(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-519763
(P2006-519763A)
(43)公表日　平成18年8月31日(2006.8.31)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4C084
C07K 16/42	(2006.01)	C07K	16/42		4C085
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4H045
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00		

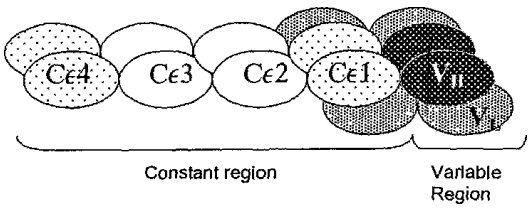
審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 87 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2005-502084 (P2005-502084)
(86)(22)出願日　平成15年11月7日 (2003.11.7)
(85)翻訳文提出日　平成17年7月5日 (2005.7.5)
(86)国際出願番号　PCT/BE2003/000190
(87)国際公開番号　WO2004/041867
(87)国際公開日　平成16年5月21日 (2004.5.21)
(31)優先権主張番号　60/425,073
(32)優先日　平成14年11月8日 (2002.11.8)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/425,063
(32)優先日　平成14年11月8日 (2002.11.8)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　03447005.4
(32)優先日　平成15年1月10日 (2003.1.10)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　505166225
アブリンクス　エン．ヴェー．
ベルギー，ベー－９０５２　ツヴィナールデ，テヒノロギーパルク　４
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100129160
弁理士　古館　久丹子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也
(72)発明者　シレンス，カレン
ベルギー，ベー－３０９０　オヴェリセ，ジーン　トンベウーストラート　２１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】治療用ポリペプチドの投与法およびそのためのポリペプチド

(57)【要約】
本発明は、タンパク質治療分子を経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内、または吸入投与するにあたり、ラクダ科抗体から由来したVHHポリペプチドを使用して不活性化を回避するのに適する方法に関する。本発明は、さらに、前記治療分子に関する。本発明は、さらに、細胞内部に治療分子を送達する方法に関する。本発明はさらに抗-IgE治療分子に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
IgEに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物。
【請求項２】
少なくとも1個の単一ドメイン抗体がラクダ科 VHHである請求項１に記載のポリペプチド構築物。
【請求項３】
少なくとも1個の単一ドメイン抗体が配列番号1～11のいずれかで表される配列に相当する請求項１および２に記載のポリペプチド構築物。
【請求項４】
抗-IgE単一ドメイン抗体数が少なくとも2個である請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項５】
少なくとも1個の単一ドメイン抗体がヒト化ラクダ科VHHである請求項１～４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項６】
単一ドメイン抗体が全長単一ドメイン抗体の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項７】
ポリペプチド構築物が全長ポリペプチド構築物の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項８】
請求項１～７のいずれかに記載のポリペプチド構築物をコードする核酸。
【請求項９】
炎症過程に関連する疾患を治療および／または予防および／または緩和するための、請求項１～７のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項１０】
炎症反応に関連する疾患を治療および／または予防および／または緩和する医薬品を調製するための、請求項１～７のいずれかに記載のポリペプチド構築物の使用。
【請求項１１】
疾患の治療のために不活性化されることなく抗標的化合物を対象に送達する方法であって、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物をその対象に投与することによる方法。
【請求項１２】
前記標的が消化器系に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記標的が膣および／または直腸に位置し、前記ポリペプチド構築物を膣および／または直腸に送達する請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記標的が鼻、上気道および／または肺に位置し、前記ポリペプチド構築物を鼻、上気道および／または肺に送達する請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
前記標的が腸粘膜に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
前記標的が舌下組織に位置し、前記ポリペプチド構築物を舌下組織に送達する請求項１１に記載の方法。
【請求項１７】
前記標的が皮膚に位置し、前記ポリペプチド構築物を局所的に送達する請求項１１に記

載の方法。
【請求項１８】
前記標的が血液中に存在するかまたは血液を介して到達可能であり、前記ポリペプチド構築物が、膣および／または直腸への経口、舌下組織への経鼻、口または鼻を経由する吸入、あるいは局所である請求項１１に記載の方法。
【請求項１９】
標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するペプチド構築物。
【請求項２０】
標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに腸粘膜壁を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するペプチド構築物。
【請求項２１】
標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに鼻、上気道および／または肺の壁を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物。
【請求項２２】
標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに膣および／または直腸壁を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物。
【請求項２３】
標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに舌下組織を通過できる治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物。
【請求項２４】
標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに皮膚を通過できる治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するためポリペプチド構築物。
【請求項２５】
前記標的がTNF-αで、疾患が炎症である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項２６】
単一ドメイン抗体が配列番号12～14のいずれかで表される配列に相当する請求項２５に記載の方法またはポリペプチド。
【請求項２７】
前記標的がCEAで、疾患が結腸癌である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項２８】
前記標的がEGFRで、疾患が頭部、頸部、肺および結腸の癌のいずれかである請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項２９】
単一ドメイン抗体が配列番号23～44のいずれかで表される配列に相当する請求項２８に記載の方法またはポリペプチド構築物。
【請求項３０】
前記標的がピロリ菌の抗原で、疾患が消化不良、胃炎のいずれかである請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。

【請求項３１】
前記標的が結核菌の抗原で、疾患が結核である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項３２】
前記標的がインフルエンザウイルスの抗原で、疾患が流感である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項３３】
前記標的がIgEの抗原で、疾患がアレルギー反応である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項３４】
単一ドメイン抗体が配列番号1～11のいずれかで表される配列に相当する請求項３３に記載の方法またはポリペプチド構築物。
【請求項３５】
前記標的がMMPの抗原で、疾患が癌である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項３６】
単一ドメイン抗体が配列番号15～22のいずれかで表される配列に相当する請求項３５に記載の方法またはポリペプチド構築物。
【請求項３７】
前記標的がIFN-γの抗原で、疾患が癌、移植の拒絶反応、自己免疫疾患である請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項３８】
単一ドメイン抗体が配列番号45～70のいずれかで表される配列に相当する請求項３７に記載の方法またはポリペプチド構築物。
【請求項３９】
前記標的がピロリ菌の抗原、結核菌の抗原、インフルエンザウイルスの抗原のいずれかである請求項１１～１８のいずれかに記載の方法または請求項１９～２４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項４０】
細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体および治療標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物。
【請求項４１】
細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体および少なくとも1個の治療ポリペプチドまたは作用物質を含むポリペプチド構築物。
【請求項４２】
前記細胞内部移行レセプターが上皮細胞増殖因子レセプターである請求項４０および４１に記載のポリペプチド構築物。
【請求項４３】
細胞内部移行レセプターに対する単一ドメイン抗体が配列番号23～44のいずれかで表される配列に相当する請求項４２に記載のポリペプチド構築物。
【請求項４４】
前記細胞内部移行レセプターがLDLレセプター、FGF2r、ErbB2r、転移レセプター、PDGr、VEGrまたはPsmArのいずれかである請求項４０および４１に記載のポリペプチド構築物。
【請求項４５】
治療標的に対する1個の単一ドメイン抗体がPDK1に対するものである請求項４０～４４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項４６】
癌治療に使用するための請求項４５に記載のポリペプチド構築物。

【請求項４７】
治療標的に対する1個の単一ドメイン抗体がGSK1、Bad、カスパーゼおよびフォークヘッドのいずれかに対するものである請求項４０～４４のいずれかに記載のポリペプチド構築物。
【請求項４８】
癌治療に使用するための請求項４７に記載のポリペプチド構築物。
【請求項４９】
請求項４０～４８のいずれかに記載のポリペプチド構築物の対象への投与を含む、細胞内部に抗-標的治療化合物を送達する方法。
【請求項５０】
請求項４０～４９のいずれかに記載のポリペプチド構築物の対象への投与を含む、不活性化されずに細胞内部に抗-標的治療化合物を送達する方法。
【請求項５１】
前記細胞が消化器系に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記細胞が膣および／または直腸に位置し、前記ポリペプチド構築物を膣および／または直腸に送達する請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
前記細胞が鼻、上気道および／または肺に位置し、前記ポリペプチド構築物を鼻、上気道および／または肺に送達する請求項５０に記載の方法。
【請求項５４】
前記細胞が腸粘膜に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する請求項５０に記載の方法。
【請求項５５】
前記細胞が舌下組織に位置し、前記ポリペプチド構築物を舌下組織に送達する請求項５０に記載の方法。
【請求項５６】
前記細胞が皮膚に位置し、前記ポリペプチド構築物を局所的に送達する請求項５０に記載の方法。
【請求項５７】
前記細胞が血液中に存在するかまたは血液を介して到達可能であり、前記ポリペプチド構築物の送達が、膣および／または直腸への経口、舌下組織への経鼻、口または鼻を経由する吸入、あるいは局所である請求項５０に記載の方法。
【請求項５８】
単一ドメイン抗体がヒト化ラクダ科VHHである請求項１～７、１９～２４、４０～４８のいずれかに記載のポリペプチド構築物または請求項１１～１８、２５～３９、４９～５７のいずれかに記載の方法。
【請求項５９】
前記単一ドメイン抗体が、全長単一ドメイン抗体の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である請求項１～７、１９～２４、４０～４８、５８のいずれかに記載のポリペプチド構築物または請求項１１～１８、２５～３９、４９～５７のいずれかに記載の方法。
【請求項６０】
ポリペプチド構築物が、全長ポリペプチド構築物の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である請求項１～７、１９～２４、４０～４８、５８および５９のいずれかに記載のポリペプチド構築物または請求項１１～１８、２５～３９、４９～５９のいずれかに記載の方法。
【請求項６１】
前記単一ドメイン抗体がラクダ科VHHである請求項１～７、１９～２４、４０～４８、

５８～６０のいずれかに記載のポリペプチド構築物または請求項１１～１８、２５～３９、４９～６０のいずれかに記載の方法。
【請求項６２】
請求項１～７、１９～２４、４０～４８、５８～６１のいずれかに記載のポリペプチド構築物をコードする核酸。
【請求項６３】
薬学的キャリアと合わせて、先行する請求項のいずれかに規定したポリペプチド構築物を含む組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（背景技術）
ポリペプチド治療剤および特に抗体系治療剤には、薬剤としての多大な可能性がある。その理由は、標的に対して顕著な特異性があり、固有の毒性が低いからである。しかし、重大な欠点が１点ある：これらは、複雑な大型分子であり、そのために比較的不安定で、プロテアーゼによる分解に弱い。従来の抗体およびそれに由来する断片または一本鎖構成体（例、scFv）の投与は、例えば消化管通過中に分解されるため、それほど有効でない。これは、従来の抗体薬剤は、経口、舌下、局所、鼻内、膣内、直腸内で、または吸入によって投与できないことを意味する。その理由は、それらがこれらの部位の低pHおよびこれらの部位および血中のプロテアーゼの作用に抵抗性がなく、および／またはそれらが大型であるからである。該薬剤は、これらの問題を一部でも克服するために、注射（静脈内、皮下など）で投与しなければならない。そのため、注射投与は、多くの短所を備えながらも最も頻繁に使用されている投与方法である。その短所とは、例えば次の通りである：（ａ）特に慢性疾患を治療する場合に患者の耐容性が低い；（ｂ）薬剤が「救命手段」でない場合には、結果的には投与量による充足感が低くなる危険がある；（ｃ）患者による自己投与の実施が困難である；（ｄ）処置の無菌的実施に適した状況を得るのが難しい；（ｅ）注射筒または針を正しく安全に使用するための専門的訓練が必要である。注射を必要としない治療用ポリペプチドの送達法は、費用／時間の節約となるだけでなく、対象にとってより便利でより快適でもある。
【背景技術】
【０００２】
大半の動物細胞には、細胞外液から特定の巨大分子を取り込むための特殊な経路が存在する。巨大分子は特異的な細胞-表面レセプターに結合して内部移行されるので、この過程をレセプター介在エンドサイトーシスと呼ぶ。レセプターによる内部移行は、隔離（sequestration）と呼ばれる過程によってシグナル伝達が調節される原理に基づいており、隔離によって、結合していたアゴニスト（即ち、レセプター活性化）リガンドは、レセプターと複合している細胞表面から回収される。多くの用途には、エフェクター分子を細胞膜を通過してサイトゾルに送達することが必要である。前記の内部移行レセプターを利用すればこれを達成できる。内部移行レセプターに結合すると内部移行する抗体が記載されている。しかし、それらには、重大な欠点がある：これらの抗体は複雑な大型分子であり、このため比較的不安定であり、プロテアーゼによる分解に弱い、という欠点である。さらに、前記抗体のドメインはジスルフィド結合によって一体化されているが、この結合は細胞質の還元的環境において解離し、結合活性の実質的な喪失に至る。そのため、それらを使用して細胞内タンパク質を標的とすることはできない。
【０００３】
内部移行に依存する別の過程は、免疫応答の有効な誘導である。特に、T-細胞の応答は、抗原提示細胞（APC）によって特定のエピトープがT-細胞に有効に提示されるか否かに大きく依存する。この意味をタンパク質抗原の場合で言えば、APCがタンパク質を取り込み、内部で該タンパク質を処理し（タンパク質を切断し）、MHC（主要組織適合複合体）またはHLA分子に関連した形で特定のペプチド断片を細胞表面に発現することが必要であ

る。この過程における主要かつ重要な事象は、APCによるタンパク質抗原の効率的な取り込みである。APCによる抗原取り込みを増強できる技術があれば、本来微弱かまたは全く免疫応答を誘発しない抗原に対しても免疫応答を誘発することが可能である。そのため、抗原性抗原、すなわち本来は免疫原性が微弱かまたは全くない抗原に対しても免疫応答を惹起できる技術がワクチン接種計画では重要な意味を持つ。

【０００４】

アレルギー性疾患におけるIgEの重要な役割は、肥満細胞からのヒスタミンや他の炎症メディエーターの遊離を惹起することである。喘息を含むアレルギー性疾患治療の主力は、アレルゲン回避と症状の治療である。現在、アレルギー性疾患の最も有効な治療は、コルチコステロイドによる炎症過程の調節へと向かっている。コルチコステロイドの負の効果を伴わないより直接的な方法は、アレルギー性炎症の開始因子であるIgEのレベルで抗-IgEによりアレルギー過程を調節することにある。

【０００５】

アレルギーの治療法として抗-IgE抗体を使用する概念は、科学文献に広く開示されている。いくつかの代表的な例は、次の通りである。BaniyashとEshhar（European Journal of Immunology 14: 799-807 (1984)（非特許文献１））は、抗-IgEモノクロナール抗体が、抗原での誘発前に皮内注射すると、受動的皮膚アナフィラキシー反応を特異的に阻止できることを証明した；U.S.4,714,759（特許文献１）は、IgEに特異的な抗体を使ったアレルギー治療用の製品および方法を開示している；RupとKahn（International Archives Allergy and Applied Immunology, 89: 387-393 (1989)（非特許文献２））は、肥満細胞-IgE感作を遮断するモノクロナール抗体によるアレルギー応答発生の予防を論じている。

【０００６】

好塩基球のレセプターへのIgE結合を遮断し、該レセプターに結合したIgEには結合せず、それによって、ヒスタミン放出が回避される抗-IgE抗体は、例えば、RupとKahn（同上）（非特許文献２）、Baniyashら（Molecular Immunology 25: 705-711, 1988）（非特許文献３）、Hookら（Federation of American Societies for Experimental Biology, 71st Annual Meeting Abstract #6008, 1987（非特許文献４））によって開示されている。

【０００７】

レセプター状のIgEの拮抗体、抗-IgE抗体、結合因子またはそれらの断片が、従来技術に開示されている。例えば、U.S.4,962,035（特許文献２）には、肥満細胞IgEレセプターのα-サブユニットまたはそのIgE結合断片をコードするDNAが開示されている。Hookら（FederationProceedings Vol. 40, No. 3, Abstract #4177）（非特許文献５） が開示しているモノクロナール抗体は、その一つのタイプが抗-イディオタイプであり、第２のタイプが共通のIgE決定基に結合し、第３のタイプは、IgEが好塩基球表面にある場合に隠れている決定基を指向する。

【０００８】

U.S.4,940,782（特許文献３）に開示されているモノクロナール抗体は、遊離IgEと反応し、それによって肥満細胞へのIgE結合を阻害し、B-細胞FcEレセプターに結合する場合にはIgEと反応するが、肥満細胞FcEレセプターに結合する場合にはIgEと結合せず、またB-細胞レセプターへのIgEの結合も遮断しない。

【０００９】

U.S.4,946,788（特許文献４）には、精製IgE結合因子とその断片、IgE結合因子と反応するモノクロナール抗体およびIgEに対するリンパ球細胞レセプターとその誘導体が開示されている。

【００１０】

U.S.5,091,313（特許文献５）には、免疫グロブリンをB細胞膜に固定するドメインの細胞外セグメントに結合した抗原エピトープが開示されている。認識されるエピトープは、IgEを担持するB細胞上に存在するが、好塩基球や分泌された可溶形態のIgE中には存在しない。U.S.5,252,467（特許文献６）は、前記抗原エピトープに特異的な抗体の産生法を開示している。U.S.5,231,026（特許文献７）は、前記抗原エピトープに特異的なマウス-

ヒト抗体をコードするDNAを開示している。
【００１１】
U.S.4,714,759（特許文献８）は、毒素に結合してアレルギーを治療する抗体または抗体断片の形での免疫毒素を開示している。
【００１２】
Prestaら（J.Immunol. 151: 2623-2632 (1993)）（非特許文献６）は、遊離IgEのFceRIへの結合を阻止するが、FcεRIに結合したIgEには結合しないヒト化抗-IgE抗体を開示している。現在係属中のWO93/04173（特許文献９）は、親和性の高いおよび低いIgEレセプターに差別的に結合するポリペプチドを開示している。
【００１３】
U.S.5,428,133（特許文献１０）は、アレルギー治療法として抗-IgE抗体、特にB細胞上のIgEには結合するが、好塩基球上のIgEには結合しない抗体を開示している。この公報は、前記抗体による喘息治療の可能性に言及している。U.S.5,422,258（特許文献１１）は、前記抗体の製造法を開示している。
【００１４】
EP0841946（特許文献１２）は、IgE拮抗剤を使ったアレルギー性喘息の治療法を開示している。
【特許文献１】U.S.4,714,759
【特許文献２】U.S.4,962,035
【特許文献３】U.S.4,940,782
【特許文献４】U.S.4,946,788
【特許文献５】U.S.5,091,313
【特許文献６】U.S.5,252,467
【特許文献７】U.S.5,231,026
【特許文献８】U.S.4,714,759
【特許文献９】WO 93/04173
【特許文献１０】U.S.5,428,133
【特許文献１１】U.S.5,422,258
【特許文献１２】EP0841946
【非特許文献１】European Journal of Immunology 14: 799-807 (1984)
【非特許文献２】International Archives Allergy and Applied Immunology, 89: 387-393 (1989)
【非特許文献３】Molecular Immunology 25: 705-711, 1988
【非特許文献４】Federation of American Societies for Experimental Biology, 71st Annual Meeting Abstract #6008, 1987
【非特許文献５】Federation Proceedings Vol. 40, No. 3, Abstract #4177
【非特許文献６】J.Immunol. 151: 2623-2632 (1993)
【発明の開示】
【００１５】
（発明の目的）
本発明の目的は、先行技術の問題を克服した、タンパク質治療分子の経口、舌下、局所、鼻内、膣内、直腸内、静脈内、皮下投与法または吸入による投与法を提供することである。前記治療分子を提供するのが、さらなる目的である。
【００１６】
本発明の別の目的は、レセプターを活性化させずに、内部移行レセプターを経て、治療物質を細胞内に送達する方法を提供することである。
【００１７】
アレルギー治療のための治療剤を提供することが、本発明のさらなる目的である。
【００１８】
本発明のさらなる目的は、治療目的のナノボディ（nanobody）を提供することである。

【００１９】
（発明の概要）
本発明のある実施態様は、IgEに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。
【００２０】
本発明の別の実施態様は、少なくとも1個の単一ドメイン抗体がラクダ科（Camelidae）VHHである、上記のポリペプチド構築物である。
【００２１】
本発明の別の実施態様は、少なくとも1個の単一ドメイン抗体が配列番号1～11のいずれかで表される配列に相当する、上記のポリペプチド構築物である。
【００２２】
本発明の別の実施態様は、抗-IgE単一ドメイン抗体数が少なくとも2個である、上記のポリペプチド構築物である。
【００２３】
本発明の別の実施態様は、少なくとも1個の単一ドメイン抗体がヒト化ラクダ科 VHHである、上記のポリペプチド構築物である。
【００２４】
本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体が、全長単一ドメイン抗体の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である、上記のポリペプチド構築物である。
【００２５】
本発明の別の実施態様は、ポリペプチド構築物が、全長ポリプチド構築物の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である、上記のポリペプチド構築物である。
【００２６】
本発明の別の実施態様は、上記のとおりのポリペプチド構築物をコードする核酸である。
【００２７】
本発明の別の実施態様は、炎症過程に関連する疾患を治療および／または予防および／または緩和するための、上記のポリペプチド構築物である。
【００２８】
本発明の別の実施態様は、炎症反応に関連する疾患を治療および／または予防および／または緩和する医薬品を調製するための上記のポリペプチド構築物の使用である。
【００２９】
本発明の別の実施態様は、疾患の治療のために対象に抗-標的化合物を送達する方法であって、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物をこの対象に投与することによって不活性化されずに送達する方法である。
【００３０】
本発明の別の実施態様は、前記標的が消化器系に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する、上記の方法である。
【００３１】
本発明の別の実施態様は、前記標的が膣および／または直腸に位置し、前記ポリペプチド構築物を膣および／または直腸に送達する、上記の方法である。
【００３２】
本発明の別の実施態様は、前記標的が鼻、上気道および／または肺に位置し、前記ポリペプチド構築物を鼻、上気道および／または肺に送達する、上記の方法である。
【００３３】
本発明の別の実施態様は、前記標的が腸粘膜に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する、上記の方法である。
【００３４】
本発明の別の実施態様は、前記標的が舌下組織に位置し、前記ポリペプチド構築物を舌下組織に送達する、上記の方法である。

【００３５】
本発明の別の実施態様は、前記標的が皮膚内に位置し、前記ポリペプチド構築物を局所的に送達する、上記の方法である。
【００３６】
本発明の別の実施態様は、前記標的が血液内に存在するかまたは血液を介して到達可能であり、前記ポリペプチド構築物の送達が、膣および／または直腸への経口、舌下組織への経鼻、口や鼻を経由する吸入、もしくは局所である上記の方法である。
【００３７】
本発明の別の実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するペプチド構築物である。
【００３８】
本発明の別の実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに腸粘膜壁を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物である。
【００３９】
本発明の別の実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに鼻、上気道および／または肺の壁を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物である。
【００４０】
本発明の別の実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに膣および／または直腸壁を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物である。
【００４１】
本発明の別の実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに舌下組織を通過できる治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物である。
【００４２】
本発明の別の実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに皮膚を通過できる治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物である。
【００４３】
本発明の別の実施態様は、前記標的がTNF-αで、疾患が炎症である上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００４４】
本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体が配列番号12～14のいずれかで表される配列に相当する上記の方法またはポリペプチドである。
【００４５】
本発明の別の実施態様は、前記標的がCEAで、疾患が結腸癌である上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００４６】
本発明の別の実施態様は、前記標的がEGFRで、疾患が頭部、頚部、肺および結腸の癌のいずれかである上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００４７】
本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体が配列番号23～44のいずれかで表される配

列に相当する上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００４８】
本発明の別の実施態様は、前記標的がピロリ菌の抗原で、疾患が消化不良、胃炎のいずれかである上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００４９】
本発明の別の実施態様は、前記標的が結核菌の抗原で、疾患が結核である上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００５０】
本発明の別の実施態様は、前記標的がインフルエンザウイルスの抗原で、疾患がインフルエンザである上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００５１】
本発明の別の実施態様は、前記標的がIgEの抗原で、疾患がアレルギー反応である上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００５２】
本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体が配列番号1～11のいずれかで表される配列に相当する上記の方法またはポリペプチド構築物である。
【００５３】
本発明の別の実施態様は、前記標的がMMPの抗原で、疾患が癌である上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００５４】
本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体が配列番号15～22のいずれかで表される配列に相当する上記の方法またはポリペプチド構築物である。
【００５５】
本発明の別の実施態様は、前記標的がIFN-γの抗原で、疾患が癌、移植の拒絶反応、自己免疫疾患のいずれかである上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００５６】
本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体が配列番号45～70のいずれかで表される配列に相当する上記の方法またはポリペプチド構築物である。
【００５７】
本発明の別の実施態様は、前記標的がピロリ菌の抗原、結核菌の抗原、インフルエンザウイルスの抗原のいずれかである上記の方法または上記のポリペプチド構築物である。
【００５８】
本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体および治療標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。
【００５９】
本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体および少なくとも1個の治療ポリペプチドまたは作用物質を含むポリペプチド構築物である。
【００６０】
本発明の別の実施態様は、前記細胞内部移行レセプターが上皮細胞増殖因子レセプターである上記のポリペプチド構築物である。
【００６１】
本発明の別の実施態様は、前記細胞内部移行レセプターに対する単一ドメイン抗体が配列番号23～44のいずれかで表される配列に相当するポリペプチド構築物である。
【００６２】
本発明の別の実施態様は、前記細胞内部移行レセプターがLDLレセプター、FGF2r、ErbB2r、転移レセプター、PDGr、VEGrまたはPsmArのいずれかである上記のポリペプチド構築物である。
【００６３】

本発明の別の実施態様は、治療標的に対する単一ドメイン抗体がPDK1に対するものである上記のポリペプチド構築物である。

【００６４】

本発明の別の実施態様は、癌の治療に使用する上記のポリペプチド構築物である。

【００６５】

本発明の別の実施態様は、治療標的に対する単一ドメイン抗体がGSK1、Bad、カスパーゼおよびフォークヘッドのいずれかに対するものである上記のポリペプチド構築物である。

【００６６】

本発明の別の実施態様は、癌の治療に使用する上記のポリペプチド構築物である。

【００６７】

本発明の別の実施態様は、上記のポリペプチド構築物の対象への投与を含む、細胞内部へ抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【００６８】

本発明の別の実施態様は、上記のポリペプチド構築物の対象への投与を含む、不活性化されずに細胞内部に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【００６９】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が消化器系に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する上記の方法である。

【００７０】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が膣および／または直腸に位置し、前記ポリペプチド構築物を膣および／または直腸に送達する上記の方法である。

【００７１】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が鼻、上気道および／または肺に位置し、前記ポリペプチド構築物を鼻、上気道および／または肺に送達する上記の方法である。

【００７２】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が腸粘膜に位置し、前記ポリペプチド構築物を経口で送達する上記の方法である。

【００７３】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が舌下組織に位置し、前記ポリペプチド構築物を舌下組織に送達する上記の方法である。

【００７４】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が皮膚に位置し、前記ポリペプチド構築物を局所的に送達する上記の方法である。

【００７５】

本発明の別の実施態様は、前記細胞が血液内に存在するかまたは血液を介して到達可能であり、前記ポリペプチド構築物の送達が、膣および／または直腸への経口、舌下組織への経鼻、口や鼻を経由する吸入、もしくは局所である上記の方法である。

【００７６】

本発明の別の実施態様は、単一ドメイン抗体がヒト化ラクダ科VHHである上記のポリペプチド構築物または上記の方法である。

【００７７】

本発明の別の実施態様は、前記単一ドメイン抗体が、全長単一ドメイン抗体の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である、上記のポリペプチド構築物または上記の方法である。

【００７８】

本発明の別の実施態様は、ポリペプチド構築物が、全長ポリペプチド構築物の相同配列、機能部分または相同配列の機能部分である、上記のポリペプチド構築物または上記の方法である。

【００７９】

本発明の別の実施態様は、前記単一ドメイン抗体がラクダ科VHHである上記のポリペプチド構築物または上記の方法である。

【００８０】

本発明の別の実施態様は、上記のポリペプチド構築物をコードできる核酸である。

【００８１】

本発明の別の実施態様は、上記のポリペプチド構築物を薬学的キャリアと合わせて含む組成物である。

【００８２】

（発明の詳細な説明）

本発明は、1個以上の標的分子に対する1個以上の単一ドメイン抗体を、それぞれ適切な剤型で、直接、あるいは送達を促進する成分を含有する組成物の一部として含むポリペプチド構築物に関する。

【００８３】

本発明は、さらに、経口で、舌下、局所、鼻内、膣内、直腸内に、または、吸入によるなど非侵襲的方法によって対象に投与するための、1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物に関する。前記の非侵襲的送達経路は、予想外にも、治療化合物を簡便に送達する有効手段を提供する。

【００８４】

本発明は、静脈内および皮下などの普通の侵襲的方法によって対象に投与するための、1個以上の単一ドメイン抗体を含む構築物にも関する。

【００８５】

本発明は、さらに、1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内に、または、吸入によって対象に投与する段階を含む治療ペプチド送達法に関する。

【００８６】

本発明は、さらに、抗-IgE単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物に関する。

【００８７】

単一ドメイン抗体は、その相補決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である抗体である。例として、重鎖抗体、天然で軽鎖を欠いた抗体、通常の4-鎖抗体に由来する単一ドメイン抗体、抗体由来のもの以外の遺伝子工学による抗体および単一ドメインスカホールドがあるが、それらに限定されない。単一ドメイン抗体は、従来技術のものでも、今後得られる単一ドメイン抗体でもよい。単一ドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ウシを含めたいずれかの種から由来してもよいが、それらに限定されない。本発明のある態様によれば、単一ドメイン抗体は、本明細書で使用する場合、軽鎖欠如重鎖抗体として既知の天然に産する単一ドメイン抗体である。前記単一ドメイン抗体は、例えばWO 9404678に開示されている。本明細書では、明瞭にするために、天然で軽鎖が欠如した重鎖抗体に由来するこの可変ドメインを、VHHまたはナノボディとし、通常の4-鎖免疫グロブリンVHと区別する。前記のVHH分子は、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびグアナコなどのラクダ科の種に産する抗体から誘導できる。ラクダ科以外の他種は、天然で軽鎖が欠如した重鎖抗体を産生できる；そのようなVHHは、本発明の範囲内である。

【００８８】

本発明による、また、当業者に既知のVHHは、WO 94/04678に記載のラクダ科由来のものなど、天然で軽鎖が欠如した免疫グロブリンから誘導される重鎖可変ドメインである（以後、VHHドメインまたはナノボディと称する）。VHH分子は、IgG分子の約1/10の大きさである。該分子は、単一ポリペプチドで、非常に安定であり、極端なpHおよび温度条件に耐性を示す。さらに、それらは通常の抗体の場合にはないプロテアーゼの作用に耐性がある。さらに、VHHのインビトロでの発現は、高収量の、適当に折りたたまれた機能性VHHを生じる。さらに、ラクダ科が生成する抗体は、抗体ライブラリーの使用によって、あるいは、ラクダ科以外の哺乳類（WO 9749805）の免疫化を経て、インビトロで生成される抗体に

認識されるもの以外のエピトープを認識する。抗-アルブミンVHH'sは、それ自体、キャリアタンパク質として既知の血清アルブミンと、より効率的な方法で相互作用できる。キャリアタンパク質としての血清アルブミンエピトープには、結合タンパク質、ペプチドおよび小型化学物質が到達できないものがある。VHH'sは、空洞などの「異常な」または非従来型エピトープに結合することが既知であるので（WO97/49805）、前記VHH'sの循環アルブミンへの親和性が増加する可能性がある。

【００８９】

本発明は、さらに、単一ドメイン抗体が標的に対するVHHであり、該VHHがヒト類似配列を有するクラスに属するポリペプチド構築物に関する。該クラスは、VHHが、例えば、Kabatナンバリングによる L45など、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、アスパラギンまたはグルタミンからなる群から選択されたアミノ酸を45位に保持する点を特徴とする。MMP-12に結合し、配列番号15で表されるVHH配列は、VHHポリペプチドのこのヒト類似クラスに属する。このクラスに属するペプチド自体は、ヒトVHフレームワーク領域に高いアミノ酸配列相同性を示し、前記ペプチドは、ヒトに直接投与でき、それによる望ましくない免疫反応は予想されず、ヒト化操作を加える負担がない。

【００９０】

IFNγに結合する配列68で表される別のヒト類似クラスのラクダ科単一ドメイン抗体が、WO 03035694に記載されており、疎水性FR2残基を含有している。これは、ヒト由来または他種由来の通常の抗体に典型的に認められるが、この場合、通常の抗体からのVHに存在する保存トリプトファンを103位の荷電アルギニン残基で置換することでこの親水性の喪失を補っている。これらの2つのクラスに属するペプチドは、それ自体、ヒトVHフレームワーク領域に高いアミノ酸配列相同性を示すので、前記ペプチドは、ヒトに直接投与でき、それによる望ましくない免疫反応は予想されず、ヒト化操作をさらに進める負担がない。

【００９１】

本発明で使用する場合のVHHは、いずれも、従来のクラスのものであっても、あるいは、ヒト類似ラクダ科抗体クラスであってもよい。前記抗体は、標的全体またはその断片、またはその相同配列の断片に対するものであってもよい。これらのポリペプチドは、全長ラクダ科抗体、即ち、FcおよびVHHドメイン、ヒトFcドメインを持つ重鎖ラクダ科抗体のキメラ型を含む。

【００９２】

医薬的に興味深いものはどれも本発明の標的である。本明細書に数種の標的の例を提示するが、本発明をそれらに限定することを意図するものではない。標的の例は、TNF-α、IgE、IFN-γ、MMP-12、EGFR、CEA、H. pylori、TB、インフルエンザを含む。標的に対する単一ドメイン抗体は、10^{-6}Mよりも高い親和性で前記標的に結合できる単一ドメイン抗体を意味する。

【００９３】

標的は、前記標的の断片であることもできる。従って、標的は、免疫応答を誘発できる前記標的の断片でもある。標的は、全長標的に対する単一ドメイン抗体に結合できる前記標的の断片でもある。

【００９４】

本明細書で使用の断片は、100%未満（例、99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%など）の配列を指すが、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個またはそれ以上のアミノ酸を含む。断片は、当該相互作用が1×10^{-6}M以上の親和性で維持されるのに十分な長さである。

【００９５】

本明細書で使用の断片は、野生型標的に対して惹起される単一ドメイン抗体に結合する標的の能力を実質的に改変しない、1個以上のアミノ酸の任意の挿入物、欠失物および置換物も指す。挿入、欠失または置換アミノ酸数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11

、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69または70個のアミノ酸までであるのが好ましい。

【００９６】

本発明のある実施態様は、本明細書に開示のポリペプチド構築物で、この場合、標的に対する単一ドメイン抗体数は2個以上である。前記の多価ポリペプチド構築物は、該標的に対する著しく高い機能的親和性があり、一価ポリペプチド対応物に比較して、予想よりもはるかに高い阻害性を示すという長所を有する。

【００９７】

多価ポリペプチド構築物は、一価ポリペプチド構築物よりも数桁高い機能的親和性を有する。本発明者は、これらの多価ポリペプチド構築物の機能的親和性が二価および多価抗体について先行技術で報告されたものよりもはるかに高いことを認めた。驚くべきことに、互いに直接、あるいは、短リンカー配列によって結合されている本発明の多価ポリペプチド構築物は、通常の多価4-鎖抗体に理論的に予想された高い機能的親和性を示す。

【００９８】

本発明者は、前記の機能的活性の大幅な増加を、直線的結合アッセイか機能アッセイ、例えば慢性結腸炎などの動物モデルにおいて、好ましくは多重ドメインと多量体タンパク質から成る抗原で検出できることを認めた。

【００９９】

本明細書で使用の多価抗-標的ポリペプチドは、共有結合した2個以上の抗-標的ポリペプチドを含むポリペプチドを指す。該抗-標的ポリペプチドは、同一配列であることも、あるいは、異なる配列であることもできるが、同一の標的または抗原に対するものである。多価抗標的ポリペプチドは、結合する抗-標的ポリペプチド数に応じて、二価（2個の抗-標的ポリペプチド）、三価（3個の抗標的ポリペプチド）、四価（4個の抗-標的ポリペプチド）であることも、あるいは、さらに高い原子価分子を有することもできる。

【０１００】

1個以上の抗-TNF-α VHHを含む本発明の多価ポリペプチド構築物の一例を実施例７で説明する。

【０１０１】

従来技術の方法または何らかの今後の方法を使って、単一ドメイン抗体は結合させ、1個以上の単一ドメイン抗体を含む本明細書に開示のいずれかのポリペプチド構築物を形成できる。該抗体は、非共有的に（例、ストレプトアビジン／ビオチン併用法、抗体／タグ併用法使用）もしくは、共有的に結合することができる。Blattler et al, Biochemistry 24, 1517-1524 ; EP294703に記載されるものなどの有機誘導化剤とアミノ酸残基を反応させることによる化学架橋によって該抗体を融合できる。別法として、単一ドメイン抗体は、DNAレベルで遺伝子融合できる。即ち、1個以上の抗-標的単一ドメイン抗体を含む完全ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物が生じる。二価または多価VHHポリペプチド構築物の製造法は、PCT特許出願WO 96/34103に開示されている。VHH抗体を結合する方法は、VHH抗体コード配列を直接、あるいは、ペプチドリンカーを経由して結合する遺伝子経路による。例えば、VHH抗体のC-末端は、隣の単一ドメイン抗体のN-末端に結合できる。

【０１０２】

この結合形態を拡大して、トリ、テトラ他の機能的構築物の構築および産生のために単一ドメイン抗体を追加結合することができる。

【０１０３】

本発明のある態様によれば、単一ドメイン抗体は、ペプチドリンカー配列を経て互いに結合される。前記リンカー配列は、天然に存在する配列でも、非天然に現れる配列でもよい。該リンカー配列は、多価抗-標的ポリペプチドを投与される対象において非免疫原性であると予想される。該リンカー配列は、多価抗-標的ポリペプチドに十分な柔軟性を与

え、同時に、タンパク質分解に耐性を示すことができる。リンカー配列の非限定的な一例は、WO 96/34103に述べられているVHHのヒンジ領域から誘導できるものである。

【０１０４】

本明細書に開示のポリペプチド構築物は、従来技術の方法または今後の方法に従って当業者が製造できる。例えば、ラクダの免疫化とそれからのハイブリドーマの入手、または、従来技術の分子生物学技術による単一ドメイン抗体ライブラリーのクローン化とその後のファージディスプレイを使った選択によるなど、従来技術の方法を使って、VHHを入手できる。

【０１０５】

本発明のある態様によれば、ポリペプチド構築物は、全長ポリペプチド構築物の相同配列であることができる。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築物は、全長ポリペプチド構築物の機能部分であることができる。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築物は、全長ポリペプチド構築物の相同配列であることができる。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築物は、全長ポリペプチド構築物の相同配列の機能部分であることができる。本発明のある態様によれば、ポリペプチド構築物は、ポリペプチド構築物の配列を含むことができる。

【０１０６】

本発明のある態様によれば、ポリペプチド構築物の形成に使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体（例、VHH）またはその相同配列であることができる。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築物の形成に使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体の機能部分であることができる。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築物の形成に使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体の相同配列であることができる。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築物の形成に使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体の相同配列の機能部分であることができる。

【０１０７】

本発明の相同配列は、本明細書で使用する場合、本発明のポリペプチドの機能的特性を実質的に改変しない1個以上のアミノ酸の付加、欠失または置換を含むことができる。アミノ酸欠失または置換の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69または70個のアミノ酸までであるのが好ましい。

【０１０８】

本発明に記載の相同配列は、アミノ酸の付加、欠失または置換によって改変される抗-標的ポリペプチドの配列であることができ、前記改変は、非改変ポリペプチドと比較して、機能的特性を実質的に改変しない。

【０１０９】

本発明に記載の相同配列は、ヒト化されたポリペプチドであることができる。新規クラスのVHHの抗体のヒト化は、さらに、投与時にヒト個体への望ましくない免疫反応の可能性を減少させると思われる。

【０１１０】

本発明に記載の相同配列は、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、グアナコなど、他のラクダ科の種に存在する配列であることができる。

【０１１１】

相同配列が配列同一性を示す場合、それは、親配列と高い配列相同性を呈し（70%、75%、80%、85%、90%、95%または98%以上の配列同一性）、好ましくは、親配列と同様の性質、即ち親和性を特徴とし、前記同一性を既知の方法により算出することを意味する。

【０１１２】

別法として、相同配列は、以下の式に従った親配列のいずれかの位置番号で許容された置換から得られるいずれかのアミノ酸配列であることもできる：

SerをSer、Thr、GlyおよびAsnで置換；
ArgをArg、His、Gln、LysおよびGluの1種類で置換；
LeuをLeu、Ile、Phe、Tyr、MetおよびValの1種類で置換；
ProをPro、Gly、AlaおよびThrの1種類で置換；
ThrをThr、Pro、Ser、Ala、Gly、HisおよびGlnの1種類で置換；
AlaをAla、Gly、ThrおよびProの1種類で置換；
ValをVal、Met、Tyr、Phe、IleおよびLeuの1種類で置換；
GlyをGly、Ala、Thr、ProおよびSerの1種類で置換；
IleをIle、Met、Tyr、Phe、ValおよびLeuの1種類で置換；
PheをPhe、Trp、Met、Tyr、Ile、ValおよびLeuの1種類で置換；
TyrをTyr、Trp、Met、Phe、Ile、ValおよびLeuの1種類で置換；
HisをHis、Glu、Lys、Gln、ThrおよびArgの1種類で置換；
GlnをGln、Glu、Lys、Asn、His、ThrおよびArgの1種類で置換；
AsnをAsn、Glu、Asp、GlnおよびSerの1種類で置換；
LysをLys、Glu、Gln、HisおよびArgの1種類で置換；
AspをAsp、GluおよびAsnの1種類で置換；
GluをGlu、Asp、Lys、Asn、Gln、HisおよびArgの1種類で置換；
MetをMet、Phe、Ile、Val、LeuおよびTyrの1種類で置換。

【０１１３】

本発明に記載の相同ヌクレオチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で親配列をコードできるヌクレオチド配列の逆相補体に（Somebrook et al., Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New Yorkによって記載されたものなど）ハイブリダイズできる50、100、200、300、400、500、600、800または1000ヌクレオチド以上のヌクレオチド配列を指すことができる。

【０１１４】

機能部分は、本明細書で使用する場合、1×10^{-6}M以上の親和性で当該相互作用を維持するのに十分な大きさの単一ドメイン抗体配列を指す。

【０１１５】

別法として、機能部分は、完全アミノ酸配列の部分欠失を含み、なおも、標的の結合およびそれとの相互作用に必要な結合部位およびタンパク質ドメインを維持する。

【０１１６】

機能性タンパク質は、本明細書で使用する場合、完全配列の100%未満（例、99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%など）を指すが、5個以上のアミノ酸または15個以上のヌクレオチドを含む。

【０１１７】

抗-IgE単一ドメイン抗体

本発明のある態様は、アレルギーの症状緩和、治療および予防に適した治療化合物に関する。前記治療化合物は、IgEと相互作用し、アレルギー反応の原因である免疫応答カスケードを調節する。

【０１１８】

本発明の別の態様は、眼内アレルギー疾患治療のための局所用眼科組成物の調製における抗-IgE単一ドメイン抗体（例、VHH）の使用に関する（実施例２）。本発明のVHHを使った前記組成物調製の経済性は、例えば哺乳類細胞での通常の抗体の産生と比較して細菌または酵母VHH発現系を使った産生が容易で、低コストであるとすると、通常の抗体よりもはるかに好ましい。

【０１１９】

眼内浸透とその結果の眼内効果は、通常の抗体および大きなサイズの誘導断片では、ほとんど期待されない。しかし、本発明のポリペプチド構築物は、非常に効率が良く、高力価で、低分子量と組み合わせた安定性を示すと予想される。そのため、本発明のポリペプチド構築物で、局所以外の前記適応症への応用が想定される。

【０１２０】
本発明のある実施態様は、IgEに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。
【０１２１】
本発明の別の実施態様は、IgEに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、単一ドメイン抗体が配列番号1～11のいずれかで表される配列に相当するポリペプチド構築物である。前記配列は、ラクダ科 VHHから由来する。
【０１２２】
本発明は、IgEに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、さらに、対象の1個以上の血清タンパク質に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物が、驚くべきことに、前記構築物の一部でない場合、抗-IgE単一ドメイン抗体の半減期に比較して、前記対象の循環系内では有意に長い半減期を有する、とした所見にも関する。さらに、前記ポリペプチド構築物が、マウスで無傷のままである高安定性、極端なpH耐性、高温安定性および高標的親和性などの同様に好ましいVHHの性質を呈することが認められた。
【０１２３】
本発明の別の実施態様は、IgEに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、さらに、1個以上の血清タンパク質に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。
【０１２４】
血清タンパク質は、対象の血清中に認められるいずれかの適切なタンパク質またはその断片であることができる。本発明のある態様では、血清タンパク質は、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、チロキシン-結合タンパク質、トランスフェリンまたはフィブリノーゲンである。VHHパートナーは、有効治療に必要な半減期および／または標的抗原の区画化などの使用目的に応じて、上記血清タンパク質のいずれかに向けることができる。
【０１２５】
本発明のある態様は、IgEに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、さらに、配列番号71～84のいずれかで表される配列に相当する抗-血清アルブミン単一ドメイン抗体1個を含むポリペプチド構築物である。
【０１２６】
ポリペプチド構築物の送達
本発明のポリペプチド構築物の送達に関する本発明の態様は、本明細書に開示の抗-IgE単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物に限定されず、以下に示すように、どの標的にも適用できる。ポリペプチド構築物は、任意に上述の変形物を伴う1個以上の標的に対する単一ドメイン抗体を含むことができる。
【０１２７】
本発明のある実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する際に使用するポリペプチド構築物である。
【０１２８】
当業者に既知のとおり、いったん、前記ポリペプチド構築物を得ると、正しい位置（胃内、結腸内など）で最大量のVHHを放出するように、配合技術を適用できる。消化器系に標的が位置する疾患を治療、予防および／または症状緩和する上でこの送達法が重要である。
【０１２９】
本発明のある態様は、不活性化されずに胃内環境を通過できる治療化合物による調節に感応する疾患を、該疾患に関連する抗原に特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、治療、予防および／または症状緩和する方法である。
【０１３０】

本発明の別の実施態様は、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０１３１】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに消化器系に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０１３２】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０１３３】

本発明の別の実施態様は、膣および／または直腸への抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、該部位の標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。

【０１３４】

非限定的な例では、本発明に記載の製剤は、ジェル、クリーム、坐薬、フィルム状で、あるいは、スポンジ状で、または、経時間的に活性成分をゆっくりと放出する膣リングとして（前記製剤は、EP 707473、EP 684814、US 5629001に開示）、1個以上の標的に対する1個以上のVHHを含む、本明細書に開示のポリペプチド構築物を含む。

【０１３５】

本発明のある態様は、疾患に関連する抗原に特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に膣および／または直腸投与することによって、膣および／または直腸に対する治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法である。

【０１３６】

本発明の別の実施態様は、不活性化されずに膣および／または直腸に対する抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０１３７】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の膣および／または直腸に投与することによって、不活性化されずに膣および／または直腸に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０１３８】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の膣および／または直腸に投与することによって、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０１３９】

本発明の別の実施態様は、鼻、上気道および／または肺に対する抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含む標的に対する1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。

【０１４０】

非限定的な例では、本発明に記載の製剤は、鼻内スプレー（例、エアゾル）または吸入器として1個以上の標的に対する、本明細書に開示のポリペプチド構築物を含む。該構築物は小型であるので、治療用IgG分子よりもはるかに有効にその標的に到達できる。

【０１４１】

本発明のある態様は、口または鼻から吸入より、1個以上の単一ドメイン抗体が疾患に関連する抗原に特異的な本明細書に開示のポリペプチド構築物を対象に投与することによって、上気道および肺に達する治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および

／または症状緩和する方法である。

【０１４２】

本発明の別の態様は、分散性VHH組成物で、特にUS 6514496に記載されているもののような乾燥粉末分散性VHH組成物である。これらの乾燥粉末は、平均粒度が0.4～10μmの範囲の離散乾燥粒子を大量に含んでいる。前記粉末は、吸入器内で容易に分散させることができる。VHH'sは、溶解度が高いために、（吸入後、肺で）容易に溶解できる凍結乾燥剤などの組成物に特に適している（Muyldermens, S., Reviews in Molecular Biotechnology, 74, 277-303, (2001)）。別法として、前記凍結乾燥VHH製剤は、希釈剤で再溶解し、皮下投与に適した安定な再溶解製剤とすることができる。例えば、抗-IgE抗体製剤（実施例１；US 6267958、EP 841946）が調製されており、アレルギー性喘息の治療に有用である。

【０１４３】

本発明の別の実施態様は、不活性化されずに鼻、上気道および／または肺に対する抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０１４４】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の鼻、上気道および／または肺に投与することによる抗-標的治療化合物の鼻、上気道および／または肺への送達方法である。

【０１４５】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の鼻、上気道および／または肺に投与することによって、不活性化されずに抗-標的治療化合物を鼻、上気道および／または肺に送達する方法である。

【０１４６】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の鼻、上気道および／または肺に投与することによって、不活性化されずに抗-標的治療化合物を対象の血流に送達する方法である。

【０１４７】

本発明のある実施態様は、腸粘膜透過性が高まった疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。本明細書に開示のポリペプチド構築物は、小型であるため、例えばクローン病など、腸粘膜透過性の増加を引き起こす疾患の患者において、腸粘膜を通過し、より効率的に血流に達することができる。

【０１４８】

本発明のある態様は、疾患に関連する抗原に特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含む本明細書に開示のポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、腸粘膜透過性が高まった疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法である。

【０１４９】

この方法は、本発明のさらなる態様-能動輸送キャリアの使用-によって一層強化できる。本発明のこの態様では、腸壁から血流への移行を増強するキャリアにVHHを融合させる。非限定的な例として、この「キャリア」は、治療用VHHに融合される第二VHHである。前記の融合構築物は、従来技術の方法を使って生成する。「キャリア」VHHは腸壁のレセプターに特異的に結合し、腸壁からの能動移行を誘発する。

【０１５０】

本発明の別の実施態様は、腸粘膜の透過性を高める疾患で、腸粘膜に到る抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製への、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０１５１】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに抗-標的治療化合物を腸

粘膜に送達する方法である。

【０１５２】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに抗-標的治療化合物を対象の血流に送達する方法である。

【０１５３】

本発明のある実施態様は、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であって、舌下組織を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するポリペプチド構築物である。本明細書に開示の前記ポリペプチド構築物の製剤、例えば錠剤、スプレー、ドロップを舌下に置き、粘膜から舌下の毛細血管網に吸収させる。

【０１５４】

本発明のある態様は、舌下組織を有効に通過できる治療化合物による調節に感応する疾患を、疾患に関連する抗原に特異的なVHHを対象に舌下投与することによって、治療、予防および／または症状緩和する方法である。

【０１５５】

本発明の別の実施態様は、舌下組織を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０１５６】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに抗-標的治療化合物を舌下組織に送達する方法である。

【０１５７】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに抗-標的治療化合物を対象の血流に送達する方法である。

【０１５８】

本発明のある実施態様は、皮膚を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和するのに使用するための、少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。前記ポリペプチド構築物の製剤として、例えばクリーム、フィルム、スプレー、ドロップ、パッチを皮膚上に置き、通過させるものがあげられる。

【０１５９】

本発明のある態様は、疾患に関連する抗原に特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含む本明細書に開示のポリペプチド構築物を対象に局所投与することによって、皮膚を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法である。

【０１６０】

本発明の別の態様は、アレルギー性疾患などの眼病の治療のための局所眼科用組成物としての、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用であり、この方法は、本明細書に開示のポリペプチド構築物を含む眼科用組成物の局所投与を含み、前記構築物は1個以上の抗-IgE VHHを含む（実施例１、実施例２）。

【０１６１】

本発明の別の実施態様は、皮膚を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０１６２】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に局所投与することによって、不活性化されずに皮膚に抗-標的治療化合

物を送達する方法である。

【０１６３】

本発明のある態様は、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に局所投与することによって、対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０１６４】

本発明のポリペプチド構築物を使用できる治療標的の非限定的な例は、炎症過程に関与するTNFである。TNF作用の遮断は、例えばクローン病などの特定の病態に非常に望ましい抗炎症効果を発揮できる。現在の治療法は、抗-TNF抗体の静脈内投与から成る。我々の実施例（実施例４）は、TNFを結合し、さらに、そのTNFレセプターへの結合を遮断する本発明に記載のVHHを実証している。これらの抗-TNFポリペプチド構築物の経口送達は、結腸内の罹患部位に前記分子を活性型として送達することとなる。これらの部位は、重度の炎症をきたしており、TNF-産生細胞を含有する。これらの抗-TNFポリペプチド構築物は、局所的にTNFを中和し、全身への分布を回避し、それによって、負の副作用を限定することができる。Micrococcus lactisなどの遺伝子組換え微生物は、抗体断片を分泌できる（US 6190662、WO 0023471）。前記組換え微生物は、腸内での抗体断片の限局産生および送達媒体として使用できる。TNF中和抗体断片を産生する系統（菌株）を使用することによって、炎症性腸疾患を治療できるはずである。本発明の別の実施態様は、炎症過程に関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、TNF-αに特異的な少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、この場合、前記ポリペプチド構築物は、経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与し、もしくは、吸入によって投与する。本発明の別の態様は、炎症過程に関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、例えばTNF-αに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与または吸入による投与を含む。

【０１６５】

本発明のある態様によれば、本発明のポリペプチド構築物は、TNF-αに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体で、前記単一ドメイン抗体が配列番号12～14のいずれかで表される配列に相当する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含む。前記配列は、抗-TNF-αラクダ科 VHHである。

【０１６６】

本発明のポリペプチド構築物を使用できる治療標的のさらなる非限定的な例は、特定の結腸癌特異的抗原で、例えばCEAまたはEGFレセプターである。本発明のある態様では、結腸癌抗原に対する治療用VHHは、例えば化合物または放射性化合物などの1個以上の腫瘍破壊試薬に結合または該試薬を備える。

【０１６７】

上述のように、本発明に記載の結腸癌特異的抗原は、上皮増殖因子レセプター（EGFR）で、これは、哺乳類の細胞分裂の必須メディエーターであり、認識細胞癌遺伝子である。EGFのそのレセプター（EGFR）への結合後、シグナリングカスケードが開始され、細胞発達を生じる。EGFRは、頭部、頚部、肺、結腸などの部位に位置する上皮悪性腫瘍を伴う細胞上に過剰発現しながら、ヒト腫瘍形成にも関与する。本発明の別の態様は、EGFRに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含む、EGFR-介在癌に関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するためのポリペプチド構築物であり、この場合、前記VHHを経口、舌下、局所、鼻内、静脈内、皮下、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する（実施例２５～３１）。本発明の別の態様は、EGFR-介在癌に関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、EGFRに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与または吸入による投与を含む。

【０１６８】

本発明のある態様によれば、本発明のポリペプチド構築物は、EGFRに対する少なくとも

1個の単一ドメイン抗体を含み、前記単一ドメイン抗体は、配列番号23～44のいずれかで表される配列に相当する。前記配列は抗-EGRF ラクダ科 VHHである。

【０１６９】

上述のように、本発明に記載の別の結腸癌特異的抗原は、癌胎児性抗原（CEA）、認識腫瘍マーカーである。本発明の別の態様は、CEA-介在癌に関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、CEAに特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記ポリペプチドを経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、CEAに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入による投与を含む、CEA-介在癌に関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法である。この糖タンパク質に特異的な数種のVHHは、ヒトコブラクダの免疫化後に得られた専用ライブラリーからCEAコートされた固相上で選択することによって単離されている。2個の断片のみが、細胞結合抗原を認識することが、FACS分析を使用することによって、明らかであった。未変性構造を認識したVHHの1つを、β-ラクタマーゼとの融合タンパク質の構築に使用した。精製融合タンパク質の機能性をインビトロにおいて、プロドラッグ転換細胞傷害性アッセイで検討した。さらに、インビボにおいて、免疫複合体を腫瘍-標的生体内分布試験で検討した。

【０１７０】

本発明のポリペプチド構築物を使用できる治療標的の非限定的な例は、ピロリ菌で、これは、ヒトの胃および十二指腸の内層を覆う粘液に棲息する細菌である。正常なヒトの胃には、内表全体を覆う極薄の粘液層がある。この粘液は、防御的役割を果たし、胃酸と敏感な胃壁の間のバリアとして作用する。ピロリ菌は、胃の内層に刺激因子として作用し、これが、胃の炎症（胃炎）を引き起こす。本発明のある実施態様は、ピロリ菌に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記構築物は、ウレアーゼの酵素機能を阻害する。単一ドメイン抗体、特にVHHは、酵素部位を占有する特異的な特性を有するので、選択されたVHHは、酵素活性を阻害し、ピロリ菌感染の毒力を中和すると思われる。本発明の別の態様は、ピロリ菌に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記構築物が胃壁への細菌の付着を阻害し、それによって胃壁の刺激および胃炎を防止する。本発明のある実施態様は、胃壁の刺激および胃炎に関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、ピロリ菌に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与するが、経口投与が好ましい。本発明の別の態様は、胃壁の刺激および胃炎に関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、ピロリ菌に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含むが、経口投与が好ましい。

【０１７１】

本発明のVHHを使用できる治療標的の非限定的な例は、糞便／経口経路を経て伝染するウイルス性疾患のE型肝炎である。症状は、年齢と共に増加し、腹痛、食欲不振、褐色尿、発熱、肝肥大、黄疸、倦怠、悪心および嘔吐がある。総致死率は、1～3%であるが、妊婦では15～25%である。いったん投与を受けると、大半の患者は生涯に亘って防御をもたらす中和化IgG反応を発達させる。中和化VHH分子は、経口投与ができるために、通常のIgG分子よりも有利である。ほとんどのE型肝炎感染は、北アフリカ、中央アフリカ、アジア、中央アメリカに発生するので、それらの国では、医療支援体制が未発達であることから、経口投与が非常に有利である。本発明のある態様は、E型肝炎に関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するためのHEVカプシドタンパク質（56 kDa）に特異的な1個以上のVHHであり、前記VHHを経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、E型肝炎に関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、前記VHHの対象への経口、舌下、局所、

静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含む。

【０１７２】

本発明のポリペプチド構築物を使用できる治療標的の非限定的な例は、TB菌およびインフルエンザウイルスなど、呼吸器疾患を誘発する微生物である。TB即ち結核は、結核菌と呼ばれる細菌によって引き起こされる疾患である。該細菌は、身体のどんな部位をも攻撃できるが、通常は、肺を攻撃する。インフルエンザは、「流感」を引き起こすウイルス性疾患である。インフルエンザウイルスは、肺にも存在する。本発明のある態様は、TBに関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、結核菌エピトープに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、TBに関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、前記VHHの対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含む。本発明の別の態様は、流感に関連する疾患を治療、予防、および／または緩和するのに使用するための、インフルエンザウイルスに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、流感に関連する疾患を治療、予防および／または緩和する方法で、前記ポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含む。

【０１７３】

本発明のポリペプチドを使用できる治療標的の非限定的な例は、アレルギーに関連するIgEである。一生の間に、対象は、無害な寄生虫（例、Dermatophagoides pteronyssinus、ハウスダストのダニ）や物質（凝塊、プラスチック、金属）へのアレルギー反応をきたす場合がある。これは、IgE分子を誘導し、免疫反応カスケードをもたらす。本発明のある態様は、IgEに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチドが、肥満細胞および好塩基球上のレセプターとのIgEの相互作用を防止する。それら自体が、免疫カスケード、アレルギー反応の開始を防御する。IgE分子は、血流中に存在するので、それらの標的に到達するために、VHHを1個以上の能動輸送キャリアに融合させるのは、本発明の範囲内である。本発明の別の態様は、アレルギーに関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、IgEエピトープに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、アレルギーに関連する疾患を治療、予防および／または緩和する方法で、前記ポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含む。

【０１７４】

本発明のある態様によれば、本発明のポリペプチド構築物は、IgEに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含み、前記単一ドメイン抗体は、配列番号1～11のいずれかで表される配列に相当する。前記配列は抗-IgE ラクダ科 VHHである。

【０１７５】

本発明のポリペプチド構築物を使用できる治療標的の非限定的な例は、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）ファミリーの構成酵素であるヒトマクロファージエラスターゼ（MMP-12）である。これらの酵素は、正常過程および炎症過程に重要な役割を果たし、組織の再構築に寄与する。さらに、MMPは、正しい細胞外マトリックス再構築および破壊の他に、癌や炎症などの多様な病態に重要な役割を果たす。マクロファージエラスターゼ、即ちMMP-12は、大きな特異性ポケットと幅広い基質特異性を有する。それは、細胞外タンパク質の過剰なタンパク質分解（例、煙誘発気腫における肺損傷、Churgら、A. 2003）、あるいは、マトリックス分解の増加（例、肥満におけるMMP-12酵素活性の上昇、Chaveyら、2003）を原因とする数種の疾患に役割を果たす。他の臨床適応症には、小児脂肪便症および表皮水疱症（Salmelaら、2001）、子宮体腎炎（Kanekoら、2003）、食道扁平上皮癌

（Dingら、2002）および皮膚癌（Kerkelaら、2000）がある。

【０１７６】

MMP-12は、肺胞マクロファージによって細胞外腔に分泌され、MMP-12の調節障害が肺気腫に到る肺胞膜の分解に対して考えられる理由である。MMP-12の標的基質には、エラスチン、フィブロネクチンおよびラミニンなどの細胞外マトリックスタンパク質があり、α1-アンチトリプシンおよび組織因子プロテアーゼ阻害剤もある。本発明の別の態様は、炎症過程に関連する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、MMP-12に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、炎症過程に関連する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、前記ポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含む。

【０１７７】

本発明の別の態様は、（１）メタロプロテイナーゼに特異的に結合し、メタロプロテイナーゼによって分解されないVHH's、（２）1個以上のメタロプロテイナーゼのタンパク質分解活性を阻害するVHH's、（３）非特異的化学阻害剤（例、バチマスタット、メリマスタット....）と異なり、あるMMPに著しく特異的な阻害性VHH's （例、MMP-12特異的拮抗剤）から成る。

【０１７８】

本発明のある態様によれば、本発明のポリペプチド構築物は、ヒトMMP-12に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含み、前記単一ドメイン抗体は、配列番号15～22のいずれかで表される配列に相当する。前記配列は抗-MMP-12 ラクダ科 VHHである。

【０１７９】

本発明のポリペプチド構築物を使用できる治療標的の非限定的な例は、一部のT細胞によって分泌されるIFN-γである。IFN-γは、その抗-ウイルス活性に加えて、ナチュラルキラー（NK）細胞およびTヘルパー1（Th1）細胞を刺激し、マクロファージを活性化し、細胞表面のMHC分子の発現を刺激する。そのため、IFN-γは、一般に、免疫機能の多くの側面を強化する働きをし、免疫系が過剰活動している病態（例、クローン病）、例えば自己免疫疾患および臓器移植拒絶反応、の治療の候補物質となっている。本発明のある態様は、免疫反応に関連する疾患の治療、予防および／または緩和に使用するための、IFN-γに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記ポリペプチド構築物を経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与し、あるいは、吸入で投与する。本発明の別の態様は、免疫反応に関連する疾患を治療、予防および／または緩和する方法で、前記ポリペプチド構築物の対象への経口、舌下、局所、静脈内、皮下、鼻内、膣内、直腸内投与、あるいは、吸入での投与を含む。本発明の他の実施態様では、IFN-γを中和するポリペプチド構築物が、乾癬患者の治療に使用されている。

【０１８０】

本発明のある態様によれば、本発明のポリペプチド構築物は、IFN-γに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含み、前記単一ドメイン抗体は、配列番号45～70のいずれかで表される配列に相当する。前記配列は、抗-IFN-γ ラクダ科 VHHである。

【０１８１】

本発明は、特異的配列を固定する単一ドメイン抗体（例、VHH）の同定法にも関するもので、これは、（US 6361938に記載されるとおり）ヒトまたは動物の組織を通過する抗-標的単一ドメイン抗体の送達または輸送を促進し、それらはGIT（消化管）上皮層、肺胞細胞、血液-脳関門の内皮、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、腎臓上皮細胞、パイヤー板M細胞および肝細胞を含むが、これらに限定されない。さらに、本発明のVHHと合わせて、ナノ粒子、ミクロ粒子、リポソーム、ミセル、シクロデキストリンを含む送達系を使用できる。観血的脳神経外科手術を利用せずに使用できる新規脳内薬剤の開発を著しく限定している血液-脳関門を、小型（<600ダルトン）および疎水性（Partridge et al, Adv. Drug Delivery Reviews, 15, 5-36 (1995)）分子のみが容易に通過できる。

【０１８２】
細胞内部へのポリペプチド構築物の送達
本発明の別の態様は、細胞内部に治療ポリペプチドおよび／または作用物質を送達する方法および分子である。本発明のさらなる態様は、抗原提示細胞内部に抗原を送達し、それによって、該抗原への強力な免疫反応を誘発する方法および分子である。本発明のなおもさらなる態様は、血液-脳関門、肺-血液バリアなどの天然のバリアを通過する治療ポリペプチドおよび／または作用物質を送達する方法および分子を提供することである。
【０１８３】
本発明のある態様は、標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、細胞内部移行レセプターに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記ポリペプチド構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行する。
【０１８４】
細胞内部の標的は、前記細胞の働きに影響を与え、それへの結合は、単独で、細胞自体の表現型の変化を招く可能性がある。これは、例えば、細胞死、細胞周期または細胞増殖への作用、あるいは、細胞内シグナリング経路の妨害である場合がある （例えば、Poul MA et al, J Mol Biol, 2000, 301, 1149-1161参照）。
【０１８５】
本発明のある実施態様は、細胞内部移行レセプターに特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、該ポリペプチド構築物は、それに共有的にまたは非共有的に結合する治療ポリペプチドまたは作用物質を含む。前記治療ポリペプチドまたは作用物質は、細胞内で作用する1個以上の標的を有する。例えば、図１２参照。前記治療ポリペプチドは、小胞、小器官および他の細胞質構造、膜結合構造、核を含む細胞内の特異的コンパートメントに該ポリペプチドを狙わせる特異的配列を保有してよい。
【０１８６】
本発明に記載の内部移行レセプターは、細胞表面に示されるレセプターで、リガンドへの結合時、細胞の細胞質への前記リガンドの細胞内部移行を仲介する。本発明に記載の内部移行レセプターには、LDLレセプター、EGFr、FGF2r、ErbB2r、トランスフェリンレセプター、PDGFr、VEGFr、PsmArまたは抗原提示細胞内部移行レセプターがあるが、これらに限定されない。
【０１８７】
本発明のある実施態様は、本明細書に開示の細胞内部移行レセプターに特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含み、さらに、抗原を含むポリペプチド構築物である。
【０１８８】
本発明のある実施態様は、本明細書に開示の細胞内部移行レセプターに特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記レセプターは、抗原提示細胞（APC）上の内部移行レセプターである。該レセプターは、APCに著しく特異的で、他の細胞タイプ上で、発現せず、少量存在するのが好ましい。
【０１８９】
本発明の別の実施態様は、1個以上の抗-レセプター単一ドメイン抗体と抗原を含むポリペプチド構築物である。従って、APC上の内部移行レセプターに対するVHHに抗原を結合させることによって、APCによる抗原取り込みは、APCと抗原の間の受動的相互作用によっては決定されず、VHHと前記レセプターの間の「能動」結合によって決定される。これは、該過程をさらに効率化するだけでなく、再現性を高め、抗原ごとにT-細胞活性化が大きく変動する原因となる抗原構造には左右されない。
【０１９０】
内部移行後、複合体は、APCによって消化され、抗原小片がMHC/HLAと結合して表面に露出され、強力な免疫反応を誘発する。
【０１９１】
本発明の別の実施態様は、抗原に対して対象を免疫化する方法であって、APC上に存在

する抗原に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物の、それを必要とする対象への投与を含み、前記単一ドメイン抗体は、さらに当該抗原を含む。

【０１９２】

本発明のある実施態様は、本明細書に開示の細胞内部移行レセプターに特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、この場合、前記レセプターはEGFRである。一般に、レセプターの内部移行作用は、封鎖（sequestration）と呼ばれる過程でアゴニストリガンドの結合時に起こる。細胞外シグナルを適切な規模および特異性の細胞内シグナルに確実に翻訳するために、シグナリングカスケードが封鎖過程を経由して緻密に調節され、その際、レセプターが、サイトゾル区画への内部移行作用によって細胞表面から物理的に除去される（Carman, C.V.およびBenovic, J.L. Current Opinion in Neurobiology 1998, 8: 335-344）。これは、実際には、アゴニストリガンドまたは抗体だけが前記レセプターを経て細胞内部移行すると予想されることを意味する。治療での使用に関しては、その細胞内部に毒殺量を送達する前に、該抗体が最初に腫瘍細胞の増殖を誘発するというのは効果として望ましくない。

【０１９３】

内部移行レセプターの一部は、腫瘍細胞上の上皮増殖因子レセプター（EGFR）またはErBb2レセプターなど、特定の細胞上に過剰発現する。上皮増殖因子（EGF）は、哺乳類細胞の細胞分裂に必須のメディエーターで、被認識細胞癌遺伝子であり、そのため、抗-レセプター療法に適した標的である。EGFのそのレセプター（EGFR）への結合後、シグナリングカスケードが開始され、細胞発達が起こる。EGFRは、頭部、頚部、肺、結腸などの多くの上皮悪性腫瘍細胞に過剰発現されるように、ヒトの腫瘍形成に関与する。これらのレセプターの1つに結合する際に細胞内部移行するVHHを、細胞内部への分子送達に使用できる。

【０１９４】

本発明のある実施態様は、EGFRに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、単一ドメイン抗体が配列番号23～44のいずれかで表される配列に相当するポリペプチド構築物である。驚くべきことに、単一ドメイン抗体の1つは、効率的に細胞内部移行した事実があるにもかかわらず、EGFRを活性化しなかった。前記タイプの抗体は、増殖を刺激せずに毒殺量を細胞に送達できるので、治療応用に好ましい。

【０１９５】

本発明の別の実施態様は、EGFRに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記抗-EGFR単一ドメイン抗体はEGFRを活性化しない。前記ポリペプチド構築物は、本明細書で言及するとおり、EGFRを刺激せずに、細胞への治療剤および／またはポリペプチドの送達に使用できる。

【０１９６】

本発明の別の実施態様は、EGFRに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物で、前記抗-EGFR単一ドメイン抗体はEGFRを活性化せず、配列番号31で表される配列に相当する。

【０１９７】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、さらに細胞内標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含み、前記単一ドメイン抗体は共有結合または非共有結合されている。この多重特異的ポリペプチド構築物は、非レセプター特異的単一ドメイン抗体の標的に応じて疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用できる。この標的は、例えば、PDK1などのキナーゼであることができる。PDK1は、乳癌細胞中に過剰発現される。活性化ループ中でT308をリン酸化してAktを活性化する。Aktの多数の下流基質が細胞生存の促進に直接的役割を果たす。これらには、GSK3、Bad、カスパーゼ-9およびフォークヘッドがある。

【０１９８】

本発明のある実施態様は、細胞内部移行レセプターに対する単一ドメイン抗体を含むポ

リペプチド構築物であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、さらに、PDK1、GSK1、Bad、カスパーゼ-9およびフォークヘッドに対する1個以上の単一ドメイン抗体を含む。本発明の別の態様は、癌治療のための前記構築物の使用である。本発明の別の態様は、癌治療用医薬品の調製のための前記構築物である。

【０１９９】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、さらに、該構築物は、それに共有結合または非共有結合する薬剤または毒性化合物を含む。毒性化合物の一例は、還元環境のために細胞内だけで活性を示す化合物である（例、追加的にシステインで遺伝子組み換え修飾し、不活性酵素となるが、還元環境では活性型となる酵素）。毒性化合物の別の例は、特定の細胞型だけに特異的に毒性を発揮する化合物である。毒性化合物または薬剤の例は、細胞内部に存在するリガンドで活性化され、当該表現型となる化合物である。他の例には、プロドラッグ、小有機分子がある。本発明のある態様は、前記構築物の投与を要する疾患の治療への前記構築物の使用である。本発明の別の態様は、前記構築物の投与を要する疾患の治療のための医薬品の調製への前記構築物の使用である。

【０２００】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、さらに、繊維状ファージがその表面に前記構築物を発現する。前記構築物は、ファージ先端に付着できる。本発明のある態様では、遺伝子療法ベクターとしての使用に、DNAを封入し、細胞に送達するために構築物-ファージ集合体を使用できる。本発明に従って、ファージは、治療で使用するために、前記構築物をコードするものに加えて、DNAを保持できる。本発明に従って、ファージは治療ポリペプチドコード遺伝子を保持してもよく、それは細胞内部の前記遺伝子の発現用プロモーターによって制御される。前記プロモーターの例は、CMVプロモーターがある（Kassner et al, Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264: 921-928）が、それに限定されない。ファージは既存の遺伝子療法用ベクターに勝る際立った長所を有する。理由は、高力価での産生が簡単で、経済的であり、哺乳類細胞に対する固有の向性を持たず、遺伝子組換えおよび進化が比較的簡単である（Larocca D et al, Curr. Pharm. Biotechnol, 2002: 3: 45-57） からである。

【０２０１】

本発明の別の実施態様は、本明細書に開示のポリペプチド構築物で、この場合、前記単一ドメイン抗体は、細胞内部移行レセプターに特異的なVHHから誘導したペプチドである。前記VHHペプチドは、ほぼペプチドによってのみ、その抗原と結合できる。細胞内部移行VHHは、細胞内部移行性についてスクリーンしたペプチドライブラリーから調製できる。細胞内取り込み用に、これらのVHHペプチドを治療ポリペプチドまたは作用物質にタグとして付加させることができる点は、本発明の一態様である。VHHペプチドは、例えば、治療用VHHの細胞への輸送に使用できる。本発明のある実施態様では、VHHペプチドは、CDR3である。本発明の別の実施態様では、VHHペプチドは、いずれか他のCDRである。

【０２０２】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに特異的で、このレセプターへの結合時に細胞内部移行するVHHの選択法であり、この方法は、VHHのファージライブラリー（未処理または免疫）をもってレセプター-提示細胞を選別すること（panning）、ならびに、細胞に内部移行されたファージを細胞内から回収することによって細胞内部移行VHHを選択することを含む。本発明は、レセプターを過剰発現する細胞系またはレセプター遺伝子を形質導入した細胞系を使用する選択法を含み、レセプターに結合するファージ抗体の容易な選択が可能である。これによって、タンパク質発現および精製が不要で、細胞内部移行VHHの生成が著しくスピードアップする。

【０２０３】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに特異的な少なくとも1個の単一ド

メイン抗体を含むポリペプチド構築物を該レセプターに共有または非共有結合させることによる細胞の内部移行作用によって取り込むための、治療ポリペプチド、作用物質または抗原の送達法であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行する。

【０２０４】

本発明に記載のVHHは、VHHの投与を必要とする疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用できる。

【０２０５】

本発明の別の実施態様は、細胞内標的分子と相互作用する治療ポリペプチドまたは作用物質を送達する方法で、それらを必要とする対象への細胞内部移行レセプターに特異的な1個以上のVHHの投与を含み、前記VHHが、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、前記VHHは前記ポリペプチドまたは作用物質に融合する。

【０２０６】

本発明の別の実施態様は、治療ポリペプチド、作用物質または抗原の送達法で、細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物をそれらに共有または非共有結合させて天然バリアを通過させて送達する方法であり、前記構築物は、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行する。本発明によれば、天然バリアには、血液-脳、肺-血液、消化器-血液、膣-血液、直腸-血液および鼻-血液の各バリアがあるが、これらに限定されない。

【０２０７】

例えば、上気道および肺を経由して送達されるペプチド構築物は、治療ポリペプチドまたは作用物質の肺腔から血液への輸送に使用できる。該構築物は、粘膜表面（気管支上皮細胞）上に存在するレセプターに特異的に結合し、血流標的に特異的な治療ポリペプチドまたは作用物質を肺腔から血液に輸送する。別の例では、治療ポリペプチドまたは作用物質は、腸壁上に存在する細胞内部移行レセプターに対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物に結合し、血流に送り込まれる。前記構築物は、治療ポリペプチドまたは作用物質が細胞の内部移行作用を経由して壁を通過する輸送を誘発する。

【０２０８】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに特異的なVHHであり、前記VHHは、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行し、前記VHHは治療ポリペプチドまたは作用物質に共有または非共有結合し、前記VHHは、天然バリアを通過する。

【０２０９】

本発明の別の実施態様は、細胞内部移行レセプターに特異的なVHHに該レセプターを共有または非共有結合させることによる局所での取り込みのために、治療ポリペプチド、作用物質または抗原を送達する方法であり、前記VHHは、前記レセプターへの結合時に細胞内部移行する。本発明によれば、局所領域には、脳、肺、消化器、膣、直腸および鼻の各領域があるが、それに限定されない。

【０２１０】

本発明のある実施態様は、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。

【０２１１】

当業者に既知のとおり、いったんポリペプチド構築物が手に入ると、正しい位置（胃内、結腸内など）で最大量のVHHを放出する配合技術を応用できる。この送達法は、標的が消化器系に位置する疾患の治療、予防および／または症状緩和にとって重要である。

【０２１２】

本発明のある態様は、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、該疾患に関連する抗原に特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによる方法である。

【０２１３】

本発明の別の実施態様は、不活性化されずに胃内環境を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０２１４】

本発明のある態様は、不活性化されずに消化器系に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによる方法である。

【０２１５】

本発明のある態様は、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによる方法である。

【０２１６】

本発明の別の実施態様は、膣および／または直腸に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。

【０２１７】

非限定的な例では、本発明に記載の製剤は、経時的に活性成分をゆっくりと放出するジェル、クリーム、坐薬、フィルム状で、あるいは、スポンジ、または、膣リングとして、1個以上の標的に対する1個以上のVHHを含む、本明細書に開示のポリペプチド構築物を含む（前記製剤は、EP 707473、EP 684814、US 5629001に開示）。

【０２１８】

本発明のある態様は、膣および／または直腸に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に膣および／または直腸投与することによる方法である。

【０２１９】

本発明の別の実施態様は、不活性化されずに膣および／または直腸に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０２２０】

本発明のある態様は、不活性化されずに膣および／または直腸に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の膣および／または直腸に投与することによる方法である。

【０２２１】

本発明のある態様は、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の膣および／または直腸に投与することによる方法である。

【０２２２】

本発明の別の実施態様は、鼻、上気道および／または肺に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含む、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。

【０２２３】

非限定的な例では、本発明に記載の製剤は、鼻内スプレー（例、エアゾル）または吸入器の形態で、1個以上の標的に対する本明細書に開示のポリペプチド構築物を含む。該構築物は、小型であるため、治療用IgG分子よりもはるかに効率的に、その標的に到達できる。

【０２２４】

本発明のある態様は、1個以上の単一ドメイン抗体が該疾患関連抗原に特異的である本明細書に開示のポリペプチド構築物を対象に口や鼻から吸入することによって、鼻、上気

道および肺に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法である。

【０２２５】

本発明の別の実施態様は、US 6514496に記載されているものなど、分散性VHH組成物、特に乾燥粉末分散性VHH組成物である。これらの乾燥粉末組成物は、平均粒度が0.4～10mmの範囲の離散乾燥粒子を多数を含む。前記粉末は、吸入器中で容易に分散することができる。VHH'sは、高可溶化能により、（吸入された後に肺で）容易に溶解できる凍結乾燥剤などの組成物に特に適している（Muyldermans, S., Reviews in Molecular Biotechnology, 74, 277-303, (2001)）。別法として、前記凍結乾燥VHH製剤は、希釈剤で再溶解し、皮下投与に適した安定な再溶解製剤とすることができる。例えば、抗-IgE抗体製剤（実施例１；US 6267958、EP 841946）が調製されており、アレルギー性喘息に有用である。

【０２２６】

本発明の別の実施態様は、不活性化されずに鼻、上気道および／または肺に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０２２７】

本発明のある態様は、鼻、上気道および／または肺に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の鼻、上気道および／または肺に投与することによる方法である。

【０２２８】

本発明のある態様は、不活性化されずに鼻、上気道および／または肺に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の鼻、上気道および／または肺に投与することによる方法である。

【０２２９】

本発明のある態様は、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象の鼻、上気道および／または肺に投与することによる方法である。

【０２３０】

本発明のある実施態様は、腸粘膜に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、本明細書に開示のポリペプチド構築物で、この場合、前記疾患は腸粘膜の透過性を高めるものである。本明細書に開示のポリペプチド構築物は、小型であるため、腸粘膜透過性の増加を引き起こす疾患、例えばクローン病を発症した対象において、腸粘膜を通過し、より効率的に血流に到達することができる。

【０２３１】

本発明のある態様は、腸粘膜に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、本明細書に開示のポリペプチド構築物を対象に経口投与することによる方法であり、前記疾患は腸粘膜の透過性を高めるものである。

【０２３２】

本発明の別の実施態様は、腸粘膜に送達される抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製への、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用であり、前記疾患は腸粘膜の透過性を高めるものである。

【０２３３】

本発明のある態様は、本発明のポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに腸粘膜に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０２３４】

本発明のある態様は、本発明のポリペプチド構築物を対象に経口投与することによって、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法である。

【０２３５】

この工程は、本発明の追加態様-能動輸送キャリアの使用によって一層強化できる。本発明のこの態様では、本明細書に記載のポリペプチド構築物は、腸壁から血流への移行を増強するキャリアに融合される。非限定的な例では、この「キャリア」は、前記ポリペプチドに融合されたVHHである。前記融合構築物は、従来技術の方法を使って製造される。「キャリア」VHHは腸壁上のレセプターに特異的に結合し、該壁からの能動輸送を誘発する。

【０２３６】

本発明のある実施態様は、舌下組織を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、標的に対する少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。本明細書に開示の前記ポリペプチド構築物の製剤、例えば錠剤、スプレー、ドロップを舌下に置き、粘膜から舌下の毛細血管網に吸着させる。

【０２３７】

本発明のある態様は、舌下組織を有効に通過できる治療化合物による調節に感応する疾患を、治療、予防および／または症状緩和する方法であり、該疾患に関連する抗原に特異的なVHHを対象に舌下投与することによる方法である。

【０２３８】

本発明の別の実施態様は、舌下組織を通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための、本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０２３９】

本発明のある態様は、不活性化されずに舌下組織に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによる方法である。

【０２４０】

本発明のある態様は、不活性化されずに対象の血流に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に経口投与することによる方法である。

【０２４１】

本発明のある実施態様は、皮膚を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患の治療、予防および／または症状緩和に使用するための、少なくとも1個の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物である。前記ポリペプチド構築物の製剤、例えばクリーム、フィルム、スプレー、ドロップ、パッチを皮膚上に置き、通過させる。

【０２４２】

本発明のある態様は、皮膚を有効に通過できる治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する方法で、該疾患に関連する抗原に特異的な1個以上の単一ドメイン抗体を含む本明細書に開示のポリペプチド構築物の対象への局所投与による方法である。

【０２４３】

本発明の別の態様は、アレルギー性疾患など眼病の治療のための局所眼科用組成物としての本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用であり、その方法は、本明細書に開示のポリペプチド構築物を含む眼科用組成物の局所投与を含み、前記構築物は1個以上の抗-IgE VHHを含む（実施例１、実施例２）。

【０２４４】

本発明の別の実施態様は、皮膚を有効に通過できる抗-標的治療化合物による調節に感応する疾患を治療、予防および／または症状緩和する医薬品の調製のための本明細書に開示のポリペプチド構築物の使用である。

【０２４５】

本発明のある態様は、不活性化されずに皮膚に抗-標的治療化合物を送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に局所投

与することによる方法である。

【０２４６】

本発明のある態様は、抗-標的治療化合物を対象の血流に送達する方法で、前記標的に対する1個以上の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド構築物を対象に局所投与することによる方法である。

【０２４７】

本発明の別の態様は、どの単一ドメイン抗体（例、VHH）分子が、例えば口、鼻、肺、皮膚を利用した投与時に、天然バリアを通過して血流に入るかを決定する方法である。非限定的な例では、本方法は、未処理、合成または免疫単一ドメイン抗体ファージライブラリーのマウスなどの小動物への投与を含む。投与後、様々な時点で、血液を採取し、血流に能動的に移行したファージをレスキューする。さらに、投与後、器官を単離し、結合ファージを剥離させることができる。肺腔から血流への能動輸送のためのレセプターの非限定的な例は、FcレセプターN（FcRn）である。従って、本発明の方法は、血液に能動輸送されるだけでなく、特定器官を狙うことができる単一ドメイン抗体を特定する。本方法は、どのVHHが消化器を通過して血液中に；舌（または舌下）を通過して血液中に；皮膚他を通過して血液中に輸送されるかを特定できる。

【０２４８】

本発明のある態様は、前記方法を使って得られる単一ドメイン抗体である。本発明に従って、前記単一ドメイン抗体を、本発明のポリペプチド構築物中の単一ドメイン抗体として使用できる。別の単一ドメイン抗体、治療剤、あるいは、血液を経て到達可能な標的または血液中の標的に対するポリペプチドキャリアをさらに含む前記構築物を、前記単一ドメイン抗体にとって最も効率な経路で投与できる。

【０２４９】

一般に、「治療有効量」、「治療有効投与量」および「有効量」は、望みの結果（例えば、IFN-γ結合の調節；炎症の治療または予防）を達成するのに必要な量を意味する。当業者であれば、例えば本発明で使用されるIFN-γ結合などのリガンド-標的結合を調節する各種化合物の力価および「有効量」は変動し得るものであることを認識する。当業者は、該化合物の力価を容易に検定できる。

【０２５０】

用語「化合物」は、本明細書で使用する場合、本発明のポリペプチド構築物、または前記ポリペプチド構築物をコードすることのできる核酸を指す。

【０２５１】

「薬学的に許容される」とは、生物学的にもしくはその他の点で望ましくないというわけではない材料を意味し、即ち、その材料を上記化合物と合わせて個体に投与した場合に、望ましくない生物学的作用やそれを含む医薬組成物の他の成分のいずれかと消去する様式で相互作用を引き起こすことはないものである。

【０２５２】

本発明のポリペプチド構築物は、対象の病態の治療または予防に有効で、薬学的有効量の化合物または組成物の投与を含む。

【０２５３】

本発明に開示のポリペプチド構築物は、対象の病態の治療または予防に有効で、例えばドキソルビシンなどの別のものとの薬学的有効量の複合薬の投与を含む。

【０２５４】

本発明は、本発明の単一化合物を含む製剤の投与に限定されない。本発明の1個以上の化合物を含む製剤を、それを必要とする患者に投与する併用療法を提供するのは、本発明の範囲内である。

【０２５５】

本発明の有用な化合物は、医薬組成物として配合し、ヒト患者や家畜などの哺乳類宿主に、選択した投与経路、即ち、非経口的、静脈内、筋肉内、皮下経路に適応する様々な剤型で、膣および／または直腸、鼻内、口または鼻からの吸入、舌下、局所投与できる。

【０２５６】
本発明の化合物は、遺伝子療法的送達法を使っても投与できる。例えば、U.S.No.5,399,346参照。これは参照によって、そのまま組み入れられる。遺伝子療法的送達法を使って、本発明の化合物について遺伝子を形質導入した一次細胞をさらに組織特異的プロモーターで形質導入し、特定の器官、組織、移植片、腫瘍または細胞を標的とすることができる。
【０２５７】
従って、本化合物は、不活性希釈剤や同化可能な食用キャリアなどの薬学的に許容される媒体と併用して投与してもよい。それらは、ゼラチン硬または軟カプセルに封入し、圧縮して錠剤化し、あるいは、患者の治療食の食品に直接混入してもよい。治療での経口投与に関しては、活性化合物を、1種類以上の賦形剤と混合し、摂取可能な錠剤、口腔内貼付錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハスなどの剤型として使用できる。前記組成物および調製品は、少なくとも0.1%の活性化合物を含有する必要がある。組成物および調製品の含有率は、当然、変動させることができ、所定の単位剤型の重量の約2～60%であるのが便利であると思われる。前記の治療上有用な組成物中の活性化合物量は、有効投与量レベルが得られる量とする。
【０２５８】
錠剤、トローチ、ピル、カプセルなどは、以下のものも含有することができる：トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤；リン酸ジカルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；スクロース、フルクトース、ラクトースまたはアスパルテームなどの甘味料、またはペパーミント、ウィンターグリーンオイルなどの香料。また、チェリーフレーバーを添加してもよい。単位剤型がカプセルの場合、上記タイプの材料に加えて、植物油やポリエチレングリコールなどの液体キャリアを含有できる。コーティング剤として、あるいは、その他、固体単位剤型の物理的形状を変更するために、様々な他の材料を含むことができる。例えば、錠剤、ピルまたはカプセルは、ゼラチン、ロウ、セラックまたは砂糖などでコートできる。シロップまたはエリキシルは、活性化合物、スクロース、フルクトースを甘味料として、メチルおよびプロピルパラベンを防腐剤として、染料およびチェリーまたはオレンジフレーバーなどの香料を含有してもよい。当然、どの単位剤型の調製でも、それに使用する材料は、薬学的に許容可能で、使用量で実質的に無毒でなければならない。さらに、活性化合物は、徐放性調製品および器具に混入してもよい。
【０２５９】
活性化合物は、注入や注射により静脈内または腹腔内投与もできる。活性化合物またはその塩の溶液を水で調製し、任意に無毒な界面活性剤と混合することができる。分散剤も、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチンおよびそれらの混合液、および油でも調製できる。これらの調製品は、通常の保存および使用条件下で、微生物の増殖を防ぐために、防腐剤を含有する。
【０２６０】
注射または注入に適した医薬剤型は、滅菌注射または注入液または分散剤の即時的調製に適応させた滅菌水溶液または分散液または滅菌粉末であることができ、任意にリポソームに封入することができる。いずれの場合も、最終剤型は、製造および保存条件下で、無菌、流動性、安定でなければならない。液体キャリアまたは媒体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステルおよび適切なそれらの混合液を含む溶媒または液体分散媒であることができる。例えば、リポソームの配合によって、分散剤の場合、必要な粒度の維持によって、あるいは、界面活性剤の使用によって、適正な流動性を維持できる。各種抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによって微生物の作用を防止できる。多くの場合、等張剤、例えば糖、緩衝剤または塩化ナトリウムを含むのが好ましい。吸収を遅くする

作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物中での使用によって、注射組成物の遅延吸収を引き起こすことができる。

【０２６１】

滅菌注射液は、適当な溶媒中の必要量の活性化合物を必要に応じて種々の上記の他の成分と混合した後、フィルター滅菌することによって調製する。滅菌注射液調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これらは、活性成分と、先に滅菌濾過した溶液中に存在するいずれかの望みの追加成分の粉末を生じる。

【０２６２】

局所投与に関しては、本化合物を、液体の場合、純粋形で適用できる。しかし、一般に、皮膚科で許容可能なキャリアと併用して、組成物または製剤として皮膚に投与するのが望ましく、該キャリアは固体であることも、液体であることもできる。

【０２６３】

有用な固体キャリアには、タルク、クレー、微結晶セルロース、シリカ、アルミナなどの微粉砕固体がある。有用な液体キャリアには、水、ヒドロキシアルキルまたはグリコールまたは水-アルコール／グリコール混合液があり、その中に、本化合物を、任意に非毒性界面活性剤を使って有効レベルで溶解または分散できる。香料や別の抗菌剤などのアジュバントを添加し、特定使用のための性質を最適化できる。得られた液体組成物を、吸収性パッドから適用し、包帯や他のドレッシングを使って浸透させ、あるいは、ポンプ式またはエアゾルスプレーヤーを使って離患部に噴霧できる。

【０２６４】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪アルコール、修飾セルロース、変性ミネラル材料などの増粘剤も、液体キャリアと共に使用し、使用者の皮膚に直接塗る塗布ペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成できる。

【０２６５】

皮膚への本化合物の送達に使用できる有用な皮膚科用組成物の例は、従来技術である；例えば、Jacquetら（U.S.No. 4,608392）、Geria（U.S.No. 4,992,478）、Smithら（U.S.No.4,559,157）およびWortzman（U.S.No.4,820,508）参照。

【０２６６】

本化合物の有用な投与量は、インビトロ活性と動物モデルのインビボ活性を比較して決定できる。マウスおよび他の動物の有効投与量のヒトへの外挿法は、従来技術である；例えば、U.S.No.4,938,949参照。

【０２６７】

一般に、ローションなどの液体組成物中の本化合物の濃度は、約0.1～25重量%、好ましくは約0.5～10重量%になる。ゲルまたは粉末などの半固体または固体組成物の濃度は、約0.1～5重量%、好ましくは約0.5～2.5重量%になる。

【０２６８】

治療での使用に必要な本化合物、またはその活性塩または誘導体の量は、選択した特定の塩だけでなく、投与経路、治療する病態の性質および患者の年齢および状態に応じて変動させ、最終的に、主治医または臨床医の裁量にまかせる。また、本化合物の投与量は、標的細胞、腫瘍、組織、移植片または器官に応じて変動させる。

【０２６９】

望ましい投与量は、単回量または適当な間隔で、例えば1日当たり2回、3回、4回またはそれ以上の小分け量で投与する分割量として提示できるのが便利である。小分け量自体は、さらに、何回も不定期間隔の投与に分割できる。インサフレーターからの頻回吸入、眼球への何回もの点眼などがある。

投与計画は、長期、毎日投与であることができる。「長期」は、少なくとも2週間、好ましくは数週間、数ヶ月または数年間であることを意味する。必要なこの投与量範囲の変更は、本明細書の内容に示される通常の実験によってのみ、当業者が決定できる。Remington's Pharmaceutical Science（Martin, E. W., ed. 4）、Mack Publishing Co., Easton, PA参照。合併症の場合にも、個々の医師が投与量を調整できる。

【０２７０】
（図面の簡単な説明）
図１：IgE領域を示す図
図２：pH2.2、pH3.2、pH4.2における基準およびペプシン処理TNF3EのELISA（100%は、1/100希釈で測定されたシグナルである）
図３：実験の設定
図４：ヒトのMMP12の触媒ドメインのタンパク質分解活性へのVHHクローンの阻害能
図５：ラマの血清におけるA431特異的抗体力価を検出するELISA
図６：ラマの血清におけるEGFR特異的抗体力価の検出
図７：ラマ024および025、ならびに、ラマ026および027の血清におけるEGFR特異的抗体力価の検出
図８：EGFRに対するファージの応答
図９：エピトープ特異的溶出選択手法によって同定されたクローン31個のアミノ酸のアラインメント
図１０：エピトープ特異的溶出選択手順によって同定されたユニークなEGFR特異的クローン20個の細胞上（パネルＡ）または固相固定EGFR上（パネルＢ）のファージELISA
図１１：レセプターの内部移行作用およびシグナリングに対するナノボディEGFR-11a42の作用。Her-14（パネルＡ）または3T3（パネルＢ）による、内部移行作用が可能な条件下でのEGFR-IIIa42の蛍光顕微鏡可視化。レセプターチロシンキナーゼ活性に対するEGFR-IIIa42の作用を示すウェスタンブロットをパネルＣに示す。
図１２：治療タンパク質、毒性化合物、薬剤またはポリヌクレオチドを送達するための内部移行レセプターに対するVHHの使用を示す図
（表の簡単な説明）
表１：実施例１に記載の免疫化スキーム
表２：実施例１に記載のベクター特異的プライマーを用いたPCRによる挿入の存在
表３：実施例１に記載の一次選択
表４：実施例１に記載の一次選択からレスキューされたファージを用いた二次選択
表５：実施例１に記載のニュートラアビジンコーティング管を用いた2回目の選択
表６：実施例１に記載のELISAにおいて試験されるクローンの数に対するヒトIgEおよびキメラIgEの両方への結合について陽性を記録するクローンの数
表７：処置スケジュール
表８：実施例７および８に記載の異なるラマおよび組織由来のライブラリー、それらの多様性および挿入%の概要
表９：免疫化スケジュールおよび組織採集物
表１０：構築されたライブラリーの概要
表１１：エピトープ特異的溶出選択手順の概要
表１２：内部移行作用選択手順の概要
表１３：プライマー配列
表１４：配列リスト
【実施例】
【０２７１】
実施例の表題
IgE
実施例１：IgEに対するVHH
実施例２：抗-IgEのVHH製剤
実施例３：抗IgE製剤
【０２７２】
TNF-α
実施例４：抗TNF-αの選択
実施例５：ヒトTNFαに特異的な抗体断片の安定性試験

実施例６：マウスにおける抗-ヒトTNFα特異的VHHの経口投与
実施例７：IBDの動物モデルにおける効力
【０２７３】
MMP12
実施例８：免疫化
実施例９：レパートリークローニング
実施例１０：ライブラリーのレスキューおよびファージ調製
実施例１１：ヒトMMP-12特異的VHHの選択
実施例１２：選択されたVHHの特異性
実施例１３：選択されたVHHの多様性
実施例１４：VHHの発現および精製
実施例１５：選択されたVHHの機能的特徴づけ：比色法におけるVHHによるMMP-12のタンパク質分解活性の阻害
実施例１６：肺送達のための抗-MMP12 VHHの製剤
【０２７４】
インターフェロンγ
実施例１７：免疫化
実施例１８：レパートリークローニング
実施例１９：ライブラリーのレスキューおよびファージ調製
実施例２０：ヒト-IFNγ VHHの選択
実施例２１：選択されたVHHの多様性
実施例２２：VHHの発現および精製
実施例２３：抗-IFNγ VHHの局所適用
【０２７５】
治療的VHH断片
実施例２４：抗-TNFα VHH#3EのVHH-CDR3の発現
【０２７６】
EGFR
実施例２５：免疫化
実施例２６：免疫応答の評価
実施例２７：重鎖抗体断片（VHH）レパートリーのクローニング
実施例２８：クローン化レパートリーの評価
実施例２９：EGFR特異的ナノボディの同定のための複数選択ストラテジー
実施例３０：EGFR特異的ナノボディの特徴づけ
実施例３１：EGFレセプターが媒介するナノボディの細胞内部移行
【０２７７】
PDK1
実施例３２：ラマの免疫化
実施例３３：レパートリークローニング
実施例３４：ライブラリーのレスキュー、ファージ調製
実施例３５：選択
実施例３６：スクリーニング
実施例３７：細胞内部移行VHHについてのスクリーニング
実施例３８：VHHが阻害するPDK1-Akt相互作用についてのスクリーニング
実施例３９：二重特異性構築物の作製
実施例４０：腫瘍細胞のエンドサイトーシスおよび溶解
実施例４１：本発明の抗-標的-単一ドメイン抗体間の相同性の計算
実施例４２：抗血清アルブミンVHHに融合したVHH-CDR3断片を含む二重特異性構築物の構築
【０２７８】

実施例：

IgE

実施例１：IgEに対するVHH

2匹のラマを、ヒトIgE、Scripps laboratories, Cat nr. I0224、で免疫化した。以下の免疫化スキームを、表１に従って使用した。

【０２７９】

RNAを抽出には異なる供給源を使用した：

- 最後の抗原注射4日後と10日後との間の免疫血液150ml
- 最後の抗原注射4日後のリンパ節生検

密度勾配遠心分離（Ficoll-Paque Plus Amersham Biosciences）によって、末梢血液リンパ球（PBL）を単離した。PBLおよびリンパ節を使用して総RNAを抽出（Chomczynskiおよび Sacchi 1987）した。オリゴd(T)オリゴヌクレオチドを使用するMMLV逆転写酵素（Gibco BRL）を用いて、200μgの総RNAについてのcDNAを調製した（de Haardら、1999）。cDNAを、フェノール／クロロホルム抽出で精製し、続いてエタノール沈殿を行い、その後、鋳型として使用してVHHレパートリーを増幅した。

第１のPCRにおいて、従来の抗体遺伝子セグメント（1.6kb）および重鎖抗体遺伝子セグメント（1.3kb）の両方のレパートリーを、リーダー特異的プライマー（5'-GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT-3'）およびオリゴd(T)プライマー（5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTT-3’）を用いて増幅させた。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって分離し、重鎖抗体セグメントをコードする1.3kb断片をアガロースゲルから精製した。FR1逆方向プライマー（国際特許出願公開WO03/054016、配列ABL037～ABL043）および同一のオリゴd(T)順方向プライマーの混合物を用いて、第２のPCRを行った。

PCR産物を、（FR1プライマーに導入された）SfiIおよび（フレームワーク4に天然に存在する）BstEIIで消化した。ゲル電気泳動に続いて、約400塩基対のDNA断片をゲルから精製し、ファージミドpAX004の対応する制限酵素部位に連結して、Escherichia coli TG1にエレクトロポレーションした後に、クローン化VHHのライブラリーを得た。pAX004により、c-mycタグ、ヘキサヒスチジンタグおよびgeneIII産物との融合タンパク質として個々のVHHを発現しているファージ粒子の産生が可能になる。挿入率を、ベクターベースのプライマーの組合せを用いたPCRにおいて決定した。

結果を表２に要約する。

【０２８０】

IgEの定常領域に対するVHH分子を選択するために、免疫化に用いられたヒトIgEの代わりにキメラIgEを用いて選択を行った。Fcεレセプターと相互作用する領域は、IgEの定常部分に位置し、さらにとりわけ図１に示すように、Cε2～Cε3に及ぶ領域に位置している。

【０２８１】

PBL 4日目ライブラリー、PBL10日目ライブラリーおよびリンパ節4日目ライブラリーのプールを用いて、各々2匹のラマについて一次選択を行った。キメラIgEを5μg/mlおよび0.5μg/mlで固相にコーティングし、特定のファージを0.1Mグリシン（pH2.5）によって溶出した。

得られた結果を表３に示す。

【０２８２】

5μg/mlを用いた一次選択からレスキューされたファージを用いて、二次選択を行った。キメラIgEを1μg/mlで固相コーティングし、特定のファージをバフィーコート細胞またはリゾチームを用いて1時間溶出した。バフィーコート細胞はFcεレセプターを発現している細胞を含み、一方、リゾチームは無関係のタンパク質であり、コントロールとして供す。得られた結果を表４に示す。

【０２８３】

ニュートラアビジンコーティング管および2nMビオチン化IgEを用いて、別の2回目の選択を行った。特定のファージをバフィーコート細胞またはリゾチームを用いて1時間溶出

した。バフィーコート細胞はFcεレセプターを発現している細胞を含み、一方、リゾチームは無関係のタンパク質であり、コントロールとしての役割である。得られた結果を表５に示す。

【０２８４】

1回目の選択から得られた個々のクローンを、固相コーティングヒトIgEまたはキメラIgEを用い、ELISAでスクリーニングした。ELISAにおいて試験されるクローンの数に対するヒトIgEおよびキメラIgEの両方への結合について陽性を記録するクローンの数を、表６にまとめる。

【０２８５】

ヒトおよびキメラIgE結合について陽性であるクローンを採取し、PCRによって増幅させ、HinfIで消化した。アガロースゲルでHinfIプロフィールを決定し、異なるプロフィールについて代表的なクローンを配列決定した。得られた配列を表１４の配列番号1～11に示す。

【０２８６】

実施例２：抗-IgE VHHの局所適用

眼の局所適用のための抗アレルギー性医薬組成物を得るために、抗-IgE VHHの溶液を以下のように調製した：

- 0.9gの塩化ナトリウム、0.02gのクエン酸ナトリウム、0.02gのパラオキシ安息香酸メチル、0.1gのクロロブタノールおよびpH6.5とするのに適切な量の酢酸を含む100mlの滅菌水に溶解した治療用量の抗IgE VHHを含む点眼液
- 治療用量の抗-IgE VHHを含む眼軟膏を、1.0gの流動パラフィンおよび100gの総混合物を得るのに適切な量のソフトパラフィンを含むように、従来法に従って調製した。

【０２８７】

実施例３：抗-IgE製剤

IgEのその高親和性レセプターへの結合を阻害する抗-IgE VHHは、アレルギーの処置において潜在的な治療的価値を有する。

高度に精製されたVHH#2H11を製剤用緩衝液中に透析し、続いて凍結乾燥用分散保護剤（lyoprotectant）を等張濃度で添加した。等張性処方を以下のように作成した：25mg/mlのVHH#2H11を、抗体1モル当たり500モルの糖を含む5mMヒスチジン緩衝液（pH6）中に処方した。この処方物をBWFI（0.9%ベンジルアルコール）により再構築し、等張性糖濃度340nM、pH6で20mMヒスチジン中に抗体が100mg/mlとなる体積にした。等張性処方物中の抗IgE VHHの結合活性を、IgEレセプター阻害アッセイで測定した。その後の4℃で3ヶ月までの間の貯蔵において、結合活性は本質的に不変であることを見出した。

【０２８８】

TNF-α

実施例４：抗TNF-αの選択

2匹のラマを、実施例１に記載したスケジュールに従い、注射1回当たり100μgのヒトTNF-αで免疫化した。ライブラリー（短期および長期免疫化手順）を構築し、インビトロでビオチン化したTNF-αを用いて選択した。ビオチン化をMagniら（Anal Biochem 2001、298、181-188）に記載されるように行った。

【０２８９】

TNF中のビオチンの取り込みを、SDS-PAGE分析およびエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ抱合体（Sigma）を用いた検出によって評価した。

【０２９０】

修飾タンパク質の機能性を、固相コーティングされた組換体p75レセプターに結合する能力について評価した。{ビオチン化}1回目の選択において、400ngおよび50ngのビオチン化TNF-αを、マイクロタイタープレート（NUNC maxisorb）のウェルにコーティングされたニュートラアビジン（Pierce；PBS中に10μg/ml）上に捕捉した。これらのウェルにファージ（1.2×10^{10} TU-s）を添加し、室温で2時間インキュベートした。洗浄（PBS-tweenで20回およびPBSで2回）の後、拘束されたファージを、過剰のレセプター（CD120bまたは

p75の細胞外ドメイン；10μM）を添加して溶出するか、またはインタクトなTNFレセプターを発現している細胞を用いて溶出した。30,000と100,000との間のファージクローンを、急速スキームを用いて免疫化したラマ由来のライブラリーからTNFで溶出し、一方、BSA（3μM；陰性コントロール）で溶出した場合にこれらの数の約10%を得た。

【０２９１】

他のライブラリー（長期免疫化スキーム）から、10倍多い数をレセプターおよびBSAで溶出し、以前に観察されたのと同じ濃縮係数（10）を得た。新しいファージを、50ng TNF（急速免疫化スキーム）および400ng TNF（緩慢なスキーム）の溶出液から調製し、400ng、50ngおよび10ngの捕捉されたTNF（投入量：1.2×10^{10}ファージ/ウェル）についての別の回の選択に使用した。約2.5×10^{7}のファージを、400ngおよび50ngの捕捉されたTNFを含むウェルからレセプター（10μM）で溶出し、そして約2×10^{6}のファージを、10ngのTNFでウェルから溶出した。一方、陰性コントロール（10μMのBSAで溶出）は、これらの数の5～10%のみを得た。得られた溶出ファージの数により、レセプターでの溶出は特異的であり、TNFのレセプター結合部位に結合するVHH断片を溶出すべきであることが示唆される。

【０２９２】

培養上清中へのVHHの産生のために、個々のクローンを採取し、マイクロタイタープレート中で増殖させた。エクストラアビジンコーティングプレート上に捕捉されたTNFを用いたELISAスクリーニングにより、約50%の陽性クローンが示された。HinFIフィンガープリント分析により、14個の異なるクローンが選択されたことが示され、これらのクローンを増殖させ、50mlスケールに誘導した。

【０２９３】

ペリプラズム画分を調製し、VHH断片をIMACで精製し、アッセイに使用して、それらの拮抗特性、すなわちTNFのそのレセプターとの相互作用を防止する特性を分析した。この目的のために、VHH（1μMおよび0.3μM）を、TNF-α（3nMおよび0.7nM）と共に室温で1.5時間インキュベートした（0.2%カゼイン／PBS中で）。この混合物100μlを、レセプターの細胞外ドメインを固定化したマイクロタイタープレートのウェルに移した。1時間のインキュベーションの後、このプレートを洗浄し、拘束されたTNFを、アルカリホスファターゼ抱合ストレプトアビジンを用いて検出した。三量体TNF分子の結合をおそらく支持するmABが二量体の外観であるのに対し、VHHは真の単量体であるという事実にもかかわらず、2つのVHH断片により、3μMおよび0.3μMのインタクトmAB Remicade（Infliximab;Centercor）を用いて得られたものと同様の拮抗プロフィールを得た。TNFレセプターを発現しているヒト細胞株およびマウス肉腫細胞株WEHIを用いて、VHHの効力を示す同様の実験を行った。得られた配列を表１４の配列番号12～13に示す。

【０２９４】

実施例５：ヒトTNFαに特異的な抗体断片の安定性試験

経口投与されたタンパク質は、胃の酸性pHで変性され、同様にペプシンによって分解される。我々らは、ペプシンに対するVHHTNF3Eの耐性を研究するために胃の環境を模倣すると予想される条件を選択した。ヒトTNFαに特異的なVHHであるTNF3Eを、E.coliにおいて組換えタンパク質として産生させ、IMACおよびゲル濾過クロマトグラフィーによって均質に精製した。精製後のタンパク質濃度を、280nmで計算されたモル吸光係数を用いて分光光度的に決定した。それぞれpH2、pH3およびpH4のMcIlvaine緩衝液（J.Biol.Chem.49、1921、183）で100μg/mlに希釈した溶液を調製した。これらの溶液を37℃で15分間インキュベートし、その後にブタ胃粘膜ペプシンを1/30の体積比で添加した。プロテアーゼ添加の60分後に試料を収集し、直ちに0.1%カゼインを含むPBS（pH7.4）で100倍に希釈して、ペプシンを不活性化した。この試料から、7つのさらなる3倍希釈物を調製し、ELISAによって機能的抗体断片の存在を評価した。プロテアーゼ添加前に収集したアリコートから調製した同一の希釈物を、基準として供した。ELISAアッセイにおいて、ビオチン化TNFαを、ニュートラアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレートのウェル中に捕捉した。ペプシン処理試料および基準試料の両方について、同様の試料段階希釈物を調製し、これらの希釈物100μlをウェルに添加した。1時間のインキュベーションの後、これらの

プレートを洗浄した。捕捉されたTNFαに結合しているVHHの検出のために、ポリクローナルウサギ抗VHH抗血清（R42）および抗ウサギIgGアルカリホスファターゼ抱合体を用いた。洗浄の後、これらのプレートをリン酸パラニトロフェニルで発色させた。図２にプロットされたこれらのデータは、消化条件に曝露された全ての試料ならびに基準試料について、同様の曲線を示す。このことは、VHH 3Eが、選択された全ての条件下でその機能的活性を本質的に保持していることを示す。

【０２９５】

実施例６：マウスにおける抗ヒトTNFα特異的VHHの経口投与

抗ヒトTNFα特異的VHH#TNF3E（100倍希釈PBS中100μg/ml）を含む抗体溶液を調製した。3匹のマウスに、初めに12時間飲料水を与えず、続いて次の2時間の間、抗体溶液を自由に摂取させた。その後、これらのマウスを屠殺し、それらの胃を切開した。1%BSAを含む500μlのPBSでこれらの胃を洗い流すことによって、直ちに胃の内容物を採集した。続いて、洗い流された物質を用いて、1/5希釈から始まる段階的な3倍希釈物を非希釈液の物質から調製した。これらの試料100μlを、ヒトTNFαでコーティングされたマイクロタイタープレートの個々のウェルに移した。1時間のインキュベーションおよびその後の大規模な洗浄の後、免疫反応性物質の存在をポリクローナルウサギ抗VHH抗血清（R42）により評価し、次いで抗ウサギアルカリホスファターゼ抱合体と共にインキュベーションした。ELISAはリン酸パラニトロフェニルを用いて発色させた。10分後に得られたELISAシグナルは、これらのマウスの胃洗浄物中の機能性VHH TNF3Eの存在を明らかに示した。標準曲線と比較することにより、我々らは、試験した3匹のマウスについて、胃洗浄液中の機能性抗体断片の濃度が1.5μg/ml、12.6μg/mlおよび8.6μg/mlであることを決定した。

【０２９６】

実施例７： IBDの動物モデルにおける効力

１）慢性大腸炎の動物モデル

種々の投与経路によって適用される二価のVHH構築物の効力を、BALB/cマウスにおけるDSS（デキストラン硫酸ナトリウム）で誘導された慢性大腸炎のモデルにおいて評価した。このモデルは、Okayasuら[Okayasuら、Gastroenterology 1990; 98:694-702]によって最初に記載され、Kojouharoffら[G. Kojouharoffら、Clin. Exp. Immunol. 1997;107: 353-8]によって改変された。これらの動物を、11週齢でCharles River Laboratories、ドイツから入手し、体重が21gと22gとの間に達するまで動物施設で飼育した。4回のDSS処置サイクルによって、これらの動物において慢性大腸炎を誘発した。各サイクルは、DSSを5%(w/v)の濃度で飲料水と共に供したDSS処置間隔（7日間）および飲料水中にDSSが存在しない回復間隔（12日間）から構成された。最後の回復期間を12日間から21日間に延長して、処置時に急性炎症よりもむしろ慢性炎症を示す炎症状態を提供した。最後の回復間隔の後で、マウスを8匹のマウスの群に無作為に割り当て、VHH-構築物で処置を開始した。処置間隔は2週間であった。処置間隔の終了から一週間後に動物を屠殺し、腸を切開して組織学的に検査した。実験の設定を図３に概略的に示す。

【０２９７】

２）VHH処置スケジュール

VHH処置期間の間、マウス（1群あたり8匹）を二価VHH#3F（VHH#3F-VHH#3F；配列番号14）で、100μgの二価VHH 3Fの胃内適用または静脈内適用によって、連続14日間毎日処置した。さらなる動物の群を、二価VHH#3Fで14日間の間、1日置きに直腸処置した。全ての処置群において、二価VHH#3Fの100μgの用量を、緩衝溶液中1mg/mlの濃度で適用した。陰性コントロール群は、他の点では同一の条件下で100μlのPBSを受けた。処置スケジュールを表７に示す。

【０２９８】

３）結果

マウスを屠殺した後、体重を測定し、結腸を切開した。切開した結腸の長さを測定し、結腸の組織学的分析をヘマトキシリン-エオシン（HE）染色（標準条件）によって評価した。陰性コントロール（PBS処置）と比較して、二価ナノボディ3Fで処置した群は、延長

した結腸長さならびに改善された組織学的スコアを示し[G.Kojouharoffら、Clin. Exp. Immunol. 1997;107: 353-8]、したがって処置の効力を実証した。

【０２９９】

MMP12

実施例８：免疫化

1匹のラマ（ラマ5）を、MMP12の組換えヒト触媒ドメインで、適切な動物に優しいアジュバントであるStimune（Cedi Diagnostics BV、オランダ）を用いて筋肉注射で免疫化した。この組換え触媒ドメインを、H.Tschesche教授、Universitaet Bielefeldから入手し、5mM Tris/HCl pH=7.5、100mM NaCl、5mM $CaCl_2$中の56μg/mlの溶液として加えた（Lang, Rら、(2001)）。ラマは、一週間間隔で6回の注射、最初の2回の注射は各々10μgのMMP-12を含み、最後の4回の注射は各々5μgのMMP-12を含む、を受けた。最後の免疫化から4日後、リンパ節生検（LN）および血液試料（PBL1）150mlを動物から採集し、血清を調製した。最後の免疫化から10日後、第2の血液試料（PBL2）150mlを採取し、血清を調製した。ラマ重鎖免疫グロブリン（HcAb）の遺伝子供給源として末梢血液リンパ球（PBL）を、Ficoll-Paque勾配（Amersham Biosciences）を用いて血液試料から単離し、5×10^8個のPBLを得た。抗体の最大多様性は、採取したBリンパ球の数、すなわちPBLの数の約10%に等しいことが予想される（5×10^7個）。ラマにおける重鎖抗体の画分は、Bリンパ球の数の20%までである。従って、血液試料150ml中のHcAbの最大多様性を、10^7個の異なる分子として計算する。総RNAを、ChomczynskiおよびSacchi(1987)の方法に従って、PBLおよびリンパ節から単離した。

【０３００】

実施例９：レパートリークローニング

オリゴd(T)オリゴヌクレオチドを使用し、MMLV逆転写酵素（Gibco BRL）を用いて、200μgの総RNAについてcDNAを調製した（de Haardら、1999）。cDNAを、フェノール／クロロホルム抽出で精製し、続いてエタノール沈殿を行い、その後、VHHレパートリーを増幅させるための鋳型として使用した。

第１のPCRにおいて、従来の抗体遺伝子セグメント（1.6kb）および重鎖抗体遺伝子セグメント（1.3kb）の両方のレパートリーを、リーダー特異的プライマー（5'-GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT-3'）およびオリゴd(T)プライマー（5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTT-3'）を用いて増幅させた。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって分離し、重鎖抗体セグメントをコードする1.3kb断片をアガロースゲルから精製した。FR1逆方向プライマー（国際特許出願公開WO03/054016、配列ABL037～ABL043）および同一のオリゴd(T)順方向プライマーの混合物を用いて、第２のPCRを行った。

PCR産物を、（FR1プライマーに導入された）SfiIおよび（フレームワーク4に天然に存在する）BstEIIで消化した。ゲル電気泳動に続いて、約400塩基対のDNA断片をゲルから精製し、ファージミドpAX004の対応する制限酵素部位に連結して、Escherichia coli TG1にエレクトロポレーションの後に、クローン化VHHのライブラリーを得た。pAX004により、c-mycタグ、ヘキサヒスチジンタグおよびgeneIII産物を含む融合タンパク質として個々のVHHを発現しているファージ粒子の産生が可能になる。TG1細胞のエレクトロポレーションの後に得られた多様性を表８に示す。挿入率を、ベクターベースのプライマーの組合せを用いたPCRにおいて決定した。

【０３０１】

実施例１０：ライブラリーのレスキューおよびファージ調製

ライブラリーを、2%グルコースおよび100μg/mlのアンピシリンを含む10mlの2×TY培地中で37℃にてOD_{600nm}が0.5に到達するまで増殖させた。M13K07ファージ（10^{12}個）を添加し、混合物を37℃で2回×30分間、最初は振盪せず、次に100 rpmで振盪してインキュベートした。細胞を、室温にて4,500 rpmで5分間遠心分離した。細菌のペレットを、100μg/mlのアンピシリンおよび25μg/mlのカナマイシンを含む50mlの2×TY培地に再懸濁し、250 rpmで活発に振盪させながら37℃で一晩インキュベートした。一晩の培養物を4℃にて4,500 rpmで15分間遠心分離した。ファージを氷上で30分間PEG沈殿させ（20%ポリエチレング

リコールおよび1.5M NaCl）、4,500 rpmで20分間遠心分離した。このペレットを1mlのPBSに再懸濁した。ファージを再び氷上で10分間PEG沈殿させ、4℃にて14,000rpmで10分間遠心分離した。このペレットを1mlの0.5%スキムミルクまたはPBS-BSA[1mg/ml]（Sigma, Cat NrA3059）に溶解した。

【０３０２】

実施例１１：ヒトMMP-12特異的VHHの選択

ファージを、実施例１０に上述したようにレスキューおよび調製した。

MMP-12特異的結合剤を得るために、2つのアプローチを進めた：

【０３０３】

ａ．PVDF膜上にコーティングされた不活性MMP-12

100ngのヒトMMP-12触媒ドメイン（33μlのPBS中に希釈）を、製造元のガイドラインに従ってPVDF（Immobilon-P, Millipore, Cat Nr IPVH 15150）の小片（1cm^2）上にスポットし、MeOH固定化により不活性MMPを得た。コントロールとして、等量のリゾチーム（Sigma, Cat Nr L-6876）および33μlのPBSもまたスポットし、固定化した。これらの膜片を、4℃にて5%スキムミルク中で一晩ブロッキングし、PBSで3回洗浄した後、ファージ調製物を加えた（5%スキムミルク1ml中に4×10^9個のファージ）。ファージおよび膜片（1,5ml管中）を室温にて3時間回転させながらインキュベートした。次いで、これらの膜を15ml管に移し、10mlの[PBS+0.05% Tween-20]で6回洗浄した。これらの膜を500μlのTEA[5mlのH_2O中に70μl]に10分間回転させながら曝露することにより、ファージを溶出させた。溶出したファージを含む溶液を除去し、pHを1Mトリス（pH=7.5）で中和した。

対数増殖期のTG1細胞を、溶出したファージで感染させ、段階希釈物を選択培地にプレートした。MMP-12コーティングされた膜から得られた選択後の形質導入されたTG1コロニーの数を、リゾチームを固定化した陰性コントロールと比較することによって、濃縮度を決定した。濃縮を示すMMP選択由来の細菌を擦り落とし、2回目の選択に使用した。

これらの細菌をヘルパーファージで重感染させて組換えファージを産生し、MMP-12に対する二次選択を行った（実施例９に記載のように）。MMP-12を上記のように固定化し、この膜を5%スキムミルク中で4℃にて一晩ブロッキングした。ファージ（1ml中に2.5×10^9個）を調製してこれらの膜に曝露し、1回目の選択時と同様にMMP結合性についてさらに選択した。対数増殖期のTG1細胞を、溶出させてpHを中和したファージで感染させ、選択培地にプレートした。MMP-12コーティングされた膜由来の形質導入されたTG1コロニーの数を陰性コントロール（固定化リゾチーム）と比較することによって、濃縮度を決定した。

【０３０４】

ｂ．ニトロセルロース膜上にコーティングされた活性MMP-12

250ngのヒトMMP-12触媒ドメイン（Biomol Research laboratories Inc, SE 138-9090）を、納入業者のガイドラインに従って、Hybond-C extra（Amersham Biosciences, Cat Nr RPN 303E）の小片上に直接スポットした。コントロールとして、等容量のPBSをスポットした。スポット領域を含む直径5mmの円板をそれぞれの膜から切り抜き、1.5ml管に移して、1mlのBSA-PBS[1mg/ml]中で4℃にて一晩ブロッキングした。これらの円板を15mlのPBS中で3回洗浄し、続いて、マイクロタイタープレートウェル中の200μlのファージ調製物に移して曝露した。これらのファージは、室温にて15分間BSA-PBS中でプレインキュベートしたことを除いて、実施例９のように調製した。これらの円板をPBS/0.05%Tween-20で5回洗浄し、PBS-BSAを用いて室温にて2時間ブロッキングした。これらの膜を100μlのTEA[5mlのH_2O中に70μl]に10分間回転させながら曝露することによって、ファージを溶出させた。溶出したファージを含む溶液を除去し、pHを1Mトリス（pH=7.5）で中和した。

対数増殖期のTG1細胞を、溶出したファージで感染させ、選択培地にプレートした。MMP-12膜円板上における選択後に形質導入されたTG1コロニーの数を陰性コントロール（PBS）と比較することによって濃縮度を決定した。MMP-12選択由来の細菌を擦り落とし、2回目の選択に使用した。

これらの細菌をヘルパーファージで重感染させて組換えファージを産生し、MMP-12に対する二次選択を行った（実施例９に記載のように）。MMP-12を上記のように固定化し、こ

の膜をPBS-BSA[1mg/ml]中で4℃にて一晩ブロッキングした。ファージ（1ml中に2.5×10^9個）を調製してこれらの膜に曝露し、1回目の選択時と同様にMMP結合性についてさらに選択した。対数増殖期のTG1細胞を、溶出させて中和したファージで感染させ、選択培地にプレートした。MMP-12コーティングされた膜由来の形質導入されたTG1コロニーの数を、陰性コントロールと比較することによって濃縮度を決定した。

【０３０５】

実施例１２：選択されたVHH'sの特異性

個々のクローンを採取し、マイクロタイタープレート中の0.1%グルコースおよび100mg/mlのアンピシリンを含む150mlの2×TY中で、37℃にてOD_{600nm}が0.6になるまで増殖させた。次いで、1mM IPTGおよび5mM $MgSO_4$を添加し、この培養物を37℃にて4時間インキュベートした。これらの細胞のペリプラズム抽出物（PE、調製法は実施例１３を参照）についてELISAを行い、選択されたクローンの特異性を試験した。

固相コーティングされたヒトMMP-12を用いて選択されたクローンを試験するために、プレートを1μg/mlの濃度のヒトMMP-12触媒ドメインで4℃にて一晩コーティングした。プレートをPBS/0.05%Tween-20で5回洗浄した。ウェルを1%スキムミルクで室温にて2時間ブロッキングした。ペリプラズム抽出物（100μl）をこれらのウェルに加え、室温にて1時間インキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。抗c-myc抗体の次に抗マウス-HRPおよびABTS/H_2O_2を基質として使用して、検出を行った。プレートを室温にて30分間のインキュベーションの後に405nmで読み取った。

膜固定化ヒトMMP-12を使用して選択されたクローンを試験するために、50ngのヒトMMP-12触媒ドメイン試料を、製造元のガイドラインに記載されるようにPVDF膜上にスポットした。50ngのリゾチームを陰性コントロールとしてスポットした。これらの膜を、4℃にて一晩スキムミルクでブロッキングし、PBSで5回洗浄して1,5ml管に移した。ペリプラズム抽出物（100μl）を1%スキムミルク中で10倍希釈し、膜（$2cm^2$）当たり1mlを加えて室温にて1時間回転させた。膜をPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。抗c-myc抗体の次に抗マウス-HRPおよびDAPを基質として使用して、検出を行った。明瞭なスポットが現れるまで、膜を基質と共に室温でインキュベートした。MMP-12特異的結合剤であると判定された7つのクローンを、表１４の配列番号15～21に示す。

他のMMPに対する非特異的結合についてチェックするために、同様のアプローチを続いて行い、そのアプローチにおいて、50ngのMMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP9およびMMP13の活性触媒ドメイン（全て、Biomol Research laboratories Incより）をHybond C-extra上に固定化した。これらの膜を4℃にて一晩スキムミルクでブロッキングし、PBSで5回洗浄し、1,5ml管に移した。ペリプラズム抽出物（100μl）を1%スキムミルク中で10倍希釈し、膜（$2cm^2$）当たり1mlを加えて室温にて1時間回転させた。膜をPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。抗c-myc抗体の次に抗マウス-HRPおよびDAPを基質として使用して、検出を行った。明瞭なスポットが現れるまで、膜を基質とともに室温でインキュベートした。MMP-12以外のいずれのMMPにおいても、7つの選択されたVHHクローンの有意な検出は観察されなかった。

【０３０６】

PVDF膜固定化ヒトMMP-12触媒ドメインに対して選択された結合剤に関する結果を表１４の配列番号15～21に示す。

Hybond膜固定化によって選択されたMMP-12阻害剤に関する結果を表１４の配列番号22に示す。

【０３０７】

実施例１３：選択されたVHH'sの多様性

M13逆方向プライマーおよびgenIII順方向プライマーを使用してPCRを行った。Hinf1フィンガープリント法を使用してこれらのクローンを分析し、代表的なクローンを配列決定した。配列決定分析を行った結果、Immobilon-P選択について表１４の配列番号15～21に示す配列を得、Hybond-Cについて表１４の配列番号22に示す配列を得た。

【０３０８】

実施例１４：VHHの発現および精製

クローンを、振盪フラスコ中の0.1%グルコースおよび100μg/mlのアンピシリンを含む50mlの2×TY中で、37℃にてOD_{600nm}が2になるまで増殖させた。1mM IPTGおよび5mM $MgSO_4$を添加して、培養物を37℃にてさらに3時間インキュベートした。培養物を4℃にて4,500 rpmで10分間遠心分離した。このペレットを-20℃で一晩凍結させた。次に、このペレットを室温で40分間解凍し、1mlのPBS/1mM EDTA/1M NaCl中に再懸濁し、1時間氷上で振盪した。4,500 rpmで4℃にて10分間遠心分離することによってペリプラズム画分を単離した。VHHを含む上清をNi-NTA（Qiagen）に負荷し、Aekta FPLCクロマトグラフィーシステム（Amersham Biosciences）において均質に精製した。VHHを、25mMクエン酸pH=4,0を用いてNi-NTAから溶出し、25mMクエン酸pH=4,0中で平衡化した陽イオン交換カラムに直接加えた（HR 5/5カラム中のSource 30S, Amersham Biosciences）。VHHを、PBS中の1M NaClで溶出し、さらにMMP-12アッセイ緩衝液[50mM HEPES、100mM NaCl、0,05% Brij-35]で平衡化したサイズ排除カラム（Superdex 75 HR10/30、Amersham Biosciences）で精製した。VHHの収率を吸光係数およびピーク表面積によって計算した。

【０３０９】

実施例１５：選択されたVHHの機能的特徴づけ：比色アッセイにおけるVHHによるMMP-12のタンパク質分解活性の阻害

VHHを発現させ、実施例１３に記載されるように精製した。精製されたVHHを、BIOMOL Research Laboratories社からの創薬のためのMMP-12比色アッセイキット（MMP-12 Colorimetric Assay Kit for Drug Discovery）（AK-402）を使用して、ヒトMMP-12触媒ドメインを阻害する能力について分析した。キットに記載された実験方法条件に従った。

このキットと共に提供された阻害剤（PI115-9090）を陽性コントロールとして推奨濃度で使用した。VHHを7μMの濃度で加えた。BIOMOLキットと共に提供されたマイクロタイタープレート中でアッセイを行い、MMP-12タンパク質分解活性を37℃にてプレートリーダー（405nm）中で追跡した。

1つの阻害性VHHおよび1つの不活性VHHの結果を、陽性コントロールと共に図４に示す。

ニトロセルロース上にコーティングされた活性MMP-12を使用した選択（実施例１２）由来の唯一のVHH分子（クローンP5-29）が、ヒトMMP-12触媒ドメインの阻害を示した。他のMMP-12結合剤は全て（クローンP5-5のみ図示する）、MMP-12に結合するにもかかわらず、MMP-12を阻害しなかった。

【０３１０】

実施例１６：肺送達のための抗-MMP12 VHHの製剤

抗体の100%製剤を、1.0mlの脱イオン水中に5mgのVHHを溶解させることによって調製した。溶液のpHは6.5であった。抗体の90%製剤を、1.0mlの2mMクエン酸緩衝液中に4.5mgのVHHを溶解させることによって調製した。抗体の70%製剤を、1mlのpH6.5クエン酸緩衝液中の1mg/mlの賦形剤に3.5mgのVHHを溶解させることによって調製した。使用した様々な種類の賦形剤は以下のごとくであった：糖賦形剤：ショ糖、ラクトース、マンニトール、ラフィノースおよびトレハロース。高分子賦形剤：フィコールおよびPVP。タンパク質賦形剤：HSA。

上記製剤の乾燥粉末を、Buchi Spray Dryerを使用した噴霧乾燥によって生成した。

粒子サイズ分布を遠心沈降によって測定した。

【０３１１】

インターフェロンγ

実施例１７：免疫化

4匹のラマ（ラマ5、ラマ6、ラマ22およびラマ23）を、ヒトIFN-γ（PeproTech Inc, USA, Cat Nr: 300-02）で、適切な動物に優しいアジュバントであるStimune（Cedi Diagnostics BV、オランダ）を用いて筋肉注射で免疫化した。2匹のラマ（ラマ29およびラマ31）を、マウスIFN-γ（Protein Expression & Purification core facility, VIB-RUG、ベルギー）で、適切な動物に優しいアジュバントであるStimune（Cedi Diagnostics BV、オランダ）を用いて筋肉注射で免疫化した。これらのラマは、一週間間隔で6回の注射を受け

、初めの2回の注射はそれぞれ100μgのIFN-γを含み、最後の4回の注射はそれぞれ50μgのIFN-γを含んでいた。最後の免疫化から4日後に、150mlの血液試料（PBL1）およびリンパ節生検（LN）を各動物から採集し、血清を調製した。最後の免疫化の10日後、第2の血液試料（PBL2）150mlを各動物から採取し、血清を調製した。ラマ重鎖免疫グロブリン（HcAb）の遺伝子供給源として末梢血液リンパ球（PBL）をFicoll-Paque 勾配（Amersham Biosciences）を用いて血液試料から単離し、5×10^8個のPBLを得た。抗体の最大多様性は、サンプリングしたBリンパ球の数、すなわちPBLの数の約10%に等しいことが予想される（5×10^7個）。ラマにおける重鎖抗体の画分は、Bリンパ球の数の20%までである。従って、血液試料150ml中のHcAbの最大多様性を、10^7個の異なる分子として計算する。総RNAを、ChomczynskiおよびSacchi(1987)の方法に従って、PBLおよびリンパ節から単離した。

【０３１２】

実施例１８：レパートリークローニング

オリゴd(T)オリゴヌクレオチドを使用し、MMLV逆転写酵素（Gibco BRL）を用いて、200μgの総RNAについてcDNAを調製した（de Haardら、1999）。cDNAを、フェノール/クロロホルム抽出で精製し、続いてエタノール沈殿を行い、その後、VHHレパートリーを増幅させるための鋳型として使用した。

第１のPCRにおいて、従来の抗体遺伝子セグメント（1.6kb）および重鎖抗体遺伝子セグメント（1.3kb）の両方のレパートリーを、リーダー特異的プライマー（5'-GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT-3'）およびオリゴd(T)プライマー（5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTT-3'）を用いて増幅させた。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって分離し、重鎖抗体セグメントをコードする1.3kb断片をアガロースゲルから精製した。FR1逆方向プライマー（国際特許出願公開WO03/054016、配列ABL037～ABL043）および同一のオリゴd(T)順方向プライマーの混合物を用いて、第２のPCRを行った。

PCR産物を、（FR1プライマーに導入された）SfiIおよび（フレームワーク4に天然に存在する）BstEIIで消化した。ゲル電気泳動に続いて、約400塩基対のDNA断片をゲルから精製し、ファージミドpAX004の対応する制限酵素部位に連結して、Escherichia coli TG1のエレクトロポレーションの後に、クローン化VHHのライブラリーを得た。pAX004により、c-mycタグ、ヘキサヒスチジンタグおよびgeneIII産物を含む融合タンパク質として個々のVHHを発現しているファージ粒子の産生が可能になる。TG1細胞のエレクトロポレーションの後に得られた多様性を表１に示す。挿入率を、ベクターベースのプライマーの組合せを用いたPCRにおいて決定した。

【０３１３】

実施例１９：ライブラリーのレスキューおよびファージ調製

ライブラリーを、OD_{600nm}が0.5に到達するまで、2%グルコースおよび100μg/mlのアンピシリンを含む10mlの2×TY培地中で37℃にて増殖させた。M13KO7ファージ（10^{12}）を添加し、混合物を37℃で2回×30分間、最初は振盪せず、次に100 rpmで振盪してインキュベートした。細胞を、室温にて4,500 rpmで5分間遠心分離した。細菌のペレットを、100μg/mlのアンピシリンおよび25μg/mlのカナマイシンを含む50mlの2×TY培地に再懸濁し、250 rpmで活発に振盪させながら37℃で一晩インキュベートした。一晩の培養物を4℃にて4,500 rpmで15分間遠心分離した。ファージを氷上で30分間PEG沈殿（20%ポリエチレングリコールおよび1.5M NaCl）させ、4,500 rpmで20分間遠心分離した。このペレットを1mlのPBSに再懸濁した。ファージを再び氷上で10分間PEG沈殿させ、4℃にて14,000 rpmで10分間遠心分離した。このペレットを1mlのPBS-0.1%カゼインに溶解した。

【０３１４】

実施例２０：ヒトIFNγ特異的VHHの選択

ファージを、実施例１７に上述したようにレスキューおよび調製した。

IFN-γ特異的結合剤を得るために、以下の2つのアプローチを進めた：

【０３１５】

ａ．固相コーティングされたIFN-γ

マイクロタイターウェルを10～0.4μg/ウェルの異なる濃度でのヒトIFN-γで、4℃にて

一晩コーティングした。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。ウェルをPBS+1%カゼインで室温にて2時間ブロッキングした。ファージを室温で2時間インキュベートした。ウェルをPBS+0.05% Tween-20で20回洗浄した。最後の2回の洗浄はPBSを用いて行った。特定のファージを1～2μgのIFN-γ R1（R&D Systems, Cat Nr: 673-IR/CF）を用いて1時間溶出した。陰性コントロールとして10μg卵アルブミン（Ovalbumine）（Sigma,A2512）を無関係なタンパク質として用いて溶出を行った。対数増殖期のTG1細胞を、溶出したファージで感染させ、選択培地にプレートした。溶出のためにレセプターを用いた選択後に形質導入されたTG1コロニーの数を、溶出のために卵アルブミンを用いた陰性コントロールと比較することによって濃縮度を決定した。濃縮を示す選択由来の細菌を擦り落とし、2回目の選択に使用した。

これらの細菌を実施例３に記載のようにヘルパーファージで重感染させて組換えファージを産生した。マイクロタイターウェルを2～0.1μg/ウェルの異なる濃度でのIFN-γで、4℃にて一晩コーティングした。プレートをPBS/0.05%Tween-20で5回洗浄した。ウェルをPBS+1%カゼインで室温にて2時間ブロッキングした。ファージを室温で2時間インキュベートした。ウェルをPBS+0.05%Tween-20で20回洗浄した。最後の2回の洗浄はPBSを用いて行った。特定のファージを、1～2μgのIFN-γ R1または無関係なタンパク質として10μg卵アルブミンを用いて1時間、引き続いて4℃にて一晩溶出し、引き続いてファージを0.1MグリシンpH2.5を用いて室温にて15分間溶出し、1M Tris-HCl pH=7.5で中和した。対数増殖期のTG1細胞を、溶出させて中和したファージで感染させ、選択培地にプレートした。溶出のためにレセプターを用いた選択後に形質導入されたTG1コロニーの数を、溶出のために卵アルブミンを用いた陰性コントロールと比較することによって濃縮度を決定した。

【０３１６】

ｂ．ビオチン化IFN-γ

マイクロタイターウェルを2μg/mlの濃度のニュートラアビジンで、4℃にて一晩コーティングした。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。ウェルをPBS+1%カゼインで室温にて2時間ブロッキングした。ビオチン化ヒトIFN-γを100～10ng/ウェルの濃度で4℃にて一晩捕捉した。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。ファージを室温で2時間インキュベートした。ウェルをPBS+0.05% Tween-20で洗浄した。最後の2回の洗浄はPBSを用いて行った。特定のファージを1～2μgのIFN-γ R1（R&D Systems, Cat Nr: 673-IR/CF）を用いて1時間溶出した。陰性コントロールとして10μg卵アルブミン（Sigma, A2512）を無関係なタンパク質として用いて溶出を行った。対数増殖期のTG1細胞を、溶出したファージで感染させ、選択培地にプレートした。溶出のためにレセプターを用いた選択後に形質導入されたTG1コロニーの数を、溶出のために卵アルブミンを用いた陰性コントロールと比較することによって濃縮度を決定した。濃縮を示す選択由来の細菌を擦り落とし、2回目の選択に使用した。

細菌をヘルパーファージで重感染させて組換えファージを産生した。マイクロタイターウェルを、2μg/mlの濃度でのニュートラビジンで4℃にて一晩コーティングした。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。ウェルをPBS+1%カゼインで室温にて2時間ブロッキングした。ビオチン化ヒトIFN-γを20～2.5ng/100μlの濃度で4℃にて一晩捕捉した。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄した。ファージを室温で2時間インキュベートした。ウェルをPBS+0.05%Tween-20で20回洗浄した。最後の2回の洗浄はPBSを用いて行った。特定のファージを、1～2μgのIFN-γ R1または無関係なタンパク質として10μg卵アルブミンを用いて1時間、引き続いて4℃にて一晩溶出し、引き続いてファージを0.1MグリシンpH2.5を用いて室温にて15分間溶出し、1M Tris-HCl pH=7.5で中和した。対数増殖期のTG1細胞を、溶出させて中和したファージで感染させ、選択培地にプレートした。溶出のためにレセプターを用いた選択後に形質導入されたTG1コロニーの数を、溶出のために卵アルブミンを用いた陰性コントロールと比較することによって濃縮度を決定した。

【０３１７】

実施例２１：選択されたVHH'sの多様性

M13逆方向プライマーおよびgenIII順方向プライマーを使用してPCRを行った。Hinf1フ

ィンガープリント法を使用してこれらのクローンを分析し、代表的なクローンを配列決定した。配列決定分析を行った結果、ヒトIFN-γについて表４に示す配列を得た（配列番号45～70）。

【０３１８】

実施例２２：VHHの発現および精製

WK6 Escherichia coli細胞へのDNAの形質転換後に、小規模発現を開始した。

クローンを、振盪フラスコ中の0.1%グルコースおよび100μg/mlのアンピシリンを含む50mlの2×TY中で、37℃にてOD_{600nm}が2になるまで増殖させた。1mM IPTGおよび5mM $MgSO_4$を添加して、培養物を37℃にてさらに3時間インキュベートした。培養物を4℃にて4,500 rpmで10分間遠心分離した。このペレットを-20℃で一晩凍結させた。次に、このペレットを室温で40分間解凍し、1mlのPBS/1mM EDTA/1M NaCl中に再懸濁し、1時間氷上で振盪した。4,500 rpmで4℃にて10分間遠心分離することによってペリプラズム画分を単離した。VHHを含む上清をTALON（Clontech）に負荷し、均質に精製した。VHHの収率を吸光係数によって計算した。

【０３１９】

実施例２３：抗IFNγ VHH'sの局所適用

１：眼の局所適用のための抗アレルギー性医薬組成物を得るために、少なくとも1つの抗IFN-γ VHHの溶液を以下のように調製した：

- 0.9gの塩化ナトリウム、0.02gのクエン酸ナトリウム、0.02gのパラヒドロキシ安息香酸メチル、0.1gのクロロブタノールおよびpH6.5とするのに適切な量の酢酸を含む100mlの滅菌水に、治療用量の抗IFNγ VHHを溶解して含む点眼液
- 治療用量の抗IFNγ VHHを含む眼軟膏を、1.0gの流動パラフィンおよび100gの総混合物を得るのに適切な量のソフトパラフィンを含むように、従来法に従って調製した。

２：抗炎症性医薬塗布物を得るために、本発明の局所用の調製品は、少なくとも1つの抗IFNγ VHHおよび薬学的に許容されるキャリアを含んだ。これらを以下のように調製した：

- 基礎クリームの調製

基礎クリーム調製用の試薬は、以下のとおりである（100kgの基礎クリームに対する含量）：ジメチルシリコンオイル（17kg）、流動パラフィン（9kg）、ステアリン酸（7.5kg）、セチルアルコール（1kg）、ステアリルアルコール（3kg）、グリセロール（20kg）、エチルパラベン（0.1kg）、Peregal A-20（0.45kg）、柔軟剤SG（0.85kg）、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）（41.1kg）。

ステンレス鋼タンクを恒温水浴中に設置し、約10分間かけて80℃に加熱した。この液体を徹底的に混合した。次いで、乳化および均質化装置を開口したステンレス鋼タンク中に設置し、この混合物を完全に乳化するまで3500rpmで20分間攪拌した。この混合物が半固形クリームになるまで、恒温水浴の温度を室温まで自然に冷却した。この混合物は、絶えず攪拌されていた。

- 液状の抗体混合物の調製

VHH#MP3B1SRAを実施例２２にしたがって調製した。凍結乾燥した抗体を、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）で2mg/mlの濃度に再構成した。1000gの基礎クリームに対して45mgのVHH#MP3B1SRA抗体を添加した。

【０３２０】

治療用VHH断片

実施例２４：抗-TNFα VHH#3EのVHH-CDR3断片の発現

VHH#3EのCDR3領域を、フレームワーク4領域に位置するセンスプライマー（順方向：CCCCTGGCCCCAGTAGTTATACG）およびフレームワーク3領域に位置するアンチセンスプライマー（逆方向：TGTGCAGCAAGAGACGG）を用いて増幅した。

pAX10中のCDR-3断片をクローン化するために、2回目のPCR増幅を、必要な制限酵素部位を導入する以下のプライマーを用いて行った：

逆方向プライマーSfi1：

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCTGTGCAGCAAGAGACGG
順方向プライマーNot1：
GTCCTCGCAACTGCGCGGCCGCCCCCTGGCCCCAGTAGTTATACG
【０３２１】
PCR反応を、50μｌの反応容量において50pmolの各プライマーを用いて行った。一次PCRの反応条件は、94℃で11分間、次いで94/55/72℃で30/60/120秒間を30サイクル、そして72℃で5分間であった。全ての反応を2.5mM MgCl2、200mM dNTPおよび1.25U AmpliTaq God DNAポリメラーゼ（Roche Diagnostics、ブリュッセル、ベルギー）を用いて行った。
Sfi1およびNot1での切断の後、PCR産物をpAX10中にクローン化した。
【０３２２】
EGFR
実施例２５：免疫化
獣医学部の倫理委員会（Ethical Committee of the Faculty of Veterinary Medicine）（ヘント大学、ベルギー）の承認後、4匹のラマ（024、025、026および027）を、全ての現行の動物福祉規制（animal welfare regulation）にしたがい腫瘍抗原上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）で免疫化した。抗体依存性の免疫応答（表９）を引き起こすために、2匹の動物に、細胞表面にEGFRを発現しているインタクトなヒト外陰扁平上皮癌細胞（A431, ATCC CRL1555）を注射し、一方で、A431由来の膜抽出物を他の2匹のラマ（026および027）に投与した。各動物は、一週間間隔で7回用量の皮下投与による抗原を受けた（表９）。インタクトな細胞を用いた免疫化の場合、各用量は10^8個の新しく採集されたA431細胞からなる。膜抽出物を用いた免疫化のための用量は、10^8個のA431細胞から調製された小胞からなる。小胞は、Cohenら（Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, Chinkers M, 1982年,「A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasmamembrane vesicles」, J. Biol. Chem. 257:1523-31）にしたがって調製した。小胞を投与前に-80℃で保存した。アジュバントStimune（CEDI Diagnostics B. V., Lelystad, オランダ）を含む乳濁液中の8μｇの精製EGFR（Sigma）の2回の余分の注射を、ラマ025に筋肉内投与した（表９）。
【０３２３】
実施例２６：免疫応答の評価
0日目、28日目および42日目に10mlの免疫（プレ免疫）血液を採集し、血清を用いて4匹の動物における免疫応答の誘導を評価した。これらの動物がA431エピトープを認識する抗体を産生したか否かを検証するために、第１のELISAを行った。組織培養用処理した96ウェルプレートをゼラチンでコーティングした後（PBS中0.5%で10分間）、過剰のゼラチンを除去し、A431細胞をマイクロウェル中でコンフルエントになるまで一晩増殖させた。細胞をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで室温にて30分間固定した。その後、固定剤をPBS中の100mMグリシンで10分間ブロッキングし、続いてウェルを4%スキムミルク-PBS溶液で再度10分間ブロッキングした。免疫された動物の血清希釈物を加え、ウサギにおいて生起させたポリクローナル抗ラマ抗血清、続いて二次的のヤギ抗ウサギセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）抱合体（Dako、デンマーク）を用いて、A431特異的抗体を検出した。4匹の動物すべてについて、インタクトな細胞または膜小胞で免疫化した結果、有意なA431特異的抗体力価の誘導がもたらされた（図５）。
これらの誘導されたラマ抗体がEGFR特異的であるか否かを検証するために、上記と同様に行って、血清中の抗体力価をヒトEGFR（Her-14）を発現しているマウス線維芽細胞において評価し、親株のマウス線維芽細胞株であるNIH3T3クローン2.2（3T3）と比較した（図６）。この場合もやはり、Her-14に結合している抗体の血清力価は、親株の3T3細胞についての力価と比較して高く、このことは、循環血清抗体がEGFR特異的であることを示している。
最後に、免疫された動物における血清応答を、固相コーティングした精製EGFRについて評価した。精製されたEGFR（Sigma）および無関係の癌胚性抗原（CEA, Scripps）（両方とも1μg/ml）を96ウェルMaxisorpプレート（Nunc）中で4℃にて一晩固定化した。ウェル

をカゼイン溶液（PBS中の1%）でブロッキングした。血清希釈物の添加後、特異的に結合した免疫グロブリンを、ウサギ抗ラマ抗血清、続いてヤギ抗ウサギアルカリホスファターゼ抱合体（Sigma）を用いて検出し、全ての動物についてEGFRに対する有意な抗体依存性の免疫応答が誘導されたことを示した（図７）。

【０３２４】

実施例２７：重鎖抗体断片（VHH）レパートリーのクローニング

ラクダ科の免疫グロブリン個体発生についてほとんど知られていないので、別個の器官および異なる時点の組織を含むB細胞を、それぞれの動物について採集した（表９）。組織採集の後、総RNAをChomczynskiおよびSacchiによって記載された手順にしたがって単離した（Chomczynski PおよびSacchi N. 1987年,「Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroformextraction」, Anal Biochem 162：156-159）。VHHレパートリーをクローン化する手順は、国際特許出願公開WO 03/054016に記載された方法に基づく。cDNAを、オリゴd(T)オリゴヌクレオチドを使用し、MMLV逆転写酵素（Invitrogen）を用いて総RNAについて調製した（de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR. 1999年,「A large non-immunized human Fab fragment phage library that permitsrapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies」, J. Biol. Chem. 274：18218-30）。cDNA合成に用いた別個の組織のRNAの量を、表１０に記載する。cDNAをフェノール／クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿で精製し、その後VHHレパートリーを増幅させるための鋳型として使用した。

第１のPCRにおいて、従来の抗体遺伝子セグメント（1.6kb）および重鎖抗体遺伝子セグメント（1.3kb）の両方のレパートリーを、リーダー特異的プライマー（ABL002）およびオリゴd(T)プライマーであるABL010を用いて増幅させた（プライマーのリストについて、表１３を参照）。得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって分離した。重鎖抗体セグメントをコードしている増幅された1.3kb断片をアガロースゲルから精製し、FR1プライマー（ABL037～ABL043）およびABL010の混合物を用いたネステッドPCRにおける鋳型として使用した。PCR産物を、（FR1プライマーに導入された）SfiIおよび（FR4に天然に存在する）BstEIIで消化した。ゲル電気泳動に続いて約400塩基対のDNA断片をゲルから精製し、330ngの増幅させたVHHレパートリーを1μgのファージミドpAX004の対応する制限酵素部位に連結して、Escherichia coli TG1にエレクトロポレーションの後に、ライブラリーを得た。pAX004により、geneIII産物を含む融合タンパク質として個々のVHHを発現しているファージ粒子の産生が可能になる。免疫化されたラマから採集した別個の組織から得られたライブラリーのサイズを、表１０に記載する。品質管理として、M13逆方向プライマーおよびgeneIIIプライマーを用いたコロニーPCRを、各ライブラリーの24個の無作為に採取したコロニーについて行い、正しいサイズの挿入部を含むクローンの割合を計算した（表１０）。

【０３２５】

実施例２８：クローン化レパートリーの評価

ポリクローナルファージELISAにおいて、クローン化されたファージレパートリーの特異性をEGFRおよび無関係の抗原（TNFα）について評価した。geneIII産物を含む融合タンパク質としてVHHレパートリーを発現している組換えビリオンを産生するために、ライブラリーを、2%グルコースおよび100μg/mlのアンピシリンを含む10mlの2×TY培地中で37℃にてOD_{600nm}が0.5に到達するまで増殖させた。M13K07ファージ（10^{12}個）を添加し、混合物を37℃で2回×30分間、最初は振盪せず、次に100 rpmで振盪してインキュベートした。細胞を、室温にて4,500 rpmで5分間遠心分離した。細菌のペレットを、100μg/mlのアンピシリンおよび25μg/mlのカナマイシンを含む50mlの2×TY培地に再懸濁し、250 rpmで活発に振盪させながら37℃で一晩インキュベートした。一晩の培養物を4℃にて4,500 rpmで15分間遠心分離し、上清を用いてファージを濃縮した。ファージを氷上で30分間PEG沈殿させ（20%ポリエチレングリコールおよび1.5M NaCl）、4,500 rpmで20分間遠心分離した。このペレットを1mlのPBSに再懸濁した。ファージを再び氷上で10分間PEG沈殿させ、4℃

にて14,000rpmで10分間遠心分離した。このペレットを1mlのPBSに溶解した。1μg/mlのEGFRまたはTNFαを96ウェルMaxisorpプレート（Nunc）中で固定化し、4℃にて一晩インキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tween-20で5回洗浄し、ウェルをカゼイン溶液（PBS中1%）でブロッキングし、そしてファージ希釈物を室温で2時間添加した。結合したファージを、抗M13 gpVIII-HRP抱合型モノクローナル抗体（Amersham Biosciences）およびABTS/H_2O_2を基質として用いて検出した。プレートを室温で15分間のインキュベーションの後に405nmで読み取った。動物024および動物025のPBL1ライブラリーからレスキューされたファージのプールからのファージ応答の例を、図８に示す。

【０３２６】

実施例２９：EGFR特異的ナノボディの同定のための複数選択ストラテジー

ライブラリーを、細菌を対数期（OD_{600}=0.5）まで増殖させることによってレスキューし、続いてヘルパーファージで感染させて、クローン化VHHのレパートリーをgpIII融合タンパク質としてファージの先端に発現している組換えファージを得た（実施例１８に記載されるように）。EGFR特異的抗体について選択する場合、2つの別個の選択ストラテジーに従った。

【０３２７】

エピトープ特異的溶出による選択

第１の選択ストラテジーは、EGFRがリガンド溶出によってアフィニティークロマトグラフィーで精製され得るという事実に基づいた。リガンド結合部位または重複エピトープを競合する過剰の分子を加える、4つの異なる溶出条件を実行した（表１１）。選択がA431細胞またはHer-14細胞において行われた場合、非選択性の組換えファージを、それぞれ6×10^6個の血液細胞（主に単球、T細胞およびB細胞）または2×10^7個の3T3細胞と共に4℃で20分間混合し、一般的なEGFR非特異的エピトープを認識する組換えファージについて枯渇させた。次いで、非結合性ファージを$EGFR^+$の選択細胞と共に2時間インキュベートし、氷冷PBSで6回洗浄した。その後、ファージを過剰のEGFリガンドであるマウスモノクローナル2e9（Defize LH,Moolenaar WH, van der Saag PT, de Laat SW 1986年,「Dissociation of cellular responses to epidermal growth factor usinganti-receptor monoclonal antibodies」, EMBO J. 5: 1187-92）または EGFR拮抗抗体225および528（Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J, Sato GH 1983年,「Biological effects invitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors」, Mol. Biol. Med. 1: 511-529）で溶出させた。レセプター媒介性のファージの細胞内部移行を回避するために、全ての選択工程を4℃で行った。対数的に増殖したE. coli TG1を、溶出させたファージで感染させ、選択培地2×TY Ap100および2%グルコースで37℃にて一晩増殖させた。細胞を擦り落とし、必要があればいつでも次回のパニング（panning）に使用した。EGFR特異的組換えファージ（表１１）を濃縮するために、2回または3回のパニングを行った。精製抗原を選択に用いる場合はいつでも（表１１）、EGFRをMaxisorpマイクロタイタープレート上に1μg/mlで固定化した。

【０３２８】

細胞内部移行VHH断片についての選択

第２の選択ストラテジーは、リガンドのレセプターへの結合後、EGFR媒介性の細胞シグナル伝達がレセプターの内部移行作用の機構によって下方制御され得るという観察に基づいた。細胞表面分子を介して細胞内部移行され得る組換えファージを同定するために、Poulら（Poul MA, Becerril B, Nielsen UB, Morisson P, Marks JD. 2000年,「Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries」, J. Mol. Biol. 301: 1149-61.）によって記載されたプロトコルに従った。非選択性組換えファージを、2%スキムミルクを補充した氷冷結合培地（重炭酸塩緩衝化DMEM；10%FCS（ウシ胎児血清）；25mM Hepes）中で4℃にて30分間、約2×10^7個のマウス線維芽細胞3T3に添加して、非特異的VHHについて枯渇させた。その後、非結合性ファージを、結合培地中で予冷却した$EGFR^+$の選択細胞（Her-14またはA431）と共に4℃で1.5時間インキュベートし、続いて氷冷PBSで6回洗浄して非結合性のファージを除去した。細胞を予熱した結合培地で覆い

、直ちに37℃に20分間移行し、内部移行作用を可能にした。その後、細胞を4℃に冷却させ、弱酸（500mM NaCl；100mMグリシンpH2.5）とともに10分間インキュベーションして剥ぎ取り、表面結合性の組換えファージを除去した。細胞をトリプシン処理によって細胞外基質から遊離させた。次いで、再懸濁した細胞を4℃にて100mM TEAで4分間溶解し、内部移行されたファージを遊離させた。対数的に増殖したE. coli TG1を溶出したファージで感染させ、選択培地（2%グルコースを含む2×TY Ap100）で37℃にて一晩増殖させた。A431についておよび平行してHer-14についての単回の選択に使用されるライブラリーを、表１２にまとめる。

【０３２９】

実施例３０：EGFR特異的ナノボディの特徴づけ

パニングのエピトープ特異的溶出手順後の個々のクローンのEGFR特異性を検証するために、ファージELISAを各クローンについて行った。各選択手順（1、2、3、4、IaおよびIIIa；表１１）について無作為に採取した47個のクローンを対数期（OD_{600}=0.5）まで増殖させ、続いてヘルパーファージで感染させて、実施例１８に記載のように組換えファージを得た。ファージELISAを、固相コーティングEGFR（非コーティングウェルと比較する）およびゼラチンコーティングHer-14細胞（3T3と比較する）の両方について行った。EGFR特異的VHHの存在を、各クローンの約10^9個の組換えファージ粒子を使用して検証した後、抗M13gpVIII-HRP抱合型モノクローナル抗体を用いて検出した。細胞および／または固相固定化EGFRについてのファージELISAにおいて陽性と評価されたクローンを用いて（表１１）、HinfIフィンガープリント分析を行った（データは示さず）。各々別個のフィンガープリントの代表的なクローンについてヌクレオチド配列を決定した結果、条件1、Ia、2、IIIa、3および4について、それぞれ5個、8個、3個、4個、7個および4個の異なる配列を得た。これらの31個の結合剤のアミノ酸配列アラインメント（図９）により、それらのうちの20個がユニークであることが示された（表１４の配列番号23～42に記載される）。ファージELISA（細胞および固相コーティングEGFRの両方について）における20個のユニークなクローンのEGFR特異性を図１０に示す。

内部移行作用プロトコルによる選択のために、合計84個の個々のクローンを用いた細胞についてのファージELISAを、エピトープ特異的溶出選択手順によって同定されたクローンについてと同様に行った。HinfIフィンガープリント分析の後、20個のユニークな結合剤（データは示さず）、2個の新規の抗EGFRクローン、EGFR-B11およびクローンEGFR-F11の上記パネルに対するヌクレオチド配列決定およびアミノ酸配列アラインメントを同定した（表１４の配列番号43～44）。細胞についてのファージELISAにおける両方のクローンのEGFR特異性を、図１０のパネルＡに示す。

【０３３０】

実施例３１：EGFレセプター媒介性のナノボディの細胞内部移行

Her-14細胞および3T3細胞をカバーガラス片上で一晩増殖させ、結合培地（実施例１９を参照）で洗浄し、4℃で20分間冷却した。ファージを実施例１８に記載のようにナノボディEGFR-IIIa42から調製し、2%スキムミルクを補充した結合培地で希釈した約10^{12}個の組換えビリオンを、氷冷細胞に4℃で1時間添加した。細胞を氷冷PBSで1回洗浄して非結合性のファージを除去した。その後、これらの細胞を20分間37℃に移行してファージの内部移行を可能にし、再度4℃に冷却させた。細胞をPBSで2回洗浄した。次いで、室温で7分間のストリッピング緩衝液（150mM NaCl、125mM HAc）を用いた2回の酸洗浄により、細胞表面結合性のファージを除去した。PBSで2回洗浄した後、細胞を室温で30分間4%パラホルムアルデヒドのPBS中で固定し、再度PBSで2回洗浄した。次いで、固定した細胞を0.2% Triton X-100のPBS中で室温にて5分間透過させ、続いてPBSで2回洗浄し、残存する固定剤を100mMグリシンのPBS中で室温にて10分間ブロッキングした。細胞をPBS-0.5%(w/v)ゼラチンで洗浄し、抗M13gpVIII-FITC（Amersham Biosciences）、続いて抗マウスFITC標識化モノクローナル抗体を用いた染色によって内部移行されたファージを可視化し、その後、蛍光顕微鏡によって可視化した。図１１により、EGFRIIIa42はHer-14細胞（パネルＡ）に細胞内部移行できるが、3T3細胞（パネルＢ）に細胞内部移行できないことを示す。その後、F

ACS分析により、ナノボディEGFR-IIIa42はA431およびHer-14の両方に結合できるが、3T3には結合できないことを実証した（データは示さず）。

レセプターシグナル伝達に対するEGFレセプター特異的ナノボディの影響を実証するために、細胞を12ウェル組織培養プレート中の1ウェル当たり100,000細胞で10%(v/v)血清を含む培地（DMEM）中に播種した。8時間後、細胞を低濃度（0.5% v/v）の血清を含む培地（DMEM）で1回洗浄し、同培地中で一晩血清欠乏にした。アッセイ当日、培地を結合培地（DMEM/0.5% FCS/25mM Hepesおよび2%スキムミルク）に交換し、適切な場合、リガンドまたはナノボディ（一価または二価）を37℃で添加した。15分後、細胞を氷上で急速に冷却し、氷冷PBS（10mM Na-リン酸；150mM NaCl、pH7.4）で2回洗浄した。50μlのタンパク質試料緩衝液中でプレートから細胞を擦り落として、全細胞溶解物を調製した。タンパク質を6%(w/v)ポリアクリルアミドゲル上でサイズ分画し（2つの平行なゲル上に1ゲル当たり20μlを負荷した）、PVDF膜（Roche）にブロットした。ブロットを、EGFRの総量についてレセプターに対するウサギポリクローナル抗血清（Santa Cruz）を用いて染色し、リン酸化レセプターについてモノクローナル抗ホスホチロシン抗体（PY-20；Transduction Labs）を用いて、続いて適切にロバで発生させたペルオキシダーゼ抱合型二次抗体（抗ウサギまたは抗マウス）を用いて染色した。Western Lightning（商標）基質（Perkin Elmer Life Sciences）を使用し、増強された化学蛍光によって検出を行った。驚いたことに、抗EGFR-IIIa42ナノボディは、EGFを枯渇させたEGFR^{+}細胞を活性化しなかった。これは、レセプターTyrキナーゼリン酸化の欠失によって示された（図１１、パネルＣ）。EGFが細胞に2種類の濃度で添加された陽性コントロールは、レセプターのリン酸化を明らかに誘導し、従ってこれらの細胞の活性化を誘導した。

【０３３１】

PDK1

実施例３２（１）：ラマの免疫化

2匹のラマを組換えEGFレセプターの反応混液およびPDK1で免疫化する。これらのラマを、EGFレセプターを過剰発現している細胞株で追加免疫する。これらの免疫化スキームを表１５にまとめる。

【０３３２】

実施例３３：レパートリークローニング

RNA抽出について以下の異なる供給源を使用する：

- 最後の抗原注射4日後と10日後との間の免疫血液150ml
- 最後の抗原注射4日後のリンパ節生検

密度勾配遠心分離（Ficoll-Paque Plus Amersham Biosciences）によって、末梢血液リンパ球（PBL）を単離する。PBLおよびリンパ節を、全RNAの抽出（ChomczynskiおよびSacchi 1987）に使用し、次いでヘキサヌクレオチドランダムプライマーを用いてcDNAの合成を行う。2つのヒンジ特異的プライマーである：AACAGTTAAGCTTCCGCTTGCGGCCGCGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCGおよびAACAGTTAAGCTTCCGCTTGCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGGTT、ならびにフレームワーク1特異的プライマーである：GAGGTBCARCTGCAGGASTCYGGを使用して、レパートリーを増幅する。断片を、PstIおよびNotIを用いて消化し、ファージミドベクター中にクローン化する。このレパートリーをTG1エレクトロコンピテント細胞中に形質転換し、100μg/mlのアンピシリンおよび2%グルコースを含むLB寒天プレート上にプレートする。ベクター特異的プライマーを用いたPCRによって、挿入の存在についてコロニーをスクリーニングする。

【０３３３】

実施例３４：ライブラリーのレスキュー、ファージ調製

ライブラリーを、2%グルコースおよび100μg/mlのアンピシリンを含む60mlの2×TY培地中で37℃にてOD_{600nm}が0.5に到達するまで増殖させる。M13K07ファージ（1012）を添加し、混合物を37℃で2回×30分間、最初は振盪せず、次に100 rpmで振盪してインキュベートする。細胞を、室温にて4,500 rpmで10分間遠心分離する。細菌のペレットを、100μg/mlのアンピシリンおよび25μg/mlのカナマイシンを含む300mlの2×TY培地に再懸濁し、250

rpmで活発に振盪させながら30℃で一晩インキュベートする。一晩の培養物を4℃にて10.000 rpmで15分間遠心分離する。ファージをPEG沈殿させ（20%ポリエチレングリコールおよび1.5M NaCl）、10.000 rpmで30分間遠心分離する。このペレットを20mlのPBSに再懸濁する。ファージを再びPEG沈殿させ、4℃にて20,000 rpmで30分間遠心分離する。このペレットを5mlのPBSに溶解する。ファージを、OD_{600nm}=0.5でのTG1細胞の感染、ならびに100μg/mlのアンピシリンおよび2%グルコースを含むLB寒天プレート上へのプレーティングによって、滴定する。形質転換体の数は、ファージの数（pfu）を示す。これらのファージを15%グリセロールと共に-80℃で保存する。

【０３３４】

実施例３５：選択

免疫管を、2μg/mlのEGFR、2μg/mlのPDK1または1%カゼインを含むPBSでコーティングする。4℃で一晩インキュベーションの後、これらの管を、1%カゼインを含むPBSで室温にて3時間ブロッキングする。ラマ005の3つのライブラリーおよびラマ006の3つのライブラリーの200μlのファージをプールし、EGFRについては、PDK1については50mMTris/HCl（pH 7.4）、150mM KCl、1.0mM DTT、1mM MgCl2および0.3mg/mlのBSA中に、2mlの最終容量で免疫管に添加する。

【０３３５】

室温で2時間インキュベーションの後、これらの免疫管を、PBS-Tweenで10回およびPBSで10回洗浄する。結合性のファージを2mlの0.2Mグリシン緩衝液pH=2.4で溶出させる。溶出したファージで指数関数的な増殖期のTG1細胞を感染させ、次いで100μg/mlのアンピシリンおよび2%グルコースを含むLB寒天プレート上にプレートする。パニングから得られる結果の例を、表１６および１７に示す。

【０３３６】

実施例３６：スクリーニング

マイクロタイタープレートを、4℃にて一晩、2μg/mlのEGFRまたは2μg/mlのPDK1でコーティングする。これらのプレートを、300μlのPBS中の1%カゼインで室温にて2時間ブロッキングする。これらのプレートを、PBS-Tweenで3回洗浄する。ペリプラズム抽出物を単一のコロニーから調製し、このマイクロタイタープレートのウェルに加える。プレートをPBS-Tweenで6回洗浄し、その後、マウス抗ヒスチジンmABのPBS中の1/1000倍希釈物と共に室温で1時間インキュベーションし、続いてまた室温で1時間、抗マウス-アルカリホスファターゼ抱合体のPBS中の1/2000倍希釈物と共にインキュベーションすることによって、VHHの結合を検出する。基質PNPP（1Mジエタノールアミン、1mM Mg_2SO_4中の2mg/mlのリン酸p-ニトロフェニル、pH9.8）を用いて染色を行い、30分後にシグナルを405nmで測定する。各選択についてELISAで試験されるクローンの数に対する陽性クローンの期待数の例を、表１８に示す。

【０３３７】

実施例３７：細胞内部移行VHHについてのスクリーニング

EGFRに特異的な個々のクローンをPCRによって増幅し、CMVプロモーターによって駆動される緑色蛍光タンパク質レポーター遺伝子をパッケージ化するように操作されたファージ中にクローン化する（Poul MAら、J Mol Biol, 1999, 288: 203-211）。ファージを調製し、EGFRを過剰発現している腫瘍細胞（A431）と共にインキュベートする。EGFR媒介性のエンドサイトーシスを受けるファージを、GFP発現によって測定する。1 VHH（EGFR-21）は、極めて高いGFP発現を示すことが期待され、さらなる分析に使用される。別のアプローチにおいて、Laroccaら（Laroccoら, Molecular Therapy, 2001, 3: 476-484）およびPoulら（Poul MAら, J Mol Biol, 1999, 288: 203-211）に記載されるように、冷メタノールでの処理による細胞の透過化処理の後、細胞内部移行ファージを抗ファージ抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）で染色する。

【０３３８】

実施例３８：VHH阻害性PDK1-Akt相互作用についてのスクリーニング

PDK1を、上記のようにマイクロタイタープレート中にコーティングし、これらのプレー

トをブロッキングの後、ウェルを100μg/mlのAktと共に室温にて1時間インキュベートする。次いで（洗浄せずに）、これらのウェルに100μlのペリプラズム抽出物を添加し、VHH結合を上記のように測定する。PDK1に結合できないVHHを、PDK1とAktの間の相互作用に対する阻害剤として評価する。阻害ELISAにおいて試験されるVHHの数に対する阻害性VHHの期待数を、表１９にまとめる。

【０３３９】

実施例３９：二重特異性構築物の作製

EGFR-21、およびPDK1に対する5つの異なる強い阻害性VHH（PD-1、PD-7、PD-32、PD-33およびPD-72）の、二重特異性構築物を調製する（Conrathら，J Biol Chem，2001，276：7346-7350）。これらの5つの二重特異性構築物についてタンパク質を調製および均質に精製して、ウエスタンブロット分析により安定であることを示す。

【０３４０】

実施例４０：腫瘍細胞のエンドサイトーシスおよび溶解

二重特異性構築物を、EGFRを過剰発現している腫瘍細胞（A431）と共にインキュベートする。うまくエンドサイトーシスによって取り込まれた全ての構築物を共焦点顕微鏡法によって示す。これらの構築物の1つであるEGFR-21-PD-32は、細胞増殖を阻害し、最終的に細胞死を引き起こすことができると期待される。

【０３４１】

実施例４１：本発明の抗-標的-単一ドメイン抗体間の相同性の計算

本発明の抗-標的単一ドメイン抗体間のアミノ酸配列相同性の程度を、Bioedit Sequence Alignment Editorを用いて算出した。これらの計算結果は、ClustalWによって位置あわせされるように、全ての配列間で一致する残基の比率を示す（Thompson，J．D．，Higgins，D．G.およびGibson，T．J．(1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting，position specific gap penalties and weight matrix choice．Nucleic Acids Research，submitted，June 1994）。表２０は、本発明の抗TNF-α VHH間の相同性割合（fraction homology）を示す。表２１は、本発明の抗IFN-γ VHH間の相同性百分率を示す。

【０３４２】

実施例４２：抗血清アルブミンVHHに融合したVHH-CDR3断片を含む二重特異性構築物の構築

機能的部分であるMP2F6SRのCDR3領域を、フレームワーク4領域に位置するセンスプライマー（F6 CRD3順方向プライマー：CTGGCCCCAGAAGTCATACC）およびフレームワーク3領域に位置するアンチセンスプライマー（F6 CDR3逆方向プライマー：TGTGCATGTGCAGCAAACC）を用いて増幅させた。

CDR-3断片を抗血清アルブミンVHH MSA-21と融合させるために、2回目のPCR増幅を以下のプライマーを用いて行った：

F6 CDR3順方向プライマー Sfi1：

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCTGTGCATGTGCAGCAAACC

F6 CDR3逆方向プライマー Not1：

GTCCTCGCAACTGCGCGGCCGCCTGGCCCCAGAAGTCATACC

【０３４３】

PCR反応を、50mlの反応容量において50pmolの各プライマーを用いて行った。一次PCRの反応条件は、94℃で11分間、次いで94/55/72℃で30/60/120秒間を30サイクル、そして72℃で5分間であった。全ての反応を2.5mM $MgCl_2$、200mM dNTPおよび1.25U AmpliTaq God DNAポリメラーゼ（Roche Diagnostics、ブリュッセル、ベルギー）を用いて行った。

【０３４４】

MSAクローンのVHH遺伝子を制限酵素Pst1/BstEIIで切断後、これらの消化産物をpAX11中にクローン化し、マルチクローニング部位のC末端にVHHを有するクローンを得た。これらのクローンを、ベクターベースのプライマーを用いるPCRによって試験した。MSA VHHとの融合におけるCDR3のN末端発現を可能にするためにPCR産物を制限酵素Sfi1/Not1で切断し

た後、650bpの産物を生じるクローンからDNAを調製し、これをアクセプターベクターとして使用してMP2F6SRのCDR3をクローン化した。

【０３４５】

【表１】

日	ラマ 2	ラマ 4
0	100 µg	100 µg
7	100 µg	
14	50 µg	
21	50 µg	100 µg
28	50 µg	
35	50 µg	
42		50 µg
70		50 µg

表１:実施例1に記載の免疫化スキーム

【０３４６】

【表２】

	#最後の注射後の日数	RNA供給源	ﾗｲﾌﾞﾗﾘｰのｻｲｽﾞ	挿入%
ラマ 002	4	リンパ	1.3×10^7	89
	4	PBL	1.9×10^7	95
	10	PBL	1.1×10^9	70
ラマ 004	4	PBL	1.7×10^8	96
	4	リンパ	4.9×10^7	>95
	10	PBL	2.2×10^6	>95

表2:実施例1に記載のベクター特異的プライマーを用いたPCRによる挿入の存在

【０３４７】

【表３】

	5 µg/ ml	0.5 µg/ ml	0 µg/ ml (ブランク)
ラマ2 (4日目のPBL、10日目のPBL、4日目のﾘﾝﾊﾟ節をﾌﾟｰﾙ)	$1.4\ 10^6$	$2.7\ 10^5$	$1.5\ 10^4$
ブランクと比較した濃縮度	*400 x*	*18 x*	
ラマ4 (4日目のPBL、10日目のPBL、4日目のﾘﾝﾊﾟ節をﾌﾟｰﾙ)	$3.3\ 10^6$	$4.5\ 10^5$	$7.2\ 10^4$
ブランクと比較した濃縮度	*140 x*	*6.25 x*	

表3:実施例1に記載の一次選択

【０３４８】

【表４】

	1 μg/ ml	1 μg/ ml	0 μg/ ml	0 μg/ ml
	溶出 バフィーコート細胞	溶出 リゾチーム	溶出 バフィーコート細胞	溶出 リゾチーム
ラマ 2 （5μg/ml IgE選択：400×濃縮）	1.2 10^8	1.2 10^8	6 10^3	3 10^3
リゾチーム溶出と比較した濃縮度	濃縮なし			2x
ラマ 4 （5μg/ml IgE選択：140×濃縮）	1.3 10^8	2 10^7	3 10^3	3 10^3
リゾチーム溶出と比較した濃縮度	6.5 x		濃縮なし	

表4：実施例1に記載の一次選択からのレスキューされたファージを用いた二次選択

【０３４９】

【表５】

	2 nM IgE	2 nM IgE	0 nM IgE	0 nM IgE
	溶出 バフィーコート細胞	溶出 リゾチーム	溶出 バフィーコート細胞	溶出 リゾチーム
ラマ 2 （5μg/ml IgE選択：400×濃縮）	1.5 10^8	1.5 10^7	3 10^5	3 10^3
リゾチーム溶出と比較した濃縮度	10 x			
ラマ 4 （5μg/ml IgE選択：140×濃縮）	3.3 10^7	2.2 10^7	3 10^3	6 10^3
リゾチーム溶出と比較した濃縮度	1.5 x			

表5：実施例1に記載のニュートラアビジンコーティング管を用いた2回目の選択

【０３５０】

【表６】

	5μg/mlで選択	0.5μg/mlで選択
ラマ 002	39/47	21/47
ラマ 004	45/47	46/47

表6：実施例1に記載のELISAにおいて試験されるクローンの数に対するヒトIgEおよびキメラIgEの両方への結合について陽性を記録するクローンの数

【０３５１】

【表７】

群	動物	詳細	スケジュール
1	8	陰性コントロール1 腹腔内	毎日100μlのPBSを腹腔内に
2	8	陰性コントロール2 直腸内	隔日で100μlのPBSを直腸に2週間
3	8	陰性コントロール3 胃内	毎日100μlのPBSを胃内に 連続14日間
4	8	陽性コントロール1 デキサメタゾン	5μgを腹腔内に連続7日間
5	8	陽性コントロール2 IL10を発現しているI.lactis	1日1回の経口投与を連続14日間
6	8	二価VHH 3F 胃内	毎日100μgの二価VHH $3F_2$ を 胃内に連続14日間
7	8	二価VHH 3F 腹腔内	毎日100μgの二価VHH 3Fを腹腔 内に連続14日間
8	8	二価VHH 3F 直腸内	100μl PBS中100μgの二価VHH 3F を直腸内に隔日で2週間

表7：処置スケジュール

【０３５２】

【表８】

動物	抗原	供給源	力価	挿入%
ラマ 5	ヒト MMP-12	PBL時間1	$2.1\ 10^8$	94%
ラマ 5	ヒト MMP-12	PBL時間2	$7.5\ 10^6$	92%
ラマ 5	ヒト MMP-12	リンパ節	$7.8\ 10^8$	100%

表8：実施例7および8に記載の異なるラマおよび組織由来のライブラリー、それらの多様性および挿入%の概要

【０３５３】

【表９】

日	ラマ 024	ラマ 025	ラマ 026	ラマ 027
0	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
7	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
14	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
21	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
28	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
35	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
42	インタクトな細胞	インタクトな細胞	小胞	小胞
46	150ml血液サンプル（PBL1）	150ml血液サンプル（PBL1）	150ml血液サンプル（PBL1） リンパ節	150ml血液サンプル（PBL1） リンパ節
47	リンパ節 脾臓 骨髄			
49		精製EGFR	150ml血液サンプル（PBL2）	150ml血液サンプル（PBL2）
55		精製EGFR		
59		150ml血液サンプル（PBL2）		
60		リンパ節 脾臓 骨髄		

表9：免疫化スケジュールおよび組織採集物

【０３５４】

【表１０】

動物	組織	RNA（μg）	サイズ（x 10^8）	挿入％
ラマ 024	PBL1	200	0.25	83
ラマ 024	リンパ節　回腸	40	2.3	78
ラマ 024	リンパ節　腸	150	0.17	100
ラマ 024	骨髄	97	1.5	83
ラマ 024	脾臓	160	0.16	95
ラマ 025	PBL1	200	0.06	95
ラマ 025	リンパ節 （回腸＋腸）	200	0.8	96
ラマ 025	骨髄	200	0.045	88
ラマ 025	脾臓	200	2	86
ラマ 025	PBL2	200	0.13	83
ラマ 026	PBL1＋リンパ節	100 + 200	2.46	85
ラマ 027	PBL1＋リンパ節	100 + 200	1.08	92

表10：構築されたライブラリーの概要

【０３５５】

【表１１】

溶出条件	溶出分子	選択:抗原型			ΦELISA Her-14	ΦELISA EGFR	結合剤ファミリー
		1回目	2回目	3回目			
1 Ia	EGF	A431	Her-14 EGFR	-	1/47 5/47	24/47 23/47	6 8
2 IIIa	2e9	A431	Her-14 EGFR	-	2/47 11/47	32/47 32/47	5 4
3	225	A431	A431	Her-14 EGFR	8/47 20/47	28/47 31/47	5
4	528	A431	A431	Her-14 EGFR	16/47 22/47	10/47 29/47	5

表11:エピトープ特異的溶出選択手順の概要

【０３５６】

【表１２】

ライブラリー	選択細胞	選択された抗体断片
リンパ節、骨髄、脾臓およびPBL1をプール（024＋025）	Her-14	A2
骨髄をプール（024＋025）	A431	A4, A9, B11
PBL1をプール（024＋025）	A431	F11

表12:「内部移行作用」選択手順の概要

【０３５７】

【表１３】

名称	配列 5' – 3'
ABL002	GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT
ABL010	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTT
ABL037	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGA GTCTGG
ABL038	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGCAGCTGGTGGA GTCTGG
ABL039	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGCGGTGCAGCTGGTGGA GTCTGG
ABL040	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCGTGCAGCTGGTGGA TTCTGG
ABL041	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGA GTCTGG
ABL042	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGA GTCTGG
ABL043	CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGA GTCTGG
geneIII	CCACAGACAGCCCTCATAG
M13 rev	GGATAACAATTTCACACAGG

表13:プライマー配列

【０３５８】

【表１４－１】

配列番号	名称	配列
		抗-IgE VHH
1	VHH#2C3	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCRASGRIFRINAMGWYRQAPGKQRELVATI TSTGSTNFADSVKGRFTIYRDGAKRTVDLRLNSLKPEDTAVYFCNADVREY DLGPWRQYWGQGTQVTVSS
2	VHH#4G12	QVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCSVSGTSISNRVMAWFRQAPGKQRDFVAYI TSAVNTDYADFVKGRFTISRDNAQNMVHLQMNSLKPEDTAVYYCNVLKDTW FRTPYDYYWGQGTQVTVSS
3	VHH#2C1	QVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCVVSGRTLSYSSLAWFRQAPGKERDFVAAL SLTTYY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTADYFCATARTRTDYAPLLSA ASTYDAWGQGTQVTVSL
4	VHH#2H3	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSSRYYAMGWFRQGPGKEREFVAAV NWNGDSTYYADSVKGRFTISRGNAENTAYLQMNSLVPEDTAVYYCAMRMNA GLGYSAASYQYWGQGTQVTVSL
5	VHH#2D12	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTFLEHVMAWFRQTPGKEREFVGAI DWSGRRITYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKPEDTAVYYCAADRTY SYSSTGYYYWGQGTQVTVSS
6	VHH#2G4	QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTFLEHVMAWFRQTPGKEREFVGAI DWSGRRITYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKPEDTAVYYCAADRTY SYSSTGYYYWGQGTQVTVSS
7	VHH#4C5	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLSSYTMAWFRQAPGKEREFVASI SSSGISTYYADSVKGRFTISRDIAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKYRY YSTLYTKSGEYDYWGQGTQVTVSS
8	VHH#4A2	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTISSYAMAWFRQAPGKEREFVASI SSSGVSKHYADSVKGRFTISNDKVKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCAAKYRY YSSYYTKSGDYDYWGQGTQVTVSS
9	VHH#2D4	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVAAV SYSGSYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMASLKPEDTAVYYCAARNRGYS TYAGVYDYWGQGTQVTVSS
10	VHH#2B6	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVASI TWIGGGTYYADSVKGRFTISRDHAGNTVYLQMNTLKPDDTAVYYCALDRRS STYYLMKGEYDYRGRGTQVTVSS
11	VHH#2H11	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVASI TWTGTGTYYADSVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDRRS STYYLMKGEYDYRGRGTQVTVSS
		抗-TNFα VHH
12	VHH#3E-His tag	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPKEREF VARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH
13	VHH#3F	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAV SWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQ KYNWASASYNVWGQGTQVTVSS

【０３５９】

【表１４－２】

14	VHH#3F/ VHH#3F	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAV SWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQ KYNWASASYNVWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQDSGGGLVQAGGS LRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRF EISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQ VTVSS
		ヒトMMP-12特異的VHH
15	MMP-12 P1-1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYPMAWVRQAPGKGLEWISVI NSGGVNTSYAASVKGRFTISRDNAKNTLFLQMNSLKPEDTAVYYCAKYSLK NEQYWRGQGTQVTVSS
16	MMP-12 P1-3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDGMGWYRQAPGKQRERKQRE LVAAITSGGSTKYADSVKGRFTISRDNANDTVYLQMNTLKPEDTAVYYCNA VLLRRGIVYDYWGQGKQVTVSS
17	MMP-12 P1-7	QVQLQESGGGSVKAGGSLRLSCAASGSIFSIDGMGWYRQAPGKQRERKQRE LVAAITSGGSTKYADSVKGRFTISRDNANDTVYLQMNTLKPEDTAVYYCNA VLLRRGIVYDYWGQGKQVTVSS
18	MMP-12 P1-26	QVQLQESGGGLVRAGGSLRLSCVASGRTLSKYRMGWFRQFPGKERELVAEI EWKSSSTWYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLRMNSLKPEDTAVYYCAAATLG EPLVKYTYWGQGTQVTVSS
19	MMP-12 P1-33	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDGMGWYRQAPGKQRERKQRE LVAAITSGGSTKYADSVKGRFTISRDNANDTVYLQMNTLKPEDTAVYYCNA VLLRRGIVYDYWGQGKQVTVSS
20	MMP-12 P1-41	QVQLQDSGGGLVRTGDSLRLSCVVFGGTISTYAMGWFRRAPGKEREFVAAI DASGGFTEYADSVRGRFRIARDNPLSAVYLQMNSLKPEDTAFYYCAADKDR DTVVRFTTTPNEYDYWGQGTQVTVSS
21	MMP-12 P1-44	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNHWLYWVRQAQGKGLEWVSAI NPGGSTVYLDSVKGRFTISRGNTKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKAMAWA TDWDEYDLWGQGTQVTVSS
22	MMP-12 P5-29	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTVYTTGWFRQAPGKEREFVAAI DWSGSSTYYTDSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARDAI VGVTDTSGYRYWGQGTQVTVSS
		抗-EGFR VHH
23	EGFR-1.4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYVMGWFRQAPGKERDFVVGI GRSGGDNTYYADSVKGRFTISWDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAASTY SRDTIFTKWANYNYWGQGTQVTVSS
24	EGFR-1.9	QVQLQESGGGLVKAGGSLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVGAI HWSGGRTYYADSVKGRFTISSDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAASRII YSYVNYVNPGEYDYWGQGTQVTVSS
25	EGFR-1.33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHYMSWFRQAPGKEREFVAAI TSSSRTYYTESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAADRTFY GSTWSKYDYRGQGTQVTVSS
26	EGFR-1.34	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSKYAMGWFRQAPGKEREFVSAI SWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQVNSLKPEDTAVYYCAATYLV DVWAVHVPIRPYEYDYWGQGTQVTVSS
27	EGFR-1.38	QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFGGYAMGWFRQAPGKEREFVAAI SWSGGSTYYADSLKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCAAGLRP SPNYNHERSYDYWGQGTQVTVSS
28	EGFR-Ia1	QVQLQESGGGLVQAGGSLLLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAI NWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAAFYCAATYNP YSRDHYFPRMTTEYDYWGQGTQVTVSS

【０３６０】

【表１４－３】

28	EGFR-Ia1	QVQLQESGGGLVQAGGSLLLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAI NWSGGSTSYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAAFYCAATYNP YSRDHYFPRMTTEYDYWGQGTQVTVSS
29	EGFR-Ia7	QVQLQESGGRLVQTGGSLRLSCAASGGTFGTYALGWFRQAPGKEREFVAAI SRFGSTYYADSVKGRFTISRDNANNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAAREGVA LGLRNDANYWGQGTQVTVSS
30	EGFR-Ia15	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAI GLNTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTSGVVG GTPKRYDYWGQGTQVTVSS
31	EGFR-IIIa42	EVQLVESGGGSVQAGGSLKLSCAASGRSFSTYAMGWFRQAPGQDREFVATI SWTDSTDYADSVKGRFTISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRWAS SRRNVDYDYWGQGTQVTVSS
32	EGFR-2.6	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAI NWGGGNTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASEWG GSDYDHDYDYWGQGTQVTVSS
33	EGFR-2.20	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSSYAMAWFRQAPGKEREFVAAI SWGGGSTYYAVSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTARYYCAADETF HSSAYGEYEYWGQGTQVTVSS
34	EGFR-IIIa5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTFSSYAMGWFRQTPGKEREFVAAI TSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKSTMYLQMDSLMLDDTSVYYCAADSSR PQYSDSALRRILSLSNSYPYWGQGTQVTVSS
35	EGFR-3.18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFADYAMSWVRQAPGKGLQWVSSI SYNGDTTYYAESMKDRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCASSGSY YPGHFESWGQGTQVTVSS
36	EGFR-3.32	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGYAMGWFRQAPGEEREFVAAI SWRGTSTYYGDSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSHS DYAPDYDYWGQGTQVTVSS
37	EGFR-3.34	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAIGWFRQAPGKEREFVAAI SWGGSNTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGEVS NSDYAYEYDYWGQGTQVTVSS
38	EGFR-3.39	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRYIMGWFRQAPGKEREFVAGISRSG ASTAYADSVKDRFTISRDSALNTVYLQMNSLKAEDTAVYFCAAALAIRLGI PRGETEYEYWGQGTQVTVSS
39	EGFR-3.40	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCSASGLTFSNYAMAWFRQAPGKEREFVATI SQRGGMRHYLDSVKDRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAADLMY GVDRRYDYWGRGTQVTVSS
40	EGFR-4.11	QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSITMGWFRQAPGKERQFVSAI NSNGNRYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVQAYS SSSDYYSQEGAYDYWGQGTQVTVSS
41	EGFR-4.21	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSSMGWFRQAPGKEREFVATINL SGDRTDYADSVKGRFTISRDNPKNTVYLQMDSLEPEDSAVYYCAGTSLYPS NLRYYTLPGTYADWGQGTQVTVSS
42	EGFR-4.22	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVARI TGTGTGITGAVSTNYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADRSRTIVVPDYWGQGTQVTVSS
43	EGFR-B11	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASRFSSAQYAIGWFRQAPGKEREGVSYI TFSGGPTGYADSVKGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYT RPGSMWVSSLYDNWGQGTQVTVSS
44	EGFR-F11	QVQLQESGGRLVQAGGSLRLSCAASEHTFRGYAIGWFRQAPGKEREFVSSI TYDGTLTNYADSVTGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYVCAAGYSY RYTTLNQYDSWGQGTQVTVSS

【０３６１】

【表１４－４】

		抗－ヒトIFN γ VHH
45	MP3D2SRA	QVQLQDSGGGTVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAVGWFRQAPGKEREFVARI LWTGASRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAALPSN IITTDYLRVYYWGQGTQVTVSS
46	MP3A3SR	QVQLQDSGGGTVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAVGWFRQAPGKEREFVARI KWSGGSRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCA?LPSN IITTDYLRVYYWGQGTQVTVSS
47	MP3C5SR	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGSVFSRTPMGWYRQAPGKQRELV AGILTSGATSYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLSPEDTAEYYCNTYP TWVLSWGQGTQVTVSS
48	MP3C1SR	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGSVFSRTPMGWYRQAPGKQRELV AGILSSGATVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLSPEDTAEYYCNTYP TWVLSWGQGTQVTVSS
49	MP3G8SR	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGSVFSRTPMGWYRQAPGKQRELV AGILSSGATAYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLSPEDTAEYYCNTYP TWVLSWGQGTQVTVSS
50	MP3D2BR	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAASRGIFRFNAGGWYRQAPGKQRELVAFI GVDNTTRYIDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLQPEDTAVYYCNKVPYID WGQGTQVTVSS
51	MP3H6SRA	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYNMGWFRQAPGKEREFVAGI SWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRP YGVPSPRQGDYDYWGQGTQVTVSS
52	MP3B4SRA	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYNMGWFRQAPGKEREFVAGI SWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRP YGVPSPRQGDYDYWGQGTQVTVSS
53	MP4E4BR	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSIYNMGWFRQAPGKEREFVAAI SWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAINTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRP YGVPSPRQGEYDYWGQGTQVTVSS
54	MP4H8SR	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNIYNMGWFRQAPGKERDFVAAI SWNGGSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRP YGVPSPRQGDYDYWGQGTQVTVSS
55	MP2F6SR	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKEREFVAAI SWNGGSTYYDDSVKGRFTISRDNANNLVYLQMNSLNFEDTAVYYCACAANP YGIPQYRENRYDFWGQGTQVTVSS
56	MP3D1BR	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFDNYNMGWFRQAPGKEREFVAAI SWNGGSTYYDDSVKGRFTISRDNFQKLVYLQMNSLKLEDTAVYYCACAANP YGIPQYRENRYDFWGQGTQVTVSS
57	MP2B5BR	QVQLVESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQAPGKEREFLASV TWGFGSTSYADSVKGRFTISRDKAKDTVYLQMNTLEPDDTSVYYCASSPRY CAGYRCYVTASEFDSWGQGTQVTVSS
58	MP2C1BR	QVKLEESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQAPGKEREFLASV SWGFGSTYYADSVKGRFTISRDTAKDTVYLQMNTLEPDDTSVYYCASSPRY CAGYRCYATASEFDSWGQGTQVTVSS
59	MP4A12SR	QVQLQESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQAPGKEREFLASV TWGFGSTYYADSVKGRFTISRDKAKDTVYLQMNTLEPDDTSAYYCASSPRY CAGYRCYVTASEFDSWGPGTQVTVSS
60	MP3F4SRA	QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEHEFVAGI WRSGVSLYYTDSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAAEATF PTWSRGRFADYDYRGQGTQVTVSS

【０３６２】

【表１４－５】

61	MP3D3BR	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRSFSSYGMGWFRQAPGKDHEFVAGI WRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNGLKPEDTAVYYCAAEATF PTWNRGTFADYDYRGQGTQVTVSS
62	MP3E5BR	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEHEFVAGI WRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNGLKPEDTAVYYCAAEATF PTWNRGSFADYDYRGQGTQVTVSS
63	MP3C7SRA	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEHEFVAGI WRSGVSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAAEATF PTWNRGRFADYDYSGQGTQVTVSS
64	MP2F1BR	AVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVASGGTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVARI GYSGRSISYATSVEGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASLVSG TLYQADYWGQGTQVTVSS
65	MP2C5BR	QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVASGGTFSRYAMGWFRQPPGKERDFVARI GYSGQSISYATSVEGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASLVSG TLYKPNYWGQGTQVTVSS
66	MP2C10BR	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTYTVGWFRQAPGKEREFVAAISWS GGSALYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMGSLEPEDTAYYSCAAPGTRYYG SNQVNYNYWGQGTQVTVSS
67	MP2G5SR	QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTYTVGWFRQAPGKEREFVAAIDWS GGSALYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMGSLEPEDTAVYWCAAPGTRYHG RNQVNYNYWGQGTQVTVSS
68	MP3B1SRA	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSI NSRTGSITYADSVKGRFTITLDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCASRVDD RVSRGQGTQVTVSS
69	MP2F10SR	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISSFRMGWFRRAPGEEREFVAFV RSNGTSTYYADSVEGRFTITRDNAKNTVYLRMDSLKPEDTAVYYCAAATRD YGGSFDYWGQGTQVTVSS
70	MP3A7SRA	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSFRMGWFRRAPGEEREFVAFV RSNGTSTYYADSVEGRFTITRDNAKNTVYLRMDSLKPEDTAVYYCAAATRD YGGSFDYWGQGTQVIVSS
		抗－マウス血清アルブミンVHH
71	MSA21	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGI SSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSL NPGGQGTQVTVSS
72	MSAcl6	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSGTTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVGAI KWSGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNNLKPEDTGVYTCAADRDR YRDRMGPMTTTDFRFWGQGTQVTVSS
73	MSAcl12	QVKLEESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTFSSFAMGWFRQAPGREREFVASI GSSGITTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGLCYCAVNRYG IPYRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
74	MSAcl10	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMVATI SIGGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCVAHRQTV VRGPYLLWGQGTQVTVSS
75	MSAcl14	QVQLVESGGKLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAGS GRSNSYNYYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASTNL WPRDRNLYAYWGQGTQVTVSS
76	MSAcl16	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREFVAAI SWSGGTTRYLDSVKGRFTISRDSTKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDSSG RLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS

【０３６３】

【表１４－６】

77	MSAcl19	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREFV AAISWSGGTTRYIDSVKGRFTLSRDNTKNMVYLQMNSLKPDDTAVY YCAVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
78	MSAcl5	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFL AGVTWSGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLEMNSLNPEDTAVY YCAAAYGGGLYRDPRSYDYWGRGTQVTVSS
79	MScl11	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDAWPIAWFRQAPGKEREGV SCIRDGTTYYADSVKGRFTISSDNANNTVYLQTNSLKPEDTAVYYC AAPSGPATGSSHTFGIYWNLRDDYDNWGQGTQVTVSS
80	MSAcl15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGV SCISSSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNTLEPDDTAVY YCAAGGLLLRVEELQASDYDYWGQGIQVTVSS
81	MSAcl8	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGV ACISNSDGSTYYGDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAVY YCATADRHYSASHHPFADFAFNSWGQGTQVTVSS
82	MSAcl7	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAYGLTFWRAAMAWFRRAPGKERELV VARNWGDGSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAVRTYGSATYDIWGQGTQVTVSS
83	MSAcl20	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFV AAINRNGGTTNYADALKGRFTISRDNTKNTAFLQMNSLKPDDTAVY YCAAREWPFSTIPSGWRYWGQGTQVTVSS
84	MSAcl4	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFV VGINRGGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNTVYLQMNRLKPEDSAIY ICAARPEYSFTAMSKGDMDYWGKGTLVTVSS

表14:配列表

【０３６４】

【表１５】

免疫化の日数	ラマ005 EGFr	ラマ006 EGFr	ラマ005 PDK1	ラマ006 PDK1
0	100 μg	40 μg	40 μg	40 μg
7	100 μg		40 μg	
14	50 μg		20 μg	
21	50 μg	40 μg	20 μg	40 μg
28	50 μg		20 μg	
35	50 μg		20 μg	
42		20 μg		20 μg
70		20 μg		20 μg

表15:実施例32による免疫化スキーム

【０３６５】

【表１６】

ラマ	RNA供給源	溶出条件	Pfu EGFr	Pfuカゼイン	濃縮度
005	3つのライブラリーのプール	0.2 Mグリシン, pH 2.4	1 x 10^7	1 x 10^4	1000
006	3つのライブラリーのプール	0.2 Mグリシン, pH 2.4	5 x 10^6	1 x 10^4	500

表16:実施例35によるパニングの結果

【０３６６】

【表１７】

ラマ	RNA 供給源	溶出 条件	Pfu PDK1	Pfu カゼイン	濃縮度
005	3つのライブラリーのプール	0.2 Mグリシン, pH 2.4	1 x 10^8	1 x 10^4	10000
006	3つのライブラリーのプール	0.2 Mグリシン, pH 2.4	9 x 10^7	1 x 10^4	9000

表17：実施例35によるパニングの結果

【０３６７】

【表１８】

標的	ラマ 005	ラマ 006
EGFr	26/95	38/95
PDK1	93/95	87/95

表18：実施例36によるスクリーニング後の陽性クローンの数

【０３６８】

【表１９】

標的	ラマ 005	ラマ 006
PDK1	56/93	63/87

表19：実施例38による阻害ELISAにおいて試験されるVHHの数に対する阻害性VHHの数

【０３６９】

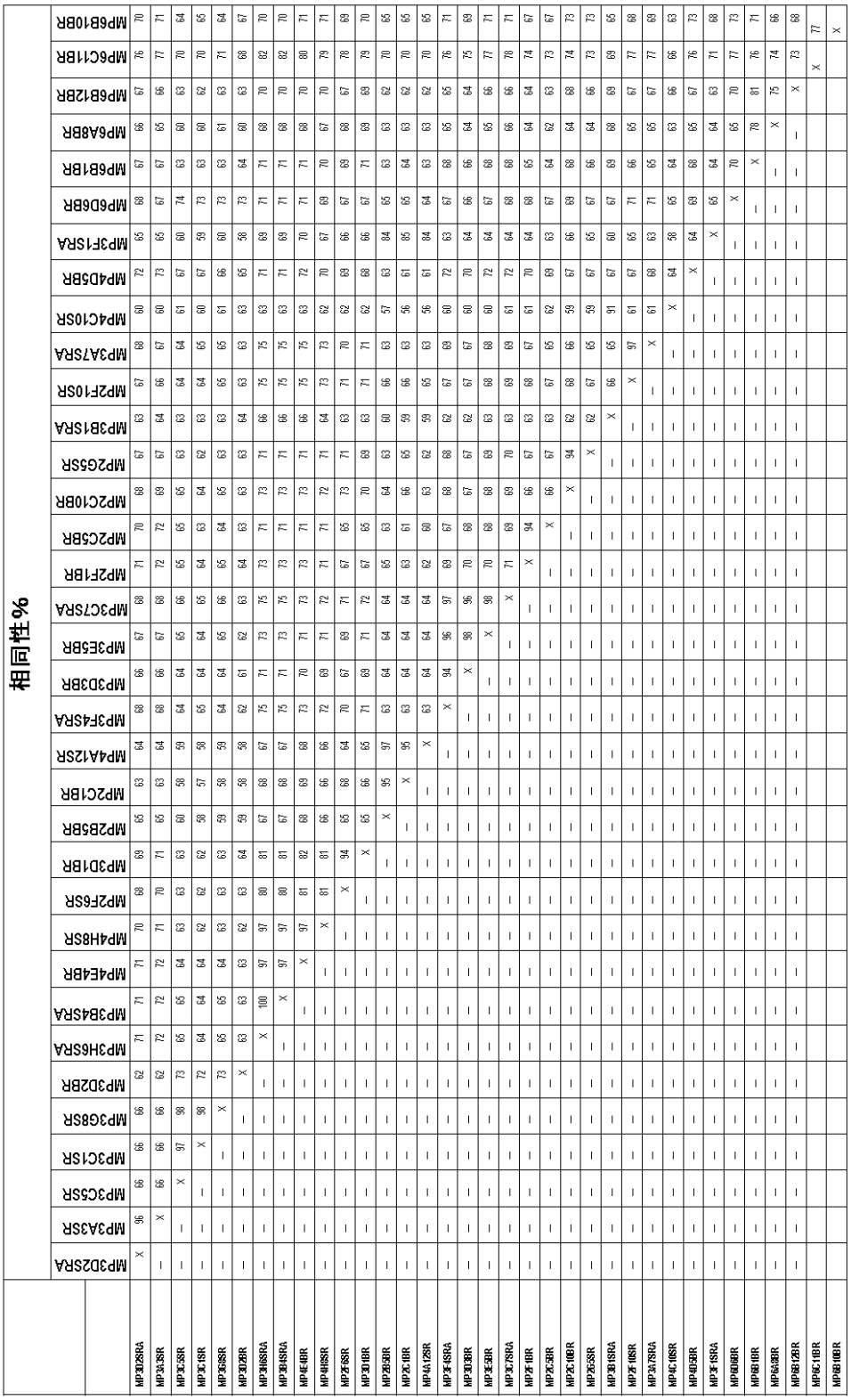
【表２０】

配列	VHH#1A	VHH#7B	VHH#2B	VHH#3E	VHH#3G	VHH#10A	VHH#2G	VHH#1F	VHH#9C	VHH#11E	VHH#10C	VHH#4B	VHH#10D	VHH#12B	VHH#9E	VHH#3F
VHH#1A	1.000	0.601	0.764	0.596	0.622	0.600	0.682	0.629	0.609	0.601	0.614	0.818	0.642	0.747	0.596	0.604
VHH#7B	---	1.000	0.604	0.635	0.645	0.943	0.653	0.616	0.933	0.933	0.719	0.593	0.614	0.620	0.616	0.624
VHH#2B	---	---	1.000	0.620	0.645	0.611	0.682	0.661	0.629	0.620	0.637	0.796	0.634	0.951	0.620	0.645
VHH#3E	---	---	---	1.000	0.875	0.641	0.713	0.689	0.620	0.643	0.612	0.604	0.648	0.596	0.674	0.682
VHH#3G	---	---	---	---	1.000	0.651	0.779	0.740	0.637	0.637	0.653	0.645	0.689	0.622	0.708	0.716
VHH#10A	---	---	---	---	---	1.000	0.658	0.614	0.935	0.935	0.725	0.592	0.612	0.626	0.622	0.637
VHH#2G	---	---	---	---	---	---	1.000	0.741	0.653	0.669	0.685	0.666	0.746	0.650	0.701	0.717
VHH#1F	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.616	0.616	0.664	0.661	0.714	0.645	0.709	0.717
VHH#9C	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.941	0.743	0.601	0.622	0.645	0.600	0.616
VHH#11E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.719	0.601	0.622	0.637	0.608	0.624
VHH#10C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.650	0.606	0.637	0.600	0.632
VHH#4B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.611	0.796	0.588	0.629
VHH#10D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.619	0.674	0.674
VHH#12B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.604	0.637
VHH#9E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.854
VHH#3F																1.000

表20：本発明の抗TNF-α VHH間の相同性割合

【０３７０】

【表２１】



相同性%	MP3D2SRA	MP3A3SR	MP3C3SR	MP3C1SR	MP3G8SR	MP3D2BR	MP3H6SRA	MP3B4SRA	MP4E4BR	MP4H8SR	MP2F6SR	MP3D1BR	MP2B5BR	MP2C1BR	MP4A12SR	MP3F4SRA	MP3D3BR	MP3E5BR	MP3C7SRA	MP2F1BR	MP2C5BR	MP2C10BR	MP2G5SR	MP3B1SRA	MP2F10SR	MP3A7SRA	MP4C10SR	MP4D5BR	MP3F1SRA	MP6D6BR	MP6B1BR	MP6A8BR	MP6B12BR	MP6C11BR	MP6B10BR
MP3D2SRA	×	96	66	66	66	62	71	71	71	70	68	69	65	63	64	68	66	67	68	71	70	68	67	63	67	68	60	72	65	68	67	66	67	76	70
MP3A3SR	—	×	66	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3C3SR	—	—	66	97	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3C1SR	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3G8SR	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3D2BR	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3H6SRA	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3B4SRA	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP4E4BR	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP4H8SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2F6SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3D1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2B5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2C1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP4A12SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3F4SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3D3BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3E5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3C7SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2F1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2C5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2C10BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2G5SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3B1SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2F10SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP3A7SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP4C10SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—	—
MP4D5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—	—
MP3F1SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—	—
MP6D6BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—	—
MP6B1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—	—
MP6A8BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—	—
MP6B12BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—	—
MP6C11BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	—
MP6B10BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×

表21：本発明の抗IFN-γ VHH間の相同性百分率

【０３７１】

（参考文献）

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology 1990; 98: 694-702.

Kojouharoff G,Hans W, Obermeier F, Mannel DN, Andus T, Scholmerich J, Gross V, Falk W. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reducesinf

lammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. Clin Exp I mmunol 1997; 107: 353-8.

MMP12

Salmela MT, Pender SL, Reunala T, MacDonald T, Saarialho-Kere U.
Gut, 2001; 48(4): 496-502
Parallel expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in duodenal and skin lesions ofpatients with dermatitis herpetiformis.

Chavey C, MariB, Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-DeckertS.
J. Biol. Chem., 2003; 278: 11888-11896.
Matrixmetalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during o besity andmodulate adipocyte differentiation.

Churg A, Wang RD,Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL.
Am. J. Respir.Crit. Care Med., 2003; 167: 1083-1089.
Macrophage Metalloelastase Mediates Acute Cigarette Smoke-Induced Inflammation V ia TNF-alphaRelease.

R Lang, AKocourek, M Braun, H Tschesche, R Huber, W Bode, K Maskos
J Mol Biol, Sep 2001; 312(4): 731-42.
Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based o n the 1.1A crystal structure.

Yoshikatsu Kaneko, Minoru Sakatsume, Yuansheng Xie, Takeshi Kuroda, Michiko Igas hima, Ichiei Narita and Fumitake Gejyo
The Journal of Immunology, 2003, 170: 3377-3385.
Macrophage Metalloelastase as a Major Factor for Glomerular Injury in Anti-Glome rularBasement Membrane Nephritis

Ding Y, ShimadaY, Gorrin-Rivas MJ, Itami A, Li Z, Hong T, Maeda M, Komoto I, Kawabe A, Kaganoi J, Imamura M.
Oncology 2002; 63(4): 378-84.
Clinicopathological significance of human macrophage metalloelastase expression in esophagealsquamous cell carcinoma.

Kerkela E, Ala-Aho R, Jeskanen L, Rechardt O, Grenman R, Shapiro SD, Kahari VM, Saarialho-KereU.
J Invest Dermatol 2000 Jun; 114(6): 1113-9
Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin c ancer.

【図面の簡単な説明】

【０３７２】

【図１】IgE領域を示す図である。

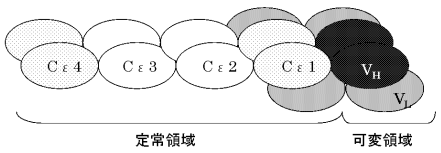
【図２】pH2.2、pH3.2、pH4.2における基準およびペプシン処理TNF3EのELISAを示す図である。

【図３】実験の設定を示す図である。

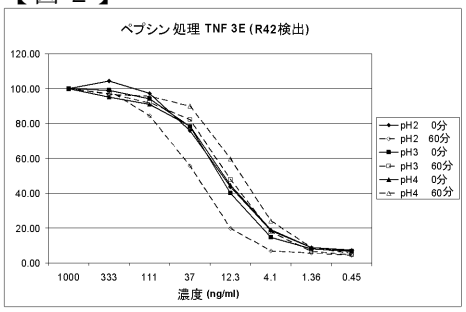
【図４】ヒトのMMP12の触媒ドメインのタンパク質分解活性へのVHHクローンの阻害能を示

す図である。
【図５】ラマの血清におけるA431特異的抗体力価を検出するELISAを示す図である。
【図６－１】ラマの血清におけるEGFR特異的抗体力価の検出を示す図である。
【図６－２】ラマの血清におけるEGFR特異的抗体力価の検出を示す図である。
【図７】ラマ024および025およびラマ026および027の血清におけるEGFR特異的抗体力価の検出を示す図である。
【図８】EGFRに対するファージの応答を示す図である。
【図９－１】エピトープ特異的溶出選択手法によって同定されたクローン31個のアミノ酸のアラインメントを示す図である。
【図９－２】エピトープ特異的溶出選択手法によって同定されたクローン31個のアミノ酸のアラインメントを示す図である。
【図１０】エピトープ特異的溶出選択手順によって同定されたユニークなEGFR特異的クローン20個の細胞上（パネルＡ）または固相固定EGFR（パネルＢ）上のファージELISAを示す図である。
【図１１－１】レセプターの内部移行作用およびシグナリングに対するナノボディEGFR-1la42の作用を示す図である。
【図１１－２】レセプターの内部移行作用およびシグナリングに対するナノボディEGFR-1la42の作用を示す図である。
【図１２】治療タンパク質、毒性化合物、薬剤またはポリヌクレオチドを送達するための内部移行レセプターに対するVHHの使用を示す図である。

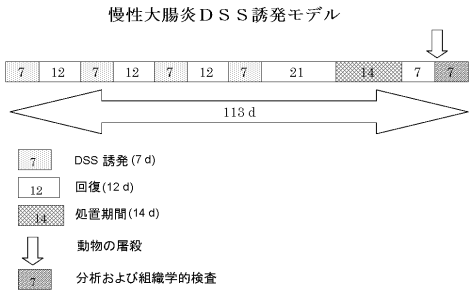
【図１】



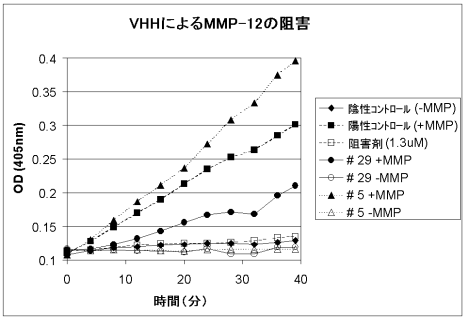
【図２】



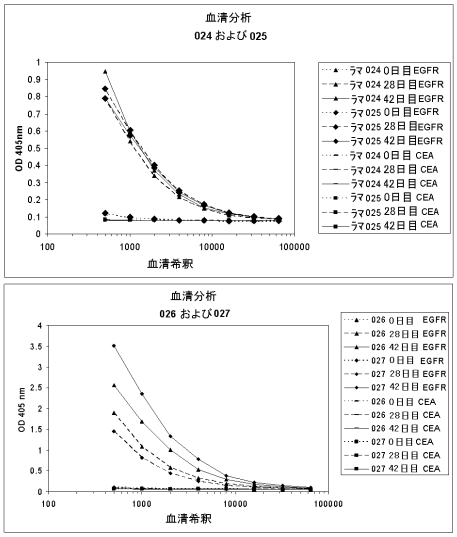
【図３】



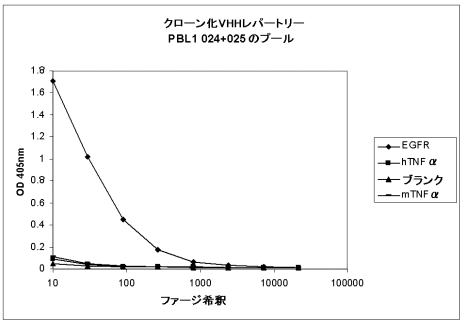
【図４】



【図７】



【図８】



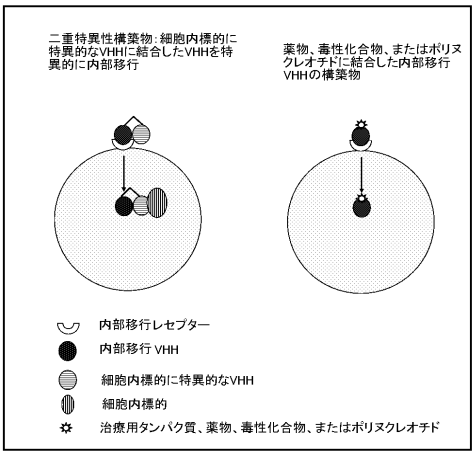
【図９－１】

```
        <   FR1                          > CDR1  <   FR2       > CDR2
1.33   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SHYMS WFRQAPGKEREFVA AITSSSRTYTTESVKG
3.14   AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SHYMS WFRQAPGKEREFVA AITSSSRTYTTESVKG
2.34   QVKLEESGGGLVQPGDSLRLSCAASGFTFS SHYMS WFRQAPGKEREFVA AITSSSRTYTTESVKG
1.4    EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS NYVMG WFRQAPGKERDFVV GIGRSGGDNTYYADSVKG
Ia9    QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS NYVMG WFRQAPGKERDFVV GIGRSGGDNTYYADSVKG
2.20   EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFS SYAMA WFRQAPGKEREFVA AISWGGGSTTYAVSVKG
IIIa6  EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFS SYAMA WFRQAPGKEREFVA AISWGGGSTTYAVSVKG
Ia26   QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCAASGRGFS NYAMG WFRQAPGQDREFVA TISWTNSTDYADSVKG
IIIa42 EVQLVESGGGSVQAGGSLKLSCAASGRSFS TYAMG WFRQAPGQDREFVA TISWTDSTDYADSVKG
Ia33   QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTASGRRFS TYAVG WFRQAPGQDREFVA TISWTNSTDYADSVKG
3.1    EVQLVESGGGSVQAGGSLKLSCTASGRRFS TYAVG WFRQAPGQDREFVA TISWTNSTDYADSVKG
Ia1    QVQLQESGGGLVQAGGSLLLSCAASGRTFS SYAMG WFRQAPGKEREFVA AINWSGGSTSYADSVKG
Ia21   QVQLQESGGGLVQAGGSLLLSCAASGRTFS SYAMG WFRQAPGKEREFVA AINWSGGSTSYADSVKG
IIIa3  QVQLQESGGGLVQAGGSLLLSCAASGRTFS SYAMG WFRQAPGKEREFVA AINWSGGSTSYADSVKG
1.9    QVQLQESGGGLVKAGGSLRLSCAASGRTFS SYVMG WFRQAPGKEREFVG AIHWSGGRTYYADSVKG
1.34   QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS KYAMG WFRQAPGKEREFVS AISWSDGSTTYADSVKG
Ia10   QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS KYAMG WFRQAPGKEREFVS AISWSDGSTTYADSVKG
2.6    QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS NYAMG WFRQAPGKEREFVA AINWGGGNTTYADSVKG
3.34   QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS SYAIG WFRQAPGKEREFVA AISWGGSNTTYYADSVKG
1.38   QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFG GYAMG WFRQAPGKEREFVA AISWSGGSTTYYADSLKG
3.32   QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS GYAMG WFRQAPGKEREFVA AISWRGTSTTYGDSAKG
4.43   QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS GYAMG WFRQAPGKEREFVA AISWRGTSTTYGDSAKG
Ia15   QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFS SYAMG WFRQAPGKEREFVA AIGLNTTYADSVKG
Ia7    QVQLQESGGRLVQTGGSLRLSCAASGGTFG TYALG WFRQAPGKEREFVA AISRFGSTTYYADSVKG
3.39   QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRYIM G     WFRQAPGKEREFVA GISRSGASTAYADSVKD
3.40   QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCASGLTFS NYAMA WFRQAPGKEREFVA TISQRGGMRHYLDSVKD
4.22   QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFS INAMG WYRQAPGKQRELVA RITGTGTGITGAVSTNYADSVKG
4.11   QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFS SITMG WFRQAPGKERQFVS AINSNGNRYYADSVKG
4.21   EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFS SMG   WFRQAPGKEREFVA TINLSGDRTDYADSVKG
IIIa5  EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTFS SYAMG WFRQTPGKEREFVA AITSSGGSTTYADSVKG
3.18   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFA DYAMS WVRQAPGKGLQWVS SISYNGDTTTYAESMKD
```

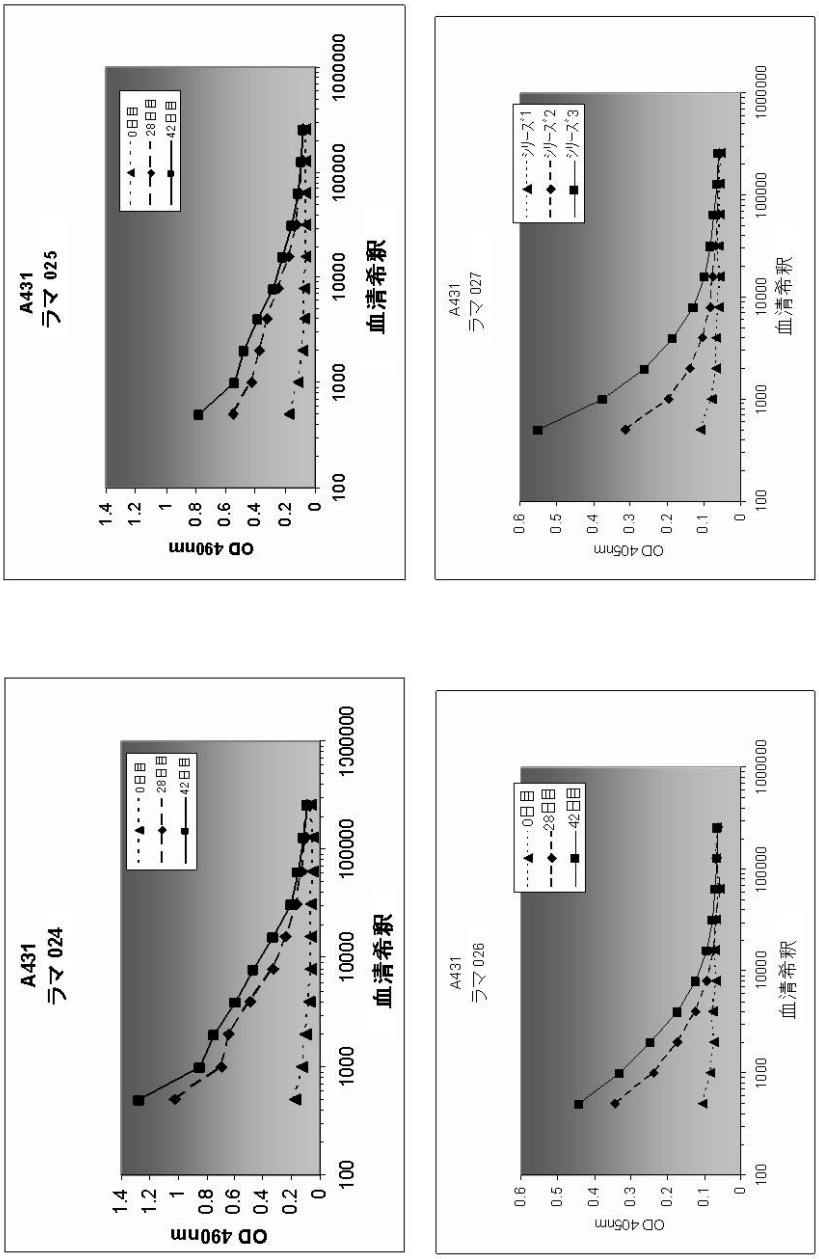
【図９－２】

```
        <   FR3                        >.CDR3                  <   FR4   >
1.33   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA DRTFYGSTWSKYDY         RGQGTQVTVSS
3.14   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAA DRTFYGSTWSKYDY         RGQGTQVTVSS
2.34   RFTISRDNAKNTVYLQMDSLKSEDTAVYYCAA DRTFYGSTWSKYDY         RGQGTQVTVSS
1.4    RFTISWDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA STYSRDTIFTKWANYNY      WGQGTQVTVSS
Ia9    RFTISWDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA STYSRDTIFTKWANYNY      WGQGTQVTVSS
2.20   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTARYYCAA DETFHSSAYGEYEY         WGQGTQVTVSS
IIIa6  RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTARYYCAA DETFHSSAYGEYEY         WGQGTQVTVSS
Ia26   RFAISRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAA DKWASSTRSIDYDY         WGQGIQVTVSS
IIIa42 RFTISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVYYCAA  DRWASSRRNVDYDY        WGQGTQVTVSS
Ia33   RFTISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTSVYYCAA DKWSSSRRSVDYDY        WGQGTQVTVSS
3.1    RFTISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTSVYYCAA DKWSSSRRSVDYDY        WGQGTQVTVSS
Ia1    RFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAAFYCAA TYNPYSRDHYFPRMTTEYDY  WGQGTQVTVSS
Ia21   RFTISKDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAAFYCAA TYNPYSRDHYFPRMTTEYDY  WGQGTQVTVSS
IIIa3  RFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAAFYCAA TYNPYSRDHYFPRMTTEYDY  WGQGTQVTVSS
1.9    RFTISSDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SRIIYSYVNYVNPGEYDY     WGQGTQVTVSS
1.34   RFTISRDNAKNTVYLQVNSLKPEDTAVYYCAA TYLVDVWAVHVPIRPYEYDY   WGQGTQVTVSS
Ia10   RFTISRDNAKNTVYLQVNSLKPEDTAVYYCAA TYLVDVWAVHVPIRPYEYDY   WGQGTQVSVSS
2.6    RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SEWGGSDYDHDYDY         WGQGTQVTVSS
3.34   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GEVSNSDYAYEYDY         WGQGTQVTVSS
1.38   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCAA GLRPSPNYNHER-SYDY      WGQGTQVTVSS
3.32   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GSHSDYAPDYDY           WGQGTQVTVSS
4.43   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GSHSDYAPDYDY           WGQGTQVTVSS
Ia15   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA RTSGVVGGTPKRYDY        WGQGTQVTVSS
Ia7    RFTISRDNANNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAA REGVALGLRNDANY         WGQGTQVTVSS
3.39   RFTISRDSALNTVYLQMNSLKAEDTAVYFCAA ALAIRLGIPRGETEYEY      WGQGTQVTVSS
3.40   RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAA DLMYGVDRRYDY           WGRGTQVTVSS
```

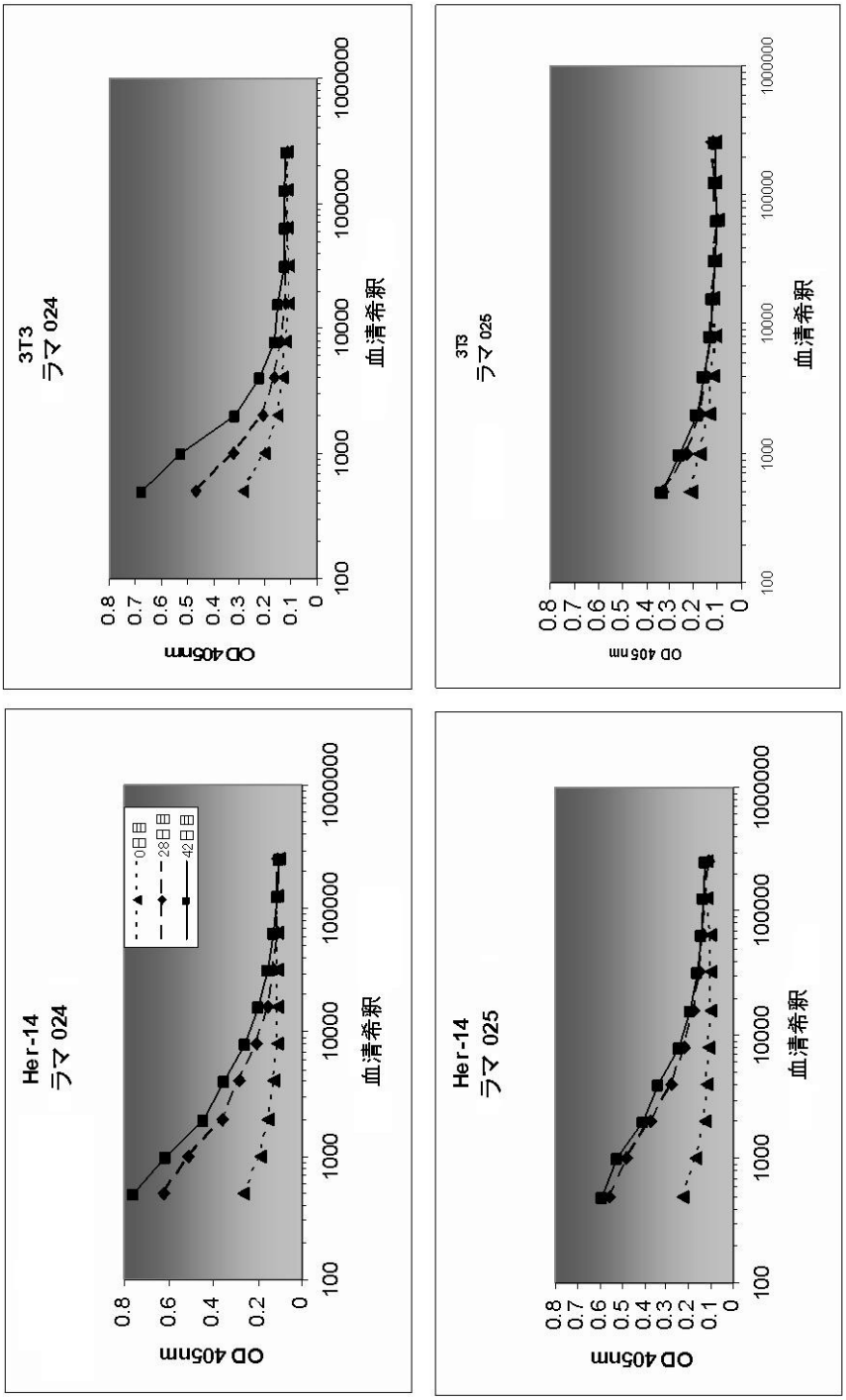
【図１２】


二重特異性構築物：細胞内標的に特異的なVHHに結合したVHHを特異的に内部移行
薬物、毒性化合物、またはポリヌクレオチドに結合した内部移行VHHの構築物
内部移行レセプター
内部移行 VHH
細胞内標的に特異的なVHH
細胞内標的
治療用タンパク質、薬物、毒性化合物、またはポリヌクレオチド

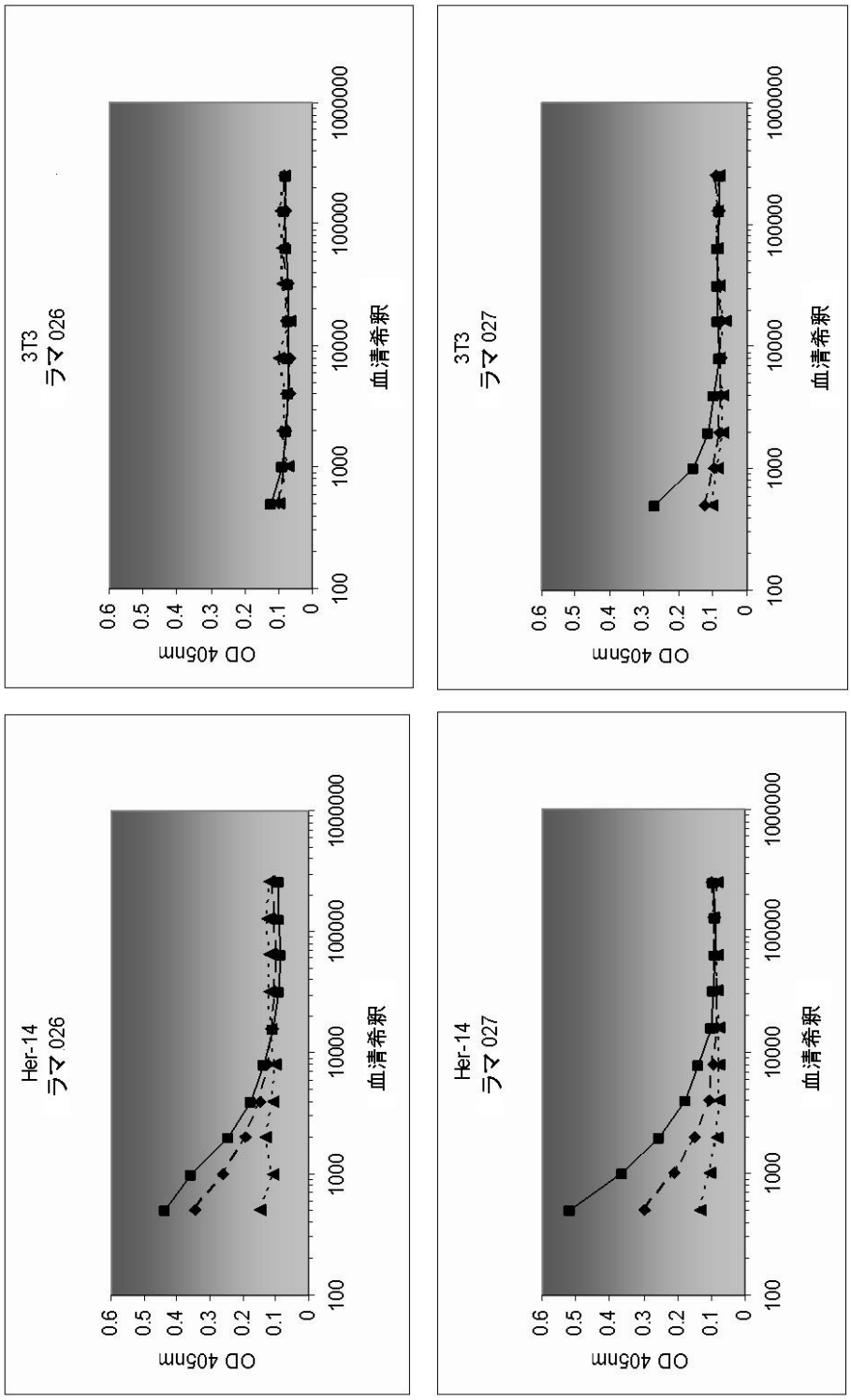
【図５】


A431
ラマ 025
0日目
28日目
42日目
OD 490nm
血清希釈
A431
ラマ 027
シリーズ1
シリーズ2
シリーズ3
OD 405nm
血清希釈
A431
ラマ 024
0日目
28日目
42日目
OD 490nm
血清希釈
A431
ラマ 026
0日目
28日目
42日目
OD 405nm
血清希釈

【図６－１】

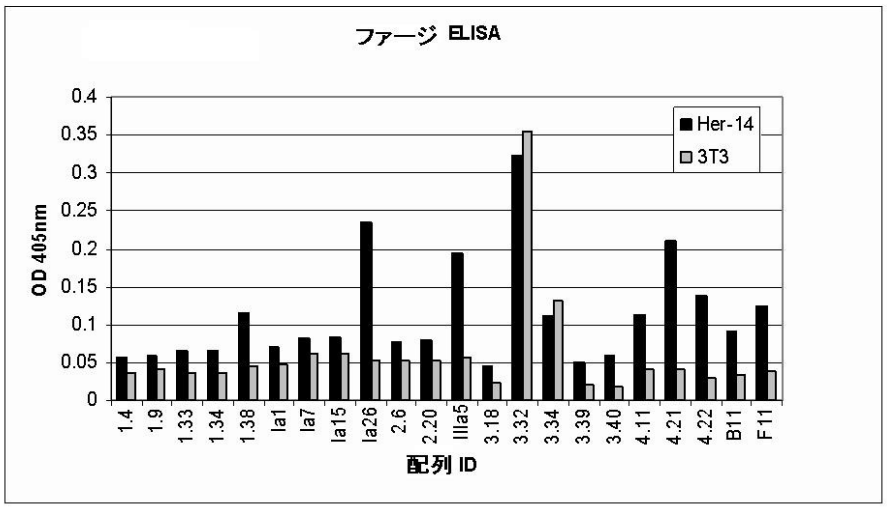

3T3
ラマ 024
3T3
ラマ 025
Her-14
ラマ 024
Her-14
ラマ 025
OD 405nm
血清希釈
0日目
28日目
42日目
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
100
1000
10000
100000
1000000

【図６－２】

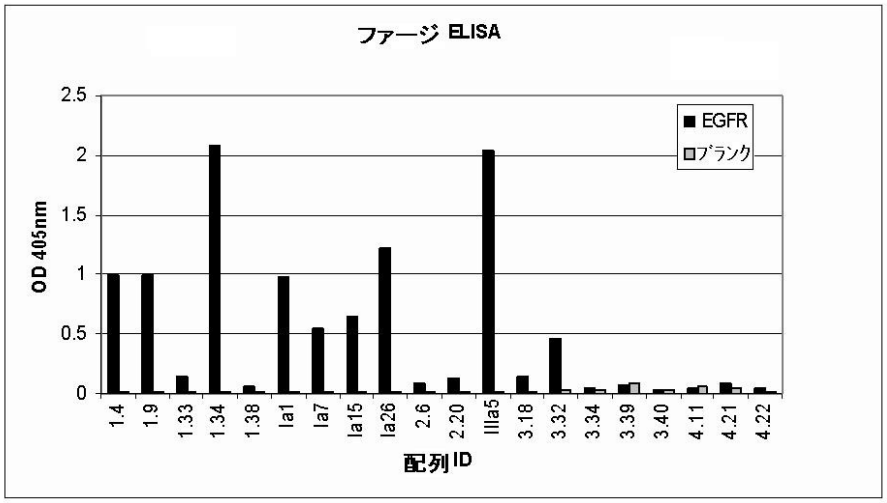

3T3
ラマ 026
OD 405nm
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
100
1000
10000
100000
1000000
血清希釈
3T3
ラマ 027
OD 405nm
血清希釈
Her-14
ラマ 026
OD 405nm
血清希釈
Her-14
ラマ 027
OD 405nm
血清希釈

【図１０】

A

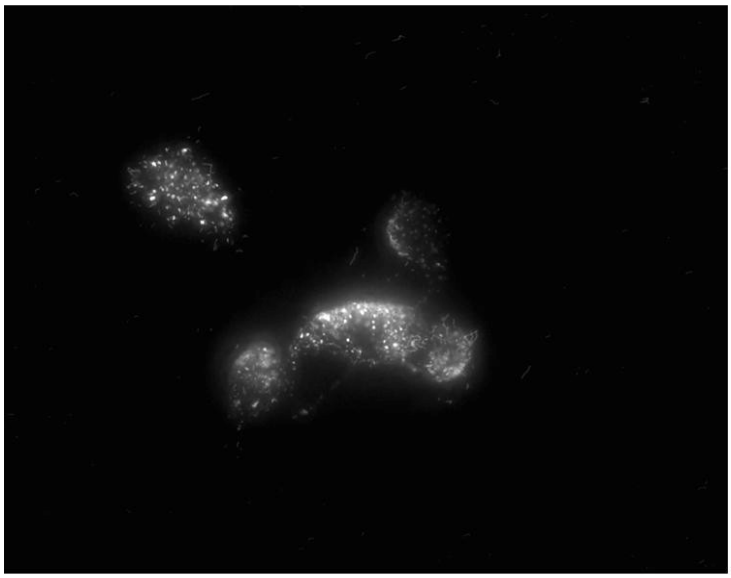

ファージ ELISA
OD 405nm
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Her-14
3T3
1.4
1.9
1.33
1.34
1.38
Ia1
Ia7
Ia15
Ia26
2.6
2.20
IIIa5
3.18
3.32
3.34
3.39
3.40
4.11
4.21
4.22
B11
F11
配列 ID

B


ファージ ELISA
OD 405nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
EGFR
ブランク
1.4
1.9
1.33
1.34
1.38
Ia1
Ia7
Ia15
Ia26
2.6
2.20
IIIa5
3.18
3.32
3.34
3.39
3.40
4.11
4.21
4.22
配列ID

【図１１－１】

A

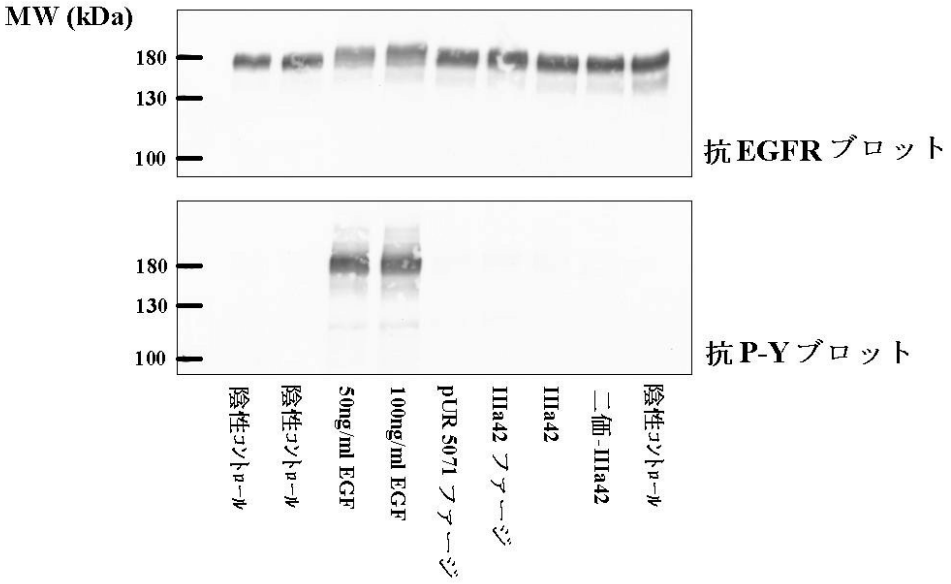


B



【図１１－２】

C



【配列表】

2006519763000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/BE 03/00190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/42 C07K16/24 C07K16/30 C07K16/12 C07K16/10
C07K16/40 C07K16/28 C12N15/13 A61K39/395 A61P11/06
A61P35/00 A61P31/06 A61P31/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, GENSEQ, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 589 840 A (CIBA GEIGY AG ;TANOX BIOSYSTEMS INC (US)) 30 March 1994 (1994-03-30)	1,6-24, 33,34
Y	page 5, lines 4-16	1-24,33, 34,58-63
X	US 2002/054878 A1 (LOWE JOHN ET AL) 9 May 2002 (2002-05-09) claims 8-31	1,6-24, 33,34
Y	examples 2-4	1-24,33, 34,58-63
X	WO 91/02078 A (PEPTIDE TECHNOLOGY LTD) 21 February 1991 (1991-02-21) page 4, lines 15-24	11-25, 59,60,63
Y		11-25, 58,61

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 June 2004

Date of mailing of the international search report
01 07 2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL – 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
ALCONADA RODRIGUEZ

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/BE 03/00190

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MUYLDERMANS S: "SINGLE DOMAIN CAMEL ANTIBODIES: CURRENT STATUS" REVIEWS IN MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 74, no. 4, June 2001 (2001-06), pages 277-302, XP001057480 ISSN: 1389-0352 table 1	1-24,33, 34,58-63
Y	VALLE E ET AL: "Infliximab" EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY, ASHLEY, LONDON,, GB, vol. 2, June 2001 (2001-06), pages 1015-1025, XP002965315 ISSN: 1465-6566 the whole document	11-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BE 03/001 90

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 11-18, 25-39 and 49-57 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [X] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-24 and 58-63 (in part) and 25-26, 33, 34 (complete)

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ BE 03/00190

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 11-18, 25-39 and 49-57 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

International Application No. PCT/ BE 03/ 00190

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24 and 58-63 (in part) and 33, 34 (complete)

A camelidae VHH single domain antibody directed against IgE, in particular, the polypeptides represented by any of SEQ ID NO:1-11; a nucleic acid encoding for said VHH, use of the antibody for the preparation of a medicament for treating or alleviating disorders relating to inflammatory regions, a method for delivering an anti-target compound to a subject by administering the anti-IgE VHH antibodies, the anti-IgE antibodies for use in the treatment of an allergic response, the camelidae VHH anti-IgE which is humanised and the camelidae VHH anti-IgE in a composition togehter with a pharmaceutical carrier.

---

2. claims: 11-24 and 58-63 (in part) and 25-26 (complete)

As invention 1 but relating to an anti-TNF-alpha camelidae VHH antibody (SEQ ID NO:12-14) and the uses thereof for the treatment of inflammation.

---

3. claims: 11-24 and 58-63 (in part) and 27 (complete)

As invention 1 but relating to an anti-CEA camelidae VHH antibody and the uses thereof for the treatment of colon cancer.

---

4. claims: 11-24 and 49-63 (in part) and 28, 29, 40-44 (complete)

As invention 1 but relating to a single domain antibody directed an internalising cellular receptor, in particular the anti-EGF recetpr camelidae VHH antibody (SEQ ID NO:23-44) and the uses thereof for the treatment of head, neck, lung and colon cancer.

---

5. claims: 11-24, 39 and 58-63 (in part) and 30 (complete)

As invention 1 but relating to single domain antibodies against an antigen of Helicobacter pylori and the uses thereof for the treatment of indigestion and gastritis.

---

6. claims: 11-24, 39 and 58-63 (in part) and 31 (complete)

As invention 1 but relating to single domain antibodies against an antigen of Mycobacterium tuberculosis and the uses thereof for the treatment of tuberculosis.

International Application No. PCT/ BE 03/00190

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 11-24, 39 and 58-63 (in part) and 32 (complete)

As invention 1 but relating to single domain antibodies against an antigen of the influenza virus and the uses thereof for the treatment of flu.

---

8. claims: 11-24 and 58-63 (in part) and 35-36 (complete)

As invention 1 but relating to an anti-MMP camelidae VHH antibody (SEQ ID NO:15-22) and the uses thereof for the treatment of cancer.

---

9. claims: 11-24 and 58-63 (in part) and 37-38 (complete)

As invention 1 but relating to an anti-IFN-gamma camelidae VHH antibody (SEQ ID NO:45-70) and the uses thereof for the treatment of cancer, transplant rejection and an auto immune disorder.

---

10. claims: 11-24 and 58-63 (in part) and 45, 46 (complete)

As invention 1 but relating to an anti-PDK camelidae VHH antibody and the uses thereof for the treatment of cancer.

---

11. claims: 11-24 and 58-63 (in part) and 47, 48 (complete)

As invention 1 but relating to single domain antibodies against GSK1, Bad, caspase and Forkhead and the uses thereof for the treatment of cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In tional Application No
PCT/BE 03/00190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0589840 A	30-03-1994	AT 264388 T	15-04-2004
		AU 675449 B2	06-02-1997
		AU 4748893 A	31-03-1994
		CA 2106719 A1	25-03-1994
		CN 1428352 A	09-07-2003
		CN 1088986 A ,B	06-07-1994
		DE 69333484 D1	19-05-2004
		EP 0589840 A1	30-03-1994
		FI 934145 A	25-03-1994
		FI 20040696 A	19-05-2004
		JP 6225788 A	16-08-1994
		MX 9305920 A1	31-05-1994
		NO 933394 A	25-03-1994
		NZ 248743 A	27-04-1995
		SG 49856 A1	19-03-2002
		ZA 9307033 A	11-08-1994
		US 6066718 A	23-05-2000
		US 5958708 A	28-09-1999
		US 6072035 A	06-06-2000
US 2002054878 A1	09-05-2002	US 6290957 B1	18-09-2001
		US 5994511 A	30-11-1999
		US 2003149244 A1	07-08-2003
		AT 253116 T	15-11-2003
		AU 741115 B2	22-11-2001
		AU 8270198 A	25-01-1999
		CA 2295540 A1	14-01-1999
		CN 1268176 T	27-09-2000
		DE 69819332 D1	04-12-2003
		DK 996728 T3	23-02-2004
		EP 0996728 A2	03-05-2000
		HU 0002474 A2	28-10-2000
		JP 2002510211 T	02-04-2002
		NO 996551 A	01-03-2000
		NZ 501842 A	01-02-2002
		PL 338030 A1	25-09-2000
		PT 996728 T	31-03-2004
		SK 187599 A3	06-08-2001
		TR 200000206 T2	21-07-2000
		WO 9901556 A2	14-01-1999
		ZA 9805500 A	24-12-1999
WO 9102078 A	21-02-1991	AU 640400 B2	26-08-1993
		AU 6145490 A	11-03-1991
		WO 9102078 A1	21-02-1991
		EP 0486526 A1	27-05-1992
		CA 2064915 A1	08-02-1991
		DE 69027121 D1	27-06-1996
		DE 69027121 T2	14-11-1996
		DK 486526 T3	24-06-1996
		JP 3443119 B2	02-09-2003
		JP 2003096096 A	03-04-2003
		JP 2003231699 A	19-08-2003
		US 2003162948 A1	28-08-2003
		US 2003232970 A1	18-12-2003
		US 2004002588 A1	01-01-2004
		US 2003171553 A1	11-09-2003
		US 2003166874 A1	04-09-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int ional Application No
PCT/BE 03/00190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9102078 A		US 2003216552 A1	20-11-2003
		US 2004002589 A1	01-01-2004
		US 2003208047 A1	06-11-2003
		US 5644034 A	01-07-1997
		US 2003171554 A1	11-09-2003
		US 2003171555 A1	11-09-2003
		US 2004002590 A1	01-01-2004
		US 2004092721 A1	13-05-2004
		US 2003225254 A1	04-12-2003
		US 6416757 B1	09-07-2002
		US 2003232971 A1	18-12-2003
		US 6593458 B1	15-07-2003
		US 2001018507 A1	30-08-2001
		US 2001023287 A1	20-09-2001
		US 2001018508 A1	30-08-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00	
A61P 1/14	***(2006.01)***	A61P	1/14	
A61P 1/04	***(2006.01)***	A61P	1/04	
A61P 11/00	***(2006.01)***	A61P	11/00	
A61P 31/16	***(2006.01)***	A61P	31/16	
A61P 37/08	***(2006.01)***	A61P	37/08	
A61P 37/06	***(2006.01)***	A61P	37/06	
A61P 37/02	***(2006.01)***	A61P	37/02	
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395 N	
		A61K	39/395 T	
		A61K	39/395 R	
		A61K	39/395 S	

(31)優先権主張番号 PCT/EP03/06581
(32)優先日 平成15年6月23日(2003.6.23)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 PCT/EP03/07313
(32)優先日 平成15年7月8日(2003.7.8)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バエック，マルク
ベルギー，ベー－１９８１ ホフスターデ，ニーウストラート ３７
(72)発明者 ヴァン ベルゲン エン ヘネゴウウェン，パウル ペー．，エム．，ペー．
オランダ，エンエル－３５８４ ヘーエー ウートレヒト，ルイス ボウメーシュテルラーン １２７

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA58 DA02 EA04 GA11 HA01 HA03
4C084 AA01 AA02 AA07 BA02 BA22 BA23 CA17 CA18 MA52 MA56
MA57 MA59 MA60 MA63 NA03 NA05 NA14 ZA59 ZA66 ZB07
ZB08 ZB11 ZB26 ZB33
4C085 AA16 BA07 BA09 BA51 BB01 BB06 BB17 BB22 BB35 EE01
GG06 GG08 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA22 FA72 FA74