

(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2014-522868

(P2014-522868A)

(43) 公表日 平成26年9月8日 (2014. 9. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 2 4
A61K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 3
A61P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 B O 6 4
A61P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C O 7 6
A61P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 133 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-523080 (P2014-523080)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月27日 (2012. 7. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年3月26日 (2014. 3. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/048631
 (87) 国際公開番号 W02013/019652
 (87) 国際公開日 平成25年2月7日 (2013. 2. 7)
 (31) 優先権主張番号 61/513, 453
 (32) 優先日 平成23年7月29日 (2011. 7. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/591, 727
 (32) 優先日 平成24年1月27日 (2012. 1. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513020179
 イレブン・バイオセラピューテイクス・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400
 (74) 代理人 100146318
 弁理士 岩瀬 吉和
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精製タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、細胞培養物、精製方法および精製された組成物を包含する、キメラサイトカインタンパク質の調製と送達のための方法と組成物を提供する。

【選択図】 図 1



FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 21 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むキメラサイトカインタンパク質調製物の精製方法であって、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラム、またはハイドロキシアパタイトカラムのうちの少なくとも 2 つを使用してタンパク質調製物を精製することを含む方法。

【請求項 2】

陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラム、およびハイドロキシアパタイトカラムの 3 つ全てを使用してタンパク質調製物を精製することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

キメラサイトカインタンパク質調製物が、少なくとも 1 リットルの培地中で培養された大腸菌細胞 (E. coli) から回収され、ここで、大腸菌細胞は、誘導性プロモーター下でキメラサイトカインタンパク質を発現する核酸配列を含むプラスミドを含有する、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞が 0.05 mM ~ 0.8 mM の EDTA の存在下で培養される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

細胞が少なくとも 2.5 mM の EDTA の存在下で溶解される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

(a) キメラサイトカインタンパク質調製物を陽イオン交換カラム (CEX) に供し、
(b) 陽イオン交換カラムを、キメラサイトカインタンパク質を溶出しない洗浄緩衝液で洗浄し、そして、キメラサイトカインタンパク質を含有する CEX 溶出液を供給するために溶出緩衝液を使用して結合タンパク質を陽イオン交換カラムから溶出し、
(c) CEX 溶出液を陰イオン交換表面に供し、
(d) 陰イオン交換カラムからの通過画分 (AEX 通過画分) を収集し、そして、セラミックハイドロキシアパタイトカラム (CHA) に負荷し、
(f) 結合タンパク質を CHA カラムから溶出し、
それにより、キメラサイトカインタンパク質調製物を精製する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

脱アラニンタンパク質アイソフォーム、メチオニル化タンパク質アイソフォームおよびアセチル化タンパク質アイソフォームに対する未変化のタンパク質の比率が精製後に上昇する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

精製調製物が、タンパク質の脱アラニン型を 10 % 未満、タンパク質のアセチル化型を 10 % 未満、およびタンパク質のメチオニル化型を 10 % 未満含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

精製調製物が 50 百万分率未満の宿主細胞タンパク質を含有する、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

精製タンパク質調製物が

未変化のタンパク質を 70 % ~ 100 %、

脱アラニンタンパク質アイソフォームを 0 % ~ 15 %、

メチオニル化タンパク質アイソフォームを 0 % ~ 10 %、および

アセチル化タンパク質アイソフォームを 0 % ~ 15 %、

含む、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

精製タンパク質調製物が

未変化のタンパク質を80%～99%、

脱アラニンタンパク質アイソフォームを2%～7%、

メチオニル化タンパク質アイソフォームを0.1%～4%、および

アセチル化タンパク質アイソフォームを0%～5%、

含む、請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

配列番号21の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むキメラサイトカインタンパク質の精製方法であって、

(a) 未変化型および場合により脱アラニン型のキメラサイトカインタンパク質を含有する負荷調製物を陽イオン交換表面に供し、

(b) 陽イオン交換表面を、キメラサイトカインタンパク質を溶出しない洗浄緩衝液で洗浄し、そして、未変化型のキメラサイトカインタンパク質を含有するCEX溶出液を供給するために溶出緩衝液で陽イオン交換表面を溶出処理し、

(c) CEX溶出液を陰イオン交換表面に供し、

(d) 陰イオン交換表面からの通過画分(AEX通過画分)を収集し、

(e) AEX通過画分をセラミックハイドロキシアパタイトカラム(CHA)に負荷し、

(f) CHAカラムを溶出処理し、

(g) 精製キメラサイトカインタンパク質を含有する溶出液を収集し、

(h) 場合により溶出液を限外濾過ステップおよび／または透析濾過ステップに供し、そして、精製キメラサイトカインタンパク質を含有する残余分を収集する、ことを含む方法。

【請求項13】

請求項9に記載の方法を用いて作製される、配列番号21の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むキメラサイトカインタンパク質の精製調製物。

【請求項14】

タンパク質の純度が90%よりも高く、調製物が10%未満の脱アラニン型、10%未満のアセチル化型、および10%未満のメチオニル化型を含む、請求項13に記載の精製調製物。

【請求項15】

調製物が50百万分率未満の宿主細胞タンパク質を含有する、請求項13または請求項14に記載の精製調製物。

【請求項16】

配列番号21の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む未変化型のおよび場合により脱アラニン型、アセチル化型またはメチオニル化型のキメラサイトカインタンパク質を含有する負荷調製物を陽イオン交換表面に供し、

キメラサイトカインタンパク質を溶出しない洗浄緩衝液で陽イオン交換表面を洗浄し、および、未変化型のキメラサイトカインタンパク質を含有するCEX溶出液を供給するために溶出緩衝液で陽イオン交換表面を溶出処理する、ことを含む方法。

【請求項17】

負荷調製物が5、4、3.5、3.3mS/cm未満の電気伝導度を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

負荷調製物が界面活性剤を含まない、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

負荷調製物が、以前にクロマトグラフィー処理をされていない溶菌液から調製される、請求項16～18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】

負荷調製物が遠心分離および／または濾過により清澄化される、請求項16に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 2 1】

負荷調製物が 6. 0、5. 8、5. 6、または 5. 4、または 5. 3 未満の pH を有する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 2】

負荷調製物が 3 0 %、2 5 % または 2 0 % 未満の脱アラニン型のキメラサイトカインタンパク質を含有する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 3】

負荷調製物が 3 0 %、2 5 % または 2 0 % 未満のアセチル化型のキメラサイトカインタンパク質を含有する、請求項 1 6 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

負荷調製物が 3 0 %、2 5 % または 2 0 % 未満のメチオニル化型のキメラサイトカインタンパク質を含有する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 5】

溶菌液を 6. 0 未満の pH に調節して負荷調製物を調製することをさらに含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 6】

陽イオン交換表面が強陽イオン交換 (C E X) 表面である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 7】

表面がカラムに充填することができる C E X マトリックスを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

C E X マトリックスが架橋ポリ (スチレン - ジビニルベンゼン) ビーズを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

表面がスルホプロピル官能基を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

C E X マトリックスが P o r o s (登録商標) X S、C M C - セルローズ、S P - S e p h a d e x (登録商標) および S P - S e p h a r o s e (登録商標) F F である、請求項 2 7 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

C E X マトリックスが 2 0 m l より大きい体積のカラム中に存在する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

カラムを 1、5 または 1 0 カラム体積よりも多い量で洗浄する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 3】

カラムを 5、4、3. 5 または 3. 3 m S / c m 未満の電気伝導度を有する緩衝液で洗浄する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 4】

洗浄緩衝液が 4 0、3 0 または 2 5 m M 未満の N a C l を有し、洗浄緩衝液が少なくとも 5、1 0 または 1 5 m M の N a C l を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

陽イオン交換表面を 2 つの異なる緩衝液で洗浄する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 6】

1 つの洗浄緩衝液が pH 5. 3 を有し、他方の洗浄緩衝液が pH 6. 2 を有する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

溶出が段階的溶出を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 8】

50

段階的溶出がより高い pH を有する溶出緩衝液を適用することを含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

段階的溶出が 5.5 未満の pH から 5.9 より高い pH のものである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

段階的溶出が、塩濃度を増加させた、および／または電気伝導度を増加させた溶出緩衝液を適用することを含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

塩濃度を 30 mM の NaCl よりも低い濃度から 40 mM の NaCl よりも高い濃度上昇させる、請求項 37 に記載の方法。 10

【請求項 42】

溶出緩衝液中の主要な塩が NaCl である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 43】

溶出緩衝液が 4 より高い電気伝導度を有する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 44】

溶出緩衝液が少なくとも pH 5.9 ～ 6.1 の範囲で緩衝能を有する緩衝液を含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 45】

未変化型のキメラサイトカインタンパク質および脱アラニン型が異なるキネティクスで溶出する、請求項 27 に記載の方法。 20

【請求項 46】

脱アラニン型が未変化型の後に溶出する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 47】

前記の方法が、負荷調製物に比べて CEX 溶出液中の脱アラニン型のパーセンテージを少なくとも 1、3、5、7 または 8 % 減少させることにより、脱アラニン型に対して未変化型を濃縮する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 48】

CEX 溶出液中の脱アラニン型が、総キメラサイトカインタンパク質の 20、15、12 または 10 % 未満である、請求項 27 に記載の方法。 30

【請求項 49】

アセチル化型およびメチオニル化型が未変化型の前に溶出する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 50】

前記の方法が、負荷調製物に比べて CEX 溶出液中の前記のアセチル化型およびメチオニル化型のパーセンテージを少なくとも 1、3、5、7 または 8 % 減少させることにより、アセチル化型およびメチオニル化型に対して未変化型を濃縮する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 51】

CEX 溶出液中のアセチル化型およびメチオニル化型が、それぞれ総キメラサイトカインタンパク質の 20、15、12 または 10 % 未満である、請求項 27 に記載の方法。 40

【請求項 52】

キメラサイトカインタンパク質の純度が、CEX 溶出液中で少なくとも 50、60、70、80、85、90 または 95 % である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 53】

CEX 溶出液が負荷調製物よりも低い HCP レベルを有する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 54】

CEX 溶出液を、キメラサイトカインタンパク質が陰イオン交換表面に実質的に結合しない条件下で陰イオン交換表面に供する、請求項 27 に記載の方法。 50

【請求項 55】

配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むキメラサイトカインタンパク質の調製物であって、請求項 16 に記載の方法により得られた C E X 溶出液を含む調製物。

【請求項 56】

配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むキメラサイトカインタンパク質を含有する調製物を陰イオン交換 (A E X) 表面に供し、そして、
陰イオン交換表面からの A E X 通過画分を収集する、
ことを含む方法。

10

【請求項 57】

A E X 通過画分が、陰イオン交換表面に供される調製物よりも少ない宿主細胞タンパク質を含有する、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

陰イオン交換表面が 100 ~ 300 マイクロモル C l - / m l のイオン容量を有する、請求項 56 または 57 に記載の方法。

【請求項 59】

陰イオン交換表面が第四級アンモニウム型強陰イオン交換体である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

陰イオン交換表面が P o r o s (登録商標) H Q または C a p t o (商標) Q 陰イオン交換樹脂を含む、請求項 56 に記載の方法。

20

【請求項 61】

陰イオン交換表面が膜を含む、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 62】

A E X 通過画分中のエンドトキシンが、陰イオン交換表面に供された調製物に比べて減少する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 63】

配列番号 21 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質のバッチ調製物の作製方法であって、

30

ハイドロキシアパタイトカラムから精製されたタンパク質のバッチ調製物に由来する画分を供給するステップ、

脱アラニン型、アセチル化型、およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上の存在を決定するために w C E X クロマトグラフィーにより画分を評価するステップ、および

前記の決定に基づき、バッチの分類、選択、受領、廃棄、公開、保留、医薬製品への処理、出荷、異なる場所への輸送、製剤、ラベル付け、包装、商品公開、販売および売り出しからなる群より選択される 1 つ以上のステップを含む方法により前記バッチタンパク質調製物をさらに処理するステップ、
を含む方法。

40

【請求項 64】

脱アラニン型、アセチル化型、およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上が 10 % 未満のレベルでバッチに存在すると判断される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

さらに処理するステップが、タンパク質調製物の作製のためバッチを受領することを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 66】

評価が、バッチが脱アラニン型、アセチル化型、およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上のレベルに基づき、所定の基準値に合致するかを決定することを含む、請求項 63 に記載の方法。

50

【請求項 67】

評価が、前記の決定を記憶することをさらに含む、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

記憶が、コンピュータ読み取り可能記録での記憶を含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

基準値が市販のタンパク質試料からまたは以前のバッチから決定された値である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 70】

基準値が規制当局により課された製造基準であるまたはその製造基準を含む、請求項 66 に記載の方法。

10

【請求項 71】

基準値が公開基準であるまたは公開基準を含む、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 72】

前記の決定に基づき、タンパク質調製物の作製におけるステップを変更することをさらに含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 73】

決定のステップが、タンパク質調製物の所望の特性と関連している存在または量を決定することを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 74】

特性がタンパク質製品の添付文書に記載される、請求項 73 に記載の方法。

20

【請求項 75】

特性がタンパク質についての米国薬局方に出ている、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 76】

キメラサイトカインタンパク質を供給する方法であって、
配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列を含有する大腸菌細胞を培養してキメラサイトカインタンパク質を提供することを含む方法。

【請求項 77】

前記核酸配列がプラスミドに含まれる、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記核酸配列が誘導性プロモーターシステムの制御下にある、請求項 76 に記載の方法。

30

【請求項 79】

前記細胞を少なくとも 1 リットル、10 L、100 L、1000 L または 5000 L の培地中で培養する、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 80】

核酸配列が配列番号 29 のヌクレオチド配列を含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 81】

細胞を、LB 培地よりも富んだ栄養素量を有する培地で培養する、請求項 76 に記載の方法。

40

【請求項 82】

細胞を、少なくとも 0.5 % もしくは 1 % もしくは 1.2 % のトリプトン、少なくとも 1 %、2 %、2.2 % もしくは 2.4 % の酵母エキス、および／または少なくとも 0.1 %、0.2 %、もしくは 0.4 % のグリセロールを含有する培地で培養する、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 83】

核酸配列の転写が IPTG によって誘導可能である請求項 76 に記載の方法。

【請求項 84】

細胞が 5、10、20、30、35、または 40 よりも高い OD のときに誘導される、請求項 76 に記載の方法。

50

【請求項 85】

タンパク質を含有する調製物を供給するために金属キレート剤の存在下で大腸菌細胞を溶解することをさらに含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 86】

金属キレート剤が EDTA であり、2.5 mM より高い濃度で存在する、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

溶菌緩衝液の pH が 7.5 未満である、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 88】

溶菌緩衝液が界面活性剤を含まない、請求項 85 に記載の方法。

10

【請求項 89】

溶菌緩衝液が 200 mM 未満の NaCl を有する、またはそのような濃度の NaCl を有する塩溶液よりも低い電気伝導度を有する、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 90】

3 つまたは 2 つを超えないカラムクロマトグラフィーステップにより溶菌液からタンパク質を精製することをさらに含む、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 91】

キメラサイトカインタンパク質の純度が最初のカラムクロマトグラフィーステップの後で少なくとも 50、60、70、80、90 または 95 % である、請求項 90 に記載の方法。

20

【請求項 92】

キメラサイトカインタンパク質を含む組成物であって、該組成物は、請求項 85 に記載の溶菌方法により得られ、ここで、該タンパク質は、配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項 93】

配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むキメラサイトカインタンパク質精製調製物であって、キメラサイトカインタンパク質は、純度が 90 % よりも高く、ここで、該調製物は、脱アラニン型を 10 % 未満、アセチル化型を 10 % 未満およびメチオニル化型を 10 % 未満含む、調製物。

【請求項 94】

HCP レベルが 1000 ppm 未満である、請求項 93 に記載の調製物。

30

【請求項 95】

核酸およびエンドトキシンが実質的に含まれない、請求項 93 に記載の調製物。

【請求項 96】

凍結乾燥されている請求項 93 に記載の調製物。

【請求項 97】

水性である請求項 93 に記載の調製物。

【請求項 98】

タンパク質が 1 ~ 100 mg/ml である、請求項 93 に記載の調製物。

【請求項 99】

配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質を含む調製物の評価方法であって、

40

(a) 前記タンパク質の脱アラニン型のレベル、

(b) 前記タンパク質のアセチル化型のレベル、または

(c) 前記タンパク質のメチオニル化型のレベル、

のうちの 1 つ以上または全ての決定値を得て、

それにより調製物を評価する、

ことを含む方法。

【請求項 100】

前記の方法が、(a)、(b) および (c) のうちの 1 つ以上または全ての決定された

50

レベルを基準値と比較することをさらに含み、ここで、それぞれがそれ自体の基準値を有することができる、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

基準値が、前記タンパク質の市販の試料、前記タンパク質の別のバッチ、規制当局により推奨されている、公表されている、または要求されている値のセット、公開仕様または公開基準、薬局方機関により推奨されている、公表されている、または要求されている値のセットから決定する、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記の決定がクロマトグラフィーによる分析を含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 103】

前記の調製物が基準値に対して事前に選択した関係を有するかを決定することをさらに含む、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記の決定に応答して、調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装、または販売のうちの 1 つ以上を含むプロセスを調製物に行う、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記の決定に応答して、タンパク質を作製するためのプロセスのパラメータを変更する、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 106】

(a)、(b) または (c) の型のうちの 1 つ以上のレベルが 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 または 20 % (重量/重量) 未満である場合、調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装、または販売のうちの 1 つ以上を含むプロセスを調製物に行う、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 107】

前記調製物が、前駆調製物を精製ステップに供することにより作製された、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 108】

前記調製物が、クロマトグラフィー基材のうちの 1 つ以上または全てに前駆調製物を接触させて作製された、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 109】

前記調製物が、陽イオン交換基材、陰イオン交換基材、およびハイドロキシアパタイト基材の順序でこれらと前駆調製物を接触させて作製された、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 110】

前記調製物が精製工程における中間産物である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 111】

前記調製物が精製工程からの溶出液を含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 112】

前記調製物が陽イオン交換カラムからの溶出液を含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 113】

前記調製物が陰イオン交換カラムからの溶出液を含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 114】

前駆調製物を精製ステップに供することをさらに含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 115】

前駆調製物をクロマトグラフィー基材に接触させることをさらに含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 116】

前駆調製物をクロマトグラフィー基材のうちの 1 つ以上または全てと接触させることをさらに含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 117】

10

20

30

40

50

前駆調製物を、陽イオン交換基材、陰イオン交換基材、およびハイドロキシアパタイト基材の順序で接触させることをさらに含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 118】

プロセスが、眼への投与のための調製物を製剤化することを含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 119】

評価を記憶することをさらに含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 120】

記憶がコンピュータ読み取り可能記録での記憶を含む、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

タンパク質調製物の評価方法であって、

ハイドロキシアパタイトカラムから精製された、配列番号 21 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質の調製物から単離画分を供給し、

脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上のレベルを決定するために、弱陽イオン交換 (WC EX) クロマトグラフィーを用いて画分を分析する、ことを含む、

ここで、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上が 10 % 未満のレベルで存在する場合、調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装、または販売のうちの 1 つ以上を含むプロセスを調製物に行い、

それにより、タンパク質調製物を分析する、ことを含む方法。

【請求項 122】

配列番号 21 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質の調製物を作製するプロセスを分析する方法であって、

タンパク質の調製物の単離画分を供給し、

請求項 97 に記載の方法を用いて画分を分析し、そして

脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上が 10 % 未満のレベルで存在する場合、分析に基づき少なくとも部分的にプロセスを維持する、ことを含む方法。

【請求項 123】

配列番号 21 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質の調製物の処理方法であって、

調製物中の脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上のレベルについての WC EX 決定値を提供し、そして

脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のタンパク質のうちの 1 つ以上が 10 % 未満のレベルで存在する場合、調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装、または販売のうちの 1 つ以上を含むプロセスを調製物に行う、ことを含む方法。

【請求項 124】

プロセスが眼への投与のための調製物の製剤化を含む、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 125】

タンパク質の活性を決定することをさらに含む、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 126】

配列番号 21 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質、塩、等張化剤、および界面活性剤を含む組成物。

【請求項 127】

塩が、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、または塩化ナトリウム、またはトリス酢酸である、請求項 126 に記載の組成物。

【請求項 128】

界面活性剤が、ポロキサマー 188、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、また

10

20

30

40

50

はポリエトキシレートである、請求項 1 2 6 に記載の組成物。

【請求項 1 2 9】

等張化剤が、ソルビトール、マンニトール、ショ糖、トレハロース、またはグリセロールである、請求項 1 2 6 に記載の組成物。

【請求項 1 3 0】

pH 5. 5、pH 5. 6、pH 5. 8、pH 5. 9、pH 6、pH 6. 1、pH 6. 3、pH 6. 5 または pH 6. 6 である請求項 1 2 6 に記載の組成物。

【請求項 1 3 1】

配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む 1 m g / m L ~ 2 0 m g / m L のタンパク質、1 0 m M クエン酸ナトリウム、5 % ソルビトール、0. 1 % ポロキサマー 1 8 8 を含み、pH 6 を有する、請求項 1 2 6 に記載の組成物。 10

【請求項 1 3 2】

眼への投与に適切な請求項 1 2 6 に記載の組成物。

【請求項 1 3 3】

配列番号 2 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質を含む調製物であって、

- (a) 前記タンパク質の脱アラニン型を 0 % と 1 5 % の間
- (b) 前記タンパク質のアセチル化型を 0 % と 1 5 % の間、および
- (c) 前記タンパク質のメチオニル化型を 0 % と 1 5 % の間、

含む調製物。 20

【請求項 1 3 4】

前記調製物中のタンパク質の少なくとも 8 0、9 0、9 5、9 9 % が、前記タンパク質ならびに (a)、(b) および (c) の型である、請求項 1 3 3 に記載の調製物。

【請求項 1 3 5】

少なくとも 6 グラム、6 0 グラム、6 0 0 グラム、6 0 0 0 グラム、1 0 k g、5 0 k g、1 0 0 k g または 1 5 0 k g の前記タンパク質を含む、請求項 1 3 3 に記載の調製物。

【請求項 1 3 6】

ポリペプチドを含む調製物であって、

- ポリペプチドを 7 0 % ~ 1 0 0 %、
- 脱アラニンポリペプチドを 0 % ~ 1 5 %、
- メチオニル化ポリペプチドを 0 % ~ 1 0 %、および
- アセチル化ポリペプチドを 0 % ~ 1 5 % 含み、ここで、ポリペプチドが配列番号 2 1 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、調製物。

30

【請求項 1 3 7】

調製物が、

- ポリペプチドを 8 0 % ~ 9 9 %、
- 脱アラニンポリペプチドを 2 % ~ 7 %、
- メチオニル化ポリペプチドを 0. 1 % ~ 4 %、および
- アセチル化ポリペプチドを 0 % ~ 5 %、

含む、請求項 1 3 6 に記載の調製物。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2 0 1 1 年 7 月 2 9 日に提出された米国特許仮出願番号第 6 1 / 5 1 3, 4 5 3 号、および 2 0 1 2 年 1 月 2 7 日に提出された米国特許仮出願番号第 6 1 / 5 9 1, 7 2 7 号の優先権を主張する。これらの特許仮出願の内容全体が本願における参照によりここに組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

インターロイキン-1 α (IL-1 α) および β (IL-1 β) は免疫調節性サイトカインファミリーの原型メンバーであり、免疫系の調節において大きな役割をいくつか有している。IL-1 α と IL-1 β はインターロイキン-1 受容体 I (IL-1RI) に結合して補助的受容体であるインターロイキン-1 受容体アクセサリタンパク質 (IL-1RAcP) の会合を引き起こす。IL-1 α と IL-1 β によって刺激されたシグナル伝達が、ナイーブ T 細胞の増殖と生存および T_H 17 細胞の発生を含む T 細胞応答を属服することになる。

【発明の概要】

【0003】

とりわけインターロイキン-1 受容体 I (IL-1RI) に対して応答性の細胞シグナル伝達を調節するために、障害を治療するために、および、細胞性受容体を検出したり、細胞性受容体に結合したりするために使用され得る非天然サイトカインドメインならびに他の薬剤が本明細書に取り上げられる。

【0004】

インターロイキン-1 (IL-1) キメラインヒビターの精製調製物およびそのようなタンパク質の精製方法も本明細書に取り上げられる。そのキメラインヒビターは、少なくとも2つの異なるインターロイキンの表面形体、例えば、IL-1RI と相互作用する表面形体を含み得る。その表面形体は、IL-1 β と IL-1Ra、IL-1 α と IL-1RA、または3種のそのようなサイトカインの全てに由来し得る。IL-1 キメラインヒビターの合成は未知の作用を有する生成物関連種を生成し得る。本明細書に取り上げられる発明は、そのような生成物関連種の量が大いに減少したタンパク質調製物の作製方法を提供する。驚くことに、本処理に使用された陽イオンカラムと陰イオンカラムの両方がかなりの量の生成物関連種の除去に有効であった。

【0005】

1つの態様では、本開示は、キメラサイトカインタンパク質の提供方法を特色とする。その方法は、誘導性プロモーターシステムの制御下にキメラサイトカインタンパク質をコードする核酸配列を含むプラスミドを含有する大腸菌 (E. coli) 細胞を、例えば、少なくとも1リットルの培地に培養することを含む。培養体積は、例えば、1L~15, 000L、例えば、5L~10, 000Lであり得る。例えば、培養体積は、2L、10L、90L、100L、400L、500L、800L、1000L、5000L、8000L、10, 000Lまたは12, 000Lよりも多くあり得る。例えば、前記キメラサイトカインタンパク質には、実施例1のアミノ酸配列、例えば、P03、P04、またはP05に対して少なくとも90%、95%、98%、または100%同一であるアミノ酸配列が含まれる。例えば、そのタンパク質はP05である。核酸配列には、実施例1に記載される核酸配列、例えば、P05をコードする配列が含まれ得る。

【0006】

細胞は、LB培地よりも富んだ栄養素量を有する培地で培養され得る。例えば、細胞は、少なくとも0.5%もしくは1%もしくは1.2%のトリプトン、少なくとも1%、2%、2.2%もしくは2.4%の酵母エキス、少なくとも0.5mMのEDTA (例えば、0.05mM~0.8mMのEDTA)、および/または少なくとも0.1%、0.2%、もしくは0.4%のグリセロールを含有する培地で培養される。その培地に微量元素を補充することができる。細胞に、培養中にグルコースを例えば少なくとも3、5、6、7、8、または9g/L/時間の割合で与えることができる。細胞に、例えば、培地のpH、OD、および/または細胞培養条件に従って1つよりも多くの割合、例えば、少なくとも2つの異なる割合で栄養を与えることができる。

【0007】

例えば、細胞に、培養中に例えば5~60%の間、30~60%の間、40~60%の間、または20~40%の間の溶存酸素の割合で酸素を補給することができる。培地はpH6~7.5またはpH6.7~7.2またはpH6.9~7.1で維持され得る。

10

20

30

40

50

【0008】

例えば、細胞は、ODが5、10、20、30、35、または40よりも高い時点で、例えば、IPTGの添加により誘導処理を受ける。例えば、誘導性プロモーターシステムは、T7プロモーターおよび1つ以上のlacオペレーターの制御下にあるT7ポリメラーゼをコードする遺伝子を含む。コード核酸配列は、T7プロモーターに機能するように結合され得る。

【0009】

前記の方法は、キメラサイトカインタンパク質を含有する溶菌液を供給するために、例えば、金属キレート剤の存在下で大腸菌細胞を溶解することをさらに含み得る。その金属キレート剤は、例えばEDTAまたはEGTAであり得る。例えば、金属キレート剤はEDTAであり、2.5mMより高い濃度、例えば、2.6mM、3mM、4mM、5mM、7mMまたは8mMよりも高い濃度、例えば、4～11mMの間の濃度で存在する。細胞は、前記の金属キレート剤を含有する溶菌緩衝液を使用して溶解され得る。

10

【0010】

溶菌緩衝液は8.0未満、7.9未満、7.5未満、7.1未満、7.0未満、6.9未満のpH、例えば、5.0と7.0の間、または5.9と7.5の間、または5.9と7.1の間のpHを有し得る。溶菌緩衝液は0.1%のトリトンX-100よりも低い界面活性剤濃度／ミセル濃度を有し得る。例えば、溶菌緩衝液は界面活性剤を含まない。溶菌緩衝液は、500mM未満、400mM未満、300mM未満、200mM未満、100mM未満、50mM未満、もしくは10mM未満のNaCl、またはそのような濃度のNaClを有する塩溶液よりも低い電気伝導度を有し得る。

20

【0011】

前記の方法は、例えば、3つまたは2つを超えないカラムクロマトグラフィーステップにより溶菌液からキメラサイトカインタンパク質を精製することをさらに含み得る。したがって、本明細書に記載されるとおりに使用するために、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー用に負荷調製物を調製するために溶菌液を使用することができる。

【0012】

いくつかの実施形態では、前記の方法は次のクロマトグラフィーステップ、すなわち、(i)陽イオン交換ステップ、(ii)陰イオン交換ステップ、および(iii)ハイドロキシアパタイトカラムステップのうちの少なくとも1つ、2つ、または3つを含み得る。

30

【0013】

いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質は1つ以下のカラムクロマトグラフィーステップを用いて精製される。例えば、キメラサイトカインタンパク質の純度は最初のカラムクロマトグラフィーステップの後で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または95%である。

【0014】

いくつかの実施形態では、クロマトグラフィークラム用の負荷物調製は、例えば、0.8/0.45μm濾過(Sartorius Sartopore(登録商標)2)、および／または0.45/0.2μm濾過(Sartorius Sartopore(登録商標)2)を使用する1つ以上の濾過ステップを含む。

40

【0015】

1つの態様では、本発明は、陽イオン交換カラム、および陰イオン交換カラム、およびハイドロキシアパタイトカラムを使用してキメラサイトカインタンパク質調製物を精製する方法を特色とする。キメラサイトカインタンパク質調製物を、少なくとも500mL、1リットル、2リットルまたは5リットルまたはそれより多い培地で培養された細菌細胞、例えば、誘導性プロモーター下でキメラサイトカインタンパク質を発現する核酸配列を有するプラスミドを含有する大腸菌細胞、などの細胞から回収することができた。

【0016】

1つの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質調製物を陽イオン交換カラム(C

50

EX) に供し、その陽イオン交換カラムを、キメラサイトカインタンパク質を溶出しない洗浄緩衝液で洗浄し、そして、キメラサイトカインタンパク質を含有するCEX溶出液を供給するために溶出緩衝液を使用して結合タンパク質を前記陽イオン交換カラムから溶出する。そのCEX溶出液を次に、例えば、キメラサイトカインタンパク質が陰イオン交換表面に実質的に結合しない条件下でその陰イオン交換表面に供し、そして、その陰イオン交換カラムからの通過画分(AEX通過画分)を収集し、そして、セラミックハイドロキシアパタイトカラム(CHA)に負荷する。緩衝条件は、キメラサイトカインタンパク質がCHAカラムに結合するような条件である。次に精製タンパク質をそのカラムから溶出する。未変化のタンパク質の混入タンパク質アイソフォーム、例えば脱アラニンタンパク質アイソフォーム、メチオニル化タンパク質アイソフォームおよびアセチル化タンパク質アイソフォームに対する割合が精製後に上昇する。例えば、1つの実施形態では、精製調製物は10%未満の脱アラニン型の前記タンパク質、10%未満のアセチル化型の前記タンパク質、および10%未満のメチオニル化型の前記タンパク質を含む。別の実施形態では、精製調製物が50百万分率未満の宿主細胞タンパク質を含有する。

【0017】

精製タンパク質調製物は、例えば、70%~100%、例えば、80%~99%の未変化のタンパク質、0%~15%、例えば、2%~7%の脱アラニンタンパク質アイソフォーム、0%~10%、例えば、0.1%~4%のメチオニル化タンパク質アイソフォーム、および0%~15%、例えば、0%~5%のアセチル化タンパク質アイソフォームを含有し得る。

【0018】

別の態様では、本開示は、未変化のキメラサイトカインタンパク質および随意で無アラニン型(例えば、脱アラニン型)、メチオニル化型およびアセチル化型のキメラサイトカインタンパク質のうちの1つ以上を含有する負荷調製物を陽イオン交換表面に供すること、キメラサイトカインタンパク質を溶出しない洗浄緩衝液で前記陽イオン交換表面を洗浄すること、および、未変化型のキメラサイトカインタンパク質を含有するCEX溶出液を供給するために前記陽イオン交換表面に溶出緩衝液を流すことを含む方法を特色とする。例えば、未変化型のキメラサイトカインタンパク質には、実施例1のアミノ酸配列、例えば、P03、P04、またはP05に対して少なくとも90%、95%、98%、または100%同一であるアミノ酸配列が含まれる。例えば、そのタンパク質はP05である。核酸配列には、実施例1に記載される核酸配列、例えば、P05をコードする配列が含まれ得る。未変化のタンパク質、例えば、P05タンパク質の脱アラニン型、メチオニル化型およびアセチル化型はタンパク質調製物、例えば、P05タンパク質調製物中の、本発明において取り上げられる精製方法により除去される不純物である。未変化のタンパク質の脱アラニン型は、N末端アラニンがタンパク質分解により除去された未変化型の前記タンパク質であり、未変化のタンパク質のメチオニル化型は、N末端にメチオニンが結合した前記の未変化のタンパク質であり、キメラサイトカインタンパク質のアセチル化型は、アセチル化された未変化のタンパク質、またはアセチル化された未変化のタンパク質のメチオニル化型である。

【0019】

例えば、負荷調製物は5mS/cm未満、4mS/cm未満、3.5mS/cm未満、または3.3mS/cm未満の電気伝導度を有し得る。負荷調製物は界面活性剤を含まなくてもよい。負荷調製物は6.0未満、5.8未満、5.6未満、または5.4未満のpH、例えば、約5.3のpHを有し得る。いくつかの実施形態では、負荷調製物は以前にクロマトグラフィーにかけられていない溶菌液から調製される。前記の方法は、負荷調製物を調製するために、例えば、中程度の酸、例えば酢酸を使用して、例えば、800mM未満、600mM未満、400mM未満、300mM未満、または好ましくは約200mM未満の酢酸の溶液を添加することにより、例えば6.0未満のpHに溶菌液を調節することを含み得る。負荷調製物は、例えば、遠心分離および/または濾過により清澄化され得る。負荷調製物は、5g/L未満、4g/L未満、3g/L未満、または2g/L未満

のタンパク質濃度を有し得る。いくつかの実施形態では、負荷調製物は、総キメラサイトカインタンパク質のパーセンテージとして、30%未満、25%未満または20%未満の脱アラニン型、30%未満、25%未満または20%未満のアセチル化型、および30%未満、25%未満または20%未満のメチオニル化型のキメラサイトカインタンパク質を含有する。いくつかの実施形態では、負荷調製物は、総キメラサイトカインタンパク質のパーセンテージとして、5%~20%または7%~17%の脱アラニン型、1%~10%または2%~7%のメチオニル化型、および5%~20%または8%~15%を含有する。陽イオン交換表面は、例えば強陽イオン交換（CEX）表面であり得る。いくつかの実施形態では、前記表面はスルホプロピル官能基を含む。前記表面は、カラムに充填され得るマトリックス（CEXマトリックス）であり得る。例えば、CEXマトリックスには架橋ポリ（スチレン-ジビニルベンゼン）ビーズが含まれる。例となるCEXマトリックスにはPoros（登録商標）XS、CM-Sephadex、CMC-セルローズ、SP-Sephadex（登録商標）およびSP-Sephadex（登録商標）Fast flowが含まれる。

10

【0020】

キメラサイトカインタンパク質は、例えば、1mlのCEXマトリックス当たり40mg未満の濃度で負荷され得る。例えば、マトリックスは、50~200マイクロモルNa⁺/mlの間、80~140マイクロモルNa⁺/mlの間、または88~120マイクロモルNa⁺/mlの間のイオン容量を有する。

【0021】

いくつかの実施形態では、CEXマトリックスは、0.5~20mlの間のカラム、または10mLと1000Lの間のカラム、例えば、10mL、15mL、20mL、100mL、200mL、500mL、1L、2L、6L、10L、50L、100L、250L、500L、600L、700Lまたは800Lよりも大きいカラムの中に存在する。例えば、カラムは1カラム体積、5カラム体積または10カラム体積よりも大きい体積で洗浄される。カラムは、5mS/cm未満、4mS/cm未満、3.5mS/cm未満、3.3mS/cm未満の電気伝導度を有する緩衝液を使用して洗浄され得る。例えば、洗浄緩衝液は40mM未満、30mM未満、または25mM未満のNaClを有し、および/または洗浄緩衝液は少なくとも5mM、10mM、もしくは15mMのNaClまたは同等の濃度の他の塩を有する。洗浄緩衝液は酢酸を含み得る。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は6.5未満、6.0未満、5.9未満、5.6未満、または5.5未満のpH、例えば、5~5.5のpH、例えば、約5.3のpH、または5~5.5のpH、例えば、約5.9のpHを有する。

20

30

【0022】

いくつかの実施形態では、溶出は濃度勾配を含まない。例えば、溶出は段階的溶出を含む。その段階的溶出は、結合緩衝液とそれぞれ前の段階の溶出緩衝液よりも高いpHを有する溶出緩衝液を供することを含み得る。段階的溶出は、例えば、5.7未満のpHから5.7より高いpHへ、例えば、5.6未満のpHから5.85より高いpHへ、例えば、5.5未満のpHから5.9より高いpHへ、例えば、約5.3のpHから少なくとも6.0のpHへ、または約5.3のpHから少なくとも6.8のpHへの段階的溶出である。段階的溶出は、塩濃度を増加させた、および/または電気伝導度を増加させた溶出緩衝液を供する適用ことを含み得る。例えば、塩濃度は、30mM以下のNaClの濃度から40mM以上のNaClの濃度に、または他の塩の同等の濃度に上昇する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液中の主要な塩はNaClである。

40

【0023】

溶出緩衝液は3.5mS/cm、4mS/cm、5mS/cm、5.5mS/cm、6mS/cmよりも高い電気伝導度、例えば、5.5~7mS/cmの間の、例えば、6~7mS/cmの間の、例えば、約6.6mS/cmの電気伝導度を有し得る。溶出緩衝液には、少なくともpH5.9~6.1の範囲で緩衝能を有する緩衝液が含まれ得る。例えば、溶出緩衝液はMOPS、例えば、少なくとも50mMのMOPS、例えば、100~

50

250 mMの間のMOPSを含む。溶出緩衝液は少なくとも20 mMのMOPSを最大で約8.0までのpHで含むこともできる。

【0024】

未変化型のキメラサイトカインタンパク質および脱アラニン型、アセチル化型、およびメチオニル化型はそれぞれと異なる様に、例えば、異なるキネティクスおよび／または異なる塩濃度もしくはpHで陽イオン交換表面から溶出し得る。例えば段階的溶出または濃度勾配溶出の間に、例えば、脱アラニン型は未変化型の後に溶出し、アセチル化型はメチオニル化型と未変化型の前に溶出し、そして、メチオニル化型は未変化型の前に溶出する。

【0025】

前記の方法は、例えば、1つ以上の脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%または8%減少させることにより、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のうちの1つ以上に比べて未変化型を濃縮するために用いられ得る。例えば、溶出液中の脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のうちの1つ以上が総キメラサイトカインタンパク質の20%未満、15%未満、12%未満、10%未満または8%未満である。

【0026】

前記の方法は、脱アラニン型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも10%、20%、40%、60%もしくは70%以上減少させることにより、脱アラニン型に比べて未変化型を濃縮するために用いられ得る。例えば、溶出液中の脱アラニン型は、総キメラサイトカインタンパク質の20%未満、15%未満、12%未満、10%未満、または8%未満である。例えば、溶出液中の脱アラニン型は総キメラサイトカインタンパク質の2%～20%、3%～10%、または4%～7%である。

【0027】

前記の方法は、アセチル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも70%、80%、90%もしくは99%減少させることにより、アセチル化型に比べて未変化型を濃縮するために用いられ得る。例えば、溶出液中のアセチル化型は総キメラサイトカインタンパク質の10%未満、5%未満、3%未満、1%未満、または0.5%未満である。例えば、溶出液中のアセチル化型は総キメラサイトカインタンパク質の0.01%～5%、1%～3%、または2%～2.5%である。

【0028】

前記の方法はまた、メチオニル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも10%、20%、40%、70%もしくは80%減少させることにより、メチオニル化型に比べて未変化型を濃縮するためにも用いられる得る。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の10%未満、8%未満、5%未満、3%未満、または2%未満である。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の1%～10%、2%～8%、または3%～5%である。

【0029】

いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質の回収率は20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%よりも高く、例えば、60%と80%の間である。いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質の純度はCEX溶出液中で少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、または95%である。例えば、いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質の純度はCEX溶出液中で少なくとも70%～99%、80%～98%、90%～95%である。概して、宿主細胞タンパク質（HCP）濃度は負荷調製物に比べて減少する。宿主細胞タンパク質は、受容体結合因子と異なる調製物中のタンパク質を指し、例えば、調製した受容体結合因子が由来する宿主細胞の内在性タンパク質、典型的には大腸菌タンパク質である。

【0030】

例えば、C E X 溶出液は 1 0 0 0 p p m 未満、8 0 0 p p m 未満、6 0 0 p p m 未満、または 5 0 0 p p m 未満の H C P を有する。いくつかの実施形態では、H C P 濃度は少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 % または 9 9 % 減少する。例えば、H C P 濃度は 8 0 % ~ 9 9 . 9 9 %、または 9 0 % ~ 9 9 . 5 % 減少する。

【0031】

1 つの態様では、本発明は、例えば、未変化のキメラサイトカインタンパク質、ならびに随意で脱アラニン型、メチオニル化型およびアセチル化型の前記タンパク質を含む C E X 溶出液を特色とする。その溶出液は未変化のタンパク質を 8 0 % ~ 9 9 % (例えば、8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 以上の未変化のタンパク質)、3 % ~ 2 0 % の脱アラニン種 (例えば、脱アラニン種を 5 %、1 0 %、1 5 % または 2 0 %)、0 . 1 % ~ 1 5 % のメチオニル化種 (メチオニル化種を 0 . 2 %、0 . 5 %、1 %、5 % または 1 0 %)、および 0 % ~ 5 % のアセチル化種 (アセチル化種を 0 . 0 0 1 %、0 . 0 1 %、0 . 1 %、1 % または 3 %) 含み得る。

【0032】

いくつかの態様では、C E X 溶出液を、例えば、キメラサイトカインタンパク質が前記陰イオン交換表面に実質的に結合しない条件下で陰イオン交換表面に供する。他の実施形態では、C E X 溶出液を、陰イオン交換クロマトグラフィーでの吸着と溶出を用いて処理する。

【0033】

前記の方法は、例えば、総じて 3 つ以下または 2 つ以下の追加のカラムクロマトグラフィーステップを含む精製工程において用いられ得る。いくつかの実施形態では、単一のカラムクロマトグラフィーステップが用いられる。例えば、クロマトグラフィーステップの際に濃度勾配溶出を行わない。

【0034】

別の方法は、キメラサイトカインタンパク質を含有する調製物を陰イオン交換表面に供すること、および、その陰イオン交換表面からの通過画分 (A E X 通過画分) を収集することを含む。前記の方法は、例えば、上で、および本明細書において記載されるように、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーと併用され得る。例えば、A E X 通過画分は陰イオン交換表面に供された調製物よりも少ない H C P、例えば、少なくとも 2 倍、1 0 倍、または 5 0 倍少ない H C P を含有する。エンドトキシンと核酸、例えば D N A は陰イオン交換表面に供された調製物に比べて減少し得る。いくつかの実施形態では、供される調製物は 5 0 0 0 p p m よりも少ない H C P を含有し、A E X 通過画分は 1 0 0 0 p p m、5 0 0 p p m、4 0 0 p p m、または 3 0 0 p p m よりも少ない H C P を含有する。いくつかの実施形態では、A E X 通過画分中の H C P はさらに 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % または 9 0 % 減少する。いくつかの実施形態では、A E X 通過画分中の H C P は 5 0 % ~ 9 0 %、6 0 % ~ 8 0 %、または 6 5 % ~ 7 5 % 減少する。

【0035】

例えば、陰イオン交換表面は第四級アンモニウム型強陰イオン交換体である。いくつかの実施形態では、陰イオン交換表面には C a p t o (商標) Q 陰イオン交換樹脂が含まれる。いくつかの実施形態では、陰イオン交換表面には P o r o s (登録商標) H Q 陰イオン交換樹脂が含まれる。いくつかの実施形態では、陰イオン交換表面は 5 0 ~ 4 0 0 マイクロモル C l - / m l または 1 0 0 ~ 3 0 0 マイクロモル C l - / m l のイオン容量を有する。陰イオン交換カラムの体積は 4 0 m L から 2 0 L までの範囲にあり得る。例えば、陰イオン交換カラムは約 5 0 m L、5 0 0 m L、1 L、5 L、1 0 L、2 0 L、5 0 L、8 0 L、1 0 0 L、1 2 0 L、1 5 0 L、3 0 0 L、5 0 0 L、6 0 0 L または 7 0 0 L の体積を有し得る。

【0036】

陰イオン交換表面は膜であり得る。

【0037】

1 つの態様では、本発明は、未変化のキメラサイトカインタンパク質、ならびに随意で

脱アラニン型、メチオニル化型およびアセチル化型の前記タンパク質を含むAEX通過画分を特色とする。その通過画分は、例えば、未変化のタンパク質を80%~99%（例えば、未変化のタンパク質の80%、85%、90%または95%以上）、3%~20%の脱アラニン種（例えば、脱アラニン種を5%、10%、15%または20%）、0.1%~15%のメチオニル化種（メチオニル化種を0.2%、0.5%、1%、5%または10%）、および0%~5%のアセチル化種（アセチル化種を0.001%、0.01%、0.1%、1%または3%）含み得る。

【0038】

別の方法は、キメラサイトカインタンパク質を含有する調製物を、例えば、キメラサイトカインタンパク質がCHAカラムに結合する条件下でセラミックハイドロキシアパタイトカラム（CHA）に供すること、および、例えば、キメラサイトカインタンパク質CHAカラムから遊離する条件下でCHAカラムを溶出処理すること、および、精製キメラサイトカインタンパク質を含有する溶出液を収集することを含む。例えば、CHAカラムの溶出液から収集された精製キメラサイトカインタンパク質は、より少ない宿主細胞タンパク質、および／または減少した量の脱アラニン、アセチル化およびメチオニル化型などの型のキメラサイトカインタンパク質を含有する。いくつかの実施形態では、CHAカラムの溶出液から収集される調製物は500ppm、200ppm、100ppmよりも少ない、または50ppm未満のHCPを含有する。いくつかの実施形態では、CHAカラムの溶出液中のHCPはさらに50%、60%、70%、80%、90%、92%、96%または98%減少する。いくつかの実施形態では、CHAカラムの溶出液中のHCPは50%~99%、60%~98%、または80%~95%減少する。

【0039】

未変化型のキメラサイトカインタンパク質および脱アラニン型、アセチル化型、およびメチオニル化型は他と異なる様に、例えば、異なるキネティクスおよび／または異なる塩濃度もしくはpHでCHA交換表面から溶出し得る。例えば段階的溶出または濃度勾配溶出の間に、例えば、脱アラニン型は未変化型の前に溶出し、そして、メチオニル化型は脱アラニン型の前に溶出する。

【0040】

前記の方法は、例えば、1つ以上の脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%または8%減少させることにより、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のうちの1つ以上に比べて未変化型を濃縮するために用いられ得る。例えば、溶出液中の脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型のうちの1つ以上は総キメラサイトカインタンパク質の20%未満、15%未満、12%未満、10%未満または8%未満である。

【0041】

前記の方法は、脱アラニン型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも10%、20%、40%60%もしくは70%以上減少させることにより、脱アラニン型に比べて未変化型を濃縮するために用いられ得る。例えば、溶出液中の脱アラニン型は総キメラサイトカインタンパク質の1%~10%、2%~8%、または3%~6%である。溶出液中の脱アラニン型は総キメラサイトカインタンパク質の20%未満、15%未満、12%未満、10%未満、または8%未満であり得る。

【0042】

前記の方法は、アセチル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも70%、80%、90%もしくは99%減少させることにより、アセチル化型に比べて未変化型を濃縮するために用いられ得る。例えば、CHA溶出液のアセチル化型は総キメラサイトカインタンパク質の10%未満、5%未満、3%未満、1%未満、または0.5%未満である。例えば、溶出液中のアセチル化型は総キメラサイトカインタンパク質の0.01%~5%、1%~3%、または2%~2.5%である。

【0043】

前記の方法また、メチオニル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも10%、20%、40%、70%、80%もしくは90%減少させることにより、メチオニル化型に比べて未変化型を濃縮するためにも用いられる得る。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の10%未満、5%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満または0.05%未満である。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の0.05%~10%、1%~8%、または3%~5%である。

【0044】

いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質の回収率は50%、60%、80%または90%よりも高く、例えば、80%と99%の間である。いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質の純度はCHA溶出液中で少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、または95%である。例えば、いくつかの実施形態では、キメラサイトカインタンパク質の純度はCHA溶出液中で少なくとも70%~99%、80%~98%、90%~95%である。概して、HCP濃度は負荷調製物に比べて減少する。

【0045】

例えば、CHA溶出液は1000ppm未満、800ppm未満、600ppm未満、または500ppm未満のHCPを有する。いくつかの実施形態では、HCP濃度は少なくとも70%、80%、90%または99%減少する。例えば、HCP濃度は80%~99.99%、または90%~99.5%減少する。

【0046】

CHAカラムの体積は例えば150mLから500Lまでの範囲にあり得る。例えば、陰イオン交換カラムは約200mL、220mL、500mL、1L、5L、10L、30L、100L、500L、600L、700Lまたは800Lの体積を有し得る。

【0047】

1つの態様では、本発明は、例えば、未変化のキメラサイトカインタンパク質、ならびに随意で脱アラニン型、メチオニル化型およびアセチル化型の前記タンパク質を含むCHA溶出液を特色とする。その溶出液は、例えば、未変化のタンパク質を80%~99%（例えば、80%、85%、90%または95%以上の未変化のタンパク質を）、脱アラニン種を0.1%~15%（例えば、2%、5%、または10%の脱アラニン種を）、メチオニル化種を0.1%~10%（0.01%、0.5%、1%、または5%のメチオニル化種を）、およびアセチル化種を0%~5%（0.001%、0.01%、0.1%、1%または3%のアセチル化種を）含み得る。

【0048】

本明細書に記載される精製工程は、脱アラニン型、アセチル化型および／またはメチオニル化型を検出する物質の評価をさらに含み得る。例えば、その評価は弱陽イオン交換分析クロマトグラフィーを含む。

【0049】

前記の精製工程は追加のクロマトグラフィーステップ、セラミックハイドロキシアパタイトステップおよび／または限外濾過／透析濾過の実施をさらに含み得る。

【0050】

キメラサイトカインタンパク質の総回収率は出発タンパク質調製物の30%、40%、50%、60%、70%または80%であり得る。キメラサイトカインタンパク質の回収率は総出発タンパク質の30%~90%、40%~80%、または50%~70%であり得る。

【0051】

別の態様では、本開示は、キメラサイトカインタンパク質を含有する精製調製物を特色とする。例えば、キメラサイトカインタンパク質は実施例1に記載されるタンパク質、例えば、P03、P04、またはP05、またはそのようなタンパク質に対して少なくとも90%同一であるタンパク質である。例えば、そのタンパク質はP05である。未変化型

の脱アラニン型に対する比率は少なくとも1:1、2:1、3:1、5:1、8:1または10:1であり、未変化型のアセチル化型に対する比率は少なくとも1:1、2:1、3:1、5:1、8:1または10:1であり、そして、未変化型のメチオニル化型に対する比率は少なくとも1:1、2:1、3:1、5:1、8:1または10:1である。

【0052】

キメラサイトカインタンパク質の純度は90%、92%、94%または95%よりも高いことがあり得る。例えば、精製調製物は総タンパク質のパーセンテージとして少なくとも50%、60%、70%、80%、90%の未変化型を含有する。例えば、脱アラニン型は調製物中のタンパク質の50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、15%未満もしくは10%未満、および／または総キメラサイトカインタンパク質の50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、15%未満もしくは10%未満である。未変化型、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型の相対量は弱陽イオン交換分析クロマトグラフィーなどの分析方法により決定され得る。前記調製物はキメラサイトカインタンパク質の他のアイソフォーム（すなわち、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型以外）の10%未満の量を含み得る。

10

【0053】

精製調製物中のキメラサイトカインタンパク質の濃度は少なくとも0.001mg/ml、0.1mg/ml、1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、20mg/mlまたは50mg/mlであり得る。例えば、前記タンパク質の濃度は10~100mg/ml、1mg/mL~20mg/mLの間、1~50mg/mlの間、10~50mg/mlの間、または25~75mg/mlの間、または40~105mg/mlの間である。

20

【0054】

前記調製物は水性調製物であり得、そして、緩衝剤および薬理学的に許容可能な塩をさらに含み得る。前記調製物は（例えば、注射用水を含む）無菌水性調製物であり得る。調製物は、その体積が様々であり得、そして、少なくとも1mg、100mg、1g、10g、50g、100g、または1kgの未変化のタンパク質を含み得る。

【0055】

前記調製物は凍結乾燥され得る。前記調製物は、例えば水性である場合、凍結され得るか、4℃~8℃または室温であり得る。いくつかの実施形態では、前記調製物（例えば、液体調製物または凍結乾燥調製物）は室温（例えば、21℃~25℃、例えば、23℃）で少なくとも2週間、少なくとも1か月間、少なくとも3か月間、少なくとも6か月間、少なくとも1年間、またはより長い期間安定である。1つの実施形態では、前記調製物は凍結されて（例えば、-20℃または-70℃または-80℃で）少なくとも6か月間、少なくとも1年間、少なくとも2年間、またはより長い期間安定である。いくつかの実施形態では、前記調製物は20%未満、15%未満、10%未満、または5%未満の脱アラニン型、アセチル化型、およびメチオニル化型を含む。

30

【0056】

前記調製物は核酸とエンドトキシンを実質的に含まないことがあり得る。例えば、前記調製物は1000ppm未満、500ppm未満、400ppm未満、300ppm未満、200ppm未満、100ppm未満または50ppm未満のHCPレベルを有する。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、前記調製物は本明細書に記載される緩衝条件を含む。いくつかの実施形態では、前記調製物は5~6の間、6~7の間、または7~8の間のpH、例えば、5.5~7.5の間のpHを有する。いくつかの実施形態では、前記調製物は10mS/cm未満、8mS/cm未満、7mS/cm未満、6mS/cm未満、5mS/cm未満、または4mS/cm未満の電気伝導度を有する。前記調製物はMOPSまたは他の緩衝剤、例えばトリスまたは酢酸塩を含み得る。前記調製物は界面活性剤を含まなくてもよい。前記調製物はリン酸塩を含み得る、またはリン酸塩を含まなくてもよい。前記調製物はキレート剤を含み得る。

50

【0058】

前記調製物は塩、等張化剤および界面活性剤のうちの1つ以上を含み得る。その塩は、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどであり得る。例となる等張化剤にはソルビトール、マンニトール、ショ糖、トレハロース、およびグリセロールが含まれる。例となる界面活性剤には、例えば、ポリキサマー188、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ソルビタンの他の脂肪酸エステル、およびポリエトキシレートが含まれる。

【0059】

1つの実施形態では、前記調製物は1mg/mL~30mg/mLのキメラサイトカインタンパク質、5mM~15mMのクエン酸ナトリウム、2%~8%のソルビトール、0.05%~0.15%のポリキサマー188、をpH5.5~6.5で含む。別の実施形態では、前記調製物は1mg/mL~20mg/mLのキメラサイトカインタンパク質、10mMのクエン酸ナトリウム、5%のソルビトール、0.1%のポリキサマー188をpH6.0で含む。

10

【0060】

1つの実施形態では、前記調製物はステロイドをさらに含む。そのステロイドは、例えば、デキサメタゾン、フルオシノロン、フルオシノロンアセトニド、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、またはそれらの塩もしくは混合物であり得る。

【0061】

1つの態様では、前記調製物は眼への投与、例えば、眼への局所的投与に適切である。

20

【0062】

1つの態様では、本発明は、本明細書に記載されるキメラサイトカインタンパク質、例えば、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質を含む調製物の評価方法であって、(a) 脱アラニン型の前記タンパク質のレベル、(b) アセチル化型の前記タンパク質のレベル（その場合、アセチル化型は、全長配列、例えば、キメラサイトカインタンパク質の全長配列、または脱アラニン型の全長のアセチル化型であり得る）、または(c) メチオニル化型の前記タンパク質のレベル（その場合、メチオニル化型は、全長配列、例えば、キメラサイトカインタンパク質の全長配列のメチオニル化型であり得る）のうちの1つ以上または全ての決定値を取得すること、例えば、直接取得することを含む方法を特色とする。前記の方法は、(a)、(b) および(c) のうちの1つ以上または全ての決定レベルを基準値と比較することをさらに含み得、(a)、(b) および(c) のそれぞれはそれ自体の基準値を有することができる。例えば、前記の方法は次のうちの1つ以上または全てを含み得る：(a) の決定レベルは脱アラニン型のレベルについての基準値と比較され得る、(b) の決定レベルはアセチル化型のレベルについての基準値と比較され得る、(c) の決定レベルはメチオニル化型のレベルについての基準値と比較され得る。

30

【0063】

1つの実施形態では、前記基準値は、例えば、前記タンパク質の市販の試料、別のバッチ、例えば前記タンパク質の以前のバッチ、規制当局により推奨されている、公表されている、または要求されている値のセット、公開仕様または公開基準、米国薬局方などの薬局方機関により推奨されている、公表されている、または要求されている値のセットから決定される。

40

【0064】

前記の決定は、例えば、クロマトグラフィーによる分析、例えば、弱陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析を含み得る。

【0065】

1つの実施形態では、前記の方法は前記調製物が基準値に対する事前に選択した関係を有するか決定すること、例えば、それが基準値よりも高いか、基準値と等しいか、または基準値よりも低いかに決定することを含む。

【0066】

50

1つの実施形態では、その決定に応答して、前記調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装または販売のうちの1つ以上を含む処理を前記調製物に行う。

【0067】

1つの実施形態では、その決定に応答して、タンパク質を作製するための処理のパラメータが変更される。ある実施形態では、その決定は所与の変更が実施された後に繰り返される。

【0068】

アセチル化型、メチオニル化型または未変化型のうちの1つ以上のレベルが、例えば、重量／重量で1%未満、2%未満、3%未満、4%未満、5%未満、6%未満、7%未満、8%未満、9%未満、10%未満、15%未満、または20%未満である場合、前記調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装または販売のうちの1つ以上を含む処理を前記調製物に行う。

【0069】

前記調製物は、例えば、前駆調製物を精製ステップに供することにより作製され得る。前記調製物は、前駆調製物を陽イオン交換基材、陰イオン交換基材またはハイドロキシアパタイト基材などのクロマトグラフィー基材と接触させることによって作製され得る。前記調製物は、前駆調製物を陽イオン交換基材、陰イオン交換基材またはハイドロキシアパタイト基材などのクロマトグラフィー基材のうちの1つ以上または全てと接触させることによって作製され得る。1つの実施形態では、前記調製物は、前駆調製物を陽イオン交換、陰イオン交換、およびハイドロキシアパタイト基材の順序でこれらと接触させることによって作製された。

【0070】

いくつかの実施形態では、前記調製物は精製工程における中間産物であり、そしてこの場合、前記調製物は、例えば、クロマトグラフィー工程からの濃縮された、または希釈された溶出液であり得る。

【0071】

前記調製物には、例えば、陽イオン交換カラムからの濃縮された、または希釈された溶出液など、陽イオン交換カラムからの溶出液が含まれる場合があり、または、前記調製物には陰イオン交換カラムからの溶出液が含まれる場合がある。

【0072】

1つの実施形態では、前記の方法には、前駆調製物を精製ステップに供することをさらに含む。例えば、前駆調製物を陽イオン交換基材、陰イオン交換基材またはハイドロキシアパタイト基材などのクロマトグラフィー基材のうちの1つ以上または全てと接触させることができる。前駆調製物を陽イオン交換基材と、次に陰イオン交換基材と、そして次にハイドロキシアパタイト基材と接触させることができる。

【0073】

処理には、例えば、眼への投与用に前記調製物を製剤することが含まれ得る。

【0074】

1つの実施形態では、例えば、コンピュータ読み取り可能記録の様式で評価が記憶される。

【0075】

本発明の1つの態様は、タンパク質調製物を評価する方法であって、例えば、ハイドロキシアパタイトカラムから精製された、配列番号21の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質の調製物に由来する単離画分を供給し、そして、その画分を弱陽イオン交換(WCEX)クロマトグラフィーで分析して脱アラニン型、アセチル化型またはメチオニル化型の前記タンパク質のうちの1つ以上のレベルを決定することによる方法を特色とする。脱アラニン型、アセチル化型またはメチオニル化型の前記タンパク質のうちの1つ以上が10%未満で存在する場合、例えば、前記調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装または販売により前記調製物

10

20

30

40

50

が処理される。

【0076】

1つの態様では、本発明は、配列番号21の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質の調製物を作製する処理を分析する方法であって、例えば、前記タンパク質の調製物の単離画分を供給し、請求項93に記載の方法を用いてその画分を分析し、そして、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型の前記タンパク質のうちの1つ以上が10%未満で存在する場合、少なくとも部分的にその分析に基づきその処理を維持することによる方法を特色とする。

【0077】

別の態様では、本発明は、配列番号21の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質の調製物を処理する方法であって、例えば、調製物中の脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型の前記タンパク質のうちの1つ以上のレベルについてのwCEX決定値を提供し、そして、脱アラニン型、アセチル化型およびメチオニル化型の前記タンパク質のうちの1つ以上が10%未満のレベルで存在する場合、前記調製物の選択、受領、医薬製品への処理、出荷、製剤、ラベル付け、包装または販売のうちの1つ以上を含む処理を前記調製物に行うことによる方法を特色とする。

【0078】

前記の処理には、例えば、眼への投与用に前記調製物を製剤することが含まれ得る。

【0079】

1つの実施形態では、前記の処理には、前記タンパク質の活性を決定することが含まれる。

【0080】

別の態様では、本開示は、少なくとも2つの親サイトカインドメインに由来するアミノ酸残基、例えば、少なくとも2つの親サイトカインドメインに由来する受容体結合形体、表面形体、βストランド、およびループを含有するサイトカインドメインを含む単離タンパク質を特色とする。

【0081】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインはIL-1RIに結合し、そして、異なる親サイトカインドメインに由来する、例えば、受容体アゴニストおよび受容体アンタゴニスト（例えばIL-1βとIL-1Ra、またはIL-1αとIL-1Ra）に由来する、IL-1βとIL-1αに由来する、またはIL-1Ra、IL-1αとIL-1Raの3つ全てに由来する受容体結合形体を含む。受容体結合形体は部位AおよびB内の残基、セグメントまたは領域に対応し得る。部位AおよびBに対応するそのような残基、セグメントおよび領域に関して、IL-1（IL-1β、IL-1α、およびIL-1Ra）との関連で、さらに以下の定義を参照されたい。

【0082】

部位Aに関して、前記サイトカインドメインは、(a)(i)第1親サイトカインドメイン内の対応する残基に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である部位A残基、(a)(ii)第1親サイトカインドメイン内の対応する残基に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である拡張型部位A残基、(a)(iii)第1親サイトカインドメインの対応する領域に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である部位AセグメントA1およびA2、ならびに／または(a)(iv)第1親サイトカインドメインの対応する領域に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である部位A領域を有し得る。

【0083】

部位Bに関して、前記サイトカインドメインは、(b)(i)第2親サイトカインドメイン内の対応する残基に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である部位B残基、(b)(ii)

第2親サイトカインドメイン内の対応する残基に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である拡張型部位B残基、(b)(iii)第2親サイトカインドメインの対応する領域に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である部位BセグメントB1、B2、およびB3、ならびに／または(b)(iv)第2親サイトカインドメインの対応する領域に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である部位B領域を有し得る。

【0084】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、(a)(i)およびb(i)、(a)(ii)およびb(ii)、(a)(iii)および(b)(iii)、または(a)(iv)および(b)(iv)の形体を含み、例えば、その場合、各形体は80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%の同一性によりさらに定義される。例えば、第1親サイトカインドメインがIL-1 β であり得、第2親サイトカインドメインがIL-1Raであり得る。例えば、第1親サイトカインドメインがIL-1 α であり得、第2親サイトカインドメインがIL-1Raであり得る。

【0085】

前記サイトカインドメインは、サイトカイン補助的受容体(例えば、IL-1RACP)との相互作用を損なう前記ドメイン内の1つ以上の位置に第2親サイトカインドメイン由来のアミノ酸を含むこともできる。例えば、その第2親サイトカインドメインはIL-1Raである。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、IL-1Raに由来する1つ以上の部位Cおよび／もしくはDセグメント(例えば、C1、D1、D2、D3、D4、および／またはD5)、またはそのようなセグメントに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、もしくは100%同一である配列を含む。例えば、前記サイトカインドメインは、(i)IL-1Ra内の対応する残基に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である部位C残基、(ii)IL-1Ra内の対応する残基に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である部位D残基、(iii)IL-1Ra内の対応する残基に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一であるC1セグメント、または(iv)IL-1Ra内の対応する残基に対して少なくとも3残基、4残基、または5残基で同一であるD2セグメントを含む。前記サイトカインドメインは、(i)および(ii)、または(ii)および(iii)(例えば、その場合、各形体は80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%の同一性によりさらに定義される)、または(iii)および(iv)の形体を含むことができる。

【0086】

前記ドメインは、少なくとも2つの異なるヒトIL-1ファミリーサイトカインドメインに由来する、A領域(A1およびA2セグメントを有する)、B領域(B1、B2、およびB3セグメントを有する)、C領域、およびD領域(D1、D2、D3、D4、およびD5セグメントを有する)からなる群より選択される領域を含み得る。

【0087】

前記サイトカインドメインは、異なるサイトカインドメインに由来する部位A領域および部位B領域を含み得る。部位A領域は天然受容体アゴニストまたはアンタゴニストに由来し得る。部位B領域は天然受容体アゴニストに由来し得る。前記サイトカインドメインは、天然受容体アンタゴニストに由来する部位C領域および／または天然受容体アンタゴニストに由来する部位D領域を含み得る。

【0088】

例えば、前記ドメインは、少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、20アミノ酸長、または25アミノ酸長であり、少なくとも2つの異なる親サイトカインドメイン、例えば、第1および第2親サイトカインドメインに由来する

対応するセグメントに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一であるセグメントを有するキメラドメインであり得る。その親サイトカインドメインはIL-1 β 、IL-1 α およびIL-1RaなどのIL-1RI結合サイトカインであり得る。いくつかの実施形態では、その第1親サイトカインドメインに由来するセグメントに存在しないアミノ酸は2つ以上の他の親サイトカインドメインに由来する。

【0089】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、第1親サイトカインドメインの対応するセグメントに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一であり、少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、20アミノ酸長、または25アミノ酸長の少なくとも2つのセグメントを含み、そして、そのようなセグメントに存在しないアミノ酸は第2親サイトカインドメイン内の対応する残基に対してほとんど（例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%）同一である。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、(i)第1親サイトカインドメインの対応するセグメントに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一であり、少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、20アミノ酸長、または25アミノ酸長の少なくとも2つのセグメント、および(ii)第2親サイトカインドメインに対して同一であり、例えば、少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、10アミノ酸長、または15アミノ酸長の少なくとも、1つ、2つ、または3つのセグメントを含む。

20

【0091】

例えば、前記サイトカインドメインは、それぞれ第1親サイトカインドメイン（例えば、IL-1Ra）に対して同一である（または少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、もしくは98%同一である）、20~50アミノ酸、25~50アミノ酸、30~45アミノ酸、または30~40アミノ酸（例えば、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、35アミノ酸、36アミノ酸、37アミノ酸、38アミノ酸、39アミノ酸、または40アミノ酸）の第1セグメント、および20~45アミノ酸、20~40アミノ酸、25~40アミノ酸、または25~35アミノ酸（例えば、25アミノ酸、26アミノ酸、27アミノ酸、28アミノ酸、29アミノ酸、30アミノ酸、31アミノ酸、32アミノ酸、33アミノ酸、34アミノ酸、または35アミノ酸）の第2セグメント、および第2親サイトカインドメイン（例えば、IL-1 β またはIL-1 α ）に対して同一である（または少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、もしくは98%同一である）第3セグメントを含み得る。例えば、その第3セグメントは55~90アミノ酸長の間、60~90アミノ酸長の間、60~85アミノ酸長の間、または70~85アミノ酸長の間、例えば、75アミノ酸長、76アミノ酸長、77アミノ酸長、78アミノ酸長、79アミノ酸長、80アミノ酸長、81アミノ酸長、82アミノ酸長、83アミノ酸長、84アミノ酸長、または85アミノ酸長であり得る。

30

40

【0092】

いくつかの実施形態では、第1セグメントはWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNV（配列番号9、本明細書においてA1セグメントともいう、そして、配列番号3の残基16~40およびIL-1 β の番号付に従って残基11~36に対応する）に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%のセグメントであり得る。第2セグメントは、(IL-1 β の番号付に従って)残基121~139または121~140に対応する配列番号3(IL-1Ra)の残基120~140または120~141に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%のセグメントであり得る。第3セグメントは

50

、 I L - 1 β（配列番号 1）の残基 45～100 または 42～120 に対して少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または 100% であり得る。

【0093】

いくつかの場合では、第 1 セグメントは配列番号 3 の残基 14～45（I L - 1 β の番号付に従って残基 9～41 に対応する）に対して少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または 100% のセグメントであり得る。第 2 セグメントは配列番号 3 の残基 120～145（I L - 1 β の番号付に従って残基 121～145 に対応する）または配列番号 3 の残基 120～147（I L - 1 β の番号付に従って残基 121～147 に対応する）に対して少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または 100% のセグメントであり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも（I L - 1 β の番号付に従う）残基 11～41 および 120～147 が I L - 1 R a 内の対応する残基に対して全体として少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または 100% 同一である。

【0094】

いくつかの実施形態では、第 1 I L - 1 ファミリーサイトカインドメインのセグメントのうちの 1 つの末端は、配列番号 1 のアミノ酸 41 から 5 アミノ酸内、4 アミノ酸内、3 アミノ酸内、2 アミノ酸内、または 1 アミノ酸内に位置し、第 1 I L - 1 ファミリーサイトカインドメインのセグメントのうちの 1 つの末端は、配列番号 1 のアミノ酸 121 から 5 アミノ酸内、4 アミノ酸内、3 アミノ酸内、2 アミノ酸内、または 1 アミノ酸内に位置する。

【0095】

いくつかの実施形態では、前記ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸 42 から 5 アミノ酸内、4 アミノ酸内、3 アミノ酸内、2 アミノ酸内、または 1 アミノ酸内の位置に N 末端を有し、配列番号 1 のアミノ酸 120 から 5 アミノ酸内、4 アミノ酸内、3 アミノ酸内、2 アミノ酸内、または 1 アミノ酸内に C 末端を有するセグメント、および／または配列番号 1 のアミノ酸 121 から 5 アミノ酸内、4 アミノ酸内、3 アミノ酸内、2 アミノ酸内、または 1 アミノ酸内の位置に N 末端を有し、配列番号 1 のアミノ酸 145 から 5 アミノ酸内、4 アミノ酸内、3 アミノ酸内、2 アミノ酸内、または 1 アミノ酸内に C 末端を有するセグメントを含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、（I L - 1 β の番号付に従う）11～41 番および 120～147 番に対応する位置にある前記ドメインの残基は I L - 1 R a 内の対応する残基に対して全体として少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または 100% 同一である。前記ドメインはまた、例えば、前述のものと類似の位置において I L - 1 サイトカインファミリーメンバーに由来する配列にも基づき得る。

【0097】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、次の配列、WDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGP NV（配列番号 9）、NLEEK（配列番号 10）、RIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGP NVNLEEK（配列番号 11）、AMEADQP（配列番号 12）、FLCTAMEADQPVS LTNPDEGVMVTKFY（配列番号 13）のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多くの配列、および／または前述の配列に対して少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、もしくは 100% 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、次の配列、VQGEESNDKI（配列番号 14）、KKKMEKRF（配列番号 15）、およびFSMSFVQGEESNDKI PV ALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVD PKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKL E FES（配列番号 16）のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれより多くの配列、および／または前述の配列に対して少なくとも 80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または 100% 同一である配列を含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、 $\beta 1 \beta 2$ ループ、 $\beta 2 \beta 3$ ループ、 $\beta 8 \beta 9$ ループおよび $\beta 10 \beta 11$ ループのうちの1つ以上または全ては、IL-1 アンタゴニスト、例えば、IL-1 Ra に由来する対応するループに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、 $\beta 4 \beta 5$ ループ、 $\beta 5 \beta 6$ ループ、 $\beta 6 \beta 7$ ループおよび $\beta 7 \beta 8$ ループのうちの1つ以上または全ては、 $\beta 1 \beta 2$ ループ、 $\beta 2 \beta 3$ ループ、 $\beta 8 \beta 9$ ループおよび $\beta 10 \beta 11$ ループに最も類似しているヒト親サイトカインとは異なる IL-1 ファミリーサイトカインドメインに由来する対応するループに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である。例えば、 $\beta 4 \beta 5$ ループ、 $\beta 5 \beta 6$ ループ、 $\beta 6 \beta 7$ ループおよび $\beta 7 \beta 8$ ループのうちの1つ以上または全ては、IL-1 β などの IL-1 アゴニストに由来するそのようなループに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、 $\beta 11 \beta 12$ ループは、IL-1 アンタゴニスト、例えば、IL-1 Ra に由来する対応するループに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、IL-1 Ra の β スtrand である $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 10$ および $\beta 11$ のうちの1つ、2つ、3つ、または全てに対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、IL-1 β の $\beta 4$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、および $\beta 8$ のうちの1つ、2つ、3つ、または全てに対して、または IL-1 β の $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、および $\beta 8$ に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である配列を含む。

20

【0100】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号3のアミノ酸 I 46 ~ G 59、A 55 ~ G 59、A 55 ~ V 83、I 60 ~ V 83、N 84 ~ D 95、I 46 ~ S 110、V 49 ~ S 110、または I 46 ~ G 118 に対して80%、85%、90%、95%よりも高い同一性を有する、または100%同一であるセグメントを含有しない。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1のアミノ酸 N 7 ~ V 41、R 11 ~ M 36、N 102 ~ D 145、または Y 121 ~ D 145 に対して80%、85%、90%、95%よりも高い同一性を有する、または100%同一であるセグメントを含有しない。

30

【0101】

概して、前記サイトカインドメインは天然物ではない。それはヒト IL-1 ファミリーサイトカインドメインと異なる。例えば、それは、IL-1 Ra (配列番号3)、IL-1 β (配列番号1)、および/または IL-1 α (配列番号2) と98%未満、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、または55%未満同一である。前記サイトカインドメインはそのようなサイトカインに対して少なくとも30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%同一であり得る。例えば、キメラドメインは IL-1 Ra、IL-1 β 、および IL-1 α と30~95%、40~90%、または45~85%同一であり得る。例えば、キメラドメインは、IL-1 β と40~90%同一、そして、IL-1 Ra と35~85%同一であり得、IL-1 β と40~80%同一、そして、IL-1 Ra と45~80%同一であり得、IL-1 β と45~72%同一、そして、IL-1 Ra と45~80%同一であり得、IL-1 β と45~72%同一、そして、IL-1 Ra と53~80%同一であり得、IL-1 β と50~72%同一、そして、IL-1 Ra と53~70%同一であり得、IL-1 β と60~72%同一、そして、IL-1 Ra と53~68%同一であり得、IL-1 β と65~72%同一、そして、IL-1 Ra と54~60%同一であり得、または IL-1 β と68~72%同一、そして、IL-1 Ra と54~57%同一であ

40

50

り得る。例えば、キメラドメインは、IL-1 α と40～90%同一、そして、IL-1Raと35～85%同一であり得、IL-1 α と40～80%同一、そして、IL-1Raと45～80%同一であり得、IL-1 α と45～72%同一、そして、IL-1Raと45～80%同一であり得、IL-1 α と45～72%同一、そして、IL-1Raと53～80%同一であり得、IL-1 α と50～72%同一、そして、IL-1Raと53～70%同一であり得、IL-1 α と60～72%同一、そして、IL-1Raと53～68%同一であり得、IL-1 α と65～72%同一、そして、IL-1Raと54～60%同一であり得、またはIL-1 α と68～72%同一、そして、IL-1Raと54～57%同一であり得る。

【0102】

10

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインはIL-1Raと異なり、そして、一方で天然受容体アンタゴニスト（IL-1Raなど）の部位Cおよび／または部位Dの特性を含みつつ、受容体に結合する。例えば、前記ドメインは、ヒトIL-1 β およびIL-1Raと98%未満、95%未満、92%未満、90%未満、85%未満、および80%未満同一である。例えば、前記ドメインはIL-1Raと40～95%、40～90%、または45～85%同一である。前記ドメインは、IL-1 α またはIL-1 β などのIL-1ファミリーサイトカインアゴニストと40～95%、40～90%、または45～85%同一である場合もある。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、サイトカインシグナル伝達のアゴニストである第1親サイトカインドメインの少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%または85%のアミノ酸を含む。

20

【0103】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、受容体アンタゴニスト（IL-1Ra）よりも受容体アゴニスト（IL-1 β またはIL-1 α など）に対して高いアミノ酸同一性（例えば、少なくとも5%、10%、15%または20%高い）を有するが、IL-1RIのアンタゴニストとして機能する。

【0104】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは完全にキメラであり、例えば、前記ドメイン中の各アミノ酸は複数の親サイトカインドメインのうちの1つ、例えば、2つの親サイトカインドメインのうちの1つ、または3つ以上の親サイトカインドメインのうちの1つに由来する。例えば、親サイトカインドメインはヒトサイトカインドメインまたは非ヒト霊長類サイトカインドメインである。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは部分的にキメラであり、例えば、前記ドメイン中の全てのアミノ酸が複数の親サイトカインドメインのうちの1つに由来するわけではない。

30

【0105】

例えば、前記単離タンパク質はIL-1RIに結合し、その受容体によるシグナル伝達を調節し、例えば、IL-1RI受容体シグナル伝達活性を刺激または抑制する。いくつかの実施形態では、そのタンパク質は、IL-1 β 応答性ヒト細胞と接触したときにIL-6産生を実質的に誘導せず、および／または、例えば、10 μ g/ml、100 μ g/ml、または1mg/mlの濃度でIL-1 β 応答性レポーター遺伝子の産生を実質的に誘導しない。概して、前記タンパク質は100nM未満、50nM未満、20nM未満、10nM未満、または5nM未満のIC50で（例えば、本明細書に記載される細胞性アッセイなどにおいて、0.1ng/mlの濃度で）IL-1 β によるシグナル伝達を抑制する。前記タンパク質は、IL-1Raのものよりも低い、例えば、少なくとも10%、20%または50%低いIC50でIL-1 β によるシグナル伝達を阻害することができる。

40

【0106】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、例えば、親サイトカインドメインのうちの1つと同一またはそれよりも高い親和性で結合する。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは100nM未満、50nM未満、20nM未満、10n

50

M未満、5 nM未満、または1 nM未満、または500 pM未満、400 pM未満、100 pM未満、または50 pM未満の K_D でIL-1RIに結合する。例えば、結合定数は $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、または $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ よりも高くあり得、解離定数は $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、または $6 \times 10^{-5} s^{-1}$ よりも低くあり得る。

【0107】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、IL-1 β またはIL-1Raより高い親和性（例えば、低い K_D ）および／または遅い解離速度でIL-1RIに結合する。例えば、前記サイトカインドメインは、IL-1Raのものよりも低い、もしくは同等の解離定数で、および／またはIL-1 β のものよりも高い、もしくは同等の結合定数でIL-1RIに結合することができる。

10

【0108】

前記サイトカインドメインの長さは、およそ120～180アミノ酸の間、140～170アミノ酸の間、148～160アミノ酸の間、または150～156アミノ酸の間である。いくつかの実施形態では、前記ドメインは152アミノ酸長、153アミノ酸長、または154アミノ酸長である。通常、前記ドメインは少なくとも10個、11個、または12個の β ストランドを含み、そして、安定的に折り畳まれている。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、本明細書に記載されるように、少なくとも38℃、40℃、42℃、44℃、46℃、48℃、50℃、52℃、54℃、56℃、58℃、60℃、62℃、または64℃の融点（ T_m ）を有する。サイトカインドメインは51～61℃の間、51～66℃の間、56～61℃の間、または56～66℃の間の T_m を有し得る。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、少なくとも48℃、50℃、51℃、55℃、57℃、58℃、または59℃まで折畳み構造の変性を開始しない。例えば、それは、生理的緩衝液中でのIL-1Raおよび／またはIL-1 β の T_m の値よりも少なくとも10℃以内または5℃以内にある T_m を有する。いくつかの実施形態では、生理的緩衝液中でIL-1Raおよび／またはIL-1 β よりも熱安定性を有する。例えば、前記ドメインは、生理的緩衝液中でのIL-1Raおよび／またはIL-1 β の T_m よりも少なくとも2℃、4℃、6℃、7℃、または8℃高い、例えば、約0.5 mg/mlの濃度でのIL-1Raおよび／またはIL-1 β の T_m よりも約5～12℃、5～10℃、または7～10℃だけ高い T_m を有し得る。

20

30

【0109】

前記タンパク質は本明細書に記載される他の形体を含み得る。

【0110】

別の態様では、本開示は、キメラIL-1ファミリーサイトカインドメインを含む単離タンパク質を特色とする。IL-1サイトカインファミリーメンバーの例にはIL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-18、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1F10、およびIL-33が含まれる。前記サイトカインドメインには、前述のサイトカインのうちの1つの受容体結合領域、または1つ以上のそのようなサイトカインの要素を含むタンパク質配列が含まれ得る。例えば、前記サイトカインドメインには、2つ以上のIL-1サイトカインファミリーメンバーからなるキメラが含まれ得る。

40

【0111】

1つの実施形態では、キメラドメインは、少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、20アミノ酸長、25アミノ酸長、30アミノ酸長、35アミノ酸長、40アミノ酸長、45アミノ酸長、50アミノ酸長、55アミノ酸長、60アミノ酸長、65アミノ酸長、または70アミノ酸長であり、第1IL-1ファミリーサイトカインに対するアミノ酸同一性を有する（または少なくとも80%、82%、85%、87%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である）少なくとも1つのセグメント、および少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9ア

50

ミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、20アミノ酸長、25アミノ酸長、30アミノ酸長、35アミノ酸長、または40アミノ酸長であり、第2IL-1ファミリーサイトカインに対するアミノ酸同一性を有する（または少なくとも80%、82%、85%、87%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である）別のセグメントを含む。キメラドメインは、第1および第2IL-1ファミリーサイトカインのうちの一方または両方と90%未満、85%未満、80%未満または75%未満が同一であり得る。

【0112】

1つの実施形態では、第1および第2IL-1ファミリーサイトカインは、IL-1β、IL-1αおよびIL-1Raからなる群より選択される。別の実施形態では、第1および第2IL-1ファミリーサイトカインは、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7およびIL-1F8からなる群より選択される。別の実施形態では、第1IL-1ファミリーサイトカインはアゴニストからなる群より選択され、第2IL-1ファミリーサイトカインはアンタゴニストからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、キメラドメインは、同じ親サイトカインドメインに由来する120個、110個、100個、90個、または80個よりも少ない連続するアミノ酸を含む。

【0113】

1つの実施形態では、キメラドメインは、少なくとも50か所、60か所、70か所、80か所、90か所、100か所、110か所、または120か所の位置で第1IL-1ファミリーサイトカインと同一であり、少なくとも50か所、60か所、70か所、80か所、90か所、100か所、110か所、または120か所の位置で第2IL-1ファミリーサイトカインと同一である（両方のそのようなサイトカインとそれぞれに同一であり得る位置を含む）。

【0114】

1つの実施形態では、キメラドメインは、それぞれ少なくとも5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、または20アミノ酸長であり、第1IL-1ファミリーサイトカインの対応するセグメントに対するアミノ酸同一性を有し（または少なくとも80%、82%、85%、87%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であり）、そして、残りの位置ではほとんど第2IL-1ファミリーサイトカインに由来するアミノ酸を含む、少なくとも2つ、3つ、または4つの非連続的なセグメントを含む。1つの実施形態では、キメラドメインは、隣接するセグメントが異なる親IL-1ファミリーサイトカインドメインに由来する、4つ、5つ、6つ、または7つのセグメントを含む。例えば、前記ドメイン内の各アミノ酸は、天然ヒトIL-1ファミリーサイトカインドメインに由来する少なくとも5アミノ酸長または6アミノ酸長のペプチド内に位置する。1つの実施形態では、キメラドメインは、(i) IL-1βに由来する少なくとも50アミノ酸長、60アミノ酸長、65アミノ酸長、70アミノ酸長、または75アミノ酸長のセグメント、(ii) IL-1Raに由来する少なくとも15アミノ酸長、20アミノ酸長、25アミノ酸長のセグメント、および(iii) IL-1Raに由来する少なくとも15アミノ酸長、20アミノ酸長、25アミノ酸長の別のセグメントのうちの少なくとも1つ、2つ、または3つを含む。

【0115】

1つの実施形態では、非連続的なセグメントは、IL-1β内のそのような位置の番号付に従って、残基(i) 1~6および45~61、(ii) 1~6および86~95、(iii) 45~61および86~95、(iv) 1~6および148~153、(v) 45~61および148~153、または(vi) 86~95および148~153を含む。第1IL-1ファミリーサイトカインに由来する3つの非連続的なセグメントは、IL-1β内のそのような位置の番号付に従って、例えば、残基1~8、42~120および141~153、残基1~10、37~125および131~153、または残基1~6、45~61、86~95および148~153を含み得る。キメラドメインは、残りの

10

20

30

40

50

位置で第 2 I L - 1 ファミリーサイトカインに対して少なくとも 80 %、82 %、85 %、87 %、90 %、92 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一であり得る。1 つの実施形態では、非連続的なセグメントの境界部のうちの 1 つ以上が、第 1 および第 2 I L - 1 ファミリーサイトカインが同一または保存されている位置に位置する。前記タンパク質は本明細書に記載される他の形体を有し得る。

【0116】

別の態様では、本開示は、I L - 1 R I に結合する I L - 1 ファミリーサイトカインドメインを含む単離 I L - 1 インヒビターを特色とする。例えば、I L - 1 インヒビターは、上または本明細書の別の部分に記載の 1 つ以上の形体を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、(a) 次の (I L - 1 β の番号付に従って) A R G 1 1、S E R 1 3、G L N 1 4、G L N 1 5、G L U 2 5、L Y S 2 7、L E U 2 9、H I S 3 0、L E U 3 1、G L N 3 2、G L Y 3 3、G L N 3 4、A S P 3 5、M E T 3 6、G L N 3 8、G L N 3 9、A L A 1 2 7、G L U 1 2 8、A S N 1 2 9、M E T 1 3 0、および G L N 1 4 1 の位置で I L - 1 R a と同一であるアミノ酸、および (b) 次の A L A 1、P R O 2、V A L 3、A R G 4、L E U 6、P H E 4 6、G L N 4 8、G L U 5 1、S E R 5 2、A S N 5 3、L Y S 5 5、I L E 5 6、P R O 5 7、L Y S 9 2、L Y S 9 3、L Y S 9 4、L Y S 1 0 3、G L U 1 0 5、A S N 1 0 8、G L N 1 4 9、P H E 1 5 0、および S E R 1 5 2 の位置で I L - 1 β と同一であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、部位 A セグメント A 1 および A 2 は I L - 1 R a の対応するセグメントに対して (全体として) 少なくとも 80 % 同一である。いくつかの実施形態では、部位 B セグメント B 1、B 2、および B 3 は I L - 1 β の対応するセグメントに対して (全体として) 少なくとも 80 % 同一である。例えば、部位 A セグメント A 1 および A 2 は I L - 1 R a の対応するセグメントに対して (全体として) 少なくとも 90 % 同一であり、そして、部位 B セグメント B 1、B 2、および B 3 は I L - 1 β の対応するセグメントに対して (全体として) 少なくとも 90 % 同一である。例えば、部位 A セグメント A 1 および A 2 は I L - 1 R a の対応するセグメントと同一であり、そして、部位 B セグメント B 1、B 2、および B 3 は I L - 1 β の対応するセグメントと同一である。

【0117】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、I L - 1 R a の β スtrand である β 2、 β 3、 β 10 および β 11 に対して (全体として) 少なくとも 80 % 同一である配列、および I L - 1 β の β スtrand である β 4、 β 6、 β 7、および β 8 に対して (全体として) 少なくとも 80 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、I L - 1 R a の β スtrand である β 2、 β 3、 β 10 および β 11 と同一である配列、および I L - 1 β の β スtrand である β 4、 β 6、 β 7、および β 8 と同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、上で I L - 1 β から特定されたセグメントおよび形体は I L - 1 α 、または I L - 1 β もしくは I L - 1 α の組合せから得られる。

【0118】

いくつかの実施形態では、I L - 1 インヒビターは、次の特性のうちの 1 つ以上 (例えば、少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、または 7 つ) を含む：(i) I L - 1 β 、I L - 1 α 、または I L - 1 R a 内の対応する残基に対して少なくとも 60 %、70 %、80 %、85 %、88 %、90 %、92 %、95 %、98 %、または 100 % 同一である部位 A 残基または部位 B 残基 (および/または拡張型部位 A 残基および拡張型部位 B 残基)、(ii) I L - 1 R a 内の対応する残基に対して全体として少なくとも 80 %、85 %、88 %、90 %、92 %、95 %、98 %、または 100 % 同一である A 1 セグメントおよび A 2 セグメント、(iii) I L - 1 β または I L - 1 α 内の対応する残基に対して全体として少なくとも 80 % 同一である B 1 セグメント、B 2 セグメント、および B 3 セグメント、(iv) I L - 1 R a 内の対応する残基に対して少なくとも 80 %、85 %、88 %、90 %、92 %、95 %、98 %、または 100 % 同一である部位 A 領域、(v) I L - 1 β または I L - 1 α 内の対応する残基に対して少なくとも 80 %、85

%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%である部位B領域、(v i) I L - 1 R aまたはI L 3 6 R a内の対応する残基に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である部位C残基および／または部位D残基、(v i i) I L - 1 R a内の対応する残基に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一であるC 1セグメント、(v i i i) I L - 1 R a内の対応する残基に対して少なくとも3残基、4残基、または5残基で同一であるD 2セグメント。前記サイトカインドメインはI L - 1 R aと異なり、例えば、前記サイトカインドメインは、I L - 1 R aと99%未満、98%未満、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満同一であり、および／またはI L - 1 R aと少なくとも30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%同一である、例えば、I L - 1 R aと40～95%、40～90%、または45～85%同一である。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号3のアミノ酸I 4 6～G 5 9、A 5 5～G 5 9、A 5 5～V 8 3、I 6 0～V 8 3、N 8 4～D 9 5、I 4 6～S 1 1 0、V 4 9～S 1 1 0、またはI 4 6～G 1 1 8に対して80%、85%、90%、95%よりも高い同一性を有する、または100%同一であるセグメントを含有しない。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1のアミノ酸N 7～V 4 1、R 1 1～M 3 7、N 1 0 2～D 1 4 4、またはY 1 2 1～D 1 4 4に対して80%、85%、90%、95%よりも高い同一性を有する、または100%同一であるセグメントを含有しない。

10

20

【0119】

いくつかの実施形態では、前記インヒビターは、100 nM未満、50 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、または1 nM未満の K_D でI L - 1 R Iに結合する。いくつかの実施形態では、前記インヒビターは、I L - 1 β またはI L - 1 R aよりも高い親和性（例えば、低い K_D ）および／または遅い解離速度でI L - 1 R Iに結合する。

【0120】

いくつかの実施形態では、前記インヒビターは、I L - 1 β 応答性ヒト細胞に接触したときにI L - 6発現を実質的に誘導しない。概して、前記インヒビターは、例えば、100 nM未満、50 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、または5 nM未満のI C 5 0でI L - 1 β によるシグナル伝達を阻害する。

30

【0121】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、次の配列、W D V N Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V（配列番号9）、N L E E K（配列番号10）、R I W D V N Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V N L E E K（配列番号11）、A M E A D Q P（配列番号12）、F L C T A M E A D Q P V S L T N M P D E G V M V T K F Y（配列番号13）のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多くの配列、および／または前述の配列に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、次の配列、V Q G E E S N D K I（配列番号14）、K K K M E K R F（配列番号15）、およびF S M S F V Q G E E S N D K I P V A L G L K E K N L Y L S C V L K D D K P T L Q L E S V D P K N Y P K K K M E K R F V F N K I E I N N K L E F E S（配列番号16）のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれより多くの配列、および／または前述の配列に対して少なくとも80%、85%、88%、90%、92%、95%、98%、または100%同一である配列を含む。前記インヒビターは本明細書に記載される他の形体を含み得る。

40

【0122】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される配列、例えば、表4または実施例1に記載される配列、例えば、P 0 1、P 0 2、P 0 3、P 0 4、P 0 5、P 0 6、もしくはP 0 7のアミノ酸配列、または実施例1、5、6、もしくは本明細書中の別のか所

50

の配列に対して少なくとも80%、82%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む単離タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列は、少なくとも1つの置換、挿入または欠失を含む。そのアミノ酸配列は15個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、または2個よりも少ない非保存的置換、または15個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、または2個より少ない全置換を含み得る。そのアミノ酸配列は少なくとも1個、2個、3個、4個、または5個の置換、例えば、保存的置換を含み得る。

【0123】

P01、P02、P03、P04、P05、P06、もしくはP07のアミノ酸配列、または実施例1、5、6、もしくは本明細書中の別のか所の配列に対してメチオニンN末端を含む単離タンパク質、およびP01、P02、P03、P04、P05、P06、もしくはP07のアミノ酸配列、または実施例1、5、6、もしくは本明細書中の別のか所の配列であってN末端のアラニンが存在しない単離タンパク質も提供される。これらの型はそれぞれ未変化のタンパク質のメチオニル化アイソフォームおよび脱アラニンアイソフォームを表す。アセチル化されている単離タンパク質も提供される。アセチル化型にはアセチル化未変化タンパク質、アセチル化メチオニル化タンパク質、およびアセチル化脱アラニンアイソフォームが含まれる。前述の配列は本明細書において開示される他の形体を含み得る。例えば、その配列は、例えば、IL-1RI結合配列のN末端側またはC末端側にヘキサヒスチジン配列などのタグをさらに含み得る。前記配列は、IL-1RI結合配列の安定性または薬物動態を修飾する部分をさらに含み得る。というのも、前記配列は、血清アルブミンおよび／またはFcドメイン、またはそれらの1つ以上のドメイン、例えば、1つ以上の免疫グロブリン定常ドメインまたは1つ以上のアルブミンドメインをさらに含み得るからである。前記タンパク質は本明細書に記載される他の形体を有し得る。いくつかの実施形態では、前記単離タンパク質は、本明細書において開示される配列またはキメラドメインからなる、またはそれらから基本的になる。

【0124】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書に記載される循環置換した型のサイトカインドメイン、例えば表4に記載されるサイトカインドメインを有するドメイン、および／または配列番号3を包含するドメインを含む単離タンパク質を提供する。そのタンパク質は、リンカーで空間をあけてもよい、前記の循環置換型のN末端またはC末端に異種性配列（例えば、Fcドメインまたはアルブミン）をさらに含み得る。前記タンパク質は本明細書に記載される他の形体を有し得る。

【0125】

本開示はまた、本明細書に記載される1つ以上の受容体結合剤（例えば、キメラサイトカインドメインを含むタンパク質）を含む医薬組成物も取り上げる。その組成物は点眼用医薬組成物、局所投与用組成物、または非経口投与用組成物であり得る。

【0126】

別の態様では、本開示は、対象において免疫応答または炎症応答を調節する方法を特色とする。前記の方法は、本明細書に記載される受容体結合剤を含む組成物を、対象における免疫応答または炎症応答を調節するのに有効な量でその対象に投与することを含み得る。

【0127】

別の態様では、本開示は、対象においてIL-1介在性障害を治療する方法を特色とする。前記の方法は、IL-1RIに結合することができるタンパク質、例えば、本明細書に記載される受容体結合剤を含む組成物をその対象に投与することを含む。例えば、その障害は自己免疫障害、例えば、リウマチ性関節炎または若年性慢性関節炎、強皮病、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、ベーチェット症候群、炎症性腸疾患、喘息、血管炎、または乾癬であり得る。前記の障害は凝集体形成を伴う障害、例えば、高尿酸血症、痛風、

糖尿病（非インスリン依存性糖尿病を含む。）、アルツハイマー病、二次反応性アミロイドーシス、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、またはパーキンソン病であり得る。前記の障害はCAPS（CIAS1関連周期性症候群）障害または本明細書に記載される他の障害でもあり得る。

【0128】

別の態様では、本開示は、対象においてIL-1介在性眼疾患を治療する方法を特色とする。前記の方法は、IL-1RIに結合することができるタンパク質、例えば、本明細書に記載される受容体結合剤を含む組成物をその対象に投与することを含み得る。例えば、その組成物は、対象の眼または周辺領域に局所的に投与される点眼用組成物である。1つの実施形態では、その障害はドライアイ障害である。いくつかの実施形態では、対象は全身性自己免疫疾患の症状を示さない。いくつかの実施形態では、対象はシェーグレン症候群を有する。いくつかの実施形態では、対象は移植片対宿主病（GVHD）を有する。さらに他の実施形態では、その障害はぶどう膜炎である。

【0129】

さらに別の態様では、本開示は、IL-1活性を阻害する方法を特色とする。前記の方法は、IL-1RIに結合することができる受容体結合剤をIL-1応答性細胞または対象に接触させることを含む。概して、そのタンパク質は、その細胞または対象に付随するIL-1活性を阻害するのに有効な量で投与される。前記タンパク質を対象から取り出した細胞に生体外で接触させることができる。

【0130】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されるタンパク質をコードする1つ以上の配列、または本明細書（例えば、表5）において開示される核酸、そのような核酸にハイブリダイズする配列、またはそのような核酸に対して80%、82%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一である配列を包含する単離核酸を特色とする。例となるハイブリダイズする配列は少なくとも200ヌクレオチド長、300ヌクレオチド長、400ヌクレオチド長、420ヌクレオチド長、または450ヌクレオチド長、例えば、420～480ヌクレオチド長の間であり得る。その核酸は本明細書において開示される他の形体を含むこともできる。

【0131】

本明細書に記載されるタンパク質およびそれらのポリペプチド鎖をコードする1つ以上の配列を包含する核酸を含む組換え宿主細胞も取り上げられる。受容体結合剤は、その受容体結合剤の発現を可能にする条件下でその宿主細胞を培養すること、および随意で、その受容体結合剤を、例えば、その宿主細胞に関連する細胞または培地から回収することを含む方法により作製され得る。例えば、受容体結合剤は、前記の細胞の溶菌液から精製され得る。精製した受容体結合剤は、例えば、賦形剤、安定化剤、および緩衝液のうちの1つ以上と製剤化され得る。

【0132】

キメラタンパク質ドメインを提供する方法も取り上げられる。前記の方法は、共通の折り畳み構造を有する少なくとも2つの親タンパク質（例えば、第1親タンパク質と第2親タンパク質）を特定し、第1親タンパク質内の少なくとも2つのセグメントの位置を特定し、そして、第1親タンパク質のその2つのセグメント、および残りの位置に主に第2親タンパク質に由来する残基を含むキメラアミノ酸配列をコードする配列を有する核酸を構築することを含む。前記ドメインは、主にβ-シートから構成されるドメイン、または主にα-ヘリックスから構成されるドメイン、またはそのような要素の組合せを有するドメインであり得る。例えば、前記ドメインは、サイトカインの折り畳み構造を有し得る。第1および第2親タンパク質は、相同性、例えば、10～40%の間のアミノ酸同一性に関連し得る。いくつかの実施形態では、第1タンパク質由来のセグメントは単一の折り畳み構造を有するタンパク質ドメイン内に位置し、そして、キメラアミノ酸配列は第1および第2親タンパク質の対応するドメインと同一ではないある形状の折り畳まれたタンパク質ドメイン

を含む。いくつかの実施形態では、その2つの親タンパク質は異なる機能特性を有し、そして、そのキメラドメインはその親タンパク質うちの一方または両方の特質を有し得る。いくつかの実施形態では、キメラドメインは、第1親タンパク質に由来する1つの結合面を有し、第2親タンパク質に由来する別の結合面を有する。

【0133】

本明細書は、部位A、B、C、およびDに関して、IL-1ファミリーサイトカイン内の様々な領域、セグメントおよび残基を参照する。ヒトIL-1βの配列（配列番号1）内のそのような残基、セグメントおよび領域の場所、および対応する位置が下および図1に提供されている。

【0134】

10

部位A. IL-1β内の部位A残基は次を含む：ARG11、SER13、GLN14、GLN15、SER21、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLU128、ASN129およびMET130、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応する残基（本明細書において「部位A残基」と呼称される）。ある特定の状況では、特にIL-1βと関連して、部位A残基ならびにGLN149、およびPHE150、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応する残基を含む「拡張型部位A残基」を参照する。さらに、例えばA1セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の11～36に対応する）およびA2セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の125～131に対応する）、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応するセグメントを含む、図4に示される「部位A領域」を定義することができる。

20

【0135】

部位B. IL-1β内の部位B残基は次を含む：ALA1、PRO2、ARG4、GLN48、GLU51、ASN53、ILE56、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105およびASN108、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応する残基（本明細書において「部位B残基」と呼称される）。ある特定の状況では、特にIL-1βと関連して、部位B残基ならびに図4の部位B領域の外側にあるPHE46およびSER152を含む「拡張型部位B残基」を参照する。さらに、例えばB1セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の1～5に対応する）、B2セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の48～56に対応する）、およびB3セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の92～98に対応する）、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応するセグメントを含む、図4に示される「部位B領域」を定義することができる。

30

【0136】

部位C. IL-1β内の部位C残基は次を含む：ILE104、ILE106、ASN107、LYS109、GLU111、THR137、LYS138、GLY139、GLY140、GLN141、THR144およびASP145、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応する残基（本明細書において「部位C残基」と呼称される）。さらに、例えばC1セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の136～145に対応する）、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応するセグメントを含む、図4に示される「部位C領域」を定義することができる。

40

【0137】

部位D. IL-1β内の部位D残基は次を含む：LEU6、THR9、LYS63、GLU64、LYS65およびASN66、および他のIL1サイトカインファミリーメンバーの対応する残基（本明細書において「部位D残基」と呼称される）。さらに、例えば、D1セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の6～9に対応する）、D2セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の37～41に対応する）、およびD3セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の63～66に対応する）、D4セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の86～91に対応する）、およびD5セグメント（IL-1βにおいて配列番号1の150～153に対応する）、および他のIL1サイトカインファミリ

50

メンバーの対応するセグメントを含む、図4に示される「部位D領域」を定義することができる。

【0138】

図4に示されている配列に対して件のサイトカインのアラインメントを行うことにより、部位A、B、C、およびDの残基および領域の場所をさらに特定することができる。

【0139】

本明細書において参照されるIL-1 β （ヒト）のアミノ酸配列は次のものである：A
P V R S L N C T L R D S Q Q K S L V M S G P Y E L K A L H L Q G Q D M E Q Q V V
F S M S F V Q G E E S N D K I P V A L G L K E K N L Y L S C V L K D D K P T L Q
L E S V D P K N Y P K K K M E K R F V F N K I E I N N K L E F E S A Q F P N W Y
I S T S Q A E N M P V F L G G T K G G Q D I T D F T M Q F V S S（配列番号1）。 10

【0140】

本明細書において参照されるIL-1 α （ヒト）のアミノ酸配列は次のものである：S
A P F S F L S N V K Y N F M R I I K Y E F I L N D A L N Q S I I R A N D Q Y L T
A A A L H N L D E A V K F D M G A Y K S S K D D A K I T V I L R I S K T Q L Y V
T A Q D E D Q P V L L K E M P E I P K T I T G S E T N L L F F W E T H G T K N Y
F T S V A H P N L F I A T K Q D Y W V C L A G G P P S I T D F Q I L E N Q A（配
列番号2）。 20

【0141】

本明細書において参照されるIL-1Ra（ヒト）のアミノ酸配列は次のものである：
R P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V
N L E E K I D V V P I E P H A L F L G I H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L
E A V N I T D L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P T T S F E S A A C P G W F
L C T A M E A D Q P V S L T N M P D E G V M V T K F Y F Q E D（配列番号3）。I
L-1 β 、IL-1 α 、およびIL-1Raという用語は、本明細書において使用される
場合、それぞれの成熟タンパク質を指す。

【0142】

本明細書において参照され、図4において示される β シートは次の表の配列を指す。

【表 1】

表 1

シート	I L - 1 β (配列番号 1)	I L - 1 R a (配列番号 3)	ループ	I L - 1 β (配列番号 1)	I L - 1 R a (配列番号 3)
β 1	6 ~ 1 2	1 1 ~ 1 7	β 1 β 2	1 3 ~ 1 7	1 8 ~ 2 2
β 2	1 8 ~ 2 1	2 3 ~ 2 6	β 2 β 3	2 2 ~ 2 4	2 7 ~ 2 8
β 3	2 5 ~ 2 8	2 9 ~ 3 2	β 3 β 4	2 9 ~ 4 1	3 3 ~ 4 5
β 4	4 2 ~ 4 6	4 6 ~ 5 0	β 4 β 5	4 7 ~ 5 6	5 1 ~ 5 4
β 5	5 7 ~ 6 2	5 5 ~ 6 0	β 5 β 6	6 3 ~ 6 6	6 1 ~ 6 4
β 6	6 7 ~ 7 0	6 5 ~ 6 8	β 6 β 7	7 1 ~ 8 0	6 9 ~ 7 8
β 7	8 1 ~ 8 3	7 9 ~ 8 1	β 7 β 8	8 4 ~ 9 9	8 2 ~ 9 8
β 8	1 0 0 ~ 1 0 5	9 9 ~ 1 0 4	β 8 β 9	1 0 6 ~ 1 0 9	1 0 5 ~ 1 0 8
β 9	1 1 0 ~ 1 1 4	1 0 9 ~ 1 1 3	β 9 β 1 0	1 1 5 ~ 1 2 0	1 1 4 ~ 1 1 9
β 1 0	1 2 1 ~ 1 2 3	1 2 0 ~ 1 2 2	β 1 0 β 1 1	1 2 4 ~ 1 3 0	1 2 3 ~ 1 2 9
β 1 1	1 3 1 ~ 1 3 5	1 3 0 ~ 1 3 4	β 1 1 β 1 2	1 3 6 ~ 1 4 5	1 3 5 ~ 1 4 5
β 1 2	1 4 6 ~ 1 5 0	1 4 6 ~ 1 5 0			

【 0 1 4 3 】

2つの配列の間の「相同性」または「配列同一性」（それらの用語は本明細書において互換的に使用される）の計算は次のように行われる。本明細書において提供されるアラインメントに従ってそれらの配列のアラインメントを行う、または適切なアラインメントが存在しないとき、最適なアラインメントは、B l o s u m 6 2 スコアリング・マトリックスと10のギャップ・ペナルティー、および1のギャップ伸長ペナルティーを用いる E M B O S S パッケージの N e e d l e のアルゴリズムで実施されるように、NeedlemanとWunschのアルゴリズムを使用して最良のスコアとして決定される。Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453、Addison Wesley社出版の D. Sankoff および J. B. Kruskal, (編), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, 1~44頁のKruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison、およびヨーロッパ・バイオインフォマティクス研究所(英国、ケンブリッジ)のEMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000), Rice, P. et al., A., Trends in Genetics 16, (6) pp. 276-277より入手可能なツール、ならびにebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.htmlおよびemboss.open-bio.org/wiki/Appdoc:Needleにおいてオンラインで入手可能なツールを参照のこと。次に、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1配列内の位置が第2配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められているとき、それらの分子はその位置で同一である（本明細書において使用される場合、アミノ酸または核酸の「同一性」はアミノ酸または核酸の「相同性」と同じである）。2つの配列の間の同一性パーセントは、それらの配列が共有する同一の位置の数の関数である。一群の参照配列に対する目的の1つの配列の全体的な同一性を決定するため、目的の配列が、参照配列からなる群のうちのいずれか1つ以上におい

て対応する位置にある少なくとも1つのアミノ酸と同一である場合、その位置を同一であると見なす。セグメント、形体または領域のリストに関して、そのようなリストの全てのメンバーについて同一性を全体として計算して全体の同一性パーセンテージを得ることができる。

【0144】

本明細書は、本明細書において開示される配列に対して少なくとも80%、82%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を提供する。

【0145】

本明細書において使用される場合、「獲得する(acquire)」または「獲得すること(acquiring)」という用語は、物体または値、例えば数値を、その物体または値を「直接的に獲得すること」または「間接的に獲得すること」により所有することを指す。「直接的に獲得すること」は、物体または値を得るためにある過程を実行すること(例えば、合成方法または分析方法を実行すること)を意味する。「間接的に獲得すること」は、別の機関または出所(例えば、物体または値を直接的に獲得する第三者機関)から物体または値を受け取ることを指す。物体の直接的な獲得には、物質、例えば出発物質の物理的変化を含む過程を実行することが含まれる。例となる変化には、2つ以上の出発物質からの物体の作製、物質の剪断または断片化、物質の分離または精製、2つ以上の別々の実体の混合物への混合、共有結合または非共有結合の分断と形成を含む化学反応の実行が含まれる。値の直接的獲得には、試料または別の物質の物理的変化を含む過程を実行すること、例えば、試料、分析物、または試薬などの物質の物理的変化を含む分析過程(時には、本明細書において「物理的分析」と呼称される)の実行、分析方法、例えば、次のうちの1つ以上を含む方法の実行が含まれる: 物質、例えば、分析物、またはその断片もしくは他の派生物の別の物質からの分離または精製; 分析物、またはその断片もしくは他の派生物と別の物質、例えば、緩衝液、溶媒または反応物質との混合; または、分析物、またはその断片もしくは他の派生物の、例えばその分析物の第1原子および第2原子の間の共有結合または非共有結合の分断または形成による構造変化; または、試薬、またはその断片もしくは他の派生物の、例えばその試薬の第1原子および第2原子の間の共有結合または非共有結合の分断または形成による構造変化。

【0146】

本明細書において使用される場合、「～に対応する」という用語は、参照ポリペプチドに関する、目的のポリペプチド中のアミノ酸残基の位置を指定するために用いられる。概して、その位置は本明細書において提供されるアラインメント(例えば、図4)によって特定される位置である。

【0147】

本明細書において使用される場合、「高ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションと洗浄の条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応実行の手引きは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1~6.3.6中に見出すことができ、それは参照により組み込まれる。水性の方法および非水性の方法がその参照文献中に記載されており、どちらも使うことができる。高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件には、 $6 \times \text{SSC}$ 中、約45℃でのハイブリダイゼーションに続いて $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 中での65℃での1回以上の洗浄、または実質的に同じ条件が含まれる。本明細書は、本明細書において開示されるアミノ酸配列をコードする核酸、および本明細書、例えば実施例1において開示される核酸に高ストリンジェント条件下でハイブリダイズする配列を含有する単離核酸を提供する。

【0148】

本明細書において参照される天然タンパク質は、そのようなタンパク質のヒト型、および他の哺乳類種の型もまた特定の包含する。

【0149】

10

20

30

40

50

本明細書において引用される全ての特許文書、特許出願公開文書、および公開参照文献は、あらゆる目的について参照により組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0150】

【図1】 X線結晶解析のデータから決定されたP04の構造の図。IL-1Raに由来する残基の骨格は黒色で示されており、IL-βに由来する残基の骨格は灰色で示されている。

【図2】 ヒトIL-1RIの細胞外ドメインに結合したP05タンパク質のモデルの3つの視像を示す図。P05では、IL-1Ra残基は黒色で示されており、IL-1β残基は白色で示されている。

【図3】 IL-1Ra残基が黒色で示されており、IL-1β残基が白色で示されている、キメラタンパク質のモデルを示す図。モデルは次のタンパク質を示す：P01（図3A）、P03（図3B）、P04（図3C）、P05（図3D）、P07（図3E）、およびP06（図3F）。

【図4】 いくつかのヒトIL-1ファミリーサイトカインのアラインメントを提供する図：IL-1β（配列番号1）、IL-1α（配列番号2）、IL-1Ra（配列番号3）、IL-33（配列番号4）、IL-36Ra（配列番号5）、IL-36α（配列番号6）、IL-36β（配列番号7）、およびIL-36γ（配列番号8）。本明細書の本文において参照されているセグメントがアラインメントの下に特定されている。さらに、b-シートおよびそのようなシート間のループが特定されている。

【図5A】 P01のアミノ酸配列（配列番号17）の表。IL-1βに由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例1も参照されたい。

【図5B】 P02のアミノ酸配列（配列番号18）の表。IL-1βに由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例1も参照されたい。

【図5C】 P03のアミノ酸配列（配列番号19）の表。IL-1βに由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例1も参照されたい。

【図5D】 P04のアミノ酸配列（配列番号20）の表。IL-1βに由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例1も参照されたい。

【図5E】 P05のアミノ酸配列（配列番号21）の表。IL-1βに由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例1も参照されたい。

【図6】 受容体結合剤を発現する大腸菌細胞から精製されたタンパク質からなる例となる試料を示すSDS-PAGEゲルの画像。15kDaと20kDaの分子量マーカーが左に示されている。レーンは次のとおりである：分子量マーカー（レーン1および6）、抽出物（レーン2および7）、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製された物質（レーン3および8）、陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製された物質（レーン4および9）、およびそのような物質の還元試料（レーン5および10）。レーン2～5はP05精製のもの、およびレーン6～10はP04精製のものである。実施例2も参照されたい。

【図7A】 IL-1βと陰性対照であるβ-グルクロニダーゼ（GUS）タンパク質と比べたP06、P07、およびP01タンパク質のシグナル伝達を刺激する能力を示す表および付随の棒グラフ。

【図7B】 様々なIL-1β濃度におけるP01によるIL-1βの拮抗作用を示すグラフ。

【図8A】 0.1ng/mlのIL-1β（ヒト）の存在下におけるP03（ヘキサヒスチジンタグ化）、P04（ヘキサヒスチジンタグ化）、P05（ヘキサヒスチジンタグ化）、およびIL-1RaによるIL-1βの拮抗作用を示すグラフ。

【図8B】 0.1ng/mlのIL-1β（ヒト）の存在下における非タグ化型のP01、P02、P03、P04、およびP05、およびIL-1Raを含有する溶菌液によるIL-1βの拮抗作用を示すグラフであって、各溶菌液中のタンパク質濃度の推定値を使用しているグラフ。

10

20

30

40

50

【図 9】固定化された可溶性 I L - 1 R I に対する次のタンパク質、すなわち、I L - 1 β (図 9 A)、I L - 1 R a (図 9 B)、P 0 4 (図 9 C)、および P 0 5 (図 9 D) の結合キネティクスを示す S P R データのグラフを含む図。

【図 1 0 A】実施例 7 に記載される、I L - 1 R a、I L - 1 β 、P 0 3、P 0 4、および P 0 5 の熱変性を示すグラフ。

【図 1 0 B】図 1 0 A 内のグラフの負の一次導関数を示す図。

【図 1 1 A】ドライアイモデルのマウスについて第 0 日、第 3 日、第 7 日、第 9 日、および第 1 1 日に、2 つの独立した試験の中の眼毎の、角膜のフルオレセイン染色により試験した、平均角膜染色スコア $\pm$ 標準誤差 (S E M) を示す棒グラフ。処置を受けなかった (n = 1 8)、1 0 m g / m l の P 0 5 の処置を受けた (n = 1 9)、またはベヒクルである 1 . 2 5 $\times$ P B S の処置を受けた (n = 2 0) マウスがいた。星印は次のような、ベヒクルと比べた P 0 5 の統計的有意性を示す：* (P < 0 . 0 5) および ** (P < 0 . 0 0 5) 。

【図 1 1 B】ドライアイモデルのマウスについて第 0 日、第 3 日、第 7 日、第 9 日、および第 1 1 日での、眼毎の平均角膜染色スコア $\pm$ 標準誤差 (S E M) を示す、別個の実験に由来するデータを表す棒グラフ。処置を受けなかった (n = 8)、ベヒクルである 1 . 2 5 $\times$ P B S の処置を受けた (n = 8)、1 0 m g / m l のマウス血清アルブミン (M S A) の処置を受けた (n = 8)、または 1 0 m g / m l の P 0 5 の処置を受けた (n = 9) マウスがいた。星印は次のようなマウス血清アルブミンと比べた P 0 5 の統計的有意性を示す：* (P < 0 . 0 5) および *** (P < 0 . 0 0 0 5) 。

【図 1 1 C】図 1 1 B と同じ実験において、レスタシス (Restasis) (登録商標) (0 . 0 5 % サイクロスポリン乳剤) (n = 8) で処置されたマウスのデータを含む棒グラフ。星印は次のようなレスタシス (登録商標) と比べた P 0 5 の統計的有意性を示す：** (P < 0 . 0 0 5) および *** (P < 0 . 0 0 0 5) 。

【図 1 2 A】P 0 4 の X 線結晶解析構造 (黒色) を P 0 4 の構造のコンピュータモデル (灰色) に重ね合わせた構造を示す図。

【図 1 2 B】P 0 4 の K 6 4 と E 3 9 の間の相互作用を例示する図。

【図 1 2 C】P 0 4 の C 末端残基 Q 1 4 9 および S 1 5 2 の K 4 0 および R 9 との間の相互作用を例示する図。

【図 1 3】p H 6 . 0 および 3 5 % B での溶出について、洗浄および溶出プロファイルを示す拡大されたクロマトグラムを含むグラフ。

【図 1 4】p H 6 . 0 および 3 0 % B での溶出について、洗浄および溶出プロファイルを示す拡大されたクロマトグラムを含むグラフ。

【図 1 5】p H 6 . 0 および 3 5 % B での溶出を利用する実験から精製されたタンパク質からなる例となる試料を示す S D S - P A G E ゲルの画像。

【図 1 6】p H 6 . 0 および 3 0 % B での溶出を利用する実験から精製されたタンパク質からなる例となる試料を示す S D S - P A G E ゲルの画像。

【図 1 7 A】2 L と 1 0 0 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【図 1 7 B】2 L と 1 0 0 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【図 1 7 C】2 L と 1 0 0 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【図 1 7 D】2 L と 1 0 0 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0 1 5 1】

I L - 1 ファミリーのサイトカインにはいくつかのメンバーが含まれ、全てが、 β - バレルを形成する 6 つの β ストランドとそれに取り付けられた別の 6 つの β ストランドから構成される共通の b - トレフォイル折畳み構造を有する。ヒト型および他の哺乳類型のこ

10

20

30

40

50

これらのサイトカインの一次構造は公知である。いくつかのヒト IL - 1 ファミリーメンバーからなる例となる構造アラインメントが図 1 に示されている。

【0152】

我々は、とりわけ、IL - 1 の折畳み構造が可塑性に富むことを発見した。特に、異なるメンバーに由来する要素を組み合わせることでサイトカインシグナル伝達を刺激する、またはそれを抑制するタンパク質を提供することができる。これらのタンパク質の例には、例えば、1つのサイトカインに由来する2つ以上のセグメントまたは表面残基を、別のサイトカインまたはサイトカインコンセンサス配列を背景として含み、そうして異なる IL - 1 ファミリーサイトカインに由来する受容体相互作用部位からなる非天然型の組合せを作り出すキメラサイトカインドメインが含まれる。

10

【0153】

IL - 1 ファミリーサイトカインは、部位 A および部位 B と呼ばれる少なくとも2つの主要な受容体相互作用部位を含み得る。部位 A および B は主要なサイトカイン受容体（例えば、IL - 1 R I）との接触に関与する。IL - 1 R a と IL - 1 β の場合には、例えば、その2つのタンパク質は、IL - 1 R a による受容体の接触が部位 A よりも部位 B において少なくなるほど、部位 A および B について実質的に異なる。

【0154】

我々は、1つのサイトカインに由来する部位 A と別のサイトカインに由来する部位 B を含む機能性キメラサイトカインドメインの構築が可能であることを発見した。IL - 1 の折畳み構造の可塑性により、IL - 1 シグナル伝達を抑制する様々なキメラサイトカインドメインの構築が可能になる。

20

【0155】

さらに、IL - 1 ファミリーサイトカインは、部位 C および部位 D と呼ばれる2つの補助的受容体との相互作用部位であって、活性化作用および／または拮抗作用に関わり、そして、サイトカインの、その補助的サイトカイン受容体（例えば、IL - 1 R A c P）と相互作用する能力にとって決定的であり得る相互作用部位を含み得る。天然の受容体アンタゴニスト（IL - 1 R a など）に由来する部位 C 残基および／または部位 D 残基を含むことにより、拮抗特性が付与され得る。1つ以上の IL - 1 アゴニスト（例えば、IL - 1 β と IL - 1 α ）および／または1つの IL - 1 受容体アンタゴニスト（例えば、IL - 1 R a）に由来する部位 A および B の一方または両方、および1つの IL - 1 受容体アンタゴニスト（IL - 1 R a など）に由来する部位 C および D の一方または両方を含むキメラサイトカインドメインを構築することができる。したがって、シグナル伝達を抑制し、IL - 1 アゴニストに由来する部位 B 残基を含むキメラサイトカインドメインを作製することができる。

30

【0156】

例となる組合せは下の表 2 でも提供される。

【表 2】

表 2

	A	B	C	D
1.	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 R a	I L - 1 β または 1 α
2.	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 R a
3.	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 R a	I L - 1 R a

10

4.	I L - 1 R a	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 R a	I L - 1 β または 1 α
5.	I L - 1 R a	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 R a
6.	I L - 1 R a	I L - 1 β または 1 α	I L - 1 R a	I L - 1 R a

【0157】

起源配列は、特定されたサイトカインドメインについてヒト配列と同一であり得る、または、それらの起源配列は、別々の領域についてそれぞれヒト配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれより多い割合で同一であるように、例えば、それぞれの領域に由来する1つ以上のセグメントを含み得るように、そのヒト配列に対して変異を含有し得る。

20

【0158】

部位A残基と部位B残基の供給源は、主要受容体への親和性を最大にするように選択され得る。例えば、I L - 1 R I に結合するため、部位A残基はI L - 1 R a に由来し得、部位B残基はI L - 1 β に由来し得る。

【0159】

キメラサイトカインドメインは、 10^{-8} 未満、 10^{-9} 未満、または 10^{-10} 未満の K_D 、例えば、同じ条件下で天然受容体リガンド（例えば、I L - 1 β 、I L - 1 α 、またはI L - 1 R a）の10倍以内または100倍以内の K_D で、または同じ条件下で天然リガンド（例えば、I L - 1 β 、I L - 1 α 、またはI L - 1 R a）の K_D 未満の K_D でI L - 1 ファミリー受容体、例えば、ヒトI L - 1 R I に結合する能力を有し得る。さらに、ある特定の実施形態では、そのキメラサイトカインドメインは、その親サイトカインドメインのうちの少なくとも1つよりも低い K_D で、それより速い K_{on} で、またはそれより遅い K_{off} で結合する。

30

【0160】

I L - 1 ファミリー受容体に結合し、そして、受容体シグナル伝達を阻害するキメラサイトカインドメインは、下で説明するように、I L - 1 ファミリーサイトカインシグナル伝達が介在する障害を治療するための受容体結合剤として使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、そのキメラサイトカインドメインはI L - 1 R I に結合し、そして、I L - 1 シグナル伝達を抑制する。例えば、それは100 nM未満、10 nM未満、1 nM未満、0.6 nM未満、または0.3 nM未満の IC_{50} を有する。

40

【0161】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、第1 I L - 1 ファミリーサイトカインドメインに対して少なくとも40%、45%、または50%同一であり得るが、完全に同一ではなく、例えば、95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満同一である。同時に、前記サイトカインドメインは、第2 I L - 1 ファミリーサイトカインドメインに対して少なくとも40%、45%、または50%同一でもあり得るが、完全に同一ではなく、例えば、95%未満、90%未満、85%未満、または80%未満同一

50

である。第1および第2 IL-1ファミリーサイトカインドメインは互いに対して50%未満同一であり得る。例えば、第1 IL-1ファミリーサイトカインドメインはアゴニスト（例えば、IL-1βまたはIL-1α）であり得、一方、第2 IL-1ファミリーサイトカインドメインは受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra）であり得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメイン内の位置の少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、98%、99%、または100%が、それぞれのそのような位置で、そこに存在するアミノ酸が第1 IL-1ファミリーサイトカインドメインと同一であるか、第2 IL-1ファミリーサイトカインドメインと同一である（または、特定の位置で第1および第2 IL-1ファミリーサイトカインが同一である場合、両方と同一である）という性質を有する。前記サイトカインドメイン内のアミノ酸位置の100%がこの性質を有する場合、前記ドメインは2つのサイトカインからなる完全なキメラである。キメラサイトカインドメインはまた、2つより多くのサイトカインから作製され得、その親サイトカインに対して変異を有することもできる（例えば、1つ以上の特定の位置で、そこに存在するアミノ酸が、その親サイトカインのそれぞれにある対応するアミノ酸と異なる）。

【0163】

サイトカインドメインは、様々なIL-1サイトカインドメインに由来する部位A残基、部位B残基、部位C残基、および部位D残基を有することができ、そして同様に、様々なIL-1サイトカインドメインに由来する部位A領域、部位B領域、部位C領域、および部位D領域を有することができる。

【0164】

部位A. 例えば、ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、上で特定された部位A残基のうちの少なくとも5個、10個、12個、15個、16個、17個、もしくは18個で、または上で特定された拡張型部位A残基のうちの少なくとも5個、10個、12個、15個、16個、17個、18個、19個、もしくは20個で、またはそのような残基の保存的置換で、またはそのような残基の少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、95%、もしくは100%で、受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra）またはアゴニストに由来する残基を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra）またはアゴニスト（例えば、IL-1βまたはIL-1α）内のセグメントA1、A2、またはA1+A2に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である残基を含む。

【0165】

ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、本明細書において特定される部位A残基のうちの少なくとも5個、10個、12個、15個、16個、17個、もしくは18個で、または上で特定された拡張型部位A残基のうちの少なくとも5個、10個、12個、15個、16個、17個、もしくは18個で、またはそのような残基の保存的置換で、またはそのような残基の少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、95%、もしくは100%でIL-1アゴニスト（例えば、IL-1β残基）に対して同一である残基を含む。

【0166】

部位B. ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、本明細書において特定される部位B残基のうちの少なくとも2個、3個、5個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、もしくは15個で、またはそのような残基の保存的置換で、またはそのような残基の少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、95%、もしくは100%でIL-1アゴニスト（例えば、IL-1β残基またはIL-1α残基）に対して同一である残基を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、IL-1サイトカインアゴニスト（例えば、IL-1βまたはIL-1α）内のセグメントB1、B2、B3、B1+B2、B1+B3、B2+B3、またはB1+B2+B3に

対して少なくとも70%、75%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、または100%同一である残基を含む。

【0167】

部位C. ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、本明細書において特定される部位C残基のうちの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、もしくは12個で、そのような残基の保存的置換で、またはそのような残基の少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、もしくは100%で受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra残基）に対して同一である残基を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra）内のセグメントC1に対して少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、または100%同一である残基を含む。

10

【0168】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、例えば、配列番号1のTHR137に対応する位置に疎水性アミノ酸（例えば、メチオニンまたはイソロイシン）、または配列番号1のGLN141に対応する位置に疎水性アミノ酸、例えば、脂肪族アミノ酸（例えば、バリンまたはイソロイシン）、および配列番号1のASP145に対応する位置に非酸性アミノ酸、例えば塩基性アミノ酸（例えば、リシンまたはアルギニン）、および他のIL-1サイトカインにおいてそれらに対応する位置にあるそのような残基のうちの1つ以上を含み得る。Asp145は、IL-1RAcPの動員に重要であることが証拠により示されており、したがって、非酸性残基への変異がアゴニスト活性を妨害し、そして、拮抗特性を付与するためにその変異を用いることができる。したがって、ある特定の実施形態では、塩基性アミノ酸（例えば、リシンまたはアルギニン）または疎水性アミノ酸などの非酸性アミノ酸は、配列番号1のASP145に対応する場所に位置する。

20

【0169】

部位D. ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、本明細書において特定される部位D残基のうちの少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、もしくは6個で、またはそのような残基の保存的置換で、またはそのような残基の少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、95%、もしくは100%で受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra残基）に対して同一である残基を含む。いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは、受容体アンタゴニスト（例えば、IL-1Ra）内のセグメントD1、D2、D3、D4、D5、D1+D2、D1+D2+D3、およびそれらの組合せに対して少なくとも50%、65%、75%、80%、90%、95%、または100%同一である残基を含む。

30

【0170】

IL-1β内のいくつかの残基、例えば、ALA1、PRO2、VAL3、ARG4、LEU6、ARG11、SER13、GLN14、GLN15、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLN38、GLN39、PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56、PRO57、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105、ASN108、ALA127、GLU128、ASN129、MET130、GLN141、GLN149、PHE150、およびSER152はIL-1RIの近くでそれと接触する、またはIL-1RIの近くに位置する。上で記述した部位の指定に加えて、これらの残基は2つの集合、すなわち、集合1および集合2に分類され得る。

40

【0171】

IL-1β内の例となる集合1残基は次を含む：ARG11、SER13、GLN14、GLN15、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLN38、GLN39、ALA127、GLU128、ASN129、MET130およびGLN141、および他のIL-1サイトカインファミリーメンバー内の対応する残基。拡張型集合1残基には相

50

相互作用集合1残基および1ITB構造内で前述の残基と4オングストローム以内にある残基が含まれる。IL-1 β 内の例となる集合2残基は次を含む：ALA1、PRO2、VAL3、ARG4、LEU6、PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56、PRO57、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105、ASN108、GLN149、PHE150およびSER152、および他のIL-1サイトカインファミリーメンバー内の対応する残基。拡張型集合2残基には、相互作用集合2残基および1ITB構造内で前述の残基と4オングストローム以内にある残基が含まれる。ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、上で特定された集合1残基のうちの少なくとも15個、16個、17個、18個、19個、20個、または21個でIL-1 β 残基を含む。ある特定の実施形態では、サイトカインドメインは、上で特定された集合2残基のうちの少なくとも15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、または22個でIL-1 β 残基を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインドメインは、拡張型集合1残基のうちの少なくとも15個、16個、17個、18個、19個、20個、または21個でIL-1 β 残基を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインドメインは、拡張型集合2残基のうちの少なくとも15個、16個、17個、18個、19個、20個、または21個でIL-1 β 残基を含む。

10

【0172】

受容体結合剤として使用され得る他の変異体には、2つ以上のIL-1サイトカインファミリーメンバーに由来する配列を有するタンパク質が含まれる。そのような変異体の例には、IL-1 β とIL-1Raに基づくキメラドメインが含まれる。例えば、その変異体は、IL-1Raの集合1に由来する（例えば、IL-1Raに由来する全ての集合1残基）1つ以上のアミノ酸残基、およびIL-1 β の集合2に由来する1つ以上のアミノ酸残基（例えば、IL-1 β に由来する全ての集合2残基）を含み得る。

20

【0173】

例となるキメラタンパク質は、次のアミノ酸位置でIL-1 β と、すなわち、IL-1 β 内のこれらの位置との一致に基づき、ほとんど（例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一である：配列番号1の残基1~8、42~120、および141~153；配列番号1の残基1~6、45~61、86~95、および148~153；ならびに配列番号1の残基1~10、37~125、および131~153。

30

【0174】

残りの残基はIL-1Raとほとんど（例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり得る。例えば、次のアミノ酸位置がIL-1Raとほとんど同一であり得る：配列番号1の残基9~41および121~140；配列番号1の残基7~44、62~85、および96~147；ならびに配列番号1の残基11~36および126~130。

【0175】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインはIL-1 β のアミノ酸位置Gln48~Asn53に加えて少なくとも2か所、4か所、5か所、10か所、または20か所の位置でIL-1 β と同一であり、そして、例えば、前記サイトカインドメインはIL-1 β 以外のサイトカインとほとんど、例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。

40

【0176】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1の1~8番に対応する位置でIL-1 β と同一である少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、または8個の残基を含む。例えば、それは、ALA1、PRO2、VAL3、ARG4、およびLEU6のうちの3つ、4つ、または5つ全てに対応する位置でIL-1 β と同一である残

50

基を含む。

【0177】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1の45～61番に対応する位置でIL-1 β と同一である少なくとも8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、または17個の残基を含む。例えば、それは、PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56、およびPRO57のうちの3つ、4つ、5つ、6つ、7つまたは8つに対応する位置でIL-1 β と同一である残基を含む。

【0178】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1の86～95番に対応する位置でIL-1 β と同一である少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、または10個の残基を含む。例えば、それは、LYS92、LYS93、およびLYS94のうちの1つ、2つ、または3つ全てに対応する位置でIL-1 β と同一である残基を含む。

10

【0179】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1の148～153番に対応する位置でIL-1 β と同一である少なくとも3個、4個、5個、または6個の残基を含む。例えば、それは、GLN149、PHE150、およびSER152のうちの1つ、2つ、または3つ全てに対応する位置でIL-1 β と同一である残基を含む。

【0180】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、IL-1 β 内のTHR147に対応する位置でトレオニンを含まない。例えば、この位置は、チロシンなどの芳香族アミノ酸であり得る。IL-1 β 内のTHR147に対応する位置にあるその芳香族アミノ酸は、いくつかの実施形態において（IL-1 β の番号付に従って）位置11に存在する別の芳香族アミノ酸（例えば、トリプトファン）の近位に位置し得る。

20

【0181】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインはIL-1 β 内のCYS8に対応する位置で芳香族アミノ酸を含まない。例えば、この位置は、フェニルアラニン以外のアミノ酸、または芳香族アミノ酸以外のアミノ酸であり得る。例えば、それは、システイン、バリン、セリン、トレオニンまたはアラニンであり得る。この位置は、他の大残基、特に（IL-1 β の番号付に従って）MET44およびMET148の近位に位置する。位置8、43、および148のうちの3つ全てが大残基ではないことが好ましい。

30

【0182】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号1の30～36番に対応する位置でIL-1Raと同一である少なくとも5個、6個、または7個の残基、例えば、YLQGPNV（配列番号43）と同一である少なくとも5個、6個、または7個の残基を含む。例えば、前記サイトカインドメインは、配列番号1の11～36番に対応する位置でIL-1Raと同一である少なくとも10個、12個、14個、16個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、または26個の残基を含む。前記サイトカインドメインはまた、配列番号1の145番に対応する位置で塩基性残基を含むこともできる。

40

【0183】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、（a）IL-1 β のVal40に対応する位置でグルタミン酸、およびIL-1 β のLys65に対応する位置でリシン；（b）IL-1 β のThr9に対応する位置でアルギニン、およびIL-1 β のGln149に対応する位置でグルタミン；ならびに／または（c）IL-1 β のVal41に対応する位置でリシン、およびIL-1 β のSer152に対応する位置でセリンを含む。

【0184】

前記サイトカインドメインはまた、126～132番に対応する位置でIL-1Raと同一である少なくとも4個、5個、6個、または7個の残基、例えば、MEADQPVS

50

(配列番号 44) と同一である少なくとも 4 個、5 個、6 個、または 7 個の残基も含み得る。

【0185】

ある特定の実施形態では、前記サイトカインドメインは、配列番号 1 の 62～85 番に対応する位置で IL-1 β と同一である少なくとも 10 個、12 個、14 個、16 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、または 24 個の残基を含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、前記サイトカインドメインは次のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上（例えば、4 つ全て）を含む：RSLAFR（配列番号 45）、IDVSFV（配列番号 46）、KKMDKR（配列番号 47）、および KFYMQF（配列番号 48）；次のうちの 1 つ以上（例えば、4 つ全て）：RSLAFR（配列番号 45）、IDVSFV（配列番号 46）、NKLSFE（配列番号 49）、および KFYMQF（配列番号 48）；次のうちの 1 つ以上（例えば、4 つ全て）：RSLAFR（配列番号 45）、EEKFSM（配列番号 50）、RFVFI R（配列番号 51）、および VT KFT M（配列番号 52）；次のうちの 1 つ以上（例えば、4 つ全て）：RSLAFR（配列番号 45）、EEKFSM（配列番号 50）、FESAAC（配列番号 53）、および VT KFT M（配列番号 54）；または次のうちの 1 つ以上（例えば、4 つ全て）：LNCRIW（配列番号 55）、EEKFSM（配列番号 50）、PNWFLC（配列番号 56）、および KFYMQF（配列番号 48）。

【0187】

キメラタンパク質は様々な目的のために使用され得る。例えば、受容体シグナル伝達活性を上昇または低下させるために、受容体を発現している細胞を検出するために、または、キメラタンパク質が結合する細胞またはタンパク質を精製するために、それらのキメラタンパク質を使用することができる。

【0188】

IL-1 β と IL-Ra に基づくキメラサイトカインドメインの具体的な例は、下の実施例 1 において提供され、そして、IL-1 シグナル伝達を抑制する、次の例となるサイトカインドメインを包含する。

【0189】

P01. P01 ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸 Ala12～Val48、Ile60～Val83、および Asp95～Tyr147 に対応する IL-1Ra に由来する 3 つのセグメント、および IL-1 β に由来する残りの 4 つのセグメントを含む。全体として、P01 ドメインは、IL-1 β に由来する 153 アミノ酸のうちの 74 アミノ酸（約 48% 同一性）および IL-1Ra に由来する 119 アミノ酸（約 77% 同一性）を有する。これらのパーセンテージは総計で 100% よりも大きくなる。なぜなら、P01 および本明細書において開示される他の例となるタンパク質の多数のアミノ酸が IL-1 β と IL-1Ra の間で保存されているアミノ酸であり、したがって、それらが IL-1 β と IL-1Ra の両方の同一性パーセンテージに寄与するからである。

【0190】

P02. P02 ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸 Ala12～Val48、Ile60～Val83、および Ser110～Tyr147 に対応する IL-1Ra に由来する 3 つのセグメント、および IL-1 β に由来する残りの 4 つのセグメントを含む。全体として、P02 ドメインは、IL-1 β に由来する 153 アミノ酸のうちの 85 アミノ酸（約 55% 同一性）および IL-1Ra に由来する 108 アミノ酸（約 70% 同一性）を有する。

【0191】

P03. P03 ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸 Ala12～Lys45 および Phe100～Lys145 に対応する IL-1Ra に由来する 2 つのセグメント、および IL-1 β に由来する残りの 3 つのセグメントを含む。全体として、P03 ドメインは、IL-1 β に由来する 153 アミノ酸のうちの 94 アミノ酸（約 61% 同一性）および IL

10

20

30

40

50

- 1 R a に由来する 9 1 アミノ酸 (約 6 4 % 同一性) を有する。

【0192】

P 0 4 . P 0 4 ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸 A l a 1 2 ~ L y s 4 5 および A l a 1 1 4 ~ L y s 1 4 5 に対応する I L - 1 R a に由来する 2 つのセグメント、および I L - 1 β に由来する残りの 3 つのセグメントを含む。全体として、P 0 4 ドメインは、I L - 1 β に由来する 1 5 3 アミノ酸のうちの 1 0 4 アミノ酸 (約 6 8 % 同一性) および I L - 1 R a に由来する 8 9 アミノ酸 (約 5 8 % 同一性) を有する。

【0193】

P 0 5 . P 0 5 ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸 A r g 1 4 ~ L y s 4 5 および P h e 1 2 0 ~ T y r 1 4 7 に対応する I L - 1 R a に由来する 2 つのセグメント、および I L - 1 β に由来する残りの 3 つのセグメントを含む。全体として、P 0 5 ドメインは、I L - 1 β に由来する 1 5 3 アミノ酸のうちの 1 0 8 アミノ酸 (約 7 0 % 同一性) および I L - 1 R a に由来する 8 5 アミノ酸 (約 5 5 % 同一性) を有する。

10

【0194】

他のキメラタンパク質を同様に構築することができる。例えば、I L - 1 α と I L - 1 R a の間でキメラタンパク質をすることができ、例えば、具体的には、ドメインは、上の例のそれぞれについて I L - 1 R a の前記の特定されたセグメントと I L - 1 β よりもむしろ I L - 1 α に由来する対応する残基を組合せて含む。

【0195】

タンパク質の修飾と置換

20

タンパク質配列、例えば本明細書に記載される配列は、例えば、1 つ以上の保存的置換を行うことにより変更され得る。保存的置換を行って機能を保持する、または機能に適度の変化を与えることができる。例となる保存的置換が次の表に記載される。

【表 3】

表 3

原型	例となる置換	さらに特定のな置換
アラニン (A)	バリン、ロイシン、イソロイシン	バリン
アルギニン (R)	リシン、グルタミン、アスパラギン	リシン
アスパラギン (N)	グルタミン、ヒスチジン、リシン、アルギニン	グルタミン
アスパラギン酸 (D)	グルタミン酸	グルタミン酸
システイン (C)	セリン	セリン
グルタミン (Q)	アスパラギン	アスパラギン
グルタミン酸 (E)	アスパラギン酸	アスパラギン酸
グリシン (G)	プロリン、アラニン	アラニン
ヒスチジン (H)	アスパラギン、グルタミン、リシン、アルギニン	アルギニン
イソロイシン (I)	ロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン	ロイシン
ロイシン (L)	ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニン	イソロイシン
リシン (K)	アルギニン、グルタミン、アスパラギン	アルギニン
メチオニン (M)	ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン	ロイシン
フェニルアラニン (F)	ロイシン、バリン、イソロイシン、アラニン、チロシン	ロイシン
プロリン (P)	アラニン	アラニン
セリン (S)	トレオニン	トレオニン
トレオニン (T)	セリン	セリン
トリプトファン (W)	チロシン、フェニルアラニン	チロシン

10

20

30

40

チロシン (Y)	トリプトファン、フェニルアラニン、トレオニン、セリン	フェニルアラニン
バリン (V)	イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、ロイシン、ノルロイシン	アラニン

【0196】

置換は、(a) 置換の近傍の骨格構造、例えば、シートまたはらせん構造、(b) 目的の部位にある分子の電荷または疎水性、または(c) 側鎖の体積および分岐に与えるそれらの置換の効果の可能性に基づいて選択され得る。アミノ酸残基は側鎖の特性に基づいて分類され得る：(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン；(2) 中性親水性：システイン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン；(3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；(4) 塩基性：ヒスチジン、リシン、アルギニン；(5) 骨格構造に影響する残基：グリシン、プロリン；および(6) 芳香族アミノ酸：トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン。

【0197】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーで異なるクラスのメンバーを置換することを含み得る。保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーで同じクラスの別のメンバーを置換することを含み得る。

【0198】

特定の残基の重要性は、アミノ酸の疎水性 (hydropathic) 指標との関係で評価される場合もある。それぞれのアミノ酸には、その疎水性と電荷特性に基づく疎水性指標が割り当てられている：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；トレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リシン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)。疎水性アミノ酸指標とその重要性に関する考察について、例えば、Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131を参照されたい。

【0199】

タンパク質の配列は、オリゴヌクレオチド介在性 (部位特異的) 変異形成 (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331, 1986; Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487, 1987)、カセット式変異形成 (Wells et al., Gene, 34:315, 1985)、制限選択式変異形成 (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London, 317:415, 1986)、およびPCR式変異形成を含むあらゆる方法によって変更され得る。In Vitro Mutagenesis Protocols: 第3版、Braman (編), Humana Press, (2010) ISBN: 1607616513 およびPCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic Engineering, Chen and Janes (編), Humana Press, (2002) ISBN: 0896039730も参照のこと。

【0200】

スキニング・アミノ酸分析を、連続する配列に沿って1つ以上のアミノ酸を評価するために用いることができる。その方法は、領域内の各々のアミノ酸またはほぼ各々のアミノ酸を特定のアミノ酸、例えば、アラニン、セリン、またはバリンなどの比較的小型で中性のアミノ酸に変異させることを含み得る。アラニンはβ炭素を越える側鎖を排除しており、変異体の主鎖の立体構造を変える可能性が低いので、アラニンが選択されるのが通常である (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989)。アラニンは最も一般的なアミノ酸でもあり、そして、タンパク質内部に埋まった位置およびタンパク質表面に露出した位置の両方で頻繁に見いだされる (Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman

10

20

30

40

50

& Co., N.Y.)、Chothia, J. Mol. Biol., 150:1, 1976)。より顕著な変更をおこなうためにスキヤニング過程を適用することができ、例えば、荷電残基を反対の電荷を有する残基に変更することができ、短い側鎖を有する残基を大きい側鎖を有する残基で置換することができる。例えば、アルギニン・スキヤニングは、アラニン・スキヤニングの代わりに、またはアラニン・スキヤニングに加えて用いることができるアプローチである。そのスキヤニングを、領域内の各残基に、または特定の特性を有する残基、例えば、タンパク質の表面もしくはその近くの残基、またはそのタンパク質の表面もしくはその近くにありそのような残基に適用することができる。

【0201】

タンパク質の構造、そのドメインのうちの1つの構造、またはそのタンパク質を含む複合体の構造を、例えば、相同性ベース・モデル化法、エネルギー最小化法、および／または公知の解明済みの構造を使用する他のモデル化法を実行することによりモデル化することができる。そのような方法には、サンディエゴにあるAccelrys Software社が2010年に公開したAccelrys Software社 Discovery Studio (登録商標)、リリース3.0、AMBER (商標) モデリング・ソフトウェア (Case et al. (2005) J. Computat. Chem. 26, 1668-1688 およびCase et al. (2010), AMBER 11, カリフォルニア州立大学サンフランシスコ校、米国カリフォルニア州) およびCHARMM (商標) モデリング・ソフトウェア (Molecular Simulations社) が含まれる。Baker and Sali, Science 294(5540):93-6, 2001も広く参照されたい。構造を直接的に、例えば、X線結晶構造解析および／またはNMRスペクトル分析を用いて決定することもできる。

【0202】

IL-1ファミリーサイトカインの構造について説明する例となるPDB構造には1IL1B、1IL1R、1IL1RA、1IL1TB、2IL1B、2IL1A、2KLL、4IL1B、5IL1B、6IL1B、7IL1B、8IL1B、9IL1B、および1MD6が含まれる (米国ニュージャージー州ピスカタウェイにあるRCSB-ラトガース共同研究機構から、および米国国立医学図書館 (米国、メリーランド州、ベセスダ) からオンラインによりpdb.orgで入手可能である)。例えば、IL-1 β のみの構造および受容体IL-1RIとの複合体での構造が解明されている。例えば、Finzel et al. (1989) J. Mol. Biol. 209: 779-791、PDB 1IL1TB、およびVigers et al. (1997) Nature 386: 190-194を参照のこと。IL-1RIが付いたIL-1Raの構造も解明されている。例えば、PDB 1IL1RAおよびSchreuder et al., (1997) Nature 386: 194-200を参照のこと。

【0203】

相同性モデル化法を (複数の) 配列のアラインメントにより、例えば、基本的局所アラインメント検索ツール (BLAST)、PSI-BLAST、PHI-BLAST、WU-BLAST-2、および／またはMEGABLASTなどのコンピュータソフトウェアを用いて支援することができる。Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410、Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266, 460-480、およびKarlin et al., 1993, PNAS USA 90, 5873-5787を参照のこと。巨大分子 (アミノ酸配列および核酸配列) のアラインメントを行うためのさらなるアルゴリズムには、FASTA (Pearson, 1995, Protein Science 4, 1145-1160)、Clustal W (Higgin et al., 1996, Methods Enzymol. 266, 383-402)、DnClustal (Thompson et al., 2000, Nucl. Acids Res. 28, 2910-2926)、およびMolecular Operating Environment (Chemical Computing Group, Montreal, Quebec Canada H3A 2R7) が含まれる。さらに、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージのALIGNプログラム (バージョン2.0) に組み込まれているMyersとMillerのアルゴリズム (Myers & Miller, CABIOS 4, 11-17, 1988) を用いることができる。

【0204】

IL-1 β とIL-1Raのコンセンサス配列を、その2つの配列を比較し、そして、同一である残基または高度に保存されている残基を特定することにより得ることができる

。本明細書に記載されるキメラサイトカインドメインは、そのような同一である残基または高度に保存されている残基のうちの少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、または100%を有し得る。例となるコンセンサス配列は、D X X Q K X _{ 8 ~ 9 } L - A X X L Q G X _{ 1 8 ~ 2 8 } L G X _{ 7 } L S C V X X X D X X X L Q L E X V X _{ 8 ~ 9 } K X X K R F X F X _{ 1 0 } F E S A X X P X W X X X T X X X X X X P V X L X _{ 5 ~ 6 } G X X X T X F X X Q（配列番号57）であり、その配列でXは独立して任意のアミノ酸であり、そして、下付きの数または範囲はそのアミノ酸の出現数である。本明細書に記載されるキメラサイトカインドメインは、そのコンセンサス配列（その配列の中でX残基は同一性の対象として計数しない）に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、または100%の同一性を有し得る。他のコンセンサス配列は、

10

【0205】

I L - 1 サイトカインファミリーメンバーのさらなる変異体は、ディスプレイ・ベースの系または他のライブラリー・ベースのスクリーニングを用いて作製および評価され得る。例えば、前記タンパク質変異体は、呈示または発現させられ、そして、I L - 1 サイトカインファミリーメンバーの受容体に結合する能力について評価され得る。例えば、I L - 1 β、I L - 1 R α、または本明細書に記載されるサイトカインドメインの変異体はI L - 1 R I の可溶性細胞外ドメインに結合する能力について評価され得る。ディスプレイ・ベースの系についての一般的な説明には次のものが含まれる：細胞ディスプレイについては、Chao et al. Nat Protoc. 2006;1(2):755-68、Colby et al. Methods Enzymol. 2004;388:348-58、Boder et al., Methods Enzymol. 2000;328:430-44)、ファージディスプレイについては、（例えば、Viti et al., Methods Enzymol. 2000;326:480-505およびSmith (1985) Science 228:1315-1317)、およびリボソームディスプレイについては（例えば、Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022 および Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92、Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328:404-30、および Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-3。

20

【0206】

多くの実施形態が本明細書においてヒト I L - 1 サイトカイン配列を親ドメインとして用いて例示されているが、他の配列を使用することができる。例えば、他の種に由来する多数の他の I L - 1 サイトカインが知られており、利用可能であり、そして、E n t r e z（メリーランド州、ベセスダの米国国立医学図書館）およびE B I - E M B L（英国、ケンブリッジシャー、ヒンクストン）などの公立のデータベースにおいて見つけ出すことができる。U N I P R O T データベースからのそのような配列の例（UniProt.orgで利用可能であり、そして、The UniProt Consortium, Nucleic Acids Res. D142-D148 (2010)を参照のこと）には次のものが含まれる：

30

【表 4】

タンパク質	受託番号
I L - 1 α	P 0 1 5 8 3、P 0 1 5 8 2、P 1 6 5 9 8、P 0 8 8 3 1、Q 2 8 3 8 5、Q 2 8 5 7 9、O 4 6 6 1 2、P 4 8 0 8 9、P 1 8 4 3 0、P 0 4 8 2 2、P 4 6 6 4 7、O 4 6 6 1 3、Q 3 H W U 1、P 7 9 1 6 1、Q 6 0 4 8 0、P 7 9 3 4 0
I L - 1 β	P 0 1 5 8 4、P 1 0 7 4 9、Q 2 8 3 8 6、P 0 9 4 2 8、P 1 4 6 2 8、P 2 1 6 2 1、Q 6 3 2 6 4、P 4 1 6 8 7、P 4 8 0 9 0、Q 9 Y G D 3、P 2 6 8 8 9、Q 2 M H 0 7、Q 2 8 2 9 2、Q 9 W V G 1、P 4 6 6 4 8、P 7 9 1 8 2、P 5 1 4 9 3、Q 8 6 5 X 8
I L - 1 R a	P 1 8 5 1 0、P 2 5 0 8 5、O 1 8 9 9 9、P 2 6 8 9 0、P 2 5 0 8 6、Q 9 G M Z 4、Q 9 B E H 0、O 7 7 4 8 2、Q 8 6 6 R 8、Q 2 9 0 5 6
I L - 1 R I	Q 0 2 9 5 5、P 1 4 7 7 8、P 1 3 5 0 4
I L - 1 R A c P	Q 9 N P H 3、Q 6 1 7 3 0、P 5 9 8 2 2、Q 6 3 6 2 1

10

20

【0207】

本明細書に記載されるサイトカインドメインは、I L - 1 R I に結合することができる変異体サイトカインドメインに存在する置換を含むこともできる。例えば、配列番号1の位置15（配列番号3の位置20に対応する）はメチオニンまたはアスパラギンでありうる。配列番号1の位置30（配列番号3の位置34に対応する）はグリシン、ヒスチジン、トリプトファン、またはメチオニンであり得る。

30

【0208】

I L - 1 β と I L - 1 R a のさらなる例となる変異体には、Boraschi et al. (1996) *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 1, d270-308、Evans et al., *J. Biol. Chem.*, 270:11477 (1995) および Greenfeder et al., *J. Biol. Chem.*, 270:22460 (1995) に記載される変異体が含まれる。例えば、I L - 1 β の変異体には R 1 1 G、R 1 1 A、Q 1 5 H、E 1 0 5 G、および T 1 4 7 G が含まれる。例えば、Evans et al. を参照のこと。I L - 1 R a の変異体には W 1 6 Y、Q 2 0 M、Q 2 0 N、Y 3 4 G、Y 3 4 H、Y 3 4 W、Y 3 4 M、Y 1 4 7 G、Y 1 4 7 H、Y 1 4 7 M、K 1 4 5 D、H 5 4 P、V 1 8 S、T 1 0 8 K、C 1 1 6 F、C 1 2 2 S、C 1 2 2 A、Y 1 4 7 G、H 5 4 P、H 5 4 I、ならびに Evans et al. および Greenfeder et al., *J. Biol. Chem.*, 270:22460 (1995) 中の他の変異体が含まれる。サイトカインドメインは、前述の位置のうちの1つで I L - 1 R a と同一である残基を含み得る。サイトカインドメインはまた、前述の変異のうちの1つと異なる残基に対応する位置で含むこともできる。

40

【0209】

さらに、I L - 1 ファミリーサイトカインは、1つ以上の不對システイン残基を含み得る。1つ以上、例えば、2つ、3つ、または全てのそのような不對システイン残基は変異形成されて別のアミノ酸、例えば、アラニンまたはセリンなどの非荷電アミノ酸になり得る。例えば、P 0 1 は配列番号17の位置67、70、116、および122にシステインを含む。1つ、2つ、3つ、または4つ全てのそのようなシステインは別のアミノ酸、

50

例えば、アラニンまたはセリンなどの非荷電アミノ酸で置換され得る。P 0 2 は配列番号 1 8 の位置 6 7、7 0、1 1 6、および 1 2 2 にシステインを含む。1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つ全てのそのようなシステインは別のアミノ酸、例えば、アラニンまたはセリンなどの非荷電アミノ酸で置換され得る。P 0 3 は配列番号 1 9 の位置 7 0、1 1 6、および 1 2 2 にシステインを含む。1 つ、2 つ、または 3 つ全てのそのようなシステインは別のアミノ酸、例えば、アラニンまたはセリンなどの非荷電アミノ酸で置換され得る。P 0 4 は配列番号 2 0 の位置 7 0、1 1 6、および 1 2 2 にシステインを含む。1 つ、2 つ、または 3 つ全てのそのようなシステインは別のアミノ酸、例えば、アラニンまたはセリンなどの非荷電アミノ酸で置換され得る。P 0 5 は配列番号 2 1 の位置 8、7 0、および 1 2 2 にシステインを含む。1 つ、2 つ、または 3 つ全てのそのようなシステインは別のアミノ酸、例えば、アラニンまたはセリンなどの非荷電アミノ酸で置換され得る。

10

【0 2 1 0】

本明細書に記載されるキメラサイトカインドメインを包含する I L - 1 ファミリーサイトカインドメインを循環置換することもできる。例えば、前記ドメインの C 末端セグメントを再配置して、それがもとの N 末端と N 末端セグメント（一般に、C 末端セグメントの切除後にもとのタンパク質の残りの部分を含む）の N 末端側にあるようにすることができる。その 2 つの再配置されたセグメントは（例えば、約 3 アミノ酸～1 0 アミノ酸の間の）リンカーによって分断され得る。概して、置換前の前記ドメイン内の全てのアミノ酸が、順序の他は保持される。いくつかの実施形態では、その置換のための切断点は可動領域内、例えば、b 6～b 7 ループ（例えば、配列番号 3 の 7 1～8 0 番に対応するアミノ酸）または b 7～b 8 ループ（例えば、配列番号 3 の 8 4～9 9 番に対応するアミノ酸）などの可動性ループ内に存在し得る。

20

【0 2 1 1】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される受容体結合剤、例えば、I L - 1 ファミリーサイトカインドメインを含む受容体結合剤は、3 0 k D a 未満、2 5 k D a 未満、2 2 k D a 未満、2 0 k D a 未満、1 9 k D a 未満、1 8 k D a 未満、または約 1 7 k D a 未満の分子量を有する。いくつかの実施形態では、その受容体結合剤は 1 8 k D a 超、1 9 k D a 超、2 0 k D a 超、2 2 k D a 超、2 5 k D a 超、3 0 k D a 超、4 0 k D a 超、4 5 k D a 超、または 5 0 k D a 超の分子量を有する。例えば、その受容体結合剤は、他のポリペプチド、重合性成分または非重合性成分、例えば、薬剤の薬物動態、安定性、免疫原性、および／または分子量を修飾する成分を含み得る。そのタンパク質は他の修飾、例えば、翻訳後修飾または合成による修飾を含み得る。ある特定の実施形態では、前記受容体結合剤は糖鎖修飾を受けていない。他の実施形態では、前記受容体結合剤は少なくとも 1 つの糖鎖修飾を含む。

30

【0 2 1 2】

例えば、本明細書に記載される受容体結合剤は、追加のドメインと形態を含み得る。例えば、受容体結合剤は抗体タンパク質のドメインに、例えば、F c ドメインまたは 1 つ以上の定常ドメイン（例えば、C H 1、C H 2、または C H 3）に直接的または間接的に融合され得る。例えば、前記ドメインはヒトのドメインまたはヒトのドメインの変異体であり得る。F c ドメインまたは 1 つ以上の定常ドメインは受容体結合剤の N 末端側または C 末端側に位置し得る。

40

【0 2 1 3】

F c ドメインを、あらゆる適切な免疫グロブリンから、例えば、ヒト抗体、例えば、I g G 1 サブタイプ、I g G 2 サブタイプ、I g G 3 サブタイプ、または I g G 4 サブタイプ、I g A、I g E、I g D または I g M の抗体などから得ることができる。一例では、その F c ドメインにはおよそ位置 C y s 2 2 6 のアミノ酸残基から、またはおよそ位置 P r o 2 3 0 から F c ドメインのカルボキシル末端までの配列が含まれる。F c ドメインは一般に 2 つの定常ドメインであり C H 2 ドメインと C H 3 ドメインを含み、および随意で C H 4 ドメインを含む。抗体の F c 領域に置換を有し、そして増加した血清半減期を有する抗体は国際公開第 0 0 / 4 2 0 7 2 号、国際公開第 0 2 / 0 6 0 9 1 9 号、Shields et

50

al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)、Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216 (2004)にも記載されている。I g G重鎖内の残基の番号付は、メリーランド州にある米国公衆衛生局国立衛生研究所（1991年）出版の Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版中のE U指標の番号付であって、その中のヒトI g G1 E U抗体の番号付を参照した番号付である。

【0214】

1つの実施形態では、受容体結合剤は、例えば、米国特許第5,739,277号およびGhetie et al., Ann. Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)に記載されるように、インビボ血清半減期を増加させるサルベージ受容体結合エピトープを含む。いくつかの実施形態では、そのエピトープはその受容体結合剤に融合されているFc領域内に含まれる。

10

【0215】

1つの実施形態では、受容体結合剤は血清アルブミン配列、またはFcRn受容体に結合するような配列の一部分、または血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミンに結合する配列を含む。例えば、血清アルブミンに結合するある特定のペプチドは前記の受容体結合剤、例えば、DICLP RWGCLW（配列番号22）という配列と結合し得る。Dennis et al. J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002)も参照されたい。

【0216】

受容体結合剤は修飾されて、その薬剤のサイズおよび安定性を増加させる配列、例えば、国際公開第2008/155134号または国際公開第2009/023270号に記載されている配列を含むことができる。そのような配列は概して生物学的に不活性であり得、例えば、それはIL-1サイトカインファミリーメンバーが介在するシグナル伝達を調節することがない。様々な安定化ポリペプチド配列、例えば、グリシンやセリンに富む配列、ならびにグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンまたはプロリンなどの他のアミノ酸に富む配列を使用することができる。例えば、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%グリシンおよび/またはセリン残基を含むように配列を設計することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質に付加される安定化ポリペプチド配列の合計の長さは少なくとも20アミノ酸、25アミノ酸、35アミノ酸、50アミノ酸、60アミノ酸、70アミノ酸、80アミノ酸、90アミノ酸、100アミノ酸、120アミノ酸、140アミノ酸、160アミノ酸、180アミノ酸、200アミノ酸、250アミノ酸、300アミノ酸、350アミノ酸、400アミノ酸、500アミノ酸、600アミノ酸、700アミノ酸、800アミノ酸、900アミノ酸、または1000アミノ酸もしくは2000アミノ酸よりも長くあり得る。安定化配列は、例えば、生物学的活性が有るポリペプチドに、例えば受容体結合剤のN末端またはC末端に融合され得る。安定化配列の融合により、非修飾型タンパク質と比べてその融合タンパク質の流体力学半径を著しく増加させることができ、その増加は、例えば、超遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィーまたは光分散によって検出され得る。いくつかの実施形態では、安定化配列は次のアミノ酸をほとんど、または全く含有しない：システイン（ジスルフィド形成と酸化を防ぐため）、メチオニン（酸化を防ぐため）、アスパラギンおよびグルタミン（脱アミド化を防ぐため）およびアスパラギン酸。安定化配列を、タンパク質分解性の変質に対する感受性を低下させる傾向があるプロリン残基を含むように設計することができる。

20

30

40

【0217】

結合アッセイ

受容体結合剤とその標的の相互作用を、例えば放射免疫アッセイ、細胞結合アッセイ、および表面プラズモン共鳴（SPR）を含むあらゆる適切なアプローチを用いて分析することができる。放射性ヨウ素化タンパク質競合を用いる例となる細胞結合アッセイがBorachi et al., J. Immunol., 155(10):4719-25 (1995)に記載されている。

【0218】

SPRまたは生体分子相互作用分析（BIA）はリアルタイムで、および、相互作用物のいずれも標識することなく生体分子特異的相互作用を検出することができる。BIAチ

50

ップの結合面での質量の変化（結合事象を示す）によりその表面近傍での光の屈折率の変化（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象）が起こる。その屈折率の変化が検出可能なシグナルを生じ、そのシグナルが生体分子間のリアルタイムの反応の指標として測定される。SPRを用いる方法は、例えば、Raether, 1988, Surface Plasmons, Springer Verlag, Sjolander and Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345, Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705、およびBIAcore International AB社（スウェーデン、ウプサラ）により提供されるオンライン情報源に記載されている。BIAcore（登録商標）システムまたはReichert SR7000DC Dual Channel SPRを使用して、キネティクス、親和性または特異性について、標識を使用することなくリアルタイムで相互作用を比較およびランク付けすることができる。サイトカイン受容体細胞外ドメイン（例えば、IL-1RIの細胞外ドメイン）の受容体結合剤の結合親和性はおよそ生理的な条件、例えば、10 mMのHEPES（pH 7.4）、150 mMのNaCl、3 mMのEDTA、0.005%のツイーン20の下でSPRを用いて測定され得る。SPRに依らない他の方法も、例えば、結合および親和性を測定するために用いられ得る。

10

【0219】

結合アッセイから得られた情報を使用して正確で定量的な平衡解離定数（ K_D ）の測定値、および受容体結合剤の標的への結合についての反応速度論的パラメータ（例えば、 K_{on} および K_{off} ）を提供することができる。そのようなデータを使用して異なるタンパク質、標的および条件を比較することができる。この情報を使用して構造活性相関（SAR）を展開することもできる。例えば、変異体タンパク質の反応速度論的パラメータおよび平衡結合パラメータを参照物質または親タンパク質のパラメータと比較することができる。特定の結合パラメータ、例えば、高親和性および低速 K_{off} と相関する所与の位置での変異体アミノ酸を特定することができる。この情報を（例えば、相同性モデル化法、エネルギー最小化法、またはX線結晶構造解析もしくはNMRによる構造決定を用いる）構造モデル化と組み合わせることができる。

20

【0220】

親和性の評価に使用するタンパク質は、組換え型として作製され得、そして、精製または固定化に適切なタグ、例えば、FLAGタグ、mycタグ、ヘマグルチニンタグ、ヒスチジンタグ、またはFcドメイン融合を含み得る。受容体タンパク質（例えば、IL-1RI、およびIL-1RAcP）の細胞外ドメインを、例えば、細菌細胞または昆虫細胞での発現により、例えば、Sf9細胞でのバキュロウイルス発現を用いて組み換え型として作製することができる。可溶性受容体タンパク質を、例えば、それらのタグに結合する試薬を含むチップ、例えば、Fcドメインまたは他のタグに特異的なIgGで被覆されたチップを使用してBIAcoreシステムに固定化することができる。

30

【0221】

細胞活性アッセイ

受容体結合剤の受容体アンタゴニストとして機能する能力を、例えば、細胞ベースの測定法で評価することができる。例えば、受容体結合剤によるIL-1RI阻害を評価することができる。IL-1活性のいくつかの例となる測定法がBoraschi et al.（上掲）に記載されており、そして、その測定法にはT細胞増殖アッセイ、IL-6産生アッセイおよびIL-8産生アッセイ、およびカルシウム流入阻害が含まれる。

40

【0222】

一例となる測定法では、受容体結合剤のその能力は、ヒト線維芽細胞からのIL-6のIL-1 β 誘導化放出を阻害するその能力について評価される。MRC5細胞におけるIL-1 β 誘導化サイトカイン放出の阻害はIL-1介在性活性をインビボで阻害するその薬剤の能力と相関する。その測定法の詳細はDinarello et al., Current Protocols in Immunology, Ch. 6.2.1-6.2.7, John Wiley and Sons Inc., 2000に記載されている。簡単に説明すると、ヒトMRC5ヒト線維芽細胞（ATCC番号CCL-171、米国、バージニア州、マナサス）をマルチウェルプレート内で集密になるまで培養する。細胞を設定

50

した用量の受容体結合剤および対照で処理する。その後、細胞をその用量設定した薬剤および／または対照の存在下で100 pg/mlのIL-1 β と接触させる。陰性対照細胞にはIL-1 β で刺激を与えない。各群の処理細胞で放出されたIL-6の量を、IL-6 ELISAキット（例えば、BD Pharmingen社、米国、ニュージャージー州、フランクリン・レイクス）を使用して測定する。使用することができる対照には緩衝液のみ、IL-1Ra、およびIL-1 β に対する抗体が含まれる。

【0223】

受容体結合剤の効力をインビボで評価することもできる。例となる測定法はEconomides et al., Nature Med., 9:47-52 (2003)に記載されている。簡単に説明すると、マウスに設定した用量の受容体結合剤および対照を腹腔内注射する。注射から24時間後に、マウスに1 mg/kgの用量で組換えヒトIL-1 β を皮下注射する。IL-1 β の注射から2時間後（IL-6応答のピーク時間）にマウスを殺処理し、そして、血液を採取し、処理して血清を得る。血清IL-6レベルをELISAにより測定する。阻害の割合（％）を実験動物の血清で検出されたIL-6の対照で検出されたIL-6に対する比率に基づいて計算することができる。

【0224】

インビボでのIL-1活性についての他の例となる測定法がBoraschi et al.（上掲）に記載されており、そして、その測定法には食欲低下アッセイ、低血糖血アッセイ、および好中球増加血アッセイが含まれる。

【0225】

作製

受容体結合剤は組換え宿主細胞における発現によって作製され得るが、インビトロ転写と翻訳、および化学合成などの他の方法によっても作製され得る。

【0226】

細胞による発現では、受容体結合剤をコードする1つ以上の核酸（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）をクローニングまたは発現のための複製可能なベクターに挿入することができる。様々なベクターが公開されており、利用可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルスゲノム、ファージミド、ファージゲノム、または他の自律複製性配列であり得る。適切なコード核酸配列を様々な技法によりベクターに挿入することができる。例えば、適切な制限酵素部位を（例えば、PCRを用いて）設計することができる。次いで、制限酵素消化とライゲーションを用いてコード核酸配列を適切な場所に挿入することができる。ベクターの要素は通常、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列のうちの1つ以上を含む。

【0227】

受容体結合剤は単独で組換え技術により作製され得るが、シグナル配列、エピトープまたは精製部分、および標識などの1つ以上の他の成分への融合によっても組換え技術により作製され得る。受容体結合剤はインターロイキン-1ファミリーメンバーのプロドメインを含むことができ、例えば、そのプロドメインはタンパク質分解処理により除去され得る。

【0228】

細菌による発現では、受容体結合剤を、シグナル配列を付けて、またはシグナル配列を付けずに作製することができる。例えば、その受容体結合剤を細胞内で産生することができる、それでその受容体結合剤は封入体に、または可溶性画分に蓄積する。その受容体結合剤を、例えば、原核生物性シグナル配列、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定性エンテロトキシンIIなどに由来する適切なリーダー配列を付加することにより、分泌させることもできる。発現用の例となる細菌性宿主細胞にはあらゆる形質転換可能な大腸菌K-12株（例えば、大腸菌BL21、C600、ATCC23724；大腸菌HB101 NRRLB-11371、ATCC-33694；大腸菌MM294 ATCC-33625；大腸菌W3110 ATCC-27325、および大腸

10

20

30

40

50

菌 B L R (D E 3))、枯草菌 (*B. subtilis*)、シュードモナス属、および他の桿菌の株が含まれる。細菌系で産生されたタンパク質は通常糖鎖修飾されていない。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される受容体結合剤は実質的に糖鎖修飾を含まず、例えば、哺乳類または他の真核細胞の糖鎖修飾を含まない。

【0229】

受容体結合剤を酵母宿主細胞、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、ハンゼヌラ属 (*Hanseula*)、またはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) において発現させることができる。酵母発現では、受容体結合剤を細胞内で産生することもでき、または、例えば、酵母インペルターゼリーダーまたは α 因子リーダー (サッカロマイセス型およびクルイベロマイセス型を含む)、または酸性ホスファターゼリーダー、またはカンジダ・アルビカンズ (*C. albicans*) グルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日に公開された欧州特許第362,179号) を使用して分泌により産生することもできる。哺乳類細胞発現では、同じ種または近縁の種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列ならびにウイルス性分泌リーダーなど、哺乳類シグナル配列を使用して前記タンパク質が分泌するようにすることができる。あるいは、受容体結合剤を、インターロイキン-1ファミリーメンバーのプロドメイン、例えば、I L - 1 α プロドメインまたは I L - 1 β プロドメインを使用して産生することができる。

【0230】

発現ベクターとクローニングベクターの両方が、そのベクターが1つ以上の選択された宿主細胞において複製することを可能にする核酸配列を含有する。そのような配列は様々な細菌、酵母、およびウイルスについてよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 由来の複製起点は大半のグラム陰性細菌にとって適切であり、2 m プラスミド起点は酵母にとって適切であり、そして、様々なウイルス性起点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V) は哺乳類細胞でのクローニングベクターにとって有用である。

【0231】

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常選択遺伝子または選択マーカーを含有する。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、またはテトラサイクリンへの抵抗性を付与するタンパク質をコードし、(b) 栄養要求性欠損を相補するタンパク質 (例えば、サッカロマイセス属における U R A 3 マーカー) をコードし、または (c) 複合培地からは入手できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードし、例えば、その遺伝子は桿菌のための D - アラニンラセマーゼをコードする。様々なマーカー、例えば D H F R または チミジンキナーゼが哺乳類細胞にも利用可能である。D H F R を、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) によって説明されるように、D H F R 活性に欠損を有する細胞株 (例えば、C H O 細胞株) と併せて使用することができ、調製し、そして増殖させることができる。

【0232】

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、受容体結合剤をコードする核酸配列に機能するように結合された、m R N A を合成させるためのプロモーターを含有する。原核生物性宿主との使用に適切な例となるプロモーターには b - ラクタマーゼプロモーターシステムおよびラクトースプロモーターシステム (Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (t r p) プロモーターシステム (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776)、および t a c プロモーターなどのハイブリッドプロモーター (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)) が含まれる。細菌系で使用するためのプロモーターは適切に位置するシャイン・ダルガノ配列を含有することもできる。また、T 7 ポリメラーゼシステムを使用して、T 7 プロモーターの制御下に置かれている核酸コード配列を発現させることもできる。例えば、p E T ベクター (E M D C h e m i c a l s 社、米国、ニュージャージー州、ギブスタウン) および、例えば、E M D C h e m i c a l s 社から入手可能な N o v a g e n 使用者プロトコル T B 0 5 3 および米国特許

代5, 693, 489号に記載されているような宿主細胞を参照のこと。例えば、そのようなベクターをBL21 (DE3)細胞およびBL21 (DE3) pLysS細胞と併用してタンパク質を、例えば、細胞培養物1ml当たり少なくとも0.05mg、0.1mg、または0.3mg作製することができる。使用することができる他の細胞株にはB834のDE3ライソジェン型、BLRのDE3ライソジェン型、HMS174のDE3ライソジェン型、NovaBlueのDE3ライソジェン型が含まれ、それらの細胞株にはpLysSプラスミドを担持する細胞が含まれる。

【0233】

酵母細胞と使用するための例となるプロモーターには3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) または他の解糖系の酵素 (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978))、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸脱炭酸酵素、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、およびピルビン酸キナーゼのためのプロモーターが含まれる。他の例となる酵母プロモーターは誘導可能であり、培養条件により転写が制御されるというさらなる利点を有する。誘導性プロモーターの例にはアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、メタロチオネイン、およびマルトースとガラクトースの利用に重要な酵素のためのプロモーター領域が含まれる。

【0234】

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの受容体結合剤をコードするmRNAの発現は、例えば、ポリオーマウイルス、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス2)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40 (SV40)などのウイルスのゲノムから、異種性哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、および熱ショックプロモーターから得られたプロモーターにより制御され得る。異種性プロモーターシステム、例えばテトラサイクリン応答性プロモーターを使用することもできる。Urlinger, S., et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(14):7963-7968を参照のこと。転写をcisまたはtransに位置するエンハンサー配列によって引き起こすこともできる。例となる哺乳類エンハンサー配列にはグロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリンのためのエンハンサーが含まれる。さらなる例には複製起点の後期側のSV40エンハンサー (100~270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーを受容体結合剤のコード配列の5'側の位置または3'側の位置でベクターに挿入することができるが、プロモーターの5'側の部位に設置することが好ましい。

【0235】

真核生物性宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物の有核細胞)において使用される発現ベクターは転写の終結とmRNAの安定化に必須の配列を含有することもできる。そのような配列は通常真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域および時には3'非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、受容体結合剤をコードするmRNAの非翻訳部分内のポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。発現ベクターは1つ以上のイントロン配列を含んでもよい。

【0236】

受容体結合剤を昆虫細胞、例えば、Sf9細胞またはSF21細胞内で、例えば、pFAST-BAC (商標) システムを使用して発現させることもできる。さらなる例となるバキュロウイルス発現ベクターは米国、カリフォルニア州、カールスバードのInvitrogen、Life Technologies社から入手可能である。受容体結合剤を哺乳類細胞内で発現させることもできる。例えば、哺乳類起源の細胞株を使用することもできる。哺乳類宿主細胞株の例にはサル腎臓細胞のCOS-7株 (ATCC CRL 1

651) (Gluzman et al., Cell 23:175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞 (ATCC CCL163)、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、およびBHK (ATCC CRL10) 細胞株、およびMcMahan et al. (EMBO J. 10: 2821, 1991)によって記載されるアフリカミドリザル腎臓細胞株CV1 (ATCC CCL70) 由来のCV1/EBNA細胞株が含まれる。DNAを哺乳類細胞に導入するために確立された方法が記述されている (Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 1569)。

【0237】

組換え細胞における受容体結合剤の合成への適応に適切なさらに他の方法、ベクター、および宿主細胞はMolecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Sambrook et al. (編)、Cold Spring Harbor Press, (2001) (ISBN: 0879695773)に記述されている。

10

【0238】

受容体結合剤は、一度細胞内で発現すると、培地、封入体、または細胞溶解液から回収され得る。細胞を、凍結融解循環処理、超音波処理、機械的破碎、または細胞誘拐罪 (例えば、界面活性剤) などの物理的手段または化学的手段により破碎することができる。

【0239】

受容体結合剤を細胞溶解液または細胞培地の中で見出すことができる他の細胞タンパク質またはポリペプチドから精製することができる。様々なタンパク質精製の方法を用いることができ、そして、そのような方法は当技術分野において公知であり、例えばDeutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)、およびScopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (2010) (ISBN: 1441928332)に記載されている。例となる精製法には、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ、またはDEAEなどの陽イオン交換樹脂でのクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えば、Sephadex (登録商標) G-75を使用するゲル濾過；IgGなどの混入汚染物質を除去するためのプロテインA-Sepharose (登録商標) カラム；および親和性カラム (例えば、前記タンパク質のエピトプタグ化型に結合する金属キレートカラム、および受容体結合剤と関係が有るどのような精製部分をも結合する様々なリガンドを有するカラム) による精製法が含まれる。精製方法には、2つの異なるイオン交換クロマトグラフィーステップの組合せ、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーとその後の陰イオン交換クロマトグラフィー、またはその逆が含まれ得る。受容体結合剤を、塩および/またはpHの勾配溶出または段階的溶出を含む様々な方法によりイオン交換樹脂から溶出することができる。いくつかの実施形態では、受容体結合剤は精製部分 (例えば、エピトプタグおよび親和性ハンドル) を含む。そのような部分を親和性クロマトグラフィーのために使用することができ、そして随意で、タンパク質分解性の切断により除去することができる。

20

30

【0240】

イオン交換クロマトグラフィーをイオン交換分離技術として使用することもできる。イオン交換クロマトグラフィーは (複数の) 分子の全体の電荷の間の差異に基づいて分子を分離する。イオン交換クロマトグラフィーを用いて未変化型の受容体結合剤を他の型のようなタンパク質から分離することができる。

40

【0241】

陰イオン性置換基または陽イオン性置換基を、クロマトグラフィー用の陰イオン性担体または陽イオン性担体を形成するためにマトリックスに取り付けることができる。陰イオン交換置換基にはジエチルアミノエチル (DEAE) 基、第4級アミノエチル (QAE) 基、および第4級アミン (Q) 基が含まれる。陽イオン性置換基にはカルボキシメチル (CM)、スルホエチル (SE)、スルホプロピル (SP)、ホスフェート (P) およびスルホネート (S) が含まれる。DE23、DE32、DE52、CM-23、CM-32 およびCM-52などのセルロースイオン交換樹脂がWhatman社から入手可能である (英国、ケント州、メードストーン)。Sephadex (登録商標) と他の架橋イオン交換体も知られている。例えば、DEAE-、QAE-、CM- およびSP-Sepha

50

d e x（登録商標）ならびにD E A E -、Q -、C M - およびS - S e p h a r o s e（登録商標）およびS e p h a r o s e（登録商標）F a s t F l o wがP h a r m a c i a A B社から入手可能である。T o y o p e a r l（登録商標）D E A E - 6 5 0 SまたはM、およびT o y o p e a r l（登録商標）C M - 6 5 0 SまたはMなどのD E A EおよびC M誘導体化エチレングリコール-メタクリレート共重合体がT o s o H a a s社（米国、ペンシルバニア州、フィラデルフィア）から入手可能である。

【0242】

陽イオン交換表面は、共有結合した負に帯電したリガンドを有するイオン交換表面であり、そのイオン交換表面は、したがって、表面と接触している溶液の中の陽イオンと交換される遊離陽イオンを有する。例となる表面には、陽イオン交換樹脂、例えば、共有結合した基がカルボキシレートまたはスルホネートである陽イオン交換樹脂が含まれる。市販の陽イオン交換樹脂にはC M C - セルロース、S P - S e p h a d e x（登録商標）およびS P - S e p h a r o s e（登録商標）F a s t F l o w（P h a r m a c i a社）が含まれる。

【0243】

陰イオン交換表面は、共有結合した正に帯電した基、例えば第4級アミノ基を有するイオン交換表面である。例となる陰イオン交換表面は陰イオン交換樹脂、例えばD E A Eセルロース、T M A E、Q A E - S e p h a d e x（登録商標）、F a s t Q S e p h a r o s e（登録商標）（P h a r m a c i a社）およびQ S e p h a r o s e（登録商標）F a s t F l o wである。

【0244】

受容体結合剤のための例となる精製計画には、溶菌緩衝液の中での大腸菌細胞の溶解とそれに続く深層濾過が含まれる。次に、その材料を陽イオン交換クロマトグラフィー（C E X）に供する。次にC E X溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィー（A E X）ステップで陰イオン交換媒体に流す。A E Xの通過画分（F T）を最終精製ステップに供することができる。次に材料を限外濾過／透析濾過により処理して、例えば、その材料を濃縮または脱塩することができる。限外濾過／透析濾過膜は、塩などの低分子量物質を濾液へと通過させつつ、残余分中にタンパク質を保持するように、名目分子量カットオフ（「N M W C O」）に基づいて選択され得る。どのような緩衝性溶液も、または滅菌水を、例えば生成物の所望の最終p Hおよび電気伝導度に応じて、最終緩衝液交換ステップの間に使用することができる。

【0245】

受容体結合剤を、水、P B S、および緩衝溶液を含む様々な溶液の中で貯蔵することができる。例となる緩衝溶液には酢酸ナトリウム（p H 4. 5）、酢酸ナトリウム（p H 4. 7）、酢酸ナトリウム（p H 4. 9）、酢酸ナトリウム（p H 5. 1）、酢酸ナトリウム（p H 5. 3）、酢酸ナトリウム（p H 5. 5）、コハク酸（p H 5. 2）、コハク酸（p H 5. 4）、コハク酸（p H 5. 6）、コハク酸（p H 5. 8）、ヒスチジン（p H 5. 7）、ヒスチジン（p H 6. 0）、ヒスチジン（p H 6. 3）、ヒスチジン6. 6）、リン酸ナトリウム（p H 6. 5）、リン酸ナトリウム（p H 6. 7）、リン酸ナトリウム7. 0）、リン酸ナトリウム（p H 7. 3）、リン酸ナトリウム（p H 7. 7）、イミダゾール（p H 6. 5）、イミダゾール（p H 6. 8）、イミダゾール（p H 7. 2）、トリス（p H 7. 0）、トリス（p H 7. 5）、トリス（p H 7. 7）が含まれる。緩衝性薬剤は、例えば、約1～100 mM、5～50 mM、10～50 mM、または5～25 mMの濃度で存在し得る。その溶液はN a C lなどの塩（例えば、50 mM、150 mM、または250 mM、およびそれらの間の範囲）、アルギニン（例えば、約1%、2%、3%、4%、5%、7. 5%、およびそれらの間の範囲で）、ショ糖（例えば、約1%、2%、3%、4%、5%、7. 5%、8. 5%、10%、15%、およびそれらの間の範囲で）、グリセロール（例えば、約0. 5%、1%、2%、3%、4%、5%、7. 5%、8. 5%、10%、15%、およびそれらの間の範囲で）、および／または界面活性剤、例えばT X - 100、およびツイーン80（ポリソルベート）（例えば、約0. 001

10

20

30

40

50

%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1.0%およびそれらの間の範囲で)をさらに含み得る。

【0246】

受容体結合剤は少なくとも50mg、100mg、500mg、1g、5g、10g、またはそれより多くの量で前記組成物中に存在し得る。

【0247】

分析方法

宿主細胞タンパク質(HCP)は受容体結合因子と異なる調製物中のタンパク質を指し、例えば、調製した受容体結合因子が由来する宿主細胞の内在性タンパク質、典型的には大腸菌タンパク質である。宿主細胞タンパク質は10000ppm、1000ppm、900ppm、800ppm、または700ppm(百万分率)よりも少なく存在することが好ましい。HCPは、例えば、ELISAまたは他の検出方法により検出され得る。例えば、ELISAはHCPに対するポリクローナル抗体を使用することができる。例となるキットがCygus Technologies社から入手可能である(カタログ番号F410;米国、ノースカロライナ州、サウスポート)。別の例となるキットはAlphaScreen技術を使用する(AlphaLISA(登録商標)大腸菌HCPキット、製品番号AL261C/F、Perkin Elmer社、米国、マサチューセッツ州、ウォーザン)。

【0248】

受容体結合剤を含有する材料、または受容体結合剤を含有している可能性がある材料を、例えば、高速液体クロマトグラフィーを用いて評価することができる。例となる分析技術には弱陽イオン交換高速液体クロマトグラフィー(wCEX-HPLC)、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)、逆相液体クロマトグラフィー、ESI-MS、ターボスプレー・イオン化マスマススペクトロメトリー、ナノスプレー・イオン化マスマススペクトロメトリー、サーモスプレー・イオン化マスマススペクトロメトリー、ソニックスプレー・イオン化マスマススペクトロメトリー、SELDI-MSおよびMALDI-MSが含まれる。他の分析技術には光散乱スペクトル測定が含まれる。

【0249】

いくつかの実施形態では、受容体結合剤のN末端領域にはIL-1 β のN末端領域に由来するペプチドと同一である配列、例えば、ペプチドAPVRS(配列番号58)が含まれる。そのようなタンパク質を発現する組換え細胞(特に大腸菌細胞)は未変化のタンパク質ならびに脱アラニンアイソフォーム、アセチル化アイソフォーム、および(例えば、Ala1のN末端側に)追加のメチオニンを有するアイソフォームを含む他のアイソフォームを産生し得る。アミノ酸位置2(N末端残基が位置1にある場合)にプロリンを含む受容体結合剤は、大腸菌のプロテアーゼ、例えば、X-PROに対する切断特異性を有するアミノペプチダーゼPによる切断を受けやすいことがあり得る。この切断によりN末端アミノ酸が除去され得る。例えば、P03、P04、およびP05は位置2にプロリンを有する。未変化型のP03、P04、およびP05は153アミノ酸長であり、そして、アラニンで始まり、一方、脱アラニン種は152アミノ酸長であり、そして、プロリンで始まる。メチオニン化(methonated)アイソフォームは154アミノ酸長であり、そして、メチオニンで始まり、そのメチオニンはAla1のN末端側にある。

【0250】

上で挙げたものなどの分析技術を用いて、未変化型と他の型、例えば、脱アラニン種、アセチル化脱アラニン種またはメチオニル化種との間で区別を付けることができる。例となる分析技術はwCEX-HPLCである。例えば、P05を、下の実施例9に記載されるようにDionex ProPac(登録商標)WCX-10 4 $\times$ 250mmカラム(製品番号054993)を使用して評価することができる。WCX-HPLCのピークをC4逆相(RP)-HPLC接続質量分析により評価することができる。未変性のP05は17700.4Daの理論上の質量を有し、そして、17700.4Daとして検出される。脱アラニン種は17629.4Daとして検出され、それは未変性のP05の質

量よりも71 Da 少ない。その71 Daの質量の減少は1つのアラニン残基の除去に対応する。メチオニル化未変性P05種は17830.80 Daとして検出され、そして、メチル化メチオニル化P05種17845.59 Daで検出可能である。アセチル化型は、例えば、C18逆相高速液体クロマトグラフィー（RP/HPLC）を介したトリプシン分解性ペプチドマッピングにより検出され得る。

【0251】

医薬組成物

受容体結合剤を医薬組成物として製剤することができる。典型的には、その組成物は無菌であり、そして、緩衝剤、薬学的に許容可能な塩、および賦形剤または安定化剤のうちの1つ以上を含む。例えば、その組成物は水性組成物であり得る。本明細書に記載される受容体結合剤を生物学的製剤の標準的な方法に従って製剤することができる。例えば、Gennaro (編), Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472)、Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems、第7版、Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727)、Kibbe (編), Handbook of Pharmaceutical Excipients、第3版、(2000) (ISBN: 091733096X)、Protein formulation and delivery, McNally and Hastedt (編), Informa Health Care (ISBN: 0849379490) (2007)を参照のこと。

【0252】

医薬組成物用の受容体結合剤の純度は通常少なくとも10%、20%、50%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または99.99%であり、そして、その受容体結合剤は通常ヒトタンパク質を含まない。その受容体結合剤は前記組成物中の唯一のタンパク質、または前記組成物中の唯一の活性タンパク質であり得る。その受容体結合剤を1つ以上の他の活性タンパク質、例えば、1つ以上の他の精製活性タンパク質、例えば、関連または非関連のタンパク質と組み合わせることもできる。いくつかの実施形態では、前記組成物は約0.001~10%、例えば、0.001~0.1%、0.01~1%、または0.1%~10%の間の濃度で受容体結合剤を含有し得る。

【0253】

したがって、本明細書は精製型または単離型の本明細書に記載される前記薬剤も取り上げる。「単離された (isolated)」という用語は、物質のもともとの環境（例えば、細胞または材料であって、そこから受容体結合剤が作製される細胞または材料）から取り出されたその物質を指す。医薬組成物は、実質的に発熱性物質を含まず、実質的に核酸を含まず、および/または実質的に細胞性酵素および成分、例えば、ポリメラーゼ、リボソームタンパク質、およびシャペロンタンパク質を含まないことがあり得る。

【0254】

医薬組成物は薬学的に許容可能な担体を含み得る。本明細書において使用される場合、「薬学的に許容可能な担体」には、生理的に適合性があるどのような、および全ての溶媒、分散媒体、被覆材、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。「薬学的に許容可能な塩」は、親化合物の所望の生物活性を保持し、そして、どのような望まれない毒性効果も付与することがない塩（例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと）、例えば、酸付加塩および塩基付加塩を指す。

【0255】

1つの実施形態では、受容体結合剤を1つ以上の賦形剤、例えば、塩化ナトリウム、およびリン酸緩衝剤（例えば、リン酸水素ナトリウム7水和物、リン酸二水素ナトリウム）、およびポリソルベートと共に製剤する。受容体結合剤を、例えば、緩衝溶液中に、例えば、約5~100 mg/ml、5~30 mg/ml、30~50 mg/ml、または50~100 mg/mlの濃度で提供することができ、および、受容体結合剤を2~8℃で貯蔵することができる。医薬組成物は様々な他の形状であることもできる。これらには、例えば、液体剤形、半固体剤形および固体剤形、例えば、液体溶液（例えば、注射可能および点滴可能溶液）、分散体または懸濁液、およびリボソームが含まれる。好ましい形状は目的とする投与法および治療適応に左右され得る。本明細書に記載される薬剤のための組

成物は通常注射可能溶液または点滴可能溶液の形状であり、または局所送達または眼内送達（以下を参照のこと）用である。

【0256】

医薬組成物は通常無菌であり、そして、製造条件および貯蔵条件下で安定である。医薬組成物を、それが投与用の規制基準および工業基準に合っていることを確認するために試験することもできる。その組成物を溶液、マイクロエマルジョン、分散体、リポソーム、または高薬品濃度に適切な他の規則構造として製剤することができる。無菌注射可能溶液を、必要とされる量の本明細書に記載される薬剤を適切な溶媒に、必要に応じて上で列挙した要素のうちの1つ、または組合せと共に混合し、続いて濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散体は、基礎分散媒体および上で列挙したもののうちの必要とされる他の要素を含有する無菌ベヒクルに本明細書に記載される薬剤を投入して混合することにより調製される。無菌注射可能溶液の調製用の無菌粉剤の場合では、好ましい調製方法は、以前に濾過滅菌されたその溶液に由来する本明細書に記載される薬剤およびあらゆる追加の所望の成分からなる粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥である。適切な溶液の流動性は、例えば、レシチンなどの被覆材を使用することにより、分散体の場合は必要とされる粒径を維持することにより、および、界面活性剤を使用することにより維持され得る。注射可能組成物の長期化した吸収を、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアレート塩およびゼラチンを含むことにより図ることができる。

【0257】

例えば、受容体結合剤を重合体、例えば、実質的に非抗原性の重合体、例えば、ポリアルキレンオキシドまたはポリエチレンオキシドと結合させることができる。いくつかの実施形態では、その重合体は受容体結合剤と、例えば、直接的または間接的に共有結合で結合している。適切な重合体は、実質的に重量によって異なる。約200ダルトンから約35,000ダルトンまで（または約1,000～約15,000ダルトン、および2,000～約12,500ダルトン）の範囲にある数平均分子量を有する重合体を使用することができる。例えば、受容体結合剤を水溶性重合体、例えば、親水性ポリビニル重合体、例えば、ポリビニルアルコールまたはポリビニルピロリドンと複合体化することができる。そのような重合体の非限定的なリストにはポリエチレングリコール（PEG）またはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレンオキシドホモ重合体、ポリオキシエチレン化ポリオール、それらの共重合体および、ブロック共重合体の水溶性が維持されることを条件として、それらのブロック共重合体が含まれる。さらなる有用な重合体には、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、およびポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体（プルロニック）などのポリオキシアルキレン；ポリメタクリレート；カルボマー；ラクトース、アミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、デキストラン硫酸、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、または酸性ムコ多糖類、例えば、ヒアルロン酸からなる多糖サブユニットなどのホモ多糖類およびヘテロ多糖類を包含する、単糖であるD-マンノース、D-およびL-ガラクトース、フコース、フルクトース、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルクロン酸、シアル酸、D-ガラクトツロン酸、D-マンヌロン酸（例えば、ポリマンヌロン酸またはアルギン酸）、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、D-グルコースおよびノイラミン酸を含む分岐または非分岐多糖類；ポリソルビトールおよびポリマンニトールなどの糖アルコールの重合体；ヘパリンまたはヘパランが挙げられる。

【0258】

ある特定の実施形態では、受容体結合剤は、化合物を急速な放出から守る担体と共に調製され得る。その受容体結合剤は制御放出性製剤として送達され得、インプラントにより送達され得、またはマイクロカプセル化送達系により送達され得る。例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など、生物分解性、生体適合性重合体を使用することができる。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を広く参照のこと。

10

20

30

40

50

【0259】

投与

受容体結合剤を対象、例えば、ヒト対象に様々な方法、例えば、ボーラス投与としての静脈内投与により、またはある期間に渡る連続点滴により、筋肉内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、滑膜内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、髄腔内、硬膜外の注射、胸骨内注射および点滴により投与することができる。さらに他の投与方法には局所（例えば、皮膚または粘膜性）または吸入（例えば、鼻腔内または肺内）経路が含まれる。多数の適用で、投与経路は静脈内注射または点滴、皮下注射、または筋肉内注射のうちの1つである。

【0260】

受容体結合剤を一定の用量で、またはmg/kg用量で投与することができる。受容体結合剤を静脈内投与（IV）または皮下投与（SC）することができる。受容体結合剤を、例えば、毎日、隔日、2日おきに、3日おきに、または4日おきに、毎週、3週～5週間ごとに、例えば、3週間おきに、または毎月投与することができる。

【0261】

医薬組成物は「治療的有効量」の本明細書に記載される薬剤を含み得る。薬剤の治療的有効量は、個体の疾患の状態、年齢、性別および体重、および個体において所望の応答、例えば、少なくとも1つの障害パラメータの改善、またはその障害の少なくとも1つの症状の改善を誘起するその化合物の能力、（および随意で、投与されている任意のその他の薬剤の効果）などの要因に応じて変化し得る。治療的有効量はまた、前記組成物のどのような有毒効果または有害効果よりも治療上有益な効果の方が上回る量でもある。受容体結合剤は通常治療的有効量で投与される。

【0262】

医薬組成物を、医療装置、例えば、インプラント、点滴ポンプ、皮下注射針、および無針皮下注入装置を使用して投与することができる。その装置は、例えば、医薬組成物を貯蔵するための1つ以上の筐体を含むことができ、そして、単位用量の受容体結合剤および随意で第二剤を送達するように構成され得る。その用量は一定の用量、すなわち、治療される対象にとって単位投与量として適切な物理的に別個の単位であり得、各単位は、所望の治療効果をもたらすために計算された所定の量の受容体結合剤を医薬担体および随意で別の薬剤と併せて含有し得る。

【0263】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される障害を治療するため、受容体結合剤を、その障害の重症度を反映する少なくとも1つの指標で持続的改善を誘導するのに充分である量および時間でその障害を有する対象に投与することができる。その対象が1～4週間を隔てた少なくとも2つの機会に改善を示す場合、その改善は「持続的」と見なされる。改善の程度を徴候または症状に基づいて決定することができ、そして、改善の程度は、クオリティ・オブ・ライフについての質問書など、その対象に対して与えられる質問書を用い得ることもできる。

【0264】

疾患の程度を反映する様々な指標が、治療の量と時間が充分であるか決定するために評価され得る。選択した指標または（複数の）指標のベースライン値は、受容体結合剤の最初の用量の投与前の対象を検査することにより確定される。最初の用量の投与の約60日以内にベースライン検査を行うことが好ましい。

【0265】

改善は、対象が、選択した指標または（複数の）指標についてのベースラインよりも上の改善を表すまで受容体結合剤の用量を繰り返し投与することにより引き起こされ得る。慢性の病気の治療では、改善の程度は、少なくとも一か月、またはそれより長い期間、例えば、1か月間、2か月間、または3か月間、またはそれより長い期間、または無期限で投与を繰り返すことにより得られ得る。急性の病気の治療では、前記薬剤を1～6週間の期間、またはたったの一用量投与することができる。

【0266】

1つ以上の指標によって、治療後の疾患の程度が改善されたように見えることがあるが、同じレベルまたは低減した用量もしくは頻度で治療を無期限に続けてもよい。治療を、例えば、改善または症状が消えた時点で中断することもできる。治療をいったん低減または中断して、症状が再び現れた場合、治療を再開することができる。

【0267】

治療

受容体結合剤、例えば、IL-1RIに結合し、そして、IL-1シグナル伝達を抑制する受容体結合剤を使用して「IL-1介在性障害」を治療することができる。IL-1介在性障害には、(i)少なくとも部分的にはIL-1の受容体活性化作用により引き起こされ、(ii)IL-1シグナル伝達成分（例えば、IL-1 α 、IL-1 β 、またはIL-1RI）のレベルもしくは活性の上昇、またはIL-1シグナル伝達の上昇を伴い、および／または(iii)IL-1活性を低下させることにより改善されるあらゆる疾患または医学的状態が含まれる。IL-1介在性障害には、自己免疫障害および炎症性障害を含む、急性および慢性障害が含まれる。IL-1介在性障害には全身性および非全身性障害が含まれる。IL-1 α とIL-1 β は、感染応答ならびにリウマチ性関節炎を含む炎症性疾患に関連がある強力な炎症促進性サイトカインであるということはよく確証されている。IL-1産生の増加がいくつかの自己免疫障害、虚血、および様々な癌を有する患者で観察されており、したがって、IL-1をこれらの疾患および関連の疾患と関連づける。

【0268】

Sims and Smith, The IL-1 family: regulators of immunity, Nature Reviews Immunology, doi:10.1038/nri2691 (2010)も広く参照されたい。

【0269】

「治療する(treat)」という用語は、対象、例えば、患者への本明細書に記載される薬剤の投与であって、統計学的に有意な程度にまで、または当業者が検出可能な程度にまで、障害、例えば、本明細書に記載される障害に伴う健康状態、症状またはパラメータを改善するために有効な、または、障害の進行を防ぐために有効な量、方式、および／または方法での投与を指す。その治療は、障害、障害の症状、または障害になりやすい傾向を治療する、治癒する、緩和する、軽減する、変える、修正する、改良する、一時的にやわらげる、改善する、または影響を及ぼすことを意図したものであり得る。有効な量、方式または方法は対象に応じて異なることがあり得、そして、対象に合わせてそれらを適合させることができる。例となる対象にはヒト、霊長類、および他の非ヒト哺乳類動物が含まれる。受容体結合剤を、障害またはその症状の発生のリスクを減少させるために予防的に投与することもできる。

【0270】

IL-1介在性障害は自己免疫障害でありうる。IL-1介在性自己免疫障害の例にはリウマチ性関節炎、強直性脊椎炎、ベーチェット症候群、炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎を含む）、喘息、乾癬、I型糖尿病、および本明細書において特定される他の障害が含まれる。本明細書に記載される受容体結合剤を、そのようなIL-1介在性自己免疫障害を有する、またはそのリスクがある対象に投与することができる。IL-1介在性障害は、下で説明されるものなどの炎症性障害であり得る。本明細書に記載される受容体結合剤を、そのようなIL-1介在性炎症性障害を有する、またはそのリスクがある対象に投与することができる。

【0271】

例となるIL-1介在性障害は次の物を含む。

【0272】

リウマチ性関節炎および関連の関節炎疹

受容体結合剤を、リウマチ性関節炎を有する、またはそのリスクがある対象を治療するために使用することができる。リウマチ性関節炎(RA)は、関節部の滑膜を冒し、そし

て、関節軟骨を損傷する慢性全身性自己免疫炎症性疾患である。R A の発病はTリンパ球依存性であり、そして、リウマチ因子として知られる自己抗体の産生を含み得る。リウマチ因子と抗原の複合体が関節滑液および血液中で形成し、蓄積することができ、それは、リンパ球、好中球、および単球の滑膜への浸潤を含む。対称的なパターンで関節が冒されることが典型的であるが、例えば、肺性線維症、血管炎、および皮膚の潰瘍、または好中球減少症、血小板減少症および巨脾症を現すフェルティ症候群を引き起こす関節外での疾患も生じ得る。患者は冒された関節の領域内のリウマチ結節、心膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、および肺性線維症を伴う間質性肺炎を示す場合もある。1つの型のI L - 1 R a が中程度から重症の活動性R A の治療に適応される。例えば、Cohen, S. et al. Arthritis & Rheumatism 46, 614-24 (2002)、Fleischmann, R.M. et al. Arthritis & Rheumatism 48, 927-34 (2003)、Nuki, G., et al. Arthritis & Rheumatism 46, 2838-46 (2002)、Schiff, M.H. et al. Arthritis & Rheumatism 50, 1752-60 (2004)を参照のこと。

【0273】

活動性R A の症状には疲労感、食欲の欠如、微熱、筋肉痛および関節痛、および凝りが含まれる。筋肉および関節の凝りは通常午前中、および一定時間何もしなかった後に最も目立つ。病的再燃（フレア）の間、関節は、一般に滑膜炎の結果として、しばしば赤くなり、むくみ、痛くなり、そして固くなる。R A とR A の症状の評価に有用な尺度には、リウマチ性関節炎重症度スケール（R A S S ; Bardwell et al., (2002) Rheumatology 41(1):38-45)、S F - 3 6 関節炎特異的健常度指数（A S H I ; Ware et al., (1999) Med . Care. 37(5 Suppl):MS40-50)、関節炎インパクト測定スケールまたは関節炎インパクト測定スケール2（A I M S またはA I M S 2 ; Meenan et al. (1992) Arthritis Rheum. 35(1):1-10）；スタンフォード健常度評価質問書（H A Q）、H A Q I I、または改変H A Q（例えば、Pincus et al. (1983) Arthritis Rheum. 26(11):1346-53を参照のこと）が含まれる。

【0274】

本明細書に記載される受容体結合剤を、R A を有する、またはそのリスクがある対象に、前述の徴候および症状のうちの1つ以上の発症を遅らせる、および／またはそれを改善するために投与することができる。その対象は中程度から重症の活動性R A を有する場合がある。その対象はT N F 阻害剤療法（例えば、E N B R E L（登録商標）（エタネルセプト）、H U M I R A（登録商標）（アダリムマブ）、またはR E M I C A D E（登録商標）（インフリキシマブ）を用いる治療法）に対して応答しない者であり得、その対象は以前にT N F 阻害剤を投与されたことがあり得；またはその対象はT N F 阻害剤を受け続けている（およびそれに応答している、または応答していない）こともあり得る。

【0275】

前記対象にメトトレキサートを投与することもできる。その対象に1つ以上の他のD M A R D S（疾患修飾性抗リウマチ薬）、コルチコステロイド、および／または非ステロイド性抗炎症剤を投与することができる。受容体結合剤と共投与することができるさらに他の薬品には、C D 2 8 の阻害剤（例えば、C T L A 4 - I g）、R A N K L の阻害剤、I F N g の阻害剤、I L - 6 の阻害剤、I L - 8 の阻害剤、およびI L - 1 7 の阻害剤が含まれる。阻害剤にはそのようなメディエーターに対する抗体、そのようなメディエーターに特異的な可溶性受容体に対する抗体、および／またはそのようなメディエーターの受容体に対する抗体が含まれる。

【0276】

若年性慢性関節炎

受容体結合剤を、例えば、21歳未満、18歳未満、17歳未満、16歳未満、15歳未満、または14歳未満の対象における若年性慢性関節炎を治療するために使用することができる。若年性慢性関節炎はいくつかの点でR A に類似している。対象はリウマチ因子陽性であり得る。対象は少間接性型、多関節性型、または全身性型のこの疾患を有し得る。その関節炎は関節の強直および関連の成長の原因となることがあり、そして、慢性前部ぶどう膜炎および全身性アミロイドーシスを引き起こすこともあり得る。受容体結合剤

を、1つ以上のそのような症状の発症を遅らせ、またはそれを改善するために使用することができる。

【0277】

受容体結合剤を、全身発症若年性特発性関節炎（S O - J I A）を含む若年性特発性関節炎を治療するために使用することができる。対象は、以前のコルチコステロイド治療がうまくいかなかったことがあり得、または0.3mg/kgに等しいか、それより多くの一日量でのコルチコステロイド治療を必要としたことがあり得る。例えば、Quartier et al. (2011) Ann Rheum Dis. 70(5):747-54を参照のこと。

【0278】

他のリュウマチ性障害

本明細書に記載される受容体結合剤を、強皮病、全身性エリテマトーデス、痛風、骨関節炎、リュウマチ性筋痛、乾癬性関節炎および慢性ライム関節炎を包含する他のリュウマチ性障害、皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎、およびリンパ脈管筋腫症（lymphangioleiomyomatosis）を包含する随意筋および他の筋肉の炎症、発熱性関節炎症候群、小児肉芽腫性関節炎（P G A）／ブラウ症候群、および本明細書において考察される他のリュウマチ性障害を治療するために使用することもできる。

【0279】

受容体結合剤を、代謝性リュウマチ性障害、例えば、高尿酸血症に伴う障害、例えば慢性急性痛風を含む痛風、および他の結晶介在性関節症を治療するために使用することができる。その薬剤を、例えば、キサンチンオキシダーゼ阻害剤、尿酸オキシダーゼ、または尿酸排泄薬により誘発される病的再燃（フレア）を含む痛風に伴う薬物誘発性の病的再燃（フレア）を治療するために使用することができる。痛風では、尿酸の結晶がインフラマソームを活性化し、I L - 1 β の放出を引き起こし得る。

【0280】

脊椎関節症

受容体結合剤を、脊椎関節症を治療するために使用することができ、その脊椎関節症には、強直性脊椎炎、ライター症候群、炎症性腸疾患に伴う関節炎、乾癬に伴う脊椎炎、若年発症脊椎関節症および未分化脊椎関節症などの障害が含まれる。脊椎関節症は、しばしば、H L A - B 27 遺伝子と関係がある。対象がリュウマチ因子を持たない場合があり、脊椎炎に伴う、または伴わない仙腸骨炎および炎症性非対称性関節炎を示す場合がある。対象が眼炎を有している場合もある（以下を参照のこと）。

【0281】

強皮病

受容体結合剤を、強皮病または全身性硬化症を治療するために使用することができる。強皮病は、局所的または全身性であり得る皮膚の硬化を特徴とする。微小血管系での血管病変および内皮細胞傷害が存在することもあり得る。対象は、皮膚病変部に単核球の浸潤を示し、抗核抗体を有する場合がある。発病を示す他の器官には、異常な蠕動／運動性という結果になる平滑筋の萎縮および線維症を有する場合がある胃腸管、小弓状動脈および小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎臓皮質の血流を減少させる同心円状の内皮細胞下内膜増殖を有する場合があり、そして、タンパク尿症、高窒素血症、および高血圧の原因となる場合がある腎臓、萎縮、間質性線維症、炎症、肺、間質性肺炎および間質性線維症を含む場合がある骨格筋、ならびに例えば、収縮帯の壊死と瘢痕形成／線維症を示す場合がある心臓が含まれ得る。本明細書に記載される受容体結合剤を、強皮病を有する、またはそのリスクがある対象に、前述の徴候および症状のうちの1つ以上を改善するために投与することができる。

【0282】

シェーグレン症候群

受容体結合剤を、シェーグレン症候群を治療するために使用することができる。シェーグレン症候群は、免疫介在性炎症とその後の涙腺と唾液腺の機能破壊を特徴とする。その疾患は炎症性結合組織病と関連が有り得る、またはそれらを伴い得る。その疾患はR o 抗

10

20

30

40

50

原およびL a抗原に対する自己抗体産生と関連があり、それらの抗原の両方は低分子RNA-タンパク質複合体である。病変により、胆汁性肝硬変、末梢神経障害または感覚神経障害を含む他の徴候または関連を有する乾性角結膜炎および口腔乾燥症、および触知可能な紫斑が生じ得る。シェーグレン症候群に関連する眼疾患の治療も下で考察する。

【0283】

甲状腺障害

受容体結合剤を、甲状腺障害を治療するために使用することができる。例となる甲状腺障害はグレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、および萎縮性甲状腺炎を包含し、そして、それは、甲状腺内に存在し、多くの場合、甲状腺に特異的なタンパク質と反応する抗体の産生と甲状腺抗原に対する自己免疫応答の結果である。自然発症モデル、すなわち、ラット（B U FラットおよびB Bラット）およびニワトリ（肥満ニワトリ）、およびサイログロブリンか甲状腺ミクロソーム抗原（甲状腺ペルオキシダーゼ）を使用する動物の免疫により作製された誘発性モデルを含む実験動物モデルが利用可能である。

10

【0284】

糖尿病性障害および代謝性障害

受容体結合剤を、若年発症性糖尿病（自己免疫真性糖尿病およびインスリン依存型の糖尿病を含む）および成人発症性糖尿病（インスリン非依存性糖尿病および肥満介在性糖尿病を含む）、I型糖尿病およびII型糖尿病などの糖尿病性障害を治療するために使用することができる。例えば、I型真性糖尿病またはインスリン依存性糖尿病は、自己抗体および自己反応性T細胞によって引き起こされる膵島細胞の自己免疫性破壊を伴う。さらに、IL-1 β 活性を低下させることによりグルコース制御と β 細胞機能を改善することができ、そして、II型糖尿病を治療するためにIL-1 β 活性の低下を用いることができる。例えば、Owyang et al. Endocrinology. 2010;151(6):2515-27を参照のこと。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される受容体結合剤を、インスリンを投与されていない対象、例えばインスリン依存性ではない対象に投与することができる。例えば、その対象は前糖尿病性であり得る。その対象は耐糖能障害か空腹時血糖障害のどちらかを有し得る。その対象は肥満であるか、 23 kg/m^2 、 25 kg/m^2 、 30 kg/m^2 、 35 kg/m^2 、または 40 kg/m^2 を越える肥満度指数を有する場合がある。その対象はインスリン耐性であるか、および／または高血糖症または高インスリン血症を特徴とする場合がある。その対象はII型糖尿病に伸展するリスクを有する場合がある。Larsen, et al. (2007) NEJM 356:1517-26およびLarsen, et al. (2009) Diabetes Care 32:1663-8も参照されたい。いくつかの実施形態では、前記対象は 6.1 mmol/L 、 6.5 mmol/L 、 7 mmol/L 、または 8 mmol/L よりも高い空腹時血漿グルコース値を有する。いくつかの実施形態では、前記対象は5.5%、5.7%、6%、6.4%、7%、7.5%または8%よりも高いA1Cレベルを有する。

20

30

【0285】

いくつかの実施形態では、前記対象に、例えば、インスリンの分泌を刺激するスルホニルウレア（例えば、クロルプロパミド、トラザミド、アセトヘキサミド、トルブタミド、グリブリド、グリメピリド、グリピジド）および／またはメグリチニド類（例えば、レバグリニド、ナテグリニド）などのインスリン分泌促進物質も投与する。前記対象にビグアニド（例えば、メトホルミン）を投与することもできる。受容体結合剤を、膵臓 β 細胞の欠損および／または膵臓 β 細胞への傷害を減少させるために投与することができる。

40

【0286】

いくつかの実施形態では、前記対象は遺伝子IL1RNの5'部近位に位置するrs4251961というCアレルについてヘテロ接合性またはホモ接合性である。

【0287】

受容体結合剤を用いる治療には、糖尿病に伴う二次的健康状態、例えば、糖尿病性網膜症、糖尿病性患者における腎臓移植拒絶、肥満介在性インスリン耐性、および自体タンパク尿症および高血圧を伴い得る腎不全の改善またはそれらの悪化の予防が含まれる。

50

【0288】

胃腸障害

本明細書に記載される受容体結合剤を、例えばセリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、特発性胃不全麻痺、慢性膵臓炎および急性膵臓炎を含む膵臓炎、炎症性腸疾患、ならびに胃潰瘍および十二指腸潰瘍を含む潰瘍を包含する炎症性胃腸障害を治療するために使用することができる。

【0289】

肺疾患

受容体結合剤を、IL-1が介在する肺疾患を治療するために使用することができる。治療することができる例となる肺疾患には慢性閉塞性肺疾患（例えば、肺気腫および慢性気管支炎）、肺胞タンパク症、ブレオマイシン誘発性ニューモパチーおよび線維症、特発性肺線維症および放射線誘発性肺線維症を含む肺線維症、肺性サルコイドーシス、嚢胞性線維症、肺コラーゲン蓄積症、ARDS、気管支肺異形成症（BPD）、慢性閉塞性肺疾患、および早生児の慢性線維化肺疾患が含まれる。さらに、本明細書に記載される受容体結合剤を、石綿症、炭鉱労働者の塵肺症、ケイ肺症、または微細粒子への長期の曝露に伴う類似の健康状態を含む職業性肺疾患を治療するために使用することができる。好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺臓炎を含む炎症性肺疾患および線維化肺疾患は、受容体結合剤を使用して治療することができる誤調節された免疫炎症応答を含む場合がある。

10

【0290】

サルコイドーシスは、身体のほぼ全ての組織における類上皮肉腫の存在を特徴とする、病因が未知である健康状態である。肺の病変が最も一般的である。発病は、疾患部位での活性型マクロファージおよびリンパ系細胞の存続とこれらの細胞種により放出された活性産物の局所的および全身的な放出の結果としてのその後の慢性続発症を伴う。

20

【0291】

心血管障害

本明細書に記載される受容体結合剤を、心血管障害または傷害、例えば、大動脈瘤、急性冠動脈症候群、動脈炎、大脳動脈閉塞を含む血管閉塞、冠状動脈バイパス手術の合併症、虚血／再灌流傷害、アテローム硬化性心臓病を含む心臓病、慢性自己免疫心筋炎およびウイルス性心筋炎を含む心筋炎、慢性心不全、うっ血性心不全、心筋梗塞を含む心不全、心臓手術後または頸動脈バルーン血管形成術後の再狭窄および／またはアテローム性硬化症、無症候性心筋虚血、左心室ポンプ機能不全、左心室補助装置の移植後合併症、レーノー現象、血栓性静脈炎、川崎血管炎を含む血管炎、静脈閉塞性疾患、巨細胞性動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、およびシェーンライン・ヘノッホ紫斑病を治療するために使用することができる。受容体結合剤を、例えば、そのような心血管障害のリスクを低下させるために予防的に投与することもできる。いくつかの実施形態では、受容体結合剤を患者に、アテローム性硬化症を治療するために、またはそのリスクを低下させるために投与する。

30

【0292】

IL-1介在性シグナル伝達は急性心筋梗塞により活性化され、そして、そのシグナル伝達が梗塞巣周縁の心筋細胞においてアポトーシス性細胞死を開始させることができ、それが梗塞巣のサイズに拡大する。本明細書に記載される受容体結合剤を、心筋梗塞により引き起こされる損傷を減少させるために投与することができる。例えば、受容体結合剤を、心筋梗塞のリスクが有る対象、または心筋梗塞、特に急性心筋梗塞を、例えば、ここ2時間以内、4時間以内、6時間以内、12時間以内、24時間以内、または48時間以内に経験したことが有る対象に投与することができる。前記薬剤を、例えば、ヘパリンおよびアスピリンを含む他の薬剤と組み合わせて投与することができる。

40

【0293】

受容体結合剤を、脳卒中、くも膜下出血、頭部外傷または脳傷害、および／または心血管障害に伴う炎症を治療するために使用することもできる。例えば、IL-1βレベルの上昇は、脳卒中および脳傷害と関連が有る神経炎症との関係が示されている（Rothwell,

50

N. J., et al., TINS 23(12): 618-625, 2000)。受容体結合剤を、そのような炎症ならびに虚血および／または低酸素症と関連が有る他の炎症を軽減させるために投与することができる。さらに、受容体結合剤を、例えば、そのような障害および／またはそのような障害に関連する炎症のリスクを低下させるために予防的に投与することもできる。例えば、受容体結合剤を、脳卒中、虚血イベント、他の心血管系イベント、または出血性イベント（例えば、くも膜下出血）のリスクが有る対象、または脳卒中、虚血イベント、他の心血管系イベント、または出血性イベント（例えば、くも膜下出血）を、例えば、ここ2時間以内、4時間以内、6時間以内、12時間以内、24時間以内、または48時間以内に経験したことが有る対象に投与することができる。

【0294】

泌尿生殖器系障害および腎臓障害

泌尿生殖器系の障害を、本明細書に記載される受容体結合剤を使用して治療することもできる。そのような障害には、自己免疫系球体腎炎、毒物への曝露に起因する糸球体腎炎、または溶血連鎖球菌 (Haemolytic streptococci) または他の感染性因子との感染に続いて発生する糸球体腎炎を包含する糸球体腎炎が含まれる。糸球体腎炎および尿細管間質性腎炎を含む免疫介在性腎疾患は、腎臓抗原に対する自己反応性抗体またはT細胞の産生の結果として直接的な、または他の非腎臓抗原に対して反応する抗体および／または免疫複合体の腎臓内での沈着の結果として間接的な腎臓組織への抗体またはTリンパ球介在性傷害の結果である。したがって、免疫複合体を形成することとなる他の免疫介在性疾患は間接的な続発症として免疫介在性腎疾患を誘発することもあり得る。直接的な免疫機構と間接的な免疫機構の両方により、結果として器官の機能障害を生じ、いくつかの場合では、腎不全へと進行する腎臓組織における傷害の発生をもたらす／誘発することになる。液性免疫機構と細胞性免疫機構の両方が傷害の発生に関与し得る。

【0295】

受容体結合剤を、環境毒素、薬品または他の原因への曝露に伴う尿毒症症候群を含む尿毒症症候群およびその臨床的合併症（例えば、腎不全、貧血および肥大型心筋症）を治療するために使用することもできる。吸収機能の変化を引き起こすことになる胆嚢壁の炎症から生ずる合併症を治療することもできる。そのような合併症には胆石症（胆石）および胆管結石症（胆管石）および胆石症と胆管結石症の再発が含まれる。治療することができるさらなる病気は血液透析の合併症、良性前立腺肥大、非細菌性前立腺炎、および慢性前立腺炎を含む前立腺の病気、および血液透析の合併症である。受容体結合剤を、慢性前立腺炎／骨盤痛症候群を含む慢性骨盤痛、およびヘルペス感染後の疼痛などの慢性疼痛を治療するために使用することもできる。

【0296】

血液疾患および腫瘍疾患

本明細書に記載される受容体結合剤を、癌関連カヘキシー、疲労感、無力症、カヘキシー腫瘍随伴症候群および高カルシウム血症を包含する、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、エプスタイン・バー・ウイルス陽性鼻咽頭癌、グリオーマ、大腸癌、胃癌、前立腺癌、腎臓細胞癌、子宮頸部癌および卵巣癌、肺癌（SCLCおよびNSCLC）を含む様々な型の癌を治療するために使用することができる。例えば、Voronov et al. (2003) PNAS 100:2645-2650を参照のこと。肉腫、骨肉腫および癌腫を含む固形腫瘍、例えば、腺癌（例えば、乳癌）および扁平上皮癌は治療可能でもある。ある特定の腫瘍におけるIL-1 β の役割に関して、例えば、Krelin et al. (2007) Cancer Res. 67:1062-1071を参照のこと。その他の癌には食道 (esophageal) 癌、胃癌、胆嚢癌、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄球性白血病、慢性または急性リンパ芽球性白血病および有毛細胞性白血病を含む白血病が含まれる。多発性骨髄腫を含む、転移浸潤能力を有する他の悪性腫瘍を、受容体結合剤を使用して治療することができる。例えば、Lust et al. (2009) Mayo Clin Proc 84(2):114-122を参照のこと。

【0297】

受容体結合剤を、慢性特発性好中球減少症、慢性疾患性貧血、ファンコーニ再生不良性

10

20

30

40

50

貧血を含む再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病、骨髓異形成症候群（不応性貧血、環状鉄芽球を伴う不応性貧血、芽球増加を伴う不応性貧血、移行期芽球の増加を伴う不応性貧血を含む）、骨髓線維症／骨髓様異形成、および鎌状赤血球血管閉塞性（vasocclusive）クリーゼを含む貧血および血液疾患を治療するために使用することもできる。

【0298】

自己免疫溶血性貧血、免疫汎血球減少症、および発作性夜間ヘモグロビン尿症は、赤血球細胞の表面（および、いくつかの場合では、同様に血小板を含む他の血液細胞の表面）に発現された抗原と反応する抗体の産生の結果生じる場合があり、そして、それは、それらの抗体が被覆した細胞の補体介在性溶解および／またはADCC／Fc受容体介在性機構を介した除去の結果である。血小板減少性紫斑病を含む自己免疫血小板減少症、および他の臨床背景における免疫介在性血小板減少症では、血小板の破壊／除去は抗体または補体のどちらかの血小板への結合とその後の補体性溶解、ADCCまたはFc受容体介在性機構による除去の結果として起こる。

【0299】

受容体結合剤を、自己免疫性リンパ増殖性症候群（ALPS）、慢性リンパ芽球性白血病、有毛細胞性白血病、慢性リンパ性白血病、末梢T細胞リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、パーキットリンパ腫、エプスタイン・バー・ウイルス陽性T細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫、ホジキン病、びまん性侵襲性リンパ腫、急性リンパ性白血病、Tガンマリンパ増殖性疾患、皮膚B細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫（すなわち、菌状息肉腫）およびセザリー症候群を含む様々なリンパ増殖性障害を有する、またはそのリスクが有る対象に投与することもできる。

【0300】

肝疾患

本明細書において開示される受容体結合剤は、急性アルコール性肝炎、急性薬物誘発性肝炎またはウイルス性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、およびC型、硬化性胆管炎、肝類洞上皮、未知の原因による肝臓の炎症を含む、肝炎などの肝臓の病気を治療するのに有用である。

【0301】

聴覚障害

受容体結合剤を、聴力損失を伴い、そして、異常なIL-1発現と関連する障害を治療するために使用することもできる。そのような障害には自己免疫過程から生じると考えられている蝸牛神経関連聴力損失、例えば、自己免疫聴力損失、メニエール症候群およびコレステリン腫、聴力損失を多くの場合伴う中耳障害が含まれる。

【0302】

骨障害

骨と関節の非関節炎性障害も本明細書に記載される受容体結合剤を使用して治療することが可能である。この非関節炎性障害は骨または関節の炎症性障害、骨損失につながる破骨細胞障害、例えば、限定されないが、閉経後の骨粗鬆症を含む骨粗鬆症、骨関節炎、歯の弛緩または損失を引き起こす歯根膜炎、および人工関節置換術後の義肢の弛緩（一般に、装着具の破片に対する炎症応答と関連がある）、例えば、整形外科インプラント性の骨溶解を包含する。

【0303】

アミロイド疾患

また、本明細書に記載される受容体結合剤を、原発性アミロイドーシスおよびアルツハイマー病を含む様々な病気の特徴をなしている続発性アミロイドーシス、二次反応性アミロイドーシス、ダウン症候群、および透析関連アミロイドーシスを治療するために使用することができる。さらに、受容体結合剤を、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、およびパーキンソン病を治療するために使用することができる。これらの疾患は炎症応答を引き起こすことができる凝集体とアミロイドの形成を伴うこともあり得る。

【0304】

神経障害

受容体結合剤を、多発性硬化症；特発性脱髄性多発ニューロパチーまたはギラン・バレー症候群、および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーを含む中枢神経系および末梢神経系の神経炎症を治療するために使用することもできる。これらの障害は自己免疫基盤を有し、オリゴデンドロサイトまたはミエリンに対して直接的に引き起こされた損傷の結果として神経の脱髄化を生じると考えられている。多発性硬化症では、疾患の誘発にTリンパ球が関与する。多発性硬化症は再発寛解の経過または慢性進行性経過のどちらかを有する。病変部には主にTリンパ球介在性のミクログリア細胞からなる浸潤物および浸潤性マクロファージが含まれ、CD4⁺Tリンパ球が病変部での主な細胞種である。オリゴデンドロサイト細胞死とその後の脱髄化の機序は分かっていないが、Tリンパ球駆動性である可能性がある。

10

【0305】

ミオパチー

受容体結合剤を、炎症と自己免疫に関連するミオパチーを治療するために使用することができる。皮膚筋炎、多発性筋炎および他のものを含む特発性炎症性ミオパチーは、筋力低下を引き起こす、病因が未知である慢性筋肉炎症の障害である。筋肉傷害／炎症は多くの場合対称的であり、進行性である。自己抗体が大半の型と関連する。これらの筋炎特異的自己抗体はタンパク質合成に関与する要素、タンパク質およびRNAの機能に向けられたものであり、それらの機能を阻害する。

20

【0306】

脈管炎障害

本明細書に記載される受容体結合剤を、血管炎障害、例えば、全身性血管炎を治療するために使用することができる。全身性血管炎には、初期病変が炎症であり、その後の血管への損傷が、冒された血管によって栄養供給されている組織の虚血／壊死／変性、およびいくつかの場合では最終的に末端器官機能不全を引き起こす疾患を含まれる。脈管炎はリウマチ性関節炎、全身性硬化症などのような他の免疫性炎症介在性疾患の二次病変または続発症として、特に免疫複合体の形成も伴う疾患において生じる場合もある。

【0307】

原発性全身性血管炎群内の疾患には全身性壊死性血管炎、結節性多発動脈炎、アレルギー性血管炎と肉芽腫症、多発性血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、リンパ腫様肉芽腫症、および巨細胞性動脈炎が含まれる。混合型脈管炎には皮膚粘膜リンパ節症候群（MLNSまたは川崎病）、CNS単独血管炎、ベーチェット病、閉塞性血栓性血管炎（バージャー病）および皮膚壊死性細静脈炎が含まれる。これらの血管炎障害の発病機構は主に血管壁における免疫グロブリン複合体の沈着とその後のADCC、補体活性化、またはそれらの両方を介した炎症応答の誘発に起因すると考えられている。

30

【0308】

CAPS

受容体結合剤を、CAPS障害、すなわち、CIAS1関連周期性症候群を治療するために使用することができる。CAPSには3つの遺伝的症候群、すなわち、新生児期発症多臓器炎症性障害（NOMID）、マックル・ウェルズ症候群（MWS）、および家族性感冒自己炎症性症候群（FCAS）（Hoffman et al. 2001 Naure 29:301-305、Feldmann et al. 2002 Am J Hum Genet 71:198-203、Aksentijevich et al. 2002 Arthritis Rheum 46:3340-3348）が含まれる。CAPSは散発的または家族的パターンを有する常染色体優性遺伝形式で遺伝される。CIAS1は、カスパーゼ1の活性を調節する細胞内酵素複合体である「インフラマソーム」のタンパク質成分であるNALP3をコードする。CIAS1の変異によりIL-1産生の増加と多数の病理的帰結が引き起こされる（Aksentijevich et al. 2002、上掲）。IL-1は肝臓における急性期反応物質、例えば、C反応性タンパク（CRP）および血清アミロイドA（SAA）の産生を強力に誘導する。

40

【0309】

50

C A P S 障害は共通の臨床的特徴を有し、そして、様々な臨床的重症度を有する疾患として存在する。N O M I D は最も重症であり、M W S はやや軽度であり、そして、F C A S は最も軽度である。C A P S 障害はいくつかの重なり合う特徴を有し、そして、個体は徴候および症状からなる特有の型を有し得る。これらの病気全てに共通の特徴には、発熱、じん麻疹様の発疹、関節炎または関節痛、筋肉痛、倦怠感、および結膜炎が含まれる。

【0310】

N O M I D では、慢性無菌性髄膜炎が知的傷害を引き起こす場合があり、そして、これらの患者は骨端と膝蓋骨において外観を損ない、且つ、障害を引き起こす骨の過形成を患う場合もある。これらの患者は、頭蓋内の圧力上昇により生じる視神経の萎縮に起因する盲目症を患う場合もある。M W S および N O M I D は通常、聴覚系、髄膜および関節を含み得る重い炎症を伴う。これらの患者は毎日の高熱のスパイク熱、および分布と程度が頻繁に変化する慢性の発疹を患う場合がある。患者は聴力損失または難聴を患う場合がある。結膜炎と乳頭浮腫が頻繁に観察される。アミロイドーシスは慢性炎症に起因する腎不全と急性期反応物質（特に S M）の過剰産生を発生および誘発し得る。受容体結合剤を、N O M I D、M W S、または F C A S を有する、または N O M I D、M W S、もしくは F C A S に関連する遺伝子型を有すると診断された対象に投与することができる。さらに、受容体結合剤を、T R A P S（T N F 受容体関連周期性症候群）を有する対象に投与することができる。

10

【0311】

皮膚疾患

20

受容体結合剤を、皮膚疾患、例えば、炎症性皮膚疾患または自己免疫性もしくは免疫介在性皮膚疾患を治療するために使用することができる。例となる障害は乾癬である。水疱性皮膚症、多形性紅斑、および接触皮膚炎を含むその他の自己免疫性または免疫介在性皮膚疾患には自己抗体が介在しており、その自己抗体の発生は T リンパ球依存的である。乾癬は T リンパ球介在性炎症性疾患である。病変部には T リンパ球、マクロファージおよび抗原加工細胞、およびいくつかの好中球からなる浸潤物が含まれる。

【0312】

治療することができる皮膚または粘膜のその他の傷害には、ダリエー病、毛包性角化症および尋常性天疱瘡を包含する棘融解性疾患が含まれる。さらにその他の障害には、にきび、酒さ、円形脱毛症、アフタ性口内炎、水泡性類天疱瘡、火傷、湿疹、多形性紅斑および多形水泡性紅斑（スティーブンス・ジョンソン症候群）を含む紅斑、炎症性皮膚疾患、扁平苔癬、線状 I g A 水泡性土官（小児期慢性水泡性皮膚病）、皮膚弾力喪失、胃潰瘍を含む粘膜性表面潰瘍、好中球性皮膚炎（スィート症候群）、皮膚筋炎、毛孔性紅色靴糠疹、乾癬、壊疽性膿皮症、多中心性細網組織球症、および中毒性表皮剥離症が含まれる。受容体結合剤により治療可能な他の皮膚関連健康状態には疱疹状皮膚炎（デューリング病）、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、およびじん麻疹（慢性特発性じん麻疹を含む）が含まれる。

30

【0313】

アレルギー性疾患

受容体結合剤を、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、アレルギー性結膜炎（以下も参照のこと）およびじん麻疹を治療するために使用することができる。これらの疾患には、しばしば T リンパ球誘発性炎症、I g E 介在性炎症、またはそれらの両方が介在する。

40

【0314】

喘息は、多くの場合 1 つ以上の誘引に応答して、気道が時に収縮し、炎症を起こし、そして、過剰量の粘液で埋め尽くされる呼吸器系に関係する慢性健康状態である。寒気、暖気、湿った空気、運動または労作、感情的なストレス、およびウイルス性の病気などの環境中の刺激（またはアレルゲン）への曝露のような事によって、エピソードが誘発され得る。気道の狭窄は喘鳴、息切れ、胸部圧迫、および咳などの症状を引き起こす。受容体結合剤を、喘息を治療するために使用することができ、そして、そのような治療のための局

50

所的送達または肺送達用に製剤することができ、または、非経口的に送達することができる。

【0315】

移植

受容体結合剤を、移植を受けるところである、移植を受けている、または移植から回復しているところである対象に投与することができる。移植片拒絶および移植片対宿主病（GVHD）を含む移植に関連する疾患はTリンパ球依存性であり、Tリンパ球機能の阻害は改善につながる。角膜移植は、受容体結合剤を使用する治療により改善され得る新血管形成を伴い得る。受容体結合剤を、固形器官の移植、例えば心臓、肝臓、皮膚、腎臓、肺（肺移植気道閉塞）の移植または骨髄移植を含む他の移植により生じる合併症を治療するために使用することもできる。

10

【0316】

感染症

本明細書に記載される受容体結合剤はマラリアおよび住血吸虫症を含む原虫症の治療、および、らい性結節性紅斑、細菌性またはウイルス性髄膜炎、肺性結核を含む結核、ならびにインフルエンザの感染および伝染性単核球症を含む細菌またはウイルスの感染に続いて発生する肺炎の治療に有用である。

【0317】

家族性地中海熱、高免疫グロブリンDおよび周期性発熱症候群、およびTNF受容体関連周期性症候群（TRAPS）、および成人発症性スティル病、シュニッツラー症候群、および線維化肺胞炎を含む遺伝性周期性発熱症候群も受容体結合剤を使用して治療可能である。

20

【0318】

いくつかの実施形態では、受容体結合剤を、対象においてIL-6の活性または発現を低下させるためにその対象に投与する。例えば、その対象は、少なくとも部分的にIL-6に関係する、またはIL-6が介在する障害を有し得る。

【0319】

眼疾患および眼内送達

本明細書に記載される受容体結合剤を、眼の表面を冒す眼疾患、炎症性眼疾患、および自己免疫反応が少なくとも部分的に介在する眼疾患を含む眼疾患を治療するために使用することができる。

30

【0320】

いくつかの実施形態では、眼疾患は眼の表面を冒すドライアイ障害である。その障害には、乾性角結膜炎、乾性角膜炎、眼球乾燥症候群、眼球乾燥症、涙液膜障害、涙生成の減少、涙液欠損、およびマイボーム腺機能不全と呼ばれる健康状態が含まれる。ドライアイはシェーグレン症候群（SS）に関連する型、例えば、シェーグレン症候群関連乾性角結膜炎を含み得るが、シェーグレン症候群に関連しない型、例えば、非シェーグレン症候群関連乾性角結膜炎も含み得る。患者は全身性自己免疫障害の他の徴候を有する場合も有しない場合もある。IL-1はドライアイ障害の発病と関連があるとされている。例えば、Enriquez de Salamanca et al. (2010), Mol. Vis. 16:862-873を参照のこと。

40

【0321】

ドライアイ症候群を有する対象は眼の炎症による乾燥を示す場合があり、そして、ざらざらする、チクチクする、むずむずする、燃えるような、または圧力をかけられた感覚、刺激、疼痛、および充血を経験する場合がある。ドライアイは過剰な目の加水および逆に不十分な涙の生成の両方を伴う場合がある。受容体結合剤をそのような対象に、1つ以上のそのような症状の発症または悪化を改善または予防するために投与することができる。受容体結合剤を、例えば、神経炎症に起因する痛み、例えば眼の痛みをそのような痛みを経験している対象においてやわらげるために使用することもできる。

【0322】

いくつかの実施形態では、前記眼疾患は、全身性自己免疫障害（例えば、シェーグレン

50

症候群およびリウマチ性関節炎)に、またはIL-1または別のIL-1サイトカインファミリーメンバーに関連する障害に伴う眼疾患である。患者は全身性自己免疫障害または全身性自己免疫障害の他の徴候を有する場合も有しない場合もある。

【0323】

受容体結合剤を、眼の表面、例えば角膜を冒す他の障害を治療するために使用することもできる。そのような障害には角膜眼表面炎状態、角膜新血管形成、末梢潰瘍性角膜炎および細菌性角膜炎を含む角膜炎が含まれる。受容体結合剤を、角膜の創傷を治癒している対象(例えば、角膜の創傷を有する対象)を治療するために使用することができる。受容体結合剤を、眼に関係する手技、例えば、角膜移植/角膜形成術、人工角膜移植手術、眼表層移植、選択的内皮移植を受けるところである、受けている、またはそれから回復しているところである対象に投与することができる。例えば、Dana (2007) Trans Am Ophthalmol Soc 105: 330-43、Dekaris et al. (1999) Curr Eye Res 19(5): 456-9、およびDana et al. (1997) Transplantation 63:1501-7を参照のこと。受容体結合剤を、結膜瘢痕化障害および結膜炎を含む結膜を冒す障害を治療するために使用することができる。受容体結合剤を、類天疱瘡症候群およびスティーブンス・ジョンソン症候群などのさらに他の障害を治療するために使用することができる。本明細書に記載される受容体結合剤を対象に、眼の中、または眼の周囲での新血管形成を調節するために投与することができる。例えば、Dana (2007) Trans Am Ophthalmol Soc 105: 330-43を参照のこと。

【0324】

受容体結合剤を、眼を冒すアレルギー性反応を有する対象、例えば、重症のアレルギー性結膜炎などのアレルギー性(アトピー性)眼疾患を経験している対象に投与することができる。例えば、受容体結合剤を局所的に投与することができる。例えば、Keane-Myers AM et al. (1999) Invest Ophthalmol Vis Sci, 40(12): 3041-6も参照されたい。

【0325】

受容体結合剤を、眼を冒す自己免疫障害を有する対象に投与することができる。例となる自己免疫眼疾患には交換性眼炎、フォークト・小柳・原田(VKH)症候群、バードショット網脈絡膜症(birdshot retinochorioidopathy)、眼瘢痕性類天疱瘡、フックス異時性虹彩毛様体炎、および様々な型のぶどう膜炎が含まれる。受容体結合剤を対象に、前述の障害のうちのいずれかを治療するために投与することができる。

【0326】

受容体結合剤を、糖尿病性網膜症を有する、またはそのリスクが有る対象に投与することができる。例えば、Demircan et al. (2006) Eye 20:1366-1369 and Doganay et al. (2006) Eye, 16:163-170を参照のこと。

【0327】

ぶどう膜炎には急性型と慢性型が含まれ、そして、虹彩、毛様体および脈絡膜のうちの1つ以上の炎症が含まれる。慢性型は全身性自己免疫疾患、例えば、ベーチェット症候群、強直性脊椎炎、若年性リウマチ性関節炎、ライター症候群および炎症性腸疾患と関連が有る場合がある。前部ぶどう膜炎では、炎症は主に虹彩中に存在する(虹彩炎とも)。前部ぶどう膜炎は、全身性自己免疫疾患を有する対象を冒す場合があるが、全身性自己免疫疾患を有しない対象を冒す場合もある。中間部ぶどう膜炎は前部硝子体、周辺網膜および毛様体の炎症を伴い、多くの場合、前部ぶどう膜炎または脈絡網膜炎をほとんど有しない。周辺部ぶどう膜炎(pan planitis)は虹彩と脈絡膜の間にある毛様体扁平部の炎症により生じる。後部ぶどう膜炎はぶどう膜と主に脈絡膜に関係し、そして、脈絡膜炎とも呼称される。後部ぶどう膜炎は全身性感染症または自己免疫疾患に伴う場合がある。それは数か月および数年持続することがある。受容体結合剤を対象に、前述の型のぶどう膜炎のうちのいずれかを治療するために投与することができる。例えば、Tsai et al. (2009) Mol Vis 15:1542-1552およびTrittibach P et al. (2008) Gene Ther. 15(22): 1478-88も参照されたい。

【0328】

いくつかの実施形態では、受容体結合剤を、加齢黄斑変性(AMD)を有する、または

そのリスクがある対象を治療するために使用する。受容体結合剤を眼に局所的に投与、（例えば、硝子体中に）注入、または全身的に投与することができる。例えば、Olson et al. (2009) Ocul Immunol Inflamm 17(3):195-200を参照のこと。

【0329】

本明細書に記載される受容体結合剤を、眼疾患を治療するためにあらゆる方法により投与することができる。その薬剤を非経口的な方法で送達することができる。あるいは、または加えて、その薬剤を眼に直接的に、または眼の近傍に送達することができる。例えば、前記タンパク質を局所的または眼内に、例えば、下で説明するように投与することができる。

【0330】

眼内送達用の製剤と方法

受容体結合剤を含有する点眼用製剤を局所投与のために、例えば、液滴剤もしくは軟膏としての投与のために、または、例えば、前眼房もしくは結膜嚢への移植のために送達することができる。液滴剤を、点眼器を使用して送達することができる。眼内送達用に製剤されているとき、受容体結合剤は0.0001～0.1%、0.001～5%、例えば、0.005～0.5%、0.05～0.5%、0.01～5%、0.1～2%または1%～5%の濃度で存在し得る。しばしば、点眼用製剤は眼に直接に適用され、それは、まぶたへの局所的適用または眼球とまぶたの間の空間（結膜嚢）への滴下を含む。点眼用製剤は、涙液と容易に混合し、角膜と結膜の表面に拡がるように設計され得る。通常の投与技術を用いて、その薬品の大部分を下結膜円蓋に置く。毛管現象、拡散力、およびまばたき反射により、その薬品が角膜前涙液膜に入り込み、そこからその薬品が角膜へと浸透する。

【0331】

点眼用製剤は1つ以上の他の薬剤、例えば、リメキシロン、ロテブレドノール、メドリゾンおよびヒドロコルチゾンなどの抗炎症性ステロイド、または非ステロイド性抗炎症剤を含むこともできる。例えば、そのステロイドは0.001～1%の濃度で存在し得る。いくつかの実施形態では、ステロイドが存在しない。例えば、受容体結合剤は製剤中の唯一の活性薬剤である。

【0332】

前記製剤は次の成分のうちの1つ以上を含むこともできる：界面活性剤、等張化剤、緩衝液、保存剤、共溶媒および粘度上昇剤。等張化剤を、前記組成物の浸透圧を、例えば、天然の涙の浸透圧に調節するために使用することができる。例えば、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、ブドウ糖および／またはマンニトールを、適切な等張性、例えば、生理的等張性を得るために添加することができる。等張化剤を、約150～450mOsmまたは250～350mOsmの浸透圧を生じさせるのに十分な量で添加することができる。

【0333】

前記製剤は点眼用送達に適切な緩衝化物を含むこともできる。その緩衝剤は、特に貯蔵条件下でpHの変化に対する1つ以上の緩衝成分（例えば、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウムまたはホウ酸）を含み得る。例えば、緩衝液を、pH5.5～7.5、6.0～7.5、または、例えば6.5～7.5の範囲内にある目標のpHをもたらすために選択することができる。

【0334】

前記製剤は水性担体またはリン脂質担体を含み得る。特にドライアイ障害の治療のために、前記製剤は短期の症状の軽減をもたらす薬剤、例えば、眼を潤滑し、そして、涙の形成を補助する化合物を含み得る。例えば、（1つ以上のリン脂質を含む）リン脂質担体を使用して短期の症状の軽減をもたらすことができる。人工涙様担体として有用な例または人工涙様組成物にはTears Naturelle（商標）（Alcon Labs社、米国、テキサス州）が含まれる。例えば、前記製剤は、ml当たり、1mgのデキストラン、70および3mgのヒドロキシプロピルメチルセルロース、および随意でPOLYQ

UAD（登録商標）（ポリクオタニウム - 1）0.001%（質量／体積）のような保存剤を含み得る。リン脂質担体制剤の例には、米国特許第4,804,539号、米国特許第4,883,658号、米国特許第5,075,104号、米国特許第5,278,151号、および米国特許第5,578,586号において開示されるものが含まれる。

【0335】

前記製剤は、滑沢剤または湿潤剤として作用する他の化合物を含むこともできる。これらには、単量体ポリオール、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール；重合体ポリオール、例えばポリエチレングリコール、様々なセルロースファミリーの重合体、すなわち、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（「HPMC」）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース（「HPC」）、デキストラン、例えばデキストラン70；水溶性タンパク質、例えばゼラチン；およびビニル重合体、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン；およびカルボマー、例えばカルボマー934P、カルボマー941；カルボマー940、カルボマー974Pなどの粘性剤が含まれる。さらにその他の例には多糖類、例えばヒアルロン酸およびその塩ならびにコンドロイチン硫酸およびその塩、ならびにアクリル酸重合体が含まれる。ある特定の実施形態では、前記製剤は1～400cPの間の粘性を有する。

【0336】

前記製剤は、例えば、付属の点眼器が付いた瓶に、または単回使用用の点眼器として、単回使用用または多用量使用用に包装され得る。前記製剤は、例えば使用中の細菌または真菌の汚染混入を防ぐために1つ以上の保存剤を、および／または、例えばタンパク質を可溶化するために1つ以上の界面活性剤を含むこともできる。例となる保存剤には塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、臭化ベンゾドデシニウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、フェニルエチルアルコール、エデト酸二ナトリウム、ソルビン酸、およびポリクオタニウム - 1が含まれ、そして、それらは0.001から1.0%（重量／体積）までの濃度で含まれ得る。無菌だが保存剤を含まない、受容体結合剤を含有する製剤を提供することも可能である。例となる界面活性剤にはトリトンX-100、エリュージェント（Elugent）、ツイーン20およびツイーン80が含まれ、そして、それらは0.001から1.0%（重量／体積）までの濃度で含まれ得る。界面活性剤を含まない製剤を提供することも可能である。前記製剤は単回使用による適用のために調製され得る。

【0337】

眼科医療用パックを、点眼用製剤の眼との接触を長くするために使用することができる。綿球を前記製剤で浸し、次に、それを上結膜円蓋または下結膜円蓋に挿入する。受容体結合剤を、イオントフォレーシスにより投与することもできる。この方法は、電極を担持する洗眼器内で溶液の角膜との接触を維持する。その薬品の拡散が電位差によりもたらされる。

【0338】

受容体結合剤を注射、例えば、結膜下注射により送達することもできる。前記製剤を結膜の下に注射することができ、それが強膜を通して眼への単純な拡散による移動を容易にする。前記製剤を結膜の下、およびより眼の後方の部分内の基底をなすテノン囊の下に注射して前記薬剤を毛様体、脈絡膜および網膜に送達することもできる。前記製剤を球後注射により投与することもできる。

【0339】

ドライアイと他の表面障害に関して、対象を、例えば、次のアプローチのうちの1つ以上を用いて評価することができる：眼表面疾患指数（OSDI）、角膜および結膜の染色、およびシルマー試験。当技術分野において公知の他の方法を使用することができる。

【0340】

眼表面疾患指数（OSDI）は、DESを含む眼表面炎症性障害、および視覚関連機能へのそれらの影響と一致する眼の刺激の症状を迅速に評価する12項目からなる質問集である。例えば、Ocul Immunol Inflamm. 2007 Sep-Oct;15(5):389-93を参照のこと。そのOSDI質問書の12項目は0～4の段階で採点される。スコアが回答に基づいて得られ

10

20

30

40

50

、OSDIスコアが0～100の段階で生じる。スコアが高いほど大きな障害を表す。ベースラインからの負の変化は視覚関連機能および眼炎症性障害の改善を示す。

【0341】

角膜と結膜の染色

角膜染色は表皮の疾患、または通常ドライアイなどの眼表面炎症性障害に関して見られる眼の表面の表皮バリアにおける破損の尺度である。角膜染色は、臨床的に明らかなドライアイがなくても、重いまぶたの疾患、例えば後部眼瞼炎がある場合は、存在し得る。角膜染色と目の不快感との相関は、全てではないが多くの患者で高く、全般的に、角膜染色は上で説明されたOSDIの高いスコアと関連がある。角膜フルオレセイン染色には、生理食塩水で湿らせたフルオレセイン試験紙または1%ナトリウムフルオレセイン溶液を使用して涙液膜を染色する。角膜全体を次に、黄色のバリアフィルター（ラッテン12番）とコバルトブルーの照明を使用する細隙灯評価を用いて試験する。染色をオックスフォード・スキーマに従って格付けする。結膜染色は、同様に、表皮の疾患または眼の表面の表皮バリアにおける破損の尺度である。結膜染色は、リサミン・グリーンを使用して、細隙灯下で行われる。生理食塩水で湿らせた試験紙または1%リサミン・グリーン溶液を使用して涙液膜を染色し、そして、眼瞼間結膜の染色が30秒から後、2分未満の後に評価される。中程度の強度の白色光を用いて、眼瞼間領域の鼻側の、および一時的な結膜の染色だけがオックスフォード・スキーマを用いて格付けされる。

10

【0342】

シルマー試験

シルマー試験は、下結膜円蓋に濾紙の紙片（5×35mmのワットマン41番濾紙の紙片）を設置して、麻酔して、および麻酔せずに行われる。この試験は薄暗い部屋で行われる。患者は、5分が経過し、紙片が取り除かれるまでその眼をゆるく閉じる。涙の線は、紙片が眼から取り除かれた後に数ミリメートル進み続けるので、正確に5分の時点で涙の線にボールペンで印をつける。涙液の産生は、紙片が5分の間に湿ったミリメートル単位の長さにより測定される。麻酔無しでの10mm以下のシルマー試験の結果および麻酔有りでの5mm以下のシルマー試験の結果は異常と見なされる。ベースラインからの正の変化は本明細書に記載される眼炎症性障害の1つ以上の症状の改善を示す。

20

【0343】

肺送達用の製剤と方法

受容体結合剤を、例えば、その薬剤を気道、例えば上気道および下気道の組織に投与するために肺送達の吸入法または他の方法用に製剤することができる。肺の通気道へ薬剤を局所的に送達するために使用することができる3つの共通するシステムには、乾燥粉末吸入器（DPI）、定量吸入器（MDI）およびネブライザが含まれる。MDIを使用して受容体結合剤を可溶化型で、または分散体として送達することができる。MDIには、装置を起動するとエアロゾル化した医薬を気道へと押し出すフレオンまたは他の比較的高い蒸気圧の噴射剤が含まれているのが典型的である。対照的にDPIは一般に、乾燥粉末の医薬を肺に導入するためには患者の息を吸い込む労力に依存する。ネブライザは液体溶液にエネルギーを加え、吸入することができる医薬品のエアロゾルを形成する。前記薬剤を凍結乾燥形状で（例えば、室温で）貯蔵し、吸入前に溶液に再構成することができる。液体換気または肺洗浄の際の薬品のフルオロケミカル媒体を使用する直接的肺送達も有望な送達方法である。これらの方法および他の方法を、受容体結合剤を送達するために使用することができる。例えば、前記薬剤は、1吹き（puff）当たり少なくとも約0.02mg、0.1mg、0.5mg、1mg、1.5mg、2mg、5mg、10mg、20mg、40mgまたは50mg、またはそれより多くの投与単位形態で送達される。

30

40

【0344】

受容体結合剤は、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジエリロロテトラフルオロクトリアン（dielilorotetrafluoroctliane）、二酸化炭素または他の適切な気体を使用して、加圧パックまたはネブライザからエアロゾルスプレー物の形態で好都合にも送達され得る。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、計

50

量された量を送達するバルブを付けることにより決定され得る。吸入器または吹入器で使用するためのカプセルおよびカートリッジは、粒子が製剤化された粒子である場合、受容体結合剤とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基材の粉末混合物を含有して製剤されてもよい。製剤化受容体結合剤または製剤化されていない受容体結合剤に加えて、100%のDPPCまたは他の界面活性剤などの他の材料と一緒に混合して製剤化受容体結合剤または製剤化されていない受容体結合剤の送達および分散を促進することができる。粒径を、上気道への送達であるか下気道への送達であるか制御するために変更することもできる。例えば、1~5ミクロンまたは10~50ミクロンの範囲のサイズの粒子をそれぞれ下気道および上気道用に使用することができる。

【0345】

界面活性剤などの送達増強剤を使用して肺送達をさらに増強することができる。界面活性剤は一般に、親水性部分および親油性部分を有する化合物であって、2つの非混和相の間の接触面と相互作用することにより薬品の吸収を促進する化合物である。界面活性剤は乾燥粒子ではいくつかの理由のため、例えば、粒子の凝集の低下およびマクロファージによる貪食の低下のため有用である。界面活性剤は当技術分野においてよく知られており、そして、それにはホスフォグリセリド、例えばホスファチジルコリン、L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)およびジホスファチジルグリセロール(DPPG)、ヘキサデカノール、脂肪酸、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリオキシエチレン-9-、アウリルエーテル(auryl ether)、パルミチン酸、オレイン酸、ソルビタントリオレエート(スパン85)、グリココール酸塩、サーファクチン、ポロクソマー(poloxamer)、ソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタントリオレエート、チロキサポール、およびリン脂質が含まれる。

【0346】

また、本明細書に記載されるキメラサイトカインドメインを特異的に認識する抗体も本明細書に取り上げられる。例えば、そのような抗体はあらゆる親サイトカインドメインと比べてキメラドメインに優先的に結合する。例えば、特異的抗体は、第1親サイトカイン由来のセグメントと第2親サイトカインの間の連結部を包含するエピトープに結合することができる。

【0347】

核酸送達

受容体結合剤は、その受容体結合剤をコードし、そして、発現することができる核酸を送達することによって対象に提供され得る。例えば、受容体結合剤をコードする核酸配列を転写制御配列の制御下に置き、遺伝子送達用の核酸ベクター、例えば、ウイルス性ベクターに配置することができる。例となるウイルス性ベクターにはアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ関連ウイルスベクターが含まれる。ベクターはプラスミドまたは線状分子、例えば、線状二本鎖DNAの形状であり得る。その送達される核酸は標的細胞のゲノムに組み込まれる、例えば、標的細胞のゲノムに組み込まれるように設計され得る。あるいは、その送達される核酸は、送達後にそれが細胞内で自律的に存在するように設計され得る。

【0348】

転写制御配列を操作して一過性発現または構成的発現をもたらすことができる。一過性制御は、外部からの薬剤によって、例えば、外部からの薬剤(例えば、ステロイドホルモンまたはFK506)または環境シグナルに応答する転写因子の転写応答エレメントを使用することによって調節される制御を包含し得る。

【0349】

送達される核酸上に提供されている遺伝子の発現を、例えば、その遺伝子がコードするタンパク質の(例えば、抗体を使用する)検出により、または、例えばPCRもしくはノーザンハイブリダイゼーションを用いるmRNAの検出により評価することができる。送達される核酸が一般に操作されて、転写が開始され、それにより生じるメッセージからタンパク質が翻訳されるように転写調節DNAと翻訳調節DNAが受容体結合剤のコード配

10

20

30

40

50

列に対して適切な位置に配置される。その核酸は哺乳類細胞、特にヒトに由来する転写調節性核酸配列および翻訳調節性核酸配列を含み得る。そのような配列には、例えば、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および終結配列、翻訳開始配列および終結配列、およびエンハンサー配列または活性化配列が含まれる。

【0350】

さらに、発現ベクターは追加のエレメントを含んでもよい。例えば、組み込み型発現ベクターでは、その発現ベクターは宿主細胞のゲノムに相同な少なくとも1つ、または2つの配列を、例えば、発現コンストラクトを挟み込んで含有することができる。その組み込み型ベクターを、適切な相同配列をそのベクター内への包含に選択することにより、宿主細胞内の特定の座位に導くことができる。組み込み型ベクターのコンストラクトは当技術分野においてよく知られている。

10

【0351】

例となるアデノウイルスベクターにはAd2またはAd5などの改変型のヒトアデノウイルスが含まれ、それらのウイルスではウイルスがインビボで複製するのに必要な遺伝配列が除去されている。例えば、E1領域を除去することができ、そして、そのゲノムを、受容体結合剤をコードする発現カセットを受け入れるようにさらに改変することができる。

【0352】

例となるレトロウイルスベクターにはLNL6、LXSN、LNCXおよびレンチウイルスベクターが含まれる。特定のレンチウイルスベクターがPawliuk et al. (2001) Science 294:2368およびImren et al. (2002) PNAS 99:14380によって説明されており、そして、それらには、限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、HIV-1、HIV-2）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、およびウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）が含まれる。これらのベクターが安全であるように、例えば、必須遺伝子（例えば、gagおよびpol）を別々のベクターに分割することにより、および、レトロウイルスを複製欠損にすることにより、構築および操作することができる。次に複製欠損レトロウイルスを、標準的な技法により、ヘルパーウイルスまたはパッケージング細胞株の使用を介してビリオンにパッケージする。組換えレトロウイルスの作製およびそのようなウイルスを使用するインビトロまたはインビボでの細胞の感染のためのプロトコルはCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (編) Greene Publishing Associates, (1989)、第9、10～9、14節、および他の標準的な実験マニュアルに見出され得る。レトロウイルスベクターは、受容体結合剤を発現するための配列に加えて、左側（5'）レトロウイルスLTR、レトロウイルス搬出配列、随意でリバース応答配列（RRE）、プロモーター、および遺伝子座制御領域（LCR）または他の転写インシュレーター配列および右側（3'）レトロウイルスLTRを含み得る。レトロウイルスベクターは中央ポリプリントラクト（cPPT）またはDNAフラップをさらに含有してウイルスタイターおよび形質導入効率を増加させることができる。

20

30

【0353】

受容体結合剤をコードする配列を含有する核酸を任意の適切な標的細胞に、例えば、エクスピボまたはインビボで送達することができる。例となる標的細胞には滑膜細胞、造血細胞、皮膚細胞などが含まれる。その核酸を眼に関連する標的細胞、例えば角膜上皮細胞に送達することができる。送達にはデブリードマン、または上皮基底層を露出するための角膜上皮の擦過が含まれ得る。その後、送達用の核酸を添加する。別の実施形態では、前記核酸は角膜内皮細胞、角膜の周縁部の下にある小柱網の細胞、眼の脈絡膜層の細胞、網膜、強膜または毛様体の細胞、網膜血管系または眼血管系の細胞、または硝子体の細胞または水晶体、例えば水晶体上皮の細胞に送達される。

40

【0354】

送達方法には、例えば、レトロウイルスの感染、アデノウイルスの感染、プラスミドを使用する形質転換、外来性核酸を含有するリボソームを使用する形質転換、遺伝子銃によ

50

る核酸送達（例えば、金粒子または他の金属粒子への核酸の負荷と細胞への射出または注入）、アデノ随伴ウイルスの感染、およびエプスタイン・バー・ウイルスの感染が含まれる。送達は、注射針による注入、皮下噴射、電気穿孔または遺伝子銃を含むあらゆる方法による細胞または組織への送達であり得る。

【0355】

遺伝子送達のための他の方法は、例えば、Kay, M. A. (1997) Chest 111(増刊第6号): 138S-142S、Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81、Shiratoriy, Y. et al. (1999) Liver 19:265-74、Oka, K. et al. (2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86、Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52、Yang, N. S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56、Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) Ann. N.Y. Acad. Sci. 716:90-101、Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172、Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49、およびLee, H. C. et al. (2000) Nature 408:483-8に見出され得る。 10

【0356】

例となる第二剤

本明細書に記載される受容体結合剤を第二剤と共に投与することができる。その2つの薬剤は共投与され得る、または例えば異なる投与計画を用いて別個に投与され得る。例となる第二剤には抗炎症性薬剤が含まれる。

【0357】

1つの実施形態では、第二剤はIL-17アンタゴニスト（全てのIL-17ファミリーメンバーのアンタゴニスト、例えば、IL-17A、IL-17F、IL-17B、IL-17C、IL-17D、およびIL-17Eのアンタゴニストを包含する）である。例となるIL-17アンタゴニストには、IL-17（IL-17A、IL-17F、IL-17B、IL-17C、IL-17D、およびIL-17Eを含む）に結合し、IL-17介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、IL-17の1つ以上の受容体、例えばIL-17RAおよびIL-17RCに結合し、IL-17介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、IL-17と少なくとも1つの受容体サブユニット、例えば、IL-17とIL-17RA、またはIL-17、IL-17RAとIL-17RCを含有する複合体に結合し、IL-17介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、ならびにIL-17RAおよびIL-17RCの可溶性細胞外ドメインのうちの1つ以上を含み、IL-17介在性シグナル伝達を抑制する可溶性受容体などの薬剤が含まれる。 30

【0358】

別の実施形態では、第二剤はIL-12アンタゴニストである。例となるIL-12アンタゴニストには、IL-12（p35およびp40を含む）に結合し、IL-12介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、IL-12の1つ以上の受容体、例えばIL-12R β 1またはIL-12R β 2に結合し、IL-12介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、p35、p40および少なくとも1つの受容体サブユニット、例えばIL-12R β 1またはIL-12R β 2を含有する複合体に結合し、IL-12介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、およびIL-12R β 1またはIL-12R β 2の可溶性細胞外ドメインのうちの1つ以上を含み、IL-12介在性シグナル伝達を抑制する可溶性受容体などの薬剤が含まれる。 40

【0359】

別の実施形態では、第二剤はIL-23アンタゴニストである。例となるIL-23アンタゴニストには、IL-23（p19およびp40を含む）に結合し、IL-23介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、IL-23の1つ以上の受容体、例えばIL-23RaまたはIL-23Rに結合し、IL-23 50

介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、p 19、p 40 および少なくとも1つの受容体サブユニット、例えば、I L - 1 2 R b 1 または I L - 2 3 R を含有する複合体に結合し、I L - 2 3 介在性シグナル伝達を抑制する薬剤（例えば、抗体および他の結合タンパク質）、および I L - 1 2 R b 1 または I L - 2 3 R の可溶性細胞外ドメインうちの1つ以上を含み、I L - 2 3 介在性シグナル伝達を抑制する可溶性受容体などの薬剤が含まれる。

【0360】

I L - 2 3 に対する例となる抗体が説明されている。例えば、Beyer et al., J. Mol. Biol. (2008), doi:10.1016/j.jmb.2008.08.001を参照のこと。

【0361】

動物モデル

受容体結合剤を、ヒトの疾患、例えばヒト自己免疫疾患および／またはヒト炎症性疾患の動物モデルにおいて評価することができる。その薬剤はその動物における対応する標的タンパク質への特異性を有し得る。

【0362】

リウマチ性関節炎モデル

受容体結合剤をリウマチ性関節炎の動物モデル、例えば、コラーゲン誘導関節炎（C I A）モデルにおいて評価することができる。例えば、McIndoe et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2210-2214、Issekutz, A. C. et al., Immunology (1996) 88:569、およびCurrent Protocols in Immunology, Unit 15.5, Coligan et al. (編), John Wiley & Sons, Inc.を参照のこと。そのモデルは、天然 I I 型コラーゲンに関して感受性のラット／マウスの系統を免疫することにより作製される。コラーゲンを完全フロイントアジュバント（C F A）中に乳化し、そして、尾の付け根に皮内注射する（100mg コラーゲン：100mg C F A／マウス）。対照マウスに0.05mlの上流水／C F A乳液を皮内注射する。不完全アジュバント中のコラーゲンかなる追加免疫用の注射を最初の免疫の21日後に投与する。疾患はコラーゲンで免疫されて誘導された自己免疫応答に起因する。

【0363】

関節を関節炎、炎症、パンス、軟骨損傷および骨吸収について、確定された尺度を用いて採点することができる。例えば、関節炎の重症度を次のように採点することができる：0＝目に見える関節炎の影響無し；1＝1つの指または関節の浮腫および紅斑；2＝2つの関節の浮腫および紅斑；3＝2つより多くの関節の浮腫および紅斑；4＝足関節の強直と手足の変形を伴う、足および指全体の重症の関節炎。各肢の採点を合計し、それぞれ個々の動物の関節炎指標（A I）として記録する。他の採点スキームをこれらおよび他の基準について使用することもできる。

【0364】

多発性硬化症

実験的アレルギー性脳脊髄炎（E A E）は多発性硬化症についての有用なマウスモデルである。受容体結合剤をE A Eモデルにおいて評価することができる。E A Eは、中枢神経系におけるT細胞および単核球細胞炎症およびその後の軸索の脱ミエリン化を特徴とするT細胞介在性自己免疫障害である（例えば、Bolton, C., 1995, Multiple Sclerosis, 143を参照のこと）。例となるプロトコルはCurrent Protocols in Immunology, Unit 15.1 and 15.2; Coligan et al. (編), John Wiley & Sons, Inc.に見出され得る。オリゴデンドロサイトまたはシュワン細胞が、例えば、Duncan et al., 1997, Molec. Med. Today, 554-561に記載されるように中枢神経系に移植されているモデルがミエリン疾患に利用可能でもある。

【0365】

同種移植片

受容体結合剤を、例えば、マウス尾皮膚移植片を使用する皮膚同種移植片拒絶反応の動物モデルにおいて評価することができる。皮膚同種移植片拒絶反応にはT細胞、ヘルパー

10

20

30

40

50

T細胞およびキラー・エフェクターT細胞が介在する。例えば、Current Protocols in Immunology, Unit 4.4; Coligan et al. (編), 1995, John Wiley & Sons, Inc. を参照のこと。他の移植拒絶モデルを使用することもできる。例えば、Tinubu et al., 1994, J. Immunol., 4330-4338を参照のこと。

【0366】

I B Dおよび大腸炎モデル

炎症性腸疾患の例となるモデルは、S C I Dマウスに移植されたC D 4 + C D 4 5 R b - 高発現細胞を使用するものである。例えば、Hirano et al., J Pharmacol Sci. 2009 Jun;110(2):169-81遺伝子導入I L - 1 0欠損マウスの使用法を参照のこと。例えば、Inaba et al., Inflamm Bowel Dis., DOI: 10.1002/ibd.21253 (2010)を参照のこと。さらに別の例となる大腸炎モデルは急性大腸炎を誘発させるためにデキストラン硫酸ナトリウム(D S S)を使用する。例えば、大腸炎は自由に飲める飲料水中の5% (重量/体積) D S S (30~40 k D aの分子質量; I C N B i o m e d i c a l s 社、オハイオ州、オーロラ) を投与することによりマウスにおいて誘導され得る。この処置により生じる症状は、出血性の下痢、体重減少、大腸の短縮化、および好中球浸潤に伴う粘膜の潰瘍形成である。D S S誘発性大腸炎は、リンパ過形成、限局性陰窩損傷、および上皮の潰瘍形成と共に炎症性細胞の固有層への浸潤を組織学的な特徴とする。これらの変化はD S Sの上皮への毒性効果のため、および固有層細胞の貪食およびT N F - α とI F N - γ の産生により生じると考えられている。例えば、Hassan et al. PLoS One. 2010 Jan 25;5(1):e8868を参照のこと。

【0367】

ドライアイ疾患モデル

受容体結合剤を当技術分野において公知の方法を用いてドライアイ疾患のマウスモデルにおいて評価することができる。例えば、ドライアイは、マウスにスコポリアミンを皮下注射し、次にそのマウスを環境制御室で飼育することにより誘発され得る。具体的な例として、正常で健康な6~10週齢の雌C 5 7 B L / 6マウスを、環境制御室内で乾燥環境に連続的に曝露することによりドライアイを持つように誘導することができる。その部屋は30%未満の低相対湿度(全般的に約19%)、高い空気の循環(15リットル/分)および一定の温度(約22℃)を有する。その部屋で飼育されたマウスは涙の分泌を阻害するためにスコポリアミンで処理もされる。持続放出性経皮スコポリアミンパッチをN o v a r t i s 社(ニュージャージー州、サミット)から入手することができる。パッチの4分の1を48時間ごとにマウスの脱毛した尾の中部に適用する。環境制御室およびスコポリアミンの組合せにより、比較的短期間(約2~4日)に重症のドライアイが生じる。環境制御室をBarbino et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 46: 2766-2711 (2005)に記載されるように準備することができ、そして、環境制御室が空気の循環、湿度および温度の制御を可能とする。

【0368】

マウスをドライアイの徴候について、例えば、a) ドライアイの患者では一般的に減少する涙液の産生を測定する綿糸試験、b) 角膜表面の損傷のマーカーである角膜フルオレセイン染色、および一般的な眼科検査を実行することによって、モニターすることができる。

【0369】

綿糸試験

涙の産生を、フェノールレッド(Z o n e - Q u i c k, L a c r i m e d i c s 社、ワシントン州、イーストサウンド)を染み込ませる綿糸試験を用いて測定することができる。蛍光灯付き拡大鏡の下で糸をジュエラーピンセットで持ち上げ、右目の結膜円蓋の外眼角に30秒または60秒配置する。涙が染み込んだ長さ(mm)を顕微鏡下で血球計算版の目盛りを用いて読み取る。

【0370】

角膜フルオレセイン染色

角膜フルオレセイン染色を、マイクロピペットにより眼の下結膜嚢に1.0 μ lの5%フルオレセインを適用することにより評価することができる。角膜をフルオレセインの滴下から3分後にコバルトブルーの光を用いる細隙灯付き生物顕微鏡で検査する。点状の染色を、角膜の表面が分割されている5つの領域のそれぞれについて0~3段階の標準化国立眼研究所(NEI)格付けシステムを用いて盲検的に記録する。

【0371】

他の適切な方法を使用してもよい。例えば、実施例8(下掲)を参照のこと。

【0372】

診断上の使用および他の使用

本明細書に記載される受容体結合剤を使用して、IL-1R1を試料、すなわちそのような受容体を発現する細胞において検出することができる。例えば、その薬剤を、標識である部分、すなわちシグナルを生じる部分、例えば酵素、放射性標識、エピトープ、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質)で直接的または間接的に標識することができる。前記薬剤を試料または細胞と接触させて、前記受容体を試料中に、または細胞上に存在するか、例えば、標準的な免疫プロットイング、免疫蛍光法、酵素免疫アッセイ(EIA)、放射免疫アッセイ(RIA)、蛍光エネルギー移動、ウェスタンブロット、および他の診断技術および検出技術を用いて決定することができる。

【0373】

また、受容体結合剤をインビボ検出用に標識し、対象に投与することもできる。その対象は、例えば、NMRまたは他の断層撮影手段により画像化され得る。例えば、前記結合剤を、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{188}Rh などの放射性標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、ポジトロン放出断層撮影(「PET」)スキャナーが検出可能であるポジトロン放出性同位体、ルシフェリンなどの化学発光体、およびペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素マーカーを使用して標識することができる。前記薬剤を、常磁性の薬剤および強磁性体または超常磁性体(主にT2応答を変える)などの造影剤を使用して標識することができる。

【0374】

受容体結合剤を、それが結合する受容体を発現する細胞を精製するために使用することもできる。例えば、受容体結合剤を固定化担体(例えば、磁性ビーズまたはカラムマトリックス)に結合し、そして、その受容体を発現する細胞に接触させることができる。その担体を、例えば、生理的緩衝液を使用して洗浄することができ、そして、その細胞をその担体から回収することができる。

【0375】

受容体結合剤を使用して、それが結合する可溶性型の受容体を精製することができる。例えば、その可溶性受容体を含有する試料を固定化受容体結合剤に結合させることができ、次に、例えば、洗浄後にその固定化薬剤から回収することができる。

【0376】

次の非限定的な実施例が本明細書に記載される本発明の実施形態をさらに例示する。

実施例

【実施例1】

【0377】

(下の)表4に記載されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸を、T7プロモーターとアンピシリン耐性遺伝子を含有するpETベクター(pET31シリーズ)またはT7プロモーターとカナマイシン耐性遺伝子を含有するpETベクター(pET28シリーズ)(EMD Chemicals社、米国、ニュージャージー州、ギブスタウン)内に構築し、そして、発現させた。発現に使用することができるコード配列の例が表5において提供される。

10

20

30

40

【表 5】

表 4

	例となるキメラタンパク質	配列番号
P 0 1	APVRS LAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKIDVSFVQGGEESNDKIPVALGIH GGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVDPKNYPKKK MDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTA MEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	1 7
P 0 2	APVRS LAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKIDVSFVQGGEESNDKIPVALGIH GGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVDPKNYPKKK MEKRFVFNKIEINNKL SFESAACPGWFLCTA MEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	1 8
P 0 3	APVRS LAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKFSMSFVQGGEESNDKIPVALGLK EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKK MEKRFVFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTA MEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFTMQFVSS	1 9
P 0 4	APVRS LAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKFSMSFVQGGEESNDKIPVALGLK EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKK MEKRFVFNKIEINNKL E FESAACPGWFLCTA MEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFTMQFVSS	2 0
P 0 5	APVRS LNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKFSMSFVQGGEESNDKIPVALGLK EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKK MEKRFVFNKIEINNKL E FESAQFPNWFLCTA	2 1

10

20

30

40

	MEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	
P 0 6	APVRS LNCTLWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVEQQVVF SMSFVQGEE SNDKIPVALGLK EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKK MEKR FVF NKIEINN KLEFESAQFPNWYIST S MEADQPVF LGGTKGGQDITDFTMQFVSS	2 3
P 0 7	APVRS LNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKFSMSFVQGEE SNDKIPVALGLK EKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKK MEKR FVF NKIEINN KLEFESAQFPNWFLCTA MEADQPVS LTNMPDEGQDITDFTMQFVSS	2 4

10

20

【 0 3 7 8 】

上のタンパク質をコードする例となる核酸配列が表 5 に記載される。いくつかの実施形態では、その核酸配列は下に記載されている最初のヌクレオチドの前に A T G をさらに含む。いくつかの実施形態では、その核酸配列は下に記載されている最後のヌクレオチドの後に終止コドン（例えば、T A A、T A G、または T G A）をさらに含む。

【表 6】

表 5

	例となるキメラタンパク質をコードする核酸	配列番号
P 0 1	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCT GGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAG GAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA GGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGATAG ATGTGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAA TGACAAAATACCTGTGGCCTTGGGCATCCAT GGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGT CTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGC AGTTGATCCCAAAAATTACCCAAAGAAGAAG ATGGACAAGCGCTTCGCCTTCATCCGCTCAG ACAGCGGCCCCACCACCAGTTTTTGAGTCTGC CGCCTGCCCCCGGTTGGTTCCTCTGCACAGCG ATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCA ATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAA ATTCTACATGCAATTTGTGTCTTCC	2 5
P 0 2	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCT GGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAG GAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA GGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGATAG ATGTGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAA TGACAAAATACCTGTGGCCTTGGGCATCCAT GGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGT CTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGC AGTTGATCCCAAAAATTACCCAAAGAAGAAG ATGGAAAAGCGATTTGTCTTCAACAAGATAG AAATCAATAACAAGCTGAGTTTTTGAGTCTGC	2 6

10

20

30

40

	CGCCTGCCCCGGTTGGTTCCTCTGCACAGCG ATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCA ATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAA ATTCTACATGCAATTTGTGTCTTCC	
P 0 3	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCT GGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAG GAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA GGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGTTCT CCATGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAA TGACAAAATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAG GAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTTGA AAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAG TG TAGATCCCCAAAATTACCCAAAGAAGAAG ATGGAAAAGCGATTTGTCTTCATCCGCTCAG ACAGCGGCCCCACCACCAGTTTTTGAGTCTGC CGCCTGCCCCGGTTGGTTCCTCTGCACAGCG ATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCA ATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAA ATTCACCATGCAATTTGTGTCTTCC	2 7
P 0 4	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCT GGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAG GAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA GGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGTTCT CCATGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAA TGACAAAATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAG GAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTTGA AAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAG TG TAGATCCCCAAAATTACCCAAAGAAGAAG	2 8

10

20

30

40

	ATGGAAAAGCGATTTGTCTTCAACAAGATAG AAATCAATAACAAGCTGGAATTTGAGTCTGC CGCCTGCCCCGGTTGGTTCCTCTGCACAGCG ATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCA ATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAA ATTCACCATGCAATTTGTGTCTTCC		10
P 0 5	GCACCTGTACGATCACTGAACTGCAGAATCT GGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAG GAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA GGACCAAATGTCAATTTAGAAGAAAAGTTCT CCATGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAA TGACAAAATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAG GAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTTGA AAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAG TGTAGATCCCCAAAATTACCCAAAGAAGAAG ATGGAAAAGCGATTTGTCTTCAACAAGATAG AAATCAATAACAAGCTGGAATTTGAGTCTGC CCAGTTCCCCAACTGGTTCCTCTGCACAGCG ATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCA ATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAA ATTCTACATGCAATTTGTGTCTTCC	2 9	20
P 0 6	GCACCTGTACGATCACTGAACTGCACGCTCT GGGATGTTAACCAGAAGACCTTCTATCTGAG GAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAA GGACCAAATGTCGAGCAACAAGTGGTGTTCT CCATGTCCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAA TGACAAAATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAG GAAAAGAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTTGA	3 0	40

30

40

前記タンパク質は、下に例示されるように、IL-1 β とIL-1Raに由来する多種多様な残基を含み得る。P01、P02、P03、P04およびP05という例の中で、サイトカインドメインはIL-1 β に由来する48～70%の残基とIL-1Raに由来する55～78%の残基を有し得る。（多数のアミノ酸残基がその2つのタンパク質の間で保存されているので、IL-1 β とIL-1Raに対する同一性パーセンテージの合計は100%よりも高くなる場合がある。）

【表 7】

表 6

	I L - 1 β の残基数	I L - 1 R A の残基数	総残基数	I L - 1 β の割合 (%)	I L - 1 R A の割合 (%)
P 0 6	1 3 0	6 2	1 5 2	8 5. 5	4 0. 8
P 0 7	1 1 3	8 0	1 5 3	7 3. 9	5 2. 3
P 0 5	1 0 8	8 5	1 5 3	7 0. 6	5 5. 6
P 0 4	1 0 4	8 9	1 5 3	6 8. 0	5 8. 2
P 0 3	9 4	9 9	1 5 3	6 1. 4	6 4. 7
P 0 2	8 5	1 0 8	1 5 3	5 5. 6	7 0. 6
P 0 1	7 4	1 1 9	1 5 3	4 8. 4	7 7. 8

10

20

【実施例 2】

【0380】

ヘキサヒスチジントグを含有するタンパク質を大腸菌細胞 B L 2 1 (D E S) 株または B L R (D E 3) 内で、L B ブロス培地中で 1 m M の I P T G を使用して 3 7 ° C で 3 時間誘導することにより発現させた。細胞を 2 0 ~ 5 0 m M トリス、0. 5 M N a C l、2. 5 m M E D T A、0. 1 % トリトン X - 1 0 0、p H 8. 0 中で溶菌した。溶菌液を、0. 1 % のポリソルベート 8 0 を含有する 1. 2 5 × P B S に対して透析し、次に、H i s T r a p H P (登録商標) 充填済みカラム (G E H e a l t h c a r e 社、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) を使用する I M A C クロマトグラフィーにかける前に 0. 8 / 0. 2 μ m フィルターに通して滅菌濾過した。そのカラムを 5 0 m M リン酸、5 0 0 m M N a C l、p H 7. 1 に平衡化し、そのカラムに試料を負荷し、そして、そのカラムを同じ緩衝液で洗浄した。そのカラムに対し、同じ緩衝液中の 2 5 m M イミダゾールを使用して前溶出操作を行い、そして、同じ緩衝液中の 1 2 5 m M イミダゾールを使用して溶出操作を行った。溶出されたタンパク質を 1. 2 5 × P B S、0. 1 % ポリソルベート 8 0、p H 7. 4 に対して徹底的に透析した。

30

【0381】

タンパク質を、それが 2 0 m M リン酸ナトリウム、0. 5 M N a C l 1 0 m M イミダゾール、p H 7. 4 の緩衝液中にある状態で負荷した。そのタンパク質を、2 0 0 m M イミダゾール、2 0 m M リン酸ナトリウム、0. 5 M N a C l、p H 7. 4 の緩衝液を使用して溶出した。溶出されたタンパク質を P B S、0. 1 % ポリソルベート 8 0、p H 7. 4 に対して徹底的に透析し、A m i c o n U l t r a (登録商標) (1 0 K) フィルターを使用して濃縮し、そして、4 ° C または - 8 0 ° C で貯蔵した。

40

【0382】

ヘキサヒスチジントグを欠くタンパク質をイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。P 0 5 タンパク質をイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。発現細胞の溶菌液を、塩が無く (約 1 m S / c m の電気伝導度)、低 p H (約 p H 5. 5) の状態で G i

50

g a C a p S (商標) カラム (T o s o h B i o s c i e n c e L L C 社、米国、ペンシルバニア州、キング・オブ・プロシア) に供した。その後、そのカラムに対し、pH 勾配 (緩衝液 A = 10 mM 酢酸、pH 5.5 ; 緩衝液 B = 20 mM トリス、pH 8) による溶出操作をおこなった。次に、溶出されたタンパク質を含有する 5 ml の画分を 5 ml の H₂O と 5 ml の 20 mM トリス (pH 8) で希釈し、その後、C a p t o (商標) Q 樹脂 (G E H e a l t h c a r e 社、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) に供し、そして、20 mM トリス、pH 8.0 中の 0 mM ~ 250 mM の N a C l 濃度勾配を使用して溶出した。溶出されたタンパク質を 1.25 × P B S、0.1% ツイーン (登録商標) 80 または ツイーン (登録商標) を欠く 1.25 × P B S に対して徹底的に透析し、そして、貯蔵した。図 6 を参照のこと。P 0 3 タンパク質および P 0 4 タンパク質を、同様の方法を用いて精製した。

10

【0383】

P 0 5 を発現する細胞を、S a r t o r i u s 2 L B i o s t a t (商標) A + 内の、10 g / L グルコース、10 mM M g S O₄、微量元素 (1 mg / ml の T e k n o v a (商標) 1000 X 微量元素、T 1001 番) および抗生物質で補充された無動物成分ソイトン (T 7660 番) を含む T e k n o v a (商標) テリフィック・ブロスでも培養し、そして、その細胞に対し、OD 35 ~ 40 の時点で 1 mM の I P T G を使用して約 6 時間の誘導操作を行った。細胞を 37 °C、30% の溶存酸素、pH 7.0、および 200 ~ 800 r p m の攪拌、2 L / 分の酸素注入の条件で培養した。pH の上昇によって検出されるグルコースの欠乏が起きたときに、細胞に 9 g のグルコース / L / 時間の割合でグルコースを供給した。pH が減少する (誘導から約 2.5 時間後) ときは、供給を 6 g グルコース / L / 時間に低下させた。

20

【0384】

細胞を収集し、溶菌緩衝液 (20 mM トリス、10 mM E D T A、0.1% トリトン、pH 8.0 ; 20 mM トリス、10 mM E D T A、0.1% トリトン、pH 7.0 ; 50 mM M O P S、10 mM E D T A、0.1% トリトン、pH 6.5 ; または 50 mM M O P S、10 mM E D T A、0.1% トリトン、pH 6.0) 中で溶菌した。溶菌液を pH 5.3 および 3 m S / c m (1 ml カラム樹脂当たり 35 mg の生成物) で P o r o s (登録商標) X S 陽イオンイオン交換媒体 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社、米国、カリフォルニア州、カールスバード) に負荷した。

30

【0385】

例となる手法では、P 0 5 タンパク質を、100 mM M O P S、25 mM N a C l、pH 7.0 を含有する緩衝液を使用する pH 7.0 へのステップにより溶出した。第 1 溶出ピークを廃棄し、第 2 溶出ピークをプールして収集し、そして、その第 2 溶出ピークが P 0 5 タンパク質を含んでいた。初期のプールは脱アラニン種と比べて未変性の P 0 5 タンパク質に富んでいた。この溶出された物質を次に C a p t o Q (商標) 陰イオン交換樹脂に流した。通過画分に未変性の P 0 5 タンパク質が含まれており、その通過画分を収集した。

【0386】

別の例となる手法では、媒体を 100 mM M O P S、20 mM N a C l、pH 6.0 で洗浄した。P 0 5 タンパク質を、100 mM M O P S、50 ~ 58 mM N a C l、pH 6.0 を含有する緩衝液を使用する pH 6.0 へのステップにより溶出した。第 1 溶出ピークをその後のピークと分離し、そして、その第 1 溶出ピークが未変性の P 0 5 タンパク質を含んでいた。この溶出された物質を次に C a p t o Q (商標) 陰イオン交換樹脂に流した。通過画分に未変性の P 0 5 タンパク質が含まれており、その通過画分を収集した。

40

【実施例 3】

【0387】

タンパク質またはタンパク質を含有する上清を I L - 1 活性について細胞ベースの測定法において評価した。H E K - B l u e (商標) I L - 1 β 応答性細胞を使用して I L -

50

IL-1β活性をモニターした（InvivoGen社、米国、カリフォルニア州、サンディエゴより入手可能）。これらの細胞は5つのNF-κB結合部位と5つのAP-1結合部位に融合したIFN-β最小プロモーターの制御下にあるSEAPレポーター遺伝子を含む。細胞表面上のIL-1受容体のIL-1βとの結合によりNF-κB活性化とSEAP産生が引き起こされる。SEAPレポートは、例えば、QUANTI-Blue（商標）（InvivoGen社、米国、カリフォルニア州、サンディエゴ）と分光光度分析を用いて検出され得る。HEK-Blue IL-1β細胞懸濁液を70～80%の集密まで培養された細胞から調製した。その再懸濁細胞を新しい培養培地（DMEM、4.5g/lグルコース、2mM L-グルタミン、10%（体積/体積）加熱不活化胎児ウシ血清（56℃で30分）、50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、1000mg/mlノルモシン（Normocin）T）中に約330,000細胞/mlに調節した。

10

【0388】

試薬を平底96ウェル細胞培養プレートのウェルに添加した：50mlの最終体積へ10mlの20ng/mlの濃度のIL-1β、100μlの目的の薬剤および30mlの細胞培地。陽性対照試料と陰性対照試料を並行して調製した。次に150mlのHEK-Blue IL-1β細胞懸濁液（約50,000細胞）を各ウェルに添加し、そして、そのプレートを組織培養恒温器内、5%CO₂、37℃で一晩培養した。概して、（200mlの最終体積中の）最終IL-1β濃度は0.1ng/mlであった。IL-1β活性を翌日（12～15時間後）に評価した。定量前に製造業者の指示に従ってQUANTI-Blue（商標）試薬を調製した。平底96ウェル測定用プレートを、150mlのQUANTI-Blue（商標）溶液を各ウェルに添加して準備した。96ウェル組織培養プレートのウェルから50mlの調整済み培地を測定用プレートの各ウェルに添加した。そのプレートを37℃で約15～20分間保温した。その後、SEAPレベルを、分光光度計を使用して620～655nmで測定した。

20

【0389】

結果、図7Aに示されているように、このアッセイでは、P06タンパク質はIL-1RIアゴニストとして挙動し、P07タンパク質は部分的アゴニストとして挙動し、そして、P01タンパク質は受容体を活性化することができなかった。実際には、P01タンパク質は、IL-1βの存在下でアッセイされたとき、アンタゴニストとして挙動した。図7Bは、上のHEKBlue（商標）細胞アッセイを使用した、様々なIL-1βタンパク質濃度におけるP01によるIL-1β活性の拮抗作用を示す。拮抗作用はP01の量の増加と共に上昇した（x軸はP01を含有する上清のマイクロリッター数を反映する）。

30

【0390】

タンパク質P01、P02、P03、P04およびP05はそれぞれIL-1β活性を抑制した。例えば図8Aおよび8Bを参照のこと。P05のIC50は約5ng/ml未満であった。P05を、このアッセイにおいてIL-1RIを刺激する能力について試験し、そして、P05は、試験した最も高い濃度である1mg/mlでもどのような検出可能な受容体活性化作用も有していないことが観察された。P01、P02、P03、P04およびP05も、IL-1βに対して応答性であるヒト骨肉腫細胞株であるMG-63細胞におけるIL-1β誘導性IL-6発現を阻害した。ドライアイ疾患のマウスモデルでは、ヘキサヒスチンタグ化P05が生物活性を有することが観察された。非タグ化P05については下の実施例8も参照されたい。

40

【実施例4】

【0391】

可溶性組換えヒトIL-1RI（IL-1RIの細胞外ドメインに対応する）へのタンパク質の結合特性を、Reichert SR7000DC Dual Channel SPRシステムを使用する表面プラズモン共鳴を用いて評価した。結合は、0.005%ツイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水中で評価された。IL-1βは8～9nMの

50

間の K_D および $2 \sim 3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の間の解離定数 (K_d) を有することが観察され、別の実験では、約 2 nM の K_D 、 $1.3 \sim 1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の結合定数および約 $2.9 \sim 3.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離定数 (K_d) を有することが観察された。図 9 A を参照のこと。P 0 1 タンパク質は I L - 1 β と同様の結合キネティクスで結合したが、結合実験 (約 180 秒) の解離期に間に解離しなかった。このように、P 0 1 タンパク質は、同様の条件下で I L - 1 β よりも高い親和性で I L - 1 R I に結合した。

【0392】

I L - 1 R a の結合は約 0.33 nM の K_D 、約 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の結合定数 (K_a)、および約 $6.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の解離定数 (K_d) を有することが観察された。図 9 B を参照のこと。キメラサイトカインドメイン P 0 1、P 0 2、P 0 3、P 0 4 および P 0 5 は約 12 pM から 1700 pM までの範囲の K_D 、約 $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の結合定数 (K_a)、および約 2×10^{-5} から $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ までの範囲の解離定数 (K_d) を有することが観察された。例えば、図 9 C および 9 D ならびに下の表 7 を参照のこと。

【表 8】

表 7

タンパク質	$k_a (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{pM})$
I L - 1 β	$1.47 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$2.95 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	2010
I L - 1 R a	$2.01 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$6.58 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	326
P 0 1	$4.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$2.32 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	470
P 0 2	$3.39 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$2.16 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	636
P 0 3	$4.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	290
P 0 4	$3.00 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$5.14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	1714
P 0 5	$3.47 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$4.15 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	12
P 0 6	$4.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	410
P 0 7	$1.58 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1.46 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	92553

【実施例 5】

【0393】

その他の例となるキメラ I L - 1 ファミリータンパク質には次のものも含まれる。

【表 9】

P08	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKFSMSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	配列番号 3 2
P09	APVRSQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKFSMSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	配列番号 3 3
P10	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKIDVSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	配列番号 3 4
P11	APVRSINCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKIDVSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	配列番号 3 5
P12	APVRSINCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKFSMSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFTMQFVSS	配列番号 3 6
P13	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKFSMSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQED	配列番号 3 7
P14	APVRSINCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNVLEEKFSMSFVQGEES NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNK IEINNKLFEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQED	配列番号 3 8

10

20

30

【0394】

下のポリペプチドは、IL-1 α に由来する少なくとも2つのセグメントとIL-1R α に由来する少なくとも2つのセグメントを含むキメラドメインである。

【表 10】

SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGNPNV 配列番号 3 9
LEEKFDMGAYKSSKDDAKITVILRISKTLQLYVTAQDEDQPVLLKEMPEIP
KTITGSETNLLFFWETHGTKNYFTSVAHPNLFLCTAMEADQPVSLTNMPD
EGVMVTKFYILENQA

40

【実施例 6】

【0395】

循環置換したIL-1キメラドメインが、その分子のN末端を、リンカー配列を使用し

50

てC末端に結合し、それらの末端のそれぞれについて新しい場所を選択することにより構築され得る。IL-1 β に由来する末端を有するタンパク質にとって、リンカーの長さは5アミノ酸から10アミノ酸までの間、例えば約7アミノ酸であり得る。新しい末端にとって好ましい場所は、受容体から見て外側に向くループ、例えば β 6 $\sim\beta$ 7ループ（例えば、配列番号1の71 $\sim$ 80に対応するアミノ酸）または β 7 $\sim\beta$ 8ループ（例えば、配列番号1の84 $\sim$ 99に対応するアミノ酸）内にある。

【0396】

そのような循環置換したIL-1キメラドメインの例には、

DKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNKIEINNKLFEFESA
QFPNWFLLCTAMEADQPVS LTNPDEGVMVT KFYMQFVSSG
GSGGGSAPVRS LNCR IWDVNQKTFYLRNNQLVAGY LQGP N
VNLEEKFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKD
(配列番号40) ; および

NYPKKKMEKRFFVFNKIEINNKLFEFESAQFPNWFLLCTAMEA
DQPVS LTNPDEGVMVT KFYMQFVSSGSGGGSAPVRS LN
CR IWDVNQKTFYLRNNQLVAGY LQGP NVNLEEKFSMSFVQ
GEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPK
(配列番号41)

が含まれる。

【実施例7】

【0397】

タンパク質P03、P04、P05、mIL-1Ra（メチオニルIL-1Ra）およびIL-1 β をリン酸-緩衝生理食塩水（PBS）、pH7.4中に0.5mg/mlの濃度で調製した。それらのタンパク質をSYPROオレンジ色素（Invitrogen社、カリフォルニア州）と、ストック濃度について1:500で希釈して混合し、示差走査型蛍光定量にかけた。例えば、He et al. (2010) J. Pharm. Sciences, 99 1707-1720を参照のこと。蛍光の測定を、1分あたり1 $^{\circ}$ Cの率で温度を25 $^{\circ}$ Cから95 $^{\circ}$ Cまで上昇させているときに、Agilent Mx3005 QPCR機械を使用してモニターした。融点（ T_m ）の値は、蛍光遷移の一次導関数の最大値から得た。タンパク質P03、P04およびP05は50 $^{\circ}$ Cよりも高い59 $^{\circ}$ Cという折畳み構造の変性の開始温度、ならびに59 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ Cおよび64 $^{\circ}$ Cよりも高い T_m を有することが観察された。結果が下の表8ならびに図10Aおよび10Bに示されている。

【表11】

表8

タンパク質	T_m ($^{\circ}$ C)	折畳み構造の変性の開始温度 ($^{\circ}$ C)
mIL-1Ra	56	48
IL-1 β	56	41
P03	65	59
P04	60	51
P05	65	59

【0398】

P04はmIL-1RaとIL-1 β よりも約4 $^{\circ}$ C高い T_m を有し、そして、mIL-1Raよりも約3 $^{\circ}$ C高く、IL-1 β よりも約10 $^{\circ}$ C高い折畳み構造の変性の開始温度を示す。P03とP05はmIL-1RaとIL-1 β よりも約9 $^{\circ}$ C高い T_m を有し、そして、mIL-1Raよりも約11 $^{\circ}$ C高く、IL-1 β よりも約18 $^{\circ}$ C高い折畳み構造の変

性の開始温度を示す。

【実施例 8】

【0399】

精製された P05（ヘキサヒスチジンタグを欠く）を 1.25×PBS 中に調製し、ドライアイ疾患のマウスモデルにおいて試験した。このモデルでは、Jackson Laboratories 社から購入した（30%以上の相対湿度、ヒドロゲル補助食品、および enviro-dry 環境強化を有する動物飼育室で 1～2 週間順応させられた）6～10 週齢の雌 C57BL/6 マウスを第 0 日にフルオレセイン染色について事前に選別した。フルオレセイン染色について、新しく注射用水に 10mg/mL の濃度に希釈して作製したフルオレセインをそれぞれの各眼に対して 0.4 μL ずつ投与した。投与から約 8～13 分後、Olympus 蛍光解剖顕微鏡を使用して眼を採点した。点状の染色を、角膜の表面が分割されている 5 つの領域のそれぞれについて 0～3 段階の標準化国立眼研究所（NEI）格付けシステムを用いて記録した（スコアの範囲は 0～15/眼である）。教育用ブリッジを使用して、各眼について 1 つの全体的なスコアを与えるために、2 つの盲検によるスコアにより（複数の）マウスが同時に評価された。

10

【0400】

各眼について（15 という最大のスコアのうち）7 以下のスコアを有するマウスを第 1 日にドライアイチャンバー（20%±2%の湿度と約 21 L/分/ケージという一定の空気の循環）内に配置し、そして、実験の最中は（検査を除いて）このチャンバー内で飼育した。第 3 日に、マウスを再度採点し、そして、1 群当たり 8～10 匹のマウスを有する処置群に無作為化した。4～5 匹のマウスからなる各ケージがほぼ同じ平均疾患スコアを有するようにマウスを無作為化した。第 3 日に開始し、無作為化の後に、マウスに 1 日につき 2 回の頻度で 3 μL/眼で目薬中の P05 またはベヒクル（1.25×PBS）を局所投与した。マウスを角膜フルオレセイン染色について第 7 日、第 9 日、および第 11 日に上で説明したように検査し、採点した。実験の最中は、採点者は処置群について盲検状態にされた。

20

【0401】

図 11A は、次の 1 日につき 2 回の処置、すなわち、処置無し、ベヒクル（1.25×PBS）による処置、および 10mg/mL（1%）P05 による処置の下にある、2 つの同一の実験のマウスについての第 0 日、第 3 日、第 7 日、第 9 日、および第 11 日での平均角膜染色スコア±標準誤差の棒グラフである。10mg/mL の P05 は実験の第 7 日、第 9 日、および第 11 日に角膜染色を著しく低下させた。角膜染色の低下によって評価される効力は 0.1mg/mL の P05 という低い用量を用いても観察された。組換え IL-1Ra も中程度にその動物モデルにおける角膜染色を低下させた。

30

【0402】

図 11B に示されているように、10mg/mL の P05 の効果は、同じベヒクル中の 10mg/mL のマウス血清アルブミンとの比較に基づいて特異的であった。ベヒクルと比べて、10mg/mL マウス血清アルブミン（MSA）では効果は見られず、そして、10mg/mL の P05 の効果は 10mg/mL マウス血清アルブミンと比べて統計的に有意であった。図 11C に示されているように、10mg/mL の P05 を点眼用乳剤中の 0.05%サイクロスポリン（Restasis（登録商標））とも比較した。P05 は角膜染色を低下させたが、0.05%サイクロスポリン点眼用乳剤については 1 日につき 2 回の投薬から約 1 週間後に効果が観察されなかった。

40

【実施例 9】

【0403】

補足ステップが、BLR（DE3）大腸菌細胞における発酵により産生された P05 の精製のために開発されている。溶出条件は、1 mL のカラムについての実験アプローチの統計的設計（DOE）により確定された。その最適化された条件は中間規模（10 mL カラム）で実行された。

【0404】

50

生成物を、10 mM EDTAを添加したpH 7.0の20 mMトリスからなる溶菌緩衝液中でマイクロフルイダイゼーションにより抽出する。清澄化した溶菌液を5.3のpHおよび3 mS/cmの電気伝導度に調節する。その調整済み溶菌液を、1 mLのカラム当たり25~30 mgのP05という容量に対して2分間の滞留時間を有するPoros（登録商標）XS（強陽イオン交換樹脂）に負荷する。そのカラムを平衡化緩衝液で洗浄して結合しなかった種を除去する。pH 6.0および3 mS/cmでの2回目の洗浄を実施して夾雑物の集団を除去する。生成物をpH 6.0および6.6 mS/cmで溶出する。生成物関連種をpH 6.0および12.4 mS/cmで溶出する。カラムを高塩緩衝液およびNaOHで清浄化する。

【0405】

P05は6.58という理論上のpIを有する17 kDaのタンパク質である。脱アラニン種の理論上のpIは6.8である。メチオニル化種の理論上のpIは6.3であり、アセチル化種の理論上のpI値は6.3より下である。これらの3つのアイソフォームとP05タンパク質は弱陽イオン交換分析クロマトグラフィーによって容易に分離される。脱アラニン種は、大腸菌内に見出されるアミノペプチダーゼP活性の産物である可能性がある。それらのアイソフォームは質量分析法、ペプチドマッピング法、およびHPLC法によって特定され得る。

【0406】

クロマトグラフィーの材料

Poros（登録商標）XSは50 μmの公称粒径を有する架橋ポリ（スチレン-ジビニルベンゼン）ビーズに基づく。そのクロマトグラフィー用マトリックスはスルホプロピル表面化学を有する。それは結合の最中の塩レベルの上昇に耐えるように設計された。Poros（登録商標）XS（カタログ番号4404339、Life Technologies社）材は大量の泥状物として調達され、そして、1 mLという最終カラム体積（5 cmのベッド高）を有する5×50 mm Tricornカラム（カタログ番号28-4064-09、GE Healthcare社）に充填され、または10×150 mm Tricornカラム（カタログ番号28-4064-16、GE Healthcare社）に10.5 mLという最終体積（13.4 cmのベッド高）まで充填された。

【0407】

緩衝液

全ての緩衝液はMilliQ水を使用して体積に基づいて調製された。所望のpHに達するために、10 NのHClまたは（10 MのNaOHのストック溶液から作製された）1 MのNaOHのどちらかを添加して緩衝液を滴定した。調製後、全ての緩衝液を0.2 mmのPESボトルトップフィルターに通して濾過した。全てのpHと電気伝導度の測定を室温（約20~25℃）で実行した。

【0408】

Poros（登録商標）XS緩衝液

CEx平衡化緩衝液—1 Lの緩衝液当たり0.57 mLの水酢酸と2.44 gのNaClを添加することにより作製された21 mMのNaClを含む10 mM酢酸（HoAc）。最終pHは5.3であり、最終電気伝導度は3 mS/cmであった。

【0409】

CEx洗浄緩衝液—1 Lの緩衝液当たり19.5 gのMOPS遊離酸、1.5 gのMOPSナトリウム塩、および1.28 gのNaClを添加することにより作製された22 mMのNaClを含む100 mM MOPS。最終pHは（所望により）5.7~6.6であり、最終電気伝導度は3 mS/cmであった。

【0410】

CEx溶出緩衝液—1 Lの緩衝液当たり19.5 gのMOPS遊離酸、1.5 gのMOPSナトリウム塩、および6.93 gのNaClを添加することにより作製された118 mMのNaClを含む100 mM MOPS。最終pHは（所望により）5.7~6.6であり、最終電気伝導度は12.4 mS/cmであった。

10

20

30

40

50

【0411】

C E X 溶離緩衝液－1 L の緩衝液当たり 0. 57 mL の氷酢酸と 175 g の NaCl を添加することにより作製された 3 M の NaCl を含む 10 mM 酢酸。最終 pH は 5. 3 であり、最終電気伝導度は 188 mS / cm であった。

【0412】

溶菌液調製物

溶菌液の pH を、1 L の緩衝液当たり 11. 5 mL の氷酢酸を混合することにより作製された 200 mM で pH 4. 5 の酢酸を使用して調節した。その溶液を、1 M の NaOH を使用して 4. 5 の最終 pH まで滴定した。濃縮された酸または強酸の低い pH に起因する局所的な沈殿を防ぐためにこの溶液を使用した。

10

【0413】

これらの実験の負荷材料は 2 L フェドバッチバイオリアクターの運転に由来する抽出物であった。細胞沈殿物からの生成物の抽出は、10 mM EDTA を添加した pH 7. 0 の 20 mM トリスを使用して行われた。その新しい抽出物を、Milli Q 水を使用して 3 mS / cm の電気伝導度にまで希釈した（通常 1 : 1 ~ 1. 5 の希釈）。その希釈された抽出物を 41 mL のアリコットにして -20 °C で凍結した。負荷物を調製するために、アリコットを室温で融かし、そして、pH 4. 5 の 200 mM 酢酸を使用して pH 5. 3 に滴定した。電気伝導度のわずかな調整は、滴定後に必要とされるとき、Milli Q 水の添加により行った。最後に、負荷物を、C E X 平衡化緩衝液を使用して 2. 5 倍に希釈して約 1. 7 g / L の濃度にした。その負荷物を 0. 8 / 0. 2 μm フィルターに通して滅菌濾過した。その調整済み負荷物を調製した当日に使用した。

20

【0414】

宿主細胞タンパク質の測定

宿主細胞タンパク質（HCP）レベルを大腸菌発現システムに特異的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）キット（カタログ番号 F410、Cygnum Technologies 社）により決定した。そのキットと共に提供されたプロトコルに正確に従った。HCP レベルについてアッセイされる試料を、試料希釈剤（カタログ番号 I028、Cygnum Technologies 社）を使用して、10 倍という最小希釈率で希釈した。試料は通常 2 つの希釈率で希釈して、それぞれの希釈について 2 つ組でプレートに添加した。HCP のレベルは百万分率（ppm）または ng - HCP / mg - 生成物を単位として表される。

30

【0415】

SDS - PAGE 分析

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS - PAGE）による純度分析では、1 mm × 10 ウェル、1 mm × 12 ウェル、または 1 mm × 15 ウェルのいずれかの NuPAGE 4 - 12 % ビストリスゲル（それぞれカタログ番号 NP0322 Box および NP0323 Box、Invitrogen 社）を使用する。泳動緩衝液は 20 × 濃度（カタログ番号 NP0002、Invitrogen 社）から調製した 1 × MES SDS 泳動緩衝液である。Novex シャープ染色済みタンパク質標準物質（カタログ番号 57318、Invitrogen 社）を分子量の指標として使用する。分析用の試料は Milli Q 水を使用する希釈により 30 mL の最終体積に調製され、そして、10 mL の 4 × ドデシル硫酸リチウム（LDS）（カタログ番号 NP0008、Invitrogen 社）を 1 × の終濃度まで添加した。その試料をボルテックスにより 5 秒間混合した。A280 / A320 測定により計算したタンパク質濃度に基づき、ウェル当たり 3 μg の目的物を負荷した。

40

【0416】

wC E X

P05 を、10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5. 5（緩衝液 A）と 10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5. 5、250 mM NaCl（緩衝液 B）の移動相溶液を使用する、1. 2 mL / 分の流速で Dionex ProPac（登録商標）WCX - 10 4 × 250 mm

50

カラム（製品番号 054993）を使用する弱陽イオン交換クロマトグラフィー（w C E X）により評価した。濃度勾配は 20 分に渡って 10 % B から 25 % B まで実行される。アセチル化種が、実行から約 10 分後に最初に溶出する。メチオニル化種が 2 番目に溶出し、次に未変性の P 0 5 が、その濃度勾配の後の部分にある脱アラニン種の約 1.5 ～ 2.5 分前に溶出する。

【0417】

陽イオン交換捕捉クロマトグラフィー

クロマトグラフィーを A K T A E x p l o r e r 100 クロマトグラフィーシステムで実行した。10 mL の P o r o s （登録商標）X S カラムを充填した。材料を 40 mg の P 0 5 / m l の割合で負荷した。または、材料を 25 ～ 30 mg の P 0 5 / m l の割合で負荷することができる。クロマトグラフィーの方法が表 9 にまとめられている。滞留時間は負荷ステップおよび溶出ステップの間、2 分で一定に保たれた。擬似溶出プールを作成し、そして、精製物の回収率、H C P れべる、および未変性のタンパク質の割合（％）について測定した。全部で 2 回の実行を、10 mL カラムについて、p H 6.0 で 30 % と 35 % の % B を用いて完了した。

【表 12】

表 9

ステップ	カラム体積（C V）	緩衝液
平衡化	10	10 mM HoAC + 21 mM NaCl pH 5.3
負荷	40	調整済み溶菌液、3 mS/cm pH 5.3
1 回目の洗浄	5 ～ 10	10 mM HoAC + 21 mM NaCl pH 5.3
2 回目の洗浄	9 ～ 10	100 mM MOPS + 22 mM NaCl pH 6.0 (3 mS/cm)
1 回目の溶出	30	100 mM MOPS + 22 mM NaCl pH 6.0 (3 mS/cm) を 100 mM MOPS + 118 mM NaCl pH 6.0 が 30～35% になる様に混合
2 回目の溶出	6	100 mM MOPS + 118 mM NaCl pH 6.0
溶離	5 ～ 6	10 mM HoAC + 3 M NaCl pH 5.3
清浄化	20	1 M NaOH
中和（NaCl）	10	100 mM MOPS + 118 mM NaCl pH 6.0
再平衡化	20	10 mM HoAC + 21 mM NaCl pH 5.3

【0418】

2 回目の洗浄により、主に夾雑物から構成されるピークが生じる。30 % の B と 35 % の B による 1 回目の溶出によって、S D S - P A G E 分析で純度が 95 % よりも高い生成

物が生じる。2回目の洗浄の塩濃度を少しずつ上昇させて溶出ピークの肩部を取り除くことができる。図13～16も参照されたい。最終生成物プールの回収率は50%よりも高く、脱アラニン種は10%未満、溶出液中のHCPは600ppm未満である。

【0419】

2Lの培養調製物では、250mLのPoros（登録商標）XSカラムを捕捉クロマトグラフィーのために使用し、50mLのPorosHQ陰イオンカラムを使用し、そして、220mLのCHA（ハイドロキシアパタイトカラム）を使用して夾雑物をさらに除去した。

【0420】

100Lの培養調製物では、6.25LのPorosXSカラムを捕捉クロマトグラフィーのために使用し、1LのPorosHQカラムを陰イオンクロマトグラフィーのために使用し、そして、30LのCHAハイドロキシアパタイトカラムを使用して夾雑物をさらに除去した。3回のサイクルが100Lの発酵槽全体を処理するために必要とされた。

【0421】

1000Lの培養調製物では、約50Lから約80Lまで、例えば約60L、または約70Lの体積を有するPorosXSカラムを捕捉クロマトグラフィーのために使用することができ、約5Lから約20Lまで、例えば約10Lまたは約15Lの体積を有するPorosHQカラムを陰イオン交換クロマトグラフィーのために使用することができ、そして、約250Lから約500Lまで、例えば約300Lまたは約400Lの体積を有するCHAハイドロキシアパタイトカラムを使用して夾雑物をさらに除去することができる。所望により、いくつかのバッチにおける大きい発酵槽を処理するためにより小さいカラムが使用されるだろう。

【実施例10】

【0422】

P04が精製され、そして、25%PEG1500、0.1MPCB（pH4.0）中20℃で回折品質の結晶を成長させた。そのタンパク質は空間群 $P2_12_12_1$ の状態に結晶化し、 $a=44.5$ 、 $b=46.4$ 、 $c=64.8$ という典型的な単位格子ディメンションを有する。その結晶は高分解まで回折され、そして、 $1.47\text{ \AA}$ まで拡大したデータセットが先端放射光施設ビームラインLS-CAT21ID-F（米国、イリノイ州、シカゴ）で収集された。P04のX線構造は、PDB構造の1ITBと1IRA（Vigers et al., (1997) Nature 386: 190-194および Schreuder et al., (1997) Nature 386: 194-200）に由来する既知のIL-1 β 構造とIL-1Ra構造の適切な部分を組み込んでいるモデルを使用する分子置換により解明された。最終モデルは $17.6\%/20.4\%$ という $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ まで精緻化された。その最終モデルは1つのP04分子（140残基）と98分子の水を含有する（表10）。P04残基1～2、48～49および85～93は、その電子密度では見えなかった。それらの残基は最終モデルでは失われている。

【表 1 3】

表 1 0

結晶構造解析データの収集と精密化統計情報 (Refinement Statistics)

データ収集の統計情報		
空間群	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
格子ディメンション		
a、b、c (Å)	44.5、46.4、64.8	10
α、β、γ (°)	90、90、90	
波長 (Å)	0.9787	
分解能 (Å)	50.0 - 1.47 (1.52 - 1.47)	
R _{merge}	0.039 (0.56)	
I / σ I	37.7 (2.9)	
完全性 (%)	99.8 (100)	20
多重度	6 (5.9)	
精密化統計		
分解能 (Å)	28.64 - 1.47 (1.53 - 1.47)	
反射数	22926	
R _{work} / R _{free}	17.6 / 20.4	
平均B (Å)	22.3	30
結合距離の根平均二乗偏差 (Å)	0.007	
結合角の根平均二乗偏差 (°)	1.137	

括弧内の数字は最外殻に対応する。

$$R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} [\sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_i I_i]$$

$R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} \|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}\| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$ であり、 F_{obs} と F_{calc} は観察された構造係数および計算された構造係数である。

R_{free} は精緻化に使用されない反射のサブセット (5%) から計算された。

【0 4 2 3】

P 0 4 結晶構造はモデル化により予想された構造と同様の折畳み構造を有する。この構造の視像が図 1 に示されている。その 2 つの構造を重ね合わせたものが図 1 2 A に示されている。骨格炭素の根平均二乗偏差 (RMSD) は、I L - 1 β セグメントと I L - 1 R a セグメントとそれぞれの親分子上の同じ残基に対して、1.41 Å と 1.09 Å であった。P 0 4 は少なくとも 1 つの特有の塩橋を有し、そして、I L - 1 β に由来する残基と I L - 1 R a に由来する対応する残基、すなわち、(i) 図 1 2 B に示される G l u 3 9 - L y s 6 4 (I L - 1 R A に由来する G l u 3 9、I L - 1 β に由来する L y s 6 4)

40

50

、(i i) 図 1 2 C に示される A r g 9 - G l n 1 4 9 (I L - 1 R A に由来する A r g 9、I L - 1 β に由来する G l n 1 4 9)、および (i i i) 図 1 2 C に示される S e r 1 5 2 - L y s 4 0 (I L - 1 R A に由来する S e r 1 5 2、I L - 1 β に由来する L y s 5 0) との間の相互作用に関わる 2 つの特有の水素を有する。これらの相互作用は I L - 1 β 構造と I L - 1 R a 構造には存在しないので、これらの特有の相互作用が P 0 4 の上昇した熱安定性を説明することができる。これらの相互作用に参与する残基は、同様に上昇した熱安定性を有するタンパク質である P 0 3 と P 0 5 にも存在する。

【実施例 1 1】

【0 4 2 4】

追加の精製ステップを、細胞培養物から作製されたタンパク質をさらに精製するために用いて、例えば、生成物関連種、例えば脱アラニン種、アセチル化種およびメチオニル化種、例えばメチオニル化された未変化のタンパク質を分離して除くことを補助することができる。そのような精製ステップは、例えば、セラミックハイドロキシアパタイトカラム (C H A) を使用し、宿主細胞タンパク質 (H C P) レベルを 5 0 p p m 未満にまで低下させることができる。C H A タイプ I は、電荷および／またはカルシウムイオンの配位に基づいて生体分子の分離を提供するマルチモードクロマトグラフィー媒体である。5 m L のカラム体積と 4 0 μ m の粒径を有する充填済みカラムを B i o - R a d L a b o r a t o r i e s 社 (カタログ番号 7 3 2 - 4 3 2 2) から入手した。

【0 4 2 5】

緩衝液調製物

全ての緩衝液は M i l l i Q 水を使用して体積に基づいて調製された。全ての緩衝液成分は、供給業者とカタログ情報と共に表 1 1 にまとめられている。所望の p H に達するために、1 0 N の H C l または (1 0 M の N a O H のストック溶液から作製された) 1 N の N a O H のどちらかを使用して緩衝液を滴定した。調製後、全ての緩衝液を 0 . 2 μ m の P E S ボトルトップフィルターユニットに通して濾過した。全ての p H と電気伝導度の測定を室温 (約 2 0 ~ 2 5 $^{\circ}$ C) で実行した。

【表 1 4】

表 1 1 . 緩衝液成分情報

化合物	供給業者	カタログ番号
10 N HCl	Fisher Scientific	SA49
10 M NaOH	BDH/VWR	BDH3247-1
NaCl	Fisher Scientific	S671-500
リン酸二水素カリウム	Fisher Scientific	BP362-500
リン酸水素二カリウム	Fisher Scientific	BP363-500
氷酢酸	Fisher Scientific	
エタノール (200 プルーフ)	Decon Labs, Inc	2701

【0 4 2 6】

C H A 緩衝液調製物

C H A の平衡化および洗浄用緩衝液 - 1 3 . 5 m M の N a C l を含む 1 0 m M リン酸カリウムが 1 L の緩衝液当たり 1 . 1 8 g のリン酸二水素カリウム、0 . 2 1 g のリン酸水素二カリウム、および 0 . 7 9 g の N a C l を添加することにより作製された。最終 p H は 6 . 5 であり、最終電気伝導度は 2 . 5 m S / c m であった。

【0 4 2 7】

CHA溶出緩衝液－160mMリン酸カリウムが1Lの緩衝液当たり14.1gのリン酸二水素カリウムおよび9.8gのリン酸水素二カリウムを添加することにより作製された。最終pHは6.5であり、最終電気伝導度は約18mS/cmであった。

【0428】

CHA溶離／調整緩衝液－400mMリン酸カリウムが1Lの緩衝液当たり19.2gのリン酸二水素カリウムおよび45.1gのリン酸水素二カリウムを添加することにより作製された。最終pHは6.8であり、最終電気伝導度は約52mS/cmであった。

【0429】

注入流 (feed stream) 調製物

AEX通過画分を、限外濾過 (10,000kDa Hydrosart膜、Sartorius - Stedim社) を用いて5倍に濃縮した。透析濾過はこれらの実験には実行しなかった。濃縮後、pHを、MilliQ水を使用して氷酢酸を10倍に希釈して作製した10%酢酸を使用して調節した。電気伝導度を、MilliQ水を使用して調節した。

【0430】

注入流 (feed stream) 調製物

これらの実験の負荷物を2Lフェドバッチバイオリアクター実験で発酵させられた大腸菌細胞から抽出した。抽出は、10mM EDTAが添加された0.1%トリトンXを含むpH7.0の20mMトリスを使用して実行された。作りたての抽出物を、MilliQ水を使用して3mS/cmの電気伝導度にまで希釈し (通常1～1.5倍の希釈)、そして、CEXによる精製のためにpH5.3にまで滴定した。希釈された抽出物を0.8/0.2μmのSartopore (登録商標) 2XLGフィルター (カタログ番号5441307G4--OO、Sartorius - Stedim社) に通して滅菌濾過した。溶菌液をPoros (登録商標) XSカラムに負荷し、そして、約12CVの溶出液を収集した。その溶出液を、2Mトリス塩基を使用してpH7.5まで滴定し、MilliQ水を使用して5mS/cmまで希釈し、そして、Poros (登録商標) HQカラムに負荷した。50mMトリス、2M NaCl、pH7.5の緩衝液をPoros (登録商標) HQカラムクロマトグラフィー (chromatography) に使用した。Poros (登録商標) HQ通過画分のプールを上で説明したように5倍に濃縮し、その後、pH6.5および2.5mS/cmに調節した。

【0431】

A280/A320によるタンパク質濃度

280nmでの吸光度を、分光光度計 (NanoDrop2000、Thermo Scientific社) を使用して測定し、320nmでのベースラインの減算を行った。濃度は次の式により計算された：

【数1】

$$C = \frac{(A_{280} - A_{320})}{\epsilon \ell}$$

この式で、Cはmg/mLを単位とする濃度であり、A280とA320はそれぞれ280nmおよび320nmでの吸光度であり、 ϵ はタンパク質の吸光係数 ($1 \text{ AU} \times \text{mL} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) であり、そして、

【数2】

ℓ

は光路長である。2mLのアリコットをそのまま希釈せずに測定した。

【0432】

宿主細胞タンパク質の測定

宿主細胞タンパク質 (HCP) レベルを大腸菌発現システムに特異的な酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キット (カタログ番号F410、Cygnus Techno

logies社)により決定した。そのキットと共に提供されたプロトコルに正確に従った。HCPレベルについてアッセイされる試料を、試料希釈剤(カタログ番号I028、Cygnus Technologies社)を使用して希釈した。精製された試料中のHCPレベルは低いため、CHA溶出液試料をそのまま希釈せずに測定した。試料は通常1つの希釈率で希釈して、それぞれの希釈について2つ組でプレートに添加した。特定の試料に対する典型的な希釈が表12に概説されている。HCPのレベルは百万分率(ppm)またはng-HCP/mg-P05を単位として表される。

【表15】

表12. HCPのELISAに使用された典型的な希釈係数

10

試料	希釈係数
CHA負荷物	10
CHA溶出液	1

【0433】

弱陽イオン交換クロマトグラフィー(wCEx)

分析的wCEx分析をAgilent 1260 HPLCシステムまたはBioInertシステムで実行し、そして、5℃に設定した温度制御自己注入チャンバーおよび280nmでデータを収集するPDA検出器を利用した。移動相AはpH5.5の10mM酢酸ナトリウムであった。移動相Bは250mM NaClが添加されたpH5.5の10mM酢酸ナトリウムであった。約10~50μgの生成物をDionex ProPac WCX-10カラム(カタログ番号054993、Dionex Corporation社)に注入した。カラムを1.2mL/分で操作した。未変性のP05は約16分に溶出する。脱アラニン種は約18分に溶出し、メチオニル化種は約14分、そして、acP05は約9分に溶出する。

20

【0434】

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

分析的SEC分析をAgilent 1200 Bio-inert HPLCシステムで実行し、そして、5℃に設定した温度制御自己注入チャンバーおよび214nmと280nmでデータを収集するPDA検出器を利用した。移動相は10×PBSストック溶液(カタログ番号BP3994、Fisher社)の希釈液から調製した1×PBSであった。約10~50μgの生成物をZenix SEC-150(カタログ番号213150-7820、Sepax社)に注入した。カラムを1mL/分で操作した。P05の単量体は約5.2分で溶出した。高次構造分子量種は3.7~4.9分で溶出した。

30

【0435】

現行のCHAカラムの操作条件

注記：開発に使用した小さいカラム体積(5mL)と比較的大きいクロマトグラフィー系の体積のため、スケールアップ時に体積を調節する必要がある。現行のCHAカラムの操作条件が表13にまとめられている。全てのステップが2分の滞留時間(2.5mL/分)および室温で実行された。1mLのカラム当たり15mgのP05という負荷が目標とされた。溶出ピークが2CV分の画分に収集され、そして、A280/A320、wCEx、SEC、およびHCPのELISAにより検定された後に最終的な溶出プールを作製した。

40

【表 1 6】

表 1 3. CHAのクロマトグラフィー方法

ステップ	カラム体積 (CV)	緩衝剤
カラム調整	10	400 mM リン酸カリウム、 pH 6.8
平衡化	10	10 mM リン酸カリウム+ 13.5 mM NaCl、 pH 6.5 (2.5 mS/cm)
負荷		調整済み Poros (登録商標) HQ FT、 2.5 mS/cm pH 6.5. 1 mL のカラム当たり約 1 5 m g の P 0 5 を負荷
洗浄	10	10 mM リン酸カリウム+ 13.5 mM NaCl、 pH 6.5 (2.5 mS/cm)
溶出	20	10~90%の B の線形濃度勾配 (B は 160 mM リン酸カリウム、 pH 6.5 である)
清浄化	8	0.5 M NaOH
カラム調整	10	400 mM リン酸カリウム、 pH 6.8
再平衡化	10	10 mM リン酸カリウム+ 13.5 mM NaCl pH 6.5 (2.5 mS/cm)

10

20

【 0 4 3 6】

セラミックハイドロキシアパタイト (CHA) クロマトグラフィーのまとめ

30

CHA クロマトグラフィーのまとめが表 1 4 に提供されている。生成物を、耐塩性強陽イオン交換樹脂である Poros XS を使用する陽イオン交換クロマトグラフィーにより捕捉する。Poros XS 溶出液を調整し、そして、通過モードで Poros HQ に負荷する。生成物はカラムを通過した画分に収集される。通過画分を限外濾過／透析濾過か希釈／滴定のどちらかにより pH 6. 5 と 2. 5 m S / c m に調節することができる。次に、その生成物流 (product stream) を CHA カラムに負荷し、そして、1 0 % B から 9 0 % B までの 2 0 C V に渡る濃度勾配を用いて溶出する。濃度勾配溶出の間、画分を収集し、そして、夾雑物と生成物関連種のレベルを決定するために w C E X により検定した後に最終プールを作成する。将来の開発には、結合能とその分離能への影響、ならびに負荷物中の生成物関連種レベルの上昇の分離能への影響の調査が含まれる。より規模が大きい CHA カラム (約 1 5 0 m L) も拡張性を確保するために評価される。

40

【表 17】

表 14. CHAクロマトグラフィーのまとめ

	含アラニン 型の割合 (%)	脱アラニン 型の割合 (%)	メチオニル 化型の割合 (%)	生成物の回 収率 (%)	単量体の割 合 (%)	HCP (ppm)	HCP減 少率 (%)	溶出体積 (CV)
負荷	88	3.8	4.8	--	98.3	179	--	--
溶出プ ール 1	89	3.7	4.5	109	99.0	26	86	12
溶出プ ール 2	90	3.5	3.6	104	99.4	18	90	10
溶出プ ール 3	94	2.7	1.0	90	99.4	12	93	8

10

20

【実施例 12】

【0437】

100Lでの実施が、次のようにP05を発現させ、精製して行われた。

(A) 実施例9に従う100Lのバイオリアクターでの発酵により、 $4.45\text{ g/L} \times 103.2\text{ L} = 459.2\text{ g}$ のP05タンパク質が産生された。

(B) 3回のPoros（登録商標）XS陽イオン交換カラム [Poros XS 19.9cmのベッド高×20cmの内径（6.25L）]への注入とその後の溶出により次のようにP05が捕捉された。

1回目： $97.8\text{ L} \times 1.41\text{ g/L} = 137.9\text{ g}$

2回目： $105\text{ L} \times 1.28\text{ g/L} = 134.4\text{ g}$

3回目： $102\text{ L} \times 1.42\text{ g/L} = 144.8\text{ g}$

総計のP05負荷物 = 417.1 g （90.8%）

3回のPoros（登録商標）XSおよび溶出プール： $187.5\text{ L} \times 1.82\text{ g/L} = 341.2\text{ g}$ のP05

Poros（登録商標）XSによるP05の回収率 (%) = $(341.2 / 417.1) \times 100 = 81.8\%$

(C) 2回のPoros（登録商標）HQ陰イオン交換カラム [Poros HQ 13.0cmのベッド高×10cmの内径（1.02L）]への注入とその後のPoros（登録商標）HQによる通過とさらに2回のPoros（登録商標）HQへの注入により次のようにP05が捕捉された。

1回目： $210\text{ L} \times 0.725\text{ g/L} = 152.5\text{ g}$

2回目： $200\text{ L} \times 0.725\text{ g/L} = 145.0\text{ g}$ ；総計のP05負荷物 = 297.5 g

Poros（登録商標）HQからの通過画分

1回目： $210\text{ L} \times 0.713\text{ g/L} = 149.7\text{ g}$

2回目： $200\text{ L} \times 0.71\text{ g/L} = 142.0\text{ g}$ ；総計のP05負荷物 = 291.7 g

Poros（登録商標）HQによるP05の回収率 (%) = $(291.7 / 297.5) \times 100 = 98.1\%$

(D) ハイドロキシアパタイト（CHA）カラム [ハイドロキシアパタイトタイプ1 4

30

40

50

0 μm 19.2 cmのベッド高 $\times$ 44.6 cmの内径(30.0 L)]への負荷と溶出により次のようにP05が捕捉された。

負荷調製物1: $460\text{ L} \times 0.33\text{ g/L} = 151.8\text{ g}$

負荷調製物2: $420\text{ L} \times 0.32\text{ g/L} = 134.4\text{ g}$; 総計のP05負荷物 = 286.2 g

溶出プール: $285\text{ L} \times 0.95\text{ g/L} = 270.75\text{ g}$

ハイドロキシアパタイトによるP05の回収率(%) = $(270.75 / 286.2) \times 100 = 94.6\%$

(E) 溶出されたP05の限外濾過/透析濾過により次のようにP05が捕捉された。

負荷 $285\text{ L} \times 0.95\text{ g/L} = 270.75\text{ g}$

残余分: $3.96\text{ L} \times 65.3\text{ g/L} = 258.6\text{ g}$ 、回収率(%) = $(258.6 / 270.75) \times 100 = 95.5\%$

限外濾過/透析濾過緩衝液はpH6.5の10 mMリン酸ナトリウムおよび5%ソルビトールであった。

(F) パック・オフを、10%ルトロール(Lutrol)からなる緩衝液、ならびにpH6.5の10 mMリン酸ナトリウム、5%ソルビトールおよび0.1%ルトロールからなる緩衝液を使用して実行した。

最終生成物プールの回収率は70%超であり、溶出液中の脱アラニン種は10%未満であり、そして、HCPは50 ppm未満である。

【実施例13】

【0438】

P05のためのフェドバッチ発酵工程

フェドバッチ培養を、1.6 Lの作業体積を用いるBioStat A+制御器付きのSartorius 2L Univesseilバイオリアクターで行った。バイオリアクターを121°Cで60分間オートクレーブにかけ、そして、無菌の瓶と配管溶接器を使用してオートクレーブ後にバッチ培地を添加した。

【0439】

バッチ培地は、10 g/Lのグルコースと2 mMの硫酸マグネシウムを添加した、無動物成分ソイトン(Teknova社)を使用するテリフィック・ブロスからなった。この溶液を、0.2 μm のPES膜フィルターを使用して濾過した。バイオセーフティー・キャビネット内で無菌濃縮ストック溶液のアリコットを濾過したテリフィック・ブロスに添加することにより、補助栄養素の濃度が次の終濃度に達した: 0.08 g/Lアンチフォーム204(Sigma社)、0.1 mM EDTA(Caliber社)、50 mg/L硫酸カナマイシン(Teknova社)および1 mL/L微量元素溶液(1000X微量元素、Teknova社)。微量元素溶液は50 mM塩化第二鉄、20 mM塩化カルシウム、10 mM塩化マンガン、10 mM塩化亜鉛、2 mM塩化コバルト、2 mM塩化銅、2 mM塩化ニッケル、2 mMモリブデン酸ナトリウム、2 mM亜セレン酸ナトリウム、および2 mMホウ酸を含有した。

【0440】

フェドバッチ培養を37°CとpH7.0 $\pm$ 0.05の条件で実行した。pHは、上限については85%のリン酸(Amresco社)を使用して、そして、下限については28%水酸化アンモニウム(Ricca社)を使用して調節された。泡はアンチフォーム204溶液(Sigma社)により制御された。空気の循環と初期攪拌速度をそれぞれ1.25(体積/体積/m)と200 rpmに設定した。溶存酸素分圧は、800 rpmへの攪拌カスケードと酸素濃縮を用いて飽和圧力の30%に制御された。

【0441】

最初のグルコースレベル(10 g/L)が消尽され、pHと溶存酸素の急速な増加が観察されたらすぐに、栄養素の供給を開始した。供給培地は、400 g/Lのグルコース(Sigma社)と30 mMの硫酸マグネシウム(Sigma社)を添加した、無動物成分ソイトン(Teknova社)を使用するテリフィック・ブロスからなった。初期供給速

10

20

30

40

50

度は約 0.6 mL/分 (9 g グルコース/L/時間) であった。培養の導入から 4 時間に、供給速度を、グルコースの蓄積を避けるために約 0.4 mL/分 (6 g グルコース/L/時間) に低下させた。

【0442】

培養物の OD₆₀₀ が 35~40 に達したらすぐに 1 mM の イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG、Applied Biosystems 社) を使用して誘導を行った。誘導から 6 時間後に培養物を回収した。

【0443】

次のパラメータのために培養物を 1 時間毎に試料抽出した：オフラインでの pH (Orion 4 Star pHメーター、Thermo Scientific 社)、OD₆₀₀ (Ultrospec 2100 Pro、Amersham Biosciences 社)、グルコース濃度と乳酸濃度 (YSI 7100、YSI Life Sciences 社)、SDS-PAGE ゲルからなる濃度測定を用いる生成物の濃度、分析 wCEX のために 10 mL の試料、および湿潤細胞重量と乾燥細胞重量のために 1 mL の試料。湿潤細胞重量試料と乾燥細胞重量試料について、前もって重量測定した微量遠心管内の 1 mL の培養物を 14,000 g で 2 分間遠心沈殿した (Mini Spin Plus 遠心分離機、Eppendorf 社)。上清を廃棄し、ペレットを 1 mL の 1.25×リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS、Calbiochem 社) で 2 回洗浄した。その後、そのペレットとチューブの重量を測定し、湿潤細胞重量を決定した。その後、そのペレットをチューブ内において 65℃ で少なくとも 48 時間乾燥させた。そのペレットとチューブの重量を再度測定し、乾燥細胞重量を決定した。

【0444】

様々な IL-1β/IL-1Ra ハイブリッドを発現する細胞株を振盪フラスコ実験において培養し、そして、発現誘導した。5 つの株全てが最適化された培養条件を用いて同様の生産性を示した。細胞ベースの活性アッセイでは、P05 は IL-1R1 受容体に対して、次に最も近いハイブリッド分子よりも一桁高い、12 pM という K_d を有する最も高い活性を示した (表 15 を参照のこと)。P01 分子と P02 分子も高い活性を示したが、それらは不溶性であり、抽出時に封入体中に存在することが明らかになった。P03 生成物から P05 生成物までは可溶性画分に存在した。P03 から P05 までの製造はより容易であることから、これらの 3 つのハイブリッドに集中して初期の安定性の試験を行った。

【表 18】

表 15：様々なハイブリッド分子の活性と安定性の比較

ハイブリッド分子	K _d (pM)	T _m (°C)
P01	470	
P02	640	
P03	290	65
P04	1700	60
P05	12	65
IL-1β	2000	56
IL-1Ra	330	

【0445】

それらの 3 つの可溶性ハイブリッド分子の融点を、定量的 PCR 機械 (Agilent

社)を使用する示差走査型蛍光定量により決定した。それらの融点は表15に示されている。3つのハイブリッド分子全てがIL-1Raよりも高い融点を有したが、P03とP04は65℃という最も高い融点を有した。

【0446】

発酵工程の開発による生成物関連種の低減

P05タンパク質の品質に対する炭素源の効果を測定するために、2つ組の2Lフェドバッチ実験を行った。それぞれの実験では、1つのリアクターは、上で説明したように基本培地に10g/Lのグルコースを含有し、供給培地に400g/Lのグルコースを含有し、そして、1つのリアクターは基本培地に10g/Lのグリセロール(Fisher Scientific社)を含有し、供給培地に400g/Lのグリセロールを含有した。その2つのリアクターでの細胞増殖の差は顕著ではないにもかかわらず(表16を参照のこと)、グリセロール含有発酵は、グルコース含有発酵よりも少ないP05を産生した(5.4g/Lに対して7.0g/L)。グリセロールを使用して産生された原料はより高いパーセンテージのアセチル化種(対照リアクターにおける総タンパク質の8.9%に対して、総タンパク質の14.7%)、ならびにより高いパーセンテージの脱アラニン種(対照リアクターにおける総タンパク質の13.4%に対して、総タンパク質の17.3%)を含有した。グリセロール含有発酵による酸素利用の増加も観察されたという事実から、これらの培養物における生成物のアセチル化の上昇は低酸素状態または何らかの他のストレス状態により生じ得たのだらうという仮説が立てられた。したがって、グルコースがP05の発酵にとって優れた炭素源であることが確認された。

【0447】

高温、わずかに塩基性の環境(pH7.5~9)、および触媒としての Mn^{2+} の存在の全てがアミノペプチダーゼPの酵素活性を上昇させる。アミノペプチダーゼP活性にとってあまり好ましくない培養条件を利用することの利点を調査するためにいくつかの実験を行った。振盪フラスコ実験を32℃で行ったが、対照フラスコと比べた生産性の顕著な低下が観察された。この特性が、工程所要時間が増加すること、および技術移転とスケールアップが複雑になることに加えて、P05タンパク質の品質を改善する方法を望ましくないものとした。

【0448】

発酵工程の開発による生成物関連種の低減

P05タンパク質の品質に対する培養pHの効果を測定するために、2Lフェドバッチ発酵をpH6.8±0.05で行った。脱アラニン種のパーセンテージはpH6.8に制御された発酵においてより低かったが(対照リアクターにおける総タンパク質の13.4%にたいして、総タンパク質の6.9%)、比較的低いpHにおける細胞増殖と生産性は対照発酵におけるものよりも著しく低かった(表16を参照のこと)。生産性の40%よりも大きい損失が、P05タンパク質の品質を改善する方法を望ましくないものとした。

【0449】

回収、抽出、および清澄化

回収時に培養物を300~320mLの等量の体積で5つに分け、そして、4℃、6000g(GS-3ローターを用いるSorvall RC5C Plus遠心分離機、Dupon社)で20分間遠心沈殿させた。凍結したペレットを直ぐに抽出操作にかけない場合は-80℃で凍結した。生成物を抽出するために、ペレットを、pH7.0で20mMトリス・ベース(Fisher社)、0.1%トリトンX-100(Fisher社)、および10mMEDTA(Caliber社)からなる溶菌緩衝液に再懸濁した。次に細胞のペーストを18,000psiでマイクロフルイダイザー(M-110Pマイクロフルイダイザー、Microfluidics社)に3回通した。次に溶液を6000g、4℃で20分間遠心分離した。抽出液を直ぐに清澄化しない場合は-20℃で凍結した。

【表 1 9】

表 1 6 : 様々な 2 L フェドバッチ発酵により生成された材料の増殖、生産性およびタンパク質の品質についてのデータ

戦略	最終OD ₆₀₀	DCW	生産性	未変性型の割合 (%)	脱アラニン型の割合 (%)	アセチル化型の割合 (%)	メチオニル化型の割合 (%)
対照	140	28 g/L	7.0 g/L	75.1 %	13.4 %	8.9 %	2.6 %
グリセロール	130	24 g/L	5.4 g/L	約 65 %	17.3 %	14.7 %	N/A
pH 6.8	115	25 g/L	4.0 g/L	81.6 %	6.9 %	8.9 %	2.6 %
-MnCl ₂	105	N/A	4.5 g/L	77.2 %	4.8 %	10.2 %	7.8 %
0.1 mM EDTA	150	29 g/L	8.0 g/L	73.8 %	9.3 %	10.8 %	6.1 %
0.2 mM EDTA	145	27 g/L	6.7 g/L	71.9 %	8.5 %	13.6 %	6.0 %
0.4 mM EDTA	150	27 g/L	8.7 g/L	73.5 %	6.7 %	13.8 %	6.0 %

【 0 4 5 0 】

塩化マンガンを含むしない微量元素溶液を特別に処方した（1000X微量元素-MnCl₂、Teknova社）。この溶液の使用を2Lフェドバッチ発酵において評価した。より低いpHを利用する実験から理解できるように、細胞増殖と生産性は塩化マンガンを取り除くことによって負の影響を受けた（表16を参照のこと）。脱アラニン種のパーセンテージは減少したが（対照リアクターにおける総タンパク質の13.4%に対し、総タンパク質の4.8%）、アセチル化種とメチオニル化種のパーセンテージはそれぞれ1%超と5%超上昇した。全ての金属ベースの酵素活性を低下させる試みにおいて、基本培地におけるEDTAの使用を研究した。基本培地における0~0.8mMのEDTAの使用を研究する振盪フラスコ実験を行った。EDTAの基底濃度の上昇は増殖に何の負の効果も引き起こさなかった。最終OD₆₀₀値は上昇した。生産性のわずかな減少が観察されたが、未変性の生成物種の相対的なパーセンテージは顕著に増加した（表17を参照のこと）。例えば、0.4mMのEDTAの基本培地への付加により、脱アラニン種の相対的パーセンテージが6.3%から2.5%まで減少した。

【表 20】

表 17：様々な濃度の EDTA を含有する振盪フラスコにより生成された原料の増殖、生産性およびタンパク質の品質についてのデータ

EDTA の濃度	最終 OD ₆₀₀	生産性	未変性型の割合 (%)	脱アラニン型の割合 (%)
0 mM	11.3	0.78 g/L	93.7 %	6.3 %
0.05 mM	11.7	0.73 g/L	96.2 %	3.8 %
0.2 mM	12.4	0.71 g/L	97.1 %	2.9 %
0.4 mM	12.5	0.71 g/L	97.5 %	2.5 %
0.8 mM	12.7	0.71 g/L	97.1 %	2.9 %

10

【0451】

これらの小規模の実験に基づき、0.1 mM、0.2 mM、および 0.4 mM の EDTA 濃度を 2 L フェドバッチ発酵において試験した。振盪フラスコ試験から理解できるように、EDTA を含有する発酵はわずかにより高い最終 OD₆₀₀ 値まで増殖した（表 16 を参照のこと）。生産性は維持されるかわずかに向上した。例えば、0.1 mM の EDTA を含有する培養物は、150 の最終 OD₆₀₀、29 g/L の乾燥細胞重量まで増殖し、そして、P05 の 8 g/L を産生した（それぞれ対照培養物の 140 の OD₆₀₀、28 g/L、および 7 g/L と比較して）。産生された脱アラニン種のパーセンテージは EDTA の濃度の上昇と共に減少したが、アセチル化種のパーセンテージは増加した。メチオニル化種のパーセンテージも EDTA を含有する発酵の全てでより高かった（対照培養物の 2.6 % と比較して 6.0 ~ 6.1 %）。0.1 mM の EDTA という条件が望ましくない生成物関連種を減少させる最も効果的な発酵戦略であると判断された。アセチル化種とメチオニル化種のパーセンテージは対照培養物におけるものよりも高いが、0.1 mM の EDTA の基本培地への付加により、全体の生産性を上昇させつつ、増殖とスケールアップという考慮すべき事柄に対する影響を最小にしながら脱アラニン種を効果的に減少させた。

20

30

【0452】

発酵工程のスケールアップ

自家開発したフェドバッチ発酵工程を CMO (Fujifilm Diosynth Biotechnologies 社、英国、ビルingham) に技術移転した。技術移転によるフェドバッチ発酵を、3 L の作業体積を用いる DCU2 制御器付きの 5 L B. Braun Biostat ED バイオリアクターで行った。次に自家の GMP 遵守テリフィック・ブロスと微量元素溶液をさらなる発酵のために利用し、そして、それらが成績において研究用培地の処方と同等であることが明らかになった。最終的な 100 L 規模の工程を、100 L の作業体積を用いる DCU-3 制御器付きの 100 L B. Braun D バイオリアクターで行った。

40

【0453】

2 L と 100 L の反応からのタンパク質の回収とそれに続くカラムクロマトグラフィーがそれぞれ実施例 14 および 15 において説明される。クロマトグラフィーステップには、P05 タンパク質を捕捉するための Poros XS 陽イオン交換カラムの使用、P05 調製物から夾雑物をさらに精製するための陰イオン交換カラムおよびセラミックハイドロキシアパタイト (CHA) カラムの使用が含まれる。

【0454】

Poros XS 捕捉ステップでは、負荷物の調製は、100 L の発酵から得られた負荷

50

大腸菌溶菌液のpH／電気伝導度をpH 5.3に調節し、次に15,000×gで30分間遠心分離することにより行われた。遠心分離後、工程流（process stream）を30インチの0.8／0.45μmフィルターに、続いて30インチの0.45／0.2μmフィルターに流してバッチ濾過した。さらなる工程開発の試みにより、負荷物の調製中にpH範囲を5.3～5.9の範囲内に調節することが研究されている。捕捉カラムの生成物結合能は、1mLの樹脂あたり40mgのタンパク質まで負荷するときは影響されなかった。アセチル化型およびメチオニル化型のP05の減少度は、負荷物のpHが上昇するにつれ大きかった。脱アラニン型の分離はpHが上昇するにつれ低下したが、なお許容レベルであった。

【0455】

セラミックハイドロキシアパタイト（CHA）カラムの溶出条件を次のように開発した。溶出条件には20CVの濃度勾配が含まれ、それがその後の下流の工程において大容積を処理する、すなわち、限外濾過と透析濾過の必要性の原因となる。様々なパラメータを調査して、CHAカラムの溶出を生成物の回収率、小さい溶出体積、および生成物種の分離に関して最適化した。改変型の濃度勾配溶出／段階的溶出の組合せがCHAタイプIカラムの溶出体積を減少させるために開発された。簡単に説明すると、10mMリン酸から32～64mMリン酸までの5CVに渡る濃度勾配溶出とその次の160mMリン酸への段階溶出が実施された。5CVの濃度勾配溶出の間、メチオニル化型と脱アラニン型のP05が溶出画分に濃縮された。160mMリン酸への段階的溶出の間に溶離する溶出プールに所望の生成物プロファイルを有するP05が濃縮した（すなわち、1%未満のメチオニル化型、4%未満の脱アラニン型）。この工程の作業ウィンドウを説明するために完全要因実験を完了した。6.2と6.8の間のpH値および上で言及した5CVの濃度勾配溶出中のリン酸濃度の範囲を調査した。生成物関連種の減少、工程関連不純物（HCP）の減少、および生成物の回収率に関して、堅牢な作業がこのウィンドウ内で観察された。このウィンドウ内の最適な条件を、約2倍のスケールアップを実証するために12mLのカラムに合わせて調整した。さらに、脱アラニン型とメチオニル化型のP05のレベルが上昇した難しい負荷物をその最適な条件で調査した。溶出プロファイルは同様であった。

【実施例14】

【0456】

2回の2L培養反応が、実施例13において上で説明されたようにP05を発現および精製して行われた。

【0457】

結果は次の通りである。

（A）実施例13に従う2Lのバイオリアクターでの発酵により次のパーセンテージでタンパク質が回収された。

【表21】

	1回目の実施	2回目の実施
P05	70.7%	75.4%
脱アラニン種	15.4%	10.3%
メチオニル化種	2.27%	2.55%
アセチル化種	9.49%	10.0%
HCP	30363ppm	26676ppm

【0458】

（B）P05は、回収されたタンパク質から、Poros（登録商標）XS陽イオン交換カラム〔235mLの体積〕を通して捕捉され、続いて溶出され、それにより次のパーセンテージでタンパク質の収集が行われた。

【表 2 2】

	1 回目の実施	2 回目の実施
P O 5	9 1. 7 % (7 5. 7 % の回収)	9 4. 2 % (7 6. 3 % の回収)
脱アラニン種	5. 1 8 % (6 6. 4 % の減少)	4. 2 8 % (5 8. 4 % の減少)
メチオニル化種	1. 8 7 % (1 7. 6 % の減少)	1. 1 0 % (5 7. 1 % の減少)
アセチル化種	0. 0 % (9 9. 9 9 % の減少)	0. 0 % (9 9. 9 9 % の減少)
H C P	1 8 8 p p m (9 9. 4 % の減少)	9 5. 5 p p m (9 9. 6 % の減少)

10

【 0 4 5 9】

(C) P o r o s X S の収集物に由来するタンパク質を P o r o s (登録商標) H Q 陰イオン交換カラム [5 0 m L の体積] に通して処理し、それにより次のパーセンテージでタンパク質が生じた。

【表 2 3】

	1 回目の実施	2 回目の実施
P O 5	9 1. 7 % (9 2. 9 % の回収)	9 4. 2 % (9 2. 9 % の回収)
脱アラニン種	5. 3 7 %	4. 2 8 %
メチオニル化種	2. 0 9 %	1. 1 0 %
アセチル化種	0. 0 %	0. 0 %
H C P	4 0. 5 p p m (7 8. 5 % の減少)	3 0. 8 p p m (6 7. 7 % の減少)

20

【 0 4 6 0】

陰イオン交換カラムの主な目的は D N A、エンドトキシン、および H C P (宿主細胞タンパク質) を除去することであることに留意すること。

30

【 0 4 6 1】

(D) P o r o s H Q 収集物に由来するタンパク質をハイドロキシアパタイト (C H A) カラム [ハイドロキシアパタイトタイプ 1、2 2 0 m L の体積] に通して処理し、それにより次の濃度でタンパク質が生じた。

【表 2 4】

	1 回目の実施	2 回目の実施
P O 5	9 4. 9 % (8 7. 2 % の回収)	9 5. 8 % (8 8. 4 % の回収)
脱アラニン種	3. 8 4 % (2 8. 5 % の減少)	3. 4 2 % (2 1. 2 % の減少)
メチオニル化種	0. 3 7 % (8 2. 1 % の減少)	0. 5 2 % (5 2. 1 % の減少)
アセチル化種	0. 0 %	0. 0 %
H C P	3. 9 p p m (9 0. 5 % の減少)	2. 5 p p m (9 2. 0 % の減少)

40

【 0 4 6 2】

(E) C H A カラムからのタンパク質を限外濾過／透析濾過にかけ、それにより次の濃度でタンパク質が生じた。

【表 2 5】

	1 回目の実施	2 回目の実施
P O 5	9 4 % (9 7 . 7 % の回収)	9 4 % (9 7 . 7 % の回収)
脱アラニン種	4 . 2 7 %	4 . 2 7 %
メチオニル化種	0 . 8 2 %	0 . 8 2 %
アセチル化種	0 . 0 %	0 . 0 %
H C P	0 . 7 p p m (8 1 . 8 % の減少)	0 . 7 (7 1 . 7 % の減少)

10

【 0 4 6 3】

限外濾過／透析濾過ステップの主な目的は、緩衝液を交換すること、およびタンパク質を濃縮することであることを留意すること。

【表 2 6】

	1 回目の実施	2 回目の実施
ステップ (A) ～ (E) 後の総合的な P O 5 の回収率	6 0 %	6 3 %

【実施例 15】

20

【 0 4 6 4】

2 回の 1 0 0 L の系の実施が、実施例 1 3 において上で説明されたように P O 5 を発現および精製して行われた。1 回目の実施は R & D (研究開発) 条件の下で行われ、2 回目の実施は G M P (医薬品製造基準) 条件の下で行われた。

【 0 4 6 5】

結果は次の通りである。

(A) 実施例 1 3 に従う 1 0 0 L のバイオリアクターでの発酵により次のパーセンテージでタンパク質が回収された。

【表 2 7】

	1 回目の実施	2 回目の実施
P O 5	6 5 . 7 %	5 5 . 8 %
脱アラニン種	8 . 8 3 %	1 2 . 5 %
メチオニル化種	6 . 1 2 %	4 . 7 2 %
アセチル化種	1 1 . 5 %	1 4 . 6 %

30

【 0 4 6 6】

(B) P O 5 は、回収されたタンパク質から、P o r o s (登録商標) X S 陽イオン交換カラム [6 . 2 5 L の体積] を通して捕捉され、続いて溶出され、それにより次のパーセンテージでタンパク質の収集が行われた。

40

【表 2 8】

	1 回目の実施	2 回目の実施
P O 5	9 0 . 2 5 % (7 3 % の回収)	9 3 . 1 5 % (6 4 % の回収)
脱アラニン種	6 . 9 5 % (2 1 . 3 % の減少)	4 . 7 9 % (6 1 . 7 % の減少)
メチオニル化種	1 . 9 6 % (6 7 . 9 % の減少)	1 . 3 6 % (7 1 . 2 % の減少)
アセチル化種	0 . 0 2 % (9 9 . 8 % の減少)	0 . 0 2 % (9 9 . 9 % の減少)

50

【0467】

(C) Poros XSの収集物に由来するタンパク質をPoros（登録商標）HQ陰イオン交換カラム〔1 Lの体積〕に通して処理し、それにより次のパーセンテージでタンパク質が生じた。

【表29】

	1回目の実施	2回目の実施	
P05	91.225%（%の回収）	未決（91%の回収）	
脱アラニン種	5.62%	未決	10
メチオニル化種	2.55%	未決	
アセチル化種	0.0%	未決	

【0468】

(D) Poros HQ収集物に由来するタンパク質をハイドロキシアパタイト（CHA）カラム〔ハイドロキシアパタイトタイプ1、30 Lの体積〕に通して処理し、それに次のパーセンテージを有するタンパク質プールが生じた。

【表30】

	1回目の実施	2回目の実施	
P05	94.9%（91%の回収）	96.18%（89%の回収）	20
脱アラニン種	3.82%（32%の減少）	3.41%（50.4%の減少）	
メチオニル化種	0.51%（80%の減少）	0.10%	
アセチル化種	0.01%	0.0%	

【0469】

(E) CHAカラムからのタンパク質を限外濾過／透析濾過にかけ、それにより次の濃度でタンパク質が生じた。

【表31】

	1回目の実施	2回目の実施	
P05	94.1%（100%の回収）	未決（104%の回収）	30
脱アラニン種	4.15%	未決	
メチオニル化種	1.13%	未決	
アセチル化種	0.0%	未決	

【0470】

限外濾過／透析濾過ステップの主な目的は、緩衝液を交換すること、およびタンパク質を濃縮することであることを留意すること。

【表32】

	1回目の実施	2回目の実施
ステップ(A)～(E)後の総合的なP05の回収率	65%	54%

【0471】

他の実施形態は次の特許請求の範囲の範囲内にある。

【図 1】

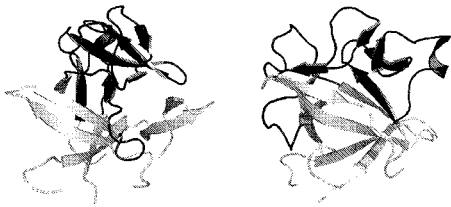


図 1

【図 2】

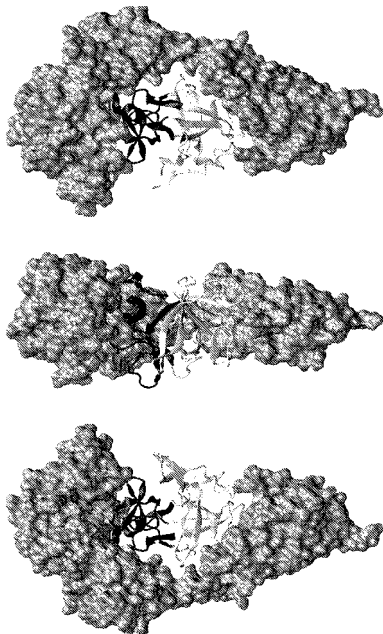


図 2

【図 3】

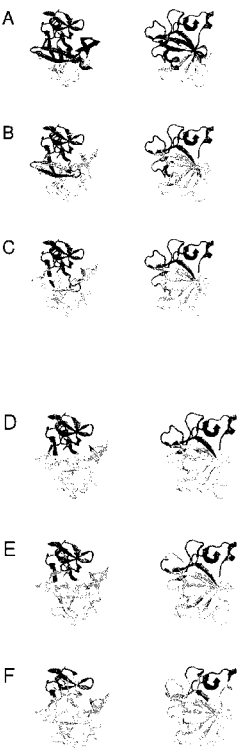


図 3

【図 4】



図 4

【図 5 A】

図 5 A : P 0 1

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ
GPNVNLEEKIDV**SFVQGEESNDKIPVALGIHG**
GKMCLSCVKSGDETRLQLEAV**DPKNYPKKKM**
DKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAME
ADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY**MQFVSS**
(配列番号 : 17)

【図 5 B】

図 5 B : P 0 2

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ
GPNVNLEEKIDV**SFVQGEESNDKIPVALGIHG**
GKMCLSCVKSGDETRLQLEAV**DPKNYPKKKM**
EKRFVFNKIEINNKL**SF**ESAACPGWFLCTAME
ADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY**MQFVSS**
(配列番号 : 18)

【図 5 C】

図 5 C : P 0 3

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ
GPNVNLEEK**FSMSFVQGEESNDKIPVALGLKE**
KNLYLSCVLKDDKPTLQLESVD**PKNYPKKKM**
EKRFVFNKIEINNKL**SF**ESAACPGWFLCTAME
ADQPVSLTNMPDEGVMVTK**FTMQFVSS**
(配列番号 : 19)

【図 5 D】

図 5 D : P 0 4

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ**GPNVNLEE**
KFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTL
QLESVD**PKNYPKKKMEKR**FVFNKIEINNKL**FESAACPG**
WFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTK**FTMQFVSS**
(配列番号 : 20)

【図 5 E】

図 5 E : P 0 5

APVRSL**NC**RIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ**GPNVNLEE**
EKFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPT
LQLESVD**PKNYPKKKMEKR**FVFNKIEINNKL**FESAQFPN**
WFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY**MQFVSS**
(配列番号 : 21)

【図 6】

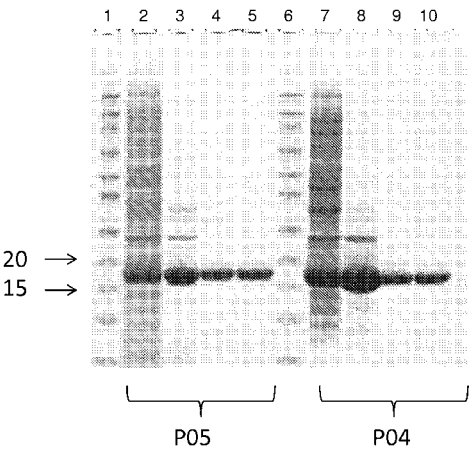


図 6

【図 7 A】

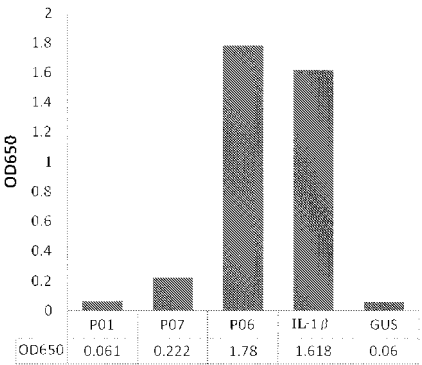


図 7 A

【図 7 B】

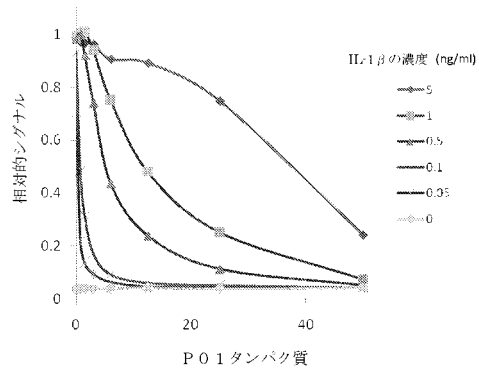


図 7 B

【図 8 A】

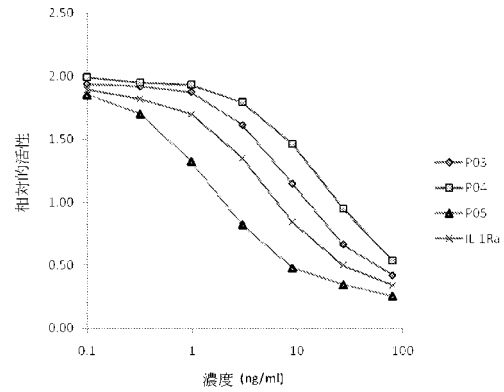
IL-1 β の濃度 = 0.1 ng/ml

図 8 A

【図 8 B】

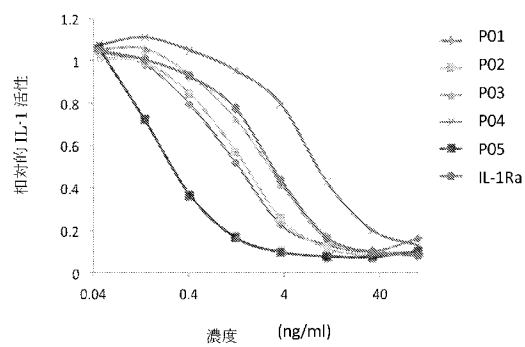
IL-1 β の濃度 = 0.1 ng/ml

図 8 B

【図 9】

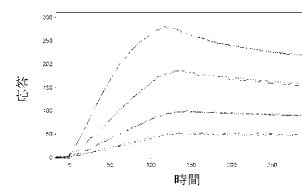


図 9 A

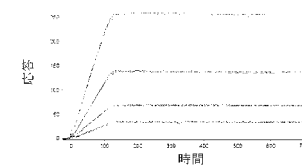


図 9 B

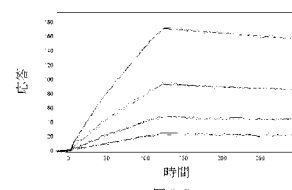


図 9 C

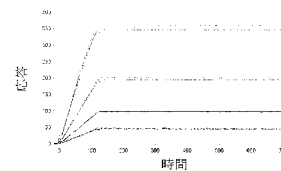


図 9 D

【図 10 A】

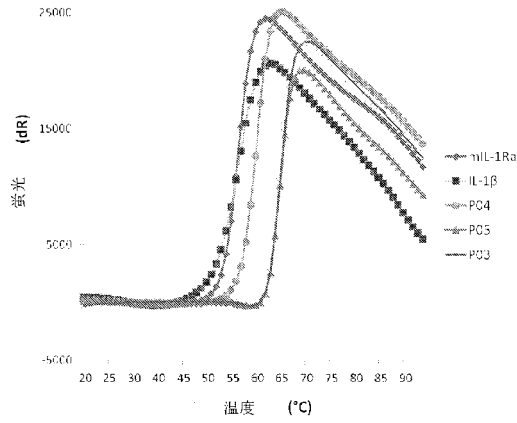


図 10 A

【図 10 B】

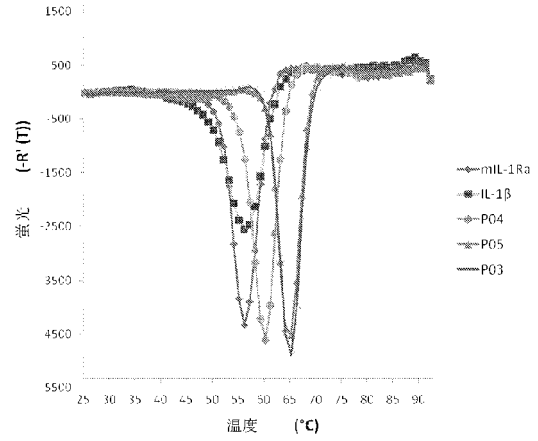


図 10 B

【図 11 A】

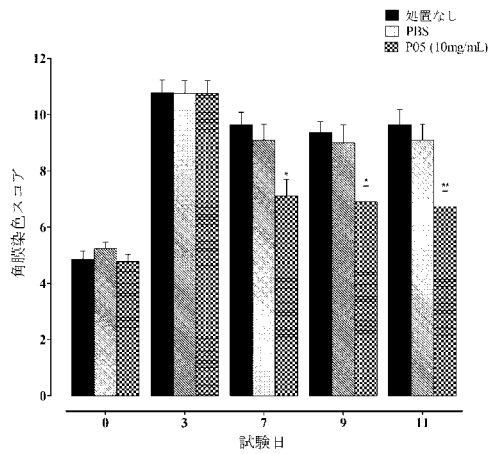


図 11 A

【図 11 B】

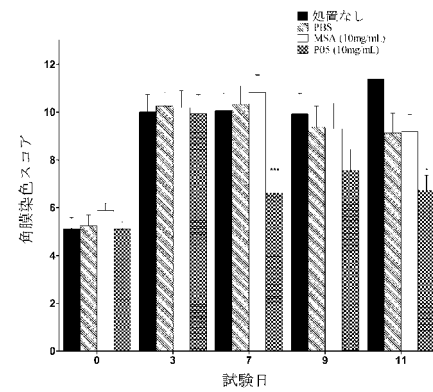


図 11 B

【図 11 C】

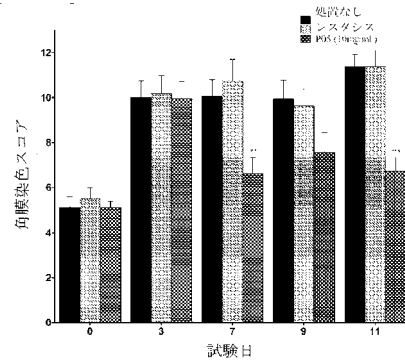


図 11 C

【図 1 2 A】

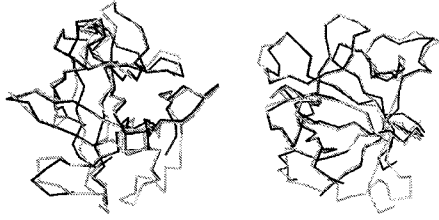


図 1 2 A

【図 1 2 C】

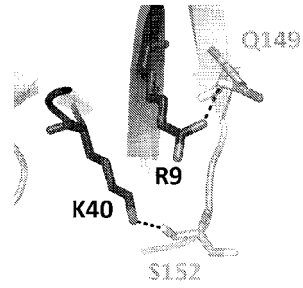


図 1 2 C

【図 1 2 B】

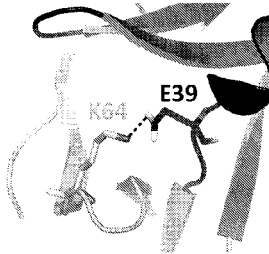


図 1 2 B

【図 1 3】

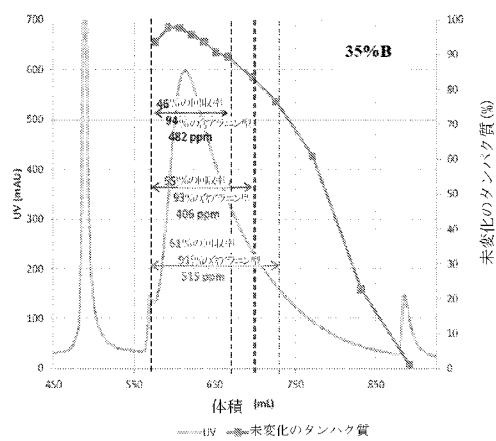


図 1 3

【図 1 4】

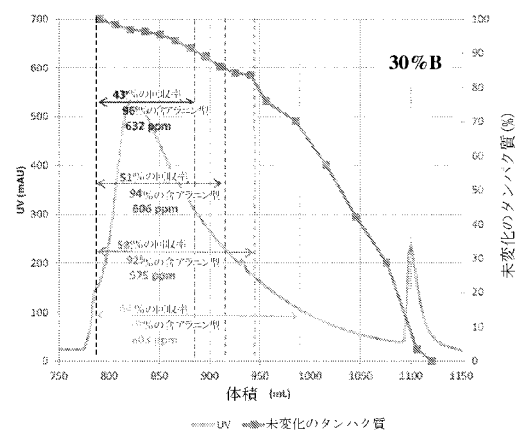


図 1 4

【図 15】

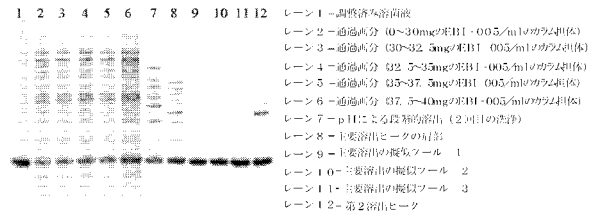


図 15

【図 16】

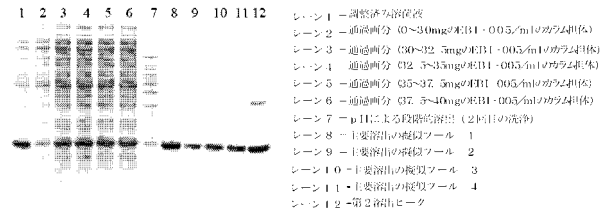


図 16

【図 17 A】

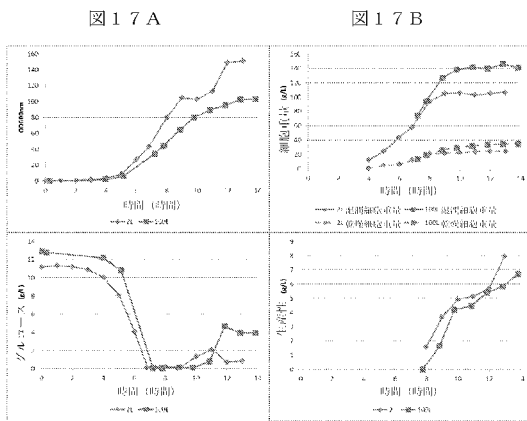


図 17 C

図 17 D

【図 17 B】

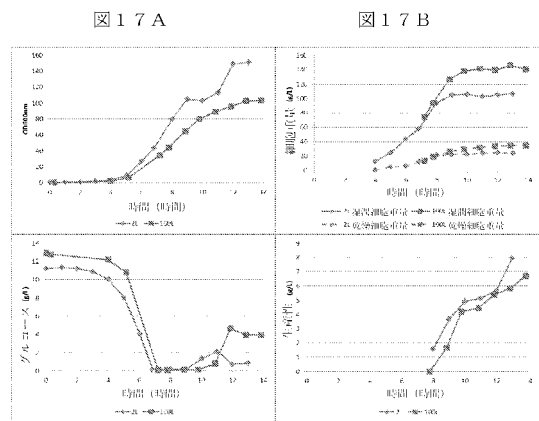
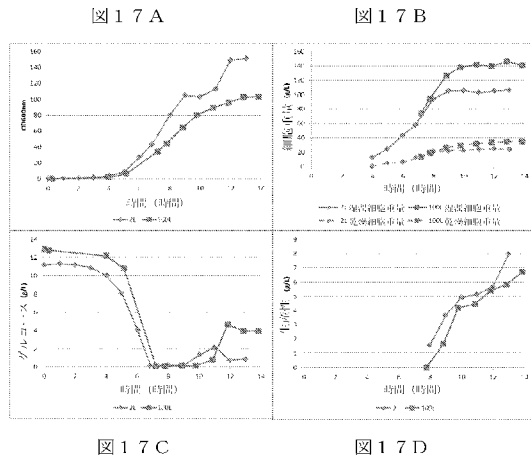


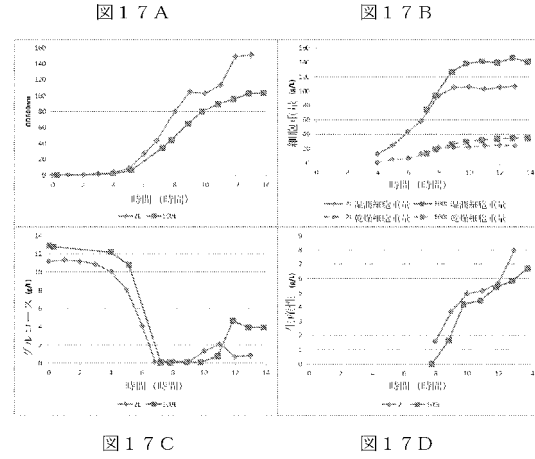
図 17 C

図 17 D

【図 17 C】



【図 17 D】



【配列表】

2014522868000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年4月10日(2014.4.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

前記の方法はまた、メチオニル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも10%、20%、40%、70%もしくは80%減少させることにより、メチオニル化型に比べて未変化型を濃縮するためにも用いられ得る。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の10%未満、8%未満、5%未満、3%未満、または2%未満である。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の1%～10%、2%～8%、または3%～5%である。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

前記の方法また、メチオニル化型のパーセンテージを少なくとも1%、3%、5%、7%、もしくは8%、または少なくとも10%、20%、40%、70%、80%もしくは

90%減少させることにより、メチオニル化型に比べて未変化型を濃縮するためにも用いられ得る。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の10%未満、5%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満または0.05%未満である。例えば、溶出液中のメチオニル化型は総キメラサイトカインタンパク質の0.05%~10%、1%~8%、または3%~5%である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

P01、P02、P03、P04、P05、P06、もしくはP07のアミノ酸配列、または実施例1、5、6、もしくは本明細書中の別のか所の配列に対してメチオニンN末端を含む単離タンパク質、およびP01、P02、P03、P04、P05、P06、もしくはP07のアミノ酸配列、または実施例1、5、6、もしくは本明細書中の別のか所の配列であってN末端のアラニンが存在しない単離タンパク質も提供される。これらの型はそれぞれ未変化のタンパク質のメチオニル化アイソフォームおよび脱アラニンアイソフォームを表す。アセチル化されている単離タンパク質も提供される。アセチル化型にはアセチル化未変化タンパク質、アセチル化メチオニル化タンパク質、およびアセチル化脱アラニンアイソフォームが含まれる。前述の配列は本明細書において開示される他の形体を含み得る。例えば、その配列は、例えば、IL-1RI結合配列のN末端側またはC末端側にヘキサヒスチジン配列などのタグ（配列番号：42）をさらに含み得る。前記配列は、IL-1RI結合配列の安定性または薬物動態を修飾する部分をさらに含み得る。というのも、前記配列は、血清アルブミンおよび／またはFcドメイン、またはそれらの1つ以上のドメイン、例えば、1つ以上の免疫グロブリン定常ドメインまたは1つ以上のアルブミンドメインをさらに含み得るからである。前記タンパク質は本明細書に記載される他の形体を有し得る。いくつかの実施形態では、前記単離タンパク質は、本明細書において開示される配列またはキメラドメインからなる、またはそれらから基本的になる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

【図1】X線結晶解析のデータから決定されたP04の構造の図。IL-1Raに由来する残基の骨格は黒色で示されており、IL- β に由来する残基の骨格は灰色で示されている。

【図2】ヒトIL-1RIの細胞外ドメインに結合したP05タンパク質のモデルの3つの視像を示す図。P05では、IL-1Ra残基は黒色で示されており、IL-1 β 残基は白色で示されている。

【図3】IL-1Ra残基が黒色で示されており、IL-1 β 残基が白色で示されている、キメラタンパク質のモデルを示す図。モデルは次のタンパク質を示す：P01（図3A）、P03（図3B）、P04（図3C）、P05（図3D）、P07（図3E）、およびP06（図3F）。

【図4】いくつかのヒトIL-1ファミリーサイトカインのアラインメントを提供する図：IL-1 β （配列番号1）、IL-1 α （配列番号2）、IL-1Ra（配列番号3）、IL-33（配列番号4）、IL-36Ra（配列番号5）、IL-36 α （配列番号6）、IL-36 β （配列番号7）、およびIL-36 γ （配列番号8）。本明細書の本文において参照されているセグメントがアラインメントの下に特定されている。さらに、b-シートおよびそのようなシート間のループが特定されている。

【図 5 A】P 0 1 のアミノ酸配列（配列番号 1 7）の表。I L - 1 β に由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例 1 も参照されたい。

【図 5 B】P 0 2 のアミノ酸配列（配列番号 1 8）の表。I L - 1 β に由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例 1 も参照されたい。

【図 5 C】P 0 3 のアミノ酸配列（配列番号 1 9）の表。I L - 1 β に由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例 1 も参照されたい。

【図 5 D】P 0 4 のアミノ酸配列（配列番号 2 0）の表。I L - 1 β に由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例 1 も参照されたい。

【図 5 E】P 0 5 のアミノ酸配列（配列番号 2 1）の表。I L - 1 β に由来するセグメントは太字の斜体で示されている。下の実施例 1 も参照されたい。

【図 6】受容体結合剤を発現する大腸菌細胞から精製されたタンパク質からなる例となる試料を示す SDS - PAGE ゲルの画像。1 5 k D a と 2 0 k D a の分子量マーカーが左に示されている。レーンは次のとおりである：分子量マーカー（レーン 1 および 6）、抽出物（レーン 2 および 7）、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製された物質（レーン 3 および 8）、陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製された物質（レーン 4 および 9）、およびそのような物質の還元試料（レーン 5 および 1 0）。レーン 2 ～ 5 は P 0 5 精製のもの、およびレーン 6 ～ 1 0 は P 0 4 精製のものである。実施例 2 も参照されたい。

【図 7 A】I L - 1 β と陰性対照である β - グルクロニダーゼ（G U S）タンパク質と比べた P 0 6、P 0 7、および P 0 1 タンパク質のシグナル伝達を刺激する能力を示す表および付随の棒グラフ。

【図 7 B】様々な I L - 1 β 濃度における P 0 1 による I L - 1 β の拮抗作用を示すグラフ。

【図 8 A】0. 1 n g / m l の I L - 1 β （ヒト）の存在下における P 0 3（ヘキサヒスチジンタグ化（配列番号 4 2 に開示されたヘキサヒスチジン））、P 0 4（ヘキサヒスチジンタグ化（配列番号 4 2 に開示されたヘキサヒスチジン））、P 0 5（ヘキサヒスチジンタグ化（配列番号 4 2 に開示されたヘキサヒスチジン））、および I L - 1 R a による I L - 1 β の拮抗作用を示すグラフ。

【図 8 B】0. 1 n g / m l の I L - 1 β （ヒト）の存在下における非タグ化型の P 0 1、P 0 2、P 0 3、P 0 4、および P 0 5、および I L - 1 R a を含有する溶菌液による I L - 1 β の拮抗作用を示すグラフであって、各溶菌液中のタンパク質濃度の推定値を使用しているグラフ。

【図 9】固定化された可溶性 I L - 1 R I に対する次のタンパク質、すなわち、I L - 1 β （図 9 A）、I L - 1 R a（図 9 B）、P 0 4（図 9 C）、および P 0 5（図 9 D）の結合キネティクスを示す S P R データのグラフを含む図。

【図 1 0 A】実施例 7 に記載される、I L - 1 R a、I L - 1 β 、P 0 3、P 0 4、および P 0 5 の熱変性を示すグラフ。

【図 1 0 B】図 1 0 A 内のグラフの負の一次導関数を示す図。

【図 1 1 A】ドライアイモデルのマウスについて第 0 日、第 3 日、第 7 日、第 9 日、および第 1 1 日に、2 つの独立した試験の中の眼毎の、角膜のフルオレセイン染色により試験した、平均角膜染色スコア $\pm$ 標準誤差（S E M）を示す棒グラフ。処置を受けなかった（n = 1 8）、1 0 m g / m l の P 0 5 の処置を受けた（n = 1 9）、またはベヒクルである 1. 2 5 $\times$ P B S の処置を受けた（n = 2 0）マウスがいた。星印は次のような、ベヒクルと比べた P 0 5 の統計的有意性を示す：*（P < 0. 0 5）および**（P < 0. 0 0 5）。

【図 1 1 B】ドライアイモデルのマウスについて第 0 日、第 3 日、第 7 日、第 9 日、および第 1 1 日での、眼毎の平均角膜染色スコア $\pm$ 標準誤差（S E M）を示す、別個の実験に由来するデータを表す棒グラフ。処置を受けなかった（n = 8）、ベヒクルである 1. 2 5 $\times$ P B S の処置を受けた（n = 8）、1 0 m g / m l のマウス血清アルブミン（M S A）の処置を受けた（n = 8）、または 1 0 m g / m l の P 0 5 の処置を受けた（n = 9）

マウスがいた。星印は次のようなマウス血清アルブミンと比べた P 0 5 の統計的有意性を示す：*（ $P < 0.05$ ）および***（ $P < 0.0005$ ）。

【図 1 1 C】図 1 1 B と同じ実験において、レスタシス（Restasis）（登録商標）（0.05% サイクロスポリン乳剤）（ $n = 8$ ）で処置されたマウスのデータを含む棒グラフ。星印は次のようなレスタシス（登録商標）と比べた P 0 5 の統計的有意性を示す：**（ $P < 0.005$ ）および***（ $P < 0.0005$ ）。

【図 1 2 A】P 0 4 の X 線結晶解析構造（黒色）を P 0 4 の構造のコンピュータモデル（灰色）に重ね合わせた構造を示す図。

【図 1 2 B】P 0 4 の K 6 4 と E 3 9 の間の相互作用を例示する図。

【図 1 2 C】P 0 4 の C 末端残基 Q 1 4 9 および S 1 5 2 の K 4 0 および R 9 との間の相互作用を例示する図。

【図 1 3】pH 6.0 および 35% B での溶出について、洗浄および溶出プロファイルを示す拡大されたクロマトグラムを含むグラフ。

【図 1 4】pH 6.0 および 30% B での溶出について、洗浄および溶出プロファイルを示す拡大されたクロマトグラムを含むグラフ。

【図 1 5】pH 6.0 および 35% B での溶出を利用する実験から精製されたタンパク質からなる例となる試料を示す SDS - PAGE ゲルの画像。

【図 1 6】pH 6.0 および 30% B での溶出を利用する実験から精製されたタンパク質からなる例となる試料を示す SDS - PAGE ゲルの画像。

【図 1 7 A】2 L と 100 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【図 1 7 B】2 L と 100 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【図 1 7 C】2 L と 100 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【図 1 7 D】2 L と 100 L のタンパク質産生シリーズで行われた最終フェドバッチ発酵プロセスを比較するグラフ。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0380

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0380】

ヘキサヒスチジンタグ（配列番号 42）を含有するタンパク質を大腸菌細胞 BL 21（DE 3）株または BL R（DE 3）内で、LB プロス培地中で 1 mM の IPTG を使用して 37℃ で 3 時間誘導することにより発現させた。細胞を 20～50 mM トリス、0.5 M NaCl、2.5 mM EDTA、0.1% トリトン X-100、pH 8.0 中で溶菌した。溶菌液を、0.1% のポリソルベート 80 を含有する 1.25×PBS に対して透析し、次に、His Trap HP（登録商標）充填済みカラム（GE Healthcare 社、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ）を使用する IMAC クロマトグラフィーにかける前に 0.8/0.2 μm フィルターに通して滅菌濾過した。そのカラムを 50 mM リン酸、500 mM NaCl、pH 7.1 に平衡化し、そのカラムに試料を負荷し、そして、そのカラムを同じ緩衝液で洗浄した。そのカラムに対し、同じ緩衝液中の 25 mM イミダゾールを使用して前溶出操作を行い、そして、同じ緩衝液中の 125 mM イミダゾールを使用して溶出操作を行った。溶出されたタンパク質を 1.25×PBS、0.1% ポリソルベート 80、pH 7.4 に対して徹底的に透析した。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0382

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0382】

ヘキサヒスチジntag（配列番号42）を欠くタンパク質をイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。P05タンパク質をイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。発現細胞の溶菌液を、塩が無く（約1mS/cmの電気伝導度）、低pH（約pH5.5）の状態でGigaCapS（商標）カラム（Tosoh Bioscience LLC社、米国、ペンシルバニア州、キング・オブ・プロシア）に供した。その後、そのカラムに対し、pH勾配（緩衝液A=10mM酢酸、pH5.5；緩衝液B=20mMトリス、pH8）による溶出操作をおこなった。次に、溶出されたタンパク質を含有する5mlの画分を5mlのH₂Oと5mlの20mMトリス（pH8）で希釈し、その後、Capto（商標）Q樹脂（GE Healthcare社、米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ）に供し、そして、20mMトリス、pH8.0中の0mM～250mMのNaCl濃度勾配を使用して溶出した。溶出されたタンパク質を1.25×PBS、0.1%ツイーン（登録商標）80またはツイーン（登録商標）を欠く1.25×PBSに対して徹底的に透析し、そして、貯蔵した。図6を参照のこと。P03タンパク質およびP04タンパク質を、同様の方法を用いて精製した。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0390

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0390】

タンパク質P01、P02、P03、P04およびP05はそれぞれIL-1β活性を抑制した。例えば図8Aおよび8Bを参照のこと。P05のIC50は約5ng/ml未満であった。P05を、このアッセイにおいてIL-1RIを刺激する能力について試験し、そして、P05は、試験した最も高い濃度である1mg/mlでもどのような検出可能な受容体活性化作用も有していないことが観察された。P01、P02、P03、P04およびP05も、IL-1βに対して応答性であるヒト骨肉腫細胞株であるMG-63細胞におけるIL-1β誘導性IL-6発現を阻害した。ドライアイ疾患のマウスモデルでは、ヘキサヒスチジntag化P05（配列番号42に開示されたヘキサヒスチジン）が生物活性を有することが観察された。非タグ化P05については下の実施例8も参照されたい。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0399

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0399】

精製されたP05（ヘキサヒスチジntag（配列番号42）を欠く）を1.25×PBS中に調製し、ドライアイ疾患のマウスモデルにおいて試験した。このモデルでは、Jackson Laboratories社から購入した（30%以上の相対湿度、ヒドロゲル補助食品、およびenvirodry環境強化を有する動物飼育室で1～2週間順応させられた）6～10週齢の雌C57BL/6マウスを第0日にフルオレセイン染色について事前に選別した。フルオレセイン染色について、新しく注射用水に10mg/mLの濃度に希釈して作製したフルオレセインをそれぞれの各眼に対して0.4μLずつ投与した。投与から約8～13分後、Olympus蛍光解剖顕微鏡を使用して眼を採点した。点状の染色を、角膜の表面が分割されている5つの領域のそれぞれについて0～3段階の標準化国立眼研究所（NEI）格付けシステムを用いて記録した（スコアの範囲は0～15/眼である）。教育用ブリッジを使用して、各眼について1つの全体的なスコアを与えるために、2つの盲検によるスコアにより（複数の）マウスが同時に評価された。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/048631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/20 C07K14/545 B01D15/36
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K B01D

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/063195 A2 (REDDYS LAB LTD DR [IN]; REDDYS LAB INC DR [US]; KOTICHA DARSHAN [IN];) 26 May 2011 (2011-05-26) the whole document	1-12, 16-54, 56-91, 99-125
Y	US 2009/111745 A1 (TOMLINSON IAN M [GB]) 30 April 2009 (2009-04-30) the whole document	1-12, 16-54, 56-91, 99-125
Y	US 4 770 781 A (SCHMIDT JACK A [US] ET AL) 13 September 1988 (1988-09-13) the whole document	1-12, 16-54, 56-91, 99-125
	----- -/--	

☒ 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

15 January 2013

Date of mailing of the international search report

23/01/2013

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

Bassias, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/048631

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2012/016203 A1 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS INC [US]; BARNES THOMAS M [US]; HOU JINZHAO [US] 2 February 2012 (2012-02-02) the whole document -----	1-137
X,P	Eric S. Furfine ET AL: "EBI-005: An IL-1 Receptor Inhibitor Designed for the Treatment of Dry Eye Syndrome", 7 May 2012 (2012-05-07), pages 1-1, XP055036406, Retrieved from the Internet: URL:http://www.elevenbio.com/pdf/Eleven_poster_042312_lowres.pdf [retrieved on 2012-08-27] the whole document -----	13-15, 55, 92-98, 126-137
E	WO 2012/103240 A2 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS INC [US]; BARNES THOMAS M [US]; HOU JINZHAO [US] 2 August 2012 (2012-08-02) the whole document -----	1-137
A	CHARLES A. DINARELLO: "Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family", ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 1, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 519-550, XP055014922, ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612 -----	1-137

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/048631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011063195	A2	26-05-2011	NONE
US 2009111745	A1	30-04-2009	AU 2005311103 A1 08-06-2006 BR P10518762 A2 09-12-2008 CA 2589802 A1 08-06-2006 CN 101111522 A 23-01-2008 EP 2024396 A2 18-02-2009 JP 2008521426 A 26-06-2008 KR 20070099584 A 09-10-2007 US 2009111745 A1 30-04-2009 WO 2006059110 A2 08-06-2006 ZA 200704431 A 26-11-2008 ZA 200705010 A 30-09-2009 ZA 200804551 A 25-11-2009
US 4770781	A	13-09-1988	NONE
WO 2012016203	A1	02-02-2012	NONE
WO 2012103240	A2	02-08-2012	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P 19/06		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00		
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14		
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16		
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K 47/12		
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02		
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18		
A 6 1 K	47/14	(2006.01)	A 6 1 K 47/14		
A 6 1 K	47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34		
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26		
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/10		
C 0 7 K	1/18	(2006.01)	C 0 7 K 1/18	Z N A	
C 0 7 K	1/20	(2006.01)	C 0 7 K 1/20		
C 0 7 K	14/52	(2006.01)	C 0 7 K 14/52		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02		
G 0 1 N	30/88	(2006.01)	G 0 1 N 30/88	2 0 1 X	
G 0 1 N	30/26	(2006.01)	G 0 1 N 30/88	1 0 1 C	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G 0 1 N 30/88	1 0 1 M	
			G 0 1 N 30/88	J	
			G 0 1 N 30/88	1 0 1 T	
			G 0 1 N 30/26	A	
			C 1 2 N 15/00	A	

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

(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 230105223

弁護士 城山 康文

- (72)発明者 バーンズ, トーマス, エム
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400
- (72)発明者 ホー, ジンジャオ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400
- (72)発明者 ザービスーパーストートシス, グレゴリー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400
- (72)発明者 シャーマー, エミリー, ベルチャー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400
- (72)発明者 マクニール, ゲイリー, エル
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400
- (72)発明者 ゴールデン, キヤスリン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142、ケンブリッジ、ファースト・ストリート・215、スイート・400

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA11 BA80 DA06 EA04 FA10
4B063 QA01 QQ08 QR66 QR77 QR80 QS36 QS38 QX01
4B064 AG01 CA02 CA19 CC06 CC15 CC24 CE10 CE11 DA01
4C076 BB24 CC01 CC07 CC11 CC15 CC16 CC18 CC21 DD09 DD38D
DD67D EE23 EE49
4C084 AA02 AA06 BA01 BA08 BA21 BA22 BA23 DA13 MA05 MA58
MA66 NA14 ZA021 ZA161 ZA221 ZA361 ZA591 ZA661 ZA891 ZA941
ZA961 ZB151 ZC311 ZC351 ZC411 ZC421
4H045 AA20 AA30 FA74 GA23 GA24