

(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2019-503167

(P2019-503167A)

(43) 公表日 平成31年2月7日(2019.2.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 7 6
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 136 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-524281 (P2018-524281)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月10日 (2016.11.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月6日 (2018.7.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/077361
 (87) 国際公開番号 W02017/081211
 (87) 国際公開日 平成29年5月18日 (2017.5.18)
 (31) 優先権主張番号 62/253, 318
 (32) 優先日 平成27年11月10日 (2015.11.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515313756
 ユニバーシティ・メディカル・センター・
 ハンブルク・エッペンドルフ
 University Medical
 Center Hamburg - Eppendorf
 ドイツ国、20246 ハンブルク、マル
 ティーニシュトラッセ 52
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 ノルティ, フリードリッヒ
 ドイツ連邦共和国 22767 ハンブル
 ク、パウルゼンプラッツ 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD38に対する抗原結合性ポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、CD38と特異的に結合するポリペプチドに関し、したがって、CD38の発現増加によって特徴づけられる疾患の診断、ならびに治療的および予防的処置に好適である。また、ポリペプチドを含むコンジュゲートおよび医薬組成物も開示される。加えて、本発明は、生体試料におけるCD38および/またはCD38発現細胞の検出方法への、かかるポリペプチドの使用に関する。抗原結合性ポリペプチドが用いられる、CD38および/またはCD38発現細胞の精製および濃縮プロセスもまた記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

200 nM 未満の EC_{50} 値で CD38 と特異的に結合する少なくとも 1 つのイムノグロブリン単一可変ドメイン (ISVD) を含む、ポリペプチド。

【請求項 2】

ISVD が、腫瘍細胞増殖を阻害する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

CD38 が、ヒト CD38 (配列番号 465) である、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

少なくとも 1 つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、FR1 から FR4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、CDR1 から CDR3) からなり、

(i) CDR1 が、

(a) 配列番号 117 ~ 174、および

(b) 配列番号 117 ~ 174 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(ii) CDR2 が、

(c) 配列番号 233 ~ 290、および

(d) 配列番号 233 ~ 290 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(iii) CDR3 が、

(e) 配列番号 349 ~ 406、および

(f) 配列番号 349 ~ 406 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

少なくとも 1 つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、FR1 から FR4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、CDR1 から CDR3) からなり、

(i) CDR1 が、

(a) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(ii) CDR2 が、

(c) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(iii) CDR3 が、

(e) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

少なくとも 1 つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4 つのフレームワ

10

20

30

40

50

ーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3 ）からなり、

（ i ） C D R 1 が、

（ a ）配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

（ b ）配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

（ i i ） C D R 2 が、

（ c ）配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および

（ d ）配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

（ i i i ） C D R 3 が、

（ e ）配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および

（ f ）配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

少なくとも 1 つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3 ）からなり、

（ i ） C D R 1 が、

（ a ）配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、および

（ b ）配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

（ i i ） C D R 2 が、

（ c ）配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

（ d ）配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

（ i i i ） C D R 3 が、

（ e ）配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

（ f ）配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

I S V D が、

- C D R 1 が配列番号 1 1 7 ~ 1 7 4 により表され、C D R 2 が配列番号 2 3 3 ~ 2 9 0 により表され、C D R 3 が配列番号 3 4 9 ~ 4 0 6 により表される I S V D、

- 配列番号 1 ~ 5 8 により表される I S V D、および、

- 配列番号 1 ~ 5 8 のいずれか 1 つとの少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性により表される I S V D、

10

20

30

40

50

からなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

C D R が、以下からなる群から選ばれる、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド：

C D R 1 が配列番号 1 1 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 4 9 である、

C D R 1 が配列番号 1 1 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 4 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 0 である、

C D R 1 が配列番号 1 1 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 5 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 1 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 6 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 2 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 7 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 3 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 8 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 4 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 9 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 5 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 0 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 6 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 7 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 8 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 9 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 4 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 0 である、

C D R 1 が配列番号 1 2 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 5 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 1 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 6 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 2 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 7 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 3 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 8 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 4 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 9 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 5 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 0 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 6 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 7 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 8 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 9 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 4 であり、C D R 3 が配列番号 3 7 0 である、

C D R 1 が配列番号 1 3 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 5 であり、C D R 3 が配列番号 3 7 1 である、

10

20

30

40

50

50

C D R 1 が配列番号 1 6 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 7 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 8 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 9 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 4 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 0 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 5 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 1 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 6 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 2 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 7 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 3 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 8 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 4 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 9 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 5 である、および、

C D R 1 が配列番号 1 7 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 9 0 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 6 である。

【請求項 1 0】

各々が、2 0 0 p M 未満の EC_{50} 値で C D 3 8 と特異的に結合する第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 1 1】

第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3 ）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8、および

(b) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4、および

(d) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0、および

(f) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3 ）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

(b) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あ

10

20

30

40

50

るいは

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および

(d) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および

(f) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 9 または 10 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 12】

第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8、および

(b) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

20

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4、および

(d) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0、および

(f) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

30

第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

40

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

(d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3

50

93、394、399、400、401、402、403、404、405、406、および

(f) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項9または10に記載のポリペプチド。

【請求項13】

第1のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1からCDR3)からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号129、163、164、165、166、および

(b) 配列番号129、163、164、165、166のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号245、279、280、281、282のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号361、395、396、397、398のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

第2のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1からCDR3)からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは、

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および

(d) 配列番号233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは、

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406、および

(f) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項9または10に記載のポリペプチド。

【請求項14】

FACSアッセイにおけるEC₅₀が、190pM以下、例えば180、170、160、150、140、130、120、110、100未満、もしくはさらにはそれ未満

10

20

30

40

50

、例えば 90、80、70、60、50、40、35、30、25、20 未満、もしくはさらにはそれ未満、例えば 16 pM 未満であり、および / または、

ポリペプチドが、競合 FACS において決定されたときに、最大 100 nM、例えば 50 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、好ましくはさらには最大 2 nM、例えば 1 nM の IC₅₀ により CD38 と結合し、および / または、

前記ポリペプチドが、好ましくは競合 FACS において決定されたときに、ベンチマークの IC₅₀ よりも、少なくとも 10%、例えば 20%、30%、50%、80%、90% もしくはさらには 100% 良好な IC₅₀ により CD38 と結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 15】

CD38 と結合できる少なくとも 2 つの ISVD を含み、前記 ISVD が異なる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

CD38 と結合できる少なくとも 2 つの ISVD を含み、前記 ISVD が CD38 上の異なるエピトープと結合する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

少なくとも 2 つの ISVD が互いに直接連結するか、またはリンカーを介して互いに連結する、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

リンカーが、配列番号 482 ~ 494 に記載のリンカーの群から選択される、請求項 17 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 19】

さらに、任意に 1 つ以上のペプチドリナーを介して連結される 1 つ以上の他の基、残基、部分または結合単位を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

1 つ以上の他の基、残基、部分または結合単位が、かかる基、残基、部分または結合単位のない対応するポリペプチドと比較し増加した半減期を有するポリペプチドを提供する、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 21】

1 つ以上の増加した半減期を有するポリペプチドを提供する他の基、残基、部分または結合単位が、ポリエチレングリコール、血清タンパク質またはその断片、血清タンパク質と結合できる結合単位、Fc 部、抗体定常ドメイン、および血清タンパク質と結合できる小タンパク質またはペプチド、からなる群から選ばれる、請求項 20 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 22】

薬剤、例えば毒素もしくは毒素部分、またはイメージング剤をさらに含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 23】

ISVD が、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、dAb、dAb としての使用に好適なアミノ酸配列、ナノボディ、VHH、ヒト化 VHH およびラクダ化 VHH からなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 24】

さらに CH2 および CH3 定常ドメインを含む、請求項 1 から 23 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 25】

CH2 および CH3 ドメインが、直接連結するかまたはリンカーを介して連結する、請求項 17 に記載のポリペプチド。

【請求項 26】

50

請求項 24 または 25 に記載の第 1 のポリペプチドと、請求項 24 または 25 に記載の第 2 のポリペプチドと、を含み、前記ポリペプチドの C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインが、F c 部を形成する、イムノグロブリン構築物。

【請求項 27】

第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドが同じである、請求項 26 に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 28】

第 1 のポリペプチドの C H 2 ドメインが、第 2 のポリペプチドの C H 2 ドメインと対をなし、および / または、第 1 のポリペプチドの C H 3 ドメインが、第 2 のポリペプチドの C H 3 ドメインと対をなす、請求項 26 または 27 に記載のイムノグロブリン構築物。

10

【請求項 29】

第 1 のポリペプチドが、第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含み、第 2 のポリペプチドが、第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含む、請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 30】

第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

20

(b) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

30

(e) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 129、163、164、165、166、および

(b) 配列番号 129、163、164、165、166 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

40

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号 245、279、280、281、282 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号 361、395、396、397、398 のアミノ酸配列に対し 4、3、

50

2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 29 に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 31】

第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8、および

(b) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4、および

(d) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0、および

(f) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

(d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、請求項 29 に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 32】

第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

(i) C D R 1 が、
 (a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および
 (b) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、
 2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i) C D R 2 が、
 (c) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および
 (d) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、
 2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i i) C D R 3 が、
 (e) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および
 (f) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、
 2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、
 第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4
) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、
 (a) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5
 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、および
 (b) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5
 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の
 相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、
 (c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2
 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、お
 よび
 (d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2
 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のア
 ミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群
 から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、
 (e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3
 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、お
 よび
 (f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3
 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のア
 ミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群
 から選ばれる、請求項 2 9 に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 3 3】

第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドが同じである、請求項 2 9 ~ 3 2 のいづ
 れか一項に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 3 4】

第 1 の I S V D が C D 3 8 の第 1 のエピトープと結合し、第 2 の I S V D が C D 3 8 上
 の第 2 のエピトープと結合し、前記第 1 のエピトープが前記第 2 のエピトープと異なり、
 好ましくは前記第 1 のエピトープが前記第 2 のエピトープと重複しない、請求項 2 6 ~ 3
 3 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 3 5】

薬剤、例えば毒素もしくは毒素部分、またはイメージング剤をさらに含む、請求項 2 6
 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物。

【請求項 3 6】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは請求項 2 6 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物を含む医薬組成物。

【請求項 3 7】

C D 3 8 の発現増加によって特徴づけられる疾患の治療的処置方法に用いられる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 2 6 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

高増殖性疾患または自己免疫性疾患の治療的処置方法に用いられる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 2 6 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3 9】

バーキットリンパ腫、T細胞リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性的リンパ球性白血病（CLL）、多発性骨髄腫、慢性的骨髄性白血病（CML）、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、C D 3 8 発現固形腫瘍、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、グレーブス病、シェーグレン症候群、多発性筋炎、水疱性類天疱瘡、糸球体腎炎、脈管炎または喘息、バラケル・サイモンズ（Barraquer-Simons）症候群、自己免疫心疾患、炎症性腸疾患、発作性夜間ヘモグロビン尿症、非定型溶血性尿毒症症候群および虚血再灌流傷害および移植臓器の拒絶の治療的処置方法に用いられる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 2 6 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のイムノグロブリン構築物、または請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 4 2】

請求項 4 0 に記載の核酸分子または請求項 4 1 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4 3】

(a) 請求項 4 0 に記載の核酸分子の発現を可能にする条件下で、請求項 4 2 に記載の宿主細胞を培養することと、

30

(b) 培養物からポリペプチドを単離することと、を含む、

請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドの組換え産生方法。

【請求項 4 4】

- 配列番号 1 ~ 5 8 により表されるポリペプチドの存在下で、C D 3 8 への競合阻害剤ポリペプチドの結合を決定することと、

- 前記競合阻害剤ポリペプチドの C D 3 8 に対する結合が、配列番号 1 ~ 5 8 により表されるポリペプチドの非存在下での、C D 3 8 への競合阻害剤の結合と比較し、配列番号 1 ~ 5 8 により表されるポリペプチドの存在下で、少なくとも 1 0 %、例えば 2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 % またはさらにはそれ以上、例えば 8 0 %、9 0 % またはさらには 1 0 0 % 減少する競合阻害剤ポリペプチドを検出することと、

40

を含む、

配列番号 1 ~ 5 8 により表されるポリペプチドと競合する競合阻害剤ポリペプチドを決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ラクダ科の重鎖抗体の V H H ドメインの C D R 1、C D R 2 および C D R 3 領域を含む抗原結合性ポリペプチドに関する。ポリペプチドは、特異的に C D 3 8 と結合し、したがって、C D 3 8 の発現増加によって特徴づけられる疾患の診断、ならびに治療的および予防的処置に好適である。抗原結合性ポリペプチドを含むコンジュゲートおよび

50

医薬組成物もまた開示される。加えて、本発明は、生体試料におけるCD38および/またはCD38発現細胞の検出方法への、かかる抗原結合性ポリペプチドの使用に関する。抗原結合性ポリペプチドが用いられる、CD38および/またはCD38発現細胞の精製および濃縮プロセスもまた記載される。

【背景技術】

【0002】

細胞表面マーカーCD38は、約42kDaのII型膜貫通糖タンパク質であり、免疫系細胞の、また他の細胞の表面にも発現する(1)。CD38は、短い細胞内N末端ドメインと、膜貫通ヘリックスと、タンパク質のC末端に位置する長い細胞外ドメインと、からなる(2)。

10

【0003】

CD38は多機能酵素であり、二次メッセンジャーであるADPリボース(ADPR)、ニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸(NAADP)およびサイクリックADPリボース(cADPR)の合成の重要なステップが触媒される。これらのシグナル分子は、細胞内Ca²⁺レベルの調節に関与する(3~5)。さらに、ADP-リボシルトランスフェラーゼとの相互作用の際、CD38は、免疫応答を調節しうることがさらに示唆されている(6)。そのリガンドであるCD31との結合により、CD38によるサイトカインのさらなる増加が誘導される(7)。

【0004】

CD38は、多くの造血障害において上方制御されることが知られている。例えば、CD38は、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫の細胞表面上、ならびに白血病の経過で出現する様々な細胞において高いレベルで発現することが知られている。臨床的には、CD38の存在は、慢性リンパ球性白血病(CLL)のマーカーとして、既にルーチンの用いられている(8)。CLLにおいては、Bリンパ球の強い増大が見られる(9)。高レベルのCD38は、予後不良のCLL患者のマーカーである。CD38は、Bリンパ球の増殖および増大に影響すると考えられる(8)。

20

【0005】

また、HIV-I感染の場合、CD38は予後マーカーである。T細胞上でのCD38の発現増加は、疾患進行の指標である一方、発現減少は、HAART(高活性抗レトロウイルス療法)治療の有効性の指標とみなされている(10)。診断および治療に使用可能であるCD38に対するモノクローナル抗体は、従来技術で周知である(8)。ヒト抗CD38抗体は現在、多発性骨髄腫の処置のフェーズIおよびIIの臨床試験中である。参照文献(11~13)では、癌または自己免疫性疾患の処置における、アポトーシスによる、または細胞傷害性機構によるCD38発現細胞を除去するCD38特異的抗体の使用が開示されている。

30

【0006】

ヒト医療分野におけるポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体の使用の短所は、それらの投与後の安定性がしばしば不十分であることに起因する。加えて、モノクローナル抗体の製造に要する経費は非常に高い。特にヒト化抗体は、ヒトへの使用に好適であるために低免疫原性であるべきであるが、その調製は労働およびコスト集約的である。加えて、丸ごとの抗体は、それらのサイズ上の理由から組織への浸透性が限られる。したがって、治療におけるそれらの欠点のかなりの改善が、効率面および経済面で現実的な療法のためには必要となる。

40

【0007】

従来技術において、抗体の投与の課題に関連する課題を解決するための幾つかのストラテジーが開発されている。これらのストラテジーは主に、完全IgG抗体の断片の使用に基づくものである。例えば、Fv、Fab、F(ab')およびF(ab')₂が治療目的で用いられている。しかしながら、これらの断片はしばしば、完全抗体と比較し抗原に対する特異性および/または親和性が低くなる。さらにその上に、これらの断片はしばしば、水溶液への低い溶解性のみを示す。

50

【 0 0 0 8 】

したがって、可溶性で、製造が容易で、容易に組織を透過し標的と結合する、改善された薬剤に対するニーズが存在する。

【 0 0 0 9 】

補体依存性細胞障害 (C D C) は、抗体依存性細胞障害 (A D C C) の次に、癌に対する最適な治療用モノクローナル抗体 (m A b) の機能にとり非常に重要な機構であり (Beum et al. 2008 J. Immunology 181:822-832)、このエフェクター機能は、化学療法の処置後であっても完全に保存される。C D C 活性は、抗体の F c 部分によって媒介される。しかしながら、この活性は幾つかの抗体によっては生じる (Manches et al. 2003 Blood 101:949-954) が、その全てによって生じるわけではない (Cardarelli et al. 2002 Cancer Immunology, Immunotherapy 51: 15-24、Wang et al. 2004 Angiogenesis 7:335-345)。

10

【 0 0 1 0 】

F c 部に連結されたイムノグロブリン単一可変ドメインを含む構築物が公知である。例えば、欧州特許出願公開第 0 6 9 8 0 9 7 号および Hamers-Casterman ら (Nature 1993, June 3; 363 (6428): 446-8) に記載されるように、ラクダ科動物からの天然の「重鎖抗体」は、ヒンジ領域を介して F c 部に連結される天然の単一可変ドメイン (「V_{H H} ドメイン」と称される) を含む。興味深いことに、これらの参考文献のさらなる記載によると、これらの重鎖抗体は従来の 4 鎖型抗体に存在する C_H 1 ドメインを欠き、V_{H H} が、ヒンジを介して F c 部の C_H 2 ドメインに直接連結されている。Ablynx NV 名による国際公開第 2 0 0 9 / 0 6 8 6 3 0 号は、ヒト F c 部に連結されうる、結合特性の改善された様々な I S V D を記載している。

20

【 0 0 1 1 】

ラクダ科動物の重鎖のみの抗体に由来する C D 3 8 特異的なナノボディおよび C D 3 8 - F c 融合タンパク質が、Fumey ら (PEGS Europe November 2014 ポスター) に記載されている。著者は、これらのナノボディがインビボで C D 3 8 を発現する腫瘍を検出することを示している。その上に、ナノボディ - F c 融合タンパク質は強力な補体依存性細胞傷害性を示す。

【 0 0 1 2 】

有効な免疫療法は、特異的に標的と結合し、同時に C D C を活性化させるべきである。しかしながら、現在まで得られた結果は、抗 C D 3 8 ナノボディ - F c 融合タンパク質が免疫療法に有用であることを確立した一方で、特定のナノボディによって標的とされる C D 3 8 上のいずれのエピトープが特に治療目的に有利なのかは不明なままである。このように、抗 C D 3 8 I S V D を治療的に効果的にする具体的な機能特性に対するさらなる洞察に対するニーズ、ならびに、様々なタイプの癌および他の状態、例えば炎症性疾患の処置により有効である改善された治療用 C D 3 8 結合剤に対するニーズが存在する。さらに、改善された診断法に対するニーズが存在する。

30

【 発明の概要 】

【 0 0 1 3 】

本発明は、様々な C D 3 8 のエピトープと特異的に結合できる I S V D を初めて提供するものである。I S V D により認識されるエピトープ、すなわちエピトープ 1 (「E 1」)、エピトープ 2、(「E 2」) およびエピトープ 3 (「E 3」) が重複しないことが、エピトープビニング実験で明らかとなった。エピトープ 1 およびエピトープ 3 と結合する I S V D を組み合わせることで、I S V D 個々と比べて相乗効果が示された。その上に、この組合せはベンチマークを上回った。立体配置的な制限にもかかわらず、エピトープ 1 およびエピトープ 3 と結合する I S V D を含むバイパラトピック (biparatopic) な構築物が、個々の I S V D の対応する組合せと同様の効果を示した。様々な幅広い C D 3 8 発現腫瘍細胞株ならびにヒト患者に由来する腫瘍細胞に対して、バイパラトピックな F c 構築物が有効であることもまた示された。予想外にも、少なくとも 1 つの I S V D がエピトープ 2 と結合する I S V D の組合せ (例えば E 2 および E 1 の組合せまたは E 2 および E

40

50

3の組合せ)は、かかるISVDが欠如する組合せ(例えば組合せE1+E3)を上回ることを見出した。

【0014】

本発明のISVDは特に、CD38の発現増加によって特徴づけられる障害の診断において、および/または治療的処置への使用に好適である。

【0015】

したがって、本発明は、200pM未満のEC₅₀値でCD38と特異的に結合する少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメイン(ISVD)を含むポリペプチドに関し、好ましくは前記ISVDが腫瘍細胞増殖を阻害する。さらにより好ましくは、前記CD38はヒトCD38(配列番号465)である。

10

【0016】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1からCDR3)からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号117~174、および

(b) 配列番号117~174のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは、

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号233~290、および

(d) 配列番号233~290のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは、

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号349~406、および

(f) 配列番号349~290のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

20

【0017】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1からFR4)および3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1からCDR3)からなり、

30

(i) CDR1が、

(a) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは、

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに/あるいは、

40

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0018】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記少なくとも1つのイムノグロブリン

50

ン単一可変ドメインが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号129、163、164、165、166、および

(b) 配列番号129、163、164、165、166のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号245、279、280、281、282のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号361、395、396、397、398のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0019】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメインが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは、

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および

(d) 配列番号233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは、

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406、および

(f) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0020】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記ISVDが、

- CDR1が配列番号117～174により表され、CDR2が配列番号233～290により表され、CDR3が配列番号349～406により表されるISVD、

- 配列番号1～58により表されるISVD、および、

- 配列番号1～58のいずれか1つと少なくとも80%以上の配列同一性により表されるISVD、

10

20

30

40

50

からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0021】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記CDRが、以下からなる群から選択される：

CDR1が配列番号117であり、CDR2が配列番号233であり、CDR3が配列番号349である、

CDR1が配列番号118であり、CDR2が配列番号234であり、CDR3が配列番号350である、

CDR1が配列番号119であり、CDR2が配列番号235であり、CDR3が配列番号351である、

CDR1が配列番号120であり、CDR2が配列番号236であり、CDR3が配列番号352である、

CDR1が配列番号121であり、CDR2が配列番号237であり、CDR3が配列番号353である、

CDR1が配列番号122であり、CDR2が配列番号238であり、CDR3が配列番号354である、

CDR1が配列番号123であり、CDR2が配列番号239であり、CDR3が配列番号355である、

CDR1が配列番号124であり、CDR2が配列番号240であり、CDR3が配列番号356である、

CDR1が配列番号125であり、CDR2が配列番号241であり、CDR3が配列番号357である、

CDR1が配列番号126であり、CDR2が配列番号242であり、CDR3が配列番号358である、

CDR1が配列番号127であり、CDR2が配列番号243であり、CDR3が配列番号359である、

CDR1が配列番号128であり、CDR2が配列番号244であり、CDR3が配列番号360である、

CDR1が配列番号129であり、CDR2が配列番号245であり、CDR3が配列番号361である、

CDR1が配列番号130であり、CDR2が配列番号246であり、CDR3が配列番号362である、

CDR1が配列番号131であり、CDR2が配列番号247であり、CDR3が配列番号363である、

CDR1が配列番号132であり、CDR2が配列番号248であり、CDR3が配列番号364である、

CDR1が配列番号133であり、CDR2が配列番号249であり、CDR3が配列番号365である、

CDR1が配列番号134であり、CDR2が配列番号250であり、CDR3が配列番号366である、

CDR1が配列番号135であり、CDR2が配列番号251であり、CDR3が配列番号367である、

CDR1が配列番号136であり、CDR2が配列番号252であり、CDR3が配列番号368である、

CDR1が配列番号137であり、CDR2が配列番号253であり、CDR3が配列番号369である、

CDR1が配列番号138であり、CDR2が配列番号254であり、CDR3が配列番号370である、

CDR1が配列番号139であり、CDR2が配列番号255であり、CDR3が配列番号371である、

10

20

30

40

50

[illegible]

10

20

30

40

50

C D R 1 が配列番号 1 6 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 7 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 8 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 9 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 4 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 0 である、

C D R 1 が配列番号 1 6 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 5 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 1 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 6 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 2 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 7 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 3 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 8 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 4 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 9 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 5 である、

C D R 1 が配列番号 1 7 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 9 0 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 6 である、ポリペプチドに関する。

【 0 0 2 2 】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、各々が 2 0 0 p M 未満の EC_{50} 値で C D 3 8 に特異的に結合する第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含む、ポリペプチドに関する。

【 0 0 2 3 】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8、および

(b) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4、および

(d) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0、および

(f) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 129、163、164、165、166 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(ii) CDR2 が、

(c) 配列番号 245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号 245、279、280、281、282 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(iii) CDR3 が、

(e) 配列番号 361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号 361、395、396、397、398 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0024】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の ISVD が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1 から FR4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1 から CDR3）からなり、

(i) CDR1 が、

(a) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(ii) CDR2 が、

(c) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(iii) CDR3 が、

(e) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

前記第 2 の ISVD が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1 から FR4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1 から CDR3）からなり、

(i) CDR1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(ii) CDR2 が、

(c) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および

(d) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群

10

20

30

40

50

から選ばれ、ならびに／あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【 0 0 2 5 】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

(b) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および

(d) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および

(f) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

(d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに／あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群

10

20

30

40

50

から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0026】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、

- FACSアッセイにおけるEC₅₀が190 pM以下であり、例えば180、170、160、150、140、130、120、110、100 pM未満、もしくはさらにはそれ未満、例えば90、80、70、60、50、40、35、30、25、20 pM未満、もしくはさらにはそれ未満、例えば16 pM未満であり、および/または、

- 前記ポリペプチドが、好ましくは競合FACSで決定されたとき、最大100 nM、例えば50 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、好ましくはさらには最大2 nM、例えば1 nMのIC₅₀によりCD38と結合し、および/または、

- 前記ポリペプチドが、好ましくは競合FACSで決定されたとき、ベンチマークのIC₅₀よりも、少なくとも10%、例えば20%、30%、50%、80%、90%、またはさらには100%良好なIC₅₀によりCD38と結合する、ポリペプチドに関する。

【0027】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、CD38と結合できる少なくとも2つのISVDを含み、前記ISVDが異なる、ポリペプチドに関する。

【0028】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、CD38と結合できる少なくとも2つのISVDを含み、前記ISVDがCD38上の異なるエピトープと結合する、ポリペプチドに関する。

【0029】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記少なくとも2つのISVDが互いに直接連結するか、またはリンカーを介して互いに連結する、ポリペプチドに関する。

【0030】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、リンカーが配列番号482~494を有するリンカーの群から選択される、ポリペプチドに関する。

【0031】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、さらに、任意に1つ以上のペプチドリリンカーを介して連結される1つ以上の他の基、残基、部分または結合単位を含む、ポリペプチドに関する。

【0032】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記1つ以上の他の基、残基、部分または結合単位が、かかる基、残基、部分または結合単位のない対応するポリペプチドと比較し、増加した半減期を有するポリペプチドを提供する、ポリペプチドに関する

【0033】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記1つ以上の増加した半減期を有するポリペプチドを提供する他の基、残基、部分または結合単位が、ポリエチレングリコール、血清タンパク質またはその断片、血清タンパク質と結合できる結合単位、Fc部、抗体定常ドメイン、ならびに血清タンパク質と結合できる小分子タンパク質またはペプチドからなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

【0034】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、薬剤、例えば毒素もしくは毒素部分、またはイメージング剤をさらに含む、ポリペプチドに関する。

【0035】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記ISVDが、単一ドメイン抗体、ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、dAb、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、ナノボディ、VHH、ヒト化VHHおよびラクダ化VHからなる群から選ばれる、ポリペプチドに関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、C H 2 および C H 3 定常ドメインをさらに含む、ポリペプチドに関する。

【 0 0 3 7 】

したがって、本発明は、本明細書に記載される、前記 C H 2 および前記 C H 3 ドメインが、直接連結するかまたはリンカーを介して連結する、ポリペプチドに関する。

【 0 0 3 8 】

さらなる特に好ましい態様において、本発明は、本明細書に記載される第 1 のポリペプチドおよび本明細書に記載される第 2 のポリペプチドを含み、前記ポリペプチドの前記 C H 2 ドメインおよび前記 C H 3 ドメインが F c 部を形成する、イムノグロブリン構築物に関する。

10

【 0 0 3 9 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが同じである、イムノグロブリン構築物にも関する。

【 0 0 4 0 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 のポリペプチドの前記 C H 2 ドメインが前記第 2 のポリペプチドの前記 C H 2 ドメインと対をなし、および / または前記第 1 のポリペプチドの前記 C H 3 ドメインが前記第 2 のポリペプチドの前記 C H 3 ドメインと対をなす、イムノグロブリン構築物にも関する。

【 0 0 4 1 】

20

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 のポリペプチドが、第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含み、前記第 2 のポリペプチドが、第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含む、イムノグロブリン構築物にも関する。

【 0 0 4 2 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8、および

30

(b) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4、および

(d) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

40

(e) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0、および

(f) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

(b) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、

50

2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および

(d) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および

(f) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、イムノグロブリン構築物にも関する。

10

【 0 0 4 3 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3 ）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8、および

(b) 配列番号 1 3 1、1 3 2、1 3 4、1 4 0、1 4 4、1 4 6、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 5、1 5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

20

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4、および

(d) 配列番号 2 4 7、2 4 8、2 5 0、2 5 6、2 6 0、2 6 2、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 1、2 7 4 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0、および

(f) 配列番号 3 6 3、3 6 4、3 6 6、3 7 2、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 5、3 8 7、3 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

30

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3 ）からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

40

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

(d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

50

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、イムノグロブリン構築物にも関する。

【 0 0 4 4 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

(b) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および

(d) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および

(f) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

(d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれ、ならびに / あるいは、

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選ばれる、イムノグロブリン構築物にも関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが同じである、イムノグロブリン構築物にも関する。

【 0 0 4 6 】

また、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の I S V D が C D 3 8 の第 1 のエピトープと結合し、前記第 2 の I S V D が C D 3 8 上の第 2 のエピトープと結合し、前記第 1 のエピトープが前記第 2 のエピトープと異なり、好ましくは前記第 1 のエピトープが前記第 2 のエピトープと重複しない、イムノグロブリン構築物にも関する。

【 0 0 4 7 】

また、本発明は、本明細書に記載される、薬剤、例えば毒素もしくは毒素部分、またはイメージング剤をさらに含む、イムノグロブリン構築物にも関する。

10

【 0 0 4 8 】

加えて、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドまたは本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物を含む、医薬組成物に関する。

【 0 0 4 9 】

本発明は、C D 3 8 の発現増加によって特徴づけられる疾患の治療的処置方法に用いられる、本明細書に記載されるポリペプチド、本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物または本明細書に記載される医薬組成物に関する。

【 0 0 5 0 】

本発明は、高増殖性疾患または自己免疫性疾患の治療的処置方法に用いられる、本明細書に記載されるポリペプチド、本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物または本明細書に記載される医薬組成物に関する。

20

【 0 0 5 1 】

本発明は、パーキットリンパ腫、T細胞リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性的リンパ球性白血病(CLL)、多発性骨髄腫、慢性的骨髄性白血病(CML)、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、C D 3 8 発現固形腫瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、グレーブス病、シェーグレン症候群、多発性筋炎、水疱性類天疱瘡、糸球体腎炎、脈管炎または喘息、バラケル・サイモンズ(Barraquer-Simons)症候群、自己免疫心疾患、炎症性腸疾患、発作性夜間ヘモグロビン尿症、非定型溶血性尿毒症症候群および虚血再灌流傷害および移植臓器の拒絶の治療的処置の方法に用いられる、本明細書に記載されるポリペプチド、本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物または本明細書に記載される医薬組成物に関する。

30

【 0 0 5 2 】

また、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸分子にも関する。

【 0 0 5 3 】

また、本発明は、本明細書に記載される核酸分子を含む発現ベクターにも関する。

【 0 0 5 4 】

また、本発明は、本明細書に記載される核酸分子または本明細書に記載される発現ベクターを含む宿主細胞にも関する。

40

【 0 0 5 5 】

また、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドの組換え産生のための方法にも関し、

(a) 本明細書に記載される核酸分子の発現を可能にする条件下で、本明細書に記載される宿主細胞を培養することと、

(b) 培養物からポリペプチドを単離することと、を含む。

【 0 0 5 6 】

また、本発明は、配列番号 1 ~ 5 8 により表されるポリペプチドと競合する競合阻害剤ポリペプチドを決定する方法にも関し、

50

- 配列番号 1 ~ 58 により表されるポリペプチドの存在下で、CD38 への前記競合阻害剤ポリペプチドの結合を決定することと、

- 配列番号 1 から 58 により表されるポリペプチドの非存在下での、CD38 への競合阻害剤の結合と比較し、配列番号 1 ~ 58 により表されるポリペプチドの存在下で、前記競合阻害剤ポリペプチドの CD38 に対する結合が、少なくとも 10%、例えば 20%、30%、40%、50% またはさらにはそれ以上、例えば 80%、90% またはさらには 100% 減少する競合阻害剤ポリペプチドを検出することと、を含む。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図 1】イムノグロブリン構築物の例を示す模式図。この場合、構築物は 2 つのポリペプチド (1) および (2) を含み、各々が 2 つの定常ドメイン (7) および (8)、「第 1 の」ISVD (3) ならびに「第 2 の」ISVD (4) を含む。第 1 の ISVD (3) は、任意に好適なリンカー (5) を介して第 2 の ISVD (4) に連結し、また任意に (かつ通常は) 好適なリンカーまたはヒンジ領域 (6) を介して定常ドメインにも連結する。ポリペプチド (1) の定常ドメイン (7) および (8)、ならびにポリペプチド鎖 (2) の対応する定常ドメイン (7) および (8) が、一緒になって Fc 部 (9) を形成する。

【図 2A】(A) CD38 特異的ナノボディが解離速度を低い nM 域において示す。ヒト血液 50 μ L のサンプルを、RT で 30 分間、連続タイトレーションされた、精製された一価のナノボディとインキュベートした。細胞を二回洗浄し、結合した Nb を FITC コンジュゲート抗 c-myc (9E10) により検出した。

【図 2B】T 細胞を、APC コンジュゲート抗 CD3 により染色した。赤血球を溶解させ、細胞をフローサイトメトリーにより分析した。リンパ球および CD3 陰性細胞においてゲーティングを実施した。

【図 2C】(B) FACS 分析により、血液中の白血球上の CD38 への VHH の結合を確認する (CD16 + NK 細胞および CD19^{int} B 細胞のサブセット)。

【図 3】補体の給源としての 20% のプールされたヒト血清の存在下、図 3 に示すように、LP-1 骨髄腫細胞を 37 で 1 h、2 μ g の Fc 融合タンパク質とインキュベートした。ヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みから細胞死を決定した。

【図 4】組合せ対個別の構築物のタイトレーション。補体の給源としてのプールされたヒト血清の存在下、LP-1 骨髄腫細胞を 37 で 2 h、異なる濃度のイムノグロブリン構築物とインキュベートした。ヨウ化プロピジウムによる染色から細胞死を決定した。

【図 5】別々のエピトープを認識する Nb - Fc 融合タンパク質の組合せが、CA46 リンパ腫細胞に対し強力な細胞傷害性を示す: KSV037 (A)、KSV064 (B)。CA46 リンパ腫細胞を 4 で 20 min、ダラツムマブ scFv - Fc と、個々の Nb - Fc (2 μ g / 120 μ L) と、または 2 つの Nb - Fc 融合タンパク質 (各 1 μ g) の組合せと (A)、または Nb - Fc 融合タンパク質およびダラツムマブ scFv - Fc (各 1 μ g) の組合せと (B)、インキュベートし、その後、20 μ L の天然ヒト血清または不活性化ヒト血清 (56 で 30 min インキュベートして補体成分を不活性化) のいずれかを追加した。細胞を 37 で 60 min さらにインキュベートし、洗浄し、PBS / BSA / ヨウ化プロピジウム中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

【図 6A】(A) バイパトピックイムノグロブリン構築物が、初代骨髄腫細胞 (KSV123) に対し強力な細胞傷害性を示す。ミエローマ患者からの初代骨髄細胞をフィコール密度勾配遠心により精製し、洗浄し、4 で 10 min、ダラツムマブ scFv、バイパトピック Nb - Nb211 - 10GS - 121Fc 融合タンパク質または無関係対照 Nb - Fc 融合タンパク質 (各 2 μ g / 120 μ L)、または 211Nb - Fc および 121Nb - Fc 融合タンパク質 (各 1 μ g / 120 μ L) の組合せとインキュベートし、その後 10 μ L のヒト血清を追加した。細胞を 37 で 60 min さらにインキュベートし、洗浄し、蛍光色素コンジュゲートした CD56、CD45 に対する mAb または適切な CD38 特異的 Nb (Nb - Fc 融合物のものとは独立した別のものと結合) を用い 4

10

20

30

40

50

で60min対比染色した。細胞を洗浄し、PBS/BSA/ヨウ化プロピジウム中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。骨髓腫細胞のPI染色を、CD56+/CD45lo細胞のゲーティングにより評価した。

【図6B】(B)scFv-Fc(DarascFv)および完全IgG(ダラツムマブH+L)のフォーマットにおける、ダラツムマブと比較したバイパトリック抗CD38VHH-Fc構築物のCDC。数値はPI陽性細胞の%を示す。

【図7】バイパトリックイムノグロブリン構築物は、補体因子C1qとの高い結合能を示す。

【図8】バイパトリックイムノグロブリン構築物は、広範囲な癌に対して細胞傷害性である。

【図9】様々なエピトープと結合するバイパトリックイムノグロブリン構築物が、ベンチマークよりも細胞傷害性である。

【図10】Alexa680コンジュゲートナノボディは、インビボでCD38+腫瘍を優良に区別する。A)Nb注入前、ならびに1h、2h、4h、6h、8h、12h、24hおよび48h後に光学的分子イメージングを実施した。同一の量のシグナル強度を全て等しいレベルにし、適正な目視比較を可能にした。腫瘍より下のシグナルが腎臓に対応する。尾部および足部のシグナルは、おそらく標識Nbを含む尿との接触を反映する。B)CD38陽性およびCD38陰性腫瘍のT/B比を、目的領域(ROI)から決定した。半定量分析における、腫瘍および正常組織(後肢)の周辺のROIを描画した。バックグラウンドシグナルを腫瘍周辺のROIの放射効率から減算することによって、CD38陽性およびCD38陰性腫瘍のT/B比率を算出した。T/B比率を時間の関数としてプロットする。

【図11-1】28種の一価の精製された抗CD38VHHおよびベンチマークとしてのダラツムマブscFvによる、Octet RED384(ForteBio)の生物発光分析による、タンデムなエピトープビニング解析のセンサーグラム。第2のアナライズの会合および解離のセンサーグラムを記録した。結合捕捉レベルを、ロードの終わりに10秒間の時間枠にて評価した。Wardの方法に従い、非階層的なクラスター形成を行った。

【図11-2】28種の一価の精製された抗CD38VHHおよびベンチマークとしてのダラツムマブscFvによる、Octet RED384(ForteBio)の生物発光分析による、タンデムなエピトープビニング解析のセンサーグラム。第2のアナライズの会合および解離のセンサーグラムを記録した。結合捕捉レベルを、ロードの終わりに10秒間の時間枠にて評価した。Wardの方法に従い、非階層的なクラスター形成を行った。

【図12】抗CD38VHH-Fcと、ダラツムマブscFv-Fc(ダラツムマブhc)および完全IgGフォーマット(ダラツムマブH+L)との組合せによりCDCを測定した。ダラツムマブとは異なるエピトープを認識するVHH-Fcは、フォーマットに関係なく、ダラツムマブhcおよびダラツムマブH+LのいずれのCDCをも増強する。ファミリー数を「f」で示す。

【図13】CD38のGDPシクラーゼ活性に対する抗CD38VHHの効果。A)CD38のGDPシクラーゼ活性を阻害するかまたは強化する、様々なVHHの濃度における蛍光のトレース。基質のより速い変換は、CD38酵素感作および高い傾き(RFU/s)を示す一方、より遅い変換および低い傾きは、酵素活性の阻害を示す。B)400nMのVHHの一回用量による、CD38酵素活性の阻害または強化。白色のバーはエピトープ2VHHを、灰色はエピトープ1を、黒のバーはエピトープ3を示す。

【図14】CD38のcGDPシクラーゼ活性の強化または阻害に対する、抗CD38VHHの組合せの相乗効果。

【図15】ダラツムマブ(ダラツムマブH+L)と比較した、バイパトリック抗CD38VHHのADCC活性。CD38+CA46細胞を標的細胞として用いた。CD16をトランスフェクションしたNK92エフェクター細胞対標的細胞の比率が3:1となるよう、エフェクターを追加した。細胞殺傷を3時間後に評価した。

【図16】CD38+CA46同所異種移植モデルにおける、腫瘍成長および生存に対す

10

20

30

40

50

るバイパトリックCD38VHH - - FcWF211 - 10GS - WF121 - Fcの効果。

【図17】エピトープビニングの結果および交差ブロッキング分析の階層的クラスタリングにより定義されるCD38上のVHHエピトープのベン図。

【発明を実施するための形態】

【0058】

特に記載または定義がない限り、使用する全ての用語は、当分野におけるそれらの通常の意味を有し、それらは当業者にとり明らかである。参照として、例えば標準的なハンドブック、例えばSambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd. Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、F. Ausubelら (Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987)、Lewin (Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1985)、Oldら (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2nd edition) University of California Press, Berkeley, CA, 1981)、Roittら (Immunology (6th. Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh, 2001)、Roittら (Roitt's Essential Immunology (10th Ed.) Blackwell Publishing, UK, 2001)、およびJanewayら (Immunobiology (6th Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York, 2005)、ならびに本明細書において引用される一般的な背景技術が挙げられる。

10

【0059】

特に明記しない限り、具体的に詳細に記載しない全ての方法、ステップ、技術および操作は、当業者には明らかであるように、自体公知の方法で実施可能であり、実施された。参照として、例えば標準的なハンドブックおよび本明細書に記載の一般的背景技術、およびその中の引用参照文献、ならびに、例えば以下のレビュー：Presta (Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56, 2006)、Levin and Weiss (Mol. Biosyst. 2(1): 49-57, 2006)、Irving et al. (J. Immunol. Methods 248(1-2): 31-45, 2001)、Schmitz et al. (Placenta 21 Suppl. A: S106-12, 2000)、Gonzales et al. (Tumour Biol. 26(1): 31-43, 2005)が挙げられ、これらは、親和性成熟や、イムノグロブリンなどのタンパク質の特異性および他の所望の特性を改善するための他の技術などのタンパク質工学の技術を記載する。

20

【0060】

本明細書で用いられる「配列」という用語（例えば「イムノグロブリン配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「V_HH配列」または「タンパク質配列」などの用語中）は、一般的に、前後関係がより限定された解釈を必要としない限り、然るべきアミノ酸配列ならびにそれをコードする核酸またはヌクレオチド配列の両者を包含すると理解すべきである。

30

【0061】

アミノ酸残基は、標準的な3文字表記、または1文字表記でのアミノ酸コードにより示される。参照として、国際公開第08/020079号の48ページの表A-2が挙げられる。

【0062】

核酸またはアミノ酸は、例えば、それが得られた反応媒体または培養培地と比較し、通常、前記給源または培地中で会合する、別の核酸、別のタンパク質/ポリペプチド、別の生物学的成分もしくは巨大分子、または少なくとも1つの混入物質、不純物もしくは微量成分などの少なくとも1つの他の成分からそれが分離されたとき、「(本質的に)単離された(形態)」と考えられる。特に少なくとも2倍に、特に少なくとも10倍に、より具体的には少なくとも100倍に、また最大で1000倍以上に精製されたとき、核酸またはアミノ酸は「(本質的に)単離された」と考えられる。「(本質的に)単離された形態で」ある核酸またはアミノ酸は、好適なクロマトグラフィー技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動などの好適な技術を使用して決定したときに、好ましくは本質的に均質である。

40

50

【 0 0 6 3 】

あるヌクレオチド配列またはアミノ配列が、それぞれ、別のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を「含む」か、または「本質的に」別のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列「からなる」といわれるときは、それぞれ、後者のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、前者のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に組み込まれていることを意味するが、このことはより通常には、それぞれ、前者のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、その配列中に、それぞれ、後者の配列と同じヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有する、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基のストレッチを含むことを一般的に意味し、前者の配列が実際に生成されたまたは得られた方法とは無関係である（例えば、本明細書に記載されるいかなる好適な方法によるものであってもよい）。非限定的な例として、本発明のポリペプチドが、イムノグロブリン単一可変ドメインを含むといわれるときは、前記イムノグロブリン単一可変ドメイン配列が、本発明のポリペプチドの配列中に組み込まれていることを意味するが、より通常には、本発明のポリペプチドが、その配列中にイムノグロブリン単一可変ドメインの配列を含むことを一般的に意味し、本発明の前記ポリペプチドが生成されたまたは得られた方法とは無関係である。また、核酸またはヌクレオチド配列が、別のヌクレオチド配列を含むといわれるときは、挙げられている前者の核酸またはヌクレオチド配列は、好ましくは、それが発現産物（例えばポリペプチド）として発現されるとき、後者のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列が前記発現産物の一部をなす（言い換えると、後者のヌクレオチド配列が、挙げられている前者のより大きな核酸またはヌクレオチド配列と同じ読み枠である）。

10

20

【 0 0 6 4 】

「本質的に、～からなる」とは、本発明の方法で使用するイムノグロブリン単一可変ドメインが、正確に本発明のポリペプチドと同じであるか、または、イムノグロブリンの単一可変ドメインのアミノ末端、カルボキシ末端、またはアミノ末端およびカルボキシ末端の両方に、1～20アミノ酸残基、例えば1～10アミノ酸残基、好ましくは1～6アミノ酸残基、例えば1、2、3、4、5または6アミノ酸残基などの限定された数のアミノ酸残基を有する本発明のポリペプチドに対応する。

【 0 0 6 5 】

2つ以上のヌクレオチド配列を比較する場合、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列間の「配列同一性」のパーセンテージは、[第2のヌクレオチド配列の対応する部位のヌクレオチドと同一である第1のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの数]を、[第1のヌクレオチド配列のヌクレオチドの総数]で除算し、[100%]で乗算することにより算出することができ、第1のヌクレオチド配列と比較し、第2のヌクレオチド配列のヌクレオチドの欠失、挿入、置換または追加は、単一ヌクレオチド（位置）の相違と考えられる。代替的には、2つ以上のヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、NCBIのBlastのv2.0などの配列アラインメント用の公知のコンピュータアルゴリズムを用いて、標準的な設定を用いて算出できる。配列同一性の程度を決定するための他の幾つかの技術、コンピュータアルゴリズムおよび設定は、例えば国際公開第04/037999号、欧州特許出願公開第0967284号、欧州特許出願公開第1085089号、国際公開第00/55318号、国際公開第00/78972号、国際公開第98/49185号および英国特許出願公開第2357768号に記載されている。通常、2つのヌクレオチド配列間の「配列同一性」のパーセンテージを上記で概説した算出方法に従って決定する目的には、ヌクレオチド数の最も大きいヌクレオチド配列を「第1の」ヌクレオチド配列とし、別のヌクレオチド配列を「第2の」ヌクレオチド配列とする。

30

40

【 0 0 6 6 】

2つ以上のアミノ酸配列を比較する目的には、第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列間の「配列同一性」（また本明細書において「アミノ酸同一性」とも称される）のパーセンテージは、[第2のアミノ酸配列の対応する位置のアミノ酸残基と同一である第1のアミノ酸配列のアミノ酸残基の数]を、[第1のアミノ酸配列のアミノ酸残基の総数]で除算し、[100%]で乗算することにより算出することができ、第1のアミノ酸配列と

50

比較し、第2のアミノ酸配列中のアミノ酸残基の欠失、挿入、置換または追加は、単一アミノ酸残基（位置）の相違として、すなわち、本明細書で定義される「アミノ酸相違」と考えられる。代替的には、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を、例えば、ヌクレオチド配列の配列同一性の程度の決定に関して上記したような公知のコンピュータアルゴリズムを用いて、同様に標準的な設定を用いて算出することができる。通常、2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」のパーセンテージを上記で概説した算出方法に従って決定する目的には、アミノ酸残基数の最も大きいアミノ酸配列を「第1の」アミノ酸配列とし、別のアミノ酸配列を「第2の」アミノ酸配列とする。

【0067】

また、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を決定する際、当業者は、いわゆる「保存的」アミノ酸置換、すなわち、アミノ酸残基が類似する化学構造を有する他のアミノ酸残基により置換され、ポリペプチドの機能、活性または他の生物学的性質にほとんど、または本質的に影響しないアミノ酸置換と一般的に称される置換を考慮できる。かかる保存的アミノ酸置換は、例えば国際公開第04/037999号、英国特許出願公開第2357768号、国際公開第98/49185号、国際公開第00/46383号および国際公開第01/09300号から当分野において周知であり、またかかる置換の（好ましい）タイプおよび/または組合せは、国際公開第04/037999号および国際公開第98/49185号、ならびにその中のさらなる引用参考文献の該当する教示を基礎として選択することができる。

【0068】

かかる保存的置換は、好ましくは、以下のグループ（a）～（e）中の1つのアミノ酸が、同じグループ内の別のアミノ酸残基により置換される置換である。（a）小さい脂肪族、無極性または低極性残基：Ala、Ser、Thr、ProおよびGly；（b）極性、負荷電残基およびそれらの（非荷電）アミド：Asp、Asn、GluおよびGln；（c）極性、正荷電残基：His、ArgおよびLys；（d）大きい脂肪族、無極性残基：Met、Leu、Ile、Valおよびシステイン；ならびに（e）芳香族残基：Phe、TyrおよびTrp。特に好適な保存的置換は、以下の通りである。AlaからGly、またはSer；ArgからLys；AsnからGln、またはHis；AspからGlu；CysからSer；GlnからAsn；GluからAsp；GlyからAla、またはPro；HisからAsn、またはGln；IleからLeu、またはVal；LeuからIle、またはVal；LysからArg、Gln、またはGlu；MetからLeu、Tyr、またはIle；PheからMet、Leu、またはTyr；SerからThr；ThrからSer；TrpからTyr；TyrからTrp；および/またはPheからVal、Ile、またはLeu。

【0069】

また、本明細書に記載されるポリペプチドに適用されるいずれかのアミノ酸置換は、Schulzらにより開発された、異なる種の相同タンパク質間のアミノ酸変化の頻度分析（Principles of Protein Structure", Springer-Verlag, 1978）、ChouおよびFasmanにより開発された構造形成ポテンシャル分析（Biochemistry 13: 211, 1974; Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978）、Eisenbergら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984）、KyteおよびDoolittle（J. Molec. Biol. 157: 105-132, 1981）ならびにGoldmanら（Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986）により開発されたタンパク質の疎水性パターン分析に基づいてもよく、これらの全内容を全て本明細書に参照により援用する。ナノボディの一次、二次および三次構造に関する情報は、本明細書の詳細な説明、および上で引用の一般的背景技術に記載されている。また、これに関して、ラマ由来のV_{HH}ドメインの結晶構造が、例えばDesmyterら（Nature Structural Biology, 3: 803, 1996）、Spinelliら（Natural Structural Biology, 3: 752-757, 1996）およびDecanniereら（Structure, 7 (4): 361, 1999）に開示されている。従来公知のV_Hドメインにおいて、V_H/V_Lのインターフェースを形成する幾つかのアミノ酸残基およびそれらの位置における可能なラクダ化置換に関する詳しい情報が、上で引用の従来技術文献に存在する。

【0070】

アミノ酸配列および核酸配列は、それらが全長において100%の配列同一性（本明細書で定義される）を有する場合、「完全に同じ」であるものとする。

【0071】

2つのアミノ酸配列を比較するとき、「アミノ酸の相違」という用語は、第1の配列内のある位置において、第2の配列と比較し、単一アミノ酸残基が挿入、欠失または置換されていることを指し、すなわち、2つのアミノ酸配列が、1つ、2つもしくはそれ以上のかかるアミノ酸の相違を含みうるということが理解される。

【0072】

「アミノ酸の相違」は、1、2、3または最大4つの置換、欠失、挿入またはそれらのいかなる組み合わせであってもよいが、それは本発明のポリペプチドの特性を改善するか、または少なくとも、本発明のポリペプチドの所望の特性、または所望の特性のバランスもしくは組合せを損なわないものである。この点、本発明の結果として得られるポリペプチドは少なくとも、1、2、3または最大4つの置換、欠失または挿入を有さない、1つ以上のCDR配列を含むポリペプチドと比較し、例えば親和性を表面プラスモン共鳴（SPR）で測定した場合に、同じ、ほぼ同じ、またはより高い親和性で、CD38と結合すべきものである。

10

【0073】

例えば、また本発明のポリペプチドの発現に用いる宿主生物に応じて、翻訳後修飾のための1つ以上の部位（例えば1つ以上のグリコシル化部位）を除去するように、かかる欠失および/または置換を設計でき、それは当業者の技量の範囲内である。

20

【0074】

本明細書にて用いられている「ナノボディファミリー」、「VHHファミリー」または「ファミリー」とは、同一の長さを有する（すなわち、それらの配列中に同数のアミノ酸を有する）一群のナノボディおよび/またはVHH配列であって、（Kabatt付番に従い）位置8から位置106間のアミノ酸配列が89%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を指す。

【0075】

交換可能に用いられる用語「エピトープ」および「抗原決定基」は、イムノグロブリン、通常の抗体、イムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または本発明に係るポリペプチドなどの抗原結合性分子により、より具体的には前記分子の抗原結合部位により認識される、ポリペプチドまたはタンパク質などの大分子中の部分のことを指す。エピトープは、イムノグロブリンのための最小限の結合部位を定め、それによりイムノグロブリンの特異的な標的を表す。

30

【0076】

エピトープを認識する抗原結合性分子（例えば本発明のイムノグロブリン、通常抗体、イムノグロブリン単一可変ドメインおよび/またはポリペプチド）の部分は、「パラトープ」と称される。

【0077】

特定のエピトープ、抗原、またはタンパク質（またはその少なくとも一部、断片もしくはエピトープ）と「結合する」ことができるか、「特異的に結合する」ことができるか、「親和性を有する」か、および/または「特異性を有する」ポリペプチド（本発明のイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、または一般的な抗原結合分子またはその断片）は、前記エピトープ、抗原またはタンパク質「に対する」または「を標的とする」と言われ、またはかかるエピトープ、抗原またはタンパク質に対する「結合」分子であるか、または「抗」エピトープ、「抗」抗原または「抗」タンパク質（例えば「抗」CD38）であると言われる。

40

【0078】

「特異性」という用語は、国際公開第08/020079号の53～56頁のパラグラフn）に記載の意味を有し、またその記載によると、特定の抗原結合性分子または抗原結

50

合性タンパク質（例えば本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチド）と結合できる異なるタイプの抗原または抗原決定基の数のことを指す。国際公開第08/020079号（参照により本明細書に援用）の53～56頁に記載のように、抗原結合性タンパク質の特異性は、親和性および／またはアビディティに基づいて決定することができ、また同文献は、（本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチドなどの）抗原結合性分子と該当する抗原との間の結合を測定するための幾つかの好ましい技術を記載している。典型的には、抗原結合性タンパク質（例えば本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチド）は、 $10^{-5} \sim 10^{-12} \text{ mol/L}$ 以下、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12} \text{ mol/L}$ 以下、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12} \text{ mol/L}$ の解離定数（ K_D ）で（すなわち、 $10^5 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ 以上、好ましくは $10^7 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ 以上、より好ましくは $10^8 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ の会合定数（ K_A ）により）それらの抗原と結合する。 10^{-4} mol/L 超のいかなる K_D 値（または 10^4 M^{-1} より低いいかなる K_A 値）は一般的に、非特異的結合を示すものとして考えられる。好ましくは、本発明の一価のポリペプチドは、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満（例えば10～5 nMの間、またはそれ以下）の親和性で所望の抗原と結合する。抗原結合性タンパク質による抗原または抗原決定基への特異的な結合は、いかなる好適な自体公知の方法を用いても決定することができ、例えば、Scatchard分析または競合的結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）およびエンザイムイムノアッセイ（EIA）、ならびにサンドイッチ競合アッセイ、ならびに当分野において公知のその変法、ならびに本明細書に記載の他の方法が挙げられる。当業者に明らかなように、また国際公開第08/020079号の53～56頁に記載されるように、解離定数は実際であるかまたは見かけの解離定数でもよい。解離定数を決定する方法は当業者には明らかであり、例えば国際公開第08/020079号の53～56頁に記載の技術が含まれる。

【0079】

イムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチドは、（上記の K_D 値、 K_A 値、 K_{off} 速度および／または K_{on} 速度として好適に表した場合に）イムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチドが第2の標的または抗原と結合する場合と比較し、少なくとも10倍、例えば少なくとも100倍、好ましくは少なくとも1000倍以上の親和性で、第1の抗原と結合するとき、第2の標的または抗原よりも第1の標的または抗原に「特異的である」ものとする。例えば、イムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチドは、前記イムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチドが第2の標的または抗原と結合する場合と比較し、少なくとも10倍低い K_D 値、例えば少なくとも100倍低い、好ましくは少なくとも1000倍低い、またはさらにはそれより低い K_D 値で、第1の標的または抗原に結合しうる。好ましくは、イムノグロブリン単一可変ドメインおよび／またはポリペプチドが、第2の標的または抗原と比較し第1の標的または抗原に「特異的である」というときは、それらが（本明細書で定義されるように）前記第1の標的または抗原に対するものであるが、前記第2の標的または抗原に対するものではないことをいう。

【0080】

本明細書において交換可能に用いられる「（交差）ブロッキングする」、「（交差）ブロッキングされた」、「（交差）ブロッキング」、「競合的結合」、「（交差）競合する」および「（交差）競合すること」および「（交差）競合」の用語は、イムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤による、他のイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは結合剤による所定の標的への結合を妨げる能力を意味する。イムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤が、別のものの標的への結合を妨げることを可能にする程度、すなわち、本発明における交差ブロッキングをうるか否かは、例えば競合ELISAにおいてファージ上にディスプレイされたISVDに対して精製されたISVDのスクリーニングを行うなどの、競合的結合アッセイを用いて

決定できる。ある I S V D の C D 3 8 への結合が、別の I S V D (例えば競合 E L I S A における精製 I S V D) の C D 3 8 への結合と競合する場合、前記 I S V D は、同じエピトープビン (bin) に属し、例えば C D 3 8 上の同じまたは類似のエピトープと結合する。I S V D の C D 3 8 への結合が、別の I S V D (例えば競合 E L I S A における精製 I S V D) の C D 3 8 への結合と競合しないかまたは部分的に競合するのみである場合、前記 I S V D は、異なるエピトープビンに属し、例えば C D 3 8 上の同じまたは類似のエピトープと結合しない。特に好適な定量的交差ブロッキングアッセイとしては、例えば、細胞に発現させた C D 3 8 に対する、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) 結合アッセイが挙げられる。(交差)ブロッキングの程度は、例えば(減少した)チャンネル蛍光により測定することができる。

10

【0081】

エピトープおよびエピトープビンは、I S V D と C D 3 8 との複合体の結晶構造を(例えば X 線結晶解析によって)解析することによって同定する(ならびに I S V D をエピトープビンに割り当てる)ことができる(参照として、例えば Li et al. 2016 Nature Sci. Rep. 6:27055/DOI:10.1038/srep27055 が挙げられる)。一般的に、異なるエピトープビンに属する I S V D は、C D 3 8 上の異なるアミノ酸残基と複合体を形成すると考えられる。しかしながら、異なる I S V D が、例えば本明細書に記載されるアッセイにおいて、各々競合しない場合、I S V D は、これらの I S V D の C D 3 8 との複合体が、幾つかの(しかし全てでない)アミノ酸残基を共有しているとしても、異なるエピトープビンに割り当てられうるということが理解される。

20

【0082】

本発明において、C D 3 8 に特異的な I S V D が 3 つの異なる非重複エピトープと本質的に結合することが明らかとなり、それらを仮に「エピトープ 1」、「エピトープ 2」および「エピトープ 3」と命名し、それぞれの I S V D はまた、本明細書においては「エピトープ 1 I S V D または V H H」、「エピトープ 2 I S V D または V H H」、および「エピトープ 3 I S V D または V H H」と命名する。ダラツムマブのエピトープは、図 17 に示すようにエピトープ 1 I S V D、およびエピトープ 2 I S V D の一部、およびエピトープ 3 I S V D と重複する。

【0083】

I S V D ファミリー、例えば V H H ファミリーの 1 - 9 . 2 a、1 - 9 . 2 b、1 - 9 . 3 b、S - 14 a、1 - 14 . 1 a、1 - 14 . 2 b、1 - 15 . 1 b、1 - 15 . 2 a、I - 15 . 2 b、1 - 15 . 3 a、s - 15 a および s - 16 a は、エピトープ 1 を認識し、結合する。これらのファミリーは、代表的なエピトープ 2 I S V D または V H H (例えば M U 1067、U 523、J K 2)、またはエピトープ 3 I S V D または V H H (例えば W F 36、W F 152、W F 100)と競合しない。

30

【0084】

I S V D ファミリー、例えば V H H ファミリーの 1 - 9 . 1 c、1 - 19 . 1 a、1 - 19 . 1 b、1 - 19 . 2 a および 1 - 19 . 2 b は、エピトープ 2 を認識し、結合する。これらのファミリーは、代表的なエピトープ 1 I S V D または V H H (例えば M U 1068、M U 274、M U 211)、またはエピトープ 3 I S V D または V H H (例えば W F 36、W F 152、W F 100)と競合しない。

40

【0085】

I S V D ファミリー、例えば V H H ファミリーの 1 - 8 . 1 a、1 - 8 . 1 b、1 - 8 . 2 a、1 - 8 . 2 f、1 - 8 . 3 a、1 - 12 b、1 - 17 a、1 - 17 a、1 - 17 b、1 - 17 c、s - 19 a、s - 19 b、s - 24 a、s + / - 24 b、s - 24 c、s + / - 24 d および 1 - 24 a は、エピトープ 3 を認識し、結合する。これらのファミリーは、代表的なエピトープ 1 I S V D または V H H (例えば M U 1068、M U 274、M U 211)、またはエピトープ 2 I S V D または V H H (例えば M U 1067、M U 523、J K 2)と競合しない。

【0086】

50

前記の請求項のいずれか一項に記載のポリペプチドは、少なくとも2つのISVD（例えばCD38と結合できる第1のISVDおよびCD38と結合できる第2のISVD）を含み、前記第1のISVDは、本明細書で定義されるように競合アッセイ（例えば、競合ELISAまたは細胞上に発現されたCD38との蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）結合アッセイ）において、前記第2のISVDにより競合しない（例えば、前記第1のISVDおよび前記第2のISVDは、CD38上の異なるエピトープと結合して、異なるエピトープピンに属する）。

【0087】

イムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤が、本発明に従い交差ブロッキングするかまたは交差ブロッキングできるか否かを決定するための好適なFACSアッセイを、以下に全般的に記載する。本明細書に記載されるイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤のいずれかをを用いてアッセイを実施できることはいうまでもない。FACS装置（例えばFACS Canto; Becton Dickinson社）を、製造業者の推奨に従い操作する。

【0088】

CD38への結合に関する2つの結合剤（例えば2つのイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/またはナノボディ）間での「（交差）ブロッキング」または「（交差）競合」を評価する際、ヒトCD38を過剰発現する細胞（例えばFlp-In（商標）293細胞）およびバックグラウンド細胞株として親細胞を使用し、FACS競合実験を実施できる。様々な検出試薬が使用可能であり、例えば、モノクローナルANT-FLAG（登録商標）M2抗体（Sigma-Aldrich社、cat# F1804）、モノクローナル抗C-myc抗体（Sigma-Aldrich社、cat# WH0004609M2）、モノクローナル抗HISタグ抗体（Sigma-Aldrich社、cat# SAB1305538）が挙げられ、各々様々な標識を有しうる。例えば、<http://www.thefcn.org/flow-fluorochromes>に記載の広範囲にわたるフルオロフォアを、フローサイトメリーの標識として使用できる。フルオロフォア（または単に「Fluor」）は典型的には、CD38を認識する抗体、例えばナノボディなどのイムノグロブリン単一可変ドメイン、または検出試薬として用いられる抗体と結合される。

限定されないが、例えばAlexa Fluor（登録商標）、DyLight（登録商標）、ローダミン、PE、FITCおよびCy3とコンジュゲートした抗体などの各種のコンジュゲート抗体が利用できる。各フルオロフォアは、特徴的なピーク励起および放出波長を示す。使用可能な標識の組合せは、フルオロフォアの励起に用いるランプ（単数もしくは複数）もしくはレーザー（単数もしくは複数）の波長、および使用可能な検出器に依存する。

【0089】

CD38と結合させるための2つの試験結合剤（AおよびBと称する）間の競合を評価する際、未標識の（コールドな）結合剤Aの希釈系列を調製し、標識付きの結合剤B*と共に（例えば20000個の）細胞に追加する。試験混合物の結合剤B*の濃度は、細胞上に発現されるCD38上の結合部位を容易に飽和させる程に十分高くなければならない。細胞上に発現されるCD38上の、前記結合剤に対する結合部位を飽和させる結合剤B*の濃度は、CD38細胞上への結合剤B*のタイトレーション系列、および結合に関するEC₅₀値の測定により決定できる。飽和濃度で働くために、結合剤B*を、100×EC₅₀濃度で用いてもよい。

【0090】

結合剤Aおよび結合剤B*の混合物で細胞をインキュベートし、細胞を洗浄した後、FACSにおけるリードアウトを実施できる。最初に、散乱プロファイルから測定した生の細胞にゲートを設定し、チャンネル蛍光の総量を記録する。

【0091】

また別の結合剤B*の溶液を調製する。この溶液の結合剤B*は、（結合剤AおよびB*の）試験混合物と同じ緩衝液中に含まれ、同じ濃度でなければならない。またこの別の溶液を細胞に追加する。インキュベートおよび細胞の洗浄の後、FACSにおけるリードアウトを実施できる。最初に、散乱プロファイルから測定した生の細胞にゲートを設定し

10

20

30

40

50

、チャンネル蛍光の総量を記録する。

【0092】

結合剤 B * の別の溶液によりインキュベートされた細胞の蛍光と比較し、結合剤 A および B * の混合物によりインキュベートされた細胞の蛍光の減少は、細胞上に発現した CD 38 との結合に関して、結合剤 B * の結合が結合剤 A によって（交差）ブロッキングされていることを示す。

【0093】

本発明の交差ブロッキングするイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤は、上記の FACS 交差ブロッキングアッセイにおいて CD 38 と結合するものであり、その結果、アッセイの間、第 2 のイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤の存在下で記録される蛍光は、（別の標識されたイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤について測定した）最大蛍光の 80% ~ 0.1% の間（例えば 80% ~ 4%）、具体的には最大蛍光の 75% ~ 0.1% の間（例えば 75% ~ 4%）、より具体的には最大蛍光（上記のように定義）の 70% ~ 0.1% の間（例えば 70% ~ 4%）である。

【0094】

また、CD 38 との結合に関する 2 つの試験結合剤（A * および B * と称する）間の競合は、CD 38 発現細胞に両結合剤（各々異なるフルオロフォアで標識）を追加することによっても評価できる。インキュベートおよび細胞の洗浄の後、FACS におけるリードアウトを実施できる。各フルオロフォアのゲートを設定し、チャンネル蛍光の総量を記録する。1 つのフルオロフォア蛍光の減少または欠如が、細胞上に発現された CD 38 と結合する結合剤による（交差）ブロッキングを示す。

【0095】

標的に対するイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤が、本明細書で定義されるように（交差）ブロッキングするか否か、（交差）ブロッキングできる否か、競合的に結合するか否か、または（交差）競合的か否かを決定する他の方法は、Xiao-Chi Jia ら（Journal of Immunological Methods 288: 91-98, 2004）、Miller ら（Journal of Immunological Methods 365: 118-125, 2011）、および / または本明細書に記載される方法に記載されている。

【0096】

本明細書において交換可能に用いられる用語「免疫応答を増強すること」および「免疫応答を誘導すること」は、補体系、T 細胞、B 細胞、マクロファージおよび / またはナチュラルキラー（NK）細胞の 1 つ以上の応答（単数または複数）の活性化、刺激または増殖をもたらすプロセスを指す。本発明のポリペプチドおよびイムノグロブリン構築物は、免疫応答、例えば補体系の活性化、T 細胞、B 細胞またはナチュラルキラー細胞の増殖または活性化を誘導できる。補足活性、T 細胞、B 細胞およびナチュラルキラー細胞の活性化を測定するための好適なアッセイは、本発明に係る分野において公知であり、例えば、Buillard et al. 2013, J. Exp. Med. Vol. 210, 9: 1685-1693、Zhou et al. October 2010, J. Immunother. Vol. 33, No 8、および Hanabuchi 2006, Blood, Vol. 107, No 9: 3617-3623 にそれぞれ記載されている。「免疫応答」という用語には、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」（「ADCC」）、「補体依存性細胞傷害性」（「CDC」）、「抗体依存性細胞ファゴサイトーシス」（「ADCP」）および「補足依存性細胞傷害性」（「CDC」）が含まれる。補体系は、オプソニン化、走化性、炎症、溶解およびアポトーシスをもたらすカスケードの起点となる。断片結晶化可能部分（Fc 部）は、Fc 受容体と呼ばれる細胞表面レセプター、および補体系の幾つかのタンパク質と相互作用する、抗体のテール領域である。この特性によって、抗体がさらに免疫系を活性化させることが可能となる。

【0097】

免疫応答は、様々なアッセイにより決定することができ、限定されないが、FACS、

10

20

30

40

50

増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイ、細胞殺傷アッセイ、ファゴサイトーシスアッセイ、レポーター遺伝子アッセイ（例えばNF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイ）、T細胞活性化アッセイ、細胞表面レセプター結合アッセイ、および活性化の公知マーカー発現またはサイトカインの分泌を測定するアッセイが挙げられ、いずれも当分野において周知である。

【0098】

本明細書で用いられる「補体依存性細胞傷害性」（「CDC」）という用語は、抗体により媒介される補体活性化のプロセスを指し、細胞またはビリオン上の標的へ抗体が結合する結果、MAC（膜障害複合体）アセンブリによって膜孔が形成され、細胞溶解に至るプロセスである。CDCは、実施例のセクションにて説明されるように、正常ヒト血清が補体給源として用いられるCDCアッセイなどのインビトロアッセイによって、またはC1q効率アッセイにおいて評価することができ、それらは全て当業者に周知である。

10

【0099】

本明細書で用いられる用語「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」（「ADCC」）とは、結合した抗体の定常領域を認識するFc受容体発現細胞により、抗体で被覆された標的細胞またはビリオンを殺傷するメカニズムを指す。ADCCは、周知の方法を使用して測定できる。

【0100】

本明細書で用いられる用語「抗体依存性細胞ファゴサイトーシス」（「ADCP」）とは、食細胞による内在化によって、抗体で被覆された標的細胞またはビリオンを除去するメカニズムを指す。内在化された、抗体で被覆された標的細胞またはビリオンは、ファゴソームと呼ばれるベシクル中に包含され、これはその後1つ以上のリソソームと融合してファゴリソソームを形成する。ADCPは、van BijらのJournal of Hepatology Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685に記載されるように、エフェクター細胞としてマクロファージを用いたインビトロ細胞傷害性アッセイおよびビデオ顕微鏡観察を用いて評価できる。

20

【0101】

本明細書で用いられる用語「補足依存性細胞傷害性」（「CDCC」）とは、標的細胞またはビリオンを、抗体により媒介される補体活性化の結果として、標的細胞またはビリオンに共有結合した補体3（C3）切断産物を認識する補体受容体を発現する細胞で殺傷するメカニズムを指す。ADCCにおいて記載したように、CDCCは同様の方法で評価できる。

30

【0102】

本明細書で用いられる「腫瘍細胞増殖を阻害する」という用語は、インビトロでの腫瘍細胞の増殖、またはインビボでの腫瘍成長が、例えば、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%以上、例えば100%減少することを指す。

40

【0103】

本明細書における「効力」という用語は、イムノグロブリン構築物、ベンチマーク、ポリペプチド、ISVDまたはナノボディなどの剤の尺度、その生物学的活性である。剤の効力は、例えば実施例のセクションで説明されるように、当分野において公知のいかなる好適な方法で測定してもよい。細胞培養ベースの効力アッセイは通常、剤により生じる生理学的反応を測定し、比較的短期間に結果が得られるため、生物学的活性を測定するための好ましいフォーマットである。生成物の作用メカニズムに基づく様々な形態の細胞ベースのアッセイが使用可能であり、その例としては、限定されないが、増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイ、細胞殺傷アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ（例えばNF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイ）、T細胞活性化アッセイ、細胞表面レセプター結合ア

50

ッセイ、および機能的に必須なタンパク質または他のシグナル分子（例えば、リン酸化タンパク質、酵素、サイトカイン、cAMPなど）の誘導/抑制を測定するアッセイ、および、活性化に係る公知のマーカーの発現またはサイトカイン分泌を測定するアッセイが挙げられ、それらは全て公知技術である。細胞ベースの効力アッセイから得られる結果は、対応するベンチマーク（実施例セクションを参照）において得られた反応に対する本発明のイムノグロブリン構築物との比較によって定まる「相対的な効力」として表すことができる。

【0104】

化合物（例えば本発明のイムノグロブリン構築物）がベンチマーク（例えば参照化合物）より強力であるとは、化合物（例えば本発明のイムノグロブリン構築物）により得られる反応が、所定のアッセイにおいて、少なくとも1.5倍、例えば2倍、好ましくは少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、またはさらには少なくとも10倍、参照化合物（例えばベンチマーク）による反応より良好である（例えば機能的に良好である）場合をいう。

【0105】

本発明のポリペプチドの「有効性」をいうときは、ポリペプチド濃度を飽和させたときの、効果そのものの最大強度の計測を行う。有効性とは、本発明のポリペプチドにより得られる最大の反応を示す。それは所望の（治療的）効果を生じさせるポリペプチドの能力を意味する。本発明のポリペプチドの有効性は、インビボのモデルを用いて評価できる。

【0106】

本発明のイムノグロブリン構築物、イムノグロブリン単一可変ドメインおよびポリペプチドの、ならびにそれを含む組成物の有効性または効力は、自体公知の好適なインビトロアッセイ、細胞ベースのアッセイ、インビボアッセイ、および/または動物モデル、またはそれらの組み合わせを用いて、関連する具体的な疾患または障害に応じて試験することができる。好適なアッセイおよび動物モデルは当業者にとり明らかであり、例えば、リガンド置換アッセイ（例えばBurgess et al., Cancer Res 2006 66:1721-9）、イムノグロブリン構築アッセイ（例えば国際公開第2009/007427A2号、Goettsch, 2009）、シグナル伝達アッセイ（例えばBurgess et al., Mol Cancer Ther 9:400-9）、増殖/生存アッセイ（例えばPacchiana et al., J Biol Chem 2010 Sep M110.134031）、細胞接着アッセイ（例えばHolt et al., Haematologica 2005 90:479-88）および遊走アッセイ（例えばKong-Beltran et al., Cancer Cell 6:75-84）、内皮細胞スブラウティングアッセイ（例えばWang et al., J Immunol. 2009; 183:3204-11）、およびインビボ異種移植モデル（例えばJin et al., Cancer Res. 2008 68:4360-8）、ならびに、下記の実験セクションにおいて、および本明細書において引用する先行技術で使用されるアッセイおよび動物モデルが挙げられる。インビトロでの前記第1の標的の障害を表す方法として、IC₅₀が挙げられる。

【0107】

本発明のポリペプチドの「半減期」は、一般的に、国際公開第08/020079号の57ページのパラグラフo)に記載されるように定義され、その記載によると、例えば天然のメカニズムによるポリペプチドの分解および/またはポリペプチドのクリアランスもしくは隔離により、ポリペプチドの血清中濃度がインビボにおいて50%減少するのに要する時間のことを指す。本発明のポリペプチドのインビボ半減期は、薬物動態学的分析など、自体公知のいかなる方法で決定してもよい。好適な方法は当業者に明らかであると考えられ、例えば一般的には、国際公開第08/020079号の57頁のパラグラフo)に記載の方法であってもよい。国際公開第08/020079号の57頁のパラグラフo)に記載のように、半減期は、 $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$ および曲線下面積(AUC)などのパラメータを使用して表すことができる。参照として、例えば標準的なハンドブック、例えばKennethら(Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, John Wiley & Sons Inc., 1986)、ならびにM GibaldiおよびD Perron("Pharmacokinetics", Marcel Dekker, 2nd Rev. Edition, 1982)が挙げられる。用語「半減期の増加」ま

10

20

30

40

50

たは「増加した半減期」とは、国際公開第08/020079号の57頁のパラグラフo)にも定義され、具体的には $t_{1/2}$ の増加を指すが、 $t_{1/2}$ および/またはAUC、またはその両方の増加を伴っても伴わなくともよい。

【0108】

特に明記しない限り、用語「イムノグロブリン」および「イムノグロブリン配列」は、本明細書において、重鎖抗体または従来の4鎖型抗体のいずれを指すものとして用いられるときでも、フルサイズの抗体、その個々の鎖、ならびにその全ての部分、ドメインまたは断片（限定されないが、抗原結合性ドメインまたは断片（例えばそれぞれ V_H ドメインまたは V_H/V_L ドメイン）を含む）を包含する一般的な用語として用いられる。

【0109】

本明細書で用いられる（ポリペプチドまたはタンパク質の）「ドメイン」なる用語は、残りのタンパク質とは独立に、その三次構造を保持する能力を有する、フォールディングされたタンパク質構造を意味する。一般的に、ドメインは、タンパク質の個別の機能特性を担い、多くの場合、タンパク質の残りの部分および/またはドメインの機能の損失なしに、他のタンパク質へ追加もしくは移動させることができ、またはそこから除去することができる。

【0110】

本明細書で用いられる「イムノグロブリンドメイン」という用語は、抗体鎖（例えば従来の4鎖型抗体の、または重鎖抗体の鎖など）の球状領域を、または、本質的に、かかる球状領域からなるポリペプチドを指す。イムノグロブリンドメインは、それらが抗体分子に特徴的な、約7つの逆平行鎖が2つのシートとして配列した2層サンドイッチからなり、任意に保存されたジスルフィド結合によって安定化されたイムノグロブリンの折り畳み構造を保持していることを特徴とする。

【0111】

本明細書中で使用される用語「イムノグロブリン可変ドメイン」とは、それぞれ、「フレームワーク領域1」または「FR1」として、「フレームワーク領域2」または「FR2」として、「フレームワーク領域3」または「FR3」として、「フレームワーク領域4」または「FR4」として、当分野において記載され、および、本質的に、本明細書において後述される4つの「フレームワーク領域」からなる、イムノグロブリンドメインを意味し、前記フレームワーク領域は、3つの「相補性決定領域」または「CDR」により中断され、それらは、「相補性決定領域1」または「CDR1」として、「相補性決定領域2」または「CDR2」として、および「相補性決定領域3」または「CDR3」として、それぞれ当分野において記載され、また本明細書で後述される。このように、イムノグロブリン可変ドメインの一般構造または配列は、以下の通り示すことができる：FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4。抗原結合部位を有することによって抗体に抗原に対する特異性を付与するのが、イムノグロブリン可変ドメイン（単数または複数）である。

【0112】

「単一可変ドメイン」と交換可能に用いられる「イムノグロブリン単一可変ドメイン」という用語は、抗原結合部位が単一のイムノグロブリンドメインに存在し、またそれにより形成される分子として定義される。これにより、イムノグロブリン単一可変ドメインが、2つのイムノグロブリンドメイン、特に2つの可変ドメインが相互作用して抗原結合部位を形成する「従来型の」イムノグロブリンまたはそれらの断片とは別のものとなる。典型的には、従来型のイムノグロブリンでは、重鎖可変ドメイン（ V_H ）および軽鎖可変ドメイン（ V_L ）が相互作用して抗原結合部位を形成する。この場合、 V_H および V_L の両方の相補性決定領域（CDR）が、抗原結合部位に寄与しており、すなわち合計6つのCDRが抗原結合部位の形成に関与している。

【0113】

上記の定義を考慮すると、従来の4鎖型抗体（当分野において公知の、例えばイムノグロブリンG、イムノグロブリンM、イムノグロブリンA、イムノグロブリンDまたはイム

10

20

30

40

50

ノグロブリン E 分子) の抗原結合性ドメイン、または F a b 断片、F (a b ') 2 断片、ジスルフィド結合された F v または s c F v 断片などの F v 断片の抗原結合性ドメイン、またはかかる従来型の 4 鎖型抗体に由来する d i a b o d y (いずれも公知) の抗原結合性ドメインは、通常、これらの場合、抗原の各エピトープへの結合が、通常、1 つの (単一の) イムノグロブリンドメインのみでは起こらず、例えば軽鎖および重鎖可変ドメインによる一対の (会合した) イムノグロブリンドメインによって、すなわちイムノグロブリンドメインの V H - V L によって、はじめて各抗原のエピトープと共同で結合するため、イムノグロブリン単一可変ドメインとは考えない。

これとは対照的に、イムノグロブリン単一可変ドメインは、更なるイムノグロブリン可変ドメインとの組合せなしに抗原のエピトープと特異的に結合できる。イムノグロブリン単一可変ドメインの結合部位は、単一の V H / V H H または V L ドメインにより形成される。ゆえに、イムノグロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位が、3 つの C D R のみにより形成される。

【 0 1 1 4 】

このように、単一可変ドメインは、それが単一の抗原結合単位 (すなわち、単一の抗原結合性ドメインが他の可変ドメインと相互作用して機能的な抗原結合性単位を形成する必要がない、本質的に単一の可変ドメインからなる、機能的な抗原結合単位) を形成できる限り、軽鎖可変ドメイン配列 (例えば V L 配列) もしくは好適なその断片、または重鎖可変ドメイン配列 (例えば V H 配列または V H H 配列) もしくは好適なその断片、であってもよい。

【 0 1 1 5 】

本発明の一態様において、イムノグロブリン単一可変ドメインは、重鎖可変ドメイン配列 (例えば V H 配列) であり、より具体的には、イムノグロブリン単一可変ドメインは、従来の 4 鎖型抗体から誘導される重鎖可変ドメイン配列であるか、または重鎖抗体から誘導される重鎖可変ドメイン配列であってもよい。

【 0 1 1 6 】

例えば、イムノグロブリン単一可変ドメインは、(単一) ドメイン抗体 (もしくは (単一) ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸) 、 「 d A b 」 または d A b (もしくは d A b としての使用に好適なアミノ酸) 、またはナノボディ (本明細書において定義され、V H H を含むがこれに限定されない) 、他の単一可変ドメイン、またはそれらのいかなる好適な断片、であってもよい。

【 0 1 1 7 】

具体的には、イムノグロブリン単一可変ドメインは、ナノボディ (登録商標) (本明細書で定義される) またはその好適な断片であってもよい。なお、ナノボディ (登録商標) 、N a n o b o d i e s (登録商標) および N a n o c l o n e (登録商標) は Ablynx N . V . 社の登録商標である。ナノボディの一般的説明については、下のさらなる記載、また、例えば本明細書で引用する国際公開第 0 8 / 0 2 0 0 7 9 号 (1 6 頁) に記載の従来技術をさらに参照してもよい。

【 0 1 1 8 】

「 V H H ドメイン » (別名、V H H 、V _H H ドメイン、V H H 抗体断片および V H H 抗体) は、最初は「重鎖抗体」(すなわち「軽鎖欠損抗体」、Hamers-Casterman et al. Nature 363: 446-448, 1993) の抗原結合性イムノグロブリン (可変) ドメインとして開示されたものである。「V H H ドメイン」という用語は、これらの可変ドメインを、従来の 4 鎖型抗体に存在する重鎖可変ドメイン (本明細書において「V _H ドメイン」または「V H ドメイン」と称される) から、および従来の 4 鎖型抗体に存在する軽鎖可変ドメイン (本明細書において「V _L ドメイン」または「V L ドメイン」と称される) から、区別するために選ばれたものである。V H H およびナノボディの更なる説明に関する参照としては、Muyldermans のレビュー (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001) 、ならびに背景技術においても言及した以下の特許出願 : Vrije Universiteit Brussel 大学による国際公開第 9 4 / 0 4 6 7 8 号、国際公開第 9 5 / 0 4 0 7 9 号および国際公開

10

20

30

40

50

第 9 6 / 3 4 1 0 3 号、ユニリーバ社の国際公開第 9 4 / 2 5 5 9 1 号、国際公開第 9 9 / 3 7 6 8 1 号、国際公開第 0 0 / 4 0 9 6 8 号、国際公開第 0 0 / 4 3 5 0 7 号、国際公開第 0 0 / 6 5 0 5 7 号、国際公開第 0 1 / 4 0 3 1 0 号、国際公開第 0 1 / 4 4 3 0 1 号、欧州特許出願公開第 1 1 3 4 2 3 1 号および国際公開第 0 2 / 4 8 1 9 3 号、Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) の国際公開第 9 7 / 4 9 8 0 5 号、国際公開第 0 1 / 2 1 8 1 7 号、国際公開第 0 3 / 0 3 5 6 9 4 号、国際公開第 0 3 / 0 5 4 0 1 6 号および国際公開第 0 3 / 0 5 5 5 2 7 号、Algonomics 社および Ablynx 社の国際公開第 0 3 / 0 5 0 5 3 1 号、カナダ国家研究会議 (National Research Council of Canada) による国際公開第 0 1 / 9 0 1 9 0 号、Institute of Antibodies による国際公開第 0 3 / 0 2 5 0 2 0 号 (欧州特許出願公開第 1 4 3 3 7 9 3 号)、ならびに Ablynx 社による国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 7 号、国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 2 号、国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 5 号、国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 3 号、国際公開第 0 4 / 0 6 2 5 5 1 号、国際公開第 0 5 / 0 4 4 8 5 8 号、国際公開第 0 6 / 4 0 1 5 3 号、国際公開第 0 6 / 0 7 9 3 7 2 号、国際公開第 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号、国際公開第 0 6 / 1 2 2 7 8 7 号および国際公開第 0 6 / 1 2 2 8 2 5 号、および Ablynx 社によるさらに公開された特許出願が挙げられる。これらの出願に記載の更なる従来技術、特に国際公開第 0 6 / 0 4 0 1 5 3 号の 4 1 ~ 4 3 頁に記載の参照文献リストを参照してもよく、当該リストおよび参照文献は、参照により本明細書に援用される。これらの参照文献に記載のように、ナノボディ (特に V H H 配列および部分的にヒト化したナノボディ) は、特に 1 つ以上のフレームワーク配列に存在する、1 つ以上の「ホールマーク残基」の存在により特徴づけることができる。ナノボディに関する更なる説明、具体的にはナノボディのヒト化および / またはラクダ化、ならびに他の修飾、部分または断片、誘導体または「ナノボディ融合体」、多価構築物 (幾つかのリンカー配列に関する非限定的な例を包含する)、ならびに、ナノボディの半減期を増加させる異なる修飾およびそれらの調製、については、例えば国際公開第 0 8 / 1 0 1 9 8 5 号および国際公開第 0 8 / 1 4 2 1 6 4 号に記載されている。ナノボディの更なる一般的説明についての参照として、例えば本明細書において引用する、国際公開第 0 8 / 0 2 0 0 7 9 号 (1 6 頁) に記載の従来技術が挙げられる。

10

20

30

40

【0 1 1 9】

「ドメイン抗体」(また、「D a b」、「ドメイン抗体」および「d A b」としても公知、「ドメイン抗体」および「d A b」の語は、GlaxoSmithKline 社のグループの商標として使用されている) は、例えば欧州特許出願公開第 0 3 6 8 6 8 4 号、Ward et al. (Nature 341: 544-546, 1989)、Holt et al. (Trends in Biotechnology 21: 484-490, 2003)、および国際公開第 0 4 / 0 6 8 8 2 0 号、ならびに D o m a n t i s 社の国際公開第 0 6 / 0 3 0 2 2 0 号、国際公開第 0 6 / 0 0 3 3 8 8 号および国際公開第 0 3 / 0 0 2 6 0 9 号および他の公開された特許出願に記載されている。ドメイン抗体は、本質的に、非ラクダ科の哺乳動物の、特にヒト 4 鎖型抗体の V H または V L ドメインに対応する。単一の抗原結合性ドメインとして (すなわち、V L または V H ドメインの各々との対によってではなく) エピトープに結合させるためには、例えばヒトの単一 V H または V L ドメイン配列のライブラリーを用いて、かかる抗原結合性に関する具体的な選抜を行う必要がある。ドメイン抗体は、V H H と同様、約 1 3 ~ 約 1 6 k D a の分子量を有し、完全にヒト配列に由来する場合、例えばヒトの治療的使用のためのヒト化を必要としない。

【0 1 2 0】

なお、哺乳類の起源でないため、本発明の前後関係においては好ましさが低い、単一可変ドメインを特定のサメの種由来のものとしてもよいことに留意すべきである (例えば、いわゆる「I g N A R ドメイン」、国際公開第 0 5 / 1 8 6 2 9 号を参照)。

【0 1 2 1】

そのように、本発明の意味においては、「イムノグロブリン単一可変ドメイン」または「単一可変ドメイン」という用語には、ヒト以外の給源の、好ましくはラクダ科の動物を給源とし、好ましくはラクダ科動物の重鎖抗体から誘導されるポリペプチドが含まれる。前述したように、それらはヒト化してもよい。さらに、当該用語は非ラクダ科動物 (例え

50

ばマウスまたはヒト)を給源とし、それを、例えばDavies and Riechmann (FEBS 339: 28 5-290, 1994; Biotechnol. 13: 475-479, 1995; Prot. Eng. 9: 531-537, 1996) およびR ie chmann and Muyldermans (J. Immunol. Methods 231 : 25-38, 1999) に記載のように「ラクダ化」した誘導ポリペプチドを含んでもよい。

【0122】

V H Hドメインのアミノ酸残基は、Riechmann and Muyldermans (J. Immunol. Methods 231: 25-38, 1999) の図2に示すようなラクダ科動物由来のV H Hドメインへの適用と同様、Kabatら ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91) で示されるV_Hドメインに関する一般的な付番方法に従い付番される。V_Hドメインのアミノ酸残基に付番するための代替法であって、V H Hドメインにも同様に適用できる方法も当分野において公知である。しかしながら、本願の明細書、特許請求の範囲および図面では、特に明記しない限り、上記の通りV H Hドメインに適用されるKabat付番に従い行う。

【0123】

留意点としては、V_HドメインおよびV H Hドメインに関して当分野で周知であるが、各C D Rのアミノ酸残基の総数は変動しうるものであり、Kabat付番により示されるアミノ酸残基の総数と対応しえないということである(すなわち、Kabat付番に従う1つ以上の位置が、実際の配列中に存在しないか、または、実際の配列が、Kabat付番から考えられる数より多くのアミノ酸残基を含む場合がありうる)。これは、一般的にはKabat付番が実際の配列中のアミノ酸残基の実際の付番に対応する場合も、また対応しない場合もあることを意味する。V HドメインおよびV H Hドメインのアミノ酸残基の総数は、通常110~120の範囲、多くの場合112~115の間の範囲である。しかしながら、より短いおよびより長い配列も、本明細書に記載される目的に適しうる点に留意すべきである。

【0124】

C D R領域の決定は、様々な方法に従い実施できる。Kabatに従うC D Rの決定においては、V H HのF R 1が、位置1~30のアミノ酸残基を含み、V H HのC D R 1が、位置31~35のアミノ酸残基を含み、V H HのF R 2が、位置36~49のアミノ酸を含み、V H HのC D R 2が、位置50~65のアミノ酸残基を含み、V H HのF R 3が、位置66~94のアミノ酸残基を含み、V H HのC D R 3が、位置95~102のアミノ酸残基を含み、V H HのF R 4が、位置103~113のアミノ酸残基を含む。

【0125】

しかしながら、本願においては、C D R配列はKontermann and Dubel (Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51, 2010) に従い決定されたものである。この方法によれば、F R 1は位置1~25のアミノ酸残基を含み、C D R 1は位置26~35のアミノ酸残基を含み、F R 2は位置36~49のアミノ酸を含み、C D R 2は位置50~58のアミノ酸残基を含み、F R 3は位置59~94のアミノ酸残基を含み、C D R 3は位置95~102のアミノ酸残基を含み、F R 4は位置103~113 (Kabat付番に従う) のアミノ酸残基を含む。

【0126】

ドメイン抗体およびナノボディ (V H Hドメインを含む) などのイムノグロブリン単一可変ドメインは、ヒト化することができる。具体的には、ナノボディ (V H Hドメインを含む) などのヒト化されたイムノグロブリン単一可変ドメインは、以前の段落で一般的に定義されるイムノグロブリン単一可変ドメインであってもよいが、(本明細書で定義される) ヒト化置換であり、および/または、それに対応する少なくとも1つのアミノ酸残基(具体的には少なくとも1つのフレームワーク残基)が存在するものである。潜在的に有用なヒト化置換は、天然のV_{H H}配列のフレームワーク領域の配列を1つ以上の密接に関連するヒトV_H配列の対応するフレームワーク配列と比較し、その後、このように決定される1つ以上の潜在的に有用なヒト化置換(またはそれらの組み合わせ)を、本明細書に記載のいずれかの自体公知の方法に従い、前記V_{H H}配列中に導入し、得られるヒト化V

H₁H₂配列を、標的との親和性に関して、安定性に関して、発現の容易性およびレベルに関して、および/または、他の目的の特性に関して試験することにより、確認できる。このようにして、試行錯誤を減少させつつ、他の適切なヒト化置換（またはその好適な組合せ）を、本明細書の開示に基づき当業者が決定できる。また、前記に基づいて、イムノグロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディ（VHHドメインを含む）（のフレームワーク領域）を、部分的にヒト化でき、または完全にヒト化できる。

【0127】

1つ以上のCDRのアミノ酸配列内に1つ以上の変異を導入することによって、イムノグロブリン単一可変ドメイン、例えばドメイン抗体およびナノボディ（VHHドメインおよびヒト化されたVHHドメインを含む）を親和性成熟させることもでき、かかる変異により、それぞれの親分子と比較し、得られるイムノグロブリン単一可変ドメインの各抗原に対する親和性が改善される。本発明の親和性成熟されたイムノグロブリン単一可変ドメイン分子は、公知技術の方法により、例えば、Marks et al. (Biotechnology 10:779-783, 1992)、Barbas, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813, 1994)、Shier et al. (Gene 169: 147-155, 1995)、Yelton et al. (Immunol. 155: 1994-2004, 1995)、Jackson et al. (J. Immunol. 154: 3310-9, 1995)、Hawkins et al. (J. Mol. Biol. 226: 889-896, 1992)、Johnson and Hawkins (Affinity maturation of antibodies using phage display, Oxford University Press, 1996)の記載に基づき調製できる。

10

【0128】

イムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばドメイン抗体またはナノボディ）を出発物質としてポリペプチドを設計/選抜および/または調製するプロセスは、本明細書において、前記イムノグロブリン単一可変ドメインを「フォーマット化する」とも称され、ポリペプチドの一部を構成するイムノグロブリン単一可変ドメインは、「フォーマット化された」または「フォーマットされた形の」ポリペプチドと称される。イムノグロブリン単一可変ドメインをフォーマット化できる方法の例、およびかかるフォーマットの例は、本明細書の開示に基づき当業者に自明であり、かかるフォーマット化されたイムノグロブリン単一可変ドメインは、本発明の更なる側面を構成する。

20

【0129】

例えば、限定されないが、1つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインを、ポリペプチドの調製用の「結合単位」、「結合ドメイン」または「ビルディングブロック」（これらの用語は交換可能に用いられる）として用いることができ、それらは任意に、（すなわち、CD38上の同一または他のエピトープに対する、および/またはCD38以外の1つ以上の他の抗原、タンパク質または標的に対する）結合単位として有用な1つ以上の更なるイムノグロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

30

【0130】

一価のポリペプチドは、1つの結合単位（例えばイムノグロブリン単一可変ドメインなど）のみを含むかまたは本質的にそれからなる。2つ以上の結合単位（例えばイムノグロブリン単一可変ドメインなど）を含むポリペプチドは、本明細書において「多価」ポリペプチドとも称され、かかるポリペプチド中の結合単位/イムノグロブリン単一可変ドメインはまた、本明細書において「多価フォーマット」として存在すると称される。例えば、「二価」ポリペプチドは、2つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（任意にリンカー配列を介して連結）を含むことができ、一方、「三価」ポリペプチドは、3つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（任意に2つのリンカー配列を経て連結）を含むことができ、一方、「四価」ポリペプチドは、4つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（任意に3つのリンカー配列を介して連結）を含むことができる。

40

【0131】

多価ポリペプチドにおいて、二つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインは、同一でもよく、または異なってもよく、同じ抗原または抗原決定基に対するものであってもよく（例えば同じ部分（単数または複数）またはエピトープ（単数または複数）に対して、ま

50

たは異なる部分またはエピトープに対して)、あるいは異なる抗原または抗原決定基に、あるいはそのいかなる好適な組合せに対するものであってもよい。少なくとも1つの結合単位が第1の抗原(すなわちCD38)を標的とし、少なくとも1つの結合単位が第2の抗原(すなわちCD38と異なる)を標的とする、少なくとも2つの結合単位(例えばイムノグロブリン単一可変ドメインなど)を含むポリペプチドは、「多重特異的」ポリペプチドとも呼ばれ、かかるポリペプチドに存在する結合単位(例えばイムノグロブリン単一可変ドメインなど)はまた、本明細書において「多重特異的フォーマット」でもあると称される。このように、例えば、本発明の「二重特異性」ポリペプチドは、第1の抗原(すなわちCD38)を標的とする少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメインと、第2の抗原(すなわちCD38と異なる)を標的とする少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメインと、を含むのに対し、本発明の「三重特異性」ポリペプチドは、第1の抗原(すなわちCD38)を標的とする少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメインと、第2の抗原(すなわちCD38と異なる)を標的とする少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメインと、第3の抗原(すなわちCD38および第2の抗原と異なる)を標的とする少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメインと、を含む。

10

20

30

40

【0132】

例えば、「バイパラトピックポリペプチド」または「トリパラトピックポリペプチド」などの「マルチパラトピックポリペプチド」は、各々が異なるパラトープ(本明細書においてさらに記載される)を有する2つ以上の結合単位を含むか、または本質的にそれらからなる。

【0133】

CD38 結合剤

広範囲な免疫、スクリーニング、特徴解析および複合的戦略に基づき、本発明の発明者は予想外にも、イムノグロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドが、CD38の様々なエピトープに結合し、従来技術に記載のCD38をアンタゴナイズする分子と比較し、CD38により媒介される免疫応答を調節する好ましい特性を示すことを見出した。

【0134】

本発明は、CD38(好ましくはヒトCD38)に対する特異性を有し、および/または、それに結合するポリペプチド(また本明細書において「本発明のポリペプチド」と称される)を提供する。CD38(分化抗原群38)(別名、サイクリックADPリボースヒドロラーゼ)は、CD4+、CD8+、Bリンパ球およびナチュラルキラー細胞などの多くの免疫細胞の表面に存在する糖タンパク質である。CD38はまた、細胞接着、シグナル伝達およびカルシウムシグナル伝達において機能を発揮する。好ましい態様では、タンパク質、本発明のポリペプチドは、ヒトCD38(GenBankのAccession番号BAA18966.1(配列番号465))に結合する。特に好ましい態様では、本発明のポリペプチドは、特異的にCD38のC末端に局在化する細胞外ドメインと結合する。ヒトCD38における、CD38細胞外ドメインは、アミノ酸42~300にわたる。

【0135】

【化1】

配列番号465

```
MANCEFSPVS GDKPCCRLSR RAQLCLGVS LVLILVVVLA VVVPWRQQW SGP GTTKRFP
ETVLARCVKY TEIHPMRHV DCQSVWDAFK GAFISKHPCN ITEEDYQPLM KLGTQTVPCN
KILLWSRIKD LAHQFTQVQR DMFTLED TLL GYLADDLTWC GEFNTSKINY QSCPDWRKDC
SNNPVSVFWK TVSRRAEAAA CDVVHVMLNG SRSKIFDKNS TFGSVEVHNL QPEKVQTLEA
WVIHGGREDS RDLCDQPTIK ELESII SKRN IQFSCKNIYR PDKFLQCVKN PEDSSCTSEI
```

50

【0136】

本発明により提供されるポリペプチドおよびイムノグロブリン構築物は、本明細書においてさらに定義されるように、様々な免疫療法、例えば様々な癌、免疫不全および感染症の処置において使用できる。

【0137】

したがって、本発明は、従来技術のアミノ酸配列および抗体と比較し、他の有利な特性（例えば調製が容易であること、良好な安定性、および／または製品コストの削減）に加えて、改善された望ましい治療的および／または薬理特性と関連する特定の機能特性を有する、CD38と結合するポリペプチドおよびイムノグロブリン構築物を提供する。

【0138】

本発明は、CD38への結合に特に適するアミノ酸残基のストレッチ（配列番号117～174、配列番号233～290および配列番号349～406、表A-1）を提供する。特に、本発明は、CD38に結合し、ストレッチの前記CD38への結合が（本明細書に記載されるように）免疫応答を増強するアミノ酸残基の配列を提供する。これらのアミノ酸残基のストレッチは、本発明のポリペプチド中に、特に、それらが本発明のポリペプチドの抗原結合部位の（一部を）形成する態様で存在してもよく、および／または組み込まれてもよい。これらのアミノ酸残基のストレッチは、CD38に対して作製された重鎖抗体のCDR配列またはV_HH配列として得られたものである。これらのアミノ酸残基のストレッチは、本明細書において、「本発明のCDR配列（単数または複数）」と（すなわち、それぞれ「本発明のCDR1配列（単数または複数）」、「本発明のCDR2配列（単数または複数）」および「本発明のCDR3配列（単数または複数）」として）も称される。

【0139】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、200 pM未満のEC₅₀値でCD38と特異的に結合する、少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（ISVD）を含むポリペプチドに関し、好ましくは、前記CD38はヒトCD38（配列番号465）である。

【0140】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、前記ISVDが腫瘍細胞増殖を阻害するポリペプチドに関する。

【0141】

しかしながら、本発明は、最も広義には、これらのアミノ酸残基のストレッチによって、本発明のポリペプチドが、（本明細書で定義される）特定の親和性および効力によりCD38と結合できる限り、これらのアミノ酸残基のストレッチが本発明のポリペプチドにおいて有する特定の構造的役割または機能に限定されない点に留意すべきである。このように、一般的に、本発明は最も広義には、特定の親和性、アビディティ、有効性および／または効力によりCD38と結合でき、本明細書に記載される1つ以上のCDR配列、特に二つ以上のかかるCDR配列の好適な組合せを、1つ以上の更なるアミノ酸配列を介して、全ポリペプチドがCD38と結合できる結合ドメインおよび／または結合単位を形成する態様で各々適切に連結された形で含む、一価のポリペプチド（また本明細書において「本発明の一価のポリペプチド（単数または複数）」と称される）を提供する。しかしながら、本発明の一価のポリペプチド中にかかるCDR配列が1つだけ存在する場合であっても、本発明の一価のポリペプチドのCD38との結合能力が十分に提供される点にも留意すべきであり、例えば参照として、国際公開第03/050531号に記載のいわゆる「促進断片（Expedite fragments）」が挙げられる。

【0142】

エピトープピニング実験で、ISVDは、3つの異なる非重複エピトープ：エピトープ1、エピトープ2およびエピトープ3と結合することが解っている。ISVDは、それに応じて分類されうる。

【0143】

具体的かつ非限定的な側面では、本発明の一価のポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基のストレッチを含みうる：

(i) CDR1配列：

(a) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；

および/または(ii) CDR2配列：

(c) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；

および/または(iii) CDR3配列：

(e) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(d) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列。

【0144】

具体的かつ非限定的な側面では、本発明の一価のポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基のストレッチを含みうる：

(i) CDR1配列：

(a) 配列番号129、163、164、165、166、および

(b) 配列番号129、163、164、165、166のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；

および/または(ii) CDR2配列：

(c) 配列番号245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号245、279、280、281、282のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；

および/または(iii) CDR3配列：

(e) 配列番号361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号361、395、396、397、398のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列。

【0145】

具体的かつ非限定的な側面では、本発明の一価のポリペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも一つのアミノ酸残基のストレッチを含みうる：

(i) CDR1配列：

(a) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；

および/または(ii) CDR2配列：

(c) 配列番号233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および

(d) 配列番号233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290のア

ミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；

および/または(i i i) C D R 3配列：

(e) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406、および

(f) 配列番号349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列。

【0146】

特に、本発明の一価のポリペプチドは、1つの抗原結合部位を含む一価のポリペプチドであってもよく、その際、前記抗原結合部位は、上記のC D R 1配列、C D R 2配列およびC D R 3配列（またはそのいかなる好適な組合せ）からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基のストレッチを有する。しかしながら、好適な側面では、本発明の一価のポリペプチドは、本発明のC D R 1配列、本発明のC D R 2配列および/または本発明のC D R 3配列からなる群から選択される1以上（例えば2つ以上の）アミノ酸残基のストレッチを含む。好ましくは、本発明の一価のポリペプチドは、それぞれ、本発明のC D R 1配列、本発明のC D R 2配列および本発明のC D R 3配列からなる群から選択される、3つのアミノ酸残基のストレッチを含む。本明細書において本発明の好ましい一価のポリペプチドとされるC D Rの組合せを、表A - 1に列記する。

【0147】

さらに、本発明は、本発明の一価のポリペプチドの（またはその発現に用いる本発明の核酸）給源、または、本発明の一価のポリペプチドまたは核酸を生成させるまたは取得する（またはそのために用いた）方法に関して、何ら限定されない点にさらに留意すべきである。このように、本発明の一価のポリペプチドは、（いかなる適切な種に由来する）天然の一価のポリペプチドでも、または合成もしくは半合成の一価のポリペプチドでもよい。

【0148】

さらに、限定されないがヒト骨格または非イムノグロブリン骨格などの他の「骨格」に対して、前記の1つ以上のC D Rを「グラフトする」ことができることも、当業者に自明である。適切な骨格およびかかるC D Rグラフトの技術は当業者に自明であり、例えば米国特許第7,180,370号、国際公開第01/27160号、欧州特許出願公開第0605522号、欧州特許出願公開第0460167号、米国特許第7,054,297号、Nicaise et al. (Protein Science 13: 1882-1891, 2004)、Ewert et al. (Methods 34: 184-199, 2004)、Kettleborough et al. (Protein Eng. 4: 773-783, 1991)、O' Brien and Jones (Methods Mol. Biol. 207: 81-100, 2003)、Skerra (J. Mol. Recognit. 13: 167-187, 2000) およびSaerens et al. (J. Mol. Biol. 352: 597-607, 2005)、およびその中の更なる引例などにより公知技術である。例えば、マウスまたはラットのC D Rをヒトフレームワークおよび骨格上へグラフトする技術自体も公知であり、また同様に用いることにより、本発明の一価のポリペプチドについて本明細書において定義されるC D R配列の1つ以上と、1つ以上のヒトフレームワーク領域または配列と、を含むキメラタンパク質が提供される。アミノ酸配列を提示するための適切な骨格は当業者に自明であり、例えば、限定されないが、イムノグロブリン（すなわち本明細書で上記したイムノグロブリン配列以外の）に基づくかまたはそれに由来する結合骨格、プロテインAドメイン (Affibodies (商標) など) に由来するタンパク質骨格、テンダミスタット (tendamistat)、フィブロネクチン、リボカリン、C T L A - 4、T細胞レセプター、人工アンキリンリピート、アビマー (avimers) およびP D Zドメイン (Binz et al. Nat. Biotech., 23: 1257, 2005)、ならびに、限定されないがD N AまたはR N Aアプタマーなどの、D N AまたはR N Aに基づく結合部分 (Ulrich et al. Comb. Chem. High Throughput Screen 9: 619-32, 2006) が挙げられる。

【0149】

本発明の前記一価のポリペプチドにおいて、C D Rは、更なるアミノ酸配列に連結されてもよく、および/またはアミノ酸配列を介して各々連結されてもよく、その際、前記アミノ酸配列は、好ましくはフレームワーク配列であるか、またはフレームワーク配列として作用するアミノ酸配列であるか、または一緒にC D Rを提示するための骨格を形成する。

【0150】

好適かつ非限定的な態様では、本発明の一価のポリペプチドは、少なくとも2つのフレームワーク配列に連結される少なくとも3つのC D R配列を含み、その際、3つのC D R配列のうちの好ましくは少なくとも1つはC D R 3配列であり、その他の2つのC D R配列はC D R 1またはC D R 2配列であり、好ましくは、1つがC D R 1配列であり、1つがC D R 2配列である。特に好適かつ非限定的な態様では、本発明の一価のポリペプチドは、構造F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4を有し、その際、C D R 1、C D R 2およびC D R 3は、本発明の一価のポリペプチドに関して本明細書で定義されるとおりであり、F R 1、F R 2、F R 3およびF R 4は、フレームワーク配列である。本発明のかかる一価のポリペプチドにおいて、フレームワーク配列は、いかなる適切なフレームワーク配列であってもよく、適切なフレームワーク配列の例は、例えば標準的なハンドブックおよび本明細書の更なる開示および従来技術に基づき、当業者に明らかである。

10

【0151】

したがって、本発明の一価のポリペプチドは、本質的に、4つのフレームワーク領域(それぞれF R 1からF R 4)および3つの相補性決定領域(それぞれC D R 1からC D R 3)からなり、

20

(i) C D R 1が、

(a) 配列番号117~174、および

(b) 配列番号117~174のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され、および/または、

(ii) C D R 2が、

(c) 配列番号233~290、および

(d) 配列番号233~290のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され、および/または、

30

(iii) C D R 3が、

(e) 配列番号349~406、および

(f) 配列番号349~406のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される。

【0152】

さらに好適なC D R配列は、表A - 1において表す。

【0153】

また、得られる結合剤の配列分析では、別々のファミリーが同定された。対応する配列を、表A - 2に示す。別々のファミリーへの分類は、C D Rの配列の類似性および相違に基づくものとした。全てのファミリーの代表的なものを、C D 38への結合親和力およびC D C活性に基づいて単離した(実施例を参照)。

40

【0154】

1つの具体的かつ非限定的な側面では、本発明の一価のポリペプチドは、イムノグロブリンフォールドを含む一価のポリペプチド、または適切な条件(生理的条件などの)下で、(すなわちフォールディングによって)イムノグロブリンフォールドを形成できる一価のポリペプチドであってもよい。参照として、特に、Halaby et al. (J. Protein Eng. 12: 563-71, 1999)によるレビューが挙げられる。好ましくは、適切にイムノグロブリンフォールドを形成するようにフォールディングされるとき、アミノ酸残基のストレッチは、C D 38との結合のための抗原結合部位を適切に形成することが可能である。したがって、好適な側面では、本発明の一価のポリペプチドは、例えばイムノグロブリン単一可変

50

ドメインなどのイムノグロブリンである。

【 0 1 5 5 】

したがって、フレームワーク配列は好ましくは、イムノグロブリンフレームワーク配列（の好適な組合せ）、またはイムノグロブリンフレームワーク配列から（例えば配列最適化（例えばヒト化またはラクダ化）によって）誘導されるフレームワーク配列である。例えば、フレームワーク配列は、軽鎖可変ドメイン（例えばV_L配列）などのイムノグロブリン単一可変ドメイン、および/または重鎖可変ドメイン（例えばV_H配列）から誘導されるフレームワーク配列であってもよい。特に好適な一側面では、フレームワーク配列は、V_HH配列から誘導されたフレームワーク配列（前記フレームワーク配列が任意に部分的に、または、完全にされてもよい）または、（本明細書で定義されるように）ラクダ化された従来型のV_H配列のいずれかである。

10

【 0 1 5 6 】

フレームワーク配列は、好ましくは、本発明の一価のポリペプチドが、ドメイン抗体（またはドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸配列）などのイムノグロブリン単一可変ドメイン、単一ドメイン抗体（または単一ドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸）、「dAb」（またはdAbとしての使用に適するアミノ酸）、ナノボディ（登録商標）、V_HH配列、ヒト化V_HH配列、ラクダ化V_H配列、または親和性成熟によって得られたV_HH配列、であるようなものであってもよい。また、適切なフレームワーク配列は、例えば標準的なハンドブックおよび本明細書の更なる開示および従来技術に基づき、当業者に明らかである。

20

【 0 1 5 7 】

特に、本発明の一価のポリペプチドに存在するフレームワーク配列は、1つ以上のホールマーク残基（国際公開第08/020079号の表A-3～A-8において定義される）を含んでもよく、すなわち、本発明の一価のポリペプチドはナノボディである。かかるフレームワーク配列（の好適な組み合わせ）の幾つかの好適かつ非限定的な例は、本明細書における更なる開示から明らかとなる（例えば表A-1を参照）。一般的に、ナノボディ（特にV_HH配列および部分的にヒト化されたナノボディ）は、具体的には、1つ以上のフレームワーク配列（例えば、さらに国際公開第08/020079号、61頁第24行目～98頁第3行目に記載）内に1つ以上の「ホールマーク残基」が存在することにより特徴づけることができる。

30

【 0 1 5 8 】

より具体的には、本発明は、FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3 FR4の（一般）構造を有するアミノ酸配列の、少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドの提供に関し、式中、FR1からFR4はフレームワーク領域1から4にそれぞれ該当し、CDR1からCDR3は相補性決定領域1から3にそれぞれ該当し、i)配列番号1～58のアミノ酸配列（表A-3を参照）の少なくとも1つと少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%のアミノ酸同一性を有し、その際、アミノ酸同一性の程度を決定するために、CDR配列を形成するアミノ酸残基は無視される。この点、参照として、配列番号1～58（表A-2を参照）のイムノグロブリン単一可変ドメイン中のフレームワーク1の配列（配列番号59～116）、フレームワーク2の配列（配列番号175～232）、フレームワーク3の配列（配列番号291～232）、フレームワーク4の配列（配列番号407～464）を列挙する表A-1、または、ii)表A-1にて図示するフレームワーク配列の組合せ、が挙げられ、その際、iii)好ましくは、Kabab付番に従う位置11、37、44、45、47、83、84、103、104および108のアミノ酸残基の1つ以上が、国際公開第08/020079号の表A-3から表A-8に記載のホールマーク残基から選択される。

40

【 0 1 5 9 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、ISVDが、
- CDR1が配列番号117～174により表され、CDR2が配列番号233～290

50

により表され、C D R 3 が配列番号 3 4 9 ~ 4 0 6 により表される I S V D、
- 配列番号 1 ~ 5 8 により表される I S V D、および、
- 配列番号 1 ~ 5 8 のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性により表される I S V D、
からなる群から選択される、ポリペプチドを提供する。

【 0 1 6 0 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、C D R が、以下からなる群から選択される：

C D R 1 が配列番号 1 1 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 4 9 である；

C D R 1 が配列番号 1 1 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 4 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 0 である；

C D R 1 が配列番号 1 1 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 5 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 1 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 6 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 2 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 7 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 3 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 8 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 4 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 3 9 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 5 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 0 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 6 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 7 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 8 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 5 9 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 4 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 0 である；

C D R 1 が配列番号 1 2 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 5 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 1 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 6 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 2 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 7 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 3 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 8 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 4 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 4 9 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 5 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 0 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 6 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 7 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 8 である；

C D R 1 が配列番号 1 3 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 5 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 6 9 である；

10

20

30

40

50

[illegible]

10

20

30

40

50

C D R 1 が配列番号 1 6 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 7 9 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 5 である；
C D R 1 が配列番号 1 6 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 0 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 6 である；
C D R 1 が配列番号 1 6 5 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 1 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 7 である；
C D R 1 が配列番号 1 6 6 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 2 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 8 である；
C D R 1 が配列番号 1 6 7 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 3 であり、C D R 3 が配列番号 3 9 9 である；
C D R 1 が配列番号 1 6 8 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 4 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 0 である；
C D R 1 が配列番号 1 6 9 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 5 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 1 である；
C D R 1 が配列番号 1 7 0 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 6 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 2 である；
C D R 1 が配列番号 1 7 1 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 7 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 3 である；
C D R 1 が配列番号 1 7 2 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 8 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 4 である；
C D R 1 が配列番号 1 7 3 であり、C D R 2 が配列番号 2 8 9 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 5 である；
C D R 1 が配列番号 1 7 4 であり、C D R 2 が配列番号 2 9 0 であり、C D R 3 が配列番号 4 0 6 である、ポリペプチドを提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 1 】

本発明のイムノグロブリン（特にイムノグロブリン単一可変ドメイン）は、全て「改良されたイムノグロブリン可変ドメイン」の名称の以下の同時係属中の米国仮特許出願に記載の特定の変異／アミノ酸残基を含んでもよい：米国仮特許出願第 6 1 / 9 9 4 5 5 2 号（2014 年 5 月 1 6 日に出願）；米国仮特許出願第 6 1 / 0 1 4 , 0 1 5 号（2014 年 6 月 1 8 日に出願）；米国仮特許出願第 6 2 / 0 4 0 , 1 6 7 号（2014 年 8 月 2 1 日に出願）；および米国仮特許出願第 6 2 / 0 4 7 , 5 6 0 号（2014 年 9 月 8 日に出願）（いずれも A b l y n x 社が出願人）。

【 0 1 6 2 】

特に、本発明のイムノグロブリン（特にイムノグロブリン単一可変ドメイン）は、好適には、（i）位置 1 1 2 で K または Q を含むか、または（i i）位置 1 1 0 で K または Q を、および位置 1 1 で V を含むか、または（i i i）位置 8 9 で T を含むか、または（i v）位置 8 9 で L を、および位置 1 1 0 で K または Q を含むか、または（v）位置 1 1 で V を、および位置 8 9 で L を含むか、または（i）から（v）のあらゆる好適な組合せを含む。

【 0 1 6 3 】

前記同時係属中の米国仮特許出願にも記載されるように、本発明のイムノグロブリンが上記の（i）から（v）のいずれか 1 つ（またはその好適な組合せ）に係る変異を含むとき、

- 位置 1 1 のアミノ酸残基は、好ましくは L、V または K から選択され（最も好ましくは V である）、
- 位置 1 4 のアミノ酸残基は、好ましくは A または P から最適に選択され、
- 位置 4 1 のアミノ酸残基は、好ましくは A または P から最適に選択され、
- 位置 8 9 のアミノ酸残基は、好ましくは T、V または L から最適に選択され、
- 位置 1 0 8 のアミノ酸残基は、好ましくは Q または L から最適に選択され、
- 位置 1 1 0 のアミノ酸残基は、好ましくは T、K または Q から最適に選択され、

- 位置 1 1 2 のアミノ酸残基は、好ましくは S、K または Q から最適に選択される。

【0164】

前記同時係属中の米国仮特許出願に記載されるように、前記の変異は、本発明のイムノグロブリンおよび化合物へのいわゆる「既存抗体」の結合を防止または減少させることに効果的である。この目的においては、本発明のイムノグロブリンは、（任意に前記変異との組合せで）C末端伸長部（X）_nを含んでもよく（式中、_nは1～10、好ましくは1～5、例えば1、2、3、4または5（好ましくは1または2、例えば1）であり、各Xは、独立に選択される、（好ましくは天然の）アミノ酸残基であり、好ましくは、各々アラニン（A）、グリシン（G）、バリン（V）、ロイシン（L）またはイソロイシン（I）からなる群から独立に選択される）、その参照として、前記米国仮特許出願および国際公開第12/175741号が挙げられる。特に、本発明のイムノグロブリンは、タンパク質、ポリペプチドまたは他の化合物またはそれらを含む構築物のC末端を形成するとき、かかるC末端伸長部を含んでもよい（また、参照として、前記米国仮特許出願および国際公開第12/175741号が挙げられる）。

10

【0165】

本発明は、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば配列番号1～58）と競合する競合剤（例えばポリペプチド）を決定する方法に関し、該方法では、本発明のポリペプチドの非存在下での競合剤のCD38に対する結合と比較し、ポリペプチドである本明細書に記載のポリペプチドが、CD38への結合、例えばhCD38（配列番号465）との結合に関して、該競合剤と競合するかまたは交差ブロッキングし、本発明のポリペプチドの存在下で、該競合剤のCD38に対する結合が、少なくとも5%、例えば10%、20%、30%、40%、50%またはそれ以上、例えば80%、90%または100%（すなわち所定のアッセイにおいて検出不可能な程度で）減少する。例えば、競合および交差ブロッキングは、公知技術のいかなる手段（例えば競合ELISAまたはFACSアッセイ）で測定することができる。

20

【0166】

本発明はまた、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば配列番号1～58）と競合する競合剤に関し、該競合剤は、CD38との結合に関して本明細書に記載されるポリペプチドと競合するかまたは交差ブロッキングし、前記競合剤の存在下で、前記競合剤がない場合の本発明のポリペプチドによるCD38への結合と比較し、本発明のポリペプチドのCD38に対する結合は、少なくとも5%、例えば10%、20%、30%、40%、50%またはそれ以上、例えば80%、さらには、例えば少なくとも90%または100%（すなわち所定のアッセイにおいて検出不可能な程度で）減少する。一側面では、本発明は、配列番号1～58のうちの1つなどの本発明のポリペプチドによるCD38との結合を交差ブロッキングするポリペプチド、および/または配列番号1～38のうちの少なくとも1つによって、CD38との結合が交差ブロッキングされるポリペプチドに関し、前記ポリペプチドは、特異的にCD38と結合する少なくとも1つのVH、VL、dAb、イムノグロブリン単一可変ドメイン（ISVD）を含み、CD38との結合が、好ましくはCD38の活性を調節する。

30

【0167】

イムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤が、本発明に従い交差ブロッキングするかまたは交差ブロッキングできるか否かを決定するための適切なFACSアッセイを、以下に記載する。本明細書に記載されるイムノグロブリン、抗体、イムノグロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは他の結合剤のいずれかをを用いてアッセイを実施できることはいうまでもない。FACS装置（例えばFACS Canto; Becton Dickinson社）を、製造業者の推奨に従い操作する。

40

【0168】

ゆえに、さらに好適な側面では、本発明は、配列番号1～58により表されるポリペプチドと競合する競合阻害剤ポリペプチドを決定する方法に関し、該方法は、配列番号1～58により表されるポリペプチドの存在下で、CD38への前記競合ポリペプチドの結合

50

を決定することと、配列番号 1 から 58 により表されるポリペプチドの存在下での前記競合ポリペプチドの C D 38 に対する結合が、配列番号 1 から 58 により表されるポリペプチドが存在しない場合と比較し、少なくとも 10 %、例えば 20 %、30 %、40 %、50 % またはそれ以上、例えば 80 %、90 % または 100 % 減少する競合ポリペプチドを検出することと、を含む。

【0169】

二価結合においては、熱力学的側面と同様に、制御的な側面からの利点が存在する。しかしながら、立体配置的自由度が制限されるとき、エピトープへの結合には、かなりの立体配置的制約が同時に存在することが公知である。両方のパラトープが同一であるとき、二価結合は（例えば普通抗体の）結合活性を増加させる場合があるが、これは異なるパラトープの場合には明らかでない。特に、エピトープが第 1 のパラトープと結合するとき、これにより第 2 のエピトープへの第 2 のパラトープの結合が妨げられる。特に、親和性が異なる場合には顕著である。本発明者らは、多価ポリペプチドが、多価フォーマットにおけるこれらの立体配置的制約または標的親和性の相違にもかかわらず、本質的に、対応する一価のポリペプチドの組合せと同程度の、免疫応答における活性および効率を示すことを見出した。本発明者らはまた、異なる C D 38 のエピトープに対する I S V D を含む多価ポリペプチドが、通常の抗体に基づくベンチマーク分子と比較し、免疫応答を強化するということを見出した。

【0170】

ゆえに、本発明はさらに、多価ポリペプチド（また、本明細書において「本発明の多価ポリペプチド」と称される）に関し、該ポリペプチドは、C D 38 を標的とする少なくとも 1 つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（またはその適切な断片）と、さらに、（好ましくは C D 38 を標的とする）1 つのイムノグロブリン単一可変ドメインと、を含むかまたは、（本質的に）それからなる。

【0171】

好適な一側面では、本発明の多価ポリペプチドは、2 つ以上のヒト C D 38 に対するイムノグロブリン単一可変ドメインを含むかまたは、本質的にそれからなる。2 つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインは、1 つ以上のペプチドリンカーを介して任意に連結されてもよい。

【0172】

本発明の多価ポリペプチドでは、2 つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）は、同一でもよくまたは異なってもよく、同じ抗原または抗原決定基（例えば同じ部分またはエピトープ、または異なる部分またはエピトープ）を標的とすることができ、あるいは、異なる抗原または抗原決定基を標的とすることができ、あるいは、そのいかなる好適な組合せであってもよい。例えば、本発明の二価ポリペプチドは、以下を含んでもよい：

- （a）2 つの同一のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）；
- （b）タンパク質または抗原の第 1 の抗原決定基を標的とするナノボディなどの第 1 のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および前記タンパク質または抗原の同じ抗原決定基を標的とするナノボディなどの第 2 のイムノグロブリン単一可変ドメインであって、前記第 1 のイムノグロブリン単一可変ドメインが前記第 2 の I S V D と異なる；
- （c）タンパク質または抗原の第 1 の抗原決定基を標的とするナノボディなどの第 1 のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および前記タンパク質または抗原の（前記第 1 の抗原決定基と異なる）他の抗原決定基を標的とするナノボディなどの第 2 のイムノグロブリン単一可変ドメイン；または
- （d）第 1 のタンパク質または抗原を標的とするナノボディなどの第 1 のイムノグロブリン単一可変ドメイン、およびナノボディなどの、第 2 の（すなわち前記第 1 のタンパク質または抗原と異なる）タンパク質または抗原を標的とする第 2 のイムノグロブリン単一可変ドメイン。同様に、本発明の三価ポリペプチドは、例えば限定されないが、以下を含んでもよい：

- (a) 3つの同一のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）；
- (b) タンパク質または抗原の第1の抗原決定基に対するナノボディなどの2つの同一のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および同じタンパク質または抗原の異なる抗原決定基を標的とするナノボディなどの、第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン；
- (c) タンパク質または抗原の第1の抗原決定基に対するナノボディなどの2つの同一のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および前記第1のタンパク質または抗原と異なる第2のタンパク質または抗原を標的とするナノボディなどの第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン；
- (d) 第1のタンパク質または抗原の第1の抗原決定基を標的とするナノボディなどの第1のイムノグロブリン単一可変ドメイン、前記第1のタンパク質または抗原の、前記第1の抗原決定基と異なる第2の抗原決定基を標的とするナノボディなどの第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および前記第1のタンパク質または抗原と異なる第2のタンパク質または抗原を標的とするナノボディなどの第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン；または
- (e) 第1のタンパク質または抗原を標的とするナノボディなどの第1のイムノグロブリン単一可変ドメイン、前記第1のタンパク質または抗原と異なる第2のタンパク質または抗原を標的とするナノボディなどの第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン、およびナノボディなどの、前記第1および第2のタンパク質または抗原と異なる第3のタンパク質または抗原を標的とする第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン。

10

20

30

40

50

【0173】

少なくとも2つのイムノグロブリン単一可変ドメインを含む（ナノボディなどの）本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）が、第1の抗原（すなわちCD38）を標的とし、少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）が、第2の抗原（すなわちCD38と異なる）を標的とするため、本発明では「多重特異的な」ポリペプチドとも呼ばれ、かかるポリペプチドに存在するイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）はまた、本明細書において、「多重特異的なフォーマット」である、と称される。このように、例えば、本発明の「二重特異性」ポリペプチドは、第1の抗原（すなわちCD38）を標的とするナノボディなどの少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメイン、および第2の抗原（すなわちCD38と異なる）を標的とするナノボディなどの少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドであり、あるいは、本発明の「三重特異的」ポリペプチドは、少なくとも1つの、第1の抗原（すなわちCD38）を標的とするナノボディなどのイムノグロブリン単一可変ドメイン、および第2の抗原（すなわちCD38と異なる）を標的とするナノボディなどの少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメイン、および第3の抗原（すなわち両方のCD38および第2の抗原と異なる）を標的とするナノボディなどの少なくとも1つの更なる抗原イムノグロブリン単一可変ドメイン、その他、を含むポリペプチドである。

【0174】

したがって、一側面では、本発明の多価ポリペプチドは、本発明の二価ポリペプチドの場合、その最も単純な形態では、CD38を標的とする第1のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、およびCD38を標的とする同一の第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）を含み、前記第1および第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）が、（本明細書で定義される）リンカー配列を介して任意に連結されてもよく、本発明の三価ポリペプチドの場合、その最も単純な形態では、CD38を標的とする第1のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、CD38を標的とする同一の第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、およびCD38を標的とする同一の第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）を含み、前記第1、第2および第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）は、1つ以上、具体的には2つのリンカー配列を介して任意に連結されてもよい。

【 0 1 7 5 】

別の側面では、本発明の多価ポリペプチドは、C D 3 8を標的とする第1のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、および第2の抗原を標的とする第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）を含み、前記第1および第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）が、（本明細書で定義される）リンカー配列を介して任意に連結されてもよい、本発明の二重特異性ポリペプチドでもよく、あるいは、本発明の多価ポリペプチドは、C D 3 8を標的とする第1のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、第2の抗原を標的とする第2のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、および第3の抗原を標的とする第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）、を含み、前記第1、第2および第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）が、1つ以上、具体的には2つのリンカー配列を介して任意に連結されてもよい、本発明の三重特異性ポリペプチドでもよい。

10

【 0 1 7 6 】

別の態様において、本発明のポリペプチドは、三価の、二重特異性ポリペプチドである。本発明の三価、二重特異性ポリペプチドは、その最も単純な形態では、C D 3 8に対するナノボディなどの、2つの同一のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および他の抗原（例えば血清アルブミン）を標的とする第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）を含み、前記第1、第2および第3のイムノグロブリン単一可変ドメイン（例えばナノボディ）が、1つ以上、具体的には2つのリンカー配列を介して任意に連結されてもよい、（本明細書で定義される）三価ポリペプチドでもよい。

20

【 0 1 7 7 】

更なる態様において、本発明のポリペプチドは、マルチパラトピックポリペプチド（また、本明細書において「本発明のマルチパラトピックポリペプチド」と称される）であり、例えば（a）「本発明のバイパラトピックポリペプチド」または「本発明のトリパラトピックポリペプチド」である。本明細書で用いられる用語「マルチパラトピック」（抗原）結合分子または「マルチパラトピック」ポリペプチドとは、少なくとも2つの（すなわち2つまたはそれ以上の）イムノグロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドを意味し、その際、「第1の」イムノグロブリン単一可変ドメインはC D 3 8を標的とし、「第2の」イムノグロブリン単一可変ドメインはC D 3 8を標的とし、これらの「第1」および「第2」のイムノグロブリン単一可変ドメインは、異なるパラトープを有する。したがって、マルチパラトピックポリペプチドは、C D 3 8に対する2つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、少なくとも1つの「第1の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、C D 3 8上の第1のエピトープを標的とし、少なくとも1つの「第2の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、C D 3 8上の第1のエピトープと異なるC D 3 8上の第2のエピトープを標的とする。

30

【 0 1 7 8 】

更なる特に好適な側面では、本発明のポリペプチドは、バイパラトピックポリペプチドである。本明細書で用いられる「バイパラトピック」（抗原）結合分子または「バイパラトピック」ポリペプチドという用語は、C D 3 8を標的とする「第1の」イムノグロブリン単一可変ドメインおよびC D 3 8を標的とする「第2の」イムノグロブリン単一可変ドメインを含み、「第1」および「第2」のイムノグロブリン単一可変ドメインが、異なるパラトープを有するポリペプチドを意味する。したがって、バイパラトピックポリペプチドは、C D 3 8に対する2つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、「第1の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、C D 3 8上の第1のエピトープを標的とし、「第2の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、C D 3 8上の第1のエピトープと異なるC D 3 8上の第2のエピトープを標的とする。

40

【 0 1 7 9 】

別の態様において、本発明のポリペプチドは、トリパラトピックポリペプチドである。本明細書で用いられる「トリパラトピック」（抗原）結合分子または「トリパラトピック

50

」ポリペプチドという用語は、CD38を標的とする「第1の」イムノグロブリン単一可変ドメイン、CD38を標的とする「第2の」イムノグロブリン単一可変ドメイン、およびCD38を標的とする「第3の」イムノグロブリン単一可変ドメイン、を含み、これらの「第1の」、「第2の」および「第3の」イムノグロブリン単一可変ドメインが、異なるパラトープを有するポリペプチドを意味する。したがって、トリパラトピックポリペプチドは、CD38に対する3つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、「第1の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、CD38上の第1のエピトープを標的とし、「第2の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、CD38上の第1のエピトープと異なるCD38上の第2のエピトープを標的とし、「第3の」イムノグロブリン単一可変ドメインは、CD38上の第1および第2のエピトープと異なるCD38上の第3のエピトープを標的とする。

10

【0180】

本発明の多価ポリペプチドに存在する2つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインは、軽鎖可変ドメイン配列（例えばV_L配列）、または重鎖可変ドメイン配列（例えばV_H配列）からなってもよく、それらは、従来の4鎖型抗体から誘導される重鎖可変ドメイン配列、または重鎖抗体から誘導される重鎖可変ドメイン配列からなってもよい。好適な側面では、それらは、ドメイン抗体（またはドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸）、単一ドメイン抗体（または単一ドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸）、「dAb」（またはdAbとしての使用に適するアミノ酸）、ナノボディ（登録商標）（V_HHを含むが、これに限定されない）、ヒト化V_HH配列、ラクダ化V_H配列、または親和性成熟によって得られたV_HH配列、からなる。2つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインは、部分的に、または完全に、ヒト化されたナノボディまたは部分的に、または完全にヒト化されたV_HHからなってもよい。本発明の好ましい側面では、本発明の多価ポリペプチドに含まれるイムノグロブリン単一可変ドメインは、本明細書で定義される、本発明の1つ以上の一価のポリペプチドである。

20

【0181】

一態様では、本発明が、各々が200nM未満のEC₅₀値でCD38に特異的に結合する、第1のISVDおよび第2のISVDを含む、本明細書に記載されるポリペプチドを提供する。

【0182】

一態様では、本発明が、CD38と結合できる少なくとも2つのISVDを含み、前記ISVDが異なる、本明細書に記載されるポリペプチドを提供する。

30

【0183】

一態様では、本発明は、CD38と結合できる少なくとも2つのISVDを含み、前記ISVDがCD38上の異なるエピトープと結合する、本明細書に記載されるポリペプチドを提供する。

【0184】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、前記第1のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

40

(i) CDR1が、

(a) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、2

50

68、269、271、274のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され、

前記第2のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号129、163、164、165、166、および

(b) 配列番号129、163、164、165、166のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号245、279、280、281、282のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号361、395、396、397、398のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される、ポリペプチドを提供する。

【0185】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、前記第1のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) CDR2が、

(c) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(iii) CDR3が、

(e) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390のアミノ酸配列に対し4、3、2または1アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

前記第2のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

(i) CDR1が、

(a) 配列番号1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) CDR 2 が、

(c) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および

(d) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(iii) CDR 3 が、

(e) 配列番号 349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406、および

(f) 配列番号 349、351、352、357、358、368、391、392、393、394、399、400、401、402、403、404、405、406 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される、ポリペプチドを提供する。

【0186】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、前記第 1 の ISVD が、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、FR 1 から FR 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、CDR 1 から CDR 3）から本質的になり、

(i) CDR 1 が、

(a) 配列番号 129、163、164、165、166、および

(b) 配列番号 129、163、164、165、166 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) CDR 2 が、

(c) 配列番号 245、279、280、281、282、および

(d) 配列番号 245、279、280、281、282 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(iii) CDR 3 が、

(e) 配列番号 361、395、396、397、398、および

(f) 配列番号 361、395、396、397、398 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

前記第 2 の ISVD が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、FR 1 から FR 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、CDR 1 から CDR 3）からなり、

(i) CDR 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) CDR 2 が、

(c) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および

(d) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群

10

20

30

40

50

から選択され；

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される、ポリペプチドを提供する。

【 0 1 8 7 】

本発明の多価ポリペプチドの C D 3 8 への結合は、結合実験において測定できる。典型的なアッセイとしては、限定されないが、C D 3 8 を細胞表面に露出させるアッセイが挙げられる（実施例参照）。本発明の多価ポリペプチドの C D 3 8 への結合を測定するための好適なアッセイは F A C S 分析であり、例えば実施例にて説明される F A C S アッセイが挙げられ、当該アッセイでは、本発明の多価ポリペプチドを細胞上に発現した C D 3 8 に結合させる。本発明のポリペプチドを C D 3 8 に結合させるための幾つかの好適な E C₅₀ および / または K_D 値は、本明細書における更なる詳細な説明および実施例から明らかとなる。

【 0 1 8 8 】

かかる F A C S 結合実験において、本発明の多価ポリペプチドは、 10^{-8} M 以下の、より好ましくは 10^{-9} M 以下の、より好ましくは 10^{-10} M 以下の、例えば 10^{-11} M の、ヒト C D 3 8 との結合における E C₅₀ 値を示しうる。例えば、かかる F A C S 結合実験において、本発明の多価ポリペプチドは、 10^{-11} M ~ 10^{-8} M の、例えば 10^{-11} M ~ 10^{-10} M の、 10^{-10} M ~ 10^{-9} M の、または 10^{-11} M ~ 10^{-10} M の、ヒト C D 3 8 との結合における E C₅₀ 値を示しうる。

【 0 1 8 9 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、

- F A C S 分析の E C₅₀ が、190 pM 以下、例えば 180、170、160、150、140、130、120、110 または 100 未満、例えば 90、80、70、60、50、40、35、30、25 または 20 未満、例えば 16 pM 未満であり、および / または、

- 前記ポリペプチドが、最大 100 nM、例えば 50 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、好ましくは最大 2 nM、例えば 1 nM、の I C₅₀ により C D 3 8 と結合し、および / または

- ベンチマークの I C₅₀ と比較し、好ましくは競合 F A C S による測定において、少なくとも 10 %、例えば 20 %、30 %、50 %、80 %、90 % または 100 % 優れた I C₅₀ により C D 3 8 と結合する、ポリペプチドを提供する。

【 0 1 9 0 】

本発明の多価ポリペプチドは、C D 3 8 と結合し、免疫応答を調節（すなわち増加、促進、刺激または増強）できる。より具体的には、本発明のポリペプチドは免疫応答を強化でき、例えば C D C 活性を強化する。

【 0 1 9 1 】

本発明者らは、驚くべきことに、本発明のポリペプチドが F c 部に結合するとき、免疫応答（例えば C D C）が効率的に誘導されることを観察した。さらに、2 つの一価の F c 構築物、すなわち C D 3 8 上の異なるエピトープに対する各々の組合せが、対応するベンチマークよりはるかに良好な効力（例えば免疫応答）を示した。また、C D 3 8 上の異なるエピトープに対する I S V D を含む二価のポリペプチドが F c 構築物においてフォーマット化されるとき、この F c 構築物もまた、対応するベンチマークよりはるかに良好な効力（例えば免疫応答）を示した。

【 0 1 9 2 】

10

20

30

40

50

本発明において「ベンチマーク」とは、本明細書に記載されるパフォーマンス、すなわち分子の1つ以上の機能的な特徴、例えば親和性、効率および効力を評価するための評価の基準として用いられる。特定のイムノグロブリン構築物は、特定のベンチマークの適切さを決定し、それは当業者によって、容易に評価できる。ゆえに、特に好適な側面では、本発明は、2つのポリペプチド（各々「本発明のポリペプチド」）を含み、各ポリペプチドが、通常、適切なヒンジ領域またはリンカーを介して、1つ以上の定常ドメイン（例えばCH₂および/またはCH₃ドメイン）に連結される1つ以上のISVDを含み、それらが、最終的な構築物においてFc部と一緒に形成する、イムノグロブリン構築物を提供する。

【0193】

このように、「本発明のイムノグロブリン構築物」は、一般的に（本明細書で定義される）Fc部を含み、その際Fcを形成する2つのポリペプチドが各々、任意に適切なリンカーまたはヒンジ領域を介して、（本明細書において定義される）2つ以上の単一可変ドメインに連結する。かかる構築物は、例えば欧州特許出願公開第1621554号、国際公開第02/056910号または国際公開第2009/068630号に記載のものであってもよい。

【0194】

本発明のポリペプチドおよび本発明の構築物を形成する際のそれらの使用は、本発明の更なる側面である。また、特定の発明の側面では、本明細書にさらに記載されるように、本発明のこれらのポリペプチドは、そのように（すなわち他のポリペプチド鎖との相互作用なしで、および/または本発明のイムノグロブリン構築物の一部としてでなく）使用されうる。

【0195】

好ましくは、本発明の構築物では、本発明の各ポリペプチドは、少なくとも1つ、例えば1つ、2つまたは3つのISVD、より好ましくは2つのISVDのみを含む。換言すれば、本発明のイムノグロブリン構築物は、好ましくは合計4つの（すなわち各ポリペプチドに2つの）ISVDを含む。

【0196】

また、本発明の各ポリペプチドは、通常2つの定常ドメイン（例えばIgG、IgAまたはIgDに由来するFc部の場合）、または3つの定常ドメイン（例えばIgまたはIgEに由来するFc部の場合）を含み、それにより、最終的な構築物において、2つのポリペプチド鎖の定常ドメインが、Fc部例えば、IgG（例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）、IgA、IgD、IgEまたはIgMに由来するFc部、またはその誘導体、類縁体、変異体、部分もしくは断片（キメラFc部を含む）を形成し、それらは、本明細書にさらに記載されるエフェクター機能を有してもよく、または有さなくともよい。

【0197】

4つの単一可変ドメインおよび（例えばIgGまたはIgAまたはその類縁体、変異体または誘導体に由来するFc部を形成する）4つの定常ドメインを有する本発明の構築物を、非限定的な図1に図示する。前記構築物は、2つのポリペプチド（1）および（2）を含み、各々2つの定常ドメイン（7）および（8）、「第1の」ISVD（3）および「第2の」ISVD（4）を含む。第1のISVD（3）は、任意に適切なリンカー（5）を介して第2のISVD（4）に連結し、また任意に（また通常）適切なリンカーまたはヒンジ領域（6）を介して定常ドメインに連結する。ポリペプチド（1）の定常ドメイン（7）および（8）、ならびにポリペプチド鎖（2）の対応する定常ドメイン（7）および（8）は、共にFc部（9）を形成する。2つのポリペプチド対に存在する対応する定常ドメインは、例えば共有結合で各々結合し、例えば、ポリペプチド1上のCH₂ドメインは、ポリペプチド2上のCH₂ドメインと対になり、ポリペプチド1上のCH₃ドメインは、ポリペプチド2上のCH₃ドメインと対になる、等。

【0198】

したがって、本発明の一側面では、本発明のイムノグロブリン構築物において、前記第1のポリペプチドの前記CH2ドメインは、前記第2のポリペプチドの前記CH2ドメインと対をなし、および/または、前記第1のポリペプチドの前記CH3ドメインは、前記第2のポリペプチドの前記CH3ドメインと対をなす、イムノグロブリンのFc部は、(従来技術において、当業者に公知のように)パパインによる抗体の消化後、典型的に生じる抗体の断片として定義され、それは、イムノグロブリンの2つのCH2-CH3領域、および連結領域(例えばヒンジドメイン)を含む。抗体重鎖の定常ドメインは、抗体のアイソタイプ(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgDまたはIgE)を定義する。

【0199】

Fc部は、補体系のFc受容体およびタンパク質と呼ばれる細胞表面レセプターと共に、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)または補体依存性細胞傷害性(CDC)などの抗体のエフェクター機能を媒介する。

【0200】

本明細書で用いられる「CH2ドメイン」または「CH2ドメイン」という用語は、イムノグロブリンのCH2ドメインを指す。このように、例えば、ヒトIgG1抗体のCH2ドメインは、EU付番システムに従うとアミノ酸228~340に対応する。しかしながら、CH2ドメインは、本明細書に記載される他のサブタイプのいずれかでもよい。

【0201】

本明細書で用いられる「CH3ドメイン」または「CH3ドメイン」という用語は、イムノグロブリンのCH3ドメインを指す。このように、例えば、ヒトIgG1抗体のCH3ドメインは、EU付番システムに従うとアミノ酸341~447に対応する。しかしながら、CH3ドメインは、本明細書に記載される他のサブタイプのいずれかでもよい。

【0202】

CH2ドメイン、ヒンジおよびCH3ドメインを含む好適な領域は、配列番号466および467により表される。

【化2】

配列番号466:ヒトIgG1

```
AAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

【化3】

配列番号467:マウスIgG2c

```
AAAPCPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPMVTCVVDVSEDDPDVQISWFEVNNVE
VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPPRAPQVYVL
PPPAEEMTKKEFSLTCLMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLKVQKSTWER
RNLFACSMGHEGSAQSPYD
```

【0203】

例えばScheuplein et al. 2010などの当業者に公知のいずれかの好適な方法によって、Fc部を含む本発明のポリペプチドを調製できる。例えば、適切な制限酵素部位が隣接するプライマーを用いたPCR増幅、およびそれに続く発現ベクターpMEの消化およびそれに対するライゲーションにより、マウスIgG1またはヒトIgG1のFc部分への融合タンパク質として個々のISVDを再クローニングすることが可能である。

【0204】

本発明の一側面では、本発明のポリペプチドはさらに、CH2およびCH3定常ドメイ

10

20

30

40

50

ンを含み、好ましくは、前記 C_H2 および前記 C_H3 ドメインは直接連結されるかまたはリンカーを介して連結される。

【0205】

好適かつ非限定的な本発明の側面では、本発明のイムノグロブリン構築物は、（任意に適切なリンカーを介して）一对の第2の I S V D に連結される一对の第1の I S V D に（任意に適切なリンカーまたはヒンジ領域を介して）連結される F_c 部を含み（すなわち、本明細書にさらに記載されるように、各ポリペプチドが結合して F_c 部を形成する）、すなわち、本明細書で示す構築物および I S V D は、

- 両方の第1の I S V D が、C D 3 8 の第1の標的、抗原エпитープ、抗原決定基、一部、ドメインまたはサブユニットを標的とし、

- 両方の第2の I S V D が、C D 3 8 の第2の標的、抗原、エпитープ、抗原決定基、一部、ドメインまたはサブユニットを標的とし、

C D 3 8 の第1の標的、抗原エпитープ、抗原決定基、一部、ドメインまたはサブユニットが、C D 3 8 の第2の標的、抗原エпитープ、抗原決定基、一部、ドメインまたはサブユニットと異なる。

【0206】

他の側面によれば、本発明の1つ以上のポリペプチドは（任意に適切なリンカーまたはヒンジ領域を介して）、1つ以上の定常ドメインに（例えば、F_c 部を形成するための部分もしくは全部として使用できる、2つまたは3つの定常ドメイン）、F_c 部に、I g G タイプの抗体定常領域に、および/または、1つ以上の抗体部分、断片またはドメインに連結させることができ、それにより、本発明のポリペプチドに1つ以上のエフェクター機能を付与し、および/または1つ以上の F_c 受容体と結合する能力を付与することができる。例えば、この目的のために、限定されないが、1つ以上の更なるアミノ酸配列は、抗体中の、例えば（本明細書に記載されるように）重鎖抗体、好ましくは従来型のヒト4鎖型抗体由来の1つ以上の C_H2 および/または C_H3 ドメインを含んでもよく、および/または、例えば I g G 由来の（例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 由来の）、I g E 由来の、または他のヒト I g（例えば I g A、I g D または I g M）由来の F_c ドメイン（の一部）を形成してもよい。例えば国際公開第94/04678号は、ラクダ化 V H H ドメイン（すなわちナノボディ）またはそのヒト化誘導体を含む重鎖抗体を開示しており、そこでは、ラクダ科 C_H2 および/または C_H3 ドメインがヒト C_H2 および C_H3 ドメインと置換され、それにより、ナノボディ、ならびにヒト C_H2 および C_H3 ドメインを含む（が C_H1 ドメインを含まない）、各々2つの重鎖からなるイムノグロブリンが提供され、当該イムノグロブリンが、C_H2 および C_H3 ドメインにより提供されるエフェクター機能を有し、また当該イムノグロブリンが、いかなる軽鎖の存在なしでも機能できる。

【0207】

具体的には、本発明のイムノグロブリン構築物は、ベンチマークと比較し、（実際のまたは見かけの）K_D 値、（実際のまたは見かけの）K_A 値、K_{o_n} 速度および/または K_{o_f} 速度として、適切に測定および/または表される親和性で、標的と結合する。

【0208】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドを含むイムノグロブリン構築物に関し、当該イムノグロブリン構築物は、例えばリガンド競合アッセイ、競合 F A C S、機能的細胞アッセイ（リガンドにより誘導される走化性の抑制等）、アルファースクリーンアッセイなど（好ましくは競合 F A C S）によって測定した場合、ベンチマークの I C₅₀ よりも少なくとも10%、例えば20%、30%、50%、80%、90%、または100%またはそれ以上良好な I C₅₀ で標的と結合する。

【0209】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドを含むイムノグロブリン構築物に関し、前記イムノグロブリン構築物は、例えばリガンド競合アッセイ、競合 F A C S、機能的細胞アッセイ（リガンドにより誘導される走化性の抑制等）、アルファースク

10

20

30

40

50

リーンアッセイなど（好ましくは競合 F A C S）によって測定した場合、ベンチマークの I C ₅₀ よりも少なくとも 1.5 倍、例えば 2 倍、3 倍または 4 倍、さらには 5 倍または 10 倍良好な I C ₅₀ で標的と結合する。

【0210】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドを含み、例えばリガンド競合アッセイ、競合 F A C S、機能的細胞アッセイ（リガンドにより誘導される走化性の抑制等）、アルファースクリーンアッセイなど（好ましくは競合 F A C S）によって測定した場合、200 nM ~ 0.01 nM の間の、例えば 0.01、0.05、0.1、0.15、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 または 200 nM の I C ₅₀ を有するイムノグロブリン構築物に関する。

10

【0211】

したがって、本発明は、さらに C H 2 および C H 3 ドメインを含み、好ましくは前記 C H 2 および C H 3 ドメインが直接連結されるかまたはリンカーを介して連結される、本発明の第 1 のポリペプチドと、さらに C H 2 および C H 3 ドメインを含み、好ましくは前記 C H 2 および C H 3 ドメインが直接連結されるかまたはリンカーを介して連結される、本発明の第 2 のポリペプチドと、を含み、前記ポリペプチドの前記 C H 2 ドメインおよび前記 C H 3 ドメインが F c 部を形成する、イムノグロブリン構築物に関する。

【0212】

本発明の更なる好ましい一態様では、イムノグロブリン構築物中の前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドは同一である。

20

【0213】

一態様では、本発明は、前記第 1 のポリペプチドが、第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含み、前記第 2 のポリペプチドが、第 1 の I S V D および第 2 の I S V D を含む、イムノグロブリン構築物に関する。

【0214】

一態様では、本発明は、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

30

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および

(b) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(ii) C D R 2 が、

(c) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および

(d) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

40

(iii) C D R 3 が、

(e) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および

(f) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 から F R 4）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 から C D R 3）からなり、

50

(i) C D R 1 が、

- (a) 配列番号 129、163、164、165、166、および
 (b) 配列番号 129、163、164、165、166 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；
 (ii) CDR2 が、
 (c) 配列番号 245、279、280、281、282、および
 (d) 配列番号 245、279、280、281、282 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；
 (iii) CDR3 が、
 (e) 配列番号 361、395、396、397、398、および
 (f) 配列番号 361、395、396、397、398 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される、イムノグロブリン構築物に関する。

10

【0215】

一態様では、本発明は、前記第1のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

- (i) CDR1 が、
 (a) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158、および
 (b) 配列番号 131、132、134、140、144、146、150、151、152、153、155、158 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；
 (ii) CDR2 が、
 (c) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274、および
 (d) 配列番号 247、248、250、256、260、262、266、267、268、269、271、274 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；
 (iii) CDR3 が、
 (e) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390、および
 (f) 配列番号 363、364、366、372、376、378、382、383、384、385、387、390 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

20

30

前記第2のISVDが、本質的に、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1からFR4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1からCDR3）からなり、

- (i) CDR1 が、
 (a) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58、および
 (b) 配列番号 1、3、4、9、10、20、43、44、45、46、51、52、53、54、55、56、57、58 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；
 (ii) CDR2 が、
 (c) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290、および
 (d) 配列番号 233、235、236、241、242、252、275、276、277、278、283、284、285、286、287、288、289、290 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

40

50

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される、イムノグロブリン構築物に関する。

【 0 2 1 6 】

一態様では、本発明は、前記第 1 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、および

(b) 配列番号 1 2 9、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、および

(d) 配列番号 2 4 5、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、および

(f) 配列番号 3 6 1、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

前記第 2 の I S V D が、本質的に、4 つのフレームワーク領域 (それぞれ、F R 1 から F R 4) および 3 つの相補性決定領域 (それぞれ、C D R 1 から C D R 3) からなり、

(i) C D R 1 が、

(a) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、および

(b) 配列番号 1、3、4、9、1 0、2 0、4 3、4 4、4 5、4 6、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(i i) C D R 2 が、

(c) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、および

(d) 配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 6、2 4 1、2 4 2、2 5 2、2 7 5、2 7 6、2 7 7、2 7 8、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択され；

(i i i) C D R 3 が、

(e) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、および

(f) 配列番号 3 4 9、3 5 1、3 5 2、3 5 7、3 5 8、3 6 8、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6 のアミノ酸配列に対し 4、3、2 または 1 アミノ酸の相違を有するアミノ酸配列、からなる群から選択される、イムノグロブリン構築物に関する。

【 0 2 1 7 】

一態様では、本発明は、前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが同一

10

20

30

40

50

である、イムノグロブリン構築物に関する。

【0218】

一態様では、本発明は、前記第1のISVDがCD38の第1のエピトープと結合し、前記第2のISVDがCD38上の第2のエピトープと結合し、前記第1のエピトープが前記第2のエピトープと異なり、好ましくは前記第1のエピトープが前記第2のエピトープと重複しない、イムノグロブリン構築物に関する。

【0219】

本発明の一価のポリペプチドおよび本発明の多価ポリペプチド（本発明のイムノグロブリン構築物に含むか否かを問わない）は、1つ以上の他の基、残基、部分または結合単位をさらに含んでもよく、またはさらに含まなくともよい。これらの一価のポリペプチドおよび多価ポリペプチド（更なる基、残基、部分または結合単位の有無を問わない）はいずれも、「本発明の化合物」、「本発明の構築物」および/または「本発明のポリペプチド」と呼ばれる。

【0220】

例えば、かかる更なる基、残基、部分または結合単位は、1つ以上の更なるアミノ酸配列でもよく、そうすると、当該ポリペプチドは（融合）タンパク質または（融合）ポリペプチドとなる。好適かつ非限定的な側面では、前記1つ以上他の基、残基、部分または結合単位は、イムノグロブリンである。さらにより好ましくは、前記1つ以上他の基、残基、部分または結合単位は、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸、「dAb」、dAbとしての使用に適するアミノ酸、ナノボディ（例えば例えばVHH、ヒト化VHHまたはラクダ化VH配列）からなる群から選択されるイムノグロブリン単一可変ドメインである。

【0221】

上述の通り、更なる結合単位（例えば異なる抗原特異性を有するイムノグロブリン単一可変ドメイン）を連結して多重特異的なポリペプチドを形成することができる。2以上の特異性のイムノグロブリン単一可変ドメインを結合することによって、二重特異性、三重特異性等の構築物を形成することができる。例えば、本発明のポリペプチドは、1つ、2つ、3つまたはそれ

以上のCD38に対するイムノグロブリン単一可変ドメインと、他の標的に対する1つのイムノグロブリン単一可変ドメインと、を含んでもよい。かかる構築物およびその修飾物はいずれも、（当業者に容易に想定できるように）、「本発明の化合物、本発明の構築物および/または本発明のポリペプチド」という本明細書で用いられる用語に包含される。

【0222】

上記の化合物、構築物および/またはポリペプチドにおいて、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のイムノグロブリン単一可変ドメイン、および1つ以上の基、残基、部分または結合単位は各々、直接に、および/または1つ以上の適切なリンカーまたはスペーサを介して連結されてもよい。例えば、1つ以上の基、残基、部分または結合単位がアミノ酸配列であるとき、リンカーはアミノ酸配列でもよく、その結果、得られるポリペプチドは融合（タンパク質）または融合（ポリペプチド）となる。

【0223】

1つ以上の更なる基、残基、部分または結合単位は、いかなる適切なおよび/または目的のアミノ酸配列でもあってもよい。更なるアミノ酸配列は、本発明のポリペプチドの（生物学的）特性を変化させても、または変化させなくともよく、影響してもよく、また、本発明のポリペプチドに更なる官能性を付与しても、または付与しなくともよい。好ましくは、更なるアミノ酸配列は、それが本発明のポリペプチドに1つ以上の所望の特性または官能性を付与するものである。

【0224】

かかるアミノ酸配列の例は、当業者に明らかであり、一般的には、通常抗体およびその断片に基づくペプチド融合において用いられるあらゆるアミノ酸配列（限定されないが、

10

20

30

40

50

S c F v および単一ドメイン抗体を含む)を含んでもよい。参照としては、例えばHolliger and Hudson (Nature Biotechnology 23: 1126-1136, 2005)によるレビューが挙げられる。

【0225】

例えば、かかるアミノ酸配列は、本発明のポリペプチドそれ自体と比較し、半減期、溶解性または吸収を増加させ、免疫原性または毒性を減少させ、好ましくない副作用を排除または軽減し、および/または他の有利な特性を付与し、および/または、本発明の化合物、構築物またはポリペプチドの望ましくない特性を減少させるアミノ酸配列でもよく、またはそうでなくてもよい。かかるアミノ酸配列の幾つかの非限定的な例は、血清タンパク質であり、例えばヒト血清アルブミン(例えば国際公開第00/27435号を参照)またはハプテン分子(例えば循環抗体により認識されるハプテン、例えば国際公開第98/22141号を参照)である。

10

【0226】

タグまたは他の機能性部分(例えば毒素、標識、放射性化学物質など)をさらに含む、本発明のイムノグロブリンまたはポリペプチドを含む化合物、構築物および/またはポリペプチドも本発明に包含される。

【0227】

あるいは、更なる基、残基、部分または結合単位は、例えば、単独で生物学的におよび/または薬理的に活性を有するか、または活性を有さない化学基、残基、部分であってもよい。例えば、限定されないが、かかる基は、本発明の1つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインまたは一価のポリペプチドに連結されることにより、本発明のポリペプチドの「誘導体」を形成しうる。

20

【0228】

したがって、本発明は最も広義には、本発明のポリペプチドの誘導体である化合物、構築物および/またはポリペプチドも包含する。かかる誘導体は一般的には、本発明のポリペプチド中の、および/または本発明のポリペプチドを形成するアミノ酸残基の1つ以上の修飾によって、具体的には化学的および/または生物学的(例えば酵素的)修飾によって得ることが可能である。

【0229】

かかる修飾の例、ならびに、かかる修飾および潜在的用途およびかかる修飾による利点を導入するために用いることができる態様、方法および技術により修飾できるポリペプチド配列中の(すなわちタンパク質骨格、または好ましくは側鎖上への)アミノ酸残基の例は、当業者に明らかである(Zangi et al., Nat Biotechnol 31(10):898-907, 2013を参照)。

30

【0230】

例えば、かかる修飾では、(例えば共有結合的な連結、または他のいずれかの好適な方法により)、本発明のポリペプチドの内部および表面への1つ以上の官能基、残基または、部分への、特に、1つ以上の官能基、残基または部分への導入を行ってもよく、それにより、本発明のポリペプチドに1つ以上の所望の特性または官能性が付与される。かかる官能基の例は、当業者に明らかである。

40

【0231】

例えば、かかる修飾では、(例えば共有結合的な連結、または他のいずれかの好適な方法により)、1つ以上の官能基の導入を行ってもよく、それにより、本発明のポリペプチドの半減期、溶解性および/または吸収性が増加し、本発明のポリペプチドの免疫原性および/または毒性が減少し、本発明のポリペプチドのいずれかの好ましくない副作用を排除または軽減し、および/または、他の有利な特性を付与し、および/または、本発明のポリペプチドの望ましくない特性を減少させ、または前記の2つ以上のいかなる組合せを生じさせる。かかる官能基、およびそれらを導入する技術の例は当業者に明らかであり、通常、前記で引用した一般的な先行文献に記載のいずれの官能基および技術、ならびに、医薬用タンパク質の修飾のための、特に、抗体または抗体断片(S c F v および単一ドメ

50

イン抗体を含む)の修飾のための官能基および公知技術それ自体が含まれ、参照として、例えばRemington (Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980)が挙げられる。かかる官能基は、例えば、本発明のポリペプチドに(例えば共有結合で)直接連結されてもよく、または任意に適切なリンカーまたはスペーサを介して連結されてもよく、これらはまた当業者に明らかである。

【0232】

更なるアミノ酸残基は、本発明のポリペプチドの他の(生物学的)特性を変化させるかもしくはないか、変更するか、あるいは影響するものであってもよく、また本発明のポリペプチドに、更なる官能性を付与するかまたは付与しなくともよい。例えば、かかるアミノ酸残基は以下のとおりである：

a) 例えば異種起源の宿主細胞または宿主生物における発現の結果として、N末端Met残基を含みうる。

b) 合成により、宿主細胞からポリペプチドを分泌させるシグナル配列またはリーダー配列を形成できる(例えば、本発明のポリペプチドの発現に用いる宿主細胞に応じて、本発明のポリペプチドをプレ、プロまたはプレプロ形態とすることができる)。適切な分泌リーダーペプチドは当業者に明らかであり、本明細書においてさらに記載されうる。通常、かかるリーダー配列はポリペプチドのN末端基に連結されるが、最も広義の態様における本発明はそれに限定されない。

c) 例えば、前記配列または残基に対する親和性に基づく技術を用い、「タグ」(例えばポリペプチドの精製を可能にまたは容易にするアミノ酸配列または残基)を形成できる。その後、前記配列または残基を(例えば化学的または酵素的切断によって)除去し、ポリペプチドを得ることができる(その際、前記タグは任意に、切断可能なリンカー配列を介してアミノ酸配列またはポリペプチド鎖に連結されてもよく、または切断可能モチーフを含んでもよい)。かかる残基の幾つかの好適かつ非限定的な例は、複数のヒスチジン残基、グルタチオン残基およびmycタグ(例えばA A A E Q K U S E E D L N G A A、配列番号206)である。

d) 官能化された、および/または、官能基の結合部位として機能しうる1つ以上のアミノ酸残基でもよい。適切なアミノ酸残基および官能基は当業者に明らかで、本発明のポリペプチドの誘導体の場合、本明細書に記載のアミノ酸残基および官能基が含まれるが、これらに限定されない。

【0233】

一態様では、本発明は、1つ以上の他の基、残基、部分または結合単位(任意に1つ以上のペプチドのリンカーを介して連結される)をさらに含む、本明細書に記載されるポリペプチドに関する。

【0234】

本発明の具体的側面では、本発明の対応するポリペプチドと比較し増加した半減期を有する化合物または構築物を調製する。かかる半減期延長部分を含む本発明のポリペプチドの例としては、限定されないが、例えば、イムノグロブリン単一可変ドメインが、1つ以上の血清タンパクまたはその断片(例えば(ヒト)血清アルブミンまたはその適切な断片)、または、血清タンパク質(例えば血清アルブミン(例えばヒト血清アルブミン))と結合できる1つ以上の結合単位(例えばドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸、単一ドメイン抗体、単一のドメイン抗体としての使用に適するアミノ酸、「dAb」、dAbとしての使用に適するアミノ酸、ナノボディ、VHH配列、ヒト化VHH配列またはラクダ化VHH配列)、血清イムノグロブリン(例えばIgG)、トランスフェリンまたは国際公開第04/003019号に列挙されるいずれか1つの他の血清タンパク質、に適切に連結されたポリペプチド、イムノグロブリン単一可変ドメインが、Fcドメイン(例えばヒトFc)、抗体定常領域(例えばIgG由来の抗体定常領域)またはその適切な一部または断片に連結されたポリペプチド、または、1つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインが、血清タンパクと結合できる1つ以上の小分子タンパク質またはペプチドに最適に連結されたポリペプチド(例えば、限定されないが、国際公開第91/01

10

20

30

40

50

743号、国際公開第01/45746号または国際公開第02/076489号に記載のタンパク質およびペプチド)が挙げられる。参照としては、dAbについては国際公開第03/002609号および国際公開第04/003019号、Harmsen et al. (Vaccine 23: 4926-42, 2005)、欧州特許出願公開第0368684号、ならびにAblynx社による国際公開第08/028977号、国際公開第08/043821号および国際公開第08/068280号、ならびに国際公開第08/043822号が挙げられる。

【0235】

具体的かつ非限定的な本発明の側面では、本発明のポリペプチドは、CD38に対する本発明の1つ以上のIg単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチドの他に、ヒト血清アルブミンに対する少なくとも1つのIg単一可変ドメインを含んでもよい。これらのヒト血清アルブミンに対するイムノグロブリン単一可変ドメインは、前述のAblynx社による出願に広義に記載されているものであってもよい(例えば国際公開第04/062551を参照)。増加した半減期を付与し、本発明のポリペプチドにおいて使用できる幾つかの特に好ましいナノボディとしては、国際公開第06/122787号(表IIおよびIIIを参照)において開示されるナノボディALB-1からALB-10が挙げられ、中でも、ALB-8(国際公開第06/122787号の配列番号62)、ならびに国際公開第2012/175400号において開示されるナノボディ(国際公開第2012/175400号の配列番号1~11)、および「改良されたイムノグロブリン単一可変ドメイン」の名称の出願係属中の米国仮特許出願第62/047,560号(出願日:2014年9月8日、出願人:Ablynx社)において開示される配列番号109のナノボディが特に好ましい。

10

20

【0236】

特に好適かつ非限定的な本発明の側面では、本発明は、少なくとも1つのイムノグロブリン単一可変ドメイン(ISVD)と、さらに本明細書に記載されるイムノグロブリン単一可変ドメインと結合する1つ以上の(好ましくは1つの)血清アルブミン、例えば、Alb11、Alb23、Alb129、Alb132、Alb8、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG(表A-4を参照)のイムノグロブリン単一可変ドメインと結合する血清アルブミンと、を含む、本発明のポリペプチドを提供する。

30

【0237】

【表 1】

表A-4: 血清アルブミン結合性ISVD配列(「ID」は本明細書で用いられる配列番号を指す)

名称	ID	アミノ酸配列
Alb8	468	EVQLVESGGGLVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS
Alb23	469	EVQLLESGGGLVQPGLNSLRSLCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS
Alb129	470	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA
Alb132	471	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPWVSSISGSGSDTLYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA
Alb11	472	EVQLVESGGGLVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS
Alb11 (S112K)-A	473	EVQLVESGGGLVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA
Alb82	474	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS
Alb82-A	475	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSA
Alb82-AA	476	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSAA
Alb82-AAA	478	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSAAA
Alb82-G	479	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSG
Alb82-GG	480	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGG
Alb82-GGG	481	EVQLVESGGGVVQPGLNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGG

10

20

【0238】

したがって、本発明のポリペプチドは、例えば三価の、二重特異性ポリペプチドでもよく、2つのイムノグロブリン単一可変ドメイン、好ましくは本発明のCD38に対する一価のポリペプチドと、(ヒト)血清アルブミンを標的とする第3のイムノグロブリン単一可変ドメインと、を含み、前記第1、第2および第3のイムノグロブリン単一可変ドメインは、1つ以上、特に3つのリンカー配列を介して任意に連結されてもよい。

30

【0239】

エフェクター機能を提供するように本発明のポリペプチドに最適に連結されうる他のアミノ酸配列は、当業者に明らかであり、所望のエフェクター機能を基礎として選択される。参照としては、例えば国際公開第04/058820号、国際公開第99/42077号、国際公開第02/056910号および国際公開第05/017148号、ならびに上記のHolliger and Hudsonのレビュー、ならびに国際公開第09/068628号が挙げられる。Fc部または抗体定常領域に対する本発明のポリペプチドのカップリングにより、本発明の対応するポリペプチドと比較し、増加した半減期がもたらされうる。

40

【0240】

本発明の1つ以上のポリペプチドと、長いインビボ半減期を有する1つ以上の定常ドメインを含む他の適切な構築物が、当業者に明らかである。一般的に、増加した半減期を有するいかなる融合タンパク質または誘導体は、好ましくは50kD以上の分子量(腎臓吸収のためのカットオフ値)を有する。

【0241】

他の具体的かつ非限定的な側面では、本発明のポリペプチドは、天然、合成または半合成の定常ドメイン(またはその類縁体、誘導体、変異体、部分または断片)に、(任意に適切なリンカーまたはヒンジ領域を介して)連結させてもよく、それらはイムノグロブリ

50

ン構築物（すなわち従来の４鎖型抗体で天然に存在する定常ドメインと比較し）の自己会合が減少する（または本質的にない）傾向がある。かかるモノマーとしての（すなわち自己会合しない）Fc鎖誘導体またはその断片は、当業者に明らかである。例えば、Helm et al. (J. Biol. Chem. 271: 7494, 1996)は、本発明のポリペプチド鎖に使用できるモノマー状のFc鎖誘導体を記載する。

【0242】

また、かかるモノマー状Fc鎖異型は、好ましくは、（由来するFc部に応じて）補体または適切なFc受容体と結合することが未だできるもの、および／または、由来するFc部のエフェクター機能の一部もしくは全部を未だ有する（または未だ目的とする使用に適するレベルへの減少にとどまっている）ものである。あるいは、本発明のかかるポリペプチド鎖では、モノマー状Fc鎖は、ポリペプチド鎖に増加した半減期を付与するために使用でき、その場合、モノマー状Fc鎖は完全にまたは本質的にエフェクター機能を有さないものであってもよい。

10

【0243】

通常、増加した半減期を有する本発明のポリペプチドは、好ましくは、対応するイムノグロブリン単一可変ドメインまたは本発明のポリペプチドそれ自体の半減期と比較し少なくとも１．５倍、好ましくは少なくとも２倍、例えば少なくとも５倍、例えば少なくとも１０倍または２０倍、半減期が長い。通常、増加した半減期を有する本発明のポリペプチドは、好ましくは、対応するイムノグロブリン単一可変ドメインまたは本発明のポリペプチドそれ自体の半減期と比較し、１時間以上、好ましくは２時間以上、好ましくは６時間以上、例えば１２時間以上、または２４、４８または７２時間以上、半減期が長い。

20

【0244】

他の好適かつ非限定的な態様において、本発明のかかるポリペプチドは、少なくとも約１２時間、好ましくは少なくとも２４時間、より好ましくは、少なくとも４８時間、さらに好ましくは少なくとも７２時間以上のヒトの血清中半減期を示す。例えば、本発明のポリペプチドは、少なくとも５日（例えば約５～１０日）、好ましくは少なくとも９日（例えば約９～１４日）、好ましくは少なくとも１０日（例えば約１０～１５日）、または少なくとも約１１日（例えば約１１～１６日）、より好ましくは少なくとも約１２日（例えば約１２～１８日以上）、または１４日以上（例えば約１４～１９日）の半減期を有する。

30

【0245】

一態様では、本発明は、前記１つ以上の他の基、残基、部分または結合単位が、かかる基、残基、部分または結合単位のない対応するポリペプチドと比較し、増加した半減期を有するポリペプチドを提供する、本明細書に記載されるポリペプチドに関する。

【0246】

一態様では、本発明は、前記１つ以上の増加した半減期を有するポリペプチドを提供する他の基、残基、部分または結合単位が、ポリエチレングリコール、血清タンパク質またはその断片、血清タンパク質と結合できる結合単位、Fc部、抗体定常ドメイン、ならびに血清タンパク質と結合できる小分子タンパク質またはペプチドである、本明細書に記載されるポリペプチドに関する。具体的な例は、本発明のポリペプチドを（例えばPEG化によって）化学修飾し、その半減期を増加させた、本発明の誘導体ペプチドである（下記参照）。これは、半減期を増加させておよび／または医薬用タンパク質の免疫原性を低下させるために最も広く用いられる技術の１つであり、ポリ（エチレングリコール）（PEG）またはその誘導体（例えばメトキシポリ（エチレングリコール）またはmPEG）などの適切な薬理的に許容できるポリマーの付加を含む。一般的に、いかなる適切な形態のPEG化も使用可能であり、例えば抗体および抗体断片の分野で用いられるPEG化（限定されないが（単一）ドメイン抗体およびScFv）を用いることができ、参照としては、例えばChapman (Nat. Biotechnol. 54: 531-545, 2002)、Veronese and Harris (Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 453-456, 2003)、Harris and Chess (Nat. Rev. Drug. Discov. 2: 214-221, 2003)および国際公開第04/060965)が挙げられる。例えばNektar T

40

50

herapeutics社（米国）から、タンパク質のPEG化用の各種試薬も市販されている。

【0247】

好ましくは、特にシステイン残基を介する部位特異的PEG化が用いられる（例えばYang et al. (Protein Engineering 16: 761-770, 2003)を参照。例えば、この場合、本発明のポリペプチドに天然に存在するシステイン残基にPEGを付加することが可能であり、本発明のポリペプチドを、PEG付加用の1つ以上のシステイン残基が最適に導入されるよう修飾してもよく、または、PEG付加のための1つ以上のシステイン残基を含むアミノ酸配列を、本発明のポリペプチドのN末端および/またはC末端に融合させてもよく、いずれも、当業者に公知のタンパク質工学的技術を直接使用できる。

【0248】

好ましくは、本発明のポリペプチドの場合、5000ダルトン以上の、例えば10,000以上および200,000未満の、例えば100,000未満、例えば20,000~80,000ダルトンの範囲の分子量のPEGが用いられる。

【0249】

本発明のマーカポリペプチドの使用目的に応じて、さらにもう別の修飾として、1つ以上の検出可能マーカまたは他のシグナル発生基もしくは部分を導入してもよい。適切な標識およびそれらを付加し、使用し、検出する技術は、当業者に明らかであり、例えば、限定されないが、蛍光マーカ（例えばフルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレサミンおよび蛍光金属（例えばランタノイド由来の¹⁵²Euまたは他の金属）、リン光性標識、化学発光標識または生物発光標識（ルミナル、イソルミノール、セロマチック（theromatic）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、オキサレートエステル、ジオキセタンまたはGFPおよびその類縁体）、放射性同位元素（例えば³H、¹²⁵I、³²P、³⁵S、¹⁴C、⁵¹Cr、³⁶Cl、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Feおよび⁷⁵Se）、金属、金属キレートもしくは金属カチオン（例えば^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹In、¹³¹I、⁹⁷Ru、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Gaなどの金属カチオン）、または特にインビボ、インビトロまたはin situでの診断およびイメージング用に適する他の金属もしくは金属カチオン（例えば¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶²Dy、⁵²Crおよび⁵⁶Fe）、ならびにクロモフォアおよび酵素（例えばリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ、-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ピオチンアビジンペルオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコール糖-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ）。他の適切な標識が、当業者に明らかであり、例えばNMRまたはESR分光法を使用して検出できる部分が挙げられる。

【0250】

本発明のかかるマーカポリペプチドは、例えばインビトロ、インビボまたはインサイチュアッセイ（ELISA、RIA、EIAなどの公知のイムノアッセイおよび他の「サンドイッチアッセイ」など）、ならびに（具体的な標識の選択により）インビボの診断およびイメージング目的に使用することができる。

【0251】

当業者に明らかであるように、例えば上記金属または金属カチオンの1つをキレートするために、キレート基を導入する他の修飾を行ってもよい。例えば、適切なキレート基として、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0252】

さらに別の修飾として、特定の結合対（例えばピオチン-（ストレプト）アビジン結合対）の一部分である官能基を導入してもよい。かかる官能基を用いることにより、結合対

10

20

30

40

50

の残り半分を結合させた他のタンパク質、ポリペプチドまたは化学物質に、いわゆる結合対の形成によって、本発明のポリペプチドを結合させることができる。例えば、本発明のポリペプチドは、ビオチンとコンジュゲートさせ、アビジンまたはストレプトアビジンとコンジュゲートさせた他のタンパク質、ポリペプチド、化合物または担体と連結させることができる。例えば、本発明のかかるコンジュゲートポリペプチドは、例えば検出可能なシグナル発生剤をアビジンまたはストレプトアビジンにコンジュゲートした診断システムにおいて、レポーターとして用いることができる。かかる結合対は、例えば本発明のポリペプチドを、医薬用途に適する担体などの担体に結合するために用いることもできる。1つの非限定的な例は、Cao and Suresh (Journal of Drug Targeting 8: 257, 2000)に記載のリボソーム製剤である。またかかる結合対を用いて、治療的活性剤を本発明のポリペプチドに連結させてもよい。

10

【0253】

他の有望な化学的および酵素的修飾も当業者に明らかである。研究用途（例えば機能-活性の関係の試験）用に、かかる修飾を導入してもよい。参照としては、例えばLundblad and Bradshaw (Biotechnol. Appl. Biochem. 26: 143-151, 1997)が挙げられる。

【0254】

好ましくは、前記化合物、構築物、ポリペプチドおよび/または誘導体は、本明細書において定義される（すなわち本発明のポリペプチドのために定義される）親和性（最適には、 K_D 値（実際のまたは見かけの）、 K_A 値（実際のまたは見かけの）、 K_{on} 速度および/または K_{off} 速度、あるいは本明細書にさらに記載される IC_{50} 値として測定され、および/または表される）により CD38 と結合する。かかる誘導体はまた、通常、本明細書で定義される CD38 効率および/または効力を有する。

20

【0255】

特異性の観点から、本発明のポリペプチドは、イメージング剤とのコンジュゲートに非常に適する。抗体へコンジュゲートするための適切なイメージング剤は公知であり、本発明のポリペプチドへのコンジュゲートにも同様に有用である。適切なイメージング剤としては、限定されないが、有機分子、酵素標識、放射能標識、有色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属錯体、金属、金コロイド、蛍光マーカー、金属標識、ビオチン、化学発光、生物発光、クロモフォアおよびそれらの混合物、からなる群から好ましくは選択される。

30

【0256】

したがって、本発明は、限定されないが、好ましくは有機分子、酵素標識、放射能標識、有色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属錯体、金属、金コロイド、蛍光マーカー、金属標識、ビオチン、化学発光、生物発光、クロモフォアおよびそれらの混合物群から選択される分子を含むイメージング剤をさらに含む、本発明のポリペプチドに関する。

【0257】

本発明のかかる化合物、構築物および/またはポリペプチド、およびその誘導体は、（本明細書で定義されるように）本質的に単離された形態であってもよい。

【0258】

本発明はさらに、本明細書に記載される化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞および組成物を調製する方法に関し、本明細書に記載される核酸分子または本明細書に記載される発現ベクターを含む宿主細胞が含まれる。

40

【0259】

幾つかの態様では、本発明のポリペプチドは、薬剤とコンジュゲートさせてポリペプチド-薬剤コンジュゲート（PDC）を形成する。同時の抗体-薬剤コンジュゲート（ADC）は、薬剤（例えば細胞毒性もしくは細胞増殖抑制性剤、毒素または毒素部分）の局所送達への抗体-薬剤コンジュゲートの使用が腫瘍への薬剤の標的・特異的送達を可能にする抗腫瘍用途において用いられ、より高い薬効、低い毒性等の提供を可能にする。これらのADCは、（1）モノクローナル抗体、（2）そのコンジュゲート用のリンカー、（3）

50

毒素部分または毒素、の3つの成分を有する。この技術の概要は、Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010)、Carter et al., Cancer J. 14(3): 154 (2008)、および Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009)に記載され、参照により全開示内容を本明細書に援用する。PDCはまた、(1)、ポリペプチド、(2)そのコンジュゲート用のリンカー、(3)薬剤(例えば毒素部分または毒素)の3つの成分を有する。当業者であれば、ADCの技術、方法、手段等がPDCに同様に適用できると認識するであろう。

【0260】

本発明は、薬剤(例えば毒素または毒素部分)を含む本発明のポリペプチド(本発明のイムノグロブリン構築物に含むか否かを問わず)を提供する。

10

【0261】

薬剤(例えば毒素部分または毒素)は、いかなる好適な方法を用いてポリペプチドに連結またはコンジュゲートすることもできる。通常、コンジュゲートは、公知のように、ポリペプチドへの共有結合によってなされ、一般的にはリンカー(通常ペプチド結合)に依存する。例えば、薬剤(例えば毒素部分または毒素)は、直接に、または適切なリンカーを介してポリペプチドに共有結合される。適切なリンカーとしては、切断不可能もしくは切断可能なリンカー(例えば、細胞内の酵素(例えば、細胞エステラーゼ、カテプシンBなどの細胞プロテアーゼ)のための切断部位を含むpH切断可能なリンカー)を含んでもよい(実施例のセクションを参照)。かかる切断可能なリンカーを用いることにより、ポリペプチドが内在化された後、薬剤(例えば毒素部分または毒素)を放出できるリガンドを調製できる。薬剤(例えばポリペプチドに対する毒素部分または毒素)を連結またはコンジュゲートする様々な方法が使用可能である。選択される具体的な方法は、薬剤(例えば連結またはコンジュゲートする毒素部分または毒素、およびポリペプチド)に依存する。必要に応じて、末端の官能基を含むリンカーを、ポリペプチドおよび薬剤(例えば毒素部分または毒素)の連結に使用できる。通常、コンジュゲーションは、反応性官能基を含む(または反応性官能基を有するために修飾された)毒素部分または毒素などの薬剤を、リンカーにより、または直接に、ポリペプチドと反応させることによって実施される。共有結合は、適切な条件で第2の化学基と反応できる化学成分または官能基を含む(または含むために修飾された)毒素部分または毒素などの薬剤を反応させ、それにより共有結合を形成させることによりなされる。必要に応じて、いずれかの好適な方法を用いて、適切な反応性化学基をポリペプチドに、またはリンカーに付加することができる(Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)を参照)。多くの適切な反応化学基の組合せが従来技術において公知であり、例えば、求電子基と反応できるアミン基、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)などが挙げられる。チオールは、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロイル、ピリジリジルスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール(TNB-チオール)などと反応できる。アルデヒド官能基はアミンまたはヒドラジド含有分子とカップリングでき、アジド基は三価のリン基と反応してホスホロアミデートまたはホスホロイミデート結合を形成できる。活性基を分子に導入する好適な方法が公知である(例えばHermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)を参照)。

20

30

40

【0262】

後述するように、PDCの薬剤はいかなる数の薬剤であってもよく、限定されないが、細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤(例えば化学療法剤)、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、菌類、植物または動物由来の酵素活性を有する毒素またはその断片)、毒素部分、または放射性同位元素(すなわちラジオコンジュゲート)が挙げられる。他の態様では、本発明はさらに、PDCの使用方法を提供する。

【0263】

本発明に用いられる薬剤には、(特に癌の処置に用いられる)細胞毒性剤が含まれる。かかる薬剤には、一般的には、DNA傷害剤、代謝拮抗剤、天然物質およびそれらの類縁

50

体が含まれる。典型的な細胞毒性剤の種類としては、酵素阻害剤が挙げられ、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤およびチミジル酸シンターゼ阻害剤、DNAインターカレータ、DNA切断酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリンファミリーの薬剤、ビンカルカロイド薬、マイトマイシン、ブレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、プテリジンファミリーの薬剤、ジイネン、ボドフィロトキシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、分化誘導剤およびタキソールが挙げられる。

【0264】

例えば、これらのクラスのメンバーとしては、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、メルファラン、ロイロシン、ロイロシダイン (leurosine)、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンC、マイトマイシンA、カミノマイシン、アミノプテリン、タリソマイシン、ボドフィロトキシンおよびボドフィロトキシン誘導体 (例えばエトポシドまたはリン酸エトポシド、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン)、タキサン (タキソール、タキソテールレチン酸、酪酸、N8-アセチルスペルミジン、カンプトセシン、カリケアマイシン、エスペラマイシン、エンジイン、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、カリケアマイシン、カンプトセシン、メイタンシノイド (DM1を含む)、モノメチルアウリスタチンE (MMAE)、モノメチルアウリスタチンF (MMAF) およびメイタンシノイド (DM4)) およびそれらの類縁体が挙げられる。

10

【0265】

薬剤 (例えば毒素) は、ポリペプチド-毒素コンジュゲートとして使用でき、細菌毒素 (例えばジフテリア毒素)、リシン (ricin) などの植物性毒素、小分子毒素 (例えばゲルダナマイシン) (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581, Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028, Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド (欧州特許出願公開第1391213号、Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、ならびにカリケアマイシン、(Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928, Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342) が挙げられる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合またはトポイソメラーゼ抑制を含むメカニズムによって、それらの細胞障害能および細胞抑止効果を発揮するものであってもよい。

20

30

【0266】

本発明のポリペプチドと、小分子毒素、例えばメイタンシノイド、ドラスタチン、アウリスタチン、トリコテセン、カリケアマイシンおよびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体のうちの1つ以上と、のコンジュゲートが本発明に包含される。

【0267】

本発明のポリペプチドにコンジュゲートできる抗腫瘍剤としては、BCNU、ストレプトゾisin、ピンクリスチンおよび5-フルオロウラシル、LL-E33288錯体として米国特許第5053394号、および第5770710号で記載される公知の薬剤のファミリー、ならびにエスペラマイシン (米国特許第5877296号) などの他の薬剤が挙げられる。

40

【0268】

使用できる薬剤、例えば酵素活性を有する毒素および断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖 (Pseudomonas aeruginosa由来)、細菌性シュードモナス外毒素PE38、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、-サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、ツルレイシ (Momordica charantia) 阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ (Saponaria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンが挙げられる。1993年10月28日に公開された国際公開

50

第 9 3 / 2 1 2 3 2 号を参照。

【 0 2 6 9 】

本発明にはさらに、本発明のポリペプチドと、核酸分解活性を有する化合物（例えばリボヌクレアーゼまたは DNA エンドヌクレアーゼ（例えばデオキシリボヌクレアーゼ）、DNase）との間で形成される PDC が包含される。

【 0 2 7 0 】

腫瘍の選択的な破壊のために、本発明のポリペプチドは、高放射性原子を含んでもよい。様々な放射性同位元素が、放射性標識コンジュゲート抗体の産生に利用できる。その例としては、At 211、I 131、I 125、Y 90、Re 186、Re 188、Sm 153、i 212、P 32、Pb 212 および Lu の放射性同位元素が挙げられる。

10

【 0 2 7 1 】

放射性標識または他の標識を、公知の方法に採用してもよい。例えば、生合成、または水素の代わりにフッ素 - 19 などを含む適切なアミノ酸前駆物質を使用した化学的アミノ酸合成によって、ペプチドを合成できる。Tc 99m または I 123、Re 186、Re 188 および In 111 などの標識を、ペプチドのシステイン残基を介して付加することができる。イットリウム 90 は、リジン残基を経て付加することができる。IODOGEN 法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) を用いてヨウ素 123 を導入できる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989) に詳細に他の方法が記載されている。

【 0 2 7 2 】

ADC の分野の当業者に公知のいずれかの技術を用い、ポリペプチド - 薬剤コンジュゲート化合物を産生することができる。簡潔には、ポリペプチド - 薬剤コンジュゲート化合物は、抗体単位としての本発明のポリペプチド、薬剤、および任意に薬剤と結合剤を接続するリンカーを含みうる。

20

【 0 2 7 3 】

薬剤または抗体 - 薬剤コンジュゲートが、細胞に対する細胞増殖抑制性および / または細胞傷害性効果を及ぼすか否かを決定する方法は公知である。一般的に、抗体 - 薬剤コンジュゲートの細胞傷害性または細胞増殖抑制活性などの効果は、以下のとおり測定することができる：

細胞培地中で、標的タンパク質を発現する哺乳動物細胞に抗体 - 薬剤コンジュゲートを曝露させる；

30

約 6 時間から約 5 日の期間、細胞をインキュベートする；

および細胞生存度を測定する。

細胞ベースのインビトロアッセイを用いて、抗体 - 薬剤コンジュゲートによる生存度（増殖）変化、細胞傷害性およびアポトーシス（カスパーゼ活性化）誘導を測定することができる。これらの方法は、PDC にも同様に適用できる。

【 0 2 7 4 】

したがって、本発明は、さらに薬剤（例えば毒素または毒素部分またはイメージング剤）を含む、本発明のポリペプチド（本発明のイムノグロブリン構築物に含まれるか否かを問わず）に関する。明確さを期すため、本発明はまた、薬剤（例えば毒素または毒素部分またはイメージング剤）をさらに含む、（本発明のポリペプチドを含む）イムノグロブリン構築物に関する。

40

【 0 2 7 5 】

本発明の多価ポリペプチドは、一般的には、少なくとも本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび / または一価のポリペプチドを、本発明の 1 つ以上の更なるイムノグロブリン単一可変ドメインおよび / または一価のポリペプチドに、任意に 1 つ以上の適切なリンカーを介して適切に連結させ、本発明の多価ポリペプチドを得るステップを含む方法により調製できる。本発明のポリペプチドはまた、一般的には、本発明のポリペプチドをコードする核酸を準備し、好適な方法で前記核酸を発現させ、発現された本発明のポリペプチドを回収する、ステップを少なくとも含む方法によって調製できる。かかる方法は

50

公知の方法で実施することができ、（例えば本明細書にさらに記載される方法および技術を基礎とし）当業者に明らかである。

【0276】

本発明の多価ポリペプチドを調製する方法は、好適な方法で本発明および例えば1つ以上のリンカーの二つ以上のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチドを連結するステップを少なくとも含んでもよい。本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチド（およびリンカー）は、従来技術において公知のいずれかの方法によって、また本明細書にさらに記載されている方法で連結できる。好適な技術としては、本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチド（およびリンカー）をコードする核酸配列を連結し、多価ポリペプチドを発現する遺伝子構築物を調製することが挙げられる。アミノ酸または核酸を連結する技術は当業者に明らかであり、参照としては、標準的なハンドブックである、Sambrook et al. および Ausubel et al.（前記）、ならびに下記の実施例が挙げられる。

10

【0277】

本発明はまた、イムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または本発明の多価ポリペプチドを調製するための本発明の一価のポリペプチドの使用に関する。多価ポリペプチドの調製方法は、イムノグロブリン単一可変ドメインのおよび/または本発明の一価のポリペプチドを、任意に1つ以上のリンカーを介して、本発明の少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチドに連結させることを含む。次に、本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインまたは一価のポリペプチドを、結合ドメインまたは結合単位として用い、2つ（例えば二価ポリペプチドにおいて）、3つ（例えば三価ポリペプチドにおいて）、4つ（例えば四価において）またはそれ以上（例えば多価ポリペプチドにおいて）の結合単位を含む多価ポリペプチドを提供および/または調製する。この点、本発明のイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチドは、結合ドメインまたは結合単位として用いることにより、多価（例えば2つ、3つ、4つまたはそれ以上の結合単位を含む、本発明の二価、三価または四価）のポリペプチドを提供および/または調製する。

20

【0278】

本発明はまた、多価ポリペプチドを調製するための、本発明の（本明細書に記載される）イムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または（特に）一価のポリペプチドの使用に関する。多価ポリペプチドの調製方法は、イムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または本発明の一価のポリペプチドを、任意に1つ以上のリンカーを介して、本発明の少なくとも1つの更なるイムノグロブリン単一可変ドメインおよび/または一価のポリペプチドに連結させることを含む。

30

【0279】

本発明の多価ポリペプチドに用いられる適切なスペーサまたはリンカーは、当業者に明らかで、一般的に、アミノ酸配列を連結するために従来技術において使用されるいかなるリンカーまたはスペーサであってもよい。好ましくは、前記リンカーまたはスペーサは、医薬的使用を目的とするポリペプチドを構築する用途に適する。

【0280】

幾つかの特に好適なスペーサとしては、従来技術において抗体断片または抗体ドメインを連結するために用いられるスペーサおよびリンカーが挙げられる。これらには、上記で引用した一般的背景技術に記載のリンカー、ならびに、例えば従来技術において d i a b o d y または S c F v 断片を構築するために用いられるリンカーが挙げられる（しかしながら、この点、d i a b o d y および S c F v 断片の場合、使用するリンカー配列は、関連する V_H および V_L ドメインと一緒に完全な抗原結合部位を形成するのを可能にする長さ、柔軟性および他の特性を有さなければならないことに留意すべきであるが、本発明のポリペプチドにおいて使用するリンカーの長さまたは柔軟性については、各イムノグロブリン単一可変ドメインは完全な抗原結合部位を単独で形成するため、特に制限はない）。

40

【0281】

50

例えば、リンカーは適切なアミノ酸配列、具体的には1～50アミノ酸配列、好ましくは1～30、例えば1～10アミノ酸残基でありうる。かかるアミノ酸配列の幾つかの好適な例としては、 $(gly_x ser_y)_z$ 型などの $gly-ser$ リンカー（例えば $(gly_4 ser)_3$ または $(gly_3 ser_2)_3$ 、国際公開第99/42077号に記載）、ヒンジ様領域（例えば天然に存在する重鎖抗体のヒンジ領域または類似の配列（例えば国際公開第94/04678に記載）が挙げられる。

【0282】

他の特に好適な幾つかのリンカーを表A-5に示す。

【表2】

表A-5:リンカー配列（「ID」は本明細書で用いられる配列番号を指す）

名称	ID	アミノ酸配列
3A リンカー	482	AAA
5GS リンカー	483	GGGGS

7GS リンカー	484	SGGSGGS
8GS リンカー	485	GGGGCGGGS
9GS リンカー	486	GGGGSGGGS
10GS リンカー	487	GGGGSGGGGS
15GS リンカー	488	GGGGSGGGSGGGGS
18GS リンカー	489	GGGGSGGGSGGGGGGS
20GS リンカー	490	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
25GS リンカー	491	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
30GS リンカー	492	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
35GS リンカー	493	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
40GS リンカー	494	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

【0283】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される、前記少なくとも2つのISVDが互いに直接連結されるか、またはリンカーを介して相互に連結され、好ましくは、当該リンカーが配列番号482～494のリンカーの群から選択される、ポリペプチドを提供する。

【0284】

他の適切なリンカーとしては、一般的に、有機化合物またはポリマー（特に医薬用のタンパク質への使用に適するもの）が挙げられる。例えば、ポリ（エチレングリコール）部分が、抗体ドメインの連結に用いられる（例えば国際公開第04/081026号を参照）。

【0285】

使用するリンカーが本発明のポリペプチドに1つ以上の他の好ましい特性または官能性を付与し、および/または、（例えば本発明のポリペプチド誘導体に関して本明細書に記

10

20

30

40

50

載されるように)誘導体の形成のために、および/または官能基の結合のために1つ以上の部位を付与することも、本発明の範囲内である。例えば、1つ以上の荷電アミノ酸残基を含むリンカーは、親水性を向上させることができる一方、小さいエピトープまたはタグを形成するかまたは含むリンカーは、検出、同定および/または精製用に使用することができる。また、本明細書の開示に基づき、当業者であれば、任意に幾つかの限られたルーチン実験を行った後に、本発明の特定のポリペプチドへの使用に最適なリンカーを決定することができる。

【0286】

本発明のポリペプチドおよび核酸は、公知の方法をそのまま使用し調製することができ、それは本明細書における更なる記載から当業者に明らかである。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体の調製に関する公知の、具体的には、抗体断片(限定されないが(単一)ドメイン抗体およびScFv断片が含まれる)の調製のためのいずれかの方法をそのまま使用し調製することができる。ポリペプチドおよび核酸を調製する幾つかの好適かつ非限定的な方法には、本明細書に記載される方法および技術が含まれる。

10

【0287】

本発明のポリペプチドを産生する方法は、次のステップを含みうる：

- 適切な宿主細胞または宿主生物(また本明細書において「本発明の宿主」と称される)において、または本発明の前記ポリペプチドをコードする核酸(また本明細書において「本発明の核酸」と称される)の他の適切な発現系において、発現させるステップと、次に任意に：

20

- このようにして得られた本発明のポリペプチドを単離および/または生成するステップ。

【0288】

具体的には、かかる方法は、以下のステップを含みうる：

本発明の前記宿主が本発明の少なくとも1つのポリペプチドを発現および/または産生する条件下で、本発明の宿主を培養および/または維持するステップと、次に任意に、このようにして得られた本発明のポリペプチドを単離および/または精製するステップ。

【0289】

本発明はまた、本明細書に記載されるポリペプチドの組換え産生方法に関し、当該方法は、

30

- (a) 本発明の核酸分子の発現を可能にする条件下で本発明の宿主細胞を培養することと、
- (b) 培養物からポリペプチドを単離することと、を含む。

【0290】

したがって、本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸またはヌクレオチド配列(また「本発明の核酸」と呼ばれる)に関する。本発明の核酸は、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAの形態であってもよく、好ましくは二本鎖DNAの形態である。例えば、本発明のヌクレオチド配列は、ゲノムDNA、cDNAまたは合成DNA(例えば目的の宿主細胞または宿主生物における発現に特に適するコドン選択がなされたDNA)でもよい。

40

【0291】

本発明の一態様によれば、本明細書で定義されるように、本発明の核酸は本質的に単離された形態である。本発明の核酸はまた、ベクター(例えばプラスミド、コスミドまたはYAC)の形態であっても、ベクター中に存在しても、および/またはベクターの一部であってもよく、また本質的に単離された形態であってもよい。

【0292】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される核酸分子を含む発現ベクターに関する。

【0293】

本発明の核酸が、本明細書に記載される本発明のポリペプチドに関する情報に基づいて、

50

公知の方法をそのまま使用し調製または取得することができ、および／または、適切な天然の給源から単離することもできる。また、当業者に明らかなように、本発明の核酸を調製するために、幾つかのヌクレオチド配列、例えば、イムノグロブリン単一可変ドメインまたは本発明の一価のポリペプチドをコードする少なくとも2つの核酸、および例えば1つ以上のリンカーをコードする核酸は、好適な方法で連結されうる。

【0294】

本発明の核酸を生成させる技術は当業者に明らかで、例えば、限定されないが、自動化DNA合成、部位特異的変異導入、2つ以上の天然のおよび／または合成された配列（またはその2つ以上の部分）を結合すること、不完全長の発現産物の発現をもたらす変異の導入、1つ以上の制限酵素部位の導入（例えば適切な制限酵素を用いて容易に切断でき、および／またはライゲーションできるカセットおよび／または領域の作製）、および／または1つ以上の「ミスマッチ」プライマーを使用したPCR反応による変異導入が挙げられる。これらの、および他の技術は当業者に明らかであり、参照としては、標準的なハンドブックである、Sambrook et al.およびAusubel et al.（前記）、ならびに下記の実施例が挙げられる。

10

【0295】

本発明の核酸は、遺伝子構築物中に存在し、および／またはその一部である形態であってもよく、それは当業者に明らかである。かかる遺伝子構築物は、一般的に、1つ以上の公知の遺伝子構築物中のエレメント、例えば、1つ以上の適切な調節エレメント（例えば適切なプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど）、および本明細書において参照される遺伝子構築物の更なるエレメントと任意に連結した本発明の少なくとも1つの核酸を含む。本発明の少なくとも1つの核酸を含むかかる遺伝子構築物はまた、本明細書において「本発明の遺伝子構築物」と称される。

20

【0296】

本発明の遺伝子構築物は、DNAまたはRNAでもよく、好ましくは二本鎖DNAである。本発明の遺伝子構築物は、目的の宿主細胞または宿主生物の形質転換に適する形態、目的の宿主細胞のゲノムDNAへの導入に適する形態、または目的の宿主生物における自立複製、維持または遺伝に適する形態、であってもよい。例えば、本発明の遺伝子構築物は、ベクター（例えばプラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクターまたはトランスポゾン）の形態であってもよい。特に、前記ベクターは、発現ベクター、すなわちインビトロおよび／またはインビボで（例えば適切な宿主細胞、宿主生物または発現系において）遺伝子発現を可能にするベクターであってもよい。

30

【0297】

好適かつ非限定的な態様では、本発明の遺伝子構築物は、
a) 本発明の少なくとも1つの核酸、
b) 作動可能に連結した、プロモーターおよび任意に適切なターミネーターなどの1つ以上の調節エレメント、
および任意に c) 1つ以上の公知の遺伝子構築物の更なるエレメント、を含み、
これらの「調節エレメント」、「プロモーター」、「ターミネーター」および「作動可能に連結」の用語は、従来技術におけるそれらの通常の（さらに本明細書に記載される）意味を有し、遺伝子構築物に存在する前記「更なるエレメント」は、例えば3'または5' UTR配列、リーダー配列、選択マーカー、発現マーカー／レポーター遺伝子、および／または形質転換または導入（効率）を促進または増加できるエレメントでありうる。かかる遺伝子構築物におけるこれらの、また他の適切なエレメントは当業者に明らかであり、例えば使用する構築物のタイプ、目的の宿主細胞または宿主生物、目的の本発明のヌクレオチド配列を（例えば構成的に、一時的にまたは誘導可能な発現を介して）発現させる方法、および／または用いられる形質転換方法に依存しうる。例えば、抗体および抗体断片（限定されないが（単一）ドメイン抗体およびScFv断片を含む）の発現および産生のための公知の制御配列、プロモーターおよびターミネーターをそのまま、本質的に類似する方法で使用する。

40

50

【0298】

好ましくは、本発明の遺伝子構築物においては、少なくとも1つの前記本発明の核酸、前記調節エレメント、および任意に1つ以上の前記更なるエレメントは、各々「作動可能に連結され」、一般的には、それによりそれらが各々機能的な関係にあることを意味する。例えば、前記プロモーターがコード配列の転写および/または発現を開始し、または制御/調整することができる場合、プロモーターは、コード鎖に「作動可能に連結される」と考えられる（前記コード配列が前記プロモーターの「制御下」であると理解されなければならない）。通常、2つのヌクレオチド配列が作動可能に連結されるとき、それらは同じ方向を向き、また通常同じ読み枠で存在するであろう。それらはまた、通常本質的に隣接するが、これはまた必須ではない。

10

【0299】

本発明のヌクレオチド配列を、例えば、上記のSambrook et al.およびAusubel et al.,のような一般的な概説書の技術を使用して、上記の1つ以上の更なるエレメントに最適に連結することによって、本発明の遺伝子構築物が通常提供されうる。

【0300】

本発明の遺伝子構築物は多くの場合、公知の適切な（発現）ベクターをそのまま使用し、本発明のヌクレオチド配列を挿入することによって得られる。適切な発現ベクターの幾つかの好適かつ非限定的な例は、下記の実施例において使用され、ならびに本明細書において記載されるものである。

【0301】

一般的に、医薬用途のために、本発明のポリペプチド、化合物および/または（イムノグロブリン）構築物を、少なくとも1つの本発明のポリペプチド、化合物および/または（イムノグロブリン）構築物、ならびに少なくとも1つの薬理的に許容される担体、希釈液または賦形剤および/またはアジュバント、ならびに、任意に、1つ以上の薬学的活性を有するポリペプチドおよび/または化合物をさらに含む医薬調製物または組成物として調製できる。非限定的な例として、かかる製剤は、経口投与、非経口投与（例えば静脈内、筋肉内もしくは皮下注射、または静脈内点滴）、局所投与、吸入による投与、スキンパッチ、インプラント、坐薬など、による投与に適する形態であってもよく、非経口投与が、好ましい。かかる適切な投与形態（投与方法に応じて、固体状、半固体状、液体状）、ならびにその調製に用いられる方法および担体は、当業者に明らかであり、本明細書においてさらに記載されている。かかる製剤または組成物は、本明細書において一般的に「医薬組成物」と称される。ヒト以外の生物に用いられる製剤または組成物は、本明細書において一般的に「獣医用組成物」と称される。

20

30

【0302】

このように、更なる側面では、本発明は、本発明の少なくとも1つのポリペプチド、本発明の少なくとも1つの化合物、本発明の少なくとも1つの（イムノグロブリン）構築物または本発明の少なくとも1つの核酸と、少なくとも1つの好適な担体、希釈剤または賦形剤（すなわち医薬用途に適する）と、任意に1つ以上の更なる活性物質と、を含む医薬組成物に関する。具体的な側面では、本発明は、配列番号1～58または前記配列番号1～58に含まれるCDR、の少なくとも1つ、または配列番号117～174、233～290または349～406の少なくとも1つ（表A-1を参照）を含むISVDと、少なくとも1つの好適な担体、希釈剤または賦形剤（すなわち医薬用途に適する）と、任意に1つ以上の更なる活性物質と、を含む医薬組成物に関する。

40

【0303】

一般的に、本発明のポリペプチド、化合物および/または（イムノグロブリン）構築物は、公知のいかなる好適な方法をそのまま使用し製剤化および投与することができる。参照としては、例えば前記で引用した一般的背景技術（具体的には国際公開第04/041862号、国際公開第04/041863号、国際公開第04/041865号、国際公開第04/041867号および国際公開第08/020079号）、ならびに標準的なハンドブック、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishi

50

ng Company, USA (1990)、Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005)、またはHandbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (例えば252～255頁を参照)が挙げられる。

【0304】

本発明のポリペプチド、化合物および/または(イムノグロブリン)構築物は、通常抗体および抗体断片(ScFvおよびdiabodyを含む)および他の薬学的に活性を有するタンパク質のためのいずれかの公知の方法をそのまま使用し、製剤化および投与することができる。かかる製剤およびその調製方法は当業者に明らかであり、例えば非経口投与(例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、管こう内、動脈内または鞘内投与)、または局所投与(すなわち経皮または皮内投与)に適する調製物が挙げられる。

10

【0305】

非経口投与用の調製物は、例えば点滴または注射に適する無菌液、懸濁液、分散液またはエマルジョンであってもよい。例えば、かかる調製物のための好適な担体または希釈液として、国際公開第08/020079号の143頁に記載のものが挙げられるが、これに限定されない。通常、水溶液または懸濁液が好ましい。

【0306】

このように、本発明のポリペプチド、化合物および/または(イムノグロブリン)構築物は、例えば、薬理学的に許容されるビヒクル(例えば不活性希釈剤または吸収性の接触可能な担体)と組み合わせて、経口投与により全身投与されうる。それらは、ハードまたはソフトゼラチンカプセルに封入してもよく、錠剤中に圧縮してもよく、または患者の食物中に直接添加してもよい。処置的な経口投与の場合、本発明のポリペプチド、化合物および/または(イムノグロブリン)構築物は、1つ以上の賦形剤と組み合わせてもよく、消化可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェハなどの形態で用いられる。かかる組成物および調製物は、本発明のポリペプチド、化合物および/または(イムノグロブリン)構築物を少なくとも0.1%含まなければならない。組成物および調製物中のそれらのパーセンテージは、当然ながら変化し、好適には所定の単位用量形態において約2～約60重量%としうる。かかる処置的に有用な組成物中の本発明のポリペプチド、化合物および/または(イムノグロブリン)構築物の量は、有効量レベルが得られる程度の量である。

20

30

【0307】

錠剤、トローチ、ピル、カプセルなどはまた、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤および甘味料または香料(例えば国際公開第08/020079号の143～144頁に記載)を含んでもよい。単位用量形態がカプセルであるとき、上記のタイプの材料に加えて、液体担体(例えば植物油またはポリエチレングリコール)を含んでもよい。その他種々の物質を、コーティング剤として、あるいはその他固形状の単位用量形態の物理的形態を調節するために添加させてもよい。例えば、錠剤、ピルまたはカプセルをゼラチン、ワックス、シェラックまたは砂糖等でコーティングしてよい。シロップまたはエリキシルは、本発明のポリペプチド、化合物および/または構築物、甘味剤としてスクロースまたはフルクトース、防腐剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素および調味料(例えばサクラ

40

【0308】

経口投与用の調製物および製剤では、本発明の(イムノグロブリン)構築物は、胃内環境に抵抗し、腸に移動できるよう、腸溶性コーティングにより提供してもよい。さらに一般的に言えば、経口投与用の調製物および製剤は、消化管内のいかなる目的部位への送達のために最適に調製することができる。さらに、適切な坐薬を用いて消化管への送達を行ってもよい。

50

【0309】

本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物は、点滴または注射により、静脈内または腹腔内投与してもよい。具体例は、国際公開第08/020079号の144および145頁、または国際出願第PCT/EP2010/062975号（全文書）にさらに記載されている。

【0310】

局所投与の場合、本発明のポリペプチド、化合物および／または構築物は、純粋形態において投与でき、すなわちそのとき、それらは液体である。しかしながら、皮膚病理学的に許容できる担体との組み合わせで、固体または液体状の組成物または製剤として皮膚に投与することが一般的に望ましい。具体例は、国際公開第08/020079号の145

10

【0311】

本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物の有効な投与量は、動物モデルにおけるそれらのインビトロ活性およびインビボ活性を比較することにより決定できる。マウスおよび他の動物の有効量からヒトへの用量を推定する方法が公知であり、例えば米国特許第4938949号明細書を参照。

【0312】

一般的に、液体組成物（例えばローション剤）中の本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物の濃度は、約0.1～25重量％、好ましくは約0.5～10重量％である。半固体または固体状組成物（例えばゲルまたは粉末）中の濃度は、約0.1～5重量％、好ましくは0.5～2.5重量％である。

20

【0313】

処置上必要となる本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物の量は、選択される特定のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物のみならず、投与経路、処置しようとする症状の状態、ならびに患者の年齢および状態によっても変化し、また最後は担当医師または臨床医の裁量によっても変化する。また、本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物の投与量は、標的細胞、腫瘍、組織、移植または器官に応じて変化する。

【0314】

望ましい投与は、単回投与、または適切な間隔で投与される一日当たり2回、3回、4回またはそれ以上の分割投与において好適に行うことができる。各分割投与自体、例えば適切な投与間隔でさらに分割することができる。

30

【0315】

投与レジメンには、長期間の毎日投与が含まれうる。「長期間」とは、少なくとも2週間、好ましくは数週間、数か月または数年の期間を意味する。本明細書において教示されるルーチン試験のみを用い、当業者は、この用量範囲の必要な変更を決定できる。投与量は、何らかの合併症が生じた場合に、個々の医師により調整されてもよい。

【0316】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるポリペプチドまたは本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物を含む、医薬組成物に関する。

40

【0317】

本発明はさらに、本明細書に記載されるポリペプチド、化合物および／またはイムノグロブリン構築物、核酸、宿主細胞および組成物の用途および使用、ならびにCD38関連の疾患、障害または症状（例えば各種の癌および炎症性疾患）の予防および／または処置方法に関する。幾つかの好適かつ非限定的な用途および使用が、本明細書の更なる説明から明らかとなる。

【0318】

本発明のポリペプチド、化合物および／または構築物は通常、免疫応答を強化するために用いることができる。特に、本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物は、本明細書に記載されるような適切なアッセイによって測定した場合

50

、本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物がない場合のＣＤＣ活性の状態と比較し、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％以上、例えば１００％、ＣＤＣ活性を強化できる。

【０３１９】

別の側面では、本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物は、本明細書に記載されるような適切なアッセイによって測定した場合に、本発明のポリペプチド、化合物および／または（イムノグロブリン）構築物がない場合の個人の腫瘍、無進行生存および／または全体的な生存率と比較し、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％以上、例えば１００％、腫瘍成長を阻害し、腫瘍後退を誘導し、無進行生存を増加させ、および／または腫瘍を有する個人の全体的な生存率を向上させることができる。

10

【０３２０】

更なる態様において、本発明は、少なくとも１つのＣＤ３８関連の疾患、障害または症状の予防または処置のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物のおよび／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

20

【０３２１】

本発明の前後関係において、「予防または処置」という用語は、疾患を予防および／または処置することが含まれるのみならず、また一般的に、疾患の発症を防止し、減速させ、または疾患の進行を逆転させ、疾患に関連する１つ以上の徴候の発症を防止または遅延させ、疾患に関連する１つ以上の徴候を低減および／または緩和し、それらに関連するいかなる疾患および／または徴候の重症度および／または期間を減少させ、および／または、それらに関連するいかなる疾患および／または徴候重症度の増加を防止し、疾患によって生じるいかなる生理的損傷も予防、低減または逆転させること、また通常では、処置を受ける患者に有益なあらゆる薬理学的行動が含まれる。

30

【０３２２】

処置を受ける対象は、いかなる温血動物でもあってもよいが、特に哺乳動物、具体的にはヒトである。当業者に明らかなように、処置を受ける対象は、具体的には、本明細書に記載の疾患、障害および症状に罹患するか、またはそのリスクを有する人物である。

【０３２３】

本発明は、ＣＤ３８、その生物学的または薬理活性、および／またはＣＤ３８が関与する生物学的経路またはシグナル伝達、に関連する少なくとも１つの疾患、障害または症状の予防および／または処置のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物の中でおよび／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。具体的には、前記薬学的有効量は、ＣＤ３８、その生物学的または薬理的活性、および／またはＣＤ３８が関連する生物学的経路またはシグナル伝達を、刺激し、増強しまたはアゴナイズするのに十分な量、および／または、体内循環中において、ＣＤ３８、その生物学的または薬理的活性、および／またはＣＤ３８が関連する生物学的経路またはシグナル伝達（特にＣＤ３８により媒介される免疫応答）を刺激し、増強しまたはアゴナイズするのに十分なレベルの、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、および／または本発明の（イムノグロブリン）構築物を提供する量でありうる。

40

【０３２４】

50

本発明はまた、本発明のポリペプチド、本発明の化合物のおよび／または本発明の（イムノグロブリン）構築物を患者に投与することによって予防および／または処置できる少なくとも１つの疾患、障害または症状の予防または処置のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物および／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

【０３２５】

具体的には、本発明は、本明細書において、列記される疾患、障害および条件からなる群から選択される少なくとも１つの疾患、障害および／または条件の予防および／または処置のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物および／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

10

【０３２６】

本発明はまた、免疫応答（例えばＣＤＣ活性）を強化する方法に関する。

【０３２７】

本発明はまた、Ｔ細胞、Ｂ細胞またはナチュラルキラー細胞の増殖または活性化を強化する方法に関する。

【０３２８】

本発明はまた、腫瘍成長を阻害する方法に関する。

【０３２９】

本発明はまた、ＣＤ３８が媒介する疾患の予防および／または処置のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物および／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

20

【０３３０】

具体的には、本発明は、免疫応答（例えばＣＤＣ活性、ＡＤＣＣ活性、ＡＤＣＰ活性、ＣＤＣＣ活性、Ｔ細胞、Ｂ細胞またはナチュラルキラー細胞の増殖または活性化）を強化する方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物のおよび／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

30

【０３３１】

本発明はまた、腫瘍成長を阻害する方法に関する。前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物のおよび／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

【０３３２】

本発明はまた、癌の予防および／または処置のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効量の本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の（イムノグロブリン）構築物のおよび／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

。

【０３３３】

具体的には、本発明は、免疫応答の増加または活性化を強化する方法に関し、前記方法は、薬学的有効量の、少なくとも１つの配列番号１～５８または前記配列番号１～５８に含まれるＣＤＲ、または配列番号１１７～１７４、２３３～２９０または３４９～４０６の少なくとも１つを含むＩＳＶＤ、それを含む（イムノグロブリン）構築物および／またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

40

【０３３４】

本発明はまた、腫瘍成長を阻害する方法に関する。前記方法は、薬学的有効量の、少な

50

くとも1つの配列番号1～58または前記配列番号1～58に含まれるCDR、または配列番号117～174、233～290または349～406の少なくとも1つを含むISVD、それを含む(イムノグロブリン)構築物および/またはそれを含む医薬組成物を投与することを含む。

【0335】

一態様では、本発明は、CD38の発現増加によって特徴づけられる疾患の治療的処置方法に用いられる、本明細書に記載されるポリペプチド、本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物または本明細書に記載される医薬組成物に関する。

【0336】

一態様では、本発明は、高増殖性疾患または自己免疫性疾患の治療的処置方法に用いられる、本明細書に記載されるポリペプチド、本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物または本明細書に記載される医薬組成物に関する。

10

【0337】

一態様では、本発明は、バーキットリンパ腫、T細胞リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性的リンパ球性白血病(CLL)、多発性骨髄腫、慢性的骨髄性白血病(CML)、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、CD38発現固形腫瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、グレーブス病、シェーグレン症候群、多発性筋炎、水疱性類天疱瘡、糸球体腎炎、脈管炎または喘息、バラケル・サイモンズ(Barraquer-Simons)症候群、自己免疫心疾患、炎症性腸疾患、発作性夜間ヘモグロビン尿症、非定型溶血性尿毒症症候群および虚血再灌流傷害および移植臓器の拒絶の治療的処置への使用のための、本明細書に記載されるポリペプチド、本明細書に記載されるイムノグロブリン構築物または本明細書に記載される医薬組成物に関する。

20

【0338】

更なる態様では、本発明は、CD38発現する細胞の阻害および/または殺傷のための方法に関する。

【0339】

本発明のポリペプチドは、CD38の発現増加によって特徴づけられる疾患を診断する方法への使用に特に適する。診断は、CD38を高発現する細胞または組織の検出に基づく。これらの細胞および組織は、本発明のポリペプチドを結合させた後、適切なマーカーにより検出することができる。

30

【0340】

CD38の発現増加が関与する多数の疾患が報告されている。例えば、CD38の発現増加は、特定の高増殖性疾患(例えば前立腺腫瘍などの幾つかの悪性腫瘍、および特に血液癌(例えば非ホジキンリンパ腫))において示されている。慢性リンパ球性白血病(CLL)、多発性骨髄腫、慢性骨髄性白血病(CML)、急性骨髄性白血病(AML)および急性リンパ芽球性白血病(ALL)などの、Bリンパ球上のCD38の発現増加を示すリンパ腫は、この発現増加を基礎として診断することができる。

【0341】

新生物疾患に加え、特定の細胞におけるCD38の発現増加を示す自己免疫性疾患および炎症性疾患が公知である。例えば全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、多発性硬化症および喘息などのこれらの疾患は、本発明の抗原結合性ポリペプチドを使用して診断することができる。

40

【0342】

このように、本発明はまた、細胞におけるCD38の発現増加によって特徴づけられる疾患を診断する方法に関し、当該方法は、

(a) 患者のサンプルに存在するポリペプチドとCD38の複合体の形成を可能にする条件下で、患者から得た生体サンプルと本発明のポリペプチドとを接触させることと、

(b) 患者のサンプル中において、ポリペプチドとCD38発現細胞との複合体を検出することと、を含み、

50

ステップ (b) における複合体の存在は、C D 3 8 の発現増加によって特徴づけられる疾患への患者の罹患を示すものである。

【 0 3 4 3 】

診断される疾患は、好ましくは高増殖性疾患または自己免疫性疾患である。特に好ましくは、前記疾患は以下からなる群から選択される：パーキットリンパ腫、T細胞リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性的リンパ球性白血病 (C L L)、多発性骨髄腫、慢性的骨髄性白血病 (C M L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、C D 3 8 発現固形腫瘍、全身性エリテマトーデス (S L E)、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、グレーブス病、シェーグレン症候群、多発性筋炎、水疱性類天疱瘡、糸球体腎炎、脈管炎または喘息、バラケル・サイモンズ (Barraquer-Simons) 症候群、自己免疫心疾患、炎症性腸疾患、発作性夜間ヘモグロビン尿症、非定型溶血性尿毒症症候群および虚血再灌流傷害および移植臓器の拒絶。

10

【 0 3 4 4 】

本発明の好ましい態様では、悪性非ホジキンリンパ腫の診断方法は、好ましくは多発性骨髄腫、C L L、C M L、A M L または A L L である。

【 0 3 4 5 】

生体サンプルは、患者からの組織サンプル (例えば腫瘍から得た組織標本) であってもよい。それはさらに、例えば血液またはリンパ液などの体液サンプルでもよい。前記サンプルは、Bリンパ球および/またはTリンパ球を含む血液サンプルであってもよい。診断される疾患に応じて、体液の特定のフラクションでもよい。例えば、C L L、C M L、A M L または A L L の診断方法で分析される (B リンパ球を含む) 患者の血液フラクションである。

20

【 0 3 4 6 】

診断の間にステップ (b) で検出できる複合体の数を、同じ条件で分析された参照サンプルと比較する。参照サンプルは、検出しようとする疾患 (例えば多発性骨髄腫、C L L、C M L、A M L または A L L) について診断された患者由来のものであってもよい。この場合、患者の試料および参照サンプル中の複合体数がほぼ同一である測定結果は、当該患者がそれぞれの疾患に罹患する確率が高いと診断されることを示す。あるいは、参照サンプルは、健常な個人に由来するものであってもよい。この場合、参照サンプルと比較し、患者サンプル中の複合体数の測定値は著しく異なり、例えば増加しており、すなわちこの測定結果は、当該患者がそれぞれの疾患に罹患する確率が高いと診断されることを示す。

30

【 実施例 】

【 0 3 4 7 】

材料および方法：

タンパク質の産生およびラマの免疫：

酵母細胞の分泌タンパク質として3つの潜在的N結合グリコシル化部位が不活性化されたC D 3 8 変異体の細胞外ドメインが製造され、Hon Cheung Lee (香港) より厚意により提供された。C D 3 8 の真核生物発現ベクターは、Fabio Malavasi (トリノ) より厚意により提供された。S p e c o l アジュバント (4 0 0 μ L 総容積中 5 0 μ g) (Boersma、1992 #85、Koch-Nolte、2007 #2、Alzogaray、2011 #1) と共に乳化した精製組換えタンパク質を用い、2匹のラマ (Lama glama) (1 0、2 5 と表示) に皮下免疫した。2匹のラマ (5 3 8 および 5 3 9 と表示) に、c D N A のバリスティック免疫により免疫を行った。Judyith Appelton博士 (コーネル大学、N Y (デーリー、2 0 0 5 # 99)) の厚意により提供されたラマ 1 g G 2 および 1 g G 3 と反応するモノクローナル抗体を用いた血清の連続希釈系列において、組換えC D 3 8 をコーティングしたマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) 上のE L I S A によって、液性免疫応答をモニターした。第3または第4のブースター後、1 0 ~ 1 4 日後に動物から採血した。

40

【 0 3 4 8 】

50

ファージディスプレイライブラリーの構築およびCD38に特異的なナノボディの選抜

Ficoll-Paque (商標) (GE Healthcare社、Chalfont St Giles、UK) 勾配遠心により、単核細胞を120mlの血液から単離した。TRIzol試薬 (Invitrogen社、Carlsbad、CA) を用いてこれらの細胞から精製したRNAを基に、ランダム六量体プライマーを用いてcDNAを合成した。ナノボディをコードする領域を、ナノボディに特異的な縮重プライマーを用いたPCRにより増幅した。PCR産物をアガロースゲルから精製し、SfiIおよびNotI (NEB社、Ipswich、MA) により順次消化し、PelBリーダーペプチドの下流、キメラHis6x-Mycエピトープタグ (Zarebski, 2005 #86; Alzogaray, 2011 #1) の上流に、pHEN2ファージミドベクターにクローニングした。XL1-B1ue大腸菌 (Stratagene社、La Jolla、CA) を形質転換し、 $4.0 \times 10^5 \sim 10^7$ クロンの規模のライブラリーを得た。10倍過剰のM13KO7ヘルパーファージ (GE Healthcare社、Chalfont St Giles、UK) で感染させた形質転換体の培養液上清から、ファージ粒子をポリエチレングリコールにより沈殿させた。CD38を固定したマイクロタイタープレート (Nunc MaxiSorp社、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) 上で、またはCD38をトランスフェクションしたYac-1細胞を含む溶液中で、特異的ファージのパニングを実施した。ファージ粒子 (1.6×10^{14}) を、PBS (10%のCarbонат 無脂肪粉ミルク (Nestle社、Glendale、CA) 中、室温で攪拌しながら、60分間、CD38またはCD38トランスフェクション細胞とインキュベートした。十分に洗浄した後、結合したファージを、50mMのジエチルアミンによりELISAプレートから溶出させ、1Mのトリス-HCl (pH8) で中和した。トリプシン処理によって、トランスフェクション細胞からファージを溶出させた。同じ手順で、溶出させたファージをタイトレーションし、さらに1または2ラウンドのパニングに供した。TG1大腸菌細胞 (Stratagene社、La Jolla、CA) の感染を基に、すべてのステップにおいてファージ力価を測定した。プラスミドDNAをシングルコロニーから単離し、pHEN2に特異的なフォワードおよびリバースプライマーを使用してシーケンス解析を行った。

【0349】

ナノボディの産生および再フォーマッティング

HB2151大腸菌細胞 (GE Healthcare、Chalfont St Giles、UK) において、モノマーのナノボディを発現させた。細菌培養液のOD₆₀₀が0.5に達したときにIPTG (Roche社、Rotkreuz、Switzerland) によりタンパク質の発現を誘導し、細胞を37で3~4hさらに培養し、その後回収した。浸透圧ショックおよび高速遠心分離による細菌残渣の除去によって、ペリプラズムのライセートを得た。固定化金属アフィニティークロマトグラフィ (IMAC) によって、大腸菌のペリプラズムライセートからナノボディを簡易精製した。

【0350】

pCSE2.5ベクター (Schirrmann, 2010 #58) (Thomas Schirrmann氏 (Braunschweig) の厚意により提供された) に、NcoIおよびNotIを用いて、選抜されたナノボディのコード領域をサブクローニングした。(G4S)nリンカーを使用した、2つのナノボディを融合させるPCRによって、バイパラトピックナノボディを構築した。ヒンジおよびマウスIgG2cまたはヒトIgG1のFcドメインの上流にGSリンカーで連結された1または2個のナノボディをコードする配列を、pCSE2.5ベクターにサブクローニングすることによって、ナノボディFc融合フォーマットを作製した。公開された配列 (国際公開第2011/154453) を用いた遺伝子合成により、ガラツムマブscFv-Fc融合タンパク質を作製したが、その際、NcoIおよびNotI部位を側方に有する15GSリンカーを介してVHドメインおよびVLドメインを融合させ、ヒンジおよびマウスIgG2cまたはヒトIgG1のFcドメインの上流側に、pCSE2.5ベクターにクローニングした。

【0351】

無血清培地において培養した、一過的にトランスフェクションしたHEK-6E細胞内において、組換えmyc-hisタグ付きナノボディ、ナノボディ-Fc融合タンパク

質および s c F v - F c 融合タンパク質を発現させた。トランスフェクションの6日後、遠心分離により清澄な上清を回収した。細胞上清中のナノボディを、既知量のマーカータンパク質との比較において、SDS-PAGEおよびクーマシー染色によって定量した。その際、10 μ L 上清のサンプルを、標準タンパク質（アルブミン 4 μ g、IgH 2 μ g、IgL 1 μ g、リゾチーム 0.4 μ g、アルブミン 1 μ g、IgH 0.5 μ g、IgL 0.25 μ g、リゾチーム 0.1 μ g）と並べてサイズ分画を行った。組換え Nb の収量は、典型的に、0.5 ~ 3 μ / 10 μ L で変動した。

【0352】

Ni-NTA アガロース（Sigma社、St Louis、MO）を用い、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより Myc-His タグ付きナノボディを精製した。

10

【0353】

プロテイン G - セファロース（GE-Healthcare社）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、Fc-融合タンパク質を精製した。

【0354】

ELISA

組換え CD38（100 ng / 100 μ L PBS / ウェル）を、4 で一晩、96 ウェルの Nunc MaxiSorp プレート（Thermo Fisher Scientific社、Waltham、MA）に吸着させた。ウェルを PBS により二回洗浄し、5%の脱脂粉乳を含む PBS で室温で2時間ブロッキングした。ナノボディ含有ペリプラズムライセート（PBSで1:10に希釈）で30分間、ウェルをインキュベートした。PBS / 0.05%のTween 20で洗浄した後、結合したナノボディを、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗 C-myc の mAb 9E10（Sigma社、St Louis、MO）および基質としての（TMB）（Sigma社、St Louis、MO）で検出した。Victor3 ELISAリーダー（Perkin-Elmer社、Waltham、MA）を使用して450 nmの吸光度を測定した。

20

【0355】

アフィニティー解析では、10 μ g / ml の BSA 含有 PBS を用いて一価のナノボディの希釈系列を調製し、60分間ウェルをインキュベートした。PBS / 0.05% Tween 20により3回ウェルを洗浄した。結合した抗体を、基質としてペルオキシダーゼコンジュゲート抗 C-myc の mAb 9E10 および TMB を用いて検出した。

【0356】

エピトープ解析では、RTで30分間、過剰な一価のナノボディまたはナノボディ-Fc融合タンパク質（500 ng / 100 μ L の PBS、1% BSA）を用いてウェルをプレインキュベートした後、プレコンジュゲート VHH-抗 c-myc を添加し、RTで20分間、さらにインキュベートした。Victor3 ELISAリーダー（Perkin-Elmer社、Waltham、MA）を使用して450 nmの吸光度を測定した。

30

【0357】

FACS

ナノボディ含有ペリプラズムライセート（PBSで1:10に希釈）を用い、30分間、非トランスフェクション Yac-1 細胞およびヒト CD38 により安定にトランスフェクションした Yac-1 細胞をインキュベートした。PBS / 0.1% BSA による洗浄後、結合したナノボディを、FITC コンジュゲート抗 C-myc の mAb 9E10（Sigma社、St Louis、MO）により検出した。

40

【0358】

アフィニティー解析では、PBS / 0.1% BSA を用いて一価のナノボディの系列希釈を調製し、CD38-トランスフェクション細胞を60分間インキュベートした。PBS / 0.1% BSA により3回、細胞を洗浄した。結合した抗体を、FITC コンジュゲート抗 C-myc の mAb 9E10 を用いて検出した。

【0359】

Nb の解離の解析では、CD38 トランスフェクション細胞の2つの別々のアリコート

50

e x a 6 4 8 コンジュゲート N b とインキュベートした。細胞を 4 回洗浄し、F A C S 解析の前に、1 : 1 の比率で混合し、4 で 0、20、60 または 180 分間、さらにインキュベートした。幾つかの実験においては、細胞混合後、0、0.5 および 16 h において解析した。標的細胞からの N b の解離、および e F l u o r 4 5 0 標識された細胞との会合を、F l o w J o ソフトウェア (Treestar 社) を使用して解析した。

【0360】

エピトープ解析の場合、細胞を R T で 30 分間、過剰な一価のナノボディまたはモノクローナル抗体 (2 μ g / 100 μ L の P B S / 0.1 % B S A) とブレインキュベートし、その後、蛍光色素コンジュゲートナノボディ (0.5 μ L の P B S 中 500 n g) を添加し、R T で 20 分間さらにインキュベートした。細胞を洗浄し、BD-FACS Canto を用いたフローサイトメトリーにより解析した。FlowJo ソフトウェア (Treestar 社) を使用してデータを解析した。

10

【0361】

補体依存性の細胞傷害性アッセイ

骨髄腫 (L P - 1) またはパーキットリンパ腫 (Daudi、CA46、Jijoye 13) 細胞株を、N b - F c 融合タンパク質と共に 4 で 10 分間ブレインキュベートし、その後ヒト血清 (15 %) を添加し、37 で 1 h さらにインキュベートした。細胞を洗浄し、F A C S 解析の前に P B S / 0.2 % B S A / ヨウ化プロピジウム中に再懸濁した。

【0362】

骨髄腫患者から得た骨髄細胞を、フィコール密度勾配遠心により精製し、N b - F c 融合タンパク質と 4 で 10 分間ブレインキュベートし、その後ヒト血清 (15 %) を添加し、37 で 1 h さらにインキュベートした。細胞を洗浄し、C D 4 5 および C D 5 6 に対する蛍光色素コンジュゲート m A b を用いて、ならびに、適切な蛍光色素がコンジュゲートした C D 3 8 特異的 N b を用いて (ダラツムマブ - s c F v - F c により処置された細胞は N b - J K 3 6、パイパラトピック 2 1 1 - 1 0 G S - 1 2 1 N b - F c では N b - M U 5 2 3 に)、4 で 30 分間染色した。次に細胞を洗浄し、F A C S 解析の前に P B S / 0.2 % B S A / ヨウ化プロピジウム中に再懸濁した。

20

【実施例 1】

【0363】

免疫による C D 3 8 に特異的な重鎖抗体の誘導

30

4 匹のラマを C D 3 8 で免疫し、重鎖抗体を誘導した。具体的には、各種のプロトコルに従い、ラマ 10 および 25 を C D 3 8 の組換えヒト非グリコシル化細胞外ドメイン (配列番号 465) で免疫、ブースター免疫し、一方、他のラマ 538、539 を、基本的に先行文献 (Koch-Nolte et al 2007 FASEB J. 21:3490-3498) の記載に従い、C D 3 8 発現ベクター (完全配列を発現する) で免疫した。各ラマに、2 週間の投与間隔により 4 回、抗原の投与を行った。各投与は、プラスミドをコンジュゲートさせた金粒子 (1 ショットあたり 0.5 m g の金粒子上へ D N A を 1 μ g コンジュゲート) を、皮膚に 600 p s i の圧力で 12 ショット投与することで行った。最終的な遺伝子免疫の 3 週間後、2 \times 10⁷ の C D 3 8 でトランスフェクションした H e k 2 9 3 細胞を単回ブーストした。時間経過に伴う体液性免疫応答の誘導をモニターするため、定期的に血液サンプルを採取した。B 細胞組織の単離のため、第 4 の D N A 免疫の 3 および 9 日後 (P B L 1 および P B L 2)、ならびに細胞ブーストの 4 および 8 日後 (P B L 3 および P B L 4) に、これらの動物から血液を採取した。製造業者の指示に従い、フィコールハイバックを使用し、血液サンプルから末梢血単核細胞を調製した。プロテイン G およびプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより、ラマ血清からイムノグロブリンサブクラスを精製した。最初に、免疫後の血清をプロテイン G - セファロースカラムにアブライした。結合した I g G タンパク質の溶出の際、サブタイプに従った分画が実施されるように (25)、緩衝液の pH 値を選択した。重鎖 1 g G 2 c サブタイプ抗体を pH 3.5 で溶出させ、一方、I g G 1 抗体をカラムから pH 2.7 で溶出させた。プロテイン G カラムに結合しなかったフラクションをプロテイン A カラムにアブライした。pH 4.5 および 2.7 において、

40

50

重鎖 I g G 2 b サブタイプ抗体が溶出された。I g G サブクラスの精製を S D S - P A G E ゲル電気泳動により確認した。

【 0 3 6 4 】

体液性免疫応答の誘導に成功したこと、および免疫血清の反応性、ならびに精製された I g G サブクラスを E L I S A により確認した。対照抗原 E D I N (Staphylococcus aureus 由来の酵素 - 毒素) と比較し、免疫後血清および精製 I g G サブクラスは、組換えヒト C D 3 8 に対する具体的な反応性を示した (データ示さず) 。

【 実施例 2 】

【 0 3 6 5 】

免疫したラマのファージディスプレイライブラリーに由来する、C D 3 8 特異的な V H H の選抜および配列解析

ファージディスプレイライブラリーを作製するため、RNeasy Midi キット (Qiagen GmbH 社、Hilden) を用い、最終注入後のラマの末梢血リンパ球から R N A を単離し、逆転写によって c D N A に変換させた。逆転写の際、R N A 中の異なる位置で結合するランダムヘキサマーを用いた。V H H をコードする c D N A を P C R により増幅した。要約すると、V H H ライブラリーのファージディスプレイを容易にするように設計されたファージミドベクター (p H E N 2、C 末端 6 H I S および m y c タグを含む) に、P C R 増幅された V H H レパートリーを、特定の制限酵素部位を介してクローニングした。次にライゲーション産物で大腸菌を形質転換し、V H H 断片を発現するファージライブラリーを作成した。標準的なプロトコル (例えば、本明細書において引用する A b l y n x 社による国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 5 号、国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 3 号、国際公開第 0 4 / 0 6 2 5 5 1 号、国際公開第 0 5 / 0 4 4 8 5 8 号および他の従来技術および出願を参照) に従い、ファージを調製した。各 1 2 個のランダムに選抜されたクローンの D N A のシーケンス解析の結果、広範な V H H レパートリーのクローニングに成功したことが確認された。選抜された細胞全てを使用して、免疫後のファージライブラリーからの C D 3 8 特異的な V H H の選抜を行った。トランスフェクションしなかった 1×10^7 個の N I H - 3 T 3 細胞 (A T C C、M. musculus の胎生期の結合組織) とインキュベートするネガティブ選抜により非特異的 V H H を除去した。2 または 3 ラウンドの選抜を、C D 3 8 でトランスフェクションした N I H - 3 T 3 細胞で行った。各選抜ラウンドの後、特定のクローンの強化がシーケンシングにより検出された。二回以上検出されたクローン、または C D R 領域中にごく少数のアミノ酸置換を有する複数のクローンを、ファミリーとして定義した。

【 実施例 3 】

【 0 3 6 6 】

大腸菌細胞における V H H の組換え発現

上記で同定された代表的なファミリーの V H H を大腸菌において発現させた。ファージアウトプットを用いて大腸菌を感染させ、個々の V H H クローンを解析した。標準的なプロトコル (例えば、本明細書において引用する A b l y n x 社による国際公開第 0 3 / 0 3 5 6 9 4 号、国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 5 号、国際公開第 0 4 / 0 4 1 8 6 3 号、国際公開第 0 4 / 0 6 2 5 5 1 号および他の従来技術および出願を参照) に従い、ペリプラズム抽出物を調製した。要約すると、光学密度が 0 . 5 に達するまで、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ カルベニシリンを含有する 100 ml の $2 \times \text{YT}$ 培地 (BD Difco 社、Heidelberg) 中で形質転換菌体を再懸濁した。イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) によりタンパク質発現を誘導し、3 h 後、細胞を遠心分離した終了させた。浸透圧ショックによって、外側の細胞壁を破壊し、V H H を含有するペリプラズム画分を回収した。金属イオンアフィニティークロマトグラフィーによって、H I S タグを介して V H H を精製した。その後 V H H を P B S に対して透析し、タンパク質濃度の測定後、4 ° で貯蔵した。S D S - P A G E 解析により精製された V H H の純度、完全性および濃度を確認した (図示せず) 。培養液 1 リットルあたり 0 . 1 ~ 1 0 m g の収率で、モノマー状 V H H が精製された。

10

20

30

40

50

【実施例 4】

【0367】

フローサイトメトリーによる選抜されたVHHの結合特異性の解析

4.1 CD38でトランスフェクションしたNIH-3T3およびLP-1 骨髓腫細胞に対する結合

フローサイトメトリーを用い、CD38トランスフェクション後NIH-3T3細胞および親細胞への結合性を測定することによって、各種のファミリーを代表する精製された一価の抗CD38 VHHの結合特異性を測定した。結合強度を増加させるため、VHHを、C末端c-myc マーカーを標的とする蛍光標識抗体と、1:7のモル比でブレインキュベートし、二価フォーマット(抗c-myc-FITC、9E10AbD、Serotec)を模倣させた。4で30分間、蛍光色素コンジュゲート抗体1μgと共に 1×10^6 個の細胞をインキュベートした。二回の洗浄、細胞をPBS中に再懸濁し、FACS CaliburまたはFACS Canto(BD Biosciences社、Heidelberg)上のフローサイトメトリーにより解析した。ソフトウェアFlowJo(Treestar社、Stanford, US)を使用してデータを評価した。

10

【0368】

28種のVHHファミリーが、トランスフェクションしたNIH-3T3マウス繊維芽細胞のヒトCD38への特異的結合を示したが、非トランスフェクション細胞では示さなかった(データ示さず)。CD38を発現するLP-1 骨髓腫細胞株との結合によって、選抜された抗CD38 VHHのCD38への用量依存的結合がさらに確認された(データ示さず)。

20

【0369】

4.2 白血球およびヒト腫瘍細胞株上の天然CD38に対する結合

次に、精製された一価の抗CD38 VHHの、末梢血白血球(PBMC)の細胞表面上の天然CD38への結合に関して、フローサイトメトリー解析した。その際、過剰量のFITC標識抗c-myc抗体によるVHHの系列希釈(50ng~16pgにわたる)を用いて、50μLのヒト血液をRTで30分間インキュベートした。CD38を強く発現するNK細胞およびBリンパ球と、CD38を弱く発現するTリンパ球とを区別するため、APC標識抗CD3抗体を用いた。赤血球細胞を洗浄し、溶解バッファーにより溶解させた後、フローサイトメトリーにより結合を試験した。クロストリジウム・ディフィシレ(Clostridium difficile)の毒素Bに特異的なVHH(VHHのL-14)をネガティブコントロールとして用いた。ポジティブコントロールとして、CD38に対するFITC標識モノクローナル抗体(抗ヒトCD38-FITC、1A10、BD Biosciences社)を用いた。リンパ球を前方および側方の散乱光として定義した。FlowJoソフトウェアを用いて、CD3陰性細胞集団の平均蛍光強度(MFI)を算出した。VHHのバックグラウンド結合は、CD38抗体のコントロールのレベルを超えなかった。ネガティブコントロールのVHHのL-14は結合を示さなかった。タイトレーション曲線は、解析したVHHの結合能に関する半定量性を表し(図2A)、そこで示される高いMFIは、遅い解離速度および高い結合能を示す。

30

【0370】

PBMCプール内のVHHによるBリンパ球およびNK細胞サブセットへの結合を、さらに単離直後のPBMC上のマルチカラーFACS解析によりさらに解析した。Alexa Fluor 647プロテインラベリングキット(Molecular Probes社、Eugene, USA)を用い、VHHのサブセットを蛍光色素Alexa-647にコンジュゲートし、4で30分間、0.1%のBSAを添加した0.1mLのPBS中で、 1×10^6 のPBMCと結合させた。CD38を強く発現するNK細胞およびプラズマ細胞を区別するため、CD16(3G8)に対するAPC-Cy7標識モノクローナル抗体およびCD19(HI B19)に対するFITC標識モノクローナル抗体を用いる対比染色により細胞を染色した。直接標識した抗CD38 1A10抗体を参照として用いた。

40

【0371】

50

結合後の結果を図 2 B に示す。

【 0 3 7 2 】

これらの結果は、NK 細胞およびプラズマ細胞上の CD 3 8 の染色を示す。

【 0 3 7 3 】

4 . 3 可溶性 CD 3 8 に対する結合

可溶性、非グリコシル化、組換えヒト CD 3 8 に対する、精製された一価の抗 CD 3 8 V H H の選抜クローンの結合能を、マイクロスケール熱泳動により解析した。この方法は、熱泳動（すなわち温度勾配に沿った分子の移動）の原理に基づく。温度勾配を赤外線レーザーで発生させ、蛍光顕微鏡観察によって勾配内の分子の動きを追ひ、測定した。相互作用が存在するとき、溶液中の分子の熱泳動による移動度は変化する。測定の際、モノマー状の非標識 V H H の系列希釈を用い、M S T 緩衝液（2 5 m M のトリス / H C l （p H 8 ））、1 0 0 m M の N a C l 、0 . 1 % の B S A 、0 . 1 % の T w e e n - 2 0 、0 . 5 m M の D T T ）中の A l e x a 6 4 7 をコンジュゲートさせた一定濃度（1 2 . 5 n M および 5 n M ）の CD 3 8 と 1 0 分間インキュベートした。各バッチを NanoTemper Monolith h NT.115 において解析した。蛍光値の変化を、平均化した蛍光に対するパーセンテージ変化として測定し、V H H 濃度として考慮した。独立に実施した 2 回の試験の測定結果から、GraphPad Prism ソフトウェアを用い、解離定数 K_D を算出した。

【 0 3 7 4 】

M U 3 9 7 （配列番号 3 3 ）、M U 1 0 6 8 （配列番号 3 4 ）、M U 1 0 6 7 （配列番号 4 9 ）、M U 5 2 3 （配列番号 4 7 ）、M U 2 7 4 （配列番号 3 5 ）などの様々な V H H が、ナノモル範囲（1 ~ 6 n M ）の低い K_D 値で CD 3 8 と結合し、高親和性を示した（表 4 . 3 A に示す）。

【 0 3 7 5 】

【表 3】

表4. 3A:選抜されたVHHのCD38への結合に関するKD値、n=2。

VHH	ファミリー	クローン	K_D [nM]
MU397	12	L-15.1a	1
MU1068	13	L-15.1b	138
MU274	13	L-15.2a	3
MU523	19	L-19.1a	3
MU1067	20	L-19.2a	4.5
MU1053	14	L-15.3	6
MU54	22	S-24a	16
MU415	16	L+15	23
MU370	5	L-9.1a	225

【 0 3 7 6 】

さらに、ヒト CD 3 8 タンパク質に対する、様々な一価の精製された V H H の解離（結合 o f f ）速度定数を Octet RED384（ForteBio 社）のバイオルミネセンス動態アッセイで測定した。酢酸緩衝液（p H 6 ）中で A R 2 G バイオセンサー表面上へのヒト CD 3 8 の直接の固定化を行い、1 0 0 n M の H C l により検体の再生を行った。検体は、最初に飽和量 1 μ M で、次に非常に速い o n 速度を示す V H H についてはさらに 1 0 0 n M で試験した。参照として、ダラツムマブ（D a r a s c F v ）の s c F v およびネガティブコントロールとして無関係な c A b l y s 3 V H H を用いた。1 : 1 の L a n g m u i r 動力学モデルを使用し、センサーグラムをフィットさせた。非特異的結合は、同時平行の参照センサー値を減算することによって、o f f 速度アッセイにおいて補正した。

【 0 3 7 7 】

off速度を表4.3Bに示す。off速度は 2.2×10^{-3} から $7.8 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$ の範囲であり、ダラムマップscFvでは $4.4 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$ のoff速度であった。

【0378】

【表4】

表4.3B: Octet BLI上で評価した固定化ヒトCD38タンパク質へのVHHの結合のoff速度:

VHH	ファミリー	ファミリー	$K_{\text{dis}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
WF9	1	I-8.1b	2.2E-03
WF32	2	I-8.2f	2.6E-04
Jk36	2	I-8.2a	2.0E-04
WF42	3	I-8.3a	3.8E-04
Jk2	4	I-9.1c	1.1E-03
MU370	5	I-9.2a	5.1E-04
Jk29	6	I-9.3b	1.8E-04
WF14	7	I-12b	6.3E-03
JK28	8	I-13a	6.3E-04
WF69	9	S-14b	2.0E-03
MU738	9	S-14a	2.9E-03
Jk44	10	I-14.1a	2.4E-04
Jk22	11	I-14.2b	3.2E-03
MU1068	13	I-15.1b	2.1E-04
WF140	13	s-15a	5.4E-04
MU274	13	I-15.2a	1.1E-04
MU1053	14	I-15.3a	9.0E-04
Jk19	15	I-15.4a	1.1E-04
MU415	16	I+15b	1.1E-03
WF211	17	s-16a	4.5E-03
WF121	18	I-17a	<2.3E-04 #
MU523	19	I-19.1a	7.8E-05
MU1067	20	I-19.2a	1.2E-04
WF139	21	s-19b	<2.2E-04 #
WF124	21	s-19a	<2.5E-04 #
MU1105	22	I-24a	<3.0E-04#
WF114	22	s+/-24b	<1.4E-04#
WF100	22	s+/-24d	5.1E-04
Dara scFv			4.4E-03

#: 感度限界に到達したため、正確なoff速度の測定不能。

【0379】

4.4 配列解析

CD38特異的な結合が確認された代表的なクローンのシーケンシングを行った。配列を表A-3に示す。

【実施例5】

【0380】

VHHファミリーの違いによる、認識されるエピトープの多様性

様々なVHHファミリーによって認識されるCD38タンパク質上のエピトープを評価するため、様々なファミリーの代表的な精製VHHを、少量の蛍光標識VHHのセットに対してビンニングした (binned)。具体的には、VHHのサブセットを、Alexa Fluor 647 プロテインラベリングキット (Molecular Probes, Eugene, USA) を用いて蛍光色素 Alexa - 647 にコンジュゲートさせ、次にエピトープマッピングに用いた。さらに、ダラムマップのscFvもAlexa - 647で標識し、同じパネルに含めた。

【0381】

100 μL の PBS / 0.5% の BSA 中の、 5×10^5 の LP-1 骨髄腫細胞を、RT で 10 分間、5 μg の非コンジュゲート型 VHH とブレインキュベートし、さらに RT で 30 分間、FACS 解析の前に、500 ng の Alexa - 647 コンジュゲート VHH とインキュベートした。FACS シグナルの減少は、非コンジュゲート型 VHH の競合的結合を示す。ART2 特異的な VHH をネガティブコントロールとして用い、それは CD38 への結合を示さなかった。それぞれの蛍光色素コンジュゲート VHH の非コンジュゲート型誘導体をポジティブコントロールとして用いた。

【0382】

FACS実験の結果を表5Aにまとめる。

【0383】

【表5】

表5A:CD38+LP-1 骨髄腫細胞に対するVHHの結合競合。CD38発現LP-1 骨髄腫細胞への結合に関する、Alexa647コンジュゲートVHHによる交差ブロッキング解析。数値は、無関係VHHによる競合と比較した、蛍光色素の結合に対する阻害(パーセント)を示す。

エピトープ	Alexa467で標識されたVHHの結合(パーセント)												
	VHH	Fa _m	クローン	WF211	MU1068	MU274	JK2	MU1067	MU523	JK19	JK36	WF100	Dara scFv
1	MU738	9	S-14a	64	74	53	8	6	-15	-8	39	33	87
1	JK22	11	I-14.2b	97	97	96	23	0	-8	29	27	5	99
1	JK28	8	I-13a	94	95	94	-10	8	-9	96	74	60	99
1	WF211	17	s-16a	97	97	96	12	8	-9	52	18	4	
1	MU1053	14	I-15.3a	94	95	93	-11	6	-10	38	10	12	98
1	MU370	5	I-9.2a	89	86	80	-8	5	-5	31	24	26	97
1	MU274	13	I-15.2a	98	99	99	-32	7	-7	14	36	45	99
1	MU1068	13	I-15.1b	86	90	81	0	5	-7	36	46	35	97
1	MU415	16	I+15b	98	98	98	36	7	-11	18	37	47	98
1	JK44	10	I-14.1a	87	90	83	10	3	-13	-6	45	28	95
1	JK29	6	I-9.3b	97	98	98	9	4	-4	1	33	36	99
2	JK2	4	I-9.1c	-2	15	3	56	17	16	9	9	20	-1
2	MU523	19	I-19.1a	30	71	20	99	98	99	8	43	40	99
2	MU1067	20	I-19.2a	31	79	8	99	99	98	34	26	48	99
3	WF14	7	I-12b	16	25	6	26	2	-12	69	62	69	32
3	WF121	18	I-17a	71	59	10	16	5	-13	99	99	99	99
3	WF124	21	s-19a	88	64	15	22	3	-9	97	100	99	99
3	WF42	3	I-8.3a	3	23	7	14	4	-2	99	99	97	97
3	WF9	1	I-8.1b	-16	18	5	22	3	-13	65	49	66	-23
3	JK36	2	I-8.2a	-13	22	16	18	4	-13	97	97	96	-9
3	WF100	22	s+/-24d	9	27	0	52	6	-7	88	90	80	46
3	JK19	15	I-15.4a	12	39	8	-35	1	-17	97	99	98	86

ここで、接頭辞「Jk」を有するVHHは、本発明では接頭辞「jk」、「Jko」または「jko」によって示されることもある。

【0384】

CD38特異的なVHHは3つの異なる非重複エピトープと実質的に結合し、それらを仮に「エピトープ1」、「エピトープ2」および「エピトープ3」と称する。ダラツムマブエピトープは、エピトープ1、およびエピトープ2の一部、およびエピトープ3のVHHクローンと重複する。

【0385】

VHHファミリー1-9.2a、1-9.2b、1-9.3b、S-14a、1-14.1a、1-14.2b、1-15.1b、1-15.2a、1-15.2b、1-15.3a、s-15aおよびs-16aは、エピトープ1を認識し結合する。これらのファミリーは、代表的なエピトープ2(MU1067、MU523、JK2)またはエピトープ3(WF36、WF152、WF100)のVHHと競合しない。

【0386】

VHHファミリー1-9.1c、1-19.1a、1-19.1b、1-19.2aおよび1-19.2bは、エピトープ2を認識し結合する。これらのファミリーは、代表的なエピトープ1(MU1068、MU274、MU211)またはエピトープ3(WF36、WF152、WF100)のVHHと競合しない。

【0387】

10

20

30

40

50

VHHファミリー1-8.1a、1-8.1b、1-8.2a、1-8.2f、1-8.3a、1-12b、1-17a、1-17b、1-17c、s-19a、s-19b、s-24a、s+/ -24b、s-24c、s+/ -24dおよび1-24aは、エピトープ3を認識し結合する。これらのファミリーは、代表的なエピトープ1 (MU1068、MU274、MU211) またはエピトープ2 (MU1067、MU523、JK2) のVHHと競合しない。

【0388】

表5Bは、エピトープビニングの結果を要約したものである。

【表6】

表5B

エピトープ 1				エピトープ 2			エピトープ 3					
VHH	クローンID	ファミリークラスター		VHH	クローンID	ファミリー	VHH	クローンID	ファミリークラスター			
WF69	s-14.1b	9	1.1	jk12	l-9.1a	4	jk46	l-12.1	7	3.1		
MU737	s-14.1c			jk14	l-9.1b		WF14	l-12.1				
MU738	s-14.1a			jk49	l-9.1a		WF121	l-17.1a	18			
MU727	s-14.1d			jk2	l-9.1c		WF127	l-17.1a				
MU1053	l-15.3a			14	jk42	l-9.1d	WF144	l-17.1a				
WF211	s-16.1a	17	MU523	l-19.1a	19	WF129	l-17.1b					
jk20	l-13.1a	8	MU1065	l-19.1b		WF141	l-17.1c					
jk28	l-13.1a			MU1067	l-19.2a	20	WF124	s-19.1a	21			
jk26	l-13.1b			MU551	l-19.2b		WF139	s-19.1b				
jk27	s-13.1a						WF42	l-8.3a	3	3.2		
jk22	l-14.2b						11	jk19	l-15.4			15
jk33	l-14.2a							WF9	l-8.1b			1
jk34	l-14.2c	WF152	l-8.1a					2				
jk35	l-14.2d	jk54	l-8.1a									
MU370	l-9.2a	5	jk30						l-8.2b		22	
MU375	l-9.2b		jk31				l-8.2d					
Jk25	l-9.3a		6				jk36	l-8.2a				
jk29	l-9.3b						jk32	l-8.2e				
MU397	1-15.1a		12				jk24	l-8.2c				
WF140	s-15.1a	13	WF32				l-8.2f					
MU1068	l-15.1b		MU1103				s-24.1c					
MU274	l-15.2a		MU725				s-14.1a					
MU413	l-15.2b		WF100				s-24.1d					
Jk44	l-14.1a	10	WF114				s-24.1b					
MU535	s+15.1a	16	WF97				l-24.1a					
MU415	l-15.1b		MU110				l-24.1a					

【0389】

VHHは細胞上の結合競合に基づき3つの非重複エピトープ群に分類できる一方で、ダラムマブの競合阻害剤および非競合阻害剤が群内に存在する。この交差ブロッキングは、エピトープの重複、またはCD38のコンフォメーション安定化の相違に起因する立体障害を示すといえる。VHHのCD38への同時結合をさらに評価するため、28種の一種の精製された抗CD38 VHHおよびベンチマークとしてのダラムマブ s c F v を用

10

20

30

40

50

いた、Octet RED384 (ForteBio) 上の生物発光分析による、タンデムによるエピトープビニング解析を行った。A R 2 G バイオセンサー表面上へ、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のヒト C D 3 8 を直接固定化した (酢酸緩衝液 (pH 6) 中)。C D 3 8 バイオセンサーの再生は、 100 nM の H C 1 による 5 秒間の再生パルスで 5 回行い、実施した。 100 nM の飽和濃度の V H H を C D 3 8 と結合させ、一方、ダラツムマブ s c F v では 1μ で行った。第 2 の検体の結合および解離のセンサーグラムを記録した。結合捕捉レベルを、ロード後 10 秒間の時間枠にて評価した。W a r d の方法に従い、非階層的なクラスタリングを行った。

【0390】

結果を図 11 にまとめる。

10

【0391】

交差ブロッキング F A C S により前回同定された 3 つのエピトープビンを、タンデムのエピトープビニングにより確認した。一般的に、双方向性ブロッキングが各エピトープ群内で観察された。各群内に下位クラスターを割り当てることができる。エピトープ 3 内では、ダラツムマブと競合したファミリー 3、7、18 および 21 から構成されるサブグループが同定された (クラスター 3.1)。エピトープ群 1 内では、(それぞれ 8、11、14 および 17) から構成されるサブグループはまた、クラスター 3.1 内のファミリーのサブセットと競合したが、クラスター 3.2 のファミリーとは競合しなかった。エピトープ群 2 内では、ファミリー 4 は、ダラツムマブと同時に C D 3 8 と結合できるが、他の 2 つのファミリー 19 および 20 は競合した。

20

【0392】

ファミリー 9 はエピトープ 1 内でビニングされたが、またエピトープ 2 および幾つかのエピトープ 3 のファミリーとも競合し、それは、結合する C D 3 8 のコンフォメーションが、他のエピトープ 1 ファミリーのそれとは異なることを示唆する。置き換えに似た挙動が、ファミリー 7 およびファミリー 9 の V H H で観察され、第 2 の V H H との結合の間の解離を示すものである。いかなる理論にも拘束されないが、これらの V H H は、他の V H H ファミリーの場合とは異なる、C D 3 8 のコンフォメーションと結合することを示すといえる。

【0393】

エピトープ 1 およびエピトープ 2 内の様々な V H H のエピトープを、C D 3 8 タンパク質との共結晶化により決定した。C D 3 8 - U 3 7 5 (f a m 5、1 - 9.2、エピトープ 1)、C D 3 8 - M U 5 5 1 (f a m 20、1 - 19.2、エピトープ 2) および C D 3 8 - M U 1 0 5 3 (f a m 14、1 - 15.3、エピトープ 1) の構造に関する情報は、それぞれ、P D B コード 5 F 2 1、5 F 1 0 および 5 F 1 K (Li et al. 2016, Scientific reports) に記載されている。3 つの全ての V H H は、細胞および組換えタンパク質との結合においてダラツムマブと競合し、それはエピトープの重複を示唆する。これに従えば、ダラツムマブの結合にとり重要であると記載される C D 3 8 の S e r 2 7 4 は、2 つのエピトープ 1 V H H 各々による、C D 3 8 上のフットプリントの一部である。ファミリー 5 および 14 は、エピトープ 1 内の 2 つの下位クラスターに分離される。これは、部分的なフットプリントの重複と整合するものである。

30

40

【実施例 6】

【0394】

様々な N b - F c の組合せが、強力な補体依存性細胞傷害性 (C D C) を示す

抗体療法は、癌処置において非常に強力であることが証明されている。標的の腫瘍細胞を殺傷するために抗体医薬が採用する 2 つの重要なメカニズムは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 (A D C C) および補体依存性細胞傷害性 (C D C) である。抗 C D 3 8 V H H の潜在的 C D C 活性を評価するため、各種の選抜された V H H を、基本的に国際公開第 2009/068630 号に記載のように、ヒト F c 尾部 (h F c、I g G 1) との遺伝子融合体として産生させた。

【0395】

50

6.1 CD38発現ヒト腫瘍細胞株に対するCD C

WF211-hFcは、エピトープ1と結合するWF211（配列番号42、ファミリー-s-16a）をベースとし、WF121-hFcは、エピトープ3と結合するWF121（配列番号43、ファミリー-l-17a）をベースとする。ポジティブコントロールとして、scFv-Dara-hFcを用いた。scFv-Dara-hFcは、ダラツムマブの単鎖Fvドメインをベースとするが、本発明のVHHとの直接比較を容易にするため、前記Fvドメインを同様にhFcとコンジュゲートさせた。

【0396】

対応するネガティブコントロールとして、マウスART2.2（s+16aのhFc）または毒素B（601）に対するNb-Fc融合タンパク質を用いた。

10

【0397】

補体の給源としての20%のプールされたヒト血清の存在下、LP-1骨髓腫細胞を37で1h、2μgのFc融合タンパク質とインキュベートした。ヨウ化プロビジウム（PI）の取り込みから細胞死を測定した。

【0398】

結果を図3に示す。

【0399】

WF121-hFcおよびWF211-hFcは、ネガティブコントロール（s+16a-hFc）とほぼ同等の細胞傷害性を有する。対照的に、ダラツムマブscFv-hFcは、約34%のPI陽性細胞に見られる、CD C媒介性細胞傷害性の増加を示す。予想外にも、WF121-hFcおよびWF211-hFcの（「組合せ」）の、エピトープ1とエピトープ3の両方への結合は、約92%のPI陽性細胞に見られる、明らかな相乗的細胞傷害性を示す。

20

【0400】

6.2 組合せ対個別の構築物のタイトレーション

さらに、組合せ対個別における、Nb-hFc融合タンパク質の細胞傷害性を評価するため、実施例6.1の記載と実質的に同じ条件で、用量を変化させてタイトレーションを実施した。

【0401】

結果を図4に示す。

30

【0402】

結果は、個別の部分1つのみによる結合と比較し、同時にエピトープ1およびエピトープ3を結合させた組合せでは、優れた効果が得られることを裏付けるものである。

【0403】

6.3 CA46ヒト・パーキットリンパ腫における、ダラツムマブとの組合せ

使用される部分に関連するエピトープの違いの重要性を評価するため、実施例6.1の実験を繰り返したが、本試験では、WF139hFc（配列番号52）+WF42hFc（配列番号10）の組合せ（両方のナノボディがエピトープ3と結合）と、WF211hFc（配列番号42）+WF42hFc（配列番号10）の組合せ（各ナノボディがそれぞれエピトープ1および3と結合）を比較した。コントロールとして、tox B（601）およびダラツムマブhFc（エピトープ1と結合）を用いた。CA46ヒト・パーキットリンパ腫細胞における細胞傷害性を試験した。

40

【0404】

結果を図5に示す。これらの結果は、組合せ（本実施例ではCD38のエピトープ1およびエピトープ3に対する結合物質）が相乗効果を発揮するという知見を裏付けるものである。さらに、前記結果は、各種の癌に存在する2つの異なるエピトープと結合させたときの細胞傷害性効果が、一般的に適用できることを示すものである。

【0405】

CD38上の2つの異なるエピトープとの結合を見出すことがさらに一般的に適用できる（すなわち結合剤の特定のフォーマットに限定されない）か否かを判断するため、異な

50

る V H H s および ダラツム マブ h F c を用いて実験を繰り返した。(1) ダラツム マブ と競合せず、(2) ダラツム マブ と組み合わされた V H H は相乗効果を示すことが証明された。この組合せにより、細胞死の顕著な増加(ダラツム マブ h F c 単独での 16 % から、組合せでの 87 %) がもたらされた。一方、(1) ダラツム マブ と競合し、(2) ダラツム マブ と組み合わされた V H H は、相乗効果を示さなかった(表 6 . 4)。前記結果は、各種の癌に存在する 2 つの異なるエピトープと結合させたときの細胞傷害性効果が、一般的に適用できることを示すものである。

【 0 4 0 6 】

6 . 4 ダウディ・ヒト・パーキットリンパ腫における、抗 C D 3 8 V H H - F c とダラツム マブ との組合せの、ダラツム マブ h F c および ダラツム マブ H + L との比較

異なるエピトープと結合する、ダラツム マブ s c F v - F c (ダラツム マブ h F c) と、それと競合しない V H H - F c との組合せが、C D C 媒介性の細胞殺傷効果を非常に増加させることを示した。次のステップにおいて、発明者らは、V H H - F c もまた、従来のダラツム マブ フォーマット、すなわち 2 つの軽鎖および 2 つの重鎖から構成される完全 I g G (ダラツム マブ H + L) と相乗作用するか否かを試験しようとした。この目的において、通常抗体フォーマットのダラツム マブ を、完全長のダラツム マブ の軽鎖および重鎖をコードする各発現ベクターの、H E K - 6 E への同時トランスフェクションを経て産生させた。C D 3 8、C A 4 6 を発現している 2 つの異なる細胞株およびダウディ・ヒト・パーキット・リンパ腫細胞において、ダラツム マブ h F c および ダラツム マブ H + L 単独、ならびに異なる抗 C D 3 8 V H H - F c の組合せにより C D C 細胞傷害性を試験した。

【 0 4 0 7 】

結果を図 1 2 に示す。結果は、ダラツム マブ とは異なるエピトープを認識する抗 C D 3 8 V H H - F c は、フォーマットに関係なく、ダラツム マブ h F c および ダラツム マブ H + L のいずれの C D C をも強化することを示す。

【 0 4 0 8 】

エピトープ 1 (W F 2 1 1、M U 2 7 4)、エピトープ 2 (J K 2、M U 1 0 6 7) およびエピトープ 3 (J K 3 6、W F 1 0 0) の代表的な V H H - F c メンバーを用いて、V H H - F c の組合せにより誘導される C D C のより広範囲な解析を実施した。

【 0 4 0 9 】

結果を図 6 . 4 に示す。

【 0 4 1 0 】

結果が、W F 2 1 1 - F c および M U 2 7 4 - F c (すなわちエピトープ 1 と結合する 2 つの異なる V H H - F c メンバー) のいずれの C D C も、エピトープ 2 またはエピトープ 3 に結合する V H H - F c によって劇的に強化されるが、エピトープ 1 と結合している他の V H H - F c メンバーでは強化されないことを示す。対照的に、J K 2 - F c および M U 1 0 6 7 - F c (すなわちエピトープ 2 と結合する V H H - F c メンバー) の C D C は、エピトープ 1 またはエピトープ 3 に結合する V H H - F c メンバーによって劇的に強化されるが、エピトープ 2 と結合する他の V H H - F c メンバーでは強化されないことを示す。さらに、J K 3 6 - F c および W F 1 0 0 - F c (すなわちエピトープ 3 と結合する V H H - F c メンバー) の C D C は、エピトープ 1 またはエピトープ 2 に結合する V H H - F c メンバーによって劇的に強化されるが、エピトープ 3 と結合する他の V H H - F c メンバーでは強化されないことを示す。最後に、ダラツム マブ h F c の C D C は、エピトープ 2 またはエピトープ 3 と結合する V H H - F c メンバー (b) のサブセットによって劇的に強化されるが、エピトープ 1 と結合する V H H - F c メンバーでは強化されないことを示す。以上から、各種の癌に存在する 2 つの異なるエピトープと結合させたときの細胞傷害性効果が、一般的に適用できることが示される。

【 0 4 1 1 】

【表 7】

表6. 4: CD38上の非重複エピトープと結合するVHH-Fcの組合せが、他のVHH-FcおよびダラツムマブhFcのCDCを劇的に強化する: 数値は、VHH-FcまたはダラツムマブhFc(Dara-Fc)の示される組合せおよび20パーセントのヒト血清の存在下、90分間のインキュベート後のPI陽性CA46リンパ腫細胞のパーセンテージを示す。

エピトープ	ID	ファミリー	クローン	組合せ相手						
				Jk2-Fc	MU1067-Fc	MU211-Fc	WF274-Fc	Jk36-Fc	WF100-Fc	Dara-Fc
E2	Jk2-Fc	4	I-9.1c	5	4	99	100	100	96	68
E2	MU1067-Fc	20	I-19.2a	4	5	100	99	100	96	71
E2	MU523-Fc	19	I-19.1a	4	5	100	100	100	96	6
E1	MU370-Fc	5	I-9.2a	100	100	1	2	100	97	2
E1	Jk29-Fc	6	I-9.3b	99	100	1	2	100	97	3
E1	JK28-Fc	8	I-13a	100	100	2	1	100	53	2
E1	MU738-Fc	9	s-14a	100	100	2	3	100	97	2
E1	WF69	9	s-14b	100	100	1	3	100	97	2
E1	Jk44-Fc	10	I-14.1a	100	100	3	4	100	98	3
E1	Jk22-Fc	11	I-14.2b	99	100	2	4	100	90	3
E1	MU1068-Fc	12	I-15.1b	100	100	1	1	100	96	3
E1	WF140	12	s-15.1c	100	100	1	1	100	96	3
E1	MU274-Fc	13	I-15.2a	100	100	2	2	100	95	2
E1	MU1053-Fc	14	I-15.3a	100	100	2	1	100	54	3
E1	MU415-Fc	16	I+/-15b	100	100	2	3	100	96	3
E1	WF211-Fc	17	s-16a	100	100	3	3	100	37	2
E3	WF9-Fc	1	I-8.1b	100	100	100	100	4	2	83.0
E3	Jk36-Fc	2	I-8.2a	100	100	98	100	4	2	78.4
E3	WF32	2	I-8.2f	100	100	97	100	5	2	81
E3	WF14-Fc	7	I-12b	81	97	2	100	4	2	64.5
E3	Jk19-Fc	15	I-15.4a	100	100	100	100	5	2	70.0
E3	MU1105	22	s-24a	100	100	100	100	4	2	83.9
E3	WF100-Fc	22	s+/-24d	100	100	99	100	5	2	89.2
E3	WF114	22	s+/-24b	100	100	99	100	4	2	72.4
E3	WF42-Fc	3	I-8.3a	95	98	99	100	8	2	33
E3	WF124-Fc	21	s-19a	96	100	50	100	4	2	2
E3	WF121-Fc	18	I-17a	99	99	99	100	4	2	2
E3	WF139	21	s-19b	99	99	100	100	5	2	3

【実施例 7】

【0412】

バイパラトピックイムノグロブリン構築物

エピトープ1およびエピトープ3に対する結合剤の組合せによる驚くべき結果に鑑み、本発明の発明者らは、バイパラトピック構築物の試験を試みた。バイパラトピック構築物は、個々の部分の組合せを凌ぐ各種効果（製造および承認の容易性を含む）を奏するものである。例えば、医薬当局による臨床的使用に関する販売承認を得るためには、組合せの個々の部分に関する承認および医学関係書類が必要となるからである。一方、バイパラトピック構築物には、両方の成分の比率ならびに位置を変更できないという固有の欠点が残

在する。例えば、バイパルトピック構築物では、個々の結合部分の位置が他の部分の結合能に影響しうるからである。

【0413】

7.1 バイパルトピック構築物は、初代骨髄サンプル中の骨髄腫細胞に対する細胞傷害性を有する

実施例6.1と同様、バイパルトピックイムノグロブリン構築物を含む各種の構築物を癌細胞において試験したが、本試験では骨髄腫患者に由来する初代骨髄細胞を用いた。

【0414】

構築物211-10GS-121-hFcは、WF211（配列番号42）およびWF121（配列番号43）をベースとし、これらと同じ部分を含む。これらの結合部分を10GSリンカーを介して連結し、hFcを後続させた。ポジティブコントロールとして、scFv-Dara-hFcを用いた。構築物s+16a-hFcをネガティブコントロールとして用いた。

10

【0415】

補体の給源としての20%のプールされたヒト血清の存在下、骨髄腫患者の調製直後の骨髄細胞を37で1h、2μgのFc融合タンパク質とインキュベートした。次に細胞を4で異なるmAbで染色し、PI染色の取り込みにより細胞死を測定した。

【0416】

結果を図6Aに示す。

【0417】

結果から、バイパルトピックイムノグロブリン構築物の細胞傷害性活性が、エピトープ1およびエピトープ3に対する2つの結合剤の組合せよりわずかに低いことが解る。これは、予想外にも、構築物中の個々の部分の位置などの、構築物中の立体配置的制約は、細胞傷害性に対する影響としては限られたものであることを意味する。

20

【0418】

さらに、バイパルトピックイムノグロブリン構築物は、ベンチマークより少なくとも2.5倍の細胞傷害性を示す。さらに、バイパルトピックイムノグロブリン構築物の細胞傷害性を、従来のIgGフォーマットのダラツムマブと直接比較した。その際、LP-1骨髄腫細胞、CA46パーキットリンパ腫細胞およびダウディ・パーキットリンパ腫細胞を、実質的に上記の方法に従い、37で2h、補体の給源としてプールしたヒト血清20%の存在下、2μgのFc-融合タンパク質または4μgのダラツムマブH+Lとインキュベートした。ヨウ化プロピジウム（PI）の取り込みから細胞死を測定した。

30

【0419】

結果を図6Bに示す。

【0420】

結果は、様々な範囲の癌において、バイパルトピックイムノグロブリン構築物が、ダラツムマブと比較し優れた細胞傷害性を示すことを確認するものである。

【0421】

7.2 バイパルトピック構築物は、補体因子C1qとの高い結合能を示す

前述のように、補体系は、ファゴサイトーシスおよび細胞傷害性を促進する白血球の直接の溶解または補充によって、宿主防御、外来細胞、微生物およびセルデブリスの除去に関する主要な機能を発揮する。それは40以上の血漿中および細胞タンパク質（レセプターおよび調節因子）を含む。古典経路は抗原抗体複合体（免疫複合体）の形成により起動し、それは特にC1qからなるC1複合体と結合する。

40

【0422】

バイパルトピックイムノグロブリン構築物の補体因子C1qへの結合を評価するために、LP1骨髄腫細胞を、示されるNb-FcまたはNb-Nb-Fc融合タンパク質の飽和量（2μg/120μL）で、4で20分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、さらに4で30分間、FITCコンジュゲートC1qでインキュベートした。細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリーにより解析した。

50

【 0 4 2 3 】

結果を図 7 に示す。

【 0 4 2 4 】

バイパラトピックイムノグロブリン構築物が補体因子 C 1 q との高い結合能を示すことが解る。

【 0 4 2 5 】

7 . 3 バイパラトピック構築物は各種の異なる癌において、ダラツムマブより高い細胞傷害性を示す

広い概念での妥当性を評価するため、実質的に実施例 7 . 1 に示されるバイパラトピックイムノグロブリン構築物を各種の細胞系において試験した。本試験ではイムノグロブリン構築物 3 6 - 3 5 G S - 1 0 6 7 - h F c を用いたが、それはエピトープ 3 と結合する J K 3 6 (配列番号 3 1)、およびエピトープ 2 と結合する M U 1 0 6 7 (配列番号 4 9) をベースとするものである。これらの結合部分を、3 5 G S リンカーを介して連結し、h F c を後続させた。ポジティブコントロールとして、s c F v - D a r a - h F c を用いた。構築物 s + 1 6 a - h F c をネガティブコントロールとして用いた。L P - 1 骨髄腫細胞、C A 4 6 パーキットリンパ腫細胞およびダウディ・パーキットリンパ腫細胞を、実質的に上記の方法に従い、3 7 で 2 h、補体の給源としてブールしたヒト血清 2 0 % の存在下、2 μ g の F c 融合タンパク質とインキュベートした。次に細胞を 4 で異なる m A b で染色し、P I 染色の取り込みにより細胞死を測定した。

【 0 4 2 6 】

結果を図 8 に示す。結果から、バイパラトピックイムノグロブリン構築物が様々な癌において細胞傷害性を示すことが解る。さらに、イムノグロブリンバイパラトピック構築物は、全ての場合において高い効率、すなわちベンチマークより高い細胞傷害性を示す。

【 0 4 2 7 】

7 . 4 エピトープ 2 結合剤を有するバイパラトピック構築物が、他の組合せよりも優れる

実施例 5 にて言及したように、異なる N b ファミリーの C D 3 8 に対する結合は、3 つの異なる非重複エピトープ (すなわちエピトープ 1、エピトープ 2 およびエピトープ 3) に割り当てることができる。異なるエピトープの組合せが効力に対し影響を及ぼすか否かを評価するため、ダラツムマブ h F c との比較による、全ての組合せの評価実験を行った。バイパラトピックイムノグロブリン構築物は、特定のエピトープのための代表的な V H H から作製した。V H H を G S リンカーにより連結し、ヒト F c テールを C 末端にコンジュゲートさせた。

【 0 4 2 8 】

【表 8 】

バイパラトピックな組合せ:

組合せ	名称	ベースとなる配列番号
E1 + E3	[WF211]-41GS-[WF121]-hFc	[42] + [43]
E2 + E1	[MU1067]-35GS-[MU1068]-hFc	[49] + [34]
E3 + E2	[JK36]-34GS-[MU1067]-hFc	[4] + [49]

【 0 4 2 9 】

実質的に実施例 6 . 3 にて説明したように、様々なバイパラトピックイムノグロブリン構築物を試験し、C A 4 6 パーキット - リンパ腫細胞系における細胞傷害性を解析した。

【 0 4 3 0 】

結果を図 9 に示す。

【0431】

結果から、様々なエピトープを有する抗CD38 VHHのいずれのバイパトリック組合せも、ベンチマークより高い細胞傷害性を示すことが解る。驚くべきことに、エピトープ2に対する結合剤を含む組合せは、これらの結合剤を含まない組合せより効力が高い。

【実施例8】

【0432】

ISVDは、インビボでCD38陽性腫瘍を正確に識別する

結合試験の結果に鑑み、特定のCD38 ISVDはインビボ条件でCD38と結合することができ、インビボでCD38陽性腫瘍を検出するためのイメージング剤として使用できるか否かを検討する。安定的にCD38をトランスフェクションしたDC27.10マウスリンパ腫細胞および非トランスフェクションDC27.10細胞を、ヌードマウスの左右の横腹に皮下注入することによる、二側面腫瘍モデルを用いた。腫瘍移植の7日後、近赤外蛍光のAlexa-680色素をコンジュゲートした一価のVHH、すなわちAF680-MU1067（ファミリー20、1-19.2a、エピトープ2）を50μg、マウスの尾静脈から注入した。マウスおよび組織における生体でのインビボ分布を、48時間にわたり生体内イメージングシステム（IVIS200）によってモニターした。総放射効率を、Living Image 4.2ソフトウェア（Caliper Life Sciences社）により測定した。バックグラウンドに対する腫瘍比率は、腫瘍取り込み値を、後肢から測定したバックグラウンド値で除算することにより算出した。

【0433】

結果を図10に示す。

【0434】

AF680標識VHHはインビボでCD38発現腫瘍を検出する一方、CD38陰性腫瘍または正常組織ではシグナルが示されない。抗CD38 ISVDはインビボでCD38発現腫瘍に対する優れた識別能を発揮する。

【実施例9】

【0435】

CD38のGDPシクラーゼ活性の抗CD38 VHHによる調節

次に発明者らは一価の精製された抗CD38 VHHがCD38の酵素活性を妨害できるか否かを検討した。CD38は、ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド（NGD）からのサイクリックGDP-リボース（cGDP）の合成を触媒する。cGDPの合成は、簡便には蛍光測定によってモニターできる（Deckert et al. 2014 Clin. Cane. Res. 20:4574-83）。

【0436】

簡潔には、CD38が触媒するNGDからサイクリックGDP-リボースへの変換を、蛍光測定（それぞれ300nmおよび410nmの励起および放出波長）により、時間経過とともにモニターした。CD38の組換え細胞外ドメイン（aa44~300、5nM）を、黒色の96ウェルプレートの反応緩衝液中、RTで15分間、0.4~400nMの濃度で、一価のVHHと共に15分間ブレインキュベートし、その後、80μの最終濃度でNGD（Sigma社）を添加した。独立したアッセイを3重のウェルを用いて実施した。CD38のないウェルの測定値をバックグラウンドとして用い、全ての測定値から減算した。EX300/EX410測定値を、相対蛍光単位（RFU）対時間でプロットした。Nbがない場合のコントロール試料と比較したGDPの産生（パーセント）を、（サンプルのRFU/コントロール試料のRFU × 100）算出した。

【0437】

結果を、図13（パネルAおよびB）に示す。

【0438】

エピトープ2（すなわちファミリー4、19および20）（1-9.1、1-19.1a、1-19.2a）を認識する全3つのファミリーのVHHは、用量依存的に、CD38によるNGDのcGDPへの変換を阻害し（図13A）、そのうちMU1067が最

も強力なVHHであった(図13B)。幾つかの他のVHH、すなわちエピトープ1からのファミリー14(MU1053)および11(JK22)、ならびにエピトープ3からのファミリー2(JK36)および15(JK19)も、酵素活性を一部アンタゴナイズした。エピトープ2VHHが、CD38のGDPシクラーゼ活性に対する最も強力なアンタゴニストであった。対照的に、ファミリー9(MU537、s-14、エピトープ1)およびファミリー7(WF14、l-12b、エピトープ3)の2つのVHHは、CD38の触媒作用によるcGDPの合成を強化した(図13A)。

【0439】

次に、発明者らは、CD38のGDPシクラーゼ活性に対する、非重複エピトープの抗CD38VHHの組合せの効果の解析を試みた。VHHを1:1の比率で混合し、次に系列希釈を調製して同じ酵素活性アッセイを行った結果、相乗的な阻害効果または増強効果が示された。

10

【0440】

結果を図14に示す。

【0441】

結果は、2つの非重複阻害VHHの組合せ、すなわちファミリー4(JK2、I-9、1a、エピトープ2)とファミリー2(JK36、l-8、2a、エピトープ3)との組み合わせが、CD38の酵素活性を相乗的に阻害し、ゆえに協同的作用を示すものである。最も強力なエピトープ2のVHHであるMU1067(ファミリー20、l-19、2a)の阻害はJK36の添加によってさらに改善されず、このVHHのみによって既に最大の抑制に達したことを示唆するものである。

20

【0442】

相乗効果はまた、2つの異なる強化VHH、ファミリー9(MU738、s-14a)およびファミリー7(WF14、l-12b)を組み合わせた結果CD38の酵素活性が強化されたときにも観察され、協同作用を示すものである。興味深いことに、ファミリー9のVHHであるWF69またはMU738がCD38にすでに結合しているとき、置き換え作用(結合の間の解離)がファミリー7のWF14の場合に観察され、これらのVHHが異なるコンフォメーションのCD38と結合することを示唆するものである。

【0443】

これらの結果は、CD38上の2つの非重複エピトープのターゲティングが、最大抑制に至るまで、CD38によるGDPシクラーゼ活性に対して相乗効果を発揮することを示すものである。

30

【実施例10】

【0444】

抗CD38VHH-FcによるADCC

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)を媒介する抗CD38VHH-Fc構築物の能力を評価するため、マイクロプレートアッセイを用い、ルシフェラーゼをトランスフェクションした標的細胞からのルシフェラーゼ活性の喪失を細胞死の指標として測定した。その際、CD38を発現する 5×10^4 個の、ルシフェラーゼをトランスフェクションしたCA46パーキットリンパ腫細胞を、VHH-Fc構築物またはダラツムマブの完全IgG(H+L)の系列希釈と共に、4で10分間インキュベートした。エフェクター細胞として、CD16をトランスフェクションしたNK92細胞を、エフェクター:標的細胞が3:1の比率となるように添加し、細胞を37で3時間さらにインキュベートした。細胞を遠心分離してペレット状にし、0.1mLのPBS中に再懸濁し、750 μ Lの最終濃度のルシフェリンを添加し、RTで10分間のさらにインキュベートした。ルシフェラーゼ活性をマイクロプレートリーダー(Victor社)で測定した。

40

【0445】

結果を図15に示す。

【0446】

結果は、バイパラトピックVVH-FcであるJK36-15GS-MU1067-F

50

C (E 3 - E 2) および W F 2 1 1 - 1 0 G S - W F 1 2 1 - F c が、 s c F v - F c (h c) および完全 I g G (H + L) フォーマットのダラツムマブよりもより効果的に C A 4 6 細胞の A D C C を媒介し、また最大の溶解率は 3 5 - 1 5 G S - 1 0 6 7 - F C および 2 1 1 - 1 0 G S - 1 2 1 - F c では 8 5 %、それに対してダラツムマブ h c では 6 0 %、ダラツムマブ H + L では 6 5 % であった。

【実施例 1 1】

【 0 4 4 7 】

ヒト C D 3 8 + C A - 4 6 腫瘍の異種移植モデルにおける、ダラツムマブと比較した V H H - F c のインビボ効果

C . B - 1 7 S C I D マウスの全身ヒト異種移植モデルを用い、ダラツムマブと比較したバイパルトピック V H H - F c の治療効果を試験した。ルシフェラーゼをトランスフェクションした C A 4 6 細胞の静脈内注射の 1 週間後、ルシフェリンの静脈内注射を行い、その 1 5 分後、腫瘍の増殖が、生体内イメージングシステム (I V I S 2 0 0) によって検出された。動物 (群当たりの n = 5) に対し、7 日目から (すなわち腫瘍の移植が I V I S により検出されてから) バイパルトピック W F 2 1 1 - 1 0 G S - W F 1 2 1 - F C (E 1 - E 3)、無関係 V H H - F c、またはダラツムマブ s c F v - F c (ダラツムマブ h c) を 2 m g / k g (5 0 μ g 総量 / マウス) で毎週、腹腔内投与した。注射は合計 6 回、d 4 9 まで連続して行った (3 0 0 μ L / マウス)。腫瘍増殖は、ルシフェリンの注入後イメージング解析によって 7 日毎にモニターした。

【 0 4 4 8 】

腫瘍増殖および全体的な生存率の結果を図 1 6 に示す。

【 0 4 4 9 】

結果は、バイパルトピック C D 3 8 V H H - F c の W F 2 1 1 - 1 0 G S - W F 1 2 1 - F C はダラツムマブ h c と同程度に腫瘍増殖を阻害することを示すものである。さらに、処置により生存期間が延長され、対照群のマウスの 5 0 % は 5 0 日も生存できなかったが、ダラツムマブ h c で処置したマウスの 5 0 % が 8 5 日目まで生存し、2 1 1 - 1 0 G S - 1 2 1 - F c で処置したマウスの 5 0 % は 1 0 5 日目まで生存した。

【 0 4 5 0 】

このデータは、バイパルトピック V H H - F c 構築物は C D 3 8 陽性腫瘍に対する治療効果を示し、生存率を改善することを示す。

【実施例 1 2】

【 0 4 5 1 】

エピトープピン

上記の I S V D の結果に鑑み、本発明の発明者らは、エピトープピンを再検討することができた。エピトープ 1 ピン、エピトープ 2 ピンおよびエピトープ 3 ピンは、2 つのメインサブクラスターに分割できる：

(i) エピトープ 1 . 1 (E 1 . 1) および エピトープ 1 . 2 (E 1 . 2) :

エピトープ 1 . 1 I S V D および エピトープ 1 . 2 I S V D はいずれも、ダラツムマブと競合する。

(i i) エピトープ 2 . 1 (E 2 . 1) および エピトープ 2 . 2 (E 2 . 2) :

エピトープ 2 . 1 I S V D はダラツムマブと競合せず、一方、エピトープ 2 . 2 I S V D はダラツムマブと競合する。

(i i) エピトープ 3 . 1 (E 3 . 1) および エピトープ 3 . 2 (E 3 . 2) :

エピトープ 3 . 2 I S V D はダラツムマブと競合せず、一方、エピトープ 3 . 1 I S V D はダラツムマブと競合する。

結果を要約するベン図を図 1 7 に示す。これらのピンは、E 3 . 2 のファミリーを、エピトープ 1 I S V D および エピトープ 2 I S V D、ならびにダラツムマブと組み合わせたとき、それらが E 3 . 1 ファミリーよりもパートナーとして広範囲に使用されうること示唆する。

【 0 4 5 2 】

参考文献

- (1) Liu et al. (2006), J Biol Chem 281(43):32861-9
 - (2) Liu et al. (2005), Structure, 13(9):1331-9
 - (3) Perraud et al. (2001), Nature, 411(6837):595-9
 - (4) Young et al. (2006), Biochem Biophys Res Commun, 346(1): 188-92
 - (5) Howard et al. (1993), Science, 262(5136):1056-9
 - (6) Koch-Nolte et al. (2006), Ann Med, 38(3):188-99
 - (7) Deaglio et al. (2000), Chem Immunol, 75:99-120
 - (8) Deaglio et al. (2008), Trends Mol Med, 14(5):210-18
 - (9) Mallone et al. (1998), J Clin Invest, 101(12):2821-30
 - (10) Roussanov et al. (2000), AIDS, 14(17):2715-22
 - (11) US 2009/0304710 A1
 - (12) US 2002/0164788 A1
 - (13) US 8,088,896
 - (25) Hamers-Casterman, et al. (1993), Nature, 363(6428):446-448
 - (27) Wienken, et al. (2010), Nat Commun 1:100
 - (28) Jerabek-Willemsen, et al. (2011), Assay Drug Dev Technol, 9(4):342-353
- 【 0 4 5 3 】

【表 9 - 1】

表A-1:

S e q	fw1	S e q	cdr1	S e q	fw2	Se q	cdr2	S e q	fw3	S e q	cdr3	S e q	fw4
5	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIIFSIN	1	WYRQAPGK	23	EITRGG	2	YADSVKGRFTISRDN	3	AHTFSGSF	4	WGQGTQV
9	SLRLSCGAT	7	DMG	5	QRELVA	3	TN	9	NPEDTAVYYCNA	4		0	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIIFSIN	1	WYRQAPGK	23	EITRGG	2	YADSVKGRFTISRDN	3	AHTFSGSF	4	WGQGTQV
0	SLRLSCGAT	8	DMG	6	QRELVA	4	TN	9	NPEDTAVYYCNA	5		0	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIIFSIN	1	WYRQAPGK	23	EITRGG	2	YADSVKGRFTISRDN	3	AHTFSGSF	4	WGQGTQV
1	SLRLSCGAT	9	DMG	7	QRELVA	5	TN	9	NPEDTAVYYCNA	0		8	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIILRIY	1	WYRQAPGK	23	AITSRGS	2	YADSVKGRFTISRDN	3	AHTFSGSF	4	WGQGTQV
2	SLRLSCAAS	0	DMG	8	QRELVA	6	TN	9	KPGDTAVYYCNA	5		1	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIILRIY	1	WYRQAPGK	23	AITSRGS	2	YADSVKGRFTISRDN	3	DHTFAGVY	4	WGQGTQV
3	SLRLSCAAS	2	DMG	7	QRELVA	7	TN	9	KSGDTAVYYCNA	5		1	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIILRIY	1	WYRQAPGK	23	AITSRGS	2	YADSVKGRFTISRDN	3	DHTFAGVY	4	WGQGTQV
4	SLRLSCAAS	2	DMG	8	QRELVA	8	TN	9	KSGDTAVYYCNA	3		0	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GIILRIY	1	WYRQAPGK	23	EITSRGS	2	YADSVKGRFTISRDN	3	HHTFAGAY	4	WGQGTQV
5	SLRLSCAAS	3	DMG	0	QRELVA	9	TN	9	KSGDTAVYYCNA	5		1	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQPGG	1	GSTLRLY	1	WYRQAPGK	24	EITSRGS	2	YANSVKGRFTISRDN	3	DHTFAGVY	4	WGQGTQV
6	SLRLSCAAS	4	DMG	2	QRELVA	0	TN	9	KPEDTAVYYCNA	5		1	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQAGG	1	GIILRIY	1	WYRQAPGK	24	AITSRGS	2	YADSVKGRFTISRDN	3	EHTFMGAY	4	WGQGTQV
7	SLRLSCAAS	5	DMG	3	QRELVA	1	TN	9	KPEDTAVYYCNA	6		4	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQAGG	1	RNTDSIE	1	WYRQAPGK	24	AITSRGS	2	YADSVKGRFTISRDN	3	WHVFRGNY	4	WGQGTQV
8	SLRLSCAAS	6	IMG	4	QRELVA	2	TG	0	KPEDTAVYYCNA	8		1	TVSS
6	QVQLQESGGGLVQAGG	1	ERIFSRN	1	WYRQAPGK	24	RIASLGI	3	YADSVKGRFTISRDN	3	VIRTYSTY	4	WGQGTQV
9	SLRLSCVAS	7	TMG	5	QRELVA	3	TN	0	KPEDTAVYYCNY	9		6	TVSS
7	EVQLVESGGGLVQAGG	1	ERIFSRN	1	WYRQAPGK	24	RIASLGI	3	YADSVKGRFTISRDN	3	WHYAAGRDI	4	WGQGTQV
0	SLRLSCVAS	8	TMG	6	QRELVA	4	TN	0	KPEDTAVYYCNY	6		1	TVSS
7	QVQLQESGGGLVQPGG	1	ERIFSRN	1	WYRQAPGK	24	YVGSMDGI	3	YADSVKGRFTISRDN	3	WHYAAGRDI	4	WGQGTQV
1	SLRLSCVGS	9	TMG	7	QRELVG	5	TN	3	KPEDTAVYYCNY	1		9	TVSS

10

20

30

40

【表 9 - 2】

7	2	QVKLQESGGGLVQPGG SLRLSCVAS	1 3 0	ERIFSRN TMG	1 8 8	WFRQAPGK QRELVA	24 6	YITSLGI AN	3 0 4	YADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNIL KSEDATAVYCNV	3 6 2	WHYAAGRDI	4 2 0	WGQGTQV TVSS
7	3	DVQLQASGGGSVQAGG SLTLSCRY	1 3 1	GGFVFRV SSMG	1 8 9	WFRQAPGN QRELIA	24 7	TITVGGK TN	3 0 5	YKDSVQGRFIIISRDNTVTLQMNRLQP EDTAVIYCNL	3 6 3	ASTAVGADT	4 2 1	WGQGTQV TVSS
7	4	DVQLQESGGGSVQAGG SLTLSCAS	1 3 2	GLLFRLA SMG	1 9 0	WFRQAPGK ERELIA	24 8	TITVGGK TN	3 0 6	YKDSVQGRFIIITRDNTGDKNTKSTVTLQ MNRLKPEDTAVIYCNV	3 6 4	ASPAVGADT	4 2 2	WGQGTQV TVSS
7	5	QVKLQESGGGLVQPGG SLRLSCVAS	1 3 3	GSISSII TMG	1 9 1	WFRQAPGK QREFVA	24 9	RVIIGGS TG	3 0 7	YADSVKGRFTISRDNKNTVYLEMNSL KPEDTAVIYCAA	3 6 5	GNPGTSYHY	4 2 3	WGQGTQV TVSS
7	6	QVKLQESGGGLVQPGG SLRLSCVAS	1 3 4	GSISNII TMG	1 9 2	WFRQAPGK QREFVA	25 0	RIIIGGS TG	3 0 8	YSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNISL KPEDTAVIYCAA	3 6 6	GNPGTRYIY	4 2 4	WGQGTQV TVSS
7	7	QVKLQESGGGLVQAGG SLRLSCAAS	1 3 5	GRTFSSV AMG	1 9 3	WFRQAPGK EREFVA	25 1	TINWSGG RTT	3 0 9	YADSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNISL KPEDTAVIYCAA	3 6 7	DRFSVVAVEYDY	4 2 5	WGQGTQV TVSS
7	8	EVQLVESGGGLVQAGG SLRLSCAAS	1 3 6	GRTFSSV AMG	1 9 4	WFRQAPGR EREFVA	25 2	TINWSGG RTT	3 1 0	YADSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNISL KPEDTAVIYCAA	3 6 8	DRFSVVAVEYDY	4 2 6	WGQGTQV TVSS
7	9	QVKLQESGGGLVQAGG SLRLSCAIS	1 3 7	GRTFIAD MG	1 9 5	WFRQAPGK EREFQA	25 3	GITWFGG STY	3 1 1	YADSVKGRFTISRDNKNTLXLQMNISL KPEDTAIYCAA	3 6 9	GLKRIGDQREADY	4 2 7	WGQGTQV TVSS
8	0	EVQLVESGGGLVQAGG SLRLSCAIS	1 3 8	GRTFIAD MG	1 9 6	WFRQAPGK EREFQA	25 4	GITWFGG STY	3 1 2	YADSVKGRFTISRDNKNTLXLQMNISL KPEDTAIYCAA	3 7 0	GLKRIGDQREADY	4 2 8	WGQGTQV TVAS
8	1	QVKLQESGGGLVQAGG SVRLSCAIS	1 3 9	GRTFIND MG	1 9 7	WFRQAPGK EREFQA	25 5	GITWFGG STY	3 1 3	YADSVKGRFTISRDNKNTLXLQMNISL KPEDTAIYCAA	3 7 1	GLKRIGDQREADY	4 2 9	WGQGTQV TVSS
8	2	DVQLQASGGGLVQAGG SLRLSCAGS	1 4 0	GRTFTNY DMG	1 9 8	WFRQAPGK ERRFVA	25 6	AISGSGG SAR	3 1 4	YAVPVKGRFTITRDNAKNTVYLQMSL KPEDTAVIYCAA	3 7 2	DRFVVAAGTHLDLY	4 3 0	WGQGTQV TVSS
8	3	DVQLQESGGGLVQAGG SLRLSCAGS	1 4 1	GRTFTNY DMG	1 9 9	WFRQAPGK ERRFVA	25 7	AISGSGG SAR	3 1 5	YAVPVKGRFTITRDNAKNTVYLQMSL KPEDTAVIYCAA	3 7 3	DRFVVAAGTHLDLY	4 3 1	WGQGTQV TVSS
8	4	DVQLQASGGGLVQAGG SLRLSCAGS	1 4 2	GRSFSSY AMG	2 0 0	WFRQAPGK AREIVA	25 8	TITRSGG STN	3 1 6	YAVPVKGRFTISRDNKNTVYLQMSL KPEDTAVIYCAA	3 7 4	DRFVVAAGTHLDLY	4 3 2	WGQGTQV TVSS
8	5	DVQLQASGGGLVQAGG SLRLSCAGS	1 4 3	GRTFSSY AMG	2 0 1	WFRQAPGK EREFVA	25 9	SISWSGS RTN	3 1 7	YGVFVKGRFTISRDNKNTVYLQMSL KPEDTAVIYCAA	3 7 5	DRFAVAIGTHLDLY	4 3 3	WGQGTQV TVSS

10

20

30

40

【表 9 - 3】

8	6	QVQLQESGGGLVQAGG SLRLSCAAS	1	4	4	GRTDTRY TMG	2	0	2	WFRQAPGK EREFVS	26	0	GITWNGG TS	3	1	8	YADSVKGRFTISRDNKGNKSVYLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	7	6	DRFTLVPTTSDLDY	4	3	4	WGQGTQV TVSS
8	7	QVQLQESGGRLVQPGG SLRLSCAAS	1	4	4	GRTLSNY AMA	2	0	2	WFRQGPVK EREFVA	26	1	SISASDS TL	3	1	9	YADFVKGRFTISRDNKNTVYLQMDLSL KPEDTTVIYCAA	3	7	7	RFWIGVRAPAEYNY	4	3	4	WGQGTQV TVSS
8	8	QVQLQESGGRLVQPGG SLRLSCAAS	1	4	6	GRTLSNY AMA	2	0	4	WFRQGPVK EREFVA	26	2	SISASDS TL	3	2	0	YADFVKGRFTISRDNKNTVYLQMDLSL KPEDTTVIYCAA	3	7	8	RFWIGVRAPAEYNY	4	3	5	WGQGTQV TVSS
8	9	QVQLQESGGRLVQPGG SLRLSCAAS	1	4	7	GRTFSNY AMA	2	0	5	WFRQGPVK EREFVA	26	3	AISAADS TL	3	2	1	YADFVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	7	9	RWTIAPRAPAEYNY	4	3	6	WGQGTQV TVSS
9	0	QVQLQESGGRLVQPGG SLRLSCAAS	1	4	8	GRTFSNY AMA	2	0	6	WFRQGPVK EREFVA	26	4	AISAADS TL	3	2	2	YADFVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	8	0	RWTIAPRAPAEYNY	4	3	7	WGQGTQV TVSS
9	1	DVQLQASGGGLVQAGG SLRLSCAPS	1	4	9	GGTFDAY DMG	2	0	7	WREAPGK KRQFVA	26	5	AVRSGGG TTR	3	2	3	YADSVKGRFTISRDDAKDTVFLQMNLSL KPEDTALIYCAA	3	8	1	DRWGLFSLSIATPTH	4	3	8	WGQGTQV TVSS
9	2	DVQLQASGGGSVQEGE SLRLSCVGS	1	5	0	GRTFSDW AMG	2	0	8	WFRQAPGK DREFVA	26	6	AVSGAGR GGKPS	3	2	4	YAHSVKGRFTVSRDNKNTVYLQMDNL KPEDTAVIYCAA	3	8	2	DRLVLVALSIADPGF	4	4	0	WGQGTQV TVSS
9	3	DVQLQESGGGLVQAGG SLRLSCAAS	1	5	1	GVSFTRY TMG	2	0	9	WYREVPGK ERREFV	26	7	AAVRPSG DSTY	3	2	5	YGHSVKGRFTISRDDKNIIVYLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	8	3	GFPVLVALSIADPDY	4	4	1	WGQGTQV TVST
9	4	DVQLQASGGGLVQAGG SLTVSCAAS	1	5	2	GLSFTRY TMG	2	1	0	WYREVPGK ERREFV	26	8	AAVKPAG DSAY	3	2	6	YGASVKGRFTASRDNAKNTVTLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	8	4	GFPVLTALHIAADPDY	4	4	2	WGQGTQV TVSP
9	5	DVQLQESGGGLVQAGG SLRLSCTGS	1	5	3	GRTFRNY PMA	2	1	1	WFRQAPGK EREFVA	26	9	GITWVGA STL	3	2	7	YADFVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	8	5	GRGIYAGRIAPAEYAD	4	4	3	WGQGTQV TVSS
9	6	QVQLQESGGGLVQAGG SLRLSCAAS	1	5	4	GRTFVSF GMG	2	1	2	WFRQAPGK EREFVA	27	0	AINWRGS TTA	3	2	8	YADSVKGRFTISRDKNTVTLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	8	6	GRASASTMIREYDS	4	4	4	WGQGTQV TVSE
9	7	DVQLQASGGGSVQAGG SLRLSCAAS	1	5	5	GLSFSDY AMG	2	1	3	WFRQEPVK ERRFVA	27	1	SIRSSGG TT	3	2	9	YAESVKGRFTISRDNKNTMYLQMNLSL KPEDTAVIYCAA	3	8	7	DRLVITKLSIADPGY	4	4	5	WGQGTQV TVSS
9	8	VQLQASGGGLVQAGGS LRLSCTVS	1	5	6	GFTSDDY TVG	2	1	4	WFRQAPGL KREGLS	27	2	CLSRDDG RFY	3	3	0	HSNSVKGRFTMXSDDXKNTVYLQLDLSL KPDXTAVIYCAA	3	8	8	CTSVVVLAPNWEY	4	4	6	WGQGTQV TVSS
9	9	VQLQASGGGLVQAGGS LRLSCTVS	1	5	7	GFTSDDY TVG	2	1	5	WFRQAPGL KREGLS	27	3	CLSRDDG RFY	3	3	1	HSNSVKGRFTMSDDKNTVYLQLDLSL KPDPTAVIYCAA	3	8	9	TTSVVVLLAPNWEY	4	4	7	WGQGTQV TVSS

10

20

30

40

【表 9 - 4】

1	EVQLVESGGGLVQAGE	1	GRTFTNL	2	WFRQAPGK	27	ADTWSGT	3	YGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN	3	RLRGWITTRKPNED	4	WGQGTQV
0	SLRLSCAAS	5	GMG	1	EREFVA	4	STW	3	KPEDTAVIYCAA	9	Y	4	TVAS
0		8		6				2		0		8	
1	DVQLQESGGGLVQAGD	1	GRTFSGF	2	WFRQFPKG	27	AINWSGS	3	YSDSVKGRFTISRDNKQMMYLAMNSL	3	ARSAGLGSSRRRIEGY	4	WGRGTQV
0	SLRLSCEFS	5	AMG	1	EREFVA	5	DTD	3	KPEDTAVIYCAA	9	DK	4	TVSS
1		9		7				3		1		9	
1	DVQLQESGGGLVQAGD	1	GRTFSGF	2	WFRQFPKG	27	AINWSGS	3	YSDSVKGRFTISRDNKQMMYLAMNSL	3	ARSAGLGSSRRRIEGY	4	WGRGTQV
0	SLRLSCEFS	6	AMG	1	EREFVA	6	DTD	3	KPEDTAVIYCAA	9	DK	5	TVSS
2		0		8				4		2		0	
1	DVQLQASGGGLVQAGG	1	GRTFSGF	2	WFRQFPKG	27	AINWSGS	3	YSDSVKGRFTISRDNKSTMYLVMNSL	3	ARSAELGSSRRKIQGY	4	WGRGTQV
0	SLRLSCEFS	6	AMG	1	EREFVA	7	SVD	3	KPEDTAVIYCAA	9	DQ	5	TVSS
3		1		9				5		3		1	
1	DVQLQASGGGLVQAGG	1	GRTFSGF	2	WFRQFPKG	27	AINWSGS	3	YSDSVKGRFTISRDNKSTMYLVMNSL	3	ARSAELGSSRRKIQGY	4	WGRGTQV
0	SLRLSCEFS	6	AMG	2	EREFVA	8	SVD	3	KPEDTAVIYCAA	9	DQ	5	TVSS
4		2		0				6		4		2	
1	DVQLQESGGGLVQAGS	1	GVRLDNY	2	WFRQAPGK	27	GISWSSG	3	YSDSVKGRFALSRDNKNTVYLQMN	3	QYQDRYYDEFTWKEK	4	WGKGLV
0	SLRLSCAVS	6	AMG	2	ERESVA	9	TLL	3	KPEDTAVIYCAA	9	DMDY	5	TVSS
5		3		1				7		5		3	
1	DVQLQESGGGLVQAGD	1	GPENNY	2	WFRQAPGK	28	GISWSSG	3	YSDSVKGRFTISRDNKNTAYLQMN	3	QYQERYYSDFSLEK	4	WGKGLV
0	SLRLSCAAS	6	AIG	2	EREFVA	0	SLL	3	KPEDTALYCAA	9	GMEY	5	TVSS
6		4		2				8		6		4	
1	DVQLQESGGGLVQAGD	1	GRRFDNY	2	WFRQAPGK	28	AISWSSG	3	YLDTVKGRFTISRDNKSTVYLQMN	3	RYQPRYYDSGDMGDY	4	WGQGTQV
0	SLRLSCVGS	6	AMA	2	ERTFVA	1	TTR	3	KPEDTAVIYCAA	9	EYEF	5	TVSS
7		5		3				9		7		5	
1	DVQLQESGGGLVQAGH	1	GSREFDNY	2	WFRQAPGK	28	AISWSSG	3	YLDTVKGRFTISRDNKSTVYLQMN	3	RYQPRYYDSGDMGDY	4	WGQGTQV
0	SLRLSCVGS	6	AMG	2	EREFVA	2	TTR	4	KPEDTAVIYCAA	9	EYDN	5	TVSS
8		6		4				0		8		6	
1	DVQLQASGGGLVQAGG	1	GHTFSSY	2	WFRQAPGK	28	ANMSGT	3	YSDSVKGRFTISRDIKNTVYLQMN	3	VDRSTGWDSWRDDPD	4	WDQGTQV
0	SQRLSCAAS	6	SMA	2	EREFVA	3	KTA	4	KPEDTALYCAA	9	QYDY	5	TVSS
9		7		5				1		9		7	
1	SGGGLVQAGGSQRLSC	1	GHTFSSY	2	WFRQAPGK	28	ANMSGT	3	YADSVRGRFTMSRDIKNTVYLQMN	4	ADFRGWATWRDDPD	4	WDQGTQV
1	AAS	6	SMA	2	EREFVA	4	NTY	4	KEEDTALYCAA	0	QYDY	5	TVSS
0		8		6				2		0		8	
1	DVQLQESGGGLVQAGG	1	GFTFDDY	2	WFRQAPGK	28	SISNNNS	3	YADSVKGRFTIASDNKNTVYLQMN	4	DVTLNPFTHGWNTRSG	4	WGQGTQV
1	SLRLSCAAS	6	VIG	2	EREGVS	5	TY	4	KPEDTAVIYCAA	0	PMYREYDY	5	TVSS
1		9		7				3		1		9	
1	VQLQESGGGLVQAGGS	1	GFTFDDY	2	WFRQAPGK	28	SISNNNS	3	YADSVKGRFTIASDNKNTVYLQMN	4	DVTLNPFTHGWNTRSG	4	WGQGTQV
1	LRSLCAAS	7	VIG	2	ECEGVS	6	TY	4	KPEDTAVIYCAA	0	PMYREYDY	6	TVSS
2		0		8				4		2		0	
1	DVQLQASGGGLVQAGG	1	EFTFDDY	2	WFRQAPGK	28	SISDGS	3	YADSVKGRFTISSDNKNTVYLHMSL	4	DVTLNPFTHGWNTRSG	4	WGQGTQV
1	SLRLSCAAS	7	VIG	2	EREGVS	7	TY	4	KPEDTAVIYCAA	0	PMYREYDY	6	TVSS
3		1		9				5		3		1	

10

20

30

40

【表 9 - 5】

1	VQLQASGGGLVQAGGS	1	GFTFDDY	2	WFRQSPGK	28	CISSAGS	3	YADSVKGRFTISSD	4	DVTINPFTGWDTRSG	4	WGQGTQV
1	LRLSCAAS	7	VIG	3	EREGVS	8	TY	4	NAKNMVYLQMDNL	0	PMRYEYDY	6	TVSS
4		2		0				6	KPETA	4		2	
1	DVQLQASGGGLVQAGG	1	GFTFDDY	2	WFRQAPGK	28	SISSSGS	3	YADSVKGRFTISSD	4	DVTINPFTGWDTRSG	4	WGQGTQV
1	SLRLSCAAS	7	VIG	3	EREGVS	9	IY	4	NAKNTVYLQMN	0	PMRYEYDY	6	TVSS
5		3		1				7	KPETA	5		3	
1	DVQLQASGGGLVQAGG	1	GFTFDDY	2	WFRQAPGK	29	SISSSGS	3	YADSVKGRFTISSD	4	DVTINPFTGWDTRSG	4	WGQGTQV
1	SLRLSCAAS	7	VIG	3	EREGVS	0	IY	4	NAKNTVYLQMN	0	PMRYEYDY	6	TVSS
6		4		2				8	KPETA	6		4	

Seq: 配列番号
fw: フレームワーク
cdr: 相同性決定領域

【表 1 0 - 1】

表A-2

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
Jk25	QVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCVAS-GSISIIITMGWTRQAPGKQREFVA-RVLIIGSTG--VADSVKGRFTISRDNITKN--TVYLEMNSLKPEDTAVYVCNA-----GNPGTSYHY--WGQGTQVTVSS													
Jk29	Q.....N.....I.....S.....G.....N.W.Q.....Q.....R.I.....													
MU725	D.Q.....A.....A.....FTEDDYVI..F.....E..G.S--SISNNN.Y.....AS.A.A.....A.DVILNPTGWNTRSG.MYR.E.DY.....													
WF114	-Q.....A.....A.....FTEDDYVI..F.....EC.G.S--SISNNN.Y.....AS.A.A.....A.DVILNPTGWNTRSG.MYR.E.DY.....													
MU1103	D.Q.A.....A.....A.....EFTEDDYVI..F.....E.G.S--SISD.Y.....S.A.A.....H.....A.DVILNPTGWNTRSG.MYR.E.DY.....													
WF100	-Q.A.....A.....A.....FTEDDYVI..F.S.....E.G.S--CISD.Y.....S.A.A.....M.....Q.DN.....A.DVILNPTGWNTRSG.MYR.E.DY.....													
MU1105	D.Q.A.....A.....A.....FTEDDYVI..F.....E.G.S--SISSS.IY.....S.A.A.....Q.....F.A.DVILNPTGWNTRSG.MYR.E.DY.....													
WF97	D.Q.A.....A.....A.....FTEDDYVI..F.....E.G.S--SISSS.IY.....S.A.A.....Q.....F.A.DVILNPTGWNTRSG.MYR.E.DY.....													
Jk33	Q.....R.....A.....A.....RTL.NYA.A.F.G.E.....SISASD.L.....F.....T.....A.....RWIGVRAPAE.N.....													
Jk22R.....A.....A.....RTL.NYA.A.F.G.E.....SISASD.L.....F.....T.....A.....RWIGVRAPAE.N.....													
Jk35R.....A.....A.....RTE.NYA.A.F.G.E.....AISAAD.L.....F.....Q.....Q.....RWIIVRAPAE.N.....													
Jk34	Q.....R.....A.....A.....RTE.NYA.A.F.G.E.....AISAAD.L.....F.....Q.....Q.....RWIIVRAPAE.N.....													
WF124	D.Q.A.....A.....A.....Q.....A.....HTE.SYS.A.F.....E.....ANMS.TKTA..S.....IP.....L.A.A.--VDRSTGWSRDDPDQ.D.--D.....													
WF139A.....A.....A.....Q.....A.....HTE.SYS.A.F.....E.....ANMS.TNTY.....R.M..TA.....Q.....E.L.A.A.--ADRFGRWATWRDDPDQ.D.--D.....													
WF211	E.Q.V.....A.....A.....A.....RTFTNLG..F.....E.....--ADTWS.TSTW--G.....A.....Q.N.....A.....RURGWITTRK-PNE.D.--A.....													
MU535	-Q.A.....A.....A.....TV..FT.DDY.V.F.....LK.GLS--CLSRDGRFY--HSN.....MXS.DX.....Q.LD..DX.X.A.....CTSVVLLAENW.E.--													
MU415	-Q.A.....A.....A.....TV..FT.DDY.V.F.....LK.GLS--CLSRDGRFY--HSN.....M.S.DN.....Q.LD..D.....A.....TTSVVVLLAENW.E.--													
WF152	Q.....G.T.-I.F.ND.....L.....EITR..N.....Q.N.....Q.N.....AHTSGSF--													
Jk54	Q.....G.T.-I.F.ND.....L.....EITR..N.....Q.N.....Q.N.....AHTSGSF--													
WF9	Q.....G.T.-I.F.ND.....L.....EITR..N.....Q.N.....Q.N.....AHTSGSF--													
Jk36	Q.....A.....I.LR.YD.....L.....AITSR..N.....Q.N.....Q.N.....AHTSGSF--													
Jk30	Q.....A.....I.LR.YD.....L.....AITS..R.N.....AE.....S.Q.....SG.....DHTFAGY--													
Jk31	Q.....A.....I.LR.YD.....T.....L.....EITS.....S.Q.....SG.....DHTFAGY--													
Jk24	Q.....A.....I.LR.YD.....L.....EITS.....N.....AE.....S.Q.....G.....DHTFAGY--													
Jk32	Q.....A.....TLRLYD.....D.....L.....EITS.....N.....N.....AE.....S.Q.....DHTFAGY--													
WF32	Q.....A.....I.LR.YD.....L.....AITS.....N.....Q.N.....Q.N.....WHFERGNY--													
Jk12	Q.....A.....I.LR.YD.....L.....IASL.I.N.....S.A.....Q.N.....WHYAGRD..													
Jk14	E.Q.V.....A.....A.....ER.F.RN.....L.....IASL.I.N.....S.A.....Q.N.....WHYAGRD..													
Jk2	Q.....G..ER.F.RN.....L.....G-Y.GSM.I.N.....S.A.....Q.N.....WHYAGRD..													
Jk42ER.F.RN.....L.....YITSL.IAN.....S.A.....Q.N.S.....N.Y.....WHYAGRD..													
MU370	D.Q.A.....S.A.....T.....RY.G.FVERVSS.....N..LI.--TITV..K.N--K..Q..I..ND.....T.Q.R.Q.....ASTAVGADT--R.....													
MU375	D.Q.....S.A.....T.....T..LLERIAS.....E.LI.--TITV..K.N--K..Q..I..T..GDNTKS..T.Q.R.....T.....AS.AVGADT--R.....													
MU1053	D.Q.....A.....T.....TG..RTFNYP.A.F.....E.....GITWV.ASTL--FA.....A.....Q.....S.A.....GRGIVAGRI.AEYAD--													
WF42	Q.....A.....T.....A.....A.....RTND.EI.....W.....TINT..N.....A.....Q.H.....VIRT.STY--													
Jk19	Q.....A.....A.....A.....RTEVSEG..F.....E.....AINWR..TA.....V.....I.Q.....GRTAGASTMIRE.DS--E.....													
WF121	D.Q.....A.D.....EF..RTE.GFA..F.F.E.....AINWS.DTD--S.....V.Q.--MM.A.....F.AE--ARSAGLSSRRREG.DK--R.....													
WF144	D.Q.....A.D.....EF..RTE.GFA..F.F.E.....AINWS.DTD--S.....V.Q.--MM.A.....F.AE--ARSAGLSSRRREG.DK--R.....													
WF129	D.Q.A.....A.....EF..RTE.GFA..F.F.E.....AINWS.SVD--S.....V.S--M.V.....AE--ARSAGLSSRRREG.DK--R.....													
WF141	D.Q.A.....A.....EF..RTE.GFA..F.F.E.....AINWS.SVD--S.....V.S--M.V.....AE--ARSAGLSSRRREG.DK--R.....													
MU523	D.Q.....A.S.I..AV..VRLDNYA..F.....E.S.--GWSGGLI--S.....A.....A.....Q.....QYQDRYDEFTWKEKMDY..K.L.L.....													
MU1065	D.Q.....A.D.....A.....PHENYAI..F.....E.....GWSGGLI--S.....D.....A.Q.....QYQERYYSDESLKCKMEY..K.L.L.....													
MU1067	D.Q.....A.D.....G..RRFNDA..A.F.....E.T.....AISWSG.TR--L.T.....A.S--Q.....RYQPRYDSGMDG.F.EF.....													
MU551	D.Q.....A.H.....G..REFDNYA..F.....E.....AISWSG.TR--L.T.....A.S--Q.....RYQPRYDSGMDG.F.EF.....													
Jk46	Q.....A.....A.....A.....RTE.SVA..F.....E.....TIMWS.GRTT--SA.....Q.....DRESVAVEYD..													
WF14	E.Q.V.....A.....A.....A.....RTE.SVA..F.....E.....TIMWS.GRTT--SA.....Q.....DRESVAVEYD..													
MU738	D.Q.A.....A.....A.....AG..RTFNID..F.....E.R.....AISGS.CSAR--VP.....T.A.....DREFVVAAGTHDLD..													
WF69	D.Q.....A.....A.....AG..RTFNID..F.....E.R.....AISGS.CSAR--VP.....T.A.....DREFVVAAGTHDLD..													
MU737	D.Q.A.....A.....A.....AG..RSE.SYA..F.....A.I.--TITRS.CSTN--VP.....Q.S.....DREFAVASGTHDLD..													
MU727	D.Q.A.....A.....A.....AG..RTE.SYA..F.....E.....SISWS..RTN--GVP.....Q.S.....DREFAVAGTHDLD..													

10

20

30

40

【表 1 1 - 1】

表A-3

配列 番号	名称	アミノ酸配列
1	WF152	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCGATGIIFSINDMGWYRQAPGKQRELVAEITRGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLPEDTAVYYCNAAHFTSGSFWGQGTQVTVSS
2	Jk54	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCGATGIIFSINDMGWYRQAPGKQRELVAEITRGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLPEDTAVYYCNAAHFTSGSFWGQGTQVTVSS
3	WF9	QVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCGATGIIFSINDMGWYRQAPGKQRELVAEITRGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLPEDTAVYYCNAAHFTSGSFWGQGTQVTVSS
4	Jk36	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGGSTNYADS VKGRFTISRDNAAENTVSLQMNSLKPEDTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
5	Jk30	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSGGRTNYADS VKGRFTISRDNAAENTVSLQMNSLKSQDGTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
6	Jk24	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAEITSGGSTNYADS VKGRFTISRDNAAENTVSLQMNSLKPEDTAVYYCNAHHTFAGAYWGQGTQVTVSS
7	Jk31	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIILRLYDMGWYRQTPGKQRELVAEITSGGSTNYADS VKGRFTISRDNAAENTVSLQMNSLKSQDGTAVYYCNADHTFAGVYWGQGTQVTVSS
8	Jk32	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLRLYDMGWYRQADGKQRELVAEITSGGSTNYAN SVKGRFTISRDNAAENTVSLQMNSLKPEDTAVYYCNAEHTFMGAYWGQGTQVTVSS
9	WF32	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSGGSTNYADS VKGRFTISRDNAAKSMVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAWHVFRGNYWGQGTQVTVSS
10	WF42	QVQLQESGGGLVQAGGSLTSLCAASRNTDSIEIMGWYRQAPGKQREWVATINTGGNTGYA DSVKGRFAISRDNAAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTAVIRTYSTYWGQGTQVTVSS
11	JK12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVARIASLGITNYADS VKGRFTISSDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
12	Jk14	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVARIASLGITNYADS VKGRFTISSDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
13	Jk 2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVSGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELGVYVSGMGITNYA DSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
14	Jk42	QVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAITSLGIANYADS VKGRFTISSDNAKNTVYLQMNNLKSQDGTAVYCNHYWHYAAGRDIYWGQGTQVTVSS
15	MU370	DVQLQASGGGSVQAGGSLTSLCRYSGGFVFRVSSMGWYRQAPGNQRELIATITVGKNTYK DSVQGRFIISRNDTTVTLQMNRLQPEDTAVYYCNLASTAVGADTWGQGTQVTVSS
16	MU375	DVQLQESGGGSVQAGGSLTSLCTASGLLRLASMGWYRQAPGKERELIATITVGKNTYKDS VQGRFIITRDNTGDNTKSTVTLQMNRLKPEDTAVYYCNTASPAVGADTWGQGTQVTVSS
17	Jk25	QVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIISITMGWYRQAPGKQREFVARVIIIGGSTGYADSV KGRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCNAGNPGTSYHYWGQGTQVTVSS
18	Jk29	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSISNIITMGWYRQAPGKQREFVARIIIGGSTGYSDSV KGRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCNAGNPGTRYIYWGQGTQVTVSS
19	Jk46	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSVAMGWFRQAPGKEREFVATINWSGGRTTY ADSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRFSVVAVEYDYWGQGTQVTVSS
20	WF14	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSVAMGWFRQAPGREREFVATINWSGGRTTYA DSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRFSVVAVEYDYWGQGTQVTVSS
21	Jk20	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAISGRTFIADMGWFRQAPGKEREFQAGITWFGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAIYYCAAGLKRIGDQREADYWGQGTQVTVSS
22	Jk27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAISGRTFIADMGWFRQAPGKEREFQAGITWFGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAIYYCAAGLKRIGDQREADYWGQGTQVTVAS

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

23	Jk26	QVQLQESGGGLVQAGGSVRLSCAISGRFTINDMGWFRQAPGKEREFQAGITWFGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAIYYCAAGLKRIGDQREADYWGQGTQVTVSS
24	MU738	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAGSGRTFTNYDMGWFRQAPGKEREFVAAISGSGGSARY AVPVKGRFTITRDNAKNTVYLQMSSSLKPEDTAVYYCAADRFVVAAGTHDLDYWGQGTQVT VSS
25	WF69	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGRTFTNYDMGWFRQAPGKEREFVAAISGSGGSARY AVPVKGRFTITRDNAKNTVYLQMSSSLKPEDTAVYYCAADRFVVAAGTHDLDYWGQGTQVT VSS
26	MU737	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAGSGRSFSSYAMGWFRQAPGKAREIVATITRSGGSTNYA VPVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLKPEDTAVYYCAADRFVAVASGTHDLDYWGQGTQVTVS S
27	MU727	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAGSGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVASISWSGSRTNY GVPVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLKPEDTAVYYCAADRFVAVAGTHDLDYWGQGTQVTV SS
28	Jk44	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRDTRYTMGWFRQAPGKEREFVSGITWNGGSTYA DSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRFTLVPTTSDLDYWGQGTQVTVSS
29	Jk33	QVQLQESGGRLVQPGGSLRLSCAASGRTLSNYAMAWFRQGPGKEREFVASISASDSTLYADF VKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTTVYYCAARFWIGVRAPAENYWGQGTQVTVSS
30	Jk22	QVKLQESGGRLVQPGGSLRLSCAASGRTLSNYAMAWFRQGPGKEREFVASISASDSTLYADF VKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTTVYYCAARFWIGVRAPAENYWGQGTQVTVSS
31	Jk35	QVKLQESGGRLVQPGGSLRLSCAASGRTFSNYAMAWFRQGPGKEREFVAAISAADSTLYADF VKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARWWIAVRAPAENYWGQGTQVTVSS
32	Jk34	QVQLQESGGRLVQPGGSLRLSCAASGRTFSNYAMAWFRQGPGKEREFVAAISAADSTLYAD FVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARWWIAVRAPAENYWGQGTQVTVS S
33	MU397	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAPSGGTFDAYDMGWYREAPGKKRQFVAAVRSGGGTTRY ADSVKGRFTISRDDAKDTVFLQMNSLKPEDTALYYCAADRWGLFSLIATPTHWGQGTQVTV SS
34	MU1068	DVQLQASGGGSVQEGESLKLSCVSGSRTFSDWAMGWYRQAPGKDREFVAAVSGAGRGGK PSYANSVKGRFTVSRDNKNTVYLQMDNLKPEDTAVYYCAADRLVLVALSIADPGFWGQGT RVTVSS
35	MU274	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVFSRYTMGWYREVPGKEREFVAAVRPSGDSTYY GNSVKGRFSISRDDDKNIVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGFPVLVALSIADPDYWGQGTQVTV ST
36	MU413	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGLSFTRYTMGWYREVPGKEREFVAAVKPAGDSAYY GASVKGRFTASRDNAKNTVTLQMNSLKPEDTAIYYCAAGFPVLTALHIADPDYWGQGTQVT VSP
37	MU1053	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTGSGRTFRNYPMAWFRQAPGKEREFVAGITWVGASTLY ADFAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAGRGIVAGRIPEYADWGQGTQVT VSS
38	Jk19	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFVSFGMGWFRQAPGKEREFVAAINWRGSTTAY ADSVKGRFTISRDTVKNITLYLQMNSLKPEDTAIYYCAEGRTASASTMIREYDSWGQGTQVTVS E
39	WF140	DVQLQASGGGSVQAGGSLRLSCAASGLSFSFYAMGWFRQEPGKEREFVASIRSSGGTTYAES VKGRFTISRDNKNTMYLQMNNLKPEDTAVYYCAADRLVITKLSIADPGYWGQGTQVTVSS
40	MU535	VQLQASGGGLVQAGGSLRLSCTVSGFTSDDYTVGWFRQAPGLKREGLSCLSRDRGRFYHSNS VKGRFTMXSDDXKNTVYLQLDSLKPDDTAVXYCAACTSVVLLAPNWEYWGQGTQVTVSS
41	MU415	VQLQASGGGLVQAGGSLRLSCTVSGFTSDDYTVGWFRQAPGLKREGLSCLSRDRGRFYHSNS VKGRFTMSDDNKNTVYLQLDSLKPDDTAVYYCAATTSVVLLAPNWEYWGQGTQVTVSS
42	WF211	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAAGRTFTNLGMGWFRQAPGKEREFVAAADTWSGTSTWYG DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCAARLRGWITTRKPNEDYWGQGTQVT

10

20

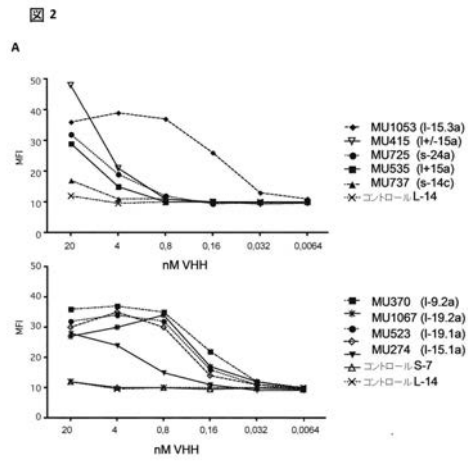
30

40

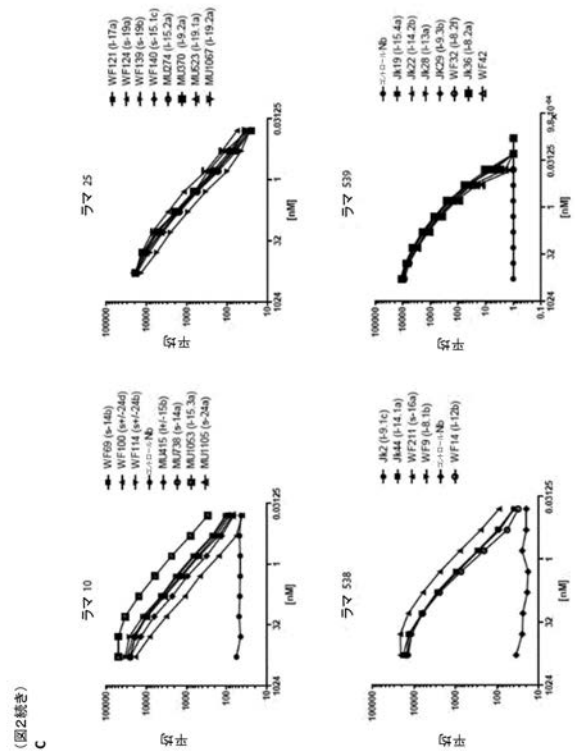
【表 1 1 - 3】

		VAS	
43	WF121	DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCEFSGRTFSGFAMGWFRQFPGKEREVAAINWSGSDTDYS DSVKGRFTISRDNVQMMYLMNSLKPEDTAVYFCAEARSAGLGSSRRIEGYDKWGRGTQV TVSS	
44	WF144	DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCEFSGRTFSGFAMGWFRQFPGKEREVAAINWSGSDTDYS DSVKGRFTISRDNVQMMYLMNSLKPEDTAVYFCAEARSAGLGSSRRIEGYDKWGRGTQV TVSS	
45	WF129	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCEFSGRTFSGFAMGWFRQFPGKEREVAAINWSGSSVDYS DSVKGRFTISRDNVQSTMYLVMNSLKPEDTAVYYCAEARSAGLGSSRRIEGYDQWGRGTQV TVSS	10
46	WF141	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCEFSGRTFSGFAMGWFRQFPGKEREVAAINWSGSSVDYS DSVKGRFTISRDNVQSTMYLVMNSLKPEDTAVYYCAEARSAGLGSSRRIEGYDQWGRGTQV TVSS	
47	MU523	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGVRLDNYAMGWFRQAPGKERESVAGISWSSGTLTLYS DSVKGRFAISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAQYQDRYDEFTWKEKMDYWGKG TLVTVSS	
48	MU1065	DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGPHFNNAIGWFRQAPGKEREFVAGISWSSGSLLYSD SVKGRFTISRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTALYYCAAQYQERYSDYSLKEKGMWYWGKTLV TVSS	
49	MU1067	DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCVSGSRRFDNYAMAWFRQAPGKERTFVAASWSSGTTTRYL DTVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARYQPRYDSDGMDGYEYFWGQGT QTVSS	20
50	MU551	DVQLQESGGGLVQAGHSLRLSCVSGSRFDNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSSGTTTRYL DTVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAARYQPRYDSDGMDGYEYDNWGQG TQTVSS	
51	WF124	DVQLQASGGGLVQAGGSQRLSCAASGHTFSSYSMAWFRQAPGKEREFVAANSMSGTKTAY SDSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNLSLKPEDTALYYCAAADRSTGWDSDWRDDPDQYDYWDQ GTQTVSS	
52	WF139	SGGGLVQAGGSQRLSCAASGHTFSSYSMAWFRQAPGKEREFVAANIMSGTNTYYADSVRG RFTMSRDIKNTVYLQMNLSKEEDTALYYCAAADRFRGWATWRDDPDQYDYWDQGTQVT VSS	
53	MU725	DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYVIGWFRQAPGKEREGVSSISNNSTYYADS VKGRFTIASDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADVTLNPFTGWNTSRGPMYRYEYDYW GQGTQTVSS	30
54	WF114	VQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYVIGWFRQAPGKECEGVSSISNNSTYYADSV KGRFTIASDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADVTLNPFTGWNTSRGPMYRYEYDYWG QGTQTVSS	
55	MU1103	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASEFTFDDYVIGWFRQAPGKEREGVSSISDGYSTYYADS VKGRFTISSDNKNTVYLHNMNSLKPEDTAVYYCAADVTLNPFTGWNTSRGPMYRYEYDYWG QGTQTVSS	
56	WF100	VQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYVIGWFRQSPGKEREGVSCISSAGSTYYADSV KGRFTISSDNKNTVYLQMDNLKPEDTAVYYCAADVTLNPFTGWNTSRGPMYRYEYDYWG QGTQTVSS	
57	MU1105	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYVIGWFRQAPGKEREGVSSISSSGSIIYADSV KGRFTISSDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYFCAADVTLNPFTGWDTRSGPMYRYEYDYWG QGTQTVSS	40
58	WF97	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYVIGWFRQAPGKEREGVSSISSSGSIIYADSV KGRFTISSDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYFCAADVTLNPFTGWDTRSGPMYRYEYDYWG QGTQTVSS	

【 図 2 A 】

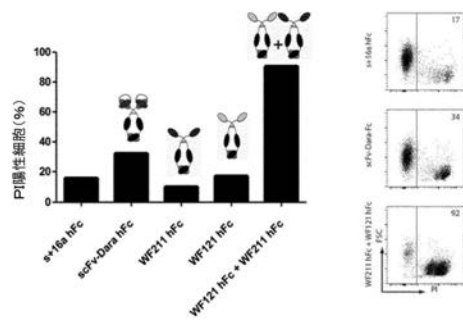


【 ㊦ 2 C 】



【図 3】

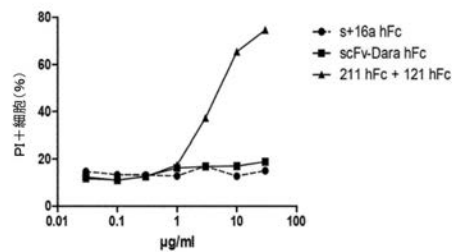
図 3



補体の給源としての20%のブールされたヒト血清の存在下、LP-1骨髓腫細胞を37℃で1時間、2 μ gのFc融合タンパク質とインキュベートした。ヨウ化プロビジウム(PI)の取り込みから細胞死を決定した。

【図 4】

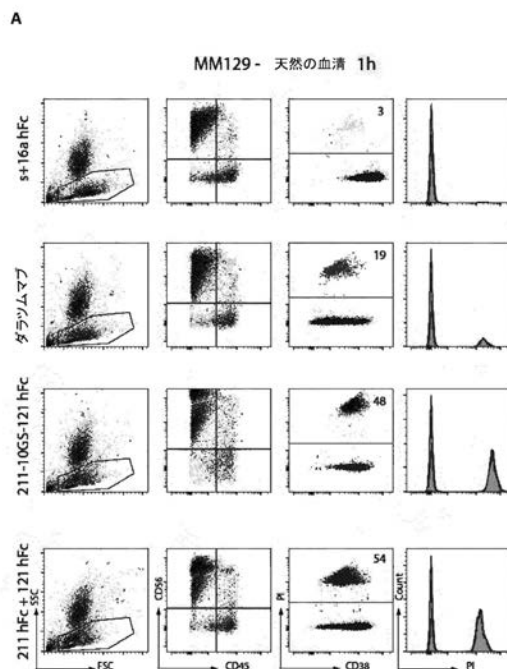
図 4



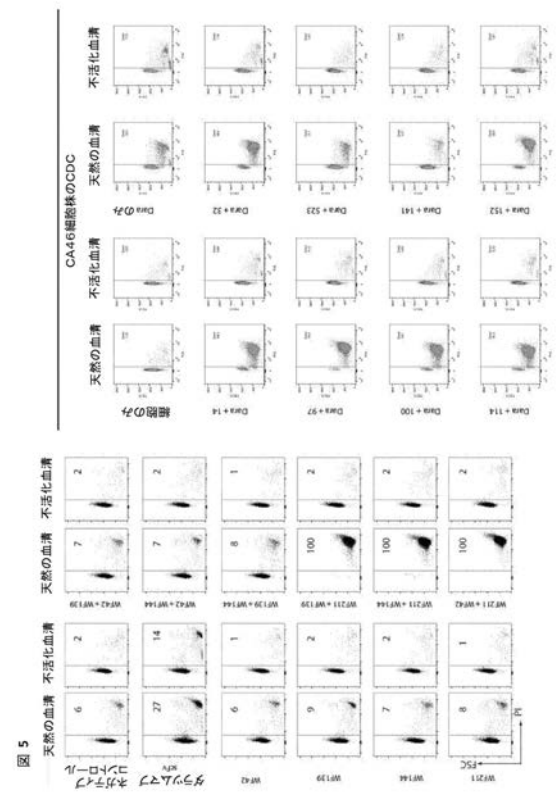
補体の給源としての20%のブールされたヒト血清の存在下、LP-1骨髓腫細胞を37℃で2時間、異なる濃度のFc融合タンパク質とインキュベートした。ヨウ化プロビジウムによる染色から細胞死を決定した。

【図 6 A】

図 6

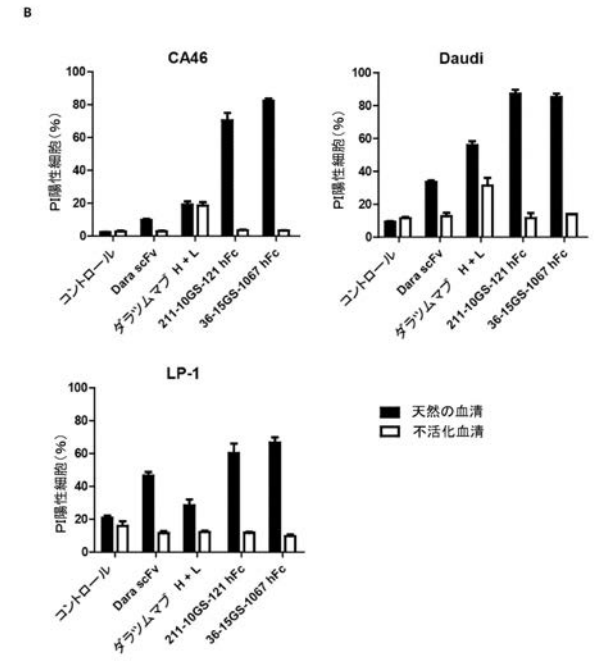


【図 5】

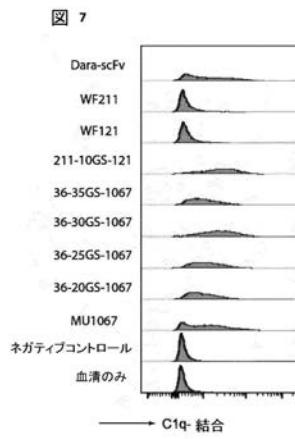


【図 6 B】

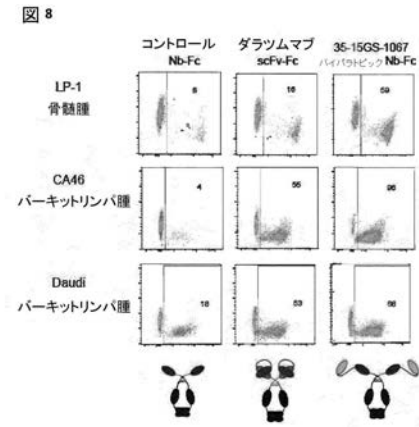
図6 (続き)



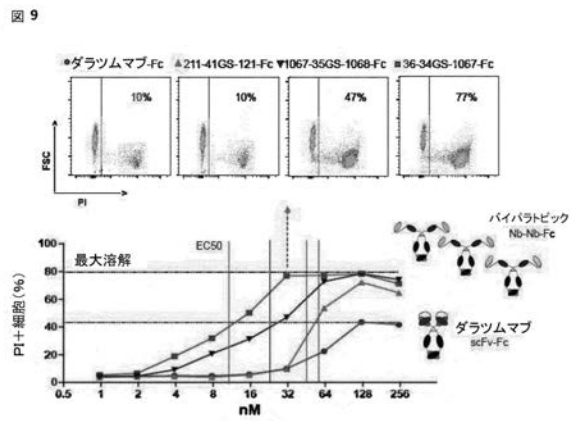
【 図 7 】



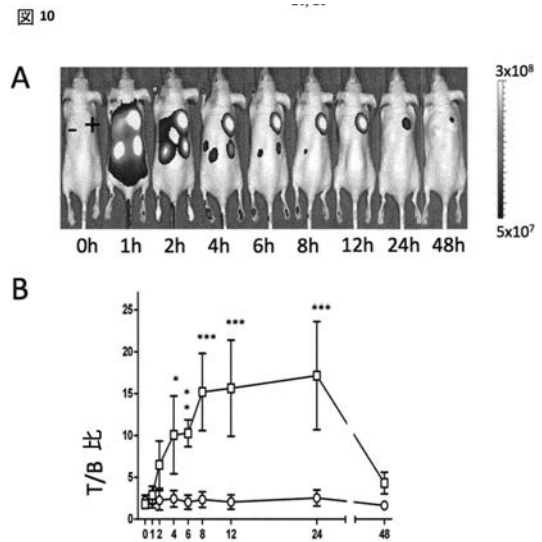
【 図 8 】



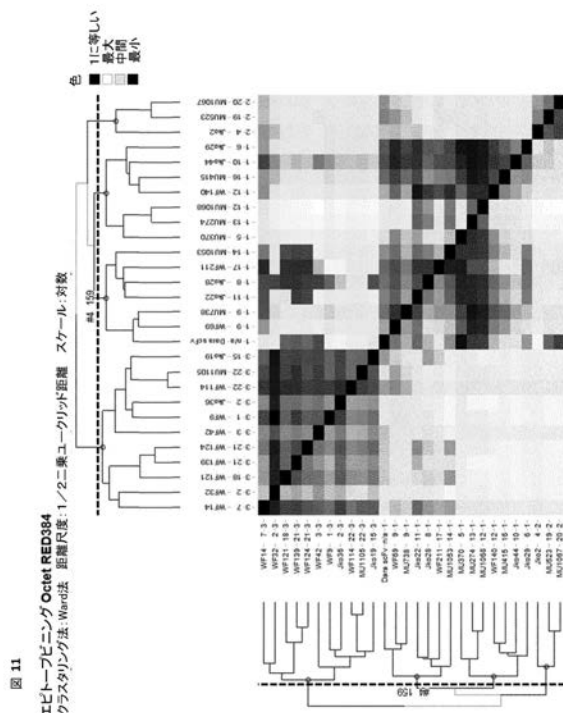
【 図 9 】



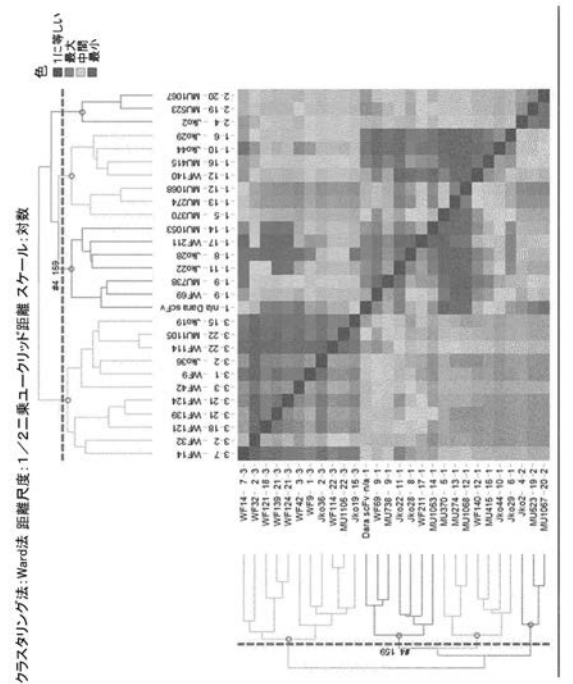
【 図 10 】



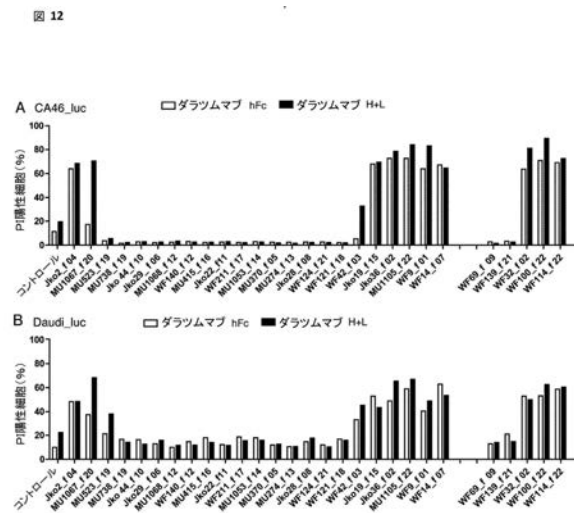
【図 1 1 - 1】



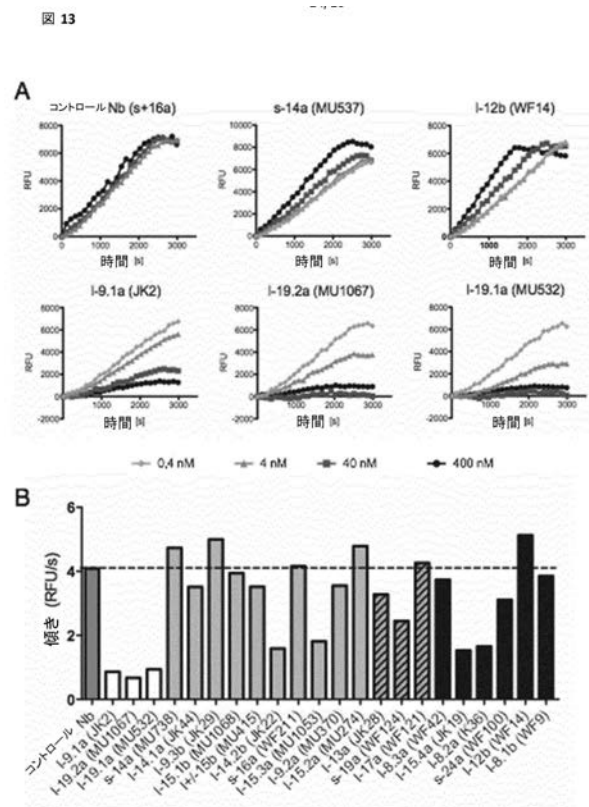
【図 1 1 - 2】



【図 1 2】

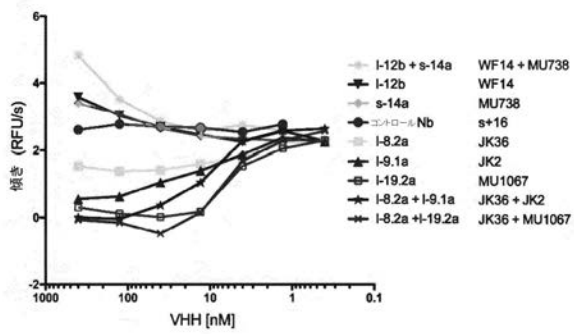


【図 1 3】



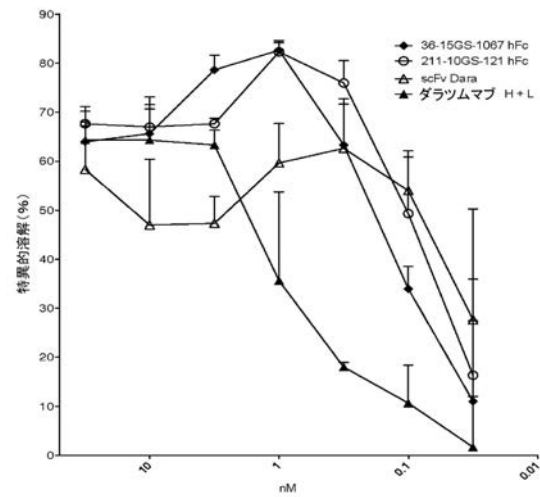
【図 14】

図 14



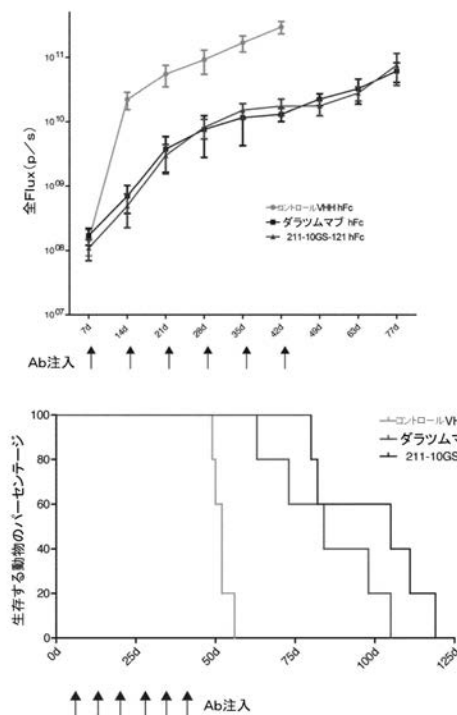
【図 15】

図 15



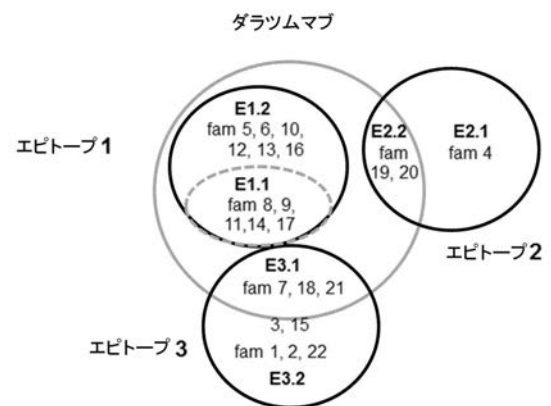
【図 16】

図 16



【図 17】

図 17



【配列表】

2019503167000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/077361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K39/395 G01N33/53
ADD. A61K39/00

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 G01N

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/066109 A1 (DOMANTIS LTD [GB]; DE ANGELIS ELENA [GB]; HOLMES STEVE [GB]; TOMLISON) 14 June 2007 (2007-06-14) abstract page 113, line 16 - line 19 page 121, line 16 - line 28 page 122; tables 8-9 page 122, line 15 - page 123, line 2 figure 25	1-4, 6-10, 13-44
X	----- CN 103 421 115 A (UNIV SOUTHEAST) 4 December 2013 (2013-12-04) the whole document ----- -/--	1-3,23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2017

Date of mailing of the international search report

24/05/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Malamoussi, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/077361

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Mandy Unger ET AL: "Antibody-Antigen Interaction Analysis Using MST to analyse the binding of Nanobodies and Nanobody-Fc fusion proteins to human CD38",</p> <p>1 January 2012 (2012-01-01), pages 1-3, XP055337079,</p> <p>Retrieved from the Internet: URL: http://www.helsinki.fi/biosciences/corefacilities/microscalethermophoresis/Application%20Note%20NT011%20Using%20MST%20to%20analyse%20the%20binding%20of%20Nanobodies%20v001%2001.pdf [retrieved on 2017-01-19] page 1, right-hand column, paragraph 2 page 2, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 2, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-----</p>	4,6-10, 13-44
A	<p>P Bannas ET AL: "Vergleich von CD38-spezifischen Nanobodies und konventionellen Antikörpern für die Nah-Infrarot- Fluoreszenz Bildgebung von Lymphomen in vivo",</p> <p>1 January 2013 (2013-01-01), pages 1-7, XP055337071,</p> <p>Retrieved from the Internet: URL: https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1346241 [retrieved on 2017-01-19] page 5 - page 6</p> <p>-----</p>	1-4, 6-10, 13-44
A	<p>AUSIELLO C M ET AL: "Functional topography of discrete domains of human CD38",</p> <p>TISSUE ANTIGENS, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK,</p> <p>vol. 56, no. 6,</p> <p>1 December 2000 (2000-12-01), pages 539-547, XP002389874,</p> <p>ISSN: 0001-2815, DOI: 10.1034/J.1399-0039.2000.560608.X</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-4, 6-10, 13-44
A	<p>HOSHINO S-I ET AL: "Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD+ glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus",</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US,</p> <p>vol. 158, no. 2,</p> <p>15 January 1997 (1997-01-15), pages 741-747, XP002389875,</p> <p>ISSN: 0022-1767</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-4, 6-10, 13-44

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/077361**Box No. 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:

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 No. 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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:

1-4, 6-10, 13-44

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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2016/ 077361

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-3(completely); 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(partially)

polypeptide comprising CD38 specific ISVD with EC50 value of less than 200nM and VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 117(=118=119), 233 (=234=235) and 349(=350=351), in particular VHH with SEQ ID No 1, 2, 3 relating to clones WF152, JK54 and WF9, respectively.

2. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 120 (=121), 236(=237) and 352(=353), in particular VHH with SEQ ID No 4,5 relating to clones JK36 and JK30, respectively.

3. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 122, 238 and 354 in particular VHH with SEQ ID No 6 relating to clone JK24

4. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 123, 239 and 355 in particular VHH with SEQ ID No 7 relating to clone JK31

5. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 124, 240 and 356 in particular VHH with SEQ ID No 8 relating to clone JK32

6. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 125, 241 and 357 in particular VHH with SEQ ID No 9 relating to clone WF32

7. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 126, 242 and 358 in particular VHH with SEQ ID No 10 relating to clone WF42

8. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 127(=128), 243(=244) and 359(=360), in particular VHH with SEQ ID No 11, 12 relating to clones JK12 and JK14, respectively.

International Application No. PCT/ EP2016/ 077361

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. claims: 4, 6, 8-10, 13-30, 32-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 129, 245 and 361 in particular VHH with SEQ ID No 13 relating to clone JK2

10. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 130, 246 and 362 in particular VHH with SEQ ID No 14 relating to clone JK42

11. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 131, 247 and 363 in particular VHH with SEQ ID No 15 relating to clone MU370

12. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 132, 248 and 364 in particular VHH with SEQ ID No 16 relating to clone MU375

13. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 133, 249 and 365 in particular VHH with SEQ ID No 17 relating to clone JK25

14. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 134, 250 and 366 in particular VHH with SEQ ID No 18 relating to clone JK29

15. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 135(=136), 251(=252) and 367(=368), in particular VHH with SEQ ID No 19, 20 relating to clones JK46 and WF14, respectively.

16. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 137(=138), 254(=255) and 369(=370), in particular VHH with SEQ ID No 21, 22 relating to clones JK20 and JK27, respectively

17. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 139, 255 and 371 in particular VHH with SEQ ID No 23 relating to clone JK26

International Application No. PCT/ EP2016/ 077361

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

18. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 140(=141), 256(=257) and 372(=373), in particular VHH with SEQ ID No 24, 25 relating to clones MU738 and WF69, respectively.

19. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 142, 258 and 374 in particular VHH with SEQ ID No 26 relating to clone MU737

20. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 143, 259 and 375 in particular VHH with SEQ ID No 27 relating to clone MU727

21. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 144, 260 and 376 in particular VHH with SEQ ID No 28 relating to clone JK44

22. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 145(=146), 261(=262) and 377(=378), in particular VHH with SEQ ID No 29, 30 relating to clones JK22 and JK22, respectively.

23. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 147(=148), 263(=264) and 379(=380), in particular VHH with SEQ ID No 31, 32 relating to clones JK35 and JK34, respectively.

24. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 149, 265 and 381 in particular VHH with SEQ ID No 33 relating to clone MU397

25. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 150, 266 and 382 in particular VHH with SEQ ID No 34 relating to clone MU1068

26. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

International Application No. PCT/ EP2016/ 077361

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 151, 267 and 383 in particular VHH with SEQ ID No 35 relating to clone MU274

27. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 152, 268 and 384 in particular VHH with SEQ ID No 36 relating to clone MU413

28. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 153, 269 and 385 in particular VHH with SEQ ID No 37 relating to clone MU1053

29. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 154, 270 and 386 in particular VHH with SEQ ID No 38 relating to clone JK19

30. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 155, 271 and 387 in particular VHH with SEQ ID No 39 relating to clone WF140

31. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 156, 272 and 388 in particular VHH with SEQ ID No 40 relating to clone MU535

32. claims: 4, 8-10, 14-29, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 157, 273 and 389 in particular VHH with SEQ ID No 41 relating to clone MU415

33. claims: 4, 5, 8-12, 14-31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 158, 274 and 390 in particular VHH with SEQ ID No 42 relating to clone WF211

34. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 159(=160), 275(=276) and 391(=392), in particular VHH with SEQ ID No 43, 44 relating to clones WF121 and WF144, respectively.

35. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

International Application No. PCT/ EP2016/ 077361

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 161=(162), 277(=278) and 393(=394), in particular VHH with SEQ ID No 45, 46 relating to clones WF129 and WF141, respectively.

36. claims: 4, 6, 8-10, 13-30, 32-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 163, 279 and 395 in particular VHH with SEQ ID No 47 relating to clone MU523

37. claims: 4, 6, 8-10, 13-30, 32-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 164, 280 and 396 in particular VHH with SEQ ID No 48 relating to clone MU1065

38. claims: 4, 6, 8-10, 13-30, 32-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 165, 281 and 397 in particular VHH with SEQ ID No 49 relating to clone MU1067

39. claims: 4, 6, 8-10, 13-30, 32-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 166, 282 and 398 in particular VHH with SEQ ID No 50 relating to clone MU551

40. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 167, 283 and 399 in particular VHH with SEQ ID No 51 relating to clone WF124

41. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 168, 284 and 400 in particular VHH with SEQ ID No 52 relating to clone WF139

42. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 169=(170), 285(=286) and 401(=402), in particular VHH with SEQ ID No 53, 54 relating to clones MU725 and WF114, respectively.

43. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 171, 287 and 403 in particular VHH with SEQ ID No 55 relating to clone MU1103

44. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

International Application No. PCT/ EP2016/ 077361

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 172, 288 and 404 in
particular VHH with SEQ ID No 56 relating to clone WF100

45. claims: 4, 7-10, 14-29, 31, 33-44(all partially)

VHH comprising CDR1-3 with SEQ ID No 173(=174), 289(=290)
and 405(=406) in particular VHH with SEQ ID No 57, 58
relating to clones MU1105 and WF97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/077361

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007066109	A1	14-06-2007	AU 2006323415 A1	14-06-2007
			BR P10619460 A2	08-11-2011
			CA 2632424 A1	14-06-2007
			CN 101379088 A	04-03-2009
			CN 101426815 A	06-05-2009
			CR 10100 A	21-08-2008
			EA 200801171 A1	30-12-2008
			EP 1963370 A1	03-09-2008
			JP 2009518025 A	07-05-2009
			KR 20080090414 A	08-10-2008
			MA 30020 B1	01-12-2008
			TW 200738750 A	16-10-2007
			US 2010021473 A1	28-01-2010
			WO 2007066109 A1	14-06-2007
			ZA 200804307 B	30-09-2009

CN 103421115	A	04-12-2013	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 5	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02		
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65		
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60		
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		D
A 6 1 K	51/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		Y
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	51/02	2 0 0	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 K	49/00		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	A 6 1 P	13/02		
			A 6 1 P	29/00		
			G 0 1 N	33/68		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 バンナス , ピーター

ドイツ連邦共和国 2 0 3 5 7 ハンブルク、フェットシュトラッセ 3 3 - エー

(72)発明者 シュッツェ , ケルスティン

ドイツ連邦共和国 2 2 5 8 9 ハンブルク、イスフェルトシュトラッセ 2 2

(72)発明者 フュメ , ウィリアム

ドイツ連邦共和国 2 0 2 5 1 ハンブルク、ゲシュヴィスター - ショル - シュトラッセ 2 1

(72)発明者 シュリーバー , レビン

ドイツ連邦共和国 2 2 3 0 7 ハンブルク、リューベンカンブ 5 8

(72)発明者 メンゼル, シュテファン

ドイツ連邦共和国 2 0 2 5 3 ハンブルク、ホーエー ヴァイデ 6 6

(72)発明者 ストールテラー, キャタリーン

ベルギー国 9 0 0 0 ヘント、ネッケルスプットストラート 2 5 9

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 FB03

4B064 AG26 CA02 CA10 CA19 CC15 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA26X AA93X AA98X AB01 BA02 BD14 CA25 CA44 CA46

4C076 AA94 CC01 CC07 CC11 CC15 CC16 CC17 CC27 CC41 EE23

EE41 EE59 FF31

4C084 AA02 AA07 BA01 BA21 BA23 BA37 BA41 CA53 DA39 NA12

NA14 ZA02 ZA36 ZA61 ZA66 ZA81 ZA94 ZB07 ZB08 ZB11

ZB26 ZB27

4C085 AA13 AA14 AA25 AA27 BB11 CC22 DD33 DD62 EE01 HH03

HH11 HH13 KA03 KA26 KA29 KB82

4H045 AA11 BA41 DA75 EA20 EA50 FA74 GA26