

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6475713号
(P6475713)

(45) 発行日 平成31年2月27日 (2019.2.27)

(24) 登録日 平成31年2月8日 (2019.2.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28

請求項の数 21 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-526518 (P2016-526518)
 (86) (22) 出願日 平成26年7月4日 (2014.7.4)
 (65) 公表番号 特表2016-527221 (P2016-527221A)
 (43) 公表日 平成28年9月8日 (2016.9.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/064283
 (87) 国際公開番号 W02015/007542
 (87) 国際公開日 平成27年1月22日 (2015.1.22)
 審査請求日 平成29年6月30日 (2017.6.30)
 (31) 優先権主張番号 13306047.5
 (32) 優先日 平成25年7月19日 (2013.7.19)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 516003687
 ヴィブ ブイゼットダブリュー
 ベルギー国, ビー-9052, ヘント, レ
 イフィセシュトラート 120
 (73) 特許権者 516003702
 ユニバーシテイト ヘント
 ベルギー国, ビー-9000, ヘント, シ
 ントーピーテルスニューシュトラート 2
 5
 (73) 特許権者 516004525
 ソントル ナショナル デ ラ リシェル
 シェ サイエントフィック
 フランス国, エフ-75794 パリ, ル
 ミシェル-アンジェ, 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的修飾 IL-1 ファミリーメンバー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 野生型ヒト IL-1 と比較して、その受容体に対する低下した親和性を特徴とする変異体ヒト IL-1 であって、前記変異体ヒト IL-1 は、R120G、Q131G、H146A、Q148G、K208E、K209A、H145A及びL147A、F162A及びQ164E、Q148G及びK208E、R120G及びQ131G、R120G及びH146A、R120G及びK208E、並びにR120G、F162A、及びQ164Eから選択される一つの変異を含む、変異体ヒト IL-1、及び、

(2) ラクダ科動物重鎖抗体の可変ドメイン (VHH) または新規抗原受容体の可変ドメイン (VNAR) を含む標的化部分であって、標的細胞において前記変異体ヒト IL-1 の活性を回復する標的化部分、を含む標的化構築物を含む組成物。

【請求項 2】

前記標的化部分が、IL-1 ファミリーサイトカイン受容体を発現する細胞上に発現したマーカーを標的とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記標的化部分が、IL-1 R1 及び / または IL-1 R a c P を発現する細胞上に発現したマーカーを標的とする、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記標的化部分が、組織特異的マーカーに指向される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に

記載の組成物。

【請求項 5】

前記標的化部分が、H e r 2 またはレプチン受容体に指向される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記変異体ヒト I L - 1 が、Q 1 3 1 G および Q 1 4 8 G を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記標的化部分が、抗 H e r 2 またはレプチン受容体 V H H を含む、請求項 6 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記変異体ヒト I L - 1 が、Q 1 4 8 G および K 2 0 8 E を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記標的化部分が、抗 H e r 2 またはレプチン受容体 V H H を含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記変異体ヒト I L - 1 が、R 1 2 0 G および Q 1 3 1 G を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

20

前記標的化部分が、抗 H e r 2 またはレプチン受容体 V H H を含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記変異体ヒト I L - 1 が、R 1 2 0 G および H 1 4 6 A を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記標的化部分が、抗 H e r 2 またはレプチン受容体 V H H を含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記変異体ヒト I L - 1 が、R 1 2 0 G および K 2 0 8 E を含む、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 15】

前記標的化部分が、抗 H e r 2 またはレプチン受容体 V H H を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記変異体ヒト I L - 1 が、R 1 2 0 G、F 1 6 2 A、および Q 1 6 4 E を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記標的化部分が、抗 H e r 2 またはレプチン受容体 V H H を含む、請求項 16 に記載の組成物。

40

【請求項 18】

医薬品として使用するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 19】

免疫応答を刺激することにおいて使用するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 20】

N F B の活性化において使用するための、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

癌を治療することにおいて使用するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サイトカイン受容体を媒介して低下した活性を有し、修飾されたインターロイキン - 1 ファミリーメンバーサイトカインが標的細胞に特異的に送達される、修飾インターロイキン - 1 (IL - 1) ファミリーメンバーサイトカインに関する。好ましくは、IL - 1 ファミリーメンバーサイトカインは変異体であり、より好ましくはIL - 1 受容体に対して低い親和性を有する変異体IL - 1 であり、この変異体IL - 1 は標的細胞に特異的に送達される。標的化は、修飾IL - 1 ファミリーメンバーサイトカインの、標的化部分、好ましくは抗体または抗体様分子への融合により実現されることが好ましい。本発明は更に、このような標的修飾IL - 1 ファミリーメンバーサイトカインの、疾患を治療するための使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

インターロイキン - 1 (IL - 1) ファミリーは、11種類の構造的に関連したファミリーメンバー(IL - 1、IL - 1 β 、IL - 1Ra、IL - 18、IL - 33及びIL - 1F5からIL - 1F10)で構成され、密接に関連した受容体のグループを介して作用する最も強力な免疫系シグナル伝達分子に含まれる。すべてのIL - 1受容体は、類似した活性化の機序を有する：一次受容体サブユニットにリガンドが結合すると(すなわち、IL - 1 α 及び IL - 1 β に対してIL - 1R1、IL - 18に対してIL - 18R並びにIL - 33に対してST2)、二次受容体サブユニットを動員し(すなわち、IL - 1 α 及び IL - 1 β に対してIL - 1RAP、IL - 18に対してIL - 18RAP並びにIL - 33に対してIL - 1RAP)、並列した受容体サブユニットの細胞質内Toll/IL - 1受容体(TIR)ドメインを媒介してシグナル伝達を開始される。二量体化したTIRドメインは、MYD88アダプタータンパク質に対してドッキングプラットフォームを提供し、その他の媒介を動員することで、炎症性核内因子 - B (NF - B) 及びマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)経路を活性化させる。IL - 1ファミリーメンバーは、主に先天性免疫細胞により産生され、免疫応答の間に様々な細胞型に作用する(Sims and Smith, 2010を参照)。

20

【0003】

Tリンパ球は、主なIL - 1ファミリー標的細胞の1つであり、異なるT細胞サブセット、特にCD8 $^{+}$ T細胞(Ben - Sasson, 2011; Ben - Sasson, 2013)及びTh17細胞(Sutton et al., 2006; Acosta - Rodriguez et al., 2007; Dunne et al., 2010; Shaw et al., 2012)の増殖及び分化に対する、特にIL - 1 α 及びIL - 1 β の増強効果が、しっかりと確立されている。Th17細胞は、IL - 17の産生を特徴とし、自己免疫疾患及び慢性炎症において重要な役割を果たす(Wilke et al., 2011にて参照される)。T細胞サブセットの中で、Th17細胞が最も高いレベルでIL - 1Rを発現し、IL - 1はTh17プライミングにおいて重要な役割を果たす。

30

40

【0004】

IL - 18は、Th1細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞に対して強力に作用するIFN誘導サイトカインとして最もよく知られている(Okamura et al., 1995; Takeda et al., 1998)。加えて、IL - 18は好中球の機能を増強させる(Leung et al., 2001)。いくつかの報告で、動物モデルにおけるIL - 18抗腫瘍作用(Micallef et al., 1997; Loeffler et al., 2008; Wigginton et al., 2002; Zaki et al., 2010)を実証し、組換えヒトIL - 18治療は、進行癌の治療に対するその効果を評価するために、近年臨床試験に入った(Robertson et al., 2008)。IL - 18とは対照的に、IL - 33は主に、Th2細胞

50

(Schmitz et al., 2005) 及び肥満細胞 (Allakhverdi et al., 2007) に作用し、近年、抗ウイルス応答を促進させるために CD8 + T 細胞に作用することが分かった (Bonilla et al., 2012)。その他の IL - 1 ファミリーメンバーにはあまり特徴はないが、要するに、異なる IL - 1 ファミリーメンバーが、異なる T 細胞サブセットまたはその他の細胞型に対して特異性を有し、それゆえ異なる治療応用に特異性を有する。

【0005】

T 細胞及び NK 細胞の活性化による、間接的な抗腫瘍活性を有することの他に、IL - 1 ファミリーメンバーは直接的な細胞増殖抑制特性を有することが分かり、ヒトメラノーマ細胞での実証が最も納得のいくものであった (Morinaga et al., 1990; Usui et al., 1991; Rangnekar et al., 1992)。

【0006】

いくつかの IL - 1 ファミリーメンバーの炎症プロセスへの関与を考慮して、臨床的関心が主に IL - 1 拮抗方法の開発へと向けられてきた (Dinarelllo et al., 2012)。それにもかかわらず、制御された IL - 1 アゴニスト活性の利用が、異なる生理学的 / 病理学的プロセスに応用することができ、免疫賦活効果が望まれた。免疫賦活療法における IL - 1 の使用に関する主な懸念の 1 つは、全身投与した場合の、その強い毒性である。しかしながら、IL - 1 作用が選択した細胞集団に限られる場合、毒性問題は解決し、治療の展望を開く。

【0007】

例えば、多発性硬化症、関節リウマチ及び炎症性腸疾患などの自己免疫状態における病因的役割を考慮すると (Wilke et al., 2011)、Th17 応答のブロッキングに多大な関心があつたが、正常な Th17 機能は、ヒト型結核菌 (Khader et al., 2007)、肺炎桿菌 (Ye et al., 2001) 及び百日咳菌 (Higgins et al., 2006) を含む、様々な病原体に対する防御免疫に不可欠である。IL - 1 は Th17 機能を刺激するので、この考えを取り上げて、弱毒化ワクチンへの応答を促進させる T 細胞アジュバントとして IL - 1 を使用した (Ben-Sasson et al., 2011)。その他の用途は、抗ウイルス応答を促進させるために、IL - 1 もしくは IL - 33 の、CD8 + T 細胞集団への標的化、または抗腫瘍活性を促進させるために、IL - 18 の、Th1 細胞もしくは NK 細胞への標的化であり得る。

【0008】

驚くべきことに、IL - 1 ファミリー受容体の活性化を欠く IL - 1 ファミリー修飾を設計することが可能であるが、標的化部分に融合した場合、細胞表面上の濃度効果によって、選択した細胞型に対するその活性を回復させることが可能であることを見出した。IL - 1 変異体は、その同族受容体に対して低下した親和性を有し、それゆえその受容体に効率的に結合及び活性化させることができない。しかしながら、標的化部分 (ナノボディなど) に変異体を融合することにより、変異体 IL - 1 ファミリーメンバーの活性が、標的化部分に認識される細胞表面標的を発現する細胞上で回復する。この活性化は選択した標的細胞のみに限られるので、主要な全身毒性を生じることはない。

【発明の概要】

【0009】

本発明の第 1 の態様は、サイトカイン受容体に対する低下した親和性を特徴とする修飾 IL - 1 ファミリーメンバーサイトカイン、及び標的化部分を含む、標的化構築物である。IL - 1 ファミリーメンバーサイトカインは、当業者に既知であり、このサイトカインとして IL - 1、IL - 1、IL - 1Ra、IL18、IL - 36Ra、IL - 36、IL - 37、IL - 36、IL - 36、IL - 38 及び IL - 33 (それぞれ、IL - 1F1、IL - 1F2、IL - 1F3、IL - 1F4、IL - 1F5、IL - 1F6、IL - 1F7、IL - 1F8、IL - 1F9、IL - 1F10 及び IL - 1F11

としても示される)が挙げられるが、これらに限定されない。IL-1ファミリーの確認には、Dinarelli(2011)を参照する。修飾IL-1ファミリーサイトカインとは、IL-1ファミリーサイトカインを改変して、その受容体への親和性を変化させ、最終的に修飾IL-1ファミリーサイトカインが、受容体に正常に結合する内因性野生型サイトカインと比較して、受容体に対して低下した親和性を有し、その結果低下した生物活性を有することを意味する。このような修飾は、正常な野生型サイトカインの活性を低下させる修飾であり得、または相同な非内因性IL-1ファミリーサイトカイン(これらに限定されないが、ヒトIL-1ファミリーサイトカイン受容体に対して活性でない別種のIL-1ファミリーサイトカインなど)の親和性を増加させる修飾であり得る。修飾は、当業者に既知の、活性を減少または増加させる任意の修飾であり得、この修飾として、PEG化及びグリコシル化などの化学及び/または酵素修飾、その他タンパク質への融合並びに突然変異が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、この修飾は突然変異であり、更により好ましくは、IL-1ファミリーサイトカインの親和性を低下させる突然変異である。本明細書で使用する場合、低下した親和性及びその結果として低下した生物活性とは、修飾IL-1ファミリーサイトカインが、受容体に正常に結合するIL-1ファミリーサイトカインと比較して、IL-1ファミリーサイトカインの生物活性の、70%未満の生物活性を有すること、更により好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの60%未満の生物活性を有すること、より好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの50%未満の生物活性を有すること、より好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの40%未満の生物活性を有すること、より好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの30%未満の生物活性を有すること、より好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの20%未満の生物活性を有すること、より好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの10%未満の生物活性を有すること、最も好ましくはIL-1ファミリーサイトカインの1%未満の生物活性を有することを意味する。好ましくは、修飾IL-1ファミリーサイトカインは、野生型IL-1ファミリーサイトカインの変異体であり、その活性は野生型IL-1ファミリーサイトカインと比較される。親和性及び/または活性は、当業者に既知の任意の方法によって測定することができる。

【0010】

本発明の好ましい実施形態は、インターロイキン-1受容体I型(IL-1RI)及び/またはインターロイキン-1受容体アクセサリタンパク質(IL-1RAcP)受容体に対する低下した親和性を特徴とする変異体IL-1、並びに標的化部分を含む、標的化構築物である。本明細書で使用する場合、変異体IL-1は、受容体に対するより低い親和性、及びその結果として炎症性転写因子NF- κ Bの低下した活性を有する、任意の変異型であり得る。野生型IL-1の受容体に対する親和性と比較した、変異体IL-1の受容体に対する親和性は、スキャッチャードプロット解析及び結合データのコンピュータフィッティング(例えば、Scatchard, 1949)により、またはBrechtle et al. (1993)に記載されているように、フロースルー条件下で反射型干渉分光法により測定することができる。変異体IL-1の活性は通常、バイオアッセイ(例えば、細胞死の誘導により)を使用して測定する、または受容体下流でのシグナル伝達事象を測定する。このようなシグナル伝達事象は、NK-Bの修飾もしくは核転座、または選択したレポーター遺伝子の誘導であり得る。変異体は、点変異体、欠失もしくは挿入変異体、またはこれらの組み合わせであってよい;いくつかの突然変異は、1つのタンパク質中に存在してよい。好ましくは、この変異体IL-1は、これらに限定されないがポリメラーゼ連鎖反応増幅による部位特異的突然変異誘発などの活性化突然変異誘発により得られる。好ましくは、この変異体IL-1は、野生型IL-1の生物活性の、70%未満の生物活性を有する、更により好ましくは野生型IL-1の60%未満の生物活性を有する、より好ましくは野生型IL-1の50%未満の生物活性を有する、より好ましくは野生型IL-1の40%未満の生物活性を有する、より好ましくは野生型IL-1の30%未満の生物活性を有する、より好ましくは野生型IL-1の20%未満の生物活性を有する、より好ましくは野生型の10%未満の生物活性を有

10

20

30

40

50

する、最も好ましくは推定された野生型（すなわち、野生型 I L - 1 のコード配列を突然変異させて変異体 I L - 1 を得たような、野生型 I L - 1 ）の 1 % 未満の生物活性を有する。好ましくは、この変異体は、A 1 1 7 G / P 1 1 8 G、R 1 2 0 X、L 1 2 2 A、T 1 2 5 G / L 1 2 6 G、R 1 2 7 G、Q 1 3 0 X、Q 1 3 1 G、K 1 3 2 A、S 1 3 7 G / Q 1 3 8 Y、L 1 4 5 G、H 1 4 6 X、L 1 4 5 A / L 1 4 7 A、Q 1 4 8 X、Q 1 4 8 G / Q 1 5 0 G、Q 1 5 0 G / D 1 5 1 A、M 1 5 2 G、F 1 6 2 A、F 1 6 2 A / Q 1 6 4 E、F 1 6 6 A、Q 1 6 4 E / E 1 6 7 K、N 1 6 9 G / D 1 7 0 G、I 1 7 2 A、V 1 7 4 A、K 2 0 8 E、K 2 0 9 X、K 2 0 9 A / K 2 1 0 A、K 2 1 9 X、E 2 2 1 X、E 2 2 1 S / N 2 2 4 A、N 2 2 4 S / K 2 2 5 S、E 2 4 4 K、N 2 4 5 Q（ここで、X はアミノ酸における任意の変化、好ましくは非保守的变化であり得る）から成る群から選択される変異体である。更により好ましくは、この変異体は、R 1 2 0 A、R 1 2 0 G、Q 1 3 0 A、Q 1 3 0 W、H 1 4 6 A、H 1 4 6 G、H 1 4 6 E、H 1 4 6 N、H 1 4 6 R、Q 1 4 8 E、Q 1 4 8 G、Q 1 4 8 L、K 2 0 9 A、K 2 0 9 D、K 2 1 9 S、K 2 1 9 Q、E 2 2 1 S 及び E 2 2 1 K から成る群から選択される。最も好ましくは、この変異体は、R 1 2 0 G、H 1 4 6 N、H 1 4 6 R、Q 1 4 8 E、Q 1 4 8 G 及び K 2 0 9 A から成る群から選択される。（ヒト I L - 1 配列に基づいた番号、ジェンバンク（genbank）登録番号 NP__000567、バージョン NP__000567.1、GI:10835145）。

【0011】

I L - 1 8 の突然変異の好ましい領域は、Y 3 7 - K 4 4、R 4 9 - Q 5 4、D 5 9 - R 6 3、E 6 7 - C 7 4、R 8 0、M 8 7 - A 9 7、N 1 2 7 - K 1 2 9、Q 1 3 9 - M 1 4 9、K 1 6 5 - K 1 7 1、R 1 8 3 及び Q 1 9 0 - N 1 9 1 である。最も好ましいのは、領域 E 6 7 - C 7 4 及び M 8 7 - A 9 7 である（ヒト配列に基づいた番号、ジェンバンク（genbank）登録番号 AAV38697、バージョン AAV38697.1、GI:54696650）。

【0012】

I L - 3 3 の突然変異の好ましい領域は、I 1 1 3 - Y 1 2 2、S 1 2 7 - E 1 3 9、E 1 4 4 - D 1 5 7、Y 1 6 3 - M 1 8 3、E 2 0 0、Q 2 1 5、L 2 2 0 - C 2 2 7 及び T 2 6 0 - E 2 6 9 である（ヒト配列に基づいた番号、ジェンバンク（genbank）登録番号 NP__254274、バージョン NP__254274.1、GI:15559209）

【0013】

好ましくは、標的化部分は、I L - 1 受容体を発現する細胞、好ましくは I L 1 - R I を発現する細胞上に発現したマーカーを標的としている。1 つの好ましい実施形態では、標的化部分は、組織特異的マーカーに指向される。

【0014】

修飾 I L - 1 ファミリーメンバーは、標的化部分に連結される。本明細書で使用する場合、“連結される”とは、共有結合によるものであっても、または親和性結合によるものであってもよい。本明細書で使用する場合、“標的化部分”とは、I L - 1 ファミリーメンバーの受容体を発現する細胞上の結合部位に対して、結合部位及び結合分子間の特異的相互作用によって融合タンパク質を指向させることのできる結合分子である。1 つの好ましい実施形態では、この結合分子は、細胞の外側に位置する分子に特異的に結合する小さな化合物である。別の好ましい実施形態では、この分子は、細胞壁上に発現したレクチン様分子に対して指向される糖構造である。別の好ましい実施形態では、この結合分子は、腫瘍または炎症環境を標的とするペプチドである。このようなペプチドは当業者に既知であり、NGR 及び RGD ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない（Yang et al., 2011; WO2005054293）。更に別の好ましい実施形態では、この結合分子は、結合ドメインを含むタンパク質である。このドメインとしては、炭水化物結合ドメイン（CBD）（Blake et al., 2006）、レクチン結合タンパク質、重鎖抗体（hcAb）、単ドメイン抗体（sdAb）、ミニボディ（Tram

10

20

30

40

50

ontano et al., 1994)、ラクダ科動物重鎖抗体の可変ドメイン(VH H)、新規抗原受容体の可変ドメイン(VNAR)、アフィボディ(Nygren et al., 2008)、アルファボディ(alphabodies)(WO2010066740)、設計されたアンキリン反復ドメイン(DARPin s)(Stumpp et al., 2008)、アンチカリン(Skerra et al., 2008)、ノッティン(knottins)(Kolmar et al., 2008)及び操作したCH2ドメイン(ナノ抗体; Dimitrov, 2009)が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、この標的化部分は、単一のポリペプチド鎖で構成され、翻訳後修飾されない。更により好ましくは、この標的化部分はナノボディである。

【0015】

この標的化部分は、当業者に既知の任意の標的化部分であり得る。非限定的な例では、標的化部分は、一方の特異性として標的細胞上の結合部位に指向され、もう一方の特異性として標的サイトカインに、またはそのサイトカインに融合したタグに指向される二重特異性抗体であってよい。別の非限定的な例では、標的化部分は変異体インターロイキン-1に化学的に連結してよく、または組換え融合タンパク質であってよい。好ましくは、この標的化構築物は、組換え融合タンパク質である。標的化部分は、変異体IL-1に直接融合してよく、またはリンカー断片、好ましくはGGSリンカーの助けにより融合してよい。標的化部分は、変異IL-1のアミノ末端またはカルボキシ末端に融合してよい; 好ましくは、この標的化部分は、変異IL-1分子のカルボキシ末端で融合される。標的化構築物は、これらに限定されないが、タグ配列、シグナル配列、別のサイトカインまたは抗体などのその他のドメインを更に含んでよい。

【0016】

本発明の別の態様は、医薬品として使用するための本発明による標的化構築物である。1つの好ましい実施形態は、免疫応答刺激にて使用するための本発明による標的化構築物である。事実、IL-1治療によってB細胞上で抗原の発現を誘導することが可能である(Killar et al., 1989)ことが知られている; 同様に、IL-18治療によって細胞性及び体液性免疫を増大させている(Kinoshita et al., 2011)。同様の方法で、IL-1がT細胞に作用して、インビボ免疫応答の規模を増大させることが実証されてきた(Ben-Sasson et al., 2011; Ben-Sasson et al., 2013)。従って、本発明の好ましい1つの態様は、ワクチン接種におけるアジュバントとして使用するための、本発明による標的化構築物である。本発明による標的化構築物は、この点が特に興味深く、その理由とは、正常な野生型IL-1の炎症誘発効果では、そのようなIL-1の用途を不可能にさせるからである。

【0017】

本発明の更に別の態様は、癌治療にて使用するための本発明による標的化構築物である。事実、Morinaga et al., 1990、Usui et al., 1991及びRangnekar et al., 1992では、IL-1ファミリーメンバーが直接的な細胞増殖抑制特性を有し、ヒトメラノーマ細胞での実証が最も納得のいくものであったことを示した。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】IL-1 ナノボディ融合タンパク質の略図。

【図2-1】mockトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損Her2でトランスフェクトした細胞における、野生型及び変異体Q148G IL-1 Her2ナノボディ融合(A)並びにその他の選択した変異体(B)によるNF- κ B活性誘導の濃度依存性。

【図2-2】mockトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損Her2でトランスフェクトした細胞における、野生型及び変異体Q148G IL-1 Her2ナノボディ融合(A)並びにその他の選択した変異体(B)によるNF- κ B活性誘導の濃度依存

10

20

30

40

50

性。

【図2 - 3】m o c kトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損H e r 2でトランスフェクトした細胞における、野生型及び変異体Q 1 4 8 G I L - 1 H e r 2ナノボディ融合 (A) 並びにその他の選択した変異体 (B) によるN F B 活性誘導の濃度依存性。

【図3】m o c kトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損H e r 2でトランスフェクトした細胞における、内因性N F - B p 6 5 の核転座に対する野生型及び変異体 (Q 1 4 8 G、L 1 4 5 A / L 1 4 7 A、F 1 6 2 A / Q 1 6 4 E) I L - 1 H e r 2ナノボディ融合の効果。

【図4】マウスレプチン受容体を発現する (m L R) または発現しない (m L R 無し) 細胞上での、抗マウスレプチン受容体ナノボディに融合した、野生型及び5 つの異なる I L - 1 変異体によるN F B 活性の誘導。

10

【図5 - 1】m o c kトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損H e r 2でトランスフェクトした細胞における、H e r 2ナノボディに融合した I L 1 二重変異体によるN F B 活性誘導の濃度依存性。

【図5 - 2】m o c kトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損H e r 2でトランスフェクトした細胞における、H e r 2ナノボディに融合した I L 1 二重変異体によるN F B 活性誘導の濃度依存性。

【図5 - 3】m o c kトランスフェクト細胞、またはシグナル伝達欠損H e r 2でトランスフェクトした細胞における、H e r 2ナノボディに融合した I L 1 二重変異体によるN F B 活性誘導の濃度依存性。

20

【発明を実施するための形態】

【0019】

実施例

実施例における材料及び方法

I L - 1 ナノボディ融合タンパク質のクローニング。

マウスレプチン受容体に対して指向される4 - 1 0 ナノボディは、Z a b e a u e t a l . (2 0 1 2) 及び特許W O 2 0 0 6 / 0 5 3 8 8 3 に記載されている。抗H e r 2 ナノボディ1 R 5 9 B は、V a n e y c k e n e t a l . (2 0 1 1) に記載されている。ナノボディの両方を、p M E T 7 真核生物発現ベクターにおいてC 末端H i s タグでクローニングした。S i g K リーダーペプチドが先行し、N 末端H A タグを持つ、成熟 I L - 1 タンパク質をコードするコドン最適化配列を、遺伝子合成 (I n v i t r o g e n 社 G e n e A r t) によって生成した。I L - 1 ナノボディ融合タンパク質を生成するために、I L - 1 配列は、サイトカインとナノボディ部分を隔てるG G S リンカー x 1 3 を用いて、p M e t 7 にて5 ' からナノボディ配列へとクローニングした。(図1)

30

I L - 1 変異体。

【0020】

I L - 1 R に対して低下した結合親和性を有すると期待される I L - 1 変異体は、その受容体と複合させたヒト I L - 1 の公開された結晶構造の文献及び解析に基づいて選択された。h I L - 1 部分での突然変異は、表 I に示す通り、突然変異誘発プライマーを使用して部位特異的突然変異誘発 (Q u i c k C h a n g e、ストラタジーン社) によって生成した：

40

【表 1】

		フォワードプライマー	リバースプライマー
1	A117G/ P118G	CCGACTACGCTGGCGGCAGTGACGGTGTCA GAAGCCTGAACTGC	GCAGTTCAGGCTTCTGACACCGTCACTG CCGCCAGCGTAGTCGG
2	R120A	CTGGCGGCAGCGCCCCTGTCGCTAGCCTGA ACTGCACCCTGCG	CGCAGGGTGCAGTTCAGGCTAGCGACA GGGGCGCTGCCGCCAG
3	R120G	GCGGCAGCGCCCCTGTCGGAAGCTTGAAGT GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAGGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
4	L122A	CGCTGGCGGCAGTGCCCCTGTCAGAAGCGC GAACTGCACCCTGCGGGACAGC	GCTGTCCCGCAGGGTGCAGTTCGCGCT TCTGACAGGGGCACTGCCGCCAGCG
5	T125G/ L126G	CGCCCCTGTCAGAAGCCTGAACTGCGGCGG CCGGGACAGCCAGCAGAAAAGC	GCTTTTCTGCTGGCTGTCCCGGCCGCC GCAGTTCAGGCTTCTGACAGGGGCG
6	R127G	AGAAGCCTGAACTGCACACTGGGGGACAGC CAGCAGAAAAGCCTGGTC	GACCAGGCTTTTCTGCTGGCTGTCCCCC AGTGTGCAGTTCAGGCTTCT
7	Q130A	CCCTGCGGGACAGCGCGCAGAAAAGCCTGG	CCAGGCTTTTCTGCGCGCTGTCCCGCA GGG
8	Q130W	CTGCACCCTGCGGGACAGCTGGCAGAAAAG CCTGGTCATGAGC	GCTCATGACCAGGCTTTTCTGCCAGCTG TCCCGCAGGGTGCAG
9	Q131G	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTC	CGCTCATGACCAGGCTCTTCCCCTGGCT

10

20

		フォワードプライマー	リバースプライマー
		ATGAGCG	GTCCCGCAG
10	K132A	GCACCCTGCGGGACAGCCAGCAGGCTAGCC TGGTCATGAGCGGCC	GGCCGCTCATGACCAGGCTAGCCTGCT GGCTGTCCCGCAGGGTGC
11	S137G/ Q138Y	CAGCAGAAAAGCCTGGTCATGGGGTACCCCT ACGAGCTGAAGGCACTGC	GCAGTGCCTTCAGCTCGTAGGGGTACC CCATGACCAGGCTTTTCTGCTG
12	L145G	GCCCCTACGAGCTGAAGGCAGGTCATCTGCA GGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGATGACCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGC
13	H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG
14	H146G	CCTACGAGCTGAAGGCACTGGGTCTGCAGG GCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGACCCAGTG CCTTCAGCTCGTAGG
15	H146E	GCTGAAGGCACTGGAGCTGCAGGGCCAGG	CCTGGCCCTGCAGCTCCAGTGCCTTCA GC
16	H146N	AGCTGAAGGCACTGAATCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGATTAGTGCCTTCAGC T
17	H146R	CTGAAGGCACTGCGTCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGACGCAGTGCCTTCAG
18	L145A/ L147A	GCGGCCCCCTACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCGCATGCGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCGC
19	Q148E	GGCACTGCATCTGGAGGGCCAGGACAT	ATGTCCTGGCCCTCCAGATGCAGTGCC
20	Q148G	GAAGGCACTGCATCTGGGTGGCCAGGACAT GGAACAGC	GCTGTTCCATGTCCTGGCCACCCAGATG CAGTGCCTTC
21	Q148L	GCACTGCATCTGCTGGGCCAGGACATG	CATGTCCTGGCCAGCAGATGCAGTGC
22	Q148G/ Q150G	CGAGCTGAAGGCACTGCATCTGGGGGGCGG GGACATGGAACAGCAGG	CCTGCTGTTCCATGTCCCCGCCCCCA GATGCAGTGCCTTCAGCTCG
23	Q150G/ D151A	GCACTGCATCTGCAGGGCGGGGCCATGGAA CAGCAGGTCGTGTTTCAGC	GCTGAACACGACCTGCTGTTCCATGGCC CCGCCCTGCAGATGCAGTGC
24	M152G	GCACTGCATCTGCAGGGCCAGGACGGGGAA CAGCAGGTGGTGTTCAGCATGAGC	GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC CCGTCCTGGCCCTGCAGATGCAGTGC
25	F162A	CATGGAACAGCAGGTGGTGTTCAGCATGAGC GCCGTGCAGGGCGAGGAAAGCAACGAC	GTCGTTGCTTTCTCGCCCTGCACGGC GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC ATG
26	F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTTCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
27	F166A	CCGACTTCACCATGCAGGCCGTCTCCAGCGG CGGCAGCAGATCTGG	CCAGATCTGCTGCCGCCGCTGGAGACG GCCTGCATGGTGAAGTCGG
28	Q164E/ E167K	GCATGAGCTTCGTGGGGGGCAAGGAAAGCA ATGACAAGATCCCCGTGGCC	GGCCACGGGGATCTTGTCATTGCTTTCC TTGCCCCCACGAAGCTCATGC
29	N169G/ D170G	GCAGGGCGAGGAAAGCGGCGGCAAGATCCC CGTGGCCCTAGGCCTGAAAGAGAAG	CTTCTCTTTCAGGCCCTAGGGCCACGGG GATCTTGCCGCCGCTTTCTCGCCCTGC
30	I172A	GAAAGCAACGACAAGGCCCCCGTGGCCCTG GG	CCCAGGGCCACGGGGGCCTTGTCGTTG CTTTC
31	V174A	GCAACGACAAGATCCCCGCGGCCCTGGGCC	CTTTCAGGCCAGGGCCGCGGGGATCT

10

20

30

40

		フォワードプライマー	リバースプライマー	
		TGAAAG	TGTCGTTGC	
32	K208E	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAAGCTAC CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTTCCATCTTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTCCAGCTGC	
33	K209A	CCCCAAGAAGCTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAGCGCTTCGTGTTCAAC	GTTGAACACGAAGCGCTTTTCCATCTTT GCCTTGGGGTAGTTCTTGGGG	
34	K209D	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAAGCTAC CCCAAGGACAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTTCCATCTTGTCTTGGGGTAG TTCTTGGGATCCACGCTTCCAGCTGC	
35	K209A/ K210A	CCCCAAGAAGCTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAACGCTTCGTGTTTC	GAACACGAAGCGTTTTTCCATCGCTGCC TTGGGGTAGTTCTTGGGG	10
36	K219S	AAAAACGCTTCGTGTTCAACAGCATCGAGAT CAACAACAAGCTC	GAGCTTGTGTTGATCTCGATGCTGTTG AACACGAAGCGTTTTT	
37	K219Q	AAAAACGCTTCGTGTTCAACAGCATCGAGAT CAACAACAAG	CTTGTGTTGATCTCGATCTGTTGAAC ACGAAGCGTTTTT	
38	E221S	GCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACAAC AAGCTCGAGT	ACTCGAGCTTGTGTTGATCGAGATCTT GTTGAACACGAAGC	
39	E221K	CTTCGTGTTCAACAAGATCAAGATCAACAACA AGCTCGA	TCGAGCTTGTGTTGATCTTGTGTTGTT GAACACGAAG	
40	K219S/ E221S	GGAAAAACGCTTCGTCTTCAACAGCATCTCG ATCAACAACAAGCTCGAGTTTCG	CGAACTCGAGCTTGTGTTGATCGAGAT GCTGTTGAAGACGAAGCGTTTTTCC	20
41	E221S/ N224A	CGCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACG CCAAGCTCGAGTTTCGAG	CTCGAACTCGAGCTTGGCGTTGATCGAG ATCTTGTGTTGAACACGAAGCG	
42	N224S/ K225S	CAACAAGATCGAGATCAACAGCAGCCTCGAA TTCGAGAGCGCCAG	CTGGGCGCTCTCGAATTCGAGGCTGCT GTTGATCTCGATCTTGTGTTG	
43	E244K	CCCCAAGTGGTACATCAGTACTAGTCAGGCC AAGAATATGCCCCGTGTTCC	GGAACACGGGCATATTCTTGGCCTGACT AGTACTGATGTACCAGTTGGGG	
44	N245Q	CAGCACTAGTCAGGCCGAGCAGATGCCCCGT CTTCCTGGGCGGCACC	GGTGCCGCCCAGGAAGACGGGCATCTG CTCGGCCTGACTAGTGCTG	30
45	E244K/ N245Q	CATCAGCACTAGTCAGGCCAAGCAGATGCCC GTCTTCCTGGGCGGCACC	GGTGCCGCCCAGGAAGACGGGCATCTG CTTGGCCTGACTAGTGCTGATG	
46	R120G/ * Q131G	GCGGCAGCGCCCCTGTCGGAAGCTTGAAGT GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC	
47	R120G/ * H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG	
49	R120G/ * L145A/ L147A	GCGGCCCCCTACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCGCATGCGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCGC	
48	R120G/ ** Q148G	GCGGCAGCGCCCCTGTCGGAAGCTTGAAGT GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC	40
50	R120G/ * F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTGAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTATTGCTTTCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C	
51	R120G/ * K208E	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAAGCTAC CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTTCCATCTTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTCCAGCTGC	

		フォワードプライマー	リバースプライマー
52	Q131G/	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTC	CGCTCATGACCAGGCTCTTCCCCTGGCT
**	Q148G	ATGAGCG	GTCCCGCAG
53	Q148G/	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA	GGATCTTGTCATTGCTTTCTCGCCCTC
**	F162A/ Q164E	GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
54	Q148G/	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC	GCGTTTTTCCATCTTTTTCTCGGGGTAGT
**	K208E	CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	TCTTGGGATCCACGCTTTCCAGCTGC

*二重／三重変異体は、鋳型としてR 1 2 0 Gを使用して生成した。**二重／三重変異体は、鋳型としてQ 1 4 8 Gを使用して生成した。

10

IL - 1 融合タンパク質の産生。

【 0 0 2 1 】

IL - 1 融合タンパク質は、HEK 2 9 3 T細胞において産生した。小規模産生のため、HEK 2 9 3 T細胞を、1 0 % FCSを補充したDMEM中において4 0 0 , 0 0 0細胞／ウェルで6ウェルプレートに播種した。2 4時間後、培地を低血清（DMEM / 5 % FCS）培地と置き換え、線状PEIを使用して細胞をトランスフェクトした。簡潔に述べると、PEIトランスフェクション混合液は、1 6 0 μ lのDMEM中にて、1 μ g発現ベクターと5 μ g PEIを混合することにより調製し、室温にて1 0分間インキュベートして、ウェルに滴下添加した。2 4時間後、トランスフェクト細胞をDMEMで洗

20

浄し、タンパク質産生のために1 . 5 m l Opt i M e m / ウェルで積層した。4 8時間後に馴化培地を回復させ、0 . 4 5 μ フィルターに通して濾過し、- 2 0 にて保存した。馴化培地中のIL - 1 含有量は、メーカーの指示に従ってE l i s a (R & D S y s t e m s 社) によって決定した。

【 0 0 2 2 】

IL - 1 R活性化を評価するために、IL - 1 Rを安定的に発現するHEK - B l u e (商標) IL - 1 細胞 (I n v i v o g e n 社) を使用し、その細胞をNF - B ルシフェラーゼレポーター遺伝子で一過性トランスフェクトした。簡潔に述べると、HEK - B l u e (商標) IL - 1 細胞を9 6ウェルプレートにて培地 (DMEM / 1 0 % FCS) に播種して (1 0 , 0 0 0細胞／ウェル)、表示量の発現プラスミド及び5 n g / ウェルの3 B - L u cレポーター遺伝子プラスミド (V a n d e n B e r g h e e t a l . , 1 9 9 8) を用いたリン酸カルシウム沈降法を使用して、翌日トランスフェクトした。トランスフェクション後2 4時間で、培地を飢餓培地 (DMEM) と置き換え、トランスフェクション後4 8時間で、細胞を融合タンパク質で6時間誘導した。誘導後、細胞を溶解させて、溶解物中のルシフェラーゼ活性を、ベルトールド社centro LB 9 6 0 ルミノメーター上で、プロメガ社Firefly Luciferase Assay Systemを使用して決定した。

30

共焦点顕微鏡によるNF - B核転座解析。

【 0 0 2 3 】

共焦点イメージングのために、1 0 ⁵ HEK 2 9 3 - T細胞／ウェル (6ウェルプレートにて) を、ポリ - L - リジン (S i g m a 社) でコーティングしたカバーガラス (Z e i s s 社) 上に播種した。その翌日、細胞をリン酸カルシウム沈降法を使用して、2 0 0 n g / ウェルの空ベクターまたはHER 2 c y t発現プラスミドでトランスフェクトした。4 8時間後、細胞をビヒクル (培地) またはIL 1 - H e r 2 ナノボディ融合タンパク質 (1 0 n g / m l) で3 0分間処理した。次に、細胞を1 x P B Sですすぎ、4 % パラホルムアルデヒド中で室温にて1 5分間固定した。1 x P B Sで3回洗浄した後、細胞を1 x P B S中にて0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0で1 0分間透過処理し、1 x P B Sの1 % B S A中で室温にて更に1 0分間ブロッキングした。次いで、サンプルをウサギ抗p 6 5抗体 (S a n t a C r u z 社C 2 0、希釈1 : 8 0 0) 及びマウス抗F l a

40

50

g抗体 (Sigma社 M2、1:2000) で、37℃ にて1時間インキュベートした。1×PBSで4回洗浄した後、細胞を抗ウサギAlexa488及び抗マウスAlexa594蛍光色素結合二次抗体 (両方とも希釈1:800) で、室温にて1時間インキュベートした。二次抗体インキュベーション後、細胞を1×PBS中で4回洗浄し、細胞核をDAPI (2 µg/ml) で染色した。1×PBSでの最終洗浄ステップ後、没食子酸プロピルを使用してカバーガラスを載せた。オリンパス社IX-81レーザー走査型共焦点顕微鏡で60倍1.35 NA対物レンズを使用して画像を得て、Fluoview1000ソフトウェアを使用して解析した。

実施例1: IL-1 リガンド及びIL-1 ナノボディ融合タンパク質。

【0024】

図1は、WT hIL-1 または表Iに記載されているhIL1 変異体のいずれかで構築されたIL-1 ナノボディ融合タンパク質の図解を示す。

実施例2: 選択した変異体IL-1 ナノボディ融合のIL-1 活性を、Nb標的を発現する細胞上で回復させる。

【0025】

野生型IL-1 及び45 IL-1 変異体 (表I) を、Her2を認識するよう十分に特徴付けされたナノボディ (1R59B) に融合させた。IL-1 ナノボディ融合タンパク質を、NF- κ B レポーター遺伝子プラスミド (5 ng/ウェル) 及びHer2 c y t (シグナル伝達欠損) 発現プラスミド (2 ng/ウェル) で一過性トランスフェクトしたHEK-B l u e (商標) IL-1 細胞にて試験した。細胞は、IL-1 - Her2ナノボディ融合で6時間処理した (0, 4~250 ng/ml までの用量反応)。図2Aに示した通り、IL-1 - Q148G - Her2ナノボディ融合は、WT IL-1 - Her2ナノボディ融合と比較して、NF- κ B を活性化させる能力の低下を示した。重要なのは、Q148G変異体のHer2 c y t発現細胞への標的化は、その活性を回復し、m o c kトランスフェクト細胞上のWT IL-1 の曲線と完全に平行なNF- κ B 活性の用量反応曲線を生成した。また、この図から明らかなのは、WT IL-1 - Her2ナノボディ融合に対する強力な標的化効果である。類似の“標的化による活性化”効果が、Her2ナノボディに融合した6つのその他IL-1 変異体 (R120G、Q131G、H146A、H145A/L147A、F162A/Q164E 及びK208E) で観察された (図2B)。

【0026】

“標的化による活性化”構想の更なる証拠を得るために、次にIL-1 - Her2ナノボディ融合によるHer2発現細胞でのNF- κ Bの選択的活性化を、共焦点顕微鏡によって可視化できるか否かについて調査した。NF- κ B核転座アッセイにより、内因性NF- κ Bの活性化を測定した。図3から明らかな通り、WT IL-1 - Her2ナノボディ融合のみが、Her2を発現しない細胞において内因性NF- κ Bの転座を促進させた。m o c kトランスフェクト細胞において検出可能なNF- κ B転座を促進させなかったのに対して、試験した3つの変異体IL-1 - Her2ナノボディ融合は、Her2に対して陽性を示すようにも染色された細胞においてNF- κ B核転座を誘発し、これらの変異体が、標的細胞にのみ作用することを示した。

【0027】

“標的化による活性化”構想が、ナノボディを使用して関連のない膜タンパク質にも同様に作用するか否かを評価するために、WT IL-1 及び5つの機能しないIL-1 変異体 (R120G、Q131G、H146A、Q148G、K209A) を、mLRを認識するよう事前に特徴付けたナノボディ (4-10) に融合した。IL-1 - Her2ナノボディ融合 (図2) について報告したのと同様の実験を、mLR発現プラスミド (10 ng/ウェル) で一過性トランスフェクトしたHEK-B l u e (商標) IL-1 細胞を使用して実施した。Her2ナノボディ融合タンパク質で得られた結果と同様に、調査したすべての変異体IL-1 ナノボディ融合 (12.5 ng/ml で試験した) で、WT融合と比較して、mLRを発現しない細胞上でNF- κ Bを活性化させる能力

10

20

30

40

50

の低下を示した。しかしながら、m L R ナノボディ部分による標的化は、選択した変異体の活性を部分的に回復させた（図4）。

【0028】

上記 I L - 1 変異体は、重要な生物活性を残したままであったので、異なる変異体を合成し、低下した基本活性を有する二重／三重変異体を得た。9つの二重／三重変異体を試験した（表Iの変異体46～54を参照）。これらからの、6つの変異体タンパク質（Q131G/Q148G、Q148G/K208E、R120G/Q131G、R120G/Q131G、R120G/H146A、R120G/K208E、R120G/F162A/Q164E）は、H e r 2 陰性細胞に対して（図2における様なN F - Bを測定する同様のアッセイを使用して）活性の残りを示さなかったが、部分的に保持された活性が、H e r 2 c y t を過剰発現する細胞上で見られた（図5）。

10

【0029】

これらのデータはすべて、細胞表面受容体を認識するナノボディに変異体を融合することによる、部分的に不活性な変異体 I L - 1 の標的化が、恐らく膜の濃度効果による強制的な受容体相互作用によって、ナノボディ標的細胞に対してその活性を回復することができることを示している。標的化による活性化が、異なる分類の膜タンパク質を認識するナノボディを使用して達成することができるという事実は、“標的化による活性化”構想の幅広い応用性を示している。

【0030】

これらのデータは、選択した細胞型への、これらの標的細胞のみに活性を保持する変異体 I L - 1 ファミリーメンバーの標的化能力に対する構想の証拠を提供するので、I L - 1 ファミリーメンバーの、生理学的に関連のある I L - 1 標的細胞への標的化を可能にするナノボディを生成する。T細胞及びNK細胞活性化因子としての I L - 1 ファミリーメンバーの重要な役割を考慮して、ナノボディは、I L - 1 をT細胞及びNK細胞へ特異的に標的化するように設計する。より具体的には、T h 1 7 細胞上で優勢に発現される C C R 6 を標的とするナノボディに加えて、細胞傷害性T細胞上で C D 8 を標的とするナノボディを開発し、I L 1 ファミリーメンバー、好ましくは I L - 1 に融合する。

20

実施例3：初代ヒトT細胞による I L - 1 7 産生に対する I L - 1 ナノボディ融合の効果。

【0031】

初代ヒトT細胞は、軟膜から単離した。最初に、l y m p h o p r e p 密度勾配遠心分離によってP B M C を単離し、回復のために0.5 n g / m l の r h I L - 2 でO / N インキュベートした。次に、T細胞をメーカーの指示に従って、p a n - T c e l l アイスレーションキット（M i l t e n y i B i o t e c 社）を使用して単離した。簡潔に述べると、T細胞を10% F C S 及びC D 3 / C D 2 8 活性化マイクロビーズ（M i l t e n y i B i o t e c 社）を補充したR P M I - 1 6 4 0 中に再懸濁（ 1×10^6 / m l ）した。次に、細胞（100 μ l / ウェル）をU底96ウェルプレートに播種し、表示濃度の I L - 1 変異型で96時間刺激した。P M A / イオノマイシン（両方とも100 n M にて）で更に6時間刺激した後、上清を回収して、I L - 1 7 レベルをE l i s a （R & D S y s t e m s 社）によって決定した。追加のサイトカインは、L u m i n e x 技術によって評価する。

30

40

【0032】

選択した変異体 I L - 1 ナノボディ融合（例えば、C C R 6 を標的としたナノボディを有する）のために、標的細胞特異的 I L - 1 7 及びI F N の産生を、フローサイトメトリーアプローチを使用して細胞内染色によって評価する。

【0033】

また、T h 1 7 集団の選択性を裏付けるために、F l a g タグを使用した二重染色によってP B M C 亜集団への結合を測定して、C D マーカーを選択し、続いてフローサイトメトリー解析を行う。

【0034】

50

最後に、臨床的に関連するヒトTh17細胞機能のインビトロモデルにおいて、IL-1 ナノボディ融合のアジュバント活性を評価する。百日咳菌に対するより効果的なワクチン（または既存ワクチンのアジュバント）の必要性を考慮して、選択した融合タンパク質が、百日咳菌処理単球由来樹状細胞（MDDC）を用いたナイーブT細胞の共培養モデルにおいて、ヒトTh17応答を増大させるか否かを決定した。ヒトMDDCは、軟膜から単離し（monocyteアイソレーションキットIIを使用、Miltenyi Biotec社）、異なる比率の百日咳菌で48時間処理し、次いで同種ナイーブT細胞と12日間共培養する。抗CD3/抗CD28での再刺激後、上清中のサイトカインプロファイル、Elisa/Luminex技術（上記参照）を使用して決定する。

実施例4：CTLに対するIL-1 ナノボディ融合の効果

10

【0035】

IL-1 - CD8ナノボディ融合が、CD8+T細胞の機能を特異的に高めることができるか否かを評価するために、ヒトPBMCを、lymphoprep密度勾配遠心分離によって軟膜から単離し、wtまたは変異体IL1 - CD8Nb融合と組み合わせたCD3/CD28活性化マイクロビーズ（Miltenyi Biotec社）で24時間刺激する。CD8+T細胞活性化に対するこれらの融合タンパク質の効果を、活性化（リン酸化）NF- κ B及びIFN γ の細胞内染色を実施することにより評価する。加えて、IL-1 ナノボディ融合がCTL脱顆粒に影響を及ぼすか否かを調査するために、PBMC（ 2×10^6 細胞/ml）を、漸増用量のIL-1 融合タンパク質と組み合わせたフィトヘムアグルチニン（PHA、 $1 \mu\text{g/ml}$ ）及びIL-2（ 100 IU/ml ）の存在下において、48時間分化させる。次に、脱顆粒を誘導するために、細胞をCD3/CD28 dynabeadsで3時間刺激して、フローサイトメトリーによって解析する。脱顆粒は、ナチュラルキラー活性の十分に確立されたマーカーである、細胞表面CD107aを検出して測定する。白血球プールでのすべてのフローサイトメトリー解析では、抗CD8染色を、IL-1 - CD8Nb効果の細胞型特異性のモニタリングができるようにするために含む。

20

【0036】

最後に、IL-1 - CD8ナノボディ融合が、インビボでの抗腫瘍活性を促進するか否かを評価するために、C57BL/6マウスに、HPV16からE6及びE7抗原癌タンパク質を生成するTC1腫瘍細胞を、皮下注射する。このモデルは、IL-1 がCD8+T細胞媒介、抗原特異的、抗腫瘍応答を促進させることを実証するのにこれまで使用された（Ben-Sasson, 2013）。簡潔に述べると、腫瘍注入後の4日間で、WTもしくは変異体IL-1 - CD8 Nb融合もしくはIL-1 - GFP Nb融合を使用または使用せずに、DOTAP及びLPSを組み合わせたHPV16E7₄₉₋₅₇ペプチド含有ワクチンでマウスを免疫化する。腫瘍サイズは、免疫付与後18日間モニタリングする。

30

実施例5：インビボ実験 - ワクチンアジュバント効果。

【0037】

最初の一連の実験では、急性毒性をモニタリングするために、C57BL/6マウスを、異なる用量のWT及び変異体IL-1 ナノボディ融合及び非融合IL-1 でiv/ip（静脈内/腹腔内）にて処理する。静脈血は、処理後の異なる時間で尾静脈穿刺により収集し、血清中のサイトカインプロファイルをLuminexアッセイにより決定する。加えて、フローサイトメトリー解析により、細胞内サイトカインレベル（IL-17、IFN γ ）及びIL-1Rの活性化（リン酸化NF- κ Bレベルの測定により評価したように）を、選択した白血球サブセットで決定する。

40

【0038】

至適用量を確立した場合、マウスワクチン接種プロトコルにおいてそのアジュバント活性を評価する。簡潔に述べると、C57BL/6マウスをipにて無細胞百日咳ワクチン（Pa）で免疫化する。Paワクチンは、 $5 \mu\text{g}$ /マウスの精製した組換え無毒化百日咳毒素（PT9K/129G）+線維状赤血球凝集素（FHA）（Brereton e

50

t al., 2011による組成物)で構成される。免疫付与後24時間で、選択した変異体IL1-NbまたはPBSをipまたはivにて投与する。動物は、28日後に追加免疫化する。1組みの動物を、2回目の免疫付与後14日で犠牲死させ、脾細胞を単離し、培地またはFHAでインビトロにて3日間再刺激する。培地上清中のサイトカインレベル(IL-17、IFN、IL-2、IL-10、IL-5、IL-4など)を、Luminex技術によって決定する。2組目のマウスは、免疫付与後14日目に百日咳菌を投与し、その投与後2時間及び5日及び10日で犠牲死させる。肺を単離し、肺ホモジネートのCFUをボルデー-ジャング寒天プレート上で定量化する。肺ホモジネート中のサイトカインレベルを、脾細胞上清において決定する。

【0039】

10

加えて、免疫付与前、次いで14日毎に、血清中の百日咳菌特異的IgGレベルを定量するために血液を(尾静脈から)サンプリングする。

実施例6: IL-1 ナノボディ融合の直接的な抗腫瘍効果

【0040】

選択したIL1ナノボディ融合の直接的な抗腫瘍活性を調査するために、IL-1誘導細胞増殖抑制効果の感受性が非常に高いことが示された(Morinaga et al., 1990)、ヒトA375メラノーマ細胞を使用する。変異体IL-1ファミリーメンバーの、A375細胞への標的化を可能にするために、すでに高親和性ナノボディの利用が可能な細胞表面マーカー(すなわち、CD20)を発現する安定したA375クローンを産生する。変異体IL1ナノボディ融合の抗増殖効果に対する、A375親細胞と比較したクローン細胞株の感受性を、XTT増殖アッセイを使用してインビトロで調査する。変異体IL-1ナノボディ融合のインビボ抗腫瘍活性は、A375異種移植モデルを使用して調査する。簡潔に述べると、A375細胞(親細胞または標的化のために表面マーカーを発現する細胞)を無胸腺ヌードマウスに皮下接種し、腫瘍増殖を、PBSまたは変異体IL1ナノボディ融合で処理した動物で、4週間モニタリングする。

20

実施例7: IL18への効果拡大: 腫瘍モデルにおける応用

【0041】

IL1ファミリーメンバーの間接的な抗腫瘍活性を評価するために、IL-18の抗腫瘍活性を実証するのにこれまで使用されたプロトコル(Micallef et al., 1997)に従って、Meth A同系マウス肉腫モデルを使用して、選択した変異体IL-18ナノボディ融合の有効性を確認する実験を行う。これらの実験で使用したIL18変異型は、殺腫瘍特性を持つ免疫細胞(すなわち、CTL、NK細胞)を標的とするナノボディに融合した変異体IL-18で構成される。マウスをこの構築物で処理すると、mock処理コントロールと比較した場合、腫瘍の有意な減少を示す。

30

参考文献

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanza vecchia A, Sallusto F. (2007) Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. Nat Immunol. 8:942-9.

40

Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. (2007) Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potentially activates and drives maturation of human mast cells. J Immunol. 179:2051-4.

Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Huli J, Paul WE. (2011) IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo

50

immune responses. *Cytokine*. 56:122-5.

Ben-Sasson SZ, Hogg A, Hu-Li J, Wingfield P, Chen X, Crank M, Caucheteux S, Ratner-Hurevich M, Berzofsky JA, Nir-Paz R, Paul WE. (2013) IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med*. 210:491-502.

Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. and Knox, J.P. (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem*. 281, 29321-29329.

Bonilla WV, Frohlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemeznz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Lohning M, Pinschewer DD. (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science*. 335:984-9.

Brecht A., Gauglitz G., Polster J. (1993). Interferometric immunoassay in a FIA-system - A sensitive and rapid approach in label-free immunosensing., *Biosens Bioelectron* 8:387-392.

Brereton CF, Sutton CE, Ross PJ, Iwakura Y, Pizza M, Rappuoli R, Lavelle EC, Mills KH. (2011). *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5896-906.

Dimitrov, D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies). *mAbs* 1, 26-28.

Dinareello CA, Simon A, van der Meer JW. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 11:633-52.

Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P, Mills KH. (2010). Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 185:1711-9.

Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced pro

- protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7980-9. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cillely GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*. 2007 8:369-77. 10
- Killar, L.M., Hatfield, C.A., Carding, S.R., Pan, M., Winterrowd, G.E. and Botto mly, K. (1989) In vivo administration of interleukin 1 elicits an increased la antigen expression on B cells through the production of interleukin 4. *Eur. J. Immunol*. 19, 2205-2210.
- Kinoshita, M., Miyazaki, H., Ono, S., Inatsu, A., Nakashima, H., Tsujimoto, H., Shinomiya, N., Saitoh, D. and Seki, S. (2011). Enhancement of neutrophil function by interleukin 18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun*. 79, 2670-2680. 20
- Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins. *FEBS J*. 275, 2684-2690. 30
- Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. (2001). A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol*. 167:2879-86.
- Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. (2008). IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth. *Cancer Gene Ther*. 15:787-94. 40
- Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. (1997). Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res*. ;57:4557-63.
- Morinaga Y, Hayashi H, Takeuchi A, Onozaki K. (1990). Antiproliferative effect of interleukin 1 (IL-1) on tumor cells: G 50

0 - G1 arrest of a human melanoma cell line by IL-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 173:186-92.

Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et al. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 378:88-91.

10

Rangnekar VV, Waheed S, Rangnekar VM. (1992). Interleukin-1-inducible tumor growth arrest is characterized by activation of cell type-specific "early" gene expression programs. *J Biol Chem.* 267:6240-8.

Robertson MJ, Kirkwood JM, Logan TF, Koch KM, Kathman S, Kirby LC, Bell WN, Thurmond LM, Weisenbach J, Dar MM. (2008). A dose-escalation study of recombinant human interleukin-18 using two different schedules of administration in patients with cancer. *Clin Cancer Res.* 14:3462-9.

Scatchard G. (1949). *Ann New York Acad Sci* 51, 660-72.

20

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 23:479-90.

30

Shaw MH, Kamada N, Kim YG, Nunez G. (2012). Microbiota-induced IL-1, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med.* 209:251-8.

40

Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. (2010). *Nat Rev Immunol.* 10:89-102.

Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.

Stump, M.T., Binz, H.K., Amstutz, P. (20

50

08) DARPinS: a new generation of protein therapeutics. Drug Discov. Today 13, 695-701.

Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med. 203:1685-91.

Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. Immunity. 8:383-90.

Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A and Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. J. Mol. Recognition 7, 9-24.

Usui N, Mimnaugh EG, Sinha BK. (1991). A role for the interleukin 1 receptor in the synergistic antitumor effects of human interleukin 1 alpha and etoposide against human melanoma cells. Cancer Res. 1991 51:769-74.

Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. J Biol Chem. 273:3285-90.

Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V. (2011). Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J. 25:2433-46.

Wigginton JM, Lee JK, Wiltrout TA, Alvor d WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wiltrout RH. (2002). Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2. J Immunol. 169:4467-74.

Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in

10

20

30

40

50

human disease. Trends Immunol. 32:603-11

Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med. 194:519-27.

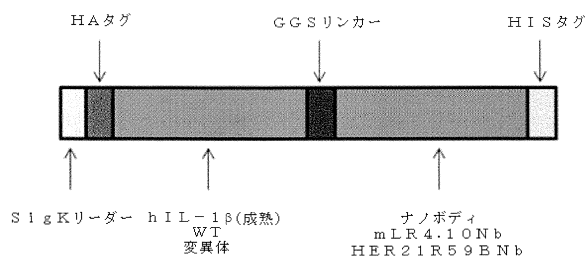
Zabeau L, Verhee A, Catteeuw D, Faes L, Seeuws S, Decruy T, Elewaut D, Peelman F, Tavernier J. (2012). Selection of non-competitive leptin antagonists using a random nanobody-based approach. Biochem J. 441:425-34.

Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. (2010). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. J Immunol. 185:4912-20.

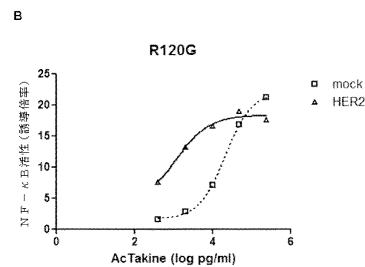
10

20

【図1】

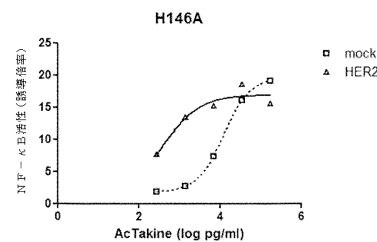
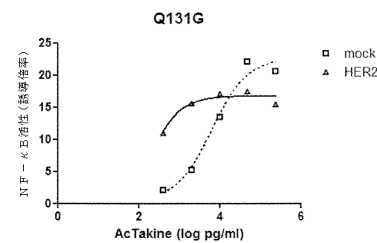
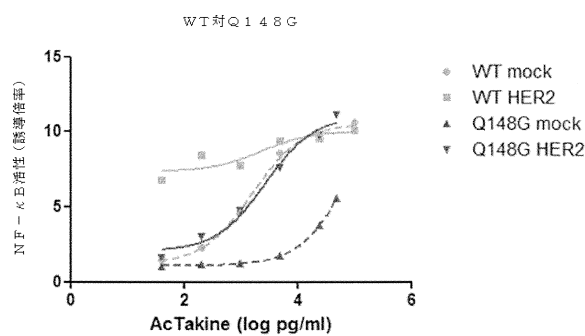


【図2-2】

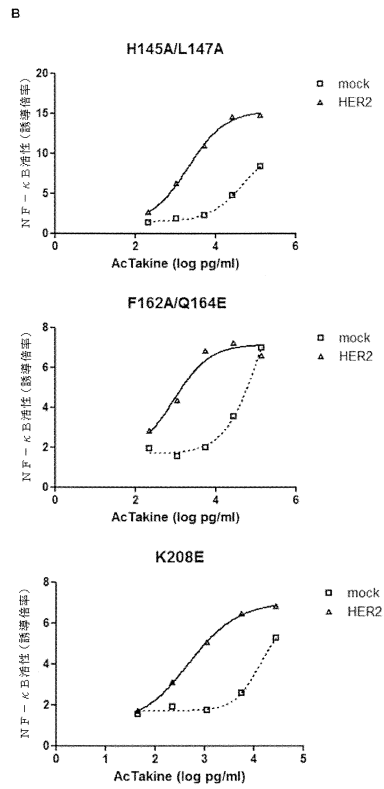


【図2-1】

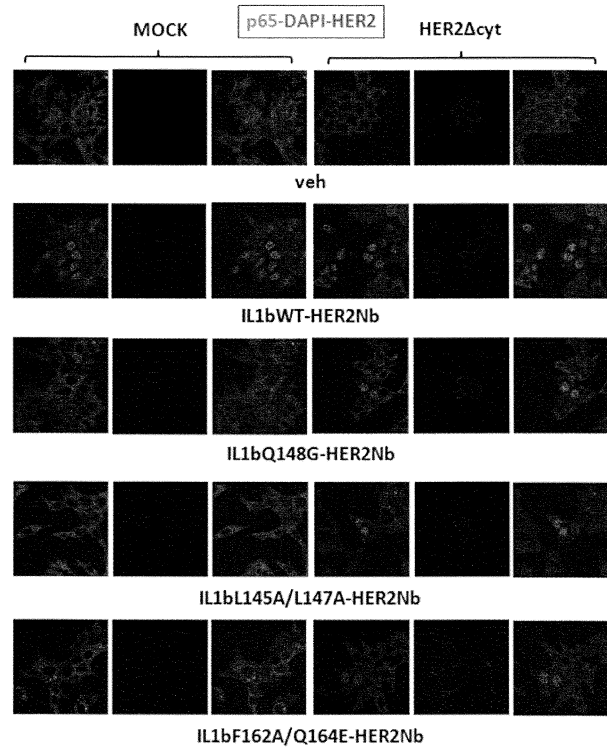
A



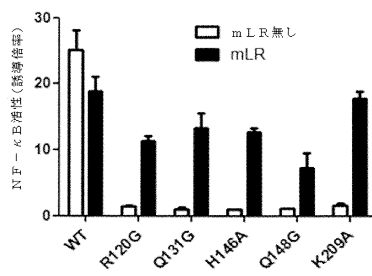
【図 2 - 3】



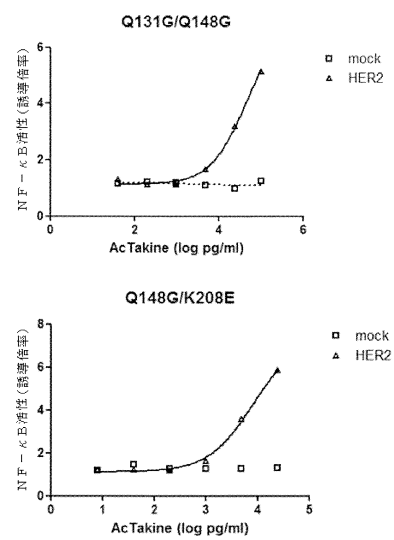
【図 3】



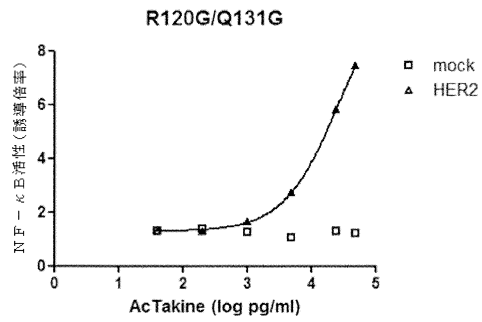
【図 4】



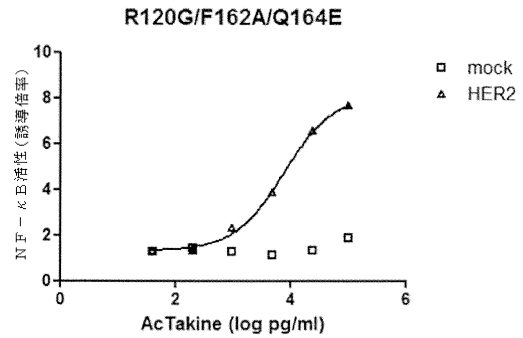
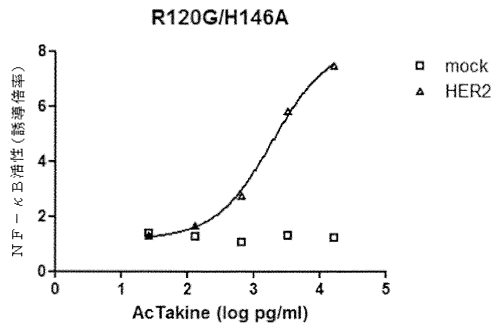
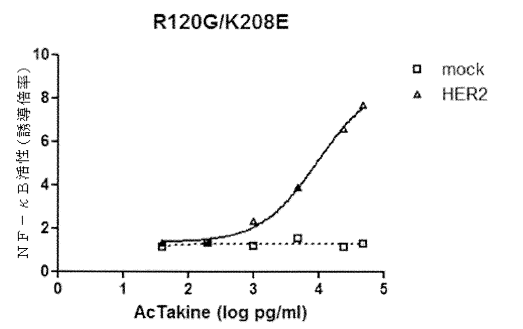
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



【図 5 - 3】



【配列表】

0006475713000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/545 (2006.01)	C 0 7 K	14/545
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20

(73)特許権者 514185655

ユニベルシテ ドゥ モンペリエ

フランス国, 3 4 0 9 0 モンペリエ, 1 6 3 リュ オーギュスト ブロウソンネット

(73)特許権者 516003780

ソントル オスピタリエ レジョナル ユニベルシテール ド モンペリエ

フランス国, エフ - 3 4 2 9 5 モンペリエ, 1 9 1 アベニュー デュ ドワイアン ガストン
ジロー

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 タヴェルニエール, ジャン

ベルギー国, ビー - 9 8 6 0, バエーゲーム, ボッテルウェグ 2

(72)発明者 ゲルロ, サラ

ベルギー国, ビー - 9 0 0 0 ヘント, ウィンターストラート 1 5

(72)発明者 ペエルマン, フランク

ベルギー国, ビー - 9 0 5 0 ヘントブルヘ, デザイアー メルシエルラアン 4 6

(72)発明者 ウゼ, ジルス

フランス国, エフ - 3 4 0 9 0 モンペリエ, 1 1 アヴェニュー デ カステルノ, 4 エンク
ロス ラッフオウックス

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 8 / 1 2 4 0 8 6 (WO, A 1)

特表2 0 1 3 - 5 0 4 5 3 9 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)