは、回収時の生存細胞数[$\times 10^6$ 細胞/mL]であり、

Viは、初期生存細胞数[$\times 10^6$ 細胞/mL]であり、

時間は、TiとThとの間の経過時間(日)である。

生産性結果(pg/細胞/日)に基づいて、13の細胞株を、遺伝子増幅のために選択した。

【0092】

ペプチド1細胞株選択のためのMTX駆動性遺伝子増幅

13の選択された細胞株を、漸増濃度のMTX(0.1~50M)の下での選択圧による第1ラウンドの遺伝子増幅のために選択した。7~10日後、13の細胞株の各々由来の各ウェルからの上清をサンプリングし、ペプチド1の力価についてアッセイした(ELISA)。高いペプチド1発現レベルを有する各細胞株由来のウェルを、生産性(pg/細胞/日)について評価した。第2ラウンドの遺伝子増幅を、生産性における顕著な増加を示した細胞株由来の合計16のウェルで開始した。

【0093】

第2ラウンドの遺伝子増幅を、増加したMTX濃度の存在下で実施し、各培養物からの上清をペプチド1の力価についてアッセイした(ELISA)。各細胞株由来の選択されたウェルを拡大増殖させ、生産性を評価した(pg/細胞/日)。増加したMTX選択圧にตอบสนองして増加した生産性を有する5つの細胞株を同定した。これら5つの細胞株を、増加したMTX濃度の下での選択圧を使用する第3ラウンドの遺伝子増幅に進めさせ、各ウェルからの上清をペプチド1の力価についてアッセイした(ELISA)。各細胞株について選択されたウェルを拡大増殖させ、生産性(pg/細胞/日)を評価し、高いペプチド1発現を実証している5つの細胞株を選択した。

【0094】

クローンの限界希釈

限界希釈クローニングを、ペプチド1発現を実証している5つの細胞株に対して実施した。1週間のインキュベーション後、Genetix CloneSelect(登録商標)Imagerを使用してプレ

ートを試験し、シングルコロニーを同定した。希釈クローニングの間の2つの細胞株の成長速度は、特に緩徐であることが注目されたので、これらの細胞株は中断した。合計して、3つの残りの細胞株から、58のクローン性コロニーを、最初に48ウェルプレート中への拡大増殖のために選択し、次いで、MTXの非存在下で、12ウェルプレート、T-25フラスコ及びT-75フラスコを通じて連続的に拡大増殖させた。次いで、58の選択されたクローンの各々を、生産性(pg/細胞/日)について評価し、16のクローンを、懸濁適応及び既知組成培地における成長への適応のために選択した。

【0095】

既知組成培地における懸濁培養への細胞株の適応

これら16の細胞株を、以下のように、既知組成培地中での懸濁培養に適応させた。接着培養物中の選択された細胞株を、CHO懸濁成長培地(L-グルタミン及びビルビン酸ナトリウム、5%透析済FCS、20mg/L L-プロリン、1×ペニシリン/ストレプトマイシン、1% pluronic F68を含むDMEM高グルコース)中での懸濁、次いで、既知組成懸濁成長培地(Life Technologies Ltd.社(Paisley, UK)からのCD Opti-CHO(登録商標)、2.5%透析済FCS、0.1×ペニシリン/ストレプトマイシン、8mM Glutamax(登録商標))中での懸濁の両方に、最初に適応させた。

10

【0096】

懸濁培養に適応したところで、細胞株を、段階的に、無血清既知組成懸濁成長培地(CD Opti-CHO(登録商標)、0.1×ペニシリン/ストレプトマイシン、8mM Glutamax(登録商標))中に切り離した。MTXを、全ての懸濁培養物から取り除いた。適応した株を拡大増殖させ、種細胞バンクを調製した。簡潔に述べると、細胞を、300mLの総容積に拡大増殖させ、細胞密度が 0.85×10^6 細胞/mLを超え、生存率が>90%になったときに回収した。更なる 3×10^7 細胞を、成長及び生産性分析のために、70mLの懸濁成長培地を含有する新たなフラスコ中に播種した。残りの細胞を、遠心分離によって回収し、適切な容積の凍結培地中に再懸濁して、 1×10^7 細胞/mLの細胞懸濁物を得た。バイアルを、-80℃まで下げて凍結させた。次いで、細胞バンクを、長期貯蔵のために液体窒素に移した。

20

【0097】

16の細胞株を、無血清適応後に5つのクローンにまで更に精練した。5つのクローンを、成長(細胞密度及び細胞倍加時間)及び生産性(pg/細胞/日)について評価し、その後、3つのクローンを選択した。1つのクローンを選択して、マスター細胞バンクを作製した。

30

【0098】

マスター細胞バンク(MCB)及び作業細胞バンク(WCB)の調製を実施した。事前播種ストック由来の1バイアルを、200バイアルのMCBの調製のために使用し、1バイアルのMCBを、200バイアルのWCBを調製するために使用した。各場合において、バイアルを解凍し、凍結保存培地を遠心分離によって除去した。細胞を再懸濁し、成長培地(CD OptiCHO(登録商標)/4mM L-グルタミン)中の容積において増殖させた。4回の継代をMCBの創出の間に実施し、6回の継代をWCBの創出の間に実施した。

【0099】

十分な細胞を得たときに、細胞を、凍結保存培地(92.5% CD OptiCHO(登録商標)/7.5% DMSO)中でポリプロピレンバイアル(各々、およそ 1.5×10^7 の生存細胞を含有する)中にアリコート化し、漸進的凍結プロセスで少なくとも60分間の期間にわたって-100℃まで温度を低下させることによって凍結保存した。バイアルを、GMP制御されたエリアにおいて、気相液体窒素自動充填コンテナ中に貯蔵する。

40

【0100】

薬物物質(DS)製造プロセスの記載

ペプチド1 DS製造プロセスの簡潔な説明は以下のとおりである。WCBバイアルからの細胞を生き返らせ、産生バイオリアクター中への接種の前に、無タンパク質培地を使用して進行性に拡大増殖させた。細胞培養の完了の際に、細胞及び細胞デブリを、培養物の濾過によって除去する。

【0101】

50

精製は、3つのクロマトグラフィーカラム工程(MAbSelect Sure、SP Sepharose、Capto Q又はSartobind Phenyl)、濃縮及びダイアフィルトレーション工程からなり、これは、2つの特異的ウイルス低減/不活性化工程;Triton X-100(エンベロープ型ウイルスの不活性化)処理及びナノ濾過工程(エンベロープ型ウイルス及び非エンベロープ型ウイルスの除去)を含む。

【 0 1 0 2 】

濃縮及びダイアフィルトレーションの後、賦形剤を、DSの配合のために添加する。配合されたペプチド1を、コンテナ中に0.22 µm濾過する。

【 0 1 0 3 】

薬物製品(DP)の説明及び組成物

10

DPは、i.v. 注入によって投与される無菌溶液である。DPは、25mM L-ヒスチジン、200mM スクロース及び0.1mgポリソルベート20/mLを含有するpH7.6の等張溶液中15mg/mLの濃度のペプチド1からなる。バイアルは、酸化に対する保護のために窒素でオーバーレイする。製品は、単回使用のために意図され、臨床的投与のための解凍まで、-20 で貯蔵される。

【 0 1 0 4 】

組成物及びバッチ配合物

薬物製品のためのバッチ配合物を、Table 4(表4)に示す。

【 0 1 0 5 】

【 表 4 】

20

Table 4 DP バッチ組成物

成分	量	品質標準
ペプチド1	720 g	Ferring 社仕様書
L-ヒスチジン	186.18 g	欧州薬局方/米国薬局方*
スクロース	3286.08 g	欧州薬局方/米国薬局方*
ポリソルベート 20	4.8 g	欧州薬局方/米国薬局方*
WFI	49536g まで	欧州薬局方/米国薬局方*
水酸化ナトリウム	適量	欧州薬局方/米国薬局方*
窒素	適量	欧州薬局方/米国薬局方*

*現行版

30

【 0 1 0 6 】

配列表

配列番号1

Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser Pro Val Val

1 5 10 15

40

Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys

20 25 30

Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn

35 40 45

His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala

50

50

55

60

Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr
 65 70 75 80

Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile
 85 90 95

10

Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys Pro Lys Asn Leu Ser Cys
 100 105 110

Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys Glu Trp Asp Gly Gly Arg
 115 120 125

Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ser Glu Trp Ala Thr
 130 135 140

20

His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg Asp Thr Pro Thr Ser Cys
 145 150 155 160

Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val Asn Ile Glu Val Trp Val
 165 170 175

30

Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr Ser Asp His Ile Asn Phe
 180 185 190

Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro Pro His Asn Leu Ser Val
 195 200 205

Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu Lys Leu Thr Trp Thr Asn
 210 215 220

40

Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg
 225 230 235 240

Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile Pro Pro Glu Asp Thr Ala
 245 250 255

50

Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp Leu Lys Pro Phe Thr Glu
 260 265 270

Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu Asp Gly Lys Gly Tyr Trp
 275 280 285

Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Glu Asp Arg Pro
 290 295 300

10

Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile Asp Pro Ser His Thr Gln
 305 310 315 320

Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys Thr Leu Pro Pro Phe Glu
 325 330 335

20

Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val Thr Leu Thr Arg Trp Lys
 340 345 350

Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala Thr Lys Leu Thr Val Asn
 355 360 365

Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Thr Val Arg Asn Leu Val
 370 375 380

30

Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile Pro Ala Cys Asp Phe Gln
 385 390 395 400

Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala Phe Pro Lys Asp Asn Met
 405 410 415

40

Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu Ser Val Lys Lys Tyr Ile
 420 425 430

Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala Pro Cys Ile Thr Asp Trp
 435 440 445

Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr Tyr Leu Arg Gly Asn Leu

50

450

455

460

Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val Thr Pro Val Tyr Ala Asp
 465 470 475 480

Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Lys Gln Ala Pro
 485 490 495

10

Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys Lys Val Gly Lys Asn Glu
 500 505 510

Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val Asp Val Gln Asn Gly Phe
 515 520 525

Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr Ile Ile Gly Asn Glu Thr
 530 535 540

20

Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Leu
 545 550 555 560

Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met Ala Ala Tyr Thr Asp Glu
 565 570 575

30

Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 580 585 590

Gln Gly Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 595 600 605

Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 610 615 620

40

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 625 630 635 640

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 645 650 655

50

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 660 665 670

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 675 680 685

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 690 695 700

10

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 705 710 715 720

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 725 730 735

20

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 740 745 750

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 755 760 765

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 770 775 780

30

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 785 790 795 800

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 805 810 815

40

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 820

配列番号2

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
 1 5 10 15

50

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
 20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
 35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
 50 55 60

10

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
 65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
 85 90 95

20

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
 100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
 115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
 130 135 140

30

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
 165 170 175

40

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
 180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
 195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
 210 215 220

50

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
 245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
 260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
 275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
 290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
 325 330 335

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val
 355 360 365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala
 370 375 380

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu
 385 390 395 400

Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile
 405 410 415

10

20

30

40

50

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala
 420 425 430

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu
 435 440 445

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala
 450 455 460

10

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr
 465 470 475 480

Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val
 485 490 495

20

Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala
 500 505 510

Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys
 515 520 525

Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
 530 535 540

30

Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
 545 550 555 560

Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
 565 570 575

40

Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
 580 585 590

Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
 595 600 605

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 610 615 620

50

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 625 630 635 640

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 645 650 655

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 660 665 670

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 675 680 685

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 690 695 700

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 705 710 715 720

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 725 730 735

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 740 745 750

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 755 760 765

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 770 775 780

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 785 790 795 800

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 805 810 815

10

20

30

40

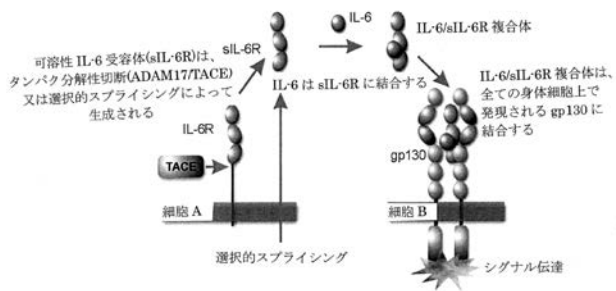
50

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 820 825 830

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 835 840

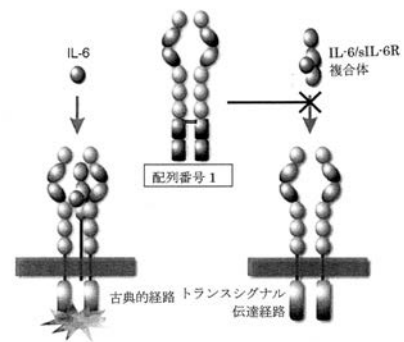
【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】

FIG. 2



【 図 3 】

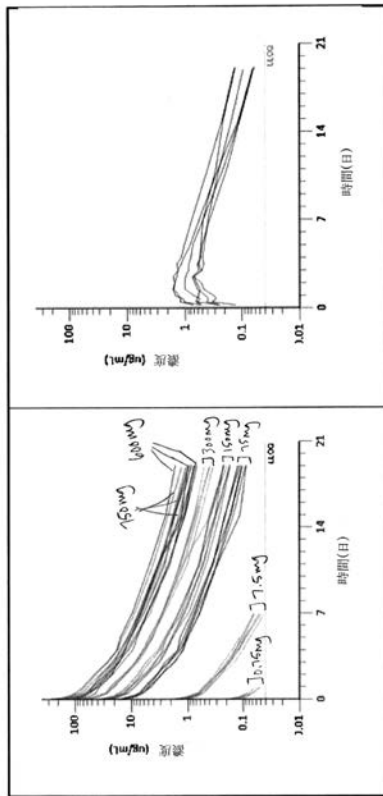


FIG.3

【 図 4 】

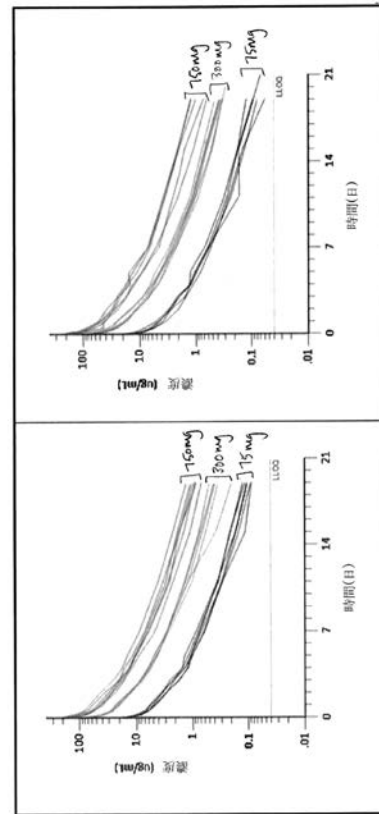


FIG.4

【 図 5 】

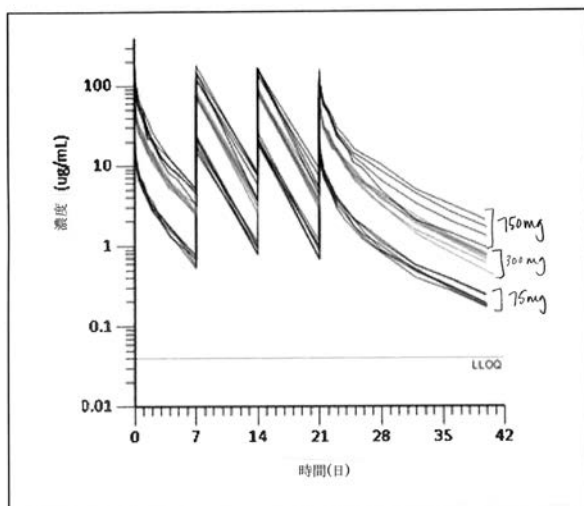


FIG.5

【 図 6 】

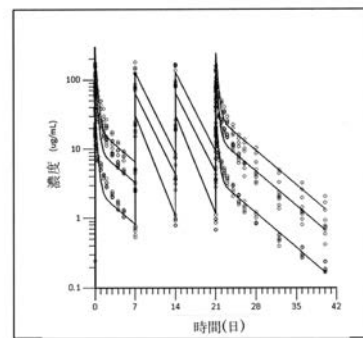


FIG. 6

【図 8 B】

断片:SV40 プロモーター
供給源:サルウイルス 40
プラスミド位置:5406~5761
機能:哺乳動物発現プロモーター
配列:
CACGAGGCCCTATTGATTATTGACTAGCTAGTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCC
AGGCTCCCCAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAG
TCCCCAGGCTCCCGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGTCCC
GCCCCAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACT
AATTTTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GTTTTTTGGAGGCCT

断片:ジヒドロ葉酸レダクターゼコード配列
供給源:サイトメガロウイルス
プラスミド位置:5794~6357
機能:CHO dhfr-細胞における選択
配列:
ATGGTTCGACCATTGAACGTCATCGTCGCCGTGTCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCG
ACCGTGGCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAAG
GTAAACAGATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTCTCCATTCTGAGAGAAGATCGACCTTTA
AAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACGAGGAGCTCATTTCITGTC
CAAAAGTTTGGATGATGCCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTT
GGATAGTTCGAGGCAGTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTG
ACAAGGATCATCGAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTGGGGGAAATATAAACT
TCTCCAGAAATACCGAGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAGGCATCAAGTATAAGTTGAAG
TCTACGAGAAGAAAGACTAA

断片:SV40 ポリ
供給源:サルウイルス 40
プラスミド位置:6358~6680
機能:ポリアダニル化配列
配列:
CAGGAAGATGCTTCAAGTCTCTGCTCCCTCTTAAAGCTATGCATTTTATAAGACCATGGGACTTT
TGCTGGCTTTAGATCATAATCAGGCATACCACATTGTAGAGGTTTACTTGCTTTAAAAACCTCCCA
CAGCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTGTGTGTAACCTGTTATTGCAGCTTCT
AATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCAATCTAGT
TGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGG

FIG. 8 (continued)

【配列表】

2017537155000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/002459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/20 C07K14/715
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GEORG H WAETZIG ET AL: "Hitting a complex target: an update on interleukin-6 trans-signalling", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, vol. 16, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 225-236, XP055266191, UK ISSN: 1472-8222, DOI: 10.1517/14728222.2012.660307 page 226 - page 227; table 2 ----- -/-	1-23

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

* Special categories of cited documents:

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

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2016

Date of mailing of the international search report

11/05/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vollbach, Silke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/002459

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TENHUMBERG STEPHANIE ET AL: "Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 40, October 2008 (2008-10), pages 27200-27207, XP002756654, ISSN: 0021-9258 page 27200 - page 27202 -----	1-23
X	EP 1 148 065 A1 (ROSE JOHN STEFAN [DE]) 24 October 2001 (2001-10-24) claims 1-10 -----	1-23
A	J. SOMMER ET AL: "Alternative Intronic Polyadenylation Generates the Interleukin-6 Trans-signaling Inhibitor sgp130-E10", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 32, 8 August 2014 (2014-08-08), pages 22140-22150, XP055265169, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.560938 abstract -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/002459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1148065	A1	24-10-2001	AT 382636 T 15-01-2008
			CY 1107380 T1 19-12-2012
			DE 60037648 T2 17-06-2010
			DK 1148065 T3 28-04-2008
			EP 1148065 A1 24-10-2001
			ES 2298106 T3 16-05-2008
			PT 1148065 E 03-04-2008
			SI 1148065 T1 30-06-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/606 (2006.01)	A 6 1 K 31/606	
A 6 1 K 31/52 (2006.01)	A 6 1 K 31/52	
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
	A 6 1 P 3/06	
	A 6 1 K 38/17	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ニクラス・アクセル・ペトリ

デンマーク・2 3 0 0・コペンハーゲン・カイ・フィスカース・プラッツ・1 1

Fターム(参考) 4C076 EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA07 AA19 BA01 BA22 BA44 CA53 DC50 MA55
 MA66 NA14 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA451 ZA452 ZA511 ZA512
 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962 ZA971 ZA972 ZB051 ZB052
 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB351 ZB352
 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412 ZC541 ZC542 ZC751 ZC752
 4C086 AA01 AA02 CB07 DA11 DA17 MA02 MA04 MA07 MA55 MA66
 NA14 ZA33 ZA36 ZA45 ZA51 ZA81 ZA89 ZA96 ZA97 ZB05
 ZB11 ZB15 ZB26 ZB27 ZB35 ZC35 ZC41 ZC54 ZC75
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 EA29
 FA72 FA74 GA21