

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6895421号
(P6895421)

(45) 発行日 令和3年6月30日 (2021. 6. 30)

(24) 登録日 令和3年6月9日 (2021. 6. 9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C O 7 K 16/24 (2006. 01)	C O 7 K 16/24
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 15 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-502328 (P2018-502328)	(73) 特許権者	517342796
(86) (22) 出願日	平成28年3月31日 (2016. 3. 31)		ブイエイチスクエアード リミテッド
(65) 公表番号	特表2018-514226 (P2018-514226A)		英国 ケンブリッジシャー シービー2 2
(43) 公表日	平成30年6月7日 (2018. 6. 7)		3 ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/057021		ケンブリッジ ロード コブレイ ヒル
(87) 国際公開番号	W02016/156465		ビジネス パーク ロワー コート 1
(87) 国際公開日	平成28年10月6日 (2016. 10. 6)	(74) 代理人	100097456
審査請求日	平成31年3月28日 (2019. 3. 28)		弁理士 石川 徹
(31) 優先権主張番号	15162112.5	(72) 発明者	スコット クロエ
(32) 優先日	平成27年3月31日 (2015. 3. 31)		英国 ケンブリッジシャー シービー2 2
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		3 ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム
前置審査			ケンブリッジ ロード コブレイ ヒル
			ビジネス パーク ロワー コート 1
			シー/オー ブイエイチスクエアード
			リミテッド
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、ここでこの免疫グロブリン鎖可変ドメインが、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR1は、配列番号:1からなり、CDR2は、配列番号:2からなり、並びに、CDR3は、配列番号:3からなる、ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号:8を含む、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、VHH、VH、VL、V-NAR、Fab断片及びF(ab')₂断片からなるリストから選択される抗体断片などの、抗体断片である、請求項1又は2記載のポリペプチド。

【請求項 4】

1nM以下、例えば0.9nM以下、例えば0.8nM以下、例えば0.7nM以下、例えば0.6nM以下、例えば0.5nM以下、例えば0.4nM以下、例えば0.3nM以下、例えば0.2nM以下、例えば0.1nM以下、例えば0.09nM以下、例えば0.08nM以下、例えば0.07nM以下、例えば0.06nM以下、例えば0.05nM以下、例えば0.04nM以下のEC50で、正常L929アッセイにおいてヒトTNF- α 細胞傷害性を中和する、請求項1～3のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 5】

小腸内に存在する1種以上のプロテアーゼなどの、1種以上のプロテアーゼに対し実質的に抵抗性である、請求項1～4のいずれか一項記載のポリペプチド。

10

20

【請求項 6】

前記1種以上のプロテアーゼが、エンテロペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシン、及び、MMP3、MMP12又はカテプシンなどの炎症性腸疾患炎症プロテアーゼからなる群から選択される、請求項5記載のポリペプチド。

【請求項 7】

請求項1～6のいずれか一項記載の少なくとも1種のポリペプチド、及び、少なくとも1種の異なるポリペプチドを含む構築体であって、該異なるポリペプチドが、TNF- α 以外の標的に結合する、前記構築体。

【請求項 8】

前記少なくとも1種の異なるポリペプチドがIL-23に結合する、請求項7記載の構築体。

10

【請求項 9】

前記少なくとも1種の異なるポリペプチドがIL-6Rに結合する、請求項7記載の構築体。

【請求項 10】

前記少なくとも1種の異なるポリペプチドがIL-7Rに結合する、請求項7記載の構築体。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体を含有する、医薬組成物。

【請求項 12】

前記組成物が、腸溶性にコートされた形態で提供される、請求項11記載の医薬組成物。

【請求項 13】

請求項1～10のいずれか1項記載のポリペプチド又は構築体を含有する、自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療のための医薬組成物であって、任意に、該医薬組成物が、腸溶性にコートされた形態で存在する、前記医薬組成物。

20

【請求項 14】

経口投与される、請求項13記載の医薬組成物。

【請求項 15】

請求項1～10のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体をコードしている、ポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

(発明の分野)

本発明は、腫瘍壊死因子-アルファ(「TNF-アルファ」、「TNF- α 」又は「TNF」)に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメイン(又は「可変ドメイン」)を含むポリペプチド、並びにこれらのポリペプチドを含む構築体及び医薬組成物に関する。本発明はまた、かかるポリペプチドをコードしている核酸、かかるポリペプチドを調製する方法、かかるポリペプチドをコードしている核酸を含むcDNA及びベクター、かかるポリペプチドを発現している又は発現することが可能である宿主細胞、並びにかかるポリペプチド、医薬組成物又は構築体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

40

(発明の背景)

腫瘍壊死因子- α は、可溶型及び膜結合型の両方で存在する、全身性炎症に関与するホモ三量体前炎症性サイトカインである。TNF- α は、単球及びマクロファージにより主として分泌されるが、腫瘍細胞株、更にはCD4+及びCD8+末梢血Tリンパ球並びに一部の培養されたT細胞株及びB細胞株によっても分泌される。TNF- α は、炎症性疾患、自己免疫疾患、ウイルス、細菌及び寄生虫の感染症、悪性腫瘍、並びに／又は神経変性疾患に関与し、且つ関節リウマチ及びクローン病などの自己免疫／自己炎症性疾患における特定の生物学的療法の標的である。

【0003】

クローン症候群及び限局性腸炎としても知られるクローン病は、多種多様な症状を引き

50

起こす炎症性腸疾患の一型である。これは最初に、腹痛、下痢、吐気及び／又は体重減少を引き起こすが、また貧血症、皮膚発疹、関節炎、眼の炎症、疲労感、及び集中力の欠如などの、胃腸管(GIT)部外の合併症も引き起こし得る(Baumgartらの文献、2012、The Lancet、380(9853):1590-605、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。クローン病は、従来の療法では制御が困難である、現在治療不能の、生涯にわたる胃腸疾患である。クローン病は、「自己免疫疾患」で、以下でより詳細に考察されている。

【0004】

TNF- α に対し十分な特異性を持つTNF- α 阻害薬は、TNF- α が観察された病理を駆動する重要なサイトカインとして関与している、クローン病などの疾患を予防又は治療するための、効率的な予防的又は治療的医薬品であることができる。

10

【0005】

抗体-ベースの治療薬は、それらの標的に対する高い特異性及び低い固有の毒性を有するので、これらは自己免疫疾患の有効な治療としての重大な可能性を有する。TNF- α に結合する抗体の投与による自己免疫疾患の治療方法が、説明されている(Kammらの文献、2011、Inflamm Bowel Dis、17:2366-91、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。

【0006】

3種の抗-TNF- α 抗体であるインフリキシマブ(商品名レミケード)、アダリムマブ(商品名ヒュミラ(Humira))及びセルトリズマブ(又は「セルトリズマブベゴル」、両方共商品名シムジア(Cimzia))は、クローン病の治療のために、臨床使用されているが；しかしこれらの抗体は、一般に、それらの固有の不安定性及び消化系によるタンパク質分解の受けやすさ、腸管内の病巣に存在する炎症プロテアーゼ、並びに腸内マイクロフローラのために、経口治療薬としての投与に適していないと考えられる。従ってこれらの物質は、皮下注射器又は針を正確且つ安全に使用するために訓練を受けた専門家を必要とする、静脈内点滴又は皮下注射により投与されなければならない。これらの物質はまた、滅菌装置、治療的ポリペプチドの液体製剤、無菌で安定な形態の該ポリペプチドのバイアル包装、並びに針の侵入のための対象における好適な部位を必要とする。対象は通常、注射を受ける前に精神的ストレスを及び注射を受けている間に疼痛を経験する。これらの全身性抗-TNF- α 抗体による長期間治療は、重篤な感染症及び癌の増大したリスクを伴う。高い製造コストと共に、これらの要因は現在、より重度の疾患を持つ患者へのこれらの物質の使用を制限している。

20

30

【0007】

いくつかの小型分子の抗炎症薬及び免疫抑制薬もまた現在、クローン病のために臨床開発されている(Daneseの文献、2012、Gut、61:918-932、及びShealyらの文献、2010、mAbs、2:428-439、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。これらの薬物は経口投与されるが、多くは、投与後全身で吸収され、且つ結果的に胃腸管病変に対する作用とは無関係である全身の免疫抑制作用を有することがある。更に、小型分子は抗体の特異性を欠いているので、重大な標的以外の(off target)副作用のリスクは高くあり続ける。

【0008】

クローン病は、主に胃腸管の疾患である。TNF- α の生成は、粘膜組織及び粘膜下組織内に存在する細胞に局在化され、且つこれは消化管壁内の慢性炎症過程、並びに疾患免疫病理の発症に寄与する追加の炎症細胞の動員を駆動する(van Deventerの文献、1999、Ann Rheum Dis、58(Suppl 1):I114-I120)。TNF- α について高度の選択性で、曝露及び活性を消化管に限定させながら経口治療薬を送達することができれば、低下した全身曝露のために安全性が著しく改善したことと一緒に、注射可能な抗-TNF- α 抗体に類似の有効性がもたらされ得る。

40

【0009】

WO 2004/041862、WO 2006/122786及びCoppietersらの文献(2006、Arthritis & Rheumatism、54(6):1856-1866)(それらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)は、TNF- α に対する単独ドメイン抗体及び関連する態様を明らかにしている。WO 2006/122786

50

において「TNF1」、「PMP1C2」又は「配列番号:52」と称される配列は、以下に更に特徴付けられる。

【0010】

本発明のポリペプチドは、少なくとも一部の実施態様において、先行技術の抗-TNF- α 物質と比べ、以下の利点を1つ以上有し得る：

- (i) TNF- α に関する増大した親和性；
- (ii) TNF- α に関する増大した特異性；
- (iii) TNF- α に対する増大した中和能；
- (iv) ヒト及びカニクイザルなどの異なる種由来のTNF- α との増大した交差反応性；
- (v) TNF- α の可溶型及び膜型の両方との増大した交差反応性；
- (vi) 例えば、マウス、カニクイザル又はヒトへ投与した場合の低下した免疫原性；
- (vii) プロテアーゼの存在下、例えば、(a)小腸及び／もしくは大腸において認められるプロテアーゼ、並びに／又はIBD炎症プロテアーゼ、例えば、トリプシン、キモトリプシン、MMP3、MMP10、MMP12、他のMMP類及びカテプシンの存在下、並びに／又は(b)小腸及び／もしくは大腸において認められる微生物細胞の溶解により、活発に分泌され及び／又は放出される、消化管共生マイクロフローラ及び／もしくは病原菌由来のプロテアーゼの存在下での、増加した安定性；
- (viii) 生成時のプロテアーゼ分解に対する増大した安定性(例えば、酵母プロテアーゼに対する抵抗性)；
- (ix) 経口投与に関する増大した安定性；
- (x) 経口投与後の腸管及び固有層への局所送達に関する増大した好適性；
- (xi) 大腸菌 (*Escherichia coli*) などの細菌、又はアスペルギルス (*Aspergillus*) 属、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属もしくはピキア (*Pichia*) 属に属する酵母、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) もしくはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの、異種宿主における発現に関する増大した好適性；
- (xii) 医薬品における使用に関する好適性及び改善された特性；
- (xiii) 機能性食品における使用に関する好適性及び改善された特性；
- (xiv) 粘膜下固有層にアクセスするための、炎症した結腸粘膜上皮及び粘膜下組織の透過などの、改善された組織透過性；
- (xv) (a)凍結解凍後、及び／又は(b)例えば、37℃もしくは50℃での、凍結乾燥された、液体／クリーム形状での長期貯蔵後の、実質的活性の維持；
- (xvi) 例えばヒト免疫グロブリンへの配列類似性の増加に起因した、ヒトにおける免疫原性の低下；
- (xvii) 多重特異性形式でのフォーマット化に関する増大した好適性；
- (xviii) 新規エピトープへの結合。

【0011】

前述の利点(i)から(xviii)は、一価のフォーマット又はビヘッドフォーマット(例えば、ホモビヘッドもしくはヘテロビヘッドフォーマット)などの多価フォーマットの本発明のポリペプチドにより、潜在的に認められる。

【発明の概要】

【0012】

(発明の概要)

本発明者らは、驚くべきことに、TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含む有利なポリペプチドを作製した。これらのポリペプチドは、特に、驚くべきほど高い効力から恩恵を受ける。これらはまた、TNF- α の可溶型及び膜型の両方を中和し、カニクイザルTNF- α と交差反応することが可能であり、且つトリプシン、キモトリプシン並びに／又は小腸及び大腸のプロテアーゼへの曝露時に、安定であり続ける。一実施態様において、これらのポリペプチドは、操作(engineering)により更なる増強を受ける。これらの更に増強されたポリペプチドは、前述の利点から恩恵を受け、腸管通過時にそれらのTNF- α

-中和活性を保持し、且つ更に例えば複数の哺乳動物種(齧歯類、ブタ、非ヒト霊長類及びヒト)由来の腸管のプロテアーゼ、例えば消化性、炎症性及び微生物性プロテアーゼによる、分解及び／又は不活性化に抵抗する。

【0013】

これらのポリペプチドは、特に経口投与された場合に、炎症性腸疾患(例えばクローン病又は潰瘍性大腸炎)などの、自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の予防又は治療において、あるいは、粘膜炎の予防又は治療において、特に有用であることを、予想することができる。

【0014】

本発明は、免疫グロブリン鎖可変ドメインは、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR1は、配列番号:1と60%以上の配列同一性を共有する配列を含み、CDR2は、配列番号:2と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びに(a)CDR3は、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又は(b)CDR3は、配列番号:3と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、且つここで配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基は、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドを提供する。

【0015】

同じく、免疫グロブリン鎖可変ドメインは、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR1は、配列番号:15と60%以上の配列同一性を共有する配列を含み、CDR2は、配列番号:16と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びにCDR3は、配列番号:17と50%以上の配列同一性を共有する配列を含む、TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドが提供される。

【0016】

同じく、免疫グロブリン鎖可変ドメインは、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR3は、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

(図面の説明)

【図1】図1は、ペリプラズム上清及び精製された試料の、トリプシン及びキモトリプシンへの曝露の有無の場合の、TNF- α 中和活性の割合(%)である。

【図2】図2Aは、HEK-Nf- κ B-SEAPレポーターアッセイにおける、Q65B1、Q65C7、Q62E10及びアダリムマブによるhs-TNF- α 中和である。図2Bは、Q65B1及びQ65D3によるhs-TNF- α 中和である。

【図3】図3は、マウス小腸及びヒト糞便の消化物中の、免疫グロブリン鎖可変ドメインである。

【図4】図4Aは、ID32F、ID34F、Q65B1及びインフリキシマブによる、hs-TNF- α 中和である(第一の実験)。図4Bは、ID32F、ID34F及びQ65B1による、hs-TNF- α 中和である(第二の実験)。図4Cは、ID37F、ID38F及びレミケードによる、hs-TNF- α 中和である(第二の実験)。

【図5】図5Aは、IBDプロテアーゼ中のID34F及びID25Fの安定性である。図5Bは、IBDプロテアーゼ中のエタネルセプト及びアダリムマブの安定性である。図5Cは、IBDプロテアーゼ中のインフリキシマブの安定性である。

【図6】図6は、先行技術の抗-TNF- α ポリペプチドによる、h-TNF- α の中和である。

【図7】図7は、カニクイザル胃腸管切片における、計算された管腔の[抗-TNF ICVD]である。

【図8】図8は、カニクイザル胃腸管からの抗-TNF ICVDの総回収率(%)である。

【図9】図9は、ヒュミラ競合ELISAのOD450データである。

10

20

30

40

50

【図 10】図10は、プールされたカニクイザル糞便中の抗-TNF ICVD濃度である。

【図 11】図11は、プールされたカニクイザル糞便から回収された、計算された抗-TNF ICVDである。

【0018】

(配列の説明)

配列番号:1-ID38F CDR1のポリペプチド配列

配列番号:2-ID38F CDR2のポリペプチド配列

配列番号:3-ID38F CDR3のポリペプチド配列

配列番号:4-ID38F FR1のポリペプチド配列

配列番号:5-ID38F FR2のポリペプチド配列

10

配列番号:6-ID38F FR3のポリペプチド配列

配列番号:7-ID38F FR4のポリペプチド配列

配列番号:8-ID38Fのポリペプチド配列

配列番号:9-可溶性ヒトTNF- α (モノマー)のポリペプチド配列

配列番号:10-膜結合ヒトTNF- α (モノマー)のポリペプチド配列

配列番号:11-可溶性カニクイザルTNF- α (モノマー)のポリペプチド配列

配列番号:12-膜結合カニクイザルTNF- α (モノマー)のポリペプチド配列

配列番号:13-可溶性マウスTNF- α (モノマー)のポリペプチド配列

配列番号:14-膜結合マウスTNF- α (モノマー)のポリペプチド配列

配列番号:15-Q62E10 CDR1のポリペプチド配列

20

配列番号:16-Q62E10 CDR2のポリペプチド配列

配列番号:17-Q62E10 CDR3のポリペプチド配列

配列番号:18-Q62E10 FR1のポリペプチド配列

配列番号:19-Q62E10 FR2のポリペプチド配列

配列番号:20-Q62E10 FR3のポリペプチド配列

配列番号:21-Q62E10 FR4のポリペプチド配列

配列番号:22-Q62E10のポリペプチド配列

配列番号:23-Q65F2のポリペプチド配列

配列番号:24-Q65F3のポリペプチド配列

配列番号:25-Q62F2のポリペプチド配列

30

配列番号:26-Q65G1のポリペプチド配列

配列番号:27-Q65H6のポリペプチド配列

配列番号:28-Q65F1のポリペプチド配列

配列番号:29-Q65D1のポリペプチド配列

配列番号:30-Q65C7のポリペプチド配列

配列番号:31-Q65D3のポリペプチド配列

配列番号:32-Q65B1のポリペプチド配列

配列番号:33-Q65F6のポリペプチド配列

配列番号:34-Q65F11のポリペプチド配列

配列番号:35-Q65E12のポリペプチド配列

40

配列番号:36-Q65C12のポリペプチド配列

配列番号:37-Q65A6のポリペプチド配列

配列番号:38-Q65A3のポリペプチド配列

配列番号:39-Q62F10のポリペプチド配列

配列番号:40-Q62F11のポリペプチド配列

配列番号:41-ID7F-EVのポリペプチド配列

配列番号:42-ID8F-EVのポリペプチド配列

配列番号:43-ID9F-EVのポリペプチド配列

配列番号:44-ID13F-EVのポリペプチド配列

配列番号:45-ID14F-EVのポリペプチド配列

50

配列番号:46-ID15F-EVのポリペプチド配列	
配列番号:47-ID22Fのポリペプチド配列	
配列番号:48-ID23Fのポリペプチド配列	
配列番号:49-ID24Fのポリペプチド配列	
配列番号:50-ID25Fのポリペプチド配列	
配列番号:51-ID26Fのポリペプチド配列	
配列番号:52-ID27Fのポリペプチド配列	
配列番号:53-ID28Fのポリペプチド配列	
配列番号:54-ID29Fのポリペプチド配列	
配列番号:55-Q62E10-DVQLVのポリペプチド配列	10
配列番号:56-ID34Fのポリペプチド配列	
配列番号:57-ID37Fのポリペプチド配列	
配列番号:58-Spe部位を伴う3'プライマーのポリヌクレオチド配列	
配列番号:59-Q65F1 CDR1のポリペプチド配列	
配列番号:60-Q65D1 CDR1のポリペプチド配列	
配列番号:61-ID27F CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:62-ID28F CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:63-Q65F2 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:64-Q65F3 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:65-Q62F2 CDR2のポリペプチド配列	20
配列番号:66-Q65F1 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:67-Q65D1 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:68-Q65D3 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:69-Q65B1 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:70-Q65F2 CDR3のポリペプチド配列	
配列番号:71-Q65F1 CDR3のポリペプチド配列	
配列番号:72-Q65D3 CDR3のポリペプチド配列	
配列番号:73-Q65F6 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:74-Q65F11 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:75-Q65C12 CDR2のポリペプチド配列	30
配列番号:76-Q65A6 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:77-Q65A3 CDR2のポリペプチド配列	
配列番号:78-Q65F6 CDR3のポリペプチド配列	
配列番号:79-Q65F11 CDR3のポリペプチド配列	
配列番号:80-Q62F10 CDR3のポリペプチド配列	
配列番号:81-M13. リバースのポリヌクレオチド配列	
配列番号:82-M13. フォワードのポリヌクレオチド配列	
配列番号:83-酵母発現のために最適化されたコドン、ID38Fのポリヌクレオチドコード配列	
配列番号:84-酵母発現のために最適化されたコドン、Q62E10のポリヌクレオチドコード配列	40
配列番号:85-大腸菌 (E. coli) 発現のために最適化されたコドン、ID38Fのポリヌクレオチドコード配列	
配列番号:86-大腸菌発現のために最適化されたコドン、Q62E10のポリヌクレオチドコード配列	
配列番号:87-大腸菌発現のためのID38Fオープンリーディングフレームからなるポリヌクレオチド(PelBリーダーからc-myc-6Hisタグ2×終止コドンまで)	
配列番号:88-大腸菌発現のためのID38Fオープンリーディングフレームからなるポリヌクレオチド(PelBリーダーからFlag-6Hisタグ2×終止コドンまで)	
【発明を実施するための形態】	50

【0019】

(発明の詳細な説明)

(VH及びVHHを含む抗体並びに抗体断片を含むポリペプチド)

通常の抗体又は免疫グロブリン(Ig)は、以下の4つのポリペプチド鎖を含むタンパク質である：2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖。各鎖は、定常領域と可変ドメインに分けられる。重鎖可変ドメインは、本明細書においてVHCと略記され、且つ軽(L)鎖可変ドメインは、本明細書においてVLCと略記される。これらのドメイン、それらに関連したドメイン及びそれらから誘導されたドメインは、本明細書において免疫グロブリン鎖可変ドメインと称される。VHCドメイン及びVLCドメインは更に、「フレームワーク領域」(「FR」)と称されるより保存された領域が挿入された、「相補性決定領域」(「CDR」)と称される超可変性の領域へと更に分割することができる。フレームワーク領域及び相補性決定領域は、正確に定義されている(Kabatらの文献、1991、「免疫学的関心のあるタンパク質配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH出版番号91-3242、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。通常の抗体において、VHC及びVLCの各々は、以下の順番でアミノ-末端からカルボキシ-末端へと配置された、3つのCDR及び4つのFRにより構成されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。2つの免疫グロブリン重鎖と2つの免疫グロブリン軽鎖の通常の抗体四量体は、例えばジスルフィド結合により内部連結されている免疫グロブリン重及び軽鎖、並びに同様に連結された重鎖により形成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2及びCH3を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLで構成される。重鎖の可変ドメイン及び軽鎖の可変ドメインは、抗原と相互作用する結合ドメインである。抗体の定常領域は、典型的には、免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞)及び古典的補体系の第一成分(C1q)を含む宿主組織又は因子への抗体の結合を媒介する。用語抗体は、IgA型、IgG型、IgE型、IgD型、IgM型(並びにそれらの亜型)の免疫グロブリンを含み、ここで免疫グロブリンの軽鎖は、カッパ型又はラムダ型であってよい。2本の同一重(H)鎖及び2本の同一軽(L)鎖のポリペプチドから集成された免疫グロブリン-ガンマ(IgG)抗体の全体構造は、よく確立され、且つ哺乳動物において高度に保存されている(Padlanの文献、1994、Mol Immunol、31:169-217)。

【0020】

通常の抗体構造の例外が、ラクダ科動物の血清中に認められる。これらの血清は、通常の抗体に加え、特別なIgG抗体を有する。重鎖抗体(HCAb)としても知られるこれらのIgG抗体は、L鎖ポリペプチドを持たず、且つ第一の定常ドメイン(CH1)を欠いている。そのN-末端領域において、ホモ二量体タンパク質のH鎖は、VHHと称される特定用途のための(dedicated)免疫グロブリン鎖可変ドメインを含み、これはそのコグネート抗原との会合に役立つ(Muyldermansの文献、2013、Annu Rev Biochem、82:775-797、Hamers-Castermanらの文献、1993、Nature、363(6428):446-448、Muyldermansらの文献、1994、Protein Eng、7(9):1129-1135、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。

【0021】

本明細書において使用される抗原-結合断片(又は「抗体断片」又は「免疫グロブリン断片」)は、TNF- α へ特異的に結合する抗体の部分(例えば、その1以上の免疫グロブリン鎖は完全長ではないが、TNF- α へ特異的に結合する、分子)をいう。用語抗原-結合断片に包含される結合断片の例は、以下を含む：

- (i) Fab断片(VLC、VHC、CL及びCH1ドメインからなる一価の断片)；
- (ii) F(ab')₂断片(ヒンジ領域でジスルフィド架橋により繋がれた2個のFab断片を含む二価の断片)；
- (iii) Fd断片(VHC及びCH1ドメインからなる)；
- (iv) Fv断片(抗体の1本のアームのVLC及びVHCドメインからなる)；
- (v) scFv断片(そこでVLC領域とVHC領域が対形成し、一価の分子を形成している、単独のタンパク質鎖とそれらを成すことができる合成リンカーによる、組換え法を用い、連結されたVLC及びVHCドメインからなる)；

(vi)VH(VHCドメインからなる、免疫グロブリン鎖可変ドメイン(Wardらの文献、Nature、1989、341:544-546)；

(vii)VL(VLCドメインからなる、免疫グロブリン鎖可変ドメイン)；

(viii)V-NAR(軟骨魚類IgNAR由来のVHCドメインからなる、免疫グロブリン鎖可変ドメイン(Rouxらの文献、1998、Proc Natl Acad Sci USA、95:11804-11809、及びGriffithsらの文献、2013、Antibodies、2:66-81、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)；

(ix)VHH。

【0022】

VHH又はVH中のアミノ酸残基の総数は、110～130の範囲内であってよく、好適には112～120、及び最も好適には115である。

10

【0023】

本発明の免疫グロブリン鎖可変ドメインは、例えば、核酸合成に関する技術を使用する免疫グロブリン鎖可変ドメインをコードしている核酸の調製、それに続くように得られた核酸の発現により得ることができる。具体的実施態様に従い、本発明の免疫グロブリン鎖可変ドメインは、天然の抗体のVH又はVHHドメインなどの、天然のポリペプチドのアミノ酸配列と正確に同じである(すなわち、それと100%の配列同一性を共有する)アミノ酸配列を有さない。

【0024】

本明細書に提供される例は、TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインそれ自体に関連している。しかし本明細書に開示された発明の原理は、抗体及び抗体断片などの、TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含む任意のポリペプチドに同等に適用可能である。例えば、本明細書に開示された抗-TNF- α 免疫グロブリン鎖可変ドメインは、完全長抗体などのポリペプチドへ組み込まれてよい。かかるアプローチは、McCoyらの文献、Retrovirology、2014、11:83により明らかにされ、著者らは、二量体構築体として発現される、ヒトFc領域(ヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含む)との融合として操作された抗-HIV VHHを提供している。

20

【0025】

非ヒト免疫グロブリン可変ドメインのフレームワーク領域内の少なくとも1個のアミノ酸残基の、ヒト可変ドメイン由来の対応する残基との置換は、ヒト化である。可変ドメインのヒト化は、ヒトにおける免疫原性を低下することができる。

30

【0026】

好適には、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン鎖可変ドメインからなる。好適には、本発明のポリペプチドは、抗体又は抗体断片である。好適には、この抗体断片は、VH、VL、V-NAR、Fab断片、VL又はF(ab')₂断片(VHH又はVHなど、最も好適にはVHH)である。

【0027】

(特異性、親和性、結合力及び交差反応性)

特異性とは、それに特定の抗原-結合ポリペプチドが結合することができる異なる型の抗原又は抗原決定基の数をいう。抗原-結合ポリペプチドの特異性は、抗原-結合ポリペプチドの独自の分子実体として特定の抗原を認識し且つこれを他のものから識別する能力である。

40

【0028】

抗原の抗原-結合ポリペプチドとの解離に関する平衡定数(Kd)として表される親和性は、抗原決定基と抗原-結合ポリペプチド上の抗原-結合部位の間の結合強度の測定値であり：Kd値がより小さいと、抗原決定基と抗原-結合ポリペプチドの間の結合強度はより強力である(あるいは、親和性はまた、1/Kdである親和定数(Ka)として表すこともできる)。親和性は、関心対象の特異抗原に応じて、公知の方法により決定することができる。

【0029】

結合力は、抗原-結合ポリペプチドと関連する抗原の間の結合の強度の測定値である。

50

結合力は、抗原決定基と抗原-結合ポリペプチド上のその抗原結合部位の間の親和性、並びに抗原-結合ポリペプチド上に存在する関連する結合部位の数の両方に関係している。

【0030】

好適には、本発明の抗原-結合ポリペプチドは、解離定数(Kd) 10^{-6} ~ 10^{-12} M、より好適には 10^{-7} ~ 10^{-12} M、より好適には 10^{-8} ~ 10^{-12} M、及びより好適には 10^{-9} ~ 10^{-12} Mで結合するであろう。

【0031】

10^{-6} 未満の任意のKd値は、結合を示すと考えられる。抗原-結合ポリペプチドの抗原又は抗原決定基への特異的結合は、任意の好適な公知の方式により、例えば、Scatchard解析、並びに／又は、例えば放射免疫測定(RIA)、酵素免疫測定(EIA)及びサンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイ、並びに当該技術分野において公知のそれらの様々な変形により、決定することができる。

10

【0032】

抗-TNF- α ポリペプチド、TNF- α と相互作用するポリペプチド、又はTNF- α に対するポリペプチドは全て、TNF- α に結合する効果的ポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、TNF- α 上の線状の又は高次構造のエピトープに、結合することができる。用語「TNF- α に結合する」とは、三量体TNF- α への結合、TNF- α モノマーへの結合及び／又はTNF- α のモノマーの一部への結合を意味する。

【0033】

好適には、本発明のポリペプチドは、可溶性及び膜TNF- α の両方に結合するであろう。好適には、本発明のポリペプチドは、ヒトTNF- α に結合するであろう。より好適には、本発明のポリペプチドは、ヒトTNF- α 、並びにヒトTNF- α 、マーモセットTNF- α 、カニクイザルTNF- α 及びアカゲザルTNF- α からなる群から選択される少なくとも1種の追加の霊長類のTNF- α の両方に結合するであろう。最も好適には、本発明のポリペプチドは、ヒト及びカニクイザルTNF- α の両方に結合する。

20

【0034】

好適には、本発明のポリペプチドは、可溶性及び膜TNF- α の両方を中和するであろう。好適には、本発明のポリペプチドは、ヒトTNF- α を中和するであろう。より好適には、本発明のポリペプチドは、ヒトTNF- α 、並びにヒトTNF- α 、マーモセットTNF- α 、カニクイザルTNF- α 及びアカゲザルTNF- α からなる群から選択される少なくとも1種の追加の霊長類のTNF- α の両方を中和するであろう。最も好適には、本発明のポリペプチドは、ヒト及びカニクイザルTNF- α の両方を中和する。

30

【0035】

好適にはTNF- α は、配列番号:9を含むポリペプチドであり、より好適にはTNF- α は、配列番号:9からなるポリペプチドである。好適には、TNF- α は、配列番号:10を含むポリペプチドであり、より好適にはTNF- α は、配列番号:10からなるポリペプチドである。好適にはTNF- α は、配列番号:11を含むポリペプチドであり、より好適にはTNF- α は、配列番号:11からなるポリペプチドである。好適にはTNF- α は、配列番号:12を含むポリペプチドであり、より好適にはTNF- α は、配列番号:12からなるポリペプチドである。

【0036】

ヒト由来のTNF- α 及び例えばカニクイザルTNF- α などの別の種由来のTNF- α と反応する(「交差反応する」)ことが可能であるポリペプチドは、前臨床試験を動物モデルにおいてより容易に実行することができるので、これらは有利である。

40

【0037】

好適には、本発明のポリペプチドは、TNF- α 三量体の受容体結合部位(複数可)の内にあるか及び／又はその一部を形成する、TNF- α (及び、特にTNF- α 三量体)上のエピトープに対し向けられ、その結果本発明の該ポリペプチドは、TNF- α 三量体への結合時に、該TNF- α 三量体により媒介されるTNF- α 受容体の架橋及び／又はかかる受容体架橋により媒介されるシグナル伝達を阻害又は減少することが可能である。

【0038】

50

本発明のポリペプチドは、TNF- α 三量体上の1以上のエピトープ(複数可)に結合する。本発明の一態様において、Q65F2、Q65F3、Q62F2、Q65G1、Q65H6、Q65F1、Q65D1、Q65C7、Q65D3、Q65B1、Q65F6、Q65F11、Q65E12、Q65C12、Q65A6、Q65A3、Q62E10、Q62F10、ID7F-EV、ID8F-EV、ID9F-EV、ID13F-EV、ID14F-EV、ID15F-EV、ID22F、ID23F、ID24F、ID25F、ID26F、ID27F、ID28F、ID29F、ID34F、ID37F又はID38Fと同一の、TNF- α 三量体上のエピトープに結合するポリペプチドが提供される。

【0039】

好適には、本発明のポリペプチドは、単離される。「単離された」ポリペプチドは、その当初の環境から取り出されたものである。例えば、本発明の天然のポリペプチドは、それが天然のシステムにおいて共存する物質の一部又は全てから分離される場合に、単離される。

10

【0040】

(効力、阻害及び中和)

効力は、所与の強度の作用を生じるために必要とされる量に関して表現された、治療的物質の活性の測定値である。効力の高い物質は、低濃度でより小さい反応を惹起するより低い効力の物質と比べ、低濃度でより大きい反応を惹起する。効力は、親和性及び有効性の関数である。有効性は、治療的物質の標的リガンドへの結合時に生物学的反応を生じる能力及びこの反応の量的大きさをいう。用語半値有効濃度(EC50)は、ベースラインと、特定された曝露時間後の最大値の間の中間の反応を引き起こす治療的物質の濃度をいう。治療的物質は、阻害又は刺激を引き起こしてよい。これは、効力の評価基準として、一般に使用され、且つ本明細書で使用される。

20

【0041】

本発明の目的のための中和ポリペプチドは、TNF- α に結合し、ELISAにより測定した場合、そのコグネート受容体(例えば、TNFR1、TNFR2)の一方又は両方へのTNF- α の結合を阻害するポリペプチドである。あるいは、又は加えて、本発明の目的のための中和ポリペプチドは、例えば、TNF- α の生物学的作用を阻害することにより、TNF- α の作用から細胞を防御するポリペプチドである。慣習的に、抗-TNF- α 治療的抗体製品は、中和アッセイとして、細胞死滅エンドポイントを伴うL929マウス細胞株を使用している(Humphreys及びWilsonの文献、1999、Cytokine、11(10):773-782)。L929マウス細胞株を利用するこの目的のための方法は、以下を含む：

30

固定濃度のL929アッセイー固定濃度のL929アッセイは、例えばペリプラズム抽出物中に含まれた、固定された濃度のポリペプチドのTNF- α 細胞傷害性の作用を中和する能力を比較的迅速に指示するために使用することができる(実施例セクションのパート2.2.3に詳述されるように)。

正常L929アッセイー抗-TNF- α ポリペプチドの半値有効濃度(EC50)を確定することにより、TNF- α 細胞傷害性の作用を中和する抗-TNF- α ポリペプチドの能力をアッセイするために、抗-TNF- α ポリペプチドの既知の濃度を使用し、正常L929アッセイを、行うことができる(実施例セクションのパート3.2から3.2.3に詳述されるように)。

【0042】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体は、1nM以下、例えば0.9nM以下、例えば0.8nM以下、例えば0.7nM以下、例えば0.6nM以下、例えば0.5nM以下、例えば0.4nM以下、例えば0.3nM以下、例えば0.2nM以下、例えば0.1nM以下、例えば0.09nM以下、例えば0.08nM以下、例えば0.07nM以下、例えば0.06nM以下、例えば0.05nM以下、例えば0.04nM以下のEC50で、正常L929アッセイにおいて、ヒトTNF- α 細胞傷害性を中和する。

40

【0043】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体は、1nM以下、例えば0.9nM以下、例えば0.8nM以下、例えば0.7nM以下、例えば0.6nM以下、例えば0.5nM以下、例えば0.4nM以下、例えば0.3nM以下、例えば0.2nM以下、例えば0.1nM以下、例えば0.09nM以下、例えば0.08nM以下、例えば0.07nM以下、例えば0.06nM以下、例えば0.05nM以下、例えば0.04nM以下、例えば0.03nM以下、例えば0.02nM以下、例えば0.01nM以下のEC50で、正常L929アッセイにお

50

いて、カニクイザルTNF- α 細胞傷害性を中和する。

【0044】

好適には、本発明のポリペプチドは、30nM以下、より好適には10nM以下、より好適には3nM以下、より好適には1nM以下、より好適には0.6nM以下、より好適には0.5nM以下、より好適には0.4nM以下、より好適には0.3nM以下のEC50で、ELISAアッセイにおいて、ヒトTNF- α のTNFR2への結合を阻害する。

【0045】

好適には、本発明のポリペプチドは、110nM以下、より好適には30nM以下、より好適には10nM以下、より好適には3nM以下、より好適には1nM以下、より好適には0.6nM以下、より好適には0.5nM以下、より好適には0.4nM以下、より好適には0.3nM以下のEC50で、ELISAアッセイにおいて、カニクイザルTNF- α のTNFR2への結合を阻害する。

10

【0046】

好適には、本発明のポリペプチドは、2nM以下、より好適には1nM以下、より好適には0.9nM以下、より好適には0.8nM以下、より好適には0.7nM以下、より好適には0.6nM以下、より好適には0.5nM以下、より好適には0.4nM以下、より好適には0.3nM以下のEC50で、ELISAアッセイにおいて、ヒトTNF- α のTNFR1への結合を阻害する。

【0047】

好適には、本発明のポリペプチドは、3nM以下、好適には2nM以下、好適には1nM以下、好適には0.5nM以下、好適には0.4nM以下、好適には0.3nM以下、好適には0.2nM以下、好適には0.1nM以下、好適には0.08nM以下のEC50で、可溶性ヒトTNF- α -誘導したHEK-293-NF- κ -B SEAPレポーター細胞の活性化を阻害する。

20

【0048】

好適には、本発明のポリペプチドは、300nM以下、好適には150nM以下、好適には100nM以下、好適には80nM以下、好適には40nM以下、好適には30nM以下、好適には25nM以下、好適には20nM以下、好適には15nM以下のEC50で、膜ヒトTNF- α -誘導したHEK-293-NF- κ -B SEAPレポーター細胞の活性化を阻害する。

【0049】

(ポリペプチド配列及びポリヌクレオチド配列)

ふたつの密接に関連したポリペプチド配列を比較する目的で、第一のポリペプチド配列と第二のポリペプチド配列の間の「%配列同一性」を、ポリペプチド配列に関する標準の設定を使用する、NCBI BLAST v2.0を用いて、計算することができる(BLASTP)。ふたつの密接に関連したポリヌクレオチド配列を比較する目的で、第一のヌクレオチド配列と第二のヌクレオチド配列の間の「%配列同一性」を、ヌクレオチド配列に関する標準の設定を使用する、NCBI BLAST v2.0を用いて、計算することができる(BLASTN)。

30

【0050】

ポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列が、他のポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列と、それらの全長にわたり100%配列同一性を共有する場合に、それらは同じ又は同一と言われる。配列中の残基は、左から右へと、すなわちポリペプチドのN-末端からC-末端へと；ポリヌクレオチドの5'末端から3'末端へと、番号付けられる。

【0051】

40

配列間の「差異」とは、第一の配列と比較して、第二の配列の位置での単独のアミノ酸残基の挿入、欠失又は置換をいう。ふたつのポリペプチド配列は、かかるアミノ酸差異を1、2又はそれよりも多く含むことができる。それ以外は第一の配列と同一である(100%配列同一性)第二の配列中の挿入、欠失又は置換は、低下した%配列同一性を生じる。例えば、同一の配列が、9アミノ酸残基長である場合、第二の配列中の1つの置換は、88.9%の配列同一性を生じる。同一の配列が、17アミノ酸残基長である場合、第二の配列中の2つの置換は、88.2%の配列同一性を生じる。同一の配列が、7アミノ酸残基長である場合、第二の配列中の3つの置換は、57.1%の配列同一性を生じる。第一と第二のポリペプチド配列が、9アミノ酸残基長であり、且つ6つの同一残基を共有する場合、第一と第二のポリペプチド配列は、66%より大きい同一性を共有する(第一及び第二のポリペプチド配列は

50

、66.7%の同一性を共有する)。第一と第二のポリペプチド配列が、17アミノ酸残基長であり、且つ16の同一残基を共有する場合、第一と第二のポリペプチド配列は、94%より大きい同一性を共有する(第一及び第二のポリペプチド配列は、94.1%の同一性を共有する)。第一と第二のポリペプチド配列が、7アミノ酸残基長であり、且つ3つの同一残基を共有する場合、第一と第二のポリペプチド配列は、42%より大きい同一性を共有する(第一及び第二のポリペプチド配列は、42.9%の同一性を共有する)。

【0052】

あるいは、第一の参照ポリペプチド配列を第二の比較ポリペプチド配列と比較する目的で、第二の配列を作製するために第一の配列へ成された付加、置換及び／又は欠失の数は、確定されてよい。付加は、1個のアミノ酸残基の第一のポリペプチドの配列への付加である(第一のポリペプチドのいずれかの末端での付加を含む)。置換は、第一のポリペプチドの配列中の1個のアミノ酸残基の、1個の異なるアミノ酸残基による置換である。欠失は、第一のポリペプチドの配列からの1個のアミノ酸残基の欠失である(第一のポリペプチドのいずれかの末端での欠失を含む)。

【0053】

第一の参照ポリヌクレオチド配列を第二の比較ポリヌクレオチド配列と比較する目的で、第二の配列を作製するために第一の配列へ成された付加、置換及び／又は欠失の数は、確定されてよい。付加は、1個のヌクレオチド残基の第一のポリヌクレオチドの配列への付加である(第一のポリヌクレオチドのいずれかの末端での付加を含む)。置換は、第一のポリヌクレオチドの配列中の1個のヌクレオチド残基の、1個の異なるヌクレオチド残基による置換である。欠失は、第一のポリヌクレオチドの配列からの1個のヌクレオチド残基の欠失である(第一のポリヌクレオチドのいずれかの末端での欠失を含む)。

【0054】

「保存的」アミノ酸置換は、その中でアミノ酸残基が、化学構造が類似している別のアミノ酸残基と交換され、且つそのポリペプチドの機能、活性又は他の生物学的特性にほとんど影響を有しないと予想される、アミノ酸置換である。かかる保存的置換は好適には、下記群中の1個のアミノ酸の、同じ群内の別のアミノ酸残基による置換である：

【表1】

群	アミノ酸残基
非極性脂肪族	グリシン
	アラニン
	バリン
	ロイシン
	イソロイシン
芳香族	フェニルアラニン
	チロシン
	トリプトファン
非帯電極性	セリン
	トレオニン
	アスパラギン
	グルタミン
負帯電	アスパラギン酸
	グルタミン酸
正帯電	リジン
	アルギニン

【0055】

好適には、疎水性アミノ酸残基は、非極性アミノ酸である。より好適には、疎水性アミノ酸残基は、V、I、L、M、F、W又はCから選択される。

【0056】

本明細書において使用される、ポリペプチド配列の番号付け並びにCDR及びFRの規定は、Kabatシステムに従って規定される(Kabatらの文献、1991、「免疫学的関心のあるタンパク質配列」、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH出版番号91-3242、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。第一と第二のポリペプチド配列間の「対応する」アミノ酸残基は、Kabatシステムに従う同じ位置を第二の配列中のアミノ酸残基と共有する第一の配列中のアミノ酸残基である一方で、第二の配列中のアミノ酸残基は、第一のものとは同一性が異なってよい。好適にはフレームワーク及びCDRがKabat規定に従い同じ長さである場合に、対応する残基は、同じ番号(及び文字)を共有するであろう。アラインメントは、手作業で、又は例えば、標準の設定を使用するNCBI B 10
LAST v2.0(BLASTP又はBLASTN)などの、配列アラインメントに関する既知のコンピュータアルゴリズムを使用することにより、達成することができる。

【0057】

好適には、本発明において使用されるポリヌクレオチドは、単離される。「単離された」ポリヌクレオチドは、その当初の環境から取り出されたものである。例えば、天然のポリヌクレオチドは、それが天然のシステムにおいて共存する物質の一部又は全てから分離される場合に、単離される。ポリヌクレオチドは、例えばそれが天然の環境の一部ではないベクターヘクローニングされる場合、又はそれがcDNA内に含まれる場合に、単離されていると考えられる。

【0058】

本発明の一態様において、本発明のポリペプチド又は構築体をコードしているポリヌクレオチドが提供される。好適にはポリヌクレオチドは、配列番号:83から88のいずれか一つと、70%以上、例えば80%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含むか又はこれからなる。より好適には、ポリヌクレオチドは、配列番号:83から88のいずれか一つを含むか又はこれからなる。更なる態様において、該ポリヌクレオチドを含むcDNAが提供される。

【0059】

本発明の一態様において、コードされた免疫グロブリン鎖可変ドメインのCDR1、CDR2又はCDR3をコードしている配列番号:83から86のいずれか一つの部分のいずれか一つと、70%以上、例えば80%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含むか又はこれからなるポリヌクレオチドが提供される。

【0060】

好適には、本発明のポリペプチド配列は、ネイティブの配列に関して少なくとも1つの改変を含む。好適には、本発明のポリヌクレオチド配列は、ネイティブの配列に関して少なくとも1つの改変を含む。好適には、ポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列への改変は、腸管内に存在するプロテアーゼ(例えば、トリプシン及びキモトリプシン)に対するポリペプチド又はコードされたポリペプチドの安定性を増大するように成される。

【0061】

選択された免疫グロブリン鎖可変ドメイン配列に適用されるKabat番号付けシステム

[illegible]

40

50

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:1と比べ、2以下の、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:1と比べ、2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:1と比べ、2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0064】

好適には、CDR1の配列番号:1の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、CDR1は、配列番号:1を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、CDR1の配列は、配列番号:1、配列番号:59又は配列番号:60である。

10

【0065】

好適には、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:2と55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0066】

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:2と比べ、8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:2と比べ、8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:2と比べ、8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

20

【0067】

好適には、CDR2の配列番号:2の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、配列番号:2の残基番号10に対応するCDR2の残基は、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はI(最も好適にはH)である。好適には、CDR2は、配列番号:2を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、CDR2の配列は、配列番号:61、配列番号:62、配列番号:2、配列番号:63、配列番号:64、配列番号:65、配列番号:66、配列番号:67、配列番号:68、配列番号:69である。

30

【0068】

好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0069】

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:3と比べ、3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:3と比べ、3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:3と比べ、3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、任意の置換は、配列番号:3のそれらの対応する残基に関して、保存的である。

40

【0070】

好適には、CDR3の配列番号:3の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基は、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、FもしくはIであるか；又は、好適にはR、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、V、L、W、P、M、C、FもしくはI(最も好

50

適にはH)である。好適には、配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基は、Hであり、並びにCDR3の配列番号:3の対応する残基と異なる任意の他の残基は、それらの対応する残基に関する保存的置換である。好適には、CDR3は、配列番号:3を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0071】

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:3と50%、例えば60%、例えば80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなり、ここで配列番号:3の残基番号3は、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はV(好適にはH又はHの保存的置換；より好適にはH)である。あるいは、配列番号:3の残基番号3は、H又はHの保存的置換(最も好適にはH)であり、並びにCDR3の配列番号:3の対応する残基と異なる任意の他の残基は、保存的置換である。好適には、CDR3の配列は、配列番号:3、配列番号:70、配列番号:71又は配列番号:72である。

10

【0072】

好適には、CDR1の残基1は、S、V又はNであり；残基2から4は、HWMであり、並びに残基5は、Y又はCである。好適には、CDR2の残基1から9は、EINTNGLITであり；残基10は、H、K、S又はNであり；残基11は、Yであり、残基12は、G、V、I又はAであり；残基13は、Dであり；残基14は、S又はFであり；残基15は、V又はTであり；残基16は、H、K、R又はGであり、並びに残基17は、Gである。好適には、CDR3の残基1は、Nであり；残基2は、Q又はEであり；残基3は、H、K、M又はRであり、並びに残基4から6は、GLNである。

【0073】

20

一部の特に好適なCDR配列は、以下の表に示されている。好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、以下に列挙されたCDR1配列のひとつである。好適には、本発明のポリペプチドのCDR2は、以下に列挙されたCDR2配列のひとつである。好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、以下に列挙されたCDR3配列のひとつである。好適には、本発明のポリペプチドは、以下に列挙されたCDR配列の2つ、より好適には3つの組合せを含む。

【0074】

本発明のポリペプチドの特定のファミリー1 CDR：

【表 3】

CDR1	CDR2	CDR3
SHWMY (配列番号: 1)	EINTNGLITHYGDSVHG (配列番号: 61)	NQHGLN (配列番号: 3)
VHWMY (配列番号: 59)	EINTNGLITKYGDSVHG (配列番号: 62)	NQKGLN (配列番号: 70)
NHWMC (配列番号: 60)	EINTNGLITHYGDSVKG (配列番号: 2)	NQMGLN (配列番号: 71)
	EINTNGLITSYVDSVKG (配列 番号: 63)	NERGLN (配列番号: 72)
	EINTNGLITKYIDSVRG (配列 番号: 64)	
	EINTNGLITNYVDSVKG (配列番号: 65)	
	EINTNGLITKYIDSVGG (配列 番号: 66)	
	EINTNGLITKYADFVKG (配列 番号: 67)	
	EINTNGLITKYADSTKG (配列 番号: 68)	
	EINTNGLITKYGDSVKG (配列番号: 69)	

10

20

【0075】

【表 4】

他のファミリー1メンバー、TNF1及びQ62F11に対するID38FのCDRの
%同一性

名称	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Q65B1	100	94.1	83.3
Q65F2	100	88.2	83.3
Q65F3	100	82.4	83.3
Q62F2	100	88.2	83.3
Q65G1	100	82.4	83.3
Q65H6	100	82.4	83.3
Q65F1	80	82.4	83.3
Q65D1	60	82.4	83.3
Q65D3	100	82.4	66.7
Q65C7	100	82.4	83.3
TNF1	60	88.2	33.3
Q62F11	20	52.9	13.3

30

40

【0076】

好適には、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:4と、5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0077】

50

あるいは、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:4と比べ、28以下、より好適には26以下、より好適には24以下、より好適には22以下、より好適には20以下、より好適には18以下、より好適には16以下、より好適には14以下、より好適には13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:4と比べ、28以下、より好適には26以下、より好適には24以下、より好適には22以下、より好適には20以下、より好適には18以下、より好適には16以下、より好適には14以下、より好適には13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:4と比べ、28以下、より好適には26以下、より好適には24以下、より好適には22以下、より好適には20以下、より好適には18以下、より好適には16以下、より好適には14以下、より好適には13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

10

20

【0078】

好適には、FR1の配列番号:4の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、配列番号:4の残基番号1に対応するFR1の残基は、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はN(より好適にはD又はE、最も好適にはD)である。好適には、配列番号:4の残基番号5に対応するFR1の残基は、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はN(好適にはV)である。好適には、配列番号:4の残基番号1から5に対応するFR1の残基は、DVQLVである。好適には、配列番号:4の残基番号20及び／又は24に対応するFR1の残基は、疎水性であるアミノ酸(各々、最も好適にはL又はA)である。好適には、配列番号:4の残基番号29に対応するFR1の残基は、Fである。好適には、FR1は、配列番号:4を含むか、又はより好適にはこれからなる。

30

【0079】

好適には、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:5と、10%、15%、25%、30%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、85%、90%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0080】

あるいは、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:5と比べ、13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:5と比べ、13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:5と比べ、13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

40

50

【0081】

好適には、FR2の配列番号:5の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、配列番号:5の残基番号8から11に対応するFR2の残基は、KEXEであり、ここでXはR又はLである。あるいは、配列番号:5の残基番号9から12に対応するFR2の残基は、GLEWである。好適には、FR2は、配列番号:5を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0082】

好適には、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:6と、8%、15%、20%、26%、32%、40%、45%、52%、58%、65%、70%、76%、80%、82%、85%、90%、92%、95%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

10

【0083】

あるいは、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:6と比べ、29以下、より好適には27以下、より好適には25以下、より好適には23以下、より好適には21以下、より好適には19以下、より好適には17以下、より好適には15以下、より好適には13以下、より好適には11以下、より好適には9以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:6と比べ、29以下、より好適には27以下、より好適には25以下、より好適には23以下、より好適には21以下、より好適には19以下、より好適には17以下、より好適には15以下、より好適には13以下、より好適には11以下、より好適には9以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:6と比べ、29以下、より好適には27以下、より好適には25以下、より好適には23以下、より好適には21以下、より好適には19以下、より好適には17以下、より好適には15以下、より好適には13以下、より好適には11以下、より好適には9以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

20

【0084】

好適には、配列番号:6の残基番号 26に対応するFR3の残基は、疎水性であるアミノ酸(好適にはA)である。好適には、配列番号:6のそれらの対応する残基と異なるFR3の任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、FR3は、配列番号:6を含むか、又はより好適にはこれからなる。

30

【0085】

好適には、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:7と、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0086】

あるいは、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:7と比べ、10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:7と比べ、10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:7と比べ、10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又は

40

50

より好適にはこれからなる。

【0087】

好適には、FR4の配列番号:7の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、FR4は、配列番号:7を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0088】

好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:8と50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0089】

あるいは、本発明のポリペプチドは、配列番号:8と比べ、20以下、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:8と比べ、20以下、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:8と比べ、20以下、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0090】

好適には、このポリペプチドのN-末端は、Dである。好適には、このポリペプチドは、配列番号:8を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0091】

(ファミリー2に属する配列)

好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:15と80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0092】

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:15と比べ、2以下の、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:15と比べ、2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、配列番号:15と比べ、2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0093】

好適には、CDR1の配列番号:15の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、CDR1は、配列番号:15を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0094】

好適には、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:16と55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0095】

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:16と比べ、8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。あるいは、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:16と

10

20

30

40

50

比べ、8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。あるいは、本発明のポリペプチドのCDR2は、配列番号:16と比べ、8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0096】

好適には、配列番号:16の残基番号10及び／又は16に対応するCDR2の残基は、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はI(より好適にはH)である。好適には、CDR2の配列番号:16の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、CDR2は、配列番号:16を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、CDR2の配列は、配列番号:73、配列番号:74、配列番号:75、配列番号:76、配列番号:77又は配列番号:16である。

10

【0097】

好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:17と、60%以上の配列同一性、例えば80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0098】

あるいは、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:17と比べ、3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:17と比べ、3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、配列番号:17と比べ、3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

20

【0099】

好適には、CDR3の配列番号:17の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、CDR3の配列は、配列番号:78、配列番号:79、配列番号:17又は配列番号:80である。好適には、CDR3は、配列番号:17を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0100】

好適には、CDR1の残基1から5は、IHWMYである。好適には、CDR2の残基1から9は、EINTNGLITであり；残基10は、L、T、H、K又はVであり；残基11は、Yであり；残基12は、S、A、T又はPであり；残基13から15は、DSVであり；残基16は、R、K又はSであり、並びに残基17は、Gである。好適には、CDR3の残基1は、S、A又はTであり；残基2は、R又はQであり；残基3から4は、NGであり；残基5は、A又はKであり、並びに残基6は、A又はTである。

30

【0101】

一部の特に好適なCDR配列は、以下の表に示されている。好適には、本発明のポリペプチドのCDR1は、以下に列挙されたCDR1配列のひとつである。好適には、本発明のポリペプチドのCDR2は、以下に列挙されたCDR2配列のひとつである。好適には、本発明のポリペプチドのCDR3は、以下に列挙されたCDR3配列のひとつである。好適には、本発明のポリペプチドは、以下に列挙されたCDR配列の2つ、より好適には3つの組合せを含む。

40

【0102】

本発明のポリペプチドの特定のファミリー2 CDR：

【表 5】

CDR1	CDR2	CDR3
IHWMY (配 列 番 号: 15)	EINTNGLITLYSDSVRG (配 列 番 号: 73)	SRNGAA (配 列 番 号: 78)
	EINTNGLITLYADSVKG (配 列 番 号: 74)	ARNGAA (配 列 番 号: 79)
	EINTNALITTYADSVKG (配 列 番 号: 75)	TQNGAA (配 列 番 号: 17)
	EINTNGLITHYTDVS VG (配 列 番 号: 76)	TQNGKT (配 列 番 号: 80)
	EINTNALITKYADSVKG (配 列 番 号: 77)	
	EINTNGLITVYPDSVKG (配 列 番 号: 16)	

10

【 0 1 0 3 】

【表 6】

他のファミリー2メンバー、TNF1及びQ62F11に対する62E10のCDRの
%同一性

20

名称	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Q65F6	100	76.5	66.7
Q65F11	100	88.2	66.7
Q65E12	100	88.2	66.7
Q62C12	100	94.1	66.7
Q65A6	100	76.5	66.7
Q65A3	100	100	100
Q65F10	100	82.4	66.7
TNF1	60	88.2	16.7
Q62F11	20	52.9	13.3

30

【 0 1 0 4 】

好適には、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:18と、5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【 0 1 0 5 】

40

あるいは、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:18と比べ、28以下、より好適には26以下、より好適には24以下、より好適には22以下、より好適には20以下、より好適には18以下、より好適には16以下、より好適には14以下、より好適には13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。あるいは、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:18と比べ、28以下、より好適には26以下、より好適には24以下、より好適には22以下、より好適には20以下、より好適には18以下、より好適には16以下、より好適には14以下、より好適には13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適

50

には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。あるいは、本発明のポリペプチドのFR1は、配列番号:18と比べ、28以下、より好適には26以下、より好適には24以下、より好適には22以下、より好適には20以下、より好適には18以下、より好適には16以下、より好適には14以下、より好適には13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

10

【0106】

好適には、配列番号:4の残基番号1に対応するFR1の残基は、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はN(より好適にはD又はE、最も好適にはD)である。好適には、配列番号:18の残基番号5に対応するFR1の残基は、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はN(好適にはV)である。好適には、配列番号:18の残基番号1から5に対応するFR1の残基は、DVQLVである。好適には、配列番号:18の残基番号20に対応するFR1の残基は、疎水性であるアミノ酸(好適にはL)である。好適には、配列番号:18の残基番号29に対応するFR1の残基は、Fである。好適には、FR1の配列番号:18の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、FR1は、配列番号:18を含むか、又はより好適にはこれからなる。

20

【0107】

好適には、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:19と、10%、15%、25%、30%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、85%、90%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0108】

あるいは、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:19と比べ、13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:19と比べ、13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR2は、配列番号:19と比べ、13以下、より好適には12以下、より好適には11以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

30

【0109】

好適には、配列番号:19の残基番号8から11に対応するFR2の残基は、KELEである。好適には、FR2の配列番号:19の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、FR2は、配列番号:19を含むか、又はより好適にはこれからなる。

40

【0110】

好適には、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:20と、8%、15%、20%、26%、32%、40%、45%、52%、58%、65%、70%、76%、80%、82%、85%、90%、92%、95%以上の配列同一性を共有する配列を含む。

【0111】

あるいは、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:20と比べ、29以下、より好適には

50

27、より好適には25、より好適には23、より好適には21、より好適には19、より好適には17、より好適には15、より好適には13、より好適には11、より好適には9、より好適には7、より好適には6、より好適には5、より好適には4、より好適には3、より好適には2、より好適には1の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:20と比べ、29以下、より好適には27、より好適には25、より好適には23、より好適には21、より好適には19、より好適には17、より好適には15、より好適には13、より好適には11、より好適には9、より好適には7、より好適には6、より好適には5、より好適には4、より好適には3、より好適には2、より好適には1の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR3は、配列番号:20と比べ、29以下、より好適には27、より好適には25、より好適には23、より好適には21、より好適には19、より好適には17、より好適には15、より好適には13、より好適には11、より好適には9、より好適には7、より好適には6、より好適には5、より好適には4、より好適には3、より好適には2、より好適には1の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

10

【0112】

好適には、配列番号:20の残基番号26に対応するFR3の残基は、疎水性であるアミノ酸(好適にはA)である。好適には、配列番号:20のそれらの対応する残基と異なるFR3の任意の残基は、それらの対応する残基に関して、保存的置換である。好適には、FR3は、配列番号:20を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0113】

20

好適には、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:21と、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の配列同一性を共有する配列を含む。

【0114】

あるいは、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:21と比べ、10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:21と比べ、10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドのFR4は、配列番号:21と比べ、10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

30

【0115】

好適には、配列番号:21の残基番号1に対応するCDR2の残基は、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はI(好適にはH)である。好適には、FR4の配列番号:21の対応する残基と異なる任意の残基は、それらの対応する残基に関して保存的置換である。好適には、FR4は、配列番号:21を含むか、又はより好適にはこれからなる。

40

【0116】

好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:22と50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0117】

あるいは、本発明のポリペプチドは、配列番号:22と比べ、20以下、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の付加(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:22と比べ、20以下

50

、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:22と比べ、20以下、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の欠失(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。

【0118】

好適には、このポリペプチドは、配列番号:22を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、このポリペプチドのN-末端は、Dである。好適には、このポリペプチドは、配列番号:55を含むか、又はより好適にはこれからなる。

10

【0119】

好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号:22に関して、20以下、より好適には15以下、より好適には10以下、より好適には9以下、より好適には8以下、より好適には7以下、より好適には6以下、より好適には5以下、より好適には4以下、より好適には3以下、より好適には2以下、より好適には1以下の置換(複数可)を有する配列を含むか、又はより好適にはこれからなる。好適には、任意の置換は、配列番号:22におけるそれらの対応する残基に関して、保存的である。

【0120】

20

(リンカー及び多量体)

本発明の構築体は、複数のポリペプチドを含み、従って好適には多価であってよい。かかる構築体は、少なくとも2つの本発明の同一ポリペプチドを含んでよい。2つの本発明の同一ポリペプチドからなる構築体は、「ホモビヘッド」である。本発明の一態様において、2つ以上の本発明の同一のポリペプチドを含む構築体が、提供される。

【0121】

あるいは、構築体は、異なるが、両方共依然本発明のポリペプチドである、少なくとも2つのポリペプチドを含んでよい(「ヘテロビヘッド」)。

【0122】

あるいは、かかる構築体は、(a)少なくとも1つの本発明のポリペプチド、及び(b)抗体又はそれらの抗原-結合断片などの、少なくとも1つのポリペプチドであって、本発明のポリペプチドではないもの：を含んでよい(同じく「ヘテロビヘッド」)。(b)の少なくとも1つのポリペプチドは、TNF- α に結合してよく(例えば、(a)のエピトープとは異なるエピトープを介して)、あるいはTNF- α 以外の標的に結合してよい。好適には異なるポリペプチド(b)は、例えば以下のものに結合する：インターロイキン(IL-1、IL-1ra、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18及びIL-23など)、インターロイキン受容体(IL-6R及びIL-7Rなど)、転写因子(NF- κ Bなど)、サイトカイン(TNF- α 、IFN- γ 、TGF- β 及びTSLPなど)、膜貫通タンパク質(gp130及びCD3など)、表面糖タンパク質(CD4、CD20、CD40など)、可溶性タンパク質(CD40Lなど)、インテグリン(α 4 β 7及び α E β 7など)、接着分子(MAdCAMなど)、ケモカイン(IP10及びCCL20など)、ケモカイン受容体(CCR2及びCCR9など)、阻害タンパク質(SMAD7など)、キナーゼ(JAK3など)、Gタンパク質共役受容体(スフィンゴシン-1-P受容体など)、ヒト病理プロセスに關与する他の炎症メディエーター又は免疫学的に關連のあるリガンド。従って異なるポリペプチド(b)は、例えば、IL-6R、IL-6、IL-12、IL-23、IL-1- β 、IL-17AもしくはCD3；又は、ヒト病理プロセスに關与する他の炎症メディエーターもしくは免疫学的に關連のあるリガンドに結合する。

30

40

【0123】

構築体は、多価及び／又は多重特異性であることができる。多価の構築体(二価の構築体など)は、2種以上の結合ポリペプチドを含み、結果的にそこで1以上の抗原への付着が生じ得る2つ以上の部位を提示する。多価の構築体の例は、ホモビヘッド又はヘテロビヘ

50

ッドであることができる。多重特異性構築体(二重特異性構築体など)は、そこで、(a)2種以上異なる抗原への付着が生じ得るか、又は(b)同じ抗原上の2種以上の異なるエピトープへの付着が生じ得るかのいずれかである、2つ以上の部位を提示する、2つ以上の異なる結合ポリペプチドを含む。多重特異性構築体の例は、ヘテロビヘッドであることができる。多重特異性構築体は、多価である。

【0124】

好適には、本構築体内に含まれるポリペプチドは、抗体断片である。より好適には、本構築体内に含まれるポリペプチドは：VHH、VH、VL、V-NAR、Fab断片及びF(ab')₂断片からなるリストから選択される。より好適には、本構築体内に含まれるポリペプチドは、VHHである。

10

【0125】

本発明のポリペプチドは、互いに直接(すなわちリンカーを使用せずに)又はリンカーを介して繋がれることができる。好適には、リンカーは、プロテアーゼ-不安定性又は非-プロテアーゼ-不安定性リンカーである。リンカーは、好適にはポリペプチドであり、且つポリペプチドのそれらのエピトープへの結合が可能になるように、選択されるであろう。治療目的で使用される場合、リンカーは、好適にはポリペプチドが投与される対象において非-免疫原性である。好適には、ポリペプチドは、非-プロテアーゼ-不安定性リンカーにより、全て連結される。好適にはプロテアーゼ-不安定性リンカーは、形式 $[-(G_4S)_x-BJ B'-(G_4S)_y-]_z$ のものであり、ここでJは、リジン又はアルギニンであり、Bは、R、H、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F、K又はIから選択された0~5個のアミノ酸残基であり、B'は、R、H、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、M、C、F、K又はIから選択された0~5個のアミノ酸残基であり、xは、1~10であり；yは、1~10であり、並びにzは、1~10である。最も好適には、Jはリジンであり、Bは0であり、xは1であり、yは1であり、並びにzは1である。好適には、非-プロテアーゼ-不安定性リンカーは、形式 $(G_4S)_x$ のものである。最も好適には、xは6である。

20

【0126】

(ベクター及び宿主)

本明細書において使用される用語「ベクター」は、それに連結されている別の核酸を輸送することが可能である核酸分子をいうことが意図される。ひとつのベクター型は、「プラスミド」であり、これは、それに追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループをいう。別のベクター型は、ウイルスベクターであり、ここで追加のDNAセグメントは、ウイルスゲノムヘライゲーションされ得る。ある種のベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律複製が可能である(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター、並びにエピソード性哺乳動物及び酵母のベクター)。他のベクター(例えば、非-エピソード性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に、宿主細胞のゲノムへ組み込まれ、これにより宿主ゲノムと共に複製され得る。更に、ある種のベクターは、それらが機能的に連結された遺伝子の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」(又は簡単に「発現ベクター」と称される。概して、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形であることが多い。プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形であるので、本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」は、互換的に使用され得る。しかし本発明は、同等の機能を働くウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)、並びに同じくバクテリオファージ及びファージミドシステムなどの、かかる発現ベクターの他の形を含むことが意図される。本発明はまた、ポリペプチド配列又は多価及び/もしくは多重特異性の構築体をコードしている、ヌクレオチド配列にも関する。本明細書において使用される用語「組換え宿主細胞」(又は簡単に「宿主細胞」)は、組換え発現ベクターが導入されている細胞をいうことが意図される。かかる用語は、特定の対象細胞のみではなく、かかる細胞の子孫もいうことが意図される。

30

40

【0127】

本発明の一態様において、本発明のポリペプチドもしくは構築体をコードしているポリ

50

ヌクレオチドを含むベクター又は該ポリヌクレオチドを含むcDNAが、提供される。本発明の更なる態様において、本発明のポリペプチド又は構築体を発現することが可能である、該ベクターにより形質転換された宿主細胞が、提供される。好適には、宿主細胞は、大腸菌などの細菌、アスペルギルス属、サッカロミセス属、クルイベロミセス属、ハンゼヌラ属もしくはピキア属に属する酵母、例えば出芽酵母もしくはピキア・パストリスなどである。

【0128】

(安定性)

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体は、経口的に送達された場合及び腸管への曝露後(例えば、小腸及び／もしくは大腸のプロテアーゼ、並びに／又はIBD炎症プロテアーゼへの曝露後)に、中和能及び／又は効力を、実質的に保持する。かかるプロテアーゼは、エンテロペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシン、及び過敏性腸疾患炎症プロテアーゼ(MMP3、MMP12及びカテプシンなど)を含む。小腸及び／もしくは大腸のプロテアーゼ、又はその中で生成されるプロテアーゼは、腸の片利共生マイクロフローラ及び／又は病原性細菌から調達されるプロテアーゼを含み、例えばここで、プロテアーゼは、細胞膜に付着したプロテアーゼ、分泌されたプロテアーゼ及び細胞溶解時に放出されたプロテアーゼである。最も好適には、このプロテアーゼは、トリプシン及びキモトリプシンである。

10

【0129】

好適には、腸管は、イヌ、ブタ、ヒト、カンクイザル又はマウスの腸管である。小腸は好適には、十二指腸、空腸及び回腸からなる。大腸は好適には、盲腸、結腸、直腸及び肛門管からなる。好適には、本発明のポリペプチド又は構築体は、1種以上のプロテアーゼに対し、実質的に抵抗性である。胃腸管とは対照的に、腸管は、小腸及び大腸のみからなる。

20

【0130】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の当初の中和能の10%、より好適には20%、より好適には30%、より好適には40%、より好適には50%、より好適には60%、より好適には70%、より好適には80%、より好適には90%、より好適には95%、より好適には100%が、小腸及び／もしくは大腸内に存在するプロテアーゼ並びに／又はIBD炎症プロテアーゼに曝露された後、保持される場合に、本発明のポリペプチド又は構築体は、中和能を実質的に保持する。

30

【0131】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体は、例えば、37℃で、最大少なくとも2、より好適には最大少なくとも3、より好適には最大少なくとも4、より好適には最大少なくとも5、より好適には最大少なくとも5.5、より好適には最大少なくとも16、より好適には最大少なくとも21又はより好適には最大少なくとも22時間、小腸及び／もしくは大腸内に存在するプロテアーゼ並びに／又はIBD炎症プロテアーゼに曝露された後、中和能を実質的に保持する。

【0132】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の中和能の10%以上、より好適には20%以上、より好適には30%以上、より好適には40%以上、より好適には50%以上、より好適には60%以上、より好適には70%以上は、腸管、より好適には小腸又は腸大腸、より好適にはヒト糞便抽出物の条件に16時間曝露された後に、保持される。

40

【0133】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の中和能の10%以上、より好適には20%以上、より好適には30%以上、より好適には40%以上、より好適には50%以上、より好適には60%以上、より好適には70%以上は、マウス小腸の上清への好適には4、6又は16時間の曝露後、保持される。

【0134】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の中和能の10%以上、より好適には15%以上、より好適には20%以上、より好適には25%以上、より好適には30%以上、より好適に

50

は35%以上、より好適には40%以上は、マウス小腸上清への16時間の曝露後、保持される。

【0135】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の中和能の50%以上、より好適には60%以上、より好適には65%以上、より好適には70%以上、より好適には75%以上、より好適には80%以上、より好適には85%以上、より好適には85%以上は、マウス小腸上清への16時間の曝露後、保持される。

【0136】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の投与された用量の10%以上、より好適には20%以上、より好適には30%以上、より好適には40%以上、より好適には50%以上、より好適には60%以上、より好適には70%以上は、TNF- α に対する中和能を保持し、且つ腸管の条件に1、2、3、4、5、6又は7時間の曝露後に、マウス、カニクイザル及び／又はヒトの糞便(好適には排泄された糞便又は腸管から取り出された糞便)中に残存する。

【0137】

本発明のポリペプチド又は構築体の投与された量の好適には10%、より好適には20%、より好適には30%、より好適には40%、より好適には50%、より好適には60%、より好適には70%、より好適には80%、より好適には90%、より好適には95%、より好適には99%、最も好適には100%が、小腸及び／もしくは大腸内に存在するプロテアーゼ並びに／又はIBD炎症プロテアーゼに曝露された後依然として無傷である場合、本発明のポリペプチド又は本発明の構築体は、実質的に無傷であり続ける。

【0138】

好適には、本発明のポリペプチド又は本発明の構築体は、カニクイザルの胃、十二指腸、空腸又は回腸へ5時間曝露された後、実質的に無傷であり続ける。好適には、本発明のポリペプチド又は本発明の構築体は、カニクイザルの盲腸又は結腸へ16時間曝露された後、実質的に無傷であり続ける。

【0139】

好適には、本発明のポリペプチド又は構築体の当初の中和能の好適には10%、より好適には20%、より好適には30%、より好適には40%、より好適には50%、より好適には60%、より好適には70%、より好適には80%、より好適には90%、より好適には95%、より好適には100%が、凍結及び解凍後に保持される場合に、本発明のポリペプチド又は構築体は、実質的に中和能を保持する。

【0140】

(治療用途及び送達)

本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の治療の有効量は、対象への単回又は反復用量の投与時に、対象において有意な程度までTNF- α を中和する点での、有効量である。治療的有效量は、個体の病態、年齢、性別、及び体重、並びにポリペプチド、医薬組成物もしくは構築体の個体において所望の反応を引き起こす能力などの要因に応じて、変動することができる。治療的有效量はまた、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の何らかの毒性作用又は有害作用よりも、治療的有益作用が上回るものである。本発明のポリペプチド又は構築体は、対象への投与に適している医薬組成物へ混入されることができる。本発明のポリペプチド又は構築体は、医薬として許容し得る塩の形態であることができる。

【0141】

本発明の医薬組成物は、好適には経口、筋肉内、皮下又は静脈内の送達のために製剤されてよい。本発明の医薬組成物は、様々な形態であってよい。これらは、例えば、溶液液剤(例えば、注射可能な及び注入可能な液剤)、分散剤又は懸濁剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム及び坐薬などの、液体、半固形及び固形の剤形を含む。固形剤形が、好ましい。本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、賦形剤と共に混入され、且つ摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、ウェハー及び同類のものの形態で使用される。

【0142】

典型的には、本医薬組成物は、本発明のポリペプチド又は構築体、及び医薬として許容し得る希釈剤又は担体を含む。医薬として許容し得る担体の例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール及び同類のものの1種以上、並びにそれらの組合せを含む。医薬として許容し得る担体は更に、湿潤剤又は乳化剤、保存剤又は緩衝液などの、本発明のポリペプチド又は構築体の保存期間又は有効性を増強する補助物質を少量含んでよい。医薬組成物は、接着阻害物質、結合剤、コーティング、崩壊剤、香味剤、着色剤、滑沢剤、吸着剤、保存剤、甘味料、凍結乾燥賦形剤(リオプロテクタントを含む)又は圧縮助剤を含んでよい。

【0143】

最も好適には、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は本発明の構築体は、経口投与される。経口送達の重要な問題点は、十分なポリペプチド、医薬組成物又は構築体が、それが必要とされる腸管領域に到達することを確実にすることである。本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体が、それが必要とされる腸管領域に到達することを妨げる要因は、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体を分解し得る消化分泌物中のプロテアーゼの存在が挙げられる。好適には、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、ポリペプチド又は構築体それ自身の固有の特性のおかげで、1種以上のかかるプロテアーゼの存在下で実質的に安定している。好適には、本発明のポリペプチド又は構築体は、医薬組成物へ混入される前に、凍結乾燥される。

【0144】

本発明のポリペプチドはまた、腸溶性コーティングを備えてもよい。腸溶性コーティングは、胃の低いpHからポリペプチドを保護することを補助する、経口薬物に適用されるポリマー障壁である。腸溶性コーティングに使用される物質は、脂肪酸、ワックス、シェラック、プラスチック、及び植物繊維が挙げられる。好適な腸溶性コーティング成分は、アクリル酸メチル-メタクリル酸コポリマー、酢酸コハク酸セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート(ヒプロメロース酢酸エステルコハク酸エステル)、ポリビニルアセテートフタレート(PVAP)、メタクリル酸メチル-メタクリル酸コポリマー、アルギン酸ナトリウム及びステアリン酸を含む。好適な腸溶性コーティングは、pH-依存性放出ポリマーを含む。これらは、胃内で認められる強酸性pHでは不溶性であるが、より弱い酸性pHでは迅速に溶解する、ポリマーである。従って好適には、腸溶性コーティングは、酸性の胃液(pH~3)中では溶解しないが、小腸中(pH6を上回る)又は結腸中(pH7.0を上回る)に存在する比較的高いpH環境では溶解するであろう。pH-依存型放出ポリマーは、本発明のポリペプチド又は構築体が、その投薬量が小腸に到達するおおよその時間で放出されるように、選択される。

【0145】

本発明のポリペプチド、構築体又は医薬組成物は、望ましいならば、可溶化剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤及び保存剤などの、常用の添加剤と共に：植物油又は他の類似油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステル又はプロピレングリコールなどの、水性又は非水性溶媒中に、それらが溶解、懸濁又は乳化されることにより、注射用調製品に製剤され得る。許容し得る担体、賦形剤及び／又は安定化剤は、使用される用量及び濃度で、レシピエントに対し無毒であり、且つリン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸、グルタチオン、システイン、メチオニン及びクエン酸を含む抗酸化剤；保存剤(エタノール、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、p-クロロ-m-クレゾール、メチルもしくはプロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、又はそれらの組合せ)；アルギニン、グリシン、オルニチン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、プロリンなどのアミノ酸及びそれらの組合せ；単糖、二糖及び他の炭水化物；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；ゼラチン又は血清アルブミンなどの、タンパク質；EDTAなどの、キレート剤；トレハロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンノース、マルトース、ガラクトース、フルクトース、ソ

ルボース、ラフィノース、グルコサミン、N-メチルグルコサミン、ガラクトサミン、及びノイラミン酸などの、糖類；並びに／又は、ポリソルベート、POEエーテル、ポロキサマー、Triton-X、もしくはポリエチレングリコールなどの非イオン性界面活性剤を含む。

【0146】

本発明の医薬組成物は、皮膚へ局所送達されてよい(例えば、乾癬もしくは湿疹などの自己免疫疾患の治療における使用のために)。かかる医薬組成物は、好適には、クリーム、軟膏、ローション、ゲル、泡剤、経皮貼付剤、散剤、泥膏又はチンキ剤の形態であってよく、並びに好適には、ビタミンD3アナログ(例えば、カルシポトリオール及びマキサカルシトール)、ステロイド(例えば、プロピオン酸フルチカゾン、吉草酸ベタメタゾン及びプロピオン酸クロベタゾール)、レチノイド(例えば、タザロテン)、コールタール及びジトラノールを含んでよい。局所用医薬品は、互いに組合せて(例えば、ビタミンD3とステロイド)、又はサリチル酸などの更なる物質と組合せて、使用されることが多い。本発明の医薬組成物が、乾癬又は湿疹の治療のために局所送達される場合、好適にはステロイド、特に4群又は5群ステロイド、例えばヒドロコルチゾン(例えば、1%ヒドロコルチゾンクリーム)；シクロスポリン又は類似のマクロライド剤又はレチノイドなど、乾癬又は湿疹の治療において有効であると考えられる更なる物質を、この組成物中に含んでよい。

10

【0147】

全ての送達様式に関して、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、濃度5~50、又はより好適には15~40又はより好適には25~30g/リットルで、組成物のpHを安定化するために、緩衝液中に製剤されてよい。好適な緩衝液成分の例は、クエン酸ナトリウム及び／又はクエン酸などの生理的塩を含む。好適には緩衝液は、塩化ナトリウムなどの生理的塩を、100~200、より好適には125~175mM含有する。好適には、この緩衝液は、組成物のpH又は患者の生理的pHに近いpKaを有するように選択される。

20

【0148】

医薬組成物中の例証的ポリペプチド又は構築体の濃度は、約1mg/mL~約200mg/mL、又は約50mg/mL~約200mg/mL、又は約150mg/mL~約200mg/mLの範囲である。

【0149】

本発明のポリペプチド、構築体又は医薬組成物の水性製剤は、例えば約4.0~約7.0、又は約5.0~約6.0、あるいは約5.5の範囲のpHで、pH-緩衝された溶液中に調製されてよい。好適な緩衝液の例は、リン酸-、ヒスチジン-、クエン酸-、コハク酸-、酢酸-緩衝液及び他の有機酸緩衝液を含む。緩衝液の濃度は、例えば緩衝液及び製剤の所望の浸透圧に応じて、約1mM~約100mM、又は約5mM~約50mMであることができる。

30

【0150】

この医薬組成物の浸透圧は、浸透圧調節剤を含むことにより、変更されてよい。かかる浸透圧調節剤は、帯電した又は帯電していない化学種であることができる。典型的非帯電の浸透圧調節剤は、糖又は糖アルコール又は他のポリオールを含み、好ましくはトレハロース、スクロース、マンニトール、グリセロール、1,2-プロパンジオール、ラフィノース、ソルビトール又はラクチトール(特にトレハロース、マンニトール、グリセロール又は1,2-プロパンジオール)を含む。典型的帯電した浸透圧調節剤は、ナトリウムイオン、カリウムイオン又はカルシウムイオンの、塩化物イオン、硫酸イオン、炭酸イオン、亜硫酸イオン、硝酸イオン、乳酸イオン、コハク酸イオン、酢酸イオン又はマレイン酸イオンとの組合せなどの塩(特に、塩化ナトリウム又は硫酸ナトリウム)；又は、アルギニンもしくはヒスチジンなどのアミノ酸を含む。好適には、水性製剤は、等張であるが、高張溶液又は低張溶液も適していることがある。用語「等張」は、生理的塩溶液又は血清などの、それと比べられるいくつかの他の溶液と同じ浸透圧を有する溶液を意味する。等張化剤は、約5mM~約350mM量で、例えば1mM~500mMの量で使用されてよい。好適には、少なくとも1種の等張化剤が、本組成物に含まれる。

40

【0151】

界面活性剤も、製剤されたポリペプチドもしくは構築体の凝集を減少し、及び／又は製剤中の粒子の形成を最小化し、及び／又は吸着を減少するために、医薬組成物へ添加され

50

てよい。例証的界面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(Tween)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル(Brij)、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル(Triton-X)、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー(ポロキサマー、プルロニック)、及びドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む。好適なポリオキシエチレンソルビタン-脂肪酸エステルの例は、ポリソルベート20、及びポリソルベート80である。界面活性剤の例証的濃度は、約0.001%～約10%w/vの範囲であってよい。

【0152】

リオプロテクタントもまた、本発明のポリペプチド又は構築体を、凍結乾燥プロセス時の不安定化条件に対し保護するために、添加されてよい。例えば、既知のリオプロテクタントは、糖(グルコース、スクロース、マンノース及びトレハロースを含む)；ポリオール(マンニトール、ソルビトール及びグリセロールを含む)；並びに、アミノ酸(アラニン、グリシン及びグルタミン酸を含む)を含む。リオプロテクタントは、約10mM～500mMの量で含まれ得る。

10

【0153】

本発明のポリペプチド、本発明の医薬組成物又は構築体を投与するための用量範囲は、所望の治療効果を生じるためのそれである。必要とされる用量範囲は、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の正確な性質、投与経路、製剤の性質、患者の年齢、患者の状態の性質、範囲又は重症度、もしあれば禁忌、並びに担当医の判断に応じて決まる。これらの用量レベルの変動は、最適化のための標準の経験的慣習を用いて、調節することができる。

20

【0154】

本発明のポリペプチド、本発明の医薬組成物又は構築体の好適な1日投与量は、体重1kgにつき50ng～50mg、例えば1kgにつき50ug～40mg、例えば1kgにつき5～30mgの範囲である。単位投与量は、100mg未満から変動することができるが、典型的には1回用量につき250～2000mgの領域であり、これは1日1回又はより多くの頻度で、例えば1日に2、3もしくは4回、又はそれ以下の頻度で、例えば隔日もしくは週1回、2週間に1回、もしくは月1回で投与されてよい。

【0155】

本発明の一態様において、自己免疫疾患の治療のための医薬品製造における、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の使用が、提供される。本発明の更なる態様において、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の治療的有效量を、それを必要とするヒトへ投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法が、提供される。

30

【0156】

用語「治療」は、予防並びに治療的処置を包含することが、意図されている。疾患の治療はまた、それらの増悪の治療を包含し、且つまた疾患症状の再発を防止するための患者の疾患症状からの寛解の治療も包含している。

【0157】

(併用療法)

本発明の医薬組成物はまた、1種以上の活性物質(例えば、本明細書において言及された疾患の治療に適した活性物質)を含んでもよい。自己免疫疾患の治療において通常使用される他の確立された療法に付属して、又はこれと一緒に、自己免疫疾患の治療のための治療方法において、本発明の医薬組成物を使用することは、本発明の範囲内である。

40

【0158】

IBD(クローン病又は潰瘍性大腸炎など)の治療に関して、可能性のある組合せは、例えば、以下を含むリストから選択された1種以上の活性物質との組合せを含む：5-アミノサリチルサリチル酸、又はそのプロドラッグ(スルファサラジン、オルサラジン又はビスラジドなど)；コルチコステロイド(例えば、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、又はブデソニド)；免疫抑制剤(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、メトトレキセート、アザチオプリン又は6-メルカプトプリン)；抗-TNF- α 抗体(例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴル又はゴリムマブ)；抗-IL12/IL23抗体(例えば、ウス

50

テキヌマブ)；抗-IL6R抗体又は小型分子IL12/IL23阻害薬(例えば、アピリモド)；抗- α -4- β -7抗体(例えば、ベドリズマブ)；MAdCAM-1遮断薬(例えば、PF-00547659)；細胞接着分子 α -4-インテグリンに対する抗体(例えば、ナタリズマブ)；IL2受容体 α サブユニットに対する抗体(例えば、ダクリズマブ又はバシリキシマブ)；JAK3阻害薬(例えば、トファシチニブ又はR348)；Syk阻害薬及びそのプロドラッグ(例えば、フォスタマチニブ及びR-406)；ホスホジエステラーゼ-4阻害薬(例えば、テトミラスト)；HMPL-004；プロバイオティクス；デルサラジン；セマピモド/CPSI-2364；並びに、プロテインキナーゼC阻害薬(例えば、AEB-071)。最も好適な併用薬は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ベゴル又はゴリムマブである。

【0159】

10

ここで本発明の別の態様は、1種以上の更なる活性物質、例えば1種以上の前述の活性物質と組合せた、本発明の医薬組成物を提供する。

【0160】

本発明の更なる態様において、本ポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、先のリストから選択された少なくとも1種の活性物質と、逐次、同時に又は個別に投与される。

【0161】

同様に、本発明の別の態様は：

(A)本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体；及び

(B)1種以上の他の活性物質；

を含む組合せ製品を提供し、ここで成分(A)及び(B)は各々、医薬として許容し得るアジュバント、希釈剤又は担体と混合して製剤される。この本発明の態様において、組合せ製品は、単独(組合せ)製剤又は部品キット(kit-of-parts)のいずれかであってよい。従って、本発明のこの態様は、医薬として許容し得るアジュバント、希釈剤又は担体と混合した、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体、並びに別の治療薬を含有する、組合せ製剤を包含している。

20

【0162】

本発明はまた：

(i)本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体を、医薬として許容し得るアジュバント、希釈剤又は担体と混合して；並びに

(ii)医薬として許容し得るアジュバント、希釈剤又は担体と混合した、1種以上の他の活性物質を含む製剤：の、成分を含む部品キットも包含し、この成分(i)及び(ii)は、他方と一緒に投与されるのに適した形態で、各々提供される。

30

【0163】

従ってこの部品キットの成分(i)は、医薬として許容し得るアジュバント、希釈剤又は担体と混合した、先の成分(A)である。同様に、成分(ii)は、医薬として許容し得るアジュバント、希釈剤又は担体と混合した、先の成分(B)である。1種以上の他の活性物質(すなわち、先の成分(B))は、例えば、IBD(例えばクローン病及び／又は潰瘍性大腸炎)などの自己免疫疾患の治療と結びつけて、先に言及された物質のいずれかであってよい。成分(B)が、2種以上の更なる活性物質である場合、これらの更なる活性物質は、互いに製剤されるか、又は成分(A)と製剤されることができ、あるいはこれらは個別に製剤されてよい。一実施態様において、成分(B)は、1種の他の治療薬である。別の実施態様において、成分(B)は、2種の他の治療薬である。本発明のこの態様の組合せ製品(組合せ調製品又は部品キットのいずれか)は、自己免疫疾患(例えば、本明細書において言及した自己免疫疾患)の治療又は予防において使用されてよい。

40

【0164】

好適には、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、医薬品としての使用のため、より好適には自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療における使用のためである。

【0165】

(自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患)

自己免疫疾患は、免疫系が、正常な生体組織に有害に反応する場合に発症する。自己免

50

疫障害は、生体組織への損傷、異常な臓器成長及び／又は臓器機能の変化を生じ得る。この障害は、ただ1種の臓器又は組織型に影響を及ぼすか、あるいは複数の臓器及び組織に影響を及ぼすことがある。自己免疫障害により影響を受けた臓器及び組織は通常、赤血球などの血液成分、血管、結合組織、甲状腺又は脾臓などの内分泌腺、筋肉、関節及び皮膚を含む。炎症性疾患は、炎症により特徴付けられる疾患である。多くの炎症性疾患が、自己免疫疾患であり、且つまた逆も当てはまる。

【0166】

(GITの自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患)

小児及び成人の両方を苦しめる慢性炎症性腸疾患(IBD)クローン病及び潰瘍性大腸炎は、GITの自己免疫疾患及び炎症性疾患の例である(Hendricksonらの文献、2002、Clin Microbiol Rev、15(1):79-94、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。潰瘍性大腸炎は、炎症反応及び形態学的変化が、結腸に限定され続ける状態として規定される。直腸は、患者の95%で関与している。炎症は、粘膜に大きく限定され、且つ結腸の全長に沿った潰瘍形成、浮腫、及び出血の定まらない重症度の連続した関与からなる(Hendricksonらの文献、2002、Clin. Microbiol Rev、15(1):79-94、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。潰瘍性大腸炎は通常、腸管運動の通過時に最も重篤である下腹部の痙攣を伴う、糞便に混ざった血液及び粘液の存在により、顕在化される。臨床的には、血液及び粘液の混ざった下痢の存在は、潰瘍性大腸炎を、その中に血液が存在しない過敏性腸症候群から識別する。潰瘍性大腸炎とは異なり、クローン病の描写は通常微妙であり、このことは診断の遅れにつながる。関与の位置、程度、及び重症度などの要因は、胃腸症状の程度を決定する。回腸結腸の関与を有する患者は、通常食後の腹痛を有し、右下腹部の及び時折炎症性腫瘍の圧痛を伴う。胃十二指腸クローン病に関連した症状は、早期の満腹感、悪心、嘔吐、上胃部痛、又は嚥下障害を含む。肛門皮膚垂(anal tags)、深い裂肛、及びフィステルを伴う肛門周囲疾患は、共通である(Hendricksonらの文献、2002、Clin Microbiol Rev、15(1):79-94、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。

【0167】

これらの疾患において、TNF- α は、胃腸上皮の下層である固有層において生成される。この上皮は、IBDにおいて破壊され、且つこれらの疾患におけるTNF- α 生成及び生物学的作用の部位である固有層への、免疫グロブリン鎖可変ドメインの輸送を促進する(実施例8参照)。GITの他の疾患は、例えば、炎症性疾患の粘膜炎(好適には薬物-及び放射線が誘発した-粘膜炎)を含み、ここで炎症病巣は粘膜内に存在し、これは上皮の密着結合を破壊し、同じくTNF- α 生成部位への免疫グロブリン鎖可変ドメインの接近を可能にする。粘膜炎において、病巣は、口から肛門までのどこかで発生し、並びに口及び食道病巣に関しては、本可変ドメインを含有する含嗽剤又はクリーム調製品を使用することができる。肛門及び直腸病巣に関しては、本可変ドメインを含有する坐薬、クリーム又は泡剤が、局所適用に適しているであろう。免疫グロブリン鎖可変ドメインは、炎症部位での血流への吸収を介して、又はリンパ球クリアランスとそれに続く血流への侵入を介して、固有層又は他の炎症部位からクリアランスされるであろう。結果的にこれらのドメインは、血流により肝臓へ到達し、且つ腎臓における糸球体濾過によりクリアランスされるであろう。従って、これらのドメインは、自己免疫性肝炎、2型糖尿病及び糸球体腎炎などの疾患において治療的に機能することの、良い論理的裏付けが存在する。

【0168】

好適には、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、TNF- α がかかる疾患の病理に寄与する、GI(胃腸)管の自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療に使用される。

【0169】

好適には、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸疾患、II型糖尿病、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、シェーグレン症候群、セリアック病及び薬物-又は放射線-誘発した粘膜炎からなるリストから選択される、GI管の自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患(最も好適にはクローン病)の治療に使用される。

【0170】

免疫グロブリン鎖可変ドメインの経口送達は、TNF- α が少なくともある割合病理に寄与し、並びに免疫グロブリン鎖可変ドメインが、TNF- α が生物学的に活性である組織に接近することができる炎症性疾患を、理想的に治療するであろう。

【0171】

(皮膚の自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患)

乾癬は、弱体化させる自己免疫皮膚疾患である。本疾患の最も一般的形である尋常性乾癬は、銀色の鱗屑により覆われた紅色皮膚により特徴付けられる。組織学的に、その画像は、炎症細胞浸潤を伴う乾癬プラーク内のケラチノサイトの無秩序な分化及び過増殖のものである(Ortonneの文献、1999、Brit J Dermatol、140(suppl 54):1-7)。乾癬の皮膚病巣は、特徴的な銀色の光沢のある落屑を伴う様々な形状の炎症性の赤色の鋭く区切られたプラークである。用語乾癬は、乾癬、並びに紅斑、皮膚肥厚／隆起及び落屑を含む乾癬の症状を含む。

10

【0172】

乾癬治療において使用する生物学的物質は、抗-TNF- α 療法(TNFに対するモノクローナル抗体、例えばアダリムマブ及びインフリキシマブ、又はTNF- α 受容体融合タンパク質、例えばエタネルセプトなど)、CD11aに対するヒト化抗体(エファリズマブ)又はアレファセプトなどのCD2に結合する物質(これによりCD2 LFA3相互作用を遮断する)を含む。ここに列挙された生物学的物質の全てが乾癬治療における使用に承認されているのではないことは、留意されるべきである。

20

【0173】

本発明のポリペプチドは、TNF- α がかかる病巣の病理に寄与している炎症性皮膚病巣に投与するために、クリーム／軟膏、又は他の局所用担体に、混入されてよい。

【0174】

好適には、本発明のポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、天疱瘡、乾癬、湿疹及び強皮症からなるリストから選択された、皮膚の自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療において使用される。

【0175】

好適には、本ポリペプチド、医薬組成物又は構築体は、TNF- α が観察された病理のある割合の原因である、他の自己免疫／炎症性疾患の治療において使用される。

30

【0176】

(調製方法)

本発明のポリペプチドは、例えば、Green及びSambrookの文献、2012、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第4版、Cold Spring Harbour Laboratory Press社に明らかにされた技術を使用し、入手及び操作することができる。

【0177】

モノクローナル抗体は、特異的抗体-産生B細胞を、組織培養においてそれが成長する能力について及び抗体鎖合成の非存在について選択される骨髓腫(B細胞癌)細胞と融合することによる、ハイブリドーマ技術を用いて、作製することができる(Kohler及びMilsteinの文献、1975、Nature、256:495-497、並びにNelsonらの文献、2000、Molecular Pathology、53(3):111-117、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。

40

【0178】

決定された抗原に対するモノクローナル抗体は、例えば：

a)ハイブリドーマを形成するために、不死化細胞を用いて、及び好ましくは骨髓腫細胞を用いて、決定された抗原により先に免疫化された動物の末梢血から得られたリンパ球を不死化すること；

b)形成された不死化細胞(ハイブリドーマ)を培養し、且つ所望の特異性を有する抗体を産生する細胞を回収すること；

により得ることができる。

50

【0179】

あるいは、ハイブリドーマ細胞の使用は、不要である。従ってモノクローナル抗体は：
a)ベクターへ、特にファージへ、より特定すると繊維状バクテリオファージへ、(好適には決定された抗原により先に免疫化された)動物のリンパ球、特に末梢血リンパ球から得られたDNA又はcDNA配列を、クローニングする工程；

b)先のベクターにより、原核細胞を、抗体産生を可能にする条件で、形質転換する工程；

c)抗原-親和性選択にそれらを供することにより、抗体を選択する工程；

d)所望の特異性を有する抗体を回収する工程；

を含むプロセスにより得ることができる。

10

【0180】

ラクダ科の動物を免疫化し、血液中を循環するB細胞のVHHレパトアをクローニングし(C homezynski及びSacchiの文献、1987、Anal Biochem、162:156-159)、並びに抗原-特異性VHHを、ファージ、酵母、又はリボソームディスプレイを使用し、免疫ライブラリー(Arba bi-Ghahroudiらの文献、1997、FEBS Lett、414:521-526)及び非免疫ライブラリー(Tanha らの文献、2002、J Immunol Methods、263:97-109)から単離する方法は、公知である(W09 2/01047、Nguyenらの文献、2001、Adv Immunol、79:261-296、及びHarmsenらの文献、200 7、Appl Microbiol Biotechnol、77(1):13-22)。これらの参考文献は、それらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

【0181】

20

scFv断片及びFv断片などの、抗体の抗原-結合断片は、大腸菌において単離し発現することができる(Mietheらの文献、2013、J Biotech、163(2):105-111、Skerraらの文献、19 88、Science、240(4855):1038-1041、及びWardらの文献、Nature、1989 341:544-546、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。

【0182】

ポリペプチドのアミノ酸配列についてはサイレントであるが、特定の宿主における翻訳に対し好ましいコドンを生じる変異を、該ポリペプチドをコードするDNA又はcDNAに入れることができる。例えば大腸菌及び出芽酵母(S. cerevisiae)における核酸の翻訳に好ましいコドンは、わかっている。

【0183】

30

ポリペプチドの変異は、例えば、このポリペプチドをコードしている核酸への置換、付加又は欠失により達成することができる。ポリペプチドをコードしている核酸への置換、付加又は欠失は、例えば、エラープローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド-指向した変異誘発、アセンブリーPCR、PCR変異誘発、インビボ変異誘発、カセット変異誘発、繰り返しアンサンブル変異誘発、指数的アンサンブル変異誘発、部位指定変異誘発(Lin gらの文献、1997、Anal Biochem、254(2):157-178、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)、遺伝子再構成、遺伝子部位飽和変異誘発(GSSM)、合成ライゲーション再構成(SLR)を含む多くの方法又はこれらの方法の組合せにより、導入することができる。核酸の修飾、付加又は欠失はまた、組換え、繰り返し配列組換え、ホスホチオエート-修飾されたDNA変異誘発、ウラシル-含有鋳型変異誘発、ギャップ付き二重鎖変異誘発、点ミスマッチ修復変異誘発、修復-欠損宿主株変異誘発、化学変異誘発、放射原性(radiog enic)変異誘発、欠失変異誘発、制限-選択変異誘発、制限-精製変異誘発、アンサンブル変異誘発、キメラ核酸多量体生成、又はそれらの組合せを含む方法により、導入することができる。

40

【0184】

特に、人工遺伝子合成を使用してよい(Nambiarらの文献、1984、Science、223:1299-13 01、Sakamar及びKhoranaの文献、1988、Nucl. Acids Res、14:6361-6372、Wellsらの文献、1985、Gene、34:315-323、並びにGrundstromらの文献、1985、Nucl. Acids Res、13:33 05-3316、これらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。本発明のポリペプチドをコードしている遺伝子は、例えば、固相DNA合成により、合成的に生成することが

50

できる。全体の遺伝子は、前駆体鋳型DNAを必要とせずに、新規に合成されてよい。所望のオリゴヌクレオチドを得るために、ビルディングブロックは、その生成物の配列により必要とされる順番で、成長するオリゴヌクレオチド鎖へ、逐次カップリングされる。鎖集成の完了時に、生成物は、固相から溶液へと放出され、脱保護され、収集される。生成物は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により単離され、所望のオリゴヌクレオチドを高純度で得ることができる(Verma及びEcksteinの文献、1998、Annu Rev Biochem、67:99-134)。

【0185】

VH及びVHHなどの免疫グロブリン鎖可変ドメインの発現は、例えば大腸菌などの細菌のような、原核細胞などの好適な発現ベクターを用い、達成することができる(例えば、引用により本明細書中に組み込まれ、且つ以下に更に詳述される、W094/04678に開示されたプロトコルに従う)。VH及びVHHなどの免疫グロブリン鎖可変ドメインの発現はまた、真核細胞、例えば昆虫細胞、CHO細胞、Vero細胞など、又は好適にはアスペルギルス属、サッカロミセス属、クルイベロミセス属、ハンゼヌラ属又はピキア属に属する酵母などの酵母細胞を使用し、達成することもできる。好適には、出芽酵母が使用される(例えば、引用により本明細書中に組み込まれ、且つ以下に更に詳述される、W094/025591に開示されたプロトコルに従う)。

【0186】

具体的には、VHHは、以下の工程を含むプロセスにより、大腸菌細胞を使用し、W094/04678において開示された方法に従い、調製することができる：

a) Bluescriptベクター(Agilent Technologies社)内で、任意にHis-タグを含む、(例えば、ラクダ科の動物のリンパ球から得られるか又は合成的に生成される)VHHをコードしているDNA又はcDNA配列をクローニングする工程；

b) XhoI部位を含むVHHに特異的な5'プライマー、及び配列

【化1】

TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG (配列番号: 58)

を有する、SpeI部位を含む3'プライマーを使用する増幅後に、クローニングされた断片を回収する工程；

c) XhoI及びSpeI制限酵素によるベクターの消化後、Immuno PBSベクター(Huseらの文献、1989、Science、246 (4935):1275-1281、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)において、同相で(in phase)回収された断片をクローニングする工程；

d) 工程(c)の組換えImmuno PBSベクターでのトランスフェクションにより、宿主細胞、特に大腸菌を、形質転換する工程；

e) 例えば、プロテインA、陽イオン交換、又はVHHがHis-タグを含む場合ニッケル-親和性樹脂を使用するカラム上のクロマトグラフィーによるようなアフィニティ精製により、VHHコード配列の発現産物を回収する工程。

【0187】

あるいは、VH及びVHHなどの免疫グロブリン鎖可変ドメインは、下記工程を含むプロセスにより得られる：

a) 決定された特異的抗原結合部位を有する、VHHをコードしているDNA又はcDNA配列を得る工程；

b) 得られたDNA又はcDNAを、開始コドン及びHindIII部位を含む5'プライマー、並びにXhoI部位を有する停止コドンを含む3'プライマーを用いて、増幅する工程；

c) 増幅されたDNA又はcDNAを、プラスミドpMM984のHindIII部位(位置2650)及びXhoI部位(位置4067)へ、組換える工程(Merchinskyらの文献、1983、J. Virol.、47:227-232、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)；

d) 許容細胞、特にNB-E細胞(Faisstらの文献、1995、J Virol、69:4538-4543、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)を、組換えプラスミドによりトランスフェクションする工程；

e)得られた生成物を回収する工程。

【0188】

更に、VHH又はVHなどの免疫グロブリン鎖可変ドメインは、下記のように、Frenkenらの文献、2000、J Biotech、78:11-21及びW099/23221(それらの全体は引用により本明細書中に組み込まれている)に開示された方法に従い、大腸菌又は出芽酵母を使用し、生成することができる：

免疫化したラマから血液試料を採取し、フィコール(水性溶液中に容易に溶解する中性の高度に分枝した高質量の親水性多糖—Pharmacia社)不連続勾配遠心分離により、リンパ球集団を濃厚化し、酸性チオシアン酸グアニジウム抽出により全RNAを単離し(Chomezynnski及びSacchiの文献、1987、Anal Biochem、162:156-159)により、並びに第一鎖cDNA合成(例えば、RPN 1266(Amersham社)などの、cDNAキットを使用する)した後、VHH及びVH断片をコードしているDNA断片並びに短又は長ヒンジ領域の一部を、W099/23221の22及び23頁に詳述された特異的プライマーを用いるPCRにより増幅する。このPCR断片のPstI及びHindIII又はBstEIIによる消化時に、長さ約300～450bpのDNA断片は、アガロースゲル電気泳動により精製され、各々、大腸菌ファージミドベクターpUR4536又はエピソード性出芽酵母発現ベクターpUR4548へライゲーションされる。pUR4536は、pHENから誘導され(Hoogenboomらの文献、1991、Nucl Acid Res、19:4133-4137、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)、且つラマVHH及びVH遺伝子のクローニングを可能にするために、lacI^q遺伝子及び独自の制限部位を含む。pUR4548は、pSY1から誘導される(Harmsenらの文献、1993、Gene、125:115-123、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。このプラスミドから、leu2遺伝子内のBstEII部位は、PCRにより除去され、並びにSUC2シグナル配列とターミネーターの間のクローニング部位は、VH/VHH遺伝子断片のクローニングを促進するために、交換される。VH/VHHは、検出のために、C-末端にc-mycタグを有する。個別の大腸菌JM109コロニーは、1%グルコース及び100mg/Lアンピシリンを補充した2TY培地150mlを含む、96ウェルマイクロタイタープレートへ移される。一晚増殖させた後(37℃)、プレートを、100mg/Lアンピシリン及び0.1mM IPTGを含有する2TY培地中で、2つ組とする。更に一晚インキュベーションし、任意に凍結し、解凍した後、細胞を遠心分離し、ペレット化し、並びに上清をELISAにおいて使用することができる。個々の出芽酵母コロニーを、選択最小培地(必須アミノ酸及び塩基を補充した0.7%酵母窒素ベース、2%グルコースを含有)を含むテストチューブへ移し、且つ30℃で48時間増殖させる。引き続き、この培養物を、YPGal培地(1%酵母抽出物、2%バクトペプトン及び5%ガラクトース含有)中に10倍希釈する。24及び48時間増殖させた後、細胞をペレット化し、培養上清を、ELISAにおいて分析することができる。600nmでの吸光度(OD600)を、任意に測定する。

【0189】

更に、VH/VHHなどの免疫グロブリン鎖可変ドメインは、下記の手順を使用し、出芽酵母を用い、作製することができる：

VH/VHHをコードしている天然のDNA配列を単離するか、又は5' UTR、シグナル配列、終止コドンを含み、且つSacI及びHindIII部位と隣接した、合成的に生成されたVH/VHHをコードしているDNA配列(かかる合成配列は、先に概説されたように作製することができるか、又は例えば、Geneartなど商業的供給業者(Life Technologies社)から取り寄せてよい)を入手する。

【0190】

以下のように、VH/VHH遺伝子を、マルチコピー組込み(MCI)ベクターpUR8569又はpUR8542へ移すために、制限部位を使用する。25ulのVHH DNA(Geneartプラスミド又はMCIベクター)、1ulのSacI、1ulのHindIII、3ulのNEB緩衝液1(New England Biolabs社)などの二重消化のための好適な緩衝液：を使用し、任意にシャトルベクター、カセット又は他の合成遺伝子構築体内に含まれたVHHをコードしているDNA配列、並びにSacI及びHindIIIを伴うMCIベクターを、37℃で一晩、切断する。25ulの消化されたVHHをコードしているDNA及び25ulの消化されたMCIベクターを、1.5%アガロースゲル上を、1×TAE緩衝液により泳動させ、次にゲル抽出を、例えば、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen社)を用いて行う。消化された

MCIベクター及び消化されたVH/VHHをコードしているDNAのライゲーションの設定は、以下である：100ngベクター、30ng VHH遺伝子、1.5ul 10×リガーゼ緩衝液、1ul T4 DNAリガーゼ、及びddH₂O。次に、ライゲーションを、16℃で一晩行う。

【0191】

次に大腸菌細胞を形質転換する。化学コンピテントなXL-1ブルー細胞に関して、熱コンピテントなXL-1ブルー細胞200ulを解凍し、氷上で、5ulライゲーション混合物を約30分間添加し、その後42℃で90秒間熱ショック処理を施す。次に2%グルコースを補充したLuria-Bertani低塩培地800ulを添加し、細胞を37℃で2時間回復させる。細胞をLuria-Bertani寒天及びアンピシリン(100ug/ml)プレート上に播種し、37℃で一晩維持する。電気コンピテントなTG1大腸菌細胞に関して、電気穿孔キュベットを使用する。この電気穿孔キュベッ 10
ット中で：50ulの電気コンピテントなTG1細胞及び1ulライゲーション混合物を、氷上で、約15分間かけて解凍する。キュベットをホルダーに配置し、パルスをかける。2TY培地500ulを添加し、細胞を37℃で30分間回復させる。細胞100ulを、アンピシリン(100ug/ml)及び2%グルコースを含有するLuria-Bertani、寒天プレート上に播種する。プレートを37℃で一晩維持する。

【0192】

先に詳述したようにVH/VHH遺伝子が大腸菌にクローニングした後、出芽酵母は、線状化されたMCIベクターにより、形質転換することができる。形質転換が行われる前に、以下のいくつかの工程が実行される：(i)DNAは、消化により環状から線状へ変化されなければならない、そうでなければDNAは、酵母ゲノムへ組み込むことができない、並びに(ii)消化 20
されたDNAは、エタノール沈殿により、不純物が除去されなければならない。同じく、形質転換プロセス時に、酵母細胞は、半透過性とされ、その結果このDNAは膜を透過することができる。

【0193】

酵母形質転換のための調製：以下のように、VH/VHH遺伝子を発現している選択された大腸菌コロニーから調製されたミディプレップの、HpaI消化を行う。ミディプレップ20ng、HpaIの5ul、NEB4緩衝液(BioLabs社)などの好適な緩衝液10ul、及びddH₂Oを含有する溶液100ulを調製する。

【0194】

DNAを、HpaIにより、室温で一晩切断する。次に、エタノール沈殿を行う(及び、HpaI消化からの試料5ulを片側に配置する)。HpaI消化されたミディプレップ95ulへ、100%エタノール300ulを添加し、ボルテックスし、フルスピードで5分間回転させる。ペレットが存在する場合には、慎重にデカントし、70%エタノール100ulを添加し、次に再度フルスピードで5分間回転させる。再度試料をデカントし、ペレットが乾燥するまで、50~60℃で維持する。ペレットを、50ulのddH₂O中に再懸濁する。その5ulを、5ulのHpaI消化された試料と並べて、ゲル上を泳動させる。 30

【0195】

酵母の形質転換：YNBgluプレートの調製。寒天10g+水(滅菌済み)425ml、濾過した20×YNB(25mlの滅菌したH₂O中の3.35gのYNB(酵母窒素ベース)中)の25ml及び滅菌20%グルコース50mlを使用し、ペトリ皿へ注ぐ。マスタープレートから1つの酵母コロニーを採取し、3 40
mlのYPD(酵母抽出ペプトンデキストロース)中で、30℃で一晩増殖させる。翌日、約600mlのYPDを調製し、3個のフラスコを275ml、225ml及び100mlのYPDで充填するのに使用する。27.5ulの酵母YPD培養物を、第一のフラスコに添加し、穏やかに混合する。第一のフラスコから75mlを採取し、これを第二のフラスコに入れ、穏やかに混合する。第二のフラスコから100mlを採取し、第三のフラスコに入れ、穏やかに混合する。OD660が1~2の間に達するまで、増殖させる。このODに到達したフラスコの中身を、4つのFalconチューブへ、各々、±45mlで分ける。4200rpmで2分間回転させる。上清を廃棄する。2個のFalconチューブ内のペレットを、45mlのH₂O中に溶解する(チューブの数は、4個から2個へ減少する)。4 200rpmで2分間回転させる。ペレットを、45mlのH₂Oで溶解する(チューブ2個から1個へ)。4200rpmで2分間回転させる。ペレットを、5mlの酢酸リチウム(LiAc)(100mM)中に穏やかに 50

溶解させ、数秒間回転させる。一部のLiAcを慎重に廃棄するが、チューブ内のLiAcの半量以上は保持する。細胞をボルテックスし、キャリアDNAを5分間煮沸し、氷水中で急冷する。240ulのPEG、50ulの細胞、36uのLiAc(1M)、25ulのキャリアDNA、45ulのエタノール沈殿したVH/VHHを含有する15mlチューブへ、添加する。各工程後、穏やかに混合する(ブランク試料は、エタノール沈殿したVH/VHHを除くのみで、同様に処理する)。30℃で30分間インキュベーションし、チューブを3~4回穏やかに反転させ、その後42℃で20~25分間、熱ショック処理を施す。短時間最大6000rpmで回転させる。上清を穏やかに除去し、250ulのddH₂Oを加え、混合する。プレートが乾燥するまで、これを全て、YNBgluプレート上を画線させ、30℃で4~5日間成長させる。最後に、プレートを6つの同等部分に分割することによりYNBgluプレートを調製し、部分1から6と番号付けし、最大コロニーを接種し、番号1を画線する。1から6へ、大きいものから小さいものへと、他のコロニーについて繰り返す。大きいコロニーが生成されるまで、30℃で3~4日間増殖させる。VH/VHHクローンは、炭素給源としてグルコースを用いて、増殖させ、並びにVH/VHH発現の誘導は、0.5%ガラクトースの添加による、ガラクトース-7-プロモーターの刺激(turning on)により行う。3mLの小規模培養を行ってコロニーを試験し、VH又はVHHの最良の発現を示すものを選択する。次にこのコロニーを、精製に使用する。

【0196】

精製：VH/VHHは、強力な陰イオン樹脂(Capto Sなど)による陽イオン交換クロマトグラフィーにより、精製する。1日目に、VH/VHHを発現している選択された酵母コロニーを、5mlのYPD培地(YP培地+2%グルコース)中に接種し、25mLの密封した滅菌チューブ内で細胞を、30℃で一晩(180rpmで振盪しながら)増殖させる。2日目に、5mlの一晩培養物を、50mLの新たに調製したYP培地+2%グルコース+0.5%ガラクトース中に希釈し、この細胞を、250mlの曝気したバッフル付きフラスコ中で、30℃で、二晩増殖させる(180rpmで振盪しながら)。4日目に、4200rpmで20分間の遠心分離により回転し、細胞を沈降させる。強力な陰イオン樹脂を使用する陽イオン交換精製工程：リガンドを含有する上清のpHを、3.5に調節する。上清50mLにつき樹脂0.75ml(±0.5mLスラリー)を、50mLのddH₂Oにより洗浄し、引き続き結合緩衝液により3回洗浄する。洗浄した樹脂を上清へ添加し、この懸濁液を振盪機上で4℃で1.5時間インキュベーションする。樹脂-結合したVH/VHHを、500gで2分間の遠心分離により、ペレット化し、これを洗浄緩衝液で洗浄する。上清をデカントし、結合緩衝液10mLにより、樹脂を再懸濁する。PD-10カラム中にフィルターを配置し、樹脂をカラムへ注ぎ、しばらく樹脂を沈降させ、次に樹脂の上にフィルターを加える。全ての結合緩衝液が流れ出すまで、待機する。VH/VHHを、6×0.5ml溶離緩衝液で溶離させる。溶離画分をエッペンドルフチューブ内に収集する。Nanodropにより、6つの溶離した画分のタンパク質濃度を測定する。VHHを含む画分をプールし、この溶液を、カットオフ値3,500Daの透析膜へ移す。精製されたタンパク質溶液を、3LのPBSに対し、4℃で一晩透析する。5日目に、精製したタンパク質溶液を、2Lの新鮮なPBSに対し、4℃で更に2時間透析する。最後に、BCAにより最終濃度を計算する。

【0197】

VH/VHHの状況において考察したが、先に説明した技術は、必要に応じ、scFv、Fab、Fv及び他の抗体断片のために使用することもできる。

【0198】

複数の抗原-結合断片(好適にはVH/VHH)は、Blattlerらの文献、Biochemistry、24:1517-1524(その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)に説明されたように、有機誘導体化剤とアミノ酸残基を反応することによる、化学架橋により融合することができる。あるいは、抗原-結合断片は、DNAレベルで遺伝学的に融合されてもよく、すなわち1種以上の抗原-結合断片を含む完全なポリペプチド構築体をコードしているポリヌクレオチド構築体が、形成されてもよい。遺伝学的経路を介して複数の抗原-結合断片を連結する一つの方式は、直接又はペプチドリinkerを介してのいずれかの、抗原-結合断片をコードしている配列の繋ぎによるものである。例えば、第一の抗原-結合断片のカルボキシ-末端は、次の抗原-結合断片のアミノ-末端に繋がれてよい。この繋ぐ様式は、トリ-、テト

10

20

30

40

50

ラ-などの機能性構築体の構築のために、抗原-結合断片を繋ぐべく、拡大され得る。多価の(二価などの)VHHポリペプチド構築体を作製する方法は、WO 96/34103(その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)に開示されている。

【0199】

好適には、本発明のポリペプチド(特に、本発明のVHH)は、W002/48382に開示された方法に従い、酵母(例えば出芽酵母)などの真菌において、生成されることができ、これは炭素給源を含有する培地上での真菌の増殖を含み、ここで該炭素給源の50~100wt%はエタノールである。出芽酵母におけるVHH断片の大規模生成は、Thomassenらの文献、2002、Enzyme and Micro Tech、30:273-278(その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)に説明されている。

10

【0200】

本発明の一態様において、下記の工程を含む、本発明のポリペプチド又は構築体を調製するプロセスが提供される：

- i)本発明のポリヌクレオチドを、プラスミドなどのベクターへクローニングする工程；
- ii)該ベクターにより、本発明のポリペプチド又は構築体の生成が可能である、細菌細胞又は酵母細胞などの細胞を、ポリペプチド又は構築体の生成を可能にする条件下で、形質転換する工程；
- iii)アフィニティクロマトグラフィーなどにより、ポリペプチド又は構築体を回収する工程。

【0201】

本発明を、ここで以下の非限定的実施例により、更に説明する。

20

【実施例】

【0202】

(実施例)

(実施例1：ラマ免疫化、ファージディスプレイ、免疫グロブリン鎖可変ドメインの選択及び増殖)

(1.1 免疫化プロトコール1)

最初に、2頭のラマ(ラマ33及びラマ35)は、各々可溶性ヒト組換えTNF- α の3回注射(0、14及び28日目)を受け取り(Stimuneアジュバントと1:1混合後、100ugを筋肉内注射した)、引き続き膜TNF- α 発現を増大するために細菌リポ多糖とのインキュベーションにより予め活性化されているTHP-1細胞の2回注射(56及び70日目)を受け取った(1ml PBS中の 10^7 個THP-1細胞を皮下注射した)。可溶性TNF- α 及び活性化されたTHP-1細胞の両方による最終の追加免疫を、84日目に与え、その9日後に、末梢血リンパ球の単離及びライブラリー構築用のRNAの抽出のために、血液を採取した。

30

【0203】

(1.2 免疫化プロトコール2)

4ヶ月間休息させた後、これらのラマを、非-切断性膜貫通型ヒトTNF- α を発現するように操作されているCHO Flp-In細胞の、1週間空けた2回の注射により、再免疫化した。末梢血リンパ球の単離及びライブラリー構築用のRNA抽出のために、血液を2週間後に採取した。免疫化に対する血清免疫応答を、プレートELISAフォーマット並びにウサギポリクローナル抗-可変ドメイン血清及びセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合されたロバ抗-ウサギIgGによる検出を用い、固定化したヒトTNF- α への重鎖のみの抗体の結合を測定することにより、いくつかの時点で、各ラマについて評価した。得られた力価決定曲線は、各ラマは、初回ラウンドの免疫化に反応し、高力価のTNF- α -結合IgG重鎖抗体を生じたことを示した。両方の動物について若干低下したものの、第2ラウンドの免疫化後の上昇した血清の抗体力価もまた、注目された。

40

【0204】

(1.3 ファージライブラリー構築)

各免疫化相の最後に各ラマから収集した血液細胞を使用し、4つの個別のファージディスプレイライブラリー(#33、#35、#33NEW及び#35NEW)を作製した。全RNAを、免疫化され

50

たラマ(ラマ33及び35)の各々から単離した末梢血リンパ球から抽出した。次にこれらのRNAを使用し、逆転写酵素及びプライマー又はランダム八量体オリゴヌクレオチドを用い、cDNAを作製した。次に好適なプライマーを用いてPCRを行い、重鎖のみの抗体の可変ドメイン領域を特異的に増幅した。この可変ドメインレパトアをコードしているcDNA断片を、ファージミドベクターへクローニングし、且つこのライブラリーを大腸菌に導入した。ファージを、グルコース及びアンピシリンを含有する培地50ml中のグリセロールストックからの40ul及び51ulの各々の接種により、これらのライブラリーを含む細菌からレスキューした。培養物が対数相の時点で、ヘルパーファージを添加し、培養物を感染させ、ファージを作製した。翌日、作製されたファージを、PEG/NaCl溶液を用い、培養上清から沈殿させた。ファージの数は、溶液の力価決定並びに異なるファージ希釈物による対数相大腸菌TG1の感染により決定した。依然コロニー形成を生じている最高希釈を使用し、ファージ力価を計算した。sTNF- α の選択のために、滅菌96-ウェル(Maxisorpなど)プレートを、1000、250もしくは63ng/ウェル又はPBSのみのいずれかにより、一晚4°Cでコートした。翌日、プレートのウェルを、PBS中の4%Marvelによりブロッキングし、その後2%marvel/PBSと予めインキュベーションした沈殿したファージを、これらのウェルへ添加した。PBS-Tween及びPBSで十分洗浄した後、結合したファージを、アルカリpHショック(0.1Mトリエチルアミン)で15分間及び1Mトリス-HCl pH7.5による中和(総溶離)を用いるか、あるいは10倍過剰なTNF受容体を2時間使用する競合溶離のいずれかで、溶離した。溶離したファージの数は、異なるウェル由来の溶離液の力価決定、引き続き対数相大腸菌TG1への感染により、決定した。溶離したファージのほぼ半分は、対数相TG1で感染させ、且つアンピシリン及びグルコース含有培地において選択することにより、レスキューした。

10

20

【0205】

(1.4 ヒト及びカニクイザルTNF- α 結合活性を持つファージに関するライブラリー選択)

TNF- α アンタゴニスト活性を持つ可変ドメインを、ファージのヒトTNF- α への結合、それに続く過剰な可溶性TNFR2-Fc融合タンパク質(エタネルセプト)によるTNF- α -特異的可変ドメインの溶離によるか、又はバッチ溶離により、4つのファージディスプレイライブラリーから単離した。その後選択の第二ラウンドを、溶離したヒトTNF- α 特異的ファージのカニクイザルTNF- α への結合により行い、異種間TNF- α 結合活性を持つ可変ドメインのプールを、得ることができた。

30

【0206】

(1.4.1 ヒトTNF- α 結合活性を持つ可変ドメインをディスプレイしているファージの第一ラウンドライブラリー選択)

ファージライブラリーは、免疫化の各ステージについて、ラマ33及びラマ35に由来した(第一ステージ免疫化：ライブラリー#33及びライブラリー#35；第二ステージ免疫化：ライブラリー#33NEW及びライブラリー#35NEW)。選択の第一ラウンドは、ヒトTNF- α についての受け皿法(panning)により、TNF- α -結合活性を持つ可変ドメインをディスプレイしているファージを単離するために行った。

【0207】

可溶性組換えヒトTNF- α (1000、250又は63ng/ウェル)を、親水性処理されたポリプロピレンマイクロウェル(HPM)プレート(例えばNunc maxisorp)のウェル上に直接コートし、且つファージを付着させた。十分に洗浄した後、結合したファージを、(i)アルカリpHショックによる非-選択的溶離、又は(ii)TNFR2-Fc(エタネルセプト100、25及び6.3ug/ml、2時間)の添加による、TNF- α -結合したファージの選択的置き換えのいずれかを用いて、収集した。

40

【0208】

ライブラリー#33及びライブラリー#35— 対照ウェル(無TNF- α 及びPBS対照)から溶離したファージの数は、低く、並びに両方のライブラリーについて、前記溶離法のいずれかを用い、TNF- α で予備-コートされたウェルから溶離したファージの濃度-関連した濃厚化が存在した。全般的に、第一ラウンド選択で達成されたTNF-結合ファージの濃厚化は、ラ

50

イブラリー#33及び#35の両方について、約100倍であった。

【0209】

ライブラリー#33NEW及びライブラリー#35NEW－再-免疫化したラマから調製したライブラリー選択の第一ラウンドから回収したクローンの数は、低いことがわかった。これは、mTNF- α -CHO細胞に対するラマの比較的低い免疫応答(合計で比較的低い数のTNF- α -反応性クローン)、又はこの反応はmTNF- α 反応性クローンの作製につながるが、これらの限定された数のみが、可溶性TNF- α と交差反応したことを反映している。1000ng/mlヒトTNF- α でコートされたウェルからのTNFR2-Fc(エタネルセプト)による第一ラウンド選択において溶離したファージは、およそ 2×10^{12} ファージ/mlの力価の懸濁液を生じるように増殖された。

10

【0210】

(1.4.2 ヒト及びカニクイザルTNF- α 結合活性を持つ免疫グロブリン鎖可変ドメインをディスプレイしているファージの第二ラウンド選択)

(ライブラリー#33及びライブラリー#35)－第二ラウンド選択は、HPMプレートのウェル表面上に予め吸着させた可溶性ヒト又はカニクイザルTNF- α (500、125もしくは31ng/ウェル又はPBS)への、選択されたファージの付着により行った。ヒトTNF- α に結合したファージは、可溶性TNFR2-Fc(各々、50、12.5及び3.1 μ g/ml)により溶離したのに対し、カニクイザルTNF- α に結合したファージは、アルカリpHショックを用いて、溶離した。カニクイザルTNF- α に関する選択からの回収は、ヒトTNF- α に関する回収よりも低く、これは恐らく両方のライブラリーにおけるヒト及びカニクイザルの両TNF- α と交差反応性である可変ドメインを発現しているファージの頻度の低さのためであろう。

20

【0211】

(ライブラリー#33NEW及びライブラリー#35NEW)－第二ラウンド選択は、HPMプレートのウェル表面上に予め吸着させた可溶性カニクイザルTNF- α (1000、250もしくは63ng/ウェル又はPBS)への、選択されたファージの付着により、行った。結合したファージは、アルカリpHショックを用いて溶離した。

【0212】

(実施例2：無作為に選択した免疫グロブリン鎖可変ドメインクローン由来のペリプラズム上清のプライマリー評価)

(2.1 プライマリー評価のためのペリプラズム抽出物の増殖及び生成)

30

ヒトTNF- α についての第一ラウンド選択及びカニクイザルTNF- α についての第二ラウンド選択からの溶離液中に存在するファージを使用し、大腸菌TG1細胞に感染させた。コロニーを無作為に採取し(ライブラリー#33及び#35から186クローンをマスタープレートM60-M63へ；ライブラリー#33NEW及びライブラリー#35NEWから96クローンをマスタープレートM65へ)、並びに増殖させ、連続遠心分離、1 $\times$ PBS中の再懸濁、凍結解凍破碎、及び増殖された培養物の遠心分離により、ペリプラズム上清を作製した(M60-63及びM65はまた、各々、「MP60-63」及び「MP65」とも称され；ペリプラズム上清は、ペリプラズム画分(PF)又は抽出物とも称される)。

【0213】

ペリプラズム抽出物をスクリーニングし、それらの(i)プレートELISAにおける可溶性ヒトTNF- α のTNFR2-Fcへの結合を阻害する能力、及び(ii)固定濃度L929アッセイにおけるTNF- α -誘導した細胞傷害性を中和する能力について試験した。L929アッセイにおいて、TNF- α (0.5ng/ml)の細胞傷害作用は、TNFR1により媒介されると考えられ、そのためTNF- α -TNFR2-結合アッセイ及びL929アッセイの両方において阻害活性を持つ可変ドメインは、いずれかの受容体を介して媒介されたTNF- α -反応を抑制すると予想される。

40

【0214】

(2.2.1 TNF- α -結合活性及び中和活性の評価(マスタープレートM60-M63))

L929細胞傷害性アッセイ及びELISAアッセイを、ライブラリー#33及びライブラリー#35から選択されたクローンから得られた186ペリプラズム画分全てについて行った。これらのクローンは、4つのマスタープレートM60、M61、M62及びM63の上に配置し、ペリプラズ

50

ム画分を、これらのマスタープレートから作製した。M60-61は、ライブラリー#33及び#35から無作為に採取したクローンを含んだ。M62-63は、以下のように選択の2連続工程を行った後に、同じライブラリーから選択したクローンを含んだ：(i)10ug/mL hsTNF- α 及び溶離のためのエタネルセプト；(ii)hsTNF- α (5ug/mL及び0.3ug/mL)又はカニクイザルsTNF- α (5ug/mL及び0.3ug/mL)、それに続くエタネルセプトによる選択的溶離又はトリエチルアミンによる完全溶離のいずれか。186の全てのPFを、レサズリンを使用する濃度－非依存型L929細胞傷害性アッセイにより分析した。

【0215】

(2.2.2 ELISAによるペリプラズム上清のスクリーニング(マスタープレートM60-63))

スクリーニングに使用したTNF- α 濃度は、1.25ng/mlであった。ペリプラズム上清は、1 %BSA中、1/20希釈(M60及びM61)又は1/10希釈(M62及びM63)で分析した。TNF- α 及びペリプラズム上清を、アッセイ濃度の2倍で作製し、その後1:1で混合した。3つ組決定を、各上清について実行した。加えて、アダリムマブ10nMを、陽性中和抗体対照として使用した。各ELISAプレート上には、限定されたTNF- α 用量－反応(0～5ng/ml)も、組み込んだ。ペリプラズム上清の分析のためのELISAプレートは、0.7ug/ml、50ul/ウェルのエタネルセプトにより、一晚、コートした。洗浄及びブロッキング後、TNF- α 上清混合物を添加し、2時間インキュベーションした。ELISAは、ビオチン化されたポリクローナルウサギ抗-ヒトTNF- α 抗体、例えばBAF210(R&D Systems社)を0.2ug/mlで、その後mAvidin-HRP、次にTMBを用いて、呈色した。

【0216】

M60又はM61上のクローンはいずれも、有意なTNF- α 中和活性を有さなかった(全てのクローンは、10%位又はそれ未満のTNF- α 中和を示した)。対照的に、アダリムマブは、それが含まれた全てのプレート上のELISAにおいてほぼ完全な阻害を生じた。M62(ライブラリー33由来)上のクローンの多くは、良好なTNF- α 中和を示した(11クローンは、90%以上の中和を達成し、45クローンは、50%以上の中和を達成した)。ごくわずかな良好な中和クローンはまた、M63(ライブラリー35由来)上にも認められたが、その数は、選択法が同一であっても、M62よりもはるかに少なかった(2クローンは、90%以上の中和を達成し、7クローンは、50%以上の中和を達成した)。

【0217】

(2.2.3 固定濃度L929細胞傷害性アッセイによるペリプラズム上清(PS)のスクリーニング(マスタープレートM60-M63))

(材料)

- －L929細胞(10000個細胞/ウェル)
- －アッセイのためのヒトTNF- α の固定濃度：500pg/ml
- －アクチノマイシンD濃度：0.75ug/mL
- －アッセイにおいて希釈されたマスタープレートM60-M63由来のPS：1：10
- －陽性対照としての純粋な抗-TNF- α VHH：最終濃度250nM
- －ヒトTNF- α 短い用量－反応曲線：500、125、31.25、7.8pg/ml
- －インキュベーション時間：24時間
- －レサズリン細胞生存試薬

【0218】

(方法)

100ul中の10000個細胞/ウェルを、0日目に、96-ウェルマイクロプレート中のDMEM完全培地中に播種し、37°C、5%CO₂で、一晚インキュベーションした。1日目に、希釈プレートを設定し(各点で3つ組に十分な容積で)、加えて各プレートは対照として以下を含んだ：

1. DMEM完全+0.01%Triton X-100
2. DMEM完全+0.75ug/mLアクチノマイシンD
3. TNF- α 用量－反応曲線+0.75ug/mLアクチノマイシンD。

【0219】

培地を、マイクロプレートの各ウェルから除去し、細胞を、hTNF- α 500pg/mL+0.75ug/mLアクチノマイシンD+PS(1:10)を含有するDMEM完全100ul、又は異なる対照100ulと共にインキュベーションした。37℃、5%CO₂で24時間インキュベーションした後、レサズリン10ulを各ウェルへ添加し、細胞を、37℃、5%CO₂で2時間インキュベーションした。3%SDSの50ulを引き続き各ウェルへ添加した。次にプレートを、蛍光プレートリーダー上、励起(Ex)544nm/放出(Em)590nmで測定した。

【0220】

(結果)

M60-61のペリプラズム上清は、ヒトTNF- α に対するL929細胞上の保護作用を示さなかった。陽性対照は、TNF- α の作用に対する保護を示したが、無関係のVHHは示さなかった。M62-63の選択されたクローンからの複数のペリプラズム上清は、TNF- α に対するL929細胞上の保護作用を示した(107クローンは、50%以上の生存を達成した)。陽性対照は、TNF- α 中和を示したが(100%以上)、無関係のVHHは、10%未満のTNF- α 中和を示した。

【0221】

(2.3 TNF- α 結合活性及び中和活性の評価(マスタープレートM65))

ELISA及びL929細胞傷害性アッセイを、他に言及しない限りは、M60-M63について先に説明したものと同一様式で、M65について行った。

【0222】

(2.3.1 ELISAによるペリプラズム上清のスクリーニング(マスタープレートM65))

TNF- α 特異的可変ドメインクローンのM65のペリプラズム上清(合計96)を、解凍直後及び37℃で18時間インキュベーション後の両方で、ELISAによりTNFR-2-TNF- α 結合の阻害について分析した。

【0223】

ELISAプレートは、2ug/ml、50ul/ウェルのエタネルセプトにより、4℃で一晩コートし、洗浄し、その後TNF- α -可変ドメイン混合物とのインキュベーションのために、調製品中でブロッキングした。アダリムマブを、陽性対照として、10nMで使用した。抗-TNF- α 可変ドメインペリプラズム上清は、最初に1%BSA中に1:10希釈し、次に2.5ng/mlのTNF- α と1:1で混合し、ELISAプレートに添加した。ELISAの後続のプロセスは、M60-63に関して先に説明したプロトコールに従った。

【0224】

28の上清は、TNF- α 結合の80%を超える阻害を生じ、その中の18は、37℃でのインキュベーション後に、阻害活性のほとんど又は全てを保持した。

【0225】

(2.3.2 L929細胞傷害性アッセイによるペリプラズム上清のスクリーニング(マスタープレートM65))

L929細胞傷害性アッセイを、2種のファージディスプレイライブラリーから選択されたクローンから得られた、合計96のペリプラズム上清(PS)について行った(M65-#33NEW及び#35NEWから)。クローンは、(i)hsTNF- α (10ug/mL)、溶離のためのエタネルセプト、及びTEAについての選択の第一ラウンド、並びに(ii)カニクイザルsTNF- α (10ug/mL)、それに続くトリエチルアミンによる完全溶離についての選択の第二ラウンド：を行った後に、採取した。96のPS全てを、レサズリンを使用するL929細胞傷害性アッセイにより分析した。

【0226】

(材料)

- L929細胞(10000個細胞/ウェル)
- アッセイのためのヒトTNF- α の固定濃度：最終濃度500pg/ml
- アッセイにおけるPSの希釈：1:10
- 陽性対照としての純粋な抗-TNF- α VHH：最終濃度250nM
- M65上清
- TNF- α 短い用量—反応曲線：500、125、7.8pg/ml
- インキュベーション時間：22時間

10

20

30

40

50

ーレサズリン細胞生存試験

【0227】

(方法)

100ul中の10000個細胞/ウェルを、0日目に、96-ウェルCostarマイクロプレート中のDMEM完全培地中に播種し、37℃及び5%CO₂で、一晚インキュベーションした。1日目に、希釈プレートを設定し(各点で3つ組に十分な容積で)、加えて各プレートは対照として以下を含んだ:

1. DMEM完全+0.01%Triton X-100
2. DMEM完全+0.75ug/mLアクチノマイシンD
3. TNF- α 用量-反応曲線+0.75ug/mLアクチノマイシンD。

10

【0228】

培地を、マイクロプレートの各ウェルから除去し、細胞を、hTNF- α 500pg/mL+0.75ug/mLアクチノマイシンD+PS(1:10)を含有するDMEM完全100ul、又は異なる対照100ulと共にインキュベーションした。37℃で22時間インキュベーションした後、レサズリン10ulを各ウェルへ添加し、細胞を、37℃、5%CO₂で2時間インキュベーションした。3%SDSの50ulを引き続き各ウェルへ添加した。次にプレートを、蛍光プレートリーダーを用い、Ex 544 nm/Em 590nmで測定した。

【0229】

M65の選択されたクローンからの複数のペリプラズム上清は、h-TNF- α に対するL929細胞上の保護作用を示した。9クローン中、ペリプラズム画分による処理は、L929細胞の120%より大きい生存を示した。96中の合計53クローンは、L929アッセイにおいて50%より大きいTNF- α 中和活性を示し、並びにそれらの中の32は、ほぼ完全な中和を示した。

20

【0230】

(2.3.3 トリプシン及びキモトリプシンによる不活性化に対する抵抗)

上清(及び精製した試料)を、TNF-TNFR2 ELISAにおけるそれらのTNF-結合活性の維持を基に、可変ドメインクローンのトリプシン及びキモトリプシンによる不活性化に対する抵抗について、試験した。

【0231】

(方法)

トリプシン及びキモトリプシンを、1mM トリス-HCl(pH8.0)、20mM CaCl₂中に、個別に溶解し(最終容積の半分)、次に一緒に混合し、各最終濃度3mg/mL(アッセイ濃度の3倍)を得た。各ペリプラズム抽出物20uLを、PBS10uL(非消化)又は3mg/mLトリプシン+キモトリプシン混合物10uL(消化)と共に、37℃で75分間インキュベーションした。氷冷した2×プロテアーゼ停止溶液(2%BSA、1×PBS、5mM NaETDA、4mM AEBSF、0.6 μ M アプロチニン、260 μ M ベスタチン、2mM EDTA、28 μ M E-64、2 μ M ロイペプチン、1mM PBSF)の30uLを、各試料に添加し、且つ引き続き1×PBS、1%BSAの140uLを各試料に添加し、ペリプラズム抽出物の最終1:10希釈に達した。1%BSA中の最高濃度3uMを含む濃度範囲を、各精製した試料について調製した。精製した試料10uLを、10uLのトリプシン及びキモトリプシン混合物(又は非消化試料についてはPBS)及び10uLのトリプシン/キモトリプシン緩衝液と共にインキュベーションした。ペリプラズム試料及び精製した試料は、-80℃で一晩貯蔵し、翌日TNF R-2-TNF- α ELISAアッセイにおいて試験した。ELISAプレートは、0.7ug/ml、50ul/ウェルのエタネルセプトにより一晚コートし、洗浄し、次にTNF- α -可変ドメイン試料とのインキュベーションのために、調製品中でブロッキングした。TNF- α 可変ドメイン試料は、5ng/mlのh-TNF- α と、1:1混合し(TNF- α アッセイ濃度2.5ng/mL及び1:20希釈した試料を得るため)、並びに各試料50uLを、ELISAプレートに添加した。4℃でのインキュベーション後、ELISAプレートを洗浄し、0.2ug/mLビオチン化したポリクローナルウサギ抗-h-TNF- α 抗体と共に、RTで1時間インキュベーションした。次にELISAプレートを洗浄し、1:1000修飾-アビジン-HRP複合体(mAvidin-HRP)(mAvidin、例えばExtrAvidin(登録商標)(Sigma社)は、アビジンのビオチンへの高い親和性及び特異性を保持するが、アビジンについて報告された生理的pHでの非特異的結合を示さない、卵白アビジンの修飾された形である)と

30

40

50

共に、RTで1時間インキュベーションし、再度洗浄し、TMB ELISA基質100uLを、各試料へ添加した。30分後、反応を、50uLの0.5M H₂SO₄により停止し、ELISAプレートを、450nmでの吸光度について測定した。

【0232】

(結果)

11の可変ドメイン(Q65B1-Q65F6)は、ペリプラズム上清に由来し、並びに4つの可変ドメイン(Q62F2-Q62F11)は、精製された試料に由来した。ペリプラズム上清中の10の可変ドメイン及び2つの精製された可変ドメインは、良好な又は優れたトリプシン及びキモトリプシン抵抗性を有することがわかった。これらの10の可変ドメインは、同じファミリー(ファミリー1、下記パート2.4参照)に属することが、後にわかり、並びにこれらの可変ドメインの2つは、同じファミリー(ファミリー2、下記パート2.4参照)に属することが、後にわかった。ファミリー1にもファミリー2にも属さないQ62F11は、プロテアーゼ抵抗性ではなかった。Q62F10による結果は、実験誤差に起因すると考えられる(図1)。

10

【0233】

(2.4 プライマリー評価の要約)

M62及びM63： 当初採取した186のクローンのうち、ペリプラズム上清の52は、L929細胞細胞傷害性アッセイにおけるヒト可溶性TNF- α の50%以上の中和を、並びにELISAアッセイにおけるTNF- α -TNFR2結合活性の50%以上の阻害を示した。最大の中和活性を伴う25の可変ドメインクローンについて行った配列解析は、これらはファミリーに群別することができることを示した。代表的クローンを、異なるファミリー群から選択した。可変ドメインDNA配列を、大腸菌における高レベル発現のために再-クローニングし、且つ精製した可変ドメインを、より詳細な評価試験のために作製した。

20

【0234】

M65： 当初採取した96のクローンのうち、ペリプラズム上清の53は、L929細胞細胞傷害性アッセイにおけるヒト可溶性TNF- α に対する50%よりも大きい中和活性を、並びにELISAアッセイにおけるTNF- α -TNFR2結合活性の50%以上の阻害を示し、32は、両方のアッセイにおいてほぼ完全中和を示した。最も安定したクローンを同定するために、ペリプラズム上清(合計96)を、解凍直後及び37°Cで18時間インキュベーション後の両方で、ELISAにより、TNFR-2-TNF- α 結合の阻害について分析した。18の上清は、TNFR-2-TNF- α 結合阻害活性をほとんど又は全て保持した。次に最も活性のあるペリプラズム上清(28/96)を選択し、カニクイザルTNF-誘導したL929細胞の細胞傷害性の阻害について試験した。最大のTNF- α 中和活性及びプロテアーゼに対する抵抗性を伴う36の可変ドメインクローンについて行った配列解析は、これらはM62及びM63由来の可変ドメインにより、ファミリーに群別することができることを示した。代表的M65由来のクローンを、異なるファミリー群から選択した。これらの可変ドメインDNA配列を、大腸菌における発現のために再-クローニングし、且つ精製した可変ドメインを、より詳細な評価試験のために作製した。

30

【0235】

(実施例3：精製した大腸菌組換え可変ドメインの評価)

(3.1 大腸菌における選択した可変ドメインクローンの作製)

M62、M63及びM65から選択した可変ドメインのDNA配列を、大腸菌における作製のために再-クローニングし、次に発現された可変ドメインを、下記のように精製した。

40

【0236】

選択された可変ドメインを、ファージミドベクターから発現プラスミドpMEK222へサブクローニングした(pMEK222は、ファージミドpUR8100の遺伝子3が欠失された型であり、ここでクローニングされた可変ドメインには、c-myc及び6Hisタグ、2つの終止コドン及びM13ターミネーター配列が続く(WO2013/064701参照))。これらの可変ドメイン遺伝子を、Sfi I及びEco91Iにより消化し、同じ制限酵素で切断されたpMEK222へライゲーションした。大腸菌株BL21 DE3を、このライゲーションにより形質転換し、アンピシリン及び2%グルコースを補充したLB-寒天プレート上に播種した。形質転換体は、コロニーPCRを用いてスクリーニングした。プライマーM13.リバーズ(配列番号:81)及びM13.フォワード(配列番号:8

50

2)を使用する増幅は、PCRにより観察された700bp及び～350bp(空のプラスミド)の挿入断片を含むプラスミドの作製に繋がった。

【0237】

可変ドメインは、800mlの2×YT、0.1%グルコース及び100ug/mlアンピシリン中で、1/100希釈した新鮮な一晚の成長させた培養物の接種により、pMEK222から作製し、37℃で2時間増殖させた。引き続き、1mMイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、この培養物を37℃で更に5時間増殖させた。細菌を、遠心分離により収集し、30mLのPBSへ再懸濁させた。細菌を、-20℃で一晩のインキュベーションにより凍結した。細菌を、室温で解凍し、遠心分離により分画した。可変ドメインを含む可溶性画分へ、Co²⁺アガロースビーズ、例えばTalon樹脂(Thermo Scientific社)を添加し、His-タグ付き可変ドメインを結合させた。ビーズを洗浄した後、結合した可変ドメインを、150mMイミダゾールを補充したPBSにより溶離した。最後に、可変ドメインを含有する画分を、PBSに対して透析し、イミダゾールを除去した。

【0238】

精製した可変ドメインのTNF-α-中和活性を、いくつかのインビトロアッセイシステムにおいて評価し、可溶型及び膜型ヒトTNF-α及び可溶性カニクイザルTNF-αに対する有効性を評価した。

【0239】

(3.2 L929細胞のTNF-α-誘導した細胞傷害性の阻害)

TNF-α-中和活性を伴う可変ドメインのアッセイを、L929マウス細胞株、及び可溶性ヒト(又はカニクイザル)TNF-αによる細胞傷害性の誘導を基にした生物学的読み値を用いて実行した。L929細胞(10000個細胞/ウェル)を、精製された可変ドメインの希釈物と一緒に、可溶性TNF-α(500pg/ml)及びアクチノマイシン(0.75ug/mL)の存在下で、24時間培養した。実験の最後に、細胞傷害性を、レサズリンを用いて決定した。マウスL929細胞の可溶性ヒトTNF-α誘導した細胞傷害性の阻害を試験し、ヒト及びカニクイザルTNF-αに対する大腸菌組換えQ62、Q63及びQ65シリーズの各可変ドメインのTNF-α中和活性を決定した。

【0240】

(3.2.1 M62及びM63から選択された精製した免疫グロブリン鎖可変ドメイン)

(材料)

- L929細胞(10000個細胞/ウェル)
- 滅菌ポリプロピレン96-ウェルプレート
- アッセイのためのh-TNF-αの固定濃度：500pg/ml
- アクチノマイシンD濃度：0.75ug/mL
- Q62F2、Q62F11、Q62E10、Q62F10を含む、精製した可変ドメイン(MP62-63由来)
- 精製した可変ドメインの希釈範囲：300nM～5pM(1:3希釈)
- ヒトTNF-α用量—反応曲線：3ng/mL～0.5pg/mL
- カニクイザルTNF-α用量—反応曲線：10ng/mL～0.2pg/mL
- アダリムマブ用量—反応曲線：10nM～0.5pM
- インキュベーション時間：22時間
- レサズリン細胞生存試薬

【0241】

(方法)

100ul中の10000個細胞/ウェルを、0日目に、96-ウェルマイクロプレート中のDMEM完全培地中に播種し、37℃及び5%CO₂で、一晚貯蔵した。1日目に、希釈プレートを設定し(各点で3つ組に十分な容積で)、加えてプレートは対照として以下を含んだ：

1. DMEM完全+0.75ug/mLアクチノマイシンD
2. DMEM完全+0.75ug/mLアクチノマイシンD+0.5ng/mL h-TNF-α
3. DMEM完全+0.01%Triton(Cyno-TNF-α用量反応を含むプレート中のみ)
4. DMEM完全(Cyno-TNF-α、h-TNF-α及びアダリムマブ用量反応を含むプレート中のみ)

)。

【0242】

培地を、マイクロプレートの各ウェルから除去し、細胞を、各可変ドメイン希釈物100ul、又は異なる対照100ulと共にインキュベーションした。37℃及び5%CO₂で22時間インキュベーションした後、レサズリン10ulを各ウェルへ添加し、細胞を、37℃で2時間インキュベーションした。3%SDSの50ulを引き続き各ウェルへ添加した。次にプレートを、蛍光プレートリーダー上、Ex 544nm/Em 590nmで測定した。

【0243】

(3.2.2 M65から選択された精製された免疫グロブリン鎖可変ドメイン)

(材料)

- －L929細胞(10000個細胞/ウェル) 10
- －滅菌ポリプロピレン96-ウェルプレート
- －DMEM
- －ヒトTNF-α濃度：500pg/ml
- －カニクイザルTNF-α濃度：500pg/ml
- －アクチノマイシンD濃度：0.75ug/mL
- －Q65D1、Q65D3、Q65B1、Q65C7、Q65A3、Q65E12、Q65F6を含む、M65由来の精製した可変ドメイン
- －精製した可変ドメインの希釈範囲：300nM～5pM(1：3希釈)
- －ヒトTNF-α及びカニクイザルTNF-α用量－反応曲線：10ng/mL～0.5pg/mL
- －アダリムマブ用量－反応曲線：10nM～0.5pM 20
- －インキュベーション時間：22時間
- －レサズリン細胞生存試薬

【0244】

(方法)

100ul中の10000個細胞/ウェルを、0日目に、96-ウェルマイクロプレート中のDMEM完全培地中に播種し、37℃及び5%CO₂で、一晩貯蔵した。1日目に、最高濃度300nMから始まる、各精製した可変ドメインについての連続希釈物1：3(DMEM+Act.D+TNF中)を設定した(各点で3つ組に十分な容積で)。アダリムマブに関する使用した最高濃度は、10nMであった。

【0245】

下記の対照を、プレートに加えた：

1. DMEM完全+0.75ug/mLアクチノマイシンD
2. DMEM完全+0.75ug/mLアクチノマイシンD+0.5ng/mL h-TNF-α又はcyno-TNF-α
3. DMEM完全+0.01%Triton(TNF-α用量反応を含むプレート中のみ)
4. DMEM完全(TNF-α用量反応を含むプレート中のみ)。

【0246】

培地を、マイクロプレートの各ウェルから除去し、細胞を、各可変ドメイン希釈物100ul、又は異なる対照100ulと共にインキュベーションした。37℃及び5%CO₂で22時間インキュベーションした後、レサズリン10ulを各ウェルへ添加し、細胞を、37℃で2時間インキュベーションした。3%SDSの50ulを引き続き各ウェルへ添加した。次にプレートを、蛍光プレートリーダー上、Ex 544nm/Em 590nmで測定した。

【0247】

(3.2.3 L929細胞傷害性アッセイの結果)

表1(a) M62及びM63由来の抗-TNF-αクローン：ヒト及びカニクイザルTNF-誘導したL929細胞の細胞傷害性の阻害

10

20

30

40

【表 7】

クローンID	ファミリー	ヒト及びカニクイザルTNF-誘導したL929細胞の細胞傷害性の 阻害、EC50 (nM)	
		ヒトTNF	カニクイザルTNF
Q62F2	1	1	0.8
Q62F11	-	6	1.5
Q62E10	2	0.2	< 0.1
Q62F10	2	2	1.3

【0 2 4 8】

表1(b) M65由来の抗-TNF- α クローン：ヒト及びカニクイザルTNF-誘導したL929細胞の細胞傷害性の阻害

【表 8】

クローンID	ファミリー	ヒト及びカニクイザルTNF-誘導したL929細胞の細胞傷害性の 阻害、EC50 (nM)	
		ヒトTNF	カニクイザルTNF
Q65D3	1	0.15	0.1
Q65D1	1	0.1	0.06
Q65B1	1	0.04	0.01
Q65C7	1	0.15	0.03
Q65A3	2	0.15	0.04
Q65E12	2	4	4
Q65F6	2	1.5	1
アダリムマブ		0.1	0.04

【0 2 4 9】

ファミリー1に属する可変ドメインは一般に、ヒト及びカニクイザルの両方のTNF- α -誘導した細胞傷害性の極めて有効な阻害を示し、並びにファミリー2に属する可変ドメインもまた一般に、ヒト及びカニクイザルの両方のTNF- α -誘導した細胞傷害性の非常に有効な阻害を示したことを認めることができる。いくつかの可変ドメインが、アダリムマブと同様の性能を示した。

【0 2 5 0】

(3.3 TNF-TNFR2結合活性の阻害(M65から選択された精製された免疫グロブリン鎖可変ドメイン)

Maxisorbプレートを、エタネルセプト(0.7ug/mlの50ul/ウェル)によりコートした。可変ドメインを希釈し、ELISAプレートへの添加前に、ヒト又はカニクイザルTNF- α (1.25ng/ml)のいずれかと混合し、結合させた。エタネルセプトに結合したTNF- α を、ビオチン化したウサギポリクローナル抗-TNF- α 抗体(0.2ug/ml)及びmAvidin-HRP、引き続きTMBにより検出し、エタネルセプトへのTNF- α 結合についての可変ドメインによる競合のレベルを決定した。特定の可変ドメインは、ヒト及びカニクイザルTNF- α へ結合することが可能であり、これはTNF- α -TNFR2相互作用の阻害に繋がった。

【0 2 5 1】

(3.3.1 TNF-TNFR2結合活性アッセイの結果)

表2(a) M62及びM63由来の抗-TNF- α クローン-TNFR2へのヒト及びカニクイザルTNF- α 結合の阻害

10

20

30

40

【表 9】

クローンID	ファミリー	TNF- α -TNFR2結合の阻害 (ELISA)、 EC50 (nM)	
		ヒトTNF	カニクイザルTNF
Q62F2	1	0.7	1.3
Q62F11	-	2.3	1.4
Q62E10	2	0.8	1.2
Q62F10	2	30	108
アダリムマブ	-	0.3	

10

【0 2 5 2】

表2(b) M65由来の抗-TNF- α クローン-TNFR2へのヒト及びカニクイザルTNF- α 結合の阻害

【表 10】

クローンID	ファミリー	TNF-TNFR2結合の阻害 (ELISA)、 EC50 (nM)	
		ヒトTNF	カニクイザルTNF
Q65D3	1	0.33	0.45
Q65D1	1	0.37	0.32
Q65B1	1	0.29	0.45
Q65C7	1	0.35	0.32
Q65A3	2	1.3	1.1
Q65E12	2	47	65
Q65F6	2	13	24

20

【0 2 5 3】

ファミリー1に属する可変ドメインは一般に、ヒト及びカニクイザルの両方のTNF- α -TNFR2結合の極めて有効な阻害を示し、並びにファミリー2に属する可変ドメインもまた一般に、ヒト及びカニクイザルの両方のTNF- α -TNFR2結合の非常に有効な阻害を示したことを認めることができる。いくつかの可変ドメインが、アダリムマブと同様であるか又はそれよりも良い性能を示した。

30

【0 2 5 4】

(3.4 NF- κ B/SEAP HEK-293レポーター細胞の可溶性TNF- α -誘導した活性化の阻害)

選択された可変ドメインの効力は、最初に、マウスL929細胞に対する可溶性TNF- α の細胞傷害性の阻害を基に測定した。これらの可変ドメインはまた、ヒト細胞を用いるアッセイにおいても有効且つ強力であることを確認するために、HEK-293-NF- κ B-SEAPレポーター細胞を用い、実験を行った。NF- κ B/SEAP HEK-293細胞は、NF- κ B反応エレメントの転写制御下で、SEAP(分泌されたアルカリホスファターゼ)レポーター遺伝子により、安定してトランスフェクションされる。可溶性ヒトTNF- α によるレポーター遺伝子の誘導が確認され、且つTNF- α -中和抗体によるこの反応を阻害する能力が、明らかにされた。これらの細胞において、SEAPレポーター遺伝子の活性化は、細胞膜TNFR1受容体を介して可溶性TNF- α により活性化される、NF- κ B経路に左右される。

40

【0 2 5 5】

最初の実験において、Q65B1(ファミリー1)、Q65C7(ファミリー1)、Q62E10(ファミリー2)及びアダリムマブを試験した。第二の実験において、Q65D3を、Q65B1と比較した。

【0 2 5 6】

(3.4.1 Q65B1, Q65C7, Q62E10及びアダリムマブによる阻害)

(材料)

—HEK-293 NF- κ B/SEAP細胞(Imgenex社): 3.5×10^4 個細胞/ウェル、 2×10^4 個細胞/ウェル

50

(ii)、 10^4 個細胞/ウェル(ii)

－滅菌96-ウェルプレート

－10%FBS、Pen/Strep、及び500ug/mLジェネティシン抗生物質(G418、Invitrogen社、10131027)を補充したDMEM(Sigma社、D6429)

－ヒトTNF- α (Invitrogen社、PHC3015)濃度：2ng/ml

－精製された免疫グロブリン鎖可変ドメインQ65B1、Q65C7、Q65D3、Q65E5、Q65E6及びQ62E10

－免疫グロブリン鎖可変ドメイン及びアダリムマブの希釈範囲：500nM～2pM；150nM～1pM；(3.5倍希釈)

－ヒトTNF- α 用量－反応曲線：10ng/mL～0.01ng/mL

10

－プレート中の対照：

－細胞培地(CM)

－ヒト可溶性TNF- α (「hs-TNF- α 」)2ng/ml

－0.01%Triton X-100(TNF用量反応のために)

－インキュベーション時間：22.5時間

－QuantiBlue培地(InvivoGen社)：200uL

－試験した上清容量：(i)10uL、(ii)10uL及び20uL

－読み取り時点：2時間45分

－BioRadプレートリーダー(620nm)

【0257】

20

(方法)

NF- κ B/SEAP HEK-293細胞の 3.5×10^4 個細胞/ウェルを、0日目に、96-ウェル滅菌平底マイクロプレート中に100uLで播種し、37°C 5%CO₂で、一晩貯蔵した。1日目に、各精製した免疫グロブリン鎖可変ドメインについての連続希釈物(3.5倍)を、2ng/mL hs-TNF- α を含有するHEK培地100uL中に設定した(3つ組に十分な容積で)。培地を、アッセイプレートから取り除き、各試料希釈物100uLと交換した。37°C及び5%CO₂で22.5時間後、各上清の10uL又は20uLを、96ウェル平底NUNCプレート中の予め温めたQuanti Blue培地(InvivoGen社)の200uLと混合した。暗所で振盪しながら、37°Cで2時間45分インキュベーションした後、SEAP生成を、BioRadプレートリーダーにおいて620nmで測定した。

【0258】

30

結果は、Q65B1(ファミリー1)、Q65C7(ファミリー1)及びQ62E10(ファミリー2)は、可溶性ヒトTNF- α により誘導された誘導型細胞活性化の最大阻害を達成したことを示した。結果は、これらの免疫グロブリン鎖可変ドメインは、ヒト細胞上に発現されたTNFRにより媒介された可溶性TNF- α に対する反応を、強力且つ効果的に阻害することを示した(図2A)。

【0259】

(3.4.2 Q65D3及びQ65B1(両方共ファミリー1)による阻害)

材料及び方法は、細胞数/ウェルが異なり(3.5×10^4 、 2×10^4 、及び 1×10^4)、並びにTNFによる刺激後の細胞上清の容量が異なる(10uL及び20uL)以外は、ポイント3.4.1で先に説明したものである。

【0260】

40

(結果)

Q65B1及びQ65D3の両方は、HEK-293 NF- κ B/SEAPレポーター細胞におけるヒト可溶性TNF- α の活性を、完全に中和することができ、EC50値は、Q65B1についておよそ0.2nM、及びQ65D3について0.6nMである(図2B)。

【0261】

(3.5 膜TNF- α が誘導した細胞活性化の阻害)

可溶型及び膜結合型TNF- α の両方は、TNF- α -受容体を発現している細胞の活性化を誘導し、且つ両方の型は、クローン病における炎症及び病理に寄与すると考えられる。可溶型及び膜結合型のTNF- α 活性の両方を結合し且つ中和することが可能である可変ドメインは、恐らく最も有効であろう。

50

【0262】

膜-TNF- α 誘導した細胞活性化を阻害する能力を伴う可変ドメインを、同定することができることを確認するために、細胞接触レポーターアッセイを開発した。切断不可能なヒトTNF- α の膜貫通型を構成的に発現するCHO細胞株(mTNF- α -CHO)を作製した。NF- κ B/SEAP HEK-293細胞との共培養において、mTNF- α -CHO細胞は、レポーター遺伝子の活性化を誘導した。従って、mTNF- α 誘導した細胞活性化を阻害する様々な可変ドメインの能力を、決定することができる。

【0263】

(3.5.1 膜TNF- α 誘導した細胞活性化アッセイの結果)

表3(a) M62及びM63から誘導された抗-TNF- α クローン-mTNF- α -誘導したNF- κ B/SEAP HEK-293レポーター細胞活性化の阻害

【表11】

クローンID	ファミリー	mTNF- α -誘導したHEK-NF- κ B SEAPレポーターの阻害 (EC50=nM)
Q62F2	1	34
Q62F11	-	40
Q62E10	2	80
Q62F10	2	-
アダリムマブ		1-3

【0264】

表3(b) M65から誘導されたクローン-mTNF- α -誘導したHEK-NF- κ B SEAPレポーター細胞活性化の阻害

【表12】

クローンID	ファミリー	mTNF- α -誘導したHEK-NF- κ B SEAPレポーターの阻害 (EC50=nM)
Q65D3	1	16.0
Q65D1	1	15.3
Q65B1	1	10.9
Q65C7	1	14.1
Q65A3	2	23.9
Q65E12	2	173.8
Q65F6	2	109.6
アダリムマブ		1.2

【0265】

ファミリー1に属する可変ドメインは一般に、mTNF- α の有効な阻害を示し、並びにファミリー2に属する可変ドメインも一般に、mTNF- α の阻害を示すことを、認めることができる。

【0266】

(実施例4：アダリムマブとの交差反応性)

アダリムマブ1 μ g/mlで、HPMプレート上をコートし、その後異なる可変ドメインの存在又は非存在下で、ヒトTNF- α と共にインキュベーションした。遊離TNF- α -可変ドメイン複合体を除去するために洗浄した後、固定化されたmAbに依然結合しているTNF- α を、ビオチン化されたウサギポリクローナル抗hTNF- α 抗体とのインキュベーションにより検出し；その後、mAvidin-HRP、それに続けてTMBを、ELISA呈色のために添加した。

【0267】

(結果)

Q62E10(ファミリー2)、Q62F2(ファミリー1)、Q62F10(ファミリー2)、Q65A3(ファミリー2)、Q65B1(ファミリー1)、Q65C7(ファミリー1)、Q65D1(ファミリー1)、Q65D3(ファミリー1)、Q65E12(ファミリー2)、Q65F6(ファミリー2)及びQ62F11(ファミリー1でもファミリー2でもない)は、アダリムマブへのTNF- α 結合の完全な阻害を示した。

【0268】

(実施例5：マウス小腸由来の上清中の精製された大腸菌組換え抗-TNF- α 免疫グロブリン鎖可変ドメインの安定性)

精製した可変ドメインを、数匹のマウスのプールした小腸内容物から調製した上清抽出物の存在下で試験した。異なる時間、腸抽出物の存在下で可変ドメインをインキュベーションした後、「消化された」可変ドメイン試料のTNF- α -結合活性を、h-TNF- α -TNFR2 ELISAを使用しアッセイした。

10

【0269】

(マウス小腸上清)

マウス小腸を摘出し、固形内容物を除去し、腸を0.9%生理食塩水1mlですすいだ。固形部分及び液体部分を、1.5mL微量遠心チューブ内で一緒にし、均質になるようボルテックスし、16k xrcfで10分間、4℃で遠心分離した。上清を除去し、使用前には-80℃で貯蔵した。

【0270】

(プレート及び抗原)

20

抗-TNF- α 可変ドメインを、1 μ g/mLエタネルセプト(50 μ L/ウェル)でコートされたHPMプレート上で、4℃で、一晚アッセイした。プレートを、アッセイで使用する前最低1時間、1%BSAによりブロッキングした。

【0271】

(プロテアーゼ停止溶液)

プロテアーゼインヒビターカクテル錠を、プロテアーゼ停止緩衝液(2%BSA、1 $\times$ PBS、5mM NaEDTA)5mL中に溶解し、20 $\times$ プロテアーゼインヒビターストック溶液を作製した。2 $\times$ プロテアーゼ停止溶液(セクション2.3.3に説明した)を、プロテアーゼ停止緩衝液中のPMSFの100中1希釈液により、20 $\times$ プロテアーゼインヒビター溶液を10中1希釈することにより、作製した。

30

【0272】

(方法)

(消化)

可変ドメインストック溶液を、0.4%BSA中に250 μ g/mLで調製した。氷上のSI上清55.2 μ Lへ、可変ドメイン4.8 μ Lを添加し、ボルテックスにより混合した。25 μ Lを、直ちに取だし、氷冷したプロテアーゼ停止溶液25 μ Lと混合し(非消化対照)、並びに-80℃で凍結した。第二のアリコート25 μ Lを、ポリカーボネート薄-壁PCRプレートの単独のウェルへ移し、37℃で1~24時間インキュベーションした(消化された可変ドメイン)。インキュベーション後、消化された可変ドメイン試料を、氷上に配置し、氷冷したプロテアーゼ停止溶液25 μ Lを、各チューブへ添加した。アッセイ前に、これらの試料を、-80℃で凍結した。

40

【0273】

(ELISA)

可変ドメインを、1%BSA中に20 $\times$ プロテアーゼインヒビターストック溶液を希釈することにより作製した1%BSA+1 $\times$ プロテアーゼインヒビター溶液中に希釈し、5ng/mL h-TNF- α と1:1で混合した。TNF- α 混合物を、1 μ g/mLエタネルセプトでコートされたブロッキングしたHPM ELISAプレートへ移した。これらのプレートを、2時間インキュベーションし、PBS 0.5% PEG20 (PBST)で4 $\times$ 洗浄し、乾燥させ、次にビオチン化したウサギポリクローナル抗-ヒトTNF- α 抗体(50 μ L/ウェル、0.27 μ g/mL)と、1時間、振盪しながら、RTでインキュベーションした。1時間後、プレートを、PBSTで4 $\times$ 洗浄し、軽く叩いて乾燥させ、次にmAvidin-HRP(50 μ L/ウェル、1/1000希釈)と、振盪しながらRTで30分間インキュベーション

50

した。次にプレートを、PBST 4×で洗浄し、タッピングにより乾燥させ、100uL TMBを用いて呈色させた。標準曲線の可変ドメイン(PBS中)を、消化試料／未消化試料と並行して泳動した。標準曲線において使用した可変ドメイン及び被験試料の最高濃度は、各々、300ng/mL及び200ng/mLであった。

【0274】

(データ解析)

可変ドメインにより達成された阻害のレベルは、TNF-のみの対照(最大シグナル)から、消化及び非消化-対照可変ドメインのシグナルを減算することにより、計算した。これは、試料中の可変ドメインの量に比例する、各可変ドメインに関するシグナル減少を生じた。生存率(%)は、単回の希釈に関して、消化された可変ドメインのシグナル減少を、非消化可変ドメインのシグナル減少により除算することにより、計算した。

10

【0275】

(結果)

62F2及び65B1(両方共ファミリー1)は、80%より大きい生存を示し、62E10は、70%より大きい生存を示し(ファミリー2)、65D1及び65C7(ファミリー1)は、およそ50%の生存を示した。

【0276】

その後時間経過試験を行い、1時間、3時間及び7時間での性能を測定した。この結果は、先の小腸上清の研究とおおまかに一致した。

【0277】

20

(実施例6：選択された抗-TNF- α 免疫グロブリン鎖可変ドメインの最適化)

これまで調べた可変ドメインは、変異されておらず、並びに精製された可変ドメインは全て、C-末端タグ(c-myc-6His又はFlag-6His)を含んでいる。変異体を消化し、Q65B1への変異と組合せた場合に、N-末端アミノ酸の修飾、又はC-末端-タグの非存在が、更なる安定性の増大に繋がるかどうかを探索した。

【0278】

(6.1 構築体及び変異)

(i)Q65B1モノマー変異体のセット(ID7F-EV、ID8F-EV、ID9F-EV、ID13F-EV、ID14F-EV及びID15F-EV；全てHis-タグを含む)を、プロテアーゼ抵抗に対する特定の変異の作用を調べるために、設計した。

30

(ii)変異されたQ65B1モノマーのバリエーション及びHis-タグを除去することを含むビヘッド構築体のセット(ID22F-ID29F)を設計した。

(iii)配列の始めをDVQLVへと変異させること及びHis-タグを除去することを含むQ65B1モノマー変異体のセットを設計し、その先の酵母での発現を最適化できるかどうかを調べた(DVQLV変異体ID37F及びID38FはそれぞれEVQLV等価物ID32F(ID32FはHis-タグを有さないID8F-EVである)及びID34Fと対比される)。

【0279】

これらの構築体及び変異の更なる詳細は、下記表に示している。変異は、親Q65B1モノマー配列に対し下線及び太字で示している。

【0280】

40

ID26F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS
ID27F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS
ID28F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS
ID29F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SSHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS
ID34F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS
ID37F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS
ID38F	EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWLS	EINTNGLITIT ~~HY~~ GD ~~SVHG~~	RFTVSRNNAAN ~~SM~~ YLELTRLEPEDTALYYCAR	NQ ~~HGLN~~	KGQGTQ ~~TV~~ VSS

10

20

30

40

【0281】

(6.2.1 腸プロテアーゼに対する効力及び抵抗に対する作用)

(i) ID7F-EV、ID8F-EV、ID9F-EV、ID13F-EV、ID14F-EV及びID15F-EV

50

ナイーブマウス小腸上清： 7匹のC57BL/6雄マウスからの小腸の内容物を、0.9%生理食塩水で除去し、一緒にし、ホモジネートし、且つ遠心分離した。得られる上清を取り出し、アリコート化し、凍結した。

【0282】

ヒト糞便上清プール： 糞便試料を、1×PBSの添加により、スラリーとした。次にスラリーをプールし、遠心分離し、上清を取り出し、アリコートとし、-80℃で貯蔵した。このプロセスは、あらゆる細胞物質を含む、糞便マトリクスを除去する。

【0283】

抗-TNF- α 可変ドメインを、1 μ g/mLエタネルセプト(50 μ L/ウェル)で一晩コートしたHPMプレート上でアッセイした。これらのプレートを、アッセイで使用する前最低1時間、1% BSAによりブロッキングした。2×プロテアーゼ停止溶液を、実施例5に説明したように作製した。

【0284】

(消化)

可変ドメインストック溶液を、0.34% (3400 μ g/mL)BSA中に250 μ g/mLで調製した。氷上の糞便上清又は小腸上清55.2 μ Lへ、可変ドメイン4.8 μ Lを添加し、ボルテックスにより混合した。25 μ Lを、直ちに取だし、氷冷したプロテアーゼ停止溶液25 μ Lと混合し(非消化対照)、並びに-80℃で凍結した。アリコート25 μ Lを、ポリカーボネート薄-壁PCRプレートのウェルへ配置し、各々17時間又は7時間、37℃でインキュベーションした。インキュベーション後、消化された可変ドメイン試料を、氷上に配置し、氷冷したプロテアーゼ停止溶液25 μ Lを、各チューブへ添加した。アッセイ前に、これらの試料を、-80℃で凍結した。

【0285】

(ELISA)

可変ドメインを、実施例5に説明したような1%BSA+1×プロテアーゼ阻害溶液中に希釈し、5ng/mL h-TNF- α と1:1で混合し、RTで1時間インキュベーションした。次にこの可変ドメインTNF- α 混合物を、1 μ g/mLエタネルセプトでコートしたブロッキングしたELISAプレートへ装加し、RTで振盪しながら2時間インキュベーションした。プレートを、PBSTで4×洗浄し、軽く叩いて乾燥させ、ビオチン化したウサギ抗-ヒトTNF- α ポリクローナル抗体(50 μ L/ウェル、0.3 μ g/mL)と、1時間、振盪しながら、RTでインキュベーションした。1時間後、これらのプレートを、前述のように洗浄し、mAvidin-HRP(50 μ L/ウェル、1/1000希釈)と共に、振盪しながらRTで30分間インキュベーションした。次にプレートを、前述のように洗浄し、乾燥させ、100 μ L TMBを用いて呈色させた。可変ドメインの標準曲線(PBS中)を、消化/非-消化試料と並行して泳動した。標準曲線において使用した可変ドメイン及び被験試料の最高濃度は、100ng/mLであった。

【0286】

(データ解析)

消化後、可変ドメイン濃度を、TNFR2-干渉ELISAを用い測定した。このアッセイにおいて、可変ドメインは、TNF- α と混合した。その後TNF- α の残存するレベルを測定した。可変ドメインの濃度は、ELISAプレートに結合されたTNFR2受容体の結合から阻害されたTNF- α の量から推論される。生のOD450値は、1%BSAのみを含むウェルから得られたブランク測定値で調節した。標準曲線を、4-パラメータ曲線をフィットさせるために、非線形回帰を使用するGraphpad Prismを用いてプロットした。被験試料中の可変ドメイン濃度を、この標準曲線を使用するGraphpad Prismで計算した。生存率(%)は、0-時点ウェルの平均可変ドメイン濃度を、単独の時点に関する平均可変ドメイン濃度により除算することにより、計算した。2つの平均の比の標準誤差を計算した。

【0287】

(結果)

Q65B1可変ドメインモノマーの評価は、これらの変異の包含は、驚くべきことに、修飾された可変ドメインのTNF- α 中和効力(TNF- α -TNFR2 ELISA)に大きく影響を及ぼさないことを示した。

10

20

30

40

50

【0288】

ID8F-EV及びID13F-EVは、マウス腸及びヒト糞便の上清抽出物中に存在するプロテアーゼによる不活性化に対する改善された抵抗を示した(図3)。

【0289】

(ii)構築体ID22F - ID29F

(材料)

- －HEK-293 NF- κ B/SEAP細胞：50uL中、 10^4 個細胞/ウェル
- －96-ウェルプレート
- －10%FBS、Pen/Strep、及び500ug/mLジェネティシン抗生物質(G418)を補充したDMEM
- －ヒトTNF- α 濃度：2ng/ml
- －精製したホモビヘッド可変ドメイン：ID22F - ID29F
- －可変ドメイン希釈：20nM～2.1pM；2.5倍希釈
- －インキュベーション時間：23時間
- －SEAP比色測定基質培地：200uL；試験した上清容量：20uL；読み取り時点：2時間
- －プレートリーダー(620nm)

10

【0290】

(方法)

NF- κ B/SEAP HEK-293細胞の 10^4 個細胞/ウェルを、96-ウェル平底マイクロプレート中に50uLで播種し、37°C5%CO₂で、一晚インキュベーションした。翌日、各精製した可変ドメインについての連続希釈物(2.5倍)を、4ng/mL hs-TNF- α を含有するHEK培地50uL中でアッセイ濃度の2倍に設定した(3つ組に十分な容積で)。可変ドメイン及びTNF- α を、RTで1時間、振盪しながらインキュベーションし、その後アッセイプレートに各希釈物50uLを添加した。37°C及び5%CO₂で23時間経過後、各上清20uLを、96ウェル平底プレート中の予め温めたSEAP培地200uLと混合した。暗所で振盪しながら、37°Cで2時間のインキュベーション後、SEAP生成を、プレートリーダーにおいて吸光度620nmで測定した。

20

【0291】

(結果)

Q65B1ホモ-ビヘッド誘導体(変化K59H、K65H、K78S、K101Hを持つものを含む)は、可溶性TNF-誘導したHEK293-NF- κ B-SEAPレポーターアッセイにおいて、同等に強力且つ効果的であり、EC50値は0.02nM～0.03nMであった。Q65B1ホモビヘッドの効力は、そのモノマーに対しおよそ10倍増加した。

30

【0292】

(iii)ID32F、ID34F、ID37F、ID38F

酵母において発現された場合に、環化したN-末端グルタミン酸を持つ生成物が生じる可能性を避けるために、Q65B1-ベースの可変ドメインのN-末端アミノ酸をグルタミン酸からアスパラギン酸残基(これは環化を受けにくい)に変更することの作用を、調べた。Q65B1の変異体を作製し、N-末端D残基を持つ対応するQ65B1、及びこれら各々を好ましいプロテアーゼ抵抗性変異と一緒にしたバリエーションを作製した。

【0293】

(NF- κ B/SEAP HEK-293細胞レポーターアッセイを使用するID-32F、ID-34F、ID-37F、及びID-38FのsTNF- α 中和能)

40

ID-38F及びID-34Fは、可溶性ヒトTNF- α を中和することを確認するために、これらの可変ドメインを、市販の抗-TNF- α 抗体インフリキシマブ(レミケード)と比較する、NF- κ B/SEAP HEK-293細胞レポーターアッセイにおいて試験した。結果は、異なる日に行った2つの個別の実験から得た。

【0294】

(材料)

- －HEK-293 NF- κ B/SEAP細胞(Imgenex社)：50uL中 10^4 個細胞/ウェル
- －滅菌した96-ウェルプレート
- －10%FBS、Pen/Strep、及び500ug/mLジェネティシン抗生物質(G418、Invitrogen社、101

50

31027)を補充したDMEM(Sigma社、D6429)

－ヒトTNF- α (Invitrogen社、PHC3015)濃度：2ng/ml

－5種の精製した可変ドメイン：ID-32F、ID-34F、ID-37F、ID-38F及びQ65B1

－インフリキシマブ希釈：10nM～1pM(第1実験)；2nM～1pM(第2実験)

－可変ドメイン希釈：10nM～1pM(第1実験)；5nM～1pM(第2実験)

－インキュベーション時間：22時間

－QuantiBlue培地(InvivoGen社)：200uL；試験した上清容量：20uL；読み取り時点：2時間

－BioRadプレートリーダー(620nm)。

【0295】

(方法)

NF- κ B/SEAP HEK-293細胞の 10^4 個細胞/ウェルを、96-ウェル滅菌平底マイクロプレート中に50uLで播種し、37℃及び5%CO₂で一晩インキュベーションした。翌日、連続希釈した可変ドメイン及びインフリキシマブ(2.5倍)を、4ng/mL hs-TNF- α を含有するHEK培地中で、アッセイ濃度の2倍に設定した(実験1に関して)。第2の実験において、連続希釈(可変ドメインについて1.9倍及びアダリムマブについて2.2倍)を、HEK培地120uL中アッセイ濃度の4×で設定した。次に各希釈物の100uLを、8ng/mL hsTNF- α (4×)を含有するHEK培地100uLで1：1希釈し、アッセイ濃度の2倍の可変ドメイン及びTNF- α を有するようにした。可変ドメイン及びTNFを、振盪しながら、RTで1時間インキュベーションし、その後各希釈物50uLをアッセイプレートへ添加した。37℃及び5%CO₂で22時間インキュベーションした後、各上清20uLを、96ウェル平底NUNCプレート中の予め温めたQuanti Blue培地200uLと混合した。暗所において振盪しながら37℃で2時間インキュベーションした後、SEAP生成を、BioRadプレートリーダーにより620nmで測定した。

【0296】

(結果)

実験1の結果を、図4Aに示し、並びに実験2の結果を、図4B及び4Cに示す。全ての可変ドメインは、完全なsTNF- α 中和及びEC50値0.3nM～0.5nMの類似の効力を示す。これらの可変ドメインにおける変異の追加は、sTNF- α を中和するこれらの可変ドメインの効力に影響を及ぼさないことは、明らかである。インフリキシマブは、いずれの実験においても、完全なsTNF- α 中和を生じず、およそ2nMで～80%の最大中和を伴い、ほぼプラトーな用量－反応曲線を示している。

【0297】

(NF- κ B/SEAP HEK-293細胞レポーターアッセイを使用するID-34F、ID-38F、Q65B1、ID-8FEV、アダリムマブ、及びインフリキシマブのmTNF- α 中和活性)

ID-38F及びID-34Fは膜結合TNF- α を中和することを確認するために、これらの可変ドメインを、2種の前駆体(Q65B1及びID8F-EV)と比較する、NF- κ B/SEAP HEK-293細胞レポーターアッセイにおいて、試験した。2種の市販の抗-TNF- α 抗体(アダリムマブ及びインフリキシマブ)を、参照のために同じアッセイにおいて試験した。

【0298】

(材料：)

－NF- κ B/SEAP HEK-293細胞(Imgenex社)濃度：3.5×10⁴個細胞/ウェル

－安定したTNF- α _DEL発現しているFlp-In CHO細胞株(Invitrogen & GeneArt社、Life Technologies社)：25×10³個細胞/ウェル

－2種の精製した抗-TNF- α 変異体可変ドメイン：ID-34F及びID-38F

－2種の精製した抗-TNF- α 可変ドメイン：Q65B1及びID8F-EV

－2種の抗体：アダリムマブ及びインフリキシマブ

－可変ドメイン／Ab希釈：300nM～0.11nM(2.2倍希釈)

－インキュベーション時間：24時間

－QuantiBlue培地(InvivoGen社)：200uL；試験した上清容量：10uL；読み取り時点：2時間

10

20

30

40

50

ーBioRadプレートリーダー(620nm)。

【0299】

(方法)

50uL中のNF- κ B/SEAP HEK-293細胞の 3.5×10^4 個細胞/ウェルを、0日目に、96-ウェル平底マイクロプレート中に播種し、37℃及び5%CO₂で一晩貯蔵した。1日目に、各精製した可変ドメインの連続希釈物を、HEK培地50uL中アッセイ濃度の3倍で設定した(3つ組に十分な容積で)。各可変ドメイン希釈物(3×)50uLを、アッセイプレートへ添加し、その後これらのプレートを、37℃及び5%CO₂で1時間以下貯蔵した。HEK-培地中に調製したm-TNF- α CHO細胞(25000個細胞/50uL)の50uLを、HEK-アッセイプレートに添加し、最終的可変ドメインアッセイ濃度(1×)を有するようにした。細胞を、37℃及び5%CO₂で、24時間インキュベーションした。2日目に、各上清10uLを、予め温めたQuanti Blue培地(InvivoGen社)200uLと混合した。暗所において振盪しながら37℃で2時間インキュベーションした後、SEAP生成を、BioRadプレートリーダーにより620nmで測定した。得られた用量反応曲線は、GraphPad Prismソフトウェアにより解析した。

【0300】

(結果)

表4 抗-TNF- α 可変ドメイン及び市販の抗-TNF- α 抗体によるmTNF- α 中和

【表14】

可変ドメイン /抗体	EC50 (nM)
ID-34F	4.71
ID-38F	5.16
Q65B1	8.72
ID8F-EV	7.69
アダリムマブ	3.14
インフリキシマブ	3.79

【0301】

ID-34F及びID-38Fは、膜結合TNF- α の中和において、同様の効力を示し、これは可変ドメインのN-末端アミノ酸のEからDへの変化は、可変ドメインの効力に影響を及ぼさないことを指摘している。ID-34F及びID-38Fは、mTNFに対し、親モノマーQ65B1及びID-8FEVよりもわずかにより強力であるように見える。ID-34F及びID-38Fは、mTNF- α の中和において、市販の抗体アダリムマブ及びインフリキシマブよりもごくわずかに効力が弱い。

【0302】

(ID38FのTNFR1 ELISA比較)

TNFR1はまた、TNF- α 病理において役割を果たすと考えられているので、ID38F及びアダリムマブの、TNFのTNFR1への結合を防止する能力について試験するために、ELISAを行った。

【0303】

(方法)

滅菌96-ウェルマイクロタイタープレートを、1ウェルにつき0.5ug/ml hTNFR1(R&D Systems社)50ulにより、4℃で一晩コートした。プレートを、プレート洗浄機を用い、PBST中で洗浄し、1ウェルにつき1%BSA 200ul中で1時間ブロッキングした。各抗体について30nMから始める3倍連続希釈物を、2.5ng/ml TNF- α と共に、1時間インキュベーションし、次にその50ul/ウェルを、洗浄したプレートへ添加し、5時間インキュベーションした。プレートを、洗浄し、1%BSA中のビオチン化したウサギ α -hTNF(Peprotech社、P31AB7)の1/1000希釈物50ul/ウェルと共にインキュベーションし、且つ4℃で一晩インキュベーションした。プレートを洗浄し、1%BSA中のmAvidin-HRPの1/1000希釈物50ul/ウェルと共に、1時間インキュベーションし、その後最終洗浄し、及び100ul/ウェルTMB基質とインキュベーションした。この反応を、20分後に、0.5M H₂SO₄ 50ul/ウェルにより停止し、吸光度を45

0nmで読み取った。EC50値を、GraphPad Prismにおいて、ELISAデータから計算した。

【0304】

(結果)

表5

【表15】

抗-TNF物質	EC50 (pM)
ID38F	610.0
アダリムマブ	200.5

【0305】

ID38Fは、TNF- α のTNFR1への結合を、ナノモルを下回るEC50で、中和することができる。このアッセイにおけるアダリムマブのより高い効力は、この分子は二価であるが、ID38Fは一価であるという事実を反映しているかもしれない。

【0306】

(TNFR2 ELISA及び安定性アッセイ)

TNFR2 ELISAにおける可変ドメインモノマーのTNF- α -結合活性の評価は、この可変ドメインのN-末端アミノ酸のEからDへの変化は、有意な作用を有さないことを示した。

【0307】

この可変ドメインモノマーの安定性は、マウス小腸及びヒト糞便の上清中に存在するプロテアーゼによる不活性化に対するそれらの抵抗を測定することにより、先に試験した。可変ドメインのN-末端アミノ酸のEからDへの変化は、プロテアーゼ安定性に対しごくわずかな作用のみ有した。

【0308】

(6.2.2 要約)

これらの結果は、N-末端配列DVQLV並びにアミノ酸変化K59H及びK101Hを伴うQ65B1に関連したモノマー(「ID38F」)は、特に、強力なTNF- α -中和活性、小腸及び糞便のプロテアーゼによる不活性化に対する優れた抵抗性、並びに酵母において発現された場合にピログルタミル化を受けにくい生成物の生成の潜在能を有することを示している。

【0309】

(実施例7：腸及びIBD炎症プロテアーゼに対する安定性)

(7.1 炎症を起こしたIBD組織中に存在するプロテアーゼに対する安定性の証拠)

治療的抗体の迅速な分解に繋がり得るプロテアーゼ活性は、クローン病においてアップレギュレーションされる(MMP3、MMP12、カテプシン)(Biancheriらの文献、ECCO、Dublin、2011、Abstract、P007、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。従って、精製した炎症プロテアーゼ及びより複雑なIBD粘膜組織溶解液の存在下で、抗-TNF- α 可変ドメインの安定性を調べることは、重要である。

【0310】

組換えヒトMMP-3及び組換えヒトMMP-12を、商業的供給業者、例えばR&D systems社から得た(各々513-MP-010及び917-MP-010)。酵素活性化及び22時間インキュベーションは、TCNBアッセイ緩衝液(50mMトリス、10mM CaCl₂、150mM NaCl、0.05% (w/v) ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル、例えばBrij-35、pH7.5)中で行った。MMPは、主要アッセイにおいて使用する前の、プレ-インキュベーションにより活性化した。rhMMP-3を活性化するために、酵素を、5 μ g/mLキモトリプシンを含有するTCNB中で、20 μ g/mLに希釈し、37°Cで30分間インキュベーションした。活性化後、キモトリプシン活性を、PMSFの最終濃度2mMまでの添加により、阻害した。PMSFは、rhMMP-3活性に有害な影響を与えてはならない。rhMMP-12は、TCNB中で50 μ g/mLへ希釈し、並びに37°Cで30時間インキュベーションすることにより、活性化された。rhMMP-12を活性化するために、更なる添加剤又は阻害剤は使用しなかった。

【0311】

(材料)

モノマーID34F、ビヘッドID25F、エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブ
【0312】

(方法)

TCNB緩衝液中に調製した被験化合物を、氷上で、活性化したrhMMP-3及びrhMMP-12と混合した。被験化合物は、アッセイ開始時に、濃度30ug/mLで存在した。rhMMP-3は、開始アッセイ濃度12ug/mLで存在した。rh-MMP-12は、開始アッセイ濃度30ug/mLで存在した。各化合物は、両方の酵素及びTCNB緩衝液のみの対照の存在下で試験し、アッセイの過程にわたり、酵素-非依存型の分解をチェックした。酵素もまた、TCNBのみとインキュベーションし、「無化合物」対照を提供した。全ての反応物の最終容量は、t=0時で30uLであった。t=0時で、出発アッセイ容量10uLを取り出し、氷上の、プロテアーゼ停止緩衝液(1×PBS 2%BSA、5mM EDTA、実施例5に説明したような)中の2×プロテアーゼインヒビター溶液10uLに添加し、反応を停止した。T=0の試料を、-80℃で凍結した。残りの20uL反応容量を、PCRアッセイプレート中に密封し、37℃で22時間インキュベーションした。

10

【0313】

22時間のインキュベーション後、反応物の大半は、~20uLであることがわかった。プロテアーゼ停止緩衝液(1×PBS 2%BSA、5mM EDTA)中の2×プロテアーゼインヒビター溶液20uLを添加し、反応を停止した。T=22時間の試料を、-80℃で凍結した。アッセイ試料を、ウェスタンブロットにより分析した。試料を、装加色素(load dye)中6.6ng/uLの被験化合物と同等に希釈し、15uLを、10%ビス-トリスゲルに装加した(各被験化合物100ng/レーン、実験過程にわたる被験化合物濃度の変化はないと仮定する)。「無被験化合物」対照の同等容量も、装加した。化学発光MWタンパク質ラダー、例えば、Super signal(Pierce社)を、標準として5uL/レーンで添加した。試料を、SDS-MES緩衝液中で電気泳動し、半乾式ブロッキング装置、例えばiBlot上で、7分間転写プログラムを使用し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。このメンブレンを、ブロッキング液(1%BSA、2%粉末脱脂粉乳、0.05%PEG20、1×PBS pH7.4)中で、4℃で一晩ブロッキングした。可変ドメインを、1)一次：ウサギポリクローナル抗-Q65B1(-Flag-6His)(終末期採血(terminal bleed)血清)のブロッキング液中1/1000、並びに2)二次：ブロッキング液中のHRP-複合したポリクローナルブタ-抗-ウサギIgG抗体の1/1000+1%健常ヤギ血清：を用いて、検出した。エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブは、ガンマ-鎖に特異的な、ペルオキシダーゼ-複合した抗-ヒトIgG(Dako社、P0214)を、ブロッキング液中1/1000で用いて、検出した(二次抗体は使用しなかった)。ブロットを、各インキュベーション工程の間で、25mL PBST(1×PBS、0.1%PEG20)中で、6×5分間洗浄し、非特異的に結合した抗体を除去した。Pierce社 Super-Signal ECL (34087)を使用し、ブロットを呈色させ、これをImageQuant (LAS4000)を用い、必要ならば、露光時間を変動して、可視化した。

20

30

【0314】

(結果)

ID34F(Q65B1 K59H及びK101Hバリエーション)並びにID25F(ID34Fのホモビヘッド)は、22時間のインキュベーション後、インビトロにおいてrh-MMP3及びrh-MMP12の両方に完全に抵抗性であるように見える(図5A)。比較により、臨床用生物薬剤のエタネルセプト、アダリムマブ、及びインフリキシマブの各々は、完全長分子の部分的、又は全体的切断のいずれかを受け、より小さいMWの断片を生じる(図5B及び5C)。この分析は、その後の処理で変化しない、モノマー(15kDa)及びビヘッド(30kDa)に対応するバンドを示す。

40

【0315】

(7.2 ブタ及びサルからの腸液及び糞便抽出物中の安定性の証拠)

ID32F、ID34F、ID8F-EV及びQ65B1は各々、(a)ブタ十二指腸由来の上清存在下で5時間半、(b)マウス小腸由来の上清存在下で5時間半、及び(c)ヒト糞便由来の上清存在下で21時間インキュベーションした。試験した可変ドメインは、異なるGI領域由来のこれらの抽出物中で、良好な安定性を示した。各可変ドメインに関する対応するおよその生存率(%)は、以下である：

【0316】

50

表6

【表 1 6】

	ブタ十二指腸	マウス小腸	ヒト糞便
ID32F	80	55	40
ID34F	90	70	70
ID8F-EV	120	80	60
Q65B1	90	60	60

【 0 3 1 7 】

(7.3 サル胃腸管の異なる領域からの管腔内容物から調製された抽出物中のID8F-EVの安定性)

10

ID8F-EVは、胃、十二指腸、空腸及び回腸の上清中で5時間、並びに盲腸及び結腸の上清中で16時間、インキュベーションした。インキュベーション後の、ID8F-EVの生存率(%)は、およそ60%~90%の間であった。

【 0 3 1 8 】

(実施例8：経口投与後の免疫グロブリン鎖可変ドメインの腸管への局所送達及び固有層への接近)

本発明の可変ドメインは、恐らくマウスのTNF- α に結合しないが、IBDのマウスモデルにおける経口投与後の腸管への局所送達及び固有層の浸透の提示は、TNF- α の中和は、腸の炎症部位で達成されることができるとい証拠を提供する。

20

【 0 3 1 9 】

(8.1 正常及びDSS大腸炎マウスから採取した結腸セグメントの管腔のエクスピボインキュベーション後の65B1の結腸上皮の浸透)

【 0 3 2 0 】

(方法)

DSS大腸炎を、標準プロトコールを使用し、2匹のマウスにおいて誘発した。2%硫酸デキストラン(MP biomedical社)を、飲料水中で7日間投与し、その後マウスを更に3日間維持し、疾患をピーク発症させた。次にこれらのマウスを、2匹の正常マウスと共に屠殺し、結腸を摘出した。結腸管腔内容物を、PBSで穏やかに洗浄除去し、次にセグメントを、糸で結紮し、以下に示したように処理した。結腸セグメントを、2%FCS及び15mM HEPESを含有するRPMI中の3 μ g/ml 65B1で負荷し、次に開放セグメント末端を結紮し、これらのセグメントを、培養フラスコ内RPMI+2%FCS+15mM HEPES中で、穏やかに揺動しながら、RTで1.75時間インキュベーションした。次に結腸セグメントを切断し、簡単に洗浄し、並びにパラホルムアルデヒド中の固定、もしくは最適切断温度化合物(OCT)での包埋及び瞬間凍結のいずれかを行った。組織切片を、近位の結腸組織から収集した。6 μ m切片を切断し、且つ氷冷したアセトン中で90秒間固定した。これらの切片を風乾し、アッセイするまで、-20℃で貯蔵した。各抗体セットを染色するために、各マウスに関する2つの連続切片を使用した。

30

【 0 3 2 1 】

(免疫組織化学)

40

スライドを解凍し、切片を、PBS中の3%脂肪酸非含有-BSAにより、室温で30分間ブロッキングした。一次抗体インキュベーション(ウサギポリクローナル抗可変ドメイン、又はウサギ対照ポリクローナル抗体のいずれか)を、加湿したチャンバー内で、一晚(~18時間)、4℃で実行した。各結腸組織ブロックの3枚のスライドのセットを、以下のように染色した(1処理につき1枚のスライド)：

ービヒクル(前述のようなPBS中の3%FAF-BSA)

ー10 μ g/mlアフィニティ精製したウサギポリクローナル対照抗体

ー10 μ g/ml抗-可変ドメインのアフィニティ精製したウサギポリクローナル抗体(AB1219)。

【 0 3 2 2 】

インキュベーション後、各切片を、氷冷した-PBSで3分間3回洗浄した。全ての切片を、

50

ビヒクル中のヤギ抗-ウサギIgG Alexa Fluor 594抗体の20ug/ml(Molecular Probes社、A11037)及び1ug/ml Hoechst 33342(細胞核を同定するために)により、暗所、室温で、6時間染色した。二次抗体とのインキュベーション後、切片を先に説明したように洗浄し、引き続きミリQ水により最終洗浄した。切片を、暗所で風乾し、フェージング防止媒体(antifade media)(Citifluor社、AF1)と共に標本化し、カバーガラスで覆った。スライドを、観察するまで、暗所に4℃で保存した。スライドを、翌日、Olympus AX70顕微鏡を用いて観察し、各蛍光色素(Alexa Fluor 488及びUV)について、Image Pro-Plus(v7.0、Media Cybernetics社)を用い、画像を逐次捕獲した。露光レベルは、対照ウサギ抗体ポリクローナルで処置した対照又はDSSマウスからの切片を用いて設定し、並びに少なくとも2つのランダム視野を、各動物由来の各スライドから捕獲した。

10

【0323】

(結果)

正常マウス結腸の画像とは対照的に、65B1に関連した蛍光は、DSS大腸炎マウス由来の結腸切片において、大きく増加している。ヘマトキシリン・エオシン(H&E)切片は、広範な炎症を明らかにし、これは恐らく上皮の障壁機能を重度に損ない、下側にある固有層への65B1の容易な接近を可能にするであろう。正常マウス由来の結腸セグメントにおける65B1経上皮浸透はほとんど又は全く存在しないが、広範な浸透が、DSS大腸炎マウスの結腸セグメントにおいて生じた。これらの知見は、上皮障壁機能における疾患が誘導した変化は、可変ドメインの粘膜下組織への接近を可能にしたことを示唆している。

20

【0324】

(8.2 経口経管栄養後の正常及びDSS大腸炎マウスの結腸粘膜への65B1の浸透の試験)

(材料及び方法)

- ーQ65B1(3.35mg/ml = 222.3uM)
- ー1M炭酸水素ナトリウム溶液
- ー乾燥ミルク(Marvel社)、
- ーウサギ抗可変ドメイン抗体、pAB 1219
- ー対照ウサギpAb
- ーヤギ抗ウサギAlexa 594nm(Molecular Probes社、A11037)

【0325】

DSS大腸炎は、2%硫酸デキストラン(MP biomedical社)を、飲料水中で7日間投与することにより、3匹のC57BL/6マウスにおいて誘発し、その後マウスを更に3日間維持し、疾患をピーク発症させた。投薬日に、全てのDSS大腸炎マウス、及び3匹の正常マウスに、0.1M NaHCO₃、450mg/ml乾燥ミルクの100ulを与え、次に〜10分後に、2匹の正常マウス及び最も重症疾患を伴う(体重測定値により判断)2匹のDSS大腸炎マウスに、65B1、33.6uM最終濃度(76ugと同等)及び450mg/ml乾燥ミルクを含有する0.1M NaHCO₃の150ulを与えた一方で、残りの2匹のマウス(1匹の正常及び1匹のDSS大腸炎)は、ビヒクルのみを受け取った。マウスを、65B1投薬後3.25〜3.5時間で屠殺し、胃腸管を摘出した。結腸を単離し、管腔内容物を、穏やかに絞り出し、次に2%ウシ胎仔血清を含有するRPMI培地により簡単に洗浄し、その後同封のプロトコールに説明されたようにこれらを瞬間凍結した。

30

【0326】

(結果)

65B1を受け取らなかったマウス由来の結腸は、それに対し65B1特異的蛍光が判断されるべきバックグラウンド蛍光を確立する物質を提供した。VHH関連した蛍光は、赤色であるのに対し、Hoechst 33342を用い標識された細胞核は、青色であった。ビヒクルのみを受け取ったマウス1は、結腸バックグラウンド蛍光を示したのに対し、マウス2及び3には、65B1が投与された。これら3匹のマウス由来の結腸間の赤色蛍光の差異は、あったとしても極わずかであり、このことは、正常マウス結腸への65B1の浸透は、予想されたように無視できることを示している。H&E染色した切片は、明確な炎症を伴わない典型的結腸構造を示した。正常マウスとは対照的に、広範な炎症の領域が存在し、並びに一部部位では著しい上皮損傷が発生していた。ビヒクルのみを受け取ったDSS大腸炎マウスに比べ、この可

40

50

変ドメインを受け取ったDSS大腸炎マウスにおいて、65B1関連した蛍光の明確な増加が存在し、このことは固有層への経上皮浸透を指摘している。

【0327】

この結果は、経口投与された可変ドメインは、大腸炎が誘発されたマウスの結腸の粘膜下組織に接近することができることを明らかにしている。IBD患者におけるこのコンパートメントの接近は、治療的有効性のために必要とされる必須条件である。

【0328】

(実施例9：IBD生検組織のエキスピボ培養物中に存在するシグナル伝達タンパク質のリン酸化に対するID38F及びインフリキシマブの作用)

抗体-ベースの抗-TNF- α 治療薬は一般に、例えばマウスTNF- α との交差反応性を欠いているために、IBDのマウス-ベースの前臨床モデルにおいて本発明のグロブリン鎖可変ドメインの有効性を評価することは可能ではない。しかし、抗-マウスTNF- α 抗体ドメイン-分泌している乳酸菌の局所的腸送達、IBDのマウスモデルにおける結腸炎症を抑制するのに十分であることが示されている(Vandenbrouckeらの文献、2010、Mucosal Immunology、3(1):49-56、その全体は引用により本明細書中に組み込まれている)。これらの研究の結果は、IBDの予防又は治療に関する経口-投与された抗-ヒトTNFドメイン抗体-ベースのアプローチの概念の前臨床バリデーションを提供する。

【0329】

インフリキシマブは、IBDの治療に有効である。インフリキシマブは、TNFの生物活性を中和し、これがサイトカインの下流の前炎症作用の阻害に繋がることにより、主に作用すると考えられる。TNF及び二次炎症メディエーターによる罹患組織に存在する多くの異なる細胞型の活性化は、結果的に受容体、プロテインキナーゼ及び転写因子のリン酸化を生じる、複数の受容体シグナル伝達経路に関与している。実験は、(i)IBD、対、正常腸組織において、タンパク質リン酸化のパターンは、変更されること；及び(ii)リン酸化パターンは、特異的前炎症機序のインヒビターに対し感受性があること：を示している。

【0330】

(i)ID38FのTNF-中和する活性は、組織タンパク質リン酸化のパターンの変化を基にIBD組織のエキスピボ培養において明らかにされ得るかどうか、及び(ii)臨床的に有効な抗-TNF mAbインフリキシマブによるID38Fの作用を比較すること：を調べた。

【0331】

(臓器培養)

活動性IBDの患者からの経内視鏡的結腸生検又は手術の回腸粘膜標本を、24-ウェルプレート(VWR International社、Lutterworth、UK)中、100U/mlペニシリン及び100ug/mlストレプトマイシンを補充した血清-非含有HL-1培地(Cambrex BioScience社、Wokingham、UK) 300ul中に配置し(1ウェルにつき1生検)、以下の刺激により、37°C、5%CO₂で培養した：

—IgG1 10ug/ml

—インフリキシマブ10ug/ml

—ID38F 4ug/ml

—対照の非-抗-TNF- α 免疫グロブリン鎖可変ドメイン4ug/ml

【0332】

48時間培養した後、生検及び上清を、瞬間凍結させ、-70°Cで貯蔵した。

【0333】

(ホスホ-アレイ分析手順)

リン酸化タンパク質含有量の分析のために、IBD組織試料を解凍し、両方共1%で、ホスファターゼインヒビターカクテル2(Sigma-Aldrich社)及びプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma-Aldrich社)を補充したRIPA緩衝液(Sigma-Aldrich社、St. Louis、MO)中に溶解した。溶解液のタンパク質濃度は、Bio-Radタンパク質アッセイ(Bio-Rad Laboratories社、Hemel Hempstead、UK)により決定し、試料を、Array希釈緩衝液中に1.0mg/mlとなるよう希釈した。リン酸化タンパク質特性の分析は、PathScan RTK シグナル伝達抗体アレキット(化学発光リードアウトによる細胞シグナル伝達技術(Cell Signaling Technolog

y with Chemiluminescent readout) #7982)を使用し、行った。多重アレイは、サンドイッチ免疫測定原理を基にするスライド-ベースの抗体アレイである。このアレイキットは、チロシン又は他の残基においてリン酸化された場合に、28種の受容体チロシンキナーゼ及び11種の重要なシグナル伝達ノードの同時検出を可能にする(表7A参照)。標的-特異的捕獲抗体、ビオチン化されたタンパク質(陽性対照)及び非特異的IgG(陰性対照)は、ニトロセルロース-コートされたガラススライド上に2つ組でスポットした。組織溶解液の分析は、提供された試薬を使用し、製造業者の指示に従い行った。簡単に述べると、各希釈した溶解液は、スライド上で、引き続きビオチン化した検出抗体カクテルでインキュベーションした。次にストレプトアビジン-複合したHRP及びLumiGLO(登録商標)試薬を使用し、化学発光により結合した検出抗体を可視化した。このスライドの画像を、標準化学発光感光フィルム上に捕獲した。フィルムの画像を、HP LaserJet Pro 100カラスキャナー上を走査することにより入手し、スポット強度を、ImageJソフトウェアを用い定量した。

【0334】

表7A アレイ上に含まれる標的キナーゼ及びシグナル伝達タンパク質

【表17】

受容体チロシンキナーゼ		シグナル伝達ノード
EGFR/ErbB1 パン-Tyr	PDGFR パン-Tyr	Akt/PKB/Rac Thr308
HER2/ErbB2 パン-Tyr	c-Kit/SCFR パン-Tyr	Akt/PKB/Rac Ser473
HER3/ErbB3 パン-Tyr	FLT3/Flk2 パン-Tyr	p44/42 MAPK (ERK1/2) Thr202/Tyr204
FGFR1 パン-Tyr	M-CSFR/CSF-1R パン-Tyr	S6 リボソームタンパク質 Ser235/236
FGFR3 パン-Tyr	EphA1 パン-Tyr	c-Abl パン-Tyr
FGFR4 パン-Tyr	EphA2 パン-Tyr	IRS-1 パン-Tyr
InsR パン-Tyr	EphA3 パン-Tyr	Zap-70 パン-Tyr
IGF-IR パン-Tyr	EphB1 パン-Tyr	Src パン-Tyr
TrkA/NTRK1 パン-Tyr	EphB3 パン-Tyr	Lck パン-Tyr
TrkB/NTRK2 パン-Tyr	EphB4 パン-Tyr	Stat1 Tyr701
Met/HGFR パン-Tyr	Tyro3/Dtk パン-Tyr	Stat3 Tyr705
Ron/MST1R パン-Tyr	Axl パン-Tyr	
Ret パン-Tyr	Tie2/TEK パン-Tyr	
ALK パン-Tyr	VEGFR2/KDR パン-Tyr	

【0335】

(データ解析)

「バックグラウンド」シグナルを、各プロットについて測定し、且つこれを、補正しないリン酸化タンパク質シグナルから減算した。一部の「バックグラウンド-減算した」リン酸化タンパク質値に関して、負の値が得られたことは、注目される。これは恐らく、光の出力の直接測定よりもむしろ、X線フィルムへの露光及びネガ画像の走査に關与した、アレイを読み取るために使用した方法のためであろう。ID38F(又はインフリキシマブ)処理した溶解液中のリン酸化タンパク質について測定したシグナルが、バックグラウンド補正後負の値をもたらすが、対応する対照非-抗-TNF- α 免疫グロブリン鎖可変ドメイン(又はIgG)処理の補正した値は正である場合において、阻害レベルは、>50%とスコア化された。

【0336】

アレイデータの目視評価は、ID38F及びインフリキシマブの両方は、一部の組織における一部のリン酸化タンパク質に対し阻害作用を生じたことを示した。様々なリン酸化タンパク質の各々に対する抗-TNF処理の作用を調べるために、ID38F及びインフリキシマブア

レイから得たシグナルを、対応する対照可変ドメイン及びIgGアレイからのシグナルと直接比較し、並びにシグナル比(ID38F／対照可変ドメイン及びインフリキシマブ／IgG)を計算した。異なる患者由来の組織中の抗-TNF抗体による阻害の一貫したパターンが存在するかどうかを評価するために、4名のCD患者中の少なくとも3名からの組織中で $\geq 50\%$ 阻害されたこれらのリン酸化タンパク質を強調した(表7B参照)。

【0337】

表7B ID38F又はインフリキシマブにより阻害されたリン酸化タンパク質(4CD生検中3において $>50\%$)

【表18】

生物学的機能	阻害されたリン酸化タンパク質 (4つのIBD生検中3つにおいて $>50\%$)	
	ID38F、対、対照可変ドメイン	インフリキシマブ、対、IgG
マクロファージアポトーシス性細胞 クリアランス	AXL TYRO3	AXL -
T細胞シグナル伝達/接着	EphA3 Lck	EphA3 ZAP70
血管新生	VEGFR2 TIE2 EphB4	VEGFR2 TIE2 -
疼痛/神経調節	EphB1	
細胞活性化/生存 /シグナル伝達	AKT ERK1/2 S6リボソームタンパク質 -	AKT ERK1/2 S6リボソームタンパク質 SRC ALK PDGFR
造血		FLT3
上皮細胞調節	EphA1 -	EphA1 EphA2

【0338】

これらの判定基準を基に、生アレイデータの分析は、ID38F処理は、12/39リン酸化タンパク質を一貫して阻害したのに対し、インフリキシマブは、14/39リン酸化タンパク質を阻害し、その中の8種をID38Fと共有したことを示している。これらのタンパク質の機能は、全て、IBD炎症及び／又は病理において恐らく重要であるシグナル伝達経路及び免疫学的プロセスに関連している。「補正していない」及び「対照正規化した」データを使用する分析の結果を比較した場合、ID38Fにより阻害された12のリン酸化タンパク質のセットは、両方の場合において同じであり；インフリキシマブに関して、12のリン酸化タンパク質は、両方の分析に共通すると同定された。

【0339】

アレイデータの更なる分析のために、ID38F及びインフリキシマブアレイから得た「対照正規化した」値を、対応する対照可変ドメイン及びIgGアレイからの「対照正規化した」値と直接比較し、並びに先のように比を計算した。抗-TNF抗体による阻害の一貫したパターンが、4名のIBD患者の少なくとも3名からの組織中で $\geq 50\%$ 阻害されたそれらのリン酸化タンパク質を基に再度注目された(表7C参照)。

【0340】

表7C 各アレイ上の平均陽性対照シグナルに対し正規化されたアレイデータからの比の計算により同定されたリン酸化タンパク質

【表 19】

生物学的機能	阻害されたリン酸化タンパク質 (4つのCD生検中3つにおいて>50%)	
	ID38F、対、対照可変ドメイン	インフリキシマブ、対、IgG
マクロファージアポトーシス性細胞 クリアランス	AXL TYRO3	AXL -
T細胞シグナル伝達/接着	EphA3 Lck	EphA3 -
血管新生	VEGFR2 TIE2 EphB4	VEGFR2 TIE2 -
疼痛/神経調節	EphB1	RET
細胞活性化/生存 /シグナル伝達	AKT ERK1/2 S6リボソームタンパク質 -	AKT ERK1/2 S6リボソームタンパク質 SRC PDGFR
造血		FLT3 cKit
上皮細胞調節	EphA1 -	EphA1 EphA2

10

20

【0341】

ID38F処理は、12/39リン酸化タンパク質を阻害したのに対し、インフリキシマブは、14/39リン酸化タンパク質を阻害し、その中の8種をID38Fと共有した。「補正していない」及び「対照正規化した」データを使用する分析の結果を比較した場合、ID38Fにより阻害された12のリン酸化タンパク質のセットは、両方の場合において同じであり；インフリキシマブに関して、12のリン酸化タンパク質は、両方の分析に共通すると同定された。

【0342】

(結論)

活動性疾患を伴うヒト患者から採取した炎症したIBD組織の培養物において、ID38Fによる又は臨床的に有効なモノクローナル抗体インフリキシマブによる、エクスビオ処理は、受容体チロシンキナーゼ及び細胞シグナル伝達に関連した標的を含むタンパク質セットのリン酸化を阻害することができる。構造的に異なる抗体による処理は、4つの組織中3つにおける8種のタンパク質のほぼ同一のセットのリン酸化を阻害したことの証拠は、両方の抗体の作用は、内在性TNF-駆動したプロセスの中和に起因することを強力に示唆している。ID38F又はインフリキシマブによるリン酸化タンパク質セットの阻害は、4名のIBD患者の少なくとも3名から採取した組織生検において認められた。IBD組織のひとつにおける特定のリン酸化タンパク質の阻害の欠如は、疾患の患者間の差異及び／又は異なる炎症部位から採取した生検の細胞性の差異を反映しているであろう。

30

【0343】

この試験は、ID38Fにより阻害された組織リン酸化タンパク質のパターンは、インフリキシマブの臨床と関連する濃度で達成されるものと、ほぼ同一であることの証拠を提供する。

40

【0344】

(実施例10：ID38F(本発明のポリペプチド)及び先行技術の抗-TNF- α ポリペプチドの中和効力比較)

ID38Fの中和効力を、一つの同じアッセイにおいて、以下の先行技術の抗-TNF- α ポリペプチドの中和効力と比較した：

TNF1(W02006122786に開示されたVHH、その中の配列番号:52)

TNF3(W02006122786に開示されたVHH、その中の配列番号:60)

50

TNF30(W02006122786に開示されたVHH、その中の配列番号:96)
 VHH#3E(W02004041862に開示されたVHH、その中の配列番号:4)
 アダリムマブ(市販のヒトモノクローナル抗体)。

【0345】

(材料)

L929細胞(10^4 個細胞/ウェル)
 96-ウェルプレート(Costar社)
 Pen/Strep+2mM L-グルタミンを補充したDMEM(Invitrogen社)
 ヒトTNF- α (Invitrogen社)濃度:500pg/ml
 アクチノマイシンD濃度(Sigma社):0.75ug/mL
 出芽酵母から精製したID38F
 大腸菌から精製したFlag-Hisタグ付きID38F
 アダリムマブ
 大腸菌から精製したFlag-Hisタグ付きTNF1、TNF3、TNF30、VHH#4E
 希釈範囲:5pM~30nM(1:3希釈)
 インキュベーション時間:23時間
 アラマーブルー細胞生存度試薬(Invitrogen社、DAL1100):10uL/ウェル
 3%SDS
 マイクロプレートリーダー(Fluostar Optima社)(OD590nm)

10

【0346】

(方法)

100ul中の 10^4 個のL929細胞/ウェルを、0日目に、96ウェルマイクロ-プレート(Costar社)内のDMEM完全培地中に播種し、且つ37℃、5%CO₂で一晩貯蔵した。1日目に、各精製したVHH/Abに関して連続希釈1:3(DMEM+Act.D中)を、最高濃度60nMから始まるアッセイ濃度(3つ組に十分な容量で)の2倍に設定した。次に各希釈物165uLを、DMEM+Act.D中に調製した、hTNF- α 2×(1ng/mL)の165uLにより、1:1希釈した。TNF 2×の0.9mLを、CM+Act.Dの0.9mLで希釈し、アッセイ中にTNFのみの対照を有した。培地を、アッセイマイクロプレートの各ウェルから除去し、細胞を、各TNF+VHH希釈物、CM+act.D又はTNFのみ対照の100uLと共にインキュベーションした。37℃及び5%CO₂で23時間、インキュベーションした後、アラマーブルー10ulを、各ウェルに添加し、細胞を、37℃及び5%CO₂で2時間インキュベーションし、3%SDSの50ulを引き続き各ウェルへ添加した。次にプレートを、590nmで読み取った。

20

30

【0347】

(結果)

得られた中和曲線(4パラメータ非線形回帰曲線を用い、GraphPad Prismにより作製)を、図6に示している。EC50値は、表8に示している。

【0348】

表8

【表20】

抗-TNF- α ポリペプチド	EC50 (nM)
TNF1	0.751
TNF3	0.631
TNF30	0.420
VHH#3E	1.110
ID38F-Flag-His (大腸菌-生成)	0.102
ID38F (出芽酵母-生成)	0.127
アダリムマブ	0.091

40

【0349】

VHH#3Eは、L929細胞におけるヒト可溶性TNF- α -誘導した細胞傷害性の中和において、

50

最も低い効力の抗-TNF- α ポリペプチドであることを、図6及び表8から認めることができる。ID38F(大腸菌-及び出芽酵母-生成の両方)は、先行技術の抗-TNF- α VHH類のEC50よりも、およそ4倍～1対数倍(1 log)より低いEC50を有した。

【0350】

(実施例11：本発明の抗-TNF- α ICVDの医薬組成物への製剤)

本明細書において開示された本発明の抗-TNF- α ICVDの1種を含有する固形医薬組成物を、乾式造粒及び打錠により、ミニ錠の形状で作製した。この抗-TNF- α ICVDは、115のアミノ酸、12.6kDaのポリペプチドで、pIが6.8であり、水溶解度が30mg/mLより大きい。ICVDは、ヒト及びカニクイザルTNF- α に対し、高い親和性で結合し、且つ強力な中和活性を有する。

10

【0351】

ミニ錠を、異なる体裁(presentation)で提示し、ここで各体裁は、異なるサイズのカプセル中に異なる量のミニ錠を含んだ。以下に詳述した実施例において使用した主要な体裁は、15個の腸溶性コートされたミニ錠(医薬活性結合性ポリペプチド合計185mg)を含む、サイズ00 HPMCカプセルであった。ミニ錠コアは、直径3mm(コーティング厚を除く)を有した。各ミニ錠に含まれた成分、従ってカプセルに含まれた15個のミニ錠中の成分は、下記表9に列挙している。

【0352】

表9

【表 2 1】

ミニ錠成分の名称	機能	組成物中の%w/w	185mg用量 (15個ミニ錠) の量 (mg/カプセル)	12mg用量 (1個ミニ錠) の量 (mg)
ミニ錠コア				
総ポリペプチド	医薬活性成分 (API)	45.7	225	15
マンニトール	打錠助剤	12.0	59.25	3.95
微晶質 セルロース	打錠助剤	14.6	72	4.8
クロスカルメロース ナトリウム	超崩壊剤	3.1	15	1
ステアリン酸マグネシウム	滑沢剤	0.8	3.75	0.25
サブコーティング				
ヒドロキシプロピルメチル セルロース	ポリマーコート	3.8	18.75	1.25
pH感受性腸溶性 コーティング				
Eudragit(登録商標) L100	腸溶性 ポリマーコート	11.7	57.76	3.85
クエン酸トリエチル	可塑剤	2.3	11.51	0.77
タルク	粘着防止剤	5.9	28.93	1.93
ラウリル硫酸 ナトリウム	界面活性剤	0.04	0.20	0.01

【0353】

この組成物中の総ポリペプチドは、およそ70～90%の純度を有し、そのためポリペプチドの225mgは、医薬活性結合性ポリペプチド185mgを含む。

【0354】

ミニ錠は、下記の方法により製造した：

凍結乾燥したポリペプチドを、マンニトール及びステアリン酸マグネシウムの一部と配合し、乾式スラッジ化し、その密度を増加した。次にこの材料を、篩を通過させ、他のミニ錠賦形剤(微晶質セルロース、クロスカルメロースナトリウム、及び残りのステアリン酸マグネシウム)と配合し、打錠し、ミニ錠を製造した。次にミニ錠を、エタノール：水80：20中ヒドロキシプロピルメチルセルロースの5%溶液で、コートし、乾燥させ、溶媒を除去し、下側コーティング及びより滑らかな表面を作製した。次にミニ錠を、有機溶液としてイソプロピルアルコール及び水中の、クエン酸トリエチル、タルク及びラウリル硫酸ナトリウムと一緒に、Eudragit(登録商標)L100ポリマーによりコートし、乾燥させ、pH-感受性腸溶性コートを作製した。次に得られるおよそ直径3mmのミニ錠を、カプセルへ、先に示した用量で充填した。pH感受性腸溶性コーティングは、厚さ100～170umを有した。

この製剤中で使用した本発明の抗-TNF- α ICVDはまた以下において、「医薬活性結合性ポリペプチド」、「ICVD」及び「ポリペプチド」とも称される。

【0355】

(実施例12：カニクイザルへの投与：様々な腸管コンパートメント中及び糞便中のポリペプチド濃度)

(12.1 異なる腸管コンパートメント中のポリペプチド濃度)

雌カニクイザルへ経口投与した場合の腸管領域を通じての、実施例11の組成物に類似している組成物の放出特性を評価するために、試験を行った。放出特性は、異なる腸管コンパートメント中のポリペプチド濃度の分析により評価した。

【0356】

11個のミニ錠を含む単独のカプセルを、3匹のカニクイザル(サルは、M234、M236及びM238と称した)の各々に、経口投与した。このミニ錠組成物は、各ミニ錠が追加のメチレンブルー(色素)1mg及び用量141mgのICVDを含んだ点が、実施例11のものと異なった。ミニ錠8錠はまた、イソプレナリン0.7mgも含んだ。メチレンブルー色素は、胃腸(GI)管を通じて溶解したミニ錠の分布の視覚的分析のためであり(本明細書において考察しない)、並びにイソプレナリンは、心拍数モニタリング試験において使用するためであった(本明細書において考察しない)。

【0357】

経口投薬の4時間後、動物を間引きした。胃腸管を、慎重に摘出し、異なるGIコンパートメントを結紮し、次に切断し、管腔内容物及び洗浄液を収集した。未溶解の及び部分的に溶解したミニ錠の数を書き留め、且つこれらのミニ錠を除去した。次に試料を均質化し、且つ分析まで凍結した。これらのスラリーの5000rpm、10℃で5分間の最初の遠心分離後、上清1mlを、各試料から取りだし、微小遠心管中で、同じ温度で5分間、13300rpmで遠心分離した。その後上清を再度、同じ条件下であるが20分間、遠心分離し、その後これらを標準ヒュミラ競合ELISAを用いて分析した。試料及びヒュミラの全ての希釈物を、並びにICVD標準を、1%BSA、0.6M NaCl、1%ヒトAB血清、0.05%Tween 20及び2×プロテアーゼインヒビターを含有するPBS中に調製した。ICVD濃度を、GraphPad Prismの式にフィットする4パラメータ、非線形曲線を用いる標準曲線から内挿した。未希釈のGI管試料中のICVD濃度を、上清希釈因子により乗算した最良の内挿したデータの平均をとることにより、誘導した。

【0358】

無傷のミニ錠は、M236又はM238のいずれかの胃、十二指腸、空腸又は回腸において認められなかった。M234において、4個の無傷のミニ錠が、胃内で、1個が十二指腸内で、及び1個が空腸内で認められた。部分的に溶解したミニ錠は、いずれのサルのいずれのGI管領域においても認められなかった。

【0359】

スラリー上清の調製は、大量の緩衝液を添加する必要がある、必然的にICVDを希釈した。図7において、予想されたICVDの管腔濃度を示した。これらは、管腔GI管内容物は、比重1を有すると仮定し、上清ICVD濃度を緩衝液の添加時の希釈倍率を乗算することにより、計算した。示したように、非常に高いICVD濃度(0.1~>1mM)が、恐らく一部のサルのGI管コンパートメントの管腔内で生じるであろう。

【0360】

ICVDは、1匹のカニクイザルの胃(M234)の内容物内のみで検出された。ICVDは、全てのサルの回腸、盲腸及び上部結腸の内容物においても、高濃度で認められた。加えて、M234及びM238は、空腸内容物において、高濃度で検出された(図7参照)。

【0361】

最後に、4時間での実際の用量は、溶解したミニ錠によってのみ送達されると仮定して、回収されたICVDの割合(%)を、計算した。図8に示したように、ICVD用量の51.5~74.9%の割合を占めた。

【0362】

この試験は、本発明の抗-TNF- α ICVDは、カニクイザルの下部GI管へ高濃度で送達されることができるとを示した。一部のミニ錠は投薬後4時間無傷であり続けるという知見は、この用量は、時間をかけて送達され、延長された曝露の可能性をもたらすであろうということを示唆している。これらの知見が、抗-TNF- α 結合性ポリペプチドを使用した場合のIBD患者の治療を反映しているならば、下部GI管に曝露された抗-TNF- α ポリペプチドの濃度は、効果的TNF- α 中和に十分以上であろうと予想することは妥当である。

【0363】

(12.2 糞便中のポリペプチド濃度)

11個のミニ錠を含む単独のカプセルを、3匹のカニクイザルの各々に、経口投与した。このミニ錠組成物は、各ミニ錠が追加のメチレンブルー(色素)1mgを含んだ点で、実施例11と異なり、並びにミニ錠8錠はまた、イソプレナリン0.7mgも含んだ。メチレンブルー色素は、糞便中のミニ錠の溶解の視覚的分析のためであり、並びにイソプレナリンは、心拍数モニタリング試験において使用するためであった(本明細書において考察しない)。

10

【0364】

サルからプールした糞便は、8、12、20、24及び36時間に収集した(16時間には試料を収集しなかった)。ミニ錠は、いずれの糞便試料中にも認められなかった。これらは、抽出緩衝液(PBS中の0.1%BSA、0.6M NaCl、0.05%Tween 20、1×プロテアーゼインヒビター、5mM EDTA)と、1g糞便/4mL緩衝液で混合し、その後均質化し、スラリーを、分析前の貯蔵のために、-80℃で凍結した。目視試験は、12時間、20時間、24時間及び36時間のスラリーの青色着色を明らかにした。先行するインビトロ実験(示さず)は、ミニ錠の溶解時の増加するメチレンブルー濃度は、ICVD濃度と密接に相関していることを明らかにした。

20

【0365】

スラリーを解凍し、4,000rpm(3,200g)で5分間遠心分離し、微粒子物質のバルクを除去した。各上清約1mLを、エッペンドルフチューブに移し、遠心機において13.5K、10℃で5分間遠心分離し、その後上清を、新たなチューブに入れ、10℃で20分間遠心分離した。その後上清を、ヒュミラ競合ELISAを使用する、ICVD測定に直ちに使用した。

【0366】

異なる糞便上清に関するELISA OD450読み値を、図9に示している。このデータは、ICVDは、36時間上清の可能性のある例外(最低希釈で目視できるわずかな活性が存在するが)を伴い、全ての時点で、糞便上清試料中に存在することを明らかに示している。

30

【0367】

糞便1gは、液体容量1mLと同等であり、並びにこのポリペプチドは糞便中に均一に分散されているという仮定を用い、GraphPad Prismを使用するICVDに関する標準曲線に対するこれらのデータの内挿及び添加した緩衝液の希釈因子による乗算は、各糞便試料中のICVD濃度を生じた。これらは、図10に示している。

【0368】

スラリー容量(糞便1g=1mL+抽出のための緩衝液の容量を基に計算した)を用い、各試料中のICVDの μ g量を決定した(図11)。

【0369】

まとめると、医薬活性結合性ポリペプチドの持続した実質的濃度が、カニクイザル腸管を通じて8時間以上達成された。

40

【0370】

(実施例13：ヒトへの投与：回腸-盲腸接合部及び糞便中のポリペプチド濃度)

(13.1 回腸-盲腸接合部でのポリペプチド濃度)

この試験の目的は、実施例11の組成物へ混入された本発明の抗-TNF- α ICVDは、高濃度で、ヒトにおいて、多くの患者の腸におけるクローン病の主要部位及びクローン病病巣の近位部位である、回腸-盲腸接合部へ送達されることを明らかにすることである。

【0371】

末端回腸造瘻バッグを装着した4名のヒト志願者は、各々、ミニ錠の内側サイズ00カプセルに製剤された、ICVDの単回経口用量1665 mgを受け取った(合計9カプセル)。それ以外

50

は健康であるこれらの個体において、回腸末端の全内容物を、脱着可能な外部バッグへ排出させた。投薬後各毎時時点で、総回腸流出物を含む装着したバッグを、取り外し、凍結し、新たなバッグを装着した。この方式で、回腸造瘻術の試料を、投薬後12時間にわたり、毎時収集した。この時点の後、回腸造瘻術試料を、投薬後24時間まで、4時間毎に収集した。投薬前試料(-1日目)も、対照として採取した。バッグ中に認められた部分的に溶解したミニ錠は、分析前に除去し、完全に可溶性のICVDのみを分析した。このICVDを、回腸液から抽出し、回腸液1gは液体容量1mLと同等であると仮定し、活性ICVDの濃度を、機能性ELISAから決定した。

【0372】

このデータは、200nM～最大1mMの範囲の、回腸造瘻バッグ中に存在する活性ICVDの高濃度を明らかにした。加えて、高濃度は、各対象のバッグ交換の数時間にわたって観察された(表10参照)。

【0373】

表10

【表22】

対象	投薬後時間	回腸溶液中のICVD濃度 (nM)
31001	2	406350
31001	3	305560
31001	4	791
31002	2	32780
31002	3	1130000
31002	4	792060
31002	5	81750
31002	6	12780
31002	7	1300
31002	8	422
31002	9	1410
31002	10	7520
31002	11	10080
31002	12	9210
31002	16	6980
31003	3	1060000
31003	4	496030
31003	5	7080
31003	8	46110
31003	9	75480
31003	10	16030
31003	11	72940
31003	12	15870
31003	16	881
31004	2	126190
31004	3	235
31004	4	11110
31004	5	3770
31004	6	6730

ICVDは、いずれの対象からの投薬前(-1日目)試料のいずれにおいても検出されなかった。

【0374】

まとめると、持続された高濃度の医薬活性結合性ポリペプチドが、これらのヒト志願者における回腸-盲腸接合部で達成された。

【0375】

(13.2 糞便中ポリペプチド濃度)

年齢18～45歳の健常男性対象に、実施例11に詳述した組成物を用い、ICVDの単回用量62、555、1665又は4995mgのいずれかで、経口投薬した。対象1名につき各単回用量は、1日目の8:30から12:00の間に投与した。糞便試料は、投薬前(-1日目、又は1日目の投薬前のいずれか)、及び4日目の午前中(試験終了時)までの投薬後入手可能な時点全てで収集した。ICVDを、糞便から抽出し、且つ糞便1gは液体容量1mLと同等であり、及びこのポリペプチドは糞便中に均一に分散されていると仮定し、活性ICVDの濃度を、機能性ELISAにより決定した。

10

【0376】

180nM～724 μ Mの範囲の高濃度を、対象の糞便から得た(表11参照)。

【0377】

表11

【表 2 3】

対象ID	ICDV 投薬 (mg)	糞便試料 収集日	投薬前又は後	糞便中の[ICVD] (nM)
11001	62	-1	投薬前	0
11001		1	投薬後	1013
13001	555	-1	投薬前	0
13001		2	投薬後	1052
13003	555	-1	投薬前	0
13003		1	投薬後	1938
13003		2	投薬後	1511
14002	1665	-1	投薬前	0
14002		1	投薬後	5491
14002		2	投薬後	558
14004	1665	-1	投薬前	0
14004		2	投薬後	27532
14006	1665	-1	投薬前	0
14006		2	投薬後	62579
15001	4995	-1	投薬前	0
15001		1	投薬後	10047
15001		2	投薬後	135285
15001		3	投薬後	330
15004	4995	-1	投薬前	0
15004		3	投薬後	273
15005	4995	1	投薬前	0
15005		1	投薬後	724684
15005		2	投薬後	258703
15005		3	投薬後	3536
15006	4995	-1	投薬前	0
15006		1	投薬後	57120
15006		2	投薬後	358
15006		2	投薬後	186

【0 3 7 8】

アダリムマブ(ヒュミラ)及びインフリキシマブ(レミケード)などの、クローン病の治療に臨床使用される抗-TNF剤は、静脈内点滴又は皮下注射のいずれかにより、投与する。Un garらの文献、(2016) Clin Gastroenterol Hepatol. 14(4):550-557は、アダリムマブに 40
関するトラフ血清レベル56~83nM(8~12 µg/mL)及びインフリキシマブに関する42~70nM(6~10 µg/mL)は、IBD患者の80%~90%において粘膜治癒を達成するために必要であるこ
と、及びこれは「治療ウインドウ」と考えられることを言及している。これらのトラフ血
清レベルはまた、ポイント12.1において先に確立されたカニクイザル胃腸管部分における
計算された管腔抗-TNF- α ICVD濃度に関して、図7に示されている。

【0 3 7 9】

回腸-盲腸接合部へ送達された(先のセクション13.1) 抗-TNF- α ICVD濃度、及びこのセ
クションの臨床試験時にヒト志願者糞便から回収された抗-TNF- α ICVD濃度は、これらの
レベルよりも、有意に高く、従ってクローン病の治療として有効であることが予想された
。これは、消化管管腔の抗-TNF- α ICVD濃度は、消化管粘膜及び粘膜下への接近／浸透に 50

関して、市販の抗-TNF剤の血清濃度と同等であると仮定している。しかし、更なる実験的研究(示さず)において、DSS大腸炎マウスに経口投薬された、本発明のこの抗-TNF- α ICVDは、固有層へ浸透することができ、そこでこれはマウスにおいて標的(TNF)との結合(engagement)を欠いているにもかかわらず、数時間滞在することが明らかにされた。

【0380】

先の13.1に示されたデータをまとめると、これらの結果は、回腸-盲腸接合部から肛門への治療的レベルのICVDの送達がうまくいくことを明らかにしている。

【0381】

(実施例14：ヒトへの投与：免疫原性試験)

治療的抗体を含むタンパク質薬物は、患者において抗体反応を誘起することがある。タンパク質薬物のエピトープを認識する患者において産生された抗体(複数のIgクラスの)は、抗-薬物抗体(ADA)と称される。ADAの存在は、薬物の有効性/効力の喪失又は有害な患者作用を生じ得る(van Schieらの文献、Ann Rheum Dis、2015 74:311-314)。

【0382】

実施例11の組成物の男性における持続された経口投薬は、ADA反応を誘発するかどうかを評価するために、試験を行った。年齢18~45歳の健常男性対象に、実施例11に従いミニ錠に製剤された、ICVD 1665mg(合計4995mg/日)又はプラセボを含有するカプセル剤を、1日3回、14日間、経口投薬した。対象からの血清試料を、投薬前、投薬後7日目及び14日目、及び最後に28日目(治療停止後14日目)に採取した。これらの試料を、ICVD抗-薬物抗体(ADA)の存在について、サンドイッチELISAにより分析した。この分析は、4名の志願者から低力価ではあるがADA陽性の血清を明らかにし、そのうちの2名はプラセボを受け取っていた。これらの個体全てにおいて、ADAは、ICVD投薬前に若干レベルで存在した(予め存在するADA)。

【0383】

TNF-TNFR2 ELISAにおけるICVD効力の分析は、5%で、全てのADA-陽性ヒト血清試料の存在は、TNF- α に対するICVD活性に影響を及ぼさなかったことを明らかにした。従って、ICVD中和するADAの証拠は、いずれの時点でもいずれの志願者の血清においても認められなかった(表12参照)。

【0384】

表12

10

20

30

【表 2 4】

対象ID	活性又は プラセボ	試料	ADAサンドイッチ ELISA スクリーニング	ADA 力価/血清 希釈	ICVD中和
21001	活性	投薬前	陰性		
21001	活性	7日目	陰性		
21001	活性	14日目	陰性		
21001	活性	28日目	陰性		
21002	活性	投薬前	陰性		
21002	活性	7日目	陰性		
21002	活性	14日目	陰性		
21002	活性	28日目	陰性		
21003	活性	投薬前	陰性		
21003	活性	7日目	陰性		
21003	活性	14日目	陰性		
21003	活性	28日目	陰性		
21004	プラセボ	投薬前	陽性	64	なし
21004	プラセボ	7日目	陽性	64	なし
21004	プラセボ	14日目	陽性	64	なし
21004	プラセボ	28日目	陽性	64	なし
21005	活性	投薬前	陽性	64	なし
21005	活性	7日目	陽性	32	なし
21005	活性	14日目	陽性	32	なし
21005	活性	28日目	陽性	32	なし
21006	活性	投薬前	陰性		
21006	活性	7日目	陰性		

10

20

21006	活性	14日目	陰性		
21006	活性	28日目	陰性		
21007	活性	投薬前	陰性		
21007	活性	7日目	陰性		
21007	活性	14日目	陰性		
21007	活性	28日目	陰性		
21008	活性	投薬前	陽性	4	なし
21008	活性	7日目	陽性	4	なし
21008	活性	14日目	陽性	8	なし
21008	活性	28日目	陽性	128	なし
21009	プラセボ	投薬前	陽性	8	なし
21009	プラセボ	7日目	陽性	8	なし
21009	プラセボ	14日目	陽性	16	なし
21009	プラセボ	28日目	陽性	8	なし
21010	活性	投薬前	陰性		
21010	活性	7日目	陰性		
21010	活性	14日目	陰性		
21010	活性	28日目	陰性		

30

40

50

【0385】

(条項)

本発明及びその好ましい態様を規定する条項のセットは、以下である：

1. TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、ここでこの免疫グロブリン鎖可変ドメインが、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR1は、配列番号:1と60%以上の配列同一性を共有する配列を含み、CDR2は、配列番号:2と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びに

(a)CDR3は、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又は

(b)CDR3は、配列番号:3と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びにここで配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、ポリペプチド。

10

2. 前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、V、L、W、P、M、C、F又はIである、条項1記載のポリペプチド。

3. 前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、Hである、条項2記載のポリペプチド。

4. 前記CDR3が、配列番号:3を含む、条項3記載のポリペプチド。

5. 前記CDR3の配列が、配列番号:3、配列番号:70、配列番号:71又は配列番号:72である、条項1記載のポリペプチド。

6. 前記CDR1が、配列番号:1と80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、条項1~5のいずれか一項記載のポリペプチド。

20

7. 前記CDR1が、配列番号:1を含む、条項6記載のポリペプチド。

8. 前記CDR1の配列が、配列番号:1、配列番号:59又は配列番号:60である、条項6記載のポリペプチド。

9. 前記CDR2が、配列番号:2と、55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、条項1~8のいずれか一項記載のポリペプチド。

10. 前記CDR2が、配列番号:2を含む、条項9記載のポリペプチド。

30

11. 前記CDR2の配列が、配列番号:61、配列番号:62、配列番号:2、配列番号:63、配列番号:64、配列番号:65、配列番号:66、配列番号:67、配列番号:68、配列番号:69である、条項9記載のポリペプチド。

12. 配列番号:8と、50%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する、例えば96%以上の配列同一性を共有する、例えば97%以上の配列同一性を共有する、例えば98%以上の配列同一性を共有する、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含む、条項1~11のいずれか一項記載のポリペプチド。

40

13. 前記配列番号:8を含む、条項12記載のポリペプチド。

14. VHH、VH、VL、V-NAR、Fab断片及びF(ab')₂断片からなるリストから選択される、条項1~13のいずれか一項記載のポリペプチド。

15. 特に、ポリヌクレオチドが、配列番号:83~88のいずれかひとつと70%以上、例えば80%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含むか又はこれからなり、より特定すると、このポリヌクレオチドが、配列番号:83から88のいずれか一つを含むか又はこれからなる、条項1~14のいずれか一項記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。

【0386】

50

(雑記)

特許及び特許出願を含む、本出願において言及された全ての参考文献は、可能な限り完全な程度で、引用により本明細書中に組み込まれている。

【0387】

本明細書及びそれに続く請求項を通じて、状況を別に必要としない限りは、用語「含む」、並びに「含んでなる」及び「含んでいる」などの変形は、言及された整数、工程、整数群又は工程群を包含することを暗示しているが、他の整数、工程、整数群又は工程群を排除するものではないことが理解されるであろう。

【0388】

この説明及び請求項が一部を形成する本願は、任意の後願に関する優先権の基礎として使用することができる。かかる後願の請求項は、本明細書記載の任意の特徴又は特徴の組合せが対象とされてよい。これらは、製品、組成物、製法、又は用途の請求項の形をとることができる、且つ以下の請求項を、限定を伴わない例として、含むことができる。

【0389】

10

【表 2 5】

配 列

名称
(配列番号)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
ファミリー1配列							
Q65F2 (23)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITSYVDSVKG	RFTVSRDNaANTLYLEMTSLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q65F3 (24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYIDSVRG	RFTASRDNaANTLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q62F2 (25)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDN	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITNYVDSVKG	RFTVSRDNaANTLYLEMTSLKPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q65G1 (26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFDY	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYIDSVRG	RFTVSRDNaANTLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q65H6 (27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFDY	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYIDSVRG	RFTVSRDNaANTLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q65F1 (28)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFG	VHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYIDSVGG	RFTVSRDNaANRLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NQMGLN	KGQGTQVTVSS
Q65D1 (29)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGDFD	NHMMC	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYADFVKG	RFTVSRDNaANTLYLQITRLKPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q65C7 (30)	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCTASGFD	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYADFVKG	RFTVSRDNaANTLYLEITRLPEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
Q65D3 (31)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFD	SHWMY	WVRQAPGKGLEWVS	EINTNGLITKYADSTKG	RFTVSRDNaANMLNLEMTSLEPEDTALYYCAR	NERGLN	KGQGTQVTVSS
Q65B1 (32)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD	SHWMY	WVRQAPGKELEWLS	EINTNGLITKYGDSVKG	RFTVSRNNaANKMYLELRLPEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTVSS
ファミリー2配列							
Q65F6 (33)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGDFG	IHWMY	WVRQAPGKELEWVA	EINTNGLITLYSDSVRG	RFTASRDNaANALFLQMNDLKPEDTAVYYCAK	SRNGAA	KGQGTQVTVSS

(83)

JP 6895421 B2 2021.6.30

10

20

30

40

ID24F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
(49)		SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
ID25F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
(50)		SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
ID26F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
(51)		SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
ID27F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
(52)		SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
ID28F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITIKYGDVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
(53)		SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITIKYGDVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
ID29F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITIKYGDVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
(54)		SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITIKYGDVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
ID8F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
(42)							
ID34F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
(56)							
ID37F	DVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTSS
(57)							
ID38F	DVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	SHWMY	WVRQAPGKLEWL	EINTNGLITHYGDVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTSS
(8)							
比較例							
Q62F11	QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPS	DYVMG	WFRQAPGKREFVG	FIRWDGLVTRYADAVKG	RFTISRDNARNTLSQITIGLIAEDTAVYYCAA	SGGGSGFVNAGSYEY	WGQGTQVTSS
(40)							

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成1)

TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、ここでこの免疫グロブリン鎖可変ドメインが、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレ

10

20

30

40

50

ームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR1は、配列番号:1と60%以上の配列同一性を共有する配列を含み、CDR2は、配列番号:2と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びに

(a)CDR3は、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含むか、又は

(b)CDR3は、配列番号:3と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びにここで配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、ポリペプチド。

(構成2)

前記CDR3が、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1記載のポリペプチド。

(構成3)

前記CDR3が、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成2記載のポリペプチド。

(構成4)

前記CDR3の、配列番号:3における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成2又は3いずれかに記載のポリペプチド。

(構成5)

前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はIであり、例えば、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、V、L、W、P、M、C、F又はIである、構成2又は3のいずれかに記載のポリペプチド。

(構成6)

前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、Hである、構成5記載のポリペプチド。

(構成7)

前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、Hであり、並びに、該CDR3の、配列番号:3における対応する残基と異なる任意の他の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成6記載のポリペプチド。

(構成8)

前記CDR3が、配列番号:3を含む、構成2記載のポリペプチド。

(構成9)

前記CDR3が、配列番号:3からなる、構成3記載のポリペプチド。

(構成10)

前記CDR3が、配列番号:3と、50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びにここで配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、例えば、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、構成1記載のポリペプチド。

(構成11)

前記CDR3が、配列番号:3と、60%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する配列を含み、並びにここで配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はVであり、例えば、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、構成10記載のポリペプチド。

(構成12)

前記CDR3が、配列番号:3と、60%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する配列からなり、並びにここで配列番号:3の残基番号3が、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、例えば、R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、M、F、P、S、T、W、Y又はVである、構成11記載のポリペプチド。

(構成13)

配列番号:3の残基番号3が、H又はHの保存的置換である、構成10~12のいずれか一項記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

(構成 1 4)

配列番号:3の残基番号3が、Hである、構成13記載のポリペプチド。

(構成 1 5)

配列番号:3の残基番号3が、H又はHの保存的置換であり、並びに、前記CDR3の、配列番号:3における対応する残基と異なる任意の他の残基が、保存的置換である、構成10～12のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 1 6)

配列番号:3の残基番号3が、Hであり、並びに、前記CDR3の、配列番号:3における対応する残基と異なる任意の他の残基が、保存的置換である、構成15記載のポリペプチド。

(構成 1 7)

前記CDR3の配列が、配列番号:3、配列番号:70、配列番号:71又は配列番号:72である、構成12記載のポリペプチド。

(構成 1 8)

前記CDR1が、配列番号:1と、80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1～17のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 1 9)

前記CDR1が、配列番号:1と、80%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成18記載のポリペプチド。

(構成 2 0)

前記CDR1の、配列番号:1における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成1～19のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 2 1)

前記CDR1が、配列番号:1を含む、構成18記載のポリペプチド。

(構成 2 2)

前記CDR1が、配列番号:1からなる、構成19記載のポリペプチド。

(構成 2 3)

前記CDR1の配列が、配列番号:1、配列番号:59又は配列番号:60である、構成1～17のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 2 4)

前記CDR2が、配列番号:2と、55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1～23のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 2 5)

前記CDR2が、配列番号:2と、55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成24記載のポリペプチド。

(構成 2 6)

前記配列番号:2の残基番号10に対応するCDR2の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はIである、構成1～25のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 2 7)

前記配列番号:2の残基番号10に対応するCDR2の残基が、Hである、構成26記載のポリペプチド。

(構成 2 8)

前記CDR2の、配列番号:2における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成1～25のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 2 9)

10

20

30

40

50

前記CDR2が、配列番号:2を含む、構成24記載のポリペプチド。

(構成30)

前記CDR2が、配列番号:2からなる、構成25記載のポリペプチド。

(構成31)

前記CDR2の配列が、配列番号:61、配列番号:62、配列番号:2、配列番号:63、配列番号:64、配列番号:65、配列番号:66、配列番号:67、配列番号:68、配列番号:69である、構成1～23のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成32)

前記FR1が、配列番号:4と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば12%以上の配列同一性を共有する、例えば18%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば38%以上の配列同一性を共有する、例えば46%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば62%以上の配列同一性を共有する、例えば66%以上の配列同一性を共有する、例えば68%以上の配列同一性を共有する、例えば72%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば78%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1～31のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成33)

前記FR1が、配列番号:4と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば12%以上の配列同一性を共有する、例えば18%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば38%以上の配列同一性を共有する、例えば46%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば62%以上の配列同一性を共有する、例えば66%以上の配列同一性を共有する、例えば68%以上の配列同一性を共有する、例えば72%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば78%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成32記載のポリペプチド。

(構成34)

前記配列番号:4の残基番号1に対応するFR1の残基が、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はNである、構成1～33のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成35)

前記配列番号:4の残基番号1に対応するFR1の残基が、D又はEである、構成34記載のポリペプチド。

(構成36)

前記配列番号:4の残基番号1に対応するFR1の残基が、Dである、構成35記載のポリペプチド。

(構成37)

前記配列番号:4の残基番号5に対応するFR1の残基が、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はNである、構成1～36のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成38)

前記配列番号:4の残基番号5に対応するFR1の残基が、Vである、構成37記載のポリペプチド。

(構成39)

前記配列番号:4の残基番号1～5に対応するFR1の残基が、DVQLVである、構成37又は38のいずれかに記載のポリペプチド。

(構成40)

前記配列番号:4の残基番号20に対応するFR1の残基が、疎水性であるアミノ酸である、構成1～39のいずれか一項記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

(構成 4 1)

前記配列番号:4の残基番号20に対応するFR1の残基が、Lである、構成40記載のポリペプチド。

(構成 4 2)

前記配列番号:4の残基番号24に対応するFR1の残基が、疎水性であるアミノ酸である、構成1~41のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 4 3)

前記配列番号:4の残基番号24に対応するFR1の残基が、Aである、構成42記載のポリペプチド。

(構成 4 4)

前記配列番号:4の残基番号29に対応するFR1の残基が、Fである、構成1~43のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 4 5)

前記FR1の、配列番号:4における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成1~33のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 4 6)

前記FR1が、配列番号:4を含む、構成32記載のポリペプチド。

(構成 4 7)

前記FR1が、配列番号:4からなる、構成33記載のポリペプチド。

(構成 4 8)

前記FR2が、配列番号:5と、10%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば25%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1~47のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 4 9)

前記FR2が、配列番号:5と、10%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば25%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成48記載のポリペプチド。

(構成 5 0)

前記配列番号:5の残基番号8~11に対応するFR2の残基が、KEXEであり、ここでXが、R又はLである、構成1~49のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 5 1)

前記Xが、Lである、構成50記載のポリペプチド。

(構成 5 2)

前記Xが、Rである、構成50記載のポリペプチド。

(構成 5 3)

前記配列番号:5の残基番号9~12に対応するFR2の残基が、GLEWである、構成1~49のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 5 4)

前記FR2の、配列番号:5における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成1~49のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 5 5)

前記FR2が、配列番号:5を含む、構成48記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

(構成 5 6)

前記FR2が、配列番号:5からなる、構成49記載のポリペプチド。

(構成 5 7)

前記FR3が、配列番号:6と、8%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば76%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば92%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1～56のいずれか一項記載のポリペプチド。

10

(構成 5 8)

前記FR3が、配列番号:6と、8%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば76%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば92%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成57記載のポリペプチド。

20

(構成 5 9)

前記配列番号:6の残基番号26に対応するFR3の残基が、疎水性であるアミノ酸である、構成1～58のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 6 0)

前記配列番号:6の残基番号26に対応するFR3の残基が、Aである、構成59記載のポリペプチド。

30

(構成 6 1)

前記FR3の、配列番号:6における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成1～60のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 6 2)

前記FR3が、配列番号:6を含む、構成57記載のポリペプチド。

(構成 6 3)

前記FR3が、配列番号:6からなる、構成58記載のポリペプチド。

(構成 6 4)

前記FR4が、配列番号:7と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば10%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば50%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1～63のいずれか一項記載のポリペプチド。

40

(構成 6 5)

前記FR4が、配列番号:7と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば10%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば50%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配

50

列からなる、構成64記載のポリペプチド。

(構成66)

前記FR4の、配列番号:7における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成1~65のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成67)

前記FR4が、配列番号:7を含む、構成64記載のポリペプチド。

(構成68)

前記FR4が、配列番号:7からなる、構成65記載のポリペプチド。

(構成69)

配列番号:8と、50%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する、例えば96%以上の配列同一性を共有する、例えば97%以上の配列同一性を共有する、例えば98%以上の配列同一性を共有する、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成1~68のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成70)

配列番号:8と、50%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する、例えば96%以上の配列同一性を共有する、例えば97%以上の配列同一性を共有する、例えば98%以上の配列同一性を共有する、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成69記載のポリペプチド。

(構成71)

前記ポリペプチドのN-末端が、Dである、構成1~70のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成72)

配列番号:8を含む、構成69記載のポリペプチド。

(構成73)

配列番号:8からなる、構成70記載のポリペプチド。

(構成74)

TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、ここでこの免疫グロブリン鎖可変ドメインが、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR1は、配列番号:15と60%以上の配列同一性を共有する配列を含み、CDR2は、配列番号:16と50%以上の配列同一性を共有する配列を含み、及びCDR3は、配列番号:17と50%以上の配列同一性を共有する配列を含む、ポリペプチド。

(構成75)

前記CDR3が、配列番号:17と、60%以上の配列同一性、例えば80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74記載のポリペプチド。

(構成76)

前記CDR3が、配列番号:17と、60%以上の配列同一性、例えば80%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成75記載のポリペプチド。

(構成77)

前記CDR3の、配列番号:17における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74~76のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成78)

10

20

30

40

50

前記CDR3の配列が、配列番号:78、配列番号:79、配列番号:17又は配列番号:80である、構成74記載のポリペプチド。

(構成 7 9)

前記CDR3が、配列番号:17を含む、構成75記載のポリペプチド。

(構成 8 0)

前記CDR3が、配列番号:17からなる、構成76記載のポリペプチド。

(構成 8 1)

前記CDR1が、配列番号:15と、80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74～80のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 8 2)

前記CDR1が、配列番号:15と80%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成74～80のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 8 3)

前記CDR1の、配列番号:15における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74～82のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 8 4)

前記CDR1が、配列番号:15を含む、構成81記載のポリペプチド。

(構成 8 5)

前記CDR1が、配列番号:15からなる、構成82記載のポリペプチド。

(構成 8 6)

前記CDR2が、配列番号:16と、55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74～85のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 8 7)

前記CDR2が、配列番号:16と、60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成86記載のポリペプチド。

(構成 8 8)

前記配列番号:16の残基番号10に対応するCDR2の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はIである、構成74～87のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 8 9)

前記配列番号:16の残基番号10に対応するCDR2の残基が、Hである、構成88記載のポリペプチド。

(構成 9 0)

前記配列番号:16の残基番号16に対応するCDR2の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はIである、構成74～89のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 9 1)

前記配列番号:16の残基番号16に対応するCDR2の残基が、Hである、構成90記載のポリペプチド。

(構成 9 2)

前記CDR2の、配列番号:16における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74～87のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 9 3)

前記CDR2が、配列番号:16を含む、構成86記載のポリペプチド。

(構成 9 4)

前記CDR2が、配列番号:16からなる、構成87記載のポリペプチド。

(構成95)

前記CDR2の配列が、配列番号:73、配列番号:74、配列番号:75、配列番号:76、配列番号:77又は配列番号:16である、構成74記載のポリペプチド。

(構成96)

前記FR1が、配列番号:18と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば12%以上の配列同一性を共有する、例えば18%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば38%以上の配列同一性を共有する、例えば46%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば62%以上の配列同一性を共有する、例えば66%以上の配列同一性を共有する、例えば68%以上の配列同一性を共有する、例えば72%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば78%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74~95のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成97)

前記FR1が、配列番号:18と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば12%以上の配列同一性を共有する、例えば18%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば38%以上の配列同一性を共有する、例えば46%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば62%以上の配列同一性を共有する、例えば66%以上の配列同一性を共有する、例えば68%以上の配列同一性を共有する、例えば72%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば78%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成96記載のポリペプチド。

(構成98)

前記配列番号:4の残基番号1に対応するFR1の残基が、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はNである、構成74~97のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成99)

前記配列番号:18の残基番号1に対応するFR1の残基が、D又はEである、構成98記載のポリペプチド。

(構成100)

前記配列番号:18の残基番号1に対応するFR1の残基が、Dである、構成99記載のポリペプチド。

(構成101)

前記配列番号:18の残基番号5に対応するFR1の残基が、G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E又はNである、構成74~100のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成102)

前記配列番号:4の残基番号5に対応するFR1の残基が、Vである、構成101記載のポリペプチド。

(構成103)

前記配列番号:18の残基番号1~5に対応するFR1の残基が、DVQLVである、構成96~102のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成104)

前記配列番号:18の残基番号20に対応するFR1の残基が、疎水性であるアミノ酸である、構成74~103のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成105)

前記配列番号:18の残基番号20に対応するFR1の残基が、Lである、構成104記載のポリペ

10

20

30

40

50

プチド。

(構成106)

前記配列番号:18の残基番号29に対応するFR1の残基が、Fである、構成74~105のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成107)

前記FR1の、配列番号:18における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74~97のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成108)

前記FR1が、配列番号:18を含む、構成96記載のポリペプチド。

(構成109)

前記FR1が、配列番号:18からなる、構成97記載のポリペプチド。

(構成110)

前記FR2が、配列番号:19と、10%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば25%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74~109のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成111)

前記FR2が、配列番号:19と、10%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば25%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列をからなる、構成110記載のポリペプチド。

(構成112)

前記配列番号:19の残基番号8~11に対応するFR2の残基が、KELEである、構成74~111のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成113)

前記FR2の、配列番号:19における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74~111のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成114)

前記FR2が、配列番号:19を含む、構成110記載のポリペプチド。

(構成115)

前記FR2が、配列番号:19からなる、構成111記載のポリペプチド。

(構成116)

前記FR3が、配列番号:20と、8%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば76%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば92%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74~115のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成117)

前記FR3が、配列番号:20と、8%以上の配列同一性を共有する、例えば15%以上の配列

10

20

30

40

50

同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば26%以上の配列同一性を共有する、例えば32%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば45%以上の配列同一性を共有する、例えば52%以上の配列同一性を共有する、例えば58%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば76%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば82%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば92%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成116記載のポリペプチド。

(構成118)

前記配列番号:20の残基番号26に対応するFR3の残基が、疎水性であるアミノ酸である、構成74~117のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成119)

前記配列番号:20の残基番号26に対応するFR3の残基が、Aである、構成118記載のポリペプチド。

(構成120)

前記FR3の、配列番号:20における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74~117のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成121)

前記FR3が、配列番号:20を含む、構成116記載のポリペプチド。

(構成122)

前記FR3が、配列番号:20からなる、構成117記載のポリペプチド。

(構成123)

前記FR4が、配列番号:21と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば10%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば50%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74~122のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成124)

前記FR4が、配列番号:21と、5%以上の配列同一性を共有する、例えば10%以上の配列同一性を共有する、例えば20%以上の配列同一性を共有する、例えば30%以上の配列同一性を共有する、例えば40%以上の配列同一性を共有する、例えば50%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成123記載のポリペプチド。

(構成125)

前記配列番号:21の残基番号1に対応するFR4の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はIである、構成74~124のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成126)

前記配列番号:21の残基番号1に対応するFR4の残基が、Hである、構成125記載のポリペプチド。

(構成127)

前記FR4の、配列番号:21における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成74~126のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成128)

前記FR4が、配列番号:21を含む、構成123記載のポリペプチド。

(構成129)

前記FR4が、配列番号:21からなる、構成124記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

(構成 1 3 0)

配列番号:22と、50%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する、例えば96%以上の配列同一性を共有する、例えば97%以上の配列同一性を共有する、例えば98%以上の配列同一性を共有する、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含む、構成74～129のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 1 3 1)

配列番号:22と、50%以上の配列同一性を共有する、例えば55%以上の配列同一性を共有する、例えば60%以上の配列同一性を共有する、例えば65%以上の配列同一性を共有する、例えば70%以上の配列同一性を共有する、例えば75%以上の配列同一性を共有する、例えば80%以上の配列同一性を共有する、例えば85%以上の配列同一性を共有する、例えば90%以上の配列同一性を共有する、例えば95%以上の配列同一性を共有する、例えば96%以上の配列同一性を共有する、例えば97%以上の配列同一性を共有する、例えば98%以上の配列同一性を共有する、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成130記載のポリペプチド。

(構成 1 3 2)

配列番号:22を含む、構成130記載のポリペプチド。

(構成 1 3 3)

配列番号:22からなる、構成131記載のポリペプチド。

(構成 1 3 4)

前記ポリペプチドのN-末端が、Dである、構成74～133のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 1 3 5)

前記ポリペプチドが、抗体である、構成1～134のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 1 3 6)

前記ポリペプチドが、抗体断片である、構成1～135のいずれか一項記載のポリペプチド。

(構成 1 3 7)

VHH、VH、VL、V-NAR、Fab断片及びF(ab')₂断片からなるリストから選択される、構成136記載のポリペプチド。

(構成 1 3 8)

前記ポリペプチドが、VHHである、構成137記載のポリペプチド。

(構成 1 3 9)

前記ポリペプチドが、VHである、構成137記載のポリペプチド。

(構成 1 4 0)

構成1～139のいずれか一項記載の2種以上の同一ポリペプチドを含む、構築体。

(構成 1 4 1)

構成1～139のいずれか一項記載の少なくとも1種のポリペプチド、及び少なくとも1種の異なるポリペプチドを含む構築体であって、ここでこの異なるポリペプチドが、TNF- α に結合する、構築体。

(構成 1 4 2)

構成1～139のいずれか一項記載の少なくとも1種のポリペプチド、及び少なくとも1種の異なるポリペプチドを含む構築体であって、ここでこの異なるポリペプチドが、TNF- α 以外の標的に結合する、構築体。

(構成 1 4 3)

前記ポリペプチドが、少なくとも1種のプロテアーゼ-不安定性リンカーにより連結されている、構成140～142のいずれか一項記載の構築体。

10

20

30

40

50

(構成 1 4 4)

前記プロテアーゼ-不安定性リンカーが、下記フォーマット：

$[-(G_4S)_x-BJB'- (G_4S)_y-]_z$

(式中、Jは、リジン又はアルギニンであり；

xは、1～10であり；

yは、1～10であり；

zは、1～10であり；

Bは、R、H、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F、K又はIから選択された、0～5個のアミノ酸残基であり；並びに

B'は、R、H、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、M、C、F、K又はIから選択された0～5個のアミノ酸残基である。)：である、構成143記載の構築体。

10

(構成 1 4 5)

前記Jが、リジンであり、Bが0であり、xが1であり、yが1であり、並びにzが1である、構成144記載の構築体。

(構成 1 4 6)

前記ポリペプチドが全て、非-プロテアーゼ-不安定性リンカーにより連結されている、構成140～142のいずれか一項記載の構築体。

(構成 1 4 7)

前記非-プロテアーゼ-不安定性リンカーが、下記フォーマット：

$(G_4S)_x$

(式中、xは、1～10である)：である、構成146記載の構築体。

20

(構成 1 4 8)

前記xが、6である、構成147記載の構築体。

(構成 1 4 9)

1nM以下、例えば0.9nM以下、例えば0.8nM以下、例えば0.7nM以下、例えば0.6nM以下、例えば0.5nM以下、例えば0.4nM以下、例えば0.3nM以下、例えば0.2nM以下、例えば0.1nM以下、例えば0.09nM以下、例えば0.08nM以下、例えば0.07nM以下、例えば0.06nM以下、例えば0.05nM以下、例えば0.04nM以下のEC50で、正常L929アッセイにおいてヒトTNF- α 細胞傷害性を中和する、構成1～148のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体。

30

(構成 1 5 0)

1nM以下、例えば0.9nM以下、例えば0.8nM以下、例えば0.7nM以下、例えば0.6nM以下、例えば0.5nM以下、例えば0.4nM以下、例えば0.3nM以下、例えば0.2nM以下、例えば0.1nM以下、例えば0.09nM以下、例えば0.08nM以下、例えば0.07nM以下、例えば0.06nM以下、例えば0.05nM以下、例えば0.04nM以下、例えば0.03nM以下、例えば0.02nM以下、例えば0.01nM以下のEC50で、正常L929アッセイにおいてカニクイザルTNF- α 細胞傷害性を中和する、構成1～149のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体。

(構成 1 5 1)

1種以上のプロテアーゼに対し実質的に抵抗性である、構成1～150のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体。

(構成 1 5 2)

前記1種以上のプロテアーゼが、胃又は小腸又は大腸内に存在する、構成151記載のポリペプチド又は構築体。

40

(構成 1 5 3)

前記1種以上のプロテアーゼが、小腸内に存在する、構成152記載のポリペプチド又は構築体。

(構成 1 5 4)

前記1種以上のプロテアーゼが、エンテロペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシン及び炎症性腸疾患炎症プロテアーゼからなる群から選択される、構成151記載のポリペプチド又は構築体。

(構成 1 5 5)

50

前記1以上のプロテアーゼが、トリプシン、キモトリプシン及び炎症性腸疾患炎症プロテアーゼからなる群から選択される、構成154記載のポリペプチド又は構築体。

(構成156)

前記炎症性腸疾患炎症プロテアーゼが、MMP3、MMP12及びカテプシンからなる群から選択される1種以上のプロテアーゼである、構成154又は155のいずれかに記載のポリペプチド又は構築体。

(構成157)

前記プロテアーゼが、トリプシン及びキモトリプシンである、構成155記載のポリペプチド又は構築体。

(構成158)

構成1～157のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体、及び1種以上の医薬として許容し得る希釈剤又は担体を含有する、医薬組成物。

(構成159)

前記組成物が、腸溶性にコートされた形態で提供される、構成158記載の医薬組成物。

(構成160)

少なくとも1種の更なる活性物質を含有する、構成158又は159のいずれかに記載の医薬組成物。

(構成161)

少なくとも1種の更なる活性物質が、5-アミノサリチル酸、又はそのプロドラッグ(スルファサラジン、オルサラジン又はビスアラジドなど)；コルチコステロイド(例えば、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、又はブデソニド)；免疫抑制剤(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、メトトレキサート、アザチオプリン又は6-メルカプトプリン)；抗-TNF- α 抗体(例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴル又はゴリムマブ)；抗-IL12/IL23抗体(例えば、ウステキヌマブ)；抗-IL6R抗体又は小型分子IL12/IL23阻害薬(例えば、アピリモド)；抗- α -4- β -7抗体(例えば、ベドリズマブ)；MAdCAM-1遮断薬(例えば、PF-00547659)；細胞接着分子 α -4-インテグリンに対する抗体(例えば、ナタリズマブ)；IL2受容体 α サブユニットに対する抗体(例えば、ダクリズマブ又はバシリキシマブ)；JAK3阻害薬(例えば、トファシチニブ又はR348)；Syk阻害薬及びそのプロドラッグ(例えば、フォスタマチニブ及びR-406)；ホスホジエステラーゼ-4阻害薬(例えば、テトミラスト)；HMPL-004；プロバイオティクス；デルサラジン；セマピモド/CPSI-2364；並びに、プロテインキナーゼC阻害薬(例えば、AEB-071)からなるリストから選択される、構成160記載の医薬組成物。

(構成162)

前記少なくとも1種の更なる活性物質が、5-アミノサリチル酸である、構成161記載の医薬組成物。

(構成163)

医薬品として使用するための、構成1～162のいずれか一項記載のポリペプチド、医薬組成物又は構築体。

(構成164)

自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療における使用のための、構成163記載のポリペプチド、医薬組成物又は構築体。

(構成165)

前記自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸疾患、II型糖尿病、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、シェーグレン症候群、セリアック病、薬物-又は放射線-誘導型粘膜炎、天疱瘡、乾癬、湿疹及び強皮症からなるリストから選択される、構成164記載のポリペプチド、医薬組成物又は構築体。

(構成166)

前記自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患が、クローン病である、構成165記載の使用のためのポリペプチド、医薬組成物又は構築体。

(構成167)

10

20

30

40

50

経口投与される、構成163～166のいずれか一項記載の使用のためのポリペプチド、医薬組成物又は構築体。

(構成168)

皮膚へ局所投与される、構成163～166のいずれか一項記載の使用のためのポリペプチド、医薬組成物又は構築体。

(構成169)

自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療のための医薬品の製造における、構成1～162のいずれか一項記載のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の使用。

(構成170)

前記自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸疾患、II型糖尿病、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、シェーグレン症候群、セリアック病、薬物-又は放射線-誘導型粘膜炎、天疱瘡、乾癬、湿疹及び強皮症からなるリストから選択される、構成169記載のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の使用。

(構成171)

前記自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患が、クローン病である、構成170記載の使用。

(構成172)

前記医薬品が、経口投与される、構成169～171のいずれか一項記載の使用。

(構成173)

前記医薬品が、皮膚に局所投与される、構成169～171のいずれか一項記載の使用。

(構成174)

構成1～162のいずれか一項記載のポリペプチド、医薬組成物又は構築体の治療的有効量を、それを必要とするヒトに投与することを含む、自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療方法。

(構成175)

前記自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、II型糖尿病、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、シェーグレン症候群、セリアック病、薬物-又は放射線-誘導型粘膜炎、天疱瘡、乾癬、湿疹及び強皮症からなるリストから選択される、構成174記載の自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患の治療方法。

(構成176)

前記自己免疫疾患が、クローン病である、構成175記載の自己免疫疾患の治療方法。

(構成177)

前記ポリペプチド、医薬組成物又は構築体が、経口投与される、構成174～176のいずれか一項記載の自己免疫疾患の治療方法。

(構成178)

前記ポリペプチド、医薬組成物又は構築体が、皮膚に局所投与される、構成174～176のいずれか一項記載の自己免疫疾患の治療方法。

(構成179)

前記ポリペプチド、医薬組成物又は構築体が、5-アミノサリチル酸、又はそのプロドラッグ(スルファサラジン、オルサラジン又はビスアラジドなど)；コルチコステロイド(例えば、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、又はブデソニド)；免疫抑制剤(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、メトトレキサート、アザチオプリン又は6-メルカプトプリン)；抗-TNF- α 抗体(例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブベゴル又はゴリムマブ)；抗-IL12/IL23抗体(例えば、ウスティキマブ)；抗-IL6R抗体又は小型分子IL12/IL23阻害薬(例えば、アピリモド)；抗- α -4- β -7抗体(例えば、ベドリズマブ)；MAdCAM-1遮断薬(例えば、PF-00547659)；細胞接着分子 α -4-インテグリンに対する抗体(例えば、ナタリズマブ)；IL2受容体 α サブユニットに対する抗体(例えば、ダクリズマブ又はバシリキシマブ)；JAK3阻害薬(例えば、トファシチニブ又はR348)；Syk阻害薬及びそのプロドラッグ(例えば、フォスタマチニブ及びR-406)；ホスホジエステラーゼ-4阻害薬(例えば、テトミラスト)；HMPL-004；プロバイオティクス；デルサラジン；セマピモド/CPSI-2364；及び、プロテインキナーゼC阻害薬(例えば、AEB-071)からなるリストから選択さ

10

20

30

40

50

れた少なくとも1種の活性物質と、逐次、同時又は個別に投与される、構成163～178のいずれか一項記載のポリペプチド、医薬組成物、構築体、使用又は方法。

(構成180)

前記ポリペプチド、医薬組成物又は構築体が、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴル又はゴリムマブと逐次、同時又は個別に投与される、構成179記載のポリペプチド、医薬組成物、構築体又は方法。

(構成181)

配列番号:83～86のいずれか一つの、コードされた免疫グロブリン鎖可変ドメインのCDR1、CDR2又はCDR3をコードしている部分のいずれか一つと、70%以上、例えば80%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含むまたはこれからなる、ポリヌクレオチド。

10

(構成182)

構成1～157のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体をコードしている、ポリヌクレオチド。

(構成183)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号:83～88のいずれか一つと70%以上、例えば80%以上、例えば90%以上、例えば95%以上、例えば99%以上の配列同一性を共有する配列を含む又はこれからなる、構成182記載のポリヌクレオチド。

(構成184)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号:83～88のいずれか一つを含む又はこれからなる、構成183記載のポリヌクレオチド。

20

(構成185)

構成182～184のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むcDNA。

(構成186)

構成182～185のいずれか一項記載のポリヌクレオチド又はcDNAを含む、ベクター。

(構成187)

構成186記載のベクターにより形質転換され、且つ構成1～157のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体を発現することが可能である、宿主細胞。

(構成188)

前記宿主細胞が、出芽酵母などの酵母細胞である、構成187記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

30

(構成189)

前記宿主細胞が、大腸菌などの細菌細胞である、構成187記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

(構成190)

下記工程：

i) 構成182～184のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを、プラスミドなどのベクターへクローニングする工程、

ii) 構成1～157のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体の作製を可能にする条件において、該ベクターにより、該ポリペプチド又は構築体を作製することが可能である、細菌細胞又は酵母細胞などの細胞を、形質転換する工程、

40

iii) アフィニティクロマトグラフィーなどにより、該ポリペプチド又は構築体を回収する工程：

を含む、構成1～157のいずれか一項記載のポリペプチド又は構築体の製造方法。

(構成191)

TNF- α に結合する免疫グロブリン鎖可変ドメインを含むポリペプチドであって、ここで免疫グロブリン鎖可変ドメインが、3つの相補性決定領域(CDR1-CDR3)及び4つのフレームワーク領域(FR1-FR4)を含み、ここでCDR3が、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列を含む、ポリペプチド。

(構成192)

50

前記CDR3が、配列番号:3と80%以上の配列同一性を共有する配列からなる、構成191記載のポリペプチド。

(構成193)

前記CDR3の、配列番号:3における対応する残基と異なる任意の残基が、それらの対応する残基に関する保存的置換である、構成191又は192のいずれかに記載のポリペプチド。

(構成194)

前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F又はIである、構成191又は192のいずれかに記載のポリペプチド。

(構成195)

前記配列番号:3の残基番号3に対応するCDR3の残基が、Hである、構成194記載のポリペプチド。

(構成196)

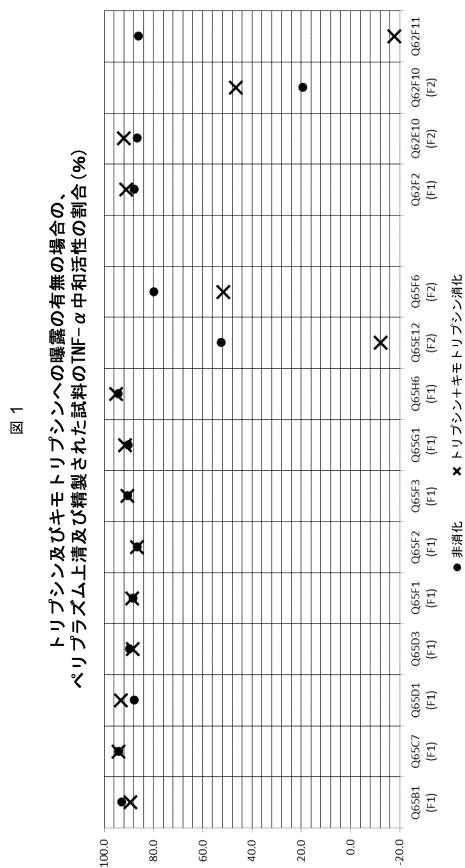
前記CDR3が、配列番号:3を含む、構成191記載のポリペプチド。

(構成197)

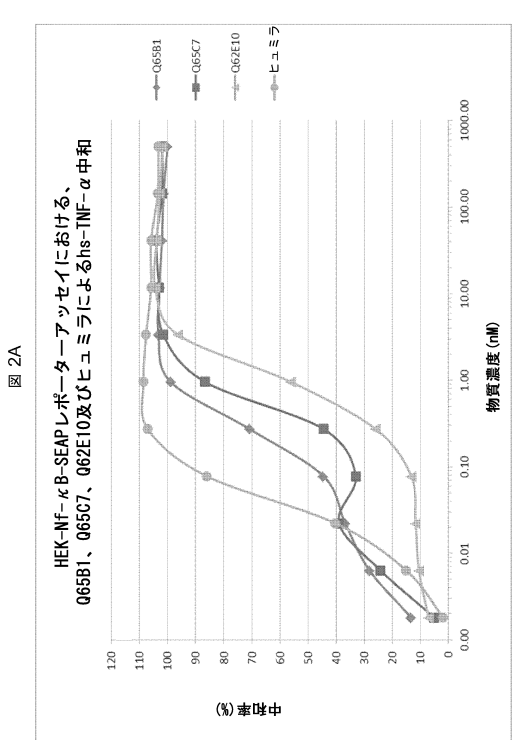
前記CDR3が、配列番号:3からなる、構成196記載のポリペプチド。

10

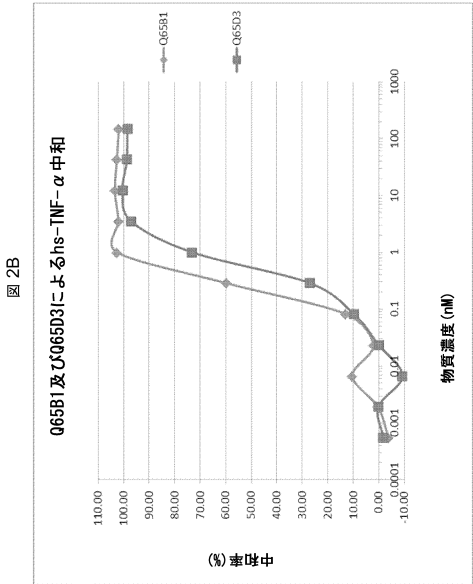
【図1】



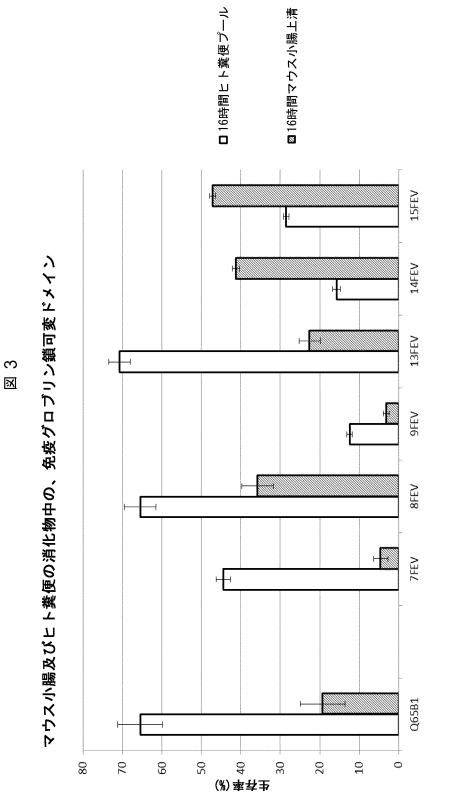
【図2A】



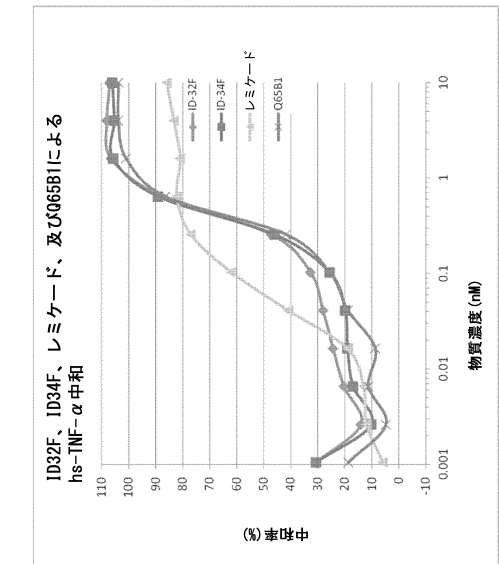
【図 2 B】



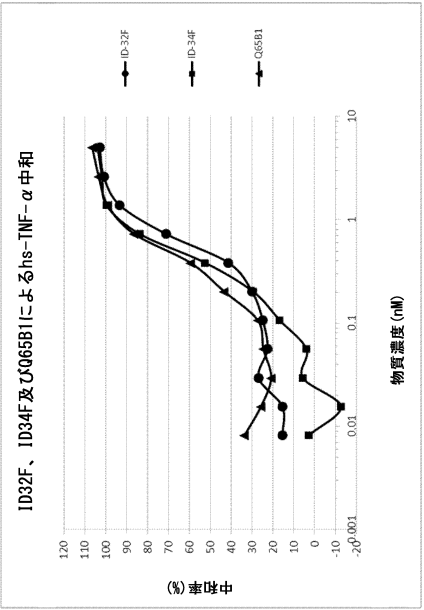
【図 3】



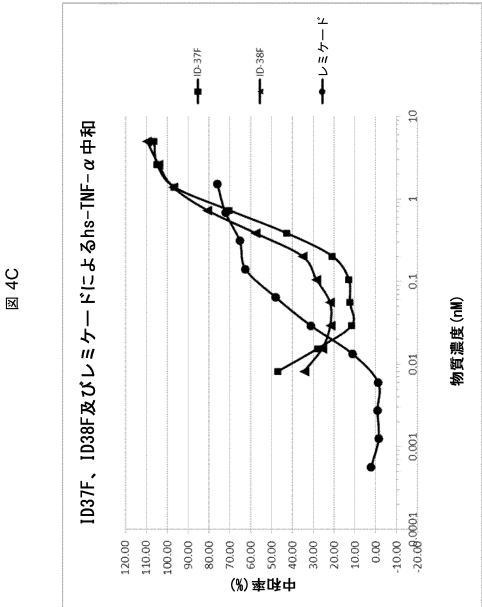
【図 4 A】



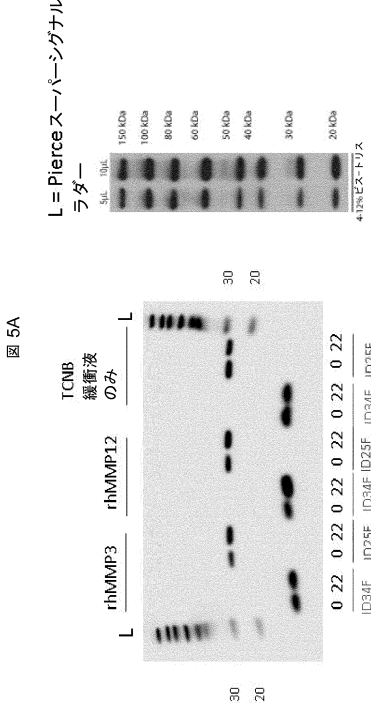
【図 4 B】



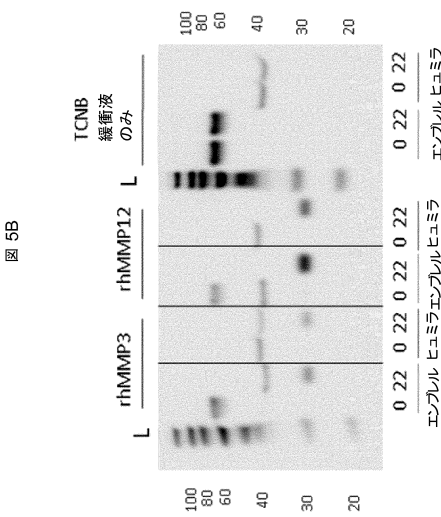
【図 4 C】



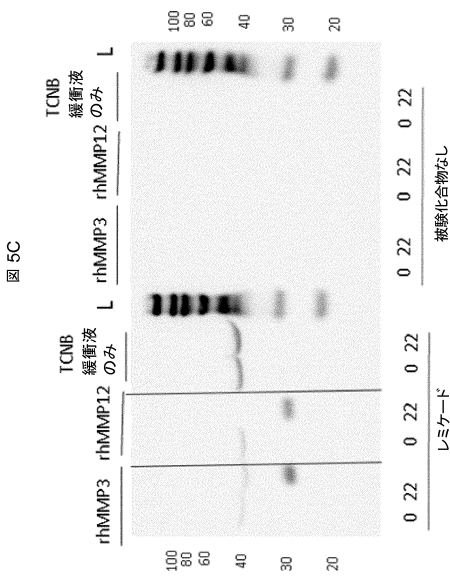
【図 5 A】



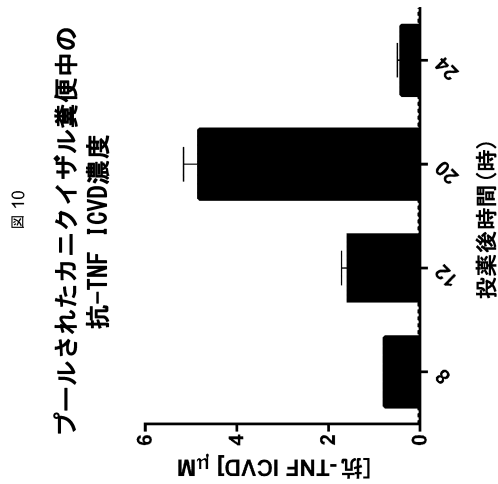
【図 5 B】



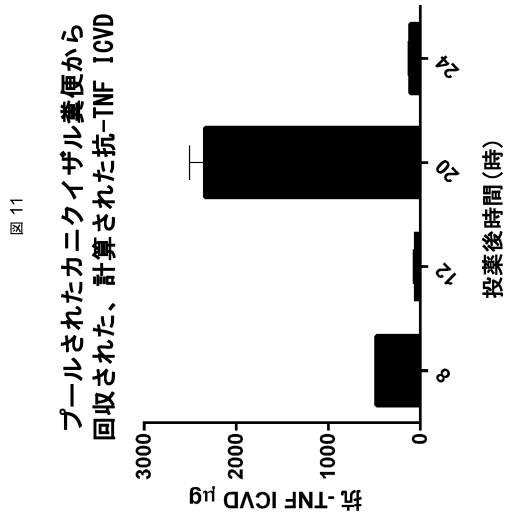
【図 5 C】



【図 1 0】



【図 1 1】



【配列表】

0006895421000001.app
0006895421000002.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 V
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 38/00
A 6 1 K	9/28	(2006.01)	A 6 1 K 9/28
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K	31/606	(2006.01)	A 6 1 K 31/606
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
C 1 2 N	9/48	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
			C 1 2 N 9/48

- (72)発明者 マイク ウエスト
 英国 ケンブリッジシャー シービー２２ ３ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム ケンブリッ
 ジ ロード コブレイ ヒル ビジネス パーク ロワー コート １ シー／オー ブイエイチ
 スクエアード リミテッド
- (72)発明者 ケビン ロバーツ
 英国 ケンブリッジシャー シービー２２ ３ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム ケンブリッ
 ジ ロード コブレイ ヒル ビジネス パーク ロワー コート １ シー／オー ブイエイチ
 スクエアード リミテッド
- (72)発明者 ティム カールトン
 英国 ケンブリッジシャー シービー２２ ３ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム ケンブリッ
 ジ ロード コブレイ ヒル ビジネス パーク ロワー コート １ シー／オー ブイエイチ
 スクエアード リミテッド
- (72)発明者 ルアナ マッジョーレ
 英国 ケンブリッジシャー シービー２２ ３ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム ケンブリッ
 ジ ロード コブレイ ヒル ビジネス パーク ロワー コート １ シー／オー ブイエイチ
 スクエアード リミテッド
- (72)発明者 マリオン キュービット
 英国 ケンブリッジシャー シービー２２ ３ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム ケンブリッ
 ジ ロード コブレイ ヒル ビジネス パーク ロワー コート １ シー／オー ブイエイチ
 スクエアード リミテッド
- (72)発明者 キース レイ
 英国 ケンブリッジシャー シービー２２ ３ジーエヌ ケンブリッジ バブラハム ケンブリッ
 ジ ロード コブレイ ヒル ビジネス パーク ロワー コート １ シー／オー ブイエイチ
 スクエアード リミテッド

審査官 林 康子

- (56)参考文献 特表２００８－５３９７７２（ＪＰ，Ａ）
 特表２００６－５２４０３６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00~15/90

CAplus/REGISTRY (STN)