

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6130350号
(P6130350)

(45) 発行日 平成29年5月17日 (2017.5.17)

(24) 登録日 平成29年4月21日 (2017.4.21)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02 Z N A

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02 Z M D

A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/10 (2006.01)

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/34 (2017.01)

A 6 1 K 47/34

請求項の数 11 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-501659 (P2014-501659)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月30日 (2012.3.30)
 (65) 公表番号 特表2014-511844 (P2014-511844A)
 (43) 公表日 平成26年5月19日 (2014.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/055830
 (87) 国際公開番号 W02012/131053
 (87) 国際公開日 平成24年10月4日 (2012.10.4)
 審査請求日 平成27年3月6日 (2015.3.6)
 (31) 優先権主張番号 61/469,388
 (32) 優先日 平成23年3月30日 (2011.3.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 505166225
 アブリンクス エン. ヴェー.
 ベルギー, ベー-9052 ヘントーツヴ
 イナールデ, テヒノロジーパルク 21
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (72) 発明者 ヘゲン, マルティン
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02
 445、ブルックライン、ウォルナット・
 ストリート 353
 (72) 発明者 カマー, ゲイル
 アメリカ合衆国、ペンシルベニア 194
 60、フェニックスビル、プリムフル・ドラ
 イブ 111

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TNF α に対する単一ドメイン抗体で免疫障害を処置する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む薬学的製剤であって、該ポリペプチドの 80 ~ 400 mg用量を少なくとも約 4 週間毎の間隔で複数回ヒトに投与することにより関節リウマチの処置を必要とするヒトにおける該処置に使用するための、薬学的製剤。

【請求項 2】

投与が、少なくとも約 6 週間の時間間隔である、請求項 1 記載の薬学的製剤。

【請求項 3】

投与が少なくとも約 8 週間の時間間隔である、請求項 1 または 2 記載の薬学的製剤。

10

【請求項 4】

用量が、前記ポリペプチドの約 80、100、120、140、160、180、200、250、275、300、320、350、375 および 400 mg から成る群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の薬学的製剤。

【請求項 5】

皮下または静脈内に投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の薬学的製剤。

【請求項 6】

ヒトが、メトトレキサートで同時処置される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の薬学的製剤。

【請求項 7】

20

薬学的に許容されうる製剤に製剤化される、請求項 1 ~ 6 記載の薬学的製剤。

【請求項 8】

製剤が、

- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、濃度約 80 mg/ml ~ 250 mg/ml のポリペプチド ;
- (b) 濃度約 5 % ~ 約 10 % の、スクロース、ソルビトール、またはトレハロースより選択される凍結保護剤 ;
- (c) 濃度約 0.01 % ~ 0.6 % の、ポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 より選択される界面活性剤 ; および
- (d) 製剤の pH が約 5.0 ~ 7.5 であるような、濃度約 10 ~ 20 mM のヒスチジン緩衝液または濃度約 20 mM のトリス緩衝液より選択される緩衝液を含む、請求項 7 記載の薬学的製剤。

10

【請求項 9】

製剤が、100 mg/ml の前記ポリペプチド、20 mM ヒスチジン、7.5 % (w/v) スクロース、および 0.01 % ポリソルベート 80 を pH 6.0 で含む、請求項 8 記載の薬学的製剤。

【請求項 10】

関節リウマチの処置を必要とするヒトにポリペプチド 80 mg を約 4 週間毎に投与することによる、該ヒトにおける該処置に使用するための、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む薬学的製剤であって、該ヒトがメトトレキサートで同時処置される、薬学的製剤。

20

【請求項 11】

関節リウマチの処置を必要とするヒトにポリペプチド 80 mg を約 8 週間毎に投与することによる、該ヒトにおける該処置に使用するための、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む薬学的製剤であって、該ヒトがメトトレキサートで同時処置される、薬学的製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、腫瘍壊死因子 (TNF) に対する単一ドメイン抗原結合 (SDAB) 分子を含むポリペプチドおよび関節リウマチなどの免疫障害を処置するために SDAB 分子を使用する方法に関する。

【0002】

発明の背景

TNF に対する SDAB は、例えば PCT 公報である国際公開公報第 04/041862 号および国際公開公報第 06/122786 号に記載されている。これらの抗 TNF

SDAB は、炎症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、1 型糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、および脈管炎などの、TNF に関連するおよび / または TNF によって仲介される疾患および障害の予防および / または治療のために使用することができる。

40

【0003】

処置計画での抗 TNF 療法の実施は、炎症状態を有する患者についての疾病負担および生活の質を改善したが、これらの治療法の多くは、医療専門家による定期的な、例えば毎週の、薬物注射を必要とする。頻繁な来院および注射は、保健医療システム、患者およびその介護者に著しい負担を与える。これらの来院を減らし、患者および介護者に自己投与の選択肢を与える結果として、著しい個人的および経済的利益が生じうる。あらゆる抗 T

50

N F 療法が処置回数の減少または自己注射の候補であるわけではなく、そのため、より長い間隔で（例えば 1 ～ 2 ヶ月に 1 回）および / または自己注射として投与された場合に有効な新規抗 T N F 療法の必要性がある。

【 0 0 0 4 】

抗腫瘍壊死因子（ T N F ）薬の投与を受ける患者は、細菌、ミコバクテリア、真菌、ウイルス、寄生虫、および他の日和見病原体による重症感染症（ S I ）のリスクがある。これらの感染症は、基礎疾患または処置として行われた投薬のいずれかに関係しうる。重症感染症（ S I ）は、入院もしくは死亡を招くか、または抗生物質などの投薬を必要とする。従って、薬物の効力を保つ一方で、重症感染症を最小限に抑える必要性がある。

【 0 0 0 5 】

発明の概要

本発明は、上述の必要性の一つまたは複数に対処する。抗 T N F S D A B を含むポリペプチドの特定の投与計画で、関節リウマチを患うヒト対象を処置する結果として、その対象の病状に統計的に有意な改善が生じた。従って、いくつかの態様では、本発明は、免疫障害を処置する必要があるヒトに二つの抗 T N F S D A B および抗ヒト血清アルブミン（ H S A ） S D A B を含むポリペプチド 3 0 ～ 2 0 0 mg を複数回投与することを含む、そのヒトにおけるその処置の方法を含み、ここで、その投与は、少なくとも約 4 週間の時間間隔である。モデル化から、用量を増加したとき、抗 T N F S D A B を含むポリペプチドが長時間間隔にわたり臨床的に有意な有害作用の増大なしに有効であったことが示された。同時の抗 T N F 阻害剤を用いた比較モデル化から、さらに、抗 T N F S D A B を含むポリペプチドが S I 作用のリスクプロファイルに影響せずに好都合な効力を併せ持つことが明らかになった。従って、いくつかの態様では、本発明は、免疫障害を処置する必要があるヒトに二つの抗 T N F S D A B および抗ヒト血清アルブミン（ H S A ） S D A B を含むポリペプチド 3 0 ～ 4 0 0 mg を複数回投与することを含む、そのヒトにおけるその処置の方法を含み、ここで、その投与は、約 8 週間または 2 ヶ月などの、少なくとも約 4 週間の時間間隔である。いくつかの態様では、本発明は、免疫障害を処置する必要があるヒトに二つの抗腫瘍壊死因子（ T N F ） S D A B および抗ヒト血清アルブミン（ H S A ） S D A B を含むポリペプチド 3 0 ～ 4 0 0 mg を複数回投与することによって、そのヒトでの免疫障害を処置するために使用するためのそのポリペプチドを含み、ここで、その投与は、少なくとも約 4 週間毎の間隔である。

【 0 0 0 6 】

いくつかの態様では、抗 T N F S D A B は、三つの相補性決定領域（ C D R 1、C D R 2、および C D R 3 ）を含み、ここで、

（ a ） C D R 1 は、

（ i ）アミノ酸配列 D Y W M Y（配列番号 2 2）；

（ i i ） D Y W M Y（配列番号 2 2）と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

（ i i i ） D Y W M Y（配列番号 2 2）とアミノ酸 1 個だけの差異を有するアミノ酸配列

を含み；

（ b ） C D R 2 は、

（ i ）アミノ酸配列 E I N T N G L I T K Y P D S V K G（配列番号 2 3）；

（ i i ） E I N T N G L I T K Y P D S V K G（配列番号 2 3）と少なくとも 8 0 %、9 0 %、もしくは 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

（ i i i ） E I N T N G L I T K Y P D S V K G（配列番号 2 3）とアミノ酸 2 もしくは 1 個の差異を有するアミノ酸配列

を含み；

（ c ） C D R 3 は、

（ i ）アミノ酸配列 S P S G F N（配列番号 2 4）；

（ i i ） S P S G F N（配列番号 2 4）と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列；または

(i i i) S P S G F N (配列番号 2 4) とアミノ酸 1 個の差異を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 0 7 】

いくつかの態様では、抗 H S A S D A B は、三つの C D R (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) を含み、ここで、

(a) C D R 1 は、

(i) アミノ酸配列 S F G M S (配列番号 2 5) ；

(i i) S F G M S (配列番号 2 5) と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(i i i) S F G M S (配列番号 2 5) とアミノ酸 1 個だけの差異を有するアミノ酸配列を含む；

(b) C D R 2 は、

(i) アミノ酸配列 S I S G S G S D T L Y A D S V K G (配列番号 2 6) ；

(i i) S I S G S G S D T L Y A D S V K G (配列番号 2 6) と少なくとも 8 0 %、9 0 %、もしくは 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(i i i) S I S G S G S D T L Y A D S V K G (配列番号 2 6) とアミノ酸 2 もしくは 1 個の差異を有するアミノ酸配列

を含む；

(c) C D R 3 は、

(i) アミノ酸配列 G G S L S R (配列番号 2 7) ；

(i i) G G S L S R (配列番号 2 7) と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(i i i) G G S L S R (配列番号 2 7) とアミノ酸 1 個の差異を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 0 8 】

特定の態様では、抗 T N F S D A B の少なくとも一つは、配列番号 2 (T N F 3 0) と少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の態様では、抗 H S A S D A B は、配列番号 5 (A L B 8) と少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、または 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の態様では、ポリペプチドは、配列番号 1 (オゾラリズマブ (ozoralizumab)) で示されるアミノ酸配列を含む。特定の態様では、S D A B の少なくとも一つはヒト化されている。

【 0 0 0 9 】

いくつかの態様では、二つの抗 T N F S D A B および抗 H S A S D A B のそれぞれは、リンカーを介して連結されている。リンカーは、配列番号 6 および配列番号 7 から成る群より選択されうるアミノ酸配列でありうる。

【 0 0 1 0 】

本発明の投与は、少なくとも約 2 週間、3 週間、4 週間、1 ヶ月、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、または 2 ヶ月の時間間隔でありうる。

【 0 0 1 1 】

本発明の用量は、S D A B 分子 1 0、3 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 6 0、1 8 0、2 0 0、2 2 5、2 5 0、2 7 5、3 0 0、3 2 0、3 5 0、3 7 5 または 4 0 0 mg を含む場合があり、静脈内、皮下、経口、経皮、経鼻、または舌下投与することができる。

【 0 0 1 2 】

本発明の S D A B 分子は、薬学的に許容されうる製剤に製剤化することができる。いくつかの態様では、製剤は、

(a) 濃度約 1 mg/ml ~ 2 5 0 mg/ml、例えば約 1 0 mg/ml ~ 2 5 0 mg/ml などの S D A B 分子；

10

20

30

40

50

(b) 濃度約 5 % ~ 約 10 % の、スクロース、ソルビトール、またはトレハロースより選択される凍結保護剤；

(c) 濃度約 0.01 % ~ 0.6 % の、ポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 より選択される界面活性剤；および

(d) 製剤の pH が約 5.0 ~ 7.5 になるような、濃度約 10 ~ 20 mM のヒスチジン緩衝液または濃度約 20 mM のトリス緩衝液より選択される緩衝液を含む。

【0013】

いくつかの態様では、製剤は、1 mg/ml、10 mg/ml、30 mg/ml、80 mg/ml、100 mg/ml、160 mg/ml、180 mg/ml、200 mg/ml の、または 250 mg/ml でさえあるポリペプチド、20 mM ヒスチジン、10 % (w/v) スクロース、および 0.02 % ポリソルベート 80 を pH 6.0 で含む。

10

【0014】

いくつかの態様では、1 mg/ml、10 mg/ml、30 mg/ml、80 mg/ml、100 mg/ml、160 mg/ml、180 mg/ml、200 mg/ml の、または 250 mg/ml でさえあるポリペプチド、20 mM ヒスチジン、7.5 % (w/v) スクロース、および 0.01 % ポリソルベート 80 を pH 6.0 で含む。

【0015】

本発明の S D A B 分子は、免疫障害を処置するために投与することができ、かつ/または本発明のポリペプチドは、免疫障害を処置するために使用することができ、ここで、免疫障害は：炎症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、若年性特発性関節炎および変形性関節症を含めた関節炎、C O P D、喘息、クローン病および潰瘍性大腸炎を含めた炎症性腸疾患、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、I 型糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、汗腺膿瘍、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、ならびに脈管炎から成る群より選択される。

20

【0016】

本発明の S D A B 分子で処置されるヒトは、メトトレキサートで同時処置されうる。

【0017】

特定の一態様では、本発明は、関節リウマチの処置を必要とするヒトに配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド 80 mg を 4 週間に約 1 回投与することを含む、そのヒトにおけるその処置の方法を考えており、ここで、そのヒトは、メトトレキサートで同時処置される。

30

【0018】

さらなる特定の一態様では、本発明は、関節リウマチの処置を必要とするヒトに配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド 160、200、320 または 400 mg を 4 週間に約 1 回投与することを含む、そのヒトにおけるその処置の方法を考えており、ここで、場合によりそのヒトは、メトトレキサートで同時処置される。

【0019】

別の特定の態様では、本発明は、関節リウマチの処置を必要とするヒトに配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド 320 または 400 mg を 8 週間に約 1 回または 1 ヶ月に 1 回投与することを含む、そのヒトにおけるその処置の方法を考えており、ここで、場合によりそのヒトは、メトトレキサートで同時処置される。

40

【0020】

さらなる一態様では、本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、関節リウマチの処置を必要とするヒトにポリペプチド 80 mg を約 4 週間毎に投与することによる、そのヒトにおけるその処置に使用するためのポリペプチドに関し、ここで、そのヒトは、メトトレキサートで同時処置される。

【0021】

50

さらなる一態様では、本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、関節リウマチの処置を必要とするヒトに配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド 160、200、320 または 400 mg を 4 週間に約 1 回投与することによる、そのヒトにおけるその処置に使用するためのポリペプチドに関し、ここで、場合によりそのヒトは、メトトレキサートで同時処置される。

【0022】

別の特定の態様では、本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、関節リウマチの処置を必要とするヒトに配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド 320 または 400 mg を 8 週間に約 1 回または 1 ヶ月に 1 回投与することによる、そのヒトにおけるその処置に使用するためのポリペプチドを考えており、こ

10

【0023】

さらなる一態様では、本発明は、免疫障害の処置を必要とするヒトにおけるその処置に使用するためのポリペプチドに関し、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 1 (オゾラリズマブ) で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと競合する。

発明の説明

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】オゾラリズマブを投薬された 6 処置群のそれぞれにおいて、8 および 16 週間目に関節リウマチの処置基準 ACR - 20、50、および 70 を満たしている患者のパーセンテージを示す図である。4 週間毎の投与計画では、1 日目、4、8、および 12 週間目にオゾラリズマブまたはプラセボのいずれかを対象に投薬した。8 週間毎の計画では、1 日目および 8 週間目に対象にオゾラリズマブを投薬し、4 および 12 週間目にプラセボを投薬した。

20

【図 2】処置群による経時的な ACR 20 反応率 (LOCF) を示す図である。

【図 3】処置群による経時的な DAS 28 反応率 (LOCF) を示す図である。

【図 4】ATN - 103 のプラセボ補正後の用量 - ACR 20 反応中央値 (95% PI) を示す図である。破線は、表示した対照薬処置のシミュレーション後の反応中央値を示す。

【図 5】ATN - 103 のシミュレーション後の DAS 反応中央値 (95% PI) を示す図である。破線は、表示した対照薬処置の反応中央値を示す。

30

【図 6】% ACR 20 および % SI に関する薬物による有用性を示す図である。各楕円は、各薬物についてその適応投与計画でのシミュレーション後の反応の 95% PI の範囲を示すものである。

【0025】

定義

本発明をさらに容易に理解できるように、いくつかの用語を最初に定義する。追加的な定義は、詳細な説明の全体にわたって示す。

【0026】

本明細書に使用される冠詞「a」および「an」は、その冠詞の一つまたは複数 (例えば少なくとも一つ) の文法的対象を表す。

40

【0027】

用語「または」は、文脈から特に明記されない限り、用語「および/または」を意味するために使用され、その用語と互換的に使用される。

【0028】

用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書において互換的に使用され、本発明の S D A B 分子を包含する。

【0029】

「約」および「およそ」は、一般に、測定値の性質または精度を考えた場合、測定された量について許容されうる誤差の程度を意味するものとする。例示的な誤差の程度は、所

50

与の値または値の範囲の20パーセント(%)以内、典型的には10%以内、より典型的には5%以内である。

【0030】

「約」、「およそ」、「少なくとも」、「または」、「最大で」などの修飾語が項目のリストに先行する場合、この用語は、リスト中の各項目を改変するよう意図されている。例えば、語句「少なくとも約10%または20%」は、「少なくとも約10%または少なくとも約20%」と解釈すべきである。

【0031】

ヌクレオチド配列の文脈において、用語「実質的に同一」は、第2の核酸配列中のアライメントされたヌクレオチドと同一のヌクレオチドを十分数または最小数含有することにより、第1および第2のヌクレオチド配列が、共通の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか、または共通の構造ポリペプチドドメインもしくは共通の機能的ポリペプチド活性をコードする第1の核酸配列、例えば、参照配列と少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するヌクレオチド配列を表すために、本明細書において使用される。

【0032】

同じく本発明に含まれるのは、本発明のポリペプチドのフラグメント、誘導体、アナログ、または変異体、およびその任意の組み合わせである。本発明のタンパク質を表す場合の用語「フラグメント」、「変異体」、「誘導体」および「アナログ」には、対応するネイティブなSDAB分子の機能的特性の少なくともいくつかを保持する任意のポリペプチドが含まれる。本発明のポリペプチドのフラグメントには、本明細書のどこか他に論じられる特異的抗原結合フラグメントに加えて、タンパク質分解フラグメントおよび欠失フラグメントが含まれる。本発明のポリペプチドの変異体には、上記フラグメント、およびアミノ酸の置換、欠失、または挿入によりアミノ酸配列が変化したポリペプチドも含まれる。変異体は、天然であっても、または非天然であってもよい。非天然変異体は、当技術分野で公知の突然変異誘発技法を用いて産生させることができる。変異ポリペプチドは、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失、または付加を含みうる。本発明のフラグメントの誘導体は、ネイティブなポリペプチドに見られない追加的な特徴を示すように変化したポリペプチドである。例には、融合タンパク質が挙げられる。変異ポリペプチドは、また、本明細書において「ポリペプチドアナログ」と呼ばれることがある。本明細書に使用されるポリペプチドの「誘導体」は、官能側基の反応によって化学的に誘導体化された一つまたは複数の残基を有する主題ポリペプチドである。同様に「誘導体」として含まれるのは、20種の標準アミノ酸の天然アミノ酸誘導体の一つまたは複数含有するポリペプチドである。例えば、4-ヒドロキシプロリンをプロリンの代わりに置換することができ；5-ヒドロキシリシンをリシンの代わりに置換することができ；3-メチルヒスチジンをヒスチジンの代わりに置換することができ；ホモセリンをセリンの代わりに置換することができ；オルニチンをリシンの代わりに置換することができる。

【0033】

用語「機能的変異体」は、天然配列に実質的に同一のアミノ酸配列を有する、または実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドであって、天然配列の一つまたは複数の活性を有する能力があるポリペプチドを表す。

【0034】

配列間の相同性または配列同一性(これらの用語は本明細書において互換的に使用される)の計算は、以下のように行われる。

【0035】

二つのアミノ酸配列の、または二つの核酸配列の同一率を決定するには、最適な比較目的のために配列をアライメントする(例えば、最適なアライメントのために第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較目的のために非相同配列を無視することができる)。典型的な一態様では、比較目的のためにアライメントされた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、40

10

20

30

40

50

%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%である。

【0036】

次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列での位置が、第2の配列で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で占められているならば、それらの分子はその位置で同一である（本明細書に使用されるアミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」に等しい）。

【0037】

二つの配列間の同一率は、それら二つの配列の最適なアライメントのために導入する必要のあるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。

10

【0038】

二つの配列の間の配列の比較および同一率の決定は、数学的アルゴリズムを使用して行うことができる。一態様では、二つのアミノ酸配列の間の同一率は、GCGソフトウェアパッケージ（インターネットのgcg.comで入手可能）中のGAPプログラムに組み入れられた、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453(1970)に記載のアルゴリズムを使用して、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびにギャップ重み16、14、12、10、8、6、または4および長さ重み1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。なお別の態様では、二つのヌクレオチド配列の間の同一率は、GCGソフトウェアパッケージ（インターネットのgcg.comで入手可能）中のGAPプログラムを使用して、NWSgapdna.CMPマトリックスならびにギャップ重み40、50、60、70、または80および長さ重み1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。一つの典型的なパラメーターセット（および他に特に規定がなければ使用すべきセット）は、ギャップペナルティー12、ギャップ伸長ペナルティー4、およびフレームシフトギャップペナルティー5を有するBlossum 62スコアリングマトリックスである。

20

【0039】

二つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の間の同一率は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み入れられた、E. Meyers and W. Miller CABIO, 4:11-17(1989)に記載のアルゴリズムを使用して、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティー12およびギャップペナルティー4を用いて決定することができる。

30

【0040】

本明細書記載の核酸配列およびタンパク質配列は、公共データベースに対して検索を行って、例えば他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するための「クエリ配列」として使用することができる。そのような検索は、Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10(1990)のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して行うことができる。BLASTヌクレオチド検索をNBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で行って、本発明において特徴とされる核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で行って、本発明において特徴とされるタンパク質（配列番号1）分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップ付きアライメントを得るために、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-25 3402(1997)に記載されたようにギャップ付きBLASTを利用することができる。BLASTおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用することができる。

40

【0041】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸、

50

グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 γ -分枝側鎖を有するアミノ酸(例えばトレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。

【0042】

用語「S D A B」は、国際公開公報第04/041862号および国際公開公報第06/122786号に記載されたような単ドメイン抗原結合分子を表す。用語「S D A B分子」は、一つまたは複数のS D A Bを含むポリペプチドまたは他の分子を表す。用語「S D A B」および「S D A B分子」は、単ドメイン抗原結合ユニット(例えばTNF30もしくはALB8)または多価単ドメイン抗原結合ドメイン(例えばTNF55、TNF56、もしくはオゾラリズマブ)を表すために互換的に使用することができる。

【0043】

可変ドメインの「C D R」は、Kabatの定義、Chothiaの定義、KabatおよびChothiaを一本化した定義、A b M定義、接触定義、ならびに/もしくはコンフォメーション定義または当技術分野で周知の任意のC D R決定法に従って同定される、超可変領域内のアミノ酸残基である。抗体のC D Rは、Kabatらによって本来定義された超可変領域として同定することができる。例えば、Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.Cを参照されたい。C D Rの位置は、Chothiaらによって本来記載された構造ループ構造として同定することもできる。例えば、Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883を参照されたい。C D Rの同定に対する他のアプローチには、KabatとChothiaの折衷案であって、Oxford MolecularのA b M抗体モデル化ソフトウェア(現在のAccelrys(登録商標))を使用して得られる「A b M定義」、またはMacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745に示される、観察された抗原接触に基づくC D Rの「接触定義」が挙げられる。本明細書においてC D Rの「コンフォメーション定義」と呼ばれる別のアプローチでは、C D Rの位置は、抗原結合にエンタルピー的に寄与する残基として同定することができる。例えば、Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166を参照されたい。なお他のC D R境界の定義は、上記アプローチの一つに厳密には従わない場合があるが、それでもなおKabatのC D Rの少なくとも一部と重複する。もっとも、特定の残基または残基の群またはC D R全体でさえ抗原結合に著しくは影響しないという予測または実験結果に照らして、それらC D Rが短縮または延長される場合がある。本明細書に使用されるC D Rは、アプローチの組み合わせを含めた、当技術分野において公知の任意のアプローチによって定義されるC D Rを表しうる。本明細書に使用される方法は、任意のこれらのアプローチに従って定義されるC D Rを利用しうる。一つよりも多いC D Rを含有する任意の所与の態様について、C D Rは、Kabatの定義、Chothiaの定義、拡張(extended)定義、A b M定義、接触定義、および/またはコンフォメーション定義のいずれかに従って定義することができる。

【0044】

発明の詳細な説明

単ドメイン抗原結合(S D A B)分子

単ドメイン抗原結合(S D A B)分子には、相補性決定領域が単ドメインポリペプチドの部分である分子が含まれる。例には、非限定的に、重鎖可変ドメイン、軽鎖を自然に欠如している結合分子、従来の4本鎖抗体由来の単ドメイン、操作されたドメインおよび抗体由来の足場以外の単ドメイン足場が挙げられる。S D A B分子は、任意の技術、または任意の将来的単ドメイン分子でありうる。S D A B分子は、非限定的に、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、魚、サメ、ヤギ、ウサギ、およびウシを含めた任意の種由来でありうる。

【0045】

本発明の一局面によると、S D A B 分子は、軽鎖を欠如している重鎖として知られる天然の単ドメイン抗原結合分子である。そのような単ドメイン分子は、例えば、国際公開公報第 9 4 / 0 4 6 7 8 号および Hamers-Casterman et al. Nature 363:446-448 (1993) に開示されている。はっきりさせるために、軽鎖を自然に欠如している重鎖分子由来のこの可変ドメインは、それを 4 本鎖免疫グロブリンの従来型 V H と区別するために V H H と表現することができる。そのような V H H 分子は、Camelidae 種から、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、およびグアナコから得ることができる。Camelidae 以外の他の種は、軽鎖を自然に欠如している重鎖分子を産生する場合があります；そのような V H H は、本発明の範囲内である。

【 0 0 4 6 】

10

S D A B 分子は、下にさらに詳細に記載するように、リコンビナント化、C D R 移植、ヒト化、ラクダ化 (camelized)、脱免疫化 (deimmunized) および / または in vitro 発生 (例えばファージディスプレイによって選択) されうる。

【 0 0 4 7 】

用語「抗原結合」には、ターゲット抗原またはそのエピトープに結合する界面を形成する決定基を含むポリペプチド、例えば本明細書記載の単ドメイン分子の部分が含まれることが意図される。タンパク質 (またはタンパク質模倣体) に関連して、抗原結合部位は、典型的には、ターゲット抗原に結合する界面を形成する (アミノ酸またはアミノ酸模倣体少なくとも 4 個の) 一つまたは複数のループを含む。典型的には、ポリペプチド、例えば単ドメイン抗体分子の抗原結合部位は、少なくとも 1 個もしくは 2 個の C D R、またはより典型的には少なくとも 3、4、5、もしくは 6 個の C D R を含む。

20

【 0 0 4 8 】

用語「免疫グロブリン可変ドメイン」は、多くの場合に、当技術分野においてヒトまたは動物起源の V L または V H ドメインに同一または実質的に同一であると理解される。ある種、例えば、サメおよびラマでは、免疫グロブリン可変ドメインが進化した結果、アミノ酸配列がヒトまたは哺乳動物の V L または V H と異なる場合があることを認識されたい。

【 0 0 4 9 】

しかし、これらのドメインは、なお抗原結合に主に関与している。用語「免疫グロブリン可変ドメイン」は、典型的には、少なくとも 1 個もしくは 2 個の C D R、またはより典型的には少なくとも 3 個の C D R を含む。

30

【 0 0 5 0 】

「免疫グロブリン定常ドメイン」または「定常領域」は、ヒトまたは動物起源の C L、C H 1、C H 2、C H 3、または C H 4 ドメインと同一または実質的に類似の免疫グロブリンドメインを含むことが意図される。例えば、William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, 209, 210-218 (1989) 中の Hasemann & Capra, Immunoglobulins: Structure and Function を参照されたい。用語「F c 領域」は、免疫グロブリンドメイン C H 2 および C H 3 を含む免疫グロブリン定常ドメインまたはこれらに実質的に類似の免疫グロブリンドメインの F c 部分を表す。

【 0 0 5 1 】

40

ある態様では、S D A B 分子は、一価分子または多特異性分子 (例えば二価、三価、もしくは四価分子) である。他の態様では、S D A B 分子は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、または四重特異性分子である。分子が「単一特異性」または「多重特異性」、例えば「二重特異性」であるかどうかは、結合性ポリペプチドが反応する異なるエピトープの数を表す。多重特異性分子は、本明細書記載のターゲットポリペプチドの異なるエピトープに特異的であってもよく、またはターゲットポリペプチドおよび異種ポリペプチドもしくは固体支持材料のような異種エピトープに特異的であってもよい。

【 0 0 5 2 】

本明細書に使用される用語「価数」は、S D A B 分子中に存在する潜在的結合ドメイン、例えば抗原結合ドメインの数を表す。各結合ドメインは、特異的に一つのエピトープと

50

結合する。S D A B 分子が一つよりも多い結合ドメインを含む場合、各結合ドメインは、「二価単一特異性」と呼ばれる二つの結合ドメインを有する抗体については同一エピトープと特異的に結合しうるし、または「二価二重特異性」と呼ばれる二つの結合ドメインを有するS D A B 分子については異なるエピトープと特異的に結合しうる。S D A B 分子は、また、二重特異性であって、かつ各特異性について二価でありうる（「二重特異性四価分子」と呼ばれる）。二重特異性二価分子、およびそれらを製造する方法は、例えば米国特許第5,731,168号；同第5,807,706号；同第5,821,333号；ならびに米国特許出願公開第2003/020734号および同第2002/0155537号に記載されており、これらの全ての開示は、参照により本明細書に組み入れられる。二重特異性四価分子およびそれらを製造する方法は、例えば、国際公開公報第02/096948号および国際公開公報第00/44788号に記載されており、これら両者の開示は、参照により本明細書に組み入れられる。多重特異性分子および多価分子のさらなる例は、国際公開公報第93/17715号；国際公開公報第92/08802号；国際公開公報第91/00360号；国際公開公報第92/05793号；米国特許第4,474,893号；同第4,714,681号；同第4,925,648号；同第5,573,920号；および同第5,601,819号；Tutt et al, J. Immunol. 147:60-69 (1991)；ならびにKostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)に提供されている。

10

【0053】

ある態様では、S D A B 分子は、一つまたは複数のターゲット抗原に結合する、相補性可変ドメインまたは免疫グロブリン定常領域例えばFc領域を欠如している一つまたは複数の単一ドメイン分子を含む一本鎖融合ポリペプチドである。抗原結合ポリペプチドによって認識される例示的なターゲット抗原には、腫瘍壊死因子（TNF）が挙げられる。いくつかの態様では、抗原結合性単一ドメイン分子は、一つもしくは複数の血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン（HSA））またはトランスフェリンより選択される血清タンパク質、例えばヒト血清タンパク質に結合する。

20

【0054】

TNF

腫瘍壊死因子（TNF）は、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、および多発性硬化症などの炎症障害に関連することが当技術分野において公知である。TNF およびそのレセプター（CD120aおよびCD120b）の両方が非常に詳細に研究されてきた。生物活性型のTNF は三量体である。抗TNF 抗体を使用してTNF の作用と拮抗するいくつかの戦略が開発されており、Remicade（登録商標）およびHumira（登録商標）のように現在市販されている。TNF 結合性単一ドメイン抗原結合分子の多数の例が、国際公開公報第04/041862号、国際公開公報第04/041865号、および国際公開公報第06/122786号に開示されており、それら全ての内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0055】

単一ドメイン抗原結合分子の追加的な例は、US2006/286066、US2008/0260757、国際公開公報第06/003388号、US2005/0271663、およびUS2006/0106203に開示されており、その全ての内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。特定の態様では、本発明のS D A B 分子には、表1のアミノ酸配列を含むS D A B、または表1の配列と約80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。代替的な態様では、本発明のS D A B 分子は、表1の配列とアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個の差異を有するアミノ酸配列を含みうる。

40

【0056】

他の態様では、TNF および血清タンパク質、例えばHSAに対する単一特異性、二重特異性、三重特異性および他の多重特異性単一ドメイン抗体が考えられている。多重特異性TNF およびHSA結合性ポリペプチドの多数の例が、国際公開公報第06/12

50

2786号に開示されており、その内容は、参照により本明細書に組み入れられる。本発明の多重特異性ポリペプチドは、表1のアミノ酸配列、または表1の配列と約80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含みうる。代替的な態様では、本発明の多重特異性SDAB分子は、表1の配列と1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個のアミノ酸差異を有するアミノ酸配列を含みうる。

【0057】

具体的な態様では、TNF結合性SDAB分子は、国際公開公報第06/122786号に開示された一つまたは複数のSDABを含む。例えば、TNF結合性SDAB分子は、国際公開公報第06/122786号に開示された一価、二価、または三価TNF結合性ポリペプチドでありうる。

10

【0058】

国際公開公報第06/122786号に開示された例示的なTNF結合性SDABには、非限定的に、TNF1、TNF2、TNF3、およびそのヒト化型が挙げられる（例えばTNF29、TNF30、TNF31、TNF32、TNF33）。一価TNF結合性SDABの追加的な例は、国際公開公報第2006/122786号の表8に開示されている。例示的な二価TNF結合性SDAB分子には、非限定的に、2個のTNF30SDABがペプチドリinkerを介して連結して単一の融合ポリペプチドを形成したものを含むTNF55およびTNF56が挙げられる（国際公開公報第06/122786号に開示されている）。二価TNF結合性SDAB分子の追加的な例は、国際公開公報第06/122786号の表19にTNF4、TNF5、TNF6、TNF7、TNF8として開示されている）。

20

【0059】

特定の態様では、抗TNFSDABは、三つの相補性決定領域（CDR1、CDR2、およびCDR3）を含み、ここで：CDR1は、アミノ酸配列DYWMY（配列番号22）；DYWMY（配列番号22）と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列；またはDYWMY（配列番号22）とアミノ酸1個だけの差異を有するアミノ酸配列を含み；CDR2は、アミノ酸配列EINTNGLITKYPDSVKG（配列番号23）；EINTNGLITKYPDSVKG（配列番号23）と少なくとも80%、90%、もしくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；またはEINTNGLITKYPSVKG（配列番号23）とアミノ酸2もしくは1個の差異を有するアミノ酸配列を含み；CDR3は、アミノ酸配列SPSGFN（配列番号24）；SPSGFN（配列番号24）と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列；またはSPSGFN（配列番号24）とアミノ酸1個の差異を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0060】

いくつかの態様では、HSA結合性SDABは、表1のアミノ酸配列、または表1の配列と約80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。代替的な態様では、本発明の抗HSA SDABは、表1の配列とアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個の差異を有するアミノ酸配列を含みうる。

40

【0061】

他の態様では、HSA結合性SDAB分子は、国際公開公報第06/122786号に開示された一つまたは複数のSDABを含む。例えば、HSA結合性SDAB分子は、国際公開公報第06/122786号に開示された一価、二価、三価HSA結合性SDAB分子でありうる。他の態様では、HSA結合性SDAB分子は、HSAへの結合特異性の少なくとも一つを有する単一特異性または多重特異性分子でありうる。例示的なHSA結合性SDABには、非限定的に、国際公開公報第06/122786号に開示されたALB1およびそのヒト化型（例えば、ALB6、ALB7、ALB8、ALB9、ALB10）が挙げられる。

【0062】

50

特定の態様では、抗HSA S D A Bは、三つのCDR (C D R 1、C D R 2、およびC D R 3) を含み、ここで、C D R 1は、アミノ酸配列S F G M S (配列番号25) ; S F G M S (配列番号25) と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列; またはS F G M S (配列番号25) とアミノ酸1個だけの差異を有するアミノ酸配列を含み; C D R 2は、アミノ酸配列S I S G S G S D T L Y A D S V K G (配列番号26) ; S I S G S G S D T L Y A D S V K G (配列番号26) と少なくとも80%、90%、もしくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列; またはS I S G S G S D T L Y A D S V K G (配列番号26) とアミノ酸2もしくは1個の差異を有するアミノ酸配列を含み; C D R 3は、アミノ酸配列G G S L S R (配列番号27) ; G G S L S R (配列番号27) と少なくとも80%配列同一性を有するアミノ酸配列; またはG G S L S R (配列番号27) とアミノ酸1個の差異を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0063】

他の態様では、S D A B分子の二つ以上の単ドメイン分子は、連結基と共にまたは連結基なしに、遺伝的融合体またはポリペプチド融合体として融合される。連結基は、当業者に明らかな任意の連結基でありうる。例えば、連結基は、1~100原子長の生体適合性ポリマーでありうる。一態様では、連結基は、ポリグリシン、ポリセリン、ポリリシン、ポリグルタミン酸、ポリイソロイシン、もしくはポリアルギニン残基、またはその組み合わせを含むまたはそれから成る。例えば、ポリグリシンまたはポリセリンリンカーは、少なくとも5、7、8、9、10、12、15、20、30、35および40個のグリシンおよびセリン残基を含みうる。使用されうる例示的なリンカーには、G l y - S e r リピート、例えば、1、2、3、4、5、6、7回またはそれよりも多い繰り返しの(G l y) 4 - S e r (配列番号19) リピートが挙げられる。いくつかの態様では、リンカーは、以下の配列を有する: (G l y) 4 - S e r - (G l y) 3 - S e r (配列番号20) または((G l y) 4 - S e r) n (配列番号21) [式中、nは4、5、または6である]。いくつかの態様では、リンカーは、配列番号6 (G S 9) または配列番号7 (G S 3 0) を含む。

20

【0064】

例示的な一態様では、本発明のS D A B分子は、ターゲット抗原、例えばT N F に結合する二つのS D A Bドメイン(例えば、二つのラクダ科可変領域)と、血清タンパク質、例えばH S Aに結合する一つの単ドメイン抗体分子(例えば、ラクダ科可変領域)との1本鎖ポリペプチド融合体から構成されうる。

30

【0065】

本明細書において「オゾラリズムブ」と呼ばれるポリペプチドは、ヒト化三価二重特異性T N F 阻害性融合タンパク質である。この融合タンパク質は、ラクダ科動物由来であって、ヒト免疫グロブリンV Hドメインと高度の配列相同性および構造相同性を有する。そのポリペプチド1本鎖は、T N F に対する結合ドメイン二つおよびH S Aに対する結合ドメイン一つから構成され、アミノ酸9個のG - S リンカー二つがドメイン同士を結合している。オゾラリズムブの詳細な説明は、国際公開公報第06/122786号(ここではT N F 60と呼ばれる)に提供されており、その内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0066】

【表 1】

表 1

名称	配列 番号	配列
オゾラリズマブ (TNF60)	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS ggggsgggs EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS Ggggsgggs EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS

[illegible]

20

30

40

TNF1-GS30-TNF1 (TNF7)	14	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTA LYYCARSPPSGFNRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LKPEDTALYYCARSPPSGFNRGQGTQVTVSS
TNF2-GS30-TNF2 (TNF8)	15	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSEPSGYTYTIGWFRQAP GKREFVARIYWSSGLTYADSVKGRFTISRDLAKNTVDLLMNSLK PEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRFTFSEPSGYTYTIGWFRQAPGKREFVARIYWSSGLTYADSVKG RFTISRDLAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYN YWQGTQVTVSS
TNF3-GS30-TNF3 (TNF9)	16	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSASGRSLSNYYMGWFRQAPGKERE LLGNISWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKNTIYLQMNLKPEDTA VYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSASGRSLSN YYMGWFRQAPGKERELLGNIWRGYNIIYKDSVKGRFTISRDDAKN TIYLQMNLKPEDTAVYYCAASILPLSDDPGWNTYWGQGTQVTVSS
TNF30-GS30-TNF30-C (TNF55)	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRPEDTAVYYCARSPPSGFNRGQGTTLTVSC
TNF30-GS30-TNF30-gggC (TNF56)	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLE WVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTA VYYCARSPPSGFNRGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQ APGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRPEDTAVYYCARSPPSGFNRGQGTTLTVSSgggC
(Gly)4-Ser	19	(G)4-S
(Gly)4-Ser-(Gly)3-Ser	20	(G)4-S-(G)3-S
((Gly)4-Ser) _n	21	((G)4-S) _n [式中、 <i>n</i> は4, 5, または6である]
TNF CDR1	22	DYWMY
TNF CDR2	23	EINTNGLITKYPDSVKG
TNF CDR3	24	SPSGFN
HSA CDR1	25	SFGMS
HSA CDR2	26	SISGSGSDTLVADSVKG
HSA CDR3	27	GGSLSR

10

20

30

【0067】

S D A B 分子の調製

本発明の S D A B 分子は、リコンビナント化、C D R 移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、および/または *in vitro* 産生（例えば、ファージディスプレイによって選択）される一つまたは複数の単ドメイン分子（例えば S D A B）から構成されうる。抗体および S D A B 分子を発生させるための技法、ならびにそれらをリコンビナント改変するための技法は、当技術分野において公知であり、下に詳細に説明される。

【0068】

抗体を得るために、当業者に公知の多数の方法が利用可能である。例えば、モノクローナル抗体は、公知の方法によるハイブリドーマの発生により産生させることができる。次に、このように形成されたハイブリドーマは、酵素免疫吸着アッセイ（E L I S A）およ

40

50

び表面プラズモン共鳴 (BIACORE (商標)) 分析などの標準法を用いてスクリーニングされ、特定抗原と特異的に結合する S D A B を産生する一つまたは複数のハイブリドーマが同定される。任意の形態の特定抗原、例えばリコンビナント抗原、天然形態、その任意の変異体またはフラグメント、さらにはその抗原性ペプチドを免疫原として使用することができる。

【 0 0 6 9 】

抗体および S D A B 分子を作製する方法の一例には、タンパク質発現ライブラリー、例えばファージまたはリボソームディスプレイライブラリーをスクリーニングすることが挙げられる。ファージディスプレイは、例えば、米国特許第 5 , 2 2 3 , 4 0 9 号 ; Smith Science 228: 1315-1317(1985) ; 国際公開公報第 9 2 / 1 8 6 1 9 号 ; 国際公開公報第 9 1 / 1 7 2 7 1 号 ; 国際公開公報第 9 2 / 2 0 7 9 1 号 ; 国際公開公報第 9 2 / 1 5 6 7 9 号 ; 国際公開公報第 9 3 / 0 1 2 8 8 号 ; 国際公開公報第 9 2 / 0 1 0 4 7 号 ; 国際公開公報第 9 2 / 0 9 6 9 0 号 ; および国際公開公報第 9 0 / 0 2 8 0 9 号に記載されている。

【 0 0 7 0 】

ディスプレイライブラリーの使用に加えて、特定抗原は、非ヒト動物、例えばげっ歯類、例えばマウス、ハムスター、またはラットを免疫処置するために使用することができる。一態様では、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、マウス抗体産生を欠損するマウス系統を操作して、ヒト I g ロークラスの大フラグメントを有するようにすることが可能である。ハイブリドーマ技法を用いて、所望の特異性を有する遺伝子から得られた抗原特異性モノクローナル抗体を産生させ、選択することができる。例えば、XENOMOUSE (商標)、Green et al Nature Genetics 7:13-21 (1994)、US2 0030070185、国際公開公報第 9 6 / 3 4 0 9 6、および P C T 出願 PCT/US96/05928 を参照されたい。

【 0 0 7 1 】

別の態様では、S D A B 分子が非ヒト動物から得られ、次に改変、例えばヒト化、脱免疫化、および / またはキメラ化される。これらの S D A B 分子は、当技術分野において公知のリコンビナント D N A 技法を用いて産生させることができる。キメラ抗体および S D A B 分子を製造するための多様なアプローチが記載されている。例えば Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 81:6851(1985); Takeda et al, Nature 314:452(1985); 米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号および同第 4 , 8 1 6 , 3 9 7 号 ; 欧州特許公報 EP1714 96 および 0173494 ; ならびに英国特許 GB 2177096B を参照されたい。ヒト化 S D A B 分子も、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するが、内因性マウス免疫グロブリン遺伝子を発現する能力はないトランスジェニックマウスを使用して産生させることができる。Winter は、本明細書記載のヒト化 S D A B 分子を調製するために使用することができる例示的な C D R 移植法を記載している (米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号)。特定の S D A B 分子の C D R 全部を非ヒト C D R の少なくとも一部に置き換えることもでき、または C D R のいくつかだけを非ヒト C D R に置き換えることもできる。予め決定された抗原への S D A B 分子の結合に必要なとされる数の C D R を置き換えることだけが必要である。

【 0 0 7 2 】

ヒト化 S D A B 分子は、抗原結合に直接的には関与しない可変ドメインの配列を、ヒト可変ドメイン由来の同等配列に置き換えることによって発生させることができる。ヒト化抗体またはそのフラグメントを発生させるための例示的な方法は、Morrison Science 229 :1202-1207(1985); Oi et al. BioTechniques 4:214(1986); ならびに米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号 ; 同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号 ; 同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号 ; 同第 5 , 8 5 9 , 2 0 5 号 ; および同第 6 , 4 0 7 , 2 1 3 号によって提供される。

【 0 0 7 3 】

それらの方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも一つからの免疫グロブリン可変ドメインの全てまたは部分をコードする核酸配列を単離し、操作し、発現させることを含む。そのような核酸は、上記のような、予め決定されたターゲットに対する S D A B 分子を産生す

10

20

30

40

50

るハイブリドーマから、および他の起源から得ることができる。次に、ヒト化 S D A B 分子をコードするリコンビナント D N A を、適切な発現ベクター中にクローニングすることができる。

【 0 0 7 4 】

ある態様では、ヒト化 S D A B 分子は、保存的置換、コンセンサス配列の置換、生殖細胞系列の置換および / または復帰突然変異の導入によって最適化される。そのような変化された免疫グロブリン分子は、当技術分野において公知のいくつかの技法のいずれかによって製造することができ (例えば Teng et al, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 80:7308-7312(1983); Kozbor et al, Immunology Today 4:7279(1983); Olsson et al, Meth. Enzymol, 92:3-16(1982))、国際公開公報第 9 2 / 0 6 1 9 3 号または EP 0239400 の教示に従って製造してもよい。S D A B 分子をヒト化するための技法は、国際公開公報第 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号にも提供されている。

10

【 0 0 7 5 】

S D A B 分子は、また、ヒト T 細胞エпитープの特異的欠失、すなわち国際公開公報第 9 8 / 5 2 9 7 6 号および国際公開公報第 0 0 / 3 4 3 1 7 号に開示された方法による「脱免疫化」によって改変することができる。簡潔には、M H C クラス I I に結合するペプチドを求めて、S D A B 分子の重鎖可変ドメインを分析することができ ; これらのペプチドは、潜在的 T 細胞エпитープ (国際公開公報第 9 8 / 5 2 9 7 6 号および国際公開公報第 0 0 / 3 4 3 1 7 号に定義されている) に相当する。国際公開公報第 9 8 / 5 2 9 7 6 号および国際公開公報第 0 0 / 3 4 3 1 7 号に記載されているように、潜在的 T 細胞エピ
トープを検出するために、「ペプチドスレッディング」と呼ばれるコンピュータモデル化
アプローチを適用することができ、追加的に、V H および V L 配列中に存在するモチーフ
を求めて、ヒト M H C クラス I I 結合性ペプチドのデータベースを検索することができる
。これらのモチーフは、1 8 種の主要 M H C クラス I I D R アロタイプのいずれかに結
合することから、潜在的 T 細胞エピトープを構成する。検出された潜在的 T 細胞エピト
ープは、可変ドメイン中の少数のアミノ酸残基を置換することによって、または好ましくは
単一アミノ酸置換によって除去することができる。典型的には、保存的置換が行われる。

20

【 0 0 7 6 】

多くの場合、しかし排他的ではなく、ヒト生殖細胞系列抗体配列中の位置に共通のアミノ酸を使用することができる。例えば、ヒト生殖細胞系列配列は、Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798(1992); Cook et al., Immunol. Today 16(5):237-242(1995); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799-817(1992); および Tomlinson et al., EMBO J. 14:4628-4638(1995) に開示されている。V B A S E ディレクトリーは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の総合ディレクトリーを提供する (Tomlinson, LA. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK によって編集)。これらの配列は、ヒト配列の起源として、例えばフレームワーク領域および C D R のために使用することができる。ヒトフレームワークのコンセンサス領域も、例えば米国特許第 6 , 3 0 0 , 0 6 4 号に記載されているように使用することができる。S D A B 分子は、タンパク質を産生するように遺伝的に操作された生きた宿主細胞によって産生させることができる。タンパク質を産生するように細胞を遺伝的に操作する方法は、当技術分野において周知である。例えば、Ausubel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York) を参照されたい。そのような方法には、タンパク質をコードし、そのタンパク質の発現を可能にする核酸を、生きた宿主細胞中に導入することを含む。これらの宿主細胞は、培養で成長した細菌細胞、真菌細胞、または好ましくは動物細胞でありうる。細菌宿主細胞には、非限定的に、Escherichia coli 細胞が挙げられる。適切な E. coli 株の例には : H B 1 0 1、D H 5 a、G M 2 9 2 9、J M 1 0 9、K W 2 5 1、N M 5 3 8、N M 5 3 9、および外来 D N A を切断できない任意の E. coli 株が挙げられる。使用できる真菌宿主細胞には、非限定的に、Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris および Aspergillus 細胞が挙げられる。使用できる動物細胞系の少数の例は、C H O、V E R O、B H K、H e L a、C o s、M D C K、2 9 3、3 T 3、および W I 3 8 である。

30

40

50

新規動物細胞系は、当業者に周知の方法を用いて樹立できる（例えば、トランスフォーメーション、ウイルス感染、および/または選択により）。場合により、タンパク質は、ホスト細胞によって培地中に分泌させることができる。

【0077】

改変S D A B分子

本発明の製剤は、フレームワーク領域の一つ中の少なくとも一つのアミノ酸位置で天然ドメイン、例えばV Hドメインのアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有する少なくとも一つのS D A B分子を含有しうる。ヒト化S D A B分子などの、本発明のいくつかのS D A B分子のアミノ酸配列は、少なくとも一つのフレームワーク領域中の少なくとも一つのアミノ酸位置で天然ドメイン、例えば天然V H I - Iドメインのアミノ酸配列と異なりうることを了解されたい。

10

【0078】

本発明には、また、S D A B分子の誘導体の製剤が含まれる。そのような誘導体は、一般に、S D A B分子および/または本明細書開示のS D A B分子を形成する一つもしくは複数のアミノ酸残基の改変によって、特に化学的および/または生物学的（例えば酵素的）改変によって得ることができる。そのような改変の例、さらにはそのような方法で（すなわちタンパク質主鎖上または好ましくは側鎖上のいずれかで）改変できるS D A B分子配列内のアミノ酸残基の例、そのような改変を導入するために使用できる方法および技法、ならびにそのような改変の潜在的な使用および利点は、当業者に明らかであろう。

【0079】

20

例えば、そのような改変は、S D A B分子内またはS D A B分子上の一つまたは複数の官能基、残基または部分の、特にS D A B分子に一つまたは複数の所望の性質または官能性を付与する一つまたは複数の官能基、残基または部分の（例えば共有結合による、または任意の他の適切な方法での）導入を必要としうる。そのような官能基の例は、当業者に明らかであろう。

【0080】

例えば、そのような改変は、S D A B分子の半減期、溶解性および/もしくは吸収を増加させる、S D A B分子の免疫原性および/もしくは毒性を減少させる、S D A B分子の任意の望ましくない副作用を除去もしくは軽減する、および/またはS D A B分子に他の好都合な性質を付与および/もしくはS D A B分子の望まれない性質を減少させる一つまたは複数の官能基の（例えば共有結合による、または任意の他の適切な方法での）導入；あるいは前記の二つ以上の任意の組み合わせを含みうる。そのような官能基の例およびそれらを導入する技法の例は、当業者に明らかであり、一般に、本明細書上に引用された全般背景技術に指摘された全ての官能基および技法、ならびに薬学的タンパク質の改変のために、特に抗体または抗体フラグメント（S c F vおよび単ドメイン抗体を含む）の改変のためにそれ自体公知の官能基および技法（その参照は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)になされる）を含みうる。そのような官能基は、例えば本発明のS D A B分子に直接（例えば共有結合的に）、または場合によってはこれも当業者に明らかなように適切なリンカーもしくはスパーサーを介して連結してもよい。薬学的タンパク質の半減期を増加および/または免疫原性を減少させるために広く使用される一技法は、ポリエチレングリコール（P E G）などの適切な薬理学的に許容されうるポリマーまたはその誘導体（メトキシポリエチレングリコールもしくはm P E Gなど）の結合を含む。一般に、抗体および抗体フラグメント（非限定的に（単一）ドメイン抗体およびS c F vを含む）のために当技術分野において使用されるP E G化などの、任意の適切な形式のP E G化を使用することができ；例えば、Chapman, Nat. Biotechnol., 54:531-545 (2002); Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:453-456 (2003); Harris and Chess, Nat. Rev. Drug Discov., 2, (2003)；および国際公開公報第04/060965号が参照される。タンパク質のP E G化用の様々な試薬も、例えばNektar Therapeutics, USAから市販されている。

30

40

【0081】

50

好ましくは、部位特異的 P E G 化が、特にシステイン残基を介して使用される（例えば Yang et al., Protein Engineering 16(10):761-770 (2003) 参照）。例えば、このために、S D A B 分子中に自然に存在するシステイン残基に P E G を結合させてもよく、P E G の結合のための一つもしくは複数のシステイン残基を適切に導入するように S D A B 分子を改変してもよく、または P E G の結合のための一つもしくは複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列を、本発明の S D A B の N および / もしくは C 末端に融合させてもよい（これら全ては、当業者に本質的に公知のタンパク質工学の技法を用いる）。

【 0 0 8 2 】

好ましくは、S D A B 分子について、5 0 0 0 よりも大きい、例えば 1 0 , 0 0 0 よりも大きく 2 0 0 , 0 0 0 未満、例えば 1 0 0 , 0 0 0 未満；例えば 2 0 , 0 0 0 ~ 8 0 , 0 0 0 の範囲の分子量を有する P E G が使用される。

【 0 0 8 3 】

P E G 化に関して、全般に、本発明は、好ましくは該 P E G 化が、(1) in vivo 半減期を増加させる；(2) 免疫原性を減少させる；(3) P E G 化のために本質的に公知の一つもしくは複数のさらなる有益な性質を提供する；(4) S D A B 分子の親和性に本質的には影響しない（例えば、下記実施例に記載されたアッセイなどの適切なアッセイによって決定されるとき、該親和性を 9 0 % よりも大きく、好ましくは 5 0 % よりも大きく、1 0 % よりも大きく減少させない）；および / または (4) S D A B 分子の他の所望の性質のどれにも影響しない方法で、一つまたは複数のアミノ酸位置で P E G 化された任意の S D A B 分子も包含することに留意されたい。適切な P E G 基およびそれらを特異的にまたは非特異的に結合させるための方法は、当業者に明らかであろう。

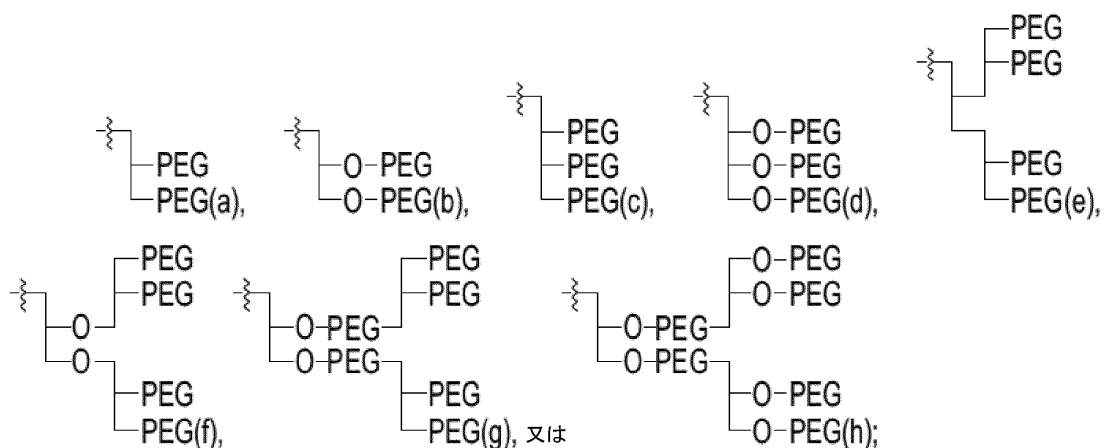
【 0 0 8 4 】

P E G 化 S D A B は、例えば、2 0 1 1 年 7 月 1 6 日に出願された、参照により本明細書に組み入れられる米国特許仮出願第 6 1 / 2 6 5 , 3 0 7 号に開示されている。

【 0 0 8 5 】

いくつかの態様では、P E G 化 S D A B は、P E G ポリマーに連結した改変 S D A B 分子を含み、ここで、P E G ポリマー分子は、式 (a) ~ (h) :

【 化 1 】



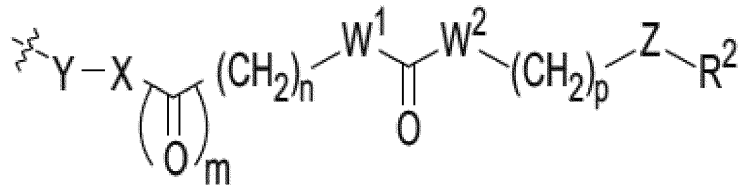
から成る群より選択される分岐 P E G ポリマー分子である。

【 0 0 8 6 】

いくつかの態様では、P E G 化 S D A B は :

- (i) 一つまたは複数のターゲットに結合する一つまたは複数の単一抗原結合ドメイン；
 - (i i) 非ペプチド性リンカー；および
 - (i i i) 一つまたは複数のポリマー分子
- を含み、ここで、非ペプチド性リンカーは、式 (I) :

【化 2】



[式中、

W 1 および W 2 は、それぞれ独立して、結合または N R 1 より選択され；

10

Y は、結合、R a で 0 ~ 2 回置換された C 1 - 4 アルキレン、またはピロリジン - 2 , 5 - ジオンであり；

X は、O、結合、または不在であり；

Z は、O、N R 3、S または結合であり；

R 1 および R 3 は、それぞれ独立して水素または C 1 - 6 アルキルであり；

R 2 は、不在または一つもしくは複数のポリマー部分であり；

R a は、ヒドロキシル、C 1 - 4 アルキルまたは C 1 - 4 アルコキシより選択され；

m は、0 または 1 であり；

n は、0、1、2 または 3 であり；

p は、0、1、2、3 または 4 である]

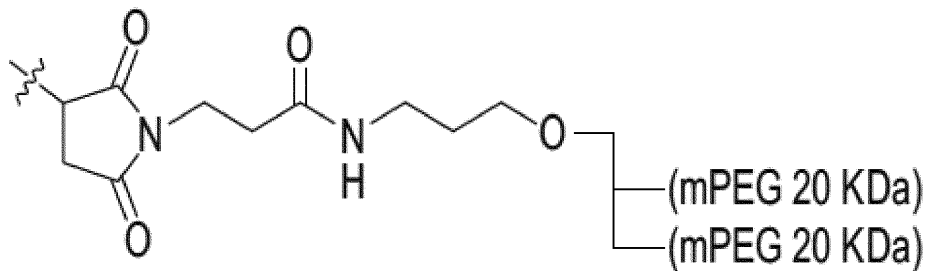
20

で示される部分である。

【 0 0 8 7 】

追加的な態様では、P E G 化 S D A B は、次式：

【化 3】



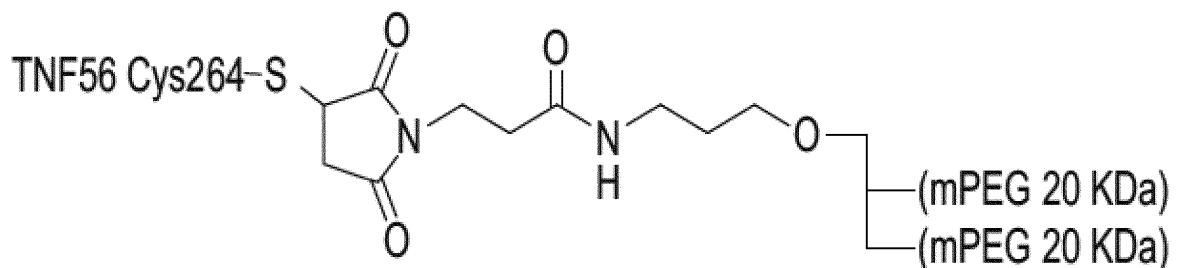
30

により表されるリンカーを介して P E G に連結している。

【 0 0 8 8 】

特定の態様では、改変 S D A B 分子は、以下：

【化 4】



40

の構造を含む。

【 0 0 8 9 】

別の、通常はあまり好ましくない改変は、S D A B 分子を発現させるために使用されるホスト細胞に応じて、通常は共翻訳修飾および / または翻訳後修飾の部分として、N また

50

はO - 結合型グリコシル化を含む。

【0090】

S D A Bを製造する方法

S D A B分子は、タンパク質を産生するように遺伝的に操作された、生きた宿主細胞によって産生することができる。タンパク質を産生するために細胞を遺伝的に操作する方法は、当技術分野において周知である。例えば Ausubel et al., eds. (1990)、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York)を参照されたい。そのような方法には、タンパク質をコードし、その発現を可能にする核酸を、生きた宿主細胞中に導入することを含む。これらの宿主細胞は、培養して成長した細菌細胞、真菌細胞、または動物細胞でありうる。細菌宿主細胞には、非限定的に*Escherichia coli*細胞が挙げられる。適切な*E. coli*株の例には：H B 1 0 1、D H 5 a、G M 2 9 2 9、J M 1 0 9、K W 2 5 1、N M 5 3 8、N M 5 3 9、および外来DNAを切断できない任意の*E. coli*株が挙げられる。使用できる真菌宿主には、非限定的に、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*および*Aspergillus*細胞が挙げられる。使用できる動物細胞系の少数の例は、C H O、V E R O、B H K、H e L a、C o s、M D C K、2 9 3、3 T 3、およびW I 3 8である。新しい動物細胞系は、当業者に周知の方法を用いて樹立することができる（例えば、トランスフォーメーション、ウイルス感染、および/または選択によって）。場合によっては、タンパク質は、宿主細胞によって培地中に分泌させることができる。

10

【0091】

いくつかの態様では、S D A B分子は、細菌細胞、例えば*E. coli*細胞から産生させることができる。例えば、S D A Bがディスプレイ実体とバクテリオファージタンパク質（またはそのフラグメント）との間に抑制可能な終止コドンを含むファージディスプレイベクター中の配列によってコードされる場合、ベクターの核酸を、終止コドンを抑制できない細菌細胞に転移することができる。この場合、S D A Bは、遺伝子I I Iタンパク質に融合されず、ペリプラズムおよび/または培地中に分泌される。

20

【0092】

S D A B分子は、また、真核細胞で産生させることができる。一態様では、S D A B分子は、*Pichia*（例えばPowers et al. J Immunol Methods 251:123-35 (2001)参照）、*Hansenula*、または*Saccharomyces*などの酵母細胞で発現される。

【0093】

一態様では、S D A B分子は、哺乳動物細胞で産生される。クローン抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させるための典型的な哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（C H O細胞）（D H F R選択マーカーと共に使用された、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220(1980)に記載のd h f r - C H O細胞を含む。例えばKaufman and Sharp, Mol. Biol. 159:601-621 (1982)に記載）、リンパ球細胞系、例えば、N S 0 骨髓腫細胞およびS P 2細胞、C O S細胞、ならびにトランスジェニック動物由来、例えばトランスジェニック哺乳動物由来の細胞が挙げられる。例えば、細胞は、乳腺上皮細胞である。

30

【0094】

S D A B分子をコードする核酸配列に加えて、リコンビナント発現ベクターは、宿主細胞でのベクターの複製をレギュレーションする配列（例えば複製起点）および選択マーカー遺伝子などの追加的な配列を保持しうる。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号；第4,634,665号；および第5,179,017号参照）。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G 4 1 8、ヒグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。

40

【0095】

S D A B分子のリコンビナント発現のための例示的なシステムでは、単一ドメイン抗体鎖をコードするリコンビナント発現ベクターが、リン酸カルシウム介在性トランスフェクションによってd h f r - C H O細胞に導入される。リコンビナント発現ベクター内

50

で、抗体遺伝子は、（例えば、CMVエンハンサー/A d M L Pプロモーター調節エレメントまたはSV40エンハンサー/A d M L Pプロモーター調節エレメントのようなSV40、CMV、アデノウイルスなどから得られる）エンハンサー/プロモーター調節エレメントに作動的に連結されて高レベルの遺伝子転写を推進する。リコンビナント発現ベクターは、また、ベクターをトランスフェクションされたCHO細胞の選択を、メトトレキサート選択/増幅を用いて可能にするDHFR遺伝子を保持する。選択されたトランスフォーマント宿主細胞を培養して、抗体鎖の発現を可能にすることができ、インタクトな単ドメインが、培地から回収される。標準的な分子生物学的技法を用いて、リコンビナント発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクションし、トランスフォーマントについて選択し、宿主細胞を培養し、培養液から抗体分子を回収することができる。例えば、いくつかのSDAB分子をアフィニティークロマトグラフィーによって単離することができる。

10

【0096】

一態様では、SDAB分子は、国際公開公報第10/056550号に記載されたように精製される。例示的な一態様では、SDABは、SDABと混入物（一つまたは複数）との混合物をプロテインAベースの支持体および/またはイオン交換支持体と、SDABをその支持体に結合または吸着させる条件で接触させること；SDABが支持体に結合し続ける条件で、結合された支持体を洗浄することによって一つまたは複数の混入物を除去すること、ならびに吸着したSDAB分子を溶離緩衝液で溶離することによってSDABを支持体から選択的に溶離することによって、一つまたは複数の混入物から精製される。

20

【0097】

SDAB分子は、また、トランスジェニック動物によって産生させることができる。例えば、米国特許第5,849,992号は、トランスジェニック哺乳動物の乳腺中に抗体を発現させる方法を記載している。乳汁特異的プロモーターならびに抗体分子および分泌用シグナル配列をコードする核酸を含む導入遺伝子が構築される。そのようなトランスジェニック哺乳動物の雌によって産生される乳汁は、その中に分泌された関心対象の単ドメインを含む。抗体分子は、乳汁から精製することができ、またはいくつかの適用では直接使用することができる。

【0098】

製剤

30

本発明のSDABは、薬学的に許容されうる任意の製剤に製剤化することができる。製剤は、液体または乾燥している場合がある。製剤は、混合、乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、または薬学的組成物を製剤化するための任意の公知の方法により発生させることができる。

【0099】

薬学的製剤は、溶液、マイクロエマルション、分散物、リポソーム、または高いタンパク質濃度に適した他の秩序構造として製剤化することができる。無菌注射液は、本明細書記載の製剤を必要量で、必要に応じて上に列挙された成分の一つまたは組み合わせと共に適切な溶媒中に混合し、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散物は、本明細書記載の製剤を、基本分散媒および下記に列挙される成分からの他の必要成分を含有する無菌ビヒクル中に混合することによって調製される。溶液の適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合は必要とされる粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

40

【0100】

注射用組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる製剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含ませることによってもたらしすることができる。

【0101】

SDAB分子の製剤は、SDAB分子、凍結保護剤として作用できる化合物、および緩衝剤を含む。製剤のpHは、一般にpH5.5~7.0、好ましくは約pH6である。いくつかの態様では、製剤は液体として保存される。他の態様では、製剤は液体として調製

50

され、次に例えば凍結乾燥または噴霧乾燥によって乾燥され、その後保存される。乾燥された製剤は、乾燥化合物、例えばエアロゾルもしくは粉末として使用することができ、または例えば水、緩衝液、もしくは他の適切な液体を用いてその本来の濃度もしくは別の濃度に再構成することができる。

【0102】

S D A B 分子の精製プロセスは、凍結した液体としての長期保存およびその後の凍結乾燥に適した製剤への S D A B 分子の移行を許すように計画される（例えば、ヒスチジン / スクロース製剤を使用）。製剤は、特定濃度のタンパク質と共に凍結乾燥される。次に、凍結乾燥された製剤を、必要に応じて適切な希釈剤（例えば水）で再構成して、本来の製剤成分を所望の濃度に、一般に凍結乾燥前の濃度以上の濃度に再溶解することができる。

10

【0103】

凍結乾燥製剤を再構成して、本来凍結乾燥された液体の体積に対する、凍結乾燥物に添加される水または希釈剤の量に応じて、本来（すなわち凍結乾燥前）の濃度と異なる濃度を有する製剤を生産することができる。適切な製剤は、抗体の完全性の一つまたは複数のパラメーターをアッセイすることによって同定することができる。

【0104】

本発明の S D A B は、国際公開公報第 10 / 077422 号に記載されるように製剤化することができる。本発明の S D A B は、以下の例示的なプロセスによって製剤化することができる：S D A B、凍結保護剤、界面活性剤、および緩衝剤の混合物を凍結乾燥すること；ならびに凍結乾燥された混合物を希釈剤中で再構成することによって製剤を調製すること。特定の態様では、本発明の S D A B は、以下のプロセスによって製剤化される：細胞培養で S D A B を発現させること；クロマトグラフィー精製ステップおよび / または限外濾過 / ダイアフィルトレーションステップにより S D A B を精製すること；スクロースを濃度約 5 ~ 10 % で、ポリソルベート 80 を濃度約 0.01 ~ 0.02 % で、製剤の pH が約 5 ~ 7.5 になるようなヒスチジン緩衝液を濃度約 10 ~ 20 mM またはトリス緩衝液を濃度約 20 mM で含有する製剤中の S D A B 濃度を約 10 ~ 250 mg/ml に調整すること。

20

【0105】

処置方法

T N F 関連障害、例えば炎症障害または自己免疫障害を治療または予防（例えばそれに関連する一つもしくは複数の症状を軽減もしくは改善）するために、S D A B 分子を、単独で、または第 2 の薬剤、例えば第 2 の治療活性薬剤もしくは薬理学的活性薬剤と組み合わせ、対象（例えばヒト対象）に投与することができる。

30

【0106】

二つの抗腫瘍壊死因子（T N F）S D A B および抗ヒト血清アルブミン（H S A）S D A B を含むポリペプチドなどの本発明の S D A B 分子は、単独でまたは本明細書記載の第 2 の薬剤と組み合わせ、免疫障害の治療または予防を必要とするヒトにその治療または予防のために使用することができる。

【0107】

用語「処置」は、統計的に有意な程度または当業者に検出可能な程度のいずれかに、障害に関連する状態、症状、もしくはパラメーターを改善するために、または障害の進行を予防するために有効な量、方式、および / または様式で治療薬を投与することを表す。治療的使用の場合、処置は、対象での障害もしくは状態を改善、治癒、維持しうる、または障害もしくは状態の持続期間を短縮しうる。治療的使用では、対象は、症状の部分的または完全な顕在化を有しうる。典型的な場合には、処置は、対象の障害もしくは状態を、医師によって検出されうる程度まで改善するか、または障害もしくは状態の悪化を予防する。有効量、やり方、または様式は、対象に応じて変動することがあり、対象に合わせることもできる。

40

【0108】

本明細書に使用される用語「対象」および「患者」は、互換的に使用される。本明細書

50

に使用される用語「（一つまたは複数の）対象」は、動物、例えば、非霊長類を含めた哺乳動物（例えばウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、ラクダ、ネコ、イヌ、モルモット、ラット、マウス、ヒツジ）および霊長類（例えばカニクイザル、ゴリラ、チンパンジーなどのサルおよびヒト）を表す。

【0109】

処置されうる免疫障害の非限定的な例には、非限定的に、自己免疫障害、例えば関節炎（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎、ループス関連関節炎または強直性脊椎炎を含む）、強皮症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、脈管炎、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を含む）、重症筋無力症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、大腸炎、糖尿病（I型）；例えば皮膚の炎症状態（例えば、乾癬）；急性炎症状態（例えば、内毒血症、セプシスおよび敗血症、毒素性ショック症候群および感染症）；移植片拒絶およびアレルギーが挙げられる。一態様では、TNF 関連障害は、関節炎性障害、例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ（RA）（例えば、中等症～重症関節リウマチ）、骨関節炎、乾癬性関節炎、もしくは強直性脊椎炎、多関節型若年性特発性関節炎（JIA）の一つもしくは複数より選択される障害；または乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、および／もしくは多発性硬化症である。

【0110】

ある態様では、SDAB分子（または製剤）は、第2の治療剤と組み合わせて投与される、または投与のために使用される。例えば、TNF-SDABについて、第2の薬剤は抗TNF抗体またはそのTNF結合性フラグメントの場合があり、ここで、第2のTNF抗体は、製剤のTNF結合性SDAB分子と異なるエピトープ特異性を有する。TNF結合性SDABと共に製剤化できる薬剤の他の非限定的な例には、例えば、サイトカイン阻害剤、成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞毒、および細胞分裂阻害剤が挙げられる。一態様では、追加的な薬剤は、非限定的に非ステロイド系抗炎症剤（NSAID）；コルチコステロイド、例えばプレドニゾロン、プレドニゾン、コルチゾン、およびトリアムシノロンなど；ならびに疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）、例えばメトトレキサート、ヒドロキシクロロキン（Plaquenil）およびスルファサラジン、レフルノミド（Arava（登録商標））などを含めた関節炎のための標準処置、エタネルセプト（Enbrel（登録商標））、インフリキシマブ（Remicade（登録商標））（メトトレキサートを併用または併用せず）、およびアダリムマブ（Humira（登録商標））、抗CD20抗体（例えばRituxan（登録商標））、可溶性インターロイキン-1レセプター、例えばアナキンラ（Kineret）など、金、ミノサイクリン（Minocin（登録商標））、ペニシラミン、ならびに細胞毒、例えばアザチオプリン、シクロホスファミド、およびシクロスポリンなどを含めた腫瘍壊死因子阻害剤である。そのような組み合わせ療法は、投与される治療剤のより低い用量を有利に利用することで、様々な単剤療法に関連する、起こりうる毒性または合併症を避けることができる。

【0111】

追加的な薬剤がメトトレキサートである場合、メトトレキサートの用量は、1週間に約7.5～約25mgの範囲でありうる。

【0112】

SDAB分子は、液体溶液（例えば、注射液および注入液）の形態で投与するまたは投与のために使用することができる。そのような組成物は、非経口様式（例えば、皮下、腹腔内、もしくは筋肉内注射）、または吸入によって投与することができる。本明細書に使用される語句「非経口投与」および「非経口的に投与される」は、経腸投与および局所投与以外の、通常は注射による投与様式を意味し、それには、皮下または筋肉内投与、さらには静脈内、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、表皮下、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が挙げられる。一態様では、本明細書記載の製剤は、皮下投与される。

【0113】

本発明者らは、オゾラリズマブとTNF との二重特異性相互作用部位が特に免疫障害の処置に有用であるという仮説を立てた。従って、本発明は、免疫障害の処置を必要とするヒトにおいてそれを処置する方法であって、配列番号1（オゾラリズマブ）で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと競合するポリペプチドをそのヒトに投与することを含む方法に関する。

【0114】

投与計画

オゾラリズマブは、投薬間隔が少なくとも4週間で皮下投与された場合、関節リウマチの処置に効力を示した。対照的に、Humira（登録商標）に推奨される投薬は、2週間毎の投与であり、Remicade（登録商標）は、静脈投与しなければならない。従って、本発明の投与計画は、最新技術に勝る利点を提供する。

10

【0115】

本発明のSDAB分子は、30mgおよび80mg用量で4週間毎の投与で疾患の処置に効力を示した。これらの効力の結果に基づくモデル化から、より高い用量（例えば120～200mgまたは200～400mg）で、本発明のSDAB分子が6もしくは8週間または2ヶ月毎に投与された場合に疾患の処置に有効であることが示された。この有利なプロファイルの結果は、注射負担の減少を招く。

【0116】

加えて、モデル化から、オゾラリズマブ処置の重症感染症（SI）がエタネルセプトおよびインフリキシマブよりも低かったことも示された。特に、従来技術の抗TNF 阻害剤に比べて、本発明のSDAB分子は、非常に好都合な利益（効力）危険（SI作用）率を示す。

20

【0117】

従って、本発明のSDAB分子は、30～200mgの範囲の用量で4、6、または8週間毎に投与することができる。特に有効な用量は30～400mgである。特定の態様では、用量は、SDAB分子約5、10、15、20、25、30、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、320、350、375または400mgを含む。

【0118】

1回量約30～200mgまたは30～400mgであっても、およそ毎日、隔日、1週間に2回、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間毎、または1もしくは2ヶ月毎に投与することができる。

30

【0119】

特定の態様では、用量約30、80、120、160、200、240、280、320、360または400mgの、配列番号1（オゾラリズマブ）で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドは、およそ4、6、もしくは8週間または2ヶ月毎にヒト対象に投与される。いくつかの態様では、対象は、関節リウマチを患う。

【0120】

追加的な態様では、SDAB分子の用量は、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395または400mgである。

40

【0121】

いくつかの態様では、用量は、約3、6、10、8、36、72、144、または288mgである。

50

【 0 1 2 2 】

特定の態様では、S D A B 分子は P E G 化されており、用量は、約 3 . 6、1 0 . 8、3 6、7 2、1 4 4、または 2 8 8 mg である。

【 0 1 2 3 】

若年患者への投与のために、用量は、患者の体重に合わせるべきである。特定の態様では、用量は、約 0 . 1、0 . 3 8、1、2、3、3 . 5、4、4 . 5 または 5 mg/kg である。

【 0 1 2 4 】

対象を、メトトレキサートで同時処置してもよい。いくつかの態様では、対象は、オゾラリズマブの初回投薬前に、メトトレキサートを少なくとも約 6 または 1 2 週間投与されている場合がある。メトトレキサートは、任意の適切な経路によって投与することができ、用量は、1 週間に約 7 . 5 ~ 2 5 mg の範囲でありうる。

10

【 0 1 2 5 】

効力を決定する方法

任意の特定の S D A B 分子の効力または投与計画は、当業者に利用可能な方法によって決定することができる。簡潔には、臨床試験時に、医療関係者が患者を観察することができ、病状は基準の任意の組み合わせによって判断される。患者の病状の改善は、多数の時点でこれらの基準に基づき決定され、処置の効力を評価するために患者集団に関してこれらの決定の組み合わせがプロットされる。

【 0 1 2 6 】

例示的な態様では、関節リウマチについての疾患進行は、表 2 に示される任意または全ての基準によって測定することができる。

20

【 0 1 2 7 】

【表 2】

表 2

RA 分類のための ACR 基準	Arnett et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.1988;31:315-241. Hochberg et al., American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1992;35:498-502.
RA における改善の ACR 予備定義(ACR20, 50, 70)	Felson, et al., American College of Rheumatology preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1995; 38:727-735
関節評価—28 ヶ所の関節	Starz et al., J Musculoskeletal Med 28(3):1-7
NY 心臓協会(NYHA) の心機能分類	The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 9th ed. Boston, Mass: Little, Brown & Co; 1994:253-256.
朝のこわばりの持続時間	Khan et al., J Rheum 36(11):2435-42 (2009)
健康評価質問票を用いた機能障害指数 (HAQ-DI)	Bruce & Fries, Health Qual Life Outcomes 1:20 (2003)
SF-36	http://www.sf-36.org/demos/SF-36.html QualityMetric Incorporated
医師および患者の包括的評価	Reid & Miller, Clinical Trials in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis, Springer, 2008
一般健康視覚的アナログ尺度	Massy-Westropp et al, J Hand Ther 18(1):30-33 (2005)
疾患活動性スコア 28 (DAS 28)	Van der Heijde et al., J. Rheumatol 1993; 20: 579-81 Van Gestel et al., Arthritis Rheum 1998; 41:1845-1850 Prevoo et al., Arthritis Rheum 1995; 38:44-8. Aletaha et al., Arthritis Res 2005; 7:R796-R806. The DAS-CRP. UMC Sint Radbound Nijmegen DAS website. Available at http://www.das-score.nl . (last date accessed 30 Apr 200
EULAR 反応基準	van Gestel et al., Arthritis Rheum. 1998; 41(10):1845-1850.
疼痛視覚的アナログ尺度	Callahan et al., Arthritis Rheum 30(6):630-36 (1987)

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

実施例

実施例 1

関節リウマチ (R A) 患者でのシームレス第 1 / 2 相無作為化層別化二重盲検プラセボ対照試験をオゾラリズマブで行った。試験に対して無作為化された対象は合計 2 5 4 人であり、そのうち対象 1 人は処置せず、残りの対象 2 5 3 人を改変包括解析 (modified intent-to-treat) (m I T T) 集団および安全性の解析対象集団 (safety population) に組み込んだ。各対象を、 T N F 阻害剤 (T N F i) 未処置または T N F i 事前使用に基づき層別化された一つだけの処置群に無作為に割り付けた。処置群は表 3 記載の合計 6 群であり、各群に患者 4 0 ~ 4 5 人を無作為化した。

50

【 0 1 2 9 】

【表 3】

表 3

群	処置
1	4 週間毎に 10 mg (合計 4 回)
2	8 週間毎に 10 mg (途中の 4 週間目の来院時にプラセボを与える) (合計 2 回)
3	4 週間毎に 30 mg (合計 4 回)
4	4 週間毎に 80 mg (合計 4 回)
5	8 週間毎に 80 mg (途中の 4 週間目の来院時にプラセボを与える) (合計 2 回)
6	4 週間毎にプラセボ (合計 4 回)

10

【 0 1 3 0 】

これら 6 群におけるベースライン特性は、一般に類似しており；群間で D A S 2 8 にわずかであるが統計的に有意な差 ($p = 0.048$) が観察され、80 mg Q 4 群で D A S 2 8 の平均が最高 (6.59) であった。対象の年齢は、18 ~ 79 歳 (平均 52.1 歳) であり、大部分の対象 (80.2%) は、女性であった (R A 患者での臨床試験に予想される通り)。疾患持続期間の全体平均は 8.3 年であり、対象の 28.9% は T N F i の事前処置を受けていた。

【 0 1 3 1 】

効力分析のための一次集団は、オゾラリズマブを少なくとも 1 回投与された全ての無作為化対象として定義される m I T T 集団であった。全ての患者を、1 週間に用量 7.5 ~ 25 mg のメトトレキサートで同時処置した。

20

【 0 1 3 2 】

各対象は、表示の時点で 1 回量レベルのオゾラリズマブまたはプラセボの皮下 (S C) 注射を受けた。

【 0 1 3 3 】

関心対象の一次比較は、プラセボに対する各 A T N - 1 0 3 処置群の比較である。

【 0 1 3 4 】

表 4 に、16 週間目の米国リウマチ学会 2 0 (A C R 2 0) 反応率を示す。

【 0 1 3 5 】

30

【表 4】

表 4

処置	N	n(%)	P 値	プラセボ調整後の差 およびその信頼区間 (30% パーセンタイル, 80% パーセンタイル)	
				プラセボに比べた オゾラリズマブ	全体 (オゾラリズマブ - プラセボ)
プラセボ	45	19 (42.2)	0.120		
10 mg Q4	42	22 (52.4)	0.130		10.2 (9.3, 24.7)
10 mg Q8	41	20 (48.8)	0.390		6.6 (3.6, 19.6)
30 mg Q4	40	24 (60.0)	0.122		17.8 (9.4, 25.0)
80 mg Q4	43	31 (72.1)	0.006		29.9 (23.5, 38.7)
10 mg Q4	42	25 (59.5)	0.101		17.3 (12.2, 27.9)

40

【 0 1 3 6 】

層別化された (T N F i 未処置または T N F i 事前使用) Cochran-Mantel-Haenszel 検定に基づき P 値を得た。プラセボ調整後の差について層別化された (T N F i 未処置または T N F i 事前使用) 信頼区間を計算するために、Mehrotra および Railkar によって提唱された最小危険 (M R) 重みづけ法を使用する。A C R 2 0 反応が得られる前に、A C R

50

要素の任意の欠落データを推定するために最終評価スコア外挿 (last observation carried forward) (LOCF) アプローチを使用した。

【 0 1 3 7 】

図 1 に、8 週間目および 16 週間目に ACR20、ACR50、および ACR70 基準を満たしている対象のパーセンテージを示す。投与計画のいくつかは、以下の終点においてプラセボよりも利点を有した：ACR20 (図 1 および 2)、ACR50 (図 1)、DAS28 (図 3)、ACR-N、TJC、SJC、疼痛 VAS、HAQ-DI、CRP、医師の包括的評価、患者の包括的評価、一般健康 VAS、および EULAR 反応 (データは示さず)。

【 0 1 3 8 】

簡潔には図 1 に示すように、8 週目に 10mg Q8 について対象の 36.6% が ACR20 を満たし、対象の 9.8% が ACR50 を満たし、対象の 0% が ACR70 を満たし；10mg Q4 について対象の 45.2% が ACR20 を満たし、対象の 11.9% が ACR50 を満たし、対象の 7.1% が ACR70 を満たし；30mg Q4 について対象の 50% が ACR20 を満たし、対象の 32.5% が ACR50 を満たし、対象の 15% が ACR70 を満たし；80mg Q8 について対象の 54.8% が ACR20 を満たし、対象の 23.8% が ACR50 を満たし、対象の 4.8% が ACR70 を満たし；80mg Q4 について対象の 65.1% が ACR20 を満たし、対象の 25.6% が ACR50 を満たし、対象の 2.3% が ACR70 を満たした。16 週目に、10mg Q8 について対象の 48.8% が ACR20 を満たし、対象の 24.4% が ACR50 を満たし、対象の 8.9% が ACR70 を満たし；10mg Q4 について対象の 52.4% が ACR20 を満たし、対象の 21.4% が ACR50 を満たし、対象の 4.8% が ACR70 を満たし；30mg Q4 について対象の 60% が ACR20 を満たし、対象の 32.5% が ACR50 を満たし、対象の 20% が ACR70 を満たし；80mg Q8 について対象の 59.5% が ACR20 を満たし、対象の 31% が ACR50 を満たし、対象の 19% が ACR70 を満たし；80mg Q4 について対象の 72.1% が ACR20 を満たし、対象の 37.2% が ACR50 を満たし、対象の 11.6% が ACR70 を満たした。

【 0 1 3 9 】

図 3 に示すように、4 週間目に、DAS28 基準について観察されたベースライン (プラセボ) からの平均変化は、10mg Q4 について 1.39%、10mg Q8 について 1.05%、30mg Q4 について 1.62%、80mg Q4 について 1.63%、80mg Q8 について 1.67% であった。8 週間目に、DAS28 基準について観察されたベースラインからの平均変化は、10mg Q4 について 1.59%、10mg Q8 について 1.01%、30mg Q4 について 1.78%、80mg Q4 について 2.00%、80mg Q8 について 1.85% であった。12 週間目に、DAS28 基準について観察されたベースラインからの平均変化は、10mg Q4 について 1.61%、10mg Q8 について 1.72%、30mg Q4 について 2.31%、80mg Q4 について 2.30%、80mg Q8 について 2.20% であった。16 週間目に、DAS28 基準について観察されたベースラインからの平均変化は、10mg Q4 について 1.60%、10mg Q8 について 1.70%、30mg Q4 について 2.09%、80mg Q4 について 2.46%、80mg Q8 について 1.93% であった。20 週間目に、DAS28 基準について観察されたベースラインからの平均変化は、10mg Q4 について 1.02%、10mg Q8 について 1.03%、30mg Q4 について 1.62%、80mg Q4 について 2.00%、80mg Q8 について 1.36% であった。

【 0 1 4 0 】

全体的に、オゾラリズマブの安全性プロファイルは、他の TNF 阻害剤 (TNFi) の安全性プロファイルに匹敵するよう見える。報告された SAE も他の抗 TNF 剤の安全性プロファイルと一致した (データは示さず)。

【 0 1 4 1 】

実施例 2：関節リウマチにおける市販の抗 TNF 剤 5 種に比べた Nanobody (登録商標) A

10

20

30

40

50

T N - 1 0 3 の比較有効性

2 . 1 目的 :

新規な腫瘍壊死因子阻害剤 (T N F i) であるオゾラリズマブ (A T N - 1 0 3) は、ヒト血清アルブミン結合ドメインに連結した 2 個のヒト T N F 結合ドメインを含有するヒト化三価二重特異性 Nanobody である。効力 (A C R 2 0 / 5 0 / 7 0 、 D A S 、 H A Q) および安全性 / 忍容性 (重症感染症率、% S I) に関して市販の腫瘍壊死因子 遮断 (抗 T N F) 薬 5 種に比べた様々な用量 / 投与計画の A T N - 1 0 3 の比較有効性を判断するために、および説明共変数の作用を評価するために、モデルに基づくメタ解析 (M B M A) を行った。

【 0 1 4 2 】

10

2 . 2 方法 :

モデルに基づく効力および安全性の比較解析は、5 種の対照薬 (インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト、セルトリズマブペゴルおよびゴリムマブ) にわたり、試験群 (study-arm) レベルで要約された公開データおよび施設内第 I I a 相データを用いて行った。

【 0 1 4 3 】

特に、A C R 2 0 / 5 0 / 7 0 データセットは、合計 6 3 群の臨床試験 2 0 試験に参加している対象 7 , 4 7 4 人からのデータを含んでいた。D A S を、臨床試験 8 試験の 2 1 群から観察した。重症感染症率のデータセットは、合計 4 6 群の臨床試験 1 4 試験に参加している対象 6 , 2 0 9 人からのデータを含んでいた。データセットは、薬物曝露の測定値 (用量力価、投薬間隔)、ベースライン疾患重症度の共変数 (圧痛関節および腫脹関節数、観察された D A S、患者および医師の包括的評価、C R P 濃度、疾患期間)、臨床試験集団の特徴 (抗 T N F を経験した対象のパーセントおよび地理的特徴 (アジア人対非アジア人対象)) を含んだ。

20

【 0 1 4 4 】

三つの A C R 終点および D A S 終点は、それぞれ関節の A C R 2 0 / 5 0 / 7 0 および D A S モデルを用いて記載した。

【 0 1 4 5 】

2 . 3 結果

2 . 3 . 1 シミュレーション後の用量 - A C 2 0 / 5 0 / 7 0 反応

30

D M A R D の連続バックグラウンド投薬に補助的に 2 4 週間処置した後の、A T N - 1 0 3 および 5 種の対照薬の予想される用量反応関係を、最終 A C R 2 0 / 5 0 / 7 0 モデルを用いて典型的な患者集団 (プラセボ群で T N F の経験あり、平均ベースライン腫脹関節数 1 9、A C R 2 0 反応率 2 1 %) においてシミュレーションした。図 4 にその集団における 2 4 週間目での A C R 2 0 反応について予測される A T N - 1 0 3 の用量反応関係を他の抗 T N F 薬に比べて示す。

【 0 1 4 6 】

このシミュレーションから、8 0 mg Q 4 W A T N - 1 0 3 処置がアダリムマブおよびゴリムマブに対する反応の 9 5 % に匹敵する一方で、2 0 0 mg A T N - 1 0 3 Q 4 W はエタネルセプトに対する反応の 9 5 % に類似する反応を生じると予測されることが示唆される。

40

【 0 1 4 7 】

2 . 3 . 2 シミュレーション後の用量 - D A S 反応

継続中の D M A R D バックグラウンド投薬に補助的に 2 4 週間処置した後の、D A S % C f B についての A T N - 1 0 3 および 5 種の対照薬の予想される用量反応関係をシミュレーションした。D A S プラセボ反応は、D A S についてのベースラインから - 1 6 % の変化と想定されたが、これは、構造化されていない平均プラセボモデルパラメータの推定値の平均を反映している (データは示さず) 。

【 0 1 4 8 】

図 5 に、D A S 反応についての A T N - 1 0 3 の予想される用量反応関係を他の抗 T N

50

F 薬に比べて示す。シミュレーションから、200mg Q4Wで、ATN-103がDAS %CFBに関してゴリムマブおよびセルトリズマブよりも優れていることが示される。

【0149】

2.3.3 シミュレーション後の重症感染症率

シミュレーション後のプラセボ補正後%SIから、ATN-103の予想される感染率がアダリムマブおよびゴリムマブに匹敵する一方で、セルトリズマブ、エタネルセプト、およびインフリキシマブの方が高い重症感染症率を有しうることが示唆される（データは示さず）。

【0150】

図6に、他の抗TNF薬に比したATN-103の予想される効力（ACR）および安全性（%SI）プロファイルの総合的な概要を提供する。特に、図6に、関連する投与計画でのシミュレーション後の抗TNF薬の効力（ACR20）の95%予測区間および付随するシミュレーション後の重症感染症率の95%予測区間を示す。最適な効力/安全性有用性を左上の隅（高い効力、低い重症感染症率）方向に示し、それは、右下の隅に近づくほど減少する。楕円プロットは、抗TNF薬の間で有用性がかなり重複していることを示す。

【0151】

シミュレーション後の効力および安全性のこの表示から、200mg ATN-103 Q4Wが他の抗TNF薬に比べて良好な位置にありうることが示唆される。

【0152】

2.3.4 400mg Q8Wの投与計画

モデルから、反応は処置計画に依存せず、200mg Q4W投与計画または400mg Q8Wで類似の作用を得られることが示唆される。

【0153】

2.4 結論：

5種の抗TNF薬に比したATN-103の効力（ACR/DAS）および安全性/忍容性（重症感染症率）についての比較有効性を、モデルに基づくメタ解析で評価した。他の抗TNF薬に比べて、ATN-103は、効力とSI作用との好都合な組み合わせを示す。

【0154】

モデルに基づくシミュレーションから、200mg ATN-103 Q4Wまたは400mg ATN-103 Q8Wはエタネルセプト、アダリムマブおよびインフリキシマブに効力が類似していることが示された。

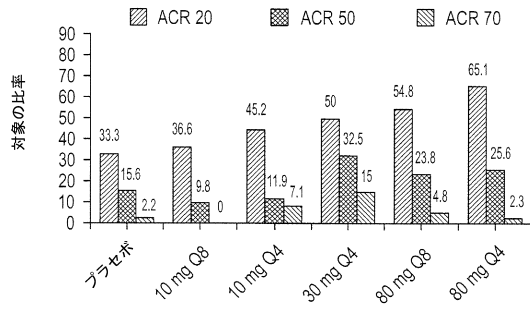
10

20

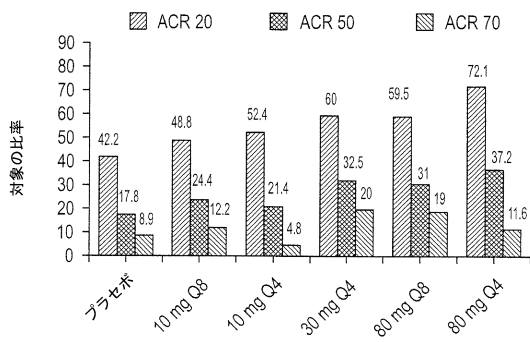
30

【図 1】

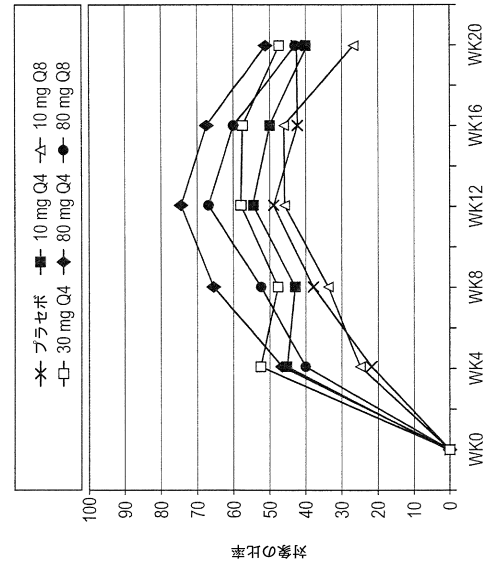
8週間目



16週間目

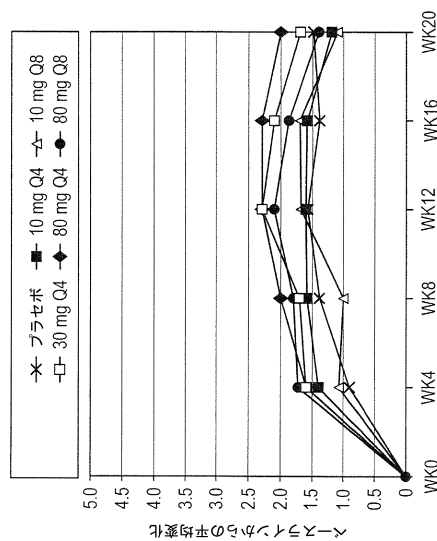


【図 2】



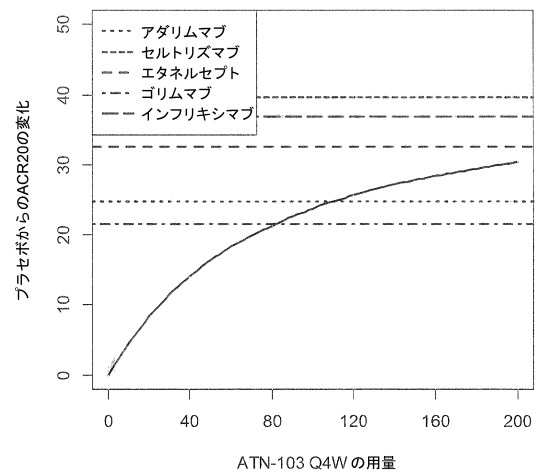
ACR-20

【図 3】

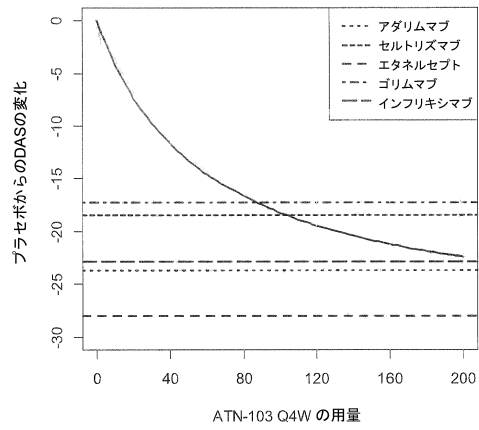


DAS28

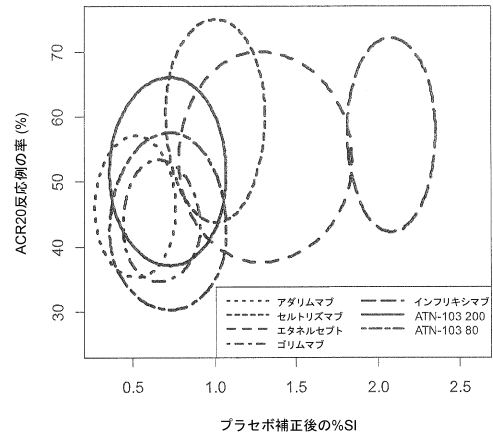
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0006130350000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 9/08	(2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 31/519	(2006.01)	A 6 1 K 31/519

(72)発明者 シャルマ, アマルナート
 アメリカ合衆国、ペンシルベニア 19355、モルバーン、スクール・レーン 2

(72)発明者 シールズ, キャシー
 アメリカ合衆国、ペンシルベニア 19003、アードモア、ミル・クリーク・ロード 112

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特表2008-539772(JP,A)
 国際公開第2010/077422(WO,A1)
 国際公開第2010/056550(WO,A1)
 mAbs, 2010年, Vol.2, No.6, p695-700
 薬学雑誌, 2009年, Vol.129, No.1, p19-24
 日本内科学会雑誌, 2009年, Vol.98, No.10, p2518-2523
 整形外科と災害外科, 2010年, Vol.59, No.4, p809-812

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 38/00-38/58
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)