

(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2020-515252

(P2020-515252A)

(43) 公表日 令和2年5月28日 (2020.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/31 (2006.01)	C 0 7 K 14/31	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 127 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-552853 (P2019-552853)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月3日 (2018.4.3)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月12日 (2019.11.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/058448
 (87) 国際公開番号 W02018/178392
 (87) 国際公開日 平成30年10月4日 (2018.10.4)
 (31) 優先権主張番号 17164226.7
 (32) 優先日 平成29年3月31日 (2017.3.31)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 519340226
 スウェーディッシュ オーファン バイオ
 ヴィトルム エービー (ピーユービーエル
)
 スウェーデン国, 1 1 2 7 6 ストック
 ホルム
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

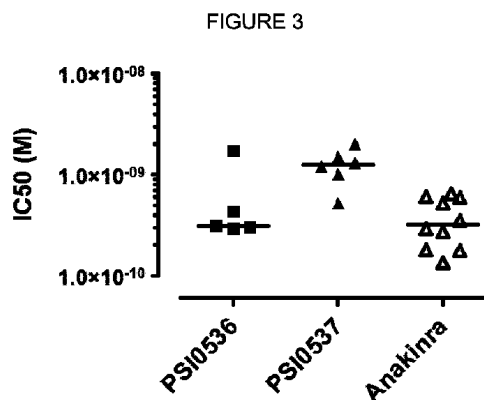
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 R - I 結合ポリペプチド

(57) 【要約】

本開示は、結合モチーフ (BM) $EX_2X_3X_4X_5X_6X_7EIX_{10}X_{11}LPNLX_{16}RX_{18}QYX_{21}AFIX_{25}X_{26}LX_{28}D$ を含む、インターロイキン-1受容体タイプ I (I L - 1 R - I) に対して結合親和性を有する操作されたポリペプチドクラスに関する。本開示はまた、治療剤、予後剤、および/または診断剤としてのかかる I L - 1 R - I 結合ポリペプチドの使用に関する。

【選択図】 図 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I L - 1 R - I 結合モチーフ BM を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドであって、前記モチーフが、

i) E X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ E I X₁₀ X₁₁ L P N L X₁₆ R X₁₈ Q Y X₂₁ A F I X₂₅ X₂₆ L X₂₈ D (配列番号 1 6 8 6)

(相互に独立して、

X₂ は、A、I、L、T、および V から選択され；

X₃ は、E および Y から選択され；

X₄ は、A、E、I、K、Q、R、T、V、および Y から選択され；

10

X₅ は、I および V から選択され；

X₆ は、Q および Y から選択され；

X₇ は、F および M から選択され；

X₁₀ は、F および Y から選択され；

X₁₁ は、A、D、E、F、G、H、K、L、Q、R、S、T、V、および Y から選択され；

X₁₆ は、N および T から選択され；

X₁₈ は、K および R から選択され；

X₂₁ は、T および V から選択され；

X₂₅ は、I および R から選択され；

20

X₂₆ は、K および S から選択され、ならびに

X₂₈ は、F および L から選択される)、

および

i i) i) で定義した配列に対して少なくとも 93% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなる、I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

【請求項 2】

I L - 1 R - I 結合モチーフ BM を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドであって、前記モチーフが、

i) E X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ E I X₁₀ X₁₁ L P N L X₁₆ R X₁₈ Q Y X₂₁ A F I X₂₅ X₂₆ L X₂₈ D (配列番号 1 6 8 6)

30

(相互に独立して、

X₂ は、A、E、F、H、I、L、Q、S、T、および V から選択され；

X₃ は、A、D、E、F、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₄ は、A、D、E、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₅ は、A、I、および V から選択され；

X₆ は、H、Q、R、および Y から選択され；

X₇ は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、Q、S、V、W、および Y から選択され；

40

X₁₀ は、F および Y から選択され；

X₁₁ は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₁₆ は、N および T から選択され；

X₁₈ は、K および R から選択され；

X₂₁ は、T および V から選択され；

X₂₅ は、I および R から選択され；

X₂₆ は、K および S から選択され、ならびに

X₂₈ は、F および L から選択される)、

および

50

i i) X_5 が I または V であることを条件として、i) で定義した配列に対して少なくとも 96% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 3】

配列 i) が、以下の 10 の条件 I ~ X :

- I. X_3 は E であること ;
 - II. X_5 は、I および V から選択されること ;
 - III. X_6 は、Q および Y から選択されること ;
 - IV. X_7 は、F および M から選択されること ;
 - V. X_{10} は、F および Y から選択されること ;
 - VI. X_{18} は、K および R から選択されること ;
 - VII. X_{21} は T であること ;
 - VIII. X_{25} は R であること ;
 - IX. X_{26} は、K および S から選択されること ; ならびに
 - X. X_{28} は、F および L から選択されること
- のうちの少なくとも 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、または全てなど) を満たす、請求項 1 または 2 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 4】

配列 i) が、配列番号 1 ~ 1632 および 1679 からなる群 (配列番号 20 ~ 1632 および 1679 からなる群など) から選択される配列中の 8 位 ~ 36 位の配列に対応する、先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 5】

配列 i) が、配列番号 1206 ~ 1632 および 1679 からなる群 (配列番号 1210 ~ 1632 および 1679 からなる群など) から選択される配列中の 8 位 ~ 36 位の配列に対応する、請求項 4 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 6】

配列 i) が、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1679 からなる群 (配列番号 1252、1328、1435、および 1679 からなる群など) から選択される配列中の 8 位 ~ 36 位の配列に対応する、請求項 5 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 IL-1R-I 結合モチーフが、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成し、前記 IL-1R-I 結合モチーフが、前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内に、相互連結ループと共に 2 つのヘリックスの一部を本質的に形成することが好ましい、先行請求項のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 8】

前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインが、細菌受容体ドメイン、好ましくは *Staphylococcus aureus* 由来のプロテイン A のドメインまたはその誘導体から選択される、請求項 7 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 9】

xi) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK (配列番号 1721) ([BM] が、先行請求項のいずれか 1 項に定義の IL-1R-I 結合モチーフである) ; および
 xx) BM に隣接する配列中の、xi) に定義の配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列
 から選択されるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 10】

xxi) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAPK

(配列番号 1709) ([BM] が、請求項 1～8 のいずれか 1 項に定義の IL-1R-I 結合モチーフである) ; および

xxii) BM に隣接する配列中の、xxi) に定義の配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列

から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 11】

配列 xix) または xxi) が、配列番号 1～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群 (配列番号 20～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する、請求項 9 または 10 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

10

【請求項 12】

xix) または xxi) が、配列番号 1206～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群 (配列番号 1210～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する、請求項 11 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 13】

配列 xix) または xxi) が、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1670～1679 からなる群 (配列番号 1252、1328、1435、1672、1675～1676、および 1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する、請求項 12 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

20

【請求項 14】

IL-1R-I の IL-1 サイトカインとの相互作用 (IL-1R-I の IL-1 α および/または IL-1 β との相互作用など) を遮断することができる、先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 15】

前記相互作用の K_D 値が最大で 1×10^{-6} M (最大で 1×10^{-7} M など、最大で 1×10^{-8} M など、最大で 1×10^{-9} M など、最大で 9×10^{-10} など) であるように IL-1R-I に結合することができる、先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

30

【請求項 16】

前記 IL-1R-I が、ヒト IL-1R-I またはカニクイザル IL-1R-I (ヒト IL-1R-I など) である、請求項 14 または 15 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 17】

少なくとも 2 つの IL-1R-I 結合ポリペプチドモノマー単位を含み、そのアミノ酸配列が同一でも異なってもよい、多量体の形態の先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 18】

— 先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチドからなる第 1 の部分 ; および
— 所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第 2 の部分
を含む、融合タンパク質または抱合体。

40

【請求項 19】

前記所望の生物学的活性が治療活性である、請求項 18 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 20】

前記所望の生物学的活性が結合活性である、請求項 18 に記載の融合タンパク質または抱合体。

50

【請求項 21】

前記所望の生物学的活性が、前記融合タンパク質または抱合体の組織分布を改変する結合活性である、請求項 18 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 22】

前記所望の生物学的活性が、前記第 2 の部分が前記融合タンパク質または抱合体の *in vivo* 半減期を増大させるような *in vivo* 半減期増大活性である、請求項 18 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 23】

前記第 2 の部分が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインまたはその誘導体；血清アルブミン；抗体の Fc 部分、およびトランスフェリンからなる群から選択される、請求項 18 に記載の融合タンパク質または抱合体。

10

【請求項 24】

前記第 2 の部分が、抗体の Fc 部分（IgG1 Fc または IgG4 Fc など）である、請求項 23 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 25】

前記 Fc が、未変異形態の Fc と比較して Fc Rn に対する親和性の改善および／またはエフェクター応答の減少を示す変異 Fc である、請求項 24 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 26】

配列番号 1639～1658 および 1734～1737 からなる群（配列番号 1648～1654 および 1734～1737 からなる群など）から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 18～25 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質または抱合体。

20

【請求項 27】

請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

30

【請求項 30】

請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、または抱合体、および少なくとも 1 つの薬学的に許容され得る賦形剤または担体を含む組成物。

【請求項 31】

少なくとも 1 つのさらなる活性薬剤（免疫応答改変剤および抗癌剤から選択される薬剤など）をさらに含む、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記融合タンパク質が請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質である、請求項 30 または 31 に記載の組成物。

40

【請求項 33】

医薬、診断剤、および／または予後剤として使用するための、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体または請求項 30～32 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 34】

医薬として使用するための、請求項 33 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 35】

IL-1R-I 関連障害の治療、予後、または診断における請求項 33～34 のいずれか 1 項に記載の使用のための IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体

50

、または組成物。

【請求項 36】

前記 IL-1R-I 関連障害が、炎症性疾患、自己炎症性症候群、自己免疫疾患、感染症、心血管疾患、虚血性疾患、癌、および糖尿病からなる群から選択される、請求項 35 に記載の使用のための IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 37】

前記 IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に、疾患発症から 24 時間以内に反復して（疾患発症から 24 時間以内に少なくとも 2 回など、疾患発症から 24 時間以内に少なくとも 3 回など、疾患発症から 24 時間連続的になど）投与する、請求項 33～36 のいずれか 1 項に記載の使用のための IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 38】

前記融合タンパク質または抱合体が請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質または抱合体であり、前記組成物が請求項 32 に記載の組成物である、請求項 33～37 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 39】

前記融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被検体に週 1 回投与する、請求項 38 に記載の使用のための融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本開示は、インターロイキン-1 受容体タイプ I（以下、IL-1R-I と呼ぶ）に対して結合親和性を有する操作されたポリペプチドクラスに関する。本開示はまた、治療剤、予後剤、および／または診断剤としてのかかる IL-1R-I 結合ポリペプチドの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

IL-1 系は、炎症応答の開始および維持で中心的な役割を果たし、免疫系の先天免疫および適応免疫でも役割を果たすので、薬学的介入の魅力的な標的である（Dinarello, 2009, Annu Rev Immunol, 27:519-50; Sims and Smith, 2010, Nat Rev Immunol. 10(2):89-102）。IL-1 系は、多くの場合、炎症応答におけるイニシエーターおよび主要サイトカインの役割を果たすので、病理学的免疫応答の進行の多くの局面をかかるとして調整することができる。IL-1β の生物学的活性を、タイプ IL-1 受容体 IL-1R-I への IL-1β の結合を防止するか調整する抗体によって薬理的に阻害することができる。

【0003】

IL-1 系の生物学的活性を、IL-1R の拮抗によって調整することもできる。アナキンラ（Kineret（登録商標））と呼ばれる組換え形態の内因性 IL-1Ra は、例えば、US 6599873 号、EP 0343684 号、および EP 0541920 号に記載されている。アナキンラは、関節リウマチ、クリオピリン関連周期性症候群（CAPS; Kone-Paut and Galeotti, 2014, Expert Rev Clin Immunol, 10(1):7-18）、ならびに多数の他の炎症性および自己免疫性の容態（Dinarello et al, 2011, Blood, 117(14):3720-32; Dinarello et al, 2012, Nat Rev Drug Discov, 11(8):633-52）において臨床的有効性が示されている。

【0004】

IL-1受容体を、IL-1R-Iサブユニットに結合してリガンド媒介性のIL-1受容体の活性化およびシグナル伝達を防止する抗体によって拮抗することもできる。いくつかのかかる抗体は、WO2004/022718号に記載されており、これは15C4などのIL-1R-Iアンタゴニストを開示している。IL-1R-Iサブユニットに結合するIL-1受容体拮抗抗体の他の例は、WO2010/052505号に記載されており、これは、9GL抗体などのIL-1R-Iアンタゴニストを開示している。2D8と呼ばれるIL-1受容体拮抗抗体のさらに別の例は、WO2005/023872号に記載されている。

【0005】

炎症性疾患が予測不可能かつ慢性であり、また、医学的必要性が高いにもかかわらずその要求が満たされていないことから、新規の治療様式を開発することが必要である。組織浸透率は分子サイズに反比例するので、比較的大きな抗体分子は、本質的に、組織への分布能力および浸透能力が低い。

【0006】

したがって、抗体または他の大分子薬物を使用することが常に治療に最適というわけではなく、IL-1受容体に対して高い親和性を有する薬剤の提供が必要とされ続けている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の概要

本開示の目的は、例えば、治療、予後、および診断に適用するために使用することができる新規のIL-1R-I結合剤を提供することである。

【0008】

本開示の目的は、種々の形態の炎症疾患、自己炎症疾患、および自己免疫疾患を標的にする効率的な治療を可能にする分子を提供することである。

【0009】

本開示のさらなる目的は、予後および診断への適用に適切な分子を提供することである。

【0010】

本開示から当業者に自明のこれらおよび他の目的は、添付の特許請求の範囲に記載され、本明細書中に一般的に開示されている本発明の異なる態様によって満たされる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

したがって、本開示の第1の態様では、IL-1R-I結合モチーフBMを含むIL-1R-I結合ポリペプチドであって、そのモチーフが、

i) $EX_2X_3X_4X_5X_6X_7EI X_{10}X_{11}LPNLX_{16}RX_{18}QYX_{21}AFIX_{25}X_{26}LX_{28}D$ (配列番号1686)

(相互に独立して、

X_2 は、A、D、E、F、H、I、L、Q、S、T、およびVから選択され；

X_3 は、A、D、E、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X_4 は、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X_5 は、A、I、およびVから選択され；

X_6 は、F、H、I、Q、R、T、V、およびYから選択され；

X_7 は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、Q、S、T、V、W、およびYから選択され；

X_{10} は、FおよびYから選択され；

10

20

30

40

50

X_{11} は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X_{16} は、N および T から選択され；

X_{18} は、K、R、および S から選択され；

X_{21} は、Q、T、および V から選択され；

X_{25} は、I、M、R、V、および Y から選択され；

X_{26} は、K および S から選択され、ならびに

X_{28} は、F、I、L、および M から選択される）、および

i) X_5 が I または V であることを条件として、i) で定義した配列に対して少なくとも 96% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。

10

【0012】

関連する配列クラスである IL-1R-I 結合ポリペプチドの上記定義は、いくつかの異なる選択実験において IL-1R-I との相互作用について選択された、親足場のいくつかの無作為なポリペプチドバリエーションの統計解析に基づく。同定された IL-1R-I 結合モチーフ（すなわち、「BM」）は、親足場の標的結合領域に対応し、この領域は、3 ヘリカルバンドルタンパク質ドメイン内の 2 つの α ヘリックスを構成する。親足場では、2 つの BM ヘリックスのアミノ酸残基を変動させると、抗体の Fc 定常部との相互作用のための結合表面が得られる。本開示では、結合表面残基を無作為に変動させ、その後

20

【0013】

当業者に認識されるように、本開示のポリペプチドの IL-1R-I 結合能などの任意のポリペプチドの機能は、ポリペプチドの三次構造に依存する。したがって、ポリペプチドの機能に影響を及ぼすことなくポリペプチド中のアミノ酸配列にわずかな変更を加えることが可能である。したがって、本開示は、IL-1R-I 結合特性を保持している IL-1R-I 結合ポリペプチドの改変バリエーションを包含する。

【0014】

このようにして、i) に定義のポリペプチドに対して 96% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む IL-1R-I 結合ポリペプチドも本開示に包含される。したがって、i) に定義の配列の一定の配列バリエーションが、上記定義に包含されるが、但し、かかる配列バリエーション内で X_5 が I または V であることを条件とする。例えば、アミノ酸残基の一定の機能群（例えば、疎水性、親水性、極性など）に属するアミノ酸残基を同一の官能基に由来する別のアミノ酸残基と交換することができる。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、本明細書中に開示の IL-1R-I 結合ポリペプチド配列の任意の位置でかかる変更を行うことができる。他の実施形態では、足場アミノ酸残基とも呼ばれる不変の位置でのみかかる変更を行うことができる。このような場合、可変位置（すなわち、配列 i) 中の「X」を用いて示された位置）での変更は許されない。

40

【0016】

用語「% 同一性」は、本明細書を通して使用される場合、例えば、以下のように計算することができる。問い合わせ配列を、CLUSTAL W アルゴリズム (Thompson et al, 1994, Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680) を使用して標的配列とアラインメントする。アラインメントした配列のうちで最短のものに対応するウィンドウにわたって比較する。場合によっては、アラインメントした配列のうちの最短のものが標的配列であり得る。他の例では、問い合わせ配列は、アラインメントした配列の最短のものを構成し得る。各位置のアミノ酸残基を比較し、標的配列中の同一の対応配列を有する問い合わせ配列中の位置の百分率を % 同一性として報告する。

50

【0017】

本明細書中で使用する場合、「 X_n 」および「 X_m 」を、上記で定義の配列 i) 中の位置 n および m のアミノ酸を示すために使用し、ここで、 n および m は、上記配列の N 末端から数えた上記配列内のアミノ酸の位置を示す整数である。例えば、 X_3 および X_7 は、配列 i) の N 末端からそれぞれ 3 位および 7 位のアミノ酸を示す。

【0018】

第 1 の態様の実施形態では、配列 i) 中の X_n が、表 1 の可能な残基の群から独立して選択されるポリペプチドを提供する。当業者は、列挙した可能な残基の群のいずれか 1 つから X_n を選択することができ、この選択が X_m 中のアミノ酸の選択から独立しており、 $n \neq m$ であることを認識するであろう。したがって、表 1 中の位置 X_n の列挙した可能な残基のいずれかを、表 1 中の任意の他の可変位置中の列挙した可能な残基の群のいずれかと独立して組み合わせることができる。

10

【0019】

当業者は、表 1 を以下のように読み取るべきであることを認識するであろう：第 1 の態様の 1 つの実施形態では、配列 i) 中のアミノ酸残基「 X_n 」が「可能な残基」から選択されるポリペプチドを提供する。したがって、表 1 は、本開示の第 1 の態様のいくつかの具体的および個別化された実施形態を開示する。例えば、第 1 の態様の 1 つの実施形態では、配列 i) 中の X_4 が A、D、E、I、K、Q、S、および V から選択されるポリペプチドを提供し、第 1 の態様の別の実施形態では、配列 i) 中の X_4 が A、E、I、K、Q、および V から選択されるポリペプチドを提供する。誤解を避けるために、列挙した実施形態を、さらに別の実施形態において自由に組み合わせることができる。例えば、1 つのかかる組み合わせた実施形態は、 X_4 が A、E、I、K、Q、および V から選択され、一方で、 X_6 が、H、Q、T、および Y から選択され、 X_{11} が H、R、および Y から選択されるポリペプチドである。

20

【0020】

【表 1】

表 1 : 本開示の第 1 の態様の実施形態

残 基	可 能 な 残 基
X_n	
X_2	A, E, F, H, I, L, Q, S, T, V
X_2	A, F, H, I, L, Q, S, T, V
X_2	A, H, I, L, Q, S, T, V
X_2	A, H, I, L, Q, T, V
X_2	A, H, I, L, T, V
X_2	A, F, I, L, T, V
X_2	A, I, L, T, V
X_2	A, I, T, V
X_2	A, I, L, T
X_2	A, L, T, V
X_2	A, I, L, V
X_2	I, L, T, V
X_2	A, I, T
X_2	A, I, V
X_2	A, T, V
X_2	I, T, V
X_2	I, L, T
X_2	I, L, V
X_2	L, T, V
X_2	I, V
X_2	I, L
X_2	I, T
X_2	I, V
X_2	L, T
X_2	L, V
X_2	T, V
X_2	A, I
X_2	A, T
X_2	A, V
X_2	L

10

20

30

40

X ₂	T
X ₂	V
X ₂	I
X ₂	A
X ₃	A, D, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₃	A, D, E, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₃	A, D, E, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₃	A, D, E, F, H, I, K, Q, R, S, T, V, Y
X ₃	A, D, E, F, H, I, K, Q, R, V, Y
X ₃	D, E, H, I, K, L, Q, T, V, Y
X ₃	D, E, H, I, K, Q, T, V, Y
X ₃	D, E, H, I, K, Q, R, S, V, Y
X ₃	D, E, H, I, K, Q, S, V, Y
X ₃	D, E, H, I, K, Q, R, V, Y
X ₃	D, E, I, K, Q, R, V, Y
X ₃	D, E, H, I, K, Q, V, Y
X ₃	D, E, H, I, Q, V, Y
X ₃	D, E, I, Q, R, V, Y
X ₃	D, E, I, Q, V, Y
X ₃	D, E, H, Q, Y
X ₃	D, E, Q, V, Y
X ₃	D, E, V, Y
X ₃	D, E, R, V
X ₃	D, E, K, V

10

20

30

40

X ₃	E, I, V, Y
X ₃	E, V, Y
X ₃	D, E, V
X ₃	D, E, Y
X ₃	E, V
X ₃	D, E
X ₃	E, Y
X ₃	E, I
X ₃	E, K
X ₃	E
X ₄	A, D, E, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₄	A, D, E, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₄	A, D, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₄	A, D, E, F, H, I, K, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₄	A, D, E, F, H, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₄	A, D, E, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₄	A, D, E, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₄	A, D, E, I, K, Q, R, S, T, V
X ₄	A, D, E, I, K, Q, T, V
X ₄	A, D, E, H, I, K, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₄	A, D, E, H, I, K, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₄	A, D, E, I, K, Q, R, S, T, V
X ₄	A, E, I, K, Q, R, T,

10

20

30

40

	V, Y
X ₄	A, D, E, H, I, K, Q, R, S, T, V
X ₄	A, D, E, H, I, K, R, S, V
X ₄	A, D, E, H, K Q V, W
X ₄	A, D, E, H, I, R, S, T, V
X ₄	A, D, E, I, K, Q, S, V
X ₄	A, D, E, I, Q, R, V
X ₄	A, D, E, K, Q, S, T, V
X ₄	A, D, E, I, Q, V
X ₄	A, D, E, K, Q, V
X ₄	A, E, I, K, Q, V
X ₄	A, E, H, K, Q, V
X ₄	A, D, E, I, V
X ₄	A, D, E, I, R
X ₄	D, E R, T, V
X ₄	A, D, E, K, Q
X ₄	A, D, E, Q, V
X ₄	A, D, E, K, V
X ₄	A, E, Q, V
X ₄	A, E, I, R
X ₄	A, D, E, I
X ₄	A, D, E, Q
X ₄	A, D, E, V
X ₄	A, D, E, K
X ₄	A, E, K, V
X ₄	A, D, E
X ₄	A, E, V
X ₄	A, D
X ₄	A, E
X ₄	D, E
X ₄	E, V
X ₄	E

10

20

30

40

X ₄	D
X ₄	A
X ₄	V
X ₅	A, V
X ₅	I, V
X ₅	A, I
X ₅	A
X ₅	I
X ₅	V
X ₆	F, H, Q, R, V, Y
X ₆	H, Q, T, Y
X ₆	F, H, Q, Y
X ₆	A, H, Q, W, Y
X ₆	H, Q, Y
X ₆	Q, Y
X ₆	Y
X ₆	Q
X ₇	A, D, E, F, H, I, L, M, Q, S, V, W, Y
X ₇	A, D, E, F, H, L, M, Q, R, W, Y
X ₇	A, D, E, F, H, I, L, M, Q, W, Y
X ₇	D, E, F, H, L, M, Q, W, Y
X ₇	D, F, H, L, M, Q, W, Y
X ₇	F, H, I, L, M, Q, V, W, Y
X ₇	F, H, I, L, M, Q, V, Y
X ₇	D, F, H, L, M, Q, W, Y
X ₇	F, H, I, L, M, Q, Y
X ₇	F, L, M, Q, W, Y
X ₇	F, M, Q, W, Y
X ₇	F, L, M, W, Y
X ₇	F, I, L, M, Y

10

20

30

40

X ₇	F, H, M, W, Y
X ₇	F, L, M, Y
X ₇	F, M, W, Y
X ₇	F, L, M, W
X ₇	D, F, H, M
X ₇	D, F, M
X ₇	F, M, Y
X ₇	M, W, Y
X ₇	F, M, W
X ₇	F, L, M
X ₇	L, M, Y
X ₇	F, L, Y
X ₇	F, M
X ₇	L, M
X ₇	M, Y
X ₇	F, L
X ₇	L, Y
X ₇	F, Y
X ₇	F, W
X ₇	M, W
X ₇	L
X ₇	Y
X ₇	F
X ₇	M
X ₇	W
X ₁₀	F
X ₁₀	Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, I, K, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S, T, V,

10

20

30

40

	Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, Q, R, S, T, V, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, Q, R, S, T Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, L, N, Q, R, S, T, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, N, Q, R, S, T, V, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, N, Q, R, S, V, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, Q, R, S, V, W, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, Q, R, S, V, Y
X ₁₁	A, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, I, L, M, Q, S, T, V, W, Y
X ₁₁	A, D, E, G, K, N, Q, R, S, T, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, D, E, G, H, Q, S, Y
X ₁₁	A, D, E, F, G, H, K, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, D, G, H, K, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, E, G, H, K, N, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, E, G, H, K, N, R,

10

20

30

40

	S, Y
X ₁₁	A, E, G, H, K, N, S, Y
X ₁₁	A, E, G, H, N, R, S, Y
X ₁₁	A, D, G, H, K, Q, R, S
X ₁₁	A, D, G, H, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, E, G, H, R, S, Y
X ₁₁	A, D, G, H, Q, R, S
X ₁₁	A, G, H, Q, R, S, Y
X ₁₁	A, G, H, Q, R, S
X ₁₁	A, E, G, H, S, Y
X ₁₁	A, E, G, N, S, Y
X ₁₁	A, H, R, S, Y
X ₁₁	A, D, G, H, S, Y
X ₁₁	A, D, G, H, R, Y
X ₁₁	A, E, N, R, Y
X ₁₁	A, E, G, H, Y
X ₁₁	A, G, H, S, Y
X ₁₁	A, E, G, S, Y
X ₁₁	A, E, G, H, S
X ₁₁	A, E, H, R, Y
X ₁₁	A, G, H, R, Y
X ₁₁	A, H, R, S, Y
X ₁₁	A, E, G, N, S
X ₁₁	A, H, N, R, Y
X ₁₁	A, D, G, H
X ₁₁	A, G, S, Y
X ₁₁	A, G, H, Y
X ₁₁	A, G, H, S
X ₁₁	A, E, G, Y
X ₁₁	A, E, G, S
X ₁₁	A, E, G, H
X ₁₁	A, H, R, Y
X ₁₁	G, H, R, Y
X ₁₁	A, G, R, Y

10

20

30

40

X ₁₁	A, G, H, Y
X ₁₁	A, G, H, R
X ₁₁	A, E, G, N
X ₁₁	A, E, G, S
X ₁₁	A, E, G
X ₁₁	A, G, H
X ₁₁	A, G, S
X ₁₁	A, G, Y
X ₁₁	A, H, R
X ₁₁	A, R, Y
X ₁₁	A, H, Y
X ₁₁	H, R, Y
X ₁₁	A, G
X ₁₁	A, H
X ₁₁	A, R
X ₁₁	A, Y
X ₁₁	H, R
X ₁₁	H, Y
X ₁₁	R, Y
X ₁₁	A, E
X ₁₁	A,
X ₁₁	G
X ₁₁	R
X ₁₁	Y
X ₁₁	H
X ₁₁	E
X ₁₆	N
X ₁₆	T
X ₁₈	K, R
X ₁₈	R
X ₁₈	K
X ₂₁	T, V
X ₂₁	T
X ₂₁	V
X ₂₅	I, M, R
X ₂₅	I, R
X ₂₅	R
X ₂₅	I

10

20

30

40

X ₂₆	K
X ₂₆	S
X ₂₈	F, I, L
X ₂₈	F, L
X ₂₈	F
X ₂₈	L

【0021】

10

本開示の1つの実施形態では、i)において、

X₂は、A、E、F、H、I、L、Q、S、T、およびVから選択され；

X₃は、A、D、E、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₄は、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₅は、A、I、およびVから選択され；

X₆は、F、H、Q、R、V、およびYから選択され；

X₇は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、Q、S、T、V、W、およびYから選択され；

20

X₁₀は、FおよびYから選択され；

X₁₁は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、Q、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₁₆は、NおよびTから選択され；

X₁₈は、KおよびRから選択され；

X₂₁は、TおよびVから選択され；

X₂₅は、IおよびRから選択され；

X₂₆は、KおよびSから選択され、ならびに

X₂₈は、FおよびLから選択される、

IL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。

30

【0022】

本開示の1つの実施形態では、i)において、

X₂は、A、E、F、H、I、L、Q、S、T、およびVから選択され；

X₃は、A、D、E、F、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₄は、A、D、E、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₅は、A、I、およびVから選択され；

X₆は、H、Q、R、およびYから選択され；

X₇は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、Q、S、V、W、およびYから選択され；

40

X₁₀は、FおよびYから選択され；

X₁₁は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₁₆は、NおよびTから選択され；

X₁₈は、KおよびRから選択され；

X₂₁は、TおよびVから選択され；

X₂₅は、IおよびRから選択され；

X₂₆は、KおよびSから選択され、ならびに

X₂₈は、FおよびLから選択される、

50

I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0023】

本開示の1つの実施形態では、i)において、

X₂ は、A、I、L、T、およびVから選択され；

X₃ は、E、I、V、およびYから選択され；

X₄ は、A、D、E、F、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₅ は、A、I、およびVから選択され；

X₆ は、QおよびYから選択され；

X₇ は、F、H、I、L、M、Q、V、W、およびYから選択され；

10

X₁₀ は、FおよびYから選択され；

X₁₁ は、A、D、E、F、G、H、K、L、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₁₆ は、NおよびTから選択され；

X₁₈ は、KおよびRから選択され；

X₂₁ は、TおよびVから選択され；

X₂₅ は、IおよびRから選択され；

X₂₆ は、KおよびSから選択され、ならびに

X₂₈ は、FおよびLから選択される、

I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

20

【0024】

本開示の別の実施形態では、上記 I L - 1 R - I 結合モチーフが、i)において、

X₂ は、A、I、L、T、およびVから選択され；

X₃ は、EおよびYから選択され；

X₄ は、A、E、I、K、Q、R、T、V、およびYから選択され；

X₅ は、IおよびVから選択され；

X₆ は、QおよびYから選択され；

X₇ は、FおよびMから選択され；

X₁₀ は、FおよびYから選択され；

X₁₁ は、A、D、E、F、G、H、K、L、Q、R、S、T、V、およびYから選択され；

30

X₁₆ は、NおよびTから選択され；

X₁₈ は、KおよびRから選択され；

X₂₁ は、TおよびVから選択され；

X₂₅ は、IおよびRから選択され；

X₂₆ は、KおよびSから選択され、ならびに

X₂₈ は、FおよびLから選択される、配列から選択されるアミノ酸配列

および上記定義の配列に対して少なくとも93%同一性を有するアミノ酸配列からなる I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0025】

本開示の別の実施形態では、i)において、

X₂ は、A、I、L、T、およびVから選択され；

X₃ は、EおよびYから選択され；

X₄ は、A、D、E、F、H、K、L、Q、R、S、T、V、W、およびYから選択され；

X₅ は、A、I、およびVから選択され；

X₆ は、QおよびYから選択され；

X₇ は、F、H、I、L、M、Q、V、W、およびY (F、H、I、L、Q、V、W、およびYなど) から選択され；

X₁₀ は、FおよびYから選択され；

50

X_{11} は、A、D、E、F、G、H、K、Q、R、S、V、W、および Y から選択され；
 X_{16} は、N および T から選択され；
 X_{18} は、K および R から選択され；
 X_{21} は T であり；
 X_{25} は、I および R から選択され；
 X_{26} は、K および S から選択され、ならびに
 X_{28} は、F および L から選択される、IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。

【0026】

IL-1R-I 結合ポリペプチドのサブクラスを定義する 1 つのより特定の実施形態では、配列 i) は、以下の 10 の条件 I ~ X：

- I. X_3 は E であること；
 - II. X_5 は、I および V から選択されること；
 - III. X_6 は、Q および Y から選択されること；
 - IV. X_7 は、F および M から選択されること；
 - V. X_{10} は、F および Y から選択されること；
 - VI. X_{18} は、K および R から選択されること；
 - VII. X_{21} は T であること；
 - VIII. X_{25} は R であること；
 - IX. X_{26} は、K および S から選択されること；ならびに
 - X. X_{28} は、F および L から選択されること
- のうちの少なくとも 5 つを満たす。

【0027】

第 1 の態様の IL-1R-I 結合ポリペプチドのいくつかの例では、配列 i) 10 の条件 I ~ X のうちの少なくとも 6 つを満たす。より具体的には、配列 i) は、10 の条件 I ~ X のうちの少なくとも 7 つ（10 の条件 I ~ X のうちの少なくとも 8 つなど、10 の条件 I ~ X のうちの少なくとも 9 つなど、10 の条件 I ~ X のうちの全てなど）を満たし得る。

【0028】

第 1 の態様の IL-1R-I 結合ポリペプチドのいくつかの実施形態では、 $X_2 X_3 X_6$ が VEQ または VEY である IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、 $X_2 X_3 X_6$ が IEQ または VEQ である IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、 $X_6 X_{10}$ は、QF、QY、YF、および YY からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X_6 X_{10}$ は QF である。いくつかの実施形態では、 $X_{10} X_{18}$ は、FK、FR、YK、および YR からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 $X_{10} X_{18}$ は FK または FR である。いくつかの実施形態では、 $X_{18} X_{25} X_{28}$ は KRL または RRL である。いくつかの実施形態では、 $X_5 X_7$ は、AM、IM、または VM である。いくつかの実施形態では、 $X_5 X_7$ は IM または VM である。

【0029】

1 つの実施形態では、 X_5 は、I および V から選択される。別記の実施例 4 で証明されているように、BM の位置 X_5 の意図しない変更により、IL-1R-I 結合ポリペプチド（Z18557、配列番号 1205）が IL-1R-I に対して高い親和性を示すことが見出された（表 11 を参照のこと）。この位置でのアラニンのバリンまたはイソロイシンの交換により、IL-1R-I に対して高親和性を有する IL-1R-I 結合ポリペプチドが生成される。

【0030】

以下の実験の項で詳述するように、IL-1R-I 結合ポリペプチドバリエーションの選択により、いくつかの個別の IL-1R-I 結合モチーフ（BM）配列が同定された。これらの配列は、この態様の配列 i) の個別の実施形態を構成する。個別の IL-1R-I 結合モチーフの配列は、図 1 に示した配列番号 1 ~ 1632 および 1679 として列挙した

10

20

30

40

50

アミノ酸配列のアミノ酸の位置 8～36 に対応する。したがって、この態様の I L－1 R－I 結合ポリペプチドの 1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1～1632 および 1679 からなる群（配列番号 20～1632 および 1679 からなる群など）から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1206～1632 および 1679 からなる群（配列番号 1210～1632 および 1679 からなる群など）から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。

【0031】

1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1205 および 1250～1632 からなる群から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。

【0032】

1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1206～1252 および 1679 からなる群から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。

【0033】

別の実施形態では、配列 i) は、配列番号 1253～1632 からなる群から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。別の実施形態では、配列 i) は、配列番号 1253～1441 からなる群または配列番号 1442～1632 からなる群から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。

【0034】

1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 158、227、268、294、325、1176、1205、1251、1252、1270、1284、1285、1298、1307、1308、1311、1324、1328、1330、1331、1334、1339、1340、1343、1353、1361、1362、1364、1367、1368、1375、1393、1415、1420、1421、1422、1423、1435、1471、1472、1571、1594、および 1662 からなる群（配列番号 268、1205、1252、1270、1284、1285、1298、1307、1308、1324、1328、1330、1331、1334、1339、1340、1343、1361、1364、1367、1368、1375、1393、1415、1420、1421、1422、1423、および 571 からなる群など、配列番号 1252、1285、1298、1308、1324、1328、1330、1331、1340、1361、1393、1415、1420、および 1421 からなる群など）から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に相当する。

【0035】

1 つの特定の実施形態では、配列 i) は、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1679 から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1252、1328、1435、および 1679 からなる群（配列番号 1252、1328、および 1679 からなる群；配列番号 1252、1435、1679 からなる群；配列番号 1252 および 1679 からなる群；または配列番号 1328 および 1435 からなる群など）から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。1 つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1252、1328、および 1435 からなる群から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する。

【0036】

したがって、図 1 は、その I L－1 R－I 結合能が（少なくとも親和性ベースのアッセイでの単離によって）実験的に立証されているポリペプチドバリエーションを例証している。このバリエーションにより、配列 i) と 93% 同一性、または、適用できる場合、96% 同一性を示す I L－1 R－I 結合モチーフ（BM）の個別の実施形態を構成するいくつかの個別の BM 配列が同定される。

【0037】

本開示のいくつかの実施形態では、上記定義の BM は、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン「の一部を形成する」。これは、元の 3 ヘリックスバンドルドメイン内の類似

10

20

30

40

50

の構造モチーフがBMに置換されるように、BMの配列が元の3ヘリックスバンドルドメインの配列内に「挿入される」か、配列上にグラフトされることを意味すると理解される。例えば、理論に拘束されることを望まないが、BMは、3ヘリックスバンドルの3つのヘリックスのうちの2つを構成すると考えられ、したがって、任意の3ヘリックスバンドル内のかかる2ヘリックスモチーフを置換することができる。当業者が理解するように、ポリペプチドの基本構造に影響を及ぼさないように、3ヘリックスバンドルドメインのうちの2つのヘリックスが2つのBMヘリックスに置換されなければならない。すなわち、本発明のこの実施形態のポリペプチドのC α 骨格の折りたたみ全体は、BMが一部を形成する3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの折りたたみと実質的に同一である（例えば、二次構造の同一のエレメントを同一の順序などで有する）。したがって、この実施形態のポリペプチドが元のドメインと同一の折りたたみを有する場合に、本開示のBMは3ヘリックスバンドルドメインの「一部を形成し」、これは、基本構造の性質を共有することを意味し、この性質により、例えば、類似のCDスペクトルが得られる。当業者は、関連する他のパラメーターを認識している。

10

【0038】

特定の実施形態では、したがって、IL-1R-I結合モチーフ（BM）は、3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する。例えば、BMは、本質的に、上記3ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内に、相互連結ループと共に2つの α ヘリックスを構成し得る。特定の実施形態では、上記3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、細菌受容体タンパク質のドメインから選択される。かかるドメインの非限定的な例は、黄色ブドウ球菌由来のプロテインAの5つの異なる3ヘリカルドメイン（ドメインBなど）およびその誘導体である。いくつかの実施形態では、3ヘリカルバンドルタンパク質ドメインは、ブドウ球菌プロテインAのドメインBから誘導されるプロテインZのバリエーションである。

20

【0039】

本明細書中に開示のIL-1R-I結合ポリペプチドが3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成するいくつかの実施形態では、IL-1R-I結合ポリペプチドは結合モジュール（BM_{od}）を含むことができ、そのアミノ酸配列は、
 i i i) K-[BM]-D P S Q S X_a X_b L L X_c E A K K L X_d X_e X_f Q；（配列番号1687）

30

（[BM]は、本明細書中で定義のIL-1R-I結合モチーフであり；
 X_aは、AおよびSから選択され；
 X_bは、NおよびEから選択され；
 X_cは、A、S、およびCから選択され；
 X_dは、E、N、およびSから選択され；
 X_eは、D、E、およびSから選択され；
 X_fは、AおよびSから選択される）；

および

40

i v) i i i) で定義した配列に対して少なくとも91%同一性を有するアミノ酸配列から選択される。

【0040】

いくつかの実施形態では、上記ポリペプチドは、産生および保存中ならびにin vivoにおいて高い構造安定性（化学修飾、物理的条件の変化、およびタンパク質分解活性に対する耐性など）を有利に示し得る。

【0041】

上記で考察するように、上記アミノ酸配列と比較して変化が小さく、この変化がポリペプチドの三次構造および機能に大きな影響を及ぼさないポリペプチドも、本開示の範囲内に含まれる。したがって、いくつかの実施形態では、配列i v)は、i i i)によって定

50

義された配列に対して少なくとも93%（少なくとも95%同一性など、少なくとも97%同一性など）を有する。特定の実施形態では、上記で例示したかかる小さな変化は、隣接配列（すなわち、上記の i i i）中のBMに隣接する配列の一部）中のみに存在し得る。他の実施形態では、小さな変化は、BM中および／または隣接配列中に存在し得る。

【0042】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_a はAである。

【0043】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_a はSである。

【0044】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_b はNである。

10

【0045】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_b はEである。

【0046】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_c はAである。

【0047】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_c はSである。

【0048】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_c はCである。

【0049】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_d はEである。

20

【0050】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_d はNである。

【0051】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_d はSである。

【0052】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_e はDである。

【0053】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_e はEである。

【0054】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_e はSである。

30

【0055】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の $X_d X_e$ は、EE、ES、SE、およびSSから選択される。

【0056】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の $X_d X_e$ はESである。

【0057】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の $X_d X_e$ はSEである。

【0058】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_f はAである。

【0059】

1つの実施形態では、配列 i i i）中の X_f はSである。

40

【0060】

1つの実施形態では、i i i）中で、 X_a はAであり； X_b はNであり； X_c はAであり、 X_f はAである。

【0061】

1つの実施形態では、i i i）中で、 X_a はAであり； X_b はNであり； X_c はCであり、 X_f はAである。

【0062】

1つの実施形態では、i i i）中で、 X_a はSであり； X_b はEであり； X_c はSであり、 X_f はSである。

50

【0063】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはCであり；X_fはSである。

【0064】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはAであり；X_bはNであり；X_cはAであり；X_dX_eはNDであり、X_fはAである。

【0065】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはAであり；X_bはNであり；X_cはCであり；X_dX_eはNDであり、X_fはAである。

【0066】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはSであり；X_dX_eはNDであり、X_fはSである。

【0067】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはCであり；X_dX_eはNDであり、X_fはSである。

【0068】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはAであり；X_bはNであり；X_cはAであり；X_dX_eはSEであり、X_fはAである。

【0069】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはAであり；X_bはNであり；X_cはCであり；X_dX_eはSEであり、X_fはAである。

【0070】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはSであり；X_dX_eはSEであり、X_fはSである。

【0071】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはCであり；X_dX_eはSEであり、X_fはSである。

【0072】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはAであり；X_bはNであり；X_cはAであり；X_dX_eはESであり、X_fはAである。

【0073】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはAであり；X_bはNであり；X_cはCであり；X_dX_eはESであり、X_fはAである。

【0074】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはSであり；X_dX_eはESであり、X_fはSである。

【0075】

1つの実施形態では、i i i) 中で、X_aはSであり；X_bはEであり；X_cはCであり；X_dX_eはESであり、X_fはSである。

【0076】

1つの実施形態では、配列i i i) またはi v) は、配列番号1～1638および1667～1670からなる群から選択される配列中の7位～55位の配列に対応する。

【0077】

なおさらなる実施形態では、配列i i i) は、配列番号1～1638、1667～1668、および1670～1679からなる群（配列番号20～1638および1670～1679からなる群など）から選択される配列中の7位～55位の配列に対応する。1つの実施形態では、配列i i i) は、配列番号1206～1638および1670～1679からなる群（配列番号1206～1632および1670～1679からなる群など、配列番号1210～1638および1670～1679からなる群など、配列番号1210～1632および1670～1679からなる群など）から選択される配列中の7位～

10

20

30

40

50

55位の配列に対応する。

【0078】

1つの実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1205、1250～1632、および 1670～1679 からなる群から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。

【0079】

1つの実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1206～1252、1672、および 1679 からなる群から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。

【0080】

別の実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1253～1632、1670～1671、および 1673～1678 からなる群から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。別の実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1253～1441、1670～1671、および 1674～1678 からなる群または配列番号 1442～1632、および 1673 からなる群から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。

【0081】

1つの実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 158、227、268、294、325、1176、1205、1251、1252、1270、1284、1285、1298、1307、1308、1311、1324、1328、1330、1331、1334、1339、1340、1343、1353、1361、1362、1364、1367、1368、1375、1393、1415、1420、1421、1422、1423、1435、1471、1472、1571、1594、1662、および 1670～1679 からなる群（配列番号 268、1205、1252、1270、1284、1285、1298、1307、1308、1324、1328、1330、1331、1334、1339、1340、1343、1361、1364、1367、1368、1375、1393、1415、1420、1421、1422、1423、1571、1670～1672、1674、および 1676～1679 からなる群など、配列番号 1252、1285、1298、1308、1324、1328、1330、1331、1340、1361、1393、1415、1420、1421、1670～1672、1674、1676～1677、および 1679 からなる群など）から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。

【0082】

1つの特定の実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1670～1679 から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。1つの実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1252、1328、1435、1672、1675～1676、および 1679 からなる群（配列番号 1252、1328、および 1679 からなる群；配列番号 1252、1435、および 1679 からなる群；または配列番号 1328 および 1435 からなる群など）から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。1つの実施形態では、配列 i) は、配列番号 1252、1328、および 1435 からなる群から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。

【0083】

1つの実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1672、1675～1676、および 1679 からなる群（配列番号 1672 および 1675～1676 からなる群など）から選択される配列中の 7 位～55位の配列に対応する。

【0084】

また、さらなる実施形態では、

v) YA-[BMod]-AP；（配列番号 1688）

（[BMod] は本明細書中に定義の IL-1R-I 結合モジュールである）；および v i) v) で定義した配列に対して少なくとも 90% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。

【0085】

あるいは、

v i i) F N - [B M o d] - A P ; (配列番号 1 6 8 9)

([B M o d] は本明細書中に定義の I L - 1 R - I 結合モジュールである) ; および v i i i) v i i) で定義した配列に対して少なくとも 9 0 % 同一性を有するアミノ酸配列

から選択されるアミノ酸配列を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0086】

1 つの実施形態では、

i x) F N K - [B M] - D P S Q S A N L L X_c E A K K L N D A Q A P ; (10
配列番号 1 6 9 0)

([B M] は上記定義の I L - 1 R - I 結合モチーフであり、X_c は、A および C から選択される) ; および

x) i x) で定義した配列に対して少なくとも 9 0 % 同一性を有するアミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0087】

別の実施形態では、

x i) F A K - [B M] - D P S Q S S E L L X_c E A K K L S E S Q A P ; (20
配列番号 1 6 9 1)

([B M] は上記定義の I L - 1 R - I 結合モチーフであり、X_c は、A、S、および C から選択される) ; および

x i i) x i) で定義した配列に対して少なくとも 9 0 % 同一性を有するアミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0088】

別の実施形態では、

x i i i) F A K - [B M] - D P S Q S S E L L X_c E A K K L N D S Q A P ; (30
配列番号 1 6 9 2)

([B M] は上記定義の I L - 1 R - I 結合モチーフであり、X_c は、A、S、および C から選択される) ;

x i v) x i i i) で定義した配列に対して少なくとも 9 0 % 同一性を有するアミノ酸配列 30

からなる群から選択されるアミノ酸を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0089】

さらに別の実施形態では、

x v) Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L X_c E A K K L X_d X_e S Q A P ; (40
配列番号 1 6 9 3)

([B M] は上記定義の I L - 1 R - I 結合モチーフであり、X_c は、A、S、および C から選択され、X_d は、E、N、および S から選択され、ならびに X_e は、D、E、および S から選択される) ; および

x v i) x v) で定義した配列に対して少なくとも 9 0 % 同一性を有するアミノ酸配列 40

からなる群から選択されるアミノ酸を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0090】

さらに別の実施形態では、

x v i i) K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L X_c E A K K L X_d X_e S Q A P ; (50
配列番号 1 6 9 4)

([B M] は上記定義の I L - 1 R - I 結合モチーフであり、X_c は、A、S、および C から選択され、X_d は、E、N、および S から選択され、ならびに X_e は、D、E、および S から選択される) ; および

x v i i i) x v i i) で定義した配列に対して少なくとも 9 0 % 同一性を有するアミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸を含む I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを提供する。

【0091】

上記で考察するように、上記アミノ酸配列と比較して変化が小さく、この変化がポリペプチドの三次構造および機能に大きな影響を及ぼさないポリペプチドも、本開示の範囲内に含まれる。したがって、いくつかの実施形態では、配列 v i)、v i i i)、x)、x i i)、x i v)、x v i)、または x v i i i) は、例えば、それぞれ、v)、v i i)、i x)、x i)、x i i i)、x v)、および x v i i i) によって定義された配列に対して少なくとも 90 % (少なくとも 92 % など、少なくとも 94 % など、少なくとも 96 % など、少なくとも 98 % など) 同一であり得る。特定の実施形態では、上記で例示したかかる小さな変化は、隣接配列 (すなわち、v)、v i i)、i x)、x i)、x i i i)、x v)、および x v i i i) 中の BM に隣接する配列の一部) のみに存在し得る。他の実施形態では、小さな変化は、BM 中および／または隣接配列中のみに存在し得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、I L - 1 R - I 結合モチーフは、以下から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの一部を形成し得る：

A D N N F N K - [B M] - D P S Q S A N L L S E A K K L N E S Q A P K 配列番号 1 6 9 5 ;

A D N K F N K - [B M] - D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K 配列番号 1 6 9 6 ;

A D N K F N K - [B M] - D P S V S K E I L A E A K K L N D A Q A P K 配列番号 1 6 9 7 ; 20

A D A Q Q N N F N K - [B M] - D P S Q S T N V L G E A K K L N E S Q A P K 配列番号 1 6 9 8 ;

A Q H D E - [B M] - D P S Q S A N V L G E A Q K L N D S Q A P K 配列番号 1 6 9 9 ;

V D N K F N K - [B M] - D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K 配列番号 1 7 0 0 ;

A E A K Y A K - [B M] - D P S E S S E L L S E A K K L N K S Q A P K 配列番号 1 7 0 1 ;

V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L N D A Q A P K 配列番号 1 7 0 2 ; 30

V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L N D S Q A P K 配列番号 1 7 0 3 ;

A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K 配列番号 1 7 0 4 ;

A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P 配列番号 1 7 0 5 ;

A E A K F A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K 配列番号 1 7 0 6 ;

A E A K F A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P 配列番号 1 7 0 7 ; 40

A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L N D A Q A P K 配列番号 1 7 0 8 ;

A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P K 配列番号 1 7 0 9 ;

A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P 配列番号 1 7 1 0 ;

A E A K F A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P K 配列番号 1 7 1 1 ;

A E A K F A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P 配列番号 50

1 7 1 2 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L S E A Q A P K	配列番	
号 1 7 1 3 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L E S S Q A P K	配列番	
号 1 7 1 4 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L E S S Q A P	配列番号	
1 7 1 5 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L E S A Q A P K	配列番	
号 1 7 1 6 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S D S Q A P K	配列番	10
号 1 7 1 7 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S D S Q A P	配列番号	
1 7 1 8 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L S D S Q A P K	配列番	
号 1 7 1 9 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L S D A Q A P K	配列番	
号 1 7 2 0 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K	配列番	
号 1 7 2 1 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L N D A Q A P K	配列番	20
号 1 7 2 2 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P K	配列番	
号 1 7 2 3 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L S E A Q A P K	配列番	
号 1 7 2 4 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L E S S Q A P K	配列番	
号 1 7 2 5 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L E S A Q A P K	配列番	
号 1 7 2 6 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S D S Q A P K	配列番	30
号 1 7 2 7 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L S D S Q A P K	配列番	
号 1 7 2 8 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L S D A Q A P K	配列番	
号 1 7 2 9 ;		
V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L N K A Q A P K	配列番	
号 1 7 3 0 ;		
A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L A E A K K L N K A Q A P K	配列番	
号 1 7 3 1、		
および		40
A D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K	配列番	
号 1 7 3 2		

([B M] は上記定義の I L - 1 R - I 結合モチーフである) 。

【 0 0 9 3 】

1 つの実施形態では、上記 I L - 1 R - I 結合ポリペプチドは、上記定義の配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 4 】

1 つの実施形態では、I L - 1 R - I 結合ポリペプチドは、以下から選択されるアミノ酸配列を含む：

x i x) V D A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K (50

配列番号 1721)

(式中、[BM] は、本明細書中で定義の IL-1R-I 結合モチーフである) ; および x x) x i x) 中に定義した配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列。

【0095】

1つの実施形態では、IL-1R-I 結合ポリペプチドは、以下から選択されるアミノ酸配列を含む：

x x i) A E A K Y A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P K (配列番号 1709)

(式中、[BM] は、本明細書中で定義の IL-1R-I 結合モチーフである) ; および x x i i) x x i) 中に定義した配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列。

【0096】

1つの特定の実施形態では、上記 IL-1R-I 結合ポリペプチドは、配列番号 1667~1668 および 1670~1679 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0097】

1つの実施形態では、IL-1R-I 結合ポリペプチドは、以下から選択されるアミノ酸配列を含む：

x x i i i) A E A K F A K - [B M] - D P S Q S S E L L S E A K K L S E S Q A P K (配列番号 1711) (式中、[BM] は、本明細書中で定義の IL-1R-I 結合モチーフであり) ; および

x x i v) x x i i i) 中に定義した配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列。

【0098】

また、上記アミノ酸配列と比較して変化が小さく、この変化がポリペプチドの三次構造および機能に大きな影響を及ぼさないポリペプチドも、本開示の範囲内に含まれる。したがって、いくつかの実施形態では、配列 x x) 、 x x i i) 、または x x i v) は、例えば、それぞれ、x i x) 、 x x i) 、または x x i i i) によって定義された配列に対して少なくとも 89% (少なくとも 91% など、少なくとも 93% など、少なくとも 94% など、少なくとも 96% など、少なくとも 98% など) 同一であり得る。さらに同様に、特定の実施形態では、上記で例示したかかる小さな変化は、x i x) 、 x x i) 、または x x i i i) 中に記載の BM に隣接する配列中のみに存在し得る。他の実施形態では、小さな変化は、BM 中および/または隣接配列中に存在し得る。

【0099】

かかる IL-1R-I 結合ポリペプチド中の配列 x i x) ~ x x i v) を、図 1 に示す配列番号 1~1638、1667~1668、および 1670~1679 からなる群から選択される配列中の 1 位~58 位の配列から選択することができる。

【0100】

この態様の IL-1R-I 結合ポリペプチドの 1つの実施形態では、配列 x i x) 、 x x i) 、または x x i i i) は、配列番号 1~1632、1667~1668、および 1670~1679 からなる群 (配列番号 20~1638、1667~1668、および 1670~1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位~58 位の配列に対応する。1つの実施形態では、配列 x i x) 、 x x i) 、または x x i i i) は、配列番号 1206~1632、1667~1668、および 1670~1679 からなる群 (配列番号 1210~1632、1667~1668、および 1670~1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位~58 位の配列に対応する。

【0101】

1つの実施形態では、配列 x v i i) 、 x i x) 、または x x i) は、配列番号 1205、1250~1632、および 1670~1679 からなる群から選択される配列中の 1 位~58 位の配列に対応する。

【0102】

1つの実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1206～1252、1672、および 1679 からなる群から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。

【0103】

別の実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1253～1632、1670～1671、および 1673～1678 からなる群から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。別の実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1253～1441、1670～1671、および 1674～1678 からなる群または 1442～1632 および 1673 からなる群から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。

10

【0104】

1つの実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 158、227、268、294、325、1176、1205、1251、1252、1270、1284、1285、1298、1307、1308、1311、1324、1328、1330、1331、1334、1339、1340、1343、1353、1361、1362、1364、1367、1368、1375、1393、1415、1420、1421、1422、1423、1435、1471、1472、1571、1594、1662、および 1670～1679 からなる群（配列番号 268、1205、1252、1270、1284、1285、1298、1307、1308、1324、1328、1330、1331、1334、1339、1340、1343、1361、1364、1367、1368、1375、1393、1415、1420、1421、1422、1423、1571、1670～1672、1674、および 1676～1679 からなる群など、配列番号 1252、1285、1298、1308、1324、1328、1330、1331、1340、1361、1393、1415、1420、1421、1670～1672、1674、1676～1677、および 1679 からなる群など）から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。

20

【0105】

1つの特定の実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1670～1679 からなる群から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。1つの実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1252、1328、1435、1672、1675～1676、および 1679 からなる群（配列番号 1252、1328、および 1679 からなる群；配列番号 1252、1435、および 1679 からなる群；または配列番号 1328 および 1435 からなる群など）から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。1つの実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1252、1328、および 1435 からなる群から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。

30

【0106】

1つの実施形態では、配列 xix ）、 xxi ）、または $xxiii$ ）は、配列番号 1672、1675～1676、および 1679 からなる群（配列番号 1672、1675、および 1676 からなる群など）から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する。

40

【0107】

1つの実施形態では、上記 IL-1R-I 結合ポリペプチドは、45℃を超える融解温度を有する。

【0108】

本明細書中に定義のポリペプチドの IL-1R-I への結合は、*in vivo* または *in vitro* のいずれかにおける IL-1R-I を介したシグナル伝達を妨害し得る

50

。したがって、1つの実施形態では、IL-1R-I依存性シグナル伝達を遮断することができる本明細書中に定義のIL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。

【0109】

半数阻害濃度 (IC_{50}) は、ある物質の特定の定量化可能な生物学的機能または生化学的機能の阻害有効性の尺度である。この定量的尺度は、ある特定の物質がある特定の生物学的機能を50%阻害するのに必要な量を示し、当該分野で一般的に使用されている。1つの特定の実施形態では、遮断の半数阻害濃度 (IC_{50}) が最大で $1 \times 10^{-7} M$ (最大で $5 \times 10^{-8} M$ など、最大で $2 \times 10^{-8} M$ など、最大で $1 \times 10^{-8} M$ など、最大で $5 \times 10^{-9} M$ など、最大で $2 \times 10^{-9} M$ など、最大で $1 \times 10^{-9} M$ など、最大で $5 \times 10^{-10} M$ など、最大で $4 \times 10^{-10} M$ など、最大で $3 \times 10^{-10} M$ など) であるようなIL-1R-Iシグナル伝達を遮断することができる本明細書中に定義のIL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。1つの実施形態では、遮断の半数阻害濃度 (IC_{50}) は、 $1 \times 10^{-15} M$ と $1 \times 10^{-7} M$ との間 ($1 \times 10^{-15} M$ と $1 \times 10^{-8} M$ との間など、 $1 \times 10^{-15} M$ と $1 \times 10^{-9} M$ との間など、 $1 \times 10^{-15} M$ と $1 \times 10^{-10} M$ との間など、 $1 \times 10^{-15} M$ と $1 \times 10^{-11} M$ との間など、 $1 \times 10^{-15} M$ と $1 \times 10^{-12} M$ との間など) である。

【0110】

本明細書中で使用される用語「IL-1R-I結合」および「IL-1R-Iに対する結合親和性」は、例えば、ELISA、バイオレイヤー干渉法 (BLI)、または表面プラズモン共鳴 (SPR) テクノロジーの使用によって試験することができるポリペプチドの性質を指す。例えば、以下の実施例に記載のように、IL-1R-I結合親和性を、抗体をコーティングしたELISAプレートにポリペプチド試料を補足し、ビオチン化IL-1R-Iを添加後、スト렙トアビジン抱合HRPを添加する実験で試験することができる。TMB基質を添加し、450nmの吸光度を、マルチウェルプレートリーダー (Victor³ (Perkin Elmer) など) を使用して測定する。次いで、当業者は、かかる実験によって得た結果を解釈することにより、IL-1R-Iに対するポリペプチドの結合親和性の少なくとも定性的な尺度を確立することができる。例えば相互作用についての EC_{50} 値 (半数効果濃度) を決定するための定量的尺度が望まれる場合、ELISAも使用することができる。ビオチン化IL-1R-Iの希釈系列に対するポリペプチドの応答を、上記のELISAを使用して測定する。次いで、当業者は、かかる実験によって得られた結果を解釈することができ、例えば、GraphPad Prism5 および非線形回帰を使用して結果から EC_{50} 値を計算することができる。

【0111】

IL-1R-I またはそのフラグメントを表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置のセンサーチップ上に固定し、試験すべきポリペプチドを含む試料をチップ上に通過させる実験においてIL-1R-I結合親和性を試験することもできる。あるいは、試験すべきポリペプチドを装置のセンサーチップ上に固定し、IL-1R-I またはそのフラグメントを含む試料をチップ上に通過させる。次いで、当業者は、かかる実験によって得た結果を解釈することにより、IL-1R-Iに対するポリペプチドの結合親和性の少なくとも定性的な尺度を確立することができる。例えば相互作用について K_D 値を決定するための定量的尺度が望まれる場合、表面プラズモン共鳴法を使用することもできる。結合値を、例えば、Biacore (GE Healthcare) 装置またはProtein XPR36 (Bio-Rad) 装置で定義することができる。IL-1R-Iを装置のセンサーチップ上に適切に固定し、その親和性を決定すべきポリペプチドの試料を系列希釈によって調製し、無作為な順序で注入する。次いで、 K_D 値を、例えば、BIAevaluation 4.1ソフトウェアまたは装置の製造者によって提供された他の適切なソフトウェアの1:1ラングミュア結合モデルを使用して、結果から計算することができる。

【0112】

したがって、1つの実施形態では、相互作用の EC_{50} 値が最大で $1 \times 10^{-7} M$ (最大で $5 \times 10^{-8} M$ など、最大で $1 \times 10^{-8} M$ など、最大で $5 \times 10^{-9} M$ など、最大

で 1×10^{-9} M など、最大で 5×10^{-10} M など、最大で 4×10^{-10} M など、最大で 3×10^{-10} M など、最大で 2×10^{-10} M など) であるように IL-1R-I に結合することができる本明細書中に定義の IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。1つの実施形態では、相互作用の EC_{50} 値は、 1×10^{-15} M と 1×10^{-7} M との間 (1×10^{-15} M と 1×10^{-8} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-9} M との間など、 1×10^{-15} M と 5×10^{-10} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-10} M との間など、 1×10^{-15} M と 5×10^{-11} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-11} M との間など、 1×10^{-15} M と 5×10^{-12} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-12} M など) である。

【0113】

1つの特定の実施形態では、IL-1R-I との相互作用の K_D 値が最大で 1×10^{-6} M (最大で 1×10^{-7} M など、最大で 5×10^{-8} M など、最大で 4×10^{-8} M など、最大で 3×10^{-8} M など、最大で 2×10^{-8} M など、最大で 1×10^{-8} M など、最大で 7×10^{-9} M など、最大で 5×10^{-9} M など、最大で 4×10^{-9} M など、最大で 3×10^{-9} M など、最大で 2×10^{-9} M など、最大で 1×10^{-9} M など、最大で 9×10^{-10} M など、最大で 7×10^{-10} M など、最大で 5×10^{-10} M など) であるように IL-1R-I に結合することができる IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。1つの実施形態では、IL-1R-I との相互作用の K_D 値は、 1×10^{-15} M と 1×10^{-6} M との間、 1×10^{-15} M と 1×10^{-7} M との間、 1×10^{-15} M と 1×10^{-8} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-9} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-10} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-11} M との間など、 1×10^{-15} M と 1×10^{-12} M との間などである。

【0114】

1つの実施形態では、本明細書中に定義の IL-1R-I 結合ポリペプチドであって、上記 IL-1R-I がヒト IL-1R-I またはカニクイザル IL-1R-I (ヒト IL-1R-I など) である、IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。

【0115】

本明細書中に定義の IL-1R-I 結合ポリペプチドは、IL-1R-I の IL-1 サイトカインとの相互作用 (IL-1R-I の IL-1 α および/または IL-1 β との相互作用など) を遮断することが可能であり得る。したがって、1つの実施形態では、上記 IL-1R-I 結合ポリペプチドは、IL-1R-I の IL-1 サイトカインとの相互作用 (IL-1R-I の IL-1 α および/または IL-1 β との相互作用など) を遮断することができる。

【0116】

当業者は、本開示の範囲を逸脱することなく特定の適用に本明細書中に開示の任意の態様の IL-1R-I 結合ポリペプチドを合わせるために、そのポリペプチドに種々の改変および/または付加を行うことができることを理解するであろう。

【0117】

例えば、1つの実施形態では、本明細書中に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチドであって、そのポリペプチドが、C末端および/またはN末端でさらなるアミノ酸によって伸長されており、かつ/またはさらなるアミノ酸を含んでいる、IL-1R-I 結合ポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドは、ポリペプチド鎖中の最初および/または最後の位置に1つまたは複数のアミノ酸残基を有するポリペプチドと理解すべきである。したがって、IL-1R-I 結合ポリペプチドは、任意の適切な数のさらなるアミノ酸残基 (例えば、少なくとも1つのさらなるアミノ酸残基) を含み得る。各々のさらなるアミノ酸残基を、例えば、産生、精製、in vivo または in vitro での安定化、ポリペプチドのカップリングまたは検出を改善するために個別または集合的に付加することができる。かかるさらなるアミノ酸残基は、化学的カップリングのために付加された1つまたは複数のアミノ酸残基を含み得る。これの一例は、システイン残基の付加である。さらなるアミノ酸残基は、ポリペプチドの精製または検出のための「タグ」も提供すること

10

20

30

40

50

ができる（タグに特異的な抗体との相互作用のためのHis₆タグ、(HisGlu)₃タグ（「HEHEHE」タグ）、「myc」（c-myc）タグ、または「FLAG」タグ、または固定化金属アフィニティクロマトグラフィ（IMAC）のためのHis₆-タグなど）。

【0118】

上記で考察したさらなるアミノ酸を、IL-1R-I結合ポリペプチドに、化学的抱合（公知の有機化学法を使用）または任意の他の手段（融合タンパク質としてのIL-1R-I結合ポリペプチドの発現など）によってカップリングするか、任意の他の様式にて、直接またはリンカー（例えば、アミノ酸リンカー）を介して連結することができる。

【0119】

上記で考察したさらなるアミノ酸は、例えば、1つまたは複数のポリペプチドドメイン（複数）を含み得る。さらなるポリペプチドドメインは、別の機能（例えば、さらなる別の結合機能、酵素機能、有毒な機能、蛍光シグナル伝達機能、またはこれらの組み合わせなど）を有するIL-1R-I結合ポリペプチドを提供することができる。

【0120】

さらなるポリペプチドドメインは、同一のIL-1R-I結合機能を有する別のIL-1R-I結合部分をさらに提供することができる。したがって、さらなる実施形態では、多量体の形態のIL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。上記多量体は、モノマー単位として少なくとも2つの本明細書中に開示のIL-1R-I結合ポリペプチドを含み、ここで、そのアミノ酸配列は同一でも異なっても良いと理解される。多量体の形態のこのポリペプチドは、各々がIL-1R-I結合モチーフを有し、各々が多量体内でモノマーを形成する適切な数のドメインを含み得る。これらのドメインは、同一のアミノ酸配列を有し得るが、あるいは、異なるアミノ酸配列を有し得る。換言すれば、本発明のIL-1R-I結合ポリペプチドは、ホモ多量体またはヘテロ多量体（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体）を形成し得る。1つの実施形態では、上記単量体単位が相互に共有結合しているIL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。1つの実施形態では、上記単量体単位が相互に非共有結合しているIL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。別の実施形態では、上記IL-1R-I結合ポリペプチドモノマー単位は、融合タンパク質として発現される。1つの実施形態では、二量体形態のIL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。産生後にジスルフィド結合した二量体を形成するIL-1R-I結合ポリペプチドの一例は、配列番号1658に記載の配列を有するポリペプチドである。IgG1Fcのヒンジ領域（配列番号1662の1～16位として図1に開示）を、IL-1R-I結合ポリペプチドの二量体形態を得るために使用することができる。

【0121】

さらに、本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチドまたはその多量体が第1のドメイン（すなわち、第1の部分）を構成し、第2およびさらなる部分がIL-1R-Iへの結合以外の機能を有する「異種」融合ポリペプチドもしくはタンパク質、または抱合体も意図され、本開示の範囲内に含まれる。かかるタンパク質における融合ポリペプチドまたは抱合体の第2のおよびさらなる部分も所望の生物学的活性を適切に有する。

【0122】

したがって、本開示の第2の態様では、第1の態様のIL-1R-I結合ポリペプチドからなる第1の部分、および所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第2の部分を含む融合タンパク質または抱合体を提供する。別の実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体は、第2の部分の生物学的活性と同一または異なり得る所望の生物学的活性を含むさらなる部分をさらに含み得る。

【0123】

したがって、1つの実施形態では、上記IL-1R-I結合ポリペプチドは、配列i)またはii)に記載のIL-1R-I結合モチーフBM；配列iii)またはiv)に記載の結合モジュールBM_{od}、または、配列v)～xxiv)のうちのいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。特に、上記IL-1R-I結合モチーフは、8～36位のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列に対応し得；上記結合モジュールは、7位～55位のアミノ酸配列に対応し得；上記配列*x i x*）、*x x i*）、または*x x i i i*）を、図1に示す配列番号および上に列挙する配列番号から選択される配列からなる群から選択することができる。IL-1R-I結合ポリペプチドの好ましい実施形態は、第1の態様に開示されている。

【0124】

所望の生物学的活性の非限定的な例は、治療活性、結合活性、および*in vivo*半減期増大活性を含む。

【0125】

1つの実施形態では、上記所望の生物学的活性は、上記第2の部分が融合タンパク質または抱合体の*in vivo*半減期を増加させるような*in vivo*半減期増大活性である。

10

【0126】

*in vivo*半減期増大活性は、この文脈において、融合タンパク質または抱合体の*in vivo*半減期を増加させる活性と理解すべきである。第1の部分（および可能性がある場合のさらなる部分）の半減期は、*in vivo*半減期増大活性を有する第2の部分への融合または抱合によって増大される。対応する融合タンパク質または抱合体が上記の第1のIL-1R-I結合部分、*in vivo*半減期増大活性を有する第2の部分、および任意選択的に1つまたは複数のさらなる部分（さらなるIL-1R-I結合部分など）を含み得ると認識されるであろう。例えば、上記融合タンパク質または抱合体は、2つのIL-1R-I結合ポリペプチドおよび第2の部分を含むことができ、これは、2つのIL-1R-I結合ポリペプチドのみを含む融合物または抱合体と比較して*in vivo*半減期が増加している。IL-1R-I結合ポリペプチドおよび半減期延長部分を含む融合タンパク質の例を産生し、実験的に試験している（実施例10）。1つの実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体は、配列番号1639～1657からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

20

【0127】

得られた融合タンパク質または抱合体の半減期を、*in vivo*半減期が本質的に長い第2の部分によって延長することができる。融合タンパク質または抱合体の水力学的サイズを増大させるポリペプチドは、例えば、融合タンパク質または抱合体の半減期を増大させることができる。あるいは、第2の部分は、*in vivo*半減期が長い天然タンパク質（血清アルブミンまたは抗体のFc部分など）からなり得る。

30

【0128】

1つの実施形態では、上記第2の部分は、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインまたはその誘導体；アルブミン；抗体のFc部分、およびトランスフェリンのうちの1つを含む。1つの実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体は、配列番号1639～1658からなる群から選択される配列を含む。

【0129】

1つの実施形態では、上記第2の部分は、抗体のFc部分（IgG1 Fc（配列番号1662）またはIgG4 Fcなど）である。半減期延長部分として使用することができるIgG4 Fcは、Uniprot受入番号P01861、アミノ酸残基99～327に記載のFc部である。1つの実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体は、配列番号1646～1654からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

40

【0130】

1つの実施形態では、上記抗体のFc部分は、Fcの未変異形態と比較してFcRnに対する親和性が改善されており、かつ／またはエフェクター応答が減少している変異Fcである。したがって、上記Fc部分は、1つまたは複数の変異が導入されている天然に存在するFcのバリエーションである。例えば、上記融合タンパク質または抱合体は、配列番号1734～1737からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

50

【0131】

上記第2の部分が *in vivo* 半減期増大活性を有する別の非限定的な例では、上記第2の部分はトランスフェリンである。本明細書中に開示の融合タンパク質または抱合体の特定の実施形態では、配列番号1657からなる群から選択されるポリペプチドを提供する。

【0132】

1つの特定の実施形態では、*in vivo* 半減期増大活性はアルブミン結合活性である。かかるアルブミン結合活性を提供する部分の非限定的な例は、アルブミン結合ラクダ Ig V_HH ドメインおよびアルブミン結合操作単一 Ig V_H ドメインである。

【0133】

1つの実施形態では、上記アルブミン結合活性は、*Fin ego l d i a m a g n a* 由来のペプトストレプトコッカスアルブミン結合 (PAB) タンパク質のアルブミン結合ドメインまたはその誘導体によって得られる。

【0134】

1つの実施形態では、上記アルブミン結合活性は、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインまたはその誘導体によって得られる。かかるアルブミン結合ドメインの例は、配列番号1659~1661に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。好ましくは、アルブミン結合ドメインは、配列番号1661に記載されている。1つの実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体は、配列番号1639~1645からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0135】

別の非限定的な例では、上記 *in vivo* 半減期増大活性は、ポリエチレングリコール (PEG) またはヒドロキシエチルデンプン (HES) によって得られる。

【0136】

例えば、少なくとも1つのさらなる部分を含む上記融合タンパク質または抱合体は、[IL-1R-I 結合ポリペプチド] - [半減期増大部分] - [選択された標的に対する親和性を有する部分] を含み得る。この例における3つの部分をポリペプチドのN末端からC末端への任意の順序で配置することができると理解すべきである。

【0137】

別の非限定的な例は、非融合 IL-1R-I 結合ポリペプチドと比較して融合タンパク質の組織分布を改変することが可能な結合活性である。1つの実施形態では、結合活性は、トランスフェリン受容体への結合である。かかる結合活性は、抱合体または融合タンパク質を、血液脳関門を通過して脳組織内に移行させると推測され得る (Yu et al, 2011, Sci Transl Med 3 (84): 84ra44)。好ましい実施形態では、かかる結合活性は、抗体フラグメントによって得られる。

【0138】

結合活性の別の非限定的な例は、生物学的活性を遮断するように作用する活性である。

【0139】

1つの実施形態では、結合活性が生物学的活性を遮断するように作用する IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、または抱合体を提供する。

【0140】

本開示の IL-1R-I 結合ポリペプチドを組み込んだ融合タンパク質または抱合体の上記説明に関して、第1の部分、第2の部分、およびさらなる部分の表示は、一方の本発明の IL-1R-I 結合ポリペプチドまたはポリペプチドと、他方の他の機能を示す部分とを明確に区別するためであることに留意すべきである。これらの表示は、融合タンパク質または抱合体のポリペプチド鎖中の異なるドメインの実際の順序を指すことを意図しない。同様に、第1および第2の単位の表示は、上記単位を明確に区別するためのものである。したがって、例えば、上記第1の部分（またはモノマー単位）は、制限されないが、融合タンパク質または抱合体のN末端、中央、またはC末端に出現し得る。

【0141】

当業者は、融合タンパク質の構築では、しばしば、融合すべき機能的部分の間にリンカーを使用し、異なる性質を有する異なる種類のリンカー（可動性アミノ酸リンカー、固定アミノ酸リンカー、および切断可能なアミノ酸リンカーなど）が存在することを認識している。リンカーは、例えば、融合タンパク質の安定性を増大させるか折りたたみを改善するため、融合タンパク質の発現を増加させるため、生物学的活性を改善するため、ターゲティングを可能にするため、および薬物動態学を変化させるために使用されている。したがって、1つの実施形態では、本明細書中に開示の任意の態様のポリペプチドは、少なくとも1つのリンカー（可動性アミノ酸リンカー、固定アミノ酸リンカー、および切断可能なアミノ酸リンカーから選択される少なくとも1つのリンカーなど）をさらに含む。

【0142】

1つの実施形態では、上記リンカーは、本明細書中に定義の I L - 1 R - I 結合ポリペプチドからなる第1の部分と所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第2の部分との間に配置される。別の実施形態では、上記リンカーは、上記第1の部分内に配置される。例えば、1つまたは複数のリンカーを、本明細書中に定義のポリペプチドの単量体単位の間配置することができる。さらに別の実施形態では、リンカーを、上記第1の部分内および上記第1の部分と上記第2の部分との間に配置することができる。

【0143】

可動性リンカーは、連結されたドメインに一定の程度の運動または相互作用が必要である場合に当該分野でしばしば使用され、いくつかの実施形態で特に有用であり得る。かかるリンカーは、一般に、小さな非極性の（例えば、G）または極性の（例えば、SまたはT）アミノ酸から構成される。いくつかの可動性リンカーは、主に、一続きのG残基およびS残基からなる（例えば、 $(GGGG)_p$ ）。機能的部分の間を適切に分離するためか、必要な部分間相互作用を維持するために、コピー数「p」を調整してリンカーを最適化することが可能である。GおよびSリンカーとは別に、他の可動性リンカーが当該分野で公知である（可動性を維持するためのさらなるアミノ酸残基（TおよびAなど）ならびに可溶性を改善するための極性アミノ酸残基を含むGおよびSリンカーなど）。1つの実施形態では、上記リンカーは、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含む可動性リンカーである。当業者は、他の適切なリンカーを認識している。

【0144】

1つの実施形態では、上記リンカーは、GS、VDSS、VDGS、VEGS、ASSS、 $(GGGG)_2$ （配列番号1683）、AS $(GGGG)_2$ （配列番号1684）、および $((KEAAA)_3KELAA)_2$ （配列番号1685）から選択される。1つの特定の実施形態では、上記リンカーは、AS $(GGGG)_2$ （配列番号1684）または $((KEAAA)_3KELAA)_2$ （配列番号1685）である。1つの実施形態では、リンカーを含む上記融合タンパク質または抱合体は、配列番号1639～1658に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。特に、リンカーAS $(GGGG)_2$ を含む例示的な融合タンパク質または抱合体は、配列番号1646～1658（配列番号1648および1657など）のアミノ酸配列に記載されている。

【0145】

本開示のさらなる態様では、本明細書中に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド；上記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター；および上記発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0146】

上記のポリペプチドまたは融合タンパク質を産生する方法であって、上記ポリペプチドのその発現ベクターからの発現を許容する条件下で上記宿主細胞を培養する工程、およびポリペプチドを単離する工程を含む方法も本開示に含まれる。

【0147】

あるいは、本開示の I L - 1 R - I 結合ポリペプチドを、保護された反応性側鎖を有するアミノ酸および／またはアミノ酸誘導体を使用した非生物学的ペプチド合成によって産

10

20

30

40

50

生することができ、その非生物学的ペプチド合成は、
ーアミノ酸および／またはアミノ酸誘導体を段階的にカップリングして、保護された反応性側鎖を有する第1の態様のポリペプチドを形成する工程、
ーポリペプチドの反応性側鎖から保護基を除去する工程、および
ー水溶液中でポリペプチドを折りたたむ工程を含む。

【0148】

本開示のIL-1R-I結合ポリペプチドが独立して治療剤、診断剤、または予後剤として有用であり得るか、他の治療剤または診断剤を標的にする（例えば、IL-1R-Iに直接的または間接的に影響を及ぼす）ための手段として有用であり得ると理解すべきである。例えば、IL-1R-Iシグナル伝達の阻害によって直接的な治療効果を得ることができる。

10

【0149】

したがって、別の態様では、本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、または抱合体、および少なくとも1つの薬学的に許容され得る賦形剤または担体を含む組成物を提供する。1つの実施形態では、上記組成物は、少なくとも1つのさらなる活性薬剤（少なくとも2つのさらなる活性薬剤など、少なくとも3つのさらなる活性薬剤など）をさらに含む。かかる組み合わせで有用であることを証明することができるさらなる活性薬剤の非限定的な例は、本明細書中に記載の免疫応答改変剤および抗癌剤である。1つの実施形態では、上記組成物は、上記所望の生物学的活性が、上記第2の部分
融合タンパク質または抱合体のin vivo半減期を増大させるようなin vivo半減期増大活性である融合タンパク質または抱合体を含む。かかる半減期増大活性を提供する部分の例は、本明細書中の他所に開示されている。

20

【0150】

それ故、本開示の別の態様では、医薬、予後剤、または診断剤として用いるための本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を提供する。1つの実施形態では、医薬として用いるための上記IL-1R-I結合ポリペプチドを提供する。

【0151】

1つの実施形態では、in vivoでのIL-1R-I機能を調整するための医薬として使用するための、本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または組成物を提供する。本明細書中で使用する場合、用語「調整する」は、活性の変化（IL-1R-I機能をハイボモルフにすること、IL-1R-I機能の部分的阻害または完全な阻害など）を指す。

30

【0152】

1つの実施形態では、IL-1R-I関連障害の治療、予後、または診断における使用のための本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または組成物を提供する。

【0153】

本明細書中で使用する場合、用語「IL-1R-I関連障害」は、IL-1R-Iがシグナル伝達経路において制御的役割を果たす任意の障害、疾患、または容態を指す。したがって、1つの実施形態では、IL-1R-I関連障害（炎症性疾患、自己炎症性症候群、自己免疫疾患、感染症、心血管疾患、虚血性疾患、癌、および糖尿病からなる群から選択される障害など）の治療で用いる本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または組成物を提供する。1つの実施形態では、上記IL-1R-I関連障害は、炎症性疾患、自己炎症性症候群、および自己免疫疾患からなる群から選択される。

40

【0154】

1つの実施形態では、上記IL-1R-I関連障害は、家族性地中海熱（FMF）；クリオピリン関連周期性症候群（CAPS）；TNF受容体関連周期性症候群（TRAPS

50

）；高IgD症候群（HIDS）；周期熱；アフタ性口内炎；咽頭炎；腺炎（PFAPA）；関節リウマチ（RA）、若年性RA、若年性特発性関節炎、全身性若年性特発性関節炎、；成人発症スティル病；シュニッツラー症候群；マックル・ウェルズ症候群；マクロファージ活性化症候群；ベーチェット病；ブドウ膜炎；尋常性ざ瘡；壊疽性膿皮症；痛風；2型糖尿病、初発糖尿病；眼乾燥症候群；汗腺膿瘍；好中球性皮膚症、特に、組織球貪食性脂肪組織炎、ウェーバー・クリスチャン病、および好中球性脂肪組織炎；心血管疾患、心筋梗塞、卒中；肝不全、腎不全；急性肺損傷；偽痛風、カルシウムピロリン酸沈着症、軟骨石灰化症、IL-1受容体アンタゴニスト欠損症（DIRA）、IL-36受容体アンタゴニスト欠損症（DITRA）、ADAM2欠損症（DADA2）、化膿性関節炎、壊疽性膿皮症・アクネ（PAPA）症候群、壊疽性膿皮症・アクネ・化膿性汗腺炎（PASH）症候群、PAPA・化膿性汗腺炎（PAPASH）症候群、リンパ水腫を伴う自己炎症性症候群（AILE）、ホスホリパーゼC-γ-2変異自己炎症性症候群、NALP12関連周期性症候群（NAPS12）、メバロン酸キナーゼ欠損症（MKD）、乾癬性関節炎、反応性関節炎、強直性脊椎炎、ヘモクロマトーシス関連関節炎、関節周囲石灰沈着症、骨関節炎、炎症性骨関節炎、変形性手関節症、膿疱性乾癬（全般的膿疱性乾癬（GPP）、手拳足底膿疱症（PPP）、アロボー稽留性肢端皮膚炎（ACH）など）；ブラウ症候群；スイート症候群；種々の脈管炎（巨細胞性動脈炎（GCA）、リウマチ性多発筋痛（PMR）、高安動脈炎、川崎病、蕁麻疹様血管炎、およびヘノッホ・シェンライン紫斑病（HSP）など）；好中球性蕁麻疹および特発性寒冷蕁麻疹；扁平苔癬；多発性筋炎、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、および封入体筋炎筋炎；種々の病期の骨髄腫（くすぶり型骨髄腫（SMM）、無症候性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、および多発性骨髄腫など）；腫瘍性悪液質；固形腫瘍成長；新生児期障害（気管支肺異形成（予防法）、壊死性小腸結腸炎（NEC）、未熟児網膜症（ROP）、周産期脳虚血に起因する脳性麻痺、および乳児呼吸急迫症候群（IRDS）など）；ホイップル病；外傷性脳損傷；難治性癲癇；全身性炎症反応症候群（SIRS）；皮膚ループス；イエスナー・カノフ病；筋萎縮性側索硬化症；全身性硬化症（強皮症）；敗血症性ショック；急性腭炎；慢性再発性多病巣性骨髄炎、非細菌性骨炎（NBO）、滑膜炎・ざ瘡・膿疱症・骨増殖症・骨炎（SAPHO）症候群、およびマジード症候群；再発性多発性軟骨炎；特発性再発性心包炎（IRP）；心筋炎；エルドハイム・チェスター病；若年性黄色肉芽腫；膵島細胞移植；血液透析誘導性全身性炎症；移植片対宿主病；ANCA関連糸球体腎炎および再発性糸球体腎炎；コーガン症候群；自己免疫性内耳疾患；慢性肉芽腫性疾患（CGD）；キャッスルマン病；心不全；拡張期心不全；抗シンターゼ症候群；急性ACL損傷；急性出血性白質脳炎；AAアミロイド症；ディジョージ症候群；全般的疲労；慢性疲労症候群（CFS）；湾岸戦争病（GWI）；および発作睡眠からなる群から選択される。

【0155】

別の実施形態では、上記IL-1R-I関連障害は、癌（結腸癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、黒色腫、および前立腺癌からなる群から選択される癌など）である。

【0156】

当業者は、上記IL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または本明細書中に記載の抗IL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体を含む組成物を標準的な投与技術（経口、局所、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、口内、舌下、十二指腸、または坐剤での投与が含まれる）を使用して被験体に投与することができることを認識するであろう。したがって、1つの実施形態では、経口、局所、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、口内、舌下、十二指腸、または坐剤での投与のための本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または組成物を提供する。1つの実施形態では、上記投与は、経口、静脈内、皮下、または十二指腸への投与であり、1つの特定の実施形態では、上記投与は経口投与である。

【0157】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用する場合、用語「被験体」は、ヒト被験体などの哺乳動物被験体を指す。

【0158】

IL-1R-I 媒介疾患において局所投与経路が特に関連し得る適応症の非限定的な例には、眼疾患（眼乾燥症、ブドウ膜炎、強膜炎、および潰瘍性角膜炎など）；皮膚科学的疾患（魚鱗癬および全般性膿疱性乾癬など）；肺疾患（成人呼吸急迫症候群、気管支肺異形成、慢性閉塞性肺疾患、石綿症、および珪肺症など）が含まれる。

【0159】

いくつかの実施形態では、上記使用のためのポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を一定期間以内に（例えば、疾患発症から24時間以内に）繰り返し投与することが有利であり得る。1つの特定の実施形態では、上記IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、必要とする被験体に疾患発症から24時間以内に繰り返して（疾患発症から24時間以内に少なくとも2回など、疾患発症から24時間以内に少なくとも3回など）投与する。さらに特定の実施形態では、上記IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、発症から制限された時間に（24時間など）継続して投与する。脳への分布が必要である場合（卒中の急性処置など）、反復投与または継続投与が好ましいかもしれない。

10

【0160】

上記融合タンパク質または抱合体が *in vivo* 半減期増大活性を有する第2の部分を含むいくつかの実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体またはかかる融合タンパク質または抱合体を含む組成物を、それらを必要とする被験体に週に1回投与する。

20

【0161】

関連する態様では、有効量の本明細書中に記載のIL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を必要とする被験体に投与する工程を含む、IL-1R-I 関連障害の治療方法を提供する。上記方法のより特定の実施形態では、本明細書中に記載のIL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物は、IL-1R-I 機能を *in vivo* で調整する。

【0162】

1つの実施形態では、上記IL-1R-I 関連障害は、前の態様に関連した上記定義の群から選択される。

30

【0163】

上記治療方法のいくつかの実施形態では、上記のポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、一定の期間以内に（例えば、疾患発症から24時間以内に）反復投与することが有利であり得る。1つの特定の実施形態では、上記IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、必要とする被験体に疾患発症から24時間以内に繰り返して（疾患発症から24時間以内に少なくとも2回など、疾患発症から24時間以内に少なくとも3回など）投与する。さらに特定の実施形態では、上記IL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、発症から制限された時間に（24時間以内など）継続して投与する。中枢神経系への分布が必要である場合（卒中の急性処置など）、反復投与または継続投与が好ましいかもしれない。

40

【0164】

上記治療方法の他の実施形態では、上記融合タンパク質または抱合体は、*in vivo* 半減期増大活性を有する第2の部分を含むか、上記組成物は、*in vivo* 半減期増大活性を有する第2の部分を含む融合タンパク質または抱合体を含む。かかる方法では、上記融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に週1回投与することができる。

【0165】

治療有効量の本明細書中に記載のIL-1R-I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または組成物、および少なくとも1つの第2の薬物（上記の免疫応答調整剤または抗癌剤など）を投与することが有利であり得る。

50

【0166】

本明細書中で使用する場合、用語「共投与」は、併用投与および連続投与の両方を含む。したがって、1つの実施形態では、上記の免疫応答調整剤の共投与をさらに含む上記定義の方法を提供する。別の実施形態では、上記の抗癌剤の共投与をさらに含む上記定義の方法を提供する。

【0167】

本開示の別の態様では、IL-1R-Iを含むと疑われる試料を準備する工程、上記試料を本明細書中に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物と接触する工程、およびIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物の結合を検出して、試料中のIL-1R-Iの存在を示す工程を含む、IL-1R-Iを検出する方法を提供する。1つの実施形態では、上記方法は、試料との接触後に非結合のポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を除去するための中間体洗浄工程をさらに含む。

10

【0168】

種々の例示的な態様および実施形態を参照して本発明を記載しているが、本発明の範囲を逸脱することなく様々に変更を加えることができ、その要素を等価物に替えることができると当業者に理解されるであろう。さらに、その本質的な範囲を逸脱することなく、本発明の教示に特定の状況または分子を適応させるために、多くの修正を加えることができる。したがって、本発明は意図されるいかなる特定の実施形態にも制限されるべきではないが、本発明は添付の特許請求の範囲の範囲に含まれる全ての実施形態を含むことを意図する。

20

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】本開示のIL-1R-I結合ポリペプチド（配列番号1～1638および1667～1679）、アルブミン結合ポリペプチド（配列番号1659～1661）；ヒトIgG1Fc（配列番号1662）、ヒトアルブミン（配列番号1663）、およびヒトトランスフェリン（配列番号1664）の例、任意選択的にリンカーを含む、上記ポリペプチド（配列番号1639～1658および1734～1737）を含むIL-1R-I結合融合ポリペプチド、対照ポリペプチド（GS-hIL-1 β 、配列番号1733）の例のアミノ酸配列、ならびに本発明を説明するために選択、スクリーニング、および／または特徴づけのために使用されたカニクイザルIL-1R-I-His₆（配列番号1665）およびカニクイザルIL-1R-I-Fc（配列番号1666）のアミノ酸配列の一覧表である。本明細書中に開示のIL-1R-I結合ポリペプチドの推定IL-1R-I結合モチーフ（BM）は、配列番号1～1638および1667～1668および1670～1679を有する配列中の残基8から残基36にわたる。配列番号1669では、上記BMは、残基5から残基33にわたる。これらの各Zバリエーション内で完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予想される49アミノ酸残基長のポリペプチド（BM_{od}）のアミノ酸配列は、残基7から残基55にわたるが、アミノ酸配列が残基4から残基52にわたる配列番号1669を用いたN末端短縮Zバリエーションを例外とする。

30

【図2】6つの抗IL-1R-I結合融合タンパク質（PSI0536、配列番号1648；PSI0537、配列番号1649；PSI0534、配列番号1646；PSI0535、配列番号1647；PSI0538、配列番号1650；PSI0539、配列番号1651）についてのNHDf細胞におけるIL-1 β 誘導IL-6放出阻害の濃度-反応曲線を示す線図である。参照としてアナキンラ（点線）を含めた。

40

【図3】5～10人の個別のドナー由来のヒト全血におけるIL-1 β 誘導IL-6放出の50%阻害（IC₅₀）でのIL-1R-I結合Zバリエーションの濃度を示す線図である。PSI0536（配列番号1648）、PSI0537（配列番号1649）、およびアナキンラについてのIC₅₀の中央値は、それぞれ、0.31、1.25、および0.30nMであった。

【0170】

50

実施例 概要

以下の実施例は、ファージディスプレイテクノロジーに基づくインターロイキン1受容体 I (IL-1R-I) を標的にする新規の Z バリエーション分子の開発を開示する。本明細書中に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチドを配列決定し、そのアミノ酸配列を、配列識別名として配列番号 1~1632 を付して図 1 に列挙する。本明細書中に開示のさらなる IL-1R-I 結合ポリペプチドを、配列識別名として配列番号 1633~1638 および 1667~1679 を付して図 1 に列挙する。実施例は、IL-1R-I 結合ポリペプチドの特徴づけおよび上記ポリペプチドの *in vitro* 機能性をさらに記載する。本明細書中で使用する場合、用語「IL-1R-I 結合 Z バリエーション」は、本明細書中に開示の IL-1R-I 結合モチーフを含む 58 アミノ酸長の IL-1R-I 結合ポリペプチドを指す。

10

【0171】

実施例 1

IL-1R-I 結合 Z バリエーションの選択およびスクリーニング

この実施例では、ヒトおよびカニクイザルの IL-1R-I (それぞれ、hIL-1R-I および cIL-1R-I) を、Z バリエーションのファージライブラリーを用いたファージディスプレイ選択における標的タンパク質として使用した。選択したクローンの DNA を配列決定し、Z バリエーションを、ペリプラズム画分として E. coli 内で産生し、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ) において IL-1R-I に対してアッセイした。

20

【0172】

材料と方法

標的タンパク質のビオチン化：ヒト IL-1R-I-Fc (hIL-1RI-Fc Creative BioMart カタログ番号 IL1RI-771H) およびヒト IL-1R-I (hIL-1RI、RnD Systems カタログ番号 269-1R/CF) を、製造者の推奨にしたがって、10 倍モル過剰量の No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン (Thermo Scientific、カタログ番号 21327) を使用して、室温 (RT) で 30 分間ビオチン化した。ビオチン化前に、製造者の説明書にしたがって、透析カセット (Slide-a-lyzer 3.5 K, 3500 MWCO, Thermo Scientific、カタログ番号 66333) を使用して hIL-1R-I-Fc のためにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、10 mM リン酸塩、137 mM NaCl、2.68 mM KCl、pH 7.4) に緩衝液を交換し、hIL-1R-I を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解した。ビオチン化後、上記のように両タンパク質について PBS に緩衝液を交換した。

30

【0173】

his タグ化標的タンパク質の発現：カニクイザル IL-1R-I-His₆ (cIL-1R-I-His₆、配列番号 1665) を、本質的に製造者のプロトコールにしたがって、FreeStyle 293-F 発現系 (Thermo Fisher Scientific) を使用して発現させた。発現ベクターのトランスフェクション 5 日後に遠心分離によって上清を採取し、-70℃で保存した。FreeStyle 293-F 培養由来の凍結上清を解凍し、濾過した (0.22 μm)。cIL-1R-I-His₆ を含む上清を、IMAC カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを使用して精製した。精製されたタンパク質を、PBS に緩衝液交換した。タンパク質の純度を、クーマシー・ブルーで染色する SDS-PAGE によって分析し、質量分析 (HPLC/MS または MALDI-TOF/MS) を使用して分子量を分析した。

40

【0174】

IL-1R-I 結合 Z バリエーションのファージディスプレイ選択：野生型アルブミン結合ドメイン (ABD001 と略す、配列番号 1660) への融合においてバクテリオファージ上にディスプレイされたプロテイン Z のランダムバリエーションのライブラリーを使用して IL-1R-I 結合 Z バリエーションを選択した。Zlib006 Naive. II と示した

50

ライブラリーのサイズは、 1.5×10^{10} ライブラリーメンバー（Zバリエーション）である。ファージライブラリーベクター pAY02592 における構築およびファージストックの生成は、以前に WO2016/113246 号に記載されていた。

【0175】

hIL-1R-I-Fc、ビオチン化 hIL-1R-I-Fc (b-hIL-1R-I-Fc)、ビオチン化 hIL-1R-I (b-hIL-1R-I)、および cIL-1R-I-His₆ (配列番号 1665) に対する選択を、4つの選択サイクルで行った。第1のサイクルでは、4つの選択トラックを並行して実施した(1-1~1-4)。選択トラック 1-1 および 1-4 を、サイクル 2 の 2 つのパートに分割し、それにより、表 2 に示すように、それぞれ、ラウンド 2、3、および 4 中に合計 6 つのパラレルトラックを得た；2-1~2-9、3-1~3-9、および 4-1~4-9。選択のために使用したファージ粒子数は、前のサイクルにおける溶出ファージ粒子数の 2000 倍であったが、選択トラック 4-1~4-5 ではより少ない量で使用した。ファージストックの調製、選択手順、および選択サイクル間のファージの増幅は、以下の 1~8 を例外として、本質的に WO2009/077175 号に記載のように行った。例外 1：10% ウシ胎児血清 (FCS、Gibco、カタログ番号 10108-165)、 $1.5 \mu\text{M}$ ヒト血清アルブミン (HSA、Novozymes、カタログ番号 230-005)、および 0.1% Tween 20 (Acros Organics、カタログ番号 233362500) を補足した PBS を、選択緩衝液として使用した。例外 2：表 2 に示すように、それぞれ、Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジン (SA ビーズ、Life technologies/Invitrogen、カタログ番号 11206D)、ビオチン化ヒト IgG1-Fc でプレコーティングした SA ビーズ (b-hFc、Jackson Immuno Research カタログ番号 009-060-008) (Fc/SA ビーズ)、本質的に WO2009/077175 号に記載のよう調製した b-hFc および (Z00000)₂-Cys-ビオチンでプレコーティングした SA ビーズ (Fc/Z00000/SA ビーズ)、b-hFc でプレコーティングしたプロテイン A ビーズ (Life technologies/Novex、カタログ番号 10002D) (Fc/プロテイン A ビーズ)、または Dynabeads (登録商標) His-Tag Isolation and Pulldown (IM ビーズ、Life Technologies/Novex、カタログ番号 10104D) とのファージストックのインキュベーションによって、RT で 60 分超または 4℃ で一晩サイクル 1~4 において事前選択を行った。b-hFc を、ビーズ (それぞれ、5、8.5、または $10 \mu\text{g}$ の b-hFc/mg Z00000/SA ビーズ、プロテイン A ビーズ、または SA ビーズ) と RT で 1 時間超 インキュベートし、次いで、ビーズを事前選択での使用前に $2 \times \text{PBST}$ (0.1% Tween 20 を補足した PBS) で洗浄した。例外 3：選択で使用した全てのチューブおよびビーズを、3% BSA (ウシ血清アルブミン、Sigma カタログ番号 A3059) および 0.1% Tween 20 を補足した PBS で事前にブロックした。例外 4：RT の溶液中で選択し、選択時間は、第 1 のサイクルにおいては 140 分間であり、その後のサイクルでは 120 分間であった。例外 5：以下の量の標的タンパク質およびビーズを使用して、標的-ファージ複合体をビーズ上に捕捉した：それぞれ、 $3.2 \mu\text{g}$ hIL-1R-I-Fc/mg Z00000/SA ビーズ、 $4 \mu\text{g}$ hIL-1R-I-Fc/mg プロテイン A ビーズ、 $2 \mu\text{g}$ b-hIL-1R-I-Fc または $2 \mu\text{g}$ b-hIL-1R-I/mg SA ビーズ、および $4.5 \mu\text{g}$ cIL-1R-I-His₆/mg IM ビーズ。各選択トラックのために使用したビーズのタイプは、表 2 で事前選択のために示したタイプと同一である。例外 6： $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを補足した培地で成長させた E. coli ER2738 株細胞 (Lucigen, Middleton, WI, USA) を、ファージ感染のために使用した。例外 7：細菌と比較して 5 倍過剰の M13K07 ヘルパーファージにより、対数期細菌を感染させた。例外 8：ラウンド 2 および 3 後のファージ粒子の増幅を、本質的に WO2016/113246 号に記載のように行った；しかし、実施例 5 では、一晩の培養において $100 \mu\text{M}$ IPTG、2

5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、および2%グルコースを補足したトリプシンダイズブロス+酵母抽出物 (TSB-YE) 培地を使用した。

【0176】

標的濃度の低下および洗浄数の増加によって得た選択サイクルにおけるストリンジェンシーの増加を記載している選択ストラテジーの概要を、表2に示す。

【0177】

【表 2】

表 2：ナイーブラライブラリーからのファージディスプレイ選択の概要

サイ クル	選 択 ト ラ ッ ク	ライブラリー 由来のファ ージストックま たは選 択 ト ラ ッ ク	事前選 択 ビ ー ズ	標 的	標 的 濃 度 (nM)	洗 浄 数
1	1-1	Zlib006Naive. II	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	100	2
1	1-2	Zlib006Naive. II	Fc/protein A	hIL-1R-I-F c	100	2
1	1-3	Zlib006Naive. II	Fc/SA	b-hIL-1R-I- Fc	100	2
1	1-4	Zlib006Naive. II	SA	b-hIL-1R-I	100	2
2	2-1	1-1	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	67	4
2	2-2	1-1	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	33	4
2	2-3	1-2	Fc/protein A	hIL-1R-I-F c	67	4
2	2-5	1-3	Fc/SA	b-hIL-1R-I- Fc	67	4
2	2-7	1-4	SA	b-hIL-1R-I	67	4
2	2-9	1-4	IM	cIL-1R-I-Hi s ₆	67	4
3	3-1	2-1	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	44	6
3	3-2	2-2	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	11	6
3	3-3	2-3	Fc/protein A	hIL-1R-I-F c	44	6
3	3-5	2-5	Fc/SA	b-hIL-1R-I- Fc	44	6
3	3-7	2-7	SA	b-hIL-1R-I	44	6
3	3-9	2-9	SA	b-hIL-1R-I	44	6
4	4-1	3-1	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	30	8
4	4-2	3-2	Fc/Z00000/S A	hIL-1R-I-F c	3.7	8
4	4-3	3-3	Fc/protein A	hIL-1R-I-F c	30	8
4	4-5	3-5	Fc/SA	b-hIL-1R-I- Fc	30	8
4	4-7	3-7	SA	b-hIL-1R-I	30	8
4	4-9	3-9	IM	cIL-1R-I-Hi s ₆	30	8

【0178】

PBST0.1%を使用して1分間洗浄し、WO2009/077175号に記載のp

H 2で溶出したビーズ結合ファージ／標的複合体についてのプロトコールのように溶出させた。

【0179】

ELISAのためのZバリエントの産生：1mlの培地から溶解したペレットの最終体積が1000 μ l PBST 0.05% (0.05% Tween 20を補足したPBS)であったことを除いて、本質的にWO2016/113246号に記載のようにZバリエントを産生した。

【0180】

ペリプラズム抽出物の最終上清は、AQHDEALE-[Z#####]-VDYV-[ABD]-YVPG (Gronwallら(2007) J Biotechnol, 128:162-183)として示されるABDとの融合物(Z-ABD; ABD001、配列番号1660)としてZバリエントを含んでいた。Z#####は、個別の58アミノ酸残基Zバリエントを指す。

【0181】

ZバリエントのELISAスクリーニング：ZバリエントのヒトIL-1R-Iへの結合を、標的としての1nM hIL-1R-I-Fcおよび検出のための1:10,000に希釈したヤギ抗ヒトIgG-HRP (Southern Biotech、カタログ番号2040-05)を使用して、本質的にWO2016/113246号に記載のようにELISAで分析した。ブランクコントロールとして、PBST 0.05%をZ-ABDペリプラズム試料の代わりに添加し、ネガティブコントロールとして、ABD001 (配列番号1660)を有するペリプラズム抽出物をZ-ABDペリプラズム試料の代わりに添加した。コントロールプレートを、標的タンパク質の代わりに100nM b-hFcおよび検出のための1:30,000に希釈したストレプトアビジン抱合HRP (Thermo Scientific、カタログ番号N100)を使用した類似の設定でアッセイした。

【0182】

配列決定：ELISAスクリーニングと並行して、配列決定のためのクローンを選定した。単一クローンから増幅させたPCRフラグメントを配列決定し、本質的にWO2009/077175号に記載のように分析した。

【0183】

ZバリエントのEC₅₀分析：IL-1R-I結合Zバリエントの選択物を、上記のELISAを使用したhIL-1R-I-Fcの希釈系列に対する反応の分析に供した。標的タンパク質hIL-1R-I-Fcを、100nMから0.01nMまで1:10で段階的に希釈した。バックグラウンドコントロールとして、標的タンパク質を添加せずにZバリエントをアッセイした。得られたデータを、GraphPad Prism 5および非線形回帰を使用して分析し、EC₅₀値(半数効果濃度)を計算した。

【0184】

結果

IL-1R-I結合Zバリエントのファージディスプレイ選択：ヒトおよびカニクイザルのIL-1R-Iに対する4サイクルのファージディスプレイ選択後に、個別のクローンを得た。

【0185】

ZバリエントのELISAスクリーニング：4サイクルの選択後に得たクローンが96ウェルプレート中に個別に産生され、1nM標的タンパク質を使用したELISAにおいてhIL-1R-I-Fc結合活性についてスクリーニングした。並行して、Fc結合を除外するためのELISAを行った。hIL-1R-Iに対して陽性のクローンを同定し、IL-1R-I陽性クローンは、Fc単独に対しては陽性でなかった。ABDネガティブコントロールについての反応は得られなかった。45の同定したZバリエントが0,71AU超(8.5 $\times$ コントロールバックグラウンド)というELISAスクリーニングの結果を示した。

【0186】

配列決定：E L I S Aスクリーニングと並行して、4サイクルの選択後に得たクローンを配列決定した。各バリエントに固有の識別番号#####を与え、個別のバリエントをZ#####と呼ぶ。同定された58アミノ酸残基長のZバリエントのサブセットのアミノ酸配列を、図1中および配列表中に配列番号1～19として列挙する。推定IL-1R-I結合モチーフは、各配列中の残基8から残基36にわたる。これらの各Zバリエント内で完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予想される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、残基7から残基55にわたる。

【0187】

ZバリエントのEC₅₀分析：上記Zバリエントのサブセット（配列番号1～19）を、hIL-1R-I-Fcを使用したE L I S A標的滴定に供した。得られた結果をEC₅₀値の計算のために使用した（表3）。

【0188】

【表3】

表3：E L I S A滴定分析からのEC₅₀値の計算値

Zバリエント	配列番号	EC ₅₀ (M)	Zバリエント	配列番号	EC ₅₀ (M)
Z12884	13	6.4×10 ⁻¹⁰	Z12922	3	2.9×10 ⁻⁹
Z12891	19	2.2×10 ⁻⁹	Z12929	17	1.7×10 ⁻⁸
Z12895	12	2.3×10 ⁻¹⁰	Z12933	2	1.5×10 ⁻⁹
Z12905	7	7.3×10 ⁻⁹	Z12941	4	4.6×10 ⁻¹⁰
Z12910	11	2.3×10 ⁻¹⁰	Z12961	16	2.9×10 ⁻¹⁰
Z12911	18	3.2×10 ⁻¹⁰	Z12964	1	3.9×10 ⁻¹⁰
Z12912	10	3.9×10 ⁻¹⁰	Z12967	9	1.7×10 ⁻¹⁰
Z12915	5	4.3×10 ⁻⁹	Z12974	8	2.1×10 ⁻¹⁰
Z12917	15	3.3×10 ⁻¹⁰	Z12975	6	2.6×10 ⁻¹⁰
Z12920	14	6.6×10 ⁻⁹			

【0189】

実施例2

一次IL-1R-I結合Zバリエントの産生および特徴づけ

この実施例は、一次ファージ選択に由来するHisタグ化Zバリエントのサブクローニングおよび産生、その標的結合の特徴づけ、標的の遮断、および融点についての一般の手順を記載する。

【0190】

材料と方法

His₆タグを有するZバリエントのサブクローニング：それぞれのZバリエントのDNAを、ファージライブラリーベクターpAY02592から増幅させた。N末端His₆タグを有する単量体Zバリエント分子の構築についてのサブクローニングストラテジーを、標準的な分子生物学技術を使用して適用した。Z遺伝子フラグメントを、発現ベクターにサブクローン化し、それにより、コード配列MGSSHHHHHHLLQ-[Z#####]-VDを得た。

【0191】

培養：E. coli T7E2細胞（Gene Bridges）を、それぞれのIL-1R-I結合Zバリエントの遺伝子フラグメントを含むプラスミドで形質転換した。得られた組換え株を、50 μg/mlカナマイシンを補足した培地中にて、EnPressoプロトコル（BioSilta）を使用して50 mlのスケールで30℃にて、または930 ml TSB-YE培地中で37℃にて培養した。タンパク質発現を誘導するために、IPTGを、OD₆₀₀約10（EnPresso）または2（TSB+YE）での最

終濃度 0.2 mM まで添加した。誘導後、培養物を 16 時間 (EnPresso) または 5 時間 (TSB+YE) インキュベートした。細胞を遠心分離によって回収した。

【0192】

His₆ タグを有する IL-1R-I 結合 Z バリエーションの精製：およそ 1~2 g の各細胞ペレットを、Benzonase (登録商標) (Merck) を補足した結合緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、20 mM イミダゾール、pH 7.4) に再懸濁した。細胞破壊後、細胞片を遠心分離によって除去し、各上清を、1 ml His GraviTrap IMAC カラム (GE Healthcare) にアプライした。洗浄緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、60 mM イミダゾール、pH 7.4) での洗浄によって夾雑物を除去し、引き続いて Z バリエーションを溶出緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.4) で溶出した。IMAC 精製後、緩衝液を、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) を用いて PBS (2.68 mM KCl、137 mM NaCl、1.47 mM KH₂PO₄、8.1 mM Na₂HPO₄、pH 7.4) と交換した。全 Z バリエーションを、第 2 の精製工程に供した。各 Z バリエーションを、RPC 溶媒 A (0.1% TFA、10% ACN、90% 水) で事前に平衡化した 1 ml Resource15 RPC カラム (GE Healthcare) にロードした。RPC 溶媒 A でのカラム洗浄後、結合したタンパク質を、20 ml の直線勾配 0-50% RPC 溶媒 B (0.1% TFA、80% ACN、20% 水) で溶出した。次いで、緩衝液を、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) を用いて PBS (2.68 mM KCl、137 mM NaCl、1.47 mM KH₂PO₄、8.1 mM Na₂HPO₄、pH 7.4) と交換した。

【0193】

NanoDrop (登録商標) ND-1000 分光光度計 (Saveen Werner AB) および各タンパク質の減衰係数を用いた 280 nm での吸光度の測定によってタンパク質濃度を決定した。およそ 1 mg/ml 未満の濃度の試料を、Amicon Ultra-4, Ultracel-3K (Merck Millipore) を使用して濃縮した。純度を、クーマシー・ブルーで染色する SDS-PAGE によって分析し、各精製 Z バリエーションの同一性を、LC/MS 分析を使用して確認した。

【0194】

Biacore 親和性分析：His₆ タグ化 Z バリエーションに対するヒトおよびカニクイザルの IL-1R-I の親和性 (K_D) を、Biacore 2000 装置 (GE Healthcare) を用いて決定した。hIL-1R-I または cIL-1R-I-His₆ を、CM5 チップ (GE Healthcare、カタログ番号 BR100012) の異なるフローセル内のカルボキシル化デキストラン層上に固定した。製造者のプロトコールにしたがってアミンカップリング化学を使用して固定した。酢酸塩 (pH 4.5) (GE Healthcare、カタログ番号 BR100350) をリガンド希釈のために使用し、HBS-EP (GE Healthcare、カタログ番号 BR100188) をランニング緩衝液として使用した。チップ上の 1 つのフローセル表面を活性化し、分析物注入中のブランクとして使用するために不活性化した。動態実験では、HBS-EP をランニング緩衝液として使用し、流速は 50 μl/分であり、温度は 25 °C であった。分析物 (すなわち、Z バリエーション) を、それぞれ HBS-EP 緩衝液で最終濃度 40 nM および 10 nM に希釈し、標的チップ表面上に 2 分間にわたって注入し、その後ランニング緩衝液中で 8 分間解離させた。速度定数を、BiaEvaluation ソフトウェア 4.1 (GE Healthcare) において 1:1 結合モデルを用いて得られたセンサーグラムから計算した。

【0195】

in vitro IL-1β 中和アッセイ：TF-1 細胞株は、多数の異なるサイトカイン (IL-1β が含まれる) に応答して増殖する。この細胞株を使用して、一次 IL-1R1 結合剤が IL-1β 作用を阻害する能力を評価した。TF-1 細胞を、10% F

C S (G i b c o)、ペニシリンーストレプトマイシン (L o n z a)、および 2 ng/ml r h G M - C S F (R & D S y s t e m s) を補足した L - グルタミン (L o n z a) を含む R P M I 1 6 4 0 中に維持した。使用前に、細胞を、r h G M - C S F を含まない R P M I 1 6 4 0 で 2 回洗浄した。次いで、細胞をカウントし、 3×10^4 細胞/ウェルの密度で 96 ウェル平底プレートに分注した。別のプレートで、阻害結合剤の系列希釈物 (H i s₆ タグ化 I L - 1 R - I 結合 Z バリエーション (濃度範囲 $400 \sim 0.1 \text{ nM}$) または I L - 1 R - I 結合タンパク質 K i n e r e t (アナキンラ、S o b i) (濃度範囲 $0.3 \sim 0.0003 \text{ nM}$)) を、 0.6 nM I L - 1 β (P e p r o T e c h) の存在下でインキュベートした。Z バリエーションポリペプチドと I L - 1 β との事前に混合した複合体を、T F - 1 細胞を含むウェルに移した。細胞を、加湿 $5\% \text{ CO}_2$ 雰囲気にて 37°C で 72 時間刺激した。最後の 4 時間のインキュベーション中に、ウェルあたり $19 \mu\text{l}$ の 2 倍希釈した C C K - 8 (F l u k a, S i g m a A l d r i c h) を添加して、増殖応答を決定した。マイクロプレートリーダー (V i c t o r 3, P e r k i n E l m e r) を使用して 450 nm での吸光度を測定した。細胞成長に関するデータを、4 パラメーター用量 - 反応曲線に対する非線形回帰によって評価し、半数阻害濃度 (I C₅₀) を、G r a p h P a d P r i s m プログラムを使用して決定した。

10

【0196】

円二色性 (C D) 分光分析：精製された H i s₆ タグ化 Z バリエーションを、P B S で 0.5 mg/ml に希釈した。各々の希釈 Z バリエーションについて、 $250 \sim 195 \text{ nm}$ での C D スペクトルを、 20°C で得た。さらに、可変温度測定 (V T M) を実施して融解温度 (T_m) を決定した。V T M では、 221 nm での吸光度を測定し、温度を温度勾配 $5^\circ\text{C}/\text{分}$ で 20°C から 90°C に上昇させた。Z バリエーションの再折りたたみ能力を研究するために、加熱手順後に 20°C での新規の C D スペクトルを得た。J a s c o J - 8 1 0 分光偏光計 (J a s c o S c a n d i n a v i a A B) において光路長 1 mm のセルを使用して C D を測定した。

20

【0197】

結果

H i s₆ タグ化 Z バリエーションの産生：H i s₆ タグを有する I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションは、E . c o l i 内で可溶性遺伝子産物として発現された。およそ $1 \sim 2 \text{ g}$ の細菌ペレットからのタンパク質の精製量を、 280 nm での吸光度の測定によって分光高度的に決定し、R P C 精製前の異なる I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションについてはおよそ $3 \sim 25 \text{ mg}$ の範囲であった。各最終タンパク質調製物の S D S - P A G E 分析では、これらが主に I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションを含むことを示していた。各 Z バリエーションの正確な同一性および分子量は、H P L C - M S 分析によって確認された。

30

【0198】

B i a c o r e 親和性分析：H i s₆ タグ化 I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションのヒトおよびカニクイザルの I L - 1 R - I との相互作用を、B i a c o r e 装置における固定化 I L - 1 R - I を含む表面上への 2 つの濃度の各 Z バリエーションの注入によって解析した。ヒト I L - 1 R - I についての親和性 (K_D) の計算値を表 4 に示す。ヒト I L - 1 R - I に対する最強の結合剤 (Z 1 2 9 6 7、配列番号 9) は、ヒト I L - 1 R - I に $1.2 \times 10^{-9} \text{ M}$ の親和性で結合し、カニクイザル I L - 1 R - I に $3.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ の親和性で結合した。

40

【0199】

【表 4】

表 4. IL-1R-I への His₆-Z ポリペプチド結合の親和性

Z バリエーション	配列番号	ヒト IL-1R-I K _D (M)
Z12884	13	1.8×10 ⁻⁸
Z12895	12	5.5×10 ⁻⁹
Z12911	18	7.1×10 ⁻⁹
Z12917	15	8.0×10 ⁻⁹
Z12922	3	9.8×10 ⁻⁹
Z12967	9	1.2×10 ⁻⁹
Z12974	8	1.5×10 ⁻⁸
Z12975	6	8.9×10 ⁻⁸

10

【0200】

in vitro IL-1β 中和アッセイ: His₆ タグ化 IL-1R-I 結合 Z バリエーションの IL-1β 阻害能を、TF-1 細胞アッセイで分析した。得られた IC₅₀ 値を表 5 に示す。

【0201】

【表 5】

表 5: TF-1 細胞アッセイ由来の His₆-Z ポリペプチドについての IC₅₀ 値。

20

Z バリエーション	配列番号	IC ₅₀ (nM)
Z12884	13	27
Z12895	12	7.1
Z12911	18	30
Z12917	15	11
Z12922	3	66
Z12967	9	1.1
Z12974	8	60
Z12975	6	35
Kineret	-	0.05

30

【0202】

CD 分析: His₆ タグを有する IL-1R-I 結合 Z バリエーションについて決定された CD スペクトルは、各々が 20℃ で α-ヘリックス構造を有することを示していた。この結果は、融解温度を決定した可変温度測定においても立証された (表 6)。90℃ への加熱前後に測定したスペクトルを重ね合わせたときに全ての IL-1R-I 結合 Z バリエーションについて可逆的の折りたたみが認められた。

【0203】

【表 6】

表 6: 融解温度 (T_m)。

40

Z バリエーション	配列番号	T _m (°C)	Z バリエーション	配列番号	T _m (°C)
Z12911	18	64	Z12975	6	51
Z12967	9	58	Z12884	13	49
Z12922	3	47	Z12917	15	56
Z12974	8	49	Z12895	12	55

【0204】

実施例 3

IL-1R-I 結合 Z バリエーションの第 1 の成熟ライブラリーの設計および構築

50

この実施例では、成熟ライブラリーを構築した。ライブラリーを、さらなる I L-1 R-I 結合 Z バリエーションの選択のために使用した。成熟ライブラリーからの選択は、通常、親和性が増大した結合剤が得られることが予想される (Orlova et al, (2006) Cancer Res 66 (8): 4339-48)。

【0205】

材料と方法

ライブラリーの設計：ライブラリーは、主に、実施例 1 および 2 に記載の一次選択に由来するヒト I L-1 R-I 結合 Z バリエーションに基づいた。一次選択由来の Z バリエーションのサブセットの配列を、図 1 および配列表に配列番号 1~19 として列挙している。名称が Zlib006 I L-1 R I. I の新規のライブラリーでは、Z 分子足場中の 10 の可変位置が一定のアミノ酸残基に偏っており、3 つの位置が一定に保持されていた。TRIM テクノロジーによって生成された、無作為化した一連のトリヌクレオチド基本単位の組み込みが可能で 2 つのオリゴヌクレオチドを、Ella Biotech (Martinsried, Germany) から取り寄せた。これらのオリゴヌクレオチドは、それぞれ、Z 分子のヘリックス 1 およびヌクレオチドを示し、18 の重複ヌクレオチドのアニーリング領域を含んでいた。アセンブリされた二本鎖 DNA 配列は以下であった：5'-A A A T A A A T C T C G A G G T A G A T G C C A A A T A C G C C A A A G A A N N N N N N N N N N G C G N N N N N N G A G A T C N N N N N N C T G C C T A A C C T C A C C N N N N N N C A A N N N N N N G C C T T C A T C N N N A A A T T A N N N G A T G A C C C A A G C C A G A G C T C A T T A T T T A-3' (配列番号 1680；設計されたコドンで NNN と表示する)。この配列は、制限部位 Xho I および Sac I に隣接した Z バリエーションアミノ酸配列の部分的に無作為化されたヘリックス 1 および 2 をコードする。新規のライブラリーの各アミノ酸残基 (Z 分子足場中の 10 の可変アミノ酸位置 (9、10、11、13、14、17、18、25、32、および 35) および 3 つの一定のアミノ酸位置 (24、27、および 28) が含まれる) の設計を、表 7 に示す。得られた理論上のライブラリーサイズは、 9.7×10^8 バリエーションであった。選択したアミノ酸の一部の分布率が高い 9、13、17、18、32、および 35 位を除いて、異なるアミノ酸の理論上の均等分布を各アミノ酸の位置に適用した。

【0206】

【表 7】

表 7：第 1 の成熟ライブラリー Zlib006 I L-1 R I. I の設計。

Z バリエーション分子内のアミノ酸位置	アミノ酸無作為化 (不均等分布の場合の百分率)	異なるアミノ酸の数
9	A(30%), E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y	14
10	A, D, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, W, Y	15
11	A, D, E, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y	16
13	A, F, H, I, L, Q(20%), S, T, V, W, Y(20%)	11
14	A, D, E, F, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y	16
17	F, W(20%), Y	3
18	A(11%), D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y	17
24	R	1
25	H, K, R, S	4
27	Y	1
28	T	1
32	A, I, L, R(70%)	4
35	F(80%), L(20%)	2

【0207】

ライブラリーの構築：本質的にWO2015/189430号における成熟ライブラリーについて記載のように、2つのオリゴヌクレオチドを、アセンブリし、増幅させ、ベクターpAY02592にクローン化し、E. coli ER2738に形質転換した。ライブラリー設計と比較した構築ライブラリーの内容を検証し、その結果を評価するために、Zlib006IL-1RI. Iライブラリー由来のクローンを、(WO2009/077175号に記載のように) 配列決定した。

【0208】

ファージストックの調製：ファージミドライブラリーを含むファージストックを、浸透フラスコにて2つのバッチで調製した。ファージミドライブラリーを含むグリセロールストック由来の細胞を、2%グルコース、10 μ g/ml テトラサイクリン、および100 μ g/ml アンピシリンを補足したそれぞれ2 l および3 l のTSB-YE培地に播種した。培養物を、OD₆₀₀が対数期の0.5~0.9に到達するまで37℃で成長させた。4~10倍モル過剰のM13KO7ヘルパーファージを使用して培養物に感染させ、37℃で30分間培養した。バッチ1培養物を遠心分離によってペレット化し、100 μ g/ml アンピシリン、25 μ g/ml カナマイシン、および0.1 mM IPTGを補足したTSB-YE培地に溶解し、30℃で一晩成長させた。バッチ2培養物に、0.1 mM IPTGを添加し、その後に37℃で1時間インキュベートした。25 μ g/ml カナマイシンの添加後、培養物を30℃で一晩成長させた。Gronwallら、前出に記載のように、両バッチについて、一晩成長させた細胞を4,000gの遠心分離でペレット化し、その後に培地中に残存しているファージ粒子をPEG/NaCl中で2回沈殿させ、濾過し、PBSおよびグリセロールに溶解した。ファージストックを、選択で使用するまで-80℃で保存した。

【0209】

結果

ライブラリーの構築：新規のライブラリーZlib006IL-1RI. Iを、検証された結合特性を有する一連のIL-1RI結合Zバリエーションに基づいて設計した（実施例1および2）。設計したライブラリーの理論上のサイズは、 9.7×10^8 Zバリエーションであった。E. coli ER2738細胞に対する形質転換後の滴定によって決定された実際のライブラリーサイズは、 5.6×10^9 形質転換体であった。ライブラリーの質を、192の形質転換体の配列決定およびその実際の配列と理論上の設計との比較によって試験した。設計したライブラリーと比較した実際のライブラリーの内容は、満足なものであることが示された。したがって、IL-1RIに対する潜在的な結合剤の第1の成熟ライブラリーが首尾よく構築された。

【0210】

実施例4

第1の成熟ライブラリー由来のZバリエーションの選択およびスクリーニング

この実施例では、ヒトおよびカニクイザルのIL-1RIを、Zバリエーションの成熟ファージライブラリーを使用したファージディスプレイ選択における標的タンパク質として使用した。選択されたクローンのDNAを配列決定し、E. coli ペリプラズム画分でZバリエーションを産生し、ELISAおよびBiacoreにおいてIL-1RIに対してアッセイした。

【0211】

材料と方法

標的タンパク質の発現：本質的に製造者のプロトコールにしたがって、Fc融合カニクイザルIL-1RI (cIL-1RI-Fc、配列番号1666) を、Exp293発現系 (Thermo Fisher Scientific) を使用して発現させた。発現ベクターのトランスフェクションの7日後に遠心分離によって上清を回収し、-70℃で保存した。Exp293培養物由来の凍結上清を解凍し、濾過した (0.22 μ m)。cIL-1RI-Fcを含む上清を、MabSelect SuReカラム使用

したアフィニティークロマトグラフィを用いて精製した。精製したタンパク質の緩衝液を、PBSに交換した。タンパク質の純度を、クーマシー・ブルーで染色するSDS-PAGEによって分析し、分子量を、質量分析（HPLC/MSまたはMALDI-TOF/MS）を使用して分析した。

【0212】

IL-1R-I結合Zバリエーションのファージディスプレイ選択：ビオチン化ヒト標的タンパク質b-hIL-1R-I-Fcおよびb-hIL-1R-I、ならびにカニクイザル標的タンパク質cIL-1R-I-Fc（配列番号1666）およびb-cIL-1R-I-Fc（実施例1中のhIL-1R-I-Fcとしてビオチン化したcIL-1R-I-Fc）を、実施例3に記載のZバリエーション分子の新規のライブラリーを使用したファージ選択で使

10

用した。並行選択トラックおよび標的濃度を低下させ、洗浄数を増加させることによって得た選択サイクルにおける全体的なストリンジェンシーの増加を記載している選択ストラテジーの概要を、表8に示す。以下の1～6を例外として、本質的に実施例1に記載のように4～5サイクルで選択した。例外1：ファージストックの、それぞれFc/SAビーズ（選択トラック1-1、1-2、1-4、1-6、1-8、2-14、および2-16）、SAビーズ（選択トラック1-3、1-7、1-9、2-15、および2-17）、またはFc/プロテインAビーズ（選択トラック1-5）のインキュベーションによってRTで60分間を超えて事前選択を行った。例外2：表8中の各トラックに示すように、選択時間は30～100分間であった。例外3：標的-ファージ複合体を、以下の量の標的タンパク質およびビーズを使用してビーズ上に補足した：それぞれ、8 μg

20

b-hIL-1R-I-Fc、1 μg b-hIL-1R-I、または4 μg cIL-1R-I-Fc/mg SAビーズ、および5 μg cIL-1R-I-Fc/mg プロテインAビーズ。選択ラウンド5では、2 mg SPHERO neutravidinビーズ（Sphero techカタログ番号NVM-20-5）を、標的-ファージ複合体捕捉のために使用した。例外4：トラック2-14、2-15、2-17、3-14、3-15、および3-17の第2の最終洗浄工程では、それぞれ、各トラックの標的濃度の100倍のhIL-1R-Iを、洗浄緩衝液に添加し、15～20分間洗浄した。例外5：ビーズ洗浄手順後に選択トラック4-1～4-13のファージ/標的/ビーズ複合体を2つに分割した。半分の試料を溶出に供し、4-1x～4-13xと表示した残りの半分を溶出前のさらなる66時間の洗浄工程に供した。例外6：表8に示すように、トラ

30

ック4の2つの洗浄ラウンド4-4xおよび4-6xを第5の選択ラウンドに供し、それにより、トラック5-1および5-2が得られた。10 μg/mlテトラサイクリンを補足した培地中で成長させたE. coli XL-1 Blue細胞（Agilent Technologies、カタログ番号200268）をファージ感染のために使用し、細菌と比較して10倍過剰のM13K07ヘルパーファージを、対数期細菌に感染させた。ラウンド1～3後のファージ粒子を、本質的に実施例1のラウンド2および3についての記載のように増幅させた。

【0213】

【表 8】

表 8：第 1 の成熟ライブラリーからの選択の概要。

サイク ル	選択ト ラック	ライブラリー 由来のファ ージストックま たは選択トラ ック	標 的	標 的 濃 度 (nM)	選 択 時 間 (分)	洗 浄 数
1	1-1	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I-Fc	50	70	4
1	1-2	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I-Fc	10	70	4
1	1-3	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I	50	70	4
1	1-4	Zlib006IL-1RI.I	b-cIL-1R-I-Fc	100	70	2
1	1-5	Zlib006IL-1RI.I	cIL-1R-I-Fc	100	70	2
1	1-6	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I-Fc	10	45	5
1	1-7	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I	10	45	5
1	1-8	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I-Fc	10	45	5
1	1-9	Zlib006IL-1RI.I	b-hIL-1R-I	10	45	5
2	2-1	1-1	b-hIL-1R-I-Fc	20	60	6
2	2-2	1-1	b-hIL-1R-I-Fc	5	60	6
2	2-3	1-2	b-hIL-1R-I-Fc	4	60	8
2	2-4	1-2	b-hIL-1R-I-Fc	4	60	12
2	2-5	1-3	b-hIL-1R-I	20	60	6
2	2-6	1-3	b-hIL-1R-I	10	60	6
2	2-7	1-3	b-hIL-1R-I	10	60	10
2	2-8	1-4	b-cIL-1R-I-Fc	50	60	4
2	2-9	1-5	cIL-1R-I-Fc	50	60	4
2	2-10	1-1	b-cIL-1R-I-Fc	100	60	2
2	2-11	1-1	b-cIL-1R-I-Fc	50	60	6
2	2-12	1-1	cIL-1R-I-Fc	100	60	2
2	2-13	1-1	cIL-1R-I-Fc	50	60	6
2	2-14	1-8	b-hIL-1R-I-Fc	2	30	10*
2	2-15	1-9	b-hIL-1R-I	2	30	10*
2	2-16	1-9	b-cIL-1R-I-Fc	25	30	3
2	2-17	1-6/1-7 プール	b-hIL-1R-I	2	30	10*
3	3-1	2-1	b-hIL-1R-I-Fc	5	60	8
3	3-2	2-2	b-hIL-1R-I-Fc	0.5	60	8
3	3-3	2-3	b-hIL-1R-I-Fc	1	60	12
3	3-4	2-4	b-hIL-1R-I-Fc	1	60	24

10

20

30

40

3	3-5	2-5	b-hIL-1R-I	5	60	8
3	3-6	2-6	b-hIL-1R-I	1	60	8
3	3-7	2-7	b-hIL-1R-I	2	60	20
3	3-8	2-8	b-cIL-1R-I-Fc	25	60	6
3	3-9	2-9	cIL-1R-I-Fc	25	60	6
3	3-10	2-10	b-hIL-1R-I-Fc	25	60	6
3	3-11	2-11	b-hIL-1R-I-Fc	5	60	8
3	3-12	2-12	b-hIL-1R-I-Fc	25	60	6
3	3-13	2-13	b-hIL-1R-I-Fc	5	60	8
3	3-14	2-14	b-hIL-1R-I-Fc	0.5	40	16*
3	3-15	2-15	b-hIL-1R-I	0.5	40	16*
3	3-16	2-16	b-hIL-1R-I	2	40	9
3	3-17	2-17	b-hIL-1R-I	0.4	40	16*
4	4-1	3-1	b-hIL-1R-I-Fc	1	40	10**
4	4-2	3-2	b-hIL-1R-I-Fc	0.05	40	10**
4	4-3	3-3	b-hIL-1R-I-Fc	0.2	40	16**
4	4-4	3-4	b-hIL-1R-I-Fc	0.2	40	36**
4	4-5	3-5	b-hIL-1R-I	1	40	10**
4	4-6	3-6	b-hIL-1R-I	0.1	40	10**
4	4-7	3-7	b-hIL-1R-I	0.4	40	30**
4	4-8	3-8	b-cIL-1R-I-Fc	12.5	40	8**
4	4-9	3-9	cIL-1R-I-Fc	50	40	8**
4	4-10	3-10	b-cIL-1R-I-Fc	50	40	6**
4	4-11	3-11	b-cIL-1R-I-Fc	10	40	12**
4	4-12	3-12	cIL-1R-I-Fc	50	40	6**
4	4-13	3-13	cIL-1R-I-Fc	10	40	12**
4	4-14	3-14	b-hIL-1R-I-Fc	0.1	40	20
4	4-15	3-15	b-hIL-1R-I	0.1	40	20
4	4-16	3-16	b-cIL-1R-I-Fc	5	40	16
4	4-17	3-17	b-hIL-1R-I	0.2	40	16
5	5-1	4-4x	b-hIL-1R-I-Fc	50	100	3
5	5-2	4-6x	b-hIL-1R-I	50	100	3

*第2の最終洗浄工程におけるhIL-1R-Iの添加。

**選択トラックを洗浄後に2つに分割した。一方を溶出前に週末にわたるさらなる洗浄に供した。

【0214】

第1の選択サイクルでは、9つの選択トラックを実施した；1-1～1-9。サイクル2では、いくつかのトラックを2、3、または6トラックに分割し、2トラックを1つのトラックにプールし、それにより、サイクル2、3、および4に合計で17の並行トラックが得られた；それぞれ、2-1～2-17、3-1～3-17、および4-1～4-17。サイクル5では、2トラックを実施した；5-1および5-2。それぞれ、選択トラック1-1～1-5ではZlib006IL-1RI. Iのバッチ1を使用し、1-6～

1-9ではバッチ2を使用した。全選択トラックを、表8に示す。選択のために使用したファージ粒子数は、典型的には、前のサイクルにおける溶出ファージ粒子数の2000倍であった。

【0215】

配列決定：異なる選択トラックのサイクル4または5由来の個別のクローンを、配列決定のために選定した。遺伝子断片の増幅および配列分析を、本質的に実施例1に記載のように行った。

【0216】

ELISAおよびBiacoreスクリーニングのためのZバリエーションの産生：培養体積が1.2mlであり、ペリプラズム抽出物を、凍結融解手順後に1.2μm 96ウェル濾板(MerckMilliporeカタログ番号MSANLY50)を使用した濾過によって清澄化したことを除いて、本質的に実施例1に記載のようにZバリエーションを産生した。BiacoreでスクリーニングしたZバリエーションを、HBS-E P緩衝液で5倍希釈した。

【0217】

ZバリエーションのELISAスクリーニング：Zバリエーションのヒトへの結合を、標的タンパク質として0.3nM hIL-1R-I-Fcを使用して、本質的に実施例1に記載のようにELISAで分析した。ブランクコントロールとして、PBST 0.05%をZ-ABDペリプラズム抽出物の代わりに添加した。

【0218】

ZバリエーションのEC₅₀分析：IL-1R-I結合Zバリエーションの選択物を、上記のELISAを使用したhIL-1R-I-Fcの希釈系列に対する応答の分析に供した。標的タンパク質hIL-1R-I-Fcを、100nMから0.01nMまで1:10にて段階的に希釈した。バックグラウンドコントロールとして、標的タンパク質を添加せずにZバリエーションをアッセイした。得られたデータを、GraphPad Prism 5および非線形回帰を使用して分析し、EC₅₀値(半数効果濃度)を計算した。Z12967(配列番号9)を有するペリプラズム抽出物を、シグナル比較のために並行して分析した。

【0219】

ZバリエーションのBiacoreスクリーニング：ZバリエーションのヒトIL-1R-Iへの結合を、Biacore T200装置を使用した動態スクリーニングで分析した。ポリクローナルヤギ抗ABD抗体(ヤギ抗ABD)を、基本的には実施例2における他のタンパク質について記載のように、CM5チップ表面上に固定した。動態スクリーニングのために、分析物を2つの工程で注入した。第1に、Z-ABD(ABD001、配列番号1660)ペリプラズム抽出物を、表面上に5μl/分で1分間注入した。第2の工程として、100nM hIL-1R-Iを30μl/分で2分間注入し、その後にランニング緩衝液HBS-E P中で2分間解離させた。グリシン-HCl(pH2.0)(カタログ番号BR100355、GE Healthcare)を、サイクル間の抗体表面の再生のために使用した。アッセイの温度は25℃であった。動態解析を実施するために、ヤギ抗ABDを含むがZ-ABD試料を含まない基準表面上に注入した100nM hIL-1R-I由来のシグナルを、hIL-1R-IへのZ-ABD結合のセンサーグラムから差し引いた。ラフスクリーニング親和性(K_D)を、BiaEvaluationソフトウェア4.1(GE Healthcare)の1:1結合モデルを使用して、基準から100nM hIL-1R-I応答を差し引いて計算した。Z12967のペリプラズム抽出物を、比較のためにスクリーニング分析に含めた。4つのZバリエーションのペリプラズム抽出物も、上記と同一の設定を使用するが、5つの濃度のhIL-1R-Iを注射し、且つ単一サイクル動態のために1:1モデルを使用してデータを評価する、単一サイクル動態(SCK)アッセイに供した。

【0220】

結果

10

20

30

40

50

I L - 1 R - I 結合 Z バリエントのファージディスプレイ選択：各クローンを、4 または 5 サイクルのヒトおよびカニクイザルの I L - 1 R - I に対するファージディスプレイ選択後に得た。

【0221】

配列決定：4 または 5 サイクルの選択後に得たクローンを配列決定した。各バリエントに固有の識別番号 ##### を与え、個別のバリエントを Z ##### と呼ぶ。58 アミノ酸残基長の Z バリエントのアミノ酸配列を、図 1 中および配列表中に配列番号 20 ~ 1209 として列挙する。推定 I L - 1 R - I 結合モチーフは、各配列中の残基 8 から残基 36 にわたる。これらの各 Z バリエント内で完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予想される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、残基 7 から残基 55 にわたる。1 つの配列決定した Z バリエント (Z 18557、配列番号 1205) において、バリン残基が 12 位に存在することが認められた。

10

【0222】

Z バリエントの E L I S A スクリーニング：4 または 5 サイクルの選択後に得たクローンを 96 ウェルプレート中に個別に産生し、E L I S A においてヒト I L - 1 R - I 結合活性についてスクリーニングした。アッセイした Z バリエントの 98 % が、ブランクコントロールの 2 倍または 0.3 nM h I L - 1 R - I - F c に対してより高い陽性シグナルを生じた。

【0223】

Z バリエントの $E C_{50}$ 分析： 0.99 AU ($16.5 \times$ ブランクコントロール) を超える結果を示す 115 の Z バリエントのサブセットを、h I L - 1 R - I - F c を使用した E L I S A 標的滴定に供した。得られた結果を $E C_{50}$ 値の計算のために使用した (表 9)。Z 12967 (配列番号 9) の結果は、 $2.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。

20

【0224】

【表 9】

表 9：ELISA 滴定分析からの EC₅₀ 値の計算。

Z バリ アント	配列 番号	EC ₅₀ (M)	Z バリ アント	配列 番号	EC ₅₀ (M)	Z バリ アント	配列 番号	EC ₅₀ (M)
Z15811	21	2.5×10^{-10}	Z16054	258	2.4×10^{-10}	Z16246	441	3.9×10^{-10}
Z15813	23	3.5×10^{-10}	Z16058	262	2.3×10^{-10}	Z16255	449	1.7×10^{-10}
Z15824	34	2.3×10^{-10}	Z16070	273	2.3×10^{-10}	Z16263	457	2.6×10^{-10}
Z15840	49	2.5×10^{-10}	Z16072	275	2.2×10^{-10}	Z16264	458	3.0×10^{-10}
Z15862	71	2.1×10^{-10}	Z16084	287	2.2×10^{-10}	Z16277	470	2.6×10^{-10}
Z15876	1206	4.2×10^{-10}	Z16089	291	2.4×10^{-10}	Z16301	494	2.2×10^{-10}
Z15886	94	2.6×10^{-10}	Z16092	293	2.4×10^{-10}	Z16302	495	2.8×10^{-10}
Z15897	105	2.5×10^{-10}	Z16093	294	2.1×10^{-10}	Z16305	498	2.2×10^{-10}
Z15923	131	2.4×10^{-10}	Z16097	298	2.0×10^{-10}	Z16312	504	2.4×10^{-10}
Z15927	135	2.2×10^{-10}	Z16102	302	2.8×10^{-10}	Z16319	511	3.0×10^{-10}
Z15929	137	2.4×10^{-10}	Z16106	306	2.3×10^{-10}	Z16321	513	2.7×10^{-10}
Z15932	1207	2.3×10^{-10}	Z16116	316	2.1×10^{-10}	Z16329	519	4.5×10^{-10}
Z15949	154	2.5×10^{-10}	Z16117	317	2.1×10^{-10}	Z16341	531	1.7×10^{-10}
Z15953	158	2.1×10^{-10}	Z16121	321	2.3×10^{-10}	Z16363	550	2.0×10^{-10}
Z15960	165	2.3×10^{-10}	Z16122	322	2.9×10^{-10}	Z16377	562	2.1×10^{-10}
Z15961	166	2.1×10^{-10}	Z16127	325	2.1×10^{-10}	Z16378	563	2.0×10^{-10}
Z15975	1209	2.4×10^{-10}	Z16135	333	2.5×10^{-10}	Z16388	573	2.9×10^{-10}
Z15978	182	4.8×10^{-10}	Z16141	339	2.8×10^{-10}	Z16405	590	3.6×10^{-10}
Z15987	191	2.3×10^{-10}	Z16143	341	2.1×10^{-10}	Z16678	853	2.4×10^{-10}
Z15996	200	2.5×10^{-10}	Z16155	351	2.9×10^{-10}	Z16681	856	2.3×10^{-10}
Z15997	201	2.5×10^{-10}	Z16156	352	2.4×10^{-10}	Z16688	863	2.7×10^{-10}

10

20

30

40

Z15999	203	2.4×10^{-10}	Z16161	357	2.5×10^{-10}	Z16749	921	2.7×10^{-10}
Z16000	204	2.4×10^{-10}	Z16162	358	2.7×10^{-10}	Z16771	943	2.4×10^{-10}
Z16003	207	2.8×10^{-10}	Z16163	359	1.7×10^{-10}	Z17244	1147	4.2×10^{-10}
Z16004	208	2.5×10^{-10}	Z16164	360	6.8×10^{-10}	Z17255	1158	2.5×10^{-10}
Z16007	211	2.2×10^{-10}	Z16165	361	2.2×10^{-10}	Z17257	1160	4.8×10^{-10}
Z16008	212	2.3×10^{-10}	Z16168	364	2.8×10^{-10}	Z17269	1171	2.7×10^{-10}
Z16011	215	2.2×10^{-10}	Z16169	365	1.8×10^{-10}	Z17270	1172	3.0×10^{-10}
Z16023	227	2.1×10^{-10}	Z16173	369	3.6×10^{-10}			
Z16034	238	2.3×10^{-10}	Z16178	374	2.4×10^{-10}	Z17274	1176	2.1×10^{-10}
Z16041	245	2.4×10^{-10}	Z16206	402	4.5×10^{-10}	Z17278	1180	2.7×10^{-10}
Z16042	246	2.4×10^{-10}	Z16207	403	2.2×10^{-10}	Z17279	1181	2.8×10^{-10}
Z16043	247	2.3×10^{-10}	Z16219	415	2.4×10^{-10}	Z17280	1182	2.2×10^{-10}
Z16046	250	2.7×10^{-10}	Z16234	429	5.4×10^{-10}	Z17288	1190	4.2×10^{-10}
Z16048	252	2.5×10^{-10}	Z16236	431	2.4×10^{-10}	Z17292	1194	2.0×10^{-10}
Z16049	253	2.4×10^{-10}	Z16241	436	4.9×10^{-10}	Z17296	1198	3.2×10^{-10}
Z16050	254	2.3×10^{-10}	Z16243	438	2.2×10^{-10}	Z17297	1199	2.4×10^{-10}
Z16051	255	2.5×10^{-10}	Z16245	440	2.2×10^{-10}	Z18557	1205	1.9×10^{-10}
Z16053	257	2.5×10^{-10}						

10

20

30

【0225】

平均して、このライブラリー（第1の成熟ライブラリー）に由来するZバリエントは、一次選択に由来するZバリエントの平均 EC_{50} と比較して EC_{50} 値が10倍改善された。

40

【0226】

ZバリエントのBiacoreスクリーニング：IL-1R-I結合Zバリエントの選択物を、Biacore動態スクリーニングに供した。単一濃度のhIL-1R-Iを、抗ABD抗体を含むセンサーチップ表面上のペリプラズム抽出物から捕捉した各Z-ABD上に注射した。スクリーニング親和性の計算値を、表10に示す。Z16062（配列番号266）では、アッセイした結合剤の最良の K_D 値（ $7.6 \times 10^{-9} M$ ）を得た。Z12967の K_D は $2.5 \times 10^{-8} M$ であった。SCK実験でアッセイした4つの結合剤は、その各スクリーニング動態親和性から0～14%逸脱した K_D 値を得た。

【0227】

50

【表 10】

表 10 : B i a c o r e 動態スクリーニングから計算した K_D 値。

Z バリ アント	配列番 号	K_D (M)	Z バリ アント	配列番 号	K_D (M)	Z バリ アント	配列番 号	K_D (M)
Z15824	34	9.2×10^{-9}	Z16019	223	1.5×10^{-8}	Z16042	246	9.7×10^{-9}
Z15840	49	1.1×10^{-8}	Z16020	224	2.0×10^{-8}	Z16043	247	8.3×10^{-9}
Z15864	73	1.6×10^{-8}	Z16021	225	9.6×10^{-9}	Z16044	248	1.7×10^{-8}
Z15873	82	2.3×10^{-8}	Z16022	226	1.5×10^{-8}	Z16045	249	2.0×10^{-8}
Z15876	1206	8.3×10^{-9}	Z16023	227	9.2×10^{-9}	Z16046	250	1.8×10^{-8}
Z15882	90	9.0×10^{-9}	Z16024	228	1.4×10^{-8}	Z16047	251	1.9×10^{-8}
Z15889	97	1.5×10^{-8}	Z16025	229	1.9×10^{-8}	Z16048	252	1.1×10^{-8}
Z15897	105	1.2×10^{-8}	Z16026	230	1.6×10^{-8}	Z16049	253	1.4×10^{-8}
Z15908	116	1.7×10^{-8}	Z16027	231	1.4×10^{-8}	Z16050	254	1.3×10^{-8}
Z15947	152	1.1×10^{-8}	Z16028	232	1.9×10^{-8}	Z16051	255	1.5×10^{-8}
Z15953	158	1.1×10^{-8}	Z16029	233	2.1×10^{-8}	Z16052	256	1.2×10^{-8}
Z15972	177	1.2×10^{-8}	Z16030	234	1.7×10^{-8}	Z16053	257	1.1×10^{-8}
Z15986	190	9.5×10^{-9}	Z16031	235	2.0×10^{-8}	Z16054	258	2.9×10^{-8}
Z16009	213	2.0×10^{-8}	Z16032	236	2.6×10^{-8}	Z16055	259	1.2×10^{-8}
Z16010	214	1.2×10^{-8}	Z16033	237	1.9×10^{-8}	Z16056	260	1.3×10^{-8}
Z16011	215	1.1×10^{-8}	Z16034	238	9.1×10^{-9}	Z16057	261	3.3×10^{-8}
Z16012	216	1.2×10^{-8}	Z16035	239	1.7×10^{-8}	Z16058	262	1.4×10^{-8}
Z16013	217	1.8×10^{-8}	Z16036	240	1.1×10^{-8}	Z16059	263	1.6×10^{-8}
Z16014	218	1.1×10^{-8}	Z16037	241	1.4×10^{-8}	Z16060	264	1.9×10^{-8}
Z16015	219	1.5×10^{-8}	Z16038	242	8.9×10^{-9}	Z16061	265	1.2×10^{-8}

10

20

30

40

Z16016	220	1.2×10^{-8}	Z16039	243	1.4×10^{-8}	Z16062	266	7.6×10^{-9}
Z16017	221	1.8×10^{-8}	Z16040	244	2.0×10^{-8}	Z16063	267	1.2×10^{-8}
Z16018	220	1.6×10^{-8}	Z16041	245	1.0×10^{-8}	Z16065	268	7.8×10^{-9}

【0228】

実施例 5

第1の成熟ライブラリー由来のIL-1R-I結合Zバリエントの産生および特徴づけ
この実施例は、His₆タグ化ZバリエントおよびABD融合Zバリエント（第1の成熟ライブラリーファージ選択に由来する）のサブクロニングおよび産生の一般的な手順、そのIL-1R-I結合の特徴づけ、遮断、および融点を記載する。

【0229】

材料と方法

His₆タグを有するZバリエントのサブクロニング：それぞれのZバリエントのDNAをファージライブラリーベクターpAY02592から増幅させ、本質的に実施例2に記載のように標準的な分子生物学技術を使用してN末端His₆タグを用いてサブクロニングした。

【0230】

ABDとの融合物中のZバリエントのサブクロニング：標準的な分子生物学技術を使用して、それぞれのZバリエントのN末端配列の1および2位をそれぞれアミノ酸残基AおよびEに変異させた。得られた新規のZバリエントを、ABDバリエントを含む発現ベクターにサブクローン化し、それにより、コード配列[Z#####]-ASGS-ABD（ABDバリエントはP013（配列番号1661）であった）を得た。Z#####は、個別の58アミノ酸残基長のZバリエントを指す。

【0231】

培養：E. coli T7E2細胞（GeneBridges）を、それぞれのIL-1R-I結合Zバリエントの遺伝子フラグメントを含むプラスミドで形質転換した。得られた組換え株を、EnPressoプロトコル（BioSilta）を使用して、50mlのスケールで50μg/mlカナマイシンを補足した培地中にて30℃で培養した。タンパク質発現を誘導するために、IPTGを、OD₆₀₀約1.0での最終濃度0.2mMまで添加した。誘導後、培養物を16時間インキュベートした。細胞を遠心分離によって回収した。

【0232】

His₆タグを有するIL-1R-I結合Zバリエントの精製：本質的に実施例2に記載されているが、大多数の試料についてIMAC精製工程とRPC精製工程との間の緩衝液の交換を行わずに精製した。RPC精製中、RPC溶媒Aを0.1%TFAの100%水溶液に変更し、直線勾配は18mlで0-60%RPC溶媒Bであった。

【0233】

ABDと融合したIL-1R-I結合Zバリエントの精製：およそ2gの各細胞ペレットを、Benzonase（登録商標）（Merck）を補足したTST緩衝液（25mM Tris-HCl、1mM EDTA、200mM NaCl、0.05%Tween 20、pH 8.0）に再懸濁した。細胞破壊および遠心分離による清澄化後、各上清を、抗ABDリガンド（自家製）で固定した1mlアガロースを使用した重力流カラムに適用した。TST緩衝液および5mM NH₄Ac（pH 5.5）緩衝液での洗浄後、ABD融合Zバリエントを、0.1M HAcで溶出した。溶出物を含む緩衝液を、PD-10脱塩カラム（GE Healthcare）を使用してPBS（2.68mM KCl、137mM NaCl、1.47mM KH₂PO₄、8.1mM Na₂HPO₄、

10

20

30

40

50

pH 7.4)と交換した。

【0234】

NanoDrop (登録商標) ND-1000 分光光度計 (Saveen Werner AB) およびそれぞれのタンパク質の減衰係数を使用した 280nm での吸光度の測定によってタンパク質濃度を決定した。純度を、クーマシー・ブルーで染色する SDS-PAGE によって分析し、各精製 Z バリエーションの同一性を、LC/MS 分析を使用して確認した。

【0235】

Biacore 動態解析: His₆ タグ化 Z バリエーションに対するヒトおよびカニクイザルの IL-1R-I の速度定数 (k_{on} および k_{off}) および親和性 (K_D) を、Biacore 2000 装置 (GE Healthcare) を使用して決定した。100、10、および 1nM の Z バリエーションを使用して、本質的に実施例 2 に記載のように実験を行った。分析物の注入時間は 3 分間であり、その後 15 分間解離し、0.5M NaCl を補足した 2×5s グリシン (pH 3.0) (GE Healthcare、カタログ番号 BR100357) を、サイクル間の表面の再生のために使用した。BiaEvaluation ソフトウェア 4.1 (GE Healthcare) において 1:1 結合モデルを使用して、得られた 2 つまたは 3 つの濃度のそれぞれの Z バリエーションのセンサーグラムから速度定数を計算した。His₆ タグ化 Z 12967 を、比較のためにアッセイに含めた。

【0236】

in vitro IL-1 β 中和アッセイ: His₆ タグ化 IL-1R-I 特異的 Z バリエーションを、TF-1 細胞アッセイにおいてその阻害能力について試験した。実施例 2 に記載のようにアッセイを実施した。細胞成長に関するデータを、4 パラメーター用量-反応曲線に対する非線形回帰によって評価し、IC₅₀ 値を、GraphPad Prism プログラムを使用して決定した。His₆ タグ化 Z 12967 を、比較のために含めた。

【0237】

円二色性 (CD) 分光分析: CD を、実施例 2 に記載のように His₆ タグ化 Z バリエーションについて分析した。

【0238】

結果

His₆ タグでのサブクローニング: Z バリエーションを、N 末端 His₆ を有する構築物にサブクローニングした。

【0239】

His₆ タグ化 Z バリエーションの産生: His₆ タグを有する IL-1R-I 結合 Z バリエーションは、E. coli 内で可溶性遺伝子産物として発現された。タンパク質の精製量を、280nm での吸光度の測定によって分光高度的に決定し、およそ 1~7mg タンパク質/g ペレットの範囲であった。各最終タンパク質調製物の SDS-PAGE 分析では、これらが主に IL-1R-I 結合 Z バリエーションを含むことを示していた。各 Z バリエーションの正確な同一性および分子量は、HPLC-MS 分析によって確認された。

【0240】

Biacore 動態解析: His₆ タグ化 IL-1R-I 結合 Z バリエーションのヒトおよびカニクイザルの IL-1R-I との相互作用を、Biacore 装置における固定化 IL-1R-I を含む表面上への種々の濃度の Z バリエーションの注入によって解析した。ヒト IL-1R-I 結合についての動態パラメーター (K_D 、 k_{on} 、および k_{off}) の計算値の概略を、表 11 に示す。ヒト IL-1R-I への最強の結合剤である Z 18557 (配列番号 1205) の K_D は、ヒト IL-1R-I に対して 1.5×10^{-10} 、カニクイザル IL-1R-I に対して 7.6×10^{-9} M であった。ヒト IL-1R-I に対する Z 12967 の K_D は、 5.1×10^{-10} M であった。

【0241】

【表 1 1】

表 1 1. ヒト IL-1R-I への His₆-Z ポリペプチド結合についての動態パラメーターおよび親和性。

Z バリアント	配列番号	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Z15862	71	2.8×10^6	1.9×10^{-3}	6.7×10^{-10}
Z15876	1206	2.1×10^6	1.3×10^{-3}	6.2×10^{-10}
Z15927	135	2.4×10^6	1.2×10^{-3}	5.1×10^{-10}
Z15953	158	6.0×10^6	1.5×10^{-3}	2.4×10^{-10}
Z15961	166	4.3×10^6	2.0×10^{-3}	4.6×10^{-10}
Z16007	211	2.3×10^6	2.1×10^{-3}	9.2×10^{-10}
Z16023	227	5.3×10^6	1.5×10^{-3}	2.9×10^{-10}
Z16043	247	2.5×10^6	1.1×10^{-3}	4.4×10^{-10}
Z16062	266	2.6×10^6	1.1×10^{-3}	4.4×10^{-10}
Z16065	268	6.9×10^6	1.3×10^{-3}	1.9×10^{-10}
Z16072	275	4.6×10^6	2.2×10^{-3}	4.7×10^{-10}
Z16093	294	5.6×10^6	1.4×10^{-3}	2.5×10^{-10}
Z16097	298	3.1×10^6	1.5×10^{-3}	4.8×10^{-10}
Z16116	316	2.6×10^6	2.3×10^{-3}	8.8×10^{-10}
Z16117	317	4.0×10^6	2.7×10^{-3}	6.9×10^{-10}
Z16127	325	6.7×10^6	1.9×10^{-3}	2.9×10^{-10}
Z16143	341	3.1×10^6	1.6×10^{-3}	5.3×10^{-10}
Z16163	359	3.5×10^6	2.0×10^{-3}	5.5×10^{-10}
Z16165	361	2.1×10^6	3.6×10^{-3}	1.7×10^{-9}
Z16169	365	2.6×10^6	1.0×10^{-3}	3.9×10^{-10}
Z16219	415	2.5×10^6	5.6×10^{-3}	2.2×10^{-9}
Z16245	440	2.7×10^6	3.1×10^{-3}	1.2×10^{-9}
Z16255	449	3.0×10^6	3.1×10^{-3}	1.0×10^{-9}
Z16301	494	3.1×10^6	2.1×10^{-3}	6.6×10^{-10}
Z16341	531	3.0×10^6	1.6×10^{-3}	5.2×10^{-10}
Z16363	550	3.2×10^6	1.8×10^{-3}	5.7×10^{-10}
Z16377	562	2.1×10^6	1.1×10^{-3}	5.4×10^{-10}
Z16378	563	6.6×10^6	3.6×10^{-3}	5.5×10^{-10}
Z16681	856	3.6×10^6	5.0×10^{-3}	1.4×10^{-9}
Z17274	1176	1.1×10^7	2.4×10^{-3}	2.2×10^{-10}
Z17280	1182	2.4×10^6	5.3×10^{-3}	2.2×10^{-9}
Z17292	1194	1.3×10^7	5.0×10^{-3}	3.8×10^{-10}
Z18557	1205	4.4×10^6	6.7×10^{-4}	1.5×10^{-10}

【0 2 4 2】

in vitro IL-1 β 中和アッセイ: His₆ タグ化 IL-1R-I 結合 Z バリアントの IL-1 β 阻害能を、TF-1 細胞アッセイで分析した。得られた IC₅₀ 値を表 1 2 に示す。Z 1 8 5 5 7 (配列番号 1 2 0 5) は最高の阻害能を示し、IC₅₀ 値は 0.5 nM 未満であった。Z 1 2 9 6 7 の IC₅₀ は 5.2 nM であった。

【0 2 4 3】

【表 1 2】

表 1 2 : T F - 1 細胞アッセイ由来の H i s ₆ - Z ポリペプチドについての I C ₅₀ 値。

Z バリア ント	配列番号	I C ₅₀ (nM)	Z バリア ント	配列番号	I C ₅₀ (nM)
Z15862	71	6.6	Z16163	359	1.8
Z15876	1206	2.4	Z16165	361	11.5
Z15927	135	2.5	Z16169	365	0.76
Z15953	158	3.7	Z16219	415	24.2
Z15961	166	2.9	Z16245	440	8.2
Z16007	211	5.9	Z16255	449	8.5
Z16023	227	3.8	Z16301	494	4.5
Z16043	247	2.5	Z16341	531	3.9
Z16062	266	1.8	Z16363	550	8.1
Z16065	268	1.7	Z16377	562	3.1
Z16072	275	4.3	Z16378	586	32.7
Z16093	294	3.3	Z16681	856	20.1
Z16097	298	3.4	Z17274	1176	4.6
Z16116	316	4.1	Z17280	1182	5.4
Z16117	317	8.5	Z17292	1194	13.2
Z16127	325	4.1	Z18557	1205	<0.5
Z16143	341	4.8			

10

20

【0 2 4 4】

C D 分析 : H i s ₆ タグを有する I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションについて決定された C D スペクトルは、各々が 2 0 ° C で α - ヘリックス構造を有することを示していた。この結果は、融解温度を決定した可変温度測定においても立証された (表 1 3) 。 9 0 ° C への加熱前後に測定したスペクトルを重ね合わせたときに全ての I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションについて可逆的折りたたみが認められた。

【0 2 4 5】

【表 1 3】

30

表 1 3 : 融解温度 (T m) 。

Z バリア ント	配列番号	T m (° C)	Z バリア ント	配列番号	T m (° C)
Z15876	1206	55	Z16117	317	63
Z15927	135	56	Z16127	325	59
Z15953	158	56	Z16163	359	57
Z15961	166	59	Z16169	365	48
Z16023	227	60	Z16245	440	63
Z16043	247	54	Z16341	531	59
Z16062	266	54	Z16377	562	52
Z16065	268	59	Z16681	856	68
Z16093	294	52	Z17280	1182	62
Z16097	298	56	Z18557	1205	60
Z16116	316	59			

40

【0 2 4 6】

実施例 6

I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションの 2 つの第 2 の成熟ライブラリーの設計および構築

この実施例では、2 つの第 2 の成熟ライブラリーを構築した。ライブラリーを、さらな

50

る I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションの選択のために使用した。

【0247】

材料と方法

ライブラリーの設計：ライブラリーは、主に、実施例 4 および 5 に記載のヒト I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションの配列に基づいた。名称が Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I および Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I である新規のライブラリーでは、主に第 1 の成熟ライブラリーからの選択に由来する主に Z バリエーション（配列番号 1 9 ~ 1 2 0 9）に基づいたストラテジーにしたがって、それぞれ、Z 分子足場中の 1 0 の変動可能な位置が一定のアミノ酸残基に偏っており、3 つの位置が一定に保持されていた。さらに、両方のライブラリーでは、変動させるために新規のアミノ酸位置（5 8 a a Z バリエーション配列の 1 2 位）を含め、それにより、合計 1 1 の可変位置を得た。実施例 5 で特徴づけた Z 1 8 5 5 7（配列番号 1 2 0 5）の 1 2 位はバリンであった。このライブラリー設計により、1 2 位にアミノ酸 A、V、および I を得た。

10

【0248】

Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I について、DNA リンカーを、DNA 2 . 0 (M e n l o P a r k、C A、U S A) から取り寄せた以下の配列を含むスプリットプール合成を使用して生成した：5' - A A A T A A A T C T C G A G G T A G A T G C C A A A T A C G C C A A A G A A N N N N N N N N N N N N N N G A G A T C N N N N N N C T G C C T A A C C T C A C C N N N N N N C A A N N N N N N G C C T T C A T C N N N A A A T T A N N N G A T G A C C C A A G C C A G A G C T C A T T A T T T A - 3'（配列番号 1 6 8 1、設計されたコドンを N N N と表示する）。新規のライブラリーの各アミノ酸残基（Z 分子足場中の 1 1 の可変アミノ酸位置（9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 7、1 8、2 5、2 8、および 3 5）および 3 つの一定のアミノ酸位置（2 4、2 7、および 3 2）が含まれる）の設計を、表 1 4 に示す。得られた理論上のライブラリーサイズは、 2.2×10^7 バリエーションであった。選択したアミノ酸の一部の分布率が高い 1 0、1 1、1 2、1 3、1 7、2 8、および 3 5 位を除いて、異なるアミノ酸の理論上の均等分布を各アミノ酸位置内に適用した。

20

【0249】

Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I について、ライブラリーを、T R I M テクノロジーを使用して実施例 3 に記載の Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I と同様に構築した。DNA 配列 5' - A A A T A A A T C T C G A G G T A G A T G C C A A A T A C G C C A A A G A A N N N N N N N N N N N N N N G A G A T C N N N N N N C T G C C T A A C C T C A C C N N N N N N C A A N N N N N N G C C T T C A T C N N N A A A T T A N N N G A T G A C C C A A G C C A G A G C T C A T T A T T T A - 3'（配列番号 1 6 8 2、設計されたコドンを N N N と表示する）を、E l l a B i o t e c h (M a r t i n s r i e d, G e r m a n y) から取り寄せた。新規のライブラリーの各アミノ酸残基（Z 分子足場中の 1 1 の可変アミノ酸位置（9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 7、1 8、2 5、3 2、および 3 5）および 3 つの一定のアミノ酸位置（2 4、2 7、および 2 8）が含まれる）の設計を、表 1 5 に示す。得られた理論上のライブラリーサイズは、 1.0×10^8 バリエーションであった。選択したアミノ酸の一部の分布率が高い 1 0、1 1、1 2、3 2、および 3 5 位を除いて、異なるアミノ酸の理論上の均等分布を各アミノ酸位置内に適用した。

30

40

【0250】

【表 14】

表 14 : Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I ライブラリーの設計 (第 2 の成熟)。

Zバリエーション分子内のアミノ酸位置	アミノ酸無作為化 (不均等分布の場合の百分率)	異なるアミノ酸の数
9	A,E,I,L,T,V	6
10	E(50%),I,L,R,V,Y	6
11	A,E(27%),I,K,Q,R,T,V,Y	9
12	A(50%),I,V	3
13	A,I,L,Q(50%),V,Y	6
14	F,M,Q,W,Y	5
17	F(70%),Y(30%)	2
18	A,D,E,F,G,H,I,K,L,Q,R,S,T,V,W,Y	16
24	R	1
25	K,R	2
27	Y	1
28	I,T(71.4%),V	3
32	R	1
35	F(25%),I(12.5%),L(50%),Y(12.5%)	4

【0251】

【表 15】

表 15 : Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I ライブラリーの設計 (第 2 の成熟)。

Zバリエーション分子内のアミノ酸位置	アミノ酸無作為化 (不均等分布の場合の百分率)	異なるアミノ酸の数
9	A,E,I,L,T,V	6
10	E(60%),I,V	3
11	A,D,E(15%),F,H,I,K,L,Q,R,S,T,V,W,Y	15
12	A(50%),I(20%), V(30%)	3
13	A,E,F,H,I,K,L,Q,R,S,T,V,W,Y	14
14	A,E,F,H,I,K,L,Q,R,S,T,V,W,Y	14
17	F,I,L,W,Y	5
18	A,D,E,F,G,H,I,K,L,Q,R,S,T,V,W,Y	16
24	R	1
25	K,R	2
27	Y	1
28	T	1
32	I(10%),R(90%)	2
35	F(30%),L(70%)	2

【0252】

ライブラリーの構築およびファージストックの調製 : Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I および Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I を、WO2016/113246号 (実施例 4) および実施例 3 にそれぞれ記載のように構築した。両方のライブラリーについて、E . c o l i X L - 1 B l u e を、ライブラリー形質転換に使用した。ライブラリー設計と比較した構築ライブラリーの内容を検証し、その結果を評価するために、Zバリエーションのライブラリー由来のクローンを、(実施例 3 に記載のように) 配列決定した。

【0253】

ファージミドライブラリーを含むファージストックを、浸透フラスコ中に調製した。フ

ファージミドライブラリーを含むグリセロールストック由来の細胞を、本質的に実施例 3 の Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I バッチ 2 について記載のように、それぞれ 0 . 5 l または 1 l の T S B - Y E 培地に播種した。培養物を、OD₆₀₀ 0 . 8 ~ 0 . 9 で 1 0 ~ 2 0 倍モル過剰の M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージを使用して感染させた。ファージストックを、実施例 3 に記載のように調製した。

【0254】

結果

ライブラリーの構築：新規のライブラリーを、検証された結合特性（実施例 4 および 5）を有する Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I から選択された一連の I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションに基づいて設計した。Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I および Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I の理論上のサイズは、それぞれ、 2.2×10^7 バリエーションおよび 1.0×10^8 Z バリエーションであった。E . c o l i X L - 1 B l u e 細胞の形質転換後の滴定によって決定された実際のライブラリーサイズは、それぞれ、 1.2×10^9 形質転換体および 7.0×10^9 形質転換体であった。

10

【0255】

それぞれ Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I および Z l i b 0 0 6 I L - 1 R I . I I I 由来の 192 および 96 の形質転換体の配列決定およびその実際の配列と理論上の設計との比較によってライブラリーの質を試験した。設計したライブラリーと比較した実際のライブラリーの内容は、満足なものであることが示された。したがって、I L - 1 R - I への潜在的な結合剤の 2 つの成熟ライブラリーが首尾よく構築された。

20

【0256】

実施例 7

第 2 の成熟ライブラリーからの Z バリエーションの選択

この実施形態では、ヒトおよびカニクイザルの I L - 1 R - I を、Z バリエーションの 2 つの第 2 の成熟ファージライブラリーを使用したファージディスプレイ選択での標的タンパク質として使用した。

【0257】

材料と方法

I L - 1 R - I 結合 Z バリエーションのファージディスプレイ選択：ビオチン化ヒト標的タンパク質 b - h I L - 1 R - I - F c および b - h I L - 1 R - I 、ならびにカニクイザル標的タンパク質 b - c I L - 1 R - I - F c を、実施例 6 に記載の Z バリエーション分子の新規のライブラリーを使用したファージ選択で使用した。並行選択トラックならびに標的濃度の低下および洗浄数の増加によって得た選択サイクルにおけるストリンジェンシーの全体的な増加を記載している選択ストラテジーの概要を、表 16 に示す。

30

【0258】

【表 16】

表 16：2つの第2の成熟ライブラリーからの選択の概要。

サイ クル	選 択 ト ラ ッ ク	ライブラリー由 来のファージス トックまたは選 択トラック	標 的	標 的 濃 度 (nM)	選 択 時 間 (分)	洗 浄 数
1	1-1	Zlib006IL-1RI.I I	b-hIL-1R-I-F c	10	45	5
1	1-2	Zlib006IL-1RI.I I	b-hIL-1R-I	10	45	5
1	1-3	Zlib006IL-1RI.I I	b-cIL-1R-I-F c	25	45	3
1	1-4	Zlib006IL-1RI.I II	b-hIL-1R-I-F c	20	45	5
1	1-5	Zlib006IL-1RI.I II	b-hIL-1R-I	20	45	5
1	1-6	Zlib006IL-1RI.I II	b-cIL-1R-I-F c	50	45	3
1	1-7	Zlib006IL-1RI.I I	b-hIL-1R-I-F c	10	45	5
1	1-8	Zlib006IL-1RI.I I	b-hIL-1R-I	10	45	5
1	1-9	Zlib006IL-1RI.I I	b-cIL-1R-I-F c	25	45	3
1	1-10	Zlib006IL-1RI.I II	b-hIL-1R-I-F c	20	45	5
1	1-11	Zlib006IL-1RI.I II	b-hIL-1R-I	20	45	5
1	1-12	Zlib006IL-1RI.I II	b-cIL-1R-I-F c	50	45	3
2	2-1	1-1	b-hIL-1R-I-F c	1	30	10*
2	2-2	1-2	b-hIL-1R-I	2	30	10
2	2-3	1-2	b-hIL-1R-I	1	30	10
2	2-4	1-2	b-hIL-1R-I	1	30	10*
2	2-5	1-3	b-hIL-1R-I	10	30	8
2	2-6	1-4	b-hIL-1R-I-F c	4	30	8
2	2-7	1-5	b-hIL-1R-I	4	30	8
2	2-8	1-5	b-hIL-1R-I	2	30	10
2	2-9	1-5	b-hIL-1R-I	2	30	10*
2	2-10	1-6	b-hIL-1R-I	20	30	6
2	2-11	1-7/1-8/1-9 プ ール	b-hIL-1R-I	1	30	10*

10

20

30

40

2	2-12	1-10/1-11/1-12 プー ル	b-hIL-1R-I	2	30	10*
3	3-1	2-1	b-hIL-1R-I-F c	0.4	40	16*
3	3-2	2-2	b-hIL-1R-I	0.4	40	15
3	3-3	2-3	b-hIL-1R-I	0.1	40	20
3	3-4	2-4	b-hIL-1R-I	0.1	40	16*
3	3-5	2-5	b-cIL-1R-I-F c	5	40	12
3	3-6	2-6	b-hIL-1R-I-F c	0.8	40	12
3	3-7	2-7	b-hIL-1R-I	0.8	40	12
3	3-8	2-8	b-hIL-1R-I	0.2	40	20
3	3-9	2-9	b-hIL-1R-I	0.2	40	16*
3	3-10	2-10	b-cIL-1R-I-F c	10	40	9
3	3-11	2-11	b-hIL-1R-I	0.4	40	16*
3	3-12	2-12	b-hIL-1R-I	0.4	40	16*
4	4-1	3-1	b-hIL-1R-I-F c	0.125	40	20**
4	4-2	3-2	b-hIL-1R-I	0.125	40	20
4	4-3	3-3	b-hIL-1R-I	0.05	40	30
4	4-4	3-4	b-hIL-1R-I	0.05	40	20**
4	4-5	3-5	b-hIL-1R-I	1	40	16
4	4-6	3-6	b-hIL-1R-I-F c	0.16	40	16**
4	4-7	3-7	b-hIL-1R-I	0.16	40	16
4	4-8	3-8	b-hIL-1R-I	0.1	40	30
4	4-9	3-9	b-hIL-1R-I	0.1	40	20**
4	4-10	3-10	b-hIL-1R-I	2	40	16
4	4-11	3-11	b-hIL-1R-I	0.2	40	16
4	4-12	3-12	b-hIL-1R-I	0.2	40	16

*第2の最終洗浄工程におけるh I L - 1 R - Iの添加。

**選択トラックを、第2の最終洗浄工程前に2つに分割した。一部をh I L - 1 R - Iの存在下での一晚の洗浄に供し、一部をP B S Tでの1時間の洗浄に供した。

【0259】

以下の1～3を例外として、本質的に実施例4に記載のように4サイクルで選択した。
 例外1：S Aビーズ（b-h I L - 1 R - Iトラック）またはF c / S Aビーズ（b - I L - 1 R I - F cトラック）とのファージストックのインキュベーションによって、R Tで60分を超えて選択ラウンド1および2において事前選択を行った。例外2：それぞれトラック2-1、2-4、2-9、2-11、2-12、3-1、3-4、3-9、3-11、および3-12の第2の最終洗浄工程において、h I L - 1 R - Iをそれぞれのトラックの標的濃度より100倍の濃度で洗浄緩衝液に添加し、15～20分間洗浄した。例外3：第4の選択ラウンドでは、トラック4-1、4-4、および4-6を、第2の最終洗浄工程前に2つに分割した。一方については、h I L - 1 R - Iをそれぞれのトラックの標的濃度より100倍の濃度で洗浄緩衝液に添加し、第2の最終洗浄を一晚行った。他方については、第2の最終洗浄に1時間のP B S Tでの洗浄を適用した。

【0260】

第1の選択サイクルでは、以下の12の選択トラックを実施した；1-1～1-12。

10

20

30

40

50

サイクル2では、2つのトラックを3つに分割し、6つのトラックを2つのトラックにプールし、それにより、サイクル2、3、および4において合計で以下の12の並行トラックを得た；それぞれ、2-1~2-12、3-1~3-12、および4-1~4-12。全選択トラックを、表16に示す。選択のために使用したファージ粒子数は、典型的には、前のサイクルにおける溶出ファージ粒子数の2000倍であった。

【0261】

結果

IL-1R-I結合Zバリエントのファージディスプレイ選択：ヒトおよびカニクイザルのIL-1R-Iに対する4サイクルのファージディスプレイ選択後に、個別のクローンを得た。

【0262】

実施例8

第1および第2の成熟ライブラリーからのZバリエントのスクリーニング

この実施例では、実施例4および実施例7由来の選択クローンのDNAを配列決定し、ZバリエントをE. coliペリプラズム画分中に産生し、ELISAおよびBiacoreにおいてIL-1R-Iに対してアッセイした。

【0263】

材料と方法

潜在的な結合剤の配列決定：3つの成熟ライブラリーZlib006IL-1RI. I、Zlib006IL-1RI. II、およびZlib006IL-1RI. IIIを使用した選択のサイクル4由来の個別のクローンを、配列決定のために選定した。遺伝子断片の増幅および配列分析を、本質的に実施例1に記載のように行った。

【0264】

ELISAおよびBiacoreスクリーニングのためのZバリエントの産生：熱処理（82℃、20分間）の後に濾過によって清澄化することによってペリプラズム抽出物を調製することを除いて、Zバリエントを本質的に実施例4に記載のようにな産生した。BiacoreでスクリーニングしたZバリエントを、HBS-E緩衝液で5倍希釈した。

【0265】

ZバリエントのELISAスクリーニング：ZバリエントのヒトIL-1R-Iへの結合を、標的タンパク質として0.2nM hIL-1R-I-Fcを使用して、本質的に実施例1に記載のようになELISAで分析した。ネガティブコントロールとして、ABD001のペリプラズム抽出物を使用した。

【0266】

ZバリエントのEC₅₀分析：IL-1R-I結合の選択を、上記のELISAを使用したhIL-1R-I-Fcの希釈系列に対する応答の分析に供した。標的タンパク質hIL-1R-I-Fcを、20から0.002nMまで1:10にて段階的に希釈した。バックグラウンドコントロールとして、標的タンパク質を添加せずにZバリエントをアッセイした。得られたデータを、GraphPad Prism5および非線形回帰を使用して分析し、EC₅₀値（半数効果濃度）を計算した。Z12967、Z16065、およびZ16218（それぞれ、配列番号9、268、および414に対応する）を有するペリプラズム抽出物を、シグナル比較のために並行して分析した。ネガティブコントロールとして、ABD001のペリプラズム抽出物を使用した。

【0267】

ZバリエントのBiacoreスクリーニング：ZバリエントのヒトIL-1R-Iへの結合を、Z-ABD（ABD001、配列番号1660）ペリプラズム抽出物を2分間注入することを除いて本質的に実施例4に記載のようになBiacore2000装置を使用した動態スクリーニングで分析した。Z12967、Z16065、およびZ16218のペリプラズム抽出物を、比較のためにスクリーニング分析に二連で含めた。ABD（ABD001、配列番号1660）を有するペリプラズム抽出物を、ネガティブコントロールとして含めた。

10

20

30

40

50

【0268】

結果

配列決定：4サイクルの選択後に得たクローンを配列決定した。各バリエーションに固有の識別番号#####を与え、個別のバリエーションをZ#####と呼ぶ。58アミノ酸残基長のZバリエーションのアミノ酸配列を、図1中および配列表中に配列番号1210～1632として列挙する。推定IL-1R-I結合モチーフは、各配列中の残基8から残基36にわたる。これらの各Zバリエーション内で完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予想される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、残基7から残基55にわたる。

【0269】

10

ZバリエーションのELISAスクリーニング：4サイクルの選択後に得たクローンを96ウェルプレート中に個別に産生し、ELISAにおいてヒトIL-1R-I結合活性についてスクリーニングした。アッセイしたZバリエーションの99.5%が、ブランクコントロールの2倍または0.2nM hIL-1R-I-Fcに対してより高い陽性シグナルを生じた。

【0270】

ZバリエーションのEC₅₀分析：0.74AU（8.2×ブランクコントロール）を超える結果を示す102のZバリエーションのサブセットを、hIL-1R-I-Fcを使用したELISA標的滴定に供した。得られた結果をEC₅₀値の計算のために使用した（表17）。Z12967、Z16065、およびZ16218の結果は、それぞれ、2.6×10⁻¹⁰、2.1×10⁻¹⁰、および2.2×10⁻¹⁰Mであった。

20

【0271】

【表 17】

表 17 : E L I S A 滴定分析からの EC_{50} 値の計算。

Z バリ アント	配列 番号	EC_{50} (M)	Z バリ アント	配列 番号	EC_{50} (M)	Z バリ アント	配列 番号	EC_{50} (M)
Z15840	49	2.3×10^{-1} 0	Z1881	1	2.8×10^{-10}	Z1892	0	2.4×10^{-1} 0
Z15862	71	2.5×10^{-1} 0	Z1881	3	2.0×10^{-10}	Z1896	6	2.5×10^{-1} 0
Z15876	1206	1.9×10^{-1} 0	Z1881	4	2.7×10^{-10}	Z1896	7	3.1×10^{-1} 0
Z15934	1208	1.7×10^{-1} 0	Z1881	9	2.9×10^{-10}	Z1896	8	2.0×10^{-1} 0
Z15945	150	2.3×10^{-1} 0	Z1882	0	3.3×10^{-10}	Z1897	1	3.5×10^{-1} 0
Z15975	1209	1.9×10^{-1} 0	Z1882	4	2.8×10^{-10}	Z1898	2	2.5×10^{-1} 0
Z16062	266	2.1×10^{-1} 0	Z1882	5	3.5×10^{-10}	Z1901	2	2.4×10^{-1} 0
Z16183	379	2.3×10^{-1} 0	Z1882	6	2.4×10^{-10}	Z1905	3	2.4×10^{-1} 0
Z16208	404	2.2×10^{-1} 0	Z1882	7	2.4×10^{-10}	Z1905	4	2.5×10^{-1} 0
Z16603	782	2.2×10^{-1} 0	Z1883	1	2.9×10^{-10}	Z1905	6	2.2×10^{-1} 0
Z16606	785	2.3×10^{-1} 0	Z1883	2	1.5×10^{-10}	Z1905	7	2.2×10^{-1} 0
Z18754	1252	3.5×10^{-1} 0	Z1883	4	2.5×10^{-10}	Z1905	9	3.5×10^{-1} 0
Z18757	1321	3.0×10^{-1} 0	Z1883	6	2.3×10^{-10}	Z1906	0	2.2×10^{-1} 0
Z18758	1281	2.4×10^{-1} 0	Z1883	8	2.4×10^{-10}	Z1907	2	1.6×10^{-1} 0
Z18759	1314	2.4×10^{-1} 0	Z1884	3	2.8×10^{-10}	Z1907	5	1.5×10^{-1} 0
Z18760	1435	1.7×10^{-1} 0	Z1884	6	1.9×10^{-10}	Z1907	8	2.2×10^{-1} 0
Z18763	1431	2.6×10^{-1} 0	Z1886	6	3.1×10^{-10}	Z1908	5	2.1×10^{-1} 0
Z18766	1274	3.3×10^{-1} 0	Z1887	4	2.2×10^{-10}	Z1909	0	2.0×10^{-1} 0
Z18769	1339	2.9×10^{-1} 0	Z1887	5	2.9×10^{-10}	Z1911	5	2.3×10^{-1} 0
Z18770	1284	2.8×10^{-1} 0	Z1887	7	3.5×10^{-10}	Z1911	7	2.1×10^{-1} 0
Z18771	1341	2.5×10^{-1} 0	Z1887	8	3.7×10^{-10}	Z1911	8	2.3×10^{-1} 0

10

20

30

40

Z18774	1389	2.6×10^{-1} 0	Z1887	9	3.4×10^{-10}	Z1912	3	2.6×10^{-1} 0
Z18776	1418	2.2×10^{-1} 0	Z1888	1	2.8×10^{-10}	Z1915	1	2.3×10^{-1} 0
Z18777	1326	2.6×10^{-1} 0	Z1888	2	3.1×10^{-10}	Z1915	8	1.5×10^{-1} 0
Z18785	1323	2.5×10^{-1} 0	Z1888	4	2.3×10^{-10}	Z1915	9	2.1×10^{-1} 0
Z18786	1320	2.4×10^{-1} 0	Z1888	6	2.9×10^{-10}	Z1917	1	2.3×10^{-1} 0
Z18790	1439	2.6×10^{-1} 0	Z1888	7	2.1×10^{-10}	Z1917	2	1.6×10^{-1} 0
Z18799	1423	2.3×10^{-1} 0	Z1888	8	2.3×10^{-10}	Z1918	0	2.0×10^{-1} 0
Z18803	1327	2.5×10^{-1} 0	Z1888	9	2.4×10^{-10}	Z1918	1	1.8×10^{-1} 0
Z18804	1329	2.7×10^{-1} 0	Z1889	0	2.5×10^{-10}	Z1918	2	1.7×10^{-1} 0
Z18805	1437	2.7×10^{-1} 0	Z1890	4	3.8×10^{-10}	Z1918	3	2.2×10^{-1} 0
Z18806	1271	2.7×10^{-1} 0	Z1890	8	2.4×10^{-10}	Z1930	2	2.6×10^{-1} 0
Z18808	1342	4.0×10^{-1} 0	Z1891	2	1.4×10^{-10}	Z1930	4	2.7×10^{-1} 0
Z18810	1278	2.9×10^{-1} 0	Z1891	7	2.2×10^{-10}	Z1930	5	2.6×10^{-1} 0

10

20

【0272】

ZバリエントのBiacoreスクリーニング：188のIL-1R-I結合Zバリエントのサブセットを、Biacore動態スクリーニングに供した。単一濃度のhIL-1R-Iを、抗ABD抗体を含むセンサーチップ表面上のペリプラズム抽出物から捕捉した各Z-ABD上に注射した。スクリーニング親和性の計算値を、表18に示す。Z12967、Z16065、およびZ16218の K_D 値は、それぞれ、 2.7×10^{-8} 、 7.5×10^{-9} 、および 1.3×10^{-8} M（二連の平均）であった。

30

【0273】

Z16065と結合モチーフBMの X_5 位のみが異なるアミノ酸配列を有するZ18814は、Z16065の3倍の親和性を有する。Z16065は、 X_5 位にアラニン残基を有するIL-1R-I結合Zバリエントの間で最も高い結合親和性（ K_D ）を有する（表11）。Z18814は、 X_5 位にイソロイシン残基を有する。 X_5 位にバリンまたはイソロイシンを有するいくつかのZバリエントは、IL-1R-Iに対する親和性が高いことが見出された。

40

【0274】

【表 18】

表 18 : B i a c o r e 動態スクリーニングから計算した K D 値。

Z バリ アント	配列 番号	Biacore スクリー ニング K _D (M)	Z バリ アント	配列 番号	Biacore スクリー ニング K _D (M)	Z バリ アント	配列 番号	Biacore スクリー ニング K _D (M)
Z15840	49	6.9×10 ⁻⁹	Z18830	1295	2.9×10 ⁻⁹	Z18938	1370	4.5×10 ⁻⁹
Z15862	71	1.3×10 ⁻⁸	Z18831	1308	3.0×10 ⁻⁹	Z18941	1409	3.3×10 ⁻⁹
Z15876	1206	5.7×10 ⁻⁹	Z18832	1340	1.6×10 ⁻⁹	Z18942	1483	1.5×10 ⁻⁸
Z15932	1207	5.5×10 ⁻⁹	Z18833	1297	3.8×10 ⁻⁹	Z18948	1414	4.3×10 ⁻⁹
Z15934	1208	9.4×10 ⁻⁹	Z18834	1361	2.4×10 ⁻⁹	Z18952	1290	3.0×10 ⁻⁹
Z15945	150	9.6×10 ⁻⁹	Z18836	1430	2.9×10 ⁻⁹	Z18956	1625	1.4×10 ⁻⁸
Z15975	1209	8.9×10 ⁻⁹	Z18838	1337	3.3×10 ⁻⁹	Z18958	1283	2.8×10 ⁻⁹
Z16062	266	6.4×10 ⁻⁹	Z18839	1440	3.1×10 ⁻⁹	Z18959	1357	2.9×10 ⁻⁹
Z16183	379	6.5×10 ⁻⁹	Z18841	1359	2.5×10 ⁻⁹	Z18966	1272	2.9×10 ⁻⁹
Z16191	387	6.3×10 ⁻⁹	Z18843	1309	3.1×10 ⁻⁹	Z18967	1388	3.2×10 ⁻⁹
Z16208	404	1.1×10 ⁻⁸	Z18844	1349	4.0×10 ⁻⁹	Z18968	1472	2.4×10 ⁻⁹
Z16397	582	1.3×10 ⁻⁸	Z18846	1331	2.1×10 ⁻⁹	Z18971	1559	5.5×10 ⁻⁹
Z16440	624	1.3×10 ⁻⁸	Z18847	1363	3.0×10 ⁻⁹	Z18982	1553	5.2×10 ⁻⁹
Z16603	782	9.1×10 ⁻⁹	Z18848	1304	3.0×10 ⁻⁹	Z18989	1592	4.5×10 ⁻⁹
Z16606	785	9.6×10 ⁻⁹	Z18849	1299	3.0×10 ⁻⁹	Z19012	1588	4.5×10 ⁻⁹
Z16737	910	1.2×10 ⁻⁸	Z18850	1367	2.6×10 ⁻⁹	Z19031	1600	3.1×10 ⁻⁹
Z18754	1252	2.5×10 ⁻⁹	Z18851	1291	3.6×10 ⁻⁹	Z19043	1505	3.4×10 ⁻⁹
Z18756	1366	2.9×10 ⁻⁹	Z18853	1298	2.3×10 ⁻⁹	Z19053	1526	8.7×10 ⁻⁹
Z18757	1321	3.0×10 ⁻⁹	Z18856	1330	2.9×10 ⁻⁹	Z19054	1528	7.0×10 ⁻⁹
Z18758	1281	4.8×10 ⁻⁹	Z18860	1265	6.2×10 ⁻⁹	Z19056	1586	6.9×10 ⁻⁹
Z18759	1314	3.4×10 ⁻⁹	Z18861	1369	3.3×10 ⁻⁹	Z19057	1558	4.2×10 ⁻⁹
Z18760	1435	3.0×10 ⁻⁹	Z18863	1362	2.4×10 ⁻⁹	Z19059	1240	9.2×10 ⁻⁹
Z18762	1415	2.1×10 ⁻⁹	Z18866	1324	2.7×10 ⁻⁹	Z19060	1228	1.0×10 ⁻⁸
Z18763	1431	5.2×10 ⁻⁹	Z18868	1391	2.7×10 ⁻⁹	Z19072	1554	5.2×10 ⁻⁹
Z18766	1274	3.1×10 ⁻⁹	Z18870	1428	3.0×10 ⁻⁹	Z19075	1618	4.8×10 ⁻⁹
Z18767	1235 3	5.1×10 ⁻⁹	Z18871	1332	3.5×10 ⁻⁹	Z19078	1248	9.5×10 ⁻⁹
Z18769	1339	2.7×10 ⁻⁹	Z18872	1410	2.6×10 ⁻⁹	Z19079	1236	1.4×10 ⁻⁸
Z18770	1284	2.6×10 ⁻⁹	Z18873	1306	3.1×10 ⁻⁹	Z19085	1564	4.9×10 ⁻⁹
Z18771	1341	3.0×10 ⁻⁹	Z18874	1421	2.3×10 ⁻⁹	Z19090	1540	3.0×10 ⁻⁹
Z18774	1389	3.0×10 ⁻⁹	Z18875	1420	2.7×10 ⁻⁹	Z19094	1231	1.8×10 ⁻⁸
Z18776	1418	2.8×10 ⁻⁹	Z18876	1286	3.7×10 ⁻⁹	Z19099	1548	3.8×10 ⁻⁹
Z18777	1326	3.8×10 ⁻⁹	Z18877	1301	2.7×10 ⁻⁹	Z19107	1566	6.7×10 ⁻⁹
Z18782	1333	2.7×10 ⁻⁹	Z18878	1302	3.8×10 ⁻⁹	Z19115	1489	6.1×10 ⁻⁹
Z18783	1257	3.4×10 ⁻⁹	Z18879	1390	6.2×10 ⁻⁹	Z19117	1631	4.2×10 ⁻⁹
Z18784	1433	3.7×10 ⁻⁹	Z18881	1355	3.2×10 ⁻⁹	Z19118	1579	8.4×10 ⁻⁹
Z18785	1323	2.7×10 ⁻⁹	Z18882	1311	2.6×10 ⁻⁹	Z19123	1241	1.1×10 ⁻⁸
Z18786	1320	4.8×10 ⁻⁹	Z18884	1403	2.7×10 ⁻⁹	Z19127	1213	9.8×10 ⁻⁹

10

20

30

40

Z18790	1439	3.0×10^{-9}	Z18885	1294	3.9×10^{-9}	Z19135	1247	1.6×10^{-8}
Z18794	1424	3.7×10^{-9}	Z18886	1432	3.9×10^{-9}	Z19141	1506	1.7×10^{-8}
Z18796	1352	3.6×10^{-9}	Z18887	1386	2.9×10^{-9}	Z19143	1471	1.4×10^{-9}
Z18798	1268	3.2×10^{-9}	Z18888	1422	2.6×10^{-9}	Z19144	1374	3.1×10^{-9}
Z18799	1423	2.6×10^{-9}	Z18889	1344	3.4×10^{-9}	Z19146	1434	2.9×10^{-9}
Z18800	1328	1.9×10^{-9}	Z18890	1352	3.1×10^{-9}	Z19147	1307	2.4×10^{-9}
Z18803	1327	3.1×10^{-9}	Z18893	1353	2.1×10^{-9}	Z19151	1594	2.7×10^{-9}
Z18804	1329	3.3×10^{-9}	Z18894	1312	2.5×10^{-9}	Z19153	1310	3.1×10^{-9}
Z18805	1437	3.7×10^{-9}	Z18895	1411	2.6×10^{-9}	Z19158	1571	1.5×10^{-9}
Z18806	1271	4.1×10^{-9}	Z18896	1436	3.5×10^{-9}	Z19159	1364	1.9×10^{-9}
Z18807	1400	3.8×10^{-9}	Z18898	1285	2.5×10^{-9}	Z19160	1379	3.8×10^{-9}
Z18808	1342	4.2×10^{-9}	Z18904	1587	3.4×10^{-9}	Z19166	1305	3.5×10^{-9}
Z18810	1278	3.1×10^{-9}	Z18908	1591	3.6×10^{-9}	Z19168	1500	4.6×10^{-9}
Z18811	1405	4.5×10^{-9}	Z18909	1303	2.7×10^{-9}	Z19169	1402	2.7×10^{-9}
Z18813	1375	2.0×10^{-9}	Z18910	1416	3.1×10^{-9}	Z19170	1334	2.0×10^{-9}
Z18814	1368	2.4×10^{-9}	Z18911	1441	2.8×10^{-9}	Z19171	1593	3.0×10^{-9}
Z18817	1343	3.5×10^{-9}	Z18912	1251	3.6×10^{-9}	Z19172	1551	4.5×10^{-9}
Z18819	1276	3.0×10^{-9}	Z18916	1536	4.1×10^{-9}	Z19180	1393	7.9×10^{-10}
Z18820	1417	3.3×10^{-9}	Z18917	1509	7.1×10^{-9}	Z19181	1549	9.7×10^{-9}
Z18821	1269	3.5×10^{-9}	Z18919	1350	2.8×10^{-9}	Z19182	1628	2.8×10^{-9}
Z18823	1282	2.4×10^{-9}	Z18920	1270	3.2×10^{-9}	Z19183	1235	1.2×10^{-8}
Z18824	1264	3.3×10^{-9}	Z18922	1533	4.9×10^{-9}	Z19302	1419	3.2×10^{-9}
Z18825	1275	4.9×10^{-9}	Z18923	1482	9.0×10^{-9}	Z19303	1262	4.0×10^{-9}
Z18826	1356	3.5×10^{-9}	Z18925	1479	1.1×10^{-8}	Z19304	1273	4.5×10^{-9}
Z18827	1318	4.3×10^{-9}	Z18927	1372	3.4×10^{-9}	Z19305	1261	3.8×10^{-9}
Z18828	1296	2.6×10^{-9}						

10

20

【0275】

実施例9

第1および第2の成熟ライブラリー由来のZバリエーションの産生および特徴づけ

30

この実施例は、第1および第2の成熟ライブラリーフェージ選択に由来するHis₆タグ化Zバリエーションのサブクローニングおよび産生の一般的な手順、その標的結合の特徴づけ、標的の遮断、および融点についての一般的手順を記載する。

【0276】

材料と方法

His₆タグを有するZバリエーションのサブクローニング：実施例8でスクリーニングしたZバリエーションのサブセットを、サブクローニングのために選択した。それぞれのZバリエーションのDNAをファージライブラリーベクターpAY02592から増幅させ、本質的に実施例2に記載のように標準的な分子生物学技術を使用してN末端His₆タグを用いてサブクローニングした。

40

培養：E. coli T7E2細胞（GeneBridges）を、それぞれのIL-1R-I結合Zバリエーションの遺伝子フラグメントを含むプラスミドで形質転換した。得られた組換え株を、EnPressoプロトコル（BioSilta）を使用して、50 mlのスケールで50 μg/mlカナマイシンを補足した培地中にて30℃で培養した。タンパク質発現を誘導するために、IPTGを、OD₆₀₀約1.0での最終濃度0.2 mMまで添加した。誘導後、培養物を16時間インキュベートした。細胞を遠心分離によって回収した。

【0277】

His₆タグを有するIL-1R-I結合Zバリエーションの精製：実施例2に記載されているが、IMAC精製工程とRPC精製工程との間の緩衝液の交換を行わずに、IL-1

50

R-I 結合 Z バリエントのおよそ 2/3 を精製した。RPC 精製中の直線勾配も、18 ml の 0-60% RPC 溶媒 B に変更した。IL-1R-I 結合 Z バリエントの残りの 1/3 に対しては IMAc 精製のみを行い、その後、最終的に PBS に緩衝液を交換した。精製を、本質的に実施例 2 の第 1 の部分に記載のように行った。およそ 1~2 g の各細胞ペレットを使用した。

【0278】

Biacore 動態解析：His₆ タグ化 Z バリエントに対するヒトおよびカニクイザルの IL-1R-I の速度定数 (k_{on} および k_{off}) および親和性 (K_D) を、Biacore 2000 装置 (GE Healthcare) を使用して決定した。48、12、3、および 0.75 nM の Z バリエントを使用して、本質的に実施例 5 に記載のよう

10

【0279】

in vitro IL-1 β 中和アッセイ：His₆ タグ化 IL-1R-I 特異的 Z バリエントを、TF-1 細胞アッセイにおいてその阻害能力について試験した。実施例 2 に記載のよう

20

【0280】

円二色性 (CD) 分光分析：His₆ タグ化 Z バリエントについての CD を、実施例 2 に記載のよう

【0281】

結果

30

His₆ タグ化 Z バリエントの産生：His₆ タグを有する IL-1R-I 結合 Z バリエントは、E.coli 内で可溶性遺伝子産物として発現された。タンパク質の精製量を、280 nm での吸光度の測定によって分光高度的に決定し、IMAc 精製および RPC 精製の両方を行った IL-1R-I 結合 Z バリエントについてはおよそ 0.4~7 mg タンパク質/g ペレットの範囲であった。IMAc 精製のみを行った IL-1R-I 結合 Z バリエントについては、タンパク質の精製量はおよそ 4~15 mg タンパク質/g ペレットの範囲であった。各最終タンパク質調製物の SDS-PAGE 分析では、これらが主に IL-1R-I 結合 Z バリエントを含むことを示していた。各 Z バリエントの正確な同一性および分子量は、HPLC-MS 分析によって確認された。

【0282】

40

Biacore 動態解析：His₆ タグ化 IL-1R-I 結合 Z バリエントのヒトおよびカニクイザルの IL-1R-I との相互作用を、Biacore 装置における固定化 IL-1R-I を含む表面上への種々の濃度の Z バリエントの注入によって解析した。ヒト IL-1R-I 結合についての動態パラメーター (K_D 、 k_{on} 、および k_{off}) の計算値の概略を、表 19 に示す。Z12967、Z16065、Z16163、および Z18557 の K_D 値は、それぞれ、 8.2×10^{-10} 、 5.1×10^{-10} 、 7.6×10^{-10} 、および 1.4×10^{-10} M であった。カニクイザル IL-1R-I 結合の K_D 値は、それぞれ、Z18754、Z18760、および Z18800 について 2.0×10^{-9} 、 6.7×10^{-9} 、および 3.3×10^{-9} M であった。

【0283】

50

【表 19】

表 19. ヒト IL-1R-I への His₆-Z ポリペプチド結合についての動態パラメーターおよび親和性。

Z バリエーション	配列番号	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Z15876	1206	5.2×10^6	4.1×10^{-3}	8.0×10^{-10}
Z15932	1207	1.8×10^7	1.1×10^{-2}	6.4×10^{-10}
Z15934	1208	1.4×10^7	1.1×10^{-2}	7.5×10^{-10}
Z15975	1209	4.1×10^7	2.9×10^{-2}	7.1×10^{-10}
Z18754	1252	7.0×10^7	6.0×10^{-3}	8.6×10^{-11}
Z18760	1435	1.3×10^7	2.7×10^{-3}	2.1×10^{-10}
Z18762	1415	4.2×10^7	5.2×10^{-3}	1.3×10^{-10}
Z18769	1339	1.9×10^7	3.1×10^{-3}	1.6×10^{-10}
Z18770	1284	3.0×10^7	5.0×10^{-3}	1.7×10^{-10}
Z18799	1423	2.6×10^7	4.5×10^{-3}	1.8×10^{-10}
Z18800	1328	1.8×10^7	2.5×10^{-3}	1.4×10^{-10}
Z18813	1375	2.0×10^7	3.9×10^{-3}	2.0×10^{-10}
Z18814	1368	3.0×10^7	4.4×10^{-3}	1.5×10^{-10}
Z18817	1343	2.8×10^7	4.8×10^{-3}	1.7×10^{-10}
Z18823	1283	4.7×10^6	1.8×10^{-3}	3.8×10^{-10}
Z18831	1308	4.0×10^7	5.3×10^{-3}	1.3×10^{-10}
Z18832	1340	5.9×10^7	7.0×10^{-3}	1.2×10^{-10}
Z18834	1361	5.8×10^7	8.0×10^{-3}	1.4×10^{-10}
Z18846	1331	4.7×10^7	5.1×10^{-3}	1.1×10^{-10}
Z18850	1367	1.3×10^7	2.3×10^{-3}	1.7×10^{-10}
Z18853	1298	2.2×10^7	3.0×10^{-3}	1.4×10^{-10}
Z18856	1330	4.6×10^7	5.7×10^{-3}	1.2×10^{-10}
Z18863	1362	2.2×10^7	4.8×10^{-3}	2.2×10^{-10}
Z18866	1324	3.6×10^7	4.2×10^{-3}	1.2×10^{-10}
Z18874	1421	4.9×10^7	5.2×10^{-3}	1.1×10^{-10}
Z18875	1420	2.4×10^7	2.8×10^{-3}	1.2×10^{-10}
Z18882	1311	1.2×10^7	3.0×10^{-3}	2.5×10^{-10}
Z18888	1422	1.8×10^7	2.9×10^{-3}	1.6×10^{-10}
Z18893	1353	8.6×10^6	2.4×10^{-3}	2.7×10^{-10}
Z18898	1285	6.7×10^7	4.4×10^{-3}	6.6×10^{-11}
Z18912	1251	9.2×10^7	1.9×10^{-2}	2.1×10^{-10}
Z18920	1270	3.6×10^7	5.5×10^{-3}	1.5×10^{-10}
Z18968	1472	3.0×10^7	8.4×10^{-3}	2.8×10^{-10}
Z19072	1554	4.3×10^7	1.8×10^{-2}	4.1×10^{-10}
Z19075	1618	1.4×10^7	6.4×10^{-3}	4.5×10^{-10}
Z19143	1471	1.7×10^7	3.9×10^{-3}	2.2×10^{-10}
Z19147	1307	2.8×10^7	4.3×10^{-3}	1.5×10^{-10}
Z19151	1594	2.8×10^7	7.0×10^{-3}	2.5×10^{-10}
Z19158	1571	2.7×10^7	4.4×10^{-3}	1.6×10^{-10}
Z19159	1364	2.7×10^7	5.0×10^{-3}	1.9×10^{-10}

10

20

30

40

Z19170	1334	2.1×10^7	4.3×10^{-3}	2.0×10^{-10}
Z19172	1551	4.9×10^7	2.3×10^{-2}	4.6×10^{-10}
Z19180	1393	2.2×10^7	3.1×10^{-3}	1.4×10^{-10}
Z19181	1549	2.0×10^7	1.6×10^{-2}	8.2×10^{-10}
Z19182	1628	2.1×10^7	5.5×10^{-3}	2.6×10^{-10}

【0284】

in vitro IL-1 β 中和アッセイ：His₆タグ化IL-1R-I結合ZバリエーションのIL-1 β 阻害能を、TF-1細胞アッセイで分析した。得られたIC₅₀値を表20に示す。Z12967、Z16065、Z16163、およびZ18557のIC₅₀値は、それぞれ、7.4、3.3、3.3、および0.6 nMであった。

【0285】

【表20】

表20：TF-1細胞アッセイ由来のHis₆-ZポリペプチドについてのIC₅₀値。

Zバリエーション	配列番号	IC ₅₀ (nM)
Z15934	1208	6.4
Z15975	1209	3.3
Z18754	1252	0.6
Z18760	1435	0.9
Z18813	1375	1.2
Z18814	1368	0.4
Z18831	1308	0.4
Z18832	1340	0.5
Z18834	1361	0.5
Z18846	1331	0.2
Z18874	1421	0.3
Z18912	1251	1
Z18968	1472	1.4
Z19072	1554	2.4
Z19159	1364	1.2
Z19172	1551	2
Z19181	1549	4.6
Z19182	1628	1.5

【0286】

CD分析：His₆タグを有するIL-1R-I結合Zバリエーションについて決定されたCDスペクトルは、各々が20℃で α -ヘリックス構造を有することを示していた。この結果は、融解温度を決定した可変温度測定においても立証された（表21）。90℃への加熱前後に測定したスペクトルを重ね合わせたときに全てのIL-1R-I結合Zバリエーションについて可逆的折りたたみが認められた。

【0287】

BMのX₅位にバリン残基またはイソロイシン残基を有するIL-1R-I結合Zバリエーション（Z18912、Z18920、Z18968、Z19072、Z19075、Z19143、Z19147、Z19151、Z19158、Z19159、Z19170、Z19172、Z19180、Z19181、およびZ19182）の熱安定性および α -ヘリックス含有量は、X₅にアラニン残基を有するZバリエーションと実質的に異ならなかった。

【0288】

【表 2 1】

表 2 1 : 融解温度 (T_m)。

Zバリエーション	配列番号	T _m (°C)	Zバリエーション	配列番号	T _m (°C)
Z15876	1206	55	Z18866	1324	61
Z15932	1207	60	Z18874	1421	61
Z15934	1208	62	Z18875	1420	61
Z15975	1209	59	Z18882	1311	53
Z18754	1252	63	Z18888	1422	61
Z18760	435	57	Z18893	1353	60
Z18762	1415	62	Z18898	1285	59
Z18769	1339	59	Z18912	1251	53
Z18770	1284	59	Z18920	1270	56
Z18799	1423	60	Z18968	1472	62
Z18800	1328	67	Z19072	1554	63
Z18813	1375	61	Z19075	1618	56
Z18814	1368	61	Z19143	1471	56
Z18817	1343	60	Z19147	1307	57
Z18823	1283	52	Z19151	1594	59
Z18831	1308	58	Z19158	1571	55
Z18832	1340	58	Z19159	1364	54
Z18834	1361	58	Z19170	1334	52
Z18846	1331	60	Z19172	1551	59
Z18850	1367	62	Z19180	1393	58
Z18853	1298	59	Z19181	1549	61
Z18856	1330	61	Z19182	1628	62
Z18863	1362	57			

10

20

【0 2 8 9】

実施例 1 0

I L - 1 R - I 結合融合タンパク質の産生および特徴づけ

この実施例は、異なる *in vivo* 半減期延長融合パートナーに融合した異なる I L - 1 R - I 結合タンパク質バリエーションの DNA の構築および産生の一般的工程を記載する。

【0 2 9 0】

材料と方法

DNA 構築：任意選択的に異なるリンカー（表 2 2）を介してヒト I g G 1 F c（配列番号 1 6 6 2）、アルブミン結合ポリペプチドバリエーション（P P 0 1 3；配列番号 1 6 6 1）、ヒトアルブミン（配列番号 1 6 6 3）、またはヒトトランスフェリン（配列番号 1 6 6 4）に融合した一連の I L - 1 R - I 結合 Z バリエーション（以下を参照のこと）をコードする DNA を、E. coli での発現またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞での発現のためにコドン最適化し、Thermo Fisher Scientific の Invitrogen Gene Art 遺伝子合成サービスによって合成した。遺伝子を、E. coli 細胞または CHO 細胞でのその後の発現のための発現ベクターでクローン化した。

40

【0 2 9 1】

融合タンパク質は、I L - 1 R - I 結合 Z バリエーション a) Z 1 2 9 6 7（配列番号 9）、b) Z 1 2 8 9 5（配列番号 1 2）、c) Z 1 8 8 3 1（配列番号 1 3 0 8）、d) Z 1 8 8 4 6（配列番号 1 3 3 1）、e) Z 1 8 7 5 4（配列番号 1 2 5 2）、f) Z 1 9 1 5 1（配列番号 1 5 9 4）、g) Z 1 8 8 7 4（配列番号 1 4 2 1）、h) Z 1 8 7 6

50

0 (配列番号1435)、i) Z18800 (配列番号1328)、j) Z18898 (配列番号1285)、およびk) Z19147 (配列番号1307)、ならびに上記の異なる融合パートナーの結合モチーフに基づいていた。IL-1R-I結合Zバリエーションa)~k)は、異なる足場変異(1、2、23、52、および/または53位)または変異と組み合わせた欠失(1~3位の欠失; ΔV1D2A3、52および53位の変異)を含んでいた(以下の表22を参照のこと)。変異Zバリエーションを、配列番号1667~1668および1670~1679として図1に列挙している。これらの得られた融合ポリペプチドは、PSI0405 (配列番号1639)、PSI0407 (配列番号1640)、PSI0411 (配列番号1641)、PSI0412 (配列番号1642)、PSI0415 (配列番号1643)、PSI0416 (配列番号1644)、PSI0417 (配列番号1645)、PSI0534 (配列番号1646)、PSI0535 (配列番号1647)、PSI0536 (配列番号1648)、PSI0537 (配列番号1649)、PSI0538 (配列番号1650)、PSI0539 (配列番号1651)、PSI0574 (配列番号1652)、PSI0575 (配列番号1653)、PSI0576 (配列番号1654)、PSI0580 (配列番号1655)、PSI0581 (配列番号1656)、PSI0582 (配列番号1657)であった(表22を参照のこと)。

【0292】

【表 2 2】

表 2 2 : 融合タンパク質および発現系

配列番号	融合タンパク質	構築物	発現系
1639	PSI0405	Z12967[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>VEGS</i> -ABD	<i>E. coli</i>
1640	PSI0407	Z12895[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>VEGS</i> -ABD	<i>E. coli</i>
1641	PSI0411	<i>AS</i> -ABD- <i>GS</i> -Z12967[V1A;D2E;N52S;D53E]	<i>E. coli</i>
1642	PSI0412	<i>AS</i> -ABD- $(G_4S)_2$ -Z12967[V1A;D2E;N52S;D53E]	<i>E. coli</i>
1643	PSI0415	<i>AS</i> -ABD-Z12967[V1A;D2E;N52S;D53E]	<i>E. coli</i>
1644	PSI0416	<i>AS</i> -ABD-Z12967[ΔV1D2A3;N52S;D53E]	<i>E. coli</i>
1645	PSI0417	<i>AS</i> -ABD- $((KEAAA)_3KELAA)_2$ -Z12967[V1A;D2E;N52S;D53E]	<i>E. coli</i>
1646	PSI0534	Z18831[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1647	PSI0535	Z18846[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1648	PSI0536	Z18754[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1649	PSI0537	Z19151[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1650	PSI0538	Z18874[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1651	PSI0539	Z18760[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1652	PSI0574	Z18800[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1653	PSI0575	Z18898[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>
1654	PSI0576	Z19147[V1A;D2E;N52S;D53E]- <i>AS</i> (G_4S) ₂ -IgG1 Fc	<i>E. coli</i>

10

20

30

40

1655	PSI0580	Z18754[V1A;D2E;N52S;D53E]-AS(G ₄ S) ₂ - アルブミン	CHO
1656	PSI0581	Z18754[V1A;D2E;T23N;N52S;D53E]- AS(G ₄ S) ₂ -アルブミン	CHO
1657	PSI0582	Z18754[V1A;D2E;N52S;D53E]-AS(G ₄ S))- ₂ -トランスフェリン	CHO
1658	PSI0589	PSI0536[アミノ酸 1~86], 二量体	

10

【0293】

融合タンパク質の培養および精製：E. coli細胞を、IL-1R-I結合融合タンパク質（表22を参照のこと）に対応する遺伝子フラグメントを含む発現ベクターで形質転換し、次いで、フェッドバッチ技術を使用してバイオリアクター中で培養するか浸透フラスコ中で培養し、その後にタンパク質を発現させ、遠心分離によって細胞を回収した。細胞ペレットを-20℃で保存した。製造者のプロトコールに本質的にしたがってExpiCHO発現系（Thermo Fisher Scientific）を使用して、IL-1R-I結合Zバリエーション（表22を参照のこと）も発現させた。発現ベクターのトランスフェクション12日後に遠心分離によって上清を回収し、-70℃で保存した。

【0294】

20

凍結E. coli細胞ペレットを再懸濁し、次いで、超音波処理によって破壊し、引き続いて細胞片を遠心分離で除去後、濾過した（0.22μm）。ExpiCHO培養物由来の凍結上清を解凍し、濾過した（0.22μm）。IL-1R-I結合Zバリエーションを含む各上清を、従来のクロマトグラフィ法（アフィニティクロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、およびサイズ排除クロマトグラフィなど）を使用して精製した。動物研究で用いるZバリエーションも、Detoxi-Ge1内毒素除去カラム（Pierce、カタログ番号20344）を使用した内毒素除去精製に供した。精製ZバリエーションをPBS緩衝液に交換し、別段に記述しない限り、PBSは、その後の実験で使用される処方緩衝液でもあった。IL-1R-I結合Zバリエーションの純度を、クーマシー・ブルーで染色するSDS-PAGEによって分析し、各精製したZバリエーションの分子量を、質量分析（HPLC/MSまたはMALDI-TOF/MS）を使用して分析した。

30

【0295】

IL-1R-I結合融合タンパク質PSI0589（配列番号1658）（ジスルフィドによってヒンジ領域で連結された二量体Z18754バリエーション）を、PSI0536（表22を参照のこと）由来のIgG1 Fc部分の除去によって得た。精製されたPSI0536のIdeSプロテアーゼ（FabRICATOR, Genovis AB）とのインキュベーションによってこれを行った。次いで、切断産物を、従来のクロマトグラフィ法（イオン交換クロマトグラフィおよびアフィニティクロマトグラフィなど）を使用して精製した。精製された二量体Z18754バリエーションを、PBSへの緩衝液交換に供し、PBSは、その後の実験で使用される処方緩衝液でもあった。純度を、クーマシー・ブルーで染色するSDS-PAGEによって分析し、分子量を、質量分析（HPLC/MSまたはMALDI-TOF/MS）を使用して分析した。

40

【0296】

バイオレイヤー干渉法（BLI）動態解析：4つのIL-1R-I結合融合タンパク質のヒトおよびカニクイザルのIL-1R-Iへの結合を、BLIを使用して分析した。PSI0536、PSI0537、PSI0534、およびPSI0535（配列番号1648、1649、1646、1647）と示されたFc融合IL-1R-I結合Zバリエーションを、OctetRED96装置（Pall、ForteBio）を使用して各サイクルにおいて0.5μg/mlで150秒間プロテインAセンサー（Pall、Forte

50

B i oカタログ番号18-5010)にロードした。引き続いて、これらのセンサーを、異なる漸増濃度の0.15~5nMの範囲のヒトIL-1R-I (R&D system sカタログ番号269-1R/CF)または2.5~80nMの範囲のカニクイザルIL-1R-I (配列番号1665)に暴露した。会合を300秒間記録し、解離を300秒間(ヒト)または90秒間(カニクイザル)記録し、スペクトログラムを記録し、全体的適合(Octet System Data Analysis 8.2ソフトウェア, Pall, ForteBio)を使用して1:1 Langmuirモデルにしたがって分析した。各センサーを、センサー上にロードされているが、緩衝液のみに暴露した同一のリガンドを有するセンサーに対して参照した。各会合/解離サイクル後、全センサーを、3パルスの10mMグリシン(pH2.5)によってそれぞれ10秒間再生させた。全工程を、25℃で振盪速度1000rpmにて行い、融合タンパク質(Z-Fc融合タンパク質)および分析物(ヒトまたはカニクイザルのIL-1R-I)の全ての希釈物は、1×動態緩衝液(Pall, ForteBio)中に存在していた。

【0297】

結果

培養および精製：全てのIL-1R-I結合融合タンパク質(表22)は、可溶性タンパク質としてE.coli細胞またはCHO細胞中にて高レベルで発現した。精製により高純度のタンパク質調製物が得られ、これをクーマシー・ブルーで染色するSDS-PAGEによって分析した。各Zバリエーションの正確な同一性および分子量が、質量分析によって確認された。

【0298】

B L I動態解析：4つのZ-Fc融合タンパク質バリエーション(配列番号1648、1649、1646、1647)を、OctetRED96装置におけるB L Iテクノロジーを使用して、プロテインAセンサー上にロードしたヒトおよびカニクイザルのIL-1R-Iに結合する能力について分析した。4つ全てのバリエーションは、1:1モデルにしたがって0.46~0.72nm(ヒト)または0.31~0.37nm(カニクイザル)の範囲のB-max値でIL-1R-Iに結合した。Z-Fc融合タンパク質バリエーションの動態データ(会合速度定数(k_{on})、解離速度定数(k_{off})、および解離定数 K_D)を、表23に示す。

【0299】

【表23】

表23：IL-1R-I結合融合タンパク質の動態パラメータ

融合タンパク質および配列番号	ヒト IL-1R-I			カニクイザル IL-1R-I		
	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
PSI0536 (配列番号 1648)	7.5×10^{-10}	8.99×10^5	6.79×10^{-4}	1.4×10^{-8}	1.70×10^6	2.34×10^{-2}
PSI0537 (配列番号 1649)	1.2×10^{-9}	8.41×10^5	1.02×10^{-3}	3.1×10^{-8}	1.78×10^6	5.48×10^{-2}
PSI0534 (配列番号 1646)	1.6×10^{-9}	4.04×10^5	6.42×10^{-4}	2.8×10^{-8}	1.08×10^6	2.99×10^{-2}
PSI0535 (配列番号 1647)	7.2×10^{-10}	5.83×10^5	4.21×10^{-4}	1.1×10^{-8}	1.49×10^6	1.66×10^{-2}

【0300】

実施例11：

細胞ベースのアッセイを使用したin vitro薬理学的活性分析

材料と方法

正常ヒト皮膚線維芽(NHDF)細胞におけるIL-1 β 誘導IL-6産生に及ぼすIL-1R-I結合融合タンパク質の阻害性の影響をモニタリングした。

【0301】

タンパク質での処置の3日前に細胞を播種した。タンパク質（IL-1R-I結合融合タンパク質またはアナキンラ）を、9 μ M組換えヒト血清アルブミン（rHSA）の存在下の無血清成長培地で100 nMの出発濃度に希釈し、引き続いて、1:4に9回連続希釈して、100 nM~0.38 pMの濃度範囲のタンパク質を得た。IL-1R-I結合融合タンパク質またはアナキンラを、チャレンジ用量の3.4 pM IL-1 β の存在下で試験し、細胞を、タンパク質と共に37℃で22時間インキュベートし、その後に培地を回収した。回収した培地を41倍に希釈後、IL-6含有量を、製造者の推奨条件にしたがってヒトIL-6 ELISAキット（R&D Systems）を使用して分析した。XLFitを使用してデータを解析し、IC₅₀値を濃度-反応曲線から計算した。

10

【0302】

実施例9に記載のように産生したHis₆タグ化IL-1R-I結合ZバリエントのNHDF細胞におけるIL-1 β 誘導IL-6産生に及ぼす阻害性の影響を同様にモニタリングし、IC₅₀値を計算した。

【0303】

化学合成したタンパク質：PSI0558と示した配列番号1672の化学合成バージョンを、BACHEM AGから取り寄せた。PSI0558の活性を、上記の方法にしたがって評価した。

【0304】

結果

20

NHDF細胞からのIL-1 β 誘導IL-6放出は、IL-1R-I結合融合タンパク質およびアナキンラによって濃度依存様式で低下した。各IL-1R-I結合融合タンパク質を2回試験し、このアッセイにおける両実験由来のデータを、アナキンラの過去の平均値（n>20）と共に表24に示し、2つの実験のうちの1つを、図2にも示す。

【0305】

【表24】

表24: in vitro IC₅₀値

名称	配列番号	IC ₅₀ (pM)
PSI0536	1648	66;45
PSI0537	1649	260;200
PSI0534	1646	140;110
PSI0535	1647	80;50
PSI0538	1650	87;70
PSI0539	1651	240;110
アナキンラ		平均 70

30

【0306】

いくつかのIL-1R-I結合融合タンパク質を、同一の様式であるが、1回だけ試験した。この実験に由来する結果を、表25に示す。

【0307】

【表25】

表25: in vitro IC₅₀値

名称	配列番号	IC ₅₀ (pM)
PSI0589	1658	1.8
PSI0582	1657	2.0
PSI0580	1655	1500
PSI0581	1656	1800

40

【0308】

50

TF-1細胞アッセイ（実施例9、表20）で事前に証明されたHis₆タグ化IL-1R-I結合ZバリエーションのIL-1β阻害能を、このNHDFアッセイで確認した（結果を示さず）。

【0309】

化学合成したPSI0558のIC₅₀値は、690 pMであった。

【0310】

実施例12

全血アッセイを使用した*in vitro*薬理学的活性分析

個別のドナー由来の全血におけるIL-1β誘導IL-6産生に及ぼすIL-1R-I結合融合タンパク質の阻害性の影響を測定した。

10

【0311】

材料と方法

IL-1R-I結合融合タンパク質（配列番号1648-1649）での処置の1～3時間前に健康なドナーから採血した。タンパク質（IL-1R-I結合融合タンパク質またはアナキナラ）を、無血清RPMI（ThermoFisher Scientific、RPMI1640培地、GlutaMAX（商標）Supplement、カタログ番号61870010）で500 nMの出発濃度に希釈し、引き続いて、1：3に10回連続希釈し、それにより、500 nM～25 pMの濃度範囲のタンパク質を得た。IL-1R-I結合融合ポリペプチドまたはアナキナラを、チャレンジ用量の100 pM IL-1βの存在下で試験した。血液をタンパク質と21～23時間インキュベートし、その後血漿を回収した。回収した血漿を2倍希釈し、IL-6の含有量を、製造者の推奨条件にしたがってヒトIL-6キット（V-PLEXヒトIL-6キットヒトインターロイキン-6、MSD）を使用して分析した。

20

【0312】

検量線（キットに用意されている）を使用してIL-6濃度（pg/ml）を計算し、XLFitを使用してデータを分析し、濃度-反応曲線からIC₅₀値を計算した。

【0313】

結果

ヒト全血中のIL-1β誘導IL-6放出は、IL-1R-I結合融合タンパク質およびアナキナラによって濃度依存様式で低下した。IL-1R-I結合融合タンパク質を5～6人の個別の健康なドナー由来の血液で試験し、10人の個別の血液ドナー由来のアナキナラデータと比較した（図3）。配列番号1648（PSI0536）、配列番号1649（PSI0537）、およびアナキナラについてのIC₅₀値の中央値は、それぞれ、0.32、1.25、および0.31 nMであった。

30

【0314】

実施例13

ラットにおけるIL-1R-I結合融合タンパク質の*in vivo*薬物動態学

この実施例では、IL-1R-I結合融合タンパク質（配列番号1646～1651）の薬物動態学を、雄ラットの単回用量研究で評価した。

40

【0315】

材料と方法

融合タンパク質：IL-1R-I結合融合タンパク質PSI0534、PSI0535、PSI0536、PSI0537、PSI0538、およびPSI0539（表22、配列番号1646～1651を参照のこと）を、この研究で評価した。6つの全試験項目を、25 mMリン酸ナトリウムおよび125 mM塩化ナトリウムの溶液（pH7.0）として構成した。

【0316】

生存期：6つの融合タンパク質の薬物動態学的性質を、雄スプレーグ・ドーリーラットで調査した。各試験項目について、3匹のラットの側方尾静脈に単回用量の15 mg/kg（2.5 ml/kg）をi.v.注射し、別の3匹のラットの頸部に単回用量の30 m

50

g/kg (5 ml/kg) を s. c. 注射した。血清調製のための血液試料を、投与前、i. v. 投与の 5 分後および 20 分後、1、4、8、24、48、72、および 96 時間後、または s. c. 投与の 20 分後、1、4、8、24、48、72、96、および 120 時間後に回収した。

【0317】

定量的 ELISA：ラット血清試料中の融合タンパク質レベルを、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって決定した。ELISA アッセイは、定量的サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術を使用した。

【0318】

簡潔に述べれば；IL-1R-I 結合融合タンパク質の Z バリエーションドメインを認識するヤギポリクローナル抗 Z 抗体 (自家製、Affibody AB) を、マイクロプレート上にコーティングした。非結合ポリクローナル抗体を洗い流し、プラスチック表面への非特異的結合を減少させるためのブロッキング剤としてカゼインを添加した。第 2 の洗浄工程による非結合カゼインの除去後、標準および試料を、ウェルにピペットし、存在する任意の融合タンパク質が固定された抗体に結合した。任意の非結合物質を洗い流した後、HRP 標識されたブタ抗ウサギ抗体 (Dako、カタログ番号 P0399) を添加した。任意の非結合抗ウサギ HRP 試薬を除去するための洗浄後、基質溶液をウェルに添加し、最初の工程における融合タンパク質の結合量に対して比例して発色させた。発色を停止させ、色の強度を測定した。

【0319】

薬物動態学的解析：薬物動態学的解析は、各用量群由来の血清濃度の中央値対時間データに基づいていた。観察された最高 (血中) 濃度 (C_{max}) および最大血清濃度に到達するまでの時間 (t_{max}) を、生物学的分析データから直接得た。他の薬物動態学的パラメーター (すなわち、クリアランス (CL)、s. c. 投与後の見かけ上のクリアランス (CL/F)、定常状態での見かけ上の分布体積 (V_{ss})、平均滞留時間 (MRT)、および終末相半減期 ($t_{1/2z}$) を、Phoenix WinNonlin ソフトウェアバージョン 6.3 (Pharsight Corp., USA) を使用したノンコンパートメント解析によって推定した。i. v. 投与後の終末相勾配の推定は、24 時間から 96 時間までの 4 つのデータポイントに基づいていた。s. c. 投与後の終末相勾配の推定は、24 時間から 120 時間までの 5 つのデータポイントに基づいていた。Microsoft Excel を使用して皮下生物学的利用能 (F) を計算した。

【0320】

結果

6 つの試験した融合タンパク質の間の薬物動態学に有意差は認められなかった。i. v. 投与後の薬物動態学は、およそ 2.4 ml/h·kg のクリアランスおよび約 140 ml/kg の分布体積を特徴とし、平均滞留時間が約 60 時間であると解釈された (表 26)。

【0321】

【表 2 6】

表 2 6 : 雄ラットの静脈内への単回用量の投与 (5 mg / kg) 後の薬物動態学的パラメーターの推定値

パラメーター	PSI0534	PSI0535	PSI0536	PSI0537	PSI0538	PSI0539
CL (ml/h·kg)	2.83	2.40	2.68	2.06	2.36	2.03
V _{ss} (ml/kg)	159	149	143	136	146	113
MRT (時間)	56.4	62.1	53.5	65.9	61.6	55.5
t _{1/2z} (時間)	48.7	52.1	44.7	55.1	50.4	48.3

10

【0 3 2 2】

皮下生物学的利用能は平均 5 0 % であり、ピークレベルは投与 2 4 時間後に認められた。次いで、血清レベルは、4 5 ~ 5 9 時間の範囲の半減期で低下した (表 2 7)。

【0 3 2 3】

【表 2 7】

20

表 2 7 : 雄ラットの皮下への単回用量の投与 (3 0 mg / kg) 後の薬物動態学的パラメーターの推定値

パラメーター	PSI0534	PSI0535	PSI0536	PSI0537	PSI0538	PSI0539
F (%)	41.5	49.6	46.7	60.3	47.2	52.2
C _{max} (nM)	828	866	948	1115	796	886
t _{max} (時間)	24	24	24	24	24	24
CL/F (ml/h·kg)	6.81	5.70	6.05	4.69	5.98	5.42
V _z /F (ml/kg)	445	457	403	372	509	424
t _{1/2z} (時間)	45.3	55.6	46.1	55.1	59.0	54.3
MRT (時間)	72.4	87.3	74.5	87.4	91.7	86.2

30

【0 3 2 4】

40

実施例 1 4

サルにおける I L - 1 R - I 結合融合タンパク質の i n v i v o 薬物動態学
材料と方法

融合タンパク質 : P S I 0 5 3 6 (配列番号 1 6 4 8) と示した I L - 1 R - I 結合融合タンパク質を、2 5 mM リン酸ナトリウムおよび 1 2 5 mM 塩化ナトリウムの溶液 (p H 7 . 0) として構成した。

【0 3 2 5】

生存期 : P S I 0 5 3 6 の薬物動態学的性質を、ナীব雄カニクイザルで調査した。
3 匹のサルの尾静脈に単回用量の 5 mg / kg (1 ml / kg) を i . v . 注射し、別の
3 匹のサルの背部に単回用量の 1 0 mg / kg (1 ml / kg) を s . c . 注射した。血

50

清調製のための血液試料を、投与前、i. v. 投与の5分後および20分後、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144、168、240、および504時間後、またはs. c. 投与の20分後、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144、168、240、および504時間後に回収した。

【0326】

定量的ELISA：サル血清中のPSI0536を、実施例13に記載のELISAにしたがって定量した。

【0327】

薬物動態学的解析：薬物動態学的パラメーターは、個別の血清濃度対時間データに基づき、実施例13に記載のようにWinNonlinソフトウェアを使用して決定した。i. v. 投与後の終末相勾配の推定は、72時間から504時間までの7つのデータポイントに基づいていた。s. c. 投与後の終末相勾配の推定は、48時間から504時間までの8つのデータポイントに基づいていた。Microsoft Excelを使用して皮下生物学的利用能（F）を計算した。

【0328】

結果

i. v. 投与後のPSI0536（配列番号1648）の薬物動態学は、低クリアランス（ $1.07 \text{ ml/h} \cdot \text{kg}$ ）および少量の分布（ 117 ml/kg ）を特徴とし、平均滞留時間が109時間であると解釈された（表28）。

【0329】

【表28】

表28：平均（ $\pm \text{SD}$ ）3匹の雄サルの静脈内への単回用量（ $5.04 (\pm 0.01) \text{ mg/kg}$ ）後のPSI0536の薬物動態学的パラメーターの推定値

パラメーター	推定値
CL (ml/h·kg)	1.07 ± 0.04
V_{ss} (ml/kg)	117 ± 3
MRT (時間)	109 ± 1
$t_{1/2z}$ (時間)	92.7 ± 3.7

【0330】

PSI0536の平均皮下生物学的利用能は、73.9%であった。ピークレベルは、投与後平均18.7時間で認められた。次いで、血清レベルは、77.3時間の半減期で低下した（表29）。

【0331】

10

20

30

【表 29】

表 29：3匹の雄サルの皮下への単回用量（10.1（±0.1）mg/kg）後のPSIO536の平均（±SD）薬物動態学的パラメーターの推定値

パラメーター	推定値
F (%)	73.9 ± 5.5
C _{max} (nM)	779 ± 159
t _{max} (時間)	18.7 ± 7.5
CL/F (ml/h·kg)	1.46 ± 0.10
V _z /F (ml/kg)	163 ± 23
t _{1/2z} (時間)	77.3 ± 6.3
MRT (時間)	115 ± 14

10

20

【0332】

結論

最小標的血清濃度を100 nMまたはさらに200 nMと仮定すると、高皮下生物学的利用能の低クリアランスとの組み合わせは、サルにおける10 mg/kg PSIO536の週1回の皮下用法を容易にする。

【0333】

実施例15

Fc部分が変異したIL-1-R-I結合融合タンパク質の産生および特徴づけ

IgG1またはIgG4のFc部分の変異バリエーションを有するIL-1-R-I結合ポリペプチドバリエーションZ18754（配列番号1252）の4つのIL-1-R-I結合融合タンパク質を産生した。IgG1 Fc部分では、FCγR3Aとの相互作用によるエフェクター機能を無効にするための1つの変異（N297A）を導入した。哺乳動物細胞において産生されたFc含有ポリペプチドは、変異がなければかかるエフェクター機能を生じ得る。さらに、一方の融合タンパク質（配列番号1735）において、FcRnに対する親和性を増加させるためにLSと示される2つの他の残基を導入し（WO2009/086320）、別の融合タンパク質（配列番号1736）では、FcRnに対する親和性を増加させるためにYTEと示される3つの変異（WO02060919）を導入した。Z18754（配列番号1252）のIgG4 Fc（低エフェクター応答を誘発することが公知のサブタイプ）との1つの融合タンパク質を産生した（配列番号1737）。S228Pとして公知の1つの変異（van der Neut Kolfshoten M. et al, 2007, Science 317 (5844): 1554-7）を、この融合タンパク質のヒンジ領域にさらに導入した。この変異により、抗体のIgG4サブクラスで生じ得るアーム交換が排除される。

30

40

【0334】

材料と方法

融合タンパク質PSIO653～PSIO656（配列番号1734～1737）（詳細については表30を参照のこと）を、実施例10にしたがってCHO細胞中に産生させた。

【0335】

正常ヒト皮膚線維芽（NHDF）細胞におけるIL-1β誘導IL-6産生に及ぼすI

50

L-1R-I 結合融合タンパク質の阻害性の影響を、実施例 11 に示すようにモニタリングした。

【0336】

ビオチン化 FCγR3A (Sino Biological) を動態学のためにストレプトアビジンバイオセンサー (Pall/Fortebio) 上に固定し、タンパク質を 100 および 1000 nM の濃度で試験したことを除いて、FCγR3A に対する親和性を、本質的に実施例 10 に開示のようにバイオレイヤー干渉法を使用して分析した。さらに、ヒト IgG (GammaNorm, Octapharma) を、測定におけるコントロールとして使用した。

【0337】

ヒトビオチン化 FcRn (Immunitrack ApS) をビオチン CAPture チップ (GE Healthcare) 上に固定し、2.5 ~ 200 nM の範囲の 5 つの濃度で分析物を試験したことを除いて、FcRn に対する親和性を、本質的に実施例 9 に記載のように Biacore を使用して評価した。

【0338】

【表 30】

表 30：融合タンパク質および発現系

配列番号	融合タンパク質	構築物	発現系
1734	PSI0653	Z18754[N297A]-IgG1 Fc	CHO
1735	PSI0654	Z18754[N297A]-LS-IgG1 Fc	CHO
1736	PSI0655	Z18754[N297A]-YTE-IgG1 Fc	CHO
1737	PSI0656	Z18754[S228P]-IgG4 Fc	CHO

【0339】

結果

培養および精製：変異 Fc 部分を有する全ての IL-1-R-I 結合融合タンパク質 (表 30) は、可溶性タンパク質として CHO 細胞中にて高レベルで発現した。精製により高純度のタンパク質調製物が得られ、これをクーマシー・ブルーで染色する SDS-PAGE によって分析した。各 Z バリエントの正確な同一性および分子量を、質量分析によって確認した。

【0340】

in vitro 薬理学的活性：NHDF 細胞からの IL-1β 誘導 IL-6 放出は、IL-1R-I 結合融合タンパク質によって濃度依存様式で低下した。IL-1R-I 結合融合タンパク質を一度試験した。この実験由来の結果を、表 31 に示す。

【0341】

【表 31】

表 31：in vitro IC₅₀ 値

配列番号	融合タンパク質	IC ₅₀ (pM)
1734	PSI0653	4.3
1735	PSI0654	2.9
1736	PSI0655	5.9
1737	PSI0656	8.4

【0342】

FCγR3A 親和性分析：ヒト IgG は、1000 nM の濃度で 57 nM の親和性で FCγR3A に結合した。融合タンパク質 PSI0653-PSI0655 (配列番号 1734 ~ 1736) は、いずれの濃度でも結合しなかった。PSI0656 (配列番号 17

37) は、1000 nM で弱く結合したが、100 nM では結合しなかった。

【0343】

Biacore FcRn 親和性分析：FcRn に対する親和性は、配列番号 1735 > 配列番号 1736 > 配列番号 1734 = 配列番号 1737 の順序であった。

【0344】

結論：融合タンパク質（配列番号 1734：1737）の変異 Fc バリエーションは、質および活性に関して前に産生されたタンパク質と等価であった（実施例 10 を参照のこと）。グリカン結合部位の除去により、FCγR3A への結合が排除されたので、配列番号 1734～1736 中の IgG1 Fc 部分のエフェクター機能が取り除かれた。IgG4 Fc を含む配列番号 1737 は、FCγR3A に対する親和性がそのサブクラスの Fc で予想される親和性よりも低かった。配列番号 1735 および 1736 における FcRn 親和性増強変異は親和性を増加させ、配列番号 1735 の増加が最も大きかった。

【0345】

実施形態の項目別表

1. IL-1R-I 結合モチーフ BM を含む IL-1R-I 結合ポリペプチドであって、そのモチーフが、

i) EX₂X₃X₄X₅X₆X₇EIX₁₀X₁₁LPNLX₁₆RX₁₈QYX₂₁AFIX₂₅X₂₆LX₂₈D（配列番号 1686）

（相互に独立して、

X₂ は、A、D、E、F、H、I、L、Q、S、T、および V から選択され；

X₃ は、A、D、E、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₄ は、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₅ は、A、I、および V から選択され；

X₆ は、F、H、I、Q、R、T、V、および Y から選択され；

X₇ は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、Q、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₁₀ は、F および Y から選択され；

X₁₁ は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、および Y から選択され；

X₁₆ は、N および T から選択され；

X₁₈ は、K、R、および S から選択され；

X₂₁ は、Q、T、および V から選択され；

X₂₅ は、I、M、R、V、および Y から選択され；

X₂₆ は、K および S から選択され、ならびに

X₂₈ は、F、I、L、および M から選択される）、

および

ii) X₅ が I または V であることを条件として、i) で定義した配列に対して少なくとも 96% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-1R-I 結合ポリペプチド。

2. 上記 IL-1R-I 結合モチーフが、

i)

X₂ は、A、I、L、T、および V から選択され；

X₃ は、E および Y から選択され；

X₄ は、A、E、I、K、Q、R、T、V、および Y から選択され；

X₅ は、I および V から選択され；

X₆ は、Q および Y から選択され；

X₇ は、F および M から選択され；

X₁₀ は、F および Y から選択され；

10

20

30

40

50

X_{11} は、A、D、E、F、G、H、K、L、Q、R、S、T、V、およびYから選択され；

X_{16} は、NおよびTから選択され；

X_{18} は、KおよびRから選択され；

X_{21} は、TおよびVから選択され；

X_{25} は、IおよびRから選択され；

X_{26} は、KおよびSから選択され、ならびに

X_{28} は、FおよびLから選択される、配列、ならびに

i) で定義した配列に対して少なくとも93%同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-1R-I結合ポリペプチド。

10

3. 配列 i) が、以下の10の条件 I ~ X：

I. X_3 はEであること；

II. X_5 は、IおよびVから選択されること；

III. X_6 は、QおよびYから選択されること；

IV. X_7 は、FおよびMから選択されること；

V. X_{10} は、FおよびYから選択されること；

VI. X_{18} は、KおよびRから選択されること；

VII. X_{21} はTであること；

VIII. X_{25} はRであること；

IX. X_{26} は、KおよびSから選択されること；ならびに

20

X. X_{28} は、FおよびLから選択されること

のうちの少なくとも5つを満たす、先行項目のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

4. 配列 i) が、10の条件 I ~ Xのうちの少なくとも6つを満たす、項目3に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

5. 配列 i) が、10の条件 I ~ Xのうちの少なくとも7つを満たす、項目4に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

6. 配列 i) が、10の条件 I ~ Xのうちの少なくとも8つを満たす、項目5に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

7. 配列 i) が、10の条件 I ~ Xのうちの少なくとも9つを満たす、項目6に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

30

8. 配列 i) が、10の条件 I ~ Xの全てを満たす、項目7に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

9. $X_2 X_3 X_6$ がVEQまたはVEYである、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

10. $X_2 X_3 X_6$ がIEQまたはVEQである、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

11. $X_6 X_{10}$ がQF、QY、YF、およびYYからなる群から選択される、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

12. $X_6 X_{10}$ がQFである、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

40

13. $X_{10} X_{18}$ がFK、FR、YK、およびYRからなる群から選択される、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

14. $X_{10} X_{18}$ がFKまたはFRである、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

15. $X_{18} X_{25} X_{28}$ がKRLまたはRRLである、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

16. $X_5 X_7$ がIMまたはVMである、項目1~8のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

17. 配列 i) が、配列番号1~1632および1679からなる群（配列番号20~1

50

6 3 2 および 1 6 7 9 からなる群など) から選択される配列中の 8 位～3 6 位の配列に対応する、先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

1 8. 配列 i) が、配列番号 1 2 0 6 ～1 6 3 2 および 1 6 7 9 からなる群 (配列番号 1 2 1 0 ～1 6 3 2 および 1 6 7 9 からなる群など) から選択される配列中の 8 位～3 6 位の配列に対応する、先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

1 9. 配列 i) が、配列番号 1 2 5 2、1 2 8 5、1 3 0 7、1 3 0 8、1 3 2 8、1 3 3 1、1 4 1 5、1 4 2 1、1 4 3 5、1 5 9 4、および 1 6 7 9 からなる群 (配列番号 1 2 5 2、1 3 2 8、1 4 3 5、および 1 6 7 9 からなる群など) から選択される配列中の 8 位～3 6 位の配列に対応する、先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 0. 配列 i) が、配列番号 1 2 5 2 中の 8 位～3 6 位の配列に対応する、項目 1 9 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 1. 配列 i) が、配列番号 1 3 2 8 中の 8 位～3 6 位の配列に対応する、項目 1 9 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 2. 配列 i) が、配列番号 1 4 3 5 中の 8 位～3 6 位の配列に対応する、項目 1 9 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 3. 上記 I L - 1 R - I 結合モチーフが、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する、先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 4. 上記 I L - 1 R - I 結合モチーフが、上記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内に、相互連結ループと共に 2 つのヘリックスの一部を本質的に形成する、項目 2 3 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 5. 上記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインが、細菌受容体ドメインから選択される、項目 2 4 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 6. 上記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインが、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A のドメインまたはその誘導体から選択される、項目 2 5 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 7. 結合モジュール B M o d を含み、そのアミノ酸配列が、

i i i) K - [B M] - D P S Q S X_a X_b L L X_c E A K K L X_d X_e X_f Q ; (配列番号 1 6 8 7)

(

[B M] は、項目 1 ～2 2 のいずれか 1 つに定義の I L - 1 R - I 結合モチーフであり ;

X_a は、A および S から選択され ;

X_b は、N および E から選択され ;

X_c は、A、S、および C から選択され ;

X_d は、E、N、および S から選択され ;

X_e は、D、E、および S から選択され ;

X_f は、A および S から選択される) ; および

i v) i i i) で定義した配列に対して少なくとも 9 1 % 同一性を有するアミノ酸配列から選択される、先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 8. 配列 i i i) が、配列番号 1 ～1 6 3 8、1 6 6 7 ～1 6 6 8、および 1 6 7 0 ～1 6 7 9 からなる群 (配列番号 2 0 ～1 6 3 8 および 1 6 7 0 ～1 6 7 9 からなる群など) から選択される配列中の 7 位～5 5 位の配列に対応する、先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

2 9. 配列 i i i) が、配列番号 1 2 0 6 ～1 6 3 2 および 1 6 7 0 ～1 6 7 9 からなる群 (配列番号 1 2 1 0 ～1 6 3 2 および 1 6 7 0 ～1 6 7 9 からなる群など) から選択される配列中の 7 位～5 5 位の配列に対応する、項目 2 8 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

3 0. 配列 i i i) が、配列番号 1 2 5 2、1 2 8 5、1 3 0 7、1 3 0 8、1 3 2 8、1 3 3 1、1 4 1 5、1 4 2 1、1 4 3 5、1 5 9 4、および 1 6 7 0 ～1 6 7 9 からなる群 (配列番号 1 2 5 2、1 3 2 8、1 4 3 5、1 6 7 2、1 6 7 5 ～1 6 7 6、および

10

20

30

40

50

1679からなる群など)から選択される配列中の7位～55位の配列に対応する、項目28に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

31. 配列iii)が、配列番号1672中の7位～55位の配列に対応する、項目30に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

32. 配列iii)が、配列番号1675中の7位～55位の配列に対応する、項目30に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

33. 配列iii)が、配列番号1676中の7位～55位の配列に対応する、項目30に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

34. ADNNFNK-[BM]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK

配列番号1695;

ADNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK 配列番号1696;

ADNKFNK-[BM]-DPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK 配列番号1697;

ADAQQNNFNK-[BM]-DPSQSTNVLGAEAKKLNESQAPK

配列番号1698;

AQHDE-[BM]-DPSQSANVLGEAQKLND SQAPK 配列番号1699;

VDNKFNK-[BM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK 配列番号1700;

AEAKYAK-[BM]-DPSESSELLSEAKKLNKSQAPK 配列番号1701;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK 配列番号1702;

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDSQAPK 配列番号1703;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK 配列番号1704;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAP 配列番号1705;

AEAKFAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK 配列番号1706;

AEAKFAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAP 配列番号1707;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK 配列番号1708;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAPK 配列番号1709;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAP 配列番号1710;

AEAKFAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAPK 配列番号1711;

AEAKFAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAP 配列番号1712;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSSEAQAPK 配列番号1713;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAPK 配列番号1714;

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAP 配列番号1715;

10

20

30

40

50

AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLESAQAPK 号1716;	配列番	
AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSDSQAPK 号1717;	配列番	
AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSDSQAP 1718;	配列番号	
AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDSQAPK 号1719;	配列番	
AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDAQAPK 号1720;	配列番	10
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK 号1721;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDDAQAPK 号1722;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAPK 号1723;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSAQAPK 号1724;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLESSQAPK 号1725;	配列番	20
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLESAQAPK 号1726;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSDSQAPK 号1727;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDSQAPK 号1728;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLSDAQAPK 号1729;	配列番	
VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK 号1730;	配列番	30
AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK 号1731,	配列番	
および		
ADAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK 号1732,	配列番	
から選択されるアミノ酸配列を含み、 [BM]は、項目1~22のいずれか1つに定義のIL-1R-I結合モチーフである、 先行項目のいずれかに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。		
35. xix) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQA PK (配列番号1721) ([BM]は、項目1~22のいずれか1つに定義のIL-1 R-I結合モチーフである、VDKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKK LNDSQAPK (配列番号1721)) ; および		40
xx) BMに隣接する配列中の、xix)に定義の配列に対して少なくとも89%同一性 を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、項目1~34のいずれか1つ に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。		
36. xxi) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQA PK (配列番号1709)		
([BM]は、項目1~22のいずれか1つに定義のIL-1R-I結合モチーフである 、AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAPK (配列番 号1709)) ; および		50

x x i i) BMに隣接する配列中の、x x i) に定義の配列に対して少なくとも89%同一性を有するアミノ酸配列

から選択されるアミノ酸配列を含む、項目1~34のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

37. 配列x i x) またはx x i) が、配列番号1~1632、1667~1668、および1670~1679からなる群(配列番号20~1632、1667~1668、および1670~1679からなる群など)から選択される配列中の1位~58位の配列に対応する、項目35または36に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

38. x i x) またはx x i) が、配列番号1206~1632、1667~1668、および1670~1679からなる群(配列番号1210~1632、1667~1668、および1670~1679からなる群など)から選択される配列中の1位~58位の配列に対応する、項目37に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

39. 配列x i x) またはx x i) が、配列番号1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および1670~1679からなる群(配列番号1252、1328、1435、1672、1675~1676、および1679からなる群など)から選択される配列中の1位~58位の配列に対応する、項目38に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

40. 配列x x i) が、配列番号1672中の1位~58位の配列に対応する、項目39に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

41. 配列x x i) が、配列番号1675中の1位~58位の配列に対応する、項目39に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

42. 配列x x i) が、配列番号1676中の1位~58位の配列に対応する、項目39に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

43. IL-1R-I依存性シグナル伝達を遮断することができる、先行項目のいずれかに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

44. 遮断の半数阻害濃度(IC₅₀)が最大で 1×10^{-7} M(最大で 1×10^{-8} Mなど、最大で 1×10^{-9} Mなど、最大で 5×10^{-10} Mなど)である、項目43に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

45. IL-1R-IのIL-1サイトカインとの相互作用(IL-1R-IのIL-1 α および/またはIL-1 β との相互作用など)を遮断することができる、項目43または44に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

46. 相互作用のEC₅₀値が最大で 1×10^{-7} M(最大で 1×10^{-8} Mなど、最大で 5×10^{-9} Mなど、最大で 1×10^{-10} Mなど、最大で 5×10^{-10} Mなど、最大で 2×10^{-10} Mなど)であるようにIL-1R-Iに結合することができる、先行項目のいずれかに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

47. 相互作用のK_D値が最大で 1×10^{-6} M(最大で 1×10^{-7} Mなど、最大で 1×10^{-8} Mなど、最大で 1×10^{-9} Mなど、最大で 9×10^{-10} など)であるようにIL-1R-Iに結合することができる、先行項目のいずれかに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

48. 上記IL-1R-Iが、ヒトIL-1R-IまたはカニクイザルIL-1R-I(ヒトIL-1R-Iなど)である、項目43~47のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

49. C末端および/またはN末端にさらなるアミノ酸を含む、先行項目のいずれかに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

50. 上記さらなるアミノ酸が、産生、精製、in vivoまたはin vitroでの安定化、ポリペプチドのカップリングまたは検出を改善する、項目49に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

51. 少なくとも2つのIL-1R-I結合ポリペプチドモノマー単位を含み、そのアミノ酸配列が同一でも異なってもよい、多量体の形態の先行項目のいずれかに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

52. 上記 I L - 1 R - I 結合ポリペプチドモノマー単位が相互に共有結合している、項目 51 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

53. I L - 1 R - I 結合ポリペプチドモノマー単位が融合タンパク質として発現する、項目 52 に記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

54. 項目 51 ~ 53 のいずれか 1 つに記載の二量体形態の I L - 1 R - I 結合ポリペプチド。

55. ー 先行項目のいずれかに記載の I L - 1 R - I 結合ポリペプチドからなる第 1 の部分；および

ー 所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第 2 の部分

を含む、融合タンパク質または抱合体。

56. 上記所望の生物学的活性が治療活性である、項目 55 に記載の融合タンパク質または抱合体。

57. 上記所望の生物学的活性が結合活性である、項目 55 に記載の融合タンパク質または抱合体。

58. 上記所望の生物学的活性が、上記融合タンパク質または抱合体の組織分布を改変する結合活性である、項目 55 に記載の融合タンパク質または抱合体。

59. 上記所望の生物学的活性が、上記第 2 の部分が融合タンパク質または抱合体の *in vivo* 半減期を増大させるような *in vivo* 半減期増大活性である、項目 57 に記載の融合タンパク質または抱合体。

60. 上記 *in vivo* 半減期増大活性がアルブミン結合活性である、項目 59 に記載の融合タンパク質または抱合体。

61. 上記アルブミン結合活性が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインまたはその誘導体によって得られる、項目 60 に記載の融合タンパク質または抱合体。

62. 上記第 2 の部分が、配列番号 1659 ~ 1661 (配列番号 1661 など) に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、項目 61 に記載の融合タンパク質または抱合体。

63. 上記第 2 の部分が血清アルブミンである、項目 59 に記載の融合タンパク質または抱合体。

64. 上記第 2 の部分が、抗体の F c 部分 (I g G 1 F c または I g G 4 F c など) である、項目 59 に記載の融合タンパク質または抱合体。

65. 上記 F c が、未変異形態の F c と比較して F c R n の改善および／またはエフェクター応答の減少を示す変異 F c である、項目 64 に記載の融合タンパク質または抱合体。

66. 上記第 2 の部分がトランスフェリンである、項目 58 または 59 に記載の融合タンパク質または抱合体。

67. 配列番号 1639 ~ 1658 および 1734 ~ 1737 からなる群 (配列番号 1646 ~ 1654 および 1734 ~ 1737 からなる群など) から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、項目 59 ~ 65 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質または抱合体。

68. 上記結合活性が生物学的活性を遮断するように作用する、項目 57 に記載の融合タンパク質または抱合体。

69. 少なくとも 1 つのリンカーをさらに含み、上記リンカーが可動性アミノ酸リンカー、固定アミノ酸リンカー、および切断可能なアミノ酸リンカーからなる群から任意選択的に選択される、項目 55 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質または抱合体。

70. 上記リンカーが、上記第 1 の部分と上記第 2 の部分との間に配置されている、項目 69 に記載の融合タンパク質または抱合体。

71. 上記リンカーが、上記第 1 の部分内に配置されている、項目 69 に記載の融合タンパク質または抱合体。

72. 上記リンカーが、グリシン、セリン、およびアラニンからなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基を含む可動性リンカーである、項目 69 または 70 に記載の融合タンパク質または抱合体。

10

20

30

40

50

73. 上記リンカーが、GS、VDSS、VDGS、VEGS、ASGS、(GGGS)₂ (配列番号1683)、AS(GGGGS)₂ (配列番号1684)、および((KEAAA)₃KE LAA)₂ (配列番号1685)からなる群から選択される、項目72に記載の融合タンパク質または抱合体。

74. 上記リンカーが、AS(GGGGS)₂ (配列番号1684)および((KEAAA)₃KE LAA)₂ (配列番号1685)から選択される、項目73に記載の融合タンパク質または抱合体。

75. 項目1~74のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

76. 項目75に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

77. 項目76に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

78. 一上記発現ベクターからの上記ポリペプチドの発現を許容する条件下で項目77に記載の宿主細胞を培養する工程、および

一上記ポリペプチドを単離する工程

を含む、項目1~77のいずれか1つに記載のポリペプチドを産生する方法。

79. 項目1~74のいずれか1項に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、または抱合体、および少なくとも1つの薬学的に許容され得る賦形剤または担体を含む組成物。

80. 少なくとも1つのさらなる活性薬剤(免疫応答改変剤および抗癌剤から選択される薬剤など)をさらに含む、項目79に記載の組成物。

81. 上記融合タンパク質が請求項59~67のいずれか1項に記載の融合タンパク質である、項目79または80に記載の組成物。

82. 医薬、診断剤、および/または予後剤として使用するための、項目1~74のいずれか1つに記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体または項目79~81のいずれか1つに記載の組成物。

83. 医薬として使用するための、項目82記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

84. 上記ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物が、IL-1R-I機能を*in vivo*で調整する、項目83に記載の使用のためのIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

85. 診断剤および/または予後剤として使用するための、項目82に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

86. IL-1R-I関連障害の治療、予後、または診断における項目82~85のいずれか1項に記載の使用のためのIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

87. 上記IL-1R-I関連障害が、炎症性疾患、自己炎症性症候群、自己免疫疾患、感染症、心血管疾患、虚血性疾患、癌、および糖尿病からなる群から選択される、項目86に記載の使用のためのIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

88. 上記IL-1R-I関連障害が、家族性地中海熱(FMF); クリオピリン関連周期性症候群(CAPS); TNF受容体関連周期性症候群(TRAPS); 高IgD症候群(HIDS); 周期性熱; アフト性口内炎; 咽頭炎; 腺炎(PFAPA); 関節リウマチ(RA)、若年性RA、若年性特発性関節炎、全身性若年性特発性関節炎; 成人発症ステイル病; シュニッツラー症候群; マックル・ウェルズ症候群; マクロファージ活性化症候群; ベーチェット病; ブドウ膜炎; 尋常性ざ瘡; 壊疽性膿皮症; 痛風; 2型糖尿病、初発糖尿病; 眼乾燥症候群; 汗腺膿瘍; 好中球性皮膚症、特に、組織球貪食性脂肪組織炎、ウェーバー・クリスチャン病、および好中球性脂肪組織炎; 心血管疾患、心筋梗塞、卒中; 肝不全、腎不全; 急性肺損傷; 偽痛風、カルシウムピロリン酸沈着症、軟骨石灰化症、IL-1受容体アンタゴニスト欠損症(DIRA)、IL-36受容体アンタゴニスト欠損症(DITRA)、ADAM2欠損症(DADA2)、化膿性関節炎、壊疽性膿皮症・ア

10

20

30

40

50

クネ（PAPA）症候群、壊疽性膿皮症・アクネ・化膿性汗腺炎（PASH）症候群、PAPA・化膿性汗腺炎（PAPASH）症候群、リンパ水腫を伴う自己炎症性症候群（AILE）、ホスホリパーゼC- γ -2変異自己炎症性症候群、NALP12関連周期性症候群（NAPS12）、メバロン酸キナーゼ欠損症（MKD）、乾癬性関節炎、反応性関節炎、強直性脊椎炎、ヘモクロマトーシス関連関節炎、関節周囲石灰沈着症、骨関節炎、炎症性骨関節炎、変形性手関節症、膿疱性乾癬（全般性膿疱性乾癬（GPP）、手拳足底膿疱症（PPP）、アロボー稽留性肢端皮膚炎（ACH）など）；ブラウ症候群；スイート症候群；種々の脈管炎（巨細胞性動脈炎（GCA）、リウマチ性多発筋痛（PMR）、高安動脈炎、川崎病、蕁麻疹様血管炎、およびヘノッホ・シェーンライン紫斑病（HSP）など）；好中球性蕁麻疹および特発性寒冷蕁麻疹；扁平苔癬；多発性筋炎、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、および封入体筋炎筋炎；種々の病期の骨髄腫（くすぶり型骨髄腫（SMM）、無症候性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、および多発性骨髄腫など）；腫瘍性悪液質；固形腫瘍成長；新生児期障害（気管支肺異形成（予防法）、壊死性小腸結腸炎（NEC）、未熟児網膜症（ROP）、周産期脳虚血に起因する脳性麻痺、および乳児呼吸急迫症候群（IRDS）など）；ホイップル病；外傷性脳損傷；難治性癲癇；全身性炎症反応症候群（SIRS）；皮膚ループス；イエスナー・カノフ病；筋萎縮性側索硬化症；全身性硬化症（強皮症）；敗血症性ショック；急性膵炎；慢性再発性多病巣性骨髄炎、非細菌性骨炎（NBO）、滑膜炎・ざ瘡・膿疱症・骨増殖症・骨炎（SAPHO）症候群、およびマジード症候群；再発性多発性軟骨炎；特発性再発性心包炎（IRP）；心筋炎；エルドハイム・チェスター病；若年性黄色肉芽腫；膵島細胞移植；血液透析誘導性全身性炎症；移植片対宿主病；ANCA関連糸球体腎炎および再発性糸球体腎炎；コーガン症候群；自己免疫性内耳疾患；慢性肉芽腫性疾患（CGD）；キャスルマン病；心不全；拡張期心不全；抗シンターゼ症候群；急性ACL損傷；急性出血性白質脳炎；AA アミロイド症；ディジョージ症候群；全般性疲労；慢性疲労症候群（CFS）；湾岸戦争病（GWI）；および発作睡眠からなる群から選択される、項目86または87に記載の使用のためのIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

89. 上記IL-1R-I関連障害が、癌（多発性骨髄腫、結腸癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、黒色腫、および前立腺癌からなる群から選択される癌など）である、項目87に記載の使用のためのIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

90. 上記IL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に、疾患発症から24時間以内に反復して（疾患発症から24時間以内に少なくとも2回など、疾患発症から24時間以内に少なくとも3回など、疾患発症から24時間連続的になど）投与する、項目82～89のいずれか1項に記載の使用のためのIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

91. 上記融合タンパク質または抱合体が項目58～67のいずれか1つに記載の融合タンパク質または抱合体であり、上記組成物が項目81に記載の組成物である、項目82～84、86～89のいずれか1つに記載の使用のための融合タンパク質、抱合体、または組成物。

92. 上記融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に、週1回投与する、項目91に記載の使用のための融合タンパク質、抱合体、または組成物。

93. 有効量の項目1～74のいずれか1項に記載のIL-1R-I結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体または項目79～81のいずれか1つに記載の組成物を、それらを必要とする被験体に、投与する工程を含む、IL-1R-I関連障害を治療する方法。

94. 上記IL-1R-I関連障害が、炎症性疾患、自己炎症性症候群、自己免疫疾患、感染症、心血管疾患、虚血性疾患、癌、および糖尿病からなる群から選択される、項目93に記載の方法。

95. 上記IL-1R-I関連障害が項目88に定義の群から選択される、項目93また

10

20

30

40

50

は 9 4 に記載の方法。

9 6 . 上記 I L - 1 R - I 関連障害が癌（多発性骨髄腫、結腸癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、黒色腫、および前立腺癌からなる群から選択される癌など）である、項目 9 4 に記載の方法。

9 7 . 上記 I L - 1 R - I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に、疾患発症から 2 4 時間以内に反復して（疾患発症から 2 4 時間以内に少なくとも 2 回など、疾患発症から 2 4 時間以内に少なくとも 3 回など、疾患発症から 2 4 時間連続的になど）投与する、項目 9 3 ～ 9 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

9 8 . 上記融合タンパク質または抱合体が項目 5 9 ～ 6 7 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質または抱合体であり、上記組成物が項目 8 1 に記載の組成物である、項目 9 3 ～ 9 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

9 9 . 上記融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に、週 1 回投与する、項目 9 7 に記載の方法。

10

【図 1 A】

品名	配列番号
VDKAYAEADATNFIYLPULTRQVYAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	1
VDKAYAEAKTAQIEIYDLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	2
VDKAYAEDEQAQIEIYDLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	3
VDKAYAEVLYAYWEIYFALPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	4
VDKAYAEVYNAHHEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	5
VDKAYAEAHHAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	6
VDKAYAEARAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	7
VDKAYAEADHQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	8
VDKAYAEARPAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	9
VDKAYAEALLQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	10
VDKAYAEALQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	11
VDKAYAEALQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	12
VDKAYAEALQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	13
VDKAYAEVYARDEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	14
VDKAYAEARQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	15
VDKAYAEAFSAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	16
VDKAYAEADAAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	17
VDKAYAEHWAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	18
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	19
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	20
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	21
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	22
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	23
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	24
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	25
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	26
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	27
VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	28

【図 1 B】

FIGURE 1B

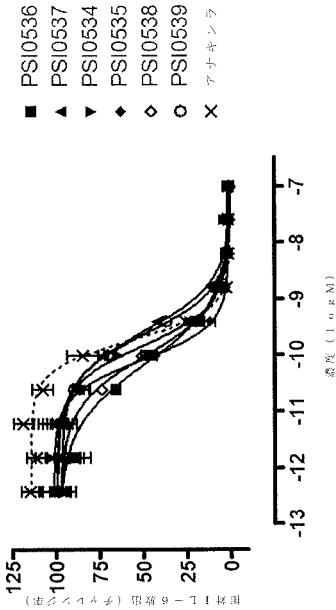
Z15819	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	29
Z15820	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	30
Z15821	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	31
Z15822	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	32
Z15823	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	33
Z15824	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	34
Z15825	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	35
Z15826	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	36
Z15827	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	37
Z15828	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	38
Z15829	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	39
Z15830	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	40
Z15831	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	41
Z15832	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	42
Z15833	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	43
Z15834	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	44
Z15835	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	45
Z15836	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	46
Z15837	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	47
Z15838	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	48
Z15839	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	49
Z15840	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	50
Z15841	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	51
Z15842	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	52
Z15843	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	53
Z15844	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	54
Z15845	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	55
Z15846	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	56
Z15847	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	57
Z15848	VDKAYAEVQAQIEIYFQLPULTRQVAFIRKLDDPSQSELLSEAKKLINDSQAPK	57

【図 1 B K】

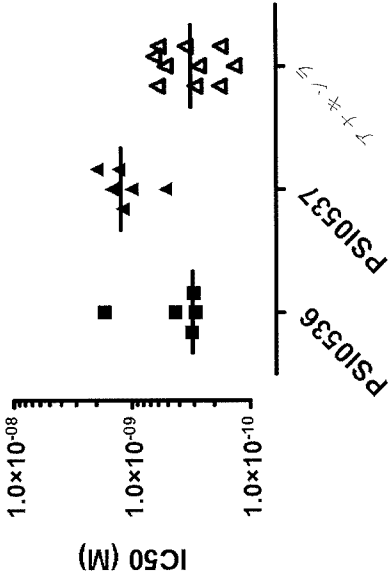
FIGURE 1BK

GS-hl-1B	GSAFVRSINCTLRSGQKSGVNGGPFYELKALHLDQDMEQGVFSMSFVQERSNDXIEVALGLREK NLLLECVJAKODDEPTLQESVUPNATFPGQMEKEVFENCIEINKLEFSQAQFPMNTISPSQARNREV FLLGGSLKGGQSLIDVLIHQVYGG	1733
PSI0536	AEAKYAEVEEQIMEIFRLPNLTRQYTAIRKLLDDPSQSELSEAKLSEQAQKASGGGGGGGSDKHTHCP PCPAPELLGGPSVLFPPKPKOTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNNWVDGVVHNATKPREQYASTYRV VSVTVIHQDWLNGKEYCKKCKSNALPAPKEKTSKAGQPREPQVYTLPPSRDELTMNQVSLCLVGGTPPSDIA VEVESNGQPPNNYKTTTPVLDSDGSFELYSLTYDKSRWQGNVFSQVHEALHSHYTKQSLSPK	1734
PSI0537	AEAKYAEVEEQIMEIFRLPNLTRQYTAIRKLLDDPSQSELSEAKLSEQAQKASGGGGGGGSDKHTHCP PCPAPELLGGPSVLFPPKPKOTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNNWVDGVVHNATKPREQYASTYRV VSVTVIHQDWLNGKEYCKKCKSNALPAPKEKTSKAGQPREPQVYTLPPSRDELTMNQVSLCLVGGTPPSDIA VEVESNGQPPNNYKTTTPVLDSDGSFELYSLTYDKSRWQGNVFSQVHEALHSHYTKQSLSPK	1735
PSI0538	AEAKYAEVEEQIMEIFRLPNLTRQYTAIRKLLDDPSQSELSEAKLSEQAQKASGGGGGGGSDKHTHCP PCPAPELLGGPSVLFPPKPKOTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNNWVDGVVHNATKPREQYASTYRV VSVTVIHQDWLNGKEYCKKCKSNALPAPKEKTSKAGQPREPQVYTLPPSRDELTMNQVSLCLVGGTPPSDIA VEVESNGQPPNNYKTTTPVLDSDGSFELYSLTYDKSRWQGNVFSQVHEALHSHYTKQSLSPK	1736
PSI0539	AEAKYAEVEEQIMEIFRLPNLTRQYTAIRKLLDDPSQSELSEAKLSEQAQKASGGGGGGGSDKHTHCP PCPAPELLGGPSVLFPPKPKOTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFNNWVDGVVHNATKPREQYASTYRV VSVTVIHQDWLNGKEYCKKCKSNALPAPKEKTSKAGQPREPQVYTLPPSRDELTMNQVSLCLVGGTPPSDIA VEVESNGQPPNNYKTTTPVLDSDGSFELYSLTYDKSRWQGNVFSQVHEALHSHYTKQSLSPK	1737

【図 2】



【図 3】



【配列表】

2020515252000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成31年1月19日(2019.1.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

IL-1R-I結合モチーフBMを含むIL-1R-I結合ポリペプチドであって、前記モチーフが、

i) $EX_2X_3X_4X_5X_6X_7EI X_{10}X_{11}LPNLX_{16}RX_{18}QYX_{21}AFIX_{25}X_{26}LX_{28}D$ (配列番号1686)

(相互に独立して、

X_2 は、A、I、L、T、およびVから選択され；

X_3 は、E、およびYから選択され；

X_4 は、A、E、I、K、Q、R、T、V、およびYから選択され；

X_5 は、I、およびVから選択され；

X_6 は、Q、およびYから選択され；

X_7 は、F、およびMから選択され；

X_{10} は、F、およびYから選択され；

X_{11} は、A、D、E、F、G、H、K、L、Q、R、S、T、V、およびYから選択され；

X_{16} は、N、およびTから選択され；

X_{18} は、K、およびRから選択され；

X_{21} は、T、およびVから選択され；

X_{25} は、I、およびRから選択され；

X_{26} は、K、およびSから選択され、ならびに

X_{28} は、F、およびLから選択される)、

および

ii) X_5 がIまたはVであることを条件として、i) で定義した配列に対して少なくとも93%同一性を有するアミノ酸配列

から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-1R-I結合ポリペプチド。

【請求項2】

IL-1R-I結合モチーフBMを含むIL-1R-I結合ポリペプチドであって、前記モチーフが、

i) 配列番号1~1632および1679からなる群(配列番号20~1632および1679からなる群など)から選択される配列中の8位~36位の配列

および

ii) X_5 がIまたはVであることを条件として、i) で定義した配列に対して少なくとも96%同一性を有するアミノ酸配列

から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-1R-I結合ポリペプチド。

【請求項3】

配列i) が、以下の10の条件I~X:

I. X_3 はEであること；

II. X_5 は、I、およびVから選択されること；

III. X_6 は、Q、およびYから選択されること；

IV. X_7 は、F、およびMから選択されること；

V. X_{10} は、F、および Y から選択されること；
 VI. X_{18} は、K、および R から選択されること；
 VII. X_{21} は T であること；
 VIII. X_{25} は R であること；
 IX. X_{26} は、K、および S から選択されること；ならびに
 X. X_{28} は、F、および L から選択されること
 のうちの少なくとも 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、または全てなど）を満たす、請求項 1 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 4】

配列 i) が、配列番号 1206～1632 および 1679 からなる群（配列番号 1210～1632 および 1679 からなる群など）から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する、請求項 2 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 5】

配列 i) が、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1679 からなる群（配列番号 1252、1328、1435、および 1679 からなる群など）から選択される配列中の 8 位～36 位の配列に対応する、請求項 4 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 6】

前記 IL-1R-I 結合モチーフが、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成し、前記 IL-1R-I 結合モチーフが、前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内に、相互連結ループと共に 2 つのヘリックスの一部を本質的に形成することが好ましい、先行請求項のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインが、細菌受容体ドメイン、好ましくは *Staphylococcus aureus* 由来のプロテイン A のドメインまたはその誘導体から選択される、請求項 6 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 8】

xxi) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK（配列番号 1721）（[BM] が、先行請求項のいずれか 1 項に定義の IL-1R-I 結合モチーフである）；および

xx) BM に隣接する配列中の、xxi) に定義の配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 9】

xxi) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSSESQAPK（配列番号 1709）（[BM] が、請求項 1～8 のいずれか 1 項に定義の IL-1R-I 結合モチーフである）；

および

xxii) BM に隣接する配列中の、xxi) に定義の配列に対して少なくとも 89% 同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 10】

配列 xix) または xxi) が、配列番号 1～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群（配列番号 20～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群など）から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する、請求項 8 または 9 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 11】

xxi) または xxi) が、配列番号 1206～1632、1667～1668、および 1670～1679 からなる群（配列番号 1210～1632、1667～1668、

および 1670～1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する、請求項 10 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 12】

配列 xix) または xxi) が、配列番号 1252、1285、1307、1308、1328、1331、1415、1421、1435、1594、および 1670～1679 からなる群 (配列番号 1252、1328、1435、1672、1675～1676、および 1679 からなる群など) から選択される配列中の 1 位～58 位の配列に対応する、請求項 11 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 13】

IL-1R-I の IL-1 サイトカインとの相互作用 (IL-1R-I の IL-1 α および/または IL-1 β との相互作用など) を遮断することができる、先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 14】

前記相互作用の K_D 値が最大で 1×10^{-6} M (最大で 1×10^{-7} M など、最大で 1×10^{-8} M など、最大で 1×10^{-9} M など、最大で 9×10^{-10} など) であるように IL-1R-I に結合することができる、先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 15】

前記 IL-1R-I が、ヒト IL-1R-I またはカニクイザル IL-1R-I (ヒト IL-1R-I など) である、請求項 13 または 14 に記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 16】

少なくとも 2 つの IL-1R-I 結合ポリペプチドモノマー単位を含み、そのアミノ酸配列が同一でも異なってもよい、多量体の形態の先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチド。

【請求項 17】

— 先行請求項のいずれかに記載の IL-1R-I 結合ポリペプチドからなる第 1 の部分 ; および
— 所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第 2 の部分
を含む、融合タンパク質または抱合体。

【請求項 18】

前記所望の生物学的活性が治療活性である、請求項 17 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 19】

前記所望の生物学的活性が結合活性である、請求項 17 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 20】

前記所望の生物学的活性が、前記融合タンパク質または抱合体の組織分布を改変する結合活性である、請求項 17 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 21】

前記所望の生物学的活性が、前記第 2 の部分が前記融合タンパク質または抱合体の in vivo 半減期を増大させるような in vivo 半減期増大活性である、請求項 17 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 22】

前記第 2 の部分が、連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインまたはその誘導体 ; 血清アルブミン ; 抗体の Fc 部分、およびトランスフェリンからなる群から選択される、請求項 17 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 23】

前記第 2 の部分が、抗体の Fc 部分 (IgG1 Fc または IgG4 Fc など) である、請求項 22 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 24】

前記 F c が、未変異形態の F c と比較して F c R n に対する親和性の改善および／またはエフェクター応答の減少を示す変異 F c である、請求項 23 に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 25】

配列番号 1639～1658 および 1734～1737 からなる群（配列番号 1648～1654 および 1734～1737 からなる群など）から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質または抱合体。

【請求項 26】

請求項 1～25 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 29】

請求項 1～25 のいずれか 1 項に記載の I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、または抱合体、および少なくとも 1 つの薬学的に許容され得る賦形剤または担体を含む組成物。

【請求項 30】

少なくとも 1 つのさらなる活性薬剤（免疫応答改変剤および抗癌剤から選択される薬剤など）をさらに含む、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記融合タンパク質が請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質である、請求項 29 または 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

医薬、診断剤、および／または予後剤として使用するための、請求項 1～25 のいずれか 1 項に記載の I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、もしくは抱合体または請求項 29～31 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 33】

医薬として使用するための、請求項 32 に記載の I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 34】

I L－1 R－I 関連障害の治療、予後、または診断における請求項 32～33 のいずれか 1 項に記載の使用のための I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 35】

前記 I L－1 R－I 関連障害が、炎症性疾患、自己炎症性症候群、自己免疫疾患、感染症、心血管疾患、虚血性疾患、癌、および糖尿病からなる群から選択される、請求項 34 に記載の使用のための I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 36】

前記 I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被験体に、疾患発症から 24 時間以内に反復して（疾患発症から 24 時間以内に少なくとも 2 回など、疾患発症から 24 時間以内に少なくとも 3 回など、疾患発症から 24 時間連続的になど）投与する、請求項 32～35 のいずれか 1 項に記載の使用のための I L－1 R－I 結合ポリペプチド、融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 37】

前記融合タンパク質または抱合体が請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の融合タン

パク質または抱合体であり、前記組成物が請求項 3 1 に記載の組成物である、請求項 3 2 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の使用のための融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【請求項 3 8】

前記融合タンパク質、抱合体、または組成物を、それらを必要とする被検体に、週 1 回投与する、請求項 3 7 に記載の使用のための融合タンパク質、抱合体、または組成物。

【手続補正書】

【提出日】令和1年11月25日(2019.11.25)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2020515252000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/058448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/00 C07K14/31
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/063308 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; DREW PHILIP D [GB]; DE WILDT RUDOLF M T [GB]; TOMLI) 7 June 2007 (2007-06-07) page 2, column 7 - page 3, column 16 page 16, line 18 - page 17, line 8 -----	1-39
A	NYGREN PER-AKE: "Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold", FEBS JOURNAL, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 275, no. 11, 1 June 2008 (2008-06-01) , pages 2668-2676, XP002601623, ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/J.1742-4658.2008.06438.X ----- -/-	1-39

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 2018

Date of mailing of the international search report

11/06/2018

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

Marinoni J-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/058448

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRIMM S ET AL: "Selection and characterisation of affibody molecules inhibiting the interaction between Ras and Raf in vitro", NEW BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 27, no. 6, 31 December 2010 (2010-12-31), pages 766-773, XP027539673, ISSN: 1871-6784 [retrieved on 2010-11-30] -----	1-39
A	WO 2013/126006 A1 (SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB PUBL [SE]) 29 August 2013 (2013-08-29) -----	1-39
A	WO 2011/110515 A1 (AFFIBODY AB [SE]; ABRAHMSSEN LARS [SE]) 15 September 2011 (2011-09-15) -----	1-39
A	WO 2014/064237 A1 (AFFIBODY AB [SE]) 1 May 2014 (2014-05-01) -----	1-39
A	WO 2009/077175 A1 (AFFIBODY AB [SE]; LINDBORG MALIN [SE]; GUNNERIUSSON ELIN [SE]; LENDEL) 25 June 2009 (2009-06-25) -----	1-39
A	WO 2014/140366 A1 (AFFIBODY AB [SE]) 18 September 2014 (2014-09-18) -----	1-39
A	WO 2016/113246 A1 (AFFIBODY AB [SE]) 21 July 2016 (2016-07-21) -----	1-39
A	GRONWALL ET AL: "Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid @b peptides", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 128, no. 1, 23 December 2006 (2006-12-23), pages 162-183, XP005734691, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2006.09.013 -----	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/058448

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007063308 A2	07-06-2007	AU 2006321364 A1	07-06-2007
		CA 2632866 A1	07-06-2007
		CN 101454344 A	10-06-2009
		CR 10022 A	22-09-2008
		EA 200801170 A1	30-12-2008
		EP 1957536 A2	20-08-2008
		JP 2009519011 A	14-05-2009
		KR 20080077238 A	21-08-2008
		MA 30300 B1	01-04-2009
		TW 200730539 A	16-08-2007
		US 2009155283 A1	18-06-2009
		WO 2007063308 A2	07-06-2007
WO 2013126006 A1	29-08-2013	AU 2013222836 A1	18-09-2014
		AU 2017245376 A1	02-11-2017
		CA 2863862 A1	29-08-2013
		CN 104114574 A	22-10-2014
		EP 2817329 A1	31-12-2014
		HK 1204790 A1	04-12-2015
		JP 6276202 B2	07-02-2018
		JP 2015508652 A	23-03-2015
		JP 2018052942 A	05-04-2018
		KR 20140129163 A	06-11-2014
		NZ 628625 A	31-03-2016
		PH 12014501604 A1	08-10-2014
		RU 2014137303 A	10-04-2016
		SG 11201404942U A	26-09-2014
		US 2015011474 A1	08-01-2015
		US 2018085428 A1	29-03-2018
		WO 2013126006 A1	29-08-2013
		ZA 201406773 B	31-08-2016
WO 2011110515 A1	15-09-2011	CA 2789738 A1	15-09-2011
		CN 102811782 A	05-12-2012
		CN 107686513 A	13-02-2018
		DK 2544785 T3	18-01-2016
		DK 2977088 T3	09-10-2017
		EP 2544785 A1	16-01-2013
		EP 2977088 A1	27-01-2016
		ES 2641896 T3	14-11-2017
		JP 5951509 B2	13-07-2016
		JP 2013528567 A	11-07-2013
		US 2013203962 A1	08-08-2013
		WO 2011110515 A1	15-09-2011
WO 2014064237 A1	01-05-2014	AU 2013336646 A1	28-05-2015
		CA 2889037 A1	01-05-2014
		CN 104854127 A	19-08-2015
		DK 2912054 T3	11-09-2017
		EP 2912054 A1	02-09-2015
		ES 2639099 T3	25-10-2017
		HK 1210793 A1	06-05-2016
		JP 2015534994 A	07-12-2015
		KR 20150077447 A	07-07-2015
		PL 2912054 T3	30-11-2017
		US 2015291668 A1	15-10-2015
		WO 2014064237 A1	01-05-2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/058448

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009077175 A1	25-06-2009	AT 527353 T DK 2231860 T3 EP 2231860 A1 ES 2373832 T3 WO 2009077175 A1	15-10-2011 05-12-2011 29-09-2010 09-02-2012 25-06-2009
WO 2014140366 A1	18-09-2014	AU 2014230018 A1 CA 2902657 A1 CN 105209482 A DK 2970406 T3 EP 2970406 A1 ES 2660912 T3 HK 1216756 A1 JP 2016511280 A KR 20150132349 A LT 2970406 T RU 2015141224 A US 2016031967 A1 US 2018118807 A1 WO 2014140366 A1	05-11-2015 18-09-2014 30-12-2015 05-02-2018 20-01-2016 26-03-2018 02-12-2016 14-04-2016 25-11-2015 12-03-2018 21-04-2017 04-02-2016 03-05-2018 18-09-2014
WO 2016113246 A1	21-07-2016	AU 2016208161 A1 CA 2972683 A1 CN 108064235 A EP 3245224 A1 JP 2018508186 A KR 20170116023 A US 2017362290 A1 WO 2016113246 A1	13-07-2017 21-07-2016 22-05-2018 22-11-2017 29-03-2018 18-10-2017 21-12-2017 21-07-2016

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K	14/79	(2006.01)	C 0 7 K	14/79
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/00
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53

Z

N

D

(81)指定国・地域 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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

- (72)発明者 フェルドヴィッシュ, ヨアヒム
スウェーデン国, 1 3 5 4 2 ティーレソー, コラルベージェン 1 6
- (72)発明者 リンドバーク, マリン
スウェーデン国, 1 3 2 4 8 サルトヒェーボー, ヒンドベージェン 5
- (72)発明者 ニールソン, ヨアキム
スウェーデン国, 1 8 2 5 2 ダンデリユド, エルジーエイチ 1 8 0 3, メーバイダーレン 5
- (72)発明者 ノードリング, エリック
スウェーデン国, 1 8 2 3 5 ダンデリユド, スポーツツゲベージェン 1 4 エー
- (72)発明者 スウェンソン, ロバート
スウェーデン国, 1 1 1 2 7 ストックホルム, エルジーエイチ 1 3 0 1, ストラ ニガタン 2 0

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA53Y AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24
CA44 CA46
4C076 AA95 CC05 CC07 CC11 CC27 EE41
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 MA05 NA13 ZA362
ZB072 ZB112 ZB262 ZB322 ZC352
4C085 AA14 AA15 BB36 BB42 CC23 EE01 EE03

4H045	AA10	AA11	AA30	BA10	BA41	CA11	CA40	DA70	DA75	EA20
	EA50	FA74	GA26	GA31						

专利名称(译)	il-1r-i结合多肽		
公开(公告)号	JP2020515252A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019552853	申请日	2018-04-03
发明人	フェルドヴィッシュ,ヨアヒム リンドバーグ,マリ ニールソン,ヨアキム ノードリング,エリック スウェンソン,ロバート		
IPC分类号	C12N15/62 C07K19/00 C07K16/00 C07K14/31 C07K14/765 C07K14/79 C12N15/31 C12N15/13 C12N15/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/00 C12N15/63 A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P9/00 A61P3/10 A61K47/68 A61K39/395 A61K38/16 G01N33/53		
CPC分类号	A61P35/00 A61P37/00 C07K14/545 C07K14/7155 C07K14/79 C07K2318/20 C07K2319/00 C07K2319 /21 C07K2319/30 C07K2319/31		
FI分类号	C12N15/62.Z C07K19/00.ZNA C07K16/00 C07K14/31 C07K14/765 C07K14/79 C12N15/31 C12N15/13 C12N15/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/00 C12N15/63.Z A61P35/00 A61P37 /02 A61P29/00 A61P31/00 A61P9/00 A61P3/10 A61K47/68 A61K39/395.N A61K38/16 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA53Y 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC05 4C076 /CC07 4C076/CC11 4C076/CC27 4C076/EE41 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZA362 4C084/ZB072 4C084 /ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC352 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/BB36 4C085 /BB42 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA70 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA74 4H045/GA26 4H045/GA31		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	2017164226 2017-03-31 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开公开了结合基序 (BM) EX 2 X 3 X 4 X 5 X 6。 X 7 EIX 10 X 11 LPNLX 16 RX 18 QYX 包含 21 AFIX 25 X 26 LX 28 D的I型白介素1受体 (IL) -1R-1) 具有结合亲和力的工程化多肽类别。 本公开还涉及此类 IL-1R-1结合多肽作为治疗剂, 预后剂和/或诊断剂的用途。 [选择图]图3

