

(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2008-521426

(P2008-521426A)

(43) 公表日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 C 0 7 6
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	A	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-543912 (P2007-543912)	(71) 出願人	502197046 ドマンティス リミテッド
(86) (22) 出願日	平成17年12月1日 (2005.12.1)		イギリス国 ティーダブリュ8 9ジーエ
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月25日 (2007.7.25)		ス ミドルセックス, ブレントフォード, グレート ウエスト ロード 980
(86) 國際出願番号	PCT/GB2005/004603	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 英輔
(87) 國際公開番号	W02006/059110	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(87) 國際公開日	平成18年6月8日 (2006.6.8)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	60/632,361		
(32) 優先日	平成16年12月2日 (2004.12.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	PCT/GB2005/002163		
(32) 優先日	平成17年5月31日 (2005.5.31)		
(33) 優先権主張国	英國(GB)		
(31) 優先権主張番号	PCT/GB2005/004319		
(32) 優先日	平成17年11月10日 (2005.11.10)		
(33) 優先権主張国	英國(GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドメイン抗体への複合体化により血清半減期が延長されたPLADドメインペプチド

(57) 【要約】

PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体を含む、薬物組成物、薬物融合体、および薬物複合体を提供する。その薬物融合体および薬物複合体は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと融合または複合体化されているPLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体を含む。薬物組成物、薬物融合体、および薬物複合体は、非複合体化または非融合の治療薬または診断薬と比較してより長いin vivo半減期を有する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

X'部分およびY'部分を含む薬物融合体であって、
X'が、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体であり、かつ
Y'が、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分である、薬物融合体。

【請求項 2】

前記ポリペプチド結合性部分が、血清アルブミンに対して結合特異性を有する、請求項1に記載の薬物融合体。 10

【請求項 3】

前記ポリペプチド結合性部分が、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントである、請求項1に記載の薬物融合体。

【請求項 4】

前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体が、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約10個連続したアミノ酸の領域を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の薬物融合体。

【請求項 5】

PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列が、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項4に記載の薬物融合体。 20

【請求項 6】

前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列が、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、および配列番号97からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項5に記載の薬物融合体。 30

【請求項 7】

X'部分およびY'部分を含む薬物融合体であって、
X'が、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体であり、かつ
Y'が、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである、薬物融合体。

【請求項 8】

X'が、Y'のアミノ末端に位置する、請求項7に記載の薬物融合体。

【請求項 9】

Y'が、X'のアミノ末端に位置する、請求項7に記載の薬物融合体。 40

【請求項 10】

前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する、請求項7～9のいずれか一項に記載の薬物融合体。

【請求項 11】

Y'が、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号24、配列番号25、および配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の薬物融合体。

【請求項 12】

Y'が、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配 50

列を含む、請求項 10 に記載の薬物融合体。

【請求項 13】

前記 PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体が、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、および DR4 の PLA-D ドメインから選択される PLA-D ドメインのアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約 10 個連続したアミノ酸の領域を含む、請求項 7 ~ 12 のいずれか一項に記載の薬物融合体。

【請求項 14】

PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体のアミノ酸配列が、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、および DR4 の PLA-D ドメインから選択される PLA-D ドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 13 に記載の薬物融合体。

10

【請求項 15】

PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体のアミノ酸配列が、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 96、および配列番号 97 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 14 に記載の薬物融合体。

【請求項 16】

血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと、前記免疫グロブリン重鎖可変ドメインまたは免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと共有結合している PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体とを含む薬物複合体。

20

【請求項 17】

PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体が、リンカー部分を介して、前記免疫グロブリン重鎖可変ドメインまたは免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと共有結合している、請求項 16 に記載の薬物複合体。

【請求項 18】

血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインが、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、および配列番号 23 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 16 または 17 に記載の薬物複合体。

30

【請求項 19】

PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体が、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、および DR4 の PLA-D ドメインから選択される PLA-D ドメインのアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約 10 個連続したアミノ酸の領域を含む、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の薬物複合体。

40

【請求項 20】

PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体のアミノ酸配列が、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、および DR4 の PLA-D ドメインから選択される PLA-D ドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 19 に記載の薬物複合体。

【請求項 21】

PLA-D ドメインまたは PLA-D ドメインの機能性変異体のアミノ酸配列が、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列

50

番号 9 3 、配列番号 9 4 、配列番号 9 5 、配列番号 9 6 、および配列番号 9 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 2 0 に記載の薬物複合体。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の薬物融合体をコードする単離または組換え核酸。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の組換え核酸を含む核酸構築体。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 に記載の組換え核酸または請求項 2 3 に記載の構築体を含む宿主細胞。

10

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の宿主細胞を前記組換え核酸の発現に適当な条件下で維持し、それによって薬物融合体を生成させることを含む、薬物融合体を生成する方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の薬物融合体または薬物複合体および生理学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 2 7】

炎症性疾患を患う個体を治療する方法であって、前記個体に、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の薬物複合体または薬物融合体の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 2 8】

炎症性疾患が関節炎である、請求項 2 7 に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

治療、診断、または予防に使用する、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の薬物複合体または薬物融合体。

【請求項 3 0】

炎症性疾患治療用医薬品を製造するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の薬物複合体または薬物融合体の使用。

【請求項 3 1】

炎症性疾患が関節炎である、請求項 3 0 に記載の使用。

30

【請求項 3 2】

肺炎症または呼吸器疾患の治療用医薬品を製造するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の薬物複合体または薬物融合体の使用。

【請求項 3 3】

*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分に結合している、P L A D ドメインまたはP L A D ドメインの機能性変異体を含む薬物組成物であって、前記薬物組成物が、前記P L A D ドメインまたはP L A D ドメインの機能性変異体に比べてより長い*in vivo*血清半減期を有し、かつ前記P L A D ドメインまたはP L A D ドメインの機能性変異体の活性の少なくとも約 9 0 % を有する、薬物組成物。

【請求項 3 4】

第 1 の部分および第 2 の部分を含む薬物融合体であって、第 1 の部分がP L A D ドメインまたはP L A D ドメインの機能性変異体であり、第 2 の部分が*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドである、薬物融合体。

40

【請求項 3 5】

*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドと複合体化したP L A D ドメインまたはP L A D ドメインの機能性変異体を含む、薬物複合体。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

関連出願

50

本出願は、米国を指定し2005年11月10日に出願された国際出願第PCT/GB2005/004319号の一部継続出願であり、かつ、2004年12月2日に出願された米国仮出願第60/632,361号の利益を請求している米国を指定し2005年5月31日に出願された国際出願第PCT/GB2005/002163号の一部継続出願である。上記出願の教示全体を参照により本明細書に組み込む。

【0002】

発明の背景

治療および/または診断目的に有用と思われる活性を保持する多くの薬物は、投与しても身体から急速に排出されるため、限定的な価値しか有しない。例えば、治療上有用な活性を有する多くのポリペプチドは腎臓を経て血液循環から急速に排出される。従って、所望の治療効果を実現するためには高用量を投与しなければならない。改善した薬物動態特性を有する改善した治療薬および診断薬が必要とされている。血清アルブミンに結合するポリペプチドは当技術分野で公知である[例えば、EP 0486525 B1 (Cemu Bioteknik AB)、US 6,267,964 B1 (Nygrenら)、WO 04/001064 A2 (Dyax, Corp.) ; WO 02/076489 A1 (Dyax, Corp.)、WO 01/45746 (Genentech, Inc.)を参照]。

10

【発明の開示】

【0003】

発明の要旨

本発明は、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体を含む薬物組成物、薬物融合体、および薬物複合体に関する。一様では、本発明は、X'部分およびY'部分を含む薬物融合体であって、X'がPLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体であり、かつY'がin vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分である、薬物融合体である。

20

【0004】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する。例えば、ポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントでありうる。

【0005】

PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体は、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約10個連続したアミノ酸の領域を含むのが好ましい。例えば、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列は、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有しうる。別の例では、前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列は、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、および配列番号97からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する。

30

【0006】

いくつかの実施形態では、薬物融合体はX'部分およびY'部分を含み、その際、X'はPLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体であり、Y'は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである。そのような実施形態では、X'はY'のアミノ末端に位置していてもよく、またはY'がX'のアミノ末端に位置していてもよい。好ましくは、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する。

40

【0007】

50

ある実施形態では、Y'は、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号24、配列番号25、および配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0008】

他の実施形態では、Y'は、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0009】

PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体は、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約10個連続したアミノ酸の領域を含むのが好ましい。例えば、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列は、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有しうる。別の例では前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列は、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、および配列番号97からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する。

10

20

【0010】

他の態様では、本発明は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと、前記免疫グロブリン重鎖可変ドメインまたは免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと共有結合しているPLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体とを含む薬物複合体(drug conjugate)である。一部の実施形態では、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体は、リンカー部分を介して、前記免疫グロブリン重鎖可変ドメインまたは免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと共有結合している。

【0011】

ある実施形態では、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体は、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約10個連続したアミノ酸の領域を含むのが好ましい。例えば、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列は、TNFR1、TNFR2、FAS、LT-R、CD40、CD30、CD27、HVEM、OX40、およびDR4のPLADドメインから選択されるPLADドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有しうる。別の例では、前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体のアミノ酸配列は、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、および配列番号97からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する。

40

【0013】

本発明はまた、本発明の薬物融合体をコードする、単離核酸または組換え核酸および核

50

酸構築体にも関する。本発明はまた、本発明の組換え核酸を含む宿主細胞、および前記組換え核酸の発現に適当な条件下でその宿主細胞を維持し、それによって薬物融合体を生成させることを含む薬物融合体を生成する方法にも関する。

【0014】

本発明はまた、本発明の薬物融合体または薬物複合体および生理学的に許容される担体を含む医薬組成物にも関する。

【0015】

本発明はまた、炎症性疾患を患う個体を治療する方法であって、前記個体に、本発明の薬物複合体または薬物融合体の治療有効量を投与することを含む方法にも関する。特定の実施形態では、炎症性疾患が関節炎である。

10

【0016】

本発明はまた、治療、診断、または予防に使用する薬物複合体または薬物融合体、ならびに本明細書に開示する疾患（例えば関節炎）などの炎症性疾患治療用の医薬品を製造するための、本発明の薬物複合体または薬物融合体の使用にも関する。

【0017】

本発明はまた、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分に結合している、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体を含む薬物組成物であって、前記薬物組成物が、前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体に比べてより長い*in vivo*血清半減期を有し、かつ前記PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体の活性の少なくとも約90%を有する、薬物組成物に関する。

20

【0018】

本発明は、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体と、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドとを含む複合体タンパク質または融合タンパク質に関する。例えば、血清アルブミン、アルブミン断片、またはアルブミン変異体、または新生仔Fc受容体。本明細書に記載したように、本発明の複合体においては、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体と、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドとは、直接的または間接的に、共有結合または非共有結合により複合体化されうる。本発明の融合タンパク質においては、PLADドメインまたはPLADドメインの機能性変異体と、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドとは、任意の所望の向きで單一コピーまたは複数コピーで存在させることができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

発明の詳細な記載

本明細書では、明瞭簡潔な明細書を書くことができるように実施形態は記載されているが、本発明から逸脱することなく、実施形態は様々に組み合わせ、または分離しうるものと意図され理解されるであろう。

【0020】

本発明の実施形態のどれか一つと同じ構造式を有する物質の公知組成物はそれ自体明白に除かれる。それに対して、新規な当該組成物、既知の組成物の新規な組合せ、既知の組成物の新規な使用、または既知の組成物が関与する新規な方法は除かれない。

40

【0021】

本明細書で使用する「薬物(drug)」は、個体において生物学的標的分子と結合し、かつ/またはその機能を改変することにより有益な治療的または診断的效果を生じさせるために、その個体へ投与されうる任意の化合物（例えば、小有機分子、核酸、ポリペプチド）をさす。標的分子は、個体のゲノムによってコードされる内在性標的分子（例えば、その個体のゲノムによってコードされる酵素、受容体、増殖因子、サイトカイン）、または病原体ゲノムによってコードされる外来性標的分子（例えば、ウイルス、細菌、真菌、線虫、または他の病原体のゲノムによってコードされる酵素）でありうる。

【0022】

50

本明細書で使用する「薬物組成物 (drug composition)」は、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合性部位）を含むポリペプチド結合性部分と共有結合または非共有結合している薬物を含む組成物をさす。薬物組成物は、薬物が、ポリペプチド結合性部分と共有結合または非共有結合している複合体でありうる。薬物は、直接的または間接的に〔例えば、適当なリンカーおよび／または相補的結合パートナー同士の非共有結合（例えば、ビオチンおよびアビジン）により〕ポリペプチド結合性部分と共有結合または非共有結合させることができる。相補的結合パートナーを使用する場合、直接的または適当なリンカー部分を介して結合パートナーの一つに薬物を共有結合させることができ、その相補的結合パートナーは、直接または適当なリンカー部分を介してポリペプチド結合性部分と共有結合することができる。薬物が、ポリペプチドまたはペプチドである場合、薬物組成物は融合タンパク質であってよく、その際、ポリペプチドもしくはペプチド薬物とポリペプチド結合性部分とは、連続したポリペプチド鎖の別個の部分（成分）である。

10

【0023】

本明細書で使用する「複合体 (conjugate)」は、薬物に結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント、を含む組成物をさす。そのような複合体は、薬物が共有結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む「薬物複合体」、および薬物が非共有結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む「非共有結合性薬物複合体」を含む。

20

【0024】

本明細書で使用する「薬物複合体」は、薬物が共有結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む組成物をさす。薬物は、直接的に、または適当なリンカー部分を介して間接的に、抗原結合性フラグメントと共有結合させることができ。薬物は、アミノ末端やカルボキシ末端など、任意の適当な位置で、または適当なアミノ酸側鎖（例えば、リジンのアミノ基）を通じて抗原結合性フラグメントと結合させることができる。

【0025】

本明細書で使用する「非共有結合性薬物複合体」は、薬物が非共有結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む組成物をさす。薬物は、直接（例えば、静電相互作用、疎水的相互作用）または間接的に〔例えば、一つのパートナーを薬物と共有結合させ、その相補的結合パートナーを抗原結合性フラグメントと共有結合させる、相補的結合パートナー（例えば、ビオチンおよびアビジン）の非共有結合により〕抗原結合性フラグメントと非共有結合させることができる。相補的結合パートナーを使用する場合、結合パートナーの一つは、直接的にまたは適当なリンカー部分を介して、薬物と共有結合させることができ、その相補的結合パートナーは、直接的にまたは適当なリンカー部分を介して、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと共有結合させることができる。

30

【0026】

本明細書で使用する「薬物融合体」は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと、ポリペプチド薬物とを含む融合タンパク質をさす。血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントとポリペプチド薬物は、単一の連続したポリペプチド鎖の別個の部分（成分）として存在する。

40

【0027】

本明細書で使用する「薬物基準 (drug basis)」という用語は、活性を評価し、測定し、または決定するために使用する薬物（または薬物部分）量に基づいて標準化した薬物組成物および薬物の活性をさす。全体的に、本発明の薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）は、それが含む薬物よりも分子量が大きい。従って、等量の重量の薬物組成物および薬物は、分子比またはモル比で異なる量の薬物を含む。例えば、本発明の薬物組成物の分子量が、それが含む薬物の分子量の2倍である場合、2 μg の薬物組成物および 1 μg の薬物を使用する「薬物基準」で活性を決定することができ

50

きる。これらの量には（遊離薬物または薬物組成物の一部として）同量の薬物が含まれるからである。活性は、適切な計算を用いる「薬物基準」により、例えば、標的結合部位基準当たり、または酵素薬物には活性部位基準当たりの活性を表すことによって標準化し表すことができる。

【0028】

本明細書で使用する「インターロイキン1受容体アンタゴニスト」(IL-1ra)は、天然に存在する、すなわち内在性の哺乳動物のIL-1raタンパク質、ならびに天然に存在する、すなわち内在性の対応する哺乳動物のIL-1raタンパク質のアミノ酸配列と同じであるアミノ酸配列を有するタンパク質[例えば、組換えタンパク質、合成タンパク質(すなわち、有機合成化学の方法を使用し作製したもの)]をさす。従って、本明細書で定義するように、その用語は、成熟タンパク質、多型変異体もしくは対立形質変異体、およびIL-1raの他のアイソフォーム(例えば、選択的スプライシングまたは他の細胞内プロセスによって產生されるもの)、およびこれらの修飾形態(例えば、脂質付加、グリコシリ化、PEG化したもの)もしくは未修飾形態を含む。天然に存在する、すなわち内在性のIL-1raには、哺乳動物(例えばヒト、非ヒト霊長類)で天然に存在する野生型タンパク質、例えば、成熟IL-1ra、多型変異体もしくは対立形質変異体、および他のアイソフォームを含む。そのようなタンパク質は、例えば、IL-1raを天然に產生する供給源から回収し、または単離することができる。これらのタンパク質、ならびに天然に存在し、すなわち内在性の対応するIL-1raと同じアミノ酸配列を有するIL-1raタンパク質は、その対応する哺乳動物の名前によって呼ばれる。例えば、その対応する哺乳動物がヒトである場合、そのタンパク質はヒトIL-1raと表される。

10

20

30

【0029】

IL-1raの「機能性変異体」には、機能性フラグメント、機能性突然変異タンパク質、および/または機能性融合タンパク質が含まれ、これらは適当な方法[例えば、突然変異誘発(例えば、化学的突然変異誘発、放射線突然変異誘発)、組換えDNA技術]を使用し生成することができる。「機能性変異体」はインターロイキン-1の1型受容体と拮抗する。一般的に、IL-1raのフラグメントまたは一部分には、成熟IL-1raと比較して、アミノ酸(すなわち、一個または複数のアミノ酸)が欠失かつ/または付加(すなわち、一個または複数のアミノ酸が欠失かつ/または付加)されているもの(例えば、N末端欠失、C末端欠失、または内部欠失)が含まれる。成熟IL-1raと比較して、連続したアミノ酸だけが欠失し、または非連続のアミノ酸が欠失しているフラグメントまたは一部分も想定される。

【0030】

ヒトIL-1raの機能性変異体は、ヒトIL-1raの成熟152アミノ酸形態に対して少なくとも約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%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有し、ヒトイントロイキン-1の1型受容体に拮抗することができる。[Eisenbergら、Nature 343:341-346 (1990)を参照。]その変異体は、一個または複数の追加のアミノ酸を含むことができる(例えば、153、154またはそれ以上の数のアミノ酸を含む)。例えば、変異体IL-1raは、アミノ末端メチオニン残基に続く配列番号33の残基26~177からなるアミノ酸配列を含むことができる。[KINERET(登録商標)(anakinra), Amgen Inc.]

40

本明細書で使用する「サポリン」は、サポナリアオフィシナリス(Saponaria officinalis)という植物によって产生される、一本鎖リボソームを不活化するポリペプチドのファミリーをさす[Stirpe, F.ら、Biochem. J. 216:617-625 (1983), Bagga, S.ら、J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003)]。サポリンポリペプチドは、長さおよび/またはアミノ酸配列が異なる数種の形態で存在する[例えば、Id.およびBarthelemy, I.ら、J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993)を参照]。サポリン-6は、サポリンの中で最も活性

50

な形態である。(Bagga, S.ら、J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003))。成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置48のアミノ酸がAspまたはGluであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置91のアミノ酸がArgまたはLysである、天然に存在するサポリン-6のアイソフォームが少なくとも4種記載されている。(Barthelemy, I.ら、J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993))。別の形態のサポリン-6には、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置99のアミノ酸がSerまたはLeuであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置134のアミノ酸がGlnまたはLysであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置147のアミノ酸がSerまたはLeuであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置149のアミノ酸がSerまたはPheであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置162のアミノ酸がAspまたはAsnであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置177のアミノ酸がAlaまたはValであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置188のアミノ酸がIleまたはThrであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置196のアミノ酸がAsnまたはAspであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置198のアミノ酸がGluまたはAspであり、成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置231のアミノ酸がAsnまたはSerであるポリペプチド、および成熟ポリペプチド(配列番号61)の位置233のアミノ酸がLysまたはArgであるポリペプチドが含まれる。(前掲)。これらのアイソフォームおよび変異体を包含するコンセンサス配列を図14Gに示す(配列番号63)。

【0031】

従って、「サポリン」という用語には、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、または組換え手法で產生したポリペプチドを含め、前駆体タンパク質、成熟ポリペプチド、未変性タンパク質、多型変異体もしくは対立形質変異体、および他のアイソフォーム(例えば、選択的スプライシングまたは他の細胞内プロセスによって產生されるもの)、ならびに前記のものの修飾形態(例えば、脂質付加、グリコシル化、PEG化したもの)または未修飾形態が含まれる。天然に存在する、すなわち内在性のサポリンには、野生型タンパク質、例えば、成熟サポリン(例えば、成熟サポリン-6)、多型変異体もしくは対立形質変異体、およびサポナリアオフィシナリス中で天然に生じる他のアイソフォームが含まれる。そのようなタンパク質は、任意の適当な方法を使用して、サポナリアオフィシナリスから回収し、または単離することができる。サポリンの「機能性変異体」には、機能性フラグメント、機能性突然変異タンパク質、および/または機能性融合タンパク質が含まれ、これらは適当な方法[例えば、突然変異誘発(例えば、化学的突然変異誘発、放射線突然変異誘発)、組換えDNA技術]を使用し生成することができる。一般的に、サポリン(例えば、サポリン-6)のフラグメントまたは一部分には、成熟サポリンと比較して、アミノ酸(すなわち、一個または複数のアミノ酸)が欠失かつ/または付加(すなわち、一個または複数のアミノ酸が欠失かつ/または付加)されているもの(例えば、N末端欠失、C末端欠失、または内部欠失)が包含される。成熟サポリンと比較して、連続したアミノ酸だけが欠失しているか、または非連続のアミノ酸が欠失しているフラグメントまたは一部分も想定される。様々なサポリン機能性変異体を調製することができる。例えば、アミノ末端伸長を含むサポリン-6の融合タンパク質が調製され、それはウサギ網状赤血球ライセトアッセイにおいて完全リボソーム阻害活性を保持することが示されている。(Barthelemy, I.ら、J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993))。活性部位残基Tyr72、Tyr120、Glu176、Arg179、またはTrp208(配列番号61の第72、120、176、179、または208のアミノ酸)がアラニンに置換されている変異体またはサポリン-6では、in vitroアッセイで細胞傷害活性が低減した。(Bagga, S.ら、J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003))。従って、サポリンの別の機能性変異体を調製したいと望むならば、これらの活性部位残基の変異、置換、交換、欠失、または修飾は避けるべきである。天然に存在する成熟ポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含むサポリン機能性変異体は、少なくともその活性部位を含むことが好ましい。例えば、天然に存在する成熟サポリン-6よりも少ないアミノ酸を含むサポリン-6変異体は、成熟サポリン-6の活性部位残基[Tyr72、Tyr120、Glu176、A

10

20

30

40

50

r g 1 7 9、および T r p 2 0 8 (配列番号 6 1 の第 7 2、1 2 0、1 7 6、1 7 9、および 2 0 8 のアミノ酸)] を含むことができ、少なくとも約 1 3 7 アミノ酸長、少なくとも約 1 5 0 アミノ酸長、少なくとも約 1 7 5 アミノ酸長、少なくとも約 2 0 0 アミノ酸長、少なくとも約 2 2 5 アミノ酸長、または少なくとも約 2 5 0 アミノ酸長でありうる。

【 0 0 3 2 】

サポリンの「機能性変異体」は、リボソームを不活化する活性（例えば、r R N A N - グリコシダーゼ活性）および / または細胞傷害活性を有する。そのような活性は、公知のウサギ網状赤血球ライセートアッセイ、または腫瘍細胞系を使用する公知の細胞毒性アッセイのいずれかを使用するタンパク質合成の阻害など、任意の適当な方法を使用し、容易に評価することができる [例えば、Bagga, S. ら、J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (200 10 3) および Barthélémy, I. ら、J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993) を参照] 。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、サポリンの機能性変異体は、成熟サポリン - 6 (配列番号 6 1) に対して少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 5 %、または少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 1 %、または少なくとも約 9 2 %、または少なくとも約 9 3 %、または少なくとも約 9 4 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 6 %、または少なくとも約 9 7 %、または少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、薬物と、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分とを含む薬物組成物に関する。血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントを含む薬物組成物に関して本明細書に詳述するように、薬物とポリペプチド結合性部分は、互いに共有結合または非共有結合していてよい。いくつかの実施形態では、薬物組成物は、ポリペプチド薬物と、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する抗原結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを含む融合タンパク質である。他の実施形態では、薬物組成物は、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する抗原結合部位を含むポリペプチド結合性部分に共有結合または非共有結合している薬物を含む。

【 0 0 3 5 】

典型的には、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドは、in vivo で天然に存在し、かつ生物（例えばヒト）から望ましくない物質を除去する内在性機序による分解または除去に耐性を有するポリペプチドである。例えば、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドは、細胞外マトリックス由来タンパク質、血中に見られるタンパク質、血液脳関門または神経組織で見られるタンパク質、腎臓、肝臓、肺、心臓、皮膚、または骨に局在するタンパク質、ストレスタンパク質、疾患特異的タンパク質、または F c 輸送に関与するタンパク質から選択することができる。

【 0 0 3 6 】

in vivo 血清半減期を延長する好適なポリペプチドには、例えば、トランスフェリン受容体特異的リガンド - 神経医薬融合タンパク質（米国特許第 5 , 9 7 7 , 3 0 7 号を参照、その教示を参照により本明細書に組み込む）、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、インスリン様成長因子 1 (I G F 1) 受容体、インスリン様成長因子 2 (I G F 2) 受容体、インスリン受容体、血液凝固因子 X 、 1 - アンチトリプシン、および H N F 1

が含まれる。血清半減期を延長する適当なポリペプチドには、 - 1 糖蛋白（オロソムコイド；A A G ）、 - 1 抗キモトリプシン (A C T) 、 - 1 ミクログロブリン（タンパク質 H C ; A I M ）、アンチトロンビン I I I (A T I I I) 、アポリポプロテイン A - 1 (A p o A - 1) 、アポリポプロテイン B (A p o B) 、セルロプラスミン (C p) 、補体成分 C 3 (C 3) 、補体成分 C 4 (C 4) 、 C 1 エステラーゼインヒビター (C 1 I N H) 、 C - 反応性タンパク質 (C R P) 、フェリチン (F E R) 、ヘモペキ

10

20

30

40

50

シン(H P X)、リポタンパク質(a)(L p (a))、マンノース結合タンパク質(M B P)、ミオグロビン(Myo)、プレアルブミン(ブラントスサイレチン ; P A L)、レチノール結合タンパク質(R B P)、およびリウマチ因子(R F)も含まれる。

【 0 0 3 7 】

細胞外マトリックスに由来する好適なタンパク質には、例えば、コラーゲン、ラミニン、インテグリン、およびフィブロネクチンが含まれる。コラーゲンは、主要な細胞外マトリックスタンパク質である。現在、約 15 種類のコラーゲン分子が知られ、身体の様々な箇所で見つかっており、例えば、I 型コラーゲン(身体のコラーゲンの 90 % を占める)は骨、皮膚、腱、靭帯、角膜、内臓に見られ、または I I 型コラーゲンは軟骨、椎間板、脊索、および眼の硝子体液に見られる。

10

【 0 0 3 8 】

血液由来の好適なタンパク質には、例えば、血漿タンパク質 [例えば、フィブリノゲン、 - 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) 、血清アミロイドプロテイン 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 - 2 - ミクログロブリン] 、酵素および酵素インヒビター (例えば、プラスミノゲン、リゾチーム、シスタチン C 、 - 1 - アンチトリプシン、および膵臓トリプシンインヒビター) 、免疫系タンパク質、例えば、免疫グロブリンタンパク質 (例えば、 I g A 、 I g D 、 I g E 、 I g G 、 I g M 、免疫グロブリン軽鎖 (/)) 、輸送タンパク質 (例えば、レチノール結合タンパク質、 - 1 ミクログロブリン) 、デフェンシン (例えば、 - 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) などが含まれる。

20

【 0 0 3 9 】

血液脳関門または神経組織に見られる好適なタンパク質には、例えば、メラノコルチニン受容体、ミエリン、アスコルビン酸トランスポーターなどが含まれる。

【 0 0 4 0 】

in vivo 血清半減期を延長する好適なポリペプチドには、腎臓に局在するタンパク質 (例えば、ポリシスチン、 I V 型コラーゲン、有機アニオントransporter-K 1 、ヘイマン抗原) 、肝臓に局在するタンパク質 (例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、 G 250) 、肺に局在するタンパク質 (例えば、 I g A に結合する分泌成分) 、心臓に局在するタンパク質 (例えば H S P 27 、これは拡張型心筋症に関連する) 、皮膚に局在するタンパク質 (例えばケラチン) 、骨特異的タンパク質、例えば、形態形成タンパク質 (B M P) で、これは骨形成活性を示すタンパク質のトランスフォーミング増殖因子 スーパーファミリーのサブセットである (例えば、 B M P - 2 、 B M P - 4 、 B M P - 5 、 B M P - 6 、 B M P - 7 、 B M P - 8) 、腫瘍特異的タンパク質、例えば、栄養芽細胞抗原、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、肝臓および脾臓に見られるカテプシン B)) も含まれる。

30

【 0 0 4 1 】

好適な疾患特異的タンパク質には、例えば、 L A G - 3 (リンパ球活性化遺伝子) 、オステオプロテジェリンリガンド (O P G L 、 Nature 402, 304-309 (1999) 参照) 、 O X 40 [T N F 受容体ファミリーのメンバー。活性化した T 細胞に発現し、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (H T L V - I) を産生する細胞で特異的に上方調節される。 Immunol. 165 (1) : 263-70 (2000) 参照] を含め、活性化した T 細胞にのみ発現する抗原が含まれる。適当な疾患特異的タンパク質には、例えば、 C G 6512 ショウジョウバエ、ヒトパラブレギン、ヒト F t s H 、ヒト A F G 3 L 2 、マウス f t s H を含む (関節炎 / 癌に関連する) メタロプロテアーゼ ; および酸性線維芽細胞増殖因子 (F G F - 1) 、塩基性線維芽細胞増殖因子 (F G F - 2) 、血管内皮増殖因子 / 血管透過性因子 (V E G F / V P F) 、トランスフォーミング増殖因子 - (T G F) 、腫瘍壞死因子 - (T N F -) 、アンジオゲニン、インターロイキン - 3 (I L - 3) 、インターロイキン - 8 (I L - 8) 、血小板由来内皮増殖因子 (P D - E C G F) 、胎盤増殖因子 (P l G F) 、ミッドカイン血小板由来増殖因子 - B B (P D G F) を含む血管新生増殖因子、およびフラクタ

40

50

ルカインも含まれる。

【0042】

*in vivo*血清半減期を延長する好適なポリペプチドには、熱ショックタンパク質(HSP)などのストレスタンパク質も含まれる。通常、HSPは細胞内に見られる。HSPが細胞外で見られる場合、それは細胞が死滅し、その中身が溢れ出たという指標である。外傷、疾患、または損傷の結果、細胞外HSPが免疫系から応答を誘発する時、このプログラムされていない細胞死(壊死)が生じる。細胞外HSPと結合することによって、本発明の組成物を疾患部位に局在化することができる。

【0043】

Fc輸送に関する好適なタンパク質には、例えば、プラムベル(Brambell)受容体(FcRBとしても知られる)が含まれる。このFc受容体は、送達に潜在的に有用な2つの機能を有する。それらの機能とは(1)胎盤を通して母から子供にIgGを輸送すること(2)分解からIgGを保護し、それによってその血清半減期を延長することである。その受容体は、エンドソームからIgGを再生すると考えられる(Holligerら、Nat Biotechnol 15(7):632-6(1997)を参照)。

【0044】

本発明での使用に好適なアルブミン、アルブミンフラグメント、またはアルブミン変異体の例は、国際公開第2005/077042 A2号に記載されており、その全体を参照により本明細書に組み込む。特に、以下のアルブミン、アルブミンフラグメント、またはアルブミン変異体を本発明で使用することができる。

【0045】

- 配列番号1(国際公開第2005/077042 A2号に開示され、この配列を参照により明白に本開示に組み込む)、

- 国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸1~387を含み、またはそれからなるアルブミンフラグメントまたは変異体、

- 以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むアルブミン、またはそのフラグメントもしくは変異体:(a)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸54~61、(b)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸76~89、(c)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸92~100、(d)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸170~176、(e)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸247~252、(f)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸266~277、(g)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸280~288、(h)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸362~368、(i)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸439~447(j)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸462~475、(k)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸478~486;および(1)国際公開第2005/077042 A2号の配列番号1のアミノ酸560~566。

【0046】

本発明によるTNFR1結合リガンドにおいて使用するのに好適なアルブミン、フラグメント、および類似体のさらなる例は、国際公開第03/076567 A2号に記載され、その全体を参照により本明細書に組み込む。特に、以下のアルブミン、フラグメント、または変異体を本発明で使用することができる。

【0047】

- 国際公開第03/076567 A2号、例えば、図3に記載されているヒト血清アルブミン(この配列情報を参照により明白に本開示に組み込む)、

- 式分子量が66,500である585アミノ酸の単一非グリコシル化ポリペプチド鎖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. 34:59(1975); Lawnら、Nucleic Acids Research 9:6102-6114(19

10

20

30

40

50

81) ; Minghettiら、J. Biol. Chem. 261:6147 (1986) を参照]、

- Weitkampら、Ann. Hum. Genet. 37:219 (1973) に記載されているアルブミンの多型変異体または類似体またはフラグメント、

- 欧州特許第322094号に記載されているアルブミンフラグメントまたは変異体、例えば、HA(1-373)、HA(1-388)、HA(1-389)、HA(1-369)、およびHA(1-419)、ならびに1~369および1~419のフラグメント、

- 欧州特許第399666号に記載されているアルブミンフラグメントまたは変異体、例えば、HA(1-177)およびHA(1-200)、ならびにHA(1~X)(Xは178~199の任意の数)のフラグメント。

10

【0048】

本発明の薬物組成物は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むあらゆるポリペプチド結合性部分を含むことができる。ポリペプチド結合性部分は、別個の分子実体として、少なくとも31、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80個のアミノ酸、少なくとも約90個のアミノ酸、少なくとも約100個のアミノ酸、または少なくとも約110個のアミノ酸を含むのが好ましい。好ましくは、ポリペプチド結合性部分は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドと、少なくとも約5mM

KDのKD [KD = K_o_f_f(kd)/K_o_n(ka)]で結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド結合性部分は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドと、表面プラズモン共鳴によって（例えばビニアコアの装置を使用して）決定したKD、約10~約100nM、または約100nM~約500nM、または約500nM~約5mMで結合する。特定の実施形態では、ポリペプチド結合性部分は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドと、KD約50nM、または約70nM、または約100nM、または約150nM、または約200nMで結合する。

20

【0049】

好ましくは、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分は、原核生物または細菌のポリペプチドまたはペプチドではない。好ましくは、ポリペプチド結合性部分は、真核生物、哺乳動物、またはヒトのポリペプチドまたはペプチドである。

30

【0050】

ある実施形態では、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分は、折り畳まれたタンパク質ドメインである。他の実施形態では、ポリペプチド結合性部分の分子量は、別個の分子実体として少なくとも約4KD_a、少なくとも約4.5KD_a、少なくとも約5KD_a、少なくとも約5.5KD_a、少なくとも約6KD_a、少なくとも約6.5KD_a、少なくとも約7KD_a、少なくとも約7.5KD_a、または少なくとも約8KD_aである。

【0051】

in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含む好適なポリペプチド結合性部分は、任意の適当な方法、例えば、天然に存在するか、または天然に存在しないポリペプチドを適当な接着アッセイでスクリーニングする方法を使用し同定することができる。本明細書に記載したように、好ましいin vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対する抗原結合部位を有するポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントである。しかし、in vivo血清半減期を延長する他のポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントも本発明に使用することができる。

40

【0052】

所望の場合には、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに結合する、抗体またはその抗原結合性フラグメントの一つまたは複数の相補性決定領域（CDR）を、その抗体

50

または抗原結合性フラグメントの抗原結合特異性を保持する非免疫グロブリン構造に構成することができる。本発明の薬物組成物は、そのような非免疫グロブリン結合性部分を含むことができる。そのような非免疫グロブリン結合性部分は、任意の適当な方法を使用し調製することができ、例えば、エピトープに特異的に結合するポリペプチド結合性部分を生成するために、CDR移植のための骨格(scaffold)としてSpAなどの天然細菌の受容体が使用されてきた。この手順の詳細は、米国特許出願第5,831,012号に記載されており、その教示を参照により本明細書に組み込む。他の適当な骨格には、フィプロネクチンおよびアフィボディをベースとする骨格が含まれる。適当な手順の詳細は、国際公開第98/58965号に記載されている。他の適当な骨格には、van den Beukenら、J. Mol. Biol. 310:591-601(2001)に記載されているリポカリン(lipocallin)およびCTL4、ならびに国際公開第00/69907号(Medical Research Council)に記載されている骨格などが含まれ、それらの骨格は、例えば、細菌GROELまたは他のシヤペロンポリペプチドの環構造をベースとしている。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、本発明の薬物組成物は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する非免疫グロブリン結合性部分を含み、その非免疫グロブリン結合性部分は、本明細書に記載したV_H、V_L、またはV_{HH}のCDRのうち1、2、または3つと適切な骨格とを含む。ある実施形態では、非免疫グロブリン結合性部分は、本明細書に記載したV_H、V_L、またはV_{HH}のCDR3を含むがCDR1またはCDR2は含まず、かつ適当な骨格を含む。他の実施形態では、非免疫グロブリン結合性部分は、本明細書に記載したV_H、V_L、またはV_{HH}のCDR1およびCDR2を含むがCDR3は含まず、かつ適当な骨格は含む。他の実施形態では、非免疫グロブリン結合性部分は、本明細書に記載したV_H、V_L、またはV_{HH}のCDR1、CDR2、およびCDR3と適当な骨格を含む。他の実施形態では、薬物組成物は、本明細書に記載したV_H、V_L、またはV_{HH}のCDR3のみと薬物を含む。

20

【0054】

本発明の薬物組成物は、薬物融合体、薬物複合体、および非共有結合性薬物複合体を調製するために本明細書記載の方法などの適当な方法を使用して調製することができる。加えて、本発明の薬物組成物は、薬物融合体、薬物複合体、および非共有結合性薬物複合体に関して本明細書に詳述する利点および有用性を有する。

30

【0055】

本発明は、薬物単独(非複合化型薬物、非融合薬物)と比較して、改善された薬物動態特性(例えば、血清半減期の増大)、および他の利点を有する薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を提供する。これらの薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントと、一種または複数の所望の薬物とを含む。

【0056】

本明細書に記載したように、本発明の薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、薬物単独と比較して、in vivo血清半減期を劇的に延長し、かつ/またはAUCを増大させることができる。加えて一般的には、薬物の活性は、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)中で実質的に変化しない。しかし、薬物単独と比較して、薬物組成物の活性の幾分の変化は受容可能であり、一般的にはこの変化は薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)の改善された薬物動態特性によって補われるものである。例えば、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、薬物標的と薬物単独よりも低い親和性で結合するかもしれないが、薬物組成物の薬物動態特性が改善(例えばin vivo血清半減期の延長、AUCの増大)されているために、薬物単独と比較しておよそ同等または優れた効力を有しうる。加えて、より少ない量の薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体)を投与して所望の治療的または診断的効果を得ることができる。好ましくは、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有

40

50

結合性薬物複合体、薬物融合体)の活性は、薬物単独の活性とせいぜい約100倍、またはせいぜい約50倍、またはせいぜい約10倍、またはせいぜい約5倍、またはせいぜい約4倍、またはせいぜい約3倍、またはせいぜい約2倍異なるだけである。例えば、薬物のK_D、K_i、または中和用量50(ND₅₀)が1nMであり、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)のK_D、K_i、またはND₅₀が約2nM、または約3nM、または約4nM、または約5nM、または約10nMである。

【0057】

好ましくは、薬物組成物の活性(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、薬物の活性と比較して実質的に減少しない。ある実施形態では、薬物組成物の活性は、薬物の活性と比較してせいぜい約10%、せいぜい約9%、せいぜい約8%、せいぜい約7%、せいぜい約6%、せいぜい約5%、せいぜい約4%、せいぜい約3%、せいぜい約2%、せいぜい約1%減少するだけであるか、または実質的に変化しない。あるいは記載したように、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、薬物の活性の少なくとも約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%、少なくとも約99%を保持し、または薬物と実質上同じ活性を保持する。好ましくは、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)および薬物の活性を、「薬物基準」で決定し、かつ/または比較する。

10

20

30

40

【0058】

本明細書に記載し示すように、本発明の薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、薬物単独よりも高い活性(例えば、in vivo活性)を有しうる。例えば、実施例6に示すように、DOM7m-16/IL-1raは、マウスモデルでの関節炎の治療において、重量にて同じ用量(10mg/kgまたは1mg/kg)を投与した場合のIL-1raよりも有効であった。DOM7m-16/IL-1raは、その分子量がIL-1raの分子量の約2倍であるにもかかわらずより有効であった。すなわち、DOM7m-16/IL-1raを与えたマウスは、IL-1raを与えたマウスのIL-1ra(DOM7m-16/IL1-raの一部分として)の約半分しか受容していなかったことになる。

【0059】

ある実施形態では、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、薬物よりも活性(例えば、in vivo活性)が高く、例えば、薬物組成物は、薬物の活性の少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、少なくとも約300%、少なくとも約350%、少なくとも約400%、少なくとも約450%、または少なくとも約500%の活性を有する。好ましくは、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)および薬物の活性は、「薬物基準」で決定し、かつ/または比較する。薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)および薬物の活性は、好適なin vitro系またはin vivo系を使用して測定することができる。ある実施形態では、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、in vivoで決定すると、それが含む薬物よりも高い活性を有する。他の実施形態では、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、in vitroで決定すると、それが含む薬物よりも高い活性を有する。

50

【0060】

血清アルブミンに対して結合特異性を有するドメイン抗体(dAb)を含む薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)はさらに利点を提供する。ドメイン抗体は、非常に安定性があり、抗体および他の抗体の抗原結合性フラグメントに比べて小さく、大腸菌または酵母(例えば、ピキア・パストリス)中で発現させることによって高収量で産生でき、また本明細書に記載したように、血清アルブミンに結合する

50

抗体の抗原結合性フラグメントはヒト起源または所望する任意の種のライブラリーから容易に選択することができる。従って、血清アルブミンと結合する d A b を含む薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）は、哺乳動物細胞中で全体的に產生される治療薬（例えばヒト、ヒト化、またはキメラ抗体）よりも容易に產生させることができ、免疫原性ではない d A b を使用することができる（例えば、ヒト d A b は、ヒトで疾患の治療または診断のための薬物融合体または薬物複合体に、使用することができる）。

【 0 0 6 1 】

薬物が、血清アルブミンと結合するポリペプチド結合性部分（例えば、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント）を含む薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）の一部である場合、薬物の免疫原性が低減されうる。従って、血清アルブミンと結合するポリペプチド結合性部分（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む薬物組成物に関して、薬物は、（薬物単独よりも）免疫原性が低いか、または実質的に非免疫原性でありうる。従って、被験体の免疫系によって抗薬物抗体が產生されるために生じる効力の損失を最少にして、そのような薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を長時間に渡つて繰り返し被験体に投与することができる。

【 0 0 6 2 】

加えて、本明細書に記載した薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）は、向上した安全プロフィールを有し、副作用も薬物単独より低い。例えば、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントの血清アルブミン結合活性の結果として、薬物融合体および複合体（薬物複合体、非共有結合性薬物複合体）の血管循環における滞留時間は増加する。加えて、これらの複合体および薬物融合体は、全身投与（例えば血管内投与）した後、血液脳関門を通過して中枢神経系に蓄積することは実質的にできない。従って、神経毒性または望ましくない向精神薬作用を持つ薬物を含む複合体（薬物複合体、非共有結合性薬物複合体）および薬物融合体は、薬物単独と比較して高い安全性および低い副作用で投与することができる。同様に、これらの複合体（薬物複合体、非共有結合性薬物複合体）および薬物融合体は、薬物単独よりも、特定の臓器（例えば、腎臓または肝臓）に対する毒性を低くすることができる。本明細書に記載した複合体および薬物融合体は、血管循環で薬物または薬物に結合する標的（例えば毒素）を隔離し、それによって薬物または組織上の標的の作用を減少（例えば毒の効果を阻害）させるために使用することもできる。

【 0 0 6 3 】

薬物動態を分析し *in vivo* 半減期を決定するために適当な方法は、当技術分野で周知である。そのような方法は、例えば、Kenneth, Aら、Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists、およびPetersら、Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996) に記載されている。『Pharmacokinetics』、M Gibaldi & D Peron, published by Marcel Dekker, 第2改訂版 (1982) という参考文献もあり、この文献は $t_{1/2}$ および $t_{1/2}$ 半減期 ($t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$) および曲線下面積 (AUC) などの薬物動態パラメーターについて記載している。

【 0 0 6 4 】

半減期 ($t_{1/2}$ および $t_{1/2}$) および AUC は、複合体または融合体の血清濃度の時間に対する曲線から決定することができる。WinNonlin分析パッケージ (Pharsight Corp., Mountain View, CA 94040, USA から入手可能) を使用して、例えば、曲線をモデリングすることができる。第1相（相）では、薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）は、多少除去されるが主として患者内に分散する。第2相（相）は、薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）が分散され、薬物組成物が患者から排出されるにつれて血清濃度が減少する最終相である。 $t_{1/2}$ 半減期は、第1相の半減期であり、 $t_{1/2}$ 半減期は第2相の半減期である。従つて、本発明は、15分以上の範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有する、本発明による薬物組成物（例え

10

20

30

40

50

ば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)、または本発明による薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を含む組成物を、提供する。一実施形態では、その範囲の下限は、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、または12時間である。さらに、またはその代わりに、本発明による薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)または組成物は、12時間またはそれを最大とする範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有する。一実施形態では、その範囲の上限は、11、10、9、8、7、6、または5時間である。好適な範囲の一例は、1~6時間、2~5時間、または3~4時間である。

【0065】

10

有利には、本発明は、 $t_{1/2}$ 半減期が2.5時間以上の範囲にある薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を提供する。一実施形態では、その範囲の下限は3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、または12時間である。いくつかの実施形態では、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)の $t_{1/2}$ 半減期が21日またはそれ以下の範囲である。一実施形態では、その範囲の上限は12時間、24時間、2日、3日、5日、10日、15日、または20日である。特定の実施形態では、本発明による薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)の $t_{1/2}$ 半減期は、12~60時間の範囲である。別の実施形態では、その $t_{1/2}$ 半減期は12~48時間の範囲である。別の実施形態では、さらに、その $t_{1/2}$ 半減期は12~26時間の範囲である。

20

【0066】

上記判定基準に加えて、またはそれに代えて、本発明は、AUC値(曲線下面積)が0.01mg·min/mL以上、または1mg·min/mL以上の範囲にある薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を提供する。一実施形態では、その範囲の下限は、0.01、0.1、1、5、10、15、20、30、100、200、または300mg·min/mLである。特定の実施形態では、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)のAUCは、600mg·min/mLまでの範囲にある。一実施形態では、その範囲の上限は500、400、300、200、150、100、75、または50mg·min/mLである。他の実施形態では、薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)のAUCは、以下の範囲からなる群から選択される範囲にある:15~150mg·min/mL、15~100mg·min/mL、15~75mg·min/mL、15~50mg·min/mL、0.01~50mg·min/mL、0.1~50mg·min/mL、1~50mg·min/mL、5~50mg·min/mL、および10to50mg·min/mL。

30

【0067】

本発明は、薬物と、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位(例えば抗原結合部位)を含むポリペプチド結合性部分とを含む薬物組成物(例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)に関する。薬物組成物の好ましい実施形態では、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位(例えば抗原結合部位)を含むポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する。

40

【0068】

いくつかの実施形態では、薬物組成物は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位(例えば抗原結合部位)を含むポリペプチド結合性部分と共に結合している薬物を含む。これらの実施形態では、薬物は、アミノ末端やカルボキシ末端などの任意の適当な位置で、または適当なアミノ酸側鎖(例えば、リジンのアミノ基)により、ポリペプチド結合性ドメインと共に結合させることができる。

【0069】

他の実施形態では、薬物組成物は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対し

50

て結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分と非共有結合している薬物を含む。そのような実施形態では、薬物は、直接的（例えば、静電相互作用、疎水的相互作用を通じて）または間接的に〔例えば、一つのパートナーを薬物と共に結合させ、その相補的結合パートナーを抗原結合性フラグメントと共有結合させる、相補的結合パートナー（例えば、ビオチンおよびアビジン）の非共有結合により〕抗原結合性フラグメントと非共有結合させることができる。相補的結合パートナーを使用する場合、直接的にまたは適当なリンカー部分を介して、結合パートナーの一つを薬物と共に結合させることができ、またその相補的結合パートナーを直接的または適当なリンカー部分を介してポリペプチド結合ドメインと共有結合させることができる。

【0070】

10

他の実施形態では、薬物組成物は、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分と、ポリペプチド薬物とを含む融合タンパク質である。融合タンパク質は、第1の部分として、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分を、そして第2の部分として、ポリペプチド薬物を含む一連のポリペプチド鎖を含み、これらの部分はポリペプチド鎖の別個の部分（成分）として存在する。第1および第2の部分は、ペプチド結合により互いに直接結合させ、あるいは適当なアミノ酸、またはペプチドもしくはポリペプチドリンカーにより結合させることができる。追加の部分（例えば、第3、第4）および／またはリンカー配列を適宜存在させることができる。第1の部分は、第2の部分（すなわちポリペプチド薬物）に対して、N末端位置、C末端位置、または内部にあってよい。ある実施形態では、融合タンパク質は、*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分を一個または複数と、ポリペプチド薬物部分を一個または複数含む。これらの実施形態では、融合タンパク質は、同一であっても異なるっていてもよい1～約10個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10）のポリペプチド薬物部分、同一であっても異なるっていてもよい*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含む1～約20個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20）のポリペプチド結合性部分を含みうる。

20

【0071】

30

*in vivo*血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分と、ポリペプチド薬物部分は任意の所望の位置に存在させることができる。例えば、アミノ末端からカルボキシル末端へ向かって、それらの部分を以下の順序で存在させることができる：一個または複数のポリペプチド結合性部分、一個または複数のポリペプチド薬物部分、一個または複数のポリペプチド結合性部分。別の実施例では、アミノ末端からカルボキシル末端へ向かって、それらの部分を、以下の順序で存在させることができる：一個または複数のポリペプチド結合性部分、一個または複数のポリペプチド薬物部分、一個または複数のポリペプチド結合性部分、一個または複数のポリペプチド薬物部分、一個または複数のポリペプチド結合性部分。本明細書に記載したように、ポリペプチド結合性部分とポリペプチド薬物部分は、ペプチド結合により互いに直接結合し、あるいは適当なアミノ酸、またはペプチドもしくはポリペプチドリンカーにより結合させることができる。

40

【0072】

ある実施形態では、融合タンパク質は、次式（アミノ末端からカルボキシ末端へ）を有する連続したポリペプチド鎖である。

【0073】

a - (P) n 2 - b - (X) n 1 - c - (Q) n 3 - d または a - (Q) n 3 - b - (X) n 1 - c - (P) n 2 - d

[式中、

Xはポリペプチド薬物であり、

50

P および Q は、それぞれ独立に、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分であり、

a、b、c、および d は、それぞれ独立に欠落しているか、または 1 ~ 約 100 個のアミノ酸残基であり、

n 1、n 2、および n 3 は、それぞれ、存在する X、P、または Q 部分の数を表し、

n 1 は、1 ~ 約 10 であり、

n 2 は、0 ~ 約 10 であり、かつ

n 3 は、0 ~ 約 10 であり、

但し、両方の n 2 および n 3 が 0 であってはならず、かつ

但し、n 1 および n 2 が共に 1 であり、n 3 が 0 である場合、X は抗体鎖または抗体鎖フラグメントを含まない。】

10

【0074】

いくつかの実施形態では、n 2 は 1、2、3、4、5、または 6 であり、n 3 は 0 である。他の実施形態では、n 3 は 1、2、3、4、5、または 6 であり、n 2 は 0 である。他の実施形態では、n 1、n 2、および n 3 はそれぞれ 1 である。

【0075】

ある実施形態では、X は抗体鎖または抗体鎖フラグメントを含まない。

【0076】

好みしい実施形態では、P および Q は、それぞれ独立に、血清アルブミンに対して結合特異性を有するポリペプチド結合性部分である。

20

【0077】

特に好みしい実施形態では、薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）は、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位（例えば抗原結合部位）を含むポリペプチド結合性部分を含み、その際、ポリペプチド結合ドメインは、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントである。

【0078】

本発明はまた、薬物の in vivo 血清半減期を増加させる方法であって、薬物を、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分に結合させて、それによって薬物に比べて in vivo 血清半減期が長い薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）が生成されるステップを含む方法にも関する。

30

【0079】

いくつかの実施形態では、その方法は、薬物の活性を実質的に低減することなく薬物の in vivo 血清半減期を延長するためのものであり、薬物と、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを結合し、それによって前記薬物に比べて in vivo 血清半減期が長く、かつ前記薬物の活性の少なくとも約 90 % を保持する薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を生成することを含む。

【0080】

他の実施形態では、その方法は、薬物の in vivo 血清半減期を延長し、薬物の免疫原性を減少させるためのものであり、薬物と、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを結合し、それによって薬物に比べて in vivo 血清半減期が長く、前記薬物よりも免疫原性が低い薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を生成することを含む。

40

【0081】

他の実施形態では、その方法は、薬物の活性を実質的に低減することなく、薬物の免疫原性を減少させるためのものであり、薬物と、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを結合し、それによって前記薬物よりも免疫原性が低く、前記薬物の活性の少なくとも約 90 % を保持す

50

る薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を生成することを含む。

【0082】

他の実施形態では、その方法は、薬物のin vivo血清半減期を延長し、薬物の活性を実質的に低減されることなく、薬物の免疫原性を減少させるためのものであり、薬物と、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを結合させ、それによって前記薬物に比べてin vivo血清半減期が長く、前記薬物よりも免疫原性が低く、かつ前記薬物の活性の少なくとも約90%を保持する薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を生成することを含む。10

【0083】

薬物と、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位とを含むポリペプチド結合性部分は、本明細書に記載するように、リンカーを使用するかまたは使用せずに、共有結合（例えば、ペプチド結合）または非共有結合により、結合させることができる。いくつかの実施形態では、薬物と、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位とを含むポリペプチド結合性部分は共有結合により結合する。例えば、生成した薬物組成物は、薬物複合体または薬物融合体である。他の実施形態では、薬物と、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分は非共有結合により結合し、その薬物組成物は非共有結合性薬物複合体である。20

【0084】

その方法を使用し生成した薬物組成物は、薬物よりも高い活性（例えば、in vivo活性）を有しうる。いくつかの実施形態では、その方法は、薬物単独よりも活性（例えば、in vivo活性）が高い薬物組成物を生成するものであり、薬物と、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを結合し、それによって薬物に比べて活性が高い薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を生成することを含む方法である。そのような実施形態では、本明細書に記載したように、薬物組成物の活性は薬物の活性を超えることが好ましい。

【0085】

好ましい実施形態では、ポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する。特に好ましい実施形態では、ポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントである。30

【0086】

ある実施形態では、その方法は、一個または複数のポリペプチド（例えば、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメント）から前記ポリペプチド結合性部分を選択するステップを含み、その際、選択したポリペプチド結合性部分は、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して少なくとも約5mMのKDで結合する。40

【0087】

本発明は、医薬品を製造するための、in vivo血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分の使用であって、該医薬が、薬物が前記ポリペプチド結合性部分に結合している薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む、薬物のin vivo血清半減期を延長するためのものである上記使用に関する。

【0088】

いくつかの実施形態では、その使用は、約10%を超えて薬物の活性を減少させることなく薬物のin vivo血清半減期を延長するために、薬物が前記ポリペプチド結合性部分に結合している薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む医薬品を製造するためのものである。50

【 0 0 8 9 】

他の実施形態では、その使用は医薬品を製造するためのものであって、該医薬品は、薬物の *in vivo* 血清半減期を延長し、薬物の免疫原性を減少させるための、薬物が前記ポリペプチド結合性部分に結合している薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含むものである。

【 0 0 9 0 】

他の実施形態では、その使用は医薬品を製造するためのものであって、約 10 % を超えて薬物の活性を減少させずに薬物の免疫原性を減少させるための、薬物が前記ポリペプチド結合性部分に結合している薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含むものである。

10

【 0 0 9 1 】

他の実施形態では、その使用は医薬品を製造するためのものであって、薬物の *in vivo* 血清半減期を延長し、かつ約 10 % を超えて薬物の活性を減少させないように薬物の免疫原性を減少させるための、薬物が前記ポリペプチド結合性部分に結合している薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含むものである。

【 0 0 9 2 】

薬物組成物は、本明細書に記載するように、薬物と、*in vivo* 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分とを含むことができ、これらはリンカーを使用するかまたは使用せずに、共有結合（例えばペプチド結合）または非共有結合により結合されている。いくつかの実施形態では、薬物と、*in vivo* 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分は共有結合を通じて結合される。例えば、その薬物組成物は、薬物複合体または薬物融合体でありうる。他の実施形態では、薬物と、*in vivo* 血清半減期を延長するポリペプチドに対して結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分は、非共有結合により結合され、その薬物組成物は非共有結合性薬物複合体である。

20

【 0 0 9 3 】

ある実施形態では、その使用は、前記薬物よりも活性（例えば *in vivo* 活性）を増加させるための、薬物が前記ポリペプチド結合性部分に結合されている薬物組成物（例えば、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む医薬品を製造するためのものである。そのような実施形態では、本明細書に記載したように、薬物組成物の活性は薬物の活性よりも大きいことが好ましい。

30

【 0 0 9 4 】

好ましい実施形態では、ポリペプチド結合性部分は血清アルブミンに対して結合特異性を有する。特に好ましい実施形態では、ポリペプチド結合性部分は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントである。

【 0 0 9 5 】**血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント**

本発明の薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体は、（すなわち、一個または複数の）血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む。抗原結合性フラグメントは、薬物複合体または薬物融合体を投与する動物の血清アルブミンに対して結合特異性を有しうる。好ましくは、抗原結合性フラグメントは、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する。しかし、獣医学的適用も企図され、抗原結合性フラグメントは、所望の動物の血清アルブミンに対して、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、シカ、ミンクなどに由来の血清アルブミンに対しても、結合特異性を有しうる。いくつかの実施形態では、抗原結合性フラグメントは、2 以上の種由来の血清アルブミンに対して結合特異性を有する。例えば、本明細書に記載したように、ラット血清アルブミンおよびマウス血清アルブミンに対して結合特異性を有するヒト d A b、ならびにラット、マウス、およびヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する d A b が産生されている（表 1 および図 7）。そのような d A b は、同じ薬物複合体または薬物融合体を使用して前臨床試験および臨床試験を実施できるようにする利点をもたらす。

40

50

し、適當な代理薬物融合体または薬物複合体を用いた前臨床試験の実施を不要にする。

【0096】

本発明で使用するのに適當な抗原結合性フラグメントには、例えば、F_{a b}フラグメント、F_{a b'}フラグメント、F_(a b')₂フラグメント、F_vフラグメント[一本鎖F_v(scF_v)およびジスルフィド結合F_vを含む]、単一可変ドメイン、およびdAb(V_H、V_L)が含まれる。そのような抗原結合性フラグメントは、任意の適當な方法を使用し、例えば、ペプシン、パパイン、または必要な切断特異性を有する他のプロテアーゼを使用する抗体のタンパク質分解により、または組換え技術を使用して、作製することができる。例えば、F_vフラグメントは、適當なプロテアーゼによる抗体を消化することにより、または組換えDNA技術の使用によって、調製することができる。例えば、適當なペプチドリンカー、例えば、2～約20個のグリシル残基鎖などによって結合した軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする核酸を調製することができる。その核酸は、任意の適當な技術(例えば、形質移入、形質転換、感染)を使用し、適當な宿主(例えば大腸菌)に導入することができ、一本鎖F_vフラグメントの発現に適當な条件下でその宿主を維持することができる。様々な抗体の抗原結合性フラグメントは、一個または複数の終止コドンを天然の終止部位の上流に導入した抗体遺伝子を使用して、調製することができる。例えば、免疫グロブリン重鎖のF_(a b')₂部分をコードする発現構築体は、重鎖のヒンジ領域をコードする配列の3'末端に翻訳終止コドンを導入することによって設計することができる。本発明の薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体は、血清アルブミンに結合する抗体の個々の重鎖および軽鎖、あるいは血清アルブミンに結合する個々の鎖の一部分(例えば、単一のV_H、V_LまたはV_HH)を含みうる。

10

20

30

40

【0097】

所望の血清アルブミン(例えばヒト血清アルブミン)に結合する抗体およびその抗原結合性フラグメントは、適當な天然または人工抗体のコレクションから選択するか、または適當な宿主中で適當な免疫原に対して誘起することができる。例えば、抗体は、適當な宿主[例えば、マウス、ヒト抗体遺伝子組換えマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、非ヒト靈長類(例えばサル)]を血清アルブミン(例えば、単離または精製したヒト血清アルブミン)または血清アルブミンペプチド(例えば、少なくとも約8、9、10、11、12、15、20、25、30、33、35、37、または40個のアミノ酸残基を含むペプチド)によって免疫化することにより誘起することができる。血清アルブミンに結合する抗体および抗原結合性フラグメントもまた、ファージディスプレイラリーなどの組換え抗体または抗原結合性フラグメントのライブラリーから選択することができる。そのようなライブラリーは、天然または人工のアミノ酸配列を含む抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを含みうる。例えば、そのライブラリーには、人工CDR(例えば、ランダムアミノ酸配列)およびヒトフレームワーク領域を含むF_{a b}フラグメントを含めることができる[例えば、米国特許第6,300,064号(Knappikら)を参照]。他の例では、ライブラリーは、一個または複数のCDR中に配列多様性を有するscF_vフラグメントまたはdAb(単一V_H、単一V_Lまたは単一V_HH)を含む[例えば、国際公開第99/20749号(TomlinsonおよびWinter)、国際公開第03/002609A2号(Winterら)、国際公開第2004/003019A2号(Winterら)を参照]。

【0098】

血清アルブミンに結合する適當な抗体およびその抗原結合性フラグメントには、例えば、ヒト抗体およびその抗原結合性フラグメント、ヒト化抗体およびその抗原結合性フラグメント、キメラ抗体およびその抗原結合性フラグメント、げっ歯類(例えば、マウス、ラット)抗体およびその抗原結合性フラグメント、ならびにラクダ科動物抗体およびその抗原結合性フラグメントが含まれる。ある実施形態では、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体は、血清アルブミンと結合するラクダ科動物V_HHを含む。ラクダ科動物のV_HHは、天然には軽鎖を持たない重鎖抗体に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドである。そのような抗体は、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコを含むラクダ科の動物種で生じる。V_HH分子は、IgG分子の

50

約10分の1であり、単一ポリペプチドなので非常に安定しており、極端なpHおよび温度条件に対して抵抗性がある。血清アルブミンに結合する適当なラクダ科動物のV_HHには、国際公開第2004/041862号(Ablytoc N.V.)および本明細書(図15および配列番号:73~84)に開示されたものなどが含まれる。ある実施形態では、ラクダ科動物のV_HHは、ヒト血清アルブミンと結合し、かつ、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、または配列番号84に対して少なくとも約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%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。アミノ酸配列同一性は、BLAST P [KarlinおよびAltschul, Proc. Natl. Acad. Sd. USA 87(6):2264-2268(1990)]などの適当な配列アラインメントアルゴリズムおよびデフォルトパラメーターを使用して決定するのが好ましい。

【0099】

任意の適当な技術を使用して、その免疫化抗原を調製し、ポリクローナルやモノクローナル抗体産生を実施することができる。様々な方法が記載されている[例えば、Kohlerら、Nature, 256: 495-497(1975)およびEur. J. Immunol. 6: 511-519(1976); Milsteinら、Nature 266: 550-552(1977); Koprowskiら、米国特許第4,172,124号; Harlow, E. およびD. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, 第2巻(Supplement 27, Summer '94), Ausubel, F.M.ら編, (John Wiley & Sons: New York, NY), 第11章,(1991)を参照]。一般的に、モノクローナル抗体を望む場合、不死細胞系(例えば、SP2/0、P3X63Ag8.653、またはヘテロミエローマなどの骨髄腫細胞系)から得た適当な細胞と抗体産生細胞を融合することによってハイブリドーマを产生する。抗体産生細胞は、ヒトの末梢血から得ることができ、または好ましくはヒト抗体トランスジェニック動物または当該抗原で免疫化した他の適当な動物の脾臓もしくはリンパ節から得ることができる。ヒト起源の抗体(例えばヒト抗体)を产生する細胞は、適当な方法、例えば、ヒト抗体産生細胞とヘテロミエローマもしくはトリオーマ(trioma)との融合法、または活性化させたヒトB細胞をエプスタイン・バーウイルスに感染させることによって不死化する方法を使用し、作製することができる[例えば、米国特許第6,197,582号(Trakht); Niedbalaら、Hybridoma, 17:299-304(1998); Zanellaら、J Immunol Methods, 156:205-215(1992); Gustafssonら、Hum Antibodies Hybridomas, 2:26-32(1991)を参照]。融合し、または不死化した抗体産生細胞(ハイブリドーマ)は、選択的培養条件を使用して単離し、限界希釈によってクローン化することができる。所望の特異性を有する抗体を产生する細胞は、適当なアッセイ(例えばELISA)を使用し同定することができる。

【0100】

抗体はまた、ヒト、ヒト抗体トランスジェニック動物、または目的の抗原で免疫化した他の適当な動物[例えば、米国特許第5,627,052号(Schrader)を参照]の単離した抗原特異的抗体産生細胞(例えば、末梢血、または好ましくは所望の特異性を有する抗体を产生することが判明した脾臓またはリンパ節から得た細胞)から直接調製する(例えば、合成し、またはクローン化する)ことができる。

【0101】

薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、または薬物融合体が、ヒトに投与するものである場合、血清アルブミン(例えばヒト血清アルブミン)と結合する、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、あるいはそのような抗体の抗原結合性フラグメントでありうる。これらの種類の抗体および抗原結合性フラグメントは、ヒトでほとんど免疫原性でないかまたは非免疫原性であり、よく知られている利点をもたらす。例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体の抗原結合性フラグ

10

20

30

40

50

メントを含む、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、または薬物融合体は、薬物複合体または薬物融合体に結合するヒト抗体の同化のため、（他の十分に免疫原性の抗体と比較して）ほとんど効力損失せずに、または効力の損失なしに、ヒトに繰り返し投与することができる。薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、または薬物融合体が、獣医学的投与を目的とした場合、類似の抗体または抗原結合性フラグメントを使用することができる。例えば、ウマまたはウシなどの所望の動物から得たフレームワーク領域に、マウスまたはヒト抗体から得た C D R を移植することができる。

【 0 1 0 2 】

その C D R をコードするヒト抗体および核酸は、例えば、ヒトまたはヒト抗体組換え動物から得ることができる。ヒト抗体トランスジェニック動物（例えばマウス）は、ヒト抗体のレパートリー、例えば、XENOMOUSE (Abgenix, Fremont, CA) 、 HUMAB-MOUSE 、 KIRIN TC MOUSE 、または KM-MOUSE (MEDAREX, Princeton, NJ) を产生することができる動物である。一般的に、ヒト抗体トランスジェニック動物ゲノムは、機能上の再構成を受け得るヒト免疫グロブリン座位から得た D N A を含む導入遺伝子を含むように変化させてある。内在性遺伝子によりコードされている抗体を产生する動物の能力を排除するために、ヒト抗体トランスジェニック動物中の内在性免疫グロブリン座位を破壊したまま欠失させることができます。ヒト抗体トランスジェニック動物を产生するのに適当な方法は、当技術分野で周知である [例えば、米国特許第 5 , 939 , 598 号および同第 6 , 075 , 181 号 (Kucherlapati ら) 、同第 5 , 569 , 825 号、同第 5 , 545 , 806 号、同第 5 , 625 , 126 号、同第 5 , 633 , 425 号、同第 5 , 661 , 016 号、および同第 5 , 789 , 650 号 (Lonberg ら) 、 Jakobovits ら、 Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90: 2551- 2555 (1993) , Jakobovits ら、 Nature, 362: 255-258 (1993) , Jakobovits ら、国際公開第 98 / 50433 号、 Jakobovits ら、国際公開第 98 / 24893 号、 Lonberg ら、国際公開第 98 / 24884 号、 Lonberg ら、国際公開第 97 / 13852 号、 Lonberg ら、国際公開第 94 / 25585 号、 Lonberg ら、欧州特許第 0814259A2 号、 Lonberg ら、英国特許第 2272440A 号、 Lonberg ら、 Nature 368:856-859 (1994) , Lonberg ら、 Int Rev Immunol 13 (1) :65-93 (1995) , Kucherlapati ら、国際公開第 96 / 34096 号、 Kucherlapati ら、欧州特許第 0463151B1 号、 Kucherlapati ら、欧州特許第 0710719A1 号、 Surani ら、米国特許第 5 , 545 , 807 号、 Bruggemann ら、国際公開第 90 / 04036 号、 Bruggemann ら、欧州特許第 0438474B1 号、 Taylor ら、 Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1994) , Taylor ら、 Nucleic Acids Research 20 (23) :6287-6295 (1992) , Green ら、 Nature Genetics 7:13-21 (1994) , Mendez ら、 Nature Genetics 15:146-156 (1997) , Tuailion ら、 Proc Natl Acad Sci USA 90 (8) :3720-3724 (1993) および Fishwild ら、 Nat Biotechnol 14 (7) :845-851 (1996) を参照されたい。前記のもののそれぞれの教示をその全体を参照により本明細書に組み込む] 。

【 0 1 0 3 】

ヒト抗体トランスジェニック動物は、適当な抗原（例えばヒト血清アルブミン）により免疫化することができ、抗体産生細胞は、慣用の方法を使用し、単離し融合してハイブリドーマを形成することができる。所望の特性（例えば特異性、親和性）を有するヒト抗体を产生するハイブリドーマは、任意の適当なアッセイ（例えば E L I S A ）を使用して同定し、所望の場合には適当な培養技術を使用して選択しサブクローン化することができる。

【 0 1 0 4 】

ヒト化抗体および他の C D R 移植抗体は、任意の適当な方法を使用し調製することができる。 C D R 移植抗体の C D R は、血清アルブミンと結合する適当な抗体（ドナー抗体と称する）から得ることができる。他の適当な C D R 供給源には、ヒトまたは非ヒト供給源、例えば、げっ歯類（例えばマウス、ラット、ウサギ）、ニワトリ、ブタ、ヤギ、非ヒト霊長類（例えばサル）、あるいはライプラリーから得た天然および人工の血清アルブミン特異的抗体が含まれる。

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

ヒト化抗体のフレームワーク領域は、ヒト起源であることが好ましく、そのドナー抗体の抗原結合領域に類似する領域または等価領域（例えば重鎖可変領域または軽鎖可変領域）に対する配列類似性を有する任意のヒト抗体可変領域から得ることができる。ヒト起源のフレームワーク領域の他の供給源には、ヒト可変領域コンセンサス配列が含まれる〔例えば、Kettleborough, C.A.ら、Protein Engineering 4:773-783 (1991) ; Carterら、国際公開第94/04679号；Kabat, E.A.ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健福祉省、米国政府印刷局(1991)を参照〕。CDR移植抗体の種類は他に、適当な起源のフレームワーク領域、例えば、ウマ、ウシ、イヌ、ネコなどの生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされるフレームワーク領域を含みうる。

10

【0106】

ヒト起源のフレームワーク領域は、例えばヒトまたは動物起源のフレームワーク領域中のアミノ酸残基を、そのドナー抗体の対応する位置の残基に交換する「復帰突然変異」などの、アミノ酸置換または交換を含みうる。フレームワーク領域中に、一個または複数のアミノ酸の欠失、挿入、および置換を含む一個または複数の突然変異を生じさせることができる。変異体は、非ヒトドナー鎖またはヒトアクセプター鎖の突然変異誘発を含め、様々な適当な方法によって作製することができる〔例えば、米国特許第5,693,762号(Queenら)および同第5,859,205号(Adairら)を参照されたい。その教示全体を参照により本明細書に組み込む〕。

20

【0107】

抗体の定常領域、抗体鎖（例えば重鎖、軽鎖）、またはそのフラグメントもしくは一部分が存在する場合は、それらは任意の適当な供給源から誘導することができる。例えば、ヒト、ヒト化、およびある種のキメラ抗体の定常領域、抗体鎖（例えば重鎖、軽鎖）、またはそのフラグメントまたは一部分が存在する場合、それらはヒト起源であっても、任意の適当なヒト抗体または抗体鎖から誘導することもできる。例えば、ヒト起源の定常領域またはその一部分は、対立形質変異体を含む、ヒトまたは軽鎖、および／またはヒト（例えば1、2、3、4）、 μ 、（例えば1、2）、または重鎖から誘導することができる。ある実施形態では、抗体または抗原結合性フラグメント（例えば、ヒト起源の抗体、ヒト抗体）は、機能を改変しまたはあつらえる（例えばエフェクターモード）アミノ酸置換または交換を含みうる。例えば、ヒト起源の定常領域（例えば1定常領域、2定常領域）は、補体活性および／またはFc受容体結合を減少するように設計することができる〔例えば、米国特許第5,648,260号(Winterら)、同第5,624,821号(Winterら)および同第5,834,597号(Tsoら)を参照されたい。その教示全体を参照により本明細書に組み込む〕。好ましくは、そのようなアミノ酸置換または交換を含むヒト起源の定常領域のアミノ酸配列は、ヒト起源の非改変定常領域のアミノ酸配列に対し、その全長にわたって少なくとも約95%同一であり、より好ましくはヒト起源の非改変定常領域のアミノ酸配列に対し、その全長にわたって少なくとも約99%同一である。

30

【0108】

ヒト化抗体、CDR移植抗体、あるいはヒト化抗体またはCDR移植抗体の抗原結合性フラグメントは、任意の適当な方法を使用し調製することができる。いくつかのそのような方法は、当技術分野で公知である〔例えば、米国特許第5,225,539号(Winter)、同第5,530,101号(Queenら)を参照〕。ヒト化抗体またはCDR移植抗体の一部分（例えばCDR、フレームワーク、定常領域）は、適当な抗体から（例えば一部分を新規に合成することによって）取得しまたは直接誘導することができ、あるいは所望の特性を有する（例えば血清アルブミンと結合する）抗体をコードする核酸またはその鎖を产生し発現させることができる。鎖の一部分を調製するために、所望の位置に一個または複数の終止コドンを導入することができる。例えば、ヒト化またはCDR移植可変領域をコードする核酸（例えばDNA）配列は、既存のDNA配列を改変するためのPCR突然変異誘発法を使用し構築することができる〔例えば、Kamman, M.ら、Nucl. Acids Res.

40

50

17:5404 (1989) を参照]。新規な C D R をコードする P C R プライマーは、予めヒト化可変領域の D N A 鑄型にハイブリダイズすることができ、この可変領域は同じかまたは非常に良く似たヒト可変領域をベースとしている (Sato, K. ら、Cancer Research 53:851-856 (1993))。類似する D N A 配列が、鑄型として使用できない場合は、可変領域配列をコードする配列を含む核酸を合成オリゴヌクレオチドから構築することができる [例えば、Kolbinger, F., Protein Engineering 8:971-980 (1993) を参照]。シグナルペプチドをコードする配列もその核酸中に組み込むことができる (例えばベクターに挿入の際に合成)。アクセプター抗体由来の天然シグナルペプチド配列、別の抗体のシグナルペプチド配列、または他の適当な配列を使用することができる [例えば、Kettleborough, C. A., Protein Engineering 4:773-783 (1991) を参照]。変異体は、こうした方法または他の適当な方法を使用し容易に产生することができる。一実施形態では、クローン化した可変領域を変異させることができ、所望の特異性を有する変異体をコードする配列を選択することができる [例えば、ファージライブラリーから、例えば、米国特許第 5,514,548 号 (Krebber ら) および国際公開第 93/06213 号 (Hoogenboom ら) を参照]。

10

【0109】

血清アルブミンと結合する、抗体または抗原結合性フラグメントは、キメラ抗体またはキメラ抗体の抗原結合性フラグメントでありうる。キメラ抗体またはその抗原結合性フラグメントは、一生物種 (例えばマウス) の可変領域と別の生物種 (例えばヒト) の定常領域の少なくとも一部分とを含む。キメラ抗体およびキメラ抗体の抗原結合性フラグメントは、任意の適当な方法を使用し調製することができる。いくつかの適当な方法は、当技術分野で公知である [例えば、米国特許第 4,816,567 号 (Cabilly ら)、同第 5,116,946 号 (Capon ら) を参照]。

20

【0110】

血清アルブミンに結合する抗体の抗原結合性フラグメントを得るのに好ましい方法は、抗原結合性フラグメントのレパートリーから、所望の血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗原結合性フラグメント (例えば s c F v、d A b) を選択することを含む。例えば、本明細書に記載したように血清アルブミンに結合する d A b は、適当なファージディスプレイライブラリーから選択することができる。いくつかの適当なバクテリオファージディスプレイライブラリーおよび選択方法 (例えば、一価ディスプレイ系および多価ディスプレイ系) については記載されている [例えば、Griffiths ら、米国特許第 6,555,313 B 1 号 (参照により本明細書に組み込む)、Johnson ら、同第 5,733,743 号 (参照により本明細書に組み込む)、McCafferty ら、同第 5,969,108 号 (参照により本明細書に組み込む)、Mulligan-Kehoe、同第 5,702,892 号 (参照により本明細書に組み込む)、Winter, G. ら、Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994); Soumillion, P. ら、Appl Biochem. Biotechnol 47 (2-3):175-189 (1994); Castagnoli, L. ら、Comb. Chem. High Throughput Screen, 4 (2): 121-133 (2001)、国際公開第 99/20749 号 (Tomlinson および Winter)、同第 03/002609 A 2 号 (Winter ら)、同第 2004/003019 A 2 号 (Winter ら) を参照]。バクテリオファージライブラリーで提示されたポリペプチドは、任意の適当なバクテリオファージ、例えば、纖維状ファージ (例えば f d、M 13、F 1)、溶菌性ファージ (例えば T 4、T 7)、または R N A ファージ (例えば M S 2) などで提示させて、選択して血清アルブミン (例えばヒト血清アルブミン) と結合させることができる。

30

【0111】

一般的には、適当なファージコートタンパク質との融合タンパク質として、ポリペプチドレパートリーを提示するファージのライブラリーが使用される。そのようなライブラリーは、任意の適当な方法、例えば、提示された抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードするファージベクターまたはファージミドベクターのライブラリーを適当な宿主細菌中に導入すること、および (所望の場合には、例えば、適当なヘルパーファージまたは相補プラスミドを使用し) ファージを産生するために得た細菌を培養するステップを使用

40

50

することにより生成することができる。ファージライブリーアーは、沈殿および遠心分離など、任意の適当な方法を使用し、そのような培養から回収することができる。

【0112】

そのライブルリーは、任意の所望する量のアミノ酸配列多様性を含む、抗体またはその抗原結合性フラグメントのレパートリーを含みうる。例えば、レパートリーは、所望の生物から天然に生じた抗体に対応し、かつ／またはランダムもしくはランダム化したアミノ酸配列（例えばC D R配列）の一個または複数の領域を含むことができるアミノ酸配列を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントを含みうる。そのようなレパートリーまたはライブルリー中の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所定の、ランダムまたはランダム化したアミノ酸配列領域および共通アミノ酸配列領域を含みうる。ある実施形態では、レパートリー中の全ての、または実質的に全てのポリペプチドは、所望する種類の抗体の抗原結合性フラグメント（例えばヒトV_HまたはヒトV_L）である。例えば、レパートリー中の各ポリペプチドは、V_H、V_L、またはFv（例えば一本鎖Fv）を含みうる。

10

【0113】

任意の適当な方法を使用し、抗体またはその抗原結合性フラグメントの任意の所望の領域にアミノ酸配列多様性を導入することができる。例えば、任意の適当な突然変異誘発法（例えば低忠実度PCR、オリゴヌクレオチド介在突然変異誘発もしくは部位特異的突然変異誘発、NNKコドンを使用する相異点付加）または任意の他の適当な方法を使用し、相異点を加えた抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸ライブルリーを調製することによって、抗体可変ドメインの相補性決定領域など、標的領域にアミノ酸配列相異点を導入することができる。所望の場合には、相異点を加える抗体またはその抗原結合性フラグメントの領域をランダム化することができる。

20

【0114】

適当なファージディスプレイライブルリーを使用して、血清アルブミンに結合する抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを選択し、他の有益な特性を得ることができる。例えば、折り畳みが解けたときに凝集に抵抗性を示す抗体または抗原結合性フラグメントを選択することができる。凝集はポリペプチド濃度に左右され、多くの場合、部分的に折り畳まれた、または折り畳まれていない中間体から生じると思われる。高温および高ポリペプチド濃度など、部分的に折り畳まれた中間体に好都合な要因および条件は不可逆的凝集を促進する（Fink, A.L., *Folding & Design* 3:R1-R23 (1998)）。例えば、精製したポリペプチドを凍結乾燥調製物などの濃縮形態で保存することによって、しばしば、ポリペプチドのすくなくとも一部分の不可逆的凝集がもたらされる。さらに、大腸菌などの生体系での発現によるポリペプチドの產生は、しばしば、凝集ポリペプチドを含む封入体を形成する。封入体から活性ポリペプチドを回収することは、非常に困難であり、生物学的产生系に再折り畳みステップなどの追加のステップを加える必要があるであろう。

30

【0115】

加熱されると凝集しにくく可逆的に折り畳みが解かれる抗体および抗原結合性フラグメントは、適当なファージディスプレイライブルリーから選択することができる。一般的に、提示された抗体またはその抗原結合性フラグメントのレパートリーを含むファージディスプレイライブルリーは、提示された抗体またはその抗原結合性フラグメントの少なくとも一部分の折り畳みが解ける温度（T_s）まで加熱し、次いでT_s > T_cの温度（T_c）まで冷却し、それによって抗体またはその抗原結合性フラグメントの少なくとも一部分が再び折り畳まれ、ポリペプチドの一部分が凝集する。次いで、可逆的に折り畳みが解けた（unfold）血清アルブミンに結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを有する温度（T_r）で回収する。回収した可逆的に折り畳みが解けた抗体またはその抗原結合性フラグメントは融解温度（T_m）を有し、好ましくは、T_s > T_m > T_c および T_s > T_m > T_rとなるように、そのレパートリーをT_sまで加熱し、T_cまで冷却し、そして可逆的に折り畳みが解けた抗体またはその抗原結合性フラグメントをT_rで単離した。一般的に、ファージディスプレイライブルリーを約80℃まで加熱し、選択前に約室温または約40

40

50

まで冷却する。可逆的に折り畳みが解ける凝集に抵抗性を示す抗体またはその抗原結合性フラグメントは、所定のアミノ酸残基を可逆的に折り畳みが解ける能力を付与する残基で置換することによって、デザインしまたは作製することもできる [可逆的に折り畳みが解ける抗体またはその抗原結合性フラグメントを選択し、デザインし、または作製する方法の詳細な考察については、国際公開第 2004 / 101790 号 (Jespersら)、および米国仮特許出願第 60 / 470,340 号 (2003 年 5 月 14 日出願)、および米国仮特許出願第 60 / 554,021 号 (2004 年 3 月 17 日出願) を参照されたい。国際公開第 2004 / 101790 号および前述の米国仮出願の両方の教示を参照により本明細書に組み込む] 。

【 0116 】

10

可逆的に折り畳みが解け凝集に抵抗性を示す抗体またはその抗原結合性フラグメントによって、いくつかの利点がもたらされる。例えば、凝集に対するその抵抗性のために、可逆的に折り畳みが解ける抗体またはその抗原結合性フラグメントは、大腸菌などの適当な生物学的産生系を使用し発現させることによって、可溶性タンパク質として高収量で容易に產生させることができる。加えて、可逆的に折り畳みが解ける抗体またはその抗原結合性フラグメントは、製剤化し、かつ / または慣用のポリペプチドよりも高濃度で、かつ凝集性低く活性を消失させて保存することができる。DOM7h - 26 (配列番号 20) は可逆的に折り畳みが解けるヒト V_H である。

【 0117 】

20

好ましくは、血清アルブミンと結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントは、可変ドメイン (V_H 、 V_L 、 V_J) を含み、その際、フレームワーク領域 (FR) の一つまたは複数は、(a) ヒトフレームワーク領域のアミノ酸配列、(b) ヒトフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも 8 個連続したアミノ酸、または (c) ヒト生殖系列抗体の遺伝子セグメントによってコードされるアミノ酸配列、を含み、前記フレームワーク領域は Kabat により定義される通りである。ある実施形態では、フレームワーク領域の一つまたは複数のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列抗体の遺伝子セグメントがコードす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り、あるいは前記フレームワーク領域の一つまたは複数のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列抗体の遺伝子セグメントがコードする対応する前記フレームワーク領域のアミノ酸配列に比べて合計 5 個までのアミノ酸差異を含む。

30

【 0118 】

他の実施形態では、FR1、FR2、FR3、およびFR4 のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列抗体の遺伝子セグメントがコードする対応のフレームワーク領域のアミノ酸配列と同じであり、または FR1、FR2、FR3、およびFR4 のアミノ酸配列は、前記ヒト生殖系列抗体の遺伝子セグメントがコードする対応のフレームワーク領域のアミノ酸配列に比べて、合計 10 個までのアミノ酸差異を含む。他の実施形態では、前記 FR1、FR2、およびFR3 のアミノ酸配列は、前記ヒト生殖系列抗体の遺伝子セグメントがコードする対応のフレームワーク領域のアミノ酸配列と同じである。

【 0119 】

40

特定の実施形態では、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントは、ヒト生殖系列配列をベースとする免疫グロブリン可変ドメイン (例えば V_H 、 V_L) を含み、そして所望の場合には、相補性決定領域など、一個または複数の多様化領域を含むことができる。 V_H に適当なヒト生殖系列配列には、例えば、 V_H 遺伝子セグメント DP4、DP7、DP8、DP9、DP10、DP31、DP33、DP45、DP46、DP47、DP49、DP50、DP51、DP53、DP54、DP65、DP66、DP67、DP68、および DP69、ならびに JH セグメントの JH1、JH2、JH3、JH4、JH4b、JH5、および JH6 によってコードされる配列が含まれる。 V_L についてのヒト生殖系列配列には、例えば、 V_L 遺伝子セグメント DPK1、DPK2、DPK3、DPK4、DPK5、DPK6、DPK7、DPK8、DPK9、DPK10、DPK12、DPK13、DPK15、DPK16、DPK18、DPK19、DPK20

50

、 DPK21、DPK22、DPK23、DPK24、DPK25、DPK26、およびDPK28、およびJセグメントJ1、J2、J3、J4、およびJ5によってコードされる配列が含まれる。

【0120】

ある実施形態では、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、または薬物融合体は、血清アルブミンと結合するマウス、ラット、および／またはウサギの抗体、あるいはそのような抗体の抗原結合性フラグメントを含まない。

【0121】

抗原結合性フラグメントは、任意の所望の親和性オン速度（結合速度）およびオフ速度（解離速度）で血清アルブミンに結合することができる。親和性（KD）、オン速度（ K_{on} または k_a ）、およびオフ速度（ K_{off} または k_d ）を選択して、特定の薬物について所望の血清半減期を得ることができる。例えば、慢性炎症性疾患の炎症メディエーターを中和する薬物（例えば、炎症性サイトカインに結合し中和するdAb）について最長の血清半減期を得ることが望ましいこともありうるが、他方で多少毒性がある薬物（例えば化学療法剤）については短い半減期が望ましいであろう。一般的に、血清アルブミンとの結合には高速オン速度および高速もしくは中程度のオフ速度が好ましい。これらの特性を備えた抗原結合性フラグメントを含む薬物複合体および薬物融合体は、投与後、迅速に血清アルブミンに結合し、血清アルブミンを解離しそして速やかに再結合する。これらの特性は、（例えば腎臓を通る）迅速な薬物クリアランスを減少させるが、依然として薬物標的の効率的送達および利用を提供する。

10

20

30

【0122】

一般的に、血清アルブミンと結合する抗原結合性フラグメント（例えばdAb）はKD約1nM～約500μMで結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合性フラグメントは、表面プラズモン共鳴による決定（例えばビアコアの装置を使用）で、血清アルブミンと約10～約100nM、または約100nM～約500nM、または約500nM～約5mMのKD [KD = K_{off} (k_d) / K_{on} (k_a)]で結合する。特定の実施形態では、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、または薬物融合体は、血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）と約50nM、または約70nM、または約100nM、または約150nM、または約200nMのKDで結合する抗体の抗原結合性フラグメント（例えばdAb）を含む。本明細書に記載した薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体の改善された薬物動態特性（例えば、t_{1/2}延長、AUC増加）は、血清アルブミンと結合する抗原結合性フラグメントの親和性と相關するであろう。従って、一般的に、改善した薬物動態特性を有する薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、および薬物融合体は、血清アルブミンと（例えばヒト血清アルブミン）高親和性（例えば、約500nM以下、約250nM以下、約100nM以下、約50nM以下、約10nM以下、または約1nM以下、または約100pM以下のKD）で結合する抗原結合性フラグメントを使用し調製することができる。

40

【0123】

好ましくは、血清アルブミンと結合する抗原結合性フラグメントに複合体化または融合されている薬物は、表面プラズモン共鳴（例えばビアコアの装置を使用）によって測定したところ、血清アルブミンに対する抗原結合性フラグメントの親和性よりも強い親和性（KD）、および／または血清アルブミンに対する抗原結合性フラグメントの K_{off} よりも迅速な K_{off} （ k_d ）でその標的（薬物標的）と結合した。例えば、その薬物は、SAに結合する抗原結合性フラグメントのSAに対する親和性よりも約1～約1000000倍、または約100～約100000倍、または約1000～約100000倍、または約10000～約100000倍強力な親和性で、その標的に結合することができる。例えば、SAに結合する抗体の抗原結合性フラグメントは、約10μMの親和性で結合することができるが、薬物はその標的に約100pMの親和性で結合する。

【0124】

特定の実施形態では、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントは、ヒ

50

ト血清アルブミンと結合する d A b である。例えば、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 2 4、配列番号 2 5、および配列番号 2 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H d A b、あるいは配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、および配列番号 2 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H d A b。他の実施形態では、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントは、ヒト血清アルブミンと結合する d A b であり、前記アミノ酸配列のいずれかの C D R を含む。他の実施形態では、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントは、ヒト血清アルブミンと結合する d A b であり、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、または配列番号 2 3 に対して少なくとも約 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%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。アミノ酸配列同一性は、BLAST P [Karlin および Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (6) :2264-268 (1990)] など、適当な配列アラインメントアルゴリズムおよびデフォルトパラメーターを使用し決定するのが好ましい。

10

【 0 1 2 5 】

20

薬物

本発明のある種の薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体）は、例えば、個体中で生物学的標的分子と結びつき、かつ／またはその機能を変化させることにより、有益な治療的または診断的効果を得るために個体に投与することができる任意の薬物（例えば小型有機分子、核酸、ポリペプチド）を含むことができる。本発明の他の薬物組成物（例えば薬物融合体）は、ポリペプチドもしくはペプチド薬物を含むことができる。薬物融合体の好ましい実施形態では、薬物は、抗体鎖または抗体鎖のフラグメント（例えば V_H、V_L、V_C）を含まない。

【 0 1 2 6 】

30

T N F R 1 は、リガンドに結合する細胞外領域と、内因性シグナル伝達活性を持たない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とを含む膜貫通型受容体である。T N F と結合した T N F R 1 複合体は、3 本の T N F R 1 鎖と 3 本の T N F 鎖を含む（Banner ら、Cell, 73 (3) :431-445 (1993)）。その T N F リガンドは、3 本の T N F R 1 鎖により結合される三量体として存在する（前掲）。3 本の T N F R 1 鎖は、受容体リガンド複合体中で密接にまとまってクラスター化し、このクラスタリングが T N F R 1 媒介シグナル伝達の前提条件である。実際、抗 T N F R 1 抗体など、T N F R 1 に結合する多価薬剤は、T N F の不在下で T N F R 1 のクラスタリングおよびシグナル伝達を誘発することができ、通常、T N F R 1 アゴニストとして使用されている〔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、一般的に、T N F R 1 に結合する多価薬剤は、それが T N F と T N F R 1 の結合を阻止するとしても T N F R 1 の有効なアンタゴニストではない。

40

【 0 1 2 7 】

T N F R 1 および他の T N F 受容体スーパーファミリーメンバーの細胞外領域は、プレリガンド結合アセンブリドメインまたは P L A D ドメインと称する領域〔配列番号 8 5（ヒト T N F R 1）のアミノ酸 1 ~ 5 3、配列番号 8 6（マウス T N F R 1）のアミノ酸 1 ~ 5 3〕を含む〔米国政府、国際公開第 0 1 / 5 8 9 5 3 号；米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 0 8 9 9 2 A 1 号、Deng ら、Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005) 〕。

【 0 1 2 8 】

50

ヒト (Homo sapiens) T N F R 1 の細胞外領域は以下のアミノ酸配列を有する：

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEM

GQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKKNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSL
ECTKLCLPQIENVKGTEDSGTT (配列番号 85)。

【0129】

マウス (*Mus musculus*) TNFR1 の細胞外領域は以下のアミノ酸配列を有する：
LVPSLGDREKRDSLCPQGKYVHSKNNSICCTKCHKGTYLVSDCPSPGRDTVCRECEKGTFASQNYLRQCLSCKTCRKE
SQVEISPCQADKDTVCGCKENQFQRYLSETHFQCVDCSPCFNGTVTIPCKETQNTVCNCAGFFLRESECVPCSHCKNE
ECMKLCLPPPLANVTNPQDSGTA (配列番号 86)。

【0130】

特定の受容体のPLADドメインは、*in vivo*で互いに結合し、天然リガンドの存在下で受容体の活性化を防止することができる。例えば、TNFR1のPLADドメインは、*in vivo*でTNFR1の別のPLADドメイン（例えば細胞表面上に発現されたTNFR1）に結合し、また、天然リガンドに結合した際の、受容体のクラスタリング、およびそれに続くシグナル伝達を阻害する。

10

【0131】

TNF受容体スーパーファミリーは、以下を含む当技術分野で認められたタンパク質群である：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)、TRAIL-R-1 (TNFRSF10A、DR4、Apo2)、TRAIL-R2 (TNFRSF10B、DR5、KILLER、TRICK2A、TRICKB)、TRAIL-R3 (TNFRSF10C、DcR1、LIT、TRID)、TRAIL-R4 (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 (THFRSF23、TNfrh1)。

20

【0132】

数個のPLADドメインが当技術分野で公知であり、他のPLADドメインおよびPLADドメインの機能性変異体は、国際公開第01/58953号、米国特許出願公開第2003/0108992A1号；Dengら、Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005)に記載の方法などの任意の適当な方法を使用して、容易に単離し調製することができる。本明細書に記載したTNFR1受容体結合アッセイなどの好適な結合アッセイと共に、ポリペプチド、タンパク質フラグメント、およびペプチド変異体を調製するための多くの適当な方法が当技術分野で公知であり慣用されている。代表的PLADドメインを表8に示す。

30

【0133】

40

表 8

受容体	P L A D ドメイン
T N F R 1	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 8 7)
T N F R 2	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 8 8)
F A S	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 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 8 9)
F A S	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 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 9 0)
L T β R	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 9 1)
C D 4 0	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 9 2)
C D 3 0	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 9 3)
C D 2 7	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 9 4)
H V E M	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 9 5)
O X 4 0	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 9 6)
D R 4	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 9 7)

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、薬物融合体または薬物複合体は、P L A D ドメイン、例えば、T N F R 1、T N F R 2、F A S、L T R、C D 4 0、C D 3 0、C D 2 7、H V E M、O X 4 0、D R 4 または他のT N F 受容体スーパーファミリーメンバーのP L A D 、あるいはP L A D ドメインの機能性変異体を含む。P L A D ドメインの機能性変異体は、例えば、一個または複数のアミノ酸が欠失、挿入、または置換されているが、T N F R 1、T N F R 2、F A S、L T R、C D 4 0、C D 3 0、C D 2 7、H V E M、O X 4 0 、またはD R 4 の対応するP L A D に結合する能力は保持している、T N F R 1、T N F R 2、F A S、L T R、C D 4 0、C D 3 0、C D 2 7、H V E M、O X 4 0 、またはD R 4 のP L A D ドメインでありうる。機能性変異体P L A D ドメインのアミノ酸配列は、その対応するP L A D (例えばT N F R 1、T N F R 2、F A S、L T R、C D 4 0 、C D 3 0 、C D 2 7 、H V E M 、O X 4 0 、D R 4 のP L A D) のアミノ酸配列中のアミノ酸と同一である少なくとも約10個連続したアミノ酸、少なくとも約15個連続したアミノ酸、少なくとも約20個連続したアミノ酸、少なくとも約25個連続したアミノ酸、少なくとも約30個連続したアミノ酸、少なくとも約35個連続したアミノ酸、または少なくとも約40個連続したアミノ酸の領域を含む。加えて、またはそれに代えて、機能

性変異体 P L A D ドメインのアミノ酸配列は、その対応する P L A D (例えば T N F R 1 、 T N F R 2 、 F A S 、 L T R 、 C D 4 0 、 C D 3 0 、 C D 2 7 、 H V E M 、 O X 4 0 、 または D R 4 の P L A D) のアミノ酸配列に対して少なくとも約 8 0 % 、少なくとも約 8 5 % 、少なくとも約 9 0 % 、少なくとも約 9 1 % 、少なくとも約 9 2 % 、少なくとも約 9 3 % 、少なくとも約 9 4 % 、少なくとも約 9 5 % 、少なくとも約 9 6 % 、少なくとも約 9 7 % 、少なくとも約 9 8 % 、少なくとも約 9 9 % 同一でありうる。

【 0 1 3 5 】

特定の実施形態では、薬物融合体または薬物複合体は、P L A D ドメイン (例えば T N F R 1 、 T N F R 2 、 F A S 、 L T R 、 C D 4 0 、 C D 3 0 、 C D 2 7 、 H V E M 、 O X 4 0 、 または D R 4 の P L A D) もしくは機能性 P L A D 変異体と、血清アルブミンもしくは新生仔 F c 受容体に結合する d A b を含む。10

【 0 1 3 6 】

本発明に使用することができるポリペプチド薬物を含む追加の好適な薬物は、2 0 0 5 年 5 月 3 1 日に Domantis Limited の名で出願された国際出願第 P C T / G B 2 0 0 5 / 0 0 2 1 6 3 号に開示されている。適当な薬物の開示は、その出願の 4 5 ~ 5 0 ページと表 8 に開示されている。これらの薬物は、例えば、P L A D ドメインまたは P L A D ドメインの機能性変異体、in vivo 血清半減期を延長するポリペプチドに結合特異性を有する結合部位を含むポリペプチド結合性部分、および別のポリペプチド薬物を含む薬物組成物、融合体、または複合体を調製するために本発明に使用することができる。国際出願第 P C T / G B 2 0 0 5 / 0 0 2 1 6 3 号の教示、特に本発明での使用に適当な薬物に関する教示を参照により本明細書に組み込む。20

【 0 1 3 7 】

薬物融合体

本発明の薬物融合体は、ポリペプチド薬物である第 2 の部分に連結されている、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを第 1 の部分として含む一連のポリペプチド鎖を含む融合タンパク質である。第 1 および第 2 の部分は、ペプチド結合により互いに直接結合し、あるいは適当なアミノ酸、またはペプチドもしくはポリペプチドリンカーにより結合させることができる。追加の部分 (例えば第 3 、第 4) および / またはリンカー配列も、適宜存在させることができる。第 1 の部分は、第 2 の部分 (すなわちポリペプチド薬物) に対して N 末端位置、C 末端位置、または内部にあってよい。ある実施形態では、各部分は、一個を上回るコピーで存在しうる。例えば、その薬物融合体は、それぞれが血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント (例えば、ヒト血清アルブミンと結合する V_H を一個およびヒト血清アルブミンと結合する V_L を一個、あるいはヒト血清アルブミンと結合する 2 個以上の V_H または V_L) を含む 2 個以上の第 1 の部分を含むことができる。30

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では薬物融合体は次式を有する連続したポリペプチド鎖である。

a - (X)_{n1} - b - (Y)_{n2} - c - (Z)_{n3} - d または
a - (Z)_{n3} - b - (Y)_{n2} - c - (X)_{n1} - d

[式中]

X は、第 1 の標的に対して結合特異性を有するポリペプチド薬物であり、40

Y は、血清アルブミンに対し結合特異性を有する抗体の一本鎖抗原結合性フラグメントであり、

Z は、第 2 の標的に対して結合特異性を有するポリペプチド薬物であり、

a 、 b 、 c 、および d は、それぞれ独立に欠落しているか、または 1 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸残基であり、

n 1 は、1 ~ 約 1 0 であり、

n 2 は、1 ~ 約 1 0 であり、かつ

n 3 は、0 ~ 約 1 0 であり、

但し、n 1 および n 2 が共に 1 であり、n 3 が 0 である場合、X は抗体鎖または抗体鎖

40

50

フラグメントを含まない。】

【0139】

一実施形態では、XとZのどちらも、抗体鎖または抗体鎖フラグメントを含まない。一実施形態では、n₁は1であり、n₃は1であり、n₂は2、3、4、5、6、7、8、または9である。好ましくは、Yは、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(V_H)、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン(V_L)である。より好ましくは、Yは、ヒト血清アルブミンと結合するdAb(例えばV_H、V_L、またはV_HV_L)である。特定の実施形態では、XまたはZはヒトIL-1raまたはヒトIL-1raの機能性変異体である。

【0140】

ある実施形態では、Yは、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号24、配列番号25、および配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Yは、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0141】

他の実施形態では、薬物融合体は、X'がポリペプチド薬物であるX'部分およびY'部分を含み、但しX'は抗体鎖または抗体鎖フラグメントを含まず、Y'は血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の一本鎖抗原結合性フラグメントである。好ましくは、Y'は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(V_H)、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン(V_L)である。より好ましくは、Y'は、ヒト血清アルブミンと結合するdAb(例えばV_H、V_L、またはV_HV_L)である。X'はY'のアミノ末端に位置していてもよく、またはY'はX'のアミノ末端に位置していてもよい。いくつかの実施形態では、X'およびY'はアミノ酸によって、または2~約100個のアミノ酸を含むペプチドもしくはポリペプチドリンクによって分離されている。特定の実施形態では、X'は、ヒトIL-1raまたはヒトIL-1raの機能性変異体である。

【0142】

ある実施形態では、Y'は、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号24、配列番号25、および配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Y'は、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0143】

特定の実施形態では、薬物融合体は、血清アルブミンと結合するdAbと、ヒトIL-1raとを含む(例えば配列番号28)。好ましくは、dAbは、ヒト血清アルブミンと結合し、ヒトフレームワーク領域を含む。

【0144】

他の実施形態では、薬物融合体または薬物複合体は、ヒトIL-1raの成熟152アミノ酸形態に対して少なくとも約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%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有し、ヒトイントロイキン-1の1型受容体と拮抗することができるヒトIL-1ra機能性変異体を含む[Eisenbergら、Nature 343:341-346(1990)を参照]。その変異体は、一個または複数の追加のアミノ酸を含むことができる(例えば153または154またはそれ以上のアミノ酸を含む)。本発明の薬物融合体は、任意の適当な方法を使用し生成することができる。例えば、いくつかの実施形態は、薬物融合体をコードする核酸を適当な発現ベクターに挿入することによって作製することができる。次いで、得られた構築体を適当な宿主細胞に導入して発現させる。発現後、任意の適当な方法を使用し、融合タンパク質を細胞ライセート、または好ましくはその培地もしくはペリプラズムから単離し

10

20

30

40

50

または精製することができる [例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. 編、第 2 卷、Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991) を参照] 。

【 0145 】

適当な発現ベクターは、いくつかの構成要素、例えば、複製起点、選択マーカー遺伝子、転写調節領域（例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーター）などの一個または複数の発現調節領域、および / または一個または複数の翻訳シグナル、シグナル配列またはリーダー配列などを含むことができる。発現調節領域およびシグナル配列が存在する場合、それらはベクターまたは他の供給源によって提供されたものであってよい。例えば、抗体鎖をコードするクローニング核酸の転写および / または翻訳制御配列を使用して発現を誘導することができる。

10

【 0146 】

所望の宿主細胞中で発現させるためにプロモーターを提供することができる。プロモーターは構成的または誘導的でありうる。例えば、プロモーターが核酸の転写を誘導するよう、抗体をコードする核酸、抗体鎖、またはその一部分にプロモーターを作動可能に連結することができる。様々な原核生物宿主に適当なプロモーター（例えば、大腸菌に lac、tac、T3、T7 プロモーター）および真核生物宿主に適当なプロモーター（例えばサルウイルス 40 初期または後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター）入手可能である。

20

【 0147 】

さらに典型的には、発現ベクターは、ベクターを保有する宿主細胞を選択するための選択マーカー、および複製可能発現ベクターの場合には複製起点を含む。抗生物質耐性または薬物耐性を付与する産物をコードする遺伝子は一般的な選択マーカーであり、原核細胞 [例えばラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）、テトラサイクリン耐性 Tetr 遺伝子] および真核細胞 [例えば、ネオマイシン (G418 またはジェネテシン) 、 gpt (マイコフェノール酸) 、アンピシリン、またはハイグロマイシン耐性遺伝子] に使用することができる。ジヒドロ葉酸還元酵素マーカー遺伝子によって、様々な宿主でメトトレキサートでの選択が可能になる。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードする遺伝子（例えば LECU2 、 URA3 、 HIS3 ）は、酵母でしばしば選択マーカーとして使用される。ウイルスベクター（例えばバキュロウイルス）もしくはファージベクター、およびレトロウイルスベクターなどの宿主細胞ゲノム中に組み込むことができるベクターの使用も企図される。哺乳動物細胞、原核細胞（大腸菌）、昆虫細胞 [ドロソフィラシュニーダー (Drosophila Schneider) S2 細胞、 Sf9] 、および酵母 [P. metanolica (methanolica) 、 P. pastoris (pastoris) 、出芽酵母] で発現させるのに適当な発現ベクターは当技術分野で公知である。

30

【 0148 】

薬物融合体を発現する組換え宿主細胞、および本明細書に記載した薬物融合体を調製する方法を提供する。その組換え宿主細胞は、薬物融合体をコードする組換え核酸を含む。薬物融合体は、適当な宿主細胞中でそのタンパク質をコードする組換え核酸の発現させることによって、または他の適当な方法を使用し生成することができる。例えば、本明細書に記載した発現構築体は、を適当な宿主細胞に導入することができ、得られた細胞は構築体の発現に適当な条件下で（例えば培地、動物中で）維持することができる。適当な宿主細胞は、大腸菌、枯草菌などの細菌細胞および / または他の適当な細菌を含む原核生物、真核生物、例えば、真菌細胞または酵母細胞（例えば、ピキア・パストリス、アスペルギルス種、サッカロミセスセレビシエ、シゾサッカロミセスポンプ、アカパンカビ）、あるいは他の下等真核生物の細胞および高等真核生物の細胞、例えば、昆虫細胞 [例えば Sf9 昆虫細胞（国際公開第 94/26087 号 (O'Connor) ）または哺乳動物細胞 [例えば COS-1 (ATCC 受託番号 CRL-1650) および COS-7 (ATCC 受託番号 CRL-1651) などの COS 細胞、 CHO (例えば ATCC 受託番号 CRL-9096) 、 293 (ATCC 受託番号 CRL-1573) 、 HeLa (ATCC 受託番号 CC 50

L - 2)、CV1 (ATCC受託番号CCL - 70)、WOP (Daileyら、J. Virol. 54 :739-749 (1985))、3T3、293T (Pearら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8 392-8396 (1993)]、NSO細胞、SP2 / 0、HuT78細胞など [例えれば、Ausubel, F.M. ら編、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates および John Wiley & Sons Inc., (1993) を参照] でありうる。

【 0149 】

本発明は、薬物融合体の発現に適当な条件下で本発明の組換え宿主細胞を維持することを含む薬物融合体の作製方法も含む。その方法は、所望の場合にはさらに、薬物融合体を単離しましたは回収することを含むことができる。別の実施形態では、薬物融合体の成分 (例えればヒト血清アルブミンと結合する dAb、および IL - 1ra) は、一連のポリペプチド鎖を作製するために化学的に構築される。

10

【 0150 】

複合体

別の態様では、本発明は、薬物に結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む複合体を提供する。そのような複合体は、薬物が共有結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む「薬物複合体」、および薬物が非共有結合している、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントを含む「非共有結合性薬物複合体」を含む。好ましくは、複合体は十分に安定的であり、その結果、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと薬物は、in vivo条件下で (例えればヒトに投与した場合) 、(共有結合または非共有結合で) 互いに実質的に結合したまま残存する。好ましくは、その複合体のうちせいぜい約 20 %、せいぜい約 15 %、せいぜい約 10 %、せいぜい約 9 %、せいぜい約 8 %、せいぜい約 7 %、せいぜい約 6 %、せいぜい約 5 %、せいぜい約 4 %、せいぜい約 3 %、せいぜい約 2 %、せいぜい約 1 %、または実質的にゼロが、in vivo条件下で解離または分解して薬物および抗原結合性フラグメントを放出するだけである。例えば、「in vivo」条件下での安定性は、薬物複合体または非共有結合性薬物複合体を血清 (例えればヒト血清) 中で 24 時間 37 度でインキュベートすることによって好都合に評価することができる。そのような方法の一例では、薬物複合体と非複合体化薬物の等量を希釈して異なる 2 種の血清バイアルに入れる。各バイアルの内容物の半量を -20 度直ちに凍結し、他方の半量を 37 度で 24 時間インキュベートする。次いで、SDS - PAGE および / またはウェスタンプロットティングなどの任意の適当な方法を使用し、全 4 試料を分析することができる。ウエスタンプロット法では、薬物に結合する抗体を使用してプローブすることができる。薬物複合体レーンの全薬物は、もし解離がなければ、薬物複合体のサイズで泳動する。他の多くの適当な方法を使用して「in vivo」条件下での安定性を評価することができ、例えれば、クロマトグラフィー (例えればゲル濾過、イオン交換、逆相) 、ELISA、質量分光法など、適当な分析法を使用し上記のように調製した試料を分析することによって評価できる。

20

【 0151 】

薬物複合体

別の態様では、本発明は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントと、前記抗原結合性フラグメントと共有結合している薬物とを含む薬物複合体であるが、但し薬物複合体が单一の連続するポリペプチド鎖ではない薬物複合体を提供する。

30

【 0152 】

いくつかの実施形態では、薬物複合体は、血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン (V_H)、または血清アルブミンに対して結合特異性を有する免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン (V_L)、ならびに前記 V_H または V_L と共有結合している薬物を含むが、但し、この薬物複合体は单一の連続するポリペプチド鎖ではない。好ましくは、薬物複合体は、血清アルブミンと結合する单一の V_H 、または血清アルブミンと結合する单一の V_L を含む。ある実施形態では、薬物複合体は、ヒト血清アルブ

40

50

ミンと結合し、かつ配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号24、配列番号25、および配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むV_{dAb}を含む。他の実施形態では、薬物複合体は、ヒト血清アルブミンと結合し、かつ配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むV_{HdAb}を含む。

【0153】

薬物複合体は、任意の所望の薬物を含むことができ、任意の適当な方法を使用し調製することができる。例えば、薬物は、直接、あるいはアミノ末端やカルボキシ末端など、一個または複数の位置で適当なリンカー部分を介して、またはアミノ酸側鎖を通じて間接的に、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと結合することができる。一実施形態では、薬物複合体は、ヒト血清アルブミンと結合するdAbと、ポリペプチド薬物（例えばヒトIL-1raまたはヒトIL-1raの機能性変異体）とを含み、ポリペプチド薬物（例えばヒトIL-1raまたはヒトIL-1ra機能性変異体）のアミノ末端は、dAbのカルボキシ末端と直接または適当なリンカー部分を介して結合する。他の実施形態では、薬物複合体は、ヒト血清アルブミンと結合するdAbと、dAbに共有結合している2種以上の異なる薬物とを含む。例えば、第1の薬物をdAbのカルボキシル末端と（直接的または間接的に）共有結合させることができ、第2の薬物をそのアミノ末端と（直接的または間接的に）共有結合し、または側鎖アミノ基（例えばリジンのアミノ基）を通じて共有結合させることができる。そのような薬物複合体は、公知の選択的結合方法を使用し調製することができる[例えば、Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)]を参照]。

10

20

30

40

【0154】

薬物を血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントと複合体化するための様々な方法を使用することができる。選択される特定の方法は複合体化する薬物に依存する。所望の場合には、抗原結合性フラグメントと薬物を結合するために、末端官能基を含むリンカーを使用することができる。一般的に、複合体化は、反応性官能基を含む（または、反応性官能基を含むように改変した）薬物をリンカーと、または直接、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと反応させることにより実現する。適当な条件下で、第2の化学基と反応し、それによって共有結合を形成できる化学的部分または官能基を含む（または含むように改変した）薬物を反応させることによつて共有結合は形成する。所望の場合には、任意の適当な方法を使用し[例えば、Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996) を参照]、その抗原結合性フラグメントまたはリンカーに適当な反応性化学基を加えることができる。多くの適当な反応性化学基の組合せが、当技術分野で公知であり、例えば、アミン基を求電子性基、例えば、トシレート、メシレート、ハロ（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NHS）などと反応させることができる。チオールは、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ビリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール（TNB-チオール）などと反応することができる。アルデヒド官能基は、アミン含有またはヒドラジド含有分子と結合することができ、アジド基は、三価の亜リン酸基と反応して、ホスホルアミダートまたはホスホリミド結合を形成することができる。活性基を分子に導入するのに適当な方法は、当技術分野で公知である[例えば、Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996) を参照]。

50

【0155】

いくつかの実施形態では、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントは、2個のチオールが反応してジスルフィド結合を形成することによって薬物に結合する。他の実施形態では、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントは、イソチオシアニ酸基と一级アミンが反応して、イソチオ尿素結合を生成することによって薬物に結合する。

50

【0156】

適当なリンカー部分は、直鎖または分枝鎖であってよく、例えば、テトラエチレングリコール、 $C_2 - C_{1,2}$ アルキレン、-NH-(CH₂)_p-NH-、または-(CH₂)_p-NH-（式中pは1～12）、-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH-、1～約100（好ましくは1～約12）個のアミノ酸などを含むポリペプチド鎖を含む。

【0157】

非共有結合性薬物複合体

数種の非共有結合（例えば水素結合、ファンデルワールス相互作用）は、安定した高度に特異的な分子間結合を生成することができる。例えば、相補的結合パートナー間の複数の非共有結合を通して実現した分子認識相互作用は、多くの重要な生物学的相互作用、例えば、酵素とその基質の結合、抗体による抗原の認識、リガンドとその受容体の結合、ならびにタンパク質およびペプチドの三次元構造の安定化の基礎をなす。従って、そのような弱い非共有結合性相互作用（例えば水素結合、ファンデルワールス相互作用、静電相互作用、疎水的相互作用など）を使用して、薬物と血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントを結合させることができる。

【0158】

好ましくは、抗原結合性フラグメントと薬物とを結合する非共有結合は、in vivo条件下で（例えばヒトに投与した場合）、抗原結合性フラグメントと薬物が、それぞれに実質的に結合した状態でいられるのに十分な強度である。一般的に、抗原結合性フラグメントと薬物とを結合する非共有結合は、少なくとも約10¹⁰ M⁻¹の強度を有する。好ましい実施形態では、非共有結合の強度は、少なくとも約10¹¹ M⁻¹、少なくとも約10¹² M⁻¹、少なくとも約10¹³ M⁻¹、少なくとも約10¹⁴ M⁻¹、または少なくとも約10¹⁵ M⁻¹である。ビオチンとアビジン間およびビオチンとストレプトアビジン間の相互作用は、多くの条件下で非常に効率的であり安定していることが知られており、本明細書に記載するように、ビオチンとアビジン間またはビオチンとストレプトアビジン間の非共有結合を使用して、本発明の非共有結合性薬物複合体を調製することができる。

【0159】

非共有結合は、血清アルブミンに特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントと薬物との間に直接形成することができ、または一方のパートナーが薬物と共有結合し、その相補的結合パートナーが抗原結合性フラグメントと共有結合する適当な相補的結合パートナー（例えば、ビオチンおよびアビジンもしくはストレプトアビジン）間に形成することができる。相補的結合パートナーを使用する場合、結合パートナーの一方は、直接または適当なリンカー部分を介して薬物と共有結合させることができ、その相補的結合パートナーは、直接または適当なリンカー部分を介して血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントと共有結合させることができる。

【0160】

相補的結合パートナーは、互いに選択的に結合する分子対である。多くの相補的結合パートナー、例えば、抗体（またはその抗原結合性フラグメント）とその同族抗原またはエピトープ、酵素とその基質、および受容体とそのリガンドが当技術分野で公知である。好ましい相補的結合パートナーは、ビオチンとアビジン、およびビオチンとストレプトアビジンである。

【0161】

相補的結合対メンバーと、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗原結合性フラグメントまたは薬物との直接的または間接的共有結合は、上記のように実現することができ、例えば、反応性官能基を含む（または、反応性官能基を含むように改変した）相補的結合パートナーと、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントとをリンカーの使用の有無により反応させることによって実現することができる。選択する特定の方法は、複合体化させる化合物（例えば薬物、相補的結合パートナー、血清アルブミンと結

合する抗体の抗原結合性フラグメント) 次第である。所望の場合には、末端反応性官能基を含むリンカー(例えばホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカー)は、抗原結合性フラグメントおよび/または薬物と、相補的結合パートナーとを結合するために使用することができる。一実施形態では、2個の別個の反応性部分を含むヘテロ二官能性リンカーを使用することができる。反応性部分の一つが、血清アルブミンに対して結合特異性を有する抗体の抗原結合性フラグメントとまたは薬物と反応し、かつ他方の反応性部分がその相補的結合パートナーと反応するように、ヘテロ二官能性リンカーを選択することができる。任意の適当なリンカー(例えばヘテロ二官能性リンカー)を使用することができ、多くのそのようなリンカーが当技術分野で公知であり、市販(例えばPierce Biotechnology, Inc., IL)のものを利用することができる。

10

【0162】

組成物および治療診断法

医薬または生理学的組成物(例えばヒトおよび/または獣医学的投与用)を含め、本発明の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を含む組成物を提供する。医薬組成物または生理学的組成物は、一種または複数の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)と、薬学的もしくは生理学的に許容される担体とを含む。典型的には、これらの担体には、生理食塩水および/または緩衝化媒体を含む、水溶液またはアルコール/水溶液、乳濁液、または懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム水溶液、リング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、ならびに乳酸リングル液が含まれる。ポリペプチド複合体を懸濁液で保持する必要がある場合、生理学的に許容される適当なアジュバントは、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、およびアルギン酸塩など、増粘剤から選択しうる。静脈内ビヒクルには、リングルのデキストロースをベースとするものなど、液状栄養補液および電解質補液が含まれる。防腐剤および他の添加物、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガスなども存在しうる(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。

20

【0163】

組成物には、所望の量の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を含めることができる。例えば、組成物は、重量で約5%~約99%の薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、または薬物融合体を含むことができる。特定の実施形態では、組成物は、重量で約10%~約99%、または約20%~約99%、または約30%~約99%または約40%~約99%、または約50%~約99%、または約60%~約99%、または約70%~約99%、または約80%~約99%、または約90%~約99%、または約95%~約99%の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を含むことができる。一例では、組成物は凍結し乾燥(凍結乾燥)されている。

30

【0164】

典型的には、本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、以下の炎症状態(例えば、急性および/または慢性炎症性疾患)の予防、抑制、または治療に使用される: 例えば、慢性閉塞性肺疾患(例えば慢性気管支炎、慢性閉塞性気管支炎、肺気腫)、アレルギー性過敏症、癌、細菌またはウイルス感染、細菌性肺炎(例えばブドウ球菌性肺炎)などの肺炎、自己免疫疾患[それだけには限らないが、I型糖尿病、多発性硬化症、関節炎{例えば骨関節炎、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、ループス関節炎、脊椎関節症(例えば強直性脊椎炎)}が含まれる]、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患(例えばクロhn病、潰瘍性大腸炎)、ベーチェット症候群および重症筋無力症)、子宮内膜症、乾癬、腹部癒着(例えば腹部手術後)、喘息、および敗血症性ショック。本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、慢性または急性外傷性疼痛、慢性または急性神経因性疼痛、急性または慢性筋骨格痛、慢性または急性癌疼痛など、疼痛の予防、抑制、または治療に使用することができる。本明細書に記載した薬物組成物(例えば

40

50

薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、診断を目的として投与することもできる。

【0165】

本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、以下の疾患を予防し、抑制し、または治療するための使用にも適している:肺炎症、慢性閉塞性呼吸器疾患(例えば慢性気管支炎、慢性閉塞性気管支炎、肺気腫)、喘息(例えばステロイド耐性喘息)、肺炎(例えば、ブドウ球菌性肺炎などの細菌性肺炎)、過敏性間質性肺炎、好酸球増加症による肺浸潤、環境的肺疾患、肺炎、気管支拡張症、囊胞性線維症、間質性肺疾患、原発性肺高血圧症、肺血栓塞栓症、胸膜疾患、縦隔疾患、横隔膜疾患、換気低下、過換気、睡眠時無呼吸、急性呼吸促迫症候群、中皮腫、肉腫、移植片拒絶、移植片対宿主疾病、肺癌、アレルギー性鼻炎、アレルギー、石綿沈着症、アスペルギルス腫、アスペルギルス症、気管支拡張症、慢性気管支炎、肺気腫、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、侵襲性肺炎球菌疾患(EPD)、インフルエンザ、非結核性放線菌、胸水浸出液、塵肺症、肺サイトーシス、肺炎、肺放線菌症、肺胞蛋白症、肺炭疽、肺水腫、肺塞栓、肺炎症、肺組織球症X(好酸球性肉芽腫症)、肺性高血圧症、肺ノカルジア症、肺結核、肺静脈閉塞性疾患、リウマチ性肺疾患、類肉腫症、ウェジナー肉芽腫症、および非小細胞肺癌。

10

【0166】

本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、インフルエンザ、RSV関連呼吸器疾患、およびウイルス性肺(呼吸性)疾患を予防し、抑制し、または治療する使用にも適している。

20

【0167】

本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、骨関節炎または炎症性関節炎を予防し、抑制し、または治療する使用にも適している。「炎症性関節炎」は、免疫系が関節で炎症を引き起こし、または悪化させる関節の疾患をさし、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、および脊椎関節症、例えば、強直性脊椎炎、反応性関節炎、ライター症候群、乾癐性関節炎、乾癐性脊椎炎、腸疾患性関節炎、腸疾患性脊椎炎、若年発症脊椎関節症、および未分化脊椎関節症が含まれる。一般的には、炎症性関節炎は、白血球による滑膜組織および/または滑液の浸潤を特徴とする。

30

【0168】

本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を使用して予防し、抑制し、または治療することができる癌には、リンパ腫(例えば、B細胞リンパ腫、急性骨髓性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫)、骨髄腫(例えば多発性骨髄腫)、肺癌(例えば小細胞肺癌、非小細胞肺癌)、直腸結腸癌、頭頸部癌、膀胱癌、肝臓癌、胃癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、白血病(例えば急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病)、腺癌、腎臓癌、造血器癌(例えば骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患[例えば真性多血症、本態性(または原発性)血小板血症、特発性骨髓線維症]などが含まれる。

【0169】

本明細書に記載した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、子宮内膜症、線維症、不妊症、早産、勃起機能障害、骨粗鬆症、糖尿病(例えばI型糖尿病)、成長障害、HIV感染、呼吸促迫症候群、腫瘍、および夜尿症を予防し、抑制し、または治療する使用にも適している。

40

【0170】

本発明の適用では、「予防」という用語は、疾患が誘発される前に保護的組成物を投与することを伴う。「抑制」は、誘発的事象の後ではあるが、疾患が臨床的に出現する前に組成物を投与することを言う。「治療」は、疾患症状が顕在化した後に保護的組成物を投与することを伴う。

【0171】

疾患に対する保護または疾患の治療における薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結

50

合性薬物複合体、薬物融合体)の有効性をスクリーニングするために使用可能な、動物モデル系が利用可能である。感受性マウスで全身性エリテマトーデス(SLE)を検査する方法は当技術分野で公知である(Knightら(1978)J. Exp. Med., 147: 1653; Reinerstenら(1978)New Eng. J. Med., 299: 515)。重症筋無力症(MG)は、SJL/J雌マウスで、別の種属の可溶性AchRタンパク質によりその疾患を誘発することによって検査する(Lindstromら(1988)Adv. Immunol., 42: 233)。関節炎は、マウス感受性株でI型コラーゲンを注射することによって誘発される(Stuartら(1984)Ann. Rev. Immunol., 42: 233)。放線菌ヒートショックタンパク質を注射することによって、感受性ラットでアジュバント関節炎を誘発したモデルが記載されている(Van Edenら(1988)Nature, 331: 171)。骨関節炎の治療の有効性は、コラゲナーゼの関節内注射によって関節炎を誘発したマウスマルクで評価することができる(Bloom, A.B.ら、Osteoarthritis Cartilage 12:627-635(2004))。甲状腺炎は、記載されるようにチログロブリンを投与することによってマウスで誘発される(Maronら(1980)J. Exp. Med., 152: 1115)。インスリン依存性糖尿病(IDDM)は天然に生じ、またはKanasawaら(1984)Diabetologia, 27: 113によって記載されたものなど、ある種のマウス株で誘発することもできる。マウスおよびラットのEAEは、ヒトでMSのモデルとして役立つ。このモデルでは、ミエリン塩基性タンパク質の投与によって脱髓性疾患が誘発される[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Satohら、(1987)J. Immunol., 138: 179]を参照]。

10

20

30

40

【0172】

本発明の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、別々に投与する組成物として、または他の薬剤と併せて使用しうる。これらには、様々な免疫療法薬物、例えば、シルコスボリン、メトトレキサート、アドリアマイシンまたはシスプラチン、免疫毒素などを含むことができる。例えば、肺炎または呼吸器疾患を予防し、抑制し、または治療するために薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を投与する場合、以下のものと併せて投与することができる:ホスホジエステラーゼインヒビター(例えばホスホジエステラーゼ4インヒビター)、気管支拡張薬(例えば2-アゴニスト、抗コリン作動薬、テオフィリン)、短時間作用性-アゴニスト[例えばアルブテロール、サルブタモール、バンブテロール、フェノテロール、イソエーテリン(isoetherine)、イソプロテレノール、レバルブテロール、メタプロテレノール、ビルブテロール、テルブタリンおよびトルンレート(tornlate)]、長時間作用性-アゴニスト(例えば、フルモテロールおよびサルメテロール)、短時間作用性抗コリン作動薬(例えば臭化イプラトロピウムおよび臭化オキシトロピウム)、長時間作用性抗コリン作動薬(例えばチオトロピウム)、テオフィリン(例えば、短時間作用性製剤、長時間作用性製剤)、吸入ステロイド(例えばベクロメタゾン、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾンおよびトリアムシノロン)、経口ステロイド(例えばメチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾロン、およびブレドニゾン)、短時間作用性-アゴニストと抗コリン作動薬(例えばアルブテロール/サルブタモール/イプラトロピウム、およびフェノテロール/イプラトロピウム)の併用、長時間作用性-アゴニスト、吸入ステロイド(例えばサルメテロール/フルチカゾン、およびフルモテロール/ブデソニド)および粘液溶解薬(例えば、エルドステイン、アセチルシスティン、プロムヘクシン(bromheksin)、カルボシスティン、グアイアフェネシン(guaifenesin)、およびヨウ化処理したグリセロールの併用。

40

50

【0173】

例えば、関節炎[例えば炎症性関節炎(例えば関節リウマチ)]を予防し、抑制し、または治療するために、薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を投与する場合、以下のものと組み合わせて投与することができる:疾患を改変する抗リウマチ剤(例えばメトトレキサート、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、レフルノミド、アザチオプリン、D-ペニシラミン、金(経口または筋肉内)、ミノサイ

クリン、シクロスボリン、ブドウ球菌プロテインA)、非ステロイド性抗炎剤[例えば、ロフェコキシブなどのCOX-2選択的NSAID)、サリチラート、グルココリコイド(glucocorticoids)(例えばプレジソン(predisone)]、および鎮痛薬。

【0174】

医薬組成物には、本発明の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)、または異なる薬物を含む本発明による薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)の組合せと併せて、様々な細胞傷害剤または他の薬剤の「カクテル」を含めることができる。

【0175】

薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、任意の適当な技術に従い、任意の個体または被験体に投与することができる。薬物組成物および治療しようとする疾患もしくは状態に応じて、例えば、経口、食餌性、局所、経皮、経直腸、非経口(例えば静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、くも膜下腔内、関節内注射)、および吸入(例えば気管支内、鼻腔内または経口吸入、鼻腔内点鼻剤)投与を含め、様々な投与経路が可能である。投与は、示すように局所的または全身的であってよい。好ましい投与方式は、選択した薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)、および治療する状態(例えば疾患)に応じて変化させることができる。投薬量および投与頻度は、患者の年齢、性別、および状態、他の薬物の同時投与、対抗指標、および臨床医が考慮すべき他のパラメーターに依存する。薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)の治療有効量を投与する。治療有効量は、投与条件下で所望の治療効果を得るのに十分な量である。

10

20

30

40

50

【0176】

本明細書では「被験体」または「個体」という用語は、動物、例えば、それだけには限らないが、靈長類(例えばヒト)、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、あるいは他のウシ類、ヒツジ類、ウマ類、イヌ類、ネコ類、げっ歯類、またはマウス類を含む哺乳動物を含むと定義する。

【0177】

薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、中性化合物または塩として投与することができる。アミン基または他の塩基性基を含む化合物(例えば薬物組成物、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)の塩は、例えば、塩化水素、臭化水素、酢酸、過塩素酸など、適当な有機酸または無機酸と反応させることによって得ることができる。四級アンモニウム基を含む化合物はまた、カウンターアニオン、例えば、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン、酢酸イオン、過塩素酸イオンなどを含む。カルボン酸基または他の酸性官能基を含む化合物塩は、適当な塩基、例えば、水酸化塩基を反応させることによって調製できる。酸性官能基の塩は、ナトリウム、カリウムなどのカウンターカチオンを含む。

【0178】

本発明は、被験体(例えば患者)に薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)を投与するために使用され、薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)、薬物送達器具、および任意で使用説明書を含むキットも提供する。薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、凍結乾燥剤など、製剤として提供することができる。ある実施形態では、薬物送達器具は、注射器、吸入器、鼻腔内または眼投与用器具(例えば、噴霧器、眼または鼻滴容器)、および無針注射器具からなる群から選択される。

【0179】

本発明の薬物組成物(例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体)は、保存用に凍結乾燥し、使用前に適当な担体で再構成することができる。任意の適当な凍結乾燥法(例えばスプレー乾燥、圧搾乾燥)および/または再構築技術を使用することができる。凍結乾燥および再構築により抗体活性が様々な程度で失われる可能性があり(例えば、従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも活性の損失が非常に大き

い傾向がある）、補うために使用濃度を調整する必要がありうることは当業者よって理解されよう。特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載した凍結し乾燥した（凍結乾燥）薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む組成物を提供する。好ましくは、凍結し乾燥した（凍結乾燥）薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）は、再水和時、その活性（例えば、血清アルブミンに対する結合活性）のせいぜい約20%、またはせいぜい約25%、またはせいぜい約30%、またはせいぜい約35%、またはせいぜい約40%、またはせいぜい約45%、またはせいぜい約50%が失われるだけである。活性は、凍結乾燥する前の、薬物組成物の効果をもたらすのに必要な薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）の量である。例えば、所望の時間所望の血清濃度を得て維持するのに必要な薬物複合体または薬物融合体の量である。薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）の活性は、凍結乾燥前に任意の適当な方法を使用して決定することができ、再水和後に同じ方法を使用して活性を決定し、損失した活性の量を決定することができる。

10

【0180】

薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む組成物またはそのカクテルは、予防および／または治療のために投与することができる。ある治療用途では、投与条件下で、所望の治療または予防効果、例えば、選択した細胞集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、死滅、または数種の他の測定可能なパラメーターを得るのに十分な量を「治療有効量または用量」として定義する。この投薬量を得るために必要な量は、疾患の重症度、患者自身の免疫系の全身状態、および全身の健康状態によって決まるが、一般的には、体重1キログラムあたり薬物複合体または薬物融合体は約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約80mg/kg、または約0.005～5.0mgの範囲であり、0.05～2.0mg/kg/用量の用量がより一般的に使用されている。例えば、本発明の薬物組成物（例えば薬物融合体、薬物複合体、非共有結合性薬物複合体）は、毎日（例えば、一日当たり投与は4回まで）、2日毎に、3日毎に、週2回、週1回、2週間毎に1回、月1回、または2カ月毎に1回、例えば、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約80mg/kg、約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約80mg/kg、約1mg/kg～約80mg/kg、約1mg/kg～約70mg/kg、約1mg/kg～約60mg/kg、約1mg/kg～約50mg/kg、約1mg/kg～約40mg/kg、約1mg/kg～約30mg/kg、約1mg/kg～約20mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約10mg/kg、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約5mg/kg、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約2.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、または約10mg/kgの用量で投与することができる。

20

【0181】

予防的適用には、同様の投薬量またはわずかに少ない投薬量で、薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む組成物またはそのカクテルを投与しうる。本発明による薬物組成物（例えば薬物複合体、非共有結合性薬物複合体、薬物融合体）を含む組成物は、哺乳動物の選択標的細胞集団を変化させ、不活化し、死滅させ、または除去するのに役立てるために予防および治療レジメで使用しうる。

30

【実施例】

【0182】

インターロイキン1受容体アンタゴニスト（IL-1ra）は、IL-1インターロイキン-1 1型受容体（IL-1R1）へのIL-1の結合を競合的に阻害することによって、IL-1の生物学的活性を阻害するアンタゴニストである。IL-1の産生は、炎症性刺激に応答して誘発され、炎症性応答および免疫応答を含む様々な生理学的応答を媒介する。IL-1は軟骨分解および骨吸収刺激を含むさまざまなお活性を有する。関節リウマチ患者では、局所的に産生されるIL-1の量が増加するので、天然に存在するIL-1-*ra*のレベルではこれらの異常に増加した量に競合するには不十分である。メトトレキ

40

50

サートなどの疾患修飾抗リウマチ薬（D M A R D）、およびKINERET（登録商標）（anakinra, Amgen Inc）などの生物製剤を始めとする、R A に対して利用可能ないくつもの治療が存在する。

【0183】

KINERET（登録商標）（anakinra, Amgen Inc）は、非グリコシル化形態の組換え体である、153個のアミノ酸からなり17.3キロダルトンの分子量を有するヒトインターロイキン-1受容体アンタゴニストである。[KINERET（登録商標）（anakinra, Amgen Inc）]のアミノ酸配列は、天然に存在するIL-1ra中の152個のアミノ酸および追加のN末端メチオニンに対応する。] KINERET（登録商標）（anakinra, Amgen Inc）では、一種または複数のD M A R Dでうまくいかなかった18才以上の患者において中程度～重篤な関節リウマチの徴候および症状の緩和が示されている。投薬量は、毎日の皮下注射の一回分で薬物100mgである。T_{1/2}は4～6時間であり、患者の71%は14～28日後に注射部位反応を生じる。10

【0184】

ここで本発明者らは、治療用ポリペプチドと血清アルブミン結合性dAbとを連結することによって、(i)治療用ポリペプチド単独と同様の活性を有し、かつ(ii)さらに血清アルブミンと結合する化合物が得られることを実証する。さらに、本発明は、治療用ポリペプチドの長期血清半減期種を作製するための方法を提供する。例えば、本発明者は、血清アルブミン結合性dAbとIL1-raを結合させ、それによってIL1-ra単独よりも長い血清半減期を有する化合物を得た。20

【0185】

実施例1．マウス、ラット、およびヒト血清アルブミンと結合するドメイン抗体の選択

本実施例は、血清アルブミンに対する單一ドメイン抗体（dAb）の作製方法について説明する。マウス血清アルブミン（MSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、およびラット血清アルブミン（RSA）に対するdAbの選択については記載されている。

【0186】

マウス血清アルブミンに対するdAbは、WO 2004/003019 A2に記載されているように選択した。3つのヒトファージディスプレイ抗体ライブラリーを使用した。各ライブラリーは、相補性決定領域（CDR1、CDR2、およびCDR3）に組み込まれているNNKコドンによってコードされた側鎖多様性を有するV_H（V3-23/DP47およびJ_H4b）またはV（o12/o2/DPK9およびJ_k1）の单一ヒトフレームワークに基づいていた。30

【0187】

ライブラリー1（V_H）：

多様性位置：H30、H31、H33、H35、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H97、H98

ライブラリーサイズ： 6.2×10^9

【0188】

ライブラリー2（V_H）：

多様性位置：H30、H31、H33、H35、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H97、H98、H99、H100、H100A、H100B

ライブラリーサイズ： 4.3×10^9

【0189】

ライブラリー3（V）：

多様性位置：L30、L31、L32、L34、L50、L53、L91、L92、L93、L94、L96

ライブラリーサイズ： 2×10^9

【0190】

V_HおよびV ライブラリーを、それぞれ、汎用リガンドであるプロテインAおよびプロ

10

20

30

40

50

ロテイン Lとの結合に対して予備選択し、選択されたライブラリー中の大半のクローンが機能性であるようにした。上記に示すライブラリーのサイズは、予備選択した後のサイズに当たる。

【0191】

それぞれのライブラリーを別々に使用し、血清アルブミンに対して2ラウンドの選択を実施した。各選択のために、4mLのPBS中、100μg/mLの濃度で抗原をイムノチューブ(nunc)にコートした。1ラウンド目の選択では、3つのライブラリーのそれぞれをHSA(Sigma)またはMSA(Sigma)に対して別々にパニングした。2ラウンド目の選択では、その6つの1ラウンド目選択のそれぞれに由来するファージを(i)再度同じ抗原に対して(例えば、1ラウンド目MSA、2ラウンド目MSA)、また(ii)相反する抗原に対して(例えば、1ラウンド目MSA、2ラウンド目HSA)、パニングし、その結果、合計12の2ラウンド目選択を行った。各場合において、2ラウンド目の選択後、HSAおよびMSAとの結合について48のクローンを試験した。Harrisonら、Methods Enzymol. 1996; 267: 83-109によりscFvフラグメントについて記載されたようにして可溶性dAbフラグメントを生成し、その後、標準的ELISAプロトコルを行った(Hoogenboomら(1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133)が、但し2%Tween PBSをブロッキングバッファーとして使用し、結合したdAbをプロテインL-HRP(Sigma)(Vについて)およびプロテインA-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)(V_Hについて)検出した。

【0192】

MSA、HSAまたは両方に結合することを示すバックグラウンドを超えるシグナルを生じたdAbを、プラスチックのみとの結合についてELISA不溶性形態で試験したが、全てのdAbは血清アルブミンに特異的であった。次いで、クローンを配列決定(表1を参照)したこところ、21のユニークなdAbが同定されたことが明らかになった。選択したV_HdAbクローン間の最小類似性(アミノ酸レベルで)は、86.25%であった[(69/80)×100; 多様化残基が全て異なる場合、例えば、クローン24および34の結果]。選択したV_HdAbクローン間の最小類似性は94%であった[(127/136)×100]。

【0193】

次に、その血清アルブミン結合性dAbを、溶液からビオチン化抗原を捕捉する能力について試験した。続いてELISAプロトコル(上記)を行ったが、但しELISAプレートは1μg/mLのプロテインL(Vクローン用)および1μg/mLプロテインA(V_Hクローン用)を用いてコートした。可溶性dAbを該プロトコルにるようにして溶液から捕捉し、検出をビオチン化MSAまたはHSAとストレプトアビジンHRPを用いて行った。ビオチン化MSAおよびHSAは、血清アルブミン分子1個につき平均2個のビオチンを達成することを目指して、製造業者の使用説明書に従って調製した。ELISAで溶液からビオチン化MSAを捕捉した24のクローンが同定された。これらのうち2つ(下記クローン2および38)はビオチン化HSAも捕捉した。次に、CM5ピアコアチップにコートしたMSAに結合する能力についてdAbを試験した。8つのクローンがピアコア上のMSAに結合することが判明した。

【0194】

プロトコルに以下の改変を加えたこと以外は抗MSA dAbについて先に記載した通り、ヒト血清アルブミンおよびラット血清アルブミンに対するdAbを選択した: すなわち、合成V_Hドメインのファージライブラリーは、DP47生殖系列遺伝子を含むヒトV_H3とJ_H4セグメントに基づくライブラリー4Gであった。変異誘導法により以下の特定の位置に多様性を導入した(NNKコドンを使用、Kabatによるナンバリング): CDR1中の30、31、33、35; CDR2中の50、52、52a、53、55、56、およびCDR3中の4~12個の多様化残基: 例えば4G H11中のH95、H96、H97、およびH98、ならびに4G H19中のH95、H96、H97、H98、H99、H100、H100a、H100b、H100c、H100d、H100e

10

20

30

40

50

、およびH 1 0 0 f。最後の3個のCDR3残基はFDYであり、従ってCDR3の長さは7~15残基で変化する。そのライブラリーは、 $> 1 \times 10^{10}$ の個別のクローンを含む。

【0195】

V_H および V_L ライブラリーのサブセットを、それぞれ、汎用リガンドプロテインAおよびプロテインLとの結合に対して予備選択し、未選択のライブラリー中の大半のクローンが機能性であるようにした。上記に示すライブラリーのサイズは、予備選択した後のサイズに当たる。

【0196】

V_H および V_L ライブラリーのサブセットを別々に使用して、ラットおよびヒト血清アルブミンに対し2ラウンドの選択を実施した。各選択のために、抗原を、(i) 4mlのPBS中、100μg/mlの濃度でイムノチューブ(nunc)にコートしたか、あるいは(ii)ビオチン化し、それを次いで可溶性選択に使用し、続いてストレプトアビジンビーズ(1ラウンド目)およびニュートラアビジンビーズ(2ラウンド目)上に捕捉した。(各クローンを単離するために使用した選択法の詳細については表1を参照)。いずれの場合にも、2ラウンド目の選択後、24のファージクローンをHSAまたはRSAとの結合について試験した。

【0197】

その選択の一つにおいてクローンのかなりの割合がファージELISAで陽性であった場合には、次いで可溶性dAbを製造するために、本選択から得たDNAを発現ベクター中にクローン化し、個々のコロニーを採取した。可溶性dAbフラグメントを、Harrisonら(Methods Enzymol. 1996;267:83-109)によりscFvフラグメントについて記載されたようにして製造し、続いて標準的ELISAプロトコルを行った(Hoogenboomら(1991)Nucleic Acids Res., 19: 4133)が、但し2%Tween-PBSをブロッキングバッファーとして使用し、結合したdAbを抗myc-HRPで検出した。次いで、ビアコア表面プラズモン共鳴装置(Biacore AB)を使用して、ELISAで陽性であったクローンを、MSA、RSA、またはHSAへの結合についてスクリーニングした。MSA、RSA、またはHSAと結合したdAbはさらに分析した。次いで、クローンを配列決定し、特有のdAb配列を同定した。

【0198】

10

20

30

表1. 血清アルブミンに結合するdAbについての選択プロトコル

dAb	ライブラリー	R1選択	R2選択	ビアコア結合
DOM7r-1	4G V _κ	10 μg/mlチーブ RSA	10 μg/mlチーブ RSA	RSA
DOM7r-3	4G V _κ	10 μg/mlチーブ RSA	10 μg/mlチーブ RSA	RSA
DOM7r-4	4G V _κ	10 μg/mlチーブ RSA	10 μg/mlチーブ RSA	RSA, MSA
DOM7r-5	4G V _κ	10 μg/mlチーブ RSA	10 μg/mlチーブ RSA	RSA
DOM7r-7	4G V _κ	10 μg/mlチーブ RSA	10 μg/mlチーブ RSA	RSA, MSA
DOM7r-8	4G V _κ	10 μg/mlチーブ RSA	10 μg/mlチーブ RSA	RSA, MSA
DOM7h-1	4G V _κ	10 μg/mlチーブ HSA	10 μg/mlチーブ HSA	HSA
DOM7h-2	4G V _κ	可溶性100nM HSA	可溶性50nM HSA	HSA
DOM7h-3	4G V _κ	10 μg/mlチーブ HSA	10 μg/mlチーブ HSA	-
DOM7h-4	4G V _κ	10 μg/mlチーブ HSA	10 μg/mlチーブ HSA	-
DOM7h-6	4G V _κ			
DOM7h-7	4G V _κ			
DOM7h-8	4G V _κ	可溶性200nM HSA	可溶性50nM RSA	HAS, RSA, MSA
DOM7r-13	4G V _κ	可溶性200nM HAS	可溶性50nM RSA	RSA, MSA
DOM7r-14	4G V _κ	可溶性200nM HAS	可溶性50nM RSA	RSA, MSA
DOM7h-21	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA
DOM7h-22	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA
DOM7h-23	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA
DOM7h-24	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA
DOM7h-25	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA
DOM7h-26	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA
DOM7h-27	4G V _H	100 μg/ml HSAチーブ	100 μg/ml HSAチーブ	HSA

【0199】

10

20

30

40

50

次に、ビアコアチップ (Biacore AB) 上の血清アルブミンに結合したdAbをさらに分析して親和性についての情報を得た。分析は、血清アルブミンでコートしたCM5チップ（カルボキシメチル化デキストランマトリックス）を使用して実施した。フローセル1はコートせずにブロッキングした陰性対照であり、フローセル2はHSAでコートし、フローセル3はRSAでコートし、フローセル4はMSAでコートした。血清アルブミンは、ビアコアコーティングウィザードを使用し pH 5.5 の酢酸バッファー中で固定したが、このウィザードはコートした物質の500レゾナンス・ユニット (RU) を目的としてプログラムされている。目的の各dAbは、200mL ~ 500mL 規模で大腸菌のペリプラズム中で発現させて、V_HについてはプロテインA-流線型親和性樹脂 (Amersham, UK)への、V_κについてはプロテインL-アガロース親和性樹脂 (Affitech、ノルウェー)へのバッヂ吸着を使用して上清から精製し、続いてpH 2.2 のグリシンを用いた溶出及びPBSへのバッファー交換を行った。一連の濃度のdAb (5nM ~ 5μMの範囲)を、BIACORE HBS-EPバッファー中への希釈によって調製し、さらにビアコアチップ上に流した。

【0200】

親和性 (KD) は、KDの領域中のdAb濃度によって生じたトレースにオン速度およびオフ速度曲線を適合化させることによってビアコアのトレースから算出した。血清アルブミンに対して様々な異なる親和性を有するdAbを同定した。10 ~ 100nMの範囲に含まれていたのは、HSAに対するDOM7h-8、HSAに対するDOM7h-2、およびRSAに対するDOM7r-1の親和性であった。100nM ~ 500nMの範囲

に含まれていたのは、HSAに対するDOM7h-7、RSAに対するDOM7h-8、およびHSAに対するDOM7h-26の親和性であった。500nM~5μMの範囲に含まれていたのは、HSAに対するDOM7h-23およびHSAに対するDOM7h-1の親和性であった。実施例のトレースを図6A~6Cに含める。

【0201】

実施例2. IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra)との融合体としての抗血清アルブミン抗体の構成

本実施例は、IL-1raと、血清アルブミンと結合するdAbとを含む融合タンパク質の作製方法について記載する。IL-1raのN末端にdAbを有する融合体(MSA16IL1-ra)およびIL-1raのC末端にdAbを有する融合体(IL1-raMSA16)という2個の融合体を作製した。それらの融合体およびベクターの配列を図2Cおよび2Dに示す。MSAに結合しなかった対照融合体も作製し、その配列を図2Eに示す。

【0202】

KINERET(anakinra, Amgen Inc)の半減期は4~6時間と短く、推奨される投薬レジメでは毎日の注射が必要とされる。このレジメで事例の71%において14~28日後に注射部位反応がもたらされる。従って、血清半減期がより長いヒトIL-1ra形態は有利なはずであり、効力が高く投薬頻度は減少するであろう。これはどちらも医薬品として望ましい特性である。

【0203】

クローニング

手短に言えば、以下に詳述するように2個のマルチクローニング部位(MCS)を設計し、T7プロモーターを有する発現ベクター中に挿入した。IL1-ra、dAb、GASリーダー、およびリンカーを挿入するために制限部位を設計した。一方(MCS1+3)は、IL-1raのN末端にdAbを有するタンパク質をコードし、他方(MCS2+4)は、IL-1raのC末端にdAbを有するタンパク質をコードする。

【0204】

dAb IL1-ra融合体のためのクローニング部位1+3

NdeI、隙間配列(stuffer)、SalI、NotI、隙間配列(stuffer)、XbaI、BamHI

gcgcatatgttagtgcgtcgacgtcaaaaggccatagcggcgccgctgcaggctcgagtgcgtggatcc(配列番号35)

IL1-ra dAb融合体のためのクローニング部位2+4

NdeI、隙間配列(stuffer)、StuI、SacI、隙間配列(stuffer)、SalI、NotI、TAA TAA BamHI

gcgcatatgttaagcgaggcctctggagagagctcaggagtgtcgacggacatccagatgacccaggcgccgctaataaggatccaatgc(配列番号36)

【0205】

次いで、適切な制限酵素を使用してMCSを消化し、GASリーダーをコードするアノールしたプライマーをライゲートすることによって、GASリーダーを各ベクター中に挿入した。次に、リンカーをコードするリンカーDNAを同様に挿入した。PCR(必要な制限部位を付加するように設計されたプライマーを使用する)によって、cDNAクローニングからIL-1raをコードするDNAを得、TOPOクローニングベクター中に挿入した。核酸配列決定によって正確な配列を確認後、TOPOベクターからIL-1raをコードするDNAを切り取り、リーダーおよびリンカーを含むベクター中にライゲートした。最後に、dAb発現ベクターからdAbをコードするDNAを切り取り、(ゲル精製によって精製した)挿入物とベクターをSalI/NotIで消化することによってベクター中に挿入した。

【0206】

発現および精製

10

20

30

40

50

M S A 1 6 I L 1 - r a、I L 1 - r a M S A 1 6、およびダミーI L - 1 r aは、大腸菌のペリプラズム中で発現させ、プロテインL - アガロース親和性樹脂(Affitech、ノルウェー)へのバッヂ吸着を使用して上清から精製し、続いてp H 2 . 2のグリシンで溶出させた。次いで、精製したd A bをS D S - P A G E ゲル電気泳動により分析し、続いてクーマシー染色を行った。タンパク質の一方(I L - 1 r a M S A 1 6)については、タンパク質の>90%が推定したサイズのものであり、従ってさらに精製することなく活性を分析した。他方のタンパク質(M S A 1 6 I L 1 - r aおよびダミーI L - 1 r a)には小さいバンドが混入しており、従ってF P L Cイオン交換クロマトグラフィーにより、p H 9のRESOURSEQイオン交換カラムでさらに精製した。線形塩勾配0~500mM N a C lを使用しタンパク質を溶出させた。S D S - P A G E ゲル電気泳動により分析後、推定したサイズのタンパク質を含む画分を1つにまとめ、>90%純度の混合画分を得た。このタンパク質をさらに分析に使用した。

10

【0207】

実施例3. in vitroでのd A b I L 1 - r a融合体の活性決定M R C - 5 I L - 8 アッセイ

M R C - 5 細胞(A T C C 受託番号C C L - 1 7 1、アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)、バージニア州マナッサス)におけるI L - 1 によるI L - 8 の分泌誘発を中和する能力について、M S A 1 6 I L - 1 r a融合体を試験した。その方法は、H U V E CにおけるI L - 1 によるI L - 8 の誘発について記載したAkesson, L.ら、(1996) Journal of Biological Chemistry 271, 30517-30523のものを改変したものであり、H U V E C細胞系の代わりにM R C - 5 細胞を使用した。手短に言えば、マイクロタイタープレートに播種したM R C - 5 細胞をd A b I L - 1 r a融合タンパク質もしくはI L - 1 r a対照、およびI L - 1 (1 0 0 p g / m L)と共に終夜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、I L - 8 濃度をサンドイッチE L I S A(R&D Systems)により測定した。

20

【0208】

その融合タンパク質中のI L - 1 r aの活性はI L - 8 分泌の減少をもたらした。M S A 1 6 I L 1 - r a融合体の活性およびI L - 1 r a M S A 1 6 融合体の活性によって生じるI L - 8 分泌減少をI L - 1 r a対照(組換えヒトI L - 1 r a、R&D Systems)を用いて見られた減少と比較した。試験したタンパク質のそれぞれの中和用量50(N D₅₀)を決定し、表2に示す。

30

【0209】

表2

タンパク質	N D ₅₀
I L - 1 r a	0. 5 nM
M S A 1 6 I L - 1 r a	2 nM
I L - 1 r a M S A 1 6	8 nM

40

【0210】

その結果は、I L - 1 r aが、抗血清アルブミンd A bとの融合構築体の一部として依然として活性であったことを示す。M S A 1 6 I L - 1 r aタンパク質は、その薬物動態を評価するためにさらに試験した(P K 試験)。

【0211】

血清アルブミン、抗I L - 1 r aサンドイッチE L I S A

血清アルブミンに結合し、同時にモノクローナル抗I L 1 r a抗体によって検出される能力について3つのd A b / I L - 1 r a融合体を試験した。試験した融合体は、M S A 1 6 I L - 1 r a、I L - 1 r a M S A 1 6、およびダミーI L - 1 r aであった。手短に言えば、E L I S Aプレートを10μg / m lのマウス血清アルブミンで終夜コートし

50

、0.05%Tween PBSで5回洗浄し、次いで4%Marvel PBSで1時間ブロッキングした。ブロッキング後、プレートを0.05%Tween PBSで5回洗浄し、次いで4%MPBSで希釈した各dAb, IL-1ra融合体と共に1時間インキュベートした。各融合体を1μM濃度および7つの連続4倍希釈液（すなわち60pMまで）でインキュベートした。インキュベーション後、プレートを0.05%Tween PBSで5回洗浄し、次いで製造業者が推奨する、4%MPBSで希釈したヒトIL-1受容体アンタゴニスト（Abcam, UK）に対するウサギポリクローナル抗体（ab-2573）の希釈液を加えて1時間インキュベートした。このインキュベーション後、プレートを0.05%Tween PBSで5回洗浄し、次いで4%MPBSで希釈した2次抗体（抗ウサギIgG-HRP）の1/2000希釈液と共に1時間インキュベートした。2次抗体とのインキュベーション後、プレートを0.05%Tween PBSで3回、PBSで2回洗浄し、次いで1ウェル当たり50μlのTMBマイクロウェルペルオキダーゼ基質（KPL, MA）を加えて発色させ、1ウェル当たり50μlのHCLで反応を停止させた。吸光度を450nmで読み取った。
10

【0212】

サンドイッチELISAで、MSA16IL-1raおよびIL-1raMSA16タンパク質はいずれも、1μM濃度でバックグラウンドレベルの2倍を超えて検出された。MSA16IL-1raタンパク質が、3.9nMまで下げた希釈でもバックグラウンドの2倍以上で検出されたのに対して、IL-1raMSA16タンパク質は、500nMに下げただけでバックグラウンドの2倍で検出された。対照構築体（ダミーIL-1ra）は血清アルブミンに結合しなかったので、MSA16IL-1ra融合体と血清アルブミンの結合は、血清アルブミンに対して特異的であることが示された。
20

【0213】

実施例4.マウスPK試験における薬物融合体の血清半減期の決定

A. MSA結合性dAb/HAエピトープタグ融合タンパク質のマウスでの血清半減期の決定

MSA結合性dAb/HAエピトープタグ融合タンパク質は、大腸菌のペリプラズム中で発現させ、プロテインL-アガロース親和性樹脂（Affitech、ノルウェー）へのバッチ吸着を使用して精製し、続いてpH2.2のグリシンで溶出させた。マウスでの融合タンパク質の血清半減期の決定は、CD1系統の雄動物に約1.5mg/kgを一回静脈内（i.v.）注射した後に行った。血清濃度の分析は、ヤギ抗HA（Abcam, UK）捕捉および4%MarvelでブロッキングしたプロテインL-HRP（Invitrogen, USA）検出を使用するELISAを用いて行った。洗浄は、0.05%Tween-20、PBSを用いて行った。試験試料との比較可能性を確保するために、既知濃度のMSA結合性dAb/HA融合体の標準曲線を1×マウス血清の存在下で作成した。1コンパートメントモデル（WinNonlin Software, Pharsight Corp., USA）によるモデリングによって、MSA結合性dAb/HAエピトープタグ融合タンパク質の最終相 $t_{1/2}$ は29.1時間であり、曲線下面積は559hr·μg/mlであることが示された。これは、短くほんの数分間であり得た、HAエピトープタグペプチド単独について予想された半減期を超えて大きく改善されたことを示す。
30

【0214】

薬物モデルとしてHAエピトープタグを使用するこの試験結果は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント（例えばdAb）との薬物融合体または薬物複合体としてその薬物を調製した場合、薬物のin vivo血清半減期を延長できることを示している。

【0215】

抗MSA dAbであるDOM7m-16およびDOM7m-26、ならびにMSAに結合しない对照dAbのマウスでのin vivo半減期も評価した。同様に、DOM7m-16、DOM7m-26および对照dAbにはHAエピトープタグを含めたが、これは薬物（例えば、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド薬物）のモデルとして機能する。
40
50

この試験では、MSAと結合しない対照dAbのin vivo半減期は20分であったが、DOM7m-16およびDOM7m-26のin vivo半減期は大幅に延長された。(図12)さらなる研究で、DOM7m-16は、マウスで29.5時間のin vivo半減期を有することが判明した。

【0216】

別の研究では、HAエピトープタグを含むDOM7h-8のin vivo半減期($t_{1/2}$)をマウスで評価した。2コンパートメントモデル(WinNonlin Software, Pharsight Corp., USA)によるモデリングによって、DOM7h-8が29.1時間の $t_{1/2}$ を有することが示された。

【0217】

薬物(例えばタンパク質、ポリペプチド、またはペプチド薬物)に対するモデルとしてHAエピトープタグを使用するこれら試験のそれぞれの結果は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント(例えばdAb)との薬物融合体または薬物複合体としてこの薬物を調製した場合、薬物のin vivo血清半減期を劇的に延長できることを示している。

【0218】

B. MSA結合性dAb/IL-1ra融合タンパク質のマウスでの血清半減期の決定

MSA結合性dAb/IL-1ra融合タンパク質(MSA16IL-1ra)は、大腸菌のペリプラズム中で発現させ、プロテインL-アガロース親和性樹脂(Affitech、ノルウェー)へのバッヂ吸着を使用して精製し、続いてpH2.2のグリシンで溶出させた。マウスでのMSA16IL-1ra(DOM7m-16/IL-1ra)、MSAに結合しないdAbとのIL-1ra融合体(ダミー-dAb/IL-1ra)、およびHAエピトープタグに融合させた抗MSA dAb(DOM7m-16 HAタグ)の血清半減期の決定は、CD1系統の雄動物に約1.5mg/kgを一回静脈内注射した後に行つた。

【0219】

血清濃度の分析は、IL-1raサンドイッチELISA(R&D Systems、米国)によって行った。試験試料との比較可能性を確保するために、既知濃度のdAb/IL-1ra融合体の標準曲線を1×マウス血清の存在下で作成した。モデリングは、WinNonlin薬物動態ソフトウェア(Pharsight Corp., USA)を使用して実施した。

【0220】

非MSA結合性dAbとIL-1raの融合体である対照と比較した場合、抗MSA dAbとのIL-1ra融合体は血清半減期を大幅に増加させると予想された。対照の非MSA結合性dAb/IL-1ra融合体は短い血清半減期を有すると予想された。

【0221】

試験の結果を表3に示すが、その結果は抗MSA dAbとのIL-1ra融合体(DOM7m-16/IL-1ra)の血清半減期は、MSAに結合しないdAbとのIL-1ra融合体(ダミー-dAb/IL-1ra)の約10倍長かったことを示している。その結果から、ダミー/IL-1ra(AUC: 1.5 hr. µg/ml)と比較して、DOM7m-16/IL-1ra(AUC: 267 hr. µg/ml)についての濃度時間曲線下の領域が>200倍改善(増加)したことも判明した。

【0222】

表3

剤	血清半減期
DOM7m-16/IL-1ra	4.3時間
ダミー/IL-1ra	0.4時間
DOM7m-16 HAタグ	29時間

【0223】

10

20

30

40

50

これらの試験結果は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント（例えば dAb）との薬物融合体または薬物複合体として薬物を調製した場合、薬物の *in vivo* 血清半減期および AUC を大幅に延長できることを示している。

【0224】

実施例 5. RSA 結合性 dAb / HA エピトープタグ融合タンパク質のラットにおける血清半減期の決定

抗ラット血清アルブミン dAb を、大腸菌のペリプラズム中で、C 末端 HA タグを有して発現させ、V_k dAb に対してはプロテイン L - アガロース親和性樹脂（Affitech、ノルウェー）へのバッヂ吸着、V_H dAb に対してはプロテイン A 親和性樹脂へのバッヂ吸着を使用して精製し、続いて pH 2.2 のグリシンで溶出させた。血清半減期を決定するために、4 匹のラットからなる群に 1.5 mg / kg の DOM7r-27、DOM7r-31、DOM7r-16、DOM7r-3、DOM7h-8、または無関係の抗原に結合する対照 dAb (HEL4) を一回静脈内注射した。尾静脈から 7 日間にわたって連続的に採血することによって血清試料を得、そして EELISA プレートにコートしたヤギ抗 HA (Abcam、英国ケンブリッジ) を用いたサンドイッチ EELISA によって分析し、続いて (V_H dAb に対しては) プロテイン A - HRP または (V_k dAb に対しては) プロテイン L - HRP による検出を行った。試験試料との比較可能性を確保するために、既知濃度の dAb の標準曲線を 1 × ラット血清の存在下で作成した。2 コンパートメントモデル [WinNonlin 薬物動態ソフトウェア (Pharsight Corp., USA) を使用] によるモデリングを用いて、t_{1/2} および曲線下面積 (AUC) (表 4) を計算した。ラットでの HEL4 対照についての t_{1/2} は最大 30 分であり、得られたデータに基づくと、DOM7h-8 についての AUC は約 150 hr · μg / mL ~ 約 2500 hr · μg / mL であると算出される。

【0225】

表 4

剤	骨格	ラット血清アルブミンに対する親和性 (KD)	t _{1/2} β	AUC (hr. μg/mL)
DOM7r-3	V _k	12 nM	13.7 時間	224
DOM7r-16	V _k	1 μM	34.4 時間	170
DOM7r-27	V _H	250 nM	14.8 時間	78.9
DOM7r-31	V _H	5 μM	5.96 時間	71.2

【0226】

薬物（例えば、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド薬物）に対するモデルとしてこの HA エピトープタグを使用するこのラット試験の結果は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント（例えば dAb）との薬物融合体または薬物複合体として薬物を調製した場合、薬物の *in vivo* 血清半減期を劇的に延長できることを示している。

【0227】

ヒトでの半減期の予測

相対成長スケーリングを使用して、動物で得られた半減期データから、ヒトでの dAb 薬物融合体または薬物複合体の *in vivo* 半減期を見積もることができる。3 匹の動物で決定した *in vivo* 半減期の対数を動物の体重の対数に対してプロットする。プロットした点を通る線を引き、その線の傾きおよび y 切片を用い、式 $\log Y = \log(a) + b \log(W)$ [式中、Y はヒトでの *in vivo* 半減期、 $\log(a)$ は y 切片、b は傾き、W はヒトの体重である] を使用してヒトでの *in vivo* 半減期を計算する。その線は、約 3

10

20

30

40

50

5 g (例えはマウス) 、約 260 g (例えはラット) 、および約 2,710 g の体重の動物で得られた *in vivo* 半減期データを使用し作成することができる。この計算には、ヒトの体重を 70,000 g として考えることができる。マウスおよびラットで得られた半減期値を基に、DOM7h-8などのヒト血清アルブミンと結合する dAb は、ヒトで $t_{1/2}$ が約 5.5 時間～約 40 時間、そして AUC が約 150 hr · $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 2500 hr · $\mu\text{g}/\text{mL}$ であると予測される。

【 0228 】

実施例 6 . 関節リウマチのマウスコラーゲン誘発関節炎モデルにおける抗 S A dAb / IL-1ra 薬物融合体の効力

関節リウマチの判明しているマウスモデル [DBA / 1 マウスでの II 型コラーゲン誘発関節炎 (CIA)] における融合体 DOM7m-16 / IL-1ra の効力および IL-1ra の効力を評価した。試験全体を通じて、マウスは試験施設で標準型の 2 つのケージで飼育されたが、そのケージは、明 12 時間、暗 12 時間サイクル、 20 ~ 24 とした HEPA フィルター付き Scantainer 中に収容された。食物 (Harlan-Teklad 社製の汎用餌 2016) と UV 滅菌水は自由に与えた。確実に適切に順化させるために、試験開始の少なくとも 7 日前にマウスを試験施設に移した。

【 0229 】

7 ~ 8 週齢の DBA / 1 マウス (デンマーク国 Domholtveg 在 Taconic M and B から入手) に、 1 : 1 の比率で乳濁液が安定するまで乳化させた Arthrogen-CIA アジュバントおよび Arthrogen-CIA コラーゲン (共に MD biosciences) の乳濁液を一回注射した。ビーカーの水に添加した乳濁液の液滴が固形の塊を形成した時、乳濁液は安定していると考えた。次いで、マウスにその乳濁液を注射した。

【 0230 】

乳濁液を注射してから 21 日後、最も進行した関節炎疾患を有する 20 匹の動物を試験から排除し、残りのマウスを 10 匹ずつの動物群 (各群には 5 頭の雄と 5 頭の雌が含まれた) に分けた。表 5 に示すようにマウスを処理し、 10 ml / Kg が投与されるように計算した濃度で全ての処理を行った。

【 0231 】

表 5

群	処理
1	IL-1ra、 1 mg / kg (腹腔内 (i.p.) 、ボーラス)
2	IL-1ra、 10 mg / kg (i.p. 、ボーラス)
3	DOM7m-16 / IL-1ra、 1 mg / kg (i.p. 、ボーラス)
4	DOM7m-16 / IL-1ra、 10 mg / kg (i.p. 、ボーラス)
5	ENBREL (登録商標) (entarecept; Immunex Corporation) 、 5 mg / kg (i.p. 、ボーラス)
6	生理食塩水 (陰性対照) 、 10 ml / Kg (i.p. 、ボーラス)
7	デキサメタゾン (陽性対照) 、 0.4 mg / kg (皮下注射)

10

20

30

40

【 0232 】

関節炎の重症度についての臨床スコアを 21 ~ 49 日目に週 3 回記録した。49 日目にマウスを安楽死させた。マウスが 12 以上の関節炎スコアを示すかまたは移動に深刻な問題を示した場合には、それらの個々のマウスを早めに安楽死させた。

【 0233 】

臨床スコアリングについては、以下の判定基準に従って各肢をスコアリングし、全 4 本の肢のスコアを加算してそのマウスについての合計スコアを出した。結果としてこの方法

50

によって各マウスには0～16のスコアが与えられた。スコアリング判定基準は以下の通りである：0＝正常、1＝足首または手首の軽度ではあるが明確な発赤および腫脹、または罹患した指の数には関わらず個別の指に限定された明らかな発赤および腫脹、2＝足首および手首の中程度の発赤および腫脹、3＝指を含む手足全体の重度の発赤および腫脹、4＝複数の関節を含む最高度に炎症を起こした肢。

【0234】

個々のマウスから得た臨床スコアを使用し、全ての処理日に各処理群について群平均関節炎スコアを算出した。倫理的理由によって試験から除去した全ての動物に最大スコアである16を割り当てた。群平均関節炎スコアを時間に対してプロットした（図13）。

【0235】

ウィルコクソン検定を使用し、49日目の群平均関節炎スコアの統計分析を実施した。この統計分析によって、生理食塩水対照群（群6）と比較した場合、DOM7m-16/IL-1raで処理した2つの群（1mg/kgまたは10mg/kg（群3および4））は49日目に有意に改善された関節炎スコア（それぞれ、P<1%およびP<0.05%の有意レベルで）を示したことが判明した。それに対して、1mg/kgのIL-1raによる処理（群1）は、49日目の関節炎スコアでは統計上有意な改善はもたらさなかつたが、10mg/kgのIL-1raによる処理（群2）はP<5%の有意レベルで有意な改善をもたらした。ENBREL（登録商標）（entarecept; Immunex Corporation）による処理（群5）は、49日目の関節炎スコアにP<10%有意レベルで有意な改善をもたらした。

10

20

【0236】

5mg/kgのENBREL（登録商標）（entarecept; Immunex Corporation）（群5）による基準処理と比較した場合、10mg/kg用量のDOM7m-16/IL-1raによる処理（群4）は、49日目の関節炎スコアの改善に有効であった（P<0.5%レベルで有意）。加えて、それより少ない1mg/kg用量のDOM7m-16/IL-1raによる処理（群3）は、同じ投薬量のIL-1ra単独による処理（群1）よりも、49日目の関節炎スコアの改善に効果的であった（P<10%レベルで有意）。

30

【0237】

この試験では所定の用量のDOM7m-16/IL-1raは、IL-1raまたはENBREL（登録商標）（entarecept; Immunex Corporation）よりも有効であったことを、その試験結果は示している。IL-1raに対する応答は予想通り用量依存的であり、DOM7m-16/IL-1raに対する応答も用量依存的であった。1mg/kgのDOM7m-16/IL-1raによる処理に対する平均スコアは、10mg/kgのIL-1raによる処理によって得られた平均スコアよりも一貫して低かった。これらのプロットした結果（図13）は、この試験ではDOM7m-16/IL-1raによる処理がIL-1raの約10倍有効であったことを示している。

30

【0238】

DOM7m-16/IL-1raのこの優れた効力は、DOM7-16/IL-1ra融合タンパク質が、重量基準で半分の数のIL-1受容体結合エピトープであるIL-1ra[例えば、1mgのDOM7m-16/IL-1ra(MW.31.2kD)が、IL-1受容体結合エピトープ数の約半分である1mgのIL-1ra(MW.17.1kD)を含む]しか含まないにもかかわらず、観察された。

40

【0239】

この試験の結果は、血清アルブミンと結合するdAbはIL-1raと連結させることができ（臨床上証明されているRA治療）、得られた薬物融合体は長期血清半減期特性（dAbによって付与される）とIL-1受容体結合特性（IL-1raによって付与される）の両方を有することを示している。薬物融合体の血清滞留時間のおかげで、CIAの治療に有効なDOM7-16/IL-1raの用量はIL-1raに比べて劇的に減少した。

【0240】

50

この試験の結果は、半減期の延長およびAUCの増加という利益に加えて、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメント（例えばdAb）との薬物融合体または薬物複合体として調製された薬物は、薬物単独に勝る利点をもたらす非常に有効な治療剤であることを示している。例えば、マウスCIAモデルで実証されたように、より低用量の薬物融合体でも、IL-1ra単独と比較して有効であり、より長期間にわたり、IL-1によって引き起こされた関節の炎症および関節損傷を抑制し、疾患の進行をより強くくいとめた。

【0241】

実施例7．抗SA dAb / サポリン非共有結合性薬物複合体

リボソーム不活性タンパク質サポリン（抗癌剤）は、変性剤およびプロテアーゼに対して高度に安定的であり、Tリンパ球に対する標的毒素として使用してきた。ビオチン・ストレプトアビシン結合によりサポリンをDOM7h-8に結合することによって、非共有結合性薬物複合体を調製した。この非共有結合性薬物複合体によって得られた結果は、DOM7h-8は、薬物に結合した場合にもその血清アルブミン結合特性を保持していることを実証している。

【0242】

H2151細胞中で組換え核酸を発現させることによって、位置108（配列番号24の第108のアミノ酸）のC末端アルギニンがシステイン残基に置換されたDOM7h-8cysと称するDOM7h-8変異体を作製した。その細胞を増殖し、72時間にわたり30度終夜発現自己誘導型TB readymix (Merck KGa、ドイツ)で誘発した後、遠心分離によって上清を回収した。プロテインL-アガロース上の親和性捕捉を使用し、DOM7h-8cysをその上清から精製した。次いで、その樹脂を10倍カラム容量のPBSで2回洗浄し、DOM7h-8cysを0.1MグリシンpH2で溶出させた。溶出したDOM7h-8cysを0.2倍容量のTris pH8で中和し、[セントリコン20ml濃縮容器 (Millipore Corp., MA) を使用し] 1mg/mlに濃縮した。

【0243】

濃縮したDOM7h-8cysは、NAP5脱塩カラム (GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ) を使用してバッファーをPBSに交換し、濃度を決定した。次いで、EZ-LINKスルホ-NHS-LC-ビオチン (Pierce Biotechnology Inc., IL) を使用し、そのdAbを（一級アミンにより）ビオチン化した。ビオチン化dAbをストレプトアビシン・サポリン (Advanced Targeting Systems、サンディエゴ) と1:1のモル比で混合した。

【0244】

dAb / サポリン複合体が形成されたことを確認するために、サンドイッチELISAを使用してインタクトな複合体を検出した。ELISAプレート (Nunc, NY) のウェルの半分に、ヒト血清アルブミン (HSA) を10μg/mlで1ウェル当たり100μlの容量で終夜コートした。終夜インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いでプレート全体を2%PBSで2時間プロッキングした。プロッキング後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いで2%Tween PBSで0.5μMに希釈したDOM7h-8 / サポリン非共有結合複合体で1時間インキュベートした。同じELISAプレート上の対照として、0.5μMの未結合サポリンおよび0.5μMの未結合DOM7h-8を2%Tween PBS中でインキュベートした。追加の対照は、HASでコートしていないELISAプレートのウェルでインキュベートし、2%Tweenでプロッキングした同じ3つの希釈したタンパク質であった。インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いで2%Tween PBSで希釈したヤギ抗サポリンポリクローナル抗体 (Advanced Therapeutic Systems) の1/2000希釈液で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いで(1/2000抗ヤギIgHRP複合体の)二次検出抗体と共に1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回、PBSで一回洗浄

10

20

30

40

50

し、紙の上で叩いて乾燥した。ELISAは、基質として3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン100μlで発色させ、1M塩酸50μlで反応を停止させた。DOM7h-8とサポリンの非共有結合複合体の存在は、複合体のOD600といずれかの非複合体化部分のOD600とを比較することによって確認された。

【0245】

表6

	DOM7h-8 /サポリン	DOM7h-8単独	サポリン単独
OD600 (HASでコートしたプレート)	0.311	0.06	0.079
OD600 (2%Tween PBSでブロッキングしたプレート)	0.078	0.068	0.075

10

20

30

40

50

【0246】

この試験の結果は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントに対して薬物を複合体化することができ、その複合体化した抗原結合性フラグメントが血清アルブミン結合活性を保持することを示している。加えて、ビオチン - ストレプトアビシン相互作用の安定性および強度のために、この結果は、血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合性フラグメントの血清アルブミン結合活性を保持する共有結合した複合体および非共有結合した複合体を作製できることを示している。

【0247】

実施例8. 抗SA-dAb / フルオレセイン複合体

イソチオシアニ酸フルオレセイン(FITC)とタンパク質のアミノ基、スルフヒドリル基、イミダゾイル基、チロシル基、またはカルボニル基とを架橋結合させることができる。その分子量は、多くの小分子薬物に匹敵するサイズの389Daである。この複合体で得られる結果は、この抗SA-dAbは、小さい化学物質と結合させた場合、その血清アルブミン結合特性を維持することを示し、抗SA-dAbに小分子薬物を複合体化できることを示している。

【0248】

実施例7に記載したようにして、濃縮したDOM7h-8cysを調製した。濃縮したdAbは、NAP5脱塩カラム(GE Healthcare/Amersham Biosciences, NJ)を使用して50mMホウ酸塩pH8(結合バッファー)にバッファー交換し、次いで2mlセントリコン濃縮容器(Millipore Corp., MA)を使用し2.3mg/mlに濃縮した。製造業者の説明書に従って、FITC(Pierce Biotechnology Inc.)をジメチルホルムアミド(DMF)中に10mg/mlに希釈し、次いでFITC:dAbのモル比が24:1の結合バッファー中でdAbと混合した。30分間かけてその反応を進行させた。この時点で、予めPBSで平衡化したPD10脱塩カラム(GE Healthcare/Amersham Biosciences, NJ)を使用して過剰な未反応FITCを反応から除去し、DOM7h-8cys/FITC複合体をPBSで溶出した。

【0249】

FITC/dAb結合反応が成功したことを確認するために、サンドイッチELISAを使用して、結合したdAbを検出した。ELISAプレート(Nunc, NY)のウェルの半分にヒト血清アルブミン(HSA)を10μg/mlで1ウェル当たり100μlの容量で終夜コートした。終夜インキュベーション後、プレート全体をPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いで全てのウェルを2%Tween PBSで2時間ブロッキングした。ブロッキング後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次い

で 2 % Tween PBS で $1 \mu M$ に希釈した DOM 7 h - 8 cys / FITC と共に、1 時間インキュベートした。同じ ELISA プレート上の対照として、 $1 \mu M$ の対照 FITC 結合抗体および $1 \mu M$ の未結合 DOM 7 h - 8 を 2 % Tween PBS 中でインキュベートした。追加の対照は、HSA でコートしていないが 2 % Tween でブロッキングした ELISA プレートのウェル上でインキュベートした、3 つの同じ希釈したタンパク質であった。インキュベーション後、プレートを PBS、0.05 % Tween で 3 回洗浄し、次いで 2 % Tween PBS で希釈したラット抗 FITC 抗体 (Serotec) の 1 / 500 希釈液と共に 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを PBS、0.05 % Tween で 3 回洗浄し、次いで 2 % Tween PBS で希釈した二次検出抗体 (1 / 5000 抗ラット IgG HRP 複合体) と共に 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを PBS、0.05 % Tween で 3 回、PBS で一回洗浄し、紙の上で叩いて乾燥した。基質として 1 ウェル当たり $100 \mu l$ の 3,3'-5,5'-テトラメチルベンジンで ELISA を発色させ、反応を 1 ウェル当たり $50 \mu l$ の 1 M 塩酸を加えて停止させた。DOM 7 h - 8 と FITC の複合体の存在は、複合体の OD 600 といずれかの非複合体化部分の OD 600 とを比較することによって確認された。

【0250】

表 7

	DOM 7 h - 8 / FITC	DOM 7 h - 8 単独	FITC 結合抗体 (陰性対照)
OD 600 (HSA でコートしたプレート)	0.38	0.042	0.049
OD 600 (2 % Tween PBS でブロッキングしたプレート)	0.041	0.041	0.045

【0251】

実施例 9 . 抗 S A dAb / ペプチド複合体

多くのペプチドが治療効果を有する。N または C 末端システインを有するモデルペプチドは抗血清アルブミン dAb に結合させることができる。

【0252】

この場合、以下の異なる 4 つのペプチドを使用する：ペプチド 1 YPYDVPDYAKKKKKKC (配列番号 64)、ペプチド 2 CKKKKKKYPYDVPDYA (配列番号 65)、ペプチド 3 HHHHHHHKKKKKKC (配列番号 66)、およびペプチド 4 : CKKKKKKHHHHHH (配列番号 67)。ペプチド 1 および 2 は赤血球凝集素タグ (HA タグ) の配列を含み、ペプチド 3 および 4 は His タグの配列を含む。実施例 7 に記載したようにして、濃縮した DOM 7 h - 8 cys を調製する。

【0253】

濃縮した dAb は、5 mM ジチオトレイトルで還元し、次いで NAP5 脱塩カラム (GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ) を使用して結合バッファー (20 mM Bis Tris pH 6.5、5 mM EDTA、10 % グリセロール) にバッファー交換する。dAb 溶液に添加する DMSO 中 100 mM ジチオジピリジンのストック由来の終濃度が 5 mM のジチオジピリジンを使用して、(dAb がそれ自体で二量体化しないように) システインをブロッキングする。dAb およびジチオジピリジンを 20 ~ 30 分間置いて結合させる。次いで、PD10 脱塩カラムを使用し未反応ジチオジピリジンを除去し、結合バッファー (20 mM Bis Tris pH 6.5、5 mM EDTA、10 %

10

20

30

40

50

グリセロール)でdAbを溶出させる。次いで、得られたタンパク質を必要になるまで凍結する。

【0254】

ペプチド1～4は、個別に水に溶解して濃度を200μMとし、5mM DTTを使用して還元し、次いでNAP5脱塩カラム(GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ)を使用して脱塩する。次いで、各ペプチドを、還元しブロッキングしたdAb溶液に20:1の比率で加え、ペプチド-dAb結合を生じさせる。ペプチドとdAbの結合反応の成功を確認するために、サンドイッチELISAを使用して抗SA-dAb/ペプチド複合体を検出す。

【0255】

ELISAプレート(Nunc, NY)にヒト血清アルブミンを10μg/mlで1ウェル当たり100μlの容量で終夜コートする。終夜インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いで4%Marvel PBSで2時間ブロッキングする。ブロッキング後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いで4%Marvel PBSで1μMに希釈したDOM7h-8/ペプチド複合体で1時間インキュベートする。同じELISAプレート上の対照として、20μMの未結合ペプチドおよび1μMの未結合DOM7h-8を4%MPBS中でインキュベートする。インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、次いでペプチド1および2には4%Marvel PBSで希釈したヤギ抗HA抗体(Abcam)の1/2000希釈液で、(ペプチド3および4には)同液で希釈したNiNTA-HRPの1/2000希釈液で1時間インキュベートする。インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回洗浄し、4%MPBSで1/2000に希釈した二次抗ヤギHRP抗体でヤギ抗HA抗体を含むウェルを1時間インキュベートする(他のウェルは1時間ブロッキングした)。インキュベーション後、プレートをPBS、0.05%Tweenで3回、PBSで一回洗浄し、次いで紙の上で叩いて乾燥する。ELISAは、基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンで発色させ、反応を1M塩酸を加えて停止させる。DOM7h-8/ペプチド複合体の複合体の存在は、複合体のOD600といずれかの非複合体化部分のOD600とを比較することによって確認する。

【0256】

実施例10.

この予測的実施例は、ヒトPLADドメインと、血清アルブミンと結合する免疫グロブリン可変ドメインとを含むタンパク質融合体の作製、精製、および特徴付けに使用するに適当な方法について記載する。

【0257】

ヒトTNFR1のプレリガンド構築ドメイン(PLADドメイン)をヒト血清アルブミンと結合する免疫グロブリン可変ドメイン(DOM7h-8)のN末端に融合した融合タンパク質(PLAD-DOM7h-8が得られる)、または血清アルブミンと結合する免疫グロブリン可変ドメインのC末端にPLADを融合した融合タンパク質(DOM7h-8-PLADが得られる)を作製する。PLADのアミノ酸配列は、ヒトライブラリーから単離したcDNA配列に由来し、配列番号85のアミノ酸残基1～51である。DOM7h-8のアミノ酸配列は配列番号24である。これらのタンパク質は、異なる3種の発現用生物：大腸菌(E.coli)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)、およびHEK293T細胞などの哺乳動物細胞中で発現され、精製され、in vitroアッセイおよびin vivo研究の範囲で試験される。

【0258】

以下のヌクレオチド配列は、配列番号85のアミノ酸残基1～51をコードする：CTGGTCCCTCACCTAGGGACAGGGAGAGAGATGTGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTCATAATGACTGTCCAGGCCGGGCAGGATACGGACTGCAGG(配列番号98)。

10

20

30

40

40

50

【0259】

以下のヌクレオチド配列はDOM7h-8をコードする：

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTGCCGGCAAGTCA
GAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAACCCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCGGAATTCCCCTT
TGCAAAGTGGGTCCCATCACGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTGCTACGTACTACTGTCAACAGACGTAGGGTGCCTCCTACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG (配列番号99)

融合遺伝子の構築、クローニング、および発現

重複配列を含む一对のプライマーを使用し、両遺伝子を2つの别々の反応で増幅するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって融合遺伝子産物を生成する。重複配列は、様々な長さおよび組成のポリペプチドリンカー配列〔例えば、Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser（配列番号100）など、柔軟な（flexible）6個のアミノ酸ペプチド〕を導入するために使用される。このようにして形成された2つのPCR生成物は、SOE-PCR（「スプライシング-バイ-オーバーラップ-エクステンションPCR」）と称される方法によって一つに融合されるが、このSOE-PCRでは、両鑄型は一つに（1：1の割合で）混合され、プライマーの不在下で数ラウンドのPCR増幅にかけられる。次いで、新たに形成された融合PCR産物を、少なくとも融合遺伝子全体を挟み込む一对の外部プライマーを使用し、PCRによってさらに増幅する。プライマーは、遺伝子融合生成物のどちらかの末端に制限部位を導入するように設計する。その制限部位に特異的な制限エンドヌクレアーゼでその遺伝子融合生成物を消化し、精製し、続いて発現系に適当なベクターのマルチクローニング部位に、ベクター中の任意の必要なアミノ末端分泌配列及びプロセシング配列と融合するようにライゲートする。6個のアミノ酸リンカー（ThrValAlaAlaProSer（配列番号100））をコードする介在DNAセグメントが附加された、融合タンパク質をコードする融合遺伝子を作製するために、各反応で使用されるプライマーを表9に示す。それらのプライマーの配列を表10に示す。

10

20

30

40

【0260】

使用するベクターは以下のものである。

大腸菌用のpUC119：融合生成物の発現が大腸菌ペリプラズム（ジスルフィド結合を形成するためのシステインの酸化に適当な環境）を標的とするように、酵母糖脂質アンカーモチーフ表面タンパク質分泌シグナル（GAS）をアミノ末端リーダー配列としてインフレームでクローン化する。そのリーダー配列は、大腸菌シグナルペプチダーゼによって除去されて、PLAD-DOM7h-8またはDOM7h-8-PLAD融合生成物の天然アミノ末端が得られる。この系での発現は、P_{lac}プロモーターによって駆動され、終濃度0.05~1mMのイソプロピル-チオ-β-D-ガラクトシド（IPTG）を対数増殖期培養物に添加することによって誘導される。

30

【0261】

哺乳動物細胞（HEK293T細胞など）での発現用のpDOM32：融合生成物がV-J2-C分泌シグナル配列とインフレームとなるように、PLAD-DOM7h-8（またはDOM7h-8-PLAD）をクローン化する。発現は、HEK-293細胞中で、pDOM32のCMVプロモーターによって構成的に駆動される。分泌されると、そのシグナルペプチドは除去されて、アミノ末端に追加のアミノ酸をもたないインタクトな融合タンパク質が得られる。

40

【0262】

大腸菌用のpET23：PLAD-DOM7h-8（またはDOM7h-8-PLAD）は、IPTG誘導の際にいかなるリーダーもなしに大腸菌細胞質中で不溶性タンパク質として発現される。それらのタンパク質は、融合生成物のN末端に追加のアミノ末端メチオニン残基を有する。この系での発現は、終濃度0.05~1mMのイソプロピル-チオ-β-D-ガラクトシド（IPTG）を対数増殖期培養物に添加することによって誘導される。

50

【0263】

ピキア・パストリスでの発現用の p P I C Z : 分泌が培養上清に方向づけされるように、P L A D - D O M 7 h - 8 (またはD O M 7 h - 8 - P L A D)を酵母接合因子リーダー配列に対してインフレームでクローン化する。分泌されるとK e x 2 およびS t e 1 3 プロテアーゼによってリーダー配列は除去され、アミノ末端に追加のアミノ酸を持たないタンパク質が得られる。この系での発現は、培地に100%メタノールを添加(0.5%~2.5%最終容量)することによって誘導される。

【0264】

これらの組換え融合遺伝子は、S a l I およびN o t I を使用してp U C 1 1 9 のマルチクローニング部位に、B a m H I およびH i n d I I I を使用してp D O M 3 2 に、X h o I およびN o t I を使用してp P I C Z 中にクローン化される。

10

【0265】

最初に挿入物を含むプラスミドを大腸菌細胞中に形質転換する。次いで、そのプラスミドを取り出し、当該遺伝子を配列決定して正確な遺伝子配列の存在を確認する。次いでプラスミドを大量に調製し、タンパク質発現に適した細胞中に形質転換するために使用する。

【0266】

p U C 1 1 9 ベクターを使用する発現に適当な細胞は、以下：T G 1 、T B 1 、H B 2 1 5 1 、X L - 1 B l u e 、D H 5 、U T 5 6 0 0 、W 3 1 1 0 などから選択する。p D O M 3 2 ベクターを使用する発現に適当な細胞は、以下：H E K 2 9 3 T 細胞、N S 1 、C O S 、C H O などから選択する。p E T 2 3 ベクターを使用する発現に適当な細胞は、以下：B L 2 1 (D E 3) 、B L 2 1 (D E 3) p L y s S 、P L 2 1 (D E 3) p L y s E 、B L 2 1 T u n e r 、O r i g a m i 、R o s e t t a などから選択する。p P I C Z ベクターを使用する発現に適当な細胞は、K M 7 1 H 、X 3 3 から選択する。

20

【0267】

p U C 1 1 9 、p D O M 3 2 、およびp P I C Z に基づく発現では、融合生成物は培養上清に分泌される。従って、発現に続いて培養液を遠心して細胞をペレット化する。その上清を回収し、ろ過して残存する細胞を除去し、直接、精製処理する。p E T - 2 3 に基づく発現では、融合生成物は、ペリプラズム中に封入体として蓄積される。封入体は、細胞溶解ステップおよび封入体を清浄化するための数回の洗浄ステップを含む当技術分野で公知の方法に従って調製される。高濃度の変性剤(例えば尿素、塩酸グアニジン)および還元剤(例えばD T T 、-メルカプトエタノール、T C E P)を加えることによって封入体を可溶化する。当技術分野で公知の方法に従って、漸減量の変性剤を加えたバッファーでの緩徐透析によって、または再折りたたみバッファーでの迅速希釈によって、それらの融合生成物の再折りたたみを行う。L - アルギニン、グリセロールなどの添加物、P M S F などのプロテアーゼインヒビター、およびG S H およびG S S G などの酸化還元剤を再折りたたみバッファーに加えると折たたみ収量は向上する。

30

【0268】

融合タンパク質の精製

融合タンパク質は、ペプトストレプトコッカル(Peptostreptococcal)プロテインLアガロースカラム上でアフィニティー精製する。これは、P L A D - D O M 7 h - 8 (またはD O M 7 h - 8 - P L A D)融合タンパク質の免疫グロブリン可変ドメイン成分とプロテインLとの間の特異的高親和性相互作用を利用する。典型的には、この試料は、中性p HでプロテインLカラムにロードされる。カラムは、高塩度中性p Hで洗浄し、低p Hバッファーを加えることによって試料を溶出させる。溶出した試料を採取しp Hを中和にする。残存するいかなる混入物質も、カチオンまたはアニオン交換、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、または別の適当な方法によって除去される。

40

【0269】

アミノ末端配列決定およびM A L D I 質量分析によって、得られた配列および質量がD N A配列を基に予想したものと適合することで、精製融合タンパク質の正体(identity)

50

を確認する。

【0270】

融合タンパク質の活性

次いで、任意のリンカーを有する融合生成物の生物活性についてアッセイする。

【0271】

P L A D 活性：P L A D ドメインが細胞表面のT N F R 1と阻害性複合体を形成しうるよう¹⁰に、精製したP L A D - D O M 7 h - 8（またはD O M 7 h - 8 - P L A D）融合タンパク質と共にヒトM R C - 5 細胞を予めインキュベートする。次いで、細胞をヒトT N F - で処理し、37°でインキュベートする。次いで、I L - 8 E L I S A を使用して、T N F 刺激に応答してM R C - 5 細胞が分泌するI L - 8 の量を測定する。融合タンパク質のP L A D 活性は、用量応答的様式でI L - 8 の分泌が阻害されることによって示される。

【0272】

抗血清アルブミンの活性：P L A D - D O M 7 h - 8（またはD O M 7 h - 8 - P L A D）融合タンパク質の血清アルブミンに対する親和性を分析するために、C M - 5 ビアコアチップをp H 5 . 5 で約500レゾナンス・ユニットのアルブミンと結合させ、ビアコアチップ上にビアコアH B S - E P バッファー中に5nM～5μMの範囲で希釈した精製融合タンパク質を流すことによって結合曲線を得る。親和性（K_d）は、各融合タンパク質のK_dの範囲で生成されたトレースに対してオン速度曲線とオフ速度曲線を適合させることによって計算され、融合パートナー（別の分子実体としての）の不在下でD O M 7 h - 8 の親和性（ヒト血清アルブミンに対してK_d：70nM）と比較する。²⁰

【0273】

薬物動態試験：4匹ずつのラット群には、融合タンパク質、または血清アルブミンと結合する対照免疫グロブリン可変ドメイン（どちらについても[³H] - N S P で放射性標識する）の1.5mg / kg を静脈内ボーラスで与え、放射活性計数値分析用に7日間にわたって尾静脈から血清試料を採取する。血清濃度 対 時間曲線は、WinNonlinソフトウェアを使用する1または2コンパートメントモデルに適合させる。融合タンパク質については、P L A D 部分が血清アルブミンと結合する免疫グロブリン可変ドメインの最終半減期に影響を及ぼさない限り、15時間のオーダーの最終半減期が予測される。

【0274】

表9

鋳型1	1のPCR用プライマー	鋳型2	2のPCR用プライマー	1と2のSOE-PCR用プライマー	ライゲート対象のプラスミド
DOM7h-8	DOM008, 1399	PLAD	1398, 1400	DOM008, 1400	pUC119
DOM7h-8	V _κ EAEA, 1399	PLAD	1398, 1400	V _κ BAEA, 1400	pPICZα
DOM7h-8	1393, 1399	PLAD	1398, 1401	1393, 1401	pDOM32

【0275】

10

20

30

40

表10

プライマーナンバー	配列
D O M O 0 8	AGCGGATAACAATTCACACAGGA (配列番号101)
V _κ E A E A (またはV _κ)	TATCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCAGACATCCAGATGACCCAGTCTC (配列番号102) (TATCTCGAGAAAAGAGACATCCAGATGACCCAGTCTC (配列番号103))
1 3 9 3	CCCGGATCCACCGGCGACATCCAGATGACCCAGTCTC (配列番号104)
1 3 9 9	GAGGGACCAGAGATGGAGCAGCGACGGTCCGTTGATTCCACCTGGTCCC (配列番号105)
1 3 9 8	CAAACGGACCGTGTGCTCCATCTCTGGTCCCTCACCTAGGGGACAG (配列番号106)
1 4 0 0	GCGACAGGGAGCGGCCGCTCATTACCTGCAGTCCGTATCCTGCC (配列番号107)
1 4 0 1	GACAGAAGCTTATCACCTGCAGTCCGTATCCTGCC (配列番号108)

10

20

【0276】

本発明は、特に、その好ましい実施形態に関して示し記載されているが、その中で、添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱することなしに、形態および詳細に様々な変化を加えうることは当業者には理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0277】

【図1A】図1Aはマウス血清アルブミン(MSA)と結合させることにより選択した3個のVのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。アラインメントしたアミノ酸配列は、DOM7m-16とも呼ぶMSA16(配列番号1)、DOM7m-12とも呼ぶMSA12(配列番号2)、およびDOM7m-26とも呼ぶMSA26(配列番号3)と名付けられたV由来のものである。

【図1B】図1Bはラット血清アルブミン(RSA)と結合させることにより選択した6個のVのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。アラインメントしたアミノ酸配列は、DOM7r-1(配列番号4)、DOM7r-3(配列番号5)、DOM7r-4(配列番号6)、DOM7r-5(配列番号7)、DOM7r-7(配列番号8)、およびDOM7r-8(配列番号9)と名付けられたV由来のものである。

【図1C】図1Cはヒト血清アルブミン(HSA)と結合させることにより選択した6個のVのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。アラインメントしたアミノ酸配列は、DOM7h-2(配列番号10)、DOM7h-3(配列番号11)、DOM7h-4(配列番号12)、DOM7h-6(配列番号13)、DOM7h-1(配列番号14)、およびDOM7h-7(配列番号15)と名付けられたV由来のものである。

【図1D】図1Dはヒト血清アルブミンおよびコンセンサス配列(配列番号23)と結合させることにより選択した7個のV_Hアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。アラインメントした配列は、DOM7h-22(配列番号16)、DOM7h-23(配列番号17)、DOM7h-24(配列番号18)、DOM7h-25(配列番号19)、DOM7h-26(配列番号20)、DOM7h-21(配列番号21)、およびDOM7h-27(配列番号22)と名付けられたV_H由来のものである。

【図1E】図1Eはヒト血清アルブミンおよびラット血清アルブミンと結合させることにより選択した3個のVアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。アラインメントしたアミノ酸配列は、DOM7h-8(配列番号24)、DOM7r-13(配列番号25)と名付けられたV由来のものである。

30

40

50

5) 、およびDOM7r - 14 (配列番号26)と名付けられたV由来のものである。

【図2-1】図2Aおよび2BはそれぞれMSA16IL-1ra (DOM7m - 16 / IL - 1raとも呼ぶ)融合体およびIL-1raMSA16 (IL - 1ra / DOM7m - 16とも呼ぶ)融合体を発現させるために使用するベクターの模式図である。

【図2-2】図2Cおよび2DはIL-1raMSA16融合体 (IL - 1ra / DOM7m - 16とも呼ぶ)をコードするヌクレオチド配列 (配列番号27)および該融合体のアミノ酸配列 (配列番号28)を示す図である。

【図2-3】図2Cおよび2DはIL-1raMSA16融合体 (IL - 1ra / DOM7m - 16とも呼ぶ)をコードするヌクレオチド配列 (配列番号27)および該融合体のアミノ酸配列 (配列番号28)を示す図である。

【図2-4】図2Eおよび2FはMSA16IL-1ra融合体 (DOM7m - 16 / IL - 1raとも呼ぶ)をコードするヌクレオチド配列 (配列番号29)および該融合体のアミノ酸配列 (配列番号30)を示す図である。

【図2-5】図2Eおよび2FはMSA16IL-1ra融合体 (DOM7m - 16 / IL - 1raとも呼ぶ)をコードするヌクレオチド配列 (配列番号29)および該融合体のアミノ酸配列 (配列番号30)を示す図である。

【図2-6】図2Gおよび2Hは血清アルブミンに結合しなかったダミーIL-1ra融合体をコードするヌクレオチド配列 (配列番号31)および該融合体のアミノ酸配列 (配列番号32)を示す図である。

【図2-7】図2Gおよび2Hは血清アルブミンに結合しなかったダミーIL-1ra融合体をコードするヌクレオチド配列 (配列番号31)および該融合体のアミノ酸配列 (配列番号32)を示す図である。

【図3】図3AはIL-1がHeLa細胞によるIL-8の産生を誘発することを示し、かつIL-8がELISAアッセイで検出される機序を示す図である。図3BはIL-1ra (、「R&D」と記載)、MSA16IL-1ra ()、およびIL-1raMSA16 ()のそれぞれが、IL-1が誘発する培養MRC-5細胞によるIL-8の分泌を、阻害したことを示すグラフである。観察された阻害は、IL-1ra、MSA16IL-1raおよびIL-1raMSA16について用量依存的であった。

【図4】図4A～4Cはマウス血清アルブミン不含 (4A)、5%マウス血清アルブミン含有 (4B)、または10%マウス血清アルブミン含有 (4C)のアッセイにおいて、IL-1ra ()およびMSA16IL-1ra ()の両方が、IL-1が誘発する培養MRC-5細胞によるIL-8の分泌を阻害したことを示すグラフである。観察された阻害は、試験した全ての条件下で、IL-1raおよびMSA16IL-1raについて用量依存的であった。

【図5】図5はMSA16IL1-r'a融合体およびIL-1raMSA16融合体の両方が血清アルブミンと結合したが、ダミーIL1-r'a融合体は結合しなかったことを示すELISAの結果の概略図である。

【図6-1】図6A～6Cはヒト血清アルブミン (HSA)と結合するクローンDOM7h-1 (6A)、HSAと結合するクローンDOM7h-7 (6B)、およびラット血清アルブミン (RSA)と結合するクローンDOM7r-1 (6C)のビアコア (BIACORE)親和性データを示すセンサグラムおよび表である。

【図6-2】図6A～6Cはヒト血清アルブミン (HSA)と結合するクローンDOM7h-1 (6A)、HSAと結合するクローンDOM7h-7 (6B)、およびラット血清アルブミン (RSA)と結合するクローンDOM7r-1 (6C)のビアコア (BIACORE)親和性データを示すセンサグラムおよび表である。

【図6-3】図6A～6Cはヒト血清アルブミン (HSA)と結合するクローンDOM7h-1 (6A)、HSAと結合するクローンDOM7h-7 (6B)、およびラット血清アルブミン (RSA)と結合するクローンDOM7r-1 (6C)のビアコア (BIACORE)親和性データを示すセンサグラムおよび表である。

【図6-4】図6A～6Cはヒト血清アルブミン (HSA)と結合するクローンDOM7

10

20

30

40

50

h - 1 (6 A)、HSAと結合するクローンDOM7h - 7 (6 B)、およびラット血清アルブミン (RSA) と結合するクローンDOM7r - 1 (6 C) のビアコア (BIACORE) 親和性データを示すセンサグラムおよび表である。

【図6-5】図6A～6Cはヒト血清アルブミン (HSA) と結合するクローンDOM7h - 1 (6 A)、HSAと結合するクローンDOM7h - 7 (6 B)、およびラット血清アルブミン (RSA) と結合するクローンDOM7r - 1 (6 C) のビアコア (BIACORE) 親和性データを示すセンサグラムおよび表である。

【図6-6】図6A～6Cはヒト血清アルブミン (HSA) と結合するクローンDOM7h - 1 (6 A)、HSAと結合するクローンDOM7h - 7 (6 B)、およびラット血清アルブミン (RSA) と結合するクローンDOM7r - 1 (6 C) のビアコア (BIACORE) 親和性データを示すセンサグラムおよび表である。
10

【図7】図7はDOM7h - 1、DOM7r - 1、DOM7h - 2、DOM7r - 3、DOM7h - 7、DOM7h - 8、DOM7r - 8、DOM7r - 13、DOM7r - 14、DOM7m - 16、DOM7h - 22、DOM7h - 23、DOM7h - 26、DOM7r - 16、DOM7m - 26、DOM7r - 27、およびDOM7R - 31の、それらが結合する血清アルブミンに対する親和性を示す表である。DOM7h - 8は、ブタ血清アルブミンにも60nMの親和性 (KD) で結合する。

【図8】図8AはGenBankにアクセスション番号NM_173842で登録されているヒトインターロイキン1受容体アンタゴニスト (IL - 1ra) をコードする核酸のヌクレオチド配列 (配列番号33) を示す図である。この核酸は、位置65から始まるオーブンリーディングフレームを有する。図8Bは図8Aに示す核酸 (配列番号33) によってコードされるヒトIL - 1raのアミノ酸配列 (配列番号34) を示す図である。この成熟タンパク質は、152アミノ酸残基 (配列番号34のアミノ酸残基26～177) からなる。
20

【図9】CD1系統の雄動物に一回の静脈内 (i . v .) 注射 (用量は約1.5mg / kgであった) を行った後、マウス血清中のMSA結合性dAb / HAエピトープタグ融合タンパク質の濃度 (μg / mL) を経時的 (日) に示すグラフである。血清濃度は、ヤギ抗HA (Abcam, UK) 捕捉剤およびプロテインL - HRP (Invitrogen, USA) 検出試薬を使用しELISAによって決定した。試験試料との比較可能性を確保するために、既知濃度のMSA結合性dAb / HA融合体の標準曲線を1×マウス血清の存在下で作成した。

1コンパートメントモデル (WinNonlin Software, Pharsight Corp., USA) によるモデリングによって、MSA結合性dAb / HAエピトープタグ融合タンパク質の最終相t1 / 2は29.1時間であり、曲線下面積は559hr · μg / mLであることが示された。
30

【図10】図10はラット血清アルブミン (RSA) と結合させることにより選択したVのアミノ酸配列を示す図である。図示する配列は、DOM7r - 15 (配列番号37)、DOM7r - 16 (配列番号38)、DOM7r - 17 (配列番号39)、DOM7r - 18 (配列番号40)、DOM7r - 19 (配列番号41)と名付けられたV由来のものである。

【図11-1】図11A～11Bはラット血清アルブミン (RSA) に結合するV_Hアミノ酸配列を示す図である。図示する配列は、DOM7r - 20 (配列番号42)、DOM7r - 21 (配列番号43)、DOM7r - 22 (配列番号44)、DOM7r - 23 (配列番号45)、DOM7r - 24 (配列番号46)、DOM7r - 25 (配列番号47)、DOM7r - 26 (配列番号48)、DOM7r - 27 (配列番号49)、DOM7r - 28 (配列番号50)、DOM7r - 29 (配列番号51)、DOM7r - 30 (配列番号52)、DOM7r - 31 (配列番号53)、DOM7r - 32 (配列番号54)、およびDOM7r - 33 (配列番号55)と名付けられたV_H由来のものである。
40

【図11-2】図11A～11Bはラット血清アルブミン (RSA) に結合するV_Hアミノ酸配列を示す図である。図示する配列は、DOM7r - 20 (配列番号42)、DOM7r - 21 (配列番号43)、DOM7r - 22 (配列番号44)、DOM7r - 23 (配列番号45)、DOM7r - 24 (配列番号46)、DOM7r - 25 (配列番号47)
50

)、DOM7r-26(配列番号48)、DOM7r-27(配列番号49)、DOM7r-28(配列番号50)、DOM7r-29(配列番号51)、DOM7r-30(配列番号52)、DOM7r-31(配列番号53)、DOM7r-32(配列番号54)、およびDOM7r-33(配列番号55)と名付けられたV_H由来のものである。

【図11-3】図11A～11Bはラット血清アルブミン(RSA)に結合するV_Hアミノ酸配列を示す図である。図示する配列は、DOM7r-20(配列番号42)、DOM7r-21(配列番号43)、DOM7r-22(配列番号44)、DOM7r-23(配列番号45)、DOM7r-24(配列番号46)、DOM7r-25(配列番号47)、DOM7r-26(配列番号48)、DOM7r-27(配列番号49)、DOM7r-28(配列番号50)、DOM7r-29(配列番号51)、DOM7r-30(配列番号52)、DOM7r-31(配列番号53)、DOM7r-32(配列番号54)、およびDOM7r-33(配列番号55)と名付けられたV_H由来のものである。
10

【図11-4】図11A～11Bはラット血清アルブミン(RSA)に結合するV_Hアミノ酸配列を示す図である。図示する配列は、DOM7r-20(配列番号42)、DOM7r-21(配列番号43)、DOM7r-22(配列番号44)、DOM7r-23(配列番号45)、DOM7r-24(配列番号46)、DOM7r-25(配列番号47)、DOM7r-26(配列番号48)、DOM7r-27(配列番号49)、DOM7r-28(配列番号50)、DOM7r-29(配列番号51)、DOM7r-30(配列番号52)、DOM7r-31(配列番号53)、DOM7r-32(配列番号54)、およびDOM7r-33(配列番号55)と名付けられたV_H由来のものである。
20

【図12】図12はCD1系統の雄動物に一回の静脈内(i.v.)注射(用量は約1.5mg/kgであった)を行った後、それぞれHAエピトープタグを含むDOM7m-16、DOM7m-26、またはMSAに結合しない対照dAbのマウス血清中濃度(初期投与量に対する%)を経時的に示すグラフである。血清濃度は、ヤギ抗HA(Abcam, UK)捕捉剤およびプロテインL-HRP(Invitrogen, USA)検出試薬を使用するELISAによって決定した。試験試料との比較可能性を確保するために、既知濃度のMSA結合性dAb/HA融合体の標準曲線を1×マウス血清の存在下で作成した。1コンパートメントモデル(WinNonlin Software, Pharsight Corp., USA)によるモデリングによって、対照dAbの最終相t_{1/2}は20分であったが、DOM7m-16、DOM7m-26は血清中に非常に長く残存したことが示された。
30

【図13】図13はコラーゲン誘発関節炎(CIA)マウスモデルでの関節炎の治療において、DOM7m-16/IL-1raが、IL-1raまたはENBREL(登録商標)(entarecept; Immunex Corporation)よりも有効であったことを示すグラフである。関節炎を誘導し、21日目から、マウスをデキサメタゾン0.4mg/kg(ステロイド)で、DOM7m-16/IL-1ra 1mg/kg(IL-1ra/抗SA 1mg/kg)または10mg/kg(IL-1ra/抗SA 10mg/kg)で、IL-1ra 1mg/kgまたは10mg/kgで、ENBREL(登録商標)(entarecept; Immunex Corporation)5mg/kgで、または生理食塩水で、処置した。結果は、この研究では、DOM7m-16/IL-1raが、IL-1raまたはENBREL(登録商標)(entarecept; Immunex Corporation)よりも有効であったことを示している。IL-1raに対する応答は、予想通り用量依存的であり、DOM7m-16/IL-1raに対する応答も用量依存的であった。1mg/kgのDOM7m-16/IL-1raによる治療の平均スコアは、10mg/kgのIL-1raによる治療によって得られた平均スコアよりも一貫して低かった。結果は、この研究では、DOM7m-16/IL-1raによる治療が、IL-1raよりも10倍有効性が高かったことを示している。
40

【図14-1】図14A～14Gは、サポリンポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図14Aは、Swissprotアクセッション番号P27559として登録されているサポリン-2前駆体のアミノ酸配列(配列番号56)を示す。そのシグナルペプチドは、配列番号56のアミノ酸1～24である。図14Bは、Swissprotアクセッション番号P27560として登録されているサポリン-3のアミノ酸配列(配列番号57)を示す。
50

【図14-2】図14A～14Gは、サポリンポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図14Cは、Swissprotアクセッション番号P27561として登録されているサポリン-4前駆体のアミノ酸配列（配列番号58）を示す。そのシグナルペプチドは、配列番号58のアミノ酸1～24である。図14Dは、Swissprotアクセッション番号Q41389として登録されているサポリン-5のアミノ酸配列（配列番号59）を示す。

【図14-3】図14A～14Gは、サポリンポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図14Eは、Swissprotアクセッション番号P20656として登録されているサポリン-6前駆体のアミノ酸配列（配列番号60）を示す。そのシグナルペプチドは、配列番号60のアミノ酸1～24であり、可能性のあるプロペプチドは配列番号60のアミノ酸278～299である。成熟ポリペプチドは、配列番号60のアミノ酸25～277（配列番号61）である。図14Fは、Swissprotアクセッション番号Q41391として登録されているサポリン-7のアミノ酸配列（配列番号62）を示す。

【図14-4】図14A～14Gは、サポリンポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図14Gは、サポリン-6の数種の変異体およびアイソフォームを包含するコンセンサスアミノ酸配列（配列番号63）を示す。

【図15】国際公開第2004/041862号に開示されている、マウス血清アルブミンに結合する数種のラクダ科動物のV_HHのアミノ酸配列を示す。配列A（配列番号68）、配列B（配列番号69）、配列C（配列番号70）、配列D（配列番号71）、配列E（配列番号72）、配列F（配列番号73）、配列G（配列番号74）、配列H（配列番号75）、配列I（配列番号76）、配列J（配列番号77）、配列K（配列番号78）、配列L（配列番号79）、配列M（配列番号80）、配列N（配列番号81）、配列O（配列番号82）、配列P（配列番号83）、配列Q（配列番号84）。

10

20

【図1A】

A

MSAに対して選択したV_x

Kabatのナンバリング	5	10	15	20	25	30	35
MSA16	DIQM T QSPS S LSAS V GDRV T ITCR A SQSI I KHLK W						
MSA12	DIQM T QSPS S LSAS V GDRV T ITCR A SQSI F RHLK W						
MSA26	DIQM T QSPS S LSAS V GDRV T ITCR A SQSI Y YHLK W						

Kabatのナンバリング	40	45	50	55	60	65	70
MSA16	YQQK P GKAP K LLIY Q ASRL Q SGVP S RFSG S GSCT D						
MSA12	YQQK P GKAP K LLIY A ASRL Q SGVP S RFSG S GSCT D						
MSA26	YQQK P GKAP K LLIY K ASTL Q SGVP S RFSG S GSCT D						

Kabatのナンバリング	75	80	85	90	95	100	105
MSA16	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q GARNP QTFG Q GTKV E						
MSA12	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q VALY P KTFG Q GTKV E						
MSA26	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q VRKV P RTFG Q GTKV E						

Kabatのナンバリング

MSA16	I KR
MSA12	I KR
MSA26	I KR

【図1B】

B

RSAに対して選択したV_x

Kabatのナンバリング	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-1	DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQYI G RYLR W						
DOM7r-3	DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQYI G RYLR W						
DOM7r-4	DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQWI G RYLR W						
DOM7r-5	DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQYI S RQLR W						
DOM7r-7	DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQYI G RYLR W						
DOM7r-8	DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQWI H RQLK W						

Kabatのナンバリング	40	45	50	55	60	65	70
DOM7r-1	YQQK P GKAP K LLIY D SSVL Q SGVP S RFSG S GSCT D						
DOM7r-3	YQQK P GKAP K LLIY D SSVL Q SGVP S RFSG S GSCT D						
DOM7r-4	YQQK P GKAP K LLIY N GSQQL Q SGVP S RFSG S GSCT D						
DOM7r-5	YQQK P GKAP R LLIY Q ASVL Q SGIP S RFSG S GSCT D						
DOM7r-7	YQQK P GKAP K LLIY D SSVL Q SGVP S RFSG S GSCT D						
DOM7r-8	YQQK P GKAP K LLIY Y ASIL Q SGVP S RFSG S GSCT D						

Kabatのナンバリング	75	80	85	90	95	100	105
DOM7r-1	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q RYRM P YTFG Q GTRV E						
DOM7r-3	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q RYMQ P FTFG Q GTKV E						
DOM7r-4	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q RYLG P YTFG Q GTKV E						
DOM7r-5	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q RYIT P YTFG Q GTKV E						
DOM7r-7	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q RYSS P XTFG Q GTKV E						
DOM7r-8	FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQ Q TFSK P STFG Q GTKV E						

Kabatのナンバリング

DOM7r-1	I KR
DOM7r-3	I KR
DOM7r-4	I KR
DOM7r-5	V KR
DOM7r-7	I KR
DOM7r-8	I KR

【図1C】

C

HSAに対して選択したV_k

Kabatのナンバリング 5 10 15 20 25 30 35

DOM7h-2 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQKI D TYLN W
DOM7h-3 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQWI D TGIA W
DOM7h-4 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQEI Y SWLA W
DOM7h-6 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQSI S SYLN W
DOM7h-1 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQSI S SYLN W
DOM7h-7 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQSI S SYLN W

Kabatのナンバリング 40 45 50 55 60 65 70

DOM7h-2 YQQKP GKAP K LLIY R SSSLQ S AVPS RFGS S GSGT V
DOM7h-3 YQQKP GKAP R LLIY N VSRL Q SGVP S RFGS S GSGT D
DOM7h-4 YQQRP GKAP K LLIY N ASHL Q SGVP S RFGS S GSGT D
DOM7h-6 YQQKP GKAP T LLIY R LSVL Q SGVP S RFGS S GSGT D
DOM7h-1 YQQKP GKAP K LLIY R NSFL Q SGVP S RFGS S GSGT D
DOM7h-7 YQQKP GKAP K LLIY R NSQL Q SGVP S RFGS S GSGT D

Kabatのナンバリング 75 80 85 90 95 100 105

DOM7h-2 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ TYAV P PTFG Q GTKV E
DOM7h-3 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ XWGS P TTFG Q GTKV E
DOM7h-4 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ VIGD P VTFG Q GTKV E
DOM7h-6 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ TYFV P PTFG Q GTKV E
DOM7h-1 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ TYTV P PTFG Q GTKV E
DOM7h-7 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ QTFAV P PTFG Q GTKV E

Kabatのナンバリング

DOM7h-2 IKR
DOM7h-3 IKR
DOM7h-4 IKR
DOM7h-6 IKR
DOM7h-1 IKQ
DOM7h-7 IKR

【図1D】

D

HSAに対して選択したV_H

Kabatのナンバリング 5 10 15 20 25 30 35

DOM7h-22 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF W KYNN S
DOM7h-23 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF Y DYNN S
DOM7h-24 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF H RYSM S
DOM7h-25 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF W KYNN A
DOM7h-26 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF D EYNN S
DOM7h-21 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF D LYDN S
DOM7h-27 EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF S DYRM S
コンセンサス EVQL L ESGG G LVQP G GSLR L SCAA S GFTF X XYNN S

Kabatのナンバリング 40 45 50 55 60 65 70

DOM7h-22 WVRQ A PGKG L EWVS S IDFM G PHTYY Y ADSV K GRFT I
DOM7h-23 WVRQ A PGKG L EWVS T IHTG G GVTYY Y ADSV K GRFT I
DOM7h-24 WVRQ A PGKG L EWVS T ILPGG DVTTYY Y ADSV K GRFT I
DOM7h-25 WVRQ A PGKG L EWVS T ILGE G GNNTYY Y ADSV K GRFT I
DOM7h-26 WVRQ A PGKG L EWVS T ILPHG DRTYY Y ADSV K GRFT I
DOM7h-21 WVRQ A PGKG L EWVS S IVNS G VRRTYY Y ADSV K GRFT I
DOM7h-27 WVRQ A PGKG L EWVS T IIISNG XITTY Y ADSV K GRFT I

Kabatのナンバリング 74 79 82b 86 91 96 100a

DOM7h-22 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKQ R TSML P
DOM7h-23 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKQ N PSYQ -
DOM7h-24 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKQ T PDYM -
DOM7h-25 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKT M DYK -
DOM7h-26 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKQ D PLYR -
DOM7h-21 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKL N QSYH W
DOM7h-27 SRDN S KNTL Y LQMN S LRAED TAVV Y CAKQ D WMYH -

Kabatのナンバリング 100c 105 110

DOM7h-22 MKGK F DYWG Q GTLV T VSS
DOM7h-23 ---- F DYWG Q GTLV T VSS
DOM7h-24 ---- F DYWG Q GTLV T VSS
DOM7h-25 ---- F DYWG Q GTLV T VSS
DOM7h-26 ---- F DYWG Q GTLV T VSS
DOM7h-21 D--- F DYWG Q GTLV T VSS
DOM7h-27 ---- F DYWG Q GTLV T VSS

【図1E】

E

HSAおよびRSAに対して選択したV_k

Kabatのナンバリング 5 10 15 20 25 30 35

DOM7h-8 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQSI S SYLN W
DOM7h-13 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQHI N RELR W
DOM7h-14 DIQMT QSPSS LSAS V GDRV T ITCR A SQHI N RELR W

Kabatのナンバリング 40 45 50 55 60 65 70
DOM7h-8 YQQKP GKAP K LLIY R NSPL Q SGVP S RFGS S GSGT D
DOM7h-13 YQQKP GKAP K LLIY Q ASRL Q SGVP S RFGS S GSGT D
DOM7h-14 YQQKP GKAP K LLIY Q ASRL Q SGVP S RFGS S GSGT D

Kabatのナンバリング 75 80 85 90 95 100 105

DOM7h-8 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ TYRV P PTFG Q GTKV E
DOM7h-13 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ KYLP P PTFG Q GTKV E
DOM7h-14 FTLT I SSLQ P EDFAT YYCQQ RYRV P PTFG Q GTKV E

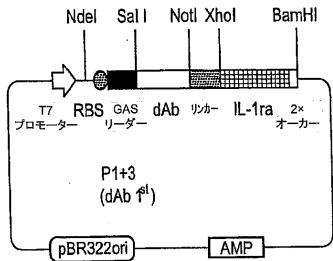
Kabatのナンバリング

DOM7h-8 IKR
DOM7h-13 IKR
DOM7h-14 IKR

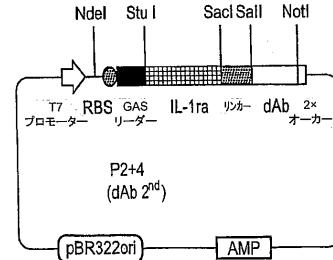
【図2-1】

A

(i)ベクター図



B



【図2-2】

C

(ii)ヒトIL-1ra,dab融合体のアミノ酸配列および核酸配列
IL-1raMSA16

1 R P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q
 1 AGGCCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAGAGCTTCAGAATCTGGGATGTACCGAC
 21 K T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V
 61 AGAACCTTCTATCTGGAAACACRAACTAGTTGGCGGATACTTGCAAGGACCAAATGTC
 43 N L E E K I D V V P I E P H A L F L G I
 121 AATTAGAGAAAAGATAGATAGTGTGATGGTACCCATTGGCCTCATGCTCTTGGGAAATC
 61 H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L
 181 CATGGAGGGAGAGATGCGCTGCTGTGTCAGTCTGGTGTGAGACCCAGACTCCAGCTG
 81 E A V N I T D L S E N R K Q D K X R F A F
 241 GAGGCACTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAACGGACAGCGCTTGGCTTC
 101 I R S D S G P T T S F E S A A C F G W F
 301 ATCCGCTCAGACAGCTGGCCCCACCCRGTGTTGAGTCTGCGCTGGCCGGTGGITGG
 121 L C T A M E A D Q P V S L T N M P D E G
 361 CTCTGACACAGCGATGAAGCTGAGCAGGCGCTCAGCCATACCRATATGCCGAGCG
 141 V M V T K F Y F Q E D E S S G G G G S G
 421 GTCATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGGAGCGAGGCTCAGGTGGGGGGTCAGGC
 161 G G G S G G G G S C G G G G S G G G G S T
 481 GGAGGTGGCAGCGCGGTGCGGGGTGAGTGGTGGCGAGAACGGCGGGTGGCGGGTGG
 181 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 541 GACATCCAGATGACCCAGTCAGTCAGAGCATTTAAAGCATTTAAAGTGGTACAGCAGAA
 201 I T C R A S Q S I I K H L K W Y Q Q K P
 601 ATCACCTTGCCGGCAAGTCAGAGCATTTAAAGCATTTAAAGTGGTACAGCAGAA
 221 G K A P K L L I Y G A S R L Q S G V P S
 661 GGGAAAGCCCCCTARGCTCTGATCTATGGTGCATCCGGTTGCAAGTGGTCCCATCA
 241 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 721 CCTTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTTCACCCATCAGCACTTCAC
 101 G Q G T K V E I K R A A A S G G G G G S G
 301 GGCCAAGGGACCAAGGGAAATCAACGGCGGGCGCAAGCGTGGAGGGCGGTCAAGG
 121 G G G S G G G G S G G G G S G G G G S R
 361 GGAGGTGGCAGCGCGGTGCGGGTCAAGGTGGTGGCGAGCGGGCGGTGGCGCTCGAGG
 141 P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K
 421 CCCTCTGGAGAAATCAGCAAGATGCAAGCTCAGAATCTGGGATGTGGTACCCAGAAG
 161 T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V N
 481 ACCTTCTATCTGGAGGACACRAACTAGTTGGCGGATACTTGCAAGGACCAAATGTC
 181 L E E K I D V V P I E P H A L F L G I H
 541 TTAGAAGAAGATAGATAGTGTGTAACCAATGAGCCTCATGCTCTTGGGAAATCCAT
 201 G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L E
 601 GGAGGGAGATGTCCTGCTCTGGTCAAGCTGGTGTGAGACCCAGACTCCAGCTGGAG
 221 A V N I T D L S E N R K Q D K R F A F I
 661 GCAGTAACTCACTGACCTGAGCGAGAACAGAACGGACAGCGCTTGGCGCTTCATC
 241 R S D S G P T T S F E S A A C P G W F L
 721 CGCTCAGACAGTGGCCCCACCCAGTTGGTGTGAGCTCTGGCGGTGGCTTCATC

【図2-3】

D

261 E D F A T Y Y C Q Q G A R W F Q T F G Q
 781 GAAGATTTGCTACGACTACTGTCAGACAGGGGGCTGGCTGGCCCTCAGAGGTTGG
 281 G T K V E I K R A A A - -
 841 GGGACCAAGGTGGAAATCAACAGGGCGGGCGATAATAA

【図2-4】

E

MSA16IL-1ra

1 S T D I Q M N T Q S P S S L D S A S V G D R
 1 TCAGCGGACATCCAGATGACCCAGTCCTCATCTCCCTGTCATCTGGTAGGAGACCCG
 21 V T I T C R A S Q S I I K H L K W Y Q Q K P
 61 GTCAACCATCACTTGCCGGCAAGTCAGAGCATTTAAAGCATTTAAAGTGGTACCGAC
 41 K P G K A P K L L I Y G A S R L Q S G V
 121 AAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCTGATCTATGGTGCATCCGGTTGCAAAAGTGGG
 61 P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L
 181 CCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGTC
 81 Q P E D F A T Y Y C Q Q G A R W F Q T F
 241 CAACCTGAAAGATTTGCTACGACTACTGTCAGACAGGGGGCTGGCTGGCCCTCAGAC
 101 G Q G T K V E I K R A A A S G G G G G S G
 301 GGCCAAGGGACCAAGGGAAATCAACGGCGGGCGCAAGCGTGGAGGGCGGTCAAGG
 121 G G G S G G G G S G G G G S G G G G S R
 361 GGAGGTGGCAGCGCGGTGCGGGTCAAGGTGGTGGCGAGCGGGCGGTGGCGCTCGAGG
 141 P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K
 421 CCCTCTGGAGAAATCAGCAAGATGCAAGCTCAGAATCTGGGATGTGGTACCCAGAAG
 161 T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V N
 481 ACCTTCTATCTGGAGGACACRAACTAGTTGGCGGATACTTGCAAGGACCAAATGTC
 181 L E E K I D V V P I E P H A L F L G I H
 541 TTAGAAGAAGATAGATAGTGTGTAACCAATGAGCCTCATGCTCTTGGGAAATCCAT
 201 G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L E
 601 GGAGGGAGATGTCCTGCTCTGGTCAAGCTGGTGTGAGACCCAGACTCCAGCTGGAG
 221 A V N I T D L S E N R K Q D K R F A F I
 661 GCAGTAACTCACTGACCTGAGCGAGAACAGAACGGACAGCGCTTGGCGCTTCATC
 241 R S D S G P T T S F E S A A C P G W F L
 721 CGCTCAGACAGTGGCCCCACCCAGTTGGTGTGAGCTCTGGCGGTGGCTTCATC

【図2-5】

F

261 C T A M E A D Q P V S L T N M P D E G V
 781 TGCAACAGGGATGGAGCTGACCGAGCCCTCAGCCCTACCAATATGCCGTGACGAAGGG
 281 M V T K F Y F Q E D E - -
 841 ATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGGAGACGAGTAATAA

【図2-6】

G
ダミーIL-1ra

```

1 S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1 TCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGT

21 V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q
61 GTCAACCCATCACTTGGCCGCAAGTCAGAGCATTTAGGAGCTATTAAATGGTACCCAGCAG

41 K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V
121 AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGTC

61 P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L
181 CCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGTCG

81 Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P N T F
241 CAACCTGAAGATTTGCTAGCTACTACTGTACACAGAGTTACAGTACCCCTAATACGTC

101 G Q G T K V E I K R A A A S G G G S G
301 GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGGCGCCGCHAAGCGGTGGAGGCCGTTCAAGC

121 G G G S G G G G S G G G G S G G G G S R
361 GGAGGTGGCAGGGCGGTGGCGGTGGCGGAGGCGCGCTGGCGCTCGAGG

141 P S G R K S S K M Q A F R I N D V N Q K
421 CCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTCAGAATCTGGGATGTTAACCAAGAAG

161 T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N V N
481 ACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGGGATACTTGCAGGACCAATGTCAT

181 L E E K I D V V P I E P H A L F L G I H
541 TTAGAGAGAAAAGATGATGTTGACCAATGAGCTCATGCTCTGGGATTCAT

201 G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L E
601 GGAGGAAAGATGTCCTCTCTGTGAGCTTGATGAGACAGACTCCAGCTGGAG

221 A V N I T D L S E N R K Q D K R F A F I
661 GCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAACAGCAGGACARGCCTCGCCTCATC

241 R S D S G P T T S F E S A A C P G W F L
721 CGCTCAGACAGTGGCCCCACCACAGTTTGAGCTGCCGCTGCCCGTTGGTCCCTC

```

【図2-7】

H

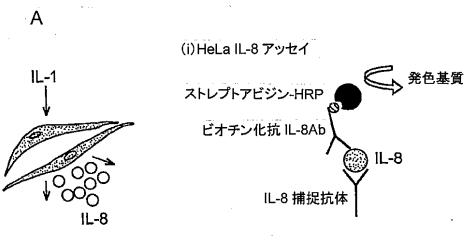
```

261 C T A M E A D Q P V S L T N M P D E G V
781 TGCACAGCGATGGAAGCTGACCAAGGCCCTACCAATATGCTGACGAAGGCCTC

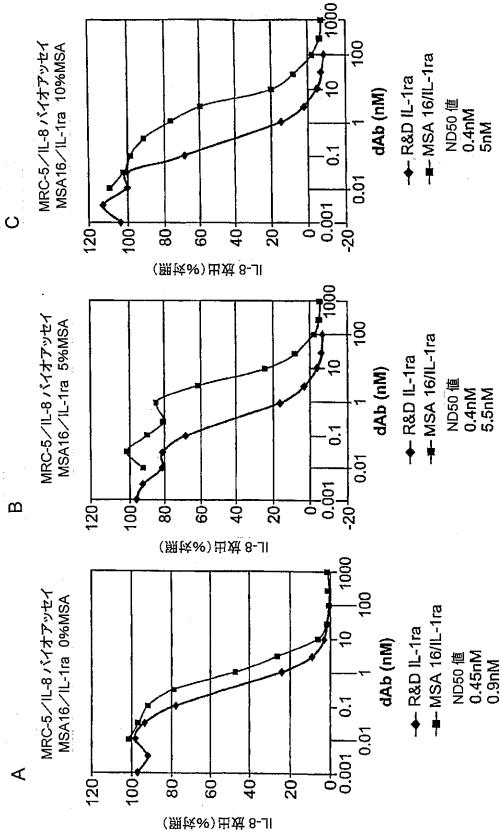
281 M V T K F Y F Q E D E -
841 ATGGTCACCAAATTCCTACTTCCAGGAGACGAGTAATAAA

```

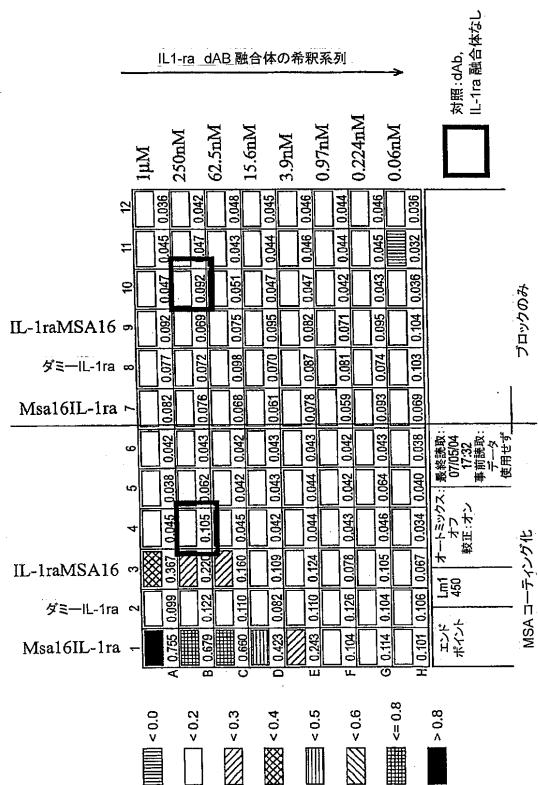
【図3】



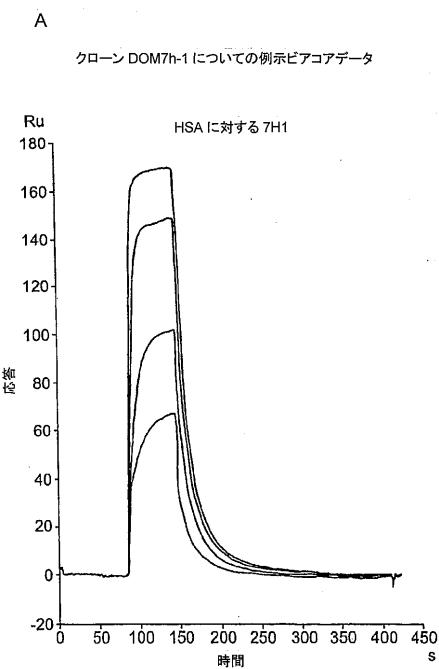
【図4】



【図5】



【図6-1】



【図6-2】

A(続き)

レポート

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	R_{max} (RU)	R_i (RU)	被分析物濃度
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.3$	5.63e4	0.0539	12.7	160	2000n
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.4$	1.49e5	0.0523	39.3	117	1000n
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.5$	1.12e5	0.0481	80.1	58	500n
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.6$	5.01e4	0.0486	136	40.6	250n

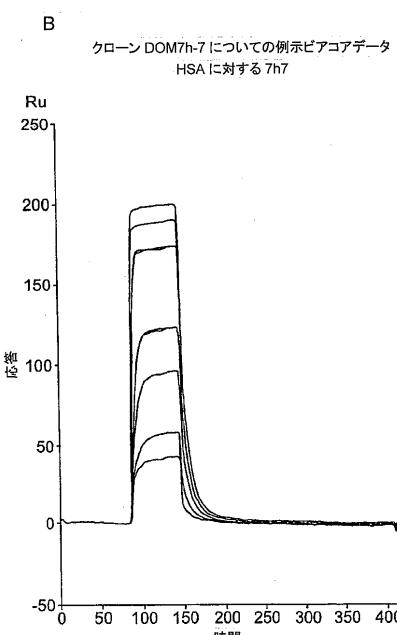
	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	k_{obs} (1/s)	Chi^2
					0.12
12.05.04 オフ速度、オフ速度 $F_c=2.3$	1.05e6	0.57e6	8.59	0.167	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 $F_c=2.4$	2.85e6	0.53e6	29.1	0.201	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 $F_c=2.5$	2.33e6	0.49e6	43.1	0.104	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 $F_c=2.6$	1.03e6	0.57e6	27.8	0.0611	

パラメーター

	ka	$T(ka)$	R_{max}	$T(R_{max})$	濃度	t_0	kd
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.3$	5.63E+04	10.7	12.7	28.9	2000n	91.5	0.0539
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.4$	1.49E+05	40.3	39.3	114	1000n	91.5	0.0523
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.5$	1.12E+05	35.1	80.1	68.1	500n	91.5	0.0481
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.6$	5.01E+04	5.32	136	6.21	250n	91.5	0.0486

	RI	$T(RI)$
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.3$	160	632
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.4$	117	442
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.5$	58	257
12.05.04 オフ速度、オン速度 $F_c=2.6$	40.6	198

【図6-3】



【図 6 - 4】

B(続き)

レポート

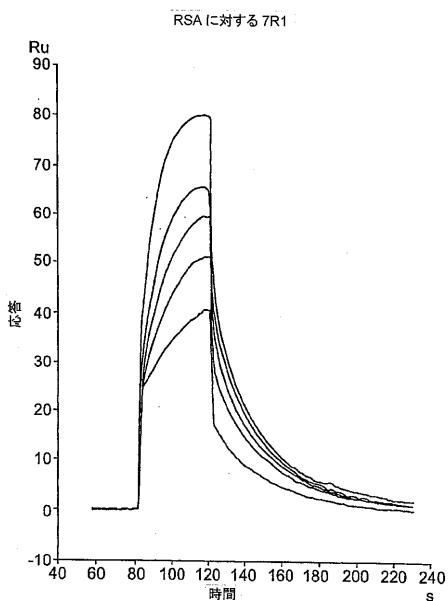
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	被分析物濃度
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-41	11	0.107	6.32e3	196	5000n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-42	2.35e3	0.106	60.9	185	3000n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-43	2.51e5	0.108	39	140	2000n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-44	6.23e5	0.105	46.2	132	1000n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-45	3.02e5	0.103	106	57.8	500n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-46	2.83e5	0.0996	122	44	250n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-47	1.43e5	0.0946	181	29	125n
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-48	5.01e5	0.1	62.8	26	62.5n

	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
					0.542
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-41	103	9.71e-3	3.25	0.107	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-42	2.21e4	4.51e-5	3.79	0.113	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-43	2.33e6	4.3e-7	32.1	0.61	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-44	5.93e6	1.69e-7	39.6	0.728	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-45	2.93e6	3.44e-7	63	0.254	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-46	2.83e6	3.39e-7	50.7	0.171	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-47	1.51e6	2.57e-7	28.8	0.112	
12.05.04 オフ速度、オフ速度 Fc=2-48	5.01e6	2.27e-7	15	0.131	

【図 6 - 5】

C

クローン DOM7h-1 についての例示ビアコアデータ



【図 6 - 6】

C(続き)

レポート

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	被分析物濃度
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-1	3.23e6	0.0345	40.8	53	25n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-2	2.89e6	0.0344	45.1	39.9	20n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-3	2.52e6	0.0331	52.8	34.8	15n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-4	2.87e6	0.0316	53.5	30.5	10n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-5	1.93e6	0.0316	79.8	27.1	5n

	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-1	9.35e7	3.74e-7	28.5	0.115	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-2	8.41e7	3.69e-7	28.3	0.0923	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-3	7.62e7	3.65e-7	28.2	0.071	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-4	9.07e7	3.61e-7	25.5	0.0603	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-5	6.1287	3.66e-7	18.7	0.0413	

パラメーター

	ka	T(ka)	Rmax	T(Rmax)	濃度	t0	kd
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-1	3.23E+06	58.2	40.8	138	25n	87.5	0.0345
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-2	2.89E+06	42.9	45.1	82.9	20n	87.5	0.0344
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-3	2.52E+06	27.6	52.8	43	15n	87.5	0.0331
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-4	2.87E+06	18.3	53.5	25.6	10n	87.5	0.0316
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-5	1.93E+06	3.91	79.8	4.38	5n	87.5	0.0316

	RI	T(RI)
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-1	53	488
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-2	39.9	383
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-3	34.8	348
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc=3-4	30.5	312

【図 7】

抗 SA dAb の親和性

dAb	骨格 (scaffold)	親和性(KD)		
		マウス血清 アルブミン	ラット血清 アルブミン	ヒト血清 アルブミン
DOM7h-1	V _X	+	+	800 nM
DOM7h-2	V _X	+	+	70 nM
DOM7h-7	V _X	+	+	400 nM
DOM7h-3	V _X	+	12 nM	-
DOM7h-8	V _X	200 nM	120 nM	70 nM
DOM7h-16	V _X	1 μM	1 μM	-
DOM7m-16	V _X	50 nM	ND	+
DOM7m-26	V _X	60 nM	ND	+
DOM7r-1	V _X	-	15 nM	-
DOM7r-8	V _X	40 nM	20 nM	-
DOM7r-13	V _X	-	80 nM	-
DOM7r-14	V _X	-	50 nM	-
DOM7r-27	V _H	250 nM	250 nM	-
DOM7r-31	V _H	1 μM	5 μM	(10 μM 推定値)
DOM7h-22	V _H	-	-	60 nM
DOM7h-23	V _H	-	-	900 nM
DOM7h-26	V _H	-	-	300 nM

- 検出可能な結合無し

+ 検出可能であるが弱い結合(推定 KD > 5 μM)

ND 測定せず

【 四 8 】

A

B

M E I C R G L R S H L I T L L L F L F H S E T I C R P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K T F Y L
R N N Q L V A G Y L Q G P V N V L B E E K I D V V P I E P H A L F L G I H G G K M C L S C V K S G D E
T R L Q L E A V N I T D L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P T T S F E S A A C P G W F L C T A M
E A D O P V S L T N M P D E G V M W T K F Y F O E D E

(四 10)

Kabatのナンバリング	5	10	15	20	25	30	35
<u>DOM7r-15</u>	DIQM	T QSPS	S LSAS	V GDRV	T ITCR	A SQSI	G RRLK W
<u>DOM7r-16</u>	DIQM	T QSPS	S LSAS	V GDRV	T ITCR	A SQKI	Y KNLR W
<u>DOM7r-17</u>	DIQM	T QSPS	S LSAS	V GDRV	T ITCR	A SQKI	Y NNLR W
<u>DOM7r-18</u>	DIQM	T QSPS	S LSAS	V GDRV	T ITCR	A SQNI	Y KSLG W
<u>DOM7r-19</u>	DIQM	T QSPS	S LSAS	V GDRV	T ITCR	A SQNI	Y KSLG W

Kabatのナンバリング	40	45	50	55	60	65	70
DON7x-15	Y	Q	K	P	G	A	A
DON7x-16	Y	Q	K	P	G	K	A
DON7x-17	Y	Q	K	P	G	K	L
DON7x-18	Y	Q	K	P	G	K	L
DON7x-19	Y	Q	K	P	G	K	L

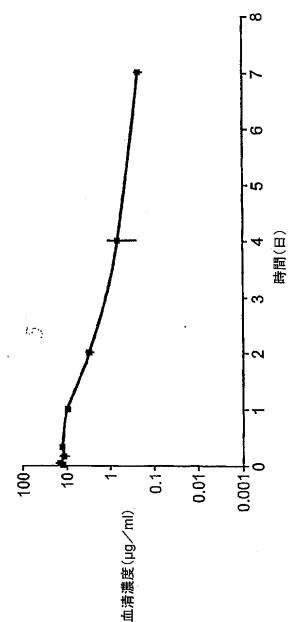
Kabat のナンバリング	75	80	85	90	95	100	105
<u>DOM7r-15</u>	F	T	L	T	I	S	S
<u>DOM7r-16</u>	F	T	L	T	I	S	S
<u>DOM7r-17</u>	F	T	L	T	I	S	S
<u>DOM7r-18</u>	F	T	L	T	I	S	S
<u>DOM7r-19</u>	F	T	L	T	I	S	S

Kabat のナンバリング

<u>DOM7r-15</u>	I KR
<u>DOM7r-16</u>	I KR
<u>DOM7r-17</u>	I KR
<u>DOM7r-18</u>	I KR
<u>DOM7r-19</u>	I KR

【 四 9 】

静脈内ボーラス投与後の抗 MSA dAb HA Tピトープタグ融合体の薬物動態



【図 1.1 - 1】

datのナンバリング	5	10	15	20	25	30	35
MTR-20	B V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-21	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-22	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-23	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-24	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-25	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-26	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-27	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S						
MTR-28	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K D Y Q M A						
MTR-29	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K D Y V M G						
MTR-30	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F H D Y V M G						
MTR-31	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F P R H Y R M G						
MTR-32	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F M W D K M G						
MTR-33	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W A Y P M S						

【図 1 1 - 2】

A(続き)
Kabat のナンバリング

DOM7r-20	40	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-21	45	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-22	50	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-23	54	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-24	59	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-25	64	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-26	69	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-27	74	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-28	79	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-29	84	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-30	89	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-31	94	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-32	99	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T
DOM7r-33	104	W V R Q A P G K G L E B W V S T I S P F G S T T Y A D S V K G R F T

【図 1 1 - 3】

A(続き)
Kabat のナンバリング

DOM7r-20	74	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G G K D P -
DOM7r-21	79	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G N L E P F -
DOM7r-22	84	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G N L S N G F -
DOM7r-23	89	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V K D N T F
DOM7r-24	94	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K N T G G X Q F
DOM7r-25	99	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T G P S S F
DOM7r-26	104	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T E N R G V
DOM7r-27	109	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S D V L K T G
DOM7r-28	114	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V R S M R P Y
DOM7r-29	119	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G F R L P R
DOM7r-30	124	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G R G P N V
DOM7r-31	129	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S Y M G D R F
DOM7r-32	134	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S A S P -
DOM7r-33	139	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G Q G S F -

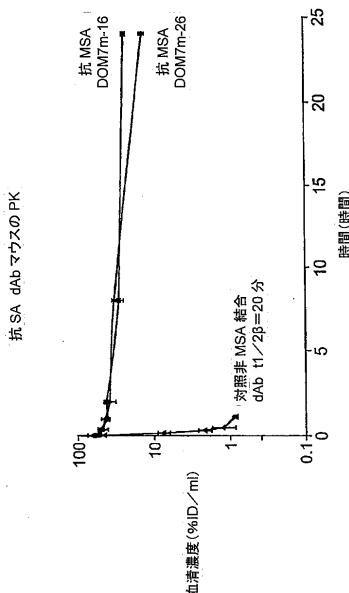
【図 1 1 - 4】

B

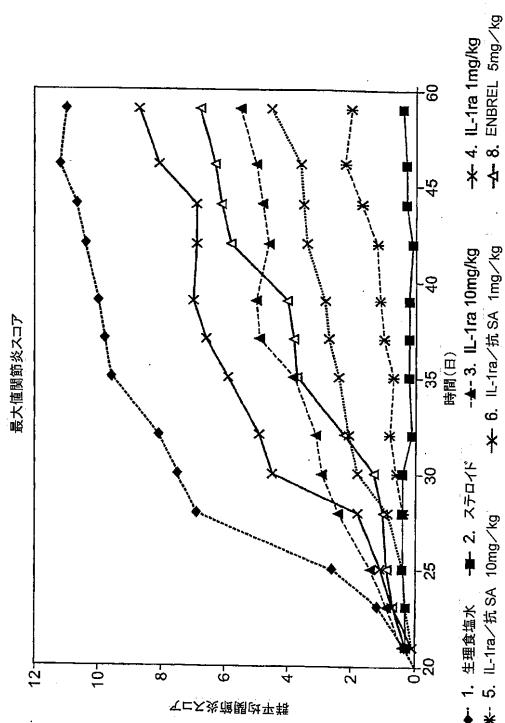
Kabat のナンバリング

DOM7r-20	10	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-21	10	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-22	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-23	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-24	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-25	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-26	11	S F - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-27	11	L D G F D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-28	11	K F - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-29	11	T F - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-30	11	L Q F - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-31	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-32	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S
DOM7r-33	11	- - - D Y W G G Q G G T T L V T V S S

【図 1 2】



【図13】



【図14-1】

A

1 MKIYVWATIA WILLOPSAWT TTDAVTSITL DLVNPTAGQY SSFVDKIRNN VKDPNLKYGG
 61 TDIAVIGPPS KDKFLRINFO SSRGTVSLGL KRDNLYVWAY LAMDNTNVNR AYYFSEITS
 121 AELTALPPEA TTANQKALEY TEDYQSIEKN AQITQGDQSR KELGLGIDLL LTFMEAVNKK
 181 ARVVKNEARF LLIAIQMTAE VARFRYIQNL VTKNFPNKPD SDNKVIQFEV SWRKISTAIY
 241 GDAKNGVFNK DYDFGFCKVR QVKDLQMGLL MYLGPKSSN EANSTAYATT VL

B

1 DPNLKYGTD IAVIGPPSRD KFLRLNFQSS RGTVSLGLR ENLYVWAYLA MDNANVNRAY
 61 YFGTEITSAB LTTLPEATV ANQKALEVTE DYQSIEKNAK ITEGDKTRKE LGLGINLLST
 121 IMDAVNKKAR VVKNEARFLL IAIQMTAEAAA RPRYIQNLVT KNFPNKFNSE DKVIQFQVN
 181 SKISKAIYGD AKNGVFNKDY DPGFGKVRQV KDLQMLLMY LGTPNNAAD RYRAEL

【図14-2】

C

1 MKIYVWATIA WILLOPSAWT TTDAVTSITL DLVNPTAGQY SSFVDKIRNN VKDPNLKYGG
 61 TDIAVIGPPS KDKFLRINFO SSRGTVSLGL KRDNLYVWAY LAMDNTNVNR AYYFSEITS
 121 AELTALPPEA TTANQKALEY TEDYQSIEKN AQITQGDQSR KELGLGIDLL STSMEAVNKK

D

1 VTSITLDLVN PTAGQYSSPV DKIRNNVKDP NLKYGGTDIA VIGPPSKEF LRINFQSSRG
 61 TVSLGLKRDN LYVVAYLAND NTNVNRAYF RSEITSABLT ALFPEATTAN QKALEYTEDY
 121 QSIEKNAQIT QGDKSREKLG LGIDLLLTSM EAVNKKARVV KNEARFLIA IQMTAEVARF
 181 RYIQLNLVTKN FPNKFDSDNK VIQFEVSWRK ISTAIYGDAK NGVFNKDYDF GFGKVRQVND
 241 LQMGLLMLYLG KPK

【図14-3】

E

1 MKIYVWATIA WILLOPSAWT TTDAVTSITL DLVNPTAGQY SSFVDKIRNN VKDPNLKYGG
 61 TDIAVIGPPS KDKFLRINFO SSRGTVSLGL KRDNLYVWAY LAMDNTNVNR AYYFSEITS
 121 AESTALPPEA TTANQKALEY TEDYQSIEKN AQITQGDQSR KELGLGIDLL STSMEAVNKK
 181 ARVVKNEARF LLIAIQMTAE VARFRYIQNL VIKNFPNKFSE SENKVIQFEV NWKKISTAIY
 241 GDAKNGVFNK DYDFGFCKVR QVKDLQMGLL MYLGPKSSN EANSTVRHYG PLKPTLLIT

F

1 VTSITLDLVN PTAGQYSSPV DKIRNNVKDP NLKYGGTDIA VIGPPSKEF LRINFQSSRG
 61 TVSLGLKRDN LYVVAYLAND NTNVNRAYF RSEITSABLT ALFPEATTAN QKALEYTEDY
 121 QSIEKNAQIT QGDKSREKLG LGIDLLLTSM EAVNKKARVV KNEARFLIA IQMTAEVARF
 181 RYIQLNLVIKN FPNKPNSENK VIQFEVNWKK ISTAIYGDAK NGVFNKDYDF GFGKVRQVND
 241 LQMGLLMLYLG KPK

【図14-4】

G
 VTSITLDLVN PTAGQYSSEV DKIRNNVKDP NLKYGGTDIA VIGPPSK(E/D)KF LRINFQSSRG
 TVSLGLKRDN LYVVAYIAMD NTWVNRAAYF (R/K)SEITSAE(S/L)T(S/F)M EAVNKKARVV
 QKALEYTEDY QSIEKNAQIT QGD(Q/K)SRKELG LQIDLL(S/L)T(S/F)M EAVNKKARVV
 K(D/N)EARFLJIA IQMTAE(A/V)ARF RYIQNLV(I/T)KN FPNKF(N/D)S(B/D)NK
 VIQPEV(N/S)W(K/R)K ISTAIYGDAK NGVFNKDYDF GPGKVRQVKD LQMGLIMYLG
 KPXSSNEANS TVRHGPLKP TLLIT

【図15】

配列	
A	抗マウス血清アルブミン QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGVEWW SCISLSSDGTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSILPFGGCGTQVTVSS
B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGVEWW SEISSSGSNTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSILPFGGCGTQVTVSS
C	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGLEWW SAISADGSDERKNAADSVKGRFTISRDNGRKMLTLDNMNSLKPEDTAVYYC VIGRSGPSPCGGTQVTVSS
D	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGLEWW SAISADGSDERKNAADSVKGRFTISRDNGRKMLTLDNMNSLKPEDTAVYYC VIGRSGPSPCGGTQVTVSS
E	AVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCVSGGTTFSSAAAMGWFRQAPGKGFRFV CAIXWMSGCTYYTDSSVKGRTFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVTYYC AADPDRYDBMGEWTTIDPRFWFOGQTQVTVSS
F	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV ASICGSSCITZTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGLCYC AVNRYGIPYPSCTOYONWCGTQVTVSS
G	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV ATISIGGTYIADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AHROTVEHGFYIILNGQGTQVTVSS
H	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV AGSGCRNSNTYYDSVKGRTFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AAETNLNIPDRNLYAAYWCGTQVTVSS
I	EVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV AAISWMSGCTYYADSVKGRFTISRDSTKNAVYIQMNSLKPEDTAVYYC AVDSSGRILWTLSTYDLYNGQGTQVTVSS
J	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV AAISWMSGCTYYDSVKGRTFTISRDNTKNVYLQMNSLKPEDTAVYYC AVDSSGRILWTLSTYDLYNGQGTQVTVSS
K	EVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV AGVIVWSGGSTTYGDSVKGRFTISRDSAKNTVITLEMNSLKPEDTAVYYC AAAYGGGLARDPRTYDWWGGTQVTVSS
L	EVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV SCIRDGTYYDSVKGRTFTISRDNNANTVYLQTMNSLKPEDTAVYYCRA FSGPRTGSSHFTYIYMLRDDDNWCGTQVTVSS
M	EVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV SCISLSSDGTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTILEPDDTAVYYC AAGGLLILRVEELQASDIDYWGCGTQVTVSS
N	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV ACIENSDDGTYGDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC ATADRIYASASHFPSTIFSGWYIYNGQGTQVTVSS
O	EVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV VARWNGDGSCTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AAVRTYGSATYDWWCGTQVTVSS
P	EVQLQESGGGLVQDGGSILRSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV AAIINRNGGTTYYADALKGRFTISRDNTKNTPLQTMNSLKPEDDTA VYYC AAREWPPTSTPSGWYIYNGQGTQVTVSS
Q	DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCBASGFTPSRFGRGMYWVRQAPGKGFRFV VGMNRGGGVTRDYYADSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNRLKPDSDA YIC AARPEYSFTAMSKGDDWKGKLTWTVSS

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K19/00 C07K16/46 C07K16/44 A61K47/48			
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 A61K			
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, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	DENG GUO-MIN ET AL: "Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors" NATURE MEDICINE, vol. 11, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 1066-1072, XP002397702 ISSN: 1078-8956 the whole document ----- -/-/	1-35	
<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			
Date of the actual completion of the international search 6 September 2006		Date of mailing of the international search report 22/11/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lechner, Oskar	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004603

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DENG GUO-MIN ET AL: "A potential therapeutic molecule for inflammatory arthritis targeting pre-ligand assembly domain (PLAD) of TNF receptors" FASEB JOURNAL, vol. 19, no. 4, Suppl. S, Part 1, March 2005 (2005-03), page A915, XP002397703 & EXPERIMENTAL BIOLOGY 2005 MEETING/35TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES; SAN DIEGO, CA, USA; MARCH 31 -APRIL 06, 2005 ISSN: 0892-6638 abstract	1-35
Y	WO 01/58953 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE S) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document	1-35
Y	WO 2004/041867 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN; VAECK, MARK; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, PAU) 21 May 2004 (2004-05-21) abstract page 16, lines 16-31	1-35
Y	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08) the whole document	1-35
A	GOLSTEIN PIERRE: "Signal transduction: FasL binds preassembled Fas" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 288, no. 5475, 30 June 2000 (2000-06-30), pages 2328-2329, XP002397592 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-35
A	CHAN FRANCIS KA-MING ET AL: "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 288, no. 5475, 30 June 2000 (2000-06-30), pages 2351-2354, XP002397593 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-35
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004603

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SIEGEL RICHARD M ET AL: "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations" SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 288, no. 5475, 30 June 2000 (2000-06-30), pages 2354-2357, XP002397594 ISSN: 0036-8075	1-35
A	WO 2004/041862 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN; LAUWEREYS, MARC; DE HAARD, HANS) 21 May 2004 (2004-05-21) the whole document	1-35
A	WO 91/01743 A (CEMU BIOTEKNIK AB) 21 February 1991 (1991-02-21) the whole document	1-35
A	WO 01/45746 A (GENENTECH, INC; DELANO, WARREN, L; DENNIS, MARK, S; LOWMAN, HENRY, B) 28 June 2001 (2001-06-28) the whole document	1-35
A	DENNIS MARK S ET AL: "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 35035-35043, XP002285300 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-35
A	WO 03/002609 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL; WINTER, GREG; IGNATOVICH, OLGA; TOMLINSON, I) 9 January 2003 (2003-01-09) the whole document	1-35
A	SMITH B J ET AL: "Prolonged in vivo residence times of antibody fragments associated with albumin." BIOCONJUGATE CHEMISTRY. 2001 SEP-OCT, vol. 12, no. 5, September 2001 (2001-09), pages 750-756, XP002270731 ISSN: 1043-1802 the whole document	1-35
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004603

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 abstract page 488	1-35
E	WO 2006/051288 A (DOMANTIS LIMITED; TOMLINSON, IAN, M) 18 May 2006 (2006-05-18) the whole document	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.	PCT/GB2005/004603
-------------------------------	-------------------

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 claims 27, 28 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/GB2005/004603

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0158953	A	16-08-2001	AU CA EP	3807601 A 2399388 A1 1263788 A2		20-08-2001 16-08-2001 11-12-2002
WO 2004041867	A	21-05-2004	AU AU AU AU BR	2003283137 A1 2003286002 A1 2003286003 A1 2003286004 A1 0316092 A		07-06-2004 07-06-2004 07-06-2004 07-06-2004 27-09-2005
WO 2004003019	A	08-01-2004	AT CA CN EP JP	328906 T 2492092 A1 1678634 A 1517921 A2 2006512895 T		15-06-2006 08-01-2004 05-10-2005 30-03-2005 20-04-2006
WO 2004041862	A	21-05-2004	WO WO CA CA CA MX	2004041865 A2 2004041863 A2 2505316 A1 2505325 A1 2505326 A1 PA05004955 A		21-05-2004 21-05-2004 21-05-2004 21-05-2004 21-05-2004 17-11-2005
WO 9101743	A	21-02-1991	AT AU AU CA DE DE EP JP JP SE SE	107514 T 652124 B2 6143990 A 2064689 A1 69010206 D1 69010206 T2 0486525 A1 4507242 T 3477196 B2 509359 C2 8902638 A		15-07-1994 18-08-1994 11-03-1991 02-02-1991 28-07-1994 13-10-1994 27-05-1992 17-12-1992 10-12-2003 18-01-1999 02-02-1991
WO 0145746	A	28-06-2001	AU AU CA EP JP	784285 B2 2458701 A 2390691 A1 1240337 A2 2003518075 T		02-03-2006 03-07-2001 28-06-2001 18-09-2002 03-06-2003
WO 03002609	A	09-01-2003	CA EP JP US	2447851 A1 1399484 A2 2005504524 T 2004219643 A1		09-01-2003 24-03-2004 17-02-2005 04-11-2004
WO 2006051288	A	18-05-2006	NONE			

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

(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,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 , エム .

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) 4B024 AA01 BA26 BA28 BA61 CA02 CA20 DA06 EA04
 4B064 AG04 AG07 AG26 CA02 CA05 CA10 CA19 CC24 CE11 CE12
 DA01
 4B065 AA26X AA77X AA93X AB01 AC14 BA02 BB15 CA24 CA25 CA44
 4C076 CC04 CC15 CC41 EE59 FF31
 4C084 AA02 AA07 BA19 BA20 BA22 BA44 CA53 NA14 ZA59 ZA96
 ZB11
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA03 DA14 DA75
 EA20 FA74 GA23 GA26