

(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2017-518748

(P2017-518748A)

(43) 公表日 平成29年7月13日(2017.7.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-568907 (P2016-568907)  
 (86) (22) 出願日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月10日 (2017. 1. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/061034  
 (87) 国際公開番号 W02015/177175  
 (87) 国際公開日 平成27年11月26日 (2015. 11. 26)  
 (31) 優先権主張番号 14169488.5  
 (32) 優先日 平成26年5月22日 (2014. 5. 22)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509029645  
 ビエリス ファーマシューティカルズ ゲー  
 ムーエムペーハー  
 ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジ  
 ングーヴァイエンステファン リゼーマイ  
 トネルーストラッセ 3 0  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的結合ポリペプチドおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、Swiss Prot Q16552である標的に対する新規な特異的結合性の治療用および / または診断用ポリペプチド、ならびにSwiss Prot Q9NPF7である標的に対する新規な特異的結合性の治療用および / または診断用ポリペプチドに関する。加えて、本発明は、Swiss Prot Q16552およびSwiss Prot Q9NPF7の一方または両方に対する新規な特異的結合性の治療用および / または診断用ポリペプチドに関する。本発明は、該ポリペプチドをコードする核酸分子ならびに該ポリペプチドおよび核酸分子を生成するための方法にも関する。加えて、本発明は、ポリペプチドを含む組成物ならびにこれらのポリペプチドの治療的および / または診断的使用に指向する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

本質的に実施例1に記載されるアッセイにおいて測定される場合、IL-17Aに約1nM以下の $K_D$ で結合するリポカリンムテインを含む、IL-17Aおよび/またはIL-23p19に対する結合特異性を有するポリペプチド。

## 【請求項 2】

リポカリンムテインが、本質的に実施例3に記載される競合ELISA様式において、IL-17Aのその受容体IL-17RAに対する結合を約100pM以下のIC50値で阻害することが可能である、請求項1記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

リポカリンムテインが、IL-17Aのその受容体IL-17RAに対する結合を阻害することが可能であり、かつ該リポカリンムテインが、本質的に実施例5に記載されるアッセイにおいて測定される場合、(i)第1のサブユニットとしてSEQ ID NO:53または55、および(ii)第2のサブユニットとしてSEQ ID NO:54または56を含むポリペプチドの平均EC50値と少なくとも同じくらいまたはそれよりも優れた平均EC50値を有する、請求項1または2記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

リポカリンムテインが、ヒトIL-17A、カニクイザルIL-17A、およびキヌザルIL-17Aと交差反応性である、前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

リポカリンムテインが、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO: 41) の配列位置26~33、56、58、60~61、64、92、101、104~106、108、111、114、および153に以下の1つまたは複数の変異アミノ酸残基を含む、前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチド: Arg26 Phe; Glu27 Trp1; Phe28 Cys; Pro29 Ser; Glu30 Gly; Met 31 Ile; Asn32 His; Leu33 Glu; Leu56 Asp; Ser58 Glu; Arg60 Phe; Cys61 Leu; Val64 Phe; His92 Arg; Cys101 Ser; Glu104 Asp; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108の欠失; Arg111 Pro; Lys114 Trp; およびCys153 Ser。

## 【請求項 6】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列に対して少なくとも75%同一の配列相同性を有する、前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチド。

## 【請求項 8】

IL-17Aの結合がその診断に有用である、疾患または障害の診断における使用のための、前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチド。

## 【請求項 9】

i. ポリペプチドを、IL-17Aを含有する疑いのある試験試料に、適切な条件下で接触させることにより、該ポリペプチドとIL-17Aまたはそのドメインもしくはフラグメントとの間の複合体の形成を可能にすること、および

ii. 適切なシグナルにより該複合体を検出することを含む、IL-17Aの検出のための前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 10】

i. ポリペプチドを、IL-17Aを含有すると推定される試料に、適切な条件下で接触させることにより、該ポリペプチドとIL-17Aまたはそのドメインもしくはフラグメントとの間の複合体の形成を可能にすること、および

ii. 該試料から該複合体を分離することを含む、IL-17Aの分離のための前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 11】

前記請求項のいずれか一項記載のポリペプチドを含む、診断キットまたは分析キット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2】

試料を、請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドに、ムテインとIL-17Aとの複合体の形成を可能にする条件下で接触させる段階を含む、試料中のIL-17Aの存在を検出する方法。

## 【請求項 1 3】

対象におけるIL-17Aの結合のための、請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 1 4】

対象に、請求項1~7のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドの有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-17Aを結合させる方法。

10

## 【請求項 1 5】

対象に、請求項1~7のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドの有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-17Aのその受容体に対する結合を阻害するための方法。

## 【請求項 1 6】

本質的に実施例6または実施例13に記載されるアッセイにおいて測定される場合、約1nM以下の $K_D$ でIL-23p19に結合するリポカリンムテインを含む、IL-17Aおよび/またはIL-23p19に対する結合特異性を有するポリペプチド。

## 【請求項 1 7】

リポカリンムテインが、本質的に実施例8または実施例14に記載される競合ELISA様式において、IL-23のその受容体IL-23Rに対する結合を約0.55nM以下のIC50値で阻害することが可能である、請求項16記載のポリペプチド。

20

## 【請求項 1 8】

リポカリンムテインが、IL-23のその受容体IL-23Rに対する結合を阻害することが可能であり、かつ該リポカリンムテインが、本質的に実施例10に記載されるアッセイにおいて測定される場合、(i)第1のサブユニットとしてSEQ ID NO:57または59、および(ii)第2のサブユニットとしてSEQ ID NO:58または60を含むポリペプチドの平均EC50値と少なくとも同じくらいまたはそれよりも優れた平均EC50値を有する、請求項16または17記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 9】

リポカリンムテインが、ヒトIL-23およびマウスIL-23の両方と交差反応性である、請求項16~18のいずれか一項記載のポリペプチド。

30

## 【請求項 2 0】

リポカリンムテインが、成熟ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:43) の配列位置28、36、40~41、49、52、68、70、72~73、77、79、81、87、96、100、103、106、124~125、127、132、および134に以下の1つまたは複数の変異アミノ酸残基を含む、請求項16~19のいずれか一項記載のポリペプチド: Gln28 His; Leu36 Glu; Ala40 Leu; Ile41 Leu; Gln49 Arg; Tyr52 Thr; Asn65 Asp; Ser68 Arg; Leu70 Glu; Arg72 Gly; Lys73 AlaまたはVal; Lys75 Thr; Asp77 Lys; Trp79 GlnまたはArg; Arg81 Gly; Asn96 Gly; Lys98 Glu; Tyr100 Met; Leu103 Met; Tyr106 Phe; Asn114 Asp; Met120 Ile; Lys125 Tyr; Ser127 Tyr; およびLys134 Glu。

40

## 【請求項 2 1】

リポカリンムテインが、成熟ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:43) と比較して以下のアミノ酸置換のセットの1つを含む、請求項16~20のいずれか一項記載のポリペプチド:

(1)Gln28 His; Leu36 Glu; Ala40 Leu; Ile41 Leu; Gln49 Arg; Tyr52 Thr; Asn65 Asp; Ser68 Arg; Leu70 Glu; Arg72 Gly; Lys73 Ala; Lys75 Thr; Cys76 Tyr; Asp77 Lys; Trp79 Gln; Arg81 Gly; Asn96 Gly; Lys98 Glu; Tyr100 Met; Leu103 Met; Tyr106 Phe; Met120 Ile; Lys125 Tyr; Ser127 Tyr; およびLys134 Glu;

(2)Gln28 His; Leu36 Glu; Ala40 Leu; Gln49 Arg; Tyr52 Thr; Asn65 Asp; Ser68

50

Arg ; Leu70 Glu ; Arg72 Gly ; Lys73 Val ; Lys75 Thr ; Cys76 Arg ; Asp77 Lys ; Trp79 Arg ; Arg81 Gly ; Asn96 Gly ; Tyr100 Met ; Leu103 Met ; Tyr106 Phe ; Lys125 Tyr ; Ser127 Tyr ; およびLys134 Glu ; または

(3)Gln28 His ; Leu36 Glu ; Ala40 Leu ; Ile41 Leu ; Gln49 Arg ; Tyr52 Thr ; Asn65 Asp ; Ser68 Arg ; Leu70 Glu ; Arg72 Gly ; Lys73 Val ; Lys75 Thr ; Cys76 Tyr ; Asp77 Lys ; Trp79 Gln ; Arg81 Gly ; Asn96 Gly ; Tyr100 Met ; Leu103 Met ; Tyr106 Phe ; Asn114 Asp ; Lys125 Tyr ; Ser127 Tyr ; およびLys134 Glu。

【請求項 2 2】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO:2および45~46からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項16~21のいずれか一項記載のポリペプチド。

10

【請求項 2 3】

リポカリンムテインが、SEQ ID NO:2および45~46からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性または少なくとも70%の配列相同性を有する、請求項16~22のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

IL-23p19の結合がその診断に有用である、疾患または障害の診断における使用のための、請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 2 5】

i. ポリペプチドを、IL-23p19を含有する疑いのある試験試料に、適切な条件下で接触させることにより、該ポリペプチドとIL-23p19またはそのドメインもしくはフラグメントとの間の複合体の形成を可能にすること、および

20

ii. 適切なシグナルにより該複合体を検出すること

を含む、IL-23p19の検出のための請求項17~24のいずれか一項記載のムテインの使用。

【請求項 2 6】

i. ポリペプチドを、IL-23p19を含有すると推定される試料に、適切な条件下で接触させることにより、該ポリペプチドとIL-23p19またはそのドメインもしくはフラグメントとの間の複合体の形成を可能にすること、および

ii. 該試料から該複合体を分離すること

を含む、IL-23p19の分離のための、請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

30

【請求項 2 7】

請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドを含む、診断キットまたは分析キット。

【請求項 2 8】

試料を、請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドに、ムテインとIL-23p19との複合体の形成を可能にする条件下で接触させる段階を含む、試料中のIL-23p19の存在を検出する方法。

【請求項 2 9】

対象におけるIL-23p19の結合のための、請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

40

【請求項 3 0】

対象に、請求項16~23のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドの有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-23p19を結合させる方法。

【請求項 3 1】

対象に、請求項16~23のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドの有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-23のその受容体に対する結合を阻害するための方法。

【請求項 3 2】

リポカリンムテインが、有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞分裂阻害剤、毒素、金属錯

50

体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、請求項1~7および16~23のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項33】

リポカリンムテインが、そのN末端および/またはそのC末端において、タンパク質またはタンパク質ドメインまたはペプチドである部分に融合されている、請求項1~7および16~23のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項34】

リポカリンムテインが、ムテインの血清半減期を延長する部分にコンジュゲートされている、請求項1~7および16~23のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項35】

血清半減期を延長する部分が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンブロン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、請求項34記載のポリペプチド。

【請求項36】

ポリアルキレングリコールが、ポリエチレン(PEG)またはその活性化誘導体である、請求項35記載のポリペプチド。

【請求項37】

対象におけるIL-17AおよびIL-23p19の結合のための、(i)請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドおよび(ii)請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項38】

第1のリポカリンムテインおよび第2のリポカリンムテインが、並行して、同時に、または順次投与されるのを含めて、組み合わせで投与される、請求項37記載の使用。

【請求項39】

第1のリポカリンムテインおよび第2のリポカリンムテインが、個別の間隔で独立した時点において投与されるのを含めて、相互に独立して投与される、請求項37記載の使用。

【請求項40】

対象に、(i)請求項1~7のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドおよび(ii)請求項16~23のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドの有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-17AおよびIL-23p19を結合させる方法。

【請求項41】

対象に、(i)請求項1~7のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドおよび(ii)請求項16~23のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドの有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-17AおよびIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を阻害するための方法。

【請求項42】

(i)請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドおよび(ii)請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドの組み合わせ。

【請求項43】

(i)請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドおよび(ii)請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項44】

少なくとも1種の薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤、または担体をさらに含む、請求項124記載の組成物。

【請求項45】

試料を、(i)請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドおよび(ii)請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドに、第1のポリペプチドとIL-17Aとの複合体および第2のポリペプチドとIL-23p19との複合体の形成を可能にする条件下で接触させる段階を含む、試料におけるIL-17AおよびIL-23p19の存在を検出する方法。

【請求項46】

10

20

30

40

50

第1のリポカリンとIL-17Aとの複合体および第2のリポカリンとIL-23p19との複合体を検出する段階をさらに含む、請求項45記載の方法。

【請求項47】

1つまたは複数の容器の中に、請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドを別々にまたは混合して含むキット。

【請求項48】

1つまたは複数の容器の中に、請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドを別々にまたは混合して含むキット。

【請求項49】

1つまたは複数の容器の中に、請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドおよび請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドを別々にまたは混合して含むキット。

10

【請求項50】

第1の容器が請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドを含み、第2の容器が請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドを含む、第1および第2の容器を含む、パーツのキット。

【請求項51】

ポリペプチドが少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質であり、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性を有し、別のサブユニットがIL-23p19に対する結合特異性を有する、請求項1または16記載のポリペプチド。

【請求項52】

融合タンパク質が、本質的に実施例2に記載されるアッセイにおいて約1nM以下のKDによるIL-17Aに対する結合親和性を有する、請求項51記載のポリペプチド。

20

【請求項53】

融合タンパク質が、本質的に実施例7に記載されるアッセイにおいて約10nM以下のKDによるIL-23p19に対する結合親和性を有する、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項54】

融合タンパク質が、本質的に実施例3に記載される競合ELISA様式または本質的に実施例5に記載されるアッセイにおいて、IL-17Aのその受容体に対する結合を阻害することが可能である、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項55】

融合タンパク質が、本質的に実施例8もしくは実施例14に記載される競合ELISA様式、または本質的に実施例10もしくは実施例15に記載されるアッセイにおいて、IL-23のその受容体に対する結合を阻害することが可能である、請求項51記載のポリペプチド。

30

【請求項56】

融合タンパク質の1つのサブユニットが、請求項1~7のいずれか一項記載のポリペプチドを含む、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項57】

融合タンパク質の1つのサブユニットが、請求項16~23のいずれか一項記載のポリペプチドを含む、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項58】

融合タンパク質が、リポカリンムテインを含む1つのサブユニットをリポカリンムテインを含む別のサブユニットと共有結合させるリンカーを含む、請求項51記載のポリペプチド。

40

【請求項59】

融合タンパク質の1つのサブユニットが、融合タンパク質の別のサブユニットに直接または化学リンカーを介して結合される、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項60】

ポリペプチドが少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質であり、該2つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性を有する、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項61】

50

融合タンパク質の少なくとも1つのサブユニットが、IL-17Aに特異的なリポカリンムテインを含む、請求項60記載のポリペプチド。

【請求項62】

融合タンパク質がサブユニットをさらに含み、該サブユニットがIL-23p19に対する結合特異性を有する、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項63】

融合タンパク質がサブユニットをさらに含み、該サブユニットがIL-17Aに対する特異性を有する、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項64】

融合タンパク質が、SEQ ID NO:3~4のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項51記載のポリペプチド。

【請求項65】

融合タンパク質が、有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ピオチン、細胞分裂阻害剤、毒素、金属錯体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、請求項51~64のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項66】

融合タンパク質が、タンパク質またはタンパク質ドメインまたはペプチドである部分に融合されている、請求項51~64のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項67】

融合タンパク質が、ムテインの血清半減期を延長する部分にコンジュゲートされている、請求項51~64のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項68】

血清半減期を延長する部分が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンブレン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、請求項67記載のポリペプチド。

【請求項69】

ポリペプチドが、少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質であり、1つのサブユニットが、IL-17Aに対する結合特異性またはIL-23p19融合タンパク質に対する結合特異性を有し、別のサブユニットが、アルブミン結合ドメイン(ABD)またはアルブミン結合ペプチドを含む、請求項1または16記載のポリペプチド。

【請求項70】

アルブミン結合ドメイン(ABD)またはアルブミン結合ペプチドが、SEQ ID NO:14またはSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む、請求項69記載のポリペプチド。

【請求項71】

融合タンパク質が、IL-17Aに対する結合特異性を有する2つのサブユニットを含む、請求項69~70記載のポリペプチド。

【請求項72】

融合タンパク質が、本質的に実施例12に記載されるアッセイにおいて測定される場合、HSA、IL-17A、およびIL-23p19の全てに同時に結合することが可能である、請求項69~70記載のポリペプチド。

【請求項73】

IL-17Aに対する結合特異性またはIL-23p19融合タンパク質に対する結合特異性を有する1つのサブユニットおよびヒト抗体のFc部分を含む融合タンパク質である、請求項1または16記載のポリペプチド。

【請求項74】

融合タンパク質が少なくとも2つのサブユニットを含み、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性を有し、別のサブユニットがIL-23p19に対する結合特異性を有する、請求項73記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 5】

SEQ ID NO:5～13のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項65～74記載のポリペプチド。

## 【請求項 7 6】

ポリペプチドが少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質であり、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性またはIL-23p19融合タンパク質に対する結合特異性を有し、別のサブユニットがTNF阻害タンパク質を含む、請求項1または16記載のポリペプチド。

## 【請求項 7 7】

融合タンパク質が17Aに結合することが可能であり、該融合タンパク質が、本質的に実施例16に記載されるアッセイにおいて測定される場合、該融合タンパク質中に含まれるリポカリウムテインの平均EC50値と少なくとも同じくらいまたはそれよりも優れた平均EC50値を有する、請求項76記載のポリペプチド。 10

## 【請求項 7 8】

融合タンパク質がIL-23に結合することが可能であり、該融合タンパク質が、本質的に実施例17に記載されるアッセイにおいて測定される場合、該融合タンパク質中に含まれるリポカリウムテインの平均EC50値と少なくとも同じくらいまたはそれよりも優れた平均EC50値を有する、請求項76記載のポリペプチド。

## 【請求項 7 9】

融合タンパク質がTNF- に結合することが可能であり、該融合タンパク質が、本質的に実施例18に記載されるアッセイにおいて測定される場合、融合タンパク質中に含まれる抗体の平均EC50値と少なくとも同じくらいまたはそれよりも優れた平均EC50値を有する、請求項76記載のポリペプチド。 20

## 【請求項 8 0】

融合タンパク質が、本質的に実施例19に記載されるアッセイにおいて測定される場合、TNF- 、IL-17A、およびIL-23p19の全てに同時に結合することが可能である、請求項76記載のポリペプチド。

## 【請求項 8 1】

TNF阻害タンパク質が、SEQ ID NO:61および62の抗体である、請求項76記載のポリペプチド。 30

## 【請求項 8 2】

SEQ ID NO:63および62のアミノ酸配列またはSEQ ID NO:64および62のアミノ酸配列を含む、請求項76～77記載のポリペプチド。

## 【請求項 8 3】

対象におけるIL-17Aおよび/またはIL-23p19の結合のための、請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む組成物の使用。

## 【請求項 8 4】

対象におけるIL-17および/またはIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を阻害する、請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む組成物の使用。 40

## 【請求項 8 5】

対象に、請求項51～82のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドのまたは該ポリペプチドを含む1種または複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-17Aおよび/またはIL-23p19を結合させる方法。

## 【請求項 8 6】

対象に、請求項51～82のいずれか一項記載の1種または複数種のポリペプチドのまたは該ポリペプチドを含む1種または複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む、対象におけるIL-17および/またはIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を阻害するための方法。

## 【請求項 8 7】

IL-17Aおよび/またはIL-23p19との複合体形成のための、請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項88】

IL-17Aおよび/またはIL-23p19の検出のための、請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項89】

IL-17Aおよび/またはIL-23p19の検出のための、請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項90】

請求項51～82のいずれか一項記載の少なくとも1種のポリペプチド、およびキットを使用するための1つまたは複数の説明書を含む、キット。

10

【請求項91】

請求項1～7、請求項16～23、および請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項92】

核酸分子の発現を可能にするために調節配列に機能的に連結されている、請求項91記載の核酸分子。

【請求項93】

ベクターまたはファージミドベクター中に含まれている、請求項91または92記載の核酸分子。

20

【請求項94】

請求項91～93のいずれか一項記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項95】

リポカリンムテインまたは融合タンパク質が、該リポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードする核酸から出発して、遺伝子操作方法により産生される、請求項1～7、請求項16～23、および請求項51～82のいずれか一項記載のポリペプチドを産生する方法。

【請求項96】

リポカリンムテインまたは融合タンパク質が、細菌宿主生物または真核宿主生物において産生され、該宿主生物またはその培養物から単離される、請求項95記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【背景技術】

【0001】

#### I. 背景

様々なリポカリンのムテインは、急速に拡大しているクラスの治療薬である。実際、リポカリンのムテインは、インターロイキン17Aまたはインターロイキン23などの、野生型リポカリンの天然リガンドとは異なる標的に対して高い親和性および特異性を示すように構築することができる（例えば、国際公開公報第99/16873号（特許文献1）、同第00/75308号（特許文献2）、同第03/029463号（特許文献3）、同第03/029471号（特許文献4）および同第05/19256号（特許文献5））。

【0002】

40

#### A. インターロイキン17A

インターロイキン17A（IL-17A、IL-17と同義）は、Th17系列のT細胞から産生されるサイトカインである。IL-17は、当初、「CTL関連抗原8」（CTLA-8）と称された（Rouvier et al., J. Immunol, 150 5445-5556 (1993)（非特許文献1）； Yao et al., Immunity, 3: 811-821 (1995)（非特許文献2））。その後、CTLA-8のヒト等価物がクローニングされ、「IL-17」と称された（Yao et al., J. Immunol, 155(12): 5483-5486 (1995)（非特許文献3）； Fossiez et al., J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996)（非特許文献4））。

【0003】

ヒトIL-17A（CTLA-8、さらにIL-17と名付けられた、Swiss Prot Q16552）は、Mrが17,000ダルトンの糖タンパク質である（Spriggs et al., J. Clin. Immunol, 17: 366-369 (1

50

997) (非特許文献5))。IL-17Aは、ホモダイマーIL-17A/Aとして、またはホモログIL-17Fと複合体化してヘテロダイマー性IL-17A/Fを形成するヘテロダイマーとしてのいずれかで存在し得る。IL-17F (IL-24、ML-1) は、IL-17Aと55%のアミノ酸同一性を共有する。また、IL-17AおよびIL-17Fは、血管内皮細胞、末梢T細胞、B細胞、線維芽細胞、肺細胞、骨髄単球性細胞、および骨髄間質細胞を含む多種多様な細胞上に発現される同じ受容体 (IL-17RA) を一緒に利用する (Kolls et al., *Immunity*, 21 : 467-476 (2004) (非特許文献6); Kawaguchi et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 114(6): 1267-1273 (2004) (非特許文献7); Moseley et al., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14(2): 155-174 (2003) (非特許文献8))。さらなるIL-17ホモログが同定されている (IL-17B、IL-17C、IL-17D、およびIL-17E)。これらの他のファミリーのメンバーは、IL-17Aと30%未満のアミノ酸同一性を共有する (Kolls et al., 2004)。

10

## 【0004】

IL-17Aは、Th17細胞によって主に発現され、関節リウマチ (RA) の患者の滑液中に高レベルで存在し、早期のRA発生に関与することが示されている。IL-17Aは、多発性硬化症 (MS) 患者の脳脊髄液中にも過剰発現される。加えて、IL-17は、TNF- $\alpha$  およびIL-1の誘導因子であり、後者は、罹患した患者についての骨侵食および非常に有痛性の結果の主な一因である (Lubberts E. (2008) *Cytokine*, 41, p. 84-91 (非特許文献9))。さらに、IL-17Aの不適切または過剰な産生は、変形性関節症、骨インプラントの緩み、急性移植拒絶反応 (Antonysamy et al., (1999) *J. Immunol.*, 162, p. 577-584 (非特許文献10); van Kooten et al. (1998) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 9, p.1526-1534 (非特許文献11))、敗血症、敗血症性ショックまたはエンドトキシンショック、アレルギー、喘息 (Molet et al., (2001) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, p. 430-438 (非特許文献12))、骨量減少、乾癬 (Teunissen et al. (1998) *J. Invest. Dermatol.*, 111, p. 645-649 (非特許文献13))、虚血、全身性硬化症 (Kurasawa et al., (2000) *Arthritis Rheum.*, 43, p. 2455-2463 (非特許文献14))、卒中、および他の炎症障害などの様々な他の疾患および障害の病理に関連する。

20

## 【0005】

IL-17Aの様々な阻害剤が報告されているものの、この重要な炎症促進性サイトカインの発見以来、現行のアプローチは、複雑な哺乳類細胞産生系を必要とする、ジスルフィド結合安定性に依存する、一部の抗体フラグメントが凝集する傾向がある、溶解性が限られている、そして最後ではあるが重要なこととして、それらは、ヒト化された場合であっても、望まれない免疫応答を誘発しうるといったように、最適ではない。したがって、IL-17Aに対して結合親和性を有するリポカリンムテインなどのタンパク質を開発するニーズが依然としてある。

30

## 【0006】

## B. インターロイキン23

インターロイキン23 (IL-23としても公知) は、2種のサブユニット、すなわちp19およびp40から構成されるヘテロダイマー性サイトカインである (B. Oppmann et al, *Immunity* 13, 715 (2000) (非特許文献15))。p19 (Swiss Prot Q9NPF7、本明細書において「IL-23p19」と互換的に称される) サブユニットは、IL-6、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、およびIL-12のp35サブユニットと構造的に関係する。IL-23は、IL-23RおよびIL-12ベータ1から構成されるヘテロダイマー性受容体への結合によってシグナル伝達を仲介する。IL-12ベータ1サブユニットは、IL-12ベータ1およびIL-12ベータ2から構成されるIL-12受容体によって共有される。トランスジェニックp19マウスは、深刻な全身性炎症および好中球増加症を示すと最近報告されている (M. T. Wiekowski et al, *J Immunol* 166, 7563 (2001) (非特許文献16))。

40

## 【0007】

ヒトIL-23は、T細胞、特にメモリーT細胞の増殖を促進すると報告されており、Th17細胞の分化および/または維持の一因となり得る (D.M. Frucht, *Sci STKE* 2002 Jan 8; 2002(114):PE1 (非特許文献17))。

50

## 【 0 0 0 8 】

(p19サブユニットへの結合を介する) IL-23の多様な選択的阻害剤が報告されているものの、この重要なヘテロダイマー性サイトカインの発見以来、これらの現行のアプローチは、複雑な哺乳類細胞産生系を必要とする、ジスルフィド結合の安定性に依存する、一部の抗体フラグメントが凝集する傾向がある、溶解性が限られている、そして最後ではあるが重要なこととして、それらは、ヒト化された場合であっても、望まれない免疫応答を誘発し得るなどのいくつかの重大な欠点をまだ有している。したがって、IL-23に対して結合親和性を有するリポカリウムテインなどのタンパク質を開発する、まだ満たされていないニーズがある。

## 【 先行技術文献 】

10

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 9 】

【 特許文献 1 】 国際公開公報第99/16873号

【 特許文献 2 】 同第00/75308号

【 特許文献 3 】 同第03/029463号

【 特許文献 4 】 同第03/029471号

【 特許文献 5 】 同第05/19256号

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 1 0 】

【 非特許文献 1 】 Rouvier et al., J. Immunol, 150 5445-5556 (1993)

20

【 非特許文献 2 】 Yao et al., Immunity, 3: 811-821 (1995)

【 非特許文献 3 】 Yao et al., J. Immunol, 155(12): 5483-5486 (1995)

【 非特許文献 4 】 Fossiez et al., J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996)

【 非特許文献 5 】 Spriggs et al., J. Clin. Immunol, 17: 366-369 (1997)

【 非特許文献 6 】 Kolls et al., Immunity, 21 : 467-476 (2004)

【 非特許文献 7 】 Kawaguchi et al., J. Allergy Clin. Immunol, 114(6): 1267-1273 (2004)

【 非特許文献 8 】 Moseley et al., Cytokine Growth Factor Rev., 14(2): 155-174 (2003)

【 非特許文献 9 】 Lubberts E. (2008) Cytokine, 41, p. 84-91

30

【 非特許文献 10 】 Antonysamy et al., (1999) J. Immunol, 162, p. 577-584

【 非特許文献 11 】 van Kooten et al. (1998) J. Am. Soc. Nephrol., 9, p.1526-1534

【 非特許文献 12 】 Molet et al., (2001) J. Allergy Clin. Immunol., 108, p. 430-438

【 非特許文献 13 】 Teunissen et al. (1998) J. Invest. Dermatol, 111, p. 645-649

【 非特許文献 14 】 Kurasawa et al., (2000) Arthritis Rheum., 43, p. 2455-2463

【 非特許文献 15 】 B. Oppmann et al, Immunity 13, 715 (2000)

【 非特許文献 16 】 M. T. Wiekowski et al, J Immunol 166, 7563 (2001)

【 非特許文献 17 】 D.M. Frucht, Sci STKE 2002 Jan 8; 2002(114):PE1

40

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 1 1 】

## II. 定義

以下のリストは、本明細書全体を通して使用される用語、語句、および略語を定義するものである。本明細書において列挙および定義される全ての用語は、全ての文法形式を包含することが意図される。

## 【 0 0 1 2 】

本明細書において使用される「IL-17A」(IL-17A/A、およびIL-17Fと複合体化した、IL-17A/Fとも名付けられるIL-17Aを含む)は、Swiss Prot Q16552によって定義される完全長タンパク質、そのフラグメント、またはその変種を意味する。

## 【 0 0 1 3 】

50

本明細書において使用される「IL-23p19」は、Swiss Prot Q9NPF7によって定義される完全長タンパク質、そのフラグメント、またはその変種を意味する。

【0014】

本明細書において使用される「検出可能な親和性」は、選択された標的と一般的に少なくとも約 $10^{-5}$ Mの親和性定数で結合する能力を意味する。より低い親和性は、一般的に、ELISAなどの通常法でもはや測定不能であり、したがって、二次的な重要性である。例えば、本開示によるリポカリンムテインの結合親和性は、一部の態様では、 $K_D$ が800nM未満、一部の態様では $K_D$ が30nM未満、一部の態様では約50ピコモル濃度(pM)以下であり得る。

【0015】

本明細書において使用される場合、選択された標的(この場合、IL-17AまたはIL-23p19)に対する本開示のタンパク質(例えばリポカリンのムテイン)またはその融合タンパク質の「結合親和性」は、当業者に公知の多数の方法によって測定すること(およびそれによって、ムテイン-リガンド複合体のKD値を決定すること)ができる。そのような方法には、蛍光滴定、競合ELISA、等温滴定熱量測定(ITC)などの熱量測定法、および表面プラズモン共鳴(BIAcore)が含まれるが、それらに限定されるものではない。そのような方法は、当技術分野において十分に確立されており、その例は、下記にも詳述される。

【0016】

それぞれの結合因子とそのリガンドとの間の複合体形成は、それぞれの結合パートナーの濃度、競合因子の存在、使用される緩衝系のpHおよびイオン強度、ならびに解離定数 $K_D$ の決定に使用される実験方法(例えばいくつか例を挙げると、蛍光滴定、競合ELISA、もしくは表面プラズモン共鳴)またはさらには実験データの評価に使用される数学アルゴリズムなどの多数の異なる要因によって影響を受けることも、言及されている。

【0017】

したがって、 $K_D$ 値(それぞれの結合因子とその標的/リガンドとの間に形成される複合体の解離定数)が、所与のリガンドに対する個々のリポカリンムテインの親和性を決定するために使用される方法および実験設定に応じて、特定の実験的範囲内で変動し得ることも、当業者に明らかである。これは、例えば $K_D$ 値が表面プラズモン共鳴(Biacore)によって、競合ELISAによって、それとも「直接ELISA」によって決定されたかどうかに応じて、測定される $K_D$ 値におけるわずかな偏差または許容範囲があり得ることを意味する。

【0018】

本明細書において使用される「ムテイン」、「変異」実体(タンパク質もしくは核酸)、または「変異体」は、天然の(野生型)核酸またはタンパク質の「参照」骨格と比較して、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の交換、欠失、または挿入を表す。

【0019】

本開示のムテインに関連して本明細書において使用される用語「フラグメント」は、N末端およびC末端において短縮された、すなわちN末端および/またはC末端アミノ酸の少なくとも1つを欠如する完全長成熟ヒト涙液リポカリンに由来するタンパク質またはペプチドに関する。そのようなフラグメントは、成熟リポカリンの一次配列の連続アミノ酸を少なくとも10個以上、例えば20または30個以上含む場合があり、通常、成熟リポカリンのイムノアッセイで検出可能である。該用語は、本明細書記載のムテインおよび変種のフラグメントも含む。本発明のリポカリンムテイン、そのフラグメントまたは変種は、好ましくは、本明細書記載のIL-17Aおよび/またはIL23p19に結合する機能を保持する。一般に、本開示のリポカリンムテインまたは本開示による組み合わせまたは本明細書記載の融合タンパク質の対応するタンパク質リガンドIL-17A(IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)またはIL-23p19に関して、本明細書において使用される用語「フラグメント」は、本開示によるムテインによって認識および/または結合される完全長リガンドの能力を保持する、N末端および/またはC末端において短縮されたタンパク質またはペプチドリガンドに関する。

【0020】

本明細書において使用される用語「変異誘発」は、成熟リポカリンの所与の配列位置に

10

20

30

40

50

天然に存在するアミノ酸が、それぞれの天然ポリペプチド配列中のこの特定の位置に存在しない少なくとも1つのアミノ酸によって置換され得るように実験条件が選ばれることを意味する。用語「変異誘発」は、1つまたは複数のアミノ酸の欠失または挿入による配列セグメント長の（追加的な）改変も含む。したがって、例えば、選ばれた配列位置における1つのアミノ酸が、ひと続きの3つのランダム変異に置き換わり、野生型タンパク質のそれぞれのセグメントの長さと比較して2つのアミノ酸残基の挿入をもたらすことは、本開示の範囲内である。そのような挿入または欠失は、本開示において変異誘発に供することができる任意のペプチドセグメントにおいて相互に独立して導入され得る。本開示の例示的な一態様では、いくつかの変異の挿入は、選ばれたリポカリン骨格のループABに導入され得る（参照によりその全体が本明細書に組み入れられる国際特許出願WO2005/019256参照）。

10

**【0021】**

用語「ランダム変異誘発」は、予め決定された単一のアミノ酸（変異）が特定の配列位置に存在するのではなく、少なくとも2つのアミノ酸が、変異誘発の間に予め定義された配列位置に特定の確率で組み入れられる可能性があることを意味する。

**【0022】**

「同一性」は、配列の類似性または関係を測定する、配列の性質である。本開示において使用される用語「配列同一性」または「同一性」は、本開示のポリペプチド配列を問題の配列と（相同）アライメント後に、これらの2つの配列の長い方における残基数に対する一对の同一な残基のパーセンテージを意味する。同一性は、同一残基の数を残基の合計数で割り、結果に100をかけることによって測定される。

20

**【0023】**

用語「相同性」は、本明細書においてその通常の意味で使用され、本開示のポリペプチド（例えば、本開示の任意のリポカリンムテイン）の直鎖アミノ酸配列における同等の位置で同一のアミノ酸および保存的置換（例えばアスパラギン酸残基によるグルタミン酸残基の交換）と見なされるアミノ酸を含む。

**【0024】**

配列相同性または配列同一性のパーセンテージは、例えばプログラムBLASTP、バージョンblastp 2.2.5（2002年11月16日；Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402参照）を使用して、本明細書において決定することができる。この態様において、相同性のパーセンテージは、好ましくは一对の比較において参照として野生型タンパク質骨格を使用する、プロペプチド配列を含むポリペプチド配列全体（マトリックス：BLOSUM 62；ギャップコスト：11.1；カットオフ値を $10^{-3}$ に設定）のアライメントに基づく。それは、BLASTPプログラムの出力における結果として示される「陽性」（相同アミノ酸）の数を、アライメント用プログラムにより選択されるアミノ酸の合計数で割ったパーセンテージとして計算される。

30

**【0025】**

具体的には、野生型リポカリンと異なるリポカリン（ムテイン）のアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型リポカリンのアミノ酸配列における特定位置に対応するかどうかを判定するために、当業者は、当技術分野において周知の手段および方法、例えば手作業による、あるいはBasic Local Alignment Search Toolを表すBLAST2.0もしくはClustalWなどのコンピュータプログラムまたは配列アライメントを生成するために適切な任意の他の適切なプログラムを使用することによるアライメントを使用することができる。したがって、野生型リポカリンは、「サブジェクト配列」または「参照配列」として機能し得、一方で本明細書記載の野生型リポカリンと異なるリポカリンのアミノ酸配列は、「クエリ配列」として機能する。用語「参照配列」および「野生型配列」は、本明細書において互換的に使用される。

40

**【0026】**

「ギャップ」は、アミノ酸の付加または欠失の結果である、アライメント中のスペースである。したがって、正確に同じ配列の2つのコピーは、100%の同一性を有するが、それ

50

ほど高度に保存されていない、欠失、付加、または置換を有する配列は、より低い程度の同一性を有し得る。当業者は、標準パラメーターを使用して配列同一性を決定するために、いくつかのコンピュータプログラム、例えばBlast (Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402)、Blast2 (Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410)、およびSmith-Waterman (Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197) が利用可能であることを認識するであろう。

**【 0 0 2 7 】**

本開示に使用される用語「変種」は、例えば置換、欠失、挿入または化学的改変によるアミノ酸配列の改変を含む、タンパク質またはペプチドの誘導体に関する。そのような改変は、一部の態様では、タンパク質またはペプチドの機能性を減少させない。そのような変種は、1つまたは複数のアミノ酸がそれらのそれぞれのD-立体異性体によって、または例えば、オルニチン、ヒドロキシプロリン、シトルリン、ホモセリン、ヒドロキシセリン、ノルバリンなどの、20種の天然アミノ酸以外のアミノ酸によって置き換えられているタンパク質を含む。しかし、そのような置換は、保存的でもあり得、すなわちアミノ酸残基が、化学的に類似のアミノ酸残基に置き換えられる。保存的置換の例は、以下の群のメンバーの間での置換である：1)アラニン、セリン、およびトレオニン；2)アスパラギン酸およびグルタミン酸；3)アスパラギンおよびグルタミン；4)アルギニンおよびリジン；5)イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン；ならびに6)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。本開示のリポカリンムテインまたは本開示による組み合わせまたは本明細書記載の融合タンパク質の対応するタンパク質リガンドIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) またはIL-23p19に関連して本明細書において使用される用語「変種」は、本明細書記載のSwissProtに寄託されているとおりのIL-17AまたはIL-23p19参照タンパク質などのそれぞれ野生型IL-17AまたはIL-23p19タンパク質と比較して、1つまたは複数、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、40、50、60、70、または80個以上のアミノ酸置換、欠失および/または挿入を有する、それぞれIL-17タンパク質もしくはそのフラグメントまたはIL-23タンパク質もしくはそのフラグメントに関する。IL-17AまたはIL-23p19の変種は、それぞれ、好ましくは本明細書記載のSwissProtに寄託されているとおりのIL-17AまたはIL-23p19参照タンパク質などの野生型IL-17AまたはIL-23p19タンパク質に対してそれぞれ少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%のアミノ酸同一性を有する。

**【 0 0 2 8 】**

「天然配列」のリポカリンは、対応する天然由来のポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するリポカリンを意味する。したがって、天然配列のリポカリンは、任意の生物、特に哺乳類からのそれぞれの天然リポカリンのアミノ酸配列を有することができる。そのような天然配列のポリペプチドは、自然界から単離することができ、または組み換え手段または合成手段によって産生することができる。用語「天然配列」のポリペプチドは、具体的にはリポカリンの天然の短縮型または分泌型形態、リポカリンの選択的スプライシングをされた形態および天然アレル変種などの、天然変種形態を包含する。ポリペプチドの「変種」は、天然配列ポリペプチドに対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、または少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変種には、例えば、1つまたは複数のアミノ酸残基がポリペプチドのNまたはC末端に付加または欠失したポリペプチドが含まれる。一般的に変種は、天然配列のポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約80%を含む、少なくとも約85%などのアミノ酸配列同一性、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性または少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性などを有する。説明的な一例として、最初の4つのN末端アミノ酸残基 (HHLA) および最後の2つのC末端アミノ酸残基 (Ser、Asp) は、例えば、本開示の涙液リポカリン (Tlc) ムテインにおいて、タンパク質、例えばSEQ ID NO:1の生物学的機能に影響せずに欠失され得る。

**【 0 0 2 9 】**

本開示により使用される場合の用語「位置」は、本明細書に示されるアミノ酸配列内の

アミノ酸の位置または本明細書に示される核酸配列内のヌクレオチドの位置のいずれかを意味する。1種または複数種のリポカリンムテインのアミノ酸配列の位置に関連して本明細書において使用される用語「対応する」または「対応している」を理解するために、対応する位置は、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数によってのみ決定されるわけではない。したがって、置換され得る本開示による所与のアミノ酸の位置は、(変異型または野生型)リポカリンにおける該当するアミノ酸の欠失または付加が原因で変動し得る。同様に、置換され得る本開示による所与のヌクレオチドの位置は、プロモーターを含む、ムテインもしくは野生型リポカリンの5'-非翻訳領域(UTR)および/または任意の他の調節配列もしくは遺伝子(エキソンおよびイントロンを含む)の中の該当する欠失または付加的なヌクレオチドが原因で変動し得る。

10

**【0030】**

したがって、本開示による対応する位置について、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、示された数が、類似する隣接ヌクレオチド/アミノ酸と異なり得るが、交換、欠失、または付加され得る該隣接ヌクレオチド/アミノ酸も、1つまたは複数の対応する位置に含まれることを好ましくは理解されたい。

**【0031】**

加えて、本開示による参照骨格に基づくリポカリンムテインにおける対応する位置について、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、リポカリンの間で高度に保存された全体的フォールディングパターンに照らして当業者によって認識されるように、たとえそれらの示された数が異なると、(変異型または野生型)リポカリンにおける該当する位置と構造的に対応することを好ましくは理解されたい。

20

**【0032】**

用語「アルブミン」には、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラット血清アルブミンなどの全ての哺乳類アルブミンが含まれる。

**【0033】**

非天然標的について本明細書において使用される用語「有機分子」または「有機小分子」は、任意で1つまたは2つの金属原子を含む、100から2000ダルトンの間、好ましくは100から1000ダルトンの間の範囲の分子量を有する、少なくとも2つの炭素原子を含むが、好ましくは7または12個以下の回転可能な炭素結合を含む有機分子を意味する。

**【0034】**

本明細書において使用される語句「検出する」、「検出」、「検出可能な」、または「検出すること」は、量的および定性的レベルの両方、ならびにそれらの組み合わせで理解される。したがって、それには、関心対象の分子の量的、半量的および定性的測定が含まれる。

30

**【0035】**

「対象」は、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトである。用語「哺乳類」は、本明細書において、非限定的にヒト、家畜および農用動物、ならびに展示動物、スポーツ動物、またはペット動物、例えば説明的な例を少しだけ挙げるなら、ヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ラット、ブタ、カニクイザルなどの類人猿等を含む、哺乳類として分類される任意の動物を表す。好ましくは、本明細書における哺乳類はヒトである。

40

**【0036】**

「有効量」は、有益なまたは所望の結果をもたらすために十分な量である。有効量は、1回または複数回の投与で投与することができる。

**【0037】**

「試料」は、任意の対象から採取された生物学的試料として定義される。生物学的試料には、血液、血清、尿、便、精液、または組織が含まれるが、それらに限定されるものではない。

**【0038】**

本明細書記載の「融合ポリペプチド」は、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性を有するかまたはIL-23p19に対する結合特異性を有する、少なくとも2つのサブユニ

50

ットを含む。融合ポリペプチド内で、これらのサブユニットは、共有結合または非共有結合により連結され得る。好ましくは、融合ポリペプチドは、2つ以上のサブユニットの間の翻訳融合である。翻訳融合は、1つのサブユニットについてのコード配列をさらなるサブユニットのコード配列とフレーム内に遺伝子操作することによって生成され得る。両方のサブユニットは、リンカーをコードするヌクレオチド配列によって散在し得る。しかし、本開示の融合ポリペプチドのサブユニットは、化学リンカーによっても連結され得る。

#### 【0039】

本開示の融合ポリペプチドにより含まれ得る「リンカー」は、本明細書記載の融合ポリペプチドの2つ以上のサブユニットを連結する。連結は、共有結合または非共有結合であり得る。好ましい共有結合は、アミノ酸間のペプチド結合などのペプチド結合を介する。したがって、好ましい態様では、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個以上のアミノ酸などの1つまたは複数のアミノ酸から構成される。好ましいリンカーは、本明細書において記載されている。他の好ましいリンカーは、化学リンカーである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0040】

#### III. 図面の説明

【図1】SEQ ID NO:1のリポカリウムテインとヒトIL-17Aとの相互作用についての表面プラズモン共鳴による結合速度定数 (on-rate) および解離速度定数 (off-rate) の典型的な測定を提供する。標準的なアミン化学反応を使用してセンサーチップ上にIL-17Aを固定化し、SEQ ID NO:1のリポカリウムテインを可溶性分析物として採用し、チップ表面に分析物を流した。結果として生じた解離定数 ( $K_D$ ) は0.8nMである。

【図2】SEQ ID NO:1のリポカリウムテインとヒトIL-17A/Fとの相互作用についての表面プラズモン共鳴による結合速度および解離速度の典型的な測定を提供する。専用の実験キットを使用してセンサーチップ上にビオチン化SEQ ID NO:1を捕捉し、ヒトIL-17A/Fを可溶性分析物として採用し、チップ表面に分析物を流した。結果として生じた解離定数 ( $K_D$ ) は100pMである。

【図3】SEQ ID NO:1のリポカリウムテインが、hIL-17Aとその受容体hIL-17RAとの間の相互作用を75pMのIC50でブロック可能なことを実証する。ビオチン化hIL-17Aを、様々な濃度のSEQ ID NO:1のリポカリウムテインと共に予備インキュベートし、可溶性hIL-17RAを固定化したELISAプレート上で非中和hIL-17Aを定量した。陰性対照SEQ ID NO:41は、競合作用を有さなかった。データを単一部位結合モデルで適合させた。

【図4】競合ELISA様式で測定したSEQ ID NO:1のリポカリウムテインの交差反応性プロフィールを示す。カニクイザルIL-17AおよびキヌザルIL-17Aとの完全交差反応性は、hIL-17Aと比較したほぼ同一のIC50値から明らかである。データを単一部位結合モデルで適合させた。

【図5】SEQ ID NO:1のリポカリウムテインが、細胞に基づくアッセイにおいてhIL-17Aのその受容体hIL-17RAに対する結合をブロックするのに非常に有効であることを図示する。アッセイは、U87-MG細胞におけるG-CSFのhIL-17A誘導型分泌に基づく。細胞を一定濃度のhIL-17Aと共にインキュベートし、SEQ ID NO:1のリポカリウムテインまたは比較のためにベンチマーク抗体1 (重鎖SEQ ID NO:53、軽鎖SEQ ID NO:54)、ベンチマーク抗体2 (重鎖SEQ ID NO:55、軽鎖SEQ ID NO:56) および陰性対照としてSEQ ID NO:2を用いて滴定した。MSD (Meso Scale Discovery (登録商標)、以後「MSD」) によって測定された任意単位でのG-CSF濃度をリポカリウムテインまたは抗体分子の濃度に対してプロットする。結果として生じた、SEQ ID NO:1のリポカリウムテインについての平均IC50値は0.13nM (最初の実験では0.17nM、繰り返しの実験では0.10nM) であり、これは、平均IC50 = 2.33 (2.65/2.01) nMを示したベンチマーク1よりも有意に強力であり、平均IC50 = 0.12 (0.14/0.10) nMを有したベンチマーク2と比較して類似の範囲内であった。陰性対照SEQ ID NO:2は、細胞のIL-17A誘導型G-CSF産生に効果を示さなかった。IL-17Aに対するSEQ ID NO:1またはベンチマーク抗体分子の結合は、細胞表面IL-17RAに対するIL-17Aの結合をブロックするこ

10

20

30

40

50

とで、G-CSF分泌の誘導を防止する。全ての分子について等しいG-CSF濃度のプラトーを仮定して、データを単一部位結合モデルで適合させた。

【図6】ヒトIL-23と相互作用しているSEQ ID NO:2のリポカリウムテインについての表面プラズモン共鳴による結合速度定数および解離速度定数の典型的な測定を提供する。3つの反復実験で決定された平均解離定数は、 $K_D = 0.35 \pm 0.20 \text{ nM}$ に達した。

【図7】SEQ ID NO:2のリポカリウムテインとヒトIL-23との相互作用についての表面プラズモン共鳴による結合速度および解離速度の典型的な測定を提供する。専用の実験キットを使用してセンサーチップ上にビオチン化SEQ ID NO:2を捕捉し、IL-23を可溶性分析物として採用し、チップ表面に分析物を流した。結果として生じた解離定数 ( $K_D$ ) は2.9nMである。アッセイの実施を容易にするために高い非生理学的濃度のNaClを採用しなければならなかったことに留意されたい。したがって、結果は、生理条件下でのIL-23に対するSEQ ID NO:2の親和性を示すものではない。このアッセイの有用性は、それが、SEQ ID NO:2およびこのムテインを含む融合タンパク質の親和性の比較を可能にできることにある（実施例11および表1参照）。

【図8】SEQ ID NO:2のリポカリウムテインが、hIL-23とその受容体hIL-23Rとの間の相互作用を0.54nMのIC50でブロックすることが可能であることを実証する。ビオチン化hIL-23を様々な濃度のSEQ ID NO:2のリポカリウムテインと共に予備インキュベートし、可溶性hIL-23Rを固定化したELISAプレート上で非中和hIL-23を定量した。陰性対照SEQ ID:43は競合効果を有さない。データを単一部位結合モデルで適合させた。

【図9】競合ELISA様式で測定されたSEQ ID NO:2のリポカリウムテインの交差反応性プロフィールおよび特異性を示す。SEQ ID NO:2のリポカリウムテインは、ヒトおよびマウスIL-23と完全に交差反応性であり、カニクイザルおよびキヌザルIL-23に対して幾分減少した親和性を表す。データを単一部位結合モデルで適合させた。

【図10】SEQ ID NO:2のリポカリウムテインが、細胞に基づく増殖アッセイにおいてhIL-23の生物学的活性をブロック可能であることを実証する。アッセイにおいて、SEQ ID NO:2、IgGアイソタイプ陰性対照、および2種類のベンチマーク抗体（ベンチマーク3:重鎖、SEQ ID NO:57および軽鎖、SEQ ID NO:58；ベンチマーク4:重鎖、SEQ ID NO:59および軽鎖、SEQ ID NO:60）をhIL-23と共に予備インキュベートし、続いてhIL-23RおよびhIL-12R1をトランスフェクトしたBa/F3細胞に添加した。トランスフェクト後のBa/F3細胞は、ヒトIL-23に応答して増殖する。実験から、この生物学的活性がSEQ ID NO:2ならびにベンチマーク抗体3および4によりそれぞれ1.2nM (1.7/0.7)、3.0nM (3.1/2.9)、1.2nM (0.8/1.5)のEC50値でブロックされることが示される。陰性対照は、細胞増殖に効果を示さなかった。データをS字状用量反応モデルで適合させた。

【図11】表1に特徴付けられる構築物SEQ ID NO:1~13に関する図的概要を提供する。SEQ ID NO:1（図11において「1」と省略）は、IL-17A結合性リポカリウムテインに対応する。SEQ ID NO:2（「2」と省略）は、IL-23結合性リポカリウムテインに対応する。SEQ ID NO:14（「14」と省略）は、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインに対応する。SEQ ID NO:15（「15」と省略）は、SEQ ID NO:14を遺伝子操作した脱免疫（deimmunized）バージョンである。SEQ ID NO:16（「16」と省略）は、ヒトIgG1抗体のFc部に対応する。

【図12】例示の実験において、本明細書開示のリポカリウムテインに基づく多特異性融合タンパク質が、結合したそれぞれの他の標的によって妨害されることなく、IL-17A、IL-23、およびヒト血清アルブミン（HSA）に同時に結合可能であることを実証する。SEQ ID NO:9は、IL-17A結合性リポカリウムテインSEQ ID NO:1、IL-23結合性リポカリウムテインSEQ ID NO:2、および連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン由来のヒト血清アルブミン結合ペプチドのヘテロダイマー性融合タンパク質である。図12に示す表面プラズモン共鳴実験において、ビオチン化SEQ ID NO:9をセンサーチップ上に捕捉した。同時結合を実証するために、緩衝液中のhIL-17AF、hIL-23、およびHSAの希釈物を、調製済みチップ表面に連続的に適用した。単一の標的を用いる、固定化SEQ ID NO:9に対するhIL-17AF、hIL-23、およびHSAの適用も行って、比較のために単一の標的との結合により得ること

が可能な最大結合レベルを得た。図12に、全ての3つの標的の完全結合について予想される応答を反映している、測定された結合曲線および理論的結合曲線を示す。後者は、個別の標的に対するSEQ ID NO:9の実験応答を合わせることによって得た。測定された曲線および理論的曲線は、ほとんど同一であり、示された差は、実験曲線での標的の解離に起因すると考えられる。データにより、SEQ ID NO:9は、単一の標的のみとの結合と比べてシグナル強度の喪失も動態における変化もなしに、全ての標的に同時に結合可能であることが示される。

【図13】ヒトIL-23に結合するリポカリウムテインSEQ ID NO:45 (図13A) およびSEQ ID NO:46 (図13B) についての表面プラズモン共鳴による結合速度および解離速度の典型的な測定を提供する。結果として生じた解離定数 ( $K_D$ ) は、それぞれ0.1nM (SEQ ID NO:45) および0.6nM (SEQ ID NO:46) である。

【図14】リポカリウムテインSEQ ID NO:45およびSEQ ID NO:46が、hIL-23とその受容体hIL-23Rとの間の相互作用をそれぞれ0.1nM (SEQ ID NO:45) および1.1nM (SEQ ID NO:46) のIC50でブロック可能であることを実証する。ビオチン化hIL-23を様々な濃度のリポカリウムテインと共に予備インキュベートし、可溶性hIL-23Rを固定化したELISAプレート上で非中和hIL-23を定量した。データを単一部位結合モデルで適合させた。

【図15】SEQ ID NO:45およびSEQ ID NO:46のリポカリウムテインが、細胞に基づく増殖アッセイにおいてhIL-23の生物学的活性をブロック可能であることを実証する。アッセイにおいて、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、および陰性対照SEQ ID NO:43をhIL-23と共に予備インキュベートし、続いてhIL-23RおよびhIL-12R $\alpha$ 1をトランスフェクトしたBa/F3細胞に添加した。トランスフェクト後のBa/F3細胞は、ヒトIL-23に反応して増殖する。実験により、この生物学的活性が、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46によりそれぞれ3.7nMおよび5.4nMのIC50値でブロックされることが示される。陰性対照SEQ ID NO:43は、細胞増殖に効果を示さなかった。データをS字状用量反応モデルで適合させた。

【図16】標的IL-17Aに対するSEQ ID NO:63および62ならびにSEQ ID NO:1のリポカリウムテインの特異性を決定した代表的な実験を提供する。ビオチン化IL-17Aをマイクロタイタープレート上に捕捉し、試験分子を滴定した。結合した試験分子を、実施例16に記載されるHRP標識抗ヒトTLc特異性抗体により検出した。自由パラメーターとしてEC50値および最大シグナル、ならびに1に固定した傾きを用いた1:1結合モデルでデータを適合させた。

【図17】標的IL-23に対するSEQ ID NO:64および62ならびにSEQ ID NO:2のリポカリウムテインの特異性を決定した代表的な実験を提供する。ビオチン化IL-23をマイクロタイタープレート上に捕捉し、試験分子を滴定した。結合した試験分子を実施例17に記載されるHRP標識抗ヒトNGAL特異性抗体により検出した。自由パラメーターとしてEC50値および最大シグナル、ならびに1に固定した傾きを用いた1:1結合モデルでデータを適合させた。

【図18】標的TNF- $\alpha$ に対するSEQ ID NO:63と62とのポリペプチド融合体およびSEQ ID NO:64と62とのポリペプチド融合体の特異性、ならびにSEQ ID NO:61および62の抗体の特異性を決定した代表的な実験を提供する。TNF- $\alpha$ をマイクロタイタープレート上にコーティングし、試験分子を滴定した。結合した試験分子を実施例18に記載されるHRP標識抗ヒトIgG Fc特異性抗体により検出した。自由パラメーターとしてEC50値および最大シグナル、ならびに1に固定した傾きを用いた1:1結合モデルでデータを適合させた。

【図19】SEQ ID NO:63と62とのポリペプチド融合体およびSEQ ID NO:64と62とのポリペプチド融合体が、両方の標的、すなわちそれぞれTNF- $\alpha$  およびIL-17A、TNF- $\alpha$  およびIL-23に同時に結合する能力を決定した代表的な実験を提供する。組み換えTNF- $\alpha$ をマイクロタイタープレート上にコーティングし、続いてポリペプチド融合体を滴定した。その後、一定濃度のビオチン化IL-17AまたはIL-23のいずれかを添加し、それを実施例19に記載されるHRP標識extravidinにより検出した。自由パラメーターとしてEC50値および最大シグナル、ならびに1に固定した傾きを用いた1:1結合モデルでデータを適合させた。

【発明を実施するための形態】

【0041】

IV. 本開示の詳細な説明

10

20

30

40

50

本開示は、IL-17Aおよび/またはIL-23p19に対する結合特異性を有する最新技術のポリペプチドまたはタンパク質であって、ポリペプチドが、IL-17AまたはIL-23p19に少なくとも検出可能な親和性で結合するリポカリウムテインを含む、ポリペプチドまたはタンパク質に寄与する。

【0042】

一部の態様では、ポリペプチドは、IL-17Aと少なくとも検出可能な親和性で結合可能なリポカリウムテインである。一部の態様では、ポリペプチドは、IL-23p19と少なくとも検出可能な親和性で結合可能なリポカリウムテインである。本開示は、対象におけるIL-17AおよびIL-23p19の結合のための両方のポリペプチドの使用にも関する。

【0043】

一部の局面では、ポリペプチドは、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性を有し、別のサブユニットが、IL-23p19に対する結合特異性を有する、少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質である。一部のさらなる態様では、融合タンパク質は、さらにサブユニットを含む場合があり、その際、サブユニットは、IL-23p19またはIL-17Aに対する結合特異性を有する。一部のなおさらなる態様では、融合タンパク質は、IL-17Aに特異的な1つのサブユニット、IL-23p19に特異的な1つのサブユニット、および細菌アルブミン結合ドメイン (ABD) を含む1つのサブユニットを含み得る。

【0044】

一部の他の局面では、本開示のポリペプチドは、IL-17Aに特異的な少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質、またはIL-23p19に特異的な少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質でもあり得る。

【0045】

一部の態様では、IL-17Aに対する結合特異性を有する融合タンパク質のサブユニットは、本開示のIL-17Aに特異的なリポカリウムテインを含む。一部の態様では、IL-23p19に対する結合特異性を有する融合タンパク質のサブユニットは、IL-23p19に結合する抗体を含む。一部の他の態様では、IL-23p19に対する結合特異性を有する融合タンパク質のサブユニットは、本開示のIL-23p19に特異的なリポカリウムテインを含む。一部の態様では、IL-17Aに対する結合特異性を有する融合タンパク質のサブユニットは、IL-17Aに結合する抗体を含む。

【0046】

本開示のポリペプチドまたはタンパク質は、リポカリン、好ましくはレチノール結合タンパク質 (RBP)、ピリン結合タンパク質 (BBP)、アポリポタンパク質D (APO D)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、涙液リポカリン (TLPCまたはTlc)、 $\alpha_2$ -ミクログロブリン関連タンパク質 (A2m)、24p3/ウテロカリン (24p3)、フォンエブネル腺タンパク質1 (VEGP1)、フォンエブネル腺タンパク質2 (VEGP2)、および主要アレルゲンCa n f1前駆体 (ALL-1) からなる群より選択されるリポカリンのムテインであることができる。

【0047】

本明細書において使用される「リポカリン」は、複数 (好ましくは4つ) のループにより一端で2つ1組になって繋がった複数 (好ましくは8つ) の鎖を含むことにより結合ポケットを画定する円柱状 プリーツシート超二次構造領域を有する、分子量約18~20kDAのモノマー性タンパク質として定義される。それ以外は強固なりポカリン骨格におけるループのこの多様性が、異なる大きさ、形状、および化学特性を有する標的を収容することがそれぞれ可能であるリポカリンファミリーのメンバー間の、多種多様な異なる結合様式をもたらしている (例えば、Flower, D.R. (1996)、前記; Flower, D.R. et al. (2000)、前記、またはSkerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350に総説されている)。実際、リポカリンファミリーのタンパク質は、全体的な配列保存性が異常に低レベルである (多くの場合に20%未満の配列同一性を有する) が、それでも全体的フォールディングパターンは高度に保存されており、広範なりガンドに結合するように自然界で進化している。様々なリポカリンにおける位置間の対応は、当業者に周知である。例えば米

10

20

30

40

50

国特許第7,250,297号を参照されたい。

【0048】

上に言及したように、リポカリンは、その超二次構造、すなわち4つのループにより一端で2つ1組になって繋がった8つの鎖を含むことにより結合ポケットを画定する円柱状ブリーツシート超二次構造領域により定義されるポリペプチドである。本開示は、本明細書において具体的に開示されたりポカリンムテインに限定されない。これに関して、本開示は、4つのループにより一端で2つ1組になって繋がった8つの鎖を含むことにより結合ポケットを画定する円柱状ブリーツシート超二次構造領域を有するリポカリンムテインであって、4つのループの少なくとも3つのそれぞれの少なくとも1つのアミノ酸は、変異されており、該リポカリンは、IL-17AまたはIL-23p19に検出可能な親和性で結合するために有効である、リポカリンムテインに関する。

10

【0049】

特定の一態様では、本明細書開示のリポカリンムテインは、リポカリン-1、涙液プレアルブミン、またはフォンエブネル腺タンパク質とも呼ばれるヒト涙液リポカリン (TLPCまたはTlc) のムテインである。本明細書において使用される用語「ヒト涙液リポカリン」または「Tlc」または「リポカリン-1」は、SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセッション番号P31025を有する成熟ヒト涙液リポカリン (アイソフォーム1) を表す。SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセッション番号P31025に示されるアミノ酸配列は、好ましい「参照配列」として使用される場合があり、より好ましくは、SEQ ID NO:41に示されるアミノ酸配列が参照配列として使用される。

20

【0050】

本開示は、成熟ヒト涙液リポカリンの配列の最初の4つのN末端アミノ酸残基 (His-His-Leu-Leu; 位置1~4) および/または成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の最後の2つのC末端アミノ酸残基 (Ser-Asp; 位置157~158) (SWISS-PROTデータバンクアクセッション番号P31025) が欠失した上記と同義のTlcムテイン (SEQ ID NO:2~5) も包含する。加えて、本開示は、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の配列位置108に対応する1つのGHループアミノ酸残基 (Lys) が欠失している、上記と同義のTlcムテイン (SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:43) を包含する。成熟ヒト涙液リポカリンの野生型ポリペプチド配列の別の可能性のある変異は、その全体が参照により本明細書に組み入れられるPCT出願WO2005/019256に記載のように、配列位置5~7のアミノ酸配列 (Ala Ser Asp) をGly Gly Aspに交換することである。

30

【0051】

本開示によるTlcムテインは、さらに、アミノ酸置換Arg111 Proを含み得る。本開示によるTlcムテインは、置換Lys114 Trpも含み得る。それは、置換Cys101 SerまたはCys101 Thrも含み得る。一部の好ましい態様では、本開示によるTlcムテインは、置換Cys153 Serも含み得る。

【0052】

アミノ酸配列の改変には、特定の制限酵素のための切断部位を組み入れることによって変異リポカリン遺伝子またはその部分のサブクローニングを簡略化するための単一アミノ酸位置の特異的変異誘発が含まれる。加えて、IL-17AまたはIL-23p19に対するTlcムテインの親和性をさらに改善するために、これらの変異を組み入れることもできる。さらに、フォールディング安定性、血清安定性、タンパク質抵抗性、もしくは水溶解性を改善するためなど、ムテインのある特徴を改変するために、または必要であれば凝集傾向を低減するために、変異を導入することができる。例えば、ジスルフィド架橋形成を防止するために、天然のシステイン残基が他のアミノ酸に変異され得る。Tlcムテインのアミノ酸配列にシステイン残基を導入するためのそのような変異の例示的な可能性には、置換Thr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 Cys、およびGlu131 Cysが含まれる。例えばそれぞれのTlcムテインの血清半減期を増加させるために、アミノ酸位置40、73、90、95、および/または131のいずれかの側部に生成したチオール部位を使用してムテインがPEG化またはHES化され得る。

40

50

## 【0053】

別の特定の態様では、本明細書開示のリポカリンムテインは、ヒトリポカリン2のムテインである。本明細書において使用される用語「ヒトリポカリン2」または「ヒトLcn2」または「ヒトNGAL」は、SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセス番号P80188の成熟ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)を表す。本開示のヒトリポカリン2ムテインは、本明細書において「hNGALムテイン」とも称され得る。SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセス番号P80188に示されるアミノ酸配列は、好ましい「参照配列」として使用される場合があり、より好ましくは、SEQ ID NO:43に示されるアミノ酸配列が参照配列として使用される。

## 【0054】

一部の態様では、検出可能な親和性でIL-17AまたはIL-23p19に結合するリポカリンムテインは、天然システイン残基の、別のアミノ酸、例えばセリン残基による少なくとも1つのアミノ酸置換を含み得る。一部の他の態様では、検出可能な親和性でIL-17AまたはIL-23p19に結合するリポカリンムテインは、野生型リポカリンの1つまたは複数のアミノ酸を置換している、1つまたは複数の天然でないシステイン残基を含み得る。さらなる特定の態様では、本開示によるリポカリンムテインは、システイン残基による天然アミノ酸の少なくとも2つのアミノ酸置換を含むことにより、1つまたは複数のシステイン架橋を形成する。一部の態様では、システイン架橋は、少なくとも2つのループ領域を繋ぎ得る。これらの領域の定義は、本明細書においてFlower (Flower, 1996、前記、Flower, et al., 2000、前記)およびBreustedtら(2005、前記)に従って使用される。

## 【0055】

IL-17AまたはIL-23p19に対する、またはそれに特異的な、本開示のタンパク質には、定義されたタンパク質骨格に基づく任意の数の特異的結合タンパク質ムテインが含まれる。好ましくは、交換、欠失または挿入されるヌクレオチドまたはアミノ酸の数は、それぞれ、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個以上、例えば25、30、35、40、45または50個であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11個が好ましく、9、10または11個がいっそうより好ましい。しかし、本開示のリポカリンムテインが、IL-17AまたはIL-23p19に、特にヒトIL-17AまたはヒトIL-23p19に依然結合可能であることが、好ましい。

## 【0056】

一局面では、本開示には、IL-17AまたはIL-23p19と少なくとも検出可能な親和性で結合する様々なリポカリンムテインが含まれる。この意味で、IL-17AまたはIL-23p19は、参照野生型リポカリンの非天然リガンドと見なすことができ、ここで、「非天然リガンド」は、生理条件下で野生型リポカリンと結合しない化合物を表す。野生型リポカリンの特定の配列位置に1つまたは複数の変異を操作することによって、本発明者らは、非天然リガンド、例えばIL-17AまたはIL-23p19に対する高い親和性および高い特異性が可能であることを実証した。一部の態様では、野生型リポカリンの特定の配列位置をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個以上でさえあるヌクレオチドトリプレットにおいて、これらの位置でのヌクレオチドトリプレットのサブセットによる置換によりランダム変異誘発が実施され得る。

## 【0057】

さらに、本開示のリポカリンムテインは、少なくとも任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個を含む、任意の1つまたは複数の、参照リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の特定の配列位置に対応する配列位置に変異アミノ酸残基を有し得る。

## 【0058】

本開示のタンパク質は、変異アミノ酸配列位置以外に「親の」タンパク質骨格(リポカリンなど)の野生型(天然)アミノ酸配列を含み得る。一部の態様では、本開示によるリポカリンムテインは、そのような変異が、ムテインの結合活性およびフォールディングを少なくとも本質的に妨害しないまたは干渉しない限り、1つまたは複数の配列位置に1つまたは複数のアミノ酸変異も有し得る。そのような変異は、確立された標準方法(Sambrook

10

20

30

40

50

, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) を使用してDNAレベルで非常に容易に成し遂げることができる。アミノ酸配列の変更の具体的な例は、挿入または欠失およびアミノ酸置換である。そのような置換は、保存的であり得、すなわち、アミノ酸残基が、特に極性およびサイズに関して化学的に類似の特性のアミノ酸残基に置き換えられる。保存的置換の例は、以下の群のメンバーの間での置換である：1) アラニン、セリン、およびトレオニン；2) アスパラギン酸およびグルタミン酸；3) アスパラギンおよびグルタミン；4) アルギニンおよびリジン；5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン；ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方で、アミノ酸配列中に非保存的変更を導入することも可能である。加えて、単一のアミノ酸残基を置き換える代わりに、ヒト涙液リポカリンの一次構造の1つまたは複数の連続アミノ酸を挿入または欠失させることも、これらの欠失または挿入が安定にフォールディングされた/機能的ムテイン(例えば、切断されたN末端およびC末端を有するT1cムテイン)を生じる限り、可能である。そのようなムテインでは、例えば、1つまたは複数のアミノ酸残基がポリペプチドのNまたはC末端に付加またはその末端から欠失している。一般的に、そのようなムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列に対して少なくとも約70%の、少なくとも約80%を含む、少なくとも約85%などのアミノ酸配列同一性を有し得る。具体的な一例として、本開示は、成熟ヒト涙液リポカリンの配列のN末端の最初の4つのアミノ酸残基(His-His-Leu-Leu；位置1~4)および/または成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の最後の2つのC末端アミノ酸残基(Ser-Asp；位置157~158)が欠失した(SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:43)、上記と同義のT1cムテインも包含する。

10

20

**【0059】**

本明細書開示のリポカリンムテインのアミノ酸配列は、他のリポカリンとの配列同一性と比較した場合、参照リポカリンに対して高い配列同一性を有する。この一般的な状況で、本開示のリポカリンムテインのアミノ酸配列は、参照リポカリンのアミノ酸配列と少なくとも実質的に類似しているが、但し、場合によってはアミノ酸の付加または欠失の結果であるギャップ(下に定義)がアライメント中にあることを条件とする。参照リポカリンの配列と実質的に類似する本開示のリポカリンムテインのそれぞれの配列は、一部の態様では、参照リポカリンの配列に対して少なくとも70%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも75%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも80%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも82%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも85%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも87%の同一性もしくは配列相同性、または少なくとも95%の同一性もしくは配列相同性を含む少なくとも90%の同一性もしくは配列相同性を有するが、但し、変更された位置または配列が保持され、1つまたは複数のギャップが可能であることを条件とする。

30

**【0060】**

結合特異性は絶対的な特性ではなく相対的な特性であるので、本開示のリポカリンムテインが、標的と1種または複数種の参照標的とを識別するのが可能であれば、本明細書において使用される場合、本開示のリポカリンムテインは、その標的(例えばIL-17AまたはIL-23p19)に「特異的に結合する」。「特異的結合」は、例えば、ウエスタンブロット、ELISA検査、RIA検査、ECL検査、IRMA検査、FACS、IHC、およびペプチドスキャンにより、判定することができる。

40

**【0061】**

一態様では、本開示のリポカリンムテインは、そのN末端および/またはそのC末端において、ムテインの血清半減期を延長するタンパク質ドメインである融合パートナーに融合されている。さらに特定の態様では、タンパク質ドメインは、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質である。

**【0062】**

別の態様では、本開示のリポカリンムテインは、ムテインの血清半減期を延長する化合

50

物にコンジュゲートされている。より好ましくは、ムテインは、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンブ、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている。

【0063】

なお別の態様では、本開示は、本明細書開示のリポカリンムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。本開示は、該核酸分子を含む宿主細胞を包含する。

【0064】

本開示によるT1cムテインは、天然形態のヒト涙液リポカリンの変異誘発により得ることができる。本開示によるhNGALムテインは、天然形態のヒトリポカリン2の変異誘発により得ることができる。変異誘発の一部の態様では、置換（または置き換え）は、保存的置換である。しかしながら、リポカリンムテインがIL-17AもしくはIL-23p19に結合する能力を保持し、かつ/または成熟ヒト涙液リポカリンもしくは成熟ヒトリポカリン2のアミノ酸配列とそれぞれ少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、もしくは少なくとも85%以上同一である点で、それから置換された配列に対する同一性を有する限り、任意の置換（非保存的置換または下記の例示的な置換からの1つもしくは複数を含む）が、想定される。

10

【0065】

A. インターロイキン-17A（IL-17A、IL-17と同義）に対して結合親和性を有するリポカリンムテイン

20

一局面では、本開示は、ヒトIL-17A（「IL-17」と同じ）に結合するヒトリポカリンムテインおよびその有用な適用を提供する。本明細書記載の結合タンパク質は、ヒトIL-17Aホモダイマー（「IL-17A/A」と同じ）および/またはヒトIL-17AとヒトIL-17Fホモログとのヘテロダイマー（「IL-17A/F」と同じ）に結合し得る。本開示は、本明細書記載のIL-17A結合タンパク質を製造する方法およびそのようなタンパク質を含む組成物も提供する。本開示のIL-17A結合タンパク質およびその組成物は、試料中のIL-17A（IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む）を検出する方法または対象におけるIL-17A（IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む）を結合させる方法に使用され得る。本開示によって提供される使用に伴うこれらの特徴を有するそのようなヒトリポカリンムテインは、以前に報告されていない。

30

【0066】

本開示の一態様は、本質的に実施例1に記載されるアッセイにおいて測定される場合、約1nM以下、例えば0.8nMの $K_D$ で測定される親和性でインターロイキン-17A（IL-17A）に結合可能なリポカリンムテインに関する。

【0067】

一部の他の態様では、リポカリンムテインは、本質的に実施例3に記載される競合ELISA様式において、IL-17Aのその受容体IL-17RAに対する結合を、約100pM以下、例えば75pMのIC50値で阻害することが可能である。

【0068】

一部の特定の態様では、IL-17A結合性リポカリンムテインは、ヒトIL-17A、カニクイザルIL-17A、およびキヌザルIL-17Aと交差反応性である。

40

【0069】

一部のなおさらなる態様では、本開示のリポカリンムテインは、その受容体IL-17RAに対するIL-17Aの結合をブロックすることが可能である。一部のさらなる態様では、リポカリンムテインおよびベンチマーク抗体を本質的に実施例5に記載されるアッセイにおいて測定される場合に、リポカリンムテインは、ベンチマーク抗体のEC50値と少なくとも同じくらい（すなわち差が0.1nM未満）またはそれよりも優れた平均EC50値を有する。一部の態様では、ベンチマーク抗体は、(i)第1のサブユニットとしてSEQ ID NO:53または55、および(ii)第2のサブユニットとしてSEQ ID NO:54または56を含むポリペプチドである。同時にベンチマーク抗体がアッセイにおいて約2.33nM以下、例えば約0.12nMのEC50値を有す

50

る場合、リポカリンムテインは、アッセイにおいて約0.13nM以下でさえある平均IC50値を有し得る。

【0070】

一部の他の態様では、本開示のIL-17A結合性リポカリンムテインは、例えば、本質的に実施例1に記載されるアッセイにおいて、SEQ ID NO:42のリポカリンムテインの $K_D$ よりも低い、最初に述べたリポカリンムテインの $K_D$ で測定される、SEQ ID NO:42のリポカリンムテインよりも高い親和性でIL-17Aに結合可能である。一部のさらなる態様では、本開示のIL-17A結合性リポカリンムテインは、例えば本質的に実施例5に記載されるアッセイにおいて測定される場合、IL-17Aのその受容体IL-17RAに対する結合を、SEQ ID NO:42のリポカリンムテインよりも低いEC50値で阻害することが可能である。

10

【0071】

1. インターロイキン-17A (IL-17A) に対して結合親和性を有する例示的なりポカリンムテイン

一局面では、本開示は、インターロイキン17A (IL-17A) に対する、またはそれに特異的な、新規な特異的結合性ヒト涙液リポカリンムテインに関する。本明細書開示のヒト涙液リポカリンムテインは、治療および/または診断目的で使用され得る。本開示のヒト涙液リポカリンムテインは、本明細書において「T1cムテイン」とも称され得る。結合特異性は絶対的な特性ではなく相対的な特性であるので、本開示のT1cムテインが、標的と1種または複数種の参照標的とを識別するのが可能であれば、本明細書において使用される場合、本開示のT1cムテインは、その標的 (例えば本明細書ではIL-17A) に「特異的に結合する」。「特異的結合」は、例えば、ウエスタンブロット、ELISA検査、RIA検査、ECL検査、IRMA検査、FACS、IHC、およびペプチドスキャンにより決定することができる。

20

【0072】

これに関して、本開示は、約10nM、約1nM、または約0.1nM以下のKDで測定される親和性でインターロイキン-17A (IL-17A) に結合可能な1種または複数種のT1cムテインを提供する。より好ましくは、T1cムテインは、約1nM、0.8nM、0.6nM、または100pM以下のKDで測定される親和性を有することができる。

【0073】

一部の特定の態様では、そのようなT1cムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SWISS-PROTデータバンクアクセス番号P31025; SEQ ID NO:41) の位置26~33、56、58、60~61、64、92、101、104~106、108、111、114、および153に対応する1つまたは複数の位置に変異アミノ酸残基を含む。

30

【0074】

さらに特定の態様では、そのようなT1cムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:41) の位置101、111、114、および153に対応する1つまたは複数の位置に変異アミノ酸残基をさらに含み得る。

【0075】

一部のさらなる態様では、T1cムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:41) の配列位置26、27、28、29、30、31、32、33、56、58、60、61、64、92、101、104、105、106、108、111、114、および153に対応する1つまたは複数の配列位置に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個以上でさえある変異アミノ酸残基を含み得る。

40

【0076】

一部のなおさらなる態様では、本開示は、ポリペプチドに関し、その際、該ポリペプチドは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列と比較して、配列位置26~33、56、58、60~61、64、92、101、104~106、108、111、114、および153に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個以上でさえある変異アミノ酸残基を含むT1cムテインであり、該ポリペプチドは、IL-17Aに、特にヒトIL-17Aに結合する。

【0077】

一部の態様では、本開示によるリポカリンムテインは、例えばセリン残基による、天然

50

システイン残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含み得る。一部の態様では、本開示によるTlcムテインは、セリン残基による位置61および/または153における天然システイン残基のアミノ酸置換を含む。これに関連して、システイン残基61および153によって形成される野生型涙液リポカリンの（それぞれの未処置（naive）核酸ライブラリーのレベルにおける）構造的ジスルフィド結合の除去（Breustedt, et al., 2005、前記参照）が、安定にフォールディングされるだけでなく、所与の非天然リガンドに高い親和性で結合することもできる涙液リポカリンムテインを提供し得ることが見出されたことは、注目される。理論に拘束されることを望むわけではないが、構造的ジスルフィド結合の除去は、本開示のムテインへの非天然の人工ジスルフィド結合の（自然）生成または計画的導入を可能にすることによって、ムテインの安定性を増大させるさらなる利点を提供するとも考えられる。例えば、一部の態様では、本開示によるTlcムテインは、セリン残基による位置101における天然システイン残基のアミノ酸置換を含む。さらに、一部の態様では、本開示によるムテインは、プロリン残基による位置111における天然アルギニン残基のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、本開示によるムテインは、トリプトファン残基による位置114における天然リジン残基のアミノ酸置換を含む。

10

#### 【0078】

本開示によるTlcムテインは、さらに、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列（SWISS-PROTデータバンクアクセス番号P31025）に関して、成熟ヒト涙液リポカリンの位置26～33、56、58、60～61、64、92、101、104～106、108、111、114および153のいずれかに、システイン残基による天然アミノ酸残基の、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個または少なくとも14個を含む、1つまたは複数のアミノ酸置換を含み得る。

20

#### 【0079】

一部の態様では、本開示によるムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列に関して、位置28または105にシステイン残基による天然アミノ酸のアミノ酸置換を含む。一部の態様では、本開示によるムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列に関して位置28または105にシステイン残基による天然アミノ酸のアミノ酸置換を含む。さらなる特定の態様では、本開示によるムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列に関して位置28および105に2つのシステイン残基による天然アミノ酸のアミノ酸置換を含む。

30

#### 【0080】

一部の態様では、本開示によるTlcムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列（SWISS-PROTデータバンクアクセス番号P31025）の配列位置61および153のそれぞれに存在するシステイン残基の少なくとも一方または両方が別のアミノ酸により置換されたアミノ酸、ならびに配列位置26～33、56、58、60～61、64、92、101、104～106、108、111、114、および153のいずれか1つに少なくとも3つのアミノ酸残基の変異を含む。位置26～34はABループに含まれ、位置55はシートの最末端に位置し、続く位置56～58ならびに60～61および64は、CDループに含まれる。位置104～108は、成熟ヒト涙液リポカリンのバレル構造の開放端の結合部位内のGHループに含まれる。これらの領域の定義は、Flower（Flower, 1996、前記、Flower, et al., 2000、前記）およびBreustedtら（2005、前記）に従って本明細書において使用される。一部の態様では、本開示によるTlcムテインは、アミノ酸置換Cys61 Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Gly、Gln、Asp、Asn、Leu、Tyr、Met、Ser、Pro、またはTrpおよびCys153 SerまたはAlaを含む。そのような置換は、Cys61およびCys153を連結する天然ジスルフィド架橋の形成を防止するために、したがって、ムテインの取り扱いを容易にするために、有用であることが証明されている。しかし、IL-17Aに結合し、Cys61とCys153との間に形成したジスルフィド架橋を有する涙液リポカリンムテインも、本開示の一部である。

40

#### 【0081】

一部の態様では、本開示によるIL-17A結合性Tlcムテインは、成熟ヒト涙液リポカリン

50

の直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:41) の配列位置26~33、56、58、60~61、64、92、101、104~106、108、111、114、および153の任意の1つまたは複数に、以下の1つまたは複数の変異アミノ酸残基を含む: Arg26 Phe; Glu27 Trp; Phe28 Cys; Pro29 Ser; Glu30 Gly; Met31 Ile; Asn32 His; Leu33 Glu; Leu56 Asp; Ser58 Glu; Arg60 Phe; Cys61 Leu; Val64 Phe; His92 Arg; Cys101 Ser; Glu104 Asp; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108の欠失; Arg111 Pro; Lys114 Trp; およびCys153 Ser。一部の態様では、本開示のTlcムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンのこれらの配列位置に2個以上、例えば3、4、5、6、7、8個または全ての変異アミノ酸残基を含む。

【0082】

さらに特定の態様では、本開示のTlcムテインは、SEQ ID NO:1またはそのフラグメントもしくは変種のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。

【0083】

さらに特定の態様では、本開示のTlcムテインは、SEQ ID NO:1からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、少なくとも80%、または少なくとも85%以上の同一性を有する。

【0084】

本開示は、SEQ ID NO:1からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するTlcムテインの構造ホモログも含み、構造ホモログは、Tlcムテインに関して約60%を超える、好ましくは65%を超える、70%を超える、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、92%を超える、最も好ましくは95%を超えるアミノ酸配列相同性または配列同一性を有する。

【0085】

一部の特定の態様では、本開示は、約1nM以下のKDで測定される親和性でIL-17Aに結合するリポカリンムテインを提供し、その際、リポカリンムテインは、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列に対して少なくとも90%以上、例えば95%の同一性を有する。

【0086】

2. インターロイキン17A (IL-17A) に対する結合親和性を有するリポカリンムテインの適用

IL-17Aは、多数の障害、例えば多発性硬化症 (MS) (Hellings, P. W. et al., *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 42-50; Matusevicius, D. et al., *Multiple Sclerosis* 5 (1999) 101-104)、関節リウマチ (RA) (Ziolkovska, M. et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 2832-38; Kotake, S. et al., *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 1345-52; Hellings, P. W. et al., *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 42-50) の病因に関係しているメモリーT細胞サブセット (Th17と呼ばれる) によって産生される炎症促進性サイトカインである。IL-17Aは、他の炎症性サイトカイン、ケモカインおよび接着分子の誘導 (Komiyama, Y. et al., *J. Immunol.* 177 (2006) 566-573)、乾癬、クローン病、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、喘息、および移植拒絶反応において役割を果たしている。

【0087】

IL-17Aは、炎症促進応答の誘導に関与し、組織壊死因子-アルファ (TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-8、IL-1、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、プロスタグランジンE2 (PGE2)、IL-10、IL-12、IL-1Rアンタゴニスト、白血病抑制因子、およびストロメライシンを含む多様な他のサイトカイン、因子、およびメディエーターの発現を誘導または仲介する (Yao et al., *J. Immunol.* 155(12): 5483-5486 (1995); Fossiez et al., *J. Exp. Med.*, 183(6): 2593-2603 (1996); Jovanovic et al., *J. Immunol.* 160: 3513-3521 (1998); Teunissen et al., *J. Investig. Dermatol.* 111: 645-649 (1998); Chabaud et al., *J. Immunol.* 161: 409-414 (1998))。IL-17Aは、軟骨細胞およびヒト変形性関節症外植片において一酸化窒素も誘導する (Shalom-Barak et al., *J. Biol Chem.*, 273: 27467-27473 (1998); Attur et al., *Arthritis Rheum.*, 40: 1050-1053 (1997))。IL-17Aは、それがT細胞介在自己免疫に果たす役割により、サイトカイン、ケモカイン、および成長因子 (上記) の放出を誘導し、好中球蓄積の重要な局所編成役であり、軟骨および骨の破壊に関与

10

20

30

40

50

する。IL-17Aシグナル伝達をターゲティングすることが、関節リウマチ(RA)、乾癬、クローン病、多発性硬化症(MS)、乾癬性疾患、喘息、およびループス(SLE)を含む多様な自己免疫疾患に有用であることを示し得る証拠がますます増え続けている(例えば、Aggarwal et al., J. Leukoc. Biol., 71(1): 1-8 (2002); Lubberts et al., "Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion," Arthritis Rheum., 50: 650-659 (2004)を参照されたい)。

【0088】

加えて、炎症過程および免疫調節過程が様々な形態の心血管疾患の病因に関係していることが、当技術分野において公知である(Biasucci, L., et al., Circulation 1999, 99:855-860; Albert, C, et al, Circulation 2002, 105:2595-9; Buffon, A., et al, NEJM 2002, 347:55-7; Nakajima, T., et al., Circulation 2002, 105:570-5)。最近の研究は、疾患の炎症応答および免疫調節応答を軽減することにより心血管疾患を処置するための基礎を確立している(Blankenberg, S., et al., Circulation 2002, 106:24-30; Mallat, Z., et al, Circulation 2001, 104:1598-603; Mallat, Z., et al, Circ Res. 2001, 89:E41-5)。心血管疾患は、心臓の筋肉および/または血管、末梢血管、筋肉ならびに様々な器官を冒すいくつかの障害を包含する。

【0089】

したがって、本開示のT1cμテインの多数の可能性のある適用は、医学に存在する。さらなる一局面では、本開示は、試料中のIL-17A(IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)を検出するための開示されたT1cμテインの使用およびそれぞれの診断方法に関する。

【0090】

本開示は、IL-17Aとの複合体形成について記載される1種または複数種のT1cμテインの使用も含む。

【0091】

したがって、本開示の別の局面では、開示されたμテインは、IL-17Aの検出のために使用される。そのような使用は、1種または複数種のμテインを、IL-17Aを含有する疑いのある試料に、適切な条件下で接触させることにより、μテインとIL-17Aとの間の複合体の形成を可能にする段階、および適切なシグナルにより複合体を検出する段階を含み得る。

【0092】

検出可能なシグナルは、上に説明したような標識により、または結合、すなわち複合体形成自体に起因する物理特性の変化により、生じさせることができる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、一方が金箔などの表面に固定化されている結合パートナー同士の結合時に変化する。

【0093】

本明細書開示のμテインは、IL-17Aの分離のためにも使用され得る。そのような使用は、1種または複数種のμテインを、IL-17Aを含有すると推定される試料に、適切な条件下で接触させることにより、μテインとIL-17Aとの間の複合体の形成を可能にする段階、および試料から複合体を分離する段階を含み得る。

【0094】

IL-17Aの検出およびIL-17Aの分離のための、開示されたμテインの使用では、μテインおよび/もしくはIL-17Aまたはそのドメインもしくはフラグメントが適切な固相上に固定化され得る。

【0095】

なお別の局面では、本開示は、本開示によるT1cμテインを含む診断または分析キットを特徴とする。

【0096】

診断におけるそれらの使用に加えて、なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17Aの結合のための、および/または対象におけるIL-17Aのその受容体に対する結合を阻害するための、本開示のμテインまたは該μテインを含む組成物の使用を包含する。

## 【0097】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17Aを結合させる方法であって、対象に、本開示の1種もしくは複数種のリポカリンムテインのまたは該ムテインを含む1種もしくは複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む方法の特徴とする。

## 【0098】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17Aのその受容体に対する結合を阻害するための方法であって、対象に、本開示の1種もしくは複数種のリポカリンムテインのまたは該ムテインを含む1種もしくは複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む方法を含む。

## 【0099】

本開示に関連して、IL-17Aに対して結合親和性を有する、開示されたりポカリンムテインは、ホモダイマーとして存在するIL-17Aに結合することができるが、そのようなムテインは、ホモログIL-17Fと複合体化してヘテロダイマー性IL-17A/Fを形成したヘテロダイマーとして存在するIL-17Aにも結合することができる。好ましい一態様では、本開示の1種のリポカリンムテインは、IL-17Fと複合体化したIL-17Aに検出可能な親和性で結合し得る。

## 【0100】

B. インターロイキン23p19 (IL-23p19) に対して結合親和性を有するリポカリンムテイン  
加えて、本開示は、ヒトIL-23p19に結合するヒトリポカリンムテインおよびそれに関する有用な適用を提供することによって、IL-23p19の代替的阻害剤のニーズを満たす。したがって、本開示は、本明細書記載のIL-23p19結合タンパク質を製造および使用方法ならびに試料中のIL-23p19を検出する方法または対象におけるIL-23p19を結合させる方法に使用され得る組成物も提供する。本開示により提供される使用に付随してこれらの特徴を有するヒトリポカリンムテインは、以前に報告されていない。

## 【0101】

本開示の一態様は、本質的に実施例6または実施例13記載に記載されるアッセイにおいて測定される場合、インターロイキン23p19 (IL-23p19) に、約0.6nMなどの約1nM以下のKDで測定される親和性で結合することが可能なりポカリンムテインに関する。

## 【0102】

一部の他の態様では、リポカリンムテインは、本質的に実施例8または実施例14に記載される競合ELISA様式において、IL-23のその受容体IL-23Rに対する結合を約0.55nM以下のIC50値で阻害することが可能である。

## 【0103】

一部の特定の態様では、リポカリンムテインは、ヒトIL-23およびマウスIL-23の両方と交差反応性である。

## 【0104】

一部のなおさらなる態様では、本開示のリポカリンムテインは、IL-23のその受容体IL-23Rに対する結合を阻害することが可能である。一部のさらなる態様では、リポカリンムテインおよびベンチマーク抗体が本質的に実施例10または実施例15記載に記載されるアッセイにおいて測定される場合、リポカリンムテインは、ベンチマーク抗体の平均EC50値と少なくとも同じくらいの平均EC50値（すなわち差が1.0nM未満）またはそれよりも優れた平均EC50値を有する。一部の態様では、ベンチマーク抗体は、(i)第1のサブユニットとしてSEQ ID NO:57または59、および(ii)第2のサブユニットとしてSEQ ID NO:58または60を含むポリペプチドである。ベンチマーク抗体が、アッセイにおいて同時に約1.2nMなどの約3nM以下のEC50値を有する場合、リポカリンムテインは、アッセイにおいて約1.2nM以下でさえある平均EC50値を有し得る。

## 【0105】

一部の他の態様では、本開示のIL-23p19結合性リポカリンムテインは、SEQ ID NO:44のリポカリンムテインよりも生物物理的に安定である。

## 【0106】

## 1. インターロイキン23p19 (IL-23p19) に対して結合親和性を有する例示的なりポカリンムテイン

一局面では、本開示は、インターロイキン23p19 (IL-23p19) に対する、またはそれに特異的な、新規な特異的結合性ヒトリポカリン2 (Lcn2またはNGAL) ムテインに関する。本明細書開示のヒトリポカリン2ムテインは、治療および/または診断目的で使用され得る。本開示のヒトリポカリン2ムテインは、本明細書において「NGALムテイン」とも称され得る。結合特異性は絶対的な特性ではなく相対的な特性であるので、本明細書において使用される本開示のT1cムテインが、標的と1種または複数種の参照標的とを識別するのが可能であれば、本開示のT1cムテインは、その標的(この場合IL-23p19)に「特異的に結合する」。「特異的結合」は、例えば、ウエスタンブロット、ELISA検査、RIA検査、ECL検査、IRMA検査、FACS、IHC、およびペプチドスキャンにより決定することができる。

### 【0107】

これに関して、本開示は、約10nM以下のKDで測定される親和性でインターロイキン23p19 (IL-23p19) に結合可能な1種または複数種のNGALムテインを提供する。より好ましくは、NGALムテインは、約1nM以下のKDで測定される親和性を有することができる。

### 【0108】

一部の態様では、本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:43) の位置28、36、40~41、49、52、65、68、70、72~73、75~77、79、81、87、96、98、100、103、106、114、120、125、127、134、および175に対応する1つまたは複数の位置に置換を含む。

### 【0109】

特定の態様では、本開示のリポカリンムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SWISS-PROTデータバンクアクセス番号P80188; SEQ ID NO:43) の配列位置28、36、40~41、49、52、65、68、70、72~73、75~77、79、81、87、96、98、100、103、106、114、120、125、127、134、および175に対応する配列位置に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21個以上でさえある置換を含む。好ましくは、本開示は、成熟ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列の位置36、87、および/または96に対応する位置における1つまたは複数の置換に加えて、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列の位置28、36、40~41、49、52、65、68、70、72~73、75~77、79、81、87、96、98、100、103、106、114、120、125、127、134、および175に対応する1つまたは複数の位置に置換を含むリポカリンムテインにすることが想定されている。

### 【0110】

一部のなおさらなる態様では、本開示は、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、配列位置28、36、40~41、49、52、65、68、70、72~73、75~77、79、81、87、96、98、100、103、106、114、120、125、127、134、および175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、または21個以上でさえある変異アミノ酸残基を含むhNGALムテインであるポリペプチドであって、IL-23p19、特にヒトIL-23p19に結合する、ポリペプチドに関する。

### 【0111】

一部の態様では、本開示のIL-23p19結合性hNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:43) の配列位置28、36、40~41、49、52、65、68、70、72~73、75~77、79、81、87、96、98、100、103、106、114、120、125、127、134、および175の任意の1つまたは複数に、以下の1つまたは複数の変異アミノ酸残基を含む: Gln28 His; Leu36 Glu; Ala40 Leu; Ile41 Leu; Gln49 Arg; Tyr52 Thr; Asn65 Asp; Ser68 Arg; Leu70 Glu; Arg72 Gly; Lys73 AlaまたはVal; Lys75 Thr; Asp77 Lys; Trp79 GlnまたはArg; Arg81 Gly; Asn96 Gly; Lys98 Glu; Tyr100 Met; Leu103 Met; Tyr106 Phe; Asn114 Asp; Met120 Ile; Lys125 Tyr; Ser127 Tyr; およびLys134 Glu。一部の態様では、本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALのこれらの配列位置に2つ以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12以上でさえある、または全ての変異アミノ酸残基を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 1 2 】

追加的に、本開示によるIL-23p19結合性hNGALムテインは、以下の置換：Cys87 Serも含み得る。さらに、本開示によるIL-23p19結合性hNGALムテインは、以下の置換：Cys76 TyrまたはArgも含み得る。さらに、本開示によるIL-23p19結合性hNGALムテインは、以下の置換：Cys175 Alaも含み得る。

## 【 0 1 1 3 】

一部の追加的な態様では、IL-23p19に結合する本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下のアミノ酸置換のセットの1つを含む：

(a)Gln28 His ; Leu36 Glu ; Ala40 Leu ; Ile41 Leu ; Gln49 Arg ; Tyr52 Thr ; Asn65 Asp ; Ser68 Arg ; Leu70 Glu ; Arg72 Gly ; Lys73 Ala ; Lys75 Thr ; Cys76 Tyr ; Asp77 Lys ; Trp79 Gln ; Arg81 Gly ; Asn96 Gly ; Lys98 Glu ; Tyr100 Met ; Leu103 Met ; Tyr106 Phe ; Met120 Ile ; Lys125 Tyr ; Ser127 Tyr ; およびLys134 Glu ;

(b)Gln28 His ; Leu36 Glu ; Ala40 Leu ; Gln49 Arg ; Tyr52 Thr ; Asn65 Asp ; Ser68 Arg ; Leu70 Glu ; Arg72 Gly ; Lys73 Val ; Lys75 Thr ; Cys76 Arg ; Asp77 Lys ; Trp79 Arg ; Arg81 Gly ; Asn96 Gly ; Tyr100 Met ; Leu103 Met ; Tyr106 Phe ; Lys125 Tyr ; Ser127 Tyr ; およびLys134 Glu ; または

(c)Gln28 His ; Leu36 Glu ; Ala40 Leu ; Ile41 Leu ; Gln49 Arg ; Tyr52 Thr ; Asn65 Asp ; Ser68 Arg ; Leu70 Glu ; Arg72 Gly ; Lys73 Val ; Lys75 Thr ; Cys76 Tyr ; Asp77 Lys ; Trp79 Gln ; Arg81 Gly ; Asn96 Gly ; Tyr100 Met ; Leu103 Met ; Tyr106 Phe ; Asn114 Asp ; Lys125 Tyr ; Ser127 Tyr ; およびLys134 Glu。

## 【 0 1 1 4 】

残りの領域、すなわち配列位置28、36、40~41、49、52、65、68、70、72~73、75~77、79、81、87、96、98、100、103、106、114、120、125、127、134、および175と異なる領域において、本開示のhNGALムテインは、変異アミノ酸配列位置以外の野生型（天然）アミノ酸配列を含み得る。

## 【 0 1 1 5 】

さらに特定の態様では、本開示によるリポカリンムテインは、SEQ ID NO:2および45~46またはそのフラグメントもしくは変種からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 1 1 6 】

本開示のIL-23p19結合性hNGALムテインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2および45~46からなる群より選択される配列に対して少なくとも95%の同一性を含む、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性などの高い配列同一性を有し得る。

## 【 0 1 1 7 】

本開示は、SEQ ID NO:2および45~46からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するhNGALムテインの構造ホモログであって、hNGALムテインに関して約60%を超える、好ましくは65%を超える、70%を超える、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、92%を超える、最も好ましくは95%を超えるアミノ酸配列相同性または配列同一性を有する構造ホモログも含む。

## 【 0 1 1 8 】

一部の特定の態様では、本開示は、約1nM以下のKDで測定される親和性でIL-23p19に結合するリポカリンムテインであって、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列に対して少なくとも90%以上、例えば95%の同一性を有するリポカリンムテインを提供する。

## 【 0 1 1 9 】

2. インターロイキン23p19 (IL-23p19) に対して結合親和性を有するリポカリンムテインの適用

インターロイキン23 (IL-23) は、独特なサブユニットp19 (本明細書において互換的に「IL-23p19」と称される)、およびインターロイキン12 (IL-12) と共有されるp40サブユニットからなるヘテロダイマー性サイトカインである (Oppmann, Immunity 13:115 (2000))。IL-23は、Th17と称される「新しい」Tヘルパー (Th) サブセットとして今や名付け

られている活性化CD4 T細胞からのIL-17AおよびIL-17Fの産生および/または維持を刺激することが見出されている。IL-23サイトカインおよび受容体の生物学についての総説は、Holscher, Curr. Opin. Invest. Drugs 6:489 (2005)およびLangrish et al. Immunol Rev. 202:96 (2004)に概説されている。Th1およびTh2系列と同様に、Th17細胞は、細胞外細菌などの特定クラスの病原体に対する適応免疫をもたらすように進化した可能性が最も高い。しかし、不適切なTh17応答は、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、および乾癬を含む自己免疫障害の増え続けるリストに深く関係している。

【0120】

これに関して、IL-23は、インターロイキン-17の産生によって特徴付けられる明確なCD4 T細胞活性化状態を促進する(J. Biol. Chem. 278:1910-191 (2003); Langrish et al. 10  
も参照されたい)。IL-23は、自己免疫性炎症を誘導する病原性T細胞集団を動員する(J. Exp. Med. 201: 233-240 (2005); Starnes et al. "Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production" J. Immunol. 167:4137-4140 (2001))。

【0121】

したがって、本開示のIL-23p19に対して結合親和性を有するムテインについての数多くの可能な適用が、医学において存在する。さらなる一局面では、本開示は、試料中のIL-23p19を検出するための、開示されたそのようなムテインの使用、およびそれぞれの診断方法に関する。 20

【0122】

本開示は、IL-23p19との複合体形成について記載される、IL-23p19に対して結合親和性を有する1種または複数種のムテインの使用にも関する。

【0123】

したがって、本開示の別の局面では、開示されたムテインは、IL-23p19の検出のために使用される。そのような使用は、1種または複数種のムテインを、IL-23p19を含有する疑いのある試料に、適切な条件下で接触させることにより、ムテインとIL-23p19との間の複合体形成を可能にする段階、および適切なシグナルにより複合体を検出する段階を含み得る。

【0124】

検出可能なシグナルは、上に説明したような標識により、または結合、すなわち複合体形成自体に起因する物理特性の変化により、生じさせることができる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、一方が金箔などの表面に固定化されている結合パートナー同士の結合時に変化する。 30

【0125】

本明細書開示のムテインは、IL-23p19の分離のためにも使用され得る。そのような使用は、1種または複数種のムテインを、IL-23p19を含有すると推定される試料に、適切な条件下で接触させることにより、ムテインとIL-23p19との間の複合体の形成を可能にする段階、および試料から複合体を分離する段階を含み得る。

【0126】

IL-23p19の検出およびIL-23p19の分離のための、開示されたムテインの使用において、ムテインおよび/もしくはIL-23p19またはそのドメインもしくはフラグメントが適切な固相上に固定化され得る。 40

【0127】

したがって、例えば試料中のIL-23p19などの分子の存在または非存在、およびその濃度またはレベルが決定され得る。

【0128】

なお別の局面では、本開示は、本開示によるIL-23p19に対する結合親和性を有するムテインを含む診断キットまたは分析キットを特徴とする。

【0129】

診断におけるそれらの使用に加えて、なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-23p19の結合のための、および/または対象におけるIL-23のその受容体に対する結合を阻害するための、本開示の該ムテインまたはそのようなムテインを含む組成物の使用を包含する。

【0130】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-23p19を結合させる方法であって、対象に、本開示のIL-23p19に対して結合親和性を有する1種もしくは複数種のリポカリンムテインのまたは該ムテインを含む1種もしくは複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む方法の特徴とする。

【0131】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-23のその受容体に対する結合を阻害するための方法であって、対象に、本開示のIL-23p19に対して結合親和性を有する1種もしくは複数種のリポカリンムテインのまたは該ムテインを含む1種もしくは複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む方法を含む。

【0132】

C. IL-17A結合性リポカリンムテインおよび/またはIL-23p19結合性リポカリンムテインを含む組成物ならびにリポカリンムテインの使用

IL-17AおよびIL-23は、炎症に關与するサイトカインである。ヒトインターロイキン-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む「IL-17」としても公知)は、インターロイキン6 (IL-6)の発現、細胞内接着分子1 (ICAM-1)、インターロイキン8 (IL-8)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、およびプロスタグランジンE2の発現を刺激するサイトカインであって、CD34+造血前駆細胞の好中球への選択的成熟に役割を果たすサイトカインである (Yao et al., J. Immunol 755:5483 (1995); Fossiez et al., J. Exp. Med. 183:2593 (1996))。ヒトインターロイキン23 (「IL-23」としても公知)は、T細胞、特にメモリーT細胞の増殖を促進することが報告されているサイトカインである。

【0133】

IL-17A (IL-17A/Fとも名付けられている、IL-17Fと複合体化したIL-17Aを含む)およびIL-23の両方が、多発性硬化症、関節リウマチ、クローン病、および乾癬などの多数の自己免疫疾患に重要な役割を果たすことが報告されている。IL-23およびIL-17Aの両方が、多発性硬化症を有するヒトの中樞神経系および多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を経験しているマウスにおいて過剰発現されている。EAEがミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 35-55ペプチドまたはプロテオリピドペプチド (PLP) のいずれかによって誘導される場合、過剰発現がマウスにおいて観察される。さらに、IL-23p19またはIL-17Aのいずれかの中和は、マウスにおけるEAE症状の改善を招く (Park et al., Immunol 6:1133 (2005); Chen et al., J Clin Invest. 116:1317 (2006))。

【0134】

IL-17AおよびTh17細胞がIL-23非依存的な供給源から産生できることも実証され、IL-17エフェクター応答のインビボ発生は、IL-23非依存的であることが示されている (Mangan et al., Nature 441:231 (2006))。IL-23の中和は、既存のIL-17A産生細胞を理論的に除去するが、新しいTh17細胞の発生を完全には防止しない。

【0135】

したがって、IL-23 (p19を介して) およびIL-17Aの両方に結合することが、IL-23p19単独またはIL-17A単独の中和よりも治療的に有効であり、したがって、炎症性疾患の有効な処置に有益であることから、本開示は、これらの炎症促進性サイトカインIL-17AおよびIL-23p19の両方の結合に関する。

【0136】

IL-17Aおよび/またはIL-23p19に対する抗体が記載されているものの、これらの抗体に基づくアプローチは、複雑な哺乳類細胞産生系を必要とする、ジスルフィド結合安定性に依存する、一部の抗体フラグメントが凝集する傾向がある、溶解性が限られている、そし

10

20

30

40

50

て最後ではあるが重要なこととして、それらは、ヒト化された場合であっても、望まれない免疫応答を誘発し得るなどのいくつかの重大な欠点をまだ有している。したがって、新規なクラスのIL-17A結合タンパク質またはIL-23p19結合タンパク質、例えばIL-17AまたはIL-23p19に対して結合親和性を有するリポカリンムテインの生成のための骨格として、リポカリンなどの小型球状タンパク質を開発するといった、まだ満たされていないニーズが存在する。

【0137】

したがって、IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)ならびに/またはIL-23p19に結合するヒトリポカリンムテインであって、薬学的適用に使用することができるヒトリポカリンムテインを提供することが、本開示の目的である。本開示は、該リポカリンムテインおよび任意で1種または複数種の薬学的または診断学的に許容される賦形剤(例えばアジュバント、希釈剤、または担体)を含む1種または複数種の組成物も提供する。本開示のリポカリンムテインおよびその組成物は、試料中のIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)および/またはIL-23p19を検出する方法、あるいは対象におけるIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)および/またはIL-23p19を結合させる方法に使用され得る。

10

【0138】

上述のように、IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)およびIL-23p19を、それぞれIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)またはIL-23p19に特異的なリポカリンムテインと同時に結合させることは、それぞれIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/F)単独の結合またはIL-23p19単独の結合が誘導し得る低酸素介在効果の一部を克服することもできる。したがって、本開示は、対象におけるIL-17AおよびIL-23p19の結合のための、(i)IL-17Aに特異的な第1のリポカリンムテインおよび(ii)IL-23p19に特異的な第2のリポカリンムテインの使用を包含する。そのような使用は、対象に、(i)IL-17Aに特異的な第1のリポカリンムテインおよび(ii)IL-23p19に特異的な第2のリポカリンムテインの有効量を投与する段階を含む。

20

【0139】

本開示に関連して、IL-17Aに特異的なリポカリンムテインは、ホモダイマーとして存在するIL-17A (すなわちIL-17A/A)に結合することができるが、それは、ホモログIL-17Fと複合体化してヘテロダイマーIL-17A/Fを形成するヘテロダイマーとして存在するIL-17Aにも結合することができる。好ましい一態様では、リポカリンムテインは、IL-17AとIL-17Fとの複合体に結合する。

30

【0140】

第1のリポカリンムテインおよび第2のリポカリンムテインは、並行して、同時に、または順次投与されるのを含めて、組み合わせで投与され得る。一部の態様では、第1のリポカリンムテインおよび第2のリポカリンムテインは、投与され得る組成物中に含まれ得る。組成物は、少なくとも1種の薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤、または担体に関連して、有効量の活性成分としての第1および第2のリポカリンムテインを含み得る。第1のリポカリンムテインおよび第2のリポカリンムテインはまた、個別の間隔で独立した時点において投与されるのを含めて、相互に独立して投与され得る。

40

【0141】

一部の態様では、本開示は、IL-17Aに特異的な第1のリポカリンムテインおよび(ii)IL-23p19に特異的な第2のリポカリンムテインを含む組成物であって、例えば対象においてIL-17AおよびIL-23p19の結合方法に使用することができる組成物にも関する。加えて、そのような組成物は、例えば試料中のIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)およびIL-23p19を検出する方法に使用され得る。

【0142】

一部の他の態様では、本開示は、第1のリポカリンムテインおよび第2のリポカリンムテインの組み合わせに関する。これらのリポカリンムテインの一方は、所与の非天然標的としてのIL-17Aに検出可能な親和性で結合することができる。他方のリポカリンムテインは、所与の非天然標的としてのIL-23p19に検出可能な親和性で結合することができる。した

50

がって、それぞれのリボカリウムテインは、所与の非天然標的としてのIL-17AまたはIL-23p19にそれぞれ結合する。用語「非天然標的」は、生理条件下で対応するリボカリウムと結合しない化合物を表す。例えば、第1のリボカリウムテインは、IL-17Aに結合することができ、第2のリボカリウムテインは、IL-23p19に結合することができ、またはその逆である。第1のリボカリウムテインと第2のリボカリウムテインとの組み合わせは、様々な形態で提供され得る。

【0143】

一部の態様では、本開示に使用される、IL-17Aに特異的なリボカリウムテインは、検出可能な親和性で、すなわち約100nM、約50nM、約25nMまたは約15nMを含む少なくとも200nMの解離定数で、IL-17Aに結合することが可能である。一部の態様では、本開示に使用されるIL-23p19に特異的なリボカリウムテインは、検出可能な親和性で、すなわち、約100nM、約50nM、約25nMまたは約15nMを含む少なくとも200nMの解離定数で、IL-23p19に結合することが可能である。一部のさらに好ましい態様では、本開示による組み合わせのリボカリウムテインは、それぞれIL-17AまたはIL-23p19に、少なくとも約10nM、約1nM、約0.1nM、または約10pM以下でさえある、IL-17AまたはIL-23p19に対する解離定数で結合する。したがって、本開示は、(i)IL-17Aに対して特に高い親和性を有するリボカリウムテインと、(ii)IL-23p19に対して特に高い親和性を有するリボカリウムテインとの組み合わせを提供する。

【0144】

一部の態様では、IL-17Aに対して検出可能な親和性を有するリボカリウムテインは、ヒト涙液リボカリウムのムテインである。これら、およびIL-17Aに対して検出可能な親和性を有するリボカリウムテインに関するさらなる詳細は、本開示のA節に見出すことができる。

【0145】

特定の好ましい一態様では、IL-17Aに特異的なリボカリウムテインは、SEQ ID NO:1に示される。

【0146】

一部の態様では、IL-23p19に対して検出可能な親和性を有するリボカリウムテインは、ヒト涙液リボカリウムのムテインまたはヒト好中球ゼラチナーゼ関連リボカリウムのムテインである。これら、およびIL-23p19に対して検出可能な親和性を有するリボカリウムテインのさらなる詳細は、本開示のB節に開示されている。

【0147】

特定の好ましい一態様では、IL-23p19に特異的なリボカリウムテインは、SEQ ID NO:2、45、および46の任意の1つに示される。

【0148】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17AおよびIL-23を結合させる方法であって、対象に、(i)IL-17Aに特異的な第1のリボカリウムテインおよび(ii)IL-23p19に特異的な第2のリボカリウムテインの有効量を投与する段階を含む方法の特徴とする。

【0149】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17AおよびIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を阻害するための方法であって、対象に、(i)IL-17Aに特異的な第1のリボカリウムテインおよび(ii)IL-23p19に特異的な第2のリボカリウムテインの有効量を投与する段階を含む方法を含む。

【0150】

本開示は、IL-17AおよびIL-23p19との複合体の形成のための、(i)IL-17Aに特異的な第1のリボカリウムテインおよび(ii)IL-23p19に特異的な第2のリボカリウムテインの使用も含む。

【0151】

したがって、本開示の別の局面では、開示されたムテインは、IL-17AおよびIL-23p19の検出のために使用することができる。そのような使用は、2種以上のムテインを、IL-17A

10

20

30

40

50

およびIL-23p19を含有する疑いのある試料に、適切な条件下で接触させることにより、それぞれムテインとIL-17Aとの間またはムテインとIL-23p19との間の複合体形成を可能にする段階、および適切なシグナルにより複合体を検出する段階を含み得る。

【0152】

検出可能なシグナルは、上に説明したような標識により、または結合、すなわち複合体形成自体に起因する物理特性の変化により、生じさせることができる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、一方が金箔などの表面に固定化されている結合パートナー同士の結合時に変化する。

【0153】

本明細書開示のムテインは、IL-17AおよびIL-23p19の分離のためにも使用され得る。そのような使用は、1種または複数種のムテインを、IL-17AおよびIL-23p19を含有すると推定される試料に、適切な条件下で接触させることにより、それぞれムテインとIL-17Aとの間またはムテインとIL-23との間の複合体の形成を可能にする段階、ならびに試料から複合体を分離する段階を含み得る。

10

【0154】

IL-17AおよびIL-23p19の検出ならびにIL-17AおよびIL-23p19の分離のための開示されたムテインの使用において、ムテインならびに/あるいはIL-17AおよびIL-23p19またはそれらのドメインもしくはそれらのフラグメントは、適切な固相上に固定化され得る。

【0155】

したがって、例えば試料中のIL-17Aおよび/またはIL-23p19の存在または非存在、ならびにそれらの濃度またはレベルが決定され得る。

20

【0156】

別の局面では、本開示は、パーツのキットを提供する。キットは、第1および第2の容器を含む。第1の容器は第1のリポカリンムテインを含み、第2の容器は第2のリポカリンムテインを含む。一局面では、本開示は、1つまたは複数の容器の中に、IL-17Aに特異的なリポカリンムテインを別々にまたは混合して含むキットに関する。なお別の局面では、本開示は、1つまたは複数の容器の中に、IL-23p19に特異的なリポカリンムテインを別々にまたは混合して含むキットにも関する。一部の態様では、本開示は、1つまたは複数の容器の中に、IL-17Aに特異的なリポカリンムテインおよびIL-23p19に特異的なリポカリンムテインを別々にまたは混合して含むキットに関する。一部のさらに好ましい態様では、キットは、IL-17Aに特異的な第1のリポカリンムテインを含む第1の容器およびIL-23p19に特異的な第2のリポカリンムテインを含む第2の容器を含む。一部の態様では、キットは、それに一体化された、または1つもしくは複数の別々の文書として、内容物またはキット、およびリポカリンムテインの使用に関する情報をさらに含む。キットは、一部の態様では、希釈剤中で再構成するために製剤化された1種または複数種の組成物を含み得る。そのような希釈剤、例えば無菌希釈剤も、キット中に、例えば容器内に、含まれ得る。

30

【0157】

D. IL-17Aおよび/またはIL-23p19に対する結合親和性を有する融合タンパク質およびその使用

一局面では、本開示は、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性を有し、別のサブユニットがIL-23p19に対する結合特異性を有する、少なくとも2つのサブユニットを任意の順序で含む融合タンパク質に関する。

40

【0158】

例えば、本開示は、それぞれIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) およびIL-23p19に対する結合特異性を有するタンパク質部分を有する融合タンパク質を提供する。これに関して、融合タンパク質の1つのサブユニットは、IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) に特異的な本開示のリポカリンムテインを含み得、一方で融合タンパク質の別のサブユニットは、IL-23p19に特異的な本開示のリポカリンムテインを含み得る。

【0159】

別の局面では、本開示は、それぞれがIL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) に対す

50

る結合特異性を有する、少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質に関する。一部の態様では、少なくとも1つのサブユニットはIL-17Aに特異的なリポカリウムテインを含む。一部の態様では、融合タンパク質は、本質的に実施例2に記載されるアッセイにおいて約1nM以下のKDによりIL-17Aに対する結合親和性を有する。一部の追加的な態様では、融合タンパク質は、本質的に実施例3に記載される競合ELISA様式または本質的に実施例5に記載されるアッセイにおいて、IL-17Aのその受容体に対する結合を阻害することが可能である。

**【0160】**

一部のさらなる態様では、2つのサブユニットのそれぞれは、IL-17A/Aに特異的なリポカリウムテインを含む。一部のさらなる態様では、2つのサブユニットのそれぞれは、IL-17A/Fに特異的なリポカリウムテインを含む。2つのリポカリウムテインは、異なるアミノ酸配列を有し得る。それゆえに、一部の態様では、2つのリポカリウムテインは、IL-17A上の異なるエピトープに結合する。しかし、一部の他の態様では、2つのリポカリウムテインは、相互に同一であり得る。例えば、そのような融合タンパク質は、SEQ ID NO:1の2つのL-アミノ酸配列を含み得る。これに関して、融合タンパク質は、SEQ ID NO:10、SEQ NO:12、またはSEQ ID NO:13に示されるアミノ酸配列を有し得る。

10

**【0161】**

一部の態様では、IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) に対する結合特異性を有する2つのサブユニットを有する本開示の融合タンパク質は、標的(例えばIL17A/A)のダイマー性質によりもたらされる、2つのサブユニットのアビディティー効果により、単一のサブユニットよりも高い効力を示し得る。これに関して、融合タンパク質は、二価融合タンパク質であることができる。なお別の局面では、本開示は、IL-23p19に対する結合特異性を有する少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質も包含する。一部の態様では、少なくとも1つのサブユニットはIL-23p19に特異的なリポカリウムテインを含む。一部の態様では、融合タンパク質は、本質的に実施例7に記載されるアッセイにおいて、約10nM以下のKDによりIL-23p19に対する結合親和性を有する。一部の追加的な態様では、融合タンパク質は、本質的に実施例8もしくは実施例14に記載される競合ELISA様式または本質的に実施例10もしくは実施例15に記載されるアッセイにおいてIL-23のその受容体に対する結合を阻害することが可能である。

20

**【0162】**

一部のさらなる態様では、2つのサブユニットのそれぞれはIL-23p19に特異的なリポカリウムテインを含む。2つのリポカリウムテインは異なるアミノ酸配列を有し得る。それゆえに、一部の態様では、2つのリポカリウムテインはIL-23p19上の異なるエピトープに結合する。しかし、一部の他の態様では、2つのリポカリウムテインは相互に同一であり得る。

30

**【0163】**

さらなる一局面では、本出願は、(i) IgG抗体などの完全長ヒト抗体を含む免疫グロブリンのFc部分、および(ii) IL-17Aに特異的なリポカリウムテインを含む融合タンパク質を開示する。

**【0164】**

別の局面では、本出願は、(i) IgG抗体などの完全長ヒト抗体を含む免疫グロブリンのFc部分、および(ii) IL-23p19に特異的なリポカリウムテインを含む融合タンパク質を開示する。

40

**【0165】**

IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) に特異的な、例示的なリポカリウムテインは、本開示のA節に開示されたものを含む。特に好ましい一態様では、リポカリウムテインは、SEQ ID NO:1に示される。

**【0166】**

IL-23p19に特異的な例示的なリポカリウムテインは、本開示のB節に開示されたものを含む。特に好ましい一態様では、リポカリウムテインは、SEQ ID NO:2、45、および46の

50

いずれか1つに示される。

【0167】

一部の特定の態様では、リポカリンムテインは、例えばペプチド結合を介して、ヒト抗体のFc部分のC末端および/またはN末端に連結され得る(図11参照)。特定の態様では、本開示の融合タンパク質は、IgG抗体のFc部分に結合されたりポカリンムテインを含み得る。これに関して、そのような融合タンパク質の1つは、SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含む。

【0168】

なお好ましい態様では、本開示の融合タンパク質は、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、またはSEQ ID NO:13に示されるアミノ酸を含む。

10

【0169】

関係する態様では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質は、IL-17AおよびIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を阻害することが可能である。一部のさらなる態様では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質は、IL-17AおよびIL-23p19と同時に会合(engage)できることにより、その結果、IL-17AおよびIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を同時に阻害することが可能である。

【0170】

この局面では、本開示は、1つのサブユニットがIL-17A(IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)に特異的なリポカリンムテインを含み、1つのサブユニットがIL-23p19に特異的なリポカリンムテインを含む、少なくとも2つのサブユニットを任意の順序で含む融合タンパク質に関する。一部のさらなる態様では、融合タンパク質は、IL-17A(IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む)またはIL-23p19に特異的なリポカリンムテインを含む、追加的なサブユニットを含み得る。一部の態様では、融合タンパク質の2つの異なるサブユニットに含まれる2つのIL-17A特異的なリポカリンムテインは、IL-17A標的上の異なるエピトープに結合し得る；あるいは、融合タンパク質の2つの異なるサブユニットに含まれる2つのIL-17A特異的なリポカリンムテインは、同じアミノ酸配列を有し得る、それゆえに、IL-17A標的上の同じエピトープに対して特異性を有する。IL-17Aに結合する2つのサブユニットを有する本開示の融合タンパク質は、標的のダイマー性質によってもたらされるアビディティ効果により、IL-17Aに結合するサブユニットを1つだけ有する融合タンパク質よりもIL-17Aに対して強い結合性を示し得る。同様に、融合タンパク質の2つの異なるサブユニット中に含まれる2つのIL-23p19特異的なリポカリンムテインは、IL-23p19標的上の異なるエピトープに結合し得る；あるいは、融合タンパク質の2つの異なるサブユニット中に含まれる2つのIL-23p19特異的なリポカリンムテインは、同じアミノ酸配列を有することにより、IL-23p19標的上の同じエピトープに対して特異性を有し得る。融合タンパク質は、1つのサブユニットを別のサブユニットと連結するリンカーも含み得る。

20

30

【0171】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質の1つのサブユニットは、本開示のA節に開示されたりポカリンムテインを含む。特に好ましい態様では、該サブユニットは、SEQ ID NO:1に示されるリポカリンムテインを含む。

【0172】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質の1つのサブユニットは、本開示のB節に開示されたりポカリンムテインを含む。特定の好ましい態様では、該サブユニットは、SEQ ID NO:2、45、および46のいずれか1つに示されるリポカリンムテインを含む。

40

【0173】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、A節に開示されたりポカリンムテインおよびB節に開示されたりポカリンムテインを含む。

【0174】

特定の態様では、本開示の融合タンパク質は、SEQ ID NO:3に示されるアミノ酸配列を含む。

【0175】

50

特定の一態様では、本開示の融合タンパク質は、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含む。

【0176】

なお好ましい一態様では、本開示の融合タンパク質は、SEQ ID NO:12またはSEQ ID NO:13に示されるアミノ酸を含む。

【0177】

別の局面では、本出願は、1つのサブユニットがIL-17AまたはIL-23p19に対する結合特異性を有し、別のサブユニットがアルブミン結合ドメイン (ABD) またはアルブミン結合ペプチドを含む、少なくとも2つのサブユニットを含む融合タンパク質を開示する。一部の態様では、IL-17AまたはIL-23p19に対する結合特異性を有するサブユニットは、本開示のIL-17AまたはIL-23p19に特異的なリポカリウムテインを含む。さらに、融合タンパク質は、(i) IL-17Aに特異的な1つのサブユニット、(ii) IL-23p19に特異的な1つのサブユニット、および(iii) 細菌アルブミン結合ドメインを含む1つのサブユニットを任意の順序で含み得る。一部の態様では、IL-17Aに対する結合特異性を有するサブユニットは、本開示のIL-17Aに特異的なリポカリウムテインを含む。一部の他の態様では、IL-23p19に対する結合特異性を有するサブユニットは、本開示のIL-23p19に特異的なリポカリウムテインを含む。

10

【0178】

一部の態様では、アルブミン結合ドメイン (ABD) は、連鎖球菌プロテインG (Koenig, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83) または例えばSEQ ID NO:14に示すようなそのフラグメントであり得る。一部の他の態様では、アルブミン結合ペプチドは、例えばその全体が参照により本明細書に組み入れられるPCT出願W02012/004384に開示されているような、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインに由来するヒト血清アルブミン結合ペプチドである。一部の好ましい態様では、アルブミン結合ペプチドはSEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0179】

特に、本開示は、ヒト血清アルブミン (HSA) およびIL-23p19の両方に同時に結合することが可能である、例えばSEQ ID NO:7に示されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質を提供する。

【0180】

本開示は、HSAおよびIL-17Aの両方に同時に結合することが可能である、例えばSEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質を提供する。一部の好ましい態様では、そのような融合タンパク質は、例えばSEQ ID NO:10に示されるアミノ酸配列を含む、2つのIL-17A特異的なリポカリウムテインを含み得る。

30

【0181】

加えて本出願は、例えば融合タンパク質が、本質的に実施例12に記載されるアッセイにおいて測定される場合、HSA、IL-17A、およびIL-23p19の全てに同時に結合することが可能な融合タンパク質を特徴とする。一部のさらなる態様では、融合タンパク質は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、またはSEQ ID NO:9に示されるアミノ酸配列を含む。一部の好ましい態様では、そのような融合タンパク質は、例えばSEQ ID NO:6に示されるアミノ酸配列を含む、2つのIL-17A特異的なリポカリウムテインを含み得る。

40

【0182】

追加的な一局面では、本開示は、1つのサブユニットがIL-17Aに対する結合特異性またはIL-23p19に対する結合特異性を有し、別のサブユニットが、例えばTNF阻害タンパク質を含んでTNFに対する結合特異性を有する、少なくとも2つのサブユニットを任意の順序で含む融合タンパク質に関する。腫瘍壊死因子 (またはTNFファミリー) は、TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) およびリンホトキシン- $\alpha$ などの細胞死 (アポトーシス) を引き起こすことができるサイトカイン群を表す。例示的なTNF阻害剤には、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、セルトリマブペゴール、およびゴリムマブが含まれる。一部のさらなる態様では、TNF特異的なサブユニットは、SEQ ID NO:61および62の抗体などの

50

抗TNF- 抗体を含む。一部の追加的な態様では、IL-17Aに対する結合特異性またはIL-23p19に対する結合特異性を有するサブユニットは、SEQ ID NO:1のリポカリンまたはSEQ ID NO:2のリポカリンなどの本開示のリポカリンムテインを含む。一部のなおさらなる態様では、融合タンパク質は、SEQ ID NO:63および62のアミノ酸配列またはSEQ ID NO:64および62のアミノ酸配列を含む。

#### 【0183】

一部の態様では、融合タンパク質は、17Aに結合することが可能であり、一部の好ましい態様では、例えば、融合タンパク質およびリポカリンムテインが本質的に実施例16に記載されるアッセイにおいて測定される場合、融合タンパク質中に含まれるリポカリンムテインの平均EC50値と少なくとも同じくらいの平均EC50値またはそれよりも優れた平均EC50値を有し得る。一部の態様では、融合タンパク質は、IL-23に結合することが可能であり、一部の好ましい態様では、例えば、融合タンパク質およびリポカリンムテインが本質的に実施例17に記載されるアッセイにおいて測定される場合、融合タンパク質中に含まれるリポカリンムテインの平均EC50値と少なくとも同じくらいの平均EC50値またはそれよりも優れた平均EC50値を有し得る。一部の態様では、融合タンパク質は、TNF- に結合することが可能であり、一部の好ましい態様では、抗体および融合タンパク質が本質的に実施例18に記載されるアッセイにおいて測定される場合、融合タンパク質中に含まれる抗体の平均EC50値と少なくとも同じくらいの平均EC50値またはそれよりも優れた平均EC50値を有し得る。一部のさらなる態様では、例えば融合タンパク質が本質的に実施例19に記載されるアッセイにおいて測定される場合、融合タンパク質は、TNF- 、IL-17A、およびIL-23p19の全てに同時に結合することが可能であり得る。

#### 【0184】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、約1nM以下のKDで測定される、IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) に対する結合親和性を有する。より好ましくは、該融合タンパク質は、0.1nM以下のKDで測定される親和性を有し得る。一部のさらなる態様では、本開示の融合タンパク質の1つまたは複数のIL-17A結合部位は、IL-17A (IL-17A/AおよびIL-17A/Fを含む) に対して、単独のポリペプチドなどの部位と同じくらいの結合親和性または阻害能を有し得る (表1参照)。

#### 【0185】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、約10nM以下のKDで測定される、IL-23p19に対する結合親和性を有する。より好ましくは、融合タンパク質は、約1nM以下のKDで測定される親和性を有し得る。一部のさらなる態様では、本開示の融合タンパク質の1つまたは複数のIL-23p19結合部分は、IL-23p19に対して、単体のポリペプチドなどの部分と同じくらいの結合親和性または阻害能を有し得る (下の表1参照)。

#### 【0186】

(表1) 競合ELISA、表面プラズモン共鳴 (SPR) および細胞に基づく機能アッセイにおける、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の個別のリポカリンムテインの活性をそれらの融合タンパク質SEQ ID NO:3~13と比較した概要を提供する。それぞれの構築物がIL-17A結合性リポカリンムテインSEQ ID NO:1、IL-23結合性リポカリンムテインSEQ ID NO:2、またはその両方を含むかどうかに応じて、IL-17および/またはIL-23との相互作用についての値を決定した。それぞれIL-17およびIL-23に対する活性を決定するために、競合ELISA実験を実施例3および/または実施例8記載のように実施し、SPR実験を逆様式で、すなわちセンサーチップ上に固定化されたタンパク質構築物を用いて、実施例2および/または実施例6記載のように実施し、細胞アッセイは、IL-17A誘導G-CSF分泌 (実施例5) および/またはIL-23誘導Ba/F3細胞増殖 (実施例10) のいずれかに基づいた。IL-23の親和性を決定するために行われた逆様式SPR実験が、非生理的高濃度のNaClの存在下で実施されたこと、したがって、値は生理条件下でのIL-23に対する親和性を反映しないが、SEQ ID NO:2含有融合タンパク質であるSEQ ID NO:3~13において、単体のムテインSEQ ID NO:2と比較してIL-23に対する相対親和性が異なるかどうかを判定するのに役立つことに留意されたい。表1に、SEQ ID NO:1を含む全ての融合体のIL-17A結合活性が、全てのアッセイ様式で

SEQ ID NO:1自体の結合活性と少なくとも同じくらいであることを実証する。したがって、SEQ ID NO:1を、活性の喪失なしに任意の融合タンパク質において柔軟に用いることができる。全てのSEQ ID NO:2含有融合体のIL-23結合活性は、全てのアッセイ様式でSEQ ID NO:2自体の結合活性に非常に近い。したがって、SEQ ID NO:2を、顕著な活性の喪失なしに任意の融合タンパク質中において柔軟に用いることができる。

SEQ ID	競合 ELISA (IC50, IL17A)	Biacore, 逆様式 (Kd, IL17AF)	G-CSFの分泌 (EC50, IL17A)	競合 ELISA (IC50, IL23)	Biacore, 逆様式 (Kd, IL23)	細胞増殖 (EC50, IL23)
	実施例3参照	実施例2参照	実施例5参照	実施例3参照	実施例7参照	実施例10参照
SEQ ID NO: 1	0,08 nM (0,06 - 0,09)	0,10 nM	0,13 nM (0,17/0,1)			
SEQ ID NO: 2				0,54 nM (0,26 - 0,83)	2,9	1,2 nM (1,7/0,7)
SEQ ID NO: 8	0,10 nM (0,07 - 0,13)	0,10 nM				
SEQ ID NO: 7				1,11 nM (0,69 - 1,53)	2,4	
SEQ ID NO: 10	0,05 nM (0,03 - 0,07)	0,04 nM	0,1 nM (0,15/0,04)			
SEQ ID NO: 3	0,04 nM (0,03 - 0,05)	0,10 nM	0,15 nM (0,21/0,09)	0,64 nM (0,49 - 0,79)	3,0	0,9 nM (1,1/0,6)
SEQ ID NO: 4	0,07 nM (0,05 - 0,09)	0,08 nM	0,24 nM (0,20/0,29)	0,99 nM (0,69 - 1,29)	2,0	2,8 nM (2,8/2,7)
SEQ ID NO: 5	0,05 nM (0,03 - 0,06)	0,08 nM	0,15 nM (0,20/0,10)	1,09 nM (0,63 - 1,56)	1,7	n.d.
SEQ ID NO: 9	0,05 nM (0,04 - 0,07)	0,09 nM	0,16 nM (0,19/0,12)	2,07 nM (0,91 - 3,22)	1,9	2,1 nM (2,4/1,7)
SEQ ID NO: 6	0,04 nM (0,02 - 0,05)	0,10 nM	0,05 nM (0,06/0,04)	0,97 nM (0,61 - 1,33)	1,9	0,8 nM (0,9/0,7)
SEQ ID NO: 11	0,09 nM (0,06 - 0,12)	0,07 nM	0,06 ± 0,04 nM (n=3)			
SEQ ID NO: 12	0,03 nM (0,01 - 0,04)	0,04 nM	0,05 ± 0,04 nM (n=3)			
SEQ ID NO: 13	0,04 nM (0,03 - 0,05)	n.d.	0,05 ± 0,04 nM (n=3)			

10

20

30

## 【 0 1 8 7 】

関係する一態様では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質は、IL-17Aのその受容体に対する結合を阻害することが可能である。

## 【 0 1 8 8 】

関係する一態様では、本開示の融合タンパク質は、IL-23のその受容体に対する結合を阻害することが可能である。

## 【 0 1 8 9 】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、本開示のリポカリウムテインと本開示の別のリポカリウムテインとを相互に共有結合させるリンカー（例えばペプチド結合）も含み得る。これは、例えば、連結後のリポカリウムテインを、ペプチドリンカーによって繋がれた単一のポリペプチドとして発現させることによって達成することができる。適切なペプチドリンカーは、例えば本明細書記載の、任意のアミノ酸を含む任意長のひと続きのアミノ酸から構成され得る。好ましいリンカー設計は、式(GxSy)n [式中、xは、n回繰り返される構成要素中のグリシンリピートの数であり、yは、セリンリピートの数である] に従う、グリシンおよびセリンの一続きの反復アミノ酸を利用する。各変数x、y、およびnの値は、0~100、好ましくは0~10の範囲であり得る。これにより、非限定的な例としてSEQ ID NO:18~20が提供される。

40

## 【 0 1 9 0 】

50

一部の他の態様では、本開示のリポカリンムテインを本開示の別のリポカリンムテインに連結するために、化学的な共有結合が適用され得る。一例は、リンカーとアミノ酸側鎖との間、例えばマレイミドとリポカリンムテイン内の遊離システインとの間、または活性化カルボン酸エステルとリポカリンムテインにおける内の一級アミンとの間で反応性の化学作用を可能にする二官能性リンカーの使用である。これは、タンパク質発現の際に含められ得、かつ選択的に誘導体化できる官能基を提供する非天然アミノ酸側鎖を用いる反応を含む。一部のなおさらなる態様では、アジドおよびアルキンの付加環化などの「クリック」ケミストリーが、本開示の融合タンパク質の1つまたは複数のサブユニットを連結するために使用され得る。

【0191】

一部のさらに好ましい態様では、本開示の融合タンパク質は、SEQ ID NO:18~20のいずれか1つに示されるアミノ酸配列をさらに含む。

【0192】

一部のさらなる態様では、本開示のリポカリンムテインを含む1つのサブユニットは、本明細書開示の融合タンパク質中に本開示のリポカリンムテインを含む別のサブユニットに、直接または化学リンカーを介して、結合され得る。

【0193】

一部のなおさらなる態様では、本開示のリポカリンムテインは、別のリポカリンムテインのN末端もしくはC末端のいずれか、またはN末端およびC末端の両方に融合することができる。

【0194】

一部の態様では、開示の融合タンパク質に含まれる各サブユニットは、熱安定性を保持している（例えば、 $T_m$ が少なくとも40 の融解温度に耐えることができる）。一部の態様では、開示の融合タンパク質中に含まれる3つのサブユニットのそれぞれは、1つまたは複数の他のサブユニットに対してアンフォールディングについて高い協同性を有する（例えば、部分的なアンフォールディングを排除することで、それらの分解速度を顕著に減少させる）。アンフォールディングは全か無のプロセスであるので、この部分的アンフォールディングの排除は、「協同的」と呼ばれる。一部のさらなる態様では、融合タンパク質中に含まれる1つまたは複数のリポカリンムテインは、 $T_m$ が少なくとも50 、少なくとも55 、または少なくとも60 以上でさえある融解温度に耐えることができる。一部のなおさらなる態様では、融合タンパク質中に含まれる1つまたは複数のHSA構成要素は、 $T_m$ が少なくとも30 、少なくとも35 、または少なくとも40 以上でさえある融解温度に耐えることができる。

【0195】

一部の態様では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質は、本開示のリポカリンムテインのマルチマー：例えばテトラマー、トリマーまたはダイマーを含み、その際、少なくとも1つのリポカリンムテインは、別のリポカリンムテインの少なくとも一方の側（例えばN末端）に融合される。一部のさらなる態様では、マルチマー性融合タンパク質は、対応するモノマー性融合タンパク質よりも好ましい場合がある。例えば、IL-17Aに結合する本開示のダイマー性融合タンパク質は、標的のダイマー性質によってもたらされるアビディティ効果により、IL-17Aに対してより強い結合性を示し得る。

【0196】

一部のさらなる態様では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質は、その開示全体が参照により本明細書に組み入れられるSchlehuber, S., and Skerra, A. (2001), Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.* 382, 1335-1342に記載の「デュオカリン (Duocalin)」の形成を招く。

【0197】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17Aおよび/またはIL-23p19の結合のため、ならびに/あるいは対象におけるIL-17および/またはIL-23のそれらの各々の受容体

10

20

30

40

50

に対する結合を阻害するための、本開示の1種もしくは複数種の融合タンパク質またはそのようなタンパク質を含む1種もしくは複数種の組成物の使用を包含する。

【0198】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17Aおよび/またはIL-23p19を結合させる方法であって、対象に、本開示の1種もしくは複数種の融合タンパク質のまたは該タンパク質を含む1種もしくは複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む方法の特徴とする。

【0199】

なお別の局面では、本開示は、対象におけるIL-17および/またはIL-23のそれらの各々の受容体に対する結合を阻害するための方法であって、対象に、本開示の1種もしくは複数種の融合タンパク質のまたはそのようなタンパク質を含む1種もしくは複数種の組成物の有効量を投与する段階を含む方法を含む。

10

【0200】

本開示の融合タンパク質は、シグナル配列も含み得る。ポリペプチドのN末端のシグナル配列は、このポリペプチドを特定の細胞区画、例えば大腸菌 (*E. coli*) のペリプラズムまたは真核細胞の小胞体に誘導する。多数のシグナル配列が、当技術分野において公知である。大腸菌のペリプラズムへのポリペプチド分泌のための例示的なシグナル配列は、OmpAシグナル配列である。

【0201】

本開示は、IL-17Aおよび/またはIL-23p19との複合体形成のための本開示の1種または複数種の融合タンパク質の使用も含む。

20

【0202】

したがって、本開示の別の局面では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質を、IL-17Aおよび/またはIL-23p19の検出のために使用することができる。そのような使用は、本開示の1種または複数種の融合タンパク質を、IL-17Aおよび/またはIL-23p19を含有する疑いのある試料に、適切な条件下で接触させることにより、それぞれタンパク質とIL-17Aとの間および/またはタンパク質とIL-23との間の複合体形成を可能にする段階、ならびに適切なシグナルにより複合体を検出する段階を含み得る。

【0203】

検出可能なシグナルは、上に説明したような標識により、または結合、すなわち複合体形成自体に起因する物理特性の変化により、生じさせることができる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、一方が金箔などの表面に固定化されている結合パートナー同士の結合時に変化する。

30

【0204】

本明細書開示の1種または複数種の融合タンパク質は、他の物質を含有する試料からのIL-17Aおよび/またはIL-23p19の分離のためにも使用され得る。そのような使用は、1種または複数種の融合タンパク質を、IL-17Aおよび/またはIL-23p19を含有すると推定される試料に、適切な条件下で接触させることにより、それぞれタンパク質とIL-17Aとの間および/またはタンパク質とIL-23p19との間の複合体形成を可能にする段階、ならびに試料から複合体を分離する段階を含み得る。

40

【0205】

IL-17Aおよび/またはIL-23p19の検出ならびにIL-17Aおよび/またはIL-23p19の分離のための開示された融合タンパク質の使用において、融合タンパク質、IL-17A、IL-23p19、および/またはそのドメインもしくはフラグメントは、適切な固相上に固定化され得る。

【0206】

したがって、例えば試料中のIL-17Aおよび/またはIL-23p19などの分子の存在または非存在、ならびにその濃度またはレベルが決定され得る。

【0207】

別の局面では、本開示は、少なくとも1種の本開示の融合タンパク質およびキットを使用するための1つまたは複数の説明書を含むキットを提供する。

50

## 【0208】

一部の態様では、キットは、それに一体化された、または1つもしくは複数の別々の文書として、内容物またはキット、および融合タンパク質の使用に関する情報をさらに含む。キットは、一部の態様では、希釈剤中に再構成するために製剤化された1種または複数種の本開示の融合タンパク質を含み得る。そのような希釈剤、例えば無菌希釈剤も、キット中に、例えば容器内に、含まれ得る。

## 【0209】

一部の態様では、本開示の1種または複数種の融合タンパク質は、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、尋常性乾癬、および若年性特発性関節炎などの、免疫応答の抑制が望ましいいくつかの状態の治療に使用され得る。

10

## 【0210】

## E. 本開示のリポカリンムテインおよび融合タンパク質

リポカリンは、リガンドに結合するように自然に進化したタンパク質性結合分子である。リポカリンは、脊椎動物、昆虫、植物および細菌を含む多数の生物に存在する。リポカリンタンパク質ファミリーのメンバー (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) *FASEB J.* 1, 209-214) は、典型的には小型の分泌タンパク質であり、単一のポリペプチド鎖を有する。それらは、一連の異なる分子認識特性、すなわちそれらが様々な、主として疎水性の分子 (レチノイド、脂肪酸、コレステロール、プロスタグランジン、ピリベルジン、フェロモン、味物質、および臭気物質など) に結合できること、特定の細胞表面受容体とのそれらの結合性、およびそれらの高分子複合体の形成によって特徴付けられる。リポカリンは、過去に主として輸送タンパク質として分類されていたが、現在は多様な生理機能を果たすことが明らかとなっている。これらには、レチノール輸送、嗅覚、フェロモンシグナル伝達、およびプロスタグランジン合成における役割が含まれる。リポカリンは、免疫応答の調節および細胞ホメオスタシスの仲介にも関係している (例えば、Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* 318, 1-14およびFlower, D.R. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24に総説されている)。

20

## 【0211】

リポカリンは共通して、全体的な配列保存性が異常に低レベルであり、多くの場合に20%未満の配列同一性を有する。極めて対照的に、それらの全体的フォールディングパターンは、高度に保存されている。リポカリン構造の中央部分は、単一の8本鎖逆平行シートがそれ自体に戻って閉じて、連続的に水素結合したバレルを形成したものである。このバレルは、中央の空洞を形成する。バレルの一端は、その底部にかかるN末端ペプチドセグメントおよび鎖を繋ぐ3つのペプチドループにより立体的に遮断されている。

30

バレルの他端は、溶媒に開放されており、4つの柔軟なペプチドループにより形成される標的結合部位を取り囲んでいる。それ以外は強固なりポカリン骨格におけるループのこの多様性が、異なる大きさ、形状、および化学特性を有する標的を収容することがそれぞれ可能である、多種多様な異なる結合様式をもたらしている例えば、Flower, D.R. (1996)、前記; Flower, D.R. et al. (2000)、前記、またはSkerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350に総説されている)。

## 【0212】

本開示によるリポカリンムテインは、任意の選ばれたリポカリンのムテインであり得る。ムテインが使用され得る適切なりポカリン (時に「タンパク質『参照』骨格」または単に「骨格」とも称される) の例には、涙液リポカリン (リポカリン-1、フォンエブネル腺タンパク質)、レチノール結合タンパク質、好中球、リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、ラクトグロブリン、ピリン結合タンパク質 (BBP)、アポリポタンパク質D (APO D)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、涙液リポカリン (Tlc)、2ミクログロブリン関連タンパク質 (A2m)、24p3/ウテロカリン (24p3)、フォンエブネル腺タンパク質1 (VEGP 1)、フォンエブネル腺タンパク質2 (VEGP 2)、および主要アレルゲンCan f1前駆体 (ALL-1) が含まれるが、それらに限定されるものではない。関連する態様では、リポカリンムテインは、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、ヒ

40

50

ト涙液リポカリン (Tlc)、ヒトアポリポタンパク質D (APO D)、およびオオモンシロチヨウ (Pieris brassicae) のピリン結合タンパク質からなる群より選択される。

【0213】

IL-17AまたはIL-23p19に結合する本開示のリポカリンムテインに関連して本明細書において使用される場合、用語「に対して特異的」は、リポカリンムテインが、IL-17AまたはIL-23p19それぞれに結合し、またはそれと反応することを含む。したがって、それに結合し、またはそれと反応することは、リポカリンムテインが、IL-17AまたはIL-23p19それぞれに特異的に結合することを含む。これに関連して、用語「特異的に」は、リポカリンムテインが、本明細書記載のIL-17Aタンパク質またはIL-23p19タンパク質と反応するが、本質的に別のタンパク質とは反応しないことを意味する。用語「別のタンパク質」には、本明細書開示のリポカリンが向けられるIL-17AまたはIL-23p19と密接に関係するまたは相同であるタンパク質を含めて、それぞれ任意の非IL-17Aまたは非IL-23p19タンパク質が含まれる。しかし、「対象」の定義に関連して記載されたものなどのヒト以外の種に由来するIL-17AまたはIL-23p19タンパク質、フラグメントおよび/または変種は、用語「別のタンパク質」によって除外されない。用語「本質的に結合しない」は、本開示のリポカリンムテインが、別のタンパク質に結合しないこと、すなわち30%未満、好ましくは20%、より好ましくは10%、特に好ましくは9、8、7、6または5%未満の交差反応性を示すことを意味する。リポカリンが、本明細書の上に定義されたように特異的に反応するかどうかは、とりわけ、本開示のリポカリンムテインとIL-17AまたはIL-23p19との反応およびリポカリンと他のタンパク質との反応を比較することによって容易に検査することができる。「特異的結合」は、例えば、ウエスタンブロット、ELISA検査、RIA検査、ECL検査、IRMA検査、FACS、IHC、およびペプチドスキャンにより、判定することもできる。

10

20

【0214】

別のリポカリンとの配列同一性と比較した場合、本開示によるリポカリンムテインのアミノ酸配列は、それぞれのリポカリンに対して高い配列同一性を有する(上も参照)。この一般的な状況で、本開示による組み合わせのリポカリンムテインのアミノ酸配列は、対応するリポカリン(野生型または参照リポカリン)のアミノ酸配列に少なくとも実質的に類似している。本開示による組み合わせのリポカリンムテインのそれぞれの配列は、対応するリポカリンの配列と実質的に類似しており、野生型(または参照)リポカリンに対する一部の場合、対応するリポカリンの配列に対して、少なくとも95%の同一性を含む、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82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性を有する1つまたは複数のアミノ酸態様を有する。これに関して、本開示のリポカリンムテインは、もちろん、リポカリンムテインをそれぞれIL-17AまたはIL-23p19に結合可能にする本明細書記載の置換を比較的に含み得る。典型的には、リポカリンのムテインは、天然配列のリポカリンに対して、リポカリンのリガンド結合部位の開放端の4つのループ中のアミノ酸の1つまたは複数の変異を含む(上記参照)。上に説明したように、これらの領域は、所望の標的に対するリポカリンムテインの結合特異性を決定するのに不可欠である。具体的な一例として、涙液リポカリン、NGALリポカリン、またはそれらのホモログのポリペプチドに由来するムテインは、N末端領域における、ならびに/または天然リポカリン結合ポケットの反対側に位置する 40

パレル構造の端部に配置される3つのペプチドループBC、DE、およびFGにおける、任意の配列位置に1、2、3、または4つ以上の変異アミノ酸残基を有し得る。さらに具体的な例として、涙液リポカリンまたはそのホモログのポリペプチドに由来するムテインは、涙液リポカリンの野生型配列と比較して、パレル構造の端部に配置されるペプチドループDEに変異アミノ酸残基を有さない場合がある。

30

40

【0215】

本開示によるリポカリンムテインは、対応する天然リポカリンと比較して1つまたは複数、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個でさえある置換を含むが、但し、そのようなリポカリンムテインが、それぞれIL-17AまたはIL-23p19に結合可能でなければならないことを条件とする。例えば、リポカリンム

50

テインは、例えば涙液リポカリン、NGALリポカリン、または本明細書開示の任意の他のリポカリンの野生型配列を有する野生型リポカリンの別個の位置に対応する位置に（すなわち、対応する位置に）置換を有することができる。一部の態様では、本開示による組み合わせのリポカリンムテインは、アルギニン残基による天然アミノ酸の、2、3、4または5つを含む、少なくとも2つのアミノ酸置換、場合によってはなお多くのアミノ酸置換を含む。したがって、本明細書記載のタンパク質の「参照」骨格の核酸は、それぞれIL-17AまたはIL-23p19に結合することが可能なリポカリンムテインを生成する目的で、変異誘発に供される。

【0216】

また、本開示のリポカリンムテインは、リポカリンムテインの生物学的活性（その標的、例えばそれぞれIL-17AまたはIL-23p19に対する結合）に影響せずに、そのN末端またはC末端に、好ましくはC末端に、Strep-tag、例えばStrep II tagなどの異種アミノ酸配列を含むことができる。タグの好ましい一例は、SEQ ID NO:17に示される）。

10

【0217】

同様に、本開示のリポカリンムテインは、それぞれの野生型リポカリン、例えばSEQ ID NO:2~7および12~14と比較して、そのN末端において1、2、3、もしくは4つ以上のアミノ酸および/またはそのC末端において1もしくは2つ以上のアミノ酸を欠如し得る。

【0218】

具体的には、野生型リポカリンと異なるリポカリンムテインのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型リポカリンのアミノ酸配列における特定の位置に対応するかどうかを判定するために、当業者は、当技術分野において周知の手段および方法、例えば手作業で、またはBasic Local Alignment Search Toolの略語であるBLAST2.0もしくはClustalWもしくは配列アライメントを生成させるために適した任意の他の適切なプログラムなどのコンピュータプログラムを使用することによるアライメントを使用することができる。したがって、野生型リポカリンは、「サブジェクト配列」または「参照配列」として機能し得、一方で本明細書記載の野生型リポカリンと異なるリポカリンのアミノ酸配列は、「クエリ配列」として機能する。用語「参照配列」および「野生型配列」は、本明細書において互換的に使用される。

20

【0219】

一部の態様では、置換（または置き換え）は、保存的置換である。それにもかかわらず、リポカリンムテインが、それぞれIL-17AもしくはIL-23p19に結合する能力を保持し、かつ/またはそれが、「元の」配列と少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、もしくは少なくとも85%以上同一である点で、それから置換された配列に対する同一性を有する限り、非保存的置換または下に挙げた例示的な置換からの1つもしくは複数を含む任意の置換が、想定される。

30

【0220】

一般的に、保存的置換は、（それぞれ保存的と見なすことができる1つまたは複数の置換が後ろに続く）変異されるアミノ酸に従って列挙された以下の置換である：Ala Gly、Ser、Val；Arg Lys；Asn Gln、His；Asp Glu；Cys Ser；Gln Asn；Glu Asp；Gly Ala；His Arg、Asn、Gln；Ile Leu、Val；Leu Ile、Val；Lys Arg、Gln、Glu；Met Leu、Tyr、Ile；Phe Met、Leu、Tyr；Ser Thr；Thr Ser；Trp Tyr；Tyr Trp、Phe；Val Ile、Leu。他の置換も許容され得、経験的に、または他の公知の保存的もしくは非保存的置換により判定することができる。さらなる方向付けとして、以下の8つのグループは、それぞれ、相互の保存的置換を定義していると典型的に見なすことができるアミノ酸を含む：

40

- a. アラニン (Ala)、グリシン (Gly)；
- b. アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)；
- c. アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)；
- d. アルギニン (Arg)、リジン (Lys)；
- e. イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)、バリン (Val)；

50

- f. フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp) ;  
 g. セリン (Ser)、トレオニン (Thr) ; および  
 h. システイン (Cys)、メチオニン (Met) 。

## 【0221】

そのような置換が生物学的活性における変化を招くならば、以下のような、またはアミノ酸のクラスに関連してさらに下に記載されるような、より実質的な変化を導入してもよく、所望の特徴について生成物がスクリーニングされ得る。そのようなより実質的な変化の例は : Ala Leu、Ile ; Arg Gln ; Asn Asp、Lys、Arg、His ; Asp Asn ; Cys Ala ; Gln Glu ; Glu Gln ; His Lys ; Ile Met、Ala、Phe ; Leu Ala、Met、ノルロイシン ; Lys Asn ; Met Phe ; Phe Val、Ile、Ala ; Trp Phe ; Tyr Thr、Ser ; Val Met、Phe、Ala である。

10

## 【0222】

リポカリンの生物学的特性における実質的な改変は、(a)置換領域中のポリペプチド主鎖の、例えばシートもしくはヘリカル立体構造などの構造、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさの維持に及ぼす効果が、顕著に異なる置換を選択することによって果たされる。天然残基は、共通の側鎖特性に基づきグループ分けされる : (1)疎水性 : ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン ; (2)中性親水性 : システイン、セリン、トレオニン ; (3)酸性 : アスパラギン酸、グルタミン酸 ; (4)塩基性 : アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン ; (5)鎖の配向に影響する残基 : グリシン、プロリン ; および(6)芳香族 : トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン。

20

## 【0223】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止するために、それぞれのリポカリンの適切な立体構造の維持に関与しない任意のシステイン残基も、一般的にセリンと置換され得る。逆に、リポカリンの安定性を改善するために、システイン結合がリポカリンに追加され得る。

## 【0224】

上述の挿入を含む任意の変異は、確立された標準法を使用して、核酸に対して、例えばDNAレベルで非常に容易に行うことができる。アミノ酸配列の変更の具体的な例は、挿入または欠失およびアミノ酸置換である。そのような置換は、保存的であり得、すなわち、アミノ酸残基は、特に極性およびサイズに関して、化学的に類似の特性のアミノ酸残基と置き換えられる。保存的置換の例は、以下の群のメンバーの間の置換である : 1)アラニン、セリン、およびトレオニン ; 2)アスパラギン酸およびグルタミン酸 ; 3)アスパラギンおよびグルタミン ; 4)アルギニンおよびリジン ; 5)イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン ; ならびに6)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方で、アミノ酸配列に非保存的変更を導入することも可能である。加えて、単一のアミノ酸残基を置き換える代わりに、涙液リポカリンの一次構造の1つまたは複数の連続アミノ酸を挿入するかまたは欠失させることも、これらの欠失または挿入が安定にフォールディングされた / 機能性ムテインを生じる限り、可能である。

30

40

## 【0225】

アミノ酸配列の改変は、特定の制限酵素のための切断部位を組み入れることによって変異リポカリン遺伝子またはその部分のサブクローニングを簡略化するための、単一アミノ酸位置の特異的変異誘発を含む。加えて、これらの変異は、所与の標的に対するリポカリンムテインまたは融合タンパク質の親和性をさらに改善するためにも組み入れることができる。さらに、変異は、フォールディング安定性、血清安定性、タンパク質抵抗性、もしくは水溶性を改善するため、または必要に応じて凝集傾向を低減するためなど、ムテインまたは融合タンパク質のある特徴を調節するために、導入することができる。例えば、ジスルフィド架橋形成を防止するために、天然システイン残基が、他のアミノ酸に変異され得る。例えばポリエチレングリコール (PEG)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、ピオ

50

チン、ペプチド、もしくはタンパク質などの他の化合物とのコンジュゲーションのための、または非天然ジスルフィド結合の形成のための、新しい反応基を導入するために、他のアミノ酸配列位置をシステインに計画的に変異させることも可能である。例えばそれぞれのリポカリンムテインまたは融合タンパク質の血清半減期を延ばすために、生成したチオール部位を使用してムテインまたは融合タンパク質がPEG化またはHES化され得る。

【0226】

一部の態様では、上記部分の1つが本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質にコンジュゲートされるならば、アミノ酸側鎖へのコンジュゲーションは、有利であり得る。適切なアミノ酸側鎖は、ヒトリポカリンのアミノ酸配列に天然に存在し得、または変異誘発により導入され得る。適切な結合部位が変異誘発により導入される場合、1つの可能性は、システイン残基による適切な位置におけるアミノ酸の置換である。

10

【0227】

例えば、そのような変異は、ヒト涙液リポカリンの野生型配列におけるThr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 CysまたはGlu131 Cys置換の少なくとも1つを含む。これらの位置のいずれかに新たに創出されたシステイン残基は、次に、ムテインまたは融合タンパク質を、ムテインまたはその融合タンパク質の血清半減期を延長するPEGまたはその活性化誘導体などの部分にコンジュゲートするために利用することができる。

【0228】

ヒトリポカリン2のムテインに関して、ヒトリポカリン2ムテインを含むリポカリンのアミノ酸配列にシステイン残基を導入するような変異の例示的な可能性は、ヒトNGALの野生型配列の配列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146または158に対応する配列位置の少なくとも1つにシステイン(Cys)残基を導入することを含む。本開示のヒトリポカリン2ムテインが、SWISS-PROT/UniProtデータベースアクセス番号P80188の配列と比較して、システインが別のアミノ酸残基により置き換えられた配列を有する一部の態様では、対応するシステインが、該配列内に再導入され得る。具体的な一例として、そのような場合、アミノ酸位置87のシステイン残基は、SWISS-PROTアクセス番号P80188の配列に本来存在するようにシステインに復帰させることによって導入され得る。例えばそれぞれのヒトリポカリン2ムテインまたはその融合タンパク質の血清半減期を延ばすために、アミノ酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、および/または158のいずれかの側部で生成したチオール部位を使用してムテインがPEG化またはHES

20

30

【0229】

別の態様では、上記部分の1つを本開示によるリポカリンムテインまたは融合タンパク質にコンジュゲートするのに適したアミノ酸側鎖を提供するために、人工アミノ酸が、変異誘発により導入され得る。一般的に、そのような人工アミノ酸は、より反応性であるように、その結果所望の化合物へのコンジュゲーションを容易にするように設計される。人工tRNAを介して導入され得るそのような人工アミノ酸の一例は、パラ-アセチルフェニルアラニンである。

【0230】

本明細書開示のムテインまたは融合タンパク質のいくつかの適用のために、例えばタンパク質またはタンパク質ドメインまたはペプチドである部分に融合されたコンジュゲートの形態で、それらを使用することが有利であり得る。一部の態様では、リポカリンムテインまたはその融合タンパク質は、リポカリンムテインのN末端またはC末端において(本開示の融合タンパク質に含まれるものを含む)、タンパク質、タンパク質ドメインまたはペプチドに、例えばシグナル配列および/または親和性タグに融合される。

40

【0231】

容易な検出および/または組み換えタンパク質の精製も可能にする、Strep-tag(登録商標)またはStrep-tag(登録商標)II(Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、mycタグ、FLAGタグ、His<sub>6</sub>タグ、もしくはHAタグなどの親和性タグまたはグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのタンパク質は、適切な融合パートナーのさ

50

らなる例である。最終的に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) または黄色蛍光タンパク質 (YFP) などの発色または蛍光特性を有するタンパク質も、同様に、本開示のリポカリウムテインに適した融合パートナーである。

#### 【0232】

一般に、本開示のリポカリウムテインまたは融合タンパク質を、化学、物理、光学、または酵素反応において検出可能な化合物またはシグナルを直接的または間接的に生成する、任意の適切な化学物質または酵素を含む化合物で標識することが可能である。物理反応および同時の光学反応 / マーカーの一例は、放射線照射時の蛍光発光または放射性標識を使用した場合のX線の放出である。アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、および  $\beta$ -ガラクトシダーゼは、発色反応産物の形成を触媒する酵素標識 (および同時に光標識) の例である。一般に、抗体のために通常使用される全ての標識 (免疫グロブリンのFc部分において糖部分と共にもっぱら使用されるものを除く) は、また、本開示のリポカリウムテインまたは融合タンパク質のコンジュゲーションのためにも使用することができる。例えば所与の細胞、組織もしくは器官へのそのような薬剤のターゲティングされた送達のために、または周囲の正常細胞に影響せずに、細胞、例えば腫瘍細胞の選択的ターゲティングのために、本開示のリポカリウムテインまたは融合タンパク質は、また任意の適切な治療用活性薬剤にコンジュゲートされ得る。そのような治療用活性薬剤の例には、放射性核種、毒素、有機小分子、および治療用ペプチド (細胞表面受容体のアゴニスト / アンタゴニストとして作用するペプチド、または所与の細胞標的上でタンパク質結合部位を競合するペプチドなど) が含まれる。しかし、本開示のリポカリウムテインまたは融合タンパク質は、アンチセンス核酸分子、低分子干渉RNA、マイクロRNAまたはリボザイムなどの治療活性核酸にもコンジュゲートされ得る。そのようなコンジュゲートは、当技術分野において周知の方法により産生させることができる。

10

20

#### 【0233】

上に示すように、本開示のリポカリウムテインまたは融合タンパク質は、一部の態様では、ムテインまたは融合タンパク質の血清半減期を延長する部分にコンジュゲートされ得る (これに関し、CTLA-4に対して結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリウムのムテインに関するそのようなコンジュゲーション戦略について記載しているPCT公報WO2006/56464も参照されたい)。血清半減期を延長する部分は、ほんの数例を挙げると、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン、パルミチン酸などの脂肪酸分子 (Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質、トランスフェリンであり得る。アルブミン結合タンパク質は、アルブミンに対して結合活性を有する、細菌アルブミン結合タンパク質、抗体、ドメイン抗体を含む抗体フラグメント (例えば、米国特許第6,696,245号を参照されたい)、またはリポカリウムテインであり得る。したがって、本開示のリポカリウムテインまたは融合タンパク質の半減期を延長するのに適したコンジュゲーションパートナーには、連鎖球菌プロテインGのドメイン (Koenig, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83) またはSEQ ID NO:39に示されるドメインなどの細菌アルブミン結合ドメインが含まれる。加えて、コンジュゲーションパートナーとして使用できるアルブミン結合ペプチドの例は、例えば、米国特許出願第2003/0069395号またはDennisら (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* 277, 35035-35043) に記載されている、Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cysコンセンサス配列 [ 式中、Xaa<sub>1</sub>は、Asp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり ; Xaa<sub>2</sub>は、Asn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり ; Xaa<sub>3</sub>は、Ala、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり ; Xaa<sub>4</sub>は、Asp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrである ] を有するペプチドである。

30

40

#### 【0234】

他の態様では、アルブミン自体 (Osborn, B.L. et al., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548)、またはアルブミンの生物学的活性フラグメントを、本開示のリポカ

50

リンムテインまたは融合タンパク質のコンジュゲーションパートナーとして使用することができる。用語「アルブミン」には、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラットアルブミンなどの全ての哺乳類アルブミンが含まれる。

【0235】

アルブミン結合タンパク質が抗体フラグメントならば、それは、ドメイン抗体であり得る。ドメイン抗体 (dAb) は生物物理特性およびインビボ半減期を正確に制御して、最適な安全性および有効性の産物プロファイルを創出可能にするように操作される。ドメイン抗体は、例えば、Domantis Ltd. (Cambridge, UK and MA, USA) から市販されている。

【0236】

トランスフェリンが、本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質の血清半減期を延長するための部分として使用される場合、ムテインまたは融合タンパク質を、非グリコシル化トランスフェリンのNもしくはC末端、またはその両方に遺伝的に融合することができる。非グリコシル化トランスフェリンは、半減期14~17日を有し、トランスフェリンとコンジュゲートしたムテインまたは融合タンパク質は、同様に延長した半減期を有するであろう。トランスフェリン担体は、高いバイオアベイラビリティ、生体内分布および循環安定性も提供する。この技法は、BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA) から市販されている。タンパク質安定化剤 / 半減期延長パートナーとして使用するための組み換えヒトトランスフェリン (DeltaFerrin (商標)) は、Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) から市販されている。

10

【0237】

免疫グロブリンのFc部分が、本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質の血清半減期を延長するために使用されるならば、Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) から市販されているSynFusion (商標) 技法が使用され得る。このFc融合技法の使用は、より長期間作用する生物学的製剤の創出を可能にし、例えば、薬物動態、溶解性、および産生効率を改善するために、抗体のFc領域に連結した2つのコピーのムテインからなり得る。

20

【0238】

本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質の半減期を延長するためのなお別の代替法は、ムテイン (本開示の融合タンパク質に含まれるものを含む) のNまたはC末端に、長い、構造不定の、柔軟なグリシンリッチ配列 (例えば、約20~80個の連続グリシン残基を有するポリグリシン) を融合することである。WO2007/038619に開示されたこのアプローチは、例えば「rPEG」(組み換えPEG)とも名付けられている。

30

【0239】

ポリアルキレングリコールが、コンジュゲーションパートナーとして使用されるならば、ポリアルキレングリコールは、置換、非置換、直鎖または分岐であることができる。それは、活性化ポリアルキレン誘導体であることもできる。適切な化合物の例は、インターフェロンに関する国際公開公報第99/64016号、米国特許第6,177,074号もしくは米国特許第6,403,564号に記載される、またはPEG改変アスパラギナーゼ、PEG-アデノシンデアミナーゼ (PEG-ADA)、またはPEG-スーパーオキシドジスムターゼ (例えば、Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148参照) などの他のタンパク質について記載される、ポリエチレングリコール (PEG) 分子である。ポリエチレングリコールなどのそのようなポリマーの分子量は、例えば、分子量約10,000、約20,000、約30,000または約40,000ダルトンのポリエチレングリコールを含む、約300から約70,000ダルトンの範囲であり得る。そのうえ、例えば米国特許第6,500,930号または同第6,620,413号に記載のように、デンブunまたはヒドロキシエチルデンブun (HES) などの糖質オリゴマーおよびポリマーを、血清半減期の延長のために、本開示のムテインまたは融合タンパク質にコンジュゲートすることができる。

40

【0240】

加えて、本明細書開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質は、酵素活性または

50

他の分子に対する結合親和性などの、本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質に新しい特徴を付与し得る部分にコンジュゲートされ得る。適切な部分の例には、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインGのアルブミン結合ドメイン、プロテインA、抗体フラグメント、オリゴマー化ドメイン、または毒素が含まれる。

#### 【0241】

加えて、本明細書開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質を別の酵素活性部位と融合することにより、結果として生じた融合タンパク質の両方の「構成要素」が、一緒に所与の治療標的に作用することが可能であり得る。例えば、リポカリンムテインの結合ドメイン（本開示の融合タンパク質に含まれるものを含む）は、病因となる標的に結合し、酵素ドメインが標的の生物学的機能を消失させ得る。

10

#### 【0242】

一部の態様では、本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質は、本開示のリポカリンムテインおよび別の開示された部分を相互に共有結合するリンカー（例えばペプチド結合）を介して、部分にコンジュゲートされ得る。これは、例えば、ペプチドリンカーによって繋がれた単一のポリペプチドとして、連結したりポカリンムテインを発現させることにより、達成することができる。適切なペプチドリンカーは、任意のアミノ酸を含む任意長のひと続きのアミノ酸から構成され得る。好ましいリンカー設計は、式 $(GxSy)_n$  [式中、 $x$ は、 $n$ 回繰り返される構成要素中のグリシンリピートの数であり、 $y$ は、セリンリピートの数である]に従う、グリシンおよびセリンのひと続きの反復アミノ酸を利用する。

20

#### 【0243】

一部の他の態様では、本開示のリポカリンムテインを別の開示された部分に連結するために、化学的な共有結合法が適用され得る。一例は、リンカーとアミノ酸側鎖との間、例えばマレイミドとリポカリンムテイン内の遊離システインとの間、または活性化カルボン酸エステルとリポカリンムテイン内の第一級アミンとの間で反応性の化学作用を可能にする二官能性リンカーの使用である。これは、タンパク質発現の間に含まれ得、選択的に誘導体化できる官能基を提供する非天然アミノ酸側鎖を用いる反応を含む。一部のなおさらなる態様では、アジドおよびアルキンの付加環化などの「クリック」ケミストリーが、本開示の融合タンパク質の1つまたは複数のサブユニットを連結するために使用され得る。

30

#### 【0244】

本開示は、本開示のリポカリンムテインおよび融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子（DNAおよびRNA）にも関する。遺伝コードの縮重は、あるコドンで、同じアミノ酸を特定する他のコドンにより置換することを許容するので、本開示は、本明細書記載のリポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードする特定の核酸分子に限定されるのではなく、機能的ムテインまたは機能的融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む全ての核酸分子を包含する。これに関して、本開示は、概してSEQ ID NO:23~35、45~49および54に示される一部の例示的なりポカリンムテイン、一部の例示的な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供する。

40

#### 【0245】

本開示の一態様では、方法は、ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:8）の配列位置28、36、40~41、49、52、68、70、72~73、75、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132、および134に対応する配列位置の少なくとも1つ、時にはそれより多くをコードするヌクレオチドトリプレットにおける変異誘発に核酸分子を供する段階を含む。

#### 【0246】

本開示による方法の別の態様では、ヒト涙液リポカリンをコードする核酸分子は、最初に、ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:1）のアミノ酸配列位置26

50

~ 34、55 ~ 58、60 ~ 61、64、104 ~ 108の1つまたは複数における変異誘発に供される。次に、ヒト涙液リポカリンをコードする核酸分子は、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置101、111、114、および153の1つまたは複数における変異誘発にも供される。

【0247】

本開示は、実験的変異誘発の示された配列位置以外に追加的な変異を含む、本開示のリポカリンムテインおよび融合タンパク質をコードする核酸分子も含む。そのような変異は、多くの場合に、許容され、または例えばそれらがムテインおよび融合タンパク質の改善されたフォールディング効率、血清安定性、熱安定性、もしくはリガンド結合親和性に寄与する場合、有利であると判明することさえある。

【0248】

本出願に開示された核酸分子は、1種または複数種の調節配列と「機能的に連結され」て、この核酸分子の発現を可能にし得る。

【0249】

DNAなどの核酸分子が、転写および/または翻訳調節に関する情報を含む配列エレメントを含み、かつそのような配列が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「機能的に連結される」ならば、それは、「核酸分子を発現することが可能」または「ヌクレオチド配列の発現を許すことが」可能であると呼ばれる。機能的連結は、調節性配列エレメントおよび発現されるべき配列が、遺伝子発現を可能にする方法で繋がれている連結である。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、種間で異なる場合があるが、一般にこれらの領域は、原核生物においてプロモーター自体、すなわち転写開始を指令するDNAエレメントと、RNAに転写された場合に翻訳開始のシグナルとなるDNAエレメントとの両方を含むプロモーターを含む。そのようなプロモーター領域には、通常、原核生物における-35/-10ボックスおよびシャイン・ダルガノエレメントまたは真核生物におけるTATAボックス、CAAT配列、および5'-キャップエレメントなどの、転写および翻訳の開始に参与する5'非コード配列が含まれる。これらの領域は、エンハンサーまたはリプレッサーエレメント、ならびに天然ポリペプチドを宿主細胞の特定の区画にターゲティングするための翻訳されたシグナル配列およびリーダー配列も含むことができる。

【0250】

加えて、3'非コード配列は、転写終結、ポリアデニル化などに関する調節エレメントを含み得る。しかし、これらの終結配列が、特別な宿主細胞において十分には機能的でないならば、それらは、その細胞において機能的なシグナルと置換され得る。

【0251】

したがって、本開示の核酸分子は、プロモーター配列などの調節配列を含むことができる。一部の態様では、本開示の核酸分子は、プロモーター配列および転写終結配列を含む。適切な原核生物用プロモーターは、例えば、tetプロモーター、lacUV5プロモーターまたはT7プロモーターである。真核細胞での発現に有用なプロモーターの例は、SV40プロモーターまたはCMVプロモーターである。

【0252】

本開示の核酸分子は、プラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミドまたは人工染色体などの、ベクターの部分または任意の他の種類のクローニング媒体でもあることができる。

【0253】

一態様では、核酸分子はファージミド (phasmid) 中に入れられる。ファージミドベクターは、M13もしくはf1などの溶原性ファージの遺伝子間領域またはその機能的部分が関心対象のcDNAと融合されたものをコードするベクターを意味する。細菌宿主細胞にそのようなファージミドベクターおよび適切なヘルパーファージ (例えばM13K07、VCS-M13またはR408) を重感染させた後、完全な状態のファージ粒子が産生されることにより、コードされる異種cDNAと、ファージ表面にディスプレイされるそれに対応するポリペプチドとの物理的カップリングが可能になる (例えば、Lowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys.

10

20

30

40

50

Biomol. Struct. 26, 401-424、またはRodi, D.J., and Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93参照)。

【0254】

そのようなクローニング媒体は、上記調節配列および本明細書記載のリポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードする核酸配列とは別に、発現のために使用される宿主細胞に適合性の種に由来する複製配列および制御配列、ならびに形質転換または形質移入された細胞に選択可能な表現型を付与する選択マーカを含むことができる。多数の適切なクローニングベクターが、当技術分野において公知であり、市販されている。

【0255】

本明細書記載のリポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードするDNA分子、および特にそのようなムテインのコード配列を含むクローニングベクターは、該遺伝子を発現することが可能な宿主細胞中に形質転換することができる。形質転換は、標準技法を使用して行うことができる。したがって、本開示は、本明細書開示の核酸分子を含む宿主細胞にも指向する。

10

【0256】

形質転換宿主細胞は、本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養される。適切な宿主細胞は、大腸菌 (*E. coli*) もしくは枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などの原核生物性、あるいは出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、SF9もしくはHigh5昆虫細胞、不死化哺乳類細胞系 (例えば、HeLa細胞もしくはCHO細胞)、または初代哺乳類細胞などの真核生物性であることができる。

20

【0257】

本開示は、本明細書記載のポリペプチドの産生のための方法であって、リポカリンムテインまたは融合タンパク質が、リポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードする核酸から出発して、遺伝子操作方法により産生される方法にも関する。該方法は、インピボで実施することができ、リポカリンムテインまたは融合タンパク質を、例えば細菌または真核性宿主生物において産生し、次にこの宿主生物またはその培養物から単離することができる。タンパク質をインピトロで、例えばインピトロ翻訳系の使用により産生することも可能である。

【0258】

リポカリンムテイン、融合タンパク質またはフラグメントをインピボで産生させる場合、そのようなムテインをコードする核酸が、(既に上で概説されている)組み換えDNA技法により適切な細菌または真核性宿主生物に導入される。このために、宿主細胞に、本明細書記載のリポカリンムテインまたは融合タンパク質をコードする核酸分子を含むクローニングベクターが、確立された標準方法を用いて最初に形質転換される。次に、宿主細胞は、異種DNAを発現させ、その結果対応するポリペプチドの合成を可能にする条件下で培養される。続いて、ポリペプチドは、細胞または培地のいずれかから回収される。

30

【0259】

一部の態様では、本出願に開示されたDNAなどの核酸分子は、本開示の別の核酸分子に「機能的に連結され」て、本開示の融合タンパク質の発現を可能にし得る。これに関して、機能的な連結は、第1の核酸分子の配列エレメントおよび第2の核酸分子の配列エレメントが、単一のポリペプチドとしての融合タンパク質の発現を可能にする方法で繋がれた連結である。

40

【0260】

加えて、一部の態様では、Cys76とCys175との間の天然ジスルフィド結合は、本開示のNGALムテイン(本開示の融合タンパク質に含まれるものを含む)において除去され得る。同様に本開示のTlcムテイン(本開示の融合タンパク質に含まれるものを含む)について一部の態様では、Cys61とCys153との間の天然ジスルフィド結合が除去され得る。したがって、そのようなムテインまたは融合タンパク質を、還元的酸化還元環境を有する細胞区画において、例えばグラム陰性細菌の細胞質において産生することができる。

50

## 【0261】

本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質が分子内ジスルフィド結合を含む場合、適切なシグナル配列を使用して酸化的酸化還元環境を有する細胞区画に新生ポリペプチドを誘導することが好ましい場合がある。そのような酸化的環境は、大腸菌などのグラム陰性細菌のペリプラズムによって、グラム陽性細菌の細胞外環境において、または真核細胞の小胞体の内腔において提供され得、通常は、構造的ジスルフィド結合の形成に有利である。

## 【0262】

しかし、宿主細胞、好ましくは大腸菌のサイトゾル中に本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質を産生させることも可能である。この場合、ポリペプチドは、可溶性状態およびフォールディングされた状態で直接得られるか、または封入体の形態で回収され、続いてインビトロで再生され得る。さらなる選択肢は、酸化的細胞内環境を有する特定の宿主株の使用であり、これにより、サイトゾル中でのジスルフィド結合の形成が可能になり得る (Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8)。

10

## 【0263】

しかし、本明細書記載のリポカリンムテインまたは融合タンパク質は、必ずしも遺伝子操作の使用によってのみ生成または産生されなくてもよい。それどころか、そのようなリポカリンムテインまたは融合タンパク質は、メリーフィールド固相ポリペプチド合成などの化学合成またはインビトロの転写および翻訳によっても、得ることができる。例えば、分子モデリングを使用して有望な変異を同定し、次に、望まれる(設計された)ポリペプチドをインビトロ合成し、IL-17Aに対する結合活性を検討することが可能である。タンパク質の固相および/または液相合成のための方法は、当技術分野において周知である(例えば、Bruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43を参照されたい)。

20

## 【0264】

別の態様では、本開示のリポカリンムテインまたは融合タンパク質は、当業者に公知の十分に確立された方法を利用して、インビトロ転写/翻訳によって産生され得る。

## 【0265】

当業者は、本開示により企図されるがそのタンパク質配列または核酸配列が本明細書において明示的に開示されていないリポカリンムテインを調製するために有用な方法を認識するであろう。概要として、アミノ酸配列のそのような改変は、例えば、特定の制限酵素のための切断部位を組み入れることにより、変異リポカリンム遺伝子またはその部分のサブクローニングを簡略化するために、単一のアミノ酸位置の特異的変異誘発を含む。加えて、これらの変異は、リポカリンムテインまたは融合タンパク質のその標的(例えば、それぞれIL-17AまたはIL-23p19)に対する親和性をさらに改善するためにも、組み入れることができる。さらに、変異は、フォールディング安定性、血清安定性、タンパク質抵抗性、もしくは水溶性を改善するため、または必要に応じて凝集傾向を低減するためなど、ムテインまたは融合タンパク質のある特徴を調節するために、導入することができる。例えば、ジスルフィド架橋形成を防止するために、天然システイン残基が、他のアミノ酸に変異され得る。

30

40

## 【0266】

本明細書開示のリポカリンムテインおよび融合タンパク質ならびにそれらの誘導体を、抗体またはそのフラグメントと同様、多数の分野に使用することができる。例えば、リポカリンムテインおよび/または融合タンパク質ならびにそれらのそれぞれの誘導体を、酵素、抗体、放射性物質、または生化学活性もしくは既定の結合特徴を有する任意の他の基を用いて標識するために使用することができる。そうすることによって、そのそれらの各々の標的は、検出され、またはそれらと接触した時にもたらされ得る。加えて、本開示のリポカリンムテインおよび/または融合タンパク質は、確立された分析方法(例えば、ELISAもしくはウエスタンブロット)または顕微鏡法もしくは免疫センサー法により、化学構造を検出するために役立つ。これに関して、検出シグナルは、適切なムテイン、も

50

しくは適切な融合タンパク質の使用により直接的に；または抗体により結合されたムテインの免疫化学的検出により間接的に生成させることができる。

【0267】

本発明により、IL-17および/またはIL-23に検出可能な親和性で結合するタンパク質ムテインを提供するように操作することができる他のタンパク質の骨格には、EGF様ドメイン、クリングドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANドメイン、G1aドメイン、SRCRドメイン、クニツノウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、テンダミスタット (tendamistat)、カザール型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル (P型) ドメイン、フォンウィルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、サイログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン、リンクドドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメイン (例えば、ドメイン抗体またはラクダ重鎖抗体)、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォンウィルブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カッパボディー (Kappabody)」 (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997))、「ミニボディー (Minibody)」 (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994))、「ダイアボディー (Diabody)」 (Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993))、「ヤヌシン (Janusin)」 (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991)およびTraunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)、ナノボディー、アドネクチン (adnectin)、テトラネクチン (tetranectin)、マイクロボディー (microbody)、アフィリン (affilin)、アフィボディー (affibody) アンキリン、クリスタリン、ノッチン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質、アンキリンもしくはアンキリンリピートタンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質、アビマー (avimer) (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlröth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, *Nat Biotech*, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in *Nat Biotech*. 2005 Nov 20 edition) ;およびSilverman J, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlröth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP, *Nat Biotech*, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in *Nat. Biotechnology*. 2005 Nov 20 edition) にも記載のヒト受容体ドメインファミリーのエキソンシャッフリングにより進化した多価アビマータンパク質が含まれる。

【0268】

本開示の追加的な目的、利点、および特徴は、限定的であると意図されない以下の実施例およびその添付図面を検討することにより当業者に明らかになる。したがって、本開示は、例示的な態様および任意の特徴により具体的に開示されるものの、本明細書において開示される、その中に具体化された開示の改変および変形が当業者によって用いられ得ること、ならびにそのような改変および変形が、本開示の範囲内であると見なされることを理解すべきである。

【実施例】

【0269】

V. 実施例

実施例1：SPRにより測定されるIL-17Aに対するリポカリウムテインの親和性

IL-17Aに対するSEQ ID NO:1のリポカリウムテインの結合親和性を測定するために、Bia

core T200機器 (GE Healthcare) を利用する表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づくアッセイを利用した。SPR親和性アッセイ (図1) では、標準的なアミン化学反応を使用してIL-17Aをセンサーチップ上に固定化した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を使用してチップの表面を活性化した。続いて、279レゾナンスユニット (RU) の固定化レベルが達成されるまで、10mM酢酸塩 (pH5) 中の5  $\mu\text{g/mL}$  IL-17A溶液を流速10  $\mu\text{L/分}$  で適用した。残留した活性化基をエタノールアミンでクエンチした。エタノールアミンの後にEDC/NHSで処理することにより、参照チャンネルはブランク固定化を受けた。

#### 【0270】

親和性を決定するために、SEQ ID NO:1の4つの希釈液をHBS-EP+緩衝液中に調製し、調製済みのチップ表面に適用した。接触時間300秒、解離時間1200秒で、流速30  $\mu\text{L/分}$  を適用して、結合アッセイを実施した。全ての測定を25  $^{\circ}\text{C}$  で行った。10mM水性 $\text{H}_3\text{PO}_4$  (30秒) および10mMグリシン-HCl (pH1.5) (15秒) の連続注入に続く、流動緩衝液を用いた余分な洗浄および安定化時間30秒で固定化IL-17A表面の再生を果たした。タンパク質の測定前に、スタートアップの3サイクルをコンディショニング目的で行った。データをBiacore T200 Evaluationソフトウェア (V 1.0) で評価した。ダブルリファレンスを使用した。生データの適合に1:1結合モデルを使用した。

#### 【0271】

結果として生じた適合曲線を図1に示す。データから、SEQ ID NO:1がIL-17Aに結合速度定数 $k_a = 7.0 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ および解離速度定数 $k_d = 5.3 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の高い親和性で結合し、解離定数 $K_D = 0.8 \text{nM}$ を生じたことが示される。

#### 【0272】

実施例2：代替的な様式のSPRにより測定された、IL-17A/Fに対するリポカリウムテインの親和性

SEQ ID NO:1をリガンドとして捕捉し、ヒトIL-17A/Fを分析物として適用する、代替的なアッセイ様式の表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づくアッセイにおいてIL-17AFに対するSEQ ID NO:1のリポカリウムテインの結合親和性を測定するために、Biacore T200機器 (GE Healthcare) を使用した。この様式では、アッセイにおける潜在的なアビディティー効果を避けるために、(実施例1で使用したホモダイマー性IL-17Aとは対照的に) ヒトIL-17A/Fを採用した。適切な過剰のEZ-Link NHS-PEG4-ビオチン (Thermo, Cat# 21329) を適用して、SEQ ID NO:1を室温で2時間ビオチン化し、Zebaスピン脱塩プレート (Thermo, Cat# 21329) を製造業者の説明書に従って使用して、未反応のビオチンを分離した。

#### 【0273】

SPR親和性アッセイでは、Biotin CAPture Kit (GE Healthcare) を使用してビオチン化SEQ ID NO:1をセンサーチップCAP上に捕捉した。センサーチップCAPにはssDNAオリゴヌクレオチドが予め固定化されていた。無希釈のBiotin CAPture Reagent (相補ss-DNAオリゴヌクレオチドとコンジュゲートしたストレプトアビジン) を流速2  $\mu\text{L/分}$  で300秒間適用した。続いて、0.4 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  のビオチン化SEQ ID NO:1を流速5  $\mu\text{L/分}$  で300秒間適用した。参照チャンネルにビオチンCAPture Reagentのみを負荷した。

#### 【0274】

結合親和性を決定するために、ヒトIL-17A/Fの5つの希釈物 (0.2 ~ 20nM) をHBS-EP+緩衝液中に調製し、調製されたチップ表面に適用した。流速30  $\mu\text{L/分}$  を適用して、単サイクル動態アプローチを試料接触時間300秒および解離時間2400秒で使用した。リガンドの固定化後、5つの濃度全てを昇順に連続的に適用し、その後解離を監視した。全ての測定を25  $^{\circ}\text{C}$  で行った。0.25M NaOHを有する6M Gua-HClを注入し、続いてランニングバッファーで余分の洗浄を行い、安定化時間120秒を設けることでセンサーチップCAP表面の再生を成し遂げた。Biacore T200 Evaluationソフトウェア (V 1.0) でデータを評価した。ダブルリファレンスを使用した。生データの適合に単サイクル動態1:1結合モデルを使用した。

#### 【0275】

結果として生じた適合曲線を図2に示す。データから、SEQ ID NO:1がヒトIL-17A/Fに結

合速度定数 $k_a = 1.2 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ および解離速度定数 $k_d = 1.2 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ の高い親和性で結合し、計算平衡解離定数 $K_D = 100 \text{pM}$ を生じたことが示される。実施例1との比較から、SPRアッセイの結果がアッセイ様式にいくらか依存することが示される。しかし、両方の様式で、それぞれヒトIL-17AおよびヒトIL-17A/Fに対するSEQ ID NO:1の親和性は、高く、ナノモル濃度以下の範囲である。アッセイは、SEQ ID NO:1とこのムテインを含む融合体との間の比較を可能にするために重要である（下の実施例11参照）。

【0276】

実施例3：IL-17Aへのリポカリウムテイン結合の競合的作用様式

SEQ ID NO:1が競合様式でIL-17Aに結合するかどうかを、競合ELISA様式を使用してインビトロで試験した（図3）。この実験では、一定濃度のビオチン化ヒトIL-17Aを様々な濃度のSEQ ID NO:1と共に1時間インキュベートした。溶液中でのこの予備インキュベーションの後に、一定分量のリポカリウムテイン/IL-17A混合物を、ヒトIL-17RAをコーティングしたELISAプレートに移して、hIL-17RAとの結合がブロックされなかったhIL-17Aの濃度を測定した（図3）。

10

【0277】

全てのインキュベーション段階を、300rpmで振盪して行い、各インキュベーション段階の後に、Biotek EL405セレクトCWウォッシャーを使用してプレートをPBS-T緩衝液（PBS、0.05% Tween 20）80  $\mu\text{l}$ で5回洗浄した。第1の段階では、384ウェルMSDプレートに、PBS中に濃度1  $\mu\text{g/ml}$ の可溶性ヒトIL-17RA 20  $\mu\text{l}$ を4で一晚直接コーティングした。洗浄後、受容体コーティング済みのウェルを、PBS-T/BSA（0.1% Tween 20含有PBS中の2% BSA）60  $\mu\text{l}$ を用いて室温で1時間ブロッキングした。

20

【0278】

適切な出発濃度のSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:41を使用して、PBS-T/BSA緩衝液中に1:4の比にピコモル濃度範囲まで系列希釈した様々な濃度のSEQ ID NO:1または陰性対照としてのSEQ ID NO:41と共に、一定濃度0.01nMのヒトIL-17Aを溶液中でインキュベートした。室温で1時間インキュベーション後に、反応混合物20  $\mu\text{l}$ をhIL-17RAコーティング済みMSDプレートに移して、未結合（遊離）の、または非競合的に結合したhIL-17Aを室温で20分間捕捉した。ELISAの読み出し結果を遊離hIL-17Aの絶対濃度に変換可能にするために（下記参照）、様々な濃度のhIL-17Aを含有する標準曲線をPBS-T/BSA中に調製し、同じMSDプレート上で同様に20分間インキュベートした。

30

【0279】

結合したビオチン化hIL-17Aの検出および定量を可能にするために、残った上清を捨て、PBS-T/BSA中に濃度1  $\mu\text{g/mL}$ のStreptavidin Sulfo-tag 20  $\mu\text{l}$ を添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、MSD Read Buffer T（2x）60  $\mu\text{l}$ を各ウェルに添加し、プレートを15分以内に読み取った。

【0280】

結果として生じた電気化学発光（ECL）シグナルを、SECTOR Imager 2400（Meso Scale Discovery）を使用して測定した。以下のように評価を行った：遊離IL-17A濃度 $c(\text{IL-17A})_{\text{遊離}}$ を計算し（並行して決定した標準曲線から）、SEQ ID NO:1の濃度 $c(\text{SEQ ID NO:1})$ に対してプロットした。IL-17A/IL-17RA複合体の形成が50%ブロックされたSEQ ID NO:1の濃度（IC50）を得るために、合計トレーサー濃度 $c(\text{IL-17A})_{\text{合計}}$ およびIC50値を自由パラメータとして $c(\text{IL-17A})_{\text{遊離}} = c(\text{IL-17A})_{\text{合計}} / (1 + c(\text{SEQ ID NO:1}) / \text{IC50})$ に従う単一部位結合モデルを用いた非線形回帰により、曲線を適合させた。曲線適合は、GraphPad Prism 4ソフトウェアを使用して行った。

40

【0281】

図3に、陰性対照SEQ ID NO:41がhIL-17Aに結合せず、対照的に、SEQ ID NO:1は、hIL-17Aに対する強い競合結合を実証し、適合されたIC50値は75pMであったことを示す。

【0282】

実施例4：IL-17Aに対するリポカリウムテインの特異性および種交差反応性

SEQ ID NO:1のリポカリウムテインの特異性および種交差反応性（図4）を、「溶液競合

50

ELISA」によってアッセイし、その原理は以下の通りであった：一定濃度のSEQ ID NO:1を様々な濃度のリガンドと共に1時間インキュベートした。リガンドは、ヒトIL-17A、カニクイザルIL-17A (cIL-17A)、およびキヌザルIL-17Aであった。溶液中でのこの予備インキュベーション後に、ニュートラアビジンによりビオチン化hIL-17Aを固定化したELISAプレートに、一定分量のムテイン/リガンド混合物を移して、残りの遊離SEQ ID NO:1の濃度を測定した。遊離（非リガンド結合型）SEQ ID NO:1の濃度を定量ELISA設定により決定した（図4）。本アッセイは、全てのリガンドがSEQ ID NO:1上の同じ結合部位をターゲティングしていたこと、すなわちリガンドが相互に競合してSEQ ID NO:1に結合したことに依拠したことに留意されたい。

#### 【0283】

以下の詳細な実験プロトコールでは、インキュベーション段階および洗浄段階を、上の競合ELISAプロトコールに記載したように行った。蛍光測定に適した384ウェルプレート（Greiner FLUOTRAC（商標）600、黒平底、高結合性）に、PBS中に濃度5 µg/mlのニュートラアビジン20 µlを4で一晚コーティングした。洗浄後、ニュートラアビジンコーティング済みウェルをブロッキング緩衝液（PBS-T/BSA）100 µlで、室温にて1時間ブロッキングした。再度洗浄後、PBS中に濃度1 µg/mLのビオチン化hIL-17A 20 µlを室温で1時間添加し、過剰の試薬を除去した。

#### 【0284】

適切な出発濃度を使用して、PBS-T/BSA中に1:3の比でピコモル濃度範囲まで系列希釈した様々な濃度のリガンド（hIL-17A、cIL-17A、およびキヌザルIL-17A）と共に、一定濃度0.25nMのSEQ ID NO:1を溶液中でインキュベートした。室温で1時間インキュベーション後に、ビオチン化hIL-17Aが固定化された384ウェルプレートに反応混合物20 µlを移して、未結合（遊離）のSEQ ID NO:1を室温で20分間捕捉した。ELISAの読み出し結果を遊離SEQ ID NO:1の絶対濃度に変換可能にするために（下記参照）、様々な濃度のSEQ ID NO:1を含有する標準曲線をPBS-T/BSA中に調製し、および同じELISAプレート上で同様に20分間インキュベートした。

#### 【0285】

残った上清を捨て、PBS-T/BSA中に所定の最適濃度のHRP標識抗リポカリン抗体20 µlを添加し、室温で1時間インキュベートした。抗リポカリン抗体は、リポカリンムテイン混合物を用いたウサギの免疫処置によって得られたものであり、続いてキット（EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific）を製造業者の説明書に従って使用してその抗体をHRPとカップリングさせ、抗体-HRPコンジュゲートを得た。洗浄後、蛍光発生HRP基質（Quantablu, Pierce）20 µlを各ウェルに添加し、反応を60分間進行させた。プレート上の各ウェルの蛍光強度を、Genios Plus Microplateリーダー（Tecan）を使用して読み取った。データを評価するために、遊離SEQ ID NO:1濃度 $c(\text{SEQ ID NO:1})_{\text{遊離}}$ を標準曲線の結果に基づき計算し、リガンド濃度 $c(\text{Ligand})$ に対してプロットした。IL-17A/SEQ ID NO:1複合体の形成が50%ブロックされたリガンド濃度（IC50）を得るために、合計トレーサー濃度 $c(\text{SEQ ID NO:1})_{\text{合計}}$ およびIC50値を自由パラメーターとして $c(\text{SEQ ID NO:1})_{\text{遊離}} = c(\text{SEQ ID NO:1})_{\text{合計}} / (1 + c(\text{Ligand}) / \text{IC50})$ に従う単一部分結合モデルを用いた非線形回帰により、曲線を適合させた。曲線適合は、GraphPad Prism 4ソフトウェアを使用して行った。

#### 【0286】

まとめると、曲線適合は、以下の結果をもたらした： $\text{IC50}_{\text{hIL-17A}} = 0.1\text{nM}$ 、 $\text{IC50}_{\text{cIL-17A}} = 0.1\text{nM}$ および $\text{IC50}_{\text{キヌザルIL-17A}} = 0.2\text{nM}$ 。図4に示すように、データにより、SEQ ID NO:1が、ヒト、カニクイザル、およびキヌザル由来のIL-17Aに対して高い親和性を示すことが実証され、したがって、SEQ ID NO:1がカニクイザルおよびキヌザルIL-17Aと完全に交差反応性であることが示される。

#### 【0287】

実施例5：細胞に基づくアッセイにおけるIL-17A誘導G-CSF分泌のリポカリンムテイン介在性ブロック

10

20

30

40

50

本発明者らは、SEQ ID NO:1がIL-17Aの生物学的活性をブロックする能力を実証するために、細胞に基づくアッセイを利用した。アッセイは、U87-MG細胞（ATCCカタログ# HTB-14）におけるG-CSFのIL-17A誘導分泌に基づいた。臨床的に発生した2つのベンチマーク抗体に対するSEQ ID NO:1の効力を比較するために、この高感度の機能アッセイを利用した。このアッセイでは、組み換えhIL-17AをSEQ ID NO:1、ベンチマーク抗体分子または対照と共に予備インキュベートし、細胞に添加した。SEQ ID NO:1に加えて、以下のベンチマークおよび対照をアッセイに含ませた：ベンチマーク抗体1（重鎖SEQ ID NO:53；軽鎖SEQ ID NO:54）、ベンチマーク抗体2（重鎖SEQ ID 55；軽鎖SEQ ID NO:56）ならびに陰性対照としてSEQ ID NO:2およびヒトIgGアイソタイプ抗体（Dianova, CAT# 009-000-002）。次に、上清中のG-CSF濃度をELISAにより測定した。

10

## 【0288】

U87-MG細胞を細胞培養フラスコに入れて標準条件下で培養した（10%ウシ胎仔血清FCS（PAA Laboratories）を含有するダルベッコ変法イーグル培地DMEM（PAN Biotech GmbH）、37℃、5% CO<sub>2</sub>雰囲気）。

## 【0289】

実験1日目に、Accutase（PAA Laboratories）を製造業者の説明書に従って用いて、接着細胞をそれらの支持体から解離させた。続いて細胞を1000rpmで5分間遠心沈殿させ、培地中に再懸濁し、100μm細胞ストレーナー（Falcon）を通過させて濾過して、細胞凝集物を除去した。次に、細胞を、96ウェル平底組織培養プレート（Greiner）に最終体積100μlを使用して密度5000個/ウェルで蒔いた。それらを標準条件下で一晩インキュベートした。

20

## 【0290】

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、ヒトIgGアイソタイプ抗体（Dianova, CAT# 009-000-002）、ベンチマーク抗体1およびベンチマーク抗体2（上記）が、研究中の分子（「MUS」）であった。2日目に、96ウェルプレート中に成長した細胞の培地を新鮮培地80μlによって置き換え、続いて一定濃度0.1nMの組み換えhIL-17AおよびMUS溶液の希釈系列を細胞に添加した。これは、各MUSまたは対照について3つ組で行った。細胞を標準条件下でさらに20~24時間インキュベートした。G-CSFレベルの測定のために上清を収集する前に、ウェルを顕微鏡で視覚的に検査した。かなりの細胞死または細胞凝集物の存在を示したウェルを評価から除外した。MSDからのG-CSF Ultra-Sensitive Kitを使用してG-CSFレベルを決定した。データを評価するために、MUS濃度c(MUS)に対してG-CSF濃度を任意ユニットでプロットした。U-87 MG細胞によるG-CSF産生の誘導が50%に減少したMUS濃度（IC<sub>50</sub>）を得るために、自由パラメーターがIC<sub>50</sub>、誘導G-CSF濃度c(G-CSF)<sub>最大</sub>、および未誘導G-CSF濃度c(G-CSF)<sub>最小</sub>で、 $c(G-CSF) = c(G-CSF)_{\text{最小}} + [c(G-CSF)_{\text{最大}} - c(G-CSF)_{\text{最小}}] / [1 + c(MUS) / IC_{50}]$ に従う単一部位結合モデルを用いて、非線形回帰により曲線を適合させた。ここで、c(G-CSF)<sub>最大</sub>およびc(G-CSF)<sub>最小</sub>は、研究中のアンタゴニストまたは対照分子に依存しなかったと仮定し、したがってそれらを、全ての分子について共通の値に適合させた。

30

## 【0291】

図5に、2つ組で行った実験の代表的な実施例を示す。結果として生じたSEQ ID NO:1についての平均EC<sub>50</sub>値は0.13nM（第1の実験で0.17nM、繰り返し実験で0.10nM）であり、それは、EC<sub>50</sub> = 2.33 (2.65/2.01) nMを示したベンチマーク1よりも有意に強力であり、EC<sub>50</sub> = 0.12 (0.14/0.10) nMを有するベンチマーク2と比較して類似の範囲内であった。SEQ ID NO:2およびヒトIgGアイソタイプ抗体（Dianova, CAT# 009-000-002、図5に示さず）からなる陰性対照は、細胞のIL-17A誘導G-CSF産生に無効であった。

40

## 【0292】

実施例6：SPRによって測定されたIL-23に対するリポカリンムテインの親和性

ヒトIL-23に対するSEQ ID NO:2のリポカリンムテインの結合親和性を測定するために、Biacore T200機器（GE Healthcare）を利用する表面プラズモン共鳴（SPR）に基づくアッセイを利用した。SPR親和性アッセイ（図6）では、標準的なアミン化学反応を使用してhIL-23をセンサーチップ上に固定化した。EDCおよびNHSを使用してチップの表面を活性化し

50

た。続いて、十分な固定化レベルが達成されるまで、10mM酢酸塩 (pH4.5) 中の5 µg/mL hIL-23溶液を流速10 µL/分で適用した。残留した活性化基をエタノールアミンでクエンチした。エタノールアミンの後にEDC/NHSで参照チャンネルを処理した (ブランク固定化)。

【0293】

SEQ ID NO:2の結合親和性を決定するために、SEQ ID NO:2の5つの希釈液をHBS-EP+緩衝液中に調製し、調製済みのチップ表面に適用した。接触時間300秒、解離時間1200秒で、流速30 µL/分を適用して、結合アッセイを実施した。全ての測定を25 °Cで行った。10mM水性H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30秒)の注入に続く、流動緩衝液を用いた余分な洗浄および安定化時間30秒で固定化hIL-23表面の再生を果たした。タンパク質の測定前に、スタートアップの3サイクルの測定をコンディショニング目的で行った。データをBiacore T200 Evaluationソフトウェア (V 1.0) で評価した。ダブルリファレンスを使用した。生データの適合に1:1結合モデルを使用した。

10

【0294】

図6に、3つ組で行った実験の代表的な実施例を示す。結果として生じた適合曲線により、SEQ ID NO:2が、hIL-23に結合速度定数 $k_a = 5.0 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ および解離速度定数 $k_d = 1.9 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の高い親和性で結合したことが実証される。3回の反復実験で決定された平均解離定数は、 $K_D = 0.35 \pm 0.20 \text{nM}$ になり、SEQ ID NO:2とヒトIL-23との間の高親和性相互作用を実証している。

【0295】

実施例7：代替的な様式でSPRにより測定されたIL-23に対するリポカリウムテインの親和性

20

SEQ ID NO:2をリガンドとして捕捉し、hIL-23を分析物として適用する、代替的なアッセイ様式の表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用してヒトIL-23に対するSEQ ID NO:2の結合親和性を測定するために、Biacore T200機器 (GE Healthcare) を使用した。SEQ ID NO:2および対照を実施例2記載のようにビオチン化した。SPR親和性アッセイでは、Biotin CAPture Kit (GE Healthcare) を使用してビオチン化SEQ ID NO:2をセンサーチップCAP上に捕捉した。このために、無希釈のBiotin CAPture Reagentを流速2 µL/分で300秒間適用した。続いて、0.4 ~ 10 µg/mLのビオチン化SEQ ID NO:2または対照を流速5 µL/分で300秒間適用した。参照チャンネルにはビオチン CAPture Reagentのみを負荷した。

【0296】

30

結合親和性を決定するために、hIL-23 (7 ~ 600nM) の5つの希釈液を、350mM NaClを補充したHBS-EP+緩衝液中に調製し、調製済みのチップ表面に適用した。hIL-23とチップ表面との非特異的相互作用を最小限にするために350mM NaClの添加が必要であった。流速30 µL/分を適用して、単サイクル動態アプローチを試料接触時間300秒および解離時間4000秒または7200秒で使用した。リガンドの固定化後、5つの濃度全てを昇順に連続的に適用し、その後解離を監視した。全ての測定を25 °Cで行った。センサーチップCAP表面の再生およびデータ評価を、実施例2記載のように成し遂げた。

【0297】

結果として生じた適合曲線を図7に示す。データから、SEQ ID NO:2がhIL-23に結合速度定数 $k_a = 1.23 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ および解離速度定数 $k_d = 3.55 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ のかなり高い親和性で結合し、計算平衡解離定数 $K_D = 2.9 \text{nM}$ を生じたことが示される。実施例6との比較から、SPRアッセイ様式を使用した場合に親和性の強い低下が示されるが、それは、hIL-23とチップ表面との非特異的相互作用を最小限にして、その結果、この様式でアッセイを実施することを容易にするために緩衝液中に含めなければならなかった高い非生理学的濃度のNaCl (350mM) に起因すると考えられる。本アッセイは、SEQ ID NO:2とこのムテインを含有する融合体との比較を可能にするために重要である (下の実施例11参照)。

40

【0298】

実施例8：IL-23へのリポカリウムテイン結合の競合的作用様式

実施例3と同様であるが、標的としてhIL-23を使用して、リポカリウムテインSEQ ID NO:2が競合様式でhIL-23に結合するかどうかを、競合ELISA様式を使用してインビトロで試

50

験した(図8)。

【0299】

全てのインキュベーション段階を、300rpmで振盪して行い、各インキュベーション段階の後に、Biotek EL405セレクトCWウォッシャーを使用してプレートをPBS/0.05% Tween 20 80 µlで5回洗浄した。384ウェルMSDプレートに、PBS中に濃度1 µg/mlの可溶性ヒトIL-23受容体20 µlを4で一晚直接コーティングした。洗浄後、受容体コーティング済みのウェルを、PBS-T/BSA 60 µlを用いて室温で1時間ブロッキングした。

【0300】

適切な出発濃度を使用して、PBS-T/BSA中に1:4の比にピコモル濃度範囲まで系列希釈した様々な濃度のSEQ ID NO:2または陰性対照としてのSEQ ID NO:43と共に、一定濃度0.01nMのビオチン化ヒトIL-23を溶液中でインキュベートした。室温で1時間インキュベーション後に、反応混合物20 µlをIL-23受容体コーティング済みMSDプレートに移して、未結合(遊離)の、または非競合的に結合したhIL-23を室温で20分間捕捉した。ELISAの読み出し結果を遊離hIL-23の絶対濃度に変換可能にするために(下記参照)、100nMから開始して様々な濃度のhIL-23を含有する標準曲線(1:4に11段階の系列希釈)をPBS-T/BSA中に調製し、同じMSDプレート上で同様に20分間インキュベートした。結合したビオチン化hIL-23の検出および定量を可能にするために、残った上清を捨て、PBS-T/BSA中に濃度1 µg/mLのStreptavidin Sulfo-tag 20 µlを添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、MSD Read Buffer T(2x) 60 µlを各ウェルに添加し、プレートを15分以内に読み取った。

10

【0301】

結果として生じたECLシグナルを、SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)を使用して測定した。実施例3と同様に評価を行った。図8に示すように、陰性対照SEQ ID NO:43は、hIL-23に結合せず、対照的に、SEQ ID NO:2は、hIL23に対する競合結合を実証し、適合されたIC50値は0.54nMであった。

20

【0302】

実施例9: IL-23に対するリポカリウムテインの特異性および種交差反応性

SEQ ID NO:2のリポカリウムテインの特異性および種交差反応性(図9)を、実施例4と同様に、しかし異なるリガンド、すなわちヒト、カニクイザル(cIL-23)、キヌザル、およびマウス由来のIL-23を検討する、「溶液競合ELISA」によってアッセイした。

【0303】

以下の詳細な実験プロトコールでは、インキュベーション段階および洗浄段階を、上の競合ELISAプロトコールに記載したように行った。蛍光測定に適した384ウェルプレート(Greiner FLUOTRAC(商標)600、黒平底、高結合性)に、PBS中に濃度5 µg/mlのニュートラアビジン20 µlを4で一晚コーティングした。洗浄後、ニュートラアビジンコーティング済みウェルをPBS-T/BSA 100 µlで、室温にて1時間ブロッキングした。再度洗浄後、PBS中に濃度0.25 µg/mLのビオチン化hIL-23-Bio 20 µlを室温で1時間添加し、過剰の試薬を除去した。

30

【0304】

適切な出発濃度を使用して、PBS-T/BSA中に1:3の比でピコモル濃度範囲まで系列希釈した様々な濃度のリガンド(hIL-23、cIL-23、キヌザルIL-23、およびマウスIL-23)と共に、一定濃度0.5nMのSEQ ID NO:2を溶液中でインキュベートした。室温で20分間インキュベーション後に、hIL-23コーティング済み384ウェルプレートに反応混合物20 µlを移して、未結合(遊離)のSEQ ID NO:2を室温で20分間捕捉した。ELISAの読み出し結果を遊離SEQ ID NO:2の絶対濃度に変換可能にするために(下記参照)、様々な濃度のSEQ ID NO:2を含有する標準曲線をPBS-T/BSA中に調製し、同じMSDプレート上で同様に20分間インキュベートした。

40

【0305】

プレートに捕捉されたSEQ ID NO:2を定量するために、残った上清を捨て、PBS-T/BSA中に予め決められた最適濃度のHRP標識抗リポカリウム抗体20 µlを添加し、室温で1時間インキュベートした。抗リポカリウム抗体は、リポカリウムテイン混合物を用いたウサギの免疫

50

処置によって得られたものであり、続いてキット (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) を製造業者の説明書に従って使用してその抗体をHRPとカップリングさせ、抗体-HRPコンジュゲートを得た。プレートのさらなる取り扱い、データ取得および評価を、実施例4記載のように行った。

#### 【0306】

図9に示すように、結果から、SEQ ID NO:2がヒトおよびマウスIL-23と完全に交差反応性であり、カニクイザルおよびキヌザルのIL-23に対して、 $IC_{50}_{hIL-23} = 0.9nM$ 、 $IC_{50}_{cIL-23} = 4.8nM$ 、 $IC_{50}_{mar mIL-23} = 12nM$ および $IC_{50}_{mIL-23} = 0.5nM$ のいくらか減少した親和性を示すことが実証される。

#### 【0307】

実施例10：細胞に基づく増殖アッセイにおけるIL-23のリポカリンムテイン介在性ブロック

ヒトIL-23受容体を組み換え発現する細胞を利用する短期増殖バイオアッセイの適用により、SEQ ID NO:2のリポカリンムテインがhIL-23の生物学的活性を中和する能力を判断した。Ba/F3形質移入細胞系は、受容体の両方のサブユニットhIL-23RおよびhIL-12R 1を発現し、ヒトIL-23およびカニクイザルIL-23の両方に応答性である。Ba/F3細胞は、hIL-23に反応して用量依存的に増殖し、hIL-23中和剤により増殖を阻害することができる。アッセイでは、様々な濃度のSEQ ID NO:2を一定量のhIL-23と共に予備インキュベートし、続いて、その混合物を培養Ba/F3細胞に添加した。培養3日後に、生存可能な細胞数を定量することによって、増殖の程度を判断した。CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega CAT# G7571) を使用してこれを行い、代謝活性な細胞数と相関するATPレベルを測定した。SEQ ID NO:2がhIL-23を中和する能力を、その $IC_{50}$ 値、すなわちhIL-23誘導増殖の最大半値阻害に導くリポカリンムテイン濃度により判断した。

#### 【0308】

アッセイを設定する詳細な手順を本明細書により以下に説明する。RPMI-1640培地、10%ウシ胎仔血清、0.05mM 2-メルカプトエタノール、500  $\mu g/mL$  ゲネチシン (G418)、1ng/mL mIL-3、2  $\mu g/mL$  ピューロマイシン、および200  $\mu g/mL$  ゼオシン (zeocin) 中でBa/F3形質移入体を維持した。RPMI-1640培地、10%ウシ胎仔血清、および0.05mM 2-メルカプトエタノール中でBa/F3の増殖アッセイを実施した。384ウェル白色透明平底プレート (Greiner) 中、25  $\mu L$  / ウェルでアッセイを行った。

#### 【0309】

1日目に、Ba/F3懸濁細胞培養物からの細胞を計数し、ペレットにし、アッセイ培地中で2回洗浄し、2500個 / ウェルの密度で蒔いた。Ba/F3細胞の増殖を誘導するために必要な、予め決められた $EC_{50}$ に対応する50pMのhIL-23 (CAT# HZ-1254, HumanZyme)、ならびにSEQ ID NO:2、陰性対照 (ヒトIgGアイソタイプ抗体、CAT#. 009-000-003, Dianova) およびベンチマーク抗体 (ベンチマーク3:SEQ ID NO:57およびSEQ ID NO:58、ベンチマーク4:SEQ ID NO:59およびSEQ ID NO:60) の希釈系列をウェルに添加した。全ての用量設定系列を、アッセイ培地中での1:3系列希釈および適切な出発濃度を使用して行った。続いて、細胞を37 °Cで72時間増殖させた。hIL-23の効力が日間および日内変動に供されなかったことを確認するために、50nMから開始するアッセイ培地中での1:3希釈段階を使用して、hIL-23単独の希釈系列をBa/F3細胞に添加することにより、hIL-23に対するBa/F3細胞の用量依存的増殖応答をチェックした。72時間後の細胞増殖を定量するために、各ウェルの中でCellTiter-Glo試薬25  $\mu L$  を細胞に添加し、軌道シェーカー上で2分間インキュベートして細胞溶解を誘導し、PheraStar FSリーダーを使用して発光を測定した。

#### 【0310】

GraphPad Prismソフトウェア (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) を使用して試料濃度に対して発光シグナルをプロットし、S字状用量反応モデルでデータの非線形回帰を行って、 $EC_{50}$ 値を決定した。

#### 【0311】

実験結果を図10に示す。上に開示した増殖アッセイは、2つの独立した実験を代表する

10

20

30

40

50

ものである。SEQ ID NO:2は、平均EC50 1.2nM (第1の実験で1.7nM、繰り返し実験で0.7nM)を表し、ベンチマーク3は、EC50 3.0nM (3.1/2.9)を示し、ベンチマーク4は、EC50 1.2nM (0.8/1.5)を示した。陰性対照は、増殖に効果を有さなかった。したがって、データにより、SEQ ID NO:2およびベンチマーク分子は、この機能アッセイにおいて匹敵する効力を示すことが実証される。

【0312】

実施例11：融合タンパク質の設計および特徴

以下および図11に示すように、IL-17A結合リポカリウムテインおよびIL-23結合リポカリウムテインの一方または両方のいずれかを含む様々な融合タンパク質を生成させ、発現させ、特徴付けた。

【0313】

SEQ ID NO:8は、SEQ ID NO:1と、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインに由来する脱免疫化アルブミン結合ペプチド (dABD、SEQ ID NO:15)との融合タンパク質である。

【0314】

SEQ ID NO:7は、SEQ ID NO:2とSEQ ID NO:15との融合タンパク質である。

【0315】

SEQ ID NO:10は、2つのSEQ ID NO:1配列が並んで、リンカーSEQ ID NO:18を介して連結したものがSEQ ID NO:15と融合されたホモダイマー性融合タンパク質である。

【0316】

SEQ ID NO:3は、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2がリンカーSEQ ID NO:18を介して連結したヘテロダイマー性融合タンパク質であり；一方でSEQ ID NO:4は、逆順のリポカリウムテインSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:1を有し、わずかに異なるリンカーSEQ ID NO:19で連結したヘテロダイマー性融合タンパク質である。

【0317】

SEQ ID NO:5は、SEQ ID NO:3に対応するが、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン (SEQ ID NO:14)と追加的にC末端融合した融合タンパク質である。

【0318】

SEQ ID NO:9は、SEQ ID NO:3に対応するが、dABD (SEQ ID NO:15)と追加的にC末端融合した融合タンパク質である。

【0319】

SEQ ID 6は、2つのSEQ ID NO:1の配列が並んで、C末端がSEQ ID NO:2およびdABD (SEQ ID NO:15)と融合したトリマー性融合タンパク質である。リポカリウム間のリンカーは、SEQ ID NO:18からなかった。

【0320】

本発明者らは、1つまたは複数のSEQ ID NO:1部分とIgG1のFc部分との融合タンパク質も生成させ、それは、SEQ ID NO:16に対応する。

【0321】

SEQ ID NO:11は、SEQ ID NO:1とSEQ ID NO:16とがペプチドリンカーSEQ ID NO:19を介して連結したC末端融合物に対応する融合タンパク質である。

【0322】

SEQ ID NO:12は、SEQ ID NO:16のFc分子がN末端およびC末端の両方でSEQ ID NO:1を与えられるような、SEQ ID NO:1のN末端およびC末端の二重融合体に対応する融合タンパク質である。

【0323】

SEQ ID NO:13は、SEQ ID NO:16のFc分子との、SEQ ID NO:10のホモダイマー性融合タンパク質のC末端融合物に対応する融合タンパク質である。

【0324】

全ての融合タンパク質を、適用可能な場合、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2について正確に上記のようなアッセイ、すなわちhIL-17A (実施例3)およびhIL-23 (実施例8)につ

10

20

30

40

50

いて競合ELISAアッセイ、hIL-17AF（実施例2）およびhIL-23（実施例6）について融合タンパク質をSPRチップ上に固定化したSPRアッセイ、ならびにhIL-17A（実施例5）およびhIL-23（実施例10）について記載された機能的細胞に基づくアッセイにより完全に特徴付けた。

#### 【0325】

実験結果を表1にまとめる。表に、個別のリポカリンムテインSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の活性を、競合ELISA、表面プラズモン共鳴（SPR）および機能的細胞に基づくアッセイにおいてそれらの融合タンパク質SEQ ID NO:3~13と比較した概要を提供する。それぞれの構築物がIL-17A結合リポカリンムテインSEQ ID NO:1、IL-23結合リポカリンムテインSEQ ID NO:2、またはその両方を含むかどうかに応じて、IL-17および/またはIL-23との相互作用について値を決定した。それぞれIL-17およびIL-23に対する活性を決定するために、実施例3および/または実施例8記載のように競合ELISA実験を実施し、逆様式のSPR実験を、すなわちセンサーチップ上に固定化したタンパク質構築物を用いて、実施例2および/または実施例6記載のように実施し、細胞アッセイは、IL-17A誘導G-CSF分泌（実施例5）および/またはIL-23誘導Ba/F3細胞増殖（実施例10）のいずれかに基づいた。IL-23の親和性を決定するために行われた逆様式SPR実験が、非生理的高濃度のNaClの存在下で実施されたこと、したがって、値が生理条件下でのIL-23に対する親和性を反映しないが、融合タンパク質SEQ ID NO:3~13において、単体のムテインSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2と比較してIL-23に対する相対親和性が異なるかどうかを判定するために役立つことに留意されたい。表1に、SEQ ID NO:1を含む全ての融合体のIL-17A結合活性が、全てのアッセイ様式でSEQ ID NO:1自体の結合活性と少なくとも同じくらいであることを実証する。したがって、SEQ ID NO:1を、活性の喪失なしに任意の融合タンパク質において柔軟に用いることができる。全てのSEQ ID NO:2含有融合タンパク質のIL-23結合活性は、全てのアッセイ様式でSEQ ID NO:2自体の結合活性に非常に近い。したがって、SEQ ID NO:2を、顕著な活性喪失なしに任意の融合タンパク質において柔軟に用いることができる。

#### 【0326】

実施例12：融合タンパク質による全ての標的の同時結合を示すように計画されたSPR実験 hIL-17A、hIL-23およびヒト血清アルブミン（HSA）へのSEQ ID NO:9の融合タンパク質の同時結合を実証するために、Biacore T200機器（GE Healthcare）を使用する表面プラズモン共鳴（SPR）に基づくアッセイを利用した。実施例2記載のようにSEQ ID NO:9をビオチン化した。SPR親和性アッセイでは、Biotin CAPture Kit（GE Healthcare）を使用してビオチン化SEQ ID NO:9をセンサーチップCAP上に捕捉した。このために、無希釈のBiotin CAPture Reagentを流速2  $\mu$ L/分で300秒間適用した。続いて、0.4~10  $\mu$ g/mLのビオチン化SEQ ID NO:9を流速5  $\mu$ L/分で300秒間適用した。参照チャンネルにビオチンCAPture Reagentのみを負荷した。

#### 【0327】

同時結合を実証するために、hIL-17A/F、hIL-23、およびHSA（200nM、1000nM、および2000nM）の希釈物を、350mM NaClを補充したHBS-EP+緩衝液中に調製し、調製済みのチップ表面に連続的に適用した。流速30  $\mu$ L/分を適用して、hIL-17A/F、hIL-23、およびHSAを試料接触時間300秒で連続的に注入した。比較のために単一の標的に結合することによって得ることができる最大結合レベルを得るために、単一のリガンドhIL-17A/F、hIL-23、およびHSAを用いて、固定化SEQ ID NO:9に対する標的の適用も行った。

#### 【0328】

図12に、測定された結合曲線を、全てのリガンドの競合結合を反映している理論的結合曲線と比較する。個別のリガンドに対するSEQ ID NO:9の実験応答を集めることによって、後者を得た。測定された曲線および理論的曲線は、ほぼ同一であり、示された差は、実験曲線における標的の解離に起因すると考えられる。データにより、SEQ ID NO:9は、単一の標的のみとの結合と比べてシグナル強度の喪失も動態における変化もなしに、全ての標的hIL-17A、hIL-23、およびHSAに同時に結合可能なことが示される。

#### 【0329】

### 実施例13：IL-23に対する代替的なりポカリンムテインの親和性

ヒトIL-23に対するリポカリンムテインSEQ ID NO:45およびSEQ ID NO:46の結合親和性を測定するために、Biacore T200機器（GE Healthcare）を利用する表面プラズモン共鳴（SPR）に基づくアッセイを利用した。SPR親和性アッセイ（図13）では、標準的なアミン化学反応を使用してhIL-23をセンサーチップ上に固定化した。実施例6記載のように、チップの活性化、hIL-23の固定化、SPR測定およびデータ評価を行った。

#### 【0330】

図13に示すように、結果として生じた適合曲線から、SEQ ID NO:45がhIL-23に結合速度定数 $k_a = 3.0 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ および解離速度定数 $k_d = 3 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の高い親和性で結合し、解離定数 $K_D = 100 \text{pM}$ を生じたことが実証される。同様に、図13に示すように、SEQ ID NO:46がhIL-23に結合速度定数 $k_a = 7.0 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ および解離速度定数 $k_d = 4.0 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ の高い親和性で結合し、解離定数 $K_D = 0.6 \text{nM}$ を生じた。

10

#### 【0331】

### 実施例14：IL-23に対するリポカリンムテインの競合作用様式

競合ELISA様式を使用して、リポカリンムテインSEQ ID NO:45およびSEQ ID NO:46が競合様式でヒトIL-23に結合するかどうかをインビトロ試験した（図14）。実験および評価を実施例8と同一の方式で実施した。

#### 【0332】

実験結果を図14に示す。SEQ ID NO:45は、適合されたIC50値が0.1nMで、hIL23への競合結合を示し、SEQ ID NO:46も適合されたIC50値が1.1nMでhIL23への競合結合を表す。

20

#### 【0333】

### 実施例15：細胞に基づく増殖アッセイにおけるIL-23のリポカリンムテイン介在性ブロック

ヒトIL-23受容体を組み換え発現する細胞を利用する短期増殖バイオアッセイの適用により、リポカリンムテインSEQ ID NO:45およびSEQ ID NO:46がhIL-23の生物学的活性を中和する能力を判断した。実験および評価は、実施例10と同様に実施した。SEQ ID NO:43を、陰性対照として役立てた。

#### 【0334】

実験結果を図15に示す。SEQ ID NO:45は、平均EC50 3.7nMを表し、SEQ ID NO:46は、EC50 5.4nMを示す。陰性対照は、増殖に効果を有さなかった。したがって、データにより、SEQ ID NO:2ならびにSEQ ID NO:45およびSEQ ID NO:46のリポカリンムテインは、この機能アッセイにおいて匹敵する効力を示すことが実証される。

30

#### 【0335】

### 実施例16：IL-17Aに対する融合タンパク質の特異性

本発明者らは、IL-17Aに対するSEQ ID NO:63および62の融合タンパク質の特異性を決定するためにELISAアッセイを利用した。ニュートラアビジンをPBS中に溶解させ（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、マイクロタイタープレート上に4で一晚コーティングした。各インキュベーション段階の後に、0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) を補充したPBS 100  $\mu\text{L}$  でプレートを5回洗浄した。PBS-T中の2% BSA(w/v) (PBS-TB) でプレートを室温で1時間ブロックし、その後洗浄した。ビオチン化されていたIL-17A (Peprotech) を、濃度1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のニュートラアビジン上に20分間捕捉した。未結合のタンパク質を洗浄除去した。続いて、異なる濃度のSEQ ID NO:1のリポカリンムテインまたは融合タンパク質をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、それに洗浄段階が続いた。PBS-TB中に1:2000希釈した、HRPコンジュゲート型抗ヒトTLc抗体と共にインキュベーション後に、結合した融合タンパク質またはリポカリンムテイン検出した。追加的な洗浄段階の後に、蛍光発生HRP基質 (QuantaBlu, Thermo) を各ウェルに添加し、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して蛍光強度を検出した。

40

#### 【0336】

図16に、EC50値および最大シグナルが自由パラメーターであり、傾きを1に固定した、1:1結合S字状適合の結果としての適合曲線と一緒に実験結果を示す。結果として生じたEC5

50

0値を、データのS字状適合の誤差を含めて表2に提供する。観測されたEC50値は、実験誤差内であり、抗体-リポカリウムテイン融合タンパク質およびリポカリウムテインに非常に類似していた。実験により、融合タンパク質中に含まれるようなSEQ ID NO:1のリポカリウムテインを、IL-17Aに対する活性の喪失なしにSEQ ID NO:61および62の抗体と融合できることが示される。

【0337】

(表2) IL-17Aの結合についてのELISAデータ

名称	EC50 IL-17A [nM]
SEQ ID NO: 1	1.14 ± 0.10
SEQ ID NO : 63および62	1.25 ± 0.17

10

【0338】

実施例17: IL-23に対する融合タンパク質の特異性

本発明者らは、IL-23に対するSEQ ID NO:64と62との融合タンパク質の特異性を決定するためにELISAアッセイを利用した。ニュートラアビジンをPBS (5 µg/mL) 中に溶解させ、マイクロタイタープレート上に4 で一晚コーティングした。各インキュベーション段階の後に、0.1% (v/v) Tween20を補充したPBS (PBS-T) 100 µLでプレートを5回洗浄した。PBS-T中の2% BSA(w/v)でプレートを室温で1時間ブロッキングし、その後洗浄した。ピオチン化IL-23を、濃度1 µg/mlのニュートラアビジン上に20分間捕捉した。未結合のタンパク質を洗浄除去した。続いて、異なる濃度のSEQ ID NO:2のリポカリウムテインまたは融合タンパク質をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、それに洗浄段階が続いた。2% (w/v) BSAを補充したPBS-T (PBS-TB) 中に1:1000希釈した、HRPコンジュゲート型抗ヒトNGAL抗体と共にインキュベーション後に、結合した融合タンパク質またはリポカリウムテインを検出した。追加的な洗浄段階の後に、蛍光発生HRP基質 (QuantaBlu, Thermo) を各ウェルに添加し、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して蛍光強度を検出した。

20

【0339】

図17に、EC50値および最大シグナルが自由パラメーターであり、傾きを1に固定した、1:1結合S字状適合の結果としての適合曲線と一緒に、実験結果を示す。結果として生じたEC50値を、表3に提供する。抗体-リポカリウムテイン融合タンパク質およびリポカリウムテインについて観測されたEC50値は、実験誤差内で非常に類似している。これにより、融合タンパク質に含まれるようなSEQ ID NO:2のリポカリウムテインを、IL-23に対する活性の喪失なしにSEQ ID NO:64および62の抗体と融合できることが実証される。

30

【0340】

(表3) IL-23の結合についてのELISAデータ

名称	EC50 IL-23 [nM]
SEQ ID NO: 2	1.3 ± 0.08
SEQ ID NO : 64および62	1.2 ± 0.08

40

【0341】

実施例18: TNF- に対する融合タンパク質の特異性

本発明者らは、TNF- に対するSEQ ID NO:63と62との融合タンパク質およびSEQ ID NO:64と62との融合タンパク質の特異性を決定するためにELISAアッセイを利用した。SEQ ID NO:61と62との抗体を陽性対照として役立てた。組み換えTNF- (R&D Systems, 210-TA-100/CF) をPBS (1 µg/mL) 中に溶解させ、マイクロタイタープレート上に4 で一晚コーテ

50

イングした。各インキュベーション段階の後に、PBS-T 100  $\mu$ Lでプレートを5回洗浄した。PBS-T中の2% BSA(w/v)でプレートを室温で1時間ブロッキングし、その後洗浄した。異なる濃度のTNF 特異的親抗体または融合タンパク質をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、それに洗浄段階が続いた。PBS-TB中に1:5000希釈した、HRPコンジュゲート型ヤギ抗ヒトIgG Fab抗体 (Jackson Laboratories) と共に室温で1時間インキュベーション後に、結合した融合タンパク質または抗体を検出した。追加的な洗浄段階の後に、蛍光発生HRP基質 (QuantaBlu, Thermo) を各ウェルに添加し、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して蛍光強度を検出した。

【 0 3 4 2 】

図18に、EC50値および最大シグナルが自由パラメーターであり、傾きを1に固定した、1:1結合S字状適合の結果としての適合曲線と一緒に、実験結果を示す。結果として生じたEC50値を、表4に提供する。試験した全てのタンパク質について観測されたEC50値は、非常に類似している。これにより、融合タンパク質に含まれるような抗体を、TNF に対するその活性を損なわずに、異なるリポカリンムテインと融合できることが実証される。

【 0 3 4 3 】

(表4) TNF 結合についてのELISAデータ

名称	EC50 TNF $\alpha$ [nM]
SEQ ID NO : 61 および 62	0.16 $\pm$ 0.01
SEQ ID NO : 63 および 62	0.22 $\pm$ 0.01
SEQ ID NO : 64 および 62	0.26 $\pm$ 0.01

【 0 3 4 4 】

実施例19: ELISAに基づく設定における融合タンパク質の同時標的結合の実証

それぞれTNF およびIL-17AまたはIL-23に対するSEQ ID NO:63と62との融合タンパク質およびSEQ ID NO:64と62との融合タンパク質の同時結合を実証するために、二重結合ELISA様式を使用した。PBS中の組み換えTNF- (R&D Systems, 210-TA-100/CF) (1  $\mu$ g/mL) をマイクロタイタープレート上に4 で一晩コーティングした。各インキュベーション段階の後に、PBS-T 100  $\mu$ Lでプレートを5回洗浄した。PBS-T中の2% BSA(w/v)でプレートを室温で1時間ブロッキングし、その後再度洗浄した。異なる濃度の融合タンパク質をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、それに洗浄段階が続いた。続いて、ビオチン化IL-17A (SEQ ID NO:63および62の場合) またはビオチン化IL-23 (SEQ ID NO:64および62の場合) をPBS-TB中に1  $\mu$ g/mLの一定濃度で1時間添加した。洗浄後、Extravidin-HRP (Sigma-Adrich, PBS-TB中に1:5000) をウェルに1時間添加した。追加的な洗浄段階の後に、蛍光発生HRP基質 (QuantaBlu, Thermo) を各ウェルに添加し、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して蛍光強度を検出した。

【 0 3 4 5 】

図19に、EC50値および最大シグナルが自由パラメーターであり、傾きを1に固定した、1:1結合S字状適合の結果としての適合曲線と一緒に、実験結果を示す。結果として生じたEC50値を、表5に提供する。全ての融合タンパク質は、1桁のナノモル濃度範囲のEC50値で明らかな結合シグナルを示したが、これは、融合タンパク質が、TNF およびIL-17AまたはIL-23のいずれかと同時に会合できることを実証している。

【 0 3 4 6 】

(表5) 同時標的結合についてのELISAデータ

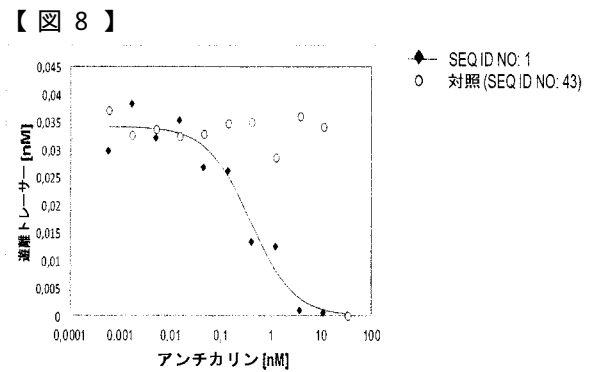
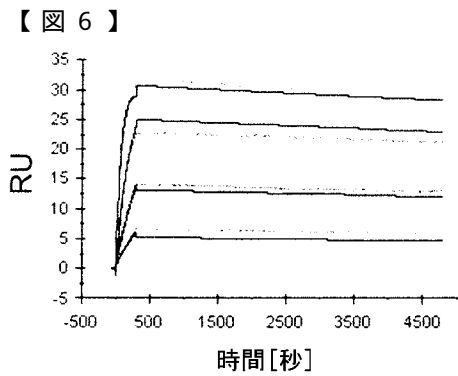
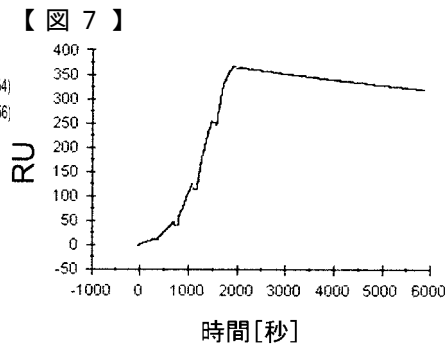
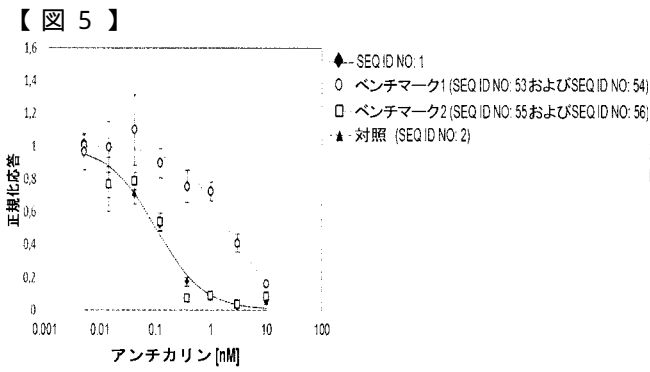
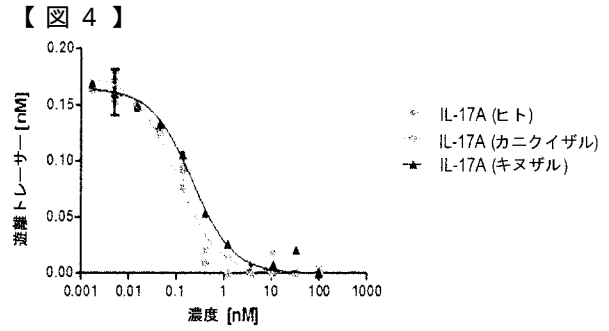
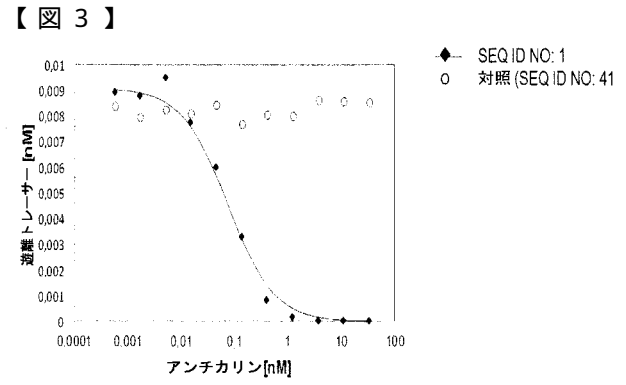
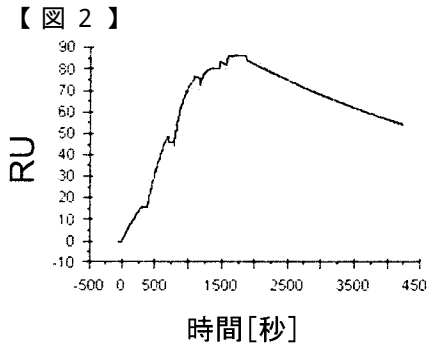
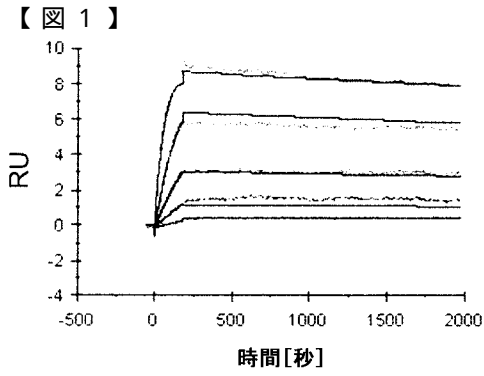
名称	二重結合のEC50 [nM]
SEQ ID NO : 63 および 62	2.70 ± 0.22
SEQ ID NO : 64 および 62	1.54 ± 0.16

## 【 0 3 4 7 】

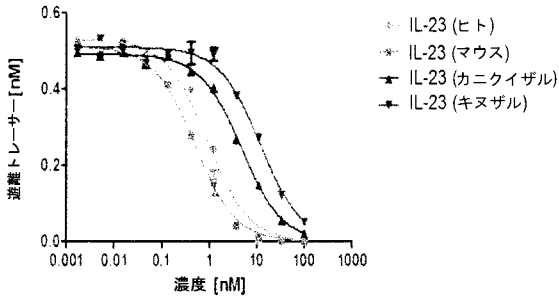
本明細書に例示的に記載された態様は、本明細書において具体的に開示されていない任意の1つまたは複数の要素、1つまたは複数の限定の不在下で適切に実施され得る。したがって、例えば用語「含む」、「含めて」、「含有する」などは、拡張的かつ非限定的に読み取られるものとする。追加的に、本明細書において採用される用語および表現は、限定の用語としてではなく、説明の用語として使用されており、そのような用語および表現の使用に、示され記載された特徴またはその部分の任意の等価物を除外する意図はなく、本発明の範囲内で様々な改変が可能であることが認識される。したがって、本態様が好ましい態様および任意の特徴により具体的に開示されているものの、その改変および変形が当業者により用いられ得ること、ならびにそのような改変および変形が本発明の範囲内であると見なされることを理解すべきである。本明細書記載の全ての特許、特許出願、テキストおよび査読された刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。さらに、参照により本明細書に組み入れられる参考文献中の用語の定義または使用が、本明細書において提供されるその用語の定義と矛盾するまたは反対である場合、本明細書において提供されるその用語の定義が適用され、参考文献中のその用語の定義は、適用されない。上位概念の開示の範囲内にある、より狭義の種および下位概念のグループのそれぞれもまた、本発明の一部を形成する。これは、削除された材料が本明細書において具体的に記載しているか否かにかかわらず、上位概念から任意の主題を除去する但し書きまたは否定的限定を含む本発明の包括的記述を含む。加えて、特徴がマーカッシュグループで記載されている場合、当業者は、本開示は、それによってマーカッシュグループの任意の個別のメンバーまたはメンバーのサブグループについても記載されていることを認識するであろう。本発明のさらなる態様は、添付の特許請求の範囲から明らかになる。

## 【 0 3 4 8 】

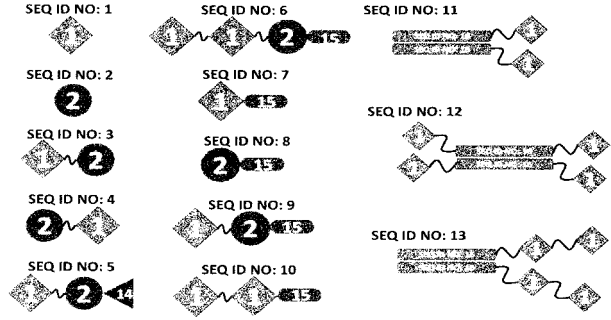
等価物：当業者は、単なるルーティンの実験を用いて、本明細書記載の発明の具体的な態様の多数の等価物を認識し、または確認することが可能である。そのような等価物は、添付の特許請求の範囲により包含されることが意図される。本明細書において言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個別の刊行物、特許または特許出願が、具体的かつ個別に参照により本明細書に組み入れられると示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。



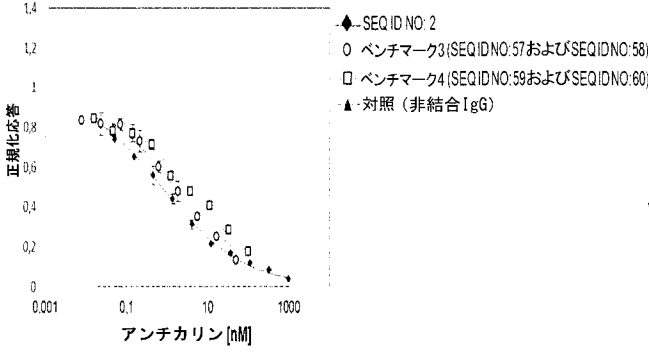
【図 9】



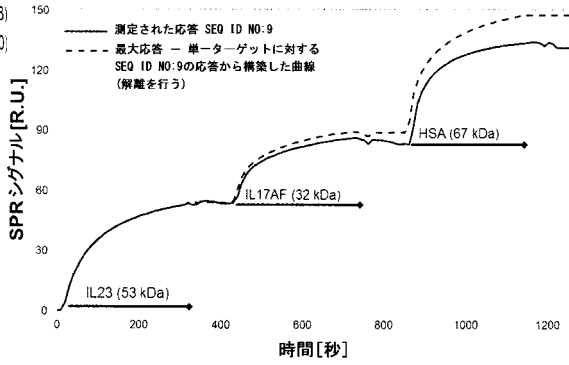
【図 11】



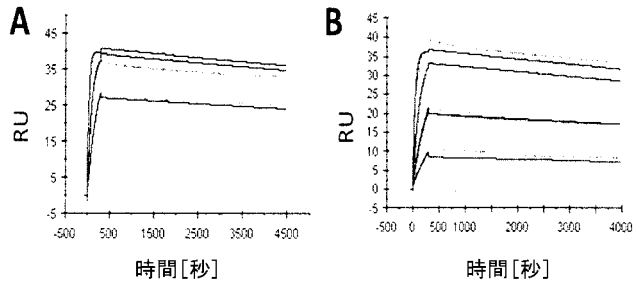
【図 10】



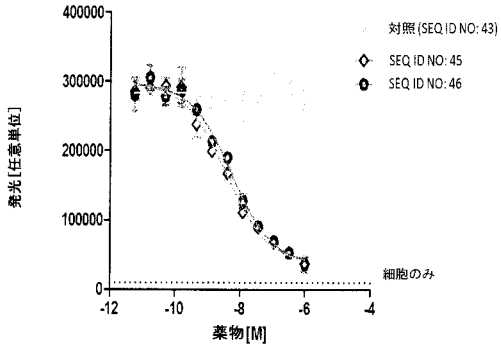
【図 12】



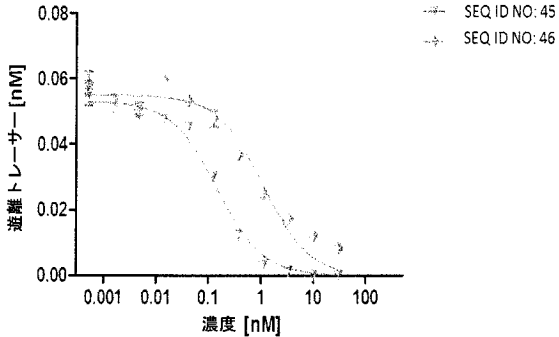
【図 13】



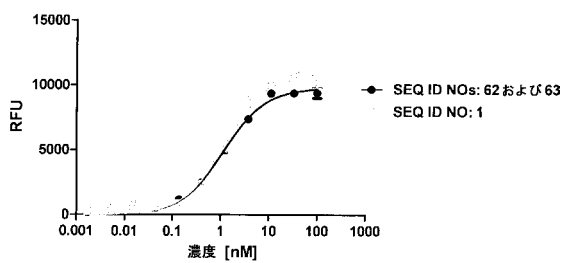
【図 15】



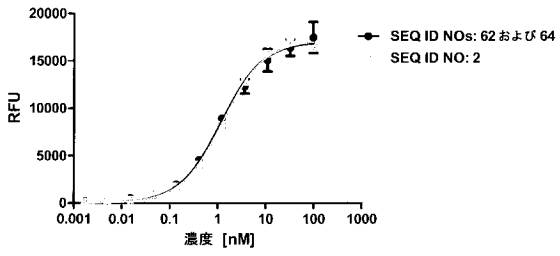
【図 14】



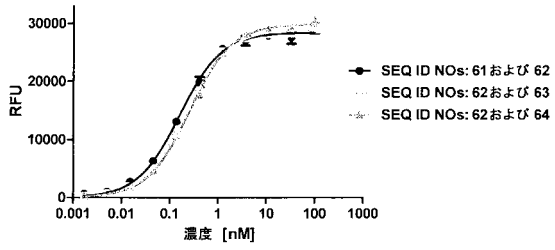
【図 16】



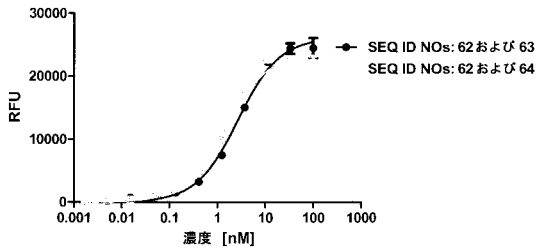
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 配列表 】

2017518748000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/061034
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K14/00	C07K19/00	A61K38/16 C07K14/54 C07K14/47
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/149032 A1 (ASTRAZENECA AB [SE]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; COCHRANE DUNCAN [GB] 27 December 2007 (2007-12-27) pages 1,36; claims 51-53 pages 58,60; claims 57-59 -----	1-15, 32-36, 47,91-96
X,P	WO 2014/076321 A1 (PIERIS AG [DE]) 22 May 2014 (2014-05-22)  the whole document ----- ----- -/--	1-15, 32-36, 47,91-96
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  14 September 2015		Date of mailing of the international search report  21/12/2015
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  Seranski, Peter

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/061034
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEISS G A ET AL: "ANTICALINS VERSUS ANTIBODIES: MADE-TO-ORDER BINDING PROTEINS FOR SMALL MOLECULES", CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 7, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages R177-R184, XP001079019, ISSN: 1074-5521, DOI: 10.1016/S1074-5521(00)00016-8 abstract -----	1-15, 32-36, 47,91-96
X	SKERRA A: "'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties", REVIEWS IN MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 4, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 257-275, XP002269554, ISSN: 1389-0352, DOI: 10.1016/S1389-0352(01)00020-4 abstract -----	1-15, 32-36, 47,91-96
X	SCHLEHUBER S ET AL: "Anticalins as an alternative to antibody technology", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, ASHLEY, LONDON, GB, vol. 5, no. 11, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1453-1462, XP009101205, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1517/14712598.5.11.1453 abstract -----	1-15, 32-36, 47,91-96
X	HOHLBAUM A M ET AL: "Anticalins(R): The lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies", EXPERT REVIEW OF CLINICAL IMMUNOLOGY, FUTURE DRUGS LTD., LONDON, GB, vol. 3, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 491-501, XP001538450, ISSN: 1744-666X, DOI: 10.1586/1744666X.3.4.491 abstract -----	1-15, 32-36, 47,91-96
X	SKERRA ARNE: "Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 4, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 336-344, XP009101213, ISSN: 1464-8431 abstract -----	1-15, 32-36, 47,91-96
	----- -/--	

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/061034

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARNE SKERRA: "Alternative binding proteins: Anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities",            FEBS JOURNAL,            vol. 275, no. 11,            24 June 2008 (2008-06-24), pages            2677-2683, XP055099855,            ISSN: 1742-464X, DOI:            10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x            abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-15,            32-36,            47,91-96</p>
X	<p>WO 2012/156219 A1 (ABLYNX NV [BE]; MERCK PATENT GMBH [DE]; ROMMELAERE HEIDI [BE]; KOLKMAN) 22 November 2012 (2012-11-22) pages 80-81,</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-15,            32-36,            47,91-96</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/EP2015/061034**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-15, 47(completely); 32-36, 91-96(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2015/ 061034

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15, 47(completely); 32-36, 91-96(partially)

Polypeptide having binding specificity for IL-17A comprising a lipocalin mutein; uses; kit; method of detecting; method of binding; methods of inhibiting; nucleic acid, host cell, method of producing

---

2. claims: 16-31, 48(completely); 32-36, 91-96(partially)

Polypeptide having binding specificity for IL-23p19 comprising a lipocalin mutein; uses; kits; method of detecting; method of binding; method for inhibiting; nucleic acid, host cell, method of producing

---

3. claims: 37-46, 49, 50

Method of binding/inhibiting/detecting IL-17A and IL-23p19 /use in a subject/sample using the polypeptides of Invention 1 and Invention 2 together

---

4. claims: 51-90(completely); 91-95(partially)

Fusion.Polypeptides having binding specificity for IL-17A and IL-23p19 comprising a lipocalin mutein; uses; methods of binding; method for inhibiting; combination of polypeptides; composition of polypeptides; method for detecting; kits; nucleic acid molecule; host cell; method of producing a polypeptide

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/061034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007149032 A1	27-12-2007	AR 061568 A1	03-09-2008
		AU 2007261748 A1	27-12-2007
		BR P10713382 A2	29-05-2012
		CA 2655976 A1	27-12-2007
		CN 101611057 A	23-12-2009
		EP 2041176 A1	01-04-2009
		ES 2399475 T3	01-04-2013
		JP 5385784 B2	08-01-2014
		JP 2009540824 A	26-11-2009
		KR 20090029272 A	20-03-2009
		TW 200815469 A	01-04-2008
		US 2008044423 A1	21-02-2008
		UY 30430 A1	31-01-2008
		WO 2007149032 A1	27-12-2007
WO 2014076321 A1	22-05-2014	CA 2891557 A1	22-05-2014
		EP 2920202 A1	23-09-2015
		US 2015344538 A1	03-12-2015
		WO 2014076321 A1	22-05-2014
WO 2012156219 A1	22-11-2012	AU 2012257942 A1	02-05-2013
		CA 2834907 A1	22-11-2012
		CN 103717618 A	09-04-2014
		EA 201391632 A1	30-07-2014
		EP 2705058 A1	12-03-2014
		JP 2014516945 A	17-07-2014
		KR 20140132661 A	18-11-2014
		SG 194632 A1	30-12-2013
		US 2014314743 A1	23-10-2014
		WO 2012156219 A1	22-11-2012

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	B
	G 0 1 N 33/536	C
	G 0 1 N 33/536	D
	G 0 1 N 33/536	E
	G 0 1 N 33/53	U
	C 0 7 K 16/24	Z N A

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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヒンナー マーロン  
ドイツ連邦共和国 8 1 2 4 7 ミュンヘン オイゲン パプスト シュトラーセ 9

(72)発明者 アレアシュドルファー アンドレア  
ドイツ連邦共和国 8 5 2 8 3 ヴォルンツァッハ モザルトシュトラッセ 2 0 エイ

(72)発明者 ヴィーデンマン アレクサンダー  
ドイツ連邦共和国 デー - 8 9 0 7 7 ウルム フュルステネッカーシュトラッセ 5

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA19 CC24  
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44  
4C076 AA95 CC29 EE23 EE38 EE41 EE59 FF31  
4C084 AA01 AA06 AA07 BA01 BA22 BA41 BA42 NA12 NA13 NA14  
ZB211 ZC021 ZC781  
4C085 AA14 AA21 AA24 EE01  
4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 EA20 FA74

专利名称(译)	特异性结合多肽及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017518748A</a>	公开(公告)日	2017-07-13
申请号	JP2016568907	申请日	2015-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	皮里斯制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	ピエ工松鼠ファーマシューティカルズゲーエムベーハー		
[标]发明人	ヒンナーマーロン アレアシュドルファーアンドレア ヴィーデンマンアレクサンダー		
发明人	ヒンナー マーロン アレアシュドルファー アンドレア ヴィーデンマン アレクサンダー		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 A61K38/16 A61K39/395 A61P43/00 A61K47/60 A61K47/64 A61K47/68 G01N33/53 G01N33/536 C07K16/24		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/47 G01N33/6869 G01N2333/47 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 C12P21/02		
FI分类号	C12N15/00.A C12P21/02.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 A61K38/16 A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61K47/60 A61K47/64 A61K47/68 G01N33/53.P G01N33/536.B G01N33/536.C G01N33/536.D G01N33/536.E G01N33/53.U C07K16/24.ZNA		
F-TERM分类号	4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C076/AA95 4C076/CC29 4C076/EE23 4C076/EE38 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF31 4C084/AA01 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084/NA12 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZC021 4C084/ZC781 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA24 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2014169488 2014-05-22 EP		
其他公开文献	JP2017518748A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及新的特异性结合治疗和/或诊断多肽，其靶向是Swiss Prot Q 16552，以及治疗和/或诊断新型特异性结合靶标，即Swiss Prot Q9 NPF7本发明涉及一种多肽。此外，本发明提供Swiss Prot Q 16552和Swiss Prot对于Q9 NPF7中的一种或两种的新型特异性结合特异性治疗和/或诊断多肽。本发明还涉及编码所述多肽的核酸分子和产生所述多肽和核酸分子的方法。此外，本发明涉及包含多肽的组合物以及这些多肽的治疗和/或诊断用途。

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-568907 (P2016-568907)	(71) 出願人	509028645
(86) (22) 出願日	平成27年5月20日 (2015.5.20)		ビエリス ファーマシューティカルズ ゲー ムベーパー
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月10日 (2017.1.10)		ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジ ングヴァイエンステファン リゼーマイ トネルーストラッセ 3 0
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/061034		
(87) 国際公開番号	W02015/177175		
(87) 国際公開日	平成27年11月26日 (2015.11.26)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	14169488.5		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成26年5月22日 (2014.5.22)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 峯名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕季
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的結合ポリペプチドおよびその使用