

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522864

(P2017-522864A)

(43) 公表日 平成29年8月17日 (2017.8.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 97 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-572529 (P2016-572529)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月15日 (2015.6.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月18日 (2017.1.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/063362
 (87) 国際公開番号 W02015/189430
 (87) 国際公開日 平成27年12月17日 (2015.12.17)
 (31) 優先権主張番号 14172331.2
 (32) 優先日 平成26年6月13日 (2014.6.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

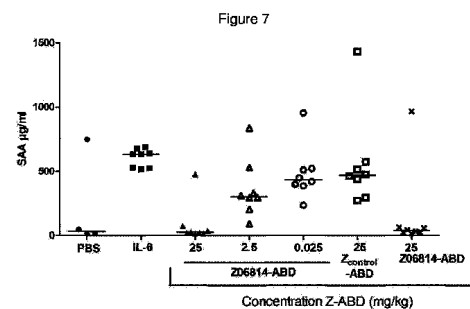
(71) 出願人 516368254
 アフィボディ アクティエボラード
 スウェーデン国, エスー171 63 ソ
 ルナ, グナール アスブルンズ アレ 2
 4
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ポリペプチド

(57) 【要約】

本願は、インターロイキン-6に対する結合親和性を有する改変されたポリペプチドのクラスに関し、配列 E E X₃X₄A W X₇E I H X₁₁L P N L X₁₆X₁₇X₁₈Q X₂₀X₂₁A F I X₂₅X₂₆L X₂₈X₂₉を含む I L-6 結合ポリペプチドを提供する。本願はまた、治療、予後予測及び／又は診断剤としての当該 I L-6 結合ポリペプチドの使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I L-6 結合モチーフ BM を含む、I L-6 結合ポリペプチドであり、前記 I L-6 結合モチーフが：

i) E E X₃ X₄ A W X₇ E I H X₁₁ L P N L X₁₆ X₁₇ X₁₈ Q X₂₀ X₂₁ A F I X₂₅ X₂₆ L X₂₈ X₂₉

(式中、互いに独立して、

X₃が、A、F、H、K、Q、R、S、W及びYから選択され；

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

X₇が、F、H、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W及びYから選択され；

X₁₁が、A、I、K、L、M、N、R、S、T及びVから選択され；

X₁₆が、N及びTから選択され；

X₁₇が、A、I、T及びV；

X₁₈が、D、E、G、H、K、N、Q、R、S及びTから選択され；

X₂₀が、I、L、M、R、T及びVから選択され；

X₂₁が、A、S、T及びVから選択され；

X₂₅が、I、M、Q、S、T、V及びWから選択され；

X₂₆が、K及びSから選択され；

X₂₈が、F、L、M及びYから選択され；並びに、

X₂₉が、D及びRから選択される)

及び、

i i) i) で定義された配列と少なくとも93%の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列からなる、I L-6 結合ポリペプチド。

【請求項 2】

前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 1 5 5 1 からなる群から選択される配列の 8 位から 3 6 位の配列に相当する、例えば、配列番号 1 ~ 1 4 及び配列番号 1 5 1 2 からなる群から選択される、例えば配列番号 1 5 1 2 の 8 位から 3 6 位の配列に相当する、請求項 1 に記載の I L-6 結合ポリペプチド。

【請求項 3】

前記 I L-6 結合モチーフが、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する、請求項 1 又は 2 に記載の I L-6 結合ポリペプチド。

【請求項 4】

前記 I L-6 結合ポリペプチドが、結合モジュール B M o d を含み、前記結合モジュール B M o d のアミノ酸配列が：

i i i) K - [BM] - D P S Q S X_a X_b L L X_c E A K K L X_d X_e X_f Q

(式中、[BM] は、

X₂₉が、Dであり；

X_aが、A及びSから選択され；

X_bが、N及びEから選択され；

X_cが、A、S及びCから選択され；

X_dが、E、N及びSから選択され；

X_eが、D、E及びSから選択され；

X_fが、A及びSから選択されるもので提供される請求項 1 又は 2 に定義される I L-6 結合モチーフである)；及び、

i v) i i i) によって定義される配列と少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列、から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の I L-6 結合ポリペプチド。

【請求項 5】

x i) V D A K Y A K - [BM] - D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K；

(式中、[BM]は、請求項1～2のいずれか1項に定義されたIL-6結合モチーフである)、及び、

x i i) x i)で定義された配列と少なくとも89%の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【請求項6】

前記配列x i)が、配列番号1～1551からなる群から選択される、例えば、配列番号1～14及び配列番号1512からなる群から選択される、例えば配列番号1512である、請求項5に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【請求項7】

10

シス-シグナル伝達経路及び/又はトランス-シグナル伝達経路を介してIL-6依存性シグナル伝達を阻害することができる、請求項1～6のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【請求項8】

阻害する半最大阻害濃度が、最大で 1×10^{-6} M、例えば最大で 1×10^{-7} 、例えば最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} Mである、請求項7に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【請求項9】

IL-6/IL-6Raとgp130との相互作用を阻害することができる、請求項7又は8に記載のIL-6結合ポリペプチド。

20

【請求項10】

相互作用のEC50値が最大で 1×10^{-7} 、例えば最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} Mであるように、又は、相互作用のK_D値が最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} MであるようにIL-6に結合することができる、請求項1～9のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【請求項11】

—請求項1～10のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチドからなる第1の部分；及び、

—所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第2の部分、を含む、融合タンパク質又はコンジュゲート。

30

【請求項12】

請求項1～10のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項13】

請求項1～11のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートと、少なくとも1つの医薬的に許容される賦形剤又は担体とを含む、組成物。

【請求項14】

薬剤、診断薬又は予後予測薬として使用するための請求項1～11のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は請求項13に記載の組成物。

40

【請求項15】

前記ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物が、インビボでIL-6機能を調節する、請求項14に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【請求項16】

IL-6関連障害の治療、予後予測又は診断における、請求項14～15のいずれか1項に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【請求項17】

50

前記 I L - 6 関連障害が、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染性疾患、癌、糖尿病、神経疾患及びうつ病からなる群から選択される、

例えば、慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、若年性特発性関節炎又は全身性若年性特発性関節炎、血管炎、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患；グレーブス病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛症、喘息、慢性閉塞性肺疾患、再発性多発軟骨炎、膵炎、腹膜炎、腎炎、川崎病、シェーグレン症候群及び成人スティル病からなる群から選択される、

例えば、結腸炎関連癌、腎癌 (renal cancer)、腎臓癌 (kidney cancer)、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、乳癌及び肺癌からなる群から選択される癌、

例えば、アルツハイマー病、H I V、糖尿病、敗血症、悪液質、骨髄異形成症候群 (M D S)、肝硬変、移植片対宿主病、心筋梗塞、子宮内膜症及び骨粗鬆症から選択される、請求項 16 に記載の使用のための I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

本願は、インターロイキン-6 (以下、I L - 6 と称する) に対する結合親和性を有する改変されたポリペプチドのクラスに関する。本願はまた、治療剤、予後予測剤及び／又は診断剤としての当該 I L - 6 結合ポリペプチドの使用に関する。

【0002】

背景

炎症は、例えば病原体及び損傷細胞を破壊する自然免疫系によるサイトカイン駆動応答である。慢性関節リウマチ (R A) 及びクローン病などのいくつかの疾患状態では、炎症系の調節が損なわれ、組織損傷を引き起こす。最も研究されている炎症誘発剤の中には、サイトカインであるインターロイキン-6 (I L - 6) 及び腫瘍壊死因子 (T N F) がある。I L - 6 は、B 細胞刺激因子 2 (B S F 2)、肝細胞刺激因子 (H S F)、ハイブリドーマ増殖因子 (H G F) 及びインターフェロン- β 2 (I F N B 2) としても知られている。

【0003】

ヒト I L - 6 は、21 k D a の分子量を有する 184 個のアミノ酸の単一のポリペプチド鎖からなるが、変わりやすいグリコシル化パターンは、21 ~ 26 k D a の間で変化するサイズを説明している。I L - 6 は、T 細胞、B 細胞、単球、線維芽細胞、肝細胞、内皮細胞及びケラチノサイトを含む多種多様な細胞型によって分泌される。下流のシグナル伝達は、急性炎症から後天性免疫又は慢性炎症性疾患への移行を誘導する。I L - 6 シグナル伝達及びその調節は複雑であり、いくつかの因子及びメカニズムが関与する。I L - 6 シグナル伝達は、シス-シグナル伝達経路としても知られる、古典的な I L - 6 シグナル伝達経路を介して又はトランス-シグナル伝達経路を介して起こり得る。古典的な I L - 6 シグナル伝達経路では、循環する I L - 6 が、膜結合 I L - 6 受容体 α (I L - 6 R α) に結合し、続いて、膜結合アンカー型 g p 130 コレセプターに結合し、三元複合体が形成される。この複合体は、続いて、g p 130 部分を介したシグナル伝達をもたらす第 2 の隣接する三元複合体と二量体化する (B o u l a n g e r e t a l . , 2003, S c i e n c e 300 (5628) : 2101-2104)。循環系において、I L - 6 は、I L - 6 R α の可溶性外部ドメインに結合されるものとして存在することもできる。そのような複合体は、共受容体 g p 130 を発現するが I L - 6 R α を欠く、任意の細胞の I L - 6 依存性活性化を含む、トランス-シグナル伝達機構の要因である (C h a l a r i s e t a l . , 2011, E u r J C e l l B i o l 90 (6-7) : 484-494 ; A s s i e r e t a l . , 2010, J o i n t B o n e

Spine 77 (6) : 532-6)。トランスシグナル伝達又は前炎症性の経路は、疾患状態に最も関連する経路であることが示唆されており、従って、最も好ましいのは阻害することである。対照的に、古典的なシグナル伝達経路は、重要な抗炎症及び再生プロセスに関与するものとして考えられている (Scheller et al., 2011, Biochim Biophys Acta 1813 (5) : 878-888)。

【0004】

抗IL-6R α 抗体トシリズマブ（アクテムラ（登録商標））は、IL-6関連障害の臨床使用のために承認されている。異なるIL-6誘発経路に対処するために、他の薬物候補も開発されている。これらには、IL-6サイトカインそれ自体に結合する、抗体CNTO136（シルクマブ）(Xu et al., 2011, Br J Clin Pharmacol 72 (2) : 270-281; Zhuang et al., 2013, Int J Clin Pharmacol Ther 51 (3) : 187-199) 及びMED15117 (Finch et al., 2011, J Mol Biol 411 (4) : 791-807) を含む。加えて、トランスシグナル伝達を選択的にブロックすることを目的とするgp130-Fc融合CR5/18が開発中である (Kopf et al., 2010, Nat Rev Drug Discov 9 (9) : 703-718; Chalaris et al., 2012, Dig Dis 30 (5) : 492-499) を含む。

【0005】

炎症性疾患の予測不能かつ慢性の特性、並びに、未だ満たされていない医学的必要性は、新しい治療法の開発を保証する。組織浸透率は分子の大きさに負に相関するので、比較的大きな抗体分子は本質的に不十分な組織分布及び浸透能力を有する。

【0006】

従って、モノクローナル抗体の使用は、治療に必ずしも最適ではなく、IL-6に対して高い親和性を有する薬剤の提供が引き続き必要である。大きな関心は、IL-6関連障害の治療、診断及び予後予測におけるそのような分子の使用の提供でもある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本願の目的は、例えば、治療、予後予測及び診断用途に使用され得る、新規IL-6結合剤を提供することである。

【0008】

本願の目的は、現行の治療法の上記及び他の欠点を緩和しながら、様々な形態の炎症性及び自己免疫疾患を標的とする効率的な治療を可能にする分子を提供することである。

【0009】

さらに、本願の目的は、予後予測及び診断用途に適した分子を提供することである。

【0010】

本願から当業者に明らかなこれらの目的及び他の目的は、添付の特許請求の範囲において請求される本発明の様々な態様によって、及び本明細書において一般に開示されるものによって満たされる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

従って、本願の第1の態様は、IL-6結合モチーフBMを含み、前記IL-6結合モチーフが、

i) $EE X_3 X_4 A W X_7 E I H X_{11} L P N L X_{16} X_{17} X_{18} Q X_{20} X_{21} A F I X_{25} X_{26} L X_{28} X_{29}$

(式中、互いに独立して、

X_3 が、A、F、H、K、Q、R、S、W及びYから選択され；

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

10

20

30

40

50

X_7 が、F、H、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W及びYから選択され；
 X_{11} が、A、I、K、L、M、N、R、S、T及びVから選択され；
 X_{16} が、N及びTから選択され；
 X_{17} が、A、I、T及びV；
 X_{18} が、D、E、G、H、K、N、Q、R、S及びTから選択され；
 X_{20} が、I、L、M、R、T及びVから選択され；
 X_{21} が、A、S、T及びVから選択され；
 X_{25} が、I、M、Q、S、T、V及びWから選択され；
 X_{26} が、K及びSから選択され；
 X_{28} が、F、L、M及びYから選択され；並びに、
 X_{29} が、D及びRから選択される）

10

及び、

i i) i) で定義された配列と少なくとも93%の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-6結合ポリペプチドが提供される。

【0012】

IL-6結合ポリペプチドに関連する配列のクラスの上記の定義は、いくつかの異なる選択実験においてIL-6とのそれらの相互作用で選択された親骨格の多数のランダムポリペプチド変異体の統計分析に基づく。同定されたIL-6結合モチーフ、すなわち「BM」は、親の骨格の標的結合領域に対応し、この領域は3ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内に2つの α ヘリックスを構成する。親骨格では、2つのBMヘリックスの様々なアミノ酸残基が、抗体の定常Fc部分と相互作用するための結合表面を構成する。本願において、結合表面残基のランダム変異及びその後の変異体の選択は、Fc相互作用能力を、IL-6との相互作用能力と置き換えた。

20

【0013】

当業者が理解するように、本願のポリペプチドのIL-6結合能力などの任意のポリペプチドの機能は、ポリペプチドの三次構造に依存する。それゆえ、ポリペプチド中のアミノ酸の配列に、その機能に影響を与えることなく、わずかな変更を加えることが可能である。従って、本願は、IL-6結合特性が保持されるようなIL-6結合ポリペプチドの改変された改変体を包含する。

【0014】

このように、本願に包含されるのは、i)において定義されるポリペプチドに対して93%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、IL-6結合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、i)で定義したポリペプチドと少なくとも96%同一である配列を含み得る。例えば、アミノ酸残基の特定の官能基（例えば、疎水性、親水性、極性など）に属するアミノ酸残基を、同じ官能基からの別のアミノ酸残基に交換することができる可能性がある。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、そのような変換は、本明細書に開示されるIL-6結合ポリペプチドの配列の任意の位置でなされ得る。他の実施形態において、そのような変換は、非可変位置においてのみなされ得、骨格アミノ酸残基とも示される。そのような場合、変換は、可変位置、すなわち、配列i)の「X」で示される位置での変換は許容されない。

40

【0016】

本明細書全体を通して使用される用語「%同一性」は、例えば、以下のように計算され得る。クエリー配列は、CLUSTAL Wアルゴリズム(Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22:4673-4680(1994))を用いて標的配列に対して整列される。整列された配列のうち最も短いものに対応するウィンドウで比較が行われる。整列した配列の最短は、場合によっては標的配列であってもよい。他の例では、クエリー配列は、整列した配列の最短を構成してもよい。各位置のアミノ酸残基を比較し、標的配列中の同一の対応するクエリー配列中の位置のパーセンテージを%同一性として報告する。

50

【0017】

本明細書中で使用される場合、「 X_n 」及び「 X_m 」は、上で定義した配列 i) の n 及び m 位のアミノ酸を示すために使用され、 n 及び m は、前記配列の N 末端から数えて前記配列内のアミノ酸の位置を示す整数である。例えば、 X_3 及び X_7 は、配列 i) の N 末端から 3 位及び 7 位のアミノ酸をそれぞれ示す。

【0018】

第 1 の態様の実施形態では、配列 i) の X_n が、表 1 の可能性のある残基の群から独立して選択されるポリペプチドが提供される。当業者であれば、 X_n が、可能性のある前記の列挙した任意の 1 つから選択され、この選択は、 $n \neq m$ である X_m におけるアミノ酸の選択とは独立していることを理解するであろう。従って、表 1 の位置 X_n に列挙された可能性のある残基のいずれかは、表 1 の任意の他の可変位置に列挙された可能性のある残基のいずれかと独立して組み合わせることができる。

10

【0019】

当業者は、表 1 を以下のように読むべきであることを理解するであろう：

第 1 の態様による一実施形態では、ポリペプチドが提供され、ここで、配列 i) のアミノ酸残基「 X_n 」は、「可能性のある残基」から選択される。従って、表 1 は、本願の第 1 の態様のいくつかの特定の個別化された実施形態を開示する。例えば、第 1 の態様による一実施形態では、配列 i) の X_3 が A、H、K、Q、R 及び Y から選択されるポリペプチドが提供され、第 1 の態様による別の実施形態では、配列 i) の X_3 が A、K、Q、R 及び Y から選択されるポリペプチドが提供される。疑わしいことを避けるために、列挙された実施形態は、さらに他の実施形態において自由に組み合わせることができる。例えば、そのような組合せ実施形態の 1 つは、 X_3 が A、K、R 及び Y から選択され、 X_4 が H 及び K から選択され、 X_{11} が A、I、L 及び T から選択されるポリペプチドである。

20

【0020】

【表 1 - 1】

表 1 : 本願の第 1 の態様の実施形態

X_n	可能性のある残基
X_3	A, F, H, K, Q, R, W, Y
X_3	A, H, K, Q, R, S, W, Y
X_3	A, H, K, Q, R, W, Y
X_3	A, H, K, Q, R, Y
X_3	A, K, Q, R, Y
X_3	A, K, R, Y
X_3	A, K, R
X_3	A, R, Y
X_3	K, R
X_3	A, R
X_3	R, Y
X_3	R
X_3	K
X_3	A
X_3	Y
X_4	A, D, E, F, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
X_4	A, D, E, F, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, Y
X_4	A, D, E, F, H, K, L, M, N, Q, R
X_4	A, D, E, F, H, K, M, N, Q, R, S, T, V, Y
X_4	A, D, E, F, H, K, N, Q, R, S, T, Y
X_4	A, D, E, H, K, N, Q, R, S, T, Y
X_4	A, D, E, H, K, Q, R, T
X_4	A, D, E, F, H, K, M, Q, R, S, T, V, Y
X_4	A, D, E, F, H, K, Q, R, S, T, V
X_4	A, D, E, H, K, Q, R
X_4	A, D, E, H, K, R
X_4	D, E, H, K, R
X_4	A, D, E, K, R
X_4	A, D, E, H, K
X_4	D, E, K, R
X_4	A, D, E, K
X_4	D, E, H, K
X_4	D, H, K, Q
X_4	E, H, K, R
X_4	D, E, R
X_4	D, E, K
X_4	H, K, Q

10

20

30

40

【表 1 - 2】

X_n	可能性のある残基
X_4	D, K, Q
X_4	D, H, Q
X_4	D, H, K
X_4	E, H, K
X_4	E, H, R
X_4	H, K, R
X_4	K, E, R
X_4	D, E
X_4	R, E
X_4	K, E
X_4	E, H
X_4	D, K
X_4	H, K
X_4	K, Q
X_4	K, D
X_4	D, Q
X_4	H, Q
X_4	K
X_4	H
X_4	D
X_4	Q
X_4	E
X_4	R
X_7	F, H, I, K, L, M, N, R, T, V, W, Y
X_7	F, H, I, K, L, M, N, R, T, W, Y
X_7	F, H, I, L, M, N, R, T, W, Y
X_7	F, H, K, L, M, N, R, S, T, V, W, Y
X_7	F, H, K, L, M, N, R, T, V, W, Y
X_7	F, H, K, L, M, N, R, T, W, Y
X_7	F, H, L, M, N, R, T, W, Y
X_7	F, H, R, T, W, Y
X_7	F, I, N, R, T, W, Y
X_7	F, I, R, W, Y
X_7	F, N, R, W, Y
X_7	F, R, T, W, Y
X_7	F, H, T, W, Y
X_7	F, H, W, Y
X_7	F, T, W, Y

10

20

30

40

【表 1 - 3】

X_n	可能性のある残基
X_7	F, R, W, Y
X_7	F, H, L, M, R, T, V, W, Y
X_7	F, H, R, T, W, Y
X_7	I, R, W, Y
X_7	F, W, Y
X_7	F, R, Y
X_7	R, W, Y
X_7	I, R, Y
X_7	I, W, Y
X_7	F, Y
X_7	W, Y
X_7	I, Y
X_7	R, Y
X_7	F
X_7	W
X_7	Y
X_7	I
X_7	R
X_{11}	A, I, K, L, N, R, S, T, V
X_{11}	A, I, K, L, M, N, S, T, V
X_{11}	A, I, K, L, N, S, T, V
X_{11}	A, I, K, L, S, T, V
X_{11}	A, I, K, L, N, T, V
X_{11}	A, I, K, L, T, V
X_{11}	A, I, K, L, T
X_{11}	I, K, L, T
X_{11}	A, I, L, T
X_{11}	A, I, K, L
X_{11}	A, K, L, N, S, T
X_{11}	A, K, L, N, S
X_{11}	A, K, L, S, T
X_{11}	A, K, L, S
X_{11}	K, L, S
X_{11}	A, K, L
X_{11}	A, I, L
X_{11}	I, L
X_{11}	A, L, N
X_{11}	A, L

10

20

30

40

【表 1 - 4】

X_n	可能性のある残基
X_{11}	L, N
X_{11}	L
X_{11}	A
X_{11}	N
X_{11}	S
X_{11}	I
X_{11}	K
X_{11}	T
X_{16}	N
X_{16}	T
X_{17}	I, T, V
X_{17}	A, I, V
X_{17}	I, V
X_{17}	I
X_{17}	V
X_{18}	D, E, H, K, N, Q, R, S, T
X_{18}	D, E, G, H, N, Q, R, S, T
X_{18}	D, E, H, N, Q, R, S, T
X_{18}	D, E, H, N, Q, S, T
X_{18}	D, E, N, Q, S, T
X_{18}	D, E, N, S, T
X_{18}	D, E, Q, S, T
X_{18}	D, E, S, T
X_{18}	D, E, Q, S
X_{18}	D, E, N, S
X_{18}	D, E, S
X_{18}	D, E, N
X_{18}	D, E
X_{18}	E
X_{18}	D
X_{20}	I, L, M, R, V
X_{20}	I, M, R, T, V
X_{20}	I, M, R, V
X_{20}	I, L, M, V
X_{20}	I, M, V
X_{20}	I, M
X_{20}	M, V
X_{20}	M

10

20

30

40

【表 1 - 5】

X_n	可能性のある残基
$X_{2,1}$	A, S, T
$X_{2,1}$	A, S, V
$X_{2,1}$	A, S
$X_{2,1}$	A, V
$X_{2,1}$	A, T
$X_{2,1}$	A
$X_{2,5}$	I, Q, S, T, V, W
$X_{2,5}$	I, Q, S, T, V
$X_{2,5}$	I, Q, S, T, W
$X_{2,5}$	I, Q, S, T
$X_{2,5}$	I, S, T
$X_{2,5}$	Q, S, T
$X_{2,5}$	S, T, W
$X_{2,5}$	S, T
$X_{2,5}$	S
$X_{2,5}$	T
$X_{2,6}$	K
$X_{2,6}$	S
$X_{2,8}$	F, L, Y
$X_{2,8}$	F, M, Y
$X_{2,8}$	F, L, M
$X_{2,8}$	F, L
$X_{2,8}$	F, Y
$X_{2,8}$	F
$X_{2,9}$	D
$X_{2,9}$	R

10

20

30

【0021】

第1の態様の1つの特定の実施形態では、前記配列 i) において、

X_3 が、A、H、K、Q、R及びYから選択され；

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

X_7 が、F、H、I、K、L、M、N、R、T、V、W及びYから選択され；

が、A、I、K、L、N、S、T及びVから選択され；

40

X_{16} が、Tであり；

X_{17} が、A、I、T及びVから選択され；

X_{18} が、D、E、H、K、N、Q、R、S及びTから選択され；

X_{20} が、I、L、M、R及びVから選択され；

X_{21} が、A、S及びVから選択され；

X_{25} が、I、Q、S、T、V及びWから選択され；

X_{26} が、Kであり；

X_{28} が、F、L、M及びYから選択され；並びに、

X_{29} が、Dである、

ポリペプチドが提供される。

50

【0022】

IL-6 結合ポリペプチドのサブクラスを規定する、より具体的な実施形態では、配列 i) は、11 の条件 I ~ XI :

- I. X_3 が、K 及び R から選択される；
- II. X_{11} が、A 及び L から選択される；
- III. X_{16} が、T である；
- IV. X_{17} が、I 及び V から選択される；
- V. X_{18} が、D 及び E から選択される；
- VI. X_{20} が、M である；
- VII. X_{21} が、A である；
- VIII. X_{25} が、S 及び T から選択される；
- IX. X_{26} が、K である；
- X. X_{28} が、F ；並びに
- XI. X_{29} が、D である、

の少なくとも 6 つを満たす。

【0023】

第 1 の態様による IL-6 結合ポリペプチドのいくつかの例において、配列 i) は、11 の条件 I ~ XI の少なくとも 7 つを満たす。より具体的には、配列 i) は、11 の条件 I ~ XI の少なくとも 8 つ、例えば 11 の条件 I ~ XI の少なくとも 9 つ、例えば 11 の条件 I ~ XI のうちの少なくとも 10、例えば、11 の条件 I ~ XI の全てを満たしてもよい。

【0024】

第 1 の態様による IL-6 結合ポリペプチドのいくつかの実施形態では、IL-6 結合ポリペプチドが提供され、ここで、 $X_{17}X_{20}X_{21}$ は VMA 及び IMA から選択される。いくつかの実施形態では、 $X_{20}X_{21}X_{28}$ は MAF である。いくつかの実施形態では、 $X_{17}X_{20}X_{28}$ は、VMF 及び IMF から選択される。いくつかの実施形態において、 $X_{17}X_{21}X_{28}$ は、VAF 及び IAF から選択される。

【0025】

以下の実験セクションで詳細に記載されるように、IL-6 結合ポリペプチド変異体の選択は、いくつかの個々の IL-6 結合モチーフ (BM) 配列の同定をもたらした。これらの配列は、当該態様の配列 i) の個々の実施形態を構成する。個々の IL-6 結合モチーフの配列は、図 1 に提示された配列番号 1 ~ 1551 のアミノ酸 8 位 ~ 36 位に対応する。従って、この態様による IL-6 結合ポリペプチドの一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 1551 からなる群より選択される配列中の 8 位 ~ 36 位に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 1502 からなる群より選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 7、配列番号 15 ~ 89 及び配列番号 151 ~ 871 からなる群から選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 6、配列番号 8 ~ 14、配列番号 90 ~ 150 及び配列番号 872 ~ 1502 からなる群から選択される配列における 8 位から 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 152 及び配列番号 1503 ~ 1515 からなる群から選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 150 及び配列番号 1503 ~ 1515 からなる群から選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 152 からなる群より選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。別の実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 150 からなる群から選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。さらに別の実施形態では、配列 i) は、配列番号 7、配列番号 15 ~ 89 及び配列番号 151 ~ 152 からなる群から選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1 ~ 6、配列番号 8 ~ 14 及び配列番号 90 ~ 150 からなる群から選択される配列における 8 位 ~ 36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i)

は、配列番号 1～14 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される配列における 8 位～36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1～14 及び配列番号 1512 からなる群より選択される配列における 8 位～36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1～14 からなる群より選択される配列における 8 位～36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1～5 からなる群から選択される配列における 8 位～36 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i) は、配列番号 1512 の 8 位～36 位の配列に対応する。特定の個々の実施形態では、配列 i) は、配列番号 1～14 のいずれか 1 つの中の 8 位～36 位の配列に個々に対応する。

【0026】

本願のいくつかの実施形態では、上記で定義した BM は、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの「一部を形成する」。これは、元の 3 ヘリックスバンドルドメインの配列に BM の配列が「挿入」されているか又は「グラフトされている」ことを意味し、BM が元のドメインの類似の構造モチーフに置き換わることを意味する。例えば、理論に縛られることを望むものではないが、BM は 3 ヘリックスバンドルの 3 つのヘリックスのうちの 2 つを構成すると考えられ、従って、3 ヘリックスバンドル内のそのような 2 ヘリックスモチーフを置き換えることができる。当業者が理解するように、2 つの BM ヘリックスによる 3 ヘリックスバンドルドメインの 2 つのヘリックスの置換は、ポリペプチドの基本構造に影響を与えないように行わなければならない。すなわち、本発明のこの実施形態によるポリペプチドの C α 骨格の全体的な折り畳みは、それが部分を形成する、例えば、同じ

10

20

【0027】

特定の実施形態では、IL-6 結合モチーフ (BM) は、従って、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する。例えば、BM は、本質的に、前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質内に、タンパク質ドメイン内に相互接続ループを有する 2 つの α ヘリックスを構成することができる。特定の実施形態では、前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、細菌受容体タンパク質のドメインから選択される。そのようなドメインの非限定的な例は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来のプロテイン A の 5 つの異なる 3 ヘリックスドメイン、例えばドメイン B、及びその誘導体である。いくつかの実施形態では、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインは、ブドウ球菌の (*staphylococcal*) プロテイン A のドメイン B に由来するタンパク質 Z の変異体である。

30

【0028】

本明細書に開示されるような IL-6 結合ポリペプチドが 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成するいくつかの実施形態において、該 IL-6 結合ポリペプチドは結合モジュール (BMod) を含んでもよく、前記結合モジュールのアミノ酸配列が

40

i i i) K-[BM]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLX_dX_eX_fQ

(式中、[BM] は、本明細書で定義された IL-6 結合モチーフであり、

X₂₉ は、D であり；

X_a は、A 及び S から選択され；

X_b は、N 及び E から選択され；

X_c は、A、S 及び C から選択され；

X_d は、E、N 及び S から選択され；

X_e は、D、E 及び S から選択され；

50

X_f は、A及びSから選択されるもので提供される) ; 及び、

i v) i i i) によって定義される配列と少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列、
から選択される。

【0029】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、生産及び貯蔵の間、並びにインビボにおいて、化学的修飾に対し、物理的条件の変化に対し、及びタンパク質分解に対して、高い構造安定性、例えば異性化に対する耐性を示すことが有益であり得る。従って、本明細書に開示されるIL-6結合ポリペプチドが3ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する他の実施形態では、IL-6結合ポリペプチドが結合モジュール(BMo
d)を含み得、そのアミノ酸配列は：

v) K-[BM]-QPEQ X_a X_b LL X_c EAKKL X_d X_e X_f Q

(式中、[BM]は、本明細書で定義されたIL-6結合モチーフであり、

X_{29} が、Rであり；

X_a が、A及びSから選択され；

X_b が、N及びEから選択され；

X_c が、A、S及びCから選択され；

X_d が、E、N及びSから選択され；

X_e が、D、E及びSから選択され；

X_f が、A及びSから選択されるもので提供される) ; 及び、

v i) v) によって定義される配列と少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列、
から選択される。

【0030】

上述のように、ポリペプチドの三次構造及び機能にほとんど影響を与えない、上記のアミノ酸配列と比較してわずかな置換を含むポリペプチドも本願の範囲内である。従って、いくつかの実施形態では、配列i v) 又はv i) は、i i i) 及びv) にそれぞれ定義される配列と、少なくとも93%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも97%の同一性を有する。

【0031】

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_a は、Aである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_a は、Sである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_b は、Nである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_b は、Eである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_c は、Aである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_c は、Sである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_c は、Cである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_d は、Eである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_d は、Nである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_d は、Sである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_e は、Dである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_e は、Eである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の X_e は、Sである。

【0032】

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の $X_d X_e$ は、EE、ES、SE、SD及びSSから選択される。

【0033】

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の $X_d X_e$ は、ESである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の $X_d X_e$ は、SEである。

一実施形態において、配列i i i) 又はv) の $X_d X_e$ は、SDである。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_f は、A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_f は、S である。

【0034】

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は A 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は C 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は S 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は C 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は A ; $X_d X_e$ は ND 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は C ; $X_d X_e$ は ND 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は S ; $X_d X_e$ は ND 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は C ; $X_d X_e$ は ND 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は A ; $X_d X_e$ は SE 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は C ; $X_d X_e$ は SE 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は S ; $X_d X_e$ は SE 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は C ; $X_d X_e$ は SE 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は A ; $X_d X_e$ は SD 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は C ; $X_d X_e$ は SD 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は S ; $X_d X_e$ は SD 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は C ; $X_d X_e$ は SD 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は A ; $X_d X_e$ は ES 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は A ; X_b は N ; X_c は C ; $X_d X_e$ は ES 及び X_f は A である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は S ; $X_d X_e$ は ES 及び X_f は S である。

一実施形態において、配列 i i i) 又は v) の X_a は S ; X_b は E ; X_c は C ; $X_d X_e$ は ES 及び X_f は S である。

【0035】

さらなる実施形態において、配列 i i i) は、図 1 に提示される配列番号 1 ~ 1551 からなる群から選択される配列の 7 位 ~ 55 位の配列に対応する。他の実施形態において、配列 i i i) は、配列配列番号 1 ~ 1502 からなる群から選択される配列中の 7 位 ~ 55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 7、配列番号 15 ~ 89 及び配列番号 151 ~ 871 からなる群から選択される配列中の 7 位 ~ 55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 i i i) は、配列番号 1 ~ 6、配列番号 8 ~ 14、

10

20

30

40

50

配列番号 90～150 及び配列番号 872～1502 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～152 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～150 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～152 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。別の実施形態において、配列 *i i i*) は、配列番号 1～150 からなる群より選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。さらに別の実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 7、配列番号 15～89 及び配列番号 151～152 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～6、配列番号 8～14 及び配列番号 90～150 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～14 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～14 及び配列番号 1512 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～14 からなる群から選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～5 からなる群より選択される配列における 7 位～55 位の配列に対応する。一実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1512 の 7 位～55 位の配列に対応する。特定の個々の実施形態では、配列 *i i i*) は、配列番号 1～14 個々のいずれか 1 つの 7 位～55 位の配列に対応する。

【0036】

また、さらなる実施形態では、
 $v i i) Y A - [B M o d] - A P ;$
 (式中、 $[B M o d]$ は、上記定義の $I L - 6$ 結合モジュールである) ; 及び、
 $v i i i) v i i)$ で定義される配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列、
 から選択されるアミノ酸配列を含む、 $I L - 6$ 結合ポリペプチドが提供される。

【0037】

あるいは、
 $i x) F N - [B M o d] - A P ;$
 (式中、 $[B M o d]$ は、上記定義の $I L - 6$ 結合モジュールである) ; 及び、
 $x) i x)$ で定義される配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列、
 から選択されるアミノ酸配列を含む、 $I L - 6$ 結合ポリペプチドが提供される。

【0038】

上述のように、ポリペプチドの三次構造及び機能にほとんど影響を与えない上記アミノ酸配列と比較して、小さな置換を含むポリペプチドも本願の範囲内に含まれる。従って、いくつかの実施形態では、配列 $v i i i)$ 及び $x)$ は、例えば $v i i)$ 及び $v i i)$ それぞれによって定義される配列と少なくとも 92%、例えば少なくとも 94%、例えば少なくとも 96% 同一である。

【0039】

いくつかの実施形態において、 $I L - 6$ 結合モチーフは、以下から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの一部を形成してもよい：

$A D N N F N K - [B M] - D P S Q S A N L L S E A K K L N E S Q A P K ;$
 $A D N K F N K - [B M] - D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K ;$
 $A D N K F N K - [B M] - D P S V S K E I L A E A K K L N D A Q A P K ;$
 $A D A Q Q N N F N K - [B M] - D P S Q S T N V L G E A K K L N E S Q A P K ;$
 $A Q H D E - [B M] - D P S Q S A N V L G E A Q K L N D S Q A P K ;$
 $V D N K F N K - [B M] - D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K ;$
 $A E A K Y A K - [B M] - D P S E S S E L L S E A K K L N K S Q A P K ;$

VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNDAQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLND SQAPK;
 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLND SQAPK;
 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSE SQAPK;
 AEAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLSE SQAPK;
 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLE SSQAPK;
 AEAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLE SSQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLND SQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLSE SQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLSE SQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLE SSQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-QPEQSSELLSEAKKLE SSQAPK;
 VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK; 及び
 AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLAEAKKLNKAQAPK
 (式中、[BM]は、上記で定義されるIL-6結合モチーフである)

【0040】

一実施形態では、IL-6結合ポリペプチドは、

x i) VDAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLND SQAPK;

(式中、[BM]は、上で定義したIL-6結合モチーフである)、及び、

x i i) x i) で定義した配列と少なくとも89%の同一性を有するアミノ酸配列、
から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0041】

別の実施形態では、IL-6結合ポリペプチドは、

x i i i) AEAKYAK-[BM]-DPSQSSELLSEAKKLND SQAPK;
;

(式中、[BM]は、上で定義したIL-6結合モチーフである)、及び、

x i v) x i i i) で定義した配列と少なくとも89%の同一性を有するアミノ酸配列、
から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0042】

また、上記アミノ酸配列と比較してわずかな置換(ポリペプチドの三次構造及び機能に大きな影響を与えない)を含むポリペプチドもまた、本願の範囲内に含まれる。従って、いくつかの実施形態において、配列x i i) 及びx i v) は、x i) 及びx i i i) によってそれぞれ定義される配列と、例えば、少なくとも91%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%同一であり得る。

【0043】

そのようなポリペプチドにおける配列x i) は、配列番号1~1551からなる群から選択され得る。別の実施形態では、配列x i) は、配列番号1~1502からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は、配列番号7、配列番号15~89及び配列番号151~871からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は、配列番号1~6、配列番号8~14、配列番号90~150及び配列番号872~1502からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は、配列番号1~152及び配列番号1503~1515からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は、配列番号1~150及び配列番号1503~1515からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は、配列番号1~152からなる群から選択される。別の実施形態では、配列x i) は、配列番号1~150からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、配列x i) は、配列番号7、配列番号15~89及び配列番号151~152からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は、配列番号1~6、配列番号8~14及び配列番号90~150からなる群から選択される。一実施形態では、配列x i) は

、配列番号 1～14 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される。一実施形態では、配列 x i) は、配列番号 1～14 及び配列番号 1512 からなる群から選択される。一実施形態では、配列 x i) は、配列番号 1～14 からなる群から選択される。一実施形態では、配列 x i) は、配列番号 1～5 からなる群から選択される。一実施形態では、配列 x i) は配列番号 1512 である。特定の個々の実施形態において、配列 x i) は、配列番号 1～14 個々のいずれか 1 つである。

【0044】

本明細書で定義されるようなポリペプチドの IL-6 への結合は、インビボ又はインビトロで IL-6 を介する標準的なシスー及び／又はトランスーシグナル伝達を妨害し得る。従って、一実施形態では、シスーシグナル伝達経路を介して IL-6 依存性シグナル伝達を阻害することができる本明細書で定義される IL-6 結合ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、本明細書で定義される IL-6 結合ポリペプチドは、トランスシグナル伝達経路を介して IL-6 依存性シグナル伝達を阻害することができる。別の実施形態では、本明細書で定義される IL-6 結合ポリペプチドは、シスーシグナル伝達経路及びトランスーシグナル伝達経路の両方を介して IL-6 依存性シグナル伝達を阻害することができる。

【0045】

半最大阻害濃度 (IC50) は、特定の生物学的又は生化学的機能を阻害する物質の有効性の尺度である。この定量的尺度は、所与の生物学的プロセスを半減させるために特定の物質がどれくらい必要であるかを示し、当技術分野で一般的に使用されている。1 つの特定の実施形態では、阻害の半最大阻害濃度 (IC50) が最大で 1×10^{-6} M、例えば最大で 1×10^{-7} M、例えば最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} M であるように、IL-6 シグナル伝達を阻害することができる本明細書に定義される IL-6 結合ポリペプチドが提供される。この阻害はシス又はトランスシグナル伝達経路のいずれかの阻害であり得る。一実施形態では、前記 IL-6 結合ポリペプチドは、IL-6 / IL-6 Ra と gp130 との相互作用を阻害することができる。

【0046】

本明細書で使用される「IL-6 結合」、「IL-6 に対する結合親和性」という用語は、例えば、ELISA 又は表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術の使用によって試験され得るポリペプチドの特性を指す。例えば、以下の実施例に記載されるように、IL-6 結合親和性は、ポリペプチドのサンプルが抗体被覆 ELISA プレート上に捕捉され、ビオチン化 IL-6 が添加され、続いてストレプトアビジン結合 HRP が添加される実験において試験され得る。TMB 基質を添加し、Victor³ (Perkin Elmer) のようなマルチウェルプレートリーダーを用いて 450 nm で吸光度を測定する。当業者は、このような実験によって得られた結果を解釈して、少なくとも IL-6 に対するポリペプチドの結合親和性の定性的尺度を確立することができる。定量的測定が望まれる場合、例えば、相互作用の EC50 値 (半最大有効濃度) を決定するために、ELISA もまた使用され得る。ビオチン化 IL-6 の連続希釈に対するポリペプチドの応答を、上記のような ELISA を用いて測定される。当業者は、このような実験によって得られた結果を解釈し、EC50 値を、例えば Graph Pad Prism 5 及び非線形回帰を用いて、結果から計算することができる。

【0047】

IL-6 結合親和性は、表面プラズモン共鳴 (SPR) IL-6 又はそのフラグメントが、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置のセンサーチップ上に固定化され、試験される該ポリペプチドを含むサンプルがチップ上を通過する実験において試験することもできる。あるいは、試験されるポリペプチドを機器のセンサーチップ上に固定し、IL-6 又はそのフラグメントを含むサンプルをチップ上に通す。当業者は、このような実験によって得られた結果を解釈して、少なくとも IL-6 に対するポリペプチドの結合親和性の定性的尺度を確立することができる。定量的尺度が望ましい場合、例えば、相互作用の K_D 値を決定するために、表面プラズモン共鳴法を使用することもできる。結合値は、例えば Bi

acore (GE Healthcare) 又は ProteOn XPR36 (Bio-Rad) 機器で定義することができる。IL-6 は、装置のセンサーチップ上に適切に固定化され、親和性が決定されるべきポリペプチドのサンプルは、連続希釈によって調製され、ランダムな順序で注入される。K_D 値は、例えば、BIAevaluation 4.1 ソフトウェアの 1:1 Langmuir 結合モデル、又は機器製造者によって提供される他の適切なソフトウェアを使用して、結果から計算することができる。

【0048】

従って、一実施形態では、本明細書に定義される IL-6 結合ポリペプチドが提供され、相互作用の EC50 値が最大で 1×10^{-7} M、例えば最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} M であるように、IL-6 に結合することができる。

10

【0049】

一実施形態では、IL-6 結合ポリペプチドは、相互作用の K_D 値が、最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} M であるように IL-6 に結合することができる。

【0050】

当業者は、本願の範囲から逸脱することなく、ポリペプチドを特定の用途に合わせるために、本明細書に開示される任意の態様の IL-6 結合ポリペプチドに対して様々な改変及び／又は付加を行うことができることを理解するであろう。

【0051】

例えば、一実施形態では、本明細書に記載の IL-6 結合ポリペプチドが提供され、このポリペプチドは、C 末端及び／又は N 末端に、追加のアミノ酸で伸長されている、及び／又は追加のアミノ酸を含む。そのようなポリペプチドは、ポリペプチド鎖の最初の位置及び／又は最後の位置に 1 つ又は複数の追加のアミノ酸残基を有するポリペプチドとして理解されるべきである。従って、IL-6 結合ポリペプチドは、任意の適切な数の付加的なアミノ酸残基、例えば、少なくとも 1 つの付加的なアミノ酸残基を含み得る。各付加的なアミノ酸残基は、例えば、ポリペプチドの産生、精製、インビボ又はインビトロでの安定化、結合又は検出を改善するために、個々に又は集合的に添加され得る。このような付加的なアミノ酸残基は、化学的カップリングのために添加される 1 つ以上のアミノ酸残基を含み得る。この一例は、システイン残基の付加である。付加的なアミノ酸残基はまた、ポリペプチドの精製又は検出のための「タグ」、例えば、タグに特異的な抗体との相互作用のための、あるいは、His₆ タグの場合の固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) のための、His₆ タグ、(HisGlu)₃ タグ (「HEHEHE」タグ) 又は「myc」(c-myc) タグ又は「FLAG」タグ、を提供し得る。

20

30

【0052】

上記のさらなるアミノ酸は、化学的コンジュゲート (公知の有機化学方法を使用) 又は他の任意の手段、例えば融合タンパク質として複合体を発現するか、又は直接的に又はリンカーを介して、例えばアミノ酸リンカーを介して、他の任意の様式で、IL-6 結合ポリペプチドへ連結されてもよい。

【0053】

上記のさらなるアミノ酸は、例えば、1 つ又は複数のポリペプチドドメイン (単数又は複数) を含み得る。さらなるポリペプチドドメインは、別の機能、例えば、さらに別の結合機能、酵素機能、毒性機能、蛍光シグナル伝達機能又はそれらの組み合わせを有する IL-6 結合ポリペプチドを提供し得る。

40

【0054】

さらなるポリペプチドドメインは、さらに、同じ IL-6 結合機能を有する別の IL-6 結合部分を提供し得る。従って、さらなる実施形態では、多量体形態の IL-6 結合ポリペプチドが提供される。前記多量体は、単量体単位として本明細書に開示される少なくとも 2 つの IL-6 結合ポリペプチドを含むと理解され、そのアミノ酸配列は同一でも異なっているてもよい。ポリペプチドの多量体形態は、それぞれが IL-6 結合モチーフを有

50

し、それぞれが多量体内に単量体を形成する、適切な数のドメインを含み得る。これらのドメインは、同一のアミノ酸配列を有していてもよいが、異なるアミノ酸配列を有していてもよい。換言すれば、本発明の I L - 6 結合ポリペプチドは、ホモ又はヘテロ多量体、例えばホモ又はヘテロ二量体を形成してもよい。一実施形態では、I L - 6 結合ポリペプチドが提供され、前記単量体単位は共に共有結合されている。別の実施形態では、前記 I L - 6 結合ポリペプチド単量体単位は、融合タンパク質として発現される。一実施形態では、二量体形態の I L - 6 結合ポリペプチドが提供される。

【0055】

さらに、本明細書に記載の I L - 6 結合ポリペプチド又はその多量体が第 1 のドメイン又は第 1 の部分、及び I L - 6 結合ポリペプチドに結合する以外の機能を有する第 2 の及びさらなる部分を構成する「ヘテロジェニック」融合ポリペプチド若しくはタンパク質、又はコンジュゲートも考えられ、本願の範囲内にあると考えられる。このようなタンパク質中の融合ポリペプチド又はコンジュゲートの第 2 の及びさらなる部分（単数）／部分（複数）もまた、適切に所望の生物学的活性を有する。

【0056】

従って、本願の第 2 の態様では、第 1 の態様の I L - 6 結合ポリペプチドからなる第 1 の部分と、所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第 2 の部分とを含む融合タンパク質又はコンジュゲートが提供される。別の実施形態では、前記融合タンパク質又はコンジュゲートは、第 2 の部分の生物学的活性と同一でも異なってもよい所望の生物学的活性を含むさらなる部分を付加的に含むことができる。

【0057】

所望の生物学的活性の非限定的な例は、治療活性、結合活性及び酵素活性を含む。一実施形態では、所望の生物学的活性を有する第 2 の部分は、治療的に活性があるポリペプチドである。

【0058】

治療的に活性なポリペプチドの非限定的な例は、ヒト内在性酵素、ホルモン、成長因子、ケモカイン、サイトカイン及びリンホカインからなる群から選択される分子のような生体分子である。

【0059】

結合活性の非限定的な例は、融合タンパク質又はコンジュゲートのインビボ半減期を増加させる結合活性、及び生物学的活性を阻害するように作用する結合活性である。一つの特の実施形態において、結合活性は、融合タンパク質又はコンジュゲートのインビボ半減期を増加させるアルブミン結合活性である。一実施形態では、前記アルブミン結合活性は、連鎖球菌（*streptococcal*）プロテイン G 又はその誘導体のアルブミン結合ドメインによって提供される。

【0060】

本願のこの態様の一実施形態では、付加的な免疫応答調節剤を含む I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートが提供される。さらなる免疫応答調節剤の非限定的な例には、免疫抑制剤又は免疫調節剤又は他の抗炎症剤が含まれる。例えば、本明細書に記載の I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートは、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）（例えば、金塩（*gold salt*）、アザチオプリン、メトトレキセート及びレフルノミド）；カルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリン A 又は FK 506）；リンパ球再循環モジュレータ；mTOR 阻害剤（例えば、ラパマイシン）；免疫抑制特性を有するアスコマイシン；グルココルチコイド；コルチコステロイド；シクロホスファミド；免疫抑制性モノクローナル抗体；接着分子阻害剤（例えば、LFA-1 アンタゴニスト、ICAM-1 若しくは-3 アンタゴニスト、VCAM-4 アンタゴニスト又は VLA-4 アンタゴニスト）；抗 TNF 剤（例えば、エタネルセプト又は TNF に対するモノクローナル抗体、例えばインフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ及びセルトリズマブペゴール）；炎症誘発性サイトカイン阻害剤；IL-1 阻害剤（例えば、アナキンラ又は IL-1 トラップ）；IL-17 阻害剤；ケモカイン阻害剤

；非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）（例えば、アスピリン）；及び抗感染剤及び他の免疫応答調節剤と、組み合わせて使用してもよい。従って、一実施形態では、前記免疫応答調節剤は、疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）、カルシニューリン阻害剤、リンパ球再循環のモジュレーター、mTOR阻害剤、免疫抑制特性を有するアスコマイシン、グルココルチコイド、コルチコステロイド、シクロホスファミド、免疫抑制的モノクローナル抗体、接着分子阻害剤、抗TFN剤、炎症性誘発性サイトカイン阻害剤、IL-1阻害剤、IL-17阻害剤、ケモカイン阻害剤、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0061】

当業者が理解するように、第1の態様によるIL-6結合ポリペプチドは、融合タンパク質において、又は任意の他の部分とのコンジュゲートパートナーとして有用であり得る。従って、治療的に活性があるポリペプチド及び免疫応答調節剤の上記リストは、決して限定するものと解釈されるべきではない。

【0062】

当業者は、融合タンパク質の構築には、融合される機能的部分の間にリンカーを使用することがしばしばあり、異なる特性を有する異なる種類のリンカー、例えば、可撓性アミノ酸リンカー、剛性アミノ酸リンカー及び切断可能なリンカーが存在することを認識している。リンカーは、融合タンパク質の発現を増大させ、生物学的活性を向上させ、標的化を可能にし、薬物動態を変化させるために、例えば、融合タンパク質の安定性を増加させるか、又は折り畳みを改善するために使用されている。従って、一実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質は、少なくとも1つのリンカー、例えば、可撓性アミノ酸リンカー、剛性アミノ酸リンカー及び切断可能アミノ酸リンカーから選択される少なくとも1つのリンカーをさらに含む。

【0063】

可撓性リンカーは、接合されたドメインがある程度の運動又は相互作用を必要とする場合、しばしば当該分野で使用され、いくつかの実施形態において特に有用であり得る。そのようなリンカーは、一般に、小さい、非極性（例えばG）又は極性（例えばS又はT）アミノ酸からなる。いくつかの可撓性リンカーは、主にG及びS残基のストレッチからなり、例えば、（GGGGS）_pである。コピー数「p」を調製することにより、機能的部分の間の適切な分離を達成するために、又は必要な部分間の相互作用を維持するために、リンカーを最適化することが可能になる。G及びSリンカーとは別に、他の可撓性リンカーが当該分野で公知であり、例えば、可撓性を維持するためのT及びA、並びに、溶解性を改善するための極性アミノ酸残基などの付加的なアミノ酸残基を含むG及びSリンカーである。本明細書で使用が考慮される可撓性リンカーの例には、KESGSSVSSSEQLAQFRSLD、EGKSSGSGSEKST及びGSAAGSAGSEFも含まれる。

【0064】

従って、一実施形態では、前記リンカーは、グリシン（G）、セリン（S）及び／又はスレオニン（T）残基を含む可撓性リンカーである。一実施形態では、前記リンカーは、（G_nS_m）_p及び（S_mG_n）_pから選択される一般式（式中、独立して、n=1~7、m=0~7、n+m≤8及びp=1~7である）を有する。一実施形態では、n=1~5である。一実施形態では、m=0~5である。一実施形態では、p=1~5である。より特定の実施形態では、n=4、m=1及びp=1~4である。さらにより具体的な実施形態では、前記リンカーは（GGGGS）₃である。別の特定の実施形態では、前記リンカーはGGGGSである。別の特定の実施形態では、前記リンカーはVDGSである。別の特定の実施形態では、前記リンカーはASSSである。

【0065】

上記態様はさらに、第1の態様のIL-6結合ポリペプチド、又は第2の態様の融合タンパク質若しくはコンジュゲートに含まれるIL-6結合ポリペプチドが、さらに標識、例えば、蛍光色素及び金属、発色性色素（chromophoric dyes）、化学

10

20

30

40

50

発光化合物及び生物発光タンパク質、酵素、放射性核種及び放射性粒子からなる群から選択される標識を含む、ポリペプチドを包含する。そのような標識は、例えば、ポリペプチドの検出のために使用され得る。

【0066】

例えば、標識された I L - 6 結合ポリペプチドが、本願の第 1 の態様の I L - 6 結合ポリペプチド及び標識を含む実施形態において、標識されたポリペプチドは、例えば、I L - 6 発現細胞、例えば炎症に関連する癌の細胞の間接的な標識に使用されてもよい。

【0067】

他の実施形態では、標識された I L - 6 結合ポリペプチドは、所望の生物学的活性を有する第 2 の部分も含む融合タンパク質又はコンジュゲート中の部分として存在する。いくつかの例において、標識は、I L - 6 結合ポリペプチドのみに、場合によっては I L - 6 結合ポリペプチド及びコンジュゲート又は融合タンパク質の第 2 又はさらなる部分の両方に結合してもよい。さらに、標識を、I L - 6 結合部分ではなく、第 2 の部分又はさらなる部分のみに結合させることも可能である。従って、さらに別の実施形態では、第 2 の及び任意にさらなる部分を含む I L - 6 結合ポリペプチドが提供され、前記標識は前記第 2 の又はさらなる部分のみに結合される。

【0068】

I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートが放射性標識されている実施形態では、そのような放射性標識ポリペプチドは放射性核種を含み得る。大部分の放射性核種は金属の性質を有し、金属は、典型的には、タンパク質及びペプチド中に存在する元素と安定な共有結合を形成することができない。このため、放射性金属を用いたタンパク質及びペプチドの標識は、キレート剤、すなわちキレートと呼ばれる非共有結合化合物を形成する多座配位子を金属イオンと共に使用して行われる。I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートの実施形態において、放射性核種の取り込みは、放射性核種がポリペプチドに配位結合、キレート化又は複合化され得ることを介して、キレート化環境の提供によって可能になる。

【0069】

キレート剤 (c h e l a t o r) の一例は、ポリアミノポリカルボキシレートタイプのキレート剤である。そのようなポリアミノポリカルボキシレートキレート剤の 2 つのクラス：大環状及び非環状キレート剤に分けることができる。

【0070】

一実施形態では、I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートは、システイン残基のチオール基又はリシン残基のイプシロンアミン基を介して I L - 6 結合ポリペプチドにコンジュゲートされたポリアミノポリカルボキシレートキレート剤によって提供されるキレート化環境を含んでいる。

【0071】

インジウム、ガリウム、イットリウム、ビスマス、放射性アクチニド及び放射性ランタニドの放射性同位元素に最も一般的に使用される大環状キレート化剤は、D O T A (1 , 4 , 7 , 1 0 - テトラアザシクロデカン - 1 , 4 , 7 , 1 0 - 四酢酸) の異なる誘導体である。一実施形態では、I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートのキレート化環境は、D O T A 又はその誘導体によって提供される。より具体的には、一実施形態では、本願に包含されるキレート化ポリペプチドは、D O T A 誘導体 1 , 4 , 7 , 1 0 - テトラアザシクロデカン - 1 , 4 , 7 - トリス - 酢酸 - 1 0 - マレイミドエチルアセトアミド (マレイミドモノアミド - D O T A) を前記ポリペプチドと接触させることで得られる。

【0072】

さらに、1 , 4 , 7 - トリアザシクロノナン - 1 , 4 , 7 - 三酢酸 (N O T A) 及びその誘導体をキレート化剤として使用してもよい。従って、一実施形態では、ポリアミノポリカルボン酸キレート化剤が 1 , 4 , 7 - トリアザシクロノナン - 1 , 4 , 7 - 三酢酸又はその誘導体である I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートが提

供される。

【0073】

最も一般的に使用される非環式ポリアミノポリカルボン酸キレート剤は、DTPA（ジエチレントリアミンーペンタ酢酸）の異なる誘導体である。従って、ジエチレントリアミンペンタ酢酸又はその誘導体によって提供されるキレート化環境を有するポリペプチドもまた、本願に包含される。

【0074】

本願のさらなる態様において、本明細書に記載のIL-6結合ポリペプチド又は融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び前記発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。

10

【0075】

また、本願に包含されるのは、上記のポリペプチド又は融合タンパク質を産生する方法であり、その発現ベクターから前記ポリペプチドの発現を許容する条件下で前記宿主細胞を培養し、前記ポリペプチドを単離することを含む。

【0076】

本願のIL-6結合ポリペプチドは、代わりに、保護された反応性側鎖を有するアミノ酸及び／又はアミノ酸誘導体を使用する非生物学的ペプチド合成によって製造することができ、非生物学的ペプチド合成が、

－保護された反応性側鎖を有する第1の態様のポリペプチドを形成するためのアミノ酸及び／又はアミノ酸誘導体の段階的カップリング、

20

－ポリペプチドの反応性側鎖からの保護基の除去、及び

－水溶液中でのポリペプチドの折り畳み、

を含んでいる。

【0077】

本願のIL-6結合ポリペプチドは、例えば、IL-6に対する直接的又は間接的に影響ものとともに、それ自体で治療剤、診断剤又は予後予測剤として、又は他の治療剤若しくは診断剤を標的化する手段として有用であり得ることが理解されるべきである。直接的な治療効果は、例えば、IL-6シグナル伝達を阻害することによって達成され得る。

【0078】

本願の分子の小さいサイズ及び堅牢性が、従来のモノクローナル抗体に基づく治療よりもいくつかの利点をもたらす。このような利点には、投与経路、例えば、投与の代替経路、抗体より高用量での投与、及びFc媒介性副作用の非存在が含まれる。本明細書中に開示されるポリペプチドの非常に高い溶解性及び安定性の可能性と組み合わせた小さいサイズは、例えば皮下注射用に、少容量で薬物を極度に少ないモル濃度にすることを可能にする。全身投与のために、これは、容量が少なく許容された投与量にて、便利な小さい予め充填された注射器又は自動注射器を使用する外来「家庭用」の治療を示唆する。加えて、多様な製剤中の機能的安定性を保持する能力と組み合わせた薬物製剤中の高モル濃度の能力が、局所（例えば、皮膚又は肺）又は経口投与経路を開拓する。代替投与経路がIL-6介在性疾患に特に関連し得る適応症の非限定的な例として、喘息及び乾癬が含まれる。

30

【0079】

別の態様では、本明細書に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートと、少なくとも1つの医薬的に許容される賦形剤または担体を含む組成物が提供される。一実施形態では、前記組成物は、少なくとも1つの追加の活性剤、例えば、少なくとも2つの追加の活性剤、例えば少なくとも3つの追加の活性剤をさらに含む。このような組み合わせにおいて有用であることが判明し得る追加の活性剤の非限定的な例は、本明細書に記載の免疫応答調節剤及び抗癌剤である。

40

【0080】

抗癌剤の非限定的な例は、オーリスタチン、アントラサイクリン、カリケアマイシン、コンプレタスタチン、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、CC-1065抗腫瘍抗生物質、エクテインサスシジン（ecteinascidin）、ゲルダナマイシン、マ

50

イタンシノイド、メトトレキセート、マイコトキシン、タキソール、リシン、ブーゲニン (bougain)、ゲロニン、シュードモナスエキソトキシン38 (PE38)、ジフテリアトキシン (DT)、及びそれらの類似体、及びそれらの誘導体並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤を含む。当業者は、細胞傷害性薬剤の非限定的な例には、前記薬剤の全ての可能な変異体が含まれ、例えば、薬剤オーリスタチンは、例えばオーリスタチンE、オーリスタチンF、オーリスタチンPE、及びその誘導体が含まれることが理解されよう。

【0081】

当業者は、本明細書に記載の前記IL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又はIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲートを含む組成物は、経口、局所、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、頬側、舌下又は坐剤投与が含まれる通常の投与技術を用いて、被験体へ投与されてもよいことを理解するであろう。従って、一実施形態では、経口、局所、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、頬側、舌下又は坐剤投与のための本明細書に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は組成物が提供される。

10

【0082】

IL-6は、特定の癌、例えば炎症関連癌、例えば肺癌、乳癌及び結腸癌の診断及び予後予測のための有益なマーカーとしても役立ち得る。例えば、IL-6は、結腸直腸癌に罹患している患者の予後及び生存不良に関連している (Ky et al., Jpn J Clin Oncol. 2010 Jun; 40 (6): 580-7)。

20

【0083】

従って、本願の別の態様では、医薬、予後予測薬又は診断薬として使用するための本明細書に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は組成物が提供される。一実施形態において、IL-6結合ポリペプチドは、薬剤として使用するために提供される。

【0084】

一実施形態では、インビボでIL-6機能を調節するための薬剤として使用するための、本明細書に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は組成物が提供される。本明細書中で使用される場合、用語「調節する」は、活性を変化させる、例えば、IL-6機能ハイポモルフ (hypomorph)、IL-6機能を部分的に阻害する又は完全に阻害することをもたらすことを指す。

30

【0085】

IL-6結合ポリペプチドが、治療、予後予測及び／又は診断に有用であり得る、IL-6関連障害の非限定的な例は、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染性疾患、癌、糖尿病、神経疾患及びうつ病、例えば、慢性関節リウマチ (RA)、若年性RA、若年性特発性関節炎 (juvenile idiopathic arthritis) 又は全身性若年性特発性関節炎、血管炎 (vasculitis)、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患；グレーブス病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症 (MS)、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛症 (polymyalgia rheumatic)、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、再発性多発軟骨症、脾炎、腹膜炎、腎炎、川崎病、シェーグレン症候群、成人スティル病 (adult Still's disease)、大腸炎関連癌 (colitis associated cancer)、腎癌 (renal cancer)、腎臓癌 (kidney cancer)、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、キャスルマン病、乳癌、肺癌、アルツハイマー病、HIV、糖尿病、敗血症、悪液質、骨髄異形成症候群 (MDS)、肝硬変、移植片対宿主病、心筋梗塞、子宮内膜症及び骨粗鬆症を含む。IL-6関連癌の非限定的な例には、肺癌、乳癌及び結腸癌が含まれる (Schaffer and Brugge, J Clin Invest. (2007) 117 (12): 3660-3663; Nagasaki et al., British Journal of Cancer (2

40

50

014) 110, 469-478)。

【0086】

従って、一実施形態では、IL-6 関連障害、例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、癌、糖尿病、神経疾患及びうつ病からなる群から選択される障害の治療、予後予測又は診断に使用するための IL-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物が提供される。一実施形態において、前記 IL-6 関連障害は、炎症性疾患及び自己免疫疾患からなる群から選択される。一実施形態において、前記 IL-6 関連障害は、慢性関節リウマチ (RA)、若年性 RA、若年性特発性関節炎又は全身性若年性特発性関節炎、血管炎、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患；グレーブス病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症 (MS)、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛症、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、再発性多発軟骨炎、膵炎、腹膜炎、腎炎、川崎病、シェーグレン症候群及び成人スティル病からなる群から選択される。別の実施形態では、前記 IL-6 関連障害は、癌、例えば、大腸炎関連癌、腎癌、腎臓癌、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、乳癌及び肺癌からなる群から選択される癌である。別の実施形態において、前記 IL-6 関連障害は、アルツハイマー病、HIV、糖尿病、敗血症、悪液質、骨髄異形成症候群 (MDS)、肝硬変、移植片対宿主病、心筋梗塞、子宮内膜症及び骨粗鬆症からなる群から選択される。

10

【0087】

関連する態様では、IL-6 関連障害の治療方法であって、本明細書に記載の有効量の IL-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法が提供される。前記方法のより具体的な実施形態において、本明細書に記載の IL-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物は、インビボで IL-6 機能を調節する。

20

【0088】

一実施形態では、前記 IL-6 関連障害は、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、癌、糖尿病、神経疾患及びうつ病からなる群、例えば、炎症性疾患及び自己免疫疾患からなる群から選択される。前記態様の 1 つの特定の実施形態において、IL-6 関連障害は、慢性関節リウマチ (RA)、若年性 RA、若年性特発性関節炎又は全身性若年性特発性関節炎、血管炎、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患；グレーブス病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症 (MS)、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛症、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、再発性多発軟骨炎、膵炎、腹膜炎、腎炎、川崎病、シェーグレン症候群及び成人スティル病からなる群から選択される。別の実施形態では、前記 IL-6 関連障害は、癌、例えば、大腸炎関連癌、腎癌、腎臓癌、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、乳癌及び肺癌からなる群から選択される癌である。別の実施形態において、前記 IL-6 関連障害は、アルツハイマー病、HIV、糖尿病、敗血症、悪液質、骨髄異形成症候群 (MDS)、肝硬変、移植片対宿主病、心筋梗塞、子宮内膜症及び骨粗鬆症からなる群から選択される。

30

【0089】

本明細書に記載される治療上有効な量の IL-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は組成物、及び上述の免疫応答調節剤又は抗癌剤などの少なくとも 1 つの第 2 の薬物物質を投与することは有益であり得る。

40

【0090】

本明細書で使用される場合、用語「共投与 (co-administration)」は、同時投与及び逐次投与の両方を包含する。従って、一実施形態では、上記のような免疫応答調節剤の共投与をさらに含む、上記で定義した方法が提供される。別の実施形態では、上記のような抗癌剤の共投与をさらに含む、上で定義した方法が提供される。

【0091】

本願の別の態様では、IL-6 を検出する方法であって、IL-6 を含むことが疑われ

50

るサンプルを提供すること、前記サンプルを本明細書に記載の I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物と接触させること、及びサンプル中の I L - 6 の存在を示すための I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物の結合を検出することを含む。一実施形態では、前記方法は、前記サンプルに接触させた後に、非結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物を除去するための中間洗浄工程をさらに含む。

【0092】

一実施形態において、該方法は、被験体における I L - 6 の存在を決定するための診断又は予後予測方法であり、該方法が、以下：

一被験体又は被験体から単離されたサンプルを、本明細書に記載の I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物と接触させる工程、及び

一前記被験体又は前記試料に結合した I L - 6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物の量に対応する値を得る工程、を含む。

【0093】

一実施形態では、前記方法は、被験体又はサンプルと接触させた後かつ値を得る前に、非結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物を除去するための中間洗浄工程をさらに含む。

【0094】

一実施形態では、前記方法は、前記値を参照と比較する工程をさらに含む。該参照は、数値、閾値又は視覚的指標、例えば、呈色反応に基づくものであってもよい。当業者は、参照との比較の異なる方法が当該技術分野において知られており、使用に適していることを理解するであろう。

【0095】

そのような方法の一実施形態において、前記被験体は、哺乳類被験体であり、例えば、ヒト被験体である。

【0096】

一実施形態では、前記方法はインビボで実施される。別の実施形態では、前記方法はインビトロで実施される。

【0097】

本発明は、様々な例示的な態様及び実施形態を参照して説明されているが、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変更が行われ得、均等物がその要素の代わりに用いられ得ることは、当業者に理解される。さらに、本発明の本質的な範囲から逸脱することなく、特定の状況又は分子を本発明の教示に適合させるために、多くの改変を行うことができる。従って、本発明は、企図される特定の実施形態に限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲に含まれる全ての実施形態を含む。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1-1】図1は、本願の I L - 6 結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体 P P 0 1 3（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L - 6（配列番号1555）及びマウス I L - 6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L - 6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L - 6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図1-2】図1は、本願の I L - 6 結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体 P P 0 1 3（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の

説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1 5 5 5) 及びマウス I L-6 (配列番号 1 5 5 6) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する (本明細書において、B M o d という)。

【図 1-3】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1 ~ 1 5 5 1)、対照ポリペプチド (配列番号 1 5 5 2 ~ 1 5 5 3)、アルブミン結合ドメイン (A B D) 変異体 P P O 1 3 (配列番号 1 5 5 4)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1 5 5 5) 及びマウス I L-6 (配列番号 1 5 5 6) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する (本明細書において、B M o d という)。

10

【図 1-4】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1 ~ 1 5 5 1)、対照ポリペプチド (配列番号 1 5 5 2 ~ 1 5 5 3)、アルブミン結合ドメイン (A B D) 変異体 P P O 1 3 (配列番号 1 5 5 4)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1 5 5 5) 及びマウス I L-6 (配列番号 1 5 5 6) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する (本明細書において、B M o d という)。

20

【図 1-5】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1 ~ 1 5 5 1)、対照ポリペプチド (配列番号 1 5 5 2 ~ 1 5 5 3)、アルブミン結合ドメイン (A B D) 変異体 P P O 1 3 (配列番号 1 5 5 4)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1 5 5 5) 及びマウス I L-6 (配列番号 1 5 5 6) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する (本明細書において、B M o d という)。

30

【図 1-6】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1 ~ 1 5 5 1)、対照ポリペプチド (配列番号 1 5 5 2 ~ 1 5 5 3)、アルブミン結合ドメイン (A B D) 変異体 P P O 1 3 (配列番号 1 5 5 4)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1 5 5 5) 及びマウス I L-6 (配列番号 1 5 5 6) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する (本明細書において、B M o d という)。

40

【図 1-7】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1 ~ 1 5 5 1)、対照ポリペプチド (配列番号 1 5 5 2 ~ 1 5 5 3)、アルブミン結合ドメイン (A B D) 変異体 P P O 1 3 (配列番号 1 5 5 4)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1 5 5 5) 及びマウス I L-6 (配列番号 1 5 5 6) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する (本明

50

細書において、BModという)。

【図1-8】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド(配列番号1~1551)、対照ポリペプチド(配列番号1552~1553)、アルブミン結合ドメイン(ABD)変異体PPO13(配列番号1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6(配列番号1555)及びマウスIL-6(配列番号1556)のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ(BM)は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する(本明細書において、BModという)。

10

【図1-9】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド(配列番号1~1551)、対照ポリペプチド(配列番号1552~1553)、アルブミン結合ドメイン(ABD)変異体PPO13(配列番号1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6(配列番号1555)及びマウスIL-6(配列番号1556)のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ(BM)は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する(本明細書において、BModという)。

【図1-10】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド(配列番号1~1551)、対照ポリペプチド(配列番号1552~1553)、アルブミン結合ドメイン(ABD)変異体PPO13(配列番号1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6(配列番号1555)及びマウスIL-6(配列番号1556)のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ(BM)は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する(本明細書において、BModという)。

20

【図1-11】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド(配列番号1~1551)、対照ポリペプチド(配列番号1552~1553)、アルブミン結合ドメイン(ABD)変異体PPO13(配列番号1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6(配列番号1555)及びマウスIL-6(配列番号1556)のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ(BM)は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する(本明細書において、BModという)。

30

【図1-12】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド(配列番号1~1551)、対照ポリペプチド(配列番号1552~1553)、アルブミン結合ドメイン(ABD)変異体PPO13(配列番号1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6(配列番号1555)及びマウスIL-6(配列番号1556)のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ(BM)は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する(本明細書において、BModという)。

40

【図1-13】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド(配列番号1~1551)、対照ポリペプチド(配列番号1552~1553)、アルブミン結合ドメイン(ABD)変異体PPO13(配列番号1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6(配列番号1555)及びマウスIL-6

50

(配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BMod という)。

【図 1-14】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 PPO13 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6 (配列番号 1555) 及びマウス IL-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BMod という)。

10

【図 1-15】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 PPO13 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6 (配列番号 1555) 及びマウス IL-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BMod という)。

20

【図 1-16】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 PPO13 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6 (配列番号 1555) 及びマウス IL-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BMod という)。

30

【図 1-17】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 PPO13 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6 (配列番号 1555) 及びマウス IL-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BMod という)。

40

【図 1-18】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 PPO13 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6 (配列番号 1555) 及びマウス IL-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BMod という)。

50

【図 1-19】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P O 1 3（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6（配列番号 1555）及びマウス I L-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ（B M）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1-20】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P O 1 3（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6（配列番号 1555）及びマウス I L-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ（B M）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1-21】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P O 1 3（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6（配列番号 1555）及びマウス I L-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ（B M）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1-22】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P O 1 3（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6（配列番号 1555）及びマウス I L-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ（B M）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1-23】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P O 1 3（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6（配列番号 1555）及びマウス I L-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ（B M）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1-24】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P O 1 3（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6（配列番号 1555）及びマウス I L-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチド

10

20

30

40

50

において、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BM od という)。

【図 1-25】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1555) 及びマウス I L-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BM od という)。

10

【図 1-26】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1555) 及びマウス I L-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BM od という)。

20

【図 1-27】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1555) 及びマウス I L-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BM od という)。

30

【図 1-28】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1555) 及びマウス I L-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BM od という)。

40

【図 1-29】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対照ポリペプチド (配列番号 1552~1553)、アルブミン結合ドメイン (ABD) 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1554)、並びに、選択、スクリーニング及び/又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L-6 (配列番号 1555) 及びマウス I L-6 (配列番号 1556) のアミノ酸配列のリストである。本願の I L-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L-6 結合モチーフ (BM) は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する (本明細書において、BM od という)。

50

【図 1-30】図 1 は、本願の I L-6 結合ポリペプチド (配列番号 1~1551)、対

照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PP013（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BM_{od}という）。

【図1-31】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PP013（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BM_{od}という）。

10

【図1-32】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PP013（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BM_{od}という）。

20

【図1-33】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PP013（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BM_{od}という）。

30

【図1-34】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PP013（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BM_{od}という）。

40

【図1-35】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PP013（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで

50

伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BModという）。

【図1-36】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PPO13（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BModという）。

10

【図1-37】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PPO13（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BModという）。

20

【図1-38】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PPO13（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BModという）。

30

【図1-39】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PPO13（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BModという）。

40

【図1-40】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体PPO13（配列番号1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒトIL-6（配列番号1555）及びマウスIL-6（配列番号1556）のアミノ酸配列のリストである。本願のIL-6結合ポリペプチドにおいて、推定されるIL-6結合モチーフ（BM）は、各配列中の8位から36位まで伸長する。これらの各Z変異体内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸長する（本明細書において、BModという）。

50

【図1-41】図1は、本願のIL-6結合ポリペプチド（配列番号1～1551）、対照ポリペプチド（配列番号1552～1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変

異体 P P 0 1 3（配列番号 1 5 5 4）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L－6（配列番号 1 5 5 5）及びマウス I L－6（配列番号 1 5 5 6）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L－6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L－6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1－4 2】図 1 は、本願の I L－6 結合ポリペプチド（配列番号 1～1 5 5 1）、対照ポリペプチド（配列番号 1 5 5 2～1 5 5 3）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P 0 1 3（配列番号 1 5 5 4）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L－6（配列番号 1 5 5 5）及びマウス I L－6（配列番号 1 5 5 6）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L－6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L－6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1－4 3】図 1 は、本願の I L－6 結合ポリペプチド（配列番号 1～1 5 5 1）、対照ポリペプチド（配列番号 1 5 5 2～1 5 5 3）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P 0 1 3（配列番号 1 5 5 4）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L－6（配列番号 1 5 5 5）及びマウス I L－6（配列番号 1 5 5 6）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L－6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L－6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1－4 4】図 1 は、本願の I L－6 結合ポリペプチド（配列番号 1～1 5 5 1）、対照ポリペプチド（配列番号 1 5 5 2～1 5 5 3）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P 0 1 3（配列番号 1 5 5 4）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L－6（配列番号 1 5 5 5）及びマウス I L－6（配列番号 1 5 5 6）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L－6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L－6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1－4 5】図 1 は、本願の I L－6 結合ポリペプチド（配列番号 1～1 5 5 1）、対照ポリペプチド（配列番号 1 5 5 2～1 5 5 3）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P 0 1 3（配列番号 1 5 5 4）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L－6（配列番号 1 5 5 5）及びマウス I L－6（配列番号 1 5 5 6）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L－6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L－6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 4 9 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 5 5 位まで伸長する（本明細書において、B M o d という）。

【図 1－4 6】図 1 は、本願の I L－6 結合ポリペプチド（配列番号 1～1 5 5 1）、対照ポリペプチド（配列番号 1 5 5 2～1 5 5 3）、アルブミン結合ドメイン（A B D）変異体 P P 0 1 3（配列番号 1 5 5 4）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト I L－6（配列番号 1 5 5 5）及びマウス I L－6（配列番号 1 5 5 6）のアミノ酸配列のリストである。本願の I L－6 結合ポリペプチドにおいて、推定される I L－6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 3 6 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される

49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、BMod という）。

【図 1-47】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体 PPO13（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6（配列番号 1555）及びマウス IL-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、BMod という）。

10

【図 1-48】図 1 は、本願の IL-6 結合ポリペプチド（配列番号 1~1551）、対照ポリペプチド（配列番号 1552~1553）、アルブミン結合ドメイン（ABD）変異体 PPO13（配列番号 1554）、並びに、選択、スクリーニング及び／又は本発明の説明用の特徴付けに使用されるヒト IL-6（配列番号 1555）及びマウス IL-6（配列番号 1556）のアミノ酸配列のリストである。本願の IL-6 結合ポリペプチドにおいて、推定される IL-6 結合モチーフ（BM）は、各配列中の 8 位から 36 位まで伸長する。これらの各 Z 変異体内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸長する（本明細書において、BMod という）。

20

【図 2】図 2 は、実施例 2 に記載したようにアッセイした、hIL-6 と hIL-6Ra との間の相互作用の阻害の結果を示す。比較のために含めた hIL-6Ra 結合抗体トシリズマブ（黒）と対照的に、試験した IL-6 結合 Z 変異体（灰色）は、hIL-6 のその受容体 hIL-6Ra への結合を阻害しなかった。

【図 3】図 3 は、実施例 2 に記載したようにアッセイした hgp130 に対する hIL-6/hIL-6Ra 複合体の結合の阻害の結果を示す。濃度依存的阻害は、全ての試験した主要な IL-6 結合 Z 変異体（灰色）、並びに比較のために含まれていたトシリズマブ（黒）でも見られた。各変異体の計算された IC50 値を表 3 に示す。

【図 4】図 4 は、実施例 2 に記載したようにアッセイした、gp130 発現ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUEVC）に基づく系における IL-6 媒介性トランスシグナル伝達の濃度依存的阻害を示す。ABD 変異体 PPO13（配列番号 1554）の C 末端に融合した IL-6 結合 Z 変異体はトランスシグナル伝達を阻害したが、PPO13 と融合した対照 Z 変異体 ZO3638（配列番号 1552）はトランスシグナル伝達を阻害しなかった。比較のためにトシリズマブを含めた。

30

【図 5】図 5 は、実施例 7 に記載したようにアッセイした、hgp130 に対する hIL-6/hIL-6Ra 複合体の結合の阻害の結果を示す。濃度依存的阻害は、試験した全ての成熟 IL-6 結合 Z 変異体（灰色）並びに両方とも比較のために含めたトラリツマブ（黒色）及び主要なバインダー ZO6814（配列番号 1512；破線）で見られた。全て成熟した IL-6 結合 Z 変異体は、実施例 2 でアッセイした主要バインダーよりも効率的な阻害を示した（図 3 との比較）。

40

【図 6】図 6 は、実施例 7 に記載の TF-1 細胞中和アッセイの結果を示す。IL-6 誘導 TF-1 細胞増殖の濃度依存的阻害は、試験した全ての IL-6 結合 Z 変異体（黒で示された成熟した Z 変異体；灰色三角で示された主要なバインダー ZO6814（配列番号 1512）及びトラリツマブ（灰色四角形）について見られたが、陰性対照抗体 hIgG（灰色丸形）では認められなかった。

【図 7】図 7 は、実施例 8 に記載したような抗関節炎マウスモデルにおいて、IL-6 で誘発された血清アミロイド A（SAA）タンパク質放出をアッセイでスコア付けされた、AB 変異体 PPO13（配列番号 1554）と融合した Z 変異体 ZO6814（配列番号 1512）のインビボでの有効性を示す。4 群のマウスに、IL-6 結合 ZO6814-ABD 融合タンパク質を 0 mg/kg 体重（黒正方形）、0.025 mg/kg 体重（

50

白丸)、2.5 mg/kg 体重(白三角)又は2.5 mg/kg 体重(白三角)与えた。対照として、マウスにABD(白四角)と融合した対照Z変異体(Z04726;配列番号1553)(Z_{control}-ABDと称する)2.5 mg/kgを与えた。マウスにhIL-6を注射し、続いてSAAタンパク質のレベルを測定した。PBS(黒丸)及び2.5 mg/kg Z06814-ABD(十字)をそれぞれ与えたマウスの2つのさらなる対照群は、その後IL-6注射されなかった。

【実施例】

【0099】

概要

以下の実施例は、インターロイキン6(IL-6)を標的とする新規なZ変異体分子の開発を開示する。ファージライブラリーを用いたファージディスプレイ技術を用いて、Z変異体を得た。本明細書に記載されるIL-6結合ポリペプチドをコードする遺伝子を配列決定し、対応するアミノ酸配列を図1に列挙し、識別子配列番号1~1551で表示した。

10

【0100】

実施例1

IL-6結合Z変異体の選択及びELISAスクリーニング

【0101】

この実施例では、ヒト(hIL-6)及びマウスIL-6(mIL-6)を、Z変異体のファージライブラリーを用いるファージディスプレイ選択において、標的タンパク質として使用した。選択されたクローンのDNAを配列決定し、クローンを大腸菌ペリプラズム画分で産生させ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)でIL-6に対してアッセイした。

20

【0102】

材料及び方法

標的タンパク質、ヒト及びマウスIL-6のビオチン化: No-Weigh EZ-Link Sulfo-NHS-LC (Thermo Scientific、カタログ番号21327)を用いて、製造業者の推奨に従って12×モル過剰で添加して、hIL-6及びmIL-6(PeproTech、各カタログ番号200-06及び216-16)をビオチン化した。反応は室温(RT)で30分間行った。次に、Slide-a-lyzer透析カセット(Thermo Scientific、カタログ番号66333, 3, 500 MWCO)を用いて、製造元の指示に従って、リン酸緩衝生理食塩水(PBS、10 mMリン酸、137 mM NaCl、2.68 mM KCl、pH 7.4)に緩衝液を交換する。

30

【0103】

IL-6結合Z変異体のファージディスプレイ選択: Gronwall et al., (2007) J Biotechnol, 128:162-183に本質的に記載されたファージミドpAY02592で構築された、バクテリオファージ上に提示されるタンパク質Zのランダム変異体のライブラリーを用いてIL-6結合Z変異体を選択した。このライブラリーでは、アルブミン結合ドメイン(ABDと略記され、ストレプトコッカス(Streptococcus) G148株由来のプロテインGのGA3に対応する)をZ変異体に対する融合パートナーとして使用した。ライブラリーはZlib006Naive. IIと表示され、 1.5×10^{10} ライブラリメンバ(Z変異体)のサイズを有する。ファージミドライブラリーZlib006Naive. IIを含有するグリセロールストックからの大腸菌RR1ΔM15細胞(Rutherford et al., (1982) Nucleic Acids Res 10:5765-5772)を、100 µg/mlのアンプシリンを補充した20 Lの規定されたプロリンフリー培地[7 g/Lのリン酸水素二カリウム、1 g/Lのクエン酸三ナトリウム二水和物、0.02 g/Lのウラシル、6.7 g/LのYNB(Difco(商標)Yeast Nitrogen Base w/o amino acids、Becton Dickinson)、5.5 g/Lの

40

50

グルコース－水和物、0.3 g/LのL－アラニン、0.24 g/LのL－アルギニン－塩酸塩、0.11 g/LのL－アスパラギン－水和物、0.1 g/LのL－システイン、0.3 g/LのL－グルタミン酸、0.1 g/LのL－グルタミン、0.2 g/Lのグリシン、0.05 g/LのL－ヒスチジン、0.1 g/LのL－イソロイシン、0.1 g/LのL－ロイシン、0.25 g/LのL－リジン－塩酸塩、0.1 g/LのL－メチオニン、0.2 g/LのL－フェニルアラニン、0.3 g/LのL－セリン、0.2 g/LのL－スレオニン、0.1 g/LのL－トリプトファン、0.05 g/LのL－チロシン、0.1 g/LのL－バリン]に播種した。培養物を発酵槽（Belach Biotechnik、BR20）中で37℃にて培養した。細胞が、0.75の600nm（OD₆₀₀）の光学密度に達したとき、培養物約2.6 Lを10倍モル過剰のM13K07ヘルパーファージ（New England Biolabs、カタログ番号N0315S）を用いて感染させた。細胞を30分間インキュベートした後、発現の誘導のための100 μMのイソプロピル－β－D－ガラクトシド、25 μg/mLカナマイシン及び12.5 μg/mLカルベニシリンを補充したTSB－YE（トリプシンソイブ羅斯－酵母エキス；30 g/LのTSB、5 g/Lの酵母エキス）を発酵槽に20 Lまで充填した。細胞を30℃で22時間増殖させ、培養中の細胞を15,900 gでの遠心分離によってペレット化した。ファージ粒子を上清からPEG/NaCl（ポリエチレングリコール／塩化ナトリウム）中で2回沈殿させ、ろ過し、Gronwall et al.,（上記）に記載のようにPBS及びグリセロールに溶解した。ファージストックは、使用前まで－80℃で保存した。

10

20

【0104】

選択手順及びファージストック調製は、本質的に国際公開第2009/077175号の別のビオチン化標的に対する選択について記載したように実施された。バックグラウンド結合剤（binder）の量を減少させるために、ファージストックをSAビーズと共に室温で30分間インキュベートすることにより予備選択を行った。選択に使用される全てのチューブ及びビーズを、5%BSAを補充したPBSで予備ブロッキングを行った。選択は、室温で2時間、3%BSA及び0.1%Tween 20を補充したPBS中で行い、続いて、1.6 μg ビオチン化hIL－6又はmIL－6あたり1 mg ビーズを使用して、Dynabeads（登録商標）M－280ストレプトアビジン（SAビーズ、Invitrogen、カタログ番号11206D）上の標的ファージ複合体の捕捉を行った。ファージ増幅には大腸菌XL1－Blue株（Agilent technologies、カタログ番号200268）を用いた。

30

【0105】

ビオチン化hIL－6及びmIL－6に対する選択は、4つの異なる最終トラックに分割された4つのサイクルで行われた：サイクル1のトラック（1）は、第2サイクル又は第4サイクルのいずれかに分けられ、サイクル2では3つのトラック（1－1から1－3）、サイクル3では3つのトラック（1－1－1から1－3－1）、そしてサイクル4では4つのトラック（1－1－1－1から1－3－1－2）が完全に得られた。洗浄後、結合したファージを500 μlの0.1 Mグリシン－HCl、pH 2.2を用いて選択トラックから溶出し、続いて50 μlの1 M Tris－HCl、pH 8.0及び450 μlのPBSで直ちに中和した。使用した選択ストラテジー及びパラメータの概要は、低下した標的濃度及び洗浄回数の増加に関する選択トラックの差異を表2に示す。

40

【0106】

【表 2】

表 2：一次選択の戦略の概要

サイクル	選択トラック	ライブラリー又は 選択トラック由来の ファージストック	標的	標的濃度(nM)	洗浄回数
1	1	Zlib006Naive. II	hIL-6	100	2
2	1-1	1	hIL-6	50	5
2	1-2	1	hIL-6	10	5
2	1-3	1	mIL-6	100	4
3	1-1-1	1-1	hIL-6	25	6
3	1-2-1	1-2	hIL-6	2	8
3	1-3-1	1-3	hIL-6	25	6
4	1-1-1-1	1-1-1	hIL-6	10	8
4	1-2-1-1	1-2-1	hIL-6	0.5	12
4	1-3-1-1	1-3-1	mIL-6	10	8
4	1-3-1-2	1-3-1	hIL-6	0.5	12

【0107】

配列決定：標準的PCRプログラム及びプライマーAFFI-21（5'-tgcttc
ccggcctcggtatgttggtg；配列番号1557）及びAFFI-22（5'-
cggaaccagagccaccaccagg；配列番号1558）を使用して、単一のコロニーからPCRフラグメントを増幅した。ビオチン化オリゴヌクレオチド
AFFI-72（5'-biotin-cggaaccagagccaccaccagg；配列番号1559）及びBigDye（登録商標）Terminator v3.
1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いて、製造業者の推奨に従って使用して、増幅フラグメントの配列決定を行った。
Magnatrix 8000（Magnetic Biosolution）機器を用いて磁気ストレプトアビジン被覆ビーズ（Detach Streptavidin
Beads、Nordia、カタログ番号2012-01）に結合させてシーケンス
反応物を精製し、ABI PRISM（登録商標）3130xl Genetic Analyzer（PE Applied Biosystems）で解析した。

【0108】

ELISAのためのZ変異体の作製：配列決定したZ変異体を、深ウェルプレート（Nunc、カタログ番号278752）中で、100µg/mlアンピシリン及び0.1mM IPTGを補充した1ml TSB-YE培地中の選択物から単一コロニーを接種することによって産生した。プレートを37℃で24時間インキュベートした。細胞を遠心分離によりペレット化し、PBST0.05%（0.05%Tween-20を補充したPBS）200µlに再懸濁し、-80℃で凍結し、ウォーターバス中で解凍して、細胞のペリプラズム画分を放出させた。凍結融解手順を5回繰り返した。サンプルをPBST0.05%で合計800µlに希釈し、細胞を遠心分離によってペレット化した。ペリプラズム抽出物の上清は、AQHDEALE-[Z#####]-VDYV-[ABD]-YVPG（Gronwallら、上記）として発現した、ABDに対する融合物としてZ変異体を含有した。Z#####は個々の58個のアミノ酸残基Z変異体を意味する。

【0109】

Z変異体のELISA分析：IL-6へのZ変異体の結合をELISAアッセイで分析した。コーティングバッファー（50mMの炭酸ナトリウム、pH9.6；Sigma、カタログ番号C3041）で希釈した2µg/mlの抗ABDヤギ抗体（社内で製造）を

4℃で一晩、ハーフエリアの96ウェルELISAプレート(Costar、カタログ番号3690)をコートした。抗体溶液を注ぎ出し、ウェルを100μlのPBSC(0.5%カゼインを補充したPBS; Sigma、カタログ番号C8654)で室温にて1.5時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を捨て、50μlのペリプラズム溶液をウェルに添加し、ゆっくり振盪しながら室温で1.5時間インキュベートした。上清を注ぎ出し、ウェルをPBST0.05%で4回洗浄した。次に、PBSC中の7.7nMの濃度の50μlのビオチン化hIL-6を各ウェルに添加した。プレートを室温で1.5時間インキュベートし、続いて上記のように洗浄した。ストレプトアビジンコンジュゲートHRP(Thermo Scientific、カタログ番号N100)をPBSCで1:30000に希釈してウェル添加し、続いて45分間インキュベートした。上記のように洗浄した後、50μlのImmunoPure TMB基質(Thermo Scientific、カタログ番号34021)をウェルに添加し、プレートを製造業者の推奨に従って処理した。特定の無関係のタンパク質に結合するZ変異体を、その特異的で無関係なタンパク質に対してアッセイすることによって陽性対照として使用し、hIL-6に対してアッセイすることによって陰性対照として使用した。ブランク対照として、ペリプラズムサンプルの代わりにPBST0.05%を添加した。マルチウェルプレートリーダー(Victor³、Perkin Elmer)を用いて450nmで吸光度を測定した。

10

【0110】

結果

20

IL-6 結合Z変異体のファージディスプレイ選択: 個々のクローンを、ビオチン化hIL-6及びmIL-6に対する4サイクルのファージディスプレイ選択の後に調製した。

【0111】

配列決定: 選択ラウンド4から無作為に選んだクローンについて配列決定を行った。各Z変異体には一意の識別番号#####が与え、個々の変異体はZ#####という。58残基の長さのZ変異体のアミノ酸配列を図1及び配列表の配列番号1503~1551に列挙する。推定のIL-6結合モチーフ(BM)は、各配列において8位から36位まで伸びる。これらの各Z変異体(BMod)内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は、7位から55位まで伸びる。

30

【0112】

Z変異体のELISA分析: 4サイクルの選択後に得られたクローンを96ウェルプレートで生成し、ELISAでhIL-6結合活性についてスクリーニングした。少なくとも3×ネガティブコントロールに対応するシグナルで反応する全てのクローンを陽性IL-6結合剤とみなした。無関係のタンパク質に特異的な対照分子は、特異的なタンパク質に対して陽性シグナルを与えたが、hIL-6に対してはシグナルが得られなかった。

【0113】

実施例2

IL-6 結合Z変異体の産生及びインビトロ特性決定

40

【0114】

この実施例では、Z変異体のサブセットをサブクロニングし、産生させ、競合ELISA及び細胞アッセイにおいて機能的に評価した。IL-6結合Z変異体が、IL-6とIL-6Rαの間、又はIL-6とgp130受容体との間の特異的相互作用をそれぞれ阻害できるかどうかを調べるために、2つの異なるELISAアッセイを適用した。古典的なシス-シグナル伝達経路及びトランス-シグナル伝達経路をそれぞれ模倣する2つの異なる細胞アッセイを用いて、Z変異体ポリペプチドの効力を評価した。最後に、それらの二次構造を調べ、それらの融解温度T_mを決定するために、Z変異体のサブセットについて円偏光二色性(CD)分光法を実施した。

【0115】

50

材料及び方法

Z変異体のサブクローニング：13のIL-6結合Z変異体のDNA、Z06777（配列番号1503）、Z06779（配列番号1504）、Z06789（配列番号1505）、Z06791（配列番号1506）、Z06792（配列番号1507）、Z06799（配列番号1508）、Z06802（配列番号1509）、Z06805（配列番号1510）、Z06809（配列番号1511）、Z06814（配列番号1512）、Z06829（配列番号1513）、Z06834（配列番号1514）、Z06844（配列番号1515）を、ライブラリーベクターpAY02592から増幅した。標準的な分子生物学技術（別の標的に結合するZ変異体について、国際公開第2009/077175号に本質的に記載されているように）を用いて、N末端His₆タグを有する単量体Z変異体分子の構築のサブクローニング戦略を適用した。Z遺伝子フラグメントを発現ベクターpAY01448にサブクローニングして、コードされた配列MGSSHHHHHHLLQ-[Z#####]-VDを得た。

10

【0116】

5つのIL-6結合Z変異体、Z06789、Z06799、Z06809、Z06814及びZ06829、及び無関係の標的であるに結合する2つの対照Z変異体Z03638（配列番号1552）及びZ04726（配列番号1553）のサブセットは、ABD変異体PP013（配列番号1554）と融合してサブクローニングした。発現ベクターにコードされる構築物はMGSSLLQ-[Z#####]-VDGS-PP013であった。

20

【0117】

培養及び精製：各IL-6結合Z変異体の遺伝子フラグメントを含むプラスミドで大腸菌BL21（DE3）細胞（Novagen）を形質転換し、37℃で50μg/mlのカナマイシンを補充した800又は1000mlのTSB-YE培地で培養した。タンパク質発現を誘導するために、OD₆₀₀=2でIPTGを0.2mMの最終濃度まで添加し、培養物を37℃でさらに5時間インキュベートした。遠心分離により細胞を回収した。

【0118】

His₆-タグを有するIL-6結合Z変異体の精製：タンパク質精製は、非変性又は変性条件下で行った。

【0119】

非変性条件下での精製は以下のように行った：約2～5gの各細胞ペレットを10mlのPBSに再懸濁した。超音波処理による細胞破壊の後、遠心分離により細胞破片を除去し、各上清を、20mlの洗浄緩衝液（46.6mM Na₂HPO₄、3.4mM NaH₂PO₄、及び300mM NaCl、pH7.0）で平衡化した2mlのTalon coboltカラム（Clontech、カタログ番号635504）に適用した。コンタミネーションを洗浄緩衝液で洗浄することによって除去し、続いて溶出緩衝液（50mM NaH₂PO₄、100mM NaCl、30mM HAc及び70mM NaAc、pH5.0）でIL-6結合Z変異体を溶出した。

30

【0120】

変性条件下での精製は以下のように行った：約2～5gの各細胞ペレットを10mlの溶解緩衝液（7M塩酸グアニジニウム、47mM Na₂HPO₄、2.65mM NaH₂PO₄、10mM Tris-HCl、104mM NaCl、pH8.0）に再懸濁し、続いて37℃、150rpmで2時間インキュベートした。洗浄及び溶出工程は、非変性精製のように、しかし、異なる緩衝液（洗浄緩衝液：6M塩酸グアニジニウム、47mM Na₂HPO₄、3.4mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、pH8.0；溶出緩衝液：6M尿素、0.1M NaCl、29.6mMのHAc、70.4mMのNaAc及び50mMのNaH₂PO₄、pH5.0）を用いて実施した。精製したZ変異体を、製造者のプロトコールに従って、PD-10カラム（GE Healthcare）を用いてPBSに緩衝液交換した。

40

【0121】

50

タンパク質濃度は、各タンパク質の吸光係数を用いて280nmでの吸光度を測定することによって決定した。IL-6結合Z変異体の純度を、クーマシーブルーで染色したSDS-PAGEにより分析した。

【0122】

ABDとの融合したIL-6結合Z変異体の精製：約2.5gの各細胞ペレットを、Benzonase（登録商標）（Merck）を補充した20mlのTST緩衝液（25mM Tris-HCl、1mM EDTA、200mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 8.0）に再懸濁した。超音波処理による細胞破壊及び遠心分離による清澄化後、各上清を1mlの抗ABDアガロース（国際公開第2014/064237号）を有する重力流カラムに適用した。TST緩衝液及び5mM NH₄Ac pH 5.5緩衝液で洗浄した後、ABD融合Z変異体を0.1M HAcで溶出した。PD-10カラム（GE Healthcare）を用いて、PBS（2.68mM KCl、137mM NaCl、1.47mM KH₂PO₄、8.1mM Na₂HPO₄、pH 7.4）への緩衝液交換を行った。次に、低エンドトキシン含量を確実にするために、ABD融合Z変異体を1mlのDetoxi-Gel Endotoxin除去カラム（Pierce、カタログ番号20344）で精製した。タンパク質濃度は、それぞれのタンパク質の吸光係数を用いて280nmでの吸光度を測定することによって決定した。純度を、クーマシーブルーで染色したSDS-PAGEにより分析し、各精製Z-ABD変異体の同一性をLC/MS分析を用いて確認した。

【0123】

結合部位の分析：第1のアッセイを用いて、hIL-6とヒトIL-6R α （hIL-6R α ）との間の相互作用のIL-6結合Z変異体の干渉を評価した。この実験では、半分の領域の96ウェルELISAプレートを2 μ g/mlの濃度で抗IL-6R捕捉抗体（R&D Systems）でコーティングした。プレートを4℃で一晩インキュベートし、次いで水道水で2回洗浄した。次に、プレートをPBSC中で1時間ブロッキングし、hIL-6R α （R&D Systems）を250ng/mlの濃度で添加した。プレートを室温で1.5時間インキュベートし、次いで200 μ lの0.05% Tween/PBSで4回洗浄した。別々のプレートにおいて、13個のHis₆タグ付きZ変異体ポリペプチドの連続希釈液（濃度範囲500~0.5nM）を、2.5nMのビオチン化hIL-6で滴定した。IL-6R α 抗体トシリズマブ（Roche）を同じ方法で調製し、比較のために含めた。次に、Z変異体とビオチン化hIL-6との各混合複合物を、hIL-6R α を含むウェルに移した。プレートをさらに1.5時間インキュベートし、次いで4回洗浄した。ストレプトアビジン-HRP（Thermo Scientific）の1:8000希釈液を加え、プレートを1時間インキュベートした。プレートを0.05% Tween/PBSで最後の4回洗浄し、TMB基質（Thermo Scientific）を添加し、15分後、反応を2M H₂SO₄で停止させた。吸光度は、マイクロプレートリーダー（Victor³、Perkin Elmer）を用いて450nmで測定した。

【0124】

第2のアッセイを用いて、ヒトgp130（hgp130）とhIL-6/hIL-6R α 複合体との間の相互作用に対するIL-6結合Z変異体の干渉を評価した。この実験では、半分領域の96ウェルELISAプレートを、4 μ g/mlの濃度にてFc融合hgp130（hgp130-Fc）でコーティングした。プレートを4℃で一晩インキュベートし、次いで水道水で2回洗浄した。次に、プレートをPBSC中で1時間ブロッキングした。プレートを室温で1.5時間インキュベートし、次いで200 μ lの0.05% Tween/PBSで4回洗浄した。別々のプレートにおいて、13のHis₆タグ化Z変異体ポリペプチドの連続希釈物（濃度範囲500~0.5nM）をhIL-6/hIL-6R α の固定濃度（それぞれ0.5nM及び5nM）で滴定した。

【0125】

IL-6R α 結合抗体トシリズマブ（Roche）を同様に調製し、比較のために含め

た。次いで、各 Z 変異体ポリペプチドと h I L - 6 / h I L - 6 R α とを予め混合した複合体を、h g p 1 3 0 を含有するウェルに移した。プレートを 1 . 5 時間インキュベートし、次いで 4 回洗浄した。ビオチン化抗 I L - 6 R α 抗体 (R & D S y s t e m s) を添加し、プレートをさらに 1 . 5 時間インキュベートし、続いて洗浄した。ストレプトアビジン-HRP (T h e r m o S c i e n t i f i c) の 1 : 8 0 0 0 希釈液を加え、プレートを 1 時間インキュベートした。次に、プレートを 4 回洗浄し、TMB 基質 (T h e r m o S c i e n t i f i c) を 1 5 分間添加してから、反応を 2 M H₂SO₄ で停止させた。吸光度は、マイクロプレートリーダー (V i c t o r³、P e r k i n E l m e r) を用いて 4 5 0 n m で測定した。

【0126】

インビトロ中和アッセイ：古典的なシグナル伝達経路を評価する第 1 のアッセイは、ヒト I L - 6、T N F 及び G M - C S F に応答して増殖する T F - 1 細胞株を使用した。T F - 1 細胞を、1 0 % F C S (G i b c o)、P e n - S t r e p (L o n z a) 及び 2 n g / m l r h G M - C S F (R & D S y s t e m s) を添加した L - g l u t (L o n z a) を含む R P M I 1 6 4 0 中で培養した。使用前に、細胞を r h G M - C S F の非存在下にて、R P M I 1 6 4 0 中で 2 回洗浄した。次いで細胞を計数し、1 ウェルあたり 4×10^4 細胞の密度で 9 6 ウェル平底プレートに分注した。別々のプレートにおいて、阻害化合物 (I L - 6 結合 Z 変異体、H i s₆ タグ (濃度範囲 1 0 0 0 ~ 0 . 1 n M) 又は A B D 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1 5 5 4 ; 濃度範囲 2 0 0 ~ 0 . 0 0 7 n M)) 及び I L - 6 R α 結合抗体 トシリズマブ (R o c h e ; 濃度範囲 2 0 0 ~ 0 . 0 0 7 n M) を、0 . 0 9 9 n M r h I L - 6 (R & D S y s t e m s、U K) の存在下でインキュベートした。さらに、A B D 融合変異体を 9 μ M の r h H S A (N o v o z y m e s) と共に又は伴わずにインキュベートした。その後、Z 変異体ポリペプチドと h I L - 6 とを予め混合した複合体を、T F - 1 細胞を含むウェルに移し、3 7 ° C にて加湿 5 % C O₂ 雰囲気下で 7 2 時間インキュベートした。インキュベーションの最後の 4 時間の間に、1 0 μ l の C C K - 8 (F l u k a、S i g m a A l d r i c h) を増殖細胞の数を決定するためにウェルごとに添加した。吸光度は、マイクロプレートリーダー (V i c t o r³、P e r k i n E l m e r) を用いて 4 5 0 n m (A b s 4 5 0) で測定した。細胞増殖のデータを、4 パラメータの用量反応曲線への非線形回帰によって評価し、G r a p h P a d P r i s m プログラムを用いて半最大阻害濃度 (I C 5 0) を決定した。阻害分子による T F - 1 細胞の I L - 6 依存性増殖の阻害は、A b s 4 5 0 から、細胞を含むが h I L - 6 を含まないコントロールウェルを差し引いたものであった。

【0127】

トランスシグナル伝達経路に対処するために、第 2 のアッセイを使用した。ここでは、ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) を h I L - 6 及び可溶性 h I L - 6 R α で刺激し、読み出しは単球走化性タンパク質-1 (M C P - 1) の産生であった。H U V E C (L o n z a) は、E G M - 2 b u l l e t キット培地 (L o n z a) で増殖させ、8 回以下で培養継代した。使用前に細胞を 7 5 % コンフルエントになるまで増殖させた。トリプシン / E D T A (L o n z a) を用いて細胞を剥離し、再懸濁し、新鮮な培地で 1 回洗浄した。次に、細胞を計数し、1 ウェルあたり 2×10^4 細胞の密度で 9 6 ウェル平底プレートに分注した。細胞を、加湿した 5 % C O₂ 雰囲気中、3 7 ° C で一晚培養した。別々のプレートにおいて、A B D 変異体 P P 0 1 3 (配列番号 1 5 5 4) と融合させた I L - 6 結合 Z 変異体 Z 0 6 7 8 9、Z 0 6 7 9 9、Z 0 6 8 0 9、Z 0 6 8 1 4 及び Z 0 6 8 2 9、異なる標的に結合する P P 0 1 3 融合陰性対照 Z 0 3 6 3 8 (配列番号 1 5 5 4) の連続希釈液 (1 0 0 ~ 0 . 0 0 1 5 n M)、及び、トキシリズマブ (R o c h e) の連続希釈液 (2 0 0 ~ 0 . 0 0 3 n M) を、組換え h I L - 6 (1 0 n g / m l ; 0 . 5 n M) 及び固定濃度 2 0 0 n g / m l (5 . 6 n M) の可溶性 h I L - 6 R α の存在下で、9 μ M r h H S A (N o v o z y m e s) を含む又は含まない状態でインキュベートした。次に、試験分子及び h I L - 6 / h I L - 6 R α とのプレ混合溶液を、H U V E C を含むウェルに移し、これを加湿 5 % C O₂ 雰囲気中、3 7 ° C で 2 4 時間インキュベートした。培

養期間後に無細胞上清を収集し、ヒトMCP-1レベルを、MCP-1 Duo set ELISA開発システム（R&D Systems）を用いたサンドイッチELISA法によって決定した。

【0128】

MCP-1 ELISA：半分領域の96ウェルELISAプレートを、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にて抗MCP-1捕捉抗体（R&D Systems）でコーティングした。プレートを 4°C で一晩インキュベートし、水道水で2回洗浄し、PBSC中で1時間ブロッキングした。次いで、プレートを $4\times 200\mu\text{l}$ の 0.05% Tween/PBSで4回洗浄した後、標準及びサンプルを添加した。プレートを室温で2時間インキュベートし、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化抗MCP-1抗体（R&D Systems）を添加する前に洗浄した。次いで、プレートをさらに1.5時間インキュベートし、次に4回洗浄した。次に、ストレプトアビジン-HRP（Thermo Scientific）の $1:8000$ 希釈液を加え、プレートを1時間インキュベートした。プレートを最後に4回洗浄し、TMB基質（Thermo Scientific）を20分間添加してから、反応を $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ で停止させた。吸光度は、マイクロプレートリーダー（Victor³、Perkin Elmer）を用いて 450nm で測定した。

10

【0129】

CD分析：精製されたHis₆標識Z変異体のサブセットをPBSで $0.5\text{mg}/\text{ml}$ に希釈した。各希釈Z変異体について、 $250\sim 195\text{nm}$ のCDスペクトルを 20°C で得た。さらに、融解温度（T_m）を決定するために可変温度測定（VTM）を行った。VTMでは、吸光度を 221nm で測定し、温度を 20°C から 90°C に上昇させ、 $5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の温度勾配で測定した。CD測定は、光路長 1mm のセルを使用してJasco J-810分光偏光計（Jasco Scandinavia AB）で行った。

20

【0130】

結果

培養及び精製：N末端His₆タグを用いて構築された13のIL-6結合Z変異体（配列番号1503～1515）を大腸菌で産生させた。 280nm での吸光度を測定することによって分光光度的に決定した、約 $2\sim 5\text{g}$ の細菌ペレット由来のIMAC精製タンパク質の量は、異なるIL-6結合Z変異体について約 $10\text{mg}\sim 20\text{mg}$ の範囲であった。ABD変異体PP013（配列番号1554）に融合された5つのZ変異体、約 2.5g の細菌ペレットから $2\text{mg}\sim 12\text{mg}$ が得られた。各最終タンパク質調製物のSDS-PAGE分析は、これらが主にIL-6結合Z変異体を含むことを示した。各IL-6結合Z変異体の正確な同一性及び分子量を、HPLC-MS分析によって確認した。

30

【0131】

結合部位の分析：（i）hIL-6とhIL-6R α 又は（ii）hgp130と予め形成したhIL-6/hIL-6R α 複合体との間の相互作用を阻害する、試験した13のIL-6結合His₆タグ付きZ変異体の能力を、2つの別の競合ELISA実験で調査した。hIL-6/hIL-6R α の相互作用の阻害について試験した場合、13種のZ変異体のいずれも有意な効果を示さなかった（図2）。しかしながら、全てのZ変異体は、予め形成したhIL-6/hIL-6R α とhgp130との間の相互作用の明確な濃度依存的阻害、すなわち、トランスシグナル伝達類似の相互作用の阻害を示した（図3）。各Z変異体の計算されたIC₅₀値を表3に示す。比較のために含まれる抗体トシリズマブは、両方の実験において阻害効果を示した。

40

【0132】

【表 3】

表3：hgp130とのhIL-6/hIL-6R α 相互作用を阻害する主要なZ変異体のIC50値

Z変異体	Z変異体の配列番号:	IC50 (M)
His ₆ -Z06777	1503	4.6×10^{-8}
His ₆ -Z06779	1504	3.6×10^{-8}
His ₆ -Z06789	1505	6.2×10^{-9}
His ₆ -Z06791	1506	2.3×10^{-8}
His ₆ -Z06792	1507	1.7×10^{-8}
His ₆ -Z06799	1508	3.7×10^{-9}
His ₆ -Z06802	1509	2.7×10^{-8}
His ₆ -Z06805	1510	4.2×10^{-8}
His ₆ -Z06809	1511	3.3×10^{-9}
His ₆ -Z06814	1512	1.6×10^{-9}
His ₆ -Z06829	1513	1.1×10^{-8}
His ₆ -Z06834	1514	5.3×10^{-8}
His ₆ -Z06844	1515	8.7×10^{-8}

10

20

【0133】

インビトロ中和アッセイ：古典的シグナル伝達経路及びトランスシグナル伝達経路におけるIL-6依存性シグナル伝達を阻害するIL-6結合Z変異体の能力を調べるために、2つの異なる細胞アッセイを使用した。古典的なシグナル伝達経路を評価する第一のアッセイは、ヒトIL-6、TNF及びGM-CSFに応答して増殖するTF-1細胞株を使用した。gp130と呼ばれるシグナル伝達受容体サブユニットと併せたIL-6の細胞表面IL-6受容体への直接のシグナル伝達は、シスシグナル伝達と呼ばれる。このアッセイは、13の変異体全てがTF-1細胞のIL-6依存性増殖を阻止することができることを示した。His₆タグ付きZ変異体及びABD変異体PP013（配列番号1554）に組換え融合したZ変異体、並びに比較のために含んだトラスツズマブのhIL-6R α 結合抗体の計算されたIC50値を表4に示す。

30

【0134】

【表 4】

表 4：TF-1 細胞の IL-6 依存性増殖を阻害する主要な Z 変異体の IC50 値

Z変異体	Z変異体の配列番号:	IC50 (M)
His ₆ -Z06777	1503	7.2×10^{-8}
His ₆ -Z06779	1504	3.0×10^{-8}
His ₆ -Z06789	1505	8.6×10^{-9}
His ₆ -Z06791	1506	5.2×10^{-9}
His ₆ -Z06792	1507	5.3×10^{-8}
His ₆ -Z06799	1508	3.9×10^{-9}
His ₆ -Z06802	1509	4.3×10^{-8}
His ₆ -Z06805	1510	7.7×10^{-8}
His ₆ -Z06809	1511	2.0×10^{-8}
His ₆ -Z06814	1512	1.6×10^{-9}
His ₆ -Z06829	1513	2.8×10^{-8}
His ₆ -Z06834	1514	6.1×10^{-8}
His ₆ -Z06844	1515	1.1×10^{-7}
Z06789-ABD	1505	$\sim 1 \times 10^{-7}$
Z06799-ABD	1508	2.4×10^{-9}
Z06809-ABD	1511	1.0×10^{-8}
Z06814-ABD	1512	8.0×10^{-10}
Z06829-ABD	1513	1.5×10^{-8}
トシリズマブ		3.0×10^{-10}

【0135】

トランスシグナル伝達経路も細胞ベースのシステムで阻害できるかどうかを調べるために、gp130 発現ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた第 2 のアッセイを行った。予め形成した hIL-6/hIL-6Rα 複合体と HUVEC のインキュベーションは、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) の IL-6 トランス伝達依存性分泌を生じ、IL-6 結合 Z 変異体の任意のトランスシグナル伝達阻害能力の分析を可能にする。このアッセイでは、ABD 変異体 PP013 (配列番号 1554) に組換え融合された 5 つの Z 変異体を HSA の存在下で分析した。比較のために、hIL-6Rα 結合抗体トシリズマブを含めた。研究された 5 つの変異体の全てがトランスシグナル伝達を阻害することが示された (図 4)。1 つの変異体、Z06814-ABD は、トシリズマブよりも強力であることが示され、5 nM のトシリズマブと比較して、約 1 nM の IC50 値を示した。

【0136】

CD 分析：7 つの Z 変異体について決定された CD スペクトルは、各々が 20 °C で α-ヘリックス構造を有することを示した。可変温度測定で決定された融解温度 (Tm) を表 5 に示す。

【0137】

【表 5】

表 5：選択された Z 変異体の融解温度

Z変異体	配列番号:	Tm (° C)
His ₆ -Z06779	1504	51
His ₆ -Z06789	1505	52
His ₆ -Z06792	1507	48
His ₆ -Z06799	1508	44
His ₆ -Z06809	1511	51
His ₆ -Z06814	1512	49
His ₆ -Z06829	1513	40

10

【0138】

実施例 3IL-6 結合 Z 変異体の第一の成熟したライブラリーの設計及び構築

【0139】

この実施例では、成熟ライブラリーを構築した。このライブラリーを新しい IL-6 結合 Z 変異体の選択に使用した。成熟ライブラリーからの選択は、通常、増加した親和性を有する結合剤をもたらすと予想される (Orlova et al., (2006) Cancer Res 66 (8): 4339-48)。この研究では、スプリットプール合成 (split-pool synthesis) を用いて、ランダム化された一本鎖リンカーを生成し、合成において、所望の位置に規定のコドンの取り込みを可能にした。

20

【0140】

材料及び方法

ライブラリー設計：ライブラリーは、実施例 1 及び 2 に記載の IL-6 結合 Z 変異体の配列の選択に基づいた。新しいライブラリーでは、Z 分子骨格中の 12 の可変位置は、特定の amino 酸残基にバイアスを有し、1つの位置は、配列番号 1503~1551 に定義された Z 変異体配列に基づく戦略に従って、一定に保たれた。スプリットプール合成を使用して、147bp の DNA リンカーを生成し、Z 変異体 amino 酸配列の部分的に無作為化されたヘリックス 1 及び 2 をコードした。従って、制限部位 Xho I 及び Sac I に隣接する 5'-AA AT A AAT CTC GAG GTA GAT GCC AAA TAC GCC AAA GAA NNN NNN NNN GCG TGG NNN GAG ATC NNN NNN CTG CCT AAC CTC ACC NNN NNN CAA NNN NNN GGC TTC ATC NNN AAA TTA NNN GAT GAC CCA AGC CAG AGC TCA TTA TTT A-3' (配列番号 1560; NNN と表示したランダム化コドン) は、DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA) に注文した。Z 分子骨格における 12 の可変 Z 位置 (9, 10, 11, 14, 17, 18, 24, 25, 27, 28, 32 及び 35) を含む新しいライブラリー中の amino 酸残基の理論的分布を表 6 に示す。結果として得られる理論上のライブラリーサイズは、 3.6×10^9 変異体である。

30

40

【0141】

【表 6】

表 6：ライブラリーの設計、第一の成熟

Zにおけるアミノ酸位置	ランダム化（アミノ酸略語）	アミノ酸の数	割合
9	E (70 %), H, Q, T,	4	1/10, 7/10 (E)
10	A, H, Q, R,	4	1/4
11	A, D, E, H, K, Q, R, S, T, V	10	1/10
13	W	1	1/1
14	A, F, H, L, R, S, T, W, Y	9	1/9
17	H (70 %), Q, S, T	4	1/10, 7/10 (H)
18	A, H, I, K, L, M, S, T, V	9	1/9
24	A, H, I, T, V	5	1/5
25	D, E, H, N, Q, R, S, T	8	1/8
27	A, H, I, L, M, R, T, V	8	1/8
28	A, E, H, S, T, V	6	1/6
32	A, H, I, M, Q, S, T, V, W	9	1/9
35	F, L, M, Y	4	1/4

【0142】

ライブラリー構築：12サイクルのPCR中にAmpliTaq Goldポリメラーゼ（Applied Biosystems、カタログ番号4311816）を用いてライブラリーを増幅し、供給元の推奨に従って、QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen、カタログ番号28106）を使用して精製した。無作為ライブラリーフラグメントの精製したプールを制限酵素XhoI及びSacI-HF（New England Biolabs、カタログ番号R0146L及びカタログ番号R3156M）で消化し、PCR精製キット（QIAGEN、カタログ番号28106）を使用して濃縮した。続いて、産物を調製用2.5%アガロースゲル（Nuisieve GTCアガロース、Cambrex、Invitrogen）上に流し、供給元の推奨に従って、QIAGENゲル抽出キット（QIAGEN、カタログ番号28706）を使用して、精製した。

【0143】

ファージミドベクターpAY02592（本質的には上記のGronwallらに記載のpAffi1と同じ）を同じ酵素で制限し、フェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を用いて精製した。制限フラグメント及びベクターをと5：1のモル比で、T4 DNAリガーゼ（Fermentas、カタログ番号EL0011）を用いて室温で2時間連結し、続いて4℃で一晩インキュベートした。連結したDNAをフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により回収し、続いて10mM Tris-HCl（pH 8.5）に溶解した。従って、ベクターpAY02592中に得られたライブラリーは、連鎖球菌プロテインGに由来するアルブミン結合ドメイン（ABD）にそれぞれ融合したZ変異体をコードした。

【0144】

連結反応（約160ngのDNA／形質転換）をエレクトロコンピテント大腸菌ER2738細胞（50μl、Lucigen、Middleton、WI、USA）にエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの直後に、約1mlの回収培地（ER2738細胞とともに供給）を添加した。形質転換した細胞を37℃で60分間インキュベートした。滴定及び形質転換体の数を決定するためにサンプルを採取した。次に、細胞をプールし、2%グルコース、10μg/mlテトラサイクリン及び100μg/mlアン

ピシリンを補充した1リットルのTSB-YE培地中で、37℃にて一晚培養した。細胞を4,000gで7分間ペレット化し、PBS/グリセロール溶液(約40%グリセロール)に再懸濁し、等分し、-80℃で保存した。内容を確認するためにZ変異体のライブラリー由来のクローンを配列決定し、ライブラリー設計と比較して、構築ライブラリーの結果を評価した。配列決定を実施例1に記載のように行い、アミノ酸分布を確認した。

【0145】

ファージストックの調製：ファージミドライブラリーを含むファージストックを20リットルの発酵槽(Belach Biotechnik)中で調製した。ファージミドライブラリーを含むグリセロールストックからの細胞を、1g/lのグルコース、100mg/lのアmpiシリン及び10mg/lテトラサイクリンを補充したTSB-YE(トリプシンソイブ羅斯ー酵母エキス；30g/l TSB、5g/l酵母エキス)10L中に播種した。細胞が600nmでの光学密度(OD₆₀₀)が0.64に達したとき、5倍モル過剰のM13K07ヘルパーファージを用いて約1.1Lの培養物を感染させた。細胞を30分間インキュベートした後、発酵槽に複合発酵培地[2.5g/L(NH₄)₂SO₄；酵母エキス5.0g/L；30g/Lトリプトン、2g/L K₂HPO₄；3g/LのKH₂PO₄、1.25g/L；Na₃C₆H₅O₇・2H₂O；Breox FM T30消泡剤0.1ml/L]で10Lまで充填した。以下の成分を添加した：10mlのカルベニシリン25mg/mL；5mlのカナマイシン50mg/mL；1mLの1Mイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)；17.5ml/Lの300g/LのMgSO₄及び5mlの微量元素溶液[1.2M HClに溶解した、35g/lのFeCl₃・6H₂O；10.56g/LのZnSO₄・7H₂O；2.64g/LのCuSO₄・5H₂O；13.2g/LのMnSO₄・H₂O；13.84g/LのCaCl₂・2H₂O)。グルコース制限流加培養を、600g/Lグルコース溶液を反応器に供給して開始した(開始時3.5g/h、20時間後から培養終了時まで37.5g/h)。pHは、25%NH₄OHの自動添加によりpH7に制御した。空気を補充し(5L/分)、攪拌機を500rpmに設定した。流加培養の24時間後、OD₆₀₀は2.2であった。培養中の細胞を15,900gの遠心分離によってペレット化した。ファージ粒子をPEG/NaCl中の上清から2回沈殿させ、濾過し、実施例1に記載したようにPBS及びグリセロールに溶解した。選択時に使用するまでファージストックを-80℃で保存した。

【0146】

結果

ライブラリー構築：新しいライブラリーは、結合特性が確認されたIL-6結合Z変異体のセット(実施例1及び2)に基づいて設計された。設計されたライブラリーの理論上のサイズは、3.6×10⁹個のZ変異体であった。大腸菌ER2738細胞への形質転換後の滴定によって決定されたライブラリーの実際のサイズは、3.5×10⁹個の形質転換体であった。

【0147】

ライブラリーの品質は、192の形質転換体の配列決定及びそれらの実際の配列を理論的デザインと比較することによって試験した。設計されたライブラリーと比較した実際のライブラリーの内容は満足のいくものであることが示された。従って、IL-6に対する潜在的な結合剤の成熟したライブラリーが良好に構築された。

【0148】

実施例4

第一の成熟したライブラリーからのZ変異体の選択、スクリーニング及び特徴付け

【0149】

材料及び方法

成熟IL-6結合Z変異体のファージディスプレイ選択：標的タンパク質hIL-6(R&D Systems、カタログ番号206-IL/CF)及びmIL-6(Abnova、カタログ番号P4346116)は、実施例1に記載のよう

10

20

30

40

50

施例 3 に記載の Z 変異体分子の新規ライブラリーを用いたファージディスプレイ選択は、以下の例外を除いて、本質的には実施例 1 に記載されるように、h I L - 6 及び m I L - 6 に対して 4 サイクルで実施した。選択時に、ウシ胎仔血清 (F C S、G i b c o、カタログ番号 1 0 1 0 8 - 1 6 5) 及びヒト血清アルブミン (H S A、A l b u c u l t、N o v o z y m e s、カタログ番号 2 3 0 - 0 0 5) を選択緩衝液に最終濃度 1 0 % 及び 1 . 5 μ M になるように添加した。選択に用いた全ての試験管及びビーズを、3 % B S A を補充した 0 . 1 % の P B S T で予備ブロッキングした。サイクル 1 A では、S A - ビーズとファージストックのインキュベーションによって予備選択工程を実施した。全てのトラックに対し、サイクル 1 で選択容量は 2 m l であった。ファージ標的複合体の捕捉のために、4 μ g のビオチン化 h I L - 6 又は m I L - 6 あたり 1 m g のビーズを使用した。

10

【0150】

サイクル 1 の 6 つのトラック (1 から 6) は、サイクル 2 又はサイクル 3 のいずれかに分割し、サイクル 2 では合計 7 つのトラック (1 - 1 から 6 - 2)、サイクル 3 では 1 2 トラック (1 - 1 - 1 から 6 - 2 - 1)、及び、サイクル 4 では 1 2 トラック (1 - 1 - 1 - 1 から 6 - 2 - 1 - 1) が得られた。

【0151】

結合したファージ粒子は、2 つの異なる手順を用いて溶出した ; 1) 5 0 0 μ l の 0 . 1 M グリシン - H C l、p H 2 . 2、続いて 5 0 μ l の 1 M T r i s - H C l、p H 8 . 0 及び 4 5 0 μ l の P B S での即時中和、又は 2) 5 0 0 μ l の 1 0 0 m M リン酸ナトリウム及び 1 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 5 . 5 及び 5 0 0 μ l の P B S で中和した。

20

【0152】

低い標的濃度及び洗浄回数の増加を用いて得られるその後のサイクルにおけるストリンジェンシーの増大を説明する、選択戦略の概要を表 7 に示す。

【0153】

【表 7】

表 7：第一の成熟の選択戦略の概要

サイクル	選択トラック	ライブラリー又は 選択トラック由来の ファージストック	標的	標的濃度 (nM)	洗浄回数	溶出
1	1	Zlib006IL-6.1	hIL-6	50	2	pH 2.2
1	2	Zlib006IL-6.1	hIL-6	25	2	pH 2.2
1	3	Zlib006IL-6.1	hIL-6	10	3	pH 2.2
1	4	Zlib006IL-6.1	hIL-6	50	2	pH 5.45
1	5	Zlib006IL-6.1	hIL-6	25	2	pH 5.45
1	6	Zlib006IL-6.1	mIL-6	100	2	pH 2.2
2	1-1	1	hIL-6	25	8	pH 2.2
2	2-1	2	hIL-6	10	8	pH 2.2
2	3-1	3	hIL-6	2.5	12	pH 2.2
2	4-1	4	hIL-6	25	8	pH 5.45
2	5-1	5	hIL-6	10	8	pH 5.45
2	6-1	6	mIL-6	100	4	pH 2.2
2	6-2	6	mIL-6	50	6	pH 2.2
3	1-1-1	1-1	hIL-6	5	12	pH 2.2
3	1-1-2	1-1	hIL-6	1.25	15	pH 2.2
3	2-1-1	2-1	hIL-6	1.25	12	pH 2.2
3	2-1-2	2-1	hIL-6	0.5	15	pH 2.2
3	3-1-1	3-1	hIL-6	0.5	20	pH 2.2
3	3-1-2	3-1	hIL-6	0.05	20	pH 2.2
3	4-1-1	4-1	hIL-6	5	12	pH 5.45
3	4-1-2	4-1	hIL-6	1.25	15	pH 5.45
3	5-1-1	5-1	hIL-6	2.5	12	pH 5.45
3	5-1-2	5-1	hIL-6	1	15	pH 5.45
3	6-1-1	6-1	mIL-6	50	11	pH 2.2
3	6-2-1	6-2	mIL-6	25	11	pH 2.2
4	1-1-1-1	1-1-1	hIL-6	0.5	16	pH 2.2
4	1-1-2-1	1-1-2	hIL-6	0.05	20	pH 2.2
4	2-1-1-1	2-1-1	hIL-6	0.1	16	pH 2.2
4	2-1-2-1	2-1-2	hIL-6	0.025	20	pH 2.2
4	3-1-1-1	3-1-1	hIL-6	0.025	30	pH 2.2
4	3-1-2-1	3-1-2	hIL-6	0.0025	30	pH 2.2
4	4-1-1-1	4-1-1	hIL-6	1	16	pH 5.45
4	4-1-2-1	4-1-2	hIL-6	0.1	20	pH 5.45
4	5-1-1-1	5-1-1	hIL-6	0.2	16	pH 5.45
4	5-1-2-1	5-1-2	hIL-6	0.05	20	pH 5.45
4	6-1-1-1	6-1-1	mIL-6	10	12	pH 2.2
4	6-2-1-1	6-2-1	mIL-6	1	16	pH 2.2

【0154】

ファージ粒子の増幅：選択サイクル1と2との間のファージ粒子の増幅は、以下の例外を除いて、本質的に実施例1に記載の通りに行った。大腸菌 E R 2 7 3 8 をファージ増幅に使用し、M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージを5倍過剰で使用した。選択サイクル2と4と

10

20

30

40

50

の間のファージ粒子の増幅は、以下のように溶液中の細菌の感染によって実施された。対数期大腸菌 E R 2 7 3 8 のファージ粒子の感染後、2 % グルコース、1 0 μ g / m l テトラサイクリン及び 1 0 0 μ g / m l アンピシリンを補充した T S B を添加し、続いて 3 7 ° C で 3 0 分間回転しながらインキュベートした。その後、細菌に M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージを感染させた。感染した細菌を遠心分離によってペレット化し、1 0 0 μ M の I P T G、2 5 μ g / m l のカナマイシン及び 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを補充した T S B - Y E 培地に再懸濁し、3 0 ° C で一晚増殖させた。一晚培養した物を遠心分離し、上清中のファージ粒子を P E G / N a C l 緩衝液で 2 回沈殿させた。最後に、ファージ粒子を次の選択サイクルに入る前に選択バッファーに再懸濁した。最後の選択サイクルでは、対数期の細菌を溶出液で感染させた、E L I S A スクリーニングに使用するための単一コロニーを形成するために 0 . 2 g / l のアンピシリンを補充した T B A B プレート (3 0 g / l トリプトース血液寒天基質、O x o i d、カタログ番号 C M O 2 3 3 B) に広げる前に希釈した。

10

【0155】

潜在的な結合剤の配列決定：異なる選択トラックからの個々のクローンを配列決定のために選択した。E L I S A スクリーニングで実行された全てのクローンを配列決定した。遺伝子フラグメントの増幅及び遺伝子フラグメントの配列分析は、基本的に実施例 1 に記載したように行った。

【0156】

Z 変異体の E L I S A スクリーニング：Z 変異体を含有する単一コロニー (Z 変異体 A B D 融合タンパク質として発現される) を、I L - 6 成熟ライブラリーの選択されたクローンから無作為に選択し、実施例 1 に記載のように培養した。ペリプラズム上清の調製は、6 回の凍結融解サイクルを有すること以外は、実施例 1 のように実施した。E L I S A スクリーニングは、0 . 5 8 n M の濃度のビオチン化 h I L - 6 を用いて、実施例 1 に記載したように本質的に行った。主要な I L - 6 結合剤 Z 0 6 8 1 4 のペリプラズム画分を陽性対照として用いた。陰性対照は、A B D のみを含むペリプラズムを用いて作製した。

20

【0157】

ヒト I L - 6 結合剤の E L I S A E C 5 0 分析：選択された I L - 6 結合剤を、上記のような E L I S A を用いたビオチン化 h I L - 6 の希釈シリーズに対する応答の分析に供した。ビオチン化タンパク質を 2 5 n M の濃度で添加し、段階的に 1 : 3 希釈して 1 1 p M まで希釈した。全ての Z 変異体もバックグラウンド対照として標的タンパク質を添加せずにアッセイした。主要な I L - 6 結合剤 Z 0 6 8 1 4 (配列番号 1 5 1 2) を含有するペリプラズムサンプルが含まれ、陽性対照として分析した。陰性対照として、A B D のみを含むペリプラズムを、ビオチン化 h I L - 6 に対してアッセイした。m I L - 6 に対する選択に由来する 2 つの結合剤、Z 1 1 6 1 2 (配列番号 1 5 1) 及び Z 1 1 6 1 6 (配列番号 1 5 2) を、上記のように E L I S A を用いてビオチン化 m I L - 6 の希釈シリーズに対する応答に供した。ビオチン化タンパク質を 2 2 7 n M の濃度で添加し、段階的に 1 : 3 希釈して 1 0 4 p M まで希釈した。G r a p h P a d P r i s m 5 及び非線形回帰を用いて得られた値を分析した。

30

【0158】

結果

40

成熟した I L - 6 結合 Z 変異体のファージディスプレイ選択：各 4 サイクルを含む完全に並列の 1 2 トラックで選択した。異なる選択トラックは、標的濃度、標的型 (h I L - 6 又は m I L - 6)、選択時間、洗浄条件及び溶出緩衝液の p H を変えた。

【0159】

シーケンシング：ランダムに選択したクローンを配列決定した。それぞれの個々の Z 変異体には、実施例 1 に記載のように、識別番号 Z # # # # # が与えられた。合計 8 0 9 個の新たなユニークな Z 変異体分子が同定された。

【0160】

5 8 残基の長さの Z 変異体のアミノ酸配列を図 1 及び配列表の配列番号 7、配列番号 1

50

5～89及び配列番号151～871として列挙する。推定IL-6結合モチーフ(BM)は、各配列において8位から36位まで伸びている。これらのZ変異体の各々(BMod)内の完全な3ヘリックスバンドルを構成すると予測される49アミノ酸残基長のポリペプチドのアミノ酸配列は7位から55位まで伸びる。

【0161】

Z変異体のELISAスクリーニング：4回の選択サイクル後に得られたクローンを96ウェルプレートで産生し、ELISAを用いてhIL-6結合活性についてスクリーニングした。全ての無作為に選択されたクローンを分析した。809個のユニークなZ変異体のうち796個が、0.58nMの濃度でhIL-6に対して陰性対照の3倍以上の応答(0.3～2.1AU)を与えることが見出された。hIL-6を選択標的として使用した全ての選択トラックからのクローンは、陽性シグナルを示した。陰性対照は、0.078～0.102AUの吸光度を有していた。代表的なプレートセットのブランク対照の平均応答は0.087AUであった。

10

【0162】

IL-6結合剤のELISA EC50分析：Z変異体のサブセットを、上記のELISA実験の結果(各プレート上の陽性対照に対してそれぞれ正規化した最高のELISA値)に基づいて選択し、ELISAフォーマットにて、標的滴定に供した。ペリプラズムサンプルを、ビオチン化hIL-6又はmIL-6の連続希釈物とともにインキュベートした。主要な結合剤Z06814(配列番号1512)を有するペリプラズムサンプルもまた、陽性対照としてhIL-6に対してアッセイした。得られた値を分析し、それぞれのEC50値を計算した(表8及び9)。

20

【0163】

【表 8】

表 8 : h I L - 6 に対する計算された E C 5 0 値

Z変異体	配列番号	EC50 ELISA (M)	Z変異体	配列番号	EC50 ELISA (M)
Z11213	15	1.5×10^{-10}	Z11823	53	2.1×10^{-10}
Z11214	16	1.3×10^{-10}	Z11824	54	2.3×10^{-10}
Z11215	17	1.4×10^{-10}	Z11833	55	2.9×10^{-10}
Z11217	18	1.3×10^{-10}	Z11835	56	2.9×10^{-10}
Z11222	19	1.4×10^{-10}	Z11836	57	3.6×10^{-10}
Z11251	20	1.4×10^{-10}	Z11860	58	1.8×10^{-10}
Z11277	21	1.2×10^{-10}	Z11861	59	2.2×10^{-10}
Z11278	22	1.5×10^{-10}	Z11862	60	1.9×10^{-10}
Z11283	23	1.8×10^{-10}	Z11865	61	2.3×10^{-10}
Z11300	24	1.9×10^{-10}	Z11866	62	2.5×10^{-10}
Z11321	25	1.4×10^{-10}	Z11871	63	1.7×10^{-10}
Z11329	26	1.4×10^{-10}	Z11872	64	2.8×10^{-10}
Z11351	27	1.7×10^{-10}	Z11874	65	3.1×10^{-10}
Z11380	28	1.7×10^{-10}	Z11875	66	2.1×10^{-10}
Z11384	29	1.5×10^{-10}	Z11881	67	1.7×10^{-10}
Z11433	30	2.1×10^{-10}	Z11882	68	1.4×10^{-10}
Z11472	31	1.8×10^{-10}	Z11883	69	2.1×10^{-10}
Z11552	32	1.2×10^{-9}	Z11890	70	1.9×10^{-10}
Z11632	7	1.9×10^{-10}	Z11892	71	2.3×10^{-10}
Z11642	33	2.3×10^{-10}	Z11893	72	2.0×10^{-10}
Z11644	34	2.4×10^{-10}	Z11895	73	2.8×10^{-10}
Z11674	35	2.6×10^{-10}	Z11896	74	2.9×10^{-10}
Z11698	36	2.0×10^{-10}	Z11897	75	3.0×10^{-10}
Z11711	37	3.5×10^{-10}	Z11901	76	1.7×10^{-10}
Z11723	38	2.5×10^{-10}	Z11903	77	2.3×10^{-10}
Z11781	39	2.9×10^{-10}	Z11904	78	2.4×10^{-10}
Z11784	40	2.7×10^{-10}	Z11905	79	3.1×10^{-10}
Z11788	41	2.5×10^{-10}	Z11906	80	2.5×10^{-10}
Z11789	42	2.4×10^{-10}	Z11907	81	3.6×10^{-10}
Z11791	43	3.4×10^{-10}	Z11912	82	1.8×10^{-10}
Z11794	44	2.2×10^{-10}	Z11918	83	3.2×10^{-10}
Z11802	45	2.6×10^{-10}	Z11922	84	2.7×10^{-10}
Z11803	46	2.8×10^{-10}	Z11923	85	2.1×10^{-10}
Z11805	47	3.4×10^{-10}	Z11929	86	2.6×10^{-10}
Z11814	48	2.5×10^{-10}	Z11933	87	1.6×10^{-10}
Z11815	49	2.8×10^{-10}	Z11937	88	3.0×10^{-10}
Z11817	50	2.5×10^{-10}	Z11939	89	2.1×10^{-10}
Z11818	51	2.4×10^{-10}	Z06814	1512	2.9×10^{-10}
Z11819	52	2.5×10^{-10}			

【 0 1 6 4 】

【表 9】

表 9 : m I L - 6 に対する計算された E C 5 0 値

Z変異体	配列番号	EC50 ELISA (M)
Z11612	151	9.3×10^{-9}
Z11616	152	7.7×10^{-9}

10

【0165】

実施例 5I L - 6 結合 Z 変異体の第 2 成熟ライブラリーの設計及び構築

【0166】

この実施例では、本質的に実施例 4 に記載したように、第 2 成熟ライブラリーを構築した。このライブラリーを I L - 6 結合 Z 変異体の選択に使用した。

【0167】

材料及び方法

ライブラリー設計：ライブラリーは、実施例 4 に記載のヒト I L - 6 結合 Z 変異体の配列の選択に主に基づいた。新しいライブラリーでは、Z 分子骨格中の 13 の可変位置は、主に第 1 の成熟からの Z 変異体、すなわち、配列番号 7、配列番号 15 ~ 89 及び配列番号 151 ~ 871 で定義された配列に基づく戦略に従って、特定のアミノ酸残基にバイアスを有した。無作為の二本鎖リンカーは、後に構築される二本鎖 DNA の連結及び制限を用いて、トリヌクレオチド構築阻害の無作為セットの組み込みを可能にする C o l i b r a (商標) 技術によって生成された。二本鎖 DNA のライブラリーであり、制限部位 X h o I 及び S a c I に隣接する Z 変異体アミノ酸配列の部分的にランダム化されたヘリックス 1 及び 2 をコードする、5' - A A A T A A A A T C T C G A G G T A G A T G C C A A A T A C G C C A A A G A A N N N N N N N N N G C T N N N N N N G A G A T C N N N N N N C T G C C G A A C C T G A C C N N N N N N C A G N N N N N N G C C T T C A T C N N N A A A T T A N N N G A T G A C C C A A G C C A G A G C T C A T T A T T T A - 3' (配列番号 1561 ; ランダム化コドンで N N N と表示する) を I s o g e n i c a (E s s e x , U K) から注文された。Z 分子骨格中に 8 つの可変アミノ酸位置 (10 , 11 , 14 , 18 , 24 , 25 , 27 及び 32) 及び 5 つの定常アミノ酸位置 (9 , 13 , 17 , 28 及び 35) を含む、新規ライブラリー中のアミノ酸残基の理論的分布は、表 10 に示す。得られた理論上のライブラリーサイズは、 2.6×10^7 変異体であった。

20

30

【0168】

ライブラリー構築及びファージストック調製：ライブラリーは、実施例 3 に記載したように基本的には構築された。ライブラリーのファージストックを実施例 3 に記載のように調製した。

40

【0169】

【表 10】

表 10：ライブラリー設計、第2成熟

Z中のアミノ酸位置	許容されるアミノ酸	アミノ酸数	割合
9	E	1	1/1
10	A, D, E, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y	1	1/16
11	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	17	1/18
13	W	1	1/1
14	A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y	7	1/17
17	H	1	1/1
18	A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y	17	1/17
24	I, L, V	1	1/3
25	A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y	10	1/17
27	I, M, V	1	1/3
28	A	12	1/1
32	S, T	16	1/2
35	F	1	1/1

【0170】

結果

ライブラリー構築及びファージストック調製：新規ライブラリーは、結合特性が確認された I L-6 結合 Z 変異体のセット（実施例 4）に基づいて設計された。設計されたライブラリーの理論上のサイズは、 2.6×10^7 個の変異体であった。大腸菌 E R 2 7 3 8 細胞への形質転換後の滴定によって決定されたライブラリーの実際のサイズは、 1.8×10^9 個の形質転換体であった。

【0171】

ライブラリーの品質は、192 の形質転換体の配列決定し、それらの実際の配列を理論的設計と比較することによって試験した。理論上のライブラリーと比較した実際のライブラリーの内容は満足するものであることが示された。従って、I L-6 に対する潜在的な結合剤の成熟したライブラリーがうまく構築された。

【0172】

実施例 6

第2の成熟ライブラリーからの Z 変異体の選択、スクリーニング及び特徴付け

【0173】

材料及び方法

成熟した I L-6 結合 Z 変異体の第2のファージディスプレイ選択：実施例 4 に記載のように、標的タンパク質 h I L-6 をビオチン化した。実施例 5 に記載の Z 変異体分子の第2の成熟化ライブラリーを用いた、ファージディスプレイ選択は、以下の例外を除いて、本質的に実施例 4 に記載の通り、h I L-6 に対して実施した。全てのトラックに対し、サイクル 1 で選択容量は 4 ml であった。サイクル 2 では、選択トラック 1-2 及び 1-3 を 1 本の共通のチューブで取り扱い、最後の 1 分間の洗浄後まで分離せず、その後それらを別々に処理した。サイクル 4 でも、選択トラック 1-1-1-1 から 1-1-1-3、1-1-1-4 から 1-1-1-6、1-1-2-1 から 1-1-2-3 及び 1-1-2-4 から 1-1-2-6 それぞれを共通のチューブに入れ、最後の 1 分間の洗浄後に 3 本の別々のチューブに分割した後、表 11 に要約した異なる洗浄戦略を用いて別々に処理した。実施例 1 に記載のように、グリシン-HCl、pH 2.2 を用いて結合したファ

ージ粒子を溶出させた。選択サイクル間のファージ粒子の増幅は、基本的に実施例 1 に記載したように行った。

【0174】

低くした標的濃度及び洗浄回数の増加の点における、選択トラックの差異を記述する、選択された戦略及び使用したパラメータの概要を、表 11 に示す。

【0175】

潜在的な結合剤の配列決定：異なる選択トラックから個々のクローンを配列決定するために選択した。ELISA スクリーニングに供した全てのクローンの配列決定を行った。遺伝子フラグメントの増幅及び遺伝子フラグメントの配列分析は、基本的に実施例 1 に記載したように行った。

10

【0176】

Z 変異体の ELISA スクリーニング：Z 変異体（実施例 1 に記載の Z 変異体 ABD 融合タンパク質として発現される）を含有する単一のコロニーを、IL-6 第 2 成熟ライブラリーの選択クローンから無作為に選別して、実施例 1 に記載のように培養した。ペリプラズム上清の調製及び ELISA スクリーニングを本質的に実施例 1 に記載したように行い、凍結融解を 150 μ l の 0.05% PBST 中で行い、8 回繰り返した。ビオチン化 hIL-6 を 0.25 nM の濃度で使用した。IL-6 結合剤 Z06814 のペリプラズム画分（配列番号 1512）を、各 ELISA プレート上の陽性対照としてデュプリケートで使用した。陰性対照として、ABD のみを含むペリプラズムを、ビオチン化 hIL-6 に対してアッセイした。

20

【0177】

【表 1 1】

表 1 1：第 2 成熟のための選択戦略の概要

サイクル	選択トラック	ライブラリー又は選択トラック 由来のファージストック	標的濃度 (nM)	1 分洗浄数	4 時間洗浄数	非標識 Z06814 を用いた 4 時 間洗浄数	一晚洗浄数	週末に渡る洗浄数
1	1	Zlib006IL-6A. II	50	5	-	-	-	-
1	2	Zlib006IL-6A. II	10	5	-	-	-	-
2	1-1	1	10	15	-	-	-	-
2	1-2	1	5	15	-	-	-	-
2	1-3	1	5	15	1	-	-	-
2	2-1	2	2.5	12	-	-	-	-
3	1-1-1	1-1	1	5	-	1	-	-
3	1-1-2	1-1	1	5	-	1	-	-
3	1-2-1	1-2	0.5	15	-	-	-	-
3	1-3-1	1-3	0.5	15	-	-	-	-
3	2-1-1	2-1	0.5	12	-	-	-	-
3	2-1-2	2-1	0.1	12	-	-	-	-
4	1-1-1-1	1-1-1	1	5	-	1	-	-
4	1-1-1-2	1-1-1	1	5	-	-	1	-
4	1-1-1-3	1-1-1	1	5	-	-	-	1
4	1-1-1-4	1-1-1	1	5	-	1	-	-
4	1-1-1-5	1-1-1	1	5	-	-	1	-
4	1-1-1-6	1-1-1	1	5	-	-	-	1
4	1-1-2-1	1-1-2	1	5	-	1	-	-
4	1-1-2-2	1-1-2	1	5	-	-	1	-
4	1-1-2-3	1-1-2	1	5	-	-	-	1
4	1-1-2-4	1-1-2	1	5	-	1	-	-
4	1-1-2-5	1-1-2	1	5	-	-	1	-
4	1-1-2-6	1-1-2	1	5	-	-	-	1
4	1-2-1-1	1-2-1	0.5	15	-	-	-	-
4	1-2-1-2	1-2-1	0.5	15	1	-	-	-
4	1-3-1-1	1-3-1	0.5	15	-	-	-	-
4	2-1-1-1	2-1-1	0.5	12	-	-	-	-
4	2-1-2-1	2-1-2	0.1	12	-	-	-	-

【0 1 7 8】

IL-6 結合剤の ELISA EC50 分析：選択された IL-6 結合剤を、実施例 2 に記載の ELISA を用いて、ビオチン化 hIL-6 の連続希釈に対する応答に供した。

ビオチン化タンパク質を 5 nM の濃度で添加し、段階的に 1 : 3 で希釈し、83 fM まで希釈した。バックグラウンド対照として、全ての Z 変異体もまた、標的タンパク質を添加せずにアッセイした。主要な IL-6 結合剤 Z06814（配列番号 1512）並びに成熟結合剤 Z11632（配列番号 7）を含有するペリプラズムサンプルを陽性対照として含めた。陰性対照として、ABDのみを含むペリプラズムを、ビオチン化 hIL-6 に対してアッセイした。GraphPad Prism 5 及び非線形回帰を用いて得られた値を分析した。

【0179】

結果

成熟した IL-6 結合 Z 変異体の第 2 のファージディスプレイ選択：各トラックは 4 つのサイクルを含み、合計 17 の並行トラックで選択を実施した。選択トラックは、表 11 に概説されているように、標的濃度、選択時間及び洗浄条件が異なっていた。

10

【0180】

潜在的な結合剤の配列決定：ランダムに選択されたクロンの配列決定を行った。それぞれ個々の Z 変異体には、実施例 1 に記載のように、識別番号 Z#### が与えられた。合計 707 個の新規ユニークな Z 変異体分子が同定された。58 残基長の Z 変異体のアミノ酸配列を図 1 及び配列番号 1～6、配列番号 8～14、配列番号 90～150 及び配列番号 872～1502 として配列表に列挙されている。推定 IL-6 結合モチーフ（BM）は、各配列の 8 位から 36 位に伸びる。これらの Z 変異体の各々（BMod）内の完全な 3 ヘリックスバンドルを構成すると予測される 49 アミノ酸残基長のポリペプチドの

20

アミノ酸配列は、7 位から 55 位まで伸びる。

【0181】

Z 変異体の ELISA スクリーニング：4 つの選択サイクル後に得られたクロンを 96 ウェルプレートで産生し、ELISA を用いてヒト IL-6 結合活性についてスクリーニングした。全ての無作為に選択されたクロンを分析した。707 個のユニークな Z 変異体のうち 705 個は、陰性対照の 3 倍又は 0.25 nM の濃度の hIL-6 に対する応答（0.3～2.3 AU）を与えることが見出された。全ての選択トラックに由来するクロンについて陽性シグナルが示された。プレート上の陰性対照の平均応答は 0.085 AU であった。

【0182】

IL-6 結合剤の ELISA EC50 分析：Z 変異体のサブセットを、上記の ELISA 実験の結果に基づいて選択した。各プレート上のデュプリケート陽性対照 Z06814（配列番号 1512）の平均応答に対する応答を標準化した後、1.6 AU を超える吸光度又は 1.7 を超える応答を示す Z 変異体の全てを、実施例 4 に記載のように ELISA フォーマットで標的滴定に供した。成熟した結合剤 Z11632（配列番号 7）並びに主要な結合剤 Z06814（配列番号 1512）を有するペリプラズムサンプルも陽性対照としてアッセイした。得られた値を分析し、それぞれの EC50 値を計算した（表 12）。

30

【0183】

【表 1 2】

表 1 2 : 第 2 の成熟及び陽性対照 Z 0 6 8 1 4 及び Z 1 1 6 3 2 からの Z 変異体の E L I S A 滴定分析から計算された E C 5 0 値

Z変異体	配列番号	EC50 ELISA (M)	Z変異体	配列番号	EC50 ELISA (M)
Z14521	90	2.3×10^{-10}	Z14878	123	2.9×10^{-10}
Z14524	91	2.7×10^{-10}	Z14888	124	2.2×10^{-10}
Z14525	92	2.5×10^{-10}	Z14929	125	2.1×10^{-10}
Z14538	93	3.2×10^{-10}	Z14944	126	1.9×10^{-10}
Z14547	94	2.5×10^{-10}	Z14976	1	1.6×10^{-10}
Z14550	95	2.7×10^{-10}	Z14984	5	1.6×10^{-10}
Z14551	96	2.6×10^{-10}	Z14990	127	2.5×10^{-10}
Z14556	97	2.8×10^{-10}	Z14992	128	2.8×10^{-10}
Z14559	98	2.3×10^{-10}	Z15003	129	3.0×10^{-10}
Z14596	99	2.4×10^{-10}	Z15015	2	1.8×10^{-10}
Z14609	100	3.0×10^{-10}	Z15024	130	3.1×10^{-10}
Z14614	101	3.8×10^{-10}	Z15025	131	2.1×10^{-10}
Z14620	102	3.1×10^{-10}	Z15031	132	2.1×10^{-10}
Z14630	6	2.5×10^{-10}	Z15036	11	2.4×10^{-10}
Z14634	103	2.3×10^{-10}	Z15042	133	2.2×10^{-10}
Z14645	104	2.5×10^{-10}	Z15053	134	2.4×10^{-10}
Z14651	105	2.4×10^{-10}	Z15057	135	2.3×10^{-10}
Z14662	106	2.7×10^{-10}	Z15067	136	2.2×10^{-10}
Z14673	107	2.3×10^{-10}	Z15079	137	2.1×10^{-10}
Z14700	8	2.4×10^{-10}	Z15082	138	2.2×10^{-10}
Z14706	108	2.3×10^{-10}	Z15097	139	2.2×10^{-10}
Z14710	109	2.6×10^{-10}	Z15102	140	2.1×10^{-10}
Z14712	9	2.6×10^{-10}	Z15110	12	2.0×10^{-10}
Z14720	110	2.2×10^{-10}	Z15111	141	2.3×10^{-10}
Z14722	111	3.2×10^{-10}	Z15117	142	2.1×10^{-10}
Z14731	112	2.1×10^{-10}	Z15122	3	1.7×10^{-10}
Z14746	113	2.8×10^{-10}	Z15126	13	1.5×10^{-10}
Z14765	114	2.7×10^{-10}	Z15129	143	2.1×10^{-10}
Z14767	115	2.4×10^{-10}	Z15140	144	2.1×10^{-10}
Z14782	116	2.4×10^{-10}	Z15141	145	2.3×10^{-10}
Z14783	117	2.4×10^{-10}	Z15142	14	1.6×10^{-10}
Z14784	118	2.5×10^{-10}	Z15145	146	2.3×10^{-10}
Z14788	119	3.0×10^{-10}	Z15151	147	1.9×10^{-10}
Z14829	120	2.7×10^{-10}	Z15159	148	1.8×10^{-10}
Z14861	4	2.3×10^{-10}	Z15162	149	1.8×10^{-10}
Z14862	10	2.2×10^{-10}	Z15164	150	2.0×10^{-10}
Z14867	121	2.6×10^{-10}	Z06814	1512	3.2×10^{-10}
Z14868	122	2.8×10^{-10}	Z11632	7	2.5×10^{-10}

【 0 1 8 4 】

実施例 7

I L - 6 結合 Z 変異体のサブセットのサブクロニング、生産及び特性決定

10

20

30

40

50

【0185】

この実施例では、親和性成熟 I L-6 結合 Z 変異体のサブセットを作製し、S P R、E L I S A、細胞ベースのアッセイ及び C D によって機能的に評価した。S P R は、I L-6 と相互作用する Z 変異体の動態パラメータを測定するために使用した。競合 E L I S A を、ヒト I L-6 タンパク質に対する Z 変異体の結合様式を調べるために適用した。T F-1 細胞に基づくアッセイを適用して、I L-6 依存性シグナル伝達を阻害する Z 変異体の能力を評価した。C D を使用して、Z 変異体の二次構造を調べ、それらの融解温度を決定した。

【0186】

材料及び方法

Z 変異体の発現ベクターへのサブクロニング：14 の I L-6 結合 Z 変異体、Z 1 1 6 3 2（配列番号 7）、Z 1 4 6 3 0（配列番号 6）、Z 1 4 7 0 0（配列番号 8）、Z 1 4 7 1 2（配列番号 9）、Z 1 4 8 6 1（配列番号 4）、Z 1 4 8 6 2（配列番号 10）、Z 1 4 9 7 6（配列番号 1）、Z 1 4 9 8 4（配列番号 5）、Z 1 5 0 1 5（配列番号 2）、Z 1 5 0 3 6（配列番号 11）、Z 1 5 1 1 0（配列番号 12）、Z 1 5 1 2 2（配列番号 3）、Z 1 5 1 2 6（配列番号 13）及び Z 1 5 1 4 2（配列番号 14）の D N A は、ベクター p A Y 0 2 5 9 2 から増幅した。サブクロニングを実施例 2 に記載のように実施した。Z 遺伝子フラグメントを発現ベクター p A Y 0 1 4 4 8 にサブクロニングし、コードされた配列 M G S S H H H H H L Q- [Z # # # # #]-V D を得た。

【0187】

変性条件下でのタンパク質の発現及び精製：各 I L-6 結合 Z 変異体の遺伝子フラグメントを含むプラスミドを用いて大腸菌（E. coli）R o s e t t a 細胞（N o v a g e n）を形質転換し、50 μ g/ml カナマイシンを補充した 100 ml の T S B-Y E 培地中で 37 $^{\circ}$ C にて培養した。O D₆₀₀ = 0.8 で最終濃度 1 mM にて I P T G を添加することにより発現を誘導し、培養物を 25 $^{\circ}$ C でさらに 16 ~ 20 時間インキュベートした。遠心分離により細胞を回収した。

【0188】

タンパク質精製は、本質的に実施例 2 に記載したような変性条件下で行った。タンパク質濃度は、それぞれのタンパク質の吸光係数を用いて 280 nm での吸光度を測定することによって決定した。I L-6 結合 Z 変異体の純度を、クーマシーブルーで染色した S D S-P A G E により分析した。

【0189】

天然の条件下でのタンパク質発現及び精製：主要な Z 変異体 Z 0 6 8 1 4（配列番号 1512）並びに対照 Z 変異体 Z 0 4 7 2 6（配列番号 1553）の成熟変異体 Z 1 1 6 3 2（配列番号 7）、Z 1 4 6 3 0（配列番号 6）、Z 1 4 7 0 0（配列番号 8）、Z 1 4 7 1 2（配列番号 9）、Z 1 4 8 6 1（配列番号 4）、Z 1 4 8 6 2（配列番号 10）、Z 1 4 9 7 6（配列番号 1）、Z 1 4 9 8 4（配列番号 5）、Z 1 5 0 1 5（配列番号 2）、Z 1 5 0 3 6（配列番号 11）、Z 1 5 1 1 0（配列番号 12）、Z 1 5 1 2 2（配列番号 3）、Z 1 5 1 4 2（配列番号 14）の遺伝子フラグメントを含むプラスミドで大腸菌 B L 2 1（D E 3）細胞（N E B、カタログ番号 C 2 5 2 7 I）に形質転換した。形質転換された細菌細胞を、50 μ g/ml のカナマイシンを補充した 1000 ml の L B 培地中、37 $^{\circ}$ C で培養した。タンパク質発現を誘導するために、O D₆₀₀ = 0.8 で I P T G を 0.1 mM の最終濃度まで加え、培養物を 25 $^{\circ}$ C で 17 時間インキュベートした。4 $^{\circ}$ C 及び 8000 rpm で 30 分間遠心分離することにより細胞を回収した。上清を捨て、細胞ペレットを 10 ml の P B S に再懸濁した。超音波処理による細胞破壊の後、遠心分離によって細胞破片を除去し、各上清を、20 ml の洗浄緩衝液（20 mM N a H₂ P O₄、10 mM N a C l、20 mM イミダゾール、pH 6.0）で平衡化した 2 ml の N i-NTA カラム（Q I A G E N、カタログ番号 30410）イミダゾール、pH 6.0 に適用した。汚染物を洗浄緩衝液で洗浄することにより除去し、Z 変異体を溶出緩衝液（20 mM N a H₂ P O₄、10 mM N a C l、250 mM イミダゾール、pH 6

10

20

30

40

50

．0)で溶出した。溶出液をイオン交換カラム(Life Technologies、カタログ番号4481317)で精製し、Z変異体を塩濃度の増加によって溶出させた。次いで、VIVASPIN6カラム(Sartorius、カタログ番号VS0691)を用いて、溶出液の緩衝液溶液をPBS(10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、137mM NaCl、2.7mM KCl)に交換した。Z変異体の純度を、クーマシーブルーで染色したSDS-PAGEにより分析した。

【0190】

Protein動態分析：ヒトIL-6の動態定数(k_{on} 及び k_{off})及び親和性(K_D)を、変性条件下で精製した6つのHis₆タグ付きZ変異体について決定した。IL-6結合変異体Z06814(配列番号1512)、Z14861(配列番号4)、Z014976(配列番号1)、Z14984(配列番号5)、Z15015(配列番号2)、及びZ15122(配列番号3)を、10mM NaAc緩衝液、pH4.5中で5µg/mlに希釈し、GLCチップ(Bio-Rad、カタログ番号176-5011)に別々に固定した。製造元の推奨に従ってアミンカップリング化学を用いて固定し、ランニング緩衝液として0.05%PBSTを使用した。60µl/分である流速を使用する動態実験において、ランニング緩衝液としてPBST0.05%も使用した。分析物hIL-6を、最終濃度50nM、12.5nM、3.1nM、0.78nM、0.19nM及び0nMになるように0.05%PBSTランニング緩衝液で希釈し、3分間にトリプリケートで注入し、続いてランニング緩衝液で90分間、解離させた。解離後、0.05%Tween 20を補充したHClで表面を再生した。Bio-Rad manager Software(Bio-Rad)の1:1モデルを用いてセンサーグラムから動態定数を計算した。

【0191】

結合部位の分析：ヒトgp130(hgp130)とhIL-6/hIL-6Rα複合体の間の相互作用を有する14の成熟IL-6結合Z変異体(変性条件下で精製)の干渉を、実施例2に記載のように評価した。Z06814及びhIL-6Rα結合抗体トシリズマブを比較のために含めた。

【0192】

TF-1細胞ベースアッセイ：TF-1細胞を、10%FBS(Hyclone、カタログ番号SH30919.03)、Pen-Strep(Hyclone、カタログ番号15140-163)、及び2ng/mlのrhGM-CSF(R&D Systems、カタログ番号215-GM-010)を添加した、L-グルタミン(Hyclone、カタログ番号SH30027)を有するRPMI1640中で培養した。使用前に、rhGM-CSFの非存在下でRPMI-1640中で細胞を2回洗浄した。次いで、細胞を計数し、96ウェルプレート(Corning、カタログ番号3596)中に 4×10^4 細胞/ウェルの密度で分注した。別個のプレートにおいて、Z変異体(非変性条件下で精製された)、トシリズマブ(Roche)及び対照IgG(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号Jac-009-000-003)の連続希釈物(濃度範囲10~0.00061nM)を、0.099nMのrhIL-6(R&D Systems、カタログ番号206-IL/CF)の存在下で培養した。次に、これらのプレ混合物を、TF-1細胞を含むウェルに移し、37℃、加湿5%CO₂雰囲気下で72時間インキュベートした。インキュベーションの最後の4時間の間に、ウェル当たり10µlのWST(DoGen、カタログ番号EZ3000)をウェルに含めた。Victor X3プレートリーダー(Perkin Elmer)を用いて450nmで吸光度を測定した。各ウェルの吸光度を各プレート中のIL-6処理ウェルの平均吸光度で割ることにより、相対的な細胞生存率を計算した。データは、4パラメータ用量反応曲線に対して非線形回帰によって評価し、最大半阻害濃度(IC50)はGraphpad Prismソフトウェアを用いて測定した。

【0193】

CD分析：CD分析は、非変性条件下で精製されたZ変異体を用いて実施例2に記載の

ように実施した。

【0194】

結果

Protein動態分析：6つのHis₆タグ化IL-6結合Z変異体とヒトIL-6との相互作用を、異なる固定化Z変異体を含む表面上で様々な濃度のhIL-6を注入することによりProtein装置で分析した。表面のリガンド固定化レベルは、それぞれ100～220RUであった。1：1相互作用モデルを用いたhIL-6のZ変異体への結合に関する速度論的パラメータ (K_D 、 k_a (k_{on}) 及び k_d (k_{off})) の概要を表13に示す。

【0195】

【表13】

10

表13：Z変異体へのhIL-6結合の動力的パラメータ

Z変異体	配列番号:	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
His ₆ -Z06814	1512	4.3×10^5	8.8×10^{-5}	2.0×10^{-10}
His ₆ -Z14861	4	3.6×10^5	6.3×10^{-5}	1.7×10^{-10}
His ₆ -Z14976	1	3.1×10^5	2.7×10^{-5}	8.8×10^{-11}
His ₆ -Z14984	5	3.0×10^5	7.4×10^{-5}	2.5×10^{-10}
His ₆ -Z15015	2	4.3×10^5	7.2×10^{-5}	1.7×10^{-10}
His ₆ -Z15122	3	3.1×10^5	3.9×10^{-5}	1.2×10^{-10}

20

【0196】

結合部位の分析：全ての成熟IL-6結合Z変異体は、予め形成したhIL-6/hIL-6R α 複合体とhgp130との間のトランスシグナル伝達に似た相互作用の明確な濃度依存的阻害を示した（図5）。各成熟Z変異体は、主要な結合剤Z06814及びトシリズマブよりも高い阻害能を示した。すなわち、それは、1.6nM未満のIC50値に相当する。

【0197】

TF-1細胞に基づくアッセイ：TF-1細胞に基づくアッセイを実施して、古典的なシグナル伝達経路におけるIL-6結合Z変異体の有効性及び効力を評価した。このアッセイは、全ての親和性成熟IL-6結合Z変異体がTF-1細胞のIL-6依存性増殖を阻止できることを示した（図6）。Z変異体及びhIL-6R α 結合抗体トシリズマブについての計算されたIC50値を表14に示す。

【0198】

30

【表 1 4】

表 1 4 : T F - 1 細胞の I L - 6 依存性増殖を阻害する成熟 Z 変異体の I C 5 0 値

Z変異体	配列番号:	IC50 (M)
His ₆ -Z11632	7	1.2×10^{-10}
His ₆ -Z14630	6	8.7×10^{-11}
His ₆ -Z14700	8	1.0×10^{-10}
His ₆ -Z14712	9	2.2×10^{-10}
His ₆ -Z14861	4	1.9×10^{-10}
His ₆ -Z14862	10	4.3×10^{-10}
His ₆ -Z14976	1	4.2×10^{-11}
His ₆ -Z14984	5	2.7×10^{-10}
His ₆ -Z15015	2	2.7×10^{-11}
His ₆ -Z15036	11	1.8×10^{-10}
His ₆ -Z15110	12	9.3×10^{-10}
His ₆ -Z15122	3	8.5×10^{-11}
His ₆ -Z15142	14	5.1×10^{-10}
His ₆ -Z06814	1512	1.3×10^{-10}
トシリズマブ	N/A	4.1×10^{-10}

【0 1 9 9】

C D 分析 : 1 0 個の成熟 Z 変異体について決定された C D スペクトルは、それぞれが 2 0 °C で α - ヘリックス構造を有することを示した。可変温度測定によって決定された融解温度 (T m) を表 1 5 に示す。

【0 2 0 0】

【表 1 5】

表 1 5 : 成熟した Z 変異体のサブセットの融解温度

Z変異体	配列番号:	Tm (° C)
His ₆ -Z11632	7	51
His ₆ -Z14630	6	57
His ₆ -Z14700	8	53
His ₆ -Z14712	9	55
His ₆ -Z14861	4	48
His ₆ -Z14862	10	53
His ₆ -Z15015	2	56
His ₆ -Z15036	11	59
His ₆ -Z15110	12	50
His ₆ -Z15142	14	53

【0 2 0 1】

実施例 8

A B D との融合における I L - 6 結合 Z 変異体のインビボ活性

【0 2 0 2】

A B D との融合における I L - 6 結合 Z 変異体のインビボでの阻害効果を探索するため

に、血清アミロイドA (SAA) マウスモデルを使用した。急性期タンパク質SAAは、肝細胞から分泌され、炎症誘発性サイトカインIL-1、IL-6及びTNFによって誘導され得る。ヒト及びマウスサイトカインの配列相同性のために、ヒト変異体は、対応するマウス受容体に作用し、マウスSAA応答を誘導することができる。ヒトTNFタンパク質はマウスTNFR I I (マウスTNFR Iではない) とのみ相互作用することができることに留意されたい。

【0203】

材料及び方法

IL-6 標的 Z 変異体 Z06814 (配列番号1512) 及び無関係の標的に結合する対照 Z 変異体 Z04726 (配列番号1535) をクローニングし、実施例2に記載のように、ABD変異体 PP013 (配列番号1554) と融合させた。Balb/cマウスの4つの群 (n=8) に、5 µg/kg の hIL-6 (R&D Systems) の腹腔内 (ip) 投与9時間後に、Z06814-ABDを様々な用量 (0, 0.025, 2.5又は25 mg/kg 体重) を皮下 (sc) に注射した。第5群のマウス (n=8) は、25 mg/kg の Z04726-ABDを受けた。マウスの2つのさらなる対照群は、それぞれPBS (n=4) 及び25 mg/kg の Z06814-ABD (n=8) を受けたが、その後IL-6注射はしなかった。20時間後、血液を心穿刺により採取し、血清を採取した。

【0204】

ELISA (Tridelita) によるマウスSAAの含有量について、製造元の指示に従って血清を評価した。簡単に説明すると、希釈した血清サンプルを抗SAA-HRPとともにSAA-プレコートプレートに添加した。プレートを1時間インキュベートし、次いで4回洗浄した。TMB基質を20分間添加し、停止溶液で反応を停止させた。吸光度は、マイクロプレートリーダー (Victor³, Perkin Elmer) を用いて450 nmで測定した。

【0205】

結果

Z変異体 Z06814 (配列番号1512) の抗関節炎効果を、IL-6 誘発血清アミロイド-A (SAA) タンパク質放出をマウスモデルを用いて、インビボで評価した。4群のマウスに、5 µg/kg 体重の hIL-6 を注射する9時間前に、0, 0.025、2.5又は25 mg/kg 体重の IL-6 結合 Z06814-ABD 融合タンパク質又は25 mg/kg の対照 Z04726-ABD 融合タンパク質を与えた。さらに22時間後、SAAタンパク質のレベルを測定し、異なる群間で比較した。Z06814-ABD無し又は25 mg/kg の対照 Z04726-ABD 融合物を投与していない動物では、血清中のSAAタンパク質レベルは約500~600 µg/ml のレベルまで増加した。PBSのみ (及びhIL-6なし) を与えた対照動物は、16~64 µg/ml の範囲のレベルを示した。Z06814-ABDを与えられた動物では、有意に低いSAAタンパク質レベルが用量依存的に測定された (図7)。最も高い用量の Z06814-ABD (25 mg/kg 体重) を与えられた群では、SAAタンパク質レベルは、hIL-6注射されていない動物ほど低かった。

【0206】

発明の実施の形態のリスト

【0207】

1. IL-6 結合モチーフBMを含む、IL-6 結合ポリペプチドであって、前記IL-6 結合モチーフが：

i) EEX₃X₄AWX₇EIHXX₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QX₂₀X₂₁AFIX₂₅X₂₆LX₂₈X₂₉

(式中、互いに独立して、

X₃が、A、F、H、K、Q、R、S、W及びYから選択され；

X₄が、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V及びYから選

択され；

X₇が、F、H、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W及びYから選択され；

X₁₁が、A、I、K、L、M、N、R、S、T及びVから選択され；

X₁₆が、N及びTから選択され；

X₁₇が、A、I、T及びV；

X₁₈が、D、E、G、H、K、N、Q、R、S及びTから選択され；

X₂₀が、I、L、M、R、T及びVから選択され；

X₂₁が、A、S、T及びVから選択され；

X₂₅が、I、M、Q、S、T、V及びWから選択され；

X₂₆が、K及びSから選択され；

10

X₂₈が、F、L、M及びYから選択され；並びに、

X₂₉が、D及びRから選択される）

及び、

i i) i) で定義された配列と少なくとも93%の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列からなる、IL-6結合ポリペプチド。

【0208】

2. 項目1のIL-6結合ポリペプチドであり、前記配列i)において：

X₃が、A、H、K、Q、R及びYから選択され；

X₄が、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V及びYから選
択され；

20

X₇が、F、H、I、K、L、M、N、R、T、V、W及びYから選択され；

X₁₁が、A、I、K、L、N、S、T及びVから選択され；

X₁₆が、Tであり；

X₁₇が、A、I、T及びV；

X₁₈が、D、E、H、K、N、Q、R、S及びTから選択され；

X₂₀が、I、L、M、R及びVから選択され；

X₂₁が、A、S及びVから選択され；

X₂₅が、I、Q、S、T、V及びWから選択され；

X₂₆が、Kであり；

X₂₈が、F、L、M及びYから選択され；並びに、

30

X₂₉が、Dである、

IL-6結合ポリペプチド。

【0209】

3. 前記配列が、11の条件I~XI：

I. X₃が、K及びRから選択される；

II. X₁₁が、A及びLから選択される；

III. X₁₆が、Tである；

IV. X₁₇が、I及びVから選択される；

V. X₁₈が、D及びEから選択される；

VI. X₂₀が、Mである；

40

VII. X₂₁が、Aである；

VIII. X₂₅が、S及びTから選択される；

IX. X₂₆が、Kである；

X. X₂₈が、F；並びに

XI. X₂₉が、Dである、

の少なくとも6つを満たす、項目1又は2に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0210】

4. 前記配列i)が、11の条件I~XIの少なくとも7つを満たす、項目3に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0211】

50

5. 前記配列 i) が、11 の条件 I ~ XI の少なくとも 8 つを満たす、項目 4 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0212】

6. 前記配列 i) が、11 の条件 I ~ XI の少なくとも 9 つを満たす、項目 5 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0213】

7. 前記配列 i) が、11 の条件 I ~ XI の少なくとも 10 を満たす、項目 6 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0214】

8. 前記配列 i) が、11 の条件 I ~ XI の全てを満たす、項目 7 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 10

【0215】

9. $X_{17}X_{20}X_{21}$ が、VMA 及び IMA から選択される、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0216】

10. $X_{20}X_{21}X_{28}$ が、MAF である、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0217】

11. $X_{17}X_{20}X_{28}$ が、VMF 及び IMF から選択される、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 20

【0218】

12. $X_{17}X_{21}X_{28}$ が、VAF 及び IAF から選択される、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0219】

13. 前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 1551 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0220】

14. 前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 1502 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 13 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 30

【0221】

15. 前記配列 i) が、配列番号 7、配列番号 15 ~ 89 及び配列番号 151 ~ 871 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 14 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0222】

16. 前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 6、配列番号 8 ~ 14、配列番号 90 ~ 150 及び配列番号 872 ~ 1502 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 14 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0223】

17. 前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 152 及び配列番号 1503 ~ 1515 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 13 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 40

【0224】

18. 前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 150 及び配列番号 1503 ~ 1515 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 17 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0225】

19. 前記配列 i) が、配列番号 1 ~ 152 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 17 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0226】

20. 前記配列 i) が、配列番号 1～150 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 18 又は 19 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0227】

21. 前記配列 i) が、配列番号 7、配列番号 15～89 及び配列番号 151～152 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 19 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0228】

22. 前記配列 i) が、配列番号 1～6、配列番号 8～14 及び配列番号 90～150 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 20 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

10

【0229】

23. 前記配列 i) が、配列番号 1～14 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 18 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0230】

24. 前記配列 i) が、配列番号 1～14 及び配列番号 1512 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 23 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0231】

25. 前記配列 i) が、配列番号 1～14 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 24 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

20

【0232】

26. 前記配列 i) が、配列番号 1～5 からなる群から選択される配列の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 16、22 及び 25 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0233】

27. 前記配列 i) が、配列番号 1512 の 8 位から 36 位の配列に相当する、項目 24 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0234】

28. 前記 IL-6 結合モチーフが、3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインの一部を形成する、項目 1～27 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

30

【0235】

29. 前記 IL-6 結合モチーフが、本質的に相互連結ループを有する 2 つのヘリックスの一部を形成し、前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメイン内に存在する、項目 28 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0236】

30. 前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインが、細菌受容体ドメインから選択される、項目 29 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0237】

31. 前記 3 ヘリックスバンドルタンパク質ドメインが、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来のプロテイン A のドメイン又はその誘導体から選択される、項目 30 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

40

【0238】

32. 前記 IL-6 結合ポリペプチドが、結合モジュール BMod を含み、前記結合モジュール BMod のアミノ酸配列が：

i i i) K-[BM]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLX_dX_eX_fQ

(式中、[BM] は、

X₂₉ が、D であり；

X_a が、A 及び S から選択され；

X_b が、N 及び E から選択され；

50

X_c が、A、S及びCから選択され；

X_d が、E、N及びSから選択され；

X_e が、D、E及びSから選択され；

X_f が、A及びSから選択されるもので提供される項目1～27のいずれか1項に定義されるIL-6結合モチーフである）；及び、

i v) i i i) によって定義される配列と少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列、

から選択される、項目1～31のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0239】

33. 前記IL-6結合ポリペプチドが、結合モジュールBMo dを含み、前記結合モジュールBMo dのアミノ酸配列が：

v) $K-[BM]-QPEQSX_aX_bLLX_cEAKKLX_dX_eX_fQ$

(式中、[BM]は、

X_{29} が、Rであり；

X_a が、A及びSから選択され；

X_b が、N及びEから選択され；

X_c が、A、S及びCから選択され；

X_d が、E、N及びSから選択され；

X_e が、D、E及びSから選択され；

X_f が、A及びSから選択されるもので提供される項目1～27のいずれか1項に定義されるIL-6結合モチーフである）；及び、

v i) v) によって定義される配列と少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列、
から選択される、項目1～31のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0240】

34. 前記配列i i i) が、配列番号1～1551からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目1～32のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0241】

35. 前記配列i i i) が、配列番号1～1502からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目34に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0242】

36. 前記配列i i i) が、配列番号7、配列番号15～89及び配列番号151～871からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目35に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0243】

37. 前記配列i i i) が、配列番号1～6、配列番号8～14、配列番号90～150及び配列番号872～1502からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目35に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0244】

38. 前記配列i i i) が、配列番号1～152及び配列番号1503～1515からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目34に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0245】

39. 前記配列i i i) が、配列番号1～150及び配列番号1503～1515からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目38に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0246】

40. 前記配列i i i) が、配列番号1～152からなる群から選択される配列の7位から55位の配列に相当する、項目35又は38に記載のIL-6結合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【0247】

41. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1～150 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 39 又は 40 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0248】

42. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 7、配列番号 15～89 及び配列番号 151～152 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 40 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0249】

43. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1～6、配列番号 8～14 及び配列番号 90～150 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 41 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

10

【0250】

44. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1～14 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 39 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0251】

45. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1～14 及び配列番号 1512 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 44 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0252】

46. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1～14 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 45 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

20

【0253】

47. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1～5 からなる群から選択される配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 37、43 及び 46 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0254】

48. 前記配列 $i i i$ が、配列番号 1512 の配列の 7 位から 55 位の配列に相当する、項目 39 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0255】

49. 前記 IL-6 結合ポリペプチドが、以下：

$v i i$) Y A - [B M o d] - A P

(式中、[BMod] は、項目 32～48 のいずれか 1 項に定義される IL-6 結合モジュールである)；及び、

$v i i i$) $v i i$) で定義される配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1～48 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

30

【0256】

50. 前記 IL-6 結合ポリペプチドが、以下：

$i x$) F N - [B M o d] - A P

(式中、[BMod] は、項目 32～48 のいずれか 1 項に定義される IL-6 結合モジュールである)；及び、

x) $i x$) で定義される配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1～48 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

40

【0257】

51. A D N N F N K - [B M] - D P S Q S A N L L S E A K K L N E S Q A P K ;

A D N K F N K - [B M] - D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K ;

A D N K F N K - [B M] - D P S V S K E I L A E A K K L N D A Q A P K ;

50

ADAQQNNFNK- [BM] -DPSQSTNVLGAEAKKLNESQAPK ;
 AQHDE- [BM] -DPSQSANVLGEAQKLND SQAPK ;
 VDNKFNK- [BM] -DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK ;
 AEAKYAK- [BM] -DPSESELLEAEAKKLNKSQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNDAQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNDSQAPK ;
 AEAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNDSQAPK ;
 AEAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLSESQAPK ;
 AEAKYAK- [BM] -QPEQSSSELLEAEAKKLSESQAPK ;
 AEAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLESSQAPK ;
 AEAKYAK- [BM] -QPEQSSSELLEAEAKKLESSQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNDSQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLSESQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -QPEQSSSELLEAEAKKLSESQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLESSQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -QPEQSSSELLEAEAKKLESSQAPK ;
 VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNKAQAPK ; 及び
 AEAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNKAQAPK ;

10

20

(式中、[BM] は、項目 1～27 のいずれか 1 項に定義される IL-6 結合モチーフである)

から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1～50 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0258】

52. xi) VDAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNDSQAPK ;

(式中、[BM] は、項目 1～27 のいずれか 1 項に定義された IL-6 結合モチーフである)、及び、

xi i) xi) で定義された配列と少なくとも 89% の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1～49 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

30

【0259】

53. 項目 1～49 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチドであり、

xi i i) AEAKYAK- [BM] -DPSQSSSELLEAEAKKLNDSQAPK ;

(式中、[BM] は、項目 1～27 のいずれか 1 項に定義された IL-6 結合モチーフである)、及び、

xi v) xi i i) で定義した配列と少なくとも 89% の同一性を有するアミノ酸配列、から選択されるアミノ酸配列を含む、IL-6 結合ポリペプチド。

40

【0260】

54. 前記配列 xi) が、配列番号 1～1551 からなる群から選択される、項目 52 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0261】

55. 前記配列 xi) が、配列番号 1～1502 からなる群から選択される、項目 54 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0262】

56. 前記配列 xi) が、配列番号 7、配列番号 15～89 及び配列番号 151～871 からなる群から選択される、項目 55 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0263】

57. 前記配列 xi) が、配列番号 1～6、配列番号 8～14、配列番号 90～150

50

及び配列番号 872～1502 からなる群から選択される、項目 55 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0264】

58. 前記配列 x i) が、配列番号 1～152 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される、項目 54 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0265】

59. 前記配列 x i) が、配列番号 1～150 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される、項目 58 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0266】

60. 前記配列 x i) が、配列番号 1～152 からなる群から選択される、項目 55 又は 58 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 10

【0267】

61. 前記配列 x i) が、配列番号 1～150 からなる群から選択される、項目 59 又は 60 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0268】

62. 前記配列 x i) が、配列番号 7、配列番号 15～89 及び配列番号 151～152 からなる群から選択される、項目 60 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0269】

63. 前記配列 x i) が、配列番号 1～6、配列番号 8～14 及び配列番号 90～150 からなる群から選択される、項目 61 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 20

【0270】

64. 前記配列 x i) が、配列番号 1～14 及び配列番号 1503～1515 からなる群から選択される、項目 59 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0271】

65. 前記配列 x i) が、配列番号 1～14 及び配列番号 1512 からなる群から選択される、項目 64 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0272】

66. 前記配列 x i) が、配列番号 1～14 からなる群から選択される、項目 65 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0273】

67. 前記配列 x i) が、配列番号 1～5 からなる群から選択される、項目 57、63 及び 66 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 30

【0274】

68. 前記配列 x i) が、配列番号 1512 である、項目 65 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0275】

69. シス-シグナル伝達経路及び／又はトランス-シグナル伝達経路を介して IL-6 依存性シグナル伝達を阻害することができる、項目 1～68 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0276】

70. 阻害する半最大阻害濃度 (IC50) が最大で 1×10^{-6} M、例えば最大で 1×10^{-7} 、例えば最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} M である、項目 69 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 40

【0277】

71. IL-6 / IL-6Ra と gp130 との相互作用を阻害することができる項目 69 又は 70 に記載の IL-6 結合ポリペプチド。

【0278】

72. 相互作用の EC50 値が最大で 1×10^{-7} 、例えば最大で 1×10^{-8} M、例えば最大で 1×10^{-9} M、例えば最大で 1×10^{-10} M であるように IL-6 に結合することができる、項目 1～71 のいずれか 1 項に記載の IL-6 結合ポリペプチド。 50

【0279】

73. 相互作用の K_D 値が最大で $1 \times 10^{-8}M$ 、例えば最大で $1 \times 10^{-9}M$ 、例えば最大で $1 \times 10^{-10}M$ であるようにIL-6に結合することができる、項目1～72のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0280】

74. C末端及び／又はN末端に、付加的なアミノ酸を含む、項目1～73のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0281】

75. 前記付加的なアミノ酸（単数又は複数）が、ポリペプチドの産生、精製、インビボ若しくはインビトロでの安定化、カップリング又は検出を改善する、項目74に記載のIL-6結合ポリペプチド。

10

【0282】

76. 少なくとも2つのIL-6結合ポリペプチド単量体単位を含み、そのアミノ酸配列が同一でも異なってもよい、多量体形態の、項目1～75のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0283】

77. 前記IL-6結合ポリペプチド単量体単位が、共に共有結合している、項目76に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0284】

78. 前記IL-6結合ポリペプチド単量体単位が、融合タンパク質として発現される、項目77に記載のIL-6結合ポリペプチド。

20

【0285】

79. 二量体形態の、項目78に記載のIL-6結合ポリペプチド。

【0286】

80. 一項目1～79のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチドからなる第1の部分；及び

一所望の生物学的活性を有するポリペプチドからなる第2の部分、を含む、融合タンパク質又はコンジュゲート。

【0287】

81. 前記所望の生物学的活性が、治療活性である、項目80に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

30

【0288】

82. 前記所望の生物学的活性が、結合活性である、項目80に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【0289】

83. 前記結合活性が、融合タンパク質又はコンジュゲートのインビボ半減期を増加させるアルブミン結合活性である、項目82に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【0290】

84. 前記第2の部分が、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメイン又はその誘導体を含む、項目83に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

40

【0291】

85. 前記結合活性が、生物学的活性を阻害するように作用する、項目82に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【0292】

86. 前記所望の生物学的活性が、酵素活性である、項目80に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【0293】

87. 前記第2の部分が、治療的に活性があるポリペプチドである、項目81に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【0294】

50

８８．前記第２の部分が、免疫応答調節剤である、項目８７に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【０２９５】

８９．前記第２の部分が抗癌剤である、項目８７に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【０２９６】

９０．前記第２の部分が、ヒト内在性酵素、ホルモン、成長因子、ケモカイン、サイトカイン及びリンホカインからなる群から選択される、項目８０、８１、８６、８８及び８９のいずれか１項に記載の融合タンパク質又はコンジュゲート。

【０２９７】

９１．標識をさらに含む、項目１～９０のいずれか１項に記載のＩＬ－６結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲート。

【０２９８】

９２．前記標識が、蛍光色素及び金属、発色性色素（*chromophoric dyes*）、化学発光化合物及び生物発光タンパク質、酵素、放射性核種及び放射性粒子からなる群から選択される、項目９１に記載のＩＬ－６結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲート。

【０２９９】

９３．システイン残基のチオール基又はリジン残基のアミン基を介して、ＩＬ－６結合ポリペプチドにコンジュゲートされたポリアミノポリカルボキシレートキレート剤によって提供されるキレート化環境を含む、項目１～９２のいずれか１項に記載のＩＬ－６結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲート。

【０３００】

９４．項目１～７９のいずれか１項に記載の融合タンパク質をコードするポリペプチドをコードするポリペプチド。

【０３０１】

９５．項目９４に記載のポリペプチドを含む発現ベクター。

【０３０２】

９６．項目９５に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【０３０３】

９７．項目１～７９のいずれか１項に記載のポリペプチドを調整する方法であり、
－前記発現ベクター由来の前記ポリペプチドの発現を許容する条件下で、項目９６に記載の宿主細胞を培養すること、及び
－前記ポリペプチドを単離すること、
を含む、方法。

【０３０４】

９８．項目１～９３のいずれか１項に記載のＩＬ－６結合ポリペプチド、融合タンパク質又はコンジュゲートと、少なくとも１つの医薬的に許容される賦形剤又は担体とを含む、組成物。

【０３０５】

９９．少なくとも１つの追加の活性剤、例えば、免疫応答調節剤及び抗癌剤から選択される薬剤をさらに含む、項目９８に記載の組成物。

【０３０６】

１００．経口、局所、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、頬側（*buccal*）、舌下又は坐薬投与のための項目１～９３のいずれか１項に記載のＩＬ－６結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は項目９８～９９のいずれか１項に記載の組成物。

【０３０７】

１０１．薬剤、診断薬又は予後予測薬として使用するための項目１～９３のいずれか１項に記載のＩＬ－６結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は項目

10

20

30

40

50

98～99のいずれか1項に記載の組成物。

【0308】

102. 項目1～93のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート、又は薬剤として使用するための項目98～99のいずれか1項に記載の組成物。

【0309】

103. 前記ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物が、インビボでIL-6機能を調節する、項目102に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0310】

104. IL-6関連障害の治療、予後予測又は診断における項目101～103のいずれか1項に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0311】

105. IL-6関連障害の治療における、項目101～103のいずれか1項に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0312】

106. 前記IL-6関連障害が、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染性疾患、癌、糖尿病、神経疾患及びうつ病からなる群から選択される、項目105に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0313】

107. 前記IL-6関連障害が、炎症性疾患及び自己免疫疾患からなる群から選択される、項目106に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0314】

108. IL-6関連障害が、慢性関節リウマチ(RA)、若年RA、若年性特発性関節炎又は全身性若年性特発性関節炎、血管炎、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患；グレーブス病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症(MS)、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛症、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、再発性多発軟骨炎、腓炎、腹膜炎、腎炎、川崎病、シェーグレン症候群及び成人スティル病からなる群から選択される、項目107に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0315】

109. 前記IL-6関連疾患が、癌、例えば、結腸炎関連癌、腎癌(renal cancer)、腎臓癌(kidney cancer)、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、キャスルマン病、乳癌及び肺癌からなる群から選択される、項目106に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0316】

110. 前記IL-6関連疾患が、アルツハイマー病、HIV、糖尿病、敗血症、悪液質、骨髄異形成症候群(MDS)、肝硬変、移植片対宿主病、心筋梗塞、子宮内膜症及び骨粗鬆症から選択される、項目106に記載の使用のためのIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【0317】

111. 項目1～93のいずれか1項に記載のIL-6結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は項目98～99のいずれか1項に記載の組成物の有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む、IL-6関連疾患の治療方法。

【0318】

112. 前記 I L-6 関連障害が、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染性疾患、癌、糖尿病、神経疾患及びうつ病からなる群から選択される、項目 111 に記載の方法。

【0319】

113. 前記 I L-6 関連障害が、炎症性疾患及び自己免疫疾患からなる群から選択される、項目 112 に記載の方法。

【0320】

114. 前記 I L-6 関連障害が、慢性関節リウマチ、若年性 R A、若年性特発性関節炎又は全身性若年性特発性関節炎、血管炎、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患、グレーブス病、ベーチェット病、ブドウ膜炎、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症 (M S)、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス (S L E)、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛症、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、再発性多発軟骨症、膵炎、腹膜炎、腎炎、川崎病、シェーグレン症候群及び成人ステイロ病、からなる群から選択される、項目 113 に記載の方法。

10

【0321】

115. 前記 I L-6 関連疾患が、癌、例えば大腸炎関連癌、腎癌 (r e n a l c a n c e r)、腎臓癌 (k i d n e y c a n c e r)、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、乳癌及び肺癌からなる群から選択される癌である、項目 112 に記載の方法。

【0322】

116. 前記 I L-6 関連疾患が、アルツハイマー病、H I V、糖尿病、敗血症、悪液質、骨髄異形成症候群 (M D S)、肝硬変、移植片対宿主病、心筋梗塞、子宮内膜症及び骨粗鬆症から選択される、項目 112 に記載の方法。

20

【0323】

117. I L-6 を検出する方法であり、I L-6 を含むことが疑われるサンプルを提供することと、前記サンプルを項目 1~90 のいずれか 1 項に記載の I L-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は項目 98~99 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることと、前記サンプル中の I L-6 の存在を示すために I L-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物の結合を検出することを含む方法。

【0324】

30

118. 被験体における I L-6 の存在を決定する方法であり、前記方法は、以下：

ー被験体又は被験体から単離されたサンプルを、項目 1~93 のいずれか 1 項に記載の I L-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質若しくはコンジュゲート又は項目 98~99 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させる工程、及び

ー前記被験体又は前記サンプルに結合した I L-6 結合ポリペプチド、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物の量に対応する値を得る工程、を含む、方法。

【0325】

119. 前記値を参照と比較する工程をさらに含む、項目 118 に記載の方法。

【0326】

40

120. 前記被験体が、ヒト被験体などの哺乳動物被験体である、項目 118 又は 119 に記載の方法。

【0327】

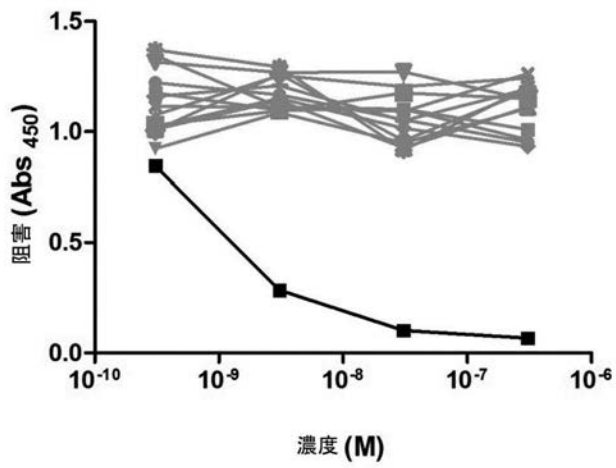
121. 前記方法が、インビボで実施される、項目 118~120 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0328】

122. 前記方法が、インビトロで実施される、項目 118~120 のいずれか 1 項に記載の方法。

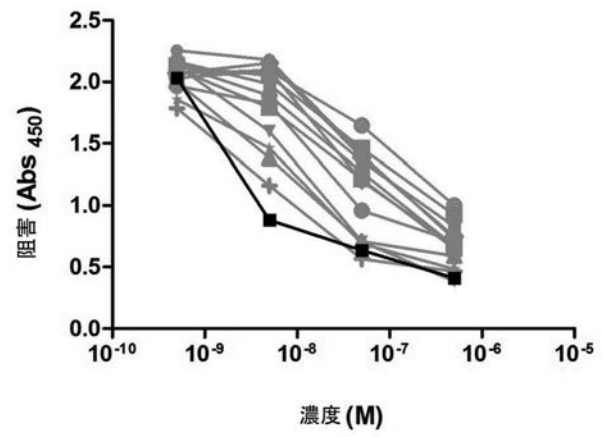
【 図 2 】

Figure 2



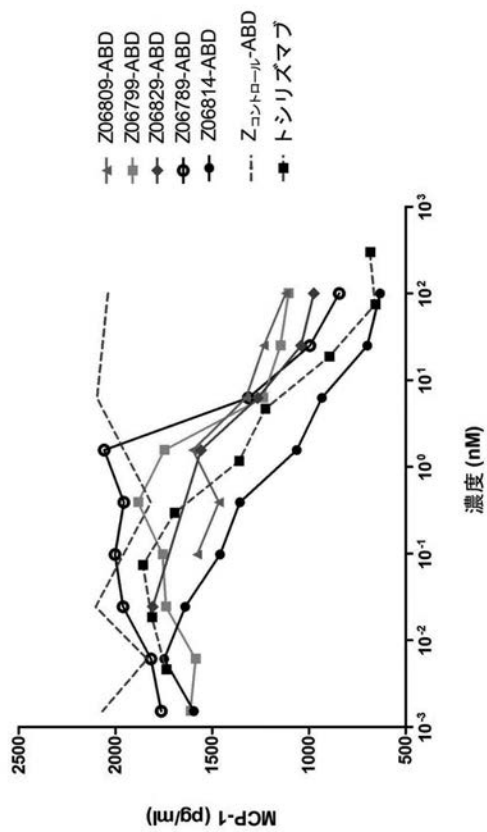
【 図 3 】

Figure 3



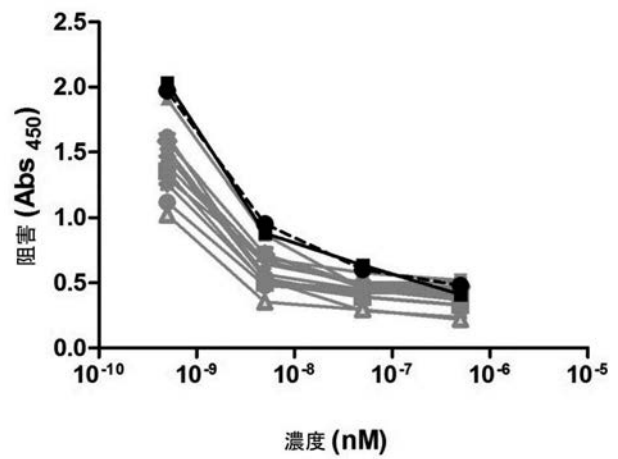
【 図 4 】

Figure 4

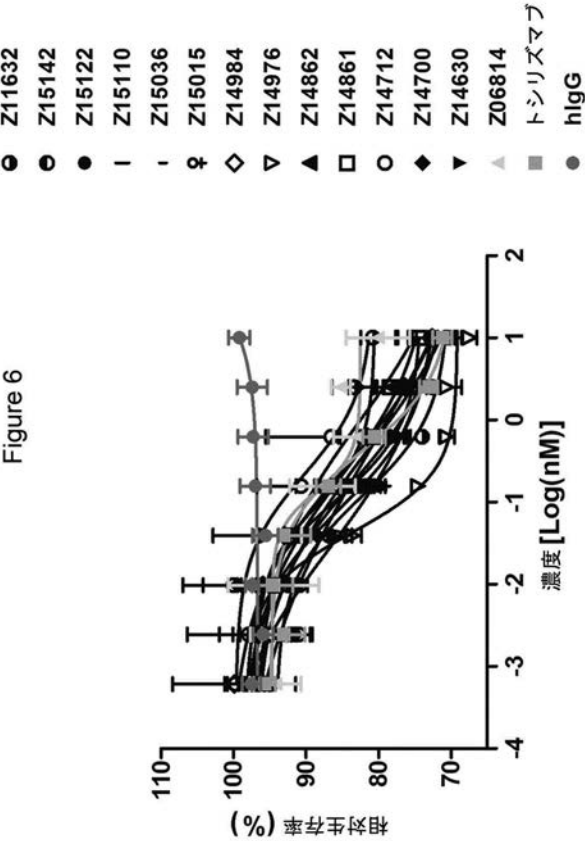


【 図 5 】

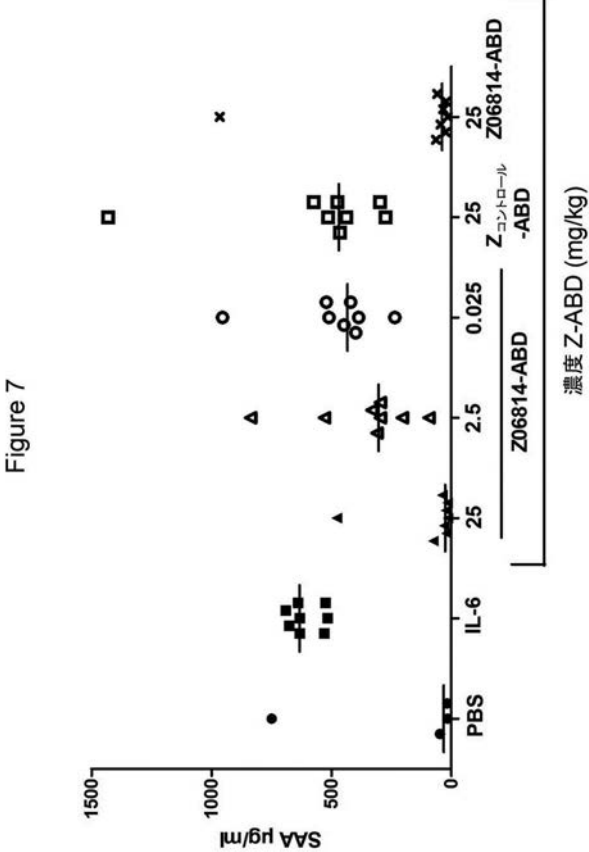
Figure 5



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配 列 表 】

2017522864000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2015/063362
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/063362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/16 C07K14/435 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/305962 A1 (BAKKER ALICE [US] ET AL) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document	1-17
Y	TERUAKI KOBAYASHI ET AL: "In Vitro Selection of a Peptide Inhibitor of Human IL-6 Using mRNA Display", MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 48, no. 2, 7 December 2010 (2010-12-07), pages 147-155, XP055152435, ISSN: 1073-6085, DOI: 10.1007/s12033-010-9355-5 the whole document	1-17
	----- -/--	
☒ 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		Date of mailing of the international search report
4 September 2015		25/09/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Ury, Alain

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/063362

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/13781 A2 (YEDA RES & DEV [IL]; CHEBATH JUDITH [IL]; HALIMI HUBERT [FR]; REVEL MI) 17 April 1997 (1997-04-17) the whole document	1-17
Y	----- NYGREN PER-AKE: "Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold", FEBS JOURNAL, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 275, no. 11, 1 June 2008 (2008-06-01) , pages 2668-2676, XP002601623, ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/J.1742-4658.2008.06438.X the whole document	1-17
Y	----- E. WAHLBERG ET AL: "An affibody in complex with a target protein: Structure and coupled folding", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 6, 18 March 2003 (2003-03-18), pages 3185-3190, XP055102112, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0436086100 the whole document	1-17
Y	----- GRIMM S ET AL: "Selection and characterisation of affibody molecules inhibiting the interaction between Ras and Raf in vitro", NEW BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 27, no. 6, 31 December 2010 (2010-12-31), pages 766-773, XP027539673, ISSN: 1871-6784 [retrieved on 2010-11-30] the whole document	1-17
Y	----- WO 2013/126006 A1 (SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB PUBL [SE]) 29 August 2013 (2013-08-29) the whole document	1-17
Y	----- WO 2011/110515 A1 (AFFIBODY AB [SE]; ABRAHMSEN LARS [SE]) 15 September 2011 (2011-09-15) the whole document	1-17
Y	----- WO 2014/064237 A1 (AFFIBODY AB [SE]) 1 May 2014 (2014-05-01) the whole document	1-17
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/063362

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/077175 A1 (AFFIBODY AB [SE]; LINDBORG MALIN [SE]; GUNNERIUSSON ELIN [SE]; LENDEL) 25 June 2009 (2009-06-25) the whole document -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/063362

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009305962	A1	10-12-2009	NONE
WO 9713781	A2	17-04-1997	AT 423790 T 15-03-2009 AU 709585 B2 02-09-1999 CA 2230949 A1 17-04-1997 DK 0852587 T3 08-06-2009 EP 0852587 A2 15-07-1998 ES 2319340 T3 06-05-2009 IL 123815 A 15-05-2007 JP 3913273 B2 09-05-2007 JP 2000500644 A 25-01-2000 PT 852587 E 10-03-2009 US 6172042 B1 09-01-2001 WO 9713781 A2 17-04-1997
WO 2013126006	A1	29-08-2013	AU 2013222836 A1 18-09-2014 CA 2863862 A1 29-08-2013 CN 104114574 A 22-10-2014 EP 2817329 A1 31-12-2014 JP 2015508652 A 23-03-2015 KR 20140129163 A 06-11-2014 PH 12014501604 A1 08-10-2014 US 2015011474 A1 08-01-2015 WO 2013126006 A1 29-08-2013
WO 2011110515	A1	15-09-2011	CA 2789738 A1 15-09-2011 CN 102811782 A 05-12-2012 EP 2544785 A1 16-01-2013 JP 2013528567 A 11-07-2013 US 2013203962 A1 08-08-2013 WO 2011110515 A1 15-09-2011
WO 2014064237	A1	01-05-2014	AU 2013336646 A1 28-05-2015 CA 2889037 A1 01-05-2014 CN 104854127 A 19-08-2015 EP 2912054 A1 02-09-2015 KR 20150077447 A 07-07-2015 WO 2014064237 A1 01-05-2014
WO 2009077175	A1	25-06-2009	AT 527353 T 15-10-2011 DK 2231860 T3 05-12-2011 EP 2231860 A1 29-09-2010 ES 2373832 T3 09-02-2012 WO 2009077175 A1 25-06-2009

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	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
			A 6 1 P	19/10	

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

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100197169
弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 フレードリク フレジド
スウェーデン国, エスー 1 1 2 2 0 ストックホルム, シュイリンググレンド 5

(72)発明者 イェリン グンネリウッソン
スウェーデン国, エスー 1 3 3 3 6 ザルツヨバーデン, エルゴーパーゲン 2 1

- (72)発明者 イングマリー ヒョイデンーグーテンバリ
スウェーデン国, エスー1 6 4 4 6 キスタ, ボルンホルムスグタン 8
- (72)発明者 ペールーオーケ ニグレン
スウェーデン国, エスー1 7 8 4 0 エーケレー, シンゲルグレンド 3 6
- (72)発明者 スサン クリント
スウェーデン国, エスー1 1 2 5 2 ストックホルム, ウロフ ダリンス ベーグ 1 6
- (72)発明者 フェイファン イウ
スウェーデン国, エスー1 9 1 3 8 ソレントゥナ, シルバーダルスバーゲン 3 7
- F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 BA23 BA41 NA14 ZA021 ZA121
ZA161 ZA331 ZA361 ZA591 ZA681 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961
ZA971 ZB071 ZB081 ZB111 ZB151 ZB261 ZB271 ZB321 ZB351 ZC351
ZC411 ZC551
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA02 EA20 EA50 FA74