

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7357038号

(P7357038)

(45)発行日 令和5年10月5日(2023.10.5)

(24)登録日 令和5年9月27日(2023.9.27)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 0 7 K 16/24 (2006.01)

C 0 7 K 16/24

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 28 外国語出願 (全72頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-168871(P2021-168871)

(22)出願日 令和3年10月14日(2021.10.14)

(62)分割の表示 特願2018-524836(P2018-524836)
の分割

原出願日 平成28年11月14日(2016.11.14)

(65)公開番号 特開2022-20666(P2022-20666A)

(43)公開日 令和4年2月1日(2022.2.1)

審査請求日 令和3年11月10日(2021.11.10)

(31)優先権主張番号 62/254,375

(32)優先日 平成27年11月12日(2015.11.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 505166225

アプリクス エン・ヴェー・

ベルギー、ペー - 9 0 5 2 ヘント - ツ
ヴィナールデ、テヒノロギーパルク 2 1

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 パイセ、マリー - アンジュ

ベルギー国 9 8 2 0 メレルベーク、ブ
ルゲメーステル エドモン ロンセストラ
ート 2 3

(72)発明者 ブクノー、ヨアヒム

ベルギー国 9 8 4 0 デ ピンテ、エル
スポスラーン 4 1

(72)発明者 カステールス、ペーテル

ベルギー国 9 4 2 0 エルベ - メール、
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改善された T N F 結合因子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 4 0 のアミノ酸配列を有し、T N F - に特異的に結合する、少なくとも 2 つの免疫グロブリン単一可変ドメイン (I S V D) を含む化合物であって、前記 I S V D が、互いに直接的に連結されるか、またはリンカーによって連結され、前記リンカーが、5 G S、7 G S、9 G S、1 0 G S、1 5 G S、1 8 G S、2 0 G S、2 5 G S、3 0 G S、および 3 5 G S のリンカーからなる群から選ばれる、前記化合物。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの I S V D が本質的に一価の形態である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの I S V D が、位置 1 の D と、C 末端アラニン残基である C 末端延長 X (n) とを有する、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

少なくとも 2 つの I S V D が、同じであり得るか、または異なり得る、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの I S V D が、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のものであり、および、少なくとも 1 つの I S V D が、独立して、配列番号 8 ~ 4 1、6 1 ~ 6 6、および 6 9 からなる群から選ばれる、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

10

20

血清蛋白質結合性部分をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

血清蛋白質結合性部分が血清アルブミンに結合する、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

血清蛋白質結合性部分が血清アルブミン結合性 I S V D である、請求項 6 または 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

血清アルブミン結合性 I S V D が、本質的に 4 つのフレームワーク領域（それぞれ F R 1 から F R 4 ）および 3 つの相補性決定領域（それぞれ C D R 1 から C D R 3 ）からなり、その中の C D R 1 が S F G M S であり、C D R 2 が S I S G S G S D T L Y A D S V K G であり、および、C D R 3 が G G S L S R である、請求項 8 に記載の化合物。

10

【請求項 10】

血清アルブミン結合性 I S V D が、配列番号 70 ~ 84 のいずれか 1 つによって表される、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

第 1 の I S V D および / または第 2 の I S V D および / または可能性として第 3 の I S V D および / または可能性として血清アルブミン結合性 I S V D が、リンカーによって連結される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物を含むか、または本質的にそれからなり、および、任意に 1 つ以上のペプチド性リンカーによって連結された 1 つ以上の他の基、残基、部分、または結合ユニットをさらに含む、構築物であって、1 つ以上の他の基、残基、部分、または結合ユニットが、ポリエチレングリコール分子、血清蛋白質またはその断片、血清蛋白質に結合し得る結合ユニット、Fc 部分、および血清蛋白質に結合し得る小型の蛋白質またはペプチドからなる群から選ばれる、前記構築物。

20

【請求項 13】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物、および / または請求項 12 に記載の構築物を含む、組成物。

【請求項 14】

医薬組成物である、請求項 13 に記載の組成物。

30

【請求項 15】

少なくとも 1 つの医薬的に許容される担体、希釈剤もしくは賦形剤、および / またはアジュバントをさらに含む、および任意に、1 つ以上のさらなる医薬的に活性なポリペプチドおよび / または化合物を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 12 に記載の構築物、または請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

消化管の疾患および / または障害の防止および / または処置における使用のための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 12 に記載の構築物、または請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 18】

炎症性腸疾患（I B D）、過敏性腸症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、粘膜炎、アフタ性口内炎、セリアック病、消化管の外傷、および / または消化管の癌の防止および / または処置における使用のための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 12 に記載の構築物、または請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

消化管に局所投与される、および / または、胃腸管（G I）への経口投与にとって好適な剤形で経口投与される、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の化合物、構築物、または組成物。

50

【請求項 20】

G I 管への経口投与のための剤形で投与され、ここで剤形が、錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、エマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤から選択される、または、消化管の疾患または障害の処置のために経直腸投与される、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の化合物、構築物、または組成物。

【請求項 21】

座薬および浣腸剤から選択される経直腸投与のための剤形で経直腸投与される、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の化合物、構築物、または組成物。

【請求項 22】

皮下注射、皮内注射、静脈注射、筋肉内注射、病巣内注射、または輸液技術によって非経口投与される、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の化合物、構築物、または組成物。

10

【請求項 23】

患者の全身循環に到達する、請求項 16 ~ 22 のいずれか一項に記載の化合物、構築物、または組成物。

【請求項 24】

皮膚の疾患または障害の防止または処置のための方法における使用のための、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物であって、該方法が、本質的に一価の形態である I S V D を含む組成物を、かかる処置の必要がある対象の皮膚または肺に適用することを、前記組成物。

20

【請求項 25】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物をコードする、核酸。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 27】

請求項 25 に記載の核酸または請求項 26 に記載の発現ベクターを含む、宿主または宿主細胞。

【請求項 28】

以下のステップ：

a) 好適な宿主細胞もしくは宿主生物において、または別の好適な発現系において、請求項 25 に記載の核酸を発現すること；任意に、次に：

30

b) 請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物を単離および/または精製することを少なくとも含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物を産生するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍壊死因子アルファ（「TNF」または「TNF - アルファ」）に結合するアミノ酸配列、化合物、およびポリペプチドに関する。具体的には、本発明は、腫瘍壊死因子アルファに結合する改善された重鎖免疫グロブリン単一可変ドメイン（本願においては「ISV」または「ISVD」ともまた言われる）に、ならびにかかる ISVD を含む蛋白質、ポリペプチド、および他の構築物、化合物、分子、または化学的実体、まとめて TNF 結合因子に関する。本発明の他の側面、態様、特徴、使用、および利点は、本願の開示に基づいて当業者には明瞭であろう。

40

【背景技術】

【0002】

本願において、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン内のアミノ酸残基/位置は Kabat に従う付番によって指示される。利便性の理由で、図 1 は、本願において具体的に参照されるアミノ酸位置のいくつかと、いくつかの代替的な付番システム（例えば、Aho および IMG T。注：明白に別様に指示されない限り、本明細書および請求項では、Kabat 付番が最終的なものである；他の付番システムは参照のためのみに与えられている）に従うそれらの付

50

番とを一覧化している表を与えている。

【 0 0 0 3 】

当分野において周知である通り、CDRに関しては、VHまたはVHH断片のCDRを定義および記載するための複数の規則、例えばKabatの定義（これは配列可変性に基づき、最も共通に用いられる）およびChothiaの定義（これは構造的なループ領域の配置に基づく）がある。例えば、ウェブサイト<http://www.bioinf.org.uk/abs/>の参照がされる。本明細書および請求項の目的のためには、Kabatに従うCDRもまた言及され得るが、最も好ましくは、CDRはAbmの定義に基づいて定義される（これは、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアに基づく）。なぜなら、これはKabatおよびChothiaの定義の間の最適な折衷物であると見なされているからである。再びウェブサイト<http://www.bioinf.org.uk/abs/>の参照がされる。

10

【 0 0 0 4 】

炎症性腸疾患（IBD）、クローン病（CD）、および潰瘍性大腸炎（UC）は慢性の活動障害性の進行性疾患である。大部分の非生物学的薬治療、例えばアミノサリチル酸製剤、ステロイド、および免疫調節薬は、症状改善を提供するが、底にある炎症プロセスを止めることはできず、疾患の経過を変えない。抗腫瘍壊死因子 - （抗TNF - ）薬剤（インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴル）の出現は、疾患の経過（CDおよびUC両方において、より少数の手術、より少ない入院、より良いクオリティ・オブ・ライフ、ステロイド節約、より高い臨床的寛解および粘膜治癒率）ならびに患者のクオリティ・オブ・ライフおよび労働生産性の両方を変えることによって、IBDが処置されるやり方を劇的に変えた（cf. Amiot and Peyrin-Biroulet 2015 Ther Adv Gastroenterol 8:66-82）。これらの治療薬蛋白質の最も共通の投与経路は注射である。これらの蛋白質の大部分は短い血清中半減期を有するので、それらは、有効であるためには高頻度でまたは高いドーズで投与されることを必要とする。さらにその上、全身投与は、感染の増大したリスクに関連する。一緒になって、これは患者コンプライアンスの損失をもたらす（cf. Singh et al. 2008 J Pharm Sci 97:2497-2523）。

20

【 0 0 0 5 】

しかしながら、結核および非ホジキンリンパ腫を包含する望ましくない長期的副作用および日和見感染が、全般的な免疫抑制によって引き起こされ、現行で用いられているモノクローナル抗体処置の繰り返しの全身注射からもたらされる（Ali et al., 2013; Galloway et al., 2011; Ford & Peyrin-Biroulet, 2013; Kozuch & Hanauer, 2008; Schreiber et al., 2007; Syed et al., 2013）。

30

【 0 0 0 6 】

抗TNF - 抗体の経口投与はこれらの副作用のいくつかを回避するはずである。

【 0 0 0 7 】

しかしながら、これらの抗TNF - 薬剤は複雑な蛋白質である。経口送達は、胃腸（GI）管の酸性のプロテアーゼリッチな環境による分解をもたらす。

【 0 0 0 8 】

治療薬抗体を保護するためにデコイ蛋白質を用いる上では、ヒトTNFアルファに対するポリクローナルウシ初乳抗体（AVX - 470）が経口経路によって投与されることを含む患者に基づく研究が、Avaxia Biologies Inc.によって潰瘍性大腸炎患者に対して最近行われた。しかしながら、研究は打ち切られた。

40

【 0 0 0 9 】

ゆえに、新たなIBD薬の必要がある。

【 0 0 1 0 】

TNFに結合し得るISVD（特にナノボディ）およびそれらの使用は、当分野においては例えばWO2004/041862およびWO2006/122786から周知であり、これらは、TNFに対するナノボディ、ならびにTNF - またはTNF - シグナル伝達に関連するおよび/またはそれによって媒介される疾患および障害、例えば炎症、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、アジソン病、

50

自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、1型糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節炎、甲状腺炎、および血管炎の防止および/または処置へのそれらの使用を記載している。

【0011】

WO2006/122786は、NC55TNF__NC7(PMP6C11)と言われる特異的な抗TNF- α ナノボディを配列番号125として開示している。この従来技術のナノボディの配列は下の表Aに配列番号58として与えられている。表Aは、(配列番号1として)この従来技術のTNF結合因子の配列最適化版(本願においては「参照A」ともまた言われる)の配列をもまたそのCDRと一緒に与えている(KabatおよびAbmの規則に従う)。図2のアラインメントから分かるように、この配列最適化版は、配列番号58の従来技術の配列と比較して次の変異を含有する: Q1E、A14P、Q27F、S29F、P40A、A49S、K73N、Q75K、V78L、D82a N、K83R、およびQ108L(Kabat付番に従う)。

10

【0012】

WO2015/1733256は、いわゆる既存抗体(「PEA」)の結合を防止するC末端延長を含む、改善された免疫グロブリンドメインに関する。WO2015/1733256は、特異的な抗TNF- α ナノボディとして配列番号345を開示しており、これは本願においてはTNF345(配列番号59)ともまた言われる。図2のアラインメントから分かるように、配列最適化版の参照Aは、配列番号59の従来技術の配列と比較して次の変異を含有する: V11LおよびL89V(Kabat付番に従う)。

20

【0013】

毒素中和性のラマモノクローナルVHH抗体断片のカクテルが、潜在的な経口治療のために最近提案された(Hussack et al., 2011 J Biol Chem 286, 8961-76.)。しかしながら、Dumoulin et al. (2002 Protein Sci, 11, 500-15)、Harmsen et al. (2006 Appl Microbiol Biotechnol, 72, 544-51) およびHussack et al. (2012 Methods Mol Biol, 911, 417-29) は、単ドメインラマ抗体断片がヒト胃腸系における蛋白質分解的な破壊を非常に受けやすいように見えると主張している。

【0014】

WO2007/025977は慢性腸炎の処置を記載しており、経口投与されたL. lactis細菌による抗mTNFナノボディのインサイチュ分泌を包含する。

30

【発明の概要】

【0015】

本発明は、改善されたTNF結合因子、具体的には、改善された抗TNF化合物およびポリペプチド、より具体的には抗TNFのISVD、さらにはより具体的には改善された抗TNFナノボディを提供することを目指す。本発明によって提供される改善されたTNF結合因子は、本願においては「本発明のTNF結合因子」または「TNF結合因子」ともまた言われる。

【0016】

より具体的には、本発明は、例えば炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、粘膜炎、アフタ性口内炎、セリアック病、消化管の外傷、および消化管の癌などの消化管の疾患を処置することに有用である改善されたTNF結合因子を提供することを目指す。それらのTNF結合因子は、好ましくは安定であり、経口投与が可能であるべきである。

40

【0017】

経口投与されたTNF結合因子は、消化管の内腔においてTNFを中和するのみならず、粘膜固有層および粘膜下層へのアクセスを獲得するということが予想される。なぜなら、消化管の腸バリアは、歯周病、アフタ性口内炎、消化管の細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫感染、消化性潰瘍、ストレスまたはH. pylori感染に関連する潰瘍、食道逆流症に

50

よって引き起こされるダメージ、炎症性腸疾患、消化管の癌によって引き起こされるダメージ、セリアック病を包含する食物不耐性、あるいはNSAIDまたは他の摂取もしくは全身送達された薬によって誘導される潰瘍を包含するがこれに限定されない全般的炎症および/あるいは潰瘍化によって破られるかあるいは損なわれ得るからである。

【0018】

ゆえに、本発明は、参照Aのバリエーションであり、かついくつもの健康なヒト対象および患者の血清中に存在し得る干渉因子（一般的に「既存抗体」または「PEA」と言われる）による低減された結合を有する、改善されたTNF結合因子を提供することを目指す。WO2012/175741、WO2013/024059、およびまた例えばHolland et al. (J. Clin. Immunol. 2013, 33(7):1192-203)、ならびに「Improved immunoglobulin variable domains」と題する2015年5月13日出願のAbylynx N.V.による同時係属中の公開PCT出願WO2015/173325 (App1. no. PCT/EP2015/060643)の参照がされる。

10

【0019】

本願にさらに記載されるように、本発明のTNF結合因子は、好ましくは、参照Aに存在するものとCDRの同じ組み合わせ（すなわち、CDR1、CDR2、およびCDR3）を有する。

【0020】

本発明のいくつかの好ましい限定しないTNF結合因子が、図3に配列番号8から41、62、63、64、65、66、および69として一覧化されている。図4は、配列番号1（参照A）および配列番号58（PMP6C11）との配列番号8～41の配列のアラインメントを示している。配列番号22から41、62～66、および69の結合因子は、本発明のTNF結合因子の例であり、通常C末端配列VTVSS（参照Aに存在する配列番号55）と比較してC末端アラニン延長、すなわちISVD配列のC末端のアラニン残基（場合によっては「位置114」ともまた言われる）を有する。WO2012/175741に（しかし、例えばWO2013/024059およびWO2015/173325にもまた）記載されているように、このC末端アラニン延長は、ISVDのC末端領域に所在する推定されるエピトープに対するいわゆる「既存抗体」（IgGであると推測される）の結合を防止し得る。このエピトープは、他の残基のなかでも、C末端配列VTVSSの表面に露出されたアミノ酸残基ならびに位置14のアミノ酸残基（およびアミノ酸配列中のその次の/それに近いアミノ酸残基、例えば位置11、13、および15）を包含すると推測され、位置83のアミノ酸残基（およびアミノ酸配列中のその次の/それに近いアミノ酸残基、例えば位置82、82a、82b、および84）ならびに/または位置108のアミノ酸残基（およびアミノ酸配列中のその次の/それに近いアミノ酸残基、例えば位置107）をもまた含み得る。

20

30

【0021】

しかしながら、かかるC末端アラニン（または、一般的にC末端延長）の存在は、広範囲の対象（健康な対象および患者両方）の血清に見出され得る「既存抗体」の結合を著しく低減し得る（さらに、沢山のケースにおいては、本質的に完全に防止し得る）が、ISVDがかかるC末端アラニン（または、より一般的には、かかるC末端延長）を含有するときでさえも、いくつかの対象の血清（例えば、SLEなどのいくつかの免疫疾患の患者の血清）は、ISVDのC末端領域に（かかる領域が露出されているときに）結合し得る既存抗体を含有し得るということが見出されている。再び、「Improved immunoglobulin variable domains」と題する2015年5月13日出願の譲受人による同時係属中の公開PCT出願WO2015/173325の参照がされる。

40

【0022】

従って、本発明の1つの特定の目的は、本願において「参照A」と言われる抗TNFナノボディの改善されたバリエーションであり、かつ具体的にはWO2015/173325に記載されている種類のいわゆる「既存抗体」（すなわち、C末端延長の存在下でさえもISVDの露出されたC末端領域に結合し得る既存抗体）による低減された結合を有する、

50

T N F 結合因子を提供することである。

【 0 0 2 3 】

一般的に、本発明は、次のアミノ酸残基（すなわち、配列番号 1 の配列と比較しての変異）を含む配列番号 1 の配列のバリエーションであるアミノ酸配列を提供することによって、この目的を達成する：

- 8 9 T ; または
- 1 1 V との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 V および 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 V および 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 1 1 V ; または
- 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 1 1 V 。

10

【 0 0 2 4 】

具体的には、本発明によって提供される T N F 結合因子において：

- 位置 1 1 のアミノ酸残基は好ましくは L または V から選ばれ；かつ
- 位置 8 9 のアミノ酸残基は好ましくは好適に T、V、または L から選ばれ；かつ
- 位置 1 1 0 のアミノ酸残基は好ましくは好適に T、K、または Q から選ばれ；かつ
- 位置 1 1 2 のアミノ酸残基は好ましくは好適に S、K、または Q から選ばれ；

その結果、(i) 位置 8 9 は T であるか；または (i i) 位置 8 9 は L でありかつ位置 1 1 は V であるか；または (i i i) 位置 8 9 は L でありかつ位置 1 1 0 は K もしくは Q であるか；または (i v) 位置 8 9 は L でありかつ位置 1 1 2 は K もしくは Q であるか；または (v) 位置 8 9 は L でありかつ位置 1 1 は V でありかつ位置 1 1 0 は K もしくは Q であるか；または (v i) 位置 8 9 は L でありかつ位置 1 1 は V でありかつ位置 1 1 2 は K もしくは Q であるか；または (v i i) 位置 1 1 は V でありかつ位置 1 1 0 は K もしくは Q であるか；または (v i i) 位置 1 1 は V でありかつ位置 1 1 2 は K もしくは Q である。

20

【 0 0 2 5 】

本発明によって提供されるアミノ酸配列のうち、(任意に、1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q 変異および / または 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q 変異との好適な組み合わせで、特に 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q 変異との組み合わせで) 位置 8 9 が T であるか、または位置 1 1 が V でありかつ位置 8 9 が L であるアミノ酸配列が、特に好ましい。位置 1 1 が V でありかつ位置 8 9 が L であり、任意に 1 1 0 K または 1 1 0 Q 変異を有するアミノ酸配列がさらに好ましい。

30

【 0 0 2 6 】

特に好ましい態様においては、本発明によって提供される T N F 結合因子において、位置 1 1 のアミノ酸残基は V であり、位置 8 9 のアミノ酸残基は L であり、位置 1 1 0 のアミノ酸残基は T であり、位置 1 1 2 のアミノ酸残基は S である。

【 0 0 2 7 】

特に好ましい態様において、本発明は T N F 結合因子、例えば免疫グロブリン単一可変ドメイン (I S V D) に関し：

- アミノ酸配列 G F T F S T A D M G (配列番号 5) である C D R 1 (A b m に従う) と；
 - アミノ酸配列 R I S G I D G T T Y (配列番号 6) である C D R 2 (A b m に従う) と；
 - アミノ酸配列 P R Y A D Q W S A Y D Y (配列番号 4) である C D R 3 (A b m に従う) と；
- を有し、

40

- 少なくとも 8 5 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性の割合 (その中の存在し得るいずれかの C 末

50

端延長およびCDRは、配列同一性の度を決定するために考慮しない)；

および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、もしくは1つのみの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覧化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/またはCDR内に存在し得るが、好ましくはCDRではなくフレームワーク内のみが存在する)；

を有し、

- 位置11のアミノ酸残基はVであり；かつ
- 位置89のアミノ酸残基はLであり；かつ
- 位置110のアミノ酸残基はTであり；かつ
- 位置112のアミノ酸残基はSであり；かつ
- 位置49のアミノ酸残基はAであり；かつ
- 位置74のアミノ酸残基はSである。

【0028】

言及した通り、本願に記載される本発明によって提供されるアミノ酸配列はTNFに結合し得る(具体的には、特異的に結合し得る)。

【0029】

本発明によって提供されるアミノ酸配列は、好ましくは、WO04/041862の例1において3)に記載されているKYM細胞を用いる細胞に基づくアッセイにおいて、50nMよりも良い、より好ましくは25nMよりも良い、例えば10nM未満であるEC50値を有する。

【0030】

表Bは、本発明のTNF結合因子の位置11、89、110、および112に存在し得るアミノ酸残基のいくつかの限定しない可能な組み合わせを一覧化している。特に好ましい組み合わせは太字によって指示されており、最も好ましい組み合わせは太字/下線によって指示されている。

【0031】

しかしながら、一方では既存抗体の結合部位を最小化または削除することに関してTNF結合因子の配列を最適化すること(「配列最適化」と、他方ではヒト化することによって、安定性を包含するTNF結合因子の種々の特性は(顕著に)負に影響された。具体的には、物理的安定性の尺度としての融点が減少し、真核生物宿主*P. pastoris*および原核生物宿主*E. coli*両方による産生が減ぜられ、GI液中での安定性が低減された。

【0032】

PEAの結合部位およびヒト化変異を「復帰変異」させ、それによって配列最適化を損なう代わりに、驚くべきことに、本発明者は、アミノ酸残基49および/または74が、両方の一見相互排他的な要件が満たされるように変改され得るということを見出した。表B-1およびB-2は、本発明のTNF結合因子の位置11、89、110、112、49、および/または74に存在し得るアミノ酸残基のいくつかの限定しない可能な組み合わせを一覧化している。

【0033】

本発明によって提供されるTNF結合因子は、さらに、本願の明細書、例、および図に記載されている通りである。すなわち、それらは本願に記載される通りであるCDRを有し、本願において開示される配列番号1の配列との配列同一性のある総体的度合(本願において定義される通り)を有し、および/またはそれらの参照配列(の1つ)との「アミノ酸の違い」(本願に記載される通り)の限定された数を有し得る。

【0034】

好ましくは、本発明のTNF結合因子は次のCDRを含む(Kabatの規則に従う)：

10

20

30

40

50

- アミノ酸配列 T A D M G (配列番号 2) である C D R 1 (Kabat に従う) と ;
- アミノ酸配列 R I S G I D G T T Y Y D E P V K G (配列番号 3) である C D R 2 (Kabat に従う) と ;
- アミノ酸配列 P R Y A D Q W S A Y D Y (配列番号 4) である C D R 3 (Kabat に従う) 。

【 0 0 3 5 】

代替的には、C D R が Abm の規則によって与えられるときには、本発明の T N F 結合因子は、好ましくは次の C D R を含む :

- アミノ酸配列 G F T F S T A D M G (配列番号 5) である C D R 1 (Abm に従う) と ;
- アミノ酸配列 R I S G I D G T T Y (配列番号 6) である C D R 2 (Abm に従う) と ;
- アミノ酸配列 P R Y A D Q W S A Y D Y (配列番号 4) である C D R 3 (Abm に従う) 。

【 0 0 3 6 】

本発明の T N F 結合因子は、好ましくは :

- 少なくとも 8 5 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 % という、配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性の度合 (その中の存在し得るいずれかの C 末端延長および C D R は、配列同一性の度合を決定するために考慮しない) ; および / または

- 配列番号 1 のアミノ酸配列との、7 つ以下の、例えば 5 つ以下の、好ましくは 3 つ以下の、例えば 3 つ、2 つ、または 1 つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置 (単数または複数) 1 1、8 9、1 1 0、または 1 1 2 の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかの C 末端延長を考慮しない) (その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび / または C D R 内に存在し得るが、好ましくは C D R ではなくフレームワーク内のみに存在する) ; をもまた有する。

【 0 0 3 7 】

本発明によって提供される本発明の T N F 結合因子の種々の側面および好ましい側面に関して、配列番号 1 に関しての配列同一性の度合ならびに / または本発明のかかる結合因子に存在し得る (すなわち、配列番号 1 の配列と比較しての) 「アミノ酸の違い」の数および種類に関しては、(i) 本発明のアミノ酸配列が、少なくとも 8 5 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 % の配列番号 1 の配列との配列同一性の度合を有すると言われるとき (その中の C D R、存在し得るいずれかの C 末端延長、ならびに当該の特定の側面によって要求される位置 1 1、8 9、1 1 0、および / または 1 1 2 の変異は、配列同一性の度合を決定するために考慮しない) ; および / または (i i) 本発明のアミノ酸配列が、配列番号 1 の配列との 7 つ以下の、好ましくは 5 つ以下の、例えば 3 つ、2 つ、または 1 つの「アミノ酸の違い」を有すると言われるとき (再び、存在し得るいずれかの C 末端延長を考慮せず、当該の特定の側面によって要求される位置 1 1、8 9、1 1 0、および / または 1 1 2 の変異を考慮しない)、これは、当該の特定の側面によって要求される位置 1 1、8 9、1 1 0、および / または 1 1 2 の変異) ならびに存在し得るいずれかの C 末端延長以外には、配列番号 1 の配列とのアミノ酸の違いを有さない配列をもまた包含するということに注意すべきである。

【 0 0 3 8 】

それゆえに、本発明の 1 つの特定の側面において、本発明の T N F 結合因子は、配列番号 1 との 1 0 0 % の配列同一性を有し得 (C D R を包含するが、本願において開示される位置 1 1、4 9、7 4、8 9、1 1 0、および / もしくは 1 1 2 の変異 (単数もしくは複数) または変異の組み合わせ、ならびに / あるいは存在し得るいずれかの C 末端延長を考慮しない)、および / または配列番号 1 とのアミノ酸の違いを有さず (すなわち、本願において開示される位置 1 1、8 9、1 1 0、および / または 1 1 2 の変異 (単

10

20

30

40

50

数もしくは複数)または変異の組み合わせ、ならびに存在し得るいずれかのC末端延長以外には)。

【0039】

いずれかのアミノ酸の違いが(すなわち、いずれかのC末端延長、ならびに当該の本発明の特定の側面によって要求される位置11、89、110、および/または112の変異以外に)存在するときに、それらのアミノ酸の違いはCDRおよび/またはフレームワーク領域内に存在し得るが、それらは好ましくはフレームワーク領域内にのみ存在し(Abmの規則によって定義される通り。すなわち、Abmの規則に従って定義されるCDR内ではない)、すなわち、その結果、本発明のTNF結合因子は配列番号1に存在するものと同じCDR(Abmの規則に従って定義される)を有する。

10

【0040】

また、本発明のいずれかの側面に従う本発明のTNF結合因子が配列番号1の配列との1つ以上のアミノ酸の違いを(当該の特定の側面によって要求される位置11、89、110、および/または112の変異以外に)有するときに、存在し得るかかる変異/アミノ酸の違い(すなわち、配列番号1の配列と比較して)のいくつかの特定の限定しない例は、例えばE1D、P40A、P40L、P40S(特にP40A)、S49A、A74S、L78V、T87A、またはそのいずれかの好適な組み合わせである。また、本発明のTNF結合因子は、好適には、D60A、E61D、および/またはP62S変異(の好適な組み合わせ)を、特に位置60~62のADSモチーフとして含み得る(限定しない例は配列番号39を見よ)。変異の他の例は、1つ以上の好適な「ヒト化」置換(の好適な組み合わせ)である;例えば、WO2009/138519(またはWO2009/138519に引用されている従来技術)およびWO2008/020079(またはWO2008/020079に引用されている従来技術)、ならびにWO2008/020079の表A-3からA-8(これらは、可能なヒト化置換を示す一覧である)の参照がされる。

20

【0041】

前述の変異のうち、S49A、A74S、および/またはL78V変異(またはそのいずれか2つのいずれかの好適な組み合わせ。その3つ全てを包含する)の存在が好ましい(配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62~63を見よ)。図5は、配列番号1、配列番号31、および配列番号36から41のアラインメントを示している。

30

【0042】

また、本発明のTNF結合因子が、その中にそれらが存在するポリペプチドまたは化合物のN末端部に存在および/またはそれを形成するときに、それらは好ましくは位置1のDを含有する(すなわち、参照Aと比較してのE1D変異)。従って、さらなる側面において、本発明は本発明のポリペプチド(これは本願にさらに記載される通りである)に関し、これがそのN末端に本発明のTNF結合因子(これは本願にさらに記載される通りである)を有し、本発明の前記TNF結合因子が位置1のDを有する。

【0043】

類似に、本発明のTNF結合因子が一価の形態で用いられるときに、これは、好ましくは、本願に記載されるC末端延長X(n)および位置1のD両方を有する。

40

【0044】

位置1のDおよびC末端延長を有する一価TNF結合因子のいくつかの好ましい限定しない例は、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62~63、好ましくは配列番号36、39、および40、最も好ましくは配列番号40として与えられる。これに関して、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62~63のTNF結合因子は、一価の形態ではない本発明の化合物またはポリペプチドにもまた用いられ得るということに注意すべきである。そのケースにおいては、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62~63のTNF結合因子は、それらが本発明の前記ポリペプチドまたは化合物のN末端に存在しないときに

50

、好ましくはそれらのN末端のDの代わりにE（すなわち、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62～63の配列と比較してのD1E変異）を有するであろう（代わりに、好ましくは、本発明の前記ポリペプチドまたは化合物のN末端ISVDは位置1のDを有し得る；また、それらは、それらが化合物またはポリペプチドのC末端に存在しないときに、好ましくはC末端延長（例えば、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62～63に存在するC末端アラニン）を含有しないであろう（代わりに、好ましくは、本発明の前記ポリペプチドまたは化合物のC末端ISVDはC末端延長を有するであろう）。

【0045】

好ましい限定しない例によって、配列番号40、39、36、64、69、37、38、および62～63は、配列番号1とのさらなるアミノ酸の違い、すなわちS49A、A74S、および/またはL78Vを有する本発明のTNF結合因子の例でもまたある。それゆえに、特定の側面において、本発明は、少なくともS49A、A74S、および/またはL78V変異の好適な組み合わせ、好ましくはこれらの変異のいずれか2つの好適な組み合わせ、例えばこれらの変異の3つ全てを有する（すなわち、本願に記載される位置11、89、110、および/または112の変異を有し、また、さらに本願に記載される通りである）本発明のTNF結合因子に関する。

【0046】

本発明のTNF結合因子は、それらが一価の形態で用いられるときに、ならびに/あるいはその中にそれらが存在する蛋白質、ポリペプチド、または化合物もしくは構築物のC末端に存在および/もしくはそれを形成するときに（あるいはそれらが別様にかかる蛋白質、ポリペプチド、または他の化合物もしくは構築物の「露出された」C末端を有するとき。これによって、一般的には、ISVのC末端が定常ドメイン（例えばCH1ドメイン）と会合または連結されていないということが意味される；再びWO2012/175741およびWO2015/1733256の参照がされる）、好ましくは、式(X)_nのC末端延長をもまた有し、式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり（好ましくは1または2、例えば1）；各Xは（好ましくは天然に存在する）アミノ酸残基であり、これは独立して天然に存在するアミノ酸残基から選ばれ（しかし、好ましい1つの側面に従うと、これはいずれかのシステイン残基を含まない）、好ましくは独立してアラニン（A）、グリシン（G）、バリン（V）、ロイシン（L）、またはイソロイシン（I）からなる群から選ばれる。

【0047】

かかるC末端延長X_(n)のいくつかの好ましい限定しない例に従うと、Xおよびnは次の通りであり得る：

(a) n = 1かつX = Ala；

(b) n = 2かつ各X = Ala；

(c) n = 3かつ各X = Ala；

(d) n = 2かつ少なくとも1つのX = Ala（残りのアミノ酸残基（単数または複数）Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる）；

(e) n = 3かつ少なくとも1つのX = Ala（残りのアミノ酸残基（単数または複数）Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる）；

(f) n = 3かつ少なくとも2つのX = Ala（残りのアミノ酸残基（単数または複数）Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる）；

(g) n = 1かつX = Gly；

(h) n = 2かつ各X = Gly；

(i) n = 3かつ各X = Gly；

(j) n = 2かつ少なくとも1つのX = Gly（残りのアミノ酸残基（単数または複数

10

20

30

40

50

) Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる)；

(k) n = 3かつ少なくとも1つのX = Gly (残りのアミノ酸残基 (単数または複数

) Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる)；

(l) n = 3かつ少なくとも2つのX = Gly (残りのアミノ酸残基 (単数または複数

) Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる)；

(m) n = 2かつ各X = AlaもしくはGly；

(n) n = 3かつ各X = AlaもしくはGly；

(o) n = 3かつ少なくとも1つのX = AlaもしくはGly (残りのアミノ酸残基 (単数または複数) Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる)；または

(p) n = 3かつ少なくとも2つのX = AlaもしくはGly (残りのアミノ酸残基 (単数または複数) Xは、独立していずれかの天然に存在するアミノ酸から選ばれるが、好ましくは独立してVal、Leu、および/またはIleから選ばれる)；

側面(a)、(b)、(c)、(g)、(h)、(i)、(m)、および(n)が特に好ましく、n = 1または2の側面が好ましく、n = 1の側面が特に好ましい。

【0048】

好ましくは、本発明のTNF結合因子に存在するいずれかのC末端延長は、(自由な)システイン残基を含有しないということにもまた注意すべきである(前記システイン残基が、さらなる官能化、例えばPEG化のために用いられるかまたはそれを意図されない限り)。

【0049】

有用なC末端延長のいくつかの特定の限定しない例は、次のアミノ酸配列である：AA、AAA、G、GG、GGG、AG、GA、AAG、AGG、AGA、GGA、GAA、またはGAG。

【0050】

本発明のTNF結合因子が位置110または112の変異を(任意に、本願に記載される位置11および/または89の変異との組み合わせで)含有するとき、(位置109から始まる)フレームワーク4のC末端アミノ酸残基は次の通りであり得る：(i) C末端延長が存在しない場合：VTVKS (配列番号43)、VTVQS (配列番号44)、VKVSS (配列番号45)、もしくはVQVSS (配列番号46)；または(ii) C末端延長が存在する場合：VTVKSX_(n) (配列番号47)、VTVQSSX_(n) (配列番号48)、VKVSSX_(n) (配列番号49)、もしくはVQVSSX_(n) (配列番号50)、例えばVTVKS A (配列番号51)、VTVQSS A (配列番号52)、VKVSS A (配列番号53)、またはVQVSS A (配列番号54)。本発明のTNF結合因子が位置110または112の変異を含有しない(本願に記載される位置11および/または89の変異のみを含有する)ときに、(位置109から始まる)フレームワーク4のC末端アミノ酸残基は、通常は：(i) C末端延長が存在しないときに：VTVSS (配列番号55) (配列番号1の配列の通り)；または(ii) C末端延長が存在するときに：VTVSSX_(n) (配列番号56)、例えばVTVSS A (配列番号57)どちらかであろう。これらのC末端配列において、Xおよびnは本願においてC末端延長について定義されている通りである。

【0051】

図4のアラインメントおよび図3から分かるように、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62~63のTNF結合因子はE1D変異およびC末端アラニン延長両方を有する。言及した通り、位置1のDおよびC末端延長両方の存在は、これらのTNF結合因子(ならびに位置1のDおよびC末端延長を有する本発明の他のTNF結合因子)を、一価の形態での使用にとって(すなわち、本願に記載される目的に

10

20

30

40

50

とって)特に好適にする。

【0052】

従って、さらなる側面において、本発明は、位置1のDおよびC末端延長X(n)(これは好ましくは単一のAla残基である)を有する本発明のTNF結合因子(これは本願にさらに記載される通りである)に関する。前記TNF結合因子は、好ましくは一価の形態である(それで用いられ、および/またはそれでの使用を意図される)。1つの特定の側面において、前記一価TNF結合因子は配列番号40、39、36、64、69、37、38、62、63、および41から選ばれる。

【0053】

本発明のTNF結合因子のいくつかの好ましい限定しない例は配列番号8から41および62~69によって与えられ、それらの配列のそれぞれは本発明のさらなる側面を形成する(それらの配列の1つを含む蛋白質、ポリペプチド、または他の化合物もしくは構築物もそうである)。

【0054】

本発明のいくつかの特に好ましいTNF結合因子は、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、および62~63の配列である(または本願に記載されるように、位置1のEを有するおよび/またはC末端延長なしのそのバリエーション)。本発明のポリペプチドまたは化合物によるそれらの意図される使用に依存する)。

【0055】

それゆえに、第1の側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列TADMG(配列番号2)であるCDR1(Kabatに従う)と；
- アミノ酸配列RISGIDGTTYDEPKG(配列番号3)であるCDR2(Kabatに従う)と；

- アミノ酸配列PRYADQWSAYDY(配列番号4)であるCDR3(Kabatに従う)と；

を有し、

- 少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%という、配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性の度合(その中の存在し得るいずれかのC末端延長およびCDRは、配列同一性の度合を決定するために考慮しない)；

および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/またはCDR内に存在し得るが、好ましくはCDRではなくフレームワーク内のみに存在する)；

を有し、

任意に：

- C末端延長(X)_n

を有し、

式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり(好ましくは1または2、例えば1)；各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在する)アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン(A)、グリシン(G)、バリン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から選ばれ；

その中の：

- 位置11のアミノ酸残基は好ましくはLまたはVから選ばれ；かつ
- 位置89のアミノ酸残基は好ましくは好適にT、V、またはLから選ばれ；かつ
- 位置110のアミノ酸残基は好ましくは好適にT、K、またはQから選ばれ；かつ
- 位置112のアミノ酸残基は好ましくは好適にS、K、またはQから選ばれ；

その結果、(i)位置89はTであるか；または(ii)位置89はLでありかつ位置

10

20

30

40

50

11はVであるか；または(iii)位置89はLでありかつ位置110はKもしくはQであるか；または(iv)位置89はLでありかつ位置112はKもしくはQであるか；または(v)位置89はLでありかつ位置11はVでありかつ位置110はKもしくはQであるか；または(vi)位置89はLでありかつ位置11はVでありかつ位置112はKもしくはQであるか；または(vii)位置11はVでありかつ位置110はKもしくはQであるか；または(viii)位置11はVでありかつ位置112はKもしくはQである。

【0056】

さらなる側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列TADMG(配列番号2)であるCDR1(Kabatに従う)と； 10
 - アミノ酸配列RISGIDGTTYDEPKG(配列番号3)であるCDR2(Kabatに従う)と；
 - アミノ酸配列PRYADQWSAYDY(配列番号4)であるCDR3(Kabatに従う)と；
- を有し、
- 少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%という、配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性の度合(その中の存在し得るいずれかのC末端延長およびCDRは、配列同一性の度合を決定するために考慮しない)；
- および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/またはCDR内に存在し得るが、好ましくはCDRではなくフレームワーク内のみ存在する)； 20
- を有し、
- 任意に：

- C末端延長(X)_n

を有し、 30

式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり(好ましくは1または2、例えば1)；各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在する)アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン(A)、グリシン(G)、バリン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から選ばれ；

この免疫グロブリン単一可変ドメインは、次のアミノ酸残基(すなわち、配列番号1のアミノ酸配列と比較しての変異)を言及されている位置に含む(付番はKabatに従う)：

- 89T；または
- 11Vとの組み合わせでの89L；または
- 110Kもしくは110Qとの組み合わせでの89L；または
- 112Kもしくは112Qとの組み合わせでの89L；または
- 11Vおよび110Kもしくは110Qとの組み合わせでの89L；または 40
- 11Vおよび112Kもしくは112Qとの組み合わせでの89L；または
- 110Kもしくは110Qとの組み合わせでの11V；または
- 112Kもしくは112Qとの組み合わせでの11V。

【0057】

具体的には、本発明のTNF結合因子は、好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)を有する(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/またはCDR内に存在し得るが、好 50

ましくはCDRではなくフレームワーク内のみに存在する)。

【0058】

特に、本発明によって提供されるTNF結合因子において、位置11のアミノ酸残基はVであり、位置89のアミノ酸残基はLであり、位置110のアミノ酸残基はTであり、位置112のアミノ酸残基はSである。

【0059】

本願に記載されるように、存在し得る(すなわち、好適な組み合わせの)かかる変異/アミノ酸の違いのいくつかの特定の限定しない例は、例えば、E1D、P40A、P40L、P40S(特にP40A)、S49A、A74S、L78V、T87A、またはそのいずれかの好適な組み合わせ、ならびに例えばD60A、E61D、および/またはP62S変異(の好適な組み合わせ)(特に、位置60~62のADSモチーフとして)および1つ以上の好適な「ヒト化」置換(の好適な組み合わせ。例えば配列番号39を見よ)である。また、言及した通り、S49A、A74S、および/またはL78V変異(またはそのいずれか2つのいずれかの好適な組み合わせ。その3つ全てを包含する)の存在(ならびに、TNF結合因子が本発明の化合物もしくはポリペプチドのN末端に存在および/もしくはそれを形成するか、または一価の形態であるときの位置1のDの存在)が好ましい。

10

【0060】

好ましい側面において、本発明のTNF結合因子、例えばISVDは、位置49のアラニン(A49)を含む。

20

【0061】

さらなる好ましい側面において、本発明のTNF結合因子、例えばISVDは、位置74のセリン(S74)を含む。

【0062】

さらなる好ましい側面において、本発明のTNF結合因子、例えばISVDは、位置73のアスパラギン(N73)および/または位置75のリジン(K75)を含む。

【0063】

言及した通り、本発明においては、位置89がTであるか、または位置11がVでありかつ位置89がLである(任意に、110Kもしくは110Q変異および/または112Kもしくは112Q変異との好適な組み合わせで、特に110Kまたは110Q変異との組み合わせで)アミノ酸配列が特に好ましい。位置11がVでありかつ位置89がLであり、任意に110Kまたは110Q変異を有するアミノ酸配列がさらにより好ましい。

30

【0064】

それゆえに、1つの好ましい側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列TADMG(配列番号2)であるCDR1(Kabatに従う)と；
- アミノ酸配列RISGIDGTTYYPVKG(配列番号3)であるCDR2(Kabatに従う)と；
- アミノ酸配列PRYADQWSAYDY(配列番号4)であるCDR3(Kabatに従う)と、

40

を有し、

- 少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%という、配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性の度合(その中の存在し得るいずれかのC末端延長およびCDRは、配列同一性の度合を決定するために考慮しない)；

および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/または

50

C D R内に存在し得るが、好ましくはC D Rではなくフレームワーク内のみ存在する) ;
を有し、

任意に：

- C末端延長(X)_n

を有し、

式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり
(好ましくは1または2、例えば1) ;各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在
する)アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン(A)、グリシン(G)、バリ
ン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から選ばれ；

その中の：

- 位置11のアミノ酸残基は好ましくはLまたはVから選ばれ；かつ

- 位置89のアミノ酸残基Tであり；かつ

- 位置110のアミノ酸残基は好ましくは好適にT、K、またはQから選ばれ(好ま
しくはTである)；かつ

- 位置112のアミノ酸残基は好ましくは好適にS、K、またはQから選ばれる(好
ましくはSである)。

【0065】

別の好ましい側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列TADMG(配列番号2)であるC D R1(Kabatに従う)と；

- アミノ酸配列RISGIDGTTY YDEPVKG(配列番号3)であるC D R2
(Kabatに従う)と；

- アミノ酸配列PRYADQWSAYDY(配列番号4)であるC D R3(Kabatに
従う)と；

を有し、

- 少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95
%という、配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性の割合(その中の存在し得るいずれか
のC末端延長およびC D Rは、配列同一性の割合を決定するために考慮しない)；

および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ
以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される
通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覽
化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない
) (その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/または
C D R内に存在し得るが、好ましくはC D Rではなくフレームワーク内のみ存在する) ;

を有し、

任意に：

- C末端延長(X)_n

を有し、

式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり
(好ましくは1または2、例えば1) ;各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在
する)アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン(A)、グリシン(G)、バリ
ン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から選ばれ；

その中の：

- 位置11のアミノ酸残基はVであり；かつ

- 位置89のアミノ酸残基はLであり；かつ

- 位置110のアミノ酸残基は好ましくは好適にT、K、またはQから選ばれ；かつ

- 位置112のアミノ酸残基は好ましくは好適にS、K、またはQから選ばれる。

1つの特定の限定しない側面において、本発明のTNF結合因子は、次のアミノ酸残基
(すなわち、配列番号1の配列と比較しての変異)を言及されている位置に含み(付番は
Kabatに従う)：

10

20

30

40

50

- 8 9 Lとの組み合わせでの1 1 V ; または
- 1 1 0 Kもしくは1 1 0 Qとの組み合わせでの1 1 V ;
- 1 1 2 Kもしくは1 1 2 Qとの組み合わせでの1 1 V ;
- 8 9 Lおよび1 1 0 Kもしくは1 1 0 Qとの組み合わせでの1 1 V ; または
- 8 9 Lおよび1 1 2 Kもしくは1 1 2 Qとの組み合わせでの1 1 V ;

かつC D R (Kabatに従う)を有し、本願に記載される通りである配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0066】

別の特定の限定しない側面において、本発明のT N F結合因子は、次のアミノ酸残基(すなわち、配列番号1の配列と比較しての変異)を言及されている位置に含み(付番はKabatに従う)：

10

- 1 1 Vとの組み合わせでの8 9 L ; または
- 1 1 0 Kもしくは1 1 0 Qとの組み合わせでの8 9 L ; または
- 1 1 2 Kもしくは1 1 2 Qとの組み合わせでの8 9 L ; または
- 1 1 Vおよび1 1 0 Kもしくは1 1 0 Qとの組み合わせでの8 9 L ; または
- 1 1 Vおよび1 1 2 Kもしくは1 1 2 Qとの組み合わせでの8 9 L ;

かつC D R (Kabatに従う)を有し、本願に記載される通りである配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0067】

別の特定の限定しない側面において、本発明のT N F結合因子は、次のアミノ酸残基(すなわち、配列番号1の配列と比較しての変異)を言及されている位置に含み(付番はKabatに従う)：

20

- 1 1 Vとの組み合わせでの1 1 0 Kもしくは1 1 0 Q ; または
- 8 9 Lとの組み合わせでの1 1 0 Kもしくは1 1 0 Q ; または
- 1 1 Vおよび8 9 Lとの組み合わせでの1 1 0 Kもしくは1 1 0 Q ;

かつC D R (Kabatに従う)を有し、本願に記載される通りである配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0068】

別の特定の限定しない側面において、本発明のT N F結合因子は、次のアミノ酸残基(すなわち、配列番号1の配列と比較しての変異)を言及されている位置に含み(付番はKabatに従う)：

30

- 1 1 Vとの組み合わせでの1 1 2 Kもしくは1 1 2 Q ; または
- 8 9 Lとの組み合わせでの1 1 2 Kもしくは1 1 2 Q ; または
- 1 1 Vおよび8 9 Lとの組み合わせでの1 1 2 Kもしくは1 1 2 Q ;

かつC D R (Kabatに従う)を有し、本願に記載される通りである配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0069】

別の側面において、本発明のT N F結合因子は位置8 9のTを含み、かつC D R (Kabatに従う)を有し、本願に記載される通りである配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

40

【0070】

別の側面において、本発明のT N F結合因子は位置1 1のVおよび位置8 9のLを含み、かつC D R (Kabatに従う)を有し、本願に記載される通りである配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0071】

言及した通り、上の側面に従う本発明のT N F結合因子は、好ましくはさらにそれらがS 4 9 A、A 7 4 S、および/またはL 7 8 V変異の好適な組み合わせ、好ましくはこれらの変異のいずれか2つの好適な組み合わせ、例えばこれらの変異の3つ全てを(再び、T N F結合因子が一価であるか、または本発明の化合物もしくはポリペプチドのN末端に存在するときには、好ましくはE 1 D変異をもまた)含有するようになっている。

50

【0072】

別の側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列 G F T F S T A D M G (配列番号5)である C D R 1 (Abmに従う)と；

- アミノ酸配列 R I S G I D G T T Y (配列番号6)である C D R 2 (Abmに従う)と；

- アミノ酸配列 P R Y A D Q W S A Y D Y (配列番号4)である C D R 3 (Abmに従う)と；

を有し、

- 少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%という、配列番号1のアミノ酸配列との配列同一性の割合(その中の存在し得るいずれかのC末端延長およびC D Rは、配列同一性の割合を決定するために考慮しない)；

および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/またはC D R内に存在し得るが、好ましくはC D Rではなくフレームワーク内のみ存在する)；

を有し、

任意に：

- C末端延長(X)_n

を有し、

式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり(好ましくは1または2、例えば1)；各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在する)アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン(A)、グリシン(G)、バリン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から選ばれ；

その中の：

- 位置11のアミノ酸残基は好ましくはLまたはVから選ばれ；かつ

- 位置89のアミノ酸残基は好ましくは好適にT、V、またはLから選ばれ；かつ

- 位置110のアミノ酸残基は好ましくは好適にT、K、またはQから選ばれ；かつ

- 位置112のアミノ酸残基は好ましくは好適にS、K、またはQから選ばれ；

その結果、(i)位置89はTであるか；または(ii)位置89はLでありかつ位置11はVであるか；または(iii)位置89はLでありかつ位置110はKもしくはQであるか；または(iv)位置89はLでありかつ位置112はKもしくはQであるか；または(v)位置89はLでありかつ位置11はVでありかつ位置110はKもしくはQであるか；または(vi)位置89はLでありかつ位置11はVでありかつ位置112はKもしくはQであるか；または(vii)位置11はVでありかつ位置110はKもしくはQであるか；または(viii)位置11はVでありかつ位置112はKもしくはQである。

【0073】

さらなる側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列 G F T F S T A D M G (配列番号5)である C D R 1 (Abmに従う)と；

- アミノ酸配列 R I S G I D G T T Y (配列番号6)である C D R 2 (Abmに従う)と；

- アミノ酸配列 P R Y A D Q W S A Y D Y (配列番号4)である C D R 3 (Abmに従う)と；

を有し、

- 少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%

%という、配列番号1のアミノ配列との配列同一性の割合(その中の存在し得るいずれかのC末端延長およびCDRは、配列同一性の割合を決定するために考慮しない)；

および/または

- 配列番号1のアミノ酸配列との、7つ以下の、例えば5つ以下の、好ましくは3つ以下の、例えば3つ、2つ、または1つの「アミノ酸の違い」(本願において定義される通り。存在し得る位置(単数または複数)11、89、110、または112の上で一覧化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかのC末端延長を考慮しない)(その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/またはCDR内に存在し得るが、好ましくはCDRではなくフレームワーク内のみに存在する)；

を有し、

任意に：

- C末端延長(X)_n

を有し、

式中、nは1から10、好ましくは1から5、例えば1、2、3、4、または5であり(好ましくは1または2、例えば1)；各Xは独立して選ばれる(好ましくは天然に存在する)アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン(A)、グリシン(G)、バリン(V)、ロイシン(L)、またはイソロイシン(I)からなる群から選ばれ；

この免疫グロブリン単一可変ドメインは、次のアミノ酸残基(すなわち、配列番号1のアミノ酸配列と比較しての変異)を言及されている位置に含む(付番はKabatに従う)：

- 89T；または

- 11Vとの組み合わせでの89L；または

- 110Kもしくは110Qとの組み合わせでの89L；または

- 112Kもしくは112Qとの組み合わせでの89L；または

- 11Vおよび110Kもしくは110Qとの組み合わせでの89L；または

- 11Vおよび112Kもしくは112Qとの組み合わせでの89L；または

- 110Kもしくは110Qとの組み合わせでの11V；または

- 112Kもしくは112Qとの組み合わせでの11V。

【0074】

言及した通り、本発明のTNF結合因子が一価の形態で用いられ、および/または本発明の化合物のC末端(本願において定義される通り)に存在するとき、TNF結合因子(および帰結として本発明のもたらされる化合物)は、好ましくはC末端延長X(n)を有し、このC末端延長は、本発明のTNF結合因子について本願に記載される通り、および/またはWO2012/175741もしくはWO2015/173325に記載される通りであり得る。

【0075】

言及した通り、本発明において、位置89がTであるか、または位置11がVでありかつ位置89がLである(任意に、110Kもしくは110Q変異および/または112Kもしくは112Q変異との好適な組み合わせで、特に110Kまたは110Q変異との組み合わせで)アミノ酸配列が特に好ましい。位置11がVでありかつ位置89がLであり、任意に110Kまたは110Q変異を有するアミノ酸配列がさらにより好ましい。

【0076】

それゆえに、1つの好ましい側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列GFTFSTADMG(配列番号5)であるCDR1(Abmに従う)と；

- アミノ酸配列RISGIDGTTY(配列番号6)であるCDR2(Abmに従う)と；

- アミノ酸配列PRYADQWSAYDY(配列番号4)であるCDR3(Abmに従う)と；

を有し、

10

20

30

40

50

- 少なくとも 85%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95% という、配列番号 1 のアミノ配列との配列同一性の度合（その中の存在し得るいずれかの C 末端延長および CDR は、配列同一性の度合を決定するために考慮しない）；

および/または

- 配列番号 1 のアミノ酸配列との、7 つ以下の、例えば 5 つ以下の、好ましくは 3 つ以下の、例えば 3 つ、2 つ、または 1 つの「アミノ酸の違い」（本願において定義される通り。存在し得る位置（単数または複数）11、89、110、または 112 の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかの C 末端延長を考慮しない）（その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/または CDR 内に存在し得るが、好ましくは CDR ではなくフレームワーク内のみ存在する）；

10

を有し、

任意に：

- C 末端延長 (X)_n

を有し、

式中、n は 1 から 10、好ましくは 1 から 5、例えば 1、2、3、4、または 5 であり（好ましくは 1 または 2、例えば 1）；各 X は独立して選ばれる（好ましくは天然に存在する）アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、ロイシン (L)、またはイソロイシン (I) からなる群から選ばれ；

その中の：

- 位置 11 のアミノ酸残基は好ましくは L または V から選ばれ；かつ

20

- 位置 89 のアミノ酸残基は T であり；かつ

- 位置 110 のアミノ酸残基は好ましくは好適に T、K、または Q から選ばれ（好ましくは T である）；かつ

- 位置 112 のアミノ酸残基は好ましくは好適に S、K、または Q から選ばれる（好ましくは S である）。

【0077】

別の好ましい側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し：

- アミノ酸配列 GFTFSTADMG（配列番号 5）である CDR 1（Abm に従う）と；

- アミノ酸配列 RISGIDGTTY（配列番号 6）である CDR 2（Abm に従う）と；

30

- アミノ酸配列 PRYADQWSAYDY（配列番号 4）である CDR 3（Abm に従う）と；

を有し、

- 少なくとも 85%、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 95% という、配列番号 1 のアミノ配列との配列同一性の度合（その中の存在し得るいずれかの C 末端延長および CDR は、配列同一性の度合を決定するために考慮しない）；

および/または

- 配列番号 1 のアミノ酸配列との、7 つ以下の、例えば 5 つ以下の、好ましくは 3 つ以下の、例えば 3 つ、2 つ、または 1 つの「アミノ酸の違い」（本願において定義される通り。存在し得る位置（単数または複数）11、89、110、または 112 の上で一覽化されている変異のいずれかを考慮せず、存在し得るいずれかの C 末端延長を考慮しない）（その中の前記アミノ酸の違いは、存在する場合には、フレームワークおよび/または CDR 内に存在し得るが、好ましくは CDR ではなくフレームワーク内のみ存在する）；

40

を有し、

任意に：

- C 末端延長 (X)_n

を有し、

式中、n は 1 から 10、好ましくは 1 から 5、例えば 1、2、3、4、または 5 であり（好ましくは 1 または 2、例えば 1）；各 X は独立して選ばれる（好ましくは天然に存在

50

する) アミノ酸残基であり、好ましくは独立してアラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、ロイシン (L)、またはイソロイシン (I) からなる群から選ばれ;

その中の:

- 位置 1 1 のアミノ酸残基は V であり; かつ
- 位置 8 9 のアミノ酸残基は L であり; かつ
- 位置 1 1 0 のアミノ酸残基は好ましくは好適に T、K、または Q から選ばれ; かつ
- 位置 1 1 2 のアミノ酸残基は好ましくは好適に S、K、または Q から選ばれる。

【0078】

1つの特定の限定しない側面において、本発明の TNF 結合因子は、次のアミノ酸残基 (すなわち、配列番号 1 の配列と比較しての変異) を言及されている位置に含み (付番は Kabat に従う):

10

- 8 9 L との組み合わせでの 1 1 V ; または
- 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 1 1 V ;
- 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 1 1 V ;
- 8 9 L および 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 1 1 V ; または
- 8 9 L および 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 1 1 V ;

かつ CDR (Abm に従う) を有し、本願に記載される通りである配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0079】

別の特定の限定しない側面において、本発明の TNF 結合因子は、次のアミノ酸残基 (すなわち、配列番号 1 の配列と比較しての変異) を言及されている位置に含み (付番は Kabat に従う):

20

- 1 1 V との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 V および 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q との組み合わせでの 8 9 L ; または
- 1 1 V および 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q との組み合わせでの 8 9 L ;

かつ CDR (Abm に従う) を有し、本願に記載される通りである配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0080】

30

別の特定の限定しない側面において、本発明の TNF 結合因子は、次のアミノ酸残基 (すなわち、配列番号 1 の配列と比較しての変異) を言及されている位置に含み (付番は Kabat に従う):

- 1 1 V との組み合わせでの 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q ; または
- 8 9 L との組み合わせでの 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q ; または
- 1 1 V および 8 9 L との組み合わせでの 1 1 0 K もしくは 1 1 0 Q ;

かつ CDR (Abm に従う) を有し、本願に記載される通りである配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0081】

別の特定の限定しない側面において、本発明の TNF 結合因子は、次のアミノ酸残基 (すなわち、配列番号 1 の配列と比較しての変異) を言及されている位置に含み (付番は Kabat に従う):

40

- 1 1 V との組み合わせでの 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q ; または
- 8 9 L との組み合わせでの 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q ; または
- 1 1 V および 8 9 L との組み合わせでの 1 1 2 K もしくは 1 1 2 Q ;

かつ CDR (Abm に従う) を有し、本願に記載される通りである配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【0082】

別の側面において、本発明の TNF 結合因子は位置 8 9 の T を含み、かつ CDR (Abm に従う) を有し、本願に記載される通りである配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性

50

のある総体的度合を有する。

【 0 0 8 3 】

別の側面において、本発明の T N F 結合因子は位置 1 1 の V および位置 8 9 の L を含み、かつ C D R (A b m に従う) を有し、本願に記載される通りである配列番号 1 のアミノ酸配列との配列同一性のある総体的度合を有する。

【 0 0 8 4 】

言及した通り、上の側面に従う本発明の T N F 結合因子は、好ましくはさらに、それらが S 4 9 A、A 7 4 S、および / または L 7 8 V 変異の好適な組み合わせ、好ましくはこれらの変異のいずれか 2 つの好適な組み合わせ、例えばこれらの変異の 3 つ全てを (再び、T N F 結合因子が一価であるかまたは本発明の化合物もしくはポリペプチドの N 末端に存在するときには、好ましくは E 1 D 変異をもまた) 含有するようになっている。

10

【 0 0 8 5 】

別の特定の限定しない側面において、本発明は、一価の形態である本願に記載される T N F 結合因子に、特に、一価の形態でありかつ本願に記載される位置 1 の D (および / または E 1 D 変異) および C 末端延長 X (n) (例えば C 末端アラニン残基) を有する本願に記載される T N F 結合因子に関する。

【 0 0 8 6 】

別の特定の限定しない側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し、これは、次のアミノ酸配列の 1 つから選ばれるアミノ酸配列であるか、または本質的にそれからなる：配列番号 4 0、配列番号 3 9、配列番号 3 6、配列番号 6 4、配列番号 6 9、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 4 1、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、および配列番号 6 8。

20

【 0 0 8 7 】

別の特定の限定しない側面において、本発明は免疫グロブリン単一可変ドメインに関し、これは、次のアミノ酸配列の 1 つから選ばれるアミノ酸配列であるか、または本質的にそれからなる：配列番号 4 0、配列番号 3 9、配列番号 3 6、配列番号 6 4、配列番号 6 9、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 4 1、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、および配列番号 6 8。

30

【 0 0 8 8 】

本発明の目的のためには、消化管は、口、咽頭、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、および肛門からなる。

【 0 0 8 9 】

本発明の目的のためには、「胃腸管」または「G I 管」は、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、および肛門を包含すると理解される。本願において用いられる用語「胃内消化」は、胃、小腸、および / または大腸における消化を言い表していると理解される。

40

【 0 0 9 0 】

抗体の用語「胃内分解」は、本願においては、胃、小腸、および大腸に存在するエンド型もしくはエキソ型酵素による、または胃内消化の間の酸性条件への暴露による胃、小腸、大腸における本発明の I S V D、化合物、またはポリペプチドの分解を言うために用いられる。

【 0 0 9 1 】

本願において用いられる用語「安定化された I S V D」、「安定化された化合物」、および「安定化されたポリペプチド」は、それぞれ、局所投与されたときの消化管における分解に対してそれをより安定にするように工作された I S V D、化合物、またはポリペプ

50

チドを言い表していると理解される。本発明に従って処理または工作されていない I S V D、化合物、またはポリペプチドと比較して、本発明に従って工作された安定化された I S V D、化合物、またはポリペプチドは、胃内消化、例えば胃、小腸、および大腸に存在するエンド型もしくはエキソ型酵素による消化によって、および/または胃に存在する酸性条件によって、よりゆっくりまたはより少ない程度に分解される。「安定化された I S V D」、「安定化された化合物」、および「安定化されたポリペプチド」は、それぞれ「G I 管における分解に対する向上した安定性を有する I S V D」、「G I 管における分解に対する向上した安定性を有する化合物」、および「G I 管における分解に対する向上した安定性を有するポリペプチド」ともまた言われる。

【0092】

消化管への I S V D、化合物、またはポリペプチドの局所投与は難しい。なぜなら、消化管は局所適用された I S V D、化合物、およびポリペプチドを分解および消化するからである。胃においては、低い pH およびプロテアーゼペプシンが、摂取された I S V D、化合物、およびポリペプチドを分解する。小腸においては、とりわけ酵素トリプシンおよびキモトリプシンが、摂取された I S V D、化合物、およびポリペプチドを分解する。大腸においては、細菌由来のプロテアーゼが、摂取された I S V D、化合物、およびポリペプチドを分解する。胃内消化に対する改善された安定性を有する I S V D、化合物、およびポリペプチドは G I 管への局所適用にとって好ましいであろう。

【0093】

安定化された I S V D、化合物、およびポリペプチドは、胃内分解を受けやすい 1 つ以上のアミノ酸残基から胃内分解に対して耐性であるアミノ酸残基への変異によって生じ得る。安定化された I S V D、化合物、およびポリペプチドは、胃内分解に対する安定性を増大させる複数のアミノ酸残基部分の変異によって生じ得る。

【0094】

ゆえに、本発明は、本発明の T N F 結合因子の安定性を付与し、T N F 結合因子の安定性を向上させるアミノ酸残基を同定することに関する。好ましくは、T N F 結合因子は、低 pH 条件の 1 つ以上、またはペプシン、トリプシン、キモトリプシン、および/もしくは細菌由来プロテアーゼなどのプロテアーゼの 1 つ以上の活性による胃内分解に対してより耐性にされる。

【0095】

ある態様において、本発明は、胃内分解に対する I S V D、化合物、またはポリペプチドの安定性を付与するアミノ酸残基を同定する方法に関し、(a) I S V D、化合物、またはポリペプチドを 1 つ以上のプロテアーゼによって断片に分解するステップと；(b) ステップ (a) の断片を例えば L C - M S などの好適な手段によって分析するステップとを含み；それによって、胃内分解に対する I S V D、化合物、またはポリペプチドの安定性を付与するアミノ酸残基 (単数または複数) を同定する。

【0096】

ある態様において、本発明は、胃内分解に対する I S V D、化合物、またはポリペプチドの安定性を向上させる方法に関し、上のステップ (a) および (b)、次に：(c) 胃内分解に対する I S V D、化合物、またはポリペプチドの安定性を付与するアミノ酸残基 (単数または複数) を変異させることと；(d) 上のステップ (a) および (b) を繰り返すこととを含み；それによって、1 つ以上の断片の不在は、胃内分解に対する I S V D、化合物、またはポリペプチドの向上した安定性を指示する。

【0097】

本明細書において：

- 用語「免疫グロブリン単一可変ドメイン」(「I S V」または「I S V D」ともまた言われる)は、一般的に、別の可変ドメインとの相互作用なしに(例えば、従来の 4 鎖モノクローナル抗体の V H および V L ドメインの間に要求される V H / V L 相互作用なしに)機能的な抗原結合部位を形成し得る免疫グロブリン可変ドメイン(これは、V H、V H H、または V L ドメインを包含する重鎖または軽鎖ドメインであり得る)を言うために

10

20

30

40

50

用いられる。I S V Dの例は当業者には明瞭であろう。例えば、ナノボディ（V H H、ヒト化V H H、および/またはラクダ化V H、例えばラクダ化ヒトV Hを包含する）、I g N A Rドメイン、V HドメインであるかまたはV Hドメインに由来する（単ドメイン）抗体（例えばd A b（商標））、ならびにV LドメインであるかまたはV Lドメインに由来する（単ドメイン）抗体（例えばd A b（商標））を包含する。本願において明白に別様に言及されない限り、重鎖可変ドメイン（例えばV HまたはV H Hドメイン）に基づくおよび/または由来するI S V Dが一般的に好ましい。最も好ましくは、本願において明白に別様に指示されない限り、I S V Dはナノボディである。

- 用語「ナノボディ」は、一般的には、W O 2 0 0 8 / 0 2 0 0 7 9またはW O 2 0 0 9 / 1 3 8 5 1 9において定義されている通りであり、それゆえに特定の側面において、一般的には、V H H、ヒト化V H H、もしくはラクダ化V H（例えばラクダ化ヒトV H）、または一般的には（例えば、化学的安定性および/または可溶性、公知のヒトフレームワーク領域との最大のオーバーラップ、ならびに最大の発現のために最適化されたなどの）配列最適化されたV H Hを意味する。用語ナノボディ（単数または複数）はAblynx N.V.の登録商標であり、それゆえにナノボディ（登録商標）（単数および/または複数）ともまた言われ得るということが注意される）；

- 一般的に、本願において別様に指示されない限り、本願において参照されるI S V D、ナノボディ、ポリペプチド、蛋白質、ならびに他の化合物および構築物は、人において（および/または任意に温血動物、特に哺乳動物においてもまた）疾患または障害の予防または処置への使用を意図される。それゆえに、一般的に、本願に記載されるI S V D、ナノボディ、ポリペプチド、蛋白質、ならびに他の化合物および構築物は、好ましくは、それらが、（生物学的）薬または他の医薬的にもしくは治療上活性な化合物、および/あるいは医薬製品または組成物として用いられ得、および/または好適にその一部であり得るようになってきている。かかる薬、化合物、または製品は、好ましくは、人間への投与にとって、例えばかかる予防または処置の必要がある対象の予防または処置にとって、または例えば治験の一部として好適であるようになってきている。本願にさらに記載されるように、この目的のためには、かかる薬または化合物は、本発明によって提供されるI S V D以外に他の部分、実体、または結合ユニットを含有し得る（これは、また本願に記載されるように、例えば1つ以上の他のさらなる治療薬部分、および/またはI S V Dに基づくもしくはナノボディに基づく生物学的薬の薬物動態もしくは薬力学特性、例えばその半減期に影響する1つ以上の他の部分であり得る）。かかるさらなる治療薬または他の部分の好適な例は、当業者には明瞭であろう。例えば、一般的に、いずれかの治療活性蛋白質、ポリペプチド、または他の結合ドメインもしくは結合ユニット、および例えば修飾、例えばW O 2 0 0 9 / 1 3 8 1 5 9の1 4 9から1 5 2頁に記載されているものを包含し得る。I S V Dに基づく生物学的薬またはナノボディに基づく生物学的薬は、好ましくは治療薬であるか、または治療薬としての使用を意図され（これは、予防薬および診断薬を包含する）、この目的のためには、好ましくは、治療上意味のある標的（例えば、R A N K - L、v W F、I g E、R S V、C X C R 4、I L - 2 3、または他のインターロイキンなど）に対する少なくとも1つのI S V Dを含有する。かかるI S V Dに基づくまたはナノボディに基づく生物学的薬のいくつかの特定の限定しない例については、例8から1 8、また、例えば（例えば、限定なしにW O 2 0 0 4 / 0 6 2 5 5 1、W O 2 0 0 6 / 1 2 2 8 2 5、W O 2 0 0 8 / 0 2 0 0 7 9、およびW O 2 0 0 9 / 0 6 8 6 2 7などの）Ablynx N.V.による種々の出願、ならびに例えば（限定なしに）W O 2 0 0 6 / 0 3 8 0 2 7、W O 2 0 0 6 / 0 5 9 1 0 8、W O 2 0 0 7 / 0 6 3 3 0 8、W O 2 0 0 7 / 0 6 3 3 1 1、W O 2 0 0 7 / 0 6 6 0 1 6、およびW O 2 0 0 7 / 0 8 5 8 1 4などの出願の参照がされる。また、本願にさらに記載されるように、さらなる部分は、（ヒト）血清アルブミンなどの（ヒト）血清蛋白質を目標とする本願に記載されるI S V Dまたはナノボディであり得、かかるI S V Dまたはナノボディもまた、特に本願に記載されるT N F結合因子の半減期を延長する際のおよび/またはそのための治療使用を見出し得る。例えばW O 2 0 0 4 / 0 4 1 8 6 5、W O 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 7、およびW O 2 0 1 2 / 1 7 5 4 0

10

20

30

40

50

0の参照がされ、これらは、半減期延長のための血清アルブミン結合性ナノボディの使用を一般的に記載している。また、本明細書においては、本願において明白に別様に言及されない限り、本願において言及される全ての用語は、WO 2009/138519（もしくはWO 2009/138519に引用されている従来技術）またはWO 2008/020079（もしくはWO 2008/020079に引用されている従来技術）において与えられている意味を有する。また、方法または技術が具体的に本願に記載されていないところでは、それはWO 2009/138519（もしくはWO 2009/138519に引用されている従来技術）またはWO 2008/020079（もしくはWO 2008/020079に引用されている従来技術）に記載されているように実施され得る。また、本願に記載される通り、本発明のいずれかのISVDまたは化合物を含むいずれかの医薬製品または組成物は、医薬製品もしくは組成物への使用のための自体公知の1つ以上のさらなる組成物（すなわち、意図される医薬形態に依存する）および/または例えば治療使用を意図される1つ以上の他の化合物もしくは活性成分（すなわち、組み合わせの製品を提供する）をもまた含み得る。

10

【0098】

また、本明細書または請求項に用いられるときに、次の用語は、WO 2009/138519の62～75頁において与えられているものと同じ意味を有し、および/または当てはまるどころではそれに記載されている様式で決定され得る：「アゴニスト」、「アンタゴニスト」、「インバースアゴニスト」、「非極性非荷電アミノ酸残基」、「極性非荷電アミノ酸残基」、「極性荷電アミノ酸残基」、「配列同一性」、「厳密に同じ」、および「アミノ酸の違い」（2つのアミノ酸配列の配列比較を言うとき）、「本質的に単離された（形態）（で）」、「ドメイン」、「結合ドメイン」、「抗原決定基」、「エピトープ」、（抗原）「に対する」または「を目標とする」、「特異性」、および「半減期」。加えて、用語「調節すること」および「調節する」、「相互作用部位」、「に特異的」、「交差ブロッキングする」、「交差ブロッキングされる」、および「交差ブロッキング」、ならびに「本質的にpHに非依存的」は、Ablynx N.V.のWO 2010/130832の74～79頁において定義されている通りである（および/またはそれに記載されているように決定され得る）。また、本発明の構築物、化合物、蛋白質、またはポリペプチドを言うときに、「一価」、「二価」（または「多価」）、「二重特異性」（または「多重特異性」）、および「二重パラトープ型」（または「多重パラトープ型」）のような用語は、WO 2009/138519、WO 2010/130832、またはWO 2008/020079において与えられている意味を有し得る。

20

30

【0099】

本願において言及されるISVD、ナノボディ、ISVDに基づく生物学的薬、ナノボディに基づく生物学的薬、またはいずれかの他のアミノ酸配列、化合物、もしくはポリペプチドとの関係においてここで用いられる用語「半減期」は、一般的には、WO 2008/020079の57頁のパラグラフo)に記載されているように定義され得、そこにおいて言及されている通り、例えば天然のメカニズムによる配列もしくは化合物の分解および/または配列もしくは化合物のクリアランスもしくは隔離を原因として、アミノ酸配列、化合物、またはポリペプチドの血清中濃度がインビボにおいて50%低減されるために取られる時間を言う。本発明のアミノ酸配列、化合物、またはポリペプチドのインビボ半減期は、自体公知のいずれかの様式で、例えば薬物動態分析によって決定され得る。好適な技術は当業者には明瞭であろう。例えば、一般的には、WO 2008/020079の57頁のパラグラフo)に記載されている通りであり得る。また、WO 2008/020079の57頁のパラグラフo)において言及されている通り、半減期は $t_{1/2}$ アルファ、 $t_{1/2}$ ベータ、および曲線下面積(AUC)などのパラメータを用いて表現され得る。これに関して、本願において用いられる用語「半減期」は、具体的には $t_{1/2}$ ベータまたは消失半減期を言うということに注意すべきである（その中で、 $t_{1/2}$ アルファおよび/もしくはAUCまたは両方は考慮に入れずにおき得る）。例えば、下の実験の部、ならびに標準的なハンドブック、例えばKenneth, A et al., Chemical Stability of P

40

50

harmaceuticals: A Handbook for PharmacistsおよびPeters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)の参照がされる。"Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982)の参照もまたされる。類似に、用語「半減期の増大」または「増大した半減期」もまたWO 2008/020079の57頁のパラグラフo)において定義されている通りであり、具体的には $t_{1/2}$ ベータの増大を言い、 $t_{1/2}$ アルファおよび/もしくはAUCまたは両方の増大ありまたはなしどちらかである。

【0100】

従って、ある側面において、本発明は本願に記載される化合物に関し、前記化合物がさらに血清蛋白質結合性部分を含む。

【0101】

さらなる側面において、本発明は本願に記載される化合物に関し、前記血清蛋白質結合性部分が血清アルブミンに結合する。

【0102】

用語が本願において具体的に定義されていないときには、それは当分野におけるその通常の意味を有し、これは当業者には明瞭であろう。例えば、標準的なハンドブック、例えばSambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd. Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); およびJaneway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005)、ならびに本願において引用される一般的な背景技術の参照がされる。

【0103】

また、すでに本願において指示されている通り、ナノボディのアミノ酸残基は、Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)によって与えられているVHの一般的な付番に従って付番され、Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195の記事においてラクダからのVHHドメインに適用; または本願において参照される通りである。この付番に従って、ナノボディのFR1は位置1~30のアミノ酸残基を含み、ナノボディのCDR1は位置31~35のアミノ酸残基を含み、ナノボディのFR2は位置36~49のアミノ酸残基を含み、ナノボディのCDR2は位置50~65のアミノ酸残基を含み、ナノボディのFR3は位置66~94のアミノ酸残基を含み、ナノボディのCDR3は位置95~102のアミノ酸残基を含み、ナノボディのFR4は位置103~113のアミノ酸残基を含む。[これに関しては、VHドメインおよびVHHドメインについて当分野において周知である通り、CDRのそれぞれのアミノ酸残基の総数は様々であり得、Kabat付番によって指示されるアミノ酸残基の総数に対応せずであり得るということに注意すべきである(すなわち、Kabat付番に従う1つ以上の位置は、実際の配列中では占有されずであり得、または実際の配列は、Kabat付番によって許される数よりも多くのアミノ酸残基を含有し得る)。これは、一般的に、Kabatに従う付番が、実際の配列中のアミノ酸残基の実際の付番に対応し得、または対応せずであり得るということの意味している。しかしながら、一般的には、Kabatの付番に従って、CDR中のアミノ酸残基の数にかかわらず、Kabat付番に従う位置1はFR1の始めに対応し、逆もまた同様であり、Kabat付番に従う位置36はFR2の始めに対応し、逆もまた同様であり、Kabat付番に従う位置66はFR3の始めに対応し、逆もまた同様であり、Kabat付番に従う位置103はFR4の始めに対応し、逆もまた同様であ

10

20

30

40

50

ると言い得る。]。

【 0 1 0 4 】

V H ドメインのアミノ酸残基に付番するための代替的な方法は、Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)) によって記載されている方法、いわゆる「AbM定義」、およびいわゆる「コンタクト定義」であり、これらの方法は、似た様式でラクダからのV H H ドメインおよびナノボディにもまた適用され得る。しかしながら、本明細書、側面、および図においては、別様に指示されない限り、Riechmann and MuyldermansによってV H H ドメインに適用されているKabatに従う付番が遵行される。

【 0 1 0 5 】

図、いずれかの配列一覧、および実験の部 / 例は本発明をさらに例解するためにのみ与えられており、本願において明白に別様に指示されない限り、本発明および / または添付の請求項の範囲をいずれかのやり方で限定すると解釈または理解されるべきではないということにもまた注意すべきである。

10

【 0 1 0 6 】

本発明は、本願に記載される本発明のT N F 結合因子を含むかまたは本質的にそれからなる（すなわち、かかるT N F 結合因子の1つ以上、例えば1つ、2つ、または3つのかかるT N F 結合因子を含むかまたは本質的にそれからなる）蛋白質、ポリペプチド、および他の構築物、分子、または化学的実体と；本発明のT N F 結合因子を発現 / 産生するためのならびに / またはそれを含む蛋白質、ポリペプチド、および他の構築物、分子、もしくは化学的実体を発現 / 産生するための方法と；本発明のT N F 結合因子ならびに / またはそれを含む蛋白質、ポリペプチド、および他の構築物、分子、もしくは化学的実体を含む組成物および製品（例えば、医薬組成物および製品）と；本発明のT N F 結合因子をコードおよび / またはそれを含む蛋白質もしくはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および核酸と；本発明のT N F 結合因子、ならびにそれを含む蛋白質、ポリペプチド、および他の構築物、分子、または化学的実体の使用（特に治療、予防、ならびに診断使用）ともまた関する。

20

【 0 1 0 7 】

本発明のこれらおよび他の側面、態様、利点、適用、および使用は、本願におけるさらなる記載から明瞭になるであろう。

【 0 1 0 8 】

従って、さらなる側面において、本発明は、少なくとも1つの（例えば、1つ、2つ、または3つの）本発明のT N F 結合因子を含むかまたは本質的にそれからなる蛋白質（例えば、融合蛋白質）、ポリペプチド、構築物、化合物、または他の化学的実体に関する（まとめて、本願においては「本発明の化合物」、「本発明のポリペプチド」、「本発明の構築物」、または「本発明の融合蛋白質」ともまた言われる）。ゆえに、本発明の化合物はポリペプチドであり得る。

30

【 0 1 0 9 】

本発明のかかる化合物は、本発明の1つ以上のT N F 結合因子以外に、さらに1つ以上の他のアミノ酸配列、化学的実体、または部分を含有し得る。それらの他のアミノ酸配列、化学的実体、または部分は、1つ以上の所望の特性を本発明の（もたらされる）化合物に授け得、および / または本発明の（もたらされる）化合物の特性を所望の様式で変改し得て、例えば、本発明の（もたらされる）化合物に所望の生物学的および / または治療活性を提供し（例えば、本発明のもたらされる化合物に、別の治療上意味のある標的に対する親和性および好ましくは力価を提供し、その結果、もたらされる化合物がT N F およびその他の治療上意味のある標的に関して「二重特異性」になる）、所望の半減期を提供し、ならびに / または薬物動態および / もしくは薬力学特性を（別様に）改変もしくは改善して、本発明の化合物を特定の細胞、組織、もしくは臓器（癌細胞および癌組織を包含する）にターゲティングし、細胞傷害効果を提供し、および / または検出可能なタグもしくは標識として働く。かかる他のアミノ酸配列、化学的実体、または部分のいくつかの限定しない例は：

40

50

- 1つ以上の好適なリンカー（例えば、9GS、15GS、もしくは35GSリンカー）；ならびに/または
 - TNF以外の治療上意味のある標的を目標とする1つ以上の結合ドメインもしくは結合ユニット（すなわち、TNFおよび別の治療上意味のある標的両方について二重特異性である本発明の化合物を提供するため）；ならびに/または
 - 半減期の増大を提供する1つ以上の結合ドメインもしくは結合ユニット（例えば、血清アルブミンなどの血清蛋白質に対して結合し得る結合ドメインもしくは結合ユニット）；ならびに/または
 - 本発明の化合物を所望の細胞、組織、もしくは臓器（例えば癌細胞）にターゲティングする1つ以上の結合ドメインもしくは結合ユニット；ならびに/または
 - TNFに対する増大した特異性を提供する1つ以上の結合ドメインもしくは結合ユニット（通常は、それらはTNFに結合する能力があるであろうが、一般的には、それら自体では本質的にTNFに対して機能的ではないであろう）；ならびに/または
 - 本発明の化合物が（所望の）細胞内に内在化されることを許す結合ドメイン、結合ユニット、もしくは他の化学的実体（例えば、WO2005/044858に記載されている内在化抗EGFRナノボディ）；ならびに/または
 - 半減期を改善する部分、例えば好適なポリエチレングリコール基（すなわちPEG化）、もしくは増大した半減期を提供するアミノ酸配列、例えばヒト血清アルブミンもしくはその好適な断片（すなわちアルブミン融合体）、もしくは例えばWO2008/068280に記載されている血清アルブミン結合性ペプチド；ならびに/または
 - 細胞傷害性ペイロードなどのペイロード；ならびに/または
 - 検出可能な標識もしくはタグ、例えば放射性標識もしくは蛍光標識；ならびに/または
 - 本発明の化合物の固定化、検出、および/もしくは精製を助け得るタグ、例えばHISもしくはFLAG3タグ；ならびに/または
 - 官能化され得るタグ、例えばC末端GGCもしくはGGGCタグ；ならびに/または
 - 本発明のTNF結合因子についてさらに本願に記載される通りおよび/またはWO2012/175741もしくはWO2015/173325に記載される通りであり得る、C末端延長X(n)、

10

20

である。

30

【0110】

通常はより好ましくないが、本発明の化合物が（好ましくはヒトの）従来の抗体の1つ以上の一部もしくは断片（例えば、Fc部もしくはその機能的な断片、または1つ以上の定常ドメイン）および/またはラクダ重鎖のみの抗体の1つ以上の一部もしくは断片（例えば、1つ以上の定常ドメイン）をもまた含有し得るということもまた本発明の範囲から除外されない。

【0111】

ある具体的な側面において、本発明は構築物に関し、これが、本願において定義されるISVDまたは本願において定義される化合物を含むかまたは本質的にそれからなり、かつ任意に1つ以上のペプチド性リンカーによって連結される1つ以上の他の基、残基、部分、または結合ユニットをさらに含む。

40

【0112】

さらなる具体的な側面において、本発明は本願において定義される構築物に関し、その中の前記1つ以上の他の基、残基、部分、または結合ユニットは、ポリエチレングリコール分子、血清蛋白質またはその断片、血清蛋白質に結合し得る結合ユニット、Fc部分、および血清蛋白質に結合し得る小型の蛋白質またはペプチドからなる群から選ばれる。

【0113】

本発明の化合物が、1つ以上のさらなる結合ドメインまたは結合ユニット（例えば、TNFに対する増大した特異性を提供するTNFに対するさらなる本質的に非機能的な結合ドメインまたは結合ユニット、TNF以外の治療標的に対する結合ドメインまたは結合ユ

50

ニット、増大した半減期を提供するヒト血清アルブミンなどの標的に対する結合ドメインまたは結合ユニット、ならびに／あるいは本発明の化合物を特定の細胞、組織、もしくは臓器にターゲティングするおよび／または本発明の化合物が細胞内に内在化されることを許す結合ドメインまたは結合ユニット)を含有するときに、これらの他の結合ドメインまたは結合ユニットは、好ましくは1つ以上のISVDを含み、より好ましくは全てISVDである。例えば、限定なしに、これらの1つ以上のさらなる結合ドメインまたは結合ユニットは、1つ以上のナノボディ(VHH、ヒト化VHH、および／またはラクダ化VH、例えばラクダ化ヒトVHを包含する)、VHドメインであるかまたはVHドメインに由来する(単一ドメイン)抗体、VHドメインであるかもしくは本質的にそれからなるかまたはVHドメインに由来するdAb、あるいはさらにはVLドメインであるかまたは本質的にそれからなる(単一)ドメイン抗体またはdAbであり得る。特に、これらの1つ以上の結合ドメインまたは結合ユニットは、存在するときには、1つ以上のナノボディを含み得、より具体的には全てナノボディである。

10

【0114】

本発明の化合物がそのC末端にISVDを有するときに(このC末端ISVDは本発明のTNF結合因子であり得るか、あるいは例えば本発明の化合物に存在する場合には、TNFに対する増大した特異性を提供するTNFに対するさらなる本質的に非機能的なISVD、TNF以外の治療標的に対するISVD、増大した半減期を提供するヒト血清アルブミンなどの標的に対するISVD、あるいは本発明の化合物を特定の細胞、組織、もしくは臓器にターゲティングするおよび／または本発明の化合物が細胞内に内在化されることを許すISVDであり得る)、本発明の化合物(すなわち、前記C末端ISVD)は、好ましくはC末端延長X(n)を有し、このC末端延長は、本発明のTNF結合因子について本願に記載される通りおよび／またはWO2012/175741もしくはWO2015/173325に記載される通りであり得る。

20

【0115】

本発明の化合物が本発明の1つ以上のTNF結合因子に加えていずれかのさらなるISVDを含有するときに(この1つ以上のさらなるISVDは、言及した通り、TNFに対する増大した特異性を提供するTNFに対するさらなる本質的に非機能的なISVD、TNF以外の治療標的に対するISVD、増大した半減期を提供するヒト血清アルブミンなどの標的に対するISVD、ならびに／あるいは本発明の化合物を特定の細胞、組織、もしくは臓器にターゲティングするおよび／または本発明の化合物が細胞内に内在化されることを許すISVDであり得る)、かかるさらなるISVDがナノボディであるか、またはVH配列である、本質的にそれからなる、および／もしくはそれに由来するISVDであるところでは、本発明の好ましい側面に従って、本発明の化合物に存在する前記1つ以上の(好ましくは全ての)さらなるISVDは、それらの配列中に、既存抗体による結合を低減する1つ以上のフレームワーク変異を含有するであろう。特に、本発明のこの側面に従うと、かかるさらなるISVDは位置11、89、110、および／または112のアミノ酸残基／変異(の好適な組み合わせ)を含有し得、それらはWO2015/173325に記載される通りであり、および／またはそれらは本質的に本発明のTNF結合因子について本願に記載される通りである。1つの特定の側面において、本発明の化合物がそのC末端にかかるISVDを有する(すなわち、そのC末端に本発明のTNF結合因子を有さない)ときに、C末端に存在および／またはそれを形成する少なくとも前記ISVDは、既存抗体による結合を低減するかかるフレームワーク変異を有する(前記C末端ISVDは、好ましくは本願に記載されるC末端延長X(n)をもまた有するであろう)。

30

40

【0116】

言及した通り、本発明の化合物が増大した半減期(すなわち、本発明の一価TNF結合因子と比較して)を有すべきときには、本発明の化合物は、好ましくは、かかる増大した半減期を提供する少なくとも1つの(例えば1つの)ISVD(特にナノボディ)を含有する。かかるISVDは、通常は、好適な血清蛋白質、例えばトランスフェリン、特に(ヒト)血清アルブミンを目標とするであろう。具体的には、かかるISVDまたはナノボ

50

ディは、例えばEP 2 1 3 9 9 1 8、WO 2 0 1 1 / 0 0 6 9 1 5、WO 2 0 1 2 / 1 7 5 4 0 0、WO 2 0 1 4 / 1 1 1 5 5 0に記載されているヒト血清アルブミンに対する(単一)ドメイン抗体またはdAbであり得、特に、WO 2 0 0 4 / 0 4 1 8 6 5、WO 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 7、WO 2 0 1 2 / 1 7 5 4 0 0、またはWO 2 0 1 5 / 1 7 3 3 2 5に記載されている血清アルブミン結合性ナノボディであり得る。特に好ましい血清アルブミン結合性ISVDは、ナノボディAlb-1(WO 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 7を見よ)またはそのヒト化バリエーション、例えばAlb-8(WO 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 7、配列番号62)、Alb-23(WO 2 0 1 2 / 1 7 5 4 0 0、配列番号1)、およびAlb-1の他のヒト化(また、好ましくは配列最適化)バリエーション、および/またはAlb-8もしくはAlb-23のバリエーション(または、より一般的には、Alb-1、Alb-8、およびAlb-23と本質的に同じCDRを有するISVD)である。

10

【0117】

再び、言及した通り、かかる血清アルブミン結合性ISVDは、存在するときには、その配列中に、既存抗体による結合を低減する1つ以上のフレームワーク変異を含有し得る。特に、かかる血清アルブミン結合性ISVDが、本質的にVHドメインからなるおよび/またはそれに由来するナノボディまたは(単一)ドメイン抗体であるときに、血清アルブミン結合性ISVDは位置11、89、110、および/または112のアミノ酸残基/変異(の好適な組み合わせ)を含有し得、それらはWO 2 0 1 5 / 1 7 3 3 2 5に記載されている通りであり、および/またはそれらは本発明のTNF結合因子について本願に記載される通りである。例えば、WO 2 0 1 5 / 1 7 3 3 2 5は、既存抗体による結合を低減する位置11、89、110、および/または112のアミノ酸残基/変異を含有するAlb-1、Alb-8、およびAlb-23のいくつものバリエーションに記載しており、それらは本発明の化合物に用いられ得る。

20

【0118】

本発明のある具体的な限定しない側面において、本発明は、TNFに結合する1つ以上のビルディングブロック、例えばISVD以外に、本願に記載されるように好ましくはヒト血清アルブミンに結合する血清アルブミン結合性ISVDなどの血清アルブミンに結合する少なくとも1つのビルディングブロックを含む本発明の化合物、例えば本発明のポリペプチドを提供し、前記血清アルブミン結合性ISVDは、本質的に4つのフレームワーク領域(それぞれFR1からFR4)および3つの相補性決定領域(それぞれCDR1からCDR3)からなり、その中のCDR1はSFGMSであり、CDR2はSISGSGSDTLYADSVKKGであり、CDR3はGGSLSRである。好ましくは、ヒト血清アルブミンに結合する前記ISVDは、Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG、Alb92、またはAlb223からなる群から選ばれる(cf.表D)。

30

【0119】

再び、かかる血清アルブミン結合性ISVDが本発明の化合物のC末端に存在するときには、血清アルブミン結合性ISVD(および結果として本発明の化合物)は好ましくはC末端延長X(n)を有し、このC末端延長は、本願において本発明のTNF結合因子について記載されている通りおよび/またはWO 2 0 1 2 / 1 7 5 7 4 1もしくはWO 2 0 1 5 / 1 7 3 3 2 5に記載されている通りであり得る。これは、好ましくは、WO 2 0 1 5 / 1 7 3 3 2 5に記載されている位置11、89、110、および/または112のアミノ酸残基/変異(の好適な組み合わせ)のような、既存抗体による結合を低減する変異をもまた有する。

40

【0120】

しかしながら、言及した通り、本発明の化合物の半減期を増大させる他の手段(例えばPEG化、ヒトアルブミンもしくはその好適な断片との融合、または好適な血清アルブミン結合性ペプチドの使用)もまた、より好ましくはないが、本発明の範囲に包含される。

【0121】

50

従って、ある態様において、本発明は本願に記載される化合物に関し、前記血清蛋白質結合性部分が抗体に基づかないポリペプチドである。

【0122】

さらなる態様において、本発明は、さらにPEGを含む本願に記載される化合物に関する。

【0123】

一般的には、本発明の化合物が増大した半減期を有するときに（例えば、半減期増大性のISVDの存在、または半減期を増大させるいずれかの他の好適なやり方による）、本発明のもたらされる化合物は、好ましくは、本発明の一価TNF結合因子の半減期よりも少なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍、例えば少なくとも10倍、または20倍超長い半減期（本願において定義される通り）を有する（ヒトおよび/または好適な動物モデルどちらか、例えばマウスもしくはカニクイザルにおいて測定される）。具体的には、本発明の化合物は、好ましくは、少なくとも1日、好ましくは少なくとも3日、より好ましくは少なくとも7日、例えば少なくとも10日というヒト対象における半減期（本願において定義される通り）を有する。

10

【0124】

1つ以上のISVDに基づく本発明の化合物が異なる「フォーマット」を有し得、例えば本質的に一価、二価、または三価であり得、単一特異性、二重特異性、三重特異性などであり得、二重パラトープ型であり得るということは本願の開示から明瞭であろう（本願および例えばWO2009/068625において定義される通り）。例えば、本発明の化合物は：

20

- （本質的に）一価であり得、すなわち（本質的に）本発明の単一のTNF結合因子を含む。言及した通り、一価の形態で用いられるときに、本発明のTNF結合因子は、好ましくは本願にさらに記載されるC末端延長X(n)を有する。本発明のかかる化合物もまた半減期延長され得る；

- （本質的に）二価または三価で単一特異性であり得る。本発明のかかる化合物は、TNFに対する2つ以上のISVDを含むであろう。それらは同じかまたは異なり得、異なるときには、TNF上の同じエピトープまたはTNF上の異なるエピトープを目標とし得る（後者のケースにおいては、本発明の二重パラトープ型または多重パラトープ型化合物を提供するため）。本発明のかかる化合物もまた半減期延長され得る；

30

- （本質的に）二価、三価（または多価）で二重特異性または三重特異性（または多重特異性）であり得る。本発明のかかる化合物は、TNFおよび少なくとも1つの他の標的を目標とするであろう。本願に記載されるように、前記他の標的は、例えば、TNFおよび前記他の治療標的に関して二重特異性である本発明の化合物を提供するために、別の治療上意味のある標的（すなわち、TNF以外）であり得る。前記他の標的は、増大した半減期を有する本発明の化合物を提供するために、増大した半減期を提供する標的（例えばヒト血清アルブミン）でもまたあり得る。また本願において言及されるように、かかる他の標的は、本発明の化合物が特定の細胞、組織、もしくは臓器にターゲティングされることをもまた許し得、または本発明の化合物が細胞内に内在化されることを許し得る。これらのアプローチ/ISVDを組み合わせると、例えば、TNFおよび少なくとも1つの他の治療上意味のある標的について二重特異性でありかつ半減期延長された本発明の化合物を提供することもまた可能である。

40

【0125】

再び、好ましくは、本発明のこれらの化合物が、本発明の少なくとも1つのTNF結合因子以外の1つ以上のISVDを含有するときに、それらの他のISVDの少なくとも1つ、好ましくは全ては、その配列中に、既存抗体による結合を低減する1つ以上のフレームワーク変異を含有するであろう（例えば、具体的には、本発明のTNF結合因子について本願に記載されている通りおよび/または一般的にWO2015/173325に記載されている通りである位置11、89、110、および/または112のアミノ酸残基/変異の組み合わせ）。また、本発明のかかる化合物がそれらのC末端に本発明のTNF結

50

合因子を有するときに、前記C末端TNF結合因子（および結果として本発明の化合物）は、好ましくは本願に記載されるC末端延長X（n）を有するであろう。類似に、本発明のかかる化合物がそれらのC末端に別のISVD（すなわち、本発明のTNF結合因子ではなく、例えば半減期延長性のISVD）を有するときに、前記C末端ISVD（および結果として本発明の化合物）は、好ましくは本願に記載されるC末端延長X（n）を有し、および/またはその配列中に、既存抗体による結合を低減する1つ以上のフレームワーク変異を含有するであろう（再び、さらに本願およびWO 2015/173325に記載される通り）。

【0126】

当業者には明瞭であろう通り、本発明の化合物が（例えば皮膚もしくは目への）局所使用を意図されるか、または例えば、例えばGI管のどこかで（胃腸；例えば、経口投与、または座薬による投与後）もしくは肺において（例えば、吸入による投与後）（局所的な）治療作用を有することを意味されるか、またはその意図される作用箇所に（例えば直接注射によって）直接的に適用されることを別様に意味されるときには、本発明の化合物は通常は半減期延長を要求しないであろう。また、ある種の急性状態または適応症の処置のためには、長くなった半減期を有さないことが好ましくあり得る。これらのケースにおいて、半減期延長なしの本発明の一価化合物または本発明の化合物（TNF結合因子を含む）（例えば、TNFに関して二価または二重パラトープ型である本発明の化合物）の使用が好ましい。

【0127】

本発明のかかる化合物のいくつかの好ましい限定しない例が下の表C-1に概略的に表されており、それらのそれぞれは本発明のさらなる側面を形成する。半減期延長なしの本発明の好適な化合物の他の例は、本願の開示に基づいて当業者には明瞭であろう。

【0128】

当業者には明瞭であろう通り、本発明の化合物が全身投与をならびに/または慢性疾患もしくは障害の防止および/もしくは処置を意図されるときには、本発明の前記化合物は、すなわち本発明のかかる化合物に存在するTNF結合因子（単数または複数）と比較して、増大した半減期（本願において定義される通り）を有することが通常は好ましいであろう。より好ましくは、本発明のかかる化合物は、半減期延長性のISVD、例えば好ましくはヒト血清アルブミンに結合するISVD、特にナノボディを含有するであろう（本願において定義される通り）。

【0129】

本発明のかかる化合物のいくつかの好ましい限定しない例が下の表C-2に概略的に表されており、これらのそれぞれは本発明のさらなる側面を形成する。半減期延長を有する本発明の好適な化合物の他の例は、本願の開示に基づいて当業者には明瞭であろう。一般的に、半減期延長を有する本発明の化合物では、C末端延長の存在が大いに好ましい。

【0130】

免疫グロブリン単一可変ドメインは、本発明のポリペプチドなどの化合物の調製のための「ビルディングブロック」として用いられ得、これは、TNF上の同じもしくは別のエピトープに対するおよび/またはTNF以外の1つ以上の抗原、蛋白質、もしくは標的に対する1つ以上のさらなる「ビルディングブロック」、例えばISVD、例えば治療作用機序を有するビルディングブロックを任意に含有し得る。

【0131】

一般的に、単一のビルディングブロック、単一の免疫グロブリン単一可変ドメイン、または単一のナノボディを含むかまたは本質的にそれからなる化合物、ポリペプチド、または構築物は、本願においてはそれぞれ「一価」化合物または「一価」ポリペプチドまたは「一価構築物」と言われる。（例えばISVDなどの）2つ以上のビルディングブロックまたは結合ユニットを含む化合物、ポリペプチド、または構築物は、本願においては「多価」化合物、ポリペプチド、構築物ともまた言われ、かかる化合物、ポリペプチド、または構築物に存在するビルディングブロック/ISVDは、本願においては「多価フォーマ

10

20

30

40

50

ット」であるともまた言われる。例えば、「二価」化合物またはポリペプチドは、任意にリンカー配列によって連結される2つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得、その一方で、「三価」化合物またはポリペプチドは、任意に2つのリンカー配列によって連結される3つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得る；その一方で、「四価」化合物またはポリペプチドは、任意に3つのリンカー配列によって連結される4つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得る、などである。

【0132】

多価化合物、ポリペプチド、または構築物において、2つ以上のISVD、例えばナノボディ同士は同じかまたは異なり得、同じ抗原または抗原決定基（例えば、同じ一部（単数もしくは複数）もしくはエピトープ（単数もしくは複数）、または異なる一部もしくはエピトープ）を目標とし得、あるいは代替的には異なる抗原または抗原決定基を目標とし得；あるいはそのいずれかの好適な組み合わせである。少なくとも1つのビルディングブロックが第1の抗原（すなわちTNF）を目標としかつ少なくとも1つのビルディングブロックが第2の抗原（すなわちTNFとは異なる）を目標とする、（例えばISVDなどの）少なくとも2つのビルディングブロックを含有する化合物、ポリペプチド、または構築物は、それぞれ「多重特異性」化合物、ポリペプチド、または構築物ともまた言われ、かかる化合物、ポリペプチド、または構築物に存在する（例えばISVDなどの）ビルディングブロックは、本願においては「多重特異性フォーマット」であるともまた言われる。それゆえに、例えば、本発明の「二重特異性」化合物またはポリペプチドは、第1の抗原（すなわちTNF）を目標とする少なくとも1つのISVDと第2の抗原（すなわち、TNFとは異なる）を目標とする少なくとも1つのさらなるISVDとを含む化合物またはポリペプチドであり、その一方で、本発明の「三重特異性」化合物またはポリペプチドは、第1の抗原（すなわちTNF）を目標とする少なくとも1つのISVDと第2の抗原（すなわちTNFとは異なる）を目標とする少なくとも1つのさらなるISVDと第3の抗原（すなわち、TNFおよび第2の抗原両方とは異なる）を目標とする少なくとも1つのさらなるISVDとを含む化合物またはポリペプチドである；などである。

【0133】

例えば「二重パラトープ型」化合物、ポリペプチド、もしくは構築物、または「三重パラトープ型」化合物、ポリペプチド、もしくは構築物などの、「多重パラトープ型」化合物、「多重パラトープ型」ポリペプチド、および「多重パラトープ型」構築物は、それぞれ異なるパラトープを有する2つ以上のビルディングブロックを含むかまたは本質的にそれからなる。

【0134】

従って、TNFに結合する本発明のISVDは本質的に単離された形態（本願において定義される通り）であり得、またはそれらは化合物、ポリペプチド、もしくは構築物の一部を形成し得、これはTNFに結合する1つ以上のISVDを含むかまたは本質的にそれからなり得、これは任意にさらに1つ以上のさらなるアミノ酸配列を含み得る（全て、任意に1つ以上の好適なリンカーによって連結される）。本発明は、本発明に従う少なくとも1つのISVD、例えば本願において定義されるTNFに結合する本発明の1つ以上のISVD（またはその好適な断片）を含むかまたは本質的にそれからなる化合物、ポリペプチド、または構築物に関する。

【0135】

本発明の1つ以上のISVDは、全て本願において定義されるそれぞれ本発明の一価、多価、または多重パラトープ型化合物、ポリペプチド、または構築物を提供するための結合ユニットまたはビルディングブロックとして、かかる化合物、ポリペプチド、または構築物に用いられ得る。それゆえに、本発明は、本発明の1つの一価ポリペプチドまたはISVDを含むかまたは本質的にそれからなる一価である化合物またはポリペプチドに関する。それゆえに、本発明は、本発明の2つ以上のISVDを含むかまたは本質的にそれからなる例えば二価または三価化合物、ポリペプチド、または構築物などの、それぞれ多価化合物、多価ポリペプチド、または多価構築物である化合物、ポリペプチド、または構築

10

20

30

40

50

物にもまた関する（1つ以上のV H Hドメインを含有する多価の多重特異性化合物またはポリペプチド、およびそれらの調製については、Conrath et al. (J. Biol. Chem. 276: 7346-7350, 2001)、ならびに例えばWO 96 / 3 4 1 0 3、WO 99 / 2 3 2 2 1、およびWO 2 0 1 0 / 1 1 5 9 9 8の参照もまたされる）。

【0136】

本発明は、さらに、多価化合物またはポリペプチド（本願においては、それぞれ「本発明の多価化合物（単数または複数）」および「本発明の多価ポリペプチド（単数または複数）」ともまた言われる）に関し、これが、TNF、好ましくはヒトTNFを目標とする少なくとも1つのISVD（またはその好適な断片）と1つの追加のISVDとを含むかまたは（本質的に）それからなる。

10

【0137】

ある側面において、その最も単純な形態において、本発明の多価化合物、ポリペプチド、または構築物は本発明の二価化合物、ポリペプチド、または構築物であり、TNFを目標とする第1のISVD、例えばナノボディとTNFを目標とする同一の第2のISVD、例えばナノボディとを含み、前記第1および前記第2のISVD、例えばナノボディは、任意にリンカー配列（本願において定義される通り）によって連結され得る。その最も単純な形態において、本発明の多価化合物、ポリペプチド、または構築物は、本発明の三価化合物、ポリペプチド、または構築物であり得、TNFを目標とする第1のISVD、例えばナノボディと、TNFを目標とする同一の第2のISVD、例えばナノボディと、TNFを目標とする同一の第3のISVD、例えばナノボディとを含み、その中の前記第1、第2、および第3の免疫グロブリンISVD、例えばナノボディは任意に1つ以上の、特に2つのリンカー配列によって連結され得る。

20

【0138】

別の側面において、本発明の多価化合物、ポリペプチド、または構築物は、本発明の二重特異性化合物、ポリペプチド、または構築物であり得、TNFを目標とする第1のISVD、例えばナノボディと、第2の抗原を目標とする第2のISVD、例えばナノボディとを含み、その中の前記第1および第2のISVD、例えばナノボディは、任意にリンカー配列（本願において定義される通り）によって連結され得る；その一方で、本発明の多価化合物、ポリペプチド、または構築物は、本発明の三重特異性化合物、ポリペプチド、または構築物であり得、TNFを目標とする第1のISVD、例えばナノボディと、第2の抗原を目標とする第2のISVD、例えばナノボディと、第3の抗原を目標とする第3のISVD、例えばナノボディとを含み、その中の前記第1、第2、および第3のISVD、例えばナノボディは任意に1つ以上の、特に2つのリンカー配列によって連結され得る。

30

【0139】

ある具体的な側面において、本発明の化合物、ポリペプチド、または構築物は、それぞれ三価の二重特異性化合物、ポリペプチド、または構築物である。本発明の三価の二重特異性化合物、ポリペプチド、または構築物は、その最も単純な形態においては、TNFに対する2つの同一のISVD、例えばナノボディと別の抗原を目標とする第3のISVD、例えばナノボディとを含む本発明の三価化合物、ポリペプチド、または構築物（本願において定義される通り）であり得、その中の前記第1、第2、および第3のISVD、例えばナノボディは任意に1つ以上の、特に2つのリンカー配列によって連結され得る。

40

【0140】

別の側面において、本発明の化合物またはポリペプチドは二重特異性化合物またはポリペプチドである。本発明の二重特異性化合物、ポリペプチド、または構築物は、その最も単純な形態において、TNFに対するISVD、例えばナノボディと別の抗原を目標とする第2のISVD、例えばナノボディとを含む本発明の二価化合物、ポリペプチド、または構築物（本願において定義される通り）であり得、その中の前記第1および第2のISVD、例えばナノボディは任意にリンカー配列によって連結され得る。

【0141】

50

好ましい側面において、本発明の多価化合物、ポリペプチド、または構築物は、TNFを目標とする2つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたは本質的にそれからなる。ある側面において、本発明は、TNFに結合する本発明に従う少なくとも2つのISVD、例えば2つ、3つ、または4つのISVD（またはその好適な断片）を含むかまたは本質的にそれからなる化合物、ポリペプチド、または構築物に関する。2つ以上のISVDは、任意に1つ以上のペプチド性リンカーによって連結され得る。

【0142】

好ましい側面において、本発明の化合物、ポリペプチド、または構築物は、少なくとも2つのISVDを含むかまたは本質的にそれからなり、前記少なくとも2つのISVDは同じかまたは異なり得るが、その少なくとも1つのISVDはTNFを目標とし、例えばTNFに結合する。

10

【0143】

特定の側面において、本発明の化合物、ポリペプチド、または構築物は、少なくとも2つのISVDを含むかまたは本質的にそれからなり、少なくとも2つのISVDは独立して配列番号8~41および61~66および69からなる群から選ばれる。

【0144】

相対的親和性は、本発明のもたらされる化合物、ポリペプチド、または構築物におけるISVDの配置に依存し得る。本発明の化合物またはポリペプチドにおけるISVDの順序（配置）が、当業者の必要に従って選ばれ得るということは理解されるであろう。個々のISVDの順序、および化合物またはポリペプチドがリンカーを含むかどうかは、設計の選択肢の問題である。リンカーありまたはなしのいくつかの配置は、他の配置と比較して好ましい結合性質を提供し得る。例えば、本発明の化合物、ポリペプチド、または構築物における第1のISVD（例えばISVD1）および第2のISVD（例えばISVD2）の順序は、（N末端からC末端に）：（i）ISVD1（例えばナノボディ1）- [リンカー] - ISVD2（例えばナノボディ2）；または（ii）ISVD2（例えばナノボディ2）- [リンカー] - ISVD1（例えばナノボディ1）であり得る；（リンカーは任意である）。全ての配置が本発明によって包摂される。所望の結合性質を提供するISVDの配置を含有する化合物、ポリペプチド、および構築物は、慣例のスクリーニングによって容易に同定され得る。

20

【0145】

本発明の化合物または構築物、例えば本発明のポリペプチドにおいて、例えばISVDなどの2つ以上のビルディングブロックと任意に1つ以上の他の基、薬、薬剤、残基、部分、または結合ユニットとは、互いに直接的に連結され得（例えばWO99/23221に記載されている通り）、および/または1つ以上の好適なスペーサーもしくはリンカーまたはそのいずれかの組み合わせによって互いに連結され得る。多価の多重特異性化合物またはポリペプチドへの使用のための好適なスペーサーまたはリンカーは、当業者には明瞭であろう。一般的には、アミノ酸配列同士を連結するために当分野において用いられるいずれかのリンカーまたはスペーサーであり得る。好ましくは、前記リンカーまたはスペーサーは、医薬使用を意図される化合物、構築物、蛋白質、またはポリペプチドを構築することへの使用にとって好適である。

30

40

【0146】

ある態様において、本発明は本願において定義される化合物またはポリペプチドに関し、前記ISVDは互いに直接的に連結またはリンカーによって連結される。別の態様において、本発明は本願において定義される化合物またはポリペプチドに関し、第1のISVDおよび/または第2のISVDおよび/または可能性として第3のISVDおよび/または可能性として血清アルブミンに結合するISVDがリンカーによって連結される。

【0147】

いくつかの特に好ましいリンカーおよびスペーサーは、抗体断片または抗体ドメインを連結するために当分野において用いられるスペーサーおよびリンカーを包含する。それらは、上で引用されている一般的な背景技術において言及されているリンカー、および例え

50

ばダイアボディまたはScFv断片を構築するために当分野において用いられるリンカーを包含する（しかしながら、これに関して、ダイアボディおよびScFv断片においては、用いられるリンカー配列は、当のV_HおよびV_Lドメインと一緒にまとまって完全な抗原結合部位を形成することを許す長さ、柔軟性の度合、および他の特性を有するべきであり、その一方で、本発明のポリペプチドに用いられるリンカーの長さまたは柔軟性については特定の限定がないということに注意すべきである。なぜなら、各ISVD、例えばナノボディは、それ自体で完全な抗原結合部位を形成するからである）。

【0148】

例えば、リンカーは、好適なアミノ酸配列、特に1および50、好ましくは1および30、例えば1および10アミノ酸残基の間のアミノ酸配列であり得る。かかるアミノ酸配列のいくつかの好ましい例は、例えば(glyxser)_z型のgly-serリンカー、例えば（例えば、WO99/42077に記載されている(gly₄ser)₃または(gly₃ser₂)₃、ならびに本願において言及されるAblynxによる出願に記載されているGS30、GS15、GS9、およびGS7リンカー（例えばWO06/040153およびWO06/122825を見よ）、ならびにヒンジ様領域、例えば天然に存在する重鎖抗体のヒンジ領域または類似の配列（例えばWO94/04678に記載されている）を包含する。好ましいリンカーは表E、例えば配列番号85~100に示されている。

10

【0149】

いくつかの他の特に好ましいリンカーは、ポリアラニン（例えばAAA）、ならびにリンカーGS30（WO06/122825の配列番号85）およびGS9（WO06/122825の配列番号84）である。

20

【0150】

ある態様において、本発明は本願において定義される化合物に関し、前記リンカーが5GS、7GS、9GS、10GS、15GS、18GS、20GS、25GS、30GS、35GS、および40GSのリンカーからなる群から選ばれる。

【0151】

他の好適なリンカーは、一般的には、有機化合物またはポリマー、特に医薬使用のための蛋白質への使用にとって好適なものを含む。例えば、ポリ（エチレングリコール）部分が抗体ドメインを連結するために用いられている。例えばWO04/081026を見よ。

30

【0152】

用いられるリンカー（単数または複数）の長さ、柔軟性の度合、および/または他の特性が（ScFv断片に用いられるリンカーにおいては通常であるように重大ではないが）、ケモカインに対するまたは他の抗原の1つ以上に対する親和性、特異性、またはアビディティを包含するがこれに限定されない、本発明の最終化合物または構築物、例えば本発明のポリペプチドの特性にいくらかの影響を有し得るということは本発明の範囲に包摂される。本願の開示に基づいて、当業者は、本発明の特定の化合物または構築物、例えば本発明のポリペプチドへの使用のための最適なリンカー（単数または複数）を、任意にいくつかの限定された慣例の実験後に決定する能力があるであろう。

【0153】

例えば、ビルディングブロック、例えばTNFおよび別の標的を目標とするISVDまたはナノボディを含む本発明の多価化合物またはポリペプチドにおいて、リンカーの長さおよび柔軟性は、好ましくは、それが、ポリペプチド中に存在する本発明の各ビルディングブロック、例えばISVDがその正当な標的、例えば標的のそれぞれの上の抗原決定基に結合することを許すようになっている。再び、本願の開示に基づいて、当業者は、本発明の特定の化合物または構築物、例えば本発明のポリペプチドへの使用のための最適なリンカー（単数または複数）を、任意にいくつかの限定された慣例の実験後に決定する能力があるであろう。

40

【0154】

用いられるリンカー（単数または複数）が、1つ以上の他の好都合な特性もしくは官能

50

性を本発明の化合物もしくは構築物、例えば本発明のポリペプチドに授け、ならびに／または誘導体の形成のためのおよび／もしくは官能基の取り付けのための1つ以上の部位を提供するということもまた本発明の範囲内である（例えば、本発明のISVDの誘導体について本願において定義される通り）。例えば、1つ以上の荷電アミノ酸残基を含有するリンカーは改善された親水性特性を提供し得、その一方で、小型のエピトープまたはタグを形成または含有するリンカーは検出、同定、および／または精製の目的のために用いられ得る。再び、本願の開示に基づいて、当業者は、本発明の特定の化合物、ポリペプチド、または構築物への使用のための最適なリンカーを、任意にいくつかの限定された慣例の実験後に決定する能力があるであろう。

【0155】

10

最後に、2つ以上のリンカーが本発明のポリペプチドなどの化合物または構築物に用いられるときに、それらのリンカーは同じかまたは異なり得る。再び、本願の開示に基づいて、当業者は、本発明の特定の化合物または構築物またはポリペプチドへの使用のための最適なリンカーを、任意にいくつかの限定された慣例の実験後に決定する能力があるであろう。

【0156】

1つ以上のナノボディを含有する多価および多重特異性化合物およびポリペプチド、ならびにそれらの調製の一般的な説明については、Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10, 7346-7350, 2001; Muylldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; および例えばWO 1996/34103、WO 1999/23221、WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164、またはWO 2009/068627の参照もまたされる。

20

【0157】

本発明は、本願に記載されるアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、および構築物をコードするヌクレオチド配列または核酸にもまた関する。本発明は、さらに、上述のヌクレオチド配列または核酸と自体公知の遺伝子構築物のための1つ以上のエレメントとを包含する遺伝子構築物を包含する。遺伝子構築物はプラスミドまたはベクターの形態であり得る。再び、かかる構築物は、一般的には、例えばWO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164、またはWO 2009/068627などのAblynx N.V.の公開特許出願に記載されている通りであり得る。

30

【0158】

ある側面において、本発明は、本発明に従うISVD、ポリペプチド、化合物、または構築物をコードする核酸に関する。

【0159】

別の側面において、本発明は、本発明に従う核酸を含む発現ベクターに関する。

【0160】

本発明は、かかるヌクレオチド配列もしくは核酸を含有する、ならびに／または本願に記載されるアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、および構築物を発現する（もしくは、発現することができる）宿主または宿主細胞にもまた関する。再び、かかる宿主細胞は、一般的には、例えばWO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164、またはWO 2009/068627などのAblynx N.V.の公開特許出願に記載されている通りであり得る。

40

【0161】

ある側面において、本発明は、本発明に従う核酸または本発明に従う発現ベクターを含む宿主または宿主細胞に関する。

【0162】

本発明は、本願に記載されるアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質

50

質、化合物、または構築物を調製するための方法にもまた関し、この方法は、本願に記載される宿主細胞を、前記宿主細胞が本願に記載されるアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物を産生または発現するような条件下において培養または維持することを含み、任意に、さらに、そのように産生されたアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物を単離することを含む。再び、かかる方法は、一般的に、例えばWO2004/041862、WO2006/122786、WO2008/020079、WO2008/142164、またはWO2009/068627などのAblynx N.V.の公開特許出願に記載されているように実施され得る。

【0163】

ある具体的な側面において、本発明は、本発明に従うISVDまたは本発明に従う化合物または本発明に従うポリペプチドを産生するための方法に関し、前記方法は、少なくとも：

a) 好適な宿主細胞もしくは宿主生物によってまたは別の好適な発現系によって、本願において定義される核酸配列を発現するステップ；任意に、次に：

b) それぞれ本発明に従うISVD、本発明に従う化合物、または本発明に従うポリペプチドを単離および/または精製するステップ、を含む。

【0164】

本発明は、本願に記載される少なくとも1つのアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物を含む組成物にもまた関する。

【0165】

本発明は、本願に記載される少なくとも1つのアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物と、任意に少なくとも1つの医薬的に許容される担体、希釈剤もしくは賦形剤、および/またはアジュバントとを含み、任意に1つ以上のさらなる医薬的に活性なポリペプチドおよび/または化合物を含む、医薬組成物にもまた関する。

【0166】

かかる調製物、担体、賦形剤、および希釈剤は、一般的には、例えばWO2004/041862、WO2006/122786、WO2008/020079、WO2008/142164、またはWO2009/068627などのAblynx N.V.の公開特許出願に記載されている通りであり得る。

【0167】

本願に記載されるアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物が、増大した半減期を有するときには、それらは好ましくは循環に投与される。そして、それらは、アミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、もしくは構築物循環に入ることを許すいずれかの好適な様式で、例えば静脈から注射もしくは輸液によって、またはアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、もしくは構築物が循環に入ることを許すいずれかの他の好適な様式で（経口投与、皮下投与、筋肉内投与、経皮投与、経鼻投与、経肺投与などを包含する）、投与され得る。投与の好適な方法および経路は、再び例えば、例えばWO2004/041862、WO2006/122786、WO2008/020079、WO2008/142164、またはWO2009/068627などのAblynx N.V.の公開特許出願の教示からもまた当業者には明瞭であろう。

【0168】

別の側面において、本発明は、本願に記載されるアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物の使用によって防止または処置され得る少なくとも1つの疾患または障害の防止および/または処置のための方法に関し、この方法は、その必要がある対象に、本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、もしくは構築物、および/またはそれを含む医薬組成物の医薬的に活

10

20

30

40

50

性な量を投与することを含む。本願に記載されるポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物の使用によって防止または処置され得る疾患および障害は、一般的には、本発明のポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物に存在する治療薬部分の使用によって防止または処置され得る疾患および障害と同じであろう。特に、本発明は、医薬としての使用のための、本願に記載される化合物、組成物、構築物、ポリペプチド、TNF結合因子、またはISVDに関する。

【0169】

本発明の文脈において、用語「防止および/または処置」は、疾患を防止および/または処置することを含むのみならず、一般的には、疾患の始まりを防止することと、疾患の進行を低速化または後退させることと、疾患に関連する1つ以上の症状の始まりを防止することまたは低速化させることと、疾患に関連する1つ以上の症状を低減および/または緩和することと、疾患および/またはそれに関連するいずれかの症状の重症度および/または持続期間を低減することと、および/または疾患および/またはそれに関連するいずれかの症状の重症度のさらなる増大を防止することと、疾患によって引き起こされるいずれかの生理的ダメージを防止すること、低減すること、または後退させることと、一般的に、処置されようとする患者にとって有益であるいずれかの薬理学的作用とをもまた含む。本発明の組成物は、現実的な治療薬剤を構成するためには、完全な治癒を奏すること、または疾患のあらゆる症状もしくは病像を根絶することを必要としない。当分野において認識される通り、治療薬剤として使用される薬は所与の疾患状態の重症度を低減し得るが、有用な治療薬剤と見なされるためには、疾患のあらゆる病像を無くすことを必要としない。類似に、予防的に投与される処置は、現実的な予防薬剤を構成するためには、状態の始まりを防止することにおいて完全に有効であることを必要としない。疾患のインパクトを単純に低減すること（例えば、その症状の数もしくは重症度を低減することにより、または別の処置の有効性を増大させることにより、または別の有益な効果を産生することによる）、または疾患が対象に起こるかもしくは悪化するであろう蓋然性を低減することが十分である。

【0170】

1つの態様において、組成物の治療有効量が患者に投与されたという指示は、具体的な障害の重症度を反映する指標のベースラインからの持続的な改善である。本発明の医薬組成物は、1つ以上の医薬的に許容される担体または賦形剤と一緒に製剤化された本発明のISVD、化合物、またはポリペプチドの治療有効量を含む。本発明のISVD、化合物、またはポリペプチドの「治療有効量」によって、いずれかの医療処置に当てはまる妥当なベネフィット/リスク比で、処置される対象に対する治療効果を授ける組成物の量が意味される。用語が本願において用いられる治療効果は、患者を「処置する」ために十分である。

【0171】

ある態様において、本発明は、消化管の疾患および/または障害の処置への使用のための、本願に記載される組成物、構築物、化合物、TNF結合因子、ISVD、またはポリペプチドに関する。

【0172】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、構築物、化合物、TNF結合因子、ISVD、またはポリペプチドに関し、消化管の前記疾患および/または障害は、炎症性腸疾患（IBD）、過敏性腸症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、粘膜炎、アフタ性口内炎、セリアック病、消化管の外傷、および消化管の癌である。

【0173】

過敏性腸症候群の患者は、腸の検出可能な組織学的変化を有さないかまたは少ししか有さないにもかかわらず、変改された腸透過性を有する（Dunlop Am J Gastroenterol. 2006 Jun; 101(6): 1288-94）。セリアック病の患者は、変改された腸透過性と、IBDと見分けられない小腸の絨毛の特徴的なダメージとを有する。炎症性腸疾患は、微生物-宿主相互作用によって開始する制御異常になった免疫応答からもたらされると考えられて

10

20

30

40

50

いる。免疫系は非病原性の共生細菌に応答し、慢性炎症を生ずる。類似に、壊死性腸炎では、ストレス負荷された未発達の免疫系が、正常な腸内細菌に対する不適切な応答を生じ、結腸炎の潜在的に致命的な形態を誘導する (Jilling et al, 2006, J Immunol, 177, 3 273-82)。

【0174】

処置されるべき対象はいずれかの温血動物であり得るが、特に哺乳動物、より具体的には人間である。当業者には明瞭であろう通り、処置されるべき対象は、特に、本願において言及される疾患および障害を患うかまたはそのリスクがある者であろう。

【0175】

別の態様において、本発明は、免疫療法のための、特に受動的免疫療法のための方法に関し、この方法は、本願において言及される疾患および障害を患うかまたはそのリスクがある対象に、本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、もしくは構築物、および/またはそれを含む医薬組成物の医薬的に活性な量を投与することを含む。

10

【0176】

アミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、もしくは構築物、および/またはそれを含む組成物は、防止または処置されるべき疾患または障害を防止および/または処置することによって好適である処置の方式に従って投与される。臨床医は、一般的に、好適な処置レジメンを決定する能力があるであろう。防止または処置されるべき疾患または障害、処置されるべき疾患の重症度および/またはその症状の重症度、用いられるべき本発明の特定のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物、用いられるべき特定の投与経路および医薬製剤または組成物、患者の年齢、性別、重さ、食事、一般的状態、ならびに臨床医に周知の類似の因子などの因子に依存する。

20

【0177】

一般的に、処置レジメンは、1つ以上の医薬的に有効な量またはドーズによる、本発明の1つ以上のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、もしくは構築物の、またはそれを含む1つ以上の組成物の投与を含むであろう。投与されるべき特定の量(単数もしくは複数)またはドーズは、再び上で引用されている因子に基づいて臨床医によって決定され得る。

30

【0178】

一般的には、本願において言及される疾患および障害の防止および/または処置のために、処置されるべき特定の疾患または障害、用いられるべき特定の融合蛋白質または構築物の力価および/または半減期、用いられる特定の投与経路および特定の医薬製剤または組成物に依存して、本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物は、一般的には、1日あたりkg体重あたり1グラムおよび0.01マイクログラムの間、好ましくは1日あたりkg体重あたり0.1グラムおよび0.1マイクログラムの間、例えば1日あたりkg体重あたり約1、10、100、または1000マイクログラムの量で、連続的に(例えば輸液によって)、単一の1日ドーズとして、または複数の分割されたドーズとして日中にどちらかで投与されるであろう。臨床医は、一般的には、本願において言及される因子に依存して好適な1日ドーズを決定する能力があるであろう。特定のケースにおいて、臨床医は、例えば上で引用されている因子および本人の専門的判断に基づいて、これらの量から逸脱することを選び得るということもまた明瞭であろう。一般的に、投与されるべき量のいくらかの手引きは、本質的に同じ経路によって投与される同じ標的に対する同等の従来の抗体または抗体断片について通常投与される量から得られ得る。しかしながら、親和性/アビディティ、有効性、生体内分布、半減期、および当業者に周知の類似の因子の違いを考慮する。

40

【0179】

通常は、上の方法においては、本発明の単一のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物が用いられる。しかしながら、本発明の2つ

50

以上のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物を組み合わせで用いることは本発明の範囲内である。

【0180】

本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物は、1つ以上のさらなる医薬的に活性な化合物または成分との組み合わせで、すなわち併用処置レジメンとしてもまた用いられ得、これは相乗効果に至り得るか、または至らずにあり得る。再び、臨床医は、上で引用されている因子および本人の専門的判断に基づいてかかるさらなる化合物または成分、および好適な併用処置レジメンを選択する能力があるであろう。

【0181】

具体的には、本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物は、本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物によって防止または処置され得る疾患および障害の防止および/または処置のために用いられるかまたは用いられ得る他の医薬的に活性な化合物または成分との組み合わせで用いられ得、その結果として、相乗効果が得られ得、または得られずにあり得る。

【0182】

臨床医には明瞭であろう通り、本発明に従って用いられる処置レジメンの有効性は、当該の疾患または障害について自体公知のいずれかの様式で決定および/または追跡され得る。臨床医は、所望の治療効果を達成するために、不要の副作用を回避、限定、もしくは低減するために、および/または一方では所望の治療効果を達成することと他方では望まれない副作用を回避、限定、もしくは低減することとの間の適切なバランスを達成するために、適切などころでは、またはケース毎に、特定の処置レジメンを変えるかまたは改変する能力があるであろう。

【0183】

一般的に、処置レジメンは、所望の治療効果が達成されるまで、および/または所望の治療効果が維持されるべき限り、遵行されるであろう。再び、これは臨床医によって決定され得る。

【0184】

本発明のアミノ酸配列、TNF結合因子、ポリペプチド、融合蛋白質、化合物、または構築物はTNFに結合することができるので、それらは、特に、TNFに結合および/またはTNFを調節することができる他の生物学的薬（抗体、例えばアダリムマブ/ヒュミラ（商標）またはインフリキシマブ/レミケード（商標）のような）によって処置され得る疾患または障害の防止および/または処置のために用いられ得る。かかる疾患および障害は当業者には明瞭であろう。本発明のTNF結合因子は、特に、WO2004/041862およびWO2006/122786において言及されている疾患および障害の防止および処置のために用いられ得る。

【0185】

言及した通り、本発明の1つの特定の側面は、一価の形態である本発明のTNF結合因子に関する。本発明のそれらの一価TNF結合因子は、局所適用（皮膚、GI管、もしくは肺への適用を包含する）にとり、ならびに/または局所投与（例えば皮膚への）、経口投与（例えばGI管への）、座薬による投与（再び、例えばGI管への）、および/もしくは肺への投与（例えば、吸入による）にとり特に好適である。そして、それらは、それぞれ皮膚、肺、またはGI管へのTNF阻害剤の適用によって防止または処置され得る皮膚、肺、またはGI管の疾患および障害の防止および/または処置のために用いられ得る（例えば、それぞれ皮膚、肺、またはGI管に影響を及ぼす炎症および/または自己免疫疾患）。

【0186】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、化合物、構築物、TNF結合因子、ポリペプチド、またはISVDに関し、組成物、化合物、構築物、TNF結合因子

10

20

30

40

50

、ポリペプチド、またはI S V Dは、消化管に局所投与される。

【0187】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dに関し、組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dは、胃腸管（G I）への経口投与にとって好適な剤形で経口投与される。

【0188】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dに関し、組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V DはG I管への経口投与のための剤形で投与され、剤形は錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、エマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤から選択される。

10

【0189】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dに関し、組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dは、消化管の疾患または障害の処置のために経直腸投与される。

【0190】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dに関し、組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dは、経直腸投与のための、好ましくは座薬および浣腸剤から選択される剤形で経直腸投与される。

20

【0191】

ある態様において、本発明は、本願に記載される組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dに関し、組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、またはI S V Dは皮下注射、皮内注射、静脈注射、筋肉内注射、病巣内注射、または輸液技術によって非経口投与される。

【0192】

かかる疾患および障害のいくつかの特定の限定しない例は、G I管の疾患または障害、例えば炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、粘膜炎、アフタ性口内炎、セリアック病、消化管の外傷、および/または消化管の癌である。言及した通り、これらの目的に用いられるときに、本発明の一価T N F 結合因子は、好ましくは位置1のD（またはE 1 D）変異およびC末端延長（例えばC末端アラニン）を有し、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、62～63、および65～66、特に配列番号40、39、36、64、および69、最も具体的には配列番号40のT N F 結合因子は、特にこれらの目的に適した本発明のT N F 結合因子の好ましい例である。

30

【0193】

それゆえに、さらなる側面において、本発明は、皮膚、肺、またはG I管の疾患および障害の防止および処置への、特に皮膚、肺、またはG I管に影響を及ぼす炎症および/または自己免疫疾患の防止および処置への使用のための、本質的に一価の形態である（かつ好ましくは位置1のDまたはE 1 D変異およびC末端延長、例えばC末端アラニンを有する）本発明のT N F 結合因子（本願に記載される通り）に関する。前記T N F 結合因子は、好ましくは、配列番号40、39、36、64、69、37、38、41、62～63、および65～66からなる群、特に配列番号40、39、36、64、および69、最も具体的には配列番号40から選ばれる。

40

【0194】

本発明は、G I管の疾患または障害、例えば炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、粘膜炎、アフタ性口内炎、セリアック病、消化管の外傷、および/または消化管の癌、特にI B Dおよびクローン病の防止および処置への使用のた

50

めの、本質的に一価の形態である（かつ好ましくは位置 1 の D または E 1 D 変異および C 末端延長、例えば C 末端アラニンを有する）本発明の T N F 結合因子（本願に記載される通り）にもまた関する。再び、前記 T N F 結合因子は、好ましくは、配列番号 4 0、3 9、3 6、6 4、6 9、3 7、3 8、4 1、6 2 ~ 6 3、および 6 5 ~ 6 8 からなる群、特に配列番号 4 0、3 9、3 6、6 4、および 6 9、最も具体的には配列番号 4 0 から選ばれる。

【 0 1 9 5 】

本発明は、皮膚への局所適用、吸入もしくは他の投与による肺への投与、および / または経口投与、経直腸投与、もしくは G I 管への他の投与を意図される（および / またはそれにとって好適である）医薬組成物にもまた関し、これは、本質的に一価の形態である（かつ好ましくは位置 1 の D または E 1 D 変異および C 末端延長、例えば C 末端アラニンを有する）本発明の T N F 結合因子を含む。再び、前記 T N F 結合因子は、好ましくは、4 0、3 9、3 6、6 4、6 9、3 7、3 8、4 1、6 2 ~ 6 3、および 6 5 ~ 6 8 からなる群、特に配列番号 4 0、3 9、3 6、6 4、および 6 9、最も具体的には配列番号 4 0 から選ばれる。

10

【 0 1 9 6 】

本発明は、皮膚の疾患または障害の防止または処置のための方法にもまた関し、この方法は、かかる処置の必要がある対象の皮膚に、本質的に一価の形態である（かつ好ましくは位置 1 の D または E 1 D 変異および C 末端延長、例えば C 末端アラニンを有する）本発明の T N F 結合因子、またはかかる一価 T N F 結合因子を含む組成物を適用することを含む。

20

【 0 1 9 7 】

本発明は、皮膚の疾患または障害の防止または処置のための方法にもまた関し、この方法は、かかる処置の必要がある対象の肺に、本質的に一価の形態である（かつ好ましくは位置 1 の D または E 1 D 変異および C 末端延長、例えば C 末端アラニンを有する）本発明の T N F 結合因子、またはかかる一価 T N F 結合因子を含む組成物を（例えば吸入によって）投与することを含む。

【 0 1 9 8 】

本発明は、G I 管の疾患または障害、例えば炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、粘膜炎、アフタ性口内炎、セリアック病、消化管の外傷、および / または消化管の癌、特に I B D またはクローン病の防止または処置のための方法にもまた関し、この方法は、かかる処置の必要がある対象の G I 管に、本質的に一価の形態である（かつ好ましくは位置 1 の D または E 1 D 変異および C 末端延長、例えば C 末端アラニンを有する）本発明の T N F 結合因子またはかかる一価 T N F 結合因子を含む組成物を投与すること（例えば、経口または経直腸投与）を含む。

30

【 0 1 9 9 】

前に言及した通り、炎症の部位において、消化管の粘膜バリアは多くの場合に損なわれており、それゆえに、経口投与された蛋白質は腸組織および全身循環に入り得る。それゆえに、ある態様において、本発明は、組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、または I S V D が患者の腸組織および全身循環に到達する、本願に記載される組成物、化合物、構築物、T N F 結合因子、ポリペプチド、または I S V D にもまた関する。

40

【 0 2 0 0 】

本発明の側面、態様、利点、および適用は、本願におけるさらなる記載から明瞭になるであろう。

【 0 2 0 1 】

以下で、本発明は、次の限定しない好ましい側面、例、および図によってさらに記載される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 0 2 】

【 図 1 】本願において具体的に参照されるアミノ酸位置のいくつかと、いくつかの代替的

50

な付番システム（例えば、AhoおよびIMGT）に従うそれらの付番とを一覧化する表である；

【図2】配列番号1、59、および58のアラインメントを示している；

【図3】本願において参照されるアミノ酸配列を一覧化している；

【図4】配列番号1、8から41、および58のアラインメントを示している；

【図5】配列番号1、31、および36から41のアラインメントを示している；

【図6】96個の血清サンプル（健康なヒト対象からの66個およびSLE患者からの30個）が次のアミノ酸配列に対する結合について試験されたときの、例1で得られたデータ点の2つの対応するプロットを示している：配列番号58（Q108L変異を有する）、参照A、参照A（L11V, V89L）- A1a、参照A（L11V, A74S, V89L）- A1a、および参照A（L11V, S49A, V89L）- A1a。各ドットは、試験された96サンプルの1つの結合レベルを表している。右手のパネルおよび左手のパネルに示されているデータ点は同じである；右手のパネルにおいて、各個々のサンプルの測定されたデータ点は、試験された化合物のそれぞれ（すなわち、配列番号58（Q108L）、参照A、参照A（L11V, V89L）- A、参照A（L11V, A74S, V89L）- A、および参照A（L11V, S49A, V89L）- A）について線によって繋がれている（結果として、線の傾きは、本発明の変異およびC末端アラニンが導入されたときに既存抗体による結合が低減される程度の指示を与える）；

【図7-1】結合データを一覧化する表である（5つの列は、正規化されたPreAb結合レベル（125秒におけるRU）を与え、4つの列は、図6にコンパイルされたデータ点の参照Aと比較したPreAb結合の低減のパーセンテージを与えている。

【図7-2】結合データを一覧化する表である（5つの列は、正規化されたPreAb結合レベル（125秒におけるRU）を与え、4つの列は、図6にコンパイルされたデータ点の参照Aと比較したPreAb結合の低減のパーセンテージを与えている。

【図7-3】結合データを一覧化する表である（5つの列は、正規化されたPreAb結合レベル（125秒におけるRU）を与え、4つの列は、図6にコンパイルされたデータ点の参照Aと比較したPreAb結合の低減のパーセンテージを与えている。

【図7-4】結合データを一覧化する表である（5つの列は、正規化されたPreAb結合レベル（125秒におけるRU）を与え、4つの列は、図6にコンパイルされたデータ点の参照Aと比較したPreAb結合の低減のパーセンテージを与えている。

【図7-5】結合データを一覧化する表である（5つの列は、正規化されたPreAb結合レベル（125秒におけるRU）を与え、4つの列は、図6にコンパイルされたデータ点の参照Aと比較したPreAb結合の低減のパーセンテージを与えている。

【図8】A016600015配列に基づいて（A）予測（「P」）および実験的に（「E」）決定されたトリプシンおよびキモトリプシン切断部位。（B）クマシー染色されたSDS-PAGEゲルによるA016600015分析。（C）A016600015配列のRPCLC-MSによるトリプシン消化分析の例示的な結果。

【図9】SHIMEモデルの概略的な図示。

【図10】エンブレル（EC30 = 0.02 nM；パネルA）およびエンブレル（EC90 = 0.2 nM；パネルB）によって処理されたHEK293H-mTNF細胞の競合FACS。IRR000027 = 無関係なナノボディ。

【図11】非還元条件下における12%のNuPageビストリスゲルによって、A016600021、A016600039、およびA016600040の発現結果を示している。5 μlサンプルを適用した。レーンは次の通りである：（1）A016600021；（2）A016600039；（3）A016600040；（4）無関係なコンパレータ；（5）無関係なコンパレータ；（6）Precision Plus蛋白質標準（BioRad）；（7）標準0.5 μg；（8）標準1.0 μg；（9）標準2.5 μg。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0203】

本発明者は、TNF結合因子のアミノ酸配列を最適化することにした（「配列最適化」）。このケースにおいては、TNF結合因子は経口投与を意図され、それゆえに、TNF結合因子は好ましくはプロテアーゼ安定性であるべきである。その上、配列最適化のプロセスにおいては、（１）TNF結合因子をヒト化し；（２）既存抗体の潜在的なエピトープをロックアウトし；（３）翻訳後修飾（PTM）の部位をロックアウトすることもまた意図される。同時に、これらの性質は、TNF結合因子の機能的性質、すなわちTNFを阻害することに合致させるべきであり、これは好ましくは約同じかまたはさらには改良されるべきである。

例１：Pichia pastorisによるナノボディ産生とプロテインA結合による精製

【0204】

抗TNF ナノボディ構築物を含むPichia pastorisのX33細胞を、24ウェルプレート（24mL）上でBGMクエン酸緩衝液中において育てた（30、250rpm）。2日後に、培地をメタノール含有緩衝液（BMCクエン酸）に切り替えて発現を誘導した。新しいメタノールを定期的に追加してメタノール消費および蒸発を補い、2日後に培地を収穫した。ナノボディを、プロテインAカラム（Poros）またはMEP Hypercel（Pall）による捕捉、次にグリシン緩衝液による溶出によって、製造者の説明書に従って精製した。爾後に、ナノボディを2mLのZebaspincolumn（Pierce）を用いてPBSに対して脱塩した。画分はVivaSpinカラム（MWCO5000、PES）を用いて濃縮した。ナノボディ画分の濃度をTrinean Dropsenseを用いて測定した。濃度は、OD340値に対する正規化ありのOD280測定に基づいた。ナノボディの純度およびインテグリティは、SDS-PAGEおよびMS分析によって、ESI-Q-TOF質量分析計（Q-TOF Ultimate（Waters）にカップリングされた逆相HPLCシステムを用いて検証した。

例２：ヒト化

【0205】

本発明のTNF結合因子の蛋白質配列は結局はラマから取得されており、ヒトに天然に存在する相同な抗体とは部分的に違っている。そのため、それらのTNF結合因子はヒト患者に投与されたときには潜在的に免疫原性である。

【0206】

一般的には、ヒト化目的のために、ナノボディ配列は、ヒト生殖細胞系列コンセンサス配列に対してより相同にされる。ナノボディ「ホールマーク」残基を例外として、ナノボディとヒト生殖細胞系列コンセンサス配列との間において異なるフレームワーク領域内の特定のアミノ酸は、蛋白質構造、活性、および安定性が好ましくは無傷に保たれるようなやり方でヒトカウンターパートに変改される。

【0207】

このケースにおいては、ヒト生殖細胞系列V遺伝子データベースとのアラインメント後に、DP51が、配列番号58との最も高い相同性を有するとして同定された。好ましくは他のナノボディ性質を無傷に保ち、またはさらにはそれらの性質を改良しながら、ヒトDP51生殖細胞系列コンセンサス配列により合致した親のナノボディ配列を変改する観点から、全ての可能な順列を作り上げた。

【0208】

結局は、合計で12アミノ酸残基を配列番号58に導入した：1E、14P、27F、29F、40A、49S、73N、75K、78L、82aN、83R、および108L。特に、Q27FおよびS29FはCDR1の一部であるが、結合に影響を及ぼさなかった（cf.配列番号1；データは示さない）。

例３：既存抗体の結合を低減する

3.1. 実験の部

【0209】

下の例3.2に用いたヒトサンプルは、商業的なソースまたはヒトボランティア（全ての要求される同意および承認が得られた後）どちらかから得られ、当てはまる法律および

10

20

30

40

50

規制要件（医療上の秘密および患者プライバシーに関してのものを包含するが、これに限定されない）に従って用いた。

【0210】

下の例3.2においては、明白に別様に指示されない限り、用いられたサンプル（すなわち、健康なボランティア、関節リウマチ（RA）患者、およびSLE患者から）中に存在する既存抗体の試験されたナノボディに対する結合は、ProteOnを用いて次のように決定した：

【0211】

ナノボディを、血清アルブミン上に、またはモノクローナル抗FLAG-M2を用いてFLAG3タグによってどちらかで捕捉した。

10

【0212】

ヒト血清アルブミン（HSA）上に捕捉されたナノボディ上への既存抗体の結合のケースにおいては、ProteOn XPR36（Bio-Rad Laboratories, Inc.）を用いて評価した。PBS/Tween（リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4、0.005% Tween 20）をランニング緩衝液として用い、実験は25℃で実施した。ProteOn GLCセンサーチップのリガンドレーンをEDC/NHS（流量30μl/min）によって活性化し、HSAをProteOn酢酸緩衝液pH4.5中の10μl/mlで注入して（流量100μl/min）、固定化レベルをおよそ3200RUにした。固定化後に、表面をエタノールアミンHClによって不活性化した（流量30μl/min）。ナノボディをHSA表面に45μl/minで2分間注入して、ナノボディ捕捉レベルをおよそ200RUにした。既存抗体を含有するサンプルを14,000rpmで2分間遠心し、上清をPBS-Tween20（0.005%）によって1:10希釈した後に、45μl/minで2分間注入し、次に爾後の400秒解離ステップであった。各サイクル後に（すなわち、新たなナノボディ捕捉および血液サンプル注入ステップの前に）、HSA表面を45μl/minのHCl（100mM）の2分注入によって再生した。センサーグラム処理およびデータ分析はProteOn Manager 3.1.0（Bio-Rad Laboratories, Inc.）によって実施した。既存抗体の結合を示すセンサーグラムは、1）ナノボディ-HSA解離および2）参照リガンドレーンに対する非特異的結合を差し引くことによる二重参照後に得られた。既存抗体の結合レベルは、報告時点を125秒に（会合の終わりの5秒後に）設定することによって決定した。既存抗体の結合のパーセンテージの低減は、参照ナノボディの125秒における結合レベルに対して相対的に計算した。

20

30

【0213】

モノクローナル抗FLAG-M2（Sigma）上に捕捉されたFLAGタグ付きナノボディ上への既存抗体の結合のケースにおいては、ProteOn XPR36（Bio-Rad Laboratories, Inc.）を用いて評価した。PBS/Tween（リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4、0.005% Tween 20）をランニング緩衝液として用い、実験は25℃で実施した。ProteOn GLCセンサーチップのリガンドレーンをEDC/NHS（流量30μl/min）によって活性化し、抗FLAG-M2のmAbをProteOn酢酸緩衝液pH4.5中の10μg/mlで注入して（流量100μl/min）、固定化レベルをおよそ4000RUにした。固定化後に、表面をエタノールアミンHClによって不活性化した（流量30μl/min）。ナノボディを抗FLAG-M2表面に45μl/minで2分間注入して、ナノボディ捕捉レベルをおよそ100RUにした。抗FLAG-M2表面に対する血液サンプルの非特異的結合を低減するために、100nMの3xFLAGペプチド（Sigma）を血液サンプルに追加した。既存抗体を含有するサンプルを14,000rpmで2分間遠心し、上清をPBS-Tween20（0.005%）によって1:10希釈した後に、45μl/minで2分間注入し、次に爾後の600秒解離ステップであった。各サイクル後に（すなわち、新たなナノボディ捕捉および血液サンプル注入ステップの前に）、抗FLAG-M2表面を、150μl/minのグリシンpH1.5（10mM）の10秒注入によって再生した。センサーグラム処理およびデータ分析はProteOn Manager 3.1.0（Bio-Rad Laboratories, Inc.）によって実施した。既存抗体の結合を示すセン

40

50

サーグラムは、1) ナノボディ - 抗FLAG - M2 解離および2) 参照リガンドレーンに対する非特異的結合を差し引くことによる二重参照後に得られた。既存抗体の結合レベルは、報告時点を125秒に(会合の終わりの5秒後に)設定することによって決定した。既存抗体の結合のパーセンテージの低減は、参照ナノボディの125秒における結合レベルに対して相対的に計算した。

3.2: 参照A(配列番号1)に本発明の変異を導入することは、既存抗体による結合の低減に至る。

【0214】

次のアミノ酸配列を用いた: 配列番号58(Q108L変異を有する)、参照A、参照A(L11V, V89L) - A1a、参照A(L11V, A74S, V89L) - A1a、および参照A(L11V, S49A, V89L) - A1a、全てN末端HIS6-FLAG3タグを有する(配列番号42)。これらのナノボディを、健康なヒトボランティアからの96個の血清サンプルからのサンプル中に存在する既存抗体による結合について試験した。化合物をFLAGタグを用いて捕捉し、結合を、この実験の部の前段において与えられているプロトコールに従ってProteOnを用いて測定した。

10

【0215】

結果は図6に示されている。図7は、図6のデータ点の1つを形成するサンプルのそれぞれの結果を一覧化している。

【0216】

試験された96サンプルの大部分について、本発明に従って変異を導入することは、既存抗体の結合の低減に至ることが分かり、低減の度合は、一般的には、各サンプル中の既存抗体が参照Aに結合することができたレベルに依存する。

20

例4: 化学的安定性評価

【0217】

種々のヒト化および/または最適化されたナノボディの化学的安定性を、強制酸化および温度ストレス試験によって評価した。

【0218】

新たな参照化合物、すなわちA016600015(配列番号61)を作った。この新たな参照化合物は推定上の臨床候補により合致しており、それゆえに変異のインパクトのより良い評価を可能にする。A016600015は、C末端アラニンおよびアミノ酸残基1のアスパラギン酸を除いて、参照A(配列番号1)と同一である。C末端A1aは、PEAを低減する観点からWO2012/175741に従って導入した(cf. 例3)。ピログルタミン酸形成の評価後に、N末端グルタミン酸をアミノ酸残基1のアスパラギン酸に置換した。新たな参照A016600015の活性は実質的に参照Aと同一であった(データは示さない)。この新たな化合物A016600015は、別様に指示されない限り、例において参照化合物としてさらに用いる。

30

【0219】

例3の結果に基づいて、抗PEA変異L11VおよびV89Lを(とりわけ)新たな参照化合物A016600015と比較して導入し、A016600018(配列番号37)およびA016600019(配列番号38)をもたらした。配列は図3に示されている。

40

4.1. 強制酸化安定性

【0220】

参照化合物A016600015のナノボディサンプル(1mg/ml)を、H₂O₂なしのコントロールサンプルと平行して、PBS中の10mMのH₂O₂に暗所においてRTで4時間付し、次にZeba脱塩スピンカラム(0.5ml)(Thermo Scientific)を用いるPBSへの緩衝液切り替えであった。それから、ストレス負荷およびコントロールサンプルを、Series 1200または1290機(Agilent Technologies)によるRPCによって、Zorbax 300SB-C3カラム(Agilent Technologies)によって70で分析した。ナノボディの酸化を、蛋白質のメインピークと比較して、酸化ストレスの結果として起

50

こるプレピークの%ピーク面積の決定によって定量した。

【0221】

参照化合物A016600015の酸化ストレス負荷サンプルにおいて、バリエーションは観察されなかった(データは示さない)。

4.2. 温度ストレス安定性

【0222】

ナノボディサンプル(1~2mg/ml)を、-20(負のコントロール)、25、および40でPBS中に4週間保存した。このインキュベーション期間後に、ナノボディをトリプシンまたはLysCによって消化した。それから、ストレス負荷およびコントロールサンプルのペプチドを、Series 1290機(Agilent Technologies)によるRPCによって、Acquity UPLC BEH300-C18カラム(Agilent Technologies)によって60で分析した。カラムはQ-TOF質量分析計(6530 Accurate Mass Q-TOF(Agilent))にカップリングされている。ペプチドマップUV214nmまたはEIC(抽出イオンクロマトグラム)クロマトグラムの統合は、所与の修飾の確実な定量を許す。

10

【0223】

40においてのみ、いくつかの異性化およびピログルタミン酸バリエーションが観察された。特に、環境に露出されたCDR2内に配置され、潜在的に異性化が可能であるアミノ酸残基54Dは、実質的に異性化を実証しなかった。ナノボディが25またはそれよりも下に延長された期間保たれた場合には、アミノ酸残基1の異性化ははっきりしなかった。

20

4.3. サーマルシフトアッセイ(TSA)による融点

【0224】

ナノボディの融点はその生物物理学的安定性の尺度である。

【0225】

種々のナノボディの融点を、サーマルシフトアッセイ(TSA)によって、本質的にEricsson et al. 2006(Anal. Biochem., 357: 289-298)に従って評価した。手短には、精製された一価ナノボディの5μl(800μg/ml)を、緩衝液(100mMリン酸、100mMホウ酸、100mMクエン酸、115mMのNaCl、3.5から9の範囲の異なるpHに緩衝した)の10μl中において蛍光プローブSypro Orange(Lnvitrogen, S6551)(最終濃度10x)の5μlとインキュベーションした。サンプルを、LightCycler 480II機(Roche)によって37から99に4.4/sの速度で加熱し、その後、それらを37まで0.03/sの速度で冷却した。熱によって誘導されるアンフォールディングによって、蛋白質の疎水性パッチが露出され、これにSypro Orangeが結合し、蛍光強度の増大をもたらす(Ex/Em=465/580nm)。蛍光強度曲線の一次導関数の変曲点が融点(Tm)の尺度として働く。

30

【0226】

参照化合物A016600015(配列番号61)をA016600018(配列番号37)およびA016600019(配列番号38)と比較した。A016600015とは対照的に、A016600018およびA016600019両方は例3に従って抗PEA変異L11VおよびV89Lを含む。

【0227】

結果は表4.3に示されている。

40

【表1】

表4.3

| NB ID | 抗-PEA | 量(μg) | Tm(°C) pH7 |
|------------|-----------|-------|------------|
| A016600015 | - | 87 | 59 |
| A016600018 | L11V V89L | 38 | 59 |
| A016600019 | L11V V89L | 16 | 56 |

50

【 0 2 2 8 】

表 4 . 3 から分かるように、抗 P E A 変異は、T m に対する効果を有さないか (A 0 1 6 6 0 0 0 1 8) または T m に対する負の効果を有するか (A 0 1 6 6 0 0 0 1 9) どちらかに見えた。特に、A 0 1 6 6 0 0 0 1 8 (「 0 0 0 1 8 」) および A 0 1 6 6 0 0 0 1 9 (「 0 0 0 1 9 」) の間の違いはそれぞれ 7 8 L および 7 8 V である。総体的に、アミノ酸残基 7 8 のこの違いのいずれかの効果は、抗 P E A 変異の導入と比較して非有意であることが示された (下もまた見よ) 。

【 0 2 2 9 】

産生するときに、抗 P E A 変異を含むこれらのバリエーションの発現が最適ではないということもまた分かった。これを例 1 の方法を用いてさらに定量した。

【 0 2 3 0 】

結果は表 4 . 3 に示されている。

【 0 2 3 1 】

実に、抗 P E A 変異を含む両方のバリエーションから取得可能な量は、参照ナノボディよりも約 2 倍低いか (A 0 1 6 6 0 0 0 1 8) 、またはさらには 4 倍低かった (A 0 1 6 6 0 0 0 1 9) 。これは本発明者の完全な驚きであった。なぜなら、これらの抗 P E A 変異 L 1 1 V および V 8 9 L の導入は、それまでは、いずれかの他のクローンについて決定されたナノボディを回収する能力のかかる深刻な低下をもたらさなかったからである。

4 . 4 . プロテアーゼ安定性

【 0 2 3 2 】

T N F 阻害剤は結局は経口投与され得るということが意図される。しかしながら、胃および腸は天然に不利な環境を構成する。なぜなら、それらは部分的に固体の食物の酵素的分解および吸収のために設計されているからである。一般的に、蛋白質基質の蛋白質分解は、ポリペプチド鎖内の 8 ~ 1 0 アミノ酸残基がプロテアーゼの活性部位の特異的な立体化学に結合および適合し得る場合にのみ起こり得る (Fontana et al. 2004 Acta Biochim Pol, 51, 299-321) 。ゆえに、酵素的切断の受けやすさは基質の物理的特性に大きく依存する。

【 0 2 3 3 】

潜在的なプロテアーゼ分解部位を同定し、より安定なバリエーションを設計するために、本発明者は、標準的な方法に従ってトリプシンおよびキモトリプシン切断部位を同定することにした。

【 0 2 3 4 】

配列番号 5 8 および新たな参照化合物 A 0 1 6 6 0 0 0 1 5 (「 0 0 0 1 5 」) の予測されたプロテアーゼ部位 (「 P 」) は、トリプシンおよびキモトリプシン両方について図 8 A においては (「 X 」) として示されている。

【 0 2 3 5 】

この図から、すでに：

- C D R 3 は 9 つの潜在的なプロテアーゼ切断部位を含む。
- ヒト化変異 Q 7 5 K (V H 3 - D P 5 1) は潜在的なトリプシン切断部位を導入した。
- ヒト化変異 K 7 3 N (V H 3 - D P 5 1) は潜在的なトリプシン切断部位を削除した。
- 抗 P E A 変異 L 1 1 V および V 8 9 L はこれに関して中立的であり、すなわちこれらの変異は、予想されたように、潜在的なプロテアーゼ切断部位を導入または削除しなかった。

ということが結論づけられ得る。

【 0 2 3 6 】

予測されたプロテアーゼ切断部位をよりインビボの条件において評価するために、ナノボディをトリプシンおよびキモトリプシンによって消化した。具体的には、抗 T N F ナノボディを 1 0 % トリプシンまたは - キモトリプシン溶液中でインキュベーションした

10

20

30

40

50

。2 μg のナノボディを、37 における 2 h、4 h、および一晩のトリプシン消化または 25 における 2 h、4 h、もしくは一晩のキモトリプシン消化にかけた。蛋白質分解反応を TFA (0.1% 最終) の追加によって止めた。反応混合物を、RPC LC - MS によって分析するか、または SDS - PAGE ゲルによって分離し、クマシーブルーによって染色するかどちらかをした。ImageQuant (GE) を用いて、無傷の材料の量を計算し、参照タイムポイントとして 0 h に対して正規化した。

【0237】

クマシー染色された SDS - PAGE ゲルによるトリプシン消化の例示的な結果が図 8 B に提供されている。RPC LC - MS によるトリプシン消化分析の例示的な結果が図 8 C に提供されている。実験的に (「E」) 確認された切断部位が図 8 A にトリプシン (「E」) およびキモトリプシン (「E」) として示されている。

10

【0238】

図 8 A から、実際の切断部位の数が低減されているということが明瞭である。それにもかかわらず、種々のトリプシンおよびキモトリプシン認識部位は残る。

【0239】

トリプシン耐性を最適化するために、1つの最適化バリエーションを工作するために5つの位置：R38、K64、S94、P95、およびR96を選択し、バリエーションA016600013；配列番号65をもたらした。

【0240】

しかしながら、これらの部位を変異させることは、バリエーションの低減された発現レベルおよび細胞内蓄積をもたらした (A016600013；配列番号65)。事実、アミノ酸残基38を復帰変異させたときには、これは発現を改善し、もたらされたバリエーション (A016600014；配列番号66) は完全に予想に反して参照化合物A016600015よりもプロテアーゼ感受性であった (データは示さない)。ゆえに、研究中の参照化合物およびナノボディ、すなわちA016600018およびA016600019のこれらの位置は変異させないことに決めた。

20

【0241】

結果の概要が表 4.4 に示されている。

【表 2】

30

表 4.4

| | | | プロテアーゼとの
インキュベーション (時間) 後の無傷のナノボディ% | | | | | | | |
|------------|-----|-----|--|----|----|----|---------|----|----|----|
| | | | トリプシン | | | | キモトリプシン | | | |
| ナノボディ | L11 | V89 | 0h | 2h | 4h | ON | 0h | 2h | 4h | ON |
| A016600015 | . | . | 100 | 95 | 99 | 79 | 100 | 16 | 18 | 15 |
| A016600019 | V | L | 100 | 83 | 91 | 78 | 100 | 27 | 39 | 31 |
| A016600018 | V | L | 100 | 89 | 85 | 63 | 100 | 38 | 31 | 14 |

40

例 5：SHIME モデルに由来する腸液中での安定性

【0242】

ヒトGI管における抗TNF ナノボディの安定性を検討するために、ナノボディを、ヒト胃腸管 (GI) を表す SHIME (ヒト腸内微生物生態系のシミュレータ) に由来する5つの異なる液中でインキュベーションした。SHIMEモデルは、完全な胃腸管の科学的に認められた動的モデルであり、これは胃腸管の物理化学的、酵素的、および微生物

50

的パラメータをコントロールされたインビトロ条件において研究するために用いられる。

【0243】

S H I M Eモデルは5つの反応器からなり、これらは胃（酸条件およびペプシン消化）、小腸（消化プロセス）、ならびに大腸の3つの領域、すなわち上行（「A」）、横行（「T」）、および下行結腸（「D」）（微生物プロセス）を連続的にシミュレーションする。これらの反応器の環境パラメータの綿密なコントロールは、構造および機能両方がヒト結腸の異なる領域の微生物コミュニティに高度に類似した複雑で安定な微生物コミュニティを許した（図9を見よ）。全てのGI液はProDigest（テクノロジーパーク4、9052ズウェイナルデ、ベルギー）によって提供された。抗TNFナノボディをGI液中で39時間という最大の期間試験した。GI液中でのインキュベーション後に、ナノボディの安定性を競合ELISAによる機能性試験によって決定した。ナノボディを、S H I M Eモデルの5つの異なるGI液中で37 において100 μg/mlという固定された濃度で試験した。表5.1のスケジュールに従って、異なるタイムポイントにおいてサンプルを取り、プロテアーゼ阻害剤の追加ありまたはなしで-20 で保存した。サンプルをコーティングされたELISAプレートに移し、爾後に競合ELISAによって試験した。簡潔には、A016600015をPBS中の1 μg/mlの濃度でコーティングした。ブロッキング後に、異なるGI液中の、0.3 nMのbiot-hTNF の固定された濃度をバリエーションのタイトレーションシリーズと一緒に追加した。検出をエクストラアビジン-HRPによって実施した

10

20

【表3】

表5.1 インキュベーションスケジュール

| 液 | タイムポイント |
|-------|-----------------------------------|
| SI 空腹 | 0, 1, 2, 4, 6, 8h* |
| 摂食 | 0, 1, 2, 4, 6, 8h* |
| 結腸A | 0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24h |
| 結腸T | 0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24, 39h |
| 結腸D | 0, 1, 2, 4, 8, 15, 20, 24, 32h |
| PBS | 0, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 20, 24, 32h |

30

* インキュベーション後に、1 mg/ml のPefablocおよび1 μMペプスタチン（プロテアーゼ阻害剤）の追加

【0244】

結腸「T」の例示的な結果が表5.2に提供されている。

40

50

【表 4】

表 5. 2

| | | 0h | 1h | 2h | 4h | 8h | 15h | 20h | 24h | 39h |
|-------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 00015 | IC50 | 7,3E-10 | 5,0E-10 | 6,4E-10 | 6,2E-10 | 9,7E-10 | 1,3E-09 | 1,9E-09 | 2,8E-09 | 2,0E-08 |
| | 比 | 1,00 | 0,69 | 0,88 | 0,85 | 1,34 | 1,72 | 2,56 | 3,88 | 27,41 |
| | % | 100% | 145% | 113% | 117% | 75% | 58% | 39% | 26% | 4% |
| 00018 | IC50 | 5,7E-10 | 5,5E-10 | 6,9E-10 | 1,2E-09 | 2,8E-09 | 9,5E-09 | 3,2E-08 | 4,2E-08 | 6,2E-07 |
| | 比 | 1,00 | 0,97 | 1,22 | 2,19 | 4,96 | 16,68 | 55,58 | 73,79 | 1097,18 |
| | % | 100% | 103% | 82% | 46% | 20% | 6% | 2% | 1% | 0% |
| 00019 | IC50 | 5,0E-10 | 4,7E-10 | 4,5E-10 | 9,1E-10 | 7,2E-10 | 1,7E-09 | 3,0E-09 | 5,2E-09 | 4,1E-08 |
| | 比 | 1,00 | 0,93 | 0,89 | 1,81 | 1,43 | 3,36 | 6,02 | 10,32 | 82,22 |
| | % | 100% | 108% | 112% | 55% | 70% | 30% | 17% | 10% | 1% |

10

【0 2 4 5】

異なる S H I M E コンパートメントに由来する液の結果に基づいて、安定性評価は、全ての G I コンパートメントにおける安定性を表すナノボディのランクづけを許す：0 0 0 1 5 > 0 0 0 1 9 > 0 0 0 1 8。

【0 2 4 6】

まとめて、プロテアーゼ切断部位を削除することは、ナノボディのこのファミリーの例えば安定性およびプロテアーゼ感受性に対して正の効果を有さないように見える。A 1 6 6 0 0 0 1 5 における抗 P E A 変異 L 1 1 V および V 8 9 L の導入は、この特定のナノボディの安定性に対して負の効果を有するように見える。

20

例 6：安定化されたバリエーション

【0 2 4 7】

プロテアーゼ切断部位を削除することは期待された結果をもたらさなかったもので、本発明者は、さらに、固有により安定であるが、ヒト化および抗 P E A 変異が好ましくは損なわれていない手の込んだ抗 T N F - バリエーションを述べる。これは、ヒト化対プロテアーゼ安定性対親和性などの相互排他的な性質を見せる種々のアミノ酸残基の観点から、非従来のアプローチを要求した。

6. 1. 内部システイン結合と C D R 3 キモトリプシン切断部位の削除

30

【0 2 4 8】

C D R 3 内に配置され、結合特性に潜在的に影響を及ぼすが、それにもかかわらず、キモトリプシン切断部位であるアミノ酸残基 Y 1 0 0 d が Y 1 0 0 d L 置換によって削除されたバリエーションを構築することに決めた (A 0 1 6 6 0 0 0 4 6 の 1 0 0 d L ; 配列番号 6 2) 。バリエーション A 0 1 6 6 0 0 0 4 5 (配列番号 6 9) を工作して、C D R 3 の位置 1 0 0 d のチロシンのインパクトをさらに評価した。

【0 2 4 9】

加えて、本発明者は、ドメイン内ジスルフィド結合の導入によって固有に安定であるバリエーションを工作し得るという仮説を立てた (c f . Wozniak-Knopp et al. 2012 PLoS One. 2012; 7(1): e30083) 。これは 2 つのシステイン残基の導入を要求するであろう。それから、それら是对になってシステインを形成するべきである。アミノ酸残基 S 4 9 は C D R 2 に隣接しており、ヒト化目的の観点から導入されたが (ヒト生殖細胞系列 D P 5 1 に対応する。例 2 を見よ) 、ナノボディの蛋白質構造および標的 T N F - とのその相互作用を結晶化研究によって解明した後に (データは示さない) 、本発明者は、ドメイン内ジスルフィド結合を導入するためにアミノ酸 S 4 9 C および I 6 9 C 変異を変異させることに決めた。S 4 9 C、I 6 9 C、および Y 1 0 0 d L を含む新たなバリエーションは A 0 1 6 6 0 0 0 5 2 (配列番号 6 3) とアノテーションする。

40

【0 2 5 0】

アミノ酸位置 4 9 の影響を詳しく評価するために、このアミノ酸残基をアラニンに変異させた。特に、位置 4 9 のこの変異は、異なりはするがヒト生殖細胞系列 I g H V 3 - I

50

g H J に対応するであろう。新たなバリエーション A 0 1 6 6 0 0 0 4 6 (配列番号 6 2)、A 0 1 6 6 0 0 0 1 6 (配列番号 3 6)、A 0 1 6 6 0 0 0 2 0 (配列番号 3 9)、および A 0 1 6 6 0 0 0 2 1 (配列番号 4 0) の全ては A 4 9 を含む。

【 0 2 5 1 】

加えて、バリエーション A 0 1 6 6 0 0 0 2 0 (配列番号 3 9) において、位置 D 6 0 A、E 6 1 D、および P 6 2 S を物理的安定性の観点から評価した。アミノ酸残基 A 6 0、D 6 1、および S 6 2 は、実験的に確認されたキモトリプシン切断部位 Y 5 8 に隣接して、Kabat に従う C D R 2 内に配置されており、これは力価損失の高いリスクを示唆する。

【 0 2 5 2 】

さらにその上、プロテアーゼ切断部位がヒト化変異 Q 7 5 K によって偶然に導入された。いずれかの理論によって拘束されないが、本発明者は、隣接して配置されたアミノ酸残基 A 7 4 S を変えることが、ヒト化およびプロテアーゼ感受性両方にある度合までのみだが潜在的に影響を及ぼすであろうという仮説を立てた。すなわち、ヒト化およびプロテアーゼ感受性両方が許容される度合まで減ぜられるということが期待された。S 7 4 を含むバリエーションは、A 0 1 6 6 0 0 0 1 6 (「 0 0 0 1 6 」)、A 0 1 6 6 0 0 0 2 0 (「 0 0 0 2 0 」)、A 0 1 6 6 0 0 0 2 1 (「 0 0 0 2 1 」)、A 0 1 6 6 0 0 0 4 6 (「 0 0 0 4 6 」)、および A 0 1 6 6 0 0 0 5 2 (「 0 0 0 5 2 」) である (それぞれ配列番号 3 6、3 9、4 0、6 2、および 6 3)。コンパレータバリエーションは A 0 1 6 6 0 0 0 3 8 であった (「 0 0 0 3 8 」 ; 配列番号 6 4)。これは A 0 1 6 6 0 0 0 2 1 (配列番号 4 0) と同一であるが、7 4 A の代わりに 7 4 S である。

10

20

【 0 2 5 3 】

もたらされた配列が図 3 に提供されている。

6 . 2 . 安定化されたバリエーションのキャラクタリゼーション

【 0 2 5 4 】

次に、これらのバリエーションを、本質的に例 3 および 4 に述べられているように種々の性質について評価した。

【 0 2 5 5 】

まず、バリエーション 0 0 0 1 6、0 0 0 2 0、および 0 0 0 2 1 の産生を P. pastoris において例 1 に従って決定した。

【 0 2 5 6 】

得られた結果の概要が表 6 . 2 A に提供されている。

30

【 表 5 】

表 6 . 2 A

| ナノボディ | L11 | S49 | D60 | E61 | P62 | A74 | L78 | V89 | 量 (µg) | pH 7 における T _m (°C) | G I 液中での安定性 (ランクづけ) |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-------------------------------|---------------------|
| A016600021 | V | A | . | . | . | S | V | L | 332 | 65 | 1 |
| A016600016 | V | A | . | . | . | S | . | L | 499 | 65 | 2 |
| A016600020 | V | A | A | D | S | S | V | L | 374 | 75 | 3 |

40

【 0 2 5 7 】

これらの結果から、これらの変異が、8 7 µ g を産生した参照化合物の産生の 4 ~ 5 倍よりも多い (c f . 例 4 . 3)、またはさらには近縁のバリエーション 0 0 0 1 8 および 0 0 0 1 9 よりも 2 0 ~ 3 0 多い産生の増大をもたらしたということが分かる。

【 0 2 5 8 】

次に、これらのバリエーションの熱安定性を例 4 . 3 に従って決定した。得られた結果の概要もまた表 6 . 2 A に提供されている。

【 0 2 5 9 】

産生が劇的に増大したのみならず、意外なことに熱安定性もまた参照化合物と比較して 5 ~ 1 6、さらにはより近縁のバリエーション 0 0 0 1 8 および 0 0 0 1 9 と比較して最高

50

で16～19 増大した。

【0260】

意外なことに、アミノ酸残基A49は、産生および安定性に対する抗PEAアミノ酸残基V11およびL89の影響を取り除く。

【0261】

例6.1の種々のバリエーションを、例5に従ってSHIMEモデルに由来するGI液中において一緒に評価した。

【0262】

A016600021、A016600038、A016600046、およびA016600052の種々の条件下におけるインキュベーション期間の終わりにもたらされた活性の概要が、表6.2Bに提供されている。PBS中でのインキュベーションは、ナノボディの固有の安定性を確認した(データは示さない)。

【表6】

| 表6. 2B | C/CO vs 時間 h | | | | | | | |
|------------|--------------|---------|---------|--------|--------|-----|-----|------|
| | CD 結腸 A | CD 結腸 D | CD 結腸 T | SI 空腹* | SI 摂食* | UC2 | UC2 | UC2 |
| A016600021 | 66 | 58 | 76 | 65 | 31 | 86 | 57 | 71 |
| A016600038 | 48 | 41 | 47 | 60 | 33 | 77 | 50 | 59 |
| A016600046 | 47 | 29 | 62 | 52 | 24 | 92 | 59 | ≥100 |
| A016600052 | 41 | 49 | 40 | ND | ND | 64 | 43 | 55 |
| A016600039 | 38 | 26 | 39 | 23 | 20 | 78 | 20 | 55 |
| A016600040 | 38 | 40 | 19 | 67 | 24 | 91 | 83 | 63 |
| A016600045 | 85 | ≥100 | 49 | 60 | 26 | 68 | 41 | ≥100 |

*有病：NDは決定されていない；CDはクローン病である；UCは潰瘍性大腸炎である

【0263】

プロテアーゼ切断部位が除去されたバリエーションA016600046のY100dL(配列番号62)およびドメイン内システイン結合によってさらに安定化されたバリエーションA016600052(配列番号63)は、これに関していずれかの改善を提供しなかった。特に、バリエーション00046および00052のIC50は、CD3の変異ゆえに、00021と比較して2～5倍増大した(0.67nMと比較してそれぞれ1.13nMおよび3.56nM)。

【0264】

SHIMEの結果は、本質的に、Tmおよび産生の結果を確認および延長した。加えて、SHIMEモデルは、バリエーション00021(配列番号40)が一貫してバリエーションA016600040(「00040」；配列番号67)およびバリエーション00038(配列番号64)よりも安定であるということを示した。これは位置74のセリンの正の寄与を指示するものである。

【0265】

特に、A74S以外はバリエーション00040(配列番号67)と同一であるバリエーションA016600039(配列番号68)は、S74がSHIMEモデルにおいては一貫してA74よりも安定でないということを示した。

【0266】

異なるSHIMEコンパートメントに由来する液の結果を包含する全ての結果に基づいて、総合的な安定性評価は、全てのGIコンパートメントにおける安定性を表すナノボディのランクづけを許す：00021>00016>00020>00040>00015>00019>00018。

【0267】

ゆえに、A16600015における抗PEA変異L11VおよびV89Lは、この具体的なナノボディの安定性に対して負の効果をもたらし、これは49C～69C

ではなく49Aによって緩和され得た。その上、抗PEA変異L11VおよびV89Lを含むナノボディにおいて、アミノ酸残基74SはSHIMEモデルにおいて安定性にとって有益であった。

6.3. A016600021は(A016600039およびA016600040よりも)好都合な性質を有する

【0268】

経口投与については、高用量が安定性の次に要求され得ると信じられる。許容されるコストを有するためには、候補は、好ましくは高い量で産生され、相当な損失なしに精製され、高濃度で製剤化される。ゆえに、本発明者は、これらのパラメータを試験するための実験を述べる。

10

【0269】

第1に、本発明者は、A016600039およびA016600040の発現レベルをA016600021と比較することにした。

【0270】

図11Aから分かるように、A016600039(配列番号68)の発現はA016600021(配列番号40)およびA016600040(配列番号67)の発現レベルよりも相当に低かった。これらの結果はAKTAmicroによってもまた定量した。その結果は表6.3に示されている。

【表7】

表6.3

20

| クローン | 収量 Aktα (g/L細胞不含培地) |
|------------|---------------------|
| A016600021 | 6.3 |
| A016600039 | 0.49 |
| A016600040 | 2.3 |

【0271】

A016600021対A016600040の製造性に関して、両方を発酵プロセスの濃縮の間の最大可溶性について試験した。清澄化された発酵プロセスにおける最大可溶性は、(A016600021の>75g/Lに対して)A016600040では30g/Lのみである。加えて、A016600040のさらなる精製の間には大きな損失に遭遇した。

30

【0272】

ゆえに、安定性に加えて、意外なことにA016600021はA016600039およびA016600040と比べて好都合な産生および精製性質をもまた有する。

【0273】

有利な安定性、発現、および精製性質に基づいて、本発明者はA016600021に注目し、その可溶性を決定した。本発明者の完全な驚きとして、A016600021は前代未聞の200mg/mlまでH₂O中に可溶であった。

40

例7:安定化されたバリエーションはベンチマークよりも高性能である

【0274】

バリエーションA016600021(配列番号40)、A016600038(配列番号64)、およびA016600045(配列番号69)を、膜結合したヒトTNF(mTNF)に対する結合について、TNF-R2に基づく抗TNF治療薬剤のエンブレル(エタネルセプト)との競合アッセイによって評価した。そのために、ヒトTNFの切断不能形態を安定に発現する細胞株を、ヒトTNFのR77T/S78Tバリエーションをコードする真核生物発現ベクターによるHEK293H細胞のトランスフェクションによって(HEK293H-mTNFと名付ける)、以前に記載されているように生じた(Harashima

50

et al., 2001 J Immunol 166:130-136)。ピューロマイシン耐性遺伝子の共発現による選択後に、個々のmTNF発現細胞のソーティングを、レミケード（インフリキシマブ）および二次ヤギF（a b'）₂抗ヒトIgGマウスads-PEによる細胞の染色によるFACS（BD FACS Aria）によって実施した。選択された個々のクローン上の膜結合したTNFの恒常的発現は、フローサイトメトリー（BD FACS Array）によって確認された。

【0275】

まず、これらの細胞上のmTNFに対するエンブレルの結合を評価した。これには、HEK293H-mTNFシングルクローンの 5×10^5 細胞を丸底96ウェルプレートに播種し、FACS緩衝液（10% FBSおよび0.05% アジ化ナトリウムを足したPBS）によって希釈されたエンブレルの異なる濃度と、4において90分間直接的にインキュベーションした。細胞をFACS緩衝液によって洗浄し、二次ヤギF（a b'）₂抗ヒトIgGマウスads-PE抗体によって4において30分間染色した。細胞の洗浄および死細胞染色試薬TO-PRO-3ヨウ素塩の存在下におけるFACS緩衝液中でのインキュベーション後に、生存可能なHEK293H-mTNF細胞上のmTNFに対するエンブレルの結合を、BD FACS Arrayの読み出しによって測定した。得られた用量反応曲線から、mTNFに対する結合についてのエンブレルのEC30およびEC90値は、それぞれ0.02 nMおよび0.2 nMであると定義された。両方の濃度は、後でTNFをターゲティングするナノボディとの競合アッセイに適用した。

【0276】

A016600021、A016600038、およびA016600045のmTNF結合を評価するために、固定されたEC30およびEC90濃度のエンブレルによる競合実験をセットアップした。抗TNFナノボディの力価をベンチマーク化合物シムジア（セルトリスマブペゴル）と比較した。加えて、無関係なナノボディ（IRR00027）を負のコントロールとして包含した。この実験においては300 nMから12.5 pMの範囲の抗TNFナノボディまたはシムジアの異なる濃度との組み合わせでのエンブレルの固定された濃度（EC30またはEC90）による細胞の共処置を使う第1のインキュベーションステップを除けば、このアッセイにおいては、エンブレル結合について上で記載されている同一の条件を適用した。BD FACS Arrayの読み出しは、ナノボディの増大していく濃度およびシムジアによる共処置によって明瞭に低減されたHEK293H-mTNF細胞上へのエンブレルの結合を決定しており、mTNFに対する結合についてエンブレルとの抗TNF薬剤の競合を指示した。抗TNF薬剤のIC50値を表7に指示されているように決定した。

【表8】

| 表7 | エンブレル
(EC30: 0.02nM) | エンブレル
(EC90: 0.2nM) |
|------------|-------------------------|------------------------|
| A016600021 | 0.43nM | 0.65nM |
| A016600038 | 0.43nM | 0.70nM |
| A016600045 | 0.54nM | 0.76nM |
| シムジア | 7.9nM | 4.8nM |

【0277】

得られた結果は、A016600021、A016600038、およびA016600045が、EC90ではシムジアよりも6~7倍良い力価、EC30ではシムジアより

も15～18倍良い驚異的な力価を有するということを実証している。安定化されたバリエーションは、mTNF結合についてエンブレルと競合するだけの同等の力価を有する。

【0278】

競合FACSにおいては、ナノボディが、mTNFに対するエンブレルの結合を完全にもまた阻害し得るということが実証された。これは、経口適用のための医薬としての優れた好適性を指示するものであろう。対照的に、シムジアの高濃度はエンブレル結合の部分的なブロックのみをもたらした(図10)。

【0279】

本願において引用される参照の全て(文献参照、発行済特許、公開特許出願、および同時係属中の特許出願を包含する)の内容全体は、特に本願において上で参照されている教示について、参照によってここに明示的に組み込まれる。

【表9】

表A：参照AおよびそのCDRならびにPMP6C11

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|---------------------|---|--|
| 58 | NC55TNF-NC7
(PMP6C11).
WO06/122786:
配列番号：125 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGR
EFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNVTYVLYQMDSLKPED
TAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS |
| 59 | WO2015/173325
配列番号：345 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR
EFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPED
TALYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS |
| 1 | 参照A | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR
EFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPED
TAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS |
| 2 | CDR1 (Kabat) | TADMG |
| 3 | CDR2 (Kabat) | RISGIDGTTYDEPVKG |
| 4 | CDR3 (Kabat/Abm) | PRYADQWSAYDY |
| 5 | CDR1 (Abm) | GFTFSTADMG |
| 6 | CDR2 (Abm) | RISGIDGTTY |
| 7 | CDR3 (Kabat/Abm) | PRYADQWSAYDY |
| 注：配列番号4は配列番号7と同一である | | |

10

20

30

40

50

【表 10】

表B：位置 11、89、110、および 112 のアミノ酸の可能な組み合わせ

| | 位置 | | | | | 位置 | | | |
|-------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|
| | 11 | 89 | 110 | 112 | | 11 | 89 | 110 | 112 |
| 組み合わせ | <u>L</u> | <u>T</u> | <u>T</u> | <u>S</u> | 組み合わせ | V | T | T | S |
| | L | T | T | K | | V | T | T | K |
| | L | T | T | Q | | V | T | T | Q |
| | L | T | K | S | | V | T | K | S |
| | L | T | Q | S | | V | T | Q | S |
| | L | V | T | K | | V | V | T | K |
| | L | V | T | Q | | V | V | T | Q |
| | L | V | K | S | | V | V | K | S |
| | L | V | Q | S | | V | V | Q | S |
| | L | L | T | K | | <u>V</u> | <u>L</u> | <u>T</u> | <u>S</u> |
| | L | L | T | Q | | <u>V</u> | <u>L</u> | <u>T</u> | <u>K</u> |
| | L | L | K | S | | <u>V</u> | <u>L</u> | <u>T</u> | <u>Q</u> |
| | L | L | Q | S | | <u>V</u> | <u>L</u> | <u>K</u> | <u>S</u> |
| | | | | | | <u>V</u> | <u>L</u> | <u>Q</u> | <u>S</u> |

10

20

30

40

50

【表 1 1】

| | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|----|----|-----|-----|----|
| 組み合わせ | | | | | 11 | 89 | 110 | 112 | 74 |
| | L | T | T | S | L | T | T | S | S |
| | L | T | T | K | L | T | T | K | S |
| | L | T | T | Q | L | T | T | Q | S |
| | L | T | K | S | L | T | K | S | S |
| | L | T | Q | S | L | T | Q | S | S |
| | L | V | T | K | L | V | T | K | S |
| | L | V | T | Q | L | V | T | Q | S |
| | L | V | K | S | L | V | K | S | S |
| | L | V | Q | S | L | V | Q | S | S |
| | L | L | T | K | L | L | T | K | S |
| | L | L | T | Q | L | L | T | Q | S |
| | L | L | K | S | L | L | K | S | S |
| | L | L | Q | S | L | L | Q | S | S |

10

| | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|----|----|-----|-----|----|
| 組み合わせ | | | | | 11 | 89 | 110 | 112 | 49 |
| | L | T | T | S | L | T | T | S | A |
| | L | T | T | K | L | T | T | K | A |
| | L | T | T | Q | L | T | T | Q | A |
| | L | T | K | S | L | T | K | S | A |
| | L | T | Q | S | L | T | Q | S | A |
| | L | V | T | K | L | V | T | K | A |
| | L | V | T | Q | L | V | T | Q | A |
| | L | V | K | S | L | V | K | S | A |
| | L | V | Q | S | L | V | Q | S | A |
| | L | L | T | K | L | L | T | K | A |
| | L | L | T | Q | L | L | T | Q | A |
| | L | L | K | S | L | L | K | S | A |
| | L | L | Q | S | L | L | Q | S | A |

20

表B-1：位置11、89、110、112、49、および74のアミノ酸の可能な組み合わせ

| | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|----|----|-----|-----|----|----|
| 組み合わせ | | | | | 11 | 89 | 110 | 112 | 49 | 74 |
| | L | T | T | S | L | T | T | S | A | S |
| | L | T | T | K | L | T | T | K | A | S |
| | L | T | T | Q | L | T | T | Q | A | S |
| | L | T | K | S | L | T | K | S | A | S |
| | L | T | Q | S | L | T | Q | S | A | S |
| | L | V | T | K | L | V | T | K | A | S |
| | L | V | T | Q | L | V | T | Q | A | S |
| | L | V | K | S | L | V | K | S | A | S |
| | L | V | Q | S | L | V | Q | S | A | S |
| | L | L | T | K | L | L | T | K | A | S |
| | L | L | T | Q | L | L | T | Q | A | S |
| | L | L | K | S | L | L | K | S | A | S |
| | L | L | Q | S | L | L | Q | S | A | S |

30

40

50

【表 1 2】

位置

| 11 | 89 | 110 | 112 | 74 |
|-------|----|-----|-----|----|
| V | T | T | S | S |
| V | T | T | K | S |
| V | T | T | Q | S |
| V | T | K | S | S |
| V | V | T | K | S |
| V | V | T | Q | S |
| V | V | K | S | S |
| V | V | Q | S | S |
| V | L | T | S | S |
| V | L | T | K | S |
| V | L | T | Q | S |
| V | L | K | S | S |
| V | L | Q | S | S |
| V | T | Q | S | S |
| 組み合わせ | | | | |

10

位置

| 11 | 89 | 110 | 112 | 49 |
|-------|----|-----|-----|----|
| V | T | T | S | A |
| V | T | T | K | A |
| V | T | T | Q | A |
| V | T | K | S | A |
| V | V | T | K | A |
| V | V | T | Q | A |
| V | V | K | S | A |
| V | V | Q | S | A |
| V | L | T | S | A |
| V | L | T | K | A |
| V | L | T | Q | A |
| V | L | K | S | A |
| V | L | Q | S | A |
| V | T | Q | S | A |
| 組み合わせ | | | | |

20

表B-2: 位置 11、89、110、112、49、および74のアミノ酸の可能な組み合わせ

位置

| 11 | 89 | 110 | 112 | 49 | 74 |
|-------|----|-----|-----|----|----|
| V | T | T | S | A | S |
| V | T | T | K | A | S |
| V | T | T | Q | A | S |
| V | T | K | S | A | S |
| V | V | T | K | A | S |
| V | V | T | Q | A | S |
| V | V | K | S | A | S |
| V | V | Q | S | A | S |
| V | L | T | S | A | S |
| V | L | T | K | A | S |
| V | L | T | Q | A | S |
| V | L | K | S | A | S |
| V | L | Q | S | A | S |
| V | T | Q | S | A | S |
| 組み合わせ | | | | | |

30

40

50

【表 1 3】

表C-1：半減期延長性のISVDなしの本発明のいくつかの化合物の概略的な図式。

| | |
|---|----|
| [本発明のTNF結合因子] | |
| [本発明のTNF結合因子]-X(n) | |
| [本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子] | |
| [本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子]-X(n) | |
| [本発明のTNF結合因子]-[TNF2] | |
| [本発明のTNF結合因子]-[TNF2]-X(n) | 10 |
| [TNF2]-[本発明のTNF結合因子] | |
| [TNF2]-[本発明のTNF結合因子]-X(n) | |
| [本発明のTNF結合因子]-[ターゲティングユニット] | |
| [ターゲティングユニット]-[本発明のTNF結合因子]- | |
| [本発明のTNF結合因子]-[ターゲティングユニット]-X(n) | |
| [本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子]-[ターゲティングユニット]-X(n) | |
| レジェンド： | |
| - 「[本発明のTNF結合因子]」は、本発明のTNF結合因子を表す | 20 |
| - 「-」は、直接的な共有結合または好適なリンカーどちらか、例えば9GS、15GS、もしくは35GSリンカーを表す | |
| - 「X(n)」は、本願において定義されるC末端延長、例えば単一のアラニン残基を表す。 | |
| - 「[TNF2]」は、本発明のTNF結合因子とは異なるTNFに対する結合ドメインまたは結合ユニット(特にISVD)を表す。 | |
| - 「[ターゲティングユニット]」は、本発明の化合物を特定の細胞、組織、または臓器にターゲティングする結合ドメインまたは結合ユニット(特にISVD)を表す | |

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表C-2：半減期延長性のISVDを有する本発明のいくつかの化合物の概略的な図式。

| |
|--|
| [本発明のTNF結合因子]-[HLE] |
| [HLE]-[本発明のTNF結合因子] |
| [本発明のTNF結合因子]-[HLE]-X (n) |
| [HLE]-[本発明のTNF結合因子]-X (n) |
| [本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子]-[HLE] |
| [本発明のTNF結合因子]-[HLE]-[本発明のTNF結合因子] |
| [HLE]-[本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子] |
| [本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子]-[HLE]-X (n) |
| [本発明のTNF結合因子]-[HLE]-[本発明のTNF結合因子]-X (n) |
| [HLE]-[本発明のTNF結合因子]-[本発明のTNF結合因子]-X (n) |
| [本発明のTNF結合因子]-[TNF2]-[HLE] |
| [本発明のTNF結合因子]-[HLE]-[TNF2] |
| [HLE]-[本発明のTNF結合因子]-[TNF2] |
| [HLE]-[TNF2]-[本発明のTNF結合因子] |
| [TNF2]-[本発明のTNF結合因子]-[HLE] |
| [TNF2]-[HLE]-[本発明のTNF結合因子] |
| [本発明のTNF結合因子]-[TNF2]-[HLE]-X (n) |
| [本発明のTNF結合因子]-[HLE]-[TNF2]-X (n) |
| [HLE]-[本発明のTNF結合因子]-[TNF2]-X (n) |
| [HLE]-[TNF2]-[本発明のTNF結合因子]-X (n) |
| [TNF2]-[本発明のTNF結合因子]-[HLE]-X (n) |
| [TNF2]-[HLE]-[本発明のTNF結合因子]-X (n) |
| [本発明のTNF結合因子]-[ターゲティングユニット]-[HLE] |
| [ターゲティングユニット]-[本発明のTNF結合因子]-[HLE] |
| [本発明のTNF結合因子]-[ターゲティングユニット]-[HLE]-X (n) |
| [HLE]-[ターゲティングユニット]-[本発明のTNF結合因子]-[HLE]-X (n) |
| レジェンド：
<ul style="list-style-type: none"> - 「[本発明のTNF結合因子]」は本発明のTNF結合因子を表す - 「-」は、直接的な共有結合または好適なリンカーどちらか、例えば9GS、15GS、もしくは35GSリンカーを表す - 「X(n)」は、本願において定義されるC末端延長、例えば単一のアラニン残基を表す。 - 「[HLE]」は、半減期延長性の結合ドメインまたは結合ユニット(特に半減期延長性のISVD)、例えば(ヒト)血清アルブミンに対するISVD(特にISVD)を表す； - 「[TNF2]」は、本発明のTNF結合因子とは異なるTNFに対する結合ドメインまたは結合ユニット(特にISVD)を表す。 - 「[ターゲティングユニット]」は、本発明の化合物を特定の細胞、組織、または臓器にターゲティングする結合ドメインまたは結合ユニット(特にISVD)を表す |

10

20

30

40

50

【表 1 5】

表 D : 血清アルブミン結合性 S S V D 配列 (「I D」は本願において用いられる配列番号を言う)

| 名称 | I D | アミノ酸配列 |
|--------------------|-----|--|
| Alb8 | 70 | EVQLVESGGGLVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS |
| Alb23 | 71 | EVQLLES GGGVLP GGS LRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS |
| Alb129 | 72 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA |
| Alb132 | 73 | EVQLVESGGGVVQP GGS LRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA |
| Alb11 | 74 | EVQLVESGGGLVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS |
| Alb11
(S112K)-A | 75 | EVQLVESGGGLVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVKVSSA |
| Alb82 | 76 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS |
| Alb82-A | 77 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA |
| Alb82-AA | 78 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSAA |
| Alb82-AAA | 79 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSAAA |
| Alb82-G | 80 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGG |
| Alb82-GG | 81 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGG |
| Alb82-GGG | 82 | EVQLVESGGGVVQP GNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGG |
| Alb92 | 83 | EVQLVESGGGVVQP GGS LRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS |
| Alb223 | 84 | EVQLVESGGGVVQP GGS LRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA |

10

20

30

40

50

【表 16】

表E：種々のアミノ酸配列（「ID」は本願において用いられる配列番号を言う）

| 名称 | ID | アミノ酸配列 |
|-----------------|-----|--|
| 5GS リンカー | 85 | GGGGS |
| 7GS リンカー | 86 | SGGSGGS |
| 8GS リンカー | 87 | GGGGCGGGS |
| 9GS リンカー | 88 | GGGGSGGGS |
| 10GS リンカー | 89 | GGGGSGGGGS |
| 15GS リンカー | 90 | GGGGSGGGGSGGGGS |
| 18GS リンカー | 91 | GGGGSGGGGSGGGGGGS |
| 20GS リンカー | 92 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| 25GS リンカー | 93 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| 30GS リンカー | 94 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| 35GS リンカー | 95 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| 40GS リンカー | 96 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| G1 ヒンジ | 97 | EPKSCDKTHTCPPCP |
| 9GS-G1 ヒンジ | 98 | GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP |
| ラマ上部長鎖
ヒンジ領域 | 99 | EPKTPKPQPAAA |
| G3 ヒンジ | 100 | ELKTP LGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP
PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP |

10

20

30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】

図 1

| Kabatに從う付番
(VH) | Chothiaに從う付番
(VH) | Abo付番 | IMGT |
|--------------------|----------------------|-------|------|
| 11 | 11 | 12 | 12 |
| 14 | 14 | 15 | 15 |
| 41 | 41 | 48 | 46 |
| 42 | 42 | 49 | 47 |
| 87 | 87 | 101 | 99 |
| 89 | 89 | 103 | 101 |
| 108 | 108 | 144 | --- |
| 110 | 110 | 146 | --- |
| 112 | 112 | 148 | --- |

ソース : <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/NumFrame.html>

【 図 2 】

図 2

```

              10      20      30      40
-----|-----|-----|-----|
配列番号 : 58  QVQLVESGGGLVQAGGSLRSLCTASGTSSTADMGWFRQPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPE
配列番号 : 1   E.....P.....F.F.....A
配列番号 : 59  E.....P.....F.F.....A

              50      60      70      80
-----|-----|-----|-----|
配列番号 : 58  PGKGRFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQTNYL
配列番号 : 1   .....S.....N.K..L..
配列番号 : 59  .....S.....N.K..L..

              90      100     110
--abc--|-----|abcd-----|
配列番号 : 58  QMDSLKPEDTAVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTQVTVSS-
配列番号 : 1   ..N..R.....L.....
配列番号 : 59  ..N..R.....L.....

```

10

【 図 3 - 1 】

図 3

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|------|------------------|---|
| 1 | 参照A: | EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 2 | CDR1 (Kabat) | TADMG |
| 3 | CDR2 (Kabat) | RISGIDGTTYDEPVKG |
| 4 | CDR3 (Kabat/Abm) | PRYADQNSAYDY |
| 5 | CDR1 (Abm) | GFTTFSTADMG |
| 6 | CDR2 (Abm) | RISGIDGTTY |
| 7 | CDR3 (Kabat/Abm) | PRYADQNSAYDY |
| 8 | 参照A:
(89T) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 9 | 参照A:
+ 110K) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 10 | 参照A:
+ 110Q) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 11 | 参照A:
+ 112K) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 12 | 参照A:
+ 112Q) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |

【 図 3 - 2 】

図 3 (続き)

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|------|-----------------------|---|
| 13 | 参照A:
+ 110K) | (89L) EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 14 | 参照A:
+ 110Q) | (89L) EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 15 | 参照A:
+ 112K) | (89L) EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 16 | 参照A:
+ 112Q) | (89L) EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 17 | 参照A:
+ 89L) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 18 | 参照A:
+ 89L + 110K) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 19 | 参照A:
+ 89L + 110Q) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |
| 20 | 参照A:
+ 89L + 112K) | (11V) EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCTASGFTTFSTADMGWFRQAPGKGRFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEATVYYCRSPRYADQNSAYDYWGQGTLLVTVSS |

20

30

40

50

【 図 3 - 3 】

図 3 (続き)

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|------|----------------------------|---|
| 21 | 参照A:
(11V + 89L + 112Q) | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 22 | 参照A:
(89T) + A | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
TYCYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 23 | 参照A:
(11V + 110K) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVKVSSA |
| 24 | 参照A:
(11V + 110Q) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVQVSSA |
| 25 | 参照A:
(11V + 112K) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVVSSA |
| 26 | 参照A:
(11V + 112Q) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 27 | 参照A:
(89L + 110K) + A | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVKVSSA |
| 28 | 参照A:
(89L + 110Q) + A | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVQVSSA |

【 図 3 - 4 】

図 3 (続き)

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|------|--------------------------------|--|
| 29 | 参照A:
(89L + 112K) + A | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 30 | 参照A:
(89L + 112Q) + A | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 31 | 参照A:
(11V + 89L) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 32 | 参照A:
(11V + 89L + 110K) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVKVSSA |
| 33 | 参照A:
(11V + 89L + 110Q) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVQVSSA |
| 34 | 参照A:
(11V + 89L + 112K) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVVSSA |
| 35 | 参照A:
(11V + 89L + 112Q) + A | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 36 | 本発明のTNF
結合因子
(00016) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 37 | 本発明のTNF
結合因子
(00018) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |

10

20

【 図 3 - 5 】

図 3 (続き)

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|------|---|--|
| 38 | 本発明のTNF
結合因子
(00019) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 39 | 本発明のTNF
結合因子
(00020) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 40 | 本発明のTNF
結合因子
(00021) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 41 | 本発明のTNF
結合因子
(00030) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 42 | HIS6-FLAG3 タグ | HHHHHGAADYKDHGDYKDHDIYKDDDDKAA |
| 43 | C-末端 | VTVKS |
| 44 | C-末端 | VTVQS |
| 45 | C-末端 | VKVSS |
| 46 | C-末端 | VQVSS |
| 47 | C-末端 | VTVKSX (n) |
| 48 | C-末端 | VTVQSX (n) |
| 49 | C-末端 | VKVSSX (n) |
| 50 | C-末端 | VQVSSX (n) |
| 51 | C-末端 | VTVKS |
| 52 | C-末端 | VTVQSA |
| 53 | C-末端 | VKVSSA |
| 54 | C-末端 | VQVSSA |
| 55 | C-末端 | VTVSS |
| 56 | C-末端 | VTVSSX ₍₁₎ |
| 57 | C-末端 | VTVSSA |
| 58 | NC55TNF-NC7
(PMP6C11)
WO2006/122786:
配列番号: 125 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 59 | WO2015/173325
配列番号: 345 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |

【 図 3 - 6 】

図 3 (続き)

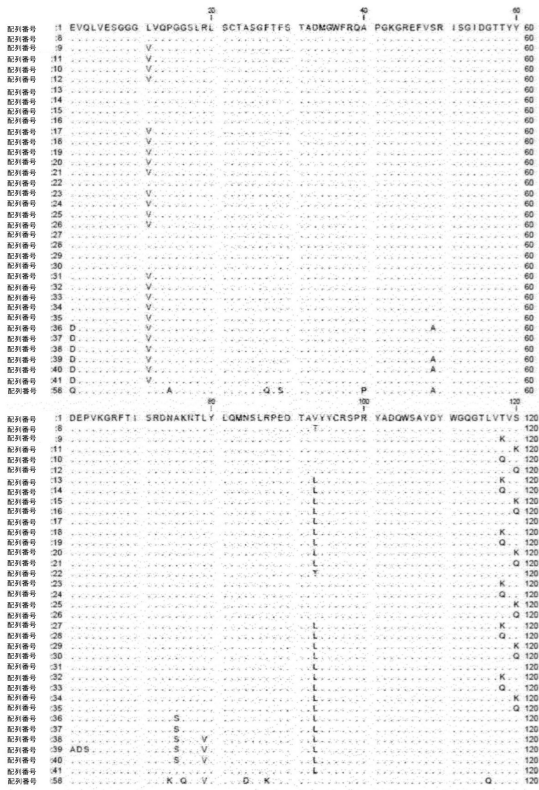
| | | |
|----|--|--|
| 60 | TNF200 | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 61 | A016600015
(TNF200A) | DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 62 | A016600046 100dL
(00046) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSALDYWGQGLTVTVSSA |
| 63 | A016600052 (49C-69C
+ 100dL (00052) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVCRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSALDYWGQGLTVTVSSA |
| 64 | A016600038 (00038) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSA |
| 65 | A016600013 (00013) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 66 | A016600014 (00014) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 67 | A016600040 (00040) | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 68 | A016600039 (00039) | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS |
| 69 | A016600045 (00045) | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE
FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA
LYYCRSPRYADQWSAHDYWGQGLTVTVSSA |

30

40

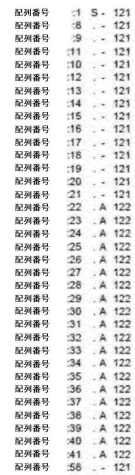
【 図 4 - 1 】

図 4



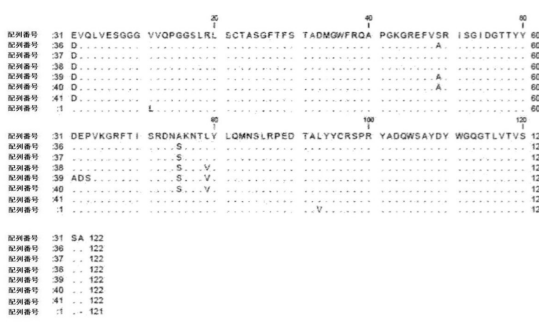
【 図 4 - 2 】

図 4 (続き)



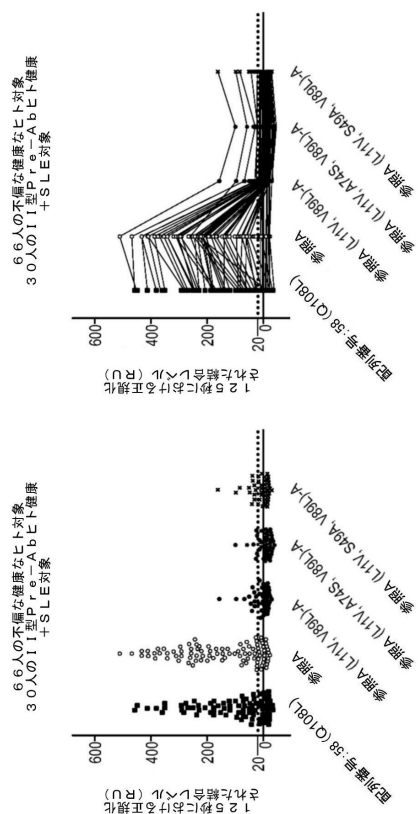
【 図 5 】

図 5



【 図 6 】

図 6



10

20

30

40

50

【図7-1】

図7

| サンプル | 正規化されたPre-A結合レベル
(12.5sにおけるRU) | | | | | 参照と比較しての
Pre-A結合の低減% | | | |
|------------------|-----------------------------------|-----|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) |
| IHuS#ABL-0042-02 | -15 | -11 | -20 | -23 | -15 | | | | |
| IHuS#ABL-0088-03 | 118 | 200 | 3 | -3 | 12 | 41 | 99 | 100 | 94 |
| IHuS#ABL-0137-01 | -17 | 8 | -15 | 22 | -14 | | | | |
| IHuS#ABL-0138-01 | -11 | 18 | -14 | 17 | -17 | | | | |
| IHuS#ABL-0139-01 | 0 | 37 | -9 | -12 | 11 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0141-01 | -17 | -2 | -15 | -15 | -10 | | | | |
| IHuS#ABL-0149-01 | 34 | 121 | 14 | -10 | 32 | 71 | 88 | 100 | 73 |
| IHuS#ABL-0150-01 | 11 | 17 | 20 | 16 | 13 | | | | |
| IHuS#ABL-0151-01 | 38 | 126 | -10 | -16 | -6 | 70 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0152-01 | -2 | 50 | 10 | 12 | -11 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0153-01 | 61 | 145 | -16 | -23 | -15 | 58 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0154-01 | -32 | -16 | -29 | -31 | -25 | | | | |
| IHuS#ABL-0159-01 | -24 | -5 | -26 | -34 | -23 | | | | |
| IHuS#ABL-0160-01 | -18 | -12 | -22 | 18 | -12 | | | | |
| IHuS#ABL-0161-01 | -17 | -8 | 11 | 16 | 8 | | | | |
| IHuS#ABL-0162-01 | -15 | -10 | -13 | -17 | -17 | | | | |
| IHuS#ABL-0148-01 | 290 | 369 | -6 | -13 | -10 | 21 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0163-01 | 236 | 310 | 4 | -6 | 5 | 24 | 99 | 100 | 98 |
| IHuS#ABL-0171-01 | -17 | -8 | -21 | -24 | -18 | | | | |
| IHuS#ABL-0172-01 | 47 | 48 | -18 | -17 | -11 | 0 | 100 | 100 | 100 |

【図7-2】

図7(続き)

| サンプル | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) |
|------------------|------------------------|-----|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| IHuS#ABL-0218-01 | 63 | 72 | -12 | -5 | -9 | 13 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0040-03 | 294 | 342 | 1 | -11 | -7 | 17 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0090-02 | 413 | 433 | 25 | -3 | 31 | 5 | 94 | 100 | 93 |
| IHuS#ABL-0173-01 | 186 | 229 | -14 | -16 | -13 | 18 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0188-01 | -14 | -6 | -21 | -23 | -16 | | | | |
| IHuS#ABL-0008-02 | 458 | 468 | 66 | 34 | 64 | 2 | 86 | 93 | 82 |
| IHuS#ABL-0189-01 | -12 | -1 | -10 | -13 | -6 | | | | |
| IHuS#ABL-0190-01 | -11 | -3 | -11 | -13 | -16 | | | | |
| IHuS#ABL-0191-01 | -21 | -13 | -17 | -19 | -20 | | | | |
| IHuS#ABL-0192-01 | -14 | 3 | -20 | -17 | -16 | | | | |
| IHuS#ABL-0185-01 | -3 | 8 | -17 | 20 | -13 | | | | |
| IHuS#ABL-0186-01 | 206 | 240 | -20 | -21 | -13 | 14 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0189-01 | 229 | 250 | 15 | 5 | 16 | 8 | 94 | 98 | 94 |
| IHuS#ABL-0200-01 | -12 | 12 | -11 | -12 | -14 | | | | |
| IHuS#ABL-0201-01 | 11 | 30 | -2 | -9 | -1 | 63 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0202-01 | 29 | 90 | -13 | -17 | -8 | 67 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0044-02 | -25 | -23 | -26 | -26 | -22 | | | | |
| IHuS#ABL-0203-01 | -9 | 18 | -15 | -16 | -8 | | | | |
| IHuS#ABL-0210-01 | -10 | 3 | -11 | -13 | -6 | | | | |
| IHuS#ABL-0211-01 | 2 | 31 | -11 | -13 | -14 | 92 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0212-01 | 47 | 137 | 4 | -5 | 5 | 66 | 97 | 100 | 97 |
| IHuS#ABL-0213-01 | -14 | 0 | -14 | -13 | -11 | | | | |

10

20

【図7-3】

図7(続き)

| サンプル | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) |
|------------------|------------------------|-----|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| IHuS#ABL-0183-01 | 290 | 353 | 13 | -1 | 17 | 18 | 96 | 100 | 95 |
| IHuS#ABL-0005-06 | -18 | -16 | -21 | -20 | -16 | | | | |
| IHuS#ABL-0219-01 | -3 | 7 | -12 | -14 | -3 | | | | |
| IHuS#ABL-0221-01 | -2 | 16 | -20 | -23 | -24 | | | | |
| IHuS#ABL-0222-01 | 140 | 144 | -11 | -13 | -12 | 3 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0223-01 | 177 | 267 | -31 | -33 | -27 | 34 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0142-01 | -2 | 25 | -22 | -23 | -15 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0143-01 | 12 | 14 | -17 | -14 | 7 | | | | |
| IHuS#ABL-0144-01 | 1 | 83 | -11 | -16 | -8 | 99 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0145-01 | 87 | 81 | -14 | -16 | -16 | -7 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0146-01 | 18 | 61 | -16 | -17 | -16 | 74 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0147-01 | 72 | 163 | -24 | -26 | -20 | 56 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0031-04 | -35 | 24 | -18 | -26 | -17 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0047-02 | -5 | 24 | -27 | -26 | -18 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0155-01 | 49 | 65 | -4 | -14 | 0 | 24 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0156-01 | 26 | 59 | -7 | -11 | -10 | 57 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0157-01 | 98 | 261 | -4 | -13 | 8 | 63 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0158-01 | 175 | 222 | -13 | -16 | -7 | 21 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0164-01 | -19 | -17 | -19 | -22 | -14 | | | | |
| IHuS#ABL-0166-01 | -19 | -18 | -18 | -18 | -11 | | | | |
| IHuS#ABL-0167-01 | -23 | 237 | -20 | -31 | -11 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0168-01 | -14 | -11 | -13 | -14 | -14 | | | | |

【図7-4】

図7(続き)

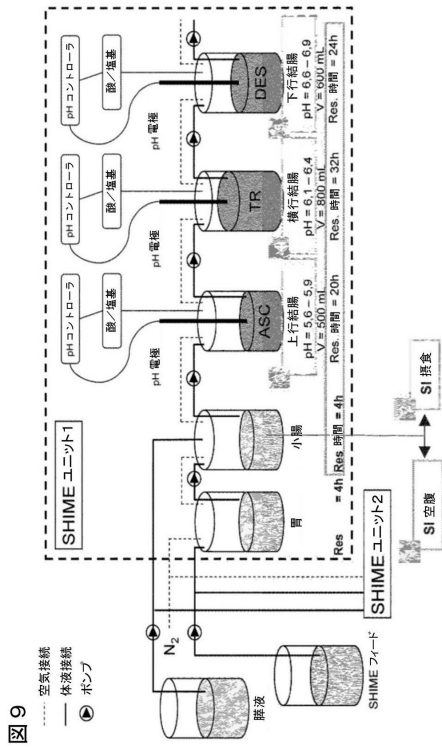
| サンプル | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) | 配列
番号:58
(Q108L) | 参照A
(L11V,
V89L) | 参照A
(L11V,
A74S,
V89L) | 参照A
(L11V,
S49A,
V89L) |
|---------------------|------------------------|-----|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| IHuS#ABL-0189-01 | -5 | 21 | -10 | -12 | -11 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0170-01 | 86 | 242 | -16 | -19 | -11 | 64 | 100 | 100 | 100 |
| ABL-0041-01_C | 34 | 77 | -19 | -31 | -19 | 55 | 100 | 100 | 100 |
| ABL-0053-01_C | 176 | 302 | -11 | -10 | 3 | 42 | 100 | 100 | 100 |
| ABL-0054-01_C | 249 | 293 | -6 | -13 | 6 | 15 | 100 | 100 | 100 |
| ABL-0045-01_C | 379 | 434 | 43 | 21 | 36 | 13 | 90 | 95 | 92 |
| ABL-0062-01_C | 268 | 375 | -7 | -18 | -8 | 29 | 100 | 100 | 100 |
| ABL-0039-01_C | 361 | 410 | 31 | 11 | 30 | 12 | 92 | 97 | 93 |
| HS#2606208In11 | 450 | 512 | 156 | 100 | 161 | 12 | 70 | 80 | 69 |
| IHuS#29Sep201In14F | 151 | 221 | 36 | 22 | 36 | 32 | 84 | 90 | 82 |
| IHuS#29Sep201In139F | 7 | 167 | -9 | -17 | -9 | 96 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#29Sep201In143M | 32 | 55 | 6 | -14 | -11 | 42 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#29Sep201In144F | 276 | 412 | 31 | 12 | 36 | 33 | 92 | 97 | 91 |
| IHuS#P012314A20 | 76 | 102 | -10 | -12 | -8 | 25 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#P012314A08 | 133 | 216 | -7 | -16 | -4 | 38 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#P012314A12 | 121 | 191 | -13 | -15 | -13 | 37 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0195-01 | 231 | 296 | -2 | -10 | 1 | 22 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#ABL-0208-01 | 351 | 384 | 50 | 26 | 49 | 9 | 87 | 93 | 87 |
| IHuS#ABL-0184-01 | 66 | 238 | -4 | -13 | -2 | 72 | 100 | 100 | 100 |
| NB130259-004 | 39 | 71 | -12 | -12 | 8 | 44 | 100 | 100 | 100 |
| IHuS#04APR2012In05m | 74 | 178 | 0 | -14 | 2 | 59 | 100 | 100 | 98 |

30

40

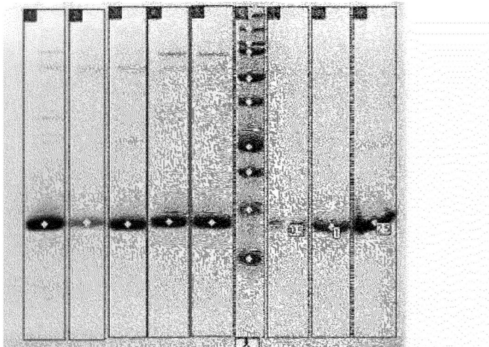
50

【 図 9 】



【 図 1 1 】

図 1 1



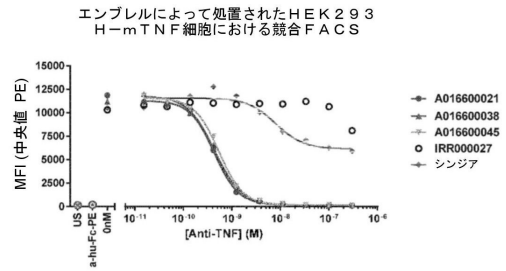
【 配列表 】

0007357038000001.app

【 図 1 0 】

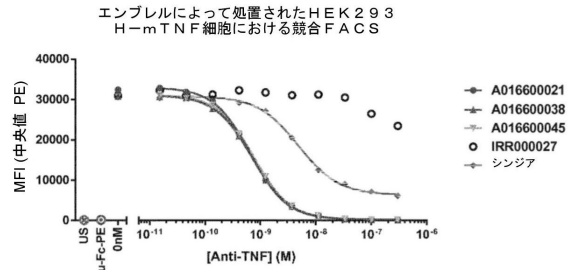
図 1 0

A



10

B



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)
 A 6 1 P 1/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 1/02 (2006.01)
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 9/20 (2006.01)
 A 6 1 K 9/02 (2006.01)
 A 6 1 K 9/08 (2006.01)
 A 6 1 K 9/10 (2006.01)
 A 6 1 K 9/107(2006.01)
 A 6 1 K 9/14 (2006.01)
 A 6 1 K 9/16 (2006.01)
 A 6 1 K 9/48 (2006.01)
 A 6 1 K 47/60 (2017.01)
 A 6 1 K 47/65 (2017.01)
 A 6 1 K 47/64 (2017.01)
 A 6 1 K 39/39 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395(2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 16/18
 C 0 7 K 16/46
 A 6 1 P 1/00
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/02
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 9/20
 A 6 1 K 9/02
 A 6 1 K 9/08
 A 6 1 K 9/10
 A 6 1 K 9/107
 A 6 1 K 9/14
 A 6 1 K 9/16
 A 6 1 K 9/48
 A 6 1 K 47/60
 A 6 1 K 47/65
 A 6 1 K 47/64
 A 6 1 K 39/39
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 C 1 2 N 15/62

D
 U
 Y
 E
 Z

リンデカウテル 2 0

(72)発明者

ヴァン ヘーク, ジーノ

ベルギー国 9 7 0 0 アイネ、オムローブ 3 5 # 2 0 3

審査官

田ノ上 拓白

(56)参考文献

特許第 6 9 6 2 9 1 5 (J P , B 2)
 特表 2 0 0 8 - 5 3 9 7 7 2 (J P , A)
 特開 2 0 1 1 - 2 5 6 1 6 9 (J P , A)
 特表 2 0 1 4 - 5 2 5 7 5 2 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 1 5
 C 1 2 N 1 / 1 9
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 5 / 1 0
 A 6 1 P 1 / 0 0
 A 6 1 P 1 / 0 4
 A 6 1 P 1 / 0 2
 A 6 1 P 1 7 / 0 2
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 A 6 1 K 9 / 2 0
 A 6 1 K 9 / 0 2
 A 6 1 K 9 / 0 8
 A 6 1 K 9 / 1 0
 A 6 1 K 9 / 1 0 7
 A 6 1 K 9 / 1 4

A 6 1 K 9 / 1 6

A 6 1 K 9 / 4 8

A 6 1 K 4 7 / 6 0

A 6 1 K 4 7 / 6 5

A 6 1 K 4 7 / 6 4

A 6 1 K 3 9 / 3 9

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

S w i s s P r o t / G e n e S e q