

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6009678号  
(P6009678)

(45) 発行日 平成28年10月19日(2016.10.19)

(24) 登録日 平成28年9月23日(2016.9.23)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 14/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/00	Z N A
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	

請求項の数 15 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-532409 (P2015-532409)  
 (86) (22) 出願日 平成25年9月19日(2013.9.19)  
 (65) 公表番号 特表2015-531604 (P2015-531604A)  
 (43) 公表日 平成27年11月5日(2015.11.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/069481  
 (87) 国際公開番号 W02014/044758  
 (87) 国際公開日 平成26年3月27日(2014.3.27)  
 審査請求日 平成27年4月21日(2015.4.21)  
 (31) 優先権主張番号 12185425.1  
 (32) 優先日 平成24年9月21日(2012.9.21)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 515077272  
 コバジェン アーゲー  
 COVAGEN AG  
 スイス国 8952 シュリーレン ヴァ  
 ーギシュトラーセ 25  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司  
 (74) 代理人 100181272  
 弁理士 神 絃一郎  
 (74) 代理人 100196298  
 弁理士 井上 高雄  
 (72) 発明者 ミシエラ シラーチ メルッコ  
 スイス国 8952 シュリーレン ヴァ  
 ーギシュトラーセ 25 コバジェン ア  
 ーゲー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な IL-17A 結合分子およびその医療用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコシル化 IL-17A の活性を阻害するポリペプチドであって、  
 ( a ) G V T L F V A L Y D Y ( X <sup>1</sup> ) ( X <sup>2</sup> ) ( X <sup>3</sup> ) ( X <sup>4</sup> ) ( X <sup>5</sup> ) ( X <sup>6</sup> ) D  
 L S F H K G E K F Q I L S T H E Y E D W W E A R S L T T G E T G Y I P S N Y V A  
 P V D S I Q ( 配列番号 1 )、ここで  
( X <sup>1</sup> ) が A、K、S、D または E であり、  
( X <sup>2</sup> ) が N、Q、A、K、S または R であり、  
( X <sup>3</sup> ) が H、K、R、L または V であり、  
( X <sup>4</sup> ) が G または S であり、  
( X <sup>5</sup> ) が H、Q、A、W、V または N であり、  
( X <sup>6</sup> ) が R、L または S であり、

前記ポリペプチドが配列番号 3 ~ 9 のいずれか一つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなる、および

( b ) ( a ) のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列、ここで、同一性決定はアミノ酸位置 ( X <sup>1</sup> ) ~ ( X <sup>6</sup> ) を除外しており、配列番号 1 におけるアミノ酸位置 31 ~ 36 中のアミノ酸配列 S T H E Y E ( 配列番号 2 ) は保存されている、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなるポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 3 ~ 9 のいずれか一つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、また

はそれらからなる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

さらなる化合物と融合した請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを含む融合構築物。

【請求項 4】

前記さらなる化合物が、薬学的に活性がある化合物、プロドラッグ、薬学的に許容される担体、診断的に活性がある化合物、細胞浸透促進剤、および/または血清中半減期を調節する化合物である、請求項 3 に記載の融合構築物。

【請求項 5】

前記さらなる化合物が、

- (a) 蛍光色素、
- (b) 感光剤、
- (c) 放射性核種、
- (d) 医療イメージング用造影剤、
- (e) サイトカイン、
- (f) 毒性化合物、
- (g) ケモカイン、
- (h) 凝血促進因子、
- (i) プロドラッグ活性化用酵素、
- (j) アルブミン結合物質、
- (k) アルブミン、
- (l) IgG 結合物質、または
- (m) ポリエチレングリコール

10

からなる群から選択される、請求項 3 に記載の融合構築物。

【請求項 6】

前記さらなる化合物が、抗体軽鎖、抗体重鎖、抗体の F<sub>c</sub> ドメイン、抗体、またはそれらの組合せからなるか、またはそれらを含む、請求項 3 に記載の融合構築物。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドが、前記さらなる化合物の C 末端の下流に位置する、請求項 6 に記載の融合構築物。

【請求項 8】

前記さらなる化合物が、配列番号 11 を含むかまたはそれからなる抗体軽鎖を含むか、またはそれからなる、請求項 6 または 7 に記載の融合構築物。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の融合構築物の少なくとも 1 コピー、および配列番号 12 の抗体重鎖の少なくとも 1 コピーを含むか、またはそれらからなる構築物。

【請求項 10】

配列番号 16 もしくは 17 を含むかまたはそれからなる融合構築物の少なくとも 1 コピー、および配列番号 12 の抗体重鎖の少なくとも 1 コピーを含むか、またはそれらからなる、請求項 9 に記載の構築物。

【請求項 11】

配列番号 16 もしくは 17 を含むかまたはそれからなる融合構築物の 2 コピー、および配列番号 12 の抗体重鎖の 2 コピーを含むかまたはそれらからなる、請求項 10 に記載の構築物。

40

【請求項 12】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子、または請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の融合構築物、または請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構築物をコードする 1 つまたは複数の核酸分子。

【請求項 13】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド、請求項 3 から 8 のいずれか一項に記載の融合構築物、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構築物、請求項 12 に記載の核酸分子

50

、またはそれらの任意の組合せを含む、医薬または診断用組成物。

【請求項 1 4】

炎症性の、自己免疫性のおよび/または骨量減少関連の疾患の治療において使用するための、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記疾患が、関節炎、関節リウマチ、慢性進行性関節炎、反応性関節炎、乾癬性関節炎、腸疾患性関節炎、変形性関節炎、リウマチ性疾患、脊椎関節症、強直性脊椎炎、ライター症候群、過敏症（気道過敏症と皮膚過敏症の両方含む）、アレルギー、全身性エリテマトーデス、炎症性筋肉障害、多発性軟骨炎、強皮症、ヴェグナー肉芽腫、皮膚筋炎、ステイブンジョンソン症候群、慢性活性化肝炎、重症筋無力症、乾癬、特発性スプルー、自己免疫性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性大腸症候群、内分泌性眼病、グレーブス病、サルコイドーシス、多発性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、若年型糖尿病（I 型糖尿病）、自己免疫性血液障害、溶血性貧血、無形成性貧血、真正赤血球性貧血、特発性血小板減少、ブドウ膜炎（前房および後房）、乾性角結膜炎、角結膜炎春季カタル、間質性肺線維症、糸球体腎炎（ネフローゼ症候群有りおよび無し）、特発性ネフローゼ症候群、微小変化型ネフロパシー、腫瘍、皮膚の炎症性疾患、角膜炎、筋炎、骨部インプラントの弛緩、代謝障害、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、脂質異常症、骨量減少、骨関節炎、骨粗しょう症、歯周疾患、閉塞性または炎症性気道疾患喘息、気管支炎、塵肺症、肺気腫、急性および超急性炎症反応、急性感染、敗血症性ショック、エンドトキシンショック、成人型呼吸窮迫症候群、髄膜炎、肺炎、重度の火傷、カヘキシー消耗性症候群、脳血管発作、ヘルペス性間質性角膜炎およびドライアイ疾患からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリコシル化 IL - 17 A の活性を阻害するポリペプチドであって、( a ) G V T L F V A L Y D Y ( X <sup>1</sup> ) ( X <sup>2</sup> ) ( X <sup>3</sup> ) ( X <sup>4</sup> ) ( X <sup>5</sup> ) ( X <sup>6</sup> ) D L S F H K G E K F Q I L S T H E Y E D W W E A R S L T T G E T G Y I P S N Y V A P V D S I Q ( 配列番号 1 )、ここでアミノ酸位置 ( X <sup>1</sup> ) ~ ( X <sup>6</sup> ) は任意のアミノ酸配列であってよい、および ( b ) ( a ) のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一であるアミノ酸配列、ここで、同一性決定ではアミノ酸位置 ( X <sup>1</sup> ) ~ ( X <sup>6</sup> ) を除外しており、配列番号 1 におけるアミノ酸位置 31 ~ 36 中のアミノ酸配列 S T H E Y E ( 配列番号 2 ) は保存されている、( a ) のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一であるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなるポリペプチドに関する。本発明はさらに、前記ポリペプチドを含む融合構築物、組成物および医療用途に関する。

【0002】

本明細書中、特許出願および製造者のマニュアルを含めた幾つかの文書を引用する。これらの文書の開示は、本発明の特許性と関連があるとは考えられないが、その全容は参照により本明細書に組み込まれている。より具体的には、全ての参照文書は、それぞれ個々の文書が参照により組み込まれていることが具体的および個々に示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれている。

【背景技術】

【0003】

CD4 + T 細胞は、適応性または先天性免疫系の他の細胞を手助けすることにより、免疫応答の調整において中心的役割を果たす。初期の研究では、2 クラスの CD4 + T 細胞 ( Th 1 および Th 2 ) が同定された。さらに近年では、CD4 + T 細胞の新たなサブセット、Th 17 系統が同定された。Th 17 細胞は、Th 1 または Th 2 免疫によって充分には保護されない細胞外細菌、ならびに数種の真菌および微生物に対する高い宿主防御に特化した、適応性免疫系の一部として進化してきたと思われる。

【0004】

10

20

30

40

50

Th17細胞は、新たなサイトカインファミリー、6メンバー(IL-17A~F)を含むことが現在知られているIL-17ファミリーの発見という状況で同定された。(以前CTLA-8と呼ばれていた)IL-17は主にTh17細胞によって発現され、それがこのサイトカインファミリーの基本メンバーであることを示すためにIL-17Aと表した。ヒトインターロイキン-17A(IL-17)は、以前に言及されたように(Miossec P. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361, 888~898頁)、CD4+Tヘルパー17(TH17)細胞系統の定義に重要である、多形質発現、炎症促進性サイトカインである。IL-17Aはホモ二量体分子であり、23アミノ酸シグナルペプチドの切断後、それはグリコシル化、共有結合ホモ二量体として分泌される(NCBI参照配列:NP\_002181.1;UniProtK識別子:Q16552;配列番号10)。F-エンドグリコシダーゼの消化によって、還元性SDS-PAGEで哺乳動物細胞により発現されるヒトIL-17Aのみかけの分子量が22から15kDaに変わり、したがってサイトカインがグリコシル化されることが実証される(Fossiez F. et al. (1998) Int Rev Immunol. 16(5~6), 541~551頁)。

10

#### 【0005】

慢性炎症プロセスの中心メディエーターとして、および以前はTh1媒介性であると考えられていた数タイプの自己免疫状態における主要病原性エフェクターとしてのTh17細胞の同定は、新たな治療手法となる見込みである(Weaver T. et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 25, 821~852頁)。実際、炎症促進性サイトカインIL-17は主にTh17細胞によって発現され、関節リウマチ(RA)がある患者の滑液に高レベルで存在し、初期RA発症と関連があることが示されている。さらに、IL-17はTNF-およびIL-1の強力な誘導物質であり、後者は主に罹患患者の骨腐食および非常に痛みを伴う結果の原因である(Lubberts E. (2008) Cytokine, 41, 84~91頁)。さらに、IL-17の不適切または過剰な生成は、骨関節炎、骨部インプラントの弛緩、急性移植片拒絶(Antony samy et al. (1999) J. Immunol. 162, 577~584頁、van Kooten et al. (1998) J. Am. Soc. Nephrol. 9, 1526~1534頁)、敗血症、敗血症性またはエンドトキシンショック、アレルギー、喘息(Molet et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108, 430~438頁)、骨量減少、乾癬(Teunissen et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111, 645~649頁)、虚血、全身性硬化症(Kurasawa et al. (2000) Arthritis Rheum. 43, 2455~2463頁)、脳血管発作、および他の炎症性障害などの、様々な他の疾患および障害の病状と関係がある。

20

30

#### 【0006】

したがって抗IL-17化合物には、IL-17の中和が関節炎などの炎症プロセスを低減することを実証した幾つかのin vivo試験と一致する、抗炎症剤、治療手法としての可能性がある。例えば、関節炎初期の免疫処置プロトコール後に始まるIL-17受容体-IgG1-Fc融合タンパク質による内在IL-17の初期の中和は、実験的関節炎の発症を抑制する(Lubberts et al. (2001) J. Immunol. 167, 1004~1013頁)。さらに、コラーゲン誘導性関節炎の発症後の動物モデルにおける中和抗IL-17抗体を用いた治療は、関節炎症、軟骨破壊および骨腐食を低減する(Lubberts et al. (2004) Arthritis and Rheumatism, 50, 650~659頁)。組織学的分析により関節炎症の抑制を確認し、全身IL-6レベルは抗IL-17抗体を用いた治療後に有意に低下した。対照的に、マウスIL-17を発現するアデノウイルスベクターを使用した全身および局所IL-17の過剰発現はコラーゲン誘導性関節炎(CIA)の発症を加速させ、その部位における滑液包炎を悪化させた(Lubberts et al. (2001) J. Immunol. 167, 1004~1013頁、およびLubberts et al.

40

50

(2002)、*Inflamm. Res.* 51、102~104頁)。さらに近年、抗IL-17抗体の使用により、乾癬、関節リウマチおよび非感染性ブドウ膜炎の臨床症状が改善されたことを実証することができた(Leonardi C. et al. (2012) *N. Engl. J. Med.* 366、1190~1199頁、Hueber W. et al. (2010) *Sci Transl Med.* 2(52):52ra72)。

#### 【0007】

単一特異性物質は、様々な異なる疾患の治療に広く使用されている。大部分の市販の生物製剤は単一特異性であり、したがって1つの標的に相互作用し干渉することができる。しかしながら、複合疾患は多因性であることが多く、疾患メディエーターの余剰または共同作用に關与する。したがって、多重の、異なる病理学的因子および経路の遮断は治療有効性の改善をもたらし得る(Kontermann R. E. (2012) *mAbs*、4:2、182~197頁)。

10

#### 【0008】

IL-17以外の、炎症性疾患、自己免疫および骨量減少関連疾患、特に関節リウマチを含めた様々な形の関節炎の病因に關与するさらなる重要な分子は、腫瘍壊死因子(TNF)である。幾つかの抗TNF治療剤が関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎およびクローン病の治療に承認されており、他の炎症状態に關して臨床試験されている。それぞれ異なる態様の免疫誘導型炎症経路を阻害する(Scott D. L. (2012) *Clin Pharmacol Ther.* 91(1)、31~43頁中に概説済み)、炎症性関節炎の治療に利用可能な5クラスの生物製剤、(i) TNF阻害剤(アダリムマブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ)、(ii) インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(アナキンラ)、(iii) B細胞阻害剤(リツキシマブ)、(iv) T細胞同時刺激阻害剤(アバタセプト)および(v) インターロイキン-6阻害剤(トシリズマブ)が現在存在する。炎症状態の治療に承認されている他の生物製剤には、カナキヌマブ(抗IL-1)およびウステキヌマブ(抗IL-12/23)がある(Reichert J. M. (2012) *mAbs*、4:3、413~415頁)。治療用途に設計されたTNF結合分子もTak and Kalden (2011) (*Arthritis Research and Therapy*、13、1~14頁)中に記載されている。

20

30

#### 【0009】

Koenders et al. (2011) (*Arthritis and Rheumatism*、63; 2329~2339頁)は、TNFとIL-17の間の相互作用は分子機構を誘発し、関節炎の動物モデルにおいて不可逆的軟骨破壊をもたらすことを記載する。さらに、可溶性インターロイキン-17受容体とTNF結合タンパク質の組合せが、いずれかの抗サイトカイン治療単独より関節炎の治療において有効であったことが、この筆者らにより発見されている。Koenders et al. (2011)の刊行物中に記載されたTNF結合分子は、二量体結合PEG化可溶性p55 TNF受容体Iである。WO2010/102251は、ヒトIL-17およびTNFと結合することができる、第一および第二ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を記載する。両ポリペプチド鎖は、抗体可変ドメインと定常ドメインによって形成される分子構造を有する。幾つかの他の二重特異性および/または多重特異性融合タンパク質が文献中に記載されている(Kontermann R. E. (2012) *mAbs*、4:2、182~197頁の概説を参照)。

40

#### 【0010】

FynSH3由来ポリペプチドは当技術分野でよく知られており、例えばGrabulovski et al. (2007) *JBC*、282、3196~3204頁、WO2008/022759、Bertschinger et al. (2007) *Protein Eng Des Sel* 20(2) 57~68頁、およびGebauer and Skerra (2009) *Curr Opinion in Chemical B*

50

iology 13: 245~255頁中に記載されている。用語「フィノマー (Fynomer)」と本明細書で互換的に使用する用語「FynSH3由来ポリペプチド」は、ヒトFynSH3ドメイン由来の非免疫グロブリン由来結合(ポリ)ペプチドを指す(例えば、Gebauer and Skerra (2009) Curr Opin in Chemical Biology 13: 245~255頁中に記載されたいわゆる足場)。ヒトFynキナーゼのSH3ドメインは、異なる標的タンパク質と高いアフィニティーおよび特異性で結合する、タンパク質(フィノマーと呼ばれるFynSH3由来結合タンパク質)を操作するための足場として首尾よく使用された(WO2008/022759、WO2011/023685、Grabulovski D. et al. (2007) J Biol Chem 282、3196~3204頁、Bertschinger J et al. (2007) Protein Eng Des Sel、2057~68頁、およびSchlatter et al. (2012) mAbs、4(4)、497~50頁)。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2010/102251号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2008/022759号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2011/023685号パンフレット

【非特許文献】

20

【0012】

【非特許文献1】Miossec P. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361、p. 888~898

【非特許文献2】Fossiez F. et al. (1998) Int Rev Immunol. 16(5~6)、p. 541~551

【非特許文献3】Weaver T. et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 25、p. 821~852

【非特許文献4】Lubberts E. (2008) Cytokine、41、p. 84~91

【非特許文献5】Antony samy et al. (1999) J. Immunol 30、162、p. 577~584

【非特許文献6】van Kooten et al. (1998) J. Am. Soc. Nephrol. 9、p. 1526~1534

【非特許文献7】Molet et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108、p. 430~438

【非特許文献8】Teunissen et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111、p. 645~649

【非特許文献9】Kurasawa et al. (2000) Arthritis Rheum. 43、p. 2455~2463

【非特許文献10】Lubberts et al. (2001) J. Immunol. 40、167、p. 1004~1013

【非特許文献11】Lubberts et al. (2004) Arthritis and Rheumatism、50、p. 650~659

【非特許文献12】Lubberts et al. (2002)、Inflamm. Res. 51、p. 102~104

【非特許文献13】Leonardi C. et al. (2012) N. Engl. J. Med.、366、p. 1190~1199

【非特許文献14】Hueber W. et al. (2010) Sci Transl Med.、2(52)、52ra72

【非特許文献15】Konterman R. E. (2012) mAbs、4:2、p. 50

182 ~ 197

【非特許文献16】Scott D.L. (2012) Clin Pharmacol Ther, 91(1), p. 31 ~ 43

【非特許文献17】Reichert J.M. (2012) mAbs, 4:3, p. 413 ~ 415

【非特許文献18】Tak and Kalden (2011) (Arthritis Research and Therapy, 13, p. 1 ~ 14

【非特許文献19】Koenders et al. (2011) (Arthritis and Rheumatism, 63, p. 2329 ~ 2339

【非特許文献20】Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, p. 3196 ~ 3204

【非特許文献21】Bertschinger et al. (2007) Protein Eng Des Sel, 20, p. 57 ~ 68

【非特許文献22】Gebauer and Skerra (2009) Curr Opin in Chemical Biology, 13, p. 245 ~ 255

【非特許文献23】Grabulovski D. et al. (2007) J Biol Chem, 282, p. 3196 ~ 3204

【非特許文献24】Schlatter et al. (2012) mAbs, 4(4), p. 497 ~ 50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

WO2011/023685は、融合タンパク質、組成物に対応するIL-17阻害ポリペプチド(「フィノマー」)、およびそれらの医療用途を記載する。これらのIL-17阻害ポリペプチドは、IL-17Aに対する高い特異性と高いアフィニティーを有する。本発明の根底にある技術的課題は、さらなるIL-17A阻害ポリペプチド、および特に技術的に改善されたこのようなIL-17A阻害ポリペプチドの提供である。この技術的課題は、特許請求の範囲内で特徴付けた実施形態により解決される。

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって本発明は、第一の実施形態では、グリコシル化IL-17Aの活性を阻害するポリペプチドであって、(a)GVTLFVALYDY(X<sup>1</sup>)(X<sup>2</sup>)(X<sup>3</sup>)(X<sup>4</sup>)(X<sup>5</sup>)(X<sup>6</sup>)DLSFHKGKFKQILSTHEYEDWWEARS LTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ(配列番号1)、ここでアミノ酸位置(X<sup>1</sup>)~(X<sup>6</sup>)は任意のアミノ酸配列であってよい、および(b)(a)のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列、ここで、同一性決定はアミノ酸位置(X<sup>1</sup>)~(X<sup>6</sup>)を除外しており、ただし配列番号1におけるアミノ酸位置31~36中のアミノ酸配列STHEYE(配列番号2)は保存されている、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなるポリペプチドに関する。本発明はさらに、前記ポリペプチドを含む融合構築物、組成物および医療用途に関する。

【0015】

本発明は、第二の実施形態では、グリコシル化IL-17Aと結合し、好ましくはその活性を阻害するポリペプチドであって、(a)GVTLFVALYDY(X<sup>1</sup>)(X<sup>2</sup>)(X<sup>3</sup>)(X<sup>4</sup>)(X<sup>5</sup>)(X<sup>6</sup>)DLSFHKGKFKQILSTHEYEDWWEARS LTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ(配列番号1)、ここで、アミノ酸位置(X<sup>1</sup>)~(X<sup>6</sup>)が任意のアミノ酸配列であってよい、および(b)(a)のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列、ここで、同一性決定はアミノ酸位置(X<sup>1</sup>)~(X<sup>6</sup>)を除外しており、ただし配列番号1におけるアミノ酸位置31~36中のアミノ酸配列STHEYE(配列番号2)は保存されている、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなるポリペプチドに関する。本発明はさら

10

20

30

40

50

に、前記ポリペプチドを含む融合構築物、組成物および医療用途に関する。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下の定義、実施例、好ましい実施形態および個々の実施形態は、本発明の第一の実施形態と第二の実施形態の両方を言及する。

【0017】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド」は、約50を超えるアミノ酸を含有する単鎖タンパク質またはそれらの断片を含めた、直鎖分子状のアミノ酸を記載する。ポリペプチドは、少なくとも2つの同一であるかまたは異なる分子からなるマルチマー、例えばオリゴマーをさらに形成することができる。このようなマルチマーの対応する高次構造は、それに応じてホモまたはヘテロ二量体、ホモまたはヘテロ三量体などと呼ばれる。さらに、アミノ酸（複数可）および/またはペプチド結合（複数可）が機能的アナログにより置換された、このようなポリペプチドのペプチド模倣体も本発明によって包含される。このような機能的アナログは、セレノシステインなどの、20遺伝子コードアミノ酸以外の全ての既知のアミノ酸を含む。用語「ポリペプチド」は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、および当技術分野でよく知られている同様の修飾によって修飾が施された天然修飾ポリペプチドも指す。

【0018】

グリコシル化IL-17Aとの結合を実質的に保持する本発明のポリペプチドの断片も、本発明によって含まれる。この点において、断片が約55未満のアミノ酸を含有する限り、高い優先度で、断片が少なくとも30アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、または少なくとも45アミノ酸を含むことが好ましい。断片中、本明細書において以下で定義するRT-およびsrc-ループに対応するアミノ酸位置は保持されることがより好ましい。

【0019】

本明細書で使用する用語「グリコシル化IL-17Aの活性を阻害するポリペプチド」によって、本明細書で前に詳細に記載したグリコシル化IL-17Aの活性を低減または完全に無効にする能力を、ポリペプチドが有することを定義する。この点において、グリコシル化IL-17A活性の阻害は、IL-17Rと呼ばれるI型細胞表面受容体（インターロイキン17受容体）とグリコシル化IL-17Aの結合の阻害を意味することが好ましい。少なくとも3種のIL-17Rの変異体、すなわちIL17RA、IL17RB、およびIL17RCが当技術分野で知られている。この点において、高い優先度で、ポリペプチドは少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%グリコシル化IL-17Aの活性を阻害することがより好ましい。本発明のポリペプチドのグリコシル化IL-17Aの阻害に関するIC<sub>50</sub>値が、1000nM以下、500nM以下、400nM以下、300nM以下、200nM以下、100nM以下、または75nM以下であることも高い優先度で好ましい。この点において、本発明のポリペプチドはグリコシル化IL-17A活性を特異的に阻害し、したがってグリコシル化IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17EまたはIL-17Fなどの他の関連タンパク質は阻害しないことが好ましい。本発明のポリペプチドはグリコシル化IL-17Aの活性を阻害する。ポリペプチドは、グリコシル化および非グリコシル化IL-17Aの活性を阻害することが好ましい。したがって前述の定義は、必要な変更を加えて非グリコシル化IL-17Aの阻害に適用する。

【0020】

グリコシル化IL-17A活性の阻害は、グリコシル化IL-17Aとの結合にも関与することは理解されよう。この点において、グリコシル化IL-17Aとの結合は、グリコシル化IL-17Aの活性の阻害をさらにもたすことが好ましい。用語「グリコシル化IL-17Aとの結合」は、本発明のポリペプチドまたは断片が、グリコシル化IL-

10

20

30

40

50

17Aと(in vivoおよび/またはin vitroで)結合相互作用を形成することを必要とする。本発明のポリペプチドは、 $10^{-7} \sim 10^{-12}$  M、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$  M、最も好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-12}$  Mの $K_D$ でグリコシル化IL-17Aと結合することが好ましい。この点において、本発明のポリペプチドはグリコシル化IL-17Aと特異的に結合し、したがってIL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17EまたはIL-17Fなどの他の関連タンパク質とは結合しないことが好ましい。本発明のポリペプチドはグリコシル化IL-17Aと結合する。ポリペプチドは、グリコシル化および非グリコシル化IL-17Aと結合することが好ましい。したがって前述の定義は、必要な変更を加えて非グリコシル化IL-17Aの結合に適用する。

10

## 【0021】

本明細書で前に引用した配列番号1は、ヒトFynキナーゼのSH3ドメインのアミノ酸配列(配列番号20、Kawakami et al. and Semba et al. in 1986により報告されたFynキナーゼのアミノ酸83~145)に由来する。配列番号20は、GVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGKFKQILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ(配列番号20)と読める。前に示した配列番号20中、RTとsrcループの配列には、それぞれ下線と二重下線を引く(二つ目の下線部「NSSE」が二重下線部である)。Grabulovskiet al. (2007) JBC、282、3196~3204頁はFynSH3ドメインのRTとsrcループにおける突然変異の影響を調べ、疎水性表面と隣接する両ループにおける突然変異により、分子間結合に關与するこのドメインの能力を決定することができたことを実証した。さらにEP2054432は、RTおよび/またはsrcループ中またはそれに隣接した突然変異は、SH3ドメインの結合特異性を決定することを示す。FynSH3のアミノ酸配列は、人間、マウス、ラットおよびサル(ギボン)の間で完全に保存されている。ニワトリのFynSH1アミノ酸が、キセノプスラエピス(Xenopus laevis)の一種は2アミノ酸位置が、対応するヒトドメインと異なる。他のSH3ドメインと同様に、FynSH3は2つのアンチパラレルシートで構成され、(RTおよびsrc-ループと呼ばれる)2つの柔軟性ループを含有し他のタンパク質と相互作用する。

20

## 【0022】

より詳細には、配列番号1は配列番号3~9のアラインメントから生じた配列である(図8参照)。図8から明らかであるように、配列番号1の位置( $X^1$ )~( $X^6$ )は、配列番号20のFynキナーゼSH3ドメインのRT-ループに対応する。この点において、本発明のポリペプチドのアミノ酸位置( $X^1$ )~( $X^6$ )は、配列EARTED(配列番号19)を有していないことが好ましい。図8からさらに明らかであるように、配列番号20のFynキナーゼSH3ドメインのsrc-ループに対応する位置、すなわち配列「STHEYE」(本明細書で前に示したように配列番号1における下線部分)は配列番号3~9の間で保存されている。RTおよびsrc-ループ内のアミノ酸位置は、グリコシル化IL-17Aに対する結合特異性を決定する。

30

## 【0023】

本発明によれば、用語「配列同一性百分率(%)」によって、鋳型核酸またはアミノ酸配列の全長を構成するヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の数と比較した、2つ以上の一直線に並んだ核酸またはアミノ酸配列の同一ヌクレオチド/アミノ酸のマッチ(「ヒット」)の数を記載する。言い換えると、2つ以上の配列または部分配列に関するアラインメントを使用し、同じ(例えば85%、90%もしくは95%同一である)アミノ酸残基またはヌクレオチドの百分率を決定することができ、このとき(部分)配列を、当技術分野で知られる配列比較アルゴリズムを使用した測定で、比較ウィンドウにわたり、または指定領域にわたり最大対応性で比較し一直線に並べ、またはこのとき手作業で一直線に並べ目視で確認する。したがって、配列同一性を決定するため比較する配列は、ヌクレオチドまたはアミノ酸の置換(複数可)、付加(複数可)または欠失(複数可)によって異なる

40

50

可能性がある。この定義は、試験配列の相補配列にも適用する。

【0024】

当業者は、核酸配列を一直線に並べるのに適したプログラムも理解している。ポリペプチド配列の配列同一性百分率は、例えば前に説明したようにプログラム、プログラムCLUSTLAW、FASTAおよびBLASTを用いて決定することができる。BLASTプログラム、すなわちNCBI BLAST アルゴリズム (Stephen F. Altschul、Thomas L. Madden、Alejandro A. Schaffer、Jinghui Zhang、Zheng Zhang、Webb Miller、and David J. Lipman (1997)、「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of prote 10  
in database search programs」、Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402頁)を使用することが好ましい。

【0025】

本明細書の前述の(b)項に列挙した配列同一性に関して、配列同一性は少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%であることが高い優先度で好ましい。

【0026】

本明細書で使用する語句「同一性決定はアミノ酸位置( $X^1$ )~( $X^6$ )を除外している」は、配列番号1に関する配列同一性の計算はアミノ酸位置( $X^1$ )~( $X^6$ )を考慮しておらず、配列番号1の残り58アミノ酸位置に限定されていることを示す。本明細書で使用される状態「ただし配列番号1におけるアミノ酸位置31~36中のアミノ酸配列S 20  
THEYE (配列番号2)は保存されている」は、配列番号1のアミノ酸位置31~36にアミノ酸変化を導入することができないことを示す。言い換えると、配列番号1のアミノ酸位置31~36に対応するアミノ酸位置は、本発明の第一の実施形態およびその好ましい実施例の範囲内にある全ポリペプチド中に配列S THEYE (配列番号2)を有する。

【0027】

この点において、配列番号1のアミノ酸位置31~37に対応するアミノ酸位置は、本発明の第一の実施形態およびその好ましい実施例の範囲内にある全ポリペプチド中に配列S THEYED (配列番号18)を有することが好ましい。言い換えると、本発明の第一の実施形態およびその好ましい実施例に関して、配列番号1のアミノ酸位置31~37中 30  
のアミノ酸配列S THEYED (配列番号18)が保存された状態に見合うことが好ましい。

【0028】

配列番号1における任意のアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であることが好ましい。保存的置換は、置換されるアミノ酸と類似した化学的性質を有する別のアミノ酸とアミノ酸の置換を示す。本明細書で言及する保存的置換は、(i)塩基性アミノ酸と異なる塩基性アミノ酸の置換、(ii)酸性アミノ酸と異なる酸性アミノ酸の置換、(iii)芳香族アミノ酸と異なる芳香族アミノ酸の置換、(iv)非極性脂肪族アミノ酸と異なる非極性脂肪族アミノ酸の置換、および(v)極性非荷電アミノ酸と異なる極性非荷電アミノ酸の置換からなる群から選択される置換であることが好ましい。塩基性アミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、およびリシンである。酸性アミノ酸はアスパラギン酸またはグルタミン酸である。芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンである。非極性脂肪族アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシンおよびプロリンである。極性非荷電アミノ酸は、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギンおよびグルタミンである。保存的アミノ酸置換と対照的に、非保存的アミノ酸置換は、前述の保存的置換(i)~(v)の範疇にない任意のアミノ酸とアミノ酸の置換である。 40

【0029】

(以前はCTLA-8と呼ばれており、それがIL17ファミリーの基本メンバーであるため本明細書および当技術分野では単に「IL-17」または「インターロイキン17 50

」とも呼ぶ)用語「IL-17A」または「インターロイキン17A」は、活性化記憶T細胞により生成される強力な炎症促進性サイトカインを表す(Gurney and Aggarwal(2002)、「IL-17: prototype member of an emerging cytokine family」、J. Leukoc. Biol. 71(1)1~8頁)。より詳細にはIL-17Aは、インターフェロンと同様に、様々な組織中でケモカイン産生を増大させ炎症部位に単球および好中球を動員することにより、遅延型反応において強力なメディエーターとして作用するサイトカインである。IL-17AはTヘルパー細胞により産生され、遅延型反応において破壊的組織損傷をもたらすIL-23によって誘導される。1ファミリーとしてのインターロイキン17Aは、細胞外病原体による免疫系の侵入に応答する炎症促進性サイトカインとして機能し、病原体の細胞マトリックスの破壊を誘導する。インターロイキン17Aは、腫瘍壊死因子およびインターロイキン-1と相乗的に作用する。ヒトIL-17Aは、好ましくは35kDaの分子量を有するジスルフィド結合、ホモ二量体、分泌型糖タンパク質である配列番号10を含むか、またはそれらからなる155アミノ酸タンパク質である。ホモ二量体の各サブユニットは約15~20kDaである。IL-17Aの構造は、23アミノ酸(aa)のシグナルペプチド、次にIL-17ファミリーに特徴的な132アミノ酸鎖領域からなる。タンパク質上のN結合型グリコシル化部位は、タンパク質精製により2つのバンド、1つが15kDaおよびもう1つが20kDaで明らかとなった後に初めて同定された。前述のように、最初に同定されたIL17は、それがこのサイトカインファミリーの基本メンバーであることを示すためIL-17Aと表示された。IL-17A以外に、IL-17ファミリーのメンバーには、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(IL-25とも呼ばれる)、およびIL-17Fがある。IL-17ファミリーは、脊椎動物の進化にわたり高度に保存されてきたと思われる、異なるシグナル伝達系を表すと考えられる。IL-17ファミリーの全てのメンバーは、それらの3次元形状に重要な4個の高度に保存されたシステイン残基を伴う類似したタンパク質構造を有するが、それらは如何なる他の既知のサイトカインとも配列類似性を有していない。

#### 【0030】

本明細書で開示するIL-17A阻害ポリペプチドは、驚くことに、非グリコシル化IL-17Aおよびグリコシル化IL-17Aに対して高い特異性および高いアフィニティを有する。特に、本発明の配列番号3~9は、非グリコシル化IL-17Aと比較して同等の効能で、グリコシル化IL-17Aを完全に阻害することができる(実施例3参照)。これは、WO2011/023685から知られるFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドと比較して有利な性質である。WO2011/023685中に記載されたFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドは、高濃度においてさえグリコシル化IL-17Aを完全に阻害せず、および/またはグリコシル化IL-17Aと非グリコシル化IL-17Aの間で阻害効能(IC<sub>50</sub>値)の大きな違いを示す(実施例3および図3参照)。本明細書で前に論じたように、IL-17Aは、*in vivo*では、グリコシル化、共有結合ホモ二量体として分泌される。グリコシル化IL-17Aと結合し阻害するという利点を有する、本明細書で開示する新規なIL-17A結合分子は、したがって、それはグリコシル化タンパク質として主に存在するので、*in vivo*でのIL-17Aの検出または結合を必要とする用途に非常に適している。このような用途は、例えば、IL-17A媒介性疾患の治療および/または予防に関する、診断および医学的治療、好ましくは医薬品の製剤化である。

#### 【0031】

本明細書中の以下の実施例は、アミノ酸位置(X<sup>1</sup>)~(X<sup>6</sup>)に関して列挙するアミノ酸は、グリコシル化IL-17A、特に配列番号10を有するグリコシル化IL-17Aに対して結合特異性をもたらすことを示す。より詳細には、図8中の本発明の配列番号3~9の配列アラインメントは、アミノ酸位置(X<sup>1</sup>)~(X<sup>6</sup>)が、配列番号3~9中の(X<sup>1</sup>)がA、K、S、DまたはEであり、(X<sup>2</sup>)がN、Q、A、K、SまたはRであり、(X<sup>3</sup>)がH、K、R、LまたはVであり、(X<sup>4</sup>)がGまたはSであり、(X<sup>5</sup>

10

20

30

40

50

)がH、Q、A、W、VまたはNであり、(X<sup>6</sup>)がR、LまたはSであるものから選択されることを示す。したがって、配列番号3～9中に存在する(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)に関する具体的なアミノ酸の組合せ以外の、前に定義した(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)から選択される他のアミノ酸配列も、グリコシル化IL-17Aに対して結合特異性をもたらすことを予想することができる。

**【0032】**

したがって、本発明の好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸位置(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)は、(X<sup>1</sup>)がA、K、S、DまたはEであり、(X<sup>2</sup>)がN、Q、A、K、SまたはRであり、(X<sup>3</sup>)がH、K、R、LまたはVであり、(X<sup>4</sup>)がGまたはSであり、(X<sup>5</sup>)がH、Q、A、W、VまたはNであり、(X<sup>6</sup>)がR、LまたはS

10

**【0033】**

(X<sup>1</sup>)がA、K、S、DまたはEであり、(X<sup>2</sup>)がN、Q、A、K、SまたはRであり、(X<sup>3</sup>)がH、K、R、LまたはVであり、(X<sup>4</sup>)がGまたはSであり、(X<sup>5</sup>)がH、Q、A、W、VまたはNであり、(X<sup>6</sup>)がR、LまたはSである保存的アミノ酸置換も、本発明によって包含される。

**【0034】**

本発明のポリペプチドのアミノ酸位置(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)は、(X<sup>1</sup>)がSまたはEであり、(X<sup>2</sup>)がAまたはSであり、(X<sup>3</sup>)がRまたはVであり、(X<sup>4</sup>)がGまたはSであり、(X<sup>5</sup>)がQまたはVであり、(X<sup>6</sup>)がLまたはSであるものから選択されることが特に好ましい。これらのアミノ酸は、それぞれ配列番号5および7中の位置(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)に対応する。本発明のポリペプチドのアミノ酸位置(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)は、(X<sup>1</sup>)がSであり、(X<sup>2</sup>)がAであり、(X<sup>3</sup>)がRであり、(X<sup>4</sup>)がGであり、(X<sup>5</sup>)がQであり、(X<sup>6</sup>)がLであることが最も好ましい。これらのアミノ酸は配列番号5中の位置(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)に相当する。

20

**【0035】**

第一ポリペプチドの項目(b)によるポリペプチドによれば、アミノ酸位置(X<sup>1</sup>)～(X<sup>6</sup>)は、配列番号1(または配列番号3～9)のアミノ酸配列の間だけでなく、FynキナーゼのSH3ドメイン(配列番号20)の(本発明による配列STHEYE(配列番号2)を有する)RT-および/またはsrc-ループ内に存在しない別のアミノ酸位置の間でも異なる可能性がある。これらの位置におけるアミノ酸の違いは、配列番号3～9の結合特異性には必須ではないと考えられる。したがって、グリコシル化IL-17Aに対する結合特異性に実質的に干渉せず、これらのアミノ酸位置を置換もしくは欠失することができ、またはさらなるアミノ酸を加えることができる。アミノ酸が置換される場合、保存的置換が好ましい。

30

**【0036】**

より好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号3～9のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなる。

**【0037】**

本明細書中の以下の実施例において示すように、配列番号3～9は、配列番号10を有する非グリコシル化およびグリコシル化IL-17Aに結合し阻害することが分かった。より詳細には、驚くことに、配列番号3～9のFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドは、非グリコシル化IL-17Aと比較して同等の効能以、グリコシル化IL-17Aを完全に阻害することができることが分かった。これは、WO2011/023685中に記載されたFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドと比較して有利な性質である(実施例3中の比較データ参照)。

40

**【0038】**

配列番号3～9の間では配列番号5および7が好ましい。配列番号5および7を使用して融合構築物、および本明細書中の実施例4中に記載した構築物を作製した。得られた融合構築物および構築物は、それらは安定性、モノマー性、可溶性があり、優れた生物物理

50

学的性質および薬物様性質を示すので非常に有用であった。さらに、さらなる化合物と配列番号5および7の融合が、グリコシル化IL-17Aとの優れた結合性に影響を与えることはなかった。

【0039】

よく知られているように、1個、2~3個もしくはさらに数個のアミノ酸の欠失、付加または置換などのアミノ酸配列のわずかな変化は、ほぼ同じ性質を有する突然変異型の原型タンパク質をもたらし可能性がある。したがって、配列番号3~9に関しては、配列番号3~9のいずれか1つと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、および最も好ましくは少なくとも98%同一であるが、ただし配列番号1におけるアミノ酸位置31~36中のアミノ酸配列STHYYE(配列番号2)は保存されているアミノ酸配列を含むポリペプチドも本発明によって包含される。アミノ酸が置換される場合、保存的置換が好ましい。

10

【0040】

本発明によれば、IL-17Aは、配列番号10のアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなることがさらに好ましい。

【0041】

本明細書中の以下の実施例から明らかであるように、配列番号10を有するヒトIL-17Aは、配列番号3~9を有するポリペプチドを同定するための標的タンパク質として使用されている。配列番号10の最初の23アミノ酸はシグナルペプチドである。したがって、本発明のポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸位置24~155内でグリコシル化IL-17Aと結合することが特に好ましい。

20

【0042】

別の実施形態では、本発明は、さらなる化合物と融合した本発明のポリペプチドを含む融合構築物に関する。

【0043】

本明細書で使用する「融合構築物」は、さらなる化合物と本発明のポリペプチドの融合体を定義する。化合物は、タンパク質性化合物または非タンパク質性化合物のいずれかであってよい。化合物がタンパク質性化合物(例えば、本明細書で以下に記載するサイトカインまたはケモカイン)である場合、融合構築物は融合タンパク質として表すこともできる。本明細書で使用する用語「融合タンパク質」は一般に、別のポリペプチドをコードする2つ以上の遺伝子の接合および発現を介して作製したポリペプチド構築物を対象とする用語である。言い換えると、この融合遺伝子の翻訳によって、各原型ポリペプチド由来の機能性がある一種のポリペプチドが生じる。ポリペプチドは直接融合、またはリンカー、すなわち短鎖ペプチド配列を介して融合することができる。一般に融合タンパク質は、当業者によく知られている組換えDNA技術(例えば、Alberts et al. Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> ed. Garland Science, 518~519頁)によって人為的に作製される。しかしながら、本発明のポリペプチドおよび融合タンパク質は、簡潔な有機合成戦略、固相支援型合成技法、または市販の自動合成装置などの、多くの従来型およびよく知られている技法のいずれかによって調製することができる。融合タンパク質は、生物学的研究または治療において使用することができる。さらなる化合物としての非タンパク質性化合物の例は、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)またはAlexa Fluorなどの有機低分子、または放射性核種である。さらなる非タンパク質性化合物のさらなる具体例は本明細書で以下に論じる。

30

40

【0044】

好ましい実施形態によれば、さらなる化合物は、薬学的に活性がある化合物、プロドラッグ、薬学的に許容される担体、診断的に活性がある化合物、細胞浸透促進剤、および/または血清中半減期を調節する化合物である。

【0045】

薬学的に活性がある化合物は、対象への投与時に生物学的活性を有し、対象に有益な影

50

響をもたらす化合物である。プロドラッグは、不活性（または不完全活性）型で対象に投与され、後に対象中での代謝プロセスを介して薬学的に活性があるかまたは薬学的に完全に活性がある化合物に転換される化合物である。薬学的に（完全に）活性がある化合物は、本明細書で以下に定義する任意の具体的疾患の治療または予防に適した化合物であることが好ましい。

【0046】

診断的に活性がある化合物は、対象への投与時に活性を有し、考えられる疾患または障害の決定または確認を可能にする化合物である。診断的に活性がある化合物の例には、蛍光色素、放射性核種または医療イメージング用造影剤などの検出可能マーカーがある。蛍光色素、放射性核種および医療イメージング用造影剤の具体例は、本明細書で以下に記載する。本発明のポリペプチドと融合した診断的に活性がある化合物は、本明細書で以下に定義しそれらの発端および/または症状（複数可）がIL-17および/またはTh-17関連である点において共通である具体的疾患のいずれか1つを、決定または確認するため特に使用することができる。このような疾患の側面は、本発明の診断的に活性がある化合物と融合した本発明のポリペプチドにより検出または確認することができる。

10

【0047】

細胞浸透促進剤は、(in vitro、ex vivoまたはin vivoにおいて)細胞への本発明のポリペプチドの送達を容易にする化合物である。

【0048】

血清中半減期を調節する化合物は、特に血液循環器系において、本発明のポリペプチドのin vivo半減期を延長することができる化合物である。血清中半減期を調節する成分はポリエチレングリコール(PEG)であることが好ましい。

20

【0049】

薬学的に許容される担体は、対象への投与時に本発明のポリペプチドの送達および/または有効性を改善する化合物である。適切な薬学的に許容される担体は当技術分野でよく知られており、例えば安定剤、抗酸化剤、pH調整物質などを含む。

【0050】

別の好ましい実施形態によれば、本発明のさらなる化合物は、(a)蛍光色素、(b)感光剤、(c)放射性核種、(d)医療イメージング用造影剤、(e)サイトカイン、(f)毒性化合物、(g)ケモカイン、(h)凝血促進因子、(i)プロドラッグ活性化用酵素、(k)アルブミン結合物質、(l)アルブミン、(m)IgG結合物質、または(n)ポリエチレングリコールからなる群から選択される。

30

【0051】

蛍光色素は、Alexa FluorまたはCy色素から選択される成分であることが好ましい。

【0052】

感光剤は、光毒性赤色蛍光タンパク質Killer Redまたは八エマトポルフィリンであることが好ましい。

【0053】

放射性核種は、線放出アイソトープ、より好ましくは $^{99m}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ の群から、および/またはポジトロンエミッター、より好ましくは $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{124}\text{I}$ の群から、および/または線エミッター、より好ましくは $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ の群から、または線エミッター、好ましくは $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ の群のいずれかから選択されるのが好ましい。

40

【0054】

本明細書で使用する造影剤は、医療イメージングにおいて身体内の構造または流体の造影を強調するために使用する物質である。一般的な造影剤は、X線減衰および磁気共鳴シグナル強調に基づいて作用する。

【0055】

サイトカインは、IL-2、IL-12、TNF-、IFN、IFN、IFN

50

、IL-10、IL-15、LI-24、GM-CSF、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-13、LIF、CD80、B70、TNF、LT-、CD-40リガンド、Fas-リガンド、TGF-、IL-1およびLI-1からなる群から選択されることが好ましい。当技術分野でよく知られているように、サイトカインは免疫系の炎症促進性または抗炎症性応答を助長し得る。したがって、治療する疾患に応じて、炎症促進性または抗炎症性サイトカインいずれかとの融合構築物が好ましい可能性がある。例えば、一般に炎症性疾患の治療には抗炎症性サイトカインを含む融合構築物が好ましく、一方一般に癌の治療には炎症促進性サイトカインを含む融合構築物が好ましい。

【0056】

毒性化合物は、低分子有機化合物またはポリペプチド、より好ましくはカリケアマイシン、メイタンシノイド、ネオカルジノスタチン、エスペラマイシン、ジネマイシン、ケダルシジン、マジュロペプチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、オーリスタチン、リシン-A鎖、モデクシン、切断型シュードモナスエキソトキシンA、ジフテリア毒素および組換えゲロニンからなる群から選択される毒性化合物であることが好ましい。

【0057】

ケモカインは、IL-8、GRO、GRO、GRO、ENA-78、LDGF-PBP、GCP-2、PF4、Mig、IP-10、SDF-1 /、BUNZO / STRC33、I-TAC、BLC / BCA-1、MIP-1、MIP-1、MDC、TECK、TARC、RANTES、HCC-1、HCC-4、DC-CK1、MIP-3、MIP-3、MCP-1-5、エオタキシン、エオタキシン-2、I-309、MPIF-1、6Ckine、CTACK、MEC、リンホタクチンおよびフラクタルカインからなる群から選択されることが好ましい。

【0058】

凝血促進因子は、組織因子(TF)または癌用凝血促進剤(CP)であることが好ましい。

【0059】

プロドラッグ活性化酵素は、カルボキシペプチダーゼ、グルクロニダーゼおよびグルコシダーゼからなる群から選択される酵素であることが好ましい。

【0060】

アルブミン結合物質、IgG結合物質の例は、Gebauer and Skerra (2009)、13:245~255頁中に記載される。したがって、アルブミン結合物質とIgG結合物質の好ましい例は、ヒト単鎖Igドメイン(ダブルアルブミンDab)、ナノボディ、ストレプトコッカスプロテインG由来の天然に存在するアルブミン結合ドメイン(ABD)、およびIgGと結合するドメインである。このような融合構築物は、例えば患者への投与時に、特に血液循環器系において、本発明のポリペプチドの半減期を増大させる。

【0061】

別の好ましい実施形態によれば、本発明のさらなる化合物は、抗体軽鎖、抗体重鎖、抗体のFcドメイン、抗体、またはそれらの組合せからなるか、またはそれらを含む。

【0062】

用語「抗体」は、前記ペプチドまたはポリペプチドと特異的に結合する、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、またはそれらの断片を含み、二重特異性抗体、合成抗体、重鎖と軽鎖以外の抗体断片、例えばFab、aF(ab<sub>2</sub>)'、FvまたはscFv断片など、またはこれらのいずれかの化学修飾誘導体も含む。例えば、モノクローナル抗体を、Kohler and Milstein、Nature 256 (1975)、495、およびGalfre、Meth. Enzymol. 73 (1981)、3中に最初に記載された技法により調製することができ、それらは当技術分野で開発された修飾がある免疫処置済み哺乳動物由来の脾臓細胞とマウスミエローマ細胞の融合体を含む。さらに、前述のペプチドに対する抗体またはそれらの断片は、例えばHarlow an

10

20

30

40

50

d Lane「Antibodies, A Laboratory Manual」、C S H Press、Cold Spring Harbor、1988中に記載された方法を使用することにより得ることができる。前記抗体の誘導体をファージディスプレイ技法によって得るとき、B I A coreシステムで利用される表面プラズモン共鳴を使用して、本発明のペプチドまたはポリペプチドのエピトープと結合するファージ抗体の有効性を高めることができる(Schier、Human Antibodies Hybridomas 7(1996)、97~105頁; Malmberg、J. Immunol. Methods 183(1995)、7~13頁)。キメラ抗体の産生は例えばWO89/09622中に記載される。本発明に従い利用する抗体のさらなる供給源は、いわゆる異種移植片抗体である。マウスにおけるヒト抗体などの異種移植片抗体の産生に関する一般原則は、例えばWO91/10741、WO94/02602、WO96/34096およびWO96/33735中に記載されている。本発明に従い利用する抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖(複数可)は、当技術分野で知られる従来技法を使用して、例えばアミノ酸の欠失(複数可)、挿入(複数可)、置換(複数可)、付加(複数可)および/または組換え(複数可)および/または当技術分野で知られる任意の他の修飾(複数可)を、単独または組合せで使用することによって、さらに修飾することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基盤をなすDNA配列に、このような修飾を導入するための方法は当業者によく知られている。例えば、Sambrook、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N Y、1989を参照。

10

20

**【0063】**

用語「モノクローナル」または「ポリクローナル抗体」(Harlow and Lane、(1988)、上記引用文参照)はさらに、それらの結合特異性を保持またはほぼ保持する前記抗体の誘導体に関する。前記誘導体の特に好ましい実施形態は本明細書で以下にさらに示すが、このような抗体の他の好ましい誘導体は、例えばマウスまたはラット可変領域とヒト定常領域を含むキメラ抗体である。

**【0064】**

用語「scFv断片」(単鎖Fv断片)は当技術分野で充分理解されており、その小さなサイズおよび組換えによりこのような断片が生じる可能性のため好ましい。

30

**【0065】**

抗体はヒト化抗体であってよい。本発明による用語「ヒト化抗体」は、そのタンパク質配列が修飾されヒトにおいて自然に生じる抗体変異体とのその類似性が増大した、非ヒト起源の抗体を意味する。ヒト化抗体の作製は、例えば、CDR3および好ましくは全6CDRなどの(所望の結合性を担う)適切なCDRコードセグメントを、ヒト抗体「足場」に挿入することによって実施することができる。ヒト化抗体を産生するための方法は、例えばEP-A10239400およびWO90/07861中に記載されている。

**【0066】**

用語「抗体軽鎖」は抗体の小さなポリペプチドサブユニットを表し、一方で用語「抗体重鎖」は抗体の大きなポリペプチドサブユニットを表す。典型的な抗体は、2つの免疫グロブリン(Ig)重鎖と2つのIg軽鎖で構成される。それぞれの軽鎖は、1つが定常(C<sub>L</sub>)ドメインであり1つが抗原との結合に重要な可変ドメイン(V<sub>L</sub>)である、2つのタンデム免疫グロブリンドメインで構成される。重鎖は、抗体のクラスまたはアイソタイプを決定する。それぞれの重鎖は、2つの領域、すなわち(同じクラスの全免疫グロブリンで同一であるがクラス間で異なる)定常領域と、異なるB細胞間で異なるが同じB細胞もしくはB細胞クローンにより生成される全免疫グロブリンで同一である可変領域を有する。任意の重鎖の可変ドメインは単一免疫グロブリンドメインで構成される。

40

**【0067】**

抗体の「機能性Fcドメイン」は当業者にはよく知られている用語であり、パパインによる抗体切断に基づき定義される。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、免

50

疫グロブリンは数クラス：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mに分けられ、これらの幾つかはサブクラス（アイソタイプ）、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4、I g A 1、およびI g A 2にさらに分けることができる。重鎖定常領域に従い、異なるクラスの免疫グロブリンは、それぞれ[ ]、[ ]、[ ]、[ ]および[  $\mu$  ]と呼ばれる。抗体の機能性F cドメインは、補体活性化、C 1 q結合およびF c受容体結合に基づき、A D C C（抗体依存性細胞媒介性細胞障害）およびC D C（補体依存性細胞障害）に直接関与する。4つのヒトI g Gアイソタイプは、異なるアフィニティーで、新生児F c受容体、活性化F c受容体、F c R I、F c R I I a、およびF c R I I I a、阻害受容体F c R I I b、およびC 1 qなどの異なる受容体と結合し、非常に異なる活性をもたらす。ヒト抗体のF cドメインの活性化および阻害受容体に対するアフィニティーは、操作し改変することができることは知られている（S t r o h l W . ( 2 0 0 9 ) C u r r O p i n B i o t e c h n o l、2 0、6 8 5 ~ 6 9 1 頁参照）。

10

## 【 0 0 6 8 】

F cドメインは、本発明のポリペプチドのi n v i v o半減期を延長することができる1つまたは複数のヒト機能性F cドメインであり、その幾つかは、例えば本明細書で以下に記載する治療、予防および/または診断用途において、本発明の融合タンパク質のポリペプチド成分の特異的標的結合の部位に、哺乳動物の免疫応答を誘導することが好ましい。このようなヒト機能性F cドメインは、I g G 1抗体のドメインであることがより好ましい。本発明のポリペプチドは、1つまたは複数の機能性F cドメインのN末端もしくはC末端の片方、または1つまたは複数のF cドメインのN末端とC末端の両方と融合することができる。本発明の融合タンパク質は、1つまたは複数の、好ましくは1つのF cドメインの好ましくはN末端と少なくとも片側で融合した、本発明のポリペプチドの多量体、好ましくは四量体、三量体もしくは最も好ましくは二量体を含むことが好ましい。

20

## 【 0 0 6 9 】

本発明のより好ましい実施形態では、F cドメインは、活性化もしくは抑制エフェクター機能を有するI g G 1の1つまたは複数の操作型ヒト機能性F cドメイン、好ましくは抑制エフェクター機能を有するI g G 1の1つまたは複数の操作型ヒト機能性F cドメイン、およびよりさらに好ましくはK a b a tのE Uインデックスに従うナンバリングでL 2 3 4およびL 2 3 5に突然変異があり抑制エフェクター機能を有する、および最も好ましくはL 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aに突然変異がある、I g G 1の1つまたは複数の操作型ヒト機能性F cドメインである（J o h n s o n G . a n d W u T . T . ( 2 0 0 0 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 8、2 1 4 ~ 2 1 8 頁参照）。

30

## 【 0 0 7 0 】

本発明の融合構築物における抗体は、T N F と特異的に結合することが好ましい。用語「~と特異的に結合する」は、無関連タンパク質と本発明の融合構築物の結合に関して観察する平衡結合定数と比較して2倍小さい、好ましくは5倍または10倍小さい平衡結合定数 $K_D$ でT N F と結合する場合を指し、このような無関連タンパク質はT N Fファミリーのメンバーではなく、またはT N F などのT N Fファミリーの異なるメンバーである。

40

## 【 0 0 7 1 】

本発明の融合構築物の別の好ましい実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、抗体軽鎖、抗体重鎖、抗体のF cドメイン、抗体、またはそれらの組合せからなるか、またはそれらを含む、前記さらなる化合物のC末端の下流に位置する。

## 【 0 0 7 2 】

このようなさらなる化合物は直接、またはリンカーを介してポリペプチドに融合することができる。したがって融合構築物は、さらなる化合物のC末端に（直接）、より具体的にはC末端アミノ酸のカルボキシル基とN末端アミノ酸のアミノ基の間のペプチド結合の形成により融合することができ、またはリンカーを介してさらなる化合物鎖のC末端に結合させることが可能である。

50

## 【 0 0 7 3 】

適切なリンカーは当業者の裁量に任される。本発明によるリンカーは、1～30炭素原子を有するアルキル、1～20エチレン部分を有するポリエチレングリコール、1～20残基を有するポリアラニン、カプロン酸、置換または非置換ポリ-p-フェニレンおよびトリアゾールからなる群から選択されることが好ましい。ペプチドリンカー、より具体的には2～30アミノ酸長を有するオリゴペプチドも好ましい。アミノ酸の使用も意図的に想定される。好ましい長さ範囲は5～15アミノ酸である。他の好ましい長さは3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19または20アミノ酸である。

## 【 0 0 7 4 】

特に好ましいのは、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または100%の、グリシン、セリンおよびアラニンなどの低分子アミノ酸からなるペプチドであるリンカーである。特に好ましいのは、グリシンとセリンのみからなるリンカーである。最も好ましいのは配列番号13～15のリンカーであり、特別好ましいのは配列番号15の配列からなるペプチドであるリンカーである。

## 【 0 0 7 5 】

本発明の融合構築物の別の好ましい実施形態によれば、さらなる化合物は、配列番号11を含むかまたはそれからなる抗体軽鎖を含むか、またはそれからなる。

## 【 0 0 7 6 】

配列番号11は抗TNF 抗体の軽鎖である。配列番号11も直接、またはリンカーを介して本発明のポリペプチドに融合することができることは理解されよう。したがって融合構築物は、さらなる化合物のC末端に(直接)、より具体的にはC末端アミノ酸のカルボキシル基とN末端アミノ酸のアミノ基の間のペプチド結合の形成により融合することができ、またはリンカーを介してさらなる化合物鎖のC末端に結合させることが可能である。好ましいリンカーは、配列番号13～15からなる群から選択される配列を含むか、またはそれからなり、配列番号15が最も好ましい。この実施形態による融合構築物の特に好ましい例は配列番号16または17を含むか、またはそれからなり、配列番号16が最も好ましい。

## 【 0 0 7 7 】

さらなる実施形態では、本発明は、配列番号11を含むかまたはそれからなる抗体軽鎖、および少なくとも1コピー、好ましくは2コピーの配列番号12の抗体重鎖を含むか、またはそれらからなる少なくとも1コピー、好ましくは2コピーの融合構築物を含むか、またはそれらからなる構築物に関する。

## 【 0 0 7 8 】

配列番号12は抗TNF 抗体の重鎖である。したがって、この実施形態による構築物は、本発明のグリコシル化IL-17Aと結合したポリペプチド、抗TNF 抗体の軽鎖(配列番号11)および抗TNF 抗体の重鎖(配列番号12)を少なくとも含み、本発明のグリコシル化IL-17Aと結合したポリペプチドと抗TNF 抗体の軽鎖が融合体を形成する。本発明の構築物における軽鎖と重鎖のコピー数は同じであることが好ましい。抗体の軽鎖成分は、抗体の重鎖成分と共に存在するとき、TNF を認識する抗原結合部位の形成をもたらす。構築物がそれぞれ2コピーの抗TNF 抗体の軽鎖(配列番号11)および抗TNF 抗体の重鎖(配列番号12)を含む場合、構築物は完全抗TNF 抗体を含むことが好ましく、この場合前記抗体のそれぞれの軽鎖は本発明のポリペプチドに直接融合する、またはリンカーを介して融合する。このような構築物の好ましい例は実施例4中に記載し、本明細書の以下の表4中に示す。

## 【 0 0 7 9 】

好ましい実施形態によれば、本発明は、配列番号16もしくは17(配列番号16が好ましい)を含むかまたはそれからなる融合構築物の少なくとも1コピー、好ましくは2コピー、および配列番号12の抗体重鎖の少なくとも1コピー、好ましくは2コピーを含むか、またはそれらからなる構築物に関する。

10

20

30

40

50

## 【0080】

この構築物は、配列番号16もしくは17（配列番号16が好ましい）を含むかまたはそれからなる融合構築物の2コピー、および配列番号12の抗体重鎖の2コピーを含むか、またはそれらからなることが好ましい。このような構築物は、したがって完全抗TNF抗体を含むことができる。

## 【0081】

本発明の構築物内では、本発明のポリペプチドは、配列番号11を含むかまたはそれからなる軽鎖のC末端下流に位置することが好ましい。

## 【0082】

本発明の構築物は、2つの標的分子、すなわち一方でグリコシル化インターロイキン-17Aおよび他方でTNFと同時に結合することができる。この構築物は、本発明のポリペプチドの存在のため、機能性グリコシル化IL-17A結合部位を含む。

10

## 【0083】

本発明による構築物は、適切な条件下で、前記融合タンパク質と前記抗体重鎖を1つにすることにより得ることができる。当業者は適切な条件を理解している。適切な条件下でのこのような一体化は、前記融合タンパク質中に含まれる抗体軽鎖と前記抗体重鎖の間の相互作用により誘発される非共有結合体をもたらす。抗体中で一般に見られるジスルフィド結合が、本発明による構築物中に存在することが好ましい。ジスルフィド結合は、典型的にはヒンジ領域の近辺に存在し、2つの重鎖および/または軽鎖と重鎖を結合させる。

## 【0084】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子、または本発明の融合構築物、または本発明の構築物をコードする1つまたは複数の核酸分子に関する。

20

## 【0085】

本発明の構築物をコードする1つまたは複数の核酸分子は、例えば1つの核酸分子が本発明の融合構築物をコードし他の核酸分子が抗体の重鎖をコードする、2つの核酸分子であってよい。

## 【0086】

本発明による核酸分子は、cDNA、およびmRNAなどのDNAを含む。さらに含まれるのは、センス鎖とアンチセンス鎖両方の、DNAまたはRNAの合成または半合成誘導体および混合型ポリマーなどの、当技術分野で知られる核酸模倣分子である。当業者により容易に理解されるように、それらは別の非天然または誘導体ヌクレオチド塩基を含有し得る。好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸分子（複数可）はDNAである。本発明によるこのような核酸模倣分子または核酸誘導体には、ホスホロチオエート核酸、ホスホロアミデート核酸、2'-O-メトキシエチルリボ核酸、モルホリノ核酸、ヘキシトール核酸（HNA）およびロックド核酸（LNA）がある（例えば、Braasch and Corey, Chemistry and Biology 8, 1~7頁（2001）参照）。LNAは、2'-酸素と4'-炭素の間のメチレン結合によってリボース環が制約を受けるRNA誘導体である。

30

## 【0087】

本発明の目的で、ペプチド核酸（PNA）はポリアミドタイプのDNAアナログである。アデニン、グアニン、チミンおよびシトシンの対応する誘導体に関するモノマー単位は（例えばPerceptive Biosystemsから）市販されている。PNAは、DNAまたはRNAの糖-リン酸骨格の代わりにアミド骨格がある合成DNA-模倣体である。結果として、DNAの構成要素、リン、酸化リン、またはデオキシリボース誘導体などはPNA中に存在しない。

40

## 【0088】

本発明によるPNAキメラは、1つまたは複数のPNA部分を含む分子である。キメラ分子の残り部分は、1つまたは複数のDNA部分（PNA-DNAキメラ）または1つまたは複数の（ポリ）ペプチド部分を含み得る（ペプチド-PNAキメラ）。本発明によるペプチド-DNAキメラは、1つまたは複数の（ポリ）ペプチド部分と1つまたは複数の

50

DNA部分を含む分子である。PNA、ペプチドおよびDNA部分を含む分子も想定される。キメラ分子の一部分の長さは1～n-1塩基、塩基相当物またはアミノ酸の範囲であってよく、この場合「n」は分子全体の塩基、塩基相当物およびアミノ酸の合計数である。

#### 【0089】

前に記載したPNA、(ポリ)ペプチド、PNAキメラ、およびペプチド-DNAキメラに関連する用語「誘導体」は、PNA、(ポリ)ペプチドおよびDNAと異なる1つまたは複数のさらなる基または置換基を含む分子に関する。当技術分野で知られており、保護基などのこれらの分子の合成、および/または標識および(切断)リンカーなどのこれらの分子に関する適用例に使用する、全ての基または置換基が想定される。

10

#### 【0090】

核酸分子が列挙した配列を(有するのではなく)含む実施形態では、5'末端もしくは3'末端の一方または両末端で、追加的ヌクレオチドが特定配列にわたり延長する。これらの追加的配列は異種または相同の性質であってよく、約50～500ヌクレオチドの延長部分を含み得るが、より高い値または低い値が除外されるわけではない。相同的配列の場合、これらの実施形態は完全ゲノムを含まず、一般に5'末端および/または3'末端における約1500の追加的ヌクレオチドに限られる。

#### 【0091】

追加的異種配列は、前述の分子のコード配列に作動可能に連結した異種プロモーターを含み得る。したがって、核酸分子はプロモーターに作動可能に連結することが好ましく、T5プロモーター/lacオペレーターエレメント、T7プロモーター/lacオペレーターエレメントからなる原核生物プロモーターの群から、またはhEF1-HTLV、CMVenh/hFerLプロモーターからなる真核生物プロモーターの群から選択されるプロモーターに作動可能に連結することがさらに好ましい。

20

#### 【0092】

本発明はさらに、本発明の1つまたは複数の核酸分子を含む1つまたは複数のベクター、および本発明の1つまたは複数の核酸分子または本発明の1つまたは複数のベクターを含む1つまたは複数の宿主細胞に関する。

#### 【0093】

ベクターおよび単離細胞、特に宿主細胞は、目的、例えば本発明のポリペプチド、融合構築物および/または構築物、および/または例えば遺伝子療法に治療上有用なベクターと宿主細胞の生成に適した、任意の従来型であってよい。当業者は、通常の方法により過剰な負担なしで、多量の従来技術からこれらの核酸分子、ベクターおよび宿主細胞を選択することができ、所望の目的に関するそれら個々の適性を確認することができる。

30

#### 【0094】

本発明の1つまたは複数のベクターは、本発明の1つまたは複数の核酸を含むことがさらに好ましく、本発明のポリペプチドまたは融合タンパク質を生成可能であることが好ましい。このようなベクターは、pQEベクター、pETベクター、pFUSEベクター、pUCベクター、YACベクター、ファージミドベクター、ファージベクター、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどの遺伝子療法に使用するベクターからなる群から選択されることが好ましい。ベクターの改変技術に関しては、Sambrook and Russell (2001)、上記引用文を参照のこと。一般にベクターは、1つまたは複数の複製起点(ori)、およびクロニングもしくは発現用の遺伝子系、1つまたは複数の宿主における例えば抗生物質耐性選択用マーカー、および1つまたは複数の発現カセットを含有し得る。適切な複製起点(ori)には、例えばColE1、SV40ウイルスおよびM13複製起点がある。

40

#### 【0095】

別の核酸分子との翻訳融合体が生成するように、本発明の1つまたは複数の核酸分子を1つまたは複数のベクターに挿入することもできる。他の核酸分子は抗TNF抗体および/またはリンカーの軽鎖および/または重鎖をコードすることが好ましく、その好まし

50

い例は本明細書で前に記載した。

【0096】

1つまたは複数の宿主細胞は、本発明の1つまたは複数の核酸分子または1つまたは複数のベクターを1つまたは複数の宿主細胞に導入することにより生成することができ、それらの存在は前記核酸分子またはベクターによってコードされるポリペプチドの発現を媒介する。宿主細胞は単離宿主細胞であることが好ましく、これは細胞が生存する生物の状態にないことを意味する。宿主は任意の原核生物または真核生物細胞であってよい。適切な真核生物宿主は、哺乳動物細胞、両生類細胞、魚類細胞、昆虫細胞、真菌細胞または植物細胞であってよい。真核生物細胞は、スポードブテラフルベルダ細胞などの昆虫細胞、

10

サッカロミセスレビスシアエまたはピキアパストリス細胞などの酵母細胞、アスペルギルス細胞などの真菌細胞、または脊椎動物細胞であってよい。後者の点で、細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞であることが好ましい。細胞は細胞株の一部であってよい。

【0097】

適切な原核生物/細菌は、大腸菌(例えば、大腸菌株HB101、DH5a、XL1Blue、Y1090およびJM101)、ネズミチフス菌、霊菌、パークホルデリアグルマエ、シュードモナスプチダ、シュードモナスフルオレセンス、シュードモナススタッゼリ、ストレプトミセスリビダンス、乳酸桿菌、マイコバクテリウムスメグマチスまたは枯草菌のような一般にクローニングに使用されるものである。本発明の核酸分子またはベクターで遺伝子操作するのに好ましい宿主細胞の例は大腸菌である。

【0098】

本発明は、本発明のポリペプチド、本発明の融合構築物、本発明の構築物、本発明の1つまたは複数の核酸分子、本発明の1つまたは複数のベクター、本発明の1つまたは複数の宿主細胞、またはそれらの任意の組合せを含む、医薬または診断用組成物も対象とする。

20

【0099】

本明細書中前でより詳細に論じたように、IL-17Aは多くの疾患に関与する。したがって、本発明のポリペプチド、融合構築物、構築物、核酸分子、ベクター、宿主細胞、またはそれらの任意の組合せは医薬品として有用である。前記医薬組成物中、本発明のポリペプチド、融合構築物、構築物、核酸分子、ベクター、宿主細胞、またはそれらの任意の組合せが唯一の活性剤であることが好ましい。医薬組成物は、飼育動物およびペット動物などの哺乳動物に投与することが好ましい。医薬組成物は、ヒトに投与することが最も好ましい。本明細書に記載する医薬組成物は、適切な用量で対象に投与する。

30

【0100】

本発明に従い使用するための医薬組成物は、1つまたは複数の生理的担体または賦形剤を使用して、当技術分野で見られる方法に従い従来の形式で製剤化することができる。例えば、Ansel et al.「Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems」、7th edition、Lippincott Williams and Wilkins Publishers、1999を参照。したがって医薬組成物は、経口、非経口、例えば皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、くも膜下、経皮、経粘膜、硬膜下、イオン導入法を介して局所もしくはは局部、舌下、吸引スプレー、エアロゾルまたは直腸など、従来の薬学的に許容される賦形剤を場合によっては含む単位剤形で投与することができる。さらに、本発明の診断用組成物は任意の従来法で製造することができる。

40

【0101】

本発明の医薬組成物は、例えば前述の疾患を治療または予防するため、唯一の活性成分として、またはアジュバントとして、他の薬物、例えば免疫抑制もしくは免疫調節剤または他の抗炎症剤と共に、もしくはこれらと組み合わせて投与することができる。例えば、本発明のポリペプチド、融合構築物および構築物は、免疫抑制モノクローナル抗体、例えば白血球受容体、例えばMHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD58、CD80、CD86またはこれらのリガンド

50

に対するアフィニティーがあるモノクローナル抗体、他の免疫調節化合物、例えばCTLA 4もしくはその突然変異体の細胞外ドメインの少なくとも一部分、例えば非CTLA 4タンパク質配列、例えばCTLA 4 Ig（例えば、ATCC68629と表す）もしくはその突然変異体と接合したCTLA 4もしくはその突然変異体の少なくとも細胞外部分を有する組換え結合分子、例えばLEA29Y、接着分子阻害剤、例えばLFA-Iアンタゴニスト、ICAM-1もしくは-3アンタゴニスト、VCAM-4アンタゴニストもしくはVLA-4アンタゴニストと組み合わせて使用することができる。さらに、本発明のポリペプチド、融合構築物および構築物は、DMARD（疾患修飾性抗リウマチ薬）、金類塩、スルファサラジン、抗マラリア薬、メトトレキサート、D-ペニシラミン、アザチオプリン、ミコフェノール酸、シクロスポリンA、タクロリムス、シロリムス、ミノサイクリン、レフルノミド、グルココルチコイド、カルシニューリン阻害剤、例えばシクロスポリンAもしくはFK506、リンパ球再循環のモジュレーター、例えばFTY720およびFTY720アナログ、mTOR阻害剤、例えばラパマイシン、40-O-（2-ヒドロキシエチル）-ラパマイシン、CCI779、ABT578、AP23573もしくはTAF93、免疫抑制の特性を有するアスコマイシン、例えばABT-281、ASM981など、コルチコステロイド、シクロホスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、レフルノミド、ミゾリピン、ミコフェノール酸、マイコフェノレートモフェチル、15-デオキシスペルグアリンまたはその免疫抑制ホモログ、アナログもしくは誘導体、または化学療法剤、例えばパクリタキセル、ゲムシタピン、シスプラチン、ドキシソルピシンもしくは5-フルオロウラシル、（他の）抗TNF作用物質、例えば（好ましくは配列番号11および/または12を含む）TNFに対するモノクローナル抗体、例えばインフリキシマブ、アダリムマブ、CDP870、またはTNF-RIもしくはTNF-RIIに対する受容体構築物、例えばエタネルセプト、PEG-TNF-RI、炎症促進性サイトカインのブロッカー、IL-1ブロッカー、例えばアナキンラもしくはIL-1トラップ、AAL160、ACZ885、IL-6ブロッカー、プロテアーゼ、例えばメタロプロテアーゼの阻害剤もしくは活性化剤、抗IL-15抗体、抗IL-6抗体、抗IL-23抗体、抗IL-22抗体、抗IL-21抗体、抗IL-12抗体、抗IFN抗体、抗IFN抗体、抗CD20抗体、抗IL-17抗体、抗IgGE抗体、アスピリンなどのNSAID、または抗感染剤と組み合わせて使用することができる。他の適切な薬物は、ACE阻害剤、レニン阻害剤、ADH阻害剤、アルドステロン阻害剤、およびアンジオテンシン受容体ブロッカーを含み得る。当然ながら、同時投与に関するこの作用物質の一覧は限定的でも完全でもない。

#### 【0102】

一般的観点で、本発明の医薬組成物はIL-17A媒介性疾患の治療または予防において使用する。

#### 【0103】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤を含むことが好ましい。「薬学的に許容される担体または賦形剤」によって、任意のタイプの無毒固形状、半固形状または液状充填剤、希釈剤、被包性物質または製剤助剤を意味する。薬学的に許容される担体または賦形剤の例は、例えば、Ansel et al.「Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems」、7th edition、Lippincott Williams and Wilkins Publishers、1999中に記載されている。

#### 【0104】

本発明の診断用組成物は、例えば異なる細胞、組織または別の適切なサンプル中の、特に配列番号10のグリコシル化IL17Aにおける、望ましくない生理的グリコシル化IL17Aレベルの検出において有用である。前記検出は、本発明のポリペプチド、融合構築物、構築物、核酸分子、ベクター、宿主細胞、またはそれらの任意の組合せとサンプルの接触、およびサンプル中のグリコシル化IL17A、特に配列番号10のグリコシル化IL17Aの存在の検出を典型的に含む。したがって本発明の診断用組成物は、疾患の発

10

20

30

40

50

症または病状、および特に本明細書において以下でさらに定義する病状の評価に使用することができる。

【0105】

本明細書で前に記載した本発明の一実施形態では、本発明のポリペプチドは、蛍光色素、感光剤、放射性核種、または医療イメージング用造影剤と結合する。このような融合構築物は診断用途に特に適している。

【0106】

本発明の診断用組成物は唯一の活性剤として投与することができ、または例えば、診断用組成物を使用し対象内の望ましくない生理的グリコシル化IL17Aレベルの部位を確認する場合、他の作用物質と組み合わせて投与することができる。一般的観点で、本発明の診断用組成物はIL-17A媒介性疾患の診断において使用される。

10

【0107】

本発明の診断用および医薬組成物の用量は、当然ながら、本発明の個々のポリペプチド、融合構築物、構築物、1つまたは複数の核酸分子、1つまたは複数のベクター、1つまたは複数の宿主細胞、またはそれらの任意の組合せ、個別患者群もしくは患者、さらなる診断用もしくは医用活性化合物の任意選択的存在、ならびに診断もしくは治療する疾患の性質および重症度に応じて変わる。しかしながら、本発明の診断用または医薬組成物は、体重1kg当たり約0.01mg～約20mg、好ましくは体重1kg当たり約0.1mg～約5mgの用量で使用することが現在好ましい。診断用または医薬組成物を2回以上投与して、例えば診断用組成物の場合は疾患の過程をモニタリングすることができ、または医薬組成物の場合は治療を延長することができる。診断用または医薬組成物の投与の頻度は、1日1回～約3カ月毎に1回、好ましくは約2週間毎に1回～約10週間毎に1回、より好ましくは4～8週間毎に1回の範囲内であることが好ましい。好ましい投薬レジメンは、1カ月に1回から2～3カ月毎に1回、またはより低い頻度の本発明の診断用または医薬組成物の投与を含む。

20

【0108】

本発明の好ましい実施形態では、前記医薬組成物を炎症性、自己免疫性および/または骨量減少関連疾患の治療法において使用する。

【0109】

本発明のより好ましい実施形態では、疾患は、関節炎、好ましくは関節リウマチ、慢性進行性関節炎、反応性関節炎、乾癬性関節炎、腸疾患性関節炎および変形性関節炎、リウマチ性疾患、脊椎関節症、強直性脊椎炎、ライター症候群、過敏症（気道過敏症と皮膚過敏症の両方含む）、アレルギー、全身性エリテマトーデス、炎症性筋肉障害、多発性軟骨炎、強皮症、ヴェグナー肉芽腫、皮膚筋炎、スティーブンソン症候群、慢性活性化肝炎、重症筋無力症、乾癬、特発性スプルー、自己免疫性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性大腸症候群、内分泌性眼病、グレーブス病、サルコイドーシス、多発性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、若年型糖尿病（I型糖尿病）、自己免疫性血液障害、溶血性貧血、無形成性貧血、真正赤血球性貧血、特発性血小板減少、ブドウ膜炎（前房および後房）、乾性角結膜炎、角結膜炎春季カタル、間質性肺線維症、糸球体腎炎（ネフローゼ症候群有りおよび無し）、特発性ネフローゼ症候群または微小変化型ネフロパシー、腫瘍、皮膚の炎症性疾患、角膜炎、筋炎、骨部インプラントの弛緩、代謝障害、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、および脂質異常症、骨量減少、骨関節炎、骨粗しょう症、歯周疾患、閉塞性または炎症性気道疾患喘息、気管支炎、塵肺症、肺気腫、急性および超急性炎症反応、急性感染、敗血症性ショック、エンドトキシンショック、成人型呼吸窮迫症候群、髄膜炎、肺炎、重度の火傷、カヘキシー消耗性症候群、脳血管発作、ヘルペス性間質性角膜炎およびドライアイ疾患からなる群から選択される。

30

40

【0110】

全ての前述の疾患は、それらの発端および/または症状（複数可）がIL-17Aおよび/またはTh-17関連である点において共通する。

【図面の簡単な説明】

50

## 【0111】

【図1】図1は、本発明のIL-17A結合ポリペプチド：(A)1L3-B09(配列番号3)、(B)11L0-C6(配列番号4)、(C)11L5-B06(配列番号5)、(D)11L6-F03(配列番号6)、(E)11L9-C09(配列番号7)、(F)11L10-A05(配列番号8)、(G)11L11-A09(配列番号9)のサイズ排除クロマトグラム(SEC)を示す図である。

【図2】図2は、本発明のFyn-SH3由来ポリペプチドによるグリコシル化および非グリコシル化IL-17Aの用量依存的in vitro阻害の結果を示す図である。A)1L3-B09(配列番号3)、(B)11L0-C6(配列番号4)、(C)11L5-B06(配列番号5)、(D)11L6-F03(配列番号6)、(E)11L9-C09(配列番号7)、(F)11L10-A05(配列番号8)。

10

【図3】図3は、WO2011/023685中に記載されたFynSH3由来結合物質によるグリコシル化および非グリコシル化IL-17Aの用量依存的in vitro阻害の結果を示す図である。(A)FynSH3由来IL-17結合物質2C1(WO2011/023685中に記載された配列番号107)。(B)FynSH3由来IL-17結合物質A1\_2(「A1」)(WO2011/023685中に記載された配列番号53)。(C)FynSH3由来IL-17結合物質B1\_2(「B1」)(WO2011/023685中に記載された配列番号39)。

【図4】図4は、本発明の二重特異性IL-17A/TNF結合ポリペプチドのサイズ排除クロマトグラム(SEC)を示す図である。(A)LC11L5-B06(それぞれ配列番号12と16の配列からなる重鎖と軽鎖を有する(本発明による)二重特異性構築物)、および(B)LC11L9-C09(それぞれ配列番号12と17の配列からなる重鎖と軽鎖を有する(本発明による)二重特異性構築物)。

20

【図5】図5は、二重特異性抗IL-17A/TNF融合タンパク質によるIL-17AとTNFの同時阻害を示す図である。200pMのTNFと400pMのIL-17AでHT-29細胞を刺激した後の、上清中のGro-ELISAレベルを示す。示した濃度のLC11L5-B06(配列番号12(重鎖)と16(軽鎖融合体))(図5.A)またはLC11L9-C09(配列番号12(重鎖)と17(軽鎖融合体))(図5.B)を加えた後、IL-17AとTNFの用量依存的阻害を観察することができる。Gro-レベルは、高濃度の阻害剤で低下するからである。対照として、細胞は単一サイトカイン(IL-17AまたはTNF)または培地のみで処理した。三連の平均値を示し、エラーバーは標準偏差(SD)を表す。

30

【図6】図6は、in vivoでのヒトIL-17AとTNFの阻害を示す図である。(A)および(B)：マウスに(「LC-B06」で表す)LC11L5-B06(配列番号12(重鎖)と16(軽鎖融合体)を静脈内(i.v.)注射し、次にヒトIL-17A(hIL-17A)(A)またはヒトTNF(hTNF)(B)を皮下注射した。示したサイトカインの投与後2時間で、マウスから血液サンプルを採取し、ELISAによりKCレベルを検出した。抗TNF抗体(図6.B)(「aTNF mAb」)またはPBSのいずれかの静脈内注射を施したマウスも示す。対照として、(サイトカイン刺激無しでPBSのみで(静脈内)処理したマウスの)基底KCレベルを示す。(C)および(D)：マウスに(「LC-C09」で表す)LC11L9-C09(配列番号12(重鎖)と17(軽鎖融合体)を静脈内(i.v.)注射し、次にIL-17A(C)またはTNF(D)を皮下注射した。示したサイトカインの投与後2時間で、マウスから血液サンプルを採取し、ELISAによりKCレベルを検出した。抗TNF抗体(図6.D)(「aTNF mAb」)またはPBSのいずれかの静脈内注射を施したマウスも示す。対照として、(サイトカイン刺激無しでPBSのみで(静脈内)処理したマウスの)基底KCレベルを示す。群当たり5匹のマウスの平均KCレベルを示す(±SEM)。

40

【図7】図7は、C57BL/6マウスへの一回静脈内注射後の異なる時間地点での(A)LC11L5-B06(配列番号12(重鎖)と16(軽鎖融合体))および(B)L

50

C11L9 - C09 (配列番号12 (重鎖) と17 (軽鎖融合体)) の血清中濃度を示す図である。血清中濃度は、捕捉剤として (括弧内に示す) TNF と IL-17A の両方を使用して ELISA によって決定した。最終時間地点 (24時間 ~ 168時間) は消失半減期を計算するため使用した。5マウスの平均血清中濃度を時間に対してプロットし、エラーバーは標準偏差 (SD) を表す。

【図8】図8は、配列番号3 ~ 9および20の配列アラインメントを示す図である。配列番号3 ~ 9は、図8から明らかであるように本出願の実施例中の内部表示にも対応する。

【図9】図9は、本発明の Fyn-SH3由来ポリペプチド11L11-A09 (配列番号9) によるグリコシル化および非グリコシル化 IL-17A の用量依存的 *in vitro* 阻害の結果を示す図である。

10

【図10】図10は、二重特異性抗 IL-17A / TNF 融合タンパク質 LC11L5-B06 および LC11L9-C09 による IL-17A の阻害を示す図である。IL-17A および IL-1 (「IL-17A / IL-1」) で NHDF 細胞を刺激した後の、細胞培養上清中の IL-6 ELISA レベルを示す。示した濃度の LC11L5-B06 (配列番号12 (重鎖) と16 (軽鎖融合体)) または LC11L9-C09 (配列番号12 (重鎖) と17 (軽鎖融合体)) を加えた後、IL-17A 媒介性 IL-6 放出の用量依存的阻害を観察した。対照実験では、細胞は単一サイトカイン (「IL-17A」または「IL-1」) または細胞培養培地のみ (「培地」) で処理した。三連の平均値を示し、エラーバーは標準偏差 (SD) を表す。

【図11】図11は、サンドイッチ ELISA および直接 ELISA 法を示す図である。  
(左) サンドイッチ ELISA を実施してインタクテナ LC11L5-B06 および LC11L9-C09 分子を検出した。ビオチン化 TNF を、ニュートラビジンコーティングマイクロタイター96ウエルプレートのウエル中に固定した。LC11L5-B06 または LC11L9-C09 を含有する血漿をウエルに加えた。検出用にジゴキシゲニン標識 IL-17A、次に基質処理および発色用に抗ジゴキシゲニン抗体 HRP コンジュゲートを使用した。  
(右) 直接 ELISA を実施して特異的 TNF 結合を検出した。ビオチン化 TNF を、ニュートラビジンコーティングマイクロタイター96ウエルプレートのウエル中に固定した。LC11L5-B06 または LC11L9-C09 を含有する血漿をウエルに加えた。結合した LC11L5-B06 または LC11L9-C09 は、基質処理および発色用の抗ヒト IgG 抗体 HRP コンジュゲートを使用して検出した。

20

30

【図12】図12は、カニクイザルへの一回静脈内注射後の異なる時間地点での (A) LC11L5-B06 (配列番号12 (重鎖) と16 (軽鎖融合体)) および (B) LC11L9-C09 (配列番号12 (重鎖) と17 (軽鎖融合体)) の血漿中濃度を示す図である。血漿中濃度は、捕捉剤として TNF およびジゴキシゲニン標識 IL-17A、次に基質処理および発色用に抗ジゴキシゲニン抗体 HRP コンジュゲートを使用してサンドイッチ ELISA によって決定した。3匹のカニクイザルの平均血漿中濃度を時間に対してプロットし、エラーバーは標準偏差 (SD) を表す。

【図13】図13は、サンドイッチ ELISA および直接 ELISA により決定したカニクイザルにおける LC11L5-B06 (A) または LC11L9-C09 (B) の血漿中濃度を示す図である。血漿中濃度は両タンパク質に関して比較可能であり、LC11L5-B06 および LC11L9-C09 は少なくとも220時間カニクイザルにおいて安定状態であることを示す。

40

#### 【0112】

実施例によって本発明を例示する。

#### 【実施例1】

#### 【0113】

本発明の Fyn-SH3由来ポリペプチドは、モノクローナル溶解物 ELISA により測定して IL-17A と結合する。

#### 【0114】

方法

50

Schlatter et al. (Schlatter et al. (2012) mAbs、4(4)、497~50頁)中に記載されたフィノマーファージライブラリーを使用し、IL-17Aに特異的なFyn-SH3由来結合タンパク質を、抗原として組換えIL-17A(R&D Systems)、および選択技術として標準ファージディスプレイ(Grabulovski D. et al.、(2007) J Biol Chem 282、3196~3204頁、Viti、F. et al. (2000) Methods Enzymol. 326、480~505頁)を使用して単離した。n-src-ループ配列「STHEYE」(配列番号2)を有する本発明のFynSH3由来ポリペプチド1L3-B09(配列番号3)は選択プロセス中に増大した。1L3-B09(配列番号3)はIL-17Aと結合し(実施例2参照)、驚くことに非グリコシル化IL-17Aと同程度にグリコシル化IL-17Aを阻害することが分かった(実施例3参照)。高いアフィニティーを有するFynSH3由来IL-17A結合物質を得るため、1L3-B09(配列番号3)はアフィニティー成熟の鑄型として使用した。n-src-ループ配列「STHEYE」(配列番号2)は一定に保ち、ランダムRT-ループレパートリー(配列番号1において(X<sup>1</sup>)(X<sup>2</sup>)(X<sup>3</sup>)(X<sup>4</sup>)(X<sup>5</sup>)(X<sup>6</sup>)として表す6アミノ酸残基)と組み合わせた。アフィニティー成熟ライブラリー作製のプロセスは、ランダムRT-ループを有する原型ライブラリー(Schlatter et al. (2012) mAbs、4(4)、497~50頁中の「ライブラリー0」)のクローニングに関して記載されたものとほぼ同じであった。

10

## 【0115】

20

原型およびアフィニティー成熟選択後、増大したFynSH3由来ポリペプチドは、溶解物ELISAによりIL-17Aとの結合に関してスクリーニングした。Grabulovski et al. (Grabulovski et al.、(2007) JBC、282、3196~3204頁)中に記載されたように、FynSH3由来結合タンパク質をコードするDNAを細菌用発現ベクターpQE12(Qiagen)にクローニングし、その結果生成した構築物はC末端mycヘキサヒスチジンタグを有していた。ポリペプチドは96ウエル形式で大腸菌のサイトゾルにおいて発現させ、ウエル当たり200μlの透明溶解物をBertschinger et al. (Bertschinger et al. (2007) Protein Eng Des Sel 20(2)、57~68頁)中に記載されたように調製した。簡単に言うと、形質転換細菌コロニーを寒天培地プレートから採取し、100μg/mlアンピシリンおよび0.1%(w/v)グルコースを含有する200μl 2xYT培地中、丸底96ウエルプレート(Nunc、カタログ番号163320)において増殖させた。タンパク質の発現は、1mMのIPTG(Applichem、ドイツ)を加えることにより、200r.p.m.で37における3時間の増殖後に誘導した。タンパク質はロータリーシェーカー内で一晩発現させた(200r.p.m.、30)。その後、96ウエルプレートは1800gで10分間遠心分離し、上清は廃棄した。細菌ペレットは、1mg/mlのリソザイムを含有する200μl溶解バッファー(50mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300mMのNaCl、10mMのイミダゾール、pH8.0)に再懸濁し、氷上に30分間放置した。後に、細菌細胞は水浴中での超音波処理によって溶かし(10秒間6バースト)、次いで1800gで10分間遠心分離した。モノクローナル細菌溶解物をELISAに使用し、ビオチン化IL-17A(研究室内でHEKEBNA細胞で生成、ビオチン化は製造者の説明書に従いNHS-PEO4-ビオチン(Pierce)で実施)をストレプトアビジンコーティングウエル(StreptaWells、High Bind、Roche)に固定し、2%ミルク(Rapilait、Migros、スイス)を含むPBSでブロッキングした後、6μg/ml抗myc抗体9E10を含有する4%ミルク(最終濃度3μg/ml)を含む50μlのPBS、および50μlの細菌溶解物を適用した。1時間のインキュベーションおよび洗浄後、抗マウスHRP抗体コンジュゲート(Sigma)を用いて、結合したFynSH3由来ポリペプチドを検出した。ペルオキシダーゼ活性の検出はBMブルー-POD基質(Roche)を加えることにより行い、1MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えることに

30

40

50

より反応を停止させた。特異的結合物質のDNA配列はDNA配列決定によって検証した。

#### 【0116】

##### 結果

IL-17Aと結合したELISA陽性FynSH3由来ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列表中に添付したように配列番号3~9で表す。

#### 【実施例2】

#### 【0117】

本発明のFynSH3由来ポリペプチドは、高いアフィニティーでグリコシル化ヒトIL-17Aと結合する。

#### 【0118】

この実施例は、FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの発現収量、ならびにサイズ排除クロマトグラフィーおよび表面プラズモン共鳴実験によるこれらのポリペプチドの特徴付けを示す。

#### 【0119】

##### 方法

##### a) FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの発現収量

Grabulovski et al. (Grabulovski et al., (2007) JBC, 282, 3196~3204頁)中に記載されたように、FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドをTG1大腸菌のサイトゾルにおいて発現させ精製した。

#### 【0120】

##### b) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

親FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド1L3-B09(配列番号3)に関して、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を、Superdex 75ショートカラム(5/150)(GE Healthcare)を使用してAKTA FPLCシステムで実施した。アフィニティー成熟クローン11L0-C6(配列番号4)、11L5-B06(配列番号5)、11L6-F03(配列番号6)、11L9-C09(配列番号7)、11L10-A05(配列番号8)および11L11-A09(配列番号9)のSECは、SEC-3カラム(Agilent)を使用し、Agilent Technologies 1200 Infinity Series HPLC装置で実施した。

#### 【0121】

##### c) アフィニティー測定

アフィニティー測定はBIAcore T200装置(GE Healthcare)を使用して実施した。グリコシル化IL-17A(研究室内で、HEK293細胞で生成)とモノマーFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの間の相互作用分析用に、Series S CM5チップ(GE Healthcare)を、アミンカップリングキット(GE Healthcare)を使用し2000RU IL-17Aを固定して使用した。ランニングバッファーは、0.05%のTween 20を含有するPBSであった。30µl/分の流量および異なる濃度のFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの注入で相互作用を測定した。相互作用の全てのキネティックデータは、BIAcore T200評価ソフトウェアを使用して評価した。

#### 【0122】

##### 結果

##### a) 発現収量

本発明のモノマーFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドに関する発現収量は、振とうフラスコ内の非最適条件下での細菌培養物の14~57mg/Lの範囲であった(表1)。

#### 【0123】

10

20

30

40

## 【表 1】

表1. TG1大腸菌で生成したFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの発現収量

フィノマー	配列番号	収量(mg/l)
1L3-B09	3	57
11L0-C06	4	43
11L5-B06	5	36
11L6-F03	6	14
11L9-C09	7	14
11L10-A05	8	32
11L11-A09	9	35

10

## 【 0 1 2 4 】

b) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) プロファイルは、全ての構築物は主に単一モノマーピークとして溶出したことを実証した (図 1)。

## 【 0 1 2 5 】

c) アフィニティー測定

結合性を B I A c o r e チップでのリアルタイム相互作用分析によって分析し、選択した I L - 1 7 A 結合ポリペプチドに関する以下の解離定数 ( $K_D$ ) が明らかになった。

20

## 【 0 1 2 6 】

## 【表 2】

表2. 組換えヒトグリコシル化IL-17A(HEKEBNA細胞で生成)とFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの結合の速度定数

フィノマー	配列番号	$K_D$ (nM)
1L3-B09	3	245
11L0-C06	4	7
11L5-B06	5	12
11L6-F03	6	11
11L9-C09	7	11
11L10-A05	8	7
11L11-A09	9	24

30

## 【実施例 3】

## 【 0 1 2 7 】

本発明の F y n S H 3 由来ポリペプチドはグリコシル化 I L - 1 7 A を阻害する

## 【 0 1 2 8 】

親クローン 1 L 3 - B 0 9、ならびに I L - 1 7 A と高いアフィニティーを有する本発明の 5 つのアフィニティー成熟 F y n S H 3 由来ポリペプチド ( 1 1 L 0 - C 6 (配列番号 4)、1 1 L 5 - B 0 6 (配列番号 5)、1 1 L 6 - F 0 3 (配列番号 6)、1 1 L 9 - C 0 9 (配列番号 7)、1 1 L 1 0 - A 0 5 (配列番号 8)) を、I L - 1 7 A を阻害するそれらの能力に関して試験した。I L - 1 7 A と T N F は、線維芽細胞において用量依存的に I L - 6 の生成を誘導する。示した F y n S H 3 由来 I L - 1 7 A 結合ポリペプチドの阻害活性は、様々な濃度の本発明の F y n S H 3 由来 I L - 1 7 A 結合ポリペプチドの有無の下において、組換えグリコシル化 I L - 1 7 A (研究室内、H E K E B N A 細胞で生成) および組換え T N F ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) でヒト皮膚線維芽細胞を刺激することによって試験した。細胞培養上清を 2 4 時間の

40

50

刺激後に採取し、上清中のIL-6濃度をELISAにより測定した。結果は、IL-17A結合ポリペプチドが、グリコシル化IL-17Aを特異的に阻害することができたことを示す。

#### 【0129】

##### 方法

エンドトキシン除去のため、タンパク質溶液をAcrodisc Mustang E膜(VWR)で3回濾過した。濾過後、本発明の阻害性FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドを含有するタンパク質溶液のエンドトキシンレベルは、Limulus ameocyte lysate(LAL)試験(PYROGENT Single Test Gel Clot LALアッセイ(Lonza))により測定して0.1EU/ml未満であった。

10

#### 【0130】

約3900の正常ヒト皮膚線維芽細胞(PromoCell、NHDF-c、C12300)を含有する細胞懸濁液100 $\mu$ lをウエル毎に分配し(96ウエルプレート、TPPまたはCorning)、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した(培地:線維芽細胞増殖培地C-23010、PromoCell)。上清を吸引し、異なる濃度の本発明のFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドとIL-17AおよびTNF $\alpha$ 含有培地を混合した後(それぞれ最終濃度1ng/mlと50pg/ml)、対応する溶液100 $\mu$ lをウエル毎に加えた。対照として、PBSをIL-17A/TNF $\alpha$ 含有培地(陽性対照=「阻害剤含まず」)、および一種サイトカインIL-17AまたはTNF $\alpha$ のみを含む培地と混合した(後者は「TNF $\alpha$ 対照」ウエルである)。陰性対照として、PBSを培地のみと混合した。比較用に、同じ条件を使用し非グリコシル化IL-17A(R&D Systems)も使用してアッセイを実施した。37 $^{\circ}$ Cで24時間のインキュベーション後、ELISAにおいて、製造者の説明書に従いIL-6ELISAキットを使用し(IL-6ELISAキット、R&D Systems)、上清のIL-6濃度を測定した。阻害の百分率をプロットし、IC<sub>50</sub>値はソフトウェアPrism5を使用して計算した。

20

#### 【0131】

IL-17A阻害の百分率は以下の式で決定した:

阻害率(%) =  $100 - \{ (A_{450-650nm}(\text{サンプル}) - A_{450-650nm}(\text{TNF } \alpha \text{ 対照})) / (A_{450-650nm}(\text{陽性対照}) - A_{450-650nm}(\text{TNF } \alpha \text{ 対照})) \times 100 \}$

30

#### 【0132】

##### 結果

正常ヒト皮膚線維芽細胞をIL-17A/TNF $\alpha$ 、および異なる濃度の示した本発明のFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドとインキュベートした。本発明のFynSH3由来ポリペプチドが、グリコシル化IL-17Aを阻害したことを観察した。IC<sub>50</sub>値を表3中に示す。図2は、グリコシル化IL-17Aと非グリコシル化IL-17A両方を阻害する、本発明の示したFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの用量依存的阻害曲線を示す。驚くことに、本発明中に記載するFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドは、非グリコシル化IL-17Aと比較して同等の効能でグリコシル化IL-17Aを完全に阻害することができることが分かった。これは、以前に発明された(WO2011/023685)FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドと比較して有利な特性である。図3は、高濃度でさえグリコシル化IL-17Aを完全に阻害せず、および/またはグリコシル化IL-17Aと非グリコシル化IL-17Aの間で阻害効能(IC<sub>50</sub>値)の大きな違いを示す、3例のWO2011/023685中に記載されたFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド(FynSH3由来IL-17A結合物質2C1(WO2011/023685中に記載された配列番号107)、FynSH3由来IL-17A結合物質A1\_\_2(WO2011/023685中に記載された配列番号53)およびFynSH3由来IL-17A結合物質B1\_\_2(「B1」)(WO2011/023685中に記載された配列番号39)を示す(図3参照)。

40

50

【 0 1 3 3 】

【 表 3 】

表3. FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドに関して得た  
グリコシル化IL-17Aの阻害に関するIC50値

フィノマー	配列番号	IC <sub>50</sub> 値(nM)
1L3-B09 (親クローン)	3	300
11L0-C06	4	35
11L5-B06	5	43
11L6-F03	6	63
11L9-C09	7	32
11L10-A05	8	28

10

【 実施例 4 】

【 0 1 3 4 】

二重特異性抗IL-17A/TNF抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体の発現および精製収量

【 0 1 3 5 】

FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド(11L5-B06(配列番号5)および11L9-C09(配列番号7))を、15アミノ酸リンカー(リンカー、配列番号15)を介して抗TNF抗体(配列番号11)の軽鎖のC末端に遺伝子融合させた。LC11L5-B06(それぞれ配列番号12と16の配列からなる重鎖と軽鎖を有する(本発明による)二重特異性構築物)、およびLC11L9-C09(それぞれ配列番号12と17の配列からなる重鎖と軽鎖を有する(本発明による)二重特異性構築物)という名称の、生成した二重特異性抗IL-17A/TNF構築物をFreeStyle CHO-S細胞に一過的にトランスフェクトし、無血清/無動物成分培地で6~10日間発現させた。タンパク質は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー(Mab Select Sureカラム; GE Healthcare)、およびAKTA Purifier装置(GE Healthcare)でのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC; Superdex G200、30/100GLカラム; GE Healthcare)によって上清から精製した。濃度は280nmでの吸光度測定によって決定した。収量は表4中に列挙する。

20

30

【 0 1 3 6 】

【 表 4 】

表4. 一過的にトランスフェクトしたCHO-S細胞において生じた  
二重特異性抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体の精製収量

	配列番号 (重鎖、軽鎖)	収量(mg/l)
LC11L5-B06	12、16	110
LC11L9-C09	12、17	110

40

【 0 1 3 7 】

精製後、AKTA FPLCシステムとSuperdex G200、30/100GLカラム(GE Healthcare)を使用してサイズ排除クロマトグラフィーを実施した。精製後のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)プロファイルは、両方の融合タンパク質は単一モノマーピークとして溶出したことを実証し、これらの融合タンパク質は優れた生物物理学的特性を有することを示した(図4)。

50

## 【実施例 5】

## 【0138】

ヒトおよびカニクイザルの IL-17A および TNF $\alpha$  に対する抗体 - FynSH3 由来 IL-17A 結合ポリペプチド融合体のアフィニティー測定

## 【0139】

IL-17A (ヒトおよびカニクイザル) ならびに TNF $\alpha$  (ヒトおよびカニクイザル) に対する LC11L5-B06 および LC11L9-C09 のアフィニティーを、BIAcore T200 装置 (GE Healthcare) を使用して測定した。Series S CM5 チップ (GE Healthcare) を、8000 RU ヤギ抗ヒト IgG Fc 特異的抗体 (Jackson ImmunoResearch) でコーティングした。ランニングバッファーは、0.05% の Tween 20 を含有する PBS であった。30  $\mu$ l / 分の流量で約 400 ~ 500 RU の LC11L5-B06 または LC11L9-C09 の捕捉、次に 30  $\mu$ l / 分の流量で異なる濃度の抗原の注入により相互作用を測定した。相互作用の全てのキネティックデータは、BIAcore T200 評価ソフトウェアを使用して評価した。ヒト抗原に対するアフィニティーは表 5 中に列挙し、カニクイザル抗原に対するアフィニティーは表 6 中に列挙する。

## 【0140】

## 【表 5】

表5. 組換えヒトグリコシル化IL-17A、およびヒトTNF $\alpha$  と抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体の結合の解離定数

	配列番号 (重鎖、軽鎖)	グリコシル化ヒトIL-17Aに対する K <sub>D</sub> 値(pM)	ヒトTNF $\alpha$ に対する K <sub>D</sub> 値(pM)
LC11L5-B06	12、16	44	144
LC11L9-C09	12、17	48	89

## 【0141】

## 【表 6】

表6. 組換えカニクイザルグリコシル化IL-17A、およびカニクイザルTNF $\alpha$  と抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体の結合の解離定数

	配列番号 (重鎖、軽鎖)	グリコシル化カニクイザルIL-17Aに対する K <sub>D</sub> 値(pM)	グリコシル化カニクイザルTNF $\alpha$ に対する K <sub>D</sub> 値(pM)
LC11L5-B06	12、16	63	120
LC11L9-C09	12、17	70	133

## 【実施例 6】

## 【0142】

LC11L5-B06 および LC11L9-C09 は IL-17A と TNF $\alpha$  を同時に阻害する

## 【0143】

IL-17A と TNF $\alpha$  は、HT-29 細胞 (ヒト結腸直腸腺癌細胞株) において用量依存的に Gro- $\alpha$  の生成を誘導する。示した構築物 (LC11L5-B06 および LC11L9-C09) の阻害活性は、様々な濃度の LC11L5-B06 および LC11L9-C09 の有無の下において、グリコシル化 IL-17A と TNF $\alpha$  で HT-29 細胞 (ヒト結腸直腸腺癌細胞株) を刺激することにより試験した。細胞培養上清は刺激の 48 時間後に採取し、ELISA で Gro- $\alpha$  に関してアッセイした。

## 【0144】

## 方法

LC11L5-B06またはLC11L9-C09を、アッセイ培地(10% FBSを補充したMacoy's 5A培地(GIBCO))に希釈した。それぞれ示した濃度の50 $\mu$ lを、それぞれ400pMと200pMの最終濃度でIL-17A(研究室内、HEK293細胞で生成)およびTNF(Thermo Fisher Scientific)を含有する50 $\mu$ lのアッセイ培地と混合した。対照として、阻害剤を含まない培地を調製した。さらに、一種サイトカインのみを含む培地またはサイトカインを含まない培地を調製した。1時間のインキュベーション後、約20,000のHT-29細胞(ATCC、#HTB-38)を含有する100 $\mu$ lの細胞懸濁液を溶液に加え、ウエル毎に分配し(96ウエルプレート、TPPまたはCorning)、37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO<sub>2</sub>で48時間培養した。37 $^{\circ}$ Cで48時間のインキュベーション後、上清を除去し、製造者の説明書に従いELISAによりGro- $\alpha$ 濃度を測定した(Gro- $\alpha$  ELISAキット、R&D Systems)。

10

## 【0145】

## 結果

図5は、IL-17A、TNF $\alpha$ 、およびこれらの組合せで刺激した後のHT-29細胞上清中の(ELISAシグナルとして示す)Gro- $\alpha$ 濃度を示す。図5中に示すように、二重特異性構築物LC11L5-B06およびLC11L9-C09は、IL-17AとTNF $\alpha$ を用量依存的および同時に阻害することができた。得られた見かけのIC<sub>50</sub>値(表7)は、本発明の二重特異性化合物が、高い効能でIL-17AとTNF $\alpha$ を阻害

20

## 【0146】

## 【表7】

表7. 二重特異性抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体に関して得たIL-17AとTNF $\alpha$ の同時阻害に関する見かけのIC<sub>50</sub>値

	配列番号 (重鎖、軽鎖)	IL-17AとTNF $\alpha$ の同時阻害 に関する見かけのIC <sub>50</sub> 値
LC11L5-B06	12、16	247
LC11L9-C09	12、17	222

30

## 【実施例7】

## 【0147】

LC11L5-B06およびLC11L9-C09は*in vivo*でIL-17AおよびTNF $\alpha$ を阻害する

## 【0148】

*in vivo*でIL-17AおよびTNF $\alpha$ を阻害するLC11L5-B06およびLC11L9-C09の能力を、C57BL/6マウスにおいて急性炎症モデルを使用して決定した。ヒトIL-17Aは、マウスIL-17A受容体に結合し刺激する。マウスに注射すると、IL-17AはケモカインKC(CXCL1)の多大な増加を引き起こし、それは注射したマウスの血清および洗浄液において1~4時間以内に検出可能である。同様の観察がヒトTNF $\alpha$ の注射でも見られ、それもマウスへの注射時にKC血清中レベルの有意な増加をもたらす。

40

## 【0149】

## 方法

マウス(C57BL/6、Charles River)に、無エンドトキシンPBSに希釈した阻害剤LC11L5-B06(2mg/kg)、LC11L9-C09(2mg/kg)、またはTNF $\alpha$ 阻害の対照として市販の抗TNF $\alpha$ 抗体(2mg/kg)(アダリムマブ(HUMIRA(登録商標)))を静脈内注射した(群当たり5マウス)。阻害

50

剤の静脈内注射後3.5時間で、(マウス当たり3 $\mu$ gのIL-17Aおよびマウス当たり0.25 $\mu$ gのTNF $\alpha$ の)皮下注射によりヒトIL-17AまたはヒトTNF $\alpha$ でKC発現を刺激した。2時間後、血清サンプリング用に血液を回収し、製造者の説明書に従い市販のKC ELISAキットを使用してKC濃度を測定した(QuantikineマウスKCイムノアッセイ、R&D Systems)。

#### 【0150】

##### 結果

マウスにヒトIL-17AまたはTNF $\alpha$ を皮下注射した後、動物はKCと呼ばれるケモカインを過剰発現する。マウス血清中の高いKCレベルはELISAにより測定することができる。本発明のFynSH3由来ポリペプチド融合体(LC11L5-B06およびLC11L9-C09)ならびに対照抗TNF $\alpha$ 抗体(図6-Bおよび6-D)の事前の静脈内注射は、*in vivo*でKCの増加を妨げた。図6は、「LC-B06」で表す)LC11L5-B06および(「LC-B09」で表す)LC11L9-C09の強力な阻害性を示す。

10

#### 【実施例8】

#### 【0151】

LC11L5-B06およびLC11L9-C09は*in vivo*で抗体様PKプロファイルを示す

#### 【0152】

本発明の融合タンパク質LC11L5-B06およびLC11L9-C09の*in vivo*での薬物動態性は、一回静脈内注射後に異なる時間地点で得たマウス血清において、ELISAによる濃度の測定により決定した。

20

#### 【0153】

##### 方法

LC11L5-B06およびLC11L9-C09を5匹のマウス(C57BL/6、Charles River)に10mg/kgの用量で静脈内注射した。10分、6、24、48、96、120、144および168時間後、約20 $\mu$ lの血液をキャピラリー-MicrovetteCB300(Sarstedt)を用いて伏在静脈から採取した。血液サンプルは9500 $\times$ gで10分間遠心分離し、ELISA分析を実施するまで血清は-20 $^{\circ}$ Cで保存した。既知の濃度で希釈系を使用して、LC11L5-B06およびLC11L9-C09の血清中濃度を、捕捉剤としてTNF $\alpha$ とIL-17Aの両方を使用するELISAにより決定した:50 $\mu$ lのビオチン化IL-17A(120nM)(R&D Systems、製造者の説明書に従いEZ-リンクNHS-PGE4-ビオチン(Pierce)を使用してビオチン化)または50 $\mu$ lのビオチン化TNF $\alpha$ (10nM)(Thermo Scientific、製造者の説明書に従いEZ-リンクNHS-PGE4-ビオチン(Pierce)を使用してビオチン化)をストレプトアビジンコーティングウエル(ReactiBind Pierce)に加え、200 $\mu$ lのPBS、4%ミルク(Rapilait、Migros、スイス)でブロッキングした後、50 $\mu$ lの希釈血清サンプル(PBS、4%ミルク中)を加えた。1時間のインキュベーションおよびPBSでの洗浄後、結合した抗体フィノマー融合タンパク質はプロテインA-HRPコンジュゲート(Sigma)で検出した。ペルオキシダーゼ活性はQuantaRed化学蛍光増大HRP基質(Pierce)の添加により検出した。蛍光強度は544nm(励起)および590nm(発光)で1~5分後に測定した。異なる時間地点において血清で測定したLC11L5-B06およびLC11L9-C09の濃度、および(片対数スケールでプロットした)消失相の、結果として得られた勾配kから、式 $t_{1/2} = \ln 2 / -k$ を使用して半減期を計算した。

30

40

#### 【0154】

##### 結果

LC11L5-B06およびLC11L9-C09の血清中濃度を図7中に示す。消失相(相、時間地点24時間~168時間)から測定した半減期は、両融合タンパク質に

50

関して4.9日～9.6日の範囲であり(表8参照)、これはマウスに注射する標準抗体治療剤に関して報告された半減期の値と同じ範囲内にある。これらのデータは、LC11L5-B06およびLC11L9-C09が、IgG様in vivo PK特性を有することを示している。

【0155】

【表8】

表8. 二重特異性抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体に関する消失半減期の値

	配列番号 (重鎖、軽鎖)	半減期(日数)
LC11L5-B06 (IL-17A検出)	12、16	6.2
LC11L5-B06 (TNF $\alpha$ 検出)	12、16	9.6
LC11L9-C09 (IL-17A検出)	12、17	4.9
LC11L9-C09 (TNF $\alpha$ 検出)	12、17	9.6

10

20

【実施例9】

【0156】

本発明のFyn-SH3由来ポリペプチド11L11-A09はグリコシル化IL-17Aを阻害する

【0157】

フィノマー11L11-A09(配列番号9)を、IL-17Aを阻害する能力に関して試験した。

【0158】

方法

実験条件は、本発明の他のFyn-SH3由来ポリペプチド(配列番号3～8)に関して実施例3中に記載したのと同じである。

30

【0159】

結果

正常ヒト皮膚線維芽細胞をIL-17A/TNF $\alpha$ 、および異なる濃度の本発明のFyn-SH3由来ポリペプチド11L11-A09(配列番号9)とインキュベートした。11L11-A09(配列番号9)が、66nMのIC<sub>50</sub>値でグリコシル化IL-17Aを阻害したことを観察した(表9)。図9は、同等な効能および有効性でグリコシル化IL-17Aと非グリコシル化IL-17Aの両方を阻害する、本発明のFyn-SH3由来ポリペプチド11L11-A09(配列番号9)の用量依存的阻害曲線を示す。

【0160】

40

【表9】

表9. FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド11L11-A09(配列番号9)に関して得たグリコシル化IL-17Aの阻害に関するIC50値

フィノマー	配列番号	IC <sub>50</sub> 値(nM)
11L11-A09	9	66

【実施例10】

【0161】

50

LC11L5 - B06およびLC11L9 - C09は高い効能でグリコシル化IL - 17Aを阻害する

【0162】

この実施例は、グリコシル化IL - 17Aを特異的に阻害する、本発明のFyn - SH3由来ポリペプチドの能力をさらに実証する。二重特異性抗IL - 17A / TNF 構築物、LC11L5 - B06（それぞれ配列番号12と16の配列からなる重鎖と軽鎖を有する（本発明による）二重特異性構築物）、およびLC11L9 - C09（それぞれ配列番号12と17の配列からなる重鎖と軽鎖を有する（本発明による）二重特異性構築物）を、実施例4中に記載したように発現させ精製した。LC11L5 - B06およびLC11L9 - C09の阻害活性は、組換えグリコシル化IL - 17A（研究室内、HEK293T細胞で生成）および組換えTNF（R&D Systems）で正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF細胞）を刺激して、様々な濃度のLC11L5 - B06またはLC11L9 - C09の有無の下においてIL - 6を生成することにより試験した。細胞培養上清を刺激の16～24時間後に除去し、上清中のIL - 6濃度をELISAにより測定した。結果は、本発明のIL - 17A結合ポリペプチドを含む融合タンパク質が、グリコシル化IL - 17Aを特異的に阻害することができたことを示す。

10

【0163】

方法

約3900の正常ヒト皮膚線維芽細胞（PromoCell、NHDF - c、C12300）を含有する細胞懸濁液100μlをウエル毎に分配し（96ウエルプレート、TPP）、37 / 5%CO<sub>2</sub>で24時間培養した（培地：線維芽細胞増殖培地C - 23010、PromoCell）。上清を吸引し、（図10中に示す最終濃度の）異なる濃度のLC11L5 - B06またはLC11L9 - C09とIL - 17AおよびIL - 1含有培地（最終濃度IL - 17A：64pM、IL - 1：10fM）を混合した後、対応する溶液100μlを細胞に加えた（三連）。対照実験では、PBSをIL - 17A / IL - 1含有培地（「IL - 17A / IL - 1」、）および一種サイトカイン「IL - 17A」または「IL - 1」のみを含む培地と混合した（後者は「IL - 17A」および「IL - 1」対照ウエルである）。陰性対照として、PBSを培地のみと混合した（「培地」）。37 / 5%CO<sub>2</sub>で16～24時間のインキュベーション後、製造者の説明書に従いIL - 6 ELISAキットを使用し（IL - 6 ELISAキット、R&D Systems）、上清中のIL - 6濃度を測定した。IC<sub>50</sub>値の計算用に阻害率を決定し、IC<sub>50</sub>値はソフトウエアPrism5を使用して計算した。

20

30

【0164】

IL - 17A阻害の百分率は以下の式で決定した：

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \left\{ \left( \frac{A_{450-650 \text{ nm}}(\text{サンプル}) - A_{450-650 \text{ nm}}(\text{IL - 1})}{A_{450-650 \text{ nm}}(\text{IL - 17A / IL - 1}) - A_{450-650 \text{ nm}}(\text{IL - 1})} \right) \times 100 \right\}$$

【0165】

結果

図10は、NHDF細胞の上清におけるIL - 6濃度の測定に関して得たELISA値（吸光度）を示す。図10中に示すように、二重特異性構築物LC11L5 - B06およびLC11L9 - C09は用量依存的にIL - 17A媒介性IL - 6生成を阻害することができ、それらがグリコシル化IL - 17Aを特異的に阻害することができたことを実証した。予想通り、IL - 1誘導型IL - 6放出を阻害することはできなかった。IL - 17A阻害に関して得たIC<sub>50</sub>値（表10）は、本発明の二重特異性化合物が高い効能でIL - 17Aを阻害することができることを示す。

40

【0166】

## 【表 10】

表10. 二重特異性抗体-FynSH3由来IL-17A結合ポリペプチド融合体に関して得たIL-17Aの阻害に関するIC50値

	配列番号 (重鎖、軽鎖)	IL-17Aの阻害に 関するIC <sub>50</sub> 値(pM)
LC11L5-B06	12、16	121
LC11L9-C09	12、17	66

## 【実施例 11】

10

## 【0167】

LC11L5-B06およびLC11L9-C09はin vivoでは安定状態でありカニクイザルでは長い半減期を示す

## 【0168】

本発明の融合タンパク質LC11L5-B06およびLC11L9-C09の薬物動態性を、一回静脈内注射後の異なる時間地点での、カニクイザルにおけるそれらの濃度の測定により決定した。既知の濃度のLC11L5-B06およびLC11L9-C09を用いた希釈系を使用し、血清中濃度は「サンドイッチELISA」を使用して決定し、完全な機能性およびインタクトな二重特異性分子LC11L5-B06およびLC11L9-C09の測定のみを確実にした。LC11L5-B06およびLC11L9-C09がイ  
ンタクトな状態であること、および本発明のFynSH3由来ポリペプチドがin vivoで(カニクイザルにおいて)抗体から切断されないことをさらに実証するため、融合タンパク質の抗体成分のみを検出する別のアッセイを開発した(「直接ELISA」)。この2つのELISA検出法は図11中に例示する。

20

## 【0169】

## 方法

二重特異性抗IL-17A/TNF構築物、LC11L5-B06(それぞれ配列番号12と16の配列からなる重鎖と軽鎖を有する(本発明による)二重特異性構築物)、およびLC11L9-C09(それぞれ配列番号12と17の配列からなる重鎖と軽鎖を有する(本発明による)二重特異性構築物)を、実施例4中に記載したように発現させ精製した。LC11L5-B06およびLC11L9-C09を、3mg/kgの用量で3匹のオスのカニクイザルに静脈内注射した。投与終了後示した時間地点で末梢静脈から血液を採取した(サンプル当たり0.6mlの回収容積)。EDTA溶液(7.5%)を抗凝血薬として使用した。血液回収後、サンプルは1200gで10分間4において遠心分離し、血漿はELISAにより分析するまで-80で保存した。

30

## 【0170】

「サンドイッチELISA」。ニュートラビジンコーティングウエル(Biomate MCP44-11)を、300rpmに設定した軽い回転軌道振とう下で、室温(RT)において60分間150μl/ウエルのブロッキングバッファー(1xPBS-5%BSA)でブロッキングした。ウエルは200μl/ウエルの洗浄バッファー(1xPBS-0.1%Tween20)で洗浄し、次いで軽い振とう下で室温において60分間、アッセイバッファー(1xPBS-1%BSA)に希釈した0.2μg/mlのビオチン化TNF(PeproTech、製造者の説明書に従いANP Technologiesからのビオチン標識キットを使用してビオチン化)を含有する100μl/ウエル溶液とインキュベートした。200μl/ウエルの洗浄バッファーで3回洗浄した後、アッセイバッファーに1:4希釈したサンプルをウエルに分配し(100μl/ウエル)、軽い振とう下で1時間インキュベートした。アッセイバッファーに希釈した64ng/mlのジゴキシゲニル化IL-17A(PeproTech、供給者の勧めるプロトコールに従いSollunckから購入したジゴキシゲニン標識キットを使用してジゴキシゲニンで標識)を含有する100μl/ウエルの溶液を加える前に、プレートは洗浄バッファーで3

40

50

回洗浄した(200 µl / ウエル)。軽い振とう下において、室温で1時間のさらなるインキュベーションを次いで実施した。洗浄バッファーでの3回の洗浄後(200 µl / ウエル)、アッセイバッファーに1:10000希釈した100 µl / ウエルの抗ジゴキシゲニンHRPコンジュゲート抗体(Roche)とプレートをインキュベートした。300 rpmで60分間室温においてインキュベーションを実施した。プレートは洗浄バッファーで3回洗浄し(200 µl / ウエル)、100 µl / ウエルのTMB(Sigma)をすぐに加え、暗所内で室温において5~10分間インキュベートした。停止溶液のアリコート(100 µl / ウエル)をそれぞれのウエルに最後に加え、酵素反応を停止させた。Victor<sup>2</sup>V(Wallac Perkin Elmer)マイクロタイタープレートリーダーを使用し、450 nmで光学濃度を測定した。

10

## 【0171】

「直接ELISA」。ニュートラビジンコーティング96ウエル(Biomat MCP44-11)を、300 rpmに設定した軽い回転軌道振とう下で、室温において60分間150 µl / ウエルのブロッキングバッファー(1xPBS-5%BSA)でブロッキングした。ウエルは200 µl / ウエルの洗浄バッファー(1xPBS-0.1%Tween20)で洗浄し、次いで軽い振とう下で室温において60分間、アッセイバッファー(1xPBS-1%BSA)に希釈した0.2 µg / mlのビオチン化TNFを含有する100 µl / ウエル溶液とインキュベートした。200 µl / ウエルの洗浄バッファーで3回洗浄した後、アッセイバッファーに1:4希釈したサンプルをウエルに分配し(100 µl / ウエル)、軽い振とう下で1時間インキュベートした。アッセイバッファーに希釈した44 ng / mlのHRPコンジュゲート抗ヒトIgGサル吸着抗体(ABCam)を含有する100 µl / ウエルの溶液を加える前に、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄した(200 µl / ウエル)。軽い振とう下において、室温で1時間のさらなるインキュベーションを次いで実施した。プレートは洗浄バッファーで3回洗浄し(200 µl / ウエル)、100 µl / ウエルのTMB(Sigma)をすぐに加え、暗所内で室温において5~10分間インキュベートした。停止溶液のアリコート(100 µl / ウエル)をそれぞれのウエルに最後に加え、酵素反応を停止させた。Victor<sup>2</sup>V(Wallac Perkin Elmer)マイクロタイタープレートリーダーを使用し、450 nmで光学濃度を測定した。

20

## 【0172】

LC11L5-B06およびLC11L9-C09に関する薬物動態分析は、Watsonパッケージ(v.7.4、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)を使用しELISA法により測定した血漿中濃度で実施した。

30

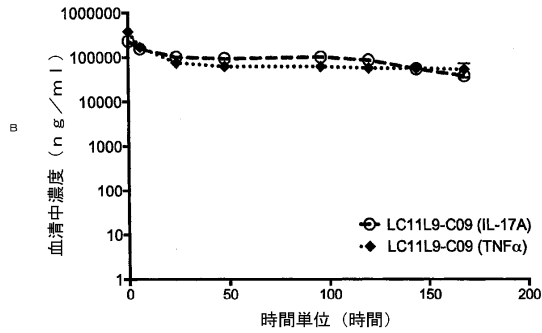
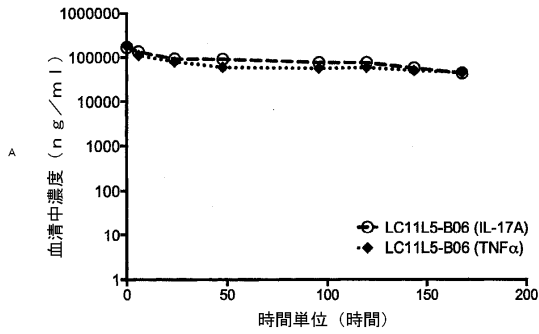
## 【0173】

## 結果

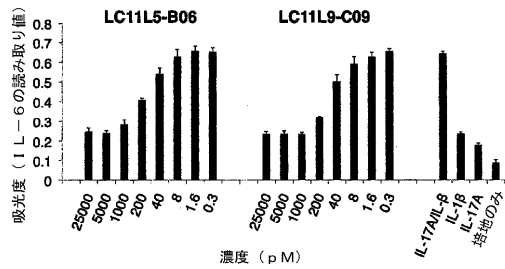
LC11L5-B06およびLC11L9-C09の血漿中濃度は図12中に示す。両化合物は、標準モノクローナル抗体治療剤に関して典型的に報告された、血液からの低いクリアランスおよび数日間の消失半減期をカニクイザルにおいて示した。重要なことに、2つの異なるELISA法を使用して得た血漿中濃度は非常に類似しており、LC11L5-B06およびLC11L9-C09がin vivoでは少なくとも220時間安定状態であること、およびFynSH3由来ポリペプチドがカニクイザルでは抗体から切断されないことが証明される(図13)。

40

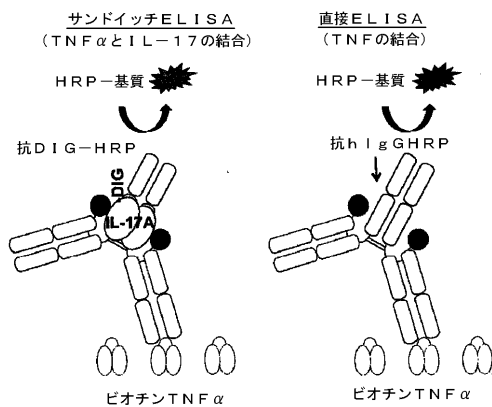
【 図 7 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 8 】

Figure 8

```

FynSH3wt (SEQ ID NO: 20)  GVTLPVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFOILNSSE-GDWWE
1L3-B9 (SEQ ID NO: 3)    GVTLPVALYDYANHGNDLSPHKGEKFOILSTHEYEDWWE
11L0-C6 (SEQ ID NO: 4)   GVTLPVALYDYKQKGLDLSFHKGEKFOILSTHEYEDWWE
11L5-B06 (SEQ ID NO: 5)  GVTLPVALYDYSARGOLDLSFHKGEKFOILSTHEYEDWWE
11L6-F03 (SEQ ID NO: 6) GVTLPVALYDYKLSALDLSFHKGEKFOILSTHEYEDWWE
11L9-C09 (SEQ ID NO: 7) GVTLPVALYDYESVGSWDLSPHKGEKFOILSTHEYEDWWE
11L10-A05 (SEQ ID NO: 8) GVTLPVALYDYSRQVLDLSFHKGEKFOILSTHEYEDWWE
11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) GVTLPVALYDYSRKNLSDLSFHKGEKFOILSTHEYEDWWE
*****

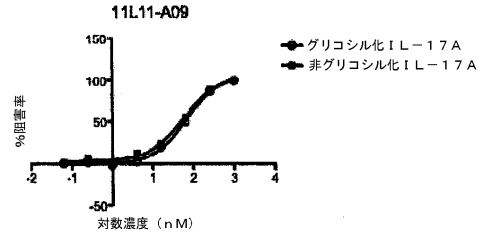
```

```

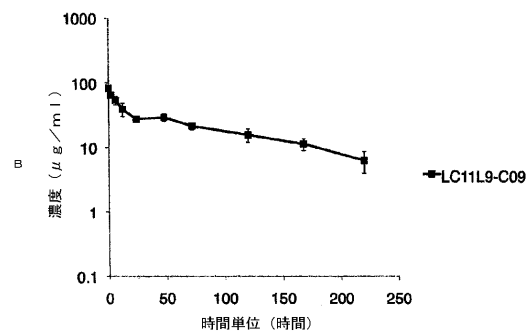
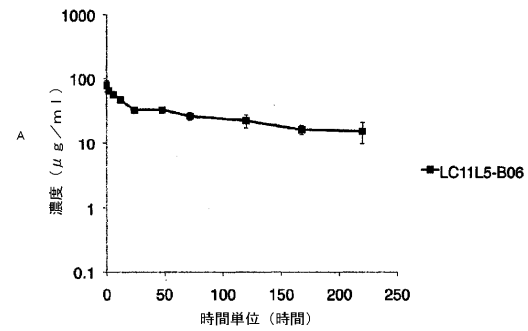
FynSH3wt (SEQ ID NO: 20)  ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
1L3-B9 (SEQ ID NO: 3)    ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
11L0-C6 (SEQ ID NO: 4)   ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
11L5-B06 (SEQ ID NO: 5)  ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
11L6-F03 (SEQ ID NO: 6) ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
11L9-C09 (SEQ ID NO: 7) ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
11L10-A05 (SEQ ID NO: 8) ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) ARSLTTGETG YIPSNVAVPVDISIQ
*****

```

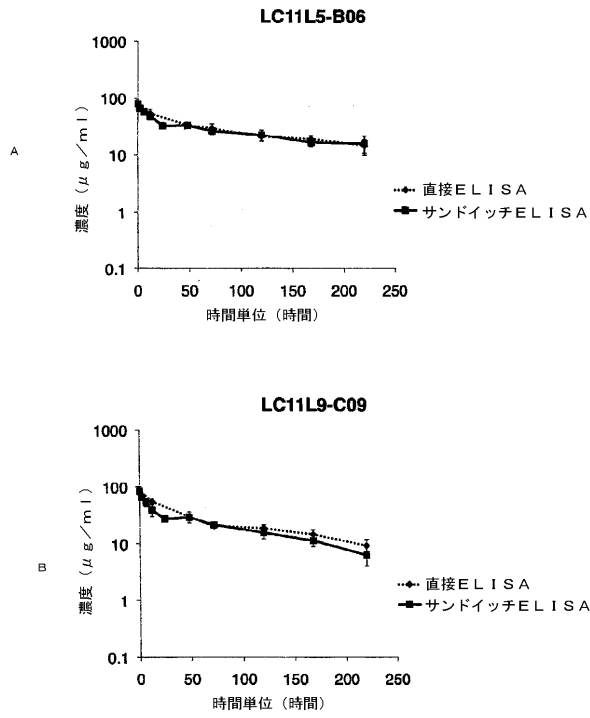
【 図 9 】



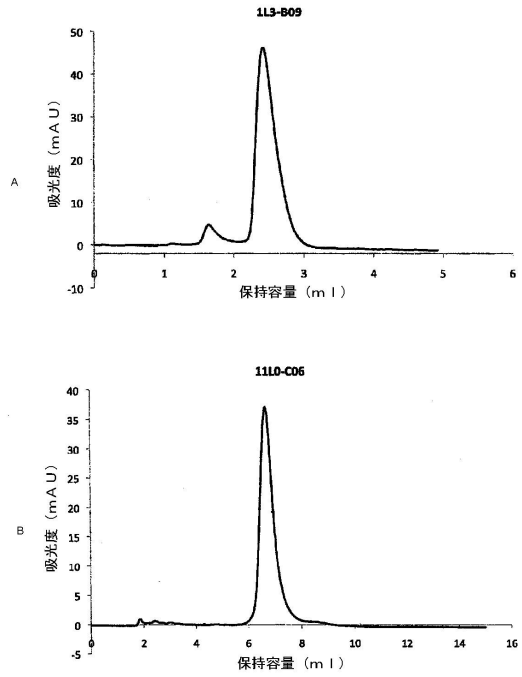
【 図 12 】



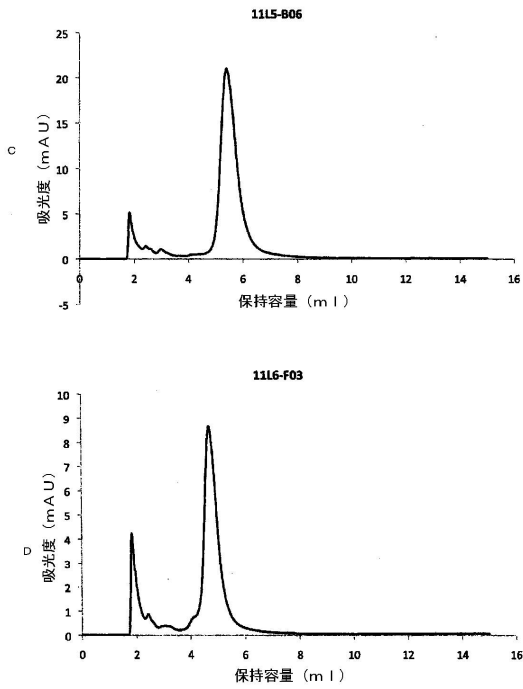
【 図 1 3 】



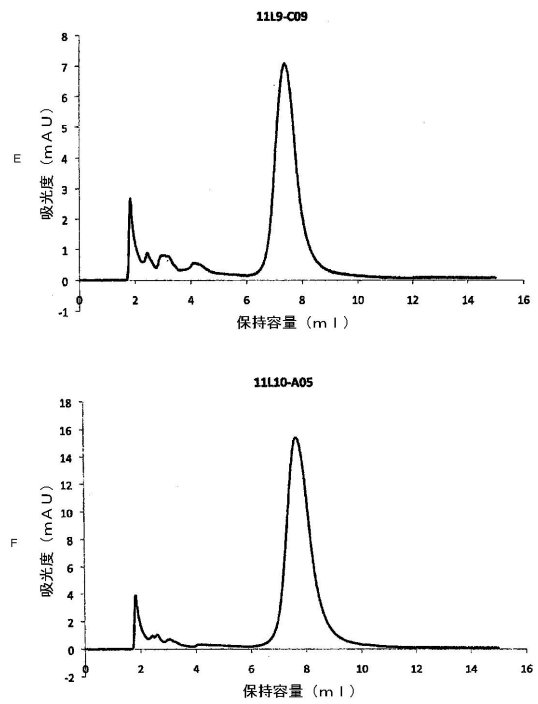
【 図 1 - 1 】



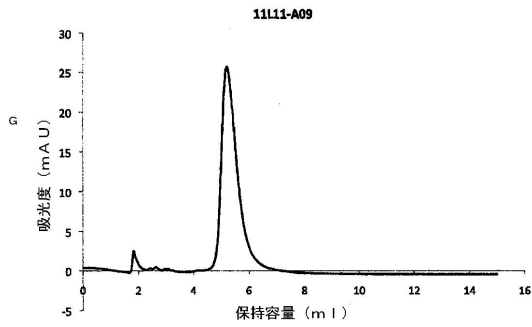
【 図 1 - 2 】



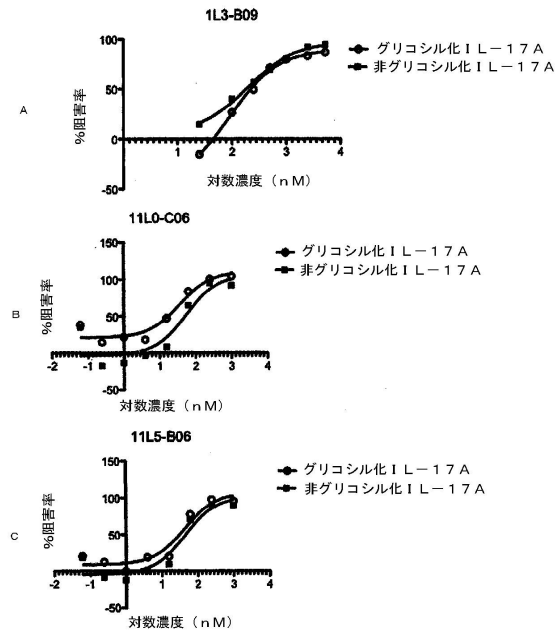
【 図 1 - 3 】



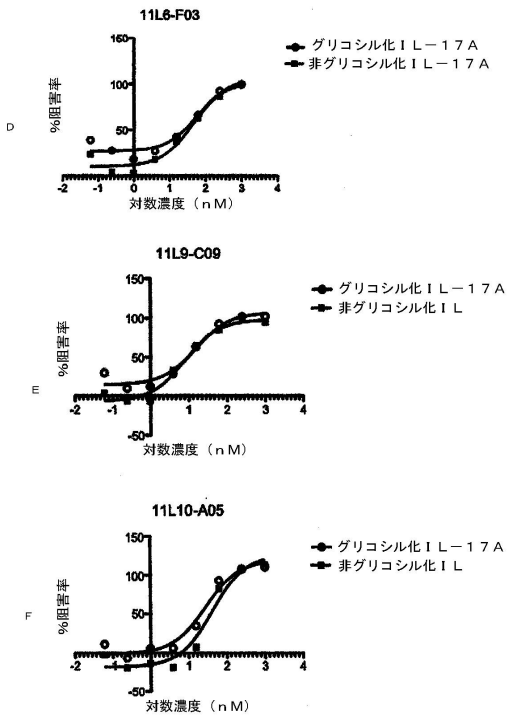
【 図 1 - 4 】



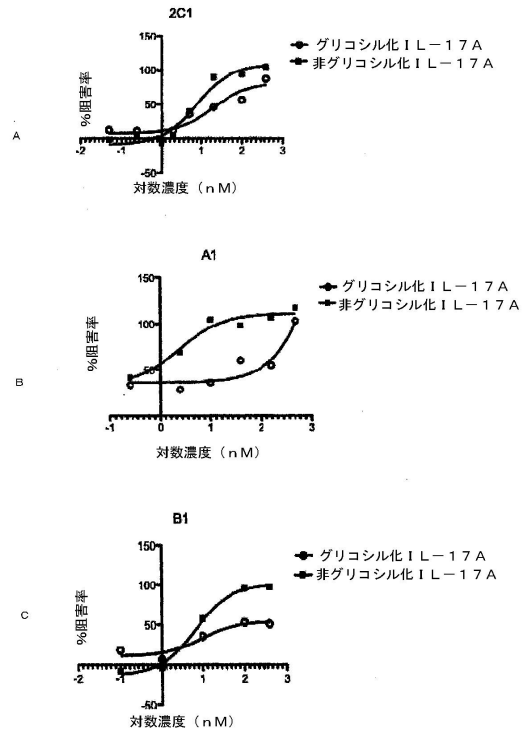
【 図 2 - 1 】



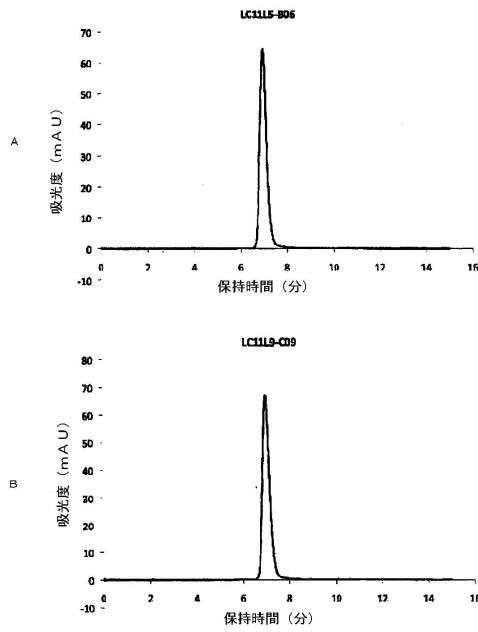
【 図 2 - 2 】



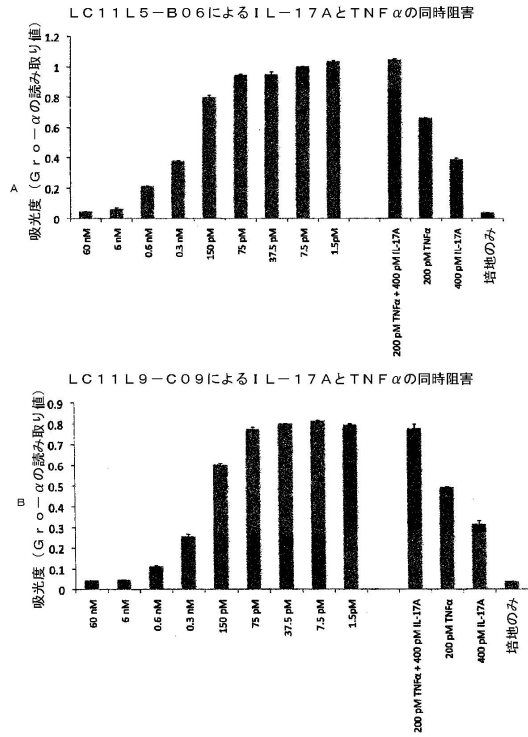
【 図 3 】



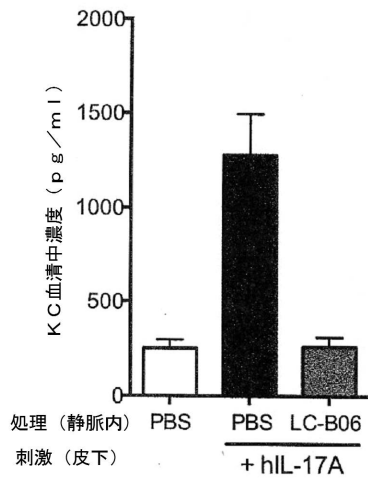
【 図 4 】



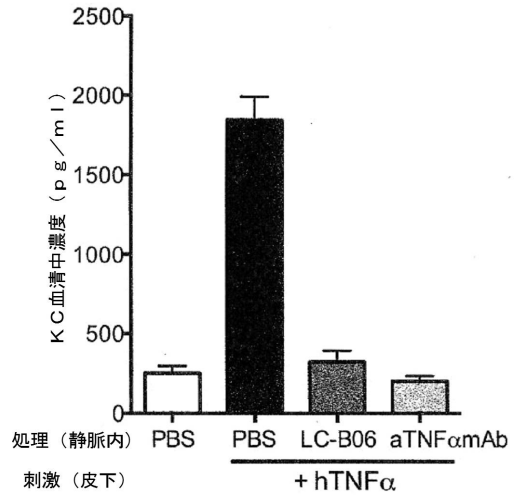
【 図 5 】



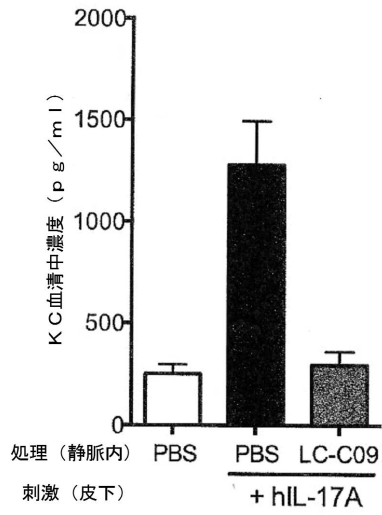
【 図 6 A 】



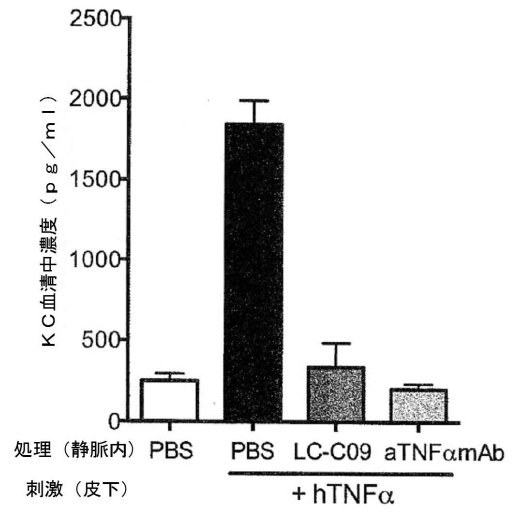
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



【 配列表 】

0006009678000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/02	A
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	A
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
C 1 2 Q	1/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/00	Z
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	

- (72)発明者 ナージャ ベンツィガー  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 リチャード ウッズ  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 ウエンジュエン ジャア  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 イザベラ アッティンガー  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 ロジャー サンタマリア  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 ヴィブケ レムケ  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 サラ バイティ  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 ウルリケ フォン デア ベイ  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 2 5 コバジェン アーゲー内

- (72)発明者 ジュリアン ベルトシグー  
スイス国 8952 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 25 コバジェン アーゲー内
- (72)発明者 ドラガン グラウブロウスキ  
スイス国 8952 シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 25 コバジェン アーゲー内

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 国際公開第2011/023685 (WO, A1)  
J. Immunol. , 2002年 7月 1日, Vol.169, No.1, p.443-453  
mAbs , 2012年 1月, Vol.4, Issue 1, p14-16

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- |                 |       |
|-----------------|-------|
| C12N            | 15/09 |
| C07K            | 14/00 |
| C07K            | 19/00 |
| C12Q            | 1/00  |
| C12Q            | 1/02  |
| PubMed          |       |
| CAPLUS (STN)    |       |
| REGISTRY (STN)  |       |
| UniProt/GeneSeq |       |

专利名称(译)	新型IL-17A结合分子及其医学用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP6009678B2</a>	公开(公告)日	2016-10-19
申请号	JP2015532409	申请日	2013-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	科巴仁AG 科瓦根股份公司		
申请(专利权)人(译)	Kobajen AG		
当前申请(专利权)人(译)	Kobajen AG		
[标]发明人	ミシェラシラーチメルッコ ナージャベンツイガー リチャードウッズ ウエンジュエンジャア イザベラアッティンガー ロジャーサンタマリア ヴィプケレムケ サラベイティ ウルリケフォンデアベイ ジュリアンベルトシンガー ドラングラウブロウスキ		
发明人	ミシェラ シラーチ メルッコ ナージャ ベンツイガー リチャード ウッズ ウエンジュエン ジャア イザベラ アッティンガー ロジャー サンタマリア ヴィプケ レムケ サラ ベイティ ウルリケ フォン デア ベイ ジュリアン ベルトシンガー ドラガン グラウブロウスキ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/00 C07K19/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K39/395 A61K51/00 A61K49/00 A61P19/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P19/00 A61P37/02 A61P21/00 A61P17/00 A61P1/16 A61P17/06 A61P1/04 A61P27/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P7/06 A61P13/12 A61P35/00 A61P9/10 A61P3/06 A61P19/10 A61P1/02 A61P11/00 A61P11/06 A61P31/00 A61P31/04 G01N33/531 C12Q1/00 C12Q1/02		
CPC分类号	A61K38/16 A61K38/1709 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/4703 C07K2319/30 C07K16/241 C07K16/244 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K2318/20 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/00.ZNA C07K19/00 A61K37/02 A61K48/00 A61K39/395.Y A61K49/02.A A61K49/00.A A61P19/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P19/00 A61P37/02 A61P21/00 A61P17/00 A61P1/16 A61P17/06 A61P1/04 A61P27/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P7/06 A61P13/12 A61P35/00 A61P9/10 A61P3/06 A61P19/10 A61P1/02 A61P11/00 A61P11/06 A61P31/00 A61P31/04 G01N33/531.A C12Q1/00.Z C12Q1/02		
代理人(译)	杉村健二 井上 高雄		

優先権 2012185425 2012-09-21 EP

其他公开文献 JP2015531604A

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及抑制糖基化IL-17A活性的多肽，其中(a)氨基酸位置(X1)至(X6)是任意的(X3)(X4)(X2)其中GVTLFVALYDY(X1)(X6)

DLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1)和(b)除了SEQ ID NO: 1中氨基酸位置31至36的氨基酸序列STHEYE (SEQ ID NO: 2)是保守的，(a)其中所述多肽包含选自氨基酸序列的氨基酸序列或由其组成，所述氨基酸序列与SEQ ID NO: 1的氨基酸序列至少85%相同。本发明还涉及包含所述多肽的融合构建体，组合物和医学用途。

大腸菌で生成したFynSH3由来IL-17A結合ポリペプチドの発現収量

フィナー	配列番号	収量(mg/l)
1L3-B09	3	57
1L0-C06	4	43
1L5-B06	5	36
1L6-F03	6	14
1L9-C09	7	14
1L10-A05	8	32
1L11-A09	9	35