

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6947632号

(P6947632)

(45) 発行日 令和3年10月13日 (2021. 10. 13)

(24) 登録日 令和3年9月21日 (2021. 9. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006. 01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C O 7 K 16/24 (2006. 01)

C O 7 K 16/24

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 23 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-536818 (P2017-536818)
 (86) (22) 出願日 平成28年1月12日 (2016. 1. 12)
 (65) 公表番号 特表2018-509137 (P2018-509137A)
 (43) 公表日 平成30年4月5日 (2018. 4. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2016/050070
 (87) 国際公開番号 W02016/113557
 (87) 国際公開日 平成28年7月21日 (2016. 7. 21)
 審査請求日 平成30年12月19日 (2018. 12. 19)
 (31) 優先権主張番号 1500463.3
 (32) 優先日 平成27年1月12日 (2015. 1. 12)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(73) 特許権者 517142462
 クレシェンド・バイオロジックス・リミテ
 ッド
 イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2
 ・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・
 バブラハム・リサーチ・キャンパス・メデ
 イトリナ・ビルディング
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 7 A 結合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 8 及び配列番号 4 0 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト重鎖可変免疫グロ
 ブリンドメイン (V_H) を含む、ヒト IL-17A に結合することができる結合分子。

【請求項 2】

0.2~1000nM の IL-6 産生の阻害についての IC_{50} を有する、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 3】

$5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-11}$ 、例えば、 $5 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-10}$ の KD (M) 値を有する、請求項 1 または 2
 に記載の結合分子。

【請求項 4】

2 つ以上の V_H ドメインを含み、前記 V_H ドメインの少なくとも 1 つが IL-17A に特異的に結合
 する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 5】

ヒト IL-17A に特異的に結合する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 6】

毒素、酵素、放射性同位体又は他の化学部分と結合している、請求項 1 から 5 のいずれか
 一項に記載の結合分子。

【請求項 7】

いかなる機能的内在性軽鎖も重鎖も産生しないマウスから得た又は得ることができる、
 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の結合分子。

10

20

【請求項 8】

請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子と、医薬担体とを含む医薬組成物。

【請求項 9】

化学的皮膚浸透促進剤を含む、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

医薬品として使用するための、請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子又は請求項8若しくは9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

自己免疫疾患、炎症性状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、及び臓器又は組織移植拒絶の治療に使用するための、請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子又は請求項8若しくは9に記載の医薬組成物。

10

【請求項 12】

前記疾患が乾癬、脊椎関節症、ブドウ膜炎及びアトピー性皮膚炎から選択される、請求項11に記載の結合分子又は医薬組成物。

【請求項 13】

皮膚への局所投与用に製剤化されている、請求項11又は12に記載の結合分子又は医薬組成物。

【請求項 14】

前記疾患が乾癬、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、骨関節炎、若年性関節リウマチ、脊椎関節症、全身硬化症、突発性炎症性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫溶血性貧血、自己免疫血小板減少症、甲状腺炎、糖尿病、免疫媒介腎疾患、中枢神経系及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば、多発性硬化症、突発性脱髄性多発性ニューロパチー又はギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー、肝胆道疾患、例えば、感染性、自己免疫慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患及びウィップル病、水泡性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎等の自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、アレルギー性疾患、例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば、好酸球性肺炎、突発性肺線維症及び過敏性肺炎、自己免疫血液障害(例えば、溶血性貧血、再生不良性貧血、真正赤血球性貧血及び突発性血小板減少症を含む)、自己免疫炎症性腸疾患(例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病及び過敏性腸症候群を含む)、移植関連疾患(移植片拒絶及び移植片対宿主病を含む)から選択される、請求項11から13のいずれか一項に記載の結合分子又は医薬組成物。

20

30

【請求項 15】

免疫測定法によって試験試料中のIL-17Aの存在を判定する方法であって、前記試料を請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子及び少なくとも1つの検出可能な標識と接触させる工程を含む方法。

【請求項 16】

患者の予防的又は治療的処置の有効性を評価する工程を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

40

【請求項 18】

請求項17に記載の核酸を含む核酸構築物。

【請求項 19】

請求項17に記載の核酸又は請求項18に記載の構築物を含む単離された宿主細胞。

【請求項 20】

請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子を製造する方法であって、宿主細胞中で前記結合分子をコードする核酸を発現させる工程と、前記宿主細胞培養物から前記結合分子を単離する工程とを含む方法。

【請求項 21】

50

請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子、請求項8又は9に記載の医薬組成物を含むキット。

【請求項22】

請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子を製造する方法であって、

- a) トランスジェニックマウスをIL-17A抗原で免疫化する工程であって、前記マウスは、ヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現しており、機能的内在性軽鎖又は重鎖を生成することができない工程と、
- b) 前記マウスからV_Hドメイン配列を含む配列のライブラリーを生成する工程と、
- c) 前記ライブラリーからV_Hドメイン配列を含む配列を単離する工程とを含む方法。

10

【請求項23】

請求項1から7のいずれか一項に記載の結合分子を含む二重パラトープ、二価又は多特異性結合分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IL-17A結合分子、及び疾患の治療における前記結合分子の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

乾癬は、主として臨床的再発及び皮膚の目に見える領域の醜い病変、全身症状及び薬物関連副作用のために、罹患率及び生活の質の顕著な低下を引き起こす、世界人口の2～3%(約1億2500万人の罹患者)に発症している慢性再発性及び寛解性炎症性皮膚疾患である。「尋常性乾癬」と呼ばれるこの疾患の一般的な形態が患者の80%超で見られ、極小から皮膚表面全体の関与まで大きさが異なり得る紅斑性鱗屑斑(典型的には、肘、膝、頭皮及び臀部上)を特徴とする。

20

【0003】

体表面積(BSA)関与の程度に応じて、乾癬を軽度(3%未満のBSAが関与)、中等度(3～10%のBSA)及び重度(10%超のBSA)疾患に分類することができる。副腎皮質ステロイド、ビタミンD誘導体、コールタール及び局所レチノイド等の局所薬剤が乾癬の初期管理の基本であり、疾患重症度の範囲にわたって患者に施用される治療手段の重要な部分である。軽度から中等度の疾患と診断された患者は、典型的には単剤療法として局所薬剤を処方される。重度疾患の患者は、典型的には光線療法又は全身(低分子)療法、例えばメトトレキサート、シクロスポリン又は経口レチノイドに対する補助として局所薬剤を処方される。中等度から重度の乾癬のための治療体制には抗体をベースとする療法も含まれる。

30

【0004】

乾癬の治療用に現在市場に出ている治療用製品は種々の程度の症状緩和及び再発率低下をもたらしているが、いずれも治癒的であるとは現在考えられていないため、慢性投与を要する。多くの既存の局所薬剤は短期間にわたって有効となり得るが、治療を制限する毒性のために、ほとんどが短期間の使用に制限されている。このことは、患者が副作用についての日常的な監視及び新たな治療プロトコルへの定期的な回帰を要することを意味する。

40

【0005】

重度疾患の患者は、典型的には光線療法又は全身(低分子)療法、例えばメトトレキサート、シクロスポリン又は経口レチノイドに対する補助として局所薬剤を処方される(Nast等、Arch Dermatol Res(2007)299:111～138)。光線療法は有効となり得るが、不便であり、皮膚がんの有意なリスクと関連している。低分子全身療法は、心血管リスクの増加;腎機能障害、白血球減少及び血小板減少と関連している。例えば、メトトレキサートは好中球減少及び肝臓損傷を引き起こすおそれがあり、相応の予防措置なしでは生殖可能年齢の男性及び女性に禁忌となる。シクロスポリンは、腎臓及び血圧に対する潜在的な有害効果を有する強力な免疫抑制剤である。アシトレチンは、一定の範囲の副作用を有する経口レ

50

チノイドであり、これも相応の予防措置なしでは生殖可能年齢の女性に禁忌となる(Nast等、Arch Dermatol Res(2007)299:111~138)。

【0006】

中等度から重度の乾癬のための治療レジメンには抗体ベースの療法も含まれる。承認されている治療薬には、アダリムマブ(Humira(登録商標))、TNF- α に対する活性を有するヒトモノクローナル抗体、TNF- α 阻害剤エタネルセプト(Enbrel(登録商標))、TNF- α 阻害剤インフリキシマブ(Remicade(登録商標))及びごく最近では、ウステキヌマブ(Stelara(登録商標))、IL12及びIL23の共通のp40サブユニットを標的とし、それによって両サイトカインのシグナル伝達を遮断するヒトmAbが含まれる。

【0007】

近年、乾癬でTh17経路の重要性がよく検証されてきており、IL17を標的とするいくつかのモノクローナル抗体(mAb)がこれらのサイトカインの調節及び乾癬への影響の有意な重要性を示している。IL-17、T細胞由来サイトカインは皮膚における局所療法の標的である。乾癬には、ある患者では全身的な面があり得るが、この疾患は主に皮膚のものである。Th17細胞によって分泌されるIL-17が、これらの細胞上に存在するIL-17R複合体を介して表皮角化細胞に作用して、角化細胞過剰増殖と進行中の炎症のフィードバックループを開始し、それによって乾癬プラークを生成する。病理学的活動の主要な要素は局所的に皮膚にあるので、IL-17/IL-17R相互作用の阻害が局所療法の最良の確認された標的であると考えられる。これは、顕著な活動段階が所属リンパ節にあるIL-23等の他の確認されたTh17標的と対照的である。

【0008】

開発中のいくつかの他のモノクローナル抗体薬剤は、中等度から重度の尋常性乾癬の患者で疾患重症度を著しく低下させることが示された。これらの薬剤には、共にIL-17Aを標的とするイクセキズマブ(Eli Lilly社)とセクキヌマブ(Novartis社)、及びIL-17RAのシグナル伝達を阻害するので、IL-17A、IL-17F、IL-17A/F及びおそらくはIL-17Eを含めたこの受容体を利用するIL-17ファミリーメンバーを遮断すると予想されるプロダルマブ(Amgen社)が含まれる。IL-17阻害剤についての予備的臨床結果は、乾癬病態生理学におけるIL-17Aの重要性を示している。実質的に確証的な第III相臨床試験までの独立した臨床試験プログラムで、3種全ての薬剤が中等度から重度の尋常性乾癬の患者で疾患重症度を著しく低下させることが報告された。セクキヌマブは、サイトカイン、ケモカイン及び病変皮膚の炎症反応に関連するタンパク質を下方制御することが示された。要約すると、IL-17Aの阻害により、斑の調節不全免疫系に対処するための選択的介入が可能になる(Girolomoni等、The British Journal of Dermatology. 2012a;167(4):717~724、Huebner等、Gut 2012;61:1693~700、Papp等、New Engl J Med 2012;366:1181~9、Mease等、N Engl J Med. 2014 12;370(24):2295~306及びLangley等、New Engl J Med 2014;371:326~38)。

【0009】

乾癬の治療用に現在市場に出ている治療用製品は種々の程度の症状緩和及び再発率低下をもたらしているが、いずれも治癒的であるとは現在考えられていないため、慢性投与を要する。多くの既存の局所薬剤は短期間にわたって有効となり得るが、治療を制限する毒性のために、ほとんどが短期間の使用に制限されている。このことは、患者が副作用についての日常的な監視及び新たな治療プロトコルへの定期的な回帰を要することを意味する。光線療法は有効となり得るが、不便であり、皮膚がんの有意なリスクと関連しており、多くの従来の(低分子)全身療法は、心血管リスクの増加;腎機能障害、白血球減少及び血小板減少と関連している。全身生物製剤は、中等度から重度の乾癬の治療を一変させたが、いずれの免疫抑制体制とも同様に、慢性使用は感染症又は悪性腫瘍のリスク増加等の顕著な副作用を有し得る。

【0010】

現在の治療的介入のいずれも治癒的でないので、全て慢性使用を要する。治療レジメンは、ローテーション又は連続療法、休薬及び併用療法を含む、毒性を低減するための戦略を採用することによって、これを考慮しなければならない。重要なことに、いくつかの薬

10

20

30

40

50

物については、ある患者が安全に受けることができる暴露に対する絶対的生涯限界が存在する。

【0011】

よって、局所使用と全身使用の両方のための新たな高度に有効で安全な療法選択肢が必要とされている。そのため、特に、長期維持療法が全身mAb使用後に症状を抑え、したがって慢性使用の安全プロファイルを改善することができる、重度疾患の患者で生物学的製剤の有効性を有する新たな局所薬物の必要性は、明らかに未だ対処されていない。同様に、疾患がそれほど重度でないために全身治療されていない患者も、生物学的有効性を有する薬物の局所施用から大いに利益を得るだろう。

【0012】

抗体が、多数の異なる疾患適応症を治療するための極めて有効な治療剤であることが判明した。特に、種々の代替物よりも、治療的使用のための完全ヒト抗体の開発へと向かう明らかな傾向が存在している。しかしながら、その大きさ及び他の物理的特性のために、現在、モノクローナル抗体は静脈内(iv)又は皮下(sc)のいずれかで投与しなければならず、それゆえ、高い全身暴露を有するというのが事実である。よって、抗体は高度に有効となり得るが、その送達経路は通常、最適以下となり、疾患でない位置で標的抗原に結合する抗体をもたらし得る(正常な、疾患でない組織の健全な機能を潜在的に損なう)又は最適以下のPK/PD特性をもたらし得る。いずれの結果も、最適以下の投与経路のために、有効性の喪失及び/又は損なわれた安全プロファイルをもたらし得る。

【0013】

その大きさ及び他の好ましい生物物理学的特性のために、抗体断片は代替投与経路の潜在的に魅力的な候補である。特に、 V_H 断片は、標的特異性及び効力を保持する免疫グロブリン分子の最も小さく、最も強固な部分である。そのため、 V_H ドメインが皮膚の中の治療上有益な位置に達して疾患を局所的に治療するように、 V_H ドメインを皮膚に局所的に送達することが有利であるだろう。血流に進入し得るいずれの V_H も急速に排除されるので、ほとんど又は全く全身暴露はなく、そのため潜在的な機序関連全身毒性が最小化されるだろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第2003/000737号

【特許文献2】国際公開第2004/076618号

【特許文献3】米国特許出願公開第2007/0243132号

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Nast等、Arch Dermatol Res(2007)299:111~138

【非特許文献2】Girolomoni等、The British Journal of Dermatology. 2012a;167(4):717~724

【非特許文献3】Huebner等、Gut 2012;61:1693~700

【非特許文献4】Papp等、New Engl J Med 2012;366:1181~9

【非特許文献5】Mease等、N Engl J Med.2014 12;370(24):2295~306

【非特許文献6】Langley等、New Engl J Med 2014;371:326~38

【非特許文献7】Sambrook等、Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989))

【非特許文献8】Kabat等、Sequences of Immunological Interest、第5版、U.S. Dept. Health & Human Services、Washington, D.C.(1991)

【非特許文献9】Kabat等(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382~391

【非特許文献10】Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No.93-324

【非特許文献11】Hwang SY等(2004) Arthritis Res Ther;6:R120~128

【非特許文献12】Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual、Academic Press;第1版(1996年10月28日) Brian K. Kay、Jill Winter、John McCafferty

【非特許文献13】Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences 2002 Macmillan Publishers Ltd、Nature Publishing Group/www.els.net

【非特許文献14】「Remington's Pharmaceutical Sciences」、E.W.Martin

【非特許文献15】Ren等、Genomics、84、686、2004

【非特許文献16】Zou等、J. Immunol.、170、1354、2003

【非特許文献17】Antibody Engineering、編者Benny Lo、第8章、161~176頁、2004

【非特許文献18】Antibody Engineering、編者Benny Lo、第19章、327~343頁、2004

【非特許文献19】Main等、J Pharmacol Exp Ther.2006年12月;319(3):1395~404

【非特許文献20】Edwards BM、He M、Methods Mol. Biol.2012;907:281~929

【非特許文献21】Edwards BM、He M、Methods Mol. Biol.2012;907:281~92

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、特に乾癬の局所治療のために、IL-17経路に関連する状態の安全で有効な療法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0017】

第1の態様では、本発明は、配列番号3、又は配列番号3と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒト重鎖可変免疫グロブリンドメイン(V_H)を含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0018】

第2の態様では、本発明は、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒト重鎖可変免疫グロブリンドメイン(V_H)であり、前記IL-17A結合分子は配列番号3、又は配列番号3と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を有するCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む、結合分子に関する。

【0019】

第3の態様では、本発明は、配列番号251又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒト重鎖可変免疫グロブリンドメイン(V_H)を含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0020】

別の態様では、本発明は、IL-17に対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒト重鎖可変免疫グロブリンドメイン(V_H)であり、前記IL-17結合分子は配列番号251、又は配列番号251と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を有するCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む、結合分子に関する。

【0021】

別の態様では、本発明は、配列番号285、又は配列番号285と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0022】

別の態様では、本発明は、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子は配列番号287、又は配列番号287と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%

10

20

30

40

50

、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を有するCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む、結合分子に関する。

【0023】

別の態様では、本発明は、配列番号343、又は配列番号343と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0024】

別の態様では、本発明は、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子は配列番号343、又は配列番号343と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を有するCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む、結合分子に関する。

10

【0025】

別の態様では、本発明は、配列番号347、又は配列番号347と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0026】

別の態様では、本発明は、IL-17に対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記IL-17結合分子は配列番号347、又は配列番号347と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を有するCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む、結合分子に関する。

20

【0027】

別の態様では、本発明は、実施例に記載されるように試験すると、すなわち、IL-17結合V_Hが細胞株HT1080からのIL-17誘導性IL-6放出を阻害する能力を測定することによって、約0.2～約1000nMの、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有する、前記請求項に記載の結合分子に関する。

【0028】

別の態様では、本発明は、 5×10^{-9} ～ 1×10^{-11} 、例えば 5×10^{-9} ～ 2×10^{-10} のKD(M)値を有する、前記請求項に記載の結合分子に関する。別の態様では、本発明は、実施例に示されるKD(M)値を有する、前記請求項に記載の結合分子に関する。

30

【0029】

別の態様では、本発明は、IL-17Aに対する2つ以上の免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む、前記請求項に記載の結合分子であって、前記ドメインがV_Hドメインである結合分子に関する。

【0030】

別の態様では、本発明は、上に定義される結合分子と、場合により医薬担体とを含む医薬組成物に関する。

【0031】

別の態様では、本発明は、自己免疫疾患、炎症状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、並びに臓器又は組織移植拒絶を治療するための方法であって、有効量の上に定義される結合分子又は医薬組成物を投与する工程を含む方法に関する。

40

【0032】

別の態様では、本発明は、自己免疫疾患、炎症状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、並びに臓器又は組織移植拒絶の治療に使用するための上に定義される結合分子又は医薬組成物に関する。

【0033】

別の態様では、本発明は、自己免疫疾患、炎症状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、並びに臓器又は組織移植拒絶を治療するための医薬品の製造における上に定義される結合分子又は医薬組成物に関する。

50

【0034】

別の態様では、本発明は、ヒトIL-17A活性を低下させるインビボ又はインビトロ方法であって、ヒトIL-17Aを上定義される結合分子と接触させる工程を含む方法に関する。

【0035】

別の態様では、本発明は、免疫測定法によって試験試料中のIL-17Aの存在を判定する方法であって、前記試料を上定義される結合分子及び少なくとも1つの検出可能な標識と接触させる工程を含む方法に関する。

【0036】

別の態様では、本発明は、上に定義される結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

10

【0037】

別の態様では、本発明は、上に定義される核酸を含む単離された核酸構築物に関する。

【0038】

別の態様では、本発明は、上に定義される核酸又は構築物を含む単離された宿主細胞に関する。

【0039】

別の態様では、本発明は、上に定義される結合分子を製造する方法であって、宿主細胞中で前記結合分子をコードする核酸を発現させる工程と、前記宿主細胞培養物から前記結合分子を単離する工程とを含む方法に関する。

【0040】

20

別の態様では、本発明は、上に記載される結合分子を含むキットに関する。

【0041】

別の態様では、本発明は、ヒトIL-17Aに結合することができる少なくとも1つのヒト免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む結合分子を製造する方法であって、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記方法が、

a) トランスジェニックマウスをIL-17A抗原で免疫化する工程であって、前記マウスはヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現しており、機能的内在性軽鎖又は重鎖を生成することができない工程と、

b) 前記マウスからV_Hドメイン配列を含む配列のライブラリーを生成する工程と、

c) 前記ライブラリーからV_Hドメイン配列を含む配列を単離する工程と

30

を含む、方法に関する。

【0042】

別の態様では、本発明は、上に記載される結合分子を含む二重パラトープ(biparatopic)、二価又は多特異性結合分子に関する。

【0043】

別の態様では、本発明は、配列番号430、432、434又は436を含む単離された結合分子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1-1】ファミリー1アミノ酸配列を示す図である。この図はファミリー1のクローンについての全長V_H配列を示す。フレームワーク(FR)及び相補性決定領域(CDR)を標識している。CDR1、CDR2及びCDR3配列を太線で強調表示している。配列番号をTable 1(表1)に示す。

40

【図1-2】図1-1の続きを示す図である。

【図2】ファミリー2アミノ酸配列を示す図である。この図はファミリー2のクローンについての全長V_H配列を示す。フレームワーク(FR)及び相補性決定領域(CDR)を標識している。CDR1、CDR2及びCDR3配列を太線で強調表示している。配列番号をTable 2(表2)に示す。

【図3】ファミリー3アミノ酸配列を示す図である。この図はファミリー3のクローンについての全長V_H配列を示す。フレームワーク(FR)及び相補性決定領域(CDR)を標識している。CDR1、CDR2及びCDR3配列を太線で強調表示している。配列番号をTable 3(表3)に示す。

50

【図4】ファミリー4アミノ酸配列を示す図である。この図はファミリー4のクローンについての全長 V_H 配列を示す。フレームワーク(FR)及び相補性決定領域(CDR)を標識している。CDR1、CDR2及びCDR3配列を太線で強調表示している。配列番号をTable 4(表4)に示す。

【図5】ファミリー5アミノ酸配列を示す図である。この図はファミリー5のクローンについての全長 V_H 配列を示す。フレームワーク(FR)及び相補性決定領域(CDR)を標識している。CDR1、CDR2及びCDR3配列を太線で強調表示している。配列番号をTable 5(表5)に示す。

【図6】図6Aは、 V_H 1-02足場のPCR増幅を示す図である。レーンM:Generuler 1kb DNAラダー(Fermentas社 SM0311)、レーン1: V_H 1-02足場、レーン2:PCR用の鋳型無し対照;矢印はPCR産物約300bpを示している。M:Generuler 1kb DNAラダー(Fermentas社SM0311)。図6Bは、cDNAからのヒトCDR3ドメインのPCR増幅を示す図である。M:Generuler 1kb DNAラダー(Fermentas社SM0311)、レーン1:ヒトリンパ節cDNAから増幅したCDR3ドメイン;レーン2:ヒト骨髄cDNAから増幅したCDR3ドメイン、レーン3:ヒト脾臓cDNAから増幅したCDR3ドメイン;レーン4:ヒト末梢血白血球cDNAから増幅したCDR3ドメイン、レーン5:PCR用の鋳型無し対照。矢印は50~100bpの範囲のPCR増幅産物を示している。M:Generuler 1kb DNAラダー(Fermentas社SM0311)。図6Cは、 V_H 1-02足場+ヒトCDR3ドメインのアセンブリ及びプルスルー(pull-through)PCR増幅を示す図である。レーンM: Generuler 1kb DNAラダー(Fermentas社SM0311)、レーン1及びレーン2: V_H 1-02足場+ヒトCDR3ドメイン、及びレーン3:PCR用の鋳型無し対照。矢印は約400bpのPCR産物を示している。M:Generuler 1kb DNAラダー(Fermentas社SM0311)。

【図7】免疫原誘導重鎖のみの抗体反応を確認する血清ELISAを示す図である。

【図8】図8Aは、IL-17Aに結合するファージELISAを示す図である。図8Bは、無関係の抗原に結合するファージELISAを示す図である。

【図9】図9Aは、生化学的阻害アッセイのデータを示す図である:x軸 $\log_{10}$ M濃度、y軸%最大シグナル; V_H 1.1.1(●)について、 IC_{50} (nM)は53であった、 V_H 1.6.1(■)について、 IC_{50} (nM)は5であった、 V_H 1.10.1(▲)について、 IC_{50} (nM)は4であった; V_H 1.7.1(▼)について、 IC_{50} (nM)は7(●)であった、 V_H 77G9について、 IC_{50} (nM)は6であった。図9Bは、生化学的阻害アッセイのデータを示す図である:x軸濃度(M)、y軸%最大シグナル; V_H 37E4(●)について、 IC_{50} (nM)は56であった、 V_H 53E11(■)について、 IC_{50} (nM)は195であった、 V_H 1.1.1(▲)について、 IC_{50} (nM)は29であった; V_H 54D5(▼)について、 IC_{50} (nM)は124(●)であった、 V_H 37B5(◆)について、 IC_{50} (nM)は決定されなかった。

【図10】図10Aは、細胞ベースのアッセイのデータを示す図である: V_H 8E10(■)、 V_H 2.1.1(●)及び V_H 86A5(○)について、x軸は濃度M($\log$) $_{10}$ を示し、y軸は光学濃度OD450nmを示す。図10Bは、細胞ベースのアッセイのデータを示す図である:MAB317(■)、 V_H 1.3.1(▲)、 V_H 3.2.1(◆)及び V_H KLH86A5(○)について、x軸は V_H 濃度M($\log$) $_{10}$ を示し、y軸は光学濃度OD450nmを示す。

【図11】A: V_H 1.1.1(5nM)、 V_H 1.10.1(1nM)、 V_H 1.6.1(630pM)、 V_H 1.3.1(230pM)についてのBIAcore(登録商標)結合アッセイの結果を示す図である。

【図12-1】 V_H クローン1.1の最適化を示す図である。クローン1.1のアミノ酸配列を最上行に示す。

【図12-2】図12-1の続きを示す図である。

【図13】図13Aは、特異性ELISAの結果を示す図である。図13Bは、特異性ELISAの結果を示す図である。

【図14】エピトープ競合の結果を示す図である。1.3.1及び V_H 3.1.1は同じエピトープに結合し、3.2.1は異なるエピトープに結合する。

【図15-1】 V_H 1.10.1、 V_H 1.17.1、及び V_H 1.3.1についてのHPLCの結果を示す図である。

【図15-2】 V_H 1.3.1、 V_H 186D2、 V_H 1.16.1、及び V_H 1.22.1についてのHPLCの結果を示す図である。

【図15-3】 V_H 1.18.1、 V_H 1.17.1、 V_H 1.21.1、及び V_H 1.20.1についてのHPLCの結果を示す図である。

【図16】図16Aは、 V_H 1.3.2(KD630pM)及び V_H 1.3.3についてのBIAcore(登録商標)結果を示す図である。図16Bは、 V_H 1.2.2及び V_H 1.3.3(KD550pM)についてのBIAcore(登録商標)結果を示す図である。図16Cは、細胞ベースのアッセイの結果を示す図である。IL-17A誘導IL6放出の阻害(18時間) V_H 1.3.2(●)EC50 5.710e-010; V_H 1.2.3(■)EC50 3.998e-010。

【図17】図17Aは、SDS-PAGE及びSEC-HPLCによる最終精製 V_H 分画クローン1.10.2の分析を示す図である。分画を、4~20%ゲルを通して還元条件下で分析した。レーン1、タンパク質標準(それぞれ500ng);レーン2、精製クローン1.10.2(5 μ g)。図17Bは、精製クローン1.10.2をSEC-HPLCによって更に分析して、タンパク質が単量体であることを確認したことを示す図である。

【図18】免疫蛍光法を示す図である。無傷のヒト皮膚及びテープを剥がしたヒト皮膚をBronaughセルに入れ、IgGを含むPBSと24時間インキュベートした。これらの実験の染色及び元の色画像で見ることができるのは以下の通りである:赤色=IgG、緑色=細胞膜中のカドヘリン。上行は明るい領域(IHC画像中赤色)中にIgG検出のみを示す。中行は明るい領域(IHC画像中緑色)中にカドヘリンのみを示す。下行は1つの画像に溶け込んだIgG及びカドヘリン検出を示す。

【図19】クローン1.10.2を用いた、無傷の正常な皮膚(Intact Normal Skin)に対する浸透試験のレシーバー流体(ニート)のELISA結果を示す図である。左から右に各試料について6、12、18及び24時間間隔でサンプリングした。なお、この図において、Vehicleはビヒクル製剤を表し、Contorolは参照(コントロール)を表し、Microemulsionはマイクロエマルジョンを表し、Prototypeはプロトタイプ製剤を表す。

【図20】クローン1.10.2を用いた、テープを剥がした皮膚(Tape-Stripped Skin)に対する浸透試験のレシーバー流体(ニート)のELISA結果を示す図である。左から右に各試料について6、12、18及び24時間間隔でサンプリングした。なお、この図において、Vehicleはビヒクル製剤を表し、Contorolは参照(コントロール)を表し、Microemulsionはマイクロエマルジョンを表し、Prototypeはプロトタイプ製剤を表す。

【図21】皮膚中のクローン1.10.2及びIgG(プロトタイプ製剤C1;PBS)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ)又はIgG(抗マウスIgG);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。上行は最後の列がIgG検出を示すことを除いて V_H 検出のみを赤色で示す(明るい領域、IHC画像中赤色)。下行は V_H /IgG検出(明るい領域、IHC画像中赤色)がカドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んでいる。

【図22】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤C2;マイクロエマルジョン)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、赤色)、第3の画像 V_H 検出(赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、赤色)。

【図23】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤C3;35%DMSO)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)、第3の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

【図24】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤1;35%プロピレングリコール)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

10

20

30

40

50

、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)、第3の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

【図25】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤2;24%Transcutol(登録商標))のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)、第3の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

10

【図26】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤3;25%プロピレングリコール及び10%EtOH)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)、第3の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

20

【図27】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤4;20%プロピレングリコール、10%ミリスチン酸イソプロピル、3%Brij(登録商標)721及び2%Brij(登録商標)72)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)、第3の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

【図28】皮膚中のクローン1.10.2(プロトタイプ製剤5;10%アズン(ラウロカプラム)、3%Brij(登録商標)721及び2%Brij(登録商標)72)のIHC画像を示す図である。これらの実験における染色は以下の通りである:赤色= V_H (抗Hisタグ);緑色=カドヘリン(細胞膜);青色=核(DNA)。左から、第1の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第2の画像カドヘリン(明るい領域、IHC画像中緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)検出と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)、第3の画像 V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)のみ、第4の画像カドヘリン(明るい領域、緑色)及び核(明るい領域、IHC画像中青色)と溶け込んだ V_H 検出(明るい領域、IHC画像中赤色)。

30

【図29】BIAcore(登録商標)結合アッセイの結果を示す図である。A:1.1 B:1.10 C:1.1~1.10。

【図30-1】1は3.2-2(G_4S)-1.2についてのOctet分析についての結果を示す図である。

【図30-2】2は3.2-6(G_4S)-1.2、3は1.2についてのOctet分析についての結果を示す図である。

40

【図31】BIAcore(登録商標)結合アッセイの結果を示す図である。1:3.2 2:1.2 3:3.2-2(G_4S)-1.2 4:3.2-6(G_4S)-1.2 n=1

【図32】BIAcore(登録商標)結合アッセイでのKD決定を示す図である。1:3.2 2:1.2 3:3.2-2(G_4S)-1.2 4:3.2-6(G_4S)-1.2 n=2

【図33】Aは、IL-6放出アッセイの結果を示す図である。1■(上部曲線):3.2 2●:1.2 3▲:3.2-2(G_4S)-1.2 4■:3.2-6(G_4S)-1.2。Bは、EC50値を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明をここで更に説明する。以下の一節で、本発明の異なる態様をより詳細に定義す

50

る。明らかに反対の指示がない限り、こうして定義される各態様を任意の他の態様と組み合わせることができる。特に、好ましい又は有利であると示される任意の特徴を、好ましい又は有利であると示される任意の他の特徴と組み合わせることができる。

【0046】

一般に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、病理学、腫瘍学、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質及び核酸化学、並びにハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、及びそれらの技術は当分野で周知であり、一般的に使用されるものである。本開示の方法及び技術は一般的に、特に指示しない限り、当分野で周知の従来方法に従って、及び本明細書の全体にわたって引用され、論じられる種々の一般的でより具体的な参考文献に記載されるように、行われる。例えば、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989))を参照されたい。酵素反応及び精製技術は、当分野で一般的に達成される又は本明細書で記載されるように、製造業者の仕様書に従って行われる。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、医薬及び製薬化学に関連して使用される命名法、並びにそれらの実験室手順及び技術は当分野で周知であり、一般的に使用されるものである。標準的な技術が化学合成、化学分析、医薬調製、製剤、及び送達、及び患者の治療に使用される。

【0047】

サイトカインのIL-17ファミリーは6つのメンバー、IL-17/IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E/IL-25及びIL-17Fを含み、これらは複数の細胞型によって産生されている。このファミリーのメンバーは、システインノットフォールド(cysteine-knot fold)構造を含む高度に保存されたC末端を有する。非共有結合ホモ二量体として分泌されるIL-17Bを除いて、ほとんどのIL-17タンパク質がジスルフィド結合二量体として分泌される。

【0048】

IL-17ファミリーサイトカインによるシグナル伝達は、IL-17受容体ファミリー、IL-17R/IL-17RA、IL-17BR/IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD及びIL-17REのメンバーによって媒介される。これらの受容体の活性化によって、炎症促進性サイトカイン及び抗微生物ペプチドの産生を誘導する細胞内経路が誘因される。IL-17A、IL-17F及びIL-17A/Fは、主に活性化T細胞によって産生され、IL-17RA及びIL-17RCからなるオリゴマー形成受容体複合体を通してシグナルを伝達する。この複合体に結合したリガンドが、細胞内アダプタータンパク質、Act1及びTRAF-6の動員、並びに転写因子、NF κ B、AP-1及びC/EBPの下流活性化をもたらす。IL-17Eは、IL-17RA及びIL-17BR/IL-17RBによって形成される受容体複合体を通して同様のシグナル伝達経路を活性化する。IL-17Eによるシグナル伝達は、Th2型免疫反応を誘導し、喘息の発病の促進に関与し得る。他のIL-17ファミリーサイトカインによって活性化されるシグナル伝達経路についてはあまり知られていない。近年の研究により、IL-17Cが主に上皮細胞によって産生され、IL-17RA及びIL-17REからなる受容体複合体に結合することが示唆されている。上皮細胞におけるIL-17Cによる自己分泌シグナル伝達は、抗菌ペプチド及び炎症促進性サイトカインの産生を刺激するが、IL-17Aのように、IL-17Cの過剰発現は自己免疫疾患の発症に寄与し得る。IL-17Eと同様に、IL-17BはIL-17BR/IL-17RBに結合するが、IL-17Bシグナル伝達の主な標的細胞及び効果は報告されていない。更に、IL-17Dの受容体及びIL-17RDのリガンドは現在知られていない。

【0049】

本発明は、全てヒトIL-17Aに結合することができる単離されたIL-17A結合分子、前記結合分子を含む、特に局所投与用の医薬組成物及び製剤、並びに前記結合分子をコードする単離された核酸、前記結合分子を生成するための前記核酸を含む組換え発現ベクター及び宿主細胞を提供する。ヒトIL-17Aを検出するため、インビトロ又はインビボでヒトIL-17Aを阻害するため、及び疾患を治療する方法において、本明細書に開示される結合分子を使用する方法も本発明によって提供される。本発明の一態様は、単離されたヒト抗ヒトIL-17A結合分子、具体的には高い親和性、遅い解離速度(off rate)及び高い中和能でヒトIL-17Aに結合する少なくとも1つの単一ドメイン抗体を含む又はからなるものを提供する。

【0050】

本発明の好ましい実施形態では、結合分子が、ヒトIL-17Aに特異的に結合することができ、ヒトIL-17ファミリーのメンバーと交差反応せず、実質的な結合も示さない。望ましくない交差反応性による副作用が低減されるので、本発明の結合分子によって示されるヒトIL-17Aホモログとのこの限られた交差反応性はその治療及び/又は診断用途にとっての利点を提供する。これは、治療的施用のための投与における利点も提供する。よって、本発明の結合分子は、ヒトIL-17Aに結合することができる/ヒトIL-17Aに関する。

【0051】

本発明のIL-17A結合分子は、ヒトIL-17A(シグナルペプチドを含む全長前駆体IL-17Aを示す登録番号Q16552(Swiss-Prot)、配列番号465)及び/又はカニクイザルIL-17(Uniprot G7P4U9)に結合する。ヒトIL-17Aは、2本の155アミノ酸鎖からなるホモ二量体である。各ポリペプチド鎖が、切断されて132残基の成熟ポリペプチドを産生する23アミノ酸N末端ペプチドを含む。IL-17AはIL-17受容体A及びCに結合し、これらの活性化を介してその効果を及ぼす。

【0052】

配列番号465

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNE
DPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA

【0053】

「IL-17結合分子」、「IL-17結合タンパク質」、「抗IL-17単一ドメイン抗体」又は「抗IL-17抗体」という用語は全て、ヒトIL-17A抗原に結合することができる分子を指す。よって、本明細書で使用される場合、IL-17は通常、特に明言しない限り又は文脈上別段の解釈が必要でない限り、IL-17Aを指す。結合反応は、例えば、関連のない特異性の抗体での陰性対照試験を参照したIL-17とその受容体の結合の阻害を測定するための結合アッセイ、競合アッセイ若しくはバイオアッセイ又は任意の種類の結合アッセイを含む、標準的な方法(定量的アッセイ)によって示され得る。「IL-17結合分子」という用語は、ヒトIL-17Aに結合することができるIL-17結合タンパク質又はその一部を含む。

【0054】

本発明は、Table 1(表1)~Table 5(表5)を参照して図1~図5のいずれかに示されるCDR3配列又はこれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれ超の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変免疫グロブリンドメイン(V_H)を含む、ヒトIL-17Aに結合することができる単離された結合分子に関する。一実施形態では、結合分子が、Table 1(表1)~Table 5(表5)を参照して図1~図5のいずれかのクローンのいずれかについて示されるCDR1、2及び3配列のセットから選択されるCDR1、2及び3配列のセットを含む。一実施形態では、結合分子が、Table 1(表1)~Table 5(表5)を参照して図1~図5のいずれかのクローンのいずれかについて示されるCDR1、2及び3配列のセットから選択されるCDR1、2及び3配列のセットを有するV_Hドメインを含む。一実施形態では、結合分子が重鎖のみの抗体である。

【0055】

別の態様では、本発明は、ヒトIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む単離された結合分子であって、前記ドメインはV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子は少なくとも1つの抗原結合部位を含む結合分子に関する。

【0056】

一実施形態では、結合分子が、ヒトIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体であって、前記ドメインはTable 1(表1)~Table 5(表5)を参照して図1~図5のいずれかに示されるCDR3配列又は前記CDR配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれ超の配列同一性を有するCDR3配列を含むV_Hドメインである免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含み得る。

【0057】

一実施形態では、前記少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体が、Table 1(表1)~Table 5(表5)を参照して図1~図5のいずれかのクローンのいずれかについて示され

10

20

30

40

50

るCDR1、2及び3配列のセットから選択されるCDR1、2及び3のセット又はCDR1、2及び3配列のセットを有するV_Hドメインを含む。別の実施形態では、結合分子が、クローン1.1~1.69、2.1~2.9、3.1~3.14、4.1又は5.1から選択されるクローンについて示されるV_Hドメインを含む又はからなる。

【0058】

一実施形態では、前記配列相同性又は同一性が少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0059】

「相同性」とは、一般的に、配列の整列後、いくつかの実施形態では、必要な場合、最大の相同性%を達成するためにギャップ導入後に比較するポリペプチドの残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合を指し、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しない。N若しくはC末端伸長も、タグも挿入も、同一性又は相同性を減少されると解釈されないものとする。アラインメントのための方法及びコンピュータプログラムは周知である。

【0060】

「抗体」という用語は、広義に、4本のポリペプチド鎖、2本の重(H)鎖と2本の軽(L)鎖で構成される任意の免疫グロブリン(Ig)分子若しくはその抗原結合部分、又はIg分子の必須のエピトープ結合特徴を保持するその任意の機能的断片、突然変異体、変異体若しくは誘導体を指す。このような突然変異体、変異体又は誘導体抗体フォーマットは当分野で公知である。全長抗体では、各重鎖が重鎖可変領域(本明細書でHCVR又はV_Hと略される)及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は3つのドメイン、C_H1、C_H2及びC_H3で構成される。各軽鎖は軽鎖可変領域(本明細書でLCVR又はV_Lと略される)及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は1つのドメイン、C_Lで構成される。V_H及びV_L領域は、より保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域が点在している相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に更に細分することができる。各V_H及びV_Lは、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列された3つのCDR及び4つのFRで構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫グロブリン分子は任意の種類(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)又はサブクラスであり得る。

【0061】

一定の実施形態では、本発明の単離された結合分子が、少なくとも1つの単一ドメイン抗体を含む又はからなり、前記ドメインがV_Hドメインである。よって、一態様では、本発明の結合分子が、V_Hドメインを有するが、V_Lドメインがない少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変重鎖ドメイン抗体(sVD、sdAB又はISV)を含む又はからなる。

【0062】

単一ドメイン抗体は当分野で記載されている;これらはその相補性決定領域が単一ドメインポリペプチド、例えば、V_Hドメインポリペプチドの一部である抗体である。

【0063】

本明細書で更に記載されるように、結合分子は2つ以上のV_Hドメインを含み得る。このような結合分子は更に詳細に説明されるように単一特異性又は多特異性、一価又は多価であり得る。

【0064】

単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインがV_Hドメインである結合分子はHumabody(登録商標)V_Hとも呼ばれる。

【0065】

よって、本発明のいくつかの実施形態では、結合分子が軽鎖を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子が重鎖ドメインC_H2及びC_H3を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子がヒンジ領域と重鎖ドメインC_H2及びC_H3を含まない。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

結合分子が重鎖ドメイン C_H1 、 C_H2 及び C_H3 を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子が重鎖ドメイン C_H1 、ヒンジ領域重鎖ドメイン C_H2 及び重鎖ドメイン C_H3 を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子が軽鎖、重鎖ドメイン C_H1 、ヒンジ領域重鎖ドメイン C_H2 及び重鎖ドメイン C_H3 を含まない。

【0066】

各 V_H ドメインは、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列された3つのCDR及び4つのFRを含む:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。 V_H フレームワークへの修飾を行って結合特性を改善することができる。例えば、 V_H ドメインはC又はN末端伸長を含み得る。本発明の結合分子の一実施形態では、 V_H ドメインが1~10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の追加のアミノ酸のC末端伸長を含む。一実施形態では、 V_H ドメインが、 C_H1 ドメインの1~12個のアミノ酸残基、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の追加のアミノ酸のC末端伸長を含む。一実施形態では、前記伸長が少なくとも1個のアラニン残基、例えば、単一アラニン残基、アラニン残基のペア又はアラニン残基のトリプレットを含む。このような伸長 V_H ドメインは本発明の範囲内にある。追加のC又はN末端残基、例えば、リンカー残基及び/又はHisタグ、例えば、ヘキサ-Hisを含む V_H ドメインも本発明の範囲内にある。

10

【0067】

好ましくは、1つ又は複数の V_H ドメインがヒト V_H ドメインである。本明細書で使用される場合、ヒト V_H ドメインは、ヒト V_H ドメインアミノ酸又は核酸配列に由来する又は基づく V_H ドメインを含む。よってこの用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変重鎖領域を含む。本明細書で使用される場合、ヒト V_H ドメインという用語は、特に対象となる抗原による免疫化に反応して、ヒト免疫グロブリンV遺伝子を発現するトランスジェニックマウスから単離された V_H ドメインを含む。本発明のヒト V_H ドメインは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロで、例えば、ランダム若しくは部位特異的突然変異誘発によって導入される、又はインビボで体細胞突然変異によって導入される突然変異)を含み得る。そのため、「ヒト V_H ドメイン」という用語は、修飾されたヒト V_H 配列も含む。

20

【0068】

よって、本発明は、IL-17Aに結合することができる/に対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記IL-17A結合分子は少なくとも1つの抗原結合部位を含む結合分子を提供する。単ドメイン抗体は特異的にヒトIL-17Aに対するものである。

30

【0069】

本明細書で使用される場合、 V_H 又は「可変ドメイン」という用語は、Kabat等、Sequences of Immunological Interest、第5版、U.S. Dept. Health & Human Services、Washington, D.C.(1991)によって定義される免疫グロブリン可変ドメインを指す。可変ドメイン内のCDRアミノ酸残基の番号付け及び位置決めは、周知のKabat番号付け慣習による。

【0070】

より具体的には、本発明は、本明細書に更に記載される親和性、Kon速度、Koff速度及び/又はKAでヒトIL-17に結合することができる V_H 免疫グロブリンドメインを提供する。

40

【0071】

本発明の結合分子は、本明細書に示されるアミノ酸配列を含む又はからなり、その好ましい配列及び/又は部分、例えば、CDRが本明細書に定義される。

【0072】

「CDR」という用語は、抗体可変配列中の相補性決定領域を指す。可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2及びCDR3と示される重鎖及び軽鎖の可変領域の各々の中の3つのCDRが存在する。「CDRセット」という用語は、抗原に結合することができる単一可変領域中に生じる3つのCDRのグループを指す。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムによって異なって定義されている。Kabatによって記載されるシステムが本明細書で使用される。「Kabat番号付け」、「Kabat定義」及び「Kabat標識」という用語は、本明細書で互

50

換的に使用される。当分野で認識されているこれらの用語は、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基よりも可変性(すなわち、超可変性)であるアミノ酸残基を番号付けするシステムを指す(Kabat等(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382~391及びKabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No.93-3242)。

【0073】

実験部でより詳細に記載されるように、5つの親結合分子を単離した(5つのクローンファミリーが得られた:クローン1.1は図1に示されるファミリー1についての親クローンであり、クローン2.1は図2に示されるファミリー2についての親クローンであり、クローン3.1は図3に示されるファミリー3についての親クローンであり、クローン4.1は図4に示されるファミリー4についての親クローンであり、クローン5.1は図5に示されるファミリー5についての親クローンである);各親分子は図1、図2、図3、図4及び図5に示されるCDR配列(CDR 1、2及び3)のセットを有している。最適化の工程を通して、親CDR3配列に由来するCDR3配列を有するクロンのパネルを、ファミリー1、2、3、4及び5の各々について作成した。最適化 V_H ドメイン配列は、実施例に示される親分子と比較して、改善したIL-17Aに対する親和性及び改善したIL-17細胞ベースのアッセイにおける効力を示す。

10

【0074】

一態様では、本発明は、ファミリー1又はファミリー1様配列を含むヒト V_H ドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0075】

一実施形態では、結合分子が、IL-17A、好ましくはヒトIL-17Aに結合することができる/に対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む又はからなり、前記ドメインがヒト V_H ドメインであり、前記IL-17A結合分子がファミリー1又はファミリー1様配列を含む。これらは、親クローン(クローン1.1、配列番号4)又はその一部の配列、例えば、CDR3配列、及び最適化の工程を通して親クローン1.1から得られるクロンの配列、例えば、図1に示される配列を含む。ファミリー1のクロンのCDR配列又はその一部、及び全長 V_H 配列は以下に示されるTable 1(表1)に従って番号付けされる。

20

【0076】

【表 1 A】

クローン	CDR1配列番号	CDR2配列番号	CDR3配列番号	全長V _H 配列 配列番号
1.1	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4
1.2	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8
1.3	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号12
1.4	配列番号13	配列番号14	配列番号15	配列番号16
1.5	配列番号17	配列番号18	配列番号19	配列番号20
1.6	配列番号21	配列番号22	配列番号23	配列番号24
1.7	配列番号25	配列番号26	配列番号27	配列番号28
1.8	配列番号29	配列番号30	配列番号31	配列番号32
1.9	配列番号33	配列番号34	配列番号35	配列番号36
1.10	配列番号37	配列番号38	配列番号39	配列番号40
1.11	配列番号41	配列番号42	配列番号43	配列番号44
1.12	配列番号45	配列番号46	配列番号47	配列番号48
1.13	配列番号49	配列番号50	配列番号51	配列番号52
1.14	配列番号53	配列番号54	配列番号55	配列番号56
1.15	配列番号57	配列番号58	配列番号59	配列番号60
1.16	配列番号61	配列番号62	配列番号63	配列番号64
1.17	配列番号65	配列番号66	配列番号67	配列番号68
1.18	配列番号69	配列番号70	配列番号71	配列番号72
1.19	配列番号73	配列番号74	配列番号75	配列番号76
1.20	配列番号77	配列番号78	配列番号79	配列番号80
1.21	配列番号81	配列番号82	配列番号83	配列番号84
1.22	配列番号85	配列番号86	配列番号87	配列番号88
1.23	配列番号89	配列番号90	配列番号91	配列番号92
1.24	配列番号93	配列番号94	配列番号95	配列番号96
1.25	配列番号97	配列番号98	配列番号99	配列番号100
1.26	配列番号101	配列番号102	配列番号103	配列番号104
1.27	配列番号105	配列番号106	配列番号107	配列番号108
1.28	配列番号109	配列番号110	配列番号111	配列番号112
1.29	配列番号113	配列番号114	配列番号115	配列番号116
1.30	配列番号117	配列番号118	配列番号119	配列番号120
1.31	配列番号121	配列番号122	配列番号123	配列番号124
1.32	配列番号125	配列番号126	配列番号127	配列番号128
1.33	配列番号129	配列番号130	配列番号131	配列番号132
1.34	配列番号133	配列番号134	配列番号135	配列番号136
1.35	配列番号137	配列番号138	配列番号139	配列番号140
1.36	配列番号141	配列番号142	配列番号143	配列番号144
1.37	配列番号145	配列番号146	配列番号147	配列番号148
1.38	配列番号149	配列番号150	配列番号151	配列番号152
1.39	配列番号153	配列番号154	配列番号155	配列番号156
1.40	配列番号157	配列番号158	配列番号159	配列番号160
1.41	配列番号161	配列番号162	配列番号163	配列番号164
1.42	配列番号165	配列番号166	配列番号167	配列番号168

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

【表 1 B】

1.43	配列番号169	配列番号170	配列番号171	配列番号172
1.44	配列番号173	配列番号174	配列番号175	配列番号176
1.45	配列番号177	配列番号178	配列番号179	配列番号180
1.46	配列番号181	配列番号182	配列番号183	配列番号184
1.47	配列番号185	配列番号186	配列番号187	配列番号188
1.48	配列番号189	配列番号190	配列番号191	配列番号192
1.49	配列番号193	配列番号194	配列番号195	配列番号196
1.50	配列番号197	配列番号198	配列番号199	配列番号200
1.51	配列番号201	配列番号202	配列番号203	配列番号204
1.52	配列番号205	配列番号206	配列番号207	配列番号208
1.53	配列番号209	配列番号210	配列番号211	配列番号212
1.54	配列番号213	配列番号214	配列番号215	配列番号216
1.55	配列番号217	配列番号218	配列番号219	配列番号220
1.56	配列番号221	配列番号222	配列番号223	配列番号224
1.57	配列番号225	配列番号226	配列番号227	配列番号228
1.58	配列番号229	配列番号230	配列番号231	配列番号232
1.59	配列番号233	配列番号234	配列番号235	配列番号236
1.60	配列番号237	配列番号238	配列番号239	配列番号240
1.61	配列番号241	配列番号242	配列番号243	配列番号244
1.62	配列番号245	配列番号246	配列番号247	配列番号248
1.63	配列番号438	配列番号439	配列番号440	配列番号441
1.64	配列番号442	配列番号443	配列番号444	配列番号445
1.65	配列番号446	配列番号447	配列番号448	配列番号449
1.66	配列番号450	配列番号451	配列番号452	配列番号453
1.67	配列番号454	配列番号455	配列番号456	配列番号457
1.68	配列番号458	配列番号459	配列番号460	配列番号461
1.69	配列番号462	配列番号463	配列番号464	配列番号466

Table 1.これは本発明の範囲内にあるファミリー1 CDRアミノ酸配列及びファミリー1全長V_H配列の配列番号を示している。対応する配列を図1に示す。

【0078】

一態様では、本発明は、配列番号3、又は配列番号3と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含むファミリー1又はファミリー1様結合分子に関する。

【0079】

一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様結合分子がIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体であって、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記ヒトV_Hドメインが配列番号3、又は配列番号3と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む。

【0080】

これらの態様の一実施形態では、相同性が配列番号3と少なくとも90%の相同性である。

【0081】

一実施形態では、V_Hドメインが、配列番号3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、223、227、231、235、239、243又は

247、440、444、448、452、456、460又は464から選択されるアミノ酸配列を含む又ははからなるCDR3配列を含む。

【0082】

一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様結合分子が、CDR1、CDR2及びCDR3を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含み、前記CDR1がアミノ酸配列、配列番号1又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含み、前記CDR2がアミノ酸配列、配列番号2又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含み、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号3又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む。例えば、CDR配列は、図1に示される配列の1つから選択されるCDR配列であり得る。

10

【0083】

一実施形態では、前記CDR1が、配列番号1又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列に示されるアミノ酸配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、配列番号2又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列に示されるアミノ酸配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR3が、配列番号3又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の相同性を有する配列に示されるアミノ酸配列を含む又ははからなる。

20

【0084】

一実施形態では、 V_H ドメインのCDR配列が図1に示されるクローン1.1～1.69について示される通りである又はその組み合わせである。一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、77、81、85、89、93、97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189、193、197、201、205、209、213、217、221、225、229、233、237、241、245、438、442、446、450、454、458又は462を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186、190、194、198、202、206、210、214、218、222、226、230、234、238、242、246、439、443、447、451、455、459又は463を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、223、227、231、235、239、243、247、440、444、448、452、456、460又は464を含む又ははからなる。

30

【0085】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号1を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号2を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号3を含む又ははからなる。

40

【0086】

一態様では、本発明はまた、図1にクローン1.1～1.69について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する V_H ドメインに関する。一実施形態では、結合分子が図1にクローン1.1～1.22について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。よって、一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号1であり、CDR2が配列番号2であり、CDR3が配列番号3である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号5であり、CDR2が配列番号6であり、CDR3が配列番号7である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号9であり、CDR2

50

が配列番号10であり、CDR3が配列番号11である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号13であり、CDR2が配列番号14であり、CDR3が配列番号15である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号17であり、CDR2が配列番号18であり、CDR3が配列番号19である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号21であり、CDR2が配列番号22であり、CDR3が配列番号23である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号25であり、CDR2が配列番号26であり、CDR3が配列番号27である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号29であり、CDR2が配列番号30であり、CDR3が配列番号31である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号33であり、CDR2が配列番号34であり、CDR3が配列番号35である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号37であり、CDR2が配列番号38であり、CDR3が配列番号39である。別の実施形態では、CDR1が配列番号41であり、CDR2が配列番号42であり、CDR3が配列番号43である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号45であり、CDR2が配列番号46であり、CDR3が配列番号47である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号49であり、CDR2が配列番号50であり、CDR3が配列番号51である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号53であり、CDR2が配列番号54であり、CDR3が配列番号55である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号57であり、CDR2が配列番号58であり、CDR3が配列番号59である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号61であり、CDR2が配列番号62であり、CDR3が配列番号63である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号65であり、CDR2が配列番号66であり、CDR3が配列番号67である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号69であり、CDR2が配列番号70であり、CDR3が配列番号71である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号73であり、CDR2が配列番号74であり、CDR3が配列番号75である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号77であり、CDR2が配列番号78であり、CDR3が配列番号79である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号81であり、CDR2が配列番号82であり、CDR3が配列番号83である。別の実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号85であり、CDR2が配列番号86であり、CDR3が配列番号87である。

【0087】

一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様配列が、配列番号4又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又はからなる V_H ドメインを有する。一実施形態では、相同性が少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。このような V_H 配列のCDR配列は図1に示される。例えば、 V_H ドメインは配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244又は248、441、445、449、453、457、461又は466を含む又はからなる。

【0088】

別の実施形態では、 V_H ドメインが上記の配列の1つから選択されるが、1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域の1つ又は複数の中にある。別の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がCDRの1つ又は複数の中にある。一実施形態では、アミノ酸置換がフレームワーク及びCDR配列中にある。一実施形態では、 V_H ドメインが配列番号4若しくは8又は1個若しくは複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10個のアミノ酸置換を含む配列を含む又はからなる。

【0089】

別の態様では、本発明は、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む又はからなる結合分子であって、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記のV_Hドメインは配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244、248、441、445、449、453、457、461若しくは466又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる結合分子に関する。

10

【0090】

別の態様では、本発明は、配列番号4に示されるV_Hドメイン又は配列番号4と比べて以下の置換を有するその変異体を含む又はからなる結合分子に関する：残基1がQであり、残基11がM又はWであり、残基13がL又はRであり、残基24がTであり、残基33がG、R、N又はQであり、残基50がE、K、S、N、G又はRであり、残基52がK、E、G、D又はRであり、残基53がPであり、残基54がTであり、残基57がQ、E又はKであり、残基61がAであり、残基62がS又はGであり、残基77がKであり、及び/又は残基13がYである。

【0091】

ファミリー1又はファミリー1様結合分子は、好ましくは本明細書で更に記載され、実施例で示され、以下で更に示されるKD、Koff、KA、Kd及びIC₅₀値を有する。

20

【0092】

「KD」という用語は、「平衡解離定数」を指し、平衡での滴定測定で、又は解離速度定数(Koff)を会合速度定数(Kon)で割ることによって得られる値を指す。「KA」は親和定数を指す。会合速度定数、解離速度定数及び平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すために使用される。会合及び解離速度定数を決定する方法は当分野で周知である。蛍光ベースの技術を用いると、平衡での生理的緩衝液中の試料を試験するための高い感度及び能力が提供される。BIAcore(登録商標)(生体分子相互作用分析)アッセイ等の他の実験手法及び機器を使用することができる。

【0093】

一態様では、本発明は、ファミリー2又はファミリー2様配列を含むヒトV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

30

【0094】

一実施形態では、結合分子が、IL-17A、好ましくはヒトIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む又はからなり、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子がファミリー2又はファミリー2様配列を含む。これらは、親配列(クローン2.1;配列番号252)又はその一部、及び親クローン(クローン2.1)又はその一部に由来するクロンの配列、例えば、CDR3配列、及び例えば、図2に示される最適化の工程を通して親クローン2.1から得られるクローン又はその一部のV_H配列を含む。ファミリー2のクロンのCDR2配列及び全長配列は以下に示されるTable 2(表2)に従って番号付けされる。

40

【0095】

【表 2】

クローン	CDR1配列番号	CDR2配列番号	CDR3配列番号	全V _H 長配列 配列番号
2.1	配列番号249	配列番号250	配列番号251	配列番号252
2.2	配列番号253	配列番号254	配列番号255	配列番号256
2.3	配列番号257	配列番号258	配列番号259	配列番号260
2.4	配列番号261	配列番号262	配列番号263	配列番号264
2.5	配列番号265	配列番号266	配列番号267	配列番号268
2.6	配列番号269	配列番号270	配列番号271	配列番号272
2.7	配列番号273	配列番号274	配列番号275	配列番号276
2.8	配列番号277	配列番号278	配列番号279	配列番号280
2.9	配列番号281	配列番号282	配列番号283	配列番号284

Table 2.これは本発明の範囲内にあるファミリー2 CDR配列及びファミリー2全長V_H配列の配列番号を示している。対応する配列を図2に示す。

【0096】

一態様では、本発明は、配列番号251、又は配列番号251と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含むファミリー2又はファミリー2様結合分子に関する。

【0097】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様結合分子が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記ヒトV_Hドメインが配列番号251、又は配列番号251と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む。

【0098】

これらの態様の一実施形態では、相同性が少なくとも90%である。

【0099】

一実施形態では、V_Hドメインが配列番号251、255、259、263、267、271、275、279又は283から選択されるCDR3を含む又はからなる。

【0100】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様配列が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む又はからなる結合分子を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17結合分子がCDR1、CDR2及びCDR3を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含み、前記CDR1がアミノ酸配列、配列番号249又はこれと少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなり、前記CDR2がアミノ酸配列、配列番号250又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなり、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号251又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0101】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号249又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号250又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号251

又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0102】

一実施形態では、 V_H ドメインのCDR配列が図2に示されるクローン2.1～2.9について示される通りである又はその組み合わせである。一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号249、253、257、261、265、269、273、277又は281を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号250、254、258、262、266、270、274、278又は282を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号251、255、259、263、267、271、275、279又は283を含む又ははからなる。

10

【0103】

一態様では、本発明は、図2の2.1～2.9について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する V_H ドメインに関する。よって、一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号249であり、CDR2が配列番号250であり、CDR3が配列番号251である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号253であり、CDR2が配列番号254であり、CDR3が配列番号255である。よって、一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号257であり、CDR2が配列番号258であり、CDR3が配列番号259である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号261であり、CDR2が配列番号262であり、CDR3が配列番号263である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号265であり、CDR2が配列番号266であり、CDR3が配列番号267である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号269であり、CDR2が配列番号270であり、CDR3が配列番号271である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号273であり、CDR2が配列番号274であり、CDR3が配列番号275である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号277であり、CDR2が配列番号278であり、CDR3が配列番号279である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号281であり、CDR2が配列番号282であり、CDR3が配列番号283である。

20

【0104】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様配列が、配列番号252又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。一実施形態では、相同性が少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。このような配列のCDR配列を図2に示す。例えば、 V_H ドメインは配列番号252、256、260、264、268、272、276、280又は284を含む又ははからなる。

30

【0105】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様配列が、配列番号252、256、260、264、268、272、276、280若しくは284又はこれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。このような配列のCDR配列を以下に列挙する。

40

【0106】

別の実施形態では、 V_H ドメインが上記の配列の1つから選択されるが、1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域の1つ又は複数の中にある。別の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がCDRの1つ又は複数の中にある。一実施形態では、アミノ酸置換がフレームワーク及びCDR配列中にある。一実施形態では、 V_H ドメインが配列番号252又は1個若しくは複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10個のアミノ酸置換を含む配列を含む又ははからなる。

【0107】

50

別の態様では、本発明は、配列番号252に示されるV_Hドメイン又は配列番号252と比べて以下の置換を有するその変異体を含む又はからなる結合分子に関する：残基1がQであり、31がA又はGであり、残基がWであり、残基43がAであり、残基50がNであり、残基77がNであり、及び/又は残基78がAである。

【0108】

ファミリー2又はファミリー2様結合分子は、本明細書で更に記載され、実施例で示され、以下で更に論じられるKD、K_{off}、K_A、K_d及びIC₅₀値を有する。

【0109】

一態様では、本発明は、ファミリー3又はファミリー3様配列を含むヒトV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0110】

一実施形態では、結合分子が、IL-17A、好ましくはヒトIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む又はからなり、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子がファミリー3又はファミリー3様配列を含む。これらは、親クローン配列(配列番号288)又はその一部、及び親クローン3.1又はその一部に由来するクロンの配列、例えば、CDR3配列、及び例えば、図3に示される最適化の工程を通して親クローン3.1から得られるクローン又はその一部のV_H配列を含む。ファミリー3のクロンのCDR配列及び全長配列は以下に示されるTable 3(表3)に従って番号付けされる。

【0111】

【表3】

クローン	CDR1配列番号	CDR2配列番号	CDR3配列番号	全長V _H 配列番号
3.1	配列番号285	配列番号286	配列番号287	配列番号288
3.2	配列番号289	配列番号290	配列番号291	配列番号292
3.3	配列番号293	配列番号294	配列番号295	配列番号296
3.4	配列番号297	配列番号298	配列番号299	配列番号300
3.5	配列番号301	配列番号302	配列番号303	配列番号304
3.6	配列番号305	配列番号306	配列番号307	配列番号308
3.7	配列番号309	配列番号310	配列番号311	配列番号312
3.8	配列番号313	配列番号314	配列番号315	配列番号316
3.9	配列番号317	配列番号318	配列番号319	配列番号320
3.10	配列番号321	配列番号322	配列番号323	配列番号324
3.11	配列番号325	配列番号326	配列番号327	配列番号328
3.12	配列番号329	配列番号330	配列番号331	配列番号332
3.13	配列番号333	配列番号334	配列番号335	配列番号336
3.14	配列番号337	配列番号338	配列番号339	配列番号340

Table 3.これは本発明の範囲内にあるファミリー3 CDR配列及びファミリー3全長V_H配列の配列番号を示している。対応する配列を図3に示す。

【0112】

一態様では、本発明は、配列番号287、又は配列番号287と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含むファミリー3又はファミリー3様結合分子に関する。

【0113】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様結合分子が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記ヒトV_Hドメインが配列番号287、又は配列番号287と少なくとも70%、少なくとも80%

10

20

30

40

50

、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む。

【0114】

これらの態様の一実施形態では、相同性が少なくとも90%である。

【0115】

一態様では、CDR3配列が、配列番号287、291、295、299、303、307、311、315、319、323、327、335又は339から選択されるアミノ酸配列を含む又ははからなる。

【0116】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む又ははからなる結合分子を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子がCDR1、CDR2及びCDR3を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含み、前記CDR1がアミノ酸配列、配列番号285又はこれと少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又ははからなり、前記CDR2がアミノ酸配列、配列番号286又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又ははからなり、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号287又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0117】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号285又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号286又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号287又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0118】

一実施形態では、V_HドメインのCDR配列が図3のようにクローン3.1～3.14について示される通りである又はその組み合わせである。

【0119】

一態様では、本発明は、図3のクローン3.1～3.14について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有するV_Hドメインに関する。

【0120】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号285、289、293、297、301、305、309、313、317、321、325、329、333又は337を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334又は338を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列287、291、295、299、303、307、311、315、319、323、327、335又は339を含む又ははからなる。

【0121】

一態様では、本発明は、図3の3.1～3.14について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有するV_Hドメインに関する。よって、一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号285であり、CDR2が配列番号286であり、CDR3が配列番号287である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号289であり、CDR2が配列番号290であり、CDR3が配列番号291である。よって、一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号293であり、CDR2が配列番号294であり、CDR3が配列番号295である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号297であり、CDR2が配列番号298であり、CDR3が配列番号299である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号301であり、CDR2が配列番

号302であり、CDR3が配列番号303である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号305であり、CDR2が配列番号306であり、CDR3が配列番号307である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号309であり、CDR2が配列番号310であり、CDR3が配列番号311である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号313であり、CDR2が配列番号314であり、CDR3が配列番号315である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号317であり、CDR2が配列番号318であり、CDR3が配列番号319である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号321であり、CDR2が配列番号322であり、CDR3が配列番号323である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号325であり、CDR2が配列番号326であり、CDR3が配列番号327である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号329であり、CDR2が配列番号330であり、CDR3が配列番号331である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号333であり、CDR2が配列番号334であり、CDR3が配列番号335である。一実施形態では、結合分子がCDR1、2及び3配列を含み、CDR1が配列番号337であり、CDR2が配列番号338であり、CDR3が配列番号339である。

10

【0122】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、配列番号288又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなるV_Hドメインを有する。このような配列のCDR配列を図3に列挙する。例えば、V_Hドメインは、配列番号292、296、300、304、308、312、316、320、324、328、332、336又は340を含む又はからなる。

20

【0123】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、配列番号288、292、296、300、304、308、312、316、320、324、328、332、336若しくは340又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%若しくは90%の相同性を有する配列を含む又はからなるV_Hドメインを有する。一実施形態では、相同性が少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、86%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%又は99%である。このような配列のCDR配列を以下に列挙する。

【0124】

別の実施形態では、V_Hドメインが上記の配列の1つから選択されるが、1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域の1つ又は複数の中にある。別の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がCDR領域の1つ又は複数の中にある。一実施形態では、アミノ酸置換がフレームワーク及びCDR配列中にある。一実施形態では、V_Hドメインが配列番号288又は1個若しくは複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10個のアミノ酸置換を含む配列を含む又はからなる。

30

【0125】

別の態様では、本発明は、配列番号288に示されるV_Hドメイン又は配列番号288と比べて以下の置換を有するその変異体を含む又はからなる結合分子に関する：残基23がAであり、残基28がNであり、残基29がA又はLであり、残基31がA又はDであり、残基33がHであり、残基34がI又はLであり、残基35がNであり、残基50がSであり、残基52がKであり、残基55がTであり、残基57がA又はTであり、残基58がKであり、残基62がRであり、残基63がEであり、残基65がEであり、残基50がI又はTであり、残基99がLであり、残基103がT、Qであり、残基104がR、F又はWであり、残基105がY、S又はDであり、残基106がP又はFであり、残基107がH、N又はGであり、残基108がD又はSであり、及び/又は残基110がY又はA又はWである。

40

【0126】

ファミリー3又はファミリー3様結合分子は、本明細書で更に記載され、実施例で示されるKD、Koff、KA、Kd及びIC₅₀値を有する。

【0127】

50

一態様では、本発明は、ファミリー4又はファミリー4様配列を含むヒトV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

【0128】

一実施形態では、結合分子が、IL-17A、好ましくはヒトIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む又はからなり、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子がファミリー4又はファミリー4様配列を含む。これらは、図4に示される親クローン配列(4.1;配列番号288)又はその一部、例えば、CDR3配列、及び例えば、図4に示される最適化の工程を通して親クローン4から得られるクローン又はその一部のV_H配列を含む。ファミリー4のクロンのCDR配列及び全長配列は以下に示されるTable 4(表4)に従って番号付けされる。

【0129】

【表4】

クローン	CDR1	CDR2	CDR3	全長
4.1	配列番号341	配列番号342	配列番号343	配列番号344

Table 4 本発明の範囲内にあるファミリー4 CDR配列及びV_H配列。対応する配列を図4に示す。

【0130】

一態様では、本発明は、配列番号343、又は配列番号343と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含むファミリー4又はファミリー4様結合分子に関する。

【0131】

一実施形態では、ファミリー4又はファミリー4様結合分子が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記ヒトV_Hドメインが配列番号343、又は配列番号343と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む。

【0132】

一実施形態では、ファミリー4又はファミリー4様配列が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む又はからなる結合分子を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17結合分子が超可変領域CDR1、CDR2及びCDR3を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含み、前記CDR1がアミノ酸配列、配列番号341又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなり、前記CDR2がアミノ酸配列、配列番号342又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなり、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号343又はこれと少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0133】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号341又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号342又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号343又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0134】

一実施形態では、ファミリー4又はファミリー4様配列が、配列番号344又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなるV_Hドメインを有する。このような配列のCDR配列を以下に列挙する。一実施形態では、相同性が少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。別の実施形態では、V_Hドメインが上に示される配列を含むが、1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域の1つ又は複数の中にある。別の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がCDRの1つ又は複数の中にある。一実施形態では、アミノ酸置換がフレームワーク及びCDR配列中にある。一実施形態では、V_Hドメインが配列番号344又は1個若しくは複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10個のアミノ酸置換を含む配列を含む又はからなる。

10

【0135】

ファミリー4又はファミリー4様結合分子は、本明細書で更に記載され、実施例で示されるKD、K_{off}、K_A、K_d及びIC₅₀値を有する。

【0136】

一態様では、本発明は、ファミリー5又はファミリー5様配列を含むヒトV_Hドメインを含む、ヒトIL-17Aに結合することができる結合分子に関する。

20

【0137】

一態様では、本発明は、IL-17A、好ましくはヒトIL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む又はからなる結合分子であって、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17が5又はファミリー5様配列に結合する結合分子に関する。これらは、図5に示される親クローン配列(5.1;配列番号348)又はその一部、及び親クローン5又はその一部から得ることができるクロンの配列、例えば、CDR3配列、及び例えば、図5に示される最適化の工程を通して親クローン5から得られるクローン又はその一部のV_H配列を含む。ファミリー5のクロンのCDR配列及び全長配列は以下に示されるTable 5(表5)に従って番号付けされる。

【0138】

30

【表5】

クローン	CDR1配列番号	CDR2配列番号	CDR3配列番号	全長V _H 配列番号
5.1	配列番号345	配列番号346	配列番号347	配列番号348

Table 5:本発明の範囲内にあるファミリー5 CDR配列及びV_H配列。対応する配列を図5に示す。

【0139】

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様結合分子が、配列番号287、又は配列番号347と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含むヒトV_Hドメインを含む。

40

【0140】

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様結合分子が、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記ヒトV_Hドメインが配列番号347、又は配列番号287と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含むCDR3配列を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む。

【0141】

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様配列が、IL-17Aに対する少なくとも1

50

つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含む又はからなる結合分子を含み、前記ドメインがヒトV_Hドメインであり、前記IL-17結合分子が超可変領域CDR1、CDR2及びCDR3を含む少なくとも1つの抗原結合部位を含み、前記CDR1がアミノ酸配列、配列番号345又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなり、前記CDR2がアミノ酸配列、配列番号345又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなり、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号347又はこれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0142】

10

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号345又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、86%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号346又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号347又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0143】

20

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様配列が、配列番号348又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%若しくは90%の相同性を有する配列を含む又はからなるV_Hドメインを有する。一実施形態では、相同性が少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%又は99%である。このような配列のCDR配列を以下に列挙する。別の実施形態では、V_Hドメインが配列番号348を含むが、1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域の1つ又は複数の中にある。別の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換がCDRの1つ又は複数の中にある。

【0144】

30

ファミリー5又はファミリー5様結合分子は、本明細書で更に記載され、実施例で示されるKD、Koff、KA、Kd及びIC₅₀値を有する。

【0145】

一態様では、本発明による結合分子が、本明細書に列挙される別のファミリーのCDR1及び/又はCDR2配列と組み合わせて、ファミリー1若しくはファミリー1様、ファミリー2若しくはファミリー2様、ファミリー3若しくはファミリー3様、ファミリー4若しくはファミリー4様、又はファミリー5若しくはファミリー5様CDR3配列から選択されるCDR3配列を含む。

【0146】

40

例えば、本発明による結合分子は、Table 2(表2)、Table 3(表3)、Table 4(表4)又はTable 5(表5)に示される1つ又は2つの他のファミリーのCDR1及び/又はCDR2配列と組み合わせて、例えば、図1に示されるファミリー1又はファミリー1様CDR3配列を含む。

【0147】

別の態様では、本発明による結合分子が、Table 1(表1)、Table 3(表3)、Table 4(表4)又はTable 5(表5)に示される1つ又は2つの他のファミリーのCDR1及び/又はCDR2配列と組み合わせて、例えば、図2に示されるファミリー2又はファミリー2様CDR3配列を含む。

【0148】

別の態様では、本発明による結合分子が、Table 1(表1)、Table 2(表2)、Table 4(表4)又はTable 5(表5)に示される1つ又は2つの他のファミリーのCDR1及び/又はCDR2配列と組み合わせて、例えば、図3に示されるファミリー3又はファミリー3様CDR3配列を含む。

50

【0149】

別の態様では、本発明による結合分子が、Table 1(表1)、Table 2(表2)、Table 3(表3)又はTable 5(表5)に示される1つ又は2つの他のファミリーのCDR1及び/又はCDR2配列と組み合わせ、例えば、図4に示されるファミリー4又はファミリー4様CDR3配列を含む。

【0150】

別の態様では、本発明による結合分子が、Table 1(表1)、Table 2(表2)、Table 3(表3)又はTable 4(表4)に示される1つ又は2つの他のファミリーのCDR1及び/又はCDR2配列と組み合わせ、例えば、図5に示されるファミリー5又はファミリー5様CDR3配列を含む。

【0151】

本明細書に記載される結合分子は、1つ又は複数の追加のタンパク質部分との融合タンパク質として提供され得る。例えば、本明細書に記載される結合分子は、第2の部分との融合体として提供され得る。

10

【0152】

第2の部分は、同様にヒトIL-17Aに特異的であるV_Hドメインを含み得るので、二価結合分子を提供し得る。一実施形態では、結合分子が二重パラトープである。二重パラトープ結合分子は異なるエピトープに結合する。本発明の二重パラトープ結合分子は、当分野で公知の方法を用いて構築することができる。

【0153】

例えば、二価結合分子を生成するために、ファミリー1又はファミリー1様結合分子をファミリー2、3、4若しくは5又はファミリー2、3、4若しくは5様結合分子に結合することができる。これを実施例及び図29～図33で更に例示する。本発明の一実施形態では、クローン1.2について定義されるV_Hが、ファミリー2又はファミリー3の別のV_H、例えば、クローン3.2について定義されるV_Hに結合される。2つ以上のV_Hはリンカー、例えば、ポリペプチドリンカーによって結合される。例えば、リンカーを含む適当なリンカーは、(Gly₄Ser)_n (n=1～10、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10)等のGS残基を含む。

20

【0154】

一実施形態では、本発明は、以下の二重パラトープ結合分子3.2-2(G₄S)-1.2、3.2-6(G₄S)-1.2、3.2-4(G₄S)-1.2の1つに関する。よって、本発明はまた、配列番号430、432、434又は436と、このような結合分子をコードする核酸とを含む結合分子に関する。

【0155】

30

別の実施形態では、第2の部分が、二重特異性結合分子を提供するために異なる抗原に特異的なV_Hドメイン又は別の抗体断片を含む。例えば、本明細書で使用される場合、「二重特異性結合分子」という用語は、IL-17Aに対する結合特異性を有する結合部位を有する本明細書に記載される結合分子と、第2の標的に対する結合特異性を有する結合部位を有する第2のポリペプチドドメインとを含むポリペプチドを指す、すなわち、薬剤は2つの標的に対する特異性を有する。第1の標的と第2の標的は同じでない、すなわち、異なる標的、例えば、タンパク質であるが、共に細胞上に存在する。従って、本明細書に記載される二重特異性ポリペプチド剤は、第1の標的及び第2の標的を発現する(又は細胞表面上で示す)細胞に選択的且つ特異的に結合することができる。別の実施形態では、結合分子が3つ以上のタンパク質部分を含む。

40

【0156】

別の実施形態では、3つ以上の部分が結合されて多特異性結合分子を提供する。本明細書に記載される多特異性ポリペプチド剤は更に、1つ又は複数の追加の標的に結合することができる、すなわち、多特異性ポリペプチドは少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ又はそれ超の標的に結合することができ、多特異性ポリペプチド剤はそれぞれ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ又はそれ超の標的結合部位を有する。

【0157】

本明細書で使用される場合、「標的」という用語は、結合部位を有するポリペプチドドメインが選択的に結合することができる生物学的分子(例えば、ペプチド、ポリペプチド

50

、タンパク質、脂質、炭水化物)を指す。標的は、例えば、細胞内標的(例えば、細胞内タンパク質標的)又は細胞表面標的(例えば、膜タンパク質、受容体タンパク質)であり得る。好ましくは、標的が細胞表面タンパク質等の細胞表面標的である。好ましくは、第1の細胞表面標的と第2の細胞表面標的が共に細胞上に存在する。

【0158】

本発明の多特異性抗体は、当分野で公知の方法を用いて構築することができる。

【0159】

二重パラトープ又は多特異性結合分子では、部分が一般的にリンカー、例えば、ポリペプチドリリンカーによって結合される。例えば、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ($n=1\sim 10$ 、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10)等のGS残基を含むリンカーを含む適当なリンカーが当分野で知られ

10

【0160】

所望であれば、二重特異性又は多特異性結合分子を、 C_H2 及び C_H3 ドメインの一方又は両方と、場合によりヒンジ領域とを含む抗体Fc領域又はその断片に結合することができる。例えば、Fc領域又はその断片に単一ヌクレオチド配列として結合する二重特異性又は多特異性結合分子をコードするベクターを使用してこのようなポリペプチドを調製することができる。

【0161】

代表的な第2の抗原標的は、白血球受容体、例えば、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD4、CD45、CD58、CD80、CD86又はこれらのリガンド;TNF、IL-1、IL-15、IL-23、IL-6又はCD20を含む。この列挙は言及される薬剤に限定されない。

20

【0162】

一実施形態では、第2(又は第3、第4、第5等)の部分が結合分子の半減期を延長するのに役立ち得る。第2又は第3の部分は、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(HSA)に結合する抗体又はその一部を含み得る。第2の部分は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)に結合する V_H ドメインを含み得る。

【0163】

第2の部分は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、又はその変異体、例えば、C34Sを含み得る。 V_H ドメインと、Fcドメイン又はその断片と(例えば、 V_H ドメインはFcドメイン又はその断片と結合している)を含む本明細書に記載される結合分子が更に提供される。ヒトIL-17A以外の抗原である第2の抗原に特異的に結合する第2の可変ドメインを含む結合分子が更に提供される。第2の抗原は、表面抗原分類(CD)分子又は主要組織適合複合体(MHC)クラスII分子であり得る。

30

【0164】

本発明は更に、本発明の結合メンバーをコードする単離された核酸を提供する。核酸はDNA及び/又はRNAを含み得る。一態様では、本発明は、上に定義されるCDR、CDRのセット、 V_H ドメイン又は結合分子をコードする単離された核酸を提供する。一態様では、本発明はまた、ファミリー1の V_H ドメインをコードする配列番号349~410を含む又はからなる核酸配列に関し、前記 V_H ドメインはそれぞれ、配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244又は248 440、444、448、452、456、460又は464を含む又はからなる。

40

【0165】

このような核酸の例を以下に示す。

配列番号349 V_H 1.1をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATTCGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCCACTTTGA

50

CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTCTCA

配列番号350 V_H 1.2をコードする核酸

GAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTT
CACGTTTACGAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCAAG
ACGGTTCTGTTTCAGTATTATGTCAGCGACGTGAAGGGTCGTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTAT
TTGCAGATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGA
TTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

配列番号351 V_H 1.3をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAG
ATGGAAGTGTGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

10

配列番号352 V_H 1.4をコードする核酸

GAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTT
CACGTTTACGAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCAAA
CCGGTTCTGTTTCAGTATTATGTCGACAGCGTGAAGGGTCGTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTAT
TTGCAGATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGA
TTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

配列番号353 V_H 1.5をコードする核酸

GAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTT
CACGTTTACGAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCCGA
CCGGTTCTGTTTCAGTATTATGTCGACAGCGTGAAGGGTCGTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTAT
TTGCAGATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGA
TTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

20

配列番号354 V_H 1.6をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAG
ATGGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCTCTCA

30

配列番号355 V_H 1.7をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCTCTCA

配列番号356 V_H 1.8をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGTATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCTCTCA

40

配列番号357 V_H 1.9をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGAATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAACAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号358 V_H 1.10をコードする核酸

50

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATCGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号359 V_H 1.11をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATCAGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAACAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

10

配列番号360 V_H 1.12をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号361 V_H 1.13をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCTCTCA

20

配列番号362 V_H 1.14をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATCGGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号363 V_H 1.15をコードする核酸

30

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAGGCAAG
ATGGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号364 V_H 1.16をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAG
ATGGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTGCCCCCTCTACTTCGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

40

配列番号365 V_H 1.17をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCCAA
CCGGGAGTGTGCAATACTATGTGTCCGACGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号366 V_H 1.18をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAG

50

ACGGCAGTGTGCAATACTATGTGGGGGGCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号367 V_H 1.19をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGAATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAACAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号368 V_H 1.20をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号369 V_H 1.21をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCCTGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAG
ATGGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

配列番号370 V_H 1.22をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

【0166】

一態様では、本発明はまた、配列、例えば、ファミリー2のV_Hドメインをコードする配列番号371を含む核酸配列に関し、前記V_Hドメインは配列番号252、256、260、264、268、272、276、280又は284を含む又はからなる。

配列番号371 V_H 2.1をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGCTATGGGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAAATAAAACAAG
ATGGAAGTGAGAAAGACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGAGAGTATATTTGGAATCCCCGAGGA
CTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCTCTCA

【0167】

一態様では、本発明はまた、例えば、ファミリー3のV_Hドメインをコードする配列番号372～381から選択される配列を含む核酸配列に関し、前記V_Hドメインは配列番号288、292、296、300、304、308、312、316、320、324、328、332、336又は340を含む又はからなる。

配列番号372 V_H 3.1をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATA
CACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTA
ACAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCAACATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTATGGATCGGGATTATTATGATACTAG
TGGTTACTTTGGCTGGTTGCACTCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCTCTCA

配列番号373 V_H 3.2をコードする核酸

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA

10

20

30

40

50

TAACGCGGACGCCTATTATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATACCGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCA
CTCCTACGCGGGGTGGTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

配列番号374 V_H 3.3をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCGCAGCTTCCGGATA
CACCTTCACCGACTACTATCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTA
ACACTGGCACCACAAAAGTATGCACGGGAGTTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTATGGATCGGGATTATTATGATACTAG
TGGTTACTTTGGCTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

10

配列番号375 V_H 3.5をコードする核酸

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCGCAGCTTCCGGATA
CACCTTCACCGACTACTATCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTA
ACACTGGCACCACAAAAGTATGCACGGGAGTTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATTGGCGCTCGCCCAA
CGACTACTTTGGCTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

配列番号376 V_H 3.6をコードする核酸

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCGCAGCTTCCGGATA
CACCTTCACCGACTACTATCTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTA
ACACTGGCACCACAAAAGTATGCACGGGAGTTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATTGGCGCTCGCCCAA
CGACTACTACGGGTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

20

配列番号377 V_H 3.9をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA
TAACTTCGACGCCTATCATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATAGTGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTATGGATCGGGATTACTATGATACTAG
TGGTTACTTTGGCTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

配列番号378 V_H 3.11をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA
TAACTTCGACGCCTATCATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATAGTGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCA
CTCCTACTTTGGCTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

30

配列番号379 V_H 3.13をコードする核酸

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA
TAACTTCGACGCCTATCATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATAGTGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCA
CTCCTACGCGGGGTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCTTCA

40

【0168】

一態様では、本発明はまた、例えば、ファミリー4のV_Hドメインをコードする配列、配列番号380を含む核酸配列に関し、前記V_Hドメインは配列番号344を含む又はからなる。

配列番号380 V_H 4.1をコードする核酸

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGCTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCACCATAAAACAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCACGAACCTCACTGTTT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGAGATACGATTTTCGACGGTGCTTT
TGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCCTCA

【0169】

50

一態様では、本発明はまた、例えば、ファミリー5のV_Hドメインをコードする配列、配列番号381を含む核酸配列に関し、前記V_Hドメインは配列番号348を含む又はからなる。

配列番号381 V_H 5.1をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAG
ATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCATCAGTGGCCCTTCTTTGACTACTGGGG
CCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCCTCA

【0170】

本発明による核酸はDNA又はRNAを含んでよく、完全に若しくは部分的に合成であっても、又は組換え的に生成されていてもよい。文脈上別段の解釈を要する場合を除き、本明細書に示されるヌクレオチド配列への言及は、指定された配列を有するDNA分子を包含し、指定された配列(UはTに置き換わる)を有するRNA分子を包含する。

【0171】

更に、本発明は、上に定義される少なくとも1つの核酸を含む核酸構築物に関する。構築物は、プラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態であり得る。

【0172】

本発明はまた、上記の1つ又は複数の核酸構築物を含む単離された組換え宿主細胞に関する。

【0173】

本発明はまた、競合アッセイで上に記載される本発明の結合分子と、IL-17Aとの結合について競合するIL-17Aに結合することができる結合剤に関する。

【0174】

本発明の結合分子は、以下に記載される一定の機能的特性を有する。

【0175】

特に、本発明の結合分子は、その標的細胞上でIL-17Aの効果を遮断するので、例えば、本明細書に記載されるIL-17A媒介疾患の治療に使用するために示される。本発明の結合分子のこれらの及び他の薬理学的活性は、例えば、当分野で記載される標準的な試験方法: Neutralization of IL-17A dependent production of interleukin-6 by primary human fibroblasts: The production of IL-6 in primary human (dermal) fibroblasts is dependent on IL-17 (Hwang SY等(2004) Arthritis Res Ther;6:R120~128))及び本明細書の実施例で証明され得る。よって、実施例により詳細に記載されるように、本発明による結合分子は、高い効力でIL-17Aを中和する。よって、「中和する」という用語は、結合タンパク質がIL-17に特異的に結合する場合の、IL-17の生物学的活性の中和を指す。中和結合タンパク質によるIL-17の生物学的活性の阻害は、実施例に記載されるように、当分野で周知のIL-17生物学的活性の1つ又は複数の指標を測定することによって評価することができる。

【0176】

例えば、受容体に結合したIL-17Aは、例えば、HT1080細胞、軟骨細胞又は他の適当な細胞若しくは組織型において、適当なアッセイを用いて測定することができる生物学的分子、例えば、MMP13、PGE2又はサイトカイン、例えば、IL-6又はIL-8の細胞放出を誘導するので、受容体に結合しているIL-17Aの中和を、生物学的アッセイでこれらの分子の細胞放出として測定することができる。

【0177】

生物学的活性の阻害は部分的であっても完全であってもよい。具体的な実施形態では、IL-17A生物学的活性に結合メンバーの非存在下での活性の少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%又は少なくとも50%、阻害する結合メンバーが提供される。結合メンバーがIL-17Aを中和する程度は中和効力と呼ばれる。効力は、当業者に公知の1つ若しくは複数のアッセイを用いて、及び/又は本明細書に記載若しくは言及されるように、決定又は測定することができ

る。例えば、効力は、

- HTRF(登録商標)(均一性時間分解蛍光測定)受容体-リガンド結合アッセイ
- IL-17及びTNF α に反応した相乗的IL-6放出を用いるHT1080細胞アッセイ
- 軟骨移植片における軟骨細胞IL-6/IL-8/MMP13/PGE2放出アッセイIL-6放出アッセイ
- 例えば、IL-17及びTNF α に対する相乗的IL-6反応を用いる、滑膜線維芽細胞(例えば、RA又はOA患者から)におけるIL-6放出アッセイ

で分析することができる。

アッセイ方法を実施例で詳細に記載する。

【0178】

2つの種のIL-17についての結合メンバーの交差反応性の程度を評価するために、第1の種(例えば、ヒト)からのIL-17Aを用いるアッセイで計算される結合メンバーの中和効力を、第2の種(例えば、カニクイザル)からのIL-17を用いる同じアッセイでの結合メンバーの中和効力と比較することができる。

【0179】

効力は通常、特に明言しない限り、IC₅₀値(nM)として表される。機能的アッセイでは、IC₅₀は、生物学的反応をその最大の50%低下させる結合メンバーの濃度である。IC₅₀は、結合メンバー濃度の対数の関数として最大生物学的反応の%をプロットし、ソフトウェアプログラムを用いてシグモイド関数をデータにあてはめてIC₅₀値を作成することによって計算することができる。

【0180】

よって、別の態様では、本発明は、ヒトIL-17Aに対する少なくとも1つのV_Hドメインを含む、又は少なくとも1つの免疫グロブリン単一V_Hドメイン抗体を含む若しくはからなる結合分子に関し、前記V_Hドメインは、実施例に記載されるように、すなわち、IL-17結合V_Hが細胞株HT1080からのIL-17誘導IL-6放出を阻害する能力を測定することによって試験すると、約0.2~約1000nM又は更に、例えば、0.2~900、0.2~800、0.2~700、0.2~600、0.2~500、0.2~400、0.2~300、0.2~200、0.2~100、0.2~50、0.2~40、0.2~30、0.2~20、0.2~10、0.2~9、0.2~8、0.2~7、0.2~6、0.2~5、0.2~4.0、0.2~3、0.2~2又は0.2~1の、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有する。例えば、本発明の結合分子は、典型的には約0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9又は4.0nMの、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有する。本発明の結合分子は、IL-17結合V_Hが細胞株HT1080からのIL-17誘導IL-6放出を阻害する能力を測定することによって評価される、約4nM未満、好ましくは約2nM未満の、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有し得る。このアッセイは反応したIL-6放出を測定するものであり、詳細な方法を以下の実施例に示す。これらの結合特性を有する結合分子、例えば、V_Hドメインは、本明細書に開示される配列の1つから選択され得る。別の実施形態では、V_Hドメインが本明細書に記載されるCDR3配列又はV_H配列を含む。

【0181】

例えば、一実施形態では、前記IL-17A結合分子が、実施例に記載されるように、すなわち、IL-17結合V_Hが細胞株HT1080からのIL-17誘導IL-6放出を阻害する能力を測定することによって試験すると、約0.2~約13、例えば、0.2~4.0nMの、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有するファミリー1様配列を含む。本発明の結合分子は、約13未満、好ましくは約10、9、8、7、6又は4nM、好ましくは約2nM未満の、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有し得る。一実施形態では、IC₅₀が0.2~2.0nM、例えば、0.2~1.0nM、例えば、約0.4nMである。一実施形態では、IC₅₀が実施例に示される通りである。

【0182】

一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様配列が、CDR3配列 配列番号3又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号3又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有

10

20

30

40

50

する配列を含む又ははからなる。

【0183】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、77、81、85、89、93、97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189、193、197、201、205、209、213、217、221、225、229、233、237、241、245、438、442、446、450、454、458又は462を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186、190、194、198、202、206、210、214、218、222、226、230、234、238、242、246、439、443、447、451、455、459、463を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、223、227、231、235、239、243、247、440、444、448、452、456、460又は464を含む又ははからなる。

10

【0184】

一実施形態では、結合分子が、図1のクローン1.1～1.69について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。一実施形態では、結合分子が、図1のクローン1.1～1.22について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。

20

【0185】

一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様配列が、配列番号4又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、86%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。例を図1に示す。一実施形態では、 V_H ドメインが、配列番号8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244、248、441、445、449、453、457、461又は466を含む又ははからなる。

30

【0186】

別の実施形態では、前記IL-17結合分子がファミリー2又はファミリー2様配列を含む。一実施形態では、前記ファミリー2様が、実施例に記載されるように、すなわち、 V_H を含むIL-17結合分子が細胞株HT1080からのIL-17誘導IL-6放出を阻害する能力を測定することによって試験すると、約9nM以下の、IL-6産生の阻害についての IC_{50} を有する。

【0187】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様配列が、CDR3配列、配列番号251又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号251又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

40

【0188】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号249又はこれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号250又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0189】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号249、253、257、261、265、269、273

50

、277又は281を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号250、254、258、262、266、270、274、278又は282を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号251、255、259、263、267、271、275、279又は283を含む又ははからなる。

【0190】

一実施形態では、結合分子が、図2のクローン2.1～2.9について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。

【0191】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様配列が、配列番号252又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。例をtable 2(表2)に示す。一実施形態では、ファミリー2配列が、配列番号256、260、264、268、272、276、280又は284を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。

10

【0192】

別の実施形態では、前記IL-17A結合分子が、実施例に記載されるように、すなわち、 V_H を含むIL-17結合分子が細胞株HT1080からのIL-17誘導IL-6放出を阻害する能力を測定することによって試験すると、約0.2～約1000nM、例えば、0.2～200の、IL-6産生の阻害についての IC_{50} を有するファミリー3様配列を含む。本発明の結合分子は、IL-17結合 V_H が細胞株HT1080からのIL-17誘導IL-6放出を阻害する能力を測定することによって評価される約200nM未満、好ましくは約100nM未満、好ましくは約10nM未満の、IL-6産生の阻害についての IC_{50} を有し得る。

20

【0193】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、CDR3配列 配列番号287又はこれと少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号287又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0194】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号285又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号286又はこれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

30

【0195】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号285、289、293、297、301、305、309、313、317、321、325、329、333又は337を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334又は338を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列287、291、295、299、303、307、311、315、319、323、327、335又は339を含む又ははからなる。

40

【0196】

一実施形態では、結合分子が、図3のクローン3.1～3.14について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。

【0197】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、配列番号288又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、86%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。このような配列のCDR配列を図3に示す。例えば、 V_H ドメインは、配列番号292、296、300、304、308、312、316、320、324、328、332、336又は340を含む又ははからなる。

50

【0198】

別の実施形態では、本発明はまた、IL-17Aに対する少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子であって、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記IL-17A結合分子はファミリー4又はファミリー4様配列を含む結合分子に関する。

【0199】

一実施形態では、ファミリー4又はファミリー4様配列が、CDR3配列 配列番号343又はこれと少なくとも70%、80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号343又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

10

【0200】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号341又はこれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号342又はこれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0201】

一実施形態では、ファミリー4又はファミリー4様配列が、配列番号344又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなるV_Hドメインを有する。例を図4に示す。

20

【0202】

別の実施形態では、前記IL-17A結合分子がファミリー5又はファミリー5様配列を含む。

【0203】

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様配列が、CDR3配列 配列番号347又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号347又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

30

【0204】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号345又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、95%、94%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号346又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0205】

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様配列が、配列番号348又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなるV_Hドメインを有する。例を図5に示す。

40

【0206】

更に、IL-17Aとの結合についての本発明のIL-17A結合分子の結合速度論及び親和性(平衡解離定数、KDとして表される)を、例えば、BIAcore(登録商標)等の表面プラズモン共鳴を用いて測定することができる、又はKDをpA2分析から推定することができる。

【0207】

別の態様では、本発明は、BIAcore(登録商標)を用いて計算される $5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-11}$ 、例えば、 $5 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-10}$ のKD(M)値を有する結合分子に関する。「KD」という用語は、「平衡解離定数」を指し、平衡での滴定測定で、又は解離速度定数(Koff)を会合速度定数

50

(Kon)で割ることによって得られる値を指す。一実施形態では、KDが実施例に示される通りであり得る。

【0208】

一実施形態では、結合分子がファミリー1又はファミリー1様配列である。一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様配列が、CDR3配列 配列番号3又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3がアミノ酸配列、配列番号3又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0209】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、77、81、85、89、93、97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189、193、197、201、205、209、213、217、221、225、229、233、237、241、245、438、442、446、450、454、458又は462を含む又ははからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186、190、194、198、202、206、210、214、218、222、226、230、234、238、242、246、439、443、447、451、455、459、463を含む又ははからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、223、227、231、235、239、243、247、440、444、448、452、456、460又は464を含む又ははからなる。

【0210】

一実施形態では、結合分子が、図1のクローン1.1~1.62について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。一実施形態では、結合分子が、図1のクローン1.1~1.22について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。

【0211】

一実施形態では、ファミリー1又はファミリー1様配列が、配列番号4又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる V_H ドメインを有する。例を図1に示す。例えば、 V_H ドメインが、配列番号8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244又は248を含む又ははからなる。

【0212】

一実施形態では、結合分子がファミリー2又はファミリー2様配列である。一実施形態では、ファミリー2様配列が、CDR3配列、配列番号251又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号251又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0213】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号249又はこれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号250又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99

%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0214】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号249、253、257、261、265、269、273、277又は281を含む又はからなり、CDR2がアミノ酸配列、配列番号250、254、258、262、266、270、274、278又は282を含む又はからなり、CDR3がアミノ酸配列、配列番号251、255、259、263、267、271、275、279又は283を含む又はからなる。

【0215】

一実施形態では、結合分子が、図2のクローン2.1～2.9について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。

【0216】

一実施形態では、ファミリー2又はファミリー2様配列が、配列番号252又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、95%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又はからなるV_Hドメインを有する。例をtable 2(表2)に示す。一実施形態では、ファミリー2配列が、配列番号256、260、264、268、272、276、280又は284を含む又はからなるV_Hドメインを有する。

【0217】

一実施形態では、結合分子がファミリー3様配列である。一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、CDR3配列 配列番号287又はこれと少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号287又はこれと少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0218】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号285又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号286又はこれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなる。

【0219】

一実施形態では、CDR1がアミノ酸配列、配列番号285、289、293、297、301、305、309、313、317、321、325、329、333又は337を含む又はからなり、CDR2がアミノ酸配列286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334又は338を含む又はからなり、CDR3がアミノ酸配列287、291、295、299、303、307、311、315、319、323、327、335又は339を含む又はからなる。

【0220】

一実施形態では、結合分子が、図3のクローン3.1～3.14について示されるCDR1、CDR2及びCDR3の組み合わせを有する。

【0221】

一実施形態では、ファミリー3又はファミリー3様配列が、配列番号288又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又はからなるV_Hドメインを有する。このような配列のCDR配列を図3に示す。例えば、V_Hドメインは、配列番号292、296、300、304、308、312、316、320、324、328、332、336又は340を含む又はからなる。

【0222】

一実施形態では、結合分子がファミリー4又はファミリー4様配列である。一実施形態では、これがCDR3配列 配列番号343又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号343又はこれ

10

20

30

40

50

と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0223】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号341又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号342又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0224】

一実施形態では、ファミリー4配列が、配列番号344又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなるV_Hドメインを有する。例を図4に示す。

【0225】

別の実施形態では、前記IL-17結合分子がファミリー5又はファミリー5様配列を含む。

【0226】

一実施形態では、ファミリー5又はファミリー5様配列が、CDR3配列 配列番号347又はこれと少なくとも80%、85%、90%、95%の相同性を有する配列を含む。一実施形態では、前記CDR3が、アミノ酸配列、配列番号347又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0227】

一実施形態では、前記CDR1が、アミノ酸配列、配列番号345又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。一実施形態では、前記CDR2が、アミノ酸配列、配列番号346又はこれと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する配列を含む又ははからなる。

【0228】

一実施形態では、ファミリー5配列が、配列番号348又はこれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列を含む又ははからなるV_Hドメインを有する。例を図5に示す。

【0229】

一実施形態では、結合分子が、上に定義されるKD及び上に定義される、IL-6産生の阻害についてのIC₅₀を有する。

【0230】

本発明はまた、ヒトV_H生殖系列配列、例えば、ヒトV_H3-07又はV_H1-02生殖系列配列の又はこれに由来するアミノ酸産物を含む単離されたV_Hドメインに関する。

【0231】

当業者であれば、インビトロ及びインビボ発現ライブラリーを含む、本明細書に記載される抗原結合分子を同定し、得るための異なる方法が存在することが分かるだろう。このことを実施例で更に記載する。ディスプレイ(例えば、リボソーム及び/又はファージディスプレイ)及び/又は突然変異誘発(例えば、エラープローン突然変異誘発)等の当分野で公知の最適化技術を使用することができる。

【0232】

インビトロ発現ライブラリーを用いて本明細書に記載されるポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物を調製又は生成する方法は、

a)アミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリーを用意す

10

20

30

40

50

る工程と;

b)前記セット、コレクション又はライブラリーを、IL-17Aに結合することができる/IL-17Aに対する親和性を有するアミノ酸配列についてスクリーニングする工程と、

c)IL-17Aに結合することができる/IL-17Aに対する親和性を有するアミノ酸配列を単離する工程と

を含むことができる。

【0233】

上記方法では、配列のセット、コレクション又はライブラリーを、例えば、スクリーニングを容易にするために、ファージ、ファージミド、リボソーム又は適当な微生物(酵母等)上にディスプレイすることができる。配列(のセット、コレクション又はライブラリー)をディスプレイ及びスクリーニングするのに適した方法、技術及び宿主生物は当業者に明らかであるだろう(例えば、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press;第1版(1996年10月28日) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty参照)。

10

【0234】

V_Hドメインを含む本明細書に記載される結合分子は、トランスジェニック齧歯動物で発現することができる。トランスジェニック齧歯動物、例えば、マウスは、内在性抗体遺伝子を発現する能力が低い。よって、一実施形態では、齧歯動物が、内在性軽及び/又は重鎖抗体遺伝子を発現する能力が低い。そのため、齧歯動物は、機能的軽及び/重鎖が産生されないように、内在性軽及び/又は重鎖抗体遺伝子の発現を妨害するための追加の修飾を含むことができる。

20

【0235】

本発明はまた、ヒトIL-17Aに結合することができる少なくとも1つのヒト免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含む結合分子を製造する方法であって、前記ドメインはヒトV_Hであり、前記方法が、

d)トランスジェニックマウスをIL-17A抗原で免疫化する工程であって、前記マウスはヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現し、機能的内在性軽鎖又は重鎖を生成することができない工程と、

e)前記マウスからV_Hドメイン配列を含む配列のライブラリーを作成する工程と、

f)前記ライブラリーからV_Hドメイン配列を含む配列を単離する工程と

を含む、方法に関する。

30

【0236】

本発明はまた、例えば、上記の方法を通して、機能的内在性軽鎖又は重鎖を生成することができないマウスから得た又は得ることができるV_Hドメインを含む結合分子に関する。

【0237】

一実施形態では、齧歯動物がマウスである。マウスは、非機能的λ軽鎖遺伝子座を含み得る。よって、マウスは機能的内在性λ軽鎖を生成しない。一実施形態では、λ軽鎖遺伝子座が部分的若しくは完全に欠失されている、又は挿入、転置、組換え事象、遺伝子編集若しくは遺伝子サイレンシングを通して非機能的にされている。例えば、少なくとも定常領域遺伝子C1、C2及びC3が非機能的にされ得る。一実施形態では、マウスが機能的内在性λ軽鎖を生成しないように遺伝子座が機能的にサイレンシングされる。

40

【0238】

更に、マウスは、非機能的κ軽鎖遺伝子座を含み得る。よって、マウスは機能的内在性κ軽鎖を生成しない。一実施形態では、κ軽鎖遺伝子座が部分的若しくは完全に欠失されている、又は挿入、転置、組換え事象、遺伝子編集若しくは遺伝子サイレンシングを通して非機能的にされている。一実施形態では、マウスが機能的内在性κ軽鎖を生成しないように遺伝子座が機能的にサイレンシングされる。

【0239】

機能的にサイレンシングされた内在性λ及びκL鎖遺伝子座を有するマウスは、例えば、これにより全体が参照により組み込まれる国際公開第2003/000737号に開示されるよう

50

に作製することができる。

【0240】

更に、マウスは非機能的重鎖遺伝子座を含み得る。よって、マウスは機能的内在性重鎖を生成しない。一実施形態では、重鎖遺伝子座が部分的若しくは完全に欠失されている、又は挿入、転置、組換え事象、遺伝子編集若しくは遺伝子サイレンシングを通して非機能的にされている。

【0241】

例えば、(これにより全体が参照により組み込まれる)国際公開第2004/076618号に記載されるように、全8つの内在性重鎖定常領域免疫グロブリン遺伝子(μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 ϵ 及び α)がマウス中に存在しない、若しくはこれらが非機能的となる程度に部分的に存在しない、又は遺伝子 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 及び ϵ が存在せず、隣接遺伝子 μ 及び α が、これらが非機能的となる程度に部分的に存在しない、又は遺伝子 μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 及び ϵ が存在せず、 α が、これが非機能的となる程度に部分的に存在しない、又は δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 ϵ 及び α が存在せず、 μ が、これが非機能的となる程度に部分的に存在しない。一実施形態では、マウスが機能的内在性重鎖鎖を生成しないように、遺伝子座が機能的にサイレンシングされている。

10

【0242】

欠失とは、一部は、例えば、挿入によって、機能的内在性遺伝子産物が遺伝子座によってコードされない、すなわち、機能的産物が遺伝子座から発現されない程度に、内在性遺伝子座遺伝子配列が欠失又は破壊されていることを意味する。別の実施形態では、遺伝子座が機能的にサイレンシングされている。

20

【0243】

一実施形態では、マウスが非機能的内在性重鎖遺伝子座、非機能的内在性 λ 軽鎖遺伝子座及び非機能的内在性 κ 軽鎖遺伝子座を含む。そのため、マウスはいかなる機能的内在性軽鎖も重鎖も生成しない。よって、マウスはトリプルノックアウト(TKO)マウスである。

【0244】

トランスジェニックマウスは、ベクター、例えば、異種重鎖遺伝子座を発現するための酵母人工染色体(YAC)を含む。YACは酵母で極めて大きなDNAインサートをクローニングするために使用され得るベクターである。天然酵母染色体のようにふるまうのに必須である全3つのシス作用性構造要素(自律複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)及び2つのテロメア(TEL))を含むのはもちろん、大きなDNAインサートを受け入れる能力により、これらが、染色体のように安定になり、酵母細胞中で忠実に伝達されるのに必要な最小サイズ(150kb)に達することが可能である。YACの構築及び使用は当分野で周知である(例えば、Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopaedia of Life Sciences 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group/www.els.net)。

30

【0245】

例えば、YACは C_H1 ドメインを欠くマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサー及び調節領域と組み合わせて、過剰なヒト V_H 、D及びJ遺伝子を含み得る。このようなYACの例を実施例節で提供する。

【0246】

内在性マウス又はラット免疫グロブリン遺伝子を欠失又は不活性化し、 C_H1 ドメインを欠くマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサー及び調節領域と組み合わせて、ヒト V_H 、D及びJ遺伝子を導入するために、当分野で公知の代替方法を使用することができる。

40

【0247】

トランスジェニックマウスは、実施例に例示される標準的な技術により作製することができる。トランスジェニックマウスを作製するための2つの最も一般的な特徴づけられた経路は、遺伝物質の新たに受精した卵母細胞への前核微量注入法を介する、又は安定にトランスフェクトした胚性幹細胞の桑実胚若しくは胚盤胞段階の胚への導入を介する。遺伝物質をどのように導入するかにかかわらず、操作された胚が偽妊娠雌レシピエントに移さ

50

れ、妊娠が継続し、候補トランスジェニックの子が生まれる。

【0248】

これらの広範な方法間の主な差異は、トランスジェニック動物を作製するために使用する前に、ESクローンを広くスクリーニングすることができるということである。対照的に、前核微量注入法は、導入後の宿主ゲノムへの遺伝物質組み込みに依拠し、一般的に言えば、導入遺伝子の組み込み成功を子が生まれた後まで確認することができない。

【0249】

導入遺伝子の取り込みが成功するのを助けるとともに、成功したかどうかを判定するための多くの方法が当分野で公知である。構築物のゲノムへのランダム組み込み、部位特異的組み込み又は相同組換えを含む複数の手段によってトランスジェニック動物を作製することができる。組換えの効率を改善するための薬物耐性マーカー(正の選択)、リコンビナーゼ、組換え媒介カセット交換、負の選択技術及びヌクレアーゼの使用を含む、導入遺伝子組み込み及びその後の修飾を駆動するとともに選択するために使用することができる種々のツール及び技術が存在する。これらの方法のほとんどがES細胞の修飾に一般的に使用されている。しかしながら、これらの技術のいくつかは、前核注入を介して媒介される遺伝子組換えを増強するための有用性を有し得る。

【0250】

所望の背景内でトランスジェニック系列をより効率的に作製するためにさらなる精密化を用いることができる。上記のように、好ましい実施形態では、内在性マウス免疫グロブリン発現をサイレンシングして、創薬のために活用され得る重鎖のみのレパートリーを発現するための導入された導入遺伝子の単独使用を可能にする。遺伝子操作マウス、例えば、全ての内在性免疫グロブリン遺伝子座(マウス重鎖、マウスκ鎖及びマウスλ鎖)についてサイレンシングされたTKOマウスを上記のように使用することができる。導入された導入遺伝子のこのTKO背景移入は、交配(従来の又は過程の効率的なスクリーニングを得るためのIVF工程を含めたもの)を介して達成することができる。しかしながら、遺伝子組換え手順中にTKO背景を含めることも可能である。例えば、微量注入法については、卵母細胞をTKOドナーから得てもよい。同様に、TKO胚からのES細胞を遺伝子組換えに使用するために得ることができる。

【0251】

本発明の結合分子を別の部分に結合することができる。これは、毒素、酵素、放射性同位体、他の検出可能な標識、ペプチド、タンパク質及び目的の化学部分から選択され得る。

【0252】

例えば、本発明の結合分子は、検出可能な又は機能的標識で標識され得る。標識は、それだけに限らないが、蛍光体、放射性標識、酵素、化学発光体(chemiluminescer)又は光増感剤を含む、シグナルを生成する又はシグナルを生成するよう誘導され得る任意の分子であり得る。よって、蛍光又は発光、放射能、酵素活性又は光吸光度を検出することによって、結合を検出及び/又は測定することができる。

【0253】

本発明の結合分子の半減期を、化学修飾、特にペグ化又は血清アルブミン、例えば、HAS若しくは抗HAS結合分子との結合、又はリポソームへの組み込みによって延長することができる。

【0254】

一実施形態では、本発明の結合分子が共有結合的に修飾されている。「共有結合的に修飾されている/共有結合修飾」という用語は、例えば、指定された配列の本発明による抗体及び結合分子の有機タンパク質性又は非タンパク質性誘導体化剤による修飾、異種ポリペプチド配列との融合、並びに翻訳後修飾を含む。例えば、指定された配列の共有結合修飾ポリペプチドは、本明細書に記載される機能的特性、例えば、ヒトIL-17に結合する又は例えば、架橋によってIL-17誘導ヒト皮膚線維芽細胞のIL-6産生を中和する能力をまだ有している。共有結合修飾は、一般的に、標的アミノ酸残基を、選択された側若しくは末

10

20

30

40

50

端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、又は選択された組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の機序を利用することによって導入される。一定の翻訳後修飾は、発現したポリペプチドへの組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンル及びアスパラギンル残基がしばしば対応するグルタミンル及びアスパルチル残基に翻訳後に脱アミド化される。或いは、これらの残基が温和な酸性条件下で脱アミノ化される。他の翻訳後修飾には、プロリン及びリジンの水酸化、セリル、チロシン又はスレオニル残基の水酸基のリン酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の $[\alpha]$ -アミノ基のメチル化が含まれる。例えば、共有結合修飾は、例えば、指定された配列の本発明による結合分子及びそのアミノ酸配列変異体、例えば、イムノアドヘシンと、異種シグナル配列とのN末端融合とを含む融合タンパク質を含む。

10

【0255】

本発明の別の態様では、本発明によるIL-17A結合分子と、場合により薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。本発明の結合分子又は組成物は、任意の簡便な経路によって投与することができ、本発明の結合分子又は組成物の投与形態の例としては、限定されないが、局所、特に、経皮、非経口及び鼻腔内が挙げられる。非経口投与は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内注射又は注入技術を含む。組成物は単回又は複数回投与単位の状態をとることができる。

【0256】

本発明の組成物は液体、例えば、溶液、エマルジョン又は懸濁液の形態であり得る。液体は注射による送達に有用となり得る。本発明の液体組成物は、それが溶液、懸濁液又は他の同様の形態のいずれであれ、以下の1つ又は複数を含むこともできる：滅菌希釈剤、例えば、水、食塩水溶液、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム、不揮発性油、例えば、合成モノ若しくはジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン又は他の溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコール又はメチルパラベン；及び張度を調整するための薬剤、例えば、塩化ナトリウム又はデキストロース。組成物を、ガラス、プラスチック又は他の材料でできたアンプル、使い捨て注射器又は複数回用量バイアルに封入することができる。

20

【0257】

具体的な実施形態では、1種又は複数の本発明の結合分子又は組成物を、治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましいだろう。

30

【0258】

よって、本発明の全ての態様の好ましい実施形態では、本発明の組成物又は結合分子の投与が、健康な又は病気の皮膚への局所投与による。結合分子は少なくとも皮膚の外層に浸透することができるので、皮膚的又は経皮的に送達させることができる。従って、本発明の種々の態様の一実施形態では、本発明の組成物又は結合分子の皮膚への局所送達、局所的非全身暴露のための皮膚への直接送達である。別の実施形態では、本発明の組成物又は結合分子の皮膚への局所送達、皮膚の全ての層を通して浸透した後に全身暴露を提供するための皮膚への直接送達である。

【0259】

治療される皮膚は、病気の皮膚であっても健康な皮膚であってもよい。好ましい実施形態では、皮膚疾患が乾癬又はアトピー性皮膚炎である。

40

【0260】

好ましくは、施用される表面積が体表面積の1%~30%、例えば、1%~10%又は1%~20%である。よって、投与は体表面積の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、27%、26%、28%、29%又は30%までであり得る。一実施形態では、疾患状態が軽度である。別の実施形態では、疾患状態が中等度である。別の実施形態では、疾患状態が重度である。乾癬を治療するために、投与は患部、典型的には肘、膝、手のひら、頭皮、足底、生殖器、上腿、鼠径部、臀部、顔及び胴体から選択される1つ又は複数の領域に対する。アトピー性皮膚炎を治療するために、投与は幹部、典型的には顔、前腕及び手首から選択される1つ又は複

50

数の領域に対する。

【0261】

結合分子は、クリーム、ローション、スプレー、溶液、ゲル、軟膏、ペースト、硬膏剤、パッチ、生体接着剤、懸濁剤等の形態で病気の又は健康な皮膚に直接施用することができる、並びに/或いはリポソーム、ミセル及び/又はマイクロスフェアを含有するように調製することができる。一実施形態では、結合分子が、液剤(例えば、スプレー)、硬膏剤、パッチ又は生体接着剤の形態で病気の皮膚に直接施用される。一実施形態では、結合分子がマイクロエマルジョンの形態で病気の皮膚に直接施用される。

【0262】

マイクロエマルジョンは一般的に、2~500nmの範囲内の液滴径を有すると定義されるので、活性剤の皮膚への有効な送達を可能にする。マイクロエマルジョンは、一定の範囲の化合物の経皮送達の増強への使用について提案されてきた。これは、全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2007/0243132号に記載されている。

10

【0263】

具体的には、本明細書で使用される場合、マイクロエマルジョンという用語は油相、水相及び界面活性剤を含む配合物を指し、マイクロエマルジョンは、例えば、本明細書に記載されるヒトV_Hドメインを含む結合分子の経皮送達が可能である。好ましくは、本発明のマイクロエマルジョンが2~500nmの範囲内の液滴径を有する。一実施形態では、マイクロエマルジョンが、共界面活性剤、共溶媒又はこれらの組み合わせを更に含む。

【0264】

本発明のマイクロエマルジョンは、界面活性剤が優先的に水溶性である水中油型マイクロエマルジョン;界面活性剤が主に油相中にある油中水型マイクロエマルジョン;界面活性剤に富む中相が水相及び油相と共存する三相マイクロエマルジョン;両連続単相;十分な量の両親媒性物質(界面活性剤+アルコール)を添加すると形成する単相ミセル溶液;又は膨潤ミセル溶液であり得る。

20

【0265】

本発明のマイクロエマルジョンは当分野で公知の方法によって製造することができる。一般に、マイクロエマルジョンは、典型的には、必要な分散レベル、伝導率、粘度、浸透性(percolativity)又は他の分散特性を生み出すために十分な力又は必要な温度を含む条件下で成分を乳化することによって製造される。

30

【0266】

マイクロエマルジョン形成は、中性子散乱、時間平均散乱、準電子光散乱、すなわち、高分解能超音波分光法又は光子相関分光法等の散乱及び分光法技術を用いて評価することができる。マイクロエマルジョンの分配係数はクロマトグラフ的に測定することもできる。特定の配合の選択は、所望の用途に応じていくつかの異なるパラダイムに基づく。例示的なパラダイムには、親水性-親油性バランス、転相温度又は凝集エネルギー比が含まれる。マイクロエマルジョンは、広範囲の非混和性液体及び他の追加の薬剤を用いて配合することができる。

【0267】

本発明のマイクロエマルジョンは、50~99重量%、最も好ましくは50~90重量%の範囲の油相と;2~50重量%、最も好ましくは1~50重量%の範囲の水相と;0.1~90重量%の界面活性剤、好ましくは1~90重量%の界面活性剤とを含み得る。マイクロエマルジョンは、0.1~90重量%の共界面活性剤又は共溶媒、好ましくは1~90重量%の共界面活性剤又は共溶媒を更に含み得る。

40

【0268】

油相は、植物又は動物由来の天然油(植物油、ヒマワリ油、ヤシ油、アーモンド油等);精製した合成又は天然のジ又はトリグリセリド(Crodamol GTCC(登録商標)及びCapmul MCM(登録商標)等);リン脂質及びその誘導体(レシチン又はリゾレシチン等);脂肪酸エステル(ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、オレイン酸エチル、オレイン酸エチルエステル等);炭化水素(ヘキサン、n-デカン~n-オクタデカンシリーズ等);及び/又

50

はグリセリン分解(glycerolysed)脂肪及び油(グリセリルモノオレエート、グリセリルモノカプリレート、グリセロールモノカプレート、プロピレングリコールモノカプリレート、プロピレングリコールモノラウレート等)を含み得る。

【0269】

他の油相成分には、それだけに限らないが、Labrafil M 1944 CS(登録商標)、ベンゼン、テトラヒドロフラン及びn-メチルピロリドン又はハロゲン化炭化水素(塩化メチレン又はクロロホルム等)が含まれる。特定の実施形態では、油相がCrodamol GTCC(登録商標)及びCapmul MCM(登録商標)を3:1比で含む。油成分は単独で又は別の油成分と組み合わせて使用される。各油又は油の固有の混合物は、当業者によって日常的に決定され得るように、水相を有するマイクロエマルジョンを形成するために、異なる界面活性剤又は界面活性剤の混合物又は界面活性剤と共界面活性剤を要し得る。水相成分は水と、1種又は複数の医薬品を含む水中の任意の水溶性成分とを含み得る。

10

【0270】

本発明のマイクロエマルジョンは、溶媒又はエマルジョン形成若しくは安定性を増強するための他の剤を更に含み得る。他の剤を導入してpH、イオン含量、重合、味覚、芳香、無菌性、色、粘度等々の機能を提供することができる。

【0271】

本発明のマイクロエマルジョンを、任意の適当な合成プラスチック、又はポリマー性、モノマー性若しくはハイブリッドコロイド材料を用いて生成することもできる。

【0272】

上に示される方法及び使用によると、結合分子を1種又は複数の化学的皮膚浸透促進剤と一緒に投与することができる。皮膚浸透促進剤の例を以下に示す。

20

【0273】

別の実施形態では、結合分子が吸蔵を用いて投与される。一実施形態では、結合分子が化学的皮膚浸透促進剤と一緒に、吸蔵を用いて、健康な又は病気の皮膚に投与される。一実施形態では、結合分子がマイクロエマルジョンとして及び吸蔵を用いて健康な又は病気の皮膚に投与される。

【0274】

本発明の種々の態様の別の実施形態では、投与が非化学的皮膚浸透促進剤、例えば、フォノフォレーシス、ソノフォレーシス、電気穿孔を用いて、又はマイクロニードル技術を用いて改善され得る。これは、薬物リザーバーと接続された小型針(高さ10~200 µm及び幅10~50 µm)を使用する。マイクロニードル送達装置は、上部真皮の神経終末に達することなく皮膚表面に適用される。

30

【0275】

上に示されるように投与される結合分子は、少なくとも皮膚の外層に浸透することができるので、疾患を治療するために有効な治療量の結合分子を送達する。本明細書に示されるように投与される結合分子は、好ましくは6時間以下、例えば、1時間以下で皮膚に浸透することができる。

【0276】

一態様では、本発明は、本発明の結合分子と、皮膚浸透を促進又は改善する皮膚浸透促進剤とを含む医薬組成物に関する。特に指定されない限り、本明細書で使用される皮膚浸透促進剤という用語は、化学的皮膚浸透促進剤を指す。多数の化学的浸透促進剤が当分野で公知であり、本発明の組成物に使用することができる。これらには、それだけに限らないが、水、アルコール、好ましくは最大6個の炭素原子を有するアルコール、例えば、エタノール、グリコール、例えば、アルコールジエチレングリコール(Transcutol(登録商標))、アルキル-N,N-二置換アミノアセテート、例えば、ドデシル-N,N-ジメチルアミノアセテート、エステル、例えば、酢酸エチル、Azone(登録商標)及び誘導体、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、テルペン及びテルペノイド、例えば、d-リモネン、脂肪酸、例えば、オレイン酸、尿素及び誘導体、例えば、1,3-ジフェニル-尿素、ピロリドン、例えば、N-メチル-2-ピロリドン及び2-ピロリドン-5-カルボン酸、シクロデキストリン

40

50

、例えば、 β -シクロデキストリン、スルホキシド、例えば、ジメチルスルホキシドが含まれる。他の皮膚浸透促進剤は当業者に公知である。一実施形態では、促進剤が水でない。一実施形態では、皮膚浸透促進剤がプロピレングリコール、ミリスチン酸イソプロピル及びアゾンの1つ又は複数から選択される。好ましい浸透促進剤は、例えば、Table 13(表13)及びTable 14(表14)、並びに実施例に示される、DMSO、アゾン、Transcutol(登録商標)、ミリスチン酸イソプロピル、オレイン酸又はこれらの組み合わせである。

【0277】

一実施形態では、浸透促進剤が水、エタノール、ポリエチレングリコール誘導体、ポリオキシエチレン誘導体(ポリソルベート等)、脂肪アルコール(セチルアルコール、ステアリルアルコール又はセロステアリルアルコール等)、グリセロール及びプロピレングリコールの1つ又は複数ではない。

10

【0278】

特定の障害又は状態の治療に有効/活性である本発明の結合分子の量は、障害又は状態の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定することができる。更に、インビトロ又はインビボアッセイを場合により使用して最適な投与量範囲を同定することができる。組成物に使用するための正確な用量は、投与経路及び疾患又は障害の重篤度にも依存し、専門家の判断及び各患者の状況により決定すべきである。

【0279】

本発明の組成物は、適当な投与量が得られるように有効量の本発明の結合分子を含む。化合物の正確な投与量は、特定の配合、施用様式及びその特定の部位、受容者及び治療している疾患により変化するだろう。年齢、体重、性別、食事、投与時間、排泄率、受容者の状態、薬物組み合わせ、反応感受性及び疾患の重症度等の他の因子も考慮すべきである。投与は、最大耐容用量内で連続的又は周期的に行うことができる。

20

【0280】

典型的には、この量は組成物の少なくとも約0.01重量%の本発明の結合分子である。

【0281】

本発明の好ましい組成物は、非経口投与単位が約0.01重量%~約2重量%の本発明の結合分子を含有するよう調製される。

【0282】

静脈内投与については、組成物は典型的には約0.1mg/kg~約250mg/kg動物体重、好ましくは約0.1mg/kg~約20mg/kg動物体重の間、より好ましくは約1mg/kg~約10mg/kg動物体重を構成し得る。

30

【0283】

本組成物は適当な担体、例えば、エアロゾル、スプレー、懸濁液又は使用に適した他の形態の形態をとることができる。適当な医薬担体の他の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、E.W.Martinに記載されている。

【0284】

リポソーム及びミセルを本発明により使用することもできる。

【0285】

リポソームは、脂質二重層を含む脂質壁を有する微細小胞であり、本文脈では、本発明の重鎖のみの抗体又は組成物をカプセル化する。本明細書中のリポソーム調製物は、カチオン性(正に帯電)、アニオン性(負に帯電)及び中性調製物を含む。カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2,3-ジオレイルオキシ]プロピル]-N,N,N-トリエチル-アンモニウム(DOTMA)リポソームが商品名Lipofectin(GIBCO BRL社、Grand Island、NY)で入手可能である。同様に、アニオン性及び中性リポソームも容易に入手可能であり、容易に入手可能な材料を用いて容易に調製することができる。このような材料には、特にホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が含まれる。これらの材料を適当な比でDOTMAと混合することもできる。これらの材料を用いてリポソームを生成する方法は

40

50

当分野で周知である。

【0286】

ミセルは、その極性頭部が外部球形シェルを形成する一方、疎水性炭化水素鎖が球の中心に向かって配向されて、コアを形成するように配置された界面活性剤分子で構成されたものとして当分野で知られている。ミセルは十分高濃度で界面活性剤を含有する水溶液中で形成するので、結果としてミセルは自然に生じる。ミセルを形成するために有用な界面活性剤には、それだけに限らないが、ラウリン酸カリウム、オクタンスルホン酸ナトリウム、デカンスルホン酸ナトリウム、ドデカンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクサートナトリウム、デシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、ドデシルアンモニウムクロリド、ポリオキシシル-8ドデシルエーテル、ポリオキシシル-12ドデシルエーテル、ノノキシノール10及びノノキシノール30が含まれる。

10

【0287】

同様に、マイクロスフェアを本製剤に組み込むことができる。リポソーム及びミセルと同様に、マイクロスフェアは本質的に本製剤の1つ又は複数の成分をカプセル化する。これらは一般的に、必ずしもそうであるとは限らないが、脂質、好ましくは荷電脂質、例えば、リン脂質から形成される。脂質マイクロスフェアの調製は当分野で周知であり、関連テキスト及び文献に記載されている。

20

【0288】

医薬組成物は、製薬分野で周知の方法論を用いて調製することができる。例えば、注射によって投与することを意図した組成物は、本発明の結合分子を水と組み合わせて溶液を形成することによって調製することができる。界面活性剤を添加して均質な溶液又は懸濁液の形成を促進することができる。

【0289】

本発明は更に、本発明の結合分子を患者に投与する工程を含む、疾患を予防及び/又は治療する方法であって、薬学的活性量の本発明の結合分子及び/又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法に関する。より具体的には、本発明は、本明細書に列挙される疾患及び障害からなる非限定的群から選択される疾患を予防及び/又は治療する方法であって、薬学的活性量の本発明の結合分子又は医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法に関する。本発明により治療することができる免疫関連疾患の例は、本明細書の開示に基づいて当業者に明らかであり、例えば、自己免疫疾患、炎症性状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、及び臓器又は組織移植拒絶が挙げられる。

30

【0290】

本発明はまた、疾患の治療に使用するための本発明の結合分子に関する。別の態様では、本発明は、疾患、例えば、自己免疫疾患、炎症性状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、及び臓器又は組織移植拒絶の治療に使用するための本発明の結合分子に関する。

【0291】

40

別の態様では、本発明は、疾患、例えば、自己免疫疾患、炎症性状態、アレルギー及びアレルギー状態、過敏反応、重度感染症、及び臓器又は組織移植拒絶を治療するための医薬品の製造における本発明の結合分子の使用に関する。異なる上記態様によると、疾患は以下の非限定的一覧から選択され得る：乾癬、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、骨関節炎、若年性関節リウマチ、脊椎関節症、全身硬化症、突発性炎症性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫溶血性貧血、自己免疫血小板減少症、甲状腺炎、糖尿病、免疫媒介腎疾患、中枢神経系及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば、多発性硬化症、突発性脱髄性多発性ニューロパチー又はギランバレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー、肝胆道疾患、例えば、感染性、自己免疫慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グル

50

テン過敏性腸疾患及びウィップル病、自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患(水泡性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む)、アレルギー性疾患、例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば、好酸球性肺炎、突発性肺線維症及び過敏性肺炎、自己免疫血液障害(例えば、溶血性貧血、再生不良性貧血、真正赤血球性貧血及び突発性血小板減少症を含む)、自己免疫炎症性腸疾患(例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病及び過敏性腸症候群を含む)、移植関連疾患(移植片拒絶及び移植片対宿主病を含む)。

【0292】

本発明の結合分子はまた、喘息、気管支炎、塵肺症、肺気腫及び他の気道の閉塞性又は炎症性疾患の治療、予防又は改善にも有用である。

10

【0293】

好ましい実施形態では、疾患が乾癬、脊椎関節症、ブドウ膜炎、アトピー性皮膚炎及び喘息から選択される。

【0294】

本発明の抗体は、IL-17によって媒介される又はIL-17産生若しくはIL-17によるTNF放出の促進を伴う望ましくない急性及び超急性炎症反応、例えば、急性感染症、例えば、敗血症性ショック(例えば、エンドトキシンショック及び成人呼吸促迫症候群)、髄膜炎、肺炎;及び重症熱傷の治療;並びに感染症、がん又は臓器機能不全の結果としての病的TNF放出に関連する悪液質又は消耗症候群、特に、例えば、HIV感染に関連する又はHIV感染の結果としてのAIDS関連悪液質の治療に有用である。

20

【0295】

本発明の結合分子は、骨関節炎、骨粗鬆症を含む骨代謝の疾患並びに他の炎症性関節炎及び骨減少(一般に、加齢性骨減少を含む)及び特に歯周病を治療するのに特に有用である。

【0296】

本発明の結合分子を、単独有効成分として又は1種若しくは複数の他の薬物、例えば、上記疾患を治療又は予防するための免疫抑制若しくは免疫調節剤又は他の抗炎症剤と組み合わせ投与することができる。例えば、本発明の結合分子を、免疫抑制モノクローナル抗体、例えば、白血球受容体、例えば、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD58、CD80、CD86又はそのリガンドに対するモノクローナル抗体;他の免疫調節化合物、例えば、CTLA4又はその変異体の細胞外ドメインの少なくとも一部、例えば、非CTLA4タンパク質配列、例えば、CTLA4Ig(例えば、ATCC68629と呼ばれる)又はその変異体、例えば、LEA29Yと結合したCTLA4又はその変異体の少なくとも細胞外部分を有する組換え結合分子;接着分子阻害剤、例えば、LFA-Iアンタゴニスト、ICAM-I若しくは-3アンタゴニスト、VCAM-4アンタゴニスト又はVLA-4アンタゴニスト;又は化学療法薬、例えば、パクリタキセル、ゲムシタビン、シスプラチン、ドキソルビシン又は5-フルオロウラシル;抗TNF剤、例えば、TNFに対するモノクローナル抗体、例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、CDP870又はTNF-RI若しくはTNF-RIIに対する受容体構築物、例えば、Etanercept(登録商標)、PEG-TNF-RI;炎症促進性サイトカインの遮断薬、IL-I遮断薬、例えば、アナキンラ又はIL-Iトラップ、AAL160、ACZ885、IL-6遮断薬;ケモカイン遮断薬、例えば、プロテアーゼの阻害剤又は活性化因子、例えば、メタロプロテアーゼ、抗IL-15抗体、抗IL-6抗体、抗CD20抗体、NSAID(アスピリン等)又は抗感染症薬と組み合わせ使用することができる。この一覧は言及される薬剤に限定されない。

30

40

【0297】

本発明の結合分子は、他の薬物と同時に、又は異なる時間に、例えば、同時に、別々に又は順次投与することができる。

【0298】

本発明はまた、疾患を診断する方法に関する。代表的な疾患は上に列挙される。一実施形態では、疾患が乾癬である。本方法は、試料中の本明細書に記載される結合分子の結合を検出することによってIL-17A発現のレベルを測定する工程と、試験試料中のIL-17Aの発

50

現のレベルを、乾癬でない対象からの対照試料中の発現のレベル又は乾癬でない対象についての標準値若しくは標準値範囲と比較する工程とを含む。対照又は標準に対する試験試料中のIL-17A発現の上昇は、疾患の存在を示す。

【0299】

別の態様では、本発明は、上記疾患の治療に有用な本発明の結合分子と、場合により取扱説明書とを含むキットを提供する。

【0300】

本発明はまた、本発明の結合分子を用いる検出方法に関する。ヒトIL-17Aに結合する能力があれば、本明細書に開示されるヒトIL-17A結合分子を使用して、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)又は組織免疫組織化学等の従来の免疫測定法を用いて、IL-17A(例えば、血清又は血漿等の生体試料中)を検出することができる。生体試料を本明細書に開示される結合分子と接触させる工程と、IL-17Aに結合した結合分子又は結合していない結合分子のいずれかを検出し、それによって生体試料中のIL-17Aを検出する工程とを含む、生体試料中のIL-17Aを検出する方法が提供される。結合分子を検出可能な物質で直接的又は間接的に標識して、結合している又は結合していない抗体の検出を容易にする。適当な検出可能な物質には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質が含まれる。

【0301】

結合タンパク質を標識する代わりに、検出可能な物質で標識したIL-17標準及び未標識ヒトIL-17結合分子を利用する競合免疫測定法によって、生体液においてヒトIL-17Aを分析することができる。このアッセイでは、生体試料、標識IL-17A標準及びヒトIL-17A結合分子を合わせ、未標識結合分子に結合した標識IL-17A標準の量を測定する。生体試料中のヒトIL-17Aの量は、IL-17結合分子に結合した標識IL-17標準の量に反比例する。同様に、検出可能な物質で標識したIL-17標準及び未標識ヒトIL-17結合分子を利用する競合免疫測定法によって、生体液においてヒトIL-17を分析することもできる。

【0302】

本明細書で説明されるように、本発明の結合分子は、インビトロとインビボの両方でIL-17活性、例えば、ヒトIL-17活性を中和することができる。

【0303】

従って、例えば、ヒト対象又は本明細書に開示される結合分子が交差反応するIL-17を有する他の哺乳動物対象において、IL-17を含む細胞培養液で、本明細書に開示されるこのような結合分子を使用してIL-17活性を阻害することができる。一実施形態では、IL-17活性が阻害又は増加されるようにIL-17を本明細書に開示される結合分子と接触させる工程を含む、IL-17活性を阻害又は増加させる方法が提供される。例えば、IL-17を含む又は含むことが疑われる細胞培養液で、本明細書に開示される結合分子を培養培地に添加して培養液中のIL-17活性を阻害することができる。

【0304】

本明細書で特に定義されない限り、本開示に関連して使用される科学及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。前記開示は本発明の方法、並びに本発明を生成及び使用するベストモードを含む、本発明の範囲内に含まれる主題の一般的な説明を提供するが、以下の実施例を提供して、当業者が本発明を実施するのを更に可能にし、その完全な書面による明細を提供する。しかしながら、当業者であれば、これらの実施例の詳細が本発明に対する限定として読まれるべきでなく、本発明の範囲は本開示に添付される特許請求の範囲及びその同等物から理解されるべきであることを認識するだろう。本開示に照らして、本発明の種々のさらなる態様及び実施形態が当業者に明らかになるだろう。

【0305】

遺伝子登録番号への言及を含む本明細書で言及される全ての文書は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0306】

「及び/又は」は、本明細書で使用される場合、他を含む又は含まない2つの指定される特徴又は成分の各々の具体的な開示とみなされるべきである。例えば、「A及び/又はB」は、あたかも各々が本明細書で個別に示されているように、(i)A、(ii)B及び(iii)AとBの各々の具体的な開示とみなされるべきである。文脈上別段の指示がない限り、上に示される特徴の説明及び定義は、本発明の特定の態様又は実施形態に限定されず、記載されている全ての態様及び実施形態に等しく準用する。

【0307】

本発明を非限定的実施例で更に説明する。

【実施例】

【0308】

10

(実施例1)

Tg/TKOマウスの構築

内在性重及び軽鎖抗体発現についてサイレンシングされた(トリプルノックアウト又はTKO)背景内の生殖系列配置の重鎖抗体トランスジェニック遺伝子座を有するマウスを、前記(国際公開第2004/076618号及び国際公開第2003/000737号、Ren等、Genomics、84、686、2004;Zou等、J. Immunol.、170、1354、2003)のように作製した。手短に言えば、 C_H1 ドメインを欠くマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサー及び調節領域と組み合わせて過剰のヒト V_H 、D及びJ遺伝子を含む酵母人工染色体(YAC)を新たに受精した卵母細胞に前核微量注入した後、トランスジェニックマウスを得た。酵母人工染色体(YAC)は酵母で極めて大きなDNAインサートをクローニングするために使用され得るベクターである。天然酵母染色体のようにふるまうのに必須である全3つのシス作用性構造要素(自律複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)及び2つのテロメア(TEL))を含むのはもちろん、大きなDNAインサートを受け入れる能力により、これらが、染色体のように安定になり、酵母細胞中で忠実に伝達されるのに必要な最小サイズ(150kb)に達することが可能である。YACの構築及び使用は当分野で周知である(例えば、Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopaedia of Life Sciences 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group/www.els.net)。

20

【0309】

使用するYACは、その天然配置の10個のヒト重鎖V遺伝子、ヒト重鎖D及びJ遺伝子、マウス $C\gamma 1$ 遺伝子及びマウス3'エンハンサー遺伝子を含む約340kbとした。これは C_H1 エクソンを欠いていた。具体的には、YACは、(5'から3'まで):テロメア-酵母TRP1マーカー遺伝子-セントロメア-10個のヒトV遺伝子-ヒトD遺伝子-ヒトJ遺伝子-マウス μ エンハンサー及びスイッチ-マウス $C\gamma 1$ ($C_H1\Delta$)遺伝子-マウス3'エンハンサー-ハイグロマイシン耐性遺伝子-酵母マーカー遺伝子HIS3-テロメアを含んでいた。

30

【0310】

トランスジェニックファウンダーマウスを、内在性免疫グロブリン発現を欠いた動物と戻し交雑して、記載される免疫化試験に使用するTg/TKO系列を作製した。

【0311】

(実施例2)

免疫化のための抗原

40

免疫化は組換え精製タンパク質を使用した。組換えヒトIL-17AをPeprotech社から購入した(Peprotech社、カタログ番号AF-200-17)。

【0312】

(実施例3)

免疫化プロトコル

本ケースでは、組換えタンパク質をTg/TKOに投与した。手短に言えば、それぞれ8~12週齢のマウスに、完全フロイントアジュバント中で乳化した組換えタンパク質合計10 μ gを受けさせ、皮下送達し、引き続いて不完全フロイントアジュバント中で乳化した組換えタンパク質1~10 μ gのブーストも皮下投与し、初期プライミング後、種々の間隔で与えた。最終用量の抗原を、アジュバントの非存在下、リン酸緩衝生理食塩中で、腹腔内投与し

50

た。

【0313】

代替の免疫化経路及び手順を使用することもできる。例えば、フロイントアジュバントの代わりに、異なるアジュバント又は免疫強化手順を使用することができる。DNA免疫化は通常、筋肉内又は遺伝子銃を介して送達する。トランスフェクト細胞又はこのような細胞からの膜調製物は通常、排他的ではないが、腹腔内投与する。

【0314】

(実施例4)

血清ELISA

免疫化中及び後、血清をマウスから回収し、ELISAによって、免疫原に対する重鎖抗体反応の存在について確認した。Nunc社のMaxisorpプレート(Nunc社カタログ番号443404)を50 μ l/ウェルの5 μ g組換え抗原/ml PBS溶液で、4°Cで一晩コーティングした。抗原溶液をデカントした後、プレートを、0.05%Tween(登録商標)20(sigma社P1379)を補足したPBS(PBS錠剤から調製、Oxoid社カタログ番号BR0014G)を用いて洗浄し、引き続いてTween(登録商標)を添加していないPBSで洗浄した。非特異的タンパク質相互作用を遮断するために、PBS中3%脱脂粉乳(Marvel社)の溶液をウェルに添加し、プレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした。血清の3%脱脂粉乳/PBS中希釈液をポリプロピレンチューブ又はプレート中で調製し、室温で少なくとも1時間インキュベートした後、ブロッキングELISAプレートに移し、ここで少なくとも1時間の更なるインキュベーションを行った。次いで、結合していないタンパク質を、PBS/Tween(登録商標)、引き続いてPBSによる繰り返しの洗浄を用いて洗い流した。次いで、PBS/3% μ 中に調製したビオチン結合ヤギ抗マウスIgG、Fc γ サブクラス1特異抗体(Jackson社115-065-205)を各ウェルに添加し、室温で少なくとも1時間の更なるインキュベーションを行った。結合していない検出抗体を、PBS/Tween(登録商標)及びPBSを用いた繰り返しの洗浄によって除去した。次いで、3%Marvel/PBS中ニュートラアビジン-HRP溶液(Pierce社31030)をELISAプレートに添加し、少なくとも30分間結合させた。更なる洗浄後、TMB基質(Sigma社カタログ番号T0440)を用いてELISAを展開し、0.5M H₂SO₄溶液(Sigma社カタログ番号320501)を添加することによって反応を10分後に停止した。450nmで読み取ることによって吸光度を測定した。血清ELISAデータの例を図7に示す。ELISPOTアッセイ等の代替アッセイを使用して免疫化誘導重鎖抗体反応を確認することもできる。

【0315】

(実施例5)

免疫化マウスからのライブラリーの作成

a. 組織の処理、RNA抽出及びcDNA製造

脾臓、鼠径及び上腕リンパ節を各免疫化動物からRNAlaterに回収した。各動物について、脾臓の1/3及び4つのリンパ節を別々に処理した。最初に、組織をホモジナイズした;組織をLysingマトリックスDビーズチューブ(MP Bio社カタログ番号116913100)に移した後、 β -メルカプトエタノールを含有するRLT緩衝液600 μ L (Qiagen社製、RNeasy(登録商標)キットカタログ番号74104)を添加した後、6m/s 40秒サイクルを用いてMP Bio社Fastprepホモジナイザー(カタログ番号116004500)でホモジナイゼーションを行った。ホモジナイズした組織を含有するチューブを氷に移し、細片を10gで5分間微量遠心分離によってペレット化した。上清400 μ lを取り出し、RT-PCRに使用した。

【0316】

最初に、製造業者の指示に従って、Qiagen社RNeasy(登録商標)キットカタログ番号74104を用いてRNAを抽出した。次いで、各RNA試料を使用して、Superscript III RT-PCR高忠実度キット(Invitrogen社カタログ番号12574-035)を用いてcDNAを作製した。各脾臓及びLN RNA試料について、それぞれV_H1、V_H2、V_H3、V_H4又はV_H6ファミリー用のプライマーと組み合わせてV_H-J/F(長)プライマーを用いて、5回のRT-PCR反応を行った。プライマーの詳細は以下である;

【0317】

【表 6】

Table 6 プライマー

V1a/pelB (長)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTB CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGG 配列番号382
V2/pelB (長)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGATC ACCTTGAAGGAGTCTGG 配列番号383
V3/pelB (長)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTG CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号384
V4-4/pelB (長)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTG CAGCTGCAGGAGTCGGG 配列番号385
V6/pelB (長)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTA CAGCTGCAGCAGTCAGG 配列番号386
VH_J/F (長)	CCGTGGTGATGGTGGTGATGGCTACCGCCACCCTCGAGTGARGAGAC RGTGACC 配列番号387

太字の残基はpUCG3と相同性を有する。

【0318】

以下のチューブ反応成分に基づいて、RT-PCR反応のためにマスターミックスを調製した。

12.5 μ l 2×反応ミックス

0.5 μ l 順方向プライマー (10 μ M)

0.5 μ l 逆方向プライマー (10 μ M)

0.5 μ l 酵素ミックス

500ng~1 μ g RNA

25 μ lまでの水

【0319】

以下の条件を用いて、サーマルサイクラーでRT-PCR反応を行った；

50°C 20分

94°C 2分

35サイクルの94°C 15秒

58°C 30秒

68°C 30秒

68°C 5分

4°Cで維持

370bpの範囲の産物をゲル電気泳動によって確認した。

【0320】

次いで、各マウスについて、1/3脾臓及び4つのリンパ節の各々から所与のファミリーについて増幅したV_H産物を、産物を水50 μ lに溶出する、Thermo/Fermentas社のGeneJet PCR精製キット(カタログ番号K0702)(製造業者の指示に従って使用した)を用いた精製のためにプールした。

【0321】

b. ファージミドベクターへのクローニング

ファージミドベクター、pUCG3をこれらの試験に使用した。示されるように、NcoI及びXhoIによる制限酵素消化、ライゲーション及び形質転換を含む従来法を用いて、V_HをpUCG3にクローニングすることができる。或いは、PCRに基づく方法を使用してV_Hファージミドライブラリーを構築することができる。これらの手順の両方を使用して増幅V_H配列からライブラリーを作製した。前者の方法が当分野で広く使用されている。PCRに基づく方法について、以下の手順を使用した：

【0322】

10

20

30

40

50

以下のプライマーで、PCRを用いてpUCG3の線状版を作製した：

pUCG3-F3 CTCGAGGGTGGCGGTAGCCATCACCACCATC

配列番号388

pUCG3-R3 TCCATGGCCATCGCCGGCTGGGCCGCGAG 配列番号389

【0323】

以下の試薬を含むPCR反応にGC緩衝液(カタログ番号F532L、NEB)を含むPhusion High fidelity PCRマスターミックスを使用した；

Phusion GC 2×ミックス 25 μ l

pUCG3 5~10ng

プライマー(10 μ M) それぞれ1.25 μ l

DMSO 1.5 μ l

10

ヌクレアーゼフリーH₂O 50 μ lの最終体積まで

使用したサイクリング条件は、

98°C30秒

10サイクルの

98°C10秒

58°C20秒

68°C2分30秒

20サイクルの

98°C10秒

58°C20秒

68°C3分

68°C5分

4°C維持

20

【0324】

PCR産物(3152bp)を、溶出緩衝液40 μ lに最終溶出して、製造業者の指示により、Fermentas社のGeneJetゲル精製キット(カタログ番号K0691)を用いてゲル精製した。以下の反応に基づき、精製したV_H RT-PCR産物を線状pUCG3と共にメガプライマーとして使用して、形質転換及びライブラリー作製のためのファージミド産物を得た；

Phusion GC 2×ミックス 25 μ l

線状pUCG3 700ng

30

V_HPCR産物 250ng

DMSO 1.5 μ l

ヌクレアーゼフリーH₂O 50 μ lの最終体積まで

PCRを以下の通り行った；

【0325】

【化1】

98°C 30秒

98°C 10秒

58°C 20秒

72°C 2分

72°C 5分

10°Cで維持

} 10サイクル

40

【0326】

PCR産物を1%アガロースゲル上で分析した。

【0327】

種々のファミリーのV_H/ファージミド産物を、最終溶出をH₂O25 μ l中にして、製造業者の指示により、FermentをPCR精製キット(カタログ番号K0702)として使用して精製し、BioRad(登録商標)10×1mmキュベット(BioRad(登録商標)カタログ番号165-2089)、Eppendorf(登録商標)Eporator及び予熱回収培地(Lucigen社、専売ミックス)を用いる電気穿孔による

50

TG1大腸菌(E.coli)(Lucigen社、カタログ:60502-2)の形質転換に使用した。精製した産物2 μ lを電気穿孔のために細胞25 μ lに添加し、最大10回の電気穿孔を1800Vで各 V_H /ファージミド産物について行った。電気穿孔した細胞を50ml Falconチューブにプール及び回収し、150rpmで振盪しながら37°Cで1時間インキュベートした。形質転換物の一定分量の10倍希釈系列を行い、2%(w/v)グルコース及び100 μ g/mlアンピシリンを補足した2×TY寒天を含有するペトリ皿に蒔いた。これらの皿上に得られたコロニーを使用してライブラリーサイズを推定した。形質転換の残りを、2%(w/v)グルコース及び100 μ g/mlアンピシリンを補足した2×TY寒天を含有する大型フォーマットBioassay板に蒔いた。全ての寒天平板を30°Cで一晩インキュベートした。2×TYブロス10mlを大型フォーマットバイオアッセイ板に添加し、コロニーをこすり取り、OD600を測定した(OD1.0=5×10⁸個細胞/ml)。一定分量を、50%v/vグリセロール溶液(50%)を添加した後に冷結保存バイアル中-80°Cで保存した、又はファージ選択工程に直接使用した。

10

【0328】

いくつかの例では、クローンを直接選抜し、配列を決定してライブラリーの多様性を推定した。典型的には、各マウスについて、1e8超の組換え体を含むファージディスプレイライブラリーを構築してそのマウスにおける V_H 多様性を完全にとらえた。

【0329】

(実施例6)

ナイーブ V_H ライブラリー

ナイーブインビトロヒト V_H 1ライブラリーの構築

20

ヒト V_H 1-02足場を以下の通りPCR(Finnzymes社F-531L)によって増幅した: 2×Phusion PCRミックス25 μ l; V1a/B(10 μ M)2.5 μ l; VH3-93/F/C-(10 μ M) 2.5 μ l; V_H 1-02をコードするプラスミド10ng及びdH₂O 50 μ lの最終体積まで。次いで、反応物を1分間95°Cに加熱し、引き続いて30サイクルのPCR:98°C10秒、54°C30秒、72°C30秒を行った。次いで、PCR産物を1%(w/v)アガロースゲル上での電気泳動、引き続いて臭化エチジウムによる染色によって分析した。PCR増幅産物を約300bpの正確なサイズで観察した(図6A)。

【0330】

脾臓、リンパ節、骨髄及び末梢血リンパ球からのヒトcDNAを商業的供給業者(Invitrogen社、Clontech)から購入した。オリゴヌクレオチドプライマー V_H CDR3/B/G-及び V_H J/Fを合成して、以下の通りB細胞cDNAからの V_H -CDR3+ V_H フレームワーク4配列のPCR増幅を促進した: 2×Phusion PCRミックス25 μ l(Finnzymes社F-531L); V_H CDR3/B/G-(10 μ M)2.5 μ l; V_H J/F(10 μ M)2.5 μ l; cDNA3ng及びdH₂O最終50 μ lまで。次いで、反応物を1分間95°Cに加熱し、引き続いて30サイクルのPCR:98°C10秒、54°C30秒、72°C30秒を行った。30サイクル後、次いで、PCR反応物を72°Cで8分間加熱し、引き続いて10°Cで維持した。次いで、PCR産物を1%(w/v)アガロースゲル上での電気泳動、引き続いて臭化エチジウムによる染色によって分析した。PCR増幅産物を約50~100bpの正確なサイズで観察した(図6B)。

30

【0331】

次いで、ヒト V_H -CDR3 PCR産物を V_H 1-02足場と組み立てて、全長 V_H 結合分子をコードするDNA産物を作製した。 V_H 1-02足場を、以下を添加することによって増幅ヒト V_H -CDR3配列と組み立てた: 2×Phusion PCRミックス12.5 μ l(Finnzymes社F-531L); V_H 1-02PCR産物40ng; 各 V_H -CDR3 PCR産物10ng及び dH₂O最終25 μ lまで。次いで、反応物を1分間95°Cに加熱し、引き続いて8サイクルのPCR:98°C10秒、54°C30秒、72°C30秒を行った。8サイクル後、次いで、PCR反応物を72°Cで8分間加熱し、引き続いて10°Cで維持した。次いで、全長 V_H 産物をプルスルーPCRによって組み立て産物から増幅した: 2×Phusion PCRミックス100 μ l(Finnzymes社F-531L); オリゴヌクレオチドV1a/B(10 μ M)10 μ l; オリゴヌクレオチド V_H J/F(10 μ M)10 μ l; V_H 1-02組み立て産物10 μ l及びdH₂O200 μ lの最終体積まで。次いで、反応物を1分間95°Cに加熱し、引き続いて30サイクルのPCR:98°C10秒、54°C30秒、72°C30秒を行った。30サイクル後、次いで、PCR反応物を72°Cで8分間加熱し、引き続いて10°Cで維持した。次いで、PCR産物を1%(w/v)アガロースゲル上での電気泳動、引き続いて臭化エチジウムによる染色によって分析した。全長 V_H 産物を約400bpの正確なサイズで観察した(図6C)。PCR

40

50

産物を、Fermentas社のPCR精製カラム(K0701)を用いて精製し、dH₂Oに再懸濁した。

【0332】

ファージディスプレイ用のライブラリーを調製するために、全長V_H産物を、制限消化及びライゲーションによってファージミドベクターpUCG3にクローニングした。pUCG3 DNA及びV_H1-02プラスループPCR産物をNcoI(Fermentas社FD0574)及びXhoI(Fermentas社FD0694)制限酵素を用いて37℃で一晩消化した。全ての消化物を5分間80℃に加熱し、次いで、各産物を、Fermentas社のPCR精製カラム(K0701)を用いて精製し、最後にdH₂Oに再懸濁した。

【0333】

消化したV_H産物を、製造業者の指示に従ってNEB T4 DNAリガーゼ(M0202M)を用いて同様に消化したpUCG3を連結した。手短に言えば、NcoI/XhoI二重消化pUCG3 DNAとV_H産物を1:2のモル比で混合し、T4リガーゼと共に16℃で一晩インキュベートした。70℃で30分間インキュベーションした後、ライゲーション産物を、Fermentas社のPCR精製カラムを用いて精製し、最後にdH₂Oに再懸濁した。次いで、Biorad(登録商標)キュベット(165-2089)及びBiorad(登録商標)Micropulserを用いて、精製したライゲーション産物2μlを、製造業者の指示に従って、エレクトロコンピテント(electrocompetent)TG1細胞(Lucigen社60502-1)25μlに電気穿孔した。電気穿孔TG1細胞を、100μg/mlのアンプシリン及び20%(w/v)のグルコースを補足した2×TY寒天平板に蒔き、30℃で一晩インキュベートした。同様に、電気穿孔TG1細胞の希釈系列を蒔いて、ライブラリーサイズを決定すると、これは7.7e9組換え体であると計算された。

配列

【0334】

【表7】

Table 7-オリゴヌクレオチドプライマー(5'から3')

VH _{JF}	GCTACCGCCACCTCGAGTGARGAGACRGTGACC 配列番号390
V1a/B	GGAACAGACCACCATGGCCCAGGTBCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGG 配列番号391
VHCDR3/B/G-	GACACGGCCGTGTATTACTGTGC 配列番号392
VHCDR3/F/C-	GCACAGTAATACACGGCCGTGTGC 配列番号393

【0335】

足場配列

V_H 1-02 アミノ酸配列 配列番号394

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCAR

V_H 1-02 核酸配列 配列番号395

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATA
CACCTTACCCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTA
ACAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

【0336】

(実施例7)

IL-17A結合VHを単離するための選択戦略

ライブラリーファージストックの調製及びファージディスプレイ選択を公開されている方法(Antibody Engineering、編者Benny Lo、第8章、161～176頁、2004)に従って行った。ほとんどの場合で、パンニング手法と組み合わせたファージディスプレイを用いて結合V_Hドメインを単離した。しかしながら、(a)可溶性選択;(b)ストレス(ファージを選択前に2時間70℃に加熱する)下で行う選択;及び(c)競合的选择(過剰な抗原又は抗原反応性V_Hドメインを競合として添加して高親和性V_Hドメインの回収を促進する又は特定のエピトープから離れた選択をそらす)を含む、種々の異なる選択法を使用することができる。免疫化

マウスからのライブラリーについては、1ラウンドの選択を行った。しかしながら、ナイーブライブラリーについては、2～3ラウンドの選択を行った。

【0337】

(実施例8)

標的結合についてのアッセイ

異なる選択からの V_H を以下のアッセイの1つ又は複数でスクリーニングして、中和特性を有する具体的な V_H を同定した。

【0338】

a) 結合ELISA

ライブラリーの選択後、公開されている方法(Antibody Engineering、編者Benny Lo、第8章、161～176頁、2004)に従って、ファージELISAによって具体的な V_H 抗体を同定した。標的タンパク質及び対照としての関連のない抗原に対してファージELISAを行った。いくつかの場合で、ファージELISAを用いる代わりに、ELISAによって、 V_H ドメインの精製した抽出物又は粗抽出物を分析した。これらの場合、細菌周辺質抽出物又は精製 V_H を使用した。

10

【0339】

ディープウェルプレートで培養した培養液1mlから小規模細菌周辺質抽出物を調製した。種菌を使用して、250rpmで振盪しながら、37℃で0.1%(w/v)グルコース+100 µg/mlアンピシリンを補足した2XTYブロス(Melford社、M2130)を含有する96ウェルのディープウェルプレート(Fisher社、カタログ番号MPA-600-030X)に植え付けた。OD600が0.6～1に達したら、IPTG(最終濃度1mM)及びアンピシリンを補足した2XTY 100 µlを添加することによって V_H 産生を誘導し、培養液を250rpmで振盪しながら30℃で一晩培養した。大腸菌を3200rpmで10分間遠心分離によってペレット化し、上清を捨てた。細胞ペレットを、穏やかにピペット操作することによって、氷冷抽出緩衝液(20%(w/v)スクロース、1mM EDTA及び50mM Tris-HCl pH8.0)30～100 µlに再懸濁した。細胞を氷上で30分間インキュベートし、次いで、4500rpmにおいて4℃で15分間遠心分離した。上清をポリプロピレンプレートに移し、脱脂粉乳/PBSブロッキング溶液中でインキュベーションした後、ELISAに使用した。

20

【0340】

精製した V_H を、周辺質抽出物のニッケル-アガロースアフィニティクロマトグラフィー精製のために V_H C末端6×HISタグを用いることによって得た。各 V_H の種菌を、250rpmで振盪しながら、30℃で2%(w/v)グルコース+100 µg/mlアンピシリンを補足した2XTYブロス(Melford社、M2103)5ml中で一晩培養した。次いで、この一晩培養液50 µlを使用して2%(w/v)グルコース+100 µg/mlアンピシリンを補足した2XTY 50mlに植え付け、250rpmで振盪しながら、37℃で約6～8時間(OD600=0.6～1.0まで)インキュベートした。次いで、培養液を3200rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットを、100 µg/mlアンピシリン+1mM IPTGを含有する新鮮な2XTYブロス50mlに再懸濁した。次いで、振盪フラスコを30℃及び250rpmで一晩インキュベートした。培養液を再度3200rpmで10分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞ペレットを、穏やかにピペット操作することによって、氷冷抽出緩衝液(20%(w/v)スクロース、1mM EDTA及び50mM Tris-HCl pH8.0)1mlに再懸濁し、次いで、1:5希釈氷冷抽出緩衝液を更に1.5ml添加した。細胞を氷上で30分間インキュベートし、次いで、4500rpmにおいて4℃で15分間遠心分離した。上清を、PBS緩衝液で前平衡化したイミダゾール(Sigma社、12399-最終濃度10mM)及びニッケルアガロースビーズ0.5ml(Qiagen社、Ni-NTA50%溶液、30210)を含有する50ml Falconチューブに移した。ニッケルアガロースビーズとの V_H の結合を、穏やかに振盪しながら4℃で2時間進めさせた。次いで、ニッケルアガロースビーズをポリプレップカラム(BioRad(登録商標)、731-1550)に移し、重力流によって上清を捨てた。次いで、カラムをPBS+0.05%Tween(登録商標)5mlで3回洗浄し、引き続いて20mMの濃度でイミダゾールを含有するPBS5mlで3回洗浄した。次いで、250mMの濃度でイミダゾールを含有するPBS250 µlを添加することによって、 V_H をカラムから溶出した。次いで、NAP-5カラム(GE Healthcare社、17-0853-01)との緩衝液交換を行い、次いで、PBS1mlで溶出することによって、精製した V_H 調製物からイミダゾールを除去した。精製した V_H の収率を分光光度測

30

40

50

定により推定し、SDS PAGEを用いて純度を評価した。

【0341】

粗 V_H 又は精製 V_H についての結合ELISAは、前記の血清ELISA及びファージELISAと類似であり、大部分は最終検出ステップが異なっていた。手短に言えば、抗原を、PBS中0.1~1 $\mu\text{g/ml}$ の50 μl 体積を添加し、4°Cで一晩インキュベートすることによって、抗原をmaxisorbプレート(Nunc社443404)上に固定した。コーティング後、抗原溶液を吸引し、プレートを、0.05%Tween(登録商標)20(sigma社P1379)を補足したPBS(PBS錠剤から調製、Oxoid社カタログ番号BR0014G)を用いて洗浄し、引き続いてTween(登録商標)を添加していないPBSで洗浄した。非特異的タンパク質相互作用を遮断するために、PBS中3%脱脂粉乳(Marvel社)の溶液をウェルに添加し、プレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした。周辺質抽出物又は精製 V_H の3%脱脂粉乳/PBS中希釈液をポリプロピレンチューブ又はプレート中で調製し、室温で少なくとも1時間インキュベートした後、ブロッキングELISAプレートに移し、ここで少なくとも1時間の更なるインキュベーションを行った。次いで、結合していないタンパク質を、PBS/Tween(登録商標)、引き続いてPBSによる繰り返しの洗浄を用いて洗い流した。次いで、PBS/3%脱脂粉乳中1:1000希釈で調製したHRP結合抗His Ab(Miltenyi Biotec社、130-092-785)を各ウェルに添加し、室温で少なくとも1時間の更なるインキュベーションを行った。結合していない検出抗体を、PBS/Tween(登録商標)及びPBSを用いた繰り返しの洗浄によって除去した。次いで、TMB基質(Sigma社カタログ番号T0440)を用いてELISAを展開し、0.5M H_2SO_4 溶液(Sigma社カタログ番号320501)を添加することによって反応を10分後に停止した。450nmで読み取ることによって吸光度を測定した。実施例ELISAデータを図8に示す。

【0342】

b)R/L生化学的阻害アッセイ

精製したものと粗周辺質抽出物の両方の V_H をIL-17Aと組換えIL-17A-Fcの相互作用を阻害する能力についても試験した。Maxisorb 96Fウェルマイクロタイタープレートを2nM IL-17-RA 50 μl (R&D systems社、カタログ番号177-IR-100)溶液とインキュベートし、4°Cで一晩インキュベートした。上記の過剰のコーティング抗原を洗浄した後、プレートのウェルを3%脱脂粉乳/PBSとインキュベートして非特異的タンパク質相互作用を遮断した。 V_H 調製物、粗周辺質抽出物若しくは精製 V_H 、又は適当な対照を、ポリプロピレンプレート又はチューブ中で、3%marvel/PBS溶液中1nM組換えIL-17A(Peprotech社、カタログ番号AF-200-17)と共に室温で少なくとも1時間インキュベートした。次いで、混合物をアッセイプレートに移し、室温で1時間インキュベートした。過剰なタンパク質を洗浄によって除去し、ビオチン化抗IL-17A Mab(R&D Systems社、カタログ番号BAF317)とインキュベートし、引き続いてニュートラアビジン-HRP(Pierce社、カタログ番号31030)及びTMB基質(Sigma社、カタログ番号T0440)を添加することによって結合IL-17Aを検出した。0.5M H_2SO_4 を添加することによってTMB反応を停止し、吸光度をプレートリーダーにおいて450nmで測定した。

【0343】

適当であれば、PRISMの曲線当てはめを使用して阻害 V_H の EC_{50} を決定した。生化学的アッセイにおけるIL-17A反応の阻害を示す実施例のデータを図9に示す。 V_H はファージミドベクターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0344】

c)R/L細胞ベースの阻害アッセイ

IL-17A結合 V_H が細胞株、HT1080(ECACC社カタログ番号85111505)からのIL-17A誘導IL6放出を阻害する能力を測定するためのアッセイを開発した。細胞株を非必須アミノ酸、10%FBS、2mM L-グルタミン及びペニシリン/ストレプトマイシンを補足した、アール塩を含むMEM中で指数増殖に維持し、37°C、5% CO_2 の加湿チャンバー中でインキュベートした。アッセイのために、50000個の細胞/ウェルを96平底組織培養プレートに蒔き、一晩培養した。精製 V_H の系列希釈を調製し、10ng/ml IL-17A(Peprotech社カタログ番号AF200-17)を補足した培養培地/PBSと37°Cで1時間インキュベートした。インキュベーション後、 V_H /IL-17A混合物(又は適当な対照)をHT1080細胞(その培養培地から吸引した)に移し、 CO_2 インキュ

ベーター中で更に5時間インキュベートした。細胞培養液上清を回収し、製造業者の指示に従って、IL-6 DuoSet(R&D Systems社、カタログ番号DY206)を用いてIL6について分析した。細胞ベースのアッセイにおけるIL-17A反応の阻害を示す実施例のデータを図10に示す。 V_H はファージミドベクターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0345】

d)Biocore(登録商標)

抗IL-17A V_H 抗体の結合速度論をBIAcore(登録商標)T200機器で測定した。組換えIL-17A(Peprotech社AF-200-17)を酢酸緩衝液、pH5.5(BIAcore(登録商標)、カタログ番号BR-100-52)中に1 μ g/mlまで希釈し、アミンカップリング化学(NHS-EDCアミンカップリングキット、カタログ番号BR-1000-50)及びBIAcore(登録商標)固定化Wizard(登録商標)ソフトウェアを用いてCM5 Series Sチップ(カタログ番号BR-1006-68)にカップリングした。このようにして、IL-17Aの100RUを固定化し、ブランク表面(IL-17A無し)も基準減算用に調製した。

【0346】

抗IL-17A V_H 抗体の結合速度論を単一サイクル速度論によって決定した。 V_H 抗体を希釈系列(典型的には最高濃度の100nM V_H で始まる1:3希釈系列)で調製し、次いで、最低濃度の V_H で始めて、抗原コーティング表面及びブランク表面上にも注射し、次いで、最高濃度まで漸進的に作業した。次いで、 V_H 結合速度論を、1:1結合モデル及びBIA評価ソフトウェアを用いて(ブランク減算)センサーグラムトレースから決定した。実施例のBIAcore(登録商標)結合トレースを図11に示す。 V_H はファージミドベクターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0347】

上記スクリーニングカスケードの後、阻害特性を示すいくつかのIL-17Aに対する V_H を同定した。これらをTable 8(表8)で以下に要約する。クローンは最適化のための親クローンである。

【0348】

10

20

【表 8】

Table 8

標 的 抗原	V _H 源	ファミリ ー名	CDR3配列	Bioch em I C50 (nM)	細 胞 ア ッ セイI C50 (nM)	BIAcore(登録商標)(親 和性)		
						ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
IL-1 7A	ナイー ブイン ビトロ ライブ ラリー	ファミリ ー3 (クローン 3.1)	MDRDYYDTS GYFGWFDS 配列番号287	230	>100 0	3.427E +04	5.94 E-03	1.73E -07
	免疫化 マウス	ファミリ ー1 (クローン 1.1)	GEILPLHFD Y 配列番号3	53	13	2.96E+ 05	1.49 E-03	5.0E- 09
		ファミリ ー2 (クローン 2.1)	ESIFGIPED 配列番号251	32	8.3	1.22E+ 06	2.47 E-03	2.0E- 09
		ファミリ ー4 (クローン 4.1)	GDTIFDGAF DI 配列番号3 43	3140	未 決 定	5856	2.89 E-03	4.93E -07
		ファミリ ー5 (クローン 5.1)	QWPFFDY 配列番号347	337	未 決 定	3.04E+ 05	5.05 E-02	1.66E -07

【0349】

(実施例9)

V_Hのリード最適化a. 免疫化マウスから単離したV_Hの最適化

必要に応じて、新規な最適化戦略を使用して免疫化マウスから単離したV_Hの結合親和性を増加させた。リードV_Hを同じ系列の他のメンバーと整列して、免疫反応中に標的化した体細胞突然変異ホットスポットを同定した(図9)。これらの位置のアミノ酸の選択が新たな組換えライブラリー手法の基礎を形成し、各突然変異ホットスポットで最適なアミノ酸を有する高親和性V_Hを選択することを目指した新たなライブラリーの設計をもたらした。

【0350】

IL-17Aの例として、クローン1.1を免疫化マウスから直接単離した。このV_Hは高い親和性でIL-17Aと結合することが示され(図11)、IL-17Aと受容体の結合を遮断することが示された。クローン1.1と同じ系列の他のメンバーを整列すると、免疫反応中に突然変異したいくつかのアミノ酸位置が同定され、V_H-CDRとV_H-フレームワーク領域の両方が影響を受けた(図12)。次いで、この情報を利用して、クローン1.1の高親和性変異体を同定することを目的とした新たなクローン1.1組換えライブラリーを設計した。

【0351】

【表 9】

Table 9

PCR	プライマー	配列	アミノ酸変化 (Kabat位置)	PCR産物 サイズ
1	V3/pel B(長)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCG CGGCCAGCCGGCCATGGCCS AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGG 配列番号397	無し	160bp
	53F9-3 3S-R	TGGCGGACCCAGTACATNYBA TAACTACTAAAGGTG 配列番号 398	S33がS、G、E、R に	
2	53F9-3 3S-F	CACCTTTAGTAGTTATVRNATG TACTGGGTCCGCCA 配列番号5 2	S33がS、G、E、R に	100bp
	53F9-5 7K-R	CACATAGTATTBCTCACTTCCA TCTTGNTYTATSYYGGCCACCC ACTCCAG 配列番号399	N50がN、S、D、K に K52がK、E、Nに K57がK、Q、Eに	
3	53F9-5 7K-F	CAAGATGGAAGTGAGVAATAC TATGTGGACTCTGTGA 配列番 号400	K57がK、Q、Eに	100bp
	53F9-7 6/79-R	AGGCTATTCATTTGCAGAWAC AGTGASTTCTTGGCGTTGTCTC TG 配列番号401	N76がN、Kに F79がF、Yに	
4	53F9-7 6/79-F	CAGAGACAACGCCAAGAASTC ACTGTWTCTGCAAATGAATAG CCT 配列番号402	N76がN、Kに F79がF、Yに	90bp
	53F9-8 9V-R	AGTATTTCCCCTTTTCGCACAGT AATACACAGCCGTG 配列番号4 03	無し	
5	53F9-8 9V-F(長)	CACGGCTGTGTATTACTGTGC GAAAGGGGAAATACTACCCCT CYASTTTGACYACTGGGGCCA GGGA 配列番号404	H100AがH、Y、Q に Y100DがY、Hに	130bp
	VH_J/F (長)	CCGTGGTGATGGTGGTGATGG CTACCGCCACCCTCGAGTGAR GAGACRGTGACC 配列番号405	無し	

【0352】

HF緩衝液を含むPhusion High FidelityPCRマスターミックス(カタログ番号F531L、NEB)を、以下の通り各プライマー対形成のために設定したPCR反応に使用した:

Phusion HF 2×ミックス 25 μ l

プライマー(10 μ M) それぞれ1.25 μ l(表のように対形成)

53F9プラスミドDNA(34ng/ μ l) 0.5 μ l

スクレアーゼフリー-H₂O 50 μ lの最終体積まで

PCRを以下の通り行った;

【0353】

10

20

30

40

【化 2】

98°C 30秒	} 31サイクル
98°C 10秒	
58°C 20秒	
72°C 20秒	
72°C 10分	
10°Cで維持	

【0354】

各PCR産物を1%アガロースゲルで分析した。次いで、各産物を、Fermentas社のPCR精製キット(K0701)を用いて40 μ l溶出緩衝液中で精製した。次いで、アセンブリPCRを設定して全V_H配列を再構成した:

10

Phusion HF 2×ミックス 25 μ l

精製PCR産物1 5 μ l

精製PCR産物2 5 μ l

精製PCR産物3 5 μ l

精製PCR産物4 5 μ l

精製PCR産物5 5 μ l

【0355】

PCRを以下の通り行った;

20

【0356】

【化 3】

98°C 30秒	} 5サイクル
98°C 10秒	
58°C 20秒	
72°C 20秒	

【0357】

プライマーV3/peIB(長)及びV_H-J/F(長)(共に10 μ M)0.5 μ lを反応物に添加し、次いで、上記条件で更に10PCRサイクル続けた。PCR産物を1%アガロースゲルで分析し、Fermentas社のPCR精製キットを用いて溶出緩衝液40 μ l中で精製した。次いで、PCR産物を実施例5、パートbで上記のようにライブラリー構築のためのメガプライマーとして使用した。次いで、ファージディスプレイ選択及びV_Hスクリーニングを実施例7及び8に記載されるように行い、この後、最大10倍改善した親和性を有するクローン1.1のいくつかの新たな変異体を単離した(クローン1.10、1.6、1.7)。

30

【0358】

b. ナイーブインビトロライブラリーから単離したV_Hの最適化

ナイーブインビトロファージディスプレイライブラリーから単離した抗IL-17A V_Hのために、いくつかの異なる戦略を使用して抗原に対するV_H親和性を増加させ、その選択及び組み合わせを当のV_Hの出発効力によって駆動した。使用した投与戦略のいくつかは当分野で既に記載されており、それには以下が含まれる:

40

a) シャフリング(Antibody Engineering、編者Benny Lo、第19章、327~343頁、2004)、但し、本発明者らの場合、CDR1及びCDR2ドメインをシャッフルした一方で、V_H CDR3配列を保持した。V_H CDR1及びCDR2ドメインをPCRによってヒトCDNA(Clontech社)から増幅し、次いで、V_H配列と組み立てて、同一のCDR3ドメインを有するが、様々なCDR1及びCDR2領域を有するV_Hのライブラリーを作製した。次いで、ファージディスプレイ技術を利用して、典型的には上記第7節に記載されるのと同じ選択法に従って、高親和性V_Hを単離した。

b) ランダム化オリゴヌクレオチド及びファージディスプレイ技術(Main等、J Pharmacol Exp Ther.2006年12月;319(3):1395~404)を用いたCDR3領域の標的化ランダム化。

50

【0359】

c. エラープローン突然変異誘発及びリボソームディスプレイによる V_H の最適化

エラープローン突然変異誘発及びリボソームディスプレイを使用して、ナイーブインビトロファージディスプレイライブラリーから単離した V_H 及び必要に応じて、免疫化マウスからの V_H の親和性を最適化した。エラープローンPCR反応、cK断片とのアセンブリ及びリボソームディスプレイのためのRNA鋳型の調製を前記(Edwards BM, He M, Methods Mol. Biol. 2012;907:281~929)のように行った。次いで、この方法を、溶液選択を促進し、選択中の抗原濃度のより大きな制御をもたらすよう適合させた。

【0360】

【表10】

10

Table 10 プライマー

CKF/f	GCACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGG GTGACTTCGCAGGCGTAGAC 配列番号406
Gaga2 G	GCAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGACCACCATGG 配列番号407
CK/f	GCACTCTCCCCTGTTGAAGCT 配列番号408

【0361】

溶液ベースのリボソームディスプレイ選択を、以下の通りプレブロッキングした(pre-b 20
locked)ストレプトアビジン磁気ビーズ(Dynabeads M280、Invitrogen社)を用いて行った。
必要な体積のビーズ(典型的には、1選択当たり100 μ l)をシリコン処理した1.5mlチューブ(Sigma社T3406)に移し、次いで、洗浄緩衝液(0.05%Tween(登録商標)20及び5mM MgAc、4
℃で保管)、次いで、再びPBS中で洗浄した後、最後に、PBS中1%BSA 100 μ l+出芽酵母(*S.c
erevisiae*)RNA 2 μ l(Sigma社の83847、RNaseフリー水中10mg/mlで調製、-20℃で保管)+ヘ
パリン20 μ l(Sigma社、カタログ番号H3393、250mg/mlストック溶液、-20℃で保管)に再懸
濁し、回転板上4℃で1時間超混合することによってインキュベートした。

【0362】

1選択当たりmRNA鋳型5 μ gを用いて、リボソーム複合体を調製するためのライブラリーR 30
NA鋳型のインビトロ翻訳を記載されるように行った(Edwards BM, He M, Methods Mol. Bi
ol. 2012;907:281~92)。インビトロ翻訳ステップが完了した後、反応物をブロッキング緩
衝液に希釈して、選択前にリボソーム複合体を安定化するのを助けた。ブロッキング緩衝
液を、10×BPM(10%BSA、10×PBST中10mM MgAc)100 μ lを、ヘパリンストック溶液10 μ l及
び出芽酵母RNAストック溶液1 μ lを含有する希釈緩衝液(5mM還元型グルタチオン、5mM酸化
型グルタチオン及び13mM AgAc)400 μ lに添加することによって調製した。

【0363】

次いで、氷上で5分間ブロッキング緩衝液とインキュベーションした後、反応物を14000 40
gにおいて4℃で5分間遠心分離し、上清を選択用の予冷した0.5mlシリコン処理チューブに
移した。第1ラウンドの選択のために、ビオチン化抗原を200mMの最終濃度についてミックス
に添加し、回転板上4℃で2時間混合することによってインキュベートした。

【0364】

抗原結合複合体を、プレブロッキングしたストレプトアビジンビーズを添加して選択ミ 50
ックスから回収し、4℃で15分間回転によってインキュベーションし、次いで、磁石を用
いて結合複合体をプルダウンした。次いで、磁気ビーズを1洗浄当たり400 μ lの洗浄緩衝
液で5回洗浄し、4℃で最大30分間インキュベートした。氷冷5mM MgAc400 μ lの最後の迅速
な洗浄を行った後、ビーズを5mM MgAc100 μ lに再懸濁した。ビーズからのRNAの溶出及び
精製を、RNeasy(登録商標)Mineluteキット(Qiagen社74204)を用いて行い、緩衝液RLT350
 μ lをビーズに添加し、十分混合し、次いで、100%エタノールを添加し、ピペット操作に
よって十分混合した。次いで、ビーズを磁石によって片側に引っ張り、残っている上清を
2ml回収チューブ中のminieluteカラムに添加し、直ちに8000gで15秒間遠心分離した。カ

ラムを新たな回収チューブに入れ、緩衝液RPEの添加からカラム以降の残りのステップを製造業者の指示に従って行った。

【0365】

溶出したRNAを、Revertaid H Minus逆転写酵素(Fermentas社EP0451)を用いてcDNAに変換した:

溶離液 6 μ l

CKF/fプライマー(10 μ M) 1.6 μ l

dNTP(10mM) 2 μ l

水 2.9 μ l

反応物を65°Cで5分間インキュベートした後、3分間超氷に移した。次いで、以下の混合物 10
8 μ lをミックスに添加した:

5×反応緩衝液 4 μ l

水 2 μ l

Rnasein Plus 1 μ l(Promega社、カタログ番号2611)

RevertAid H Minus RT 1 μ l

【0366】

反応物を混合し、短時間遠心沈殿した後、42°Cで60分間、引き続いて70°Cで10分間インキュベートした。次いで、cDNAのPCR回収を、以下の通りTaqポリメラーゼPCRキット(Qiagen社201203)を用いて行った:

10×緩衝液 80 μ l

5×Q 160 μ l

dNTPS(2.5mM) 64 μ l

Gaga2Gプライマー 38.4 μ l

Ck/Fプライマー 38.4 μ l

RT 8 μ l

Taqポリメラーゼ 4 μ l

水 407.2 μ l

反応物をそれぞれ50 μ lの16本のPCRチューブに分け、反応物を以下の通りサイクリングした:

【0367】

【化4】

94°C 5分	} 20-30サイクル
94°C 30秒	
59°C 30秒	
72°C 1分	
72°C 8分	
4°Cで維持	

【0368】

700bpの範囲の産物をゲル電気泳動によって確認し、PCR反応物をプールし、Wizard(登録商標)SV PCR精製カラム(Promega社A9281)を用いて精製した。PCR産物を直接使用して、上記のその後の選択ラウンドのためのRNA鋳型を調製した。

【0369】

その後の選択ラウンドを、増加したストリンジェンシーで、例えば、抗原濃度を低下させ、時間の長さを短縮することによって行い、複合体をビオチン化抗原とインキュベートした。更に、洗浄ステップの持続時間若しくは回数のいずれか、又は両方を増加させた。解離速度選択も洗浄ステップ後に用いて、複合体及びビーズを100~1000倍モル過剰の非ビオチン化抗原と4°Cで2時間超インキュベートした。

【0370】

その後の選択ラウンドのためのプロトコルに対する他の修正は、ストレプトアビジンビーズに非特異的に結合するリボソーム複合体を排除するための予備選択ステップを含んでいた。これは、選択前にインビトロ翻訳ミックスをストレプトアビジンビーズとインキュベートすることによって達成した(ビーズは上記のように調製、4℃で1時間結合)。次いで、ビーズを捕捉し、翻訳ミックスを清潔な1.5mlシリコン処理チューブに移し、ビオチン化抗原を選択のために添加した。

【0371】

リード最適化ステップの後、改善したV_Hの効力は以下の通りであった：

【0372】

【表11】

10

a)Table 11 抗IL-17A V_Hファミリー3(親クローン3.1はインビトロナイブライブラリーから得た)の最適化後に産生されたV_H

V _H 名	CDR3配列	Biochem IC ₅₀ (nM)	細胞アッセイ IC ₅₀ (nM)	BIAcore(親和性)		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
親クローン3.1	MDRDYYDTSGYFGWFDS 配列番号287	230	>1000	3.427E+04	5.94E-03	1.73E-07
クローン3.3	MDRDYYDTSGYFGWFDS 配列番号295	271	106	9.981E+04	2.85E-03	2.90E-08
クローン3.5	LDRDWRSPNDYFGWFDS 配列番号303	4	26	2.81E+05	6.19E-04	2.20E-09
クローン3.6	LDRDWRSPNDYYGWFD S 配列番号307	3	28	5.73E+05	4.80E-04	8.38E-10
クローン3.9	MDRDYYDTSGYFGWFDS 配列番号319	43	182	9.643E+04	0.002.01E-03	2.10E-08
クローン3.11	LDRDTWYPHSYFGWFDS 配列番号327	8	17	5.38E+05	2.37E-04	4.40E-10
クローン3.13	LDRDTWYPHSYAGWFDS 配列番号335	2	5	1.02E+06	2.01E-04	1.97E-10
クローン3.2	LDRDTWYPHSYAGWFDA 配列番号291	2.5	2.5	1.10E+06	2.52E-04	2.30E-10

20

30

40

【0373】

【表 1 2】

b)Table 12 抗IL-17A V_Hファミリー1(親は上記の免疫化TKOマウスから得た)の最適化後に産生されたV_H

V _H 名	CDR3配列	細胞アッセイ I C50 (nM)	BIAcore(登録商標)(親和性)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
クローン 1.1	GEILPLHFDY配列番号 3	13	2.96E+05	1.49E-03	5.0E-09
クローン 1.6	GEILPLYFDY配列番号 23	1.3	7.70E+05	4.82E-04	6.27E-10
クローン 1.7	GEILPLYFDY配列番号 27	2.0	7.65E+05	4.66E-04	6.09E-10
クローン 1.8	GEILPLYFDY配列番号 31	1.2	6.97E+05	4.29E-04	6.16E-10
クローン 1.9	GEILPLYFDY配列番号 35	2.4	8.77E+05	4.64E-04	5.29E-10
クローン 1.10	GEILPLYFDY配列番号 39	1.9	6.64E+05	9.66E-04	1.46E-09
クローン 1.11	GEILPLYFDY配列番号 43	1.5	6.17E+05	5.21E-04	8.45E-10
クローン 1.12	GEILPLYFDY配列番号 47	1.4	7.32E+05	5.30E-04	7.24E-10
クローン 1.13	GEILPLYFDY配列番号 51	1.2	6.14E+05	5.15E-04	8.40E-10
クローン 1.14	GEILPLYFDY配列番号 55	2.9	7.53E+05	6.88E-04	9.13E-10
クローン 1.3 プレップ1	GEILPLYFDY配列番号 11	1.8	9.64E+05	2.22E-04	2.30E-10
クローン 1.15	GEILPLYFDY配列番号 59	2.5	1.04E+06	2.42E-04	2.32E-10
クローン 1.16	GEILPLYFDY配列番号 63	1.4	9.86E+05	2.13E-04	2.16E-10
クローン 1.17	GEILPLYFDY配列番号 67	1.91	9.23E+05	4.62E-04	5.00E-10
クローン 1.18	GEILPLYFDY配列番号 71	1.04	1.31E+06	4.79E-04	3.66E-10
クローン 1.19	GEILPLYFDY配列番号 75	1.2	7.14E+05	1.53E-04	2.15E-10
クローン 1.20	GEILPLYFDY配列番号 79	2.03	8.51E+05	2.08E-04	2.44E-10
クローン 1.21	GEILPLYFDY配列番号 83	2.05	7.92E+05	2.05E-04	2.59E-10
クローン 1.22	GEILPLYFDY配列番号 87	3.25	5.65E+05	1.26E-04	2.23E-10
クローン 1.3 プレップ2	GEILPLYFDY配列番号 11	0.57	7.99E+05	5.01E-04	6.27E-10
クローン 1.2	GEILPLYFDY配列番号 6	0.4	8.74E+05	4.85E-04	5.55E-10

【0374】

最適化V_Hは、より遅い解離速度(図11)のために、IL-17に対する改善した親和性及びIL-17細胞ベースのアッセイにおける改善した効力を示す。V_Hはファージミドベクターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0375】

(実施例10)

V_Hの特性評価

a. 抗IL-17Aの特異性

個々のV_Hの標的抗原に対する特異性を、実施例8(a)に記載される方法に従って、ELISAによって確認した。V_HをIL-17Aとの結合について試験すると、IL-17C及びIL-17F等のクローン類縁体と交差反応しないことが示された。更に、種の相同体(マウスIL-17A)との結合も証明された(図13)。V_Hはファージミドベクターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0376】

b. エピトープマッピング

BIAcore(登録商標)T200機器を用いて、V_HがIL-17Aの固有のエピトープに結合することが示された。マニュアルセンサーグラムをHBS緩衝液中30 μl/分で開始し、V_Hを適当にIL-17A結合CM5チップ及び基準減算用のブランク表面に注射した(図14)。V_Hはファージミドベ

10

20

30

40

50

クターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0377】

IL-17Aについては、 V_H 試料をHBS緩衝液中4 μ g/mlで調製し、次いで、第1の V_H をIL-17A結合表面上に120秒間注射した。第1の V_H の結合後、HBS緩衝液のみを表面上に60秒間注射し、その後、第2の V_H を120秒間注射した。 V_H が同じエピトープについて競合する場合、第2の v 抗体では結合は観察されないだろう。非競合 V_H は共にIL-17A結合表面に同時に結合することができるだろう。エピトープ競合データを示す(図14)。グリシンpH1.5を10秒間注射することによって表面を再生し、次いで、この工程を異なる抗体対について繰り返した。

【0378】

c.HPLCサイズ排除クロマトグラフィー

精製した V_H をサイズ排除クロマトグラフィーに供した。手短に言えば、精製した V_H を、Waters(登録商標)2487 Dual λ #吸光度検出器-(280nmで検出)及びTSKgel G2000SWXL(TOSOH社)カラムと共にWaters(登録商標)2795 Separation Moduleを用いて分析した。試料を10~50 μ l体積で注入し、10%イソプロパノール/90%PBS又は100mMリン酸緩衝液、pH6.8、150mM NaClのいずれかの移動相中0.5ml/分~0.7ml/分の流量で流した。データを最大35分間収集し、 V_H 分画のサイズを公知の標準と比較した(図15参照)。分析した V_H はファージミドベクターから発現させ、以下のC末端伸長LEGGGSHHHHHH(配列番号396)を有する。

【0379】

(実施例11)

皮膚浸透試験

実験に使用した V_H ドメインはクローン1.10.2であった。クローン1.10.2は図1に示される V_H 配列を有するが、追加のC末端残基(配列番号409)を含む。標準的な大腸菌組換え発現ベクターを用いて、タンパク質発現を25L発酵槽の富栄養培地中標準的なバッチモード条件下で行った。発現をIPTG誘導プロモーターによって駆動し、OmpAシグナル配列によって培地に分泌させた。 V_H を、C末端Hisタグ(6 $\times$ His)を有するよう修飾し、これをその後のIHCイメージング及びウエスタンブロットでの精製及び検出に使用した。

【0380】

発酵培地中の V_H を遠心分離によって清澄化し、 Ni^{2+} -アフィニティクロマトグラフィー、引き続いてタンパク質濃縮及びSuperdex(登録商標)75での最終的なSEC精製ステップを用いて精製した。 V_H をPBS、pH7.4に緩衝液交換し、20mg/mlに濃縮した。

【0381】

予備試験で、(特に、凍結工程の潜在的な影響を評価するための)その後の試験に使用するための皮膚ディスクの品質を評価した。2つの潜在的なビヒクル製剤(PBS及び35%DMSO)の各々を、無傷の皮膚及び擦りむいた(テープを剥がした)皮膚ディスク上32°Cで24時間インキュベートし、次いで、10%ホルマリン中で固定し、70%エタノール中室温で保管した。更に、無傷の皮膚及びテープを剥がした皮膚のそれぞれ1試料を、ビヒクルと予めインキュベーションすることなく固定した(上記)。その後、固定した皮膚試料の構造をIHCによって評価した。

【0382】

プロトコル:

組織のホルマリン固定

10%ホルマリン(v/v)1Lを調製するため:

37%ホルムアルデヒド 100ml

PBSc 900ml

PBSc(PBS、0.5mM $MgCl_2$ 、0.9mM $CaCl_2$)1Lを調製するため:

PBS 1L

1M $MgCl_2$ 0.5ml

1M $CaCl_2$ 0.9ml

固定プロトコル:

10

20

30

40

50

- 1)各試料をバイアルに入れ、標本の少なくとも1cm上の高さまで10%ホルマリンで覆った。
- 2)次いで、試料を、その大きさに応じて(以下参照)一定期間室温で固定させた。

1cm3未満 18時間

1～3cm3 48時間

- 3)固定直後に、固定液を同体積の70%エタノールで置換した。この段階で、即時の処理が必要でない場合、組織を無期限に保存することができるだろう。

【0383】

免疫組織化学(IHC)

皮膚ディスクのインキュベート領域を露出するために、各ディスクを半分に切断し、両半分を包埋カセット(Cell Path社、番号EAD-0107-03A及び番号EAD-0102-03A)に入れた。試料を、一連のアルコール(70%及び100%エタノール(VWR社番号20821.330)、100%プロパン-2-オール(Fisher社、番号P/7500/PB17))及びキシレン(100%キシレン(Fisher社番号X/0250/PB17))に通すことによって脱水し、その後、パラフィンワックスを浸潤させた。試料をパラフィンワックスに包埋し、各半分の切り口が最初の露出組織となるように配向した。各ブロックの5μm切片をスライドガラス上で切断した。市販の通常のヒト皮膚(AMSBio社番号500041022)の5μm切片も切断した。この試料は固定前に凍結しなかった。前に凍結した試験試料の組織構造を、この対照皮膚と比較した。切片を、以下のプロトコルを用いてヘマトキシリン-エオシン(H&E)で染色して組織構造を可視化した。皮膚試料の画像を2つの倍率で撮った。

10

【0384】

20

ヘマトキシリン及びエオシン染色プロトコル

スライド切片を脱パラフィンし、以下の通り一連のキシレン及びエタノール洗浄で脱水した:

キシレン 10分

キシレン 10分

キシレン 1分

キシレン 1分

100%エタノール 1分

100%エタノール 1分

100%エタノール 1分

70%エタノール 1分

30

スライドを水道水で1分間洗浄し、次いで、マイヤーのヘマトキシリンに2分間移し、水道水で1分間洗浄した。スライドをScottの水に入れることによって「青色にし」、水道水で1分間洗浄した。その後、スライドをエオシン(Raymond A Lamb社;LAMB/100-D)に30秒間移し、水道水で1分間洗浄し、その後、これらを以下の通り一連のエタノール及びキシレン洗浄を通して脱水及び清澄化した:

70%エタノール 1分

無水エタノール 1分

無水エタノール 1分

無水エタノール 1分

キシレン 1分

キシレン 1分

40

【0385】

スライドをHistoClear(Fisher Scientific社;H/0468/17)に浸漬し、DPX封入剤(Cell Path社;SEA-0304-00A)に直ちに封入した。

【0386】

マイヤーのヘマトキシリン

溶液1:無水エタノール20ml中ヘマトキシリン(BDH社;340374T)3g

溶液2:ヨウ素酸ナトリウム(Sigma社S-4007)0.3g クエン酸(Fisher Scientific社C/6200/53)1g 抱水クロラル(Fisher Scientific社C/4280/53)50g 硫酸カリウムアルミニウム

50

(Sigma社237086) dH₂O 850ml。試薬を順次添加し、十分混合して確実に全て溶解させた。溶液1を溶液2に添加し、十分混合した。最後に、グリセロール120mlを添加し(Fisher Scientific社G/0650/17)、十分混合し、暗色ボトルで保管した。最終ミックスを常に使用直前に濾過した。Scottの水道水:水道水と2%MgSO₄(Sigma社M7506)及び0.35%NaHCO₃(Sigma社S-6297)。

【0387】

結果:

- 試料1 無傷の対照
- 試料2 テープを剥がした対照
- 試料3 無傷のPBS
- 試料4 テープを剥がしたPBS
- 試料5 無傷のDMSO
- 試料6 テープを剥がしたDMSO

10

【0388】

低拡大率と高拡大率の両方で、表皮及び真皮の構造は、前に凍結した試料と凍結していない対照試料との間で有意に異なるように見えなかった。真皮からの表皮の分離はなく、コラーゲンは、凍結していない対照のように、凍結試料の真皮内に高密度に詰まっているのが観察された。

【0389】

ビヒクルとインキュベートしなかった皮膚試料及びPBS又はDMSOとインキュベートした試料(試料3~6)は全て、凍結していない対照試料と比較して正常な構造を示した。テープを剥がした皮膚のIHCは、無傷の試料と比べた角質層の程度の予想される減少を明らかに確認した。

20

【0390】

上記の結果は、皮膚浸透試験に使用するための治療が、無傷の組織構造を保持するのに適していることを示唆していた。

【0391】

浸透実験はBronaughフロースルー拡散セルシステムを使用した。このシステムでは、皮膚採取したヒト皮膚の小ディスクを、上部(「ドナー」)チャンバーと下部(「レシーバー」)チャンバー(後者は皮膚試料の下側と接したままであるレシーバー流体を含有する)との間にクランプした。皮膚の上部(角質層)面に施用したV_Hを含有する試験製剤は、最初に進入し、次いで、皮膚試料の全厚さを横切った場合にのみ、ドナーチャンバーからレシーバーチャンバーに移動することができた。他の同様の装置(例えば、Franzセル)に優る、Bronaughシステムを使用することの利点は、このシステムが、皮膚に浸透する薬物を評価する際に、皮膚試料の下側を新鮮な受容流体で連続灌流して、シンクの状態を維持するという優位性を提供するという点である。

30

【0392】

種々のプロトタイプ製剤がV_Hの皮膚試料(無傷及びテープを剥がした)への浸透を促進する能力の評価。この試験の一次成果物は皮膚中のV_Hを示すIHC画像であった。

【0393】

40

全てのヒト皮膚は、待機手術後に得て、切除の24時間以内に調製した。その後、調製した組織を使用前に密閉真空包装中で凍結保存(-20℃)した。皮膚採取した皮膚の実際の厚さを、スナップゲージマイクロメータを用いて使用時に測定及び記録した。局所的に施用されるV_Hの対象となる1つの潜在的な臨床適応症は、乾癬の患者の治療である。乾癬の患者は、日常的に斑を単剤療法としての又は他の療法、例えば、局所ステロイドと配合した角質溶解薬(例えば、サリチル酸)で治療している。角質溶解薬は、鱗屑又は過角化症を除去するのを助け、他の局所薬剤の浸透を促進することができる。角質溶解薬で前処理した乾癬皮膚を模倣する最良の方法は、角質層の一部を除去するために皮膚を軽くすり減らす(テープを剥がす)ことである。これを、角質層バリア機能を損なうために、セロハンテープの小片を皮膚に繰り返し貼って、除去する(20~30回)ことによって達成した。

50

【0394】

インビトロ皮膚浸透試験は、Bronaughフロースルーセルを用いて、以下の表中の製剤の各々が V_H の無傷又はテープを剥がした皮膚への浸透を促進する相対的能力を評価した。

【0395】

単一ドナーから皮膚採取したヒト皮膚を用いて試験を行った。皮膚を以下に詳述されるように得て、調製した。各製剤の試料を試験の使用直前に調製した。

【0396】

【表13】

Table 13 インビトロ皮膚浸透試験に使用したプロトタイプ製剤の組成

成分	%w/w									
緩衝液中2% V_H 溶液	100	10	65.0							...
製剤	C1 4077-18A	C2 4077-18B	C3 4077-18C	1 4077-19A	2 4077-19B	3 4077-19C	4 4077-20A	5 4077-20B	6 4077-21 (プラセボ)	カテゴリー
マイクロエマルジョン	...	90.0	...	...	...	...	...	...	...	浸透促進剤
DMSO	...	...	35.0	...	...	...	...	...	...	
プロピレングリコール	...	...	...	35.0	...	25.0	20.0	...	25.0	
Transcutol(登録商標)	...	...	...	...	24.0	...	...	...	...	
エタノール	...	...	...	...	...	10.0	...	...	10.0	
ミリスチン酸イソプロピル	...	...	...	...	...	...	10.0	...	...	
アゾン*(ラウロカブラム)	...	...	...	...	...	...	...	10.0	...	非イオン性界面活性剤 水不溶性
Steareth-21 (Brij(登録商標)721)	...	...	...	...	...	...	3.0	3.0	...	
Steareth-2 (Brij(登録商標)72)	...	...	...	...	...	...	2.0	2.0	...	
PBS pH7.4 (適量)	...	...	...	...	11.0	...	...	20.0	65.0	
外観	透明	曇っている	透明	透明	透明	透明	白色; 濃厚	白色; ゆるい	透明	
プロトタイプ (原型)	対照			溶液				エマルジョン	溶液	

【0397】

試験設計/製剤

組織型: 単一ドナーから皮膚採取したヒト皮膚

細胞型: 54フロースルー拡散セル (直径0.9cm又は面積0.64cm²のBronaugh設計)

セル温度: 32°C

レシーバー相(RP): PBS、pH7.4、0.1%(w/v) アジ化ナトリウムを含む

RP回収点: 0~6、6~12、12~18及び18~24時間

RP流量: 0.25mL/時間

用量レベル: 無限用量: 1セル当たり製剤500mg

【0398】

【表14】

Table 14

	試験製剤	Bronaughセルの数
無傷の皮膚	A: ビヒクル1: PBS	1
	B: ビヒクル2: DMSO	1
	C: ビヒクル3:プロトタイプ3ビヒクル	1
	D: IgG対照	2
	E: C1-VH PBS対照	2
	F: C2-VHマイクロエマルジョン対照	3
	G: C3-VH DMSO対照	2
	H: プロトタイプ1	3
	I: プロトタイプ2	3
	J: プロトタイプ3	3
	K: プロトタイプ4	3
	L: プロトタイプ5	3
テープを剥がした皮膚(TS)	M: ビヒクル1: PBS	1
	N: ビヒクル2: DMSO	1
	O: ビヒクル3:プロトタイプ3ビヒクル	1
	P: IgG対照	2
	Q: C1-VH PBS対照	2
	R: C2-VHマイクロエマルジョン対照	3
	S: C3-VH DMSO対照	2
	T: プロトタイプ1	3
	U: プロトタイプ2	3
	V: プロトタイプ3	3
	W: プロトタイプ4	3
	X: プロトタイプ5	3

【0399】

組織調製

正常な皮膚: ヒト皮膚を待機手術後に得て、切除の24時間以内に調製した。その後、調製した組織を、使用前に密閉真空包装中で凍結保存(-20℃)した。皮膚厚さの範囲を決定するために、皮膚採取した皮膚の実際の厚さを、スナップゲージマイクロメータを用いて複数のランダム部位で使用時に測定及び記録した。

【0400】

テープを剥がした皮膚: 上記のように調製した正常な皮膚の試料を、角質層バリア機能を損なうために、セロハンテープの個々の片で繰り返し剥がした(30回)。

【0401】

使用直前に、皮膚試料を正確なサイズのディスクに切断し、角質層最上部とBronaughセル中で組み立てた。

【0402】

実験詳細

試験材料の投与:

各試験製剤及び対照(Table 13(表13)に詳述)の試料を、試験への使用直前に調製した。プロトタイプ製剤の投与を、拡散セルマニホールドシステムを横切って互い違いにした。

各製剤約500mgを皮膚上に分配し、正確な質量を重量により測定した。投与後、セルをパラフィンで塞ぎ、32℃で24時間の暴露期間分配しないままとした。

【0403】

試料調製及び分析:

各Bronaughセル中の皮膚試料を、0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを含むPBS、pH7.4で構成されるレシーバー流体と接触した下部表面と維持した。レシーバー流体をポンピングして0.25ml/時間で各レシーバーチャンバーに流した。レシーバー相試料を6時間間隔で連続回収により自動的に回収した。6時間ごとに、自動分画回収装置が回転して新たな20mLシンチレーションバイアルをセルの下に整列させ、次の6時間の試料を回収した。全ての試料を予め秤量したシンチレーションバイアルに回収し、回収後重量を量り、差を回収したレシーバー相の重量として記録した。

10

【0404】

24時間の暴露期間後、レシーバー流体をドナー流体で汚染することなく、ドナー溶液の除去後にBronaughチャンバーを解体し、皮膚試料をそれぞれのBronaughチャンバーから取り出し、それぞれ予備試験に記載されるようにホルマリンに固定した。

【0405】

全てのレシーバー相試料をプラスチックシンチレーションバイアルに包装し、後のELISA分析まで-80℃で凍結した。

【0406】

ELISA:

20

使用したELISA法は、レシーバー流体の各試料を2つの濃度:(a)ニート(レシーバー流体+18%Marvel 10 µl、6×PBS)及び(b)1:100希釈(レシーバー流体2 µl+3%Marvel 198 µl/PBS)で調製した。

【0407】

レシーバー流体分析の結果

レシーバー流体を浸透試験中、各Bronaughセルから4つの時点で(6時間、12時間、18時間及び24時間)サンプリングした。全てをELISAによって試験して、皮膚の上面(角質層)に施用した V_H が皮膚試料に進入し、通過したか否かを決定した。ELISAの結果を無傷の皮膚については図17に示し、テープを剥がした皮膚については図18に示す。陽性ELISAシグナルを記録する場合、異なる製剤で V_H を含有するセルから得たELISAシグナルの大きさの変動は、各プロトタイプ製剤中の異なる浸透促進剤が、 V_H が角質層を横切り、更に表皮及び真皮に浸透するのを促進する能力が異なっていることを示した。

30

【0408】

皮膚試料中の V_H のIHCイメージングの結果

プロトタイプ(prototype)製剤中の V_H で処理した皮膚からのIHC画像の例を図19～図28に示す。皮膚試料の深さ全体に渡って V_H の標識を見ることができた。更に、IHC画像上で観察された V_H 標識のスケールと対応するBronaughセルから得たレシーバー流体で測定したELISAシグナルとの間には一般的な正の相関があった。重要なことに、サイズコントロールIgGは、正常な無傷の皮膚でもテープを剥がした皮膚でも、全く角質層を横切って皮膚に更に浸透せず、ずっと小さな V_H ドメインのみが角質層を横切って表皮に浸透することができた。

40

【0409】

(実施例12)

2つの同一の又は2つの異なる抗IL-17A V_H を直接直列に又はタンパク質リンカーを介して連結することができる。2つの連結した V_H それぞれがIL-17Aの同じエピトープ上に作用する場合、連結した V_H - V_H を二価と呼ぶ。連結した2つの V_H それぞれがIL-17Aの異なるエピトープ上に作用する場合、連結した V_H - V_H を二重パラトープと呼ぶ。

【0410】

標準的な分子生物学クローニング技術を使用して、C末端HIS6タグを有する V_H -リンカー- V_H フォーマットの2つの V_H 及びリンカーのコードDNA配列を、大腸菌又は酵母(ピキア・パ

50

ストリス(*Pichia Pastoris*))発現ベクターにクローニングした。HIS6タグ付き V_H - V_H 産物の発現及び精製は、標準的なタンパク質発現及び精製方法に従う。

いくつかの構築物を作製し、結果を図に示す。構築物はクローン1.1、1.10、1.2及び3.2を使用する。

二価:1.10-3(G_4S)-1.1

リンカー配列: GGGGSGGGGSGGGG(配列番号426)

DNA配列:

二重パレート:3.2-2(G_4S)-1.2;3.2-4(G_4S)-1.2;3.2-6(G_4S)-1.2;

リンカー配列: AAGGGGSGGGG(配列番号427)

AAGGGGSGGGGSGGGGSGGGG

10

(配列番号428)

AAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG(配列番号429)

精製した V_H - V_H を、IL1A7結合親和性についてBIAcore(登録商標)で試験した。機能性をIL6放出アッセイで分析した。

【0411】

配列情報

配列番号409 1.10.2(C末端伸長及びHisタグを有するクローン1.10)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYRMYWVRQAPGKGLEWVASIEQDGSEYYVDSVKGRFTISRDNAAKSLF
LQMNSLRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGTTLTVSSAAA HHHHHH

配列番号410 1.2.2(C末端伸長及びHisタグを有するクローン1.2)

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSSAAA HHHHHH

配列番号411 1.2.3(C末端伸長を有するクローン1.2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSSA

配列番号412 1.3.2(C末端伸長及びHisタグを有するクローン1.3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSS AAA HHHHHH

配列番号413 1.3.3(C末端伸長を有するクローン1.3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSSA

30

配列番号414 1.6.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.6:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSEYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSSLEGGGS HHHHHH

配列番号415 1.7.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.7:リンカー残基及びHisタグを有する)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVAKIEQDGSEYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号416 1.10.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.10:リンカー残基及びHisタグを有する)

40

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYRMYWVRQAPGKGLEWVASIEQDGSEYYVDSVKGRFTISRDNAAKSLF
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号417 1.3.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.3:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVDSVKGRFTISRDNAAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号418 3.2.1(ファージミドベクターから発現したクローン3.2:リンカー残基及びHisタグを有する)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNADAYYINWVRQAPQGQLEWMGSIKPNTGATKYAQKFQGRVTITRDTISISTAY

50

MELSRLRSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGWFDAGQGTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号419 1.1.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.1:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLF
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLHFDYWGQTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号420 1.16.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.16:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号421 1.20.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.20:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVAKIEQDGSEEEYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号422 1.19.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.19:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号423 1.17.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.17:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKPTGSVQYYVSDVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

配列番号424 1.18.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.18:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVGGVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSSLEGGGS HHHHHH

配列番号425 1.21.1(ファージミドベクターから発現したクローン1.21:リンカー残基及びHisタグを有する)

EVQLVESGGGLVLPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSS LEGGGS HHHHHH

二価:1.10-3(G₄S)-1.1(E1/6Q)

配列番号430

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYRMYWVRQAPGKGLEWVASIEQDGSEEEYVDSVKGRFTISRDNAKNSLF
LQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASG
FTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLHF
DYWGQTLTVTVSS

配列番号431

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGTAGTTATCGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAAG
ATGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTT
CTGCAAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGA
CTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGAGGTAGTGGTGGAGGAGGTAGTGGTGGAGGAGGTA
GTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TTCACCTTTAGTAGTTATTCGATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCA
AGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGT
TTCTGCAAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCCACTTT
GACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTTCA

二重パラトープ:3.2-2(G₄S)-1.2

配列番号432

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNADAYYINWVRQAPGQGLEWMGSIKPNTGATKYAQKFQGRVTITRDTISISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGWFDAGQGTLTVTVSSAAGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC

10

20

30

40

50

AASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVSDVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEIL
PLYFDYWQGTTLVTVSS

配列番号433

CAGGTTCACTGCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA
TAACGCGGACGCCTATTATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATACCGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCA
CTCCTACGCGGGGTGGTTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTTCAGCGGCCGGTGGTGGCGGTTTCAG
GTGGAGGTGGTAGTGAGGTTTCAGTTGGTGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCTGC
GCGGCTAGCGGTTTCAGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTC
CGAGATTAAGCAAGACGGTTCTGTTTCAGTATTATGTCAGCGACGTGAAGGGTCTGTTTACCATCAGCCGTGACAAACGCGA
AAAACAGCCTGTATTTGCAGATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTG
CCGCTGTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

二重パラトープ3.2-4(G₄S)-1.2

配列番号434

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNADAYYINWVRQAPGQGLEWMGSIKPNTGATKYAQKFQGRVTITRDTISISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGWFDAGWQGTTLVTVSSAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV
QPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVSDVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA
VYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLVTVSS

配列番号435

CAGGTTCACTGCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA
TAACGCGGACGCCTATTATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATACCGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCA
CTCCTACGCGGGGTGGTTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTTCAGCGGCCGGTGGTGGCGGTTTCAG
GAGGTGGAGGTTTCAGGAGGTGGTGGTTCTGGTGGAGGTGGTAGTGAGGTTTCAGTTGGTGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTC
CAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCTGCGCGGTAGCGGTTTCAGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCA
AGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCAAGACGGTTCTGTTTCAGTATTATGTCAGCGACGTGAAGG
GTCGTTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTATTTGCAGATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCG
GTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAG
C

二重パラトープ3.2-6(G₄S)-1.2

配列番号436

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNADAYYINWVRQAPGQGLEWMGSIKPNTGATKYAQKFQGRVTITRDTISISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGWFDAGWQGTTLVTVSSAAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVSDVKGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQGTTLVTVSS

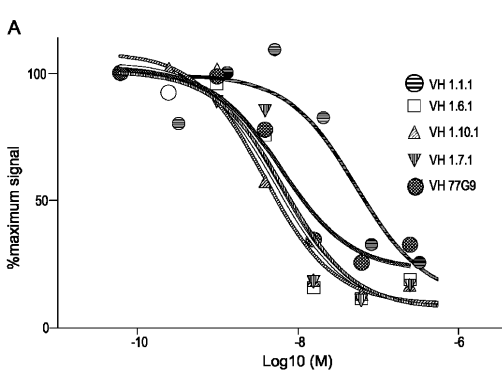
配列番号437

CAGGTTCACTGCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATA
TAACGCGGACGCCTATTATATAAAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTA
ATACCGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCA
CTCCTACGCGGGGTGGTTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTTCAGCGGCCGGTGGTGGCGGTTTCAG
GCGGAGGTGGCTCTGGAGGTGGAGGTTTCAGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGTGGATCGGGTGGAGGTGGTAGTGAGGTT
CAGTTGGTGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCTGCGCGGTAGCGGTTTCAGGTT
TAGCAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCAAGACGGTT
CTGTTTCAGTATTATGTCAGCGACGTGAAGGGTCTGTTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTATTTGCAG
ATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTG
GGGCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

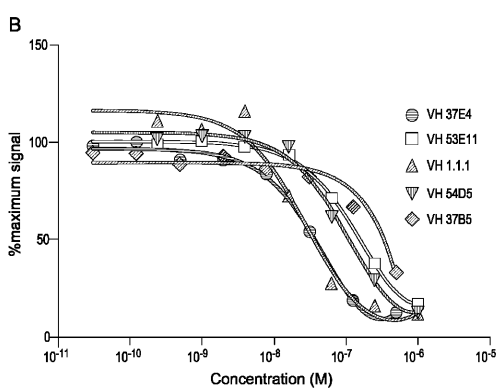
【図 8 B】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.037	0.036	0.039	0.577	0.04	0.037	0.041	0.039	0.043	0.041	0.039	0.047
B	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	0.043	0.045	0.045	0.087	0.045	0.046	0.049
C	0.046	0.038	0.039	0.038	0.037	0.037	0.039	0.038	0.038	0.038	0.038	0.037
D	0.039	0.039	0.039	0.042	0.04	0.04	0.045	0.039	0.04	0.039	0.039	0.04
E	0.04	0.04	0.04	0.041	0.044	0.041	0.041	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042
F	0.046	0.049	0.046	0.04	0.038	0.054	0.038	0.035	0.037	0.041	0.042	0.051
G	0.059	0.037	0.029	0.039	0.034	0.033	0.032	0.034	0.027	0.028	0.03	0.027
H	0.955	0.043	0.04	0.043	0.041	0.039	0.039	0.039	0.044	0.04	0.04	0.045

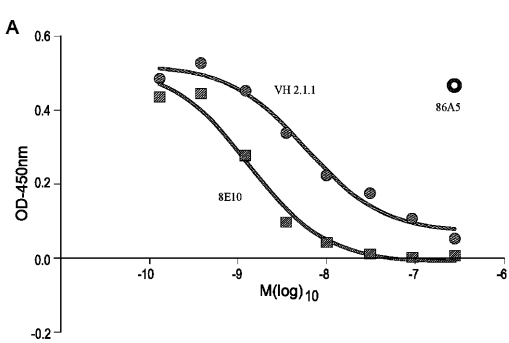
【図 9 A】



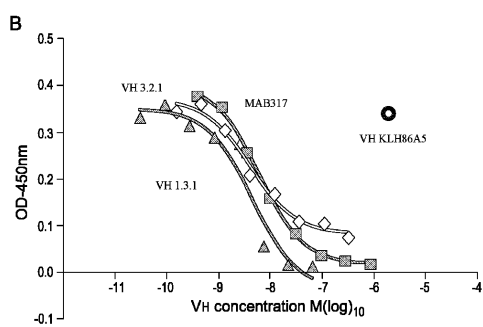
【図 9 B】



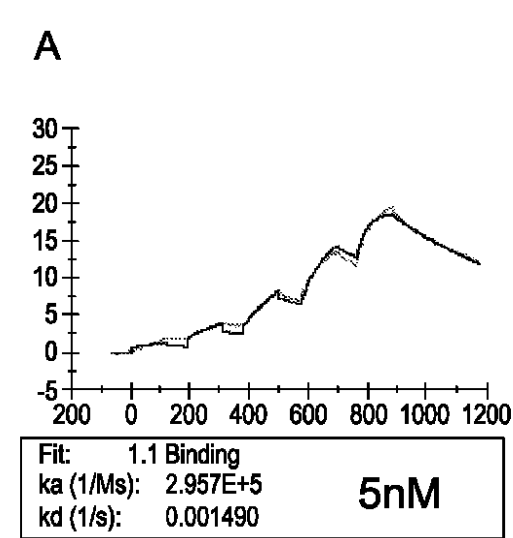
【図 10 A】



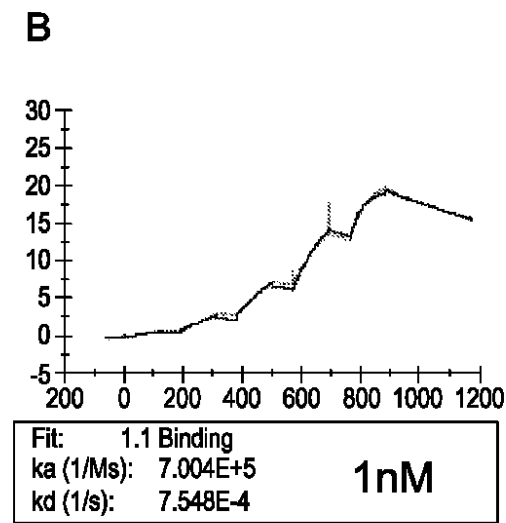
【図 10 B】



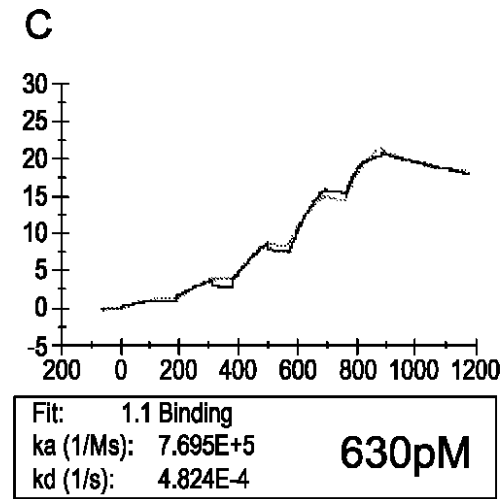
【図 11 A】



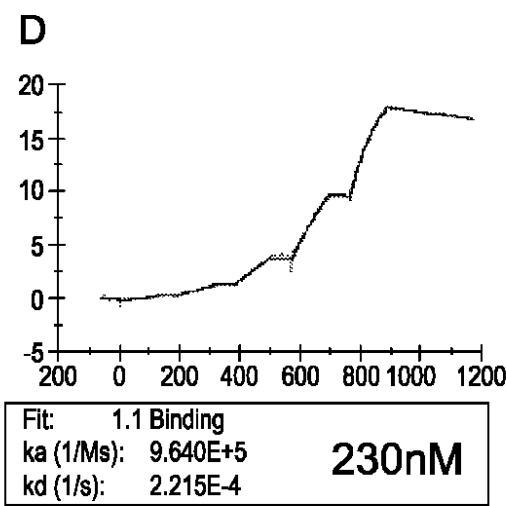
【図 1 1 B】



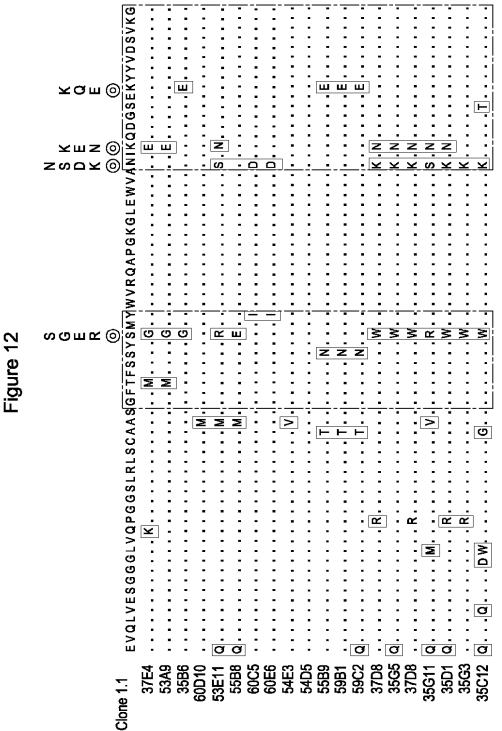
【図 1 1 C】



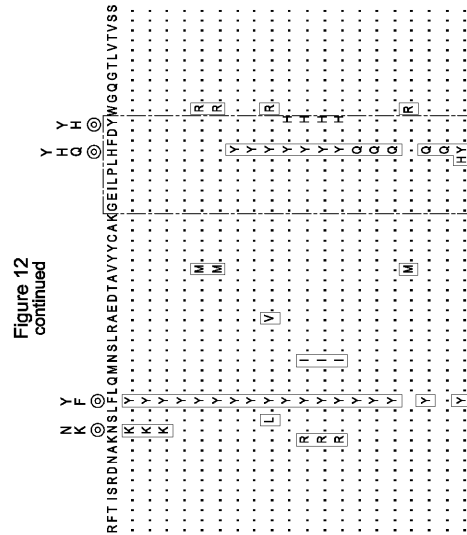
【図 1 1 D】



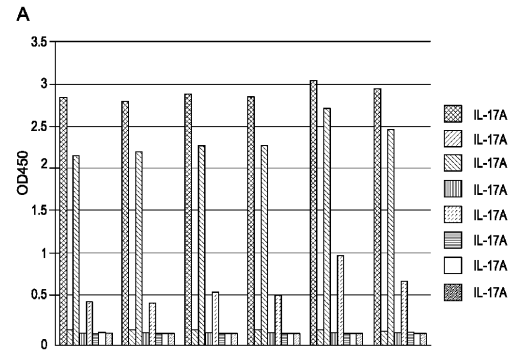
【図 1 2 - 1】



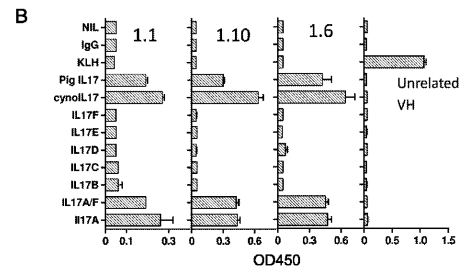
【図 1 2 - 2】



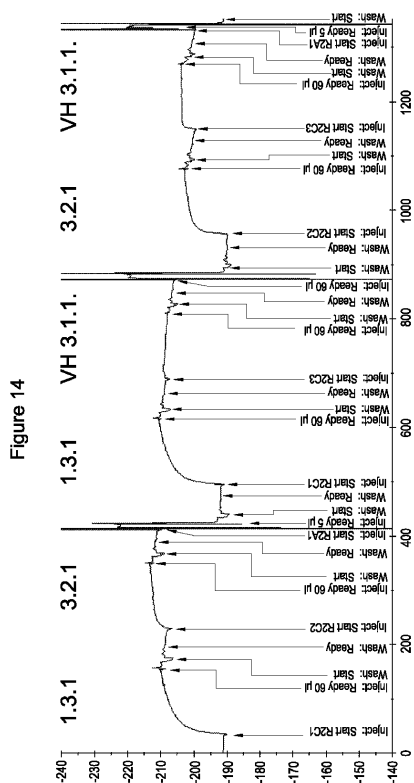
【図 1 3 A】



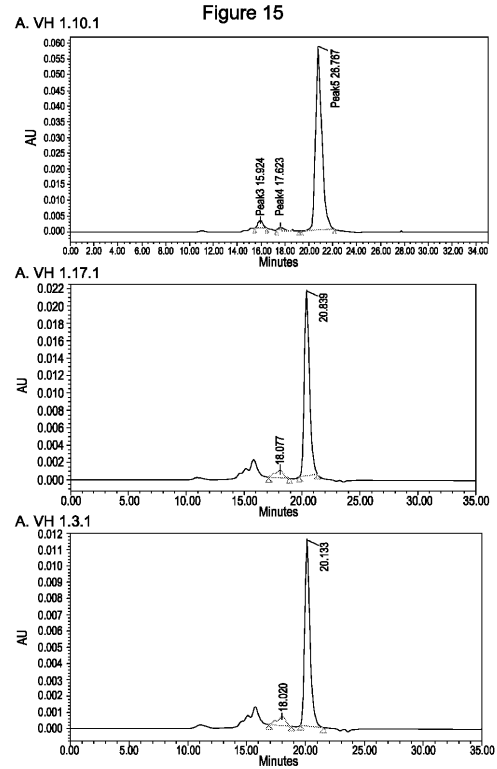
【図 1 3 B】



【図 1 4】

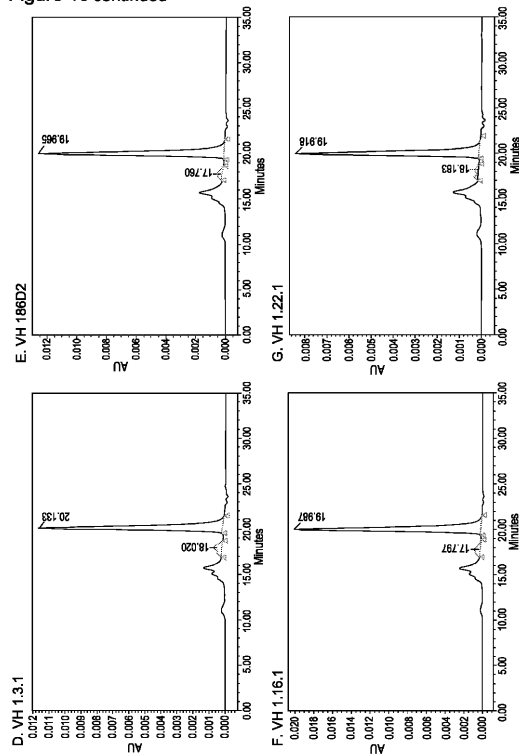


【図 1 5 - 1】



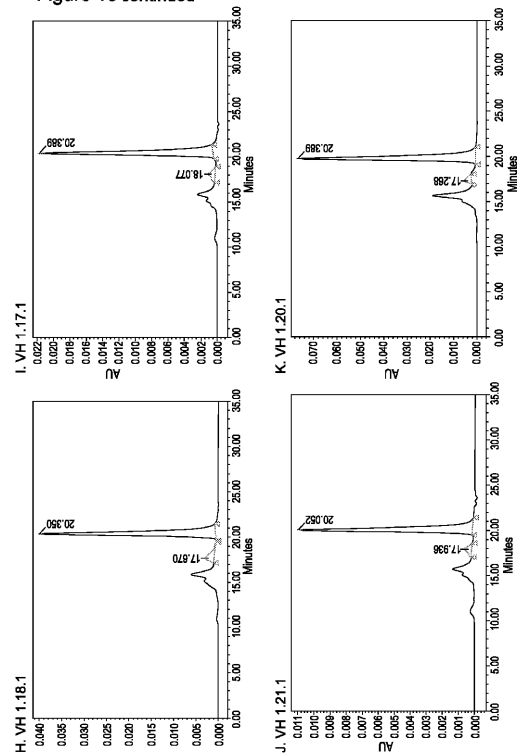
【図 15-2】

Figure 15 continued

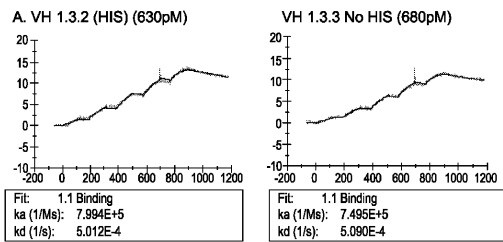


【図 15-3】

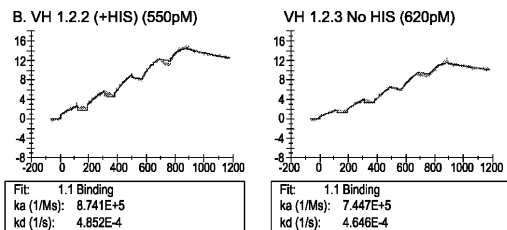
Figure 15 continued



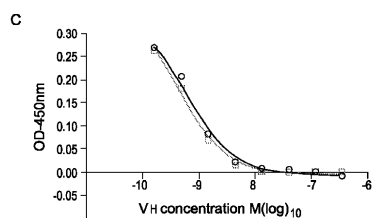
【図 16 A】



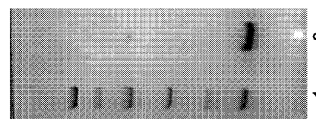
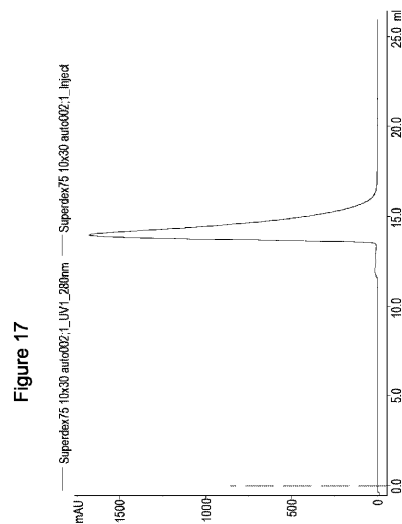
【図 16 B】



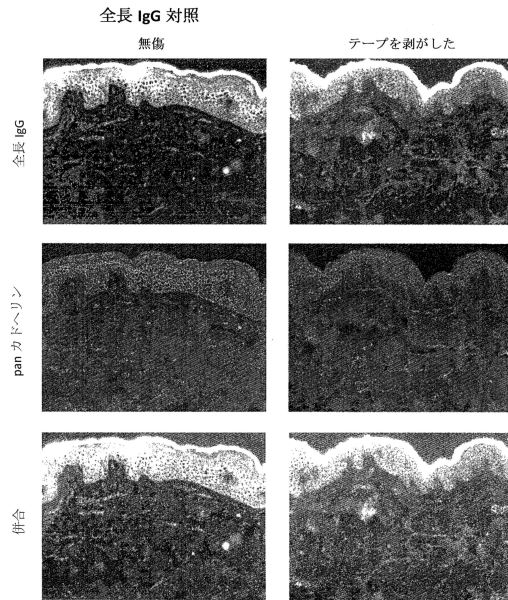
【図 16 C】



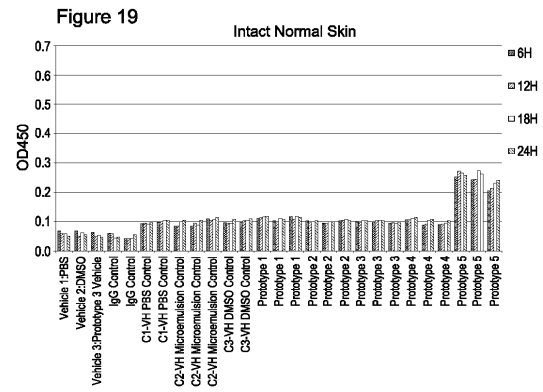
【図 17】



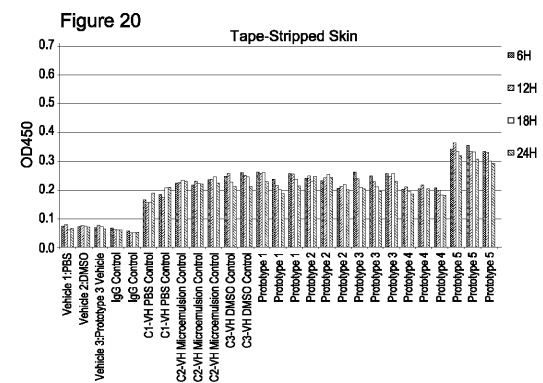
【図 18】



【図 19】

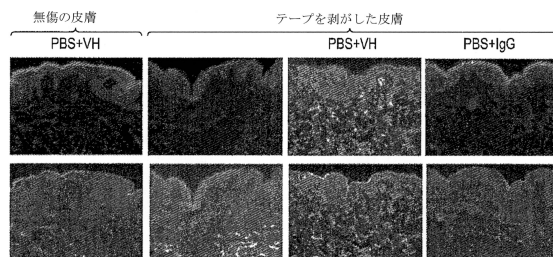


【図 20】



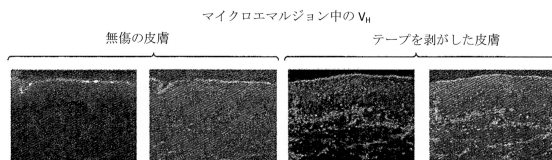
【図 21】

Figure 21



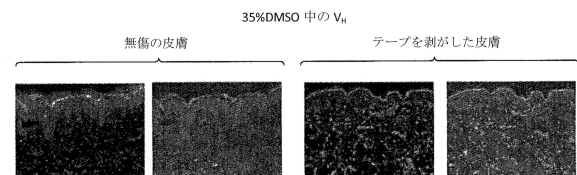
【図 22】

Figure 22



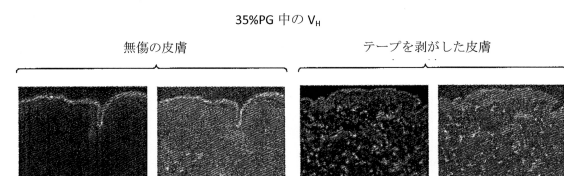
【図 23】

Figure 23



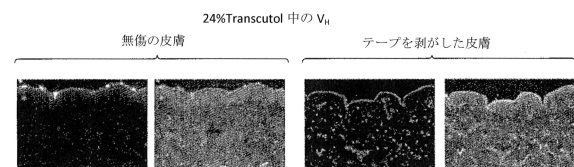
【図 24】

Figure 24



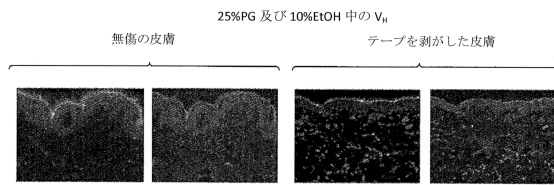
【図 25】

Figure 25



【図 26】

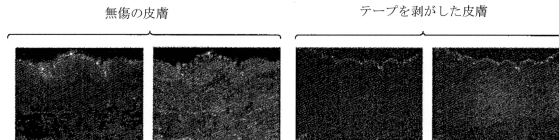
Figure 26



【図 27】

Figure 27

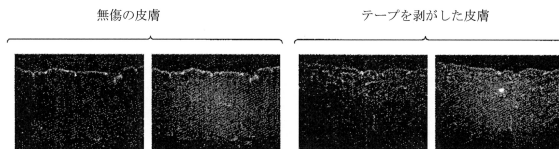
20%プロピレングリコール、10%ミリスチン酸イソプロピル、3%Brij721 及び 2%Brij72 中の V_H



【図 28】

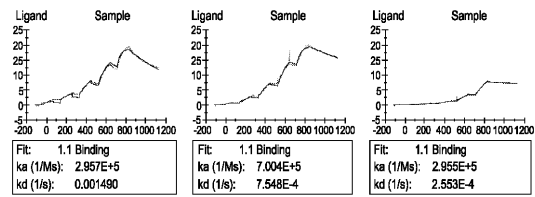
Figure 28

10%アズノ(ラウロカプラム)、3%Brij721 及び 2%Brij72 中の V_H



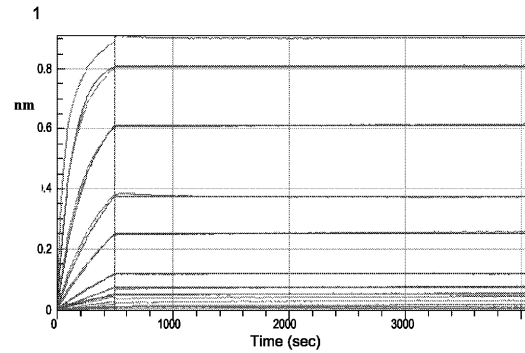
【図 29】

Figure 29



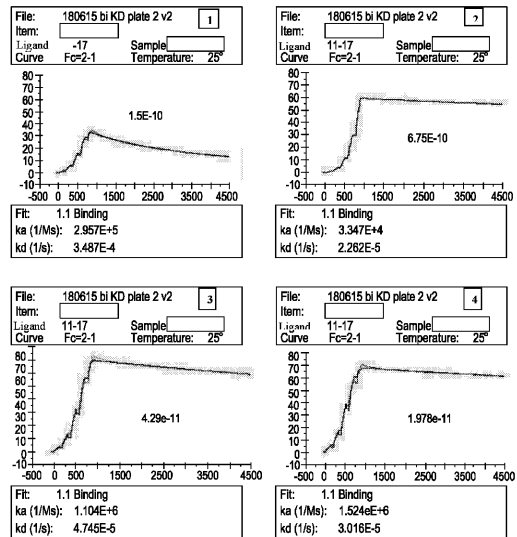
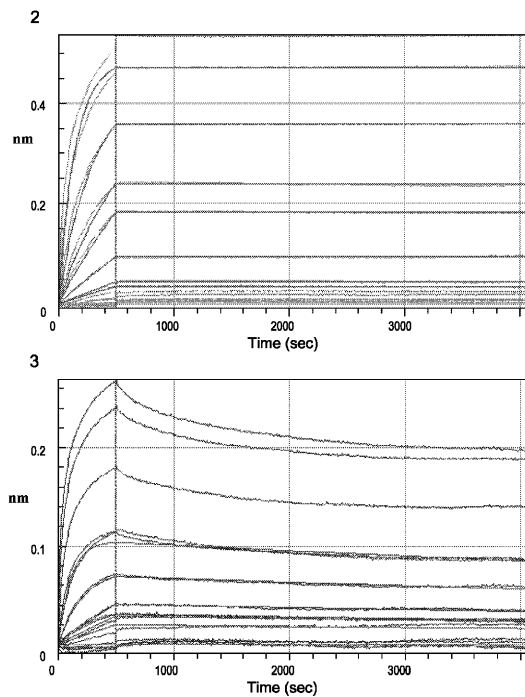
【図 30】

Figure 30

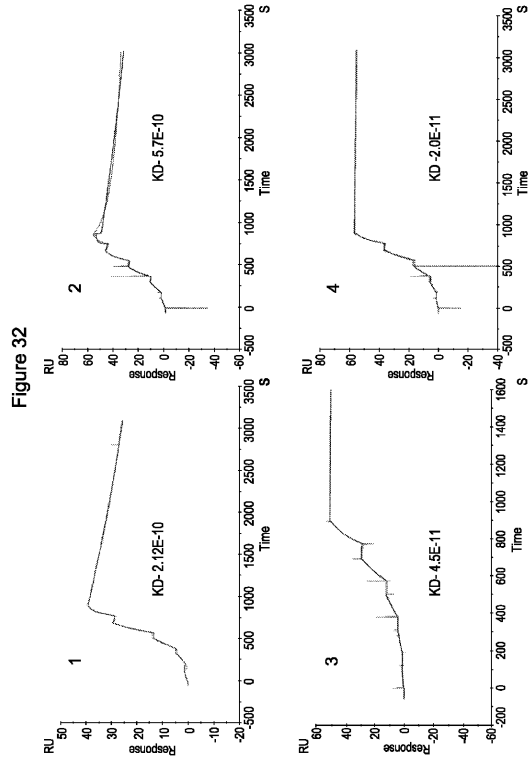


【図 31】

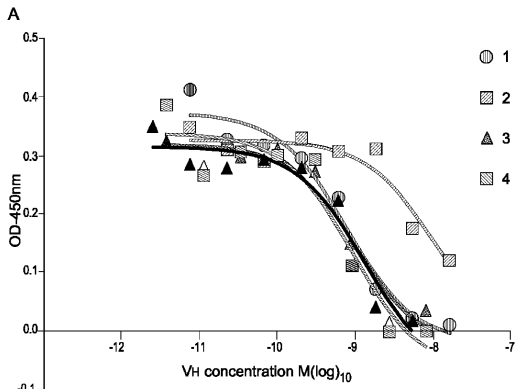
Figure 31



【図 3 2】



【図 3 3 A】



【図 3 3 B】

B

	1	2	3	4
EC50	7.870e-010	1.032e-008	1.071e-009	9.234e-010

【配列表】

0006947632000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
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	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
C 4 0 B	60/12	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	P
			C 4 0 B	60/12	

(72)発明者 ブライアン・エドワーズ
イギリス・ケンブリッジシャー・CB22・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

(72)発明者 ウッラ・ラッシュマール
イギリス・ケンブリッジシャー・CB22・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

(72)発明者 ブライアン・マックギネス
イギリス・ケンブリッジシャー・CB22・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

(72)発明者 マイク・ロマノス
イギリス・ケンブリッジシャー・CB22・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

(72)発明者 トーマス・サンダル
イギリス・ケンブリッジシャー・CB22・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

(72)発明者 ユミン・テン
イギリス・ケンブリッジシャー・CB22・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表2015-502145 (JP, A)
特表2009-540824 (JP, A)
特表2010-500028 (JP, A)
特表2014-516945 (JP, A)
特表2012-519708 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N	15/13
A61K	39/395
A61K	45/00
A61P	1/04
A61P	1/16
A61P	3/10
A61P	7/04
A61P	7/06
A61P	9/00
A61P	11/00
A61P	11/02
A61P	11/06
A61P	13/12
A61P	17/00
A61P	17/06
A61P	19/02
A61P	21/00
A61P	25/00
A61P	29/00
A61P	37/02
A61P	37/06
A61P	37/08
C07K	16/24
C12N	1/15
C12N	1/19
C12N	1/21
C12N	5/10
C12P	21/08
G01N	33/53
C40B	60/12
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)	
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)	
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq	
UniProt/GeneSeq	