

(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2008-519813

(P2008-519813A)

(43) 公表日 平成20年6月12日(2008.6.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-540709 (P2007-540709)	(71) 出願人	502197046
(86) (22) 出願日	平成17年11月10日 (2005.11.10)		ドマンティス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月6日 (2007.7.6)		イギリス国 ティーダブリュ8 9ジーエ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2005/004319		ス ミドルセックス, プレントフォード,
(87) 国際公開番号	W02006/051288		グレート ウェスト ロード 980
(87) 国際公開日	平成18年5月18日 (2006.5.18)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	10/985,847		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成16年11月10日 (2004.11.10)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内因性化合物を増強するリガンド

(57) 【要約】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分(例えば、dAb)を含むが、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しないリガンドに関する。好ましくは、このリガンドは内因性標的化合物の活性部位に結合しない。本発明は、該リガンドが結合する内因性標的化合物の半減期、生物学的利用能、活性または量を増加させるための医薬の製造のためのそのようなリガンドの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における内因性標的化合物の量を増加させるための医薬の製造のための、該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用。

【請求項 2】

被験体における内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させるための医薬の製造のための、該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用。

【請求項 3】

内因性標的化合物の *in vivo*での半減期を増加させるための医薬の製造のための、該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用。

【請求項 4】

投与部位での内因性標的化合物の量を増加させる局所投与のための医薬の製造のための、該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用。

【請求項 5】

前記医薬の投与の約4時間後の前記被験体における内因性標的リガンドの量が、該医薬の投与前の量と比較して、少なくとも1.5倍増加する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

前記医薬の投与の約4時間後の前記被験体における内因性標的リガンドの量が、該医薬の投与前の量と比較して、少なくとも10倍増加する、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記リガンドが前記内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の *in vivo*での半減期を少なくとも1.5倍増加させる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

前記リガンドが前記内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の *in vivo*での半減期を少なくとも10倍増加させる、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記リガンドが前記内因性標的化合物の活性を約10%以下阻害する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 10】

前記リガンドの阻害濃度50(IC50)が少なくとも1 μ Mである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 11】

前記リガンドが前記内因性標的化合物に結合するが、該内因性標的化合物の活性部位には結合しない、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 12】

前記リガンドが内因性標的への結合部位を有する2コピー以上の前記部分を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

前記リガンドが内因性標的への結合部位を有する前記部分のダイマーである、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、アフィポディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群より選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 16】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、免疫グロブリン単一可変ドメインからなる群より選択される抗体フラグメントである、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、免疫グロブリン単一可変ドメインである、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインがヒトV_HおよびヒトV_Lからなる群より選択される、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記リガンドが半減期延長部分をさらに含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 20】

前記半減期延長部分が、ポリアルキレングリコール部分、血清アルブミンもしくはその断片、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、またはin vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

前記半減期延長部分が、in vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を有する抗体または抗体フラグメントである、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

前記抗体または抗体フラグメントがdAbである、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記半減期延長部分が、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群より選択される、in vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分である、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 24】

in vivoでの半減期を増強するポリペプチドが、血清アルブミンまたは新生児のFc受容体である、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 25】

前記半減期延長部分がポリエチレングリコール部分である、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 26】

前記医薬が実質的に非免疫原性である、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 27】

前記医薬がデポー製剤である、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 28】

前記内因性標的化合物が、可溶性サイトカイン受容体、内因性受容体アンタゴニスト、酵素、サイトカイン、増殖因子、およびホルモンからなる群より選択される、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 29】

前記内因性標的化合物が可溶性サイトカイン受容体である、請求項 28 に記載の使用。

【請求項 30】

前記可溶性サイトカイン受容体が可溶性TNFR1である、請求項 28 に記載の使用。

【請求項 31】

内因性標的化合物への結合部位を有する部分が、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdで該内因性標的化合物に結合する、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の使用。

10

20

30

40

50

- 【請求項 3 2】
前記リガンドが、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdで前記内因性標的化合物に結合する、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の使用。
- 【請求項 3 3】
内因性標的の活性を増加させるための医薬の製造のための、該内因性標的に結合し、内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用。
- 【請求項 3 4】
前記リガンドが前記内因性標的化合物の活性部位に結合しない、請求項 3 3 に記載の使用。 10
- 【請求項 3 5】
前記リガンドが、前記内因性標的化合物の活性を約10%以下阻害する、請求項 3 3 または 3 4 に記載の使用。
- 【請求項 3 6】
前記リガンドの阻害濃度50(IC50)が少なくとも $1 \mu M$ である、請求項 3 3 または 3 4 に記載の使用。
- 【請求項 3 7】
前記リガンドが前記内因性標的への結合部位を有する2個以上の部分を含む、請求項 3 3 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の使用。
- 【請求項 3 8】 20
前記リガンドが内因性標的への結合部位を有する2コピー以上の前記部分を含む、請求項 3 3 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の使用。
- 【請求項 3 9】
前記リガンドが内因性標的への結合部位を有する前記部分のダイマーである、請求項 3 8 に記載の使用。
- 【請求項 4 0】
内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群より選択される、請求項 3 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の使用。
- 【請求項 4 1】 30
内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が抗体または抗体フラグメントである、請求項 3 3 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の使用。
- 【請求項 4 2】
内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、免疫グロブリン単一可変ドメインからなる群より選択される抗体フラグメントである、請求項 4 1 に記載の使用。
- 【請求項 4 3】
内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が免疫グロブリン単一可変ドメインである、請求項 4 2 に記載の使用。 40
- 【請求項 4 4】
前記免疫グロブリン単一可変ドメインがヒトV_HおよびヒトV_Lからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の使用。
- 【請求項 4 5】
前記リガンドが半減期延長部分をさらに含む、請求項 3 3 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の使用。
- 【請求項 4 6】
前記半減期延長部分が、ポリアルキレングリコール部分、血清アルブミンもしくはその断片、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、またはin vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分である、請求項 4 5 に記載の 50

使用。

【請求項 4 7】

前記半減期延長部分が、*in vivo*での半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を有する抗体または抗体フラグメントである、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記抗体または抗体フラグメントがdAbである、請求項 4 7 に記載の使用。

【請求項 4 9】

前記半減期延長部分が、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアピマーからなる群より選択される、*in vivo*での半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分である、請求項 4 6 に記載の使用。

10

【請求項 5 0】

*in vivo*での半減期を増強するポリペプチドが、血清アルブミンまたは新生児のFc受容体である、請求項 4 7 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5 1】

前記半減期延長部分がポリエチレングリコール部分である、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 5 2】

前記医薬が実質的に非免疫原性である、請求項 3 3 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の使用

【請求項 5 3】

前記医薬がデポ製剤である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 5 4】

前記内因性標的化合物が、可溶性サイトカイン受容体、内因性受容体アンタゴニスト、酵素、サイトカイン、増殖因子、およびホルモンからなる群より選択される、請求項 3 3 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5 5】

前記内因性標的化合物が可溶性サイトカイン受容体である、請求項 5 4 に記載の使用。

【請求項 5 6】

前記可溶性サイトカイン受容体が可溶性TNFR1である、請求項 5 5 に記載の使用。

【請求項 5 7】

内因性標的化合物への結合部位を有する部分が、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdで該内因性標的化合物に結合する、請求項 3 3 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 5 8】

前記リガンドが、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdで前記内因性標的化合物に結合する、請求項 3 3 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5 9】

内因性標的化合物の結合活性を増加させるための医薬の製造のための、内因性標的に結合し、該内因性標的の活性部位に結合せず、および該内因性標的化合物の結合活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物への結合部位を有する2個以上の部分を含むリガンドの使用。

【請求項 6 0】

前記リガンドが内因性標的への結合部位を有する2コピーの部分を含む、請求項 5 9 に記載の使用。

40

【請求項 6 1】

前記リガンドが内因性標的への結合部位を有する前記部分のダイマーである、請求項 6 1 に記載の使用。

【請求項 6 2】

前記結合活性が少なくとも10の係数により増加する、請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6 3】

前記内因性標的化合物が可溶性サイトカイン受容体である、請求項 5 9 ~ 6 3 のいずれ

50

か 1 項に記載の使用。

【請求項 6 4】

前記可溶性サイトカイン受容体が可溶性TNFR1であり、内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分がドメイン1およびドメイン4からなる群より選択されるTNFR1のドメインに独立に結合する、請求項 6 4 に記載の使用。

【請求項 6 5】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群より選択される、請求項 5 9 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6 6】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が抗体または抗体フラグメントである、請求項 5 9 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6 7】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、免疫グロブリン単一可変ドメインからなる群より選択される抗体フラグメントである、請求項 6 6 に記載の使用。

【請求項 6 8】

内因性標的化合物への結合部位を有する前記部分が免疫グロブリン単一可変ドメインである、請求項 6 7 に記載の使用。

【請求項 6 9】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインがヒトV_HおよびヒトV_Lからなる群より選択される、請求項 6 8 に記載の使用。

【請求項 7 0】

前記リガンドが半減期延長部分をさらに含む、請求項 5 9 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 1】

前記半減期延長部分が、ポリアルキレングリコール部分、血清アルブミンもしくはその断片、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、またはin vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分である、請求項 7 0 に記載の使用。

【請求項 7 2】

前記半減期延長部分が、in vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を有する抗体または抗体フラグメントである、請求項 7 1 に記載の使用。

【請求項 7 3】

前記抗体または抗体フラグメントがdAbである、請求項 7 2 に記載の使用。

【請求項 7 4】

前記半減期延長部分が、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群より選択される、in vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分である、請求項 7 1 に記載の使用。

【請求項 7 5】

in vivoでの半減期を増強するポリペプチドが、血清アルブミンまたは新生児のFc受容体である、請求項 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 6】

前記半減期延長部分がポリエチレングリコール部分である、請求項 7 1 に記載の使用。

【請求項 7 7】

前記医薬が実質的に非免疫原性である、請求項 5 9 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 8】

前記医薬がデポー製剤である、請求項 5 9 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 79】

内因性標的化合物への結合部位を有する部分が、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdで該内因性標的化合物に結合する、請求項 59 ~ 78 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 80】

前記リガンドが、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdで前記内因性標的化合物に結合する、請求項 59 ~ 78 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 81】

被験体における疾患を治療するのに好適な活性を有する内因性標的化合物に結合するリガンドであって、該内因性標的化合物を用いる処理に影響を受けやすい疾患の治療における使用のための、該内因性標的化合物の活性部位に結合しないか、または該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記リガンド。

10

【請求項 82】

前記リガンドが前記内因性標的化合物の *in vivo*での半減期を増加させる、請求項 81 に記載のリガンド。

【請求項 83】

前記リガンドが被験体における前記内因性標的化合物の量を増加させる、請求項 81 または 82 に記載のリガンド。

【請求項 84】

前記リガンドが前記内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させる、請求項 81 ~ 83 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

20

【請求項 85】

前記リガンドが前記内因性化合物の結合活性を増加させる、請求項 81 ~ 84 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 86】

前記リガンドが請求項 1 ~ 80 のいずれか 1 項に記載のものである、請求項 81 ~ 85 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 87】

被験体における疾患を治療するのに好適な活性を有する内因性標的化合物に結合するリガンドであって、該内因性標的化合物の活性部位に結合しないか、または該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記リガンドと、製薬上許容し得る担体とを含む医薬組成物。

30

【請求項 88】

前記リガンドが前記内因性標的化合物の *in vivo*での半減期を増加させる、請求項 87 に記載の医薬組成物。

【請求項 89】

前記リガンドが被験体における前記内因性標的化合物の量を増加させる、請求項 87 または 88 に記載の医薬組成物。

【請求項 90】

前記リガンドが前記内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させる、請求項 87 ~ 89 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 91】

前記リガンドが前記内因性化合物の結合活性を増加させる、請求項 87 ~ 90 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 92】

前記リガンドが請求項 1 ~ 80 のいずれか 1 項に記載のものである、請求項 87 ~ 91 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 93】

請求項 87 ~ 92 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含む薬剤送達装置。

【請求項 94】

前記薬剤送達装置が、非経口送達装置、静脈内送達装置、筋肉内送達装置、腹腔内送達

50

装置、経皮送達装置、経肺送達装置、動脈内送達装置、鞘内送達装置、関節内送達装置、皮下送達装置、鼻内送達装置、経腔送達装置、および直腸送達装置からなる群より選択される、請求項 9 3 に記載の薬剤送達装置。

【請求項 9 5】

前記装置が、シリンジ、経皮送達装置、カプセル、錠剤、ネブライザー、吸入器、アトマイザー、エアロゾル噴霧装置、マイスター、乾燥粉末吸入器、定量噴霧式吸入器、定量噴霧式スプレー装置、定量噴霧式マイスター、定量噴霧式アトマイザー、カテーテルからなる群より選択される、請求項 9 4 に記載の薬剤送達装置。

【請求項 9 6】

内因性標的化合物の半減期、生物学的利用能または活性を増加させるための、該内因性標的化合物への結合部位を有する結合部分を含むリガンドであって、内因性化合物への結合部位を有する結合部分が該内因性化合物またはその一部もしくは変異体であり、かつ該リガンドが該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、前記リガンドの使用。

10

【請求項 9 7】

前記内因性化合物が、TNF受容体スーパーファミリーのメンバーである可溶性受容体である、請求項 9 6 に記載の使用。

【請求項 9 8】

TNF受容体スーパーファミリーのメンバーの半減期、生物学的利用能または活性を増加させるための、該TNF受容体スーパーファミリーのメンバーへの結合部位を有する結合部分を含むリガンドであって、該リガンドが該TNF受容体スーパーファミリーのメンバーに結合し、該TNF受容体スーパーファミリーのメンバーの活性を実質的に阻害せず、かつ該TNF受容体スーパーファミリーのメンバーへの結合部位を有する該結合部分がプレリガンド集合ドメイン(PLAD)もしくはその変異体である、前記リガンドの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、内因性化合物を増強するリガンドに関する。

【0002】

関連出願

本出願は、2004年11月10日に提出された米国特許出願第10/985,847号の一部継続出願であり、その教示全体は参照により本明細書に組み入れられるものとする。

30

【背景技術】

【0003】

発明の背景

哺乳動物、およびヒトなどの動物は、その動物の正常な健康および生理を維持するのに助ける活性を有する様々な内因性化合物を産生する。そのような化合物は、止血、免疫機能、代謝、細胞の増殖および分化の調節などの多くの生理学的プロセスに参与している。多くの内因性化合物が単離されており、その合成または組換え形態を作製し、疾患と戦うために患者に投与することができる。現在の治療手法は、外因性の形態または外因的に産生された形態の内因性化合物を患者に投与することを含むことが多い。そのような治療手法は、通常投与される高用量に起因する望ましくない作用をもたらし得るし、組換え形態のヒトタンパク質などの特定の薬剤は、一般的には、細菌または酵母系における発現よりも高価であり、より低い収率をもたらす哺乳動物細胞における発現により産生しなければならない。

40

【0004】

これらの問題を、治療効果をもたらすための内因性化合物の有益な活性を生かし、引き出すことができる薬剤および方法の開発により克服することができる。そのような薬剤および方法の必要性が存在する。

【発明の開示】

50

【0005】

発明の概要

本発明は、医薬の製造のための、内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドであって、該リガンドが該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記リガンドの使用に関する。前記リガンドは前記内因性標的化合物の活性部位に結合しないのが好ましい。

【0006】

前記医薬は、被験体における内因性標的化合物の量を増加させるためのもの、被験体における内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させるためのもの、内因性標的化合物の *in vivo*における半減期を増加させるためのものであってよい。また、前記医薬は内因性標的化合物の活性(例えば、結合活性)を増加させるためのものであってよい。前記医薬は、局所または全身送達のためのものであってよい。

10

【0007】

いくつかの実施形態においては、医薬の投与の約4時間後の被験体における内因性標的リガンドの量は、該医薬の投与前の量と比較して、少なくとも1.5倍増加する。いくつかの実施形態においては、内因性標的化合物の *in vivo*での半減期は、該医薬の投与後に少なくとも1.5倍増加する。

【0008】

一般的には、前記リガンドは、前記内因性標的化合物の活性を約10%以下阻害するか、または少なくとも1 μ Mの阻害濃度50(IC50)を有する。

20

【0009】

前記リガンドは、内因性標的への結合部位を有する2個以上のコピーの前記部分を含んでもよい。例えば、前記リガンドは、dAbダイマーなどの内因性標的への結合部位を有する部分のダイマーであってよい。

【0010】

内因性標的化合物への結合部位を有する部分は、アフィボディ(affibody)、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、アビマー(avimer)、抗体または抗体フラグメント(例えば、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ(diabody)、免疫グロブリン単一可変ドメイン(例えば、ヒトV_H、およびヒトV_L、V_{HH}))であってよい。

30

【0011】

必要に応じて、前記リガンドはさらに、本明細書に記載の半減期延長部分を含んでもよい。例えば、前記リガンドは、ポリアルキレングリコール部分、血清アルブミンもしくはそのフラグメント、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、または *in vivo*での半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分からなる群より選択される半減期延長部分を含んでもよい。 *in vivo*で半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む好適な部分としては、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、アビマー、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、および免疫グロブリン単一可変ドメイン(例えば、ヒトV_H、ヒトV_L、V_{HH})などの抗体もしくは抗体フラグメントが挙げられる。

40

【0012】

本発明の医薬およびリガンドは、実質的に非免疫原性である。いくつかの実施形態においては、前記医薬はデポ製剤である。いくつかの実施形態においては、内因性標的化合物は、可溶性アゴニスト(例えば、サイトカイン、増殖因子、ホルモン)、可溶性受容体(例えば、可溶性TNFR1、可溶性TNFR2、可溶性IL-1受容体、可溶性IL-4受容体、可溶性IL-13受容体などの可溶性サイトカイン受容体)、内因性受容体アンタゴニスト(例えば、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra))または酵素である。特定の実施形態においては、内因性標的化合物は、可溶性TNFR1などの可溶性サイトカイン受容体である。好ましくは、前記

50

リガンドは、 $1 \times 10^{-7}M$ 以下のKdなどの高い親和性で前記内因性標的化合物に結合する。

【0013】

特定の実施形態においては、本発明の医薬またはリガンドは、公開された米国特許出願公開第2003/0144484号に開示された抗体、そのフラグメントまたは領域を含まない。特定の実施形態においては、本発明の医薬またはリガンドは、抗体A2またはキメラ抗体A2(cA2)のヒトTNF- α への結合を阻害しない。特定の実施形態においては、本発明の医薬またはリガンドは、ヒトTNF(腫瘍壊死因子)のアミノ酸87-108に含まれるエピトープまたはアミノ酸59-80および87-108の両方に含まれるエピトープに結合しない。これらのアミノ酸は

59-80: Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile (配列番号26);および 10

87-108: Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly (配列番号27)

である。

【0014】

本発明はまた、内因性標的の活性を増加させるための医薬であって、前記リガンドが該内因性標的に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記医薬の製造のための内因性標的化合物の使用にも関する。好ましくは、前記リガンドは、前記内因性標的化合物の活性部位に結合しない。いくつかの実施形態においては、内因性標的リガンドの結合活性が増加し、例えば、結合活性(例えば、親和性、アビディティ)を少なくとも10の係数(factor)により増加させることができる。 20

【0015】

本発明はまた、内因性標的化合物を用いる治療に影響を受ける疾患の治療における使用のための、被験体における疾患を治療するのに好適な活性を有する内因性標的化合物に結合するリガンドであって、該内因性標的化合物の活性部位に結合しないか、または該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記リガンドにも関する。

【0016】

本発明はまた、被験体における疾患を治療するのに好適な活性を有する内因性標的化合物に結合するリガンドであって、該内因性標的化合物の活性部位に結合しないか、または該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記リガンドと、製薬上許容し得る担体とを含む医薬組成物にも関する。 30

【0017】

本発明はまた、本発明の医薬組成物を含む薬剤送達装置にも関する。いくつかの実施形態においては、前記薬剤送達装置は、非経口送達装置、静脈内送達装置、筋肉内送達装置、腹腔内送達装置、経皮送達装置、経肺送達装置、動脈内送達装置、鞘内送達装置、関節内送達装置、皮下送達装置、鼻内送達装置、腔内送達装置、および直腸送達装置である。例えば、薬剤送達装置は、シリンジ、経皮送達装置、カプセル、錠剤、ネブライザー、吸入器、アトマイザー、エアロゾル噴霧装置、マイスター、乾燥粉末吸入器、定量噴霧式吸入器、定量噴霧式スプレー装置、定量噴霧式マイスター、定量噴霧式アトマイザー、カテーテルであってよい。 40

【0018】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における前記内因性標的化合物の半減期を増加させるための方法に関する。

【0019】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における前記内因性標的化合物の量を増加させるための方法に関する。

【0020】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む 50

有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における前記内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させるための方法に関する。

【0021】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における前記内因性標的化合物の活性(例えば、結合活性)を増加させるための方法に関する。

【0022】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における前記内因性標的化合物を用いた治療に影響を受ける疾患を有する該被験体を治療するための方法に関する。

10

【0023】

本発明はまた、本明細書に記載の新規リガンド(例えば、dAb)にも関する。

【0024】

図面の簡単な説明

図面の簡単な説明については別節を参照。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

発明の詳細な説明

本明細書内では、明確で簡潔な明細書を記載することを可能にする方法で実施形態を説明したが、実施形態を本発明から逸脱することなく様々に組み合わせるか、または分離することができることと意図されるものであり、またそれが理解されるであろう。

20

【0026】

本明細書で用いられる用語「リガンド」とは、所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する少なくとも1個のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質部分を含む化合物を指す。例えば、所望の内因性標的化合物への結合部位を有する部分は、所望の内因性標的化合物(例えば、可溶性受容体タンパク質、内因性受容体アンタゴニスト、サイトカインまたは増殖因子)に対する結合特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメイン(例えば、 V_H 、 V_L 、 V_{HH})であってよい。内因性標的化合物への結合部位を有する部分はまた、該部分が内因性標的化合物に対する結合特異性を有するような、好適な形式で所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインの1個以上の相補性決定領域(CDR)を含んでもよい。例えば、CDRを、アフィボディ、SpA足場、LDL受容体クラスAドメイン、もしくはEGFドメインなどの好適なタンパク質足場または骨格上に移植することができる。さらに、前記リガンドは、本明細書に記載のように一価(例えば、dAbモノマー)、二価(ホモ二価、ヘテロ二価)または多価(ホモ多価、ヘテロ多価)であってよい。かくして、「リガンド」は、dAbからなるポリペプチド、例えば、そのようなdAbから本質的になるポリペプチド、抗体形式(例えば、IgG様形式、scFv、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$)などの好適な形式のdAb(もしくはdAbのCDR)を含むポリペプチドまたはアフィボディ、SpA足場、LDL受容体クラスAドメインもしくはEGFドメインなどの好適なタンパク質足場もしくは骨格、第1の内因性標的化合物に結合するdAbおよび別の内因性標的化合物(例えば、血清アルブミン)に結合する第2のdAbを含む二重特異的リガンド、ならびに本明細書に記載の多価リガンドを含む。内因性標的化合物への結合部位を有する部分はまた、所望の標的への結合部位を含むタンパク質ドメインであってよく、例えば、タンパク質ドメインはアフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、アビマー(例えば、米国特許出願公開第2005/0053973号、第2005/0089932号、第2005/0164301号を参照)から選択される。必要に応じて、「リガンド」はさらに、各々独立にペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質部分もしくは非ペプチド性部分(例えば、ポリアルキレングリコール、脂質、炭水化物)であってよい1個以上の追加部分を含んでもよい。例えば、前記リガンドは、本明細書に記載の半減期延長部分(例えば、ポリアルキレングリコール部分、アルブミン、アルブミン断片もしくはアルブミン変異体を含む部分、トラ

30

40

50

ンスフェリン、トランスフェリン断片もしくはトランスフェリン変異体を含む部分、アルブミンに結合する部分、新生児のFc受容体に結合する部分)をさらに含んでもよい。

【0027】

本明細書で用いられる用語「内因性標的化合物」とは、目的の被験体(例えば、哺乳動物、ヒト)により産生される可溶性化合物を指す。内因性標的化合物としては、例えば、可溶性アゴニスト(例えば、サイトカイン、増殖因子、ホルモン)、可溶性受容体(例えば、可溶性TNFR1、可溶性TNFR2、可溶性IL-1受容体、可溶性IL-4受容体、可溶性IL-13受容体などの可溶性サイトカイン受容体)、内因性受容体アンタゴニスト(例えば、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra))、酵素などが挙げられる。

【0028】

本明細書で用いられる用語「活性部位」とは、内因性標的化合物の内因性結合パートナー(例えば、受容体のリガンドと接触させる受容体タンパク質の部位もしくはドメイン、アゴニストの受容体と接触させるアゴニストタンパク質(例えば、サイトカイン)の部位もしくはドメイン、酵素の触媒ドメイン)と相互作用する(例えば、結合する)内因性標的化合物(例えば、タンパク質)の部位またはドメインを指す。例えば、本明細書で用いられるような、サイトカイン、増殖因子またはホルモンなどの可溶性内因性化合物の「活性部位」は、該サイトカイン、増殖因子またはホルモンに結合する内因性受容体と接触させる該サイトカイン、増殖因子またはホルモン上の部位である。

【0029】

本明細書で用いられる「生物学的利用能」とは、内因性標的化合物もしくはリガンド-内因性標的化合物複合体が存在するか、または所望の作用部位(例えば、全身循環、中枢神経系、局所的な作用部位(例えば、特定の器官、組織の特定の領域(例えば、筋肉、皮膚)))へのアクセスを獲得する程度を指す。内因性標的化合物の生物学的利用能を、該内因性標的化合物の *in vivo*での半減期における任意の変化、または被験体中の内因性標的化合物の量における任意の変化とは関係なく増加させることができる。例えば、リガンドは、全身循環においては有益な活性を有するが、組織中に迅速に分布し、該組織への分布速度を遅延させる内因性標的化合物に結合し得る。そのようなリガンドは、内因性標的化合物の有益な活性が治療効果を有し得る全身循環における該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。

【0030】

本明細書で用いられる「結合活性」とは、互いに結合する結合パートナーの許容量を指す。例えば、その同族リガンドに結合する受容体または可溶性受容体の許容量である。結合活性を、例えば、親和性(K_d ; $K_d = K_{off} / K_{on}$)またはアビディティとして表すことができる。結合活性を、例えば、親和性を増加させること(例えば、結合の速度(K_{on})を増加させるか、もしくは解離の速度(K_{off})を減少させること)によるか、またはアビディティを増加させることにより増加させることができる。アビディティを、例えば、第1の結合パートナーと第2の結合パートナーを接触させる部位の数を増加させることにより増加させることができる。

【0031】

本明細書で用いられる語句「実質的に非免疫原性」とは、リガンドを被験体に投与した場合に、リガンド、リガンド-内因性標的化合物または内因性標的化合物に結合する高親和性抗体が産生されないことを意味する。高親和性抗体は、リガンド、リガンド-内因性標的化合物複合体または内因性標的化合物に、500 nM以下、または300 nM以下、または100 nM以下、または10 nM以下、または1 nM以下の親和性で結合する。リガンド、リガンド-内因性標的化合物複合体または内因性標的化合物に結合する抗体およびそのような抗体の親和性を、任意の好適な方法を用いて同定することができる。いくつかのそのような方法が当業界でよく知られている。例えば、血清サンプルを、リガンドを投与したヒトから取得することができ(例えば、投与の約1週間後、2週間後、3週間後、4週間後)、その血清を、例えば、ELISAまたは他の好適なアッセイを用いて、リガンド、リガンド-内因性標的化合物複合体または内因性標的化合物に結合する抗体の存在について試験することができる

10

20

30

40

50

。抗体の親和性を、平衡透析または表面プラズモン共鳴などの任意の好適な方法を用いて決定することができる。

【0032】

語句「免疫グロブリン単一可変ドメイン」とは、他のV領域もしくはドメインとは独立に抗原もしくはエピトープに特異的に結合する抗体の可変領域(V_H 、 V_{HH} 、 V_L)を指すが、しかしながら、この用語を本明細書で用いる場合、免疫グロブリン単一可変ドメインは、他の領域もしくはドメインが、単一免疫グロブリン可変ドメインによる抗原結合にとって必要ではない(すなわち、免疫グロブリン単一可変ドメインが追加の可変ドメインとは関係なく抗原に結合する)他の可変領域もしくは可変ドメインを含む形式(例えば、ホモ-もしくはヘテロ-マルチマー)で存在してもよい。「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、単離された抗体単一可変ドメインポリペプチドだけでなく、1個以上のモノマーの抗体単一可変ドメインポリペプチド配列を含むより大きいポリペプチドも包含する。「ドメイン抗体」または「dAb」は、この用語を本明細書で用いる場合、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」ポリペプチドと同じである。本明細書で用いられる免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドとは、哺乳動物、好ましくはヒトの免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドを指すが、それだけでなくげっ歯類(例えば、その内容の全体が参照により本明細書に組み入れられるものとするWO 00/29004に開示されたもの)またはラクダ科の V_H dAbも含む。ラクダ科のdAbは、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコなどの種から誘導された免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドであり、天然には軽鎖を含まない重鎖抗体： V_{HH} を含む。 V_{HH} 分子はIgG分子より約10倍小さく、単一ポリペプチドと同様、それらは非常に安定で、極端なpHおよび温度条件に抵抗性である。

10

20

【0033】

「相補的」。2個の免疫グロブリンドメインは、それらが同族の対もしくは基を形成する構造物のファミリーに属するか、またはそのようなファミリーから誘導され、この特徴を保持する場合、「相補的」である。例えば、抗体の V_H ドメインおよび V_L ドメインは相補的である；2つの V_H ドメインは相補的ではなく、2つの V_L ドメインも相補的ではない。相補的ドメインを、T細胞受容体の V および V (または)ドメインなどの免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバー中に見出すことができる。そのように遺伝子操作されない限り、エピトープに結合しないタンパク質足場に基づくドメインなどの、人工的であるドメインは非相補的である。同様に、(例えば)免疫グロブリンドメインとフィブロネクチンドメインに基づく2つのドメインは相補的ではない。

30

【0034】

「免疫グロブリンファミリー」。これは、2つの シートおよび、通常、保存されたジスルフィド結合を含む、抗体分子の免疫グロブリン折畳み特性を保持するポリペプチドのファミリーを指す。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、免疫系における幅広い役割(例えば、抗体、T細胞受容体分子など)、細胞接着における関与(例えば、ICAM分子)および細胞内シグナリング(例えば、PDGF受容体などの受容体分子)などの、in vivoでの細胞性および非細胞性相互作用の多くの態様に関与する。本発明は、結合ドメインを有する全ての免疫グロブリンスーパーファミリー分子に適用可能である。好ましくは、本発明は抗体に関する。

40

【0035】

「ドメイン」。ドメインは、タンパク質の残りと無関係にその三次構造を保持する折り畳まれたタンパク質構造である。一般的には、ドメインは、タンパク質の別個の機能特性を担い、多くの場合、該タンパク質および/またはドメインの残りの機能を失うことなく、他のタンパク質に付加、除去または導入することができる。単一抗体可変ドメインは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む折り畳まれたポリペプチドドメインを意味する。従って、それは完全な抗体可変ドメインと、例えば、1個以上のループが、抗体可変ドメイン、またはトランケートされたか、もしくはNもしくはC末端伸長部を含む抗体可変ドメイン、ならびに少なくとも部分的には完全長ドメインの結合活性および特異性を保持する可変ドメインの折り畳まれた断片に特徴的ではない配列により置換された、改変された可

50

変ドメインとを含む。

【0036】

「レパートリー」。多様な変異体、例えば、その一次配列において異なるポリペプチド変異体の集合体である。本発明において用いられるライブラリーは、少なくとも1000個のメンバーを含むポリペプチドのレパートリーを包含するであろう。

【0037】

「ライブラリー」。用語「ライブラリー」は、異種ポリペプチドまたは核酸の混合物を指す。ライブラリーは、それぞれ単一のポリペプチドまたは核酸配列を有するメンバーから構成される。この点で、ライブラリーはレパートリーと同義である。ライブラリーメンバー間の配列の差異は、該ライブラリー中に存在する多様性を担う。ライブラリーは、ポリペプチドもしくは核酸の単純な混合物の形態を取ってもよく、または、例えば、核酸のライブラリーで形質転換された、細菌、ウイルス、動物もしくは植物細胞などの生物もしくは細胞の形態であってもよい。好ましくは、それぞれ個々の生物または細胞は、1個のみ、または限定数のライブラリーメンバーを含む。有利には、核酸を発現ベクター中に組み込んで、該核酸によりコードされるポリペプチドの発現を可能にする。従って、好ましい態様においては、ライブラリーは、各生物がその対応するポリペプチドメンバーを産生するように発現させることができる核酸形態のライブラリーの単一のメンバーを含む1個以上のコピーの発現ベクターを含む、宿主生物の集団の形態を取ってもよい。かくして、宿主生物の集団は、遺伝的に多様なポリペプチド変異体の大きなレパートリーをコードする可能性を有する。

10

20

【0038】

「抗体」。抗体(例えば、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE)またはフラグメント(Fab、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合したFv、scFv、閉じたコンフォメーションの多特異的抗体、ジスルフィド結合したscFv、ダイアボディなど)は、抗体を天然に産生する任意の種から誘導されたものであるか、または組換えDNA技術により作製されたものである；血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、酵母または細菌から単離されたものであってもよい。

【0039】

「二重特異的リガンド」。本明細書で定義されるように、第1の免疫グロブリン単一可変ドメインと第2の免疫グロブリン単一可変ドメインとを含むリガンドであり、その可変領域は、通常は単一特異的免疫グロブリンにより結合しない同じ抗原上の2個の異なる抗原または2個のエピトープに結合することができる。例えば、2個のエピトープは同じハプテン上にあってもよいが、同じエピトープでもなく、単一特異的リガンドにより結合するほど十分に近接してもいない。本発明に従う二重特異的リガンドは、異なる特異性を有する可変ドメインから構成され、かつ同じ特異性を有する相互に相補的な可変ドメイン対を含まない。二重特異的リガンドおよび二重特異的リガンドを調製するための好適な方法は、WO 2004/058821、WO 2004/003019、およびWO 03/002609(これらの公開された国際特許出願の各々の教示全体は参照により本明細書に組み入れられるものとする)に開示されている。

30

【0040】

「抗原」。本発明に従うリガンドにより結合する分子である。典型的には、抗原は抗体リガンドにより結合し、*in vivo*で抗体応答を誘導することができる。それはポリペプチド、タンパク質、核酸または他の分子であってもよい。一般的には、本発明に従う二重特異的リガンドを、特定の抗原に対する標的特異性について選択する。従来抗体およびそのフラグメントの場合、可変ループ(L1、L2、L3およびH1、H2、H3)により定義される抗体結合部位は、抗原に結合することができる。

40

【0041】

「エピトープ」。免疫グロブリンV_H/V_L対により従来通り結合した構造物の単位である。エピトープは抗体のための最小の結合部位を規定し、かくして抗体の特異性の標的である。単ドメイン抗体の場合、エピトープは単離物中の可変ドメインにより結合した構造

50

物の単位である。

【0042】

「普遍的フレームワーク」。Kabat(「免疫学的目的のタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、US Department of Health and Human Services)により定義された配列中で保存された抗体の領域またはChothiaおよびLesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917により定義されたヒト生殖腺免疫グロブリンのレパートリーもしくは構造物に対応する単一抗体フレームワーク配列である。本発明は、超可変領域のみにおける変動を通して実質的に任意の結合特異性の誘導を許容することが見出された、単一フレームワーク、またはそのようなフレームワークのセットの使用を提供する。

【0043】

「半減期」。例えば、天然の機構によるリガンドの分解および/またはリガンドの消失もしくは隔離(sequestration)に起因して、in vivoでリガンドの血清濃度が50%低下するのにかかった時間である。本発明のリガンドはin vivoで安定であり、分解および/または消失もしくは隔離に抵抗する分子への結合によりその半減期は増加する。典型的には、そのような分子はそれ自身、in vivoでの長い半減期を有する天然のタンパク質である。リガンドの半減期は、in vivoでのその機能的活性が、半減期を増加させる分子に特異的ではない類似のリガンドよりも長い期間持続する場合に増加する。かくして、HSAに特異的なリガンドおよび標的分子を、HSAには結合しないが、別の分子には結合する、HSAに対する特異性が存在しない同一のリガンドと比較する。例えば、それは標的分子上の第2のエピトープに結合するかもしれない。典型的には、半減期は、10%、20%、30%、40%、50%以上増加する。半減期の2x、3x、4x、5x、10x、20x、30x、40x、50x以上の範囲の増加が可能である。あるいは、またはさらに、半減期の30x、40x、50x、60x、70x、80x、90x、100x、150x以上の範囲の増加が可能である。

【0044】

「実質的に同一(または「実質的に相同」)」。第1および第2のアミノ酸もしくはヌクレオチド配列が類似の活性を有するような、第2のアミノ酸もしくはヌクレオチド配列に対して、十分な数の同一もしくは等価な(例えば、類似の側鎖、例えば、保存されたアミノ酸置換を有する)アミノ酸残基もしくはヌクレオチドを含む第1のアミノ酸もしくはヌクレオチド配列である。抗体の場合、第2抗体は同じ結合特異性を有し、かつ少なくとも50%の同じものの親和性を有する。

【0045】

本明細書で言及される用語「約」は、好ましくはプラスもしくはマイナス20%、より好ましくはプラスもしくはマイナス10%、さらにより好ましくはプラスもしくはマイナス5%、さらにより好ましくはプラスもしくはマイナス2%、最も好ましくはプラスもしくはマイナス1%を意味すると解釈される。

【0046】

本明細書で用いられる用語「低いストリンジェンシー」、「中程度のストリンジェンシー」、「高いストリンジェンシー」または「非常に高いストリンジェンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を説明するものである。ハイブリダイゼーション反応を行うための案内を、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができ、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする。水性および非水性の方法がその参考文献に記載されており、どちらでも用いることができる。本明細書で言及される特異的ハイブリダイゼーション条件は以下の通りである：(1) 6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45 で低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、次いで0.2X SSC、0.1%SDS中、少なくとも50 での2回の洗浄(低いストリンジェンシー条件については、洗浄液の温度を55 まで上昇させてもよい)；(2)6X SSC中、約45 で中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、次いで0.2X SSC、0.1%SDS中、60 での1回以上の洗浄；(3)6X SSC中、約45 での高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、次いで0.2X SSC、0.1%SDS中、65 での1回以上の洗浄；および好ましくは、(4)非

10

20

30

40

50

常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、65 °Cの0.5Mリン酸ナトリウム、7% SDS、次いで65 °Cでの0.2X SSC、1% SDSでの1回以上の洗浄である。非常に高いストリンジェンシー条件(4)が好ましい条件であり、特に特定しない限り、これを用いるべきである。

【0047】

本明細書で言及される用語「競合する」とは、第1のエピトープの、その同族のエピトープ結合ドメインへの結合が、第2のエピトープがその同族のエピトープ結合ドメインに結合する場合に阻害されることを意味する。例えば、結合ドメインの物理的遮断によるか、またはエピトープに対するその親和性もしくはアビディティを低下させるように、結合ドメインの構造もしくは環境を変化させることにより、結合を立体的に阻害することができる。

10

【0048】

本明細書に開示される配列と類似するか、または相同である配列(例えば、少なくとも約70%の配列同一性)も、本発明の一部である。いくつかの実施形態においては、アミノ酸レベルでの配列同一性は、約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であってよい。核酸レベルでは、配列同一性は約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98%、99%以上であってよい。あるいは、核酸断片が選択的ハイブリダイゼーション条件下で(例えば、非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件)、鎖の相補体にハイブリダイズする場合、実質的な同一性が存在する。この核酸は全細胞中、細胞溶解物中、または部分的に精製されたか、もしくは実質的に純粋な形態で存在してもよい。

20

【0049】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」または「類似性」(これらの用語は本明細書においては互換的に用いられる)の算出を、以下のように行う。配列を、最適な比較目的のために整列させる(例えば、最適なアラインメントのために第1および第2のアミノ酸もしくは核酸配列の一方または両方にギャップを導入し、非相同配列を比較目的のために無視することができる)。好ましい実施形態においては、比較目的で整列される参照配列の長さは、該参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、およびさらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められる場合、この分子はその位置で同一である(本明細書で用いる場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である。2つの配列間の同一性%は、該配列により共有される同一の位置数の関数であり、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れる。

30

【0050】

本明細書に定義される、アミノ酸およびヌクレオチド配列のアラインメントおよび相同性、類似性または同一性を、好ましくはデフォルトパラメーターを用いる、アルゴリズム BLAST2 Sequences (Tatusova, T. A.ら、FEMS Microbiol Lett, 174:187-188(1999))を用いて調製および決定する。あるいは、有利には、BLASTアルゴリズム(バージョン2.0)を用いて、パラメーターをデフォルト値に設定して、配列アラインメントのために用いる。BLASTアルゴリズムは、米国政府(「gov」)のNational Institutes of Health(「nih」)のNational Center for Biotechnology Information(「.ncbi」)のワールドワイドウェブサイト(「www」)の、「/Blast/」ディレクトリ中、「blast_help.html」ファイル中に詳細に記載されている。検索パラメーターを以下のように定義し、有利には、定義されたデフォルトパラメーターに設定する。

40

【0051】

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)は、プログラムblastp、blastn、blastx

50

、tblastn、およびtblastxにより用いられる発見的検索アルゴリズムである；これらのプログラムは、いくらか強化されたKarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264-8の統計学的方法(上記の「blast_help.html」ファイルを参照)を用いるそれらの知見に有意性を帰するものである。BLASTプログラムは、例えば、問合せ配列に対する相同体を同定するために、配列類似性検索のために調整されたものである。このプログラムは、一般的にはモチーフスタイルの検索にとっては有用ではない。配列データベースの類似性検索における基本的問題の考察については、Altschulら(1994)を参照されたい。National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトで入手可能な5種のBLASTプログラムは、以下のタスクを実行するものである：

「blastp」は、タンパク質配列データベースに対してアミノ酸問合せ配列を比較する；

10

「blastn」は、ヌクレオチド配列データベースに対してヌクレオチド問合せ配列を比較する；

「blastx」は、タンパク質配列データベースに対してヌクレオチド問合せ配列(両方の鎖)の6枠の概念的翻訳産物を比較する；

「tblastn」は、6つ全ての読み枠(両方の鎖)で動的に翻訳されるヌクレオチド配列データベースに対してタンパク質問合せ配列を比較する；

「tblastx」は、ヌクレオチド配列データベースの6枠の翻訳物に対してヌクレオチド問合せ配列の6枠の翻訳物を比較する。

【 0 0 5 2 】

BLASTは以下の検索パラメーターを用いる；

20

HISTOGRAMは、各検索のためのスコアのヒストグラムを展示する；デフォルトは「はい」である(BLASTマニュアルのパラメーターHを参照)。

【 0 0 5 3 】

DESCRIPTIONSは、特定された数に報告された一致する配列の短い記述の数を制限する；デフォルトの限界は100記述である(マニュアルのページのパラメーターVを参照)。また、EXPECTおよびCUTOFFも参照されたい。

【 0 0 5 4 】

ALIGNMENTSは、高スコアの断片対(HSP)が報告された特定の数にデータベース配列を制限する；デフォルトの限界は50である。これより多くのデータベース配列が報告のための統計学的有意差の閾値を満足することが発生すれば(以下のEXPECTおよびCUTOFFを参照)、最も大きい統計学的有意差であると見做された一致のみを報告する(BLASTマニュアルのパラメーターBを参照)。

30

【 0 0 5 5 】

EXPECTは、データベース配列に対する一致を報告するための統計学的有意差の閾値である；デフォルト値は10であり、KarlinおよびAltschul(1990)の確率論モデルに従えば、10個の一致が単なる偶然により見出されることが予想される。一致と見做された統計学的有意差がEXPECTの閾値より大きい場合、この一致は報告されない。EXPECT閾値が低くなるほど、より厳格になり、報告される機会の一致が少なくなる。分画値が許容される(BLASTマニュアルのパラメーターEを参照)。

【 0 0 5 6 】

40

CUTOFFは、高スコアの断片対を報告するためのカットオフスコアである。デフォルト値は、EXPECT値から算出される(上記を参照)。HSPであると見做される統計学的有意差が、CUTOFF値と等しいスコアを有するただ1つのHSPであると見做されるのと少なくとも同じ高さである場合にのみ、HSPをデータベース配列について報告する。CUTOFFが高くなるほど、より厳格になり、報告される機会の一致が少なくなる(BLASTマニュアルのパラメーターSを参照)。典型的には、有意差の閾値を、EXPECTを用いて、より直感的に管理することができる。

【 0 0 5 7 】

MATRIXは、BLASTP、BLASTX、TBLASTNおよびTBLASTXのための代替的なスコアリングマトリックスを特定する。デフォルトのマトリックスはBLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 199

50

2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915-9)である。有効な代替選択としては、PAM 40、PAM120、PAM250およびIDENTITYが挙げられる。BLASTNについては代替のスコアリングマトリックスを利用できない；BLASTN要求中で指示的なMATRIXの特定は、エラー応答を戻す。

【0058】

STRANDは、TBLASTN検索を、データベース配列のちょうど頂上もしくは底部に制限する；またはBLASTN、BLASTXもしくはTBLASTX検索を、問合せ配列の頂上もしくは底部上のちょうど読み枠に制限する。

【0059】

FILTERは、Wootton & Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149-163のSEGプログラムにより決定されるような、低い組成複雑性を有する問合せ配列の断片、またはCaverie & States, 1993, Computers and Chemistry 17:191-201のXNUプログラムにより、もしくは、BLASTNについては、TatusovおよびLipmanのDUSTプログラム(NCBIのワールドウェブサイトを参照)により決定されるような、短周期間隔反復からなる断片をマスクオフする。フィルタリングは、データベース配列に対する特異的マッチングに利用可能な問合せ配列のより生物学的に興味深い領域を残して、統計学的に有意であるが、blast出力(例えば、一般的な酸性、塩基性もしくはプロリンに富む領域に対するヒット)に由来する生物学的に興味のない報告を排除することができる。

10

【0060】

フィルタプログラムにより見出された複雑性の低い配列を、ヌクレオチド配列においては文字「N」(例えば、13回繰り返される「N」)およびタンパク質配列においては文字「X」(9回繰り返される「X」)を用いて置換する。

20

【0061】

フィルタリングを、問合せ配列(またはその翻訳産物)にのみ適用し、データベース配列には適用しない。デフォルトのフィルタリングはBLASTNについてはDUST、他のプログラムについてはSEGである。

【0062】

SWISS-PROT中の配列に適用した場合、SEG、XNU、またはその両方によりマスクされるものが何もないことは普通ではないので、フィルタリングが常に効果をもたらすと期待されるべきではない。さらに、いくつかの事例においては、配列の全体をマスクするが、これは、フィルターされていない問合せ配列に対して報告された任意の一致の統計学的有意性を疑うべきであることを示唆している。受託名および/または遺伝子座名に加えて、NCBI-giはNCBI-gi識別子が出力中で示される原因となる。最も好ましくは、上記のNCBIワールドウェブサイトの「/BLAST」ディレクトリ中に提供される単純なBLAST検索アルゴリズムを用いて、配列比較を行う。

30

【0063】

特に定義しない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語および科学用語は、当業者(例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術および生化学の業界)により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。分子、遺伝子および生化学的方法(一般的には、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.およびAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology (1999) 第4版、John Wiley & Sons, Inc.(これらは参照により本明細書に組み入れられるものとする)ならびに化学的方法には、標準的な技術を用いる。

40

【0064】

本発明は、所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部分を含むリガンド、治療における使用のためのそのようなリガンドおよび医薬の製造のためのそのようなリガンドの使用およびそのようなリガンドを投与することを含む治療方法に関する。

【0065】

可溶性内因性標的化合物に結合するが、そのような抗体および抗体フラグメント(例え

50

ば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント(例えば、scFv、ジスルフィド結合したFv)、dAb、ダイアボディ)などのそのような化合物の活性を実質的に変化させない薬剤を用いて、該内因性標的化合物の特定の特性を変化させ、それによって、疾患を治療、抑制もしくは軽減するか、または診断目的のために該内因性標的化合物をより有効にすることができることを見出された。従って、本発明は、可溶性内因性化合物に結合するが、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害する(例えば、内因性標的化合物の活性部位に結合しない)が、該内因性標的化合物の特定の特性を変化させるのに有用である、本明細書に記載のリガンドに関する。例えば、所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部分を含むリガンドは、該内因性標的化合物に結合し、それによって該内因性標的化合物の水力学的大きさを増加させ、該内因性標的化合物の血清半減期を増加させることができる。有益には、内因性標的化合物は前記リガンドにより結合した場合、その生物学的活性を保持し(例えば、リガンドおよび内因性標的化合物からなる複合体中で活性である)、治療および/または診断目的にとって有益な効果をもたらす得る。

10

20

30

40

50

【0066】

本明細書に記載のリガンドは、例えば、内因性標的化合物の消失速度を低下させることにより、該内因性標的化合物の血清半減期を増加させることができる。そのような状況では、被験体における内因性標的化合物の量(例えば、全身循環における)は、被験体中に通常存在する量より多い量に増加させてもよく、増加した量の内因性標的リガンドは、より低いか、または通常量の内因性標的化合物によっては産生されない有益な治療効果をもたらす得る。

【0067】

所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部分を含むリガンドは、該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の *in vivo*での半減期における変化、または被験体中の該内因性標的化合物の量における変化とは無関係に該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。例えば、リガンドは全身循環中で有益な活性を有するが、組織中に迅速に分布するか、または消失し(例えば、ステロイドもしくはペプチドホルモン)、および分布もしくは消失の速度を遅延させる内因性標的化合物に結合し得る。そのようなリガンドは、内因性標的化合物の活性が有益な(例えば、治療的)効果を有し得る、全身循環中の内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。

【0068】

所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部分を含むリガンドは、該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性(例えば、結合活性)を増加させることができる。例えば、リガンドは内因性アゴニスト(例えば、サイトカイン)もしくは可溶性サイトカイン受容体などの内因性標的化合物に結合し、その内因性結合パートナーに対する該内因性標的化合物の親和性および/またはアビディティを増加させることにより、該内因性標的化合物の結合活性を改善することができる。例えば、所望のサイトカインに対する結合特異性を有する結合部位を有する2個以上の部分を含むリガンドは、2個以上の個々のサイトカイン分子に結合し、それによってサイトカインダイマー、トリマー、オリゴマー、またはマルチマーを産生することができる。そのようなダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーは、例えば、より高いアビディティに起因してサイトカインの受容体を発現する細胞に対する改善された結合活性を有するであろう。同様に、可溶性受容体(例えば、可溶性TNFR1)の結合活性を、可溶性TNFR1への2個以上の結合部位を含むリガンドにより増加させることができる。そのようなリガンドは、例えば、単一のTNFR1鎖よりも高いアビディティでトリマー-TNFに結合するであろう可溶性TNFR1ダイマーを形成する2個の可溶性TNFR1鎖に結合することができる。

【0069】

本明細書に記載のリガンドを全身的に投与して、例えば、全身循環中で内因性標的リガンドに結合させ、全身循環中で有益な効果をもたらすことができる。さらに、このリガンドを局所的に(例えば、皮下注射、筋肉内注射、関節内注射、皮内注射、吸入などにより)

投与し、それによって内因性標的化合物の局所的生物学の利用能を改善するか、または該リガンドを局所的に投与する部位での内因性標的化合物の量を増加させることができる。例えば、リガンドのデポ製剤を、皮下注射により局所的に投与することができ、その投与されたリガンドは、貯蔵物の部位に内因性標的リガンドを補充し、該内因性標的リガンドに結合して局所生物学の利用能を改善するか、または局所的に高い量の内因性標的リガンドを産生することができる。そのような手法は、例えば、創傷治癒を促進するか、または局所炎症反応(例えば、皮膚、肺、関節における)を阻害するのに有利である。

【0070】

本発明は、従来の治療剤および手法を越えるいくつかの利点を提供する。例えば、本明細書に記載のリガンドは、一般的には、より低い収率で産生する、より高価な哺乳動物発現系よりも、細菌もしくは酵母発現系を用いて経済的かつ大量に産生することができる小さいポリペプチドである。さらに、本明細書に記載のリガンドを、患者にとって内因性である化合物(例えば、タンパク質)の有益な活性を生かし、引き出すために投与するが、一般的には、該リガンドは患者と同じ起源(例えば、ヒト起源)のものであり、従って、実質的に非免疫原性であるタンパク質ドメイン(例えば、dAb)から構成される。有利には、これにより、患者が該リガンド、リガンド-内因性標的化合物複合体または内因性標的化合物に対する高い親和性の中和抗体を産生する危険性が有意に低下するか、または排除される。これは、治療剤の効力を制限するか、または排除し得る患者において高い親和性の抗体の産生を誘導することが多い外因性化合物、またはさらに組換え的に産生された内因性タンパク質を投与することを含む治療手法とは異なる利点である。

10

20

【0071】

内因性標的化合物に結合するリガンド

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分(例えば、dAb)を含むが、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しないリガンドに関する。好ましくは、該リガンドは内因性標的化合物の活性部位に結合しない。

【0072】

本明細書に記載のリガンドは、それらが結合する内因性標的化合物の活性を実質的に阻害せず、内因性標的化合物は該リガンドにより結合した場合、活性なままである。例えば、可溶性受容体を本発明のリガンドにより結合させ、得られる受容体-リガンド複合体中の可溶性受容体は、該可溶性受容体の内因性リガンドに結合することができる。別の例では、酵素を本発明のリガンドにより結合させ、得られる酵素-リガンド複合体中の酵素は、基質に結合し、酵素反応を触媒することができる。

30

【0073】

一般的には、前記リガンドは、それが結合する内因性標的化合物の活性を約10%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、約1%以下阻害するか、または該内因性標的化合物の活性に対する阻害効果を実質的に有さない。いくつかの例においては、リガンドが結合する内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない前記リガンドは、少なくとも1nM、少なくとも10nM、少なくとも100nM、少なくとも1 μ M、または少なくとも10 μ MのIC50などの、高い阻害濃度50(IC50)を有する前記内因性標的化合物の活性を阻害する。

40

【0074】

内因性標的化合物の活性を阻害するリガンドの能力を、任意の好適なin vitroまたはin vivoアッセイを用いて評価することができる。多くの好適なアッセイが当業界でよく知られており、化合物の阻害活性を評価するのに日常的に用いられている。例えば、TNFR1への結合部位を有する部分を含むリガンドがTNFR1の活性を阻害する能力を、内毒素ショックもしくはTNF誘導性皮膚壊死のin vivoモデル(Sheehanら、J. Exp. Med., 181:607-617(1995)を参照)、および/または本明細書に記載のin vitro受容体結合アッセイ、L929細胞毒性アッセイ、HeLa IL-8アッセイ、もしくはMRC-5 IL-8放出アッセイを用いて評価することができる。リガンドが本明細書に記載のものなどの所望の内因性標的化合物の活性を阻害するかどうかを評価するための他の好適なアッセイは、当業界でよく知られている

50

。

【0075】

一般的には、前記リガンド自体は実質的な治療活性を有さないが、治療または診断目的のために内因性標的化合物の活性を生かし、引き出すのに用いられる。いくつかの実施形態においては、前記リガンドは内因性標的化合物の活性のための好適な *in vitro* アッセイにおいて実質的な活性を有さない。例えば、内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の半減期を増加させるリガンドは、一般的には、同じであるが、リガンドを用いない前記アッセイにおける該内因性標的化合物の活性と比較して、前記アッセイにおける該内因性標的化合物の活性を変化させない。

【0076】

受容体タンパク質、可溶性アゴニスト(例えば、サイトカイン)、または酵素などの所望の内因性標的化合物に結合するが、該内因性標的化合物の活性部位には結合しないリガンド(例えば、dAb)を、任意の好適な方法を用いて同定することができる。例えば、個々のリガンド、または内因性標的化合物への結合部位を有する部分もしくはそのような部分の集合体(例えば、ライブラリーもしくはレパートリー)を、内因性標的化合物への内因性結合パートナー(例えば、天然のリガンド、基質、コファクター)の結合を、スクリーニングしようとするリガンドまたは部分(またはリガンドもしくは部分の集合体)の存在下で評価する好適な競合アッセイにおいてスクリーニングすることができる。好適な対照と比較して、内因性標的化合物への内因性結合パートナーの結合が実質的に減少(例えば、阻害)しないことは、スクリーニングしようとするリガンドまたは部分が該内因性標的化合物の活性部位に結合しないことを示唆している。

【0077】

酵素、受容体(例えば、サイトカイン受容体、増殖因子受容体)、および可溶性アゴニスト(例えば、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、ホルモン)などの、内因性標的化合物への結合部位を含むリガンドおよび部分をスクリーニングするための多くの好適なアッセイが当業界でよく知られている。さらに、競合アッセイを日常的に用いて、 $10^6 \sim 10^9$ 個以上のメンバーを含む化合物の集合体をスクリーニングする。かくして、そのようなスクリーニング活動は当業界における通常の技術の範囲内であり、当業者にとっては厄介でも過度のものであるとも考えられない。例えば、WO 03002609、WO 2004101790、WO 2005035572、WO 2004061026、WO 2004003019、WO 2004058821、WO 9404678、WO 9749805、WO 992321、WO 9937681、WO 0024884、WO 0043507、WO 0065067、WO 0140310、WO 03035694、WO 03053531、WO 03054015、WO 0305527、WO 2004015425、WO 2004041862、WO 2004041863、WO 2004041865、WO 2004062551、WO 2005044858およびEP1134231に開示された可変ドメインを、好適な競合アッセイにおいて、活性部位に結合せずに所望の内因性標的化合物に結合する能力についてスクリーニングすることができる。前記参考文献における、可変ドメイン、その配列ならびに製造および選択の方法の開示は、本発明における使用のための内因性標的化合物への結合部位を有する部分の例を当業者に提供するために参照により本明細書に明確に組み入れられるものとする。

【0078】

前記リガンドは、それらが結合する内因性標的の半減期を増加させ、それらが被験体中で結合する内因性標的の量(例えば、全身的な量、所望の部位もしくは位置での量)を増加させ、および/またはそれらが結合する内因性標的の生物学的利用能を増加させることができる。

【0079】

リガンドは、例えば、内因性標的化合物に結合し、それによって該内因性標的化合物の水力学的な大きさを増加させることにより、内因性標的化合物に結合し、これを安定化させることにより、または内因性標的化合物に結合し、その消失速度もしくは代謝速度を遅延させることにより、それが結合する内因性標的化合物の半減期を増加させることができる。一般的には、前記リガンドは、リガンドの非存在下での内因性標的化合物の半減期と比較して、少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくと

10

20

30

40

50

も約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、または少なくとも約10の係数により、それが結合する内因性標的化合物の半減期を増加させるであろう。例えば、内因性標的化合物は約1時間の半減期を有してもよく、該内因性標的化合物に結合する結合部位を有する部分を含むリガンドの投与後、該内因性標的化合物の半減期を約1.5時間、約10時間以上に増加させることができる。

【0080】

内因性標的化合物のレベルまたは量は、リガンドの半減期増加作用に起因して、本明細書に記載のリガンドの投与後に増加してもよい。例えば、本発明のリガンドの投与の1時間、もしくは2時間、もしくは3時間、もしくは4時間、もしくは5時間、もしくは6時間、もしくは7時間、もしくは8時間、もしくは9時間、もしくは10時間、もしくは11時間、もしくは12時間、もしくは1日後の内因性標的リガンドのレベルまたは量(例えば、血清中の)を、少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約500、少なくとも約1000、少なくとも約5,000、少なくとも約10,000、少なくとも約50,000、もしくは少なくとも約100,000の係数により増加させることができる。内因性標的化合物のレベルまたは量の増加を、任意の好適な方法を用いて容易に検出することができる。例えば、好適なサンプル(例えば、血清)を、リガンドの投与の前に、および投与後の1つ以上の時点で取得することができる。該サンプル中の内因性標的化合物のレベルまたは量を、任意の好適な方法を用いて決定することができる。このサンプルは、例えば、血液、血清、脳脊髄液、滑液、気管支肺胞洗浄、浣腸剤または生検のサンプルであってもよい。いくつかの実施形態においては、そのようなサンプル中のリガンドの量またはレベルは、該リガンドを投与する前の量またはレベルと比較して増加する。

10

20

【0081】

前記リガンドは、内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。この生物学的利用能を、全身的に、または所望の作用部位で(例えば、リガンドを局所投与する部位で)増加させることができる。例えば、リガンドは、全身循環中で有益な活性を有するが、組織中に迅速に分布するか、もしくは消失し(例えばステロイドもしくはペプチドホルモン)、および分布もしくは消失の速度を遅延させる内因性標的化合物に結合することができる。そのようなリガンドは、内因性標的化合物の活性が有益な(例えば、治療的)効果を有し得る全身循環中の該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。リガンドは、内因性標的化合物を所望の部位に補充することにより、該部位での該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。例えば、所望の内因性標的化合物への結合部位を含むリガンドを、患者に局所投与することができる(例えば、デポ製剤として)。局所投与されたリガンドは所望の内因性標的化合物に結合し、さらなる内因性標的化合物をその部位に補充することができる。かくして、増加したレベルまたは量の内因性標的化合物がその部位に存在して、有益な効果をもたらしてもよい。例えば、一実施形態においては、前記リガンドは、TGF β アイソフォーム3への結合部位を有する部分を含む。そのようなリガンドを局所投与して、TGF β アイソフォーム3に結合させ、TGF β アイソフォーム3を局所投与部位に補充し、かくして創傷治癒を促進することができる。

30

40

【0082】

所望の細胞表面標的への結合部位を有する部分を含む同様のリガンドを、本明細書に記載の方法を用いて調製し、これを用いて、例えば、所望の細胞型を所望の部位(例えば、損傷部位、炎症部位)に補充することができる。

【0083】

一般的には、前記リガンドは、リガンドの非存在下での内因性標的化合物の生物学的利用能と比較して、少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、または少なくとも約10の係数により、それが結合する該内因性標的化合物の生物学的利用能(例えば、全身循環中、所望の作用部位で)を増加させるであろう。例えば、前記リガンドが

50

全身循環中の生物学的利用能を増加させる場合、該リガンドの投与の時点で開始する内因性リガンドの濃度時間曲線を調製し、該内因性標的リガンドの正常な全身レベルと比較して、全身の生物学的利用能における増加の程度を決定することができる。

【0084】

前記リガンドは、それらが結合する内因性標的の活性(例えば、結合活性)を増加させることができる。例えば、リガンドは、内因性アゴニスト(例えば、サイトカイン)もしくは可溶性サイトカイン受容体などの内因性標的化合物に結合し、その内因性結合パートナーに対する該内因性標的化合物の親和性および/もしくはアビディティを増加させることにより、該内因性標的化合物の結合活性を改善することができる。所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する2個以上の部分を含むリガンドは、2個以上の個々の内因性標的化合物分子に結合し、それによって内因性標的化合物のダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーを産生することができる。そのようなダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーは、例えば、より高いアビディティに起因して内因性標的化合物のための天然の結合パートナーを発現する細胞に対する改善した結合活性を有するであろう。一般的には、そのようなリガンドは内因性標的化合物の結合活性を改善することができる。例えば、内因性標的化合物のダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーの、その結合パートナーに対する結合強度(例えば、親和性もしくはアビディティ)は、モノマー(すなわち、本発明のリガンドとの複合体にない)としての内因性標的化合物の結合強度よりも、少なくとも約10倍、少なくとも約100倍、少なくとも約1,000倍または少なくとも約10,000倍強いものであってもよい。

10

20

【0085】

一例では、前記リガンドは所望の内因性アゴニスト(例えば、サイトカイン、増殖因子)に対する結合特異性を有する結合部位を有する2個以上の部分を含み、2個以上の内因性アゴニスト分子に結合し、それによって内因性アゴニストのダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーを産生する。そのようなダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーは、例えば、より高いアビディティに起因して内因性アゴニストの受容体を発現する細胞に対する改善された結合活性を有し、改善された治療効力を有することができる。同様に、可溶性受容体(例えば、可溶性TNFR1)の結合活性を、該可溶性受容体への2個以上の結合部位を含むリガンドにより増加させることができる。そのようなリガンドは、例えば、単一の受容体鎖より高いアビディティで受容体の内因性リガンドに結合するであろう可溶性受容体ダイマーを形成する2個の可溶性受容体鎖に結合することができる。

30

【0086】

特定の実施形態においては、前記リガンドは、可溶性TNFR1に対する結合特異性を有するが、活性部位には結合しない(可溶性TNFR1の活性部位はドメイン2および3内に含まれる)2個以上の部分(dAb)を含む。そのようなリガンドは、2個以上の可溶性TNFR1鎖に結合して、増加したアビディティに起因して、そのトリマーのリガンド、TNFに対する改善された結合活性を有する、可溶性TNFR1ダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーを形成することができる。また、単一の可溶性TNFR1鎖よりも大きい水力学的大きさを有する、そのような可溶性TNFR1ダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーの半減期を、単一のTNFR1と比較して延長することもできることが理解されるべきである。結果として、そのようなリガンドは、可溶性TNFR1のTNF阻害活性を改善し、その治療効果を改善することができる。例えば、そのようなリガンドは、少なくとも約10、少なくとも約100、少なくとも約1,000または少なくとも約10,000の係数により、可溶性TNFR1の効果を改善することができる。

40

【0087】

この実施形態の一例においては、マウスTNFR1のドメイン1に結合するdAbのダイマーであるリガンドを用いて、可溶性TNFR1のダイマー化を誘導するリガンドが可溶性TNFR1の効果を改善することを証明する。例えば、そのようなリガンドを、ヒトMRC5細胞、ヒトTNFおよび可溶性マウスTNFR1を含むアッセイに添加することができる。可溶性マウスTNFR1は、ヒトTNFへの結合に関して、MRC5細胞上でヒトTNFR1と競合するであろう。マウスTNFR1

50

のドメイン1に結合するdAbのダイマーであるリガンドは、2個の可溶性マウスTNFR1鎖に結合して、前記アッセイにおいてTNFの効果を阻害するのにより有効であるマウスTNFR1ダイマーを形成する。例えば、マウスTNFR1のIC50を、可溶性TNFR1のダイマー化を誘導するリガンドの添加により、nM範囲からpM範囲まで低下させることができる(約10もしくは約100もしくは約1000倍の低下)。

【0088】

可溶性受容体鎖のダイマー化(またはトリマー化またはオリゴマー化)を誘導するリガンドの患者への投与は、細胞表面上に発現される膜貫通形態の特定の受容体のクラスター化および活性化を引き起こし得る。一般的には、そのような活性化の任意の望ましくない効果(例えば、免疫細胞の活性化)は、ダイマー化された可溶性受容体の改善された結合機能および効果と比較して最小限であろう。にもかかわらず、必要に応じて、ダイマー化、トリマー化またはオリゴマー化しているリガンドと、膜貫通形態の受容体との相互作用を、該リガンドを本明細書に記載のその水学的大きさを増加させるように形式化することによりさらに減少させることができる。例えば、前記リガンドを、PEG部分またはin vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を有する部分(例えば、血清アルブミンに結合するdAb)などの他の半減期延長部分を含むように形式化することができる。TNFR1に結合するdAbを用いて本明細書に示されるように、dAbのPEG化は、細胞に基づくアッセイにおいてTNFR1活性を阻害するdAbの能力を劇的に低下させたが、in vivoでの可溶性TNFR1への結合のための条件を近似する受容体結合アッセイにおいてTNFR1に結合するdAbの能力に対する効果をほとんど有さなかった。これらの結果は、PEG化しているdAbおよび2個以上のdAbを含むリガンドは、膜貫通形態の可溶性受容体よりも、該受容体に対するdAbの選択性を改善することを示唆している。

10

20

【0089】

いくつかの内因性標的化合物は、天然で一緒になって結合して、活性なダイマー、トリマーまたはマルチマーを形成する。かくして、内因性標的化合物への結合部位を有する部分は、該内因性標的化合物自体であってもよいし、または該内因性標的化合物の断片もしくは一部であってもよい。内因性標的化合物への結合部位を有する部分が該内因性標的化合物である場合などのいくつかの実施形態においては、前記リガンドは該内因性標的化合物の活性を有してもよい。従って、本明細書に記載のように、そのようなリガンドを投与することにより、前記内因性標的化合物の半減期を増加させ、その生物学的利用能を増加させ、その量を増加させ、および/またはその活性を増加させることができ、また、該リガンド中での生物学的に活性な形態の内因性標的化合物の存在に起因して、さらなる内因性標的化合物活性を提供するであろう。

30

【0090】

他の実施形態においては、前記リガンドは、内因性標的化合物の一部である該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含んでもよい。例えば、内因性標的化合物の一部は、in vivoで該内因性標的化合物に結合するが、該内因性標的化合物の活性(例えば、リガンド結合活性、受容体結合活性、触媒活性)を有さない一部であってもよい。

【0091】

ダイマー、トリマーまたはマルチマーを天然に形成する内因性標的化合物の例としては、例えば、増殖因子(例えば、AおよびB鎖のホモダイマーおよびヘテロダイマーを形成するPDGF)、サイトカイン(例えば、トリマーを形成するTNFスーパーファミリーのサイトカイン(例えば、RANK-L))、ならびに受容体(例えば、トリマーを形成するTNF受容体スーパーファミリーの受容体)が挙げられる。そのような内因性標的化合物の好適な一部を、該内因性標的化合物のドメインを形成するダイマー、トリマーもしくはマルチマーの構造に関する知識に基づいて、または該内因性標的化合物のペプチドもしくはポリペプチドの断片を調製し、該内因性標的化合物に結合する能力について該ペプチドもしくはポリペプチドをアッセイする(例えば、表面プラズモン共鳴もしくは任意の他の好適な方法を用いる)ことにより、容易に調製することができる。

40

【0092】

50

in vivoで対応する内因性標的化合物に結合する該内因性標的化合物の一部の例は、TNF受容体スーパーファミリーのメンバーのいわゆるプレリガンド集合ドメイン(PLAD)である(例えば、WO 01/58953; 米国特許出願公開第2003/0108992 A1号; Dengら、Nature Medicine, doi:10.1038/nm1304 (2005)を参照)。特定の受容体に由来するPLADドメインは、in vivoで互いに結合する。例えば、TNFR1のPLADドメインは、in vivoでTNFR1の別のPLADドメインに結合するであろう。

【0093】

TNF受容体スーパーファミリーは、当業界で認識されているタンパク質群であり、例えば、TNFR1 (p55、CD120a、p60、TNF受容体スーパーファミリーメンバー1A、TNFRSF1A)、TNFR2 (p75、p80、CD120b、TNF受容体スーパーファミリーメンバー1B、TNFRSF1B)、CD (TNFRSF3、LT R、TNFR2-RP、TNFR-RP、TNFCR、TNF-R-III)、OX40 (TNFRSF4、ACT35、TXGP1L)、CD40 (TNFRSF5、p50、Bp50)、Fas (CD95、TNFRSF6、APO-1、APT1)、DcR3 (TNFRSF6B)、CD27 (TNFRSF7、Tp55、S152)、CD30 (TNFRSF8、Ki-1、D1S166E)、CD137 (TNFRSF9、4-1BB、ILA)、TRAILR-1 (TNFRSF10A、DR4、Apo2)、TRAILR-2 (TNFRSF10B、DR5、KILLER、TRICK2A、TRICKB)、TRAILR3 (TNFRSF10C、DcR1、LIT、TRID)、TRAILR4 (TNFRSF10D、DcR2、TRUNDD)、RANK (TNFRSF11A)、OPG (TNFRSF11B、OCIF、TR1)、DR3 (TNFRSF12、TRAMP、WSL-1、LARD、WSL-LR、DDR3、TR3、APO-3)、DR3L (TNFRSF12L)、TAC1 (TNFRSF13B)、BAFFR (TNFRSF13C)、HVEM (TNFRSF14、ATAR、TR2、LIGHTR、HVEA)、NGFR (TNFRSF16)、BCMA (TNFRSF17、BCM)、AITR (TNFRSF18、GITR)、TNFRSF19、FLJ14993 (TNFRSF19L、RELT)、DR6 (TNFRSF21)、SOBa (TNFRSF22、Tnfrh2、2810028K06Rik)、mSOB (TNFRSF23、Tnfrh1)が挙げられる。

【0094】

いくつかのPLADドメインが当業界で公知であり、他のPLADドメインおよびPLADドメインの変異体を、WO 01/58953; 米国特許出願公開第2003/0108992 A1号; Dengら、Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005)に記載の方法などの、任意の好適な方法を用いて容易に単離および調製することができる。ポリペプチド、タンパク質断片、およびペプチド変異体を調製するための多くの好適な方法、ならびに本明細書に記載のTNFR1受容体結合アッセイなどの、任意の結合アッセイが当業界でよく知られており、従来的である。PLADドメインの例を、表1に提示する。

【表1】

受容体	PLADドメイン
TNFR1	Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys (配列番号28)
TNFR2	Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys (配列番号29)
FAS	Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys (配列番号30)
FAS	Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr

【0095】

	Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp (配列番号 31)
LT βR	Cys Arg Asp Gln Glu Lys Glu Tyr Tyr Glu Pro Gln His Arg Ile Cys Cys Ser Arg Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Val Ser Ala Lys Cys Ser Arg Ile Arg Asp Thr Val Cys (配列番号 32)
CD40	Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys (配列番号 33)
CD30	Cys His Gly Asn Pro Ser His Tyr Tyr Asp Lys Ala Val Arg Arg Cys Cys Tyr Arg Cys Pro Met Gly Leu Phe Pro Thr Gln Gln Cys Pro Gln Arg Pro Thr Asp Cys Arg Lys Gln Cys (配列番号 34)
CD27	Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met (配列番号 35)
HVEM	Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys (配列番号 36)
OX40	Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr (配列番号 37)
DR4	Ala Thr Ile Lys Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg (配列番号 38)

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態においては、前記リガンドは、TNFR1、TNFR2、FAS、LT R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、DR4もしくは他のTNF受容体スーパーファミリーメンバーのPLAD、またはPLADドメインの変異体などの、PLADである内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む。PLADドメインの変異体は、例えば、1個以上のアミノ酸が欠失、挿入または置換されているが、TNFR1、TNFR2、FAS、LT R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、もしくはDR4の対応するPLADに結合する能力を保持する、TNFR1、TNFR2、FAS、LT R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、もしくはDR4のPLADドメインであってよい。変異体PLADドメインのアミノ酸配列は、対応するPLAD(例えば、TNFR1、TNFR2、FAS、LT R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、DR4のPLAD)のアミノ酸配列中のアミノ酸と同じである、少なくとも約10個の連続したアミノ酸、少なくとも約15個の連続したアミノ酸、少なくとも約20個の連続したアミノ酸、少なくとも約25個の連続したアミノ酸、少なくとも約30個の連続したアミノ酸、少なくとも約35個の連続したアミノ酸、または少なくとも約40個の連続したアミノ酸の領域を含んでもよい。さらに、またはあるいは、変異体PLADドメインのアミノ酸配列は、対応するPLAD(例えば、TNFR1、TNFR2、FAS、LT R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、もしくはDR4のPLAD)のアミノ酸配列と、少なくとも約80%、少

なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%同一であってよい。

【0097】

PLADまたはPLAD変異体である内因性標的化合物への結合部位を有する結合部分を含むリガンドを、本明細書に記載のように形式化することができる。例えば、前記リガンドは、PLADもしくはPLAD変異体のダイマー、トリマーもしくはマルチマー、またはPLADもしくはPLAD変異体および半減期延長部分(例えば、血清アルブミンもしくは新生児のFc受容体への結合部位を有する部分)を含む融合タンパク質であってよい。

【0098】

2個以上のPLADもしくはPLAD変異体(例えば、PLADダイマー、トリマー、マルチマー)を含むリガンドは、2個以上の可溶性受容体鎖に結合して、本明細書に記載のように、可溶性受容体モノマーと比較して改善された結合機能を有し得る可溶性受容体ダイマー、トリマーまたはマルチマーを形成することができる。いくつかの状況においては、そのようなリガンドは可溶性受容体に結合し、また細胞表面上に発現された膜貫通形態の受容体に結合することもできる。必要に応じて、可溶性受容体に結合する選択性を、例えば、PEG部分、または本明細書に記載の他の半減期延長部分を用いて、前記リガンドがより大きい水力学的大きさを有するように形式化することにより改善することができる。

【0099】

特定の実施形態においては、前記リガンドはPLAD(例えば、TNFR1、TNFR2、FAS、LT_R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、もしくはDR4のPLAD)またはPLAD変異体およびPEG部分もしくは血清アルブミンもしくは新生児のFc受容体に結合するdAbなどの半減期延長部分を含む。

【0100】

好ましくは、可溶性受容体鎖のダイマー化(またはトリマー化またはオリゴマー化)を誘導するリガンドは、標準的な細胞アッセイにおいて細胞表面または膜貫通形態の該受容体を実質的に作動させない(すなわち、1 nM、10 nM、100 nM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μMまたは5,000 μMの濃度で存在する場合、該アッセイにおいて該受容体の天然のリガンドにより誘導される受容体を介する活性が約5%以下である)。

【0101】

内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分は、表面プラズモン共鳴により決定されるように、300 nM~5 pM(すなわち、 3×10^{-7} ~ 5×10^{-12} M)、好ましくは50 nM~20 pM、より好ましくは5 nM~200 pMおよび最も好ましくは1 nM~100 pM、例えば、 1×10^{-7} M以下、好ましくは 1×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-9} M以下、有利には、 1×10^{-10} M以下および最も好ましくは 1×10^{-11} M以下の K_D ；ならびに/または $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ~ $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ~ $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、例えば、 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下、好ましくは $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下、有利には $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、より好ましくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下、および最も好ましくは $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 以下の K_{off} 速度定数などの高い親和性で該内因性標的化合物に結合するのが好ましい。内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有し、高い親和性で該内因性標的化合物に結合する部分を、本明細書に記載のような任意の好適なりガンド形式に形式化することができる。

【0102】

本明細書に記載のリガンドの特徴に加えて、前記リガンドは、表面プラズモン共鳴により決定されるように、300 nM~5 pM(すなわち、 3×10^{-7} ~ 5×10^{-12} M)、好ましくは50 nM~20 pM、より好ましくは5 nM~200 pMおよび最も好ましくは1 nM~100 pM、例えば、 1×10^{-7} M以下、好ましくは 1×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-9} M以下、有利には、 1×10^{-10} M以下および最も好ましくは 1×10^{-11} M以下の K_D ；ならびに/または $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ~ $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ~ $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、例えば、 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下、好ましくは $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下、有利

10

20

30

40

50

には $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、より好ましくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下、および最も好ましくは $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 以下の K_{off} 速度定数などの高い親和性で前記内因性標的化合物に結合するのが好ましい。

【0103】

特定の実施形態においては、前記リガンドは、内因性標的化合物に結合するdAbを含む。内因性標的化合物は、例えば、可溶性受容体(例えば、可溶性サイトカイン受容体、可溶性増殖因子受容体、可溶性ホルモン受容体)、内因性受容体アンタゴニスト(例えば、IL-1ra)、酵素、内因性アゴニスト(例えば、サイトカイン、増殖因子、ホルモン)であってよい。いくつかの実施形態においては、前記リガンドはdAbダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーである。

10

【0104】

前記リガンドは、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群より選択される、内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含んでもよい。前記リガンドはまた、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、免疫グロブリン単一可変ドメイン(例えば、ヒトV_H、ヒトV_L、V_{HH})などの、抗体または抗体フラグメントである、内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含んでもよい。

【0105】

必要に応じて、前記リガンドは、本明細書に記載の半減期延長部分をさらに含んでもよい。例えば、前記リガンドは、ポリアルキレングリコール部分、血清アルブミンもしくはその断片、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、またはin vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む部分からなる群より選択される半減期延長部分を含んでもよい。in vivoでの半減期を増強するポリペプチドへの結合部位を含む好適な部分としては、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、アビマー、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、および免疫グロブリン単一可変ドメイン(例えば、ヒトV_H、ヒトV_L、V_{HH})などの、抗体または抗体フラグメントが挙げられる。

20

【0106】

本明細書に記載のように、本発明のリガンドは、それらが結合する内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない。しかしながら、標的が2個以上の活性(例えば、結合活性およびシグナリング活性)を有する場合、前記リガンドは意図された治療活性または利益と関連しない活性を阻害してもよい。例えば、リガンドまたはdAbモノマーは可溶性受容体に結合し、また膜貫通形態の該受容体に結合してもよい。そのような状況では、膜貫通形態の該受容体は、リガンド結合活性およびまたシグナリング活性を有してもよい。好ましくは、本発明のリガンドは、リガンドにより誘導されるプロセスを阻害するように働くリガンド結合活性(可溶性および膜貫通形態の受容体の)を阻害しないであろうが、膜貫通形態の受容体のシグナリング活性を阻害し得る。

30

【0107】

本発明をさらに説明するために、可溶性TNFR1に結合するリガンドの実施形態の例を以下に記載する。可溶性TNFR1に結合するリガンドの実施形態は、他の受容体に結合する本発明のリガンドの例である。

40

【0108】

TNFR1は、リガンドに結合する細胞外領域および本来のシグナル伝達活性を欠くが、シグナル伝達分子と結合することができる細胞内ドメインを含む膜貫通受容体である。TNFR1と、結合したTNFとの複合体は、3つのTNFR1鎖および3つのTNF鎖を含む(Bannerら、Cell, 73(3) 431-445 (1993))。TNFリガンドは、3つのTNFR1鎖により結合したトリマーとして存在する(上掲)。3つのTNFR1鎖は受容体-リガンド複合体中で一緒になって密接にクラスター化しており、このクラスター化はTNFR1を介するシグナル伝達にとって必要条件であ

50

る。実際、抗TNFR1抗体などの、TNFR1に結合する多価薬剤は、TNFの非存在下でTNFR1のクラスター化およびシグナル伝達を誘導することができ、TNFR1アゴニストとして一般的に用いられている(例えば、Belkaら、EMBO, 14(6):1156-1165 (1995); Mandik-Nayakら、J. Immunol, 167:1920-1928 (2001)を参照)。従って、TNFR1に結合する多価薬剤は、一般的には、それらがTNF のTNFR1への結合を遮断する場合でも、TNFR1の有効なアンタゴニストではない。

【0109】

TNFR1の細胞外領域は、13個のアミノ酸のアミノ末端セグメント(配列番号2(ヒト)のアミノ酸1~13; 配列番号4(マウス)のアミノ酸1~13)、ドメイン1(配列番号2(ヒト)のアミノ酸14~53; 配列番号4(マウス)のアミノ酸14~53)、ドメイン2(配列番号2(ヒト)のアミノ酸54~97; 配列番号4(マウス)のアミノ酸54~97)、ドメイン3(配列番号2(ヒト)のアミノ酸98~138; 配列番号4(マウス)のアミノ酸98~138)、およびドメイン4(配列番号2(ヒト)のアミノ酸139~167; 配列番号4(マウス)のアミノ酸139~167)、次いで膜に近接した領域(配列番号2(ヒト)のアミノ酸168~182; 配列番号4(マウス)のアミノ酸168~182)を含む(Bannerら、Cell 73(3) 431-445 (1993)およびLoetscherら、Cell 61(2) 351-359 (1990)を参照)。ドメイン2および3は結合したリガンド(TNF 、TNF)と接触するようになる(Bannerら、Cell 73(3) 431-445 (1993))。TNFR1の細胞外領域はまた、プレリガンド結合集合ドメインまたはPLADドメイン(配列番号2(ヒト)のアミノ酸1~53; 配列番号4(マウス)のアミノ酸1~53)と呼ばれる領域も含む(米国政府、WO 01/58953; Dengら、Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005))。

10

20

【0110】

TNFR1は、可溶性形態のTNFR1を産生する、ドメイン4中、または膜に近接する領域(配列番号2のアミノ酸168~182; 配列番号4のアミノ酸168~183)中でのTNFR1のタンパク質溶解を含むプロセスを介してin vivoで細胞の表面から抜け落ちる。可溶性TNFR1は、TNF に結合する能力を保持し、それによってTNF の活性の内因性阻害剤として機能する。

【0111】

いくつかの実施形態においては、可溶性TNFR1に結合するリガンドまたはdAbモノマーはまた、膜貫通TNFR1に結合し、細胞表面上でのTNFR1のTNF により誘導されるクラスター化を阻害することができ、このクラスター化は、受容体を介するシグナル伝達に先行するが、膜貫通TNFR1および可溶性TNFR1へのTNF の結合を阻害しない。

30

【0112】

特定の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、可溶性および膜貫通形態のTNFR1のTNF結合活性を阻害しないが、TNFR1のシグナリング活性を阻害することができる。この型のリガンドまたはdAbモノマーは、TNFR1のドメイン1またはドメイン4に結合することができる。そのようなリガンドまたはdAbモノマーは、可溶性TNFR1および膜貫通TNFR1に結合することができるが、どちらの形態のTNFR1のTNF結合活性も阻害しない。従って、そのようなリガンドまたはdAbを投与して、例えば、可溶性TNFR1の半減期を延長するか、または可溶性TNFR1の結合活性を増強することができる。従って、それを必要とする哺乳動物にそのようなリガンドまたはdAbモノマーを投与することにより、治療目的のために細胞表面のTNFR1の活性を阻害する内因性調節経路を生かし、引き出すことができる。

40

【0113】

他の実施形態においては、本発明は、他の可溶性受容体に結合するが、可溶性受容体への内因性リガンドの結合を阻害しない類似のリガンドおよびdAbモノマーを提供する。

【0114】

より具体的な実施形態においては、前記リガンドは、TNFR1のドメイン1に結合し、マウスTNFR1への結合についてTAR2m-21-23と競合するか、またはヒトTNFR1への結合についてTAR2h-205と競合するdAbを含む。より具体的な実施形態においては、前記リガンドはそのようなdAbのダイマーであり、必要に応じて、PEG部分をさらに含む。

【0115】

50

特定の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、凝集に対して実質的な耐性を有する。例えば、いくつかの実施形態においては、塩水、緩衝塩水、クエン酸緩衝塩水、水、乳液、およびFDAにより認可されたものなどの許容可能な賦形剤を含むこれらの溶媒のいずれかなどの、薬剤の製剤化に日常的に用いられる、溶媒中のリガンドまたはdAbの1~5 mg/ml、5~10 mg/ml、10~20 mg/ml、20~50 mg/ml、50~100 mg/ml、100~200 mg/mlもしくは200~500 mg/mlの溶液を、例えば、約10分、約1時間、約8時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約1週間、約2週間、約3週間、約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約6ヶ月、約1年、もしくは約2年などの時間、約22、22~25、25~30、30~37、37~40、40~50、50~60、60~70、70~80、15~20、10~15、5~10、2~5、0~2、-10~0、-20~-10、-40~-20、-60~-40、もしくは-80~-60に維持する場合、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満もしくは約1%未満の前記リガンドまたはdAbモノマーが凝集する。

10

【0116】

凝集を、顕微鏡、視覚検査もしくは分光分析もしくは任意の他の好適な方法による溶液の濁度の評価によるなど、任意の好適な方法を用いて評価することができる。好ましくは、凝集を、動的光散乱により評価する。凝集に対する耐性を有するリガンドまたはdAbモノマーは、いくつかの利点を提供する。例えば、そのようなリガンドまたはdAbモノマーを、大腸菌などの好適な生物生産系を用いる発現により、可溶性タンパク質と同様、高収率で容易に製造することができ、従来のポリペプチドよりも高い濃度で、かつ低い凝集率および活性の喪失率で製剤化および/または保存することができる。

20

【0117】

さらに、凝集に対する耐性を有するリガンドまたはdAbモノマーを、他の抗原-またはエピトープ-結合ポリペプチド(例えば、従来の抗体)よりも経済的に製造することができる。例えば、一般的には、*in vivo*での適用を意図された抗原-またはエピトープ-結合ポリペプチドの調製は、凝集したポリペプチドを除去するプロセス(例えば、ゲル濾過)を含む。そのような凝集物を除去できない場合、*in vivo*での適用にとって好適ではない調製物が得られるが、これは、例えば、アンタゴニストとして働くように意図された抗原結合ポリペプチドの凝集物が、標的抗原の架橋またはクラスター化を誘導することにより、アゴニストとして機能し得るからである。また、タンパク質凝集物は、治療用ポリペプチドを投与する被験体における免疫応答を誘導することにより、その効果を減少させ得る。

30

【0118】

対照的に、本発明の凝集耐性リガンドまたはdAbモノマーを、凝集物を除去するプロセス工程を含ませる必要がなく、*in vivo*での適用のために調製し、ポリペプチド凝集物により引き起こされる上記の欠点なしに*in vivo*での適用において用いることができる。

【0119】

いくつかの実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、dAbの融点(T_m)より高い温度(T_s)に加熱し、dAbの融点より低い温度(T_c)に冷却した場合、可逆的に折り畳みが解かれる。例えば、dAbモノマーは、80に加熱し、ほぼ室温に冷却した場合、可逆的に折り畳みが解かれる。可逆的に折り畳みが解かれるポリペプチドは、折り畳みが解かれる時に機能を失うが、再び折り畳まれる際に機能を再獲得する。そのようなポリペプチドは、折り畳みが解かれるか、または不適切に再び折り畳まれる(折り畳みに失敗したポリペプチド)、すなわち、機能を再獲得しない場合に凝集するポリペプチドとは区別される。

40

【0120】

ポリペプチドの折り畳み解除および再折り畳みを、例えば、任意の好適な方法を用いて直接的または間接的にポリペプチド構造を検出することにより評価することができる。例えば、ポリペプチド構造を、円偏光二色性(CD)(例えば、遠紫外線CD、近紫外線CD)、蛍光(例えば、トリプトファン側鎖の蛍光)、タンパク質溶解に対する感受性、核磁気共鳴(NMR)によるか、または適切な折り畳みに依存するポリペプチド機能(例えば、標的リガンドへ

50

の結合、一般のリガンドへの結合)を検出するか、もしくは測定することにより検出することができる。一例では、ポリペプチドの折り畳み解除を、結合機能(例えば、一般のリガンドおよび/または標的リガンドの結合、基質の結合)の喪失が、該ポリペプチドが折り畳みを解かれたことを示唆する機能的アッセイを用いて評価する。

【0121】

リガンドまたはdAbモノマーの折り畳み解除および再折り畳みの程度を、折り畳み解除または変性曲線を用いて決定することができる。折り畳み解除曲線を、縦座標として温度を、横座標として折り畳まれたポリペプチドの相対濃度をプロットすることにより作製することができる。折り畳まれたリガンドまたはdAbモノマーの相対濃度を、任意の好適な方法(例えば、CD、蛍光、結合アッセイ)を用いて直接的または間接的に決定することができる。例えば、リガンドまたはdAbモノマーの溶液を調製し、その溶液の楕円率をCDにより決定することができる。得られた楕円率の値は、100%の折り畳まれたリガンドまたはdAbモノマーの相対濃度である。次いで、溶液中のリガンドまたはdAbモノマーを、該溶液の温度を徐々に上昇させることにより折り畳みを解除し、好適な増加量(例えば、1の温度の各増加後)で楕円率を決定する。次いで、溶液中のリガンドまたはdAbモノマーを、該溶液の温度を徐々に低下させることにより再び折り畳み、好適な増加量で楕円率を決定する。このデータをプロットして、折り畳み解除曲線および再折り畳み曲線を作製することができる。この折り畳み解除曲線および再折り畳み曲線は、リガンドまたはdAbモノマー分子が折り畳まれる一部、リガンドまたはdAbモノマー分子が様々な程度まで折り畳みを解かれる折り畳み解除/再折り畳み遷移、およびリガンドまたはdAbモノマー分子が折り畳みを解かれる一部を含む特徴的なシグモイド形状を有する。再折り畳み曲線のy軸切片は、回収された再び折り畳まれたリガンドまたはdAbモノマーの相対量である。少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%の回収は、リガンドまたはdAbモノマーが可逆的に折り畳みを解かれることを示唆する。

10

20

【0122】

好ましい実施形態においては、リガンドまたはdAbモノマーの折り畳み解除の可逆性を、リガンドまたはdAbモノマーの溶液を調製し、熱による折り畳み解除曲線および再折り畳み曲線をプロットすることにより決定する。リガンドまたはdAbモノマーの溶液を、リガンドまたはdAbモノマーを溶解させるのに好適なpH(例えば、等電点(pI)の上または下の約3単位であるpH)を有する水性バッファーなどの、任意の好適な溶媒中で調製することができる。リガンドまたはdAbモノマーの溶液は、折り畳み解除/折り畳みを検出することができる十分な濃度である。例えば、リガンドまたはdAbモノマーの溶液は、約0.1 μM ~ 約100 μM 、または好ましくは約1 μM ~ 約10 μM であってよい。

30

【0123】

リガンドまたはdAbモノマーの融点(T_m)が既知である場合、この溶液を T_m の約10 下($T_m - 10$)まで加熱し、楕円率または蛍光(例えば、200 nm ~ 250 nmの遠紫外線CDスキャン、235 nmもしくは225 nmの固定波長CD; 298 nmで励起した300 ~ 450 nmのトリプトファン蛍光放出スペクトル)により折り畳みを評価して、100%の相対的な折り畳まれたリガンドまたはdAbモノマーを提供することができる。次いで、この溶液を所定の増加量(例えば、約0.1 ~ 約1 の増加)で T_m の少なくとも10 上($T_m + 10$)まで加熱し、楕円率または蛍光を各増加量で決定する。次いで、リガンドまたはdAbモノマーを、所定の増加量で少なくとも $T_m - 10$ まで冷却することにより再び折り畳み、楕円率または蛍光を各増加量で決定する。リガンドまたはdAbモノマーの融点が既知ではない場合、この溶液を、約25 ~ 約100 に徐々に加熱することにより折り畳みを解除した後、少なくとも約25 に徐々に冷却することにより再び折り畳み、各加熱および冷却増加量での楕円率または蛍光を決定することができる。得られたデータをプロットして、再折り畳み曲線のy軸切片が、回収された再び折り畳まれたタンパク質の相対量である、折り畳み解除曲線および再折り畳み曲線を作製することができる。

40

50

【 0 1 2 4 】

前記リガンドまたはdAbモノマーは、任意の好適な免疫グロブリン可変ドメインを含んでもよいが、ヒト可変ドメインまたはヒトフレームワーク領域を含む可変ドメインを含むのが好ましい。特定の実施形態においては、前記dAbモノマーは、本明細書に記載の普遍的フレームワークを含む。

【 0 1 2 5 】

普遍的フレームワークは、ヒト生殖腺のDPK1、DPK2、DPK3、DPK4、DPK5、DPK6、DPK7、DPK8、DPK9、DPK10、DPK12、DPK13、DPK15、DPK16、DPK18、DPK19、DPK20、DPK21、DPK22、DPK23、DPK24、DPK25、DPK26またはDPK28免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされるフレームワークアミノ酸配列を含むフレームワークなどの、V_Lフレームワーク(V_LもしくはV_H)であってよい。必要に応じて、V_Lフレームワークは、ヒト生殖腺のJ_L 1、J_L 2、J_L 3、J_L 4、またはJ_L 5免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされるフレームワークアミノ酸配列をさらに含んでもよい。

【 0 1 2 6 】

他の実施形態においては、普遍的フレームワークは、ヒト生殖腺のDP4、DP7、DP8、DP9、DP10、DP31、DP33、DP38、DP45、DP46、DP47、DP49、DP50、DP51、DP53、DP54、DP65、DP66、DP67、DP68またはDP69免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされるフレームワークアミノ酸配列を含むフレームワークなどの、V_Hフレームワークであってよい。必要に応じて、V_Hフレームワークは、ヒト生殖腺のJ_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H4b、J_H5およびJ_H6免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされるフレームワークアミノ酸配列をさらに含んでもよい。

【 0 1 2 7 】

特定の実施形態においては、dAbモノマーリガンドは、DPK9 V_Lフレームワーク、またはDP47、DP45およびDP38からなる群より選択されるV_Hフレームワークを含む。

【 0 1 2 8 】

dAbモノマーは、プロテインA、プロテインLおよびプロテインGなどの、一般のリガンドへの結合部位を含んでもよい。

【 0 1 2 9 】

特定の実施形態においては、dAbモノマーは、ヒト生殖腺抗体遺伝子セグメントによりコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列、またはヒト生殖腺抗体遺伝子セグメントによりコードされる前記対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して最大5個のアミノ酸の差異を集合的に含む1個以上の前記フレームワーク領域のアミノ酸配列と同じであるアミノ酸配列を含む1個以上のフレームワーク領域を含む。

【 0 1 3 0 】

他の実施形態においては、dAbモノマーのFW1、FW2、FW3およびFW4のアミノ酸配列は、ヒト生殖腺抗体遺伝子セグメントによりコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列、または前記ヒト生殖腺抗体遺伝子セグメントによりコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して最大10個のアミノ酸の差異を集合的に含むFW1、FW2、FW3およびFW4のアミノ酸配列と同じである。

【 0 1 3 1 】

他の実施形態においては、dAbモノマーはFW1、FW2およびFW3領域を含み、該FW1、FW2およびFW3のアミノ酸配列は、ヒト生殖腺抗体遺伝子セグメントによりコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同じである。

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態においては、dAbモノマーはラクダ科の免疫グロブリン可変ドメイン、またはラクダ科の生殖腺の抗体遺伝子セグメントによりコードされる免疫グロブリン可変ドメインにとってユニークである1個以上のフレームワークアミノ酸を含まない。

【 0 1 3 3 】

特定の実施形態においては、本発明のリガンド(例えば、dAbモノマー)は、有効量を投与する場合、疾患のモデルにおいて有効である。一般的には、有効量は、約1 mg/kg ~ 約1

0 mg/kg(例えば、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、または約10 mg/kg)である。多くの好適な疾患モデルが存在する。本明細書に記載の慢性炎症性疾患のモデルは、ヒトにおける治療効果を予測するものとして当業者により認識されている。先行技術は、これらのモデルにおいて、可溶性サイトカイン受容体(例えば、可溶性TNFR1)などの内因性標的化合物に結合する部分を含むリガンドを用いること、またはこれらが有効であることを示唆していない。

【0134】

特定の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、標準的なマウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルにおいて有効である。例えば、有効量の前記リガンドを投与することにより、標準的なマウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルにおける4本の肢の合計の平均関節炎スコアを、好適な対照と比較して、例えば、約1~約16、約3~約16、約6~約16、約9~約16、または約12~約16低下させることができる。別の例では、有効量の前記リガンドを投与することにより、標準的なマウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルにおける関節炎の症候の開始を、好適な対照と比較して、例えば、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約10日、約14日、約21日または約28日遅延させることができる。別の例では、有効量の前記リガンドを投与することにより、0~約3、約3~約5、約5~約7、約7~約15、約9~約15、約10~約15、約12~約15、または約14~約15の標準的なマウスのコラーゲン誘導性関節炎モデルにおける4本の肢の合計の平均関節炎スコアが得られる。

10

【0135】

他の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、関節炎のマウス AREモデルにおいて有効である(Kontoyiannisら、J Exp Med 196:1563-74 (2002))。例えば、有効量の前記リガンドを投与することにより、関節炎のマウス AREモデルにおける平均関節炎スコアを、好適な対照と比較して、例えば、約0.1~約2.5、約0.5~約2.5、約1~約2.5、約1.5~約2.5、または約2~約2.5低下させることができる。別の例では、有効量の前記リガンドを投与することにより、関節炎のマウス AREモデルにおける関節炎の症候の開始を、好適な対照と比較して、例えば、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約10日、約14日、約21日または約28日遅延させることができる。別の例においては、有効量のリガンドを投与することにより、0~約0.5、約0.5~約1、約1~約1.5、約1.5~約2、または約2~約2.5の関節炎のマウス AREモデルにおける平均関節炎スコアが得られる。

20

30

【0136】

他の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、炎症性腸疾患(IBD)のマウス AREモデルにおいて有効である(Kontoyiannisら、J Exp Med 196:1563-74(2002))。例えば、有効量の前記リガンドを投与することにより、IBDのマウス AREモデルにおける平均急性および/または慢性炎症スコアを、好適な対照と比較して、例えば、約0.1~約2.5、約0.5~約2.5、約1~約2.5、約1.5~約2.5、もしくは約2~約2.5低下させることができる。別の例では、有効量の前記リガンドを投与することにより、IBDのマウス AREモデルにおけるIBDの症候の開始を、好適な対照と比較して、例えば、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約10日、約14日、約21日または約28日遅延させることができる。別の例においては、有効量のリガンドを投与することにより、0~約0.5、約0.5~約1、約1~約1.5、約1.5~約2、または約2~約2.5のIBDのマウス AREモデルにおける平均急性および/または慢性炎症スコアが得られる。

40

【0137】

他の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、IBDのマウスのデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導モデルにおいて有効である。例えば、Okayasu I.ら、Gastroenterology 98:694-702(1990); Podolsky K., J Gastroenterol. 38 suppl XV:63-66(2003)を参照されたい。例えば、有効量の前記リガンドを投与することにより、IBDのマウス DSSモデルにおける平均重篤度スコアを、好適な対照と比較して、例えば、約0.1~約2.5、約0.5~約2.5、約1~約2.5、約1.5~約2.5、もしくは約2~約2.5低下させることができ

50

る。別の例では、有効量の前記リガンドを投与することにより、IBDのマウスDSSモデルにおけるIBDの症候の開始を、好適な対照と比較して、例えば、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約10日、約14日、約21日または約28日遅延させることができる。別の例においては、有効量のリガンドを投与することにより、0~約0.5、約0.5~約1、約1~約1.5、約1.5~約2、または約2~約2.5のIBDのマウスDSSモデルにおける平均重篤度スコアが得られる。

【0138】

特定の実施形態においては、前記リガンドまたはdAbモノマーは、慢性閉塞性肺疾患(COPD)のマウスのタバコ煙モデルにおいて有効である(WrightおよびChurg, Chest, 122:301-306 (2002), Groneberg, DAら、Respiratory Research 5:18 (2004), Coffman RLら、J. Exp. Med. 201(12):1875-1879 (2001), Van Scott, MRら、J. App. Physiol. 96:1433-1444 (2004)を参照)。

10

【0139】

さらなる実施形態においては、dAbモノマーのリガンドは、喘息(Coffman RLら、J. Exp. Med. 201(12):1875-1879 (2001); Van Scott, MRら、J. App. Physiol. 96:1433-1444 (2004)を参照)、肺線維症(例えば、Venkatesan, Nら、Lung 287:1342-1347 (2004))、全身性紅斑性狼瘡(SLE) (Knightら、(1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinerstenら、(1978) New Eng. J. Med., 299: 515)、重症筋無力症 (Lindstromら、(1988) Adv. Immunol., 42: 233)、関節炎(Stuartら、(1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233; Van Edenら、(1988) Nature, 331: 171)、甲状腺炎(Maronら、(1980) J. Exp. Med., 152: 1115)、インスリン依存性糖尿病(IDDM) (Kanasawaら、(1984) Diabetologia, 27: 113)の動物モデル、および多発性硬化症のEAEモデル (Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischerら(編)、GruneおよびStratton, New York, pp. 179-213; McFarlinら、(1973) Science, 179: 478; およびSatoら、(1987) J. Immunol., 138: 179を参照)において有効である。

20

【0140】

好ましくは、前記リガンドまたはdAbモノマーを、大腸菌またはピチア種(例えば、*P. pastoris*)中で発現させる場合、少なくとも約0.5 mg/Lの量で分泌させる。他の好ましい実施形態においては、dAbモノマーを、大腸菌またはピチア種(例えば、*P. pastoris*)中で発現させる場合、少なくとも約0.75 mg/L、少なくとも約1 mg/L、少なくとも約4 mg/L、少なくとも約5 mg/L、少なくとも約10 mg/L、少なくとも約15 mg/L、少なくとも約20 mg/L、少なくとも約25 mg/L、少なくとも約30 mg/L、少なくとも約35 mg/L、少なくとも約40 mg/L、少なくとも約45 mg/L、もしくは少なくとも約50 mg/L、もしくは少なくとも約100 mg/L、もしくは少なくとも約200 mg/L、もしくは少なくとも約300 mg/L、もしくは少なくとも約400 mg/L、もしくは少なくとも約500 mg/L、もしくは少なくとも約600 mg/L、もしくは少なくとも約700 mg/L、もしくは少なくとも約800 mg/L、もしくは少なくとも約900 mg/L、もしくは少なくとも約1 g/Lの量で分泌させる。他の好ましい実施形態においては、dAbモノマーを、大腸菌またはピチア種(例えば、*P. pastoris*)中で発現させる場合、少なくとも約1 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約1 mg/L~少なくとも約750 mg/L、少なくとも約100 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約200 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約300 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約400 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約500 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約600 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約700 mg/L~少なくとも約1 g/L、少なくとも約800 mg/L~少なくとも約1 g/L、もしくは少なくとも約900 mg/L~少なくとも約1 g/Lの量で分泌させる。本明細書に記載のリガンドおよびdAbモノマーは、大腸菌またはピチア種(例えば、*P. pastoris*)中で発現させる場合に分泌可能であってよいが、これらを、合成化学方法または大腸菌もしくはピチア種を用いない生物生産方法などの任意の好適な方法を用いて製造することができる。

30

40

【0141】

いくつかの実施形態においては、前記リガンドは、内因性標的化合物またはFabフラグ

50

メント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメントもしくはFvフラグメント(例えば、scFv)などの、該化合物の抗原結合フラグメントに対する結合特異性を有する抗体である。他の実施形態においては、前記アンタゴニストまたはリガンドは、dAbなどの一価であるか、またはFabフラグメント、Fab'フラグメント、もしくはFvフラグメントなどの、抗体の一価抗原結合フラグメントである。

【0142】

本開示を通して記載される本発明の他の実施形態においては、本発明のリガンドにおいて「dAb」を用いる代わりに、当業者であれば、内因性標的化合物(例えば、好適なタンパク質足場もしくは骨格、例えば、アフィボディ、SpA足場、LDL受容体クラスAドメインもしくはEGFドメイン上に移植されたCDR)に結合するか、または例えば、ドメインがアフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメインもしくはEGFドメインから選択される、TNFR1の結合部位を含むタンパク質ドメインであってよいdAbのCDRを含むドメインを用いることができることが想定される。従って、この開示は全体として、アンタゴニスト、リガンドおよびdAbの代わりにそのようなドメインを用いる方法の開示を提供すると解釈されるべきである。さらに、本発明のリガンドを、本明細書に記載のように形式化する(例えば、延長された半減期の形式)ことができる。

10

【0143】

内因性標的化合物に結合するリガンドの使用および治療方法

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有するが、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない部分(例えば、dAb)を含むリガンドに関する。好ましくは、前記リガンドは、内因性標的化合物の活性部位に結合しない。本発明のリガンドのさらなる特徴を、本明細書で説明する。簡潔さのため、および繰り返しを避けるために、前記リガンドの開示された特徴を、全てではないが、本発明の使用および方法に関して特異的に説明する。本発明の使用および方法は、本明細書に記載の任意のリガンドの使用、およびそれを投与することを含む方法を含むことが意図される。

20

【0144】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有するが、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない部分(例えば、dAb)を含むリガンド、および製薬上許容し得る担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物に関する。本発明はまた、本発明のリガンドまたは組成物を用いる治療方法および診断方法にも関する。本明細書に記載のリガンドを、in vivoでの治療および予防適用、in vivoでの診断適用などに用いることができる。

30

【0145】

例えば、典型的には、本発明のリガンド(例えば、dAbモノマー)は、疾患(例えば、急性およびまたは慢性炎症疾患)の予防、抑制または治療において有用であろう。例えば、前記アンタゴニストおよび/またはリガンドを投与して、炎症性疾患(例えば、急性および/もしくは慢性炎症)、癌および新生物(例えば、リンパ腫(例えば、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、急性骨髄性リンパ腫)、多発性骨髄腫、肺癌、癌腫)、代謝性疾患(例えば、糖尿病、肥満)、アレルギー性過敏症、細菌もしくはウイルス感染、自己免疫障害(限定されるものではないが、1型糖尿病、喘息、多発性硬化症、関節炎(例えば、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節症(例えば、強直性脊椎炎)が挙げられる)、全身性紅斑性狼瘡、炎症性腸疾患(例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎)、重症筋無力症およびベーチェット症候群、乾癬、子宮内膜症、腹部癒着(例えば、腹部手術後)、変形性関節炎、慢性閉塞性肺疾患、または内因性標的化合物を用いる治療に対して感受性のある他の疾患を治療、抑制または予防することができる。

40

【0146】

本出願においては、用語「予防」は、疾患の誘導前に保護的組成物を投与することを含む。「抑制」とは、誘導事象の後であるが、疾患の臨床的出現の前に前記組成物を投与することを指す。「治療」は、疾患症候が現れるようになった後に保護的組成物を投与することを含む。

50

【0147】

本発明は、内因性化合物の有益な活性を生かし、引き出すために患者に投与して、有益な効果(例えば、治療上有益な効果、診断上有益な効果)をもたらすことができる医薬の製造のための、本明細書に記載のリガンドの使用に関する。従って、本発明は、例えば、被験体における前記内因性標的化合物の量(例えば、全身循環中の内因性標的化合物の量、特定の器官、組織もしくは領域(例えば、関節、肺、筋肉、皮膚の部位、CNS中)などの特定の部位での量)を増加させるため、被験体における前記内因性標的化合物の生物学的利用能(例えば、全身もしくは所望の作用部位での(例えば、関節、肺、筋肉、皮膚の部位、CNS中))を増加させるため、前記内因性標的化合物のin vivoでの半減期を増加させるため、または内因性標的化合物を用いる治療に対して感受性のある疾患(例えば、本明細書に記載の疾患など)を治療するための医薬の製造のためのリガンドの使用に関する。前記医薬は、全身投与または局所投与のためのものであってよい。

10

【0148】

本発明は、被験体における内因性標的化合物の半減期を増加させるための医薬の製造のための該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用に関する。

【0149】

前記医薬を患者に投与して、例えば、内因性標的化合物に結合し、それによって該内因性標的化合物の水力学的大きさを増加させることにより、該内因性標的化合物に結合し、これを安定化させることにより、または該内因性標的化合物に結合し、その消失もしくは代謝の速度を遅延させることにより、前記リガンドが結合する該内因性標的化合物の半減期を増加させることができる。一般的には、前記リガンドは、リガンドの非存在下での内因性標的化合物の半減期と比較して、少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、または少なくとも約10の係数により、それが結合する内因性標的化合物の半減期を増加させるであろう。例えば、内因性標的化合物は、約1時間の半減期を有してもよく、該内因性標的化合物に結合する結合部位を有する部分を含むリガンドの投与後、内因性標的化合物の半減期を約1.5時間、約10時間以上に増加させることができる。

20

【0150】

本発明は、被験体における内因性標的化合物の量を増加させるための医薬の製造のための該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用に関する。

30

【0151】

内因性標的化合物のレベルまたは量は、例えば、リガンドの半減期を増加させる効果に起因して、本明細書に記載のようにリガンドの投与後に増加してもよい。例えば、本発明のリガンドの投与の1時間、もしくは2時間、もしくは3時間、もしくは4時間、もしくは5時間、もしくは6時間、もしくは7時間、もしくは8時間、もしくは9時間、もしくは10時間、もしくは11時間、もしくは12時間、もしくは1日後の内因性標的化合物のレベルまたは量(例えば、血清中の)を、少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約500、少なくとも約1,000、少なくとも約5,000、少なくとも約10,000、少なくとも約50,000、もしくは少なくとも約100,000の係数により増加させることができる。内因性標的化合物のレベルまたは量の増加を、任意の好適な方法を用いて容易に検出することができる。例えば、好適なサンプル(例えば、血清)を、リガンドの投与前および投与後の1つ以上の時点で取得し、該サンプル中の内因性標的化合物のレベルまたは量を、任意の好適な方法を用いて決定することができる。このサンプルは、例えば、血液、血清、脳脊髄液、滑液、気管支肺胞洗浄液、浣腸または生検のサンプルであってよい。いくつかの実施形態においては、そのようなサンプル中のリガンドの量またはレベルは、リガンドを投与前の量またはレベルと比較して増加している。

40

【0152】

本発明は、被験体における内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させるための医薬の製造のための該内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用に関

50

する。

【0153】

前記医薬を被験体に投与して、全身、または所望の作用部位(例えば、リガンドを局所投与する部位で)での内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。例えば、リガンドは、全身循環中で有益な活性を有するが、組織中に迅速に分布するか、または消失し(例えば、ステロイドもしくはペプチドホルモン)、分布もしくは消失の速度を遅延させる内因性標的化合物に結合してもよい。そのようなリガンドは、内因性標的化合物の有益な活性が有益な(例えば、治療的)効果を有し得る全身循環中での該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。リガンドは、内因性標的化合物を所望の部位に補充することにより、該部位での該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させることができる。例えば、所望の内因性標的化合物への結合部位を含むリガンドを、患者に局所投与することができる(例えば、デポ製剤として)。局所投与されたりガンドは、所望の内因性標的化合物に結合し、さらなる内因性標的化合物を前記部位に補充することができる。かくして、内因性標的化合物のレベルまたは量の増加を該部位に存在させて、有益な効果をもたらすことができる。例えば、一実施形態においては、前記リガンドはTGF β アイソフォーム3への結合部位を有する部分を含む。そのようなリガンドを局所投与して、TGF β アイソフォーム3に結合させ、TGF β アイソフォーム3を局所投与部位に補充させ、かくして創傷治癒を促進することができる。

10

【0154】

一般的には、前記リガンドは、リガンドの非存在下での該内因性標的化合物の生物学的利用能と比較して、それが結合する内因性標的化合物の生物学的利用能(例えば、全身循環中、所望の作用部位での)を少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、または少なくとも約10の係数により増加させるであろう。例えば、前記リガンドが全身循環中の生物学的利用能を増加させる場合、該リガンドの投与の時点で開始する内因性リガンドに関する濃度時間曲線を調製し、この曲線および曲線下面積(AUC)を、内因性標的リガンドの正常な全身レベルと比較して、全身の生物学的利用能の増加の程度を決定することができる。

20

【0155】

本発明は、内因性標的の活性を増加させるための医薬の製造のための内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドの使用に関する。

30

【0156】

前記リガンドは、それらが結合する内因性標的の活性(例えば、結合活性)を増加させることができる。例えば、リガンドは、内因性アゴニスト(例えば、サイトカイン)もしくは可溶性サイトカイン受容体などの内因性標的化合物に結合し、その内因性結合パートナーに対する、該内因性標的化合物の親和性および/またはアビディティを増加させることにより、該内因性標的化合物の結合活性を改善することができる。所望の内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する2個以上の部分を含むリガンドは、2個以上の個々の内因性標的化合物分子に結合することによって、内因性標的化合物のダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーを産生することができる。そのようなダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーは、例えば、より高いアビディティに起因して前記内因性標的化合物の天然の結合パートナーを発現する細胞に対する改善された結合活性を有するであろう。一般的には、そのようなリガンドは、内因性標的化合物の結合活性を改善することができる。例えば、内因性標的化合物の結合パートナーに対するそのダイマーの結合強度(例えば、親和性またはアビディティ)は、モノマーとしての(すなわち、本発明のリガンドとの複合体中ではない)該内因性標的化合物の結合強度よりも、少なくとも約10倍、少なくとも約100倍、少なくとも約1,000倍または少なくとも約10,000倍強いものであってよい。

40

【0157】

特定の実施形態においては、前記リガンドは可溶性TNFR1に対する結合特異性を有する

50

が、活性部位(可溶性TNFR1の活性部位はドメイン2および3内に含まれる)に結合しない2個以上の部分(dAb)を含む。そのようなリガンドは、2個以上の可溶性TNFR1鎖に結合して、増加したアビディティに起因して、そのトリマーリガンド、TNFに対する改善された結合活性を有する可溶性TNFR1ダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーを形成することができる。また、単一の可溶性TNFR1鎖よりも大きい水力学的大きさを有する、そのような可溶性TNFR1ダイマー、トリマー、オリゴマーまたはマルチマーの半減期を、単一のTNFR1と比較して延長することもできることが理解されるべきである。結果として、そのようなリガンドは可溶性TNFR1のTNF阻害活性を改善し、その治療効果を改善することができる。例えば、そのようなリガンドは、少なくとも約10、少なくとも約100、少なくとも約1,000または少なくとも約10,000の係数により、可溶性TNFR1の効果を改善することができる。 10

【0158】

この実施形態の一例においては、マウスTNFR1のドメイン1に結合するdAbのダイマーであるリガンドを用いて、可溶性TNFR1のダイマー化を誘導するリガンドが可溶性TNFR1の効果を改善することを証明する。例えば、そのようなリガンドを、ヒトMRC5細胞、ヒトTNFおよび可溶性マウスTNFR1を含むアッセイに添加することができる。可溶性マウスTNFR1は、ヒトTNFへの結合に関して、MRC5細胞上でヒトTNFR1と競合するであろう。マウスTNFR1のドメイン1に結合するdAbのダイマーであるリガンドは、2個の可溶性マウスTNFR1鎖に結合して、前記アッセイにおいてTNFの効果を阻害するのにより有効であるマウスTNFR1ダイマーを形成する。例えば、マウスTNFR1のIC50を、可溶性TNFR1のダイマー化を誘導するリガンドの添加により、nM範囲からpM範囲まで低下させることができる(約10または約100または約1000倍の低下)。 20

【0159】

好ましくは、可溶性受容体鎖のダイマー化(またはトリマー化またはオリゴマー化)を誘導するリガンドは、標準的な細胞アッセイにおいて細胞表面形態または膜貫通形態の該受容体を実質的に作動させない(すなわち、1 nM、10 nM、100 nM、1 μM、10 μM、100 μM、1 000 μMまたは5,000 μMの濃度で存在する場合、受容体に媒介される活性の約5%以下が該アッセイにおいて該受容体の天然のリガンドにより誘導される)。

【0160】

特定の実施形態においては、本発明は、内因性標的化合物の結合活性を増加させるための医薬の製造のための該内因性標的化合物への結合部位を有する2個以上の部分を含むリガンドであって、該内因性標的に結合し、該内因性標的の活性部位に結合せず、および該内因性標的化合物の結合活性を実質的に阻害しない、前記リガンドの使用に関する。 30

【0161】

本発明はまた、内因性標的化合物を用いる治療に対して反応する疾患の治療における使用のための、被験体における疾患を治療するのに好適な活性を有する該内因性標的化合物に結合するリガンドであって、該内因性標的化合物の活性部位に結合しないか、または該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、前記リガンドにも関する。例えば、前記リガンドは、前記内因性標的化合物の *in vivo*での半減期を増加させ、被験体における該内因性標的化合物の量を増加させ、該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させ、および/または該内因性化合物の結合活性を増加させることができる。 40

【0162】

本発明は、前記内因性化合物の半減期、生物学的利用能または活性を増加させるための内因性標的化合物への結合部位を有する結合部分を含むリガンドであって、内因性化合物への結合部位を有する該結合部分が該内因性化合物またはその一部もしくは変異体であり、かつ該リガンドが該内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、前記リガンドの使用に関する。

【0163】

本発明は、TNF受容体スーパーファミリーのメンバーの半減期、生物学的利用能または活性を増加させるための、TNF受容体スーパーファミリーの該メンバーへの結合部位を有 50

する結合部分を含むリガンドであって、該リガンドがTNF受容体スーパーファミリーの該メンバーに結合し、TNF受容体スーパーファミリーの該メンバーの活性を実質的に阻害せず、かつTNF受容体スーパーファミリーのメンバーの結合部位を有する該結合部分がプレリガンド集合ドメイン(PLAD)またはその変異体である、前記リガンドの使用に関する。

【0164】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における該内因性標的化合物の半減期を増加させるための方法に関する。

【0165】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における該内因性標的化合物の量を増加させるための方法に関する。

10

【0166】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における該内因性標的化合物の生物学的利用能を増加させるための方法に関する。

【0167】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における該内因性標的化合物の活性(例えば、結合活性)を増加させるための方法に関する。

20

【0168】

本発明は、内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、該被験体における該内因性標的化合物を用いる治療に対して感受性のある疾患を有する被験体を治療するための方法に関する。

【0169】

本発明は、内因性化合物への結合部位を有する結合部分が内因性化合物またはその一部もしくは変異体であり、かつリガンドが内因性標的化合物に結合し、該内因性標的化合物の活性を実質的に阻害しない、該内因性標的化合物に対する結合特異性を有する該結合部位を有する部分を含む有効量の該リガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、内因性標的化合物の半減期、生物学的利用能または活性を増加させるための方法に関する。

30

【0170】

本発明は、リガンドがTNF受容体スーパーファミリーのメンバーに結合し、TNF受容体スーパーファミリーの該メンバーの活性を実質的に阻害せず、かつTNF受容体スーパーファミリーの該メンバーへの結合部位を有する該結合部分がプレリガンド集合ドメイン(PLAD)またはその変異体である、TNF受容体スーパーファミリーの該メンバーへの結合部位を有する結合部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、TNF受容体スーパーファミリーの該メンバーの半減期、生物学的利用能または活性を増加させるための方法に関する。

40

【0171】

本発明のリガンドの治療的および予防的使用は、ヒトなどのレシピエント哺乳動物への本発明によるリガンドの投与を含む。二重特異的および多特異的リガンド(例えば、二重特異的抗体形式)は、高いアビジニティでマルチマー抗原に結合する。二重特異的または多特異的リガンドは、2個の抗原の架橋を可能にして、例えば、高いアビジニティの可溶性受容体のダイマー、トリマーまたはマルチマーを産生することができる。

【0172】

少なくとも90~95%の均質性の実質的に純粋なリガンドが哺乳動物への投与によって好ましく、98~99%以上の均質性が、薬剤としての使用によって、特に、哺乳動物がヒトである場合、最も好ましい。一度、所望のように部分的に、または均質まで精製された場合

50

、前記リガンドを診断的もしくは治療的(体外治療を含む)に用いるか、またはアッセイ手順、免疫蛍光染色などの開発および実施において用いることができる(LefkoviteおよびPernis, (1979および1981) Immunological Methods, Volumes IおよびII, Academic Press, NY)。

【0173】

一般的には、前記リガンドを、薬理的に好適な担体と一緒に精製された形態で用いることができる。典型的には、これらの担体としては、水性もしくはアルコール性/水性溶液、乳液もしくは懸濁液、塩水および/もしくは緩衝培地などの任意のものが挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウムおよび乳酸加リンゲル液が挙げられる。必要に応じて懸濁液中にポリペプチド複合体を保持するために、好適な生理学上許容し得るアジュバントを、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチンおよびアルギン酸などの増粘剤から選択することができる。

10

【0174】

静脈内ビヒクルとしては、液体および栄養補給液および電解質補給液、例えば、リンゲルのデキストロースに基づくものが挙げられる。また、抗菌剤、酸化防止剤、キレート化剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加物が存在してもよい(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。延長された放出製剤などの、様々な好適な製剤を用いることができる。

20

【0175】

本発明による医薬組成物の投与経路は、当業者には一般的に知られている任意のものであってよい。治療、限定されるものではないが、免疫治療のためには、本発明のその選択されたリガンドを、標準的な技術に従って任意の患者に投与することができる。この投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、経肺経路などの任意の好適な様式によるか、または、好適には、カテーテルを用いる直接注入によるものであってよい。非経口投与はまた、動脈内、鞘内、関節内、皮下、または他の好適な注射もしくは注入によるものであってよい。さらなる好適な様式の投与としては、経肺投与、経鼻投与、腔内、直腸内投与(例えば、座剤もしくは浣腸剤による)が挙げられる。投与の用量および頻度は、患者の年齢、性別および症状、他の薬剤の同時投与、医師により考慮に入れられる対抗指示および他のパラメーターに依存するであろう。投与は、指示されるように、局所性(例えば、経肺投与、例えば、鼻内投与による肺への局所送達)または全身性のものであってよい。

30

【0176】

本発明のリガンドを、別々に投与される組成物として、または他の薬剤と組合わせて用いることができる。これらのものとしては、シクロスポリン、メトトレキサート、アドリアマイシンもしくはシスプラチンなどの様々な免疫治療剤、および免疫毒素が挙げられる。医薬組成物は、本発明のアンタゴニスト(例えば、リガンド)と組合わせた様々な細胞傷害剤もしくは他の薬剤の「カクテル」、またはそれらを投与前にプールのかどうかを拘らず、異なる標的抗原もしくはエピトープを用いて選択されたリガンドなどの異なる特異性を有する本発明によるリガンドの組合せをも含んでもよい。一般的には、前記リガンドおよび任意の追加の薬剤を、治療効果の重複を提供する様式で投与する。

40

【0177】

特定の実施形態においては、内因性標的化合物への結合部位を有する部分を含むリガンドを、低用量の該内因性標的化合物(例えば、組換え形態の該内因性標的化合物)と一緒に投与する。本明細書に記載のように、前記リガンドは、例えば、内因性標的化合物の半減期もしくは生物学的利用能を増加させるか、または内因性標的化合物の活性を増加させて、低用量でも治療上有効にすることができる。この治療手法は、疾患を治療するためのより高用量の薬剤(例えば、組換え形態の内因性標的タンパク質)に関連する副作用を回避することができるため、有利である。

【0178】

50

他の実施形態においては、内因性標的化合物で予め負荷された(例えば、組換え形態の内因性標的化合物と共にインキュベートし、これに結合させた)リガンドを投与する。予め負荷されたリガンドを局所投与のためによく適合させて、通常は治療下のレベルで存在するか、内因性標的リガンドの活性が望まれる部位に補充するのが困難である内因性標的リガンドの高い生物学的利用能を提供する。

【0179】

エンドサイトーシスに關与する細胞外標的(例えば、クラスリン)に結合することができる本発明によるリガンドをエンドサイトーシスさせて、細胞内標的へのアクセスを可能にすることができる。さらに、二重特異的または多特異的リガンドは、細胞内標的に特異的に結合することができる結合ドメイン(例えば、dAbモノマー)を細胞内環境に送達することができる手段を提供する。この戦略には、例えば、細胞の内側で機能的なままでいることを可能にする物理的特性を有する二重特異的リガンドを必要とする。あるいは、細胞内区画の最終的な目標が酸化している場合、よく折り畳まれるリガンドはジスルフィドを含まないものである必要はない。

10

【0180】

有利には、二重特異的または多特異的リガンドを用いて、生物の体内における治療状態で相乗的に協同するサイトカインおよび他の分子を標的化することができる。従って、本発明は、2個以上の分子(例えば、サイトカイン)に結合することができる二重特異的または多特異的リガンドを投与することを含む、サイトカインまたは他の分子に結合する2個以上の結合ドメイン(例えば、dAb)の活性を相乗作用させるための方法を提供する。本発明のこの態様においては、二重特異的または多特異的リガンドは、相補的および/もしくは非相補的ドメインからなるリガンド、開いたコンフォメーションにあるリガンド、ならびに閉じたコンフォメーションにあるリガンドなどの、任意の二重特異的または多特異的リガンドであってよい。例えば、本発明のこの態様は、 V_H ドメインと V_L ドメインの組合せ、 V_H ドメインのみおよび V_L ドメインのみに關する。

20

【0181】

治療的な文脈での相乗作用を、いくつかの方法で達成することができる。例えば、標的の組合せは、両標的が前記リガンドにより標的化される場合のみ、治療上活性であってよいが、1つの標的のみを標的化することは治療上有効ではない。別の実施形態においては、1つの標的は、単独で、いくらかの低いか、または最小の治療効果を提供することができるが、第2の標的と一緒に、この組合せは治療効果の相乗的な増加を提供する。

30

【0182】

疾患に対する保護、またはその治療における前記リガンドの有効性をスクリーニングするのに用いることができる動物モデル系が利用可能である。本明細書に開示されるモデルなどの、好適な動物モデルを用いることができる。

【0183】

本発明のリガンドを保存のために凍結乾燥し、使用前に好適な担体中で再構成させることができる。この技術は従来の免疫グロブリンと共に有効であることが示されたが、当業界で公知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。当業者であれば、凍結乾燥および再構成は、抗体活性の喪失の程度の変化をもたらし得ること(例えば、従来の免疫グロブリンを用いる場合、IgM抗体はIgG抗体よりも大きい活性の喪失を有する傾向がある)、ならびに使用レベルを上方調整して補償する必要があるかもしれないことを理解できるであろう。

40

【0184】

本発明のリガンドまたはそのカクテルを含む組成物を、予防および/または治療処理のために投与することができる。特定の治療適用においては、選択された細胞の集団の、少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、殺傷、またはいくつかの他の測定可能なパラメータを達成するのに十分な量を、「治療上有効量」と定義する。この用量を達成するのに必要な量は、疾患の重篤度および患者自身の免疫系の一般的な状態に依存するであろうが、一般的には、0.005~5.0 mgリガンド/kg体重の範囲であり、より一般的には0.05~2.0 m

50

g/kg/用量の用量を用いる。予防的適用のためには、本発明のリガンドまたはそのカクテルを含む組成物を、類似するか、またはわずかにより低い用量で投与して、疾患の開始を予防、阻害または遅延させる(例えば、寛解もしくは静止を持続させるか、または急性期を予防する)ことができる。技術を有する医師であれば、疾患を治療、抑制または予防するのに好適な投薬間隔を決定することができるであろう。TNFR1のアンタゴニスト(例えば、リガンド)を投与して、慢性炎症性疾患を治療、抑制または予防する場合、それを最大で1日4回、週に2回、週に1回、2週間毎に1回、月に1回、または2ヶ月毎に1回、例えば、約10 µg/kg ~ 約80 mg/kg、約100 µg/kg ~ 約80 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約80 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約70 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約60 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約50 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約40 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約30 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約20 mg/kg、約1 mg/kg ~ 約10 mg/kg、約10 µg/kg ~ 約10 mg/kg、約10 µg/kg ~ 約5 mg/kg、約10 µg/kg ~ 約2.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kgまたは約10 mg/kgの用量で投与することができる。特定の実施形態においては、TNFR1のアンタゴニスト(例えば、リガンド)を、2週間に1回もしくは月に1回、約10 µg/kg ~ 約100 mg/kg(例えば、約10 µg/kg、約100 µg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kgもしくは約10 mg/kg)の用量で投与して、慢性炎症性疾患を治療、抑制または予防する。前記リガンドを、例えば、約1 mg/日 ~ 約10 mg/日(例えば、10 mg/日、9 mg/日、8 mg/日、7 mg/日、6 mg/日、5 mg/日、4 mg/日、3 mg/日、2 mg/日、または1 mg/日)の用量で投与することもできる(例えば、全身的または局所的に)。従って、前記薬剤を、約1 µg/kg/日 ~ 約200 µg/kg/日(例えば、約10 µg/kg/日、約20 µg/kg/日、約30 µg/kg/日、約40 µg/kg/日、約50 µg/kg/日、約60 µg/kg/日、約70 µg/kg/日、約80 µg/kg/日、約90 µg/kg/日、約100 µg/kg/日、約110 µg/kg/日、約120 µg/kg/日、約130 µg/kg/日、約140 µg/kg/日、約150 µg/kg/日、約160 µg/kg/日、約170 µg/kg/日、約180 µg/kg/日、または約190 µg/kg/日)の用量で肺組織に局所投与することができる。

【0185】

本明細書に記載の組成物を用いて行われる治療または療方は、治療前に存在するそのような症候と比較して、またはそのような組成物もしくは他の好適な対照を用いて治療されなかった個体(ヒトもしくはモデル動物)におけるそのような症候と比較して、1つ以上の症候が低減する(例えば、少なくとも10%もしくは臨床評価尺度で少なくとも1点)場合、「有効」と考えられる。症候は標的化された疾患もしくは障害に依存して明らかに変化するであろうが、通常の知識を有する医師もしくは技術者であれば、これを測定することができる。そのような症候を、例えば、疾患もしくは障害の1つ以上の生化学的指示因子のレベル(例えば、疾患と相関する酵素もしくは代謝物のレベル、影響を受けた細胞数など)をモニターすることにより、身体的な徴候(例えば、炎症、腫瘍の大きさなど)をモニターすることにより、または許容された臨床評価尺度、例えば、総合障害度評価尺度(多発性硬化症について)、Irvine Inflammatory Bowel Disease Questionnaire(32点の評価は、腸機能、全身症候、社会的機能および感情状態に関する生活の質を評価する-スコアは32~224の範囲であり、より高いスコアはより良い生活の質を示唆する)、Quality of Life Rheumatoid Arthritis Scale、St. George's Respiratory Questionnaire、もしくは当業界で公知の他の許容された臨床評価尺度により測定することができる。疾患もしくは障害の症候における、少なくとも10%または所与の臨床尺度上での1以上の点数の持続的(例えば、1日以上、好ましくはより長い)低減は、「有効な」治療を示す。同様に、本明細書に記載の組成物を用いて行われる予防は、該組成物を用いて治療されなかった同様の個体(ヒトもしくは動物モデル)におけるそのような症候と比較して、1つ以上の症候の開始もしくは重篤度が遅延、低減または廃止する場合、「有効」である。

【0186】

本発明によるリガンドまたはそのカクテルを含む組成物を、哺乳動物における選択された標的細胞集団の変化、不活性化、殺傷もしくは除去に役立つ予防および治療設定において用いることができる。さらに、本明細書に記載のポリペプチドの選択されたレパートリ

ーを、体外またはin vitroで選択的に用いて、細胞の異種収集物から、標的細胞集団を殺傷し、枯渇させるか、またはさもなければ効果的に除去することができる。哺乳動物から取得した血液を、リガンド、例えば、抗体、細胞表面受容体もしくはその結合タンパク質と体外で混合することができ、標準的な技術に従って該哺乳動物に戻すために、所望の細胞を殺傷するか、または血液から除去する。

【0187】

本発明に従うリガンドを含む組成物を、哺乳動物における選択された標的細胞集団の変化、不活性化、殺傷または除去に役立つ予防および治療設定において用いることができる。

【0188】

さらに、本明細書に記載のポリペプチドの選択されたレパートリーを体外またはin vitroで選択的に用いて、細胞の異種収集物から、標的細胞集団を殺傷し、枯渇させるか、またはさもなければ効果的に除去することができる。哺乳動物から取得した血液を、リガンド、例えば、抗体、細胞表面受容体もしくはその結合タンパク質と体外で混合することができ、標準的な技術に従って該哺乳動物に戻すために、所望の細胞を殺傷するか、または血液から除去する。

【0189】

内因性標的化合物

好適な内因性標的化合物としては、例えば、可溶性サイトカイン受容体(例えば、可溶性TNFR1、可溶性TNFR2、可溶性IL-1受容体、可溶性IL-4受容体、可溶性IL-13受容体)、内因性受容体アンタゴニスト(IL-1ra、IL-6ra)、酵素(例えば、 β -グルコセレブロシダーゼ(E.C.3.2.1.45))、血液因子(例えば、第II因子、第VIII因子)、エリスロポエチン、ヒト成長ホルモン、TPO、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、GLP-1、OXM、性ホルモン(例えば、テストステロン、エストロゲン)、骨形態形成タンパク質(例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7)、トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)アイソフォーム1、TGF- β アイソフォーム2、TGF- β アイソフォーム3、IL-10、IL-2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン、グルカゴン、GIPなどが挙げられる。

【0190】

好適な内因性標的化合物としては、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子およびケモカインなどのサイトカインが挙げられる。そのようなサイトカインの例としては、インターロイキン、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15(IL-T)、IL16、IL17、IL17B、IL17C、IL17E、IL17F、IL18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、IL-31およびIL-32、ならびにインターフェロン、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- ζ 、IFN- ω 、IFN- ω -1、IFN- ω -2、IFN- ω -3、IFN- ω 、およびIFN- ω が挙げられる。

【0191】

好適な内因性標的化合物としては、ケモカイン、CCF18、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、ECIP-1、EDNAP、ENA-78、ENAP、ENAP- α 、ENAP- β 、内皮細胞増殖阻害剤、内皮IL8、FIC、FDNCF、FINAP、GDCF-2、GCF、GCP-2、GRO- α 、GRO- β 、GRO- γ 、ヘパリン中和タンパク質、Humig、I-309、ILC、ILINCK、IMAC、I-TAC、IL8、IP-9、IP-10、リンホタクチン、LAG-1、LARC、LCC-1、LD78- α 、LD78- β 、LD78- γ 、LDCF、LEC、Lkn-1、LMC、LAI、LCF、LA-PF4、LDGF、LDNAP、LIF、LIX、MARC、MCAF、MCIF、メキシキン、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、MDC、MEC、MIP-1- α 、MIP-1- β 、MIP-1- γ 、MIP-1- δ 、MIP-3、MIP-3- α 、MIP-3- β 、MIP-3- γ 、MIP-4、MIP-4- α 、MIP-5、Monotactin-1、MPIF-1、MPIF-2、MRP-1、MRP-2、MDGF、MDNAP、MDNCF、巨核球刺激因子、MGSA、MGSA- α 、MGSA- β 、Mig、MIP-2、MIP-2- α 、MIP-2- β 、MIP-2- γ 、NAF、NAP-1、NAP-2

10

20

30

40

50

、NAP-3、NAP-4、NCP、オンコスタチンA、PARC、PBP、PBP-様、PBSF、PF4、PLF、PPBP、R ANTES、レガキン-1、SCM-1-、SCYC1、SCYC2、SC1、SCYA1、SCYA2、SCYA3、SCYA4、SCYA 5、SCYA6、SCYA7、SCYA8、SCYA9、SCYA10、SCYA11、SCYA12、SCYA13、SCYA14、SCYA15、S CYA16、SCYA17、SCYA19、SCYA20、SCYA21、SCYA22、SCYA23、SCYA24、SCYA25、SCYA26、S CYA27、SCYA28、SLC、SMC-CF、STCP-1、SCYB1、SCYB2、SCYB3、SCYB4、SCYB5、SCYB6、SC YB7、SCYB8、SCYB9、SCYB9B、SCYB10、SCYB11、SCYB12、SCYB13、SCYB14、SCYB15、SCYB1 6、SDF-1-、SDF-1-、SR-PSOX、SCYD1、SR-PSOX、TARC、TCA-3、TCA-4、TDCF、TECK、 TSC-1、TSG-8、TCF、TCK-1、TLSF-、TLSF-、TPAR-1、TSG-1、WECHEが挙げられる。

【0192】

好適な内因性標的化合物としては、コロニー刺激因子(CSF)が挙げられる。CSFは、成体 10
において骨髄の特定の多能幹細胞の増殖を刺激するサイトカインである。顆粒球-CSF (G-
CSF)は、顆粒球系列の細胞に対する増殖作用に特異的である。マクロファージ-CSF (M-CS
F)は、マクロファージ系列の細胞に特異的である。顆粒球-マクロファージ-CSF (GM-CSF)
は両クラスのリンパ細胞に対する増殖作用を有する。Epoは赤血球コロニー形成単位の増
殖を刺激するので、これもCSFならびに増殖因子であると考えられる。IL-3(主にT細胞か
ら分泌される)は幹細胞を刺激して、全形態の造血細胞を産生するので、これもマルチ-CS
Fとして知られている。

【0193】

好適な内因性標的化合物としては、エリスロポエチン(Epo)が挙げられる。Epoは腎臓に 20
より合成され、赤血球生成の主要な調節因子である。Epoは未成熟な赤血球の増殖および
分化を刺激する；それはまた赤血球前駆細胞の増殖を刺激し(例えば、赤血球バースト形
成およびコロニー形成単位)、前赤芽球への赤血球コロニー形成単位の分化を誘導する。
腎不全に起因する貧血に罹患する患者にEpoを与えた場合、その結果は迅速であり、赤血
球計数が有意に増加する。

【0194】

好適な内因性標的化合物としては、インスリン様増殖因子I(IGF-I)が挙げられる。IGF- 30
I(元はソマトメジンCと呼ばれた)はインスリンと構造的に関連する増殖因子である。IGF
-Iは増殖ホルモン(GH)に対する細胞の応答に關与する主要なタンパク質である：すなわち
、IGF-Iは、GHに回答して産生され、次いで、その後の細胞活動、特に骨増殖を誘導する
。それは、用語「ソマトメジン」に対して生じたGHに回答するIGF-Iの活性である。しか
しながら、その後の研究により、IGF-Iが骨上で最初に観察されたエンドクライン活性に
加えて、オートクラインおよびパラクライン活性を有することが示された。IGF-I受容体
は、インスリン受容体と同様、固有のチロシンキナーゼ活性を有する。その構造的類似性
のため、IGF-Iはインスリン受容体に結合することができるが、インスリン自身よりは非
常に低い親和性で結合する。

【0195】

好適な内因性標的化合物としては、インスリン様増殖因子II(IGF-II)が挙げられる。IG 40
F-IIはほとんど胚組織および新生児組織においてのみ発現される。誕生後、検出可能なIG
F-IIタンパク質のレベルは有意に落ち込む。この理由のため、IGF-IIは胎児増殖因子であ
ると考えられている。IGF-II受容体は、リソソームへのリソソーム酵素(マンノース-6-リ
ン酸残基を含む)の組込みを担うマンノース-6-リン酸受容体と同一である。

【0196】

好適な内因性標的化合物としては、腫瘍壊死因子 が挙げられる。TNF- (リンホトキ 40
シンとも呼ばれる)は、いくつかの異なる細胞型を殺傷するその能力、ならびに他の細胞
への最終的な分化を誘導する能力を特徴とする。TNF- に対する1つの有意な非増殖性応
答は、血管内皮細胞の表面上に存在するリポタンパク質リパーゼの阻害である。TNF- 合
成の所定の部位はTリンパ球、特に、細胞傷害性Tリンパ球(CTL細胞)と呼ばれる特殊なク
ラスのT細胞である。TNF- 発現の誘導は、IL-2の上昇ならびに抗原とT細胞受容体との相
互作用をもたらす。

【0197】

10

20

30

40

50

好適な内因性標的化合物としては、腫瘍壊死因子 (TNF-) が挙げられる。TNF- (リンボトキシンB、またはカケクチンとも呼ばれる) は多面的炎症サイトカインであり、いくつかの型の腫瘍の壊死を引き起こし得る。TNF- は、TNF- と36%しかアミノ酸配列相同性を有さない。しかし、この2つのタンパク質の三次構造は顕著に類似しており、両方ともTNF受容体TNFR-1およびTNFR-2に結合する。TNF- は主要組織適合複合体内にコードされるトリマータンパク質である。それは最初は17 kdの分泌形態で同定されたが、その後、切断されていない27 kdの前駆体形態も膜貫通形態で存在することがさらなる研究により示された。刺激されたマクロファージは、細胞間接触を介してTNFR-1およびTNFR-2に直接結合するか、または切断を受けてその可溶性形態に結合することができる27 kdのTNF- を産生する。このサイトカインはいくつかの型の細胞により産生されるが、特にマクロファージにより産生される。低レベルのTNF- は、線維芽細胞増殖を刺激することにより、損傷された組織および老化組織の再モデリングまたは置換を促進する。TNF- のさらなる有益な機能としては、細菌、および特定の菌類、ウイルス、および寄生侵入体に対する免疫応答におけるその役割ならびに特定の腫瘍の壊死におけるその役割が挙げられる。最後に、それは局所炎症免疫応答における重要なメディアリー (mediary) として働く。TNF- は、サイトカインのカスケードを開始し、血管の透過性を増加させることによってマクロファージおよび好中球を感染部位に補充する急性期タンパク質である。マクロファージにより分泌されたTNF- は、感染を含むように働く血液の凝固を引き起こす。TNF- はまた、慢性的な作用 (例えば、炎症における) を示し、TNF- の延長された過剰産生は、拒食症、正味異化、体重減少および貧血を特徴とし、癌およびAIDSなどの病気を生じる、悪液質として知られる症状をもたらす。

10

20

【0198】

好適な内因性標的化合物としては、CD34、CIL (コロニー阻害リンホカイン)、ダニプレスチム、GADS (shcの下流のGRB2関連アダプター)、造血細胞増殖因子、造血細胞キナーゼ、造血細胞ホスファターゼ、造血共通チロシン欠損キナーゼ、造血コロニー刺激因子-309、ヘマトポエチン-1、ヘマトポエチン-2、血液調節ペプチド、HIM、Hiwi、HnudC、プロゲニポエチン、プロゲニポエチン-1、プロゲニポエチン-2、プロゲニポエチン-4、プロメガポエチン、プロメガポエチン-1、プロメガポエチン-1a、およびシントカインなどの造血におけるサイトカインおよび増殖因子が挙げられる。

【0199】

広い意味での他の造血増殖因子としては、種々のコロニー刺激因子 (G-CSF、GM-CSF、M-CSFなどのCSFを参照)、Epo、SCF (幹細胞因子)、SCPF (幹細胞増殖因子)、種々のインターロイキン (IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL11、IL12)、LIF、TGF-、MIP-1-、TNF-、また多くの他の低分子量因子、およびいくつかの他のサイトカインが挙げられる。これらのタンパク質の多くは多機能である。これらは非常に早い分化段階または後の段階で働く；これらはまた、系列特異的な様式で働き、2個以上の系列に影響し得る。約束された前駆体の増殖および成熟は、Epo、M-CSF、G-CSF、およびIL5などの後に働く系列特異的因子により制御される。活発な細胞増殖を開始する多能前駆体は、IL3、GM-CSF、およびIL-4などのいくつかの重複するサイトカインにより調節される。休眠中の原始前駆体による循環の誘発および原始前駆体のB細胞能力の維持は、IL6、G-CSF、IL11、IL12、LIF、およびSCFなどの初期に働くサイトカインの相互作用を必要とするようである。その生物学的活性に依存して、ヘマトポエチンはいくつかのサブ群に分類されてきた。

30

40

【0200】

用語「1型ヘマトポエチン」は、いくつかの細胞型に直接作用する造血の調節に関与する因子を記載するのに用いられることがある。この群はIL3 (マルチ-CSF) およびGM-CSFを含む。コロニー刺激因子と相乗作用するが、それ自身によっては本来のコロニー刺激活性を有さない因子を、2型ヘマトポエチンと呼ぶことがある。これらはIL1、IL4、IL5およびIL6を含む。3型ヘマトポエチンは、その対応する産生細胞によるコロニー刺激因子の放出を刺激することにより造血増殖を調節するものである。これらはIL1、IL2、TNF- およびIFN- を含む。

50

【0201】

いくつかの因子は造血のプロセスを負に調節する。これらは、いくつかの型の造血細胞の増殖を選択的に阻害し、細胞死さえ誘導し得る。例えば、トランスフォーミング増殖因子TGF- β は、原始造血細胞およびリンパ細胞に対して主に作用する。MIP-1 α （マクロファージ炎症タンパク質-1 α ）と呼ばれる因子は、原始骨髄造血細胞に対する同様の活性を示す。

【0202】

好適な内因性標的化合物としては、血管新生に關与する内因性化合物が挙げられる。血管新生に關与する内因性化合物の例としては、16Kプロラクチン、ADAMTS-1、ADAMTS-8、アドレノメジュリン、血管關連移住細胞タンパク質、アンジオジェニン、アンジオジェニン關連タンパク質、アンジオモジュリン、アンジオモチン、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンジオポエチン-3、アンジオポエチン-4、アンジオポエチン-5、アンジオポエチン様1、アンジオポエチン様2、アンジオポエチン様3、アンジオポエチン様4、アンジオポエチン關連タンパク質-2、アンジオスタチン、アンジオスタチン-2、アンジオトロピン、ARP-2、B16-F1メラノーマオートクライン阻害因子-2、脳特異的血管新生阻害因子-3、C49a、CAMアッセイ、軟骨由来抗腫瘍因子、軟骨由来阻害因子、CATF、cCAF、CD55、CD1、CDT6、軟骨細胞由来阻害因子、血管新生およびメタロプロテイナーゼ活性の軟骨細胞由来阻害因子、コンドロモジュリン-1、軟骨肉腫由来増殖因子、絨毛尿膜アッセイCLAF、18型コラーゲン、結合組織増殖因子、黄体血管新生因子、脱顆粒阻害タンパク質、EGF、EG-VEGF、胚性腎臓由来血管新生因子-1、胚性腎臓由来血管新生因子-2、内分泌腺由来血管内皮増殖因子、エンドレペリン、内皮細胞刺激血管新生因子、内皮細胞由来増殖因子、内皮-単球活性化ポリペプチド-2、ESAF、f-ECGF、FGF、FGF-4、フィブリン断片E、線維芽細胞由来内皮細胞増殖因子、線維芽細胞誘導性分泌タンパク質-12、FrzB2、GFB-111、グリオーマ由来血管新生阻害因子、増殖ホルモン、GSN、HAF、ハプトグロビン、ヘパリン結合軸索促進因子、肝細胞増殖因子、HGF、HUAF、ヒト血管新生因子、ヒト阻害血管新生因子-1、ヒト子宮血管新生因子、IFN- γ 、IFN- β 、IGF、IGF-1、IGF-BP-7、ジャグド、KAF、カリスタチン、K-FGF、腎臓血管新生因子、カニノスタチン、移住刺激因子、マイトジェン調節タンパク質/プロリフェリン、マイトジェン調節タンパク質-4、単球-アンジオトロピン、MRP/PLF、MRP-4、ニューロロイキン、ニューロロイキン-1、NKG5、NLK、ノッチ-1、ノッチ-4、ORF-74、卵巣増殖因子、PAF、副甲状腺ホルモン様關連タンパク質、PD-ECGF、PDGF、PDGF-BB、PEDF、PF4、PGI₂、色素上皮由来因子、胎盤増殖因子、胎盤血管新生因子、血小板因子-4、血小板由来内皮細胞増殖因子、PIGF、PrGF、プロキネチシン-1、プロリフェリン關連タンパク質、プロスタサイクリン刺激因子、前立腺増殖因子、プロトロンビクリングル-2ドメインPRP、PTHrP、RNASE5、散乱因子、セマフォリン-3、スプラウティ、TAF、TAMF、TGF- β 、TGF- β 、トロンピン、トロンボスポンジン、TIE-1、TIE-2、組織因子、TNF- α 、TNF- β 、アポトーシスのTNF様の弱い誘導因子、トランスフェリン、TSP、腫瘍血管新生因子、腫瘍自己分泌型運動因子、タムスタチン、TWEAK、子宮血管新生因子、血管透過性因子、バスクロトロピン、VEGF、VEGF-162、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEG1、VPFが挙げられる。

【0203】

多くの異なる増殖因子およびサイトカインが、内皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞に対して走化性活性、分裂促進活性、調節活性または阻害活性を示し、従って、いずれにせよ血管新生プロセスに参加することを期待されることが示されてきた。このプロセスは、タンパク質溶解酵素、細胞外マトリックス成分、細胞接着分子、および血管作動因子の共同作用を含む。平滑筋細胞の増殖、走化性行動および/または機能的活性を調節する因子としては、アクチビンA、アドレノメジュリン、aFGF、ANF、アンジオジェニン、アンジオテンシン-2、ベタセルリン、bFGF、CLAF、ECDGF(内皮細胞由来増殖因子)、ET(エンドセリン)、第X因子、第Xa因子、HB-EGF、血管細胞増殖の心臓由来阻害因子、IFN- γ 、IL1、LDGF(平滑筋腫由来増殖因子)、MCP-1、MDGF(マクロファージ由来増殖因子、単球由来増殖因子)、NPY、オンコスタチンM、PD-ECGF、PDGF、プロラクチン、プロテインS、SDGF(平滑

10

20

30

40

50

筋細胞由来増殖因子)、SDMF(平滑筋細胞由来移住因子)、タキキニン、TGF- β 、トロンボスポンジンが挙げられる。

【0204】

血管内皮細胞の増殖、走化性行動および/または機能的活性を調節する因子としては、AcSDKP、aFGF、ANF、アンジオジェニン、アンジオモジュリン、アンジオトロピン、AtT20-ECGF、B61、bFGF、bFGF誘導活性、CAM-RF、ChDI、CLAF、ECGF、ECI、EDMF、EGF、EMAP-2、ニューロセリン(EMMPRINを参照)、エンドスタチン、内皮細胞増殖阻害因子、内皮細胞生存能力維持因子、Epo、FGF-5、IGF-2(血管内皮細胞の増殖促進活性を参照)、HBNF、HGF、HUAF、IFN- γ 、IL1、K-FGF、LIF、MD-ECI、MEC1F、NPY、オンコスタチンM、PD-ECGF、PDGF、PF4、PIGF、プロラクチン、TNF- α 、TNF- β 、トランスフェリン、VEGFが挙げられる。これらの因子のいくつかは、いくつかの他の生物学的活性に起因して最初に検出され、後に血管新生を促進することが示されたタンパク質因子である。in vivoで血管新生的に活性なタンパク質因子の一覧としては、線維芽細胞増殖因子(FGFを参照)、アンジオジェニン、アンジオポエチン-1、EGF、HGF、NPY、VEGF、TNF- α 、TGF- β 、PD-ECGF、PDGF、IGF、IL8、増殖ホルモンが挙げられる。フィブリン断片Eも、血管新生活性を有することが示された。さらに、内皮細胞のための古典的な増殖因子として振舞わないが、血管形成および血管新生プロセスにおいて突出した役割を果たすアンジオポエチン-1などの因子が存在する。PF4およびプロラクチンの16 kDa断片はin vivoで阻害的である。

10

【0205】

好適な内因性標的化合物としては、神経分化を増強し、増殖を誘導し、シナプス機能に影響し、および通常は中枢神経系および末梢神経系の発達の様々な段階の間に死ぬように運命付けられているニューロンの生存を促進する神経栄養因子などの、中枢および/または末梢神経系の形成および維持に関与する内因性化合物が挙げられる。そのようなタンパク質の例としては、BDNF(脳由来神経栄養因子)、NGF、NT-3(ニューロトロフィン-3)、NT-4、NT-5、NT-6、NT-7、CNTF(毛様体神経栄養因子)、GDNF(グリア細胞系由来神経栄養因子)、およびプルプリンなどのニューロトロフィンが挙げられる。bFGFまたはLIFなどの増殖因子も、いくつかのニューロンに対するその栄養活性に起因してニューロトロフィンに数えられることが多い。

20

【0206】

BDNF、NGFおよびNT-3は、集合的にNGFタンパク質ファミリーとも呼ばれることがあるが、これはNGFがこのファミリーのタンパク質の創始メンバーであるからである。NGF、BDNFおよびNT-3に由来する構造エレメントの組み合わせにより、全てのtrk受容体を効率的に活性化し、複数の神経栄養特異性を示す多機能Pan-ニューロトロフィン-1(PNT-1)を操作することが可能であった。別の神経生存因子はNSE(ニューロン特異的エノラーゼ)である。通常はニューロトロフィンとしては分類されず、より広い範囲の機能を有することが多い神経栄養活性を有する他の因子は、EGF、HBNF(ヘパリン結合軸索促進因子)、IGF-2、aFGFおよびbFGF、PDGF、NSE(ニューロン特異的エノラーゼ)、およびアクチピンAである。神経細胞に影響する抗増殖性増殖因子については、神経抗増殖性タンパク質、アストロスタチン、GGIF(グリア増殖阻害因子)も参照されたい。

30

【0207】

その生物活性に応じて、軸索促進因子(NPF)と神経分化因子との間には区別がなされることがある。軸索促進因子は、それ自身によっては神経の生存または一般的な増殖を促進しないが、軸索または樹状突起プロセスの増殖を誘導する1種以上の神経栄養因子に加えて必要とされる。NPF活性を有する因子としては、NGF、S100、GMF- β (グリア成熟因子)、プロテオグリカン、メロシン、コラーゲン、細胞接着分子、およびラミニンが挙げられる。

40

【0208】

好適な内因性標的化合物としては、創傷治癒に関与する内因性化合物が挙げられる。血小板は局所的に活発な増殖因子およびサイトカインの豊富な供給源である。特に、血小板由来因子としては、アデノシンジヌクレオチド(血小板の凝集を誘導し、細胞の増殖およ

50

び移住も刺激する)、 α -トロンボグロブリン、bFGF、CTAP-3(結合組織活性化タンパク質-3)、EGF、好酸球走化性ポリペプチド-1(すなわち、RANTES)、f-ECGF(線維芽細胞由来内皮細胞増殖因子)、フィブロネクチン(血小板凝集の初期マトリックスリガンドとして働く)、HCl(ヒトコラゲナーゼ阻害剤)、HGF(肝細胞増殖因子)、HRF(ヒスタミン放出因子)、IGF-BP-3、NAP-2(好中球活性化タンパク質-2)、NAP-4(好中球活性化タンパク質-4)、PBP(血小板塩基性タンパク質)、PD-ECGF(血小板由来内皮細胞増殖因子)、PDGF、PF4、血小板活性化因子(PAF、血小板凝集にも関与)、セロトニン(血管透過性を誘導し、好中球の走化性因子である)、ソマトスタチン、TGF- β 、TGF- β 、トロンボキサンA2(血管収縮、血小板凝集、および走化作用に関与する)、ピトロネクチンが挙げられる。

【0209】

循環末梢血リンパ球は創傷空間に移住する。創傷領域中に出現する最初の細胞は好中球である。好中球のメンバーは損傷の約24時間後にピークレベルに達する。それらの移住は、補体因子、IL1、TNF- α 、TGF- β などの様々な走化性因子およびサイトカイン、ならびにIL8、GRO- α 、PF4、MCP-1、IP-10、migなどのケモカインにより、ならびに細菌のポリサッカリドによっても刺激される。好中球は、内皮細胞表面上で好中球受容体として機能する、セレクチンにより内皮に接着する。好中球細胞表面上のインテグリン受容体により、細胞外マトリックスへの好中球の結合が容易になる。好中球を枯渇させた動物における創傷が治癒し得るので、好中球はインターフェロンの非存在下では創傷治癒において重要な役割を果たさないようである。好中球は、それらがもはや必要なくなった場合、組織マクロファージにより除去される。

【0210】

単球は損傷の約24時間後に出現し、損傷後48時間でピークに達する。単球はマクロファージに成熟するため、それらは修復プロセスを駆動するサイトカインの本質的な供給源であると考えられる。マクロファージおよび単球はまた、様々なケモカインにより誘引される。これらのケモカインは、白血球サブセットの空間的および一次的に異なる浸潤に寄与し、かくして創傷修復の間の炎症プロセスおよび修復プロセスを完全なものにする。

【0211】

組織マクロファージは、創傷治癒プロセスを本質的に制御および調節する細胞であり、創傷は、創傷マクロファージの枯渇を含む実験により示されたように、これらの細胞の関与なしには治癒することができない。マクロファージの分化は、いくつかの特定のサイトカインにより開始される。活性化されたマクロファージにより産生および分泌される多くのサイトカインは、創傷領域への炎症細胞のさらなる移住を支持する。また、マクロファージは細胞外マトリックスの分解を制御し、創傷マトリックスの再モデリングを調節する。マクロファージは、TGF- β 、FGF、VEGFなどのサイトカインおよび増殖因子、ならびにJ Eなどのケモカインを分泌する。

【0212】

TGF- β は、顆粒組織の形成および細胞外マトリックスのタンパク質の合成を担う主要な因子であるようであり、かくして「創傷ホルモン」と呼ばれてきた。TGF- β は、様々なTGF- β アイソフォームならびに、例えば、アクチビンAおよびBMPなどの他のファミリーメンバーからなる、最も複雑な群のうちの1つのサイトカインスーパーファミリーのメンバーである。創傷治癒プロセスの複雑性は、TGF- β -3に対するTGF- β スーパーファミリーメンバーの比、特に、TGF- β -1の比の操作により、瘢痕化および線維症が軽減されるという観察により例示されている。

【0213】

再上皮形成は、EGFファミリーの増殖因子の走化性因子および分裂増殖因子により媒介される。レプチンは創傷治癒の間のケラチノサイトのための強力な増殖因子であることが示された。

【0214】

創傷治癒の最終段階は、結合組織による顆粒組織の段階的な置換を特徴とする。このプロセスはまた、局所作用するサイトカインを必要とする。しかしながら、一度、修復プロ

10

20

30

40

50

セスが完了したら、組織増殖を最終的に抑制する因子および機構についてはほとんど知られていない。コラーゲンおよびプロテイナーゼ阻害剤の合成が、特に、TGF- および関連する因子により刺激される。創傷の閉化および傷の進化は、典型的な筋線維芽細胞の消失などの細胞質の著しい減少と関連している。アポトーシスによる細胞死が、顆粒組織の傷への進化を担う機構であると提言されている。

【0215】

胎児の創傷治癒は、瘢痕化がないために目立つ。胎児および成体の線維芽細胞は、移住活性、サイトカインに対する分裂促進応答ならびに分裂促進性のサイトカイン、増殖因子、およびマトリックス大分子の合成の点で表現型の差異を示すいくつかの証拠が存在する。

10

【0216】

増殖因子およびサイトカインの作用を操作することにより、創傷治癒を加速するか、または改変することができる。動物実験およびまた臨床実験により、bFGF、EGF、KGF、PDGF、TGF- などの様々なサイトカインを、単独または組み合わせて局所投与することは、顆粒組織形成を刺激し、上皮化を増強することにより創傷治癒をかなり加速することが示された。

【0217】

好適な内因性標的化合物としては、炎症の急性期タンパク質が挙げられる。そのようなタンパク質の好適な例およびその機能を表2に提供する。

【表 2】

表 2

タンパク質	機能
α -1 酸糖タンパク質	コラーゲンとの相互作用 繊維芽細胞増殖の促進 特定のステロイドの結合
α -1 アンチキモトリプシノーゲン	プロテアーゼインヒビター
α -1 アンチトリプシン	プロテアーゼインヒビター 気腫の分解
α -2 アンチプラスミン	凝固カスケードの調節
α -2-マクログロブリン	いくつかの血清プロテアーゼのインヒビターおよび 他の機能
アンチトロンビン-3	凝固カスケードの調節
C1 インヒビター	補体カスケードの負の制御
C2	補体成分
C4	補体成分
C4	補体成分
C4 結合タンパク質	補体成分
C5	補体成分
C9	補体成分
C-反応性タンパク質	膜ホスホリルコリンへの結合 補体活性化およびオプソニン作用 T細胞およびB細胞との相互作用
セルロプラスミン	銅輸送タンパク質 反応性酸素スカベンジャー
第 VIII 因子	修復のためのフィブリンマトリックスのクロッティ ング形成
B 因子	補体成分
フェリチン	鉄輸送タンパク質
フィブリノーゲン	修復のためのフィブリンマトリックスのクロッティ ング形成
フィブロネクチン	フィブリンクロット形成
ハプトグロビン	ヘモグロビンスカベンジャー
ヘムオキシゲナーゼ	ヘムの分解
ヘモペキシン	ヘム結合および輸送タンパク質
ヘパリンコファクター-2	プロテイナーゼインヒビター
カリクレイン	血管透過性および拡張
LPS 結合タンパク質	マクロファージ細胞活性化
マンガンスーパーオキシドジスムタ ーゼ	銅亜鉛結合タンパク質 反応性酸素種の形成
マンノース結合タンパク質	血清レクチン

10

20

30

40

プラスミノーゲン	補体のタンパク質分解活性化、クロッティング、繊維素溶解
プラスミノーゲン活性化因子阻害因子-1	プロテアーゼインヒビター
プロトロンビン	修復のためのフィブリンマトリックスのクロッティング形成
血清アミロイドA	コレステロールおよびHDLスカベンジャー
血清アミロイド-P	IgG免疫複合体の形成
フォン・ビルブラント因子	凝固タンパク質
IL1ra(IL1受容体アンタゴニスト)	IL1ra

10

20

30

40

50

【0219】

急性期タンパク質の主要な誘導因子は、IL1、IL6、およびTNFである。2つの媒介因子IL1およびIL6を用いて、2つのサブ群に急性期タンパク質を分類した。1型急性期タンパク質は、最大合成のためにIL6とIL1の相乗作用を必要とするものである。1型タンパク質の例は、C反応性タンパク質、血清アミロイドAおよび-1酸糖タンパク質である。2型急性期タンパク質は、最大誘導のためにIL6のみを必要とするものである。2型タンパク質の例は、フィブリノーゲン鎖、ハプトグロビン、および-2-マクログロブリンである。2型急性期タンパク質をコードする遺伝子の発現は、IL1により頻繁に増強されるよりもむしろ抑制される(Ramadoriら; Feyら)。急性期タンパク質の発現に影響するサイトカインと他のメディエーター物質の間の付加的、相乗的、協同的、および拮抗作用は、ほとんど全ての組合せにおいて発生し、観察された。また、多くのサイトカインは示差的な作用を示し、1または2種の急性期タンパク質の合成を誘導するが、他のものの合成を誘導しない。例えば、アクチビンAはHepG2細胞における急性期タンパク質のサブセットを誘導する。細菌のリポポリサッカリドおよびいくつかのサイトカイン(主にIL1、IL6およびTNFであるが、LIF、CNTF、オンコスタチンM、IL11、およびカルジオトロフィン-1も)が、SAA合成の誘導に関与し、これらのサイトカインのいくつかは相乗的に働く(Benigniら)。

【0220】

IL1およびまたIFN- γ は、IL6の作用のいくつかを低下させる。IL2およびIL6の作用のいくつかはTGF- β により拮抗する。2個以上のサイトカインの組合わせた作用は、それ自身に対して達成できる因子がない作用をもたらし得る。培養されたHepG2ヘパトーマ細胞中で、IL1、IL6、TNF- α およびTGF- β は抗キモトリプシンの合成を誘導し、同時にアルブミンおよびAFP(-フェトタンパク質)の合成を抑制する。フィブリノーゲンの合成はIL6により誘導され、この作用は、順にIL-1- α 、TNF- α またはTGF- β -1により抑制される。

【0221】

好適な内因性標的化合物としては、止血および凝固カスケードに関与する内因性化合物が挙げられる。毛細管浸透性および血管緊張の調節に関与するものとは別に、血管の内皮は凝固および繊維素溶解の活性化因子および阻害因子を提供することにより、非血栓形成表面の維持において決定的な役割を果たしている。内皮は、様々な免疫学的プロセスの調節にも関与している。

【0222】

内皮細胞中で、IL1は、特に、種々のコロニー刺激因子、IL6、TNF- α 、プロスタグランジン、血小板活性化因子(PAF)、プラスミノーゲン活性化因子(PAI)の合成を誘導する。IL1の重要な内因性調節因子は、IL1およびTNF- α の分泌を阻害するPGE2である。特に、TNF- α は、トロンビンの生成を触媒する第X因子活性化因子複合体の形成に関与する組織トロンボプラスチン(TPL)の合成を誘導する。また、この複合体は第IX因子を活性化する。TNF

- はまた、内皮細胞によるIL1の合成を誘導し、このIL1は内皮細胞によるTPLの産生を促進することもできる。TNF- α の合成を、IL1により誘導することもできる。TNF- α およびIL1は細胞表面抗原の合成も誘導する。接着分子の発現は血管壁でのリンパ球および白血球の接着を増加させ、かくしてこれらの細胞の経内皮移動を容易にする。TNF- α およびIL1は、トロンボモジュリンの合成を阻害することによりプロテインCの不活性化系を下方調節する。トロンピンと複合体化したトロンボモジュリンは、プロテインCを活性化し、次いでこれは膜に結合したプロテインSとの複合体を形成することができる。これらの複合体は、第Va因子を阻害する。活性化されたプロテインCはまた、複合体化によりプラスミノーゲン活性化因子阻害因子(PAI)を中和する。TNF- α およびまたIL1はかくして、第Va因子の不活性化を減少させる。

10

【0223】

凝固に關与する他の好適な内因性標的化合物としては、カリクレイン、第XII因子、第XIb因子、第XI因子、第XIa因子、第IX因子、第IXa因子、第VIII因子、第VIIIa因子、第X因子、第Xa因子、第Va因子、第XIIIa因子、プロトロンピン、トロンピン、フィブリノーゲン、フィブリン、プラスミノーゲン、プラスミンが挙げられる。

【0224】

好適な内因性標的化合物としては、ストレスホルモン(例えば、アドレナリン、副腎皮質刺激ホルモン、コルチコステロン、エピネフリン、成長ホルモン、ヒドロコルチゾン)、液体/電解質および血管ホルモン(例えば、アルドステロン、アンドロステネジオン、バソプレッシン、ブラジキニン、カルシトニン、ニューロテンシン)、肝臓および消化ホルモン(例えば、コレシストキニン、コレステロール、VIP)、生殖ホルモン(例えば、絨毛性ゴナドトロピン、エポゲン、エストラジオール、エストリオール、エストロン、エチオコラノロン、FSH、乳腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、テストステロン、オキシトシン、プロゲステロン、プロラクチン、ゴナドトロピン)、糖運搬ホルモン(例えば、グルカゴン、インスリン)、甲状腺ホルモン(例えば、T2、T3、T4、甲状腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン放出因子、TSH、副甲状腺ホルモン)、骨ホルモン(例えば、CSF-1、RANKL、骨形態形成タンパク質ファミリーメンバー)、ならびに、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、プロラクチン(PRL)、成長ホルモン(GH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、抗利尿ホルモン(ADH)(バソプレッシン)、オキシトシン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、成長因子放出ホルモン(GHRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)、ソマトスタチン、ドーパミン、メラトニン、チロキシン(T4)、カルシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH)、糖質コルチコイド(例えば、コルチゾール)、ミネラルコルチコイド(例えば、アルドステロン)、アンドロゲン(例えば、テストステロン)、アドレナリン(エピネフリン)、ノルアドレナリン(ノルエピネフリン)、エストロゲン(例えば、エストラジオール)、プロゲステロン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、アミリン、エリスロポエチン(EPO)、カルシトリオール、カルシフェロール(ビタミンD3)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、ガストリン、セクレチン、コレシストキニン(CCK)、ソマトスタチン、ニューロペプチドY、グレリン、PYY3-36、インスリン様増殖因子-1(IGF-1)、アンジオテンシノーゲン、トロンボポエチン、レプチン、レチノール結合タンパク質4、およびアジポネクチンなどの他のホルモンなどのホルモンも挙げられる。さらに好適なホルモンを表3に列挙する。

20

30

40

【表 3】

表 3

内分泌腺	ホルモン	略語	主な機能
松果体	メラトニン		生物時計。
視床下部	抗利尿ホルモン	ADH	腎臓に作用して液体および電解質バランスを保存する。
	プロオピオメラノコルチン	POMC	ACTH および MSH の前駆ホルモン。
下垂体	黄体形成ホルモン	LH	雌性体においては、この LH は卵巣に対して作用して、エストロゲンの産生を刺激し、排卵を誘導する。雄性体においては、この LH は精巣に対して作用して、テストステロンの産生を刺激する。
	卵巣刺激ホルモン	FSH	雌性体においては、FSH は卵胞の成熟を刺激する。雄性体においては、FSH はセルトリ細胞に作用し、精子産生の調節に関与する。
	副腎皮質刺激ホルモン	ACTH	ACTH は、副腎腺に作用して、コルチゾールの産生を刺激する。
	成長ホルモン	GH	GH は、種々の組織に作用して、増殖を刺激する。
	プロラクチン	Pr1	授乳中に乳を減少させる。
	メラニン細胞刺激ホルモン	MSH	皮膚の色を刺激する。
	甲状腺刺激ホルモン	TSH	TSH は甲状腺に作用して、チロキシンの産生を合図する。
膵臓	インスリン		血糖レベルを調節する。
甲状腺	トリヨードサイロニンおよびチロキシシン	T3 および T4	脳および生殖管の発達、ならびに代謝の調節。
副腎	コルチゾール		免疫抑制およびストレス応答。
	デヒドロエピアンドロステンジオン	DHEA	
卵巣	エストロゲン(エストラジオール、エストロン、エストリオール)	E2, E1, E3	増殖促進、結合組織の弾力性の維持、骨量の保存、および血管コンプライアンス。
	プロゲステロン	P4	妊娠準備における子宮内膜の維持。
	テストステロン	T	エストロゲンの前駆体であり、性的衝動に作用する。
	インヒビン		下垂体 FSH 分泌に対するフィードバック調節。
精巣	テストステロン	T	雄性体の第二次性徴の成長、精子産生および性的衝動。
	ジヒドロテストステロン	DHT	いくつかの雄性体の第二次性徴。

10

20

30

40

	インヒビン		下垂体FSH分泌に対するフィードバック調節。
胎盤	プロゲステロン	P4	妊娠の維持。
	エストリオール	E3	

【0226】

表4は、好適な内因性標的化合物および本明細書に記載のリガンドを用いて内因性化合物を標的化するための好ましい治療剤の非包括的な一覧を提供する。「識別子の例」のカラムは、内因性標的化合物または内因性標的化合物の断片もしくは変異体のアミノ酸配列を含むCAS RegistryもしくはGenbankデータベース中のエントリーと一致する、Chemical Abstracts Services (CAS)登録番号(American Chemical Societyにより刊行)および/またはGenbank受託番号(例えば、www.ncbi.nlm.nih.govのNational Center for Biotechnology Information (NCBI)のウェブページを介して入手可能なLocus ID、NP_XXXXX(参照配列タンパク質)、およびXP_XXXXX(モデルタンパク質)識別子)を提供する。これらのCASおよびGenbankおよびGenSeq受託番号の各々に関連する概要ページならびに引用された学術論文(例えば、PubMed ID番号(PMID))は、その全体が、特に、本明細書に記載のアミノ酸配列に関して、参照により各々組み入れられるものとする。「生物学的活性」のカラムは、内因性標的分子に関連する生物学的活性を記載する。「好ましい適応症」のカラムは、指示された内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含むリガンドにより治療、予防、診断、もしくは軽減することができる疾患、障害、および/または症状を記載する。

10

20

【0227】

本発明はまた、表4に開示された対応する好ましい適応症のいずれかを治療するための医薬の製造における使用のための、表4に列挙された内因性標的化合物のいずれかに対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含むリガンドにも関する。

【0228】

本発明はまた、表4に列挙された対応する内因性標的化合物に対する結合特異性を有する結合部位を有する部分を含む有効量のリガンドを、それを必要とする被験体に投与することを含む、表4に列挙された好ましい適応症のいずれかを治療するための方法にも関する。

30

【表 4】

表 4

内因性標的化合物	識別子	生物学的活性	好ましい適応症
酸性 FGF	LocusID: 2246	酸性線維芽細胞増殖因子 1 受容体を発現する細胞に結合する。	血管疾患
アクチビン(アクチビン A；	CAS-	アクチビン A 複合体。	骨折；閉経後
EDF、インヒビン β A	114949-22-3 LocusID: 3624 NP_002183 XP_004832	インヒビン β A サブユニットのホモダイマーは、下垂体 FSH 分泌のインヒビターであり、性腺間質細胞増殖を負に調節し、腫瘍抑制活性を有することが示された。さらに、この複合体の血清レベルは、顆粒膜細胞腫瘍の大きさを反映し、従って、原発ならびに再発性疾患のマーカーとして用いることができることが示された。	骨粗鬆症；癌；雄性体の不妊症；雌性体の不妊症；鎌状赤血球貧血
アクチビン β c(インヒビン β c)	LocusID: 3626 NP_005529 XP_006661	インヒビン β C サブユニットは、インヒビン/アクチビン β A および β B サブユニットと類似しており、トランスフォーミング増殖因子 β スーパーファミリーの一部であり得る。	神経変性疾患；創傷治癒；肝臓再生
アデノシンデアミナーゼ	LocusID: 100 NP_000013 XP_009517	アデノシンデアミナーゼはアデノシンのイノシンへの加水分解を触媒する。	重症複合免疫不全(SCID)患者におけるアデノシンデアミナーゼ欠損症
アジポシン	CAS-9035-55-6 Genbank: 223277 Genbank: 223281	アジポシンは前駆体タンパク質プレプロオピオメラノコルチン(POMC)の連続的切断により産生される。アジポシンは、脳のメラノコルチン-4-受容体の活性化を介する食物摂取の調節において重要な役割を果たす。	肥満；癌

10

20

30

40

アグーチシグナルタンパク質	LocusID: 434 NP_001663 XP_009476	アグーチシグナルタンパク質 (ASP) は、132 アミノ酸のタンパク質をコードし、その mRNA は精巣、卵巣、および心臓で発現され、ならびに肝臓、腎臓、および包皮においては低レベルで発現される。ASP は伸長遺伝子 (α -メラニン細胞刺激ホルモン [α -MSH] のメラニン細胞受容体をコードする) と相互作用し、細胞培養物中での ASP の発現は、マウスメラノーマ細胞において α -MSH により刺激された cAMP の蓄積を遮断する。	色素異常症 ; 肥満	10
α -グルコシダーゼ (酸 α -グルコシダーゼ ; ポンパーゼ)	LocusID: 2548 NP_000143 XP_012708	グリコーゲン中の α 1-6 結合の加水分解 ; 脱分枝酵素 ; 筋肉、肝臓および他の組織におけるデンプンの分解。	ポンペ病	20
α -ガラクトシダーゼ	LocusID: 2717	ガラクトース残基の加水分解的切断。	ファブリー病	
(アルギノコハク酸リアーゼ ; β -グルコシダーゼ ; x-ガラクトシダーゼ A ; アガルシダーゼ α ; CC-ガラクトシダーゼ)	NP_000160 XP_010108	糖スフィンゴ脂質ガラクトシルガラクトシルグルコシルセラミド由来		30
α -L イズロニダーゼ (アルロニダーゼ ; ラロニダーゼ ; イズロナート-2-スルファターゼ)	LocusID: 3425 NP_000194	イズロニダーゼは、硫酸デルマタンおよび硫酸ヘパランの分解に関与するリソソーム酵素である。	I 型ムコ多糖症 ; Ii 型ムコ多糖症 ; ハーラー症候群 ; ハーラー-シャイエ症候群 ; シャイエ症候群 ; ハンター症候群	40
アンギオポエチン 1	NP_001137	アンギオポエチン 1 は、Tie 受容体を介する血管新生の制御に関与する増殖因子である。	炎症性疾患 ; 心血管障害	
アンギオポエチン 2	Genbank: BAA95590	アンギオポエチン 2 は、Tie 受容体を介する血管新生の制御に関与する増殖因子である。	癌	

<p>アンギオスタチン (アンギオスタチン)</p>	<p>CAS-86090-08-6 LocusID: 5340 NP_000292 XP_004371</p>	<p>アンギオスタチンは、プラスミノーゲンの内部断片である(第1の4つのクリングル構造を含む)。アンギオスタチンの個々の、または組合わせたクリングル構造は、毛細管内皮細胞増殖の効果を阻害することが示された。</p>	<p>固形腫瘍</p>
<p>抗背側化形態形成タンパク質-1 (ADMP)</p>	<p>Genbank: AAC59736 Genbank: AAD52011</p>	<p>ADMP は、ヒト骨形態形成タンパク質-3 と関連する。その発現は、原腸形成中にピークに達し、背側および前腹構造の用量依存的抑制をもたらす。</p>	<p>癌</p>
<p>APO2 リガンド (TRAIL)</p>	<p>LocusID: 8743 NP_003801 XP_003200</p>	<p>細胞死を媒介する腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーのII型糖タンパク質; TRAIL は多様な系列の様々な形質転換細胞系においてアポトーシスを誘導することができるが、正常な細胞を殺傷しないようである。</p>	<p>癌</p>
<p>アレステン</p>	<p>Genbank: AF72630</p>	<p>アレステンは、内皮細胞の増殖、移住、管形成、およびマトリゲル新血管形成を阻害することにより、抗血管新生分子として機能する。</p>	<p>癌; 固形腫瘍</p>
<p>アリアルスルファターゼ B (BM102; 組換えヒト N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ; rhASB)</p>	<p>LocusID: 411 NP_000037 Genbank: AAB19988 Genbank: CAA51272 Genbank: AAA51784 Genbank: AAA51779</p>	<p>アリアルスルファターゼ B ホモダイマーは、N-アセチル-D-ガラクトサミン、硫酸コンドロイチン、および硫酸デルマトンの硫酸基を加水分解する。このタンパク質は、リゾチームに標的化される。この遺伝子の欠損はマロトー・ラミー症候群を引き起こす。</p>	<p>VI型ムコ多糖症</p>
<p>アスパラギナーゼ</p>	<p>CAS-130167-69-0 Genbank: CAA01168</p>	<p>アスパラギナーゼは、L-アスパラギンの加水分解を担う酵素である。</p>	<p>急性リンパ芽球性白血病</p>

10

20

30

40

殺菌浸透性増強タンパク質 21	LocusID: 671 NP_001716 AAA51841	殺菌活性を有する、LBP、CETP、および PLTP と類似する膜結合型タンパク質。	眼の炎症； 嚢胞性線維症； 出血性外傷； 腹部内感染；髄膜炎菌感染； 髄膜炎菌血症；中耳炎；部分肝切除；トキソプラズマ症	10
BDNF (脳由来神経栄養因子)	LocusID: 627 NP_001700 XP_006027	脳由来神経栄養因子は、中枢神経系に位置するか、またはそれに直接接続される全ての神経細胞集団の生存を促進する。	筋萎縮性側索硬化症； 神経変性	20
B-グルコセレブロシダーゼ	CAS-143003-46-7 CAS-154248-97-2 LocusID: 2629 NP_000148 XP_002191	グルコセレブロシダーゼ (β -グルコシダーゼ) は、グルコシルセラミドからのグルコースの除去を触媒して、セラミドを形成させる。	ゴーシェ病	20
BMP-2 (骨形態形成タンパク質 2; 骨関連タンパク質)	CAS-192509-82-3 LocusID: 650 NP_001191 XP_009629	BMP2 は、トランスフォーミング増殖因子- β (TGFB) スーパーファミリーに属する。骨形態形成タンパク質は骨の形成を誘導する。BMP2 は、進行性骨化性線維形成異常症 (筋炎) の常染色体優性疾患に関する候補遺伝子である。	骨再生；骨および組織の修復；癌	30
BRCA1 (BRCA1 腫瘍抑制タンパク質)	Lcous ID: 672 NP_006759 XP_007013	BRCA1 は、ヒト乳癌細胞における腫瘍抑制因子であり、RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素と結合する核リントタンパク質である。BRCA1 は、転写調節因子として機能し、また、分泌された増殖阻害タンパク質として機能するグラニン様タンパク質でもある。	癌；乳癌；前立腺癌； 卵巣癌	40

BRCA2	Locus ID: 675 NP_000050 XP_007138	BRCA2 は、ヒト乳癌細胞における腫瘍抑制因子であり、RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素と結合する核リンタンパク質である。BRCA2 は、BRCA1 とのダイマー複合体中に存在し、転写調節因子として機能し、また分泌された増殖阻害タンパク質として機能するグラニン様タンパク質でもある。	癌；乳癌；卵巣癌	10
カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)	CAS-83652-28-2 CAS-83652-28-2 Locus ID: 796 Locus ID: 797 Locus ID: 27297 NP_001732 NP_000719 NP_055293 XP_006209 XP_006016 XP_004758	CGRP は強力な血管拡張剤であり、内皮細胞および骨芽細胞増殖の調節因子である。CGRP のさらなる作用としては、胃液分泌の低下、体温の上昇、食欲抑制作用、ならびに心臓に対する正の変力作用および変時作用が挙げられる。	狭心症； 不整脈；心不全；高 血圧； 閉経後骨粗鬆症；レ イノー病；くも膜下 出血	20
カルレチキュリン	Locus ID: 811 NP_004334 XP_009055 Genbank: AH02500	カルレチキュリンは、小胞体の内腔中の主要な Ca(2+)結合(保存)タンパク質として働く多機能タンパク質である。カルレチキュリンは、核ホルモン受容体による遺伝子転写調節の重要な調節因子として作用することができる。	癌；創傷治癒	30
CD4	Locus ID: 920 NP_000607 XP_006966	CD4 は、シグナル伝達における細胞間相互作用において役割を果たす T 細胞表面糖タンパク質である。CD4 は HIV の gp120 に結合し、HIV 進入の細胞表面受容体である。	Hiv 感染	40

CD40 リガンド	LocusID: 959 NP_000065 XP_010367	CD40-L は T 細胞の表面上に発現される。それは B 細胞表面上の CD40 を拘束することにより B 細胞機能を調節する。この遺伝子における欠損は、免疫グロブリンクラススイッチの不能をもたらし、超 IgM 症候群と関連する。	上皮固形腫瘍； 頭部および頸部の癌； 免疫不全障害；非ホジキンリンパ腫；腎臓癌；腎細胞癌；固形腫瘍；ウイルス感染	10
ケモカイン結合タンパク質 (CBP1; CPB2)	LocusID: 1238 NP_001287 XP_003126 LocusID: 1241 NP_000743 XP_007314	ケモカイン結合タンパク質は、ケモカインを介するシグナリングに参与する。	移植拒絶； 心血管疾患； 慢性関節リウマチ； 炎症性疾患； 免疫系障害	20
毛様体神経栄養因子 (CNTF)	LocusID: 1270 NP_000605 XP_006012	CNTF は、神経系における様々な細胞型の分化および生存を促進する。	筋萎縮性側索硬化症；糖尿病性ニューロパシー； ハンチントン病； 肥満；腎臓障害；2型糖尿病	30
コントロスタチン	CAS-153858-68-5	コントロスタチンは、インテグリンに拮抗するユニークなダイマー性ディスインテグリンである。	癌転移； 血栓症；卒中	40
コルチコトロピン放出因子結合タンパク質	LocusID: 1393 NP_001873 XP_003672 Genbank: P24387 Genbank: CAA41086	コルチコトロピン放出因子 (CRF) は、炎症およびストレス関連応答の末梢および中枢メディエーターである。CRF 結合タンパク質は CRF を不活性化する。	慢性関節リウマチ； 炎症	50
CTLA4	LocusID: 1493 NP_005205 XP_002490	CTLA4 は、通常は活性化された T 細胞上で発現される B7 リガンド受容体である。CTLA4 Ig は、抗炎症活性を有する可溶性キメラ受容体である。	器官移植拒絶；アレルギー； 慢性関節リウマチ； 移植片対宿主障害； 乾癬； 1 型糖尿病；異種移植片拒絶	50

デコリン	LocusID: 1634 XP_012239 NP_001911	このメンバーの特殊化されたコラーゲンおよび SLRP ファミリーは、コラーゲンおよび増殖因子と相互作用する小プロテオグリカンであり、器官発達および形状化中の上皮/間葉相互作用に関与する。	癌; 糖尿病性ニューロパシー; 炎症性障害; 術後癒着; 肺線維症
Del-1 (発生調節内皮ローカス-1; EDIL3; EGF-様リピートおよびディスコイジン I 様ドメイン 3)	LocusID: 10085 Genbank: U70312 NP_005702 XP_003954	$\alpha\beta 3$ インテグリン受容体の新しいリガンドであり、胚発生における血管形態形成または再モデリングを調節するように機能し得る。	虚血; 癌; 再狭窄
DNASE	CAS-143831-71-4 CAS-9003-98-9 CAS-132053-08-0 LocusID: 1773 NP_005214 XP_008097	Dnase は、DNA を選択的に切断し、高細胞代謝回転の部位で核抗原から DNA を除去するエンドヌクレアーゼである。	慢性閉塞性肺疾患; 嚢胞性線維症; ループス腎炎
エクトアピラーゼ (CD39 ファミリー; ヒトエクトアピラーゼ (エクト-ADPases); CD39-L2; CD39-L4)	LocusID: 953 LocusID: 954 LocusID: 955 LocusID: 956 LocusID: 957 NP_001767 NP_001237 NP_001238 NP_001239 NP_001240 XP_005712 XP_011771 XP_009435 XP_003296 XP_007435	細胞外ヌクレオチドの異化を媒介する。	心筋梗塞; 卒中
EGF (上皮増殖因子)	CAS-62229-	EGF は二官能性調節特性を有する:それはいくつかの上皮腫瘍細胞の増殖を阻害し、線維芽細胞および他の細胞型の増殖を刺激した。	胃潰瘍; 創傷治癒; 冠動脈再狭窄; 血管再狭窄; 非小細胞肺癌; 乾癬

10

20

30

40

EMAP II (内皮単球活性化ポリペプチド II)	LocusID: 9255 LocusID: 13722 NP_004748 XP_003390	EMAP-II は、血管新生を阻害する腫瘍誘導性サイトカインであり、前炎症メディエーターの特性を示し、ならびに in vitro および in vivo で内皮細胞に対して強力な作用を示す。	癌
FGF-1	LocusID: 2246 NP_000791	FGF-1 は、増殖および血管新生を刺激する。	末梢血管疾患;末梢動脈閉塞疾患;重症肢虚血
FGF-2 (線維芽細胞増殖因子-2;Fiblast)	CAS-131094-16-1 LocusID: 2247 NP_001997 XP_003306	線維芽細胞増殖因子。血管新生増殖因子。	冠動脈障害; 骨折; 歯周病; 末梢血管疾患;閉経後骨粗鬆症; 皮膚潰瘍; 卒中; 末梢動脈疾患; 冠動脈疾患
FLT3 リガンド	LocusID: 2323 NP_001450 XP_008921	造血前駆細胞の増殖および生存を刺激する。樹状細胞発達を刺激する。	化学防御;血液障害; 悪性黒色腫; 骨髄抑制; 非ホジキンリンパ腫; 前立腺癌; 幹細胞可動化

10

20

30

【 0 2 3 6 】

<p>フォリトロピン</p>	<p>CAS-146479-72-3 CAS-56832-30-5 CAS-110909-60-9 CAS-150490-84-9 CAS-97048-13-0 LocusID: 1081 LocusID: 2488 NP_000726 NP_000501 XP_011444 XP_006316</p>	<p>フォリトロピンは cAMP 経路を介してステロイド産生を刺激する下垂体糖タンパク質ホルモンである。</p>	<p>雌性体の不妊; 雄性体の不妊</p>	10
<p>GDNF (グリア由来神経栄養因子; Neurturin)</p>	<p>CAS-185857-51-6 LocusID: 2668 NP_000505 XP_003703</p>	<p>グリア由来神経栄養因子 (GDNF) は、受容体チロシンキナーゼ Ret を介して細胞内で働くトランスフォーミング増殖因子-β (TGF-β) スーパーファミリーの遠いメンバーである。GDNF は、中脳ドーパミン作動性ニューロン、運動ニューロン、ノルアドレナリン作動性ニューロン、ならびに交感神経ニューロン、副交感神経ニューロンおよび感覚ニューロンの強力な生存因子である。しかしながら、運動ニューロンを除く多くの神経細胞集団にとっては、TGF-β が GDNF のコファクターとして必要である。GDNF はまた、神経系の外側で異なる機能を有し、腎臓の発達において尿管分枝化を促進し、精子形成を調節する。</p>	<p>筋萎縮性側索硬化症; パーキンソン病; ハンチントン病</p>	20
<p>ゲルソリン</p>	<p>LocusID: 2934 NP_000168 Genbank: CAA28000</p>	<p>ゲルソリンは、アクチンフィラメントを切断し、キャップするカルシウム依存性タンパク質であり、嚢胞性線維症の痰の粘度を減少させることが示された。</p>	<p>気管支炎; 嚢胞性線維症</p>	40

<p>グリア増殖因子-2 (GGF-2; ニューレグリン1)</p>	<p>LocusID: 3084 NP_039256 Genbank: AAB59622</p>	<p>GGF2 は、ニューレグリン1のアイソフォームであり、クリングル様配列+Ig および EGF 様ドメインを含む。GGF2 受容体は、チロシンキナーゼ膜貫通受容体の ERBB ファミリーのメンバーである。ERBB 受容体との相互作用を介して、GGF2 は中枢神経系におけるニューロンおよびグリアの発達において中心的な役割を果たす。</p>	<p>多発性硬化症; 化学療法により誘導されたニューロパシー; AIDS ニューロパシー; 糖尿病性ニューロパシー; 末梢性ニューロパシー</p>	10
<p>グルカゴン</p>	<p>CAS-16941-32-5 CAS-118549-37-4 LocusID: 2641 NP_002045 XP_002210</p>	<p>グルカゴンはランゲルハンス島の A 細胞中に放出される 29 アミノ酸のペプチドホルモンである。グルカゴンは、血糖濃度の降下に応答して産生される。その作用は血清グルコースを上昇させることである。インスリン依存性糖尿病における重篤な低血糖症の治療においては、グルカゴンはグリコーゲンのグルコースへの変換を刺激することにより肝臓にグルコースを放出させる。グルカゴンはまた、胃腸の平滑筋を弛緩させ、放射線試験の改善を可能にする。</p>	<p>低血糖症; 胃腸管診断; 糖尿病; 肥満; 2型糖尿病</p>	20
<p>HBNF (ヘパリン結合神経栄養因子; PTN; プレイオトロフィン; ヘパリン結合増殖因子 8; 軸索成長促進因子 1; NEGF1)</p>	<p>LocusID: 5764 NP_002816 Genbank: AAA41311 Genbank: M68916</p>	<p>HBNF は、ニューロンにおける軸索成長を刺激し、ラット脳において発達の調節される様式で発現される。</p>	<p>ニューロパシー; 神経障害</p>	40
<p>HCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン)</p>	<p>LocusID: 1081</p>	<p>ヒト絨毛性ゴナドトロピンは、</p>	<p>乳癌; カポジ肉腫</p>	

<p>ゴナドトロピン; 妊娠尿ホルモン; Ovidrel; Ovidrelle; APL)</p>	<p>LocusID: 1082 NP_000726 NP_000728 XP_011444 XP_012903</p>	<p>共通α鎖とユニークなβ鎖(絨毛性ゴナドトロピンβ)のヘテロダイマーであり、チロトロピン、ルトロピン、フォリトロピンおよびゴナドトロピンなどのいくつかの糖ペプチドホルモンに対して生物学的特異性を付与する。ヘテロダイマーのみが機能的である。その通常の機能は、妊娠の維持にとって必須であるステロイドを合成するように卵巣を刺激することである。</p>	<p>肉腫; 雌性体の不妊; 性腺機能低下症; 雄性体の不妊</p>	10
<p>熱ショックタンパク質 (HSP; HSP96; gp96)</p>	<p>LocusID: 3316 Genbank: M11717 Genbank: M15432 Genbank: X15183 Genbank: M33716</p>	<p>展示経路における熱ショックタンパク質シャペロン抗原性ペプチドである。Gp96は抗原性腫瘍抗原と複合体化した場合、腫瘍特異的殺傷応答を引き出す。</p>	<p>固形腫瘍; 結腸直腸癌; 胃癌; 悪性黒色腫; 非ホジキンリンパ腫; 脾臓癌; 腎臓癌; 肉腫; てんかん; 神経保護; 卒中</p>	20
<p>IL-1(インターロイキン-1; インターロイキン-1α; インターロイキン-1β)</p>	<p>LocusID: 3552 LocusID: 3553 NP_000566 NP_000567 XP_010760</p>	<p>サイトカインインターロイキン-1(IL-1)は、熱、睡眠、食欲減退、急性期タンパク質合成、ケモカイン産生、接着分子上方調節、血管拡張、前凝固状態、造血の増加、ならびにマトリックスメタロプロテイナーゼおよび増殖因子の産生および放出などの損傷または感染に対する宿主応答を開始および促進する様々な生物学的活性を引き出す。</p>	<p>細菌感染; 消化性潰瘍; 移植拒絶; 癌; 悪性黒色腫; 非小細胞肺癌; 前白血病; 化学防御; 放射線防御</p>	30

IL-1 受容体アンタゴニスト	CAS-143090-92-0 LocusID: 3557 NP_000568 XP_010756	IL1 受容体アンタゴニストは、標的細胞を活性化することなく IL1 受容体に熱心に結合し、IL1- α および IL1- β の結合を阻害するタンパク質である。結果として、これらの 2 つのサイトカインの生物活性は、生理的および病態生理的な免疫応答および炎症応答において中和される。	慢性関節リウマチ；喘息；糖尿病；GVHD；炎症性腸疾患；眼の炎症；乾癬；敗血性ショック；移植拒絶；炎症障害；リウマチ性障害；閉経後骨粗鬆症；卒中	10
IL-10	LocusID: 3586 NP_000563 XP_001409	IL-10 は、活性化されたマクロファージおよびヘルパーT 細胞により産生される、ifn- γ 、il-2、il-3、tnf および gm-csf などのいくつかのサイトカインの合成を阻害する。	炎症性腸疾患；急性肺損傷；自己免疫障害；癌；クローン病；移植片対宿主障害；増殖障害；肝線維症；C 型肝炎；単純ヘルペスウイルス感染；HIV 感染治療；虚血／再還流；多発性硬化症；心筋炎；乾癬；慢性関節リウマチ；敗血症；移植拒絶；1 型糖尿病；潰瘍性大腸炎；慢性関節リウマチ；炎症性腸疾患	20
				30
				40

IL-11	CAS-145941-26-0 LocusID: 3589 NP_000632 XP_008906	最初は血小板産生活性を有する造血サイトカインとして特性評価された間質細胞由来サイトカインである IL-11 は、造血細胞ならびに複数の他の組織、例えば、脳、脊髄ニューロン、腸、および精巣で発現され、それらに対する多様な作用を示すことが現在示されている。	血小板減少症; 骨髄移植拒絶; クローン病; 移植片対宿主障害; 炎症障害; 粘膜炎; 慢性関節リウマチ; 敗血症誘導性全身性炎症応答症候群	10
IL-12	LocusID: 3592	IL-12 は抗腫瘍、抗ウイルス、および を示す。	癌; C型肝炎;	
IL18 結合タンパク質	LocusID: 10068 NP_005690 XP_006006	IL18 結合タンパク質は、初期の Th1 サイトカイン応答を阻害し、それは免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。	自己免疫疾患; 炎症; 慢性関節リウマチ	20
IL2	LocusID: 3558	IL2 受容体を発現する細胞に結合し、これを活性化する。	癌 感染; 慢性関節リウマチ; 癌	
IL-4	LocusID: 3565	IL4 受容体を発現する細胞に結合し、これを活性化する。	癌; 急性免疫不全	
IL-4 受容体	LocusID: 3566 NP_000409 XP_007989	B 細胞増殖の誘導およびサイトカイン産生の誘導; 胸腺細胞の成熟の誘導; 成熟 T 細胞、NK 細胞の活性化、骨髄造血の調節、好酸球および肥満細胞生成の増強; 内皮細胞の増殖などの様々な作用を有する IL4 に結合し、その活性を遮断することができる。	喘息; 移植片対宿主障害; 過敏症	30
IL-8 (インターロイキン-8)	LocusID: 3576 NP_000575 XP_003501	IL-8(インターロイキン 8)は、好中球の化学誘引および活性化における役割を果たすサイトカインである。それはいくつかの血小板由来因子に対する類似性を有する。	陣痛誘発	40

Kunitz プロテアーゼインヒビター1 (KPI 1)	LocusID:6692 NP_003701 XP_007555	Kunitz プロテアーゼインヒビター1 は、HGF 活性化因子に特異的な強力なインヒビターであり、損傷された組織における HGF のタンパク質分解活性化の調節に関与すると考えられる。	血栓症; 抗凝固剤	10
ラクトフェリン (アポラクトフェリン)	Locus ID: 4057 NP_002334 XP_010963	ラクトフェリンは、トランスフェリンファミリーのメンバーであり、細胞外液体中の鉄を輸送し、抗細菌および抗ウイルス特性を有する。	アレルギー性接触皮膚炎; 細菌感染; 心血管障害; 凝固障害; ドライアイ; 胃炎; C型肝炎; 乾癬	20
レプチン	LocusID: 3952 NP_000221 XP_004625	脂肪細胞により分泌される。肥満制御。食物摂取の調節、体重の減少、ならびにインスリンおよびグルコースレベルの低下。	肥満; 2型糖尿病; 血管障害; 免疫学的障害; 免疫抑制	30
白血病阻害因子	LocusID:3976 NP_002300 XP_009915	白血病阻害因子は、マクロファージの分化を誘導するサイトカインである。LIF は原始胎児神経前駆細胞上で BMP2 と共に働いて、アストロサイトを誘導する。	雌性体の不妊; 神経筋肉障害	40
Lys プラスミノーゲン (組換えトランケート化されたプラスミノーゲン)	Locus ID: 5340 NP_000292 XP_004371	より反応性の高い、トランケートされた形態のプラスミノーゲンである。プラスミノーゲンはプラスミンの前駆体であり、クロットにおけるフィブリンを消化するセリンプロテアーゼである。	血栓症; 動脈閉塞障害	
マスピン	CAS-157857-21-1 Locus ID: 5268 NP_002630 XP_008742	血管新生を阻害することにより腫瘍転移を抑制するセリンプロテアーゼインヒビター。	癌; 乳癌; 前立腺癌	

メチオニナーゼ	CAS-42616-25-1 Genbank: AAB03240	メチオニナーゼは、ホモシステインおよびそのS置換誘導体の α 、 γ -排除反応ならびにシステインおよびその誘導体の α 、 β -排除反応を触媒する。それはまた、ホモシステイン基質の γ 炭素の置換基と、外因的に付加されたアルカンチオールとの間の交換反応を触媒し、対応するS-アルキルホモシステインを形成する。それはまた、システインとアルカンチオールとの間の同様の β 交換反応を触媒する。	癌; 胃腸癌; 非小細胞肺癌; 膵臓癌	10
ミクロソーム導入タンパク質	Locus ID: 4547 NP_000244 XP_003363	MTPはヘテロダイマー性ミクロソームトリグリセリド導入タンパク質の大きいサブユニットをコードする。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、リポタンパク質集合において中心的な役割を果たすことが示されたヘテロダイマー性ミクロソームトリグリセリド導入タンパク質を完成させる。	脂質障害	20
MSH-ジフテリア毒素キメラ	Locus ID: 5443 NP_000930 XP_002485 K01722 AAA32182	MSH受容体を発現する細胞に結合し、これを殺傷する。	癌	30
神経成長因子(NGF)	LocusID:4803 NP_002497 XP_002122	神経細胞の分化および生存における役割を有する増殖因子。	HIV-関連感覚ニューロパシー; 糖尿病性ニューロパシー; 神経変性障害	40

<p>中性エンドペプチダーゼ (NEP)</p>	<p>CAS-82707-54-8 Locus ID: 4311 NP_000893 NP_009218 NP_009219 NP_009220 XP_003136 XP_003137 XP_003138 XP_003139</p>	<p>中性エンドペプチダーゼは、腎臓において特に豊富な 100-kD の II 型膜貫通糖タンパク質であり、それは近位尿細管のブラシ境界上に、および糸球体上皮上に存在する。NEP は疎水性残基のアミノ側のペプチドを切断し、グルカゴン、エンケファリン、サブスタンス P、ニューロテンシン、オキシトシン、およびブラジキニンなどのいくつかのペプチドホルモンを不活性化する。</p>	<p>癌；片頭痛；炎症性腸疾患；炎症；喘息；呼吸器疾患；肺癌；小細胞肺癌</p>	10
<p>NIF (好中球阻害因子)</p>	<p>Genbank: AAA27789</p>	<p>NIF は、内皮細胞への接着および過酸化水素の接着依存的放出などのいくつかの好中球機能の糖タンパク質インヒビターである。これらの機能的作用は、他の $\beta 2$ インテグリンでなく、その $\alpha \beta 2$ への特異的結合の結果生じたものである。NIF は、動物モデルにおける組織損傷および虚血-再還流損傷などの過剰の好中球活性化の有害な作用を弱めるのに有効であることが示された。</p>	<p>卒中</p>	20
<p>ノギン</p>	<p>Locus ID: 9241 NP_005441 XP_008151</p>	<p>ノギンは、骨形態形成タンパク質-4 (BMP4) などのトランスフォーミング増殖因子-β (TGF-β) スーパーファミリーシグナリングタンパク質のメンバーに結合し、これを不活性化する。</p>	<p>進行性骨化性線維形成異常症；異常な骨増殖；病的な骨増殖</p>	30

NT-3 (ニューロトロフィン3)	LocusID: 4908 NP_002518	NT-3 は、哺乳動物のニューロンの生存および分化を制御する、神経栄養因子ニューロトロフィンのファミリーのメンバーである。この遺伝子は神経増殖因子および脳由来神経栄養因子の両方に密接に関連する。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、成体の神経系の維持に関与し、それがヒト胎盤で発現される場合、胚におけるニューロンの発達に影響する。	腸ニューロパシー；便秘；糖尿病性ニューロパシー；末梢神経障害	10
骨形成タンパク質-1 (OP-1)	LocusID: 655 NP_001710 XP_012943	OP-1 は、受容体セリン/トレオニンキナーゼを介してシグナル伝達して、細胞応答を刺激する調節分子のトランスフォーミング増殖因子-βスーパーファミリーのメンバーである。その作用としては、胎児頭蓋冠細胞による VEGF 発現の増加および大脳皮質ニューロンにおける樹状突起伸長の増加が挙げられる。	急性骨折；軟骨修復；神経細胞障害；整形外科的再構築；パーキンソン病； 歯周組織修復；腎不全；脊髄固定；卒中；歯の象牙質の再生；長骨癒着不能	20
オステオプロテグリン (破骨細胞形成阻害因子)	Locus ID: 4982 NP_002537 Locus ID: 7941 NP_005075 XP_004492	オステオプロテグリンは、破骨細胞形成および骨再吸収を阻害し、線維芽細胞増殖を誘導する。血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼは、血小板活性化因子および関連するリン脂質を不活性化する。	骨障害；癌疼痛；閉経後骨粗鬆症；慢性関節リウマチ；喘息；壊死性腸炎；急性腸炎；成人呼吸窮迫症候群；アレルギー性喘息；炎症性腸疾患；虚血／再還流；瘰癧；敗血症誘導性全身性炎症応答症候群；固形器官保存；1型糖尿病	30
				40

パッチェッド(ヘッジホッグ受容体)	Locus ID: 5727 NP_000255 XP_005574	ソニックヘッジホッグの受容体であるパッチェッドは、発生パターン化および増殖を制御する腫瘍抑制因子である。	基底細胞癌；脳の癌	
PDGF (PGDF-B)	CAS-165101-51-9 LocusID: 5154 LocusID: 5155 NP_002598 NP_002599 XP_009997	PDGF-B は、強力なミトジェンであり、形質転換剤である。それは PDGF 受容体チロシンキナーゼを介して働いて、その分裂促進作用および形質転換作用を示す。	下肢糖尿病性ニューロパシー潰瘍；褥瘡性潰瘍；糖尿病性足部潰瘍；静脈うっ滞潰瘍；歯周病；皮膚潰瘍	10
PEDF (色素上皮由来因子)	Locus ID: 5176 NP_002606	色素上皮由来因子は、セリンプロテアーゼインヒビターのセルピンファミリーの非阻害的メンバーである。それはセリンプロテアーゼ阻害以外の機構により神経突起促進因子として働く。	筋萎縮性側索硬化症；炎症性眼疾患；血管性眼疾患；変性性眼疾患；ジストロフィー性眼疾患；ニューロパシー	20
プラスミノゲン活性化因子阻害因子(プラスミノゲン活性化因子阻害因子-1)	Locus ID: 5054 NP_000593 XP_004828	プラスミノゲン活性化因子阻害因子 I は、不活性なプラスミノゲンのプラスミンへの変換を阻害することにより線維素溶解を調節する。プラスミノゲン活性化因子阻害因子 I は、セリンプロテアーゼインヒビターのセルピンファミリーのメンバーである。	出血	30
プロサブチド	Genbank: AAG31635 Pubmed: PMID: 9114068	プロサブチドは、プロサブチンから誘導された神経栄養ペプチド (TXLIDNNATEEELY；式中、X は D-アラニンである)である。	糖尿病性ニューロパシー；疼痛；中枢神経系障害	40
リラクシン(トリラクシン)	LocusID: 6013 LocusID: 6019 NP_008842 NP_005050 XP_011804 XP_005512	リラクシンは、妊娠中に卵巣の黄体で合成されるペプチドホルモンであり、出産前に血流中に放出される。その主な生物学的作用は、哺乳動物の生殖管を再モデル化して、誕生プロセスを容易にすることである。	強皮症；不妊；うっ血性心不全；労働障害；末梢動脈障害；肺線維症；肺高血圧	50

レチナール S-抗原 (レチナールアレスチン)	Genbank: AAA30378	レチナール S 抗原は、リン酸化されたロドプシンに結合し、光伝達カスケードの非活性化において役割を果たす光受容体である。	ブドウ膜炎
ヒト黄体形成ホルモン	LocusID: 1081 LocusID: 3972 NP_000726 NP_000885 XP_011444 XP_009418	hLH は、非共有結合した α および β サブユニットからなる下垂体ホルモンダイマーである。その主な作用は、卵母細胞の成熟化ならびに卵胞によるエストロゲンおよびプロゲステロンの分泌である。	不妊
サルプラーゼ	CAS-99149-95-8 Genbank: CAA01515	サルプラーゼは、非グリコシル化一本鎖組換えウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子である。	心筋梗塞
1 型可溶性補体受容体	LocusID: 1378 NP_000564 NP_000642	1 型補体受容体 (C3b/C4b 受容体) は、C3b および C4b コーティングされたリガンドの受容体である。それは膜貫通および細胞質ドメインを欠き、C4b および C3b に選択的に結合することにより C3 および C5 変換酵素活性を阻害する。	心筋梗塞；急性呼吸窮迫症候群；成人呼吸窮迫症候群；同種移植拒絶；播種性血管内凝固症候群；肺移植拒絶；多発性硬化症；再還流損傷；慢性関節リウマチ；全身性紅斑性狼瘡；異種移植拒絶

10

20

30

40

ソニックヘッジ ホッグ(ヘッジ ホッグ)	LocusID: 6469 NP_000184 XP_004942	ソニックヘッジホッグは、胚のパターン形成において中心的な役割を果たす。それはタンパク質分解的に切断され、修飾されてシグナリング分子として活性にならなければならない不活性前駆体として生じる。ソニックヘッジホッグの受容体は多通過膜貫通タンパク質であるパッチェドであり、ソニックヘッジホッグシグナリングの下流の標的は Gli3 などの転写因子である。	パーキンソン病；神経障害；脱毛症	10
スタフィロキナーゼ	Genbank: CAA29822 Genbank: CAA01335	スタフィロキナーゼは、プラスミノゲンをタンパク質分解的に活性化する単ドメインタンパク質である。	心筋梗塞；動脈閉塞性障害；卒中	20
幹細胞因子(Kit リガンド)	CAS-163545-26-4 NP_003985	SCF は、肥満細胞生存にとって実質的に必須であり、in vitro で限界的な肥満細胞増殖を誘導する。SCF の存在下では、肥満細胞は主に、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-16、および IL-18 などの前炎症性サイトカインを産生する。	乳癌における PBPCT の前の前駆細胞の可動化；ニューボゲンとの関連；幹細胞可動化；貧血；異種移植拒絶	30
ストレプトキナーゼ	CAS-9002-01-1 Genbank: E03308	ストレプトキナーゼは、非タンパク質分解的にヒト(h)プラスミノゲンを活性化し、 α 2-アンチプラスミンによる不活性化からプラスミンを保護する 3 ドメイン(α 、 β 、 γ)分子である。	心筋梗塞；血餅；肺塞栓症	40

TGF β 3 (トランスフォーミング増殖因子 β 3)	LocusID: 7043 NP_003230 XP_007417	トランスフォーミング増殖因子 β 3は、膜貫通セリン/トレオニンキナーゼを介して分裂促進シグナルを伝達するサイトカインである。TGF β 3は、肺および口蓋の正常な発達に必要である。	慢性創傷；口内粘膜炎；放射線防御	10
トロンボポエチン	LocusID: 7066 NP_000451 XP_002815	トロンボポエチンは、c-Mpl受容体に結合し、巨核球発達を調節する。	トロモサイトペニア；化学防御	20
Tie-2 (Tek; 内 膜内皮細胞キナーゼ)	LocusID: 7010 NP_000450 XP_005480	アンギオポエチン受容体チロシンキナーゼ Tie-2/Tek は、アンギオポエチンによる刺激後の細胞内シグナリングおよび血管新生応答を媒介する。	癌	30
組織因子経路阻害因子	LocusID: 7035 NP_006278 XP_002672	組織因子経路阻害因子は、リポタンパク質関連凝固阻害因子である。それはフィブリンクロット形成を阻害する Kunitz 型プロテアーゼ阻害因子である。	敗血症；凝固障害；再還流損傷；アテローム性動脈硬化症	40
TNF α	LocusID: 7124 NP_000585 XP_011402	TNF は、敗血症の病態生理において中心的な役割を果たす。高レベルの TNF α は、重篤な細菌感染における疾患の重篤度の増加と相関し、マラリア TNF α シグナリングは NF κ B の活性化およびアポトーシスの誘導を誘導し得る。	癌；CNS 癌；リンパ腫；皮膚癌；泌尿生殖器癌	【 0 2 5 1 】
TNF 結合タンパク質	NP_001056	TNF 結合タンパク質は、TNF 結合に対する競合により TNF 受容体の活性化を阻害する。	慢性関節リウマチ；心臓再還流損傷；自己免疫障害；クローン病；マラリア；再還流損傷；敗血症性ショック	

可溶性 TNF 受容体	CAS-185243-69-0 LocusID: 7132 LocusID: 7133 NP_001056 NP_001057 XP_006950 XP_001743	腫瘍壊死因子受容体は、TNF 刺激に応答して前炎症性細胞応答を媒介する。	慢性関節リウマチ；悪液質；心不全；HIV 1 感染；若年性慢性関節リウマチ；乾癬；乾癬性関節炎；敗血症性ショック；移植拒絶；アレルギー性喘息	10
t-PA	CAS-105857-23-6 CAS-171870-23-8 CAS-156616-23-8 CAS-151912-42-4 CAS-133652-38-7 CAS-191588-94-0 LocusID: 5327 NP_000921 NP_000922 XP_005024	組織型プラスミノゲン活性化因子；不活性プラスミノゲンをプラスミンに変換するセリンプロテアーゼ。	塞栓症；心筋梗塞；卒中；血栓症；うつ血性心不全；虚血性心障害；冠動脈再狭窄	20
トロホラストインターフェロン (インターフェロン τ ； IFN- τ ；トロホラスチン)	Genbank: A53746	胎盤細胞の増殖および分化、ならびにウイルス環境下での胎児の保護に関与。	HIV 感染の治療；多発性硬化症	30
トロポニン 1	LocusID: 7135 NP_003272 XP_001918 LocusID: 7136	トロポニン I は、静止している筋肉組織におけるアクチンとミオシンの相互作用を防止する調節タンパク質である。トロポニン I はトロポニンの阻害サブユニットである。	癌の転移；糖尿病性網膜症；眼の障害；黄斑変性；固形腫瘍	40
尿酸酸化酵素	LocusID: 7377 Genbank: S94095	尿酸酸化酵素は、尿酸の酸化を触媒する酵素である。	化学防御；化学療法に関連する尿酸血症の予防および治療；痛風	50

ウロキナーゼ (プロ-ウロキナーゼ)	CAS-9039-53-6 LocusID: 5328 NP_002649 XP_011861	ウロキナーゼは、血液凝固調節に関与するプラスミノゲン活性化因子として働く。それはプラスミノゲンを切断してプラスミンを形成するセリンプロテアーゼである。	カテーテル消失；冠動脈再狭窄；糖尿病性網膜症；心筋梗塞；血栓症；硝子体出血；末梢血管障害；卒中	10
VEGF-1 (VEGF-121)	LocusID: 7422 LocusID: 7423 LocusID: 7424 NP_003367 NP_003368 NP_005420 XP_004512 XP_006539 XP_003456	VEGF-1 は、内皮細胞増殖および血管浸透性を誘導する増殖因子である。	心血管疾患；血管障害；骨折治療	20

【0253】

内因性標的化合物の提供された一覧表は、包括的なものではない。リガンドが2個のエピトープに結合する場合(同じか、または異なる抗原上で)、抗原をこの一覧表から選択することができる。特定の実施形態においては、リガンドはTNFR1に結合するdAbおよび第2のdAbまたはこれらの抗原のいずれか1つに結合するエピトープ結合ドメインを含む。そのような実施形態においては、多特異的リガンドは免疫グロブリン可変ドメインの任意の組合せ(例えば、 V_HV_H 、 V_HV_L 、 V_LV_L)を含んでもよい。

30

【0254】

血清アルブミンに結合するリガンドおよびdAbモノマー

本発明は、1 nM ~ 500 μ M(すなわち、 $\times 10^{-9}$ ~ 5×10^{-4})、好ましくは100 nM ~ 10 μ Mの K_d で血清アルブミン(SA)に結合するリガンドまたはdAbモノマー(例えば、そのようなdAbを含む二重特異的リガンド)を提供する。好ましくは、第1の抗SA dAbおよび別の標的に対する第2のdAbを含む二重特異的リガンドについては、その標的に対する第2のdAbの親和性(例えば、BiaCoreを用いる表面プラズモン共鳴により測定された K_d および/または K_{off})はSAに対する第1のdAbの親和性の1 ~ 100000倍(好ましくは、100 ~ 100000倍、より好ましくは1000 ~ 100000倍、もしくは10000 ~ 100000倍)である。例えば、第1のdAbは約10 μ Mの親和性でSAに結合するが、第2のdAbは100 pMの親和性でその標的に結合する。好ましくは、血清アルブミンはヒト血清アルブミン(HSA)である。一実施形態においては、第1のdAb(またはdAbモノマー)は、約50、好ましくは70、およびより好ましくは100、150または200 nMの K_d でSA(例えば、HSA)に結合する。

40

【0255】

特定の実施形態においては、SAに結合するdAbモノマーは、凝集、折り畳み解除に可逆的に抵抗し、および/またはTNFR1に結合するdAbモノマーについて上記のようなフレームワーク領域を含む。

【0256】

リガンド形式

リガンドおよびdAbモノマーを、一特異的もしくは多特異的抗体または抗体フラグメン

50

トとして、または一特異的もしくは多特異的非抗体構造に形式化することができる。好適な形式としては、抗体の可変ドメインまたはその1種以上のCDRを、任意の好適なポリペプチド構造に対して抗原に対する結合特異性を付与するように組み入れることができる前記構造が挙げられる。IgG様形式、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、一本鎖抗体、二特異的抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖および/もしくは軽鎖のホモダイマーおよびヘテロダイマー、前記のいずれかの抗原結合フラグメント(例えば、Fvフラグメント(例えば、一本鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合したFv)、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント)、単一可変ドメイン(例えば、V_H、V_L、V_{HH})、dAb、ならびに前記のいずれかの改変体(例えば、ポリアルキレングリコール(例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコール)もしくは他の好適なポリマーの共有結合により改変されたもの)などの、種々の好適な抗体形式が当業界で公知である。単一可変ドメインおよびdAbのPEG化、同じものを調製するための好適な方法、PEG化された単一可変ドメインならびにdAbモノマーおよびマルチマーのin vivoでの半減期の増加、好適なPEG、PEGの好ましい水力学的大きさ、ならびにPEG化された単一可変ドメインならびにdAbモノマーおよびマルチマーの好ましい水力学的大きさに関して、米国を指定した(WO 2004/081026)、2003年6月30日に提出されたPCT/GB03/002804を参照されたい。上記の一部を含む、PCT/GB03/002804(WO 2004/081026)の教示全体は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

10

【0257】

前記リガンドを、例えば、(Gly₄Ser)_n(式中、n=1~8、例えば、2、3、4、5、6もしくは7である)などの好適なリンカーを用いて、所望のdAbモノマーのダイマー、トリマーまたはポリマーとして形式化することができる。必要に応じて、dAbモノマー、ダイマーおよびトリマーなどのリガンドを、C_H2およびC_H3ドメインの1つまたは両方、および必要に応じて、ヒンジ領域を含む抗体Fc領域に連結することができる。例えば、Fc領域に単一のヌクレオチド配列として連結されたリガンドをコードするベクターを用いて、そのようなポリペプチドを調製することができる。

20

【0258】

リガンドおよびdAbモノマーを、非抗体マルチリガンド構造中で組み合わせ、および/または形式化して、同じ抗原と共に標的分子に結合することによって優れたアビディティを提供する多価複合体を形成させることができる。例えば、SpAなどの天然の細菌受容体をCDRの移植のための足場として用いて、1個以上のエピトープに特異的に結合するリガンドを作製することができる。この手順の詳細は米国特許第5,831,012号に記載されている。他の好適な足場としては、フィブロネクチンおよびアフィボディに基づくものが挙げられる。好適な手順の詳細はWO 98/58965に記載されている。他の好適な足場としては、van den Beukenら、J. Mol. Biol. 310:591-601 (2001)に記載のようなりポカリンおよびCTLA4、ならびに例えば、細菌のGroELまたは他のシャペロンポリペプチドの環構造に基づく、WO 00/69907 (Medical Research Council)に記載のものなどの足場が挙げられる。タンパク質足場を組み合わせてもよい；例えば、CDRをCTLA4足場上に移植し、免疫グロブリンV_HまたはV_Lドメインと共に用いてリガンドを形成させることができる。同様に、フィブロネクチン、リポカリンおよび他の足場を組み合わせてもよい。

30

40

【0259】

任意の所望の形式を調製するための種々の好適な方法は、当業界で公知である。例えば、抗体鎖および形式(例えば、IgG様形式、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、一本鎖抗体、二特異的抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖および/もしくは軽鎖のホモダイマーおよびヘテロダイマー)を、好適な発現構築物の発現および/または好適な細胞(例えば、ハイブリドーマ、ヘテロハイブリドーマ、前記形式をコードする組換え構築物を含む組換え宿主細胞)の培養により調製することができる。さらに、抗体または抗体鎖の抗原結合フラグメント(例えば、Fvフラグメント(例えば、一本鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合したFv)、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント)などの形式を、好適な発現構築物の発現によるか、または、例えば、パバインもしくはペプシンを用いる抗体の

50

酵素的消化により調製することができる。

【0260】

前記リガンドを、例えば、WO 03/002609(その教示全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載のような、二重特異的リガンドまたは多特異的リガンドとして形式化することができる。二重特異的リガンドは、異なる結合特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。そのような二重特異的リガンドは、重鎖および軽鎖ドメインの組合せを含んでもよい。例えば、二重特異的リガンドは、scFvの形態で一緒に連結するか、または二特異的抗体もしくはその抗原結合フラグメント(例えば、 $F(ab')_2$ フラグメント)に形式化することができる V_H ドメインおよび V_L ドメインを含んでもよい。二重特異的リガンドは、抗原またはエピトープに共同的に結合する従来の2個の鎖抗体抗原結合部位を形成する相補的 V_H/V_L 対を含まない。

10

【0261】

さらに、二重特異的リガンドは、必要に応じて1個以上の C_H または C_L ドメインを含んでもよい。必要に応じて、ヒンジ領域ドメインを含有させることもできる。そのようなドメインの組合せは、例えば、IgGもしくはIgMなどの模倣天然抗体、またはFv、scFv、Fabもしくは $F(ab')_2$ 分子などのそのフラグメントであってもよい。 V_H 、 V_L 、 C_H1 および C_L ドメインを含むIgG分子の単一アームなどの他の構造物も想定される。好ましくは、本発明の二重特異的リガンドは2個の可変ドメインのみを含むが、いくつかのそのようなリガンドを、同じタンパク質と一緒に組み入れることができ、例えば、2個のそのようなリガンドを、IgGまたはIgMなどのマルチマー免疫グロブリンに組み入れることができる。あるいは、別の実施形態においては、複数の二重特異的リガンドを組合わせてマルチマーを形成させる。例えば、2個の異なる二重特異的リガンドを組合わせて、四特異的分子を作製することができる。当業者であれば、本発明の方法に従って製造された二重特異的リガンドの軽鎖および重鎖可変領域が同じポリペプチド鎖、またはあるいは、異なるポリペプチド鎖上にあってもよいことを理解できるであろう。可変領域が異なるポリペプチド鎖上にある場合、これらを、リンカー、一般的には、可撓性リンカー(ポリペプチド鎖など)、化学的連結基、または当業界で公知の任意の他の方法を介して連結することができる。

20

【0262】

多特異的リガンドは、2個以上のエピトープ結合特異性を有する。一般的には、多特異的リガンドは、dAbまたはエピトープの結合部位を含む非抗体タンパク質ドメイン、例えば、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、アビマーなどの2個以上のエピトープ結合ドメインを含む。多特異的リガンドを、以下に記載のようにさらに形式化することができる。

30

【0263】

いくつかの実施形態においては、前記リガンドはIgG様形式である。そのような形式は、1個以上の可変領域(V_H および V_L)が、所望の特異性のdAbまたは単一可変ドメインで置換されたIgG分子の従来の4つの鎖構造(2個の重鎖および2個の軽鎖)を有する。好ましくは、可変領域の各々(2個の V_H 領域および2個の V_L 領域)を、dAbまたは単一可変ドメインと置換する。IgG様形式中に含まれるdAbまたは単一可変ドメインは、同じ特異性または異なる特異性を有してもよい。いくつかの実施形態においては、IgG様形式は四価であり、1、2、3または4つの特異性を有してもよい。例えば、IgG様形式は一特異的であってよく、同じ特異性を有する4つのdAbを含む；二特異的であり、同じ特異性を有する3つのdAbと異なる特異性を有する別のdAbを含む；二特異的であり、同じ特異性を有する2つのdAbと共通であるが、異なる特異性を有する2つのdAbを含む；三特異的であり、同じ特異性を有する第1および第2のdAb、異なる特異性を有する第3のdAbならびに第1、第2および第3のdAbとは異なる特異性を有する第4のdAbを含む；または四特異的であり、それぞれ異なる特異性を有する4つのdAbを含む。IgG様形式の抗原結合フラグメント(例えば、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fv、scFv)を調製することができる。好ましくは、IgG様形式またはその抗原結合フラグメントはTNFR1と架橋しない。

40

【0264】

50

半減期延長形式

リガンドを形式化して、*in vivo*での血清半減期を延長することができる。*in vivo*での半減期の増加は、免疫グロブリン、特に、抗体および最も特にはdAbなどの小さいサイズの抗体フラグメントの*in vivo*での適用において有用である。そのようなフラグメント(Fv、ジスルフィド結合したFv、Fab、scFv、dAb)は身体から迅速に消失し、これは臨床適用を厳しく制限し得る。

【0265】

リガンド(例えば、dAbモノマー)を形式化して、例えば、ポリアルキレングリコール基(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)基、ポリプロピレングリコール基)、血清アルブミン、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはその少なくともトランスフェリン結合部分、抗体Fc領域の結合により、または抗体ドメインへのコンジュゲーションにより、より大きい水学的大きさを持たせることができる。いくつかの実施形態においては、前記リガンドをPEG化する。好ましくは、PEG化されたリガンドは、PEG化されていない同じリガンドと実質的に同じ親和性で内因性標的化合物に結合する。例えば、前記リガンドは、内因性標的化合物に結合するPEG化されたdAbモノマーであってよく、ここでPEG化されたdAbモノマーは、約1000以下の係数、好ましくは約100以下の係数、より好ましくは約10以下の係数により、PEG化されていない形態のdAbの親和性とは異なる親和性で、またはPEG化されていない形態と比較して実質的に未変化の親和性で、該内因性標的化合物に結合する。

10

【0266】

dAbモノマーなどの小さいリガンドを、抗体のより大きい抗原結合フラグメントとして、または抗体として形式化する(例えば、Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、IgG、scFvとして形式化)ことができる。アンタゴニスト(例えば、リガンド、dAbモノマー)の水学的大きさおよびその血清半減期を、本明細書に記載のように、*in vivo*での半減期を増加させる抗原もしくはエピトープに結合する結合ドメイン(例えば、抗体もしくは抗体フラグメント)に該アンタゴニストをコンジュゲートさせるか、または連結することにより増加させることもできる。例えば、前記リガンド(例えば、dAbモノマー)を、抗血清アルブミンもしくは抗新生児Fc受容体抗体もしくは抗体フラグメント、例えば、抗SAもしくは抗新生児Fc受容体dAb、Fab、Fab'もしくはscFv、または抗SAアフィボディもしくは抗新生児Fc受容体アフィボディにコンジュゲートさせるか、または連結することができる。

20

30

【0267】

本発明のリガンド(例えば、dAbモノマーおよびマルチマー)の水学的大きさを、当業界でよく知られている方法を用いて決定することができる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、リガンドの水学的大きさを決定することができる。架橋アガロースマトリックスなどの、リガンドの水学的大きさを決定するための好適なゲル濾過マトリックスはよく知られており、容易に入手可能である。

【0268】

リガンド形式の大きさ(例えば、内因性標的化合物への結合部位を有する結合部分に結合させたPEG部分の大きさ)を、所望の用途に応じて変化させることができる。例えば、リガンドが循環から離脱し、末梢組織に進入することを意図する場合、該リガンドの水学的大きさを低く維持して、血流からの溢出を容易にするのが望ましい。あるいは、リガンドがより長時間、全身循環中に保持されるのが望ましい場合、該リガンドの大きさを、例えば、Ig様タンパク質を形式化するか、または30~60 kDaのPEG部分の添加により増加させることができる。

40

【0269】

本発明によるリガンドにおける使用のための好適なアルブミン、アルブミン断片またはアルブミン変異体の例は、WO 2005/077042A2(その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている。特に、以下のアルブミン、アルブミン断片またはアルブミン変異体を、本発明において用いることができる：

・配列番号1(WO 2005/077042A2に開示されたもの、この配列は参照により本明細書の開示

50

に明確に組み入れられるものとする)；

・WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸1～387を含むか、もしくはこれからなるアルブミン断片または変異体；

・(a) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸54～61；(b) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸76～89；(c) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸92～100；(d) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸170～176；(e) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸247～252；(f) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸266～277；(g) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸280～288；(h) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸362～368；(i) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸439～447；(j) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸462～475；(k) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸478～486；および(l) WO 2005/077042A2中の配列番号1のアミノ酸560～566からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、アルブミン、またはその断片もしくは変異体。

10

【0270】

本発明によるリガンドにおける使用のための好適なアルブミン、断片および類似体のさらなる例は、WO 03/076567A2(その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている。特に、以下のアルブミン、断片または変異体を、本発明において用いることができる：

・WO 03/076567A2、例えば、その図3に記載のヒト血清アルブミン(この配列情報は参照により本明細書の開示に明確に組み入れられるものとする)；

20

・66,500の公式分子量を有する585アミノ酸の単一非グリコシル化ポリペプチドからなるヒト血清アルブミン(HA)(Melounら、FEBS Letters 58:136 (1975)；Behrensら、Fed. Proc. 34:591 (1975)；Lawnら、Nucleic Acids Research 9:6102-6114 (1981)；Minghettiら、J. Biol. Chem. 261:6747 (1986)を参照)；

・Weitkampら、Ann. Hum. Genet. 37:219 (1973)に記載のアルブミンの多型変異体もしくは類似体もしくは断片；

・EP 322094に記載のアルブミン断片もしくは変異体、例えば、HA(1～373)、HA(1～388)、HA(1～389)、HA(1～369)、およびHA(1～419)および1～369と1～419の間の断片；

・EP 399666に記載のアルブミン断片もしくは変異体、例えば、HA(1～177)およびHA(1～200)ならびにHA(1～X)(ここで、Xは178～199の任意の数である)の間の断片。

30

【0271】

(1個以上の)半減期延長部分(例えば、アルブミン、トランスフェリンならびにその断片および類似体)を本発明のリガンド中で用いる場合、それを、例えば、TNFR1結合部分のNもしくはC末端に位置する半減期延長部分を含む1個のポリペプチド鎖としてコードされる融合タンパク質をコードする1個のヌクレオチド構築物を用いることにより、内因性標的化合物の結合部位を有する結合部分への直接的融合などにより、任意の好適な方法を用いてコンジュゲートすることができる。あるいは、コンジュゲーションを、部分の間のペプチドリンカー、例えば、WO 03/076567A2またはWO 2004/003019に記載のペプチドリンカー(これらのリンカーの開示は、本発明における使用のための例を提供するための本発明の開示に参照により組み入れられるものとする)を用いることにより達成することができる。

40

【0272】

典型的には、in vivoでの血清半減期を増強するポリペプチドは、in vivoで天然に生じ、生物(例えば、ヒト)から望ましくない物質を除去する内因性機構による分解または除去に抵抗するポリペプチドである。例えば、in vivoでの血清半減期を増強するポリペプチドを、細胞外マトリックスに由来するタンパク質、血液中に認められるタンパク質、血液脳関門もしくは神経組織に認められるタンパク質、腎臓、肝臓、肺、心臓、皮膚もしくは骨に局在化するタンパク質、ストレスタンパク質、疾患特異的タンパク質、またはFc輸送に關与するタンパク質から選択することができる。

【0273】

50

in vivoでの血清半減期を増強する好適なポリペプチドとしては、例えば、トランスフェリン受容体特異的リガンド-神経薬剤融合タンパク質(米国特許第5,977,307号(その教示は参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照)、脳毛細血管内皮細胞受容体、トランスフェリン、トランスフェリン受容体(例えば、可溶性トランスフェリン受容体)、インスリン、インスリン様増殖因子1(IGF1)受容体、インスリン様増殖因子2(IGF2)受容体、インスリン受容体、血液凝固第X因子、 α -1-抗トリプシンおよびHNF が挙げられる。また、血清半減期を増強する好適なポリペプチドとして、 α -1糖タンパク質(オロソムコイド; AAG)、 α -1抗キモトリプシン(ACT)、 α -1ミクログロブリン(プロテインHC; AIM)、抗トロンピンIII(AT III)、アポリポタンパク質A-1(Apo A-1)、アポリポタンパク質B(Apo B)、セルロプラスミン(Cp)、補体成分C3(C3)、補体成分C4(C4)、C1エステラーゼ阻害因子(C1 INH)、C反応性タンパク質(CRP)、フェリチン(FER)、ヘモペキシン(HPX)、リポタンパク質(a)(Lp(a))、マンノース結合タンパク質(MBP)、ミオグロビン(Myo)、プレアルブミン(トランスサイレチン; PAL)、レチノール結合タンパク質(RBP)、およびリウマチ因子(RF)も挙げられる。

10

20

30

40

50

【0274】

細胞外マトリックスに由来する好適なタンパク質としては、例えば、コラーゲン、ラミニニン、インテグリンおよびフィブロネクチンが挙げられる。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要なタンパク質である。約15種類のコラーゲン分子が現在知られており、身体の異なる部分に認められ、例えば、I型コラーゲン(体内コラーゲンの90%を占める)は骨、皮膚、腱、靭帯、角膜、内部器官に認められ、またはII型コラーゲンは軟骨、椎間板、脊索、および眼の硝子体液に認められる。

【0275】

血液由来の好適なタンパク質としては、例えば、血漿タンパク質(例えば、フィブリン、 α -2マクログロブリン、血清アルブミン、フィブリノーゲン(例えば、フィブリノーゲンA、フィブリノーゲンB)、血清アミロイドタンパク質A、ハプトグロビン、プロフィリン、ユビキチン、ウテログロブリンおよび α -2-ミクログロブリン)、酵素および酵素阻害剤(例えば、プラスミノゲン、リソソーム、シスタチンC、 α -1-抗トリプシンおよび膵臓トリプシン阻害剤)、免疫グロブリンタンパク質(例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、免疫グロブリン軽鎖(/))などの免疫系のタンパク質、輸送タンパク質(例えば、レチノール結合タンパク質、 α -1ミクログロブリン)、デフェンシン(例えば、 α -デフェンシン1、好中球デフェンシン1、好中球デフェンシン2および好中球デフェンシン3)などが挙げられる。

【0276】

血液脳関門または神経組織に認められる好適なタンパク質としては、例えば、メラノコルチン受容体、ミエリン、アスコルビン酸輸送因子などが挙げられる。

【0277】

in vivoでの血清半減期を増強する好適なポリペプチドとしては、腎臓に局在化するタンパク質(例えば、ポリシスチン、IV型コラーゲン、有機陰イオン輸送因子K1、Heymann's 抗原)、肝臓に局在化するタンパク質(例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、G250)、肺に局在化するタンパク質(例えば、IgAに結合する分泌成分)、心臓に局在化するタンパク質(例えば、拡張型心筋症に関連するHSP27)、皮膚に局在化するタンパク質(例えば、ケラチン)、骨形成活性を示すトランスフォーミング増殖因子スーパーファミリーのタンパク質のサブセット(例えば、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8)である形態形成タンパク質などの骨特異的タンパク質(BMP)、腫瘍特異的タンパク質(例えば、トロホブラスト抗原、ハーセプチン受容体、エストロゲン受容体、カテプシン(例えば、肝臓および脾臓に認められるカテプシンB))も挙げられる。

【0278】

好適な疾患特異的タンパク質としては、例えば、LAG-3(リンパ球活性化遺伝子)、オステオプロテゲリンリガンド(OPGL; Nature 402, 304-309 (1999))、OX40(活性化されたT細胞上で発現され、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)産生細胞中で特異的に上方調節さ

れるTNF受容体ファミリーのメンバー；Immunol. 165 (1):263-70 (2000)を参照)などの活性化されたT細胞上でのみ発現される抗原が挙げられる。好適な疾患特異的タンパク質としては、例えば、CG6512 *Drosophila*、ヒトパラプレジン、ヒトFtsH、ヒトAFG3L2、マウスftsHなどのメタロプロテアーゼ(関節炎/癌と関連)；および酸性線維芽細胞増殖因子(FGF-1)、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)、血管内皮増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF β)、腫瘍壊死因子 (TNF α)、アンジオジェニン、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-8(IL-8)、血小板由来内皮増殖因子(PD-ECGF)、胎盤増殖因子(P1GF)、ミッドカイン血小板由来増殖因子-BB(PDGF)、およびラクタルカインなどの血管新生増殖因子も挙げられる。

【0279】

*in vivo*での血清半減期を増強する好適なポリペプチドとしては、熱ショックタンパク質(HSP)などのストレスタンパク質も挙げられる。HSPは通常、細胞内に認められる。これらが細胞外で認められる場合、それは細胞が死に、その内容物を流出させたことを示唆する因子である。このプログラムされていない細胞死(壊死)は、外傷、疾患または損傷の結果として、細胞外HSPが免疫系からの応答を誘発する場合に起こる。細胞外HSPへの結合は、疾患部位への本発明の組成物の局在化をもたらすことができる。

【0280】

Fc輸送に關与する好適なタンパク質としては、例えば、Brambell受容体(FcRBとしても知られる)が挙げられる。このFc受容体は2つの機能を有し、その両方は潜在的に送達にとって有用である。この機能は、(1)胎盤を横切る母から子へのIgGの輸送、(2)分解からのIgGの保護によってその血清半減期を延長することである。前記受容体はエンドソームからIgGを再利用すると考えられる(Holligerら、*Nat Biotechnol* 15(7):636-6(1997)を参照)。

【0281】

当業者であれば、薬物動態分析およびリガンドの半減期の決定のための方法に精通しているであろう。詳細はKenneth, Aら：*Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Petersら、Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996)に見出すことができる。また、 $t_{1/2}$ および $t_{1/2}$ 半減期ならびに曲線下面積(AUC)などの薬物動態パラメーターを記載する、Marcel Dekker、第2版、特別版(1982)により刊行された「*Pharmacokinetics*」、M Gibaldi & D Perronを参照することもできる。

【0282】

内因性標的化合物の機能を評価するためのアッセイ

以下のアッセイ、その好適な変形および他の好適なアッセイを用いて、内因性標的化合物の活性を評価し、およびリガンドが、それが結合する内因性標的化合物の活性を実質的に阻害するかどうかを評価することができる。

【0283】

ABC-1機能を、培養細胞からのリポタンパク質を介する脂質流出を測定することにより評価することができる(*J Clin Invest* 1999 Oct; 104(8):R25-31)。FGF1-シュードモナス外毒素キメラ機能を、細胞毒性アッセイを用いて*in vitro*でアッセイすることができる(*Proc Natl Acad Sci USA* 1989 Jun; 86(11):4215-4219)。インヒピンA活性を、マウスFriend赤白血病(MEL)細胞およびヒトK-562細胞に対するその分化誘導活性(*Proc Natl Acad Sci USA* 1988 Apr; 85(8):2434-2438)；または下垂体卵胞刺激ホルモンの分泌の抑制(*Biol Reprod* 2000 Sep;63(3):865-871)を測定することにより、*in vitro*でアッセイすることができる。インヒピンC活性を、マウスFriend赤白血病(MEL)細胞およびヒトK-562細胞に対するその分化誘導活性(*Proc Natl Acad Sci USA* 1988 Apr; 85(8):2434-2438)；または下垂体卵胞刺激ホルモンの分泌の抑制(*Biol Reprod* 2000 Sep;63(3):865-871)を測定することにより、*in vitro*でアッセイすることができる。アデノシンデアミナーゼ活性を、プリン異化を測定することにより*in vitro*でアッセイすることができる(*Mol Cell Biol* 1995 Apr; 15(4):762-767)。アジポジン機能を、アジポジンにより刺激されたマウスメラノーマ細胞におけるcAMPの蓄積を測定することにより、*in vitro*でアッセイすることができる

10

20

30

40

50

(Hum Mol Genet 1995 Feb; 4(2):223-230)。

【 0 2 8 4 】

ASP機能を、マウスメラノーマ細胞における α -MSHにより刺激されたcAMPの蓄積の阻害を測定することにより、*in vitro*でアッセイすることができる(Hum Mol Genet 1995 Feb; 4(2):223-230)。ミエリンを、MAPキナーゼによるそのリン酸化(J Neurochem 1999 Sep; 73(3): 1090-1097)；またはニューロン間のシナプス信号に対するその作用(Eur Neurol. 1988; 28(2): 57-63)の測定により、*in vitro*でアッセイすることができる。ミエリン塩基性タンパク質を、MAPキナーゼによるそのリン酸化(J Neurochem 1999 Sep; 73(3): 1090-1097)；またはニューロン間のシナプス信号に対するその作用(Eur Neurol. 1988; 28(2): 57-63)の測定により、*in vitro*でアッセイすることができる。コラーゲン機能を、*in vitro*コラーゲンフィブリル安定性アッセイ(Cell Mol Life Sci 2000 May; 57(5): 859-863)；または*in vitro*細胞接着アッセイ(J Cell Biochem Oct. 1, 1997; 67(1): 75-83)を用いて測定することができる。グルコシダーゼを、発色人工基質p-ニトロフェニル α -D-グルコシドの加水分解によりアッセイすることができる。Bergmeyer, H. U. (編) Methods of Enzymatic Analysis, 第2版(英語版), 1, 459 (1974)。 β -ガラクトシダーゼを、発色人工基質p-ニトロフェニル α -D-グルコシドのp-ニトロフェノールおよびD-ガラクトースへの加水分解によりアッセイすることができる。Rietraら、(1975)「Fabryヘミ接合体の組織における残存 α -ガラクトシダーゼ活性の特性(Properties of the residual α -galactosidase activity in the tissues of a Fabry hemizygote)」Clin Chim Acta; 62(3): 401-13。 α -L-イデュロニダーゼを、基質4-メチルウンベリフェリル α -L-イデュロニドの加水分解を蛍光分析アッセイにおいて行うことによりアッセイすることができる(Hopwoodら、(1979), Clin Chim Acta.; 92: 257-65)；他のアッセイはThompson (1978)「 α -L-イデュロニダーゼのアッセイのための基質(Substrates for the assay of α -L-iduronidase)」、Clin Chim Acta; 89(3): 435-46に見出される。

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

アンギオポエチン1活性を、毛細管発芽アッセイを用いて*in vitro*でアッセイすることができる(Curr Biol Apr. 23, 1998; 8(9): 529-532)。アンギオポエチン2活性を、毛細管発芽アッセイを用いて*in vitro*でアッセイすることができる(Curr Biol Apr. 23, 1998; 8(9): 529-532)。アンギオスタチンを、内皮増殖アッセイにおいてアッセイすることができる(「ヒトアンギオスタチンのクリングルドメイン(Kringle domains of Human Angiostatin)」、Caoら、(1996) J. Biol. Chem. 271 29461-29467)。ADMP活性を、背側化因子ノギン、グースコイドまたはフォリスタチンを下方調節するその能力を測定することにより、*in vitro*でアッセイすることができる(Development 1995 Dec;121(12): 4293-4301)。TRAILを、アポトーシスアッセイ(TRAIL-R2: TRAILの新規アポトーシス媒介受容体、Walczakら、(1996) EMBOJ 16: 5386-5397)においてアッセイすることができる。アレステン機能を、内皮細胞増殖、移住、管形成、およびMatrigel新血管形成を阻害するその能力を測定することにより、*in vitro*でアッセイすることができる(Cancer Res May 1, 2000;60(9): 2520-6)。アリアルスルファターゼB活性を、N-アセチル-D-ガラクトサミンの硫酸塩の加水分解の*in vitro*での測定によりアッセイすることができる(J Biol Chem Feb. 25, 1990; 265(6): 3374-3381)。アスパラギナーゼ活性を、アスパラギナーゼ酵素アッセイを用いて*in vitro*でアッセイすることができる(Anal Biochem Apr. 10, 2000; 280(1): 42-45)。rBPI活性を、抗細菌アッセイを用いて*in vitro*でアッセイすることができる(J Biol Chem Nov. 5, 1987;262(31): 14891-14894)。

40

【 0 2 8 6 】

BDNFを、神経増殖およびシナプス活性アッセイにおいてアッセイすることができる(BDNFは海馬細胞培養物における神経増殖およびシナプス活性を増強する。Bartrupら、(1997) Neuroreport 1; 8(17): 3791-4 Daniels L B, Glew R H, Radin N S, Vunnam R R)。B-グルコセレブロシダーゼを、 β -グルコシダーゼの供給源として肝臓を用いるコンジュリトール- β -エポキシドを用いるGaucher's病に関する蛍光分析アッセイを用いてアッセイすることができる(Clin Chim Acta. Sep. 25, 1980; 106(2): 155-63; Johnson W G, Gal

50

A E, Miranda A F, Pentchev P G. 「成人のGaucher病の診断：皮膚線維芽細胞における、新規発色基質、2-ヘキサデカノイルアミノ-4-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドの使用(Diagnosis of adult Gaucher disease: use of a new chromogenic substrate, 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside, in cultured skin fibroblasts.)」、Clin Chim Acta. Mar. 14, 1980;102(1): 91-7)。BMP-2を、Wang, E. Aら、「組換えヒト骨形態形成タンパク質は骨形成を誘導する(Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation.)」、Proc. Nat. Acad. Sci. 87: 2220-2224, 1990により記載されたようにアッセイすることができる。BT-SD機能を、スーパーオキシドジスムターゼアッセイを用いることによりアッセイすることができる(Nucleic Acids Res Mar. 25, 1985; 13(6): 2017-34)。BRCA1活性を、p21 WAF1/CIP1の発現における変化を測定することによりアッセイすることができる(Oncogene Jun. 11, 1998;16(23): 3069-82)。BRCA2活性を、p21 WAF1/CIP1の発現における変化を測定することによりアッセイすることができる(Oncogene Jun. 11, 1998;16(23): 3069-82)。CGRPの血管拡張活性を、Pharmacol Res. 1999 Mar; 39(3): 217-20に記載の大動脈輪血管拡張アッセイを用いてアッセイすることができる；内皮細胞および骨芽細胞増殖活性をin vitroで測定することができる(Eur J Pharmacol. Dec. 15, 2000; 409(3): 273-8; Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1990 May; 87(9): 3299-303)。

10

【 0 2 8 7 】

カルレチクリン活性を、カルシウム画像化アッセイを用いてin vitroで測定することができる(Cell. Sep. 8, 1995; 82(5): 765-71)。CD4機能を、gp120結合(Viral Immunol 2000; 13(4): 547-554)；またはgp120結合後の単球応答トムサイトカインの変化(J Immunol Oct. 15, 1998; 161(8): 4309-4317)を測定することにより、in vitroでアッセイすることができる。CD40リガンドを、Hollenbaugh Dら、「TNF遺伝子ファミリーのメンバーであるヒトT細胞抗原gp39は、CD40受容体のリガンドである：B細胞共刺激活性を有する可溶性形態のgp39の発現(The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity.)」、EMBO J. 1992 Dec; 11(12): 4313-21により記載されたようにアッセイすることができる。ケモカイン結合タンパク質を、受容体結合アッセイを用いてアッセイすることができる(J Biol Chem May 9, 1997; 272(19): 12495-12504)。CNTFを、神経増殖および生存アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(EMBO J. Apr. 2, 2001; 20(7) 1692-1703)。コントロールロスタチン活性を、インテグリン3および5への結合、血小板凝集の阻害、ならびにフィブロネクチンおよびピトロネクチンへの癌細胞接着の阻害を測定することにより、in vitroで測定することができる(Arch Biochem Biophys Mar. 15, 2000;375(2): 278-288)。CRF結合タンパク質の活性を、CRF結合アッセイを用いて測定することができる(Peptides Jan. 22, 2001; 22(1): 47-56)。

20

30

【 0 2 8 8 】

CTLA4活性を、T細胞活性化アッセイを用いて測定することができる(J Immunol Mar. 1, 2001; 166(5): 3143-3150)。デコリン機能を、in vitroコラーゲンフィブリル安定性アッセイ(Cell Mol Life Sci 2000 May;57(5): 859-863)；またはin vitro細胞接着アッセイ(J Cell Biochem Oct. 1, 1997;67(1): 75-83)を用いて測定することができる。Del-1機能を、3インテグリン接着アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(Genes Dev Jan. 1, 1998; 12(1): 21-33)。デスモテプラーゼを、Wallen, P., 「プラスミノゲンの生化学(Biochemistry of plasminogen.)」、Kline D. L., Reddy, K.N. N., (編), 「繊維素溶解(Fibrinolysis.)」、Boca Raton, FL: CRC Press,1980: 1-25; Saksela, O., Rifkin, D. B., 「細胞に関連するプラスミノゲンの活性化：調節および生理学的機能(Cell-associated plasminogen activation: Regulation and physiological functions.)」、Annu Rev Cell Biol 1988; 4: 93-126; Womack C J, Ivey F M, Gardner A W, Macko R F, 「末梢動脈疾患を有する患者における急性運動に対する繊維素溶解応答(Fibrinolytic response to acute exercise in patients with peripheral arterial disease.

40

50

」、Med Sci Sports Exerc 2001 Feb; 33(2): 214-9により記載のようにアッセイすることができる。DNase活性を、J Biochem (Tokyo). 1982 Oct; 92(4): 1297-303に記載のDNA分解アッセイを用いて測定することができる。エクトアピラーゼ活性を、エクトアピラーゼアッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(J Biol Chem Sep. 18, 1998; 273(38): 24814-24821)。EGFを、細胞増殖アッセイを用いてアッセイすることができる(J Biol Chem Mar. 31, 1995; 270(13): 7495-500)。EMAP II活性を、毛細管発芽アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(Curr Biol Apr. 23, 1998; 8(9): 529-532)。FGF-1を、細胞増殖アッセイ: Cell, vol.50, no.5, pp.729-737 (Aug. 1987). Proc Natl Acad Sci U.S.A, vol.86, no.3, pp.802-806 (1989)を用いてアッセイすることができる。FGF-2を、NR6R-3T3細胞を用いる増殖アッセイを用いてアッセイすることができる(Rizzino 1988 Cancer Res. 48: 4266)。フィブロラーゼ活性を、繊維素溶解アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(Thromb Res May 15, 1994; 74(4): 355-367)。FLT3を、Flt-3により形質転換されたプロB細胞系を用いる増殖アッセイにおいてアッセイすることができる(Hannum 1994 Nature 368: 643)。

10

20

30

40

50

【0289】

フォリトロピン活性を、FSH受容体を発現する細胞におけるcAMP産生を測定することにより、in vitroでアッセイすることができる(J Reprod Immunol 2001 Jan; 49(1): 1-19)。GDNF活性を、GDNF処理に応答するRetチロシンリン酸化の増加を測定することにより、in vitroでアッセイすることができる(Mol Cell Biol Mar. 15, 1995; (3): 1613-1619)。ゲルソリン活性を、アクチンのタンパク質溶解を測定することにより、in vitroでアッセイすることができる(Nature 1987 Jan 22-28; 325(6102): 362-364)。GGF2活性を、ヒトラブドミオサルコーマ細胞におけるERBB受容体チロシンキナーゼの活性化を測定することによりin vitroで測定することができる(Int J Cancer Jul. 1, 2000;87(1): 29-36)。

【0290】

グルカゴンのグルコース生成活性は、高親和性グルカゴン受容体により媒介される。組換えグルカゴンの生物学的活性を、直接結合アッセイにより評価することができる(Science Mar. 12, 1993; 259(5101): 1614-6)。HBNF活性を、神経突起伸長アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(J Biol Chem Oct. 27, 1995; 270(43): 25992-25999)。hCG受容体結合および活性化を測定して、組換えhCGの生物学的活性を評価することができる(J Biol Chem Oct. 5, 1993; 268(28): 20851-4)。熱ショックタンパク質を、マウスにおける2つのUV誘導性癌腫モデルでのHSP-ペプチド複合体の投与によりアッセイすることができる(米国特許第5,837,251号)。インターロイキン1を、1)YT-NCIまたはC3H/HeJ細胞におけるIL-1受容体への結合(Carterら、Nature 344: 633-638, 1990); 2)内皮細胞-白血球接着の誘導(Carterら、Nature 344: 633-638, 1990); 3)A375-C6細胞上での増殖アッセイ(Murai Tら、J. Biol. Chem. 276: 6797-6806, 2001); D10S増殖: Orencole & Dinarello (1989) Cytokine 1, 14-20によりアッセイすることができる。IL-1raを、1)YT-NCIまたはC3H/HeJ細胞におけるIL-1受容体へのIL-1の結合に関する競合(Carterら、Nature 344: 633-638, 1990); 2)IL-1により誘導された内皮細胞-白血球接着の阻害(Carterら、Nature 344: 633-638, 1990); 3)IL-1の抗増殖作用に高度に敏感なヒトメラノーマ細胞系であるA375-C6細胞上での増殖アッセイ(Murai Tら、J. Biol. Chem. 276: 6797-6806, 2001)によりアッセイすることができる。IL-10を、1)NK細胞へのIL-10の結合(Carson WEら、Blood 85: 3577-3585, 1995); 2)マクロファージによるTNF- α 産生の阻害(Riley J Kら、J. Biol. Chem. 274: 16513-16521, 1999); 3)マクロファージ増殖の阻害(O'Farrell A-Mら、EMBO 17: 1006-1018, 1998); MC-9増殖: Thompson-Snipesら、(1991) J. Exp. Med. 173, 507-510によりアッセイすることができる。IL-11を、造血細胞増殖アッセイにおいてアッセイすることができる。「インターロイキン-11はin vitroでヒト巨核球産生を増強する(Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro.)」、Blood. Jan. 15, 1992; 79(2): 327-31。「液体懸濁培養物中のマウス造血前駆細胞の増殖に対する幹細胞因子およびインターロイキン6またはインターロイキン11の相乗作用(Synergistic effects of stem cell factor and interleukin 6 or interleukin 11 on the expansion

sion of murine hematopoietic progenitors in liquid suspension culture.)」、Stem Cells. 1995 Jul; 13(4): 404-13; B9-11 proliferation: Luら、(1994) J Immunol. Methods 173, 19. IL-12を、ナチュラルキラー(NK)細胞細胞毒性アッセイおよびインターフェロン (IFN-)放出アッセイにおいてアッセイすることができる。「生来の免疫におけるIL-12シグナリングの2型NOシンターゼに関する要件(Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity)」、Science 284: 951-955, 1999; 「KIT-225増殖(KIT-225 proliferation)」: Horiら、(1987), Blood 70, 1069-1078.

【0291】

IL18結合タンパク質活性を、初期Th1応答を阻害するその能力を測定することによりin vitroでアッセイすることができる(Immunity 1999 Jan; 10(1): 127-136)。IL2-ジフテリア毒素キメラ機能を、細胞毒性アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(Exp Hematol 2000 Dec; 28(12): 1390-1400)。IL-4を、正常なTリンパ球中での細胞毒性アッセイにおいてアッセイすることができる(PMID: 8144944); 「CD23発現のRAMOS増加(RAMOS Augmentation of CD23 expression)」: Siegel & Mostowski (1990) J Immunol Methods 132, 287-295。IL-4受容体活性を、TF-1細胞のIL-4依存的増殖を阻害する能力により測定することができる(Kitamura, Tら、1989, J. Cell. PPhysiol. 140:323)。IL-8を、IL8R担持細胞におけるカルシウム還流をモニターするアッセイにおいてアッセイすることができる(Holmesら、(1991) Science 253, 1278-80)。インターフェロン は、EMCウイルスに感染したHela細胞を用いる抗ウイルスアッセイにおける活性を測定することができる(Meager, A. 1987, 「リンホカインおよびインターフェロン(Lymphokines and Interferons)」, A Practical Approach, Clemens, MJら(編)、IRL Press, p. 129); ヒト結腸直腸癌細胞系COLO 205上でのMHCクラスII発現の調節を測定することができる(GibsonおよびKramer, 1989, J. Immunol. Methods, 125: 105-113)。

【0292】

インターフェロン 活性を、in vitro抗ウイルスアッセイを用いて測定することができる(J Med Microbiol 1998 Nov; 47(11): 1015-8)。IP-10活性を、ラット動脈平滑筋細胞走化性アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(J Biol Chem Sep. 27, 1996; 271(39): 24286-24293)。IL-3活性を、造血細胞分化アッセイを用いてin vitroで測定することができる(Science 1985; 228(4701): 810-815)。KGF-1活性を、上皮細胞増殖アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1989 Feb; 86(3): 802-806)。キストリン活性を、冠動脈血栓症のイヌモデルにおいて組換え組織型プラスミノゲン活性化因子(rt-PA)の投与に関連する血栓溶解、再開塞、および出血をアッセイすることにより、in vitroでアッセイすることができる(Circulation 1991 Mar; 83(3): 1038-1047)。Kunitzプロテアーゼ阻害剤1活性を、HGF活性化因子に対する阻害活性を測定することにより、in vitroでアッセイすることができる(J Biol Chem Mar. 7, 1997; 272(10): 6370-6376)。ラクトランスフェリン活性を、in vitroウイルス阻害アッセイ(J Med Microbiol 1998 Nov; 47(11): 1015-8)、および抗微生物アッセイ(J Clin Invest Sep. 1, 1998; 102(5): 874-80)を用いて測定することができる。レプチンを、ob/obマウスにおける食物摂取のin vivoでの調節、体重の減少、ならびにインスリンおよびグルコースレベルの低下、ラジオイムノアッセイ(RIA)ならびに細胞に基づくアッセイにおけるレプチン受容体の活性化によりアッセイすることができる(Protein Expr Purif 1998 Dec; 14(3): 335-42)。LIF活性を、造血細胞分化アッセイを用いてin vitroで測定することができる(Science 1985; 228(4701): 810-815)。LFA-3活性を、T細胞機能を阻害するその能力を測定することによりin vitroでアッセイすることができる(JExp Med Jul. 1, 1993; 178(1): 211-222)。Lysプラスミノゲン活性を、in vitro繊維素溶解アッセイを用いて測定することができる(J Biol Chem Dec. 25, 1992; 267(36): 26150-6)。

【0293】

マスピン活性を、in vitro血管新生アッセイを用いて測定することができる(Nat Med 2000 Feb; 6(2): 196-9)。メチオニナーゼ活性を、Itoら(J Biochem (Tokyo), 1975 Nov; 78(5): 1105-1107)により記載されたようにin vitroでアッセイすることができる。MTP活

性を、apoB含有リポタンパク質分泌アッセイを用いることにより *in vitro* でアッセイすることができる (J Biol Chem Sep. 2, 1994; 269(35): 21951-21954)。NGF活性を、培養中の交感神経ニューロンにおけるCREB転写因子活性化の測定によりアッセイすることができる (Science Dec. 17, 1999; 286(5448): 2358-2361)。中性エンドペプチダーゼ活性を、ボンベシン様ペプチドのタンパク質溶解を測定することにより *in vitro* でアッセイすることができる (Proc Natl Acad Sci U.S.A. Dec. 1, 1991; 88(23): 10662-10666)。NIF活性を、多形核球白血球接着アッセイを用いて *in vitro* でアッセイすることができる (Mol Pharm 1999 Nov; 56(5): 926-932)。ノギン活性を、HeLa細胞のTNF刺激に対するTNF受容体応答を測定することによりアッセイすることができる (J Biol Chem Feb. 28, 1997; 272(9): 5861-5870)。NT-3活性を、無血清規定培地中で増殖させた培養NC前駆細胞を増殖させるその能力を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Proc Natl Acad Sci U.S.A Mar. 1, 1992; 89(5): 1661-1665)。OP-1活性を、胎児ラット頭蓋冠細胞におけるVEGF発現を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Mol Cell Endocrinol Jul. 20, 1999; 153(1-2): 113-124)。オステオプロテゲリン活性を、破骨細胞形成に関する同時培養アッセイ、胎児長骨器官培養系を用いる骨再吸収アッセイ、象牙質再吸収アッセイ、または線維芽細胞増殖アッセイを用いて *in vitro* でアッセイすることができる (FASEB J. 1998; 12: 845-854)。血漿PAFアセチルヒドロラーゼ活性を、Stafforiniら (Stroke 1997 Dec; 28(12): 2417-20)の方法により決定することができる。

10

【0294】

パチエッド (patched) 機能を、そのリガンド、ソニックヘッジホッグの結合を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Nature Nov. 14, 1996; 384(6605): 129-134)。PDGF活性を、PDGF受容体上でチロシンリン酸化を誘導するその能力を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (J Biol Chem May 25, 1989; 264(15): 8905-8912)。PEDF機能を、神経突起伸長アッセイを用いて *in vitro* でアッセイすることができる (J Biol Chem Oct. 27, 1995; 270(43): 25992-25999)。プラスミノゲン活性化因子阻害剤を、Wallen, P., 「プラスミノゲンの生化学 (Biochemistry of plasminogen.)」、Kline D. L., Reddy, K. N. N., (編)、Fibrinolysis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980: 1-25; Saksela, O., Rifkin, D. B., 「細胞に関連するプラスミノゲン活性化: 調節および生理学的機能 (Cell-associated plasminogen activation: Regulation and physiological functions.)」、Annu Rev Cell Biol 1988; 4: 93-126; Womack C J, Ivey F M, Gardner A W, Macko R F, 「末梢動脈疾患を有する急性運動患者に対する繊維素溶解応答 (Fibrinolytic response to acute exercise in patients with peripheral arterial disease.)」、Med Sci Sports Exerc 2001 Feb; 33(2): 214-9により記載されたようにアッセイすることができる。PGP活性を、胎児肝臓チロシンキナーゼ-3および顆粒球コロニー刺激因子のアゴニズムを測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Exp Hematol 2001 Jan; 29(1): 41-50)。PMP活性を、骨髄、固定化された末梢血前駆細胞、または臍帯から精製されたCD43+細胞において巨核球産生を誘導する能力を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (J Hematother 1999 Apr; 8(2): 199-208)。プロサブチド効力を、糖尿病ラットを用いる複数回投与計画を介して測定することができる (Anesthesiology 2000 Nov; 93(5): 1271-8)。

20

30

40

【0295】

in vitro でのランピルナーゼ活性を、リボヌクレアーゼおよび細胞毒性活性アッセイを用いることによりアッセイすることができる (J Mol Biol Apr. 19, 1996; 257(5): 992-1007)。リラクシン活性を、*in vitro* アッセイにおけるKCl誘導ラット子宮収縮の阻害を用いて *in vitro* でアッセイすることができる (Can J Physiol Pharmacol 1981 May; 59(5): 507-12)。レチナルS-抗原活性を、ロッド光受容体細胞中でサイクリックGMPにより開かれるチャンネルの活性を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (J Biol Chem Nov. 25, 1994; 269(47): 29765-29770)。RhLH活性を、RhLH刺激に应答する単離されたブタ莖膜細胞におけるFura-2蛍光を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Endocrinology 2000 Jun; 141(6): 2220-2228)。サルプラーゼ活性を、

50

プラスミノゲン切断アッセイを用いて *in vitro* で測定することができる (J Biol Chem J an. 18, 2001; 電子刊行物は印刷前)。1型補体受容体を、C3bおよびC4b結合を測定することにより *in vitro* でアッセイすることができる (J Exp Med Nov. 1, 1988; 168(5): 1699-1717)。

【0296】

ソニックヘッジホッグ機能を、パチエッドへのその結合を測定することにより *in vitro* でアッセイすることができる (Nature 1996 Nov. 14; 384(6605): 129-134)。スタフィロキナーゼ活性を、プラスミノゲン切断アッセイを用いて *in vitro* で測定することができる (J Biol Chem Jan. 18, 2001; 電子刊行物は印刷前)。SCF活性を、肥満細胞生存、増殖、または前炎症サイトカインの産生を測定することによりアッセイすることができる (Imm unol Rev 2001 Feb; 179: 57-60)。ストレプトキナーゼ活性を、プラスミノゲン活性化アッセイを用いて *in vitro* で測定することができる (J Biol Chem Jan. 18, 2001; 電子刊行物は印刷前)。スーパーオキシドジスムターゼ活性を、スーパーオキシドジスムターゼを用いて *in vitro* でアッセイすることができる (Nucleic Acids Res Mar. 25, 1985; 13(6): 2017-34)。T1/ST2機能を、Th2細胞活性化アッセイを用いて *in vitro* でアッセイすることができる (J Immunol Mar. 1, 2001; 166(5): 3143-3150)。TGF-1活性を、FGF-2の誘導を介する腎臓線維芽細胞増殖の誘導を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Kidney Int 2001 Feb; 59(2): 579-592)。TGF-2機能を、iNOS転写の阻害を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Inflamm Res 1997 Sep; 46(9): 327-331)。TGF-3を、プロスタグランジンE2(PGE2)の産生の刺激および器官培養物中の新生児マウス頭蓋冠における骨再吸収(PNAS USA 1985 Jul; 82(13): 4535-4538)、またはコラーゲン、オステオポンチン、オステオネクチン、およびアルカリホスファターゼの合成の刺激、ならびに骨芽細胞様細胞における複製を刺激する能力 (J Biol Chem 1987; 262: 2869, J Biol Chem 1988; 263: 13916, J Cell Biol 1988; 106: 915, J Cell Physiol 1987; 133: 426, Endocrinology 1987; 121: 212, Endocrinology 1986; 19: 2306, および J Cell Biol 1987; 105: 457) についてアッセイすることができる。

【0297】

トロンボポエチン(TPO)をアッセイして、巨核球の増殖および分化の調節を決定することができる (Mol Cell Biol 2001 Apr; 21(8): 2659-2670; Exp Hematol 2001 Jan; 29(1): 51-58; Leukemia 2000 Oct; 14(10): 1751-1756)。Tie-2/Tek機能を、アンジオポエチンによる刺激に応答するそのリン酸化を測定することによりアッセイすることができる (Int Immunol 1998 Aug; 10(8): 1217-1227)。組織因子経路阻害剤を、第Xa因子の不活性化および外来性凝集経路のVIIa-組織因子複合体の阻害についてアッセイすることができる (J Biol Chem May 5, 1998; 263(13): 6001-6004; Thromb Haemost 1998; 79(2): 306-309)。TNF結合タンパク質活性を、HeLa細胞のTNF刺激に応答するPIP5K活性化の阻害を測定することによりアッセイすることができる (J Biol Chem Feb. 28, 1997; 272(9): 5861-5870)。TNF受容体活性を、HeLa細胞のTNF刺激に応答するPIP5K活性化の増加を測定することによりアッセイすることができる (J Biol Chem Feb. 28, 1997; 272(9): 5861-5870)。t-PAを、Wallen, P., 「プラスミノゲンの生化学(Biochemistry of plasminogen.)」、Kline D. L., Reddy, K. N. N., (編)、Fibrinolysis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980: 1-25; Saksela, O., Rifkin, D. B., 「細胞に関連するプラスミノゲン活性化: 調節および生理学的機能(Cell-associated plasminogen activation: Regulation and physiological functions.)」、Annu Rev Cell Biol 1988; 4: 93-126; Womack C J, Ivey F M, Gardner A W, Macko R F, 「末梢動脈疾患を有する急性運動患者に対する繊維素溶解応答(Fibrinolytic response to acute exercise in patients with peripheral arterial disease.)」、Med Sci Sports Exerc 2001 Feb; 33(2): 214-9に記載のようにアッセイすることができる。IFN- γ 活性を、発情周期の13日目に雌羊から調製された子宮内膜の培養外植片における酸性70 kDタンパク質のIFN- γ により誘導される産生を測定することにより、*in vitro* でアッセイすることができる (Mol Endocrinol 1990 Oct; 4(10): 1506-1514)。

【0298】

トロポニンI活性を、ミオフィブリル結合アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(J Muscle Res Cell Motil 1999 Nov; 20(8): 755-760)。尿酸酸化酵素活性を、尿酸のウリカーゼ触媒性酸化に関するアッセイを用いて(Anal Chem May 15, 1999; 71(10): 1928-1934); または組換え尿酸酸化酵素の免疫アッセイにより(J Pharm Sci 1996 Sep; 85(9): 955-959)、in vitroでアッセイすることができる。ウロキナーゼ活性を、プラスミノゲン切断アッセイを用いてin vitroで測定することができる(Sazonovaら、J Biol Chem Jan. 18, 2001, 電子刊行物は印刷前)。VEGF-1活性を、内皮細胞増殖アッセイを用いてin vitroでアッセイすることができる(Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1989 Feb; 86(3): 802-806)。ビスクミンの活性を、顆粒球および好中球活性化アッセイを用いてアッセイすることができる(Anticancer Res 1999 Jul-Aug; 19(4B): 2925-2928; およびJ Leukoc Biol 2000 Dec; 68(6): 845-853)。

【0299】

免疫グロブリンに基づくリガンドの調製

本発明に従う本明細書に記載の結合リガンド(例えば、dAb)を、scFv、「ファージ」抗体および他の操作された抗体分子の調製について、抗体操作の分野で用いられる、以前に確立された技術に従って調製することができる。抗体の調製のための技術は、例えば、以下の総論およびそこに引用される参考文献に記載されている: Winter & Milstein, (1991) Nature 349:293-299; Pluckthun (1992) Immunological Reviews 130:151-188; Wrightら、(1992) Crit. Rev. Immunol. 12:125-168; Holliger, P. & Winter, G. (1993) Curr. Opin. Biotechnol. 4, 446-449; Carterら、(1995) J. Hematother. 4, 463-470; Chester, K.A. & Hawkins, R.E. (1995) Trends Biotechnol. 13, 294-300; Hoogenboom, H.R. (1997) Nature Biotechnol. 15, 125-126; Fearon, D. (1997) Nature Biotechnol. 15, 618-619; Pluckthun, A. & Pack, P. (1997) Immunotechnology 3, 83-105; Carter, P. & Merchant, A.M. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 449-454; Holliger, P. & Winter, G. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45, 128-130。

【0300】

所望の特異性を有する抗体可変ドメインの選択に用いられる好適な技術は、当業界で公知のライブラリーおよび選択手順を用いる。ヒトB細胞から収穫した再整列されたV遺伝子を用いる天然ライブラリー(Marksら、(1991) J. Mol. Biol., 222: 581; Vaughanら、(1996) Nature Biotech., 14: 309)は当業者にはよく知られている。合成ライブラリー(Hoogenboom & Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381; Barbasら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissimら、(1994) EMBO J., 13: 692; Griffithsら、(1994) EMBO J., 13: 3245; De Kruifら、(1995) J. Mol. Biol., 248: 97)を、通常はPCRを用いて、免疫グロブリンV遺伝子をクローニングすることにより調製する。PCRプロセスにおける誤差は、高程度の無作為化を誘導し得る。V_Hおよび/またはV_Lライブラリーを、標的抗原またはエピトープに対して個別に選択することができ、その場合、単一ドメイン結合を直接選択するか、または一緒に選択する。

【0301】

ライブラリーベクター系

本発明における使用にとって好適である様々な選択系が、当業界で公知である。そのような系の例を以下に記載する。

【0302】

バクテリオファージ 発現系を、バクテリオファージブランクとして、または溶原菌のコロニーとして、両方とも以前に記載されたように(Huseら(1989) Science, 246: 1275; CatonおよびKoprowski (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87; Mullinaxら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8095; Perssonら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 2432)、直接スクリーニングすることができ、本発明において有用である。そのような発現系を用いて、最大10⁶個の異なるメンバーのライブラリーをスクリーニングすることができるが、これらは実はより多い数(10⁶個を超えるメンバー)のスクリーニングには適していない。ライブラリーの構築において特に有用なものは、核酸を、それが

発現するポリペプチドに連結することができる選択ディスプレイ系である。本明細書で用いる場合、選択ディスプレイ系は、好適なディスプレイ手段により、一般のおよび/または標的リガンドの結合により、ライブラリーの個々のメンバーの選択を可能にする系である。

【0303】

大ライブラリーの所望のメンバーを単離するための選択プロトコルは、ファージディスプレイ技術により典型化されるように、当業界で公知である。多様なペプチド配列を繊維性バクテリオファージの表面上にディスプレイするそのような系(ScottおよびSmith (1990) Science, 249: 386)は、標的抗原に結合する特異的抗体フラグメントの*in vitro*での選択および増幅のための抗体フラグメント(およびそれらをコードするヌクレオチド配列)のライブラリーを作製するのに有用であることが示された(McCaffertyら、WO 92/01047)。可変領域をコードするヌクレオチド配列を、大腸菌のペリプラズム空間にそれらを指向させるリーダーシグナルをコードする遺伝子断片に連結し、結果として、得られた抗体フラグメントを、典型的にはバクテリオファージ外被タンパク質(例えば、pIIIまたはpVIII)への融合物としてバクテリオファージの表面上にディスプレイさせる。あるいは、抗体フラグメントを、ファージキャプシド(ファージ体)上に外部的にディスプレイさせる。ファージに基づくディスプレイ系の利点は、それらが生物系であるため、選択されたライブラリーメンバーを、細菌細胞中で選択されたライブラリーメンバーを含むファージを増殖させることにより簡単に増幅させることができることである。さらに、ポリペプチドライブラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列はファージまたはファージミドベクター上に含まれるため、配列決定、発現およびその後の遺伝子操作は比較的容易である。

10

20

【0304】

バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーおよびファージ発現ライブラリーの構築のための方法は、当業界でよく知られている(McCaffertyら(1990) Nature, 348: 552; Kangら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 4363; Clacksonら、(1991) Nature, 352: 624; Lowmanら、(1991) Biochemistry, 30: 10832; Burtonら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 10134; Hoogenboomら、(1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133; Changら、(1991) J. Immunol., 147: 3610; Breitlingら、(1991) Gene, 104: 147; Marksら、(1991) 上掲; Barbasら、(1992) 上掲; HawkinsおよびWinter (1992) J. Immunol., 22: 867; Marksら、1992, J. Biol. Chem., 267: 16007; Lernerら、(1992) Science, 258: 1313, 参照により本明細書に組み入れられるものとする)。

30

【0305】

1つの特に有利な手法はscFvファージライブラリーの使用であった(Hustonら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883; Chaudharyら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070; McCaffertyら(1990) 上掲; Clacksonら(1991) Nature, 352: 624; Marksら(1991) J. Mol. Biol., 222: 581; Chiswellら(1992) Trends Biotech., 10: 80; Marksら(1992) J. Biol. Chem., 267)。バクテリオファージ外被タンパク質上にディスプレイされたscFvライブラリーの様々な実施形態が記載されてきた。例えば、WO96/06213およびWO92/01047 (Medical Research Councilら)ならびにWO97/08320 (Morphosys)に記載のような、ファージディスプレイ手法の改良版も公知である。

40

【0306】

ポリペプチドのライブラリーを作製するための他の系は、ライブラリーメンバーの*in vitro*での合成のための無細胞酵素機構の使用を含む。1つの方法においては、標的リガンドおよびPCR増幅に対する選択のラウンドを変化させることにより、RNA分子を選択する(TuerkおよびGold (1990) Science, 249: 505; EllingtonおよびSzostak (1990) Nature, 346: 818)。同様の技術を用いて、所定のヒト転写因子に結合するDNA配列を同定することができる(ThiesenおよびBach (1990) Nucleic Acids Res., 18: 3203; BeaudryおよびJoyce (1992) Science, 257: 635; WO92/05258ならびにWO92/14843)。同様の方法で、*in vitro*での翻訳を用いて、大ライブラリーを作製するための方法としてポリペプチドを合成することができる。一般的には、安定化されたポリソーム複合体を含むこれらの方法は、WO

50

88/08453、WO90/05785、WO90/07003、WO91/02076、WO91/05058、およびWO92/02536にさらに記載されている。WO95/22625およびWO95/11922 (Affymax)に開示されたものなどの、ファージに基づくものではない代替的なディスプレイ系は、ポリソームを用いて選択のためのポリペプチドをディスプレイするものである。

【0307】

さらなるカテゴリーの技術は、遺伝子とその遺伝子産物との連結を可能にする人工区画中のレポトリの選択を含む。例えば、所望の遺伝子産物をコードする核酸を、油中水乳濁液により形成されたマイクロカプセル中で選択することができる選択系が、WO 99/02 671、WO 00/40712およびTawfik & Griffiths (1998) Nature Biotechnol 16(7), 652-6に記載されている。所望の活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝子エレメントをマイクロカプセル中に区画化した後、転写および/または翻訳させて、該マイクロカプセル内でその対応する遺伝子産物(RNAもしくはタンパク質)を産生させる。続いて、所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝子エレメントを分類する。この手法は、様々な手段により所望の活性を検出することにより、目的の遺伝子産物を選択する。

【0308】

ライブラリーの構築

選択を意図されたライブラリーを、例えば、上記のような当業界で公知の技術を用いて構築するか、または商業的な供給源から購入することができる。本発明において有用であるライブラリーは、例えば、WO99/20749に記載されている。一度、ベクター系を選択し、目的のポリペプチドをコードする1個以上の核酸配列を該ライブラリーベクター中にクローニングすれば、当業者であれば発現の前に突然変異誘発を行うことにより、クローン化された分子内で多様性を作製することができる；あるいは、コードされたタンパク質を上記のように発現させ、選択した後、突然変異誘発およびさらなる選択ラウンドを行ってもよい。構造的に最適化されたポリペプチドをコードする核酸配列の突然変異誘発を、標準的な分子的方法により実行する。特に有用なものは、ポリメラーゼ連鎖反応、またはPCRである(MullisおよびFaloona (1987) Methods Enzymol., 155: 335、参照により本明細書に組み入れられるものとする)。目的の標的配列を増幅するための熱安定性のDNA依存性DNAポリメラーゼにより触媒されるDNA複製の複数のサイクルを用いるPCRは、当業界でよく知られている。種々の抗体ライブラリーの構築は、Winterら(1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55、およびそこに引用された参考文献で考察されている。

【0309】

PCRを、鋳型DNA(少なくとも1 fg；より有用には、1~1000 ng)および少なくとも25 pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて実施する；プライマープールが重度に異種性である場合、より大量のプライマーを用いるのが有利であり、各配列は該プールの小画分の分子のみにより表され、量は後の増幅サイクル中で制限されるようになる。典型的な反応混合物は、2 μ lのDNA、25 pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5 μ lの10X PCRバッファ-1(Perkin-Elmer, Foster City, CA)、0.4 μ lの1.25 μ M dNTP、0.15 μ l(または2.5ユニット)のTaq DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer, Foster City, CA)および脱イオン水を含み、総量25 μ lにする。ミネラルオイルを上に乗せ、PCRを、プログラム可能なサーマルサイクラーを用いて実施する。PCRサイクルの各工程の長さおよび温度、ならびにサイクル数を、効果的なストリンジェンシー要件に従って調整する。アニーリングの温度およびタイミングを、プライマーが鋳型にアニーリングすると予想される効率および寛容される不一致の程度の両方により決定する；明らかに、核酸分子を同時に増幅および突然変異誘発する場合、少なくとも合成の最初のラウンドで不一致が必要である。プライマーアニーリング条件のストリンジェンシーを最適化する能力は当業界で中程度の技術を有する者の知識の範囲内にある。約30~72 のアニーリング温度を用いる。鋳型分子の最初の変性は通常、92~99 で4分間行い、次いで変性(94~99 で15秒~1分間)、アニーリング(上記で考察されたように決定された温度；1~2分間)、および伸長(増幅産物の長さに応じて、72 で1~5分間)からなる20~40サイクルを行う。最後の伸長は一般的には72 で4分間であり、次いで4 で不定(0~24時間)工程を行う。

10

20

30

40

50

【0310】

単一可変ドメインの結合

一度選択すれば、本発明において有用なドメインを、共有および非共有方法などの、当業界で公知の様々な方法により結合することができる。好ましい方法としては、例えば、scFv分子との結合などの、記載のようなポリペプチドリンカーの使用が挙げられる(Birdら(1988) Science 242:423-426)。好適なリンカーの考察はBirdら、Science 242, 423-426; Hudsonら、Journal Immunol Methods 231 (1999) 177-189; Hudsonら、Proc Natl Acad Sci USA 85, 5879-5883に提供されている。リンカーは、2つの単一ドメインを相互作用させる可撓性のものであるのが好ましい。1つのリンカーの例は、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ リンカー(式中、 $n=1\sim 8$ 、例えば、2、3、4、5または7)である。可撓性の低い、ダイアボディ中で用いられるリンカーを用いることもできる(Holligerら、(1993) PNAS (USA) 90:6444-6448)。一実施形態においては、用いられるリンカーは免疫グロブリンヒンジ領域ではない。

10

【0311】

可変ドメインを、リンカー以外の方法を用いて結合させることができる。例えば、天然もしくは操作されたシステイン残基を介して提供されたジスルフィド架橋の使用を利用して、 V_H-V_H 、 V_L-V_L または V_H-V_L ダイマーを安定化する(Reiterら、(1994) Protein Eng. 7:697-704)か、または可変ドメイン間の接点を再モデリングすることにより、「フィット」およびかくして、相互作用の安定性を改良することができる(Ridgewayら(1996) Protein Eng. 7:617-621; Zhuら(1997) Protein Science 6:781-788)。免疫グロブリンの可変ドメイン、および特に、抗体 V_H ドメインを連結または安定化するための他の技術を好適に用いることができる。

20

【0312】

リガンドの特性評価

リガンド(例えば、dAbモノマー、二重特異的リガンド)のその特異的抗原もしくはエピトープへの結合を、当業者であれば精通しているであろう方法により試験することができる。例えば、ELISAが挙げられる。本発明の好ましい実施形態においては、結合を、モノクローナルファージELISAを用いて試験する。ファージELISAを、任意の好適な手順に従って実施することができる：例示的なプロトコルを以下で説明する。

【0313】

選択の各ラウンドで産生されたファージの集団を、選択された抗原またはエピトープへの結合をELISAによりスクリーニングして、「ポリクローナル」ファージ抗体を同定することができる。次いで、これらの集団からの1個の感染細菌コロニーに由来するファージをELISAによりスクリーニングして、「モノクローナル」ファージ抗体を同定することができる。また、抗原またはエピトープへの結合について可溶性抗体フラグメントをスクリーニングするのが望ましいが、これを、例えば、CまたはN末端タグに対する試薬を用いるELISAにより行うこともできる(例えば、Winterら(1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55およびそこに引用された参考文献を参照)。

30

【0314】

選択されたファージモノクローナル抗体の多様性を、PCR産物のゲル電気泳動(Marksら、1991, 上掲; Nissimら、1994, 上掲)、プロービング(Tomlinsonら、1992, J. Mol. Biol. 227,776)またはベクターDNAの配列決定により評価することもできる。

40

【0315】

リガンドの構造

可変ドメインを、例えば、本明細書に記載のファージディスプレイ技術を用いて選択されたV遺伝子レパトリーから選択する場合、これらの可変ドメインは、それらが本明細書に定義される特異的一般リガンドにより認識されるような普遍的フレームワーク領域を含む。普遍的フレームワーク、一般リガンドなどの使用はWO99/20749に記載されている。

【0316】

V遺伝子レパトリーを用いる場合、ポリペプチド配列中の変異は可変ドメインの構造ループ内に位置するのが好ましい。いずれかの可変ドメインのポリペプチド配列を、DNA

50

シャッフリングまたは突然変異により変化させて、それぞれの可変ドメインと、その相補対との相互作用を増強することができる。DNAシャッフリングは当業界で公知であり、例えば、Stemmer, 1994, Nature 370: 389-391および米国特許第6,297,053号(両方とも参照により本明細書に組み入れられるものとする)により教示されている。突然変異誘発の他の方法は当業者にはよく知られている。

【0317】

一般的には、核酸分子および選択に必要なベクター構築物、リガンドの調製および形式化を、Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USAなどの標準的な実験室マニュアルに説明されたように構築および操作することができる。

10

【0318】

典型的には、本発明において有用な核酸の操作を組換えベクター中で行う。

【0319】

本明細書で用いられるベクターとは、異種DNAを、その発現および/または複製のために細胞中に導入するのに用いられる別のエレメントを指す。そのようなベクターを選択または構築し、続いて、使用方法は、当業者にはよく知られている。細菌プラスミド、バクテリオファージ、人工染色体およびエピソームベクターなどのいくつかのベクターが公共的に利用可能である。そのようなベクターを、単純なクローニングおよび突然変異誘発のために用いることができる;あるいは、遺伝子発現ベクターを用いる。本発明による使用のためのベクターを選択して、所望の大きさ、典型的には、長さ0.25キロベース(kb)~40 kb以上のポリペプチドコード配列を提供することができる。好適な宿主細胞を、*in vitro*でのクローニング操作後にベクターを用いて形質転換する。各ベクターは、一般的にはクローニング(または「ポリリンカー」)部位を含む様々な機能的成分、複製起点および少なくとも1個の選択マーカー遺伝子を含む。所与のベクターが発現ベクターである場合、それはさらに、それらが本発明によるリガンドをコードする遺伝子に機能し得る形で連結されるような、1種以上の以下のもの:それぞれクローニング部位の近くに位置するエンハンサーエレメント、プロモーター、転写終結配列およびシグナル配列を有する。

20

【0320】

一般的には、クローニングおよび発現ベクターは両方とも、1種以上の選択された宿主細胞中でベクターを複製させることができる核酸配列を含む。典型的には、クローニングベクター中で、この配列は該ベクターを宿主の染色体DNAとは独立に複製させることができるものであり、複製起点または自己複製する配列を含む。そのような配列は、様々な細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製起点は多くのグラム陰性細菌にとって好適であり、2ミクロンのプラスミド起源は酵母にとって好適であり、様々なウイルス起源(例えば、SV40、アデノウイルス)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターにとって有用である。一般的には、複製起点は、これらをCOS細胞などの高レベルのDNAを複製することができる哺乳動物細胞中で用いない限り、哺乳動物発現ベクターにとって必要ではない。

30

【0321】

有利には、クローニングまたは発現ベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含んでもよい。この遺伝子は、選択培養培地中で増殖させた形質転換宿主細胞の生存または増殖にとって必要なタンパク質をコードする。従って、選択遺伝子を含むベクターで形質転換されなかった宿主細胞は、前記培養培地中で生存しない。典型的な選択遺伝子は、抗生物質および他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートもしくはテトラサイクリン、補体栄養要求欠損に対する耐性を付与するか、または増殖培地中で利用可能ではない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

40

【0322】

本発明によるリガンドをコードするベクターの複製は大腸菌において最も都合よく行われるので、大腸菌の選択マーカー、例えば、抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与する -ラクタマーゼ遺伝子が有用である。これらを、pBR322またはpUC18もしくはpUC19な

50

どのpUCプラスミドなどの大腸菌プラスミドから取得することができる。

【0323】

発現ベクターは通常、宿主生物により認識され、目的のコード配列に機能し得る形で連結されたプロモーターを含む。そのようなプロモーターは誘導的または構成的なものであってよい。用語「機能し得る形で連結された」とは、記載の成分が、その意図される様式で機能することを許容する関係にある並置を指す。コード配列に「機能し得る形で連結された」対照配列を、コード配列の発現が対照配列と適合可能な条件下で達成されるような方法で連結する。

【0324】

原核宿主と共に使用するのに好適なプロモーターとしては、例えば、 λ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが挙げられる。細菌系における使用のためのプロモーターはまた、一般的には、コード配列に機能し得る形で連結されたShine-Delgarno配列を含むであろう。

【0325】

好ましいベクターは、ポリペプチドライブラリーメンバーに対応するヌクレオチド配列の発現を可能にする発現ベクターである。かくして、第1および/または第2の抗原もしくはエピトープを用いる選択を、該ポリペプチドライブラリーメンバーを発現する1個のクローンの個別の増殖および発現によるか、または任意の選択ディスプレイ系の使用により実施することができる。上記のように、好ましい選択ディスプレイ系はバクテリオファージディスプレイである。かくして、ファージまたはファージミドベクター、例えば、pIT1またはpIT2を用いることができる。本発明において有用なリーダー配列としては、pelB、stII、ompA、phoA、blaおよびpelAが挙げられる。1つの例は、大腸菌の複製起点(二本鎖の複製のため)およびまた、ファージの複製起点(一本鎖DNAの産生のため)を有するファージミドベクターである。そのようなベクターの操作および発現は当業界でよく知られている(HoogenboomおよびWinter (1992)、上掲; Nissimら(1994)、上掲)。簡単に述べると、前記ベクターは、ファージミドに対して選択性を付与する λ -ラクタマーゼ遺伝子および(N~C末端の)pelBリーダー配列(発現されたポリペプチドをペリプラズム空間に指向させる)、複数のクローニング部位(ヌクレオチド版のライブラリーメンバーのクローニングのため)、必要に応じて、1個以上のペプチドタグ(検出のため)、必要に応じて、1個以上のTAG停止コドンおよびファージタンパク質pIIIを含む。かくして、様々な抑制株および非抑制株の大腸菌ならびにグルコース、イソ-プロピルチオ-D-ガラクトシド(IPTG)またはVCS M13などのヘルパーファージの添加を用いて、前記ベクターは発現しないプラスミドとして複製し、大量のポリペプチドライブラリーメンバーのみを産生するか、またはそのいくらかが表面上に少なくとも1コピーのポリペプチド-pIII融合物を含むファージを産生することができる。

【0326】

本発明によるリガンドをコードするベクターの構築は、従来 of 連結技術を用いる。単離されたベクターまたはDNA断片を切断し、仕立て、および必要なベクターを作製することが望まれる形態に再連結する。必要に応じて、正確な配列が構築されたベクター中に存在することを確認するための分析を、公知の様式で行うことができる。発現ベクターを構築し、in vitro転写物を調製し、宿主細胞中にDNAを導入し、ならびに発現および機能を評価するための分析を実施するための好適な方法は、当業界で公知である。サンプル中の遺伝子配列の存在を検出し、またはその増幅および/もしくは発現を、サザンもしくはノーザン分析、ウェスタンブロットティング、DNA、RNAもしくはタンパク質のドットブロットティング、in situハイブリダイゼーション、核酸もしくはタンパク質分子の免疫細胞化学分析もしくは配列分析などの従来 of 方法により定量する。当業者であれば、必要に応じて、どのようにこれらの方法を改変することができるかを容易に予想できるであろう。

【0327】

骨格

骨格は免疫グロブリン分子に基づくものであってよく、または上記のようにその起源が免疫グロブリンでなくてもよい。本明細書に定義される好ましい免疫グロブリン骨格は、以下のもの：少なくとも(i)抗体のCL(もしくはサブクラス)ドメイン；もしくは(ii)抗体重鎖のCH1ドメインを含む免疫グロブリン分子；抗体重鎖のCH1およびCH2ドメインを含む免疫グロブリン分子；抗体重鎖のCH1、CH2およびCH3ドメインを含む免疫グロブリン分子；または抗体のCL(もしくはサブクラス)と組合わせたサブセット(ii)のいずれかから選択されるもののうちの任意の1つ以上を含む。ヒンジ領域ドメインを含有させることもできる。そのようなドメインの組合せは、例えば、IgGもしくはIgMなどの模倣天然抗体、またはFv、scFv、FabもしくはF(ab')₂分子などのそのフラグメントであってよい。当業者であれば、この一覧が包括的なものであることを意図していないことに気づくであろう。

10

【0328】

タンパク質足場

各エピトープ結合ドメインは、タンパク質足場および該ドメインと1個以上のエピトープとの特異的相互作用に關与する1個以上のCDRを含む。有利には、本発明に従うエピトープ結合ドメインは、3個のCDRを含む。好適なタンパク質足場としては、以下のもの：免疫グロブリンドメインに基づくもの、フィブロネクチンに基づくもの、アフィボディンに基づくもの、CTLA4に基づくもの、GroELなどのシャペロンに基づくもの、リポカリンに基づくものならびに細菌Fc受容体SpAおよびSpDに基づくものからなる群より選択されるもののいずれかが挙げられる。当業者であれば、この一覧が包括的なものであることを意図していないことを理解できるであろう。

20

【0329】

リガンドの構築における使用のための足場

主鎖コンフォメーションの選択

免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは全て、そのポリペプチド鎖についての類似する折り畳みを共有する。例えば、抗体はその一次配列の点で高度に多様性であるが、配列の比較および結晶学的構造は、予想に反して、抗体の6個の抗原結合ループのうち5個(H1、H2、L1、L2、L3)が限定数の主鎖コンフォメーション、または標準的な構造を取ることを示していた(ChothiaおよびLesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothiaら (1989) *Nature*, 342: 877)。従って、ループ長および重要残基の分析により、ヒト抗体の大多数において認められるH1、H2、L1、L2およびL3の主鎖コンフォメーションの予測が可能になった(Chothiaら (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinsonら (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williamsら (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220)。H3領域は配列、長さおよび構造の点で多様性がより高い(Dセグメントの使用に起因する)が、それは特定の残基の長さおよび存在、またはループおよび抗体フレームワーク中での重要な位置での残基の型に依存する短いループ長に関する限定数の主鎖コンフォメーションも形成する(Martinら (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shiraiら (1996) *FEBS Letters*, 399: 1)。

30

【0330】

特定のループ長および重要残基を選択して、メンバーの主鎖コンフォメーションが既知であることを確保したりリガンドおよび/またはドメインのライブラリーを設計することができる。有利には、これらは、上記で考察されるように、天然に認められる免疫グロブリンスーパーファミリー分子が非機能的である機会を最小化するためのこれらの現実のコンフォメーションである。生殖腺V遺伝子セグメントは、抗体またはT細胞受容体ライブラリーを構築するための1つの好適な基本フレームワークとして役立つ；他の配列も有用である。少数の機能的メンバーが、その機能に影響しない、変化した主鎖コンフォメーションを有することができるような変異が低い頻度で発生してもよい。

40

【0331】

リガンドによりコードされた異なる主鎖コンフォメーションの数を評価し、リガンド配列に基づいて主鎖コンフォメーションを予測し、および標準的構造に影響しない多様化のための残基を選択するために、標準的構造理論も有用である。ヒトVドメインにおいて

50

は、L1ループは4つの標準構造のうちの1つを取ることができ、L2ループは単一の標準構造を有し、およびヒトV_Hドメインの90%はL3ループに関する4または5つの標準構造のうちの1つを取り(Tomlinsonら(1995)、上掲)；かくして、V_Hドメインのみにおいては、異なる標準構造が組み合わさって様々な異なる主鎖コンフォメーションを作ることができることが公知である。V_HドメインがL1、L2およびL3ループに関する様々な範囲の標準構造をコードし、V_HおよびV_LドメインがH1およびH2ループに関するいくつかの標準構造をコードすることができる任意のV_Hドメインと対を形成することができる場合、これらの5つのループについて観察される標準構造の組合せの数は非常に大きい。これは、主鎖コンフォメーションにおける多様性の生成が広範囲の結合特異性の産生にとって必須であり得ることを暗示している。しかしながら、単一の既知の主鎖コンフォメーションに基づいて抗体ライブラリーを構築することにより、予想に反して、主鎖コンフォメーション中の多様性は、実質的に全ての抗原を標的化するための十分な多様性を生成するのに必要ではないことが見出された。さらにより驚くべきことに、単一主鎖コンフォメーションはコンセンサス構造である必要はなく、単一の天然のコンフォメーションをライブラリー全体の基礎として用いることができる。かくして、好ましい態様においては、本発明の二重特異的リガンドは単一の公知の主鎖コンフォメーションを有する。

【0332】

選択される単一主鎖コンフォメーションは、目的の免疫グロブリンスーパーファミリー型の分子間で一般的であるのが好ましい。コンフォメーションは、有意な数の天然分子がそれを選ぶように観察される場合、一般的である。従って、本発明の好ましい態様においては、免疫グロブリンドメインの各結合ループに関する異なる主鎖コンフォメーションの自然発生率は別々であると考えられ、次いで、異なるループに関する所望の組合せの主鎖コンフォメーションを有する天然の可変ドメインを選択する。利用可能なものがない場合、最も近い等価物を選択してもよい。異なるループに関する所望の組合せの主鎖コンフォメーションを、所望の主鎖コンフォメーションをコードする生殖腺遺伝子セグメントを選択することにより作製することが好ましい。選択された生殖腺遺伝子セグメントは天然で頻繁に発現されるのがより好ましく、全ての天然の生殖腺遺伝子セグメントにおいて最も頻繁に発現されるのが最も好ましい。

【0333】

リガンド(例えば、dAb)またはそのライブラリーの設計においては、6つの抗原結合ループの各々に関する異なる主鎖コンフォメーションの発生率を個別に考えることができる。H1、H2、L1、L2およびL3については、天然分子の抗原結合ループの20%~100%により導入された所与のコンフォメーションを選択する。典型的には、その観察された発生率は35%以上(すなわち、35%~100%)および理想的には、50%以上またはさらに65%以上である。大多数のH3ループは標準構造を有さないため、標準構造を展示するこれらのループ間で一般的である主鎖コンフォメーションを選択するのが好ましい。従って、ループの各々について、天然のレパートリーにおいて最も頻繁に観察されるコンフォメーションを選択する。ヒト抗体においては、各ループに関する最も一般的な標準構造(CS)は以下の通りである：H1-CS1(発現されたレパートリーの79%)、H2-CS3(46%)、V_HのL1-CS2(39%)、L2-CS1(100%)、V_LのL3-CS(36%)(計算は70:30の比率を仮定する、Hoodら(1967) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48: 133)。標準構造を有するH3ループについては、残基94~残基101の塩架橋を有する7個の残基のCDR3長(Kabatら(1991)「免疫学的興味タンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest)」、U.S. Department of Health and Human Services)が最も一般的であるようである。このコンフォメーションを形成するのに必要なH3長および重要残基を有するEMBLデータライブラリー中に少なくとも16個のヒト抗体配列ならびに抗体モデリング(2cgrおよび1tet)の基礎として用いることができるタンパク質データバンク中に少なくとも2個の結晶学的構造が存在する。最も頻繁に発現される生殖腺遺伝子セグメントは、標準構造のこの組合せがV_Hセグメント3~23(DP-47)、J_HセグメントJH4b、V_LセグメントO2/O12(DPK9)およびJ_LセグメントJ_L1であるものである。V_HセグメントDP45およびDP38も好適である。従って、これらのセグメ

10

20

30

40

50

ントを、所望の単一主鎖コンフォメーションを有するライブラリーを構築するための基礎として組合わせて用いることができる。

【0334】

あるいは、単離物中の結合ループの各々に関する異なる主鎖コンフォメーションの天然の発生率に基づいて単一主鎖コンフォメーションを選択する代わりに、主鎖コンフォメーションの組合せの天然の発生率を、単一主鎖コンフォメーションを選択するための基礎として用いる。抗体の場合、例えば、任意の2、3、4、5または6つ全ての抗原結合ループに関する標準構造の組合せの天然の発生率を決定することができる。ここで、選択されたコンフォメーションは天然の抗体においては一般的であるのが好ましく、それが天然のレパートリーにおいて最も頻繁に観察されるのが最も好ましい。かくして、ヒト抗体においては、例えば、5つの抗原結合ループ、H1、H2、L1、L2およびL3の天然の組合せを考える場合、最も頻繁な標準構造の組合せを決定した後、単一主鎖コンフォメーションを選択するための基礎として、H3ループに関する最も一般的なコンフォメーションと組合わせる。

10

【0335】

標準配列の多様化

いくつかの公知の主鎖コンフォメーションを選択するか、または、本発明における使用のための単一の公知の主鎖コンフォメーション、リガンド(例えば、dAb)またはライブラリーを、分子の結合部位を変化させることにより構築して、構造的および/もしくは機能的多様性を有するレパートリーを作製することができるのが好ましい。これは、変異体が、様々な活性を提供できるように、その構造および/またはその機能における十分な多様性を有するように、これを作製することを意味する。

20

【0336】

典型的には、所望の多様性を、1個以上の位置で選択された分子を変化させることにより作製する。変化させる位置を、無作為に選ぶか、または好ましくは選択する。次いで、内在するアミノ酸を任意のアミノ酸または天然もしくは合成のその類似体により置換して、非常に大多数の変異体を作製する無作為化によるか、または内在するアミノ酸を、1つ以上の規定のサブセットのアミノ酸で置換し、より限定された数の変異体を作製することにより、変異を達成することができる。

【0337】

そのような多様性を導入するための様々な方法が報告されてきた。誤りがちな(error-prone)PCR(Hawkinsら(1992) J. Mol. Biol., 226: 889)、化学突然変異誘発(Dengら(1994) J. Biol. Chem., 269: 9533)または細菌突然変異誘発株(Lowら(1996) J. Mol. Biol., 260: 359)を用いて、前記分子をコードする遺伝子中に無作為突然変異を導入することができる。選択された位置を突然変異させる方法も当業界でよく知られており、PCRを用いるか、もしくは用いない、不一致のオリゴヌクレオチドまたは縮重オリゴヌクレオチドの使用を含む。例えば、いくつかの合成抗体ライブラリーが、抗原結合ループに突然変異を標的化することにより作製されてきた。ヒト破傷風トキソイド結合FabのH3領域を無作為化して、様々な新規結合特異性を作製した(Barbasら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457)。無作為または半無作為H3およびL3領域を、生殖腺V遺伝子セグメントに付加して、突然変異されていないフレームワーク領域を有する大きいライブラリーを作製した(Hoogenboom & Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381; Barbasら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissimら(1994) EMBO J., 13: 692; Griffithsら(1994) EMBO J., 13: 3245; De Kruijffら(1995) J. Mol. Biol., 248: 97)。そのような多様化を、他の抗原結合ループのいくつか、または全てを含むように伸長させた(Cramerら(1996) Nature Med., 2: 100; Riechmannら(1995) Bio/Technology, 13: 475; Morphosys, W097/08320, 上掲)。

30

40

【0338】

ループ無作為化はH3のみについてはほぼ 10^{15} 個を超える構造を、および他の5つのループについては同様に大きい数の変異体を作製する潜在能力を有するため、それは、現在の形質転換技術を用いても、または全ての可能な組合せを表すライブラリーを産生するため

50

の無細胞系を用いてさえ、実現可能ではない。例えば、現在まで構築された最も大きいライブラリーの1つにおいては、この設計のライブラリーに関する潜在的な多様性の画分のみである 6×10^{10} 個の異なる抗体が作製された(Griffithsら(1994)、上掲)。

【0339】

好ましくは、分子の所望の機能の作製または改変に直接関与する残基のみを多様化する。多くの分子については、その機能は標的に結合することであろうし、従って、該分子のパッキング全体にとって重要である残基の変化を回避するか、または選択された主鎖コンフォメーションを維持しながら、標的結合部位中で多様性を濃縮すべきである。

【0340】

抗体ドメインに適用する際の標準配列の多様化

抗体に基づくリガンド(例えば、dAb)の場合、標的への結合部位は抗原結合部位であるのが最も多い。かくして、抗原結合部位中のこれらの残基のみを変化させるのが好ましい。これらの残基はヒト抗体レパートリーにおいて極端に多様性であり、高分解能の抗体/抗原複合体中で接触することが知られている。例えば、L2においては、位置50および53は天然の抗体中で多様性であり、抗原と接触することが観察されることが知られている。対照的に、従来手法は、いくつかの7残基を、本発明による使用のためのライブラリー中で多様化した2つと比較した、Kabatら(1991、上掲)により定義された対応する相補性決定領域(CDR1)中の全ての残基を多様化させた。これは、様々な抗原結合特異性を作製するのに必要な機能的多様性の点で有意な改善を表す。

【0341】

天然においては、抗体の多様性は2つのプロセスの結果である：ナイーブな一次レパートリーを作製するための生殖腺V、DおよびJ遺伝子セグメント(いわゆる生殖腺および結合の多様性)の体細胞組換えならびに得られる再配列されたV遺伝子の体細胞的超変異。ヒト抗体配列の分析により、一次レパートリーにおける多様性は抗原結合部位の中心に集中するが、体細胞の超変異は一次レパートリー中で高度に保存されている抗原結合部位の周辺の領域に多様性を広げることが示された(Tomlinsonら(1996) J. Mol. Biol., 256: 813を参照)。この相補性はおそらく、配列スペースを検索するための効率的な戦略として進化してきたが、抗体にとってはどうやらユニークであるだろうが、それを他のポリペプチドレパートリーにも容易に適用することができる。変化する残基は、標的の結合部位を形成するもののサブセットである。標的結合部位中の残基の異なる(重複するものを含む)サブセットは、必要に応じて、選択中の異なる段階で多様化する。

【0342】

抗体レパートリーの場合、抗原結合部位中の全てではないが、いくつかの残基を多様化させた最初の「ナイーブな」レパートリーを作製することができる。この文脈で本明細書で用いられる用語「ナイーブな」とは、予め決められた標的を有さない抗体分子を指す。その免疫系が様々な抗原刺激によりまだチャレンジされていない胎児および新生児の個体にはよくあることだが、これらの分子は免疫多様化を受けなかった個体の免疫グロブリン遺伝子によりコードされるものと似ている。次いで、このレパートリーを様々な抗原またはエピトープに対して選択する。次いで、必要に応じて、さらなる多様性を、最初のレパートリー中で多様化した領域の外側に導入することができる。この成熟したレパートリーを、改変された機能、特異性または親和性について選択することができる。

【0343】

抗原結合部位中のいくつか、または全ての残基が変化したりリガンドの構築のための結合ドメインのナイーブなレパートリーは、当業界で公知である(WO 2004/058821、WO 2004/03019、およびWO 03/002609を参照)。「一次」ライブラリーは、生殖腺V遺伝子セグメントにおいて異なる(生殖腺多様性)か、または組換えプロセス中に多様化する(結合多様性)抗原結合部位の中心の残基に制限された多様性で、天然の一次レパートリーを模倣する。多様化したこれらの残基としては、限定されるものではないが、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94およびL96が挙げられる。「体細胞」ライブラリーにおいては、多様性は組換えプロセス中に多様化する(結

10

20

30

40

50

合多様性)か、または高度に体細胞突然変異した残基に限定される。多様化するこれらの残基としては、限定されるものではないが、H31、H33、H35、H95、H96、H97、H98、L30、L31、L32、L34およびL96が挙げられる。これらのライブラリーにおける多様化にとって好適なものとして上記した残基は全て、1個以上の抗体-抗原複合体中で接触することが知られている。両ライブラリーにおいて、抗原結合部位中の全ての残基が変化しているわけではないので、必要に応じて、残りの残基を変化させることにより、さらなる多様性が選択中に組込まれる。これらの残基(または抗原結合部位を含むさらなる残基)のいずれかの任意のサブセットを、抗原結合部位の最初の、および/またはその後の多様化に用いることができることが、当業者には明らかであろう。

【0344】

10

本発明における使用のためのライブラリーの構築においては、典型的には、選択した位置の多様化を、可能なアミノ酸の数(20個全てもしくはそのサブセット)をその位置に組込むことができるように、ポリペプチドの配列を特定するコード配列を変化させることにより、核酸レベルで達成する。IUPAC命名法を用いると、最も多用途のコドンはNNKであり、これは全てのアミノ酸ならびにTAG停止コドンをコードする。NNKコドンをを用いて、必要な多様性を導入するのが好ましい。NNNコドンを含む、同じ目的を達成する他のコドンも有用であり、それはさらなる停止コドンTGAおよびTAAの産生をもたらす。

【0345】

ヒト抗体の抗原結合部位中の側鎖多様性の特徴は、特定のアミノ酸残基を好む断言された偏りである。V_H、V およびV 領域の各々における10個の最も多様な位置のアミノ酸組成を合計する場合、側鎖多様性の76%以上はわずか7個の異なる残基に由来し、これらは、セリン(24%)、チロシン(14%)、アスパラギン(11%)、グリシン(9%)、アラニン(7%)、アスパラギン酸(6%)およびトレオニン(6%)である。主鎖可撓性を提供し得る親水性残基および小さい残基に対するこの偏りはおそらく、様々な抗原またはエピトープに結合する傾向がある表面の進化を反映し、一次レパートリー中の抗体の必要な乱雑さを説明するのに役立つ。

20

【0346】

アミノ酸のこの分布を模倣するのが好ましいので、変化させる位置でのアミノ酸の分布は、抗体の抗原結合部位中に認められるものを模倣するのが好ましい。様々な標的抗原に対する特定のポリペプチド(抗体ポリペプチドだけではない)の選択を許容するアミノ酸の置換におけるそのような偏りは、任意のポリペプチドレパートリーに容易に適用される。変化させる位置でのアミノ酸分布を偏らせるための様々な方法があり(トリヌクレオチド突然変異誘発の使用など、WO97/08320を参照)、特に好ましい方法は、合成の容易性のため、従来縮重コドンの使用である。縮重コドンの全ての組合せ(各位置で等しい比率の1、2、3および4重の縮重性)によりコードされるアミノ酸プロフィールと、天然のアミノ酸使用とを比較することにより、最も典型的なコドンを算出することができる。コドン(AGT)(AGC)T、(AGT)(AGC)Cおよび(AGT)(AGC)(CT)、すなわち、IUPAC命名法を用いてそれぞれDVT、DVCおよびDVYは、所望のアミノ酸プロフィールに最も近いものである：これらは22%のセリンならびに11%のチロシン、アスパラギン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、トレオニンおよびシステインをコードする。従って、多様化した位置の各々でDVT、DVCまたはDVYのいずれかを用いてライブラリーを構築するのが好ましい。

30

40

【0347】

L929細胞毒性アッセイ

TNFR1のアンタゴニスト(例えば、リガンド、dAbモノマー)を、マウスL929線維芽細胞中でTNFにより誘導される細胞毒性を阻害する能力により同定することができる(Evans, T. (2000) Molecular Biotechnology 15, 243-248)。簡単に述べると、マイクロタイタープレート中に塗布されたL929細胞を、TNFR1のアンタゴニスト、100 pg/mlのTNFおよび1 mg/mlのアクチノマイシンD(Sigma, Poole, UK)と共に一晩インキュベートする。次いで、細胞の生存能力を、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(Promega, Madison, USA)と共にインキュ

50

ベーションした後、490 nmで吸光度を読み取ることにより測定する。TNFR1のアンタゴニストは、細胞毒性を阻害し、従って、TNFのみの対照と比較して吸光度の増加を示さるう。

【0348】

HeLa IL-8アッセイ

TNFR1のアンタゴニスト(例えば、リガンド、dAbモノマー)を、ヒトHeLa細胞によるTNFにより誘導されたIL-8の分泌を阻害する能力により同定することができる(HUVEC中のIL-1によるIL-8の誘導を記載しているAkeson, L.ら(1996) Journal of Biological Chemistry 271, 30517-30523のものから適合させた方法;ここで本発明者らはヒトTNFによる誘導に注目し、HUVEC細胞系の代わりにHeLa細胞を使用する)。簡単に述べると、マイクロタイタープレート中に塗布したHeLa細胞を、TNFR1のアンタゴニストおよび300 pg/mlのTNFと共に一晩インキュベートした。インキュベーション後、上清を細胞から吸引除去し、IL-8濃度を、サンドイッチELISA(R&D Systems)、または他の好適な方法を用いて測定する。TNFR1のアンタゴニストはIL-8の分泌を阻害し、TNFのみの対照と比較して上清中で検出されるIL-8は少ない。

10

【実施例】

【0349】

実施例1. 腫瘍壊死因子(TNF)の血清半減期の延長

ヒトTNFに関するトランスジェニックマウス(Tg197)を10匹の動物群に分け、40k分枝状PEG(PEG TAR1-5-19と呼ぶ)を含むダイマーまたは抗血清アルブミンdAb(TAR1-5-19/MSAトリマーと呼ぶ)を含む融合物として再形式化された抗TNF dAbの腹腔内用量を毎週投与した。対照として塩水の投与を用いた。薬剤投与の7週間後、動物の血清を、抗TNFサンドイッチELISAキットを用いて循環TNFレベルについて分析した。塩水を投与した動物は25.6 pg/mlの循環TNFレベルを有していたが、TAR1-5-19/MSAトリマーを受ける動物は28.8 pg/mlに上昇したTNFレベルを有し、PEG TAR1-5-19を受ける動物は2315 pg/mlに上昇したレベルを有していた。これは、血清半減期が延長されたdAbは、サイトカインなどの短い血清半減期を有する分子の循環レベルを増加させ、従って、血清レベルを増加させることができることを明確に示している。

20

【0350】

実施例2. 可溶性腫瘍壊死因子受容体1(sTNFR1)の血清半減期の延長

40kの分枝状PEG(PEG抗TNFR1 dAbと呼ぶ)または抗血清アルブミンdAb(抗TNFR1/抗SAダイマーと呼ぶ)との融合物として再形式化された(半減期延長形式)抗マウスTNFR1 dAbの単回の静脈内1 mg/kg用量をCD1マウスに投与した。血清を様々な時点で、以下に詳細に説明する抗TNFR1サンドイッチELISAを用いて可溶性TNFR1のレベルについて試験した。

30

【0351】

TNFR1の測定

F96 Maxisorpの96ウェル平底イムノプレート(Nunc、カタログ番号439454)を、抗マウスsTNFR1/TNFRSF1A抗体(PBS中1 µg/mlでウェルあたり50 µl)で被覆した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを200 µlのPBSで3回洗浄した。非特異的結合を、室温で1時間、3% BSA/PBSを用いて遮断した。プレートを200 µlのPBS/0.05% Tween-20を用いて3回洗浄した。

40

【0352】

組換えマウスsTNFR1(R&D Systems、カタログ番号4254-R1)の希釈液を5000 ng/ml、500 ng/ml、50 ng/mlおよび5 ng/mlでPBS/1%BSA中で調製し、50 µlをウェルに添加した。あるいは、TAR2m-21-23/40K分枝状PEGで免疫したマウスからの血清を、PBS/1%BSA中の1/5、1/50、1/500および1/5000希釈液で調製し、50 µlをウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを200 µlのPBS/0.05% Tween-20で3回洗浄した。

【0353】

ビオチン化抗マウスsTNFR1抗体(R&D Systems、カタログ番号AHF01)を1 µg/mlで調製し、50 µlをウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを20

50

0 µl のPBS/0.05% Tween-20で3回洗浄した。

【0354】

ペルオキシダーゼコンジュゲートIgG画分モノクローナルマウス抗ビオチン(Stratech、カタログ番号200-032-096)を160 ng/mlで調製し、50 µlをウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを200 µlのPBS/0.05% Tween-20で3回、次いでPBSで3回洗浄した。

【0355】

SureBlue TMB 1-コンピテントマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(KPL、カタログ番号52-00-00)を全てのウェルに添加した。プレートを室温で15分間インキュベートし、1M HClで反応を停止させた。吸光度を450 nmで読み取った。

10

【0356】

全てのサンプルを2回アッセイした。サンプルを含まないウェルも含まれていた。

【0357】

PEG抗TNFR1 dAbを投与したマウスからの血清の1/5希釈液についてのODの結果を、時間に対してプロットした(図1)。その結果は、dAbの消失後に基底レベルに下がり戻る前に血清中のTNFR1のレベルが上昇することを明確に示している。

【0358】

実施例3. 受容体分子に結合するが、活性部位には結合しないdAb

この実施例は、所望の受容体分子に結合するが、該受容体の活性部位には結合しないdAbを同定するための方法を例示する。この手法を、腫瘍壊死因子1受容体(TNFR1)を用いて例示するが、一般的には、受容体分子に適用可能である。

20

【0359】

異なるマウスTNFR1ドメインおよびヒトTNFR1ドメインから作製されたキメラ受容体分子(Banner DWら、Cell, 73(3):431-45 (1993))を、該分子がTNFR1の4つの規定の細胞外ドメインを含むが、これらはマウスとヒトTNFR1タンパク質間で起源が変化するように作製した。作製されたキメラ受容体は、異なるドメインの役割および機能性に従って、ヒトTNFR1とマウスTNFR1の両方の特性を有していた。この分子は、dAb、抗体およびその抗原結合フラグメントならびにヒトまたはマウスTNFR1に結合する他の分子(例えば、アフィボディ、LDL受容体ドメイン、もしくはEGFドメインなどのタンパク質ドメイン)のドメイン特異性の評価のための手段を提供した。

30

【0360】

方法

ヒトおよびマウスTNFR1配列は、EcoRIおよびNotI制限エンドヌクレアーゼ部位を介してピキア発現ベクター-pPicZalpha(Invitrogen)中で以前にクローニングされた。鑄型マウスTNFR1 DNA(および従って、マウスドメイン4で終わるキメラ受容体構築物)は、3'の6xヒスチジンタグを含んでいた。ヒトTNFR1(および従って、ヒトドメイン4で終わるキメラ受容体構築物)は、3'末端の配列中にMycおよび6xヒスチジンタグの両方を含んでいた。

【0361】

最初のPCRを、RubyTaq DNAポリメラーゼ(USB Corporation, Cleveland, Ohio)、100 ngの鑄型DNA(完全長mTNFR1またはhTNFR1 DNAの関連するDNAミニプレップ鑄型を含む)を用いる標準的なPCR条件に従って行った。

40

【0362】

設定した典型的なPCR反応は以下の通りであった：ポリメラーゼを含む25 µlの10X RubyTaq PCRバッファー；2 µlの第1プライマー(10 µMストック由来)；2 µlの第2プライマー(10 µMストック由来)；1 µl(100 ng)の完全長TNFR1鑄型DNA；20 µlのdH₂O(50 µlの最終容量)。反応物を薄壁チューブ中に入れ、サーモサイ클ラー中に置き、以下のパラメーターに従って反応を行った。

【0363】

最初の変性	3分	94°C
変性	30秒	94°C
アニーリング (25 サイクル)	30秒	55°C
伸長	1分	72°C
最後の伸長	10分	72°C

10

【0364】

キメラ構築物の作製において用いた最初のPCR反応のまとめ

構築物*	PCR番号 - 用いたプライマー	鋳型
MHHH	PCR 1 - 1 および 12	マウス
	PCR 2 - 2 および 3	ヒト
HMHH	PCR 1 - 1 および 9	ヒト
	PCR 2 - 6 および 13	マウス
	PCR 3 - 2 および 4	ヒト
HHMH	PCR 1 - 1 および 10	ヒト
	PCR 2 - 7 および 14	マウス
	PCR 3 - 2 および 5	ヒト
HHHM	PCR 1 - 1 および 11	ヒト
	PCR 2 - 2 および 8	マウス
HMMM	PCR 1 - 1 および 9	ヒト
	PCR 2 - 2 および 6	マウス

20

30

*注釈：H=ヒトドメイン；M=マウスドメイン；例えば、MHHH=マウスドメイン 1、ヒトドメイン 2-4

【0365】

これらの最初のPCRで生成されたPCR産物を、1%アガロースゲルから切り出し、ゲル精製キット(Qiagen)を用いて精製した後、50 μ l のdH₂O中に溶出させた。

40

【0366】

キメラTNFR1構築物生成に用いたプライマー

プライマー番号	プライマー配列
プライマー1	GCCAGCATTGCTGCTAAAGAA (配列番号 5)
プライマー2	GGTCGACGGCGCTATTTCAG (配列番号 6)
プライマー3	CTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGC (配列番号 7)
プライマー4	GTGTGTGGCTGCAGGAAGAAC (配列番号 8)
プライマー5	CTGCCATGCAGGTTTCTTTC (配列番号 9)
プライマー6	CTGCAGGGAGTGTGAAAAGGG (配列番号 10)
プライマー7	GTGTGTGGCTGTAAGGAGAACC (配列番号 11)
プライマー8	CTGCCATGCAGGGTTCTTTC (配列番号 12)
プライマー9	TCACACTCCCTGCAGTCCG (配列番号 13)
プライマー10	CAGCCACACACGGTGTCCCGG (配列番号 14)
プライマー11	CCTGCATGGCAGGTGCACACGG (配列番号 15)
プライマー12	TCACACTCCCTGCAGACTG (配列番号 16)
プライマー13	CAGCCACACACCGTGTCCCTTG (配列番号 17)
プライマー14	CCTGCATGGCAGTTACACACGG (配列番号 18)

10

20

30

40

【0367】

SOE PCR

集合的PCR(「ブルスルー」または重複伸長によるスプライシング(SOE)としても知られる、Gene, 15:77(1):61-8(1989)を参照)により、消化も連結も用いずに一次PCR産物を一緒にし、一次PCR産物の相補的末端を使用することが可能になる。このプロセス中に、一次産物を一緒にし、変性させた後、その相補的末端を、Taq DNAポリメラーゼおよびdNTPの存在下で一緒にアニーリングさせることができる。再アニーリングおよび伸長のいくつかのサイクルは、相補鎖の充足および完全長鋳型の産生をもたらす。ここで完全長構築物カセットにフランキングするプライマーを添加し、従来のPCRを行って集合産物を増幅させた。SOE PCRを行って、一緒にアニーリングさせ、上記の最初のPCRから誘導された種々のTNFR1ドメインを増幅させた。集合的SOE PCRを以下のように設定した：MgCl₂を含む40 μlの10 x PCRバッファー；最初のPCR1の約2 μl(100 ng)の純粋な産物；最初のPCR2の約2 μl(100 ng)の純粋な産物；36 μlのdH₂O(80 μlの最終容量)。集合工程の後にSOEプライマーミックスを以下のように添加した：2 μlの5'フランキングプライマー(プライマー1)；2 μlの3'フランキングプライマー(プライマー2)；10 μlの10 x PCRバッファー；6 μlのdH₂O(最終容量20 μl)。

【0368】

PCR反応を、以下に記載のプログラムを用いて行った。最初の集合サイクルは約45分を必要とし、その後サーモサイクラーを94 に保持するように設定した。20 μlのプライマーミックスを各反応に添加し、混合した。

【0369】

集合条件

最初の変性	5分	94°C
変性	1分	94°C
アニーリング(15 サイクル)	1分	55°C
伸長	1分	72°C

【0370】

増幅条件(94 で保持、次いで、プライマーミックスを添加)

10

変性	1分	94°C
アニーリング (25 サイクル)	1分	55°C
伸長	1分	72°C

【0371】

PCR産物を、1%アガロースゲル上で3~5 μ lの各反応物を泳動することにより調べた。

【0372】

20

ピキア発現ベクター中での集合したTNFR1キメラのクローニング

pPicZalphaベクター(Invitrogen)をEcoRIおよびNotI酵素で連続的に消化した後、Chromaspin TE-1000ゲル濾過カラム(Clontech, Mountain View, CA)精製を行った。

【0373】

大腸菌中でのTNFR1キメラ構築物の形質転換

連結されたキメラ構築物を、HB2151エレクトロコンピテント大腸菌細胞中で形質転換し、低塩LB培地中で1時間回収した後、0.25 μ g/ml ZEOCIN、フレオマイシンD(Cayla, Toulouse, France)を含む抗生物質製剤を含む低塩LB寒天上に37 で24時間塗布した。次いで、個々のコロニーを配列検証して、発現ベクター内のキメラ構築物の正確な配列および各キメラ構築ベクターから作製された大規模Maxiprepプラスミド調製を確実にした。

30

【0374】

調製されたキメラ構築物のヌクレオチド配列を以下に提示する。キメラ構築物を、そのドメインの起源に従って命名した(左のドメイン1から右のドメイン4に向かって続く)。例えば、HMMMは、ヒトドメイン1およびマウสดメイン2~4を含む。マウสดメイン4を含むキメラタンパク質はHisタグのみを有し、膜貫通領域とドメイン4の間のスペーサー領域を欠く。

【0375】

HMMM

AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTTGCTGTACCAAGT
GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG
GGAGTGTGAAAAGGGCACCTTTACGGCTTCCAGAATTACCTCAGGCAGTGCCTCAGTTGC
AAGACATGTGCGAAAAGAAATGTCCCAGGTGGAGATCTCTCCTTGCCAAGCTGACAAGGACA
CGGTGTGTGGCTGTAAGGAGAACCAGTTCCAACGCTACCTGAGTGAGACACACTTCCAGTG
CGTGGACTGCAGCCCCTGCTTCAACGGCACCGTGACAATCCCCTGTAAGGAGACTCAGAAC
ACCGTGTGTAAGTCCATGCAGGGTTCTTTCTGAGAGAAAGTGAGTGCCTCCCTTGCAGCC
ACTGCAAGAAAAATGAGGAGTGTATGAAGTTGTGCCTAAGCGCTCATCATCATCATCA
TTAATGA (配列番号 19)

10

HHHM

AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTTGCTGTACCAAGT
GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG
GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTACCCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTCAGCTGC
TCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACAGTGGACCGGGACA
CCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTTTTCCAGTG
CTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAAC
ACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGGTTCTTTCTGAGAGAAAGTGAGTGCCTCCCTTGCAGCC
ACTGCAAGAAAAATGAGGAGTGTATGAAGTTGTGCCTAAGCGCTCATCATCATCATCA
TTAATGA (配列番号 20)

20

HHMH

AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTTGCTGTACCAAGT
GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG

30

GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTCAGCTGC
 TCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGTGGAGATCTCTTCTTGCACAGTGGACCGGGACA
 CCGTGTGTGGCTGTAAGGAGAACCAGTTCCAACGCTACCTGAGTGAGACACACTTCCAGTG
 CGTGGACTGCAGCCCCTGCTTCAACGGCACCGTGACAATCCCCGTGAAGGAGACTCAGAAC
 ACCGTGTGTAAGTGCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTA
 ACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAGATTGAGAATGTTAAGGG
 CACTGAGGACTCAGGCACCACAGCGGCCGCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
 GAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA (配列番号 21)

10

HMHH

AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTCGATTTGCTGTACCAAGT
 GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGCAGGATACGGACTGCAG
 GGAGTGTGAAAAGGGCACCTTTACGGCTTCCAGAATTACCTCAGGCAGTGTCTCAGTTGC
 AAGACATGTCCGAAAGAAATGTCCAGGTGGAGATCTCTCCTTGCCAAGCTGACAAGGACA
 CGGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTAAAACCTTTTCCAGTG
 CTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAAC
 ACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTA
 ACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAGATTGAGAATGTTAAGGG
 CACTGAGGACTCAGGCACCACAGCGGCCGCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
 GAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA (配列番号 22)

20

MHHH

AGCTTGTGTCCCCAAGGAAAGTATGTCCATTCTAAGAACAATTCCATCTGCTGCACCAAGT
 GCCACAAAGGAACCTACTTGGTGAGTACTGTCCGAGCCCAGGGCGGGATACAGTCTGCAG
 GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTCAGCTGC
 TCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGTGGAGATCTCTTCTTGCACAGTGGACCGGGACA
 CCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTAAAACCTTTTCCAGTG
 CTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAAC
 ACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTA
 ACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAGATTGAGAATGTTAAGGG
 CACTGAGGACTCAGGCACCACAGCGGCCGCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
 GAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA (配列番号 23)

30

40

【 0 3 7 6 】

TNFR1キメラ構築物の調製およびピキア・パストリス中への形質転換

各マキシプレップにより生成されたプラスミドDNAを、稀な切断制限エンドヌクレアーゼPmeIで消化して、DNAを線状化した後、ピキアを形質転換した。続いて、線状化したDNAを、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈降により洗浄した後、30 µlのdH₂O中に再懸濁した。10 µlの線状化したDNA溶液を80 µlのエレクトロコンピtentなKM71Hピキア細胞と5分間混合した後、1.5kV、200 、25 µFでエレクトロポレーションした。すぐに細胞をYPDSを用いて回収し、30 で2時間インキュベートした後、100 µg/ml ZEOCIN

50

、フレオマイシンD(Cayla, Toulouse, France)を含む抗生物質製剤を含むYPDS寒天プレート上に2日間塗布した。

【0377】

ピキアにおける構築物の発現

各構築物についての個々の形質転換体コロニーを、開始培養物として5 mlのBMGY中に拾い、30℃で24時間増殖させた。この培養物を用いて、30℃で24時間増殖させた500 mlのBMGY培地に接種した後、細胞を1500～3000gで室温で5分間の遠心分離により収穫した。次いで、細胞を100 mlのBMMY中に再懸濁し、メタノール濃度をずらして増加させながら(1日目に0.5%、2日目に1%、3日目に1.5%および4日目に2%)4日間増殖させた。発現後、3300gで15分間の培養物の遠心分離後、上清を回収した。

【0378】

ニッケル樹脂を用いるTNFR1キメラ構築物の精製

最初に、培養上清を、10 mMの最終濃度のイミダゾールおよび2x PBSの添加を介して緩衝化した。Hisタグ化されたタンパク質を、ニッケル-NTA樹脂の添加を介して室温で4時間(振とう)、バッチ吸収した。次いで、上清/樹脂ミックスを、ポリプレップカラム(Biorad)中で流し入れた。次いで、樹脂を10カラム容量の2xPBSで洗浄した後、250 mMイミダゾール1x PBSを用いて溶出させた。バッファー交換後、キメラ構築発現物を、EndoHデグリコシラーゼを用いて脱グリコシル化した後、SDS-PAGEにより検証した。

【0379】

PCR中に用いられる鋳型DNA配列

ヒト(Homo sapiens)TNFR1(細胞外領域、Genbank受託番号33991418)

CTGGTCCCTCACCTAGGGGACAGGGAGAAGAGAGATAGTGTGTGTCCCCAAGG
 AAAATATATCCACCCTCAAATAATTCGATTTGCTGTACCAAGTGCCACAAAGG
 AACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGCAGGATACGGACTGCAGGG
 AGTGTGAGAGCGGCTCCTTACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTCA
 GCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACAG
 TGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGG
 AGTGAACACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTG
 CACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTC
 TTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTAACTGTAAGAAAAGCCTGGAG
 TGCACGAAGTTGTGCCTACCCCAGATTGAGAATGTTAAGGGCACTGAGGACTCA
 GGCACCACA (配列番号1)

【0380】

コードされるヒトTNFR1の細胞外領域は以下のアミノ酸配列を有する：

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYHPQNNSICCTKCHKGTLYLNDPCPGQDTPDCRECE
 SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF
 QCFNCSLCLNGTVHLSQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLP
 QIENVKGTEDSGTT (配列番号2)

【0381】

マウス(Mus musculus)TNFR1(細胞外領域、Genbank受託番号31560798)

ン表面の間の接触時間を最大化した。流動をストレプトアビジン表面がビオチン化材料で飽和するまで継続して、最大のTNFR1表面を有するチップを生成させた。典型的には、チップは、ビオチン化材料の数百から数千のSPR応答単位に結合した。

【0386】

SPRチップ上での抗TNFR1応答の力価測定

競合実験の成功には、dAbの最小量が、有意なSPRシグナルを与える表面を越えて流動するような、抗TNFR1 dAbの濃度の最初の最適化を必要とする。特定の濃度範囲内では、dAbは用量依存的な様式で表面に結合し、結合したdAbのRU数は、チップ表面を横切って流動したdAbの濃度を反映する。

【0387】

この用量依存性の濃度範囲を確認するために、抗TNFR1 dAbを、1/10希釈～1/1,000,000希釈の範囲の10倍段階希釈のBiacoreバッファー中で力価測定した。次いで、希釈液を、最も希薄なサンプルから始めて、個々に、および連続的に、TNFR1チップ表面を横切って注入した。各希釈率で達成されたRUの最大数を測定した。各注入の後、TNFR1表面を再生させて、必要に応じて好適なSPR再生バッファーを用いて、結合した抗TNFR1 dAbを除去した。この方法を用いて、約100RUを示すシグナルを生成するのに必要な抗TNFR1 dAbの最小濃度を決定した。

【0388】

抗TNFR1 dAb/キメラの予備平衡化

一度、最適な抗TNFR1 dAb濃度を決定したら、抗TNFR1 dAb/キメラTNFR1ミックスを設定した。抗TNFR1 dAbの最終濃度が以前に決定された最適濃度と同一となるように、ミックスを設定した。典型的には、反応液を、抗TNFR1 dAbの2x濃縮物50 μl、Biacoreバッファー40 μlおよび純粋な、精製されたキメラタンパク質10 μlを含む100 μl容量に設定した。最終ミックスのための典型的な濃度は、約10～100 μMのキメラタンパク質および約10～100 nMの抗TNFR1 dAbであった。混合物を、室温で30分間平衡化させた。

【0389】

競合Biacore実験

平衡後、各抗TNFR1 dAb/キメラTNFR1混合物を、TNFR1 SPR表面上で連続的に泳動し、応答単位の数を測定した。各混合物を注入した後、表面を再生させて、結合した抗TNFR1 dAbを除去した後、次の混合物を注入した。異なるキメラを用いて生成された異なる応答により、特定のdAbにより結合したTNFR1ドメインの決定が可能になった。

【0390】

これらの研究により、TAR2m-21-23がマウスTNFR1のドメイン1に結合し、TAR2h-205がヒトTNFR1のドメイン1に結合することが示された。

【0391】

TAR2m-21-23

EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLS}CAASGFTFN~RYSMG~WLRQAPGKGLEWVS~~RID
SYGRGTY^{YEDPVK}G~~RFSISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFG
SNAFDY~~~WGQGTQVTVSS (配列番号 24)

40

TAR2h-205

EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLS}CAASGFTFV~KYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~QIS
NTGGHTYYADSVK^G~~RFTISRDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCAK~~~YTGRW
EPFDY~~~WGQGT^LTVTVSS (配列番号 25)

【0392】

TAR2m-21-23およびTAR2h-205のアミノ酸配列において、CDR1は、～にフランキングし、CDR2は、～～にフランキングし、およびCDR3は、～～～にフランキングする。提示されたアミノ酸配列はギャップを含まない連続的なものである。

【0393】

50

実施例4. スクリーニング方法

本明細書に記載のキメラTNFR1タンパク質などのキメラ受容体タンパク質を、所望の受容体内の特定のドメインに結合する物質(例えば、抗体、dAb)を単離するためのアッセイまたはスクリーン中で用いることができる。所望の受容体タンパク質のためのモデルとしてTNFR1を用いて、これらの方法は、ELISAまたは表面プラズモン共鳴による受容体結合のスクリーニングの前に粗抗体調製物にキメラタンパク質を添加することを記載している。さらに、これらは表面(例えば、ELISAプレートまたはSPRチップ)上にコーティングされたキメラタンパク質の使用およびこの表面上のキメラタンパク質への抗体の結合の試験を介する該抗体のスクリーニングを記載している。同様の方法を用いて、他の受容体の所望のドメイン(例えば、活性部位の外側)に結合する物質(例えば、抗体、dAb)を同定することが

10

【0394】

可溶性ELISAスクリーン

この方法を用いて、未知の特異性の抗体または抗体フラグメントの大きいレパートリーから、TNFR1の特異的ドメインに結合する抗体または抗体フラグメント(例えば、dAb)を迅速に単離することができる。

【0395】

96ウェルのアッセイプレートを、ウェルあたり100 μ lのキメラTNFR1を用いて4 で一晚コーティングする。ウェルを0.1%TPBS(0.1%濃度のTween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水)で3回洗浄する。ウェルあたり200 μ lの1%TPBSを添加してプレートをブロックし、このプレートを室温で1~2時間インキュベートする。次いで、ウェルをPBSで3回洗浄した後、50 μ lの0.2%TPBS中、可溶性抗体または抗体フラグメント(c-Mycエピトープタグを含む)を含有する、50 μ lの細菌上清またはペリプレップを添加する。次いで、プレートを室温で1時間インキュベートする。この後、プレートを0.1%TPBS(PBS中の0.1%Tween-20)で5回洗浄する。次いで、100 μ lの一次抗c-Mycマウスモノクローナルを、各ウェルに0.1%TPBS中で添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。この一次抗体溶液を廃棄した後、プレートを0.1%TPBSで5回洗浄する。次いで、100 μ lの予め希釈されたヤギ由来抗マウスIgG(Fc特異的)HRPコンジュゲート(Sigma、カタログ番号A0168)を添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。次いで、二次抗体を廃棄し、プレートを0.1%TPBSで6回、次いでPBSで2回洗浄する。次いで、50 μ lのTMBペルオキシダーゼ溶液を各ウェルに

20

30

【0396】

競合ELISAスクリーン

この方法を用いて、TNFR1に結合する粗抗体または抗体フラグメント調製物の多様なセットを迅速にスクリーニングして、それらのドメイン結合特異性を決定することができる。

40

【0397】

96ウェルのアッセイプレートを、ウェルあたり100 μ lのマウスまたはヒトTNFR1(ヒトまたはマウスのいずれか)を用いて4 で一晚コーティングする。ウェルを、0.1%TPBS(0.1%濃度のTween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水)で3回洗浄する。ウェルあたり200 μ lの1%TPBS(1%Tween-20を含むPBS)を添加してプレートをブロックし、このプレートを室温で1~2時間インキュベートする。次いで、ウェルをPBSで3回洗浄する。同時に、細菌上清またはペリプレップを、予め最適化された濃度の溶液中のキメラTNFR1タンパク質を用いて予備平衡化させておく。次いで、可溶性抗体または抗体フラグメントを含む、50 μ lのこの粗細菌調製物/キメラタンパク質ミックスをELISAプレートに添加する。プレートを室温で1時間インキュベートする。次いで、プレートを0.1%TPBS(PBS中の0.1%Tween-20)で

50

5回洗浄し、100 μ lの一次検出抗体(またはプロテインA-HRPまたはプロテインL-HRP)を0.1%TPBS中、各ウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。この一次抗体溶液を廃棄し、プレートを0.1%TPBSで5回洗浄する。次いで、必要に応じて、100 μ lの予め希釈された二次抗体/ヤギ由来HRPコンジュゲートを添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。次いで、二次抗体を廃棄し、プレートを0.1%TPBSで6回、次いでPBSで2回洗浄する。50 μ lのTMNペルオキシダーゼ溶液を各ウェルに添加し、プレートを室温で2~60分間静置する。反応を、50 μ lの1M塩酸の添加により停止させる。プレートの450 nmでのODを、酸の添加の30分以内に96穴プレートリーダー中で読み取る。ELISAシグナルの減少は、前記抗体が、プレート上にコーティングされた完全なTNFR1よりもむしろ、キメラTNFR1ドメインに結合し、従って、該抗体がキメラタンパク質内のドメインの1つに結合することを示唆するであろう。

10

【0398】

TNFR1への結合に関して参照抗体または抗体フラグメントと競合する抗体および抗体フラグメントのための競合ELISAスクリーン

この方法を用いて、TNFR1への結合に関して参照抗体もしくは抗体フラグメント(例えば、TAR2m-21-23)と競合するか、またはTNFR1の所望のドメイン(例えば、ドメイン1)に結合するこれらの抗体もしくは抗体フラグメントについて、TNFR1に結合する粗抗体もしくは抗体フラグメント調製物の多様なセットを迅速にスクリーニングすることができる。この方法は、参照抗体または抗体フラグメントと、異なる検出可能なタグ(エピトープタグ)を含む試験抗体または抗体フラグメント(例えば、スクリーニングしようとする抗体の集団)とを使用する。

20

【0399】

96ウェルのアッセイプレートを、ウェルあたり100 μ lのマウスまたはヒトTNFR1を用いて、4で一晚コーティングする。ウェルを0.1%TPBS (0.1%濃度のTween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水)で3回洗浄する。ウェルあたり200 μ lの1%TPBS (PBS中の1%Tween-20)を添加してプレートをブロックし、このプレートを室温で1~2時間インキュベートする。次いで、ウェルをPBSで3回洗浄する。同時に、試験しようとする粗抗体調製物を、予め最適化された濃度の溶液中の参照抗体または抗体フラグメント(例えば、ドメイン1に結合する抗体; TAR2m-21-23)と混合する。既に述べたように、この抗体がドメイン結合特異性についてスクリーニングされる抗体中に存在するものと同じ検出タグを含まないことが重要である。50 μ lのこの粗抗体/参照抗体ミックスをELISAプレートに添加する。次いで、プレートを室温で1時間インキュベートする。その後、プレートを0.1%TPBSで5回洗浄し、100 μ lの一次検出抗体(スクリーニングされる抗体集団上にもみ存在するタグに結合する)を0.1%TPBS中、各ウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。この一次抗体溶液を廃棄し、プレートを0.1%TPBSで5回洗浄する。次いで、一次検出抗体を認識する、100 μ lの予め希釈された二次抗体-HRPコンジュゲートを添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。次いで、二次抗体溶液を廃棄し、プレートを0.1%TPBSで6回、次いでPBSで2回洗浄する。次いで、50 μ lのTMBペルオキシダーゼ溶液を各ウェルに添加し、プレートを室温で2~60分間静置する。反応を、50 μ lの1M塩酸の添加により停止させる。プレートの450 nmでのODを、酸の添加の30分以内に96穴プレートリーダー中で読み取る。この方法を用いるが、参照抗体または抗体フラグメントを添加しない別の平行するELISAを平行して行うべきである。参照抗体または抗体フラグメントと競合しない同じ抗体調製物についてのELISAシグナルと比較した、参照抗体または抗体フラグメントの存在下でのELISAシグナルの減少は、特定の抗体または抗体フラグメントが、TNFR1への結合に関して参照抗体または抗体フラグメントと競合し、参照抗体または抗体フラグメントと同じTNFR1のドメインに結合することを示唆するであろう。

30

40

【0400】

SPRスクリーニング

上記のELISA方法を、例えば、BIACORE 3000 SPR機器(Biacore International AB, Uppsala, Sweden)を用いて、表面プラズモン共鳴を用いる形式に容易に適合させることができ

50

る。一般的には、キメラタンパク質をSPRチップ上に固定するか、またはキメラタンパク質を、抗TNFR1抗体もしくは抗体フラグメントを含む粗細菌上清と平衡化させ、得られる混合物を完全長ヒトTNFR1もしくはマウスTNFR1でコーティングされたSPRチップ上に流出させる。

【0401】

実施例5. dAbのPEG化

無細胞受容体結合アッセイにおいてTNFR1に結合し、細胞に基づくアッセイにおいて細胞の表面上でTNFR1の機能を阻害するdAbの能力に対する、dAbのPEG化の効果を研究した。

【0402】

細胞アッセイ

MRC-5 IL-8放出アッセイ

ヒトTNFR1に結合する特定のdAbの活性を、以下のMRC-5細胞アッセイにおいて評価した。このアッセイは、MRC-5細胞中でのTNFによるIL-8分泌の誘導に基づくものであり、HUVEC中でのIL-1によるIL-8の誘導を記載している、Alceson, L.ら、Journal of Biological Chemistry 271:30517-30523 (1996)に記載の方法から適合させたものである。dAbの活性を、HUVEC細胞系の代わりにMRC-5細胞を用いて、ヒトTNF によるIL-8の誘導を評価することによりアッセイした。簡単に述べると、MRC-5細胞をマイクロタイタープレート中に塗布し、プレートをdAbおよびヒトTNF (300 pg/ml)と共に一晩インキュベートした。インキュベーション後、培養上清を吸引し、上清中のIL-8濃度を、サンドイッチELISA(R&D Systems)を介して測定した。抗TNFR1 dAb活性は、TNF のみと共にインキュベートした対照ウェルと比較して上清中へのIL-8分泌の減少をもたらした。

【0403】

受容体結合アッセイ

抗TNF dAbを、組換えTNF受容体1(p55)へのTNFの結合を阻害する能力について試験した。簡単に述べると、Maxisorpプレートを、30 mg/mlの抗ヒトFcマウスモノクローナル抗体(Zymed, San Francisco, USA)と共に一晩インキュベートした。ウェルを、0.05%Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した後、PBS中の1%BSAでブロックした後、100 ng/mlのTNF受容体1 Fc融合タンパク質(R&D Systems, Minneapolis, USA)と共にインキュベートした。抗TNF dAbをTNFと混合し、これを10 ng/mlの最終濃度で、洗浄したウェルに添加した。TNFの結合を、0.2 mg/mlのビオチン化抗TNF抗体(HyCut biotechnology, Uben, Netherlands)、次いで1/500希釈率の西洋わさびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Amersham Biosciences, UK)を用いて検出した後、TMB基質(KPL, Gaithersburg, USA)と共にインキュベートした。反応を、HClの添加により停止させ、吸光度を450 nmで読み取った。抗TNF dAb活性は、TNF結合の減少を誘導し、従って、TNFのみの対照と比較して吸光度の減少を誘導した。

【0404】

組換えTNFR1および細胞表面TNFR1に対するPEG化dAbの比較効果を、表5中に提示されるデータ中に例示する。

10

20

30

【表 5】

表 5

dAb 形式	RBA IC50 (nM)	細胞アッセイ ND50 (nM)
抗-TNFR dAb (PEG なし)	3	30
5K PEG	3	200
20K PEG	6	600
2x10K PEG	10	1000
30K PEG	10	600
2x20K PEG	10	1000

10

【0405】

細胞に基づかないアッセイ形式において受容体の細胞外部分のみを含む、組換え形態の受容体を使用する、受容体結合アッセイ(RBA)を左に示し、ここでPEG化に対する効果は最小であり、5K PEGの場合、結合における差異は観察されなかった。

【0406】

対照的に、細胞アッセイにおいて得られたデータ中に見られるように、dAbのPEG化は、該アッセイにおけるdAbの有効性を実質的に低下させた。いくつかの場合、低下した有効性は最大で33倍の係数であった。このデータは、細胞表面で受容体活性を遮断するdAbの能力に基づく細胞に基づくアッセイにおいて収集されたものであった。

20

【0407】

研究の結果は、dAbのPEG化が、無細胞アッセイにおいてTNFR1に結合する能力に対するよりも、細胞表面上のTNFR1の機能を阻害するdAbの能力に対してより大きい効果を有したことを示している。

【0408】

実施例6. 内因性アゴニスト分子に結合するが、活性部位には結合しないdAb

この実施例は、所望の内因性アゴニスト分子に結合するが、該内因性アゴニストの活性部位には結合しないdAbを同定するための方法を例示する。この手法を、エリスロポエチン(epo)を用いて例示し、それは内因性アゴニストに一般的に適用可能である。

30

【0409】

EPOに結合するドメイン抗体を、任意の好適なスクリーニング方法を用いて同定および単離することができる。組換えEPO受容体を発現し、増殖について造血因子に依存する細胞系をアッセイにおいて用いて、EPOに結合するが、その活性部位には結合せず、従って、EPO受容体へのEPOの結合を防止しないdAbを同定することができる。例えば、ヒトEPO受容体を用いてトランスフェクトされ、epo依存的増殖を受けるマウスIL-3依存的細胞系であるBa/F3細胞を用いることができる(D'Andreaら、Blood 82:46-52 (1993))。Ba/F3細胞を好適な培養皿中で培養し、培養培地を除去し、細胞をPBSなどの好適なバッファーを用いて洗浄することができる。次いで、細胞を、EPOを含む培養培地中で約48時間培養することができる。アッセイしようとするドメイン抗体を個々の培養物(例えば、好適な細胞培養アッセイプレートの個々のウェル)に添加することができる。約48時間後、細胞増殖を、ジメチルチアゾールジフェニル-テトラゾリウムブリミド(MTT)還元アッセイなどの任意の好適な方法を用いて評価することができる。細胞増殖の阻害の欠如は、dAbではなく培養培地を含む対照ウェルと比較して、dAbを含むウェルであり、これはdAbがepoの活性部位に結合しないことを示唆するであろう。

40

【0410】

本明細書中で言及される全ての刊行物、および該刊行物中に引用される参考文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。記載の方法および本発明の系の様々な改

50

変および変更は、本発明の範囲および精神を逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明を特定の好ましい実施形態と共に説明してきたが、特許請求の範囲に記載の本発明がそのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、分子生物学または関連分野における当業者にとって明らかである本発明を実施するための記載の様式の様々な改変は、特許請求の範囲の範囲内にあると意図されるものである。

【図面の簡単な説明】

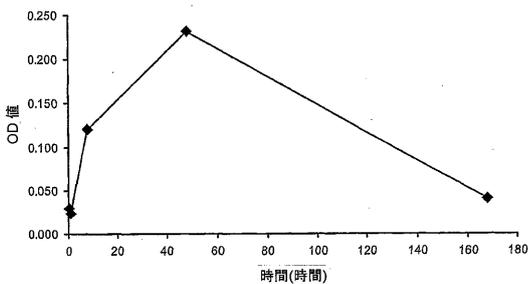
【0411】

【図1】図1は、TNFR1に結合するPEG化されたdAbモノマー (TAR2m-21-23/40K分枝状PEG ; PEG抗TNFR1 dAbとも呼ぶ)の単一静脈内投与後の、時間に対する血清中でのELISAにより検出された可溶性TNFR1の相対濃度のグラフ(濃度時間曲線)である。プロットされたデータ点は、血清の1:5希釈物を用いるELISAにより得られたものである。このグラフは、全身循環中のTNFR1の生物学的利用能が、TNFR1に結合するPEG化されたdAbモノマーの投与により増加したことを明確に示している。濃度時間曲線により示されるように、血清中の可溶性TNFR1のレベルは、PEG化されたdAbモノマーを投与した後に増加し、ピーク濃度に到達し、次いで、PEG化されたdAbが消失するにつれて、基底レベルまで時間と共に減少した。この結果は、可溶性受容体に結合するdAbを投与することにより、該受容体の生物学的利用能を増加させ、全身循環中の可溶性受容体のレベルまたは量を増加させることができること、および全身循環中の可溶性受容体の増加したレベルまたは量が消失し、基底レベルまで戻ることを示している。この結果は、全身循環中の可溶性受容体のレベルを、該可溶性受容体に結合するPEG化されたdAbモノマーを投与することにより制御することができることを示唆している。

10

20

【図1】



【配列表】

2008519813000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National application No /GB2005/004319
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 ADD. C07K16/24 C07K16/26 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) C07K 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, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200574 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2005-725413 XPO02380847 & WO 2005/094881 A1 (TAKEDA PHARM CO LTD) 13 October 2005 (2005-10-13) abstract	1-98
A	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08) example 12	17-20
A	WO 2004/001064 A (DYAX CORPORATION; SATO, AARON, K; EDGE, ALBERT) 31 December 2003 (2003-12-31) page 3; claim 24	1-93
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2006		Date of mailing of the international search report 29/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patenilaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
/GB2005/004319

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 467 416 A (HYBRITECH INCORPORATED) 22 January 1992 (1992-01-22) the whole document	1-98
A	EP 0 298 654 A (HYBRISENS LTD) 11 January 1989 (1989-01-11) the whole document	1-98
A	EP 0 339 505 A (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 2 November 1989 (1989-11-02) the whole document	1-98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/004319

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 98 is 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.: 33-58
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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. 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.:
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.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2005/004319

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 98 is 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.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 33-58

Claim 33 and the claims which are dependent thereon (claims 34-58) are not clear (Article 6 PCT) because independent claim 33 requires that the ligand must increase the activity of the endogenous target. This feature is in direct contradiction with claim 35, which is dependent on claim 33 and which states that the ligand inhibits the activity of the endogenous target compound by no more than 10%. Therefore the scope of independent claim 33 and dependent claims 34-58 is so unclear that it could not be subject to a meaningful search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

/GB2005/004319

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005094881	A1	13-10-2005	NONE
WO 2004003019	A	08-01-2004	CA 2492092 A1 08-01-2004 CN 1678634 A 05-10-2005 EP 1517921 A2 30-03-2005
WO 2004001064	A	31-12-2003	AU 2003245664 A1 06-01-2004 CA 2490009 A1 31-12-2003 EP 1576172 A2 21-09-2005 JP 2006512050 T 13-04-2006
EP 0467416	A	22-01-1992	NONE
EP 0298654	A	11-01-1989	AT 106250 T 15-06-1994 AU 1865288 A 12-01-1989 DE 3889783 D1 07-07-1994 DE 3889783 T2 08-09-1994 DK 375188 A 08-01-1989 ES 2056108 T3 01-10-1994 JP 1138461 A 31-05-1989
EP 0339505	A	02-11-1989	AU 3332389 A 02-11-1989 DK 166489 A 27-10-1989 FI 891956 A 27-10-1989 JP 2013395 A 17-01-1990 NO 891713 A 27-10-1989 PT 90364 A 10-11-1989 US 5225540 A 06-07-1993 ZA 8903088 A 28-12-1990

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52
C 0 7 K	14/575 (2006.01)	C 0 7 K	14/575
C 0 7 K	14/525 (2006.01)	C 0 7 K	14/525
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, BW, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 トムリンソン, イアン
イギリス国 シービー 4 0ダブリュジー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク
3 1 5, ドマンティス リミテッド

Fターム(参考) 4C076 AA94 CC04 CC27 EE23 EE59M FF31
4C084 AA02 AA17 MA05 NA12 ZB11 ZB26 ZC42
4C085 AA14 AA16 BB41 BB43 EE01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA57 CA40 DA01 DA30 DA50 DA75
EA20 FA74