

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5823871号  
(P5823871)

(45) 発行日 平成27年11月25日(2015.11.25)

(24) 登録日 平成27年10月16日(2015.10.16)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)  
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A  
 C 1 2 P 21/08  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 27/02

請求項の数 8 (全 178 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-540102 (P2011-540102)  
 (86) (22) 出願日 平成21年12月10日(2009.12.10)  
 (65) 公表番号 特表2012-511545 (P2012-511545A)  
 (43) 公表日 平成24年5月24日(2012.5.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/066822  
 (87) 国際公開番号 W02010/066836  
 (87) 国際公開日 平成22年6月17日(2010.6.17)  
 審査請求日 平成24年11月20日(2012.11.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/121, 228  
 (32) 優先日 平成20年12月10日(2008.12.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 505166225  
 アブリンクス エン. ヴェー.  
 ベルギー, ペー-9052 ヘントーツヴ  
 イナールデ, テヒノロジーパルク 21  
 (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国  
 (72) 発明者 ゴンザレス, マリア  
 ポルトガル, ペー-4200-534 ポ  
 ルト, 3 エー エスイー ケー, ナンバ  
 ー 88, プラカ アルツール サントス  
 シルバ  
 (72) 発明者 サンダース, ミカエル ジョン スコット  
 ベルギー, ペー-1190 ブリュッセル  
 , 38, アベニュー デ ラ ジョンクシ  
 ヨン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管新生に関連した疾患及び障害の治療のための、アンジオポイエチン/T i e システムに指向性を有するアミノ酸配列及びこれを含むポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T i e 2 タンパク質に指向性を有する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むドメイン抗体であって、単一可変ドメインが、配列番号179のC D R 1、配列番号273のC D R 2 及び配列番号367のC D R 3を含む、ドメイン抗体。

【請求項 2】

本質的に単離形態である、請求項1に記載のドメイン抗体。

【請求項 3】

単一可変ドメインが、ヒトT i e 2 に対してアンタゴニスト効果を有する、請求項1又は2に記載のドメイン抗体。

【請求項 4】

単一可変ドメインが、ヒトT i e 2 に対してアンタゴニスト効果を有しており、ヒトA n g 2 とヒトT i e 2 との間の相互作用を遮断しない、請求項1～3のいずれか一項に記載のドメイン抗体。

【請求項 5】

単一可変ドメインが、配列番号461を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のドメイン抗体。

【請求項 6】

請求項1～5のいずれか一項に記載のドメイン抗体と、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤及び/又はアジュバントとを含む薬学的組成物。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のドメイン抗体を有効成分として含む、過剰な血管新生に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害の予防及び / 又は治療のための薬剤。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のドメイン抗体を製造する方法であって、

i . 好適な宿主又は宿主細胞が少なくとも 1 つの請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のドメイン抗体を発現及び / 又は産生するような条件下で、前記宿主又は宿主細胞を培養及び / 又は維持する工程と ; 続いて

ii . 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のドメイン抗体を単離及び / 又は精製する工程と、

を含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、A n g p t l 6 等のアンジオポイエチン / T i e ファミリー群からのタンパク質に指向性を有するアミノ酸配列に加えて、1 つ又は複数のかかるアミノ酸配列を含むか又はこれらから本質的になる、化合物又は構築物、特にタンパク質及びポリペプチドに関する。

## 【0002】

本発明は、このようなアミノ酸配列及びポリペプチドをコードする核酸（本明細書中で「本発明の核酸」又は「本発明のヌクレオチド配列」とも称される）に ; このようなアミノ酸配列及びポリペプチドを調製する方法に ; このようなアミノ酸配列又はポリペプチドを発現するか、又は発現することが可能な宿主細胞に ; このようなアミノ酸配列、ポリペプチド、核酸及び / 又は宿主細胞を含む組成物、特に薬学的組成物に ; 並びに特に予防目的、治療目的又は診断目的の、例えば本明細書中で言及される予防目的、治療目的又は診断目的のこのようなアミノ酸配列又はポリペプチド、核酸、宿主細胞及び / 又は組成物の使用にも関する。

## 【0003】

本発明の他の態様、実施の形態、利点及び用途は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

## 【背景技術】

## 【0004】

アンジオポイエチン 1 ~ 4 ( A n g 1 ~ A n g 4 ) は、T i e 2 ( 主として内皮細胞において発現される受容体チロシンキナーゼ ( R T K ) ) のリガンドとして機能する増殖因子のファミリーを構成する。A n g / T i e 2 シグナル伝達は、既存の血管の不安定化及び内皮細胞遊走等の血管新生の複数の工程に関与する ( 非特許文献 1 ) 。A n g 1 及び A n g 4 は血管構造の全体性を増進する必須 ( obligatory ) アゴニストとして作用することが示され、一方 A n g 2 及び A n g 3 は状況依存性 ( context-dependent ) アンタゴニスト又は状況依存性アゴニストとして機能する。T i e 2 との構造相同性にもかかわらず、既知の A n g のいずれも T i e 1 と命名された別の R T K に結合しないが、幾つかの研究は血管発生において T i e 1 が重要な役割を有することを示す ( 非特許文献 2 ) 。A n g の構造の類似性に基づいて、6 個のアンジオポイエチン様タンパク質 ( A n g p t l ) が同定されている。興味深いことには、A n g p t l は、内皮細胞の生存及び遊走の調節を介して血管新生にも機能するが、これらのタンパク質はアンジオポイエチン受容体 T i e 2 と結合しない ( 非特許文献 3、非特許文献 4 ) 。血管新生の脱調節は、多数の悪性障害、虚血性障害、炎症性障害、感染性障害及び免疫障害をもたらす ( 非特許文献 5 ) 、それゆえ、T i e 受容体、A n g 及び A n g p t l の調節には多くの興味深い治療法に応用できる可能性がある。

## 【0005】

T i e 受容体は高度の相同性を共有する内皮特異的 R T K である。受容体 T i e 1 及び T i e 2 の両方の細胞外領域は、33% の類似性を持ち、免疫グロブリン様ループ、3 個の E G F 様ドメイン、第 2 の I g 様ループ及び 3 個のフィブロネクチンタイプ I I I リピートを含有する。76% の類似性を示す両方の受容体の細胞質領域は、多数のリン酸化部位及びタンパク質相互作用部位を含むチロシンキナーゼドメインを含有している（非特許文献 6、非特許文献 7）。アゴニスト A n g の結合の際の T i e 2 の二量体化及び自己リン酸化を介するシグナル伝達が研究され、その結果から、主要なシグナル伝達経路はホスファチジルイノシトール 3' キナーゼの活性化を含むことが示唆される（非特許文献 2）。さらに、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、本明細書におけるさらなる開示から明らかなように、及びそれらが指向性を有する T i e 及びそれらの所望される（治療）効果に依存して、生物学的な機能、経路、機構、効果、シグナル伝達及び/又はそれと関連する応答の、（完全又は部分）アゴニストとして、（完全又は部分、及び競合的又は非競合的）アンタゴニストとして、又は T i e（例えば T i e 2）の逆アゴニストとして作用することができる。それらは不可逆的に作用することができるが、可逆的な様式が好ましい。

#### 【0006】

A n g は、アミノ末端のアンジオポイエチン特異的ドメイン、続いてコイルドコイルドメイン、リンカーペプチド及びカルボキシ末端のフィブリノーゲン相同ドメインを含有する。フィブリノーゲン相同ドメインは受容体結合に関与し、コイルドコイルドメインはアンジオポイエチンモノマーの二量体化に必要とされ、短いアミノ末端領域は、T i e 2 活性化のために必要な可変的なサイズの多量体へと二量体をクラスター化するリング様構造を形成する（非特許文献 2）。ヒト A n g 1 はマウス A n g - 1 と約 97% のアミノ酸配列同一性を共有するが、ヒト及びマウスの A n g 2 は 85% のみのアミノ酸配列同一性を共有する。マウス及びヒト A n g 2 はそれらの A n g 1 ホモログに対して 60% 同一である。ヒト A n g 4 のケースでは、ヒト A n g 1、ヒト A n g 2 及びマウス A n g 3 とそれぞれ 45%、47% 及び 54% のアミノ酸配列同一性を共有する。

#### 【0007】

A n g に構造的に非常に類似しているので、A n g p t 1 は、A n g において見出されるものに類似するコイルドコイルドメイン及びフィブリノーゲン様ドメインを含有する。

#### 【0008】

T i e、A n g 及び A n g p t 1 のリスト：（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3）

T i e - ファミリー

T i e 1

T i e 2

A n g s - ファミリー

A n g 1

A n g 2

A n g 3

A n g 4

A n g p t 1 s - ファミリー

A n g p t 1 1

A n g p t 1 2

A n g p t 1 3

A n g p t 1 4

A n g p t 1 5

A n g p t 1 6

#### 【0009】

10

20

30

40

50

血管新生促進性アンジオポイエチン及び抗血管新生性アンジオポイエチン並びにTie受容体が広範囲で発現されるところで、血管新生は、腫瘍血管侵入、糖尿病性網膜症、乾癬及び関節リウマチのような複数の病理学のプロセスにおいて主要な役割を果たす（非特許文献8、非特許文献9、非特許文献5）。Tie及びアンジオポイエチンを標的とする多くの抗血管新生因子が開発中である。これらの血管新生関連タンパク質の発現の調節及び阻害が、腫瘍血管新生の阻害による腫瘍の増殖及び転移の減少を引き起こすことが報告されている（非特許文献8、非特許文献10、非特許文献4）。Ang2は状況依存性であるので、その役割はあまり明らかではない。非病的状態ではAng2の機能はアンタゴニストとして作動し、Ang1:Ang2の比は1:1であるが、腫瘍血管新生をとまなう悪性腫瘍ではAng2の発現は増加するように思われる。

10

【0010】

さらに、血管新生促進療法は虚血性疾患の治療において有利になり得る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Bouis et al 2006

【非特許文献2】Eklund L., Olsen B.R. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental Cell Research* (2006) 312: 630-641

【非特許文献3】Oike Y., Akao M., Kubota Y., Suda T. Angiopoietin-like proteins: potential new targets for metabolic syndrome therapy. *TRENDS in Molecular Medicine* (2005). 11: 473-479

20

【非特許文献4】Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GAP. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacological Research* 53 (2006) 89-103. Review

【非特許文献5】Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9(2003) 653-660

【非特許文献6】Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinase in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* (2003) 314:61-68

【非特許文献7】Fiedler U., Augustin H. G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *TRENDS in Immunology*. (2006) 27:552-558

30

【非特許文献8】Bach F., Uddin F.J., Burke D. Angiopoietins in malignancy. *EJSO* (2007). 33:7-15

【非特許文献9】Pandya N.M., Dhalla N.S., Santani D.D. Angiogenesis- a new target for future therapy. *Vascular Pharmacology* (2006) 44: 265-274

【非特許文献10】Onliner J. et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell* (2004), 6: 507-516

【発明の概要】

【0012】

本発明のポリペプチド及び/又は組成物は概して、アンジオポイエチン-Tie相互作用並びに特にアンジオポイエチンリガンド(Ang1~Ang4)と受容体Tie1及び/又はTie2との結合を調節並びに特に阻害及び/若しくは阻止するのに、並びにしたがって上記相互作用によって媒介されるシグナル伝達を調節及び特に阻害若しくは阻止するのに、リガンド及び/若しくは標的が関与する生物学的経路を調節するのに、並びに/又はかかるシグナル伝達若しくはこれらの経路に関連する、生物学的機構、応答及び効果を調節するのに、使用することができる。同様に、アンジオポイエチン様リガンド(Angpt11~Angpt16)の相互作用は、本発明のポリペプチド及び/又は組成物によって妨害することができる。

40

【0013】

このため、本発明のポリペプチド及び組成物を、血管新生に関連する疾患及び障害の予

50



防及び治療に使用することができる。一般的に、「血管新生に関連する上記の疾患及び障害」は、本発明のポリペプチド又は組成物のいずれかを（特にその薬学的に活性のある量）、及び／又はアンジオポイエチン／Tieシステム、又は上記システムが関与する生物学的な経路若しくは機構に対して活性のある既知の活性成分を（特にその薬学的に活性のある量）、それを必要とする（すなわち疾患若しくは障害、又はそれらの症状の少なくとも1つを有する、及び／又は疾患又は障害を誘発又は発症する危険性がある）被験体に好適に投与することにより、それぞれ予防及び／又は治療することができる疾患及び障害として定義することができる。このような疾患及び障害の例は本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかであり、例えばこのような疾患及び障害としては以下の例が挙げられる。

10

#### 【0014】

癌及びアンジオポイエチン：

非特許文献 8

癌及びTie受容体：

Blume-Jensen P and Hunter T. Oncogenic kinase signaling. Nature (2001). 44; 355-365.

糖尿病性網膜症及びアンジオポイエチン：

Palei J.L., Hykin P.G., Gregor Z.J., Boulton M. and Cree I.A. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. Br. J. Ophthalmol (2005). 89: 480-483.

関節リウマチ、並びにTie2及びアンジオポイエチン：

20

DeBusk L.M., Chen Y., Nishishita T., Chen J., Thomas J.W., Lin P.C. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. ARTHRITIS & RHEUMATISM (2003). 48:2461-2471.

Shahrara S., Volin M. V., Connors M.A., Haines G.K., Koch A.E. Differential expression of the angiogenic Tie receptor family in arthritic and normal synovial tissue. Arthritis Res (2002) 4: 201-208.

乾癬、並びにTie2及びアンジオポイエチン：

Kuroda K., Sapadin A., Shoji T., Fleischmajer R., Lebwohl M. Altered expression of angiopoietins and Tie2 endothelium receptor in psoriasis. The journal of investigative dermatology, (2001). 116: 713-720.

30

虚血、腎癌及びAngptl4：

LeJan S., Amy C., Cazes A., Monnot C., Lamande N., Favier J., Philippe J., Sibony M., Gasc J-M., Corvol P., Germain S.

#### 【0015】

アンジオポイエチン様4は、虚血性及び従来の腎細胞癌で産生される血管新生促進因子である（American Journal of Pathology (2003) 162: 1521-1528）。

#### 【0016】

特に、本発明のポリペプチド及び組成物は、血管の過剰な及び／若しくは望まれない生成、又は血管の生成の欠如によって特徴づけられる、血管新生に関連する疾患及び障害の予防及び／又は治療のために使用することができる。かかる障害の例は、心血管障害、癌、糖尿病性網膜症、創傷治癒、関節リウマチ、肥満、肺胞形成及び乾癬である。

40

#### 【0017】

したがってこれらに限定されないが、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドを、例えば現在血管新生を調節することができる活性成分により予防又は治療されている疾患及び障害、例えば上記で引用された従来技術等で言及されるものを全て予防及び／又は治療するのに使用することができる。また本発明のポリペプチドを、このような活性成分による治療が現在開発されている、提案されている、又は将来提案若しくは開発される疾患及び障害を全て予防及び／又は治療するのに使用することができることも予測される。さらに、本明細書中にさらに記載のそれらの有利な特性のために、本発明のポリペプチドを、これらの既知の活性成分が使用されているか、又は提案若しくは開発される疾患及び障害以

50

外の他の疾患及び障害の予防及び治療にも使用してもよいこと、及び／又は本発明のポリペプチドが本明細書に記載の疾患及び障害を治療するのに新規の方法及びレジメンを提供し得ることが予測される。

【 0 0 1 8 】

本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドの他の用途及び使用は、本明細書のさらなる開示から当業者にとって明らかになる。

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 9 】

概して、本発明の目的は、癌、糖尿病性網膜症、創傷治癒、関節リウマチ、肥満症、肺胞増殖及び乾癬、並びに本明細書で言及されるさらなる疾患及び障害の診断、予防及び／又は治療に使用することができる、薬理学的に活性な作用物質、及びこれを含む組成物を提供すること、並びにこのような作用物質及び組成物の投与及び／又は使用を伴う、このような疾患及び障害を診断、予防及び／又は治療する方法を提供することである。

10

【 0 0 2 0 】

具体的には本発明の目的は、現在当該技術分野で使用されている、及び／又は当該技術分野で既知の作用物質、組成物及び／又は方法に比べて或る特定の利点を有するような薬理学的に活性な作用物質、組成物及び／又は方法を提供することである。これらの利点は、以下のさらなる記載から明らかになる。

【 0 0 2 1 】

より具体的には本発明の目的は、癌、糖尿病性網膜症、創傷治癒、関節リウマチ、肥満症、肺胞増殖及び乾癬、並びに本明細書で言及されるさらなる疾患及び障害の診断、予防及び／又は治療に、薬理学的に活性な作用物質、及びこれを含む組成物として使用することができる治療用タンパク質を提供すること、並びにこのような治療用タンパク質及び組成物の投与及び／又は使用を伴う、このような疾患及び障害を診断、予防及び／又は治療する方法を提供することである。

20

【 0 0 2 2 】

したがって本発明の特定の目的は、(本明細書に規定のように) T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t 1 1、A n g p t 1 2、A n g p t 1 3、A n g p t 1 4、A n g p t 1 5、又はA n g p t 1 6に、具体的には温血動物由来のT i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 4又は、A n g p t 1 4に、より具体的には哺乳動物由来のT i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 4又は、A n g p t 1 4に、特にヒトT i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 4又は、A n g p t 1 4に指向性を有するアミノ酸配列を提供すること、並びに少なくとも1つのこのようなアミノ酸配列を含むか又はこれから本質的になるタンパク質及びポリペプチドを提供することである。

30

【 0 0 2 3 】

具体的には本発明の特定の目的は、温血動物、具体的に哺乳動物、より具体的にヒトにおいて予防的用途、治療的用途及び／又は診断的用途に好適であるこのようなアミノ酸配列及びこのようなタンパク質及び／又はポリペプチドを提供することである。

【 0 0 2 4 】

より具体的には本発明の特定の目的は、温血動物、具体的に哺乳動物、より具体的にヒトにおいてT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t 1 1、A n g p t 1 2、A n g p t 1 3、A n g p t 1 4、A n g p t 1 5、又はA n g p t 1 6に関連する、及び／又はT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t 1 1、A n g p t 1 2、A n g p t 1 3、A n g p t 1 4、A n g p t 1 5、又はA n g p t 1 6で媒介される1つ又は複数の疾患、障害又は症状(本明細書中で言及される疾患、障害及び症状等)の予防、治療、緩和及び／又は診断に使用することができるこのようなアミノ酸配列及びこのようなタンパク質及び／又はポリペプチドを提供することである。

40

【 0 0 2 5 】

本発明の特定の目的は、温血動物、具体的に哺乳動物、より具体的にヒトにおいてT i

50

e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6に関連する及び／又はこれらで媒介される1つ又は複数の疾患、障害又は症状（本明細書中で言及される疾患、障害及び症状等）の予防及び／又は治療のための薬学的組成物又は獣医学的組成物の調製に使用することができるこのようなアミノ酸配列及びこのようなタンパク質及び／又はポリペプチドを提供することでもある。

#### 【0026】

本発明において、概してこれらの目的は、本明細書に記載のアミノ酸配列、タンパク質、ポリペプチド及び組成物の使用によって達成される。

#### 【課題を解決するための手段】

10

#### 【0027】

概して本発明は、（本明細書に規定のように）T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6に指向性を有する、及び／又は（本明細書に規定のように）これらと特異的に結合することができるアミノ酸配列、並びにこのようなアミノ酸配列を少なくとも1つ含む化合物及び構築物、特にタンパク質及びポリペプチドを提供する。

#### 【0028】

より具体的には、本発明は本明細書に規定の（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び／又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び／又は表される）親和性でT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6と結合することができるアミノ酸配列、並びにこのようなアミノ酸配列を少なくとも1つ含む化合物及び構築物、特にタンパク質及びポリペプチドを提供する。

20

#### 【0029】

特に、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドが、

$10^{-5}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L 以下、及び好ましくは $10^{-7}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L 以下、及びより好ましくは $10^{-8}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L の解離定数（ $K_D$ ）で（すなわち $10^5$  L / モル ~  $10^{12}$  L / モル以上、及び好ましくは $10^7$  L / モル ~  $10^{12}$  L / モル以上、及びより好ましくは $10^8$  L / モル ~  $10^{12}$  L / モルの結合定数（ $K_A$ ）で）T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6と結合するようなもの、及び／又は

30

$10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ （ $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  等）の $k_{on}$  速度でT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6と結合するようなもの、及び／又は

$1 \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ）~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  等）の $k_{off}$  速度でT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6と結合するようなものであるのが好ましい。

40

#### 【0030】

好ましくは、本発明の一価のアミノ酸配列（又は本発明のアミノ酸配列を1つだけ含有するポリペプチド）が、500 nM未滿、好ましくは200 nM未滿、より好ましくは10 nM未滿（500 pM未滿等）の親和性でT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l

50

4、Angptl5、又はAngptl6と結合するようなものであるのが好ましい。

【0031】

本発明のアミノ酸配列又はポリペプチドとTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6との結合に関する幾つかの好ましいIC50値は、本明細書のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

【0032】

Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6との結合のために、本発明のアミノ酸配列は通常、そのアミノ酸配列内に1つ若しくは複数のアミノ酸残基又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基のストレッチ（すなわちそれぞれの「ストレッチ」が、（すなわちアミノ酸配列の一次構造又は三次構造で）互いに隣接しているか、又は互いに密接している2つ以上のアミノ酸残基を含む）を含有し、これを介して本発明のアミノ酸配列はTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と結合することができ、このようにしてアミノ酸残基又はアミノ酸残基のストレッチは、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と結合する「部位」（本明細書で「抗原結合部位」とも称される）を形成する。

【0033】

本発明で与えられるアミノ酸配列は、（本明細書で規定のように）本質的に単離形態であるか、又は（本明細書で規定のように）本発明のタンパク質若しくはポリペプチドの一部（1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列を含むか又は本質的にこれらになってもよく、任意でさらに1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列（全て任意で1つ又は複数の好適なリンカーを介して連結される）を含んでもよい）を形成するのが好ましい。例えば、これに限定されないが、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列は、全て本明細書に記載される一価、多価、又は多重特異性の本発明のポリペプチドをそれぞれ提供するように、このようなタンパク質又はポリペプチドにおける結合単位として使用してもよい（任意で（すなわちTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6以外の1つ又は複数の他の標的に対する）結合単位としての役割を果たし得る1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列を含有してもよい）。このようなタンパク質又はポリペプチドは、（本明細書に規定のように）本質的に単離形態でもあり得る。

【0034】

本発明のアミノ酸配列及びポリペプチド自体が、ジスルフィド架橋を介して任意の他のアミノ酸配列又はアミノ酸鎖と連結しない（が、1つ又は複数の分子内ジスルフィド架橋を含有しても又は含有しなくてもよい。例えば本明細書中に記載のナノボディは、CDR3とCDR1又はFR2との間にジスルフィド架橋を含有し得ることもあることが知られている）単一のアミノ酸鎖から本質的になるのが好ましい。しかしながら、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列は、互いに及び/又は他のアミノ酸配列と（例えばジスルフィド架橋を介して）連結し、本発明に有用でもあり得るペプチド構築物（例えばFab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、ScFv構築物、「ダイアボディ」及び他の多重特異性の構築物）を提供し得ることに留意されたい。例えばHolliger and Hudson, Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9):1126-36によるレビューを参照する。

【0035】

概して、本発明のアミノ酸配列（又はこれを含む化合物、構築物若しくはポリペプチド）は、（例えば本明細書に記載の治療目的及び/又は診断目的のための）被験体への投与を目的とする場合、上記被験体において自然発生しないアミノ酸配列であるか、又は上記被験体において自然発生する場合は、（本明細書に規定のように）本質的に単離形態であ

10

20

30

40

50

るのが好ましい。

【0036】

薬学的用途の場合、本発明のアミノ酸配列（並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド）はヒトTie2、Ang1、Ang2、又はAng4に指向性を有するのが好ましく、一方で獣医学目的の場合は、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは治療する種由来のTie2、Ang1、Ang2、Ang4、又はAngptl4に指向性を有するか、又は治療する種由来のTie2、Ang1、Ang2、Ang4、又はAngptl4と少なくとも交差反応性を有するのが好ましいことも、当業者にとって明らかである。

【0037】

さらに、本発明のアミノ酸配列は、任意でかつTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6との結合のための少なくとも1つの結合部位の他に、他の抗原、タンパク質又は標的との結合のための1つ又は複数のさらなる結合部位を含有し得る。

【0038】

関与する特定の疾患又は障害に応じて、それ自体が既知の任意の好適なin vitroアッセイ、細胞ベースのアッセイ、in vivoアッセイ及び/又は動物モデル、又はこれらの任意の組合せを使用して、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチド、並びにこれを含む組成物の有効性を試験することができる。好適なアッセイ及び動物モデルは当業者に明らかであり、例えば、固相受容体結合及び遮断アッセイ、受容体活性化/不活性化アッセイ、in vivo血管新生アッセイ、in vivoの直接的な抗血管新生効果、リポタンパク質リパーゼ（LPL）アッセイ、in vivo CAM（トリ絨毛尿膜アッセイ、in vivoの動物モデル研究、並びに以下の実験部で、及び本明細書において引用された従来技術で使用されるアッセイ及び動物モデルを含む。

【0039】

また本発明によれば、第1の種の温血動物由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6に指向性を有するアミノ酸配列及びポリペプチドは、1つ又は複数の他の種の温血動物由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と交差反応性を示しても又は示さなくてもよい。例えば、ヒトTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6に指向性を有するアミノ酸配列及びポリペプチドは、1つ又は複数の他の種の霊長類（例えば、これらに限定されないが、マカク属のサル（例えば特にカニクザル（マカク・ファシクラリス（*Macaca fascicularis*））及び/又はアカゲザル（マカク・ムラッタ（*Macacamulatta*）））及びヒヒ（パピオ・ウルジヌス（*Papio ursinus*））由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、及び/又は疾患のための動物モデル（例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ又はイヌ）、特にTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6に関連がある疾患及び障害のための動物モデルで使用されることが多い、1種又は複数種の動物（例えば本明細書で言及される種及び動物モデル）由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と交差反応性を示しても又は示さなくてもよい。この観点では、このような疾患モデルでヒトTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6に対するア

ミノ酸配列及びポリペプチドを試験することが可能であるので、存在する場合、このような交差反応性は薬剤開発の観点から都合がよいことがあることが当業者にとって明らかである。

【0040】

より一般的には、複数種の哺乳動物由来のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6と交差反応性を有する本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、同じアミノ酸配列又はポリペプチドを複数種にわたって使用することが可能であるので、通常、獣医学用途に使用するのに有利である。したがって、或る種の動物由来のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6に指向性を有するアミノ酸配列及びポリペプチド（例えばヒトTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6に対するアミノ酸配列及びポリペプチド）は、アミノ酸配列及び／又はポリペプチドの使用によって治療する種において所望の効果が提供されれば、別の種の動物の治療に使用することができることも本発明の範囲内に包含される。

10

【0041】

本発明は最も広範な意味でも、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドが指向性を有するTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の特定の抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニット又は立体構造（適用可能な場合）に特に限定されないか、又はこれらによって規定されない。しかしながら、概して本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、好ましくはTie 2上のAng 1結合部位、又はAng 2上のTie 2結合部位に指向性を有することが想定され、そうであることが好ましい（実験部を参照されたい）。したがって、好ましいが非限定的な一態様において、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、Tie 2のAng 1結合部位又はAng 2のTie 2結合部位に指向性を有し、本明細書においてさらに規定されるようなものである。

20

【0042】

また適用可能な場合、本発明のアミノ酸配列が、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の2つ以上の抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニット又は立体構造と結合することができることは、本発明の範囲内である。このような場合、本発明のアミノ酸配列及び／又はポリペプチドが結合する、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、又はサブユニットは、本質的に同じであり得るか（例えば、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6が反復構造モチーフを含有するか、又は多量体形態で生じる場合）、又は異なり得る（後者の場合、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドが、同じであり得るか、若しくは異なり得る親和性及び／又は特異性で、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6のこのような異なる抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニットと結合し得る）。また、例えば、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6が活性な立体構造及び不活性な立体構造で存在する場合、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、これらの立体構造のいずれか一方に結合しても、又はこれらの立体構造の両方に（すなわち、同

30

40

50

じであり得る又は異なり得る親和性及び／又は特異性で）結合してもよい。また、例えば、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、関連リガンドと結合するTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の立体構造と結合しても、関連リガンドと結合していないTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の立体構造と結合しても、又はこのような立体構造の両方と（また同じであり得る又は異なり得る親和性及び／又は特異性で）結合してもよい。

#### 【0043】

また本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは概して、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の天然又は合成の類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片全て；又は少なくとも、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドがTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6（例えば野生型のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6）で結合する抗原決定基（複数可）又はエピトープ（複数可）と本質的に同じである抗原決定基又はエピトープを1つ又は複数含有する、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6のこれらの類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片と少なくとも結合することが期待される。また、このような場合、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、本発明のアミノ酸配列が（野生型）Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6と結合する親和性及び特異性と同じか、又は異なる（すなわちこれより高いか、又は低い）親和性及び／又は特異性で、このような類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片と結合し得る。本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6の類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片によっては結合するものもあれば、結合しないものもあることも本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0044】

Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6が単量体形態及び1つ又は複数の多量体形態で存在する場合、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、単量体形態のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6のみと結合するか、多量体形態のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6のみと結合するか、又は単量体及び多量体形態の両方と結合することが本発明の範囲内である。同様に、このような場合、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、本発明のアミノ酸配列が多量体形態と結合する親和性及び特異性と同じか、又は異なる（すなわちこれより高いか、又は低い）親和性及び／又は特異性で単量体形態と結合し得る。

#### 【0045】

また、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6が、タンパク質複合体を形成するように他のタンパク質又はポリペプチドと（例え

ば複合サブユニットと)会合することができる場合、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドが、会合していない状態でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と結合するか、会合した状態でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と結合するか、又はその両方と結合することが本発明の範囲内である。これら全ての場合で、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドが単量体で会合していない状態でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と結合する親和性及び/又は特異性と同じか、又は異なり得る(すなわちこれより高いか、又は低い)親和性及び/又は特異性でこのような多量体又は会合したタンパク質複合体と結合し得る。

#### 【0046】

また、当業者にとって明らかなように、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6に指向性を有するアミノ酸配列を2つ以上含有するタンパク質又はポリペプチドは、対応する単量体アミノ酸配列(複数可)よりも高い結合活性でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と結合し得る。例えば、これらに限定されないが、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の異なるエピトープに指向性を有するアミノ酸配列を2つ以上含有するタンパク質又はポリペプチドは、異なる単量体それぞれよりも高い結合活性で結合することができ(通常結合し)、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6に指向性を有するアミノ酸配列を2つ以上含有するタンパク質又はポリペプチドも、より高い結合活性でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の多量体と結合することができる(通常結合する)。

#### 【0047】

概して、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、当業者にとって明らかなように、生物学的及び/又は治療的観点から最も関連がある形態のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6(単量体、多量体及び会合している形態を含む)と少なくとも結合する。

#### 【0048】

本明細書で想定される使用に好適である限り、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドの部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体を使用すること、及び/又はこのような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体を1つ又は複数含むか、又はこれから本質的になるタンパク質又はポリペプチドを使用することも本発明の範囲内である。このような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体は通常、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6との結合に機能的な抗原結合部位(の少なくとも一部)を含有し、より好ましくはTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と特異的に結合することができ、さらにより好ましくは本明細書に規定のように(さらに本明細書に記載されるような(実際又は見掛けの)



$K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6と結合することができる。このような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、誘導体、タンパク質及び/又はポリペプチドの幾つかの非限定的な例は、本明細書のさらなる記載から明らかになる。また本発明のさらなる断片又はポリペプチドは、本明細書に記載の1つ又は複数の（より小さい）部分又は断片を好適に組み合わせることによって（すなわち連結又は遺伝子融合によって）提供され得る。

#### 【0049】

本明細書でさらに記載される、本発明の具体的であるが非限定的な一態様において、このような類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、誘導体は、これらが由来する元となるアミノ酸配列に比べて（本明細書にさらに記載されるように）増大した血清半減期を有する。例えば、本発明のアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列の誘導体の半減期が増大するように、半減期を延長する1つ又は複数の基又は部分（例えばPEG）と（化学的に又は別の方法で）連結し得る。

#### 【0050】

具体的ではあるが非限定的な一態様では、本発明のアミノ酸配列は、免疫グロブリンフォールドを含むアミノ酸配列であり得るか、又は好適な条件（例えば生理的条件）下で（すなわちフォールディングによって）免疫グロブリンフォールドを形成することができるアミノ酸配列であり得る。特にHalaby et al., J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71によるレビューを参照する。好ましくは、免疫グロブリンフォールドを形成するように適切にフォールディングする場合、このようなアミノ酸配列は、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6と（本明細書に規定のように）特異的に結合することができ、より好ましくは本明細書に規定のように（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6と結合することができる。また、このようなアミノ酸配列の部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体は、免疫グロブリンフォールドを含むか又は好適な条件下で免疫グロブリンフォールドを形成することができるようなものであるのが好ましい。

#### 【0051】

具体的であるが、非限定的に、本発明のアミノ酸配列は、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR 1 ~ FR 4）と、3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR 1 ~ CDR 3）とから本質的になるアミノ酸配列、又はこのようなアミノ酸配列の任意の好適な断片（したがって通常、本明細書でさらに記載されるように、CDRの少なくとも1つを形成するアミノ酸残基の少なくとも幾つかを含有する）であり得る。

#### 【0052】

本発明のアミノ酸配列は、具体的に免疫グロブリン配列又はその好適な断片、より具体的には免疫グロブリン可変ドメイン配列又はその好適な断片（例えば軽鎖可変ドメイン配列（例えば $V_L$  配列）若しくはその好適な断片、又は重鎖可変ドメイン配列（例えば $V_H$  配列）若しくはその好適な断片）であり得る。本発明のアミノ酸配列は、重鎖可変ドメイン配列である場合、通常の本鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列（例えば、これに限定されないが、ヒト抗体由来の $V_H$  配列）又はいわゆる（本明細書に規定の）「重鎖抗体」由来のいわゆる（本明細書に規定の） $V_{HH}$  配列であり得る。

#### 【0053】

しかし本発明が、本発明のアミノ酸配列（又はこれを発現するのに使用される本発明の

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列)の起源に関しても、また本発明のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を生成又は入手する(又は生成若しくは入手した)方法に関しても限定されないことに留意すべきである。したがって本発明のアミノ酸配列は、(任意の好適な種由来の)天然アミノ酸配列、又は合成若しくは半合成のアミノ酸配列であり得る。本発明の具体的ではあるが非限定的な態様では、アミノ酸配列は(任意の好適な種由来の)天然免疫グロブリン配列、又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列であり、これにはこれらに限定されないが、(本明細書に規定の)「ヒト化」免疫グロブリン配列(例えば部分又は完全ヒト化マウス又はウサギ免疫グロブリン配列、特に部分又は完全ヒト化 $V_{HH}$ 配列又はナノボディ)、(本明細書に規定の)「ラクダ化」免疫グロブリン配列、並びに親和性成熟(例えば、合成、ランダム又は天然免疫グロブリン配列から開始する)、CDRグラフト化、ベニヤリング(veneering)、異なる免疫グロブリン配列由来の断片の組合せ(combining)、重複プライマーを使用したPCRアセンブリ、及び当業者に既知の免疫グロブリン配列を遺伝子操作する同様の技法、又は上記のいずれかの任意の好適な組合せ等の技法によって得られる免疫グロブリン配列が含まれる。例えば標準的なハンドブック、並びに本明細書に言及されるさらなる記載及び従来技術を参照する。

10

#### 【0054】

同様に、本発明のヌクレオチド配列は、天然ヌクレオチド配列、又は合成若しくは半合成の配列であってもよく、例えばPCRによって好適な天然鋳型から単離される配列(例えば細胞から単離されるDNA又はRNA)、ライブラリ(特に発現ライブラリ)から単離されたヌクレオチド配列、(それ自体が既知の任意の好適な技法(例えばミスマッチPCR)を使用して)天然ヌクレオチド配列に突然変異を導入することによって調製されたヌクレオチド配列、重複プライマーを使用してPCRによって調製されたヌクレオチド配列、又はそれ自体が既知のDNA合成のための技法を使用して調製されたヌクレオチド配列であり得る。

20

#### 【0055】

本発明のアミノ酸配列は、特に「単一可変ドメイン(single variable domain)」又は「単一可変ドメイン(複数)(single variable domains)」(以後「単一可変ドメイン(複数)」)であり得る。本発明の単一可変ドメインは、単一の抗原結合単位を形成する任意の可変ドメインである。概して、かかる単一の可変ドメインは、4個のフレームワーク領域(それぞれFR1~FR4)及び3個の相補性決定領域(それぞれCDR1~CDR3);又はかかるアミノ酸配列の任意の好適な断片(本明細書においてさらに記載されるように、通常、CDRのうちの少なくとも1つを形成するアミノ酸残基を少なくとも幾つか含有する)から本質的になるアミノ酸配列である。かかる単一可変ドメイン及び単一可変断片は、免疫グロブリンフォールドを含むか、又は好適な条件の下で免疫グロブリンフォールドを形成することが可能であることが、最も好ましい。それゆえ、単一可変ドメインは、単一抗原結合単位を形成可能である限り、例えば軽鎖可変ドメイン配列(例えば $V_L$ 配列)若しくはその好適な断片、又は重鎖可変ドメイン配列(例えば、 $V_H$ 配列又は $V_{HH}$ 配列)若しくはその好適な断片を含むことができる(すなわち、例えば別の可変ドメインと相互作用して、例えば $V_H/V_L$ 相互作用を介して、機能的抗原結合ドメインを形成するのに必要な、例えば通常の抗体及びScFv断片に存在する可変ドメインのケースのように、機能的抗原結合単位を形成するために単一抗原結合ドメインが別の可変ドメインと相互作用する必要のないような単一可変ドメインから本質的になる機能的抗原結合単位)。

30

40

#### 【0056】

単一可変ドメインは、例えば、ドメイン抗体(又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、単一ドメイン抗体(又は単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、「dAb」(又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列)、又はナノボディ(商標)(本明細書に規定のように、 $V_{HH}$ 配列を含むが、これに限定されない)、他の単一可変ドメイン、又はこれらのいずれか1つの任意の好適な断片であり得る。(単一)ドメイン抗体の概説に関しては、上記で言及された従来技術、及び欧州特許第0368

50

684号も参照する。「dAb」という用語に関しては、例えばWard et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6)、Holt et al. (Trends Biotechnol., 2003, 21 (11): 484-490)、及び例えば国際公開第04/068820号、国際公開第06/030220号、国際公開第06/003388号、及びDomantis Ltd.の他の公開特許出願を参照する。哺乳動物起源ではないため、本発明との関連ではあまり好ましくはないが、単ドメイン抗体又は単一可変ドメインは、或る特定種のサメに由来する可能性があることに留意すべきである（例えばいわゆる「IgNARドメイン」、例えば国際公開第05/18629号を参照されたい）。

#### 【0057】

特に本発明のアミノ酸配列は、（本明細書で規定の）ナノボディ（商標）又はその好適な断片（備考：ナノボディ（商標）（Nanobody<sup>TM</sup>, Nanobodies<sup>TM</sup>）及びナノクローン（商標）は、Ablynx N. V.の商標である）であり得る。V<sub>H</sub>H及びナノボディのさらなる概説に関しては、Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302におけるMuyldermansによる総説、及び包括的な背景技術として言及される以下の特許出願：Vrije Universiteit Brusselの国際公開第94/04678号、国際公開第95/04079号、及び国際公開第96/34103号；Unileverの国際公開第94/25591号、国際公開第99/37681号、国際公開第00/40968号、国際公開第00/43507号、国際公開第00/65057号、国際公開第01/40310号、国際公開第01/44301号、欧州特許第1134231号及び国際公開第02/48193号；Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) の国際公開第97/49805号、国際公開第01/21817号、国際公開第03/035694号、国際公開第03/054016号及び国際公開第03/055527号；Algonomics N.V.及びAblynx N. V.の国際公開第03/050531号；カナダ国立研究評議会による国際公開第01/90190号；Institute of Antibodiesによる国際公開第03/025020号（＝欧州特許第1433793号）；並びにAblynx N.V.による国際公開第04/041867号、国際公開第04/041862号、国際公開第04/041865号、国際公開第04/041863号、国際公開第04/062551号、国際公開第05/044858号、国際公開第06/40153号、国際公開第06/079372号、国際公開第06/122786号、国際公開第06/122787号及び国際公開第06/122825号、並びにAblynx N.V.によるさらに公開された特許出願を参照する。これらの出願で言及されるさらなる従来技術、特に国際出願の国際公開第06/040153号の41頁～43頁で言及される参考文献リストも参照する（このリスト及び参考文献は参照により本明細書に援用される）。これらの参考文献に記載されるナノボディ（特にV<sub>H</sub>H配列及び部分ヒト化ナノボディ）は特に、1つ又は複数のフレームワーク配列における1つ又は複数の「特徴的な（Hallmark：ホールマーク）残基」の存在を特徴とし得る。

#### 【0058】

本発明のアミノ酸配列は特に、ドメイン抗体（又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、単ドメイン抗体（又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、「dAb」（又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列）、又はナノボディ（商標）（本明細書に規定のように、V<sub>H</sub>H配列を含むが、これに限定されない）、他の単一可変ドメイン、又はこれらのいずれか1つの任意の好適な断片であり得る。（単一）ドメイン抗体の概説に関しては、上記で言及された従来技術、及び欧州特許第0368684号も参照する。「dAb」という用語に関しては、例えばWard et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6)、Holt et al. (Trends Biotechnol., 2003, 21 (11): 484-490)、及び例えば国際公開第06/030220号、国際公開第06/003388号、及びDomantis Ltd.の他の公開特許出願を参照する。哺乳動物起源ではないため、本発明との関連ではあまり好ましくはないが、単ドメイン抗体又は単一可変ドメインは、或る特定種のサメに由来する可能性があることに留意すべきである（例えばいわゆる「IgNARドメイン」、例えば国際公開第05/18629号を参照されたい）。

#### 【0059】

特に本発明のアミノ酸配列は、(本明細書で規定の)ナノボディ(商標)又はその好適な断片(備考:ナノボディ(登録商標)及びナノクローン(登録商標)は、Ablynx N. V.の商標である)であり得る。Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6に指向性を有するこのようなナノボディは、本明細書中で「本発明のナノボディ」とも称される。

【0060】

ナノボディの概説に関しては、以下のさらなる記載、及び本明細書で引用される従来技術を参照する。しかしこれに関して、本明細書及び従来技術は主に、いわゆる「V<sub>H</sub> 3群」のナノボディ(すなわちDP - 47、DP - 51又はDP - 29等のV<sub>H</sub> 3群のヒト生殖細胞系列の配列との高度な配列相同性を有するナノボディ)を説明し、このナノボディは本発明の好ましい態様を形成することに留意すべきである。しかし概して、本発明は最も広範な意味で、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6に指向性を有する任意種のナノボディを包含し、例えば2006年4月14日付けでAblynx N. V.により出願された"DP-78-likeNanobodies"と題する米国仮特許出願第60/792,279号に記載されるように、例えばいわゆる「V<sub>H</sub> 4群」に属するナノボディ(すなわちDP - 78等のV<sub>H</sub> 4群のヒト生殖細胞系列の配列との高度な配列相同性を有するナノボディ)も包含することに留意すべきである。

【0061】

概して、ナノボディ(特にV<sub>H</sub> H配列及び部分ヒト化ナノボディ)は特に、(また本明細書にさらに記載される)1つ又は複数のフレームワーク配列における(本明細書に記載される)1つ又は複数の「特徴的な残基」の存在を特徴とし得る。

【0062】

したがって概して、ナノボディは、(一般)構造：  
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4  
(ここで、FR 1 ~ FR 4はそれぞれフレームワーク領域1 ~ フレームワーク領域4を表し、CDR 1 ~ CDR 3はそれぞれ相補性決定領域1 ~ 相補性決定領域3を表し、1つ又は複数の特徴的な残基は本明細書にさらに規定されるようなものである)を有するアミノ酸配列として定義することができる。

【0063】

具体的にナノボディは、(一般)構造：  
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4  
(ここで、FR 1 ~ FR 4はそれぞれフレームワーク領域1 ~ フレームワーク領域4を表し、CDR 1 ~ CDR 3はそれぞれ相補性決定領域1 ~ 相補性決定領域3を表し、フレームワーク配列は本明細書にさらに規定されるようなものである)を有するアミノ酸配列であり得る。

【0064】

より具体的に、ナノボディは、(一般)構造：  
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4  
(ここで、FR 1 ~ FR 4はそれぞれフレームワーク領域1 ~ フレームワーク領域4を指し、CDR 1 ~ CDR 3はそれぞれ相補性決定領域1 ~ 相補性決定領域3を指す)を有するアミノ酸配列であり得る；ここで

i) 好ましくは、カバットナンバリング(Kabat numbering)による11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数は、以下の表A - 3で言及する特徴的な残基から選択され、

ii) 上記アミノ酸配列は、配列番号1 ~ 配列番号22のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有し、ここでアミノ酸同一性の程度を決定するためにCDR配列を形成するアミノ酸残基(配列番号1 ~ 配列番号22の配列においてXで示す)は無視する。

## 【 0 0 6 5 】

これらのナノボディにおいて、C D R 配列は概して、本明細書中にさらに規定されるようなものである。

## 【 0 0 6 6 】

したがって、本発明は、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6と（本明細書に規定のように）結合することができる、及び／又はこれらに指向性を有するこのようなナノボディ、その好適な断片、及びこのようなナノボディ及び／又は好適な断片を1つ又は複数含むか、又はこれらから本質的になるポリペプチドにも関する。

10

## 【 0 0 6 7 】

配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1 はT i e 2、A n g 1、A n g 2、及びA n g 4に対して産生されている多くのV<sub>H H</sub> 配列のアミノ酸配列を与える。

## 【 0 0 6 8 】

したがって本発明の特に好ましいナノボディの幾つかが、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 4、又はA n g p t l 4と（本明細書でさらに規定されるように）結合することができ、及び／又はこれらに指向性を有し、

i ) 配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1 のアミノ酸配列の少なくとも1つとの80%のアミノ酸同一性を有し（ここでアミノ酸同一性の程度を決定するためにC D R 配列を形成するアミノ酸残基は無視する）（またこれに関しては、表 A - 1 を参照し、この図は配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1 のナノボディのフレームワーク 1 配列（配列番号 1 2 6 ~ 配列番号 1 7 2 ）、フレームワーク 2 配列（配列番号 2 2 0 ~ 配列番号 2 6 6 ）、フレームワーク 3 配列（配列番号 3 1 4 ~ 配列番号 3 6 0 ）及びフレームワーク 4 配列（配列番号 4 0 8 ~ 配列番号 4 5 4 ）を列挙する）（フレームワーク 1 配列の1位 ~ 4 位及び27位 ~ 30位のアミノ酸残基に関しては、以下で為されるコメントも参照する。したがって、アミノ酸同一性の程度を決定するためにこれらのアミノ酸残基は無視するのが好ましい）、また

20

i i ) 好ましくはカバットナンバリングによる11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数が、以下の表 A - 3 で言及される特徴的な残基から選択される、ナノボディである。

30

## 【 0 0 6 9 】

これらのナノボディにおいて、概してC D R 配列は本明細書にさらに規定されるようなものである。

## 【 0 0 7 0 】

またこのようなナノボディは、任意で好適な方法で任意の好適な供給源で得られてもよく、例えば（すなわち好適な種のラクダ科動物由来の）天然V<sub>H H</sub> 配列、又は合成若しくは半合成のアミノ酸配列であってもよく、これにはこれらに限定されないが、（本明細書に規定の）「ヒト化」ナノボディ、（本明細書に規定の）「ラクダ化」免疫グロブリン配列（特にラクダ化重鎖可変ドメイン配列）、並びに本明細書にさらに記載されるように、親和性成熟（例えば、合成、ランダム又は天然免疫グロブリン配列から開始する）、C D R グラフト化、ベニヤリング、異なる免疫グロブリン配列由来の断片の組合せ、重複プライマーを使用したP C R アセンブリ、及び当業者に既知の免疫グロブリン配列を遺伝子操作する同様の技法、又は上記のいずれかの任意の好適な組合せ等の技法によって得られるナノボディが含まれる。また、ナノボディがV<sub>H H</sub> 配列を含む場合、上記ナノボディは、1つ又は複数の本発明のさらなる（部分又は完全）ヒト化ナノボディを提供するように、本明細書でさらに記載されるように好適にヒト化され得る。同様に、ナノボディが合成又は半合成の配列（例えば部分ヒト化配列）を含む場合、上記ナノボディは、同様に1つ又は複数の本発明のさらなる（部分又は完全）ヒト化ナノボディを提供するように、同様に本明細書で記載されるように任意でさらに好適にヒト化され得る。

40

## 【 0 0 7 1 】

50

特にヒト化ナノボディは、概してこれまでの段落でナノボディに関して規定されたようなアミノ酸配列であり得るが、この中に（本明細書に規定の）ヒト化置換である、及び／又はヒト化置換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。本明細書中の開示に基づいて、当業者にとって、幾つかの好ましいが非限定的なヒト化置換（及びその好適な組合せ）は明らかになる。付加的に又は代替的に、天然  $V_{HH}$  配列のフレームワーク領域の配列を、１つ又は複数の密接に関連したヒト  $V_H$  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、他の潜在的に有用なヒト化置換を確認することができ、その後このようにして決定した潜在的に有用なヒト化置換（又はその組合せ）の１つ又は複数を上記  $V_{HH}$  配列に（それ自体が既知の任意の方法で、本明細書にさらに記載のように）導入することができ、得られたヒト化  $V_H$  配列を、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル、及び／又は他の所望の特性に関して試験することができる。このように、限定的な試行錯誤によって、本明細書中の開示に基づき、当業者は、他の好適なヒト化置換（又はその好適な組合せ）を決定することができる。また上記に基づいて、ナノボディ（のフレームワーク領域）を部分ヒト化又は完全ヒト化してもよい。

10

#### 【 0 0 7 2 】

幾つかの特に好ましい本発明のヒト化ナノボディは配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1 のナノボディのヒト化変異体である。これらのうちの幾つかの好ましいアミノ酸配列は、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 である。

20

#### 【 0 0 7 3 】

したがって本発明の他の好ましいナノボディの幾つかは、Ang 1 / Tie 2 又は Ang 2 / Tie 2 の相互作用と（本明細書でさらに規定されるように）遮断することができ、

i) 好ましくはカバットナンバリングによる 1 1 位、3 7 位、4 4 位、4 5 位、4 7 位、8 3 位、8 4 位、1 0 3 位、1 0 4 位及び 1 0 8 位のアミノ酸残基の１つ又は複数が、以下の表 A - 3 で言及される特徴的な残基から選択される、ナノボディである。

#### 【 0 0 7 4 】

本発明の別の特定の態様によれば、本発明は、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6 との結合に特に適する多くのアミノ酸残基のストレッチ（すなわち小ペプチド）を提供する。これらのアミノ酸残基のストレッチは、特に本発明のアミノ酸配列の抗原結合部位の（一部）を形成するように、本発明のアミノ酸配列に存在し得る、及び／又は組み込まれ得る。初めに、これらのアミノ酸残基のストレッチを重鎖抗体の C D R 配列、又はTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6 に対して産生する  $V_{HH}$  配列として生成した（又は本明細書でさらに記載されるように、このような C D R 配列に基づき得る、及び／又はこれに由来し得る）ので、これらのアミノ酸残基のストレッチは概して、本明細書で「C D R 配列」（すなわちそれぞれ C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列）とも称される。しかし、本発明が最も広範な意味で、これらのアミノ酸残基のストレッチによる本発明のアミノ酸配列とTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6 との結合が可能である限り、これらのアミノ酸残基のストレッチが本発明のアミノ酸配列において有し得る特定の構造的役割又は機能に限定されないことに留意すべきである。したがって概して、本発明は最も広範な意味で、アミノ酸配列全体が、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6 と結合することができる結合ドメイン及び／又は結合単位を形成するように、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、A

30

40

50

ngptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と結合することができ、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR配列、特に2つ以上のこのようなCDR配列の好適な組合せを含む任意のアミノ酸配列を含み、これらは1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列を介して互いに好適に連結する。しかし、本発明のアミノ酸配列における1つだけのこのようなCDR配列の存在は、それ自体で既にTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と結合することができる本発明のアミノ酸配列を提供するのに十分であり得ることに留意すべきである。例えばここでもまた、国際公開第03/050531号に記載される、いわゆる「促進断片 (Expedite fragments)」を参照する。

10

#### 【0075】

したがって別の具体的ではあるが非限定的な態様において、本発明のアミノ酸配列は、本明細書に記載のCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列（又はこれらの任意の好適な組合せ）からなる群から選択されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含むアミノ酸配列であり得る。特に、本発明のアミノ酸配列は、少なくとも1つの抗原結合部位（上記抗原結合部位は、本明細書に記載のCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列（又はこれらの任意の好適な組合せ）からなる群から選択されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含む）を含むアミノ酸配列であり得る。

#### 【0076】

概して本発明のこの態様において、本発明のアミノ酸配列は、アミノ酸残基のストレッチ（上記アミノ酸残基のストレッチは、本明細書に記載のCDR配列の少なくとも1つの配列に対応するアミノ酸配列を有する）を少なくとも1つ含む任意のアミノ酸配列であり得る。このようなアミノ酸配列は、免疫グロブリンフォールドを含んでも、又は含んでいなくてもよい。例えば、これに限定されないが、このようなアミノ酸配列は、このようなCDR配列を少なくとも1つ含むが、（完全）免疫グロブリンフォールドを形成するのに十分な大きさではない免疫グロブリン配列の好適な断片であり得る（例えば同様に、国際公開第03/050531号に記載される、「促進断片」を参照する）。代替的に、このようなアミノ酸配列は、このようなCDR配列に対応する（すなわちその抗原結合部位の一部として）アミノ酸残基のストレッチを少なくとも1つ含む、好適な「タンパク質骨格」であり得る。アミノ酸配列を提示するのに好適な骨格が当業者にとって明らかであり、例えばこれらに限定されないが、（すなわち本明細書に既に記載の免疫グロブリン配列以外の）免疫グロブリンに基づく若しくはこれに由来する結合骨格、プロテインドメイン由来のタンパク質骨格（例えばアフィボディ (Affibodies) (商標)）、テンダミスタット、フィブロネクチン、リボカリン、CTLA-4、T細胞受容体、設計アンキリン反復、アビマー (avimers) 及びPDZドメイン (Binz et al., Nat. Biotech 2005, Vol 23:1257)、並びにDNA又はRNAに基づく結合部分 (DNAアプタマー又はRNAアプタマーを含むが、これに限定されない) (Ulrich et al., Comb Chem High Throughput Screen 2006 9(8): 619-32) が含まれる。

20

30

#### 【0077】

同様に、これらのCDR配列を1つ又は複数含む、任意の本発明のアミノ酸配列は、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と（本明細書に規定のように）特異的に結合することができるようなもの、及びより具体的には本明細書に規定のように（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と結合することができるようなものであるのが好ましい。

40

#### 【0078】

50

より具体的には、本発明のこの態様によるアミノ酸配列は、抗原結合部位を少なくとも1つ含む任意のアミノ酸配列であって、上記抗原結合部位が、(i)第1のアミノ酸配列が本明細書に記載のCDR1配列から選択される場合、第2のアミノ酸配列は本明細書に記載のCDR2配列若しくは本明細書に記載のCDR3配列から選択される；(ii)第1のアミノ酸配列が本明細書に記載のCDR2配列から選択される場合、第2のアミノ酸配列は本明細書に記載のCDR1配列若しくは本明細書に記載のCDR3配列から選択される；又は(iii)第1のアミノ酸配列が本明細書に記載のCDR3配列から選択される場合、第2のアミノ酸配列は本明細書に記載のCDR1配列若しくは本明細書に記載のCDR3配列から選択されるように、本明細書に記載のCDR1配列、本明細書に記載のCDR2配列及び本明細書に記載のCDR3配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を少なくとも2つ含む、任意のアミノ酸配列であり得る。

10

#### 【0079】

さらにより具体的には、本発明のアミノ酸配列は、抗原結合部位を少なくとも1つ含むアミノ酸配列であって、上記抗原結合部位が、第1のアミノ酸配列が本明細書に記載のCDR1配列から選択され、第2のアミノ酸配列が本明細書に記載のCDR2配列から選択され、第3のアミノ酸配列が本明細書に記載のCDR3配列から選択されるように、本明細書に記載のCDR1配列、本明細書に記載のCDR2配列及び本明細書に記載のCDR3配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を少なくとも3つ含む、アミノ酸配列であり得る。CDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の好ましい組合せは本明細書のさらなる記載から明らかになる。当業者にとって明らかなように、このようなアミノ酸配列は(本明細書でさらに記載のように)免疫グロブリン配列であるのが好ましいが、例えば上記CDR配列を提示するのに好適な骨格を含む任意の他のアミノ酸配列でもあり得る。

20

#### 【0080】

したがって具体的であるが非限定的な一態様において、本発明はTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6に指向性を有するアミノ酸配列に関し、該アミノ酸配列は以下のものからなる群から選択されるアミノ酸残基のストレッチを1つ又は複数含む：

- a) 配列番号173～配列番号219；
- b) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- c) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列；
- d) 配列番号267～配列番号313；
- e) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- f) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列；
- g) 配列番号361～配列番号454；
- h) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- i) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列；又はそれらの任意の好適な組合せ。

30

40

#### 【0081】

本発明のアミノ酸配列がb)及び/又はc)によるアミノ酸配列を1つ又は複数含有する場合、

- i) b)及び/又はc)によるこのようなアミノ酸配列において任意のアミノ酸置換は、(本明細書で規定されるように)対応するa)によるアミノ酸配列と比較して、保守的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び/又は

50



i i ) b ) 及び / 又は c ) によるアミノ酸配列は、対応する a ) によるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換だけを含むし、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく ; 及び / 又は

i i i ) b ) 及び / 又は c ) によるアミノ酸配列は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって a ) によるアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列であり得る。

【 0 0 8 2 】

同様に、本発明のアミノ酸配列が e ) 及び / 又は f ) によるアミノ酸配列を 1 つ又は複数含有する場合、

i ) e ) 及び / 又は f ) によるこのようなアミノ酸配列において任意のアミノ酸置換は、( 本明細書で規定されるように ) 対応する d ) によるアミノ酸配列と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく ; 及び / 又は

i i ) e ) 及び / 又は f ) によるアミノ酸配列は、対応する d ) によるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換だけを含むし、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく ; 及び / 又は

i i i ) e ) 及び / 又は f ) によるアミノ酸配列は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって d ) によるアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列であり得る。

【 0 0 8 3 】

また同様に、本発明のアミノ酸配列が h ) 及び / 又は i ) によるアミノ酸配列を 1 つ又は複数含有する場合、

i ) h ) 及び / 又は i ) によるこのようなアミノ酸配列において任意のアミノ酸置換は、( 本明細書で規定されるように ) 対応する g ) によるアミノ酸配列と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく ; 及び / 又は

i i ) h ) 及び / 又は i ) によるアミノ酸配列は、対応する g ) によるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換だけを含むし、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく ; 及び / 又は

i i i ) h ) 及び / 又は i ) によるアミノ酸配列は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって g ) によるアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列であり得る。

【 0 0 8 4 】

直前の ( last preceding ) 段落は概して、それぞれ b ) 、 c ) 、 e ) 、 f ) 、 h ) 又は i ) によるアミノ酸配列を 1 つ又は複数含む、任意の本発明のアミノ酸配列にも適用されることを理解されたい。

【 0 0 8 5 】

この特定の態様において、アミノ酸配列は以下のものからなる群から選択されるアミノ酸残基のストレッチを 1 つ又は複数含むのが好ましい :

i ) 配列番号 1 7 3 ~ 配列番号 2 1 9 ;

i i ) 配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 3 1 3 ; 及び

i i i ) 配列番号 3 6 1 ~ 配列番号 4 5 4 ; 又は  
それらの任意の好適な組合せ。

【 0 0 8 6 】

また好ましくは、このようなアミノ酸配列において、少なくとも 1 つの上記アミノ酸残基のストレッチが T i e 1 、 T i e 2 、 A n g 1 、 A n g 2 、 A n g 3 、 A n g 4 、 A n g p t 1 1 、 A n g p t 1 2 、 A n g p t 1 3 、 A n g p t 1 4 、 A n g p t 1 5 、又は A n g p t 1 6 との結合に関する抗原結合部位の一部分を形成する。

【 0 0 8 7 】

より具体的ではあるが、同様に非限定的な態様において、本発明は、( i ) アミノ酸残基の第 1 のストレッチが a ) 、 b ) 若しくは c ) によるアミノ酸配列の 1 つに対応する場合、アミノ酸残基の第 2 のストレッチは d ) 、 e ) 、 f ) 、 g ) 、 h ) 若しくは i ) によ

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列の1つに対応し；( i i )アミノ酸残基の第1のストレッチがd)、e)若しくはf)によるアミノ酸配列の1つに対応する場合、アミノ酸残基の第2のストレッチはa)、b)、c)、g)、h)若しくはi)によるアミノ酸配列の1つに対応し；又は( i i i )アミノ酸残基の第1のストレッチがg)、h)若しくはi)によるアミノ酸配列の1つに対応する場合、アミノ酸残基の第2のストレッチはa)、b)、c)、d)、e)若しくはf)によるアミノ酸配列の1つに対応するように、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸残基のストレッチを2つ以上含むT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6に指向性を有するアミノ酸配列に関する：

10

- a) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列；
- b) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- c) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列；
- d) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列；
- e) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- f) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列；
- g) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列；
- h) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- i) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列。

20

#### 【0088】

この特定の態様において、アミノ酸配列は、( i )アミノ酸残基の第1のストレッチが配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の1つに対応する場合、アミノ酸残基の第2のストレッチは配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列若しくは配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の1つに対応し；( i i )アミノ酸残基の第1のストレッチが配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の1つに対応する場合、アミノ酸残基の第2のストレッチは配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列若しくは配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の1つに対応し；又は( i i i )アミノ酸残基の第1のストレッチが配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の1つに対応する場合、アミノ酸残基の第2のストレッチは配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列若しくは配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の1つに対応するように、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸残基のストレッチを2つ以上含むのが好ましい：

30

- i) 配列番号173～配列番号219；
- i i) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列；及び
- i i i) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列。

40

#### 【0089】

また同様に好ましくは、このようなアミノ酸配列において、少なくとも2つのアミノ酸残基のストレッチがT i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6との結合に関する抗原結合部位の一部分を形成する。

#### 【0090】

さらにより具体的であるが、非限定的な態様において、本発明は、アミノ酸残基のストレッチを3つ以上含む、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5

50

、又は Ang p t l 6 に指向性を有するアミノ酸配列であって、アミノ酸残基の第 1 のストレッチが、

- a) 配列番号 1 7 3 ~ 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列；
- b) 配列番号 1 7 3 ~ 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- c) 配列番号 1 7 3 ~ 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列から選択され；

アミノ酸残基の第 2 のストレッチが、

- d) 配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 3 1 3 のアミノ酸配列；
- e) 配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 3 1 3 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- f) 配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 3 1 3 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され；

アミノ酸残基の第 3 のストレッチが、

- g) 配列番号 3 6 1 ~ 配列番号 4 5 4 のアミノ酸配列；
- h) 配列番号 3 6 1 ~ 配列番号 4 5 4 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；
- i) 配列番号 3 6 1 ~ 配列番号 4 5 4 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択される、アミノ酸配列に関する。

#### 【 0 0 9 1 】

好ましくはこの特定の態様において、アミノ酸残基の第 1 のストレッチが配列番号 1 7 3 ~ 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列からなる群から選択され；アミノ酸残基の第 2 のストレッチが配列番号 2 6 7 ~ 配列番号 3 1 3 のアミノ酸配列からなる群から選択され；アミノ酸残基の第 3 のストレッチが配列番号 3 6 1 ~ 配列番号 4 5 4 のアミノ酸配列からなる群から選択される。

#### 【 0 0 9 2 】

同様に好ましくは、このようなアミノ酸配列において、少なくとも 3 つのアミノ酸残基のストレッチが Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6 との結合に関する抗原結合部位の一部分を形成する。

#### 【 0 0 9 3 】

アミノ酸配列のこのようなストレッチの好ましい組合せは本明細書のさらなる開示から明らかになる。

#### 【 0 0 9 4 】

好ましくはこのようなアミノ酸配列において、C D R 配列が、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つの C D R 配列との少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性（9 5 % 以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有する。例えば、（本明細書中に記載の方法で）上記アミノ酸配列と、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1 の配列の 1 つ又は複数とのアミノ酸同一性の程度を求めることによって、このアミノ酸同一性の程度を決定することができ、ここではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する。また、このような本発明のアミノ酸配列は、本明細書中でさらに記載するようなものであり得る。

#### 【 0 0 9 5 】

またこのようなアミノ酸配列は、（本明細書に規定のように）Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6 と特異的に結合することができるようなもの、及びより具体的には本明細書に規定のように（本明細書にさらに記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及

10

20

30

40

50

び／又は  $k_{off}$  速度、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び／又は表される) 親和性で  $Tie1$ 、 $Tie2$ 、 $Ang1$ 、 $Ang2$ 、 $Ang3$ 、 $Ang4$ 、 $Angptl1$ 、 $Angptl2$ 、 $Angptl3$ 、 $Angptl4$ 、 $Angptl5$ 、又は  $Angptl6$  と結合することができるようなものであるのが好ましい。

#### 【0096】

本発明のアミノ酸配列が、4つのフレームワーク領域(それぞれ、 $FR1 \sim FR4$ )と、3つの相補性決定領域(それぞれ、 $CDR1 \sim CDR3$ )とから本質的になる場合、本発明のアミノ酸配列は、 $CDR1$ が、

a) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列；

b) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列； 10

c) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、及び／又は

$CDR2$ が、

d) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列；

e) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

f) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、及び／又は 20

$CDR3$ が、

g) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列；

h) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

i) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるようなものであるのが好ましい。

#### 【0097】

特にこのような本発明のアミノ酸配列は、 $CDR1$ が配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列からなる群から選択され、及び／又は $CDR2$ が配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列からなる群から選択され、及び／又は $CDR3$ が配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列からなる群から選択されるようなものであり得る。 30

#### 【0098】

特に本発明のアミノ酸配列が、4つのフレームワーク領域(それぞれ、 $FR1 \sim FR4$ )と、3つの相補性決定領域(それぞれ、 $CDR1 \sim CDR3$ )とから本質的になる場合、本発明のアミノ酸配列は、 $CDR1$ が、

a) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列；

b) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列； 40

c) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、 $CDR2$ が、

d) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列；

e) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

f) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

$CDR3$ が、

g) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列； 50

h) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

i) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるようなもの、又はこのようなアミノ酸配列の任意の好適な断片であるのが好ましい。

【0099】

特にこのような本発明のアミノ酸配列は、CDR1が配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列からなる群から選択され、CDR2が配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列からなる群から選択され、CDR3が配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列からなる群から選択されるようなものであり得る。

10

【0100】

同様に、CDR配列の好ましい組合せは、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0101】

またこのようなアミノ酸配列は、(本明細書に規定のように) Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6と特異的に結合することができるようなもの、及びより具体的には本明細書に規定のように(本明細書にさらに記載されるような(実際又は見掛けの)  $K_D$  値、(実際又は見掛けの)  $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は  $k_{off}$  速度、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表

20

【0102】

好ましいが非限定的な一態様において本発明は、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1～FR4)と、3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1～CDR3)とから本質的になるアミノ酸配列であって、上記アミノ酸配列のCDR配列が、配列番号455～配列番号501のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する、アミノ酸配列に関する。このアミノ酸同一性の程度は例えば、上記アミノ酸配列と、配列番号455～配列番号501のアミノ酸配列の配列の1つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)求めることによって決定することができる(フレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。このような本発明のアミノ酸配列は、本明細書にさらに記載されるようなものであり得る。

30

【0103】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、Tie2に結合し、Ang1との相互作用を遮断し、4つのフレームワーク領域(上記されるようなFR1～FR4、例えば表A-1において示されるような任意のFR1、FR2、FR3若しくはFR4のヒト化フレームワーク領域FR1、FR2、FR3若しくはFR4(又は好ましくは配列番号455～配列番号457、配列番号459又は配列番号460を有するTie2結合剤についての任意の対応するFR)、又は表A-1において示されるような任意のFR1、FR2、FR3又はFR4(又は好ましくは配列番号455～配列番号457、配列番号459又は配列番号460を有するTie2結合剤についての任意の対応するFR))、及び3つの相補性決定領域(それぞれCDR1～CDR3)から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のCDR配列は、配列番号455～配列番号457、配列番号459又は配列番号460のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさ

40

50

らに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と、配列番号455～配列番号457、配列番号459又は配列番号460の配列の1つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

#### 【0104】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、Ang 2に結合し、Tie 2との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域（上記されるようなFR1～FR4、例えば表A-1において示されるような任意のFR1、FR2、FR3若しくはFR4のヒト化フレームワーク領域FR1、FR2、FR3若しくはFR4（又は好ましくは配列番号464～配列番号469を有するAng 2結合剤についての任意の対応するFR）、又は表A-1において示されるような任意のFR1、FR2、FR3又はFR4（又は好ましくは配列番号464～配列番号469を有するAng 2結合剤についての任意の対応するFR））、及び3個の相補性決定領域（それぞれCDR1～CDR3）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のCDR配列は、配列番号464～配列番号469のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性（95%以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と、配列番号464～配列番号469の配列の1つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

#### 【0105】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、Tie 2に結合し、Ang 1との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域（配列番号455において記載されるようなFR1～FR4又はそのヒト化フレームワーク）及び3個の相補性決定領域（それぞれCDR1～CDR3）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のCDR配列は、配列番号455のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性（95%以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号455の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

#### 【0106】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、Tie 2に結合し、Ang 1との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域（配列番号456において記載されるようなFR1～FR4又はそのヒト化フレームワーク）及び3個の相補性決定領域（それぞれCDR1～CDR3）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のCDR配列は、配列番号456のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性（95%以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号456の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

## 【 0 1 0 7 】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、T i e 2 に結合し、A n g 1 との相互作用を遮断し、4 個のフレームワーク領域（配列番号 4 5 7 において記載されるような F R 1 ~ F R 4 又はそのヒト化フレームワーク）及び 3 個の相補性決定領域（それぞれ C D R 1 ~ C D R 3 ）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列の C D R 配列は、配列番号 4 5 7 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つの C D R 配列との、少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性（例えば 9 5 % 以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号 4 5 7 の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（ここではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

10

## 【 0 1 0 8 】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、T i e 2 に結合し、A n g 1 との相互作用を遮断し、4 個のフレームワーク領域（配列番号 4 5 9 において記載されるような F R 1 ~ F R 4 又はそのヒト化フレームワーク）及び 3 個の相補性決定領域（それぞれ C D R 1 ~ C D R 3 ）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列の C D R 配列は、配列番号 4 5 9 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つの C D R 配列との、少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性（9 5 % 以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号 4 5 9 の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（ここではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

20

## 【 0 1 0 9 】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、T i e 2 に結合し、A n g 1 との相互作用を遮断し、4 個のフレームワーク領域（配列番号 4 6 0 において記載されるような F R 1 ~ F R 4 又はそのヒト化フレームワーク）及び 3 個の相補性決定領域（それぞれ C D R 1 ~ C D R 3 ）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列の C D R 配列は、配列番号 4 6 0 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つの C D R 配列との、少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性（9 5 % 以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号 4 6 0 の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（ここではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

30

## 【 0 1 1 0 】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、A n g 2 に結合し、T i e 2 との相互作用を遮断し、4 個のフレームワーク領域（配列番号 4 6 4 において記載されるような F R 1 ~ F R 4 又はそのヒト化フレームワーク）及び 3 個の相補性決定領域（それぞれ C D R 1 ~ C D R 3 ）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列の C D R 配列は、配列番号 4 6 4 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つの C D R 配列との、少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性（9 5 % 以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号 4 6 4 の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（ここではフレームワーク

40

50

領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

【0111】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、A n g 2に結合し、T i e 2との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域(配列番号465において記載されるようなF R 1~F R 4又はそのヒト化フレームワーク)及び3個の相補性決定領域(それぞれC D R 1~C D R 3)から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のC D R 配列は、配列番号465のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのC D R 配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号465の配列との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)決定することによって、決定することができる(そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

10

【0112】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、A n g 2に結合し、T i e 2との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域(配列番号466において記載されるようなF R 1~F R 4又はそのヒト化フレームワーク)及び3個の相補性決定領域(それぞれC D R 1~C D R 3)から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のC D R 配列は、配列番号466のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのC D R 配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号466の配列との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)決定することによって、決定することができる(そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

20

【0113】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、A n g 2に結合し、T i e 2との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域(配列番号467において記載されるようなF R 1~F R 4又はそのヒト化フレームワーク)及び3個の相補性決定領域(それぞれC D R 1~C D R 3)から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のC D R 配列は、配列番号467のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのC D R 配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号467の配列との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)決定することによって、決定することができる(そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

30

40

【0114】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、A n g 2に結合し、T i e 2との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域(配列番号468において記載されるようなF R 1~F R 4又はそのヒト化フレームワーク)及び3個の相補性決定領域(それぞれC D R 1~C D R 3)から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のC D R 配列は、配列番号468のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのC D R 配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、

50



上記アミノ酸配列と配列番号468の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

【0115】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、Ang 2に結合し、Tie 2との相互作用を遮断し、4個のフレームワーク領域（配列番号469において記載されるようなFR1～FR4又はそのヒト化フレームワーク）及び3個の相補性決定領域（それぞれCDR1～CDR3）から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列のCDR配列は、配列番号469のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性（95%以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号469の配列との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）決定することによって、決定することができる（そこではフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる。

10

【0116】

本発明のこのようなアミノ酸配列において、フレームワーク配列は任意の好適なフレームワーク配列であり得るが、好適なフレームワーク配列の例は、例えば標準的なハンドブック、並びに本明細書において言及されるさらなる開示及び従来技術に基づき、当業者に明らかである。

20

【0117】

フレームワーク配列は、免疫グロブリンフレームワーク配列、又は（例えばヒト化又はラクダ化によって）免疫グロブリンフレームワーク配列から誘導されているフレームワーク配列（の好適な組合せ）であるのが好ましい。例えば、フレームワーク配列は、軽鎖可変ドメイン（例えばV<sub>L</sub>配列）及び/又は重鎖可変ドメイン（例えばV<sub>H</sub>配列）から誘導されているフレームワーク配列であり得る。特に好ましい一態様では、フレームワーク配列は、V<sub>H</sub>H配列（上記フレームワーク配列は任意で、部分又は完全ヒト化し得る）から誘導されているか、又は（本明細書に規定のように）ラクダ化した通常のV<sub>H</sub>配列であるいずれかのフレームワーク配列である。

30

【0118】

フレームワーク配列は、本発明のアミノ酸配列が、ドメイン抗体（又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、単ドメイン抗体（又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、「dAb」（又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列）、又はナノボディ（商標）（V<sub>H</sub>H配列を含むが、これに限定されない）であるようなものであるのが好ましい。同様に、好適なフレームワーク配列は、例えば標準的なハンドブック、並びに本明細書に言及されるさらなる開示及び従来技術に基づいて当業者にとって明らかである。

【0119】

特に、本発明のアミノ酸配列に存在するフレームワーク配列は、本発明のアミノ酸配列がナノボディ（商標）であるように、（本明細書に規定の）特徴的な残基を1つ又は複数含有し得る。このようなフレームワーク配列（の好適な組合せ）の幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる開示から明らかになる。

40

【0120】

同様に概して、本発明のアミノ酸配列に関して本明細書に記載のように、上記のいずれかの好適な断片（又は断片の組合せ）（例えば1つ又は複数のフレームワーク配列に好適に隣接した、及び/又はこれを介して連結した、1つ又は複数のCDR配列を（例えば、これらのCDR配列及びフレームワーク配列が、断片が誘導された完全長の（full-sized：フルサイズの）免疫グロブリン配列で発生し得るのと同じ順番（order）で）含有する

50

断片)を使用することも可能である。またこのような断片は、免疫グロブリンフォールドを含むか、若しくは形成することができるようなもの、又は代替的に免疫グロブリンフォールドを含まないか、若しくは形成することができないようなものであってもよい。

#### 【0121】

特定の一態様において、このような断片は、本明細書に記載の単一CDR配列(特にCDR3配列)を含み、フレームワーク配列(の一部)(特に断片が誘導される免疫グロブリン配列において上記CDR配列に隣接するフレームワーク配列(複数可)の一部)が両側に隣接する。例えば、CDR3配列は、FR3配列(の一部)の後にあり、FR4配列(の一部)の前にあり得る。このような断片はまた、ジスルフィド架橋、特にCDR配列のそれぞれ前後にある2つのフレームワーク領域を連結するジスルフィド架橋を含有してもよい(このようなジスルフィド架橋を形成するために、上記フレームワーク領域で自然発生するシステイン残基を使用するか、又は代替的にシステイン残基を上記フレームワーク領域に合成的に付加若しくは導入してもよい)。これらの「促進断片」のさらなる説明に関しては、同様に国際公開第03/050531号、及び2006年12月5日に出願されたAblynx N. V.の"Peptides capable of binding to serum proteins"と題するAblynx N. V.の米国仮特許出願(発明者: Revets, Hilde Adi Pierrette, Kolkman, Joost Alexander、及びHoogenboom, Hendricus Renerus JacobusMattheus)を参照する。

10

#### 【0122】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、Tie2に結合し、Ang1との相互作用を遮断し、4つのフレームワーク領域及び3つの相補性決定領域から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列は、配列番号455~配列番号457、配列番号459、又は配列番号460のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つの配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はあまり本質的ではないが99%若しくは100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号455~配列番号457、配列番号459、又は配列番号460の配列との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)決定することによって、決定することができる。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる、例えばヒト化する、及び/又は多価及び/又は多重特異性の実施形態にフォーマットすることができる。

20

30

#### 【0123】

好ましいが非限定的なさらなる態様において、本発明は、Ang2に結合し、Tie2との相互作用を遮断し、4つのフレームワーク領域及び3つの相補性決定領域から本質的になるアミノ酸配列に関し、上記アミノ酸配列は、配列番号464~配列番号469のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つの配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はあまり本質的ではないが99%若しくは100%のアミノ酸同一性を有する。このアミノ酸同一性の程度は、例えば、上記アミノ酸配列と配列番号464~配列番号469の配列との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)決定することによって、決定することができる。本発明のかかるアミノ酸配列は、本明細書においてさらに記載することができる、例えばヒト化する、及び/又は多価及び/又は多重特異性の実施形態にフォーマットすることができる。

40

#### 【0124】

別の態様において本発明は、化合物又は構築物、特にタンパク質又はポリペプチド(それぞれ本明細書で「本発明の化合物」又は「本発明のポリペプチド」とも称される)であって、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列(又はその好適な断片)を含むか又は本質的にこれからなり、任意で1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位をさらに含む、化合物又は構築物、特にタンパク質又はポリペプチドに関する。本明細書中のさらなる開示から当業者にとって明らかになるように、このようなさらなる基、残基、部分、結合単位又はアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列(及び/又はこれが存在する化合物又は構

50

築物)に対しさらなる機能性を与えても、又は与えなくてもよく、本発明のアミノ酸配列の特性を変えても、又は変えなくてもよい。

【0125】

例えば、このようなさらなる基、残基、部分又は結合単位は、化合物又は構築物が(融合)タンパク質又は(融合)ポリペプチドになるように、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列であり得る。好ましいが非限定的な態様において、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は免疫グロブリン配列である。さらにより好ましくは、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又はナノボディからなる群から選択される。

10

【0126】

代替的に、このような基、残基、部分又は結合単位は例えば、化学的な基、残基、部分(それ自体が生物学的に及び/又は薬理学的に活性であっても、又は活性でなくてもよい)であり得る。例えば、これに限定されないが、このような基は、本明細書にさらに記載されるように、本発明のアミノ酸配列又はポリペプチドの「誘導體」を提供するように、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列と連結し得る。

【0127】

本明細書に記載の1つ又は複数の誘導體を含むか又は本質的にこれからなり、任意で1つ又は複数のリンカーを介して連結した、1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位をさらに含む、化合物又は構築物も本発明の範囲内である。好ましくは、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位はアミノ酸配列である。

20

【0128】

上記の化合物又は構築物において、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列、及び1つ又は複数の基、残基、部分又は結合単位は、互いに直接、及び/又は1つ又は複数の好適なリンカー又はスペーサを介して連結してもよい。例えば、1つ又は複数の基、残基、部分又は結合単位がアミノ酸配列である場合、リンカーは、得られる化合物又は構築物が融合(タンパク質)又は融合(ポリペプチド)になるようにアミノ酸配列であってもよい。

【0129】

概して本発明の化合物又はポリペプチドは、本発明の化合物又はポリペプチドを提供するように、任意で1つ又は複数の好適なリンカーを介して、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列と、1つ又は複数のさらなる基、残基、部分又は結合単位とを好適に連結する工程を少なくとも1つ含む方法で調製することができる。本発明のポリペプチドは、概して本発明のポリペプチドをコードする核酸を準備する工程と、好適な方法で上記核酸を発現する工程と、発現した本発明のポリペプチドを回収する工程とを少なくとも含む方法で調製することもできる。このような方法は、例えば本明細書にさらに記載の方法及び技法に基づいて、当業者にとって明らかな、それ自体が既知の方法で行うことができる。

30

【0130】

本発明のアミノ酸配列から開始して本発明の化合物又はポリペプチドを設計/選択、及び/又は調製する方法は、本明細書では上記本発明のアミノ酸配列を「フォーマットする(formatting)」とも称され、本発明の化合物又はポリペプチドの一部を構成する本発明のアミノ酸は、「フォーマットされた(formatted)」、又は上記本発明の化合物又はポリペプチド「のフォーマット形態(in the format of)」であるといわれる。本発明のアミノ酸配列をフォーマットすることができる方法の例及びこのようなフォーマットの例が、本明細書中の開示に基づいて当業者にとって明らかであり、このようなフォーマットされたアミノ酸配列は、本発明のさらなる態様を形成する。

40

【0131】

本発明の特定の一態様において、本発明の化合物、又は本発明のポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列に比べて増大した半減期を有し得る。このような化合物及びポリペプチドの好ましいが非限定的な例の幾つかは、本明細書中のさらなる開示に基づいて

50

当業者にとって明らかとなり、例えば半減期が増大するように（例えばペグ化によって）化学修飾された本発明のアミノ酸配列又はポリペプチド；血清タンパク質（例えば血清アルブミン）と結合するためにさらなる結合部位を少なくとも１つ含む本発明のアミノ酸配列；又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）と連結する本発明のアミノ酸配列を少なくとも１つ含む本発明のポリペプチドが含まれる。このような半減期を延長する部分又はアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドの例は、本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかとなり、例えばこれらに限定されないが、１つ又は複数の本発明のアミノ酸配列が、１つ又は複数の血清タンパク質若しくはその断片（例えば（ヒト）血清アルブミン又はその好適な断片）、又は血清タンパク質と結合することができる１つ又は複数の結合単位（例えばドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単一ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「d A b」、d A bとしての使用に好適なアミノ酸配列、又は血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）、血清免疫グロブリン（例えばI g G）等の血清タンパク質又はトランスフェリンと結合することができるナノボディ、さらなる記載及び本明細書で言及される参考文献を参照する）と好適に連結するポリペプチド；本発明のアミノ酸配列がF c部分（例えばヒトF c）又はその好適な部分若しくは断片と連結するポリペプチド；又は１つ又は複数の本発明のアミノ酸配列が、血清タンパク質と結合することができる１つ又は複数の小タンパク質又はペプチド（例えば、これに限定されないが、国際公開第91/01743号、国際公開第01/45746号、国際公開第02/076489号、及び2006年12月5日に出願されたAblynx N. V.の"Peptides capable of binding to serum proteins"と題するAblynx N. V.の米国仮特許出願に記載のタンパク質及びペプチド）と好適に連結するポリペプチドが含まれる。

#### 【0132】

概して、半減期が増大した、本発明の化合物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列自体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（少なくとも５倍等）、例えば少なくとも１０倍、又は２０倍を超える半減期を有するのが好ましい。例えば、半減期が増大した、本発明の化合物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列自体に比べて、１時間を超えて、好ましくは２時間を超えて、より好ましくは６時間を超えて（１２時間等を超えて）、又はさらに２４時間、４８時間若しくは７２時間を超えて増大した半減期を有し得る。

#### 【0133】

本発明の好ましいが非限定的な態様において、このような本発明の化合物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列自体に比べて、１時間を超えて、好ましくは２時間を超えて、より好ましくは６時間を超えて（１２時間等を超えて）、又はさらに２４時間、４８時間若しくは７２時間を超えて増大した血清半減期を有する。

#### 【0134】

本発明の好ましいが非限定的な別の態様において、このような本発明の化合物又はポリペプチドは、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、さらにより好ましくは少なくとも７２時間以上のヒトにおける血清半減期を示す。例えば本発明の化合物又はポリペプチドは、少なくとも５日（約５日～１０日等）、好ましくは少なくとも９日（約９日～１４日等）、より好ましくは少なくとも約１０日（約１０日～１５日等）、若しくは少なくとも約１１日（約１１日～１６日等）、より好ましくは少なくとも約１２日（約１２日～１８日以上等）、又は１４日超（約１４日～１９日等）の半減期を有し得る。

#### 【0135】

別の態様において、本発明は、本発明のアミノ酸配列又は本発明のポリペプチド（又はその好適な断片）をコードする核酸に関する。このような核酸は、本明細書中で「本発明の核酸」とも称され、例えば本明細書中でさらに記載されるように遺伝子構築物の形態であり得る。

## 【0136】

別の態様において、本発明は、本発明のアミノ酸配列及び／又は本発明のポリペプチドを発現する（又は好適な状況下で発現することができる）；及び／又は本発明の核酸を含有する、宿主又は宿主細胞に関する。このような宿主又は宿主細胞の好ましいが非限定的な例の幾つかは、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

## 【0137】

本発明は、生成物又は組成物であって、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、少なくとも1つの本発明のポリペプチド（又はその好適な断片）及び／又は少なくとも1つの本発明の核酸と、任意で（すなわち組成物の使用目的に応じて）それ自体が既知のこのような組成物の1つ又は複数のさらなる成分とを含有するか又は含む、生成物又は組成物にさらに関する。このような生成物又は組成物は例えば、（本明細書に記載の）薬学的組成物、獣医学的組成物又は（同様に本明細書に記載の）診断用途のための生成物若しくは組成物であり得る。このような生成物又は組成物の好ましいが非限定的な例の幾つかは、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

10

## 【0138】

本発明は、*in vitro*（例えば*in vitro*アッセイ又は細胞アッセイ）又は*in vivo*（例えば単細胞又は多細胞生物、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒト、例えば悪性障害、虚血性障害、炎症性障害、感染性障害及び免疫障害の危険性があるヒト）のいずれかで*Tie 1*、*Tie 2*、*Ang 1*、*Ang 2*、*Ang 3*、*Ang 4*、*Ang ptl 1*、*Ang ptl 2*、*Ang ptl 3*、*Ang ptl 4*、*Ang ptl 5*、又は*Ang ptl 6*の調節（のための方法又は組成物）における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ若しくはポリペプチド、又はこれを含む組成物の使用にも関する。

20

## 【0139】

本発明は、*in vitro*（例えば*in vitro*アッセイ又は細胞アッセイ）又は*in vivo*（例えば単細胞又は多細胞生物、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒト、例えば悪性障害、虚血性障害、炎症性障害、感染性障害及び免疫障害の危険性があるか、又はこれを患うヒト）のいずれかで*Tie 1*、*Tie 2*、*Ang 1*、*Ang 2*、*Ang 3*、*Ang 4*、*Ang ptl 1*、*Ang ptl 2*、*Ang ptl 3*、*Ang ptl 4*、*Ang ptl 5*、又は*Ang ptl 6*を調節する方法であって、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを用いて*Tie 1*、*Tie 2*、*Ang 1*、*Ang 2*、*Ang 3*、*Ang 4*、*Ang ptl 1*、*Ang ptl 2*、*Ang ptl 3*、*Ang ptl 4*、*Ang ptl 5*、又は*Ang ptl 6*を調節するのに適した方法及び量で、*Tie 1*、*Tie 2*、*Ang 1*、*Ang 2*、*Ang 3*、*Ang 4*、*Ang ptl 1*、*Ang ptl 2*、*Ang ptl 3*、*Ang ptl 4*、*Ang ptl 5*、又は*Ang ptl 6*を、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ若しくはポリペプチド、又はこれを含む組成物に接触させる工程を少なくとも含む、方法にも関する。

30

## 【0140】

本発明は、*in vitro*（例えば*in vitro*アッセイ又は細胞アッセイ）又は*in vivo*（例えば単細胞又は多細胞生物、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒト、例えば悪性障害、虚血性障害、炎症性障害、感染性障害及び免疫障害の危険性があるか、又はこれを患うヒト）のいずれかで*Tie 1*、*Tie 2*、*Ang 1*、*Ang 2*、*Ang 3*、*Ang 4*、*Ang ptl 1*、*Ang ptl 2*、*Ang ptl 3*、*Ang ptl 4*、*Ang ptl 5*、又は*Ang ptl 6*を調節するための組成物（例えば、これらに限定されないが、本明細書中でさらに記載されるような薬学的組成物又は薬学的調製物）の調製における1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの使用にも関する。

40

## 【0141】

本発明では、「調節（"modulating" or "to modulate"）」は一般的に、好適な*in vitro*アッセイ、細胞アッセイ又は*in vivo*アッセイ（本明細書で言及されるもの等）を使用して測定するような*Tie 1*、*Tie 2*、*Ang 1*、*Ang 2*、*Ang 3*

50

、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の活性の低減若しくは阻害のいずれか、又は代替的に活性の増大を意味する。特に「調節」は、好適なin vitroアッセイ、細胞アッセイ、又はin vivoアッセイ（本明細書で言及されるもの等）を用いて測定するようなTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の活性を、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドが存在しない以外は同じ条件下での同じアッセイにおけるTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の活性に比べて、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%若しくは少なくとも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%、又は90%以上低減若しくは阻害すること、又は代替的に活性を増大させることを意味し得る。

#### 【0142】

当業者にとって明らかなように、「調節」は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドが存在しない以外は同じ条件下に比べて、その標的、リガンド又は基質の1つ又は複数に対するTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の親和性、結合活性、特異性及び/又は選択性を変化させること（増大又は減少のいずれであってもよい）；及び/又はTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6が存在する媒体又は環境における1つ又は複数の条件（pH、イオン強度、補因子の存在等）に対するTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6の感受性を変化させること（増大又は減少のいずれであってもよい）も伴い得る。当業者にとって明らかなように、任意の好適な方法で及び/又はそれ自体が既知の任意の好適なアッセイ、例えば本明細書に記載のアッセイ、又は本明細書で言及された従来技術に記載のアッセイを用いて同様にこれを求めてもよい。

#### 【0143】

「調節」は、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6が関与する1つ又は複数の生物学的な若しくは生理学的な機構、作用、反応、機能、経路又は活性に関して変化させる（すなわちそれぞれ、アゴニスト又はアンタゴニストとしての活性を与える）ことも意味し得る。同様に、当業者にとって明らかなように、任意の好適な方法で、及び/又はそれ自体が既知の任意の好適な（in vitro及び通常は細胞又はアッセイ内（in assay））アッセイ、例えば本明細書若しくは本明細書で言及された従来技術に記載のアッセイを用いて、アゴニスト又はアンタゴニストとしてのこのような作用を求めてもよい。特に、アゴニスト又はアンタゴニストとしての作用は、対象の生物学的活性又は生理学的活性をそれぞれ、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドが存在しない以外は同じ条件下での同じアッセイにおける生物学的活性又は生理学的活性に比べて少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%若しくは少なくとも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%、又は90%以上増大又は低減させるようなものであり得る。

#### 【0144】

調節は、例えば、Tie 1又はTie 2と基質又はリガンド（例えば、Ang 1、Ang 2、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5又はAng p t l 6等）のうちの1つととのその結合を減少又は阻害すること、及び/又は天然のリガンド、基質と結合を競合することを含むことができる。調節は

、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5 若しくはAng p t l 6の活性化、又はそれが関与する機構若しくは経路の活性化も含むことができる。調節は可逆的又は不可逆的であり得るが、通常薬学的目的及び薬理学的目的のためには可逆的であるだろう。

【0145】

本発明はさらに、本明細書中に記載のアミノ酸配列、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物を調製又は生成する方法に関する。このような方法の好ましいが非限定的な例の幾つかは、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0146】

概してこれらの方法は、

a) アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリを準備する工程と、  
b) Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有するアミノ酸配列に関して、アミノ酸配列の上記のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程と、

c) Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6と結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有するアミノ酸配列（複数可）を単離する工程とを含み得る。

【0147】

このような方法では、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、任意の好適なアミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリであり得る。例えば、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、（本明細書に記載の）免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリ（例えば免疫グロブリン配列のナイーブセット、ナイーブコレクション又はナイーブライブラリ；免疫グロブリン配列の合成又は半合成のセット、コレクション又はライブラリ；及び/又は親和性成熟を受けている免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリ）であり得る。

【0148】

またこのような方法では、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、重鎖可変ドメイン（例えばV<sub>H</sub>ドメイン又はV<sub>H H</sub>ドメイン）又は軽鎖可変ドメインのセット、コレクション又はライブラリであり得る。例えば、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、ドメイン抗体若しくは単ドメイン抗体のセット、コレクション若しくはライブラリであり得るか、又はドメイン抗体若しくは単ドメイン抗体として機能することができるアミノ酸配列のセット、コレクション若しくはライブラリであり得る。

【0149】

この方法の好ましい態様では、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、例えばTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基（例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ）を好適に免疫付与した哺乳動物由来の免疫グロブリン配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリであり得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくは他の細胞外エピトープ（複数可）であり得る。

【0150】

上記の方法において、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、スクリーニングを容易にするように、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（例えば酵母）上に提示してもよい。アミノ酸配列（のセット、コレクション又はライブラ

10

20

30

40

50

り)を提示及びスクリーニングするのに好適な方法、技法及び宿主生物は、例えば本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかである。Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)におけるHoogenboomによるレビューも参照する。

【0151】

別の態様において、アミノ酸配列を生成する方法は、

a) アミノ酸配列を発現する細胞のコレクション又は試料を準備する工程と、

b) Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6と結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有するアミノ酸配列を発現する細胞に関して上記細胞のコレクション又は試料をスクリーニングする工程と、

c) (i) 上記アミノ酸配列を単離する工程、又は(ii) 上記アミノ酸配列をコードする核酸配列を上記細胞から単離した後、上記アミノ酸配列を発現する工程のいずれかとを少なくとも含む。

【0152】

例えば、所望のアミノ酸配列が免疫グロブリン配列である場合、細胞のコレクション又は試料は例えば、B細胞のコレクション又は試料であり得る。また、この方法では、細胞の試料は、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基(例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ)を好適に免疫付与した哺乳動物に由来し得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)であり得る。

【0153】

上記の方法は、当業者にとって明らかなように、任意の好適な方法で行われ得る。例えば欧州特許第0542810号、国際公開第05/19824号、国際公開第04/051268号及び国際公開第04/106377号を参照する。工程b)のスクリーニングは、FACS等のフローサイトメトリ技法を使用して行うのが好ましい。これに関しては、例えばLieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820 (2001)を参照する。

【0154】

別の態様において、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6に指向性を有するアミノ酸配列を生成する方法は、

a) アミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリを準備する工程と、

b) Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang pt 1 1、Ang pt 1 2、Ang pt 1 3、Ang pt 1 4、Ang pt 1 5、又はAng pt 1 6と結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列に関して、上記の核酸配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程と、

c) 上記核酸配列を単離した後、上記アミノ酸配列を発現する工程とを少なくとも含む得る。

【0155】

このような方法では、アミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリは例えば、免疫グロブリン配列のナイーブセット、ナイーブコレクション又はナイーブライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリ；免疫グロブリン配列の合成又は半合成のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリ；及び/又は親和性成熟を受けている免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリであり得る。

【0156】



またこのような方法では、核酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、重鎖可変ドメイン（例えばV<sub>H</sub>ドメイン又はV<sub>H</sub>Hドメイン）又は軽鎖可変ドメインのセット、コレクション又はライブラリをコードし得る。例えば、核酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、ドメイン抗体若しくは単ドメイン抗体のセット、コレクション若しくはライブラリ、又はドメイン抗体若しくは単ドメイン抗体として機能することができるアミノ酸配列のセット、コレクション若しくはライブラリをコードし得る。

【0157】

この方法の好ましい態様では、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、例えばTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基（例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ）を好適に免疫付与した哺乳動物由来の核酸配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリであり得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ（複数可）であり得る。

10

【0158】

核酸配列のセット、コレクション又はライブラリは例えば、重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインの免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリをコードし得る。特定の一態様では、ヌクレオチド配列のセット、コレクション又はライブラリは、V<sub>H</sub>H配列のセット、コレクション又はライブラリをコードし得る。

20

【0159】

上記の方法において、ヌクレオチド配列のセット、コレクション又はライブラリは、スクリーニングを容易にするように、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（例えば酵母）上に提示してもよい。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（のセット、コレクション又はライブラリ）を提示及びスクリーニングするのに好適な方法、技法及び宿主生物は、例えば本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかである。Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)におけるHoogenboomによるレビューも参照する。

【0160】

本発明は、上記の方法、又は代替的に上記の方法のうちの1つと、さらに少なくとも上記免疫グロブリン配列のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を決定する工程と、それ自体が既知の方法で、例えば好適な宿主細胞若しくは宿主生物における発現又は化学合成により上記アミノ酸配列を発現又は合成する工程とを含む方法により得られるアミノ酸配列にも関する。

30

【0161】

また上記の工程の後に、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列を好適にヒト化（又は代替的にラクダ化）してもよく、及び/又はこのようにして得られたアミノ酸配列（複数可）を、本発明のポリペプチドを提供するように（任意で1つ又は複数の好適なリンカーを介して）互いに又は1つ若しくは複数の他の好適なアミノ酸配列と連結してもよい。また、本発明のアミノ酸配列をコードする核酸配列を、好適にヒト化（又は代替的にはラクダ化）し、かつ好適に発現してもよく、及び/又は1つ又は複数の、本発明のアミノ酸配列をコードする核酸配列を（任意で1つ又は複数の好適なリンカーをコードするヌクレオチド配列を介して）互いに又は1つ若しくは複数の、他の好適なアミノ酸配列をコードする核酸配列と連結してもよく、その後でこのようにして得られたヌクレオチド配列を本発明のポリペプチドを提供するように好適に発現してもよい。

40

【0162】

本発明はさらに、本明細書中に記載のアミノ酸配列、化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物の用途及び使用、並びにTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6に関連する疾患及び障害を予防

50

及び／又は治療する方法に関する。好ましいが非限定的な用途及び使用の幾つかは本明細書中のさらなる記載より明らかになる。

【0163】

本発明は、治療に使用する、本明細書中に記載のアミノ酸配列、化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、産物及び組成物にも関する。

【0164】

詳細には、本発明は、それを必要とする被験者に、（薬学的に有効な量の）本明細書中に記載のアミノ酸配列、化合物、構築物又はポリペプチドを投与することによって予防又は治療することができる疾患又は障害の治療に使用する、本明細書中に記載のアミノ酸配列、化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、産物及び組成物にも関する。

10

【0165】

より詳細には、本発明は、血管新生に関連する疾患及び障害の治療に使用する、アミノ酸配列、化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、産物及び組成物に関する。

【0166】

また本発明の他の態様、実施形態、利点及び用途は、本明細書中のさらなる記載から明らかになり、その中で本発明は、本発明のナノボディ及びこれを含む本発明のポリペプチド（これらは本発明の好ましい態様の幾つかを形成する）に関してより詳細に説明及び考察される。

【0167】

本明細書中のさらなる記載から明らかになるように、一般的にナノボディには、「d A b」又は同様の（単一）ドメイン抗体又は免疫グロブリン配列に比べて（本明細書で概説される）或る特定の利点があり、この利点は本発明のナノボディでも与えられる。しかし、以下の教示のより包括的な態様を、（直接又は同じように）他の本発明のアミノ酸配列にも適用することができることは、当業者にとって明らかである。

20

【0168】

これより本発明は、以下の非限定的な図面によりさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】クローンの選択のためのT i e 2 結合アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のファージの追加したもの、及びファージを追加しないものである。

30

【図2】選択されたP . E . のT i e 2 - A n g 1 遮断アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のP . E . を追加したもの、及びP . E . を追加しないものである。5個のクローン（ファミリーI、II、III及びIV）が、A n g - 1 結合の有意な遮断を示す。

【図3】希釈系列における精製ナノボディのT i e 2 - A n g 1 遮断アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のナノボディを追加したもの、及びナノボディを追加しないものである。

【図4】希釈系列における精製ナノボディのT i e 2 - A n g 2 遮断アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のナノボディを追加したもの、及びナノボディを追加しないものである。T i e 2 - A n g 1 を遮断するナノボディのどれも、A n g 2 とT i e 2 との結合を遮断することができない。

40

【図5】クローンの選択のためのA n g 2 結合アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のファージを追加したもの、及びファージを追加しないものである。

【図6】クローンの選択のためのA n g 2 - T i e 2 遮断アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のP . E . を追加したもの、及びP . E . を追加しないものである。6つのクローン（ファミリーI）が、T i e 2 とのA n g - 2 結合の有意な遮断を示す。

【図7】希釈系列における精製ナノボディのA n g 2 - T i e 2 遮断アッセイを示した図

50

である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のナノボディを追加したもの、及びナノボディを追加しないものである。

【図 8】クローンの選択のための A n g 1 結合アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のファージを追加したもの、及びファージを追加しないものである。

【図 9】クローンの選択のための A n g 4 結合アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のファージを追加したもの、及びファージを追加しないものである。

【図 10】クローンの選択のための A n g p t 1 4 結合アッセイを示した図である。陰性対照は、ウイルス抗原に対して選択された無関係のファージを追加したもの、及びファージを追加しないものである。

10

【図 11】A k t に対するリン酸化 A k t の比を報告した図である。は A n g - 1 刺激を行っていない試料を示す。試験された抗 T i e 2 ナノボディの中で、ナノボディ 1 6 3 E 9 のみが、 $7.5 \mu\text{g/ml}$  (約  $500 \text{ nM}$ ) 及び  $1 \mu\text{g/ml}$  (約  $67 \text{ nM}$ ) の両方で A n g 1 により誘導された A k t リン酸化を遮断することができた。他の T i e - 2 ナノボディのどれも、A K t のリン酸化を阻害しなかった。

【図 12】E R K に対するリン酸化 E R K の比を報告した図である。は A n g 1 刺激を行っていない試料を示す。試験された抗 T i e 2 ナノボディの中で、ナノボディ 1 6 3 E 9 のみが、 $7.5 \mu\text{g/ml}$  (約  $500 \text{ nM}$ ) 及び  $1 \mu\text{g/ml}$  (約  $67 \text{ nM}$ ) の両方で A n g 1 により誘導された E r k リン酸化を遮断することができた。他の T i e - 2 ナノボディのどれも、E r k のリン酸化を阻害しなかった。

20

【図 13】A k t に対するリン酸化 A k t の比を報告した図である。ナノボディ 1 6 3 E 9 は、A n g - 1 により誘導された A k t のリン酸化を用量依存的に阻害した。

【図 14】E R K に対するリン酸化 E R K の比を報告した図である。ナノボディ 1 6 3 E 9 は、A n g - 1 により誘導された E r k のリン酸化を用量依存的に阻害した。

【図 15】T i e - 2 ナノボディ 1 6 3 E 9 が A n g - 1 の抗アポトーシス効果を回復させることを示した図である。

【図 16】ナノボディ 1 6 3 E 9 が T i e - 2 の A n g - 1 により誘導されたリン酸化を用量依存的に阻害することを示した図である。

【図 17】ナノボディ 1 6 3 E 9 が内皮細胞の A n g - 1 により誘導された出芽を用量依存的に阻害することを示した図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0170】

[ 発明の詳細な説明 ]

本明細書、実施例及び特許請求の範囲において：

a) 特に他に指示又は規定がなければ、使用される全ての用語は当該技術分野における通常の意味を有し、当業者にとって明らかである。例えば標準的なハンドブック (例えば Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2<sup>nd</sup>.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、F.Ausubel et al, eds., "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", 2<sup>nd</sup> edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981)、Roitt et al., "Immunology" (6<sup>th</sup>.Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001)、Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10<sup>th</sup> Ed. Blackwell Publishing, UK (2001)、及び Janeway et al., "Immunobiology" (6<sup>th</sup> Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005))、並びに本明細書で言及される一般的な背景技術を参照する。

40

【0171】

b) 特に他に指示がなければ、用語「免疫グロブリン配列」は、本明細書で重鎖抗体に言及するのに使用されるのか又は通常の上鎖抗体に言及するのに使用されるかに関係なく

50

、全長抗体、その個々の鎖、及びその一部、ドメイン又は断片（これらに限定されないが、それぞれ  $V_H$  ドメイン又は  $V_H / V_L$  ドメイン等の抗原結合ドメイン又は断片を含む）の両方を含む一般的な用語として使用される。さらに（例えば「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「 $V_H$  配列」又は「タンパク質配列」等の用語で）本明細書で使用する用語「配列」は一般的に、文脈上さらなる限定的な解釈が要求される場合を除き、関連のアミノ酸配列と、これをコードする核酸配列又はヌクレオチド配列との両方を含むと理解されるべきである。また、本明細書で使用する「ヌクレオチド配列」は、該ヌクレオチド配列を有する核酸分子も包含し、そのため「ヌクレオチド配列」及び「核酸」は同等であると考えられ、本明細書中で区別なく使用されるものとする。

10

【 0 1 7 2 】

c) 特に他に指示がなければ、具体的に詳しく説明されていない全ての方法、工程、技法及び操作を実施することができ、当業者にとって明らかなそれ自体が既知の方法で実施する。また例えば、例えば標準的なハンドブック及び本明細書で言及される一般的な背景技術、並びに本明細書で言及されるさらなる参考文献並びに以下の総説、Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin and Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving et al., J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz et al., Placenta, 2000, 21 Suppl. A, S106-12; Gonzales et al., Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43（これらは、親和性成熟等のタンパク質工学技法及び免疫グロブリン等のタンパク質の特異性及び他の所望の特性を改善する他の技法を記載している）を参照する。

20

【 0 1 7 3 】

d) アミノ酸残基は、表 A - 2 に言及されるように標準的な 3 文字アミノ酸コード又は 1 文字アミノ酸コードに従って示す。

【 0 1 7 4 】

表 A - 2 : 1 文字アミノ酸コード及び 3 文字アミノ酸コード

【表 1】

非極性非荷電 (pH 6.0～7.0で) <sup>(3)</sup>	アラニン	A l a	A
	バリン	V a l	V
	ロイシン	L e u	L
	イソロイシン	I l e	I
	フェニルアラニン	P h e	F
	メチオニン <sup>(1)</sup>	M e t	M
	トリプトファン	T r p	W
	プロリン	P r o	P
極性非荷電 (pH 6.0～7.0で)	グリシン <sup>(2)</sup>	G l y	G
	セリン	S e r	S
	スレオニン	T h r	T
	システイン	C y s	C
	アスパラギン	A s n	N
	グルタミン	G l n	Q
	チロシン	T y r	Y
極性荷電 (pH 6.0～7.0で)	リシン	L y s	K
	アルギニン	A r g	R
	ヒスチジン <sup>(4)</sup>	H i s	H
	アスパラギン酸	A s p	D
	グルタミン酸	G l u	E
脚注： (1) 極性非荷電アミノ酸と見なされる場合もある。 (2) 非極性非荷電アミノ酸と見なされる場合もある。 (3) 当業者にとって明らかであるように、アミノ酸残基が、pH 6.0～7.0で荷電又は非荷電のいずれかであるとしてこの表で示されていることは、該アミノ酸残基が6.0未満のpH及び／又は7.0より高いpHで有し得る電荷を全く考慮に入れない。当業者にとって明らかであるように、この表で言及されたアミノ酸残基はこのようなより高い又はより低いpHでも荷電及び／又は非荷電のいずれかであり得る。 (4) 当該技術分野で既知のようにH i s残基の電荷は、pHのほんのわずかな移行にも強く依存するが、一般的にH i s残基は約6.5のpHで本質的に非荷電であるとみなすことができる。			

10

20

## 【0175】

e) 2つ以上のヌクレオチド配列を比較するために、[第2のヌクレオチド配列における対応する位置のヌクレオチドと同一な第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの数]を[第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチド総数]で除算し、[100%]で乗算することによって、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」のパーセントを算出することができ、第1のヌクレオチド配列に比べて、第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの欠失、挿入、置換又は付加のそれぞれは、単一ヌクレオチド(位置)での差異と考えられる。

30

## 【0176】

代替的に、標準的な設定を用いて、NCBI Blast v2.0等の配列アラインメント用の既知のコンピュータアルゴリズムを使用して、2つ以上のヌクレオチド配列間の配列同一性の程度を算出することができる。

40

## 【0177】

配列同一性の程度を決定するための幾つかの他の技法、コンピュータアルゴリズム及び設定は例えば、国際公開第04/037999号、欧州特許第0967284号、欧州特許第1085089号、国際公開第00/55318号、国際公開第00/78972号、国際公開第98/49185号及び英国特許出願公開第2357768号に記載されている。

## 【0178】

通常、上述で概説された算出方法に従って、2つのヌクレオチド配列間の「配列同一性」のパーセントを決定するために、最も多く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、他のヌクレオチド配列を「第2の」ヌクレオチド配列

50

とする。

【 0 1 7 9 】

f) 2つ以上のアミノ酸配列を比較するために、[第2のアミノ酸配列における対応する位置のアミノ酸残基と同一な第1のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の数]を[第1のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基総数]で除算し、[100%]で乗算することによって、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」(本明細書で「アミノ酸同一性」とも称される)のパーセントを算出することができ、第1のアミノ酸配列に比べて、第2のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の欠失、挿入、置換又は付加のそれぞれは、単一アミノ酸残基(位置)での差異、すなわち本明細書に規定の「アミノ酸差異」と考えられる。

10

【 0 1 8 0 】

代替的に、同様に標準的な設定を用いて、既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に関する配列同一性の程度を決定するのに上記で言及されるもの)を使用して、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を算出することができる。

【 0 1 8 1 】

通常、上述で概説された算出方法に従って、2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」のパーセントを決定するために、最も多く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、他のアミノ酸配列を「第2の」アミノ酸配列とする。

【 0 1 8 2 】

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、当業者は、いわゆる「保存的な」アミノ酸置換を考慮してもよく、これは一般的に、アミノ酸残基が同様の化学構造を有する別のアミノ酸残基に置き換わり、かつポリペプチドの機能、活性又は他の生物学的特性への影響がほとんど、又は本質的に全くないアミノ酸置換と説明することができる。このような保存的なアミノ酸置換は、例えば国際公開第04/037999号、英国特許出願公開第3357768号、国際公開第98/49185号、国際公開第00/46383号及び国際公開第01/09300号から当該技術分野において既知であり、このような置換の(好ましい)種類及び/又は組合せは、国際公開第04/037999号及び国際公開第98/49185号、並びに本明細書で引用されるさらなる参考文献の関連の教示に基づいて選択することができる。

20

【 0 1 8 3 】

このような保存的な置換は、好ましくは以下の(a)群~(e)群内の或るアミノ酸が、同じ群内の別のアミノ酸残基に置換される置換である:(a)小さく脂肪族で非極性又はわずかに極性の残基:Ala、Ser、Thr、Pro及びGly、(b)極性で負に荷電した残基及びこの(非荷電)アミド:Asp、Asn、Glu及びGln、(c)極性で正に荷電した残基:His、Arg及びLys、(d)巨大な脂肪族で非極性の残基:Met、Leu、Ile、Val及びCys、並びに(e)芳香族残基:Phe、Tyr及びTrp。

30

【 0 1 8 4 】

特に好ましい保存的置換は以下のようなものである:AlaをGlyに又はSerに、ArgをLysに、AsnをGlnに又はHisに、AspをGluに、CysをSerに、GlnをAsnに、GluをAspに、GlyをAlaに又はProに、HisをAsn又はGlnに、IleをLeuに又はValに、LeuをIleに又はValに、LysをArgに、Glnに又はGluに、MetをLeuに、Tyrに又はIleに、PheをMetに、Leuに又はTyrに、SerをThrに、ThrをSerに、TrpをTyrに、TyrをTrpに、及び/又はPheをValに、Ileに又はLeuに。

40

【 0 1 8 5 】

本明細書に記載のポリペプチドに適用される任意のアミノ酸置換はまた、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タンパク質間のアミノ酸変異頻度の解析、Chou and Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974及びAdv. Enzymol., 47: 45-149, 1978によって開発された構造形成能(structur

50

e forming potentials) の解析、並びに Eisenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984, Kyte & Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981、及び Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986 によって開発されたタンパク質における疎水性パターンの解析に基づき得る(全て全体が参照により本明細書に援用される)。ナノボディの一次構造、二次構造、及び三次構造に関する情報は、本明細書中の記載及び上記で言及された包括的な背景技術で与えられる。またこのため、ラマ由来の  $V_H$  ドメインの結晶構造は例えば、Desmyter et al., Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803 (1996)、Spinelli et al., Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757、及び Decanniere et al., Structure, Vol. 7, 4, 361 (1999) によって与えられる。通常の  $V_H$  ドメインにおいてこれらの位置で  $V_H / V_L$  界面及び潜在的なラクダ化置換を形成する幾つかのアミノ酸残基に関するさらなる情報は、上記で言及された従来技術で見出すことができる。

10

**【0186】**

g) アミノ酸配列及び核酸配列は、その全長にわたって(本明細書に規定のように) 100% の配列同一性を有する場合、「全く同じ」であるといえる。

**【0187】**

h) 2つのアミノ酸配列を比較するとき、「アミノ酸差異」という用語は、第2の配列に比べて第1の配列の位置での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表し、2つのアミノ酸配列は、1つ、2つ又はそれ以上のこのようなアミノ酸差異を含有し得ることが理解される。

20

**【0188】**

i) ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列が、それぞれ別のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を「含む」、又は別のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列「から本質的になる」というとき、これは、後者のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列がそれぞれ、初めに言及されたヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に組み込まれていることを意味し得るが、より一般的に概してこれは、初めに言及されたヌクレオチド配列又はアミノ酸配列がそれぞれ、(例えば本明細書に記載の任意の好適な方法によるものであり得る) 実際にどのように初めに言及された配列を生成又は入手するかに関係なく、その配列内にそれぞれ後者の配列と同じヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を有するヌクレオチド又はアミノ酸残基のストレッチを含むことを意味する。非限定的な例によって、本発明のナノボディが CDR 配列を含むというとき、これは、上記 CDR 配列が、本発明のナノボディに組み込まれていることを意味し得るが、より一般的に概してこれは、本発明のナノボディが、どのように上記本発明のナノボディを生成又は入手するかに関係なく、その配列内に上記 CDR 配列と同じアミノ酸配列を有するアミノ酸残基のストレッチを含有することを意味する。後者のアミノ酸配列が特異的な生物学的又は構造的な機能を有する場合、初めに言及されたアミノ酸配列において本質的に同じ、類似の又は同等の生物学的又は構造的な機能を有するのが好ましい(言い換えれば、初めに言及されたアミノ酸配列は、後者の配列が本質的に同じ、類似の又は同等の生物学的又は構造的な機能を果たすことができるようなものであるのが好ましい)ということにも留意すべきである。例えば、本発明のナノボディがそれぞれ、CDR 配列又はフレームワーク配列を含むというとき、CDR 配列及びフレームワークはそれぞれ、上記ナノボディで CDR 配列又はフレームワーク配列として機能することができるのが好ましい。また、ヌクレオチド配列が別のヌクレオチド配列を含むというとき、初めに言及されたヌクレオチド配列は、発現産物(例えばポリペプチド)で発現する場合、後者のヌクレオチド配列でコードされるアミノ酸配列が上記発現産物の一部を形成するようなもの(言い換えれば後者のヌクレオチド配列が、初めに言及されたより大きなヌクレオチド配列と同じリーディングフレーム内にあるようなもの)であるのが好ましい。

30

40

**【0189】**

j) 核酸配列又はアミノ酸配列は、通常上記供給源又は媒体に関連がある少なくとも1つの他の成分(例えば別の核酸、別のタンパク質/ポリペプチド、別の生物学的成分、又は巨大分子)、又は少なくとも1つの汚染物質、不純物若しくは微量成分から分離されてい

50

る場合、（例えばその天然の生物学的供給源及び／又はこれが得られる反応媒体又は培養媒体に比べて）「本質的な単離（形態）」であると考えられる。特に、核酸配列又はアミノ酸配列は、少なくとも2倍、具体的に少なくとも10倍、より具体的に少なくとも100倍、及び最大1000倍以上精製されている場合に、「本質的に単離された」と考えられる。「本質的に単離形態である」核酸配列又はアミノ酸配列は、好適な技法、例えば好適なクロマトグラフィ技法（例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動法）を使用して決定されたものと、本質的に相同であるのが好ましい。

#### 【0190】

k) 本明細書で使用される「ドメイン」という用語は概して、アミノ酸配列の球状領域（例えば抗体鎖、特に重鎖抗体の球状領域）又は本質的にこのような球状領域からなるポリペプチドを表す。通常、このようなドメインは、例えばシートとして、又はジスルフィド結合によって安定化したペプチドループ（例えば3つ又は4つのペプチドループ）を含む。「結合ドメイン」という用語は（本明細書で規定されるように）抗原決定基に指向性を有するようなドメインを表す。

10

#### 【0191】

l) 「抗原決定基」という用語は、抗原結合分子（例えば本発明のナノボディ又はポリペプチド）によって、及びより具体的には上記分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープを表す。「抗原決定基」及び「エピトープ」という用語は、本明細書で区別なく使用することもできる。

#### 【0192】

m) 特定の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質と（特異的に）結合することができる、特定の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質（又はその少なくとも1つの部分、断片若しくはエピトープ）に対する親和性を有する、及び／又は特定の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質（又はその少なくとも1つの部分、断片若しくはエピトープ）に対する特異性を有するアミノ酸配列（例えば本発明のナノボディ、抗体、ポリペプチド、又は概して抗原結合タンパク質若しくはポリペプチド、又はその断片）は、上記抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質「に対する」、又は「に指向性を有する」（"against" or "directed against"）と言われる。

20

#### 【0193】

n) 「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子又は抗原結合タンパク質（例えば本発明のナノボディ又はポリペプチド）分子が結合することができる、様々な種類の抗原又は抗原決定基の数を表す。抗原結合タンパク質の特異性は、親和性及び／又は結合活性に基づき決定することができる。親和性（抗原と抗原結合タンパク質との解離に関する平衡定数（ $K_D$ ）によって表される）は、抗原結合タンパク質上の抗原決定基と抗原結合部位との間の結合力の評価基準であり、 $K_D$  値が小さくなれば、抗原決定基と抗原結合分子との間の結合力が大きくなる（代替的に、親和性は、 $1/K_D$  である親和定数（ $K_A$ ）としても表すことができる）。（例えば本明細書中のさらなる開示に基づき）当業者にとって明らかのように、対象となる特異的な抗原に応じて、それ自体が既知の方法で親和性を決定することができる。結合活性は、抗原結合分子（例えば本発明のナノボディ又はポリペプチド）と関連抗原との間の結合力の評価基準である。結合活性は、抗原結合分子上での抗原決定基とその抗原結合部位との間の親和性、及び抗原結合分子上に存在する関連結合部位の数の両方に関係する。典型的には、抗原結合タンパク質（例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチド）は、 $10^{-5}$  モル/L  $\sim$   $10^{-12}$  モル/L 以下、及び好ましくは  $10^{-7}$  モル/L  $\sim$   $10^{-12}$  モル/L 以下、及びより好ましくは  $10^{-8}$  モル/L  $\sim$   $10^{-12}$  モル/L の解離定数（ $K_D$ ）で（すなわち  $10^5$  L/モル  $\sim$   $10^{12}$  L/モル以上、及び好ましくは  $10^7$  L/モル  $\sim$   $10^{12}$  L/モル以上、及びより好ましくは  $10^8$  L/モル  $\sim$   $10^{12}$  L/モルの結合定数（ $K_A$ ）で）これらの抗原と結合する。 $10^{-4}$  モル/L より大きい任意の  $K_D$  値（すなわち  $10^4$  M $^{-1}$  (L/モル) よりも小さい任意の  $K_A$  値）は一般的に非特異的な結合を示すと考えられる。好ましくは、本発明の一価の免疫グロブリン配列は、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満

30

40

50



、より好ましくは  $10 \text{ nM}$  未満 ( $500 \text{ pM}$  未満等) の親和性で所望の抗原と結合する。抗原結合タンパク質と抗原又は抗原決定基との特異的な結合は、それ自体が既知の任意の好適な方法 (例えばスキャッチャード解析及び/又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) 及びサンドイッチ競合アッセイ) を含む) 及び当該技術分野でそれ自体が既知の様々なその変更方法、並びに本明細書で言及される他の技法で求めることができる。

#### 【0194】

当業者にとって明らかなように、解離定数は実際又は見掛けの解離定数であってもよい。解離定数を決定する方法は、当業者にとって明らかであり、例えば本明細書で言及される技法が含まれる。これに関して、 $10^{-4} \text{ モル/L}$  又は  $10^{-3} \text{ モル/L}$  より大きい (例えば  $10^{-2} \text{ モル/L}$  の) 解離定数を測定することが不可能であり得ることも明らかである。任意で、また当業者にとって明らかなように、(実際又は見掛けの) 解離定数は、その関係性 ( $K_D = 1 / K_A$ ) から (実際又は見掛けの) 結合定数 ( $K_A$ ) に基づき算出することができる。

#### 【0195】

親和性は、分子相互作用の強さ又は安定性を示す。一般的に親和性は  $K_D$  すなわち解離定数として与えられ、その単位は  $\text{モル/L}$  (又は  $\text{M}$ ) である。親和性は、 $1 / K_D$  に等しい結合定数  $K_A$  とも表すことができ、その単位は  $(\text{モル/L})^{-1}$  (又は  $\text{M}^{-1}$ ) である。本明細書では、2つの分子 (例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドと、その対象となる標的との) 間の相互作用の安定性は主に、これらの相互作用の  $K_D$  値で表され、 $K_A = 1 / K_D$  の関係性を考慮して、 $K_D$  値で分子相互作用の強さを特定することを、対応する  $K_A$  値を算出するのに利用することもできることは、当業者にとって明らかである。 $K_D$  値は、 $DG = RT \cdot \ln(K_D)$  (等しくは  $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$ ) (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) の既知の関係性から、結合の自由エネルギー ( $DG$ ) と関連するので、熱力学的意味でも分子相互作用の強さを特徴付ける。

#### 【0196】

有意 (例えば特異的) と見なされる、生物学的相互作用に関する  $K_D$  は典型的に、 $10^{-10} \text{ M}$  ( $0.1 \text{ nM}$ )  $\sim 10^{-5} \text{ M}$  ( $10000 \text{ nM}$ ) の範囲内である。相互作用が強くなれば、 $K_D$  は低くなる。

#### 【0197】

$K_D$  は、( $K_D = k_{off} / k_{on}$  及び  $K_A = k_{on} / k_{off}$  のように) 複合体の解離速度定数 ( $k_{off}$  と称される) と、その結合速度 ( $k_{on}$  と称される) との比としても表すことができる。解離速度 (off-rate)  $k_{off}$  の単位は、 $\text{s}^{-1}$  ( $\text{s}$  は秒の SI 単位表記である) である。結合速度  $k_{on}$  の単位は、 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  である。結合速度は、二分子相互作用に関する拡散律速結合速度定数に近づきながら  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$  の間で変化し得る。解離速度は、 $t_{1/2} = \ln(2) / k_{off}$  の関係性から所定の分子相互作用の半減期に関連する。解離速度は、 $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体)  $\sim 1 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ) の間で変化し得る。

#### 【0198】

2つの分子間の分子相互作用の親和性は、それ自体が既知の様々な技法 (例えば既知の表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサ技法 (例えば Ober et al., Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001 を参照されたい) (ここで、1つの分子がバイオセンサーチップ上に固定され、もう1つの分子が、 $k_{on}$ 、 $k_{off}$  測定値、及びしたがって  $K_D$  (又は  $K_A$ ) 値が得られるフロー条件下で固定分子上を通る) で測定することができる。例えば、既知のピアコアの機器を使用してこれを実施することができる。

#### 【0199】

測定プロセスが、例えば1つの分子のバイオセンサ上でのコーティングに関するアーチファクト (artefacts: 人工産物) によって、示唆した分子の固有の結合親和性に幾らか

10

20

30

40

50

影響を与える場合、測定された $K_D$ は見掛けの $K_D$ に対応し得ることも、当業者にとって明らかである。また、1つの分子が、もう1つの分子に対して2つ以上の認識部位を含有する場合、見掛けの $K_D$ を測定することができる。このような状況下で、測定された親和性は、2つの分子による相互作用の結合活性により影響され得る。

#### 【0200】

親和性を評価するのに使用することができる別のアプローチは、Friguet et al. (J. Immunol. Methods, 77,305-19, 1985)の2段階ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)法である。この方法によって、溶液相の結合平衡測定が確立され、プラスチック等の支持体上での分子の1つの吸着に関連すると考えられ得るアーチファクトが避けられる。

#### 【0201】

しかし、 $K_D$ の正確な測定はかなりの労力を要する可能性があり、結果として2つの分子の結合力を評価するのに、見掛けの $K_D$ 値を求めることが多い。全ての測定が一貫して(例えばアッセイ条件を一定にして)行われていれば、見掛けの $K_D$ 測定値は真の $K_D$ の近似値として使用することができ、したがって本明細書で、 $K_D$ 及び見掛けの $K_D$ は、等しい重要性又は関連性があるとして処理されるべきであることに留意すべきである。

#### 【0202】

最後に、多くの状況下で経験豊かな科学者は、幾つかの参照分子と比較して結合親和性を決定することが都合がよいと判断することができることに留意すべきである。例えば、分子Aと分子Bとの間の結合力を評価するために、例えば分子Bと結合することが知られており、かつELISA又はFACS(蛍光活性化細胞選別)での検出を容易にするためのフルオロフォア若しくはクロモフォア群、又は他の化学部分(例えばビオチン)、又は他のフォーマット(蛍光検出用フルオロフォア、吸光検出用クロモフォア、ストレプトアビジン媒介性ELISA検出用ビオチン)で好適に標識される参照分子Cを使用することができる。典型的に、参照分子Cは固定濃度に維持し、分子Aの濃度は、分子Bの所定の濃度又は量に対して変化させる。結果として、分子Aの非存在下で分子Cについて測定されたシグナルが半分になる分子Aの濃度に対応して、 $IC_{50}$ 値が得られる。参照分子の $K_D$ である $K_{Dref}$ 及び参照分子の総濃度 $c_{ref}$ が既知であれば、以下の式： $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref} / K_{Dref})$ からA-B相互作用に対する見掛けの $K_D$ を得ることができる。 $c_{ref} \ll K_{Dref}$ の場合、 $K_D = IC_{50}$ であることに留意されたい。 $IC_{50}$ の測定が、比較用の結合因子に関して一貫して(例えば $c_{ref}$ を固定して)実施されれば、 $IC_{50}$ によって分子相互作用の強さ又は安定性を評価することができ、この測定値は、本明細書を通して $K_D$ 又は見掛けの $K_D$ と同等であると判断される。

#### 【0203】

o) 本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドの半減期は概して、例えば自然機構による配列若しくは化合物の分解及び/又は配列若しくは化合物のクリアランス(clearance)若しくは捕捉(sequestration)のために、*in vivo*でアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドの血清濃度が50%低減するのにかかる時間と定義することができる。本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドの*in vivo*半減期は、それ自体が既知の任意の方法(例えば薬物動態解析)で求めることができる。好適な技法は当業者にとって明らかであり、例えば概して、好適な用量の本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドを温血動物(すなわち、ヒト又は別の好適な哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ラット、ブタ、イヌ又は霊長類(例えばマカク属のサル(例えば特にカニクイザル(マカク・ファシクラリス)及び/又はアカゲザル(マカク・ムラット))及びヒヒ(パピオ・ウルジヌス))に好適に投与する工程と、血液試料又は他の試料を上記動物から採取する工程と、上記血液試料中の本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドのレベル又は濃度を求める工程と、このようにして得られたデータ(のプロット)から本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドのレベル又は濃度が投与時の初期レベルに比べて50%低減するまでの時間を算出する工程とを伴い得る。例えば、以下の実験部部分、Dennis et al., J. Biol. Chem 277:35035-42 (2002)及び標準的なハンドブック(例えばKenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists及

10

20

30

40

50

びPeters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)) を参照する。  
"Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, Marcel Dekker発行, 2nd Rev. edition  
(1982) も参照する。

【0204】

また当業者にとって明らかなように(例えば国際公開第04/003019号の6頁及び7頁とそこに引用されたさらなる参考文献とを参照されたい)、半減期は、 $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$  及び曲線下面積(AUC)等のパラメータを利用して表すことができる。本明細書において、「半減期の増大」は、これらのパラメータのいずれか1つ、例えばこれらのパラメータのいずれか2つ、又は本質的に3つ全てのこれらのパラメータの増大を表す。本明細書で使用される「半減期の増大」又は「増大した半減期」は特に  $t_{1/2}$  の増大を表し、 $t_{1/2}$  及び/又はAUCのいずれか又は両方は増大しても又は増大しなくてもよい。

10

【0205】

例えば、本発明のアミノ酸配列又はポリペプチドの半減期は、以下のように、齧歯類モデル又は非ヒト霊長類モデルにおいて実行される薬物動態研究を用いて決定することができる。動物群( $n = 2 \sim 10$ )に、 $1 \text{ mg/kg}$ 又は $10 \text{ mg/kg}$ の2D3-17D12融合タンパク質の静脈内ボラス注射を与える。投薬後に異なる時点(例えば、投薬後1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、48時間、144時間、192時間、240時間、288時間及び336時間)で、血漿試料を静脈で採取し、ELISAによって2D3-17D12融合タンパク質の存在について解析した。時間に対する血漿濃度を、2コンパートメント消失モデルに適合させる。クリアランス、 $V_1$ 、定常状態容積( $V_{ss}$ )、 $T_{1/2}$ 、AUC、及び投与された実際の用量について補正したAUC(AUC/用量)の薬物動態パラメーターを、各々の処理群について平均化する。群間の差は分散解析によって決定する。

20

【0206】

p) 本発明との関連では、「調節」は一般的に、好適な *in vitro* アッセイ、細胞アッセイ又は *in vivo* アッセイを使用して測定するような標的又は抗原の活性の低減若しくは阻害のいずれか、又は代替的に活性の増大を意味する。特に「調節」は、好適な *in vitro* アッセイ、細胞アッセイ、又は *in vivo* アッセイ(通常関与する標的又は抗原によって変わる)を用いて測定するように、同じであるが、本発明の構築物が存在しない条件下での同じアッセイにおける標的又は抗原の活性に比べて、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%若しくは少なくとも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%、又は90%以上標的又は抗原の活性を低減又は阻害すること、代替的に(関連又は対象の)生物学的活性を増大することを意味し得る。

30

【0207】

当業者にとって明らかなように、「調節」は、同じであるが、本発明の構築物が存在しない条件下に比べて、1つ又は複数のそのリガンド、結合パートナー、ホモマルチマー形態若しくはヘテロマルチマー形態で結び付くパートナー又は基質の親和性、結合活性、特異性及び/又は選択性を変化させること(増大又は減少のいずれであってもよい)、及び/又は標的又は抗原が存在する媒体又は環境における1つ又は複数の条件(pH、イオン強度、補因子の存在等)に対する標的又は抗原の感度を変化させること(増大又は減少のいずれであってもよい)を伴い得る。当業者にとって明らかなように、関与する標的又は抗原に応じて、任意の好適な方法で、及び/又はそれ自体が既知の任意の好適なアッセイを用いてさらにこれを求めてもよい。

40

【0208】

「調節」は、標的又は抗原が関与する(又はその基質(複数可)、リガンド(複数可)若しくは経路(複数可)が関与する、シグナル伝達経路若しくは代謝経路及び関連の生物学的作用若しくは生理学的作用のような)1つ又は複数の生物学的な若しくは生理学的な機構、作用、反応、機能、経路又は活性に関して変化させる(すなわち標的又は抗原及び

50

所望の生物学的作用若しくは生理学的作用に応じて、それぞれ、アゴニスト、アンタゴニスト、又は逆アゴニストとしての活性を与える)ことも意味し得る。ここでも同様に、当業者にとって明らかなように、関与する標的又は抗原に応じて、任意の好適な方法で、及び/又はそれ自体が既知の任意の好適な(in vitro及び通常は細胞又はアッセイ内)アッセイを使用して、アゴニスト又はアンタゴニストとしてのこのような作用を求めてもよい。特に、アゴニスト又はアンタゴニストとしてのこのような作用は、対象の生物学的活性又は生理学の活性をそれぞれ、同じであるが、本発明の構築物が存在しない条件下での同じアッセイにおける生物学的活性又は生理学の活性に比べて少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%若しくは少なくとも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%、又は90%以上増大又は低減させるようなものであり得る。

10

#### 【0209】

調節は例えば、標的又は抗原のアロステリック調節、及び/又は標的又は抗原とその基質又はリガンドの1つとの結合の低減又は阻害及び/又は標的又は抗原との結合に対する基質である天然リガンドとの競合も伴い得る。調節は、標的若しくは抗原、又はそれが関与する機構若しくは経路を活性化することも伴い得る。調節は、標的若しくは抗原のフォールディング若しくは立体構造に関して、又は標的若しくは抗原がフォールディングする能力、(例えばリガンドの結合の際に)その立体構造を変更する能力、他の(サブ)ユニットと結び付く能力、又は解離する能力に関して変化させることも伴い得る。調節は例えば、標的若しくは抗原が、他の化合物を移動させる能力、又は他の化合物(イオン等)に対するチャンネルとして働く能力を変化させることも伴い得る。

20

#### 【0210】

調節は、可逆であっても又は不可逆であってもよいが、薬学的及び薬理学的目的では通常、可逆的である。

#### 【0211】

o) 本発明は、本願において記載されるアミノ酸配列のうちの1つの結合を交差遮断するアミノ酸配列、及び/又は本願において記載されるアミノ酸配列のうちの1つによるAng、Angptl又はTieの結合を交差遮断するアミノ酸配列もまた提供する。用語「交差遮断("cross-block", "cross-blocked" and "cross-blocking")」は、本明細書中で区別なく使用し、アミノ酸配列又は他の結合因子が、他の本発明のアミノ酸配列又は結合因子とAng、Angptl又はTieとの結合を妨げる能力を意味する。本発明のアミノ酸配列又は他の結合因子が別のアミノ酸配列又は他の結合因子とAng、Angptl又はTieとの結合を妨げることができる範囲、ひいては本発明に従っての交差遮断することができるか否かを、競合結合アッセイを使用して求めることができる。1つの特に好ましい定量的な交差遮断アッセイは、表面プラズモン共鳴技術を用いて相互作用の範囲を測定することができるピアコア機器を使用する。別の好適な定量的な交差遮断アッセイは、Ang、Angptl又はTieとのこれらの結合に関して、アミノ酸配列又は他の結合因子間の競合を測定するELISAに基づくアプローチを使用する。本発明の他の好ましいアミノ酸配列は、配列番号455~配列番号501を有する少なくとも1つのアミノ酸配列と交差遮断する、又は配列番号455~配列番号501を有する少なくとも1つのアミノ酸配列により交差遮断される、単一可変ドメインを少なくとも1つ含むアミノ酸配列である。概して以下に、アミノ酸配列又は他の結合因子が、本発明に従って交差遮断するか、又は交差遮断することができるか否かを説明している。このアッセイは、本明細書中に記載のAng、Angptl又はTie結合因子のいずれかと共に使用することができることが理解されよう。ピアコア機器(例えばピアコア3000)は、製造元の推奨に沿って操作する。このように、1つの交差遮断アッセイでは、Ang、Angptl又はTieでコーティングする表面を作製するのに、標準的なアミンカップリングケミストリを用いて、Ang、Angptl又はTieタンパク質をCM5ピアコアチップと連結させる。典型的に200個~800個のAng、Angptl又はTieの共鳴単位をチップに連結させる(容易に測定可能なレベルの結合を与えるが、使用する試験試薬の

30

40

50

濃度によって容易に飽和することができる量)。互いに交差遮断する能力を評価する、2つの試験アミノ酸配列(A\*及びB\*と呼ばれる)を、好適なバッファー中で、1:1の結合部位のモル比で混合し、試験混合物を作製する。結合部位ベースの濃度を算出する場合、アミノ酸配列の分子量は、アミノ酸配列の全分子量を、このアミノ酸配列上のAng、Angptl又はTie結合部位の数で除算したものであると見なす。試験混合物中の各アミノ酸配列の濃度は、ピアコアチップ上に捕捉されたAng、Angptl又はTie分子上のこのアミノ酸配列に対する結合部位を容易に飽和するのに十分高いものとする。混合物中のアミノ酸配列は、典型的に(結合部位ベースで)1.00マイクロモル~1.5マイクロモルである(結合部位ベースの)モル濃度と同じである。A\*及びB\*を単独で含有する分離溶液も調製する。これらの溶液中のA\*及びB\*は、試験混合物と同じバッファー中で、かつ同じ濃度であるとする。試験混合物をAng、Angptl又はTieコーティングピアコアチップに通し、結合総量を記録する。それから、チップ結合Ang、Angptl又はTieを損なうことなく、結合したアミノ酸配列を取り除くようにチップを処理する。典型的に、チップを30mMのHClで60秒処理することによってこれを行う。その後、A\*単独の溶液をAng、Angptl又はTieコーティング表面に通し、結合量を記録する。さらに、チップを処理し、チップ結合Ang、Angptl又はTieを損なうことなく、結合したアミノ酸配列を全て取り除く。それから、B\*単独の溶液をAng、Angptl又はTieコーティング表面に通し、結合量を記録する。次に、A\*とB\*との混合物の理論最大結合を算出し、これは単独でAng、Angptl又はTie表面を通した際の各アミノ酸配列の結合の合計である。実際に記録された混合物の結合がこの理論最大よりも小さい場合、2つのアミノ酸配列は互いに交差遮断している。このように概して、交差遮断する本発明のアミノ酸配列又は他の結合因子は、アッセイ中、及び本発明の第2のアミノ酸配列又は他の結合因子の存在下で、記録された結合が、組合せた2つのアミノ酸配列又は結合因子の最大理論結合(直前に規定)の80%~0.1%(例えば80%~4%)、具体的に最大理論結合の75%~0.1%(例えば75%~4%)、及びより具体的に最大理論結合の70%~0.1%(例えば70%~4%)であるように、上記のピアコア交差遮断アッセイで標的と結合するものである。上記のピアコアアッセイは、アミノ酸配列又は他の結合因子が本発明に従って互いに交差遮断するかどうかを求めるのに使用する主なアッセイである。稀に、特定のアミノ酸配列又は他の結合因子が、CM5ピアコアチップとアミンケミストリを介して連結したAng、Angptl又はTieと結合しないことがある(通常、Ang、Angptl又はTie上の関連の結合部位がチップとの連結によって塞がれるか、又は破壊される場合にこれが起こる)。このような場合、タグ付け型、例えばN末端His標識Ang、Angptl又はTie(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA;2005 カタログ番号1406-ST-025)を用いて交差遮断を求めることができる。この特定のフォーマットで、抗Hisアミノ酸配列をピアコアチップに連結させた後、His標識したAng、Angptl又はTieをチップの表面上に通し、抗Hisアミノ酸配列で捕捉する。各チップ再生サイクル後に、抗Hisアミノ酸配列コーティング表面上に、新たなHis標識したAng、Angptl又はTieを充填し戻すことを除いて、本質的に上記のように、交差遮断解析を行う。N末端His標識したAng、Angptl又はTieを使用するとし

10

20

30

40

#### 【0212】

さらに、当該技術分野で既知の様々な他のタグ及びタグ結合タンパク質の組合せをこのような交差遮断解析に使用することができる(例えば、抗HA抗体によるHAタグ;抗FLAG抗体によるFLAGタグ;ストレプトアビジンによるビオチンタグ)。概して以下に、抗Ang、Angptl又はTieアミノ酸配列又は他のAng、Angptl又はTie結合因子が、本明細書中に規定のように、交差遮断するか、又は交差遮断することができるか否か求めるELISAアッセイを説明している。このアッセイは、本明細書中に記載のAng、Angptl又はTie結合因子のいずれかと共に使用することができ

50

ることが理解されよう。このアッセイの一般原理は、E L I S A プレートウェル上にコーティングした抗Ang、Ang p t l 又はT i e アミノ鎖配列又は結合因子を有することである。過剰量の第2の、潜在的に交差遮断する抗Ang、Ang p t l 又はT i e アミノ酸配列を溶液中に添加する（すなわちE L I S A プレートと結合しない）。それから、限定量のAng、Ang p t l 又はT i e をウェルに添加する。コーティングしたアミノ酸配列と溶液中のアミノ酸配列とは、限定数のAng、Ang p t l 又はT i e 分子の結合に対して競合する。プレートを洗浄し、コーティングしたアミノ酸配列と結合していない過剰なAng、Ang p t l 又はT i e を取り除き、また第2の溶液相のアミノ酸配列及び第2の溶液相のアミノ酸配列とAng、Ang p t l 又はT i e との間に形成される任意の複合体を取り除く。その後、Ang、Ang p t l 又はT i e を検出するのに適切なAng、Ang p t l 又はT i e 検出試薬を使用して、結合標的の量を測定する。コーティングしたアミノ酸配列を交差遮断することができる溶液中のアミノ鎖配列によって、第2の溶液相のアミノ酸配列の非存在下でコーティングしたアミノ酸配列と結合するAng、Ang p t l 又はT i e 分子の数に比べて、コーティングしたアミノ酸配列と結合するAng、Ang p t l 又はT i e 分子の数を低減させることができる。アミノ酸配列を固定化させるように、第1のアミノ酸配列、例えばナノボディ-Xを選択する場合、第1のアミノ酸配列をE L I S A プレートウェル上にコーティングし、その後、プレートを好適な遮断溶液で遮断し、その後添加する試薬の非特異的な結合を最小にする。ナノボディ-Y Ang、Ang p t l 又はT i e 結合部位の1つのウェル当たりのモルが、E L I S A プレートのコーティング中に使用したナノボディ-X Ang、Ang p t l 又はT i e 結合部位の1つのウェル当たりのモルの少なくとも10倍になるように、過剰量の第2のアミノ酸配列、すなわちナノボディ-Y をE L I S A プレートに添加する。それから、添加したAng、Ang p t l 又はT i e の1つのウェル当たりのモルが、各ウェルをコーティングするのに使用したナノボディ-X Ang、Ang p t l 又はT i e 結合部位のモルの少なくとも25分の1になるように、Ang、Ang p t l 又はT i e を添加する。好適なインキュベーション期間の後、E L I S A プレートを洗浄し、Ang、Ang p t l 又はT i e 検出試薬を添加し、コーティングした抗Ang、Ang p t l 又はT i e アミノ酸配列（この場合、ナノボディ-X）と特異的に結合したAng、Ang p t l 又はT i e の量を測定する。アッセイに関するバックグラウンドシグナルは、コーティングしたアミノ酸配列（この場合、ナノボディ-X）、第2の溶液相のアミノ酸配列（この場合、ナノボディ-Y）、Ang、Ang p t l 又はT i e バッファーのみ（すなわちAng、Ang p t l 又はT i e を添加しない）及びAng、Ang p t l 又はT i e 検出試薬を用いてウェル中で得られたシグナルと定義する。アッセイに関する陽性対照シグナルは、コーティングしたアミノ酸配列（この場合、ナノボディ-X）、第2の溶液相のアミノ酸配列バッファーのみ（すなわち第2の溶液相のアミノ酸配列を添加しない）、Ang、Ang p t l 又はT i e 及びAng、Ang p t l 又はT i e 検出試薬を用いてウェル中で得られたシグナルと定義する。陽性対照シグナルがバックグラウンドシグナルの少なくとも6倍になるように、E L I S A アッセイを行い得る。どのアミノ酸配列をコーティングアミノ酸配列として使用し、どのアミノ酸配列を第2の（競合）アミノ酸配列として使用するかという選択に起因する任意のアーチファクト（artefacts）（例えば有意に異なる、Ang、Ang p t l 又はT i e に対するナノボディ-Xとナノボディ-Yとの親和性）を避けるために、架橋遮断アッセイを2つのフォーマットで行い得る：1）フォーマット1は、ナノボディ-Xが、E L I S A プレート上にコーティングするアミノ酸配列であり、かつナノボディ-Yが、溶液中にある競合アミノ酸配列である場合であり、また2）フォーマット2は、ナノボディ-Yが、E L I S A プレート上にコーティングするアミノ酸配列であり、かつナノボディ-Xが、溶液中にある競合アミノ酸配列である場合である。ナノボディ-X及びナノボディ-Yは、フォーマット1又はフォーマット2のいずれかで、溶液相の抗Ang、Ang p t l 又はT i e アミノ酸配列が、溶液相の抗Ang、Ang p t l 又はT i e アミノ酸配列の非存在下で得られたAng、Ang p t l 又はT i e 検出シグナル（すなわち陽性対照ウェル）に比べて、Ang、Ang p t l 又はT i

10

20

30

40

50

e 検出シグナル (すなわちコーティングしたアミノ酸配列で結合した A n g、A n g p t 1 又は T i e の量) の 6 0 % ~ 1 0 0 %、具体的に 7 0 % ~ 1 0 0 %、及びより具体的に 8 0 % ~ 1 0 0 % の低減を引き起こすことができる場合、交差遮断すると定義する。このような E L I S A 系交差遮断アッセイは、実施例「x x x」(「E L I S A ベースの交差遮断アッセイ (Elisa-based cross-blocking assay)」) に見ることができる。

【 0 2 1 3 】

p) 本明細書でさらに記載されるように、ナノボディにおけるアミノ酸残基の総数は、1 1 0 ~ 1 2 0、好ましくは 1 1 2 ~ 1 1 5 の範囲内、及び最も好ましくは 1 1 3 であり得る。しかし、ナノボディの一部、断片、類似体又は誘導体 (本明細書中に記載) は、本明細書に概説されるさらなる要求を満たし、また好ましくは本明細書に記載の目的に好適であれば、その長さ及び/又はサイズに特に限定されないことに留意すべきである。

10

【 0 2 1 4 】

q) ナノボディのアミノ酸残基は、Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2 000 Jun 23; 240 (1-2):185-195 の論文 (例えば本明細書の図 2 を参照されたい) においてラクダ由来の V<sub>H</sub> ドメインに適用されるように、Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91) によって与えられた V<sub>H</sub> ドメインに関する一般的なナンバリングに従って数字が付けられる。このナンバリングに従うと、ナノボディの F R 1 は 1 位 ~ 3 0 位のアミノ酸残基を含み、ナノボディの C D R 1 は 3 1 位 ~ 3 5 位のアミノ酸残基を含み、ナノボディの F R 2 は 3 6 位 ~ 4 9 位のアミノ酸残基を含み、ナノボディの C D R 2 は 5 0 位 ~ 6 5 位のアミノ酸残基を含み、ナノボディの F R 3 は 6 6 位 ~ 9 4 位のアミノ酸残基を含み、ナノボディの C D R 3 は 9 5 位 ~ 1 0 2 位のアミノ酸残基を含み、ナノボディの F R 4 は 1 0 3 位 ~ 1 1 3 位のアミノ酸残基を含む。[これに関して、V<sub>H</sub> ドメイン及び V<sub>H</sub> ドメインに関して当該技術分野で既知のように、C D R それぞれにおけるアミノ酸残基の総数は変わる可能性があり、カバットナンバリングで示されるアミノ酸残基の総数に対応していなくてもよい (すなわちカバットナンバリングによる 1 つ又は複数の位置が実際の配列で占められていなくてもよく、又は実際の配列が、カバットナンバリングが可能な数より多くのアミノ酸残基を含んでいてもよい) ことに留意すべきである。このことは、概してカバットによるナンバリングは、実際の配列におけるアミノ酸残基の実際のナンバリングに対応していても、又は対応していなくてもよいことを意味する。しかし一般的に、C D R におけるアミノ酸残基の数に関係なく、カバットナンバリングに従うと、カバットナンバリングによる 1 位は、F R 1 の出発点に対応し (逆もまた同様)、カバットナンバリングによる 3 6 位は、F R 2 の出発点に対応し (逆もまた同様)、カバットナンバリングによる 6 6 位は、F R 3 の出発点に対応し (逆もまた同様)、カバットナンバリングによる 1 0 3 位は、F R 4 の出発点に対応する (逆もまた同様)]。

20

30

【 0 2 1 5 】

V<sub>H</sub> ドメインのアミノ酸残基の数字を付ける代替方法 (この方法は、類似の方法でラクダ由来の V<sub>H</sub> ドメイン及びナノボディに適用することができる) は、Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)) によって説明される方法、いわゆる「A b M 定義」及びいわゆる「接触定義」である。しかし本明細書、特許請求の範囲及び図面では、特に他に指示がなければ、Riechmann and Muyldermans によって V<sub>H</sub> ドメインに適用されるようなカバットによるナンバリングに従う。

40

【 0 2 1 6 】

r) 標的又は抗原に関して、標的又は抗原上の「相互作用部位」という用語は、リガンド、受容体若しくは他の結合パートナーとの結合に関する部位、触媒部位、開裂部位、アロステリック相互作用に関する部位、標的又は抗原の多量体化 (ホモマー化又はマルチマー化等) に関与する部位である、標的又は抗原上のアミノ酸残基の部位、エピトープ、抗原決定部位、部分、ドメイン又はストレッチ、或いは標的又は抗原の生物学的作用又は機構に関与する標的又は抗原上のアミノ酸残基の他の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメイン又はストレッチのいずれかを意味する。より一般的には、「相互作用部位」は、

50

本発明のアミノ酸配列又はポリペプチドが、（本明細書中に規定のように）標的又は抗原（及び／又は標的又は抗原が関与する任意の経路、相互作用、シグナル伝達、生物学的機構又は生物学的作用）を調節するように結合することができる、標的又は抗原上のアミノ酸残基の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメイン又はストレッチのいずれかであり得る。

【0217】

s) 図面、配列表及び実験部部分／実施例は、本発明をさらに説明するためだけに与えられ、特に他にははっきりと本明細書中に指示がなければ、本発明の範囲及び／又は添付の態様を限定するものとしては決して解釈すべきではない。

【0218】

重鎖抗体及びその可変ドメインの概説に関しては、特に本明細書で言及される従来技術、Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302におけるMuyldermansによるレビュー、及び包括的な背景技術として言及される以下の特許出願：Vrije Universiteit Brusselの国際公開第94/04678号、国際公開第95/04079号、及び国際公開第96/34103号；Unileverの国際公開第94/25591号、国際公開第99/37681号、国際公開第00/40968号、国際公開第00/43507号、国際公開第00/65057号、国際公開第01/40310号、国際公開第01/44301号、欧州特許第1134231号及び国際公開第02/48193号；Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) の国際公開第97/49805号、国際公開第01/21817号、国際公開第03/035694号、国際公開第03/054016号及び国際公開第03/055527号；Algonomics N.V. 及びAblynx N. V. の国際公開第03/050531号；カナダの国立研究評議会による国際公開第01/90190号；Institute of Antibodiesによる国際公開第03/025020号（＝欧州特許第1433793号）；並びにAblynx N.V. による国際公開第04/041867号、国際公開第04/041862号、国際公開第04/041865号、国際公開第04/041863号、国際公開第04/062551号、国際公開第05/044858号、国際公開第06/40153号、国際公開第06/079372号、国際公開第06/122786号、国際公開第06/122787号及び国際公開第06/122825号、並びにAblynx N.V. によるさらに公開された特許出願を参照する。これらの出願で言及されるさらなる従来技術、特に国際出願の国際公開第06/040153号の41頁～43頁で言及される参考文献リストも参照する（このリスト及び参考文献は参照により本明細書に援用される）。

【0219】

当該技術分野で使用される専門用語（上記の参考文献を参照されたい）に従って、天然重鎖抗体に存在する可変ドメインは、この可変ドメインを通常の四本鎖抗体に存在する重鎖可変ドメイン（以下「V<sub>H</sub> ドメイン」と表す）と、及び通常の四本鎖抗体に存在する軽鎖可変ドメイン（以下、「V<sub>L</sub> ドメイン」と表す）と区別するために、「V<sub>H H</sub> ドメイン」とも表される。

【0220】

上記で表された従来技術で言及されるように、V<sub>H H</sub> ドメインは、単離V<sub>H H</sub> ドメイン（並びにこれに基づくナノボディ、これは天然V<sub>H H</sub> ドメインと、これらの構造的特徴及び機能的性質を共有する）及びこれを含有するタンパク質を機能的な抗原結合ドメイン又はタンパク質としての使用に非常に有利なものとする、多くの特有の構造的特徴及び機能的性質を有する。特に、以下に限定されないが、（軽鎖可変ドメインの非存在下で、及びこれとの相互作用が全くなく、自然に抗原と機能的に結合するように「設計」された）V<sub>H H</sub> ドメイン及びナノボディは、単一で比較的小さい機能的な抗原結合構造単位、ドメイン又はタンパク質として機能することができる。このことは、V<sub>H H</sub> ドメインを通常の四本鎖抗体のV<sub>H</sub> ドメイン及びV<sub>L</sub> ドメイン（概してこれら自体は単一抗原結合タンパク質又はドメインとしての実際の適用に適しておらず、幾つかの形態又は機能的な抗原結合単位を与えるような別の形態で（例えばFab断片等の通常の抗体断片、V<sub>L</sub> ドメインと共



有結合する $V_H$ ドメインからなる $ScFv$ 断片等で) 組合せる必要がある) と区別する。

#### 【0221】

これらの特有の性質のために、単一抗原結合タンパク質又は抗原結合ドメインとして(すなわちより大きなタンパク質又はポリペプチド部分として)の $V_{HH}$ ドメイン及びナノボディの使用によって、通常の $V_H$ ドメイン及び $V_L$ ドメイン、 $scFv$ 又は通常の抗体断片(例えばFab断片又は $F(ab')_2$ 断片)の使用に対する多くの多大な利点が与えられる:

単一ドメインだけが、高い親和性及び高い選択性で抗原と結合することが要求されるので、2つの分離ドメインを存在させる必要もなく、これらの2つのドメインが正しい空間的立体構造及び立体構造で存在することを(すなわち特別に設計されたリンカー( $scFv$ 等)の使用によって)確認する必要もない。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは単一遺伝子から発現することができ、翻訳後フォールディング又は修飾の必要はない。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは、(本明細書でさらに考察されるように)容易に多価及び多重特異性のフォーマットに遺伝子操作することができる。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは、高溶解性であり、凝集しにくい(Ward et al., Nature, Vol. 341, 1989, p. 544で記載されるマウス由来の「dAb」等)。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは、熱、pH、プロテアーゼ及び他の変性剤又は条件に対する安定性が高い(例えばEwert et al (同上)を参照されたい)。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは、製造で要求される規模であっても調製するのが容易であり、かつ比較的安価である。例えば、 $V_{HH}$ ドメイン、ナノボディ、及びこれを含むタンパク質/ポリペプチドは、微生物発酵を使用して(例えば以下でさらに記載されるように)製造することができ、哺乳動物の発現系(例えば通常の抗体断片)を使用する必要がない。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは、通常の四本鎖抗体及びその抗原結合断片に比べて比較的小さい(約15 kDa、すなわち通常のIgGの10分の1)ため、このような通常の四本鎖抗体及びその抗原結合断片よりも高い組織(充実性腫瘍及び他の高密度組織を含むが、これらに限定されない)への浸透性を示す。

$V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは、(特に通常の $V_H$ ドメインに比べてCDR3ループが伸長するため)いわゆるキャビティ結合性を示すことができ、したがって通常の四本鎖抗体及びその抗原結合断片には接近することができない標的及びエピトープに接近することもできる。例えば、 $V_{HH}$ ドメイン及びナノボディは酵素を阻害することができることが分かっている(例えば国際公開第97/49805号、Transue et al., Proteins 1998 Sep 1; 32(4): 515-22、Lauwereys et al., EMBO J. 1998 Jul1; 17(13): 3512-20を参照されたい)。

#### 【0222】

特定の好ましい一態様において、本発明は、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対するナノボディ、及び詳細には温血動物由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対するナノボディ、及びより詳細には哺乳動物由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対するナノボディ、及び具体的にヒトTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又

10

20

30

40

50

はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対するナノボディ、並びに少なくとも1つのこのようなナノボディを含むタンパク質及び/又はポリペプチドを提供する。

【0223】

特に、本発明は、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2、に対する通常の抗体又はその断片に比べて、このような通常の抗体又は抗体断片(Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、ScFv構築物、「ダイアボディ」及び他の多重特異性構築物(例えばHolliger and Hudson, Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36による総説を参照されたい)等)に基づき得る構築物に比べて、及びまた通常の抗体の可変ドメインに由来し得るいわゆる「dAb」又は類似の(単一)ドメイン抗体に比べて、改善した治療特性及び/又は薬理学的特性、及び/又は他の有益な特性(例えば調製の簡便性の向上、及び/又は製品のコスト低減等)を有するTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対するナノボディ、及びこれを含むタンパク質及び/又はポリペプチドを提供する。これらの改善した有益な特性は、本明細書中のさらなる記載から明らかになり、例えばこれらに限定されないが、

一価フォーマット、多価フォーマット(例えば二価フォーマット)及び/又は多重特異性のフォーマット(例えば以下で記載の多重特異性のフォーマットの1つ)のいずれかでのTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対する親和性及び/又は結合活性の増大、

多価フォーマット(例えば二価フォーマット)でフォーマットするのにより良好な適合性、

多重特異性フォーマット(例えば以下で記載の多重特異性のフォーマットの1つ)でフォーマットするのにより良好な適合性、

「ヒト化」置換(本明細書中で規定)に対する適合性又は感受性の改善; 一価フォーマット、多価フォーマット(例えば二価フォーマット)及び/又は多重特異性のフォーマット(例えば以下で記載の多重特異性のフォーマットの1つ)のいずれかでの免疫原性の低下、

一価フォーマット、多価フォーマット(例えば二価フォーマット)及び/又は多重特異性のフォーマット(例えば以下で記載の多重特異性のフォーマットの1つ)のいずれかでの安定性の増大、

一価フォーマット、多価フォーマット(例えば二価フォーマット)及び/又は多重特異性のフォーマット(例えば以下で記載の多重特異性のフォーマットの1つ)のいずれかでのTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2のいずれかに対する特異性の増大、

異なる種由来のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2のいずれかとの交差反応性の低減又は所望の場合には増大、及び/又は

一価フォーマット、多価フォーマット(例えば二価フォーマット)及び/又は多重特異性のフォーマット(例えば以下で記載の多重特異性のフォーマットの1つ)のいずれかでの

の薬学的用途（予防的用途及び／又は治療的用途を含む）及び／又は診断的用途（画像化目的への使用を含むが、これに限定されない）に望ましい、１つ又は複数の他の特性の改善の１つ又は複数の含まれる。

【０２２４】

概して本発明のアミノ酸配列に対して本明細書中に記載するように、本発明のナノボディは、（本明細書中に規定のように）本質的に単離形態であるか、又は（本明細書中に規定のように）本発明のタンパク質若しくはポリペプチドの一部（１つ又は複数の本発明のナノボディを含むか又は本質的にこれからなっているてもよく、任意で１つ又は複数のさらなるアミノ酸配列（任意で全て１つ又は複数の好適なリンカーを介して連結される）をさらに含んでいてもよい）を形成するのが好ましい。例えば、限定はしないが、１つ又は複数の本発明のアミノ酸配列は、このようなタンパク質又はポリペプチドにおける結合単位として使用してもよく、全て本明細書中に記載の本発明の一価、多価又は多重特異性のポリペプチドをそれぞれ提供するように、任意で結合単位として（すなわちTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2以外の１つ又は複数の標的に対して）働き得る１つ又は複数のさらなるアミノ酸配列を含有し得る。特に、このようなタンパク質又はポリペプチドは、本明細書中にさらに記載の一価、多価又は多重特異性のナノボディ構築物をそれぞれ提供するように、任意で全て１つ又は複数の好適なリンカーを介して連結した、１つ又は複数の本発明のナノボディと、任意で１つ又は複数の（他の）（すなわちTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2以外の標的に指向性を有する）ナノボディとを含み得るか、又は本質的にこれからなり得る。このようなタンパク質又はポリペプチドは、（本明細書中に規定のように）本質的に単離形態であってもよい。

【０２２５】

本発明のナノボディにおいて、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2との結合に関する結合部位は、CDR配列によって形成されるのが好ましい。任意で、本発明のナノボディは、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2との結合に関する少なくとも１つの結合部位の他に、他の抗原、タンパク質又は標的との結合に関する１つ又は複数のさらなる結合部位を含有してもよい。このような第２の結合部位を導入する方法及び位置に関しては、例えばKeck and Huston, Biophysical Journal, 71, October 1996, 2002-2011、欧州特許第0640130号、国際公開第06/07260号、及びAblynx N.V.による2006年11月27日付けで出願された"Immunoglobulin domains with multiple binding sites"と題する米国仮特許出願を参照する。

【０２２６】

本発明のアミノ酸配列に関して本明細書中に概して記載するように、本発明のナノボディ（又はこれを含む本発明のポリペプチド）が、被験体への投与を目的とする場合（例えば本明細書中に記載の治療目的及び／又は診断目的）、本発明のナノボディは、ヒトTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好まし

くはTie 2又はAng 2に指向性を有するのが好ましいが、獣医学的目的では、治療する種由来のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に指向性を有するのが好ましい。また、本発明のアミノ酸配列と同様に、本発明のナノボディは交差反応性(すなわち、ヒトTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2及び本明細書中で言及した種の少なくとも1種の哺乳動物由来のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2のような2種以上の哺乳動物由来のTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に対する指向性)を有していても又は有しなくてもよい。

10

## 【0227】

また同様に、本発明のアミノ酸配列に関して本明細書中に概して記載するように、本発明のナノボディは概して、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2の抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニット又は立体構造(適用可能な場合)のいずれかに指向性を有し得る。しかし概して、本発明のナノボディ(及びこれを含むポリペプチド)は、Tie 2上のAng 1の結合部位、又はAng 2上のTie 2の結合部位に指向性を有することが推測され、また好ましい。

20

## 【0228】

本明細書中で既に記載のように、ナノボディのアミノ酸配列及び構造は、これらに限定されないが、4つのフレームワーク領域すなわち「FR」(又は「FW」と呼ばれることもある)から構成されていると考えることができ、当該技術分野及び本明細書中でそれぞれ、「フレームワーク領域1」すなわち「FR1」、「フレームワーク領域2」すなわち「FR2」、「フレームワーク領域3」すなわち「FR3」及び「フレームワーク領域4」すなわち「FR4」と称され、このフレームワーク領域の間には、3つの相補性決定領域すなわち「CDR」が挿入され、これは当該技術分野でそれぞれ、「相補性決定領域1」すなわち「CDR1」、「相補性決定領域2」すなわち「CDR2」及び「相補性決定領域3」すなわち「CDR3」と称される。本発明のナノボディに存在する、幾つかの好ましいフレームワーク配列及びCDR(及びこれらの組合せ)を本明細書中に記載している。他の好適なCDR配列は、本明細書中に記載の方法によって得ることができる。

30

40

## 【0229】

本発明の非限定的であるが、好ましい態様によれば、本発明のナノボディ(に存在するCDR配列)は、

ナノボディが、 $10^{-5}$ モル/L $\sim 10^{-12}$ モル/L以下、及び好ましくは $10^{-7}$ モル/L $\sim 10^{-12}$ モル/L以下、及びより好ましくは $10^{-8}$ モル/L $\sim 10^{-12}$ モル/Lの解離定数( $K_D$ )で(すなわち $10^5$ L/モル $\sim 10^{12}$ L/モル以上、及び好ましくは $10^7$ L/モル $\sim 10^{12}$ L/モル以上、及びより好ましくは $10^8$ L/モル $\sim 10^{12}$ L/モルの結合定数( $K_A$ )で)Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang

50

1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2と結合し得るようなもの、及び/又は

ナノボディが、 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等)の $k_{on}$ 速度でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2と結合し得るようなもの、及び/又は

ナノボディが、 $1 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ )  $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは $10^{-2} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 等)の $k_{off}$ 速度でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2と結合し得るようなものである。

#### 【0230】

好ましくは、本発明のナノボディ(に存在するCDR配列)は、本発明の一価ナノボディ(又は本発明のナノボディを1つだけ含有するポリペプチド)が、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満(500 pM未満等)の親和性でTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2と結合するようなものであることが好ましい。

#### 【0231】

例えば本明細書中で言及した、 $K_D$ 、 $K_A$ 、 $k_{off}$ 又は $k_{on}$ を測定する一般的技法、及び本明細書中に記載の特定のアッセイの幾つかを使用するそれ自体が既知の方法で、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に対する本発明のナノボディの親和性を求めることができる。

#### 【0232】

本発明のナノボディ(及びこれを含むポリペプチド)とTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2との結合に関する幾つかの好ましいIC50値は、本明細書中のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

#### 【0233】

好ましいが非限定的な一態様において、本発明は、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1～FR4)と3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1～CDR3)とからなる、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に対する(本明細書中に規定の)ナノボディであって、

CDR 1が、

a) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列；

b) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも

10

20

30

40

50

80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

c) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、及び／又は

CDR2が、

d) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列；

e) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

f) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、及び／又は

CDR3が、

g) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列；

h) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

i) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるか、又はこのようなアミノ酸配列の任意の好適な断片である、ナノボディに関する。

#### 【0234】

特に、好ましいが非限定的なこの態様によれば、本発明は、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1～FR4）と3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1～CDR3）とからなる、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対する（本明細書中に規定の）ナノボディであって、

CDR1が、

a) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列；

b) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

c) 配列番号173～配列番号219のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

CDR2が、

d) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列；

e) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

f) 配列番号267～配列番号313のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択され、

CDR3が、

g) 配列番号361～配列番号4547のアミノ酸配列；

h) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列；

i) 配列番号361～配列番号454のアミノ酸配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるようなもの、又はこのようなアミノ酸配列の任意の好適な断片である、ナノボディに関する。

#### 【0235】

本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で包括的に言及するように本発明のナノボディがb)及び／又はc)によるCDR1配列を1つ又は複数含有する場合、

i) b)及び／又はc)によるこのようなCDRにおいて任意のアミノ酸置換は、（本明細書で規定されるように）対応するa)によるCDRと比較して、保存的なアミノ酸置

10

20

30

40

50

換であるのが好ましく；及び／又は

i i ) b ) 及び／又は c ) による C D R は、対応する a ) による C D R と比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく；及び／又は i i i ) b ) 及び／又は c ) による C D R は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって a ) による C D R から誘導される C D R であり得る。

【 0 2 3 6 】

同様に、本発明のナノボディが e ) 及び／又は f ) による C D R 2 配列を 1 つ又は複数含有する場合、

i ) e ) 及び／又は f ) によるこのような C D R において任意のアミノ酸置換は、( 本明細書で規定されるように ) 対応する d ) による C D R と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び／又は

i i ) e ) 及び／又は f ) による C D R は、対応する d ) による C D R と比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく；及び／又は i i i ) e ) 及び／又は f ) による C D R は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって d ) による C D R から誘導される C D R であり得る。

【 0 2 3 7 】

また同様に、本発明のナノボディが h ) 及び／又は i ) による C D R 3 配列を 1 つ又は複数含有する場合、

i ) h ) 及び／又は i ) によるこのような C D R において任意のアミノ酸置換は、( 本明細書で規定されるように ) 対応する g ) による C D R と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び／又は

i i ) h ) 及び／又は i ) による C D R は、対応する g ) による C D R と比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく；及び／又は i i i ) h ) 及び／又は i ) による C D R は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって g ) による C D R から誘導される C D R であり得る。

【 0 2 3 8 】

直前の 3 段落は概して、それぞれ b ) 、 c ) 、 e ) 、 f ) 、 h ) 又は i ) による C D R 1 配列、C D R 2 配列及び／又は C D R 3 配列を 1 つ又は複数含む、任意の本発明のナノボディに適用されると理解すべきである。

【 0 2 3 9 】

本発明のナノボディのうち、具体的には上記で明示的に挙げられる C D R を 1 つ又は複数含むナノボディが好ましい。より具体的には上記で明示的に挙げられる C D R を 2 つ以上含むナノボディが好ましい。最も具体的には上記で明示的に挙げられる C D R を 3 つ含むナノボディが好ましい。

【 0 2 4 0 】

幾つかの特に好ましいが非限定的な C D R 配列の組合せ、及び C D R 配列とフレームワーク配列との好ましい組合せが以下の表 A - 1 で言及され、これは多くの好ましい ( が非限定的な ) 本発明のナノボディに存在する C D R 配列及びフレームワーク配列を挙げている。当業者にとって明らかなように、同じクロンで現れる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の組合せ ( すなわち表 A - 1 の同じ行で言及される C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列 ) が通常好ましい ( が、本発明はその最も広範な意味ではこれに限定されず、表 A - 1 で言及される C D R 配列の他の好適な組合せも含む ) 。また、同じクロンで現れる C D R 配列とフレームワーク配列との組合せ ( すなわち表 A - 1 の同じ行で言及される C D R 配列及びフレームワーク配列 ) が通常好ましい ( が、本発明はその最も広範な意味ではこれに限定されず、表 A - 1 で言及される C D R 配列及びフレームワーク配列の他の好適な組合せ、並びに例えば本明細書でさらに記載されるようなこのような C D R 配列と他の好適なフレームワーク配列との組合せも含む ) 。

## 【 0 2 4 1 】

また、表 A - 1 で言及される C D R の組合せを含む本発明のナノボディにおいて、それぞれの C D R を、言及される C D R との、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性（本明細書中で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択される C D R に置き換えることができ、ここで

i ) このような C D R において任意のアミノ酸置換は、（本明細書で規定されるように）対応する表 A - 1 で言及される C D R 配列と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び／又は

i i ) 任意のこのような C D R 配列は、対応する表 A - 1 で言及される C D R 配列と比較して、アミノ酸置換だけを含むし、アミノ酸欠失又は挿入は含まないのが好ましく；及び／又は

i i i ) 任意のこのような C D R 配列は、特に対応する表 A - 1 で言及される C D R 配列から、それ自体が既知の親和性成熟技法によって誘導される C D R である。

## 【 0 2 4 2 】

しかし、当業者にとって明らかなように、表 A - 1 で言及される、C D R 配列（の組合せ）、並びに C D R 配列及びフレームワーク配列（の組合せ）が一般的に好ましい。

## 【 0 2 4 3 】

表 A - 1 : C D R 配列の好ましい組合せ、フレームワーク配列の好ましい組合せ、及びフレームワーク配列と C D R 配列との好ましい組合せ  
（「 I D 」は添付の配列表中の配列番号を示す）

10

20



【表 2】

Clone	I D	FR1	I D	CDR1	I D	FR2	I D	CDR2	I D	FR3	I D	CDR3	I D	FR4	I D
162- E1	4 5 5	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGSIFS	1 2 6	INAMG	1 7 3	WYQAPGKQ RELVA	2 2 0	FITSVGTTNYADSV KG	2 2 0	RFIISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCA A	2 6 7	DLHYSGPN Y	3 6 4	WGQGTQVTV SS	4 0 8
162- E9	4 5 6	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLD	1 2 7	DYAIG	1 7 4	WFRQAPGKE REAVS	2 2 1	CISVDGSGTHYAD SVKG	2 2 1	RFTISRDNKNTVYLQ QMNSLKPEDTAAAYYC AV	2 6 8	QYSGGYY YTCEDSAD FGF	3 1 5	WGQGTQVTV SS	4 0 9
162- F11	4 5 7	EVQLVESGGGL VQAGGSLRLSC AASGFTFD	1 2 8	DYAIG	1 7 5	WFRQAPGKE REGVA	2 2 2	CISSDGSGTYAD SVKG	2 2 2	RFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYSCS A	2 6 9	GSVAGCIP YY	3 6 3	WGQGTQVTV SS	4 1 0
162- F3	4 5 8	EVQLVESGGGL VQAGDSLRLSCT TSGRTFS	1 2 9	DDTMG	1 7 6	WFRQAPRKE REFVA	2 2 3	AILWDSIKTYADS VKG	2 2 3	RFTISRDNKNTVYLQ QMDSLKPEDTAVYYC AA	2 7 0	TPATAGTD WYRNHY	3 6 4	WGQGTQVTV SS	4 1 1
162- H10	4 5 9	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLD	1 3 0	DYAVG	1 7 7	WFRQAPGKE REGVS	2 2 4	CIGSSYSGTYAD SVKG	2 2 4	RFTISRDNKNTVYLQ QMNSLKPEDTAVYYC AV	2 7 1	QYSGGYY YTCEDSAD FGF	3 6 8	WGQGTQVTV SS	4 1 2
163- E7	4 6 0	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTFS	1 3 1	DYSMS	1 7 8	WVRQAPGKG LEWVS	2 2 5	AISGGGEVTTYAD SVKG	2 2 5	RFTISRDNKNTLYLQ MSSLKPEDTALYYCA E	2 7 2	HLNFYSVS VRSSP	3 6 9	TSQGTQVTVS S	4 1 3
163- E9	4 6 1	EVQLVESGGGL VQPGDSLRLSC AASGFTFG	1 3 2	SNGMR	1 7 9	WVRQAPGKG PEWVS	2 2 6	SINSDGTSTYYADS VKG	2 2 6	RFTISRDNKNTLCLQ MNSLKPEDTAVYYCT T	2 7 3	TEDPYP	3 6 7	RGQGTQVTV SS	4 1 4
163- G8	4 6 2	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTFG	1 3 3	SNGMR	1 8 0	WVRQAPGKG PEWVS	2 2 7	SINSDGTSFAFYES VKG	2 2 7	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCT T	2 7 4	TMNPNP	3 6 8	RGQGTQVTV SS	4 1 5

10

20

30

40

163- H8	4	EVQLVESGGGL	1	SNMGR	1	WVRQAPGKG	2	SINSDGTSTYYAES	2	RFTISRDNAKNTLYLQ	3	TENPNP	3	RGPGTQVTV	4
	6	VQPGGSLRLSC	3		8	PEWVS	2	VKG	2	MHSLKPEDTAVYYCT	2		6	S	1
	3	AASGFTFG	4		1		8		8		2		9		6
166- C1	4	EVQLVESGGGL	1	STTIG	1	WFRQAPGKE	2	CISTGDGSTYYAE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPMWS	3	WGQGTQVTV	4
	6	VQAGGSLRLSC	3		8	REGVS	2	SVKG	2	MNSLKPEDTAVYYCA	2	SWSAPYEE	7	SS	1
	4	AASGFTFG	5		2		9		9		3	DY	0		7
166- C10	4	EVQLVESGGGL	1	TTTIG	1	WFRQAPGKE	2	CISTGDGSTNYAE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPMWS	3	WGQGTQVTV	4
	6	VQAGGSLRLSC	3		8	REGVS	0	SVKG	3	MNSLKPEDTAVYYCA	2	SWSAPYEE	7	SS	1
	5	AASGFTFG	6		3		0		0		4	DY	1		8
166- D7	4	EVQLVESGGGL	1	DTTIG	1	WFRQAPGKE	2	CISTGDGSTYYAE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPLWST	3	WGQGTQVTV	4
	6	VQAGGSLRLSC	3		8	REGIS	3	SVKG	3	MNSLNPEDTAVYYCA	2	WSAPYED	7	SS	1
	6	AASGFTFS	7		4		1		1		5	Y	2		9
166- F8	4	EVQLVESGGGL	1	TTTIG	1	WFRQAPGKE	2	CISTGGGSTYYTE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPMWS	3	WGQGTQVTV	4
	6	VQAGGSLRLSC	3		8	REWS	3	SVKG	3	MNSLKPEDTAVYYCA	2	NWSAPYEE	7	SS	2
	7	AASGFTFG	8		5		2		2		6	DY	3		0
166- G4	4	EVQLVESGGGL	1	DTTIG	1	WFRQAPGKE	2	CISTGDGSTYYAE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPLWST	3	WGQGTQVTV	4
	6	VQAGGSLRLSC	3		8	REGIS	3	SVKG	3	MNSLNPEDTAVYYCA	2	WSAPYED	7	SS	2
	8	AASGFTFS	9		6		3		3		7	Y	4		1
166- H4	4	EVQLVESGGDL	1	DFTIG	1	WFRQAPGKE	2	CINTGDGSTNYAE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPMWS	3	WGQGTQVTV	4
	6	VQAGGSLRLSC	4		8	REGVS	3	SVKG	3	MNSLKPEDTAVYYCA	2	SWSAPYEE	7	SS	2
	9	AASGFTFG	0		7		4		4		8	DY	5		2
166- E12	4	EVQLVESGGGL	1	STTIG	1	WFRQAPGKE	2	CISTGDGSTYYAE	2	RFTISSDNKNTVYLQ	3	DQAPMWS	3	WGQGTQVTV	4
	7	VQAGGSLRLSC	4		8	REGVS	3	SVKG	3	MNSLKPEDTAVYYCA	2	SWSAPYEE	7	SS	2
	0	AASGFTFG	1		8		5		5		9	DY	6		3
166- D4	4	EVQLVESGGGL	1	NTAMG	1	WYRQAPGKW	2	TIYSGGSTKYIDSV	2	RFTISRDNTRNTVHLQ	3		3	WGQGAQVTV	4
	7	VQAGGSLRLSC	4		8	RELVA	3	KG	3	MNSLKPEDTAVYYCN	2	VGAGSY	7	SS	2
	1	VASGRIFT	2		9		6		6		0		7		4
173- H9	4	EVQLVESGGGL	1	GNWMY	1	WLRQAPGKG	2	TITPRGLTAYADSV	2	RFTISRDAIENTLYLQ	3		3	RGQGTQVTV	4
	7	VQPGGSLRLSC	4		9	LEWIS	3	KG	3	MNSLKSAGDTAVYYCA	1		8	SS	2
	2	AASGFTLS	3		0		7		7		1	DKTGER	7		5
184- B6	4	EVQLVESGGGL	1	NYAMT	1	WYRQAPGKG	2	DISWDGDIITTYAAS	2	RFTISRDNAKNTLYLQ	3	YGYDSGRY	3	WGQGTQVTV	4
	7	VQPGGSLRLSC	4		9	LEWVS	3	VKG	3	MNSLKPEDSAVYYCN	2	YSY	7	SS	2
	3	AASGFTFS	4		1		8		8		2		9		6
185- H5	4	EVQLVESGGGL	1	YYAIG	1	WFRQAPGKE	2	YISSDGRTYYAD	2	RFTISRDNAKNTVYL	3	DLSGRGDV	3	WGQGTQVTV	4
	7	VQPGGSLRLSC	4		9	REGVS	3	SVKG	3	QMNSLKPEDTAVYYC	2	SEYEDY	8	SS	2
	4	AASGFTLD	5		2		9		9		3		0		7

10

20

30

40

168- A3	4 7 5	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 4 6	GNWMY	1 9 3	WLRQAPGKG LEWIS	2 4 0	TITPRGLTAYADSV KG	2 8 7	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 4	DKTGER	3 8 1	RGQGTQVTV SS	4 2 8
168- E5	4 7 6	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 4 7	SNWMY	1 9 4	WLRQAPGKG LEWIS	2 4 1	TITPRDLTAYADSV KG	2 8 8	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 5	DKAGER	3 8 2	RGQGTQVTV SS	4 2 9
168- G3	4 7 7	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 4 8	YYAIG	1 9 5	WYRQAPGKE REWVS	2 4 2	CISSNYGITTYAD SVKG	2 8 9	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 6	NTRRYGR LCDLNADY	3 8 3	WGQGTQVTV SS	4 3 0
169- A10	4 7 8	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 4 9	PSWMY	1 9 6	WLRQAPGKG LEWIS	2 4 3	TITPRGLTAYADSV KG	2 8 0	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 7	DKNGPP	3 8 4	MGQGTQVTV SS	4 3 1
169- A12	4 7 9	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 4 5	IHMNG	1 9 7	WYRQAPGNE RDLVA	2 4 4	VIIDSRRTTKYAESV KG	2 8 1	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 8	LALGTDQS STFDS	3 8 5	WGQGTQVTV SS	4 3 2
169- B12	4 8 0	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 1	INAMG	1 9 8	WYRQAPGNE RDLVA	2 4 5	VIIDSRRTTKYAESV KG	2 8 3	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 9	ELLGKMY	3 8 6	WGQGTQVTV SS	4 3 3
169- C12	4 8 1	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 2	IHMNG	1 9 9	WYRQAPGNE RDMVA	2 4 6	VIIDSRRTTKYAESV KG	2 8 4	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 0	LALGTDQS STFDS	3 8 7	WGQGTQVTV SS	4 3 4
169- C8	4 8 2	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 3	TSWMY	2 0 0	WLRQAPGKG LEWIS	2 4 7	TITPRGLTAYADSV KG	2 8 4	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 1	DKNGPP	3 8 8	MGQGTQVTV SS	4 3 5
169- E12	4 8 3	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 4	INTMG	2 0 1	WYRQAPGKG RDLVA	2 4 8	AITNGGSGTKYVDS VKG	2 8 5	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 2	ESLGRWG	3 8 9	WGQGTQVTV SS	4 3 6
169- F11	4 8 4	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 5	TSWMY	2 0 2	WLRQAPGKG LEWIS	2 4 9	TITPRGLTAYADSV KG	2 8 6	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 3	DKNGPP	3 8 0	MGQGTQVTV SS	4 3 7
170- B1	4 8 5	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 6	LYVTG	2 0 3	WYRQAPGKG RELVA	2 4 0	SITSGGSLTYADSV VKG	2 8 7	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 4	RSIGVDDM PYVY	3 8 1	WGQGTQVTV SS	4 3 8
170- C2	4 8 6	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTLS	1 5 7	LNAMT	2 0 4	WYRQAPGKG LEWIS	2 4 1	TISGGWTTTSYAD SVKG	2 8 8	RFTISRDAIENTLYLQ MNSLSKSGDTAVYYCA	3 3 5	GSEFNGYE V	3 8 2	RGQGTQVTV SS	4 3 9

10

20

30

40

170- E2	4 8 7	EVQVSEGGGL VQAGGSLRLSC AASGSISS	1 5 8	1 5 8	INVMG	2 0 5	WYRQAPGKQ RDLVA	2 5 2	TITRALNTAYATSV KG	2 5 2	2 9 9	RFTISRDNFTNTVYLQ MNSLEPEDTAVYYCN A	3 4 6	GGYYTNLR TGGNY	3 9 3	WGQGTQVTV SS	4 4 0
170- F2	4 8 8	EVQVSEGGGL VQAGGSLRLSC AASGIFII	1 5 9	1 5 9	DTMG	2 0 6	WYRQAPGKQ RELVA	2 5 3	SITPTGNTINYVDSV KG	2 5 3	3 0 0	RFAISRDNKNTMHL QMNSLKPEDTAVYYC NA	3 7 7	VYPRYYGD DDRPPVDS	3 9 4	WGQGTQVTV SS	4 4 1
170- H1	4 8 9	EVQVSEGGGL VQAGGSLRLSC AASGSISS	1 6 0	1 6 0	INVMG	2 0 7	WYRQAPGKQ RDLVA	2 5 4	VITRALNTNYATSV KG	2 5 4	3 0 1	RFTISRDDFKDTVYLQ MNSLEPEDTAVYYCN A	3 4 8	GGYYTNLR TGGNY	3 9 5	WGQGTQVTV SS	4 4 2
171- A2	4 9 0	EVQVSEGGGQ VQAGDSLRLSC KASRRITIS	1 6 1	1 6 1	TYGMG	2 0 8	WFRQAPGDK RDLVS	2 5 5	SISASGASTYYVDS VKG	2 5 5	3 0 2	RFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDAAVYYCA A	3 4 9	APNGRFIT MSAHVDS	3 9 6	WGQGTQVTV SS	4 4 3
171- A3	4 9 1	EVQVSEGGGQ VQAGDSLRLSC KASRRITIS	1 6 2	1 6 2	TYGMG	2 0 9	WFRQAPGDK RDLVS	2 5 6	SISASGASTYYVDS VKG	2 5 6	3 0 3	RFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDAAVYYCA A	3 4 0	APNGRFIT MSTHVDY	3 9 7	WGQGTQVTV SS	4 4 4
171- C4	4 9 2	EVQVSEGGGL VQPGGSLRLSC AASGRITFS	1 6 3	1 6 3	TFNTYS MG	2 1 0	WFRQAPGKE REFVA	2 5 7	AISRGGNVTPYAD SVKG	2 5 7	3 0 4	RFAISRDNKNTVAL QMNSLKPEDTAVYYC AA	3 5 1	SKIGIASTIR YYDY	3 9 8	WGQGTQVTV SS	4 4 5
171- D2	4 9 3	EVQVSEGGGL VQAGGSLRLSC AASVLTFG	1 6 4	1 6 4	TYTVG	2 1 1	WFRQAPGKE REFVS	2 5 8	IITGSGTYNDYADS VKG	2 5 8	3 0 5	RFTVSRDNKNTVYL QMNSLKSEDVAVYYC AA	3 5 2	RHWGMFS RSENDYNY	3 9 9	WGQGTQVTV SS	4 4 6
171- E2	4 9 4	EVQVSEGGGL VQAGASLRLSCV DSGDTFS	1 6 5	1 6 5	WYAMG	2 1 2	WFRQAPGK EREFV	2 5 9	SSISGGGSNTVYA DSVKG	2 5 9	3 0 6	RFTVSRDRKNTVYL QMNSLKPEDSGVYY CAA	3 5 3	DKRWGSPA TSRSTHDY	4 0 0	WGQGTQVTV SS	4 4 7
171- E4	4 9 5	EVQVSEGGGL VQPGGSLRLSC AASGRITFS	1 6 6	1 6 6	TFNTYS MG	2 1 3	WFRQAPGKE REFVA	2 5 0	AISRGGNVTPYAD SVKG	2 5 0	3 0 7	RFAISRDNKNTLTLLQ MNSLKPEDTAVYYCA A	3 5 4	SKIGIASTIR YYDY	4 0 1	WGQGTQVTV SS	4 4 8
171- F3	4 9 6	EVQVSEGGGL VQTGSLRLSC AASGRSFN	1 6 7	1 6 7	LYMG	2 1 4	WFRQAPGRE REFVA	2 5 1	GISGGGSTFYGD SVKG	2 5 1	3 0 8	RFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYC QS	3 5 5	SRRIITNPR EYGY	4 0 2	WGQGTQVTV SS	4 4 9
171- G2	4 9 7	EVQVSEGGGL VQAGGSLRLSC TASGLTFS	1 6 8	1 6 8	MYAMA	2 1 5	WIRLAPGKER EVIA	2 5 2	AIDWSGGSTFYGD SVKG	2 5 2	3 0 9	RFTISRDNKNTVYLE QMNSLKPEDTAVYYCA A	3 5 6	NRRIYSSG SSLSDNSL	4 0 3	WGQGTQVTV SS	4 5 0
171- G4	4 9 8	EVQVSEGGGL VQAGGSLRLSC VASGDTFN	1 6 9	1 6 9	WYAMG	2 1 6	WFRQAPGK EREFV	2 5 3	SAISGGGSNTVYVD SVKG	2 5 3	3 0 0	RFTVSRDRKNTVYL QMNSLKPEDSGVYY CAV	3 5 7	DKRWGSPA TSRSTHDY	4 0 4	WGQGTQVTV SS	4 5 1

10

20

30

40

170- G3	4 9 9	EVOLVESGGGL VOAGGSLRLSC AASETIFA	1 7 0	SAMG	2 1 7	WYRQPPGKQ RELVA	2 6 4	RITRGGSTNYAES VKG	3 1 1	RFAISRDNADSTLYLR MNNLKPEDTAVYYCN A	3 5 8	DTIGHSSSY ITY	4 0 5	WGQGTQVTV SS	4 5 2
171- H2	5 0 0	EVOLVESGGGL VOAGGSLRLSC AASGRPFS	1 7 1	MYAMG	2 1 8	WFRQAPGKE REFVT	2 6 5	VITWSGGSTYYAD SVKG	3 1 2	RFTISKDIKNTVYLQ MNSLKPDDMAVYYC AA	3 5 9	ARRYGNLY NTNNYDY	4 0 6	WGQGTQVTV SS	4 5 3
171- H4	5 0 1	EVOLVESGGGQ VOAGDLSRLSC KASRRITIS	1 7 2	TYGMG	2 1 9	WFRQAPGDK RDLVS	2 6 6	SISASGASTYYVDS VKG	3 1 3	RFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDAAVYYCA A	3 6 0	APNGRFIT MSTHVDS	4 0 7	WGQGTQVTV SS	4 5 4

## 【 0 2 4 4 】

このため、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から；又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 %の「配列同一性」（本明細書で規定）を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列それぞれからなる群から；及び／又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つの

10

20

30

40

50

みの「アミノ酸差異」（本明細書で規定）を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列それぞれからなる群から好適に選択される。

【 0 2 4 5 】

これに関して、「好適に選択される」とは、規定通りに、それぞれ C D R 1 配列が好適な C D R 1 配列から（すなわち本明細書で規定のように）選択され、C D R 2 配列が好適な C D R 2 配列から（すなわち本明細書で規定のように）選択され、C D R 3 配列が好適な C D R 3 配列から（すなわち本明細書で規定のように）選択されることを意味する。より具体的には、C D R 配列は、本発明のナノボディが本明細書に規定のように（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び / 又は  $k_{off}$  速度、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び / 又は表される）親和性で  $Tie1$ 、 $Tie2$ 、 $Ang1$ 、 $Ang2$ 、 $Ang3$ 、 $Ang4$ 、 $Angptl1$ 、 $Angptl2$ 、 $Angptl3$ 、 $Angptl4$ 、 $Angptl5$ 、又は  $Angptl6$ 、より好ましくは  $Tie2$ 、 $Ang2$ 、 $Ang1$ 、 $Ang4$ 、又は  $Angptl4$ 、より好ましくは  $Tie2$  又は  $Ang2Tie1$ 、 $Tie2$ 、 $Ang1$ 、 $Ang2$ 、 $Ang3$ 、 $Ang4$ 、 $Angptl1$ 、 $Angptl2$ 、 $Angptl3$ 、 $Angptl4$ 、 $Angptl5$ 、又は  $Angptl6$ 、より好ましくは  $Tie2$ 、 $Ang2$ 、 $Ang1$ 、 $Ang4$ 、又は  $Angptl4$ 、より好ましくは  $Tie2$  又は  $Ang2$  と結合するように選択されるのが好ましい。

10

【 0 2 4 6 】

特に、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 3 配列が少なくとも、表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列からなる群から；又は表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する C D R 3 配列からなる群から；及び / 又は表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 3 配列からなる群から好適に選択される。

20

【 0 2 4 7 】

好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 2 つが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から；又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列それぞれからなる群から；及び / 又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみの「アミノ酸差異」を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列それぞれからなる群から好適に選択される。

30

【 0 2 4 8 】

特に、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 3 配列が少なくとも、表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列からなる群から；又はそれぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する C D R 3 配列からなる群から好適に選択され；存在する C D R 1 配列及び C D R 2 配列の少なくとも 1 つが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列及び C D R 2 配列からなる群から；又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列及び C D R 2 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 %、さらにより好ましくは少なくとも 99 % の配列同一性を有する C D R 1 配列及び C D R 2 配列それぞれからなる群から；及び / 又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列及び C D R 2 配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 1 配列及び C D R 2 配列それぞれからなる群から好適に選択される。

40

50

## 【 0 2 4 9 】

最も好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の 3 つ全てが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から；又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列それぞれからなる群から；及び / 又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列それぞれからなる群から好適に選択される。

10

## 【 0 2 5 0 】

さらにより好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から好適に選択される。好ましくはこの態様では、存在する他の 2 つの C D R 配列の少なくとも 1 つ、又は好ましくは両方が、表 A - 1 でそれぞれ挙げられる対応する C D R 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 配列から；及び / 又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる対応する配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 配列からなる群から好適に選択される。

20

## 【 0 2 5 1 】

特に、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 3 配列が少なくとも、表 A - 1 で挙げられる C D R 3 からなる群から好適に選択される。好ましくはこの態様では、存在する C D R 1 配列及び C D R 2 配列の少なくとも 1 つ、及び好ましくは両方が、表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列及び C D R 2 配列との、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 1 配列及び C D R 2 配列それぞれからなる群から；及び / 又は表 A - 1 でそれぞれ挙げられる C D R 1 配列及び C D R 2 配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 1 配列及び C D R 2 配列それぞれからなる群から好適に選択される。

30

## 【 0 2 5 2 】

さらにより好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の少なくとも 2 つが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から好適に選択される。好ましくはこの態様では、存在する残りの C D R 配列が、表 A - 1 で挙げられる対応する C D R 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 配列からなる群から；及び / 又は表 A - 1 で挙げられる対応する配列の少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 配列からなる群から好適に選択される。

40

## 【 0 2 5 3 】

特に、本発明のナノボディにおいて、C D R 3 配列が少なくとも、表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列からなる群から好適に選択され、C D R 1 配列又は C D R 2 配列のいずれかが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列及び C D R 2 配列からなる群から好適に選択される。好ましくは、この態様において、存在する残りの C D R 配列が、表 A - 1 で挙げられる対応する C D R 配列の少なくとも 1 つとの、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 配列からなる群から；及び / 又は表 A - 1 で挙げられる対応する C D R 配列との、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R

50

配列からなる群から好適に選択される。

【 0 2 5 4 】

さらにより好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の 3 つ全てが、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から好適に選択される。

【 0 2 5 5 】

また概して、表 A - 1 で挙げられる C D R の組合せ（すなわち表 A - 1 の同じ行で言及されるもの）が好ましい。このため概して、本発明のナノボディにおける C D R が、表 A - 1 で言及される C D R 配列であるか、又は表 A - 1 で挙げられる C D R 配列との、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 配列からなる群から；及び / 又は表 A - 1 で挙げられる C D R 配列との、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 配列からなる群から好適に選択される場合、他の C D R の少なくとも 1 つ、好ましくは両方が、表 A - 1 における同じ組合せ（すなわち表 A - 1 の同じ行で言及されるもの）に属する C D R 配列から好適に選択されるか、又は同じ組合せに属する C D R 配列（複数可）との、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する C D R 配列からなる群から；及び / 又は同じ組合せに属する C D R 配列（複数可）との、3 つ、2 つ若しくは 1 つのみのアミノ酸差異を有する C D R 配列からなる群から好適に選択されることが好ましい。上記の段落で示される他の好ましい実施形態（preferences）は、表 A - 1 で言及される C D R 配列の組合せにも適用される。

【 0 2 5 6 】

このため、非限定的な例により、本発明のナノボディは例えば、表 A - 1 で言及される C D R 1 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 1 配列と、表 A - 1 で言及される（が、異なる組合せに属する）C D R 2 配列の 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する C D R 2 配列と、C D R 3 配列とを含むことができる。

【 0 2 5 7 】

幾つかの好ましい本発明のナノボディは例えば、（ 1 ）表 A - 1 で言及される C D R 1 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 1 配列、表 A - 1 で言及される（が、異なる組合せに属する）C D R 2 配列の 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する C D R 2 配列、及び表 A - 1 で言及される（が、異なる組合せに属する）C D R 3 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 3 配列；又は（ 2 ）表 A - 1 で言及される C D R 1 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 1 配列、C D R 2 配列、及び表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列の 1 つ；又は（ 3 ）C D R 1 配列、表 A - 1 で挙げられる C D R 2 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 2 配列、及び C D R 2 配列と同じ組合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 3 配列との、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する C D R 3 配列を含み得る。

【 0 2 5 8 】

幾つかの特に好ましい本発明のナノボディは例えば以下のものを含み得る：

（ 1 ）表 A - 1 で言及される C D R 1 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 1 配列；同じ組合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 2 配列との、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する C D R 2 配列；及び同じ組合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 3 配列との 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 3 配列；又は（ 2 ）C D R 1 配列、表 A - 1 で挙げられる C D R 2、及び表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列（ここで C D R 2 配列と C D R 3 配列とは異なる組合せに属し得る）。

【 0 2 5 9 】

幾つかのさらにより好ましい本発明のナノボディは例えば以下のものを含み得る：

（ 1 ）表 A - 1 で言及される C D R 1 配列の 1 つとの 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 1 配列；同じ組合せに属する、表 A - 1 で挙げられる C D R 2 配列；及び異なる組



合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 3 配列；又は ( 2 ) 表 A - 1 で言及される C D R 1 配列；同じ組合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 2 配列との、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する C D R 2 配列；及び同じ若しくは異なる組合せに属する、表 A - 1 で挙げられる C D R 3 配列との 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 3 配列。

【 0 2 6 0 】

特に好ましい本発明のナノボディは例えば、表 A - 1 で言及される C D R 1 配列と、同じ組合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 2 配列との 8 0 % を超える配列同一性を有する C D R 2 配列と、同じ組合せに属する、表 A - 1 で言及される C D R 3 配列とを含み得る。

10

【 0 2 6 1 】

最も好ましい本発明のナノボディにおいて、存在する C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列が、それぞれ表 A - 1 で挙げられる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の組合せの 1 つから好適に選択される。

【 0 2 6 2 】

別の好ましいが非限定的な本発明の態様によれば、( a ) C D R 1 は 1 個 ~ 1 2 個のアミノ酸残基、通常 2 個 ~ 9 個のアミノ酸残基、例えば 5 個、6 個又は 7 個のアミノ酸残基の長さを有し、及び / 又は ( b ) C D R 2 は 1 3 個 ~ 2 4 個のアミノ酸残基、通常 1 5 個 ~ 2 1 個のアミノ酸残基、例えば 1 6 個又は 1 7 個のアミノ酸残基の長さを有し、及び / 又は ( c ) C D R 3 は 2 個 ~ 3 5 個のアミノ酸残基、通常 3 個 ~ 3 0 個のアミノ酸残基、例えば 6 個 ~ 2 3 個のアミノ酸残基の長さを有する。

20

【 0 2 6 3 】

別の好ましいが非限定的な態様では、本発明は、C D R 配列 ( 本明細書で規定 ) が、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つの C D R 配列との、8 0 % 超、好ましくは 9 0 % 超、より好ましくは 9 5 % 超、例えば 9 9 % 以上の配列同一性 ( 本明細書で規定 ) を有するナノボディに関する。

【 0 2 6 4 】

概して、上記の C D R 配列を有するナノボディが、本明細書でさらに記載されるようなものであり、好ましくは同様に本明細書でさらに記載されるようなものであるフレームワーク配列を有し得る。このため、例えば本明細書で言及されるようにこのようなナノボディは、( 任意の好適な種由来の ) 天然のナノボディ、天然の ( すなわち好適なラクダ科動物種由来の )  $V_{H H}$  配列、又は合成若しくは半合成のアミノ酸配列若しくはナノボディ ( 部分ヒト化ナノボディ又は  $V_{H H}$  配列、完全ヒト化ナノボディ又は  $V_{H H}$  配列、ラクダ化重鎖可変ドメイン配列が挙げられるが、これらに限定されない )、及び本明細書で言及される技法により得られたナノボディであり得る。

30

【 0 2 6 5 】

このため、具体的であるが非限定的な一態様において、本発明は、4 つのフレームワーク領域 ( それぞれ、F R 1 ~ F R 4 ) と、3 つの相補性決定領域 ( それぞれ、C D R 1 ~ C D R 3 ) とからなるヒト化ナノボディであって、C D R 1 ~ C D R 3 は本明細書で規定されるようなものであり、上記ヒト化ナノボディは、少なくとも 1 つのヒト化置換 ( 本明細書で規定 )、具体的にはそのフレームワーク配列 ( 本明細書で規定 ) の少なくとも 1 つに少なくとも 1 つのヒト化置換を含む、ヒト化ナノボディに関する。

40

【 0 2 6 6 】

別の好ましいが非限定的な態様において、本発明は、C D R 配列が、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは配列番号列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 のうちの少なくとも 1 つの C D R 配列との、少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性、例えば 9 5 % 若しくはそれ以上のアミノ酸同一性、又はさらに本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有するナノ

50

ボディに関する。このアミノ酸同一性の程度は例えば、上記のナノボディと配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは配列番号列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 の配列の 1 つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書で記載のように）求めることにより決定することができ、ここでフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する。このようなナノボディは本明細書でさらに説明されるようなものであり得る。

#### 【 0 2 6 7 】

別の好ましいが非限定的な態様において、本発明は、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは配列番号列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 からなる群から、又は配列番号配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは配列番号列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの、80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、例えば99%以上の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するナノボディに関する。

#### 【 0 2 6 8 】

別の好ましいが非限定的な本発明の態様は、対応する天然 V<sub>H H</sub> 配列と比較して、少なくとも 1 つのヒト化置換（本明細書で規定）、具体的にはそのフレームワーク配列（本明細書で規定）の少なくとも 1 つに少なくとも 1 つのヒト化置換を含む、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは配列番号列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 のナノボディのヒト化変異体に関する。

#### 【 0 2 6 9 】

「好ましい」（又は「より好ましい」、「さらにより好ましい」等）と本明細書中で言及されるナノボディが、本明細書中に記載のポリペプチドで使用するのにも好ましい（又はより好ましい、又はさらにより好ましい等）ことは、当業者にとって明らかである。このように概して、1 つ又は複数の「好ましい」本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になるポリペプチドが好ましく、概して 1 つ又は複数の「より好ましい」本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になるポリペプチドがより好ましく、他も同様である。

#### 【 0 2 7 0 】

概して、単一のナノボディ（本発明の単一のナノボディ等）を含むか又はこれから本質的になるタンパク質又はポリペプチドは、本明細書で「一価」タンパク質若しくはポリペプチド、又は「一価構築物」と呼ばれる。2 つ以上のナノボディ（少なくとも 2 つの本発明のナノボディ、又は少なくとも 1 つの本発明のナノボディ及び少なくとも 1 つの他のナノボディ等）を含むか又はこれから本質的になるタンパク質及びポリペプチドは、本明細書で「多価」タンパク質若しくはポリペプチド、又は「多価構築物」と呼ばれ、これらは、対応する本発明の一価のナノボディに比べて或る特定の利点を与え得る。このような多価構築物の幾つかの非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

#### 【 0 2 7 1 】

具体的であるが、非限定的な一態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも 2 つの本発明のナノボディ、例えば 2 つ又は 3 つの本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になる。本明細書中にさらに記載のように、このような多価構築物は、本発明の単一ナノボディを含むか又はこれから本質的になるタンパク質又はポリペプチドに比べて、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t 1 1、A n g p t 1 2、A n g p t 1 3、A n g p t 1 4、A n g p t 1 5、又は A n g p t 1 6、より好ましくは T i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又は A n g p t 1 4、より好ましくは T i e 2 又は A n g 2 に対する結合活性が大きく改善するというような、或る特定の利点を与えることができる。このような多価構築物は、本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかである。

## 【 0 2 7 2 】

具体的であるが、非限定的な別の態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの本発明のナノボディと、少なくとも1つの他の結合単位（すなわち別のエピトープ、抗原、標的、タンパク質又はポリペプチドに指向性を有する）とを含むか又は本質的にこれからなり、これは好ましくはナノボディでもある。このようなタンパク質又はポリペプチドは、本明細書中で「多重特異性」タンパク質若しくはポリペプチド、又は「多重特異性構築物」とも称され、これらは、（好ましいが非限定的な幾つかの多重特異性構築物の本明細書中のさらなる考察から明らかになるように）対応する本発明の一価ナノボディに比べて或る特定の利点を与え得る。このような多重特異性構築物は、本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかである。

10

## 【 0 2 7 3 】

具体的であるが、非限定的なさらに別の態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの本発明のナノボディと、任意で1つ又は複数のさらなるナノボディと、本発明のナノボディに及び/又は得られた融合タンパク質に少なくとも1つの所望の特性を与える少なくとも1つの他のアミノ酸配列（タンパク質又はポリペプチド等）とを含むか又はこれから本質的になる。ここでも同様に、このような融合タンパク質は、対応する本発明の一価ナノボディに比べて或る特定の利点を与え得る。このようなアミノ酸配列及びこのような融合構築物の幾つかの非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

## 【 0 2 7 4 】

例えば2つ以上の上記の態様を組合せて、2つの本発明のナノボディと、1つの他のナノボディと、任意で1つ又は複数の他のアミノ酸配列とを含む三価の二重特異性構築物を提供することも可能である。このような構築物、及び本発明の関連内で特に好ましい幾つかの構築物のさらなる非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

20

## 【 0 2 7 5 】

上記の構築物において、1つ又は複数のナノボディ及び/又は他のアミノ酸配列は、互いに直接連結しても、及び/又は1つ又は複数のリンカー配列を介して互いに好適に連結してもよい。このようなリンカーの幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

## 【 0 2 7 6 】

具体的な本発明の一態様において、本発明のナノボディ、又は本発明のナノボディを少なくとも1つ含む、本発明の化合物、構築物若しくはポリペプチドの半減期は、対応する本発明のアミノ酸配列に比べて増大し得る。このようなナノボディ、化合物及びポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる開示に基づき、当業者にとって明らかになり、例えば（例えばペグ化によって）半減期が増大するように化学修飾した本発明のナノボディ配列又はポリペプチド；血清タンパク質（血清アルブミン等、例えば2006年11月27日付でAblynx N.V.により出願された"Immunoglobulin domain s with multiple binding sites"と題する米国仮特許出願を参照する）との結合に関するさらなる結合部位を少なくとも1つ含む本発明のアミノ酸配列；又は本発明のナノボディ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）と連結する本発明のナノボディを少なくとも1つ含む本発明のポリペプチドを含む。このような半減期を延ばす部分又はアミノ酸配列を含む本発明のポリペプチドの例は、本明細書中のさらなる開示に基づき、当業者にとって明らかになり、例えば1つ又は複数の本発明のナノボディが、1つ又は複数の血清タンパク質若しくはその断片（血清アルブミン又はその好適な断片等）と、又は血清タンパク質と結合することができる、1つ又は複数の結合単位（例えば血清アルブミン等の血清タンパク質、IgG等の血清免疫グロブリン、又はトランスフェリンと結合することができるナノボディ又は（単一）ドメイン抗体等）と好適に連結するポリペプチド；本発明のナノボディがFc部分（ヒトFc等）又はその好適な部分若しくは断片と連結するポリペプチド；又は1つ若しくは複数の本発明のナノボディが、血清タンパク質と結合することができる、1つ又は複数の小タンパク質又はペプ

30

40

50

チドと好適に連結するポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない（例えば国際公開第91/01743号、国際公開第01/45746号、国際公開第02/076489号、及び2006年12月5日付で出願したAblynx N.V.の"Peptides capable of binding to serum proteins"と題したAblynx N.V.の米国仮特許出願に記載のタンパク質及びペプチドであるが、これに限定されない）。

#### 【0277】

さらに、当業者にとって明らかなように、このようなナノボディ、化合物、構築物又はポリペプチドは、三重特異性又は多重特異性ナノボディ構築物を提供するように、1つ又は複数のさらなる基、残基、部位、又は結合単位（例えば1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列及び特に1つ又は複数のさらなる（すなわちTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に指向性を有しない）ナノボディ）を含有し得る。

#### 【0278】

概して、半減期が増大した本発明のナノボディ（又はこれを含む化合物、構築物若しくはポリペプチド）は、対応する本発明のアミノ酸配列自体の半減期の少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍（少なくとも5倍等）、例えば少なくとも10倍又は20倍を超える半減期を有するのが好ましい。例えば、半減期が増大した本発明のナノボディ、化合物、構築物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列自体に比べて、半減期が1時間を超えて、好ましくは2時間を超えて、より好ましくは6時間を超えて（12時間等を超えて）、又はさらに24時間、48時間若しくは72時間を超えて増大し得る。

#### 【0279】

好ましいが非限定的な本発明の一態様において、このような本発明のナノボディ、化合物、構築物又はポリペプチドは、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、さらにより好ましくは少なくとも72時間以上のヒトにおける血清半減期を示す。例えば本発明の化合物又はポリペプチドは、少なくとも5日（約5日～10日等）、好ましくは少なくとも9日（約9日～14日等）、より好ましくは少なくとも約10日（約10日～15日等）、若しくは少なくとも約11日（約11日～16日等）、より好ましくは少なくとも約12日（約12日～18日以上等）、又は14日超（約14日～19日等）の半減期を有し得る。

#### 【0280】

本発明の別の態様では、本発明のポリペプチドは、得られた本発明のポリペプチドが血液脳関門を横断するのを可能にする1つ又は複数（例えば2つ及び好ましくは1つ）のアミノ酸配列に連結する（任意で1つ又は複数の好適なリンカー配列を介して）、1つ又は複数（例えば2つ又は好ましくは1つ）の本発明のナノボディを含む。特に、得られた本発明のポリペプチドが血液脳関門を横断するのを可能にする上記1つ又は複数のアミノ酸配列は、1つ又は複数の（例えば2つ及び好ましくは1つ）ナノボディ、例えば、国際公開第02/057445号に記載のナノボディ（好ましい例は、FC44（国際公開第06/040153号の配列番号189）及びFC5（国際公開第06/040154号の配列番号190）である）であり得る。

#### 【0281】

特に、本発明のナノボディを1つ又は複数含むポリペプチドは、

$10^{-5}$  モル/L～ $10^{-12}$  モル/L以下、及び好ましくは $10^{-7}$  モル/L～ $10^{-12}$  モル/L以下、及びより好ましくは $10^{-8}$  モル/L～ $10^{-12}$  モル/Lの解離定数（ $K_D$ ）で（すなわち $10^5$  L/モル～ $10^{12}$  L/モル以上、及び好ましくは $10^7$  L/モル～ $10^{12}$  L/モル以上、及びより好ましくは $10^8$  L/モル～ $10^{12}$  L/モルの結合定数（ $K_A$ ）で）Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、Angptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に指向性を有しない）ナノボディを含む。

15、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2と結合するようなもの、及び／又は

$10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim \text{約} 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等)の $k_{on}$ 速度でT i e 1、T i e 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2と結合するようなもの、及び／又は

$1 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ )  $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは $10^{-2} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 等)の $k_{off}$ 速度でT i e 1、T i e 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2と結合するようなものであるのが好ましい。

#### 【0282】

好ましくは、本発明のアミノ酸配列を1つだけ含有するポリペプチドが、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満(500 pM未満等)の親和性T i e 1、T i e 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2と結合するようなものであるのが好ましい。これに対して、本発明のナノボディを2つ以上含有するポリペプチドは、本発明のアミノ酸配列を1つだけ含有するポリペプチドに比べて、増大した結合活性でT i e 1、T i e 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2と結合することができることが当業者には明らかである。

#### 【0283】

本発明のアミノ酸配列又はポリペプチドとT i e 1、T i e 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2との結合に関する幾つかの好ましい $IC_{50}$ 値は、本明細書のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

#### 【0284】

本発明の好ましいこの態様による他のポリペプチドは例えば、配列番号455～配列番号501、より好ましくは列番号455～配列番号457、配列番号459、配列番号460、及び配列番号464～配列番号469のアミノ酸配列の1つ又は複数と80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、例えば99%以上の「配列同一性」(本明細書で規定)を有するアミノ酸配列からなる群から選択され得る。該アミノ酸配列内に含まれるナノボディは、本明細書中にさらに規定されるようなものが好ましい。

#### 【0285】

本発明の別の態様は、本発明のナノボディをコードする核酸、又はこれを含む本発明のポリペプチドに関する。さらに、本発明の核酸に関して本明細書中に概して記載するように、このような核酸は、本明細書中に規定のように遺伝子構築物の形態であり得る。

#### 【0286】

別の態様では本発明は、本発明のナノボディ及び／又はこれを含む本発明のポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを発現するか、又は発現することができる、及び／又は本発明の核酸を含有する宿主又は宿主細胞に関する。このような宿主又は宿主細胞の幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0287】

本発明の別の態様は、少なくとも1つの本発明のナノボディと、少なくとも1つの本発明のポリペプチド及び／又は少なくとも1つの本発明の核酸と、任意で（すなわち組成物の使用目的に応じて）それ自体が既知のこのような組成物の1つ又は複数のさらなる構成要素とを含有するか又は含む生成物又は組成物に関する。このような生成物又は組成物は例えば、（本明細書に記載の）薬学的組成物、獣医学的組成物又は（同様に本明細書に記載の）診断用途のための生成物若しくは組成物であり得る。このような生成物又は組成物の幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

10

【0288】

本発明はさらに、本明細書中に記載のナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物を調製又は生成する方法に関する。このような方法の幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0289】

本発明はさらに、本明細書中に記載のナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物の適用及び使用、並びにTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に関連する疾患及び障害を予防及び／又は治療する方法に関する。幾つかの好ましいが非限定的な適用及び使用は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

20

【0290】

また本発明の他の態様、実施形態、利点及び用途は、本明細書の以下のさらなる記載から明らかになる。

【0291】

概して、最も広範な意味で本明細書で使用されるナノボディという用語は、特定の生物学的供給源又は特定の調製方法に限定されないことに留意すべきである。例えば、以下でより詳細に考察されるように、本発明のナノボディは概して、（1）天然の重鎖抗体のV<sub>H</sub>ドメインを単離することによって、（2）天然のV<sub>H</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列の発現によって、（3）天然V<sub>H</sub>ドメインの（本明細書に記載の）「ヒト化」によって、又はこのようなヒト化V<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸の発現によって、（4）任意の動物種、特に哺乳動物種（例えばヒト）由来の天然V<sub>H</sub>ドメインの（本明細書に記載の）「ラクダ化」によって、又はこのようなラクダ化V<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸の発現によって、（5）Ward et al（同上）によって記載されるような「ドメイン抗体」すなわち「Dab」の「ラクダ化」によって、又はこのようなラクダ化V<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸の発現によって、（6）それ自体が既知である、タンパク質、ポリペプチド又は他のアミノ酸配列を調製するのに合成技法又は半合成技法を使用することによって、（7）それ自体が既知である核酸合成技法を使用して、ナノボディをコードする核酸を調製した後、このようにして得られた核酸を発現することによって、及び／又は（8）上記の1つ又は複数の任意の組合せによって得ることができる。上記を実施するのに好適な方法及び技法は、本明細書中の開示に基づいて当業者にとって明らかであり、例えば本明細書でより詳細に記載される方法及び技法を含む。

30

40

【0292】

1つの好ましい群のナノボディは、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に指向性を有する天然重鎖抗体のV<sub>H</sub>ドメインに対応する。本明細書にさらに記載されるように、このよう

50

なV<sub>H H</sub>配列は概して、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2をラクダ科動物種に好適に（すなわち免疫応答及び／又はTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に指向性を有する重鎖抗体を産生するように）免疫付与することによって、上記ラクダ科動物由来の好適な生体試料（例えば血液試料、血清試料又はB細胞の試料）を得ることによって、及びそれ自体が既知の任意の好適な技法を使用して、上記試料からTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に指向性を有するV<sub>H H</sub>配列を生成することによって、生成又は入手することができる。このような技法は、当業者にとって明らかであり、及び／又は本明細書でさらに記載される。

10

## 【0293】

代替的に、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に対するこのような天然V<sub>H H</sub>ドメインは、例えばそれ自体が既知の1つ又は複数のスクリーニング技法を用いて、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2、又は少なくともその一部分、断片、抗原決定基若しくはエピトープを使用して、このようなライブラリをスクリーニングすることによってラクダ科動物のV<sub>H H</sub>配列のナイーブライブラリから得ることができる。このようなライブラリ及び技法は例えば、国際公開第99/37681号、国際公開第01/90190号、国際公開第03/025020号及び国際公開第03/035694号に記載されている。代替的に、ナイーブV<sub>H H</sub>ライブラリ由来の改良型の合成ライブラリ又は半合成ライブラリ（例えばランダム突然変異誘発及び／又はCDRシャッフリング（例えば国際公開第00/43507号に記載されているようなもの）等の技法によって、ナイーブV<sub>H H</sub>ライブラリから得られるV<sub>H H</sub>ライブラリ）を使用してもよい。

20

30

## 【0294】

このように、別の態様において、本発明は、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に指向性を有するナノボディを生成する方法に関する。一態様では、上記方法は少なくとも、

40

a) ナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリを準備する工程と、

b) Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはTie 2又はAng 2と結合することができる、及び／又はこれに対する親和性を有するナノボディ配列に関して、上記のナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程と、

c) Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、

50

より好ましくはT i e 2又はA n g 2と結合することができる、及び／又はこれに対する親和性を有するアミノ酸配列（複数可）を単離する工程とを含む。

【0295】

このような方法では、ナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリは、ナノボディ配列のナイーブセット、ナイーブコレクション又はナイーブライブラリ、ナノボディ配列の合成又は半合成のセット、コレクション又はライブラリ、及び／又は親和性成熟を受けているナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリであり得る。

【0296】

この方法の好ましい一態様では、ナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリは、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基（例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ）を好適に免疫付与したラクダ科動物種に由来している、ナノボディ配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリ、特にV<sub>H</sub>H配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリであり得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ（複数可）であり得る。

【0297】

上記の方法において、ナノボディ配列又はV<sub>H</sub>H配列のセット、コレクション又はライブラリは、スクリーニングを容易にするように、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（酵母等）上に提示してもよい。ナノボディ配列（のセット、コレクション又はライブラリ）を提示及びスクリーニングするのに好適な方法、技法及び宿主生物は、例えば本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかである。国際公開第03/054016号及びNature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116（2005）におけるHogenboomによるレビューも参照する。

【0298】

別の態様において、ナノボディ配列を生成する方法は、

a) 免疫グロブリン配列を発現するラクダ科動物種由来の細胞のコレクション又は試料を準備する工程と、

b) (i) T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2と結合することができる、及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を発現する細胞、(ii) 重鎖抗体を発現する細胞に関して上記細胞のコレクション又は試料をスクリーニングする工程であって、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2と結合することができる、及び／又はこれに対して親和性を有する重鎖抗体を発現する細胞を少なくとも1つ提供するように、本質的に単一のスクリーニング工程として、又は2つの別々のスクリーニング工程として任意の好適な順番で下位工程(i)及び(ii)を実施することができる、スクリーニングする工程と、

c) (i) 上記重鎖抗体に存在するV<sub>H</sub>H配列を上記細胞から単離する工程、又は(ii) 上記重鎖抗体に存在するV<sub>H</sub>H配列をコードする核酸配列を上記細胞から単離した後、上記V<sub>H</sub>Hドメインを発現する工程のいずれかとを少なくとも含む。

【0299】

この態様による方法において、細胞のコレクション又は試料は例えば、B細胞のコレクション又は試料であり得る。また、この方法では、細胞の試料は、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p



t13、Angpt14、Angpt15、又はAngpt16、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngpt14、より好ましくはTie2又はAng2、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基（例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ）を好適に免疫付与したラクダ科動物に由来し得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ（複数可）であり得る。

#### 【0300】

上記の方法は、当業者にとって明らかなように、任意の好適な方法で行われ得る。例えば欧州特許第0542810号、国際公開第05/19824号、国際公開第04/051268号及び国際公開第04/106377号を参照されたい。工程b)のスクリーニングは、FACS等のフローサイトメトリ法を使用して行うのが好ましい。これに関しては、例えばLieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820を参照する。特に、Ablynx N.V.による国際出願である国際公開第06/079372号で記載のいわゆる「ナノクロン（商標）」法を参照する。

#### 【0301】

別の態様において、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angpt11、Angpt12、Angpt13、Angpt14、Angpt15、又はAngpt16、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngpt14、より好ましくはTie2又はAng2に指向性を有するアミノ酸配列を生成する方法は、

a) 重鎖抗体又はナノボディ配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリを準備する工程と、

b) Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angpt11、Angpt12、Angpt13、Angpt14、Angpt15、又はAngpt16、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngpt14、より好ましくはTie2又はAng2と結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有する重鎖抗体又はナノボディ配列をコードする核酸配列に関して、上記核酸配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程と、

c) 上記核酸配列を単離し、その後それぞれ上記重鎖抗体に存在するV<sub>H</sub>H配列を発現するか、又は上記ナノボディ配列を発現する、単離する工程とを少なくとも含み得る。

#### 【0302】

このような方法では、重鎖抗体又はナノボディ配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリは例えば、重鎖抗体又はV<sub>H</sub>H配列のナイーブセット、ナイーブコレクション又はナイーブライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリ；ナノボディ配列の合成又は半合成のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリ；及び/又は親和性成熟を受けているナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリであり得る。

#### 【0303】

この方法の好ましい一態様では、アミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリは、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angpt11、Angpt12、Angpt13、Angpt14、Angpt15、又はAngpt16、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngpt14、より好ましくはTie2又はAng2、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基（例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ）を好適に免疫付与したラクダ科動物由来の重鎖抗体又はV<sub>H</sub>H配列をコードする核酸配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリであり得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ（複数可）であり得る。

#### 【0304】

上記の方法において、ヌクレオチド配列のセット、コレクション又はライブラリは、スクリーニングを容易にするように、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（例えば酵母）上に提示してもよい。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（のセット、コレクション又はライブラリ）を提示及びスクリーニングするのに好適な方法、技法及び宿主生物は、例えば本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかである。国際公開第03/054016号及びNature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)におけるHoogenboomによるレビューも参照する。

#### 【0305】

当業者にとって明らかなように、本明細書中に記載の方法のスクリーニング工程を選択工程として実施することもできる。したがって、本明細書で使用する「スクリーニング」という用語は、選択、スクリーニング、又は選択法及び/又はスクリーニング法の任意の好適な組合せを含むことができる。また、配列のセット、コレクション又はライブラリを使用する場合、これは、1個、2個、3個又は約5個、10個、50個、100個、500個、1000個、5000個、 $10^4$ 個、 $10^5$ 個、 $10^6$ 個、 $10^7$ 個、 $10^8$ 個以上の配列等の任意の好適な数の配列を含有し得る。

#### 【0306】

また、上記のアミノ酸配列のセット、コレクション又はライブラリにおける配列の1つ又は複数又は全ては、コンピュータモデリング法又は生物静力学法又はデータマイニング法等の合理的又は半経験的なアプローチで入手又は規定され得る。

#### 【0307】

さらに、このようなセット、コレクション又はライブラリは、自然に多様化した配列（例えば免疫ライブラリ）の多様なセットに由来する複数の配列を含む、（例えば、指定の点突然変異又はランダム化した位置を有する）互いの変異体である1つ、2つ以上の配列、又は任意の他の多様な配列源（例えばHoogenboom et al, Nat Biotechnol 23: 1105, 2005及びBinz et al, Nat Biotechnol 2005, 23: 1247に記載）を含み得る。配列のこのようなセット、コレクション又はライブラリは、ファージ粒子、リボソーム、細菌、酵母細胞、哺乳動物細胞の表面上に提示し、これらの担体内でアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に連結することができる。このことが、このようなセット、コレクション又はライブラリを、所望の本発明のアミノ酸配列を単離する選択法に従わせる。より一般的には、配列が好適な宿主又は宿主細胞上に提示される場合、初めに上記宿主又は宿主細胞から所望の配列をコードするヌクレオチド配列を単離した後、好適な宿主生物で上記ヌクレオチド配列を好適に発現することによって所望の配列を得ることも可能である（慣習になっている）。さらに、当業者にとって明らかなように、それ自体が既知の任意の好適な方法でこれを実施することができる。

#### 【0308】

Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に指向性を有する $V_{HH}$ 配列又はナノボディ配列を得るためのさらに別の技法は、（すなわち免疫応答及び/又はTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又はAng ptl 6、より好ましくはTie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng ptl 4、より好ましくはTie 2又はAng 2に指向性を有する重鎖抗体を生じるように）重鎖抗体を発現することができるトランスジェニック哺乳動物に好適に免疫付与すること、上記 $V_{HH}$ 配列又はナノボディ配列（をコードする核酸配列）を含有する上記トランスジェニック哺乳動物由来の好適な生体試料（例えば血液試料、血清試料又はB細胞の試料）を得ること、及びこれからそれ自体が既知の任意の好適な技法（本明細書で記載の方法又はハイブリドーマ法のいずれか等）を使用して、上記試料からTie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、又

はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に指向性を有するV<sub>H</sub>H配列を生成することを伴う。例えばこのために、国際公開第02/085945号、国際公開第04/049794号、国際公開第06/008548号及びJanssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Oct 10;103(41):15130-5に記載されている重鎖抗体発現マウス、並びにさらなる方法及び技法を使用することができる。例えば、このような重鎖抗体発現マウスは、天然源由来の(単一)可変ドメイン(例えばヒト(単一)可変ドメイン、ラクダ科動物(単一)可変ドメイン又はサメ(単一)可変ドメイン)及び例えば合成又は半合成の(単一)可変ドメイン等の任意の好適な(単一)可変ドメインを有する重鎖抗体を発現することができる。

10

#### 【0309】

本発明は、上記方法、又は代替的に上記の方法の1つと、さらに上記V<sub>H</sub>H配列又はナノボディ配列のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を決定する工程と、好適な宿主細胞若しくは宿主生物における発現又は化学合成のようなそれ自体が既知の方法で上記V<sub>H</sub>H配列又はナノボディ配列を発現又は合成する工程とを少なくとも含む方法によって得られるV<sub>H</sub>H配列又はナノボディ配列にも関する。

#### 【0310】

本明細書で言及されるように、特に好ましい群の本発明のナノボディは、天然V<sub>H</sub>Hドメインのアミノ酸配列に対応するが、すなわち上記天然V<sub>H</sub>H配列(特にフレームワーク配列)のアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸残基を、(例えば上記の)ヒト由来の通常の四本鎖抗体由来のV<sub>H</sub>ドメインの対応する位置(複数可)で発生する1つ又は複数のアミノ酸残基に置き換えることによって「ヒト化」したアミノ酸配列を有するナノボディを含む。例えば本明細書中のさらなる記載及び本明細書で言及されたヒト化に関する従来技術に基づいて、当業者にとって明らかなそれ自体が既知の方法で、これを実施することができる。また、このような本発明のヒト化ナノボディは、それ自体が既知の任意の好適な方法で(すなわち上記の(1)~(8)で示されたように)得ることができ、このため出発材料として天然V<sub>H</sub>Hドメインを含むポリペプチドを使用して得られたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意すべきである。

20

#### 【0311】

別の特に好ましい群の本発明のナノボディは、天然V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列に対応するが、すなわち通常の四本鎖抗体由来の天然V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸残基を、重鎖抗体のV<sub>H</sub>Hドメインの対応する位置(複数可)で発生する1つ又は複数のアミノ酸残基に置き換えることによって「ラクダ化」したアミノ酸配列を有するナノボディを含む。例えば本明細書中のさらなる記載に基づいて、当業者にとって明らかなそれ自体が既知の方法で、これを実施することができる。このような「ラクダ化」置換は、本明細書に規定のように、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>界面及び/又はいわゆるラクダ科動物の特徴的な残基を形成し、及び/又はV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>界面及び/又はいわゆるラクダ科動物の特徴的な残基に存在するアミノ酸位置に挿入するのが好ましい(例えば国際公開第94/04678号及びDavies and Riechmann(1994 and 1996)(同上)を参照されたい)。好ましくは、ラクダ化ナノボディを生成又は設計するための出発材料又は出発点として使用されるV<sub>H</sub>配列は、好ましくは哺乳動物由来のV<sub>H</sub>配列、より好ましくはヒトのV<sub>H</sub>配列(例えばV<sub>H</sub>3配列)である。しかし、このような本発明のラクダ化ナノボディは、それ自体が既知の任意の好適な方法で(すなわち上記の(1)~(8)で示されたように)得ることができ、このため出発材料として天然V<sub>H</sub>ドメインを含むポリペプチドを使用して得られたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意すべきである。

30

40

#### 【0312】

例えば同様に、本明細書にさらに記載されるように、それぞれ天然のV<sub>H</sub>Hドメイン又はV<sub>H</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列を準備した後、それ自体が既知の方法で、新規のヌクレオチド配列がそれぞれ、本発明の「ヒト化」又は「ラクダ化」ナノボディをコードするように、上記ヌクレオチド配列における1つ又は複数のコドンを変えることに

50

よって、「ヒト化」及び「ラクダ化」の両方を行うことができる。次にこの核酸は、所望の本発明のナノボディを提供するようにそれ自体が既知の方法で発現することができる。代替的に、それぞれ天然の $V_{HH}$ ドメイン又は $V_H$ ドメインのアミノ酸配列に基づき、それぞれ所望の本発明のヒト化又はラクダ化ナノボディのアミノ酸配列を設計した後、それ自体が既知のペプチド合成技法を使用して $de novo$ で合成することができる。また、それぞれ天然の $V_{HH}$ ドメイン又は $V_H$ ドメインのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列に基づき、それぞれ所望の本発明のヒト化又はラクダ化ナノボディをコードするヌクレオチド配列を設計した後、それ自体が既知の核酸合成技法を使用して $de novo$ で合成することができ、その後所望の本発明のナノボディを提供するように、それ自体が既知の方法で、このようにして得られた核酸を発現することができる。

10

#### 【0313】

天然 $V_H$ 配列又は好ましくは $V_{HH}$ 配列から、本発明のナノボディ及び／又はこれをコードする核酸を得るのに好適な他の方法及び技法は、当業者にとって明らかであり、例えば本発明のナノボディ、又はこれをコードするヌクレオチド配列若しくは核酸を提供するように好適な方法で、1つ又は複数の天然 $V_H$ 配列（例えば1つ又は複数のFR配列及び／又はCDR配列）の一部分又は複数部分、1つ又は複数の天然 $V_{HH}$ 配列（例えば1つ又は複数のFR配列又はCDR配列）の一部分又は複数部分、及び／又は1つ又は複数の合成又は半合成の配列を組み合わせることを含み得る（したがって適切に発現することができる）。 $V_{HH}$ 配列又はナノボディのフレームワーク配列をコードするヌクレオチド配列は、本明細書中の開示及び／又は本明細書中で言及したさらなる従来技術に基づき、当業者にとって明らかであり（及び／又は代替的に本明細書中に記載の方法を使用して得られたヌクレオチド配列からPCRによって入手され得る）、本発明のナノボディをコードする核酸を提供するように、（例えば重複プライマーを使用したPCRアセンブリによって）所望のCDRをコードするヌクレオチド配列と好適に組み合わせ得る。

20

#### 【0314】

本明細書中に言及されるように、ナノボディは特に、1つ又は複数のフレームワーク配列における1つ又は複数の「特徴的な残基」（本明細書中に記載）の存在を特徴とし得る。

#### 【0315】

したがって、好ましいが、本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは概して、最も広範な意味で

30

a) 3つの相補性決定領域／配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域／配列から構成されるアミノ酸配列（カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQである）、及び／又は

b) 3つの相補性決定領域／配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域／配列から構成されるアミノ酸配列（カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、（本明細書に規定の）荷電アミノ酸又はシステイン残基であり、44位のアミノ酸残基はEであるのが好ましい）、及び／又は

c) 3つの相補性決定領域／配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域／配列から構成されるアミノ酸配列（カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はP、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択される）を含む、ポリペプチドと定義することができる。

40

#### 【0316】

したがって好ましいが非限定的な第1の態様において、本発明のナノボディは、構造：  
FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4  
（ここで、FR1～FR4はそれぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す）を有し得る；ここで

a) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであり、及び／又は

b) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、荷電アミノ酸又はシステイ

50

ンであり、カバットナンバリングによる 4 4 位のアミノ酸残基は E であるのが好ましく、及び / 又は

c) カバットナンバリングによる 1 0 3 位のアミノ酸残基は P、R 及び S からなる群から選択され、特に R 及び S からなる群から選択され、

d) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

#### 【 0 3 1 7 】

特に、ナノボディは概して、最も広範な意味で

a) 3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列 ( カバットナンバリングによる 1 0 8 位のアミノ酸残基は Q である )、及び / 又は

b) 3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列 ( カバットナンバリングによる 4 4 位のアミノ酸残基は E であり、カバットナンバリングによる 4 5 位のアミノ酸残基は R である )、及び / 又は

c) 3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列 ( カバットナンバリングによる 1 0 3 位のアミノ酸残基は P、R 及び S からなる群から選択され、特に R 及び S からなる群から選択される ) を含む、ポリペプチドと定義することができる。

#### 【 0 3 1 8 】

したがって好ましいが非限定的な一態様によれば、本発明のナノボディは、構造 :

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

( ここで、F R 1 ~ F R 4 はそれぞれフレームワーク領域 1 ~ フレームワーク領域 4 を指し、C D R 1 ~ C D R 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す ) を有し得る ; ここで

a) カバットナンバリングによる 1 0 8 位のアミノ酸残基は Q であり、及び / 又は

b) カバットナンバリングによる 4 4 位のアミノ酸残基は E であり、カバットナンバリングによる 4 5 位のアミノ酸残基は R であり、及び / 又は

c) カバットナンバリングによる 1 0 3 位のアミノ酸残基は P、R 及び S からなる群から選択され、特に R 及び S からなる群から選択され、

d) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

#### 【 0 3 1 9 】

特に本発明による T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又は A n g p t l 6、より好ましくは T i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又は A n g p t l 4、より好ましくは T i e 2 又は A n g 2 に対するナノボディは、構造 :

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

( ここで、F R 1 ~ F R 4 はそれぞれフレームワーク領域 1 ~ フレームワーク領域 4 を指し、C D R 1 ~ C D R 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す ) を有し得る ; ここで

a) カバットナンバリングによる 1 0 8 位のアミノ酸残基は Q であり、及び / 又は

b) カバットナンバリングによる 4 4 位のアミノ酸残基は E であり、カバットナンバリングによる 4 5 位のアミノ酸残基は R であり、及び / 又は

c) カバットナンバリングによる 1 0 3 位のアミノ酸残基は P、R 及び S からなる群から選択され、特に R 及び S からなる群から選択され、

d) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

## 【0320】

特に、好ましいが、本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは概して、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと定義することができ、

a - 1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、G、Q、R、S、Lからなる群から選択され、好ましくはG、E若しくはQからなる群から選択され、

a - 2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、L、R若しくはCからなる群から選択され、好ましくはL若しくはRからなる群から選択され、

a - 3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、W、R若しくはSからなる群から選択され、好ましくはW若しくはRであり、最も好ましくはWであり、

a - 4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであるか、又は

b - 1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、E及びQからなる群から選択され、

b - 2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基はRであり、

b - 3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、W、R及びSからなる群から選択され、好ましくはWであり、

b - 4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQ及びLからなる群から選択され、好ましくはQであるか、又は

c - 1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、Q、R、S及びLからなる群から選択され、好ましくはG、E及びQからなる群から選択され、

c - 2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、L、R及びCからなる群から選択され、好ましくはL及びRからなる群から選択され、

c - 3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、P、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択され、

c - 4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQ及びLからなる群から選択され、好ましくはQであり、かつ

d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

## 【0321】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

(ここで、FR1 ~ FR4はそれぞれフレームワーク領域1 ~ フレームワーク領域4を指し、CDR1 ~ CDR3はそれぞれ相補性決定領域1 ~ 相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

a - 1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、G、Q、R、S、Lからなる群から選択され、好ましくはG、E若しくはQからなる群から選択され、

a - 2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、L、R若しくはCからなる群から選択され、好ましくはL若しくはRからなる群から選択され、

a - 3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、W、R若しくはSからなる群から選択され、好ましくはW若しくはRであり、最も好ましくはWであり、

a - 4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであり、かつ

d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

## 【0322】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：

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

(ここで、FR1～FR4はそれぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

b - 1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、E及びQからなる群から選択され、

b - 2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基はRであり、

b - 3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、W、R及びSからなる群から選択され、好ましくはWであり、

b - 4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQ及びLからなる群から選択され、好ましくはQであり、かつ

d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

#### 【0323】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：

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

(ここで、FR1～FR4はそれぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

c - 1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、Q、R、S及びLからなる群から選択され、好ましくはG、E及びQからなる群から選択され、

c - 2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、L、R及びCからなる群から選択され、好ましくはL及びRからなる群から選択され、

c - 3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、P、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択され、

c - 4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQ及びLからなる群から選択され、好ましくはQであり、かつ

d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

#### 【0324】

2つの特に好ましいが非限定的な本発明のナノボディ群は、上記のa)、上記の(a - 1)～(a - 4)、上記のb)、上記の(b - 1)～(b - 4)、上記の(c)、及び/又は上記の(c - 1)～(c - 4)によるものであり、

i) カバットナンバリングによる44位～47位のアミノ酸残基は、配列GLEW(又は本明細書に記載のGLEW様配列)を形成し、108位のアミノ酸残基はQであるか、又は

ii) カバットナンバリングによる43位～46位のアミノ酸残基は、配列KERE又は配列KQRE(又は記載されるようなKERE様配列)を形成し、108位のアミノ酸残基はQ又はLであり、好ましくはQである。

#### 【0325】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：

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

(ここで、FR1～FR4はそれぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

i) カバットナンバリングによる44位～47位のアミノ酸残基は、配列GLEW(又は本明細書に記載のGLEW様配列)を形成し、108位のアミノ酸残基はQであり、か

10

20

30

40

50

つ

i i) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【 0 3 2 6 】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：

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

(ここで、F R 1 ~ F R 4 はそれぞれフレームワーク領域 1 ~ フレームワーク領域 4 を指し、C D R 1 ~ C D R 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有し得る；ここで

i) カバットナンバリングによる 4 3 位 ~ 4 6 位のアミノ酸残基は、配列 K E R E 又は配列 K Q R E (又は K E R E 様配列) を形成し、1 0 8 位のアミノ酸残基は Q 又は L であり、好ましくは Q であり、かつ

i i) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【 0 3 2 7 】

カバットナンバリングによる 4 3 位 ~ 4 6 位のアミノ酸残基が、配列 K E R E 又は配列 K Q R E を形成する、本発明のナノボディにおいて、3 7 位のアミノ酸残基が F であるのが最も好ましい。カバットナンバリングによる 4 4 位 ~ 4 7 位のアミノ酸残基が、配列 G L E W を形成する、本発明のナノボディにおいて、3 7 位のアミノ酸残基は、Y、H、I、L、V 又は F からなる群から選択され、V であるのが最も好ましい。

【 0 3 2 8 】

したがって、決してこれらには限定されないが、上記で言及された位置に存在するアミノ酸残基に基づき、概して本発明のナノボディを以下の 3 つの群に基づいて分類することができる：

i) 「G L E W 群」：カバットナンバリングによる 4 4 位 ~ 4 7 位にアミノ酸配列 G L E W、及びカバットナンバリングによる 1 0 8 位に Q を有するナノボディ。本明細書でさらに記載されるように、この群内のナノボディは通常、3 7 位に V を有し、1 0 3 位に W、P、R 又は S を有することができ、好ましくは 1 0 3 位に W を有する。G L E W 群は、以下の表 A - 3 で言及されるもののような幾つかの G L E W 様配列も含む。より一般的には、これに限定されないが、G L E W 群に属するナノボディは、4 4 位に G、及び / 又は 4 7 位に W を有し、4 6 位は通常 E であり、好ましくは 4 5 位が荷電アミノ酸残基でもシステインでもないナノボディと定義することができる。

i i) 「K E R E 群」：カバットナンバリングによる 4 3 位 ~ 4 6 位にアミノ酸配列 K E R E 又は K Q R E (又は別の K E R E 様配列)、及びカバットナンバリングによる 1 0 8 位に Q 又は L を有するナノボディ。本明細書でさらに記載されるように、この群内のナノボディは通常、3 7 位に F、及び 4 7 位に L 又は F を有し、1 0 3 位に W、P、R 又は S を有することができ、好ましくは 1 0 3 位に W を有する。より一般的には、これに限定されないが、K E R E 群に属するナノボディは、4 4 位に K、Q 又は R (通常 K) を有し、4 5 位が荷電アミノ酸残基又はシステインであり、4 7 位が本明細書でさらに規定されるようなものであるナノボディと定義することができる。

i i i) 「1 0 3 P、R、S 群」：1 0 3 位に P、R 又は S を有するナノボディ。これらのナノボディは、カバットナンバリングによる 4 4 位 ~ 4 7 位にアミノ酸配列 G L E W、又はカバットナンバリングによる 4 3 位 ~ 4 6 位にアミノ酸配列 K E R E 又はアミノ酸配列 K Q R E のいずれかを有することができ(後者は、(K E R E 群に関して規定のように) 3 7 位の F、及び 4 7 位の L 又は F と組合せるのが最も好ましい)、カバットナンバリングによる 1 0 8 位に Q 又は L を有することができ、Q を有するのが好ましい。

【 0 3 2 9 】

また必要に応じて、ナノボディは、2 つ以上のこれらの群に属し得る(すなわちこれら

10

20

30

40

50



の特徴を有し得る)。例えば、1つの特に好ましいナノボディ群は、44位～47位にGLEW又はGLEW様配列、103位にP、R又はS(特にR)、及び108位にQ(Lへとヒト化してもよい)を有する。

#### 【0330】

より一般的には、上記に言及される定義が、天然(すなわち非ヒト化) $V_{HH}$ 配列の形態のナノボディを説明し、またこれに当てはまること、及びこれらのナノボディのヒト化変異体は、上記のもの以外のアミノ酸残基(すなわち本明細書中に規定の1つ又は複数のヒト化置換)を含有し得ることに留意されたい。例えばこれに限定されないが、GLEW群又は103P、R、S群の幾つかのヒト化ナノボディにおいて、108位のQは、108Lにヒト化し得る。本明細書中に既に言及されたように、他のヒト化置換(及びその好適な組合せ)は、本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかであろう。付加的に又は代替的に、天然の $V_{HH}$ 配列のフレームワーク領域の配列を、1つ又は複数の密接に関連するヒト $V_H$ 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、他の潜在的に有用なヒト化置換を確認することができ、その後(本明細書中にさらに記載のように、それ自体が既知の任意の方法で)このようにして求めた、潜在的に有用なヒト化置換(又はその組合せ)の1つ又は複数を上記 $V_{HH}$ 配列に導入することができ、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル、及び/又は他の所望の特性に関して、得られたヒト化 $V_{HH}$ 配列を試験することができる。このようにして、限定的な試行錯誤によって、本明細書中の開示に基づき当業者によって、他の好適なヒト化置換(又はその好適な組合せ)を求めることができる。また、上記に基づき、ナノボディ(のフレームワーク領域)を部分ヒト化又は完全ヒト化してもよい。

#### 【0331】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、(本明細書に規定のように)GLEW群に属するナノボディであってもよく、その中のCDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

#### 【0332】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、(本明細書に規定のように)KERE群に属するナノボディであってもよく、CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

#### 【0333】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、(本明細書に規定のように)103P、R、S群に属するナノボディであってもよく、その中のCDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

#### 【0334】

また、より一般的には、上記で言及された108Q、43E/44R及び103P、R、S残基の他に、本発明のナノボディは、通常の $V_H$ ドメインで $V_H/V_L$ 界面(の一部)が形成される1つ又は複数の位置で、対応する天然 $V_H$ 配列における同じ位置(複数可)で自然発生するアミノ酸残基よりも強く荷電する、1つ又は複数のアミノ酸残基、特に(表A-2で言及される)1つ又は複数の荷電アミノ酸残基を含有することができる。このような置換としては、これらに限定されないが、以下の表A-3で言及されるGLEW様配列、及び例えば44位～47位のKLEWと共に108位にQを有するナノボディを得るために、いわゆる「マイクロボディ」に関して国際出願の国際公開第00/29004号で説明される置換が挙げられる。これらの位置での他の可能性のある置換は、本明細書中の開示に基づいて当業者にとって明らかである。

## 【 0 3 3 5 】

本発明のナノボディの一態様において、83位のアミノ酸残基は、L、M、S、V及びWからなる群から選択され、Lであるのが好ましい。

## 【 0 3 3 6 】

また、本発明のナノボディの一態様において、83位のアミノ酸残基は、R、K、N、E、G、I、T及びQからなる群から選択され、(天然V<sub>H</sub>Hドメインに対応するナノボディに関しては)K若しくはE、又は(本明細書に記載の「ヒト化」ナノボディに関しては)Rのいずれかであるのが最も好ましい。一態様では、84位のアミノ酸残基は、P、A、R、S、D、T及びVからなる群から選択され、(天然V<sub>H</sub>Hドメインに対応するナノボディに関しては)P、又は(本明細書に記載の「ヒト化」ナノボディに関しては)Rであるのが最も好ましい。

10

## 【 0 3 3 7 】

さらに本発明のナノボディの一態様において、104位のアミノ酸残基は、G及びDからなる群から選択され、Gであるのが最も好ましい。

## 【 0 3 3 8 】

まとめると、ナノボディにおいて上記で言及される、11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基は、本明細書で「特徴的な残基」とも称される。特徴的な残基及び最も密接に関連したヒトV<sub>H</sub>ドメイン(V<sub>H</sub>3)の対応する位置のアミノ酸残基を表A-3に要約する。

## 【 0 3 3 9 】

20

幾つかの特に好ましいが非限定的な天然V<sub>H</sub>Hドメインで生じるこれらの特徴的な残基の組合せを表A-4で言及する。比較のために、DP-47と呼ばれるヒトV<sub>H</sub>3の対応するアミノ酸残基をイタリック体で示している。

## 【 0 3 4 0 】

表A-3：ナノボディにおける特徴的な残基

【表 3】

位置	ヒトV <sub>H</sub> 3	特徴的な残基
1 1	L、V、主にL	L、M、S、V、W、好ましくはL
3 7	V、I、F、通常V	F <sup>(1)</sup> 、Y、H、I、L又はV、好ましくはF <sup>(1)</sup> 又はY
4 4 <sup>(8)</sup>	G	G <sup>(2)</sup> 、E <sup>(3)</sup> 、A、D、Q、R、S、L、好ましくはG <sup>(2)</sup> 、E <sup>(3)</sup> 又はQ、最も好ましくはG <sup>(2)</sup> 又はE <sup>(3)</sup>
4 5 <sup>(8)</sup>	L	L <sup>(2)</sup> 、R <sup>(3)</sup> 、C、I、L、P、Q、V、好ましくはL <sup>(2)</sup> 又はR <sup>(3)</sup>
4 7 <sup>(8)</sup>	W、Y	W <sup>(2)</sup> 、L <sup>(1)</sup> 又はF <sup>(1)</sup> 、A、G、I、M、R、S、V又はY、好ましくはW <sup>(2)</sup> 、L <sup>(1)</sup> 、F <sup>(1)</sup> 又はR
8 3	R又はK、通常R	R、K <sup>(5)</sup> 、N、E <sup>(5)</sup> 、G、I、M、Q又はT、好ましくはK又はR、最も好ましくはK
8 4	A、T、D、主にA	P <sup>(5)</sup> 、A、L、R、S、T、D、V、好ましくはP
1 0 3	W	W <sup>(4)</sup> 、P <sup>(6)</sup> 、R <sup>(6)</sup> 、S、好ましくはW
1 0 4	G	G又はD、好ましくはG
1 0 8	L、M又はT、主にL	Q、L <sup>(7)</sup> 又はR、好ましくはQ又はL <sup>(7)</sup>

脚注：

(1) 具体的ではあるが、排他的ではなく、4 3位～4 6位はKERE又はKQREとの組合せである。

(2) 通常4 4位～4 7位はGLEWである。

(3) 通常4 3位～4 6位はKERE又はKQREであり、例えば4 3位～4 7位はKEREL、KEREF、KQREL、KQREF、又はKEREGである。代替的に、TERE (例えばTEREL)、KECE (例えばKECEL又はKECER)、RERE (例えばREREG)、QERE (例えばQEREG)、KGRE (例えばKGREG)、KDRE (例えばKDREV) 等の配列も可能である。幾つかの他の可能であるがあまり好ましくない配列としては例えば、DECKL及びNVCELが挙げられる。

(4) 4 4位～4 7位にGLEW、及び4 3位～4 6位にKERE又はKQREの両方を有する。

(5) 天然V<sub>HH</sub>ドメインの8 3位、8 4位はKP又はEPであることが多い。

(6) 具体的ではあるが、排他的ではなく、4 4位～4 7位はGLEWとの組合せである。

(7) 4 4位～4 7位がGLEWである場合、また1 0 3位にWを含有する (非ヒト化) V<sub>HH</sub>配列における1 0 8位は常にQであることが条件である。

(8) GLEW群は、4 4位～4 7位にGLEW様配列 (例えばGVEW、EPEW、GLER、DQEW、DLEW、GIEW、ELEW、GPEW、EWLP、GPER、GLER及びELEW) も含有する。

10

20

30

## 【0 3 4 1】

表A - 4：天然ナノボディにおける特徴的な残基の幾つかの好ましいが非限定的な組合せ  
これらの組合せのヒト化に関しては、明細書を参照する

【表 4】

	1 1	3 7	4 4	4 5	4 7	8 3	8 4	1 0 3	1 0 4	1 0 8
D P - 4 7 (ヒト)	M	V	G	L	W	R	A	W	G	L
「K E R E」群	L	F	E	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	E	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
	L	Y	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	L	R	V	K	P	Q	G	Q
	L	F	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
「G L E W」群	L	V	G	L	W	K	S	W	G	Q
	M	V	G	L	W	K	P	R	G	Q

10

## 【 0 3 4 2 】

ナノボディにおいて、特徴的な残基以外の任意の位置の各アミノ酸残基は、天然  $V_{HH}$  ドメインの（カバットナンバリングによる）対応する位置で自然発生する任意のアミノ酸残基であり得る。

## 【 0 3 4 3 】

このようなアミノ酸残基は当業者にとって明らかである。表 A - 5 ~ 表 A - 8 は、天然  $V_{HH}$  ドメインの F R 1、F R 2、F R 3 及び F R 4 の（カバットナンバリングによる）それぞれの位置に存在し得る幾つかの非限定的な残基を表す。それぞれの位置に関しては、天然  $V_{HH}$  ドメインのそれぞれの位置で最も頻繁に発生する（ナノボディにおける上記位置に最も好ましいアミノ酸残基である）アミノ酸残基を太字で示し、それぞれの位置で好ましい他のアミノ酸残基を下線処理する（備考：天然  $V_{HH}$  ドメインの 26 位 ~ 30 位で見られるアミノ酸残基の数字は、これらの位置の残基が既に C D R 1 部分を形成しているという Chothia（同上）によるナンバリングの基礎をなす仮説を支持する）。

20

## 【 0 3 4 4 】

表 A - 5 ~ 表 A - 8 では、ヒト  $V_H$  3 ドメインのそれぞれの位置に存在し得る非限定的な残基の幾つかも表している。また、それぞれの位置に関しては、天然ヒト  $V_H$  3 ドメインのそれぞれの位置で最も頻繁に発生するアミノ酸残基を太字で示し、他の好ましいアミノ酸残基を下線処理する。

30

## 【 0 3 4 5 】

参考のためのために、表 A - 5 ~ 表 A - 8 は、1 1 1 8 個の  $V_{HH}$  配列の代表的な試料におけるそれぞれのアミノ酸位置で  $V_{HH}$  エントロピー（「 $V_{HH}$  Ent .」）及び  $V_{HH}$  変動性（「 $V_{HH}$  Var .」）に関するデータ（Utrecht University の David Lutje Hulasing 及び Prof. Theo Verrips によって無償（kindly）提供されたデータ）も含有する。 $V_{HH}$  エントロピー及び  $V_{HH}$  変動性の値は、解析する 1 1 1 8 個の  $V_{HH}$  配列間のアミノ酸残基の変動性及び保存度に対する評価基準を与え、低い値（すなわち 1 未満、例えば 0 . 5 未満）は、アミノ酸残基が、 $V_{HH}$  配列間で強く保存される（すなわちほとんど変動性がない）ことを示す。例えば、8 位の G 及び 9 位の G はそれぞれ、0 . 1 及び 0 の  $V_{HH}$  エントロピー値を有し、これは（解析する 1 1 1 8 個の配列全てにおいて 9 位が G である場合）これらの残基が強く保存され、ほとんど変動しないことを示す一方で、C D R 部分を形成する残基に関しては概して、1 . 5 以上の値が見られる（データ図示せず）。（1）表 A - 5 ~ 表 A - 8 の 2 列目に列挙されるアミノ酸残基は、後の 2 列で言及される  $V_{HH}$  エントロピー及び  $V_{HH}$  変動性を決定するのに解析された 1 1 1 8 個の  $V_{HH}$  配列よりも大きい試料に基づいており、（2）以下で表すデータは、27 位 ~ 30 位のアミノ酸残基、並びにおそらく 93 位及び 94 位のアミノ酸残基でさえも既に C D R 部分を形成しているという仮説を支持することに留意されたい（しかしながら、本発明は任意の特定の仮説又は説明に限定されず、上記のように、本明細書ではカバットによるナンバリングを使用する）。配列エントロピー、配列変動性及びこれを決定する方法の一般的説明に

40

50

関しては、Oliveira et al., PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 52:544-552 (2003) を参照されたい。

【 0 3 4 6 】

表 A - 5 : F R 1 におけるアミノ酸残基の非限定的な例 ( 脚注に関しては、表 A - 3 の脚注を参照する )

【表 5】

位置	アミノ酸残基 ( 複数可 )		V <sub>HH</sub> E n t .	V <sub>HH</sub> V a r .
	ヒト V <sub>H</sub> 3	ラクダ科動物 V <sub>HH</sub>		
1	E、 <u>Q</u>	Q、A、E	—	—
2	V	V	0 . 2	1
3	Q	Q、K	0 . 3	2
4	L	L	0 . 1	1
5	V、L	Q、E、L、V	0 . 8	3
6	E	E、D、Q、A	0 . 8	4
7	S、T	S、F	0 . 3	2
8	G、R	G	0 . 1	1
9	G	G	0	1
1 0	G、V	G、D、R	0 . 3	2
1 1	特徴的な残基 : L、M、S、V、W、好ましくは L		0 . 8	2
1 2	V、I	V、A	0 . 2	2
1 3	Q、K、R	Q、E、K、P、R	0 . 4	4
1 4	P	A、 <u>Q</u> 、A、G、P、S、T、V	1	5
1 5	G	G	0	1
1 6	G、 <u>R</u>	G、A、E、D	0 . 4	3
1 7	S	S、 <u>F</u>	0 . 5	2
1 8	L	L、V	0 . 1	1
1 9	R、K	R、K、L、N、S、T	0 . 6	4
2 0	L	L、 <u>F</u> 、I、V	0 . 5	4
2 1	S	S、A、F、T	0 . 2	3
2 2	C	C	0	1
2 3	A、T	A、D、E、P、S、T、V	1 . 3	5
2 4	A	A、I、L、S、T、V	1	6
2 5	S	S、A、F、P、T	0 . 5	5
2 6	G	G、A、D、E、R、S、T、V	0 . 7	7
2 7	F	S、F、R、L、P、G、N	2 . 3	1 3
2 8	T	N、T、E、D、S、I、R、A、G、R、F、Y	1 . 7	1 1
2 9	F、 <u>V</u>	F、L、D、S、I、G、V、A	1 . 9	1 1
3 0	S、 <u>D</u> 、G	N、S、E、G、A、D、M、T	1 . 8	1 1

【 0 3 4 7 】

表 A - 6 : F R 2 におけるアミノ酸残基の非限定的な例 ( 脚注に関しては、表 A - 3 の脚注を参照する )

【表 6】

位置	アミノ酸残基（複数可）		V <sub>HH</sub> E n t .	V <sub>HH</sub> V a r .
	ヒト V <sub>H</sub> 3	ラクダ科動物 V <sub>HH</sub>		
3 6	W	W	0 . 1	1
3 7	特徴的な残基：F <sup>(1)</sup> 、H、I、L、Y又はV、好ましくはF <sup>(1)</sup> 又はY		1 . 1	6
3 8	R	R	0 . 2	1
3 9	Q	Q、H、P、R	0 . 3	2
4 0	A	A、F、G、L、P、T、V	0 . 9	7
4 1	P、S、T	P、A、L、S	0 . 4	3
4 2	G	G、E	0 . 2	2
4 3	K	K、D、E、N、Q、R、T、V	0 . 7	6
4 4	特徴的な残基：G <sup>(2)</sup> 、E <sup>(3)</sup> 、A、D、Q、R、S、L、好ましくはG <sup>(2)</sup> 、E <sup>(3)</sup> 又はQ、最も好ましくはG <sup>(2)</sup> 又はE <sup>(3)</sup>		1 . 3	5
4 5	特徴的な残基：L <sup>(2)</sup> 、R <sup>(3)</sup> 、C、I、L、P、Q、V、好ましくはL <sup>(2)</sup> 又はR <sup>(3)</sup>		0 . 6	4
4 6	E、V	E、D、K、Q、V	0 . 4	2
4 7	特徴的な残基：W <sup>(2)</sup> 、L <sup>(1)</sup> 又はF <sup>(1)</sup> 、A、G、I、M、R、S、V又はY、好ましくはW <sup>(2)</sup> 、L <sup>(1)</sup> 、F <sup>(1)</sup> 又はR		1 . 9	9
4 8	V	V、I、L	0 . 4	3
4 9	S、 <u>A</u> 、 <u>G</u>	A、 <u>S</u> 、G、T、V	0 . 8	3

10

20

【 0 3 4 8 】

表 A - 7 : F R 3 におけるアミノ酸残基の非限定的な例（脚注に関しては、表 A - 3 の脚注を参照する）

【表 7】

位置	アミノ酸残基（複数可）		V <sub>HH</sub> E n t .	V <sub>HH</sub> V a r .
	ヒト V <sub>H</sub> 3	ラクダ科動物 V <sub>HH</sub>		
6 6	R	R	0 . 1	1
6 7	F	F、L、V	0 . 1	1
6 8	T	T、A、N、S	0 . 5	4
6 9	I	I、L、M、V	0 . 4	4
7 0	S	S、A、F、T	0 . 3	4
7 1	R	R、G、H、I、L、K、Q、S、T、W	1 . 2	8
7 2	D、E	D、E、G、N、V	0 . 5	4
7 3	N、 <u>D</u> 、G	N、A、D、F、I、K、L、R、S、T、V、Y	1 . 2	9
7 4	A、S	A、D、G、N、P、S、T、V	1	7
7 5	K	K、A、E、K、L、N、Q、R	0 . 9	6
7 6	N、S	N、D、K、R、S、T、Y	0 . 9	6
7 7	<u>S</u> 、 <u>T</u> 、I	T、A、E、I、M、P、S	0 . 8	5
7 8	L、A	V、 <u>L</u> 、A、F、G、I、M	1 . 2	5
7 9	Y、H	Y、A、D、F、H、N、S、T	1	7
8 0	L	L、F、V	0 . 1	1
8 1	Q	Q、E、I、L、R、T	0 . 6	5
8 2	M	M、I、L、V	0 . 2	2
8 2 a	N、G	N、D、G、H、S、T	0 . 8	4
8 2 b	S	S、 <u>N</u> 、D、G、R、T	1	6
8 2 c	L	L、P、V	0 . 1	2
8 3	特徴的な残基：R、K <sup>(5)</sup> 、N、E <sup>(5)</sup> 、G、I、M、Q又はT、好ましくはK又はR、最も好ましくはK		0 . 9	7
8 4	特徴的な残基：P <sup>(5)</sup> 、A、D、L、R、S、T、V、好ましくはP		0 . 7	6
8 5	E、G	E、D、G、Q	0 . 5	3
8 6	D	D	0	1
8 7	T、M	T、A、S	0 . 2	3
8 8	A	A、 <u>G</u> 、S	0 . 3	2
8 9	V、L	V、A、D、I、L、M、N、R、T	1 . 4	6
9 0	Y	Y、F	0	1
9 1	Y、H	Y、D、F、H、L、S、T、V	0 . 6	4
9 2	C	C	0	1
9 3	A、K、T	A、 <u>N</u> 、G、H、K、N、R、S、T、V、Y	1 . 4	1 0
9 4	K、R、T	A、 <u>V</u> 、C、F、G、I、K、L、R、S又はT	1 . 6	9

【 0 3 4 9 】

表 A - 8 : F R 4 におけるアミノ酸残基の非限定的な例（脚注に関しては、表 A - 3 の脚注を参照する）

【表 8】

位置	アミノ酸残基（複数可）		V <sub>HH</sub> E n t .	V <sub>HH</sub> V a r .
	ヒト V <sub>H</sub> 3	ラクダ科動物 V <sub>HH</sub>		
1 0 3	特徴的な残基：W <sup>(4)</sup> 、P <sup>(6)</sup> 、R <sup>(6)</sup> 、S、好ましくはW		0 . 4	2
1 0 4	特徴的な残基：G又はD、好ましくはG		0 . 1	1
1 0 5	Q、 <u>R</u>	Q、E、K、P、R	0 . 6	4
1 0 6	G	G	0 . 1	1
1 0 7	T	T、A、I	0 . 3	2
1 0 8	特徴的な残基：Q、L <sup>(7)</sup> 又はR、好ましくはQ又はL <sup>(7)</sup>		0 . 4	3
1 0 9	V	V	0 . 1	1
1 1 0	T	T、I、A	0 . 2	1
1 1 1	V	V、A、I	0 . 3	2
1 1 2	S	S、F	0 . 3	1
1 1 3	S	S、A、L、P、T	0 . 4	3

## 【 0 3 5 0 】

このように、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、（一般）構造：

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

（ここで、FR1～FR4はそれぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す）を有するアミノ酸配列として規定することができ、ここで

i) カバットナンバリングによる11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数が、表A-3で言及される特徴的な残基から選択され、

ii) CDR1、CDR2及びCDR3が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

## 【 0 3 5 1 】

上記ナノボディは例えば、V<sub>H H</sub>配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列がV<sub>H H</sub>配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

## 【 0 3 5 2 】

特に、本発明のナノボディは、（一般）構造：

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

（ここで、FR1～FR4はそれぞれフレームワーク領域1～フレームワーク領域4を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す）を有するアミノ酸配列である可能性があり、ここで

i) カバットナンバリングによる11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位の（好ましくは）アミノ酸残基の1つ又は複数が、表A-3で言及される特徴的な残基から選択され（V<sub>H H</sub>配列が特徴的な残基を1つ又は複数含有すること、並びに部分ヒト化ナノボディが通常及び好ましくは[依然として]特徴的な残基を1つ又は複数含有すること[しかしながら、本発明に応じて好適であれば、1つ又は複数の他のアミノ酸残基ではなく、全ての特徴的な残基がヒト化した部分ヒト化ナノボディを提供することも本発明の範囲内である]、並びに本発明に応じて好適であれば、完全ヒト化ナノボディにおいて特徴的な残基の位置の全てのアミノ酸残基がヒトV<sub>H 3</sub>配列で発生するアミノ酸残基であることが理解される。本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかなように、このようなV<sub>H H</sub>配列、少なくとも1つの特徴的な残基を有するこのような部分ヒト化ナノボディ、特徴的な残基を有しないこのような部分ヒト化ナノボディ及びこのような完全ヒト化ナノボディは全て、本発明の態様を形成する）、

ii) 上記アミノ酸配列が、配列番号1～配列番号22のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有し（アミノ酸同一性の程度を求めるために、CDR配列を形成するアミノ酸残基（配列番号1～配列番号22の配列においてXで示す）は無視する）、

iii) CDR1、CDR2及びCDR3が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

## 【 0 3 5 3 】

上記ナノボディは例えば、V<sub>H H</sub>配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列がV<sub>H H</sub>配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。



【 0 3 5 4 】

表 A - 9 : K E R E、G L E W 及び P、R、S 1 0 3 群のナノボディの代表的なアミノ酸配列

C D R は X X X X で示す

【 表 9 】

KERE 配列番号 1	配列番号:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIPFSXXXXXWFRQAPGKQRDSVAXXXXXXRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYRCYFXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 2	配列番号:2	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVSGSRTFSXXXXXWFRAPGKEREFVAXXXXXXRFTI SRDTASNRGYLHMNNLTPEdTAVYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 3	配列番号:3	AVQLVDSGGGLVQAGDSLKLSCALTGGAFXXXXXWFRQTPGREREFVAXXXXXXRFTI SRDNAKNNMYYLRMNSLIPEDAAVYSCAAXXXXXXWGGGLTVTVSS
KERE 配列番号 4	配列番号:4	QVQLVESGGGLVEAGGSLRLSCTASESPFRXXXXXWFRQTSGQEREFVAXXXXXXRFTI SRDDAKNTVWLHGSLKPEDTAVYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 5	配列番号:5	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDXXXXXWYRQGPGRERELVAXXXXXXRFTI SMDYTKQTVYLLHMNSLRPEDTGLYYCKIXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 6	配列番号:6	DVKFVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGFNFXXXXXWFRQAPGKEREEVAXXXXXXRFT ISSEKDKNSVYLQMNSLKPEDTALYICAGXXXXXWGRGTQTVSS
KERE 配列番号 7	配列番号:7	QVRLAESGGGLVQSGGSLRLSCVASGSTYTXXXXXXWYRQYPGKQRALVAXXXXXXRFT IARDSTKDTFCLQMNNLKPEDTAVYYCYAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 8	配列番号:8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTSDXXXXXWFRQAPGKPREGVXXXXXRFT ISTDNAKNTVHLLMNRVNAEDTALYYCAVXXXXXWGRGTRVTVSS
KERE 配列番号 9	配列番号:9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCQASGDSITXXXXXWYRQVPGKREFVAXXXXXXRFTI SGDNAKRAIYLLQMNNLKPDdTAVYYCNRXXXXXWGGGTQTVSP
KERE 配列番号 10	配列番号:10	QVPVVESGGGLVQAGDSLRLFCVPSFTSTXXXXXWFRQAPGKEREFVAXXXXXXRFTI SRNATKNTLTLRMDSLKPEDTAVYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 11	配列番号:11	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLFCTVSGGTASXXXXXWFRQAPGKEREFVAXXXXXXRFTI ARENAGNMVYLQMNNLKPDdTALYTCAAXXXXXXWGRGTQTVSS

10

20

30

40

KERE 配列番号 12	配列番号:12	AVQLVESGGDSVQPGDSQTLSCAASGRNTNSXXXXXWFRQAPGKERVFLEXXXXXXRF ISRDSAKNMMYLMNNLKPQDTAVYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 13	配列番号:13	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVWSGLTSSXXXXXWFRQTPWQERDFVAXXXXXXRF ISRDNYKDTVLLEMNFLKPEDTAIYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 14	配列番号:14	AVQLVESGGGLVQAGASLRLSCATSTRTLDDXXXXXWFRQAPGRDREFVAXXXXXXRF VSRDSAENTVALQMNSLKPEDTAVYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 15	配列番号:15	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSRLTAHXXXXXWFRQAPGKEREAVSXXXXXRF SRDYAGNTAFLQMDSLKPEDTGYYCATXXXXXWGGGTQTVSS
KERE 配列番号 16	配列番号:16	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFVXXXXXWFRAPGKEREFVAXXXXXXRF VSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCAVXXXXXWGGGTQTVSS
GLEW 配列番号 1	配列番号:17	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXXXXXWVRQAPGKVLWVSWXXXXXRF ISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVKXXXXXWGGGTQTVSS
GLEW 配列番号 2	配列番号:18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSVSSGCTXXXXXWVRQAPGKAEWVSWXXXXXRF KISRDNAKNTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQRXXXXXWGGGTQTVSS
GLEW 配列番号 3	配列番号:19	EVQLVESGGGLALPGGSLTLCVFSGSTFSXXXXXWVRHTPGKAEWVSWXXXXXRF SRDNAKNTLYLEMNSLSPEDTAMYYCGRXXXXXWRSKGIQTVSS
P,R,S 103 配列番号 1	配列番号:20	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSXXXXXWFRQAPGKEREFVAXXXXXXRF SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAXXXXXXWGGGTQTVSS
P,R,S 103 配列番号 2	配列番号:21	DVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFDXXXXXWLRQTPGKLEWVGXXXXXRF ISRDNAKNTLYLHNLKSEDVAVYYCRRXXXXXWGGGTQTVSS
P,R,S 103 配列番号 3	配列番号:22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSVSSGCTXXXXXWVRQAPGKAEWVSWXXXXXRF KISRDNAKNTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQRXXXXXWGGGTQTVSS

特に、KERE群の本発明のナノボディは、（一般）構造：  
FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4  
を有するアミノ酸配列である可能性があり、ここで

i) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、荷電アミノ酸（本明細書中に規定）又はシステイン残基であり、44位のアミノ酸残基は好ましくはEであり、

ii) FR1は、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【0356】

表A-10：KERE群のナノボディの代表的なFW1配列

【表10】

KERE FW1 配列番号 1	配列番号:23	QVQRVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSS
KERE FW1 配列番号 2	配列番号:24	QVQLVESGGGLVQTGDSLSCSASGRTFS
KERE FW1 配列番号 3	配列番号:25	QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAATGRAFG
KERE FW1 配列番号 4	配列番号:26	AVQLVESGGGLVQPGESLGLSCVASGRDFV
KERE FW1 配列番号 5	配列番号:27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEVLGRTAG
KERE FW1 配列番号 6	配列番号:28	QVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASETILS
KERE FW1 配列番号 7	配列番号:29	QVQLVESGGGTVPGGSLNLSCVASGNTFN
KERE FW1 配列番号 8	配列番号:30	EVQLVESGGGLAQPGGSLQLSCSAPGFTLD
KERE FW1 配列番号 9	配列番号:31	AQELEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFN

【0357】

iii) FR2は、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【0358】

表A-11：KERE群のナノボディの代表的なFW2配列

【表11】

KERE FW2 配列番号 1	配列番号:41	WFRQAPGKEREFVA
KERE FW2 配列番号 2	配列番号:42	WFRQTPGREREFVA
KERE FW2 配列番号 3	配列番号:43	WYRQAPGKQREMVA
KERE FW2 配列番号 4	配列番号:44	WYRQGPGKQRELVA
KERE FW2 配列番号 5	配列番号:45	WIRQAPGKEREGVS
KERE FW2 配列番号 6	配列番号:46	WFREAPGKEREGIS
KERE FW2 配列番号 7	配列番号:47	WYRQAPGKERDLVA
KERE FW2 配列番号 8	配列番号:48	WFRQAPGKQREEVS
KERE FW2 配列番号 9	配列番号:49	WFRQPPGKVREFVG

【0359】

iv) FR3は、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【0360】

表A-12：KERE群のナノボディの代表的なFW3配列

## 【表 1 2】

KERE FW3 配列番号 1	配列番号:50	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYRCYF
KERE FW3 配列番号 2	配列番号:51	RFAISRDNNKNTGYLQMNSLEPEDTAVYYCAA
KERE FW3 配列番号 3	配列番号:52	RFTVARNNKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA
KERE FW3 配列番号 4	配列番号:53	RFTISRDIKNTVDLLMNNLEPEDTAVYYCAA
KERE FW3 配列番号 5	配列番号:54	RLTISRDNVADTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
KERE FW3 配列番号 6	配列番号:55	RFTISRDNKNTVYLQMDNVKPEDTAIYYCAA
KERE FW3 配列番号 7	配列番号:56	RFTISKDSGKNTVYLQMTSLKPEDTAVYYCAT
KERE FW3 配列番号 8	配列番号:57	RFTISRDSAKNMMYLQMNNLKPQDTAVYYCAA
KERE FW3 配列番号 9	配列番号:58	RFTISRENDKSTVYLQLNSLKPEDTAVYYCAA
KERE FW3 配列番号 10	配列番号:59	RFTISRDIYAGNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCAT

10

## 【 0 3 6 1】

v) FR 4 は、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

## 【 0 3 6 2】

20

表 A - 1 3 : K E R E 群のナノボディの代表的な F W 4 配列

## 【表 1 3】

KERE FW4 配列番号 1	配列番号:60	WGQGTQVTSS
KERE FW4 配列番号 2	配列番号:61	WGKGLTVTVSS
KERE FW4 配列番号 3	配列番号:62	RGQGTQVTSS
KERE FW4 配列番号 4	配列番号:63	WGLGTQVTSS

## 【 0 3 6 3】

vi) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

30

## 【 0 3 6 4】

上記ナノボディにおいて、1 つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが V<sub>H</sub>H 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合) 本明細書中に記載のようなものであるのが好ましい。

## 【 0 3 6 5】

また、上記ナノボディは例えば、V<sub>H</sub>H 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が V<sub>H</sub>H 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

40

## 【 0 3 6 6】

フレームワーク 1 に関して、上記で概説のアミノ酸配列がヌクレオチド配列の発現によって生成する場合、上記核酸を生成するのに使用されているプライマー(複数可)によって、初めの 4 つのアミノ酸配列(すなわちカバットナンバリングによる 1 位 ~ 4 位のアミノ酸残基)を求め得ることが多いことは、当業者にとって明らかである。このように、アミノ酸同一性の程度を求めるために、初めの 4 つのアミノ酸残基を無視するのが好ましい。

## 【 0 3 6 7】

50

また、フレームワーク 1 に関して、カバットナンバリングによる 27 位～30 位のアミノ酸位置は (CDR ではなく) フレームワーク領域の一部であると考えられるが、1000 個を超える  $V_{HH}$  配列のデータベースの解析によって、27 位～30 位のアミノ酸が、1 位～26 位のアミノ酸に対する変動性よりも非常に大きい変動性 ( $V_{HH}$  エントロピー及び  $V_{HH}$  変動性に関して表される、表 A - 5～表 A - 8 を参照されたい) を有することが見出されている。このため、アミノ酸同一性の程度を求めるために、27 位～30 位のアミノ酸残基も無視するのが好ましい。

#### 【0368】

これを考慮して、KERE 群のナノボディは、3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列であり得る；

i) カバットナンバリングによる 45 位のアミノ酸残基は、荷電アミノ酸 (本明細書中に規定) 又はシステイン残基であり、44 位のアミノ酸残基は好ましくは E であり、

ii) FR1 は、カバットナンバリングによる 5 位～26 位で、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

#### 【0369】

表 A - 14 : KERE 群のナノボディの代表的な FW1 配列 (5 位～26 位のアミノ酸残基)

【表 14】

KERE FW1 配列番号 10	配列番号:32	VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
KERE FW1 配列番号 11	配列番号:33	VDSGGGLVQAGDSLKLSCALTG
KERE FW1 配列番号 12	配列番号:34	VDSGGGLVQAGDSLRLSCAASG
KERE FW1 配列番号 13	配列番号:35	VDSGGGLVEAGGSLRLSCQVSE
KERE FW1 配列番号 14	配列番号:36	QDSGGGSVQAGGSLKLSCAASG
KERE FW1 配列番号 15	配列番号:37	VQSGGRLVQAGDSLRLSCAASE
KERE FW1 配列番号 16	配列番号:38	VESGGTLVQSGDSLKLSCASST
KERE FW1 配列番号 17	配列番号:39	MESGGDSVQSGGSLTLSCVASG
KERE FW1 配列番号 18	配列番号:40	QASGGGLVQAGGSLRLSCSASV

#### 【0370】

iii) FR2、FR3 及び FR4 は、KERE 群のナノボディの FR2、FR3 及び FR4 に関して本明細書中に言及されるようなものであり、

iv) CDR1、CDR2 及び CDR3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

#### 【0371】

上記ナノボディは例えば、 $V_{HH}$  配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が  $V_{HH}$  配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

#### 【0372】

GLEW 群のナノボディは、3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列であり得る；

i) 好ましくは、GLEW 群のナノボディが非ヒト化ナノボディである場合、108 位のアミノ酸残基は Q であり、

ii) FR1 は、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

#### 【0373】

表 A - 15 : GLEW 群のナノボディの代表的な FW1 配列

10

20

30

40

50

【表 1 5】

GLEW FW1 配列番号 1	配列番号:64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
GLEW FW1 配列番号 2	配列番号:65	EVHLVESGGGLVRPGGSLRLSCAAFGFIFK
GLEW FW1 配列番号 3	配列番号:66	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCVASGFTFS
GLEW FW1 配列番号 4	配列番号:67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVCVSSGCT
GLEW FW1 配列番号 5	配列番号:68	EVQLVESGGGLALPGGSLTLSCVFSGSTFS

【 0 3 7 4 】

10

i i i) F R 2 は、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【 0 3 7 5 】

表 A - 1 6 : G L E W 群のナノボディの代表的な F W 2 配列

【表 1 6】

GLEW FW2 配列番号 1	配列番号:72	WVRQAPGKVEWVS
GLEW FW2 配列番号 2	配列番号:73	WVRRPPGKGLEWVS
GLEW FW2 配列番号 3	配列番号:74	WVRQAPGMGLEWVS
GLEW FW2 配列番号 4	配列番号:75	WVRQAPGKEPEWVS
GLEW FW2 配列番号 5	配列番号:76	WVRQAPGKDQEWVS
GLEW FW2 配列番号 6	配列番号:77	WVRQAPGKAEWVS
GLEW FW2 配列番号 7	配列番号:78	WVRQAPGKGLEWVA
GLEW FW2 配列番号 8	配列番号:79	WVRQAPGRATEWVS

20

【 0 3 7 6 】

i v) F R 3 は、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【 0 3 7 7 】

表 A - 1 7 : G L E W 群のナノボディの代表的な F W 3 配列

【表 1 7】

GLEW FW3 配列番号 1	配列番号:80	RFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVK
GLEW FW3 配列番号 2	配列番号:81	RFTISRDNARNNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
GLEW FW3 配列番号 3	配列番号:82	RFTSSRDNKSTLYLQMNDLKPEDTALYYCAR
GLEW FW3 配列番号 4	配列番号:83	RFIISRDNKNTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQR
GLEW FW3 配列番号 5	配列番号:84	RFTASRDNKNTLYLQMNSLKSEDTARYYCAR
GLEW FW3 配列番号 6	配列番号:85	RFTISRDNKNTLYLQMDDLQSEDTAMYYCGR

30

【 0 3 7 8 】

v) F R 4 は、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【 0 3 7 9 】

表 A - 1 8 : G L E W 群のナノボディの代表的な F W 4 配列

40

【表 18】

GLEW FW4 配列番号 1	配列番号:86	GSQGTQVTVSS
GLEW FW4 配列番号 2	配列番号:87	LRGGTQVTVSS
GLEW FW4 配列番号 3	配列番号:88	RGQGTQVTVSS
GLEW FW4 配列番号 4	配列番号:89	RSRGIQVTVSS
GLEW FW4 配列番号 5	配列番号:90	WGKGTQVTVSS
GLEW FW4 配列番号 6	配列番号:91	WGQGTQVTVSS

## 【0380】

v i) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

10

## 【0381】

上記ナノボディにおいて、1 つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが V<sub>H H</sub> 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合)本明細書中に記載のようであるのが好ましい。

## 【0382】

さらにフレームワーク 1 に関して、アミノ酸同一性の程度を求めるために、1 位～4 位及び 27 位～30 位のアミノ酸残基を無視するのが好ましいことは当業者にとって明らかである。

20

## 【0383】

これを考慮して、GLEW 群のナノボディは、3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列であり得る；

i) 好ましくは、GLEW 群のナノボディが非ヒト化ナノボディである場合、108 位のアミノ酸残基は Q であり、

i i) F R 1 は、カバットナンバリングによる 5 位～26 位で、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

## 【0384】

表 A - 19 : K E R E 群のナノボディの代表的な F W 1 配列 (5 位～26 位のアミノ酸残基)

30

【表 19】

GLEW FW1 配列番号 6	配列番号:69	VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
GLEW FW1 配列番号 7	配列番号:70	EESGGGLAQPGGSLRLSCVASG
GLEW FW1 配列番号 8	配列番号:71	VESGGGLALPGGSLTLSCVFSG

## 【0385】

i i i) F R 2、F R 3 及び F R 4 は、GLEW 群のナノボディの F R 2、F R 3 及び F R 4 に関して本明細書中に言及されるようなものであり、

40

i v) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

## 【0386】

上記ナノボディは例えば、V<sub>H H</sub> 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が V<sub>H H</sub> 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。上記ナノボディにおいて、1 つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが V<sub>H</sub>

50



H 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合) 本明細書中に記載のようなものであるのが好ましい。

【 0 3 8 7 】

P、R、S 103 群のナノボディは、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成されるアミノ酸配列であり得る；

i) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はWではなく、

ii) 好ましくは、カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、P、R又はSであり、より好ましくはRであり、

iii) FR1は、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【 0 3 8 8 】

表 A - 20 : P、R、S 103 群のナノボディの代表的な FW1 配列

【 表 2 0 】

P,R,S 103 FW1 配列番号 1	配列番号:92	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS
P,R,S 103 FW1 配列番号 2	配列番号:93	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDG
P,R,S 103 FW1 配列番号 3	配列番号:94	EVHLVESGGGLVLRPGGSLRLSCAAGFIFK
P,R,S 103 FW1 配列番号 4	配列番号:95	QVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASRTIVS
P,R,S 103 FW1 配列番号 5	配列番号:96	QEHLVESGGGLVDIGGSLRLSCAASERIFS
P,R,S 103 FW1 配列番号 6	配列番号:97	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCVASGFTFS
P,R,S 103 FW1 配列番号 7	配列番号:98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCVSSGCT
P,R,S 103 FW1 配列番号 8	配列番号:99	EVQLVESGGGLALPGGSLTLSCVFSGSTFS

【 0 3 8 9 】

iv) FR2は、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【 0 3 9 0 】

表 A - 21 : P、R、S 103 群のナノボディの代表的な FW2 配列

【 表 2 1 】

P,R,S 103 FW2 配列番号 1	配列番号:102	WFRQAPGKEREFVA
P,R,S 103 FW2 配列番号 2	配列番号:103	WVRQAPGKLEWVS
P,R,S 103 FW2 配列番号 3	配列番号:104	WVRRPPGKLEWVS
P,R,S 103 FW2 配列番号 4	配列番号:105	WIRQAPGKEREGVS
P,R,S 103 FW2 配列番号 5	配列番号:106	WVRQYPGKEPEWVS
P,R,S 103 FW2 配列番号 6	配列番号:107	WFRQPPGKEHEFVA
P,R,S 103 FW2 配列番号 7	配列番号:108	WYRQAPGKRTELVA
P,R,S 103 FW2 配列番号 8	配列番号:109	WLRQAPQGLEWVS
P,R,S 103 FW2 配列番号 9	配列番号:110	WLRQTPGKLEWVG
P,R,S 103 FW2 配列番号 10	配列番号:111	WVRQAPGKAEEFVS

【 0 3 9 1 】

v) FR3は、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

【 0 3 9 2 】

表 A - 2 2 : P、R、S 1 0 3 群のナノボディの代表的な F W 3 配列  
【表 2 2】

P,R,S 103 FW3 配列番号 1	配列番号:112	RFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
P,R,S 103 FW3 配列番号 2	配列番号:113	RFTISRDNARNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
P,R,S 103 FW3 配列番号 3	配列番号:114	RFTISRDNNAKNEMYLQMNNLKTEDTGVYWCAG
P,R,S 103 FW3 配列番号 4	配列番号:115	RFTISSDSNRNMIYLMNNLKPEDTAVYYCAA
P,R,S 103 FW3 配列番号 5	配列番号:116	RFTISRDNNAKNMLYLHLNNLKSEDTAVYYCRR
P,R,S 103 FW3 配列番号 6	配列番号:117	RFTISRDNNAKKTVYLRNLNLPEDTAVYSCNL
P,R,S 103 FW3 配列番号 7	配列番号:118	RFKISRDNNAKKTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQR
P,R,S 103 FW3 配列番号 8	配列番号:119	RFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCAV

10

## 【0 3 9 3】

v i ) F R 4 は、以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、

## 【0 3 9 4】

表 A - 2 3 : P、R、S 1 0 3 群のナノボディの代表的な F W 4 配列  
【表 2 3】

P,R,S 103 FW4 配列番号 1	配列番号:120	RGQGTQVTVSS
P,R,S 103 FW4 配列番号 2	配列番号:121	LRGGTQVTVSS
P,R,S 103 FW4 配列番号 3	配列番号:122	GNKGTQVTVSS
P,R,S 103 FW4 配列番号 4	配列番号:123	SSPGTQVTVSS
P,R,S 103 FW4 配列番号 5	配列番号:124	SSQGTQVTVSS
P,R,S 103 FW4 配列番号 6	配列番号:125	RSRGIQVTVSS

20

## 【0 3 9 5】

v i i ) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

30

## 【0 3 9 6】

上記ナノボディにおいて、1 つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが V<sub>H</sub>H 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合)本明細書中に記載のようなものであるのが好ましい。

## 【0 3 9 7】

フレームワーク 1 に関して、アミノ酸同一性の程度を求めるために、1 位 ~ 4 位及び 2 7 位 ~ 3 0 位のアミノ酸残基を無視するのが好ましいことはここでもまた当業者にとって明らかである。

40

## 【0 3 9 8】

これを考慮して、P、R、S 1 0 3 群のナノボディは、3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成されるアミノ酸配列であり得る ;

i ) カバットナンバリングによる 1 0 3 位のアミノ酸残基は W ではなく、

i i ) 好ましくは、カバットナンバリングによる 1 0 3 位のアミノ酸残基は、P、R 又は S であり、より好ましくは R であり、

i i i ) F R 1 は、カバットナンバリングによる 5 位 ~ 2 6 位で、以下のアミノ酸配列

50

の少なくとも１つとの少なくとも８０％のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列であり、  
【０３９９】

表Ａ－２４：Ｐ、Ｒ、Ｓ １０３群のナノボディの代表的なＦＷ１配列（５位～２６位のアミノ酸残基）

【表２４】

P,R,S 103 FW1 配列番号 9	配列番号:100	VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG
P,R,S 103 FW1 配列番号 10	配列番号:101	AESGGGLVQPGGSLKLSCAASR

【０４００】

10

i v) F R 2、F R 3 及び F R 4 は、P、R、S １０３群のナノボディの F R 2、F R 3 及び F R 4 に関して本明細書中に言及されるようなものであり、

v) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の１つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の１つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【０４０１】

上記ナノボディは例えば、V<sub>H H</sub> 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が V<sub>H H</sub> 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

20

【０４０２】

上記ナノボディにおいて、１つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、（例えばこれらが V<sub>H H</sub> 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合）本明細書中に記載のようなものであるのが好ましい。

【０４０３】

別の好ましいが非限定的な態様において本発明は、上記のようなナノボディであって、C D R 配列が、配列番号 ４５５～配列番号 ５０１、より好ましくは配列番号 ４５５～配列番号 ４５７、配列番号 ４５９、配列番号 ４６０、及び配列番号 ４６４～配列番号 ４６９のアミノ酸配列のうちの少なくとも１つの C D R 配列との少なくとも７０％のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも８０％のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも９０％のアミノ酸同一性（９５％以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に１００％のアミノ酸同一性を有する、ナノボディに関する。このアミノ酸同一性の程度は例えば、上記ナノボディと、配列番号 ４５５～配列番号 ５０１、より好ましくは配列番号 ４５５～配列番号 ４５７、配列番号 ４５９、配列番号 ４６０、及び配列番号 ４６４～配列番号 ４６９の配列の１つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を（本明細書に記載の方法で）求めることによって決定することができる（フレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する）。このようなナノボディは、本明細書にさらに記載されるようなものであり得る。

30

【０４０４】

本明細書で既に言及されているように、別の好ましいが非限定的な本発明の態様は、配列番号 ４５５～配列番号 ５０１、より好ましくは配列番号 ４５５～配列番号 ４５７、配列番号 ４５９、配列番号 ４６０、及び配列番号 ４６４～配列番号 ４６９からなる群から、又は配列番号 ４５５～配列番号 ５０１、より好ましくは配列番号 ４５５～配列番号 ４５７、配列番号 ４５９、配列番号 ４６０、及び配列番号 ４６４～配列番号 ４６９のアミノ酸配列の少なくとも１つとの、８０％超、好ましくは９０％超、より好ましくは９５％超、例えば９９％以上の配列同一性（本明細書で規定）を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するナノボディに関する。

40

【０４０５】

また上記のナノボディにおいて、

i) 任意のアミノ酸置換（本明細書で規定のようにヒト化置換でない場合）は、（本明

50

細書で規定されるように) 対応する配列番号 455 ~ 配列番号 501、より好ましくは配列番号 455 ~ 配列番号 457、配列番号 459、配列番号 460、及び配列番号 464 ~ 配列番号 469 のアミノ酸配列のアミノ酸配列と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び/又は

i i) そのアミノ酸配列は、対応する配列番号 455 ~ 配列番号 501、より好ましくは配列番号 455 ~ 配列番号 457、配列番号 459、配列番号 460、及び配列番号 464 ~ 配列番号 469 のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換だけ、又はそうでなければ好ましくはわずか 5 つ、好ましくはわずか 3 つ、より好ましくは 1 つ若しくは 2 つだけのアミノ酸欠失若しくは挿入を含有するのが好ましく；及び/又は

i i i) CDR は、親和性成熟によって、例えば対応する配列番号 455 ~ 配列番号 501、より好ましくは配列番号 455 ~ 配列番号 457、配列番号 459、配列番号 460、及び配列番号 464 ~ 配列番号 469 のアミノ酸配列の CDR から誘導される CDR であり得る。

#### 【0406】

好ましくは、本発明のナノボディにおける CDR 配列及び FR 配列は、本発明のナノボディ (及びこれを含む本発明のポリペプチド) が、

$10^{-5}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L 以下、好ましくは  $10^{-7}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L 以下、より好ましくは  $10^{-8}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L の解離定数 ( $K_D$ ) で (すなわち、 $10^5$  L/モル ~  $10^{12}$  L/モル以上、好ましくは  $10^7$  L/モル ~  $10^{12}$  L/モル以上、より好ましくは  $10^8$  L/モル ~  $10^{12}$  L/モルの結合定数 ( $K_A$ ) で) Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又は Angptl6、より好ましくは Tie2、Ang2、Ang1、Ang4、又は Angptl4、より好ましくは Tie2 又は Ang2 に結合するようなものであり、及び/又は

$10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  等) の  $k_{on}$  速度で Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又は Angptl6、より好ましくは Tie2、Ang2、Ang1、Ang4、又は Angptl4、より好ましくは Tie2 又は Ang2 に結合するようなものであり、及び/又は

$1 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ) ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日のほぼ非可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  等) の  $k_{off}$  速度で Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又は Angptl6、より好ましくは Tie2、Ang2、Ang1、Ang4、又は Angptl4、より好ましくは Tie2 又は Ang2 に結合するようなものである。

#### 【0407】

好ましくは、本発明のナノボディに存在する CDR 配列及び FR 配列は、本発明のナノボディが、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満 (500 pM 未満等) の親和性で Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又は Angptl6、より好ましくは Tie2、Ang2、Ang1、Ang4、又は Angptl4、より好ましくは Tie2 又は Ang2 と結合するようなものである。

#### 【0408】

本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然のヒト  $V_H$  ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、特に DP-47 の対応するフレームワーク領域と比較して、フレームワーク領域の少なくとも 1

10

20

30

40

50

つに少なくとも「１つのアミノ酸差異」（本明細書で規定される）を有することが条件である。より具体的には、本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然のヒトV<sub>H</sub>ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、特にD P - 47の対応するフレームワーク領域と比較して、特徴的な残基（例えば108位、103位及び／又は45位のもの）の少なくとも１つに少なくとも「１つのアミノ酸差異」（本明細書で規定）を有することが条件である。通常、ナノボディは、F R 2及び／又はF R 4の少なくとも１つにおいて、特にF R 2及び／又はF R 4の特徴的な残基の少なくとも１つ（同様に、例えば108位、103位及び／又は45位のもの）において、天然のV<sub>H</sub>ドメインとの少なくとも１つのこのようなアミノ酸差異を有する。

10

#### 【0409】

また、本発明のヒト化ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然のV<sub>H H</sub>ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、フレームワーク領域の少なくとも１つに少なくとも「１つのアミノ酸差異」（本明細書で規定）を有することが条件である。より具体的には、本発明の非限定的な一態様によれば、ヒト化ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然のV<sub>H H</sub>ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、特徴的な残基（例えば108位、103位及び／又は45位のもの）の少なくとも１つに少なくとも「１つのアミノ酸差異」（本明細書で規定）を有することが条件である。通常、ヒト化ナノボディは、F R 2及び／又はF R 4の少なくとも１つにおいて、特にF R 2及び／又はF R 4の特徴的な残基の少なくとも１つ（同様に、例えば108位、103位及び／又は45位のもの）において、天然のV<sub>H H</sub>ドメインとの少なくとも１つのこのようなアミノ酸差異を有する。

20

#### 【0410】

本明細書における開示より明らかなように、本明細書で規定されるような本発明のナノボディの天然又は合成の類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、ホモログ及びオソログ（本明細書中でまとめて「類似体」と称される）、特に配列番号455～配列番号501、より好ましくは配列番号455～配列番号457、配列番号459、配列番号460、及び配列番号464～配列番号469のナノボディの類似体の使用も本発明の範囲内である。したがって、本発明の一態様によれば、「本発明のナノボディ」という用語は最も広範な意味ではこのような類似体も包含する。

30

#### 【0411】

概して、このような類似体では、本明細書で規定されるような本発明のナノボディと比較して、１つ又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。このような置換、挿入又は欠失はフレームワーク領域の１つ又は複数、及び／又はC D Rの１つ又は複数において起こってもよい。このような置換、挿入又は欠失がフレームワーク領域の１つ又は複数において起こる場合、特徴的な残基の１つ又は複数、及び／又はフレームワーク残基中の他の位置の１つ又は複数において起こってもよいが、特徴的な残基での置換、挿入又は欠失は（これらが本明細書中で説明されるような適切なヒト化置換でない限り）一般にあまり好適ではない。

#### 【0412】

40

非限定的な例によると、置換は例えば保存的置換（本明細書中で説明される）であってもよく、及び／又はアミノ酸残基は、別のV<sub>H H</sub>ドメインの同じ位置に自然発生する別のアミノ酸残基で置き換えられていてもよいが（このような置換の幾つかの非限定的な例については表A - 5～表A - 8を参照されたい）、本発明は概してこれに限定されない。したがって、本発明のナノボディの特性を改善するか、又は少なくとも本発明のナノボディの所望の特性又は所望の特性のバランス若しくは組合せを過度に（すなわち、ナノボディがもはやその使用目的に適さなくなる程度まで）損なわない任意の１つ又は複数の置換、欠失若しくは挿入、又はその任意の組合せが本発明の範囲内に含まれる。当業者は一般に、本明細書における開示に基づいて、また任意に、例えば限られた数の可能な置換を導入すること、及びそのようにして得られるナノボディの特性に対するその影響を求めること

50

を含み得る限られたルーチン実験の後、適切な置換、欠失若しくは挿入、又はその適切な組合せを決定及び選択することが可能である。

#### 【0413】

例えば当業者の能力の範囲内で、本発明のナノボディ又はポリペプチドを発現するために使用される宿主生物に応じて、このような欠失及び／又は置換を、翻訳後修飾される1つ又は複数の部位（例えば1つ又は複数のグリコシル化部位）を除去するように設計してもよい。代替的には、置換又は挿入を官能基（本明細書中で説明される）が結合する1つ又は複数の部位を導入して、例えば部位特異的ペグ化（同様に本明細書中で説明される）を可能にするように設計してもよい。

#### 【0414】

上記の表A-5～表A-8に示す $V_{HH}$ エントロピー及び $V_{HH}$ 変動性に関するデータから明らかなように、フレームワーク領域内の幾つかのアミノ酸残基は他よりも保存されている。一般に、任意の置換、欠失又は挿入は好ましくは保存されにくい位置で起こるが、本発明は最も広範な意味ではこれに限定されない。また、一般に、アミノ酸置換はアミノ酸欠失又はアミノ酸挿入よりも好適である。

#### 【0415】

類似体は好ましくは、本発明のナノボディに関して本明細書で規定されるようなものである親和性（本明細書中でさらに説明されるように、（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び／又は $k_{off}$ 速度として、又は代替的には $IC_{50}$ 値として適切に測定されるか、及び／又は表される）でTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2と結合することができるようなものである。

#### 【0416】

類似体は好ましくは、本明細書中で説明されるようなナノボディの有利な特性を保持するものでもある。

#### 【0417】

また、好適な一態様によれば、類似体は、配列番号455～配列番号501、より好ましくは配列番号455～配列番号457、配列番号459、配列番号460、及び配列番号464～配列番号469のナノボディの1つとの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%（少なくとも95%等）又は99%以上の程度の配列同一性を有し、及び／又は好ましくは多くとも20個、好ましくは多くとも10個、さらにより好ましくは多くとも5個、例えば4個、3個、2個又はただ1個のアミノ酸差異（本明細書で規定される）を有する。

#### 【0418】

また、類似体のフレームワーク配列及びCDRは好ましくは、本明細書で規定される好適な態様に従うものである。より一般には、本明細書中で説明されるように、類似体は（a）108位にQ、及び／又は（b）45位に荷電アミノ酸又はシステイン残基、好ましくは44位にE、より好ましくは44位にE及び45位にR、及び／又は（c）103位にP、R又はSを有する。

#### 【0419】

本発明のナノボディの1つの好適な群の類似体は、ヒト化された（すなわち、本発明の天然のナノボディの配列と比較して）ナノボディを含む。本明細書中で引用される背景技術で述べられたように、このようなヒト化は一般に、ヒト $V_H$ ドメイン、例えばヒト $V_H3$ ドメインでの同じ位置に起こるアミノ酸残基での、天然の $V_{HH}$ の配列における1つ又は複数のアミノ酸残基の置き換えを含む。可能なヒト化置換又はヒト化置換の組合せの例は、例えば本明細書中の表から、本明細書中で引用される背景技術で述べられた可能なヒト化置換から、及び／又はナノボディの配列と天然のヒト $V_H$ ドメインの配列との比較から当業者に明らかである。

10

20

30

40

50

## 【 0 4 2 0 】

ヒト化置換は、得られるヒト化ナノボディが、本明細書で規定されるようなナノボディの有利な特性を依然として保持するように、より好ましくは類似体に関して前述の段落に説明されるようなものであるように選択されるべきである。当業者は一般に、本明細書における開示に基づいて、また任意に、例えば限られた数の可能なヒト化置換を導入すること、及びそのようにして得られるナノボディの特性に対するその影響を求めることを含み得る限られたルーチン実験の後、適切なヒト化置換又は適切なヒト化置換の組合せを決定及び選択することが可能である。

## 【 0 4 2 1 】

概して、ヒト化の結果として、本発明のナノボディは、本明細書中で説明されるような本発明のナノボディの有利な特性を依然として保持しながら、より「ヒト様」となり得る。結果として、このようなヒト化ナノボディは幾つかの利点、例えば対応する天然の  $V_{HH}$  ドメインと比較して低減された免疫原性を有し得る。同様に、当業者は、本明細書における開示に基づいて、また任意に限られたルーチン実験の後、一方ではヒト化置換によりもたらされる有利な特性と、他方では天然の  $V_{HH}$  ドメインの有利な特性との間の所望の又は適切なバランスを最適化又は達成するヒト化置換又は適切なヒト化置換の組合せを選択することが可能である。

## 【 0 4 2 2 】

本発明のナノボディは任意のフレームワーク残基（複数可）で、例えば1つ又は複数の特徴的な残基（本明細書で規定される）で又は1つ又は複数の他のフレームワーク残基（すなわち、非特徴的な残基）で又はこれらの任意の適切な組合せで適切にヒト化され得る。「P、R、S - 103群」又は「KER E群」のナノボディに関する1つの好適なヒト化置換は、Q108からL108への置換である。「GLEW群」のナノボディもまた、他の特徴的な残基の少なくとも1つがラクダ化（camelid（camelizing））置換（本明細書で規定される）を含有するという条件で、Q108からL108への置換によりヒト化され得る。例えば、上述したように、1つの特に好適な群のヒト化ナノボディは、GLEW又はGLEW様配列を44位～47位に、P、R又はS（特にR）を103位に、Lを108位に有する。

## 【 0 4 2 3 】

ヒト化及び他の類似体、並びにこれをコードする核酸配列は、それ自体が既知の任意の方法で準備することができる。例えば、類似体は、天然の  $V_{HH}$  ドメインをコードする核酸を準備すること、（例えば部位特異的突然変異誘発、又は適切なミスマッチプライマーを使用するPCRによって）置換を受ける1つ又は複数のアミノ酸残基に対するコドンを変換すること、対応する所望のアミノ酸残基に対するコドンに変えること、このようにして得られる核酸/ヌクレオチド配列を適切な宿主又は発現系において発現させること、及び任意に、このようにして得られる類似体を（例えば本明細書中でさらに説明されるように）単離及び/又は精製して、本質的に単離された形の上記類似体を提供する、単離及び/又は精製することにより得ることができる。これは概して、例えば本明細書中で引用されるハンドブック及び参考文献、本明細書中で引用される背景技術及び/又は本明細書中のさらなる記載から当業者に明らかな、それ自体が既知の方法及び技法を用いて実行することができる。代替的には、所望の類似体をコードする核酸は、それ自体が既知の方法で（例えば所定のアミノ酸配列を有する核酸配列を合成する自動装置を用いて）合成することができ、次に本明細書中で説明されるように発現させることができる。さらに別の技法は、各々が所望の類似体の一部をコードする1つ又は複数の天然及び/又は合成の核酸配列を組み合わせること、及び次に組み合わせた核酸配列を本明細書中で説明されるように発現させることを含み得る。また、類似体は、例えば本明細書中で述べたような、それ自体が既知のペプチド合成技法を用いた関連アミノ酸配列の化学合成を利用して準備することができる。

## 【 0 4 2 4 】

これに関して、本発明のナノボディの配列を提供するために及び/又はこのようにして得られる配列にナノボディの有利な特性を付与するために、すなわち1つ又は複数のラク

10

20

30

40

50

ダ化置換を導入する（すなわち、上記ヒトV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列中の1つ又は複数のアミノ酸残基を、V<sub>H</sub>ドメインの対応する位置で生じるアミノ酸残基に変化させる）ことにより、本発明のナノボディ（例えばその類似体）を、例えばヒトV<sub>H</sub>3配列、例えばDP-47、DP-51又はDP-29等のヒトV<sub>H</sub>配列（すなわち、アミノ酸配列又は対応するヌクレオチド配列）から設計及び／又は準備することが可能であることも、当業者には明らかである。同様に、これは一般に、開始点としてヒトV<sub>H</sub>ドメインに対するアミノ酸配列及び／又はヌクレオチド配列を使用し、前の段落で言及される多様な方法及び技法を用いて実行することができる。

#### 【0425】

幾つかの好ましいが非限定的なラクダ化置換は、表A-5～表A-8から導くことができる。特徴的な残基の1つ又は複数でのラクダ化置換は一般に、所望の特性に他のアミノ酸位置の1つ又は複数での置換よりも大きな影響を与えるが、その両方及び任意の適切な組合せが本発明の範囲内に含まれることも明らかである。例えば、既に少なくとも幾つかの所望の特性を付与している1つ又は複数のラクダ化置換を導入すること、及び次に上記特性をさらに改善するか、及び／又はさらなる有利な特性を付与するさらなるラクダ化置換を導入することが可能である。また、当業者は一般に、本明細書における開示に基づいて、また任意に、例えば限られた数の可能なラクダ化置換を導入すること、及びナノボディの有利な特性が得られたか又は（すなわち、元のV<sub>H</sub>ドメインと比較して）改善されたか否かを求めることを含み得る限られたルーチン実験の後、適切なラクダ化置換又は適切なラクダ化置換の組合せを決定及び選択することが可能である。しかしながら、一般にこのようなラクダ化置換は好ましくは、得られるアミノ酸配列が少なくとも（a）108位にQ、及び／又は（b）45位に荷電アミノ酸又はシステイン残基及びまた好ましくは44位にE、より好ましくは44位にE及び45位にR、及び／又は（c）103位にP、R又はS、並びに任意に1つ又は複数のさらなるラクダ化置換を含有するようなものである。より好ましくは、ラクダ化置換は、本発明のナノボディ及び／又はその類似体（本明細書で規定される）、例えばヒト化類似体及び／又は好ましくは前述の段落に規定されるようなものである類似体をもたらすようなものである。

#### 【0426】

本明細書における開示から同様に明らかなように、本明細書で規定されるような本発明のナノボディの部分若しくは断片、又は2つ以上の部分若しくは断片の組合せ、特に配列番号455～配列番号501、より好ましくは配列番号455～配列番号457、配列番号459、配列番号460、及び配列番号464～配列番号469のナノボディの部分又は断片の使用もまた本発明の範囲内である。したがって、本発明の一態様によれば、「本発明のナノボディ」という用語は最も広範な意味ではこのような部分又は断片も包含する。

#### 【0427】

概して、本発明のナノボディ（例えばその類似体）のこのような部分又は断片は、対応する本発明の全長ナノボディ（又はその類似体）のアミノ酸配列と比較して、N末端の1つ又は複数のアミノ酸残基、C末端の1つ又は複数のアミノ酸残基、1つ又は複数の連続内部アミノ酸残基、又はその任意の組合せが欠失しているか、及び／又は除去されたアミノ酸配列を有する。

#### 【0428】

部分又は断片は好ましくは、本発明のナノボディに対して、本明細書で規定されるようなものである親和性（本明細書中でさらに記載されるように、（実際又は見掛けの）K<sub>D</sub>値、（実際又は見掛けの）K<sub>A</sub>値、k<sub>on</sub>速度及び／又はk<sub>off</sub>速度として、又は代替的にはI<sub>C<sub>50</sub></sub>値として適切に測定されるか、及び／又は表される）でTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2と結合することができるようなものである。



## 【 0 4 2 9 】

任意の部分又は断片は好ましくは、対応する本発明の全長ナノボディのアミノ酸配列の少なくとも 10 個の連続アミノ酸残基、好ましくは少なくとも 20 個の連続アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 30 個の連続アミノ酸残基、例えば少なくとも 40 個の連続アミノ酸残基を含むようなものである。

## 【 0 4 3 0 】

また、任意の部分又は断片は好ましくは、C D R 1、C D R 2 及び / 又は C D R 3 の少なくとも 1 つ又は少なくともその一部（特に少なくとも C D R 3 又は少なくともその一部）を含むようなものである。より好ましくは、任意の部分又は断片は、好ましくは適切なフレームワーク配列（複数可）又は少なくともその一部により連結した、C D R の少なくとも 1 つ（好ましくは少なくとも C D R 3 又はその一部）及び少なくとも 1 つの他の C D R（すなわち、C D R 1 又は C D R 2）又は少なくともその一部を含むようなものである。より好ましくは、任意の部分又は断片は、好ましくは同様に適切なフレームワーク配列（複数可）又は少なくともその一部により連結した、C D R の少なくとも 1 つ（好ましくは少なくとも C D R 3 又はその一部）及び残り 2 つの C D R の少なくとも一部を含むようなものである。

10

## 【 0 4 3 1 】

別の特に好ましいが非限定的な態様によれば、このような部分又は断片は、対応する本発明の全長ナノボディの少なくとも C D R 3、例えば F R 3、C D R 3 及び F R 4 を含む（すなわち、例えば国際出願の国際公開第 0 3 / 0 5 0 5 3 1 号（Lasters et al.）に説明される）。

20

## 【 0 4 3 2 】

上記で既に述べたように、2 つ以上のこのような部分又は断片（すなわち、同一の又は異なる本発明のナノボディに由来する）を組み合わせる、すなわち、本発明のナノボディの類似体（本明細書で規定される）を提供する及び / 又はさらなる部分又は断片（本明細書で規定される）を提供することも可能である。例えば、本発明のナノボディの 1 つ又は複数の部分又は断片を、ヒト V<sub>H</sub> ドメインの 1 つ又は複数の部分又は断片と組み合わせることもまた可能である。

## 【 0 4 3 3 】

好適な一態様によれば、部分又は断片は、配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 5 0 1、より好ましくは配列番号 4 5 5 ~ 配列番号 4 5 7、配列番号 4 5 9、配列番号 4 6 0、及び配列番号 4 6 4 ~ 配列番号 4 6 9 のナノボディの 1 つとの少なくとも 50 %、好ましくは少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 70 %、さらにより好ましくは少なくとも 80 %（少なくとも 90 % 等）、95 % 又は 99 % 以上の程度の配列同一性を有する。

30

## 【 0 4 3 4 】

部分及び断片、並びにこれをコードする核酸配列は、任意のそれ自体が既知の方法で準備して任意に組み合わせることができる。例えば、このような部分又は断片は、完全長の本発明のナノボディをコードする核酸中に終止コドン挿入すること、及び次にこのようにして得られる核酸をそれ自体が既知の方法（例えば本明細書中で説明される）で発現させることで得ることができる。代替的には、このような部分又は断片をコードする核酸は、完全長の本発明のナノボディをコードする核酸を適切に制限すること、又はこのような核酸をそれ自体が既知の方法で合成することにより得ることができる。部分又は断片はまた、それ自体が既知のペプチド合成技法を用いて準備してもよい。

40

## 【 0 4 3 5 】

本発明は最も広範な意味では本発明のナノボディの誘導体も含む。このような誘導体は概して、本発明のナノボディ及び / 又は本発明のナノボディを形成するアミノ酸残基の 1 つ又は複数の修飾、特に化学的及び / 又は生物学的（例えば酵素的）修飾により得ることができる。

## 【 0 4 3 6 】

このような修飾の例、並びにこのような形（すなわち、タンパク質骨格、又は好ましく

50

は側鎖のいずれか)で修飾することができるナノボディ配列内のアミノ酸残基の例、このような修飾の導入のために使用することができる方法及び技法、並びにこのような修飾の潜在的使用及び利点は当業者に明らかである。

【0437】

例えば、このような修飾は、1つ又は複数の官能基、残基又は部分、特に1つ又は複数の所望の特性又は官能性を本発明のナノボディに付与する1つ又は複数の官能基、残基又は部分を本発明のナノボディ中に又はナノボディ上に(例えば共有結合によるか、又は他の適切な形で)導入することを含み得る。このような官能基の例は当業者に明らかである。

【0438】

例えば、このような修飾は、本発明のナノボディの半減期、溶解性及び/又は吸収性を増大する、本発明のナノボディの免疫原性及び/又は毒性を低減する、本発明のナノボディの任意の望ましくない副作用を排除若しくは減衰する、及び/又は本発明のナノボディ及び/又はポリペプチドに他の有益な特性を付与するか、及び/又は本発明のナノボディ及び/又はポリペプチドの不要な特性を低減する、又は上記の2つ以上の任意の組合せである1つ又は複数の官能基を(例えば共有結合によるか、又は任意の他の適切な形で)導入することを含み得る。このような官能基及びこれらを導入する技法の例は当業者に明らかであり、一般に、上記で引用される包括的な背景技術で述べた全ての官能基及び技法、並びに医薬用タンパク質の修飾、特に抗体又は抗体断片(例えばScFv及び単ドメイン抗体)の修飾に関するそれ自体が既知の官能基及び技法を含み得る。これに関しては例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)を参照する。同様に当業者に明らかなように、このような官能基は、例えば本発明のナノボディに直接(例えば共有結合的に)、又は任意に適切なリンカー若しくはスパーサーを介して結合し得る。

【0439】

半減期を増大するか、及び/又は医薬用タンパク質の免疫原性を低減するために最も広く使用される技法の1つは、適切な薬理学的に許容可能なポリマー、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体(例えばメトキシポリ(エチレングリコール)すなわちmPEG)の結合を含む。概して、任意の適切な形のペグ化、例えば当該技術分野で抗体及び抗体断片(例えば、限定されるものではないが、(単一)ドメイン抗体及びScFv)に対して使用されるペグ化を使用することができる。例えばChapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002)、Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003)、Harris and Chess, Nat. Rev. Drug Discov., 2, (2003)及び国際公開第04/060965号を参照する。タンパク質のペグ化に関する多様な試薬も、例えばNektar Therapeutics, USAより市販されている。

【0440】

好ましくは、特にシステイン残基を介した部位特異的ペグ化を使用する(例えばYang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)を参照されたい)。例えば、そのために、本発明のナノボディにおいて自然発生するシステイン残基にPEGを結合してもよく、本発明のナノボディを、PEGに結合する1つ又は複数のシステイン残基を適切に導入するように修飾してもよく、又はPEGに結合する1つ又は複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列を、本発明のナノボディのN末端及び/又はC末端と融合してもよい(全て、それ自体が当業者に既知であるタンパク質工学の技法を使用する)。

【0441】

好ましくは、PEGは、本発明のナノボディ及びタンパク質に対して5000を超える(例えば10000を超える)かつ20000未満(例えば100000未満)の分子量、例えば20000~80000の範囲の分子量で使用する。

【0442】

さらに、通常あまり好ましくない修飾は、一般的に翻訳時及び/又は翻訳後の修飾の一部として、本発明のナノボディ又はポリペプチドを発現するのに用いられる宿主細胞に

10

20

30

40

50

じてN結合型又はO結合型のグリコシル化を含む。

#### 【0443】

さらに別の修飾は、標識したナノボディの用途に応じて、1つ又は複数の検出可能な標識、又は他のシグナル生成基若しくはシグナル生成部分の導入を含んでもよい。これらを結合、使用及び検出するのに好適な標識及び技法は当業者にとって明らかであり、例としては、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、及びフルオレサミン、並びに $^{152}\text{Eu}$ 等の蛍光金属、又はランタニド系列からの他の金属）、リン光標識、化学発光標識又は生物発光標識（例えば、ルミナル、イソルミナル、セロマティックアクリジニウムエステル（theromatic acridinium ester）、イミダゾール、アクリジニウム塩、シュウ酸エステル、ジオキセタン又はGFP、及びその類似体）、放射性同位体（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、及び $^{75}\text{Se}$ ）、金属、金属キレート又は金属カチオン（例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、及び $^{68}\text{Ga}$ 等の金属カチオン、又は*in vivo*、*in vitro*又は*in situ*診断及びイメージングにおける使用に特に適した他の金属若しくは金属カチオン、例えば（ $^{157}\text{Gd}$ 、 $^{55}\text{Mn}$ 、 $^{162}\text{Dy}$ 、 $^{52}\text{Cr}$ 、及び $^{56}\text{Fe}$ ）並びに、発色団及び酵素（例えば、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ピオチンアビジンペルオキシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼ）が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な標識は当業者にとって明らかであり、例としては、NMR分光法又はESR分光法を用いて検出することができる部分が挙げられる。

#### 【0444】

本発明のこのような標識したナノボディ及びポリペプチドは、例えば、特異的標識の選択に応じて、（ELISA、RIA、EIA及び他の「サンドイッチアッセイ」等のそれ自体が既知のイムノアッセイを含む）*in vitro*、*in vivo*又は*in situ*アッセイに、並びに*in vivo*診断及びイメージングの目的で使用され得る。

#### 【0445】

当業者にとって明らかであるように、別の修飾は、例えば、上記の金属又は金属カチオンの1つをキレート化するキレート基（chelating group）の導入を含んでもよい。例えば好適なキレート基としては、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）又はエチレンジアミン四酢酸（EDTA）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0446】

さらに別の修飾は、ピオチン-（ストレプト）アビジン結合対等の特異的結合対の一部である官能基の導入を含んでもよい。このような官能基は、本発明のナノボディを別のタンパク質、ポリペプチド、又は結合対の残り半分と結合する化合物に連結させるのに（すなわち、結合対の形成を介して）使用され得る。例えば、本発明のナノボディは、ピオチンとコンジュゲートし、アビジン又はストレプトアビジンとコンジュゲートした別のタンパク質、ポリペプチド、化合物又は担体に連結し得る。例えば、このようなコンジュゲートナノボディは、例えば、検出可能なシグナル生成剤がアビジン又はストレプトアビジンにコンジュゲートする診断系のレポーターとして使用され得る。このような結合対は、例えば、本発明のナノボディを、医薬目的に好適な担体を含む担体に結合させるのにも使用することができる。非限定的な一例は、Cao and Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000) によって記載のリポソーム製剤である。このような結合対はまた、本発明のナノボディと治療に有効な作用物質とを連結させるのに使用することができる。

## 【0447】

用途によっては、特に、（例えば、癌の治療において）本発明のナノボディが指向性を有する標的を発現する細胞を死滅させること、又はこのような細胞の成長及び／又は増殖を低減するか若しくは遅延させることを意図する用途では、本発明のナノボディは、毒素又は毒素残基若しくは毒素部分にも連結し得る。本発明のナノボディに連結して、例えば細胞毒性化合物をもたらし得る毒素部分、化合物又は残基の例は当業者にとって明らかであり、例えば、上記の従来技術に及び／又は本明細書中のさらなる説明に見ることができる。一例はいわゆる ADEPT（商標）技術である（国際公開第 03/055527 号に記載）。

## 【0448】

他の可能な化学修飾及び酵素修飾は当業者にとって明らかであろう。このような修飾を、（例えば、機能 - 活性関係を研究するために）調査目的で導入してもよい。例えば、Lundblad and Bradshaw, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997) を参照する。

## 【0449】

好ましくは、この誘導体は、本発明のナノボディに関して本明細書中に規定される（（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び／又は  $k_{off}$  速度として、又は代替的に本明細書中にさらに記載の  $IC_{50}$  値として好適に測定及び／又は表される）親和性で、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2と結合するような誘導体である。

## 【0450】

上述のように、本発明はまた、少なくとも1つの本発明のナノボディから本質的になるか又はこれを含む、タンパク質又はポリペプチドに関する。「から本質的になる」とは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列が、本発明のナノボディのアミノ酸配列と厳密に同じであるか、又は、1個～20個のアミノ酸残基、例えば、1個～10個のアミノ酸残基、及び好ましくは1個～6個のアミノ酸残基（例えば、1個、2個、3個、4個、5個又は6個のアミノ酸残基）等の限定数のアミノ酸残基をナノボディのアミノ酸配列のアミノ末端、カルボキシ末端、又はアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に付加させた本発明のナノボディのアミノ酸配列に対応するかどちらかであることを意味する。

## 【0451】

上記のアミノ酸残基は、ナノボディの（生物学的）特性を変更するか、改質するか、又はさもなければこれに影響を与える場合もあり又は与えない場合もあり、ナノボディにさらなる官能性を付加する場合もあり又は付加しない場合もある。例えば、このようなアミノ酸残基は、例えば、異種宿主細胞又は異種宿主生物において発現した結果得られるN末端Met残基を含み得る。

合成の際に宿主細胞からのナノボディの分泌を導く、シグナル配列又はリーダー配列を形成してもよい。好適な分泌リーダーペプチドは当業者にとって明らかであり、本明細書中にさらに記載される通りであり得る。通常、本発明は最も広範な意味では、限定されるものではないが、このようなリーダー配列は、ナノボディのN末端に連結されるであろう。ナノボディを、特定の器官、組織、細胞、又は細胞の一部若しくはコンパートメントに指向性を有し、及び／又はこれらに侵入させるか若しくは入り込ませ、及び／又はナノボディを、細胞膜、上皮細胞の層等の細胞層、固形腫瘍を含む腫瘍、又は血液脳関門のような生物学的障壁に侵入させるか若しくはこれらに対して横断させる、配列又はシグナルを形成し得る。このようなアミノ酸配列の例は当業者にとって明らかであろう。幾つかの非限定的な例は、国際公開第 03/026700 号、並びにTemsamani et al., Expert Opin. Biol. Ther., 1, 773 (2001)、Temsamani and Vidal, Drug Discov. Today, 9, 1012

10

20

30

40

50

(004) 及びRoussette, J. Pharmacol. Exp. Ther., 296, 124-131 (2001) に記載されている小ペプチドペクター(「Pe p - トランスペクター」)、並びにZhao et al., Apoptosis, 8, 631-637 (2003) によって記載されている膜輸送体配列である。抗体断片の細胞内標的化のためのC末端アミノ酸配列及びN末端アミノ酸配列は、例えば、Cardinale et al., Methods, 34, 171 (2004) によって記載されている。細胞内標的化の他の好適な技法は、以下に記述されるような、本発明のナノボディを含むいわゆる「細胞内抗体(intrabodies)」の発現及び/又は使用を伴う。

「タグ」、例えば、上記の配列又は残基を対象とする親和性技法等を用いてナノボディの精製を可能にするか又は容易にする、アミノ酸配列又は残基を形成し得る。その後、(例えば、化学的又は酵素学的な切断によって)上記の配列又は残基を除去して、ナノボディ配列をもたらし得る(この目的のために、タグは任意で、切断可能なリンカー配列を介してナノボディ配列に連結されてもよく、又は切断可能なモチーフを含有していてもよい)。このような残基の好ましいが非限定的な幾つかの例は、複数のヒスチジン残基、グルタチオン残基、及びmyc標識(例えば国際公開第06/12282号の配列番号31を参照)である。

官能基の結合のために官能化し及び/又は部位として機能することができる1つ又は複数のアミノ酸残基であり得る。好適なアミノ酸残基及び官能基は当業者にとって明らかであり、本発明のナノボディの誘導体について本明細書中に記述されたアミノ酸残基及び官能基が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0452】

別の態様によれば、本発明のポリペプチドは、そのアミノ末端で、そのカルボキシ末端で、又はそのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方で、少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列と融合する、すなわち上記本発明のナノボディと1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列とを含む融合タンパク質がもたらされるように本発明のナノボディを含む。このような融合は本明細書中で「ナノボディ融合」とも呼ばれる。

#### 【0453】

1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、任意の好適及び/又は所望のアミノ酸配列であり得る。さらなるアミノ酸配列は、ナノボディの(生物学的)特性を変更するか、改質するか、又はさもなければこれに影響を与える場合もあり又は与えない場合もあり、本発明のナノボディ又はポリペプチドにさらなる官能性を付加する場合もあり又は付加しない場合もある。好ましくは、さらなるアミノ酸配列は、本発明のナノボディ又はポリペプチドに、1つ又は複数の所望の特性又は官能性を付与するようなものである。

#### 【0454】

例えば、さらなるアミノ酸配列はまた、任意の所望のタンパク質、ポリペプチド、抗原、抗原決定基又はエピトープ(本発明のナノボディが指向性を有する同様のタンパク質、ポリペプチド、抗原、抗原決定基若しくはエピトープ、又は異なるタンパク質、ポリペプチド、抗原、抗原決定基若しくはエピトープが挙げられるが、これらに限定されない)のいずれかに指向性を有し得る第2の結合部位をもたらし得る。

#### 【0455】

このようなアミノ酸配列の例は当業者にとって明らかであり、概して、通常の抗体及びその断片に基づきペプチド融合に用いられる全てのアミノ酸配列を含み得る(ScFv及び単一ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない)。例えば、Holliger and Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005) によるレビューを参照する。

#### 【0456】

例えば、このようなアミノ酸配列は、本発明のナノボディ自体に比べて、半減期、溶解性若しくは吸着を増大させる、免疫原性若しくは毒性を低減させる、望ましくない副作用を排除若しくは減衰させる、及び/又は他の有益な特性を本発明のポリペプチドに付与するか、及び/又は本発明のポリペプチドの望ましくない特性を減らすアミノ酸配列であり得る。このようなアミノ酸配列の幾つかの非限定的な例は、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン(例えば国際公開第00/27435号を参照)又はハプテン分子(例

えば、抗体を循環させることにより認識されるハプテン（例えば国際公開第 98/22141 号を参照））である。

【0457】

特に、血清アルブミン又はその断片に対する免疫グロブリンの連結断片（例えば、V<sub>H</sub> ドメイン）を使用して半減期を増大させることができることは、当該技術分野において記載されている。国際公開第 00/27435 号及び国際公開第 01/077137 号を参照する）。本発明によれば、本発明のナノボディは好ましくは、血清アルブミン（又はその好適な断片）に直接連結するか、又は好適なリンカーを介して、特に好適なペプチドを介して連結することにより、本発明のポリペプチドを遺伝子融合（タンパク質）として発現することができる。具体的な一態様によれば、本発明のナノボディは、少なくとも血清アルブミンのドメイン I I I 又はその一部を含む、血清アルブミンの断片に連結し得る。例えば、2006 年 3 月 31 日に出願された、“Albumin derived amino acid sequence, use thereof for increasing the half-life of therapeutic proteins and of other therapeutic proteins and entities, and constructs comprising the same” と題された、Ablynx N.V. の米国仮特許出願第 60/788,256 号を参照されたい。

【0458】

代替的に、さらなるアミノ酸配列は、血清中の半減期を増大させるように、血清タンパク質（例えば、IgG 等のヒト血清アルブミン又は別の血清タンパク質等）に指向性を有する、第 2 の結合部位又は結合単位を付与し得る。このようなアミノ酸配列は例えば、下記のナノボディ、並びに、国際公開第 91/01743 号、国際公開第 01/45746 号及び国際公開第 02/076489 号に記載の小ペプチド及び結合タンパク質、及び国際公開第 03/002609 号及び国際公開第 04/003019 号に記載の dAb を含む。Harmsen et al., Vaccine, 23 (41); 4926-42, 2005、並びに欧州特許第 0368684 号、並びに、本明細書中に記載の Ablynx N.V. による以下の米国仮特許出願第 60/843,349 号、同第 60/850,774 号、同第 60/850,775 号、“Peptides capable of binding to serum proteins” と題された Ablynx N.V. による米国仮特許出願（2006 年 12 月 5 日出願）（本明細書中にも記載される）も参照する。

【0459】

このようなアミノ酸配列は特に、血清アルブミン（及びより詳細にはヒト血清アルブミン）及び/又は IgG（及びより詳細にはヒト IgG）に指向性を有し得る。例えば、このようなアミノ酸配列は、（ヒト）血清アルブミンに指向性を有するアミノ酸配列、及び FcRn への血清アルブミンの結合に関与しない（ヒト）血清アルブミン上のアミノ酸残基に結合し得るアミノ酸配列（例えば、国際公開第 06/0122787 号を参照）、及び/又は血清アルブミンのドメイン I I I の一部を形成しない血清アルブミン上のアミノ酸残基に結合し得るアミノ酸配列（例えば、同様に国際公開第 06/0122787 パンフレットを参照）；増大した半減期を有するか又は半減期を増大させ得るアミノ酸配列（例えば、“Serum albumin binding proteins with long half-lives” と題された Ablynx N.V. の米国仮特許出願第 60/843,349 号（2006 年 9 月 8 日出願）を参照されたい）；哺乳動物の少なくとも 1 種に由来の血清アルブミンと、特に霊長類の少なくとも 1 種（例えば、限定されるものではないが、マカク属のサル（例えば、特に、カニクイザル（マカク・ファシクラリス）及び/又はアカゲザル（マカク・ムラット））及びヒヒ（パピオ・ウルジヌス））と交差反応性であるヒト血清アルブミンに対するアミノ酸配列（同様に米国仮特許出願第 60/843,349 号も参照）；pH 非依存的に血清アルブミンに結合し得るアミノ酸配列（例えば、“Amino acid sequences that bind to serum proteins in a manner that is essentially independent of the pH, compounds comprising the same, and uses thereof” と題された Ablynx N.V. による米国仮特許出願第 60/850,774 号（2006 年 10 月 11 日出願）を参照）、及び/又は条件付き結合因子（conditional binder）であるアミノ酸配列（例えば、“Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner” と題された Ablynx N.V. による米国仮特許出願第 60/850,775 号（2006 年 10 月 11 日出願）を参照）であり得る。

## 【0460】

別の態様によれば、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、通常の四本鎖抗体（及び、特にヒト抗体）及び／又は重鎖抗体の1つ又は複数の部分、断片、又はドメインを含み得る。例えば、通常はあまり好ましくないが、本発明のナノボディは、通常の（好ましくはヒト） $V_H$ ドメイン若しくは $V_L$ ドメインに、又は $V_H$ ドメイン若しくは $V_L$ ドメインの天然型類似体若しくは合成類似体に、同様に任意でリンカー配列（Ward et al.によって記載されているdAb抗体等の他の（単一）ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない）を介して連結され得る。

## 【0461】

また、少なくとも1つのナノボディは、任意でリンカー配列を介して、1つ又は複数の（好ましくはヒト） $C_H1$ 、 $C_H2$ 及び／又は $C_H3$ ドメインと連結してもよい。例えば、好適な $C_H1$ ドメインと連結するナノボディは、例えば通常のFab断片又は $F(ab')_2$ 断片に類似するが、通常の $V_H$ ドメインの1つ、又は $F(ab')_2$ 断片の場合）1つ若しくは両方を本発明のナノボディで置換した抗体断片／構造体を生成するように（好適な軽鎖と共に）使用することができる。また、2つのナノボディは、（任意でリンカーを介して） $C_H3$ ドメインと連結して*in vivo*で半減期が増大した構築物をもたらすことができる。

## 【0462】

本発明のポリペプチドの具体的な一態様によれば、1つ又は複数の本発明のナノボディは、1つ又は複数のエフェクタ機能を本発明のポリペプチドに付与し及び／又は1つ又は複数のFc受容体に結合する能力を付与し得る1つ又は複数の抗体部、断片又はドメインと連結し得る。例えば、この目的で、及びこれらに限定されるものではないが、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、重鎖抗体（本明細書中に記載）及びより好ましくは通常のヒト四本鎖抗体等に由来する抗体の1つ又は複数の $C_H2$ 及び／又は $C_H3$ ドメインを含んでいてもよく、及び／又は例えばIgG、IgE、又は別のヒトIgに由来するFc領域（の一部）を形成してもよい。例えば、国際公開第94/04678号は、ラクダ科動物 $V_{HH}$ ドメイン又はそのヒト化誘導体（すなわち、ナノボディ）を含む重鎖抗体を記載しており、ここでは、ラクダ科動物 $C_H2$ 及び／又は $C_H3$ ドメインが、ヒト $C_H2$ 及び $C_H3$ ドメインで置換されている。それによりナノボディと（ $C_H1$ ドメインは含まないが）ヒト $C_H2$ 及び $C_H3$ ドメインとをそれぞれ含む2つの重鎖からなる免疫グロブリンがもたらされるが、その免疫グロブリンは、 $C_H2$ 及び $C_H3$ ドメインによって付与されるエフェクタ機能を有し、如何なる軽鎖の非存在下でも機能することができる。本発明のナノボディと好適に連結してエフェクタ機能を付与し得る他のアミノ酸配列は当業者にとって明らかであり、所望のエフェクタ機能（複数可）に基づき選択され得る。例えば、国際公開第04/058820号、国際公開第99/42077号、及び国際公開第05/017148号、並びにHolliger and Hudson（同上）のレビューを参照する。本発明のナノボディとFc部分とのカップリングによっても、対応する本発明のナノボディに比べて半減期の増大が生じ得る。用途によっては、如何なる生物学的に重要なエフェクタ機能も含まない半減期の増大を与えるFc部分及び／又は定常ドメイン（すなわち、 $C_H2$ 及び／又は $C_H3$ ドメイン）の使用も好適であるか、又は一層好ましい。1つ又は複数のナノボディと、*in vivo*で半減期が増大した1つ又は複数の定常ドメインとを含む他の好適な構築物は当業者にとって明らかであり、例えば、任意でリンカー配列を介して $C_H3$ ドメインに連結する2つのナノボディを含み得る。一般に、半減期が増大した任意の融合タンパク質又は誘導体は好ましくは、50kDを超える分子量、すなわち腎臓吸収のカットオフ値を有する。

## 【0463】

また、さらなるアミノ酸配列は、（例えば、本発明のポリペプチドを発現するのに用いられる宿主細胞に応じて、本発明のポリペプチドのプレフォーム、プロフォーム又はブレプロフォームをもたらすように）合成の際に宿主細胞から本発明のナノボディ又はポリペプチドの分泌を導くシグナル配列又はリーダー配列を形成し得る。

## 【0464】

また、さらなるアミノ酸配列は、本発明のナノボディ又はポリペプチドを、特定の器官、組織、細胞、又は細胞の一部若しくはコンパートメントに誘導し、及び／又はこれらに侵入させるか若しくは入り込ませ、及び／又は本発明のナノボディ又はポリペプチドを、細胞膜、上皮細胞の層等の細胞層、固形腫瘍等の腫瘍、又は血液脳関門のような生物学的障壁に侵入させるか若しくはこれらに対して横断させる配列又はシグナルを形成し得る。このようなアミノ酸配列の好適な例は当業者にとって明らかであり、例えば、国際公開第94/02610号、国際公開第95/22618号、米国特許第7004940号、国際公開第03/014960号、国際公開第99/07414号；国際公開第05/01690号；欧州特許第1512696号；及びCattaneo, A. & Biocca, S. (1997) *Int racellular Antibodies: Development and Applications*. Landes andSpringer-Verlagに；Kontermann, *Methods* 34, (2004), 163-170、並びにそれらに記載のさらなる参考文献に記載されるような、上記の「Pept rans」のペクター、Cardinale et al.によって記載される配列、並びにいわゆる「細胞内抗体」として本発明のナノボディ及びポリペプチドを発現又は産生するのに使用することができる、それ自体が既知のアミノ酸配列及び抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0465】

用途によっては、特に（例えば癌の治療において）本発明のナノボディが指向性を有する標的を発現する細胞を死滅させること、又はこのような細胞の成長及び／又は増殖を低減するか若しくは遅延させることを意図する用途では、本発明のナノボディはまた、（細胞）毒性タンパク質又はポリペプチドと連結し得る。本発明のナノボディと連結して、例えば、本発明の細胞毒性ポリペプチドをもたらし得るこのような毒性タンパク質及びポリペプチドの例は当業者にとって明らかであり、例えば、上記従来技術及び／又は本明細書中のさらなる記載に見出すことができる。一例は、国際公開第03/055527号に記載のいわゆるADEPT（商標）技術である。

20

## 【0466】

好ましいが非限定的な一態様によれば、上記1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、少なくとも1つのさらなるナノボディを含み、これにより、少なくとも2つ、例えば3つ、4つ、5つ以上のナノボディを含む本発明のポリペプチドをもたらし、上記ナノボディは任意で、1つ又は複数のリンカー配列（本明細書中に規定）を介して連結され得る。少なくとも1つが本発明のナノボディである2つ以上のナノボディを含む本発明のポリペプチドは、本明細書中で本発明の「多価」ポリペプチドとも呼ばれ、このようなポリペプチド中に存在するナノボディは、本明細書中で「多価フォーマット」であるとも称される。例えば、本発明の「二価」ポリペプチドは、任意でリンカー配列を介して連結される2つのナノボディを含み、本発明の「三価」ポリペプチドは、任意で2つのリンカー配列等を介して連結される3つのナノボディ等を含む。ポリペプチド中に存在するナノボディの少なくとも1つ、及びポリペプチド中に存在するナノボディの最大で全てが、本発明のナノボディである。

30

## 【0467】

本発明の多価ポリペプチドでは、2つ以上のナノボディは、同じであっても異なってもよく、同じ抗原又は抗原決定基（例えば、同じ部分（複数可）若しくはエピトープ（複数可）、又は異なる部分若しくはエピトープ）に指向性を有するものであってもよく、又は代替的に異なる抗原若しくは抗原決定基又はこれらの任意の好適な組合せに指向性を有するものであってもよい。例えば、本発明の二価ポリペプチドは、（a）2つの同一のナノボディ、（b）タンパク質若しくは抗原の第1の抗原決定基に指向性を有する第1のナノボディ、及び第1のナノボディと異なる上記タンパク質若しくは抗原の同一抗原決定基に指向性を有する第2のナノボディ、（c）タンパク質若しくは抗原の第1の抗原決定基に指向性を有する第1のナノボディ、及び上記タンパク質若しくは抗原の別の抗原決定基に指向性を有する第2のナノボディ、又は（d）第1のタンパク質若しくは抗原に指向性を有する第1のナノボディ、及び第2のタンパク質若しくは抗原に指向性を有する（す

40

50



なわち、上記第1の抗原と異なる)第2のナノボディを含み得る。同様に、本発明の三価ポリペプチドは例えば、これらに限定されるものではないが、(a)3つの同一のナノボディ、(b)抗原の第1の抗原決定基に対する2つの同一のナノボディ、及び同一抗原の異なる抗原決定基に指向性を有する第3のナノボディ、(c)抗原の第1の抗原決定基に対する2つの同一のナノボディ、及び上記第1の抗原と異なる第2の抗原に指向性を有する第3のナノボディ、(d)第1の抗原の第1の抗原決定基に指向性を有する第1のナノボディ、上記第1の抗原の第2の抗原決定基に指向性を有する第2のナノボディ、及び上記第1の抗原と異なる第2の抗原に指向性を有する第3のナノボディ、又は(e)第1の抗原に指向性を有する第1のナノボディ、上記第1の抗原と異なる第2の抗原に指向性を有する第2のナノボディ、及び上記第1の抗原及び上記第2の抗原と異なる第3の抗原に指向性を有する第3のナノボディを含み得る。

10

## 【0468】

少なくとも1つのナノボディが第1の抗原に指向性を有する(すなわち、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2に対する)ものであり、少なくとも1つのナノボディが第2の(すなわち、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2と異なる)抗原に指向性を有するものである、少なくとも2つのナノボディを含有する本発明のポリペプチドは、本発明の「多重特異性」ポリペプチドとも呼ばれており、このようなポリペプチド中に存在するナノボディは、本明細書中で「多重特異性フォーマット」であるとも称される。このため例えば、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Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2)に指向性を有する少なくとも1つのナノボディ及び第2の(すなわち、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2)に指向性を有する少なくとも1つのさらなるナノボディ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、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2)に指向性を有する少なくとも1つのナノボディ、第2の(すなわち、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2と異なる)抗原に指向性を有する少なくとも1つのさらなるナノボディ、及び第3の(すなわち、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2及び第2の抗原の両方と異なる)抗原に指向性を有する少なくとも1つのさらなるナノボディを含むポリペプチドである。

20

30

40

## 【0469】

したがって、本発明の二重特異性ポリペプチドは、その最も単純な形態において、Ti

50

e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2に指向性を有する第1のナノボディと、第2の抗原に指向性を有する第2のナノボディとを含み、上記第1のナノボディ及び上記第2のナノボディが任意でリンカー配列（本明細書中に規定）を介して連結され得る本発明の二価ポリペプチド（本明細書中に規定）であるのに対し、その最も単純な形態の本発明の三重特異性ポリペプチドは、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2に指向性を有する第1のナノボディと、第2の抗原に指向性を有する第2のナノボディと、第3の抗原に指向性を有する第3のナノボディとを含み、上記第1のナノボディ、第2のナノボディ及び第3のナノボディが、任意で1つ又は複数、特に1つ及び複数、特に2つのリンカー配列を介して連結され得る本発明の三価ポリペプチド（本明細書中に規定）である。

10

## 【0470】

しかしながら、上述から明らかであるように、本発明は、本発明の多重特異性ポリペプチドが、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2に対する少なくとも1つのナノボディと、T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2と異なる1つ又は複数の抗原に指向性を有する任意の数のナノボディとを含み得るという意味において、これらに限定されない。

20

## 【0471】

さらに、本発明のポリペプチド中における種々のナノボディの特定の順序又は配置が、最終的な本発明のポリペプチドの性質（T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t l 1、A n g p t l 2、A n g p t l 3、A n g p t l 4、A n g p t l 5、又はA n g p t l 6、より好ましくはT i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又はA n g p t l 4、より好ましくはT i e 2又はA n g 2に関する、又は1つ若しくは複数の他の抗原に対する、親和性、特異性、又は結合活性が挙げられるが、これらに限定されない）に何らかの影響を及ぼし得る点は、本発明の範囲内に包含されるが、通常、上記順序又は配置は重要なものでなく、任意で本明細書中の開示に基づく限定されたルーチン実験を幾つか実施した後に、当業者であれば好適に選択することができるであろう。したがって、特定の本発明の多価又は多重特異性のポリペプチドについて述べられる場合、明示的に指示がない限り、これは関連するナノボディの任意の順序又は配置を包含するものであることに留意されたい。

30

## 【0472】

最後に、本発明のポリペプチドが、2つ以上のナノボディと、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列（本明細書中に記述）とを含有することも、本発明の範囲内である。

40

## 【0473】

1つ又は複数のV<sub>H</sub>Hドメインを含有する多価及び多重特異性のポリペプチド、及びこれらの調製に関して、Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10, 7346-7350, 2001, Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302、並びに、例えば国際公開第96/34103号及び国際公開第99/23221号も参照する。本発明の幾つかの特定の多重特異性及び/又は多価のポリペプチドの幾つかの他の例は、本明細書中で参照されるAblynx N.V.による出願に見ることができる。

## 【0474】

50

本発明の多重特異性ポリペプチドの好ましいが非限定的な一例は、少なくとも1つの本発明のナノボディと、少なくとも1つの半減期の増大をもたらすナノボディとを含む。このようなナノボディは例えば、血清タンパク質、特にヒト血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、チロキシン結合タンパク質、(ヒト)トランスフェリン、フィブリノゲン、IgG、IgE若しくはIgM等の免疫グロブリン、又は国際公開第04/003019号に列挙された血清タンパク質の1つに指向性を有するナノボディであり得る。これらの内で、血清アルブミン(特にヒト血清アルブミン)又はIgG(特にヒトIgG、例えば上記のMuyldermansによる総説に記載されているナノボディVH-1を参照されたい)と結合することができるナノボディが特に好ましい(が、例えばマウス又は霊長類での実験に関しては、それぞれマウス血清アルブミン(MSA)又は上記霊長類由来の血清アルブミンに対する、又はこれと交差反応性のナノボディを使用することができる。しかしながら、医薬用途に関しては、通常ヒト血清アルブミン又はヒトIgGに対するナノボディが好ましい)。半減期を増大させ、本発明のポリペプチドで使用するすることができるナノボディには、上記で言及されたようなもの等の国際公開第04/041865号、国際公開第06/122787号及びAblynx N.V.によるさらなる特許出願で記載されている血清アルブミンに指向性を有するナノボディが含まれる。

#### 【0475】

例えば、本発明で使用する半減期を増大させる、幾つかの好ましいナノボディには、血清アルブミンとFcRnとの結合に関与しない(ヒト)血清アルブミン上のアミノ酸残基と結合することができるナノボディ(例えば国際公開第06/0122787号を参照されたい)；血清アルブミンのドメインIII部分を形成しない血清アルブミン上のアミノ酸残基と結合することができるナノボディ(例えば国際公開第06/0122787号を参照されたい)；半減期を増大させたか又は増大させることができるナノボディ(例えば本明細書中に言及されるAblynx N.V.による米国仮特許出願第60/843,349号を参照されたい)；少なくとも1種の哺乳動物由来の血清アルブミンと、特に少なくとも1種の霊長類(例えば、限定されるものではないが、マカク属のサル(例えば、特に、カニクイザル(マカク・ファシクラリス)及び/又はアカゲザル(マカク・ムラット))及びヒヒ(パピオ・ウルジヌス))と交差反応性であるヒト血清アルブミンに対するナノボディ(例えばAblynx N.V.による米国仮特許出願第60/843,349号を参照されたい)；pH非依存的に血清アルブミンと結合することができるナノボディ(例えば本明細書に言及されるAblynx N.V.による米国仮特許出願第60/850,774号を参照されたい)及び/又は条件付き結合因子であるナノボディ(例えばAblynx N.V.による米国仮特許出願第60/850,775号を参照されたい)が含まれる。

#### 【0476】

半減期を増大させ、本発明のポリペプチドで使用するすることができる、幾つかの特に好ましいナノボディには、国際公開第06/122787号(表II及び表IIIを参照されたい)に開示のナノボディALB-1~ALB-10が含まれ、その中でもALB-8(国際公開第06/122787号における配列番号62)が特に好ましい。

#### 【0477】

本発明のポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は、少なくとも1つの本発明のナノボディと、少なくとも1つの半減期の増大をもたらすナノボディとを含む。

#### 【0478】

具体的であるが非限定的な本発明の態様によれば、本発明のポリペプチドは、1つ又は複数の本発明のナノボディ以外に、少なくとも1つのヒト血清アルブミンに対するナノボディを含有する。

#### 【0479】

概して、1つ又は複数の本発明のナノボディを含有する、半減期が増大した任意の本発明のポリペプチド、及び本発明のナノボディ又は半減期が増大したこのようなポリペプチドの任意の誘導体は好ましくは、対応する本発明のナノボディ自体の少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍(少なくとも5倍等)、例えば少なくとも10倍又は20倍

10

20

30

40

50

を超える半減期を有する。例えば、半減期を増大させたこのような誘導体又はポリペプチドは、対応する本発明のナノボディ自体に比べて、半減期が1時間を超えて、好ましくは2時間を超えて、より好ましくは6時間を超えて(12時間等を超えて)、又はさらに24時間、48時間若しくは72時間を超えて増大し得る。

#### 【0480】

好ましいが非限定的な本発明の態様において、このような誘導体又はポリペプチドは、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、さらにより好ましくは少なくとも72時間以上のヒトにおける血清半減期を示し得る。例えばこのような誘導体又はポリペプチドは、少なくとも5日(約5日~10日等)、好ましくは少なくとも9日(約9日~14日等)、より好ましくは少なくとも約10日(約10日~15日等)、若しくは少なくとも約11日(約11日~16日等)、より好ましくは少なくとも約12日(約12日~18日以上等)、又は14日超(約14日~19日等)の半減期を有し得る。

10

#### 【0481】

本発明の一態様によれば、ポリペプチドは、*in vivo*においてポリペプチドの半減期を増大させることができる1つ又は複数の分子と結合することができる。

#### 【0482】

本発明のポリペプチドは、*in vivo*において安定化され、これらの半減期は、分解耐性及び/又はクリアランス耐性若しくは捕捉耐性のある分子への結合により増大する。通常、このような分子は、それ自体が*in vivo*において長い半減期を有する天然タンパク質である。

20

#### 【0483】

本発明の多重特異性ポリペプチドの好ましいが非限定的な別の例は、少なくとも1つの本発明のナノボディ、及び本発明のポリペプチドを特定の器官、組織、細胞、又は細胞の一部若しくはコンパートメントに誘導し、及び/又は本発明のポリペプチドを特定の器官、組織、細胞、又は細胞の一部若しくはコンパートメントに侵入させるか若しくは入り込ませ、及び/又はナノボディを細胞膜、上皮細胞層等の細胞層、固形腫瘍を含む腫瘍、又は血液脳関門のような生物学的障壁に侵入させるか若しくはこれらに対して横断させる、少なくとも1つのナノボディを含む。このようなナノボディの例としては、所望の器官、組織又は細胞(例えば、腫瘍細胞に関連する細胞表面マーカー)の特異的な細胞表面タンパク質、マーカー又はエピトープ、並びに国際公開第02/057445号及び国際公開第06/040153号に記載の単ドメイン標的化抗体断片に指向性を有するナノボディが挙げられ、このうち、FC44(国際公開第06/040153号の配列番号189)及びFC5(国際公開第06/040154号の配列番号190)が好ましい例である。

30

#### 【0484】

本発明のポリペプチドにおいて、1つ又は複数のナノボディ、及び1つ又は複数のポリペプチドは、(例えば、国際公開第99/23221号に記載のように)互いに直接連結していてもよく、及び/又は1つ又は複数の好適なスペーサー若しくはリンカー、又はこれらの任意の組合せを介して互いに連結していてもよい。

40

#### 【0485】

多価及び多重特異性のポリペプチドに使用するのに好適なスペーサー又はリンカーは当業者にとって明らかであり、一般に、アミノ酸配列を連結させるのに当該技術分野で使用する任意のリンカー又はスペーサーであってよい。好ましくは、上記リンカー又はスペーサーは、医薬用途で意図されるタンパク質又はポリペプチドを構築する上での使用に好適である。

#### 【0486】

幾つかの特に好ましいスペーサーとしては、抗体断片又は抗体ドメインを連結させるのに当該技術分野で使用されるスペーサー及びリンカーが挙げられる。これらは、上記で引用した包括的な背景技術に記載したリンカーと共に、例えば、ダイアボディ又はScFv

50

断片を構築するのに当該技術分野で使用するリンカーを含む（しかし、この点で、ダイアボディ及びS c F v断片では、使用するリンカー配列が、関連するV<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインが一体となって、完全な抗原結合部位を形成することができるような長さ、柔軟性の程度、及び他の性質を有している必要があるが、それぞれのナノボディは単独で完全な抗原結合部位を形成するため、本発明のポリペプチドに使用するリンカーの長さ又は柔軟性に関しては特に制限が存在しないことに留意されたい）。

#### 【0487】

例えば、リンカーは、好適なアミノ酸配列、具体的には1個～50個、好ましくは1個～30個、例えば1個～10個のアミノ酸残基のアミノ酸配列であってもよい。このようなアミノ酸配列の幾つかの好ましい例としては、（国際公開第99/42077号に記載の例えば（gly<sub>4</sub>ser）<sub>3</sub>又は（gly<sub>3</sub>ser<sub>2</sub>）<sub>3</sub>）等の（gly<sub>x</sub>ser<sub>y</sub>）<sub>z</sub>型のgly-serリンカー、本明細書で上述したAblynxによる出願に記載のGS30リンカー、GS15リンカー、GS9リンカー及びGS7リンカー（例えば国際公開第06/040153号及び国際公開第06/122825号を参照）、並びに天然型重鎖抗体のヒンジ領域等のヒンジ様領域、又は（国際公開第94/04678号に記載のもの等の）類似配列が挙げられる。

#### 【0488】

幾つかの他の特に好ましいリンカーは、ポリアラニン（AAA等）、並びにGS30リンカー（国際公開第06/122825号の配列番号85）及びGS9リンカー（国際公開第06/122825号の配列番号84）である。

#### 【0489】

他の好適なリンカーは一般に、有機化合物又はポリマー、特に医薬用途のタンパク質に使用するのに好適な有機化合物又はポリマーを含む。例えば、ポリ（エチレングリコール）部分が、抗体ドメインを連結させるのに使用されており、例えば、国際公開第04/081026号を参照されたい。

#### 【0490】

使用するリンカー（複数可）の長さ、柔軟性の程度及び／又は他の性質（重要ではないが、S c F v断片に使用されるリンカーにおいて一般的なものは、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2、又は1つ若しくは複数の他の抗原に対する親和性、特異性又は結合活性を含むがこれらに限定されない、最終的に得られる本発明のポリペプチドの性質に何らかの影響を及ぼし得る点が、本発明の範囲内に包含される。本明細書中での開示に基づき、任意で、限定されたルーチン実験を幾つか実施した後に、当業者であれば本発明の特定のポリペプチドに使用するために最適なリンカー（複数可）を決定することができるであろう。

#### 【0491】

例えば、（多量体受容体又は他のタンパク質等の）多量体抗原に指向性を有するナノボディを含む本発明の多価のポリペプチドにおいて、リンカーは、好ましくは、ポリペプチド中に存在する本発明のそれぞれのナノボディを、多量体のそれぞれのサブユニット上の抗原決定基に結合させるような長さ及び柔軟性を有している。同様に、同一の抗原上の2つ以上の異なる抗原決定基（例えば、抗原の異なるエピトープ、及び／又は多量体受容体、チャンネル若しくはタンパク質の異なるサブユニット）に指向性を有するナノボディを含む本発明の多重特異性ポリペプチドにおいて、リンカーは、好ましくは、それぞれのナノボディを、目的の抗原決定基に結合させるような長さ及び柔軟性を有している。この場合にも、本明細書中での開示に基づき、任意で、限定されたルーチン実験を幾つか実施した後に、当業者であれば本発明の特定のポリペプチドに使用するために最適なリンカー（複数可）を決定することができるであろう。

#### 【0492】

使用するリンカー（複数可）が、本発明のポリペプチドに、1つ又は複数の他の望まし

10

20

30

40

50

い性質又は機能を付与し、及び／又は（例えば本発明のナノボディの誘導体について本明細書中に記載の）誘導体の形成及び／又は官能基の結合のための１つ又は複数の部位をもたらすことも本発明の範囲内に包含される。例えば、１つ又は複数の荷電アミノ酸残基（上記の表 A - 2 を参照）を含有するリンカーは、高められた親水性をもたらすことができるのに対し、小エピトープ又はタグを形成するか又はこれらを含有するリンカーは、検出、同定及び／又は精製の目的で 사용할 ことができる。同様に、本明細書中での開示に基づき、任意で、限定されたルーチン実験を幾つか実施した後に、当業者であれば本発明の特定のポリペプチドに使用するために最適なリンカーを決定することができるであろう。

【 0 4 9 3 】

最終的に、本発明のポリペプチドに２つ以上のリンカーを使用する場合、これらのリンカーは同一であっても異なってもよい。この場合でも、本明細書中での開示に基づき、任意で、限定されたルーチン実験を幾つか実施した後に、当業者であれば本発明の特定のポリペプチドに使用するために最適なリンカーを決定することができるであろう。

【 0 4 9 4 】

通常、発現及び産生を容易にするため、本発明のポリペプチドは直鎖ポリペプチドである。しかしながら、本発明は、最も広範な意味ではこれらに限定されない。例えば、本発明のポリペプチドが３つ以上のナノボディを含む場合、「星型」の構築物を得るために、各「アーム」がナノボディに結合する３つ以上の「アーム」を有するリンカーを使用することによってこれらを結合させることも可能である。通常あまり好ましくないが、環状の構築物を使用することも可能である。

【 0 4 9 5 】

また、本発明には、本発明のポリペプチドの誘導体が含まれ、これは本発明の、すなわち本明細書中に記載のナノボディの誘導体に本質的に類似するものであり得る。

【 0 4 9 6 】

また、本発明には、本発明のポリペプチドから「本質的になる」タンパク質又はポリペプチドが含まれる（「から本質的になる」という語句は、上記で示したものと本質的に同じ意味を有する）。

【 0 4 9 7 】

本発明の一態様によれば、本発明のポリペプチドは、本明細書中に規定したように、本質的に単離形態である。

【 0 4 9 8 】

本明細書中のさらなる説明により当業者にとって明らかであるように、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び核酸は、それ自体が既知の方法で調製することができる。例えば、本発明のナノボディ及びポリペプチドは、抗体の調製、特に抗体断片（（単一）ドメイン抗体及び S c F v 断片が挙げられるが、これらに限定されない）の調製のためのそれ自体が既知の任意の方法で調製することができる。アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び核酸を調製するための、好ましいが非限定的な幾つかの方法としては、本明細書中に記載の方法及び技法が挙げられる。

【 0 4 9 9 】

当業者にとって明らかであるように、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチドの調製に特に有用な一方法は通常、

i ) 好適な宿主細胞又は宿主生物（本明細書中では「本発明の宿主」とも呼ぶ）において、又は本発明の上記アミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドをコードする核酸（本明細書中では「本発明の核酸」とも呼ぶ）の適切な別の発現系において、発現する工程と、場合によってはその後、

i i ) このようにして得られる本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを単離及び／又は精製する工程とを含む。

【 0 5 0 0 】

特に、このような方法は、

i ) 本発明の上記宿主が少なくとも１つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又

10

20

30

40

50

はポリペプチドを発現及び／又は産生するような条件下で、本発明の宿主を培養及び／又は維持する工程と、場合によってはその後、

i i) このようにして得られる本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを単離及び／又は精製する工程とを含み得る。

【0501】

本発明の核酸は、一本鎖又は二本鎖のDNA又はRNAの形態を取ることができ、好ましくは二本鎖DNAの形態をとる。例えば、本発明のヌクレオチド配列はゲノムDNA、cDNA又は合成DNA（目的とする宿主細胞又は宿主生物内の発現に特異的に適合しているコドンの使用によるDNA等）であってもよい。

【0502】

本発明の一態様によれば、本発明の核酸は、本明細書中に記載したように、本質的に単離形態である。

【0503】

本発明の核酸は、例えば、プラスミド、コスミド又はYAC等のベクターの形態をとり、ベクター中に存在し、及び／又はその一部であってもよく、また本質的に単離形態であってもよい。

【0504】

本発明の核酸は、本明細書中に記載の本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に関する情報に基づき、それ自体が既知の方法で調製されるか又は得ることができ、及び／又は好適な天然資源から単離することができる。類似体を得るためには、天然型V<sub>HH</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列に、例えば、部位特異的な突然変異誘発を起こして、上記類似体をコードする本発明の核酸を得ることができる。また、当業者にとって明らかであるように、本発明の核酸を調製するために、例えば、ナノボディをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列、及び例えば、1つ又は複数のリンカーをコードする核酸等の幾つかのヌクレオチド配列を好適な方法で連結することができる。

【0505】

本発明の核酸を生成するための技法は当業者にとって明らかであり、例えば、自動DNA合成、部位特異的な突然変異誘発、2つ以上の天然型配列及び／又は合成型配列（又はこれらの2つ以上の部分）の組合せ（combining）、切断された発現産物を発現させる突然変異の導入、（例えば、好適な制限酵素を用いて容易に消化及び／又はライゲーションすることができるカセット及び／又は領域を生成するための）1つ又は複数の制限部位の導入、及び／又は例えば、天然形態のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2の配列を鋳型として使用する1つ又は複数の「ミスマッチ」プライマーを使用するPCR反応による突然変異の導入が挙げられ得るが、これらに限定されない。これらの技法及び他の技法は当業者にとって明らかであり、同様に上記のSambrook et al.及びAusubel et al.の文献等の標準的なハンドブック、及び以下の実施例を参照する。

【0506】

本発明の核酸はまた、当業者にとって明らかであるように、遺伝子構築物の形態をとり、遺伝子構築物中に存在し、及び／又はその一部であってもよい。このような遺伝子構築物は一般に、例えば、1つ又は複数の好適な調節要素（好適なプロモーター（複数可）、エンハンサー（複数可）、ターミネーター（複数可）等）、及び本明細書中に述べられている遺伝子構築物のさらなる要素等）といった、1つ又は複数のそれ自体が既知の遺伝子構築物の要素に、任意で連結する少なくとも1つの本発明の核酸を含む。少なくとも1つの本発明の核酸を含むこのような遺伝子構築物は、本明細書中において「本発明の遺伝子構築物」とも呼ばれる。

【0507】

本発明の遺伝子構築物は、DNAであってもRNAであってもよく、好ましくは二本鎖

10

20

30

40

50

DNAである。また、本発明の遺伝子構築物は、目的とする宿主細胞又は宿主生物の形質転換に好適な形態、目的とする宿主細胞のゲノムDNAへの組込みに好適な形態、又は目的とする宿主生物における単独での複製、維持及び／又は継代に好適な形態をとり得る。例えば、本発明の遺伝子構築物は、例えば、プラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクター又はトランスポゾン等のベクターの形態をとることができる。特に、ベクターは、発現ベクター、すなわち、*in vitro*及び／又は*in vivo*（例えば、好適な宿主細胞、宿主生物及び／又は発現系）での発現を提供し得るベクターであってもよい。

【0508】

好ましいが非限定的な一態様では、本発明の遺伝子構築物は、

i) ii) と作動可能に連結した少なくとも1つの本発明の核酸と、

ii) プロモーター、及び任意で好適なターミネーター等の、1つ又は複数の調節要素と、任意でさらに

iii) それ自体が既知の遺伝子構築物の1つ又は複数のさらなる要素とを含み、ここで、「調節要素」、「プロモーター」、「ターミネーター」、及び「作動可能に連結した」という用語は、当該技術分野における（本明細書中に詳述するような）通常の意味を有しており、遺伝子構築物中に存在する上記「さらなる要素」とは、例えば、3' - 又は5' - UTR配列、リーダー配列、選択マーカー、発現マーカー／レポーター遺伝子、及び／又は形質転換若しくは組込み（の効率）を促進又は増大させ得る要素であってもよい。このような遺伝子構築物に好適なこれら及び他の要素は当業者にとって明らかであり、例えば、使用する構築物の種類、目的とする宿主細胞又は宿主生物、対象となる本発明のヌクレオチド配列を発現させる方法（例えば、構成的発現、一時的発現、又は誘導性発現等を介するもの）、及び／又は使用する形質転換法に応じて決定することができる。例えば、抗体及び抗体断片（（単一）ドメイン抗体及びScFv断片が挙げられるが、これらに限定されない）の発現及び産生のための、それ自体が既知の制御配列、プロモーター、及びターミネーターを、ほぼ同様の方法で使用してもよい。

【0509】

好ましくは、本発明の遺伝子構築物において、上記少なくとも1つの本発明の核酸、及び上記調節要素、及び任意で上記1つ又は複数のさらなる要素は、互いに「作動可能に連結」しており、これにより、これらは通常互いに機能的な関係にあることが意図されている。例えば、プロモーターが、コーディング配列の転写及び／又は発現を、開始又は他の方法により制御／調節することができる場合（上記コーディング配列は、上記プロモーター「に制御されている」ものとして理解されたい）、コーディング配列に「作動可能に連結」していると考えられる。一般に、2つのヌクレオチド配列が作動可能に連結している場合、これらは同一の配向を有し、通常、同一リーディングフレーム内にもある。必ずしも必要ではないが、通常、これらは本質的に隣接している。

【0510】

好ましくは、本発明の遺伝子構築物の調節要素及びさらなる要素は、目的とする宿主細胞又は宿主生物において意図される生物学的機能を付与することができるようなものである。

【0511】

例えば、プロモーター、エンハンサー又はターミネーターは、目的とする宿主細胞又は宿主生物において「作動可能」であるとされ、このため（例えば）、上記プロモーターは、（本明細書で規定したように）作動可能に連結したヌクレオチド配列（例えばコーディング配列）の転写及び／又は発現を、開始、又は他の方法により制御／調節することができるものであると意図される。

【0512】

特に好ましい幾つかのプロモーターとしては、本明細書中に述べた宿主細胞における発現のためのそれ自体が既知のプロモーター、特に、本明細書中に述べたもの及び／又は実施例において使用されるもの等の、細菌細胞における発現のためのプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。



## 【0513】

選択マーカーは、(すなわち、適切な選択条件下で)本発明のヌクレオチド配列による形質転換が(首尾良く)起こった宿主細胞及び/又は宿主生物を、形質転換が(首尾良く)起こらなかった宿主細胞及び/又は宿主生物と区別できるようなものとする。このようなマーカーの好ましいが非限定的な幾つかの例は、抗生物質(カナマイシン若しくはアンピシリン等)に対する耐性を付与する遺伝子、温度耐性を付与する遺伝子、又は形質転換されていない細胞若しくは生物が生存する上で不可欠な、培地中の或る特定の因子、化合物及び/又は(食品)成分がない状態で宿主細胞若しくは宿主生物を維持させる遺伝子である。

## 【0514】

リーダー配列は、(目的とする宿主細胞又は宿主生物において)所望の翻訳後修飾を可能にし、及び/又は転写されたmRNAを細胞の所望の部分又はオルガネラに配向させるようなものとする。また、リーダー配列は、上記細胞から発現産物を分泌させてもよい。そのようなものとして、リーダー配列は、宿主細胞又は宿主生物中で作動可能な任意のプロ配列、プレ配列、又はプレプロ配列であってもよい。リーダー配列は、細菌細胞中で発現しなくてもよい。例えば、抗体及び抗体断片(単ドメイン抗体及びScFv断片が挙げられるが、これらに限定されない)の発現及び産生のための、それ自体が既知であるリーダー配列を、ほぼ同様の方法で使うことができる。

## 【0515】

発現マーカー又はレポーター遺伝子は、(宿主細胞又は宿主生物中で)遺伝子構築物(に存在する遺伝子又はヌクレオチド配列)の発現を検出できるようなものとする。発現マーカーは、場合によっては、発現産物を、例えば、細胞の特定の部分又はオルガネラ、及び/又は多細胞生物の特定の細胞(複数可)、組織(複数可)、器官(複数可)、又は部分(複数可)に局在化させてもよい。このようなレポーター遺伝子は、本発明のアミノ酸配列とのタンパク質融合として発現させてもよい。好ましいが非限定的な幾つかの例としては、GFP等の蛍光タンパク質が挙げられる。

## 【0516】

好適なプロモーター、ターミネーター、及びさらなる要素の好ましいが非限定的な幾つかの例としては、本明細書で言及した宿主細胞における発現に使用することができるもの、及び具体的には本明細書で言及され、及び/又は下記の実施例で用いられているもの等の細菌細胞における発現に好適であるものが挙げられる。ターミネーター、転写及び/又は翻訳エンハンサー、及び/又は組込み因子等の、本発明の遺伝子構築物中に存在/使用し得るプロモーター、選択マーカー、リーダー配列、発現マーカー、及びさらなる要素についての(さらなる)非限定的な幾つかの例については、上記のSambrook et al.、及びAusubel et al.文献等の概説ハンドブック、並びに国際公開第95/07463号、国際公開第96/23810号、国際公開第95/07463号、国際公開第95/21191号、国際公開第97/11094号、国際公開第97/42320号、国際公開第98/06737号、国際公開第98/21355号、米国特許第7,207,410号、米国特許第5,693,492号、及び欧州特許第1085089号に示された例を参照する。他の例は当業者にとって明らかであろう。上記の包括的な背景技術及び本明細書中にさらに引用した参考文献も参照する。

## 【0517】

本発明の遺伝子構築物は、通常、例えば、上記のSambrook et al.及びAusubel et al.文献等の概説ハンドブックに記載の技法を用いて、本発明のヌクレオチド配列(複数可)を、1つ又は複数の上記さらなる要素と適切に連結させることにより得ることができる。

## 【0518】

多くの場合、本発明の遺伝子構築物は、本発明のヌクレオチド配列を、それ自体が既知の好適な(発現)ベクターに挿入することによって得られる。好適な発現ベクターの好ましいが非限定的な幾つかの例は、以下の実施例において使用されるもの、及び本明細書中に記載したものである。

## 【 0 5 1 9 】

本発明の核酸及び／又は本発明の遺伝子構築物は、宿主細胞又は宿主生物の形質転換、すなわち本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを発現及び／又は産生させるために使用することができる。好適な宿主又は宿主細胞は当業者にとって明らかであり、例えば、任意の好適な真菌、原核、又は真核細胞若しくは細胞株、又は任意の好適な真菌、原核、又は真核生物、例えば：

大腸菌の菌株、ミラビリス変形菌 (*Proteus mirabilis*) 等のプロテウス属の菌株、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 等のシュードモナス属の菌株等のグラム陰性菌株、及び、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 又はブレビス菌 (*Bacillus brevis*) 等のバチルス属の菌株、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 等のストレプトミセス属の菌株、スタフィロコッカス・カルノサス (*Staphylococcus carnosus*) 等のスタフィロコッカス属の菌株、及び乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) 等のラクトコッカス属の菌株等のグラム陽性菌株が挙げられるがこれらに限定されない細菌株、

トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 等のトリコデルマ属の種、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) 等のニューロスポラ属の種、ソルダリア・マクロスポラ (*Sordaria macrospora*) 等のソルダリア属の種、アスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) 又はショウコウジカビ (*Aspergillus sojae*) 等のアスペルギルス属の種、又は別の糸状菌 (*filamentous fungi*) 由来の細胞が挙げられるがこれらに限定されない真菌細胞、

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロミセス属の種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等のシゾサッカロミセス属の種、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 又はピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) 等のピキア属の種、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等のハンセヌラ属の種、クルイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) 等のクルイペロミセス属の種、アークスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*) 等のアークスラ属の種、ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) 等のヤロウィア属の種由来の細胞が挙げられるがこれらに限定されない酵母細胞、

アフリカツメガエル卵母細胞等の両生類細胞又は細胞株、

シロイチモンジヨトウ S F 9 及び S f 2 1 細胞を含むがこれらに限定されない鱗翅目に由来する細胞／細胞株、又はシュナイダー細胞及び K c 細胞等のショウジョウバエに由来する細胞／細胞株等の昆虫に由来する細胞又は細胞株、

タバコ植物等の植物又は植物細胞、及び／又は

C H O 細胞、B H K 細胞 (B H K - 2 1 細胞等)、及び H e L a 細胞、C O S 細胞 (C O S - 7 細胞等)、及び P E R . C 6 細胞等のヒト細胞又は細胞株が挙げられるがこれらに限定されない、ヒトに由来する細胞又は細胞株、哺乳動物に由来する細胞又は細胞株等の哺乳動物細胞又は細胞株、及び、

抗体及び抗体断片 (( 単一 ) ドメイン抗体及び S c F v 断片が挙げられるがこれらに限定されない) を発現及び産生するそれ自体が既知の他の全ての宿主又は宿主細胞であってもよく、これらは当業者に明らかであろう。上記で引用した包括的な背景技術及び、例えば、国際公開第 9 4 / 2 9 4 5 7 号、国際公開第 9 6 / 3 4 1 0 3 号、国際公開第 9 9 / 4 2 0 7 7 号、Frenken et al. (1998) ( 同上 )、Riechmann and Muyldermans (1999) ( 同上 )、van der Linden (2000) ( 同上 )、Thomassen et al. (2002) ( 同上 )、Joosten et al. (2003) ( 同上 )、Joosten et al. (2005) ( 同上 ) 及び本明細書中にさらに引用した文献を参照する。

## 【 0 5 2 0 】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドはまた、例えば予防目的及び／又は治療目的 ( 遺伝子治療等 ) のために、多細胞生物の 1 つ又は複数の細胞、組織、又は器官に導入し、発現させることができる。このために、本発明のヌクレオチド配列を、例えば、このように ( 例えば、リボソームを用いて )、又は好適な ( 例えば、アデノウイルス、又はアデノ随伴ウイルス等のパルボウイルス等のレトロウイルスに由来する ) 遺伝子治療用ベクターに挿入後、任意の好適な方法で細胞又は組織に導入することができる。当業

10

20

30

40

50

者にとって明らかであるように、このような遺伝子治療は、本発明の核酸又は本発明の核酸をコードする好適な遺伝子治療用ベクターを、患者又は患者の特定の細胞又は特定の組織若しくは器官に投与することにより患者の体内において、*in vivo* 及び/又は *in situ*で行うことができ、又は好適な（多くの場合、外植リンパ球、骨髓吸引物又は組織生検試料等の、治療対象となる患者の体内から採取された）細胞は、本発明のヌクレオチド配列を用いて *in vitro* で治療した後、患者の体内に好適に（再）導入することができる。これは全て、例えば Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N.Y.), Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539, Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919, Anderson, Science 256 (1992), 808-813, Verma, Nature 389 (1994), 239, Isner, Lancet 348 (1996), 370-374, Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086, Onodera, Blood 91; (1998), 30-36, Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699, Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292, Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51, Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716、国際公開第 94/29469 号、国際公開第 97/00957 号、米国特許第 5,580,859 号、米国特許第 5,589,546 号、又は Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640 に記載の当業者に既知の遺伝子治療用ベクター、技法、及び送達システムを用いて行うことができる。例えば、ScFv 断片 (Afanasieva et al., Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) 及びダイアボディ (Blanco et al., J. Immunol, 171, 1070-1077 (2003)) の *in situ* 発現は当該技術分野で説明されている。

#### 【0521】

細胞中でのナノボディの発現のために、これらは、例えば、国際公開第 94/02610 号、国際公開第 95/22618 号、及び米国特許第 7004940 号、国際公開第 03/014960 号、Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag、並びに Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170 に記載の、いわゆる「細胞内抗体」として発現させることができる。

#### 【0522】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを、例えば、ウサギ、ウシ、ヤギ又はヒツジの母乳中のようなトランスジェニック哺乳動物の母乳中（トランス遺伝子を哺乳動物に導入する一般的な技法については、例えば、米国特許第 6,741,957 号、米国特許第 6,304,489 号、及び米国特許第 6,849,992 号を参照）、植物、又は葉、花、果実、種、根、塊茎を含むがこれらに限定されない植物の一部中（例えば、タバコ、トウモロコシ、大豆、又はアルファルファ）、又は、例えば、カイコガの蛹中で産生することもできる。

#### 【0523】

さらに、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを、細胞を含まない発現系で発現及び/又は産生してもよく、このような系の好適な例は当業者にとって明らかであろう。好ましいが非限定的な幾つかの例としては、小麦麦芽系、ウサギ網状赤血球溶解物、又は Zubay の方法による大腸菌を用いた系での発現が挙げられる。

#### 【0524】

上記のように、ナノボディを使用する利点の 1 つは、これに基づくポリペプチドを、好適な細菌系における発現によって調製することができる点であり、及び好適な細菌発現系、ベクター、宿主細胞、調節要素等は、例えば上記で引用した参考文献によって当業者にとって明らかであろう。しかしながら、本発明は、最も広範な意味では細菌系における発現に限定されないことに留意されたい。

#### 【0525】

好ましくは、本発明では、本発明のポリペプチドを医薬用途に適した形態で提供する細菌発現系等の（*in vivo* 又は *in vitro*）発現系を使用し、このような発現系も当業者にとって明らかであろう。さらに当業者にとって明らかであるように、医薬用

途に適した本発明のポリペプチドは、ペプチド合成法を用いて調製することができる。

【0526】

工業的スケールでの製造において、ナノボディ又はナノボディを含有するタンパク質治療剤の（工業的）製造のために好ましい異種宿主としては、大規模スケールでの発現／産生／発酵、特に大規模スケールの医薬用途（すなわち、GMPグレード）での発現／産生／発酵に適した大腸菌、ピキア・パストリス、出芽酵母の菌株が挙げられる。このような菌株の好適な例は、当業者にとって明らかであろう。このような菌株及び産生／発現系も、Biovitrum社（Uppsala, Sweden）等の企業から入手可能である。

【0527】

代替的には、哺乳動物細胞株、特にチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を、大規模スケールでの発現／産生／発酵、特に大規模スケールの医薬用途での発現／産生／発酵のために用いることができる。このような発現／産生系も、上記の幾つかの企業から入手可能である。

【0528】

特定の発現系の選択は、或る特定の翻訳後修飾、より具体的にはグリコシル化の必要条件に一部依存している。グリコシル化が望ましいか又は必要とされるナノボディを含有する組換えタンパク質の産生には、発現したタンパク質をグリコシル化する能力を有する哺乳動物発現用宿主の使用が必要である。これに関連して、得られるグリコシル化パターン（すなわち、結合する残基の種類、数、及び位置）が、発現に用いられる細胞又は細胞株に依存することは、当業者にとって明らかであろう。好ましくは、ヒト細胞若しくは細胞株が用いられる（すなわち、本質的にヒトのグリコシル化パターンを有するタンパク質を与える）か、又は、本質的に及び／又は機能的にヒトのグリコシル化と同一であるか、又は少なくともヒトのグリコシル化を模倣したグリコシル化パターンを与えることができる別の哺乳動物の細胞株が用いられる。一般に、大腸菌等の原核宿主はタンパク質をグリコシル化する能力を有しておらず、酵母等の下等真核細胞を使用すると、通常、ヒトのグリコシル化と異なるグリコシル化パターンがもたらされる。それにもかかわらず、上記宿主細胞及び発現系の全てを、得ようとする所望のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドに応じて、本発明に用いることができることを理解されたい。

【0529】

したがって、本発明の非限定的な一態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドはグリコシル化される。本発明の別の非限定的な態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドはグリコシル化されない。

【0530】

本発明の好ましいが非限定的な一態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、細菌細胞中、具体的には大規模スケールでの医薬品製造に適した上記の株の細胞等の細菌細胞中で産生する。

【0531】

本発明の好ましいが非限定的な別の態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、酵母細胞中、具体的には大規模スケールでの医薬品製造に適した上記の種の細胞等の酵母細胞中で産生する。

【0532】

本発明のさらに好ましいが非限定的な別の態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、哺乳動物細胞中、具体的にはヒト細胞又はヒト細胞株の細胞中で、さらに具体的には大規模スケールでの医薬品製造に適した上記の細胞株等のヒト細胞又はヒト細胞株の細胞中で産生する。

【0533】

宿主細胞中での発現が、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの製造に用いられる場合、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、細胞内（例えば、細胞質中、ペリプラズム中、又は封入体中）で産生し、次いで宿主細胞から単離し、場合によってはさらに精製してもよく、又は細胞外（例えば、宿主細胞を培養する培地中

10

20

30

40

50

）で産生し、次いで培地から単離し、場合によってはさらに精製してもよい。真核宿主細胞を使用する場合、得られるナノボディ及びタンパク質のさらなる単離及び下流工程での処理が大幅に容易になるため、通常、細胞外で産生されることが好ましい。通常、大腸菌の菌株等の上記細菌細胞は、毒素及び溶血素等の数種のタンパク質を除き、タンパク質を細胞外に分泌せず、大腸菌において分泌物を産生することは、内膜を通してペリプラズム空間へタンパク質を転移させることを意味する。ペリプラズムでの産生は、細胞質での産生に対して、幾つかの利点がある。例えば、分泌産物のN末端のアミノ酸配列は、特異的シグナルペプチダーゼによる分泌シグナル配列の切断後の天然遺伝子産物と同一であってもよい。また、ペリプラズム中では、細胞質中よりもプロテアーゼ活性はるかに低いと思われる。さらに、ペリプラズム中では、混入するタンパク質が少ないため、タンパク質の精製がより容易である。別の利点は、ペリプラズムが細胞質よりも酸化的な環境をもたらすため、正しいジスルフィド結合が形成される可能性があるという点である。大腸菌中で過剰発現されたタンパク質は、不溶性の凝集物、いわゆる封入体中に見られることが多い。これらの封入体は、細胞質中又はペリプラズム中に存在させることができ、これらの封入体からの生物活性タンパク質の回収は、変性／リフォールディングプロセスを必要とする。治療効果を有するタンパク質を含む多くの組換えタンパク質は、封入体から回収される。代替的には、当業者に明らかであるように、所望のタンパク質、特に本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを分泌するように遺伝的に修飾された細菌の組換え菌株を用いることができる。

10

#### 【 0 5 3 4 】

20

したがって、本発明の非限定的な一態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、細胞内で産生され、宿主細胞から、特に細菌細胞又は細菌細胞中の封入体から単離したアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドである。本発明の別の非限定的な態様によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、細胞外で産生され、宿主細胞を培養する培地から単離されたアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドである。

#### 【 0 5 3 5 】

好ましいが非限定的な幾つかの、これらの宿主細胞で用いるためのプロモーターとしては、

大腸菌における発現のための：l a c プロモーター（及び、l a c U V 5 プロモーター等のこれらの誘導体）；アラビノースプロモーター；ファージの左側（P L）及び右側（P R）プロモーター；t r p オペロンのプロモーター；ハイブリッドl a c / t r p プロモーター（t a c 及びt r c）；T 7 - プロモーター（より具体的にはT 7 - ファージ遺伝子10のプロモーター）；及び他のT - ファージプロモーター；T n 10 テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター；外来制御オペレーター配列の1つ又は複数のコピーを含む上記プロモーターの組換え変異体；

30

出芽酵母における発現のための：A D H 1（アルコールデヒドロゲナーゼ1）、E N O（エノラーゼ）、C Y C 1（チトクロームc異性化酵素1）、G A P D H（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）、P G K 1（ホスホグリセリン酸キナーゼ）、P Y K 1（ピルビン酸キナーゼ）の構成的プロモーター；G A L 1、G A L 10、G A L 7（ガラクトース代謝酵素）、A D H 2（アルコールデヒドロゲナーゼ2）、P H O 5（酸ホスファターゼ）、C U P 1（銅メタロチオネイン）の制御的プロモーター；C a M V（カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター）の異種プロモーター；

40

ピキア・パストリスにおける発現のための：A O X 1 プロモーター（アルコールオキシダーゼI）；

哺乳動物細胞における発現のための：ヒトサイトメガロウイルス（h C M V）前初期エンハンサー／プロモーター；プロモーターがT e t リプレッサーによって制御可能なように2個のテトラサイクリンオペレーター配列を含有するヒトサイトメガロウイルス（h C M V）前初期プロモーター変異体；単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（T K）プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの長末端反復配列（R S V L T R）エンハンサー／プロ

50

モーター；ヒト、チンパンジー、マウス、又はラット由来の伸長因子1 (hEF-1) プロモーター；SV40初期プロモーター；HIV-1の長末端反復配列プロモーター；アクチンプロモーター；  
が挙げられる。

【0536】

好ましいが非限定的な幾つかの、これらの宿主細胞で用いるためのベクターとしては、哺乳動物細胞における発現のためのベクター：pMAMneo (Clontech)、pcDNA3 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pDBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460) 及び1ZD35 (ATCC 37565)、並びにアデノウイルスに基づくもの等のウイルスに基づく発現系；

細菌細胞における発現のためのベクター：pETベクター (Novagen) 及びpQEベクター (Qiagen)；

酵母又は他の真菌細胞における発現のためのベクター：pYES2 (Invitrogen) 及びピキア発現ベクター (Invitrogen)；

昆虫細胞における発現のためのベクター：pBlueBacII (Invitrogen) 及び他のバキュロウイルスベクター；

植物又は植物細胞における発現のためのベクター：例えば、カリフラワーモザイクウイルス又はタバコモザイクウイルス、アグロバクテリウムの好適な菌株又はTi-プラスミドに基づくベクター；

が挙げられる。

【0537】

好ましいが非限定的な幾つかの、これらの宿主細胞で使用するための分泌配列としては、

大腸菌等の細菌細胞における使用のための：PelB、Bla、OmpA、OmpC、OmpF、OmpT、StII、PhoA、PhoE、MalE、Lpp、LamB等；TATシグナルペプチド、ヘモリシンC末端分泌シグナル；

酵母における使用のための：-接合因子プレプロ配列、ホスファターゼ (pho1)、インベルターゼ (Suc) 等；

哺乳動物細胞における使用のための：標的タンパク質が真核細胞由来である場合には、固有シグナル、マウスIg鎖V-J2-Cシグナルペプチド等；

が挙げられる。

【0538】

本発明の宿主又は宿主細胞を形質転換するのに好適な技法は、当業者にとって明らかであり、目的とする宿主細胞/宿主生物及び使用する遺伝子構築物に依存することもある。同様に、上記ハンドブック及び特許出願を参照する。

【0539】

形質転換後、本発明のヌクレオチド配列/遺伝子構築物によって首尾よく形質転換された宿主細胞又は宿主生物を検出及び選択する工程を実行することができる。この工程は、例えば、本発明の遺伝子構築物中にある選択可能なマーカーに基づいて選択する工程、又は、例えば、特異的抗体を使用する本発明のアミノ酸配列の検出を含む工程であってもよい。

【0540】

形質転換された宿主細胞 (安定な細胞株の形態を取ることができる) 又は宿主生物 (安定な変異体系列又は株の形態を取ることができる) は、本発明のさらなる態様をなす。

【0541】

好ましくは、これらの宿主細胞又は宿主生物は、(宿主生物の場合には、その少なくと

10

20

30

40

50

も１つの細胞、部分、組織又は器官において）本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを発現し、又は（少なくとも）（例えば、好適な条件下で）発現することができるようなものである。本発明はまた、本発明の宿主細胞又は宿主生物のさらなる世代、後代及び／又は子孫を含んでおり、これらは、例えば、細胞分裂又は有性若しくは無性生殖により得られるものであってよい。

【０５４２】

本発明のアミノ酸配列を生成し／その発現を得るために、形質転換された宿主細胞又は形質転換された宿主生物は一般に、（所望の）本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドが発現／産生されるような条件下で保持、維持及び／又は培養され得る。好適な条件は当業者にとって明らかであり、通常、使用する宿主細胞／宿主生物に、及び（関連する）本発明のヌクレオチド配列の発現を制御する調節因子に依存する。この場合にも、本発明の遺伝子構築物に関する上記の段落に記載したハンドブック及び特許出願を参照する。

10

【０５４３】

一般に、好適な条件には、好適な培地の使用、好適な食餌及び／又は好適な栄養源の存在、好適な温度の使用、及び場合によっては好適な誘導因子又は化合物の存在（例えば、本発明のヌクレオチド配列が誘導性プロモーターにより制御される場合）が含まれていてもよく、これらは全て当業者が選択することができる。この場合にも、このような条件下で、本発明のアミノ酸配列は、構成的に、一時的に、又は適切に誘導された場合にのみ発現することができる。

20

【０５４４】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドが、（まず）未成熟型（同上）で産生され、次いで、使用する宿主細胞／宿主生物に応じて翻訳後修飾されてもよいことも、当業者にとって明らかであろう。また、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、この場合にも、使用する宿主細胞／宿主生物に応じてグリコシル化されてもよい。

【０５４５】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、次いで、宿主細胞／宿主生物から、及び／又は上記宿主細胞若しくは宿主生物を培養した培地から、（分取）クロマトグラフィ法、及び／又は電気泳動法、分別沈殿法、アフィニティ法（例えば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドと融合した特定の切断可能なアミノ酸配列を用いる）、及び／又は分取免疫法（すなわち、単離対象のアミノ酸配列に対する抗体を用いる）等の、それ自体が既知のタンパク質の単離技法及び／又は精製技法を用いて単離することができる。

30

【０５４６】

概して、医薬用途のために、本発明のポリペプチドは、少なくとも１つの本発明のポリペプチドと、少なくとも１つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤、及び／又はアジュバントとを含み、任意で１つ又は複数のさらなる薬理活性ポリペプチド及び／又は化合物を含む薬学的調製剤又は薬学的組成物として製剤化することができる。非限定的な例により、このような製剤は、経口投与のため、非経口投与（静脈内、筋内若しくは皮下注射、又は静脈内点滴等による）のため、局所投与のため、吸入、経皮パッチ、インプラント、坐薬等による投与のために適した形態を取ることができる。このような好適な投与形態は、投与の方法、及びその調製剤で用いるための方法及び担体に応じて、固体、半固体又は液体であってよく、当業者にとって明らかであり、本明細書にさらに記載する。

40

【０５４７】

したがって、さらなる一態様において、本発明は、少なくとも１つの本発明のアミノ酸、少なくとも１つの本発明のナノボディ又は少なくとも１つの本発明のポリペプチド、及び少なくとも１つの好適な（すなわち、医薬用途に好適な）担体、希釈剤又は賦形剤を含み、場合によっては１つ又は複数のさらなる活性物質を含有する薬学的組成物に関する。

【０５４８】

50

概して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、それ自体が既知の任意の好適な方法により製剤化及び投与することができ、これらについては、例えば、上記で引用した包括的な背景技術（特に、国際公開第04/041862号、国際公開第04/041863号、国際公開第04/041865号、国際公開第04/041867号）、及びRemington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., MackPublishing Company, USA（1990）若しくはRemington, the Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins（2005）等の標準的なハンドブックを参照する。

【0549】

例えば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、通常の抗体及び抗体断片（例えばScFv及びダイアボディ）及び他の薬理活性タンパク質のための、それ自体が既知の任意の方法で製剤化及び投与することができる。このような製剤及びこれを調製する方法は当業者にとって明らかであり、例えば、非経口投与（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋内、管腔内、動脈内若しくは髄腔内投与）又は局所（すなわち、経皮若しくは皮内）投与に好適な調製剤が挙げられる。

【0550】

非経口投与のための調製剤は、例えば、点滴又は注射に好適な滅菌液、懸濁液、分散液又は乳化液であってもよい。このような調製剤に好適な担体又は希釈剤としては、例えば、限定するものではないが、滅菌水及び緩衝水溶液、並びにリン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及びハanks液等の溶液、水性油、グリセロール、エタノール、プロピレングリコール等のグリコール、又は鉱物油、動物油、及び植物油、例えば、落花生油、大豆油、並びに好適なこれらの混合物が挙げられる。通常、水溶液又は懸濁液が好ましい。

【0551】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、遺伝子治療の送達方法を使用して投与することもできる。例えば、その全文が参照により本明細書中に援用される米国特許第5,399,346号を参照されたい。遺伝子治療の送達方法を使用して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドをコードする遺伝子によりトランスフェクトされた初代細胞を、特定の器官、組織、移植片、腫瘍又は細胞を標的とするための組織特異的プロモーターによりさらにトランスフェクトすることができ、かつ細胞内に局在化した発現のためのシグナル及び安定化配列によりさらにトランスフェクトすることもできる。

【0552】

このように、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、不活性希釈剤又は吸収可能な食用の担体等の薬学的に許容可能なビヒクルと組み合わせて、例えば、経口的に全身投与することができる。これらを、ハード又はソフトシェルゼラチンカプセルに封入してもよく、錠剤として打錠してもよく、又は患者の食事の食品に直接組み込んでよい。経口治療用の投与のために、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを1つ又は複数の賦形剤と組み合わせ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ剤、ウェハー剤等の形態で 사용할ことができる。このような組成物及び調製剤は、少なくとも0.1%の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを含有していなければならない。組成物及び調製剤中のこれらの割合は、当然ながら変えることができ、便宜的には所定の単位投薬形態の重量の約2%～約60%であろう。このような治療上有用な組成物中の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの量は、有効な用量レベルが得られるような量である。

【0553】

また、錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤等は、トラガカントガム、アラビアゴム、コーンスターチ又はゼラチン等の結着剤；リン酸二カルシウム等の賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；及びスクロース、フルクトース、ラクトース又はアスパルテーム等の甘味料を含有してもよく、又はペパーミント、冬緑油、若しくはチェリー香料等の香料を加えてもよい

10

20

30

40

50



。単位投薬形態がカプセル剤である場合、上記のような種類の物質以外に、植物油又はポリエチレングリコール等の液体担体を含含有していてもよい。種々の他の物質が、コーティングとして、又は固体状の単位投薬形態の物理的形態を他の方法により変化させるために存在していてもよい。例えば、錠剤、丸剤又はカプセル剤は、ゼラチン、ロウ、シェラック又は砂糖等でコーティングされていてもよい。シロップ剤又はエリキシル剤は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチド、甘味料としてのスクロース又はフルクトース、保存料としてのメチルパラベン又はプロピルパラベン、色素、及びチェリー又はオレンジ香料等の香料を含含有していてもよい。当然ながら、単位投薬形態の調製に使用される全ての物質は、薬学的に許容され、使用する量において実質的に無毒でなければならない。さらに、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、徐放剤及び徐放デバイス中に組み込まれていてもよい。

10

#### 【0554】

経口投与のための調製剤及び製剤にはまた、本発明の構築物が胃内環境に耐性を有しかつ腸内まで通過することを可能にする腸溶コーティングが付与される。より包括的には、経口投与のための調製剤及び製剤は、消化管のいずれかの所望部分に送達するのに好適に製剤化され得る。また、消化管に送達するのに好適な坐薬を使用してもよい。

#### 【0555】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドはまた、点滴又は注射によって静脈内投与又は腹腔内投与してもよい。本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチド、又はこれらの塩の溶液は、水中で調製することができ、任意で非毒性の界面活性剤と混合することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びこれらの混合物中、並びに油中で調製することができる。通常の保存及び使用条件下において、これらの調製剤は、微生物の増殖を防ぐための保存料を含含有している。

20

#### 【0556】

注射又は点滴に好適な薬剤投薬形態としては、滅菌注射又は滅菌点滴可能な溶液又は分散液の即時調製に適合し、任意でリボソームに封入された活性成分を含む、滅菌水溶液又は分散液又は滅菌粉末が挙げられ得る。全ての場合において、最終的な投薬形態は、滅菌されており、流体であり、製造及び保存条件下で安定でなければならない。液体の担体又はビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及びこれらの好適な混合物を含む溶媒又は液体の分散媒であってもよい。例えば、リボソームの形成により、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持することにより、又は界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等の種々の抗菌剤及び抗真菌剤により微生物の作用を妨害することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、砂糖、緩衝剤、又は塩化ナトリウムを含んでいることが好ましい。組成物において、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを使用することにより、注射可能な組成物の長時間にわたる吸収をもたらすことができる。

30

#### 【0557】

滅菌注射可能な溶液は、所要の量の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを、必要に応じて、上記に列挙した種々の他の成分を含む適切な溶媒中に混合させた後、滅菌濾過することにより調製される。滅菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、減圧乾燥法及び凍結乾燥法であり、活性成分の粉末、及び先に滅菌濾過された溶液中に存在する任意のさらなる望ましい成分が得られる。

40

#### 【0558】

局所投与のためには、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、液体の場合には、純粋な形態で適用することができる。しかし、概して、これらは、固体であっても液体であってもよい皮膚科学的に許容可能な担体と共に、組成物又は製剤として皮膚に投与されることが望ましい。

#### 【0559】

50

有用な固体担体としては、タルク、粘土、微結晶セルロース、シリカ、アルミナ等の微粉砕された固体が挙げられる。有用な液体担体としては、水、ヒドロキシアルキル又はグリコール又は水 - アルコール / グリコール配合物が挙げられ、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、任意で非毒性の界面活性剤の作用により、有効なレベルで溶解又は分散することができる。所定用途のための性質を最適化するために、芳香剤及び他の抗菌剤等のアジュバントを加えてもよい。得られる液体組成物は、絆創膏及び他の包帯に含浸させるのに用いられる吸収パッドによって塗布することができ、又はポンプ型若しくはエアロゾルスプレーを使用して患部の上に噴霧することができる。

【0560】

使用者の皮膚に直接塗布するための塗布用ペースト、ゲル、軟膏及び石鹸等を形成するために、合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩及びエステル、脂肪アルコール、修飾セルロース又は修飾無機物質等の増粘剤を液体担体と共に使用することができる。

【0561】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを皮膚に送達するために使用することができる有用な皮膚科用組成物の例は当該技術分野で既知であり、例えば、Jacquet et al. (米国特許第4,608,392号)、Geria (米国特許第4,992,478号)、Smith et al. (米国特許第4,559,157号) 及びWortzman (米国特許第4,820,508号) を参照されたい。

【0562】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの有用な用量は、これらの *in vitro* 活性、及び動物モデルにおける *in vivo* 活性を比較することにより決定することができる。マウス及び他の動物における有効用量をヒトに外挿するための方法は当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許第4,938,949号を参照されたい。

【0563】

概して、ローション等の液体組成物中の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの濃度は、約0.1重量%~25重量%、好ましくは、約0.5重量%~10重量%である。ゲル又は粉末等の半固形又は固形組成物中の濃度は、約0.1重量%~5重量%、好ましくは約0.5重量%~2.5重量%である。

【0564】

治療における使用に必要な本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの量は、選択される特定のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドだけでなく、投与経路、治療する症状の性質、並びに患者の年齢及び状態によっても変動し、最終的には担当する医師又は臨床医の判断に委ねられる。また、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの用量は、標的となる細胞、腫瘍、組織、移植片又は器官によっても変動する。

【0565】

望ましい用量は便宜上、単回用量で、又は例えば、1日2回、3回、4回以上の部分用量として、適切な間隔での分割投与で示され得る。部分用量自体を、例えば、吸入器からの複数回の吸入又は複数滴の点眼投与等の、個別で、大まかな間隔の数多くの投与にさらに分割してもよい。

【0566】

投与計画には、長期間の毎日の処置が含まれ得る。「長期間」とは、少なくとも2週間、好ましくは数週間、数ヶ月、又は数年の期間を意味する。この用量範囲における必要な変更は、本明細書中で教示されるルーチン実験のみを使用して当業者によって決定され得る。Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E. W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PAを参照されたい。用量は、何らかの合併症の場合には、個々の医師が調整することもできる。

【0567】

別の態様では、本発明は、i) 癌、糖尿病性失明、加齢黄斑変性、関節リウマチ、乾癬及び70を超える他の状態等の過剰な血管新生に関連する疾患、ii) 冠動脈疾患、卒中及び創傷治癒の遅延等の不十分な血管新生に関連する疾患からなる疾患群からの少なくと

10

20

30

40

50

**【 0 5 6 8 】**

10

**【 0 5 6 9 】**

【 0 5 7 0 】

20

30

40

50

4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2、その生物学的活性又は薬理活性、及び／又はT i e 1、T i e 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又はAng p t l 6、より好ましくはT i e 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又はAng p t l 4、より好ましくはT i e 2又はAng 2が関与する生物学的経路又はシグナル伝達を調節するのに十分な、循環血液中で本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチドのレベルを与える量とすることができる。

【0571】

本発明はさらに、本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、又は本発明のポリペプチドを患者に投与することによって予防及び／又は治療することができる少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び／又は治療する方法であって、これを必要とする被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、及び／又はこれらを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0572】

より具体的には、本発明は、本明細書中に列挙される疾患及び障害からなる群から選択される少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び／又は治療する方法であって、これを必要とする被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、及び／又はこれらを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0573】

別の態様では、本発明は、免疫療法、特に受動免疫療法に関する方法であって、本明細書中に記載の疾患及び障害を患っているか又はこれらの危険性のある被験体に、薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、及び／又はこれらを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0574】

上記の方法において、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチド、及び／又はこれらを含む組成物は、使用される特定の薬学的製剤又は薬学的組成物に応じて任意の好適な方法で投与することができる。したがって、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチド、及び／又はこれらを含む組成物は、例えば、この場合にも使用される特定の薬学的製剤又は薬学的組成物に応じて経口的、腹腔内（例えば、静脈内、皮下、筋内、又は消化管を回避した投与の任意の他の経路を介して）、鼻腔内、経皮、局所的に、坐薬を用いて、吸入によって投与することができる。臨床医は、予防又は治療すべき疾患又は障害、及び臨床医に既知の他の因子に応じて、好適な投与経路、及びこのような投与に使用される好適な薬学的製剤又は薬学的組成物を選択することができるであろう。

【0575】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチド、及び／又はこれらを含む組成物は、予防又は治療すべき疾患又は障害の予防及び／又は治療に好適な治療計画に従って投与される。臨床医は一般的に、予防又は治療すべき疾患又は障害、治療すべき疾患の重症度及び／又はその症状の重症度、使用される本発明の特定のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチド、特定の投与経路、及び使用される薬学的製剤又は薬学的組成物、患者の年齢、性別、体重、食事、全身状態、並びに臨床医に既知の同様の因子等に応じて、好適な治療計画を決定することができるであろう。

【0576】

概して、治療計画には、1つ又は複数の薬学的に有効な量又は用量の1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチド、又はこれらを含む1つ又は複数の組成物の投与が含まれるであろう。投与される具体的な量（複数可）又は用量はこの場合でも上記の因子に基づき臨床医によって決定することができる。

【0577】

概して、本明細書中に記載した疾患及び障害の予防及び／又は治療に関して、また治療すべき特定の疾患又は障害、使用される本発明の特定のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの効力、特定の投与経路、及び使用される特定の薬学的製剤又は薬学的組成物に応じて、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは概して、 $1\text{ g} / \text{kg}$ （体重）／日～ $0.01\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ （体重）／日、好ましくは、 $0.1\text{ g} / \text{kg}$ （体重）／日～ $0.1\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ （体重）／日、例えば、約 $1\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ （体重）／日、 $10\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ （体重）／日、 $100\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ （体重）／日又は $1000\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ （体重）／日の量で、連続して（例えば、点滴によって）、日々の単回用量として、又は1日の中の複数回の分割用量として投与されるであろう。臨床医は一般的に、本明細書中に記載の因子に応じて好適な日用量を決定することができるであろう。特定の場合には、例えば、上記の因子及び臨床医の専門的判断に基づきこれらの量から外れるように臨床医が選択することもあることが明らかであろう。一般的に、親和性／結合活性、有効性、体内分布、半減期及び当業者に既知の同様の因子の差異は考慮するものの、本質的に同様の経路を介して投与される、同様の標的に対する類似の通常の抗体又は抗体断片に関して通常投与される量から、投与量に関する指針を幾らか得ることができる。

10

**【0578】**

通常上記の方法では、本発明の単一アミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを使用するであろう。しかしながら、2つ以上の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び／又はポリペプチドを組み合わせ使用することも本発明の範囲内である。

**【0579】**

20

本発明のナノボディ、アミノ酸配列及びポリペプチドは、1つ又は複数のさらなる薬学的に活性のある化合物又は成分と組み合わせ、すなわち、相乗効果をもたらすことも又はもたらさないこともある複合治療計画として使用することもできる。この場合でも、臨床医は、上記の因子及び臨床医の専門的判断に基づき、このようなさらなる化合物又は成分、並びに好適な複合治療計画を選択することができるであろう。

**【0580】**

特に、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、本明細書中に記載の疾患及び障害の予防及び／又は治療に用いられるか又は用いることができる他の薬学的に活性のある化合物又は成分と組み合わせ使用してもよく、その結果、相乗効果が得られることも又は得られないこともある。このような化合物及び成分、並びにこれらを投与するための経路、方法及び薬学的製剤又は薬学的組成物の例は臨床医にとって明らかであろう。

30

**【0581】**

2つ以上の物質又は成分を複合治療計画の一環として使用する場合、これらは、同じ投与経路を介して又は異なる投与経路を介して、本質的に同じ時間で又は異なる時間で（例えば、本質的に同時に、連続して、又は交互に）投与することができる。物質又は成分を、同じ投与経路を介して同時に投与しようとする場合、当業者にとって明らかであるような、種々の薬学的製剤又は薬学的組成物、又は併せた薬学的製剤又は薬学的組成物の一部として投与してもよい。

**【0582】**

40

また、2つ以上の活性のある物質又は成分を複合治療計画の一環として使用する場合、化合物又は成分を単独で使用する場合に用いられるものと同様の量で、また同様の計画に従って、物質又は成分の各々を投与してもよく、このような併用によって、相乗効果がもたらされることも又はもたらされないこともある。しかしながら、2つ以上の活性のある物質又は成分の併用によって相乗効果がもたらされる場合には、所望の治療作用を達成しつつも、投与される物質又は成分の1つ、複数又は全ての量を低減することも可能である。これは、例えば、所望の薬学的効果又は治療効果を依然として得ると共に、一般的な量で使用される場合の物質又は成分の1つ又は複数の使用に関連するあらゆる望ましくない副作用を回避、制限又は低減するのに有用であり得る。

**【0583】**

50

本発明に従って使用される治療計画の有効性は、臨床医にとって明らかであるように、関与する疾患又は障害についてそれ自体が既知の任意の方法で決定及び／又は追跡され得る。臨床医はまた、必要に応じて及びケースバイケースで、特定の治療計画を変更又は修正し、それにより、所望の治療効果を達成し、望ましくない副作用を回避、制限又は低減し、及び／又は一方で所望の治療効果を達成することと、他方で望ましくない副作用を回避、制限又は低減することとの適切な均衡を達成することができる。

【 0 5 8 4 】

概して、所望の治療効果が達成されるまで、及び／又は所望の治療効果が維持されている限りは、治療計画は続けられる。また、これは臨床医が決定することができるものである。

10

【 0 5 8 5 】

別の態様において、本発明は、少なくとも1つの i ) 癌、糖尿病性失明、加齢黄斑変性、関節リウマチ、乾癬及び他等の過剰な血管新生、i i ) 冠動脈疾患、卒中及び創傷治療の遅延等の不十分な血管新生の予防及び／又は治療のための、及び／又は本明細書において言及される1つ又は複数の治療方法における使用のための、薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの使用に関する。

【 0 5 8 6 】

治療すべき被験体とは、任意の温血動物であり得るが、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒトである。当業者にとって明らかであるように、治療すべき被験体は、特に本明細書中に記載の疾患及び障害を患っているか又はこれらの危険性のあるヒトである。

20

【 0 5 8 7 】

本発明はまた、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを患者に投与することによって予防及び／又は治療することができる少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び／又は治療するための薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの使用に関する。

【 0 5 8 8 】

より具体的には、本発明は、i ) 癌、糖尿病性失明、加齢黄斑変性、関節リウマチ、乾癬及び他等の過剰な血管新生、並びに i i ) 冠動脈疾患、卒中及び創傷治療の遅延等の不十分な血管新生の予防及び／又は治療のための、並びに特に本明細書において挙げられた1つ又は複数の疾患及び障害の予防及び治療のための、薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの使用に関する。

30

【 0 5 8 9 】

また、このような薬学的組成物では、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを、本明細書中に記載したものの等の1つ又は複数の他の活性のある成分と好適に組み合わせてもよい。

【 0 5 9 0 】

最終的に、本発明のナノボディ（本明細書中に規定）及び本発明のポリペプチドの使用がはるかに好ましいが、本明細書中の記載に基づき、当業者であれば、同様の方法で、他のアミノ酸配列、特に T i e 1、T i e 2、A n g 1、A n g 2、A n g 3、A n g 4、A n g p t 1 1、A n g p t 1 2、A n g p t 1 3、A n g p t 1 4、A n g p t 1 5、又は A n g p t 1 6、より好ましくは T i e 2、A n g 2、A n g 1、A n g 4、又は A n g p t 1 4、より好ましくは T i e 2 又は A n g 2 に対する他の（単一）ドメイン抗体、並びにこのような（単一）ドメイン抗体を含むポリペプチドを設計及び／又は生成することもできることは明らかであろう。

40

【 0 5 9 1 】

例えば、本発明のナノボディに関して上記で記載される C D R の1つ又は複数のヒトの骨格又は非免疫グロブリン骨格を含むがこれらに限定されないこのような（単一）ドメイン抗体又は他のタンパク質骨格上に「グラフト化する (graft)」ことが可能であり得ることは、当業者にとって明らかであろう。このような C D R グラフト化の好適な骨格及び技法は当業者にとって明らかであり、当該技術分野において既知である。例えば、米国特

50

許第 7, 180, 370 号、国際公開第 01/27160 号、欧州特許第 0605522 号、欧州特許第 0460167 号、米国特許第 7, 054, 297 号、Nicaise et al., Protein Science (2004), 13: 1882-1891、Ewert et al., Methods, 2004 Oct; 34 (2): 184-199、Kettleborough et al., Protein Eng. 1991 Oct; 4 (7): 773-783、O'Brien and Jones, Methods Mol. Biol. 2003: 207: 81-100、Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187、及び Saerens et al., J. Mol. Biol. 2005 Sep 23; 352 (3): 597-607、及び本明細書中に引用したさらなる参考文献を参照されたい。例えば、マウス又はラットの CDR をヒトのフレームワーク及び骨格上にグラフト化するそれ自体が既知の技法は、本発明のナノボディの CDR の 1 つ又は複数と、1 つ又は複数のヒトフレームワーク領域又は配列とを含むキメラタンパク質をもたらすために同様に使用することができる。

10

## 【0592】

本発明のナノボディが、上記の好ましい CDR 配列以外の 1 つ又は複数の他の CDR 配列を含有する場合、これらの CDR 配列は、それ自体が既知の任意の方法で、例えば、(好ましい) ナノボディ、通常の抗体由来の (特にヒト抗体由来の) V<sub>H</sub> ドメイン、重鎖抗体、通常の四本鎖抗体 (例えば、通常のヒト四本鎖抗体)、又は Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6、より好ましくは Tie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又は Ang p t l 4、より好ましくは Tie 2 又は Ang 2 に指向性を有する他の免疫グロブリン配列から得ることができることにも留意されたい。Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6、より好ましくは Tie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又は Ang p t l 4、より好ましくは Tie 2 又は Ang 2 に指向性を有するこのような免疫グロブリン配列は、当業者にとって明らかであるようにそれ自体が既知の任意の方法で、すなわち、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6、より好ましくは Tie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又は Ang p t l 4、より好ましくは Tie 2 又は Ang 2 による免疫付与によって、又は Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6、より好ましくは Tie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又は Ang p t l 4、より好ましくは Tie 2 又は Ang 2 を有する免疫グロブリン配列の好適なライブラリをスクリーニングすることによって、又は任意の好適なこれらの組合せによって生成することができる。任意で、この後、ランダム又は部位特異的突然変異誘発のような技法、及び / 又はそれ自体が既知の親和性成熟のための他の技法を続けてもよい。このような免疫グロブリン配列を生成する好適な技法は当業者にとって明らかであり、例えば、Hoogenboom, Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005) に概説されるスクリーニング法が挙げられる。特定の標的に対する免疫グロブリンを生成する他の技法としては、例えば、ナノクローン技術 (例えば、公開米国特許出願第 2006-0211088 号に記載)、いわゆる SLAM 技術 (例えば、欧州特許出願第 0542810 号に記載)、ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックマウスの使用、又は既知のハイブリドーマ技法 (例えば、Larrick et al., Biotechnology, Vol. 7, 1989, p. 934 を参照) が挙げられる。全てのこれらの技法は、Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang p t l 1、Ang p t l 2、Ang p t l 3、Ang p t l 4、Ang p t l 5、又は Ang p t l 6、より好ましくは Tie 2、Ang 2、Ang 1、Ang 4、又は Ang p t l 4、より好ましくは Tie 2 又は Ang 2 に対する免疫グロブリンを生成するのに使用することができる、かつこのような免疫グロブリンの CDR は、本発明のナノボディにおいて、すなわち上記で概説されるように使用することができる。例えば、このような CDR の配列は、全て本明細書中に記載されるもの等のそれ自体が既知の技法を用いて、決定、合成及び / 又は単離して、本発

20

30

40

50

明のナノボディの配列（例えば、対応する天然のCDRに取って代わるように）に挿入することができ、又は、ここでも同様に、本明細書中に記載の技法を用いて、このようなCDR（又はこのようなCDRをコードする核酸）を含有する本発明のナノボディをデノ合成することができる。

#### 【0593】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、核酸、遺伝子構築物、並びに宿主及び宿主細胞のさらなる使用は、本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかであろう。例えば、限定するものではないが、本発明のアミノ酸配列は、好適な担体又は固体支持体と連結することができ、組成物及び組成物を含む調製剤からTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2を精製するそれ自体が既知の方法で 사용할 ことができる培地をもたらす。好適な検出可能な標識を含む本発明のアミノ酸配列の誘導体はまた、組成物若しくは調製剤中のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2の存在を（定性的に又は定量的に）確定するマーカーとして、又は（例えば、好適な細胞選別技法と組み合わせて）細胞若しくは組織の表面上のTie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、又はAngptl6、より好ましくはTie2、Ang2、Ang1、Ang4、又はAngptl4、より好ましくはTie2又はAng2の存在を選択的に検出するマーカーとして使用することができる。

#### 【0594】

これより本発明は、以下の非限定的な実験部によりさらに説明される。

#### 【実施例】

#### 【0595】

##### 実験部

##### 実施例1：動物免疫付与

2頭のラマ（161及び166）に、組換えヒトTie2/Fcキメラ（R&D Systems社、カタログ番号313-TI、ロット番号BK06）を含有するカクテル121を6回追加免疫して、標準的な手順に従って免疫付与する。6回目の追加免疫の5日後及び8日後に、これらの動物から血液を回収する。加えて、約1gのリンパ節を6回目の追加免疫の5日後に各々の動物から回収する。

#### 【0596】

##### 実施例2：ライブラリ構築

製造業者の取扱説明書に従ってフィコール・ハイパークを使用して、末梢血単核細胞を血液試料から調製した。次に、全RNAをこれらの細胞及びリンパ節組織から抽出し、RT-PCRの出発材料として使用し、ナノボディをコードする遺伝子断片を増幅した。これらの断片をファージミドベクターpAX50にクローニングした（以下を参照されたい）。ファージを標準的な方法に従って調製した（例えば本明細書中で言及された従来技術及び出願人によって提出された出願を参照されたい）。

#### 【0597】

LacZプロモーター、大腸菌ファージpIIIタンパク質コード配列、アンピシリン又はカルベニシリンに対する耐性遺伝子、マルチクローニング部位、及びgen3リーダー配列を含有するpUC119に由来する発現ベクターpAX50を使用する。ベクターは、ナノボディ（登録商標）コード配列とインフレームで、C末端c-mycタグ及び（His）6タグをコードする。

#### 【0598】



**実施例 3 : T i e 2 結合ナノボディのファージディスプレイ選択**

ファージライブラリー 1 6 1 及び 1 6 6 を、組換えヒト T i e 2 / F c キメラ (R&D Systems 社、カタログ番号 3 1 3 - T I、ロット番号 B K C 0 6 ) に対する選択に使用する。T i e 2 / F c を、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$  及び  $0 \mu\text{g} / \text{ml}$  (対照) で、M a x i s o r p 9 6 ウェルマイクロタイタープレート (Nunc 社) 上に直接固定化する。T i e 2 / F c の F c 部分とのファージ結合の数を最小限にするために、ファージを  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$  のヒト I g G とブレインキューベーションする。ファージライブラリーとのインキューベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージを増幅し、 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.02 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、及び  $0 \mu\text{g} / \text{ml}$  (対照) の固定化した T i e 2 / F c 上での選択の 2 回目の選択に適用した。T i e 2 / F c の F c 部分とのファージ結合の数を最小限にするために、ファージを、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  のヒト I g G +  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  の r h B 7 . 2 / F c (R&D Systems 社、カタログ番号 1 4 1 - B 2、ロット番号 B O T 0 7 5 0 3 1 ) とブレインキューベーションする。溶出したファージプールから得られた個別のコロニーを増殖し、i) 新規ファージ産生のための誘導、及び ii) 標準的な方法 (例えば、従来技術、及び本明細書において引用された出願人によって出願された出願を参照) に従って、ナノボディの発現及び抽出 (ペリプラズム抽出物) のための I P T G による誘導を行った。

10

【 0 5 9 9 】

**実施例 4 : T i e 2 結合ナノボディのスクリーニング**

T i e 2 に対する結合特異性を決定するために、モノクローナルファージプールを使用して、E L I S A 結合アッセイ設定において、クローンを試験する。T i e 2 / F c キメラ (R&D Systems 社、カタログ番号 3 1 3 - T I、ロット番号 B K C 0 6 ) とのファージ結合を試験する。簡潔には、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$  の受容体を M a x i s o r p E L I S A プレート (Nunc 社) 上に固定化し、空いている結合部位を 4 % M a r v e l スキムミルク (P B S 中で) を使用してブロックする。次に、異なるクローンのモノクローナルファージを誘導したものからの  $10 \mu\text{l}$  の上清 ( $100 \mu\text{l}$  の 2 % M a r v e l P B S 中の) を、固定化した抗原に結合させる。インキューベーション及び洗浄の工程後に、H R P コンジュゲートモノクローナル抗 M 1 3 抗体 (Gentaur 社、カタログ番号 2 7 9 4 2 1 0 1 ) を使用して、ファージ結合を示す。結合特異性は、対照 (ファージを与えない) に対して、及び対照 (類似の E L I S A 結合アッセイにおいて、同じモノクローナルファージを、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$  の固定化したヒト I g G 及び  $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$  の r h B 7 . 2 / F c との結合ことについて試験する) に対して比較して、O D 値に基づいて決定する。

20

30

【 0 6 0 0 】

図 1 及び表 B - 1 は、T i e 2 に結合するクローンの選択を示す (クローンの定義については表 B - 1 を参照されたい)。

【 0 6 0 1 】

表 B - 1 : T i e 2 に対するナノボディ。

【表 25】

名称	配列番号：	配列
162-E1	455	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYQQAPGKQR ELVAFITSVGTTNYADSVKGRFHSRDNAKNTVYLYQMNSLKPEDTA VYYCAADLHYS GP NYWGQGTQVTVSS
162-E9	456	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKER EAVSCISSVDGSTHYADSVKGRFTISRDNADKNTVYLYQMNSLKPED TAAYYCAVQGYSGGYTTCEDSADFGFWGQGTQVTVSS
162-F11	457	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKER EGVACISSDGS TYYADSVKGRFTISSDNADKNTVYLYQMNSLKPEDT AVYSCSAGSVAGCIPYYWGQGTQVTVSS
162-F3	458	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTTSGRTFSDDTMGWFRQAPRKER EFVAAILWDSIKTYADSVKGRFTISRDNADKNTVYLYQMDSLKPED TAVYYCAATPTAYGTDWYRNHYWGQGTQVTVSS
162-H10	459	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAVGWFRQAPGKE REGVSCIGSSYGSTYYADSVKGRFTISRDNADKNTVYLYQMNSLKPED DTAVYYCAVQGYSGGYTTCEDSADFGFWGQGTQVTVSS
163-E7	460	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMSWVRQAPGKGL EWVSAISGGGEVTTYADSVKGRFTISRDNADKNTLYLYQMSSLKPED TALYYCAEHLNFYSVSVRSSPTSQGTQVTVSS
163-E9	461	EVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGFTFGSNGMRWVRQAPGKG PEWVSSINSDGTSTYYADSVKGRFTISRDNADKNTLCLQMNSLKPED TAVYYCTTTEDPYPRGQGTQVTVSS
163-G8	462	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSNGMRWVRQAPGKG PEWVSSINSDGTSAFYAESVKGRFTISRDNADKNTLYLYQMNSLKPED TAVYYCTTTMNP NPRGQGTQVTVSS
163-H8	463	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSNGMRWVRQAPGKG PEWVSSINSDGTSTYYAESVKGRFTISRDNADKNTLYLYQMNSLKPED TAVYYCTTTENPNPRGPGTQVTVSS

## 【0602】

実施例5：Tie2 - Ang1相互作用を遮断するナノボディのスクリーニング

Tie2結合アッセイにおいて陽性であることが試験されたクローンを、Tie2/FcとのAng1結合を遮断する能力についてスクリーニングする。このために、ELISAに基づきリガンド競合設定において、ナノボディ含有ペリプラズム抽出物(P.E.)を使用する。簡潔には、0.75 µg/mlのヒトAng1(R&D Systems社、カタログ番号923-AN/CF、ロット番号FW073091)を、96ウェルMaxisorpマイクロタイタープレート(Nunc社)中にコーティングし、4%Marvelスキムミルク(PBS中の)でブロックする。平行して、0.2 µg/mlのTie2/Fcを、異なるクローンのナノボディを含有する10 µlのペリプラズム抽出物(P.E.)(100 µlの2%Marvel/PBS中の)とインキュベーションする。1時間後に、受容体-ナノボディ前混合物(pre-mixes)を、コーティングしたリガンドと1時間インキュベーションする。結合したTie2/Fcは、HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトIg

10

20

30

40

50

G (Jackson ImmunoResearch社、カタログ番号 109 - 035 - 098) を使用して検出する。遮断活性は、P . E . なしのウェル又は無関係の P . E . を加えたウェルと比較した O D シグナルの減少として決定される。

#### 【0603】

図2は、T i e 2 に結合するクローンの選択を使用する、この遮断アッセイの結果を示す。

#### 【0604】

162 - E 1、162 - E 9、162 - F 11、162 - H 10、163 - E 7 (以下の表 B - 2 を参照されたい) は、T i e 2 との A n g 1 結合の有意な遮断を示す。

#### 【0605】

表 B - 2 : T i e 2 に対するものであり、T i e 2 との A n g 1 結合を遮断することができるナノボディ

#### 【表26】

名称	配列番号	配列
162-E1	455	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYQQAPGK QRELVAFITSVGTNTYADSVKGRFIISRDNANKNTVYQLQMNSLKP EDTAVYYCAADLHYS GP NYWGQGTQVTVSS
162-E9	456	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGK EREAVSCISSVDGSTHYADSVKGRFTISRDNANKDTVYQLQMNSLK PEDTAAYYCAVQGYSGGYYTCEDSADFGFWGQGTQVTVSS
162-F11	457	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGK EREGVACISSDGSSTYYADSVKGRFTISSDNANKNTVYQLQMNSLK PEDTAVYSCSAGSVAGCIPYYWGQGTQVTVSS
162-H10	459	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAVGWFRQAPG KEREVSCIGSSYGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVYQLQMNSL KPEDTAVYYCAVQGYSGGYYTCEDSADFGFWGQGTQVTVSS
163-E7	460	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGGEVTTYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSL KPEDTALYYCAEHLNFYSVSVRSPTSQGTQVTVSS

#### 【0606】

上述のナノボディが T i e 2 との A n g 1 結合を遮断することができるので、したがってこれらのナノボディは T i e 2 のアンタゴニストと判断される。この機能を確認する機能的アッセイは、この実験部において追って見出すことができる。

#### 【0607】

実施例6：精製ナノボディの滴定による T i e 2 - A n g 1 相互作用遮断効率の決定

A n g 1 競合について陽性であることが試験されたクローンの受容体遮断効率を決定するために、E L I S A に基づくリガンド競合設定において、精製ナノボディの希釈系列を試験する。簡潔には、0 . 75 μg / ml のヒト A n g 1 (R&D Systems社、カタログ番号 923 - AN / C F、ロット番号 F H W 0 7 3 0 9 1) を、96 ウェル M a x i s o r p マイクロタイタープレート (Nunc社) 中にコーティングし、4 % M a r v e l スキムミルク (P B S 中の) でブロックする。平行して、0 . 2 μg / ml の T i e 2 / F c を、精製されたナノボディの希釈系列とインキュベーションする。1時間後に、受容体 - ナノボディ前混合物を、コーティングしたリガンドと1時間インキュベーションする。結合した T i e 2 / F c は、H R P コンジュゲートヤギ抗ヒト I g G (Jackson ImmunoResearch

社、カタログ番号 109-035-098) を使用して検出する。遮断活性は、P・E・なしのウェル又は無関係の P・E・を加えたウェルと比較した OD シグナルの減少として決定される。図 3 はこのアッセイの結果を示す。

#### 【0608】

実施例 7：精製 Tie 2 - Ang 1 遮断ナノボディの中での Tie 2 - Ang 2 遮断のスクリーニング

Ang 1 競合について陽性であることが試験されたクローンが、Ang 2 と受容体との結合も遮断することができるかどうかを調べるために、新規の ELISA に基づくリガンド競合設定において、先の精製ナノボディを試験する。簡潔には、0.75 µg/ml のヒト Ang 2 (R&D Systems 社、カタログ番号 923-AN/CF) を、96 ウェル Maxisorp マイクロタイタープレート (Nunc 社) 中にコーティングし、4% Marvel スキムミルク (PBS 中の) でブロックする。平行して、0.2 µg/ml の Tie 2 / Fc を、150 nM の精製ナノボディとインキュベーションする。1 時間後に、受容体 - ナノボディ前混合物を、コーティングしたリガンドと 1 時間インキュベーションする。結合した Tie 2 / Fc は、HRP コンジュゲートヤギ抗ヒト IgG (Jackson ImmunoResearch 社、カタログ番号 109-035-098) を使用して検出した。遮断活性は、P・E・なしのウェル又は無関係の P・E・を加えたウェルと比較した OD シグナルの減少として決定される。図 4 は本実施例の結果を示す。Tie 2 - Ang 1 遮断ナノボディのどれも、Ang 2 と Tie 2 との結合を遮断することができない。

#### 【0609】

Tie 2 結合ナノボディの配列アライメント (FR は小文字、CDR は大文字)

#### 【表 27】

163-G8	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftfgSNGMRwvrqapgkpwvssINS DGTSAFY
163-H8	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftfgSNGMRwvrqapgkpwvssINS DGTSTYY
163-E9	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftfgSNGMRwvrqapgkpwvssINS DGTSTYY
163-E7	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftfsDYSMSwvrqapgkglewvsAISGGGEVTTY
162-E1*	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgsifsINAMGwyqgagpgkqrelvaFITSVG-TTNY
162-F3	evqlvesggglvqagdsrlrlscttsgrtfsDDTMGwfrqaprkerefvaaAILWDSIKTTY
162-E9	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftldDYAIGwfrqapgkeregvaCIS SVDGSTHY
162-H10	evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftldDYAVGwfrqapgkeregvsCIGSSYGSTYY
162-F11	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfdDYAIGwfrqapgkeregvaCIS SVDGSTYY
163-G8	AESVKGrftisrdnakntlylqmnsllkpedtavyycttTM-----NPN-----Pr
163-H8	AESVKGrftisrdnakntlylqmnsllkpedtavyycttTE-----NPN-----Pr
163-E9	ADSVKGrftisrdnakntlcqlmnsllkpedtavyycttTE-----DPY-----Pr
163-E7	ADSVKGrftisrdnakntlylqmnsllkpedtalyycaeHL-----NFYSV---SVRSSPt
162-E1	ADSVKGrftisrdnakntvylqmnsllkpedtavyycaa-----DLHYS-----GENYw
162-F3	ADSVKGrftisrdnakntvylqmnsllkpedtavyycaaTPTAYGTDWYRN-----NYHYw
162-E9	ADSVKGrftisrdnakntvylqmnsllkpedtaayycavQG--YSGGYYYTCEDSADFGFW
162-H10	ADSVKGrftisrdnakntvylqmnsllkpedtavyycaVQG--YSGGYYYTCEDSADFGFW
162-F11	ADSVKGrftisrdnakntvylqmnsllkpedtavyscsaGS--VAGCIPY-----Yw
163-G8	gggtqvtvss
163-H8	gpqgtqvtvss
163-E9	gggtqvtvss
163-E7	sqgtqvtvss
162-E1	gggtqvtvss
162-F3	gggtqvtvss
162-E9	gggtqvtvss
162-H10	gggtqvtvss
162-F11	gggtqvtvss

\* g は Amb er 終止コドン由来の 162-E1 の FR2 にある

#### 【0610】

成員：

結合剤のファミリー (ナノボディの 1 つのファミリーは同じ CDR 3 を有する)。

成員：

- I 162 - E 1
- II 162 - E 9、162 - H 10

- I I I            1 6 3 - E 7
- I V            1 6 2 - F 1 1
- V            1 6 2 - F 3
- V I            1 6 3 - E 9、1 6 3 - G 8、1 6 3 - H 8

#### 【0611】

##### 実施例8：動物の免疫付与

2頭のラマ（171及び172）に、以下のものを含有するカクテル121を6回追加免疫して、標準的な手順に従って免疫付与する。

組換えヒトアンジオポイエチン - 1（R&D Systems社、カタログ番号923 - AN / CF）

10

組換えヒトアンジオポイエチン - 2（R&D Systems社、カタログ番号623 - AN / CF）

組換えヒトアンジオポイエチン - 4（R&D Systems社、カタログ番号964 - AN / CF）

組換えヒトアンジオポイエチン様 - 4（R&D Systems社、カタログ番号3485 - AN）

#### 【0612】

6回目の追加免疫の8日後にこれらの動物から血液を回収する。

#### 【0613】

##### 実施例9：ライブラリ構築

20

製造業者の取扱説明書に従ってフィコール・ハイパークを使用して、末梢血単核細胞を血液試料から調製した。次に、全RNAをこれらの細胞から抽出し、RT-PCRの出発材料として使用し、ナノボディをコードする遺伝子断片を増幅した。これらの断片をファージミドベクターpAX50にクローニングした。ファージを標準的な方法に従って調製した（例えば本明細書中で言及された従来技術及び出願人によって提出された出願を参照されたい）。実施例によりファージライブラリ171（Llama 171より）及びファージライブラリ172（Llama 172より）が得られる。

#### 【0614】

##### 実施例10：Ang2結合ナノボディのファージディスプレイ選択

ファージライブラリー171及び172を、組換えヒトAng2（R&D Systems社、カタログ番号623 - AN / CF）に対する選択に使用する。Ang2を、5 µg / ml、0.5 µg / ml及び0 µg / ml（対照）で、Maxisorp 96ウェルマイクロタイタープレート（Nunc社）上に直接固定化する。ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージを増幅し、2 µg / ml、0.2 µg / ml、0.02 µg / ml、及び0 µg / ml（対照）の固定化したAng2上での2回目の選択に適用した。溶出したファージプールから得られた個別のコロニーを増殖し、i) 新規ファージ産生のための誘導、及びii) 標準的な方法（例えば、従来技術、及び本明細書において引用された出願人によって出願された出願を参照されたい）に従って、ナノボディの発現及び抽出（ペリプラズム抽出物）のためのIPTGによる誘導を行った。

30

40

#### 【0615】

##### 実施例11：Ang2結合ナノボディのスクリーニング

Ang2に対する結合特異性を決定するために、モノクローナルファージプールを使用して、ELISA結合アッセイの設定において、クローンを試験する。Ang2（R&D Systems社、カタログ番号623 - AN / CF）とのファージ結合を試験する。簡潔には、0.2 µg / mlのAng2をMaxisorp ELISAプレート（Nunc社）上に固定化し、空いている結合部位を4% Marvel スキムミルク（PBS中で）を使用してブロックする。次に、異なるクローンのモノクローナルファージを誘導したものからの10 µlの上清（100 µlの2% Marvel PBS中の）を、固定化した抗原に結合させる。インキュベーション及び洗浄の工程後に、HRPコンジュゲートモノクローナル

50

抗 M 1 3 抗体 (Gentaur 社、カタログ番号 2 7 9 4 2 1 0 1) を使用して、ファージ結合を示す。結合特異性は、無関係のファージを加えた又はファージなしの対照に対して比較して、OD 値に基づいて決定する。

# 【 0 6 1 6 】

図 5 及び表 B - 3 は、A n g 2 に結合するクローンの選択を示す。

# 【 0 6 1 7 】

表 B - 3 : A n g 2 に対するナノボディ。

# 【 表 2 8 】

名称	配列番号 :	配列
166-C1	464	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGSTTIGWFRQAPGKER EGVSCISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDT AVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-C10	465	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGTTTIGWFRQAPGKER EGVSCISTGDGSTNYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDT AVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-D7	466	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSDTTIGWFRQAPGKER EGISCISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLNPEDT AVYYCALDQAPLWSTWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-F8	467	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGTTTIGWFRQAPGKER EVLVSCISTGGGSTYYTESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDT AVYYCALDQAPMWSNWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-G4	468	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSDTTIGWFRQAPGKER EGISCISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLNPEDT AVYYCALDQAPLWSTWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-H4	469	EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGFTFGDFTIGWFRQAPGKER EGVSCINTGDGSTNYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-E12	470	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGSTTIGWFRQAPGKER EGVSCISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDT AVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-D4	471	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFTNTAMGWYRQAPGKW RELVATIYSGGSTKYIDSVKGRFIISRDNTRNTVHLQMNSLKPEDT AVYYCNTVGAGSYWGQGAQVTVSS

# 【 0 6 1 8 】

実施例 1 2 : A n g 2 - T i e 2 相互作用を遮断するナノボディのスクリーニング

A n g 2 結合アッセイにおいて陽性であることが試験されたクローンを、T i e 2 / F c との A n g 2 結合を遮断する能力についてスクリーニングする。このために、E L I S A に基づくリガンド競合設定において、ナノボディ含有ペリプラズム抽出物 ( P . E . ) を使用する。簡潔には、4  $\mu$  g / m l のヒト T i e 2 / F c キメラ ( R & D Systems 社、カタログ番号 3 1 3 - T I 、ロット番号 B K C 0 6 ) を、9 6 ウェル M a x i s o r p マイクロタイタープレート ( Nunc 社 ) 中にコーティングし、4 % M a r v e l スキムミルク ( P B S 中の ) でブロックする。平行して、0 . 0 5  $\mu$  g / m l のビオチン化 r h A n g

2 (R&D Systems社、カタログ番号 B T 6 2 3、ロット番号 B N R 1 7 4 0 9 1) を、異なるクローンのナノボディを含有する  $10\ \mu\text{l}$  のペリプラズム抽出物 ( $100\ \mu\text{l}$  の 2 % M a r v e l / P B S 中の) とインキュベーションする。1 時間後に、ビオチン化 A n g 2 - ナノボディ前混合物を、コーティングしたリガンドと 1 時間インキュベーションする。結合したビオチン化 A n g 2 は、H R P コンジュゲートエキストラビジン (SIGMA社、E 2 8 8 6 - 1 M L、1 2 6 K 4 8 0 1) を使用して検出する。遮断活性は、P . E . なしのウェル又は無関係の P . E . を加えたウェルと比較した O D シグナルの減少として決定される。図 6 は、A n g 2 に結合するクローンの選択を使用する、この遮断アッセイの結果を示す。

#### 【 0 6 1 9 】

1 6 6 - D 7、1 6 6 - G 4、1 6 6 - H 4、1 6 6 - C 1 0、1 6 6 - C 1、1 6 6 - F 8 (以下の表 B - 4 を参照されたい) は、T i e 2 との A n g 2 結合の有意な遮断を示す。

#### 【 0 6 2 0 】

表 B - 4 : A n g 2 に対するものであり、T i e 2 との A n g 2 結合を遮断することができるナノボディ

#### 【表 2 9】

名称	配列番号:	配列
166-C1	464	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGSTTIGWFRQAPGKE REGVSCISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPE DTAVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-C10	465	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGTTTIGWFRQAPGKE REGVSCISTGDGSTNYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPE DTAVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-D7	466	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSDDTIGWFRQAPGKE REGISCIISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLNPE DTAVYYCALDQAPLWSTWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-F8	467	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFGTTTIGWFRQAPGKE REVVSCISTGGGSTYYTESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPE DTAVYYCALDQAPMWSNWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-G4	468	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSDDTIGWFRQAPGKE REGISCIISTGDGSTYYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLNPE DTAVYYCALDQAPLWSTWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS
166-H4	469	EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGFTFGDFTIGWFRQAPGKE REGVSCINTGDGSTNYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPE DTAVYYCALDQAPMWSSWSAPYEYDYWGQGTQVTVSS

#### 【 0 6 2 1 】

実施例 1 3 : 精製ナノボディの滴定による A n g 2 - T i e 2 相互作用遮断効率の決定

A n g 2 遮断について陽性であることが試験されたクローンの受容体遮断効率を決定するために、E L I S A に基づくリガンド競合設定において、精製ナノボディの希釈系列を試験する。簡潔には、 $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$  のヒト T i e / F c キメラ (R&D Systems社、カタログ番号 3 1 3 - T I、ロット番号 B K C 0 6) を、9 6 ウェル M a x i s o r p マイクロタイタープレート (Nunc社) 中にコーティングし、4 % M a r v e l スキムミルク (P B S 中の) でブロックする。平行して、 $0.05\ \mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン化 r h A n g 2 (

10

20

30

40

50

R&D Systems社、カタログ番号 B T 6 2 3、ロット番号 B N R 1 7 4 0 9 1 ) を、精製されたナノボディの希釈系列とインキュベーションする。1 時間後に、ビオチン化 A n g 2 - ナノボディ前混合物を、コーティングした受容体と 1 時間インキュベーションする。結合したビオチン化 A n g 2 は、H R P コンジュゲートエキストラビジン (SIGMA社、E 2 8 8 6 - 1 M L、1 2 6 K 4 8 0 1 ) を使用して検出する。遮断活性は、P . E . なしのウェル又は無関係の P . E . を加えたウェルと比較した O D シグナルの減少として決定される。図 7 はこのアッセイの結果を示す。

#### 【 0 6 2 2 】

A n g 2 結合ナノボディの配列アライメント ( F R は小文字、C D R は大文字 )

#### 【表 3 0】

166-D7	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfsDTTIGwfrqapgkeregisCISTGDGSTYY	
166-G4	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfsDTTIGwfrqapgkeregisCISTGDGSTYY	
166-H4	evqlvesggdlvqaggsrlrlscaasgftfgDFTIGwfrqapgkeregvsCINTGDGSTNY	
166-E12	kvqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfgSTTIGwfrqapgkeregvsCISTGDGSTYY	
166-C10	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfgTTTIGwfrqapgkeregvsCISTGDGSTNY	
166-C1	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfgSTTIGwfrqapgkeregvsCISTGDGSTYY	
166-F8	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgftfgTTTIGwfrqapgkeregvsCISTGGGSTYY	
166-D4	evqlvesggglvqaggsrlrlscvasgriftNTAMGwyrqapgkwrelva.TIYSGGSTKY	20
166-H5	evqlvesggglvqaggsrlslacvvsgrfsrINSMAwsrqvpngqrelva.SVTSGGYTNY	

166-D7	AESVKGrftissdnakntvylqmnslnpedtavyycaLDQAPLWSTWSAPYEYDYwgqgt	
166-G4	AESVKGrftissdnakntvylqmnslnpedtavyycaLDQAPLWSTWSAPYEYDYwgqgt	
166-H4	AESVKGrftissdnakntvylqmnslnkpedtavyycaLDQAPMWSWSAPYEYDYwgqgt	
166-E12	AESVKGrftissdnakntvylqmnslnkpedtavyycaLDQAPMWSWSAPYEYDYwgqgt	
166-C10	AESVKGrftissdnakntvylqmnslnkpedtavyycaLDQAPMWSWSAPYEYDYwgqgt	
166-C1	AESVKGrftissdnakntvylqmnslnkpedtavyycaLDQAPMWSWSAPYEYDYwgqgt	
166-F8	TESVKGrftissdnakntvylqmnslnkpedtavyycaLDQAPMWSNWSAPYEYDYwgqgt	30
166-D4	IDSVKGrftisrdntrntvhlqmnslnkpedtavyyca.....VGAGSY....wgqga	
166-H5	VDSVKGrftisrdnaknaiylqmnslnksedtavyyca...RVVVRTAHGFEDNYwgqgt	

166-D7	qvtvss	
166-G4	qvtvss	
166-H4	qvtvss	
166-E12	qvtvss	
166-C10	qvtvss	40
166-C1	qvtvss	
166-F8	qvtvss	
166-D4	qvtvss	
166-H5	qvtvss	

#### 【 0 6 2 3 】

成員：

結合剤のファミリー ( ナノボディの 1 つのファミリーは同じ C D R 3 を有する ) 。

成員：

10

20

30

40

50



- I 166 - D7、166 - G4、166 - H4、166 - E12、166 - C10、  
166 - C1、166 - F8
- II 166 - D4

#### 【0624】

##### 実施例14：Ang2結合ナノボディのファージディスプレイ選択

ファージライブラリー171及び172（実施例9）を、組換えヒトAng1（R&D Systems社、カタログ番号923 - AN / CF、ロット番号FW073091）に対する選択に使用する。Ang1を、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $0\mu\text{g}/\text{ml}$ （対照）で、Maxisorp 96ウェルマイクロタイタープレート（Nunc社）上に直接固定化する。ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージを増幅し、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 、及び $0\mu\text{g}/\text{ml}$ （対照）の固定化したAng1上での2回目の選択に適用した。この2回目の選択において、ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシン及び100倍過剰（コーティングAng1と比較してnM）組換えヒトTie2 / Fcキメラ（R&D Systems社、カタログ番号313 - TI、ロット番号BKC06）により溶出した。溶出したファージプールから得られた個別のコロニーを増殖し、i）新規ファージ産生のための誘導、及びii）標準的な方法（例えば、従来技術、及び本明細書において引用された出願人によって出願された出願を参照されたい）に従って、ナノボディの発現及び抽出（ペリプラズム抽出物）のためのIPTGによる誘導を行った。

#### 【0625】

##### 実施例15：Ang1を結合するナノボディのスクリーニング

Ang1に対する結合特異性を決定するために、モノクローナルファージプールを使用して、ELISA結合アッセイの設定において、クローンを試験する。Ang1（R&D Systems社、カタログ番号923 - AN / CF、ロット番号FW073091）に対するファージ結合を試験する。簡潔には、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ のAng1をMaxisorp ELISAプレート（Nunc社）上に固定化し、空いている結合部位を4% Marvelスキムミルク（PBS中で）を使用してブロックする。次に、異なるクローンのモノクローナルファージを誘導したものからの10 $\mu\text{l}$ の上清（100 $\mu\text{l}$ の2% Marvel PBS中の）を、固定化した抗原に結合させる。インキュベーション及び洗浄の工程後に、HRPコンジュゲートモノクローナル抗M13抗体（Gentaur社、カタログ番号27942101）を使用して、ファージ結合を示す。結合特異性は、無関係のファージを加えた又はファージなしの対照に対して比較して、OD値に基づいて決定する。

#### 【0626】

図8及び表B - 5は、Ang1に結合するクローンの選択を示す。

#### 【0627】

表B - 5：Ang1に対するナノボディ

【表 3 1】

名称	配列番号:	配列
173-H9	472	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGNWMYWLRQAPGKG LEWISTITPRGLTAYADSVKGRFTISRDI AENTLYLQMNSLKSGDTA VYYCARDKTGERRGQGTQVTVSS
184-B6	473	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTWVRQAPGKG LEWVSDISWDGDITTYAASVKGRFTISRDN AKKTLYLQMNSLKPE DSAVYYCNTYGYDSGRYYSYWGQGTQVTVSS
185-H5	474	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKER EGVSYISSSDGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPED TAVYYCATDLSGRGDVSEYEYDYWGQGTQVTVSS

10

## 【0628】

Ang 1 結合ナノボディの配列アライメント (F R は小文字、C D R は大文字)

【表 3 2】

```

185-H5  evqlvesggglvqpqgslrlscaasgftld.YYAIGwfrqapgkeregvsYISSSDGRTY
173-H9  evqlvesggglvqpqgslrlscaasgftlsGNWMy.wlrqapgkglewis.TITPRGLTA
184-B6  evqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfs.NYAMTwvrqapgkglewvsDISWDGDITT

185-H5  YADSVKGrftisrdnakntvylqmnsllkpedtavyycatDLSGRGDVSEYEYDYwgqgtq
173-H9  YADSVKGrftisrdiaentlylqmnsllksgdtavyycarDKTGER.....rgqgtq
184-B6  YAASVKGrftisrdnakktlylqmnsllkpedsavyycnt..YGYDSGRYYSY..wgqgtq

185-H5  vtvss
173-H9  vtvss
184-B6  vtvss

```

20

## 【0629】

成員:

結合剤のファミリー (ナノボディの1つのファミリーは同じC D R 3を有する)。

30

成員:

- I 173 - H9
- II 184 - B6
- III 185 - H5

## 【0630】

実施例 16: Ang 4 結合ナノボディのファージディスプレイ選択

ファージライブラリー 171 及び 172 (実施例 9 を参照されたい) を、組換えヒトアンジオポイエチン - 4 (R&D Systems 社、カタログ番号 964 - AN / CF) に対する選択に使用する。Ang 4 を、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$  及び  $0 \mu\text{g} / \text{ml}$  (対照) で、Maxisorp 96 ウェルマイクロタイタープレート (Nunc 社) 上に直接固定化する。ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージを増幅し、 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.02 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、及び  $0 \mu\text{g} / \text{ml}$  (対照) の固定化した Ang 4 上での2回目の選択に適用した。この2回目の選択において、ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージプールから得られた個別のコロニーを増殖し、i) 新規ファージ産生のための誘導、及び ii) 標準的な方法 (例えば、従来技術、及び本明細書において引用された出願人によって出願された出願を参照をされたい) に従って、ナノボディの発現及び抽出 (ペリプラズム抽出物) のための IPTG による誘導を行った。

40

## 【0631】

50

## 実施例 17 : A n g 4 結合ナノボディのスクリーニング

A n g 4 に対する結合特異性を決定するために、モノクローナルファージプールを使用して、E L I S A 結合アッセイの設定において、クローンを試験する。アンジオポイエチン - 4 ( R & D Systems 社、カタログ番号 9 6 4 - A N / C F ) に対するファージ結合を試験する。簡潔には、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$  の A n g 1 を M a x i s o r p E L I S A プレート ( Nunc 社 ) 上に固定化し、空いている結合部位を 4 % M a r v e l スキムミルク ( P B S 中で ) を使用してブロックする。次に、異なるクローンのモノクローナルファージを誘導したものからの  $10 \mu\text{l}$  の上清 (  $100 \mu\text{l}$  の 2 % M a r v e l P B S 中の ) を、固定化した抗原に結合させる。インキュベーション及び洗浄の工程後に、H R P コンジュゲートモノクローナル抗 M 1 3 抗体 ( Gentaur 社、カタログ番号 2 7 9 4 2 1 0 1 ) を使用して、ファージ結合を示す。結合特異性は、無関係のファージを加えた又はファージなしの対照に対して比較して、O D 値に基づいて決定する。

【 0 6 3 2 】

図 9 及び表 B - 6 は、A n g 4 に結合するクローンの選択を示す。

【 0 6 3 3 】

表 B - 6 : A n g 4 に対するナノボディ

【表 3 3】

名称	配列番号	配列
168-A3	475	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGNWMYWLRQAPGK GLEWISTITPRGLTAYADSVKGRFTISRDI AENTLYLQMNSLKSGD TAVYYCARDKTGERRGQGTQVTVSS
168-E5	476	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSNWMYWLRQAPGK GLEWISTITPRDLTAYADSVKGRFTISRDN AENTLYLQMNSLKSE DTAVYYCAKDKAGERRGQGTQVTVSS
168-G3	477	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLDYYAIGWYRQAPGKE REWVSCISSSNYGITTYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLYQMNSLKP EDTAIYYCATNTRRKYGRLCDLNADYWGQGTQVTVSS
169-A10	478	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSPSWMYWLRQAPGKG LEWVSTITPRGLTEYANSVKGRFTISKDN AKNTLYLQMNSLKSED TAVYYCTRDKNPPMGQGTQVTVSS
169-A12	479	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIRSIHMGWYRQAPGNER DLVAVIDSRRTTKYSESVKGRFTISRDN AKNTVYLYQMNSLKPEDT AVYYCNALALGTDQSSTFDSWGQGTQVTVSS
169-B12	480	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGNQ RDLVAAITSGDSTKYADFVKGRFTISRDN AKNTVYLYQMNSLKPE DTAVYYCAAELLGKWWYGQGTQVTVSS
169-C12	481	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIRSIHMGWYRQTPGNER DMVAVIDSRRTTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLYQMNSLKPED TAVYYCNALALGTDQSSTFDSWGQGTQVTVSS
169-C8	482	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSTSWMYWLRQAPGKG LEWVSTITPRGLTDYTD SVKGRFTISRDS AKNTLYLQMNSLKSED TADYYCTRDKNPPMGQGTQVTVSS
169-E12	483	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINTMGWYRQAPGNQ RDLVAAITNGGSTKYVDSVKGRFTISRDN AKNTVYLYQMNSLKPE DTAVYYCAAESLGRWGWGQGTQVTVSS
169-F11	484	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSTSWMYWLRQAPGKG LEWVSTITPRGLTDYTNSVKGRFTVSRDN AKNTLYLQMNSLKSE DTAVYYCTKDKNGPPMGQGTQVTVSS

10

20

30

40

【 0 6 3 4】

A n g 4 結合ナノボディの配列アライメント ( F R は小文字、 C D R は大文字 )

## 【表 3 4】

169-F11	evqlvesggglvqpggsirlscatsgftfsTSWMYwlrqapgkglewvs..TITPRGLTD	
169-C8	evqlvesggglvqpggsirlscatsgftfsTSWMYwlrqapgkglewvs..TITPRGLTD	
169-A10	evqlvesggglvqpggsirlscatsgftfsPSWMYwlrqapgkglewvs..TITPRGLTE	
168-E5	evqlvesggglvqpggsirlscaasgftlsSNWMYwlrqapgkglewis..TITPRDLTA	
168-A3	evqlvesggglvqpggsirlscaasgftlsGNWMYwlrqapgkglewis..TITPRGLTA	
168-G3	evqlvesggglvqpggsirlscaasgstldYYAIGwyrqapgkerewvsCISSSNYGITF	
169-B12	evqlvesggglvqaggsirlscaasgsifsINAMGwyrqapgnqrdlva..AITSGDSTK	
169-E12	evqlvesggglvqaggsirlscaasgsifsINTMGwyrqapgnqrdlva..AITNGGSTK	
169-A12	evqlvesggglvqpggsirlscvasgsirsIIHMGwyrqapgnqrdlva..VIIDSRTTK	10
169-C12	evqlvesggglvqpggsirlscaasgsirsIIHMGwyrqtpgnerdmva..VIIDSRTTK	
169-F11	YTNSVKGrftvsrdnakntlylqmnslksestavyyctk.....DKNGPP.....	
169-C8	YTDSVKGrftisrdsakntlylqmnslksestadyyctr.....DKNGPP.....	
169-A10	YANSVKGrftiskdnakntlylqmnslksestavyyctr.....DKNGPP.....	
168-E5	YADSVKGrftisrdnaentlylqmnslksestavyycak.....DKAGER.....	
168-A3	YADSVKGrftisrdiaentlylqmnslksgdtavyycar.....DKTGER.....	
168-G3	YADSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtaiyycatNTRRKYGRLCDLNADY.....	
169-B12	YADFVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaa.....ELLGKWY....	
169-E12	YVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaa.....ESLGRWG....	20
169-A12	YSESVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycna.....LALSTDQSSTF	
169-C12	YAESVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycna.....LALSTDQSSTF	
169-F11	..mgqgtqvtvss	
169-C8	..mgqgtqvtvss	
169-A10	..mgqgtqvtvss	
168-E5	..rgqgtqvtvss	
168-A3	..rgqgtqvtvss	
168-G3	..wgqgtqvtvss	
169-B12	..wgqgtqvtvss	
169-E12	..wgqgtqvtvss	30
169-A12	DSwgqgtqvtvss	
169-C12	DSwgqgtqvtvss	

## 【 0 6 3 5 】

成員：

結合剤のファミリー（ナノボディの1つのファミリーは同じCDR3を有する）。

成員：

- I 169 - F 1 1、169 - C 8、169 - A 1 0
- I I 168 - A 3、168 - E 5
- I I I 168 - G 3
- I V 169 - B 1 2、169 - E 1 2
- V 169 - A 1 2、169 - C 1 2

40

## 【 0 6 3 6 】

実施例 18：Angptl4 結合ナノボディのファージディスプレイ選択

ファージライブラリー 171 及び 172（実施例 9 を参照されたい）を、組換えヒトアンジオポイエチン様 - 4（R&D Systems 社、カタログ番号 3485 - AN）に対する選択に使用する。

## 【 0 6 3 7 】

Angptl4 を、5 µg / ml、0.5 µg / ml 及び 0 µg / ml（対照）で、Maxisorp 96 ウェルマイクロタイタープレート（Nunc 社）上に直接固定化する。

50

ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージを増幅し、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 、及び $0\mu\text{g}/\text{ml}$ （対照）の固定化したAngpt14上での2回目の選択に適用した。この2回目の選択において、ファージライブラリーとのインキュベーション及び広範な洗浄に続いて、結合ファージをトリプシンにより溶出した。溶出したファージプールから得られた個別のコロニーを増殖し、i) 新規ファージ産生のための誘導、及びii) 標準的な方法（例えば、従来技術、及び本明細書において引用された出願人によって出願された出願を参照）に従って、ナノボディの発現及び抽出（ペリプラズム抽出物）のためのIPTGによる誘導を行った。

【0638】

10

実施例19：Angpt14結合ナノボディのスクリーニング

Angpt14に対する結合特異性を決定するために、モノクローナルファージプールを使用して、ELISA結合アッセイの設定において、クローンを試験する。組換えヒトアンジオポイエチン様-4（R&D Systems社、カタログ番号3485-AN）に対するファージ結合を試験する。簡潔には、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ のAng1をMaxisorp ELISAプレート（Nunc社）上に固定化し、空いている結合部位を4% Marvel スキムミルク（PBS中で）を使用してブロックする。次に、異なるクローンのモノクローナルファージを誘導したものからの $10\mu\text{l}$ の上清（ $100\mu\text{l}$ の2% Marvel PBS中の）を、固定化した抗原に結合させる。インキュベーション及び洗浄の工程後に、HRPコンジュゲートモノクローナル抗M13抗体（Gentaur社、カタログ番号27942101）を使用して、ファージ結合を示す。結合特異性は、無関係のファージを加えた又はファージなしの対照に対して比較して、OD値に基づいて決定する。

20

【0639】

図10及び表B-7は、Angpt14に結合するクローンの選択を示す。

【0640】

表B-7：Angpt14に対するナノボディ。

【表 3 5】

名称	配列番号	配列
170-B1	485	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASESIFSLYVTGWYRQAPGKQREL VASITSGGSLTYADSVKGRFTISRDNKNTVHLQMHSCLKPEDTAVYF CNGRSIGVDDMPYVYWGQGTQVTVSS
170-C2	486	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLNAMTWVRQAPGKGLE WVSTISSGGWTTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSCLKPEDMA VYYCAKGSEFNGYEVRRGQGTQVTVSS
170-E2	487	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISINVMGWYRQAPGKQRDL VATITRALNTAYATSVKGRFTISRDNFTNTVYLQMNSLEPEDTAVYY CNAGGYITNLRTGGNYWGQGTQVTVSS
170-F2	488	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIFIIDTMGWYRQAPGKQREL ASITPTGNTNYVDSVKGRFAISRDNKNTMHLQMNSCLKPEDTAVYY CNAVYPRYYGDDDRPPVDSWGQGTQVTVSS
170-H1	489	EVQLVESGGGLAQAGGSLRLSCAASGSISINVMGWYRQAPGKQRDL VAVITRALNTNYATSVKGRFTISRDDFKDTVYLQMNSLEPEDTAVYY CNAGGYITNLRTGGNYWGQGTQVTVSS
171-A2	490	EVQLVESGGGQVQAGDSLRLSCKASRTISTYGMGWFRQAPGDKRD LVSSISASGASTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSCLKPEDAAVY YCAAAPNGRFITMSAHVDSWGQGTQVTVSS
171-A3	491	EVQLVESGGGQVQAGDSLRLSCKASRTISTYGMGWFRQAPGDKRD LVSSISASGASTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSCLKPEDAAVY YCAAAPNGRFITMSTHVDYWGQGTQVTVSS
171-C4	492	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSTFNTYSMGWFRQAPGKE REFVAAISRGGNVTPYADSVKGRFAISRDNKNTVALQMNSCLKPEDT AVYYCAASKIGIASTIRYYDYWGQGTQVTVSS
171-D2	493	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASVLTFGTYTVGWFRQAPGKERE FVSIITGSGTYNDYADSVKGRFTVSRDNKNTVYLQMNSCLKSEDTAV YYCAARHWGMFSRSENDYNYWGQGTQVTVSS

10

20

30

171- E2	494	EVQLVESGGGLVQAGASLRRLSCVDSGDTFSWYAMGWFRQQAPGKE REFVSSISGGGSNTVYADSVKGRFTVSRDRAKNTVYLQMNSLKPEDS GVYYCAADKRWGSPATSRSTHDYDFWGQGTQVTVSS
171- E4	495	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTFNTYSMGWFRQAPGKE REFVAAISRSGNVTPTYADSVKGRFAISRDNAKNTLTLMNSLKPEDT AVYYCAASKIGIASTIRYYDYWGQGTQVTVSS
171-F3	496	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRSFNLYYMGWFRQAPGRERE FVAGISGSGGSTFYGDSVKGRFTISRDNLKNMTMYLQMNSLKPEDTAV YYCQSSRRIITNPREYGYWGQGTQVTVSS
171- G2	497	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGLTFSMYAMAWIRLAPGKERE VIAAIDWSGGSTFYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAV YYCAANRRIYSSGSSLSDNSLYNFWGQGTQVTVSS
171- G4	498	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGDTFNWYAMGWFRQQAPGKE REFVSAISGGGSNIVYVDSVKGRFTVSRDRIKNTVYLQMNSLKPEDSG VYYCAVDKRWGSPATSRSTHDYDFWGQGTQVTVSS
170- G3	499	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASETIFASAMGWYRQPPGKQREL VARITRGGSTNYAESVKGRFAISRDNADSTLYLRMNNLKPEDTAVYY CNADTIGHSSSYITYWGQGTQVTVSS
171- H2	500	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSMYAMGWFRQAPGKERE FVTVITWSGGSTYYADSVKGRFTISKDIKNTVYLQMNSLKPDDMAV YYCAAARRYGNLYNTNNYDYWGQGTQVTVSS
171- H4	501	EVQLVESGGGQVQAGDSLRLSCKASRRTISTYGMGWFRQAPGDKRD LVSSISASGASTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDAAVY YCAAAPNGRFITMSTHVDSWGQGTQVTVSS

10

20

30

【 0 6 4 1 】

A n g p t l 4 結合ナノボディの配列アライメント ( F R は小文字、 C D R は大文字 )



【表 3 6】

171-G4	evqlvesggglvqaggsrlrlscvasgdtfn...WYAMGwfrqgqpgkerefv.SAISGGG	
171-E2	evqlvesggglvqaggsrlrlscvdsqdtfs...WYAMGwfrqgqpgkerefv.SSISGGG	
170-H1	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgsiss...INVMGwyr.qapgkqrdlva..VITRA	
170-E2	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgsiss...INVMGwyr.qapgkqrdlva..TITRA	
171-H2	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgrpfs...MYAMGwfr.qapgkerefvt.VITWSG	
171-E4	evqlvesggglvqpggsrlrlscaasgrtfsTFNTYSMGwfr.qapgkerefva.AISRSRG	
171-C4	evqlvesggglvqpggsrlrlscaasgrtfsTFNTYSMGwfr.qapgkerefva.AISRGG	
170-F2	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasgifi...DTMGwyr.qapgkqrelva..SITPT	
170-B1	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasesifs...LYVTGwyr.qapgkqrelva..SITSG	
171-F3	evqlvesggglvqtggsrlrlscaasgrsfn...LYYMGwfr.qapgrerefva.GISGSG	
171-H4	evqlvesggglvqagdsrlrlsckasrrtis...TYGMGwfr.qapgdkrdlvs.SISASG	
171-A2	evqlvesggglvqagdsrlrlsckasrrtis...TYGMGwfr.qapgdkrdlvs.SISASG	10
171-A3	evqlvesggglvqagdsrlrlsckasrrtis...TYGMGwfr.qapgdkrdlvs.SISASG	
171-D2	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasvltfg...TYTVGwfr.qapgkerefvs.IITGSG	
170-G3	evqlvesggglvqaggsrlrlscaasetifa...SAMGwyr.qppgkqrelva..RITRG	
170-C2	evqlvesggglvqpggsrlrlscaasgftfs...LNAMEwvr.qapgkglewvs.TISSGG	
171-G2	evqlvesggglvqaggsrlrlsctasgltf...MYAMAwir.lapgkerevia.AIDWSG	
171-G4	SNIVYVDSVKGrftvsrdriktvylqmnsllkpedsgvyyca...DKRWGSPATSRSTH	
171-E2	SNTVYADSVKGrftvsrdrakntvylqmnsllkpedsgvyycaa...DKRWGSPATSRSTH	
170-H1	LNTNYATSVKGrftisrddfkdtvylqmnsllkpedtavyyca...GGYYTNLRTGG	
170-E2	LNTAYATSVKGrftisrdnftntvylqmnsllkpedtavyyca...GGYYTNLRTGG	
171-H2	GSTYYADSVKGrftiskdiakntvylqmnsllkpedmavyycaa...ARRYGNLYNTN	
171-E4	NVTPYADSVKGrfaisrdnakntltlqmnsllkpedtavyycaa...SKIGIASTIRYYD	
171-C4	NVTPYADSVKGrfaisrdnakntvalqmnsllkpedtavyycaa...SKIGIASTIRYYD	
170-F2	GNTNYVDSVKGrfaisrdnnkntmhlqmnsllkpedtavyyca...VYPRYGGDDDRPPV	
170-B1	GSLTYADSVKGrftisrdnakntvhlqmnsllkpedtavyyca...RSIGVDDMPYV	
171-F3	GSTFYGDSVKGrftisrdnlnktmvlqmnsllkpedtavyyca...SRRIITNPREYG	20
171-H4	ASTYYVDSVKGrftisrdnlnktvylqmnsllkpedaavyycaa...APNGRFITMSTHV	
171-A2	ASTYYVDSVKGrftisrdnlnktvylqmnsllkpedaavyycaa...APNGRFITMSAHV	
171-A3	ASTYYVDSVKGrftisrdnlnktvylqmnsllkpedaavyycaa...APNGRFITMSTHV	
171-D2	TYNDYADSVKGrftvsrdnakntvylqmnsllksedtavyycaa...RHWGMFSRSENDY	
170-G3	GSTNYAESVKGrfaisrdnadstlylrmnllkpedtavyyca...DTIGHSSSYI	
170-C2	WTTSYADSVKGrftisrdnakntlylqmnsllkpedmavyyca...GSEFNGYEV.	
171-G2	GSTFYGDSVKGrftisrdnakntvylemnsllkpedtavyycaanRRRIYSSGSSLSDSL	
171-G4	DYDFwgggtqvtvss	
171-E2	DYDFwgggtqvtvss	
170-H1	NY...wgggtqvtvss	
170-E2	NY...wgggtqvtvss	
171-H2	NYDYwgggtqvtvss	
171-E4	Y...wgggtqvtvss	
171-C4	Y...wgggtqvtvss	30
170-F2	DS...wgggtqvtvss	
170-B1	Y...wgggtqvtvss	
171-F3	Y...wgggtqvtvss	
171-H4	DS...wgggtqvtvss	
171-A2	DS...wgggtqvtvss	
171-A3	DY...wgggtqvtvss	
171-D2	NY...wgggtqvtvss	
170-G3	TY...wgggtqvtvss	
170-C2	....rggggtqvtvss	
171-G2	NF...wgggtqvtvss	

## 【0 6 4 2】

成員：

結合剤のファミリー（ナノボディの1つのファミリーは同じCDR3を有する）。

成員：

- I 171 - A3、171 - A2
- II 170 - E2、170 - H1
- III 171 - H2
- IV 171 - E2、171 - G4
- V 171 - E4、171 - C4
- VI 170 - G3
- VII 170 - B1
- VIII 170 - F2

40

50

- I X            1 7 1 - F 3
- X            1 7 1 - D 2
- X I           1 7 0 - C 2
- X I I        1 7 1 - G 2

#### 【 0 6 4 3 】

実施例 20 : *in vitro* アッセイ、細胞ベースのアッセイ又は *in vivo* アッセイの包括的リスト :

*in vitro* 結合アッセイ : E L I S A、ピアコア

*in vivo* 結合アッセイ : フローサイトメトリー

固相受容体結合及び遮断アッセイ ( 非特許文献 10 ) : 固定化されたりガンド又は受容体のいずれかによる E L I S A ベースのアッセイ ( 受容体 / リガンドの結合の阻害が決定される )。例えば、T i e 2 ナノボディ、A n g 1 ナノボディ、又は / 及び A n g 2 ナノボディに好適な、細胞ベースのアッセイ。

受容体活性化 / 不活性化アッセイ ( Fiedler et al., 2003., Harfouche and Hussain, 2006 : 両者とも前出 ) : リン酸化受容体 ( 活性化された ) 又は下流のシグナル伝達経路のコンポーネントのリン酸化のウエスタンブロット検出。例えば、T i e 2 ナノボディ、A n g 1 ナノボディ、又は / 及び A n g 2 ナノボディに好適な、細胞ベースのアッセイ。

細胞増殖アッセイ ( 非特許文献 10 ) : 腫瘍内皮細胞 ( 例えば特異的腫瘍細胞株 ) 又はヒト臍帯静脈内皮細胞 ( H U V E C ) 等の「一般的な」内皮細胞の増殖の阻害は、中和ナノボディの追加あり又は追加なしで刺激された腫瘍細胞でアッセイされる。細胞増殖は F A C S 解析によって生細胞数をカウントすることによって決定される。

*in vivo* 血管新生アッセイ ( 非特許文献 10 ) : 異種移植研究において中和ナノボディの追加によって腫瘍増殖に対する効果を決定するアッセイ。例えば、T i e 2 ナノボディ、A n g 1 ナノボディ、又は / 及び A n g 2 ナノボディに好適な *in vivo* アッセイ。

*in vivo* の直接的な抗血管新生効果 ( 非特許文献 10 ) : ラット角膜血管新生モデルによって *in vivo* の直接的な抗血管新生効果を決定するアッセイ。例えば、T i e 2 ナノボディ、A n g 1 ナノボディ、又は / 及び A n g 2 ナノボディに好適な *in vivo* アッセイ。

リポタンパク質リパーゼ ( L P L ) アッセイ : 基質として <sup>3</sup> H - オレイン酸を使用する L P L 活性の測定 ( Yoshida et al., 2002、前出 )。例えば、A n g p t l 4 に好適な *in vitro* アッセイ。

*in vivo* C A M ( トリ絨毛尿膜 ) アッセイ : C H O - A n g p t l 4 発現細胞株を使用して、A n g p t l 4 結合ナノボディの追加によって血管侵入を阻害するか又はしないかを決定するアッセイ ( Le Jan et al., 2003、前出 )。例えば、A n g p t l 4 に好適な *in vivo* アッセイ。

*in vivo* 動物モデル研究 : h A n g p t l 4 を過剰発現するトランスジェニックマウスの脂質代謝に対する A n g p t l 4 ナノボディの注入効果を決定するアッセイ ( Koster et al., 2005、前出 )。例えば、A n g p t l 4 に好適な *in vivo* アッセイ。

#### 【 0 6 4 4 】

実施例 21 : 本発明のアミノ酸配列の特に好ましい態様のリスト

2 つの異なるエピトープに指向性を有しているか、又は同じエピトープに指向性を有しているかのいずれかの、例えば同じ標的 ( 例えば T i e 2 ) に対するアンタゴニスト効果を有する 2 つのナノボディを含むアミノ酸配列。

T i e 2 受容体に対するナノボディ及びアンジオポイエチン 1 に対するナノボディを含むアミノ酸配列。

T i e 2 受容体に対するナノボディ及びアンジオポイエチン 2 に対するナノボディを含むアミノ酸配列。

細胞毒性化合物 ( 例えばペプチド毒素、例えば免疫毒素 )、及び T i e / A n g 又は T i

10

20

30

40

50

e / Angptl の相互作用（例えば Ang 1 / Tie 2 又は Ang 2 / Tie 2 相互作用）の少なくとも 1 つを妨害することができるナノボディを含むアミノ酸配列。提示されたような本発明のアミノ酸配列（例えば、配列番号 455 ~ 配列番号 501 中の）は、特定のタイプの癌の標的化のために使用することができる。

【0645】

実施例 22：本発明の標的タンパク質のリスト（核酸配列及びアミノ酸配列へのリンク）

【0646】

【表 37】

Tie1, Tie2, Ang1, Ang2, Ang3, Ang4, Angptl1, Angptl2, Angptl3, Angptl4, Angptl5, and Angptl6	例えば、 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez</a> で見出される様々な種からの配列
ヒト Tie1	NM_005424
ヒト Tie2	NM_000459
ヒト Ang1	NM_001146
ヒト Ang2	NM_001147
ヒト Ang3	AF074332
ヒト Ang4	NM_015985
ヒト Angptl1	NM_004673
ヒト Angptl2	BC012368
ヒト Angptl3	NM_014495
ヒト Angptl4	NM_001039667
ヒト Angptl5	NM_178127
ヒト Angptl6	NM_031917

【0647】

実施例 23：Tie - 2 ナノボディ 163E9 のさらなる解析

使用される試薬

組換えヒトアンジオポイエチン - 1（R&D SYSTEM社、カタログ番号：923 - AN）、組換えヒトアンジオポイエチン - 2（R&D SYSTEM社、カタログ番号：623 - AN）、抗全 Erk p44 / 42 MAPK（Cell Signaling Technology社、カタログ番号 # 9102）、抗リン酸化 Erk p44 / 42 MAPK（Thr202 / Tyr204）（E10）（Cell Signaling Technology社、カタログ番号 # 9106S）、抗全 Akt（C67E7）（Cell Signaling Technology社、カタログ番号 # 4691）、抗リン酸化 Akt（Ser473）（D9E）（Cell Signaling Technology社、カタログ番号 # 4060）、抗 Tie - 2 / TEK、クローン Ab33（UPSTATE社、カタログ番号 # 05 - 584）、抗ホスホチロシン、4G10（Platinum、Millipore社）

【0648】

実施例 23a：Tie - 2 ナノボディ 163E9 は、バイオ - プレックス解析によって決定される、Akt 及び Erk の Ang - 1 により誘導されたリン酸化を阻害する

Ang - 1 により誘導された Tie - 2 シグナル伝達経路の活性化を阻害する Tie - 2 ナノボディを同定するために、バイオ - プレックスのリンタンパク質アッセイ及び全標的アッセイを使用した。このアッセイにより、細胞培養物又は組織試料に由来する溶解物中のタンパク質のリン酸化及び発現がそれぞれ決定される。バイオ - プレックス全標的アッセイは、1 ウェル中の標的タンパク質の存在量を示し、一方バイオ - プレックスリンタンパク質アッセイは、個別のウェル中の同じタンパク質のリン酸化レベルを示す。

【0649】

方法：

バイオ・ブレックスアッセイは、異なるスペクトルアドレスを有するビーズの選択を使用し、各々のビーズは、異なる標的（全標的アッセイにおいて、Akt及びERK 1/2；リンタンパク質アッセイにおいて、Akt（Ser<sup>473</sup>）及びERK 1/2（Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>、Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>））に対する抗体ヘカップリングした。カップリングしたビーズを96ウェルプレートのウェルへ加えた。細胞溶解物（適切に処理されたHUVECに由来する200 µg/ml～900 µg/mlのタンパク質濃度範囲で）を、カップリングしたビーズを含有するウェルへ加えた。インキュベーションを15時間～18時間放置した。各々の標的上の二次エピトープに特異的なビオチン標識検出抗体をウェルへ加える。インキュベーションを30分間放置した。蛍光標識ストレプトアビジンレポーター（ビオチン標識検出抗体に結合できる）を、ウェルへ加えた。インキュベーションを10分間放置した。リンス後に、複合体をアッセイバッファー中で再懸濁した。バイオ・ブレックスアレイリーダーにおいて、赤色識別レーザー及び緑色レポーターレーザーは個別のビーズを照射し、各々のビーズのスペクトルアドレス及び関連するレポーターシグナルを同定した。色素ビーズは内部の蛍光シグネチャーによって同定され、ビーズに結合された標的のレベルはレポーターシグナルの強度によって示された。マルチブレックスデータは同時に報告された。

【0650】

HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）をヒト臍帯静脈のコラゲナーゼ処理によって得て、20% FCSを含有するM199（2% ペニシリン・ストレプトマイシン、脳抽出物及び25 µg ヘパリンナトリウム硫酸塩）中で培養した。0.5% BSAを含有するM199中での3～4時間の飢餓後に、細胞をTie-2 ナノボディの指示濃度で10分間処理し、次いで100 ng/mlのh-Ang-1で10分間刺激した。細胞を氷冷細胞洗浄バッファー中でリンスし、プロテアーゼ阻害剤及びホスファターゼ阻害剤を含むバッファー中で溶解した。タンパク質濃度をBCA（ビシンコニン酸）アッセイによって測定し、各々の試料について等量のタンパク質（200 µg/ml～900 µg/mlの範囲で）をバイオ・ブレックス解析に使用した。Aktに対するリン酸化Aktの比及びERKに対するリン酸化ERKの比はそれぞれ図11及び12において報告され、h-Ang-1刺激を行っていない試料を示す。試験された抗Tie-2 ナノボディの中で、ナノボディ163E9のみが、7.5 µg/ml（約500 nM）及び1 µg/ml（約67 nM）の両方で、Ang-1により誘導されたAkt及びErkのリン酸化を遮断することができた。他のTie-2 ナノボディのどれも、Akt及びErkのリン酸化を阻害しなかった。

【0651】

実施例23b：ナノボディ163E9は、ウエスタンブロッティングによって決定されるように、Ang-1により誘導されたAkt及びErkのリン酸化を用量依存的に阻害する

HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）をヒト臍帯静脈のコラゲナーゼ処理によって得て、20% FCSを含有するM199（2% ペニシリン・ストレプトマイシン、脳抽出物及び25 µg ヘパリンナトリウム硫酸塩）中で培養した。

【0652】

HUVECを6ウェルプレート中にプレーティングし、サブコンフルエント状態（ $1.5 \pm 2 \times 10^5 / 9.6 \text{ mm}$ ディッシュ）で使用した。0.5% BSAを含有するM199中での3～4時間の飢餓後に、細胞を指示濃度のナノボディで10分間処理し、次いで100 ng/mlのh-Ang-1で10分間刺激した。細胞を氷冷PBS中でリンスし、煮沸バッファー（500 mM トリスHCl（pH 6.8）；10% SDS、グリセロール）中で溶解した。溶解物を遠心分離によって清澄化し、タンパク質濃度をBCA（ビシンコニン酸）アッセイによって測定した。10 µgのタンパク質を10% SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗Erk 1/2、抗リン酸化Erk 1/2、抗Akt及び抗リン酸化Aktによりウエスタンブロット解析を行った。対応する化学発光シグナルをCCDカメラによって捕捉及び定量する。Aktに対するリ

10

20

30

40

50

ン酸化Aktの比(図13)及びERKに対するリン酸化ERKの比(図14)が示される。ナノボディ163E9はAng-1により誘導されたAkt及びErkのリン酸化を用量依存的に阻害した。

【0653】

実施例23c: Tie-2ナノボディ163E9は、Ang-1の抗アポトーシス効果を回復させる

HUVECの血清飢餓はアポトーシス細胞死(Ang-1による阻害することができるプロセス)をもたらすことが知られている。Tie-2ナノボディ163E9が、Tie-2を介してAng-1により誘導された活性を妨げることをさらに実証するために、ナノボディ163E9がAng-1の抗アポトーシス活性を回復させることができるかどうかを調べた。

【0654】

アポトーシス実験は、ヌクレオソーム関連のDNA断片のレベルを評価するCell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>キット(Roche社)を使用して実行した。HUVEC細胞は、24ウェル(2×10<sup>4</sup>細胞/ウェル)又は6ウェル(9.8×10<sup>4</sup>細胞/ウェル)中に播種し、示された異なる増殖因子で一晩で処理した。手順において使用されるバッファー及び試薬はキットと共に供給される。細胞を200μl又は980μlの溶解バッファーで室温で30分間溶解し、溶解物を200gで10分間遠心分離した。ELISAアッセイは20μlの試料上清及び80μlの免疫試薬により実行した。免疫試薬は、1/20容積の抗DNA-HRP及び1/20容積の抗ヒストン-ビオチンを18/20容積のインキュベーションバッファーと混合することによって調製した。イムノアッセイ結合反応を2時間進行させ、その後、過剰量の試薬をインキュベーションバッファーによる2回の洗浄(各200μl)で除去した。ヌクレオソームの量の定量は、免疫複合体によって保持されるHRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)(それは基質としてのABTSを用いて測光により測定する)の評価によって評価した。最終的に発色反応は10~15分後にABST停止液で遮断した。

【0655】

Tie-2に対するナノボディは、HUVEC細胞(Ang-1(300ng/ml)で一晩で刺激するか、又は対照として増殖因子飢餓(SF)を行った)において試験した。図15において示されるように、Ang-1は血清飢餓に続いて起こるアポトーシスを強く阻害した。重要なことには、ナノボディ163E9は、Ang-1の抗アポトーシス活性を用量依存的に阻害した。実際ナノボディ濃度を低下させると、細胞アポトーシスの減少がもたらされた。

【0656】

実施例23d: ナノボディ163E9は、Ang-1により誘導されたTie-2のリン酸化を用量依存的に阻害する

Ang-1とTie-2との結合に続いて、Tie-2の細胞質尾部はリン酸化状態になる。Tie-2ナノボディ163E9が、Tie-2を介してAng-1により誘導された活性を妨げることをさらに実証するために、ナノボディ163E9がTie-2のリン酸化を阻害することができるかどうかを調べた。

【0657】

HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)をヒト臍帯静脈のコラゲナーゼ処理によって得て、20%FCSを含有するM199(2%ペニシリン-ストレプトマイシン、脳抽出物及び25μgヘパリンナトリウム硫酸塩)中で培養した。

【0658】

0.5%BSSAを含有するM199中での3~4時間の飢餓後に、細胞を指示濃度(ng/ml)のナノボディで10分間処理し、次いでh-Ang-1で10分間刺激した。細胞を氷冷PBS中で1回リンスし、プロテアーゼ阻害剤及びホスファターゼ阻害剤(50μg/mlペプスタチン、50μg/mlロイペプチン、10μg/mlアプロチニン、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、100μM ZnCl<sub>2</sub>、1mM Na<sub>3</sub>V

10

20

30

40

50

O<sub>4</sub>)を含むEBバッファー(10mMトリスHCl(pH7.5)、150mM NaCl、5mM EDTA、1%トリトンX100、10%グリセロール)中で4で溶解した。溶解物(450~800μg)を4で2時間プロテインGセファロース及び抗Tie-2抗体(1μg)とインキュベーションした。洗浄後に、免疫沈降物を6%SDS-PAGE中で分離し、P-Tyr及びTie-2について免疫プロットした。図16において示されるように、使用されるナノボディ163E9の最も高い濃度で、Tie-2のリン酸化は確かに減少した。

#### 【0659】

実施例23e: ナノボディ163E9は、Ang-1により誘導された内皮細胞の出芽を用量依存的に阻害する

HUVECをトリプシン処理し、カウントし、20%メトセル(Sigma社)を含有する培養培地(80mlのM-199(20%FCS、0.1mg/mlヘパリン及び0.1mg/mlの脳抽出物)と20mlメトセルストック)中で1μl当たり4個の細胞の密度で懸濁した。800個の細胞を非接着性丸底96ウェルプレートの中へ播種し、37で一晩培養した。翌日、形成されたスフェロイドを採取し、室温で15分間300gで遠心分離し、コラーゲンゲルの中へ埋め込んだ。希釈したI型コラーゲン(ラット尾部から、Sigma社)溶液は、7容積のコラーゲン(滅菌した0.2%の酢酸(pH3)中で3mg/mlに4で平衡化した)、1容積の10×M199、1容積の0.1N NaOH、及び1容積の0.2M HEPES(pH7.3)の混合によって、使用前に調製した。ECスフェロイドを、100ng/mlのAng1及び指示濃度でのナノボディ163E9あり又はなしの40%FCS含有M-199培地200μl中で懸濁し、等容積の希釈したコラーゲン溶液と混合した。スフェロイドを96ウェルプレート(400μl/ウェル)の中へ迅速に移し、重合させた。

#### 【0660】

毛細血管様の出芽を倒立位相差顕微鏡(Leica Microsystem社、Heerbrugg、Switzerland)で検査し、撮影した。毛細血管様の構造の長さ及び突出した領域を、画像化ソフトウェアwinRHIZO Pro(Regent Instruments社)で定量した。

#### 【0661】

図17において示されるように、ナノボディ163E9はAng-1によって誘導されたHUVEC細胞の出芽を用量依存的に阻害した。

#### 【0662】

当業者は、単なるルーチン実験を使用して、本明細書に記載された本発明の特定の実施形態に対する多数の均等物を認識する、又は確認することができるだろう。このような均等物は、添付の特許請求の範囲により包含されることが意図される。

#### 【0663】

本明細書で開示された全ての参考文献は、本明細書に示した目的及び情報のために、その全体が参照により援用される。

#### 【0664】

好ましい実施形態:

1. Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、及びAngptl6からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

2. Tie1及びTie2からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

3. Ang1、Ang2、Ang3及びAng4からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

4. Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、及びAngptl6からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/

10

20

30

40

50

又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

5. 本質的に単離形態である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

6. ヒトTie1、ヒトTie2、ヒトAng1、ヒトAng2、ヒトAng3、ヒトAng4、ヒトAngptl1、ヒトAngptl2、ヒトAngptl3、ヒトAngptl4、ヒトAngptl5、及びヒトAngptl6からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

7. ヒトTie1及びヒトTie2からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

10

8. ヒトAng1、ヒトAng2、ヒトAng3及びヒトAng4からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

9. ヒトAngptl1、ヒトAngptl2、ヒトAngptl3、ヒトAngptl4、ヒトAngptl5、及びヒトAngptl6からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

10. ヒトTie2、ヒトAng1、ヒトAng2、ヒトAng4及びヒトAngptl4からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

20

11. ヒトTie2及びヒトAng2からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する少なくとも1つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

12. 可変ドメインが、i) ヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、ii) ヒトTie2と少なくとも1つのAng(例えばヒトAng)との間の相互作用を遮断する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

13. 可変ドメインが、i) ヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、ii) ヒトTie2と1つだけのAng(例えばヒトAng)との間の相互作用を遮断する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

30

14. 可変ドメインが、i) ヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、ii) ヒトTie2とヒトAng1との間の相互作用を遮断する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

15. 可変ドメインが、i) ヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、ii) ヒトAng1とヒトTie2との間の相互作用を遮断し、ヒトAng2とヒトTie2との間の相互作用を遮断しない、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

16. 可変ドメインが、i) ヒトAng2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、ii) ヒトTie2とヒトAng2との間の相互作用を遮断する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

40

17. 可変ドメインが、Tie1及びTie2からなるタンパク質の群の少なくとも1つの成員に対してアンタゴニスト効果を有する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

18. 可変ドメインが、Tie1及びTie2からなるタンパク質の群の少なくとも1つの成員に対してアゴニスト効果を有する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

19. 可変ドメインが、ヒトTie2に対してアンタゴニスト効果を有する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

20. 可変ドメインが、ヒトTie2に対してアゴニスト効果を有する、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

50

21. 可変ドメインがヒト Tie 2 ホモ二量体の集合を阻害することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

22. 可変ドメインがヒト Tie 2 ホモ二量体の集合を増進することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

23. 可変ドメインが、例えば、本明細書において開示された *in vitro* の細胞ベースのモデル又は動物モデルのいずれかにおいて測定されるような血管新生を阻害することができる、これまでの又は以下のいずれかの実施形態に記載のアミノ酸配列。

24. Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Angptl 1、Angptl 2、Angptl 3、Angptl 4、Angptl 5、及び Angptl 6 からなるタンパク質の群のうちの少なくとも1つの成員と、 $10^{-5}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L 以下、及び好ましくは  $10^{-7}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L 以下、及びより好ましくは  $10^{-8}$  モル/L ~  $10^{-12}$  モル/L の解離定数 ( $K_D$ ) で、特異的に結合することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

10

25. Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Angptl 1、Angptl 2、Angptl 3、Angptl 4、Angptl 5、及び Angptl 6 からなるタンパク質の群のうちの少なくとも1つの成員と、 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  等) の結合速度 ( $k_{on}$  速度) で、特異的に結合することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

20

26. Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Angptl 1、Angptl 2、Angptl 3、Angptl 4、Angptl 5、及び Angptl 6 からなるタンパク質の群のうちの少なくとも1つの成員と、 $1 \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  等) の解離速度 ( $k_{off}$  速度) で、特異的に結合することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

27. Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Angptl 1、Angptl 2、Angptl 3、Angptl 4、Angptl 5、及び Angptl 6 からなるタンパク質の群のうちの少なくとも1つの成員と、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満 (500 pM 等) の親和性で、特異的に結合することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

30

28. 天然アミノ酸配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成のアミノ酸配列である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

29. 免疫グロブリンフォールドを含むか又は好適な条件下で免疫グロブリンフォールドを形成することが可能である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

30. 4つのフレームワーク領域 (それぞれ、FR 1 ~ FR 4) と、3つの相補性決定領域 (それぞれ、CDR 1 ~ CDR 3) とから本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

40

31. 免疫グロブリン配列である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

32. 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

33. ヒト化免疫グロブリン配列、ラクダ化免疫グロブリン配列、又は親和性成熟等の技法によって得られた免疫グロブリン配列である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

34. 軽鎖可変ドメイン配列 (例えば  $V_L$  配列) 又は重鎖可変ドメイン配列 (例えば  $V_H$

50



配列)から本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

35. 通常の本鎖抗体由来の本鎖可変ドメイン配列から本質的になるか、又は本鎖抗体由来の本鎖可変ドメイン配列から本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

36. ドメイン抗体(又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、単ドメイン抗体(又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、「dAb」(又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列)、又はナノボディ(商標)(V<sub>H</sub>H配列を含むが、これに限定されない)から本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

10

37. ナノボディ(商標)から本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

38.

i) 配列番号1~配列番号22のアミノ酸配列の少なくとも1つとの80%のアミノ酸同一性を有し(アミノ酸同一性の程度を決定するためにCDR配列を形成するアミノ酸残基は無視する)、

ii) 好ましくは、カバットナンバリングによる11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数は、表A-3で言及する特徴的な残基から選択される、

ナノボディ(商標)から本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

20

39.

i) 配列番号455~配列番号501のアミノ酸配列の少なくとも1つとの80%のアミノ酸同一性を有し(アミノ酸同一性の程度を決定するためにCDR配列を形成するアミノ酸残基は無視する)、

ii) 好ましくは、カバットナンバリングによる11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数は、表A-3で言及する特徴的な残基から選択される、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

40a. 配列番号455~配列番号501を有するアミノ酸配列のうちの少なくとも1つと、Tie、Ang及び/又はAngptlとの結合を交差遮断する少なくとも1つの可変ドメインを含む、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

30

40b. 配列番号455~配列番号501を有するアミノ酸配列のうちの少なくとも1つによってTie、Ang及び/又はAngptlに対して交差遮断される少なくとも1つの可変ドメインを含む、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

40c. 上記アミノ酸配列が交差遮断する能力又は上記アミノ酸配列が交差遮断される能力は、ピアコアアッセイにおいて検出される、実施形態40a又は40bに記載のアミノ酸配列。

40d. 上記アミノ酸配列が交差遮断する能力又は上記アミノ酸配列が交差遮断される能力は、ELISAアッセイにおいて検出される、実施形態40a又は40bに記載のアミノ酸配列。

40

40. ヒト化ナノボディ(商標)から本質的になる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載のアミノ酸配列。

41. 実施形態1~40のいずれかに記載の1つ又は複数のアミノ酸配列を含むか又はこれらから本質的になり、任意で1つ又は複数のリンカーを介して連結した、任意で1つ又は複数の他の基、残基又は部分又は結合単位をさらに含む、以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

42. 実施形態1~40のいずれかに記載の1つ又は複数のアミノ酸配列の含むか又はこれらから本質的になり、例えば、本明細書において開示された*in vitro*の細胞ベ

50

ースのモデル又は動物モデルのいずれかにおいて測定されるような血管新生を阻害することができる、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

43．上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位がアミノ酸配列である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

44．上記1つ又は複数のリンカーが存在する場合、該リンカーが1つ又は複数のアミノ酸配列である、これまでの又は以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

45．上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が免疫グロブリン配列である、実施形態42～44に記載の構築物。

46．上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又はナノボディからなる群から選択される、実施形態42～45に記載の構築物。

10

47．本発明の上記1つ又は複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン配列である、実施形態42～46に記載の構築物。

48．本発明の上記1つ又は複数のアミノ酸配列が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又はナノボディからなる群から選択される、実施形態42～47に記載の構築物。

49．実施形態42～48のいずれかに記載の1つ又は複数のナノボディを含むか又はこれらから本質的になり、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位がナノボディである、構築物。

20

50．多価構築物である、実施形態41以下のいずれかに記載の構築物。

51．多重特異性構築物である、実施形態41以下のいずれかに記載の構築物。

52．実施形態1～40のいずれかに記載の対応するアミノ酸配列自体と比較して半減期が増大している、実施形態29～38のいずれかに記載の構築物。

53．上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、実施形態1～40のいずれかに記載の対応するアミノ酸配列自体と比較して半減期が増大している化合物又は構築物を提供する、実施形態39に記載の構築物。

54．半減期が増大している化合物又は構築物を提供する、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、血清タンパク質又はその断片、血清タンパク質と結合することができる結合単位、Fc部分、及び血清タンパク質と結合することができる小タンパク質又は小ペプチドからなる群から選択される、実施形態53に記載の構築物。

30

55．半減期が増大している化合物又は構築物を提供する、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、ヒト血清アルブミン又はその断片からなる群から選択される、実施形態54に記載の構築物。

56．半減期が増大している化合物又は構築物を提供する、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）又は血清免疫グロブリン（例えばIgG）と結合することができる結合単位からなる群から選択される、実施形態55に記載の構築物。

57．半減期が増大している化合物又は構築物を提供する、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又は血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）若しくは血清免疫グロブリン（例えばIgG）と結合することができるナノボディからなる群から選択される、実施形態56に記載の構築物。

40

58．半減期が増大している化合物又は構築物を提供する、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）又は血清免疫グロブリン（例えばIgG）と結合することができるナノボディである、実施形態57に記載の構築物。

59．実施形態1～21のいずれかに記載の対応するアミノ酸配列より少なくとも1．5

50

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倍又は20倍超大きい血清半減期を有する、実施形態53～58のいずれかに記載の構築物。

60．血清半減期が、実施形態1～21のいずれかに記載の対応するアミノ酸配列と比較して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、又はさらに24時間超、48時間超又は72時間超増大している、実施形態53～59のいずれかに記載の構築物。

61．ヒトにおける血清半減期が少なくとも約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、さらにより好ましくは少なくとも72時間以上、例えば少なくとも5日(約5日～10日等)、好ましくは少なくとも9日(約9日～14日等)、より好ましくは少なくとも約10日(約10日～15日等)、若しくは少なくとも約11日(約11日～16日等)、より好ましくは少なくとも約12日(約12日～18日以上等)、又は14日超(約14日～19日等)である、実施形態53～60のいずれかに記載の構築物。

10

62．実施形態1～28のいずれかに記載の2つのアミノ酸配列を含むか又はこれらから本質的になる、実施形態53～61のいずれかに記載の構築物。

63．上記2つのアミノ酸配列が、Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、及びAngptl6からなる群から選択される同じ標的タンパク質に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、上記結合が2つの異なるエピトープに又は同じエピトープに指向性を有する、実施形態62に記載の構築物。

20

64．上記標的タンパク質が、ヒトTie1、ヒトTie2、ヒトAng1、ヒトAng2、ヒトAng3、ヒトAng4、ヒトAngptl1、ヒトAngptl2、ヒトAngptl3、ヒトAngptl4、ヒトAngptl5、及びヒトAngptl6からなる群から選択される、実施形態63に記載の構築物。

65．上記第1のアミノ酸配列がヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、上記第2のアミノ酸配列がヒトAng1に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する、実施形態64に記載の構築物。

66．上記第1のアミノ酸配列がヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、上記第2のアミノ酸配列がヒトAng2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する、実施形態64に記載の構築物。

30

67．上記第1のアミノ酸配列がヒトTie2に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合し、上記第2のアミノ酸配列がヒトAng4に指向性を有する、及び/又はこれと特異的に結合する、実施形態64に記載の構築物。

68．実施形態1～40のいずれかに記載の1つ又は複数のアミノ酸配列を含むか又はこれらから本質的になり、任意で1つ又は複数のリンカーを介して連結した、任意で1つ又は複数の毒性基、毒性残基、毒性部分又は毒性結合単位をさらに含む、実施形態53～67に記載の構築物。

69．毒性基が免疫毒素の群から選択される、実施形態68に記載の構築物。

70．少なくとも3つの可変ドメイン(例えばナノボディ)を含む、これまでの及び以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

40

71．少なくとも3つの可変ドメイン(例えばナノボディ)を含み、過剰な血管新生及び/又は腫瘍形成を阻害することができ、上記生物学的効果を本明細書において記載されたような好適な細胞ベースのモデル及び/又は動物モデルにおいて試験することができる、これまでの及び以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

72．少なくとも3つの可変ドメイン(例えばナノボディ)を含み、Tie2のクラスター形成を阻害することができるか、又は生物学的効果若しくは正常化されたレベルまで過剰な血管新生及び/若しくは腫瘍形成を阻害するような効果を全く誘導しないか若しくは部分的にのみ誘導してTie2をクラスター化させることができ、上記生物学的効果を本明細書において記載されたような好適な細胞ベースのモデル及び/又は動物モデルにおいて試験することができる、これまでの及び以下の実施形態のいずれかに記載の構築物。

50

73．実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列を1つ含むか又はこれから本質的になる一価構築物。

74．上記本発明のアミノ酸配列が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又はナノボディからなる群から選択される、実施形態57に記載の一価構築物。

75．実施形態1～40のいずれかに記載のナノボディを1つ含むか又はこれから本質的になる一価構築物。

76．実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物をコードする、核酸又はヌクレオチド配列。

77．遺伝子構築物の形態である、実施形態76に記載の核酸又はヌクレオチド配列。

78．実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物を発現する、又は好適な状況下で発現することが可能である、及び／又は実施形態76又は77に記載の核酸若しくはヌクレオチド配列を含む、宿主又は宿主細胞。

79．実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物を作製する方法であって、

a) 好適な宿主細胞若しくは宿主生物又は別の好適な発現系において、実施形態76に記載の核酸若しくはヌクレオチド配列又は実施形態77に記載の遺伝子構築物を発現する工程と、任意でその後、

b) 実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物を単離及び／又は精製する工程と、を少なくとも含む、方法。

80．実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物を作製する方法であって、

a) 実施形態78に記載の宿主又は宿主細胞が少なくとも1つの実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物を発現及び／又は産生するような条件下で、上記宿主又は宿主細胞を培養及び／又は維持する工程と、任意でその後、

b) 実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物を単離及び／又は精製する工程と、を少なくとも含む、方法。

81．実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに記載の一価構築物、又は実施形態76若しくは77に記載の核酸若しくはヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む組成物。

82．薬学的組成物である、実施形態81に記載の組成物。

83．薬学的組成物であり、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤、及び／又はアジュバントをさらに含み、任意で1つ又は複数のさらなる薬学的に活性のあるポリペプチド及び／又は化合物を含む、実施形態82に記載の組成物。

84．過剰な血管新生又は不十分な血管新生に関連する少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び／又は治療する方法であって、それを必要とする被験体に、薬学的に活性のある量の少なくとも1つの実施形態1～40のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態41～72のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態73～75のいずれかに

10

20

30

40

50

記載の一価構築物、又は実施形態 81 ~ 83 のいずれかに記載の組成物を投与することを含む、方法。

85. Tie1、Tie2、Ang1、Ang2、Ang3、Ang4、Angptl1、Angptl2、Angptl3、Angptl4、Angptl5、及び Angptl6 からなる群から選択されるタンパク質に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害を、その生物学的若しくは薬理学的活性で、及び / 又は上記タンパク質が関与する生物学的経路若しくはシグナル伝達で、予防及び / 又は治療する方法であって、それを必要とする被験体に、薬学的に活性のある量の少なくとも 1 つの実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物、又は実施形態 81 ~ 83 のいずれかに記載の組成物を投与することを含む、方法。

10

86. 実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物、又は実施形態 81 ~ 83 のいずれかに記載の組成物をそれを必要とする被験体に投与することによって予防及び / 又は治療することができる癌に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害を予防及び / 又は治療する方法であって、それを必要とする被験体に、薬学的に活性のある量の少なくとも 1 つの実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物、又は実施形態 81 ~ 83 のいずれかに記載の組成物を投与することを含む、方法。

20

87. 過剰な血管新生又は不十分な血管新生に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害を予防及び / 又は治療する薬学的組成物の調製における、実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物の使用。

88. 過剰な血管新生又は不十分な血管新生に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害を予防及び / 又は治療するための、実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物の使用。

89. 過剰な血管新生が根本原因である疾患の治療のための、実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物の使用であって、患者の血清中の機能的 Ang2 に対する機能的 Ang1 の比が、0.5 ~ 2、好ましくは 0.6 ~ 1.67、より好ましくは 0.7 ~ 1.4、より好ましくは 0.8 ~ 1.25、より好ましくは 0.9 ~ 1.1 であるように使用される投薬レジメンが制御される、使用。

30

90. 機能的 Ang2 の濃度が、Ang2 の血清中の全濃度から Ang2 に指向性を有するアミノ酸配列の血清中の全濃度を引いたものであると判断される、実施形態 89 に記載の使用。

91. 実施形態 1 ~ 40 のいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 にいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物、又は実施形態 81 ~ 83 のいずれかに記載の組成物をそれを必要とする被験体に投与することによって予防及び / 又は治療することができる癌に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害を予防及び / 又は治療する方法であって、それを必要とする被験体に、薬学的に活性のある量の少なくとも 1 つの実施形態 1 ~ 40 にいずれかに記載のアミノ酸配列、実施形態 41 ~ 72 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は実施形態 73 ~ 75 のいずれかに記載の一価構築物、又は実施形態 81 ~ 83 のいずれかに記載の組成物を投与することを含み、患者の血清中の機能的 Ang2 に対する機能的 Ang1 の比が、0.5 ~ 2、好ましくは 0.6 ~ 1.67、より好ましくは 0.7 ~ 1.4、より好ましくは 0.8 ~ 1.25、より好ましくは 0.9 ~ 1.1 であるように、使用される投薬レジメンが制御される、方法。

40

92. 機能的 Ang2 の濃度が、Ang2 の血清中の全濃度から Ang2 に指向性を有す

50

るアミノ酸配列の血清中の全濃度を引いたものであると判断される、実施形態 91 に記載の方法。

【0665】

さらに好ましい態様：

1. Tie 1、Tie 2、Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4、Ang ptl 1、Ang ptl 2、Ang ptl 3、Ang ptl 4、Ang ptl 5、及び Ang ptl 6 からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する少なくとも 1 つの単一可変ドメインを含むアミノ酸配列。

2. 本質的に単離形態である、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

3. 可変ドメインが、ヒト Tie 1、ヒト Tie 2、ヒト Ang 1、ヒト Ang 2、ヒト Ang 3、ヒト Ang 4、ヒト Ang ptl 1、ヒト Ang ptl 2、ヒト Ang ptl 3、ヒト Ang ptl 4、ヒト Ang ptl 5、及びヒト Ang ptl 6、好ましくはヒト Ang 1、ヒト Ang 2、ヒト Ang 4、ヒト Ang ptl 4、及びヒト Tie 2 からなる群から選択されるタンパク質に指向性を有する、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

10

4. 単一可変ドメインが、Tie 1 及び Tie 2 からなるタンパク質の群の少なくとも 1 つの成員に対してアンタゴニスト効果を有する、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

5. 単一可変ドメインが、ヒト Tie 2 に対してアンタゴニスト効果を有する、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

20

6. 単一可変ドメインが、ヒト Tie 2 に対してアンタゴニスト効果を有しており、ヒト Ang 2 とヒト Tie 2 との間の相互作用を遮断しない、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

7. 単一可変ドメインが、配列番号 461 の CDR を有する、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

8. 単一可変ドメインが、配列番号 461 との 80 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の配列同一性を有する、これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列。

9. 少なくとも 2 つの同一であるか又は異なる態様 1 ~ 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

10. 態様 1 ~ 8 のいずれか 1 つにおける単一可変ドメインのいずれかの（例えば配列番号 461 の）CDR 組合せを有する単一可変ドメイン。

30

11. 態様 1 ~ 8 のいずれか 1 つにおける単一可変ドメインのいずれか（例えば配列番号 461）との、80 %、好ましくは 90 %、より好ましくは 95 % の配列同一性を有する単一可変ドメイン。

12. これまでの態様のいずれかに記載のアミノ酸配列、ポリペプチド又は単一可変ドメインと、少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤及び / 又はアジュバントとを含む薬学的組成物。

13. 過剰な血管新生又は不十分な血管新生に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害を予防及び / 又は治療する方法であって、それを必要とする被験体に、薬学的に活性のある量の少なくとも 1 つの態様 1 ~ 11 のいずれかに記載のアミノ酸配列、ポリペプチド又は単一可変ドメインを投与することを含む、方法。

40

14. 過剰な血管新生又は不十分な血管新生に関連する少なくとも 1 つの疾患又は障害の予防及び / 又は治療のための、態様 1 ~ 11 のいずれかに記載のアミノ酸配列、ポリペプチド、又は単一可変ドメインの使用。

15. 態様 1 ~ 11 のいずれかに記載のアミノ酸配列、ポリペプチド、又は単一可変ドメインを製造する方法であって、

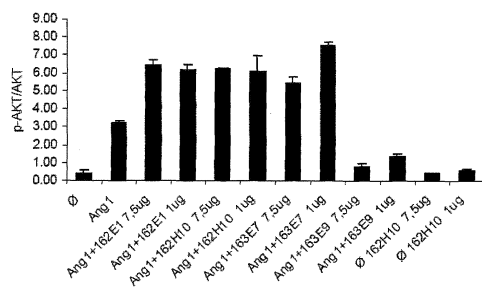
i. 好適な宿主又は宿主細胞が少なくとも 1 つの態様 1 ~ 11 のいずれかに記載のアミノ酸配列、ポリペプチド、又は単一可変ドメインを発現及び / 又は産生するような条件下で、上記宿主又は宿主細胞を培養及び / 又は維持する工程と；任意で、続いて

ii. 態様 1 ~ 11 のいずれかに記載のアミノ酸配列、ポリペプチド、又は単一可変ドメ

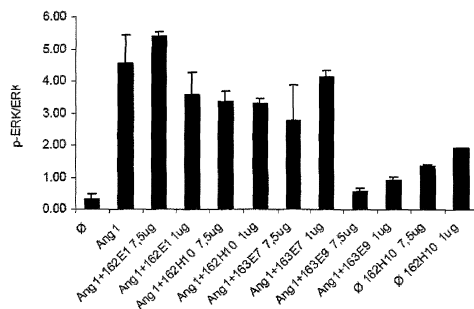
50

インを単離及び／又は精製する工程と、  
を含む、方法。

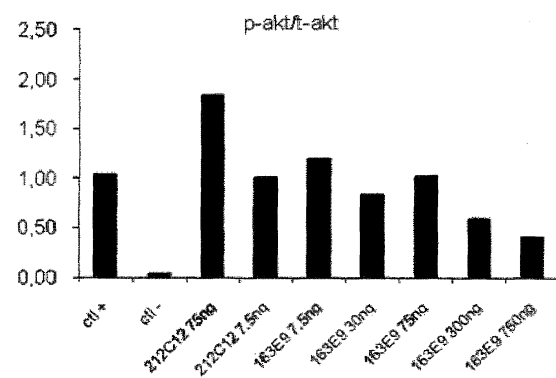
【図 1 1】



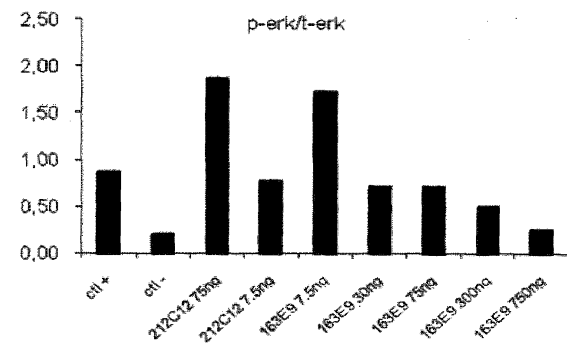
【図 1 2】



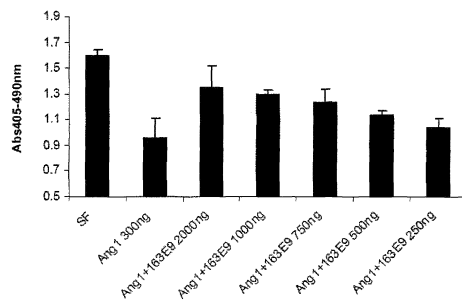
【図 1 3】



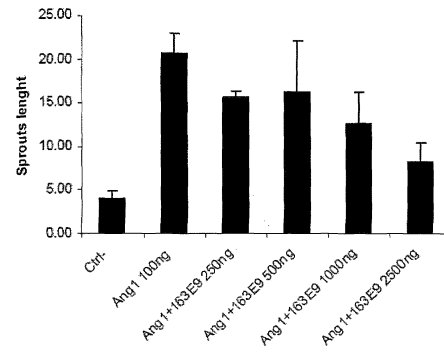
【図 1 4】



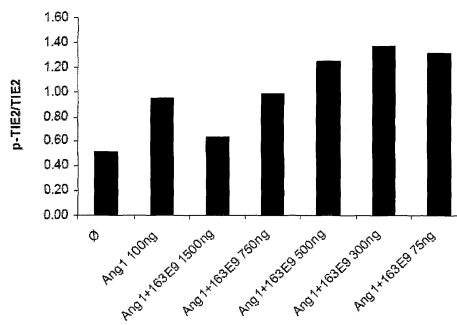
【図15】



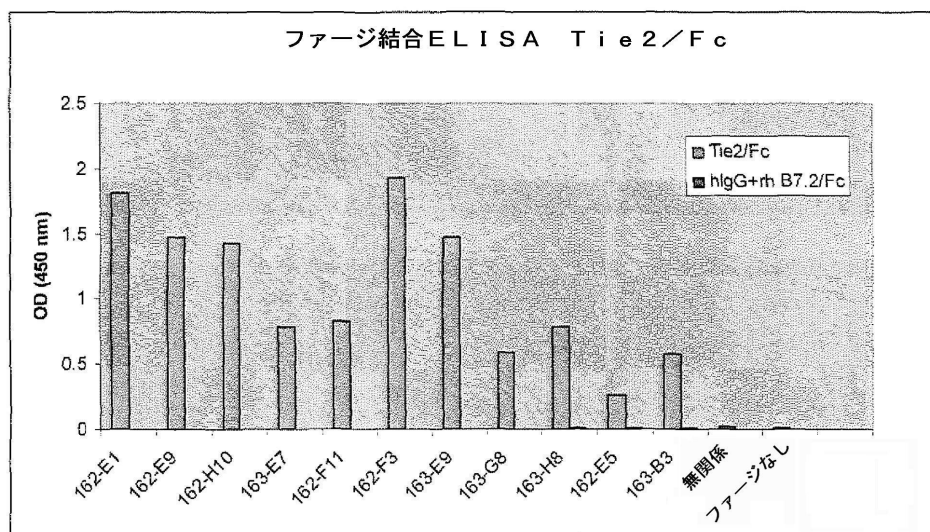
【図17】



【図16】

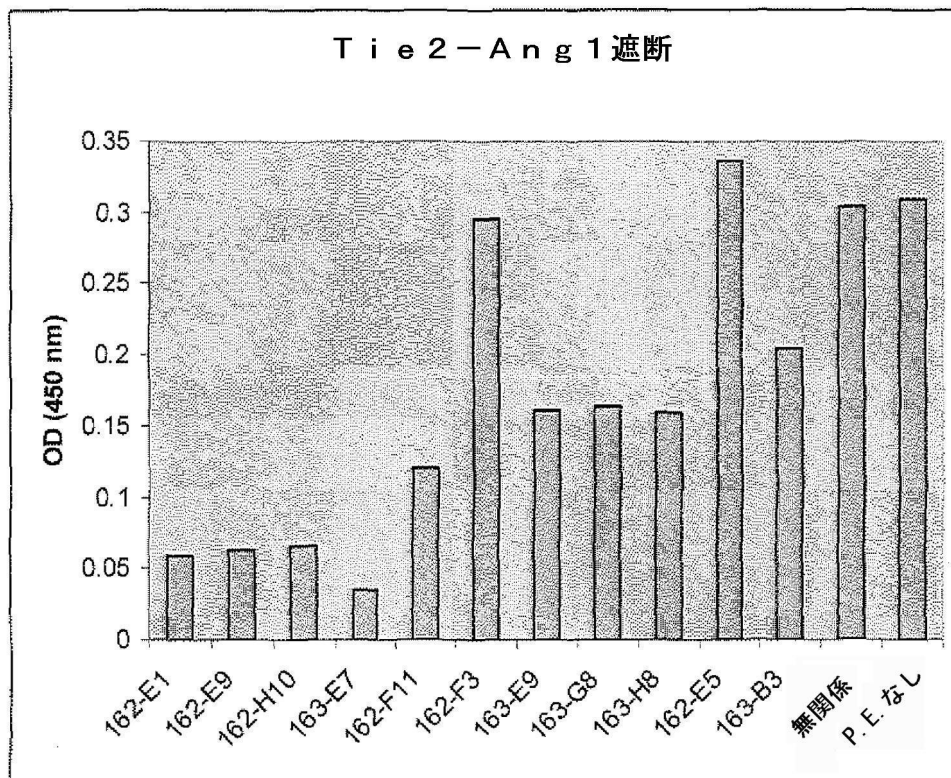


【図1】

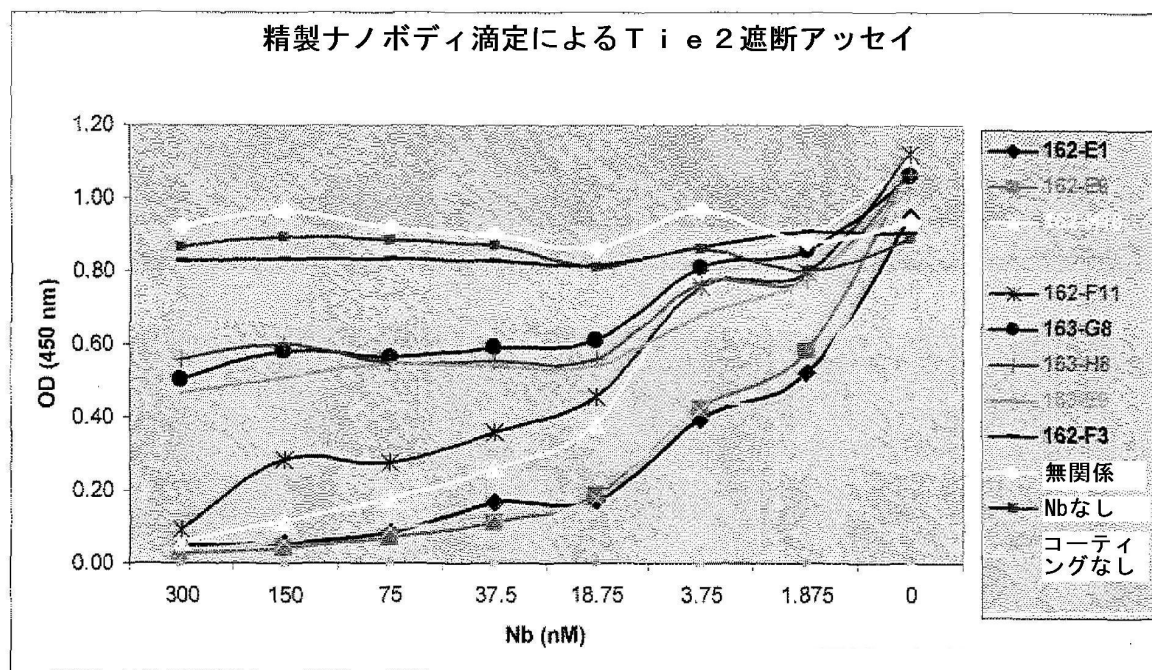




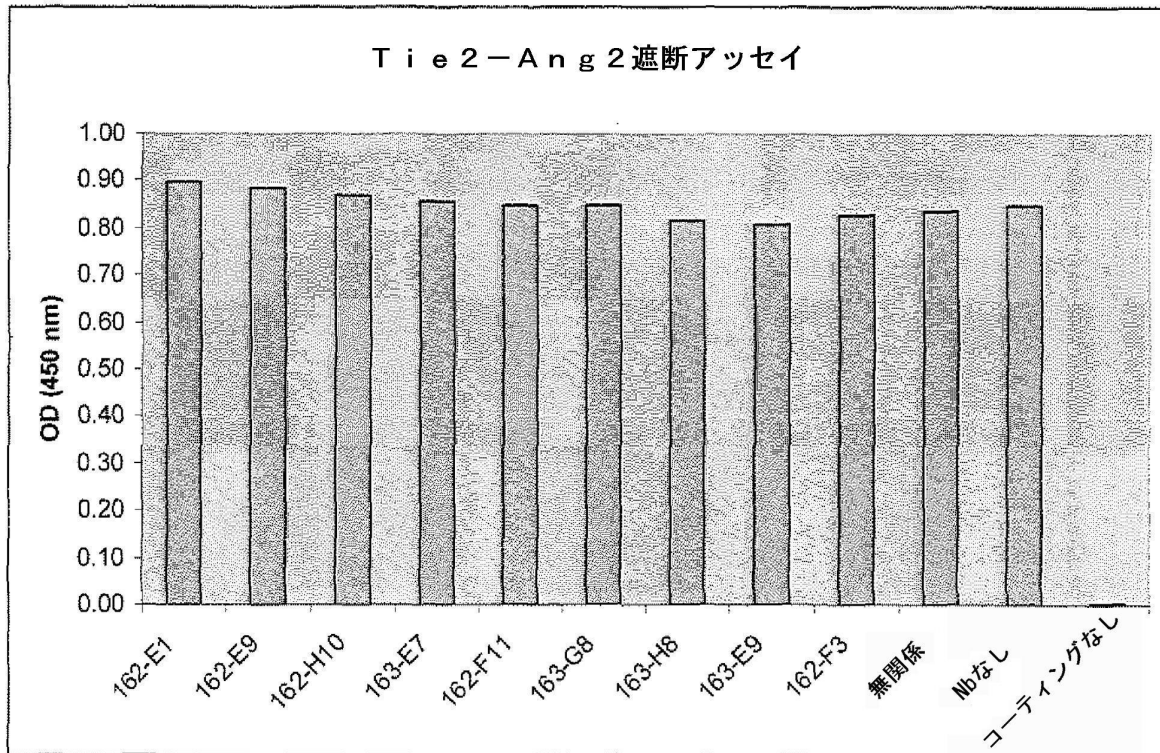
【圖 2】



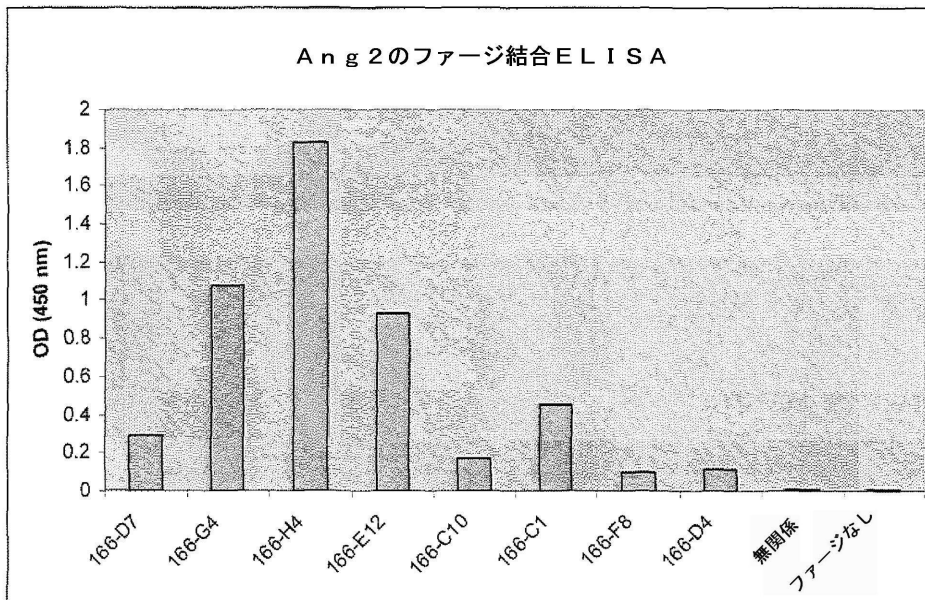
【 図 3 】



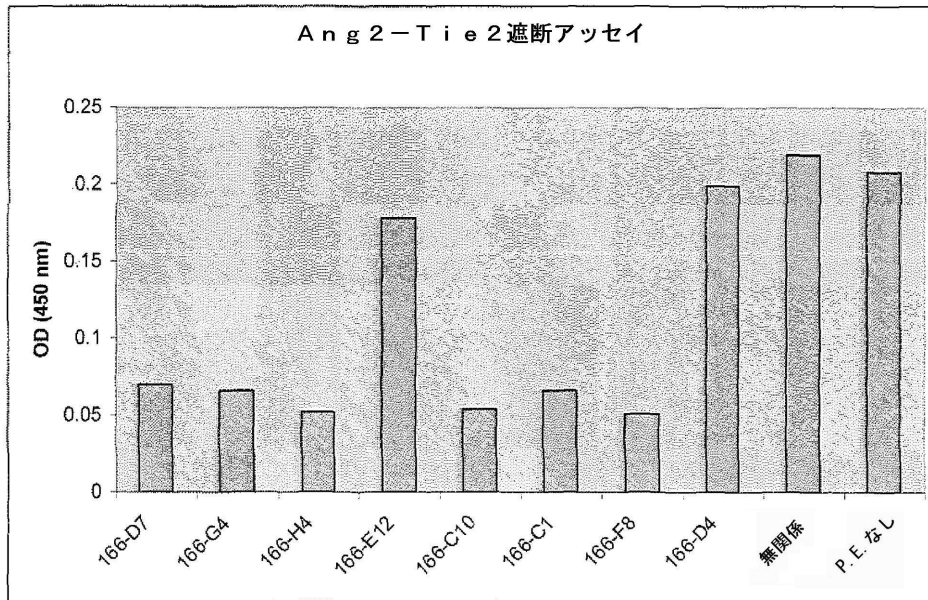
【図 4】



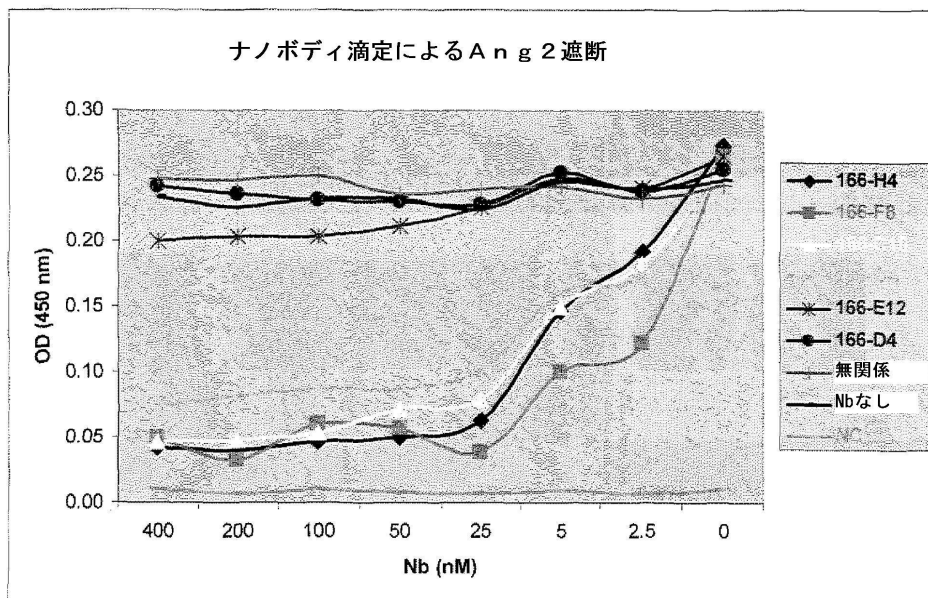
【図 5】



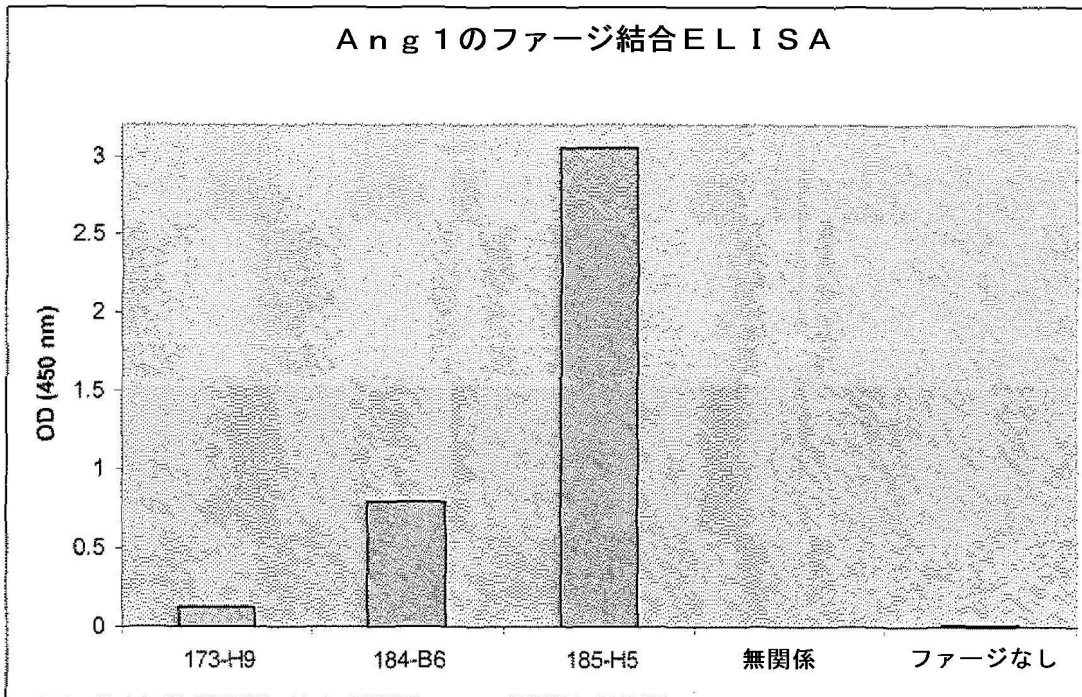
【図 6】



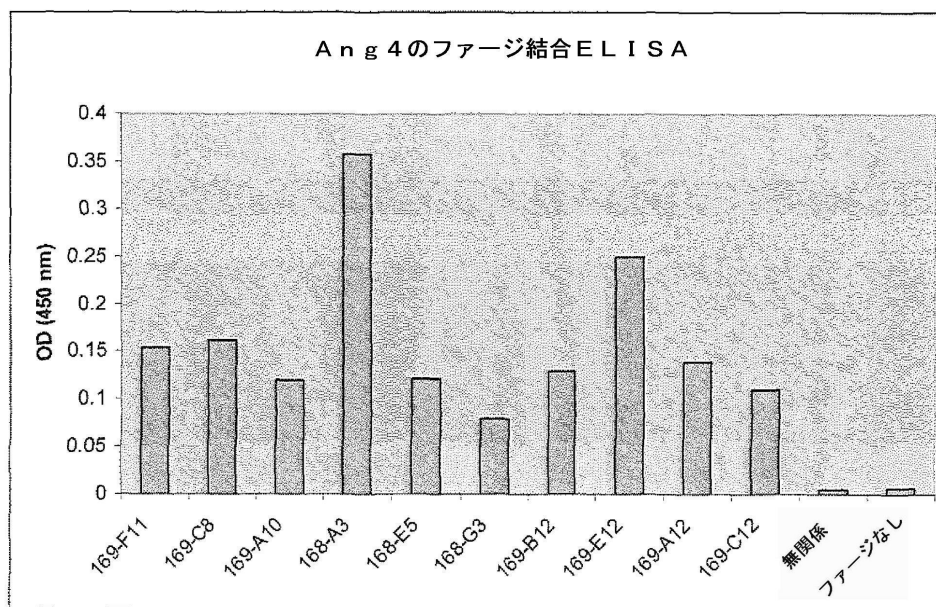
【図 7】



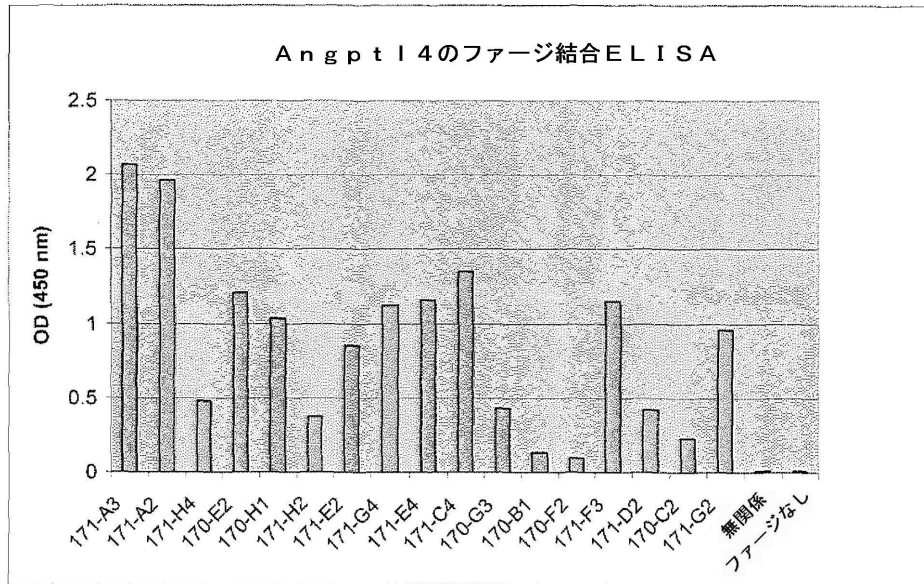
【図 8】



【図 9】



## 【図 10】



## 【配列表】

0005823871000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

- (72)発明者 デ ハールト, ヨハネス ジョゼフ ヴィルヘルムス  
オランダ, エンエル - 4 4 3 6 エンアー アウデランデ, ヘト ズヴィント 1
- (72)発明者 ヴァンランドショット, ピーター  
ベルギー, ベー - 9 8 8 1 ベレム, マルケッテストラート 2 0 - アー

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 2 5 0 9 4 ( J P , A )  
特表 2 0 0 7 - 5 3 6 9 1 2 ( J P , A )  
J. Biol. Chem., 2004, Vol. 279, No. 2, pp. 1256-1261  
Angiogenesis, 2001, Vol. 4, No. 1, pp. 29-36

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 6 / 1 8 - 1 6 / 3 6  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
U n i P r o t / G e n e S e q  
D W P I ( T h o m s o n I n n o v a t i o n )