

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6420200号
(P6420200)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int.Cl. F I
C O 7 K 16/18 (2006.01) C O 7 K 16/18 Z N A

請求項の数 1 (全 206 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2015-94805 (P2015-94805) (22) 出願日 平成27年5月7日(2015.5.7) (62) 分割の表示 特願2012-105089 (P2012-105089) の分割 原出願日 平成18年5月17日(2006.5.17) (65) 公開番号 特開2015-157850 (P2015-157850A) (43) 公開日 平成27年9月3日(2015.9.3) 審査請求日 平成27年6月5日(2015.6.5) 審判番号 不服2017-4375 (P2017-4375/J1) 審判請求日 平成29年3月28日(2017.3.28) (31) 優先権主張番号 60/682, 332 (32) 優先日 平成17年5月18日(2005.5.18) (33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 505166225 アブリンクス エン. ヴェー. ベルギー, ベー-9052 ヘントーツヴ イナールデ, テヒノロジーパルク 21 (74) 代理人 110001508 特許業務法人 津国 (72) 発明者 バイラーナエール, イーエルエス ベルギー, ベー-9881 ベレム, マル ケッテストラート 20アー 合議体 審判長 長井 啓子 審判官 中島 庸子 審判官 松浦 安紀子</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍壊死因子-アルファに対する改良ナノボディ (商標)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

四つのフレームワーク領域(それぞれFR1からFR4)及び三つの相補性決定領域(それぞれCDR1からCDR3)からなり、ヒト血清アルブミンに10nM未満の平衡定数(KD)で特異的に結合するナノボディであって、

(i) CDR1が、アミノ酸配列SFGMS(配列番号36)を含むか、又は

CDR1が、配列番号36と1つのアミノ酸の相違を有する、及び

(ii) CDR2が、アミノ酸配列SISGSGSDTLYADSVKG(配列番号40)を含むか、又は

CDR2が、配列番号40と1つのアミノ酸の相違を有する、及び

(iii) CDR3が、アミノ酸配列GGSLSR(配列番号48)を含むか、又は

CDR3が、配列番号48と1つのアミノ酸の相違を有する、

ナノボディ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍壊死因子-アルファ(TNF-α)に対する改良ナノボディ(商標)および1つ以上の該ナノボディを含む、または主成分とするポリペプチドに関する。

[注意: ナノボディ(商標)、ナノボディ(商標)、Nanoclone(商標)はAblynx N.V.の商標である]

【0002】

発明は、該ナノボディおよびポリペプチドをコードする核酸、該ナノボディおよびポリペプチドの調製方法、該ナノボディまたはポリペプチドを発現するか、または発現可能な宿主細胞、該ナノボディ、該ポリペプチド、核酸、または宿主細胞を含む組成物、そして特に下記の予防、治療、診断を目的とした該ナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、組成物の使用方法にも関する。

【0003】

本発明の他の態様、実施態様、長所、適用は、本明細書の以下でのさらなる記述から明らかになる。

【背景技術】

10

【0004】

出願人による特許文献1は、TNF アルファに対するナノボディおよび該ナノボディの調製、そして特に、炎症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫耳下腺炎、糖尿病タイプI、精巢上体炎、糸球体腎炎、グレース病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天痘瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、脈管炎などのTNF アルファが関連する、および/または媒介する疾患および障害の予防および/または治療における使用方法に関する。

【0005】

20

特許文献1記載の抗TNFナノボディはヒト化させることができ、一価または多価でありうるが、後者によってTNFに対する親和性が増大する。特許文献1記載の抗TNFナノボディ(商標)は多特異的であり、特に、TNFに対する2つ以上のナノボディ、そしてインビボでの半減期を延長させるヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質に対するナノボディをさらに含む多特異的構造物の形を取り得る。

【0006】

特許文献1は、静脈内、皮下、経口、舌下、局所、経鼻、腔内、直腸内、または吸入投与に適した抗TNFナノボディを含む医薬組成物の他、該抗TNFナノボディの調製方法、該抗TNFナノボディをコードする核酸または構造物にも関する。特許文献1記載の抗TNFナノボディは、任意に「キットの一部」の形で、診断目的でも使用されうる。

30

【0007】

特許文献2では、TNFの特定エピトープに対するTNF アルファ結合リガンドについて記載されている。結合リガンドの内、一つのドメイン抗体(「dAbs」)について言及している。

【0008】

非特許文献1では、マウスハイブリドーマから、VHドメイン骨格から始めて作成されたランダム化ファージディスプレイライブラリーから得たTNF アルファに対する単一ドメイン抗体について記載している。

【0009】

特許文献3では、TNF アルファに対するマウスの単一ドメイン抗体(「マイクロボディ」)について記載している。

40

【0010】

特許文献4では、TNF アルファに対する第一結合ドメインと血清アルブミンなどの血清タンパク質に対する第二結合ドメインを含むリガンドについて特に記載している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第04/041862号公報

【特許文献2】欧州特許第0486526号明細書

【特許文献3】国際公開第00/29004号公報

50

【特許文献4】国際公開第04/003019号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Reiterら, J. Mol. Biol. (1999), 290, 685-698

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

TNF アルファ、特にヒトのTNF アルファに対するナノボディを提供することが、本発明の主な目的である。

【0014】

特に、TNF アルファ、特にヒトのTNF アルファに対するナノボディを提供すること、そして治療および/または診断、特に上記のようなTNF アルファに関連する、および/またはTNF アルファを介した1つ以上の疾患および障害の予防、治療、および/または診断での使用に適した、および/または上記のようなTNF アルファに関連する、および/または介した1つ以上の疾患および障害の予防、治療、および/または診断のための医薬組成物の調製に使用可能な、該ナノボディを含むタンパク質またはポリペプチドを提供することが、本発明の目的である。

【0015】

特に、国際公開第04/041862号記載のTNF アルファに対するナノボディを提供して、国際公開第04/041862号記載のTNF アルファに対するナノボディおよびポリペプチドの代替物となる、および/または国際公開第04/041862号記載のTNF アルファに対するナノボディおよびポリペプチドと比較して、1つ以上の特性または特徴が改善された該ナノボディを含むタンパク質およびポリペプチドを提供することが、本発明の目的である。

【0016】

特に、TNF アルファに対するナノボディを提供すること、そして以下の特性または特徴の1つ以上について、国際公開第04/041862号記載のTNF アルファに対するナノボディおよびポリペプチドと比較して、1つ以上の特性または特徴が改善された該ナノボディを含むタンパク質およびポリペプチドを提供することが、本発明の目的である：

- 一価型、多価型（例、二価型）および/または多特異型（例、国際公開第04/041862号記載または後述の多特異型の1つ）のいずれかでのTNF アルファに対する親和性の増大；

- 多価型（例、二価型）でのフォーマッティングに対する適合性の改良；

- 多特異型（例、国際公開第04/041862号記載または後述の多特異型の1つ）でのフォーマッティングに対する適合性の改良；

- 「ヒト化」置換（本明細書で規定）における適合性または感受性の改善；および/または

- 一価型、多価型（例、二価型）および/または多特異型（例、国際公開第04/041862号記載または後述の多特異型の1つ）、一価型のいずれかにおける免疫原性の低下；

- 一価型、多価型（例、二価型）、および/または多特異型（例、国際公開第04/041862号記載または後述の多特異型の1つ）、一価型のいずれかにおける安定性の増大；

- 一価型、多価型（例、二価型）、および/または多特異型（例、国際公開第04/041862号記載または後述の多特異型の1つ）、一価型のいずれかにおけるTNF アルファに対する特異性の増大；

- 異なった種由来のTNF アルファとの交差感受性の低下、または必要に応じて、上昇；

および/または

- 一価型、多価型（例、二価型）、および/または多特異型（例、国際公開第04/041862号記載または後述の多特異型の1つ）のいずれかでの医薬用途（予防的使用または治療的使用を含む）および/または診断的用途（撮像目的での使用を含むが、これに限定され

10

20

30

40

50

ない)に好ましい1つ以上の特性の改善。

【課題を解決するための手段】

【0017】

これらの目的は、本明細書に記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドによって達成される。これらのナノボディは本明細書において「本発明のナノボディ」とも呼び、これらのタンパク質とポリペプチドは本明細書ではまとめて「本発明のポリペプチド」とも呼ぶ。

【0018】

本明細書に記載のナノボディとポリペプチドは主に治療および/または診断での使用を目的としているため、それらはヒトのTNF α をターゲットとしている(本明細書で規定)。しかし、本明細書に記載のナノボディとポリペプチドが、1種類以上の他の種の温血動物由来のTNF α 、例えば1種類以上の他の種の霊長類由来のTNF α および/または疾患モデル動物において使用されることの多い1種類以上の動物(例、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ)、特にTNF α に関連する疾患の動物モデル(本明細書に記載の種および動物モデル)由来のTNF α との交差反応性を示すことは除外されない(要求もされない)。この点について、このような交差反応性が存在する場合、ヒトのTNF α に対するナノボディとポリペプチドが該疾患モデルにおいて試験可能となるため、薬剤開発の観点から有利になりうることは当業者には明らかであろう。

【0019】

本発明は、広義では、本発明のナノボディとポリペプチドがターゲットにする、TNF α の特定の抗原決定基、エピトープ、部位、ドメイン、サブユニット、立体構造(該当する場合)に、広義では、特に限定されないし、または規定されない。

【0020】

しかし、好ましい実施態様では、本明細書においてナノボディ、タンパク質、ポリペプチドは、TNF受容体結合部内に位置する、および/またはその一部を形成する、TNF α のエピトープをターゲットにしている、および/または結合可能である(例、TNF α RI、TNF α RII(別名p55またはp75)の結合部位)。技術分野において周知のとおり、TNF三量体は、本質的に同等であり、TNF三量体内の2つのTNF単量体の接触面によって/において形成される3つの受容体結合部位を含む。例えば、本明細書に記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドは、好ましくはTNF α の以下のアミノ酸残基を含むTNF α のエピトープに対して指向性を有する、および/または結合可能である: 88番目の位置がGln、90番目の位置がLys、および/または146番目の位置がGlu。

【0021】

特に、本明細書に記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドは、TNF受容体結合部位の一部に位置する、および/または形成するTNF α 三量体のエピトープをターゲットにする、および/またはこれに結合可能である。例えば、本明細書に記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドは、以下のアミノ酸残基を含むTNF α 三量体のエピトープに対して指向性を有する、および/またはこれに結合可能である: 第一のTNF単量体(本明細書では「単量体A」と呼ぶ)の88番目の位置がGlnおよび90番目の位置がLys、二番目のTNF単量体(本明細書では「単量体B」と呼ぶ)の146番目の位置がGlu(TNF三量体において、単量体Aと単量体Bは共にTNF受容体結合部位を形成する)。

【0022】

特に、本明細書に記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドは、前述のアミノ酸(単量体Aの88番目の位置のGln、単量体Aの90番目の位置のLys、単量体Bの146番目の位置のGlu)、そしてTNF α 単量体Aの以下のアミノ酸残基の少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、さらに好ましくは5以上、好ましくは全て、または実質的に全てを含むTNF α 三量体のエピトープをターゲットにする、および/

10

20

30

40

50

またはこれに結合可能である：24番目の位置のGly、25番目の位置のGln、72番目の位置のThr、73番目の位置のHis、74番目の位置のVal、75番目の位置のLeu、77番目の位置のThr、79番目の位置のThr、83番目の位置のIle、89番目の位置のThr、91番目の位置のVal、92番目の位置のAsn、97番目の位置のIle、131番目の位置のArg、135番目の位置のGlu、136番目の位置のIle、137番目の位置のAsn、138番目の位置のArg、139番目の位置のPro、140番目の位置のAsp、そして単量体Bの以下の残基：20番目の位置のPro、32番目の位置のArg、65番目の位置のLys、112番目の位置のLys、115番目の位置のTyr、145番目の位置のAla、147番目の位置のSer。

10

【0023】

または、本明細書に記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドは、前述のアミノ酸（単量体Aの88番目の位置のGln、単量体Aの90番目の位置のLys、単量体Bの146番目の位置のGlu）、そしてTNF アルファ単量体Aの以下のアミノ酸残基の少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、さらに好ましくは5以上、好ましくは全て、または本質的に全てを含むTNF アルファ三量体のエピトープをターゲットにする、および/またはこれに結合可能である：75番目の位置のLeu、77番目の位置のThr、79番目の位置のThr、80番目の位置のIle、81番目の位置のSer、87番目の位置のTyr、89番目の位置のThr、91番目の位置のVal、92番目の位置のAsn、95番目の位置のSer、97番目の位置のIle、135番目の位置のGlu、136番目の位置のIle、137番目の位置のAsn、そして単量体Bの以下の残基：33番目の位置のAla、145番目の位置のAla、147番目の位置のSer。

20

【0024】

該エピトープは、TNF分子との複合体として結晶化したナノボディの構造分析、またはpepsc an分析によるエピトープマッピングなどの方法で示すことが可能である。

【0025】

比較して、結晶学的データ（図示せず）から、国際公開第04/041862号のナノボディ 3Eが、本発明の好ましいエピトープとは異なるエピトープ（つまり、141番目の位置がTyr、140番目の位置がAsp、67番目の位置がGln、24番目の位置がGly、23番目の位置がGluを含むエピトープ）に結合することが分かる。

30

【0026】

このように、別の態様では、本発明は、TNF受容体結合部位に存在する、および/またはこの一部を形成するTNF アルファのエピトープに結合可能な免疫グロブリン可変領域（またはその適切な断片）、好ましくはTNF アルファの以下のアミノ酸残基の少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、好ましくは全てを含むエピトープに関連する：88番目の位置がGln、90番目の位置がLys、146番目の位置がGlu。該免疫グロブリン可変領域は、好ましくは重鎖可変領域または軽鎖可変領域、そして特に、任意の哺乳動物の重鎖可変領域（ヒト重鎖可変領域、マウス重鎖可変領域、Camelid重鎖可変領域（Camelidの4鎖免疫グロブリンからの重鎖可変領域、またはいわゆる重鎖抗体からの重鎖可変領域（V_HHドメイン）など）を含むが、これらに限定されない）でありうる重鎖可変領域である。免疫グロブリン可変領域は、好ましくはドメイン抗体または単一のドメイン抗体、または（単一の）ドメイン抗体としての使用に適している。最も好ましくは、免疫グロブリン可変ドメインはナノボディ（本明細書で規定）であり、そして本発明のこの態様での使用に適したナノボディの好ましい例として、ヒト化および他の変異体の他（本明細書でさらに記述されている）、PMP1C2（TNF1、配列番号：52）およびPMP5F10（TNF3、配列番号：60）である。

40

【0027】

前述の免疫グロブリン可変領域、ナノボディに関して本明細書に記載のとおり、ヒト化もされうる（例として挙げられ、限定されない）。本発明は、例えば本明細書で規定するように、該免疫グロブリン可変領域を含む、または主成分とするタンパク質およびポリペ

50

プチドにも関する。または、このような可変領域は、例えばHoogenboom (Nature Biotechnology (1997), 15:125-126) によって再検討されているように、S c F V 構造物、二重特異性構造物、キメラ抗体または抗体構造、他の免疫グロブリン構造物の一部を形成しうる。しかし、好ましくは、上記のエピトープに対して指向性を有する免疫グロブリン可変領域はナノボディであり、この場合には該ナノボディを含むタンパク質およびポリペプチドは本明細書にさらに記述しているとおりである。

【0028】

このように、本発明の好ましいいくつかの態様は、

I) ナノボディ TNF 1 (配列番号: 52) と同じ TNF アルファの三量体上のエピトープに対して指向性を有するナノボディ。

10

II) ナノボディ TNF 3 (配列番号: 60) と同じ TNF アルファの三量体上のエピトープに対して指向性を有するナノボディ。

III) 少なくとも以下のアミノ酸残基を含む TNF アルファの三量体のエピトープに対して指向性を有するナノボディ: 単量体 A の 88 番目の位置が Gln、単量体 A の 90 番目の位置が Lys、単量体 B の 146 番目の位置が Glu。

IV) 以下のアミノ酸残基を含む TNF アルファの三量体のエピトープに対して指向性を有するナノボディ: 単量体 A の 88 番目の位置が Gln、単量体 A の 90 番目の位置が Lys、単量体 B の 146 番目の位置が Glu、TNF アルファの単量体 A の以下のア

20

ミノ酸残基本の少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つ以上、より好ましくは 5 つ以上を少なくともさらに含む: 24 番目の位置の Gly、25 番目の位置の Gln、72 番目の位置の Thr、73 番目の位置の His、74 番目の位置の Val、75 番目の位置の Leu、77 番目の位置の Thr、79 番目の位置の Thr、83 番目の位置の Ile、89 番目の位置の Thr、91 番目の位置の Val、92 番目の位置の Asn、97 番目の位置の Ile、131 番目の位置の Arg、135 番目の位置の Glu、136 番目の位置の Ile、137 番目の位置の Asn、138 番目の位置の Arg、139 番目の位置の Pro、140 番目の位置の Asp、そして単量体 B の以下の残基: 20 番目の位置の Pro、32 番目の位置の Arg、65 番目の位置の Lys、112 番目の位置の Lys、115 番目の位置の Tyr、145 番目の位置の Ala、147 番目の位置の Ser。

V) 以下のアミノ酸残基を含む TNF アルファの三量体のエピトープに対して指向性を有するナノボディ: 単量体 A の 88 番目の位置の Gln、単量体 A の 90 番目の位置の Lys、単量体 B の 146 番目の位置の Glu、そして TNF アルファ単量体 A の以下のアミノ酸残基の少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つ以上、さらに好ましくは 5 つ以上をさらに含む: 75 番目の位置の Leu、77 番目の位置の Thr、79 番目の位置の Thr、80 番目の位置の Ile、81 番目の位置の Ser、87 番目の位置の Tyr、89 番目の位置の Thr、91 番目の位置の Val、92 番目の位置の Asn、95 番目の位置の Ser、97 番目の位置の Ile、135 番目の位置の Glu、136 番目の位置の Ile、137 番目の位置の Asn、そして単量体 B の以下の残基: 33 番目の位置の Ala、145 番目の位置の Ala、147 番目の位置の Ser。

30

【0029】

- TNF に対する K_{off} 速度が $2 \cdot 10 \times 10^{-3}$ (1/s)、より好ましくは $1 \cdot 10 \times 10^{-3}$ である、上記の I) ~ V) のいずれかに記載のナノボディ。

40

- 国際公開第04/041862号の実施例 1、3) に記載の KYM 細胞を使用した細胞ベース分析試験において EC50 値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のナノボディ VHH 3E (配列番号: 4) の EC50 値よりも小さくなる上記の I) ~ V) のいずれかに記載のナノボディ。または該ナノボディのヒト化変異体。

- 国際公開第04/041862号の実施例 1、3) に記載の KYM 細胞を使用した細胞ベース分析試験において EC50 値が 12 nM よりも小さい上記の I) ~ V) のいずれかに記載のナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。

- 国際公開第04/041862号の実施例 1、3) に記載の KYM 細胞を使用した細胞ベース分析試験において EC50 値が 5 nM よりも小さい上記の I) ~ V) のいずれかに記

50

載のナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。

- 国際公開第04/041862号の実施例 1、3) に記載の K Y M 細胞を使用した細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が 3 n M よりも小さい上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。ヒト化ナノボディである上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

そしてこの実施態様のいくつかの好ましい態様は、

- G L E W クラスナノボディである上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディに関する。

- ヒト化 G L E W クラスナノボディである上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

- 1 0 3 番目の位置にアルギニン残基 (R) を含む上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

- 1 0 3 番目の位置にアルギニン残基 (R) を含み、ヒト化されている上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

- G L E W クラスナノボディであり、1 0 3 番目の位置にアルギニン残基 (R) を含み、ヒト化されている上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

- 1 0 8 番目の位置にロイシン残基 (L) を含む上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

- 配列番号 : 5 2 (T N F 1)、7 6 (T N F 1 3)、7 7 (T N F 1 4)、9 5 (T N F 2 9)、9 6 (T N F 3 0) のアミノ酸配列の 1 つと少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性 (本明細書で規定) を有する上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

【 0 0 3 0 】

- 上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディにおいて、

a) C D R 1 が

- アミノ酸配列 D Y W M Y ; または
- アミノ酸配列 D Y W M Y と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; または
- アミノ酸配列 D Y W M Y と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列 ;

を含み、

b) C D R 2 が

- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G ; または
- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; または
- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列 ;

を含み、

c) C D R 3 が

- アミノ酸配列 S P S G F N ; または
- アミノ酸配列 S P S G F N と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; または
- アミノ酸配列 S P S G F N と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列 ;

を含む、

上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

- CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y である上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G である上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- CDR 3 がアミノ酸配列 S P S G F N である上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

【 0 0 3 2 】

- 上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディにおいて、
 - CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y を含み ; CDR 3 がアミノ酸配列 S P S G F N を含み ; または 10
 - CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y を含み ; CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G を含み ; または
 - CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G を含み、CDR 3 がアミノ酸配列 S P S G F N を含み、
- CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y を含み ; CDR 3 がアミノ酸配列 S P S G F N を含む、上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y を含み ; CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G を含み、CDR 3 がアミノ酸配列 S P S G F N を含む、上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。 20
- 上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディにおいて、
 - a) CDR 1 が
 - アミノ酸配列 D Y W M Y ; または
 - アミノ酸配列 D Y W M Y と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; または
 - アミノ酸配列 D Y W M Y と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列 ;
 であり、
 - b) CDR 2 が 30
 - アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G ; または
 - アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; または
 - アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列 ;
 であり、
 - c) CDR 3 が
 - アミノ酸配列 S P S G F N である ; または
 - アミノ酸配列 S P S G F N と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 % 40
 - アミノ酸配列 S P S G F N と少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; または
 - アミノ酸配列 S P S G F N と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列 ;
 であり、

【 0 0 3 3 】

- CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y である上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G である上記の I) ~ V 50

)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR3がアミノ酸配列SPSGFNである上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- 上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディにおいて、

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYであり、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNであり、または

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYであり、CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKY PDSVKGであり、または

- CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKY PDSVKGであり、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNであり、

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKY PDSVKGを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、上記の

- 上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディにおいて、

- 任意のアミノ酸置換が保存アミノ酸の置換であり、および/または

- アミノ酸配列が、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換を含むのみで、アミノ酸の欠失または挿入を含まない、

そしてこの実施態様のいくつかの他の好ましい態様は以下に関する：

【0034】

- KERE クラスナノボディである上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- ヒト化KERE クラスナノボディである上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- 配列番号：50(TNF3)、83(TNF20)、85(TNF21)、85(TNF

22)、96(TNF23)あるいは98(TNF33)のアミノ酸配列の1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有する上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

【0035】

- 上記のI)~V)のいずれか1つに記載のナノボディにおいて、

a) CDR1が

- アミノ酸配列NY YMGである、または

- アミノ酸配列NY YMGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

- アミノ酸配列NY YMGと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、

b) CDR2が

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gである、または

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、

c) CDR3が

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである、または

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少な

10

20

30

40

50

くとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、

【0036】

- CDR1がアミノ酸配列N Y Y M Gである、上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディ。
- CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gである、上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディ。
- CDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである、上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディ。
- 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディにおいて、
 - CDR1がアミノ酸配列N Y Y M Gであり、CDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである、または
 - CDR1がアミノ酸配列N Y Y M Gであり、CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gである、または
 - CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gであり、CDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである。
- CDR1がアミノ酸配列N Y Y M Gであり、CDR2がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yであり、CDR3がアミノ酸配列I L P L S D D P G W N T Yである、上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディ。
- 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディにおいて、
 - 任意のアミノ酸置換が好ましくは保存アミノ酸の置換であり、および/または
 - 該アミノ酸配列が、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換を含むのみで、アミノ酸の欠失または挿入を含まない。

10

20

そしてさらに他の特に好ましいいくつかの態様では：

【0037】

VI) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載のナノボディを含む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチド。

VII) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチド。

30

VIII) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含む、タンパク質またはポリペプチド。

IX) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、タンパク質またはポリペプチドが、TNF三量体と結合時に、TNF三量体によって媒介されるTNF受容体の架橋および/または該受容体の架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下させることができる、タンパク質またはポリペプチド。

X) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、TNF三量体の少なくとも2つのTNF受容体結合部位への分子内結合が可能である、タンパク質またはポリペプチド。

XI) 適切なリンカーを介して連結した上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含む、タンパク質またはポリペプチド。

40

XII) 適切なリンカーを介して連結した上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ペグ化された、タンパク質またはポリペプチド。

XIII) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対する少なくとも1つのナノボディをさらに含む、タンパク質またはポリペプチド。

XIV) 上記のI) ~ V)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対する少なくとも1つのナノボディをさらに含む、TNF三量体との結合時に該TNF三量体によって媒介されるTNF受容体の架橋および/または該受容体の架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下させることができる、タンパク質または

50

ポリペプチド。

X V) 上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対する少なくとも 1 つのナノボディをさらに含み、T N F 三量体上の少なくとも 2 つの T N F 受容体結合部位への分子内結合が可能である、タンパク質またはポリペプチド。

X V I) 上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対する 1 つのナノボディをさらに含み、上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディが任意で適切なリンカーを介してヒト血清アルブミンに対して指向性を有する 1 つのナノボディと結合する、タンパク質またはポリペプチド。

X V I I) 上記の I) ~ V) のいずれか 1 項記載の 2 つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対する少なくとも 1 つのナノボディをさらに含み、上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディが任意で適切なリンカーを介してヒト血清アルブミンに対して指向性を有する 1 つのナノボディと結合し、T N F 三量体との結合時に該 T N F 三量体によって媒介される T N F 受容体の架橋および/または該受容体の架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下させることができる、タンパク質またはポリペプチド。

X V I I I) 上記の I) ~ V) のいずれか 1 項記載の 2 つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対する 1 つのナノボディをさらに含み、上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載の 2 つの各ナノボディが任意で適切なリンカーを介して、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する 1 つのナノボディと連結されており、T N F 三量体上の少なくとも 2 つの T N F 受容体結合部位への分子内結合が可能である、タンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 3 8 】

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディがヒト化ナノボディである、上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディがナノボディ A L B 1 (配列番号: 6 3) のヒト化変異体である、上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディが、A L B 3 (配列番号: 8 7)、A L B 4 (配列番号: 8 8)、A L B 5 (配列番号: 8 9)、A L B 6 (配列番号: 1 0 0)、A L B 7 (配列番号: 1 0 1)、A L B 8 (配列番号: 1 0 2)、A L B 9 (配列番号: 1 0 3)、A L B 1 0 (配列番号: 1 0 4) からなるグループから選択する、上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディが A L B 8 である、上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 上記の I) ~ V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのヒト化ナノボディ、そしてナノボディ A L B 1 (配列番号: 6 3) の 1 つのヒト化変異体を含む、または主成分とする、上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 3 9 】

ナノボディが、「上記の I) ~ V) のいずれか 1 つ記載」と前述されている場合、それは少なくとも I) ~ V) のいずれか 1 つ記載であり、I) ~ V) のいずれか 2 つ以上に記載の可能性もあり、そして「上記の I) ~ V) のいずれか 1 つ記載」と示される他の態様のいずれか 1 つ以上も含む可能性があることに留意されたい。同様に、タンパク質またはポリペプチドが、「上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つ記載」と言及されている場合、それは少なくとも V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つ記載であり、V I) ~ X V I I I) のいずれか 2 つ以上に記載の可能性もあり、そして「上記の V I) ~ X V I I I) のいずれか 1 つ記載」と示される他の態様のいずれか 1 つ以上も含む可能性がある。

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

必要に応じて、本発明のナノボディまたはポリペプチドが、TNF アルファの2つ以上の抗原決定基、エピトープ、部位、ドメイン、サブユニット、立体構造と結合可能であることも本発明の範囲内である。このような場合、本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドが結合するTNF アルファの抗原決定基、エピトープ、部位、ドメイン、サブユニットは本質的に同じであるか（例えば、TNF アルファが反復構造モチーフを含むか、または多量体として存在する）、または異なる可能性がある（後者の場合、本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドは、同じまたは異なる親和性および/または特異性でTNF アルファのこれらの抗原決定基、エピトープ、部位、ドメイン、サブユニットと結合する可能性がある）。また、例えば、TNF アルファが活性型の立体構造および不活性型の立体構造で存在する場合、本発明のナノボディおよびポリペプチドはこれらの立体構造のいずれかと結合する、またはこれらの立体構造のいずれとも結合する可能性がある（つまり、親和性および/または特異性は同じか、異なる可能性がある）。また、例えば、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、関連するリガンドと結合しているTNF アルファの立体構造に結合する、関連するリガンドと結合していないTNF アルファの立体構造に結合する、またはTNF アルファのこのような立体構造のいずれとも結合する可能性がある（ここでも、親和性および/または特異性は同じか、異なる可能性がある）。

10

【0041】

本発明のナノボディおよびポリペプチドは一般に全てが天然か、または合成のTNF アルファの類似体、変異体、突然変異体、対立因子、部位、断片、または少なくともTNF アルファ（例、野生型のTNF アルファ）において本発明のナノボディおよびポリペプチドに結合する抗原決定基またはエピトープと本質的に同じ1つ以上の抗原決定基またはエピトープを含む、TNF アルファの類似体、変異体、突然変異体、対立因子、部位、断片に結合することも予測される。ここでも、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、本発明のナノボディが（野生型の）TNF アルファに結合する親和性および特異性と同じ、または異なる（つまり、より高い、またはより低い）親和性および/または特異性でこれらの類似体、変異体、突然変異体、対立因子、部位、断片と結合しうる。本発明のナノボディおよびポリペプチドは、TNF アルファの一部の類似体、変異体、突然変異体、対立因子、部位、断片と結合するが、その他とは結合しないことも本発明の範囲内である。

20

30

【0042】

一般に、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、当業者には明らかなように、生物学および/または治療的な観点から最も関連するこれらの型（単量体、多量体、関連する型を含む）に少なくとも結合する。

【0043】

また、TNF アルファが単量体型、多量体型で、特に三量体型に存在するため、本発明のナノボディおよびポリペプチドが単量体型のTNF アルファにのみ結合する、または本発明のナノボディおよびポリペプチドがTNFの三量体型などの多量体型の1つ以上にも結合する、または多量体（例、三量体）型にのみ結合する可能性があることは本発明の範囲内である。このように、一般にここで、ナノボディ、タンパク質、ポリペプチドについて述べる場合、三量体型のTNF アルファ（該三量体の受容体結合部位（例、p55またはp75とも呼ばれる、TNF RI、THF-RIIの結合部位）に対するナノボディが含まれるが、これらに限定されない）に対して指向性を有するナノボディもこれに含まれると理解されたい。本発明のナノボディおよびポリペプチドが単量体状態および非結合状態でTNF アルファに結合する親和性および/または特異性と同じか、異なる可能性がある（つまり、より高い、または低い）親和性および/または特異性で、いかなる場合でも、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、該多量体または関連タンパク質複合体と結合しうる。

40

【0044】

また、一般に、TNF アルファに対して指向性を有する2つ以上のナノボディを含む

50

本発明のポリペプチドは、対応する単量体ナノボディまたはナノボディとより高い親和力で結合しうる。

【0045】

例として、限定はされないが、TNF アルファの異なるエピトープに対して指向性を有する2つ以上のナノボディを含むTNF アルファ多量体（本明細書で規定）タンパク質またはポリペプチドの異なるエピトープに対して指向性を有する2つ以上のナノボディを含む多価（本明細書で規定）タンパク質またはポリペプチドが対応する単量体とより高い親和力でTNF アルファに結合しうる。

【0046】

より重要なことは、TNF アルファに対して指向性を有する2つ以上のナノボディを含む多量体（本明細書で規定）タンパク質またはポリペプチドは、TNF アルファの単量体よりもTNF アルファの多量体により高い親和力で結合する可能性があり（通常、結合する）、また通常、対応する単量体ナノボディよりも高い親和力で結合しうる。このような多量体のタンパク質またはポリペプチドにおいて、2つ以上のナノボディは、例えば同じエピトープ、本質的に同等のエピトープ、または異なるエピトープに対して指向性を有しうる。このような多量体のタンパク質またはポリペプチドに関する1つの実施態様では、2つ以上のナノボディは同じでありうる（したがって、同じエピトープに対して指向性を有する）。

【0047】

TNFによるシグナル伝達の主な形態では、3つの受容体結合部位を含む、TNF分子の三量体によるTNF受容体による架橋が含まれることが知られているため、後者は特に重要である（参照例：Peppelら., J. Exp. Med., 174 (1991), 1483-1489; Engelmannら., J. Biol. Chem., 265 (1990), 14/497; Smith and Baglioni, J. Biol. Chem., 264 (1989), 14646）。例えば、Peppelらの記述のとおり、TNF受容体の改変された単量体細胞外ドメインは、TNF三量体上の受容体結合部位を1つ遮断できるだけだったが、残りの2つの受容体結合部位によってTNF受容体の架橋を阻害できなかった。一方、2つの該細胞外ドメインを含む改変タンパク質は、2つの受容体結合部位を遮断できたので、単量体の細胞外ドメインと比較して、顕著な有効性を示した。

【0048】

本発明では、インビトロのモデルである、細胞モデルおよびエキスピボのモデルのいずれにおいても単量体のナノボディがTNF アルファに結合して、TNF活性を低下させることが見出されている（以下の実験セクションを参照）。本発明は特定の機構、説明、または仮説に限定されないが、その小さなサイズおよびTNF アルファに対する高い親和性のため、本発明の2、3の単量体のナノボディはTNF三量体上の2、3の異なる受容体結合部位を同時に占めることが可能であり、そのため三量体が受容体の架橋の開始するのを妨げ、これによってシグナル伝達を開始される（しかし、他の作用機構は除外されない：例、ターゲットとなるエピトープに応じて、本発明のナノボディがTNFの三量体化への結合も阻害しうる）。

【0049】

1つのTNF三量体上の2つ以上の受容体結合部位への結合に加えて、またはその代わりに、TNF アルファのエピトープに対して指向性を有する2つ以上の免疫グロブリン可変領域（またはその適切な断片）を含む本発明のタンパク質またはポリペプチドが、2つの異なるTNF アルファ分子（例、2つの異なる三量体）上のエピトープに結合（例、分子内での結合）しうることも留意されたい。

【0050】

しかし、特に好ましい一つの実施態様では、本発明は、TNF三量体との結合時に、該TNF三量体によって媒介されるTNF受容体の架橋および/または該受容体の架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下させることができるように、TNF三量体の受容体結合部位に位置する、および/または一部を形成する、それぞれTNF アルファ（特にTNF アルファ三量体）上のエピトープに対する2つ以上の免疫グロブリン可

10

20

30

40

50

変領域（またはその適切な断片）を含む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチドに関する。

【0051】

特に、この好ましい実施態様では、本発明は、TNF三量体の受容体結合部位に位置する、および/または一部を形成する、それぞれTNF アルファ（特にTNF アルファ三量体）上のエピトープに対する2つ以上の免疫グロブリン可変領域（またはその適切な断片）を含む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチドに関する。ここで、タンパク質またはポリペプチドが1つのTNF三量体上の2つ以上の受容体結合部位に同時に結合可能なように、該免疫グロブリン可変領域は互いが連結する（換言すると、TNF三量体上の少なくとも2つのTNF受容体結合部位と分子内結合が可能）。この実施態様では、2つ以上の免疫グロブリン可変領域は好ましくは上記で規定されたとおりであり、最も好ましくはナノボディである（本明細書においてさらに記述されているとおり、タンパク質またはポリペプチドが多量体ナノボディ構造物である）。また、この実施態様では、2つ以上の免疫グロブリン可変領域は同一か、または異なり、TNF受容体結合部位内の異なるエピトープをターゲットとしているが、好ましくは同じエピトープに対して指向性を有する。

10

【0052】

この実施態様の一つの好ましい態様では、2つ以上の免疫グロブリン可変領域はTNF三量体のエピトープをターゲットにしており、TNF受容体結合部位に位置する、および/または一部を形成する。例えば、2つ以上の免疫グロブリン可変領域は、好ましくは以下のアミノ酸残基を含むTNF アルファ三量体のエピトープに対して指向性を有する、および/またはこれに結合可能である：第一のTNF単量体（本明細書では「単量体A」と呼ぶ）上の88番目の位置のG1n、90番目の位置のLys、二番目のTNF単量体（本明細書では「単量体B」と呼ぶ）上の146番目の位置のG1u（TNF三量体において単量体Aと単量体Bは一緒にTNF受容体結合部位を形成する）。

20

【0053】

ナノボディに関して以下でさらに詳述するように、該タンパク質または該ポリペプチドにおいて、該タンパク質または該ポリペプチドに存在する少なくとも2つの免疫グロブリン可変領域のN末端とC末端との距離が、好ましくは少なくとも50オングストローム、より好ましくは55～200オングストロームの範囲、さらに好ましくはオングストローム、特に65～150オングストロームの範囲になるように、少なくとも2つの免疫グロブリン可変領域は好ましくは連結する。

30

【0054】

この実施態様の特に好ましい態様では、これらの2つ以上の免疫グロブリン配列はナノボディであり、好ましくは本明細書に記載のナノボディから選択する。本発明のこの実施態様で使用する特に好ましいナノボディは、PMP1C2（TNF1、配列番号：52）および/またはPMP5F10（TNF3、配列番号：60）、そしてこれらのヒト化変異体および他の変異体（本明細書に記載）であり、PMP1C2（TNF1、配列番号：52）およびそのヒト化変異体が特に好ましい。

【0055】

したがって、今回、本実施態様ではナノボディに関してし詳細に記載する。しかし、本明細書の記載を免疫グロブリン可変領域に同様に適用できることは当業者には明らかであろう。

40

【0056】

本発明のこの実施態様では、2つ以上の免疫グロブリン配列は通常1つ以上の適切なリンカーを介して連結し、リンカーは各免疫グロブリン配列が同じTNF三量体上の異なる受容体結合部位に結合できるようになっている。適切なリンカーは特に免疫グロブリン配列が結合するTNF三量体上のエピトープ（間の距離）によって決まり、任意の一定の限られたルーチン実験後に本明細書の開示に基づいて当業者には明らかであろう。例えば、2つ以上の免疫グロブリン配列が（一つの）ドメイン抗体またはナノボディである場合、

50

本明細書に記載のリンカーから適切なリンカーを選択可能であるが、2つ以上の(一つの)ドメイン抗体またはナノボディがそれぞれ同じTNF三量体上の異なる受容体結合部位に結合できるようなリンカーの長さにする。

【0057】

また、TNF アルファの受容体結合部位に結合する2つ以上の免疫グロブリン配列が(一つの)ドメイン抗体またはナノボディである場合、それらは第三の(一つの)ドメイン抗体またはナノボディを介して互いに連結することもできる(2つ以上の免疫グロブリン配列を第三の(一つの)ドメイン抗体/ナノボディに直接、または適切なリンカーを介して連結できる)。このような第三の(一つの)ドメイン抗体またはナノボディは、本明細書にさらに記載のとおり、例えば、半減期を延長させる(一つの)ドメイン抗体またはナノボディでありうる。例えば、後者の(一つの)ドメイン抗体またはナノボディは、本明細書にさらに記載のとおり、(ヒトの)血清アルブミンといった(ヒトの)血清タンパク質に結合可能な(一つの)ドメイン抗体またはナノボディでありうる。

10

【0058】

または、TNF アルファの受容体結合部位に結合する2つ以上の免疫グロブリン配列は連続的に(直接、または適切なリンカーを介して)連結し、(上述のとおり、半減期を延長させうる)第三の(一つの)ドメイン抗体またはナノボディが、直接、またはリンカーを介してこれらの2つ以上の前述の免疫グロブリン配列の1つと連結しうる。該構造物の非限定的ないくつかの例は配列番号: 93または94の構造物である。

【0059】

20

特に、本発明の多量体、または多特異的タンパク質またはポリペプチドで存在するナノボディが、上記の特定のエピトープ(TNF3およびそのヒト化変異体の他、TNF1のエピトープおよびそのヒト化変異体)に結合する場合、(本明細書に記載した結晶学的データを参照)好ましくは、該タンパク質またはポリペプチドに存在する2つ(以上)の抗TNFナノボディが、該タンパク質またはポリペプチドに存在する2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端との間の距離が好ましくは少なくとも50オングストロームとなるように連結する必要がある、そしてより好ましくは55~200オングストロームの範囲、特に65~150オングストロームの範囲(上限が臨界未満であり、便宜上の理由で選ばれる(例、タンパク質発現/産生の目的))、またはより一般的には、距離が、タンパク質またはポリペプチドのTNF三量体への分子内結合(つまり、分子内結合の代わりに)が可能となるように、2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端との間の距離は、結晶学または分子モデル化などの適切な方法によって測定可能である(本明細書記載)。一般に、これらの技術によって、特定の多価タンパク質または多特異的タンパク質またはポリペプチドが分子内モデルを提供できるか否かを判定可能にする。または、本発明は、本発明の任意のタンパク質またはポリペプチドが(主に)TNF三量体への分子内結合または(主に)2つ以上のTNF三量体間の分子間結合をもたらすか否かを判定するために利用可能なサイズ排除クロマトグラフィー(Santoraら、Anal. Biochem., 299:119-129に記載)を利用した簡単な実験も提供する。したがって、本発明の特定の一実施態様では、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、好ましくは、この実験において主に、または本質的に排他的に分子内結合に導くようになっている。しかし、上記で強調されたとおり、別のTNF アルファ分子(例、三量体)の分子間結合を介して機能する本発明のタンパク質またはポリペプチドも本発明の範囲内であることに留意されたい。

30

40

【0060】

したがって、別の好ましい態様では、本発明は、TNF アルファ(特にTNF アルファ三量体)に対する少なくとも2つのナノボディを含む多価または多特異的タンパク質またはポリペプチドを提供し、ナノボディは好ましくはナノボディ PMP1C2(本明細書に記載)と本質的に同じエピトープをターゲットとしており、そしてタンパク質またはポリペプチドがTNF三量体との分子内結合が可能ないように、少なくとも2つの抗TNF ナノボディのN末端とC末端の距離がなるように、少なくとも2つのナノボディは連結する。好ましくは、該タンパク質またはポリペプチドにおいて、2つの抗TNFナノ

50

ディのN末端とC末端の距離は、少なくとも50オングストローム、より好ましくは55~200オングストロームの範囲、特に65~150オングストロームの範囲である。

【0061】

このような好ましいタンパク質またはポリペプチドにおいては、少なくとも2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端の好ましい距離が得られる限り、および/またはタンパク質またはポリペプチドとTNF三量体との分子内結合(本明細書に記載)が可能な限り、2つ以上のナノボディは適切に連結しうる。

【0062】

例えば、その最も単純な形では、少なくとも2つのナノボディは、少なくとも2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端の好ましい距離がもたらされて、タンパク質またはポリペプチドがTNF三量体と分子内結合(本明細書に記載)されることを可能とする、適切なリンカーまたはスペーサーを介して連結する。適切なリンカーは本明細書に記載のとおりであり、例えば、限定はされないが、好ましくは14アミノ酸、より好ましくは少なくとも17アミノ酸(約20~40アミノ酸配列)を有するアミノ酸配列を含みうる(これは、1個のアミノ酸の平均距離3.5オングストロームを利用して、49オングストロームのリンカー長、59.5オングストローム、70オングストロームのリンカー長にそれぞれ相当し、アミノ酸の最高量は上記の距離に基づいて計算される)。好ましくは、このようなアミノ酸配列は、タンパク質またはポリペプチドがTNF三量体と分子内結合(本明細書に記載)可能となるようにする必要がある。

【0063】

したがって、別の好ましい態様では、本発明は、TNFアルファ(特にTNFアルファ三量体)に対する少なくとも2つのナノボディを含む多価または多特異的なタンパク質またはポリペプチドを提供し、該ナノボディは好ましくはナノボディPMP1C2(本明細書に記載)と本質的に同じエピトープをターゲットとしており、そしてタンパク質またはポリペプチドがTNF三量体との分子内結合が可能なように、少なくとも2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端の距離がなるように、少なくとも2つのナノボディは互いに連結する。好ましくは、該タンパク質またはポリペプチドにおいて、2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端の距離(ひいてはリンカーまたはスペーサーの好ましい長さ)は、少なくとも50オングストローム、より好ましくは55~200オングストロームの範囲、特に65~150オングストロームの範囲である。

【0064】

より好ましくは、この好ましい態様では、リンカーまたはスペーサーは、少なくとも14個、好ましくは少なくとも17個、より好ましくは少なくとも20個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する(便宜上の理由のために選ばれた非臨界上限は約50個、好ましくは約40個のアミノ酸である)。好ましいが、非限定的な一実施態様では、リンカーは本質的にグリシンおよびセリン残基からなる(さらに以下に記載)。例えば、1つ適切なリンカーが本明細書において記述されるGS30リンカーである、そしてそれは30のアミノ酸残基を構成する。

【0065】

別の実施態様では、TNFアルファに対する少なくとも2つのナノボディは、別のタンパク質またはポリペプチドなどの、別の成分を介して(任意で1、2つのリンカーを介して)互いに連結する。この実施態様では、例えば、タンパク質またはポリペプチドが依然としてTNF三量体と分子内結合(本明細書に記載)できるように、少なくとも2つの抗TNFナノボディのN末端とC末端の距離が好ましい(つまり、上記)ことが望まれる。この実施態様では、やはり、好ましい距離および/または所望の分子内結合を依然、実現できる限り、少なくとも2つのナノボディは他の成分に直接に、または適切なリンカーまたはスペーサーを用いて直接、連結できる。成分は、タンパク質またはポリペプチドのTNFへの結合、および/またはタンパク質またはポリペプチドのさらなる所望の生物学的または薬理学的特性を(それほど)損なわない任意の適切な成分でありうる。このように、成分は本質的に不活性である、または生物学的に活性であり、タンパク質ま

10

20

30

40

50

たはポリペプチドの所望の特性を改善する、または改善しない、および/またはタンパク質またはポリペプチドに1つ以上の追加の所望の特性を付与しうる。例えば、限定はされないが、成分はタンパク質またはポリペプチドの半減期を向上させて、および/またはその免疫原性を低下させて、または他の所望の特性でも改善させうる。好ましい一実施態様では、この成分は別のナノボディ(TNF アルファに対する第三のナノボディを含むが、これに限定されない。もっともこれは必要ではなく、通常はそれほど好ましくない)、特に、例えば血清タンパク質(例、ヒト血清アルブミン)に対して指向性を有するナノボディなどのタンパク質またはポリペプチドの半減期に向上させる別のナノボディでありうる。該タンパク質およびポリペプチドの例を本明細書に記載している。

【0066】

10

したがって、一つの実施態様では、本発明は、受容体結合部位に位置する、および/またはその一部を形成するTNF アルファ(例、TNF アルファ三量体)上のエピトープに対してそれぞれ指向性を有しており、TNF 三量体への結合時にポリペプチドがTNF 三量体によって媒介されるTNF 受容体の架橋および/またはシグナル伝達を抑制または低下させることができるように、半減期を延長させる少なくとも1つの免疫グロブリン配列を介して(任意で1つ以上の適切なリンカーを介して)互いに連結する、2つ以上の免疫グロブリン配列(またはその適切な断片)を含む多価、多特異的な構造物に関する。

該ポリペプチドは、最初に述べた2つ以上の免疫グロブリン配列がTNF 三量体上の異なる受容体結合部位にそれぞれ結合できる。

【0067】

20

特に、この実施態様では、ポリペプチドは、半減期を(例えばヒトの血清アルブミンのような血清タンパク質に導かれるナノボディ)延長させる第三のナノボディを介してナノボディが互いに連結する、受容体結合部位に存在する、および/またはその一部を形成するTNF アルファ上のエピトープをそれぞれターゲットとする2つのナノボディを含む、三価の二重特異性ナノボディを含むうる。ここでは、TNF 三量体への結合時にポリペプチドがTNF 三量体によって媒介されるTNF 受容体の架橋および/またはシグナル伝達を阻害または低下させることができるように、最初に述べた2つの各ナノボディは第三のナノボディに直接、または適切なリンカーを介して連結する可能性がある。該ポリペプチドは、最初に記載した2つのナノボディがTNF 三量体上の異なる受容体結合部位にそれぞれ結合できる。ここでも、本発明のこの実施態様で使用する特に好ましいナノボディは、PMP1C2(TNF 1、配列番号:52)および/またはPMP5F10(TNF 3、配列番号:60)、これらのヒト化変異体と他の変異体(本明細書に記載);PMP1C2(TNF 1、配列番号:52)、および特に好ましいそのヒト化変異体;および本明細書に記載のヒト血清アルブミンに対して指向性を有するナノボディである。限定はされないが、本発明のこの実施態様での好ましい構造物は、TNF 24(配列番号:90)、TNF 26(配列番号:92)、TNF 27(配列番号:93)、TNF 28(配列番号:94)、TNF 60(配列番号:417)、TNF 62(配列番号:418)であり、このうちTNF 60が特に好ましい。

30

【0068】

したがって、本発明の実施態様の好ましいいくつかの態様は、
 XI) TNF 三量体との結合時に、該TNF 三量体によって媒介されるTNF 受容体の架橋および/または該受容体の架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下させることができるように、TNF 三量体の受容体結合部位に位置する、および/または一部を形成する、それぞれTNF アルファ(特にTNF アルファ三量体)上のエピトープに対して指向性を有する2つ以上の免疫グロブリン可変領域(またはその適切な断片)を含む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチドに関する。

40

XX) 該ポリペプチドがTNF 三量体上の少なくとも2つのTNF 受容体結合部位に分子内結合できるように、TNF 三量体の受容体結合部位に位置する、および/またはその一部を形成する、TNF アルファ(特にTNF アルファ三量体)上のエピトープをそれぞれターゲットとする2つ以上の免疫グロブリン可変領域(またはその適切な断片)を含

50

む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチド。

【0069】

- 該タンパク質またはポリペプチドが一つのTNF三量体上の2つ以上の受容体結合部位に同時に結合可能なように、該免疫グロブリン可変領域が互いに連結する、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 該免疫グロブリン可変領域がナノボディ TNF1 (配列番号: 52)と同じエピトープに結合可能な、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 該免疫グロブリン可変領域が、以下のアミノ酸残基を少なくとも含むTNF三量体のTNF受容体結合部位内のエピトープに対して結合可能な、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド: 単量体Aの88番目の位置がGln、単量体Aの90番目の位置がLys、単量体Bの146番目の位置がGlu。

該免疫グロブリン可変領域が、以下のアミノ酸残基を少なくとも含むTNF三量体のTNF受容体結合部位内のエピトープに対して結合可能な、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド: 単量体Aの88番目の位置がGln、単量体Aの90番目の位置がLysおよび単量体Bの146番目の位置がGlu。そして、さらにTNF アルファ単量体Aの以下のアミノ酸残基の少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、さらに好ましくは5つ以上、好ましくは全て、または実質的に全てをさらに含む: 24番目の位置のGly、25番目の位置のGln、72番目の位置のThr、73番目の位置のHis、74番目の位置のVal、75番目の位置のLeu、77番目の位置のThr、79番目の位置のThr、83番目の位置のIle、89番目の位置のThr、91番目の位置のVal、92番目の位置のAsn、97番目の位置のIle、131番目の位置のArg、135番目の位置のGlu、136番目の位置のIle、137番目の位置のAsn、138番目の位置のArg、139番目の位置のPro、140番目の位置のAsp、そして単量体Bの以下の残基: 20番目の位置のPro、32番目の位置のArg、65番目の位置のLys、112番目の位置のLys、115番目の位置のTyr、145番目の位置のAla、147番目の位置のSer。

【0070】

- 該免疫グロブリン可変領域が、以下のアミノ酸残基を少なくとも含むTNF三量体のTNF受容体結合部位内のエピトープに対して結合可能な、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド: 単量体Aの88番目の位置がGln、単量体Aの90番目の位置がLysおよび単量体Bの146番目の位置がGlu。そして、さらにTNF アルファ単量体Aの以下のアミノ酸残基の少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは5つ以上、好ましくは全て、または実質的に全てをさらに含む: 75番目の位置のLeu、77番目の位置のThr、79番目の位置のThr、80番目の位置のIle、81番目の位置のSer、87番目の位置のTyr、89番目の位置のThr、91番目の位置のVal、92番目の位置のAsn、95番目の位置のSer、97番目の位置のIle、135番目の位置のGlu、136番目の位置のIle、137番目の位置のAsn、そして単量体Bの以下の残基: 33番目の位置のAla、145番目の位置のAla、147番目の位置のSer。

【0071】

- 該タンパク質またはポリペプチドに存在する第一の免疫グロブリン可変領域のN末端と第二の免疫グロブリン可変領域のC末端の距離が少なくとも50オングストロームになるように少なくとも2つの免疫グロブリン可変領域が連結する、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一の免疫グロブリン可変領域のN末端と第二の免疫グロブリン可変領域のC末端の距離が55~200オングストロームになるような、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一の免疫グロブリン可変領域のN末端と第二の免疫グロブリン可変領域のC末端の距離が65~150オングストロームになるような、上記のXIX)~XX)のいずれか1

10

20

30

40

50

つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域がリンカーまたはスペーサーを介して連結する、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- リンカーまたはスペーサーがアミノ酸配列を有する、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- リンカーまたはスペーサーが少なくとも 14 個のアミノ酸残基を含む、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- リンカーまたはスペーサーが少なくとも 17 ~ 50 個のアミノ酸残基を含む、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- リンカーまたはスペーサーがグリシンおよびセリン残基を主成分とする、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- リンカーまたはスペーサーが G S 30 (配列番号: 69) である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が別の成分を介して互いに連結する、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 他の該成分がタンパク質またはポリペプチドの成分である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 他の該成分がタンパク質またはポリペプチドに少なくとも 1 つの所望の特性を付与する、またはタンパク質またはポリペプチドの少なくとも 1 つの所望の特性を改善させる、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 他の該成分がタンパク質またはポリペプチドの半減期を向上させる、またはタンパク質またはポリペプチドの免疫原性を低下させる、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域がリンカーまたはスペーサーを介して他の該成分に連結する、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 7 2 】

- リンカーまたはスペーサーがアミノ酸配列を有する、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- リンカーまたはスペーサーが本質的にグリシンおよびセリン残基からなる、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 他の該成分がナノボディである、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 他の成分がヒト血清アルブミンをターゲットとしている、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディがヒト化ナノボディである、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディがナノボディ A L B 1 (配列番号: 63) のヒト化変異体である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディが A L B 3 (配列番号: 87)、A L B 4 (配列番号: 88)、A L B 5 (配列番号: 89)、A L B 6 (配列番号: 100)、A L B 7 (配列番号: 101)、A L B 8 (配列番号: 102)、A L B 9 (配列番号: 103)、A L B 10 (配列番号: 104) からなるグループから選択される、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも 1 つのナノボディが A L B 8 である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

。

10

20

30

40

50

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域がナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、TNFに対する K_{off} 速度が 2.10×10^{-3} (1/s)よりも小さい、好ましくは 1.10×10^{-3} (1/s)よりも小さいナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド、または該ナノボディのヒト化変異体である、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0073】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のナノボディV_{HH}3E(配列番号:4)のEC50値よりも小さいナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体である、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が12 nMよりも小さいナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体である、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が5 nMよりも小さいナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体である、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0074】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、国際公開第04/041862号の実施例1、3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が3 nMよりも小さいナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体である、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のナノボディであり、ヒト化されている上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド

であり、この実施態様の特に好ましいいくつかの態様は、

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域がGLEW-クラスナノボディであり、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が103番目の位置にアルギニン残基(R)を有するナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が103番目の位置にアルギニン残基(R)を有するGLEW-クラスナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、配列番号52(TNF1)、76(TNF13)、77(TNF14)、95(TNF29)、または96(TNF30)のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有するナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0075】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて:

a) CDR1が

- アミノ酸配列DYWMY、または

- アミノ酸配列DYWMYと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、

10

20

30

40

50

より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

- アミノ酸配列DYWMYと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

を含み、

b) CDR2が

- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKG、または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

10

を含み、

c) CDR3が

- アミノ酸配列SPSGFN、または
- アミノ酸配列SPSGFNと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列SPSGFNと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

20

を含む、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0076】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、XIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここでCDR1がアミノ酸配列DYWMYを含む、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、XIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここでCDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含む、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

30

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、XIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここでCDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、XIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、または

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含む、または

40

- CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、

上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0077】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、XIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここでCDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、上記のXIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、XIX)~XX)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、CDR1がアミノ酸配

50

列 D Y W M Y を含む、C D R 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G を含む、C D R 3 がアミノ酸配列 S P S G F N を含む、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 7 8 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

a) C D R 1 が

- アミノ酸配列 D Y W M Y、または
- アミノ酸配列 D Y W M Y と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 D Y W M Y と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、

b) C D R 2 が

- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G、または
- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、

c) C D R 3 が

- アミノ酸配列 S P S G F N、または
- アミノ酸配列 S P S G F N と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 S P S G F N と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列である、

上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 3 がアミノ酸配列 S P S G F N である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 7 9 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

- C D R 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y であり、C D R 3 がアミノ酸配列 S P S G F N である、または
- C D R 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y であり、C D R 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G である、または
- C D R 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G であり、C D R 3 がアミノ酸配列 S P S G F N である、

上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここでC D R 1がアミノ酸配列D Y W M Yであり、C D R 3がアミノ酸配列S P S G F Nである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここでC D R 1がアミノ酸配列D Y W M Yであり、C D R 2がアミノ酸配列E I N T N G L I T K Y P D S V K Gであり、C D R 3がアミノ酸配列S P S G F Nである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0080】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

- 任意のアミノ酸置換が好ましくは保存アミノ酸の置換であり、および/または
- 該アミノ酸配列が、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換を含むのみで、アミノ酸の欠失または挿入を含まない、

上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、ナノボディT N F 1 (配列番号: 52)およびナノボディT N F 1 (配列番号: 52)のヒト化変異体からなるグループから選択される、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、T N F 1 3 (配列番号: 76)、T N F 1 4 (配列番号: 77)、T N F 2 9 (配列番号: 95)、T N F 3 0 (配列番号: 96)からなるグループから選択される、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域がT N F 3 0 (配列番号: 96)であり、この実施態様の好ましいいくつかの態様は、

- 「第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、K E R E-クラスナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、配列番号: 50 (T N F 3)、83 (T N F 2 0)、85 (T N F 2 1)、85 (T N F 2 2)、96 (T N F 2 3)、98 (T N F 3 3)のアミノ酸の一つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有するナノボディである、上記のX I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0081】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

a) C D R 1が

- アミノ酸配列N Y Y M G、または
- アミノ酸配列N Y Y M Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列N Y Y M Gと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

を含み、

b) C D R 2が

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G、または
- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

10

20

30

40

50

- アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

を含み、

c) C D R 3 が

- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y、または
- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

10

を含む、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 8 2 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

20

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 8 3 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G を含み、C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含む、または
- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G を含み、そして C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G を含む、または
- C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G を含み、C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含む、

30

上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G を含み、C D R 2 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含み、C D R 3 がアミノ酸配列 I L P L S D D P G W N T Y (配列番号：436) を含む、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 8 4 】

40

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

a) C D R 1 が

- アミノ酸配列 N Y Y M G、または
- アミノ酸配列 N Y Y M G と少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 N Y Y M G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、

b) C D R 2 が

50

- アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G、または
- アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

であり、

c) C D R 3 が

- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y、または
- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列

10

である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 8 5 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

20

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 8 6 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

30

- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G であり、C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、または
- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G であり、C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G である、または
- C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G であり、C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、

上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【 0 0 8 7 】

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディであり、ここで C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G であり、C D R 2 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y であり、C D R 3 がアミノ酸配列 I L P L S D D P G W N T Y である、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

40

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチドについて記載のナノボディにおいて、

- 任意のアミノ酸置換が好ましくは保存アミノ酸の置換であり；および/または
- 該アミノ酸配列が、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換を含むのみで、アミノ酸の欠失または挿入を含まない、

上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

50

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、ナノボディ T N F 3 (配列番号: 60) およびナノボディ T N F 3 (配列番号: 60) のヒト化変異体からなるグループから選択される、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- 第一、第二の免疫グロブリン可変領域が、83 T N F 20 (配列番号: 83)、T N F 21 (配列番号: 84)、T N F 22 (配列番号: 85)、T N F 23 (配列番号: 86)、T N F 33 (配列番号: 99) からなるグループから選択される、上記の X I X) ~ X X) のいずれか 1 つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

【0088】

タンパク質またはポリペプチドが「上記の X I X) から X X) のいずれか 1 つに記載の」と記述される場合、それは少なくとも X I X) から X X) のいずれか 1 つであり、X I X) および X X) のいずれにも記載であり、「上記の X I X) から X X) のいずれか 1 つに記載の」と示される他の態様の 1 つ以上も含む。

10

【0089】

しかし、本発明が任意の特定の作用機構または仮説に限定されないことに留意されたい。特に、本発明の一価のナノボディが本明細書に記載の分析およびモデルにおいても活性でありうるが見出されており、ここでは、T N F 三量体の分子内結合が本発明の具体的な一実施態様では好ましいが、本明細書記載のナノボディ、タンパク質、ポリペプチドの所望の作用、効果を得るのに必須ではないことが確認されている。同様に、本明細書記載のタンパク質およびポリペプチドによって、任意の適切な機構(つまり、分子内結合、分子間結合、またはさらに単量体 T N F への結合、そしてこれによる T N F 三量体の形成の阻害による)を介して所望の作用が得られることも本発明の範囲に含まれる。

20

【0090】

本明細書において想定される使用法に適している限り、本発明のナノボディおよびポリペプチドの部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立因子および/または派生物の使用、および/またはこれらを含む、または主成分とするタンパク質またはポリペプチドの使用が本明細書において想定される使用法に適していることも本発明の範囲内である。

このような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立因子、誘導体、タンパク質および/またはポリペプチドは、本明細書においてさらに詳述される。

【0091】

別の態様では、本発明は、4つのフレームワーク領域(それぞれ F R 1 から F R 4) および3つの相補性決定領域(それぞれ C D R 1 から C D R 3) からなる、T N F アルファに対するナノボディ(本明細書で規定)に関連しており、ここで

30

(i) C D R 1 は、配列番号: 15 ~ 21 の C D R 1 配列からなるグループまたは配列番号: 164 ~ 197 の C D R 1 配列からなるグループ、または配列番号: 15 ~ 21 の C D R 1 配列からなるグループまたは配列番号: 164 ~ 197 の C D R 1 配列からなるグループと少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列、ここで

【0092】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

40

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、

および/または配列番号: 15 ~ 21 からなるグループからの C D R 1 配列または配列番号: 164 ~ 197 からなるグループからの C D R 1 配列の少なくとも 1 つと、3 つ、2 つ、または 1 つだけ「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)があるアミノ酸配列からなるグループ、ここで

【0093】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換

50

のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、ここで

(i i) C D R 2 は、配列番号：22～28のC D R 2配列からなるグループまたは配列番号：232～265のC D R 2配列からなるグループ、または配列番号：22～28のC D R 2配列からなるグループまたは配列番号：232～265のC D R 2配列からなるグループと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるグループから選択され、ここで

【0094】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、

および/または配列番号：22～28からなるグループからのC D R 2配列または配列番号：232～265からなるグループからのC D R 2配列の少なくとも1つと、3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)があるアミノ酸配列からなるグループ、ここで

【0095】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、ここで

(i i i) C D R 3 は、配列番号：29～33のC D R 3配列からなるグループまたは配列番号：300～333のC D R 3配列からなるグループ、または配列番号：29～33のC D R 3配列からなるグループまたは配列番号：300～333のC D R 3配列からなるグループと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるグループから選択され、ここで

【0096】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、

および/または配列番号：29～33からなるグループからのC D R 3配列または配列番号：300～333からなるグループからのC D R 3配列の少なくとも1つと、3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)があるアミノ酸配列からなるグループ、ここで

【0097】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、

または配列番号：34および35のC D R 3配列からなるグループまたは配列番号：34および35のC D R 3配列からなるグループと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるグループから選択され、ここで

【0098】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換(本明細書で規定)であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、

10

20

30

40

50

および/または配列番号：34および35からなるグループからのCDR3配列の少なくとも1つと、3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）があるアミノ酸配列からなるグループ、ここで

【0099】

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換（本明細書で規定）であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まない。

【0100】

上記、および以下でさらに詳述されている、TNF アルファに対するナノボディは、本明細書において本発明のナノボディとも呼ばれている。

10

【0101】

本発明のナノボディの内、上で明確に記載されているCDRの1つ以上を含むナノボディが特に好ましく、上で明確に記載されているCDRの2つ以上を含むナノボディがさらに好ましく、上で明確に記載されているCDRの1つ以上を含むナノボディが最も好ましい。

【0102】

限定はされないが、CDRの特に好ましい組み合わせが下表Iにおいて見ることができ、ここには本発明の多数の好ましいナノボディ（限定はされない）に存在するCDRおよびフレームワーク配列が記載されている。当業者には明らかなように、同じクローンで生じるCDR1、CDR2、CDR3配列の組み合わせ（つまり、表Iの同じ行に記載されているCDR1、CDR2、CDR3配列）が通常、好ましい（もっとも、本発明は、広義では、これに限定されず、表Iに記載のCDR配列の他の適切な組み合わせも含む）。

20

【0103】

また、表I記載のCDRの組み合わせを含む、本発明のナノボディにおいて、各CDRは、記載のCDRと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるグループから選択されるCDRによって置換可能であり、ここで

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換（本明細書で規定）であり、および/または

30

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まず、

および/または配列番号：34、35からなるグループからのCDR3配列の少なくとも1つと、3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）があるアミノ酸配列からなるグループ、ここで

(1) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換（本明細書で規定）であり、および/または

(2) 該アミノ酸配列は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まない。

【0104】

40

しかし、当業者には明らかなように、表Iに記載されるCDR配列（の組み合わせ）が一般に好ましい。

【0105】

【表 I - 1】

表 I : フレームワーク配列およびCDR配列の好ましい組み合わせ

Clone	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1
PMP1C2 (TNF1)	3	QVQLVESGGGLYQPG	6	1	9	WVROAPKKG	3	2	6	8	0	3	3	3
	0	GSLRLSCAASGRTFS	4	6	8	LEWYS	2	3	2	6	0	0	0	4
PMP1G11	3	QVQLQESGGGAVQPG	6	1	9	WVROAPKKG	3	2	6	8	0	3	3	3
	1	GSLRLSCAASGDFG	5	6	9	LEWYS	3	3	7	7	1	1	0	5
PMP1H6	3	EVQLVESGGGLYQPG	6	1	0	WVROAPKKG	3	2	6	8	0	3	3	3
	2	GSLRLSCATSGDFDS	6	6	0	LEWYS	4	4	8	8	0	0	0	6
PMP1G5 (TNF2)	3	QVQLVESGGGLYQAG	6	1	0	WFRDAPGKE	3	2	6	8	0	3	3	3
	3	GSLRLSCAASGRTFS	7	6	1	REFVA	5	3	9	9	3	3	0	7
PMP1H2	3	QVKLEESGGGLYQPG	6	1	0	WFRDAPGKE	3	2	6	8	0	3	3	3
	4	DSLRLSCAASGRTFS	8	6	2	REFVA	6	3	0	0	4	4	0	8
PMP3G2	3	AVQLVESGGGLYQPG	6	1	0	WFRDAPGKE	3	2	6	8	0	3	3	3
	5	DSLRLSCAASGRTFS	9	6	3	REFVA	7	3	1	1	5	5	0	8
PMP1D2	3	AVQLVDSGGGLYQAG	7	1	0	WFRDAPGKE	3	2	6	8	0	3	3	3
	6	GSLRLSCAASGRTFS	0	6	4	REFVA	8	3	7	7	0	0	0	6

10

20

30

【表 I - 2】

Clone	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4			
	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1		
PMP3D10	3	QVQLVESGGGLVQAGG	7	1	0	WFRQAPG	2	2	3	SISWRGDNTYYKE	7	0	SILPLSDDPG	3	WGGG	
	7	SLSLCAASGRSFT	1	1	5	KERQLLA	9	9	9	SVKG	3	7	WNTN	4	TOVTV	
PMP5F10 (TNF3)	1	EVQLVESGGGLVQAGG	7	1	2	WFRQAPG	4	2	2	NISWRGYNYYKDS	7	0	SILPLSDDPG	3	WGGG	
	3	SLSLCAASGRSLS	2	1	6	KERELLG	0	0	4	VKG	4	8	WNTY	4	TOVTV	
NC55TNF_ S1C4	1	EVQLVESGGGLVQAGD	7	1	2	WFRQAPG	4	2	2	EIRPSGDFGPEGE	7	0	APYRGGGRDYR	3	WGGG	
	9	SLRLSCAASQIIFG	3	1	7	REFEVA	1	1	1	FEHTASLKG	5	9	WEYEY	4	TOVTV	
NC55TNF_ S1C3	1	EVQLVESGGGLVQIPGG	7	1	2	WFRAPG	4	2	2	GIGWSGGDAFYRN	7	0	KLSPYYNDFD	3	WGGG	
	4	SLRLSCKNAGSTSN	4	1	8	KEREFVA	2	2	2	SVKG	6	1	SSINYEY	4	TOVTV	
NC55TNF_ S2C1	1	EVQLVESGGDLVQIPGG	7	1	2	WYRRAPG	4	2	2	TITDDGTTDYGDD	7	0	NRLRSTWGR	3	WGGG	
	1	SLRLSCAVSGQLFS	5	1	9	KQRELVA	3	2	4	VKG	7	1	YDV	4	TOVTV	
NC55TNF_ S2C5	1	EVQLVESGGGLVQIPGG	7	1	2	WFRQAPG	4	2	2	FINSDSSTTYADS	7	0	EPGAYEGLW	3	WGGG	
	2	SLRLSCVYSGFTS	6	1	0	KFEWWS	4	2	4	VKG	8	2	RGYGRD	4	TOVTV	
NC55TNF_ S3C7	1	EVQLVESGGGTVQAGD	7	1	2	WFRQAPG	4	2	2	GVGYDSSIRYAE	7	0	EPGAYEGLW	3	WGGG	
	3	SLRLCAASGRSFS	7	1	1	KQREFLA	5	2	5	SVKG	9	3	TY	4	TOVTV	
															7	SS

10

20

30

【表 I - 3】

Clone	FRT		CDRT		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1
NC55TNF_S3C1	1	TNF-	1		2		2		3		3		3	WGQG
	4	ALPHAVESGGGLVQPG	7		1	WFRQAPGK	4	TISWNGSS	8	RFTISRDNKNTVYLOMNG	1	SYSNGNPHRFS	4	TQTV
	4	GSLKLSCAASGMFS	8	DSAMG	2	ERFVA	6	SYADRWAG	0	LTPQDTAVYYCAG	4	QYQY	8	SS
	1		1		2		2		2		3		3	WGQG
NC55TNF_BMP1B2	4	EVQLVESGGGLVQAGG	7		1	WFRQAPGK	4	AISWGGGSIV	8	RFTISRDNKNTVYLOMDS	1	ANNIATLRQGS	4	TQTV
	5	SLRLSCAASGRITFG	8	TYAMG	3	ERFVA	7	YAESAKG	1	LKPEDTAVYYCAA	5		9	SS
	1		1		2		2		2		3		3	LGSGT
	4	EVQLVESGGELVQAGGS	8		1	WFRQAPGK	4	SISWGGDTT	8	RFTVSRDNKNTVYLRMIN	1	VQVIDPSWISGY	5	QVTVS
NC55TNF_BMP1D2	6	LKLSCTASGRNFV	0	TYAMS	4	REFVA	8	YYSNSVKG	2	SLKPEDTADYYCAV	6	NLDYDY	0	S
	1		1		2		2		2		3		3	WGQG
	4	EVQLVESGGRVLPFGG	8		1	WFRQAPGK	4	GIOWSGGDA	8	RFRITRDPTNTVYLOMIDL	1	KLSPPYKIDFDS	5	TQTV
	7	SLRLSCKNAGSTSN	1	AYATG	5	REFVA	9	FYRNSVKG	3	KPEDTAVYYCAQ	7	SINYEY	1	SS
NC55TNF_BMP1G2	1		1		2		2		2		3		3	WGQG
	4	EVQLVESGGGLVQFPGG	8		1	WYRQAPGK	5	SITIGSRITNY	8	RFTISRDNKNTVYLOMINS	1		5	TQTV
	8	SLRLSCAAASATISS	2	MMLG	6	QREWVA	0	ADSVKG	4	LKPEDTAVYYCNA	8	VPRRDDY	2	SS
	1		1		2		2		2		3		3	WGQG
NC55TNF_BMP2A2	4	EVQLVESGGGLVQAGG	8		1	WFRQAPGK	5	RISGSDGSTY	8	RFTISRDNKNTVYLOMID	1	PRVENQWSSY	5	TQTV
	9	SLRLSCAAASGGTSS	3	SYDMG	7	GREFVA	1	YSDRAKD	5	RLKPDPTAVYYCRV	9	DY	3	SS
	1		1		2		2		2		3		3	WGKGT
	5	EVQLVESGGGLVQFPGG	8		1	WYRQAPGK	5	GIDSGGGSP	8	RFTVSRDNKNTVYLOMIN	2	FSTGADGGSW	5	QVTVS
NC55TNF_BMP2C2	0	SLRLSCAAASGGSTFS	4	TYDMS	6	GLEIWS	2	MYDVSVKG	6	SLKPEDTAVYYCAK	0	YWSYGMDS	4	S

10

20

30

【表 I - 4】

Clone	FR1		CDRT		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D	1	D
NC55TNF _BMP2FZ	5	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQAPGK	5	RVDVSGGNT	8	RFTVSRINGKNTVYLQMNHL	2	GGWGTQDYD	5	TQVTV	3	WGQG
	1	DSLRLSCAASGRSSN	5	EREFLA	3	LYGDSVKD	7	KPEDTAVYCAA	1	DY	5	SS	3	RGQGT
NC55TNF _NC10	5	EVQLVESGGGLVQPG	8	WVRQAPGK	5	FINDGGSSTT	8	RFKISRDNKAKNTLYLQMNLSL	2	RGVALD	5	QVTVS	3	WGQG
	2	GSLRLSCVYSSGCT	6	AEEHWS	4	YADSVNG	8	GPEDTAVYCCR	2		6	S	3	WGQG
NC55TNF _NC11	5	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQPPGK	5	SIKWRGNNT	8	RFTISRGNKAKNTENTVSLQIM	2	DSSHYSYYSK	5	TQVTV	3	WGQG
	3	DSLTLSCASSGRGFY	7	EREFLA	1	YADSVNG	9	NSLKPEDTADYYCAA	3	AYEYDY	7	SS	3	WGQG
NC55TNF _NC1	5	EVQLVESGGGLVQPG	8	WVRQAPGK	5	FINDGGSSTT	8	RFTISRDNKAKNTLYLQMNLSL	2		5	QVTVS	3	WGQG
	4	GSLRLSCVYSSGCT	6	YEEHWS	8	YADSVNG	0	KSEDVAVYCCR	4	RGYGRD	8	S	3	WGQG
NC55TNF _NC2	5	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQAPGK	5	AIWSGTTN	8	RFTISRDNKAKNTVHLQMNLSL	2	VQPYSGGDYY	5	TQVTV	3	WGQG
	5	GSLRLSCAASGRITFS	9	EREFLA	3	YADSVNG	1	KPEDTAVYHCAV	5	TGVEEYDY	9	SS	3	WGQG
NC55TNF _NC3	5	EVQLVESGGGLVQPG	8	WVRQAPGK	5	FINDGGSSTT	8	RFTISRDNKAKNTLYLQMNDDL	2		6	QVTVS	3	WGQG
	6	GSLRLSCVYSSGCTFS	0	AEEHWS	4	YADSVNG	2	QSEDVAVYCCR	8	RGYGRD	0	S	3	WGQG
NC55TNF _NC5	5	EVQLVESGGGLVQAG	8	WFRQAPGK	5	FINDGGSSTT	8	RFTISRDNKAKNTVYLQMNLSL	2	ARYNGTWSSN	8	TQVTV	3	WGQG
	7	GSLRLSCAASGGAFS	1	GREFLA	5	YSSNRKAG	9	KREDTAVYCYRA	7	DY	1	SS	3	WGQG

10

20

30

【表 I - 5】

Clare	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
NC55TN F_NC6	5 8 EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCQCVSSCCT	8 2 FSAYSM T	2 8 WYRQAPGKA EEFVS	6 0 FNSDGSSTT YANSVNG	9 4 RFKISRDNAKNTLYLQMINSL GPEDTAMYCGR	3 8 RGYALD	6 2 RGQGTQ VTVSS
NC55TN F_NC7	5 9 QVQLVESGGGLVQAGGGS LRLSCTASGQTSS	9 3 TADMG	2 7 WFRDPPKGG REFVA	6 1 RISGIDGTTY YDEPVKGG	9 5 RFTISRDKAQNIVYLQMDLSL KPEDTAVYYGCRS	8 3 PRYADQW SAYDY	6 3 WGQGTQ VTVSS
NC55TN F_NC8	6 0 EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCVVSIGFTFS	9 4 TTSMT	2 8 WYRQAPGKF EEWVS	6 2 FNSDGSSTT YADSVKGG	9 8 RFTISRDNAKNTLYLQMINSL KPEDTAMYCGR	3 4 RSYGRD	6 4 RSKGIQV TVSS
NC55TN F_S7C2	6 1 EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCVASASGVK	9 5 VNDMG	2 9 WYRQAPGKE RELVA	6 3 TITDDGRTNY EDFAKGG	9 7 RFTISRDNAKNTLYLQMINSL LPEDTAVYYCNA	3 1 RTYWAHL PTY	6 5 WGQGTQ VTVSS
NC55TN F_S1C6	6 2 EVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGRSFG	9 6 SVAMG	3 0 WFRQAPGKE REFVA	6 4 AIGYDGNISIR YGDVSKGG	9 8 RFTISRDNKNTMYLEMENL NADDTARYLCAA	3 2 EPLARYE GLWTY	6 6 WGQGTQ VTVSS
NC55TN F_S3C2	6 3 EVQLVESGGGLVQAGASL RLSCTTSTRTN	9 7 DRNMA	3 1 WFHQAPGKD REFVS	6 5 RIDVAGYNTA YGFDFVKG	9 9 RFTVSRDSEANTVYLQMINSL RPEDTGVYYCAA	3 3 GSWGSQ SDYDL	6 7 WGQGTQ VTVSS

表 I の注釈 :

ID は添付の配列表内の配列番号を示す。

CDR1 について：配列番号：164 は配列番号：15 と一致する。：配列番号：167 は配列番号：16 と一致する。配列番号：172 は配列番号：17 と一致する。配列番号：165、166 は配列番号：18 と一致する。配列番号：170 は配列番号：19 と一致する。配列番号：171 は配列番号：20 と一致する。配列番号：168、169 は配列番号：21 と一致する。

CDR2 について：配列番号：232、233 は配列番号：22 と一致する。：配列番号：235 は配列番号：23 と一致する。配列番号：240 は配列番号：24 と一致する。配列番号：234 は配列番号：25 と一致する。配列番号：236、237 は配列番号：26 と一致する。配列番号：238 は配列番号：27 と一致する。配列番号：239 は配列番号：28 と一致する。

CDR3 について：配列番号：303 は配列番号：29 と一致する。配列番号：308 は配列番号：30 と一致する。配列番号：306 は配列番号：31 と一致する。配列番号：307 は配列番号：32 と一致する。配列番号：304、305 は配列番号：33 と一致

10

20

30

40

50

する。配列番号：300は配列番号：34と一致する。配列番号：301、302は配列番号：35と一致する。

【0106】

このように、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つは、表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループ、または表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループ、および/または表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。これに関連して、「適切に選択される」とは、該当する場合、CDR1配列が適切なCDR1配列（本明細書で規定）から選択され、CDR2配列が適切なCDR2配列（本明細書で規定）から選択し、CDR3配列が適切なCDR3配列（本明細書で規定）から選択される。

10

【0107】

特に、本発明のナノボディにおいて、少なくとも存在するCDR3配列は、表I記載のCDR3配列からなるグループ、または表I記載のCDR3配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR3配列からなるグループ、および/または表I記載のCDR3配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR3配列からなるグループから適切に選択される。

20

【0108】

好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも2つは、表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループ、または表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループ、および/または表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の相違」を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。

30

【0109】

特に、本発明のナノボディにおいて、少なくとも存在するCDR3配列は、表I記載のCDR3配列からなるグループ、または表I記載のCDR3配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR3配列からなるグループから適切に選択され、存在するCDR1、CDR2配列の少なくとも1つは、表I記載のCDR1、CDR2配列からなるグループ、または表I記載のCDR1、CDR2配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR3配列からなるグループ、および/または表I記載のCDR1、CDR2配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR1、CDR2配列からなるグループから適切に選択される。

40

【0110】

最も好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の3つ全ては、表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループ、または表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループ、および/または表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つと

50

3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。

【0111】

さらに好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つは、表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。

好ましくは、この実施態様において、存在する他の2つのCDR配列の少なくとも1つ、好ましくはいずれも、表I記載の対応するCDR配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列、および/または表I記載の対応する配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR配列からなるグループから適切に選択される。

10

【0112】

特に、本発明のナノボディにおいて、少なくとも存在するCDR3配列は、表I記載のCDR3配列からなるグループから適切に選択される。

好ましくは、この実施態様において、存在するCDR1、CDR2配列の少なくとも1つ、好ましくはいずれも、表I記載の対応するCDR1、CDR2配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR1、CDR2配列のグループ、および/または表I記載のCDR1、CDR2配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR1、CDR2配列からなるグループから適切に選択される。

20

【0113】

さらに好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つは、表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。好ましくは、この実施態様では、存在する残りのCDR配列が、表I記載の対応するCDR配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列のグループ、および/または表I記載の対応する配列の少なくとも1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR配列のグループから適切に選択される。

30

【0114】

特に、本発明のナノボディにおいて、少なくともCDR3配列は表I記載のCDR3配列からなるグループから適切に選択され、そしてCDR1配列またはCDR2配列が表I記載のCDR1、CDR2配列からなるグループから適切に選択される。好ましくは、この実施態様では、存在する残りのCDR配列が、表I記載の対応するCDR配列の少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列のグループ、および/または表I記載の対応するCDR配列と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR配列のグループから適切に選択される。

40

【0115】

さらにもっと好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1、CDR2、CDR3全配列は、それぞれ表I記載のCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。

【0116】

また、一般に、表I記載のCDRの組み合わせ(つまり、表Iの同じ行に記載の組み合わせ)が好ましい。したがって、本発明のナノボディのCDRは、表I記載のCDR配列である、または表I記載のCDR配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列のグループ、および/または表I記載の対応するCDR配列と3つ、

50

2つ、または1つのアミノ酸の相違を有し、他のCDRの少なくとも1つ、好ましくはいずれも表I記載の同じ組み合わせに属するCDR配列から適切に選択されるか、または表I記載のCDR配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列のグループ、および/または表I記載の対応するCDR配列と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR配列のグループから適切に選択されるCDR配列である。上記のパラグラフで示される、表I記載のCDRの組み合わせもその他に好ましい。

【0117】

したがって、非限定的な例を用いれば、本発明のナノボディは、表I記載のCDR1配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR1、表I記載（しかし、異なる組み合わせに属する）のCDR2の1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸が異なるCDR2配列、そしてCDR3配列を含むことができる。

10

【0118】

本発明の好ましいナノボディは、例えば、(1)表I記載のCDR1配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR1配列、表I記載（しかし、異なる組み合わせに属する）のCDR2配列の1つと3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR2配列、表I記載（しかし、異なる組み合わせに属する）のCDR3配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR3配列、または(2)表I記載のCDR1配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR1配列、CDR2配列、表I記載のCDR3配列の1つ、または(3)CDR1配列、CDR2配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR2配列、表I記載で、CDR2配列と同じ組み合わせに属するCDR3配列と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR3配列を含む可能性がある。

20

【0119】

本発明の特に好ましいナノボディは、例えば、(1)表I記載のCDR1配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR1配列、表I記載で、同じ組み合わせに属するCDR3配列と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR2配列、表I記載で、同じ組み合わせに属するCDR3配列と80%以上の配列同一性を有するCDR3配列、(2)CDR1配列、表I記載のCDR2、表I記載のCDR3配列（ここで、CDR2配列とCDR3配列は異なる組み合わせに属する）を含む可能性がある。

30

【0120】

本発明のさらに好ましいナノボディは、例えば、(1)表I記載のCDR1配列の1つと80%以上の配列同一性を有するCDR1配列、表I記載で、同じ組み合わせに属するCDR2配列、表I記載で、異なる組み合わせに属するCDR3配列、または(2)表I記載のCDR1配列、同じ組み合わせに属する表I記載のCDR2配列と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の相違を有するCDR2配列、同じ異なる組み合わせに属する表I記載のCDR3配列と80%以上の配列同一性を有するCDR3配列を含む可能性がある。

【0121】

本発明の特に好ましいナノボディは、例えば、表I記載のCDR1配列、表I記載で、同じ組み合わせに属するCDR2配列と80%以上の配列同一性を有するCDR2配列、そして表I記載で、同じ組み合わせに属するCDR3配列を含む可能性がある。

40

【0122】

本発明の最も好ましいナノボディでは、存在するCDR1、CDR2およびCDR3配列を、表I記載のCDR1、CDR2およびCDR3配列の組み合わせの1つから適切に選択する。

【0123】

好ましくは、表I記載のCDR配列の1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するCDR配列のグループからCDR配列が適切に選択される場合、および/または表I記載のCDR配列の1つと3つ、2つ、1つのアミノ酸の相違を有するCDR配列からなるグループからCDR配列が適切に選択される場合、

50

i) 任意のアミノ酸置換は好ましくは保存アミノ酸の置換（本明細書で規定）、および/または

ii) アミノ酸配列は好ましくは、表 I 記載の CDR 配列と比較して、アミノ酸置換のみを含み、アミノ酸置換の欠失または挿入は含まない。

【0124】

本発明の非限定的であるが、好ましい実施態様によると、本発明のナノボディの CDR 配列は上で規定されているとおりであり、また本発明のナノボディが、解離定数 (K_D) $10^{-5} \sim 10^{-12}$ moles/liter (M) 以下、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ moles/liter (M) 以下、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ moles/liter (M)、および/または結合定数 (K_A) 少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$ （例、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ ）、特に K_D 500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満（例、500 pM 未満）で TNF アルファに結合するようにする。TNF アルファに対する本発明のナノボディの K_D 、 K_A 値は、例えば、本明細書記載の分析試験を利用して、それ自体公知の方法で測定される。

10

【0125】

本発明の別の好ましいが、非限定的な実施態様によると、(a) CDR 1 の長さは 1 ~ 12 アミノ酸残基、通常は 2 ~ 9 アミノ酸残基（例、5、6 または 7 アミノ酸残基）、および/または (b) CDR 2 の長さは 13 ~ 24 アミノ酸残基、通常は 15 ~ 21 アミノ酸残基（例、16、17 アミノ酸残基）、および/または (c) CDR 3 の長さは 2 ~ 35 アミノ酸残基、通常は 3 ~ 30 アミノ酸残基（例、6 ~ 23 アミノ酸残基）である。

20

【0126】

一態様では、本発明は、ナノボディ 3E よりも性能の高い TNF アルファに対するナノボディ、つまり国際公開第 04/041862 号記載の最も性能の高いナノボディを提供する。

【0127】

より具体的には、本発明のこの実施態様の好ましい態様は：

XXI) TNF に対する K_{off} 速度が $2 \cdot 10 \times 10^{-3}$ (1/s) よりも小さく、好ましくは $1 \cdot 10 \times 10^{-3}$ (1/s) よりも小さい、4つのフレームワーク領域 (FR1 ~ FR4) および3つの相補性決定領域 (CDR1 ~ CDR3) からなる、TNF アルファに対するナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。

30

XXII) 国際公開第04/041862号の実施例1、3)記載のKYM細胞を使用した細胞ベース分析試験においてEC50値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のナノボディ V_{HH}3E (配列番号: 4) のEC50値よりも小さい、4つのフレームワーク領域 (FR1 ~ FR4) および3つの相補性決定領域 (CDR1 ~ CDR3) からなる、TNF アルファに対するナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。

XXIII) 国際公開第04/041862号の実施例1、3)記載のKYM細胞を使用した細胞ベース分析試験においてEC50値が12 nMよりも小さい、TNF アルファに対するナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。

XXIV) 国際公開第04/041862号の実施例1、3)記載のKYM細胞を使用した細胞ベース分析試験においてEC50値が5 nMよりも小さい、TNF アルファに対するナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体。

40

XXV) 国際公開第04/041862号の実施例1、3)記載のKYM細胞を使用した細胞ベース分析試験においてEC50値が3 nMよりも小さい、TNF アルファに対するナノボディ、または該ナノボディのヒト化変異体であり；特に好ましいいくつかの態様が：

- GLEW-クラスナノボディである、XXI) ~ XXV) のいずれか1つに記載のナノボディ。

- 103番目の位置にアルギニン残基 (R) を含む、XXI) ~ XXV) のいずれか1つに記載のナノボディ。

- ヒト化ナノボディである、XXI) ~ XXV) のいずれか1つに記載のナノボディ。

- 108番目の位置にロイシン残基 (L) を含む、XXI) ~ XXV) のいずれか1つに

50

記載のナノボディ。

- 配列番号：52 (TNF1)、76 (TNF13)、77 (TNF14)、95 (TNF29) または 96 (TNF30) のアミノ酸配列のいずれかの1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有する、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

【0128】

- (XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディであり、ここで

a) CDR1が:

- アミノ酸配列DYWMYを含む、または
- アミノ酸配列DYWMYと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列DYWMYと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含み、

10

b) CDR2が:

- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含む、または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含み、

20

c) CDR3が:

- アミノ酸配列SPSGFNを含み、または
- アミノ酸配列SPSGFNと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列SPSGFNと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

【0129】

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- (XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディであり、ここで:

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、または

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含む、または

- CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含みおよびCDR3がアミノ酸配列SPSGFNを含む、(XXI)~(XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

【0130】

30

40

50

- XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディであり、ここで：

a) CDR 1が：

- アミノ酸配列DYWMYである；または
- アミノ酸配列DYWMYと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または
- アミノ酸配列DYWMYと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；であり

b) CDR 2が：

- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGである；または 10
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；であり

c) CDR 3が：

- アミノ酸配列SPSGFNである、または
- アミノ酸配列SPSGFNと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または 20
- アミノ酸配列SPSGFNと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列である、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

【0131】

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYである、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR 2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGである、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR 3がアミノ酸配列SPSGFNである、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディであり、ここで： 30

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYであり、CDR 3がアミノ酸配列SPSGFNである；または

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYであり、CDR 2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGである；または

- CDR 2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGであり、CDR 3がアミノ酸配列SPSGFNである、

- XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディであり、CDR 1がアミノ酸配列DYWMYであり、CDR 3がアミノ酸配列SPSGFNである、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYであり、CDR 2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGであり、CDR 3がアミノ酸配列SPSGFNである、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。 40

- XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディであり、

- 任意のアミノ酸置換が好ましくは保存アミノ酸の置換であり、および/または
- 該アミノ酸置換は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸の欠失または挿入を含まない、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノボディ。

【0132】

特に好ましいいくつかの態様は、

- KERE-クラスナノボディである、XX I) ~ XX V)のいずれか1つに記載のナノ 50

ボディである。

- 配列番号：50 (TNF3)、83 (TNF20)、85 (TNF21)、85 (TNF22)、96 (TNF23) または 98 (TNF33) のアミノ酸配列のいずれかの1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有する、XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディであり、

- XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディであり、

a) CDR1が

- アミノ酸配列NY YMGを含む、または
- アミノ酸配列NY YMGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列NY YMGと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含み、

10

b) CDR2が

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gを含む、または
- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと2つ、または1つだけア

20

c) CDR3が、

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Y、または
- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと2つ、または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含む、ナノボディ。

【0133】

- CDR1がアミノ酸配列NY YMGを含む、XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

30

- CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gを含む、XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- CDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yを含む、XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディ。

- XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディであり、

- CDR1がアミノ酸配列NY YMGを含み、CDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yを含む、または
- CDR1がアミノ酸配列NY YMGを含み、CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gを含む、または
- CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gを含み、CDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yを含む、ナノボディ。

40

- CDR1がアミノ酸配列NY YMGを含む、CDR2がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yを含む、CDR3がアミノ酸配列I L P L S D D P G W N T Yを含む、

- XXI)~XXV)のいずれか1つに記載のナノボディであり、

a) CDR1が

- アミノ酸配列NY YMGである、または
- アミノ酸配列NY YMGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

50

- アミノ酸配列 N Y Y M G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、
- b) C D R 2 が
 - アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G である、または
 - アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G と少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
 - アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり、
- c) C D R 3 が
 - アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、または
 - アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、または
 - アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と 2 つ、または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列である、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

10

【 0 1 3 4 】

- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G である、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G である、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- (X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディであり、
 - C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G であり、C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、または
 - C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G であり、C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G である、または
 - C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G であり、C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y である、ナノボディ。
- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G であり、C D R 2 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y であり、C D R 3 がアミノ酸配列 I L P L S D D P G W N T Y である、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
 - 任意のアミノ酸置換が好ましくは保存アミノ酸の置換であり、および/または
 - 該アミノ酸置換は、上記のアミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸の欠失または挿入を含まない、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。

20

30

【 0 1 3 5 】

- ヒト化ナノボディである、(X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載のナノボディ。
- および、さらに特に好ましい他のいくつかの態様は、
- (X X V I) (X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載の少なくとも 1 つのナノボディを含む、または主成分とする、タンパク質またはポリペプチド。
- (X X V I I) (X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディを含む、タンパク質またはポリペプチド。
- (X X V I I I) (X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディを含み、T N F 三量体への結合時に該 T N F 三量体によって媒介される T N F 受容体の架橋、および/または受容体の該架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下できる、タンパク質またはポリペプチド。
- (X X I X) (X X I) ~ (X X V) のいずれか 1 つに記載の 2 つのナノボディを含み、T N F 三

40

50

量体上において少なくとも2つのTNF受容体結合部位への分子内結合が可能な、タンパク質またはポリペプチド。

XXX)適切なリンカーを介して連結するXXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含む、タンパク質またはポリペプチド。

XXXI)適切なリンカーを介して連結するXXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ペグ化された、タンパク質またはポリペプチド。

XXXII)XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディをさらに含む、タンパク質またはポリペプチド。

XXXIII)XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディをさらに含み、TNF三量体への結合時に該TNF三量体によって媒介されるTNF受容体の架橋、および/または受容体の該架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下できる、タンパク質またはポリペプチド。

【0136】

XXXIV)XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディをさらに含み、TNF三量体上において少なくとも2つのTNF受容体結合部位への分子内結合が可能な、タンパク質またはポリペプチド。

XXXV)XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する1つのナノボディをさらに含み、XXI)~XXV)のいずれか1項記載の2つの各ナノボディが任意で適切なリンカーを介して、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する1つのナノボディに連結する、タンパク質またはポリペプチド。

XXXVI)XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する1つのナノボディをさらに含み、XXI)~XXV)のいずれか1項記載の2つの各ナノボディが任意で適切なリンカーを介して、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する1つのナノボディに連結され、TNF三量体への結合時に該TNF三量体によって媒介されるTNF受容体の架橋、および/または受容体の該架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害または低下できる、タンパク質またはポリペプチド。

XXXVII)XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つのナノボディを含み、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する1つのナノボディをさらに含み、XXI)~XXV)のいずれか1つに記載の2つの各ナノボディが任意で適切なリンカーを介してヒト血清アルブミンに対して指向性を有する1つのナノボディに連結され、TNF三量体上において少なくとも2つのTNF受容体結合部位への分子内結合が可能なタンパク質またはポリペプチド。

【0137】

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディがヒト化ナノボディである、XXVI)~XXXVII)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディがナノボディALB1(配列番号:63)のヒト化変異体である、XXVI)~XXXVII)のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディが、ALB3(配列番号:87)、ALB4(配列番号:88)、ALB5(配列番号:89)、A

LB6(配列番号:100)、ALB7(配列番号:101)、ALB8(配列番号:

102)、ALB9(配列番号:103)、ALB10(配列番号:104)からな

10

20

30

40

50

る

グループから選択する、 $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも1つのナノボディがALB8である、 $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。
- $XXI) \sim XXV)$ のいずれか1つに記載の2つのヒト化ナノボディおよびナノボディ

ALB 1 (配列番号: 63)の1つのヒト化変異体を含む、または主成分とする、 $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか1つに記載のタンパク質またはポリペプチド。

10

【0138】

ナノボディが「上記の $XXI) \sim XXV)$ のいずれか1つに記載の」と上で記載される場合、少なくとも $XXI) \sim XXV)$ のいずれか1つ記載、 $XXI) \sim XXV)$ のいずれか2つ以上に記載であり、また「上記の $XXI) \sim XXV)$ のいずれか1つに記載の」と示される他の態様のいずれか1つ以上をも含む可能性があることに留意されたい。同様に、タンパク質またはポリペプチドが「上記の $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか1つに記載の」と上で記載される場合、少なくとも $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか1つ記載、 $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか2つ以上に記載であり、また「上記の $XXVI) \sim XXXVII)$ のいずれか1つに記載の」と示される他の態様のいずれか1つ以上も含む可能性がある。

20

【0139】

抗TNFナノボディとして特に有用であることが判明しているクローンは、クローンPMP1C2 (TNF1)である。表39においてKYM分析試験からの比較データから分かるように、TNF1のEC50値は、国際公開第04/41862号記載の最も小さい一価のナノボディ (ナノボディ 3E)のEC50値よりも4倍以上小さい (つまり、3Eで12 nMに対してPMP1C2で2.466 nM) (表39から分かるように、本発明のTNF1からTNF9の全てのナノボディが、この分析試験において3Eよりも小さいEC50値を示した)。この点に関して、国際公開第04/41862号のナノボディ 3Eが「KEREクラス」(本明細書に記載)に属し、従ってナノボディ PMP1C2 (「GLEWクラス」に属する)よりも低い程度でヒト化されることも指摘する必要がある。ナノボディ PMP1C2をPMP1C2と(CDRおよびフレームワークのいずれにおいても)高い配列相同性を有するGLEW-クラスナノボディである国際公開第04/41862号のナノボディ 1Aと比較した場合、KYM分析試験においてPMP1C2について得られたEC50値は50倍以上小さかった (つまり、1Aでの100 nMと比較して、PMP1C2では2.466 nM)。

30

【0140】

したがって、クローンPMP1C2 (または、これに由来する、またはこれと一致するCDR配列)に存在する、1つ以上、好ましくは任意の2つ以上、さらに好ましくは3つ全てのCDRを含むナノボディが本発明において特に好ましい。また、これらのナノボディは好ましくは「103 P、R、Sグループ」(本明細書で規定)に属し、最も好ましくは103番目の位置にRを有し、好ましくは44 - 47番目の位置にGLEWないしGLEW様配列も有する。また、これらのナノボディは「103 P、R、Sグループ」(特に103番目の位置にRを有する場合)に属し、好ましいが非限定的な一つのヒト化置換は108Qから108Lである。これら好ましいナノボディにおける、好ましいが非限定的な他のヒト化置換は、TNF1の配列とこれらのヒト化配列との比較から直ぐに明らかのように、本明細書記載のTNF1のヒト化変異体 (例、TNF13、TNF14、TNF29、TNF30)に存在する置換の1つ以上である。

40

【0141】

したがって、本発明の特に好ましいナノボディにおいては、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つが、配列番号: 164のCDR1配列、配列番号: 2

50

32のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列（つまり、クローンTNF1に存在するCDR配列）からなるグループ、または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の「配列同一性」（本明細書で規定）を有するCDR1、CDR2、CDR3配列のグループ、および/または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。

【0142】

好ましくは、本発明のこれら好ましいナノボディにおいては、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも2つが、配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列（つまり、クローンTNF1に存在するCDR配列）からなるグループ、または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の「配列同一性」を有するCDR1、CDR2、CDR3のグループ、および/または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」を有するCDR1、CDR2、CDR3配列からなるグループから適切に選択される。

【0143】

最も好ましくは、本発明のこれら好ましいナノボディにおいては、存在する3つ全てのCDR1、CDR2、CDR3配列が、配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列（つまり、クローンTNF1に存在するCDR配列）からなるグループ、または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の「配列同一性」を有するCDR1、CDR2、CDR3のグループ、および/または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」を有するCDR1、CDR2、CDR3からなるグループから適切に選択される。

【0144】

さらに好ましくは、本発明のこれら好ましいナノボディにおいては、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも1つが、配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列（つまり、クローンTNF1に存在するCDR配列）からなるグループから適切に選択される。好ましくは、この実施態様において、存在する他の2つのCDR配列の少なくとも1つ、好ましくはいずれも配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の「配列同一性」を有するCDR配列から適切に選択され、および/または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」を有するCDR配列からなるグループから適切に選択される。

【0145】

さらに好ましくは、本発明のこれら好ましいナノボディにおいては、存在するCDR1、CDR2、CDR3配列の少なくとも2つが、配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列（つまり、クローンTNF1に存在するCDR配列）からなるグループから適切に選択される。好ましくは、この実施態様において、存在する残りのCDR配列は、配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と少なくとも80%、

10

20

30

40

50

好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の「配列同一性」を有するCDR配列のグループ、および/または配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列と3つ、2つ、または1つだけ「アミノ酸の相違」を有するCDR配列からなるグループから適切に選択される。

【0146】

本発明の特に好ましいナノボディでは、配列番号：164のCDR1配列、配列番号：232のCDR2配列、配列番号：300のCDR3配列（つまり、クローンTNF1に存在するCDR配列）が含まれる。

【0147】

上記のCDR配列を有するナノボディは、好ましくは本明細書においてさらに規定されるフレームワーク配列を有する。特に好ましいが非限定的ないくつかのフレームワーク配列の組み合わせは上の表Iを見るもわかる。当業者では明らかであるように、同じクローン内において生じるFR1、FR2、FR3、FR4配列の組み合わせ（つまり、表I内の同じ行に記載されるFR1、FR2、FR3、FR4配列）が通常好ましい（最も広い意味では、本発明はこれに限定されず、表I記載のフレームワーク配列の他の適切な組み合わせも含む）。

【0148】

より具体的には、本発明のこの実施態様のある好ましい態様は：
XXXVIII) 四つのフレームワーク領域（それぞれFR1からFR4まで）および三つの相補性決定領域（それぞれCDR1からCDR3まで）からなるTNF-アルファに対するナノボディであって：

a) CDR1が：

- アミノ酸配列DYWMY；または
- アミノ酸配列DYWMYと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- アミノ酸配列DYWMYと1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；を含み、

b) CDR2が：

- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKG；または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGと2またはただ1つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列；を含み、

c) CDR3が：

- アミノ酸配列SPSGFN；または
- アミノ酸配列SPSGFNと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- アミノ酸配列SPSGFNと1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列、を含むナノボディ。

【0149】

- CDR1が、アミノ酸配列DYWMYを含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。
- CDR2が、アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。
- CDR3が、アミノ酸配列SPSGFNを含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。
- ナノボディであって：
 - CDR1がアミノ酸配列DYWMYを含み；そしてCDR3が、アミノ酸配列SPSGFNを含み；または

10

20

30

40

50

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYを含み；そしてCDR 2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含み；または

- CDR 2はアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含み；そしてCDR 3が、アミノ酸配列SPSGFNを含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYを含み；そしてCDR 3が、アミノ酸配列SPSGFNを含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- CDR 1がアミノ酸配列DYWMYを含み、CDR 2がアミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKGを含み、そしてCDR 3がアミノ酸配列SPSGFNを含むXXXVII)に記載のナノボディ。

【0150】

- ナノボディであって、

- いずれのアミノ酸置換も保存的アミノ酸置換であり；および/または

- 前記アミノ酸配列は、上記アミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸欠失または挿入を含まない、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- GLEWクラスのナノボディである、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- アルギニン残基(R)を103の位置に含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- ナノボディであって、配列番号：52(TNF1)、76(TNF13)、77(TNF14)、95(TNF29)または96(TNF30)のアミノ酸配列の一つ、と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有する、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- ヒト化されたナノボディである、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- ロイシン残基(L)を108の位置に含む、XXXVIII)に記載のナノボディ。

- ナノボディであって、TNFに対する K_{off} 速度が、 $2 \cdot 10 \times 10^{-3}$ (1/s)より小さく、好ましくは $1 \cdot 10 \times 10^{-3}$ (1/s)より小さい、XXXVIII)に記載のナノボディ；またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

【0151】

- ナノボディであって、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のV_{HH} 3E(配列番号：4)のEC50値よりも小さい、XXXVIII)に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、5 nMよりも小さい、XXXVIII)に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、3 nMよりも小さい、XXXVIII)に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

【0152】

XXXIX) 四つのフレ-ムワ-ク領域(それぞれFR1からFR4まで)および三つの相補性決定領域(それぞれCDR1からCDR3まで)からなるTNF-アルファに対するナノボディであって：

a) CDR 1が：

- アミノ酸配列DYWMY；または

- アミノ酸配列DYWMYと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- アミノ酸配列DYWMYと1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり；そして

b) CDR 2が：

- アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKG；または

10

20

30

40

50

- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G と二またはただ 1 つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり；

そして

c) CDR 3 が：

- アミノ酸配列 S P S G F N ；または

- アミノ酸配列 S P S G F N と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- アミノ酸配列 S P S G F N と 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるナノボディ。

【 0 1 5 3 】

- CDR 1 が、アミノ酸配列 D Y W M Y である、XXXIX) に記載のナノボディ。

- CDR 2 が、アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G である、XXXIX) に記載のナノボディ。

- CDR 3 が、アミノ酸配列 S P S G F N である、XXXIX) に記載のナノボディ。

- ナノボディであって：

- CDR 1 はアミノ酸配列 D Y W M Y であり；そして CDR 3 が、アミノ酸配列 S P S G F N であり；または

- CDR 1 はアミノ酸配列 D Y W M Y をであり；そして CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G であり；または

- CDR 2 はアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G であり；そして CDR 3 が、アミノ酸配列 S P S G F N である、XXXIX) に記載のナノボディ。

- CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y であり；そして CDR 3 が、アミノ酸配列 S P S G F N である、XXXIX) に記載のナノボディ。

- CDR 1 がアミノ酸配列 D Y W M Y であり、CDR 2 がアミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G であり、そして CDR 3 がアミノ酸配列 S P S G F N である XXXIX) に記載のナノボディ。

- XXXIX) に記載のナノボディであって、

- 任意のアミノ酸置換も好ましくは保存的アミノ酸置換であり；および/または

- 該アミノ酸配列は、上記アミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸欠失または挿入を含まない、ナノボディ。

- G L E W クラスのナノボディである、XXXIX) に記載のナノボディ。

- アルギニン残基 (R) を 1 0 3 の位置に含む、XXXIX) に記載のナノボディ。

- ナノボディであって、配列番号：52 (T N F 1)、76 (T N F 1 3)、77 (T N F 1 4)、95 (T N F 2 9) または 96 (T N F 3 0) のアミノ酸配列の一つ、と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 99% の配列同一性(本明細書で規定)を有する、XXXIX) に記載のナノボディ。

【 0 1 5 4 】

- ヒト化されたナノボディである、XXXIX) に記載のナノボディ。

- ロイシン残基 (L) を 1 0 8 の位置に含む、XXXIX) に記載のナノボディ。

- ナノボディであって、TNF に対する K_{off} 速度が、 $2 \cdot 10 \times 10^{-10}$ (1 / s) より小さく、好ましくは $1 \cdot 10 \times 10^{-3}$ (1 / s) より小さい、XXXIX) に記載のナノボディ；またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、同じ分析試験で国際公開第 04/041862号の V_HH 3 E (配列番号：4) の E C 5 0 値よりも小さい、XXXIX) に記載のナノ

10

20

30

40

50

ボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、5 n M よりも小さい、XXXIX) に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、3 n M よりも小さい、XXXIX) に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- T N F 1 3 (配列番号 : 7 6)、T N F 1 4 (配列番号 : 7 7)、T N F 2 9 (配列番号 : 9 5) および T N F 3 0 (配列番号 : 9 6) からなる群から選択される、XXXIX) に記載のナノボディ。

【 0 1 5 5 】

- T N F 3 0 (配列番号 : 9 6) である XXXIX) に記載のナノボディであって、他の好ましい態様が :

XL) XXXVIII) または XXXIX) に記載のナノボディを含み、もしくは本質的にそれから成る、タンパクまたはポリペプチドである。

XLI) XXXVIII) または XXXIX) に記載のナノボディを少なくとも一つ含み、もしくは本質的にそれから成る、タンパクまたはポリペプチドである。

- XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含む、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- タンパクまたはポリペプチドであって、XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含み、前記タンパクまたはポリペプチドが、T N F 三量体に結合すると、前記 T N F 三量体によって仲介される T N F レセプタ - の架橋および / またはそのようなレセプタ - の架橋によって仲介されるシグナル伝達を、阻害または減少させることができる、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含み、そして T N F 三量体上の少なくとも二つのレセプタ - 結合部位と分子内結合が可能な、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含み、それらは互いに直接連結しているかまたはリンカ - を介して互いに連結している、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含み、それらはアミノ酸配列を介して互いに連結している、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含み、それらは少なくとも 1 4 のアミノ酸、より好ましくは 2 0 - 4 0 アミノ酸のような (リンカ - G S 3 0 のような)、少なくとも 1 7 のアミノ酸を含むアミノ酸配列 (例えば、制限すること無しに、グリシンおよびセリン残基を含むアミノ酸配列) を介して互いに連結している、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

【 0 1 5 6 】

- 両方のナノボディ T N F 1 がヒト化されている、ポリペプチド T N F 7 (配列番号 : 7 3) を含むもしくは本質的にそれから成る、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- ポリヌクレオチド T N F 5 5 (配列番号 : 4 1 9) または T N F 5 6 (配列番号 : 4 2 0) を含む、もしくはそれから成る、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- ペグ化された、XL) または XLI) のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- タンパクまたはポリペプチドであって、XXXVIII) または XXXIX) に記載の二つのナノボディを含み、前記タンパクまたはポリペプチドが、T N F 三量体に結合すると、前記 T N F 三量体によって仲介される T N F レセプタ - の架橋および / またはそのようなレセプタ

10

20

30

40

50

- の架橋によって仲介されるシグナル伝達を、阻害または減少させることができ、および/または前記タンパクまたはポリペプチドが、TNF三量体上の少なくとも二つのレセプタ-結合部位と分子内結合が可能であり、タンパクまたはポリペプチドが、さらにヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディを含む、XL)またはXLI)のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- タンパクまたはポリペプチドであって、XXXVIII)またはXXXIX)に記載の二つのナノボディを含み、そのタンパクまたはポリペプチドは、さらにヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディを含み、XXXVIII)またはXXXIX)に記載の二つのナノボディは、ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディに直接連結している、かまたはリンカ-を介してヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディに連結しており、タンパクまたはポリペプチドが、TNF三量体に結合すると、前記TNF三量体によって仲介されるTNFレセプタ-の架橋および/またはそのようなレセプタ-の架橋によって仲介されるシグナル伝達を、阻害または減少させることができ；および/またはタンパクまたはポリペプチドが、TNF三量体上の少なくとも二つのレセプタ-結合部位と分子内結合が可能である、XL)またはXLI)のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

10

【0157】

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディが、ヒト化ナノボディである、XL)またはXLI)のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

20

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディが、ナノボディALB1(配列番号:63)のヒト化変異体である、XL)またはXLI)のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディが、ALB3(配列番号:87)、ALB4(配列番号:88)、ALB5(配列番号:89)、ALB6(配列番号:100)、ALB7(配列番号:101)、ALB8(配列番号:102)、ALB9(配列番号:103)およびALB10(配列番号:104)からなる群から選択される、XL)またはXLI)のいずれか一項に記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディがALB8である、XL)またはXLI)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

30

- XL)またはXLI)のいずれか1つに記載の二つのヒト化ナノボディおよびナノボディALB1(配列番号:63)のヒト化変異体を含む、もしくは本質的にそれらから成る、XL)またはXLI)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- ナノボディTNF1およびナノボディALB1の両方がヒト化されている、ポリペプチドTNF24(配列番号:90)を含む、もしくは本質的にそれらから成る、XL)またはXLI)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

- 二つのナノボディTNF30および一つのナノボディALB8を含む、もしくは本質的にそれらから成る、XL)またはXLI)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

40

- ポリペプチドTNF60(配列番号:417)を含む、もしくは本質的にそれらから成る、XL)またはXLI)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチドである。

【0158】

ナノボディが上記では「XXXVIIIに記載の」または「XXXIXに記載の」と記述した場合、それは、少なくともXXXVIII)および/またはXXXIX)の一つに記載されているのであって、ならびに上記の「XXXIXに記載された」または「XXXIXに記載された」と示された一つ以上の他の態様のいずれかもまた含んでいてもよい。同様にタンパクまたはポリペプチドが上記では、「XL)またはXLI)の」いずれか1つに記載された」と記述した場合、それは少なくともXL)からXLI)の一つに記載されており、VI)からXVII)の二つ以上に記載されてい

50

てもよく、上記のXL)またはXLI)のいずれか1つに記載されているとして示された他の態様の一つ以上のいずれかを含んでいてもよい。

【0159】

上記のナノボディTNF1(ヒト化ナノボディを含むが、それに限定されない)に基づくナノボディに関して、フレ-ムワ-ク配列は、一般的に本明細書に記載するとおりであるが、好ましくは以下のとおりである：

a)FR1が、

- 配列番号：130のアミノ酸配列；または
- 配列番号：130のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- 配列番号：130のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含むあるいはその配列であり、

そして

b)FR2が

- 配列番号：198のアミノ酸配列；または
- 配列番号：198のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- 配列番号：198のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含むあるいはその配列であり、

そして

c)FR3が、

- 配列番号：266のアミノ酸配列；または
- 配列番号：266のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- 配列番号：266のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含むあるいはその配列であり、

そして

d)FR4が、

- 配列番号：334のアミノ酸配列；または
- 配列番号：334のアミノ酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
- 配列番号：334のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含むあるいはその配列であり；

ここでフレ-ムワ-ク配列に存在するアミノ酸の相違は、本明細書で記述されたとおりであることがより好ましい。

【0160】

TNF-アルファに対するナノボディは、上記のようなフレ-ムワ-クを有し(すなわちTNF1に似た)、フレ-ムワ-ク領域の少なくとも一つ(いずれか二つ、いずれか三つまたはすべての四つの領域)はヒト化されているが、そのナノボディが、本発明の更なる態様を形成する。そのようなナノボディは、特にTNFに対する K_{off} 速度が、 2.10×10^{-3} (1/s)より小さく、好ましくは 1.10×10^{-3} (1/s)より小さくなるようなCDRを有し；および/またはナノボディが、国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のV_{HH}3E(配列番号：4)のEC50値よりも小さく、また12nMよりも特に小さく、5nMよりもさらに特に小さく、3nMよりも最上に特に小さくなるようなCDRを有する。さらに、または代わりに、そのよう

なナノボディは、TNF1と同じTNF（すなわちTNF三量体）のエピト-プに対して指向性を有することが好ましい。

【0161】

特に、本発明は、TNF-アルファに対するナノボディのヒト化変異体である、TNF-アルファに関し、そのTNF-アルファに対するナノボディは、以下の配列を有する：FR1：配列番号：130；FR2：配列番号：198；FR3：配列番号：266；およびFR4：配列番号：334。そのようなナノボディはTNFに対するKoff速度が、 2.10×10^{-3} (1/s)より小さく、好ましくは 1.10×10^{-3} (1/s)より小さくなるようなCDRを有し；および/またはナノボディが、国際公開第04/041862の実施例1の3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のV_{HH}3E（配列番号：4）のEC50値よりも小さく、また12nMよりも特に小さく、5nMよりもさらに特に小さく、3nMよりも最上に特に小さくなるようなCDRを有する。さらに、または代わりに、そのようなナノボディは、TNF1と同じTNF（すなわちTNF三量体）のエピト-プに対して指向性を有することが好ましい。

10

【0162】

抗TNFナノボディとして特に有用であると見出された別のクローンは、PMP5F10（TNF3、配列番号：60）クローンである。表39におけるKYM-分析試験からの比較データから見られるように、TNF3、は国際公開第04/41862号に記載された最良の一価ナノボディよりも15倍小さいEC50値を有している。

20

【0163】

従って、クローンPMP5F10に存在するCDR（もしくはそれに由来するまたは対応するCDR配列）の一つ以上の、好ましくは二つ以上のいずれか、さらに好ましくは三つ全てを含むナノボディは、本発明では特に好ましい。さらに、これらのナノボディはKEREクラスに属することが好ましい。

【0164】

より具体的には、本発明の本実施態様の好ましいいくつかの態様は以下のようになる：XLII) 四つのフレ-ムワ-ク領域（それぞれFR1からFR4まで）および三つの相補性決定領域（それぞれCDR1からCDR3まで）からなるTNF-アルファに対するナノボディであって：

30

a) CDR1が：

- アミノ酸配列NY Y M G；または
 - アミノ酸配列NY Y M Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
 - アミノ酸配列NY Y M Gと2または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含み；
- そして

b) CDR2が：

- アミノ酸配列NI SW R G Y N I Y Y K D S V K G；または
 - アミノ酸配列NI SW R G Y N I Y Y K D S V K Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または
 - アミノ酸配列NI SW R G Y N I Y Y K D S V K Gと2またはただ1つのアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含み；
- そして

40

c) CDR3が：

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Y；または
- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

50

- アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y と 2 または 1 つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列を含むナノボディ。

【 0 1 6 5 】

- C D R 1 が、アミノ酸配列 N Y Y M G を含む、X L I I) に記載のナノボディ。
- C D R 2 が、アミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G を含む、X L I I) に記載のナノボディ。

- C D R 3 が、アミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含む、X L I I) に記載のナノボディ。

- ナノボディであって：

- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G を含む；そして C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含む；または

- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G を含む；そして C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G を含む；または

- C D R 2 がアミノ酸配列 N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G を含む；そして C D R 3 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含む、X L I I) に記載のナノボディ。

- C D R 1 がアミノ酸配列 N Y Y M G を含む；そして C D R 2 がアミノ酸配列 S I L P L S D D P G W N T Y を含む、X L I I) に記載のナノボディ。

- X L I I) に記載のナノボディであって、

- 任意のアミノ酸置換も好ましくは保存的アミノ酸置換であり；および/または

- 該アミノ酸配列は、上記アミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸欠失または挿入を含まない、ナノボディ。

- K E R E クラスのナノボディである、X L I I) に記載のナノボディ。

- ナノボディであって、配列番号：50 (T N F 3)、83 (T N F 2 0)、85 (T N F 2 1)、85 (T N F 2 2)、96 (T N F 2 3) または 99 (T N F 3 3) のアミノ酸配列の一つと、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性(本明細書で規定)を有する、X L I I) に記載のナノボディ。

【 0 1 6 6 】

- ヒト化されたナノボディである、X L I I) に記載のナノボディ。

- T N F に対する K_{off} 速度が 2.10×10^{-3} (1 / s) より小さい、好ましくは 1.10×10^{-3} (1 / s) より小さい、X L I I) に記載のナノボディ；またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、同じ分析試験で国際公開第 04/041862号の V_HH 3 E (配列番号：4) の E C 5 0 値よりも小さい、X L I I) に記載のナノボディ；またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、5 n M よりも小さい、X L I I) に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、3 n M よりも小さい、X L I I) に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

【 0 1 6 7 】

X L I I I) 四つのフレ - ムワ - ク領域 (それぞれ F R 1 から F R 4 まで) および三つの相補性決定領域 (それぞれ C D R 1 から C D R 3 まで) からなる T N F - アルファに対するナノボディであって：

a) C D R 1 が：

- アミノ酸配列 N Y Y M G ；または

- アミノ酸配列 N Y Y M G と少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、

10

20

30

40

50

より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- アミノ酸配列NY YMGと2または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり；そして

b) CDR2が：

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K G；または

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gと2または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であり；

そして

c) CDR3が：

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Y；または

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yと2または1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるナノボディ。

【0168】

- CDR1が、アミノ酸配列NY YMGである、XLIII)に記載のナノボディ。

- CDR2が、アミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gである、XLIII)に記載のナノボディ。

- CDR3が、アミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである、XLIII)に記載のナノボディ。

- ナノボディであって：

- CDR1がアミノ酸配列NY YMGであり；そしてCDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yであり；または

- CDR1がアミノ酸配列NY YMGであり；そしてCDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gであり；または

- CDR2がアミノ酸配列N I S W R G Y N I Y Y K D S V K Gであり；そしてCDR3がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである、XLIII)に記載のナノボディ。

- CDR1がアミノ酸配列NY YMGであり；そしてCDR2がアミノ酸配列S I L P L S D D P G W N T Yである、XLIII)に記載のナノボディ。

- XLIII)に記載のナノボディであって、

- 任意のアミノ酸置換も好ましくは保存的アミノ酸置換であり；および/または

- 該アミノ酸配列は、上記アミノ酸配列と比較した場合、好ましくはアミノ酸置換のみを含み、アミノ酸欠失または挿入を含まない、ナノボディ。

- KEREクラスの前ボディである、XLIII)に記載の前ボディ。

- ナノボディであって、配列番号：50(TNF3)、83(TNF20)、85(TNF21)、85(TNF22)または96(TNF23)または99(TNF33)のアミノ酸配列の一つと、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有する、XLIII)に記載の前ボディ。

【0169】

- ヒト化された前ボディである、XLIII)に記載の前ボディ。

- TNFに対する k_{off} 速度が 2.10×10^{-3} (1/s)より小さい、好ましくは 1.10×10^{-3} (1/s)より小さい、XLIII)に記載の前ボディ；またはそのような前ボディのヒト化変異体。

10

20

30

40

50

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、同じ分析試験で国際公開第 04/041862号の V_HH 3 E (配列番号: 4) の E C 5 0 値よりも小さい、XLIII) に記載のナノボディ; またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、5 n M よりも小さい、XLIII) に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- ナノボディであって、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M 細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、3 n M よりも小さい、XLIII) に記載のナノボディ、またはそのようなナノボディのヒト化変異体。

- 配列番号: 8 3 (T N F 2 0)、8 5 (T N F 2 1)、8 5 (T N F 2 2)、9 6 (T N F 2 3) または 9 8 (T N F 3 3) T N F 1 3 (配列番号: 7 6)、T N F 1 4 (配列番号: 7 7)、T N F 2 9 (配列番号: 9 5) および T N F 3 0 (配列番号: 9 6) からなる群から選択される、XLIII) に記載のナノボディ、いくつかの他の好ましい態様として次のものを伴う:

【 0 1 7 0 】

XLIV) XLII) または XLIII) に記載されたナノボディを含む、または本質的にそれから成るタンパクまたはポリペプチド。

XLV) XLII) または XLIII) に記載されたナノボディの少なくとも一つを含む、または本質的にそれから成るタンパクまたはポリペプチド。

XLVI) XLII) または XLIII) に記載されたナノボディの二つを含む、タンパクまたはポリペプチド。

XLVII) XLII) または XLIII) に記載されたナノボディの二つを含むタンパクまたはポリペプチドであって、前記タンパクまたはポリペプチドが、T N F 三量体と結合すると、前記 T N F 三量体によって仲介される T N F レセプタ - 架橋および/またはそのようなレセプタ - 架橋によって仲介されるシグナル伝達を阻害または減少させることができる、タンパクまたはポリペプチド。

XLVIII) XLII) または XLIII) に記載されたナノボディの二つを含むタンパクまたはポリペプチドであって、T N F 三量体上の少なくとも二つの T N F レセプタ - 結合部位と分子内結合することができる、タンパクまたはポリペプチド。

【 0 1 7 1 】

- その中で、両ナノボディ T N F 3 がヒト化されている、ポリヌクレオチド T N F 6 (配列番号: 7 2) または T N F 9 (配列番号: 7 5) を含むまたは本質的にそれらから成る、XLIV) または XLVIII) のいずれか一つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- ベグ化されている、XLIV) または XLVIII) のいずれか一つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- XLII) または XLIII) に記載されたナノボディの二つを含むタンパクまたはポリペプチドであって、前記タンパクまたはポリペプチドが、T N F 三量体と結合すると、前記 T N F 三量体によって仲介される T N F レセプタ - 架橋および/またはそのようなレセプタ - 架橋によって仲介されるシグナル伝達を阻害または減少させることができ; および/または前記タンパクまたはポリペプチドが、T N F 三量体上の少なくとも二つの T N F レセプタ - 結合部位と分子内結合することができ、さらにそのタンパクまたはポリペプチドが、ヒト血清アルブミンに対する指向性を有しているナノボディを少なくとも一つ含んでいる、タンパクまたはポリペプチド。

【 0 1 7 2 】

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有している少なくとも一つのナノボディが、ヒト化ナノボディである、XLIV) または XLVIII) のいずれか一つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有している少なくとも一つのナノボディが、ナノボディ A L B 1 (配列番号: 6 3) のヒト化ナノボディである、XLIV) または XLVIII) の

10

20

30

40

50

いずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有している少なくとも一つのナノボディが、ALB3(配列番号:87)、ALB4(配列番号:88)、ALB5(配列番号:89)、ALB6(配列番号:100)、ALB7(配列番号:101)、ALB8(配列番号:102)、ALB9(配列番号:103)およびALB10(配列番号:104)からなる群から選択される、XLIV)またはXLVIII)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有している少なくとも一つのナノボディがALB8である、XLIV)またはXLVIII)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- XLII)またはXLIII)に記載された二つのヒト化ナノボディおよびナノボディALB1(配列番号:63)を含む、または本質的にそれらからなる、XLIV)またはXLVIII)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

- その中でナノボディTNF3およびナノボディALB1がヒト化されている、ポリペプチドTNF26(配列番号:92)を含むまたは本質的にそれらからなる、XLIV)またはXLVIII)のいずれか1つに記載されたタンパクまたはポリペプチド。

【0173】

ナノボディが上記において「XLIIに記載の」または「XLIIIに記載の」と言及された場合、それは、少なくともXLII)および/またはXLIII)の一つに記載されているのであって、ならびに上記の「XLIIに記載された」または「XLIIIに記載された」と示された一つ以上の他の態様のいずれかもまた含んでいてもよい。同様にタンパクまたはポリペプチドが上記において、「XLV)またはXLVIII)のいずれか1つに記載された」と言及された場合、それは少なくともXL)からXLI)の一つに記載されており、XLIV)からXLVIII)の二つ以上に記載されていても良く、上記のXLIV)またはXLVIII)のいずれか1つに記載されているとして示された他の態様の一つ以上のいずれかを含んでいてもよい。

【0174】

上記ナノボディTNF3(ヒト化ナノボディを含むがこれに限定されない)に基づくナノボディに関して、フレ-ムワ-ク配列は、一般的に本明細書に記載される通りであるが、好ましくは次の如くである；

a) FR1は以下のアミノ酸配列を含むまたはその配列である；

- 配列番号:138のアミノ酸配列；または
- 配列番号:138のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- 配列番号:138のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；

そして

b) FR2は以下のアミノ酸配列を含むまたはその配列である；

- 配列番号:206のアミノ酸配列；または
- 配列番号:206のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- 配列番号:206のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；

そして

c) FR3は以下のアミノ酸配列を含むまたはその配列である；

- 配列番号:274のアミノ酸配列；または
- 配列番号:274のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- 配列番号:274のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；

そして

10

20

30

40

50

d) FR 4 は以下のアミノ酸配列を含むまたはその配列である：

- 配列番号：342のアミノ酸配列；または
- 配列番号：342のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列；または

- 配列番号：342のアミノ酸配列と1つだけアミノ酸が異なるアミノ酸配列；
ここで、フレ-ムワ-ク配列に存在するアミノ酸の差は、本明細書に記載されたとおりであるのが、より好ましい。

【0175】

別の態様では、本発明は、配列番号：52から60からなる群、配列番号：76から86からなる群、配列番号：95から99からなる群、または配列番号105から129からなる群、もしくは配列番号：52から60、配列番号：76から86、配列番号：95から99または配列番号：105から129のアミノ酸配列の一つ以上と、80%を超える、好ましくは90%を超える、より好ましくは99%以上のように、95%を超える「配列同一性」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群、から選択されるアミノ酸配列を有するナノボディに関するものであり、後者のアミノ酸配列は、最も好ましくは、ナノボディのフレ-ムワ-ク配列の一般的な説明の下に、以下ではさらに規定されるフレ-ムワ-ク配列を有する。

10

【0176】

具体的であるが、非限定的な一実施態様によれば、後者のアミノ酸配列は、本明細書ではさらに説明するように、「ヒト化」されている。

20

【0177】

最も好ましくは、本発明のナノボディは、配列番号：52から60からなる群、配列番号：76から86からなる群、配列番号：95から99からなる群、または配列番号105から129からなる群、から選択され、配列番号：76から86および配列番号：95から99の「ヒト化」ナノボディが特に好まれてもよい。

【0178】

上に述べたように、本発明の特に好ましいナノボディは、クロ-ンPMP1C2(TNF1；配列番号：52)である。従って、好ましい態様では、本発明は、配列番号：52からなる群、または配列番号：52のアミノ酸配列と80%を超える、好ましくは90%を超える、より好ましくは99%以上のように、95%を超える「配列同一性」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するナノボディに関するものであり、後者のアミノ酸配列は、最も好ましくは、ナノボディのフレ-ムワ-ク配列の一般的な説明の下で以下にさらに規定されるようなフレ-ムワ-ク配列を有する。

30

【0179】

特に好ましいのは、クロ-ンPMP1C2(TNF1；配列番号：52)のヒト化変異体である。好ましいが、非限定的ないくつかのヒト化変異体の実施例は、クロ-ンTNF13(配列番号：76)、TNF14(配列番号：77)、TNF29(配列番号：95)およびTNF30(配列番号：96)である。従って、好ましい態様では、本発明は、配列番号：76、77、95または96からなる群、もしくは配列番号：76、77、95または96のアミノ酸配列の一つと80%を超える、好ましくは90%を超える、より好ましくは99%以上のように、95%を超える「配列同一性」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヒト化ナノボディに関するものであり、後者のアミノ酸配列は、最も好ましくは、ナノボディのフレ-ムワ-ク配列の一般的な説明の下で以下にさらに規定されるようなフレ-ムワ-ク配列を有する。

40

【0180】

一つの好ましい実施態様によれば、本発明のナノボディは、ナノボディTNF1(配列番号：52)のヒト化変異体である。

【0181】

50

本発明の本実施態様の好ましいいくつかの態様は：

TNFに関する K_{off} 速度が、 2.10×10^{-3} (1/s)より小さい、好ましくは 1.10×10^{-3} (1/s)より小さい、ナノボディTNF1のヒト化変異体。

L) 国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が、同じ分析試験で国際公開第 04/041862号のV_{HH} 3E (配列番号：4)のEC50値よりも小さい、ヒト化ナノボディ。

L1) 国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が5 nMよりも小さい、ナノボディTNF1のヒト化変異体。

LII) 国際公開第04/041862号の実施例 1 の 3)に記載のKYM細胞を使用する細胞ベース分析試験においてEC50値が3 nMよりも小さい、ナノボディTNF1のヒト化変異体。

LIII) XLIX) からLII)のいずれか1つに記載のナノボディTNF1のヒト化変異体である、少なくとも一つのナノボディを含むまたは本質的にそれから成るタンパクまたはポリペプチド。

LIV) XLIX) からLII)のいずれか1つに記載のナノボディTNF1のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチド(場合によってはリンカ-を介して連結してもよい)。

LV) XLIX) からLII)のいずれか1つに記載のナノボディTNF1のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、TNF三量体に結合すると、前記TNF三量体によって仲介されるTNFレセプタ-の架橋および/またはそのようなレセプタ-の架橋によって仲介されるシグナル伝達を、阻害または減少させることができる、タンパクまたはポリペプチド。

LVI) XLIX) からLII)のいずれか1つに記載のナノボディTNF1のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、TNF三量体上の少なくとも二つのTNFレセプタ-結合部位と分子内結合が可能である、タンパクまたはポリペプチド。

LVII) ナノボディTNF1の両方がヒト化されている、ポリペプチドTNF7 (配列番号：73)を含むまたは本質的にそれから成るタンパクまたはポリペプチド。

LVIII) ナノボディTNF1の両方がヒト化され、およびペグ化されている、ポリペプチドTNF7 (配列番号：73)を含むまたは本質的にそれから成るタンパクまたはポリペプチド。

LIX) XLIX) からLII)のいずれか1つに記載のナノボディTNF1のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、さらにヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディを含む、タンパクまたはポリペプチド。

LX) XLIX) からLII)のいずれか1つに記載のナノボディTNF1のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する一つのナノボディにそれぞれのナノボディが連結している(場合によってはリンカ-を介して連結されてもよい)、タンパクまたはポリペプチド。

【0182】

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディがヒト化されたナノボディである、LIII)からLX)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディがナノボディALB1 (配列番号：63)のヒト化された変種である、LIII)からLX)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディが、ALB3 (配列番号：87)、ALB4 (配列番号：88)、ALB5 (配列番号：89)、A

10

20

30

40

50

L B 6 (配列番号：1 0 0)、A L B 7 (配列番号：1 0 1)、A L B 8 (配列番号：1 0 2)、A L B 9 (配列番号：1 0 3)およびA L B 1 0 (配列番号：1 0 4)からなる群から選択される、L I I I)からL X)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディがA L B 8である、L I I I)からL X)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

- ナノボディT N F 1およびナノボディA L B T N F 1の両方が、ヒト化されているポリペプチドT N F 2 4 (配列番号：9 0)を含む、もしくは本質的にそれらから成る、L I I I)からL X)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

- 二つのナノボディT N F 3 0および一つのナノボディA L B 8を含む、もしくは本質的にそれらから成る、L I I I)からL X)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

10

【0 1 8 3】

一つの好ましい実施態様によれば、本発明のナノボディはナノボディT N F 3 (配列番号：6 0)のヒト化変異体である。

【0 1 8 4】

本発明のこの実施態様のいくつかの好ましい態様は：

L X I) T N F に対する K_{off} 速度が $2 \cdot 10 \times 10^{-3} (1/s)$ より小さい、好ましくは $1 \cdot 10 \times 10^{-3} (1/s)$ より小さい、ナノボディT N F 3のヒト化変異体。

L X I I) 国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてE C 5 0値が、同じ分析試験で国際公開第04/041862号のV H H 3 E (配列番号：4)のE C 5 0値よりも小さい、ナノボディT N F 3のヒト化変異体。

20

L X I I I) 国際公開第04/041862号の実施例1の3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてE C 5 0値が5 n Mよりも小さい、ナノボディT N F 3のヒト化変異体。

L X I V) 国際公開第04/04186号の実施例1の3)に記載のK Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験においてE C 5 0値が3 n Mよりも小さい、ナノボディT N F 3のヒト化変異体。

L X V) L X I) からL X I V)のいずれか1つに記載のナノボディT N F 3のヒト化変異体である、少なくとも一つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチド。

30

L X V I) L X I) からL X I V)のいずれか1つに記載のナノボディT N F 3のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチド(場合によってはリンカ-を介して連結されてもよい)。

L X V I I) L X I) からL X I V)のいずれか1つに記載のナノボディT N F 3のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、T N F 三量体に結合すると、前記T N F 三量体によって仲介されるT N F レセプタ-の架橋および/またはそのようなレセプタ-の架橋によって仲介されるシグナル伝達を、阻害または減少させることができる、タンパクまたはポリペプチド。

L X V I I I) L X I) からL X I V)のいずれか1つに記載のナノボディT N F 3のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、T N F 三量体上の少なくとも二つのT N F レセプタ-結合部位と分子内結合が可能である、タンパクまたはポリペプチド。

40

L X I X) ナノボディT N F 3の両方がヒト化されている、ポリペプチドT N F 6 (配列番号：7 2)またはT N F 9 (配列番号：7 5)を含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチド。

L X X) ナノボディT N F 1の両方がヒト化され、およびペグ化されている、ポリペプチドT N F 6 (配列番号：7 2)またはT N F 9 (配列番号：7 5)を含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチド。

L X X I) L X I) からL X I V)のいずれか1つに記載のナノボディT N F 3のヒト化変異体であ

50

る、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、さらにヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディを含む、タンパクまたはポリペプチド。

LXXII) LXI) からLXIV)のいずれか1つに記載のナノボディTNF3のヒト化変異体である、二つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るタンパクまたはポリペプチドであって、ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する一つのナノボディにそれぞれのナノボディが連結している(場合によってはリンカ-を介して連結してもよい)、タンパクまたはポリペプチド。

【0185】

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディがヒト化されたナノボディである、LXV)からLXXII)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

10

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディがナノボディALB1(配列番号:63)のヒト化された変種である、LXV)からLXXII)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

- ヒト血清アルブミンに対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディが、ALB3(配列番号:87)、ALB4(配列番号:88)、ALB5(配列番号:89)、ALB6(配列番号:100)、ALB7(配列番号:101)、ALB8(配列番号:102)、ALB9(配列番号:103)およびALB10(配列番号:104)からなる群から選択される、LXV)からLXXII)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

20

- ヒト血清アルブミンに対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディがALB8である、LXV)からLXXII)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

- ナノボディTNF3およびナノボディALB1の両方が、ヒト化されているポリペプチドTNF26(配列番号:92)を含む、もしくは本質的にそれらから成る、LXV)からLXXII)のいずれか1つに記載の、タンパクまたはポリペプチド。

【0186】

別の態様では、本発明は、本明細書で規定するTNF-アルファに対する少なくとも一つのナノボディを含むまたは本質的にそれらから成るポリペプチドに関する。そのようなペプチドは、本明細書では「本発明のペプチド」とも呼ばれ、および本明細書ではさらに説明されおよび/または国際公開第04/041862号ではそこに開示されているナノボディに関して一般的に説明されており、例えば以下にさらに説明するような、多価ポリペプチドまたは多重特異性ポリペプチドであってもよい。

30

【0187】

好ましくは本発明のポリペプチドは、二価または三価(すなわち本発明のナノボディの二つまたは三つを含み、場合によっては下にそれぞれ規定されたような一つまたは二つのリンカ-を介して連結していてもよい)であり、もしくは一つまたは二つ、好ましくは二つの、本発明のナノボディを含み、また少なくとも一つのナノボディは血清タンパク、特にヒト血清アルブミンのようなヒト血清タンパクに対して指向性を有する、多重特異的なポリペプチドである。

40

【0188】

好ましいが、非限定的な一実施態様では、本発明のポリペプチドに存在する本発明のナノボディは、配列番号:52から60および配列番号:105から129、もしくはそれらのヒト化変異体から選択され、特に配列番号:76から86および配列番号:95から99のヒト化ナノボディからなる群から選択される。本発明のポリペプチドに存在する、ヒト血清アルブミンに対するナノボディは好ましくは、下に規定されるとおりであるが、より好ましくは配列番号:61から67、配列番号:87から89および配列番号:100から104からなる群から選択され、特に、配列番号:76から89および配列番号:100から104の、ヒト血清アルブミンに対するヒト化ナノボディから選択される。

【0189】

50

本発明のポリペプチドに存在するナノボディに関して、本明細書で「好ましい」（または「より好ましい」、「さらにより好ましい」等）と記載しているナノボディは、また本明細書に記載するポリペプチドの中で使用するのが好ましいことは、当業者にとっては明らかである。従って、本発明の「好ましい」ナノボディの一つ以上を含むまたは本質的にそれらから成るポリペプチドは、一般的に好ましいであろうし、また本発明の「より好ましい」ナノボディの一つ以上を含むまたは本質的にそれらから成るポリペプチドは、一般的により好ましいであろう。

【0190】

従って、本発明においては、クロ-ンPMP1C2(TNF1; 配列番号: 52)の好ましい変種(前記好ましい変種は、本明細書で規定)の一つから本質的に成る、一つ以上のナノボディを含むポリペプチドは、特に好ましい。さらにより好ましいのは、クロ-ンPMP1C2(TNF1; 配列番号: 52)のヒト化変異体の一つから成る、一つ以上のナノボディを含むポリペプチドであって、ここで前記ヒト化変異体は本明細書で規定したとおりである(例としては、TNF13、TNF14、TNF29およびTNF30が挙げられるが、これらに限定されない)。TNF30は、本発明のポリペプチドにおいて使用する特に好ましいヒト化「構成要素」である。

10

【0191】

そのようなタンパクおよびポリペプチドの、いくつかの好ましいが非限定的な例は、PMP1C2それ自身、ヒト化変異体TNF13、TNF14、TNF29およびTNF30であり; 配列番号: 70(TNF4)、配列番号: 73(TNF7)、配列番号: 90(TNF24)、配列番号: 93(TNF27)の構造物; および配列番号: 417(TNF60)、配列番号: 419(TNF55)および配列番号: 420(TNF56)の構造物であり、ここで後者の三つの構造物は、構成要素としてヒト化変異体TNF30を含む。

20

【0192】

本明細書で言及するように、本明細書に記載されたナノボディおよび構造物は、ペグ化されてもよく、またはペグ化を可能にする、および/またはペグ化を促進する一つ以上の(追加の)アミノ酸残基を含んでいてもよい。そのようなポリペプチドの好ましいが非限定的な二つの例はTNF55およびTNF56であり、両者はPEG基の容易な結合のために、追加のシステイン残基を含んでいる。

30

【0193】

本発明の好ましいが非限定的なポリペプチドのいくつかの例は、配列番号: 70から75の本発明の二価ポリペプチドならびに配列番号: 90から94および配列番号: 417から420の本発明の多重特異性ポリペプチドである。

【0194】

下に表すデータから、特に比較例のデータを見てわかるように、本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドは、改善された性質を有している。特に、本発明のタンパクおよびポリペプチドは、市販されている抗TNF生物製剤、エンブレル(Enbrel)(商標)、フミラ(Humira)(商標)およびレミケード(Remicade)(商標)と比較して、TNF-アルファに対する改善されたアフィニティーを有しているかも知れない(本明細書に記載されたKYMアッセイにおけるEC50値として表現される)。さらに、本明細書に記載されるナノボディは、国際公開第04/041862号に記載された最も性能のよいナノボディに比較して、TNF-アルファに対してより高いアフィニティーを有しているかも知れない。従って、本発明のナノボディの少なくとも一つを含む本発明のポリペプチドは、国際公開第04/041862号に記載されたTNF-アルファに対するナノボディのみを含むポリペプチドと比較して、改善された性質を有することを期待することができる。

40

【0195】

さらに特記すれば、二つ以上の(好ましくは二つ)本明細書に記載されたようなナノボディ(および場合によっては例えばヒト血清アルブミンに対するナノボディ)を含む、本

50

明細書に記載されたポリペプチドは、国際公開第 04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、H u m i r a (登録商標) および R e m i c a d e (登録商標) の同じ分析試験で E C 5 0 値よりも小さく、好ましくは E n b r e 1 (登録商標) のそれよりも小さい。

【 0 1 9 6 】

例えばそのようなタンパクまたはポリペプチドは、好ましくは国際公開第04/041862号の実施例 1 の 3) に記載の K Y M細胞を使用する細胞ベース分析試験において E C 5 0 値が、0 . 7 n M よりも小さく、特に 0 . 4 n M よりも小さいような、0 . 2 n M より小さく、好ましくは 0 . 1 n M 小さい値を有する。

【 0 1 9 7 】

マウス T N F - アルファに対するナノボディおよびマウス T N F - アルファに対するナノボディを含むポリペプチドは、次の疾患モデルにおいて有益な生物活性を示すことが、出願人たちによって示された (デ - タは示さず) :

- Okayasuらによって記載された、通常のマウスおよび I L 1 0 ノックアウトマウスを用い

て、大腸炎のデキストラン硫酸ナトリウム (" D S S ") モデル (Gastroenterol 1990, 98(3): 694)

- Courtenayら. (Nature 1980, 283(5748): 666) によって記載された、通常のマウスおよび I L 1 0 ノックアウトマウスを用いた、関節炎 (" R A) の、コラ - ゲンによって誘起された関節炎 (" C I A ") モデル

- 例えば、Rennickら (Clin Immunol Immunopathol 1995, 76(3 Pt 2): S174) によって記載されたような I B D の I L 1 0 ノックアウトマウスモデル

- 例えば Kefferら (EMBO J 1991, 10(13): 4025) によって記載された R A の K o l l i a s モデル

- Elsonら (J Immunol 1996, 157(5): 2174) によって記載された I B D の 2,4,6 - トリニトロベンゼンスルホン酸 (" T N B S ") モデル

- Koppetersら (投稿準備中) によって記載された R A の C I A モデル

- 滑膜由来線維芽細胞モデル (以下に記述) ;

- マウス空気嚢モデル。

【 0 1 9 8 】

好ましくは、本明細書に記載のナノボディは、これらのモデルの少なくとも一つでは、また好ましくはこれらのモデルの全てにおいて国際公開第04/041862号からのナノボディ 1 A よりも優れており、ならびにこれらのモデルの少なくとも一つでは、また好ましくはこれらのモデルの全てにおいて、より好ましくは国際公開第04/041862号からのナノボディ 3 E よりも優れている。さらに、本明細書に記載のポリペプチドは、好ましくは、これらのモデルの少なくとも一つ、より好ましくはこれらのモデルの全てにおいて、H u m i r a (登録商標) または R e m i c a d e (登録商標) と等しいか、または優れており; さらに好ましくは、これらのモデルの少なくとも一つ、より好ましくはこれらのモデルの全てにおいて E n b r e 1 (登録商標) と等しいか、または優れている。

【 0 1 9 9 】

これらのデ - タは、国際公開第 04/041862号に記載のナノボディおよびポリペプチド、特に本明細書に記載のナノボディおよびポリペプチドのような、T N F - アルファに対するナノボディおよびそれを含むポリペプチドが、上記の疾患および障害のような T N F によって介される疾患および障害に対して、治療効果を有するはずであるということを確認する。

【 0 2 0 0 】

他の態様では、本発明は、本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドをコードする核酸に関する。そのような核酸はまた、以下では「本発明の核酸」と呼ばれ、また例えば下に規定する遺伝的構造物の形であってもよい。

【 0 2 0 1 】

他の態様では、本発明は、本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドを

10

20

30

40

50

発現するまたは発現能を有する；および/または本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドをコードする核酸を含む宿主または宿主細胞に関する。そのような宿主または宿主細胞は、また国際公開第 04/041862号に記載の宿主および宿主細胞に相同であってもよいが、本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドを発現しまたは発現する能力を有し、および/または本明細書に記載されたような核酸を含む。

【0202】

本発明は、さらに本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド；および/または本発明の核酸を含むまたは包含する製品または組成物にも関する。そのような製品または組成物は、例えば医薬組成物(下に説明するような)または診断用の製品または組成物(また下に説明するような)であってもよい。そのような製品または組成物は、また国際公開第 04/041862号に記載の生産物および組成物と相同であってもよいが、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸を含むか包含する。

10

【0203】

本発明は、さらに本明細書に記載のナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生産物および組成物を調製または生成するための方法にも関し、その方法については下にさらに説明する。また一般的には、本明細書に記載のナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生産物および組成物は、国際公開第 04/041862号に記載の様式と相同な様式で、調製し使用してもよい。

【0204】

本発明は、さらに本発明に記載の上記ナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生産物および組成物の応用および使用に関するもので、その応用と使用としては、限定されないが、以下に記載する応用と使用が挙げられ、および/または国際公開第 04/041862号における TNF - アルファに対するナノボディおよび/またはそれに対するポリペプチドの使用と応用も挙げられる。

20

【0205】

本発明の他の態様、実施態様、利点、および応用は、以下の更なる記述から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0206】

本発明はここでさらに、以下の非限定的な実施例および図を用いて記述する。図は以下のものを示す：

30

一価 TNF アルファナノボディ

【図1】ヒト TNF アルファナノボディの配列アラインメント

【図2】血清アルブミン特異性 TNF アルファナノボディの配列アラインメント

【図3】アルブミン特異性 TNF アルファナノボディとヒト血清アルブミンとの結合

【図4】アルブミン特異性 TNF アルファナノボディとアカゲザル血清アルブミンとの結合

【図5】アルブミン特異性 TNF アルファナノボディとマウス血清アルブミンとの結合

【図6】TNF アルファおよび血清アルブミンナノボディの純度 (SDS PAGE)

【図7】TNF および血清アルブミンナノボディのウエスタンブロット分析

40

【図8】TNF アルファナノボディとヒト TNF アルファとの結合 (ELISA)

【図9】TNF アルファナノボディとアカゲザル TNF アルファとの結合 (ELISA)

【図10】ヒト TNF アルファに対するエンブレルの受容体阻害アッセイ

【図11】アカゲザル TNF アルファに対するエンブレルの受容体阻害アッセイ

【図12】TNF アルファナノボディとヒト TNF アルファとの結合 (Biacore)

【図13】TNF アルファナノボディとアカゲザル TNF アルファとの結合 (Biacore)

【図14】TNF アルファナノボディとプロテイン A との結合 (Biacore)

50

- 【図15】TNF アルファおよび血清アルブミンナノボディの温度処理（ウエスタンブロット）
- 【図16】安定性：TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）
- 【図17】血清アルブミンナノボディの温度処理（Biacore）二価TNF アルファナノボディ
- 【図18】二価TNF アルファナノボディの純度（SDS PAGE）
- 【図19】二価TNF アルファナノボディのウエスタンブロット分析
- 【図20】二価TNF アルファナノボディに対するエンブレルの受容体阻害アッセイ
- 【図21-1】安定性：二価TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）
- 【図21-2】安定性：二価TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA） 10
- 【図21-3】安定性：二価TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）ヒト化一価TNF アルファナノボディ
- 【図22】TNF 1ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図23】TNF 2ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図24】TNF 3ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図25】ALB 1ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図26】ヒト化TNF アルファおよび血清アルブミンナノボディの純度（SDS PAGE）
- 【図27】ヒト化TNF アルファおよび血清アルブミンナノボディのウエスタンブロット分析 20
- 【図28】ヒト化TNF アルファナノボディとヒトTNF アルファとの結合
- 【図29】ヒト化血清アルブミンナノボディとヒト血清アルブミンとの結合
- 【図30-1】安定性：ヒト化TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）
- 【図30-2】安定性：ヒト化TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）
- 【図30-3】安定性：ヒト化TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）三価TNF アルファナノボディ
- 【図31】三価TNF アルファナノボディの純度（SDS PAGE）
- 【図32】三価TNF アルファナノボディのウエスタンブロット分析
- 【図33】安定性：三価TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）ヒト化一価TNF アルファナノボディ（二回目） 30
- 【図34】TNF 1ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図35】TNF 2ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図36】TNF 3ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図37】ALB 1ヒト化ナノボディの複数配列アラインメント
- 【図38】ヒト化TNF アルファナノボディの純度（SDS PAGE）
- 【図39】ヒト化TNF アルファナノボディのウエスタンブロット分析
- 【図40-1】ヒト化TNF アルファナノボディとヒトTNF アルファとの結合
- 【図40-2】ヒト化TNF アルファナノボディとヒトTNF アルファとの結合
- 【図41】安定性：ヒト化TNF アルファナノボディの温度処理（ELISA）
- 【図42】検出のための、銀染色SDS PAGEゲル（A）、クマシー染色SDS PAGEゲル（B）上の、および抗NBを使用したウエスタンブロット分析（C）における、精製TNF 60の分析 40
- 【図43】Superdex HR75でのTNF 60の分析的サイズ排除クロマトグラム
- 【図44】TNF 60とヒトTNF アルファとの結合
- 【図45】エンブレル（エタネルセプト）、Humira（アダリムマブ）およびレミケード（インフリキシマブ）と比較した、Nano body（商標）TNF 60を使用したヒトTNF アルファでの細胞毒性アッセイ定における用量反応曲線
- 【図46】エンブレル（エタネルセプト）、Humira（アダリムマブ）およびレミケード（インフリキシマブ）と比較した、Nano body（商標）TNF 60を使用したアカゲザルTNF アルファでの細胞毒性アッセイで得られた用量反応曲線 50

【図47】マウスTNF60の薬物動態プロファイル

【図48】マウスTNF60の免疫原性プロファイル

【図49】クマシー染色SDS PAGEゲル上の精製TNF56 PEG40、TNF56 PEG60、TNF56 ビオチン、TNF55 PEG40、TNF55 PEG60およびTNF55 ビオチンの分析

【図50】検出のための、銀染色(A)、クマシー染色(B)を用いたSDS PAGEゲル上の、および抗NBを使用したウエスタンブロット分析(C)における、精製TNF56 PEG40の分析

【図51】SuperdexHR75上のTNF56 PEG40の分析的サイズ排除クロマトグラム

【図52】SuperdexHR200上のTNF56 PEG40の分析的サイズ排除クロマトグラム

10

【図53】エンブレル(エタネルセプト)、Humira(アダリムマブ)およびレミケード(インフリキシマブ)と比較した、Nanobody(商標)TNF56 PEG40および一価野生型Nanobody(商標)TNF1を使用したヒトTNF アルファでの細胞毒性アッセイで得られた用量反応曲線

【図54】エンブレル(エタネルセプト)、Humira(アダリムマブ)およびレミケード(インフリキシマブ)と比較した、Nanobody(商標)TNF56 PEG40を使用したアカゲザルTNF アルファでの細胞毒性アッセイで得られた用量反応曲線

【図55】マウスに静脈投与した後のペグ化二価Nanobody(商標)TNF56 PEG40およびTNF56 PEG60の薬物動態分析

20

【図56】マウスに静脈投与した後のペグ化二価Nanobody(商標)3E 3E PEG20、およびペグ化二価Nanobody(商標)3E 3E PEG40および二重特異性Nanobody(商標)3E 3E AR1の薬物動態分析

【図57】マウスTNF56 PEG40およびTNF56 PEG60の免疫原性プロファイル

【図58】マウス慢性多発性関節炎予防に対するTNF60の有効性

【図59】マウス慢性多発性関節炎の治療処置に対するTNF60の有効性

【図60】マウス慢性多発性関節炎予防における有効性に対するTNF60 Nanobody(商標)の設定の効果

【図61】Nanobody(商標)PMP1C2、3E、1Aおよび3Gの配列アライメント

30

【図62】TNF60の分子モデル

【発明を実施するための形態】

【0207】

本発明の上記のおよび他の態様ならびに実施態様は以下の更なる記述から明らかになるであろうが、ここで

a)他に断らない限り、または規定されない場合は、使用される全ての用語は、当業者には明らかである、当技術における通常の意味を有する。参照としては、例えば Sambrookら「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(2nd.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubelら編「Current protocols in Molecular biology」, Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin「Genes II」, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Oldら「Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering」, 第2版, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roittら「Immunology」(6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roittら Roitt's Essential Immunology, 第10版 Blackwell Publishing, UK (2001); および Janewayら「Immunobiology」(第6版.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005)のような標準的ハンドブック、ならびに本明細書に引用する一般的な背景技術を用いる。

40

b)他に断らない限り、「免疫グロブリン配列」という用語は、本明細書では重鎖抗体を言う場合も、一般的な四鎖抗体を言う場合であっても、全長抗体、その個々の鎖、およ

50

びその全部分、ドメインまたは断片（抗体結合ドメインまたは $V_{H H}$ ドメインまたは V_H/V_L ドメインのような断片を含むが、これらに限定されない）を含む一般的な用語として用いられる。加えるに、本明細書において用いられる「配列」という用語は（例えば「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「変異ドメイン配列」、「 $V_{H H}$ 配列」または「タンパク配列」のような用語）、前後関係が、より制限された解釈を要求しない限りは、関連したアミノ酸配列および核酸配列の両方、もしくはアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むと一般的に理解されたい。

c) 他に断らない限り、詳細に具体的には説明していない、全ての方法、ステップ、技術および操作は、当業者には明らかであるような、それ自体知られている様式で行うことが可能であり、行われてきた。参照としては、例えば再び標準的なハンドブック、上に引用された一般的な背景技術およびそれらに引用される更なる参考文献を用いればよい。

d) 表1に示したように、アミノ酸残基は、標準的な3文字または1文字のアミノ酸コードに従って示される。

【0208】

【表1】

表1：1文字および3文字アミノ酸コード

非極性 非荷電 (pH6.0~7.0 において) ⁽³⁾	アラニン	Ala	A
	バリン	Val	V
	ロイジン	Leu	L
	イソロイジン	Ile	I
	フェニルアラニン	Phe	F
	メチオニン ⁽¹⁾	Met	M
	トリプトファン	Trp	W
	プロリン	Pro	P
極性 非荷電 (pH6.0~7.0 において)	グリシン ⁽²⁾	Gly	G
	セリン	Ser	S
	スレオニン	Thr	T
	システイン	Cys	C
	アスパラギン	Asn	N
	グルタミン	Gln	Q
	チロシン	Tyr	Y
極性 非荷電 (pH6.0~7.0 において)	リジン	Lys	K
	アルギニン	Arg	R
	ヒスチジン ⁽⁴⁾	His	H
	アスパラギン酸	Asp	D
	グルタミン酸	Glu	E

注

(1) 時にはまた極性、非荷電アミノ酸と見なされる。

(2) 時にはまた非極性、非荷電アミノ酸と見なされる。

(3) 当業者にとっては明らかであるように、この表でアミノ酸残基がpH6.0から7.0において荷電あるいは非荷電であると記載している事実は、6.0よりも低いpHではおよび/または7.0よりも高いpHにおいて前記アミノ酸残基が有するかも知れない荷電に関しては、全く反映されない；表に記載しているアミノ酸残基は、当業者にとっては明らかであるようにそのように高いまたは低いpHにおいて、荷電しているおよび/または荷電していない可能性がある。

(4) 当技術において知られているように、ヒスチジン残基の荷電は、pHにおける小さな動きにさえ依存するが、約6.5のpHにおいては実質的には非荷電であると一般的に見なすことができる。

【0209】

e) 二つ以上のヌクレオチド配列を比較する目的で、第一のヌクレオチド配列と第二のヌ

クレオチド配列の間の「配列同一性」の百分率は、[第二のヌクレオチド配列において、対応する位置におけるヌクレオチドと同一である第一のヌクレオチド配列におけるヌクレオチド数]を[第一のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの全数]で割り、[100%]を掛けることによって計算すれば良く、第二のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの、それぞれの欠失、挿入、置換または付加（第一のヌクレオチド配列と比較して）は一つのヌクレオチドの相違（位置）と見なされる。

【0210】

代替法として、二つ以上のヌクレオチド配列の間の配列同一性の程度は、NCBI Blast v2.0のような配列比較の既知のコンピュータアルゴリズムを用いて、標準的な設定で計算することができる。

10

【0211】

配列同一性の程度を決定するための、他の技術、コンピュータアルゴリズムおよび設定は、例えば国際公開第04/037999、欧州特許第0967284号、欧州特許第1085089号、国際公開第00/55318号、国際公開第00/78972号、国際公開第98/49185号およびGB2357768-Aに記載されている。

【0212】

通常、上に概略を述べた計算法に従って、二つのヌクレオチド配列の間の配列同一性の百分率を決定する目的のためには、最大のヌクレオチド数を有するヌクレオチド配列が、「第一の」ヌクレオチド配列とされ、他のヌクレオチド配列を「第二の」ヌクレオチド配列とする。

20

f) 二つ以上のアミノ酸配列を比較する目的で、第一のアミノ酸配列と第二のアミノ酸配列の間の「配列同一性」の百分率は、[第二のアミノ酸配列において、対応する位置におけるアミノ酸残基と同一である第一のアミノ酸配列におけるアミノ酸数]を[第一のアミノ酸配列におけるアミノ酸の全数]で割り、[100%]を掛けることによって計算すれば良く、第二のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の、それぞれの欠失、挿入、置換または付加、- 第一のアミノ酸配列と比較して -、は一つのアミノ酸残基の相違（位置）と見なされる、すなわち下に規定したような「アミノ酸の相違」と見なされる。

【0213】

代替法として、二つのアミノ酸配列の間の配列同一性の程度は、ヌクレオチド配列に関する配列同一性を決定する上記のような既知のコンピュータアルゴリズムを用いて、また標準設定で、計算してもよい。

30

【0214】

通常、上に概略を述べた計算法に従って、二つのアミノ酸配列の間の配列同一性の百分率を決定する目的のためには、最大のアミノ酸残基数を有するアミノ酸配列が、「第一の」アミノ酸配列とされ、他のアミノ酸配列を「第二の」アミノ酸配列とする。

【0215】

さらに、二つのアミノ酸配列の間の配列同一性の程度を決定する場合、当業者は、一般的に、アミノ酸残基が類似した化学構造の別のアミノ酸残基と置換され、ポリペプチドの機能、活性、または他の生物学的特性にほとんどまたは本質的に影響を与えない、いわゆる「保存的」アミノ酸置換を考慮に入れることができる。該保存的アミノ酸置換は当業者においては良く知られており、例えば国際公開第04/037999号、GB-A-2357768、国際公開第98/49185号、国際公開第00/46383号および国際公開第01/09300号;および(好ましい)タイプおよび/またはそのような置換の組み合わせは国際公開第04/037999号、国際公開第98/49185号およびその中で引用されている参考文献からの妥当な示唆に基づき選択することができる。

40

【0216】

そのような保存的な置換は、次の(a)-(e)群内の一つのアミノ酸が、同じ群内の別のアミノ酸残基によって置換されるような、置換であることが好ましい:(a):小さな脂肪族、非極性または僅かに極性の残基:Ala、Ser、Thr、ProおよびGly;(b)極性、負荷電残基およびそれらの(非荷電)アミド:Asp、Asn、Glu

50

およびGln; (c) 極性、正荷電残基: His、ArgおよびLys; (d) 大きな脂肪族、非極性残基: Met、Leu、Ile、ValおよびCys; および(e) 芳香族残基

: Phe、TyrおよびTrp。

【0217】

特に好ましい保存的置換は以下のものである: AlaをGlyにまたはSerに; ArgをLysに; AsnをGlnまたはHisに; AspをGluに; CysをSerに; GlnをAsnに; GluをAsnに; GlyをAlaまたはProに; HisをAsnまたはGlnに; IleをLeuまたはValに; LeuをIleまたはValに; LysをArg、GlnまたはGluに; MetをLeu、TyrまたはIleに; PheをMet、LeuまたはTyrに; SerをThrに; ThrをSerに; TrpをTyrに; TyrをTrpに; および/またはPheをVal、IleまたはLeuに。

【0218】

本明細書に記載のポリペプチドに適用されるいかなるアミノ酸置換も、SchultzらPrinciples of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978によって開発された、異なった種の相同タンパク間のアミノ酸変異頻度の分析、ChouおよびFasman, Biochemistry 13:211, 1974 およびAdv. Enzymol., 47:45-149, 1978によって開発された、構造形成能力の分析、およびEisenbergら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:140-144, 1984; KyteおよびDoolittle; J. Molec. Biol. 157:105-132, 1981およびGoldmanらAnn. Rev. Biophys. Chem. 15:321-353, 1986, によって開発された、タンパクにおける疎水性パターンの解析に基づくこともできる。これらすべては、参照として本明細書に援用される。本明細書および一般的な背景技術で与えられた、ナノボディの一次、二次および三次構造に関する情報は、上に引用された。さらに、この目的のために、ラマからのV_HHドメインの結晶構造は、例えば、Desmyterら、Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803(1996); Spinelliら、Natural Structural Biology(1996); 3, 752-757; およびDecanniereら、Structure, Vol. 7, 4, 361(1999)に与えられている。従来のV_Hドメインでは、V_H/V_Lインタ-フェースおよび潜在的なラクダ化置換を、これらの位置に形成するいくつかのアミノ酸残基に関する更なる情報を、本明細書に引用されたナノボディに関する従来技術では見出すことができる;

【0219】

g) 全長で100%の配列同一性(本明細書で規定)を有しているならば、アミノ酸配列およびヌクレオチド配列は「全く同一である」とされる;

h) 二つのアミノ酸配列を比較する場合、「アミノ酸の相違」という用語は、第二の配列と比較して、第一の配列のある位置に一つのアミノ酸の、挿入、欠失または置換のことをいう; 二つのアミノ酸配列は、そのようなアミノ酸の相違を一つ、二つ以上含むことができることを意味する;

i) 核酸配列またはアミノ酸配列は、例えば、それらが得られる天然の生物源および/または反応培地または培養培地と比較して、前記生物源または培地中で通常随伴している他の成分、例えば他の核酸、他のタンパク/ポリペプチド、他の生物学的成分または高分子、もしくは少なくとも一つの混入物、不純物または微量成分のようなものの少なくとも一つから分離された時、「本質的に分離された(形態)」であると考えられる。特に、核酸配列またはアミノ酸配列は、少なくとも2倍、特に少なくとも10倍、さらに特定すれば、少なくとも100倍および1000倍以上まで精製されたとき、「本質的に分離された」と考えられる。「本質的に分離された形態」である核酸配列またはアミノ酸配列は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような、適切なクロマトグラフ技術のような、適切な技術を用いて決定される、本質的に均一であることが好ましい。

j) 本明細書で用いている「ドメイン」という用語は、一般的に抗体鎖の球状の領域を言い、特に重鎖抗体の球状領域、もしくはそのような球状領域から本質的に成るポリペプチドを言う。通常そのようなドメインは、シートとしてまたはジスルフィド結合により安定化された、ペプチドドメイン(例えば3または4ペプチドドメイン)を含むであろう。

k) 「抗原決定基」という用語は、抗原結合分子（例えば本発明のナノボディまたはポリペプチドのような）によって、より特定すれば、前記分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピト - プを言う。本明細書においては、「抗原決定基」および「エピト - プ」はまた、相互に交換して用いてもよい。

【0220】

l) 特定の抗原決定基、エピト - プ、抗原またはタンパク（または少なくとも一部、断片またはそれらのエピト - プ）に対して、結合でき、アフィニティーを有しおよび/または特異性を有するアミノ酸配列（例えば本発明のナノボディ、抗体またはポリペプチド、もしくは一般的に抗原結合タンパクまたはポリペプチド、もしくはそれらの断片）は、前記抗原決定基、エピト - プ、抗原またはタンパクに"対する"または「対する指向性を」有する

10

m) 「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子または抗原結合タンパク（例えば、本発明のナノボディまたはポリペプチド）分子が結合できる、異なったタイプの抗原または抗原決定基の数を言う。ある抗原結合タンパクの特異性は、アフィニティーおよび/または結合活性に基づいて決定することができる。抗原と抗原結合タンパクとの解離の平衡定数（ K_D ）によって表されるアフィニティーは、抗原決定基と抗原結合タンパク上の抗原結合部位の間の結合力の尺度である： K_D の値が小さければ小さいほど、抗原決定基と抗原結合分子の間の結合力がより強い（代替法として、アフィニティーは $1/K_D$ である親和定数（ K_A ）として表すこともできる）。当業者には明らかであるように（例えば、本明細書における更なる開示に基づいて）、アフィニティーは、関心ある特定の抗原に依存して、それ自体知られている様式で決定することができる。結合活性は、抗体結合分子（例えば、本発明のナノボディまたはポリペプチド）および関連した抗原の間の結合力の尺度である。結合活性は、抗原決定基および抗原結合分子の間のアフィニティーならびに抗原結合分子上に存在する関連した結合部位の数の両方に関連する。典型的には、抗原結合分子（例えば本発明のナノボディおよび/またはポリペプチド）は、解離定数（ K_D ） 10^{-5} から 10^{-12} モル/リットル（M）または未満、好ましくは、 10^{-7} から 10^{-12} モル/リットル（M）または未満、および/または会合定数（ K_A ）、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも $10^{12} M^{-1}$ のように、少なくとも $10^9 M^{-1}$ である。 $10^{-4} M$ より大きいいかなる K_D 値も、非特異的な結合を示すと一般的に考えられている。好ましくは、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、希望する抗原と500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは、例えば500 pM未満のように、10 nM未満の K_D で結合する。抗原結合タンパクの、抗原または抗原決定基との特異的な結合は、それ自体知られているいずれかの適切な方法で決定できるが、例えばScatchard分析および/または放射線免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）およびサンドイッチ拮抗法のような拮抗結合測定法、ならびに当技術においてそれ自体知られているそれらの別の変法を含む。

20

30

【0221】

n) 以下に説明するように、ナノボディのアミノ酸配列および構造は、これに限定されないが、四つのフレ - ムワ - ク領域または「FR」を含み、それらは当技術および本明細書では、「フレ - ムワ - ク領域1」または「FR1」として；「フレ - ムワ - ク領域2」または「FR2」として；「フレ - ムワ - ク領域3」または「FR3」として；および「フレ - ムワ - ク領域4」または「FR4」として、それぞれ呼ばれ；それらのフレ - ムワ - ク領域は三つの相補体決定領域または「CDR」によって中断されており、それらは当技術では、「相補体決定領域1」またはCDR1として；「相補体決定領域2」またはCDR2として；および「相補体決定領域3」またはCDR3として、それぞれ呼ばれ；

o) さらに以下に説明するように、ナノボディにおけるアミノ酸残基の全数は、110 ~ 120の領域、好ましくは112 ~ 115、最も好ましくは113である。しかしながら、ナノボディの部分、断片またはアナログ（以下にさらに説明するように）が以下に概略した更なる要項に適い、また本明細書に記載の目的に適している限り、ナノボディの部分、断片またはアナログはそれらの長さおよび/またはサイズに関しては特に限定されないこ

40

50

とに留意されたい；

p) ナノボディのアミノ酸残基は、上に引用したRiechmannおよびMuyldermansの論文におけるラクダ科のV_HHドメインに応用されたように(例えば前記の参考文献の図2を参照)、Kabatら. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No.91)によって与えられたV_Hドメインに対する一般的な番号付けに従って番号を付けられる。この番号付けに従って、ナノボディのFR1はアミノ酸残基を1-30の位置に含み、ナノボディのCDR1はアミノ酸残基を31-36の位置に含む、ナノボディFR2はアミノ酸残基を36-49の位置に含み、ナノボディのCDR2はアミノ酸残基を50-65の位置に含み、ナノボディのFR3はアミノ酸残基を66-94の位置に含む、ナノボディのCDR3はアミノ酸残基を95-102の位置に含み、およびナノボディのFR4はアミノ酸残基を103-113の位置に含む。[この点に関して、V_HドメインおよびV_HHドメインに関して、当技術においては良く知られているようにCDRのそれぞれにおけるアミノ酸残基の全数は、変化するかもしれない、Kabatの番号付けによって示されたアミノ酸残基の全数と一致しないかも知れない(すなわち、Kabatの番号付けによる一つ以上の位置が、実際の配列によって占められていない可能性もあり、または実際の配列はKabatの番号付けが許す数よりも多いアミノ酸残基を含んでいる可能性もある)。このことは、一般的にKabatによる番号付けは、実際のアミノ酸配列の実際の番号と一致する可能性もあるし、可能性がないかも知れないことを意味する。一般的にはしかし、Kabatの番号によって、およびCDRにおけるアミノ酸残基数に関係なく、Kabatの番号による1の位置はFR1の開始に相当し、逆も成り立ち、Kabat番号による36の位置はFR2の開始に相当し、逆も成り立ち、Kabat番号による66の位置はFR3の開始に相当し、逆も成り立ち、Kabat番号による103の位置はFR4の開始に相当し、逆も成り立つ。

【0222】

V_Hドメインのアミノ酸残基の番号を付ける代替法は、ラクダ科のV_HHドメインおよびナノボディにもまた適用できるのであるが、Chothiaら(Nature 342,877-883(1989))によって記述された方法で、いわゆる「AbM規定」およびいわゆる「接触規定」である。しかしながら、本明細書、請求項および図においては、RiechmannおよびMuyldermansによる、Kabatによる番号付けをV_HHドメインに適用したものに、特に断らない限り、従う；ならびに

q) 図、配列表および実験部/実施例は、本発明をさらに例示するためのみに与えられるものであり、本明細書に明瞭に示されない限りは、本発明および/または付帯した請求項の範囲を制限するものと解釈したり理解したりすべきではない。

【0223】

重鎖抗体およびその可変ドメインについての一般的な説明に関しては、参考文献として特に次の文献を一般的な背景技術として引用する：国際公開第94/04678号、国際公開第95/04079号および国際公開第96/3410号(3 of the Vrije Universiteit Brussel)；国際公開第94/25591、国際公開第99/37681号、国際公開第00/40968号、国際公開第00/43507号、国際公開第00/65057号、国際公開第01/40310、国際公開第01/44301号、EP 1134231号および国際公開第02/48193号(of Unilever)；国際公開第97/49805号、国際公開第01/21817号、国際公開第03/035694号、国際公開第03/054016号および国際公開第03/055527号(of the Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB))；国際公開第03/050531号of Algonomics N.V. and applicant；国際公開第01/90190号(by the National Research Council of Canada)；国際公開第03/025020号(= 欧州特許第1433793号)(by the Institute of Antibodies)；ならびに出願人によるまたさらに出願人によって公表された特許出願 国際公開第04/041867号、国際公開第04/041862号、国際公開第04/041865号、国際公開第04/041863号、国際公開第04/062551号；Hamers - Casterman et al., Nature 1993 June 3; 363 (6428): 446-8; Davies and Riechmann, FEBS Lett. 1994 Feb 21; 339(3): 285-90; Muyldermans et al., Protein Eng. 1994 Sep; 7(9): 1129-3; Davies and Riechmann, Biotechnology (NY) 1995 May; 13

(5): 475 - 9; Gharoudi et al., 9th Forum of Applied Biotechnology, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995; 60/4a part I: 2097 - 2100; Davies and Riechmann, Protein Eng. 1996 Jun; 9(6): 531 - 7; Desmyter et al., Nat Struct Biol. 1996 Sep; 3(9): 803 - 11; Sheriff et al., Nat Struct Biol. 1996 Sep; 3(9): 733 - 6; Spinelli et al., Nat Struct Biol. 1996 Sep; 3(9): 752 - 7; Arbabi Ghahroudi et al., FEBS Lett. 1997 Sep 15; 414(3): 521 - 6; Vu et al., Mol Immunol. 1997 Nov - Dec; 34(16 - 17): 1121 - 31; Atarhouch et al., Journal of Camel Practice and Research 1997; 4: 177 - 182; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 1998 Jan 23; 275(3): 413 - 8; Lauwereys et al., EMBO J. 1998 Jul 1; 17(13): 3512 - 20; Frenken et al., Res Immunol. 1998 Jul - Aug; 149(6): 589 - 99; Transue et al., Proteins 1998 Sep 1; 32(4): 515 - 22; Muyltermans and Lauwereys, J. Mol. Recognit. 1999 Mar - Apr; 12 (2): 131 - 40; van der Linden et al., Biochim. Biophys. Acta 1999 Apr 12; 1431(1): 37 - 46.; Decanniere et al., Structure Fold. Des. 1999 Apr 15; 7(4): 361 - 70; Ngyuen et al., Mol. Immunol. 1999 Jun; 36(8): 515 - 24; Woolven et al., Immunogenetics 1999 Oct; 50 (1 - 2): 98 - 101; Riechmann and Muyltermans, J. Immunol. Methods 1999 Dec 10; 231 (1 - 2): 25 - 38; Spinelli et al., Biochemistry 2000 Feb 15; 39(6): 1217 - 22; Frenken et al., J. Biotechnol. 2000 Feb 28; 78(1): 11 - 21; Nguyen et al., EMBO J. 2000 Mar 1; 19(5): 921 - 30; van der Linden et al., J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1 - 2): 185 - 95; Decanniere et al., J. Mol. Biol. 2000 Jun 30; 300 (1): 83 - 91; van der Linden et al., J. Biotechnol. 2000 Jul 14; 80(3): 261 - 70; Harmsen et al., Mol. Immunol. 2000 Aug; 37(10): 579 - 90; Perez et al., Biochemistry 2001 Jan 9; 40(1): 74 - 83; Conrath et al., J. Biol. Chem. 2001 Mar 9; 276 (10): 7346 - 50; Muyltermans et al., Trends Biochem Sci. 2001 Apr; 26(4): 230 - 5; Muyltermans S., J. Biotechnol. 2001 Jun; 74 (4): 277 - 302; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 2001 Jul 13 ; 276 (28): 26285 - 90; Spinelli et al., J. Mol. Biol. 2001 Aug 3; 311 (1): 123 - 9; Conrath et al., Antimicrob Agents Chemother. 2001 Oct; 45 (10): 2807 - 12; Decanniere et al., J. Mol. Biol. 2001 Oct 26; 313(3): 473 - 8; Nguyen et al., Adv Immunol. 2001; 79: 261 - 96; Muruganandam et al., FASEB J. 2002 Feb; 16 (2): 240 - 2; Ewert et al., Biochemistry 2002 Mar 19; 41 (11): 3628 - 36; Dumoulin et al., Protein Sci. 2002 Mar; 11 (3): 500 - 15; Cortez - Retamozo et al., Int. J. Cancer. 2002 Mar 20; 98 (3): 456 - 62; Su et al., Mol. Biol. Evol. 2002 Mar; 19 (3): 205 - 15; van der Vaart JM., Methods Mol Biol. 2002; 178: 359 - 66; Vranken et al., Biochemistry 2002 Jul 9; 41 (27): 8570 - 9; Nguyen et al., Immunogenetics 2002 Apr; 54 (1): 39 - 47; Renisio et al., Proteins 2002 Jun 1; 47 (4): 546 - 55; Desmyter et al., J. Biol. Chem. 2002 Jun 28; 277 (26): 23645 - 50; Ledebroer et al., J. Dairy Sci. 2002 Jun; 85 (6): 1376 - 82; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2002 Aug 16; 277 (33): 29897 - 907; Ferrat et al., Biochem. J. 2002 Sep 1; 366 (Pt 2): 415 - 22; Thomassen et al., Enzyme and Microbial Technol. 2002; 30: 273 - 8; Harmsen et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002 Dec; 60 (4): 449 - 54; Jobling et al., Nat Biotechnol. 2003 Jan; 21 (1): 77 - 80; Conrath et al., Dev. Comp. Immunol. 2003 Feb; 27 (2): 87 - 103; Pleschberger et al., Bioconjug. Chem. 2003 Mar - Apr; 14 (2): 440 - 8; Lah et al., J. Biol. Chem. 2003 Apr 18; 278 (16): 14101 - 11; Nguyen et al., Immunology. 2003 May; 109 (1): 93 - 101; Joosten et al., Microb. Cell Fact. 2003 Jan 30; 2 (1): 1; Li et al., Proteins 2003 Jul 1; 52 (1): 47 - 50; Loris et al., Biol Chem. 2003 Jul 25; 278 (30): 28252 - 7; van Koningsbruggen et al., J. Immunol. Methods. 2003 Aug; 279 (1 - 2): 149 - 61; Dumoulin et al., Nature. 2003 Aug 14; 424 (6950): 783 - 8; Bond et al., J. Mol. Biol. 2003 Sep 19; 332 (3): 643 - 55; Yau et al., J. Immunol. Methods. 2003 Oct 1; 281 (1 - 2): 161 - 75; Dekker et al., J. Virol. 2003 Nov; 77 (22): 12132 - 9; Meddeb - Mouelhi et al., Toxicol. 2003 Dec; 42 (7): 785 - 91; Verheesen et al., Biochim. Biophys. Act

a 2003 Dec 5; 1624 (1 - 3): 21 - 8; Zhang et al., J Mol Biol. 2004 Jan 2; 335 (1) : 49 - 56; Stijlemans et al., J Biol Chem. 2004 Jan 9; 279 (2): 1256 - 61; Cortez - Retamozo et al., Cancer Res. 2004 Apr 15; 64 (8): 2853 - 7; Spinelli et al., FEBS Lett. 2004 Apr 23; 564 (1 - 2): 35 - 40; Pleschberger et al., Bioconjug. Chem. 2004 May - Jun; 15 (3): 664 - 71; Nicaise et al., Protein Sci. 2004 Jul; 13 (7): 1882 - 91; Omidfar et al., Tumour Biol. 2004 Jul - Aug; 25 (4): 179 - 87; Omidfar et al., Tumour Biol. 2004 Sep - Dec; 25(5 - 6): 296 - 305; Szyndol et al., Antimicrob Agents Chemother. 2004 Sep; 48(9): 3390 - 5; Saerens et al., J. Biol. Chem. 2004 Dec 10; 279 (50): 51965 - 72; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2004 Dec 17; 279 (51) : 53593 - 601; Dolk et al., Appl. Environ Microbiol. 2005 Jan; 71(1): 442 - 50; Joo 10
sten et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Jan; 66(4): 384 - 92; Dumoulin et al., J. Mol. Biol. 2005 Feb 25; 346 (3): 773 - 88; Yau et al., J Immunol Methods. 2005 Feb; 297 (1 - 2): 213 - 24; De Genst et al., J. Biol. Chem. 2005 Apr 8; 280 (14): 14114 - 21; Huang et al., Eur. J. Hum. Genet. 2005 Apr 13; Dolk et al., Proteins. 2005 May 15; 59 (3): 555 - 64; Bond et al., J. Mol. Biol. 2005 May 6; 348(3): 699 - 709; Zarebski et al., J. Mol. Biol. 2005 Apr 21; [印刷前の電子出版]

【 0 2 2 4 】

上記の参考文献で用いる用語法に従って、天然の重鎖抗体に存在する可変ドメインは、通常の4鎖抗体に存在する重鎖可変ドメイン（以下「 V_H ドメイン」と呼ぶ）および通常の4鎖抗体に存在する軽鎖可変ドメイン（以下「 V_L ドメイン」と呼ぶ）と区別するために、また「 V_{HH} ドメイン」と呼ぶ。 20

【 0 2 2 5 】

上に参照された先行技術で述べたように、 V_{HH} ドメインは、分離された V_{HH} ドメイン（ならびに、天然の V_{HH} ドメインと構造的な特徴および機能的な性質を同じくする、それに基づくナノボディ）を機能的な抗原結合ドメインまたはタンパクとして使用するのを非常に有利にする、多数の構造的長および機能的な性質を有する。特に、それに限られるのではないが、 V_{HH} ドメイン（軽鎖の可変ドメインの存在なしに、またそれとの相互作用なしに、機能的に抗原と結合するように天然に「デザインされた」）およびナノボディは、単一の、比較的小さな、機能的な抗原結合構造ユニット、ドメインまたはタンパクとして機能することができる。このことが、 V_{HH} ドメインを通常の4鎖抗体の V_H および V_L ドメインから区別するものである。通常の4鎖抗体の V_H および V_L ドメインは、それ自体としては一般的に単一の抗原結合タンパクまたはドメインとしては実用には適しておらず、機能的な抗原結合ユニットを提供するためには、種々な形で結合しなければならない（例えばFab断片のような通常の抗体断片； V_L ドメインと共有結合で連結した V_H ドメインより成るScFv）。 30

【 0 2 2 6 】

これらのユニークな特性の故に、単一抗原結合タンパクまたは抗原結合ドメイン（すなわち、より大きなタンパクまたはポリペプチドの一部として）としての V_{HH} ドメインおよびナノボディの使用は、従来の V_H および V_L ドメイン、scFvまたは従来の抗体断片（例えばFab - またはF(ab')₂ - 断片）の使用よりも、数多くの有意な利点を提供する。 40

- 高いアフィニティーと高い選択性を有する抗原に結合するためには、ただ単一のドメインが必要なだけであり、二つの分離したドメインが存在する必要も無いし、これらの二つのドメインが正しい空間配置および立体構造で存在することを保証する必要も無い（すなわち、scFvの場合のように、特別にデザインされたリンカ - を用いて）：

- V_{HH} ドメインおよびナノボディは単一の遺伝子から発現させることができ、翻訳後の折りたたみまたは修飾も必要としない；

- V_{HH} ドメインおよびナノボディは多価および多重特異性の型に用意に操作することができる（本明細書でさらに考察するように）；

- V_{HH} ドメインおよびナノボディは高度に可溶性であり、凝集する傾向は無い（Wa 50

rdら、Nature, Vol. 341, 1989, p. 544によって記述されたマウス由来の抗原結合ドメインのように) ;

- V_HHドメインおよびナノボディは、熱、pH、プロテ-ア-ゼおよび他の変性剤または条件に対して高度に安定である(たとえば既出のEwertらを参照)。

- V_HHドメインおよびナノボディは製造工程に要求される規模においてさえ、調製するには容易で比較的安価である。たとえば、V_HHドメイン、ナノボディおよびそれを含むタンパク/ポリペプチドは、微生物の発酵(以下に説明するような)、を用いて製造することが可能であり、従来の抗体断片のように、哺乳動物発現システムの使用を必要としない ;

- V_HHドメインおよびナノボディは、従来の4鎖抗体およびその断片と比べると、比較的小さく(約15kDa、または従来のIgGよりも10分の1程度)、それ故、そのような従来の4鎖抗体およびその断片よりも組織(固形腫瘍および他の密な組織を含むが、限定されない)への浸透能が高い ;

- V_HHドメインおよびナノボディは、いわゆる空洞結合性(特に、通常のV_Hドメインに比較して、より伸びたCDR3ル-プにより)を示すことができ、それ故、従来の4鎖抗体およびその断片が接近できなかった標的およびエピト-プにも接近することができる。例えば、V_HHドメインおよびナノボディは酵素を阻害することができる(例えば国際公開第97/49805; Transue(1998)既出; Lauwereysら(1998)既出。

【0227】

上述のように、本発明は一般的に、以下に記述するまた国際公開第04/041862における予防、治療および/または診断の目的で使用可能な、TNF-アルファに指向性を有するナノボディならびにそのようなナノボディを一つ以上含むまたは本質的にそれから成るポリペプチドに関する。

【0228】

さらに上述のように、および以下に記述するように、本発明はまた、そのようなナノボディおよびポリペプチドをコードする核酸、そのようなナノボディおよびポリペプチドを調製する方法、そのようなナノボディおよびポリペプチドを発現可能な宿主細胞、そのようなナノボディ、ポリペプチド、核酸、または宿主細胞の使用、およびそのようなナノボディ、ポリペプチド、核酸または宿主細胞を含む組成物に関する。

【0229】

一般的に、本明細書において最も広義で使用されるナノボディという用語は、特定の生物源または特定の調製法に限定されない。例えば、以下により詳細に考察するように、本発明のナノボディは、(1)天然の重鎖抗体のV_HHドメインを分離することにより ; (2)天然のV_HHドメインをコードするヌクレオチド配列を発現させる事により ; (3)天然のV_HHドメインをヒト化する事によりまたはそのようなヒト化V_HHドメインをコードする核酸を発現させることにより ; (4)いずれかの動物種からの、特にヒトからのような哺乳動物からの天然V_Hドメインを「ラクダ化」することにより(以下に説明する)、またはそのようなラクダ化したV_Hドメインをコードする核酸を発現することにより ; (5) Wardら(既出)によって記載された「ドメイン抗体」または「Dab」の「ラクダ化」によりまたはそのようなラクダ化されたV_Hドメインをコードする核酸を発現することにより ; (6)タンパク、ポリペプチドまたは他のアミノ酸配列を調製するための合成または半合成技術を用いて ; (7)核酸合成技術を用いてナノボディをコードする核酸を調製し、次いで得られた核酸を発現する事により ; および/または(8)先述のいずれかの組み合わせにより、得ることができる。先述を行うための適切な方法および技術は、本明細書の開示に基づき当業者には明らかであり、例えば以下により詳細に記述される方法および技術を含む。

【0230】

しかしながら、ある特定の実施態様によれば、本発明のナノボディは、たとえば哺乳動物からの、特にヒトからの天然のV_Hドメインのアミノ酸配列のような、天然のV_Hドメインのアミノ酸配列と全く同じ(すなわち配列の同一性の程度が100%)であるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を有しない。

【0231】

本発明の特に好ましいクラスのナノボディは、天然の V_{HH} ドメインのアミノ酸配列に対応する配列を有しているナノボディを含んでいるが、それは「ヒト化」されている。すなわち前記天然 V_{HH} ドメインのアミノ酸配列における一つ以上のアミノ酸残基を、ヒトの通常の4鎖抗体からの V_H ドメイン（例えば上に示したような）における対応する位置に存在する一つ以上のアミノ酸残基によって置換することにより、なされる。これはそれ自体知られた様式で行うことが可能であり、当業者には、例えば以下の更なる記述と、本明細書で参照されたヒト化に関する先行技術に基づいて、明らかである。更に、本発明のそのようなヒト化ナノボディは、それ自体知られたいずれかの適切な様式で得ることができ（すなわち上記の（1）から（8）までの項で示したように）、従って、出発材料として、天然 V_{HH} ドメインを含むポリペプチドを用いて得られたポリペプチドに厳密に制限されることは無い。

10

【0232】

好ましいが非限定的な、103, P, R, S群および/またはGLEW群（本明細書で規定）に属するナノボディは108Qから108Lまでである。

【0233】

本発明のナノボディの他の特に好ましい種類は、ラクダ化された天然に存在する V_H ドメインのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するナノボディを含む、すなわち従来の4鎖抗体からの天然に存在する V_H ドメインのアミノ酸配列の一つ以上のアミノ酸残基を、重鎖抗体の V_{HH} ドメインにおける対応する位置に存在する一つ以上のアミノ酸で置換することによってラクダ化したものである。これはそれ自体知られた様式で行うことができ、例えば更なる以下の記述に基づき、当業者にとっては明らかである。また国際公開第94/047678をも参照とする。そのようなラクダ化は、以下でもまた述べるが、 $V_H - V_L$ インターフェースおよびいわゆるラクダ科特徴残基（国際公開第94/047678を参照）に存在するアミノ酸位置に優先的に起こっても良い。好ましくは、ラクダ化ナノボディを生成またはデザインするための出発材料または出発点として使用される V_H ドメインまたは配列は、哺乳類の V_H 配列、より好ましくはヒトの V_H 配列である。しかしながら、本発明のラクダ化ナノボディは、それ自体知られているいかなる適切な様式でも得ることができ（すなわち上記（1）-（8）の項で示されたような）、従って出発材料として天然に存在する V_H ドメインを含むポリペプチドを用いて得られるポリペプチドに厳密に限られている訳では無い。

20

30

【0234】

例えば、また以下に記述するように、ヒト化およびラクダ化は、そのような天然に存在する V_{HH} ドメインまたは V_H ドメインをそれぞれコードするヌクレオチド配列を提供することにより行うことができ、その後それ自体知られた様式で、前記ヌクレオチド配列のひとつ以上のコドンを変化させ、新しいヌクレオチド配列が本発明のヒト化またはラクダ化ナノボディをコードするようにし、その後、欲する本発明のナノボディを提供するように、得られたヌクレオチド配列をそれ自体知られた様式で発現させる。代替法として、天然に存在するそれぞれの V_{HH} ドメインまたは V_H ドメインのアミノ酸配列に基づいて、本発明の欲するヒト化またはラクダ化ナノボディのそれぞれのアミノ酸配列を設計することができ、それ自体知られているペプチド合成の技術を用いて、新規に合成可能である。更に天然に存在するそれぞれの V_{HH} ドメインまたは V_H ドメインのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に基づいて、欲する本発明のヒト化またはラクダ化ナノボディのそれぞれをコードするヌクレオチド配列を設計し、それ自体知られたヌクレオチド合成技術を用いて、新規に合成可能であり、その後、得られたヌクレオチド配列は、それ自体知られた様式で本発明のナノボディを提供するように、発現させることができる。

40

【0235】

天然に存在する V_H ドメインまたは好ましくは V_{HH} ドメイン（のアミノ酸配列）および/またはそれらをコードするヌクレオチド配列および/または核酸配列から出発して、

50

本発明のナノボディおよび/またはそれをコードするヌクレオチド配列および/または核酸配列を得るための、他の適切な方法や技術は、当業者には明らかで、例えば天然に存在するV_Hドメイン(例えば一つ以上のFRおよび/またはCDR)から由来する一つ以上のアミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列と、一つ以上の天然に存在するV_HHドメイン(例えば一つ以上のFRまたはCDR)から由来する一つ以上のアミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列とを、本発明のナノボディ(コードするヌクレオチド配列または核酸配列)を提供するような適切な様式で組み合わせることを含んでもよい。

【0236】

本発明の態様の、好ましいが、非限定的な一態様によれば、その最も広い意味においてナノボディは一般的に以下を含むポリペプチドと規定できる：

a) 三つの相補体決定領域/配列によって中断される四つのフレームワーク領域/配列を含むアミノ酸配列であって、Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基がQであり；
および/または

b) 三つの相補体決定領域/配列によって中断される四つのフレームワーク領域/配列を含むアミノ酸配列であって、Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基がEであり、またKabatによる番号45の位置のアミノ酸残基がRであり；
および/または

c) 三つの相補体決定領域/配列によって中断される四つのフレームワーク領域/配列を含むアミノ酸配列であって、Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基がP、R、およびSからなる群から選択され、特に、RおよびSからなる群から選択される。

【0237】

従って、第一に好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは構造

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

を有しており、ここでFR1からFR4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、CDR1からCDR3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで

i) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基がQであり；

および/または、そこで

ii) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基がEであり、およびKabatによる番号45の位置のアミノ酸残基がRであり；

および/または

iii) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基がP、R、およびSからなる群から選択され、特に、RおよびSからなる群から選択され；

iv) CDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0238】

特に、本発明のTNF-アルファに対するナノボディは、構造

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

を有しても良く、ここでFR1からFR4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、CDR1からCDR3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで

i) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基がQであり；

および/または、そこで

ii) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基がEであり、およびKabatによる番号45の位置のアミノ酸残基がRであり；

および/または

iii) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基がP、R、およびSからなる群か

ら選択され、特に、RおよびSからなる群から選択され；

i v) CDR 1、CDR 2およびCDR 3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0239】

特に、本発明の態様の、好ましいが非限定的な一態様では、ナノボディは、一般的に、三つの相補体決定領域/配列によって中断される四つのフレームワーク領域/配列を含むアミノ酸配列として規定でき、そこで；

a - 1) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基が、G、E、D、G、Q、R、S、Lからなる群から選択され；好ましくはG、E、またはQからなる群から選択され；そして

10

a - 2) Kabatによる番号45の位置のアミノ酸残基が、L、RまたはCからなる群から選択され；好ましくは、LまたはRからなる群から選択され；そして

a - 3) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基が、W、R、またはSからなる群から選択され；好ましくはWまたはRからなる群から選択され、そして最も好ましくはWであり；

a - 4) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基がQであり；

ここで

b - 1) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基が、EおよびQからなる群から選択され；そして

20

b - 2) Kabatによる番号45の位置のアミノ酸残基がRであり；そして

b - 3) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基が、W、RおよびSからなる群から選択され；好ましくはWであり；

b - 4) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基が、QおよびLからなる群から選択され；好ましくはQであり；

もしくは

c - 1) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基が、G、E、D、Q、R、SおよびLからなる群から選択され；好ましくはG、EおよびQからなる群から選択され；そして

c - 2) Kabatによる番号45の位置のアミノ酸残基が、L、RおよびCからなる群から選択され；好ましくは、LおよびRからなる群から選択され；そして

30

c - 3) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基が、P、R、およびSからなる群から選択され；特に、RおよびSからなる群から選択され、そして

c - 4) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基が、QおよびLからなる群から選択され；好ましくはQである。

【0240】

従って、別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

を有しても良く、

40

FR1からFR4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、CDR1からCDR3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで

i) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基が、G、E、D、G、Q、R、S、Lからなる群から選択され；好ましくはG、EまたはQからなる群から選択され；

そして

ii) Kabatによる番号45の位置のアミノ酸残基が、L、RまたはCからなる群から選択され；好ましくはLまたはRからなる群から選択され

そして

iii) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基が、W、RまたはSからなる群か

50

ら選択され；好ましくはWまたはRであり；最も好ましくはWであり；

そして

i v) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基が、Qであり；

そして

v) C D R 1、C D R 2およびC D R 3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0241】

別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

10

を有しても良く、

F R 1からF R 4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、C D R 1からC D R 3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで：

i) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基が、EおよびQからなる群から選択され；

そして

i i) Kabatによる番号45の位置のアミノ酸残基が、Rであり；

i i i) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基が、W、RおよびSからなる群から選択され；好ましくはWであり；

そして

i v) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基が、Qであり；

そして

v) C D R 1、C D R 2およびC D R 3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0242】

別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

20

30

を有しても良く、

F R 1からF R 4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、C D R 1からC D R 3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで：

i) Kabatによる番号44の位置のアミノ酸残基が、G、E、D、Q、R、SおよびLからなる群から選択され；好ましくは、G、EおよびQからなる群から選択され；

そして

i i) Kabatによる番号45の位置のアミノ酸残基が、L、RおよびCからなる群から選択され；好ましくは、LおよびRからなる群から選択され；

そして

i i i) Kabatによる番号103の位置のアミノ酸残基が、P、RおよびSからなる群から選択され；特にRおよびSからなる群から選択され；

そして

i v) Kabatによる番号108の位置のアミノ酸残基が、QおよびLからなる群から選択され；好ましくはQであり；

そして

v) C D R 1、C D R 2およびC D R 3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上

40

50

の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0243】

二つの特に好ましいが、それに非限定的な本発明のナノボディの群は、上記の a) に記載された物；上記の i) - a - 4) に記載された物；上記の b) に記載された物；上記の b - 1) から b - 4) に記載された物；上記の c) に記載された物；および/または上記の c - 1) から c - 4) に記載された物であって；

a) Kabatによる番号 44 ~ 47 の位置のアミノ酸残基が G L E W (または以下に規定するような G L E W 様配列) を形成し、および 108 の位置のアミノ酸残基が Q であり；
または

b) Kabatによる番号 43 ~ 46 の位置のアミノ酸残基が K E R E 配列または K Q R E (または K E R E 様配列) を形成し、および 108 に位置のアミノ酸残基が Q または L であり、好ましくは Q である。

【0244】

従って、他の好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは構造

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

を有しても良く、

F R 1 から F R 4 は、それぞれフレームワーク領域 1 から 4 を言い、C D R 1 から C D R 3 は、それぞれ相補体決定領域 1 から 3 を言い、ここで：

i) Kabatによる番号 44 ~ 47 の位置のアミノ酸残基が G L E W (または以下に規定するような G L E W 様配列) を形成し、および 108 の位置のアミノ酸残基が Q であり；
そして：

i i) C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0245】

他の好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは構造

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

を有しても良く、

F R 1 から F R 4 は、それぞれフレームワーク領域 1 から 4 を言い、C D R 1 から C D R 3 は、それぞれ相補体決定領域 1 から 3 を言い、ここで：

i) Kabatによる番号 43 ~ 46 の位置のアミノ酸残基が K E R E 配列または K Q R E (または K E R E 様配列) を形成し、および 108 に位置のアミノ酸残基が Q または L であり、好ましくは Q であり；

そして：

i i) C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0246】

Kabatによる番号 43 ~ 46 の位置のアミノ酸残基が K E R E 配列または K Q R E を形成する、本発明のナノボディでは、37 の位置のアミノ酸残基は F であるのが最も好ましい。Kabatによる番号 44 - 47 の位置のアミノ酸残基が配列 G L E W を形成する、本発明のナノボディでは、37 の位置のアミノ酸残基は Y、H、I、V または F からなる群から選択され、および F であるのが最も好ましい。

【 0 2 4 7 】

従って、本明細書ではいかなる制限も無いのであるが、上記の位置に存在するアミノ酸残基に基づいて、本発明のナノボディは、一般的に次の三つの群に基づいて分類することができる：

a) 「GLEW群」：Kabatによる番号44～47の位置にアミノ酸配列GLEWおよびKabatによる番号108の位置にQを有するナノボディ。更に本明細書で説明するように、この群のナノボディは通常Vを37の位置に有し、および103の位置にW、P、RまたはSを有することができ、好ましくは103の位置にWを有する。更にGLEW群はまた下の表2に言及されたようなGLEW様配列のいくつかを含む；

b) 「KERE群」：Kabatによる番号43～46の位置にアミノ酸配列KERE配列またはKQREを有しおよびKabatによる番号108の位置にQまたはLを有するナノボディ。更に本明細書で説明するように、この群のナノボディは通常Fを37の位置に有し、LまたはFを47の位置に；および103の位置にW、P、RまたはSを有することができ、好ましくは103の位置にWを有する。

c) 「103P、R、S群」：103の位置にP、RまたはSを有するナノボディ。これらのナノボディは、Kabatによる番号44～47の位置にアミノ酸配列GLEWもしくはKabatによる番号43 - 46の位置にアミノ酸配列KEREまたはKQREを有することができ、後者は最も好ましくは、37の位置のFおよび47の位置のLまたはFとの組み合わせであり（KERE群についての規定のように）；ならびにKabatによる番号108の位置にQまたはLを有することができ、および好ましくはQを有する。

【 0 2 4 8 】

従って、他の好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、GLEW群（本明細書に規定）に属するナノボディであっても良く、およびCDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【 0 2 4 9 】

他の好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、KERE群（本明細書に規定）に属するナノボディであっても良く、およびCDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【 0 2 5 0 】

従って、他の好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、103P、R、S群（本明細書に規定）に属するナノボディであっても良く、およびCDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【 0 2 5 1 】

更に、より一般的に上記の108Q、43E/44Rおよび103P、R、S残基に加えて、本発明のナノボディは、通常のVHドメインではVH/VLインターフェースの一部を形成する一つ以上の位置に、同じ位置に天然に存在するVHまたはVHHに対応するアミノ酸残基よりは、大きな荷電を有する一つ以上のアミノ酸残基を含むことができ、および特に、一つ以上の荷電したアミノ酸残基（表1に載っている）を含むことができる。

【 0 2 5 2 】

そのような置換としては、下の表2に載っているGLEW様配列；および国際公開第00/29004号に記載のいわゆる「微小体」に関する例えば108の位置のQおよび44～47の位置のKLEWが挙げられるが、限定されない。

【 0 2 5 3 】

本発明のナノボディのある実施態様では、83の位置のアミノ酸残基は、L、M、S、VおよびWからなる群から選択され；そして好ましくはLである。

【0254】

また、本発明のナノボディのある実施態様では、83の位置のアミノ酸残基は、R、K、N、E、IおよびQからなる群から選択され；そして最も好ましくはKまたはE（天然に存在するV_{HH}ドメインに対応するナノボディに関して）でありまたはR（以下に説明するヒト化ナノボディに関して）である。いくつかの実施態様では84の位置におけるアミノ酸残基は、P、A、R、S、DおよびVからなる群から選択され、そして最も好ましくはP（天然に存在するV_{HH}ドメインに対応するナノボディに関して）でありまたはR（以下に説明するヒト化ナノボディに関して）である。

【0255】

さらに、104の位置のアミノ酸残基は、GおよびDからなる群から選択され；最も好ましくはGである。

【0256】

総合的に、11、37、44、45、47、83、84、103、104および108のアミノ酸残基は、上記のナノボディに存在するのであるが、本明細書において「特徴残基」と呼ばれる。特徴残基および最も密接に関係しているヒトV_Hドメイン、V_H3、について、表2に要約する。

【0257】

天然に存在するV_{HH}ドメインに存在する、これらの特徴残基の特に好ましい組み合わせのいくつかを表3に載せる。比較のために、DP47と呼ばれるヒトV_H3の対応するアミノ酸残基を斜体で示した。

【0258】

【表2】

表2：ナノボディにおける特徴残基

位置	ヒトV _H 3	特徴残基
11	L, V; 主としてL	L, M, S, V, W; 好ましくはL
37	V, I, F; 通常V	F ⁽¹⁾ , Y, H, I or V; 好ましくはF ⁽¹⁾ or Y
44 ⁽⁸⁾	G	G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , D, Q, R, S, L; 好ましくはG ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ or Q; 最も好ましくはG ⁽²⁾ or E ⁽³⁾ .
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , C, I, L, P, Q, V; 好ましくはL ⁽²⁾ or R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W, Y	W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ or F ⁽¹⁾ , A, G, I, M, R, S or Y; 好ましくはW ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ , F ⁽¹⁾ or R
83	R or K; 通常R	R, K ⁽³⁾ , N, E ⁽³⁾ , I, M or Q; 好ましくはK or R; 最も好ましくはK
84	A, T, D; 主としてA	P ⁽³⁾ , A, L, R, S, D, V; 好ましくはP
103	W	W ⁽⁴⁾ , P ⁽⁶⁾ , R ⁽⁶⁾ , S; 好ましくはW
104	G	G or D; 好ましくはG
108	L, M or T; 主としてL	Q, L ⁽⁷⁾ or R; 好ましくはQ or L ⁽⁷⁾

注：

(1)：特に、しかしそれだけではなく、43～46の位置にKERE（配列番号：437）またはKQRE（配列番号：438）と組み合わせて。

(2)：通常44～47の位置にGLEW（配列番号：439）として。

(3)：通常43～46の位置にKEREまたはKQREとして、例えば43～47の位置に、KEREL（配列番号：440）、KEREF（配列番号：441）、KQREL（配列番号：442）、KQREF（配列番号：443）またはKEREG（配列番号：444）として。代わりに、TERE（配列番号：445）（例えばTEREL（配列番号：446））、KECE（配列番号：447）（例えばKECEL（配列番号：448））またはKECER（配列番号：449）、RERE（配列番号：450）（例えばR

10

20

30

40

50

EREG (配列番号：451))、QERE (配列番号：452) (例えばQEREG (配列番号：453))、KGRE (配列番号：454) (例えばKGREG (配列番号：455))、KDRE (配列番号：456) (例えばKDREV (配列番号：457)) は、可能である。他のいくつかの、可能ではあるが、好ましくない配列としては、DECL (配列番号：458) およびNVCEL (配列番号：459) が挙げられる。

(4)：44～47の位置にGLEWおよび43～46の位置にKEREまたはKQREの両方を有する。

(5)：天然に存在するV_{HH}ドメインの83～84の位置に、しばしばKPまたはEPとして。

(6)：特に、しかしそれだけではなく、44～47の位置にGLEWと組み合わせて。

(7)：44-47の位置がGLEWであるという条件で、108の位置は常にQである。

(8)：GLEW群は、また44～47の位置に、例えばGVEW (配列番号：460)、EPEW (配列番号：461)、GLER (配列番号：462)、DQEW (配列番号：463)、DLEW (配列番号：464)、GIEW (配列番号：465)、ELEW (配列番号：466)、GPEW (配列番号：467)、EWLP (配列番号：468)、GPER (配列番号：469)、GLER (配列番号：470) およびELEWのようなGLEW様配列をも含む。

【0259】

【表3】

表3：天然に存在するナノボディにおける特徴残基のいくつかの好ましい組み合わせこれらの組み合わせのヒト化については、本明細書を参照のこと

	11	37	44	45	47	83	84	103	104	108
DP-47(ヒト)	M	V	G	L	W	R	A	W	G	L
"KERE"群	L	F	E	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	E	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
	L	Y	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	L	R	V	K	P	Q	G	Q
	L	F	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
"GLEW"群	L	V	G	L	W	K	S	W	G	Q
	M	V	G	L	W	K	P	R	G	Q

【0260】

ナノボディにおいては、特徴残基以外のいかなる他の位置のアミノ酸残基のそれぞれも

、天然に存在するV_HHドメインの対応する位置（Kabatの番号付けに従って）に天然に存在するいかなるアミノ酸残基であることができる。

【0261】

そのようなアミノ酸残基は当業者には明らかであろう。表4～7に、天然に存在するV_HHドメインのFR1、FR2、FR3およびFR4のそれぞれの位置（Kabatの番号付けに従って）に存在することが可能ないくつかの非限定的な残基を載せる。それぞれの位置について、天然に存在するV_HHドメインのそれぞれの位置で最も高頻度で存在するアミノ酸残基（そしてそれはナノボディにおける前記位置について最も好ましいアミノ酸残基である）を、太字で示す；そしてそれぞれの位置について、他の好ましいアミノ酸残基には下線を施してある（注：天然に存在するV_HHドメインの26～30の位置に見出されるアミノ酸残基の数は、これらの位置の残基はすでにCDR1の一部を形成していると言うChothiaの番号付け（既出）の基になる仮説を支持する。

10

【0262】

表4～7には、ヒトV_H3ドメインの各位置に存在できる、非限定的な残基のいくつかをも載せる。また各位置について、天然に存在するヒトV_H3ドメインの各位置で最も高頻度で存在するアミノ酸残基を、太字で示す；そしてそれぞれの位置について、他の好ましいアミノ酸残基には下線を施してある。

【0263】

【表4】

表4：FR1におけるアミノ酸残基の非限定的な例（脚注は表2の脚注を参照）

20

位置	アミノ酸残基：	
	ヒトV _H 3	ラクダ科V _{HH} 's
1	E, Q	Q, A, E, D, H, R
2	V	V, A, E, G, L, M, Q
3	Q	Q, K, E, H, P, R, Y
4	L	L, F, P, R, V
5	V, L	Q, E, L, V, M, P, A, I
6	E	E, D, Q, A, H
7	S, T	S, F, H
8	G, R	G, A, R
9	G	G, E
10	G, V	G, D, R, A, E, N, T, V
11	特徴残基: L, M, S, V, W, F, N, P, T, Y; 好ましくはL	
12	V, I	V, A, G, M
13	Q, K, R	Q, E, K, D, G, A, H, L, N, P, R, T
14	P	A, Q, A, G, P, T, V, E, F, I, N, S
15	G	G
16	G, R	G, A, E, D, N, P, R, S, V, W
17	S	S, F, T, N, P, A, C
18	L	L, V, M, Q, R
19	R, K	R, K, L, N, S, T, A, F, G, I, M, Q
20	L	L, F, I, V, M, S
21	S	S, F, T, G, H, P, A
22	C	C
23	A, T	A, D, P, S, T, V, E, G, I, L, Q, R
24	A	A, I, S, T, V, C, E, F, G, L, N, P, Q, Y

30

40

【0264】

【表5】

表5：FR2におけるアミノ酸残基の非限定的な例（脚注は表2の脚注を参照）

位置	アミノ酸残基：	
	ヒトV _H 3	ラクダ科V _{HH} 's
36	W	W
37	特徴残基：F ⁽¹⁾ , Y, H, I, A, L, P, S or V 好ましくはF ⁽¹⁾ 又はY	
38	R	R
39	Q	Q, H, P, R, A, D, G, L, E
40	A	A, F, G, P, T, V, I, L, N, R, S, Y
41	P, S, T	P, A, L, S, I, Q, T
42	G	G, E, D, R, T, V
43	K	K, D, E, N, Q, R, T, V, A, L, M, S
44	特徴残基：G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ , D, Q, R, S, L, A, F, K, M, N, P, V, W, Y; preferably G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ 又はQ; most preferably G ⁽²⁾ 又はE ⁽³⁾ .	
45	特徴残基：L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , C, I, L, P, Q, V, D, E, G, H, K, T; 好ましくはL ⁽²⁾ 又はR ⁽³⁾	
46	E, V	E, D, K, Q, V, A, G, N
47	特徴残基：W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ or F ⁽¹⁾ , A, G, I, M, R, S, D, E, H, K, Q, T, V又はY; 好ましくはW ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ , F ⁽¹⁾ or R	
48	V	V, I, L, A, C, E, F, G, H, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
49	S, <u>A</u> , <u>G</u>	A, <u>S</u> , A, G, T, V, D, E, I, L, Q, R, Y

10

20

【0265】

【表6-1】

表6：FR3におけるアミノ酸残基の非限定的な例（脚注は表2の脚注を参照）

位置	アミノ酸残基：	
	ヒトV _H 3	ラクダ科V _{HH} 's
66	R	R
67	F	F, L, V, A, D, I, S, Y
68	T	T, A, S, D, F, G, I, K, N
69	I	I, M, V, A, F, L, R, S, T
70	S	S, A, F, E, G, K, P, T, V
71	R	R, G, I, K, Q, S, T, W, A, F, L, M, N
72	D, E	D, E, G, N, V, A, H, I, L, Q, S, T
73	N, <u>D</u> , G	N, D, F, I, K, S, T, Y, A, G, H, L, M, R, V
74	A, S	A, D, G, N, P, S, T, F, H, I, L, R, V, Y
75	K	K, A, E, K, L, N, Q, R, D, G, I, M, S, T, V, W
76	N, S	N, D, K, R, S, T, Y, E, G, H, I, Q
77	<u>S</u> , <u>T</u> , I	T, A, E, I, M, S, K, L, N, R, V
78	L, A	V, <u>L</u> , A, F, G, I, M, E, N, Q, R, S, T, W
79	Y, H	Y, A, D, F, H, S, T, C, E, I, L, N, V, W

30

40

【表 6 - 2】

80	L	L, F, V, M
81	Q	Q, E, R, T, G, H, I, K, L, M, N
82	M	M, I, L, V, G, P, T
82a	N, G	N, D, G, H, S, T, A, E, I, K, R, V
82b	S	S, N, D, G, R, A, C, E, F, I, K, M, P, T, V
82c	L	L, P, M, T, V
83	特徴残基: R, K ⁽⁹⁾ , N, E ⁽⁹⁾ , I, M, A, D, G, L, Q, S, T or Q; 好ましくは K or R; 最も好ましくは K	
84	特徴残基: P ⁽⁹⁾ , A, L, R, S, D, V, F, G, H, N, T, Y; 好ましくは P	
85	E, G	E, D, G, Q, A, N, R, V, Y
86	D	D, E, F, Y
87	T, M	T, S, A, C, M

10

【 0 2 6 6 】

【表 6 - 3】

位置	アミノ酸残基:	
	ヒト V _{H3}	ラクダ科 V _{HH3}
88	A	A, G, S, D, L, N, P
89	V, L	V, A, D, I, L, M, N, R, T, E, F, S
90	Y	Y, F, E, H, N
91	Y, H	Y, D, F, H, L, S, T, V, C, I, N, R, W
92	C	C
93	A, K, T	A, N, G, H, K, R, S, T, V, Y, E, F, I, L, M, Q
94	K, R, T	A, V, C, F, G, I, L, R, S, D, E, K, M, N, P, Q, T, W, Y T or K;

20

【 0 2 6 7 】

【表 7】

表 7: FR 4 におけるアミノ酸残基の非限定的な例 (脚注は表 2 の脚注を参照)

位置	アミノ酸残基:	
	ヒト V _{H3}	ラクダ科 V _{HH3}
103	特徴残基: W ⁽⁹⁾ , P ⁽⁹⁾ , R ⁽⁹⁾ , S, F, G, K, L, N, Q, V, Y; 好ましくは W	
104	G, A, R, S, T or D; 好ましくは G	
105	Q, R	Q, E, K, P, R, G, H, L, S, V
106	G	G
107	T	T, A, I, N, P
108	特徴残基: Q, L ⁽⁹⁾ , E, H, N, P, T or R; 好ましくは Q 又は L ⁽⁹⁾	
109	V	V
110	T	T, I, A
111	V	V, A, I, G
112	S	S, F, A, L, P, T, Y
113	S	S, A, L, P, F, T

40

【 0 2 6 8 】

従って、別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4

50

を有しても良く、

FR 1 から FR 4 は、それぞれフレームワーク領域 1 から 4 を言い、CDR 1 から CDR 3 は、それぞれ相補体決定領域 1 から 3 を言い、ここで：

i) 特徴残基は上に規定されたとおりであり、

そして

ii) CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

10

【0269】

別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4

を有しても良く、

FR 1 から FR 4 は、それぞれフレームワーク領域 1 から 4 を言い、CDR 1 から CDR 3 は、それぞれ相補体決定領域 1 から 3 を言い、ここで：

i) FR 1 は、アミノ酸配列：

20

[1] Q V Q L Q E S G G G X V Q A G G S L R L S C A A S G [2 6]

[配列番号 : 1]

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、更により好ましくは 99% の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

そのアミノ酸配列において、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、
保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表 4 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

30

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸
の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2 またはただ 1 つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定したような)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

そのアミノ酸配列において、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、
保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表 4 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

40

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸
の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

そして

【0270】

ii) FR 2 は、アミノ酸配列：

[3 6] W X R Q A P G K X X E X V A [4 9]

[配列番号 : 2]

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ま

50

しくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

そのアミノ酸配列において、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表5で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定したような）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

10

そのアミノ酸配列において、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表5で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

そして

【0271】

iii) FR3は、アミノ酸配列：

20

[66] R F T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L X X E D T A V Y Y C A A [94]
[配列番号：3]

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

そのアミノ酸配列において、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表6で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

30

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定したような）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

そのアミノ酸配列において、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表6で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

40

そして

【0272】

iv) FR4は、アミノ酸配列：

[103] X X Q G T X V T V S S [113] [配列番号：4]

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

50

そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定したような）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

10

そして

【0273】

v) CDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましく；

ここで、特徴残基は「X」によって示され、上に規定されたとおりであって、括弧内の数字はKabat番号によるアミノ酸残基の位置を言う。

20

【0274】

別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

を有しても良く、

FR1からFR4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、CDR1からCDR3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで：

30

【0275】

i) FR1は、アミノ酸配列：

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG[26]

[配列番号：5]

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

40

そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表4で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
- (3) 特徴残基の位置は上の配列に示したとおりであり；

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

そのアミノ酸配列において、

50

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、
保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表4で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸
の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
- (3) 特徴残基の位置は上の配列に示したとおりであり；

そして

【0276】

i i) FR2は、アミノ酸配列：

[36] W <u>F</u> RQA P G K <u>E R E L</u> V A [49]	[配列番号：6]
[36] W <u>F</u> RQA P G K <u>E R E F</u> V A [49]	[配列番号：7]
[36] W <u>F</u> RQA P G K <u>E R E G</u> A [49]	[配列番号：8]
[36] W <u>F</u> RQA P G K <u>Q R E L</u> V A [49]	[配列番号：9]
[36] W <u>F</u> RQA P G K <u>Q R E F</u> V A [49]	[配列番号：10]
[36] W <u>Y</u> RQA P G K <u>G L E W</u> A [49]	[配列番号：11]

10

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ま
しくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書
で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

20

そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、
保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表5で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸
の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
- (3) 特徴残基の位置37、44、45および47は上の配列に示したとおりであり

；

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違
」（明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

30

そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、
保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表5で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸
の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
- (3) 特徴残基の位置、37、44、45および47は上のそれぞれの配列に示した
とおりであり；

とおりであり；

そして

【0277】

i i i) FR3は、アミノ酸配列：

[66] R F T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L <u>K P E</u> D T A V Y Y C A A [94]	[配列番号：12]
--	-----------

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ま
しくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書
で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、

50

保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表6で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
(3) 特徴残基の位置83および84は上の配列に示したとおりであり；
および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定したような）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、そのアミノ酸配列において、

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表6で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

10

- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

- (3) 特徴残基の位置83および84は上の配列に示したとおりであり；

そして

【0278】

iv) FR4は、アミノ酸配列：

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[配列番号：13]

[103] WGQGTLVTVSS [113]

[配列番号：14]

20

からなる群から選択され、

または上記のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；そのアミノ酸配列は

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および

30

- (3) 特徴残基の位置103、104および108は上の配列に示したとおりであり

；

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

- (3) 特徴残基の位置103、104および108は上の配列に示したとおりであり

40

；

そして

【0279】

v) CDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0280】

別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

50

を有しても良く、

FR 1 から FR 4 は、それぞれフレームワーク領域 1 から 4 を言い、CDR 1 から CDR 3 は、それぞれ相補体決定領域 1 から 3 を言い、ここで：

【 0 2 8 1 】

i) FR 1 は、アミノ酸配列：

[1] Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G [2 6]

[配列番号 : 5]

10

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表 4 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
- (3) 特徴残基の位置は上の配列に示したとおりであり；

20

そして

【 0 2 8 2 】

i i) FR 2 は、アミノ酸配列：

[3 6] W F R Q A P G K E R E L V A [4 9]

[配列番号 : 6]

[3 6] W F R Q A P G K E R E F V A [4 9]

[配列番号 : 7]

[3 6] W F R Q A P G K E R E G A [4 9]

[配列番号 : 8]

[3 6] W F R Q A P G K Q R E L V A [4 9]

[配列番号 : 9]

[3 6] W F R Q A P G K Q R E F V A [4 9]

[配列番号 : 1 0]

30

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表 5 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
- (3) 特徴残基の位置 3 7、4 4、4 5 および 4 7 は上の配列に示したとおりであり；

40

そして

【 0 2 8 3 】

i i i) FR 3 は、アミノ酸配列：

[6 6] R F T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A [9 4]

[配列番号 : 1 2]

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、

50

保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または
表 6 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
(3) 特徴残基の位置 83 および 84 は上の配列に示したとおりであり；

そして

【0284】

i v) FR 4 は、アミノ酸配列：

[103] WGQGTQVTVSS [113]

[配列番号：13]

10

[103] WGQGTLVTVSS [113]

[配列番号：14]

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表 7 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
(3) 特徴残基の位置 103、104 および 108 は上の配列に示したとおりであり

20

；

そして

【0285】

v) CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0286】

別の、好ましいが非限定的な態様では、本発明のナノボディは、構造

30

FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4

を有しても良く、

FR 1 から FR 4 は、それぞれフレームワーク領域 1 から 4 を言い、CDR 1 から CDR 3 は、それぞれ相補体決定領域 1 から 3 を言い、ここで：

【0287】

i) FR 1 は、アミノ酸配列：

[1] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG [26]

[配列番号：5]

40

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表 4 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
(2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および

50

(3) 特徴残基の位置は上の配列に示したとおりであり；
そして

【0288】

ii) FR2は、アミノ酸配列：

[36] WYRQAPGKGLEWA [49]

[配列番号：11]

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

10

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表5で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
- (3) 特徴残基の位置37、44、45および47は上の配列に示したとおりであり；

そして

【0289】

iii) FR3は、アミノ酸配列：

20

[66] RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA [94]

[配列番号：12]

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表6で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
- (3) 特徴残基の位置83および84は上の配列に示したとおりであり；

30

そして

【0290】

iv) FR4は、アミノ酸配列：

[103] WGQGTVTVSS [113]

[配列番号：13]

からなる群から選択され、

および/または上記のアミノ酸配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、その配列は：

40

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
- (3) 特徴残基の位置103、104および108は上の配列に示したとおりであり；

；

そして

【0291】

50

v) CDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0292】

本発明のナノボディに存在することができるいくつかの他の配列は、上記の欧州特許欧州特許第656946号に見出すことができる（例えば許可された対応する米国特許第5,759,808号を参照）。

【0293】

別の、好ましいが非限定的な別の態様では、本発明のナノボディは、構造

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

を有しても良く、

FR1からFR4は、それぞれフレームワーク領域1から4を言い、CDR1からCDR3は、それぞれ相補体決定領域1から3を言い、ここで：

【0294】

i) FR1は、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のナノボディ、特に配列番号76から86または配列番号95から99のヒト化ナノボディに存在するFR1からなる群、または前記FR1配列の一つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され：その配列では

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表4で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、FR1配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および
- (3) 特徴残基の位置は前記FR1配列に示したとおりであり；および/または前記FR1配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され：その配列では

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表4で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、上記のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
- (3) 特徴残基の位置は前記FR1配列に示したとおりであり；

そして

【0295】

ii) FR2は、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のナノボディ、特に配列番号76から86または配列番号95から99のヒト化ナノボディに存在するFR2からなる群、または前記FR2配列の一つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更により好ましくは少なくとも99%の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；その配列では

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換（本明細書で規定）および/または表5で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、FR2配列と比較して、アミノ酸

10

20

30

40

50

の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および

(3) 特徴残基の位置 37、44、45 および 47 は F R 2 配列に示したとおりであり；

および/または前記 F R 2 配列の一つと、3、2 またはただ 1 つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

そのアミノ酸配列では、

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表 5 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、F R 2 配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

(3) 特徴残基の位置 37、44、45 および 47 は F R 2 配列に示したとおりであり；

そして

【0296】

i i i) F R 3 は、配列番号：52 から 60、配列番号 76 から 86 または配列番号 95 から 99 のナノボディ、特に配列番号 76 から 86 または配列番号 95 から 99 のヒト化ナノボディに存在する F R 3 からなる群、または前記 F R 3 配列の一つと少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、更により好ましくは少なくとも 99% の配列同一性(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；その配列では

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表 6 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、F R 3 配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および

(3) 特徴残基の位置 83 および 84 は F R 3 配列に示したとおりであり；

および/または前記 F R 3 配列の一つと、3、2 またはただ 1 つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

そのアミノ酸配列では：

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表 6 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、F R 3 配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；

(3) 特徴残基の位置 83 および 84 は F R 3 配列に示したとおりであり；

そして

【0297】

i v) F R 4 は、配列番号：52 から 60、配列番号 76 から 86 または配列番号 95 から 99 のナノボディ、特に配列番号 76 から 86 または配列番号 95 から 99 のヒト化ナノボディに存在する F R 4 からなる群、または前記 F R 4 配列の一つと少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95%、更により好ましくは少なくとも 99% の配列同一性(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；その配列では

(1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表 7 で規定されたアミノ酸置換であり；および/または

(2) アミノ酸配列は、好ましくは、F R 4 配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；および

(3) 特徴残基の位置 103、104 および 108 は F R 4 配列に示したとおりであり

10

20

30

40

50

り；

および/または前記FR3配列の一つと、3、2またはただ1つの「アミノ酸の相違」(本明細書で規定したような)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、そのアミノ酸配列では：

- (1) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (2) アミノ酸配列は、好ましくは、FR4配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まず；
- (3) 特徴残基の位置103、104および108はFR4配列に示したとおりであり；

10

り；

そして

【0298】

v) CDR1、CDR2およびCDR3は、上に規定したとおりであり、好ましくは、上の好ましい規定の一つに従って規定され、更に好ましくは上の更に好ましい規定の一つに従って規定されることがより好ましい。

【0299】

本発明のいくつかの特に好ましいナノボディは、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のアミノ酸配列からなる、特に配列番号76から86または配列番号95から99のヒト化ナノボディからなる群、または配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のアミノ酸配列の一つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更に好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；その配列では

20

- (1) 特徴残基は、上記の表2に示すことができ；
- (2) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表4~7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (3) アミノ酸配列は、好ましくは、上記アミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まない。

30

【0300】

本発明のいくつかのさらに特に好ましいナノボディは、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のアミノ酸配列からなる、特に配列番号76から86または配列番号95から99のヒト化ナノボディからなる群、または配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のアミノ酸配列の一つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、更に好ましくは少なくとも99%の配列同一性(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；その配列では

- (1) 特徴残基は、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99から選択される、妥当な配列で示されるような配列であり；
- (2) 特徴位置以外のいずれかの位置でのいかなるアミノ酸置換も、好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定)および/または表4~7で規定されたアミノ酸置換であり；および/または
- (3) アミノ酸配列は、好ましくは、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99から選択される、妥当な配列と比較して、アミノ酸の置換のみを含み、欠失または挿入を含まない。

40

【0301】

本発明のいくつかの最も好ましいナノボディは、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99のアミノ酸配列からなる、特に配列番号76から86または配列番号95から99のヒト化ナノボディからなる群から選択される。

50

【0302】

上述から明らかであるように、本明細書で用いる本発明のナノボディと言う用語は、その最も広い意味で、配列番号：52から60、配列番号76から86または配列番号95から99に記載したナノボディの、天然または合成突然変異体、変種、対立遺伝子、アナログおよび相同分子種（以後集合的に「アナログ」と呼ぶ）をも含む。

【0303】

一般的に、そのようなアナログとしては、例えば、ナノボディの相同配列（以下にさらに規定するような）、機能的部分または相同配列の機能的部分が挙げられる。一般的に、そのようなアナログでは、各フレ-ムワ-ク領域におけるそれぞれのアミノ酸残基（特徴残基を除いて）は、フレ-ムワ-ク領域の配列同一性の総合的な程度が上に規定したよう

10

に保存されている限り、他のいかなるアミノ酸残基と置換することができる。しかしながら、好ましくは、そのようなアナログにおいては：

- 上記のフレ-ムワ-ク配列における一つ以上のアミノ酸残基は、天然に存在する V_H ドメインにおけると同じ位置に天然に存在する、一つ以上のアミノ酸残基と置換される。そのような置換の例は上の表4~7に記載されている；

および/または

- 上記のフレ-ムワ-ク配列における一つ以上のアミノ酸残基は、上に記述された保存的アミノ酸置換と考えられる一つ以上のアミノ酸残基によって置換され；

および/または

- 上記のフレ-ムワ-ク配列における一つ以上のアミノ酸残基は、ヒトの天然に存在する V_H ドメインにおけると同じ位置に天然に存在する、一つ以上のアミノ酸残基と置換される。これは一般的に天然に存在する V_{HH} /ナノボディー一般の、および特に前記位置の「ヒト化」と言われ、以下により詳細に考察する；

20

そして：

- 上の表4~7では V_H ドメインおよび V_{HH} ドメインの両方に関して、一つのアミノ酸残基のみが言及されている位置は、好ましくは置換されない。

【0304】

さらに、一般的にはあまり好まれないが、フレ-ムワ-ク領域の総合的な配列同一性が、上に規定したように保持されているならば、そのようなアナログにおいては、フレ-ムワ-ク領域から一つ以上のアミノ酸残基を欠失させても良く、および/またはフレ-ムワ-ク領域に挿入してもよい（場合によっては上述の一つ以上のアミノ酸置換に加えて）。特徴残基は欠失させてはならない。また、最も好ましくは、上の表4~7においては V_H ドメインおよび V_{HH} ドメインの両方に関して、一つのアミノ酸残基のみが言及されているアミノ酸残基は、欠失させないことが好ましい。

30

【0305】

好ましくは、そのようなアナログは、TNF-アルファに対して、未だ結合可能であり、アフィニティを有し、および特異性を有する、すなわち適切なアッセイ、例えばTNFに対するアナログの結合を測定するアッセイ法および特に以下の実施例で用いたアッセイ法により測定した時、配列番号52から60、配列番号76から86または配列番号95から99の配列のナノボディの少なくとも一つの、アフィニティおよび/または特異性の、少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%以上のような、少なくとも80%を有する。

40

【0306】

一般的に、そのようなアナログは、例えば、天然に存在する V_{HH} ドメインをコードする核酸を提供し、一つ以上のヒト化されるべきアミノ酸残基に対するコドン、対応するヒトアミノ酸残基のコドンに変化させ、得られた核酸/ヌクレオチド配列を適切な宿主または発現システムで発現させ；および場合によっては得られたアナログを分離および/または精製し、前記アナログを本質的に分離した形態で（上に規定）提供する。これは、一般的に当業者には明らかな、例えば、本明細書で引用したハンドブックおよび参考文献お

50

よび/または以下の更なる説明からの、それ自体知られた方法および技術を用いて行うことができる。代わりに、例えば、アナログをコードする核酸は、それ自体知られた様式で合成することができ(例えば、先に規定したアミノ酸配列を有する核酸配列を合成するための自動装置を用いて)、適切な宿主または発現系で発現させることができる。その後、場合によっては得られたアナログを分離および/または精製して前記アナログを本質的に分離した形態で(上に規定)提供することができる。アナログを提供する他の方法は、以下に述べるようなそれ自他知られている、ペプチド合成技術を用いて、関連したアミノ酸配列を化学合成する方法が関与している。

【0307】

DP-47、DP-51、DP-54またはDP-29のような、例えばヒトV_H3配列のようなヒトV_H配列から出発して、上述のように(a)108の位置にQ;および/または(b)44の位置にEおよび/または45の位置にR、および好ましくは44の位置にEおよび45の位置にR;および/または(c)103の位置にP、RまたはS、を有するアミノ酸配列を提供するように、前記ヒトV_Hドメインのアミノ酸配列における一つ以上のアミノ酸残基を変化させることにより、ナノボディ(そのアナログを含めて)が提供できることは、一般的に当業者にはまた明らかであろう。また、前節に記載した種々の方法および技術を用いて、ヒトV_Hドメインに関するアミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列を出発点として用いて、これを行うことができる。

【0308】

本明細書においてその最も広い意味で用いられるナノボディと言う用語は、上に規定するような本発明のナノボディ(アナログを含めて)の一部または断片をも包含するが、それらについては以下にさらに説明する。

【0309】

一般的に、ナノボディおよび/またはアナログの部分または断片は、対応する全長ナノボディまたはアナログのアミノ酸配列と比較して、N-末端におけるアミノ酸残基の一つ以上、C-末端におけるアミノ酸残基の一つ以上、連続する内部アミノ酸残基の一つ以上、またはそれらのいずれかの組み合わせが欠失し、および/または除去されているアミノ酸配列を有する。そのような部分または断片の一つ以上を組み合わせると、本発明のナノボディを提供することもまた可能である。

【0310】

好ましくは、全長ナノボディおよび/またはアナログの一つ以上の部分または断片を含むナノボディのアミノ酸配列は、対応する全長ナノボディのアミノ酸配列との、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%のような、少なくとも70%の配列同一性の程度を有するべきである。

【0311】

さらに、全長ナノボディおよび/またはアナログの一つ以上の部分または断片を含むナノボディのアミノ酸配列は、対応する全長ナノボディのアミノ酸配列の少なくとも10の連続するアミノ酸残基、好ましくは少なくとも20の連続したアミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも40の連続したアミノ酸残基のような、少なくとも30の連続したアミノ酸残基を含むことが好ましい。

【0312】

一般的に、本発明のナノボディの部分または断片は、本発明の対応する全長ナノボディのアミノ酸配列と比較して、N-末端におけるアミノ酸残基の一つ以上、C-末端におけるアミノ酸残基の一つ以上、連続する内部アミノ酸残基の一つ以上、またはそれらのいずれかの組み合わせが欠失し、および/または除去されているアミノ酸配列を有する。そのような部分または断片の一つ以上を組み合わせると、本発明のナノボディを提供することもまた可能である。

【0313】

一つの好ましい実施態様に従えば、本明細書で用いられる断片は、本発明の全長ナノ

10

20

30

40

50

ディに存在するCDRの少なくとも一つ、好ましくは本発明の全長ナノボディに存在するCDRの少なくとも二つ、より好ましくは例えば、本発明の全長ナノボディに存在する全三つのCDRのように、本発明の全長ナノボディに存在するCDRの少なくとも二つを含む。

【0314】

別の、特に好ましいが、非限定的な実施態様に従えば、そのような部分または断片は、本発明の対応する全長ナノボディの少なくともFR3、CDR3およびFR4を含む、すなわち例えば、国際公開第03/050531号(Lasterら)に記載されたようなもの。

【0315】

好ましくは、そのような部分または断片は、TNF-アルファに対して、未だ結合可能であり、アフィニティーを有し、および特異性を有する、すなわち適切なアッセイ、例えばTNFに対するアナログの結合を測定するアッセイ法および特に以下の実施例では用いられたアッセイ法により測定した時、本発明の対応する全長のナノボディの、アフィニティーおよび/または特異性の、少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%以上のような、少なくとも80%を有する。

【0316】

以上の記述から、本明細書で用いるナノボディのアミノ酸配列は、ヒトの抗体の天然に存在するV_Hドメインのアミノ酸配列のような、天然に存在するV_Hドメインのアミノ酸配列のフレ-ムワ-ク領域の、少なくとも一つにおける、少なくとも一つのアミノ酸位置が異なっていることは明らかであろう。特に、本明細書で用いられたナノボディのアミノ酸配列は、ラクダ科動物および/またはヒトの抗体の天然に存在するV_Hドメインのアミノ酸配列のような、天然に存在するV_Hドメインのアミノ酸配列の特徴残基の、少なくとも一つにおける、少なくとも一つのアミノ酸位置が異なっていることは明らかであろう。

【0317】

従って、ある特定の実施態様によれば、本発明のナノボディは、天然に存在するV_Hドメインのアミノ酸配列のフレ-ムワ-ク領域の一つにおいて少なくとも一つのアミノ酸位置が異なっているアミノ酸配列を有する。本発明のより具体的であるが、非限定的な実施態様によれば、本発明のナノボディは、天然に存在するV_Hドメインのアミノ酸配列の特定残基の少なくとも一つが異なるアミノ酸配列を有している。

【0318】

上記の記述から、例えば本発明のヒト化ナノボディのような本発明のナノボディのいくつかのアミノ酸配列は、天然に存在するV_HHドメインのアミノ酸配列と、少なくとも一つのアミノ酸位置が異なっていることは、明らかであろう。従って、具体的であるが、非限定的な一実施態様によれば、本発明のナノボディは、天然に存在するV_HHドメインのアミノ酸配列の一つのフレ-ムワ-ク領域の少なくとも一つのアミノ酸位置が異なったアミノ酸配列を有している。より特定された、しかし非限定的な本発明の実施態様によれば、本発明のナノボディは、天然に存在するV_HHドメインのアミノ酸配列の一つの特徴残基の少なくとも一つにおいて異なったアミノ酸配列を有している。

【0319】

本発明はまた、その最も広い意味では、本発明のナノボディの誘導体を含む。そのような誘導体は、一般的に、本発明のナノボディおよび/または本発明のナノボディを形成する一つ以上のアミノ酸残基の修飾、特に化学的および/または生物学的(例えば酵素的)修飾により得ることができる。

【0320】

そのような修飾の例、ならびにそのような様式で(すなわち、タンパクのバックボーン上か、好ましくは側鎖上で)修飾することができるナノボディ配列中のアミノ酸残基の例、そのような修飾を導入するために用いることができる方法および技術、ならびにそのような修飾の利点は、当業者には明らかであろう。

10

20

30

40

50

【 0 3 2 1 】

例えば、そのような修飾は、本発明のナノボディ内または上に一つ以上の官能基、残基または（分子や錯体の）部分を導入（例えば、共有結合または他の適切な様式で）させることに関係しており、特に、本発明のナノボディに、一つ以上の欲する性質や機能を与えるような一つ以上の官能基、残基または（分子や錯体の）部分の導入に参与している。そのような官能基の例は、当業者には明らかである。

【 0 3 2 2 】

例えば、そのような修飾は、本発明のナノボディの半減期、溶解度および/または吸収を増加させる、本発明のナノボディの免疫原性および/または毒性を減少させる、本発明のナノボディの望ましくない、いずれかの副作用を除くまたは弱める、および/または本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドに他の有利な性質を与えおよび/または望ましくない性質を減少させる；またはこれらの二つ以上の組み合わせの性質を与える、官能基の導入（例えば、共有結合または他の適切な様式で）を含んでもよい。そのような官能基およびそれらを導入する技術の例については、当業者には明らかであり、それらは上に引用した一般的な背景技術に記載している全ての官能基および技術ならびに薬剤タンパク、および特に抗体または抗体断片（S c F v および単ドメイン抗体）に関するそれ自体知られた官能基および技術、を包含する。これらに対する参考文献としては、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mack Publishing Co. Easton, PA (1980)が挙げられる。そのような官能基は、例えば本発明のナノボディに直接連結（例えば、共有結合で）しても良く、または場合によっては適切なリンカ - またはスペ - サ - を介しても良く、これもまた当業者には明らかであろう。

【 0 3 2 3 】

薬剤タンパクの半減期を増加させおよび/または免疫原性を減少させる、最も広く用いられる技術の一つは、ポリエチレングリコ - ル（P E G）またはその誘導體（メトキシポリ（エチレングリコ - ル）またはm P E G）のような適切な薬剤として許容できるポリマーの結合を含む。一般的に、例えば、抗体および抗体断片（（単）ドメイン抗体およびS c F vを含むが、これらに限定されない）に関する技術におけるペグ化の使用のような、ペグ化のいかなる適切な型をも用いることができる。例えばChapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); by Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), by Harris とChess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) および 国際公開第 04/060965号を参照されたい。タンパクのペグ化のための種々の試薬は、例えばNektar Therapeutics, USAから市販されている。

【 0 3 2 4 】

好ましくは、部位特異的なペグ化が用いられ、特にシステイン残基を介してのペグ化が用いられる（例えば Yang ら., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003) を参照）。例えばこの目的のために、P E Gを本発明のナノボディに天然に存在するシステイン残基に結合させてもよい、本発明のナノボディを、P E G結合のために一つ以上のシステイン残基を適切に導入するために、修飾してもよい、または本発明のナノボディのN - および/またはC - 末端に、P E G結合のために、一つ以上のシステイン残基を含むアミノ酸配列を融合させてもよい。これらは全て、当業者にはそれ自体知られたタンパク改変技術を用いて行うことができる。

【 0 3 2 5 】

好ましくは本発明のナノボディおよびタンパクに関して、P E Gの分子量が10,000を越えるような、5000を越えるものおよび100,000未満のような200,000未満のを用いる；例えば20,000 ~ 80,000の範囲のものである。

【 0 3 2 6 】

ペグ化に関しては、一般的に本発明は、一つ以上のアミノ酸位置でペグ化された、いかなる本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドを包含することに注意を払うべきであり、好ましくは、前記ペグ化は（1）生体内での半減期を増大させる；（2）免疫原性を減少させる；（3）ペグ化に関してそれ自体知られている一つ以上の有利な性

10

20

30

40

50

質を提供する；(4) TNF - アルファに対するナノボディおよび/またはポリペプチドのアフィニティーに本質的に影響を及ぼさない(下の実施例に記載されているような適切なアッセイによって測定した場合、例えば、前記アフィニティーを90%越えて減少させず、好ましくは50%を越えて減少させず、より好ましくは10%を越えて減少させない)。(5)本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドの他の欲する性質のいずれにも影響をしない。適切なPEG - 基およびそれらを、特異的にまたは非特異的に結合させる方法は、当業者にとって明らかであろう。そのようなペグ化のための適切なキットおよび試薬は、例えば、Nektar (CA, USA)から得ることができる。

【0327】

他の、通常それほど好ましくない修飾としては、N - 連結またO - 連結糖鎖付加が挙げられ、通常本発明のナノボディまたはポリペプチドを発現するために使用される宿主細胞に依存する翻訳に伴うおよび/または翻訳後修飾の一部である。

【0328】

さらに別の修飾は、標識されたナノボディの意図される用途に応じて、一つ以上の検出可能な標識または他の信号を発する基または部分を導入することを含んでもよい。適切な標識および結合、使用および検出の技術は、当業者には明らかであり、例えば、蛍光標識(例えばフルオレセイン、イソチアシアネ - ト、ロ - ダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルデヒドおよびフルオレスカミン、ならびに¹⁵²Euのような蛍光金属またはランタニド系列からの他の金属のような)、リン光標識、化学発光標識または生物発光標識(例えばルミナ - ル、イソルミノ - ル、テロマチック・アクリジニウム・エステル、イミダゾ - ル、アクリジニウム塩、シュウ酸エステル、ジオキセタンまたはGFPおよびそのアナログのような)、放射性同位元素(例えば³H, ¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Feおよび⁷⁵Seのような)、金属、金属錯体または金属陽イオン(例えば、^{99m}Tc, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹I, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Gaおよび⁶⁸Gaのような金属陽イオン)または(¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Crおよび⁵⁶Fe)のような、インビボ、インビトロまたはインシツ(in situ)診断および造影における使用に特に適している金属陽イオン、ならびに発色団および酵素(例えば、リンゴ酸デヒドロゲナ - ゼ、ブドウ球菌ヌクレア - ゼ、デルタVステロイドイソメラ - ゼ、酵母アルコ - ルデヒドロゲナ - ゼ、アルファグリセロリン酸デヒドロゲナ - ゼ、トリオ - スリン酸イソメラ - ゼ、ピオチンアビジンペルオキシダ - ゼ、西洋ワサビペルオキシダ - ゼ、アルカリフォスファタ - ゼ、アスパラギナ - ゼ、グルコ - スオキシダ - ゼ、ガラクトシダ - ゼ、リボヌクレア - ゼ、ウレア - ゼ、カタラ - ゼ、グルコ - スV Iリン酸デヒドロゲナ - ゼ、グルコアミラ - ゼおよびアセチルコリンエステラ - ゼのような)。他の適切な標識は当業者には明らかであろう、そして例えばNMRまたはESR分光分析を用いて検出可能な(分子)部分が挙げられる。

【0329】

そのような標識された本発明のナノボディおよびペプチドは、特定の標識の選択に依存して、例えばインビボ、インビトロまたはインシツ(in situ)アッセイ(ELISA、RIA、EIAおよび他の「サンドイッチアッセイ」等のようなそれ自体知られている免疫アッセイ法を含む)ならびにインビボ診断および造影の目的で、使用されても良い。

【0330】

当業者には明らかであるように、他の修飾は、例えば上述の金属または金属陽イオンをキレート化するために、キレート基の導入に関わってもよい。適切なキレート基としては、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0331】

さらに他の修飾は、ピオチン - (ストレプト)アビジン結合ペアのような、特異的な結合ペアの一部である官能基の導入を含んでもよい。該官能基は、本発明のナノボディを、結合ペアの他の半分に結合している別のタンパク、ポリペプチドまたは化学物質に連結するために、すなわち結合ペアの形成を介して連結するために、用いてもよい。例えば

10

20

30

40

50

本発明のナノボディは、ビオチンと結合してもよいし、アビジンまたはストレプトアビジンと結合させた他のタンパク、ポリペプチド化合物または担体と連結してもよい。例えば、このような結合したナノボディは、検出可能な信号発信剤がアビジンまたはストレプトアビジンと結合している診断システムにおいて、レポ - タ - として用いてもよい。そのような結合ペアは、例えば、本発明のナノボディを、薬剤としての目的に適切な担体を含む担体に結合させるために用いてもよい。非限定的な一例として、CaoおよびSuresh, *Journal of Drug Targetting*, 8, 4, 257 (2000)に記載されたりポソーム製剤が挙げられる。そのような結合ペアは、治療的な活性剤と本発明のナノボディに連結するためにもまた用いてもよい。

【0332】

他の応用に関して、特に、本発明のナノボディがそれに対して指向性を持つ標的を発現する細胞を殺すことを（例えば癌の治療）、またはそのような細胞の増大および/または増殖を減少または遅くすることを意図する応用では、本発明のナノボディはまた毒素、毒性残基または部分と連結してもよい。例えば毒性の化合物を提供するために、本発明のナノボディに連結可能な、毒性部分、化合物または残基の例は、当業者には明らかであろうし、例えば、上述の引用された先行技術および/または本明細書の更なる記述に見出すことができる。一つの例としては、いわゆる A D E P T (商標) 技術、国際公開第 03/055527号が挙げられる。

【0333】

他の潜在的な化学的および酵素的修飾は、当業者には明らかであろう。そのような修飾は、研究目的で導入してもよい(例えば機能 - 活性関係を研究するために)。例えばLundblad およびBradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997)を参照されたい。

【0334】

上述したように、本発明はまた、少なくとも一つのV_HHドメインを含む(すなわち本発明の方法を用いて同定されるような)タンパクまたはポリペプチドまたはそれに基づく少なくとも一つのナノボディにも関する。

【0335】

本発明の、非限定的な一実施態様によれば、本発明のそのようなポリペプチドは、本質的にナノボディから構成されている。「本質的に構成されている」ということは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列が、(上述の)ナノボディのアミノ酸配列とまったく同じであるか、または限られた数のアミノ酸残基、例えば1 - 10アミノ酸残基、好ましくは1、2、3、4、5または6のような1 - 6アミノ酸残基がナノボディのアミノ酸配列のアミノ末端、カルボキシ末端またはアミノ末端とカルボキシ末端の両方に加えられた、ナノボディのアミノ酸配列に対応することを意味する。

【0336】

前記アミノ酸残基はナノボディの(生物学的)性質を変え、変化させ影響を与えるかも知れないし、そうでないかも知れない、またナノボディに更なる機能を加えるかも知れないし、加えないかも知れない。例えばそのようなアミノ酸残基としては：

a) 例えば異種の宿主細胞または宿主器官における発現の結果、N - 末端Met残基を含むことができる；

b) 合成時に宿主細胞からのナノボディの分泌を導くシグナル配列またはリ - ダ - 配列を形成してもよい。適切なり - ダ - 配列は当業者には明らかであろう、そして本明細書ではさらに記載されているとおりである。通常そのようなリ - ダ - 配列はナノボディのN末端に連結されるであろうが、本発明の最も広い意味で、そこに限定されてはいない；

c) ナノボディを、特定の器官、組織、もしくは細胞の部分または区画に指向性を持たせおよび/またはそこへ透過、侵入させる、および/またはナノボディを、細胞膜のような生物学的障壁、上皮細胞層のような細胞層、固形癌を含む腫瘍または血液脳関門に、浸透、通過させる、シグナル配列を形成してもよい。そのようなアミノ酸配列の例は、当業者には明らかであろう。あるいくつかの非限定的な例としては、国際公開第 03/026700号お

10

20

30

40

50

よびTemsamaniら, Expert Opin. Biol. Ther., 1, 773 (2001); Temsamani およびVidal, Drug Discov. Today, 9, 1012 (004)およびRousselle, J. Pharmacol. Exp. Ther., 296, 124-131 (2001)に記載の「低分子ペプチドベクター」(「Pep-trans vectors」)およびZhaoら, Apoptosis, 8, 631-637 (2003)によって記載された膜輸送体が挙げられる。抗体断片の細胞内標的指向化のためのC末端およびN末端アミノ酸配列は、例えばCardinaleら, Methods, 34, 171 (2004)に記載されている。他の適切な細胞内標的指向化のための技術は、上述のように、本発明のナノボディを含むいわゆる「細胞内抗体」の発現および/または使用に関する；

【0337】

d) ナノボディの精製を可能にし、または容易にする、例えばアミノ酸配列の「タグ」を形成してもよく、精製は、例えば前記配列または残基に対して指向性を有するアフィニティー技術を用いてなされる。精製後、前記配列または残基を除去して(例えば化学的または酵素的切断により)、ナノボディ配列を提供してもよい(この目的のために、タグは、場合によっては切断可能なリンカ - を介してナノボディ配列に連結してもよいし、また切断可能なモチ - フを含んでいてもよい)。いくつかの好ましいが限定しない、そのような残基の例としては、多重ヒスチジン残基、グルタチオン残基およびA A A E Q K L I S E E D L N G A A (配列番号: 476)のようなmycタグが挙げられる；

e) 機能化され、および/または官能基の結合部位として役立つことのできる一つ以上のアミノ酸残基あってもよい。適切なアミノ酸残基および官能基は当業者には明らかであり、限定されないが、本発明のナノボディの誘導体に関して本明細書に記載するアミノ酸残基および官能基が挙げられる。

【0338】

別の実施態様によれば、本発明のポリペプチドは、本発明のナノボディが、そのアミノ末端、カルボキシ末端、またはそのアミノ末端とカルボキシ末端の両方に、少なくとも、さらにもう一つのアミノ酸配列と融合しているものを含む；すなわち本発明のナノボディおよび一つ以上の更なるアミノ酸配列を含む融合タンパクを提供するためである。そのような融合は本明細書においては、「ナノボディ融合」と呼ぶ。

【0339】

一つ以上の更なるアミノ酸配列は、いかなる適切なおよび/または欲するアミノ酸配列であってもよい。更なるアミノ酸配列は、ナノボディの(生物学的)性質を変化させ、変更しあるいは影響しても、しなくても良く、本発明のナノボディまたはポリペプチドに更なる機能性を与えても、与えなくてもよい。更なるアミノ酸配列は、本発明のナノボディまたはポリペプチドに一つ以上の欲する性質を与えるようなものであることが好ましい。

【0340】

そのようなアミノ酸配列の例は、当業者には明らかであり、一般的に通常の抗体およびその断片(ScFvおよび単ドメイン抗体)に基づくペプチド融合に用いられた全てのアミノ酸配列を含んでもよい。参照として例えば、Holliger および Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005)による総説が挙げられる。

【0341】

例えば、そのようなアミノ酸配列は、本発明のナノボディそれ自体と比較して、本発明のポリペプチドの半減期、溶解度または吸収性を増加させ、免疫原性または毒性を減少させ、望ましくない副作用を除去あるいは弱め、および/または他の有利な性質を与えおよび/または望ましくない性質を減少させるようなアミノ酸配列であってもよい。そのようなアミノ酸配列の、非限定的ないくつかの例としては、ヒト血清アルブミン(WAO 00/27435を参照またはハプテン分子(例えば循環抗体によって認識されるハプテン、例えば国際公開第 98/22141を参照)が挙げられる。

【0342】

更なるアミノ酸配列は、また第二の結合部位を提供しても良く、その結合部位は、任意の好ましいタンパク、ポリペプチド、抗原、抗原決定基またはエピト - プ(本発明のナノボディが指向性を有するまたは異なったタンパク、ポリペプチド、抗原決定基またはエピ

10

20

30

40

50

ト - プを含むが、それらに限定されない) に対して指向性を有してもよい。例えば、更なるアミノ酸配列は、血清中での半減期が増加するように、血清タンパク(例えば、ヒト血清アルブミンまたは I g G のような別の血清タンパクのような) に指向する第二の結合部位を提供してもよい。参照として、例えば欧州特許第 0 368 684号、 国際公開第 91/017 43号、 国際公開第 01/45746号および 国際公開第 04/003019号(その中で種々の血清タンパクが記述されている)、「アルツハイマー病のような神経編成疾患の治療のための、アミロイドベータに対するナノボディ(商標)およびそれを含むポリペプチド」と題する出願人による欧州特許出願(種々の他のタンパクについて記載されている)、ならびに Harmsen ら、Vaccine, 23 (41); 4926-42が挙げられる。

【0343】

別の実施態様によれば、一つ以上の更なるアミノ酸配列は、通常の四鎖抗体(および特にヒト抗体)および/または重鎖抗体の一つ以上の部分、断片またはドメインを含んでもよい。例えば、通常あまり好ましくはないが、本発明のナノボディは、通常の(好ましくはヒトの) V_H または V_L ドメインまたは V_H または V_L ドメインの天然または合成アナログと連結していても良く、ここでも場合によってはリンカ - 配列を介してもよい(War dらによって記載された d A b のような、他の(単一)ドメイン抗体を含めるが、限定されない)。

【0344】

少なくとも一つのナノボディは、一つ以上の(好ましくはヒトの) C H 1、C H 2 および/または C H 3 ドメインに、場合によってはリンカ - 配列を介して、連結してもよい。例えば、適切な C H 1 ドメインに連結したナノボディを、適切な軽鎖と共に、従来の F a b 断片または F (a b ') 2 断片と相同ではあるが、一つ(F (a b ') 2 断片の場合)、一つまたは両方の通常の V_H ドメインが本発明のナノボディによって置換された抗体断片/構造体を生成するために、用いることができる。またインビボでの半減期が増加した構築体を提供するために、二つのナノボディを C H 3 ドメインに連結(場合によってはリンカ - を介して)することができる。

【0345】

本発明のポリペプチドの具体的一実施態様によれば、一つ以上の本発明のナノボディを、一つ以上のエフェクタ - 機能を本発明のポリペプチドに与える、および/または一つ以上の F c レセプタ - に結合する能力を与える、一つ以上の抗体部分、断片またはドメインに連結してもよい。例えば、この目的のために、またそれによって限定されることなく、一つ以上の更なるアミノ酸配列が、重鎖抗体のような(本明細書に記載)、より好ましくは、通常の四鎖抗体のような、抗体の C H 2 および/または C H 3 ドメインを一つ以上含んでも良く、および/または、例えば I g G、I g E または他のヒト I g からの F c 領域およびその部分を形成してもよい。例えば、国際公開第 94/04678号は、ラクダ科 V_{HH} ドメインまたはそのヒト化派生体(すなわちナノボディ)を含む重鎖抗体を記載し、ここでは、ラクダ科の C H 2 および/または C H 3 ドメインはヒト C H 2 および C H 3 と置換されており、ナノボディおよびヒト C H 2 および C H 3 ドメイン(しかし C H 1 ドメイン無しに)をそれぞれ含む二つの重鎖よりなる免疫グロブリンを提供する。免疫グロブリンは C H 2 および C H 3 ドメインによって提供されたエフェクタ - 機能を有し、その免疫グロブリンはいかなる軽鎖の存在無しに機能することができる。エフェクタ - 機能を提供するために本発明のナノボディに適切に連結可能な他のアミノ酸配列は、当業者には明らかであり、所望のエフェクタ - 機能に基づいて選択すればよい。参照としては、国際公開第 04/058820号、国際公開第 99/42077号および 国際公開第 05/017148号ならびに Holliger および Hudson (既出) による総説が挙げられる。本発明のナノボディの F c 部へのカップリングもまた、本発明の対応するナノボディと比較して、半減期の増加を導くかも知れない。いくつかの応用に関しては、生物学的に有意なエフェクタ - 機能を持たずに半減期の増加をもたらす、F c 部および/または恒常ドメイン(すなわち C H 2 および/または C H 3 ドメイン)の使用は、また適切であり、好ましいことでさえあるかも知れない。一つ以上のナノボディおよび一つ以上の恒常ドメインを含み、インビボにおける半減期が増

10

20

30

40

50

加した、他の適切な構築体は、当業者には明らかで、例えば、二つのナノボディがC H 3ドメインの場合によってはリンカ - 配列を介して連結しているものを含んでもよい。一般的には半減期が増加した融合タンパクまたは派生体のいずれもが、腎臓吸収のカットオフ値である50 k Dを越える分子量を持つことが好ましい。

【0346】

更なるアミノ酸配列はまた、合成時に宿主細胞からの本発明のナノボディまたはポリペプチドの分泌を導く、シグナル配列またはリ - ダ - 配列を形成してもよい(本発明のポリペプチドを発現するために用いた宿主細胞に応じて、例えば本発明のポリペプチドのプレ、プロ、プレプロ型を提供する)。

【0347】

更なるアミノ酸配列は、本発明のナノボディまたはポリペプチドを、特定の器官、組織、もしくは細胞の部分または区画に指向性を持たせおよび/またはそこへ透過、侵入させる、および/またはナノボディまたはポリペプチドを、細胞膜のような生物学的障壁、上皮細胞層のような細胞層、固形癌を含む腫瘍または血液脳関門に、浸透、通過させる、配列またはシグナルを形成してもよい。そのようなアミノ酸配列の例は、当業者には明らかであり、例えば以下の物が挙げられるが、非限定的な：上述の「Pept r a n s」ベクター、Cardinaleらによって記載された配列、およびいわゆる"細胞内抗体"のような本発明のナノボディおよびポリペプチドを発現製造するために使用することができる、それ自体知られたアミノ酸配列および抗体断片、例えば国際公開第94/02610号、国際公開第95/2618号、特許第7004940号、国際公開第03/014960号、国際公開第99/07414；国際公開第05/01690号；欧州特許第1512696号；および、in Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; and in Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170に記載された物、およびそれらに引用された更なる参考文献に記載されたもの。

【0348】

いくつかの応用に関して、特に、本発明のナノボディがそれに対して指向性を持つ標的を発現する細胞を殺すことを(例えば癌の治療)、またはそのような細胞の成長および/または増殖を減少または遅くすることを意図する応用では、本発明のナノボディはまた(細胞)毒性タンパクまたはポリペプチドと連結してもよい。例えば本発明の細胞毒性ポリペプチドを提供するために、本発明のナノボディと連結可能な、そのような毒性タンパクまたはポリペプチドの例は、当業者には明らかであり、上に引用された先行技術では、および/または本明細書の更なる説明で見出すことができる。一つの例としては、いわゆるA D E P T (商標)技術、国際公開第03/055527号が挙げられる。

【0349】

非限定的な一実施態様によれば、PEG基の付加のための一つ以上の特定のアミノ酸残基を提供するために、本発明のナノボディまたはポリペプチドのアミノ酸配列に、一つ以上のアミノ酸残基を、付加、挿入および/または置換することができる。

【0350】

タンパク薬剤の有効性は、標的を中和する力価に依存するが、可能性のある薬剤の固有の薬物動態にも依存する。腎臓は一般的に60,000 Da未満の分子をろ過するので、浄化を減少させる努力は、タンパク融合(Syedら、1997)、糖鎖付加またはポリエチレングリコ - ルポリマ - による修飾、すなわちペグ化(Leeら、1999; Abuchowskiら、1977; Nucciら、1991; Lecolleyら、. Chem Commun, 2004; Taoら、J Am Chem Soc, 2004; Mantovaniら、2005)を通じての生物製剤の分子量を増加させることに焦点を当ててきた。これらの方法により、生物製剤の生体内曝露時間を延長させるのに成功した。

【0351】

代替法として、半減期は、別のペグ化剤、POLY PEGを用いて二価ナノボディ、TNF56またはTNF55に結合させ、延長することができる。POLY PEGは、メタアクリルの背骨にPEGの歯を持つ櫛型のポリマ - である。POLY PEGは、メタアクリル背骨およびナノボディに対するPOLY PEGの結合方法を決定する活性端

10

20

30

40

50

末基上のPEG鎖の長さにより変わることができる。ナノボディに存在するC末端システインへの部位特異的結合は、POLY PEGにおける活性マレイミド末端基を介して達成できる。

【0352】

本発明はまた、本発明のナノボディまたはポリペプチドを発現するために使用された宿主細胞に通常依存して、一つ以上のアミノ酸の位置で糖鎖付加された、いかなる本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドも包含する（以下にさらに説明する）。

【0353】

非限定的な一実施態様によれば、使用された宿主生物によって糖鎖付加されることができる一つ以上の特定のアミノ酸残基および/または部位を提供するために、一つ以上のアミノ酸残基を、本発明のナノボディまたはポリペプチドのアミノ酸配列に付加、挿入および/または置換することができる。例えばPichiaによる糖鎖付加のための糖鎖付加部位を提供するために、好ましいが非限定的な手段によって、本発明のナノボディのCDR2内の50の位置のN残基は、例えばQ、DまたはS残基によって置換することができる。

10

【0354】

他の実施態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも一つの異なるアミノ酸配列とアミノ末端、カルボキシ末端またはアミノ末端およびカルボキシ末端の両方と融合したナノボディのアミノ酸配列を、含むことができる。

【0355】

再び、前記異なるアミノ酸配列は、ナノボディの（生物学的）性質を変え、変質させ、またはそうでなければ影響を与えるかも知れないし与えないかも知れないし、またナノボディに異なる機能を与えるかも知れないし、与えないかも知れない。

20

【0356】

例えば、好ましいが非限定的な一実施態様によれば、三つ、四つまたは五つのように、少なくとも二つのナノボディを含む本発明のポリペプチドを提供するために、前記異なるアミノ酸配列は少なくとも一つの異なるナノボディを含んでもよいが、ここで前記ナノボディは場合によっては一つ以上のリンカ配列（本明細書で規定）を介して連結されてもよい。

【0357】

二つ以上のナノボディを含む本発明のポリペプチドは、本明細書では「多価」ポリペプチドとも呼ばれる。例えば、本発明の「二価」ポリペプチドは、場合によってはリンカ配列を介して連結した二つのナノボディを含み、一方、本発明の「三価」のポリペプチドは、場合によっては二つのリンカ配列を介して連結した三つのナノボディを含む；等。

30

【0358】

本発明の多価ポリペプチドでは、二つ以上のナノボディは同一であっても異なってもよい。例えば、本発明の多価ポリペプチドにおける二つ以上のナノボディは、

- 同じ抗原に対して指向性を有しても良く、すなわち前記抗原の同じ部分またはエピトプに対して、または前記抗原の二つ以上の異なった部分またはエピトプに対して；および/または

40

- 異なった抗原に対して指向性を有してもよい；

またはそれらの組み合わせ。

【0359】

従って、本発明の二価ポリペプチドは、例えば、

- 二つの同一のナノボディを含んでも良く；

- 第一のナノボディがある抗原の第一の部分またはエピトプに指向性を有し、および第二のナノボディが前記抗原の同じ部分またはエピトプ、もしくは前記抗原の別の部分またはエピトプに指向性を有しており；

- または第一のナノボディが第一の抗原に指向性を有しており、第二のナノボディが、

50

第一の抗原とは異なる第二の抗原に指向性を有しており；

一方本発明の三価ポリペプチドは、例えば：

- 同じ抗原の同じまたは異なった部分またはエピト - プに対して指向性を有する、三つの同じ、または異なったナノボディを含んでも良く；

- 第一の抗原上の、同じまたは異なった部分またはエピト - プに対して指向性を有する二つの同じまたは異なったナノボディ、および前記第一の抗原とは異なった第二の抗原に指向性を有する第三のナノボディを含んでも良く；または

- 第一の抗原に対して指向性を有する第一のナノボディ、前記第一の抗原とは異なった第二の抗原に対して指向性を有する第二のナノボディ、および前記第一の抗原および第二の抗原とは異なった第三の抗原に指向性を有する、第三のナノボディを含んでもよい。

少なくとも一つのナノボディは、第一の抗原に対して指向性を有し、また少なくとも一つのナノボディは第一の抗原とは異なった第二の抗原に対して指向性を有する、少なくとも二つのナノボディを含むポリペプチドは「多重特異的」とも呼ばれる。従って、「二重特異的ナノボディ」は、第一の抗原に対して指向性を有する少なくとも一つのナノボディ、および第二の抗原に対して指向性を有する少なくとも一つの更なるナノボディを含み、一方、「三重特異的」ナノボディは、第一の抗原に対する指向性を有する少なくとも一つのナノボディ、第二の抗原に対する指向性を有する少なくとも一つの更なるナノボディ、および第三の抗原に対する指向性を有する少なくとも一つの更なるナノボディを含み；等。

【0360】

従って、最も簡単な形では、本発明の二重特異的ポリペプチドは、本発明の二価のポリペプチド（本明細書で規定）であって、第一の抗原に対して指向性を有する第一のナノボディ、および第二の抗原に対して指向性を有する第二のナノボディを含み、前記の第一と第二のナノボディは場合によってはリンカ - 配列（本明細書で規定）を介して連結されていても良く、一方、本発明の三重特異的ポリペプチドは、その最も簡単な形では、本発明の三価ポリペプチド（本明細書で規定）であって、第一の抗原に対して指向性を有する第一のナノボディ、第二の抗原に対して指向性を有する第二のナノボディ、および第三の抗原に対して指向性を有する第三のナノボディを含み、前記第一、第二および第三のナノボディは、場合によっては一つ以上の、および特に一つ以上である、特に二つのリンカ - 配列を介して連結されてもよい。

【0361】

しかしながら、前記から明らかなように、本発明の多重特異的ポリペプチドは、二つ以上の異なった抗原に対して指向性を有するいかなる数のナノボディを含み得るという意味では、それらに限定されていない。

【0362】

一つ以上のV_HHドメインを含む多重特異的および多価ポリペプチド、およびそれらの調製に関しては、参照としてConrathら、J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350および欧州特許第0822985号が挙げられる。

【0363】

本発明のポリペプチドでは、一つ以上のナノボディおよび一つ以上のポリペプチドは、互いに直接連結されていてもよい（例えば国際公開第99/23221号に記載）および/または互いに一つ以上の適切なスペ - サ - またはリンカ - を介して、またはそれらのいずれかの組み合わせで連結してもよい。

【0364】

多重特異的および多価ポリペプチドにおいて使用されるスペ - サ - またはリンカ - は、当業者には明らかであり、一般的に、アミノ酸配列を連結するために当技術分野において用いられるいかなるスペ - サ - またはリンカ - であってもよい。前記リンカ - およびスペ - サ - は、薬剤用を目的とするタンパクまたはポリペプチドの構築に使用されるのに適していることが好ましい。

【0365】

いくつかの特に好ましいスペ - サ - としては、抗体断片および抗体ドメインを連結するために当技術分野において用いるものが挙げられる。これらは、上に引用された一般的な背景技術に記述したリンカ - 、ならびに二重特異性抗体および S c F v 断片を構築するために、当技術分野で用いられたリンカ - を含む（しかしながら、この点について、二重特異性抗体および S c F v 断片においては、使用されるリンカ - 配列は、関連した V_H および V_L ドメインが一緒になって相補体抗原結合部位を形成できるような、長さ、可撓性および他の特性を有していなければならないが、本発明のポリペプチドにおいて使用されるリンカ - については、各ナノボディがそれ自身で相補体抗原結合部位を形成することから、長さまたは可撓性に関しては特に制限は無いことに注意されたい）。

【 0 3 6 6 】

10

他の適切なリンカ - は、一般的に、有機化合物またはポリマ - 、特に医薬として使用されるタンパクに使用するのに適した物を含む。例えば、ポリ（エチレングリコ - ル）部分は、抗体ドメインを連結するために用いられて来た、例えば国際公開第 04/081026 を参照されたい。

【 0 3 6 7 】

使用されるリンカ - が本発明のポリペプチドに一つ以上の他の好ましい特性または機能を与え、および / または派生体の形成および / または官能基の付加のための一つ以上の部位（例えば、本発明のナノボディの派生体に関しては本明細書に記載）を提供することも、本発明に含まれる。例えば、一つ以上の荷電したアミノ酸残基（上の表 A - 3 を参照）を含むリンカ - は、親水性を改善することができ、一方、小さなエピト - プまたはタグを形成しまたは含むリンカ - は、検出、同定および / または精製のために用いることができる。再び、本明細書の開示に基づき、当業者は、場合によってはいくつかのル - チン実験の後に、本発明の特定のポリペプチドにおいて使用される最適のリンカ - を決定できるであろう。

20

【 0 3 6 8 】

最後に、本発明のポリペプチドでは、二つ以上のリンカ - が用いられた場合、これらのリンカ - は同一であっても、異なってもよい。再び、本明細書の開示に基づき、当業者は、場合によってはいくつかのル - チン実験の後に、本発明の特定のポリペプチドでは使用される最適のリンカ - を決定できるであろう。

【 0 3 6 9 】

30

多価および多重特異性ポリペプチドにおいて使用されるリンカ - は、当業者には明らかであり、例えば、国際公開第 99/42077 号に記載された、(g l y₄ s e r)₃ または (g l y₃ s e r₂)₃ のような (g l y_x s e r_y)_z の型の g l y - s e r リンカ - 、天然に存在する重鎖抗体の蝶番様領域のような蝶番様領域または同様な配列が挙げられる。他の適切なリンカ - に関しては、上に引用した一般的な背景技術を参照されたい。ある特に好ましいリンカ - は、配列番号：68 および 69 において、与えられる。

【 0 3 7 0 】

リンカ - はまた、多価または多重特異性ポリペプチドにある機能性を与えることができる。例えば、一つ以上の荷電アミノ酸残基（上の表 1 を参照）を含むリンカ - は、改良した親水性を与えることができるし、一方、小さなエピト - プまたはタグを形成しまたは含むリンカ - は、検出、同定および / または精製のために用いることができる。

40

【 0 3 7 1 】

本明細書に記載したとおり、本発明のタンパク質またはポリペプチドにおいては、本明細書に記載する抗 T N F ナノボディは、好ましくは、該タンパク質もしくはポリペプチドが、T N F 三量体への結合時、該 T N F 三量体によって媒介される T N F 受容体架橋および / またはこうした受容体架橋によって媒介されるシグナル伝達を阻害もしくは低減させることができるように、かつ / またはこのタンパク質もしくはポリペプチドが、T N F 三量体上の少なくとも 2 個の T N F 受容体結合部位に分子内結合ができるように結合する。適切なリンカ - は、本明細書に記載される通りである。

【 0 3 7 2 】

50

また、本明細書に記載したとおり、タンパク質またはポリペプチドが分子間結合または分子外結合を実現するかどうかは、サイズ排除クロマトグラフィーによって（少なくとも初めに）評価され得る。サイズ排除クロマトグラフィーによって、TNF アルファと抗体との複合体を分析して、複合体中の抗体とTNF アルファ分子の数および比を決定することができる。これらのデータから、分子間または分子内結合が生じた場合、抗体と標的の様々な比でモノクローナル抗体D2E7（Humira）がTNF アルファと結合するという化学量論を確立するのにSantoraおよび同僚（L.C.Santoraら、Anal Biochem. 2001）が行ったように推定し得る。複合体の分子量から、3個の抗体分子が3個のTNF 三量体で複合体を形成したことが結論付けられ、それによって抗体が分子間形態で結合することが示される。同様の実験が2価のナノボディで行なわれ、この場合、非常に短いリンカーは、分子間結合によって得られる巨大分子複合体の形成を引き起こした。しかし、より長いリンカーを有する同じ2価のナノボディは、分散した小さな複合体としてゲル濾過カラムから溶出し、これによって分子内結合が形成されたことが実証される。より長いリンカーを含むナノボディTNF 1が最適な性能を有する（アッセイで使用するTNFの完全中和量、すなわち10 pM）というバイオアッセイデータと組み合わせると、2価のナノボディの分子内結合が2個の細胞結合受容体の架橋結合および関連する受容体活性化を効率的に妨げると結論付けることができる。HumiraやRemicadeなど公知のモノクローナル抗体は、細胞結合受容体とのある程度の相互作用が利用できる三量体TNF分子上に常に2個の受容体結合部位を残して、こうした分子内結合を形成することはできず、それによってバイオアッセイで測定されるように中和性能が低くなる。

10

20

【0373】

あるいは、タンパク質またはポリペプチドが分子間結合または分子外結合を実現するかどうかは、結晶学および/または分子モデル化（またはその他の適切なインシリコ技術）によって評価され得る。三量体TNF 30 / TNF アルファ複合体モデルを、モノマーの野生型TNF 1 / TNF アルファ複合体の結晶構造に基づいて作製した。この構造から、最終のTNF 30 - リンカー - ALB8 - リンカー - TNF 30 構造物をモデル化した。TNF 30 - リンカー - ALB8 - リンカー - TNF 30 構造物を、2個のTNF 30分子が結合したTNF アルファの三量体から出発させてモデル化した。ALB8の構造は公知ではないので、第3のTNF 30分子を代わりに使用し、これをN末端とC末端の間のラインに沿って他の2個のナノボディ間に配置した。次いで、9個のアミノ酸リンカーを、手動で加えた。

30

【0374】

このモデルを図62に示す。明らかに、ALB8と一緒に備えた9個のアミノ酸リンカーは、TNF アルファに結合した2個のTNF 30ドメイン間に約66 にわたる十分な余地がある。ALB8自体は、すでに40 に及んでおり、各リンカーは、完全に拡張した立体構造においてさらに約27 に及ぶ可能性がある。その結果、ALB8は、動きに相当な柔軟性があり、アルブミンへのその結合がTNF アルファへの結合を非常に妨害することは予知されない。

【0375】

さらに、特にALB8のC末端であるリンカーの場合、恐らく、結合力に影響を及ぼさずにリンカーを短くすることができるであろう。これは、架橋三量体に対して同じTNF アルファ三量体への結合の増加に有益な効果がある。というのは、第2のTNF 30が異なるTNF アルファと結合するという確率が、リンカーの長さで増加するからである。

40

【0376】

さらにまた本明細書に記載されるように、対応する1価のナノボディに比べて、所望の抗原に対して、および以下に述べる血清タンパク質などの少なくとも1種の血清タンパク質に対して、具体的にはヒト血清アルブミンに対して向けられる本発明の多重特異的ポリペプチドは、血清において半減期の増加を示す可能性がある。

【0377】

50

前述のように、本明細書に記載の方法は、特に、本発明のこうした多価の多重特異的ポリペプチドの作製に適している。

【0378】

本発明のポリペプチドでは、少なくとも1個のナノボディはまた、従来の V_H ドメインに、または V_H ドメインの天然もしくは合成類似体に、場合によりリンカー配列によって、結合する可能性がある。

【0379】

本発明のポリペプチドでは、少なくとも1個のナノボディはまた、 V_L ドメインに、または V_L ドメインの天然もしくは合成類似体に、場合によりリンカー配列によって結合する可能性があり、それによって、従来の $scFv$ 断片と類似した形であるが V_H ドメインの代わりにナノボディを含む本発明のポリペプチドが提供される。

10

【0380】

本発明のポリペプチドでは、少なくとも1個のナノボディはまた、 $CH1$ 、 $CH2$ 、および/または $CH3$ ドメインのうちの1個または複数に、場合によりリンカー配列によって結合される可能性がある。例えば、適切な $CH1$ ドメインに結合したナノボディを、例えば、適切な軽鎖と一緒に使用すると、従来の Fab 断片または $F(ab')$ 2断片と類似した抗体断片/構造が作製されるが、この場合、従来の V_H ドメインの一方、または($F(ab')$ 2断片の場合には)一方もしくは両方が、ナノボディと置き換えられた。該断片はまた、すなわち2種以上の抗原に対して異種特異的または二重特異的である可能性がある。例えばラクダ科(Camelid)由来の適切な $CH2$ および $CH3$ ドメインに結合したナノボディを使用して、単一特異的または二重特異的な重鎖抗体を形成することができるであろう。最後に、例えばヒト由来の適切な $CH1$ 、 $CH2$ 、および $CH3$ ドメインに結合したナノボディを、適切な軽鎖と一緒に使用すると、従来の4鎖の抗体と類似した抗体が形成されるが、この場合、従来の V_H ドメインの一方または両方は、ナノボディと置き換えられている。

20

【0381】

また、1個または複数のナノボディに加えて、本発明のポリペプチドはまた、さらに以下のとおり、官能性の基、部分、もしくは残基、例えばさらに後述のとおり治療上有効な物質、および/または蛍光性マーカー、同位元素などのマーカーもしくは標識を含むこともできる。

30

【0382】

本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、およびそれをコードする核酸は、本明細書のさらなる説明から当業者に明らかであるように、それ自体が公知の方法で調製できる。ナノボディ、ポリペプチド、および核酸を調製するためのいくつかの好ましいが非制限的な方法として、先に述べた、かつ/またはさらに後述の方法および技術が含まれる。

【0383】

当業者に明らかなるように、本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドを調製するための特に有用な一方法は、一般に、

- 適切な宿主細胞もしくは宿主生物(また、本明細書では「本発明の宿主」と呼ぶ)において、または本発明の該ナノボディまたはポリペプチド(また、本明細書では「本発明の核酸」と呼ぶ)をコードする核酸の適切な別の発現系において発現させ、場合により続いて:

40

- こうして得た本発明のナノボディまたはポリペプチドを単離かつ/または精製するステップからなる。

具体的には、こうした方法は、

- 本発明の宿主が本発明の少なくとも1個のナノボディおよび/またはポリペプチドを発現かつ/または生成するように、ある条件下で本発明の宿主を培養かつ/または維持し;場合により続いて:

- こうして得た本発明のナノボディまたはポリペプチドを単離および/または精製するステップを含むことができる。

50

【0384】

本発明の核酸は、一本または二本鎖のDNAまたはRNAの形状とすることができ、好ましくは二本鎖DNAの形状である。例えば、本発明のヌクレオチド配列は、ゲノムDNAでもcDNAでも合成DNA(所期の宿主細胞または宿主生物での発現に特異的に適したコドン使用頻度を備えたDNAなど)でもよい。

【0385】

本発明の一実施態様によれば、本発明の核酸は、上記に規定したように、本質的に単離形である。

【0386】

本発明の核酸はまた、例えば、プラスミド、コスミド、YACなどのベクターの形でよく、それで存在してもよく、かつ/またはその一部でもよく、なお、これは本質的に単離形でもよい。

10

【0387】

本発明の核酸を、本明細書に示される本発明のポリペプチドに関するアミノ酸配列の情報に基づいて、それ自体が公知の方法で調製し、または得ることができ、かつ/または適切な天然の供給源から単離することができる。類似体を提供するのに、天然に存在するV_HHドメインをコードするヌクレオチド配列は、例えば、部位特異的突然変異誘発を受ける可能性があり、それによって該類似体をコードする本発明の核酸が提供される。やはり、当業者に明らかなように、本発明の核酸を調製するのに、また、ナノボディをコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列や例えば1個または複数のリンカーをコードする核酸などいくつかのヌクレオチド配列は、適切な方法と一緒に結合することができる。

20

【0388】

本発明の核酸を作製する技術は、当業者に明らかであり、例えば、自動DNA合成;部位特異的突然変異誘発;2種以上の天然および/または合成の配列(または2種以上のその部分)を組み合わせること、切断型発現産物の発現をまねく突然変異の導入;1個または複数の制限部位の導入(例えば、適切な制限酵素を使用して容易に消化かつ/または連結することができるカセットおよび/または領域を作製すること)、ならびに/あるいは例えばテンプレートとして天然に存在するGPCRの配列を使用して、1個または複数の「不適正」プライマーを使用するPCR反応による突然変異の導入を挙げることができるが、それらに限定されない。上記その他の技術は、当業者に明らかであり、さらに、前述のSambrookらやAusubelらなどの標準的なハンドブック、ならびに下記の実施例を参照されたい。

30

【0389】

本発明の核酸は、当業者に明らかなように、遺伝学的構造物の形でよく、それで存在してもよく、かつ/またはその一部でもよい。こうした遺伝学的構造物は、一般に、例えば、1種以上の適切な調節要素(適切なプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど)や以下に参照する遺伝学的構造物の別の要素など、それ自体が公知の遺伝学的構造物の1種以上の要素に場合により結合する本発明の少なくとも1種の核酸を含む。本発明の少なくとも1種の核酸を含むこうした遺伝学的構造物はまた、本明細書で「本発明の遺伝学的構造物」とも呼ばれる。

40

【0390】

本発明の遺伝学的構造物は、DNAでもRNAでもよく、好ましくは二本鎖DNAである。本発明の遺伝学的構造物はまた、所期の宿主細胞または宿主生物の形質転換に適した形でも、所期の宿主細胞のゲノムDNAへの組み込みに適した形でも、所期の宿主生物における独立した複製、維持、および/または遺伝に適した形でもよい。例えば、本発明の遺伝学的構造物は、例えば、プラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクター、トランスポゾンなどのベクターの形をしていてもよい。具体的には、ベクターは、発現ベクター、すなわち、インビトロおよび/またはインビボ(例えば、適切な宿主細胞、宿主生物、および/または発現系)において発現を実現することができるベクターでよい。

【0391】

50

好ましいが非制限的な一実施態様では、本発明の遺伝学的構造物は、

- a) 本発明の少なくとも1種の核酸；但し、次のものに操作できるように接続されている
- b) 1種以上の調節要素、例えば、プロモーター、場合により適切なターミネーターなど；
- c) および場合により、また、
- d) それ自体が公知の遺伝学的構造物の1種以上の別の要素

を含み；ここでは、「調節要素」、「プロモーター」、「ターミネーター」、および「操作できるように接続」という用語は、当技術分野における通常の意味を有し（さらに以下に記載する通り）；遺伝学的構造物に存在する該「別の要素」は、例えば、3' - もしくは5' - UTR配列、リーダー配列、選択マーカー、発現マーカー/レポーター遺伝子、および/または形質転換もしくは組込み（の効率）を促進もしくは増加させる可能性がある要素とすることができる。上記その他のこうした遺伝学的構造物に適した要素は、当業者に明らかであり、例えば、使用する構造物のタイプ、所期の宿主細胞もしくは宿主生物；対象とする本発明のヌクレオチド配列が発現されることになっている方法（例えば、構成的発現、一過性発現、または誘導性発現によって）；および/または使用する形質転換技術に依存する可能性がある。

10

【0392】

好ましくは、本発明の遺伝学的構造物では、本発明の少なくとも1種の核酸、および調節要素、および場合により1種以上の別の要素は、一般にこれらが互いに機能的な関係にあることを意味する、互いに「操作できるように結合」されている。例えば、プロモーターは、該プロモーターがコード配列の転写および/または発現を開始または制御/調節することができる場合、コード配列に「操作できるように結合している」と考えられている（この場合、コード配列はプロモーターの「制御下」にあると理解されたい）。一般に、2個のヌクレオチド配列が操作できるように結合されているとき、これらは、同一の方向性にあり、通常同じ読み枠にもある。それらはまた、通常、本質的に隣接しているが、これはまた必要なことではない可能性がある。

20

【0393】

好ましくは、本発明の遺伝学的構造物の調節および別の要素は、これらが所期の宿主細胞または宿主生物において所期の生物学的機能を提供することができるようなものである。

30

【0394】

例えば、プロモーター、エンハンサー、またはターミネーターは、（例えば）プロモーターが、（本明細書で規定するように）それが操作できるように結合されているヌクレオチド配列、例えばコード配列の転写および/または発現を開始または制御/調節することができることを意味する、所期の宿主細胞または宿主生物において「操作できる」ものとすべきである。

【0395】

いくつかの特に好ましいプロモーターとしては、後述のものおよび/または実施例で使用するものなど、細菌細胞中に発現するそれ自体が公知のプロモーターが挙げられるが、それに限定されない。

40

【0396】

選択マーカーは、それによって、すなわち適切な選択条件下において、本発明のヌクレオチド配列で（正常に）形質転換された宿主細胞および/または宿主生物を、（正常に）形質転換されなかった宿主細胞/生物と識別することができるようなものとすべきである。こうしたマーカーのいくつかの好ましいが非限定的な例は、抗生物質（カナマイシンやアンピシリンなど）に対する耐性をもたらす遺伝子、耐熱性をもたらす遺伝子、または宿主細胞もしくは宿主生物を、形質転換されていない細胞もしくは生物の生存に不可欠な培地中のある種の因子、化合物、および/または（食物）成分がない状態で維持させることができる遺伝子である。

【0397】

50

リーダー配列は、- 所期の宿主細胞または宿主生物において、それが所望の翻訳後修飾を可能にするようなもの、および/またはそれが転写されたmRNAを細胞の所望部分または細胞小器官に導くようなものとすべきである。リーダー配列はまた、該細胞からの発現産物の分泌を可能にすることができる。したがって、リーダー配列は、宿主細胞または宿主生物において操作可能な任意のプロ、プレ、またはプレプロ配列とすることができる。リーダー配列は、細菌細胞での発現に必要なではない可能性もある。

【0398】

発現マーカーまたはレポーター遺伝子は、宿主細胞または宿主生物において、それが遺伝学的構造物（上に存在する遺伝子またはヌクレオチド配列）の発現の検出を可能にするようなものとすべきである。発現マーカーはまた、場合により、例えば細胞の特定部または細胞小器官における、および/または多細胞生物の特定細胞、組織、器官、または部分における発現産物の局在化を可能にすることもできる。こうしたレポーター遺伝子はまた、本発明のアミノ酸配列とのタンパク質融合物として発現される可能性がある。好ましいが非限定的ないくつかの例としては、GFPなどの蛍光タンパク質が含まれる。

10

【0399】

適切なプロモーター、ターミネーター、および別の要素のいくつかの好ましいが非限定的な例としては、以下の実施例で使用するものが含まれる。プロモーター、選択マーカー、リーダー配列、発現マーカー、および本発明の遺伝子構造物において存在/使用することができる別の要素 - 例えば、ターミネーター、転写および/または翻訳エンハンサー、および/または組み込み因子などのいくつかの（さらなる）非限定的な例に関しては、前述のSambrookらやAusubelらなどの一般的なハンドブック、ならびに国際公開第95/07463号、国際公開第96/23810号、国際公開第95/07463号、国際公開第95/21191号、国際公開第97/11094号、国際公開第97/42320号、国際公開第98/06737号、国際公開第98/21355号、米国特許第6,207,410号、米国特許第5,693,492号、および欧州特許第1,085,089号に示される例を参照されたい。他の例は、当業者に明らかである。また、先に引用した一般的な背景技術およびさらなる以下の引用文献も参照されたい。

20

【0400】

本発明の遺伝学的構造物は、一般に、例えば前述のSambrookらやAusubelらなどの一般的なハンドブックに記載の技術を使用して、本発明のヌクレオチド配列を前述の1種以上の別の要素に適切に結合させることによって提供できる。

30

【0401】

しばしば、本発明の遺伝学的構造物は、本発明のヌクレオチド配列を、それ自体が公知の適切な（発現）ベクターに挿入することによって得る。適切な発現ベクターのいくつかの好ましいが非限定的な例は、以下の実施例で使用するもの、ならびに以下に述べるものである。

【0402】

本発明の核酸および/または本発明の遺伝学的構造物を使用して、宿主細胞または宿主生物を形質転換することができる。宿主細胞または宿主生物は、任意の適切な（真菌、原核生物、真核生物の）細胞もしくは細胞株でもよく、または任意の適切な真菌、原核生物、または真核生物、例えば：

40

- 細菌株、グラム陰性菌株、例えば、大腸菌；プロテウス、例えばプロテウスミラピリス；シュドモナス、例えばシュドモナスフルオレッセンスの菌株など；およびグラム陽性菌株、例えば、バシラス、例えば枯草菌またはプレビス菌；ストレプトミセス、例えばストレプトミセスリビダンス；ブドウ球菌、例えばスタフィロコッカスカルノーサス；乳酸球菌、例えばラクトコッカスラクティスの菌株などが含まれるが、それらに限定されない；

- 真菌細胞、トリコデルマ種、例えばトリコデルマリシーエからの細胞；ニューロスボラ種、例えばアカパンカビからの細胞；ソルダリア種、例えばソルダリアマクロスポーラからの細胞；アスペルギルス種、例えば黒色コウジ菌もしくはアスペルギルスソーエからの細胞；またはその他の糸状菌からの細胞が含まれるが、それらに限定されない；

50

- 酵母細胞、サッカロミセス種、例えばサッカロミセスセレピシエからの細胞；シゾサッカロミセス種、例えばシゾサッカロミセスポンベからの細胞；ピキア種（*Pichia*）、例えばピキアパストリスまたはピキアメタノリカからの細胞；ハンゼヌラ種、例えばハンゼヌラポリモルフアからの細胞；クリヴェロミセス種、例えばクリヴェロミセスラクティスからの細胞；アルクラ（*Arxula*）種、例えばアルクラアデニニボランス（*adeninivorans*）からの細胞；ヤロウイア種、例えばヤロウイアリポリティカからの細胞が含まれるが、それらに限定されない；

- 両生類細胞または細胞株、例えばツメガエルの卵母細胞など；

- 昆虫派生の細胞または細胞株、例えば鱗翅類由来の細胞／細胞株など、ヨトウガ S F 9 および S f 2 1 細胞またはショウジョウバエ由来の細胞／細胞株、例えばシュナイダー および K c 細胞などが含まれるが、それらに限定されない；

- 植物または植物細胞、例えばタバコの細胞；および／または

- 哺乳動物細胞または細胞株、例えばヒト、哺乳動物由来の細胞または細胞株、C H O 細胞、B H K 細胞（例えば B H K - 2 1 細胞）、ならびに H e L a、C O S（例えば C O S - 7）、および P E R . C 6 細胞などのヒト細胞または細胞株が含まれるが、それらに限定されない；

ならびに当業者に明らかである、抗体および抗体断片の発現および産生に関するそれ自体が公知のその他の宿主または宿主細胞（（単一）ドメイン抗体および S c F v 断片を含むが、それらに限定されない）でもよい。上記に引用された一般的な背景技術、ならびに例えば国際公開第94/29457号；国際公開第96/34103号；国際公開第99/42077号；Frenkenら、（1998）、参照；RiechmannおよびMuyldermans、（1999）、参照；van der Linden、（2000）、参照；Thomassenら、（2002）、参照；Joostenら、（2003）、参照；Joostenら、（2005）、参照；ならびにさらに本明細書の引用文献を参照されたい。

【 0 4 0 3 】

本発明のナノボディおよびポリペプチドをまた、例えば、予防および／または治療目的（例えば遺伝子治療として）のために、多細胞生物の1個または複数の細胞、組織、または器官に導入し発現させることができる。このために、本発明のヌクレオチド配列を、例えば、（例えば、リポソームを使用して）、またはそれらを適切な遺伝子治療ベクター（例えば、アデノウイルスや、アデノ関連ウイルスなどのパルボウイルスなどのレトロウイルスに由来する）に挿入した後など、任意の適切な方法で細胞または組織へ導入することができる。また当業者に明らかなように、こうした遺伝子治療を、患者、あるいは患者の特定細胞または特定の組織もしくは器官に本発明の核酸またはそれをコードする適切な遺伝子治療ベクターを投与することによって、その患者の身体においてインビボおよび／またはその場で行うことができ；あるいは適切な細胞（外植されたリンパ球、骨髓穿刺液、組織生検など、治療すべき患者の身体からしばしば得られる）を、本発明のヌクレオチド配列を用いてインビトロで治療し、次いで、適切には、患者の身体に（再）導入することができる。これはすべて、当業者に周知の遺伝子治療ベクター、技術、および送達系、例えば、K. W. Culver、*「Gene Therapy」*、1994、p. xii、Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N.Y.；Giordano、*Nature F Medicine* 2（1996）、534-539；Schaper、*Circ. Res.* 79（1996）、911-919；Anderson、*Science* 256（1992）、808-813；Verma、*Nature* 389（1994）、239；Isner、*Lancet* 348（1996）、370-374；Muhlhauser、*Circ. Res.* 77（1995）、1077-1086；Onodera、*Blood* 91；（1998）、30-36；Verma、*Gene Ther.* 5（1998）、692-699；Nabel、*Ann. N.Y. Acad. Sci.*：811（1997）、289-292；Verzeletti、*Hum. Gene Ther.* 9（1998）、2243-51；Wang、*Nature Medicine* 2（1996）、714-716；国際公開第94/29469号；国際公開第97/00957号、米国特許第5,580,859号；米国特許第5,589,546号；またはSchaper、*Current Opinion in Biotechnology* 7（1996）、635-640を使用して行なうことができる。例えば、S c F v 断片（Afanasievaら、*Gene Ther.*、10、1850-1859（2003））および二重特異性抗体（Blancoら、*J. Immunol.*、171、1070-1077（2003））のインシツ（*in situ*）発現が、当技術分野では記載されている。

【 0 4 0 4 】

細胞におけるナノボディの発現に関しては、ナノボディは、例えば、国際公開第94/02610号、国際公開第95/22618号および米国特許第7004940号；国際公開第03/014960号；Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications*. Landes and Springer-Verlag；ならびにKontermann, *Methods* 34, (2004), 163-170に記載されるように、いわゆる「イントラボディ」として、発現されることもあり得る。

【0405】

産生に関しては、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、遺伝子組換え哺乳類の乳汁の中で、例えばウサギ、ウシ、ヤギまたはヒツジの乳汁の中で、（導入遺伝子を哺乳類に導入するための一般的な技術については、例えば、米国特許第6,741,957号、米国特許第6,304,489号、および米国特許第6,849,992号を参照されたい）、植物、または植物の葉、花、果実、種子、根もしくは（例えばタバコ、トウモロコシ、ダイズまたはアルファルファの）塊茎（*tubers*）を挙げるができるが、それらに限定されない、植物の部分において、または例えばカイコ *Bombyx mori* の蛹において例えば産生することもできる。

10

【0406】

さらに、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、無細胞発現系において、発現かつ/または産生することもでき、このような系の適切な例は、当業者に明らかである。いくつかの好ましいが非限定的な例には、コムギ胚芽系；ウサギ網状赤血球溶解産物；または大腸菌 *Zubay* 系における発現が含まれる。

【0407】

前述のように、ナノボディを使用することの利点の1つは、ナノボディに基づくポリペプチドは、適切な細菌系における発現を介して調製されることができ、かつ適切な細菌発現系、ベクター、宿主細胞、調節要素などが、例えば先の引用文献から当業者に明らかであることである。しかし、本発明は、その最も広い意味において、細菌系における発現に限定されないことに留意されたい。

20

【0408】

好ましくは、本発明において、医薬的使用に適切である形で本発明のポリペプチドを提供する、例えば細菌発現系などの（インピボまたはインピトロ）発現系が使用するが、そのような発現系はまた、当業者に明らかである。また当業者に明らかのように、医薬的使用に適切な本発明のポリペプチドは、ペプチド合成のための技術を使用して調製することができる。

30

【0409】

産業的規模での産生に関しては、ナノボディまたはナノボディを含むタンパク質治療薬の（産業的）産生のために好ましい異種宿主には、大規模な発現/産生/発酵のために、特に、大規模な医薬的発現/産生/発酵のために適切である、大腸菌、*Pichia pastoris*（*Pichia pastoris*）、*S. cerevisiae*（*S. cerevisiae*）の菌株が含まれる。こうした菌株の適切な例は、当業者に明らかである。こうした菌株および産生/発現系は、例えばBiovitrum（ウプサラ、スウェーデン）などの企業によって入手可能でもある。

【0410】

あるいは、哺乳類の細胞系、特にチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が、大規模な発現/産生/発酵のために、特に大規模な医薬的発現/産生/発酵のために、使用され得る。なお、そのような発現/産生系は、前述の企業のいくつかによって入手可能でもある。

40

【0411】

特定の発現系の選択は、ある種の翻訳後修飾、より具体的にはグリコシル化のための要求条件に、一部依存するであろう。グリコシル化が望ましいまたはグリコシル化を必要とする、ナノボディを含む組換えタンパク質の産生には、発現されたタンパク質をグリコシル化する能力を有する、哺乳類の発現宿主を使用する必要があるであろう。この点に関して、得たグリコシル化パターン（すなわち、付着する残基の種類、数および位置）は、その発現用に使用する細胞または細胞系に依存することは、当業者には明らかであろう。好ましく

50

は、ヒト細胞または細胞系を使用するか（すなわち、ヒトグリコシル化パターンを本質的に有するタンパク質をつくる）または、本質的かつもしくは機能的に、ヒトグリコシル化と同様の、または少なくともヒトグリコシル化を模倣する、グリコシル化パターンを提供することができる、別の哺乳類の細胞系を使用する。一般に、大腸菌などの原核宿主は、タンパク質をグリコシル化する能力を有さず、かつ、酵母などの下等真核生物の使用は、通常、ヒトグリコシル化と異なるグリコシル化パターンにつながる。それにもかかわらず、すべての前述の宿主細胞および発現系は、得られる所望のナノボディまたはタンパク質に依存して、本発明において使用できることを、理解されたい。

【0412】

したがって、本発明の非限定的な一実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、グリコシル化される。本発明の非限定的な別の実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、非グリコシル化される。

10

【0413】

本発明の好ましいが非限定的な一実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、細菌細胞において、特に、例えば前述の菌株の細胞などの、大規模な医薬的産生に適切な細菌細胞において、産生される。

【0414】

本発明の好ましいが非限定的な別の実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、酵母菌において、特に、例えば前述の種の細胞などの、大規模な医薬的産生のために適切な酵母菌において、産生される。

20

【0415】

本発明の好ましいが非限定的な別の実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、哺乳動物細胞において、特に、ヒト細胞またはヒト細胞系の細胞において、さらに特に、例えば前述の細胞系などの、大規模な医薬的産生のために適切であるヒト細胞またはヒト細胞系の細胞において、産生される。

【0416】

宿主細胞における発現が、本発明のナノボディおよびタンパク質を産生するために使用する場合、本発明のナノボディおよびタンパク質を、細胞内（例えば細胞質ゾル内、ペリプラズマ内、または封入体内）で産生し、次いで宿主細胞から単離し、場合により、さらに精製できるか；または、細胞外（例えば、宿主細胞が培養されている培地内）で産生し、次いで培地から単離し、場合により、さらに精製できる。真核生物の宿主細胞を使用する場合には、通常は、細胞外産生が好ましいが、それは、得たナノボディおよびタンパク質の、さらなる単離および下流での処理が、細胞外産生によって極めて容易になるからである。例えば前述の大腸菌の菌株などの細菌細胞は、例えば毒素や溶血素などの2、3のクラスのタンパク質を除き、通常は、細胞外でタンパク質を分泌せず、したがって、大腸菌における分泌産生というのは、内膜を通りペリプラズム腔へタンパク質が移動することを指す。ペリプラズムでの産生は、細胞質ゾルでの産生に対し、複数の利点を提供する。例えば、分泌された産物のN末端のアミノ酸配列は、特定のシグナルペプチダーゼにより分泌シグナル配列が切断された後の、天然の遺伝子産物と同一であり得る。また、細胞質より、ペリプラズムにおいての方が、プロテアーゼ活性がはるかに低いように見える。さらに、ペリプラズムにおいての方が汚染するタンパク質がより少ないため、タンパク質精製がより簡単である。さらなる利点は、ペリプラズムは、細胞質よりも酸化的環境を提供するため、正確なジスルフィド結合が形成する可能性があることである。大腸菌内で過剰発現されたタンパク質は、不溶性の凝集体、いわゆる封入体の中に、しばしば存在する。これらの封入体は、細胞質ゾル内またはペリプラズム内にあり得る。これらの封入体から生物学的に活性のあるタンパク質を回収するためには、変性/再折りたたみプロセスが必要である。治療用タンパク質を含む多くの組換えタンパク質が、封入体から回収される。または、当業者に明らかであるように、所望のタンパク質を分泌するように遺伝子を組換えた、細菌の組換え菌株、および、特に本発明のナノボディまたはポリペプチドを使用できる。

30

40

50

【0417】

したがって、本発明の非限定的な一実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、細胞内で産生し、かつ、宿主細胞から、特に細菌細胞からまたは細菌細胞の封入体から単離した、ナノボディまたはポリペプチドである。本発明の非限定的な別の実施態様によれば、本発明のナノボディまたはポリペプチドは、細胞外で産生し、かつ、宿主細胞が培養されている培地から単離した、ナノボディまたはポリペプチドである。

【0418】

これらの宿主細胞と共に使用するための、好ましいが非限定的ないくつかのプロモーターとしては、以下のものが挙げられる。

- 大腸菌における発現に関しては：lacプロモーター（およびその誘導体、例えばlacUV5プロモーターなど）；アラビノースプロモーター；ラムダファージの左向き（PL）および右向きの（PR）プロモーター；trpオペロンのプロモーター；ハイブリッドのlac/trpプロモーター（tacおよびtrc）；T7プロモーター（より具体的にはT7ファージ遺伝子10のプロモーター）および他のT系ファージプロモーター；Tn10テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター；外来の調節用オペレータ配列の1個または複数のコピーを含む上記のプロモーターを操作した変異体；

- S.セレビシエにおける発現に関しては：構成的：ADH1（アルコールデヒドロゲナーゼ1）、ENO（エノラーゼ）、CYC1（シトクロムc iso-1）、GAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸塩デヒドロゲナーゼ）；PGK1（ホスホグリセリン酸キナーゼ）、PYK1（ピルビン酸キナーゼ）；調節性：GAL1, 10, 7（ガラクトース代謝酵素）、ADH2（アルコールデヒドロゲナーゼ2）、PHO5（酸性ホスファターゼ）、CUP1（銅メタロチオネイン）；異種性：CaMV（カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター）；

- ピキアバストリスにおける発現に関しては：AOX1プロモーター（アルコールオキシダーゼI）

- 哺乳動物細胞における発現に関しては：ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）即時初期エンハンサー/プロモーター；ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）即時初期プロモーターがTetレプレッサーによって調節されるように、2個のテトラサイクリンオペレータ配列を含む、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）即時初期プロモーターの変異体；単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ（TK）プロモーター；ラウス肉腫ウイルス末端反復配列（RSV LTR）エンハンサー/プロモーター；ヒト、チンパンジー、マウスまたはラットからの延長因子1（hEF-1）プロモーター；SV40初期プロモーター；HIV-1末端反復配列プロモーター；アクチンプロモーター。

【0419】

これらの宿主細胞と共に使用するための、いくつかの好ましいが非限定的なベクターには、以下のものが挙げられる。

- 哺乳動物細胞における発現のためのベクター：pMAMneo（Clontech）、pcDNA3（Invitrogen）、pMC1neo（Stratagene）、pSG5（Stratagene）、EBO-pSV2-neo（ATCC 37593）、pBPV-1(8-2)（ATCC 37110）、pdBPV-MMTneo(342-12)（ATCC 37224）、pRSVgpt（ATCC 37199）、pRSVneo（ATCC 37198）、pSV2-dhfr（ATCC 37146）、pUCTag（ATCC 37460）、および1ZD35（ATCC 37565）、ならびに例えばアデノウイルスに基づく系などのウィルスベースの発現系；

- 細菌細胞における発現のためのベクター：pETベクター（Novagen）およびpQEベクター（Qiagen）；

- 酵母または他の真菌細胞における発現のためのベクター：pYES2（Invitrogen）およびピキア発現ベクター（Invitrogen）；

- 昆虫細胞における発現のためのベクター：pBlueBacII（Invitrogen）および他のバキュロウイルスベクター

10

20

30

40

50

- 植物または植物細胞における発現のためのベクター：例えばカリフラワーモザイクウイルスもしくはタバコモザイクウイルスに基づくベクター、アグロバクテリウム属の適切な菌株、またはTiプラスミドベースのベクター。

【0420】

これらの宿主細胞と共に使用するための、好ましいが非限定的ないくつかの分泌配列には、以下が挙げられる。

- 例えば大腸菌などの細菌細胞における使用には：PelB、Bla、OmpA、OmpC、OmpF、OmpT、StII、PhoA、PhoE、MalE、Lpp、LamB、など；TATシグナルペプチド、溶血素C末端分泌シグナル

- 酵母における使用には：接合因子プレプロ配列、ホスファターゼ（pho1）、インペルターゼ（Suc）など；

- 哺乳動物細胞における使用には：標的タンパク質が真核生物起源である場合には、固有のシグナル；マウスIg鎖V-J2-Cシグナルペプチドなど。

【0421】

本発明の宿主または宿主細胞を形質転換するための適切な技術は、当業者には明らかであり、所期の宿主細胞/宿主生物および使用される遺伝学的構造物に依存し得る。再度、上述したハンドブックおよび特許出願を参照されたい。

【0422】

形質転換後、本発明のヌクレオチド配列/遺伝学的構造物でうまく形質転換されたこれらの宿主細胞または宿主生物を検出し、選択するステップが行われ得る。これは、例えば、本発明の遺伝学的構造物内に存在する選択可能なマーカーに基づいた選択ステップ、または本発明のアミノ酸配列を、例えば特異的な抗体を使用する、検出に関するステップであってもよい。

【0423】

形質転換された宿主細胞（安定した細胞株の形態であり得る）または宿主生物（安定した突然変異株または菌株の形をし得る）が、本発明の別の態様を形成する。

【0424】

好ましくは、これらの宿主細胞または宿主生物は、本発明のアミノ酸配列を発現するか、または（例えば、適切な条件下で）（少なくとも）発現することができるようなものである（宿主生物の場合：アミノ酸配列の少なくとも1個の細胞、部分、組織または器官内）。本発明にはまた、本発明の宿主細胞または宿主生物の世代、後代および/または子孫が含まれ、それらを、例えば、細胞分裂または有性もしくは無性生殖によって得てもよい。

【0425】

本発明のアミノ酸配列の発現を生成/得るために、形質転換された宿主細胞または形質転換された宿主生物は、一般に、本発明の（所望の）アミノ酸配列が発現/生成されるような条件下で、保ち、維持し、および/または培養できる。適切な条件は、当業者には明らかであり、使用される宿主細胞/宿主生物、並びに、本発明の（関連）ヌクレオチド配列の発現を制御する調節要素に、通常は、依存するであろう。再度、本発明の遺伝学的構造物に関する段落において上述したハンドブックおよび特許出願書類を参照されたい。

【0426】

一般に、適切な条件として、適切な培地の使用、適切な食物源および/または適切な栄養の存在、適切な温度の使用、場合により、誘発因子または化合物の存在（例えば、本発明のヌクレオチド配列が誘導性プロモーターの制御下にある場合）が挙げられ得る。これら全ては、当業者によって選択され得る。この場合にやはり、このような条件下では、本発明のアミノ酸配列は、構成的な方法、一過性的な方法、または適切に誘導される場合のみに発現し得る。

【0427】

本発明のアミノ酸配列は、（まず）（上述したように）未成熟型で生成でき、次に、使用する宿主細胞/宿主生物によって、翻訳後修飾を受け得ることも当業者には明らかであ

10

20

30

40

50

る。また、本発明のアミノ酸配列は、この場合にもやはり、使用する宿主細胞/宿主生物によって、グリコシル化され得る。

【0428】

次いで、本発明のアミノ酸配列は、宿主細胞/宿主生物から、および/または宿主細胞または宿主生物が培養された培地から、例えば、(分取)クロマトグラフィーおよび/または電気泳動法、分画沈殿法、(例えば、本発明のアミノ酸配列と融合した特異的な分解アミノ酸配列を用いた)アフィニティー法、および/または、分取免疫学的手法(すなわち、単離されるアミノ酸配列に対して抗体を用いること)など、それ自体は公知であるタンパク質単離および/または精製技術を使用して単離され得る。

【0429】

一般に、医薬用途では、本発明群のうちの本発明のポリペプチドは、本発明の少なくとも1個のポリペプチドと、少なくとも1種の医薬上許容可能な担体、希釈剤または賦形剤および/またはアジュバント、並びに、場合により1種以上の別の医薬的に有効なポリペプチドおよび/または化合物を含む医薬調剤として製剤化され得る。非限定な例によって、このような製剤は、経口投与、非経口投与(例えば、静脈、筋肉もしくは皮下注射、または静脈注入)、局所投与、吸入による投与、皮膚パッチによる投与、インプラントによる投与、坐薬による投与などに適した形状であり得る。投与方法によって固体、半固体または液体であり得るこのような適切な投与形態、並びに、それを調製する際に用いられる方法および担体は、当業者には明らかであり、さらに以下に記載する。

【0430】

一般に、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、それ自体は公知である任意の適切な方法で製剤化し、投与できる。これについては、例えば、先に引用した一般的な背景技術(および、特に、国際公開公報第04/041862号、国際公開公報第04/041863号、国際公開公報第04/041865号、および国際公開公報第04/041867号)、並びにRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990)またはRemington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005)など標準的なハンドブックを参照されたい。

【0431】

例えば、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、それ自体は公知である任意の方法で、従来の抗体および抗体フラグメント(ScFvフラグメントおよびdiabodyフラグメントを含む)並びに他の医学的に有効なタンパク質に対して製剤化し、投与できる。このような製剤とその調製方法は、当業者には明らかであり、例えば、非経口投与(例えば、静脈、腹腔内、皮下、筋肉、管腔内、動脈内またはクモ膜下投与)または局所(すなわち、経皮または皮内)投与に適した調剤を含んでいる。

【0432】

非経口投与用の調剤は、例えば、注入または注射に適した無菌溶液、懸濁液、分散液、または乳濁液であり得る。このような調剤に適した担体または希釈剤として、例えば、生理学的リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液、ブドウ糖溶液およびハanks液など無菌水並びに水性緩衝液および溶液;水油;グリセロール;エタノール;プロピレングリコールなどのグリコール、または並びに、鉱油、動物油および植物油(例えば、ピーナッツ油、大豆油)、並びにそれらの適切な混合物が挙げられるが、それらだけに限定されない。通常は、水溶液または懸濁液が好ましいであろう。

【0433】

本発明のナノボディおよびポリペプチドはまた、送達の遺伝子治療方法を用いて投与できる。例えば、米国特許第5,399,346号を参照されたい。そのすべての内容は参照により本明細書に援用される。送達の遺伝子治療方法を用いると、本発明のナノボディまたはポリペプチドをコードする遺伝子でトランスフェクトされた初代細胞が、さらに、標的特定器官、組織、移植片、腫瘍または細胞に、組織特異的プロモーターでトランスフェクトされ得て、さらに、細胞内の局所的発現のために、シグナルおよび安定化配列でトランスフェクトされ得る。

10

20

30

40

50

【0434】

したがって、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体など医薬的に許容可能なビヒクルと組み合わせ、例えば、経口投与など全身投与できる。本発明のナノボディおよびポリペプチドは、硬質または軟質殻のゼラチンカプセルに包まれていてもよく、錠剤に圧縮されていてもよく、または患者の規定食の食品とともに直接組み込まれてもよい。経口的な治療投与については、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、1種または複数の賦形剤と組み合わせられ、摂取可能な錠剤、口腔錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ剤、オブラートなどの形状で用いられ得る。このような組成物および調剤は、本発明のナノボディまたはポリペプチドの少なくとも0.1%を含むべきである。組成物および調剤の割合は、もちろん変動し得て、都合のよいことには、所定の単位用量剤形の重量の約2~約60%の間とすることができる。このような治療的に有効な組成物における本発明のナノボディまたはポリペプチドの量は、有効な用量レベルを得るようなものである。

10

【0435】

錠剤、トローチ剤、丸薬、カプセル剤などはまた、以下のものを含むことができる。トラガカントガム、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤；リン酸ジカルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモでんぷん、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；およびショ糖、果糖、ラクトースまたはアスパルテームなどの甘味剤、または、ペパーミント、冬緑油もしくはチェリー香などの芳香剤を加えてもよい。単位用量剤形がカプセル剤である場合、上記のタイプの物質に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液状担体を含んでもよい。様々な他の物質が、被膜として、存在できるし、さもなければ固体の単位用量剤形の物理的形狀を変更する目的で存在できる。例えば、錠剤、丸薬またはカプセル剤がゼラチン、ワックス、セラックまたは砂糖などでコーティングされ得る。シロップまたはエリキシル剤は、本発明のナノボディおよびポリペプチド、甘味剤としてのショ糖または果糖、防腐剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、染料、チェリーまたはオレンジ香などの芳香剤を含み得る。もちろん、任意の用量剤形を調製する際に用いられる任意の材料は、医薬的に許容可能で、使用量においてほぼ無毒であるべきである。さらに、本発明のナノボディおよびポリペプチドを、持続放出調剤および持続放出製剤に組み込むことができる。

20

【0436】

経口投与用の調剤および製剤には、また、本発明の構造物が胃の環境に耐え、腸に入ることを可能にする腸溶被膜が備わっていてもよい。より一般に、経口投与用の調剤および製剤は、胃腸管の任意の所望の部分へ送達するために適切に製剤化できる。さらに、適切な坐薬は、胃腸管に送達するために用いることができる。

30

【0437】

本発明のナノボディおよびポリペプチドはまた、注入または注射によって静脈または腹腔内に投与できる。本発明のナノボディおよびポリペプチドの溶液またはそれらの塩は、水の中で調製でき、場合により、無毒の界面活性剤と混合できる。分散液も、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、トリアセチンおよびその混合物内、並びに油内で調製できる。貯蔵および使用の通常の下では、これらの調剤には、微生物の成長を妨げるために防腐剤を含んでいる。

40

【0438】

注射または注入に適した医薬上の用量剤形として、無菌注射可能もしくは注入可能溶液または分散液の即時調剤に適し、場合により、リポソームに封入されている有効成分を含む、無菌の水溶液もしくは分散液、または無菌粉末を挙げることができる。全ての場合において、最終的な用量剤形は、製造および貯蔵の条件下で、無菌であり、流体であり、安定していなければならない。液状担体またはビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど）、植物油、無毒のグリセリルエステル、およびそれらの適切な混合物を含む、溶媒または液体分散液培地であり得る。適度な流動性が、例えば、リポソームを形成することに

50

よって、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持することによって、または、表面活性剤を使用することによって、適度な流動性を維持できる。例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど様々な抗菌剤および抗かび剤によって、微生物の活動を防ぐことができる。多くの場合、等張剤（例えば、砂糖、緩衝剤または塩化ナトリウム）を含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物は、吸収遅延剤の組成物（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）において使用することによって、長期間吸収することができる。

【0439】

無菌の注射可能溶液は、本発明のナノボディおよびポリペプチドを、必要ならば、上記で列挙した様々な残りの成分を有する適切な溶媒に、必要量取り込み、次いで濾過滅菌することによって調製する。無菌の注射可能溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥法および凍結乾燥法である。これらによって、有効成分に加え、先に無菌濾過された溶液中に存在する任意の別の所望の成分の粉末を得る。

10

【0440】

局所投与の場合、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、純粋な形態、すなわちそれらが液体である場合に、適用できる。しかし、一般には、それらを組成物または製剤として、固体または液体であり得る皮膚科学的に許容可能な担体と組み合わせて、皮膚に投与することが望ましいであろう。

【0441】

有用な固体担体として、タルク、粘土、微晶質セルロース、シリカ、アルミナなど微細固体が挙げられる。有用な液状担体として、水、ヒドロキシアルキルまたは、グリコールもしくは水-アルコール/グリコールのブレンドが挙げられる。これらに、本発明のナノボディおよびポリペプチドが、有効なレベルで、場合により無毒の界面活性剤を用いて、溶解または分散することができる。芳香剤および追加の抗菌剤などアジュバントを、所定の用途に対する特性を最適化するために加えることができる。その結果生じた液状組成物を、吸収パッドから適用し、包帯および他の手当用品に含浸させるために用い、またはポンプ型もしくはエアゾールスプレーを用いて患部領域に噴射できる。

20

【0442】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪アルコール、変性セルロース、変性無機材料などの増粘剤がまた、使用者の皮膚に直接塗るために、塗布可能なペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成するために液状担体とともに使用することができる。

30

【0443】

本発明のナノボディおよびポリペプチドを皮膚に送達するために用いられることができる有用な皮膚組成物の例は、当技術分野では公知である。例えば、Jacquetら（米国特許第4,608,392号）、Geria（米国特許第4,992,478号）、Smithら（米国特許第4,559,157号）およびWortzman（米国特許第4,820,508号）を参照されたい。

【0444】

本発明のナノボディおよびポリペプチドの有用な用量は、それらのインビトロ活性とインビボ活性とを動物モデルにおいて比較することで決定できる。マウスおよび他の動物におけるヒトに対する有効な用量の外挿法は、当技術分野では公知である。例えば、米国特許第4,938,949号を参照されたい。

40

【0445】

一般に、ローション剤など液体組成物における本発明のナノボディおよびポリペプチドの濃度は、約0.1~25wt%であり、好ましくは、約0.5~10wt%である。ゲルまたは粉末など半固体または固体の組成物における濃度は、約0.1~5wt%、好ましくは、約0.5~2.5wt%である。

【0446】

治療に用いられるのに必要な本発明のナノボディおよびポリペプチドの量は、選択された特定のナノボディまたはポリペプチドだけでなく、投与経路、治療条件の本質、および患者の年齢や状態とともに変化し、最終的には、従事する医師または臨床医の判断による

50

であろう。また、本発明のナノボディおよびポリペプチドの投与量は、標的細胞、腫瘍、組織、移植片、または器官によって変化する。

【0447】

所望の投与量は、好都合なことに、単回投与量または適切な間隔で投与される分割投与（例えば、1日に2回、3回、4回またはそれ以上のサブ投与量として示され得る。サブ投与量自体はさらに、例えば、多数の個々に大まかに間隔の空いた投与に（例えば、吸入器からの多重吸入または眼に複数回点眼することによって）分割してもよい。

【0448】

投与計画は、長期の日常の治療を含み得る。「長期」は、少なくとも2週間、好ましくは、数週間、数ヶ月または数年の継続期間を意味する。この投与量の範囲の必要な変更は、本明細書の記述で示される日常的な実験のみを用いて、当業者が決定できる。Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PAを参照されたい。投与量はまた、任意の合併症が生じた場合には、個々の医師が調整できる。

10

【0449】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載したように、少なくとも1種のTNF関連の疾患または障害の予防および/または治療方法であって、該方法は、医薬的に有効な量の本発明のナノボディ、医薬的に有効な量の本発明のポリペプチド、および/またはそれを含む医薬的に有効な量の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法に関する。

20

【0450】

本発明の中では、「予防および/または治療」という用語は、疾患を予防および/または治療することを含むだけでなく、一般に、疾患の発症を防ぐこと、疾患の進行を遅らせるかまたは食い止めること、疾患に関連した1種以上の症状の発症を防ぐかまたは遅らせること、疾患に関連した1種以上の症状を軽減および/または緩和すること、疾患および/またはそれに関連した任意の症状の重症度および/または期間を軽減すること、および/または、疾患および/またはそれに関連した症状の重症度がさらに高くなるのを防ぐこと、疾患が原因で生じる任意の生理学的損傷を予防、軽減または食い止めることと、一般に、治療を受けている患者に有益な任意の薬理作用とを含んでいる。

【0451】

治療を受ける被験体は、任意の温血動物であり得るが、特に哺乳類であり、より具体的にはヒトである。当業者には明らかであるように、治療を受ける被験体は、特に、本明細書に記載した疾患および障害を患っているか、またはそれらの危険性がある人である。

30

【0452】

本発明はまた、本発明のナノボディまたはポリペプチドを患者に投与することによって、予防および/または治療することができる少なくとも1種の疾患または障害の予防および/または治療のための方法であって、該方法は、医薬的に有効な量の本発明のナノボディ、医薬的に有効な量の本発明のポリペプチド、および/またはそれを含む医薬的に有効な量の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法に関する。

【0453】

より具体的には、本発明は、本明細書で挙げた疾患および障害からなる群から選ばれる少なくとも1種の疾患または障害の予防および/または治療のための方法であって、該方法は、医薬的に有効な量の本発明のナノボディ、医薬的に有効な量の本発明のポリペプチド、および/またはそれを含む医薬的に有効な量の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法に関する。

40

【0454】

別の態様においては、本発明は、免疫療法、特に受動免疫療法に関し、この方法は、医薬的に有効な量の本発明のナノボディ、医薬的に有効な量の本発明のポリペプチド、および/またはそれを含む医薬的に有効な量の医薬組成物を、本明細書に記載した疾患および障害に苦しんでいるかまたはそれらの危険性がある被験体に、投与することを含む方法に

50

関する。

【0455】

上記の方法においては、本発明のナノボディおよび/またはポリペプチド、および/またはそれを含む組成物は、使用する特定の医薬製剤または組成物によって、任意の適切な方法で投与できる。したがって、本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドおよび/またはそれを含む組成物は、例えば、やはり、使用する特定の医薬製剤または組成物によって、経口投与、腹腔内投与（例えば、静脈投与、皮下投与、筋肉投与、または胃腸管を回避する任意の他の投与経路を介して）、鼻腔内投与、経皮投与、局所投与、坐薬を用いた投与、吸入投与することができる。臨床医は、予防もしくは治療する疾患または障害、並びに臨床医には周知の他の要因によって、適切な投与経路と、このような投与に用いる適切な医薬製剤または組成物とを選択することができる。

10

【0456】

本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドおよび/またはそれを含む組成物は、予防または治療されるべき疾患または障害を予防および/または治療するのに適した治療計画に従って、投与される。臨床医は、一般に、予防または治療される疾患または障害、治療される疾患の重症度および/またはその症状の重症度、使用される本発明の特異的なナノボディまたはポリペプチド、特定の投与経路および使用される医薬製剤または組成物、患者の年齢、性別、体重、食生活、全身状態などの要因、並びに、臨床医に周知の同様の要因によって、適切な治療計画を決定することができる。

【0457】

一般に、治療計画は、本発明の1種または複数のナノボディおよび/またはポリペプチド、または、それを含む1種または複数の組成物を、1種または複数の医薬的に有効な量または投与量で、投与することを含んでいる。投与される特定の量または投与量は、やはり、先に引用した要因に基づいて臨床医によって決定されることができる。

20

【0458】

一般に、本明細書に記載した疾患および障害を予防および/または治療するためには、治療される特定の疾患または障害、使用される本発明の特異的なナノボディおよびポリペプチドの効力、特定の投与経路および使用する特定の医薬製剤または組成物に依存して、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、一般に、1g/kg体重/日から0.01μg/kg体重/日の間、好ましくは、0.1g/kg体重/日から0.1μg/kg体重/日の間（例えば、約1μg/kg体重/日、10μg/kg体重/日、100μg/kg体重/日、または、1000μg/kg体重/日）の量を、1日1回投与量として（例えば、注入によって）連続的に、または、1日の間に複数の分割投与として、投与される。臨床医は、一般に、本明細書に記載した要因によって、適切な毎日の投与量を決定することができる。特定の場合には、臨床医は、例えば、先に引用した要因と臨床医の専門家としての判断に基づいて、これらの量からはずれて選択し得る。一般に、投与される量に関するいくつかのガイドラインは、本質的には同じ経路を介するが、アフィニティー/結合力、有効性、生体内分布、半減期および当業者に周知の同様の要因の違いを考慮して、投与される同じ標的に対して、比較可能な従来の抗体または抗体フラグメントに対して通常投与される量から得られることができる。

30

40

【0459】

通常、上記の方法では、本発明の単一のナノボディまたはポリペプチドを使用する。しかし、2種以上の本発明のナノボディまたはポリペプチドを組み合わせることは、本発明の範囲内である。

【0460】

本発明のナノボディおよびポリペプチドは、医薬的に有効な1種以上の別の化合物または成分と組み合わせ、すなわち併用治療計画としても使用でき、これにより、相乗効果を引き起こすこともあれば引き起こさないこともある。この場合もやはり、臨床医は、上記に挙げた因子および専門家としての判断に基づいて、そのような別の化合物または成分、ならびに適切な併用治療計画を選択することができるであろう。

50

【0461】

特に、本発明のナノボディおよびポリペプチドは、本明細書に引用する疾患および障害の予防および/または治療のために使用するか、または使用できる、医薬的に有効な他の化合物または成分と組み合わせる使用できる可能性があり、その結果として、相乗効果が得られることもあれば得られないこともある。このような化合物および成分、ならびにそれらを投与するための経路、方法、および医薬製剤または医薬組成物は、臨床医には明らかであろう。

【0462】

2種以上の物質または成分を併用治療計画の一環として使用する場合、それらは、同じ投与経路を介して、または異なる投与経路を介して、本質的に同時に、または別々の時点で（例えば、本質的に同時に、連続的に、もしくは交互に投与する治療計画に従って）、投与できる。これらの物質または成分を同じ投与経路を介して同時に投与する場合、当業者には明らかであるように、それらを、異なる医薬製剤もしくは医薬組成物として、または組み合わせた医薬製剤もしくは組成物の一部分として投与できる。

10

【0463】

また、2種以上の有効物質または有効成分を併用治療計画の一環として使用する場合、それらの各有効物質または有効成分は、その化合物または成分を単独で使用する場合に使用するのと同じ量で、かつ同じ治療計画に従って投与でき、また、そのような併用により、相乗効果を引き起こすこともあれば引き起こさないこともある。しかし、2種以上の有効物質または有効成分の併用により相乗効果が起きる場合、投与予定のそれらの物質または成分の1種、複数、または全種の量を減らし、それでもなお所望の治療作用を実現することが可能な場合もある。これは、例えば、通常量で使用する場合に1種以上の物質または成分の使用に付随する任意の望ましくない副作用を、回避、制限、または軽減し、それでもなお所望の医薬効果または治療効果を得るために有用な場合がある。

20

【0464】

本発明に従って使用する治療計画の有効性は、臨床医には明らかであるように、関与する疾患または障害に関してそれ自体が公知である任意の様式で、決定および/または追跡することができる。臨床医は、必要に応じて、かつケースバイケースで、所望の治療効果を実現するため、望ましくない副作用を回避、制限、もしくは軽減するため、かつ/または、一方で所望の治療効果を実現し、その一方で望ましくない副作用を回避、制限、もしくは軽減する適切なバランスを実現するために、個々の治療計画を変更または修正することもできる。

30

【0465】

一般に、治療計画は、所望の治療効果が実現されるまで、かつ/または所望の治療効果が維持されるべき期間、続けられる。やはり、これも臨床医が決定できる。

【0466】

したがって、別の態様において、本発明は、少なくとも1種の本発明のナノボディまたは少なくとも1種の本発明のポリペプチドおよび少なくとも1種の適切な担体（すなわち、獣医学的使用に適した担体）、ならびに場合により1種以上の別の有効物質を含む医薬組成物に関する。

40

【0467】

本発明は、医薬組成物を調製する際、特に、前述した疾患または障害のうちの1種など、TNF アルファによって媒介され、かつ/またはTNF アルファに関連した（例えば、TNF アルファの異常な活性、TNF アルファの異常なレベル、TNF アルファの異常な発現、および/またはTNF アルファに対する異常な過敏性もしくは応答に関連した）疾患または障害、あるいはTNF アルファに関連した生物学的現象のうち1種を予防および/または治療（少なくとも1種の症状の軽減が含まれるが、それに限定されない）するための医薬組成物を調製する際の、本発明のナノボディおよび/または本発明のポリペプチドの使用にも関する。

【0468】

50

本発明は、前述した疾患または障害のうちの1種など、TNF アルファによって媒介され、かつ/またはTNF アルファに関連した（例えば、TNF アルファの異常な活性、TNF アルファの異常なレベル、TNF アルファの異常な発現、および/またはTNF アルファに対する異常な過敏性もしくは応答に関連した）疾患または障害、あるいはTNF アルファに関連した生物学的現象のうち1種を予防および/または治療（少なくとも1種の症状の軽減が含まれるが、それに限定されない）するための方法であって、治療有効量の本発明のナノボディ、治療有効量の本発明のポリペプチド、および/または治療有効量の前述の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与する段階を含む方法にも関する。

【0469】

本発明は、腫瘍壊死因子 - アルファ（TNF アルファ）を被験体とする1種以上のナノボディを含むポリペプチドを提供する。本発明はさらに、診断および治療法におけるこれらの使用にも関する。該抗体は、ヒトフレームワーク配列に相同性が高いフレームワーク配列を有してよい。腫瘍壊死因子 - アルファ（TNF アルファ）に対する抗体を単独でまたは他の薬物と組み合わせて含む組成物について記載している。

【0470】

腫瘍壊死因子 - アルファ（TNF アルファ）は、様々な障害において、例えば関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症などの炎症性障害において重要な役割を果たすと考えられている。TNF アルファも受容体（CD120a、CD120b）も、極めて詳細に研究されてきた。生物活性型のTNF アルファは三量体であり、隣接するサブユニットによって形成される溝は、サイトカインと受容体の相互作用のために重要である。サイトカインの作用に拮抗するためのいくつかの戦略が開発されており、様々な疾患の状態を治療するために現在使用されている。

【0471】

TNF アルファに対して十分な特異性および選択性を有するTNF アルファ阻害因子は、TNF アルファが原因物質として関係付けられている障害を予防または治療するための効率的な予防用または治療用の医薬化合物となり得る。TNF アルファに対する抗体を用いて、毒素ショックを治療する方法（欧州特許第486526号）、腫瘍退縮、細胞毒性の抑制（米国特許第6448380号、米国特許第6451983号、米国特許第6498237号）、RAおよびクローン病などの自己免疫疾患（欧州特許第663836号、米国特許第5672347号、米国特許第5656272号）、移植片対宿主反応（米国特許第5672347号）、細菌性髄膜炎（欧州特許第585705号）を治療する方法が、説明されている。

【0472】

しかし、現在利用可能な薬物のどれも、自己免疫疾患の治療にとって完全に効果的ではなく、大半は高い毒性が原因で制限されている。さらに、効力およびそのような標的配列に対する選択性が十分である新しい化学的単位（NCE）を開発することは、極めて困難であり、かつ非常に長いプロセスである。これに対して、抗体ベースの治療薬は、標的に対する特異性が絶妙であり、かつ固有の毒性は低いため、薬物としてかなりの潜在能力を有する。さらに、新しい化学的単位（NCE）の開発と比べた場合、開発時間をかなり短縮することができる。しかし、従来の抗体は、TNF アルファの場合と同様に、リガンドの受容体結合ドメインが溝に埋め込まれている多量体タンパク質に対して産生させるのが困難である。本発明において説明する、ラクダ科（Camelidae）に由来する重鎖抗体は、空洞に結合する傾向を有することが公知である（国際公開第97/49805号；Lauwereysら、EMBO J. 17, 5312, 1998）。したがって、このような重鎖抗体は、本質的に、TNF のようなリガンドの受容体結合ドメインに結合するのに適している。さらに、このような抗体は、長期間に渡って安定であり、したがって貯蔵寿命を延長することが公知である（Perezら、Biochemistry, 40, 74, 2001）。さらに、このような重鎖抗体断片は、酵母または他の微生物など、哺乳動物細胞の培養発酵と比べて安価な発現系を使用する発酵槽中で「まとめて」製造することもできる（欧州特許第0698097号）。

【0473】

マウス、ヒツジ、ヤギ、ウサギなどの供給源に由来する抗体およびそれらのヒト化誘導体を、炎症の調節を必要とする状態の治療法として使用することは、いくつかの理由から問題がある。従来の抗体は室温では安定ではなく、調製および貯蔵の間、冷却されていなければならないため、冷却された実験室設備、貯蔵および輸送を必要とし、時間および費用がかかることになる。冷却は、発展途上国では実現可能ではないことがある。さらに、該抗体の製造または小規模な作製は、完全かつ活性な抗体の発現に必要な哺乳動物細胞系は時間および設備の点で高レベルの支援を必要とするため、高価であり、かつ収量は非常に少ない。さらに、従来の抗体はサイズが大きいため、例えば、炎症を起こした組織部位における組織への浸透が制限されるものである。さらに、従来の抗体は、pHに依存する結合活性を有し、したがって、例えば、胃の出血の治療、胃の外科手術の際など通常の生理学的pH範囲外の環境において使用するには不適切である。さらに、従来の抗体は低pHおよび高pHで不安定であり、したがって、経口投与には適していない。しかし、ラクダ科動物の抗体は、極端なpH、変性試薬、および高温など厳しい条件に耐えることが実証された(Dumoulinら、Protein Science 11, 500, 2002)ため、経口投与による送達に適している。さらに、従来の抗体は、温度に依存する結合活性を有し、したがって、生物学的に活性な温度範囲(例えば 37 ± 20)外の温度で実施されるアッセイまたはキットで使用するには不適切である。

10

【0474】

ポリペプチド治療薬、特に抗体ベースの治療薬は、標的に対する特異性が絶妙であり、かつ固有の毒性は低いいため、薬物としてかなりの潜在能力を有する。しかし、治療的に有用な標的に対して得た抗体は、ヒト治療法向けにそれを調製するために、それを投与した際のヒト個体における望ましくない免疫学的反応を回避するようにさらに改変する必要があることは、当業者には公知である。この改変プロセスは、一般に「ヒト化」と呼ばれる。ヒト以外の種において産生させた抗体は、その抗体をヒトでの治療に有用にするためにヒト化する必要があることは当業者には公知である((1)CDR移植: Protein Design Labs: 米国特許第6180370号、米国特許第5693761号; Genentech 米国特許第6054297号; Celltech: 460167、欧州特許第626390号、米国特許第5859205号; (2)ベニアリング(Veneering): Xoma: 米国特許第5869619号、米国特許第5766886号、米国特許第5821123号)。実質的なヒト化の要求をしないか、またはヒト化の必要性を完全に無くす抗体を作製するための方法が必要とされている。所定のフレームワーク領域またはアミノ酸残基を有し、かつ実質的なヒト化を必要とせず、またはヒト化を全く必要とせずにヒト被験体に投与できる、新しい種類の抗体が必要とされている。

20

30

【0475】

従来の抗体の別の重要な欠点は、それらが複雑な大型分子であり、したがって比較的不安定であり、かつプロテアーゼによる分解の影響を受けやすいことである。これは、従来の抗体薬物は、経口投与、舌下投与、局所投与、経鼻投与、経膈投与、直腸投与、または吸入投与できないことを意味する。これら部位の低pH、これら部位および血中でのプロテアーゼの作用に対して、従来の抗体薬物は耐性がないこと、ならびに/またはサイズが大きいためにその原因である。これらの問題のうちいくつかを克服するために、注射(静脈注射、皮下注射など)によって、従来の抗体薬物を投与しなければならない。注射による投与には、皮下注射用の注射器または針を正確かつ安全に使用するために専門家の訓練が必要となる。さらに、滅菌済み機器、治療ポリペプチドの液体製剤、該ポリペプチドを無菌かつ安定な形態でバイアル瓶に詰めたもの、および被験体に関しては、針を刺すのに適した部位が必要となる。さらに、被験体は、注射を受ける前または受ける際に身体的かつ心理的ストレスを一般に経験する。したがって、費用/時間を節約するだけでなく、被験体にとってより簡便かつ快適でもあると考えられる、注射を必要としない、治療ポリペプチドを送達するための方法が必要である。

40

【0476】

ナノボディベースの治療薬は、標的に対する特異性が絶妙であり、かつ固有の毒性は低いいため、薬物としてかなりの潜在能力を有する。しかし、それらの内因性かつ機能的なア

50

フィニティ-をさらに改善することにより、治療薬の投与量の低減、より迅速な治療法、および副作用の軽減など患者にとって多くの利点がもたらされ得る。

【0477】

本発明の一実施態様は、抗TNF アルファナノボディであり、ナノボディは、好ましくは上記により詳しく規定しているとおりである。

【0478】

本発明の一実施態様は、少なくとも1種の抗TNF アルファナノボディを含む抗TNF アルファポリペプチドであり、ポリペプチドは、好ましくは上記により詳しく規定しているとおりである。

【0479】

本発明の別の実施態様は、血清タンパク質に対して指向性を有する少なくとも1種のナノボディをさらに含む、前述の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0480】

本発明の別の実施態様は、該血清タンパク質が、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、チロキシン結合タンパク質、トランスフェリン、またはフィブリノーゲンのいずれかである、前述の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0481】

本発明の別の実施態様は、抗IFN- ナノボディ、抗TNF アルファ受容体ナノボディ、および抗IFN 受容体ナノボディからなる群より選択される少なくとも1種のナノボディをさらに含む、前述の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0482】

本発明の別の実施態様は、TNF アルファに対して指向性を有するナノボディの数が少なくとも2つである、前述の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0483】

本発明の別の実施態様は、少なくとも1種のナノボディがヒト化したラクダ科動物 V_H である、前述の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0484】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチド、ならびに抗IFN- ナノボディ、抗TNF アルファ受容体ナノボディ、および抗IFN 受容体ナノボディからなる群より選択される少なくとも1種のナノボディを含む、被験体に対して同時に、別々に、または逐次投与するための、組成物である。

【0485】

本発明の別の実施態様は、ナノボディが相同配列、機能部分、あるいは全長ナノボディの相同配列の機能部分である、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0486】

本発明の別の実施態様は、抗TNF アルファポリペプチドが相同配列、機能部分、あるいは全長抗TNF アルファポリペプチドの相同配列の機能部分である、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0487】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは少なくとも別のナノボディがラクダ科動物 V_{HH} である、前述の組成物である。

【0488】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドをコードする核酸である。

【0489】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドが腫瘍壊死因子 アルファと結合することを調節する薬剤を同定するための方法であって、以下の工程：
(a) ポリペプチドと標的との間の結合を可能にする条件下で、候補調節因子の存在下および非存在下において腫瘍壊死因子-アルファである標的と前述の抗TNF アルファポ

10

20

30

40

50

リペプチドとを接触させる工程、および

(b) 同定した候補調節因子の非存在下での結合と比べて相対的に、前述の抗TNF アルファポリペプチドと腫瘍壊死因子 - アルファとの結合を調節する薬剤として、同定された前記候補調節因子の存在下において結合が低下することにより、工程(a)のポリペプチドと標的との間の結合を測定する工程とを含む方法。

【0490】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドが腫瘍壊死因子 アルファと結合することにより、腫瘍壊死因子 - アルファ介在疾患を治療する薬剤を同定するための方法であって、以下の工程：

(a) ポリペプチドと標的との間の結合を可能にする条件下で候補調節因子の存在下および非存在下における腫瘍壊死因子 - アルファである標的と、前述の抗TNF アルファポリペプチドとを接触させる工程、および

(b) 同定した候補調節因子の非存在下における結合と比べて相対的に、腫瘍壊死因子 - アルファ介在疾患を治療する薬剤として、候補調節因子の存在下において結合が低下することにより、工程(a)のポリペプチドと標的との結合を測定する工程、を含む方法。

【0491】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドの腫瘍壊死因子 - アルファに対する結合を通じて、腫瘍壊死因子 - アルファのその受容体に対する結合を調節する薬剤を同定する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドと標的の間における結合を可能にする条件下で、候補調節因子の存在下および非存在下において腫瘍壊死因子 - アルファである標的と、前述の抗TNF アルファポリペプチドとを接触させる工程、および

(b) 前記候補調節因子の非存在下における結合と比べて相対的に、腫瘍壊死因子 - アルファのその受容体に対する結合を調節する薬剤として、同定された前記候補調節因子の存在下において結合が低下することによる、前記候補調節因子が、工程(a)のポリペプチドと標的との間の結合を測定する工程を含む方法である。

【0492】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドと腫瘍壊死因子 - アルファを含む、腫瘍壊死因子 - アルファ介在疾患を調節する薬剤のためのスクリーニング用キットである。

【0493】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドが前述の方法に従って、同定された腫瘍壊死因子 アルファと結合するのを調節する未知の薬剤である。

【0494】

本発明の別の実施態様は、前述の方法によって、同定された腫瘍壊死因子 - アルファ介在疾患を調節する未知の薬剤である。

【0495】

本発明の別の実施態様は、疾患が、炎症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症の1つ以上である、前述の未知の薬剤である。

【0496】

本発明の別の実施態様は、炎症過程に関連する疾患を治療および/または予防/または緩和させるための、前述の抗TNF アルファポリペプチド、あるいは前述の核酸、あるいは前述の組成物、あるいは前述の薬剤である。

【0497】

本発明の別の実施態様は、炎症反応に関連する疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした薬剤を調製するための、前述の抗TNF アルファポリペプチド、あるいは前述の核酸、あるいは前述の組成物あるいは前述の薬剤の使用である。

10

20

30

40

50

【0498】

本発明の別の実施態様は、物質を不活性化させずに、胃内環境を通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患を治療および/または予防および/または緩和するための、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0499】

本発明の別の実施態様は、物質を不活性化させずに胃内環境を通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療および/または予防および/または緩和するための薬剤の調製を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物の使用である。

10

【0500】

本発明の別の実施態様は、腹腔および/あるいは消化管に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患を治療および/または予防および/または緩和するための、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0501】

本発明の別の実施態様は、腹腔および/あるいは消化管に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和するための薬剤の調製を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物の使用である。

20

【0502】

本発明の別の実施態様は、鼻腔、上気道および/または肺に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる治療を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0503】

本発明の別の実施態様は、鼻腔、上気道および/または肺に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物の使用である。

30

【0504】

本発明の別の実施態様は、腸粘膜に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、腸粘膜の浸透性を高めるような疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0505】

本発明の別の実施態様は、腸粘膜に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、腸粘膜の浸透性を高めるような疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物の使用である。

40

【0506】

本発明の別の実施態様は、舌下組織を効果的に通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0507】

本発明の別の実施態様は、舌下組織を効果的に通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物の使用である。

【0508】

50

本発明の別の実施態様は、皮膚を効果的に通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物である。

【0509】

本発明の別の実施態様は、皮膚を効果的に通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の治療および/または予防および/または緩和するための薬剤の調製を目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドあるいは前述の組成物の使用である。

【0510】

本発明の別の実施態様は、前記疾患が炎症、関節リウマチ、COPD、喘息、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、糖尿病I型、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬症、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎および脈管炎のいずれかである、前述の方法、前述のキット、前述の核酸あるいは薬剤、前述の核酸あるいは薬剤の使用、前述の組成物、前述の組成物の使用、前述の抗TNF アルファポリペプチド、前述の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

10

【0511】

本発明の別の実施態様は、前述の核酸あるいは薬剤、前述の抗TNF アルファポリペプチド、あるいは前述の組成物、および好適な賦形薬を含む組成物である。

20

【0512】

本発明の別の実施態様は、腫瘍壊死因子 - アルファの機能異常によって特徴付けられる疾患の診断方法であって、以下の工程：

- (a) 前述の抗TNF アルファポリペプチドと標本とを接触させる工程と、
- (b) 前記ポリペプチドが標本と結合するのを検出する工程と、および
- (c) 工程(b)で検出した結合と標本に対して相対的に、結合の差異が腫瘍壊死因子 - アルファの機能異常によって特徴付けられる疾患の診断となる、基準とを比較する工程を含む方法である。

30

【0513】

本発明の別の実施態様は、前述の方法を用いた、前述に引用した疾患に対するスクリーニング用キットである。

【0514】

本発明の別の実施態様は、前述の単離した抗TNF アルファポリペプチドを含む、前述の疾患に対するスクリーニング用キットである。

【0515】

本発明の別の実施態様は、前記腫瘍壊死因子 - アルファの精製を目的とした前述の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

【0516】

本発明の別の実施態様は、腫瘍壊死因子 - アルファと1つ以上の腫瘍壊死因子 - アルファ受容体との間の相互作用を阻害することを目的とした、前述の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

40

【0517】

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドを産生するための方法であって、以下の工程：

- (a) 腫瘍壊死因子 - アルファを対象とするラクダ科動物のV_HHをコードする二重鎖DNAを得る工程、
 - (b) 工程(b)で選択したDNAをクローニングおよび発現させる工程、
- とを含む方法。

【0518】

50

本発明の別の実施態様は、前述の抗TNF アルファポリペプチドを産生するための方法であって、以下の工程：

(a) ポリペプチドの発現を可能にする条件下で、前述の抗TNF アルファポリペプチドをコードすることのできる核酸を含む宿主細胞を培養する工程、

(b) 培地から産生されたポリペプチドを回収する工程、

とを含む方法。

【0519】

本発明の別の実施態様は、宿主細胞が細菌あるいは酵母菌である、前述の方法である。

【0520】

本発明の別の実施態様は、炎症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群あるいは多発性硬化症のいずれかをスクリーニングするための、前述の抗TNF アルファポリペプチドを含むキットである。

【0521】

本発明による当業者にとって既知の V_{HH} は、国際公開第94/04678号に開示の(以後 V_{HH} ドメインまたはナノボディと称す)ラクダ科動物に由来する免疫グロブリンなど、軽鎖が生来欠失している免疫グロブリン由来の重鎖可変ドメインである。 V_{HH} 分子は、IgG分子に比べ約10倍分だけ小さい。これら分子は、単一ポリペプチドであり、非常に安定し、極度のpHおよび温度条件を維持する。さらにこれらの分子は、従来の抗体に該当しないタンパク質分解酵素の作用に耐性を含む。さらに、 V_{HH} がインビボで発現した場合には、高い収率で産生され、おそらくは正確に折り畳まれた機能性 V_{HH} となりうるであろう。さらに、ラクダ科動物内で生成された抗体は、抗体ライブラリの使用により、あるいはラクダ科動物(国際公開第9749805号)以外の哺乳動物の免疫接種によってインビトロで生成された抗体によって認識されるエピトープ以外のエピトープを認識する。このように、抗TNF アルファ V_{HH} は、従来の抗体に比べより効果的にTNF アルファと相互作用しうるため、TNF アルファ受容体とのその相互作用をさらに効率的に遮断する。

【0522】

TNF アルファは、免疫反応を誘発しうるTNF アルファの断片でもある。TNF アルファは、全長TNF アルファに対して生じるナノボディに結合できるTNF アルファの断片でもある。

【0523】

TNF アルファに対して指向性を有するナノボディは、 10^{-6} Mよりも大きいアフィニティーでTNF アルファに結合することができるナノボディを意味する。

【0524】

本発明の一実施態様は、ナノボディがTNF アルファに対して指向性を有するラクダ科動物 V_{HH} を含む、抗TNF アルファポリペプチドである。

【0525】

TNF アルファに対して指向性を有する抗TNF アルファポリペプチドの1つ以上のナノボディの配列は、同じであってよい。または、すべてが同じ配列を有していてもよい。抗TNF アルファポリペプチドが、すべてが同じ配列を共有しているわけではないが、同じ標的、その1つ以上の抗原に対して指向性を有する抗TNF アルファナノボディを含むことは、本発明の目的の範囲内である。

【0526】

本発明はさらに、前記ナノボディが、ヒト様配列を含むクラスに属し、TNF アルファに対して指向性を有する V_{HH} である、抗TNF アルファポリペプチドに関する。このクラスは、 V_{HH} が、位置45、例えばL45におけるグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、アスパラギンあるいはグルタミンおよび位置103におけるトリプトファンからなる群から選択されたアミノ酸を輸送することで特徴付けられる(付番はKabatの付番による)。別のヒト様クラスのラクダ科動物ナノボディが、国際公

10

20

30

40

50

開第03035694号に開示されており、これには、ヒト由来の従来の抗体あるいは他の動物種からの従来の抗体に通常認められるが、二重鎖抗体からのV_Hに存在する保存トリプトファン残基を置換する、位置103上の電荷を含むアルギニン残基による親水性のこの欠失を補正する親水性FR2残基を含有している。このように、これらの2クラスに属するペプチドは、ヒトV_Hフレームワーク領域に対する高アミノ酸配列相同性を示し、前記ペプチドは、そこからの不要な免疫反応を予期することなく、さらにはヒト化のストリンジентな作業も行わず、直接ヒトに投与してよい。本発明は、前記ポリペプチドをコードすることのできる核酸にも関する。

【0527】

本発明により使用するV_{H H}のいずれかは、従来のクラスあるいはヒト様ラクダ科動物の抗体のクラスであってよい。前記抗体は、TNF アルファ全体あるいはその断片あるいはその相同配列の断片に対して指向性を有してもよい。これらのポリペプチドには、全長ラクダ科動物の抗体、すなわちFcおよびV_{H H}ドメイン、それ自体または由来断片によるヒトFcドメインあるいはV_{H H}を含む重鎖ラクダ科動物の抗体のキメラ版を含む。

10

【0528】

抗血清アルブミンV_{H H}は、担体タンパク質として既知である従来の抗体より優れた効率的な方法で血清アルブミンと相互作用する。担体タンパク質としての血清アルブミンのエピトープの一部は、結合タンパク質、ペプチドおよび小化合物によるアクセスは不能であると考えられる。V_{H H}は、空洞などの「異常な」あるいは非従来型のエピトープに結合することが既知であるので(国際公開第97/49805号)、このV_{H H}の循環アルブミンに対するアフィニティーが高まる可能性がある。

20

【0529】

本発明は、被験体の1つあるいはそれ以上の血清タンパク質に対して指向性を有する1つ以上のナノボディをさらに含む本明細書記載の抗TNF ポリペプチドが、構造物のいずれでもないときに抗TNF アルファナノボディの半減期に比べ、驚くべきことに、被験体の循環で大幅に半減期を延長させているという発見に関する。さらに、前記ポリペプチドは、マウスで損なわれないうまの保持される高い安定性、極度のpH抵抗性、高温安定性および高標的アフィニティーなどといった同じナノボディの好ましい特性を示すことが明らかとなった。

【0530】

30

血清タンパク質は、被験体の血清中に認められる好適なタンパク質であると考えられる。本発明の一態様では、血清タンパク質は、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、チロキシン結合タンパク質、トランスフェリンあるいはフィブリノゲンのいずれかである。標的抗原の効果的処置および/または細分化のための必須半減期などといった目的とする用途しだいで、V_{H H}パートナーを前述の血清タンパク質のひとつに指向させることができる。

【0531】

本発明の具体的であるが非限定的な態様によれば、ヒト血清アルブミンに対するナノボディは、4つのフレームワーク領域(FR1~FR4それぞれ)および3つの相補的決定領域(CDR1~CDR3それぞれ)で構成されており、それら領域には、

(iv) CDR1が、以下からなる群から選択されたアミノ酸配列であり、

40

SFGMS [SEQ ID NO: 36]

LNLMG [SEQ ID NO: 37]

INLLG [SEQ ID NO: 38]

NYWMY; [SEQ ID NO: 39]

および/または前述のアミノ酸配列の1つを含む2つあるいは唯一の「アミノ酸の相違」(本明細書で規定のとおり)を含むアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列であり、この配列では、

(1) アミノ酸置換が好ましくは、保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)であり、および/または、

(2) 前記アミノ酸配列が好ましくはアミノ酸置換だけを含み、前述アミノ酸配列に

50

比べてアミノ酸欠失および挿入を含まないことが望ましく、

【0532】

(v) さらにCDR2は、以下からなる群から選択されたアミノ酸配列であり、

SISGSGSDTLYADSVKG [SEQ ID NO: 40]

TITVGDSTNYADSVKG [SEQ ID NO: 41]

TITVGDSTSYADSVKG [SEQ ID NO: 42]

SINGRGDDTRYADSVKG [SEQ ID NO: 43]

AISADSSTKNYADSVKG [SEQ ID NO: 44]

AISADSSDKRYADSVKG [SEQ ID NO: 45]

RISTGGGYSYYADSVKG [SEQ ID NO: 46]

10

あるいは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは95%、さらに好ましくは99%の、前述のアミノ酸配列の1つを含む配列同一性(本明細書で規定のとおり)を含むアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列であって、この配列では、

(1) アミノ酸置換が保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)であることが好ましく、および/または、

(2) 前記アミノ酸配列が、前述のアミノ酸配列に比べアミノ酸置換しか含まず、アミノ酸欠失あるいは挿入を含まないことが好ましく、

および/または前述のアミノ酸配列の1つを含む3、2あるいは唯一の「アミノ酸」の差異(本明細書で規定のとおり)を含むアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列であり、この配列では、

20

(1) 任意のアミノ酸置換が、好ましくは保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)であり、および/または、

(2) 前記アミノ酸配列が前述のアミノ酸配列に比べアミノ酸置換だけを含んでおり、アミノ酸欠失または挿入を含んでおらず、または、

【0533】

(vi) CDR3は、以下からなる群から選択されたアミノ酸配列であり、

DREAQVDTLDFDY [SEQ ID NO: 47]

あるいは、少なくとも80%、好ましくは90%、さらに好ましくは95%、きわめて好ましくは99%前述のアミノ酸の1つとの同一性を含むアミノ酸

30

(1) 任意のアミノ酸が保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)であり、さらに/または

(2) 前記アミノ酸配列が、前述のアミノ酸配列に比べ、アミノ酸置換だけを含み、アミノ酸欠失あるいは挿入を含まないもの

からなる群から、さらには/または前述のアミノ酸の1つを含む3、2あるいは唯一の「アミノ酸の相違」(本明細書で規定のとおり)を含む、

GGSLSR [SEQ ID NO: 48]

RRTWHSEL [SEQ ID NO: 49]

GRSVSRS [SEQ ID NO: 50]

GRGSP [SEQ ID NO: 51]

40

のアミノ酸配列からなる群から選択され、この配列では、

(1) 任意のアミノ酸置換が、好ましくは保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)であり、および/または、

(2) 前記アミノ酸配列が、前述のアミノ酸配列に比べアミノ酸置換だけを含んでおり、アミノ酸欠失または挿入を含まないことを特徴とする。

【0534】

別の態様では、本発明は、下記のCDR1、CDR2およびCDR3のそれぞれの組み合わせのどれか1つを含むドメイン抗体および/または単一のドメイン抗体からなる群から選択された、4つのフレームワーク領域(FR1~FR4それぞれ)および3つの相補的決定領域(CDR1~CDR3それぞれ)からなるヒト血清アルブミンに対するナノボ

50

ディに関する。

- CDR1: SFGMS; CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG; CDR3: GGSLSR;
- CDR1: LNLMG; CDR2: TITVGDSTNYADSVKG; CDR3: RRTWHSEL;
- CDR1: INLLG; CDR2: TITVGDSTSYADSVKG; CDR3: RRTWHSEL;
- CDR1: SFGMS; CDR2: SINGRGDDTRYADSVKG; CDR3: GRSVSRS;
- CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3: GRGSP;
- CDR1: SFGMS; CDR2: AISADSSDKRYADSVKG; CDR3: GRGSP;
- CDR1: NYWMY; CDR2: RISTGGGYSYYADSVKG; CDR3: DREAQVDTLDFDY.

【0535】

前述のCDRの組み合わせを含む本発明のナノボディにおいては、各CDRは、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも99%の、前述のCDRを含む配列同一性の(本明細書で規定のとおり)アミノ酸配列からなる群から選択されたCDRによって置き換えることができ、ここで、

(1) 任意のアミノ酸置換が、好ましくは保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)

であり、および/または、

(2) アミノ酸配列が、好ましくは前述のアミノ酸配列に比べアミノ酸置換だけを含んでおり、アミノ酸欠失または挿入を含まないことを特徴とし、

および/または前述のアミノ酸配列のひとつである前述のCDRを含む「アミノ酸の相違」(本明細書で規定のとおり)3、2あるいは唯一の(前項に指摘)

を含むアミノ酸配列からなる群から選択されたCDRによって置き換えることができる。ここで、

(1) 任意のアミノ酸置換が、好ましくは保存的アミノ酸置換(本明細書で規定のとおり)であり、および/または、

(2) アミノ酸配列が、好ましくは、前述のアミノ酸配列に比べアミノ酸置換だけを含んでおり、アミノ酸欠失または挿入を含まない。

【0536】

しかし、前述のCDRの組み合わせを有する本発明のナノボディのうち、前述に列挙したCDRの1つ以上を含むナノボディが特に好ましく、先に挙げたCDRの2つ以上を含むナノボディはさらに特に好ましく、先に挙げたCDRの3つを含むナノボディはさらに特に好ましい。

【0537】

ヒト血清アルブミンに対するこれらのナノボディでは、フレームワーク領域FR1~FR4が本発明のナノボディとして好ましくは規定されたとおりである。

【0538】

ヒト血清アルブミンに対し特に好ましいナノボディは、配列番号: 61~67、配列番号: 87~89および配列番号100~104からなる群から選択される。好ましいCDRの組み合わせとこれらナノボディに存在するフレームワーク領域を表IIにも列挙する。

【0539】

表II: フレームワーク配列の好ましい組み合わせとヒト血清アルブミンに対するナノボディ中のCDR

10

20

30

40

【表 I I】

PMP6A8 (ALB2)	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
3	6	AVQLVESGGGLVQGG	3	3	8	WYRGGPG	8	TCITVGDSTNY	9	RFTISMDYTKGTVMYLH	4	4	1	WGGGTQ
8	8	GSLRLCAASERIFD	5	5	2	NERELVA	9	ADSVKG	6	INSLRPEDTGLYCKI	3	3	0	VTVSS
3	6	EVQLVESGGGLVQEG	3	3	8	WYRQGFPG	3	TIIVGDSTVA	9	RFTISRDYDKNTLYLQM	4	4	1	WGGGTQ
9	9	GSLRLCAASERIFD	6	6	3	NERELVA	0	DSVYKG	7	INSLRPEDTGLYCKI	4	4	1	VTVSS
7	7	AVQLVESGGGLVQPG	7	7	8	WYRQAPG	9	SISGGSDTLY	9	RFTISRDNAKNTLYLQM	4	4	1	SSGGTQV
(ALB1)	0	INSLRSCAASGFTFR	7	7	4	KEPEWVS	1	ADSVKG	8	INSLKPEDTAVYYCTI	5	5	2	TVSS
7	7	AVQLVDSGGGLVQPG	7	7	8	WYRQYFG	9	SINGRGDDTRY	9	RFSISRDNAKNTLYLQM	4	4	1	RTGGTQV
1	1	GSLRLSCAASGFTFR	6	6	5	KEPEWVS	2	ADSVKG	9	INSLKPEDTAEYYCTI	6	6	3	TVSS
3	3	AVQLVESGGGLVQPG	3	3	8	WYRQAPG	3	AISADSTKNY	4	RFTISRDNAKNTLYLQM	4	4	1	SSPGTQV
2	2	GSLRLTCTASGFTFR	9	9	6	KDGEWVS	3	ADSVKG	0	INSLKPEDTAVYYCTI	7	7	4	TVSS
3	3	CVQLAESGGGLVQPG	8	8	3	WYRQAPG	9	AISADSDKRY	4	RFTISRDNAKNTLYLQM	4	4	1	ASGGTQV
3	3	GSLRLTCTASGFTFR	0	0	7	EGLWVS	4	ADSVKG	1	INSLKSEDITAVYYCTI	8	8	5	TVSS
7	7	CVQLVESGGGLVQPG	8	8	8	WYRQAPG	9	RDIISGGGYSY	4	RFTISRDNAKNTLYLQM	4	4	1	RGGGTQ
4	4	GSLRLSCAASGFTFR	1	1	8	KGLERIS	5	YADSVKYG	0	INSLKPEDTALYCAK	9	9	6	VTVSS

10

20

【0540】

本発明の別の態様は、抗IFN-ガンマポリペプチド、抗TNF アルファ受容体ポリペプチドおよび抗IFN-ガンマ受容体ポリペプチドからなる群から選択された少なくとも別のポリペプチドをさらに含む本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。

30

【0541】

本発明の一態様によれば、ナノボディは、TNF アルファ受容体に対して指向性を有する。前記ナノボディは、ラクダ科動物V_HHであってもよい。

【0542】

本発明の一態様によれば、ナノボディは、IFNガンマ受容体に対して指向性を有する。前記ナノボディは、ラクダ科動物のV_HHであってもよい。

【0543】

本発明の別の態様は、本明細書に引用されている自己免疫疾患あるいは病態治療するための、抗IFNガンマポリペプチド、抗TNF アルファ受容体ポリペプチドおよび以下に記載する相互に結合したポリペプチドなどの抗IFNガンマ受容体ポリペプチドからなる群から選択された少なくとも別のポリペプチドをさらに含む有効量の抗TNF アルファポリペプチドを完全に投与する工程を含む方法である。

40

【0544】

この多重特異的構造物は、単一特異的構造物よりも炎症性治療化合物としての潜在的能力が向上している可能性がある。

【0545】

本発明の一態様は、本明細書に開示のような抗TNF アルファポリペプチドおよび抗IFNガンマポリペプチド、抗TNF アルファ受容体ポリペプチドおよびIFNガンマ

50

受容体ポリペプチドからなる群から選択された少なくとも別のポリペプチドを含む組成物であり、これらは被験体に同時に、個別に、あるいは順次投与する。

【0546】

本発明の一態様は、抗TNF アルファポリペプチドの有効量および抗IFN-ガンマポリペプチド、抗TNF アルファ受容体ポリペプチドおよびIFN-ガンマ受容体ポリペプチドからなる群から選択された少なくとも別のポリペプチドの有効量を個人に対し同時に、個別にあるいは順次投与する工程を含む自己免疫疾患を治療するための方法である。

【0547】

本発明の別の態様は、被験体に同時に、個別にあるいは順次投与することを目的とした、抗TNF アルファペプチド、および抗IFNガンマポリペプチド、抗TNF アルファ受容体ポリペプチドおよび抗IFNガンマ受容体ポリペプチドからなる群から選択された、少なくとも別のポリペプチドを含むキットである。本発明に従いキットを使用することのできるという点は、本発明の1つの態様である。本明細書に引用する疾患を治療するのにキットを使用することができるという点は、本発明の1つの態様である。

10

【0548】

同時投与とは、被験体に対しポリペプチド群を同時に投与することを意味する。例えば、ポリペプチドの混合物あるいは前記ポリペプチドを含む組成物として投与する。例として、対象となるポリペプチドを含む液体の皮下投与、錠剤、液体、塗薬などの投与があげられるが、これに限定されない。

【0549】

個別投与とは、同時に一人の被験体に複数の投与を行うことあるいは同時に皮下注射を行うことを意味する。ポリペプチドは、独立した混合していない調剤としてキット内に存在している。例えば、各種ポリペプチドは、個々の錠剤としてキット内に存在している場合がある。2種類の錠剤を同時にあるいは1つずつ続けて嚥下させることによって被験体に錠剤を投与してもよい。

20

【0550】

順次投与とは、被験体にポリペプチドを順次投与することを意味する。ポリペプチドは、独立した混合していない調剤としてキット内に存在する。投与には間隔が必要である。例えば、1つのポリペプチドを、一方の成分を投与した後に336、312、288、264、240、216、192、168、144、120、96、72、48、24、20、16、12、8、4、2、1または0.5時間内に投与することができる。

30

【0551】

順次投与では、1つのポリペプチドを1回投与するか、あるいは別のポリペプチドの投与前および/または後に任意の回数、さまざまな用量で投与してもよい。順次投与は、同時投与あるいは順次投与と組み合わせることができる。

【0552】

以下に述べる抗TNF アルファポリペプチドの医療での使用は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドおよび本明細書に開示の被験体に同時に、独立してまたは順次投与することを目的とした、抗IFNガンマポリペプチド、抗TNF アルファ受容体ポリペプチドおよび抗IFNガンマ受容体ポリペプチドからなる群から選択された少なくとも別のポリペプチドを含む組成物にも適用される。

40

【0553】

本発明の一態様によれば、抗IFNガンマポリペプチドあるいは抗TNF アルファは、IFNガンマに対して指向性を有するナノボディである。前記ナノボディはラクダ科動物V_{HH}であってよい。

【0554】

本発明の一態様によれば、抗TNF アルファナノボディは、TNF アルファ受容体に対して指向性を有する。前記ナノボディはラクダ科動物V_{HH}であってよい。

【0555】

本発明の一態様によれば、抗IFNガンマ受容体ポリペプチド抗TNF アルファは、

50

I F Nガンマ受容体に対して指向性を有するナノボディである。前記ナノボディはラクダ科動物V_HH_Hであってよい。

【0556】

本発明の別の実施態様は、T N F アルファに対して指向性を有するナノボディの数が、2つ以上である、本明細書に開示の抗T N F アルファポリペプチドである。該多価の抗T N F アルファポリペプチドは、標的に対して異常なほど高い機能的アフィニティーを有し、一価の抗T N F アルファポリペプチドに比べ、非常に高い阻害特性を示すという利点がある。

【0557】

多価の抗T N F アルファポリペプチドは、一価の親抗T N F アルファポリペプチドに比べ高い数倍ものレベルの機能的アフィニティーを有する。発明者らは、これら多価のポリペプチドの機能的アフィニティーが2価および多価抗体に関する先行技術で報告されている機能的アフィニティーよりもはるかに高いということ突き止めている。驚いたことに、互に直接あるいは短いリンカー配列を介して結合している、本発明の抗T N F アルファポリペプチドは、従来の多価4鎖抗体で理論的に期待される高い機能的アフィニティーを示す。

10

【0558】

発明者らは、このように大幅に上昇した機能的活性が直接結合試験で、あるいは機能的試験、例えば細胞毒性試験などのいずれかで、多ドメインおよび多重メトリックタンパク質からなる抗原で検出可能であることが好ましいことを発見した。

20

【0559】

ナノボディは、当技術分野で既知の方法あるいは今後のいずれかの方法を用いて、複数のナノボディを含む、本明細書で開示のポリペプチドのどれかを形成するために結合してもよい。例えば、これらのナノボディを、Blattlerら、Biochemistry 24,1517-1524; 欧州特許第294703号によって記述されているような、有機誘導体化材とアミノ酸残基を反応させることによって化学的架橋によって融合させてもよい。あるいは、ナノボディをDNAレベルすなわち、1つ以上の抗標的ナノボディおよび1つあるいはそれ以上の抗血清タンパクナノボディを含む、完全ポリペプチド構造物をコードする、形成されたポリヌクレオチド構造物であるDNAのレベルで遺伝子操作によって融合させてもよい。2価あるいは多価VHHポリペプチド構造物を産生するための方法は、PCT特許出願国際公開第96/34103号に開示されている。複数のナノボディを結合させるための一方法は、直接あるいはペプチドリンカーを介して、ナノボディコード配列を連結することによって遺伝子経路を通じる方法である。例えば、第一のナノボディのC末端は、次のナノボディのN末端に連結させてもよい。その連結方式は、3-、4-など機能的構造物の構築および産生のための別のナノボディを連結させるために拡張することができる。

30

【0560】

本発明の一態様によれば、ナノボディはリンカーを使用せずに互に直接連結する。リンカー配列が2つのサブユニットにおける結合活性を維持するのに必要であるような、従来の大きい抗体を連結するのに対し、本発明のポリペプチドは直接連結でき、それによって、ヒトの被験体に投与したときの抗原性、リンカー配列の不安定性によるサブユニットの溶解など、リンカー配列の潜在的問題の発生を回避させることが可能である。

40

【0561】

本発明の別の態様によれば、ナノボディは、ペプチドリンカー配列を介して互に連結する。該リンカー配列は、自然発生配列あるいは非自然発生配列のどちらであってもよい。リンカー配列は、抗T N F アルファポリペプチドを投与する被験体内では非免疫原性である。リンカー配列は多価抗T N F アルファポリペプチドに対し十分なしなやかさを備える一方で、同時にタンパク質分解性劣化に対する耐性も備える。リンカー配列の非限定的な例として、国際公開第96/34103号に記載されている、VHHのヒンジ領域から由来することのできるリンカー配列がある。

【0562】

50

本発明の別の態様によれば、3つ以上のナノボディを含む多価ナノボディは、相互に直接にあるいはリンカー配列を介して連結可能である。該構造物は、従来の抗体で大きいサブユニットの立体障害によって発生することが困難であるために、機能性が、一価の構造物に比べ、本発明のVHHで認められるかなりの増大よりもむしろ喪失するかまたは大幅に減少することになる。

【0563】

本明細書に開示のポリペプチド構造物は、当技術分野で公知の方法あるいは将来のどれかの方法によれば、当業者によって発生することは可能であろう。例えば、VHHは、ラクダを免疫化し、そのハイブリドームを得るか、あるいは当技術分野で公知の分子生物学的技術を用いてナノボディライブラリをクローニングし、引き続きファージディスプレイを用いて選択を行うことによるなど、当技術分野で公知の方法を用いて得ることができる。

10

【0564】

本発明の態様によれば、抗TNF アルファポリペプチドは、全長抗TNF アルファポリペプチドの同種配列であってよい。本発明のさらなる態様によれば、抗TNF アルファポリペプチドは、全長抗TNF アルファペプチドの機能部分であってよい。本発明のさらなる態様によれば、抗TNF アルファペプチドは、全長抗TNF アルファペプチドの同種配列であってよい。本発明のさらなる態様によれば、抗TNF アルファペプチドは、全長抗TNF アルファペプチドの機能部分であってよい。本発明の態様によれば、抗TNF アルファペプチドは、抗TNF アルファペプチドの配列を有していてもよい。

20

【0565】

本発明の態様によれば、抗TNF アルファペプチドを形成するのに使用するナノボディは、完全ナノボディ（例えば、V_HH）あるいはその同種配列であってよい。本発明のさらなる態様によれば、抗TNF アルファペプチドを形成するのに使用するナノボディは、完全ナノボディの機能部分であってよい。本発明のさらなる態様によれば、ポリペプチド構造物を形成するのに使用するナノボディは、完全ナノボディの同種配列であってよい。本発明のさらなる態様によれば、ポリペプチド構造物を形成するのに使用するナノボディは、完全ナノボディの同種配列の機能部分であってよい。

【0566】

本明細書に使用するように、本発明の同種配列は、本発明のポリペプチドの機能的特性を実質的に改変しない、1つ以上のアミノ酸の付加、欠失あるいは置換を含んでいてもよい。アミノ酸の欠失あるいは置換の数は、最高1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69あるいは70個までのアミノ酸であることが好ましい。

30

【0567】

本発明による相同配列は、アミノ酸の挿入、欠失あるいは置換によって修飾されたポリペプチドであってよいが、前記修飾は、未修飾ポリペプチドに比べ、機能的特性を実質的に改変することはない。

40

【0568】

本発明による相同配列は、アミノ酸の挿入、欠失あるいは置換によって修飾されたポリペプチドであってよいが、前記修飾は、未修飾ポリペプチドに比べ、機能的特性を実質的に改変することはない。

【0569】

本発明による相同配列は、例えばラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、グワナコなど、他のラクダ科の動物種に存在している配列であってよい。

50

【0570】

相同配列が、配列同一性を示す場合には、この相同配列とは親配列と高い同一性（70%、75%、80%、85%、90%、95%あるいは98%より高い同種同一性）を示し、親配列の類似した特性、すなわちアフィニティー、によって特徴付けられることが好ましい配列を意味し、同一性は、公知の方法を用いて計算される。

【0571】

あるいは、相同配列は、下記化学式に従って、親配列の任意の数の位置で許容される置換から生じた任意のアミノ酸配列であってもよい：

Ser、Thr、GlyおよびAsnによって置換されたSer；
 Arg、His、Gln、LysおよびGluの1つによって置換されたArg； 10
 Leu、Ile、Phe、Tyr、MetおよびValの1つによって置換されたLeu；
 Pro、Gly、AlaおよびThrの1つによって置換されたPro；
 Thr、Pro、Ser、Ala、Gly、HisおよびGlnの1つによって置換されたThr；
 Ala、Gly、ThrおよびProの1つによって置換されたAla；
 Val、Met、Tyr、Phe、IleおよびLeuの1つによって置換されたVal；
 Gly、Ala、Thr、ProおよびSerの1つによって置換されたGly；
 Ile、Met、Tyr、Phe、ValおよびLeuの1つによって置換されたIle 20
 Phe、Trp、Met、Tyr、Ile、ValおよびLeuの1つによって置換されたPhe；
 Tyr、Trp、Met、Phe、Ile、ValおよびLeuの1つによって置換されたTyr；
 His、Glu、Lys、Gln、ThrおよびArgの1つによって置換されたHis；
 Gln、Glu、Lys、Asn、His、ThrおよびArgの1つによって置換されたGln；
 Asn、Glu、Asp、GlnおよびSerの1つによって置換されたAsn； 30
 Lys、Glu、Gln、HisおよびArgの1つによって置換されたLys；
 Asp、GluおよびAsnの1つによって置換されたAsp；
 Glu、Asp、Lys、Asn、Gln、HisおよびArgの1つによって置換されたGlu；
 Met、Phe、Ile、Val、LeuおよびTyrの1つによって置換されたMet。

【0572】

本発明による同種ヌクレオチド配列は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（Sambrookら、Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York によって報告されている条件など）で、親配列をコードすることのできるヌクレオチド配列の逆相補体にハイブリダイズすることが可能な、50、100、200、300、400、500、600、800あるいは1000個より多い数のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を表すこともある。

【0573】

本明細書で使用する機能的部分は、重要な相互作用が、 1×10^{-6} Mあるいはそれ以上の大きいアフィニティーで、対象とする相互作用を保持する十分な大きさをもつナノボディ配列を表している。

【0574】

または、機能的部分は、完全なアミノ酸配列の部分的欠失を含み、なおかつ標的の結合および標的との相互作用に必要な結合部位およびタンパク質ドメインを保持している。

【0575】

本明細書で機能部分は、完全な配列の100%未満（例えば、99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%など）の部分を表すが、5個あるいはそれ以上、あるいは15個あるいはそれ以上のヌクレオチドを含んでいる。

【0576】

TNF アルファ、TNF アルファ受容体、（例えば、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、チロキシン結合タンパク、トランスフェリン、フィブリノゲンなどの）血清タンパクおよびIFNガンマ、IFNガンマ受容体などの、本明細書に述べている標的は、標的の断片であってよい。したがって、標的は、免疫反応を誘発することのできる標的の断片であってよい。標的は、全長標的に対して成長させたナノボディに結合することができる標的の断片でもある。

10

【0577】

本明細書で使用する断片は、配列の100%未満（例えば、99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%など）であるが、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個あるいはそれ以上のアミノ酸を含む断片を表す。断片は、1 × 10⁻⁶ Mあるいはそれより大きい対象とする相互作用を保持するだけの十分な長さをもつ。

【0578】

本明細書で使用する断片は、野生型標的に対して成長させたナノボディに結合できる標的の能力を実質的に改変しない、1つ以上のアミノ酸の任意の挿入、欠失および置換も表す。アミノ酸の挿入、欠失あるいは置換の数は、最高1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、51個、52個、53個、54個、55個、56個、57個、58個、59個、60個、61個、62個、63個、64個、65個、66個、67個、68個、69個あるいは70個までのアミノ酸であることが好ましい。

20

30

【0579】

本発明の相同配列は、ヒト化された抗TNF アルファポリペプチドを含んでいてよい。新クラスのV_{H H}の抗体をヒト化すると、投与時にヒト個体における望ましくない免疫学的反応が起こる可能性がさらに減る。

【0580】

本発明の1つの実施態様は、抗原に対するドメイン固有のアフィニティーを減少させず、そのいっぽうで異種動物種に関するその免疫原性を減退させつつ、修飾することが可能な抗体可変ドメイン（V_{H H}）のアミノ酸残基を判定することによってラマの抗体に基づく修飾ポリペプチドを調製するための方法；およびそのように修飾されたV_{H H}に関するものであり、V_{H H}を使用すると、異種動物種に投与するのに有効な同定された残基が修飾される。

40

【0581】

さらに具体的には、本発明は、人に投与する目的で修飾された修飾V_{H H}の調製、調製されたV_{H H}およびヒトの疾患に対する治療に対して該「ヒト化された」V_{H H}の使用に関する。ヒト化されたとは、ヒトの患者に投与したときに免疫原性が軽微となるかあるいは存在しなくなるように、変異させることを意味する。本発明によれば、ポリペプチドのヒト化には、ポリペプチドがその典型的特長を失うことなく、すなわちヒト化によって調製されたポリペプチドの抗原結合能力に大きな影響を与えずに、ヒトコンセンサス配列に認められるような、それらのヒト対応アミノ酸によってラクダ科動物アミノ酸の1つ以上を置き換える工程が含まれる。該方法は、当業者にとって公知である。

50

【0582】

ラクダ科動物抗体をヒト化するには、単一のポリペプチド鎖に一定限度の量のアミノ酸を導入して、変異を誘発させる必要がある。このヒト化は、軽鎖と重鎖の2つの鎖にアミノ酸の変化を導入し、両鎖の会合を保存する必要がある、s c F v、F a b、(F a b) 2 および I g G のヒト化とは対照的である。

【0583】

国際公開第04/041862号に開示のように、抗TNF ナノボディをヒト化することができる。ヒト化には、例えば、レパートリークローニングに使用されているプライマーによって導入されているが、ラマ配列には自然発生しない、位置1および5におけるFR1中の残基の変異誘発工程を含んでいてよい。これら残基に変異誘発を導入しても、結果的に結合および/または阻害活性を喪失させることはない。ヒト化には、位置74、76、83、84、93におけるFR3中の残基の変異誘発を含まれていてよい。これら残基に変異誘発を導入しても、結果的に結合および/阻害活性を喪失させることはない。したがって、FR1とFR3の変異を組み合わせても、結合/阻害活性には影響を与えない。ヒト化には、位置108におけるFR4中の残基の変異誘発も含まれていてよい。Q108Lの変異誘発を導入すると、結果的に大腸菌における産生レベルが低下する。位置108は、ラクダ科動物V_HHでは溶媒にさらされるが、ヒト抗体では、この位置はV_H-V_L間の界面に埋まっている (Spinelli, 1996; Nieba, 1997)。単離したV_Hの位置108は、溶媒に曝露する。極性非荷電性Glnの代わりに非極性疎水性Leuを導入すると、分子の固有の折畳み/安定性に大きな効果を及ぼしうる。さらに、位置44および45におけるヒト疎水性残基 (E44GおよびR45L) によって親水性残基を置き換えても、結合および/または阻害には影響を与えなかった。しかしながら、F37VおよびF47Wを導入したときには、結合および/阻害活性の喪失が認められた。モデリングデータから、臨界残基37がCDR3ループ立体構造の完全性、ひいては活性を確保することが確認されている (付番はすべて、Kabat による)。

【0584】

本発明の1つの実施態様によれば、ヒト化には、単独であるいは組み合わせて、

- FR1 の位置1、5、28および30と、
 - FR2における位置44および45におけるホールマークアミノ酸と、
 - FR3残基74、75、76、83、84、93および94と、
 - FR4における位置103、104、108および111との
 - 付番はすべて、Kabat の付番による
- 残基のいずれかを置き換える工程が含まれる。

【0585】

本発明の1つの実施態様は、炎症過程に関する疾患の症候の治療、予防および/あるいは緩和に使用することを目的とした、前記ポリペプチドをコードすることのできる抗TNF アルファポリペプチドあるいは核酸である。TNF アルファは、炎症過程に関与し、TNF アルファの作用を遮断すると、例えばクローン病などの特定の病態に非常に望ましい抗炎症効果が得られる。実施例で、TNF アルファに結合し、さらにTNF アルファ受容体に対するその結合を遮断する、本発明によるV_HHについて実証する。

【0586】

本発明の抗TNF アルファポリペプチドは、アジソン病 (副腎)、耳の自己免疫疾患 (耳)、眼の自己免疫疾患 (眼)、自己免疫肝疾患 (肝)、自己免疫耳下腺炎 (耳下腺)、クローン病 (腸)、I型糖尿病 (膵)、精巣上体炎 (副睾丸)、糸球体腎炎 (腎)、甲状腺機能亢進症 (甲状腺)、ギラン・バレー症候群 (神経細胞)、橋本病 (甲状腺)、溶血性貧血 (赤血球)、全身性エリテマトーデス (多組織)、男性不妊 (精子)、多発性硬化 (神経細胞)、重症筋無力症 (神経筋接合部)、天疱瘡 (主に皮膚)、乾癬 (皮膚)、リウマチ熱 (心疾患、関節疾患)、関節リウマチ (関節皮膜)、サルコイドーシス (多組織および多臓器)、強皮症 (皮膚および結合組織)、シェーグレン症候群 (外分泌腺およびその他の組織)、脊椎関節症 (軸骨格およびその他の組織)、甲状腺炎 (甲状腺)

および脈管炎（血管）などの自己免疫疾患に適用可能である。

括弧内は、疾患に侵される組織である。この自己免疫疾患の一覧は、包括するためではなく例示することを目的としている。

【0587】

本発明の抗TNF アルファポリペプチドが適用可能な自己免疫病には、例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アトピー性アレルギー、気管支喘息、湿疹、ハンセン病、統合失調症、遺伝性うつ病、組織および臓器の移植、慢性疲労症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳梗塞、自閉症、てんかん、アルツス現象、アナフィラキシーならびにアルコールおよび薬物依存症などがあげられる。前述の特定された自己免疫病では、疾患に侵される組織は、一次標的組織であり、それ以外の場合には、二次標的組織である。これらの病状は、その一部あるいはほとんどが自己免疫症候群である。したがって、これら疾患の治療にあたっては、同じ方法、あるいは本明細書に開示の同じ方法を、場合によっては他の方法と組み合わせ、使用することができる。

10

【0588】

本発明の別の実施態様は、本発明による抗TNF アルファポリペプチド、あるいは炎症過程に関連する疾患を治療するための薬剤を調製することを目的とした、前記ポリペプチドをコードすることのできる核酸の使用である。疾患の例としては、リウマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症があげられる。

【0589】

本発明によるポリペプチドおよび核酸は、静脈注射などの従来の経路に従って投与してよい。ただし、本発明の抗TNF アルファポリペプチドの特殊な特性として、これらが組織膜および/または腫瘍などの障壁に浸透し、その上で局所的に作用し、さらには胃内などの極度の環境に耐えうるだけの十分な安定性を備えている。したがって、本発明の別の態様は、抗TNF アルファポリペプチドの送達に関する。

20

【0590】

本発明のナノボディおよび/またはポリペプチドを、特に消化管への経口投与方法あるいはその他の投与方法によって消化管の疾患あるいは疾患の予防または治療に使用するか、あるいはそれらに使用することを意図している場合には、通常、血中半減期を延長させた（すなわち、ペグ化であるかあるいは血中タンパクに対して指向性を有するナノボディを含む）本発明のポリペプチドを使用する必要はない。したがって、該適応には、本発明のナノボディだけを含ま本発明のポリペプチドを使用することができる。特に、TNF アルファに関連するか/またはTNF アルファを媒介とした（炎症性大腸炎（IBD）および、前述の消化管のその他の病気および疾患など）消化管の病気あるいは疾患の予防と治療を目的とした経口投与に関しては、本発明の一価のナノボディ、あるいは実質的に本発明の一価のナノボディからなる本発明のポリペプチドの使用が好ましい可能性があることを発見した。該ナノボディが血流を介して目的とする作用部位に到達すべきときには、血中半減期を延期させた本発明のポリペプチドの使用が好ましい。

30

【0591】

本発明による被験体は、治療用ポリペプチドによる調節を受けやすい任意の哺乳動物であってよい。

40

【0592】

本発明の抗TNF アルファポリペプチドの経口送達により、疾患に侵された大腸局部に該分子が活性体として提供される。これらの部位は、重篤な炎症を起こし、TNF アルファ産生細胞を含んでいてよい。TNF アルファに結合する抗TNF アルファポリペプチドは、TNF アルファを局部的に中和して、ナノボディ全体を通じた分布を回避し、それによりマイナスの副作用を抑える。マイクロコッカスラクティスなどの遺伝子修飾微生物は、抗体あるいはその機能部分を分泌することができる。該修飾微生物は、腸内の抗体あるいはその機能部分の局部産生および送達を目的とした賦形剤として使用できる。抗TNF アルファポリペプチドを産生する菌株を使用することによって、炎症性大腸症候群を治療することができる。

50

【0593】

本発明の別の態様には、国際公開第00/23471号に開示のベクターを用いたラクトコッカス *spec.* のグラム陽性菌などの非侵襲性細菌上の表面発現あるいはこれらからの分泌を利用することによって、抗TNF ポリペプチドを送達する工程が含まれる。

【0594】

本発明の一実施態様は、物質を不活性化されずに胃内環境を通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するのに使用する、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0595】

疾患の例としては、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症など、炎症を生じさせる疾患はすべてあげられるが、特にこれらに限定されない。当業者によって公知のように、いったんポリペプチド構造物を得ることができれば、(胃内、大腸内など)適切な個所で最大量のポリペプチドが放出させる製剤術を適用することができる。該送達法は、標的が消化管系にある疾患の症候を治療、予防および/または緩和させるのに重要である。

【0596】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、不活性化されずに胃内環境を通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための方法である。

【0597】

本発明の別の実施態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、不活性化されずに胃内環境を通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる治療を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための薬剤としての、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

【0598】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、前記物質が不活性化されずに消化管系に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

【0599】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、物質が不活性化されずに被験体の血流に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

【0600】

本発明の別の実施態様は、腔腔および/または直腸管に投与された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる治療を受けやすい疾患の症候あるいは疾患の治療、予防および/または緩和に使用するための、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0601】

疾患の例としては、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症など、炎症を引き起こす疾患はすべてあげられるが、特にこれらに限定されない。当業者によって公知のように、いったん前記ポリペプチド構造物を得ることができれば、(胃内、大腸内など)適切な個所で最大量のポリペプチドが放出させる製剤術を適用することができる。この送達法は、標的が消化管系にある疾患の症候を治療、予防および/または緩和させるのに重要である。非限定的な例では、本発明による製剤には、ゲル、クリーム、座薬、塗膜などの剤形または、時間の経過に伴い活性成分を徐放する、スポンジあるいは腔内リングの剤形で、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドが含まれる(該調剤については、欧州特許第707473号、欧州特許第684814

10

20

30

40

50

号および米国特許第5629001号に記載がある)。

【0602】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に腹腔および/または直腸管を経由して投与することにより腹腔および/または消化管に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための方法である。

【0603】

本発明の別の実施態様は、腹腔および/または消化管に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための薬剤の調製における、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドの

10

【0604】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に腹腔および/または消化管を経由して投与することによって、前記物質が不活性化されずに腹腔および/または消化管系に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

【0605】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体の腹腔および/または消化管に投与することによって、物質が不活性化されずに被験体の血流に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

20

【0606】

本発明の別の実施態様は、上気道および/または肺に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するのに使用するための、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。

【0607】

疾患の例としては、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症など、炎症を引き起こす疾患はすべてあげられるが、特にこれらに限定されない。非限定的な例では、本発明による製剤には、スプレー式点鼻薬(例えば、エアロゾルなど)あるいは吸入剤などの剤形で、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドが含まれる。ポリペプチド構造物は微細なため、治療用IgG分子に比べはるかに

30

【0608】

本発明の一態様は、口腔あるいは鼻腔を経由した吸引により送達された本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に投与することにより、上気道および/または肺に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための方法である。

【0609】

本発明の別の実施態様は、前記ポリペプチドが不活性化せずに、鼻腔、上気道および/または肺に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための薬剤の調製における、本明細書に

40

【0610】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体の鼻腔、上気道および/または肺に投与することによって、物質が不活性化させずに被験体の鼻腔、上気道および/または肺に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

【0611】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体の鼻腔、上気道および/または肺に投与することによって、物質を不活性化させずに被験体の血流に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

50

【0612】

本発明の一実施態様は、腸粘膜に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、腸粘膜の浸透性を高める疾患の症候を治療、予防および/または緩和するのに使用するための、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドは、サイズが微細なため、例えばクローン病などの、腸粘膜の浸透性を高める疾患にかかっている被験体中で、腸粘膜を通過して血流により効率的に到達することができる。

【0613】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、腸粘膜に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、腸粘膜の浸透性を高める疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための方法である。

10

【0614】

この工程は、本発明の別の態様、すなわち活性輸送担体の使用によって、さらに向上させることができる。本発明のこの態様では、 V_{HH} は、腸壁を通じた血流への移入を向上させる担体に融合される。非限定的な例では、この「担体」は、治療用 V_{HH} に融合された第二の V_{HH} である。該融合構造物は、本技術分野で公知の方法を使用して製造する。「担体」 V_{HH} は、腸壁を通じた能動的移入を誘発する腸内の受容体に特異的に結合する。

【0615】

本発明の別の実施態様は、腸粘膜に送達された本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、腸粘膜の浸透性を高める疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための薬剤の調製における、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

20

【0616】

本発明の一態様は、本発明の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、不活性化させずに腸粘膜に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

【0617】

本発明の一態様は、本発明のTNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、物質を不活性化させずに被験体の血流に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

30

【0618】

この工程は、本発明の別の態様、すなわち活性輸送担体の使用によって、さらに向上させることができる。本発明のこの態様では、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドは、腸壁を通じた血流への移入を向上させる担体に融合される。非限定的例では、この「担体」は、治療用 V_{HH} に融合された第二の V_{HH} である。該融合構造物は、本技術分野で公知の方法を使用して製造する。「担体」 V_{HH} は、腸壁を通じた能動的移入を誘発する腸壁の受容体に特異的に結合する。

【0619】

本発明の一実施態様は、舌下組織を効果的に通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するのに使用するための、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。

40

【0620】

疾患の例としては、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症など、炎症を生じさせる疾患はすべてあげられるが、特にこれらに限定されない。本明細書に開示の前記ポリペプチド構造物の、例えば錠剤、スプレーおよびドロップなどの剤形は舌下に置くと、粘膜を経由して舌下の毛細血管網に吸収される。

【0621】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に舌下

50

投与することによって、舌下組織を経由して効果的に通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための方法である。

【0622】

本発明の別の実施態様は、舌下組織を経由して通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための薬剤の調製における、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

【0623】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に舌下投与することによって、不活性化させずに舌下組織に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

10

【0624】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に経口投与することによって、不活性化させずに被験体の血流に本発明のナノボディあるいはポリペプチドを送達するための方法である。

【0625】

本発明の一実施態様は、皮膚を効果的に通過できる本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい疾患の症候を治療、予防および/または緩和するのに使用するのための、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドである。

20

【0626】

疾患の例としては、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸症候群および多発性硬化症など、炎症を生じさせる疾患はすべてあげられるが、特にこれらに限定されない。前記ポリペプチド構造物の、例えばクリーム、塗膜、スプレーおよび貼薬などの剤形は皮膚に使用すると、皮膚を経由して吸収される。

【0627】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを被験体に局所投与することによって、皮膚を経由して効果的に通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための方法である。

30

【0628】

本発明の別の実施態様は、皮膚を経由して効果的に通過できる、本発明のナノボディあるいはポリペプチドによる調節を受けやすい、疾患の症候を治療、予防および/または緩和するための薬剤の調製における、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドの使用である。

【0629】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを局所的に被験体に投与することによってナノボディまたは本発明のポリペプチドを不活化せずに皮膚に送達する方法である。

【0630】

本発明の一態様は、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを局所的に被験体に投与することによってナノボディまたは本発明のポリペプチドを被験体の血流に送達する方法である。

40

【0631】

本発明の他の実施態様では、抗TNF アルファポリペプチドは、前記抗TNF アルファポリペプチドを肺ルーメンから血液に輸送する活性的な輸送担体として作用する担体ナノボディ(例えばV_{HH})をさらに含む。

【0632】

担体をさらに含む抗TNF アルファポリペプチドは、粘膜面(気管支上皮細胞)に存在する受容体に特異的に結合し、肺ルーメンから血液へのポリペプチドの輸送が活性化さ

50

れる。担体ナノボディはポリペプチド構造物に融合させてよい。該融合構造物は当技術分野で公知である方法を使用して作製してよく、本明細書に記載されている。「担体」ナノボディは、表面を経由して転移を活性化する粘膜面にある受容体に特異的に結合する。

【0633】

本発明の別の態様は、ナノボディ（例えば V_{HH} ）が経鼻投与で血流に積極的に輸送されていることを判定する方法である。同様に、未処理のまたは免疫 V_{HH} ファージライブラリーは経鼻的に投与することが可能で、投与後の様々な時点後に血液または器官を単離し、血流に積極的に輸送されたファージの増幅を助けることができる。肺ルーメンから血液への輸送を活性化するための受容体の非限定的例としては、Fc受容体N（FcRn）がある。本発明の一態様は、本方法で同定された V_{HH} 分子を含んでいる。このような V_{HH} はその後、治療的 V_{HH} を血流中の対応する標的に経鼻投与で送達するための担体 V_{HH} として使用できる。

10

【0634】

本発明の態様では、ポリペプチドとTNF アルファとの結合を調節する薬剤をスクリーニングするために、本明細書に開示の抗TNF アルファポリペプチドを使用することが可能である。結合性、あるいは前記ポリペプチド置換のみを測定するアッセイで同定する場合、薬剤は、インビボで抗原の作用を調節するかを判定する機能テストを受けなければならない。

【0635】

置換実験の例では、ファージあるいは、TNF アルファまたはその断片を発現する細胞を、候補調節因子の濃度を上下して、標識化した本発明のポリペプチドを含む結合バッファー中でインキュベートする。本アッセイを確認および調整するために、標識化していない前記ポリペプチドの濃度を高めた対照競合反応を行うことができる。インキュベート後に、細胞を広範囲に洗浄し、結合および標識化したポリペプチドを、所与の標識化に対して必要であれば測定する（例えば、シンチレーション計測、蛍光等）。候補調節因子存在下で結合する標識ポリペプチドの量が少なくとも10%が減少することは、候補調節因子により結合が置換されたことを示している。1 μ M以下の濃度で標識ポリペプチドが50%置換された場合（半飽和ポリペプチド量）、本アッセイまたは本明細書に記載の他のアッセイでは候補調節因子は、特異的に結合すると考えられる。

20

【0636】

あるいは、結合または結合の置換は表面プラズモン共鳴（SPR）で監視できる。表面プラズモン共鳴アッセイは、2つの分子間の結合を測定する定量的方法として使用することが可能であり、その方法は、水相からセンサー上の膜内に固定されたTNF アルファへ、本発明のポリペプチドが結合したり、あるいは結合が減少することによって生じる固定センサー付近の大量の変化によって行われる。この大量変化は、前記ポリペプチドまたは候補調節因子の注入または除去後に共鳴単位対時間として測定し、Biacore Biosensor（Biacore AB）を使用して測定する。例えばTNF アルファは、Salamon らが記述した方法に記載の薄膜脂質膜中のセンサーチップ（例えば研究等級のCM5チップ；Biacore AB）に固定化できる（Salamonら、1996年、Biophys J. 71: 283-294；Salamonら、2001年、Biophys. J. 80: 1557-1567；Salamonら、1999年、Trends Biochem. Sci. 24: 213-219、それぞれは参照により本明細書に援用される）。Sarríoらは、SRPは、チップ上の脂質層中に固定されたGPCR A(1)アデノシン受容体に結合しているリガンドを検出するために使用できることを証明した（Sarríoら、2000年、Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174、その内容は参照により本明細書に援用される）。SPRアッセイにおける本発明のポリペプチドによるTNF アルファへの結合の条件は、出発点としてSarríoらによって報告された条件を利用し当業者によって良好に微調整できる。

30

40

【0637】

SPRは、少なくとも2つの方法で結合のモジュレーター測定を行うことができる。最初に、本発明のポリペプチドを固定化TNF アルファに事前に結合し、その後0.1 nM ~ 1 μ Mの濃度範囲で候補調節因子を注入することができる。結合ポリペプチドの置

50

換を定量し、調節因子結合の検出が可能となる。あるいは、膜結合TNFアルファは候補調節因子とともに事前にインキュベートし、本発明のポリペプチドと試験することも可能である。前記ポリペプチドおよび、調節因子と事前にインキュベートされたTNFアルファ間の結合アフィニティーにおける差異は、前記ポリペプチドおよび、調節因子の非存在下のTNFアルファ間のものと比較して、調節因子の存在下で前記ポリペプチドが結合しているかまたは置換されているかを明らかにするものである。いずれかのアッセイでは、候補調節因子の存在下で結合した前記ポリペプチドの量が10%以上減少したことによって、候補調節因子の非存在下で結合した前記ポリペプチドの量と比較して、候補調節因子はTNFアルファとポリペプチドの相互作用を阻害するということが示される。

【0638】

例えば本発明のポリペプチドの、TNFアルファへの結合の阻害を検出する他の方法は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用する。FRETは、互いに近接近している(通常、距離<100)蛍光供与体(D)および蛍光受容体(A)間に起こる量子力学的現象であり、Dの発光スペクトルがAの励起スペクトルと重なった場合に起こる。試験すべき分子、例えば本発明のポリペプチドおよびTNFアルファは、相補的一對の供与体および受容体フルオロフォアで標識化する。TNFアルファ/ポリペプチド相互作用によって密接に結合したとき、供与体フルオロフォアの励起で発せられた蛍光は、前記ポリペプチドとTNFアルファが結合していないときの励起波長に反応して発せられたものと異なる波長を有し、したがって各波長における発光強度を測定することによって結合分子対非結合分子の定量ができる。TNFアルファを標識化する供与体フルオロフォアは、当技術分野で公知である。特に興味深いのは、シアンFP(CFP、供与体(D))および黄色FP(YFP、受容体(A))として知られるオワンクラゲGFPの変異体である。例として、YFP変異体は、TNFアルファとの融合タンパク質を作製できる。融合物としてのGFP変異体の発現ベクター(Clontech社)ならびに蛍光標識試薬(分子プローブ)が当技術分野で公知である。候補調節因子を、蛍光標識リペプチドおよびYFP-TNF-アルファの混合物に添加すると、エネルギー移動が阻害され、これは例えば、候補調節因子を有しない試料と比較してYFP蛍光が減少することで明らかになる。TNFアルファ/ポリペプチド相互作用の検出に対するFRETを利用したアッセイでは、候補調節因子を含む試料では受容体波長での蛍光発光強度が10%以上減少したことによって、候補調節因子を持たない試料と比較して、候補調節因子はTNFアルファ/ポリペプチド相互作用を阻害するということが示される。

【0639】

本明細書で使用の試料は、臨床、農業、法医学、研究あるいは他の目的可能な試料由来の、臨床的な、例えば細胞画分、全血、血漿、血清、組織、細胞等のような、TNFアルファを含む任意の生物学的試料でよい。臨床的試料はヒトまたは動物起源のものでよい。分析試料は、天然には固体でも液体でも存在し得る。固体物質を使用する場合、それらが最初に好適な溶液に溶解することは明らかである。

【0640】

FRETにおける変化は、分子相互作用を監視するために蛍光消光を利用している。相互作用している対では、互いに極めて同格になるように化合された場合、一方の分子はフルオロフォアで標識化することが可能であり、もう一方は、フルオロフォアの蛍光を消光する分子で標識化することが可能である。励起下の蛍光の変化は、フルオロフォア/消光剤ペアで標識化した分子の対合に変化があることを示す。概して、標識TNFアルファの蛍光の増加は、消光剤を持つ抗TNFアルファポリペプチドが置換されたことを示す。消光アッセイでは、候補調節因子を含む試料では蛍光発光強度が10%以上増加したことによって、候補調節因子を持たない試料と比較して、候補調節因子はTNFアルファ/抗TNFアルファポリペプチド相互作用を阻害するということが示される。

【0641】

表面プラズモン共鳴およびFRET法に加えて、結合の定量には蛍光偏光測定法が有用である。蛍光標識分子の蛍光偏光度は、回転相関時間または回転速度に依存している。蛍

10

20

30

40

50

光標識化した抗TNF α ポリペプチドと結合しているTNF α によって形成されたような複合体は、複合していない標識ポリペプチドよりも偏光度が高い。TNF α /抗TNF α ポリペプチド相互作用の候補阻害物質を含むと、候補阻害物質がTNF α と前記ポリペプチドの相互作用を破壊または阻害する場合、候補阻害物質を含まない混合物と比較して蛍光偏光が減少する。蛍光偏光は、TNF α /抗TNF α ポリペプチド複合体の形成を破壊する小分子の同定に非常に適している。候補調節因子を含む試料では蛍光偏光が10%以上減少したことによって、候補調節因子を持たない試料における蛍光偏光と比較して、候補調節因子はTNF α /抗TNF α ポリペプチド相互作用を阻害するということが示される。

【0642】

TNF α /抗TNF α ポリペプチド相互作用を監視する他の代替法は、バイオセンサーアッセイを利用する。ICSバイオセンサーは当技術分野で記述されてきた(Australian Membrane Biotechnology Research研究所; Cornell B, Braach-Maksyvtis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek LおよびPace R. 「A biosensor that uses ion-channel switches」Nature 1997年、387、580)。この技術では、TNF α と抗TNF α ポリペプチドの会合は、懸濁膜二重層におけるグラミシジン促進性イオンチャネルの閉鎖と共役し、したがって、バイオセンサーのアドミタンス(インピーダンスに類似している)の測定可能な変化とも共役している。このアプローチは直線の6桁以上のアドミタンス変化であり、小分子組み合わせライブラリーのハイスループットスクリーニングに理想的に適している。候補調節因子を含む試料ではアドミタンスが10%以上変化(増加または減少)したことによって、候補調節因子を持たない試料におけるアドミタンスと比較して、候補調節因子はTNF α /前記ポリペプチド相互作用を阻害するということが示される。TNF α と抗TNF α ポリペプチドとの相互作用を試験する分析試験では、相互作用の調節因子が、物理的に前記ポリペプチドと相互に作用するタンパク質のドメインと直接相互作用することは必ずしも必要でない可能性があることに留意することが肝要である。相互作用部位から除去された位置で調節因子が相互作用し、また例えば、TNF α での立体構造変化を起こす可能性もある。にもかかわらず、このように作用する調節因子(阻害物質またはアゴニスト)は、TNF α の受容体への結合を調節する薬剤として興味深い。

【0643】

記述した結合アッセイはどれも、例えば、TNF α に結合あるいは例えば本発明のポリペプチドのTNF α への結合に影響する組織試料などの試料中の薬剤の存在を決定することに使用できる。そのように施行するため、試料の存在または非存在下でTNF α を前記ポリペプチドと反応させ、またポリペプチド結合を、使用の結合アッセイの必要に応じて測定する。前記ポリペプチドの結合が10%以上減少したことによって、試料が、前記ポリペプチドのTNF α への結合を調節する薬剤を含んでいるということが示される。無論、上記に概説した方法は、本発明の抗TNF α ポリペプチド、その相同配列、その機能的部位またはその相同配列の機能的部位とTNF α またはその断片間の結合を改変する候補調節因子をスクリーニングすることに簡単に応用できる可能性がある。

【0644】

本発明の一実施態様は、本明細書に開示された方法で同定された未知の薬剤である。

【0645】

本発明の一実施態様は、炎症過程に関する疾患の症状を治療、予防および/または軽減するために使用される本明細書に開示された方法で同定された未知の薬剤である。

【0646】

本発明の他の実施態様は、炎症過程に関する疾患の症状を治療、予防および/または軽減するために使用される本明細書に開示された方法で同定された未知の薬剤の使用である。

【0647】

疾患の例としては、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症がある。

【0648】

本発明にしたがって有用な細胞は、例えば大腸菌などの細菌細胞、例えばS・セレピシエヤピキア・パストリスなどの酵母細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞から成る群から選択されることが好ましい。

【0649】

本発明にしたがって有用な細胞は、本発明の抗TNF アルファ、その相同配列、その機能的部位、または本発明にしたがったその相同配列の機能的部位を含むポリペプチドをコードする核酸配列を導入することが可能な任意の細胞であり得る。それによってポリペ 10
プチドは、本明細書に記載したような自然レベルまたは自然を超えたレベルで発現する。好ましくは、細胞で発現する本発明のポリペプチドは、本明細書で規定した正常または正常に近い薬理作用を示す。

【0650】

本発明の好ましい実施態様に従って、細胞は、COS7細胞、CHO細胞、LM(TK)細胞、NIH 3T3細胞、HEK 293細胞、K 562細胞または1321N 1星状膠細胞腫細胞ならびに他のトランスフェクト可能な細胞系から成る群から選択される。

【0651】

概して、「治療効果のある量」、「治療効果のある用量」および「有効量」は望ましい 20
1つのまたは複数の結果(TNF アルファ結合の調節、炎症の治療または予防)を実現するのに必要な量を意味する。その有効性ひいては有効量は、本発明で使用されるTNF アルファ結合を調節する様々な化合物によって変化することが可能であることを、通常の当業者であれば理解しよう。化合物の有効性を当業者は容易に評価できる。

【0652】

本明細書で使用されているように、用語「化合物」は、本発明の抗TNF アルファポリペプチド、化合物あるいは、本明細書に記載のスクリーニング法にしたがって同定される前記ポリペプチドまたは薬剤あるいは1つ以上の誘導体化されたアミノ酸を含む前記ポリペプチドをコードすることが可能な核酸を意味する。

【0653】

「医薬的に許容できる」とは、生物学的にまたは他の用途で不適切でない材料に対する言葉であり、すなわち該材料は、何らかの望ましくない生物学的効果を生じることまたはその効果が含まれる医薬組成物の任意の他の成分を使用する有害な方法で相互作用することがない化合物とともに個体に投与してもよい。

【0654】

本明細書に記載の抗TNF アルファポリペプチドは、被験体の状態を治療または予防するために有用であり、医薬的に有効量の化合物または組成物を投与することを含んでいる。

【0655】

本発明の抗TNF ポリペプチドは、被験体の関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症に関係する状態を治療または予防するために有用であり、TNF アルファに結合する医薬的に有効量の化合物または組成物を投与することを含んでいる。 40

【0656】

本明細書に開示された抗TNF アルファポリペプチドは、被験体の状態を治療または予防するために有用であり、例えばアスピリンなど他の化合物と組み合わせた医薬的に有効量の化合物を投与することを含んでいる。

【0657】

本明細書に開示された抗TNF アルファポリペプチドは、被験体の関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症に関係する状態を治療または予 50

防するために有用であり、例えばアスピリンなど他の化合物と組み合わせた医薬的に有効量の化合物を投与することを含んでいる。

【0658】

本発明は、本発明の化合物を単独で含む製剤の投与に限定されない。併用治療を提供することは本発明の範囲内であり、その製剤を必要とする患者に、本発明の一種を超える化合物を含む製剤を投与する。

【0659】

TNF アルファが介在する状態には、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症が含まれるが、これらに限定されない。

【0660】

本発明で有用な化合物を医薬組成物として製剤化し、選択された投与経路、すなわち経口、非経口、経鼻、吸入、静脈内、筋肉内、局所または皮下経路に適応する様々な剤形で、ヒト患者または家畜などの哺乳動物宿主に投与できる。

【0661】

本発明の化合物は、送達の遺伝子治療法を利用して投与できる。例えば米国特許第5,399,346号を参照されたい。そのすべての内容は参照により本明細書に援用される。送達の遺伝子治療法を利用して、本発明の化合物に対する遺伝子でトランスフェクトした一次細胞は、特異的器官、組織、移植片、腫瘍または細胞を標的にする組織特異性プロモーターでさらにトランスフェクトできる。

【0662】

したがって本化合物は、不活性の希釈剤または吸収可能な食用担体などの医薬的に許容可能なビヒクルと併用して、例えば経口投与などで全身投与してもよい。それらはハードまたはソフトシエルのゼラチンカプセルに封入、錠剤に圧縮、または患者の食事中的食物に直接混入させてもよい。治療的経口投与では、活性化化合物は1つ以上の賦形剤と組み合わせて、また錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハース等の剤形で使用してもよい。このような組成物および製剤は少なくとも0.1%の活性化化合物を含むことが好ましい。組成物と製剤のパーセンテージは無論変更してもよく、所与の単位剤形中、重量約2~約60%であることが好都合である。このような治療効果のある組成物中の活性化化合物の量は有効投与量レベルが得られるような量である。

【0663】

錠剤、トローチ、丸薬、カプセル等は以下のものを含んでよい：トラガカントガム、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤；第二リン酸カルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑剤；およびスクロース、フルクトース、ラクトースまたはアスパルテームなどの甘味剤、あるいはペパーミント、ウィンターグリーン油またはチェリー香料などの香味料を添加してよい。単位剤形がカプセルである場合、上記のタイプの材料の他に、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含んでよい。他の様々な材料は被覆剤として、あるいはその他固形単位剤形の物理的形狀を改変するように存在してよい。例えば、錠剤、丸薬またはカプセルは、ゼラチン、ワックス、シェラックまたは砂糖等で被覆してよい。シロップまたはエリキシル剤は活性化化合物、甘味剤としてスクロースまたはフルクトース、保存料としてメチルパラベンおよびプロピルパラベン、着色料およびチェリーまたはオレンジ香料などの香味料を含んでよい。無論、任意の剤形を調製するのに使用する任意の材料は医薬的に許容可能で、決定された量で実質的に非毒性であることが好ましい。さらに、活性化化合物は徐放性製剤および装置に組み込まれてもよい。

【0664】

活性化化合物は点滴または注射で静脈内または腹腔内投与してよい。活性化化合物またはその塩の溶液は、任意に非毒性界面活性剤と混合して、水中で調整できる。分散は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチンおよびそれらの混合物中で、および油中で調製できる。保存および使用の通常条件下で、これらの製剤は、微生物の増殖を防止するために保存料を含む。

10

20

30

40

50

【0665】

注射あるいは点滴に適した医薬品剤形は、滅菌された注射液または点滴液またはそれらの散液の即席の調製に適している活性成分を含む滅菌水溶液または散液、あるいは滅菌粉末を含むことが可能で、任意にリポソームに被包することも可能である。あらゆる場合で、究極の剤形は滅菌してあり、流体であり、製造および保存の条件下で安定していることが必要である。液体担体またはビヒクルは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、非毒性グリセリルエステルおよびそれらの好適な混合物を含む溶媒または液体分散媒であり得る。適度な流動性は、例えばリポソーム形成によって、散液の場合は所望の粒子径を維持することによって、あるいは界面活性剤の使用によって維持できる。微生物の活動は、様々な抗菌薬および抗真菌薬、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等で防止できる。多くの場合、等張剤、例えば糖、緩衝剤または塩化ナトリウムを含むことは好ましいとされている。注入可能な組成物の吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンの組成中で使用することで延長できる。

10

【0666】

滅菌された注入可能な溶液は活性化合物を、上記に列挙した様々な他の成分を含む適当な溶媒中に必要量、組み込むことによって調製し、必要に応じてその後、ろ過滅菌を行う。滅菌された注入可能な溶液の調整用滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、それら技術により事前にろ過滅菌した溶液に存在する任意の付加的な目的成分に加えて有効成分の粉末が生成する。

20

【0667】

局所投与では、本化合物は、その化合物だけで、すなわち液状である場合に適用してよい。しかしながら、組成物または製剤として、固体または液体であり得る皮膚科学的に許容可能な担体と組み合わせることで皮膚に投与することが一般的に望ましい。

【0668】

有用な固体担体は、タルク、粘土、微結晶性セルロース、シリカ、アルミナ等の微粉化した固体を含む。有用な液体担体は、水、ヒドロキシアルキル、あるいはグリコールまたは水 アルコール/グリコールの混合物を含み、本化合物は有効レベルで溶解または懸濁可能で、任意に非毒性界面活性剤を援用することもある。芳香剤や付加的な抗菌薬などのアジュバントを添加して、所与の使用に対して性質を最適化できる。得られた液体組成物は吸収剤パッド経由で適用が可能であり、包帯や他のドレッシングに含浸させるために用いられ、あるいはポンプ型またはエアロゾル噴霧器を用いて患部に噴霧することが可能である。

30

【0669】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪アルコール、変性セルロースまたは変性無機材料などの増粘剤は、延展可能なペースト、ゲル、軟膏、石鹸等を形成する液体担体とともに使用することが可能であり、使用者の皮膚に直接塗布できる。

【0670】

化合物を皮膚に送達するのに使用できる有用な皮膚科学的組成物の例は当技術分野に公知であり、例えば、Jacquetら、（米国特許第4,608,392号）、Geria（米国特許第4,992,478号）、Smithら、（米国特許第4,559,157号）およびWortzman（米国特許第4,820,508号）を参照されたい。

40

【0671】

化合物の有用な投与量は、動物モデルでインビトロおよびインビボでのその活性を比較することによって決定できる。マウスおよび他の動物での有効投与量の外挿をヒトに当てはめる方法は当技術分野で公知であり、例えば米国特許第4,938,949号を参照されたい。

【0672】

概して、ローションなどの液体組成物中の化合物の濃度は、約0.1~25重量%から

50

、好ましくは約0.5～10重量%からとされている。ゲルや粉末のような半固体または固体組成物の濃度は、約0.1～5重量%、好ましくは約0.5～2.5重量%とされている。

【0673】

治療に使用するために必要な化合物あるいは活性塩またはその誘導体の量は、選択された特定の塩のみならず投与経路、治療条件の性質および患者の年齢と状態で変化し、最終的には担当の内科医または臨床医の判断に委ねられるとされている。また化合物の投与量も、標的細胞、腫瘍、組織、移植片または器官にしたがって変化する。

【0674】

望ましい用量は一日、一回量で提供されること、あるいは適当な間隔、例えば2、3、4回以上の分配用量に分けて投与することが都合がよい。分配用量自体をさらに、例えば吸入器での複数回の吸入あるいは複数回の点眼による投与などの数回の個々に大まかな間隔のある投与になるよう分けてもよい。

10

【0675】

投薬計画では、長期にわたる毎日の治療が可能であった。「長期」という言葉は、少なくとも2週間、好ましくは数週間、数ヶ月間または数年間を意味する。この投与範囲に必要な修正は、本明細書で教示された通常実験のみを利用して当業者によって決定してもよい。RemingtonのPharmaceutical Sciences (Martin, E.W., 編、4)、Mack Publishing社、イーストン、ペンシルベニア州、を参照されたい。また投与量はどんなに複雑な場合でも、個々の内科医によって調製できる。

20

【0676】

本発明は、TNF α /TNF α 受容体相互作用の調節因子である薬剤を提供する。

【0677】

候補薬剤は合成薬剤または薬剤の混合物、あるいは天然産物(例えば植物エキスまたは培養液上清)でもよい。本発明に記載の候補薬剤としては、合成可能な小分子、天然エキス、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂肪等がある。

【0678】

合成または天然薬剤の大規模ライブラリーから得られた候補調節因子薬はスクリーニングが可能である。手段の多くは現在、サッカライド、ペプチドおよび核酸をベースにした薬剤のランダムな合成および目的を持った合成に使用されている。合成薬剤ライブラリーは多数の会社、Maybridge Chemical社(Trevillet、コーンウォール、UK)、Comgenex(プリンストン、ニュージャージー州)、Brandon Associates(メリマク、ニューハンプシャー州)およびMicrosource(ニューミルフォード、コネチカット州)から入手可能である。希少な化学ライブラリーはAldrich(ミルウォーキー、ウィスコンシン州)から入手可能である。組み合わせたライブラリーは入手可能であり調製可能である。あるいは、細菌、真菌、植物および動物のエキスの形態での天然薬剤のライブラリーは、例えばPan研究所(ボセル、ワシントン州)またはMycoSearch(ノースカロライナ州)から入手可能であり、あるいは当技術分野で公知の方法で容易に生産可能である。また、天然の、および合成したライブラリーならびに薬剤は、従来の化学的、物理学的および生化学的手段によって容易に改変する。

30

40

【0679】

有用な薬剤は多数の化学的分類群中で見られる場合がある。有用な薬剤は有機薬または小分子有機薬である場合がある。小分子有機薬の分子量は、50Daを超え、約2,500Da未満、好ましくは約750Da未満、さらに好ましくは約350Da未満である。分類群の好ましい例としては、複素環、ペプチド、サッカライド、ステロイド等がある。薬剤は改変して、有効性、安定性、医薬的適合性等を促進してよい。薬剤の構造的同定は、付加的薬剤を同定、産生またはスクリーニングするために利用してよい。例えばペプチド薬を同定する場合、ペプチド薬はD-アミノ酸、特にD-アラニンなどの非天然アミノ酸を使用するなど安定性を促進するために様々な方法で改変してよく、それはアミノ末端またはカル

50

ボキシル末端を官能基化、例えばアミノ基にはアシル化またはアルキル化、ならびにカルボキシル基にはエステル化またはアミド化等することによって可能となる。

【0680】

一次スクリーニングでは、本発明に記載の候補薬剤の有用な濃度は約10 mMから約100 μ M以上(すなわち1 mM、10 mM、100 mM、1 M等)である。一次スクリーニング濃度は上限として使用され、二次スクリーニングまたは濃度曲線の産生のために半対数の間隔で(例えば9つの追加の濃度で)一次スクリーニング濃度を減少させることによって付加的濃度が決定される9つの付加的濃度とともに使用されている。

【0681】

本発明に記載のハイスループットスクリーニングキットは、好ましくは濃度1 μ M ~ 1 mMの範囲にあるポリペプチドの存在下でTNF- α と相互作用することによって、TNF- α /TNF- α 受容体相互作用を調節する薬剤を検出するのに必要な全ての手段および媒体を含んでいる。

10

【0682】

該キットは以下のものを含む: マイクロタイタープレート、より好ましくは96ウェルマイクロタイタープレートなどの固体支持体上のキットにしたがって増殖する、TNF- α をコードするヌクレオチド配列を含み発現する本発明の組み替え細胞であり、これは特に国際公開第00/02045に記載された当業者に公知の方法にしたがったものである。あるいは、TNF- α は、例えば96ウェルマイクロタイタープレートに固定された精製された形態で当業者によって供給される。あるいは、TNF- α は、例えば96ウェルマイクロタイタープレートに予め固定されたキットで供給される。TNF- α は、全TNF- α でも、またはその断片でもよい。

20

【0683】

濃度約1 μ M ~ 1 mM以上の本発明に記載の調節因子薬剤は、適当な濃度の抗TNF- α ポリペプチド、その相同配列、その機能部分またはその相同配列の機能部分の存在下で規定のウェルに添加する。前記ポリペプチドの前記濃度は、1 μ M ~ 1 mMの範囲にあることが好ましい。キットは1つ以上の本発明の抗TNF- α ポリペプチドを含んでよい。

【0684】

結合アッセイは本明細書にすでに開示された方法に従って行い、その結果を、例えば抗TNF- α ポリペプチド、その相同配列、その機能部分またはその相同配列の機能部分に結合するTNF- α のベースラインレベルと比較する。しかし調節因子薬剤は添加しない。(例えば)調節因子が無い活性レベルと比べて、TNF- α ポリペプチド結合が少なくとも2倍、好ましくは5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは100倍以上増加または減少するウェルを、さらに分析するために選ぶ。

30

【0685】

本発明は、TNF- α /TNF- α 受容体結合の調節因子をスクリーニングするのに有用な他のキット、ならびにTNF- α の機能障害によって特徴づけられる障害を診断するのに有用なキットを提供する。また本発明は、障害の調節因子をスクリーニングするのに有用なキット、ならびにそれらの診断、TNF- α を含む1つ以上の工程によって特徴づけられる前記障害のためのキットを提供する。本発明にしたがって有用なキットは単離したTNF- α を含むことが可能である。あるいは、またはさらに、キットは形質転換されTNF- α を発現する細胞を含むことができる。さらなる実施態様では、本発明に記載のキットはTNF- α をコードするポリヌクレオチドを含むことが可能である。別のさらなる実施態様では、本発明に記載のキットはTNF- α の増幅に有用な特異性プライマーを含んでよい。本発明にしたがって有用なキットは、単離したTNF- α ポリペプチド、その相同体またはその機能部分を含むことが可能である。本発明に記載のキットは、形質転換され前記ポリペプチドを発現する細胞を含むことが可能である。キットは一種以上のポリペプチドを含んでよい。さらなる実施態様では、本発明に記載のキットは、TNF- α をコードするポリヌ

40

50

クレオチドを含むことが可能である。別のさらなる実施態様では、本発明に記載のキットは、例えばTNF-アルファなどの巨大分子の増幅に有用な特異性プライマーを含んでよい。本発明に記載のキットはすべて、規定のアイテムまたはアイテムの組み合わせ、および必然的に包装材料を含むとされている。またキットは使用説明書を含むものである。

【0686】

さらに、本発明のナノボディの上述した1つ以上のCDRを他の「足場」に「移植」できることは当業者にとって明らかなことであり、これはヒト足場または非免疫グロブリン足場も含むが、これらに限定されるものではない。このようなCDR移植に好適な足場および技術は当業者に明らかであり、当技術分野に公知である。例えば、米国特許出願第7,180,370号、国際公開第01/27160号、欧州特許第0605522号、欧州特許第0460167号、米国特許出願第7,054,297号、Nicaiseら、Protein Science(2004年)、13:1882-1891; Ewertら、Methods、2004年10月; 34(2): 773-783; O'BrienおよびJones、Methods Mol. Biol. 2003年: 207: 81-100; およびSkerra、J. Mol. Recognit、2000年: 13: 167-187、およびSaerensら、J. Mol. Biol.、2005年9月23; 352(3): 597-607、および本明細書で引用された別の参考文献を参照されたい。例えば、マウスまたはラットのCDRをヒト骨格および足場に移植する自体公知の技術は、1つ以上の本発明のナノボディのCDRおよび1つ以上のヒト骨格領域または配列を含むキメラタンパク質を提供する類似した方法で利用可能である。

【0687】

したがって他の実施態様では本発明は、本発明のナノボディの、本明細書に記載したCDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列からなる群から選択された少なくとも1つのCDR配列を有するキメラポリペプチドを含む。好ましくは、このようなキメラポリペプチドは、本発明のナノボディの、本明細書に記載したCDR3配列から成る群から選択した少なくとも1つのCDR配列を含み、および任意に、本発明のナノボディの、本明細書に記載したCDR1配列およびCDR2配列から成る群から選択した少なくとも1つのCDR配列も含む。例えば、このようなキメラポリペプチドは、本発明のナノボディの、本明細書に記載したCDR3配列から成る群から選択した1つのCDR配列、本発明のナノボディの、本明細書に記載したCDR1配列から成る群から選択した1つのCDR配列、および本発明のナノボディの、本明細書に記載したCDR1配列およびCDR2配列から成る群から選択した1つのCDR配列を含んでよい。本発明のナノボディに好適な、本明細書に記載のCDRの組み合わせは、通常これらのキメラポリペプチドにも好適であるとされている。

【0688】

前記キメラポリペプチドでは、CDRはさらなるアミノ酸配列と結合、および/またはアミノ酸配列を介して互いに結合してよい。ここでは前記アミノ酸配列は、骨格配列として作用する、またはCDRを表す足場と一緒に形成する骨格配列またはアミノ酸配列であることが好ましい。参照を、最後のパラグラフに記述された先行技術に対して再度提供する。1つの好ましい実施態様にしたがって、アミノ酸配列は、ヒト骨格配列、例えばV_H3骨格配列である。しかしながら、非ヒト、合成、半合成または非免疫グロブリン骨格配列も使用してよい。好ましくは、使用の骨格配列は以下のようなものである: (1) キメラポリペプチドは、x x x xに結合可能である、すなわち少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、より好ましくは少なくとも10%のアフィニティー、例えば少なくとも25%、および50%まで、あるいは90%以上の対応する本発明のナノボディのアフィニティーを持つ; (2) キメラポリペプチドは医薬品としての使用に適している; および(3) キメラポリペプチドは本質的に、それが医薬品として使用(すなわち適応、投与方法、有効量および治療計画)されるように意図された条件(それは本質的に本発明のナノボディの使用に対して本明細書で記述した条件に類似してよい)下で非免疫原性であることが好ましい。

【0689】

非限定的な一実施態様にしたがって、キメラポリペプチドは、少なくとも1つの骨格配

10

20

30

40

50

列を介して結合している（上述した）少なくとも2つのCDR配列を含んでおり、好ましくは該2つのCDR配列のうち少なくとも1つは、CDR1またはCDR2配列である他のCDR配列と結合しているCDR3配列である。好ましいが限定的ではない実施態様に従って、キメラポリペプチドは、少なくとも2つの骨格配列を結合している（上述した）少なくとも2つのCDR配列を含んでおり、好ましくは該3つのCDR配列のうち少なくとも1つは、CDR1またはCDR2配列、好ましくは1つのCDR1配列および1つのCDR2配列である他の2つのCDR配列と結合しているCDR3配列である。1つの特に好ましいが限定的ではない実施態様に従って、キメラポリペプチドは、構造FR1' CDR1 FR2' CDR2 FR3' CDR3 FR4'を有し、ここではCDR1、CDR2およびCDR3は本発明のナノボディのCDRに対して本明細書で規定しており、FR1'、FR2'、FR3'およびFR4'は骨格配列である。FR1'、FR2'、FR3'およびFR4'は特に、それぞれ（V_H3配列などの）ヒト抗体の骨格1、骨格2、骨格3および骨格4配列および/またはこのような骨格配列の一部断片であってよい。構造FR1' CDR1 FR2' CDR2 FR3' CDR3 FR4'を有するキメラポリペプチドの一部または断片も使用可能である。このような一部または断片は前述のパラグラフに設定された基準を満たすものであることが好ましい。

【0690】

本発明はまた、このようなキメラポリペプチドを含む、および/または本質的にこのようなキメラポリペプチドから成るタンパク質およびポリペプチドに、このようなタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸に、このようなタンパク質およびポリペプチドを調製する方法に、このようなタンパク質またはポリペプチドを発現する、または発現可能な宿主細胞に、組成物、および特にこのようなタンパク質またはポリペプチド、核酸または宿主細胞を含む医薬的組成物に関係しており、また、特に予防、治療または診断目的での、例えば本明細書で記述された予防、治療または診断目的での、このようなタンパク質またはポリペプチド、このような核酸、このような宿主細胞および/またはこのような組成物の使用にも関係している。例えば、このようなタンパク質、ポリペプチド、核酸、方法、宿主細胞、組成物および使用は本発明のナノボディに対して本明細書に記載されたタンパク質、ポリペプチド、核酸、方法、宿主細胞、組成物および使用と類似のものであってよい。

【0691】

本発明のナノボディが上述の好ましいCDR配列よりも1つ以上多くCDRを含んでいる場合、これらのCDR配列は好適な（すなわち本明細書に記載の目的に適した）CDR配列であることが可能であり、および/または、これらのCDR配列は、例えば（好ましい）ナノボディ、通常抗体由来（および特にヒト抗体由来）のV_Hドメイン、重鎖抗体、（通常ヒト4鎖抗体などの）通常4鎖抗体、またはTNFに対して指向性を有する他の免疫グロブリン配列から自体公知の任意の方法で得ることが可能である。xxxxに対して指向性を有するこのような免疫グロブリン配列は、当業者に明らかであるとされているので、すなわちTNFで免疫化することによって、またはTNFで免疫グロブリン配列の好適なライブラリーをスクリーニングすることで、あるいは好適なそれらの組み合わせによって、自体公知の方法で生成することが可能である。任意にその後、ランダムな、または部位特異的な変異誘発などの技術、および/または自体公知のアフィニティー変異のための他の技術を行ってもよい。このような免疫グロブリン配列を生成する好適な技術は当業者に明らかであり、例えばHoogenboom、Nature Biotechnology、23、9、1105-1116（2005年）で概説されたスクリーニング技術がある。指定の標的に対する免疫グロブリンを生成する他の技術には、例えばナノクローン技術（例えば未公開の米国特許仮出願60/648,922に記載されている）、いわゆるSLAM技術（例えば欧州特許出願第0542810に記載されている）、ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックマウスの使用または公知のハイブリドーマ技術（例えばLarrickら、Biotechnology、7巻、1989年、p.934を参照）がある。これらの技術をすべて使用してTNFに対する免疫グロブリンを生成することが可能であり、このような免疫グロブリンのCDRは本発明の、すなわち上記に概説した

ナノボディ中で使用が可能である。例えば、このようなCDRの配列は決定、合成および/または単離、および(例えば、対応する未変性のCDRを置換するために)本発明のナノボディの配列に挿入することが可能であり、すべては本明細書に記載しているような自体公知の技術を使用している。あるいは、このようなCDRを含む本発明のナノボディ(またはこのようなCDRをコードする核酸)は、本明細書に記載した技術を再度使用してデノボ合成することが可能である。

【実施例1】

【0692】

TNF アルファおよび血清アルブミン特異性ナノボディの同定

拮抗ナノボディは、週間隔で100 μgのサイトカインを6回注入することで、ヒトTNF アルファで免疫化した2頭のラマ(Llama glama)で同定した。競合アッセイでスクリーニングを行い、標識TNF アルファのその受容体への結合の阻害能について個々のナノボディを分析した。アルブミン特異性ナノボディは、ヒト血清アルブミンで免疫化したラマから同定した。ヒト、アカゲザルおよびマウスアルブミンにおいて、ELISAで個々のナノボディをスクリーニングし、様々な種の血清アルブミンと交差反応するナノボディのパネルが得られた。

10

【実施例2】

【0693】

単離したナノボディの配列分析

マトリックスをスコア化するBLOSUM62およびカットオフ値が60%である一致度を利用して、配列分析(図1)に基づいて、様々なクラスのナノボディ:クラスI(PMP1C2、PMP1G11、PMP1H6)、クラスII(PMP1G5、PMP1H2、PMP3G2)、クラスIIb(PMP1D2)、クラスIII(PMP3D10、PMP5F10)を同定した。表8には、これらのTNF アルファナノボディの配列(配列番号52~60)が収載されている。

20

【0694】

配列分析(図2)に基づいて、様々なクラスの血清アルブミンナノボディを、マトリックスをスコア化するBLOSUM62およびカットオフ値が60%である一致度を利用して同定した。表8には、これらの血清アルブミンナノボディの配列(配列番号61~67)が収載されている。

30

【実施例3】

【0695】

Biacore分析

TNF アルファ

TNF アルファへのナノボディの結合を、Biacore3000の機器では表面プラズモン共鳴で特徴づけた。反応単位が250に達するまで、様々な種由来のTNFをアミン結合を介してCM5センサーチップ表面に共有結合させた。残留した反応群を不活性化した。ナノボディ結合を一種類の濃度(1/1000希釈)で評価した。チップ結合抗原に対する結合を可能にするために45 μl/minの流速で4分間、各ナノボディを注入した。結合ナノボディの自然解離を可能にするために同じ流速で4時間、ナノボディを有しない結合バッファーをチップにて送った。様々なナノボディについて得たセンサグラムからK_{off}値を算出した。

40

【0696】

ナノボディの各クラスのうち、未精製プロテインをBiacoreで分析した。K_{off}のデータは表9に収載されている。

【0697】

各クラスの代表的ナノボディを、K_{off}値に基づくさらなる分析のために維持した。クラスIにはPMP1C2(TNF1)を選択した;クラスIIの代表としてPMP1G5(TNF2)を選択した;クラスIIIの代表としてPMP5F10(TNF3)を選択した。

50

【0698】

血清アルブミン

結合を上述のようにアッセイした。その際例外として希釈は1/20とした。図3、4および5は、未精製タンパク質を使用した、アルブミン特異性TNF α アルファナノボディ対ヒト、アカゲザルおよびマウス血清アルブミンのスクリーニングを説明している。

【0699】

ナノボディは K_{off} 値にしたがってランク付けしている。下の表IIIを参照：

【表III】

クラス	ヒト	アカゲザル	マウス
G	PMP6A8	PMP6A8	PMP6B4
C	PMP6B4	PMP6B4	PMP6A8
B	PMP6A6	PMP6A6	PMP6A6
B	PMP6C1	PMP6C1	PMP6C1
A	PMP6G8	PMP6G8	PMP6G8
A	PMP6A5	PMP6A5	PMP6A5
D	PMP6G7	PMP6G7	PMP6G7

10

【0700】

ファミリーCおよびファミリーBのメンバーについて、最良の K_{off} を得た。それらのファミリーのメンバーについて、マウス、ヒトおよびアカゲザル血清アルブミン間の交差反応も見られた。クラスBおよびCから得た代表的ナノボディを、さらなる分析のために規定した：PMP6A6 (ALB1)をクラスBの代表として選択し、PMP6A8 (ALB2)をクラスCの代表として選択した。

20

【実施例4】

【0701】

pAX051における一価ナノボディのクローニング
大腸菌発現ベクターの説明

pAX051はpUC19の誘導体である。それはIPTGを利用して発現の誘導の制御を可能にするlacZプロモーターを含む。ベクターはアンピシリンまたはカルベニシリンに対する耐性遺伝子を有する。マルチクローニングサイトはいくつかの制限部位を収容しており、制限部位のSfiIおよびBstEIIは頻りにNanobody (商標)のクローニングに使用されている。NBをコードする配列を有するフレームでは、ベクターはC末端cmycタグおよび(His)6タグをコードする。シグナルペプチドは、発現したNanobody (商標)をペリプラズムに移動させるgen3リーダー配列である。

30

【0702】

選択されたナノボディTNF1 (PMP1C2)、TNF2 (PMP1G5)、TNF3 (PMP5F10)、ALB1 (PMP6A6)およびALB2 (PMP6A8)をコードするDNAはpAX051中でクローン化され、構造物はTG1エレクトロコンピテント細胞に形質転換した。クローンをPCR挿入部分について分析し、ヌクレオチド配列は4つの陽性クローンから決定した。グリセロールのストックを、正しい配列を含むクローンから調製し、-80℃で保存した。

【実施例5】

【0703】

一価ナノボディの発現

各ナノボディを発現するクローンの単一コロニーを植菌し、37℃でLuria培地、アンピシリン/カルベニシリン(100 μ g/ml)および2%グルコース中で前培養を開始し一晩行った。この前培養を利用し植菌を行った。植菌材料は1%(v/v)の生産培養物(TB培地+アンピシリン/カルベニシリン+0.1%グルコース)である。生産培養物は、600nmでのOD値が5~10に到達するまで37℃で培養し、IPTG(1mMの終濃度)を添加してナノボディ発現を誘導した。タンパク質発現を、4時間37℃あるいは一晩28℃のいずれかで継続可能にし、その時点で細胞を遠心分離により回収し、湿細胞ペーストとして-20℃で保存する。

40

50

【0704】

- 20 で保存した湿細胞ペーストの調製ペリプラズム抽出物を、ペレットをPeriバッファー（50 mMの NaH_2PO_4 、300 mMの NaCl 、pHを8.0に調整）に再懸濁し、混合物を4 で30分間ローターに供し、調製遠心分離機（H-6000Aローターを備えたSorvall RC-3C Plus）を利用して該混合物を遠心分離することによって作製し、細胞をペレット化する。ペリプラズム空間の粗抽出物である上清は、さらなる精製のために回収する。

【0705】

His(6)タグ化ナノボディは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）で精製する。TALON樹脂（Clontech）はメーカーの使用説明書にしたがって処理する。該抽出物は該樹脂とともに30分間ローター上で室温にてインキュベートする。樹脂はPBSで洗浄し、カラムに移す。封入された樹脂を15 mMのイミダゾールで洗浄する。ナノボディを、150 mMのイミダゾールを用いてカラムから溶出する。溶出した画分をHybond膜にスポットし、ボンソーで視覚化して分析する。タンパク質を含む画分を貯め、PBSに対して透析する。透析タンパク質を回収し、ろ過滅菌し、濃度を決定し、アリコートで-20 で保存する。

10

【実施例6】

【0706】

一価TNF アルファナノボディの特徴付け

ヒト生殖系配列に対する相同性

20

表10に示されたとおり、ナノボディアミノ酸配列をヒト生殖系配列と比較した。ヒト配列に対する相同性の順序では、ナノボディは以下のような：TNF アルファナノボディについては、 $\text{TNF}1 > \text{TNF}2 > \text{TNF}3$ であり；血清アルブミンナノボディについては、 $\text{ALB}1 > \text{ALB}2$ である。

【実施例7】

【0707】

発現レベル

発現レベルを算出し、表11に示した。収率の順序では、ナノボディは以下のような位置づけである：TNF アルファナノボディについては、 $\text{TNF}1 > \text{TNF}2 > \text{TNF}3$ であり；血清アルブミンナノボディについては、 $\text{ALB}1 > \text{ALB}2$ である。

30

【実施例8】

【0708】

SDS-PAGE分析

純度の決定には、タンパク質試料を15%のSDS-PAGEゲルで分析した。10 μl のLaemmlisサンプルバッファーを10 μl (1 μg)の精製タンパク質に添加し、試料は95 で10分間加熱し、冷却し、15%のSDS-PAGEゲルに添加した。標準法にしたがってゲルを処理し、クマシーブリリアントブルー（CBB）で染色した。図6は、TNF アルファ特異性および血清アルブミン特異性ナノボディに関するSDS-PAGEを示す。

【実施例9】

40

【0709】

ウエスタンブロット分析

100 ngの精製タンパク質をゲル上に添加した。SDS-PAGEに続いて、タンパク質を、Mini Trans-Blot（登録商標）電気泳動転写細胞（Biorad）を使用したニトロセルロース膜に移した。膜はPBS、1%カゼイン中で一晩4 でブロッキングした。

構造物はすべてc-mycタグに融合したので、マウスモノクローナル抗myc抗体を検出ツールとして使用した。さらに、ウサギポリクローナル抗ナノボディ（R23）を検出ツールとして使用した。1/2000に希釈した抗myc抗体を含むPBSまたは1/2000に希釈した抗ナノボディ抗体を含むPBSおよび1%カゼイン中で、ブロットを攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。膜をPBS中で5回洗浄し、その後二次

50

抗体を添加した(1/1000に希釈したウサギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ複合体、Sigma、A1902を含むPBS、あるいはヤギ抗ウサギIgGアルカリホスファターゼ複合体、Sigma、A8025、および1%カゼイン)。室温で1時間軽く攪拌しながらインキュベートした後、膜をPBS中で5回洗浄した。プロットをBCIP/NBT溶液を使用して展開し、バンドが鮮明に見えるようになったときに、プロットをmilliQ水で洗浄することで反応を停止した。図7はウエスタンブロット分析を示している。

【実施例10】

【0710】

ELISAヒトおよびアカゲザルTNF アルファへの結合

ELISAを行い、ヒトおよびアカゲザルTNF アルファへの結合を試験した。96ウェルのMaxisorpプレートを、2 μ g/mlのニュートラアビジンを含むPBS中で4で一晩、コーティングした。1%のカゼインで2時間、室温でプレートをブロッキングした。ビオチン化TNF アルファ(400ng/ml)をウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートした。ナノボディ試料を、開始時は2 μ g/mlで、次いで1:3の希釈度で希釈した。マウス抗myc(1/2000希釈)およびウサギ抗マウスアルカリホスファターゼ(1/2000希釈、Sigma、A1902)ならびに基質としてpNPP(2mg/ml)を使用してナノボディを検出した。図9および10は、ヒトおよびアカゲザルTNF アルファに対するELISAにおける結合性を示している。

【0711】

結果を表12に要約する。TNF1およびTNF3はヒトおよびアカゲザルTNF アルファの両方に結合していることが分かる。TNF2はヒトTNF アルファには結合するがアカゲザルTNF アルファには弱い反応しか示さない。

【実施例11】

【0712】

受容体阻害アッセイ

受容体 リガンド相互作用の阻害能を、アカゲザルおよびヒトTNF アルファで分析した。96ウェルのMaxisorpプレートを、2 μ g/mlのエンブレルを含むPBS中で4で一晩、コーティングした。1%のカゼインで2時間、室温でプレートをブロッキングした。ナノボディ試料を、ビオチン化TNF アルファ(10ng/ml)とともに室温で30分間プレインキュベートし、この際開始時は濃度5 μ g/mlで、次いで1:2の希釈度で行った。試料はプレートに添加し、1時間、室温でインキュベートした。Extravidinアルカリホスファターゼ(1/2000希釈)および基質としてpNPP(2mg/ml)を使用してビオチン化TNF アルファを検出した。図11および12は、ヒトおよびアカゲザルTNF アルファに対する阻害ELISAを示している。結果を表13に要約する。TNF1およびTNF3についてリガンド/受容体結合の阻害は、ヒトおよびアカゲザルの両TNFで見られるのに対して、TNF2はヒトTNF アルファのみ阻害している。

【実施例12】

【0713】

Biacore分析

TNF アルファ結合

実施例3に記載のとおり分析を行った。図13および14は、Biacore分析により、ヒトおよびアカゲザルTNF アルファへの結合性を説明している。結果を表14に要約する。Biacoreでの結合性実験はELISAの結果：TNF1およびTNF3についての交差反応結合を裏付けるものであり、一方TNF2はヒトTNF アルファにのみ顕著に結合する。

【0714】

血清アルブミン

結合を上述のようにアッセイした。その際例外として一連の異なる濃度で行った。チップ結合抗原に対する結合を可能にするために45 μ l/minの流速で4分間、各濃度を

10

20

30

40

50

注入した。結合ナノボディの解離を可能にするために同じ流速で、分析物を有しない結合バッファーをチップにて送った。15分後、再生液(25mMのNaOH)を注入して残存している結合分析物を除去した。

【0715】

各分析物の様々な濃度について得たセンサグラムから、平衡状態に達したとき、安定状態アフィニティーを介して K_D 値を算出した。

【0716】

結果を表15に要約する。ALB1およびALB2の両方に交差反応が見られる。ヒトおよびアカゲザルTNF α に対して、ALB2でアフィニティーが最も高かった。しかしながら、ALB1でファクター12の差異が見られたが、ヒト/アカゲザル対マウス血清アルブミンに対するアフィニティーの差異はALB2(ファクター400)でさらに明らかである。

【実施例13】

【0717】

バイオアッセイ

選択されたナノボディの抗TNF α 活性を測定するため、TNF α 感受性マウス線維芽細胞系L929を使用した。培養液中、TNF α が十分に高い濃度、すなわち毒性用量の場合、L929細胞は壊死する。TNF α とその受容体の相互作用の阻害は、細胞に混合物を添加する前に、一連の抗体希釈物を細胞毒性濃度のTNF α とともにプレインキュベートすることによって判定した。培養液がアクチノマイシンDを含んでいれば、細胞はTNF α に対してさらに感受性になり、遊離TNF α に対するバイオアッセイの感受性が高まる。

【0718】

L929細胞を培養密度に近くなるまで増殖させ、96ウェルマイクロタイタープレートに、1ウェル当たり細胞5000個をプレートアウトし、一晚インキュベートした。アクチノマイシンDを、終濃度1 μ g/mlで細胞に添加した。試験されるナノボディの段階的希釈物は細胞毒性濃度のTNF α と混合した(最終アッセイ濃度は0.5ng/mlまたは15IU/ml)。37 $^{\circ}$ Cで少なくとも30分間インキュベートした後、この混合液を、プレートに播種した細胞に添加した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで24時間、5%のCO $_2$ 雰囲気下でインキュベートした。テトラゾリウム塩WST-1を使用し細胞生存を判定した。用量反応曲線およびEC50値をGraphpad Prismで算出した。

【0719】

ヒトおよびアカゲザルTNF α について結果を表16に要約する。細胞毒性活性を中和するそれらの作用強度に基づいて、分子は以下のような位置づけである：ヒトTNF α については、TNF3 > TNF1 > TNF2であり；アカゲザルTNF α については、TNF1 = TNF3 > TNF2である。

【実施例14】

【0720】

プロテインA結合

図14は、実施例12で記述したとおりBiacoreで分析したプロテインA結合を示している。陽性結合をTNF1、TNF2、ALB1について得た。TNF3およびALB2については、結合は存在しないか、あるいは弱いものであった。

【実施例15】

【0721】

温度安定性

試料を200 μ g/mlで希釈し、500 μ lの8つのアリコートに分注した。異なるバイアルをインキュベートし、各々室温から90 $^{\circ}$ Cまで所与の温度でインキュベートした。処理後、試料を室温で2時間冷却し、4 $^{\circ}$ Cで保った。沈殿物を14,000rpmで30分間遠心分離して除去した。SNを注意深く除去し、さらに分析した。

【0722】

280 nmでのOD

280 nmでのODを測定し、濃度を算出した。結果を表17に要約する。TNF2およびTNF3については、80 でタンパク質含有量の減少が始まり、一方ALB2については、70 から減少が始まった。

【0723】

ウエスタンブロット

2 μgの処理タンパク質を15%のSDS PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に写し、上述のように処理した。ポリクローナル抗ナノボディ(R23、1/2000希釈)および抗ウサギおよびウマのダイコンペルオキシダーゼ(DAKO、P0448、1/2000希釈)を使用し検出を行った。図15はウエスタンブロット分析を示す。70、80および90 で処理したALB2について、タンパク質濃縮中で透明な液滴が見られた。70、80および90 で処理したTNF1について；90 で処理したTNF3について；90 で処理したALB1について、凝集が依然として見られ、このことは、SNが依然として微量の沈殿物を含んでいることを意味し、280 nmでのODの読み出しが高めになってしまうことになる。このことは、これら高めの温度で処理したTNF1、TNF3およびALB1について280 nmでのODで測定したタンパク質濃度が何故減少しないかを説明している。

【0724】

ELISA

ヒトTNF アルファへの結合を検出するELISAを、実施例10に記述したとおりに基本どおりに行った。結果を図16に示す。TNF1、TNF2およびTNF3に対する、ヒトTNF アルファ結合は80 で減少し始める。

【0725】

バイオアッセイ

実施例13に記述したとおりにバイオアッセイを行った。結果を表18に要約する。TNF1について、ナノボディの作用強度は70 で減少し始め、TNF2およびTNF3については80 で減少し始める。

【0726】

Biacore

実施例12に記述したとおりにヒト血清アルブミンへの結合を判定した。濃度は一定に固定した(1:50希釈)。結果を図17に示す。ALB1については、温度処理は血清アルブミンに対する結合に影響を及ぼしていない。ALB2については、70 から処理は k_{on} に影響し始めた。

【実施例16】

【0727】

二価ナノボディ

二価TNF アルファ特異性ナノボディの設定

TNF1、TNF2およびTNF3を二価ナノボディに向くように設定した。2つの構成要素の間にあるスペーサーとして、9AA GlySer リンカー(表19 配列番号68)または30AA GlySer リンカー(表19 配列番号69)のいずれかを使用した。これは、表20に表される構造物を生成した。表19には、これら二価TNF アルファナノボディ(配列番号70~75)の配列が収載されている。

【実施例17】

【0728】

二価TNF アルファ特異性ナノボディの発現

実施例5に記述したとおりに発現を行った。His(6) タグ化ナノボディを固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)で精製した。Ni NTA樹脂(Qiagen)をメーカーの使用説明書にしたがって処理した。抽出物を樹脂とともにインキュベートし、ローター上で室温で30分間インキュベートした。樹脂をPBSで洗浄しカラムに移した。封入した樹脂をPBS(1:10希釈)で洗浄した。カラムを15 mMのイ

10

20

30

40

50

ミダゾールで事前に溶出した。ナノボディを 2.5 mM のクエン酸 (pH = 4) を用いてカラムから溶出した。溶出した画分をHybond 膜にスポットし、ボンソーで視覚化して分析した。タンパク質を含む画分を貯め、さらに陽イオン交換で精製し、その後サイズ排除を行った。精製したタンパク質を回収し、ろ過滅菌し、濃度を決定し、20 でアリコートに保存した。

【実施例 18】

【0729】

二価 TNF アルファ特異性ナノボディの特徴づけ
発現レベル

二価 TNF アルファ特異性ナノボディの発現レベルを算出し、表 2.1 に示した。リンカーはナノボディの発現レベルに有意な影響を示さない。 10

【実施例 19】

【0730】

SDS - PAGE

実施例 8 に記述したとおりに SDS - Page を行った。図 1.8 に SDS Page の結果を示す。

【実施例 20】

【0731】

ウエスタンブロット

実施例 9 に記述したとおりにウエスタンブロット分析を行った。図 1.9 にウエスタンブロットの結果を示す。 20

【実施例 21】

【0732】

受容体阻害アッセイ

実施例 1.1 に記述したとおりにアッセイを行った。図 2.0 および表 2.2 に結果を示す。リガンド / 受容体結合の阻害は、一価形態と比較してすべての二価ナノボディで促進されていた。

【実施例 22】

【0733】

バイオアッセイ

実施例 1.3 に記述したとおりにアッセイを行った。表 2.3 に結果を要約する。毒性活性を中和する作用強度に基づいて、TNF 8、TNF 7、TNF 9 および TNF 5 は、エンプレルの範囲に作用強度を示している。 30

【実施例 23】

【0734】

温度安定性

実施例 1.5 に記述したとおりに試料を分析した。

【0735】

280 nm での OD

280 nm での OD を測定し、濃度を算出した。表 2.4 に結果を要約する。TNF 4 および TNF 7 では、タンパク質含有量は 7.0 から減少し始め、一方 TNF 5、TNF 6、TNF 8 および TNF 9 では 8.0 から減少し始めた。 40

【0736】

ウエスタンブロット法

実施例 1.5 に記述したとおりに、凝集物の有無について試料を分析した。

【0737】

ELISA

上述のとおり、ヒト TNF アルファへの結合を検出する ELISA を基本どおりに行った。図 2.1 に結果を示す。TNF 5、TNF 6、TNF 8 および TNF 9 では、ヒト TNF アルファ結合は 8.0 から減少し始め、TNF 4 および TNF 7 では、7.0 50

から減少し始めた。

【実施例 24】

【0738】

ヒト化一価ナノボディ

TNF アルファおよび血清アルブミン特異性ナノボディにおける非ヒトアミノ酸位置の同定

図22 (TNF1)、図23 (TNF2) 図24 (TNF3) および図25 (ALB1) は、DP51、DP53、DP54 およびDP29 配列を有する複数配列アラインメント (Clustal W1.7) を表している。

【0739】

アミノ酸の突然変異に加えて、コドン最適化が行われ、表25の配列番号76~89 (TNF アルファおよびヒト血清アルブミンにそれぞれ対するナノボディ) の配列が生成された。

【実施例 25】

【0740】

コドン最適化変異体の生成

ナノボディの全配列にわたってオリゴヌクレオチドを合成した。

【実施例 26】

【0741】

二価TNF アルファ特異性ナノボディの発現

実施例5に記述したとおりに発現を行った。

【実施例 27】

【0742】

ヒト化ナノボディの特徴づけ

発現レベル

表26に算出した発現レベルを示す。3.5~11.7 mg/ml の範囲の収率で、発現を行った。誘導時間は収率に影響しなかった。

【実施例 28】

【0743】

SDS PAGE

実施例8に記述したとおりにSDS-PAGEを行った。図26にSDS-PAGEゲルを示す。

【実施例 29】

【0744】

ウエスタンブロット

実施例9に記述したとおりにウエスタンブロット分析を行った。図27にウエスタンブロットの結果を示す。

【実施例 30】

【0745】

バイオアッセイ

実施例13に記述したとおりにアッセイを行った。

【0746】

ヒト化ナノボディの結果を表27に要約する。野生型ナノボディを参照として示す。

【実施例 31】

【0747】

Biacore

実施例12に記述したとおりに分析を行った。図28および31にBiacoreの結果を示す。

【実施例 32】

【0748】

10

20

30

40

50

温度安定性

実施例 15 に記述したとおりに試料を分析した。

【0749】

280 nm での OD

280 nm での OD を測定し、濃度を算出した。表 28 に結果を要約する。

【0750】

ヒト化 TNF1 ナノボディ (TNF13 ~ 14) では、タンパク質濃度は有意に減少していない。ヒト化 TNF2 (TNF15 ~ 19) および TNF3 (TNF20 ~ 23) では、タンパク質濃度は 80 で減少し始める。ヒト化 ALB1 (ALB4 ~ 5) では、タンパク質濃度は 70 で減少し初め、ALB3 では 60 から減少し始める。

10

【0751】

ウエスタンブロット

実施例 15 に記述したとおりに、凝集物の有無について試料を分析した。

【0752】

ELISA

実施例 15 に記述したとおりに、ヒト TNF アルファへの結合を検出する ELISA を基本どおりに行った。結果を図 30 に示す。

【0753】

ヒト TNF アルファ結合は、温度処理した WT TNF1 およびヒト化 TNF13 および 14 に；温度処理した WT TNF2 およびヒト化 TNF15 ~ 19 に同等であり；TNF21 および 22 ではヒト TNF アルファ結合は減少し、また TNF23 では少ない程度に減少し、ならびに TNF20 では、温度処理した WT TNF3 と比較して効果は全く見られない。

20

【実施例 33】

【0754】

三価 TNF アルファ ナノボディ

三価 TNF アルファ 特異性 ナノボディ の設定

TNF1、TNF2、TNF3 および ALB1 を三価 ナノボディ に向くように設定した。2つの構成要素の間にあるスペーサーとして、9AA GlySer リンカー (表 19 配列番号 68) または 30AA GlySer リンカー (表 19 配列番号 69) のいずれかを使用した。これは、表 30 の構造物を生成した。表 29 には、三価 TNF アルファ ナノボディ (配列番号 91 ~ 94) の配列が収載されている。

30

【実施例 34】

【0755】

三価 TNF アルファ 特異性 ナノボディ の発現

実施例 5 に記述したとおりに発現を行った。His (6) タグ化 ナノボディ を固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) で精製する。Ni NTA 樹脂 (Qiagen) をメーカーの使用説明書にしたがって処理する。抽出物を樹脂とともにインキュベートし、ローター上で室温で 30 分間インキュベートする。樹脂を PBS で洗浄しカラムに移す。封入した樹脂を PBS (1:10 希釈) で洗浄する。15 mM のイミダゾールで事前に溶出する。ナノボディを 25 mM のクエン酸 (pH = 4) を用いてカラムから溶出する。溶出した画分を Hybond 膜にスポットし、ボンソーで視覚化して分析する。タンパク質を含む画分を貯め、さらに陽イオン交換で精製し、その後サイズ排除を行う。精製したタンパク質を回収し、ろ過滅菌し、濃度を決定し -20 でアリコートに保存する。

40

【実施例 35】

【0756】

三価 TNF アルファ / SA 特異性 ナノボディ の特徴づけ

発現レベル

発現レベルを算出し、表 31 に示した。

50

【実施例 36】

【0757】

SDS-PAGE 分析

実施例 8 に記述したとおりに SDS-PAGE を行った。図 31 に SDS-PAGE ゲルを示す。

【実施例 37】

【0758】

ウエスタンブロット分析

実施例 9 に記述したとおりにウエスタンブロット分析を行った。図 32 にウエスタンブロット分析を示す。

10

【実施例 38】

【0759】

バイオアッセイ

実施例 13 に記述したとおりにアッセイを行った。

【0760】

表 32 に二価ナノボディの結果を要約する。毒性活性を中和する作用強度に基づいて、分子は一様に有効であり、二価分子と同等である作用強度を有する。

【実施例 39】

【0761】

ヒト血清アルブミンへの結合

結合を上述のようにアッセイした。その際例外として一連の異なる濃度で行った。チップ結合抗原に対する結合を可能にするために $45 \mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 4 分間、各濃度を注入した。次いで、結合ナノボディの解離を可能にするために同じ流速で、分析物を有しない結合バッファーをチップにて送った。15 分後、再生液 (25mM の NaOH) を注入して残存している結合分析物を除去した。

20

【0762】

各分析物の様々な濃度について得たセンサグラムから、平衡状態に達したとき、安定状態アフィニティーを介して K_D 値を算出した。

【0763】

結果を表 33 に要約する。設定された ALB1 結合剤については、野生型 ALB1 に比べてアフィニティーは減少している。しかしながらアフィニティーは依然として $7.2 \sim 14 \text{nM}$ の範囲にある。

30

【実施例 40】

【0764】

温度安定性

実施例 15 に記述したとおりに試料を分析した。

【0765】

280 nm での OD

280 nm での OD を測定し、濃度を算出した。表 34 に結果を要約する。TNF24、TNF27 および TNF28 では、タンパク質含有量は 60 で減少し初め、一方、TNF25 および TNF26 では 70 から減少し始める。

40

【0766】

ウエスタンブロット法

実施例 15 に記述したとおりに、凝集物の有無について試料を分析した。

【0767】

ELISA

上述したとおりに、ヒト TNF アルファへの結合を検出する ELISA を基本どおりに行った。結果を図 33 に示す。TNF24 および TNF27 では、ヒト TNF アルファ結合は 60 から減少し初め、TNF25、TNF26 および TNF28 では 70 で減少し始める。

50

【実施例 4 1】

【0768】

ヒト化一価ナノボディ（二回目）

TNF アルファおよび血清アルブミン特異性ナノボディにおける非ヒトアミノ酸位置の同定

図34 (TNF1)、図35 (TNF2)、図36 (TNF3) および図37 (ALB1) は、DP51、DP53、DP54 および DP29 配列を有する複数配列アラインメント (Clustal W1.7) を表している。変異した分子を発現させ、上述のように精製し、表35の配列番号95~104 (それぞれTNF アルファおよびヒト血清アルブミンに対する) の配列を生成した。

10

【実施例 4 2】

【0769】

ヒト化ナノボディの特徴づけ

発現レベル

表36に算出した発現レベルを示す。0.5~2.7 mg/ml の範囲の収率で、発現を実現した。

【実施例 4 3】

【0770】

SDS PAGE

実施例8に記述したとおりにSDS-Pageを行った。図38にSDS-Pageゲルを示す。

20

【実施例 4 4】

【0771】

ウエスタンブロット法

実施例9に記述したとおりにウエスタンブロット分析を行った。図39にウエスタンブロットの結果を示す。

【実施例 4 5】

【0772】

バイオアッセイ

実施例13に記述したとおりにアッセイを行った。

30

【0773】

ヒト化ナノボディの結果を表37に要約する。野生型ナノボディおよびヒト化ナノボディの一回目は参照としてこれに含まれる。

【実施例 4 6】

【0774】

Biacore

実施例12に記述したとおりに分析を行った。図40にBiacoreの結果を示す。

【実施例 4 7】

【0775】

温度安定性

実施例15に記述したとおりに試料を分析した。

40

【0776】

280 nmでのOD

280 nmでのODを測定し、濃度を算出した。表38に結果を要約する。

【0777】

ヒト化TNF1ナノボディ (TNF29~30) では、タンパク質濃度は有意に減少していない。ヒト化TNF2 (TNF31~32) およびTNF3 (TNF33) では、タンパク質濃度は80 で減少し始める。

【0778】

ウエスタンブロット

50

実施例 15 に記述したとおりに、凝集物の有無について試料を分析した。

【0779】

E L I S A

実施例 15 に記述したとおりに、ヒト T N F α への結合を検出する E L I S A を基本どおりに行った。結果を図 4 1 に示す。

【0780】

ヒト T N F α 結合は、W T T N F 1 およびヒト化 T N F 2 9 および T N F 3 0 と同等であり； W T T N F 2 およびヒト化 T N F 3 1 および T N F 3 2 と同等であり；ならびに W T T N F 3 およびヒト化 T N F 3 3 と同等である。

【0781】

比較例

この比較例では、本発明の 9 つのナノボディを、それぞれ「V_{HH}#1A」または「1A」、「V_{HH}3E」または「3E」および「V_{HH}#3G」または「3G」（国際公開第 04/041862 号での配列番号 1、4 および 5）と呼ばれる国際公開第 04/041862 号から得られる 3 つのナノボディと比較した。使用のアッセイは、国際公開第 04/41862 号（例えば 3 欄での実施例 1 を参照）で参照された K Y M 細胞を使用した、細胞ベースのアッセイであった。結果は下記の表 3 9 で述べられている。以上のように、本アッセイでは、本発明のナノボディの E C 5 0 値は 3 E の 1.8 倍高く、この値は国際公開第 04/041862 号にしたがったナノボディを最大に機能させる。

【実施例 48】

【0782】

三価の二重特異性ヒト化 N a n o b o d y（商標）の生成

三価の二重特異性ナノボディを設定し、最初に大腸菌発現ベクター p A X 0 5 4 にクローン化し、次いで P C R で増幅を助け、p P I C Z A 発現ベクターにクローン化した。

【0783】

大腸菌発現ベクターの説明

p A X 5 4 は p U C 1 9 の誘導体である。それは、I P T G を用いて発現の誘導を制御可能にする L a c Z プロモーターを含んでいる。そのベクターはアンピシリンまたはカルベニシリンに対する耐性遺伝子を有する。マルチクローニングサイトはいくつかの制限部位を収容し、制限部位の S f i I および B s t E I I は頻繁に N a n o b o d y（商標）のクローニングに使用される。シグナルペプチドは、発現した N a n o b o d y（商標）をペリプラズムに移動させる g e n 3 リーダー配列である。

【0784】

ピキア・パストリス発現ベクターの説明

p P I C Z A は、大腸菌の増殖を可能にする p U C 由来複製開始点を含んでいる。それはピキア・パストリス A O X 1（アルコールオキシダーゼ 1）遺伝子のプロモーターを含んでいる。この 9 4 2 b p のプロモーター領域は、(i) 目的遺伝子の発現を、メタノール誘導可能で高レベルなものにすることが可能で、(i i) 5' A O X 1 プロモーター領域内で直線化されたベクター DNA でピキアを形質転換した後、A O X 1 遺伝子座にプラスミドを組み込むことを目的にしている。p P I C Z ベクターは酵母複製開始点を含まず、したがって形質転換体は、組み換えがプラスミドとピキアゲノムの間で起こる場合、単離することしかできないということに留意されたい。ベクターは大腸菌およびピキア・パストリス宿主細胞の両方における抗生物質ゼオシン（Z e o c i n）への耐性を特定する。ベクターは S . セレピシエ 接合因子の分泌シグナルを取り込み、大部分のタンパク質を培地に効率よく分泌させる。因子シグナル配列の開始 A T G は、A O X 1 遺伝子の未変性の開始 A T G に相当する。マルチクローニングサイトはいくつかの制限部位を収容し、その部位の X h o 1 / E c o R 1 または X h o 1 / N o t 1 は、N a n o b o d y（商標）をコードする配列を分泌シグナルに融合させるために使用される典型である。マルチクローニングサイトの次には A O X 1 転写終結領域がある。この発現ベクターのさらに詳しい記載は Invitrogen のウェブサイトで見ることができる（<http://www.invitrogen.com>）

10

20

30

40

50

/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)。

【0785】

三価ナノボディの設定

3つの別個のPCR反応を、WPA-0012に示されるオリゴの組み合わせを使用してN末端、中間およびC末端のNanobody(商標)サブユニットを増殖するように設定した。M13_rev/Rev_9GlySer_L108を使用しN末端Nanobody(商標)を増殖した; For_GlySer/ShortおよびRev_15BspEI_L108を使用して中間Nanobody(商標)を増殖した; For_BspEI/M13_forを使用してC末端Nanobody(商標)を増殖した。1μlのプラスミドDNA(50~100ng)、1.5μlのフォワードプライマー(10μM 300nM)、1.5μlのリバースプライマー(10μM 300nM)、1μlのdNTP(10mM 0.2mM)、5μlのバッファー(10x 1x)、0.75μlの酵素(3.5U/μl 2.6U/μl)および39.25μlのH₂OのPCR反応液を、総量50μlとして調製した。プライマー配列を表40に示す。PCRプログラムを開始し、94を2分間保った。94で30秒間、50で30秒間および72で1分間というサイクルを30回繰り返し、その後72を10分間保った。PCR反応液を5μlずつ2%アガロースゲル上で分離して増殖を検査した。PCR産物を、メーカーの使用説明書にしたがってQIAquick PCR精製キットを使用し精製した。カラムを1つ使用し、50μlのEBバッファーで溶出した。50μlのDNAおよび2μlのBamHI(10U/μl)をメーカーが推奨する適当なバッファー中で37で2時間インキュベートし、N末端V_{HH}断片を調製した。引き続き、2μlのSfiI(10U/μl)を添加し、その混合液を55で2時間インキュベートした。50μlのDNAおよび2μlのBamHI(10U/μl)ならびに2μlのBspEI(10U/μl)をメーカーが推奨する適当なバッファー中で37で2時間インキュベートし、中間V_{HH}断片を調製した。50μlのDNAおよび2μlのBspEI(10U/μl)をメーカーが推奨する適当なバッファー中で37で2時間インキュベートし、C末端V_{HH}断片を調製した。引き続き、2μlのBspEII(10U/μl)を添加し、その混合液を60で1時間インキュベートした。予備消化反応液を2%アガロースゲルで分離した。V_{HH}のバンド(350~450bp)をゲルから切り取り、メーカーの使用説明書にしたがいQIAquick Gel Extractionキットを使用してDNAを精製した。カラム(カラム1つに最大400mgのアガロースゲルを含む)を1つ使用し、結合DNAを50μlのEBバッファーで溶出した。260nmでのOD(1ODユニット=50μg/ml)を測定し、DNA濃度を決定した。100ngのベクターpAX54、12ngのN末端V_{HH}、12ngの中間V_{HH}断片、12ngのC末端V_{HH}断片、1μlのライゲーションバッファーおよび1μlのリガーゼ(3U)を含み、終量10μlのライゲーション混合液を調製し、室温で2時間インキュベートした。2μlのライゲーション混合液で大腸菌TG1の形質転換を行った。WPA-0010に記載のとおりPCRでコロニーを分析する。陽性クローンで配列を分析する。メーカーの使用説明書にしたがって上述のとおり、Qiaprep spin Miniprepキット(Qiagen)を用いてプラスミドを調製した。VIBの配列研究施設(アントワープ、ベルギー)で配列を決定した。

【0786】

コードDNAの増殖

pAX054大腸菌発現ベクター中でクローン化されたNanobody(商標)をコードする領域を、適当なプライマーペアを使用しPCRで増幅を助ける。未変性のN末端でNanobody(商標)の発現を確実にするために、分泌シグナルのKex2切断部位を含むフレーム中でコード配列をクローン化する。フォワードプライマーは、XhoI認識部位まで分泌シグナルのC末端部を、Nanobody(商標)をコードする領域に融合させる。1μlのプラスミドDNA(50~100ng)、1.5μlのフォワードプライマー(10μM 300nM)、1.5μlのリバースプライマー(10μM 300nM)、1μlのdNTP(10mM 0.2mM)、5μlのバッファー(10x

10

20

30

40

50

1 x)、0.75 µlの酵素(3.5 U/µl 2.6 U)および39.25 µlのH2OのPCR反応液を、総量50 µlとして調製した。プライマー配列を表41に示す。PCRプログラムを開始し、94 °Cを2分間保った。94 °Cで30秒間、50 °Cで30秒間および72 °Cで2分間というサイクルを20回繰り返し、その後72 °Cを10分間保った。PCR反応液を5 µlずつ2%アガロースゲル上で分離して増殖を検査した。PCR産物を、メーカーの使用説明書にしたがってQIAquick PCR精製キットを使用し精製した。カラムを1つ使用し、結合DNAを50 µlのEBバッファーで溶出した。

【0787】

クローニング計画

NBならびにpPICZ A発現ベクターをコードするDNA断片を、適当な制限酵素(XhoI + NotI)で消化した。2 µlのXhoI(10 U/µl)および2 µlのNotI(10 U/µl)を含むメーカー推奨の適当なバッファーとともに37 °Cで3時間、50 µlのPCR産物をインキュベートし、挿入部分を得る。制限酵素量をプラスミド量に合わせてベクターを同様に得る。ベクターおよびNBをコードする断片の両方を精製し、BioPhotometer(Eppendorf)を用いてDNA濃度を定量する。断片およびアクセプターベクターを、1ユニットのT4リガーゼ(Promega)を用いて等モル比で、室温で30分間または16 °Cで一晩ライゲーションする。DNA(20~30 ng)をTG1細胞へと形質転換する。3'AOX1 Rおよび5'AOX1 Fプライマーを使用しPCRでコロニーを分析する。陽性クローンで配列を分析する。TNF30、TNF33およびALB8を三価二重特異性Nanobody(商標)に向くように設定した。構成要素間の

10

20

【0788】

形質転換P・パストリス

プラスミドDNAを単離するために、クローンの単一コロニーを50 mlのLuria培地+アンピシリンまたはカルベニシリン(100 µg/ml)+2%グルコース中に植菌し前培養を開始し、37 °Cで一晩インキュベーションする。Plasmid Midiキット(Qiagen)を使用しメーカーの使用説明書にしたがってプラスミドDNAを調製する。30 µgプラスミドDNAを、メーカーの使用説明書にしたがって適当なバッファー中で6 µlのBstX1(10 U/µl)とともに45 °Cで3時間インキュベートし、DNAを直線化する。消化したDNAを、メーカーの使用説明書にしたがってPCR Purificationキット(Qiagen)を使用し精製する。標準法にしたがってEtOH沈殿でDNAを濃縮する。X33エレクトロコンピテント細胞を10 µgの直線化DNAで形質転換し、細胞を、ゼオシン含有選択YPD寒天プレート(100/250/500 µg/ml)上で48時間培養する。X33は野生型ピキア・パストリス株である；その株自体ならびに誘導された組み換え株は未変性のAOX1遺伝子を含み、メタノールを代謝できる(Mut+)。

30

【0789】

24ウェルプレート中の1 mlのBGCMに単一コロニーを植菌し、30 °C、120 rpmで48時間増殖し、発現レベルについてクローンをスクリーニングする。細胞を遠心分離し、30 °C、120 rpmで48時間増殖するために新鮮なBGCMを細胞に添加する。次に、MeOHを終濃度0.5%まで添加し、細胞を30 °C、120 rpmで8時間培養し、その後MeOHを終濃度0.5%まで再度添加する。細胞を30 °C、120 rpmで一晩培養する。細胞を遠心分離し、上清を回収し、実施例10に記述したとおりにELISAで分析する。

40

【実施例49】

【0790】

三価二重特異性ヒト化Nanobody(商標)の発現および精製
ピキア・パストリスにおける産生

バッファー、溶液およびその他の構成はInvitrogenのウェブサイトで閲覧できる(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)。

単一コロニーをプレートから5 mlのYPDへ植菌し、前培養を開始した。培養液を3

50

0、180 rpmで一晩培養した。翌日、前培養液を50 mlのYPDへ溶出し、30、180 rpmで一晩培養した。前培養液を植菌し、最終的に600 nmでのODを0.04~0.08になるように生産培養を開始した。培養液を30、180 rpmで24時間BGC M中で培養し、4,500 rpmで30分間遠心分離した。細胞を、初めの1/3の量のBGC M培地中に再懸濁し、最終的に600 nmでのODを15~20になるようにした。一定の時点で、典型的には3回/日、細胞をMeOHで誘導し、このときMeOHの含有量は1%を超えないようにした。誘導から50時間後、上清を回収する。

【0791】

ピキア・パストリスで発現したナノボディの精製

培養上清を、22 μmのろ過膜、精密ろ過 (Hydrosart、Sartorius) でろ過する。試料を10 kDaの限外ろ過膜 (Hydrosart、Sartorius) で透析ろ過を使用して濃縮し、0.5~1 Lになるまで濃縮する。

10

【0792】

プロテインAアフィニティークロマトグラフィー (MabSelect Xtra、GE Healthcare) を使用し、ランニングバッファーとしてPBSおよびグリシン[100 mM、pH = 2.5]で、溶出のためにNanobody商標)を精製する。1.5 MのTris (pH = 8.8) で試料を中和する。Nanobody (商標) を陰イオン交換クロマトグラフィー (Source 30Q、GE Healthcare) 中でさらに処理する。10 mMのピペラジン (pH = 10.2) で試料を10倍に希釈し、1 MのNaOHでpH = 0.2に、またMilliQ水で伝導率を < 2 mS/cmに調整する。

20

【0793】

サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 75pg、HiLoad XK26/60、GE Healthcare) でナノボディを処理し、陰イオン交換クロマトグラフィー (Source 30Q、GE Healthcare) を利用し、1 MのNaOHで消毒およびDulbeccoのPBSで平衡化した5 mlのカラムに通過させLPSを除去する。

【0794】

純度の決定には、実施例8に記述したとおりにタンパク質試料を15%のSDS-PAGEゲルで分析した。メーカー (Invitrogen) が記述した標準法にしたがってSilverQuest (商標) でゲルを処理する。あるいは、実施例8および9に記述したようにクマシーブリリアントブルーまたはウエスタンプロットでゲルを処理する。結果を図42に示す。

30

【実施例50】

【0795】

三価二重特異性ヒト化Nanobody (商標) の特徴づけ

TNF60は363個のアミノ酸から成る。該タンパク質の分子量は38,441 Daである。pIは8.71である。280 nmでの吸光係数は1.736である。

【0796】

質量分光光度法

標準法にしたがってESI MSで該タンパク質の質量を測定した。TNF60の理論的質量は38,441 Daである。タンパク質は2つのSS架橋を有し、それはESI MSで測定すると質量は38,435 Daになることが好ましい。3つの異なるバッチ由来のTNF60の質量を実験的に測定すると、理論的質量と最大で0.005%異なり、38,433 Da~38,435 Daの範囲である。

40

【0797】

N末端配列決定

標準法にしたがってエドマン分解でN末端配列決定を行った。N末端配列決定により、最初の7個のアミノ酸に対するタンパク質配列はEVQLVESであることが分かった。これは理論的タンパク質配列と一致し、N末端処理が適切であることを示す。

【0798】

分析的サイズ決定

試料 (100 μg) を高分解能のSuperdex75カラムで分析し、Nanobody (商標

50

)の様々なバッチを特徴づけた。Nanobody (商標)のサイズ排除クロマトグラフィーでは、Superdex75では典型的に左右対称のピークが出現し、保持時間は11.5minである。吸光度は典型的に280、254および214nmで記録する。214nmでの測定では、検出感度はさらに高くなる。PBS中での分析的サイズ決定では、左右対称のピークが出現する。汚染物質は見られなかった。3つの異なるバッチに見られる保持時間は11.5~11.55minである。代表的なプロファイルを図43に示す。

【実施例51】

【0799】

ELISAにおけるヒトTNF アルファへのTNF60の結合

実施例10に記述したとおり、TNF60の機能性、すなわちヒトTHF への結合をELISAで分析した。結果は図44に要約してあり、ヒトTNF アルファへのTNF60の2つのバッチの用量依存および飽和可能な結合を明確に説明している。

10

【実施例52】

【0800】

細胞ベースのアッセイの機能性

TNF アルファの細胞毒性活性を中和する作用強度を、実施例13に記述したとおりに細胞ベースのアッセイで分析した。表42ならびに図45および46に結果を要約する。

【0801】

データから、TNF60はエンブレル/エタネルセプトの範囲の作用強度を示し、Humira /アダリムマブおよびレミケード/インフリキシマブの10倍強い作用強度を示すことが分かる。

20

【実施例53】

【0802】

血清アルブミンへのTNF60の結合

ヒトおよびアカゲザル血清アルブミンへの結合を、実施例12に記述したとおりにBiacoreで分析した。K_DのK_{on}およびK_{off}値は表43に示す。TNF60を、野生型構成要素を有する三価二重特異性親Nanobody (商標)であるTNF24と比較する。

【0803】

ヒトおよびアカゲザル血清アルブミンに対するTNF60のアフィニティーは類似している。アフィニティーは、TNF60の野生型類似体であるTNF24に見られるアフィニティーと比較して、2倍低い。K_{on}は2つの分子間で一致しているが、K_{off}はTNF60では2倍高い。

30

【実施例54】

【0804】

マウスの三価二重特異性ヒト化ナノボディの薬物動態学および免疫原性分析
動物

DBA1またはBALBcマウスを赤外線ランプで暖め、200μlのNanobody (商標) (マウス1匹につき100μg)を尾に静脈注射した。尾を小切開し、マイクロチューブに血液を回収し、異なる時点での血液試料を得た。典型的には、血液は、15分、2時間、4時間、6時間、1日、2日、3日、4日、7日、14日の時点でサンプリングした。血清を標準法にしたがって調製した。

40

【0805】

マウス血清のNanobody (商標)濃度の決定

マイクロタイタープレート (NUNC、Maxisorb)を2μg/mlニュートラアビジンで4°Cで一晩被覆した。プレートを、PBS/0.05%Tween-20で5回洗浄し、PBS/1%カゼインを使用し室温で2時間ブロックした。ピオチン化ヒトTNF アルファ (PBS/0.2%カゼイン中に1/2000の割合で; 400ng/ml)をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。濃度5μg/mlで開始し、1%のマウス血漿を含むPBS中

50

に5倍希釈して、標準対照 Nanobody (商標) を添加した。Nanobody (商標) を室温で2時間結合させた。プレートを5回洗浄し、ウサギポリクローナル抗ナノボディ (R23) を2000倍希釈で室温で1時間添加した。プレート洗浄後、ヤギポリクローナル抗ウサギHRP (DAKO) を使い、3000倍希釈で室温で1時間、結合を検出し、ABTS/H₂O₂ で染色した。405nmでのODを測定した。

【0806】

この最初のELISAを用いて標準対照のリニアレンジを判定した。第二のELISAでは、このリニアレンジでの濃度で、および典型的には2倍希釈の濃度で標準対照を使用した。この第二のELISAでは、血清試験試料を100倍に希釈し、さらに1%のマウス血漿中に5倍希釈して、血清試料において標準曲線のリニアレンジの読み出しが可能となる希釈を決定した。第三のELISAでは、第二のELISAで決定された適当な濃度で、および血清試料中のNanobody (商標) の濃度を性格に決定するために2倍の希釈を行って、血清試料を希釈する。

10

【0807】

実験を行いマウス (n = 3) のTNF60の薬物動態プロファイルを決定した。投与から15分後にCmax値、103, 84 ± 31 µg/mlに到達した。半減期 (t_{1/2}) を、マウス血清アルブミンの半減期と同じ1.9日と決定し、このことはTNF60が血清アルブミンの半減期を使用していることを示唆している。データを図47に示す。

【0808】

マウス抗ナノボディ抗体の判定

20

Nanobody (商標) をPBS中5 µg/mlで、4 °Cで一晩被覆した。プレートを、PBS/0.05%Tween-20で5回洗浄し、PBS/1%カゼインを使用し室温で2時間ブロッキングした。血清試料を100倍希釈し、ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。1000倍希釈ポリクローナルウサギ抗マウスHRP (DAKO、P0260) および基質としてABTSを用い検出を行った。

血清試料を50倍希釈し、マウス抗TNF60抗体の有無を分析した。TNF60では免疫原性が存在しないことが明らかになった。データを図48に示す。

【実施例55】

【0809】

二価長半減期ヒト化Nanobody (商標) の生成
ピキア・バストリス発現ベクターの説明

30

実施例48を参照されたい。

【0810】

二価Nanobody (商標) の設定

2つの別個のPCR反応を、WPA-0011に示される手順を使用してN末端およびC末端のNanobody (商標) サブユニットを増殖するように設定した。N末端Nanobody (商標) の増殖にはPiForLongおよびRev__30GlySer__L108をプライマーの組み合わせとして使用し; C末端Nanobody (商標) の増殖にはFor__GlySerおよびPiRevCys1humを使用し、あるいは、For__GlySerおよびPiRevCys2humを使用した。これらは設定に必要な制限部位およびC末端変性に必要な遊離システイン残基を誘導した。

40

【0811】

1 µlのプラスミドDNA (50 ~ 100 ng)、1.5 µlのフォワードプライマー (10 µM 300 nM)、1.5 µlのリバースプライマー (10 µM 300 nM)、1 µlのdNTP (10 mM 0.2 mM)、5 µlのバッファー (10 × 1 ×)、0.75 µlの酵素 (3.5 U/µl 2.6 U/µl) および39.25 µlのH₂OのPCR反応液を、総量50 µlとして調製した。プライマー配列を表44に示す。PCRプログラムを開始し、94 °Cを2分間保った。94 °Cで30秒間、50 °Cで30秒間および72 °Cで1分間というサイクルを30回繰り返し、その後72 °Cを10分間保った。PCR反応液を5 µlずつ2%アガロースゲル上で分離して増殖を検査した。PCR産物を、メーカーの使用説明書にし

50

たがってQIAquick PCR精製キットを使用し精製した。カラムを1つ使用し、50 µlのEBバッファーで溶出した。50 µlのDNAおよび2 µlのBamHI (10U/µl) および2 µlのXhoI (10U/µl) をメーカーが推奨する適当なバッファー中で37 °Cで1.5時間インキュベートし、N末端V_{HH}断片を調製した。50 µlのDNAおよび2 µlのBamHI (10U/µl) および2 µlのEcoRI (10U/µl) をメーカーが推奨する適当なバッファー中で37 °Cで1時間インキュベートし、C末端V_{HH}断片を調製した。予備消化反応液を2%アガロースゲルで分離した。V_{HH}のバンド(350~450 bp)をゲルから切り取り、メーカーの使用説明書にしたがいQIAquick Gel Extractionキットを使用してDNAを精製した。カラム(カラム1つに最大400mgのアガロースゲルを含む)を1つ使用し、結合DNAを50 µlのEBバッファーで溶出した。260nmでのOD(1ODユニット=50 µg/ml)を測定し、DNA濃度を決定した。XhoI/EcoRIで直線化した100ngのベクターpPICZ A、30ngのN末端V_{HH}、30ngのC末端V_{HH}断片、1 µlのライゲーションバッファーおよび1 µlのリガーゼ(3U)を含み、終量10 µlのライゲーション混合液を調製し、室温で1時間インキュベートした。2 µlのライゲーション混合液で大腸菌TG1の形質転換を行った。WPA-0010に記載のとおり、しかしAOXIFor/AOXIRevのプライマーを併用してPCRでコロニーを分析する。陽性クローンで配列を分析する。メーカーの使用説明書にしたがって上述のとおり、Qiaprep spin Miniprep キット(Qiagen)を用いてプラスミドを調製した。VIBの配列研究施設(アントワープ、ベルギー)で配列を決定した。

【0812】

P・パストリスの形質転換

実施例48を参照されたい。

【0813】

TNF30を二価Nanobody(商標)に向くように設定した。2つの構成要素間のスペーサーとして、30AA GlySerリンカーを使用した。C末端部位特異的変性を可能にするため、Nanobody(商標)の末尾のAAとしてか、またはGlyGlyCys(配列番号:471)から成る過剰スペーサーを利用するか、いずれかで、遊離システインを誘導した。

【実施例56】

【0814】

二価長半減期ヒト化Nanobody(商標)の発現および精製
ピキア・パストリスにおける産生

実施例49を参照されたい。

【0815】

二価ナノボディの精製

遠心分離および0.22 µmのろ紙によるろ過で培地を無細胞状態にした。該滅菌培地を4 °Cで保存し、さらに処理した。低分子汚染物質を、10kDaの限外ろ過(UF)膜(HydroSart Sartocoon Slice Cassette, Sartorius)で以下のように限外ろ過することで削減した: 4Lの培地を0.5~1Lに濃縮し、次いで5LのPBSで希釈し、0.5Lに再度濃縮した。この作業を2回行った。

【0816】

UFの残留物をナイロン製47mmの0.45 µm膜(Alltech #2024)でろ過した。

【0817】

次のステップでは、プロテインAアフィニティー精製(MabSelect Xtra TM, GE Healthcare)を使用して、濃縮培地から二価のNanobody(商標)を得た。カラム[35x100mm]をPBS中で平衡化し、試料添加後、PBSで広範囲に洗浄した。TNF56をグリシン[100mM、pH=2.5]で溶出した。

【0818】

MabSelect Xtra TMの溶出画分を、Tris [1,5M、pH8,8]で中和し、4 °Cで保存した。TNF56を濃縮し、Source 30Q(GE Healthcare)を使用

10

20

30

40

50

し、AEX (A = 10 mMのピペラジン (pH 10 , 8) および B = 1 MのNaCl を含む 50 mMのTris (pH 7 , 5)) で精製した。この目的を達成するため、Nanobody (商標) 画分を、伝導率が 5 mS/cmになるまで、Aバッファー (10 mMのピペラジン (pH 10 , 8)) で希釈し、pHを 10 , 8 に調整した。カラム [25 X 100 mm] を A バッファー中で平衡化し、試料をカラムに添加した。TNF56 を 5 カラム容量 (column volume : CV) の勾配で溶出した。回収した画分の pH を、1 Mの Tris (pH = 7 . 8) を用いて 7 . 8 に調製した。

【 0 8 1 9 】

ピキア・パストリスで発現した二価 Nanobody (商標) のペグ化
C 末端システインの還元

10

ジチオスレイトール (DTT、Aldrich Cat 15 , 046 - 0) を中和画分に添加し、Nanobody (商標) (通常およそ 20%) のカルボキシ末端システイン間に形成した潜在的なジスルフィド架橋を還元した。DTTの終濃度は 10 mM、およびインキュベートは 4 一晩が最適であることが分かった。分析的サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で還元を評価した。したがって、25 µl の還元 Nanobody (商標) を 75 µl の D P B S に添加し、Dulbecco の P B S (D P B S、Gibco (商標) 、REF 14190 ~ 094) 中で平衡化した Sup 75 10 / 300 GL カラムで注入した。

【 0 8 2 0 】

非還元 Nanobody (商標) および DTT を、D P B S 中で平衡化した HiLoad 2 6/60 Superdex75 prep grade カラムで、調製 SEC によって除去した。

20

【 0 8 2 1 】

280 nm で吸光度を測定し、還元 Nanobody (商標) の濃度を測定した。Uvikon 943 Double Beam UV/VIS 分光光度計 (使用法 : SOP ABL-0038 を参照) を使用した。245 ~ 330 nm での波長走査で吸収を測定した。Quartz Suprasil (登録商標) セルで調製した二つの精密なセルを使用した (Hellma、型番 : 104-QS ; 光路長 : 10 mm) 。初めに、280 nm で、900 µl の D P B S が入った 2 つのセルを設置して、ブランクの吸収を測定した。最初のセルに 100 l の試料を添加し、試料を希釈した (1 / 10) 。試料の吸収を 280 nm で測定した。

【 0 8 2 2 】

濃度を以下の式で算出した :

30

【 数 1 】

$$\frac{OD_{280}^{Sample} - OD_{280}^{blank}}{\epsilon \times l} \times 10$$

TNF55 では : $\epsilon = 1 , 85$

TNF56 では : $\epsilon = 1 , 83$

【 0 8 2 3 】

ペグ化

40

Nanobody (商標) をペグ化するために、新しく調製した 1 mM の PEG 40 溶液の 5 倍モル濃度のものを還元 Nanobody (商標) 溶液に添加した。

【 0 8 2 4 】

(NEKTAR (商標) の Transforming Therapeutics (2D3YOT01) Mw = 40 , 000 g/mol の MPEG2-MAL-40K ; NEKTAR (商標) の Transforming Therapeutics (2D3YOV01) Mw = 60 , 000 g/mol の MPEG2-MAL-60K)

【 0 8 2 5 】

Nanobody (商標) PEG 混合物を、室温 (RT) で 1 時間軽く攪拌しながらインキュベートした後、4 °C に移した。分析的 SEC によってペグ化を評価した。した

50

がって、25 μ lのNanobody (商標)を75 μ lのD-PBSに添加し、D-PBS中で平衡化したSup75HR 10/300カラムで注入した。ペグ化Nanobody (商標)は、カラムの体積を排除した範囲 (> 75 kDa)で溶出した。

【0826】

ペグ化および非ペグ化Nanobody (商標)を陽イオン交換クロマトグラフィー (Source30Sを用いたCEX、GE Healthcare; Aバッファー = 25 mMのクエン酸、pH = 4 およびB = 1 MのNaClを含むPBS)によって分離した。伝導率が < 5 mS/cmになるように試料を希釈し、pHを4, 0に調整した。カラム [25 X 100 mm]を平衡化し、試料添加後、Aバッファーで広範囲に洗浄した。ペグ化Nanobody (商標)を3 CV 勾配で溶出した。D-PBSで平衡化したHiLoad 26/60 Superdex 75 prep gradeカラム

10

【0827】

最後に陰イオン交換カラム (Source30Q)を経由した方法でNanobody (商標)からLPSを除去した。カラム (10 x 100 mm)をNaOH [1 M]中で一晩消毒し、その後、エンドトキシンを含まないD-PBS中で平衡化した。

【0828】

ビオチン化

Nanobody (商標)をビオチン化するために、10 mMのストックソリューションから調製したビオチン (EZ-Link (登録商標) マレイミド P02 ビオチン、Pierce #21901)の5倍モル濃度のものを還元Nanobody (商標)に添加した (5.5.1を参照)。ビオチン Nanobody (商標)混合物を、室温で1時間軽く攪拌しながらインキュベートした後、4 で保存した。

20

【0829】

ビオチン化Nanobody (商標)の純度を分析的SECによって制御した。したがって、25 μ lのビオチン化Nanobody (商標)を75 μ lのD-PBSに添加し、D-PBS中で平衡化したSup75HR 10/300カラムで注入した。得られたクロマトグラムから、Nanobody (商標) ビオチンは追加の精製を必要としないこと：遊離スルフヒドリルの酸化によるNanobody (商標)の二量化は検出されなかったことが結論づけられた。Sephadex G25 fine (90 ml)カラムの脱塩を経由した方法でAバッファーをD-PBSに変えた。

30

【0830】

最後に陰イオン交換カラム (Source30Q、GE Healthcare)を経由した方法でNanobody (商標) ビオチンからLPSを除去した。カラム (1 x 10 cm)を1 MのNaOH中で一晩消毒し、その後、D-PBS中で平衡化した。

【0831】

純度を判定するため、実施例8および49に記述したとおりにタンパク質試料を15% SDS PAGEゲルで分析した。結果を図49および50に示す。

【実施例57】

【0832】

二価長半減期ヒト化Nanobody (商標)の特徴づけ
生化学的特徴づけ

40

TNF55は260個のアミノ酸から成る。タンパク質の分子量は、27,106 Daである。pIは8.67である。280 nmでの吸光係数は1.850である。

【0833】

TNF56は264個のアミノ酸から成る。タンパク質の分子量は、27,365 Daである。pIは8.67である。280 nmでの吸光係数は1.830である。

【0834】

質量分光光度法

TNF55の理論的質量は27,106 Daである。TNF55 ビオチンタンパク質は

50

2つのS-S架橋を有し、ビオチンを変性すると質量は、ESI-MSの測定で27,627Daになることが好ましい。TNF55-ビオチンの質量を実験的に測定すると、27,627Daである。

【0835】

TNF56の理論的質量は27,365Daである。TNF55-ビオチンタンパク質は2つのS-S架橋を有し、ビオチンを変性すると質量は、ESI-MSの測定で27,886Daになることが好ましい。TNF55-ビオチンの質量を実験的に測定すると、27,886Daである。

【0836】

N末端配列

TNF56-PEG40のN末端配列決定により、最初の7個のアミノ酸に対するタンパク質配列はEVQLVESであることが分かった。これは理論的タンパク質配列と一致し、N末端処理が適切であることを示す。

【0837】

分析的サイズ決定

PBS中でのTNF56-PEG40分析的サイズ決定では、左右対称のピークが出現する。汚染物質は見られなかった。観察された保持時間は、Superdex HR 75では8.5mlで、Superdex HR 200では10.32mlである。代表的なプロファイルを図5-1および5-2に示す。

【実施例58】

【0838】

細胞ベースのアッセイの機能性

TNF- α の細胞毒性活性を中和する作用強度を、細胞ベースのアッセイで分析した。様々な濃度でNanobody (商標)ならびに市販のエンブレル、Humiraおよびレミケードの作用強度を、モルベースで試験した。EC50が増加するほど、化合物の活性は低下し、TNF- α は中和される。

【0839】

結果を表4-5ならびに図5-3および5-4に要約する。

【0840】

データは、一価Nanobody (商標) TNF1と比較して、二価Nanobody (商標) についての作用強度の上昇を示している。TNF55誘導体の作用強度はTNF56誘導体と類似しており、この作用強度はエンブレルの範囲であり、Humiraおよびレミケードの10倍である。

【実施例59】

【0841】

マウスの二価長半減期ヒト化ナノボディの薬物動態学的および免疫原性分析
実施例54を参照されたい。

【0842】

マウスペグ化Nanobody (商標)の半減期を試験するため、実験を行った。二価TNF56-PEG40の半減期をTNF56-PEG60の半減期と比較した。両ナノボディの2日目までの半減期は類似している。結果を図5-5に示す。

【0843】

さらに、ペグ化二価3E-3Eの半減期を調査した。3E-3E-PEG20の半減期を、100 μ gのNanobody (商標)を静脈注射した後3E-3E-PEG40の半減期と比較した。3E-3E-PEG20の半減期は17時間であり、一方、3E-3E-PEG40の半減期は2.1日であり、これは3E-3E-MSA21と同等である。結果を図5-6に示す。

【0844】

血清試料を100倍希釈し、マウス抗TNF56-PEG40または抗TNF56-PEG60抗体の有無を分析した。両分子ともに、免疫原性を持たないことが明らかになっ

10

20

30

40

50

た。データを図 5 7 に示す。

【実施例 6 0】

【0 8 4 5】

慢性多発性関節炎の予防における抗 TNF アルファナノボディ TNF 6 0 (TNF 6 0) の有効性

3'変性ヒト腫瘍壊死因子 (h TNF - アルファ、カケクチン) 導入遺伝子を担持し発現するトランスジェニックマウス系を、モデルとして使用し、関節炎の発症を予防する場合の TNF 6 0 (TNF 6 0) の有効性を研究した (EMBO J. 10、4 0 2 5 ~ 4 0 3 1) 。これらのマウスは、4 ~ 7 週齢では 1 0 0 % の発症率で慢性多発性関節炎を発症することが分かった。

10

【0 8 4 6】

3 週齢から、トランスジェニックマウスの同腹仔を 8 匹のグループに分けた。試験を開始する前に、各グループでの平均体重を算出した。以降、全試験過程で、各グループでの動物体重を週一回記録した。

【0 8 4 7】

慢性多発性関節炎の予防における TNF 6 0 の有効性を試験するために、以下のスキームにしたがって個々のグループの各動物に週二回腹腔内注射した：

グループ 1 (陰性対照) : リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) (処方バッファー)

グループ 2 (ナノボディ治療) : 3 0 mg/kg の最終用量での TNF 6 0

グループ 3 (ナノボディ治療) : 1 0 mg/kg の最終用量での TNF 6 0

グループ 4 (ナノボディ治療) : 3 mg/kg の最終用量での TNF 6 0

グループ 5 (第一陽性対照) : 3 0 mg/kg の最終用量でのエンブレル

グループ 6 (第一陽性対照) : 1 0 mg/kg の最終用量でのエンブレル

グループ 7 (第二陽性対照) : 3 0 mg/kg の最終用量でのレミケード

グループ 8 (第二陽性対照) : 1 0 mg/kg の最終用量でのレミケード

グループ 9 (第二陽性対照) : 3 mg/kg の最終用量でのレミケード

各グループに対して、注入のデータおよび注入量を記録した。

20

【0 8 4 8】

7 週間、注入を続けた。この間、各動物に対して、関節の形態における肉眼的変化を観察することによって臨床スコアを記録した。

30

【0 8 4 9】

1 0 週齢では、すべてのマウスを屠殺し、血清および関節を回収した。血清は - 7 0 で保存し、足関節はホルマリン保存した。

【0 8 5 0】

選択されたグループに対して、足関節をパラフィンに包埋し切断した。続いて足関節の切片を、疾患の進行を組織病理学的に評価するために使用した。

【0 8 5 1】

結果を図 5 8 に示す。

【実施例 6 1】

【0 8 5 2】

慢性多発性関節炎の治療処置における抗 TNF アルファナノボディ TNF 6 0 (TNF 6 0) の有効性

3'修飾ヒト腫瘍壊死因子 (h TNF - アルファ、カケクチン) 導入遺伝子を担持し発現するトランスジェニックマウス系を、モデルとして使用し、関節炎の治療処置をする場合の TNF 6 0 (TNF 6 0) の有効性を研究した (EMBO J. 10、4025-4031) 。これらのマウスは、4 ~ 7 週齢では 1 0 0 % の発症率で慢性多発性関節炎を発症することが分かった。

40

【0 8 5 3】

6 週齢から、トランスジェニックマウスの同腹仔を 8 匹のグループに分けた。試験を開始する前に、各グループでの平均体重を算出した。以降、全試験過程で、各グループでの

50

動物体重を週一回記録した。

【0854】

慢性多発性関節炎の治療処置におけるTNF60の有効性を試験するために、以下のスキームにしたがって個々のグループの各動物に週二回腹腔内注射した：

グループ1（陰性対照）：リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（処方バッファー）

グループ2（ナノボディ治療）：30mg/kgの最終用量でのTNF60

グループ3（ナノボディ治療）：10mg/kgの最終用量でのTNF60

グループ4（第一陽性対照）：30mg/kgの最終用量でのエンブレル

グループ5（第二陽性対照）：30mg/kgの最終用量でのレミケード

各グループに対して、注入のデータおよび注入量を記録した。

10

【0855】

7週間、注入を続けた。この間、各動物に対して、関節の形態における肉眼的変化を観察することによって臨床スコアを記録した。

【0856】

13週齢では、すべてのマウスを屠殺し、血清および関節を回収した。血清は-70で保存し、足関節はホルマリン保存した。

【0857】

選択されたグループに対して、足関節をパラフィンに包埋し切断した。続いて足関節の切片を、疾患の進行を組織病理学的に評価するために使用した。

【0858】

結果を図59に示す。

20

【実施例62】

【0859】

慢性多発性関節炎の予防における抗TNF アルファナノボディの有効性に対する設定の効果

3'修飾ヒト腫瘍壊死因子（hTNF-アルファ、カケクチン）導入遺伝子を担持し発現するトランスジェニックマウス系を、モデルとして使用し、慢性多発性関節炎を予防する場合の、様々な方法で設定された抗TNF-アルファナノボディの有効性を研究した（EMB0J.10、4025～4031）。これらのマウスは、4～7週齢では100%の発症率で慢性多発性関節炎を発症することが分かった。

30

【0860】

3週齢から、トランスジェニックマウスの同腹仔を8匹のグループに分けた。試験を開始する前に、各グループでの平均体重を算出した。以降、全試験過程で、各グループでの動物体重を週一回記録した。

【0861】

慢性多発性関節炎の予防のための様々な形式の抗TNF アルファナノボディの有効性を試験するために、以下のスキームにしたがって個々のグループの各動物に週二回腹腔内注射した：

グループ1（陰性対照）：リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（処方バッファー）

グループ2（ナノボディ形式1）：10mg/kgの最終用量でのTNF60

グループ3（ナノボディ形式1）：2.5mg/kgの最終用量でのTNF60

グループ4（ナノボディ形式1）：1mg/kgの最終用量でのTNF60

グループ5（ナノボディ形式2）：10mg/kgの最終用量でのTNF56 PEG40

グループ6（ナノボディ形式2）：1.8mg/kgの最終用量でのTNF56 PEG4

0

グループ7（ナノボディ形式2）：0.7mg/kgの最終用量でのTNF56 PEG4

0

グループ8（ナノボディ形式3）：1.8mg/kgの最終用量でのTNF56 biot

グループ9（ナノボディ形式4）：1mg/kgの最終用量でのTNF30

グループ10（ナノボディ形式5）：1mg/kgの最終用量でのTNF1

50

グループ 1 1 (第一陽性対照) : 10 mg/kgの最終用量でのエンブレル

グループ 1 2 (第二陽性対照) : 10 mg/kgの最終用量でのレミケード

各グループに対して、注入のデータおよび注入量を記録した。

【0862】

7週間、注入を続けた。この間、各動物に対して、関節の形態における肉眼的変化を観察することによって臨床スコアを記録した。

【0863】

10週齢では、すべてのマウスを屠殺し、血清および関節を回収した。血清は - 70 で保存し、足関節はホルマリン保存した。

【0864】

選択されたグループに対して、足関節をパラフィンに包埋し切断した。続いて足関節の切片を、疾患の進行を組織病理学的に評価するために使用した。

結果を図60に示す。

【実施例63】

【0865】

アカゲザルの抗TNF アルファナノボディTNF60 (TNF60) およびTNF56 PEG40の薬物動態学的研究

捕獲繁殖したアカゲザル (Macaca mulatta) を使用し、TNF60 およびTNF56 PEG40の薬物導体プロファイルを判定する。

【0866】

16体の動物を本研究で使用し (雄8体および雌8体)、4つのグループに分けた (1グループにつき、雄2体、雌2体)。全ての動物体重は約5kgであり、使用までの少なくとも6週間、無病状態である。餌はSniff (登録商標) Pri vegetarisch V3994である。各サルに体重kg当たり60gの餌を与える。残留物は除去する。一定の間隔 (1年に少なくとも2回) で、EPA / USA に基づいて、LUFA-ITL によって餌の汚染物質を分析した。水道水を任意に与える。各治療グループの動物を、サル施設内のいくつかの隣接したケージの一群に収容する。サルは、90cm X 82cm X 96cmのサイズのV₂Aスチール製のケージに1体ずつ入れる。室温は23 ± 3 (最大範囲) で、相対湿度は60% ± 20% (最大範囲) で維持する。例えば洗浄手順の間に生じる最大範囲からの偏差はSOP中で処理する。室は12時間おきに照明および消灯される。

【0867】

2つのグループにTNF60を与え、別の2つのグループにTNF56 PEG40を与える。右または左腕の橈側皮静脈に (PBSに溶解した) TNF60 およびTNF56 PEG40を留置カテーテルで静脈投与し、TSE輸送ポンプ (以下参照) を一定の用量2mg/kgで投与した。

【0868】

単独投与を4回行い、少なくとも14日間の洗浄によって分離した。最終投与後、少なくとも8週間の経過観察期間を設けた。4グループのうち2グループは、(PBSに溶解した) メトトレキサート (MTX) と併用してTNF60またはTNF56 PEG40を投与した。グループ2はTNF60 およびMTXを投与し; グループ4はTNF56 PEG40 およびMTXを投与する。MTXは、0.2mg/kgで毎週筋肉内投与する。投与当日は、投与の約30分前にMTXを投与する。初回投与はナノボディで開始し、8週間完全に投与を続け、4回目の投与後洗浄することとする。14回の単独MTX投与を、少なくとも1週間の洗浄期間によって分割し、最初の試験項目の投与で開始する。

【実施例64】

【0869】

滑膜由来線維芽細胞の研究

本研究では、RA 滑膜由来線維芽細胞によるTNF アルファ誘導IL6産生を弱める抗TNF生物学的製剤であるALX0071およびエタネルセプトの能力を評価した。

【0870】

10

20

30

40

50

滑膜線維芽細胞の単離

同意 R A 患者から得た滑膜関節組織を、抗生物質を含む D M E M をベースとした培地中で、4 で関節置換手術の 9 6 時間後まで保存した。3 7 で 2 時間行ったコラゲナーゼ消化によって、切開した滑膜から滑膜細胞を単離した。その後、得られた細胞懸濁液を、一連の遠心分離および再懸濁のステップによって洗浄し、次いで得られた細胞を、1 0 % F C S (v / v) が添加された D M E M をベースとした培地中で 3 7 で培養した。得られた線維芽細胞を第 2 または第 3 継代で以下の実験に使用した。4 人のドナーから得た細胞を個々の実験に使用した。9 6 ウェル平底ポリスチレンプレートに、1 0 % F C S (v / v) が添加された終量 2 5 0 μ L の D M E M をベースとした培地中、1 ウェルにつき 1 . 5 \times 1 0 ⁴ 個の割合で線維芽細胞を播種し、一晚培養した。

10

【 0 8 7 1 】

滑膜線維芽細胞の刺激

その後細胞を、5 0 n g / m L (3 n M (R & D Systems 210-TA/CF) の T N F α を単独、あるいは漸増用量の A L X 0 0 7 1 (0 . 5 7 5 ~ 1 9 2 0 n g / m L ; 0 . 0 1 5 ~ 5 0 n M) またはエタネルセプト (Wyeth Labs ; 3 . 7 5 ~ 1 1 2 5 0 n g / m L ; 0 . 0 2 5 ~ 7 5 n M) の存在下で添加した D M E M ベース培地中で、7 2 時間インキュベートした。各ウェルで終量は 2 5 0 μ L であり、各評価を三重に行った。7 2 時間後、培地の上清を除去し、I L 6 E L I S A (R & D Systems) による分析まで - 4 0 で保存した。T N F 誘導 I L 6 産生の阻害を判定し、A L X 0 0 7 1 およびエタネルセプトともに、I C 5 0 値を算出した。

20

【 0 8 7 2 】

結果の要約

4 人のドナー全員から得た R A 滑膜由来線維芽細胞によって、A L X 1 0 0 7 1 およびエタネルセプトはともに用量依存的に T N F 誘導 I L 6 産生を減少させた。これらのアッセイ条件下では 2 つの試薬間で同様の作用強度が見られた。

【 実施例 6 5 】

【 0 8 7 3 】

マウス空気嚢の研究

本研究では、マウス空気嚢への T N F α 誘導細胞浸潤を弱める抗 T N F 生物学的製剤である A L X 0 0 7 1 およびエタネルセプトの能力を評価した。

30

【 0 8 7 4 】

空気嚢の作製

2 . 5 mL の滅菌空気を麻酔した雄 C 5 7 B 1 / 6 / J マウス (2 5 ~ 3 0 g , Harlan) の背面に皮下 (s . c .) 注射し、空気嚢を形成した。3 日後に 2 . 5 ml の滅菌空気を注射し、嚢を再膨張させた。

【 0 8 7 5 】

T N F α 刺激

空気嚢を最初に作製してから 6 日後、動物を麻酔し、嚢に、0 . 1 g の組み換えヒト T N F α (R & D Systems , 210-TA-050/CF) を含む 0 . 5 % カルボキシメチルセルロース (C M C) ピヒクルを 1 ml 注射した。その他の 3 つの動物グループでは、T N F α の注射の 1 9 時間前に A L X 0 0 7 1 (0 . 0 6 2 5 , 0 . 1 2 5 および 0 . 2 5 mg / kg) を皮下注射した。第二の 3 つの動物グループに、T N F α の注射直前にエタネルセプト (Wyeth Labs , 0 . 1 2 5 , 0 . 2 5 および 0 . 5 mg / kg) を皮下注射した。

40

【 0 8 7 6 】

T N F α 注射の 2 4 時間後に、C O ₂ の濃度上昇でマウスを間引いた。嚢を、5 IU / ml のヘパリンを含む 2 ml の氷冷却エンドトキシンプリー滅菌 P B S で洗浄した。体積を記録し、Sysmex XT-Vet 細胞計数装置で総白血球細胞 (W B C) の個体群を計数するために、0 . 5 ml のアリコートを生分離した。各グループについて、回収した洗浄液 1 ml 当たりの総 W B C 数の平均および平均の標準誤差 (S E M) を算出した。統計的分析は、未

50

変換データでのクラスカル・ワリス事後テストを利用したANOVAによって行われた。

【0877】

結果の要約

ALX0071およびエタネルセプトはともに、空気嚢へのTNF アルファ誘導WBC浸潤を弱めた(表)。この減弱が、0.125 ($P < 0.01$)および0.25 mg/kg ($P < 0.05$) ALX0071服用グループの両方で統計的有意性を示している場合でも、全てのエタネルセプト服用グループでは統計的有意性は見られなかった。

【0878】

【表8-1】

名称	配列番号	配列
PMP1C2(TNF1)	52	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGFNRGQGTQVTVES
PMP1G11	53	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDGVSWMYWVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
PMP1H6	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDVSVSWMYWVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYVDSVKGGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTALYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
PMP1G5(TNF2)	55	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGLTYYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRSESYNYWGQGTQVTVSS
PMP1H2	56	QVKLEESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSESYNYWGQGTQVTVSS
PMP3G2	57	AVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSDYSGYTYTVGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSESYNYWGQGTQVTVSS
PMP1D2	58	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGKEREFVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNNLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRSEVAYNYWGQGTQVTVSS
PMP3D10	59	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFTGYMFWFRQAPGKERQLLASISWRGDNTYYKESVKGGRFTISRDDAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTNWGQGTQVTVSS
PMP5F10(TNF3)	60	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASASGRSLSNYMFWFRQAPGKERELGNISWRGYNIIYKDSVKGGRFTISRDDAKNTIYLQMNNLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTNWGQGTQVTVSS
PMP6A8(ALB2)	61	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDLNLMGWYRQGPGENERELVATCITVG.DSTNYADSVKGRFTISM DYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS

10

20

30

【表 8 - 2】

PMP6B4	62	EVQLVESGGGLVQEGGSLRLACAASERIWDINL LGWYRQGPGENERELVATITVG.DSTSYADSVK GRFTISRSDYDKNTLYLQMNLSLKPEDTGLYYCKIR RTWHSSELWGQGTQVTVSS
PMP6A6(ALB1)	63	AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKPEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTI GGSLRSRSGGTQVTVSS
PMP6C1	64	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSFG MSWVRQYPGKPEWVSSINGRGGDTRVADSVK GRFSISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAEYYCTI GRSVSRSETQGTQVTVSS
PMP6G8	65	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFG MSWVRQAPGKQDEWVSAISADSSTKNYADSVK GRFTISRDNAKMMLYLEMNSLKPEDTAVYYCVI GRGSPSPGCTQVTVSS
PMP6A5	66	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFGSFG MSWVRQAPGEGLEWVSAISADSSDKRYADSVK GRFTISRDNAKMMLYLEMNSLKSSEDVAVYYCVI GRGSPASQGTQVTVSS
PMP6G7	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYW MYWVRVAPGKGLERISRDISTGGGYSYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTALYYCAK DREAQVDLDFDYRGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1 C4	105	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASQIIFGSHVA AWFRQAPGREREFVAEIRPSGDFGPEGEFEHVT ASLKGRFTIAKNSVDNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YCAAAPYRGGRDYRWEYWEYEWGQGTQVTV
NC55TNF_S1 C3	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKNAGSTSNAYA TGWFRRAPGKEREFEVAGIQWGGDAFYRNSVK GRFRITRDPDNTVYLQMNLDLKPEDTAIYYCAQK LSPYYNDFDSSNYEYWGQGTQVTV
NC55TNF_S2 C1	107	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAVSGQLFSTND VGWYRRAPGKQRELVATITDDGTTDYGDDVKG RFVISREGEMVYLEMNSLKPEDTAVYYCNINRL RSTWGIYDVGQGTQVTVSS
NC55TNF_S2 C5	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSQFTTTS MTWVRQAPGKFEWVSPFNSDGSSTTYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAMYYCG RRGYGRDRSKGIQVTVAS
NC55TNF_S3 C7	109	EVQLVESGGGTQAGDSLRLSCAASGRSFSSVA MGWFRQAPGKQREFLAGVGYDGSSIRYAESVK GRFTIARGNRESTVFLQMNLSLKPEDTAVYFCTA EPIGAYEGLWTYWGQGTQVTVSS

10

20

30

【表 8 - 3】

NC55TNF_S3 C1	110	XXXXVESGGGLMQPGGSLKLSAASGFMFSDS AMGWFRQAPGKEREFVATISWNGGSSSADFV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNGLTPQDTAIYYCA GSYSNGNPHRFSSQYQYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BM P1B2	111	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRTFTGYA MGWFRQAPGKEREFVAISWGGGSIVYAESAK GRFTISRDNAXTMYLQMDSLKPEDTAVYYCA AANNIATLRQGGSWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BM P1D2	112	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFVITYA MSWFRRAPGKEREFVASISWSDTYYSNSVK GRFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCA VVQVIDPFSWSGVNLDDYDYLGSQTQVTVSS
NC55TNF_BM P1E2	113	EVQLVESGGRLVQPGGSLRSLSCKNAGSTSNAYA TGWFRRAPGKEREFVAGIQWGGDAFYRNSVK GRFTITRDPDNTVYLQMNLDLKPEDTAIYYCAQK LSPYYNDFDSSNYEYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BM P1G2	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASATISSIVML GWYRQAPCKQREWVASITIGSRTNYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYPCNAVPP RDDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BM P2A2	115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGQTSSSYD MGWFRQAPGEGREFVARISGSDGSTYYSDRAK DRFTISRDNNTKNMVYLQMDRLKPDPTAVYYCR VPRYENQWSSYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_BM P2C2	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGTFSTYD MSWVRQAPGKGLEWVSGIDSGGSPMYVDSV KGRFTVSRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYC AKFSTGADGGSWYWSYGMDSWGKGTQVTVSS
NC55TNF_BM P2F2	117	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCBASERSSNRYN MAWFRQAPGKEREFRLARVDVSGNTLYGDSVK DRFTVSRINGKNAMYLQMNLSLKPEDTAIYYCA AGGWGTTQYDYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC 10	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVCSGCTFSA YSMTWVRQAPGKAEEWVVFINS DGSTTYADS VNGRFKISRDNARKTLYLQMNLSLGPEDTAMYY CQRREGYALDRGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC 11	119	EVQLVESGGGLVQAGDSLTLSCASSGRGFYKNA MGWFRQPPGKEREFVASIKWNGNNTYADSVR GRFTISRGNAKNTENTVSLQMNLSLKPEDTADY YCAADSSHYSYVYSKAYEYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC 1	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVFSGFAPSASS MAWVRQAPGKYEEWVVFINS DGSTTYADSVQ GRFTISRDNAKNTLYLQMNLSKSEDTAMYYCG RRGYGRDRSQGIQVTVSS

10

20

30

【表 8 - 4】

NC55TNF_NC 2	121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRFTFSYA MGWFRQAPGKEREFVAAISWSGTITNYADSVK GRFTISRDN GKNTVHLQMNSLKPEDTAVYHCA VVQPYSGGDYITGVVEYDYWGXTQVTVSS
NC55TNF_NC 3	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVVSGETFSATS MTWVRQAPGKAEWVVSFINS DGSSTYADSVK GRFTISRDN AKNTLYLQMDLLQSEDTAMYCG RRGYGRDRSRGIQVTVSS
NC55TNF_NC 5	123	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGGAFSNYD VGWFRQAPGEGREIVARISGSDSTYSSNRAKG RFTISRDN AKNTVYLQMNLSLKREDTAVYYCRAA RYNGTWSNDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC 6	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVSSGCTFSA YSMTWVRQAPGKAEFVVSFINS DGSSTYANSV NGRPFKISRDN AKKTLYLQMNLSLGPEDTAMYC QRRGYALDRGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC 7	125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCTASGQTSSTAD MGWFRQPPGKGRFVARISGIDGTTYYDEPVK GRFTISRDKA QNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCRS PRYADQWEAYDYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_NC 8	126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVVSGETFSTTS MTWVRQAPGKFEWVVSFINS DGSSTYADSVK GRFTISRDN AKNTLYLQMNLSLKPEDTAMYCG RRGYGRDRSKGIQVTVSS
NC55TNF_S2 C2	127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVASAGVKVND MGWYRQAPGKERELVATITDDGRNTYEDPAKG RFTISRDN AKNTVYLQMNLSLGPEDTAVYYCNAR TYWAHLPTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S1 C6	128	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRSFGSVA MGWFRQAPGKEREFVAAIGYDGN SIRYGD SVK GRFTISRDN IKNTMYLEMENLNADD TARYLCA AEPLARYEGLWTYWGQGTQVTVSS
NC55TNF_S3 C2	129	EVQLVESGGGLVQAGASLRSLSCTSTRINDRFN MAWFHQAPGKDREFVSRIDVAGYNTAYGDFVK GRFTVSRDSAENTVVLQMNLSLREPDTGVVYCA AGGWGISQSDYDLWGQGTQVTVSS

10

20

【 0 8 7 9 】

【表 9】

ナノボディ	クラス	評価 k o f f (1 / s)
PMP5 F10	III	2,68E-04
PMP1 G5	II	3,59E-04
PMP1 C2	I	4,39E-04
PMP1 G11	I	1,15E-03
PMP1 H6	I	2,14E-03
PMP1 H2	II	3,65E-03
PMP3 G2	II	1,09E-02

30

【 0 8 8 0 】

【表 1 0】

ナノボディ	生殖系配列	#AA 差異 / 総計 #AA	% AA 同一性
ALB1	DP51/DP53	13/87	85.1
ALB2	DP54	26/87	70.2
TNF1	DP51/DP53	6/87	93.2
TNF2	DP54	16/87	81.7
TNF3	DP29	18/87	79.4

【 0 8 8 1 】

【表 1 1】

ナノボディ	誘導時間	収率 (mg/L)
ALB1	短時間 / 37°C	18
ALB2	短時間 / 37°C	4
TNF1	短時間 / 37°C	8.3
TNF2	短時間 / 37°C	5
TNF3	短時間 / 37°C	0.8

40

【 0 8 8 2 】

【表 1 2】

ID	50%結合 (ng/ml)	
	ヒト TNF α	アカゲザル TNF α
TNF1	12	12
TNF2	20	>8000
TNF3	18	16

【 0 8 8 3 】

【表 1 3】

ID	50% 阻害 (ng/ml)	
	ヒト TNF α	アカゲザル TNF α
TNF1	530	220
TNF2	3500	>5000
TNF3	100	100

10

【 0 8 8 4 】

【表 1 4】

ヒト TNF α	Kd (1/s)
TNF1	1,06E-03
TNF2	1,33E-03
TNF3	3,02E-04

【 0 8 8 5 】

【表 1 5】

		ヒトアルブミン	アカゲザルアルブミン	マウスアルブミン
ALB1	KD (nM)	0,57	0,52	6,5
	ka			
	(1/Ms)	1,11E+06	1,05E+06	1,11E+06
	kd (1/s)	6,30E-04	5,46E-04	7,25E-03
ALB2	KD (nM)	0,092	0,036	15,7
	ka			
	(1/Ms)	8,15E+05	1,94E+06	1,95E+05
	kd (1/s)	7,52E-05	7,12E-05	3,07E-03

20

【 0 8 8 6 】

【表 1 6】

アッセイ: L929s + Act D (5000c/w)

TNF: ヒト TNF α @ 0.5ng/ml

ナノボディ		E C ₅₀ (nM)		#	相対作用強度	
		平均	stdev		平均	stdev
TNF1	1C2	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF2	1G5	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF3	5F10	0.224	0.133	14	0.048	0.019
Enbrel		0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira		0.079	0.043	39	0.097	0.069
Remicade		0.083	0.037	45	0.103	0.058

30

アッセイ: L929s + Act D (5000c/w)

TNF: アカゲザル TNF α @ 0.5ng/ml

ナノボディ		E C ₅₀ (nM)		#	相対作用強度	
		平均	stdev		平均	stdev
TNF1	1C2	0.693	0.305	9	0.015	0.009
TNF2	1G5	>50		9		
TNF3	5F10	0.602	0.233	9	0.017	0.010
エンブレル		0.009	0.003	7	1	0.000
Humira		0.071	0.025	8	0.103	0.059
レミケード		>6.7		7		

40

【 0 8 8 7 】

【表 1 7】

%	未処理	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF1	100	98	98	98	98	95	92	90
TNF2	100	99	100	99	97	96	63	50
TNF3	100	96	97	98	96	94	75	70
ALB1	100	101	102	101	100	64	94	90
ALB2	100	100	102	100	100	28	8	17

50

【 0 8 8 8 】

【表 1 8】

ナノボディ	温度 (°C)	E C 5 0 (nM)	#	相対作用 強度
TNF1	コントロール	0,916	1	0,013
92#2302nr1.TNF1	RT	0,873	1	0,014
	37	0,901	1	0,013
	50	0,908	1	0,013
	60	0,891	1	0,013
	70	1,218	1	0,010
	80	2,655	1	0,004
	90	5,797	1	0,002
	TNF2	コントロール	2,500	1
92#2302nr2.TNF2	RT	2,165	1	0,005
	37	2,212	1	0,005
	50	2,241	1	0,005
	60	1,782	1	0,007
	70	2,487	1	0,005
	80	2,818	1	0,004
	90	6,135	1	0,002
	TNF3	コントロール	0,278	1
92#2302nr3.TNF3	RT	0,289	1	0,041
	37	0,295	1	0,040
	50	0,290	1	0,041
	60	0,281	1	0,042
	70	0,293	1	0,040
	80	0,576	1	0,021
	90	0,861	1	0,014

10

【 0 8 8 9 】

【表 1 9 - 1】

20

名称	配列番号	配列
GS9	68	GGGGSGGGCS
GS30	69	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
TNF1-GS9-TN F1(TNF4)	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYW MYWVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFNRCQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYW MYWVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGF NRGQGTQVTVSS
TNF2-GS9-TN F2(TNF5)	71	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVY YCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSSGG GGSGGGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYW SSGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSL KPEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQ VTVSS
TNF3-GS9-TN F3(TNF6)	72	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSASGRSLSNYY MGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIYKDSVK GRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSASGRSLSN YYMGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIYKDS VKGRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYC AASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF1-GS30-T NF1(TNF7)	73	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYW MYWVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFNRCQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS DYW MYWVRQAPGKLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ

30

40

【表 2 3】

アッセイ : L929s + Act D (5000c/w)
TNF : ヒト TNF α @ 0.5ng/ml

ナノボディ	E C ₅₀ (nM)		#	相対作用強度	
	平均	stdev		平均	stdev
TNF4	0.236	0.049	4	0.033	0.012
TNF5	0.020	0.010	9	0.566	0.275
TNF6	0.078	0.047	8	0.179	0.168
TNF7	0.013	0.005	8	0.673	0.211
TNF8	0.007	0.002	2	1.240	0.137
TNF9	0.012	0.005	6	0.729	0.242
エンブレル	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
レミケード	0.083	0.037	45	0.103	0.058

アッセイ : L929s + Act D (5000c/w)
TNF : アカゲザル TNF α @ 0.5ng/ml

ナノボディ	E C ₅₀ (nM)		#	相対作用強度	
	平均	stdev		平均	stdev
TNF4	0.141	0.025	4	0.065	0.015
TNF5	35.000	16.000	5	0.000	0.000
TNF6	0.398	0.074	6	0.024	0.003
TNF7	0.011	0.005	4	0.860	0.142
TNF8	1.026	0.444	2	0.010	0.001
TNF9	0.038	0.012	4	0.249	0.032
エンブレル	0.009	0.003	7	1.000	0.000
Humira	0.071	0.025	8	0.103	0.059
レミケード	>6.7		7		

10

【 0 8 9 4 】

【表 2 4】

%	未処理	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF4	100	99	99	99	98	55	34	17
TNF5	100	99	101	99	98	92	26	22
TNF6	100	103	104	103	105	99	7	7
TNF7	100	100	100	98	96	66	33	40
TNF8	100	99	100	99	100	89	11	8
TNF9	100	101	101	101	101	99	17	18

20

【 0 8 9 5 】

【表 25 - 1】

名称	配列番号	配列
TNF13(TNF1 HUM1)	76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAR SPSGFNRRGQGTQVTVSS
TNF14(TNF1 HUM2)	77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFNRRGQGTQVTVSS
TNF15(TNF2 HUM1)	78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLKPEDTAVY YCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF16(TNF2 HUM2)	79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLKPEDTAVY YCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF17(TNF2 HUM3)	80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAV YYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF18(TNF2 HUM4)	81	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLRPEDTAVY YCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF19(TNF2 HUM5)	82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGREFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLKPEDTAVY YCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF20(TNF3 HUM1)	83	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRSLSNYY MGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIIYKDSVK GRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF21(TNF3 HUM2)	84	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSNYY MGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIIYKDSVK GRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF22(TNF3 HUM3)	85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRSLSNYY MGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIIYKDSVK GRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS

10

20

【表 25 - 2】

TNF23(TNF3 HUM4)	86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRSLSNYY MGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIIYKDSVK GRFTISRDDSKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
ALB3(ALB1 HUM1)	87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB4(ALB1 HUM2)	88	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB5(ALB1 HUM3)	89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSS

30

40

【 0 8 9 6 】

【表 2 6】

ナノボディ	誘導時間	収率 (mg/L)
TNF13	一晚/28°C	8.8
TNF14	一晚/28°C	7
TNF15	短時間/37°C	7.6
TNF16	短時間/37°C	8.7
TNF17	短時間/37°C	7.2
TNF18	短時間/37°C	4.8
TNF19	短時間/37°C	8
TNF20	一晚/28°C	8.5
TNF21	一晚/28°C	7.5
TNF22	一晚/28°C	6
TNF23	一晚/28°C	2.8
ALB3	一晚/28°C	11.8
ALB4	一晚/28°C	9
ALB5	一晚/28°C	11.7

10

【 0 8 9 7 】

【表 2 7】

アッセイ: L929s + Act D (5000c/w)

TNF: ヒト TNF α @ 0.5ng/ml

ナノボディ	E C ₅₀ (nM)		#	相対作用強度	
	平均	stdev		平均	stdev
TNF1	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF2	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF15	1.669	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	1.898	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	3.023	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	1.508	0.431	4	0.004	0.001
TNF19	2.191	0.941	4	0.001	0.001
TNF3	0.224	0.133	14	0.048	0.019
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.044	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.044	0.011
エンブレル	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
レミケード	0.083	0.037	45	0.103	0.053

20

【 0 8 9 8 】

【表 2 8】

%	未処理	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF13	100	104	99	98	99	84	93	93
TNF14	100	98	101	95	99	96	99	90
TNF15	100	100	91	99	95	90	59	46
TNF16	100	97	102	101	94	101	58	48
TNF17	100	102	98	100	90	90	69	59
TNF18	100	100	101	97	91	93	63	50
TNF19	100	102	111	98	92	91	60	49
TNF20	100	94	93	93	93	92	85	67
TNF21	100	98	99	101	98	96	36	40
TNF22	100	102	101	105	99	93	25	31
TNF23	100	98	97	99	97	98	37	55
ALB3	100	100	99	98	25	18	60	62
ALB4	100	100	100	100	99	29	61	55
ALB5	100	100	100	99	94	32	61	48

30

40

【 0 8 9 9 】

【表 29 - 1】

名称	配列番号	配列
TNF1-9GS-AL B1-9GS-TNF1(TNF24)	90	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFNRRGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSR SQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGL EWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLKPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGTQV TVSS
TNF2-9GS-TN F2-9GS-ALB1(TNF25)	91	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEFS GYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLKPEDTAVY YCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQVTVSSGG GGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWS SGLTYADSVKGRFTISRDIKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVSGSYNYWGQGTQV TVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL KPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGTQVTVSS
TNF3-9GS-AL B1-9GS-TNF3(TNF26)	92	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASGRSLSNYY MGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIIYKDSVK GRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRS FGMSWVRQAPGKPEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCT IGGSLRSRSGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCASGRSLSNYYMGWFR QAPGKERELLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTIS RDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLS DDPGWNTYWGQGTQVTVSS

10

20

【表 29 - 2】

TNF1-9GS-T NF1-9GS-ALB 1(TNF27)	93	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAR SPSGFNRRGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG LRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLKPEDTALYYCARSPSGFNRRGQGTQVTVSS GGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA ASGFTFRSFGMSWVRQAPGKPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPE DTAVYYCTIGGSLRSRSGTQVTVSS
TNF3-9GS-T NF3-9GS-ALB 1(TNF28)	94	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASGRSLSNYY MGWFRQAPGKERELLGNISWRGYNIIYKDSVK GRFTISRDDAKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GLVQAGGSLRLSCASGRSLSNYYMGWFRQAP GKERELLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDD AKNTIYLQMNRLKPEDTAVYYCAASILPLSDDP GWNTYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSR SGTQVTVSS
TNF30-9GS-A LB8-9GS-TNF 30(TNF60)	417	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAR SPSGFNRRGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSG GTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRRGQGTQVTVSS

30

40

50

【表 29 - 3】

TNF33-9GS-A LB8-9GS-TNF 33 (TNF32)	418	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNYY MGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIYKDSVK GRFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGLTIVTSSGGGGGGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLTIVTSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGRSLSNYYMGWFRQAPGKGR ELLGNISWRGYNIYKDSVKGRFTISRDDSKNT IYLQMNSLRPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNT YWGQGLTIVTSS
--	-----	---

【 0 9 0 0 】

10

【表 30】

ID	形式
TNF24	TNF1-9GS-ALB1-9GS-TNF1
TNF25	TNF2-9GS-TNF2-9GS-ALB1
TNF26	TNF3-9GS-ALB1-9GS-TNF3
TNF27	TNF1-30GS-TNF1-9GS-ALB1
TNF28	TNF3-30GS-TNF3-9GS-ALB1

【 0 9 0 1 】

【表 31】

ナノボディ	誘導時間	収率 (ng/L)
TNF24	一晚 / 28°C	1.7
TNF25	短時間 / 37°C	0.445
TNF26	短時間 / 37°C	0.167
TNF27	一晚 / 28°C	2.2
TNF28	短時間 / 37°C	1

20

【 0 9 0 2 】

【表 32】

アッセイ: L929s + Act D (5000c/w)

TNF: ヒト TNFα @ 0.5ng/ml

ナノボディ	EC ₅₀ (nM)		#	相対作用強度	
	平均	stdev		平均	stdev
TNF24	0.011	0.003	11	0.878	0.243
TNF25	0.018	0.003	14	0.603	0.243
TNF26	0.020	0.009	14	0.583	0.210
TNF27	0.012	0.003	3	0.810	0.037
TNF28	0.021	0.003	6	0.543	0.360
エンブレル	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
レミケード	0.083	0.037	45	0.103	0.053

30

【 0 9 0 3 】

【表 33】

ヒトアルブミン	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
6A6 (ALB1)	0.57	1.11E+6	6.30E-4
1C2-GS-6A6-GS-1C2 (TNF24)	11	2.26E+05	2.48E-03
1G5-GS-1G5-GS-6A6 (TNF25)	7.2	2.91E+05	2.10E-03
5F10-GS-6A6-GS-5F10 (TNF26)	7.3	2.81E+05	2.05E-03
1C2-GS6-1C2-GS-6A6 (TNF27)	8.9	3.19E+05	2.34E-03
5F10-GS6-5F10-GS-6A6 (TNF28)	14	1.55E+05	2.13E-03

40

【 0 9 0 4 】

【表 34】

%	未処理	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF24	100	100	99	98	5	3	8	18
TNF25	100	nd	103	102	95	5	4	6
TNF26	100	109	115	112	107	10	8	10
TNF27	100	102	103	102	22	9	26	34
TNF28	100	97	99	99	66	3	6	10

50

【 0 9 0 5 】

【 表 3 5 】

名称	配列番号	配列
TNF29 (TNF1 HUM1)	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAR SPSGFNRRGQGTLVTVSS
TNF30 (TNF1 HUM2)	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAR SPSGFNRRGQGTLVTVSS
TNF31 (TNF2 HUM1)	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGRFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLRPEDTAVY YCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF32 (TNF2 HUM2)	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEPS GYTYTIGWFRQAPGKGRFVARIYWSSGLTYA DSVKGRFTISRDIKNTVDLQMNSLRPEDTAVY YCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
TNF33 (TNF3 HUM1)	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRSLSNY MGWFRQAPGKGRELLGNISWRGYNIYKDSVK GRFTISRDDSKNTIYLQMNSLRPEDTAVYYCAA SILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
ALB6 (ALB1 HUM1)	100	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB7 (ALB1 HUM2)	101	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB8 (ALB1 HUM3)	102	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB9 (ALB1 HUM4)	103	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB10 (ALB1 HUM5)	104	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS

10

20

【 0 9 0 6 】

【 表 3 6 】

Nanobody (商標)	誘導時間	収率
TNF29	一晚/28℃	2.1 mg/L
TNF30	一晚/28℃	2.7 mg/L
TNF31	一晚/28℃	2 mg/L
TNF32	一晚/28℃	1.5 mg/L
TNF33	一晚/28℃	0.5 mg/L

30

【 0 9 0 7 】

【表 3 7】

アッセイ: L929s + Act D (5000c/w)
TNF: ヒト TNF α @ 0.5ng/ml

VHH	E C ₅₀ (nM)			相対作用強度	
	平均	stdev	#	平均	stdev
TNF1	0.707	0.265	14	0.015	0.007
TNF13	0.988	0.014	3	0.014	0.003
TNF14	0.981	0.007	3	0.014	0.003
TNF29	1.336		1	0.013	
TNF30	0.985		1	0.017	
TNF2	1.412	0.622	14	0.007	0.002
TNF15	5.896	1.253	4	0.002	0.000
TNF16	2.422	0.192	4	0.005	0.001
TNF17	7.555	0.562	4	0.001	0.001
TNF18	3.134	0.481	4	0.004	0.001
TNF19	7.372	0.941	4	0.001	0.001
TNF31	2.195		1	0.008	
TNF32	2.506		1	0.007	
TNF3	0.224	0.133	14	0.048	0.019
TNF20	0.380	0.080	3	0.035	0.005
TNF21	0.889	0.019	3	0.015	0.003
TNF22	0.303	0.005	3	0.004	0.011
TNF23	0.3	0.011	3	0.04	0.011
TNF33	0.3		1	0.057	
エンブレル	0.009	0.005	45	1.002	0.011
Humira	0.079	0.043	39	0.097	0.069
レミケード	0.083	0.037	45	0.103	0.058

10

【0908】

【表 3 8】

	未処理	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF29	100	100	100	100	100	96	91	89
TNF30	100	100	100	99	100	96	92	89
TNF31	100	100	100	98	91	84	56	43
TNF32	100	99	98	97	87	78	45	39
TNF33	100	98	97	97	94	91	79	49

20

【0909】

【表 3 9】

アッセイ: アルファ KYM (10000c/w)
TNF: ヒト TNF α @ 1ng/ml

ナノボディ	E C ₅₀ (nM)
TNF1	2.466
TNF2	4.236
TNF3	0.655
TNF4	0.069
TNF5	0.008
TNF6	0.121
TNF7	0.009
TNF8	0.013
TNF9	0.020
エンブレル	0.040
Humira	0.103
レミケード	0.100

30

国際公開第 04/41862 から得た結果

ナノボディ	配列番号	E C ₅₀ (nM)
1A	1	100
3E	4	12
3G	5	20
レミケード		0,080

40

【0910】

【表 4 0】

%	未処理	RT	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
TNF24	100	100	99	98	5	3	8	18
TNF25	100	nd	103	102	95	5	4	6
TNF26	100	109	115	112	107	10	8	10
TNF27	100	102	103	102	22	9	26	34
TNF28	100	97	99	99	66	3	6	10

【0911】

【表 4 1】

リバーズ プライマー		配列
PiRevhumNot/a40c (Not1)	配列番号 : 427	ATGGTGGTGTGGGGGGCTATTATGAGGAGACGGTGACCAGG
フォワード プライマー		
Pi2for (Xhol)	配列番号 : 428	AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

【 0 9 1 2 】

10

【表 4 2】

ヒトTNFα	EC ₅₀ (nM)		アッセイの数
	平均	stddev	
TNF60	0.010	0.002	6
エンブレル	0.014	0.009	33
Humira	0.141	0.074	33
レミケード	0.120	0.037	33

【 0 9 1 3 】

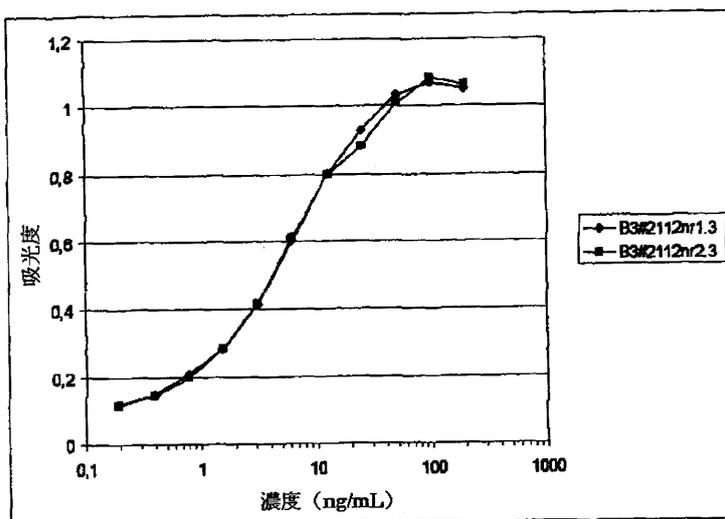
【表 4 3】

		ヒトアルブミン	アカゲザル アルブミン
TNF60	K _D (nM)	24,4	24,1
	k _{on} (1/Ms)	2,05E+05	2,09E+05
	k _{off} (1/s)	5,02E-03	5,04E-03
TNF24	K _D (nM)	11	Nd
	k _{on} (1/Ms)	2.26E+05	Nd
	k _{off} (1/s)	2.48E-03	Nd

20

【 0 9 1 4 】

【表 4 4】



30

40

【 0 9 1 5 】

【表 4 5】

ヒトTNF α	IC ₅₀ (nM)		アッセイの数
	平均	stdev	
TNF1	0.748	0.153	27
TNF55-PEG40	0.004	0.001	8
TNF55-PEG60	0.004	0.002	6
TNF55-ビオチン	0.012	0.003	5
TNF56-PEG40	0.006	0.003	67
TNF56-PEG60	0.005	0.003	7
TNF56-ビオチン	0.017	0.009	13
エンブレル	0.013	0.006	71
Humira	0.127	0.053	67
レミケード	0.144	0.061	67

【 0 9 1 6 】

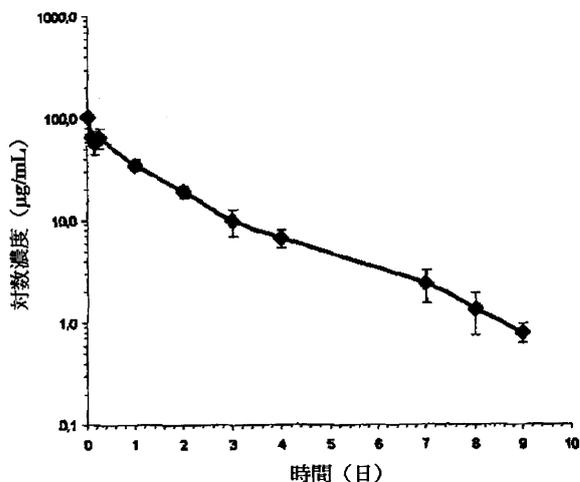
10

【表 4 6】

	DS534 P4	DS592 P4	DS605 P3	KM05-179 P4
PIIC50				
エタネルセプト	9.55	9.49	9.51	9.51
アクシビター	9.68	9.44	9.37	9.27
pM				
エタネルセプト	262	324	309	309
アクシビター	132	363	427	537

【 0 9 1 7 】

【表 4 7】



20

30

【 0 9 1 8 】

当業者は、単なる通常実験で、本明細書に記載された本発明の特定の実施態様に対する多くの同等物を理解し、または解明し得よう。このような同等物は以下の特許請求の範囲に包含されるように意図されたものである。

【 0 9 1 9 】

本明細書に開示された内容はすべて、参照により完全に援用される。

【 0 9 2 0 】

添付の表は本明細書の不可欠な部分を形成しており、それを以下に示す：

40

一価TNF アルファナノボディ

表 8 - 1 ~ 8 - 4 : TNF アルファナノボディの配列リスト

表 9 : ヒトTNF アルファナノボディの K_{off} 値

表 10 : ヒト生殖系配列に対するTNF アルファおよび血清アルブミンナノボディの相同性

表 11 : TNF アルファおよび血清アルブミンナノボディの発現レベル

表 12 : ELISAとヒトおよびアカゲザルTNF アルファとの結合

表 13 : TNF アルファナノボディの受容体阻害アッセイ

表 14 : TNF アルファナノボディの Biacore 分析

表 15 : TNF アルファナノボディとTNF アルファとの結合 (K_D 値)

50

表 16 : ヒト (a) およびアカゲザル (b) の T N F α を中和する T N F α ナノボディの作用強度

表 17 : 温度処理後の T N F α および血清アルブミンナノボディの 280 nm での O D 値

表 18 : 温度処理後の T N F α ナノボディの作用強度
二価 T N F α ナノボディ

表 19 - 1 : 二価 T N F α ナノボディおよびリンカー配列の配列リスト

表 19 - 2 : 二価 T N F α ナノボディおよびリンカー配列の配列リスト

表 20 : 二価 T N F α ナノボディ構造物

表 21 : 二価 T N F α ナノボディの発現レベル

表 22 : 二価 T N F α ナノボディの受容体阻害アッセイ

表 23 : ヒト (a) およびアカゲザル (b) の T N F α を中和する T N F α ナノボディの作用強度

表 24 : 二価 T N F α ナノボディの 280 nm での O D 値
ヒト化一価 T N F α ナノボディ

表 25 - 1 ~ 25 - 3 : ヒト化一価 T N F α および血清アルブミンナノボディの配列リスト

表 26 : ヒト化 T N F α および血清アルブミンナノボディの発現レベル

表 27 : ヒト T N F α を中和する T N F α ナノボディの作用強度

表 28 : ヒト化 T N F α および血清アルブミンナノボディの 280 nm での O D 値

三価 T N F α ナノボディ

表 29 - 1 ~ 29 - 3 : 三価 T N F α ナノボディの配列リスト

表 30 : 三価 T N F α ナノボディ構造物

表 31 : 三価 T N F α ナノボディの発現レベル

表 32 : ヒト T N F α を中和する三価 T N F α ナノボディの作用強度

表 33 : 血清アルブミンへの三価ナノボディの結合 (K_D 値)

表 34 : 三価 T N F α ナノボディの 280 nm での O D 値

ヒト化一価 T N F α ナノボディ (二回目)

表 35 : 二回目のヒト化三価 T N F α ナノボディの配列リスト

表 36 : ヒト化 T N F α ナノボディの発現レベル

表 37 : ヒト T N F α を中和する T N F α ナノボディの作用強度

表 38 : ヒト化 T N F α ナノボディの 280 nm での O D 値

表 39 : ナノボディの生物活性の比較

追加表

表 40 : 三価の N a n o b o d y (商標) を設定するのに使用するオリゴヌクレオチドの概要

表 41 : 三価の N a n o b o d y (商標) をクローニングするのに使用するオリゴヌクレオチドの概要

表 42 : 市販のコントロール (エンブレル、レミケード、Humira) と比較した、三価の N a n o b o d y (商標) T N F 60 を使用した毒性アッセイで得られた E C 50 値

表 43 : B i a c o r e におけるヒト血清アルブミンへの T N F 60 および T N F 24 のアフィニティー判定 N d は未判定 (n o t d e t e r m i n e d) を表す。

表 44 : 二価の N a n o b o d y (商標) を設定するのに使用するオリゴヌクレオチドの概要

表 45 : 市販のコントロール (エンブレル、レミケード、Humira) と比較した、二価の N a n o b o d y (商標) 使用した毒性アッセイで得られた E C 50 値

表 46 : 滑膜由来線維芽細胞の研究結果

表 47 : マウス空気嚢の研究結果

10

20

30

40

50

【図1】

```

PMP1C2  qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs d....tntv vrvqsdqtl class I
PMP1C1  qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs v....tntv vrvqsdqtl
PMP1E6  qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs v....tntv vrvqsdqtl
PMP1D10 qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs d....tntv vrvqsdqtl class III
PMP1D9  qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs d....tntv vrvqsdqtl class II
PMP1D2  qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs dntvttvrv vrvqsdqtl
PMP1D3  qqlvteqpy lvvpsqlll tcaasgffrs tntv...tntv vrvqsdqtl class IIB
PMP1C3  cevealrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1C1  cevealrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1E8  cevealrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1D10 qltvlrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1D9  qltvlrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1D2  efvavrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1D3  efvavrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1C3  efvavrtvg lvtkvsvrv grflrdaa kvllvgms lpoetlary
PMP1C1  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1E6  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D10 carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D9  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D2  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D3  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1C3  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1C1  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1E6  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D10 carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D9  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D2  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D3  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1C3  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1C1  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1E6  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D10 carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D9  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D2  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy
PMP1D3  carv.....tntvrtvg qqlvteqpy

```

【図2】

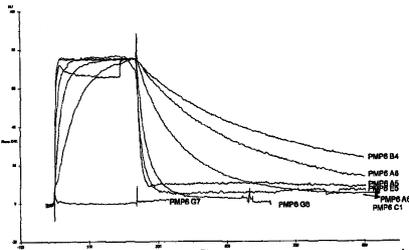
```

PMP608  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP6A5  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP6A6  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP6C1  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP6A9  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP6A4  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP6C7  ISNDSTRTV ADNVKDFI, ardeakhalv lmmalped tavyvci08
PMP608  GSP.....tntvrtvg as
PMP6A5  GSP.....tntvrtvg as
PMP6A6  GSP.....tntvrtvg as
PMP6C1  GSP.....tntvrtvg as
PMP6A9  GSP.....tntvrtvg as
PMP6A4  GSP.....tntvrtvg as
PMP6C7  GSP.....tntvrtvg as

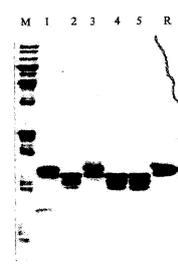
```

【図5】

マウスAに対するアルブミン特異的ナノボディのスクリーニング

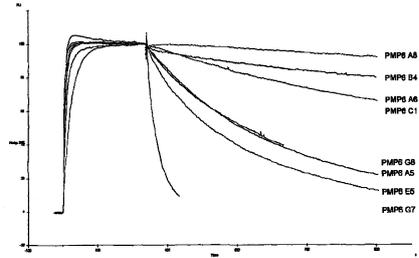


【図6】



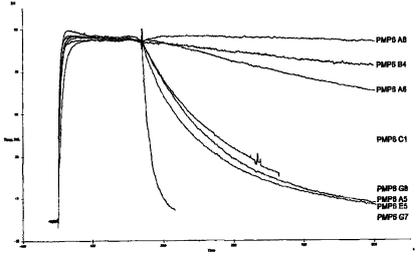
【図3】

ヒトSAに対するアルブミン特異的ナノボディのスクリーニング



【図4】

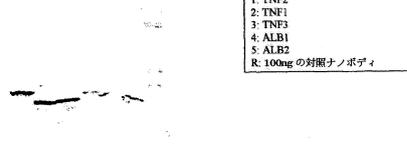
アカゲザルS Aに対するアルブミン特異的ナノボディのスクリーニング



【図7】

抗myc

R 5 4 3 2 1



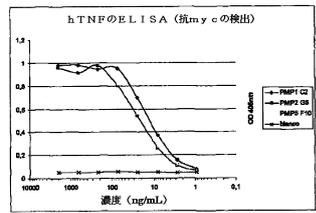
- 1: TNF2
- 2: TNF1
- 3: TNF3
- 4: ALB1
- 5: ALB2
- R: 100ngの対照ナノボディ

抗ナノボディ

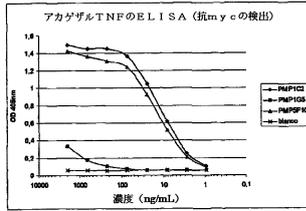
R 5 4 3 2 1



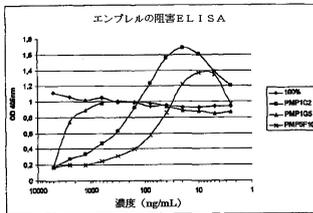
【図8】



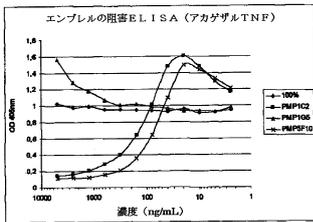
【 図 9 】



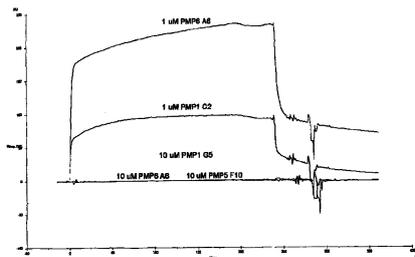
【 図 10 】



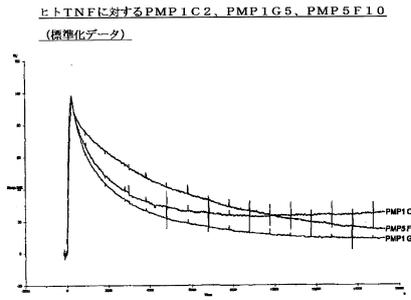
【 図 11 】



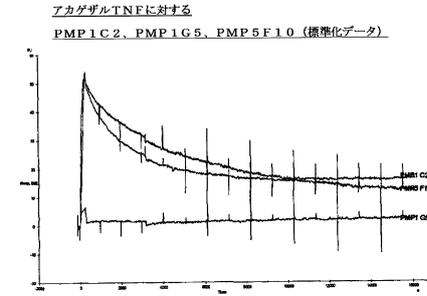
【 図 14 】



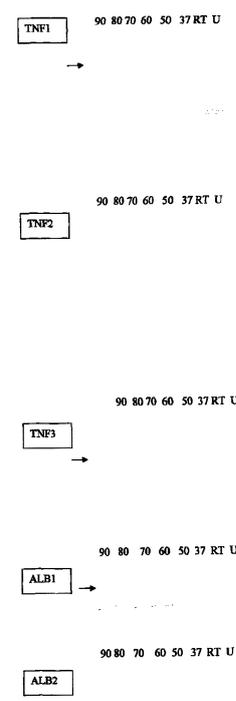
【 図 12 】



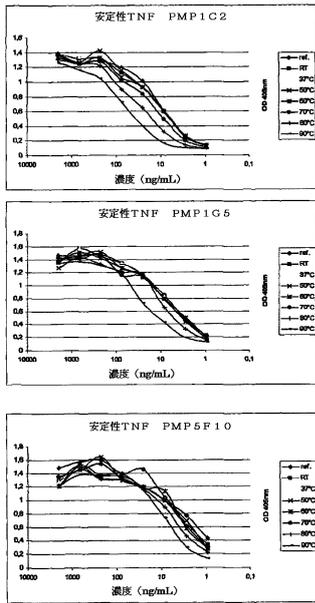
【 図 13 】



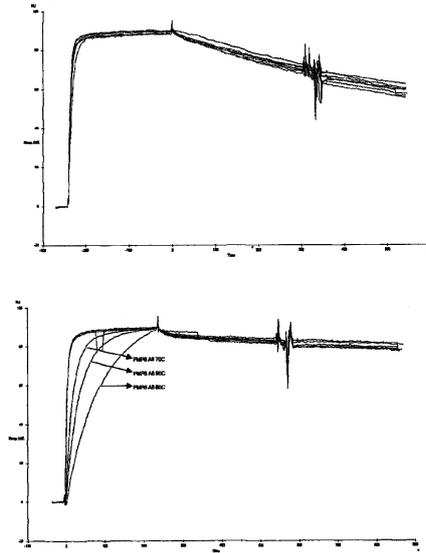
【 図 15 】



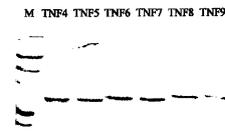
【 16 】



【 17 】

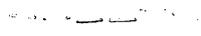


【 18 】



【 19 】

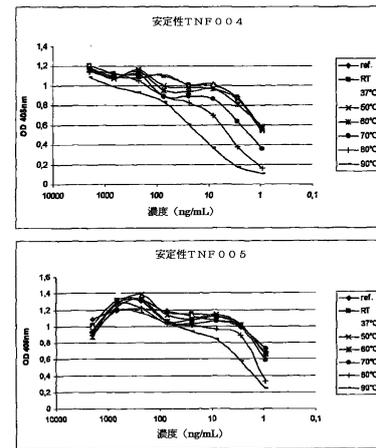
抗m y c
TNF9 TNF8 TNF7 TNF6 TNF5 TNF4



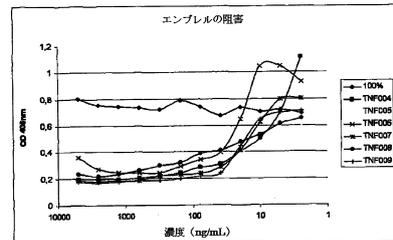
抗N B
TNF9 TNF8 TNF7 TNF6 TNF5 TNF4



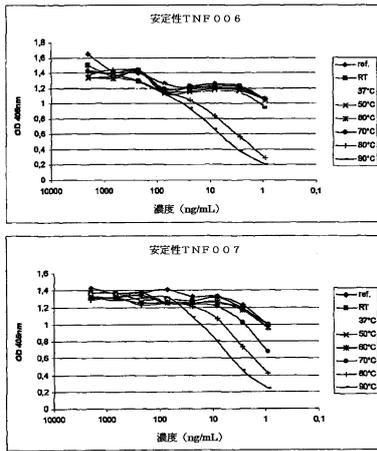
【 21 - 1 】



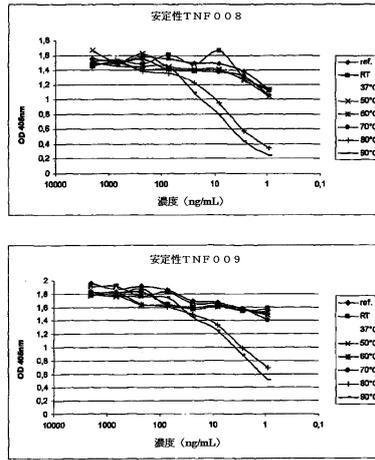
【 20 】



【 2 1 - 2 】



【 2 1 - 3 】



【 2 2 】

```

TNF11  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY  (残基数: 473)
DP51  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  RINSDGSSTIYY  (残基数: 473)
TNF1  QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  EINTNGLTPTK
TNF13  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  EINTNGLTPTK
TNF14  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  EINTNGLTPTK
*****

DP51  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  -----  WQGTQITVSSS  (残基数: 472)-E8
DP53  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  -----  WQGTQITVSSS  (残基数: 473)-E8
TNF1  PDSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SPGGIN  RQGTQITVSSS
TNF13  PDSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SPGGIN  RQGTQITVSSS
TNF14  PDSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SPGGIN  RQGTQITVSSS
*****

```

【 2 3 】

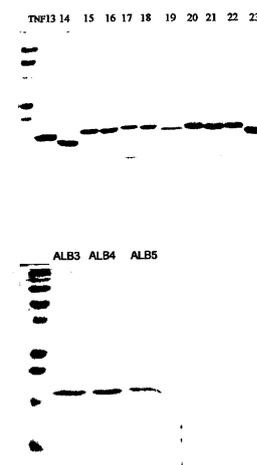
```

TNF21  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  -----SIYMS  WVRQAPGKLEWVNI  WQDSSEKYY  (残基数: 474)
TNF2  QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  EPGSYTTIG  WFRQAPGKREPVARI  WSSGLTYY
TNF15  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  EPGSYTTIG  WFRQAPGKREPVARI  WSSGLTYY
TNF16  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  EPGSYTTIG  WFRQAPGKREPVARI  WSSGLTYY
TNF17  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  EPGSYTTIG  WFRQAPGKREPVARI  WSSGLTYY
TNF18  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  EPGSYTTIG  WFRQAPGKREPVARI  WSSGLTYY
TNF19  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  EPGSYTTIG  WFRQAPGKREPVARI  WSSGLTYY
*****

DP54  VDSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  -----  WQGTQITVSSS  (残基数: 474)-E8
TNF2  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  RGLIFPSSRWSTYK  WQGTQITVSSS
TNF15  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  RGLIFPSSRWSTYK  WQGTQITVSSS
TNF16  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  RGLIFPSSRWSTYK  WQGTQITVSSS
TNF17  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  RGLIFPSSRWSTYK  WQGTQITVSSS
TNF18  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  RGLIFPSSRWSTYK  WQGTQITVSSS
TNF19  ADSVKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  RGLIFPSSRWSTYK  WQGTQITVSSS
*****

```

【 2 6 】



【 2 4 】

```

TNF31  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY  (残基数: 475)
TNF1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY
TNF20  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY
TNF21  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY
TNF22  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY
TNF23  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  DIRMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY
*****

DP29  VKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  -----  WQGTQITVSSS  (残基数: 475)-E8
TNF3  VKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SILPLSDPQWNTY  WQGTQITVSSS
TNF20  VKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SILPLSDPQWNTY  WQGTQITVSSS
TNF21  VKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SILPLSDPQWNTY  WQGTQITVSSS
TNF22  VKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SILPLSDPQWNTY  WQGTQITVSSS
TNF23  VKG  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  SILPLSDPQWNTY  WQGTQITVSSS
*****

```

【 2 5 】

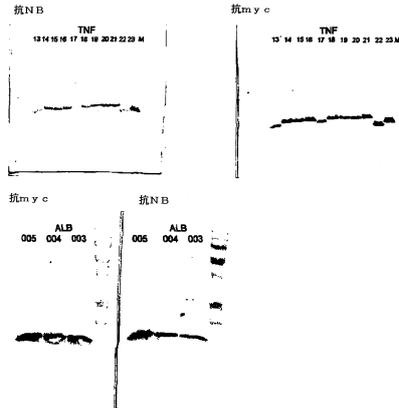
```

ALB1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY  (残基数: 475)
DP51  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  RINSDGSSTIYY  (残基数: 475)
ALB1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  RINSDGSSTIYY  (残基数: 475)
ALB3  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY  (残基数: 475)
ALB4  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY  (残基数: 475)
ALB5  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  SYVMH  WVRQAPGKLEWVS  YISSSSSTIYY  (残基数: 475)
*****

DP51  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  -----  WQGTQITVSSS
DP53  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  -----  WQGTQITVSSS
ALB1  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  GGSIGR  SSQGTQITVSSS
ALB3  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  GGSIGR  SSQGTQITVSSS
ALB4  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  GGSIGR  SSQGTQITVSSS
ALB5  RPTISRDANKTLLQMSLKPEDAVYICAR  GGSIGR  SSQGTQITVSSS
*****

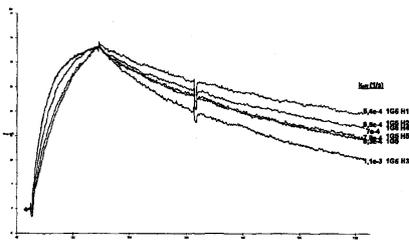
```

【図 27】



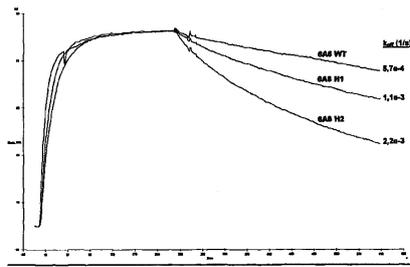
【図 28】

ヒトTNFに対する1G5WTおよびヒト化型 (標準化データ)

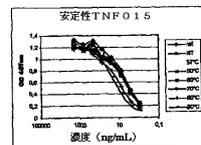
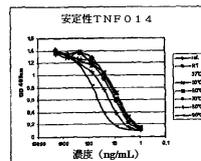
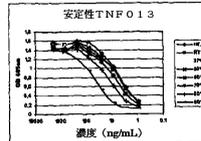


【図 29】

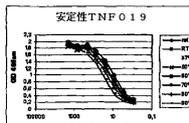
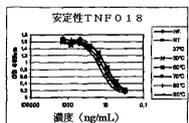
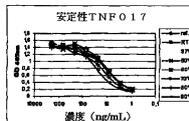
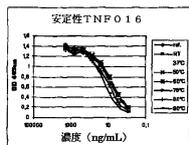
ヒトSAに対する6A6WTおよびヒト化型 (標準化データ)



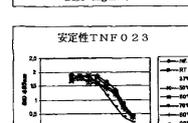
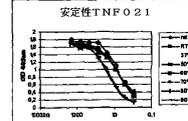
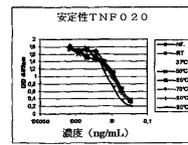
【図 30 - 1】



【図 30 - 2】



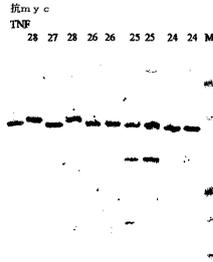
【図 30 - 3】



【 3 1 】



【 3 2 】



抗NB
TNF
M 24 24 25 25 26 26 28 27 28

【 3 6 】

TFE31 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
DF29 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
TFE3 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
TFE20 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
TFE21 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
TFE22 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
TFE23 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
TFE33 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RYRNSSTIYDASVKG
i i i e b1 b e1 b b

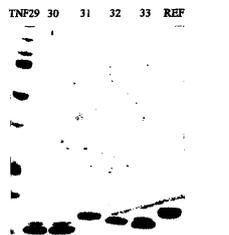
DF29 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
TFE3 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
TFE20 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
TFE21 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
TFE22 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
TFE23 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
TFE33 VEG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SILELSDDEGPNYI WQQTLYTVSS
e b b i i b b

【 3 7 】

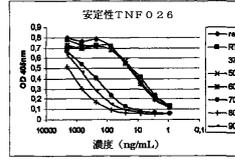
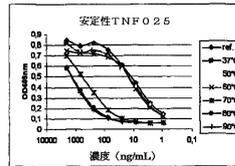
ALB11 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SYVNH WYRQAPGKLEWVS YISSSSSTIYDASVKG
DF51 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SYVNH WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTYADSVKG
ALB1 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB3 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB4 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB5 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB6 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB7 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB8 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB9 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
ALB10 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SFVNH WYRQAPGKLEWVS SLSGSSGDTLYADSVKG
e i i e1 e1

DF51 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR ----- WQQTLYTVSS
DF53 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR ----- WQQTLYTVSS
ALB1 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB3 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB4 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB5 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB6 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB7 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB8 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB9 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
ALB10 RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCI GGSLSR SQQTLYTVSS
i ii bb ib i

【 3 8 】



【 3 3 】



【 3 4 】

TFE11 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SYVNH WYRQAPGKLEWVS YISSSSSTIY
DF51 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SYVNH WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
DF53 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SYVNH WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE1 QVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RINTNGLITKY
TFE13 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RINTNGLITKY
TFE14 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RINTNGLITKY
TFE29 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RINTNGLITKY
TFE30 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS DYVMD WYRQAPGKLEWVS RINTNGLITKY
e

DF51 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR ----- WQQTLYTVSS
DF53 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR ----- WQQTLYTVSS
TFE1 PDSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SFGSN RQQTLYTVSS
TFE13 PDSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SFGSN RQQTLYTVSS
TFE14 PDSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SFGSN RQQTLYTVSS
TFE29 PDSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SFGSN RQQTLYTVSS
TFE30 PDSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR SFGSN RQQTLYTVSS
e i i b e

【 3 5 】

TFE21 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS SYVNH WYRQAPGKLEWVS YISSSSSTIYDASVKG
TFE2 QVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE15 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE16 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE17 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE18 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE19 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE31 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
TFE32 EVQLVESGGGLVQPGSSLRSLCAASGPTFS EFGYTTTIG WYRQAPGKLEWVS RINSOGSSSTY
e b e1 b

DF54 VDSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR ----- WQQTLYTVSS
DF54 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE2 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE15 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE16 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE17 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE18 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE19 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE31 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
TFE32 ADSVKG RPTISRDNANNTLYIQMSLKPEDTAVYCAR RDIPTSRVGSYNY WQQTLYTVSS
e b b b i i b e

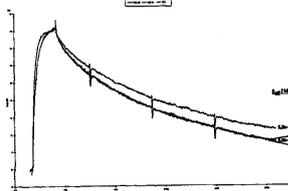
【 3 9 】

抗m y c 抗NB
REF TNF33 32 31 30 29 TNF29 30 31 32 33 Ref

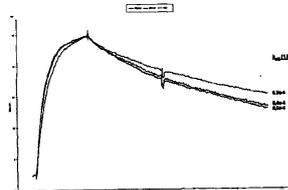


【 4 0 - 1 】

ヒトTNFに対する1C2WTおよびヒト化型（標準化データ）

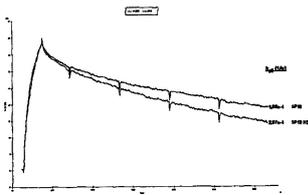


ヒトTNFに対する1G5WTおよびヒト化型（標準化データ）



【 40 - 2 】

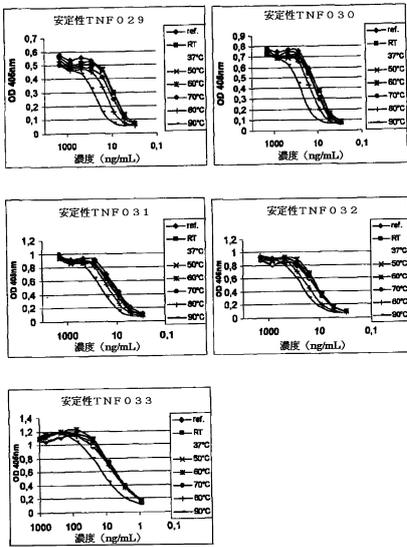
ヒトTNFに対するRFLOWTおよびヒト化型(標準化ゲータ)



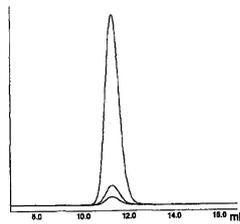
【 42 】



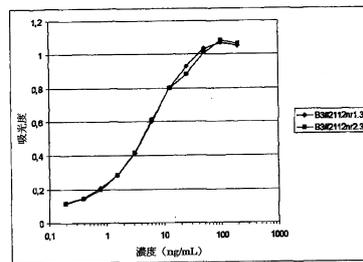
【 41 】



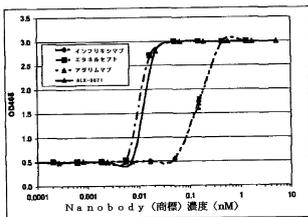
【 43 】



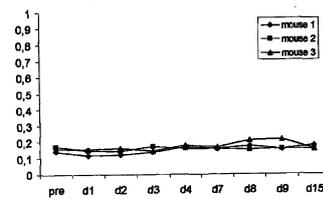
【 44 】



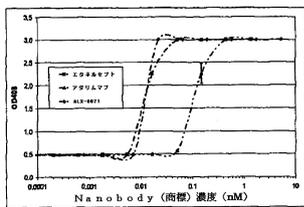
【 45 】



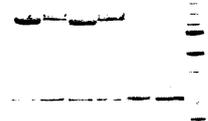
【 48 】



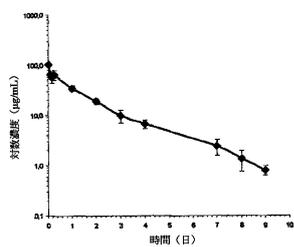
【 46 】



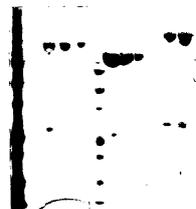
【 49 】



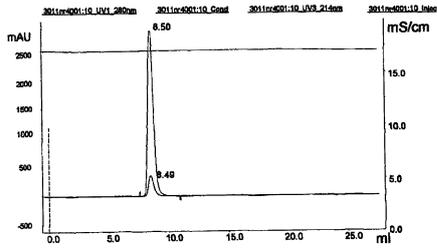
【 47 】



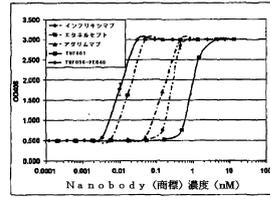
【 50 】



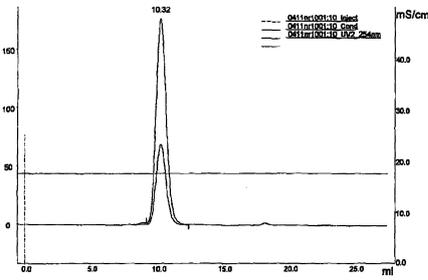
【 5 1 】



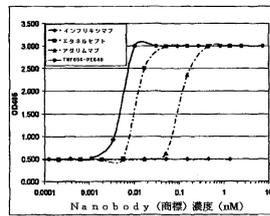
【 5 3 】



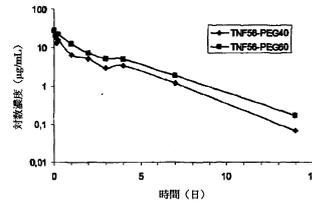
【 5 2 】



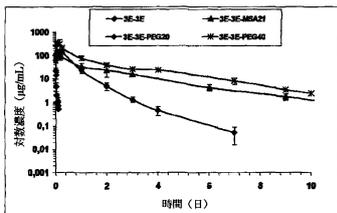
【 5 4 】



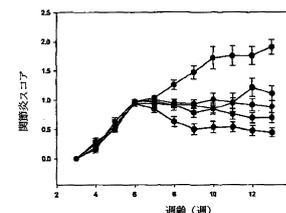
【 5 5 】



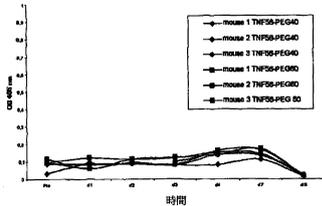
【 5 6 】



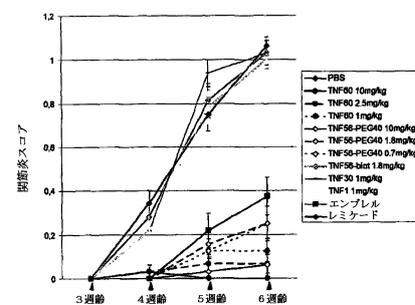
【 5 9 】



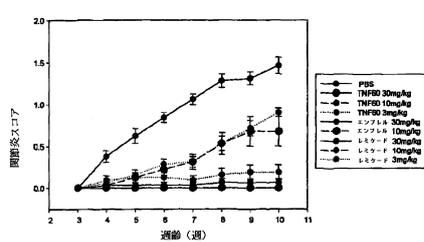
【 5 7 】



【 6 0 】



【 5 8 】



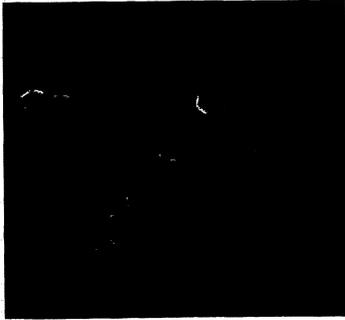
【 6 1 】

```

1
50
PMP1C2-H13eev (1) QVQLVSSGGLVPSGSLRSLSCA...
VBI1A (1) QVQLVSSGGLVPSGSLRSLSCA...
VBI3E (1) QVQLVSSGGLVPSGSLRSLSCA...
VBI3G (1) QVQLVSSGGLVPSGSLRSLSCA...
Consensus (1) QVQLVSSGGLVPSGSLRSLSCA...
51
100
PMP1C2-H13eev (46) E...
VBI1A (46) E...
VBI3E (51) E...
VBI3G (49) E...
Consensus (51) E...
101
129
PMP1C2-H13eev (96) CA...
VBI1A (96) CA...
VBI3E (101) CA...
VBI3G (99) CA...
Consensus (101) CA...

```

【図 6 2】



【配列表】

0006420200000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2004/003019号(WO, A2)
国際公開第2004/041862号(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C07K 16/00

JSTPlus(JDreamIII)

PUBMED

Registry/CAPLus(STN)

MEDLINE/BIOSIS/CAPLus(STN)