

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7256011号

(P7256011)

(45)発行日 令和5年4月11日(2023.4.11)

(24)登録日 令和5年4月3日(2023.4.3)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K

16/18

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

Y

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K

47/68

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P

1/04

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P

3/10

請求項の数 15 (全74頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-527745(P2018-527745)

(86)(22)出願日 平成28年11月28日(2016.11.28)

(65)公表番号 特表2019-504822(P2019-504822
A)

(43)公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/079048

(87)国際公開番号 WO2017/089618

(87)国際公開日 平成29年6月1日(2017.6.1)

審査請求日 令和1年11月27日(2019.11.27)

審判番号 不服2021-18067(P2021-18067/J
1)

審判請求日 令和3年12月27日(2021.12.27)

(31)優先権主張番号 62/260,411

(32)優先日 平成27年11月27日(2015.11.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 505166225

アプリンクス エン・ヴェー・

ベルギー、ペー - 9 0 5 2 ヘント - ツ
ヴィナールデ、テヒノロジーパルク 2 1

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 パッティン、エルス

ベルギー国 9 7 5 0 ハイセ、バールデ
ゲムストラート 4 6

(72)発明者 ソムベル、アリエラ ヴァン デ

ベルギー国 9 4 0 1 オースタッケル、
ホレナールストラート 9 4

(72)発明者 メールツ、ペーター

ベルギー国 9 1 6 0 ローケレン、ニー
ウェ モーレンストラート 2 7 ペー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 4 0 L を阻害するポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 4 0 L に特異的に結合する少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一可変ドメイン (I S V D) を含み、および血清アルブミンに結合する I S V D を含むポリペプチドであって、C D 4 0 L への結合が C D 4 0 L の活性を調節し、

C D 4 0 L に特異的に結合する I S V D が、本質的に 4 つのフレームワーク領域 (それぞれ F R 1 から F R 4) と 3 つの相補性決定領域 (それぞれ C D R 1 から C D R 3) とからなり、ここで、

C D R 1 が配列番号 3 3 であり、C D R 2 が配列番号 3 5 であり、C D R 3 が配列番号 3 7 である ;

C D R 1 が配列番号 6 1 であり、C D R 2 が配列番号 6 3 であり、C D R 3 が配列番号 6 5 である ;

C D R 1 が配列番号 4 0 であり、C D R 2 が配列番号 4 2 であり、C D R 3 が配列番号 4 4 である ; または

C D R 1 が配列番号 6 8 であり、C D R 2 が配列番号 7 0 であり、C D R 3 が配列番号 7 2 である、

前記ポリペプチド。

【請求項 2】

I S V D が配列番号 8、配列番号 6、配列番号 7 または配列番号 3 である、

請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

C D R 1 が配列番号 4 0 であり、C D R 2 が配列番号 4 2 であり、C D R 3 が配列番号 4 4 であり、

I S V D が配列番号 7 または配列番号 3 である、

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

ポリペプチドが C D 4 0 L に結合し、

- $1 \text{ E} \cdot 0^7 \text{ M}$ および $1 \text{ E} \cdot 1^3 \text{ M}$ の間の K_D を有し、
- $1 \text{ E} \cdot 0^7 \text{ M}$ および $1 \text{ E} \cdot 1^2 \text{ M}$ の間の $I C_{50}$ を有し、および / または
- $5 \text{ E} \cdot 0^4 (\text{s}^{-1})$ 未満の off-rate を有する、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

C D 4 0 L がヒト C D 4 0 L である、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

活性の調節が

- C D 4 0 L の活性に拮抗することであり、
- 少なくとも 2 0 % の、C D 4 0 への C D 4 0 L の結合をブロックすることであり、
- T 細胞共刺激分子ならびに / または免疫刺激性分子の C D 4 0 によって媒介される誘導に拮抗することであり、
- B 細胞活性化を阻害することであり、
- ジャーカット T 細胞における J N K リン酸化を実質的に誘導しないことであり、
- 抗 C D 3 抗体によって共刺激されたジャーカット T 細胞による I F N 分泌を実質的に誘導しないことであり、
- 初代内皮細胞の活性化を実質的に誘導しないことであり、および / または
- 血小板活性化または血小板凝集を実質的に誘導しないことである、

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

C 末端延長をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

血清アルブミンに結合する I S V D が、本質的に 4 つのフレームワーク領域（それぞれ F 1 から F R 4 ）と 3 つの相補性決定領域（それぞれ C D R 1 から C D R 3 ）とからなり、C D R 1 が配列番号 7 4 であり、C D R 2 が配列番号 7 5 であり、C D R 3 が配列番号 7 6 である、

請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

血清アルブミンに結合する I S V D が、A L B 1 3 5（配列番号 1 5）、A L B 1 2 9（配列番号 1 3）、A L B 8（配列番号 1 1）、A L B 2 3（配列番号 1 2）、および A L B 1 3 2（配列番号 1 4）からなる群から選ばれる、

請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

C 末端延長が C 末端延長 (X) n であり、式中、n が 1 から 1 0 であり；各 X が独立して選ばれるアミノ酸残基である、

請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

ポリペプチドが、少なくとも 8 0 % の配列同一性を C 0 1 0 0 0 3 3 1 8（配列番号 9）または C 0 1 0 0 0 3 3 1 3（配列番号 7 8）に対して有する、

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

C D 4 0 L / C D 4 0 によって媒介される経路の不適切な活性化に関わる個体の疾患ま

10

20

30

40

50

たは障害の処置または防止のために用いられる、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3】

医薬としての使用のための、

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス (S L E)、ループス腎炎、免疫性血小板減少性紫斑病 (I T P)、移植拒絶、クローン病、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患 (I B D)、大腸炎、喘息 / アレルギー、動脈硬化症、重症筋無力症、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ、強直性脊椎炎、冠動脈性心疾患、1 型糖尿病、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、および / または組換え医薬品に対する免疫応答の症状を処置または防止することへの使用のための、

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

ポリペプチドが、ポリペプチド 4 6 B 0 3 (配列番号 6)、2 8 B 0 2 (配列番号 3)、C 0 1 0 0 0 3 2 9 0 (配列番号 8)、および C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 (配列番号 9) の少なくとも 1 つの C D 4 0 L への結合を交差ブロックし、ならびに / またはポリペプチド 4 6 B 0 3 (配列番号 6)、2 8 B 0 2 (配列番号 3)、C 0 1 0 0 0 3 2 9 0 (配列番号 8)、および C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 (配列番号 9) の少なくとも 1 つによって C D 4 0 L への結合を交差ブロックされる、

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、C D 4 0 L に結合する免疫グロブリンに、より具体的には、1 つ以上のかかる免疫グロブリンを含むかまたは本質的にそれからなるポリペプチドに関する (本明細書においては、それぞれ「本発明の免疫グロブリン」および「本発明のポリペプチド」ともまた言われる)。

【0 0 0 2】

本発明は、かかるポリペプチドをコードする核酸に (本明細書においては「本発明の核酸 (単数もしくは複数) 」ともまた言われる ; かかるポリペプチドを調製するための方法に ; かかるポリペプチドを発現するかまたは発現する能力がある宿主細胞に ; かかるポリペプチド、核酸、および / または宿主細胞を含む組成物、特に医薬組成物に ; ならびに特に予防および / または治療目的、例えば本明細書において挙げられる予防および / または治療目的のための、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、および / または組成物の使用にもまた関する。

【0 0 0 3】

本発明の他の側面、態様、利点、および用途は、本明細書のさらなる記載から明瞭になるであろう。

【背景技術】

【0 0 0 4】

C D 4 0 / C D 4 0 リガンド (C D 4 0 L、C D 1 5 4) 相互作用は、B および T 細胞応答の開始 (Grewal & Flavell, 1998 Annu. Rev. Immunol. 16:111-135; Yang & Wilson, 1996 Science 273:1862-1864) および維持 (Grewal et al., 1996 Science 273:1864-1867; Buhlmann et al., 1999 J. Immunol. 162:4373-4376) に必要不可欠の役割を果たすことが示されている。C D 4 0 共刺激分子は、樹状細胞 (D C)、B リンパ球、マクロファージ、および C D 3 4 ⁺ 細胞前駆体のサブセットを包含する種々の抗原提示細胞 (A P C) の表面上に、恒常的にまたはインビトロ活性化後にどちらかで発現される (McLellan et al., 1996 Eur. J. Immunol. 26:1204-1210; Rondelli et al., 1999 Blood 94:2293-2300)。C D 4 0 L は、T 細胞受容体によって媒介される

10

20

30

40

50

刺激後にCD4⁺およびいくつかのCD8⁺Tリンパ球の表面上に発現される。CD40とCD40Lとの間の相互作用は、APCおよびT細胞機能両方に影響する二方向性シグナルに至る。一方では、CD40のCD40L依存的刺激は、DCおよびマクロファージがCD80およびCD86などのT細胞共刺激分子を発現することと、IL-12などの免疫刺激性サイトカインを産生することとを誘導し、それゆえに、ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞応答両方を開始するそれらの能力を増強する(Kennedy et al., 1994 Eur. J. Immunol. 24:116-123; Caux et al., 1994 J. Exp. Med. 180:1263-1272)。他方で、CD40LのCD40依存的な刺激は共刺激シグナルを送達し(Brenner et al., 1997 FEBS Letters 417:301-306)、T細胞活性化に寄与する(Koppenhoefer et al., 1997 FEBS Letters 414:444-448; Blotta et al., 1996 J. Immunol. 156:3133-3140)。動物モデルおよびヒトからの証拠は、種々の自己免疫疾患、例えばループス腎炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、ならびにルー・ゲーリッグ病およびシャルコー病としてもまた公知の筋萎縮性側索硬化症(ALS)において、病原性の自己抗体および組織損傷の生成に果たすCD40-CD40L相互作用の必須の役割を支持している。これらの知見は、CD40-CD40L相互作用を遮断する抗体の開発のきっかけとなった。

【0005】

ヒトCD40Lを標的とするヒト化モノクローナル抗体(mAb)(hu5C8またはルプリズマブ、Biogen)は、MHC(主要組織適合性複合体)がマッチしないドナーからの腎臓移植の非ヒト霊長類モデルにおいて、大部分のレシピエントにおける長期の移植片生着を誘導することが示されている(Kirk et al., 1999 Nat. Med. 5:686-693)。同じ抗体は、ループス腎炎の第II相試験でもまた試験された。しかしながら、研究は、心筋梗塞を包含する血栓塞栓事象(TE)ゆえに途中で終了しなかった(Kawai et al., 2000 Nat. Med. 6:114)。

【0006】

IgG1アイソタイプのヒト化抗CD40L抗体toralizumab(IDEC-131、hu24-31)はマウス抗CD40Lハイブリドーマ24-31に由来する。ルプリズマブと類似に、toralizumabについて計画された複数の第I相試験および第II相試験もまた、ヒト患者における血栓塞栓事象のリスクが原因で止められた。

【0007】

開発された第3の抗CD40L抗体はABI793であった。これはHuMAbマウスに由来するヒトIgG1である(Medarex Inc.)。このケースにおいては、TEがアカゲおよびカニクイ腎移植モデルにおいて既に観察され、それゆえにABI793のさらなる開発は止められた。

【0008】

血栓塞栓事象は、種々の疾患バックグラウンドにおいて異なるエピトープに対する抗体によって発生し得、心筋、肺動脈、および末梢静脈を包含する多様な部位における静脈および動脈支配域両方が関わる。しかしながら、抗CD40Lによって誘導されるTEの底にある厳密なメカニズムはまだ解明されていない。主要仮説は：

(i) IgGモノクローナル抗体の二価性が原因の血小板上のCD40Lのクロスリンク；

(ii) 血小板Fc受容体との抗CD40L抗体の相互作用、それゆえに血小板凝集および血栓症を促進、

である。

【0009】

加えて、既存抗体(PEA)および/または抗薬物抗体(ADA)などの治療蛋白質産物に対する免疫応答は、患者の安全性および産物の有効性両方について問題を呈し得る。これらの免疫学に基づく有害事象は、アナフィラキシー、サイトカイン放出症候群、「輸注反応」、および非急性反応(発熱、発疹、関節痛、筋肉痛、血尿、蛋白尿、漿膜炎、中枢神経系合併症、および溶血性貧血の遅延発症)、ならびに重大な機能を媒介する内在性

10

20

30

40

50

蛋白質の交差反応性の中和を包含する。また、治療蛋白質産物に対する望まれない免疫応答は、それらの生物学的活性を中和し得、治療蛋白質産物の有効性を阻害することによってのみならず、内在性蛋白質カウンターパートに対して交差反応することによってもまた有害事象をもたらし得、その生理学的機能の喪失に至る。免疫原性の安全性の帰結は幅広く変動し得、治療蛋白質産物を投与された患者において多くの場合には予測不可能である。P E AおよびA D Aは、治療蛋白質産物の非冗長的な内在性カウンターパートまたは近縁蛋白質と交差反応し阻害する場合には深刻な帰結を有し得る (Macdougall et al., 2012 Kidney Int. 2012 81:727-32; Seidl et al., 2012 Pharm Res 29:1454-1467)。

【0010】

W O 2 0 1 3 / 0 5 6 0 6 8 は、C D 4 0 L を標的とするドメイン抗体 (d A b) の C 末端にリンクされた I g G 1 の改変された F c 断片から構成される二量体融合蛋白質に関する。W O 2 0 1 3 / 0 5 6 0 6 8 は P E A について報告していないが、サルにおいては A D A が蛋白質に対して発生し、速いクリアランス (低い血漿暴露および低い血清中 T₁ / 2) をもたらしたということを報告している。

【0011】

十分に有効な免疫グロブリン単一可変ドメイン抗体の報告は明かされていない。現行では、BiogenおよびUCBは既存の抗 C D 4 0 L 抗体を F a b ' - P E G 分子 (C D P 7 6 5 7) として作り替えるために共同研究し、h u 5 C 8 で見られる T E 事象を克服することを試みている。半減期を引き延ばすために、F a b ' 部分がポリエチレングリコール (P E G) にカップリングされた。P E G は工業製造から医療まで多種多様な用途を有し、それゆえにそれはユビキタスに用いられている。最近の知見は、健康な血液ドナーにおける抗 P E G 抗体の 2 2 ~ 2 5 % の発生率を実証した。抗 P E G 抗体のこの発生は、いくつかの患者においては有効性を限定し得、P E G が非免疫原性であるという一般的な想定に反する。ゆえに、P E G 化された治療薬は、特に免疫低下した疾患設定において臨床使用にとつての潜在的重大性を有する。その上に、F a b ' 分子の P E G 化がその活性を 4 ~ 5 倍減少させるということが報告されている (U S 2 0 1 0 / 0 1 0 4 5 7 3)。Xie et al. は F c フォーマットの必要性を記載しており、これは、効力を改善するために分子を二価にすることを包含する (Xie et al., 2014 J. Immunol. 192:4083-4092)。

【0012】

従って、安全で有効な抗 C D 4 0 L 医薬の必要がある。

【0013】

本発明者は、機能的な F c ドメインなしの C D 4 0 L をターゲティングする一価の実体が、血小板凝集および / または活性化による有害事象を誘導することなしに C D 4 0 - C D 4 0 L の T 細胞共刺激を阻害するであろうモダリティにあたり得るとする仮説をたてた。

【発明の概要】

【0014】

本発明は、従来技術のアミノ酸配列および抗体と比較して、(例えば、調製の改善された容易さ、良好な安定性、および / または品物の縮減されたコストなどの) 他の有利な特性に加えて、改善された予防、治療、および / または薬理学的特性を有する C D 4 0 L に対するポリペプチドを提供することに取りかかった。

【0015】

非従来のスクリーニング、キャラクタリゼーション、およびコンビナトリアル戦略に基づいて、本発明者は、意外なことに、スタンドインの免疫グロブリン単一可変ドメイン (I S V D) がインビボの有効性研究およびインビトロの安全性実験において格別な性能であるということを観察した。

【0016】

その上に、本発明者は、ベンチマーク C D P 7 6 5 7 よりも高性能であるのみならず、この性能を半減期延長後にもまた保持するように、I S V D を作り替えることができた。他方で、本発明の I S V D は従来技術の抗体よりも有意に安全であることもまた実証された。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

従って、本発明は、C D 4 0 L を標的とするおよび／またはそれに特異的に結合し得る（本明細書において定義される通り）ポリペプチドに関する。

【 0 0 1 8 】

特に、本発明は、C D 4 0 L に特異的に結合する少なくとも１つの免疫グロブリン単一可変ドメイン（I S V D）を含むポリペプチドに関し、C D 4 0 L への結合はC D 4 0 L の活性を調節する。

【 0 0 1 9 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D 4 0 L に特異的に結合する前期 I S V D は本質的に４つのフレームワーク領域（それぞれ F 1 から F R 4）と３つの相補性決定領域（それぞれ C D R 1 から C D R 3）とからなり、

（ i ） C D R 1 は、

配列番号 3 3、6 1、4 0、および 6 8；ならびに

1、2、または３個のアミノ酸の違いを配列番号 3 3、4 0、6 1、または 6 8 に対して有するアミノ酸配列、

からなる群から選ばれ；

（ i i ） C D R 2 は、

配列番号 3 5、6 3、4 2、および 7 0；ならびに

1、2、または３個のアミノ酸の違いを配列番号 3 5、4 2、6 3、または 7 0 に対して有するアミノ酸配列、

からなる群から選ばれ；

（ i i i ） C D R 3 は、

配列番号 3 7、6 5、4 4、および 7 2；ならびに

1、2、3、または４個のアミノ酸の違いを配列番号 3 7、6 5、4 4、または 7 2 に対して有するアミノ酸配列、

からなる群から選ばれる；

【 0 0 2 0 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 1 は、

（ a ）配列番号 6 1；ならびに

（ b ）1、2、または３個のアミノ酸の違いを配列番号 6 1 に対して有し、

- 位置 1 においては G が E もしくは R に変化しており；
- 位置 2 においては R が H もしくは G に変化しており；
- 位置 3 においては T が I、A、S、もしくは P に変化しており；
- 位置 4 においては P が S に変化しており；
- 位置 5 においては L が P に変化しており；
- 位置 6 においては N が S、D、もしくは I に変化しており；
- 位置 7 においては Y が H に変化しており；
- 位置 8 においては H が N に変化しており；
- 位置 9 においては M が K、T、もしくは V に変化しており；および／または
- 位置 1 0 においては A が G、S、もしくは T に変化している、

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 2 1 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 2 は、

（ a ）配列番号 6 3；ならびに

（ b ）1、2、または３個のアミノ酸の違いを配列番号 6 3 に対して有し、

- 位置 1 においては A が G に変化しており；
- 位置 2 においては I が V に変化しており；
- 位置 4 においては S が N、R、もしくは G に変化しており；
- 位置 6 においては L が I に変化しており；

- 位置 7 においては G が S もしくは D に変化しており；
 - 位置 8 においては S が G、I、もしくは F に変化しており；および／または
 - 位置 9 においては T が P もしくは S に変化している、
- アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 3 は、

(a) 配列番号 6 5 ；ならびに

(b) 1、2、3、または 4 個のアミノ酸の違いを配列番号 6 5 に対して有し、

- 位置 1 においては R が Q もしくは L に変化しており；
- 位置 2 においては E が D もしくは K に変化しており；
- 位置 3 においては T が S、M、A、もしくは K に変化しており；
- 位置 4 においては T が I、S、A、もしくは R に変化しており；
- 位置 5 においては H が Y もしくは N に変化しており；
- 位置 6 においては Y が I、H、もしくは N に変化しており；
- 位置 7 においては S が T、G、N、もしくは I に変化しており；
- 位置 8 においては T が I もしくは A に変化しており；
- 位置 9 においては S が N もしくは R に変化しており；
- 位置 1 0 においては D が A に変化しており；

10

- 位置 1 1 においては R が S もしくは G に変化しており；
- 位置 1 3 においては N が D、Y、もしくは S に変化しており；
- 位置 1 4 においては E が V、A、D、もしくは N に変化しており；
- 位置 1 5 においては M が I、V、K、もしくは T に変化しており；
- 位置 1 6 においては R が K、S、W、M、G、もしくは T に変化しており；
- 位置 1 7 においては H が N、L、Q、R、もしくは D に変化しており；
- 位置 1 9 においては D が N に変化しており；および／または
- 位置 2 0 においては Y が H、F、もしくは N に変化している、

20

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 2 3 】

30

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、

- C D R 1 は配列番号 3 3 であり、C D R 2 は配列番号 3 5 であり、C D R 3 は配列番号 3 7 であるか；または

- C D R 1 は配列番号 6 1 であり、C D R 2 は配列番号 6 3 であり、C D R 3 は配列番号 6 5 である。

【 0 0 2 4 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記 I S V D は配列番号 8 または配列番号 6 である。

【 0 0 2 5 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 1 は、

40

(a) 配列番号 4 0 ；ならびに

(b) 1、2、または 3 個のアミノ酸の違いを配列番号 4 0 に対して有し、

- 位置 3 においては T が S、N、A、もしくは I に変化しており；
- 位置 4 においては L が Q、S、M、もしくは G に変化しており；
- 位置 8 においては A が N もしくは V に変化しており；
- 位置 9 においては I が L もしくは V に変化しており；および／または
- 位置 1 0 においては G が A に変化している、

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 2 6 】

50

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチド 8 に関し、C D R 2 は、

(a) 配列番号 4 2 ; ならびに

(b) 1、2、または 3 個のアミノ酸の違いを配列番号 4 2 に対して有し、

- 位置 2 においては I が V に変化しており ;
- 位置 3 においては S が G に変化しており ;
- 位置 5 においては E が G に変化しており ;
- 位置 6 においては G が S に変化しており ;
- 位置 7 においては S が G、N、T、もしくは I に変化しており ;
- 位置 8 においては T が A、P、I、もしくは S に変化しており ; および / または
- 位置 9 においては S が I、R、もしくは G に変化している、

10

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 2 7 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 3 は、

(a) 配列番号 4 4 ; ならびに

(b) 1、2、3、または 4 個のアミノ酸の違いを配列番号 4 4 に対して有し、

- 位置 4 においては R が S に変化しており ;
- 位置 7 においては L が F、M、もしくは W に変化しており ;
- 位置 8 においては G が D、A、もしくは S に変化しており ;
- 位置 9 においては S が G、N、もしくは R に変化しており ;
- 位置 1 0 においては S が G、N、T、もしくは R に変化しており ;
- 位置 1 2 においては D が G、N、E、もしくは V に変化しており ;
- 位置 1 3 においては T が N もしくは A に変化しており ;
- 位置 1 4 においては Q が H、K、L、もしくは R に変化しており ;
- 位置 1 5 においては S が P もしくは T に変化しており ;
- 位置 1 6 においては H が N もしくは Y に変化しており ;
- 位置 1 7 においては Q が L、R、もしくは H に変化しており ;
- 位置 1 8 においては Y が F に変化しており ;
- 位置 1 9 においては D が G に変化しており ; および / または
- 位置 2 0 においては Y が F もしくは N に変化している、

20

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 2 8 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 1 は配列番号 4 0 であり、C D R 2 は配列番号 4 2 であり、C D R 3 は配列番号 4 4 である。

【 0 0 2 9 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記 I S V D は配列番号 7 または配列番号 3 である。

【 0 0 3 0 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは C D 4 0 L に結合し、 $1 \text{ E}^{-0.7} \text{ M}$ および $1 \text{ E}^{-1.3} \text{ M}$ の間の、例えば $1 \text{ E}^{-0.8} \text{ M}$ および $1 \text{ E}^{-1.2} \text{ M}$ の間の、好ましくは多くても $1 \text{ E}^{-0.7} \text{ M}$ 、好ましくは $1 \text{ E}^{-0.8} \text{ M}$ もしくは $1 \text{ E}^{-0.9} \text{ M}$ よりも低い、またはさらには $1 \text{ E}^{-1.0} \text{ M}$ よりも低い、例えば $5 \text{ E}^{-1.1} \text{ M}$ 、 $4 \text{ E}^{-1.1} \text{ M}$ 、 $3 \text{ E}^{-1.1} \text{ M}$ 、 $2 \text{ E}^{-1.1} \text{ M}$ 、 $1.7 \text{ E}^{-1.1} \text{ M}$ 、 $1 \text{ E}^{-1.1}$ 、またはさらには $5 \text{ E}^{-1.2} \text{ M}$ 、 $4 \text{ E}^{-1.2} \text{ M}$ 、 $3 \text{ E}^{-1.2} \text{ M}$ 、 $1 \text{ E}^{-1.2} \text{ M}$ という K D を有し、例えば KinExA によって決定される。

40

【 0 0 3 1 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは C D 4 0 L に結合し、 $1 \text{ E}^{-0.7} \text{ M}$ および $1 \text{ E}^{-1.2} \text{ M}$ の間の、例えば $1 \text{ E}^{-0.8} \text{ M}$ および $1 \text{ E}^{-1.1} \text{ M}$ の間の I C ₅₀ を有し、例えば B 細胞増殖アッセイによって決定または B 細胞シグナル

50

伝達アッセイによって決定される。

【0032】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはCD40Lに結合し、多くても 1×10^{-7} M、好ましくは 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、または 5×10^{-10} M、 4×10^{-10} M、 3×10^{-10} M、 2×10^{-10} M、例えば 1×10^{-10} MというIC₅₀を有する。

【0033】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはCD40Lに結合し、 5×10^{-4} (s⁻¹)未満のoff-rateを有し、例えばSPRによって決定される。

【0034】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記CD40Lは好ましくはヒトCD40L、好ましくは配列番号18である。

【0035】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはCD40Lの活性に拮抗する。

【0036】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、少なくとも20%、例えば少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはさらにはより多くのCD40へのCD40Lの結合をブロックし、これは例えばリガンド競合、B細胞活性化アッセイ、AlphaScreen、または競合的結合アッセイ、例えば競合ELISAもしくは競合FACS)によって決定される。

【0037】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、CD80およびCD86などのT細胞共刺激分子ならびに/またはIL12などの免疫刺激性分子のCD40によって媒介される誘導に拮抗する。

【0038】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはB細胞活性化を阻害する。

【0039】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、ジャーカットT細胞におけるJNKリン酸化を実質的に誘導しないか、または抗CD3抗体によって共刺激されたジャーカットT細胞によるIFN 分泌を実質的に誘導しない。

【0040】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、例えばTT-IGアッセイによって決定されるB細胞活性化を阻害する。

【0041】

本発明は、さらに、血清アルブミンに結合するISVD (ALBナノボディ)を含む、本明細書に記載されるポリペプチドにもまた関する。

【0042】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、血清アルブミンに結合する前記ISVDは本質的に4つのフレームワーク領域(それぞれFR1からFR4)と3つの相補性決定領域(それぞれCDR1からCDR3)とからなり、CDR1は配列番号74であり、CDR2は配列番号75であり、CDR1は配列番号76である。

【0043】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、血清アルブミンに結合する前記ISVDは、ALB135(配列番号15)、ALB129(配列番号13)、ALB8(配列番号11)、ALB23(配列番号12)、およびALB132(配列番号14)からなる群から選ばれる。

【0044】

10

20

30

40

50

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D 4 0 L に特異的に結合する前記 I S V D および血清アルブミンに結合する前記 I S V D は、直接的に互いにリンクまたはリンカーを介してリンクされる。

【 0 0 4 5 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記リンカーは、配列番号 1 8 ~ 2 9 および 7 7 からなる群、好ましくは配列番号 2 1 から選ばれる。

【 0 0 4 6 】

本発明は、さらに C 末端延長を含む本明細書に記載されるポリペプチドにもまた関する。

【 0 0 4 7 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記 C 末端延長は C 末端延長 (X) n であり、式中、n は 1 から 1 0、好ましくは 1 から 5、例えば 1、2、3、4、または 5 であり (好ましくは 1 または 2、例えば 1) ; 各 X は独立して選ばれる (好ましくは天然に存在する) アミノ酸残基であり、好ましくは、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、ロイシン (L)、またはイソロイシン (I) からなる群から独立して選ばれる。

【 0 0 4 8 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、さらに、本明細書に記載される血清アルブミンに結合する I S V D と、本明細書に記載されるリンカーと、本明細書に記載される C 末端延長とを含む。

【 0 0 4 9 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % の配列同一性を C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 (配列番号 9) または C 0 1 0 0 0 3 3 1 3 (配列番号 7 8) に対して有する。

【 0 0 5 0 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは初代内皮細胞の活性化を実質的に誘導しない。

【 0 0 5 1 】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、例えば血小板活性化アッセイまたは血小板凝集アッセイによって決定される血小板活性化または血小板凝集を実質的に誘導しない。

【 0 0 5 2 】

本発明は、例えば C D 4 0 L / C D 4 0 によって媒介される経路の不適切な活性化が関わる個体の疾患または障害の処置すること、防止の方法にもまた関し、方法は、本発明のポリペプチドを前記疾患または障害の症状を処置または防止するために有効な量で前記個体に投与することを含む。

【 0 0 5 3 】

また、本発明は本明細書に記載される方法に関し、前記疾患または障害は、全身性エリテマトーデス (S L E)、ループス腎炎、免疫性血小板減少性紫斑病 (I T P)、移植拒絶、クローン病、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患 (I B D)、大腸炎、喘息 / アレルギー、動脈硬化症、重症筋無力症、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ、強直性脊椎炎、冠動脈性心疾患、1 型糖尿病、および組換え医薬品、例えば血友病における第 V I I 因子に対する免疫応答を含む。

【 0 0 5 4 】

本発明は、医薬としての使用のための、本明細書に記載されるポリペプチドにもまた関する。

【 0 0 5 5 】

本発明は、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス (S L E)、ループス腎炎、免疫性血小板減少性紫斑病 (I T P)、移植拒絶、クローン病、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患 (I B D)、大腸炎、喘息 / アレルギー、動脈硬化症、重症筋無力症、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ、強直性脊椎炎、冠動脈性心疾患、1 型糖尿病、および組換え医薬

10

20

30

40

50

品、例えば血友病における第ⅤⅠⅠ因子に対する免疫応答の症状を処置または防止することへの使用のための、本明細書に記載されるポリペプチドにもまた関する。

【0056】

また、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、ポリペプチド46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つのCD40Lへの結合を交差ブロックし、ならびに/またはポリペプチド46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つによってCD40Lへの結合を交差ブロックされる。

10

【0057】

本発明は、46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つによるCD40Lへの結合を交差ブロックするポリペプチドにもまた関し、ならびに/または46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つによってCD40Lへの結合を交差ブロックされ、前記ポリペプチドは、CD40Lに特異的に結合する少なくとも1つのVH、V、dAb、免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISVD）を含み、CD40Lへの結合はCD40Lの活性を調節する。

【図面の簡単な説明】

20

【0058】

【図1】96個の血清サンプルが、S112K変異なしの参照ナノボディ（参照A、配列番号16。図1においては（1）として指示されている）と比較してS112K変異を有する代表的なナノボディ（参照A + S112K + C末端アラニン。図1においては（2）として指示されている）に結合することについて試験されたときの、例6.9.3で得られたデータ点を示すプロット。

【図2】129個の血清サンプルが、V89T変異なしの参照ナノボディ（参照A、配列番号16。図2においては（1）として指示されている）と比較してV89T変異を有する代表的なナノボディ（参照A + L11V + V89T + C末端アラニン。図2においては（2）として指示されている）に結合することについて試験されたときの、例6.9.3で得られたデータ点を示すプロット；

30

【図3】血小板活性化データHV

【図4】血小板活性化データSLE

【図5】血小板凝集データHV

【図6】血小板凝集データSLE

【図7】抗CD40LナノボディはTT-IgG応答を損なわせる

【図8】指示されている濃度の異なる化合物によるヒトPBMC刺激による、IL-6誘導。

【発明を実施するための形態】

【0059】

40

安全で有効な抗CD40L医薬の必要がまだある。それらの医薬は、種々の頻繁に対立する要件に沿うべきである。フォーマットは広く適用可能であるべきである。特に、フォーマットは、好ましくは広範囲の患者に、および好ましくは広範囲のCD40Lによって媒介される障害に対してもまた有用であるべきである。フォーマットは好ましくは安全であるべきであり、いずれかの血栓塞栓事象を誘導するべきではない。加えて、フォーマットは好ましくは患者に優しくあるべきである。例えば、フォーマットは、フォーマットが腎クリアランスによって投与後即座に除去されないような延長した半減期を有するべきである。しかしながら、半減期を延長することは、好ましくはオフターゲット活性および副作用を導入、TEを誘導、または有効性を限定するべきではない。

【0060】

50

本発明はこれらの要件の少なくとも1つを実現する。

【0061】

非従来のスクリーニング、キャラクタリゼーション、およびコンビナトリアル戦略に基づいて、本発明者は、驚くべきことに、スタンドインの免疫グロブリン単一可変ドメイン (ISVD) がインビボの有効性研究およびインビトロの安全性実験において格別な性能であるということを観察した。

【0062】

その上に、本発明者は、ベンチマークCDP7657よりも高性能であるのみならず、この性能を半減期延長後にもまた保持するように、ISVDを作り替えることができた。他方で、本発明のISVDは従来技術の抗体よりも有意に安全であることもまた実証された。

10

【0063】

本発明は、従来技術のアミノ酸配列および抗体と比較して、より安全なプロフィールを包含する改善された予防、治療、および/または薬理学的特性を有するCD40Lに拮抗するポリペプチドを提供する。

【0064】

従って、本発明は、CD40Lを標的とするおよび/またはそれに特異的に結合 (本明細書において定義される通り) およびその活性を調節し得るポリペプチド、具体的にはCD40Lに特異的に結合する少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメイン (ISVD) を含むポリペプチドに関し、CD40Lへの結合はCD40Lの活性を調節する。

20

【0065】

別様に指示または定義されない限り、用いられる全ての用語は当分野におけるそれらの通常の意味を有し、これは当業者には明瞭であろう。例えば、標準的なハンドブック、例えばSambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd. Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、F. Ausubel et al. (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 et al. (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2nd edition) University of California Press, Berkeley, CA, 1981); Roitt et al. (Immunology (6th. Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh, 2001)、Roitt et al. (Roitt's Essential Immunology (10th Ed.) Blackwell Publishing, UK, 2001)、およびJaneway et al. (Immunobiology (6th Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York, 2005)、ならびに本明細書において引用される一般的な背景技術の参照がなされる。

30

【0066】

別様に指示されない限り、具体的に詳細に記載されない全ての方法、ステップ、技術、および操作は、当業者には明瞭であろう自体公知の様式で行われ得、行われた。再び、例えば、標準的なハンドブックおよび本明細書において挙げられる一般的な背景技術、ならびにそこに引用されているさらなる参照; ならびに例えば次の総説Presta (Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56, 2006)、Levin and Weiss (Mol. Biosyst. 2(1): 49-57, 2006)、Irving et al. (J. Immunol. Methods 248(1-2): 31-45, 2001)、Schmitz et al. (Placenta 21 Suppl. A: S106-12, 2000)、Gonzales et al. (Tumour Biol. 26(1): 31-43, 2005)の参照がなされる。これらは、蛋白質工学の技術、例えば、免疫グロブリンなどの蛋白質の特異性および他の所望の特性を改善するための親和性成熟および他の技術を記載している。

40

【0067】

本明細書において用いられる単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明瞭に別様に指示しない限り複数の参照を包含するということに注意しなければならない。それゆえに、例えば、「試薬」の参照はかかる異なる試薬の1つ以上を包含し、「方法」の参照は当業者に公知の同等のステップおよび方法の参照を包含し、それらは改変または本明細

50

書に記載される方法と置換され得る。

【0068】

別様に指示されない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、一連の中のあらゆる要素を言うとして理解されるべきである。当業者は、本明細書に記載される本発明の具体的な態様の多くの均等物を認識するか、またはせいぜい通例の実験作業を用いて確かめることができるであろう。かかる均等物は本発明によって包摂されることを意図される。

【0069】

用語「および/または」は、本明細書においてどこで用いられても、「および」、「または」、および「前記用語によって繋がれている要素の全てまたはいずれかの他の組み合わせ」の意味を包含する。

【0070】

本明細書において用いられる用語「約」または「およそ」は、所与の値または範囲から20%以内、好ましくは15%以内、より好ましくは10%以内、最も好ましくは5%以内を意味する。

【0071】

本明細書および次の請求項においては、文脈が別様に要求しない限り、単語「含む (comprise)」、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などのバリエーションは、記されている物もしくはステップまたは物もしくはステップの群の包含を含意するが、いずれかの他の物もしくはステップまたは物もしくはステップの群の排除を含意しないと理解される。本明細書において用いられるときに、用語「含む」は、用語「含有する」もしくは「包含する」によって、または本明細書において用いられるときに場合によっては用語「有する」によって置換され得る。

【0072】

本明細書において（例えば、「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「V_HH配列」、または「蛋白質配列」のような用語に）用いられる用語「配列」は、文脈がより限定された解釈を要求しない限り、該当するアミノ酸配列、およびそれをコードする核酸またはヌクレオチド配列両方を包含すると一般的に理解されるべきである。

【0073】

アミノ酸残基は、標準的な3文字または1文字アミノ酸コードに従って指示される。WO 008 / 020079の48ページの表A-2の参照がなされる。

【0074】

核酸またはアミノ酸は、それがソースまたは媒体中において通常結びついている少なくとも1つの他の成分、例えば別の核酸、別の蛋白質/ポリペプチド、別の生物学的成分、もしくは高分子、または少なくとも1つのコンタミネント、不純物、もしくは副成分から分離されているときに、例えばそれが得られた反応媒体または培養媒体と比較して「（本質的に）単離された（形態）（で）」あると考えられる。具体的には、核酸またはアミノ酸は、それが少なくとも2倍、特に少なくとも10倍、より具体的には少なくとも100倍、最大1000倍以上精製されたときに、「（本質的に）単離されている」と考えられる。好ましくは、「（本質的に）単離された形態で」ある核酸またはアミノ酸は本質的に均質であり、これは好適な技術、例えば好適なクロマトグラフィー技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて決定される。

【0075】

ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、それぞれ別のヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列を「含む」または別のヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列「から本質的になる」と言われるときに、これは、後者のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列がそれぞれ第1の挙げられたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列中に組み込まれているということを意味し得るが、より通常には、これは、第1の挙げられたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列がその配列中にそれぞれ後者の配列と同じヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有するそれぞれヌクレオチドまたはアミノ酸残基のストレッチを含むということを一般

10

20

30

40

50

的に意味し、第1の挙げられた配列が実際にどのように生成されたかまたは得られたか（これは、例えば本明細書に記載されるいずれかの好適な方法によってであり得る）にはかかわらない。限定しない例として、本発明のポリペプチドが免疫グロブリン単一可変ドメインを含むと言われるときには、これは、前記免疫グロブリン単一可変ドメイン配列が本発明のポリペプチドの配列中に組み込まれているということを意味し得るが、より通常には、これは、本発明のポリペプチドがその配列中に免疫グロブリン単一可変ドメインの配列を含有するということを一般的に意味し、本発明の前記ポリペプチドがどのように生成されたかまたは得られたかにはかかわらない。また、核酸またはヌクレオチド配列が別のヌクレオチド配列を含むと言われるときには、第1の挙げられた核酸またはヌクレオチド配列は、好ましくは、それが発現産物（例えばポリペプチド）に発現されるときに、後者のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列が前記発現産物の一部を形成する（換言すると、後者のヌクレオチド配列が、第1の挙げられたより大きい核酸またはヌクレオチド配列と同じ読み枠である）ようなものである。

10

【0076】

「本質的になる」によって、本発明の方法に用いられる免疫グロブリン単一可変ドメインが、本発明のポリペプチドと厳密に同じであるか、または限定された数のアミノ酸残基、例えば1～20アミノ酸残基、例えば1～10アミノ酸残基、好ましくは1～6アミノ酸残基、例えば1、2、3、4、5、もしくは6アミノ酸残基が免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ末端、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両方に追加された本発明のポリペプチドに対応するかどちらかであるということが意味される。

20

【0077】

2つ以上のヌクレオチド配列を比較する目的のためには、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間の「配列同一性」のパーセンテージは、[第2のヌクレオチド配列中の対応する位置のヌクレオチドと同一である第1のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの数]を[第1のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの総数]によって除算することと、[100%]によって乗算することによって計算され得、第1のヌクレオチド配列と比較して第2のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの各欠失、挿入、置換、または追加は、単一のヌクレオチド（位置）の違いとして考えられる。代替的には、2つ以上のヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、配列アラインメントのための公知のコンピュータアルゴリズム、例えばNCBI Blast v2.0を用いて、標準的な設定を用いて計算され得る。配列同一性の程度を決定するためのいくつかの他の技術、コンピュータアルゴリズム、および設定は、例えばWO04/037999、EP0967284、EP1085089、WO00/55318、WO00/78972、WO98/49185、およびGB2357768に記載されている。通常は、本明細書において上で概述した計算方法に従って2つのヌクレオチド配列間の「配列同一性」のパーセンテージを決定する目的のためには、最多数のヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を「第1の」ヌクレオチド配列としてとり、別のヌクレオチド配列を「第2の」ヌクレオチド配列としてとる。

30

【0078】

2つ以上のアミノ酸配列を比較する目的のためには、第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列との間の「配列同一性」（本明細書においては「アミノ酸同一性」ともまた言われる）のパーセンテージは、[第2のアミノ酸配列中の対応する位置のアミノ酸残基と同一である第1のアミノ酸配列中のアミノ酸残基の数]を[第1のアミノ酸配列中のアミノ酸残基の総数]によって除算することと、[100%]によって乗算することによって計算され得、第1のアミノ酸配列と比較して第2のアミノ酸配列中のアミノ酸残基の各欠失、挿入、置換、または追加は、単一のアミノ酸残基（位置）の違いとして、すなわち本明細書において定義される「アミノ酸の違い」として考えられる。代替的には、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度は、公知のコンピュータアルゴリズム、例えばヌクレオチド配列の配列同一性の程度を決定することについて上で挙げられたものを用いて、再び標準的な設定を用いて計算され得る。通常は、本明細書において上で概述した計算方法に従って2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」のパーセンテージを決定する目的のために

40

50

は、最多数のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を「第1の」アミノ酸配列としてとり、別のアミノ酸配列を「第2の」アミノ酸配列としてとる。

【0079】

また、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を決定する際に、当業者はいわゆる「保存的」アミノ酸置換を考慮に入れ得、これは一般的にはアミノ酸残基が類似の化学構造の別のアミノ酸残基によって置き換えられたアミノ酸置換として記載され得、これはポリペプチドの機能、活性、または他の生物学的特性に本質的に影響を有さないかまたは僅かしか有さない。かかる保存的アミノ酸置換は当分野においては例えばWO 04 / 037999、GB 335768、WO 98 / 49185、WO 00 / 46383、およびWO 01 / 09300から周知であり；かかる置換の（好ましい）型および／または組み合わせは、WO 04 / 037999およびWO 98 / 49185ならびにそこに引用されているさらなる参照からの対応する教示に基づいて選択され得る。

10

【0080】

好ましくは、かかる保存的置換は、次の群（a）～（e）の中の1つのアミノ酸が同じ群の中の別のアミノ酸残基によって置換された置換である：（a）小型の脂肪族の非極性または低極性残基：Ala、Ser、Thr、Pro、およびGly；（b）極性の負荷電残基およびそれらの（非荷電）アミド：Asp、Asn、Glu、およびGln；（c）極性の正荷電残基：His、Arg、およびLys；（d）大型の脂肪族の非極性残基：Met、Leu、Ile、Val、およびCys；ならびに（e）芳香族残基：Phe、Tyr、およびTrp。特に好ましい保存的置換は次の通りである：AlaからGlyもしくはSer；ArgからLys；AsnからGlnもしくはHis；AspからGlu；CysからSer；GlnからAsn；GluからAsp；GlyからAlaもしくはPro；HisからAsnもしくはGln；IleからLeuもしくはVal；LeuからIleもしくはVal；LysからArg、Gln、もしくはGlu；MetからLeu、Tyr、もしくはIle；PheからMet、Leu、もしくはTyr；SerからThr；ThrからSer；TrpからTyr；TyrからTrp；および／またはPheからVal、Ile、もしくはLeu。

20

【0081】

本明細書に記載されるポリペプチドに適用されるいずれかのアミノ酸置換は、Schulz et al. ("Principles of Protein Structure", Springer-Verlag, 1978)によって開発された異なる種の相同蛋白質間におけるアミノ酸バリエーションの頻度の分析、Chou and Fasman (Biochemistry 13: 211, 1974; Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978)によって開発された構造形成ポテンシャルの分析、ならびにEisenberg et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984)、Kyte and Doolittle (J. Molec. Biol. 157: 105-132, 1981)およびGoldman et al. (Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986)によって開発された蛋白質の疎水性パターンの分析にもまた基づき得、全て参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。ナノボディの一次、二次、および三次構造の情報は、本明細書における記載、および上で引用されている一般的な背景技術において与えられている。また、この目的のためには、ラマからのV_{HH}ドメインの結晶構造は、例えばDesmyter et al. (Nature Structural Biology, 3: 803, 1996)、Spinelli et al. (Natural Structural Biology, 3: 752-757, 1996)、およびDecanniere et al. (Structure, 7 (4): 361, 1999)によって与えられる。従来のV_HドメインにおいてV_H / V_L境界面を形成するアミノ酸残基のいくつかとそれらの位置における潜在的なラクダ化置換とについてのさらなる情報は、上で引用されている従来技術に見いだされ得る。

30

40

【0082】

アミノ酸配列同士および核酸配列同士は、それらが100%の配列同一性（本明細書において定義される通り）をそれらの全長に渡って有する場合には「厳密に同じ」と言われる。

【0083】

ある態様において、CD40Lに特異的に結合する本発明のポリペプチドは、少なくとも

50

も 80%、90%、95%、または 100% の配列同一性を C010003318 (配列番号 9) または C010003313 (配列番号 78) に対して有し、CD40L への結合は CD40L の活性を調節する。

【0084】

2つのアミノ酸配列を比較するときに、用語「アミノ酸の違い」は、第2の配列と比較して、第1の配列のある位置における単一のアミノ酸残基の挿入、欠失、または置換を言う；2つのアミノ酸配列は1つ、2つ、またはより多くのかかるアミノ酸の違いを含有し得るということが理解される。より具体的には、本発明のアミノ酸配列および/またはポリペプチドにおいて、用語「アミノ酸の違い」は、CDR1、CDR2、および/または CDR3 配列のある位置における単一のアミノ酸残基の挿入、欠失、または置換を言う；CDR1 配列は、元々の CDR1 配列、例えば、例えば配列番号 33、61、40、および 68 などの具体的な配列識別子 (配列番号) によって例示される CDR1 配列と比較して1、2、または最大3つのかかるアミノ酸の違いを含有し得；CDR2 は、元々の CDR2 配列、例えば、例えば配列番号 35、63、42、および 70 などの具体的な配列識別子 (配列番号) によって例示される CDR2 配列と比較して1、2、または最大3つのかかるアミノ酸の違いを含有し得、CDR3 配列は、元々の CDR3 配列、例えば、例えば配列番号 37、65、44、および 72 などの具体的な配列識別子 (配列番号) によって例示される CDR3 配列と比較して1、2、3、または最大4つのかかるアミノ酸の違いを含有し得るということが理解される。

【0085】

「アミノ酸の違い」は、1、2、3、もしくは最大4つの置換、欠失、もしくは挿入のいずれか、またはそのいずれかの組み合わせであり得る。それは本発明の ISVD の特性を改善するか、あるいはそれは少なくとも本発明の ISVD の所望の特性または所望の特性のバランスもしくは組み合わせをあまり害さないかどちらかである。これに関して、本発明のもたらされるポリペプチドは、1、2、3、または最大4つの置換、欠失、または挿入なしの1つ以上の CDR 配列を含む CD40L に結合する ISVD を含むポリペプチドと比較して、少なくとも同じ、約同じ、または好ましくはより高い親和性または効力で CD40L に結合するべきである。親和性は、例えば表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定され得、例えば、例において用いられている K_{off} 速度によって表現される。例えば、 IC_{50} によって表現される効力は、例えば例において用いられている B 細胞増殖アッセイまたは B 細胞シグナル伝達アッセイによってなどの当分野において公知のいずれかの好適な方法によって測定され得る。

【0086】

これに関して、CDR のアミノ酸配列は、自体公知の親和性成熟の1つ以上の技術を用いる親和性成熟によって、例えば例の項において用いられているエラープローン PCR によって、元々の CDR アミノ酸配列に由来するアミノ酸配列であり得る。例の項においては、本発明の ISVD の親和性および/または効力が改良され、例えば CDR の単一アミノ酸の違いが 1.8 倍から 5.2 倍改善された $off-rate$ をもたらすということが実証された。CDR のアミノ酸の違いの組み合わせ、例えば 1、2、3、もしくは最大4つの置換、欠失、もしくは挿入、またはそのいずれかの組み合わせは、 $off-rate$ をさらに改善した。

【0087】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは CD40L に結合し、それぞれ 28B02 および 46B03 よりも良好な、例えば少なくとも 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、またはさらにはより多く、例えば 10 倍良好な K_{off} を有し、例えば SPR によって決定される。

【0088】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは CD40L に結合し、多くても $5E^{-04} (s^{-1})$ 、例えば多くても $4E^{-04} (s^{-1})$ 、 $3E^{-04} (s^{-1})$ 、 $2E^{-04} (s^{-1})$ 、 $1E^{-04} (s^{-1})$ 、 $9E^{-05} (s^{-1})$

、 $8 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $7 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $6 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $4 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $3 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $2 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ という K_{off} を有し、例えばSPRによって決定される。

【0089】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはCD40Lに結合し、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ および $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ の間の、例えば $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ および $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ の間の、好ましくは多くても $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、好ましくは $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ よりも低い、またはさらには $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $3 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ よりも低い、例えば $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ の IC_{50} を有し、例えばB細胞増殖アッセイまたはB細胞シグナル伝達アッセイによって決定される。

10

【0090】

例えば、本発明のポリペプチドを発現するために用いられる宿主生物に依存して、かかる挿入、欠失、および/または置換は、翻訳後修飾の1つ以上の部位（例えば1つ以上のグリコシル化部位）が除去されるようなやり方で設計され得、これは当業者の能力内であろう。

【0091】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、CD40Lに特異的に結合する前記ISVDは、本質的に4つのフレームワーク領域（それぞれFR1からFR4）と3つの相補性決定領域（それぞれCDR1からCDR3）とからなり、

(i) CDR1は、

配列番号33、61、40、および68；ならびに

1、2、または3個のアミノ酸の違いを配列番号33、61、40、または68に対して有するアミノ酸配列、

からなる群から選ばれ；

(ii) CDR2は、

配列番号35、63、42、および70；ならびに

1、2、または3個のアミノ酸の違いを配列番号35、63、42、または70に対して有するアミノ酸配列、

からなる群から選ばれ；

(iii) CDR3は、

配列番号37、65、44、および72；ならびに

1、2、3、または4個のアミノ酸の違いを配列番号37、65、44、または72に対して有するアミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【0092】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、CDR1は、

(a) 配列番号40；ならびに

(b) 1、2、または3個のアミノ酸の違いを配列番号40に対して有し、

- 位置3においてはTがS、N、A、もしくはIに変化しており；
- 位置4においてはLがQ、S、M、もしくはGに変化しており；
- 位置8においてはAがNもしくはVに変化しており；
- 位置9においてはIがLもしくはVに変化しており；および/または
- 位置10においてはGがAに変化している、

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【0093】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、CDR2は、

(a) 配列番号42；ならびに

(b) 1、2、または3個のアミノ酸の違いを配列番号42に対して有し、

- 位置2においてはIがVに変化しており；

20

30

40

50

- 位置 3 においては S が G に変化しており；
- 位置 5 においては E が G に変化しており；
- 位置 6 においては G が S に変化しており；
- 位置 7 においては S が G、N、T、もしくは I に変化しており；
- 位置 8 においては T が A、P、I、もしくは S に変化しており；および / または
- 位置 9 においては S が I、R、もしくは G に変化している、

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 9 4 】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 3 は、

10

(a) 配列番号 4 4 ；ならびに

(b) 1、2、3、または 4 個のアミノ酸の違いを配列番号 4 4 に対して有し、

- 位置 4 においては R が S に変化しており；
- 位置 7 においては L が F、M、もしくは W に変化しており；
- 位置 8 においては G が D、A、もしくは S に変化しており；
- 位置 9 においては S が G、N、もしくは R に変化しており；
- 位置 1 0 においては S が G、N、T、もしくは R に変化しており；
- 位置 1 2 においては D が G、N、E、もしくは V に変化しており；
- 位置 1 3 においては T が N もしくは A に変化しており；
- 位置 1 4 においては Q が H、K、L、もしくは R に変化しており；
- 位置 1 5 においては S が P もしくは T に変化しており；
- 位置 1 6 においては H が N もしくは Y に変化しており；
- 位置 1 7 においては Q が L、R、もしくは H に変化しており；
- 位置 1 8 においては Y が F に変化しており；
- 位置 1 9 においては D が G に変化しており；および / または
- 位置 2 0 においては Y が F もしくは N に変化している、

20

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 9 5 】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 1 は、

30

(a) 配列番号 6 1 ；ならびに

(b) 1、2、または 3 個のアミノ酸の違いを配列番号 6 1 に対して有し、

- 位置 1 においては G が E もしくは R に変化しており；
- 位置 2 においては R が H もしくは G に変化しており；
- 位置 3 においては T が I、A、S、もしくは P に変化しており；
- 位置 4 においては P が S に変化しており；
- 位置 5 においては L が P に変化しており；
- 位置 6 においては N が S、D、もしくは I に変化しており；
- 位置 7 においては Y が H に変化しており；
- 位置 8 においては H が N に変化しており；
- 位置 9 においては M が K、T、もしくは V に変化しており；および / または
- 位置 1 0 においては A が G、S、もしくは T に変化している、

40

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【 0 0 9 6 】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、C D R 2 は、

(a) 配列番号 6 3 ；ならびに

(b) 1、2、または 3 個のアミノ酸の違いを配列番号 6 3 に対して有し、

- 位置 1 においては A が G に変化しており；
- 位置 2 においては I が V に変化しており；

50

- 位置 4 においては S が N、R、もしくは G に変化しており；
- 位置 6 においては L が I に変化しており；
- 位置 7 においては G が S もしくは D に変化しており；
- 位置 8 においては S が G、I、もしくは F に変化しており；および／または
- 位置 9 においては T が P もしくは S に変化している、

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【0097】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、CDR3は、

(a) 配列番号 65：ならびに

(b) 1、2、3、または4個のアミノ酸の違いを配列番号 65 に対して有し、

- 位置 1 においては R が Q もしくは L に変化しており；
- 位置 2 においては E が D もしくは K に変化しており；
- 位置 3 においては T が S、M、A、もしくは K に変化しており；
- 位置 4 においては T が I、S、A、もしくは R に変化しており；
- 位置 5 においては H が Y もしくは N に変化しており；
- 位置 6 においては Y が I、H、もしくは N に変化しており；
- 位置 7 においては S が T、G、N、もしくは I に変化しており；
- 位置 8 においては T が I もしくは A に変化しており；
- 位置 9 においては S が N もしくは R に変化しており；
- 位置 10 においては D が A に変化しており；
- 位置 11 においては R が S もしくは G に変化しており；
- 位置 13 においては N が D、Y、もしくは S に変化しており；
- 位置 14 においては E が V、A、D、もしくは N に変化しており；
- 位置 15 においては M が I、V、K、もしくは T に変化しており；
- 位置 16 においては R が K、S、W、M、G、もしくは T に変化しており；
- 位置 17 においては H が N、L、Q、R、もしくは D に変化しており；
- 位置 19 においては D が N に変化しており；および／または
- 位置 20 においては Y が H、F、もしくは N に変化している、

アミノ酸配列、

からなる群から選ばれる。

【0098】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、

- CDR1は配列番号 33 であり、CDR2は配列番号 35 であり、CDR3は配列番号 37 であるか；または

- CDR1は配列番号 61 であり、CDR2は配列番号 63 であり、CDR3は配列番号 65 である。

【0099】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記 ISVDは配列番号 8 または配列番号 6 である。

【0100】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、CDR1は配列番号 40 であり、CDR2は配列番号 42 であり、CDR3は配列番号 44 である。

【0101】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記 ISVDは配列番号 7 または配列番号 3 である。

【0102】

本明細書において用いられる「ナノボディファミリー」、「VHHファミリー」、または「ファミリー」は、同一の長さを有し（すなわち、それらの配列中に同数のアミノ酸を有する）、その位置 8 と位置 106 との間のアミノ酸配列（Kabat付番に従う）が例えば

10

20

30

40

50

85%、90%、95%、またはさらにはより多く、例えば99%などの少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するナノボディおよび/またはVHH配列の群を言う。

【0103】

交換可能に用いられ得る用語「エピトープ」および「抗原決定基」は、本発明の免疫グロブリン、従来の抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、VHH、ナノボディ、および/またはポリペプチドなどの抗原結合分子によって、より具体的には前記分子の抗原結合部位によって認識される、ポリペプチドまたは蛋白質などの高分子の部分と言う。エピトープは免疫グロブリンにとっての最小結合部位を定義し、それゆえに免疫グロブリンの特異性の標的にあたる。

【0104】

エピトープを認識する抗原結合分子（例えば、本発明の免疫グロブリン、従来の抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、および/またはポリペプチド）の部分は、「パラトープ」と呼ばれる。

【0105】

ある種のエピトープ、抗原、または蛋白質（またはその少なくとも1つの部分、断片、またはエピトープ）に「結合」もしくは「特異的に結合」し得る、それに対して「親和性を有する」、および/またはそれに対して「特異性を有する」ポリペプチド（例えば、本発明の免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、または一般的に抗原結合分子もしくはその断片）は、前記エピトープ、抗原、もしくは蛋白質「に対する」もしくは「を標的とする」と言われるか、またはかかるエピトープ、抗原、もしくは蛋白質に関して「結合」分子であるか、または「抗」エピトープ、「抗」抗原、もしくは「抗」蛋白質（例えば「抗」CD40L）であると言われる。

【0106】

親和性は、分子相互作用の強さまたは安定性を示す。普通は、親和性は K_D または解離定数として与えられ、これは $\text{mol}/\text{リットル}$ （または M ）の単位を有する。親和性は会合定数 K_A としてもまた表現され得、これは $1/K_D$ に等しく、 $(\text{mol}/\text{リットル})^{-1}$ （または M^{-1} ）の単位を有する。本明細書において、2つの分子間の相互作用の安定性は、主にそれらの相互作用の K_D 値に換算して表現される；関係 $K_A = 1/K_D$ に鑑みて、分子相互作用の強さをその K_D 値によって規定することが、対応する K_A 値を計算するためにもまた用いられ得るということは当業者には明瞭である。 K_D 値は、熱力学的な意味でもまた分子相互作用の強さをキャラクタリゼーションする。なぜなら、それは周知の関係 $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ （同等に $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$ ）によって結合の自由エネルギーの変化（ DG ）に関係づけられるからであり、式中、 R は気体定数に等しく、 T は絶対温度に等しく、 \ln は自然対数を示す。

【0107】

有意（例えば特異的）と考えられる生物学的相互作用の K_D は、典型的には $10^{-10} M$ （ 0.1 nM ）から $10^{-5} M$ （ 10000 nM ）の範囲である。相互作用が強いほど、その K_D は低い。

【0108】

K_D は、 k_{off} として示される複合体の解離速度定数対 k_{on} として示されるその会合の速度の比としてもまた表現され得る（その結果、 $K_D = k_{off}/k_{on}$ かつ $K_A = k_{on}/k_{off}$ ）。 $off-rate$ の k_{off} は単位 s^{-1} を有する（式中、 s は秒のSI単位表記である）。 $on-rate$ の k_{on} は単位 $M^{-1} s^{-1}$ を有する。 $on-rate$ は $10^2 M^{-1} s^{-1}$ から約 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ の間で変動し得、二分子相互作用では拡散律速の会合速度定数に近づく。 $off-rate$ は関係 $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$ によって所与の分子相互作用の半減期に関係づけられる。 $off-rate$ は $10^{-6} s^{-1}$ （複数日の $t_{1/2}$ を有するほぼ不可逆的な複合体）から $1 s^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 s$ ）の間で変動し得る。

【0109】

測定される K_D は、測定プロセスが、例えば1つの分子のバイオセンサー上のコーティ

10

20

30

40

50

ングに関するアーティファクトによって、関与する分子の固有の結合親和性に何らかに影響する場合に、見かけ上の K_D に対応し得る。見かけ上の K_D は、1つの分子が別の分子に対して1つ超の認識部位を含有する場合にもまた測定され得る。かかる状況において、測定される親和性は2つの分子による相互作用のアビディティによって影響され得る。

【0110】

親和性を評価するために用いられ得る別のアプローチは、Friguet et al. (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985)の2ステップE L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ) 手続きである。この方法は、溶液相結合平衡測定を確立し、プラスチックなどの支持体上への分子の1つの吸着に関するあり得るアーティファクトを回避する。

【0111】

しかしながら、 K_D の正確な測定は極めて労働集約的であり得、帰結として、多くの場合には、見かけ上の K_D 値が決定されて、2つの分子の結合強さを評価する。全ての測定が一貫したやり方でなされる(例えば、アッセイ条件を不変に保つ)限り、見かけ上の K_D 測定は真の K_D の近似として用いられ得るということに注意すべきであり、ゆえに、本文書において、 K_D および見かけ上の K_D は等しい重要性または妥当性で扱われるべきである。

【0112】

最後に、多くの状況において、経験がある科学者は、何らかの参照分子に対して相対的に結合親和性を決定することが便利であると判断し得るということに注意すべきである。例えば、分子AおよびBの間の結合強さを評価するためには、例えば、Bに結合することが既知であり、かつフルオロフォアもしくはクロモフォア基または他の化学的部分、例えばE L I S AもしくはF A C S (蛍光活性化セルソーティング)における容易な検出のためのビオチンもしくは他のフォーマット(蛍光検出のためのフルオロフォア、吸光検出のためのクロモフォア、ストレプトアビジンによって媒介されるE L I S A検出のためのビオチン)によって好適に標識される参照分子Cを用い得る。典型的には、参照分子Cは一定濃度に保たれ、Aの濃度がBの所与の濃度または量に対して変動させられる。結果として、Aの不在下においてCについて測定されるシグナルが半減するAの濃度に対応する IC_{50} 値が得られる。参照分子の K_D である K_{Dref} および参照分子の総濃度 c_{ref} が既知であるならば、相互作用A - Bの見かけ上の K_D は次式から得られ得る： $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref} / K_{Dref})$ 。 $c_{ref} \ll K_{Dref}$ の場合には、 $K_D \approx IC_{50}$ ということに注意。 IC_{50} の測定が、比較される結合剤について(例えば c_{ref} を一定に保つ)一貫したやり方で行われるならば、分子相互作用の強さまたは安定性は IC_{50} によって評価され得、この測定は本書においては K_D または見かけ上の K_D と同等と判断される。

【0113】

抗原または抗原決定基へのI S V Dなどの抗原結合蛋白質の特異的結合は、自体公知のいずれかの好適な様式で決定され得、例えば、スキャッチャード分析および/または競合的結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(R I A)、酵素イムノアッセイ(E I A)、およびサンドイッチ競合アッセイ、ならびに当分野において自体公知のその異なるバリエーション；ならびに本明細書において挙げられる他の技術を包含する。

【0114】

2つの分子間の分子相互作用の親和性は、自体公知の異なる技術、例えば周知の表面プラズモン共鳴(S P R)バイオセンサー技術によって測定され得(例えばOber et al., 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559を見よ)、そこでは1つの分子がバイオセンサーチップ上に固定化され、別の分子が、 k_{on} 、 k_{off} 測定、ゆえに K_D (または K_A) 値を与える流れ条件下において固定化された分子上を通過させられる。例えば、これは周知のBiacore装置を用いて行われ得る(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)。速度論的排除法(KinExA)(Drake et al., 2004, Analytical Biochemistry 328: 35-43)は、結合パートナーの標識なしに溶液中の結合事象を測定し、複合体の解離を速度論的に排除することに基づく。

10

20

30

40

50

【0115】

本発明のポリペプチドは傑出した親和性を有するということが実証された。従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはCD40Lに結合し、 $1 \text{ E}^{-07} \text{ M}$ および $1 \text{ E}^{-13} \text{ M}$ の間の、例えば $1 \text{ E}^{-08} \text{ M}$ および $1 \text{ E}^{-12} \text{ M}$ の間の、好ましくは多くても $1 \text{ E}^{-07} \text{ M}$ 、好ましくは $1 \text{ E}^{-08} \text{ M}$ もしくは $1 \text{ E}^{-09} \text{ M}$ よりも低い、またはさらには $1 \text{ E}^{-10} \text{ M}$ よりも低い、例えば $5 \text{ E}^{-11} \text{ M}$ 、 $4 \text{ E}^{-11} \text{ M}$ 、 $3 \text{ E}^{-11} \text{ M}$ 、 $2 \text{ E}^{-11} \text{ M}$ 、 $1.7 \text{ E}^{-11} \text{ M}$ 、 $1 \text{ E}^{-11} \text{ M}$ 、またはさらには $5 \text{ E}^{-12} \text{ M}$ 、 $4 \text{ E}^{-12} \text{ M}$ 、 $3 \text{ E}^{-12} \text{ M}$ 、 $1 \text{ E}^{-12} \text{ M}$ のKDを有し、例えばKinExAによって決定される。

【0116】

Gyrolab (商標) イムノアッセイシステムは、自動バイオ分析および迅速なサンプルターンアラウンドのためのプラットフォームを提供する (Fraley et al., 2013, Bioanalysis 5: 1765-74)。

【0117】

測定プロセスが、例えば1つの分子のバイオセンサー上のコーティングに関するアーティファクトによって、関与する分子の固有の結合親和性に何らかに影響する場合に、測定されるKDが見かけ上のKDに対応し得るということもまた当業者には明瞭であろう。また、見かけ上のKDは、1つの分子が別の分子について1つ超の認識部位を含有する場合に測定され得る。かかる状況において、測定される親和性は2つの分子による相互作用のアビディティによって影響され得る。

【0118】

用語「特異性」は、WO08/020079の53~56ページのパラグラフn)においてそれに与えられている意味を有し；そこで挙げられているように、具体的な抗原結合分子または抗原結合蛋白質（例えば、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインおよび/またはポリペプチド）が結合し得る抗原または抗原決定基の異なる型の数を言う。抗原結合蛋白質の特異性は、親和性および/またはアビディティに基づいて、WO08/020079の53~56ページ（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されているように決定され得、これは抗原結合分子（例えば、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインおよび/またはポリペプチド）と対応する抗原との間の結合を測定するためのいくつかの好ましい技術をもまた記載している。典型的には、抗原結合蛋白質（例えば、本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインおよび/またはポリペプチド）はそれらの抗原に結合し、 10^{-5} から 10^{-12} モル/リットル以下、好ましくは 10^{-7} から 10^{-12} モル/リットル以下、より好ましくは 10^{-8} から 10^{-12} モル/リットルという解離定数 (KD) を有する（すなわち、 10^5 から 10^{12} リットル/モル以上、好ましくは 10^7 から 10^{12} リットル/モル以上、より好ましくは 10^8 から 10^{12} リットル/モルという会合定数 (KA) を有する）。 10^{-4} mol/l より大きいいずれかのKD値（または 10^4 M^{-1} よりも低いいずれかのKA値）リットル/molは、一般的には、非特異的結合を指示すると考えられる。好ましくは、本発明の一価のポリペプチドは所望の抗原に結合し、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは、例えば10および5 nM以下の間などの10 nM未満の親和性を有する。抗原または抗原決定基への抗原結合蛋白質の特異的結合は、自体公知のいずれかの好適な様式で決定され得、例えば、スキャッチャード分析および/または競合的結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ (EIA)、およびサンドイッチ競合アッセイ、ならびに当分野において自体公知のその異なるバリエーション；ならびに本明細書において挙げられる他の技術を含む。当業者には明瞭であろう通り、WO08/020079の53~56ページに記載されているように、解離定数は実際のまたは見かけ上の解離定数であり得る。解離定数を決定するための方法は当業者には明瞭であろう。例えば、WO08/020079の53~56ページに挙げられている技術を含む。

【0119】

免疫グロブリン単一可変ドメインおよび/またはポリペプチドは、それが第1の抗原に

10

20

30

40

50

8、9、78、79、80、81、または82と競合する競合剤、例えばポリペプチドを決定する方法に関し、本明細書に記載されるポリペプチドは、例えばhCD40L（配列番号1）などのCD40Lへの結合について競合剤ポリペプチドと競合またはそれを交差ブロックし、競合剤のCD40Lへの結合は、本発明のポリペプチドの不在下における競合剤のCD40Lへの結合と比較して、本発明のポリペプチドの存在下においては少なくとも5%、例えば10%、20%、30%、40%、50%、またはさらにはより多く、例えば80%、90%、またはさらには100%縮減される（すなわち所与のアッセイにおいて実質的に検出不能）。競合および交差ブロックは、例えば競合ELISAまたはFACSアッセイなどの当分野において公知のいずれかの手段によって決定され得る。ある側面において、本発明は本発明のポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、ポリペプチド46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つのCD40Lへの結合を交差ブロックし、ならびに/またはポリペプチド46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つによってCD40Lへの結合を交差ブロックされる。

10

【0124】

本発明は、本明細書に記載されるポリペプチド、例えば配列番号3、4、5、6、7、8、9、78、79、80、81、または82と競合する競合剤にもまた関し、競合剤は、CD40Lへの結合について本明細書に記載されるポリペプチドと競合またはそれを交差ブロックし、本発明のポリペプチドのCD40Lへの結合は、前記競合剤の不在下における本発明のポリペプチドによるCD40Lへの結合と比較して、前記競合剤の存在下においては少なくとも5%、例えば10%、20%、30%、40%、50%、またはさらにはより多く、例えば80%、またはさらにはより多く、例えば少なくとも90%、またはさらには100%縮減される（すなわち所与のアッセイにおいて実質的に検出不能）。ある側面において、本発明は、本発明のポリペプチド、例えば46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）によるCD40Lへの結合を交差ブロックするポリペプチドに関し、ならびに/または46B03（配列番号6）、28B02（配列番号3）、C010003290（配列番号8）、およびC010003318（配列番号9）の少なくとも1つによってCD40Lへの結合を交差ブロックされ、前記ポリペプチドは、CD40Lに特異的に結合する少なくとも1つのVH、VL、dAb、免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISVD）を含み、CD40Lへの結合はCD40Lの活性を調節する。

20

30

【0125】

本発明に従って、免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、または他の結合剤が交差ブロックするかまたは交差ブロックする能力があるかどうかを決定するための好適なFACSアッセイが下に記載される。アッセイが、本明細書に記載される免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、または他の結合剤のいずれかに用いられ得るということは理解されるであろう。FACS装置（例えばFACS Canto；Becton Dickinson）は製造者の推奨に合わせて運転される。

40

【0126】

CD40Lに結合することについて（例えば、2つの免疫グロブリン単一可変ドメインおよび/またはナノボディなどの）2つの結合剤間の「（交差）ブロック」または「（交差）競合」を評価するためには、FACS競合実験が、（例えばCHO細胞またはHEK293H細胞などの）ヒトCD40Lを過剰発現する細胞とバックグラウンド細胞株としての親細胞とを用いて行われ得る。異なる検出試薬が用いられ得、例えばモノクローナル抗FLAG（登録商標）M2抗体（Sigma-Aldrich、cat#F1804）、モノクローナル抗C-myc抗体（Sigma-Aldrich、cat#WH0004609M2）、モノクローナル抗HISタグ抗体（Sigma-Aldrich、cat#SAB1305538）を包含し、それぞれは異なって標識される。

50

【 0 1 2 7 】

広範囲のフルオロフォアがフローサイトメトリの標識として用いられ得、当業者に公知である。フルオロフォアまたは単純に「f l u o r」は、典型的には、C D 4 0 Lを認識する抗体（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインおよび/またはナノボディ）に、または検出試薬として用いられる抗体に取り付けられる。（限定することなしに）例えばAlexa Fluor（登録商標）、DyLight（登録商標）、ローダミン、P E、F I T C、およびC y 3にコンジュゲーションされた抗体などの、種々のコンジュゲーション抗体が利用可能である。

【 0 1 2 8 】

ある標的を標的とする免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、または他の結合剤が、本明細書において定義されるように（交差）ブロックする、（交差）ブロックする能力がある、競合的に結合する、または（交差）競合性であるかどうかを決定するための他の方法は、例えばXiao-Chi Jia et al. (Journal of Immunological Methods 288: 91-98, 2004)、Miller et al. (Journal of Immunological Methods 365: 118-125, 2011)、および/または本明細書に記載される方法（例えば例7を見よ）に記載されている。

10

【 0 1 2 9 】

アミノ酸配列は、2つの異なる抗原または抗原決定基（例えば、哺乳動物の2つの異なる種からの血清アルブミン等、例えばヒト血清アルブミンおよびカニクイ（「c y n o」）血清アルブミン等、例えば哺乳動物の異なる種からのC D 4 0 L、例えばヒトC D 4 0 L、c y n o C D 4 0 L、およびラットC D 4 0 L等）について、それがそれらの異なる抗原または抗原決定基に（本明細書において定義される通り）特異的である場合には「交差反応性」とであると言われる。2つの異なる抗原に対する結合親和性は例えば係数2、5、10、50、100、またはさらにはより多くだけ異なり得るが、それがそれらの異なる抗原または抗原決定基に（本明細書において定義される通り）特異的であるならば、アミノ酸配列またはポリペプチドは交差反応性であると考えられ得るということは理解されるであろう。

20

【 0 1 3 0 】

本発明の文脈において、「調節する（modulating）」または「調節する（to modulate）」は、一般的には、好適なインビトロ、細胞、またはインビボアッセイ（例えば本明細書において挙げられるもの）を用いて測定されるC D 4 0 Lの活性を変改することを意味する。特に、「調節する（modulating）」または「調節する（to modulate）」は、（例えば、本明細書において挙げられるものなどの）好適なインビトロ、細胞、またはインビボアッセイを用いて測定して、本発明の免疫グロブリンまたはポリペプチドの存在なしでの同じ条件下の同じアッセイにおけるC D 4 0 Lの活性と比較して少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%もしくは少なくとも25%、例えば少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または90%以上、C D 4 0 Lの活性を縮減もしくは阻害することまたは代替的には活性を増大させることどちらかを意味し得る。

30

【 0 1 3 1 】

「調節する」は、C D 4 0 Lが関わる（あるいは、そのシグナル伝達経路または代謝経路およびそれらの関連する生物学的または生理学的効果などの、その基質（単数もしくは複数）、リガンド（単数もしくは複数）、または経路（単数もしくは複数）が関わる）1つ以上の生物学的または生理学的メカニズム、効果、応答、機能、経路、または活性に関して変化を奏することをもまた意味し得る。再び、当業者には明瞭であろう通り、かかる作用は、いずれかの好適な様式で、および/または自体公知のいずれかの好適な（インビトロおよび通常は細胞またはインビボアッセイ）アッセイ、例えば本明細書または本明細書において引用される従来技術に記載されるアッセイを用いて決定され得る。特に、作用は、意図される生物学的または生理学的活性が、本発明の免疫グロブリン、I S V D、またはポリペプチドの存在なしでの同じ条件下の同じアッセイにおける生物学的または生理

40

50

学的活性と比較してそれぞれ少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%もしくは少なくとも25%、例えば少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または90%以上増大または減少するようなものであり得る。調節には、B細胞および/またはT細胞活性化および/または増殖の縮減および/または阻害が関わり得る。調節には、(望まれない)免疫応答の縮減、阻害、および/または抑制が関わり得る。

【0132】

「CD40L活性」および「CD40Lによる活性」(これらの用語は本明細書において交換可能に用いられる)は、APC上のMHC分子によるT細胞受容体刺激と結びついたAPCの共刺激および活性化、サイトカインの存在下における全ての免疫グロブリンアイソタイプの分泌、B細胞増殖の刺激、B細胞活性化、サイトカイン産生、抗体クラススイッチ、および親和性成熟を包含するが、これに限定されない。例えば、X連鎖高IgM症候群の患者は機能的なCD40をそれらのB細胞上に発現するが、それらの活性化T細胞は不完全なCD40L蛋白質を有し、B細胞を活性化および免疫グロブリンアイソタイプスイッチを誘導するその不能をもたらす(Aruffo et al., 1993 Cell 72:291-300)。

10

【0133】

CD40L活性は他の分子との相互作用によって媒介され得る。「CD40L活性」は、CD40Lと次の分子との間の機能的な相互作用を包含する: CD40(CD40L受容体; 例えばhCD40、配列番号2)、5 1インテグリン、および I 3 / 4 3。例えば、CD40Lはその受容体CD40に結合し、これは種々のAPC、例えばB細胞、マクロファージ、および樹状細胞、ならびに間質細胞、血管内皮細胞、および血小板上に発現されている。このように、CD40L活性は、CD80およびCD86などのT細胞共刺激分子ならびにIL12などの免疫刺激性分子のCD40によって媒介される誘導を包含する。

20

【0134】

本明細書において用いられる用語「活性化する(activate)」、「活性化する(activates)」、および「活性化される(activated)」は、参照に対して相対的に少なくとも10%、例えば少なくとも10%、25%、50%、75%、またはさらには100%以上の、所与の測定可能なCD40L活性の増大を言う。CD40L活性は、活性が、拮抗物質の不在に対して相対的に少なくとも10%、例示的な態様においては少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、またはさらには100%(すなわち、検出可能な活性なし)縮減される場合には、「拮抗される」。例えば、本発明のポリペプチドはいくらかのまたは全てのCD40L活性に拮抗し得る。1つの態様において、本発明のポリペプチドはB細胞増殖を活性化しない。別の態様において、本発明のポリペプチドは、T細胞または樹状細胞(DC)によるサイトカイン分泌を活性化せず、ここで、サイトカインは、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-23、TNF-、およびIFN- からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインである。

30

【0135】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、CD40Lの活性に拮抗することによってCD40Lの活性を調節する。

40

【0136】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、CD40へのCD40Lの結合を好ましくは少なくとも70%、例えば80%、90%、95%、またはさらにはより多くブロックし、これはリガンド競合によって決定/(B細胞活性化FACS; AlphaScreenによって決定される。例の項をもまた見よ)によって決定される。

【0137】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、CD80およびCD86などのT細胞共刺激分子ならびにIL12などの免疫刺激性分子の

50

C D 4 0 によって媒介される誘導に拮抗する。

【 0 1 3 8 】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドはB細胞活性化に拮抗する。

【 0 1 3 9 】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、ジャーカットT細胞におけるJNKリン酸化を実質的に誘導しないか、または抗CD3抗体によって共刺激されたジャーカットT細胞によるIFN- 分泌を実質的に誘導しない。

【 0 1 4 0 】

従って、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、例えばマウスまたはサルにおいて、例えばTT-IgGアッセイによって決定されるB細胞活性化に拮抗する。

【 0 1 4 1 】

ある態様において、本発明のポリペプチドは初代内皮細胞の活性化を実質的に誘導しない。

【 0 1 4 2 】

ある態様において、本発明のポリペプチドは、例えば血小板活性化アッセイまたは血小板凝集アッセイによって決定される血小板活性化または血小板凝集を実質的に誘導しない。

【 0 1 4 3 】

本発明のポリペプチドの本明細書において用いられる用語「効力」は、その特異的な効果が起こるために要求される本発明のポリペプチドの量の関数である。これは、単純にそのポリペプチドのIC₅₀の逆数として測定される。これは、本発明の前記ポリペプチドがCD40Lの活性を調節および/または部分的にもしくは完全に阻害する能力を言う。より具体的には、これは、前記ポリペプチドが本明細書において定義されるCD40L活性の活性を縮減またはさらには全く阻害する能力を言い得る。このように、これは、前記ポリペプチドがT細胞の増殖を阻害および/またはT細胞の活性化を抑制し、インビボのある種の免疫応答の阻害をもたらす能力を言い得る。

【 0 1 4 4 】

効力は、当分野において公知のまたは本明細書に記載されているいずれかの好適なアッセイによって測定され得る。

【 0 1 4 5 】

本発明のポリペプチドの「有効性」は、飽和ポリペプチド濃度における効果そのものの最大の強さを測定する。有効性は、本発明のポリペプチドからの達成可能な最大の応答を指示する。これは、ポリペプチドが所望の（治療）効果を産生する能力を言う。

【 0 1 4 6 】

アミノ酸配列は、文脈文脈に依存して、単一アミノ酸または2つ以上のアミノ酸の非分枝の配列を意味すると解釈される。ヌクレオチド配列は、3ヌクレオチド以上の非分枝の配列を意味すると解釈される。

【 0 1 4 7 】

アミノ酸は、天然に存在する蛋白質中に普通に見いだされるL-アミノ酸であり、普通に当分野において公知である。D-アミノ酸を含有するアミノ酸配列は、この定義によって包摂されることを意図されない。連結部、クロスリンクおよびエンドキャップ、非ペプチジル結合などで改変された配列として発現され得るいずれかのペプチドまたは蛋白質はこの定義によって包摂される。

【 0 1 4 8 】

用語「蛋白質」、「ペプチド」、「蛋白質/ペプチド」、および「ポリペプチド」は本開示においては交換可能に用いられ、それぞれは本開示の目的のためには同じ意味を有する。各用語は、2つ以上のアミノ酸の直鎖から作られた有機化合物を言う。化合物は、10アミノ酸以上；25アミノ酸以上；50アミノ酸以上；100アミノ酸以上、200アミノ酸以上、さらには300アミノ酸以上を有し得る。当業者は、ポリペプチドと蛋白質と

10

20

30

40

50

を区別するアミノ酸数の当分野において認識されるカットオフポイントはないが、ポリペプチドが一般的に蛋白質よりも少数のアミノ酸を含むということと；ポリペプチドは化学合成または組換え法によって作られ得るということと；蛋白質は一般的に当分野において公知の組換え法によってインビトロまたはインビボで作られるということとを理解するであろう。

【0149】

慣例的に、ポリペプチドの一次構造中のアミド結合はアミノ酸が書かれる順序であり、ポリペプチドのアミン末端（N末端）は常に左側であり、酸末端（C末端）は右側である。

【0150】

本発明のポリペプチドは、CD40Lに結合する少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISVD）、および好ましくは血清アルブミンに結合するISVDをもまた含む。本発明のポリペプチドにおいて、ISVD同士は直接的にリンクまたはリンカーを介してリンクされ得る。さらにはより好ましくは、本発明のポリペプチドはC末端延長を含む。下で詳述されるように、C末端延長は、ヒト対象/患者の大部分のサンプル中の既存抗体/因子の結合を本質的に防止/除去する。C末端延長は、最後の（最もC末端に在る）ISVDの最後のアミノ酸残基（通常はセリン残基）のC末端に存在する。

【0151】

相対的な親和性は、ポリペプチド中のISVDの在り処に依存し得る。本発明のポリペプチド中のISVDの順序（配置）が当業者の必要に従って選ばれ得ることは理解されるであろう。個々のISVDの順序、およびポリペプチドがリンカーを含むかどうかは、設計選択肢の問題である。リンカーありまたはなしのいくつかの配置は、他の配置と比較して好ましい結合性質を提供し得る。例えば、本発明のポリペプチド中の第1のISVD（例えばISVD1）および第2のISVD（例えばISVD2）の順序は（N末端からC末端に）：（i）ISVD1（例えばナノボディ1）- [リンカー] - ISVD2（例えばナノボディ2）- [C末端延長]；または（ii）ISVD2（例えばナノボディ2）- [リンカー] - ISVD1（例えばナノボディ1）- [C末端延長]であり得る；（式中、カギ括弧間の部分、すなわちリンカーおよびC末端延長は任意である）。全ての配置は本発明によって包摂される。所望の結合性質を提供するISVDの配置を含有するポリペプチドは、通例のスクリーニングによって、例えば例の項に例示されているように容易に同定され得る。好ましい順序はN末端からC末端に：CD40Lに結合するISVD - [リンカー] - 血清アルブミンに結合するISVD - [C末端延長]であり、式中、カギ括弧間の部分は任意である。

【0152】

本発明のポリペプチドにおいて、2つ以上のISVD、例えばナノボディは、直接的に互いにリンクされ得（例えばWO99/23221に記載されている通り）、および/または互いに1つ以上の好適なリンカーもしくはそのいずれかの組み合わせを介してリンクされ得る。本発明のポリペプチドへの使用のための好適なリンカーは当業者には明瞭であろう。一般的には、アミノ酸配列をリンクするために当分野において用いられるいずれかのリンカーであり得る。好ましくは、前記リンカーは、医薬使用を意図される蛋白質またはポリペプチドを構築することへの使用に好適である。

【0153】

いくつかの特に好ましいリンカーは、抗体断片または抗体ドメインをリンクするために当分野において用いられるリンカーを包含する。それらは、上で引用されている公開に挙げられているリンカー、および例えば、diabodyまたはScFv断片を構築するために当分野において用いられるリンカーを包含する（しかしながら、これに関しては、diabodyおよびScFv断片においては、用いられるリンカー配列は、対応するV_HおよびV_Lドメインが一緒になって完全な抗原結合部位を形成することを許す長さ、柔軟性の程度、および他の特性を有するべきであるが、本発明のポリペプチドに用いられるリンカーの長さまたは柔軟性には特に限定がないということに注意すべきである。なぜなら、ナノボディなどの各ISVDはそれ自体が完全な抗原結合部位を形成するからである）。

【0154】

例えば、リンカーは、好適なアミノ酸またはアミノ酸配列、特に、1および50、好ましくは1および30、例えば1および10アミノ酸残基の間のアミノ酸配列であり得る。かかるアミノ酸配列のいくつかの好ましい例は、例えばWO99/42077に記載されている(glyxser)_z型のgly-serリンカー、例えば(例えば(gly₄ser)₃または(gly₃ser)₂)₃、ならびに本明細書において挙げられるAblynxによる出願に記載されているGS30、GS15、GS9、およびGS7リンカー(例えばWO06/040153およびWO06/122825を見よ)、ならびにヒンジ様領域、例えば天然に存在する重鎖抗体のヒンジ領域または類似の配列(例えばWO94/04678に記載されている)を包含する。好ましいリンカーが表1に示されている。

10

【0155】

いくつかの他の特に好ましいリンカーは、ポリアラニン(例えばAAA)、ならびにリンカーGS30(WO06/122825の配列番号85)およびGS9(WO06/122825の配列番号84)である。好ましい側面において、リンカーは、配列番号18~29および77からなる群、好ましくは配列番号21から選ばれる。

【0156】

用いられるリンカーの長さ、柔軟性の程度、および/または他の特性(これは通常はScFv断片に用いられるリンカーのためであるので、重大ではないが)が、ケモカインまたは他の抗原の1つ以上に対する親和性、特異性、またはアビディティを包含するがこれに限定されない本発明の最終的なポリペプチドの特性に何らかの影響を有し得るということは本発明の範囲内に包摂される。本明細書における開示に基づいて、当業者は、任意にいくつかの限定された通例の実験後に、本発明の具体的なポリペプチドへの使用にとって最適なリンカーを決定できるであろう。

20

【0157】

2つ以上のリンカーが本発明のポリペプチドに用いられるときに、それらのリンカーは同じかまたは異なり得る。再び、本明細書における開示に基づいて、当業者は、任意にいくつかの限定された通例の実験後に、本発明の具体的なポリペプチドへの使用にとって最適なリンカーを決定できるであろう。

【0158】

本発明のポリペプチドにおいて、ISVDはN末端延長によって先行され得る。本発明の文脈において、N末端延長は、少なくとも1つのアミノ酸残基から最大40アミノ酸残基、好ましくは2および30アミノ酸残基の間、例えば、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸残基などの2および20アミノ酸残基の間のアミノ酸配列からなる。N末端延長は、本発明のポリペプチドの第1の(すなわち最もN末端に在る)ISVDの第1の(すなわち、最もN末端に在る、一般的にKabat付番に従ってアミノ酸1として指定される)アミノ酸残基のN末端に存在する。従って、本発明は、N末端延長を含む第1のポリペプチドおよび/または前記第2のポリペプチドに関する。

30

【0159】

後でさらに論じられるように、ISVDはV_{HH}、V_H、またはV_Lドメインに由来し得る。しかしながら、ISVDは、それらが本発明のポリペプチド中においてV_HおよびV_Lドメインの相補的なペアを形成しないように選ばれる。ナノボディ、V_{HH}、およびヒト化V_{HH}は、それらが軽鎖を有さない天然のラクダ抗体に由来するという点で特別であり、実に、これらのドメインはラクダ軽鎖と結びついて相補的なV_{HH}およびV_Lのペアを形成する能力がない。それゆえに、本発明のポリペプチドは相補的なISVDを含まず、および/または例えば相補的なV_H/V_Lペアなどの相補的なISVDペアを形成しない。

40

【0160】

本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、前記リンカーは配列番号18~29および77からなる群から選ばれる。

【0161】

50

本発明に従うポリペプチドはさらなる分子とコンジュゲーションされ得るということもまた企図される。さらなる分子は、直接的にまたは好適な長さのスペーサーを介してポリペプチドにコンジュゲーションされ得る。治療目的のためには、治療エフェクター基、例えば放射性基、すなわち放射性同位体もしくは放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{213}Bi ）を含むかもしくはそれからなる基、毒素、または細胞傷害性基、例えば細胞生育阻害剤とのコンジュゲーションが好適であり得る。別の側面において、本発明のポリペプチドは標識基にカップリングされ得（標識されたポリペプチド）、これはそれから例えば診断目的に用いられ得る。好適な標識基は、放射性同位体（例えば、上で挙げられているもの）または放射性同位体を含む基、放射性核種、蛍光基（例えば、蛍光蛋白質、例えば GFP、RFP など、Alexa-Fluor（登録商標）色素、ローダミン、フルオレセイン、およびその誘導体、例えば FITC、シアニン色素、例えば Cy3（登録商標）および Cy5（登録商標））、酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ）、化学発光基、ビオチニル基、金属粒子（例えば金粒子）、磁性粒子（例えば、マグネタイト（ Fe_3O_4 ）および/またはマグヘマイト（ Fe_2O_3 ）を含むコアを有する）、所定のポリペプチド基などから選択され得る。

10

【0162】

別様に指示されない限り、用語「免疫グロブリン」および「免疫グロブリン配列」は、本明細書において重鎖抗体または従来の4鎖抗体を言うために用いられているかどうかにかかわらず、完全なサイズの抗体、その個々の鎖、ならびにその全ての部分、ドメイン、または断片（抗原結合ドメインまたは断片、例えばそれぞれ V_{HH} ドメインまたは V_H/V_L ドメインを包含するが、これに限定されない）両方を包含する一般的用語として用いられる。

20

【0163】

（ポリペプチドまたは蛋白質の）本明細書において用いられる用語「ドメイン」は、蛋白質の残りからは独立してその三次構造を保持する能力を有するフォールディングした蛋白質構造を言う。一般的に、ドメインは蛋白質の各独特な機能的特性を担い、多くのケースにおいては、蛋白質および/またはドメインの残りの機能喪失なしに追加、除去、または他の蛋白質に移入され得る。

30

【0164】

本明細書において用いられる用語「免疫グロブリンドメイン」は、（例えば、従来の4鎖抗体のもしくは重鎖抗体の鎖などの）抗体鎖の球状領域、または本質的にかかる球状領域からなるポリペプチドを言う。免疫グロブリンドメインは、それらが抗体分子に特徴的な免疫グロブリンフォールドを保持することの特徴とし、これは2つのベータシートに配列した約7つの逆平行ベータストランドの2層のサンドイッチからなり、任意に、保存されたジスルフィド結合によって安定化される。

【0165】

本明細書において用いられる用語「免疫グロブリン可変ドメイン」は、本質的に4つの「フレームワーク領域」からなる免疫グロブリンドメインを意味し、それらは当分野および下の本明細書においてそれぞれ「フレームワーク領域1」または「FR1」；「フレームワーク領域2」または「FR2」；「フレームワーク領域3」または「FR3」；および「フレームワーク領域4」または「FR4」と言われる；これらのフレームワーク領域は3つの「相補性決定領域」または「CDR」によって分断され、それらは当分野および下の本明細書においてそれぞれ「相補性決定領域1」または「CDR1」；「相補性決定領域2」または「CDR2」；および「相補性決定領域3」または「CDR3」と言われる。それゆえに、免疫グロブリン可変ドメインの一般的な構造または配列は次のように指示され得る：FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4。抗原結合部位を保有することによって抗原について抗体に特異性を授けるのは、免疫グロブリン可変ドメインである。

40

50

【 0 1 6 6 】

好ましい C D R が表 A - 2 に示されており、すなわち C D R 1 は配列番号 4 0、4 7、5 4、6 1、6 8、および 3 3 から選ばれ、C D R 2 は配列番号 4 2、4 9、5 6、6 3、7 0、および 3 5 から選ばれ；C D R 3 は配列番号 4 4、5 1、5 8、6 5、7 2、および 3 7 から選ばれる。好ましくは、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 は 1 つのクローンから選ばれ、例えば、

- C D R 1 は配列番号 3 3 であり、C D R 2 は配列番号 3 5 であり、C D R 3 は配列番号 3 7 であるか；

- C D R 1 は配列番号 6 1 であり、C D R 2 は配列番号 6 3 であり、C D R 3 は配列番号 6 5 であるか；

- C D R 1 は配列番号 4 0 であり、C D R 2 は配列番号 4 2 であり、C D R 3 は配列番号 4 4 であるか；

- C D R 1 は配列番号 6 8 であり、C D R 2 は配列番号 7 0 であり、C D R 3 は配列番号 7 2 であるか；

- C D R 1 は配列番号 4 7 であり、C D R 2 は配列番号 4 9 であり、C D R 3 は配列番号 5 1 であるか；または

- C D R 1 は配列番号 5 4 であり、C D R 2 は配列番号 5 6 であり、C D R 3 は配列番号 5 8 である。

【 0 1 6 7 】

「単一可変ドメイン」と交換可能に用いられる用語「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、抗原結合部位が単一の免疫グロブリンドメイン上に存在しかつそれによって形成される分子を定義する。これは、2 つの免疫グロブリンドメイン、特に 2 つの可変ドメインが相互作用して抗原結合部位を形成する「従来の」免疫グロブリンまたはそれらの断片から、免疫グロブリン単一可変ドメインを際立たせている。典型的には、従来の免疫グロブリンにおいては、重鎖可変ドメイン (V_H) と軽鎖可変ドメイン (V_L) とが相互作用して抗原結合部位を形成する。このケースにおいては、V_H および V_L 両方の相補性決定領域 (C D R) が抗原結合部位に寄与するであろう。すなわち、合計で 6 つの C D R が抗原結合部位形成に関わるであろう。

【 0 1 6 8 】

好ましい I S V D が表 A - 1 に示されており、すなわち配列番号 3、4、5、6、7、8、9、7 8、7 9、8 0、8 1、および 8 2、最も好ましくは配列番号 8、6、7、および 3 である。

【 0 1 6 9 】

上の定義に鑑みて、従来の 4 鎖抗体 (例えば、I g G、I g M、I g A、I g D、もしくは I g E 分子；当分野において公知)、または F a b 断片、F (a b ') 2 断片、F v 断片、例えばジスルフィドによってリンクされた F v もしくは s c F v 断片、またはかかる従来の 4 鎖抗体に由来する d i a b o d y (全て当分野において公知) の抗原結合ドメインは、通常は免疫グロブリン単一可変ドメインとは見なされないであろう。なぜなら、これらのケースにおいて、抗原のそれぞれのエピトープへの結合は、1 つの (単一の) 免疫グロブリンドメインによってではなく、軽および重鎖可変ドメインなどの (結びつく) 免疫グロブリンドメインのペアによって、すなわち協同してそれぞれの抗原のエピトープに結合する免疫グロブリンドメインの V_H - V_L ペアによって通常は起こるからである。

【 0 1 7 0 】

対照的に、免疫グロブリン単一可変ドメインは、追加の免疫グロブリン可変ドメインとペアになることなしに抗原のエピトープに特異的に結合する能力がある。免疫グロブリン単一可変ドメインの結合部位は単一の V_HH、V_H、または V_L ドメインによって形成される。ゆえに、免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位はせいぜい 3 つの C D R によって形成される。

【 0 1 7 1 】

このように、単一可変ドメインは、それが単一の抗原結合ユニット (すなわち、単一の

10

20

30

40

50

抗原結合ドメインが、機能的な抗原結合ユニットを形成するために別の可変ドメインと相互作用することを必要としないような、本質的に単一可変ドメインからなる機能的な抗原結合ユニット)を形成する能力がある限り；軽鎖可変ドメイン配列(例えば、 V_L 配列)もしくはその好適な断片；または重鎖可変ドメイン配列(例えば、 V_H 配列もしくは V_{HH} 配列)もしくはその好適な断片であり得る。

【0172】

本発明の1つの態様において、免疫グロブリン単一可変ドメインは重鎖可変ドメイン配列(例えば V_H 配列)である；より具体的には、免疫グロブリン単一可変ドメインは、従来の4鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列、または重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列であり得る。

10

【0173】

例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインは、(単一)ドメイン抗体(もしくは(単一)ドメイン抗体としての使用に好適であるアミノ酸)、「dAb」もしくはdAb(もしくはdAbとしての使用に好適であるアミノ酸)、またはナノボディ(本明細書において定義される通りであり、 V_{HH} を包含するがこれに限定されない)；他の単一可変ドメイン、あるいはそのいずれか1つのいずれかの好適な断片であり得る。

【0174】

特に、免疫グロブリン単一可変ドメインはナノボディ(登録商標)(本明細書において定義される通り)またはその好適な断片であり得る。[注意：ナノボディ(登録商標)およびNanoclone(登録商標)はAblynx N.V.の登録商標である]ナノボディの一般的な説明については、下のさらなる記載、および例えばWO 08/020079(16ページ)に記載されているなどの本明細書において引用される従来技術の参照がなされる。

20

【0175】

V_{HH} 、 V_{HH} ドメイン、 V_{HH} 抗体断片、および V_{HH} 抗体としてもまた公知の「 V_{HH} ドメイン」は、元々は「重鎖抗体」(すなわち、「軽鎖が欠如した抗体」；Hamers-Casterman et al. 1993 Nature 363: 446-448)の抗原結合免疫グロブリン(可変)ドメインとして記載された。用語「 V_{HH} ドメイン」は、これらの可変ドメインを、従来の4鎖抗体中に存在する重鎖可変ドメイン(これらは本明細書において「 V_H ドメイン」または「 V_H ドメイン」と言われる)および従来の4鎖抗体中に存在する軽鎖可変ドメイン(これらは本明細書において「 V_L ドメイン」または「 V_L ドメイン」と言われる)から区別するために選ばれた。 V_{HH} およびナノボディのさらなる説明については、Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001)による総説記事、ならびに次の特許出願の参照がなされ、これらは一般的な背景技術として挙げられる：ブリュッセル自由大学のWO 94/04678、WO 95/04079、およびWO 96/34103；UnileverのWO 94/25591、WO 99/37681、WO 00/40968、WO 00/43507、WO 00/65057、WO 01/40310、WO 01/44301、EP 1134231、およびWO 02/48193；Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB)のWO 97/49805、WO 01/21817、WO 03/035694、WO 03/054016、およびWO 03/055527；Algonomics N.V.およびAblynx N.V.のWO 03/050531；カナダ国立研究機構によるWO 01/90190；Institute of AntibodiesによるWO 03/025020(=EP 1433793)；およびAblynx N.V.によるWO 04/041867、WO 04/041862、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858、WO 06/40153、WO 06/079372、WO 06/122786、WO 06/122787、およびWO 06/122825、ならびにAblynx N.V.によるさらなる公開特許出願。これらの出願において挙げられているさらなる従来技術、および特に国際出願WO 06/040153の41~43ページにおいて挙げられている参照の列記の参照もまたなされ、それらの列記および参照は参照によって本明細書に組み込まれる。これらの参照に記載されている通り、ナノボディ(特に V_{HH} 配列および部分的ヒト化ナノボディ)は、特に、フレームワーク配列の1つ以上における

30

40

50

1つ以上の「ホールマーク残基」の存在を特徴とし得る。ナノボディのヒト化および/またはラクダ化、ならびに他の改変、部分もしくは断片、誘導体もしくは「ナノボディ融合体」、多価コンストラクト（リンカー配列のいくつかの限定しない例を包含する）、およびナノボディの半減期を増大させるための異なる改変、ならびにそれらの調製を包含するナノボディのさらなる説明は、例えばWO 08 / 1 0 1 9 8 5およびWO 08 / 1 4 2 1 6 4に見いだされ得る。ナノボディのさらなる一般的な説明については、例えばWO 08 / 0 2 0 0 7 9（16ページ）に記載されているものなどの本明細書において引用される従来技術の参照がなされる。

【0176】

「D a b」、「ドメイン抗体」、および「d A b」としてもまた公知の「ドメイン抗体」は（用語「ドメイン抗体」および「d A b」はGlaxoSmithKlineグループ企業によって商標として用いられている）、例えばEP 0 3 6 8 6 8 4、Ward et al. (Nature 341: 544-546, 1989)、Holt et al. (Trends in Biotechnology 21: 484-490, 2003)、およびWO 03 / 0 0 2 6 0 9、ならびに例えばWO 04 / 0 6 8 8 2 0、WO 06 / 0 3 0 2 2 0、WO 06 / 0 0 3 3 8 8、およびDomantis Ltdの他の公開特許出願に記載されている。ドメイン抗体は、本質的には、非ラクダほ乳類、特にヒト4鎖抗体のV HまたはV Lドメインに対応する。単一の抗原結合ドメインとして、すなわちそれぞれV LまたはV Hドメインとペアになることなしにエピトープに結合するためには、例えばヒト単一V HまたはV Lドメイン配列のライブラリーを用いることによって、かかる抗原結合特性の特異的選択が要求される。ドメイン抗体は、V H Hのようにおよそ13からおよそ16 k D aの分子量を有し、完全にヒト配列に由来する場合には、例えばヒトへの治療使用のためのヒト化を要求しない。

【0177】

それらがほ乳類起源ではないので本発明の文脈においてはより好ましくないが、単一可変ドメインはサメのある種の種に由来し得るということにもまた注意すべきである（例えば、いわゆる「I g N A Rドメイン」。例えばWO 05 / 1 8 6 2 9を見よ）。

【0178】

それゆえに、本発明の意味において、用語「免疫グロブリン単一可変ドメイン」または「単一可変ドメイン」は、非ヒトソース、好ましくはラクダに由来するポリペプチド、好ましくはラクダ重鎖抗体を含む。それらは以前に記載されたようにヒト化され得る。その上に、用語は、例えばDavies and Riechmann (FEBS 339: 285-290, 1994; Biotechnol. 13: 475-479, 1995; Prot. Eng. 9: 531-537, 1996)およびRiechmann and Muyldermans (J. Immunol. Methods 231: 25-38, 1999)に記載されているように「ラクダ化」された、非ラクダソース、例えばマウスまたはヒトに由来するポリペプチドを含む。

【0179】

V H Hドメインのアミノ酸残基は、Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)によって与えられるV Hドメインのための一般的な付番に従って、ラクダ科からのV H Hドメインに適用されているように、例えばRiechmann and Muyldermans (J. Immunol. Methods 231: 25-38, 1999)の図2に示されているように付番される。V Hドメインのアミノ酸残基に付番するための代替的な方法は当分野において公知であり、この方法は同様の様式でV H Hドメインにもまた適用され得る。しかしながら、本明細書、請求項、および図においては、別様に指示されない限り、上に記載されているV H Hドメインに適用されるKabatに従う付番が踏襲される。

【0180】

V HドメインおよびV H Hドメインについて当分野において周知である通り、C D Rのそれぞれのアミノ酸残基の総数は変動し得、Kabat付番によって指示されるアミノ酸残基の総数には対応せずによりあり得るということに注意すべきである（すなわち、Kabat付番に従う1つ以上の位置が実際の配列中においては占有されずによりあり得る。または、実際の配

10

20

30

40

50

列は、Kabat付番によって許される数よりも多くのアミノ酸残基を含有し得る）。これは、一般的に、Kabatに従う付番が、実際の配列中のアミノ酸残基の実際の付番に対応し得、または対応せずにより得るということの意味する。V_HドメインおよびV_HHドメインのアミノ酸残基の総数は、通常は110から120の範囲内、多くの場合には112および115の間であろう。しかしながら、より小さい配列およびより長い配列もまた本明細書に記載される目的にとって好適であり得るということに注意すべきである。

【0181】

C D R領域の決定は異なる方法に従ってされ得る。Kabatに従うC D R決定において、V_HHのF R 1は位置1～30のアミノ酸残基を含み、V_HHのC D R 1は位置31～35のアミノ酸残基を含み、V_HHのF R 2は位置36～49のアミノ酸残基を含み、V_HHのC D R 2は位置50～65のアミノ酸残基を含み、V_HHのF R 3は位置66～94のアミノ酸残基を含み、V_HHのC D R 3は位置95～102のアミノ酸残基を含み、V_HHのF R 4は位置103～113のアミノ酸残基を含む。

10

【0182】

しかしながら、本願において、C D R配列はKontermann and Dubel (Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, p p. 33-51, 2010)に従って決定された。この方法に従うと、F R 1は位置1～25のアミノ酸残基を含み、C D R 1は位置26～35のアミノ酸残基を含み、F R 2は位置36～49のアミノ酸残基を含み、C D R 2は位置50～58のアミノ酸残基を含み、F R 3は位置59～94のアミノ酸残基を含み、C D R 3は位置95～102のアミノ酸残基を含み、F R 4は位置103～113のアミノ酸残基を含む。

20

【0183】

免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばドメイン抗体およびナノボディ（V_HHドメインを包含する）はヒト化に付され得る。特に、ヒト化免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディ（V_HHドメインを包含する）は、以前のパラグラフにおいて一般的に定義されているが、その中にはヒト化置換（本明細書において定義される通り）であるおよび/またはそれに対応する少なくとも1つのアミノ酸残基が（特に、フレームワーク残基の少なくとも1つに）存在する免疫グロブリン単一可変ドメインであり得る。潜在的に有用なヒト化置換は、天然に存在するV_HH配列のフレームワーク領域の配列を1つ以上のごく近縁のヒトV_H配列の対応するフレームワーク配列と比較することによって確かめられ得る。その後、このように決定された潜在的に有用なヒト化置換の1つ以上（またはその組み合わせ）は前記V_HH配列中に（自体公知のいずれかの様式で、本明細書にさらに記載されるように）導入され得、もたらされたヒト化V_HH配列は、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さおよびレベル、ならびに/または他の所望の特性について試験され得る。このやり方で、トライアル・アンド・エラーの限定された程度によって、他の好適なヒト化置換（またはその好適な組み合わせ）が、本明細書における開示に基づいて当業者によって決定され得る。また、前述に基づいて、ナノボディ（V_HHドメインを包含する）などの免疫グロブリン単一可変ドメイン（のフレームワーク領域）が部分的ヒト化または完全ヒト化され得る。

30

【0184】

免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばドメイン抗体およびナノボディ（V_HHドメインおよびヒト化V_HHドメインを包含する）は、1つ以上のC D Rのアミノ酸配列中に1つ以上の変改を導入することによる親和性成熟に付され得る。それらの変改は、それぞれの親分子と比較して、もたらされる免疫グロブリン単一可変ドメインの、そのそれぞれの抗原に対する改善された親和性をもたらす。本発明の親和性成熟した免疫グロブリン単一可変ドメイン分子は、当分野において公知の方法によって、例えばMarks et al. (Biotechnology 10:779-783, 1992)、Barbas, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813, 1994)、Shier et al. (Gene 169: 147-155, 1995)、Yelton et al. (Immunol. 155: 1994-2004, 1995)、Jackson et al. (J. Immunol. 154: 3310-9, 1995)、Hawkins et al. (J. Mol. Biol. 226: 889 896, 1992)、Johnson and Hawkins

40

50

(Affinity maturation of antibodies using phage display, Oxford University Press, 1996)によって記載されているように調製され得る。

【0185】

V_H 、 V_L 、 V_{HH} 、ドメイン抗体、またはナノボディなどの免疫グロブリン単一可変ドメインから出発してポリペプチドを設計／選択および／または調製するプロセスは、本明細書においては前記免疫グロブリン単一可変ドメインを「フォーマットする」ともまた言われ；ポリペプチドの一部にされる免疫グロブリン単一可変ドメインは、「フォーマットされる」または前記ポリペプチド「のフォーマットである」と言われる。免疫グロブリン単一可変ドメインがフォーマットされ得るやり方の例、およびかかるフォーマットの例は、本明細書における開示から当業者には明瞭であろう；かかるフォーマットされた免疫グロブリン単一可変ドメインは本発明のさらなる側面を形成する。

10

【0186】

例えば、限定なしに、1つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインが、ポリペプチドの調製のための「結合ユニット」、「結合ドメイン」、または「ビルディングブロック」（これらの用語は本明細書において交換可能に用いられる）として用いられ得、これは、結合ユニットとして働き得る（すなわち、CD40L上の同じかもしくは別のエピトープに対するおよび／またはCD40L以外の1つ以上の抗原、蛋白質、もしくは標的に対する）1つ以上のさらなる免疫グロブリン単一可変ドメインを任意に含有し得る。

【0187】

一価のポリペプチドは、（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインなどの）1つの結合ユニットのみを含むかまたは本質的にそれからなる。（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインなどの）2つ以上の結合ユニットを含むポリペプチドは、本明細書においては「多価」ポリペプチドともまた言われ、かかるポリペプチド中に存在する結合ユニット／免疫グロブリン単一可変ドメインは、本明細書においては「多価フォーマット」であるともまた言われる。例えば、「二価」ポリペプチドは、任意にリンカー配列を介してリンクされる2つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得、「三価」ポリペプチドは、任意に2つのリンカー配列を介してリンクされる3つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得；「四価」ポリペプチドは、任意に3つのリンカー配列を介してリンクされる4つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得るなどである。

20

【0188】

多価ポリペプチドにおいて、2つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインは同じかまたは異なり得、同じ抗原もしくは抗原決定基（例えば同じ部分（単数もしくは複数）もしくはエピトープ（単数もしくは複数）、または異なる部分もしくはエピトープ）を標的とし得、または代替的には異なる抗原もしくは抗原決定基を標的とし得；あるいはそのいずれかの好適な組み合わせである。少なくとも1つの結合ユニットが第1の抗原（すなわちCD40L）を標的とし、少なくとも1つの結合ユニットが第2の抗原（すなわち、CD40Lとは異なる）を標的とする（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインなどの）少なくとも2つの結合ユニットを含有するポリペプチドは、「多重特異性」ポリペプチドともまた言われ、かかるポリペプチド中に存在する（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインなどの）結合ユニットは、本明細書においては「多重特異性フォーマット」であるともまた言われる。それゆえに、例えば、本発明の「二重特異性」ポリペプチドは、第1の抗原（すなわちCD40L）を標的とする少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインと第2の抗原（すなわち、CD40Lとは異なる）を標的とする少なくとも1つのさらなる免疫グロブリン単一可変ドメインとを含むポリペプチドであり、本発明の「三重特異性」ポリペプチドは、第1の抗原（すなわちCD40L）を標的とする少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインと、第2の抗原（すなわち、CD40Lとは異なる）を標的とする少なくとも1つのさらなる免疫グロブリン単一可変ドメインと、第3の抗原（すなわち、CD40Lおよび第2の抗原両方とは異なる）を標的とする少なくとも1つのさらなる免疫グロブリン単一可変ドメインとを含むポリペプチドである；などである。

30

40

【0189】

50

例えば「二重パラトープポリペプチド」または「三重パラトープポリペプチド」などの「多重パラトープポリペプチド」は、それぞれが異なるパラトープを有する2つ以上の結合ユニットを含むかまたは本質的にそれからなる。

【0190】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、第1のISVD（例えば、CD40Lに結合するISVD）と第2のISVD（例えば、血清アルブミンに結合するISVD）とを含む二重特異性ポリペプチドである。

【0191】

治療医薬抗体の有効性を改善するための手段は、その血清中残存性を増大させ、それによってより高い循環レベル、より頻繁でない投与、および縮減された用量を許すことである。

10

【0192】

当分野においては、インビボの分子の半減期を延長する基または部分、例えばFc領域のPEG基が記載されている。

【0193】

しかしながら、抗体のFc領域は、その血清中半減期のみならず、エフェクター機能、例えば補体依存性細胞傷害性(CDC)、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、および抗体依存性細胞貪食(ADCP)をもまた媒介し、これは安全性に負の影響を有する。

【0194】

しかしながら、前に挙げられた通り、最近の知見は、健康な血液ドナーにおける抗PEG抗体の22~25%の発生率を実証している。抗PEG抗体のこの発生は、いくつかの患者においては有効性を限定し得、PEGが非免疫原性であるという一般的な想定に反する。ゆえに、PEG化された治療薬は、特に免疫低下した疾患設定において臨床使用に与える潜在的重大性を有する。その上に、抗CD40LのFab'分子のPEG化がその活性を4~5倍減少させるということが報告されている(US2010/0104573)。

20

【0195】

本発明者は、ベンチマークCDP7657よりも高性能であるのみならず、この性能を半減期延長後にもまた保持するようにISVDを作り替えることができた。本明細書にさらに記載される本発明の具体的な限定しない側面において、本発明のポリペプチドは、CD40Lに結合する免疫グロブリン単一可変ドメインと比較して増大した血清中半減期(本明細書にさらに記載される通り)を有する。

30

【0196】

本発明のポリペプチドの「半減期」は、一般的には、WO08/020079の57ページのパラグラフo)に記載されているように定義され得、そこに挙げられているように、例えばポリペプチドの分解および/または天然のメカニズムによるポリペプチドのクリアランスもしくは隔離が原因で、ポリペプチドの血清中濃度がインビボで50%縮減されるためにとられる時間を言う。本発明のポリペプチドのインビボ半減期は、自体公知のいずれかの様式で、例えば薬物動態分析によって決定され得る。好適な技術は当業者には明瞭であろう。例えば一般的にはWO08/020079の57ページのパラグラフo)に記載されている通りであり得る。また、WO08/020079の57ページのパラグラフo)に挙げられている通り、半減期は、 $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$ 、および曲線下面積(AUC)などのパラメータを用いて表現され得る。例えば、標準的なハンドブック、例えばKenneth et al. (Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, John Wiley & Sons Inc, 1986)およびGibaldi & Perron ("Pharmacokinetics", Marcel Dekker, 2nd Rev. Edition, 1982)の参照がなされる。用語「半減期の増大」または「増大した半減期」もまたWO08/020079の57ページのパラグラフo)において定義されている通りであり、特に、 $t_{1/2}$ および/もしくはAUCの増大ありもしくはなしどちらかの、または両方の $t_{1/2}$ の増大を言う。

40

【0197】

本発明の具体的な側面において、本発明のポリペプチドは、血清蛋白質に結合するIS

50

V Dを欠く対応するポリペプチドと比較して増大した半減期を有する。かかるポリペプチドのいくつかの好ましい限定しない例は、本明細書におけるさらなる開示に基づいて当業者には明瞭になるであろう。例えば、血清蛋白質（例えば血清アルブミン）に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む本発明のポリペプチド；または本発明のアミノ酸配列の半減期を増大させる少なくとも1つの部分（特に、少なくとも1つのアミノ酸配列）にリンクされた本発明の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドを含む。かかる半減期延長性部分または免疫グロブリン単一可変ドメインを含む本発明のポリペプチドの例は、本明細書におけるさらなる開示に基づいて当業者には明瞭になるであろう；例えば、限定なしに、本発明の1つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインが、1つ以上の血清蛋白質もしくはその断片（例えば、（ヒト）血清アルブミンもしくはその好適な断片）に、または血清蛋白質に結合し得る1つ以上の結合ユニット（例えば、血清蛋白質、例えば血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）、I g Gなどの血清免疫グロブリン、またはトランスフェリンに結合し得るI S V D、ドメイン抗体、単一ドメイン抗体、「d A b」、またはナノボディなどの；本明細書において挙げられているさらなる記載および参照の参照がなされる）に好適にリンクされたポリペプチド；血清蛋白質に結合し得る1つ以上の小型蛋白質またはペプチド、例えば、限定なしに、W O 9 1 / 0 1 7 4 3、W O 0 1 / 4 5 7 4 6、W O 0 2 / 0 7 6 4 8 9、W O 2 0 0 8 / 0 6 8 2 8 0、W O 2 0 0 9 / 1 2 7 6 9 1、およびP C T / E P 2 0 1 1 / 0 5 1 5 5 9に記載されている蛋白質およびペプチドを含む本発明のポリペプチドを包含する。

【0198】

一般的に、増大した半減期を有する本発明の化合物またはポリペプチドは、好ましくは、本発明の対応するアミノ酸配列、例えばC D 4 0 Lに結合するI S V D自体（血清アルブミンに結合するI S V Dなし）の半減期よりも少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、例えば少なくとも5倍、例えば少なくとも10倍または20倍超長い半減期を有する。例えば、増大した半減期を有する本発明の化合物またはポリペプチドは、例えばヒトにおいて、本発明の対応するアミノ酸配列、例えばC D 4 0 Lに結合するI S V D自体と比較して1時間超、好ましくは2時間超、より好ましくは6時間超、例えば12時間超、またはさらには24、48、もしくは72時間超増大した半減期を有し得る。

【0199】

本発明の好ましい限定しない側面において、本発明のかかる化合物またはポリペプチドは、例えばヒトにおいて、本発明の対応するアミノ酸配列、例えばC D 4 0 Lに結合するI S V D自体と比較して1時間超、好ましくは2時間超、より好ましくは6時間超、例えば12時間超、またはさらには24、48、もしくは72時間超増大した血清中半減期を有する。

【0200】

本発明の別の好ましい限定しない側面において、本発明のかかる化合物またはポリペプチドは、少なくとも約12時間、好ましくは少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間、さらにはより好ましくは少なくとも72時間以上というヒトにおける血清中半減期を見せる。例えば、本発明の化合物またはポリペプチドは、少なくとも5日（例えば約5から10日）、好ましくは少なくとも9日（例えば約9から14日）、より好ましくは少なくとも約10日（例えば約10から15日）、または少なくとも約11日（例えば約11から16日）、より好ましくは少なくとも約12日（例えば約12から18日以上）、または14日超（例えば約14から19日）という半減期を有し得る。

【0201】

また、好ましい側面において、本発明は本明細書に記載されるポリペプチドに関し、血清アルブミンに結合する前記I S V Dは、本質的に4つのフレームワーク領域（それぞれF 1からF R 4）と3つの相補性決定領域（それぞれC D R 1からC D R 3）とからなり、C D R 1は配列番号74であり、C D R 2は配列番号75であり、C D R 3は配列番号76である（表A - 3を見よ）。

【0202】

本発明の特に好ましい限定しない側面において、本発明は、C D 4 0 L に特異的に結合する少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメイン (I S V D) と血清アルブミンに結合する少なくとも1つのI S V D とを含む本発明のポリペプチドを提供し、例えば、血清アルブミンに結合するI S V D は、A L B 1 3 5 (配列番号15)、A L B 1 2 9 (配列番号13)、A L B 8 (配列番号11)、A L B 2 3 (配列番号12)、およびA L B 1 3 2 (配列番号14) からなる群、好ましくは配列番号15から選ばれる。

【0203】

治療蛋白質産物に対する免疫応答は、患者の安全性および産物の有効性両方について問題を呈し得る。血栓塞栓事象は、蛋白質治療医薬に対する既存抗体 (P E A) および/または抗薬物抗体 (A D A) が原因でもまたあり得る。この点で、免疫原性とは、治療蛋白質産物がそれ自体および関連蛋白質に対する免疫応答を生成または免疫学的に関連する臨床的な有害事象を誘導する性向である。

【0204】

本発明者は、従来技術の抗体よりも有意に安全であるポリペプチドを作り出すことができた。

【0205】

本発明に至る研究において、C末端延長 (これは単一のC末端アラニン残基ほども単純であり得る。再びW O 1 2 / 1 7 5 7 4 1、例3を見よ) をI S V D のC末端領域または末端に追加することが、ヒト対象/患者の大部分のサンプル中の既存抗体/因子の結合を本質的に防止/除去するということを確認した後に、ヒト対象 (健康なボランティア、および/または疾患もしくは障害を患う対象) から得られたサンプルが、C末端延長が存在するときでさえもナノボディ (または他のI S V D) の暴露されたC末端領域に結合し得る (他の) 既存抗体または因子を可能性として含有するかどうかを検討された。そうする中で、本発明者は、本質的に、C末端延長したI S V D に結合するかかる既存抗体は、健康なボランティアの血液もしくは血清中またはいくつもの異なる疾患の1つを患うヒト患者から得られた血液もしくは血清中 (いくつかの炎症性疾患または自己免疫障害を包含する。データは示さない) には見いだされ得ないが、ある種の深刻な (自己) 免疫障害 (例えばS L E) を患う (全てではないが) ある種のヒト対象から得られたいくつかの血液または血清サンプルは、I S V D がC末端延長を含むときでさえもI S V D に結合し得るいくつかの既存抗体/因子を含有するように見えるということを見いだした。

【0206】

本発明者は、改善されたI S V D を提供することに取りかかった。それらは、それらが暴露されたC末端領域または末端を有するときに、免疫系に深刻に影響/活性化するある種の (自己) 免疫疾患または障害 (例えばS L E) を患うヒト対象から得られた血液または血清サンプル中に見いだされるものなどの既存抗体/因子による結合をより被りにくい。

【0207】

暴露されたC末端を有するI S V D への既存抗体/因子の結合が、位置112のセリン (Kabat付番) からリジン (K) またはグルタミン (Q) どちらかへの変異によって (さらに) 縮減され得るということが見いだされた。特に、かかるS 1 1 2 K またはS 1 1 2 Q 変異は、S L E などの深刻な自己免疫障害を患うヒト対象の血液または血清中に見いだされる既存抗体/因子などの、C末端延長を含むI S V D (ただしS 1 1 2 K またはS 1 1 2 Q 変異なし) に結合し得る既存抗体/因子の結合を (さらに) 縮減または本質的に防止/除去し得るということが見いだされた。

【0208】

この知見は広く適用可能である。

【0209】

本発明の免疫グロブリン (および特に免疫グロブリン単一可変ドメイン) は、全て「Improved immunoglobulin variable domains」と題する次の同時係属のU S 仮出願に記載されている具体的な変異/アミノ酸残基をもまた含有し得る: 2014年5月16日出願のU S 6 1 / 9 9 4 5 5 2 ; 2014年6月18日出願のU S 6 1 / 0 1 4 , 0 1 5 ;

10

20

30

40

50

2014年8月21日出願のUS62/040,167;および2014年9月8日出願のUS62/047,560(全てAblynx N.V.に譲渡し)。

【0210】

特に、本発明は、ISVD、好ましくはC末端に在るISVDを含む本明細書に記載されるポリペプチドに関し、さらにはより好ましくは、前記C末端に在るISVDは血清アルブミンに結合するISVDであり：(i)位置112のアミノ酸残基はKもしくはQの1つであり；および/または(ii)位置89のアミノ酸残基はTであり；および/または(iii)位置89のアミノ酸残基はLであり、位置110のアミノ酸残基はKもしくはQの1つであり；かつ(iv)ケース(i)から(iii)のそれぞれにおいて、位置11のアミノ酸は好ましくはVであり；前記VHドメインはC末端延長(X)nを含有し、式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり(好ましくは1または2、例えば1)；各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在する)アミノ酸残基であり、好ましくは、アラニン(A)、グリシン(G)、バリン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から独立して選ばれる。

10

【0211】

従って、本発明は、ISVD、好ましくはC末端に在るISVDを含む本明細書に記載されるポリペプチドに関し、さらにはより好ましくは、前記C末端に在るISVDは血清アルブミンに結合するISVDであり、：

- 位置11のアミノ酸残基はL、V、またはKの1つであり；かつ
- 位置14のアミノ酸残基はAまたはPの1つであり；かつ
- 位置41のアミノ酸残基はAまたはPの1つであり；かつ
- 位置89のアミノ酸残基はT、V、またはLの1つであり；かつ
- 位置108のアミノ酸残基はQ、またはLの1つであり；かつ
- 位置110のアミノ酸残基はT、K、またはQの1つであり；かつ
- 位置112のアミノ酸残基はS、K、またはQの1つであり；

20

(i)位置112のアミノ酸残基はKもしくはQの1つであり；および/または(ii)位置89のアミノ酸残基はTであり；および/または(iii)位置89のアミノ酸残基はLであり、位置110のアミノ酸残基はKもしくはQの1つであり；かつ(iv)ケース(i)から(iii)のそれぞれにおいて、位置11のアミノ酸は好ましくはVである。

30

【0212】

前記同時係属のUS仮出願において挙げられている通り、前記変異は、本発明の免疫グロブリンおよび化合物へのいわゆる「既存抗体」の結合を防止または縮減することに有効である。この目的のために、本発明の免疫グロブリンは、(任意に前記変異との組み合わせとして)C末端延長(X)nをもまた含有し得る(式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり(好ましくは1または2、例えば1)；各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在する)アミノ酸残基であり、好ましくは、アラニン(A)、グリシン(G)、バリン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から独立して選ばれ、これについては再び前記US仮出願およびWO12/175741の参照がなされる。特に、本発明の免疫グロブリンは、それが蛋白質、ポリペプチド、もしくは他の化合物、またはそれを含むコンストラクトのC末端を形成するときに、かかるC末端延長を含有し得る(再び、前記US仮出願およびWO12/175741にさらに記載されている通り)。

40

【0213】

従って、本発明は、CD40Lに特異的に結合する少なくとも1つのISVDを含むポリペプチドに関し、さらに血清アルブミンに結合するISVDを含み、血清アルブミンに結合する前記ISVDはA1b00129(A1b11(L11V,V89T)-A)(配列番号13)およびA1b00132(A1b23(L5V,L11V,V89T)-A)(配列番号14)およびALB11(S112K)-A(配列番号15)から選ばれる。好ましくは、本発明のポリペプチドは配列番号9である。

50

【 0 2 1 4 】

さらに、本発明は本発明のポリペプチドを含む医薬組成物に関する。医薬組成物が、本発明の前記ポリペプチドを含む核酸、前記核酸を含有するベクターもしくはベクター系、および／または本発明の前記ポリペプチドを産生する好ましくはヒト細胞を含むということもまたあり得る。任意に、医薬組成物は、医薬的に許容される添加剤、アジュバント、および／または担体を含む。

【 0 2 1 5 】

例示的な添加剤としては、崩壊剤、結合剤、フィラー、および滑剤が挙げられ得る。崩壊剤の例は、アガー・アガー、アルギン、炭酸カルシウム、セルロース、コロイド状二酸化珪素、ガム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、メチルセルロース、および澱粉を包含する。結合剤の例は、微結晶セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキプロピルセルロース、およびポリビニルピロリドンを含む。フィラーの例は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、三塩基性硫酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、セルロース、デキストリン、デキストロース、フルクトース、ラクチトール、ラクトース、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウム、マルチトール、マルトデキストリン、マルトース、ソルビトール、澱粉、スクロース、糖、およびキシリトールを含む。滑剤の例は、寒天、オレイン酸エチル、ラウリン酸エチル、グリセリン、グリセリルパルミトステアラート、水添植物油、酸化マグネシウム、ステアリン酸塩、マンニトール、ポロキサマー、グリコール、安息香酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリルナトリウム、ソルビトール、およびタルクを含む。通常安定化剤、保存料、湿潤および乳化剤、粘度改善剤、香味改善剤、浸透圧を変動させるための塩、緩衝剤物質、可溶化剤、希釈剤、軟化剤、着色料、およびマスキング剤、および抗酸化剤が医薬アジュバントとして考えられる。

【 0 2 1 6 】

好適な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、澱粉、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、ココアバター、水、アルコール、ポリオール、グリセロール、植物油、および同類を含むが、これに限定されない。

【 0 2 1 7 】

医薬組成物は、少なくとも1つのさらなる活性物質、例えば1つ以上のさらなる抗体またはその抗原結合断片、ペプチド、蛋白質、核酸、有機および無機分子をもまた含み得る。

【 0 2 1 8 】

本発明の好ましい態様において、本発明のポリペプチドを含む医薬組成物は医療または診断法への使用のためである。好ましくは、医薬組成物はヒト医療への使用のためであるが、それらは獣医学目的にもまた用いられ得る。

【 0 2 1 9 】

特に、本発明のポリペプチド、本発明のポリペプチドを含む本発明の核酸、ベクターもしくはベクター系、宿主もしくは宿主細胞、または医薬組成物は、CD40Lの上昇したレベルおよび／または活性に関連する、それによって引き起こされる、またはそれを伴う障害と、上に記載されている本発明のポリペプチドの投与によってCD40L活性を阻害および／または中和することによって有益には診断、防止、または処置され得る他の疾患または状態との診断、防止、または処置への使用のためである。さらなる態様において、本発明は、CD40Lの上昇したレベルおよび／または活性に関連する、それによって引き起こされる、またはそれを伴う障害と、CD40L活性を阻害および／または中和することによって有益には診断、防止、または処置され得る他の疾患または状態との診断、防止、または処置のための方法に関する。

【 0 2 2 0 】

ある態様において、本発明は、医薬としての使用のための、本発明のポリペプチドに関する。

【 0 2 2 1 】

10

20

30

40

50

さらなる態様において、本発明は、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス（SLE）、ループス腎炎、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）、移植拒絶、クローン病、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患（IBD）、大腸炎、喘息／アレルギー、動脈硬化症、重症筋無力症、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ、強直性脊椎炎、冠動脈性心疾患、1型糖尿病、および／または組換え医薬品、例えば血友病における第V因子に対する免疫応答の症状を処置または防止することへの使用のための、本発明のポリペプチドに関する。

【0222】

ある態様において、本発明は、例えばCD40L／CD40によって媒介される経路の不適切な活性化が関わる個体の疾患または障害の処置すること、防止の方法に関し、方法は、本発明のポリペプチドを前記疾患または障害の症状を処置または防止するために有効な量で前記個体に投与することを含む。好ましい医学的適応症は、CD40Lの上昇したレベルおよび／または活性に関連する自己免疫または炎症性疾患または状態である。疾患または状態は、例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、ループス腎炎、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）、移植拒絶、クローン病、炎症性腸疾患（IBD）、大腸炎、喘息／アレルギー、動脈硬化症、重症筋無力症、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ、強直性脊椎炎、シェーグレン症候群、冠動脈性心疾患、1型糖尿病、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリッグ病およびシャルコー病としてもまた公知）、および組換え医薬品、例えば血友病における第V因子に対する免疫応答から選択され得る。特に好ましい適応症はITP、SLE、およびループス腎炎である。

【0223】

本発明のポリペプチドまたは本発明に従う医薬組成物は、所望の治療または予防効果を得るために有効な量で、その必要がある対象に投与され得る。例えば、前記投与によって達成されるべき1つの所望の効果は、CD40Lの1つ以上の生物学的機能をブロック、阻害、および／または中和することであり得る。この文脈において、投与は、ポリペプチドがCD40L機能をブロック、阻害、および／または中和する能力がある条件下において、好ましくは高いおよび／または異常なレベルでCD40Lを発現することが疑われる細胞または組織と本発明のポリペプチドを接触させることを含み得る。接触はインビトロまたはインビボであり得る。

【0224】

好適な組成物の投与は、異なるやり方で、例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、経口、皮内、鼻腔内、または気管支内投与によって奏され得る。投与は直接的に標的部位においてもまた実施され得る。

【0225】

投薬レジメンは担当医および臨床的因子によって決定されるであろう。医学分野において周知である通り、いずれか一人の患者のための投薬量は多くの因子に依存し、患者のサイズ、重量、体表面積、年齢、投与されるべき具体的な化合物、使用されるポリペプチドの活性（抗体を包含する）、投与の時間および経路、一般的な健康、および他の治療または処置との組み合わせを包含する。蛋白質性の医薬活性物質は、用量あたり1gおよび100mg/kg体重の間の量で存在し得る；しかしながら、この例示的な範囲よりも下または上の用量もまた想定される。レジメンが連続輸注である場合には、それは分あたり体重のキログラムあたり1pgから100mgの範囲内であり得る。

【0226】

本発明の中和ポリペプチドは、当分野において周知の方法によってアッセイされるCD40Lの生物学的機能を少なくとも約50%、好ましくは75%、より好ましくは90%、95%、または最大99%、最も好ましくはおよそ100%（本質的に完全に）阻害および／または中和するために、例えば0.01、0.1、0.5、1、2、5、10、20、または50pg/mlの濃度で使用され得る。

【0227】

本発明のさらなる側面に従うと、本発明のポリペプチドはインビボおよびインビトロの追加の用途に用いられ得る。例えば、本発明のポリペプチドは、診断目的のために、例え

10

20

30

40

50

ばCD40Lの存在を検出および/もしくは定量ならびに/またはCD40Lを精製するように設計されたアッセイに使用され得る。また、ポリペプチドは、具体的な疾患の動物モデルにおいて、毒物学、安全性、および投薬量研究を実施するために試験され得る。

【0228】

最後に、本発明は、本発明に従う少なくとも1つのポリペプチド、前記成分をコードする少なくとも1つの核酸配列、本発明のベクターもしくはベクター系、および/または本発明に従う宿主細胞を含むキットに関する。キットは、異なる形態で、例えば診断キットとして提供され得るということが企図される。

【0229】

本発明は、次の例に基づいてより良好に理解され得る。しかしながら、当業者は、論じられている具体的な方法および結果が単に本明細書に記載されている本発明を例解するためであるということを直ちに理解するであろう。

6. 例

【0230】

次の例は、本発明の方法および産物を例解している。当業者に明らかである、分子および細胞生物学の分野において通常遭遇される記載されている条件およびパラメータの好適な改変および適合は、本発明の趣旨および範囲内である。

6.1. 材料と方法

6.1.1. フローサイトメトリー（結合）

【0231】

ペリプラズム抽出物をFACSによってヒトCD40Lへの結合について分析した。2 × 10⁵細胞（安定なCHO-K1/ヒトCD40Lトランスフェクション細胞）を、FACS緩衝液（PBS、10%ウシ胎児血清（Sigma、F7524）、0.05%アジ化Na）中のペリプラズム抽出物の1/10希釈物と4で30分間インキュベーションした。それから、細胞をFACS緩衝液によって3回洗浄し、最後に、Phycolink[®] - FLA G - RPE（Prozyme、PJ315）を含有するFACS緩衝液中に再懸濁した。この混合物を4で30分間インキュベーションした。細胞を再びFACS緩衝液によって3回洗浄し、死細胞をTOPRO3（Molecular probes、T3605）によって染色した。サンプルをFACSarray（BD Biosciences）によって分析した。

6.1.2. AlphaScreen（ブロック）

【0232】

ナノボディのCD40L/CD40相互作用ブロック能力を決定するために、ペリプラズム抽出物を、AlphaScreenテクノロジーを用いて蛋白質に基づく競合アッセイによってスクリーニングした。手短には、ビオチニル化ヒトCD40L（HEK、R&D）をドナービーズ上に捕捉し、ヒトCD40-Fcキメラを抗ヒトFcナノボディコーティングしたアクセプタービーズ上に捕捉した。抗CD40Lナノボディのブロック能力を評価するために、ペリプラズム抽出物の希釈物をビオチニル化CD40Lとブレインキュベーションした。この混合物に、CD40-Fc、アクセプタービーズ、およびストレプトアビジンをカップリングしたドナービーズを追加し、さらに室温で1時間インキュベーションした。蛍光を、EnVision多重標識プレートリーダーを用い、680nmの励起波長および520nmの放出波長を用いて測定した。AlphaScreenシグナルの減少は、CD40受容体へのビオチニル化CD40Lの結合がペリプラズム抽出物中に存在するナノボディによってブロックされるということを指示する。

6.1.3. SPR（off-rate）

【0233】

全てのoff-rateはProteOn XPR36装置（Bio-Rad Laboratories, Inc.）によって決定した。ProteOnのGLCセンサーチップを、EDC（1-エチル-3-[3-ジメチル-アミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩）およびスルホ-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）を用いるアミンカップリングによって、10mM酢酸緩衝液pH5.5中の組換えヒトCD40L（R&D、HEK）の1200~1800RUによってコーテ

10

20

30

40

50

イングした。ランニング緩衝液ProteOn P B S / T w e e n (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4、0.005% Tween 20入り)中の抗CD40Lナノボディ発現大腸菌クローンの10倍希釈されたペリプラズム抽出物を、センサーチップ上に流した。精製された一価の抗CD40Lナノボディを、100nMでセンサーチップ上に流した。親和性成熟(例6.8.を見よ)については実験を37で実施し、全ての他の実験は25で実施した。得られたデータは、スポット間の差し引きとブランク緩衝液注入の差し引きとによって二重参照した。処理後の曲線を、ラングミュア解離モデルに基づくoff-rate分析に用いた。

6.1.4 レポーターアッセイ

【0234】

このアッセイにおいて、CD40Lによって誘導されるCD40シグナル伝達の阻害に及ぼすナノボディの効果は、NF- κ B-SEAPレポーターシステムによって定量される。HEK293T細胞の安定なトランスフェクションによるNF- κ B誘導性のSEAPコンストラクトの導入によって、リガンド誘導は、胚性アルカリホスファターゼの分泌を誘起する。SEAPコンストラクトは、5つのNF- κ B結合部位に融合されたIFN- γ 最小プロモーターのコントロール下のSEAPレポーター遺伝子からなる(InvivoGen、TDS HEK-Blue (商標) CD40L細胞、cat.Hkb-cd40)。

【0235】

ナノボディの希釈系列を、ウェットチャンバー内で、CHO hCD40L 4B11細胞の膜抽出物および 5×10^4 個のHEK-Blue細胞とアッセイ媒体(DMEM (Invitrogen、cat.31966-021) + 10% FBS (Sigma、cat.F7524) + 1% Pen/Strep (Invitrogen、cat.15140-122))中において37および5%CO₂で16hインキュベーションした。爾後に、懸濁液の一部を基質に追加し、室温で1hインキュベーションした。SEAPレベルをEnvision (620nm) (Perkin Elmer)を用いて決定した。

6.1.5 B細胞活性化アッセイ

【0236】

ナノボディの希釈系列を、ウェットチャンバー内で、照射された 1×10^4 のCHO hCD40L 4B11細胞および 5×10^4 のB細胞とアッセイ媒体(PMI-1640 (Invitrogen、cat.72400-054) + 10% FBS (Sigma、cat.F7524) + 1% Pen/Strep (Invitrogen、cat.15140-122))中において37および5%CO₂で5日間インキュベーションした。第5日に、プレートを4で5分間250g遠心した。それから、細胞を抗体希釈物(マウス抗ヒトCD19-FITC (BD Pharmingen、cat.:555412) + マウス抗ヒトCD86-PE (BD Pharmingen、cat.:555658))中に再懸濁し、4に30分間置いた。その後、細胞をMACS緩衝液によって3回洗浄し、それから、1/1000希釈したTOPRO3 (Molecular Probes、T3605)を含有するMACS緩衝液中に再懸濁した。サンプルをFACSCanto IIによって分析した。

6.1.6 B細胞増殖アッセイ

【0237】

ナノボディの希釈系列を、ウェットチャンバー内で、CHO hCD40L 4B11細胞の膜抽出物および 5×10^4 個のB細胞とアッセイ媒体(RPMI-1640 (Invitrogen、cat.72400-054) + 10% FBS (Sigma、cat.F7524) + 1% Pen/Strep (Invitrogen、cat.15140-122))中において37および5%CO₂で4日間インキュベーションした。第4日に、トリチウム-チミジン(Perkin Elmer、ref:NET027X001MC)をプレートに追加した。プレートはトリチウム-チミジンとの24hのインキュベーション期間後に凍結した。次の日にプレートを収穫し、トップカウント(Perkin Elmer)によって分析した(H³チミジン取り込みアッセイ)。

6.1.7 競合ELISA

【0238】

ナノボディがCD40L蛋白質上の異なるエピトープを認識するかどうかを評価するために、精製されたナノボディを、競合ELISAにおいてファージ上に提示されたナノボディのより小さいセットに対してピニングした。96ウェルF底プレートNunc-Immuno(商標)(NUNC)の各ウェルを、PBS中のhCD40L(HEK細胞によって産生、R&D、cat#:6420-CL/CF)蛋白質の50ngと4で一晩インキュベーションした。RTにおける1hの4%(w/v)スキムミルクによるブロッキング後に、ナノボディ-ファージを、0.5μMの精製されたナノボディの存在または不在下において追加した。結合したナノボディ-ファージを抗M13-HRPMAb(GE Healthcare; cat#27-9421-01)によって検出し、450nmにおける比色検出を、可溶性(高感度)テトラメチルベンジジン基質(es(HS)TMB)(SDT)をHRP基質として用いて行った。精製されたナノボディの存在および不在下における450nmの吸光度間の比を用いて、ピニングされたナノボディがCD40L分子上の同じかまたはオーバーラップする(しない)エピトープを認識するかどうかを決定した。

6.2 ナノボディ同定

【0239】

ラマにおいてCD40Lに対する免疫応答を誘起することに鑑みて、異なる種間の相同性を、異なる種のCD40Lのアラインメントされた配列の同一性のパーセンテージと異なる残基の数とを計算するが、細胞外ドメインのみを考えることによって評価した。ヒトCD40Lに対するパーセンテージ同一性は、アカゲザルの99.5%からラマの88%ならびにマウスおよびラットの75%未満までに及ぶ。ラマCD40Lに対するヒトCD40L(hCD40L)の高い相同性は、抗体生成を感乱させる。ラットおよびマウスCD40Lに対するヒトCD40Lの低い相同性は、交差反応性のナノボディの知見を難しくする。

【0240】

5頭の非近交ラマを免疫した。2頭のラマを組換えヒトCD40Lによって免疫した(PeproTech、310-02)。3頭のラマを、hCD40Lを発現するL1ana細胞によって免疫した。hCD40LとラマCD40Lとの間の高い相同性にもかかわらず、全てのラマはhCD40Lに対して強い免疫応答を示した。

【0241】

免疫ナノボディファージディスプレイライブラリーを、全てのラマの血液サンプルから抽出されたトータルRNAを用いて調製されたcDNAから生成した。ファージディスプレイライブラリーを、組換えヒトCD40L、ヒト細胞上に発現されたヒトCD40L、または選択ラウンド間で交替する両方の抗原フォーマットどちらかを用いて探索した。

【0242】

選択アウトプットを、ナノボディ結合についてはFACSによって、ブロッキングについてはAlphaScreen競合アッセイによって、上の例6.1.1および6.1.2に従ってスクリーニングした。

【0243】

1回の選択ラウンド後に、結合ナノボディの約50%はCD40L/CD40相互作用をもまたブロックした。大腸菌によって産生された組換えhCD40Lによって選択されたナノボディを例外として、FACS結合剤の数およびブロックナノボディの割合は選択ラウンドにつれて増大した。より高いヒット率が、CHO-CD40L細胞によって免疫された動物に由来するクローンについて観察された。

【0244】

FACSおよびAlphaScreenにおけるカットオフ基準を満たす1500個超のナノボディヒットを爾後にシーケンシングし、210個の異なるナノボディファミリーに属する689個のユニークなクローンをもたらした。これらのクローンのoff-rateを、例6.1.3に述べられているように決定した。

【0245】

40個の異なるナノボディクローン、すなわちリードパネルを、さらなるキャラクタリ

ゼーションのために選択した。AlphaScreen（登録商標）においてC D 4 0 / C D 4 0 L 相互作用をブロックし、C D 4 0 L（F A C S）の本来の立体配座に結合し、o f f - r a t e $< 4 \times 10^{-3}$ を有したクローンのみをさらに考えた。

6.3 40個のナノボディのリードパネルのインビトロキャラクタリゼーション 【0246】

リードパネルの40個のナノボディをpAX205にクローニングし、P. pastorisによって産生し、さらなるキャラクタリゼーションのために精製した。それらの効力を、AlphaScreen、ならびにレポーターおよびB細胞活性化アッセイによって決定した（例6.1.4および6.1.5を見よ）。加えて、o f f - r a t eを確認した。競合E L I S Aにおいてファージ上に提示されたナノボディに対して精製されたナノボディをスクリーニングすることによって、エピトープピンを決定した（例6.1.7を見よ）。

10

【0247】

7つの異なるエピトープピンが40個のナノボディのリードパネルから同定された。ナノボディC 0 1 0 0 0 2 8 B 0 2（ピン6.2）およびC 0 1 0 0 0 4 6 B 0 3（ピン2.1）はC D P 7 6 5 7（ピン1.1）とは異なるエピトープピンである。最も効力の高いクローンはエピトープピン6.2に属した。

【0248】

ヒトおよびラマC D 4 0 Lの間の配列保存に鑑みて、7つの異なるエピトープピンに属するナノボディが同定されることは予想されなかった。

6.4 15個のナノボディのリードパネルのさらなるインビトロ選択

20

【0249】

C D 4 0 L - C D 4 0 相互作用によって誘導される重要な表現型は、B細胞活性化および増殖である。B細胞は抗原をヘルパーT細胞に提示し得る。活性化T細胞がB細胞によって提示されたペプチドを認識する場合には、T細胞上のC D 4 0 LはB細胞のそのC D 4 0 受容体に結合し、休止期B細胞の活性化を引き起こす。T細胞はI L - 4をもまた産生し、これはB細胞に直接的に影響する。これらの刺激の結果として、B細胞は分裂を行い得る。

【0250】

配列多様性とB細胞活性化アッセイにおけるそれらの性能とに基づいて選択された15個のナノボディを、B細胞増殖アッセイによって例6.1.6に従って試験した。B細胞活性化および増殖アッセイの間の主な違いは、読み出し（それぞれC D 8 6レベルおよび H^3 チミジン取り込みの決定である）およびB細胞を活性化するために用いられるC D 4 0 Lソース（それぞれ、UV照射したh C D 4 0 L発現C H O細胞、およびh C D 4 0 L細胞からの膜抽出物）である。両方のアッセイについて、B細胞は健康なドナーに由来した。 H^3 チミジン取り込みは、C D 8 6発現よりもB細胞活性化のさらに下流の指標であり、それゆえに、より妥当な機能的読み出しと考えられる。B細胞増殖アッセイにおいて、15クローンのうち6つはC D P 7 6 5 7 F a bに匹敵する効力を有することが見いだされた。

30

6.5 4つのリード候補の選択

【0251】

40

上に述べられているAlphaScreen、レポーターアッセイ、B細胞活性化アッセイ、およびB細胞増殖アッセイ、および物理化学的安定性データ（データは示さない）に基づいて、リードパネルを、最終的なキャラクタリゼーションステージのための4つのリード候補にまで縮減した。最も高い効力のエピトープピン（ピン6.2；上を見よ）から、異なるファミリーからの2つのリード候補を選択した：C 0 1 0 0 0 2 8 B 0 2（「28B02」）およびC 0 1 0 0 0 4 4 B 0 7（「44B07」）。C 0 1 0 0 0 2 8 B 0 2はB細胞増殖アッセイにおける最良のクローンの1つであったが、C 0 1 0 0 0 4 4 B 0 7はB細胞活性化アッセイにおける最も高い効力のクローンかつB細胞増殖アッセイにおける非常に高い効力のクローンであった。2つの追加のリード候補を選択した。エピトープピン4.2のC 0 1 0 0 0 2 9 C 1 0（「29C10」）、これはB細胞増殖アッセイにおけ

50

る高い効力のクローンであった。少なくとも9クローンが種々のアッセイにおいてより良好な性能であるということを指示する上の基準にもかかわらず、本発明者はエピトープピン2.1のC0100046B03(「46B03」)も選択することに決めた。なぜなら、これは異なる生殖細胞系列にあたったからである。

6.6 フォーマット：半減期延長(HLE)の効果

【0252】

典型的には、自己免疫疾患の処置は薬物が患者において持続的な利用能を有することを要求する。すなわち薬物は長い半減期を有するべきである。薬物の半減期延長の種々の手段が利用可能であり、Fc融合、PEG化、ならびに血清アルブミンおよびアルブミン結合剤への融合を包含する。

【0253】

Fc融合体は最も好ましくないオプションであるという仮説をたてた。なぜなら、これはヒト血小板上のFc受容体への結合を可能にし、潜在的に血小板活性化および凝集をもたらすであろうからである。その上に、PEG部分は別個の産生ステップにおいてナノボディにコンジュゲーションされ、増大したコストおよび減少した収量をもたらすので、PEG化は好ましくない。また、PEG化は、多くの場合には、薬物-標的結合相互作用との立体干渉が原因の縮減された結合親和性に至り、高いPEAを患う。これに鑑みて、血清アルブミンに結合するISVDへの融合による半減期延長が選好された。

【0254】

リード候補に及ぼすアルブミン結合の影響を評価するために、半減期延長型の(HLE)(NB-35GS-Alb11-FLAG3-HIS6)および非HLEの一価のISVDを構築し、IC₅₀によって指示されるヒト血清アルブミン(HSA)の不在および存在下におけるB細胞増殖アッセイによって試験した：

- C010000006はC01000028B02-Alb11-FLAG3-HIS6であり；

- C010000008はC01000029C10-Alb11-FLAG3-HIS6であり；

- C010000004はC01000044B07-Alb11-FLAG3-HIS6であり；

- C010000010はC01000046B03-Alb11-FLAG3-HIS6である。

【0255】

結果は表6.6に示されている。

【表1】

表6.6：B細胞増殖アッセイにおいて半減期延長性ISVDの融合およびHSA結合がリードナノボディの効力に及ぼす影響

コンストラクト	IC ₅₀ (M)		～倍の違い	
	-HSA	+HSA	-HSA	+HSA
C010000006	5,97E-10	1,33E-09	1	2.2
C0100028B02		2,81E-09		
C010000008	1,26E-09	2,06E-09	1	1.6
C0100029C10		1,06E-09		
C010000004	1,18E-09	1,88E-09	1	1.6
C0100044B07		1,14E-09		
C010000010	8,52E-10	1,72E-09	1	2
C0100046B03		2,38E-09		

【0256】

効力の小さい違いのみが観察され、分子の効力に及ぼす半減期延長の限定された影響を指示した。PEG化によるFab'部分の半減期延長が活性を4～5倍減少させたCDP7657とは対照的である(US2010/0104573を参照せよ)。

6.7 種間交差反応性および選択性

6.7.1 種間交差反応性

【0257】

アカゲザルの99.5%からマウスおよびラットの75%未満までに及ぶヒトCD40Lに対するCD40L配列相同性の異なる程度を考慮して、マウス、ラット、カニクイ、およびアカゲザルCD40Lに対する種間交差反応性を評価した。

【0258】

マウスCD40L(UniProtアクセッション番号:P27548)への結合を評価するために、ProteOnのGLCセンサーチップを、10mM酢酸緩衝液pH5.5中の組換えマウスCD40L(R&D、NS0)の3000～4000Uによってコーティングした。精製された一価の抗CD40Lナノボディを、ProteOnランニング緩衝液:PBS/Tween(リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4、0.005%Tween20入り)中において、100nMでセンサーチップ上に流した。処理後の曲線を、ラングミュア解離モデルに基づくoff-rate分析に用いた。全ての40個のリードパネルクロンを試験した。しかしながら、それらのいずれもマウスCD40Lへの結合を示さなかった。

【0259】

ラットCD40L(UniProtアクセッション番号:Q9Z2V2およびQ9R254(二次))に対する交差反応性をFACSによって試験した。精製されたナノボディを、ラットCD40Lへの結合についてFACSによって分析した。 2×10^5 細胞(一過的にトランスフェクションされたラットCD40LHEK細胞)を、FACS緩衝液中の精製されたナノボディと4で30分間インキュベーションした。細胞を3×洗浄し、再懸濁し、4で30分間インキュベーションした。細胞を再び3×洗浄し、死細胞をTOPRO3(Molecular probes、T3605)によって染色した。サンプルをFACSarray(商標)(BD Biosciences)によって分析した。最終的な4つのリード候補(C0100028B02、C0100029C10、C0100044B07、およびC0100046B03)のみを試験した。結合はナノボディのいずれかについては観察されなかった。

【0260】

カニクイCD40L(UniProtアクセッション番号:G7PG38)およびアカゲCD40L(UniProtアクセッション番号:G7N4M5)に対する交差反応性をリガンド競合アッセイによって試験した。精製されたナノボディを、ヒト/アカゲザル/カニクイザルCD40発現細胞へのピオチニル化ヒトCD40L結合との競合についてFACSによって分析した。ヒト、アカゲザル、およびカニクイザル(cyno)CD40Lの可溶性形態は配列が同一であるので、ヒトCD40Lを用いた。 2×10^5 細胞(一過的にトランスフェクションされたHEK細胞)を、FACS緩衝液中の精製されたナノボディの希釈系列と4で30分間インキュベーションした。それから、細胞を3×洗浄し、最後に、ストレプトアビジン-PE(BD Pharmingen、#554061)を含有するFACS緩衝液中に再懸濁した。この混合物を4で30分間インキュベーションした。細胞は上に述べられているようにさらに取り扱った。結果は表6.7に示されている。

10

20

30

40

【表 2】

表 6. 7 : ヒト/カニクイザル/アカゲザル交差反応性 (リガンド競合)

コンストラクト	ヒト CD40		カニクイザル CD40		アカゲザル CD40	
	IC50 (M)	% ブロッキング ^{2*}	IC50 (M)	% ブロッキング	IC50 (M)	% ブロッキング
C0100028B02	4,43E-09	71	4,70E-09	75	4,55E-09	72
C0100029C10	1,42E-10 [*]	98	8,07E-09	81	1,24E-08	87
C0100044B07	5,89E-09	82	5,28E-09	79	5,41E-09	83
C0100046B03	1,53E-08	96	2,27E-08	97	2,82E-08	100

* 準最適化曲線適合 ; ^{2*} 観察された最大の効果

10

【0 2 6 1】

ナノボディのそれぞれについて、IC₅₀ 値は、異なる CD 4 0 L 種について実験誤差内で同一であった。

6. 7. 2 選択性

【0 2 6 2】

Basic Local Alignment Search Tool (Blast) を用いて、ヒト蛋白質データベース中の最も近縁の蛋白質を同定した。最も近縁の蛋白質 (非 CD 4 0 L バリエーション) は TNF、HVEM-L (TNF 1 4)、および RANKL (TNF 1 1) であり、それぞれ 27.9%、27.9%、および 25.4% の配列同一性を有した。CD 4 0 L について選択性を評価するために、MaxiSorp プレート (Nunc、4 3 0 3 4 1) をヒト CD 4 0 L によって一晚コーティングし (4)、次に RT における 1 時間のブロッキングであった (PBS、1% カゼイン)。ナノボディの一定濃度を、100 倍過剰から出発する競合剤 (TNF、HVEM-L (TNF 1 4)、および hRANKL (TNF 1 1); CD 4 0 L を正のコントロールとして用いた) の希釈系列と一緒に用いた。ナノボディは抗 FLAG-HRP (Sigma (A 8 5 9 2)) によって検出した。

20

【0 2 6 3】

ヒト TNF、HVEM-L (TNF 1 4)、および hRANKL (TNF 1 1) に対する結合は、C 0 1 0 0 0 2 8 B 0 2、C 0 1 0 0 0 2 9 C 1 0、C 0 1 0 0 0 4 4 B 0 7、および C 0 1 0 0 0 4 6 B 0 3 のいずれかについて観察されなかった。

30

6. 8 親和性成熟

【0 2 6 4】

4 つの選択されたナノボディ (C 0 1 0 0 0 2 8 B 0 2、C 0 1 0 0 0 2 9 C 1 0、C 0 1 0 0 0 4 4 B 0 7、および C 0 1 0 0 0 4 6 B 0 3) は、B 細胞増殖アッセイにおいてナノモル範囲の効力を有した。これは IC₅₀ によって指示される (表 6. 8 を見よ)。

【表 3】

表 6. 8 : B 細胞増殖アッセイにおける 4 つのリードの効力データの概略

ナノボディ	平均 IC50 (M)	標準偏差 IC50 (M)
C0100028B02	1,15E-09	5,05E-10
C0100029C10	1,26E-09	6,58E-10
C0100044B07	9,71E-10	2,48E-10
C0100046B03	2,18E-09	1,09E-09

40

【0 2 6 5】

さらに効力を増大させるために、ナノボディを親和性成熟した。親のナノボディの親和性成熟バリエーションのスクリーニングのために、off-rate を決定した。

【0 2 6 6】

親和性成熟は、各親のナノボディクローンから生成したエラーブローンライブラリーを

50

スクリーニングすることによって行った。このアプローチでは、アミノ酸置換は、エラープロードPCRによって、ナノボディをコードするDNA中への変異のランダムな導入からもたらされる。帰結として、アミノ酸置換がCDRおよびフレームワーク領域(FR)両方に見いだされる。5ラウンドのファージディスプレイ選択を、組換えCD40Lの(50nMから0.05pMに)減少して行く濃度を用いて溶液中で行った。ファージディスプレイ後に、個々のナノボディをシーケンシングし、off-rateをSPR分析によって決定した(例6.1.3を参照せよ)。off-rateデータに基づいて、有益な効果を有する変異をさらに検討した。

6.8.1 C0100028B02(28B02)

【0267】

413個の配列が選択後に得られ、そのうち294クローンがシーケンシングに基づいて非冗長的であった。これらのユニークなクローンのうち、271クローンのoff-rateをProteOnによって試験した。

【0268】

本質的に、ナノボディ上のそこそこに散在するフレームワーク変異(1クローンに最大6つ)は、off-rateに影響しないか、または最小限にのみ影響した(データは示さない)。FR変異のいずれも保持されなかった。CDR変異は下の表に示されている。

【0269】

クローンのおよそ25%は親のナノボディと比べて最大2倍改善されたoff-rateを提示した。

【表4】

28B02	CDR1*									
Kabat 付番	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
絶対 付番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型 配列	G	F	T	L	E	Y	Y	A	I	G
変異			S	Q				N	L	A
変異			N	S				V	V	
変異			A	M						
変異			I	G						

*1クローンに最大2つのCDR1変異

【表5】

28B02	CDR2*								
Kabat 付番	50	51	52	53	54	55	56	57	58
絶対 付番	1	2	3	4	5	6	7	8	9
野生型 配列	C	I	S	S	E	G	S	T	S
変異	.	V	G	.	G	S	G	A	I
変異	N	P	R
変異	T	I	G
変異	I	S	.

*1クローンに最大2つのCDR2変異

10

20

30

40

50

【表 6】

28B02	CDR3*																			
Kabat 付番	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	100k	100l	101	102
絶対 付番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
野生型 配列	D	P	D	R	G	F	L	G	S	S	C	D	T	Q	S	H	Q	Y	D	Y
変異	.	.	.	S	.	.	F	D	G	N	.	G	N	H	P	N	L	F	G	F
変異	M	A	N	G	.	N	A	K	T	Y	R	.	.	N
変異	W	S	R	R	.	E	.	L	.	.	H	.	.	.
変異	T	.	V	.	R

* 1 クローンに最大 3 つの CDR 変異

【 0 2 7 0 】

CDR 3 中の 3 つの変異を、このデータセットに基づくさらなる検討のために選択した：
 L 1 0 0 a F：この変異は 1 . 3 倍改善された o f f - r a t e を（好ましくは K 4 3 R との組み合わせによって）もたらした；

D 1 0 1 G：この変異は、o f f - r a t e の 1 . 3 倍の改善をもたらした；および

Y 1 0 2 F：この変異は、o f f - r a t e の 1 . 8 倍の改善をもたらした。

最終的なバリエーションは C 0 1 0 0 0 2 3 6 6（配列番号 7）であった。

6 . 8 . 2 C 0 1 0 0 0 4 6 B 0 3（4 6 B 0 3）

【 0 2 7 1 】

7 3 1 個の配列が得られ、そのうち 2 2 9 クローンは非冗長的であった。全ての 2 2 9 クローンを ProteOn によって試験した。

【 0 2 7 2 】

本質的に、ナノボディ上のそこそこに散在するフレームワーク変異（1 クローンに最大 6 つ）は、o f f - r a t e に影響しないか、または最小限にのみ影響した（データは示さない）。FR 変異のいずれも保持されなかった。CDR 変異は下の表に示されている。

【表 7】

46B03	CDR1*										
Kabat 付番	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
絶 対 付番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
野生型 配列	G	R	T	P	L	N	Y	H	M	A	
変異	E	H	I	S	F	S	H	N	K	S	
変異	R	G	A	.	.	D	.	.	T	G	
変異	.	.	S	.	.	I	.	.	V	T	
変異	.	.	P	

* 1 クローンに最大 2 つの CDR 1 変異

10

20

30

40

50

【表 8】

46B03	CDR2*									
Kabat 付番	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
絶対 付番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型 配列	A	I	S	S	L	L	G	S	T	D
変異	G	V	.	N	.	I	S	I	P	.
変異	.	.	.	R	.	.	D	G	S	.
変異	.	.	.	G	.	.	.	F	.	.

* 1 クローンに最大 2 つの C D R 1 変異

【表 9】

46B03	CDR3*																			
Kabat 付番	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	100k	100l	101	102
絶対 付番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
野生型 配列	R	E	T	T	H	Y	S	T	S	D	R	V	N	E	M	R	H	Y	D	Y
変異	Q	D	S	I	Y	H	T	I	N	A	S	.	D	V	V	K	N	.	N	H
変異	L	K	M	S	N	N	G	A	R	.	G	.	Y	A	K	S	L	.	.	F
変異	.	.	A	A	.	.	N	S	D	T	W	Q	.	.	N
変異	.	.	K	R	.	.	I	N	.	M	R	.	.	.
変異	G	D	.	.	.
変異	T

* 1 クローンに最大 4 つの C D R 3 変異

【 0 2 7 3 】

クローンのおよそ 25% は親のナノボディと比べて最大 5.2 倍改善された off - rate を提示した。6 つの位置を、このデータセットに基づくさらなる検討のために選択した：

- ・ Y 1 0 0 H : off - rate に及ぼす効果なし
- ・ Y 1 0 0 I : 1.5 倍改善された off - rate
- ・ S 1 0 0 a T : off - rate に及ぼす効果なし
- ・ N 1 0 0 g D : 効果は目立たない
- ・ E 1 0 0 h V : off - rate に及ぼす効果なし
- ・ M 1 0 0 i I : off - rate に及ぼす効果なし
- ・ H 1 0 0 k N : 単一の変異、2.6 倍改善された off - rate
- ・ H 1 0 0 k A : 約 2 倍改善された off - rate
- ・ H 1 0 0 k S : 約 2 倍改善された off - rate

【 0 2 7 4 】

最終的なバリエーションは C 0 1 0 0 0 3 2 9 0 (配列番号 8) であった。

6.9 A1b バリエーション

【 0 2 7 5 】

本発明に至る研究において、C 末端延長をナノボディの C 末端領域に追加することは、健康なヒト対象の血漿 / 血清サンプルの大多数において既存抗体の結合を本質的に防止するということが発見された (下を見よ)。しかしながら、SLE を包含するある種の深刻な (自己) 免疫障害を患ういくつかのヒト対象からの血液および血清は、ナノボディが C

10

20

30

40

50

末端延長を含むときでさえもナノボディに結合し得るいくつかの既存抗体／因子を含有するように見える。

【0276】

下の例においては、用いられた（すなわち、健康なボランティアおよびSLE患者からの）サンプル中に存在する既存抗体の、試験されたナノボディへの結合を、次のようにProteOnを用いて決定した：ヒト血清アルブミン（HSA）上に捕捉されたナノボディへの既存抗体の結合を、ProteOn XP 36（Bio-Rad Laboratories, Inc.）を用いて評価した。PBS / Tween（リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4、0.005% Tween 20）をランニング緩衝液として用い、実験は25℃で行った。ProteOnのGLCセンサーチップのリガンドレーンをEDC / NHS（流量30 μl / min）によって活性化し、HSAをProteOn酢酸緩衝液pH 4.5中の10 μg / mlで注入して（流量100 μl / min）、固定化レベルをおよそ3200 RUにした。固定化後に、表面をエタノールアミンHClによって不活性化した（流量30 μl / min）。ナノボディをHSA表面に45 μl / minで2分間注入し、ナノボディ捕捉レベルをおよそ200 RUにした。既存抗体を含有するサンプルを14,000 rpmで2分間遠心し、上清をPBS - Tween 20（0.005%）によって1:10希釈した後に、45 μl / minで2分間注入し、次に爾後の400秒の解離ステップであった。各サイクル後に（すなわち、新たなナノボディ捕捉および血液サンプル注入ステップ前に）、HSA表面を45 μl / minのHCl（100 mM）の2分の注入によって再生した。センサーグラム処理およびデータ分析をProteOn Manager 3.1.0（Bio-Rad Laboratories, Inc.）によって行った。既存抗体の結合を示すセンサーグラムは、1）ナノボディ - HSA解離および2）参照リガンドレーンへの非特異的結合を差し引くことによる二重参照後に得られた。既存抗体の結合レベルは、報告時点を125秒に（会合の終わりの5秒後に）設定することによって決定した。既存抗体結合のパーセンテージ縮減は、参照ナノボディの125秒における結合レベルに対して相対的に計算した。参照A = A1b8（配列番号16）；参照B = A1b8 + A（配列番号17）（表2を見よ）。

6.9.1：ヒトSLEサンプル中に存在する既存抗体の結合に及ぼすS112K変異の影響

【0277】

参照Aおよび参照Bを、SLEについて陽性と確認された患者から得られた7つの血清サンプルからの既存抗体による結合について試験した。比較のために、2人の健康なヒトボランティアからの血漿サンプルを包含した。

【0278】

試験されたサンプル中の既存抗体のナノボディへの結合を、上で概述した一般的なプロトコールに従ってProteOnによって測定した。結果は下の表6.9.1に示されている。

【0279】

参照Aおよび参照Bならびに本発明のナノボディの結合データの比較から分かるように、SLE患者のいくつかから得られたサンプルは、C末端アラニン残基の存在下においてさえもナノボディに尚結合し得るある種の既存抗体を含有するように見える（C末端アラニン残基は、健康なボランティアからの血漿サンプル中に存在する既存抗体の全ての結合を（部分的にまたは本質的に完全に）本質的に防止／除去はしなかった）。

【0280】

SLEサンプルからのそれらの既存抗体の結合が、位置11および112の変異によって（位置112のケースにおいては、特にS112Kによって）大いに縮減され得たということもさらに分かる。

6.9.2：ヒトSLEサンプル中に存在する既存抗体の結合に、組み合わせられたフレームワーク変異およびC末端延長が及ぼす影響

【0281】

4つの異なるナノボディ（具体的なフレームワーク変異を有し、C末端アラニン延長ありまたはなし）を、SLEについて陽性と確認された患者から得られた5つの血清サンプル

ルからの既存抗体の結合について試験した。比較のために、健康なヒトボランティアからの1つの血漿サンプルを包含した。

【0282】

試験されたナノボディへのサンプル中の既存抗体の結合を、上で概述した一般的なプロトコールに従ってProteOnによって測定した。結果は下の表6.9.2(a)および6.9.2(b)に示されている。

【0283】

参照Aおよび参照Bの結合データの比較から分かるように、SLE患者から得られたサンプルは、C末端アラニン残基の存在下においてさえもナノボディに尚結合し得るある種の既存抗体を含有するよう見える。C末端アラニン残基は、健康なボランティアからの血漿サンプル中に存在する既存抗体の全ての結合を本質的に防止/除去はしなかった。

10

【0284】

SLEサンプルからのそれらの既存抗体の結合が、位置11および112の変異によって(位置112のケースにおいては、特にS112Kによって)大いに縮減され得たということもさらに分かる。

6.9.3: SLE患者からのサンプル中の既存抗体の結合にV89T変異が及ぼす影響。

【0285】

本明細書に記載される通り、ある種のSLE患者から得られたサンプルは、C末端延長が存在するときでさえもVHドメインの暴露されたC末端に結合し得るある種の既存抗体/因子を含有するよう見える。V89T変異が、C末端延長の存在ありまたはなしで、かかる結合を縮減または防止/除去し得るかどうかを検討した。結果は下の表6.9.2(b)および6.9.3(a)にもまた示されている。

20

【0286】

分かる通り、V89T変異は、SLE患者から得られたサンプル中に存在する既存抗体の結合を、S112K変異と類似の程度まで本質的に防止/除去し得た。しかしながら、C末端延長なしのV89T変異を有するナノボディおよびC末端延長なしのS112K変異を有する類似のナノボディについて表6.9.2(b)および6.9.3(a)に与えられているデータを比較することから分かるように、C末端延長なしのナノボディの位置112に変異を有することは、一般的には、健康なボランティアからのサンプル中の既存抗体の結合をV89T変異よりも大きい程度まで縮減する(すなわち、それぞれS112Kナノボディの100%、85%、および64%対V89Tナノボディの9%、11%、および16%)。この理由で、位置112の変異(具体的にはS112KまたはS112Q)の使用は、位置89の変異(例えばV89T)の使用と比べて多くの場合には好ましいであろう。

30

【0287】

しかしながら、表6.9.2(b)および6.9.3(a)のデータからもまた分かる通り、C末端アラニンをV89Tナノボディに追加することは、健康なボランティアから得られたサンプル中の既存抗体の結合を完全に防止/除去した。この理由から、V89TナノボディまたはVHドメインが、その中にそれが存在する蛋白質またはポリペプチドにおいて(例えば、そのC末端を形成するので)暴露されたC末端領域を有するか、または有することを意図される場合には、本明細書に記載されるV89T変異とC末端延長との組み合わせが通常は好ましいであろう(すなわち、C末端延長なしのV89Tの使用と比べて)。

40

【0288】

上の表からの結果/知見が広く適用可能であるということを確認するために、S112Kおよび/またはV89T変異を有する代表的なナノボディを、96個(S112K)および129個(V89T)のヒト血清サンプルの試験パネルに対して試験した。結合は上に述べられているプロトコールを用いてProteOnによって決定された。

【0289】

結果は図1および表6.9.3(b)にまとめられている(S112K変異を有する代

50

表的なナノボディ)。図1においては、S112K変異を有するナノボディ(参照A + S112K + C末端アラニン。上の表6.9.2(b)を見よ)を参照ナノボディ(参照A; 配列番号16)と比較した。S112K変異を有するナノボディおよび参照Aを、両方とも血清サンプルのそれぞれに対して試験し、125秒における結合レベル(RU)を決定した。それから、データを図1にプロットした。各点は、参照A(図1においては(1)として指示されている)またはS112K変異体(図1においては(2)として指示されている)どちらかについて1つのサンプルによって測定された結合を提示している。点線は、20RUという測定された結合レベルを指示している。

【0290】

同じデータは、表6.9.3(b)において数値的にもまた表されている。これは、それぞれ参照AおよびS112K変異体について、20RU超、20RU未滿(すなわち0および20RUの間)、および10RU未滿という125秒における結合レベルを与えた試験されたサンプルの総数を挙げている。

【0291】

図1にプロットされ、表6.9.3(b)に示されているデータから分かる通り、参照Aでは、試験された96サンプルの半分超が20RU超の結合レベルを与え(いくつかのケースにおいては、150~200RUほども高い)、サンプル中に存在する既存抗体が参照Aに結合しているということを指示した。比較として、S112K変異体では、いずれのサンプルも20RU超の結合レベルを与えず(大部分は10RU未滿)、S122K変異が試験された96サンプルの全てにおいて本質的に既存抗体の結合を縮減/防止する能力があるということを指示した。

【0292】

類似のプロットおよび類似のデータが、129個の血清サンプルに対して試験されたV89T変異を有する代表的なナノボディ(参照A + L11V + V89T + C末端アラニン; 上の表6.9.3(a)を見よ)についてそれぞれ図2および表6.9.3(c)に示されており、再び参照A(図2においては(1)によって指示されている; V89T変異体は図2においては(2)によって指示されている)と比較されている。

【0293】

再び、図2のプロットおよび表6.9.3(c)のデータから、少数の例外(すなわち試験されたサンプルの10%未滿。それから、これらはそれぞれが約100RU以下という125秒後の絶対結合値を与えた)を除いて、V89T変異は、試験された129サンプルの大部分において既存抗体の結合を縮減/防止する能力があったが、V89T変異なしの参照は、試験されたサンプルの大部分において既存抗体によって結合されたということが分かる。

【表10】

表6.9.3(b): 96個の血清サンプルによるS112K変異を有する代表的なナノボディの試験

試験されたナノボディ	125秒における 結合レベル < 10RU	125秒における 結合レベル < 20RU	125秒における 結合レベル > 20RU
参照A	34	41	55
参照A + S112K + C末端アラニン	92	96	0

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 6. 9. 3 (c) : 129 個の血清サンプルによる V89L および／または T100K/Q 変異を有する ナノボディ の試験

試験されたナノボディ	125秒における 結合レベル < 10RU	125秒における 結合レベル < 20RU	125秒における 結合レベル > 20RU
参照 A	27	40	89
参照 A + L11V + V89T + C末端アラニン	110	119	10

6. 10 最終的なフォーマット

10

【0294】

既存抗体の結合を縮減するために A1b バリエーションを最適化するデータに基づいて（例 6. 9 を見よ）、CD40L に結合する ISVD を最適化された A1b バリエーションに融合し、さらに試験した。

6. 10. 1 最終的なフォーマットの既存抗体の結合。

【0295】

C0100028B02 および C0100046B03 を、それぞれ A1b11 および A1b23 バリエーション、すなわち A1b00129 (A1b11 (L11V, V89T) - A) および A1b00132 (A1b23 (L5V, L11V, V89T) - A) に融合した（表 6. 10 を見よ）。

20

【表 1 2】

表 6. 10 : HLE 延長されたリード

Nanobase ID	説明
C010003320	C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-Alb11(L11V,V89T)-A
C010003323	C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-Alb23(L5V,L11V,V89T)-A
C010003326	C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-ALB11(S112K)-A
C010003313	C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100iI,H100kN)-9GS-Alb11(L11V,V89T)-A
C010003315	C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100iI,H100kN)-9GS-Alb23(L5V,L11V,V89T)-A
C010003318	C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100iI,H100kN)-9GS-ALB11(S112K)-A

30

【0296】

既存抗体への結合の不在を、本質的に上において 6. 9 に述べられている最終的なフォーマットについて評価した。

【0297】

C 末端アラニンを追加することと L11V および V89T を A1b8 ビルディングブロック中に作り出すこととによって、HLE 延長型リードへの既存抗体の結合の有意な縮減／防止があった。類似の既存抗体結合プロファイルが C010003313 (「3313」) および C010003320 (「3320」) で見られた。これは、既存抗体の結合プロファイルがリンカーに非依存的であるように見えるということをもまた実証している。

40

【0298】

C 末端 A1a を追加することと S112K を A1b8 ビルディングブロック中に作り出すこととによって、HLE 延長型リードへの既存抗体の有意な縮減／防止があった。

【0299】

類似の既存抗体結合プロファイルが、C010003326 (「3326」) と比較して C010003318 (「3318」) で見られた。再び、これは、最適化された A1

50

b バリエントを追加することによる既存抗体の縮減または防止が、最適化された A 1 b バリエントにリードナノボディをリンクするために用いられるリンカーに非依存적であるように見えるということを実証している。

【 0 3 0 0 】

その上に、これは、このケースにおいては、コンストラクト全体への既存抗体の結合の有意な縮減 / 防止を獲得するためには、C 末端ビルディングブロック（このケースにおいては、最適化された A 1 b バリエント）のみが改変されることを必要とするということをもまた実証している。

6 . 1 1 B 細胞活性化および増殖アッセイにおける効力

【 0 3 0 1 】

リード候補 C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 の効力を B 細胞活性化および B 細胞増殖アッセイによって評価した（例 6 . 1 . 6 および 6 . 4 を参照せよ）。効力を 5 C 8 および非 P E G 化 C D P 7 6 5 7 と比較した。結果は表 6 . 1 1 にまとめられている。

【表 1 3】

表 6 . 1 1 . B 細胞活性化および B 細胞増殖アッセイ

IC50 (pM)	5c8	CDP7657*	C010003318
B 細胞活性化	119	101	212
B 細胞増殖	51	864	308

* 非 P E G 化 CDP7657

【 0 3 0 2 】

B 細胞増殖データに基づいて、C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 は 5 C 8 と比較して 1 0 から 6 倍低い効力を有するが、C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 は非 P E G 化 C D P 7 6 5 7 よりも高い効力を有するということが実証された。

【 0 3 0 3 】

B 細胞活性化データに基づいて、非 P E G 化 C D P 7 6 5 7 および 5 C 8 は、C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 よりも約係数 2 だけ高い効力であるように見えるということが分かる。

【 0 3 0 4 】

結論として、5 C 8 は、これらのインビトロアッセイにおいて C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 よりも約 2 ~ 1 0 倍高い効力である。より妥当な B 細胞増殖アッセイにおいて（例 6 . 4 を参照せよ）、C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 は C D P 7 6 5 7 よりも明らかに高い効力である。B 細胞活性化アッセイにおいては、C D P 7 6 5 7 は C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 よりも約係数 2 だけ高い効力であるように見える。しかしながら、例 6 . 6 において指示されたように、C D P 7 6 5 7 の P E G 化は活性を 4 ~ 5 倍減少させた（U S 2 0 1 0 / 0 1 0 4 5 7 3 を参照せよ）。

【 0 3 0 5 】

ゆえに、C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 は全てのアッセイにおいて C D P 7 6 5 7 よりも高い効力であるように見える。

6 . 1 2 C D 4 0 L に対する親和性

【 0 3 0 6 】

h C D 4 0 L に対する最終的な二重特異性 H L E リードナノボディの親和性を定義するために、速度論的排除法（KinExA）を KinExA 3200（Sapidyne Inc.）によって実行した。

【 0 3 0 7 】

それから、応答を KinExA Pro ソフトウェア v 3 . 2 . 6 に入力し、遊離ナノボディのパーセンテージを h C D 4 0 L 濃度に対してプロットした。外れ値はフィッティングから排除されなかった。ドリフトまたはリガンドに関係づけられる非特異的結合の補正は必要ではなかった。低い変動が観察された。プロットされた値は「Affinity, Standard」分析法を用いてフィッティングした。K D の結果は表 6 . 1 2 に示されている。

【表 1 4】

表 6. 1 2 : 溶液中 K i n E x A アッセイにおける C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 および C 0 1 0 0 0 3 3 2 6 の親和性 (p M)

	KD (pM) [95% CI]
C010003318	17 pM [12 – 22 pM]
C010003326	4 pM [3 – 6 pM]

10

6 . 1 3 マウスおよびカニクイにおける T T 研究は、ナノボディがインビボの C D 4 0 L 活性を中和することに有効であるということを実証する

【 0 3 0 8 】

リードナノボディの C D 4 0 L 中和能力をインビボで評価するために、破傷風トキソイド (T T) 負荷研究をヒト化マウスおよびカニクイザルにおいて行った。

6 . 1 3 . 1 ナノボディはヒト化マウスの T T 研究において C D 4 0 L 活性を中和する .

【 0 3 0 9 】

ナノボディはマウス C D 4 0 L と交差反応性ではなかった (例 6 . 7 . 1 を見よ) 、ヒト化マウスを破傷風毒素 (T T) によって免疫し、 T T 特異的な I g G 抗体応答に C D 4 0 L 中和が及ぼす効果を異なる時点において評価した。ナノボディを、 T T 負荷に先立って、3日毎に、個体あたり合計で 1 0 回の投与になるように投与した。 T T を第 1 日および第 3 1 日に投与した。抗 C D 4 0 L 3 3 1 8 ナノボディこれらのマウスにおける T T - I g G 応答を損なわせ、この効果は有意であった (データは示さない) 。免疫抑制効果は用量依存的であったが、試験された全ての用量はコントロールよりも良好に I g G 応答を縮減した。ナノボディの免疫抑制効果は、これらのナノボディ処置されたマウスの脾臓における成熟ヒト B 細胞の不在によって確認された。類似に、マウス T T 研究において、ナノボディ 3 3 1 3 および 3 3 2 0 は、基剤群と比較されたときに T T - I g G 応答を有意に縮減することに有効であることが判明した。加えて、これらのナノボディは、 T T 免疫されたヒト P B M C グラフト免疫不全マウスの脾臓における h u P B L の定着および生育をも損なわせる (データは示さない) 。

20

【 0 3 1 0 】

ゆえに、試験された全てのナノボディはインビボの C D 4 0 L 活性を中和することに有効である。

6 . 1 3 . 2 ナノボディは、カニクイザルの T T 研究において C D 4 0 L 活性を中和する .

【 0 3 1 1 】

カニクイザル T T 研究を例 6 . 1 3 . 1 と類似に行った。手短には、カニクイザルを破傷風毒素によって毎日免疫し、 T T 特異的な I g G 抗体応答に及ぼす C D 4 0 L 中和の効果を異なる時点において評価した。ナノボディ、5 C 8、および基剤を第 0 日および第 3 1 日に投与した。第 1 日 + 4 h および第 3 1 日に、 T T を投与した。図 7 に示されているように、抗 C D 4 0 L の C 0 1 0 0 0 3 3 1 8 ナノボディはこれらのサルにおける T T - I g G 応答を損なわせ、この効果は有意であった。免疫抑制効果は用量依存的であったが、試験された全ての用量は、 I g G 応答をコントロールよりも良好に縮減した。データは、全てのナノボディ用量における可溶性標的の飽和を指示している。

40

【 0 3 1 2 】

ゆえに、試験された全てのナノボディはインビボの C D 4 0 L 活性を中和することに有効である。カニクイザルのデータは、マウスにおけるデータを確認しており、機能的な F c 領域なしでさえもナノボディの広い適用可能性を証明している。とりわけ、抗 C D 4 0 L の F c エフェクター機能は、 T T に対する液性応答に影響することが示された (Shock et al. 2015 Arthritis Research & Therapy 17:234) 。

50

6.14 TE / 血栓症のリスクのインビトロ評価

【0313】

前に挙げたように、臨床的効果の有望な証拠にもかかわらず、h u 5 C 8のさらなる開発は、処置中に現れる心血管血栓症事象 (TE) の増大した発生率ゆえに中止された。また、アカゲザルにおける5 C 8の研究において、肺血管血栓および血管症を包含する様々なTEが5 C 8の投与後に見いだされた (Wakefield et al. 2010 Arthritis Rheum. 62:1243)。

【0314】

ゆえに、抗CD40Lナノボディが臨床的に用いられ得る前に、その安全性の評価は最大限の重要性がある。安全性をインビボおよびインビトロの種々のシステムによって評価した。次の方法およびアプローチを、インビボのTEおよび/または血栓症のリスクを評価するために設計した。

6.14.1 インビトロの安全性 - 血小板アッセイ

【0315】

抗CD40LmAbは、FcγRIIIaを血小板上にクラスター化する免疫複合体によって血小板活性化および凝集を誘導し得るということがRoth et al.によって記載されているので、抗CD40Lナノボディを血小板活性化および凝集アッセイによって試験して、血小板を刺激するそれらの固有のポテンシャルを検討した (Roth et al., 2004 Transplantation 78:1238-9)。

【0316】

C010003313およびC010003318を、前に述べられた血小板活性化アッセイおよび血小板凝集アッセイによってアッセイした。5 C 8およびADPをこれらのアッセイにおける正のコントロールとしてとり上げた。健康なボランティアおよびSLE患者両方について、血小板活性化が5 C 8で観察された。対照的に、C010003313およびC010003318は健康なボランティアおよびSLE患者において非活性化プロファイルを実証した (それぞれ図3および図4)。加えて、これらのナノボディは健康なボランティアおよびSLE患者の血液による血小板凝集アッセイによって試験され、血小板凝集を誘導しないと結論づけられたが、5 C 8はした。血小板凝集アッセイの結果は図5 (健康なボランティア) および図6 (SLE患者) に示されている。

【0317】

ゆえに、インビトロの血小板活性化および凝集アッセイにおいて、ナノボディは血小板を誘導しないが、5 C 8はするということが実証された。

6.14.2 インビトロの安全性 - 内皮細胞活性化システム

【0318】

膜CD40Lは、主としてCD4⁺T細胞に限られる活性化した成熟T細胞上に一過的に発現されるが、休止期T細胞上にはされない。膜CD40Lの発現は、Tリンパ球以外の細胞、すなわち活性化血小板、初代細胞、肥満細胞、好塩基球、および好酸球上にもまた検出されているが、CD40発現は、ある種の条件下においてB細胞、ナチュラルキラー細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞上に、幅広く内皮細胞、線維芽細胞、および表皮細胞を包含する非造血細胞上に実証されている。内皮細胞は血小板の次に止血の鍵となるプレーヤーであるので、抗CD40L剤が内皮細胞に及ぼす影響を、初代HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を含有する2つのシステムにおいて評価した: 刺激ありの3Cシステム (心血管疾患/慢性炎症を模倣するため) および未刺激のHN0システム (健康な血管内皮を模倣するため) (Bioseek)。抗CD40Lナノボディ、無関係なコントロールナノボディ、5 C 8、および正のコントロールとしてのpiclamilastを、このシステムにおいて4つの異なる濃度で試験した。

【0319】

結果は、ナノボディプロファイルが、内皮細胞に及ぼすいずれかの効果を指示しないと考えられたということを実証している (データは示さない)。他方で、piclamilastは炎症状態に関連したが、最も著しい結果は5 C 8によって得られた。今のところ、内皮細胞

10

20

30

40

50

に及ぼす 5 C 8 からの影響は報告されていないが、両方の細胞系において、明瞭な用量依存的応答が観察された。具体的には、モニターされた全てのマーカー（炎症性、免疫調節、組織リモデリング、および止血）は 1 つのまたは両方の細胞系において 5 C 8 が原因で増大した。

【 0 3 2 0 】

結論として、試験されたナノボディは初代内皮細胞の活性化を誘導しなかったが、5 C 8 はした。ゆえに、抗 C D 4 0 L ナノボディは安全であるように見える。

6 . 1 4 . 3 . インビトロの安全性 - 抗 C D 4 0 L ナノボディは逆行性シグナル伝達を開始しない

【 0 3 2 1 】

その受容体 C D 4 0 への C D 4 0 L の結合は、細胞の活性化状態および細胞上の受容体の発現レベルに依存して順行性シグナルを誘導する。加えて、T N F R ファミリーメンバー（例えば C D 4 0 ）へのリガンドの結合は逆行性シグナル伝達を開始し得、細胞増殖、サイトカイン分泌、酸化バースト、クラススイッチ、および T 細胞成熟を制御することが公知である。しかしながら、T N F ファミリーのメンバーによる無制御なまたは不均衡な逆行性シグナル伝達はサイトカインストームをもたらす得、これは一般的に炎症性サイトカインの過剰なまたはコントロールされない放出として公知である（Eissner et al., 2004 Cytokine & Growth Factor Reviews 15:353-366）。

【 0 3 2 2 】

安全性をさらに評価するために、逆行性シグナル伝達が原因のサイトカインストームを開始するナノボディのポテンシャルを評価した。

【 0 3 2 3 】

10 人の健康なドナーからのヒト P B M C を、異なる濃度の異なる化合物によって刺激した：アバスチン、モノクローナル抗 C D 3 抗体、C D P 7 6 5 7、および抗 C D 4 0 L ナノボディ C 0 1 0 0 0 3 3 1 8。また、P B M C の応答性を評価するために S E B および L P S をとり上げた。アバスチンは負のコントロールとして（Min & Kawabata, 2009 in EMA Workshop "in vitro cytokine release assays"）、抗 C D 3 抗体は正のコントロールとして用いた。

【 0 3 2 4 】

ヒト P B M C を用いてインビトロのサイトカイン放出を評価するための方法は、3 つの連続したステップからなる：パフィーコートからのヒト P B M C の単離および凍結、ヒト P B M C の融解および異なる化合物による刺激、ならびに最後にアッセイ上清中のサイトカインの定量。サンプル分析はEurofins Panlabs Inc.においてLuminexプラットフォーム（Life Technologies）を用いて行われた。測定されたサイトカインは I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 6 、 I L - 1 0 、 T N F - 、および I F N - であった。サイトカインは 2 つの異なる Luminex アッセイによって分析した。第 1 のアッセイは I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 6 、および I L - 1 0 を測定し、第 2 のアッセイは T N F - および I F N - を測定した。提供者によって決定されたキットの検出限界と各サイトカインの刺激グレードを見積もったAblynxにおいて行われた実験とに基づいて、サンプルの希釈を両方のアッセイについて調整した。アッセイはキットインサートに指示されている通りに行われ、各サンプルは二重で分析された。得られた結果について統計データ分析を行って、全ての化合物をブランク（未刺激の P B M C ）と比較した。

【 0 3 2 5 】

結果は、ヒト P B M C においてアバスチンおよびモノクローナル抗 C D 3 抗体によって誘導されたサイトカイン産生が未刺激の P B M C のものよりも高かったということを実証している。また、正のコントロール化合物 S E B および L P S によって誘導されたサイトカインのレベルはブランクのものよりも高かった。化合物 C D P 7 6 5 7 では、サイトカイン I L - 2 、 T N F - 、および I F N - のレベルはブランクのものに匹敵したが、I L - 1 、 I L - 6 、および I L - 1 0 については、試験された濃度に依存していくつかの違いが観察された。P B M C 刺激による I L - 6 誘導からの例解的な結果が図 8 に示

10

20

30

40

50

されている。特に、抗CD3化合物およびアバスタチンによる総体的なサイトカイン誘導は、未刺激のサンプルと比較して陽性であることが実証された。CDP7657化合物による誘導は、ブランクサンプルのものよりも高いIL-6レベルをもたらした。ナノボディC010003318によって誘導されたIL-6レベルは、未刺激のサンプルにおいて測定されたIL-6レベルに総体的に類似していた。20 nM濃度は例外であり、測定されたIL-6レベルは最小限にはあるがブランクよりも高かった（これは外れ値であると思われる）。正のコントロール化合物SEBおよびLPSはブランクと比較して陽性であることが示された。

【0326】

総体的に、例示的なナノボディC010003318によるサイトカイン誘導は未刺激のPBMCのものに匹敵した。

10

【0327】

結論として、抗CD40Lナノボディは、インビトロ設定においては、逆行性シグナル伝達が原因のサイトカインストームを開始しない。これは再びナノボディの安全性を確認している。

6.15 インビボの安全性 - 抗CD40Lナノボディはアカゲザルでは安全である

【0328】

さらなる研究をセットアップして、インビボの抗CD40Lナノボディの安全性を評価した。具体的には、抗CD40Lナノボディの皮下投与がアカゲザルにおけるインビボのTEの欠如に至るかどうかもまた決定した。

20

【0329】

例示的なナノボディC010003318を、30 mg/kg、100 mg/kg、および300 mg/kgの用量でそれぞれ3匹の雌アカゲザルに4週間に渡って毎週1回投与した。

【0330】

次のパラメータおよびエンドポイントを本研究においては評価した：臨床兆候、体重、体重変化、体温、臨床的な病理パラメータ（血液学、凝固、臨床化学、検尿、およびリンパ球表現型検査）、免疫原性（抗薬物抗体（ADA））、毒物動態、薬力学、肉眼的剖検所見、臓器重量、および病理組織学的検査。検査は次を包含した。

【0331】

30

下に列記されているin-life手続き、観察、および測定を全ての動物について行った。動物は、一般的な健康、死亡、および異常について各日の午前中に1回および午後1回チェックした。その上に、動物は第2週から毎日観察された。第1日から（投薬日に）、動物を投薬前、および投薬後に少なくとも3回観察した。非投薬日に、動物を午前および午後1回にチェックした。第2週に始まり少なくとも週1回、全ての動物は詳細な臨床的観察を受けた。各投薬日には、日中に定期的に、全ての動物を処置に対する反応について検査した。兆候の発症、強度、および持続時間を記録した；投薬の間および投薬後の最初の1時間は動物に特に注意を払った。

【0332】

注射部位は、処置に対する反応についてモニターした。第2週から始めて毎週体重を記録した。剖検の予定日に重量を記録した。全ての動物は、前処置の間に1回（午後、投薬前測定の所期時に）体温を記録された。投薬期間の間に、全ての動物は、各投薬日の投薬のおよそ8 h後に、および剖検前に毎週体温を記録された。

40

【0333】

血液サンプル（0.5 mL）をK₂EDTAチューブに収集し、表6.15Aに規定されているパラメータについて分析した。

【表 1 5】

表 6. 1 5 A. 血液学パラメータ

赤血球数	平均血小板成分
ヘモグロビン	平均血小板体積
ヘマトクリット	血小板分布幅
平均細胞体積	白血球数
平均細胞ヘモグロビン	好中球
平均細胞ヘモグロビン濃度	リンパ球
ヘモグロビン分布幅	単球
網赤血球	好酸球
網赤血球数（絶対）	好塩基球
赤血球分布幅	大型非染色細胞
血小板数	赤血球沈降速度
血小板クリット	

10

【0 3 3 4】

血液サンプル（1 mL）を、3.8%（w/v）クエン酸三ナトリウムを含有するチューブにとり、血漿に処理し、これをパラメータの活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノゲンおよびプロトロンビン時間について分析した。

20

【0 3 3 5】

血液サンプル（1.5 mL）を、リチウムヘパリンを含有するチューブにとり、血漿に処理し、これを表 6. 1 5 B に規定されているパラメータについて分析した。

【表 1 6】

表 6. 1 5 B. 臨床化学パラメータ

尿素	蛋白質
グルコース	アルブミン
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	グロブリン
アラニンアミノトランスフェラーゼ	アルブミン／グロブリン比
アルカリホスファターゼ	コレステロール
クレアチンホスホキナーゼ	LDLコレステロール
乳酸デヒドロゲナーゼ	HDLコレステロール
ナトリウム	クレアチニン
カリウム	総ビリルビン
塩化物	カルシウム
ガンマグルタミルトランスフェラーゼ	無機リン酸
グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	トリグリセリド
アルファアミラーゼ	総胆汁酸
	免疫グロブリン G、M、A

30

40

【0 3 3 6】

表 6. 1 5 C に同定されている組織の代表的なサンプルを全ての動物から収集し、別様

50

に指示されない限り 10 % 中性緩衝ホルマリン中で保管した。

【表 17】

表 6. 15 C. 組織収集および保存

投与部位	喉頭	
動物の同定	肝臓	
動脈、大動脈	肺	
骨髓スミア	下顎リンパ節	
骨髓、大腿骨	腸間膜リンパ節	10
骨髓、胸骨	流入領域リンパ節	
骨、大腿骨	骨格筋	
骨、胸骨	視神経 a × 2	
骨、後膝関節	坐骨神経 × 2	
脳	食道	
子宮頸部	卵巣 × 2	
眼 a × 2	輸卵管 × 2	
胆嚢	脾臓	20
副腎 × 2	皮膚	
涙腺 × 2	小腸、十二指腸	
乳腺 × 2	小腸、回腸	
副甲状腺 × 2	小腸、空腸	
脳下垂体	脊髄	
唾液腺 × 2	脾臓	
甲状腺 × 2	胃	
肉眼的病変／腫瘍	胸腺	
腸管関連リンパ組織（パイエル板）	舌	30
心臓	気管	
腎臓 × 2	尿管 × 2	
大腸、盲腸	膀胱	
大腸、結腸	子宮	
大腸、直腸	膣	

a ダビッドソンの固定液中に保存

【0337】

40

表 6. 15 C に同定されている組織をパラフィン包埋し、切片化し (4 ~ 6 μm)、スライドガラスにマウントし、ヘマトキシリンおよびエオシンによって染色した。実験動物病理の訓練および経験を有する獣医学病理学者によって病理組織学的評価が行われた。病理ピアレビューが試験施設の第 2 の病理学者によって実施された。

【0338】

30、100、または 300 mg / kg、毎週 1 回の 4 週間のアカゲザルへの C010003318 の皮下投与は、脾臓および全ての用量レベルにおけるリンパ節（腋窩、鼠径、下顎、および腸間膜）の胚中心のリンパ球減少、ならびに 30 および 100 mg / kg における脾臓の胚中心のヒアリン化という顕微鏡的所見に関連した。これらの知見は試験品の予想された薬理学的効果であり、よって有害ではないと考えられた。臓器重量または

50

肉眼的病理に及ぼす試験品に関係づけられる効果はなかった。観察された臨床兆候の試験品に関係づけられる変化、または体重の変化はなかった。臨床的な病理パラメータについて、試験品に関係づけられる効果はなかった。

【 0 3 3 9 】

結論として、4週間の毎週1回の皮下の例示的なナノボディC 0 1 0 0 0 3 3 1 8の投与は、雌アカゲザルにおいては最大3 0 0 m g / k g / 週のレベルで良好に忍容された。標的臓器効果（リンパ組織）が3 0 から3 0 0 m g / k g / 週のレベルで観察されたが、試験品の薬理学的活性の結果であり、よって有害ではないと考えられた。

【 0 3 4 0 】

これらの結果に基づいて、無毒性量（NOAEL）は（試験された）最も高い投薬量として3 0 0 m g / k g / 週であると考えられた。

【 0 3 4 1 】

引き延ばされた高用量暴露後でさえも、抗CD 4 0 L ナノボディがインビボでTEを誘導するという証拠はない。

6 . 1 6 免疫原性（ADA）評価

【 0 3 4 2 】

免疫原性の評価のために、血液サンプルを全ての動物から収集して（例6 . 1 5を見よ）、既存抗体（PEA）（例6 . 9を参照せよ）または現れた抗薬物抗体（ADA）の存在を決定した。

【 0 3 4 3 】

毒物動態評価および/または安全性評価を支持するために、ADAサンプル分析を行った。（MSDプラットフォームによって）ADAサンプル分析のための認証された電気化学発光（ECL）に基づくブリッジングフォーマットを用いて、血漿サンプルを抗薬物抗体（ADA）の存在について評価した。基剤によって処置（n = 3）または3 0、1 0 0、もしくは3 0 0 m g / k g ナノボディによって処置されたどちらかの全ての4動物群から、サンプルを収集した。研究の始まり前に（研究前の第 - 7日）、および第1 5日および第2 9日にその日の投与に先立って、血液サンプルを全ての動物から収集した。

【 0 3 4 4 】

全てのサンプルからの応答はスクリーニングカットポイントよりも下であった。そのため、研究前の第 - 7日サンプルにおいてpre Abは検出されず、基剤によって処置またはナノボディを投薬された動物からのサンプルのいずれかにおいて処置中に現れるADAは検出されなかったということが結論づけられた。また、これらの結果は例6 . 9の知見を裏付けている。

【 0 3 4 5 】

ゆえに、既存のまたは処置中に現れるADAは、研究中には、十分に高感度の薬物忍容性のADAアッセイによって検出されなかった。

【 0 3 4 6 】

本願に引用される参照の全て（文献参照、交付済み特許、公開特許出願、および同時係属の特許出願を包含する）の内容全体は、特に本明細書において上で参照されている教示について、参照によって明示的にここで組み込まれる。

10

20

30

40

【表 18】

表 1. 本発明の好ましいリンカー配列

リンカーの名称	配列番号	アミノ酸配列
GS5 (5GS)	18	GGGGS
GS7 (7GS)	19	SGGSGGS
GS8 (8GS)	20	GGGGGGGS
GS9 (9GS)	21	GGGSGGGGS
GS10 (10GS)	22	GGGSGGGGS
GS15 (15GS)	23	GGGSGGGSGGGGS
GS18 (18GS)	24	GGGSGGGSGGGSGGGGS
GS20 (20GS)	25	GGGSGGGSGGGSGGGGS
GS25 (25GS)	26	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
GS30 (30GS)	27	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
GS35 (35GS)	28	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
GS40 (40GS)	29	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
A3 (3A)	77	AAA

10

【表 19】

表 2. 雑多な配列

名称	ID	アミノ酸配列
hCD40L (uniprot P29965-1)	1	MIETYNQTSPRSAAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKI EDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETK KENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTH SSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL
hCD40 (uniprot Q6P2H9)	2	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTE FTETECCLPCGESEFLDTWNRETHFHQHKYCDPNLGLRVQKGTSETDTICTCE EGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIDICQPHFPKDRGLNLLM
参照 A	16	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLVYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGTLVTVSS
参照 B	17	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLVYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGTLVTVSSA
MYC-HIS タグ	30	AAAEQKLISEEDLNAAHHHHHH
FLAG3-HIS6 タグ	31	AAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAHHHHHH

20

30

40

50

【表 2 0】

表A-1：抗CD40Lコンストラクトのアミノ酸配列（「ID」は本明細書において用いられる配列番号を言う）

名称	ID	配列
C01000 28B02	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYIAIGWFRQAPGKREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDPRGLSSCDTQSHQYDFWGQGLTVTVSS
C01000 29C10	4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYIALGWFRQAPGKREGVSCISSESTSGSTYADSVKGRF TISRDSAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDQTLFGVCRGIATPDPGFWGQGLTVTVSS
C01000 44B07	5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYIALGWFRQAPGKREGVSCISSEGSTDYADSVKGRF TISRDTAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDETFFSGSCTLSAATFGSWGQGLTVTVSS
C01000 46B03	6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTIS RDNAKATLYLRNNLSLKPEDTAVYYCAARETHYSTSDRYNEMRHVDYWGQGLTVTVSS
C01000 2366 [28B02]	7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYIAIGWFRQAPGKREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDPRGLSSCDTQSHQYDFWGQGLTVTVSS
C01000 3320 28B02- Alb129	80	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYIAIGWFRQAPGKREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDPRGLSSCDTQSHQYDFWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGG SGGGSEVLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTLLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
C01000 3323 28B02- Alb23	81	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYIAIGWFRQAPGKREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDPRGLSSCDTQSHQYDFWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGG SGGGSEVLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
C01000 3326 28B02- Alb11	82	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYIAIGWFRQAPGKREGVSCISSEGSTSYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDPRGLSSCDTQSHQYDFWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGG SGGGSEVLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTLLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVKSA
C01000 3290 [46B03]	8	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTIS RNSKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARETHISTSDRYNEIRNYDWGQGLTVTVSS
C01000 3318 46B03-Alb	9	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTIS RNSKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARETHISTSDRYNEIRNYDWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGG VESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR KTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVKSA
C01000 3313 46B03-Alb	78	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTIS RNSKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARETHISTSDRYNEIRNYDWGQGLTVTVSS GGGGGGGGG EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RDNAKTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
C01000 3315 46B03-Alb	79	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKREFVAAISSLLGSTDYADSVKGRFTIS RNSKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARETHISTSDRYNEIRNYDWGQGLTVTVSS GGGGGGGGG EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RNSKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA

10

20

30

40

50

【 表 2 1 】

表A-2: CDRおよびフレームワークの配列、プラス式Iによって提供される好ましい組み合わせ、すなわちFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
(次の用語:「ID」は所与の配列番号を言い; 第1の列はISVD全体のIDを言う)

コンストラクト	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
3	C01000 28B02	EVQLVESGGGLVQP40 GGSLRLSCAAS	GFTLEYIA IG	41	WFRQAPGKE REGVS	42	CISSEGS TS	43	YTDSVKGREFTISRDA KNTVYLQMNLSLKPEDT AVYYCAT	44	DPDRGFLGSS CDTQSHQYDY	45	WGQGTILVT SS	
4	C01000 29C10	EVQLVESGGGLVQP47 GGSLRLSCAAS	GFTLDYYA LG	48	WFRQAPGKE REGVS	49	CISSTES SDGSTY	50	YADSVKGREFTISRDSA KNTVYLQMNLSLKPEDT AVYYCAT	51	DQTLFGVCRG IATPDPGF	52	WGQGTILVT SS	
5	C01000 44B07	EVQLVESGGGLVQP54 GGRLRLSCAAS	GFTLDYYA LA	55	WFRQAPGKE REGVS	56	CISSEGS STDYAD	57	YADSVKGREFTISRDTA KNTVYLQMNLSLKPEDT AVYYCAT	58	DETTFSGSC TLSAATFGS	59	WGQGTILVT SS	
6	C01000 46B03	EVQLVESGGGLVQA61 GGSLRLSCAAS	GRTPLNYH MA	62	WFRQAPGKE REFVA	63	AISLLG STD	64	YSDSLKDRFTISRDA KATLYLRMNNLSLKPEDT AVYYCAA	65	RETHYSTSD RVNEMRHYDY	66	WGQGTILVT SS	
7	C01000 2366 (28B02)	DVQLVESGGGLVQP68 GGSLRLSCAAS	GFTLEYIA IG	69	WFRQAPGKE REGVS	70	CISSEGS TS	71	YADSVKGREFTISRDN KNTVYLQMNLSLRPEDT AVYYCAT	72	DPDRGFLGSS CDTQSHQYDF	73	WGQGTILVT SS	
8	C01000 3290 (46B03)	DVQLVESGGGLVQP33 GGSLRLSCAAS	GRTPLNYH MA	34	WFRQAPGKE REFVA	35	AISLLG STD	36	YADSVKGREFTISRDN KTTLYLQMNLSLRPEDT AVYYCAA	37	RETHISTSD RVNEIRNYDY	38	WGQGTILVT SS	

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表A-3：CDR配列を包含する、血清アルブミンに結合するISVDのアミノ酸配列
(Albナノボディ；「ID」は本明細書において用いられる配列番号を言う)

名称	ID	配列
ALB8 (Myc-His6)	10	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLIYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSAAAEQKLISEEDLNCAHHHHH
Alb8	11	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLIYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
Alb23	12	EVQLLESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPETVSSISGSGSDTLIYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
Alb129	13	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLIYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
Alb132	14	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPETVSSISGSGSDTLIYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
Alb11 (S112K)-A (ALB135)	15	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLIYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVKSA
ALB CDR1	74	SFGMS
ALB CDR2	75	SISGSGSDTLIYADSVKG
ALB CDR3	76	GGSLSR

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 6. 9. 1 : S L E 患者からの血清中に存在する既存抗体の結合による、位置 1 1 および 1 1 2 の変異対 C 末端アラニン延長の比較

	S L E 患者から得られた血清サンプル								健康なボランティアから得られた血漿サンプル		
参照 A の平均の結合（R U）											
参照 A		45	61	38	40	43	20	69	128	171	
参照 A の結合と比較した阻害（％）											
参照 B		20	16	13	45	53	86	101	95	90	
参照 A (L11E)		63	88	117	61	87	88	92	68	21	
参照 A (L11K)		87	97	107	54	106	79	102	100	61	
参照 A (L11V)		68	84	49	56	95	91	21	23	6	
参照 A (L11Y)		27	71	111	37	84	74	72	13	3	
参照 A (S112E)		13	56	91	77	74	91	94	84	22	
参照 A (S112F)		-6	18	26	-13	62	69	117	74	43	
参照 A (S112K)		71	77	105	80	116	86	120	87	62	
参照 A (S112L)		-36	36	48	-24	123	19	84	91	3	

10

20

30

40

50

表6. 9. 2 (a) : SLE患者およびヒトボランティアから得られたサンプル中の既存抗体による結合の異なる変異の影響

				変異 (単数または複数)	S L E患者から得られたサンプル					健康な ボランティア から得られた サンプル	
	L11K	L11V	V89T	S112K	114A	SLE25	SLE37	SLE39	SLE41	NB13025-14	004-030-ABL-02
参照 A の平均の結合											
						38	66	30	41	45	175
参照 A の平均の結合											
H S A 上に捕捉された参照 A の平均の結合と比較した阻害 (%)											
参照 A + V89T, C末端延長なし		x	x			100	98	100	100	98	9
参照 A + V89T + C- C末端アラニン		x	x		x	97	98	100	98	100	100
参照 A + S112 K, C末端延長なし	X			x		100	100	100	100	98	100
参照 A + S112K + C- C末端アラニン	X			x	x	100	100	100	99	99	100

表 6. 9. 2 (b) : S L E 患者およびヒトボランティアから得られたサンプル中の
既存抗体による結合の異なる変異の影響

	変異 (単数または複数)				S L E 患者から得られたサンプル					健康な ボランティア から得られた サンプル
	L11V	V89L	S112Q	114A	SLE25	SLE37	SLE39	SLE41	NB13025-14	
					004-030-ABL-02					
参照 A の平均の結合										
参照 A の平均の結合										
H S A 上に捕捉された参照 A の平均の結合と比較した阻害 (%)										
参照 A + V89L + S 112Q + C 末端アラニン		x	x	x	ND	71	51	ND	41	180
参照 A + L11V + S 112Q + C 末端アラニン	x		x	x	ND	100	100	ND	100	97
参照 A + S 112Q + C 末端アラニン			x	x	ND	92	85	ND	94	100

【表 2 6】

表 6. 9. 3 (a) : S L E 患者およびヒトボランティアからのサンプル中の既存抗体による結合に及ぼす種々の変異の影響

	変異 (単数または複数)					S L E 患者から 得られたサンプル					健康な ボランティア からの サンプル
	L11V	V89L	V89T	S112K	I14A	SLE25	SLE37	SLE39	SLE41	NB13025-14	004-030-ABL- 02
参照 A の平均の結合											
参照 A						28	44	26	33	30	151
H S A 上に捕捉された参照 A の平均の結合と比較した阻害 (%)											
参照 A + V89L, C 末端延長なし		x				77	64	53	63	41	35
参照 A + V89L + C 末端アラニン		x			x	35	27	63	42	46	83
参照 A + V89T, C 末端延長なし			x			68	12	84	100	71	11
参照 A + V89T + C 末端アラニン			x		x	46	35	71	100	97	99
参照 A + V89T + L11V, C 末端延長なし	x		x			100	97	100	100	100	16
参照 A + V89T + L11V C 末端アラニン	x		x		x	100	100	100	100	100	67
参照 A + S112K + V89L, C 末端延長なし		x		x		100	100	100	100	100	85
参照 A + S112K + V89L C 末端アラニン		x		x	x	100	100	100	100	100	100
参照 A + S112K + L11V, C 末端延長なし	x			x		100	100	100	100	100	64
参照 A + S112K + L11V + C 末端アラニン	x			x	x	100	100	100	100	100	100

10

20

30

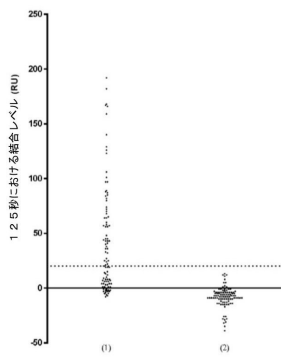
40

50

【図面】

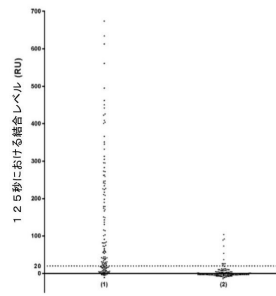
【図 1】

図 1



【図 2】

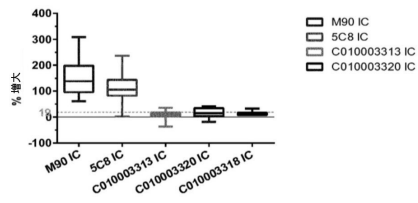
図 2



10

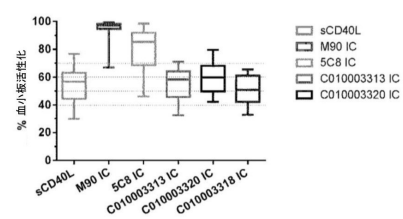
【図 3】

図 3



【図 4】

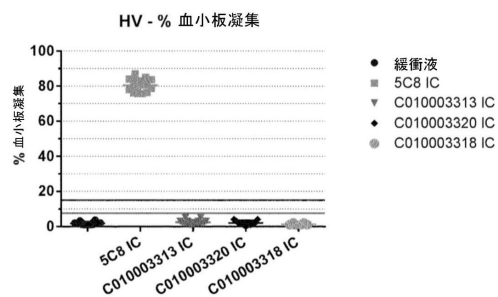
図 4



20

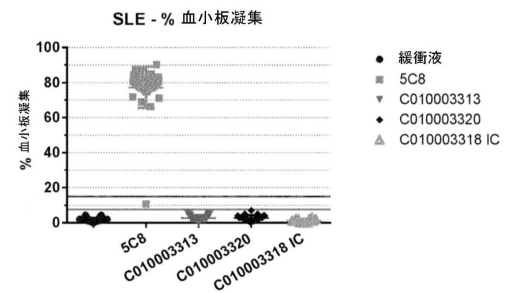
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



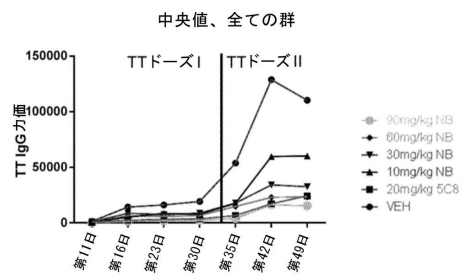
30

40

50

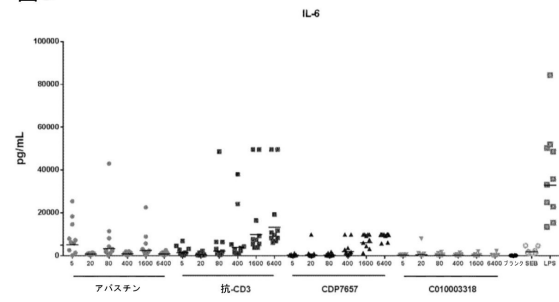
【 図 7 】

図7



【 図 8 】

图8



10

【配列表】

0007256011000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
		C 1 2 P	21/08	

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/345,967

(32)優先日 平成28年6月6日(2016.6.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 バイセ, マリー - アンジュ

ベルギー国 9 8 2 0 メレルベーク、ブルゲメーステル エドモン ロンセストラート 2 3

(72)発明者 デヴィルデ, マーテン

ベルギー国 9 3 0 0 アールスト、ベルゲメールセンストラート 1 0 9

(72)発明者 ベシュテ, ゲラルト

ベルギー国 9 0 0 0 ヘント、ヨゼフ クライスケンスストラート 2 5、ピュス 2 0

(72)発明者 フラッハ, ジャロミル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 8 6、ウェストフォード、スティーブル チェイス
サークル 2

(72)発明者 ス, ジョナサン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 5 3、ウォルサム、テイラー ストリート 5 1、ア
パートメント 4

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 牧野 晃久

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 3 2 0 9 (W O , A 1)

特開 2 0 1 2 - 1 6 7 1 1 2 (J P , A)

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 2014, Vol. 192, No. 9, p. 1 - 10

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

CAPLus / REGISTRY (STN)

UniProt / Geneseq