

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5647222号  
(P5647222)

(45) 発行日 平成26年12月24日 (2014. 12. 24)

(24) 登録日 平成26年11月14日 (2014. 11. 14)

(51) Int. Cl.	F 1	
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
<b>C O 7 K</b> 16/28 (2006. 01)	C O 7 K	16/28
<b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N	1/15
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N	1/19
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N	1/21

請求項の数 12 (全 189 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-504035 (P2012-504035)	(73) 特許権者	505166225
(86) (22) 出願日	平成22年4月12日 (2010. 4. 12)		アブリンクス エン. ヴェー.
(65) 公表番号	特表2012-523226 (P2012-523226A)		ベルギー, ベー-9052 ヘントーツヴ
(43) 公表日	平成24年10月4日 (2012. 10. 4)		ィナールデ, テヒノロジーパルク 21
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/054764	(74) 代理人	110001508
(87) 国際公開番号	W02010/115998		特許業務法人 津国
(87) 国際公開日	平成22年10月14日 (2010. 10. 14)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成23年11月16日 (2011. 11. 16)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	61/168, 410	(74) 代理人	100119079
(32) 優先日	平成21年4月10日 (2009. 4. 10)		弁理士 伊藤 佐保子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100116528
前置審査			弁理士 三宅 俊男
		(74) 代理人	100146031
			弁理士 柴田 明夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 6 R 関連疾患及び障害の治療のための I L - 6 R に指向性を有する改善されたアミノ酸配列及びこれを含むポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6 5 ~ 配列番号 6 9 のうちの 1 つからなるポリペプチドからなる群から選択される、I L - 6 R に指向性を有するポリペプチド。

【請求項 2】

化合物又は構築物であって、1 つ又は複数の請求項 1 に記載のポリペプチドを含むか、又はこれから本質的になり、任意で 1 つ又は複数のリンカーを介して連結した、1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位を任意でさらに含む、化合物又は構築物。

【請求項 3】

前記 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は半減期が増大した化合物又は構築物を提供し、かつ前記 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、血清免疫グロブリン又は I g G と結合することができる、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なポリペプチド、単一ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なポリペプチド、「d A b」、d A b としての使用に好適なポリペプチド、又はナノボディからなる群から選択される、請求項 2 に記載の化合物又は構築物。

【請求項 4】

配列番号 7 0 ~ 配列番号 7 2 のうちの 1 つからなるポリペプチドから選択される、請求項 2 又は 3 に記載の化合物又は構築物。

【請求項 5】

配列番号 70 のアミノ酸配列又は配列番号 71 のアミノ酸配列を有するか、又はこれから本質になる、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物又は構築物。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のうちの 1 つのポリペプチドを含むか、又はこれから本質になる一価構築物。

【請求項 7】

請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の多価の化合物又は構築物を調製する方法であって、請求項 1 に記載のポリペプチド又は請求項 6 に記載の一価構築物と、1 つ又は複数の基、残基、部分又は結合単位とを連結することを含む、方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸若しくはヌクレオチドの発現により得ることができる請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、又は請求項 6 に記載の一価構築物をコードする核酸又はヌクレオチドであって、前記核酸が任意で遺伝子構築物の形態である、核酸又はヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸若しくはヌクレオチドの発現により得ることができる請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、又は請求項 6 に記載の一価構築物を好適な環境下で発現することができる非ヒト宿主又は宿主細胞、及び / 又は請求項 8 に記載の核酸若しくはヌクレオチド又は遺伝子構築物を含む、非ヒト宿主又は宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸若しくはヌクレオチドの発現により得ることができる請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、又は請求項 6 に記載の一価構築物を産生する方法であって、

a) 好適な宿主細胞若しくは非ヒト宿主生物において又は別の好適な発現系において、請求項 8 に記載の核酸若しくはヌクレオチド又は遺伝子構築物を発現する工程、又は請求項 9 に記載の非ヒト宿主又は宿主細胞が、少なくとも 1 つの請求項 1 に記載のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸若しくはヌクレオチドの発現により得ることができる請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、又は請求項 6 に記載の一価構築物を発現及び / 又は産生するような条件下で、前記宿主又は宿主細胞を培養及び / 又は維持する工程、任意でその後に

b) a) の工程で得られた、請求項 1 に記載のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸若しくはヌクレオチドの発現により得ることができる請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、又は請求項 6 に記載の一価構築物を単離及び / 又は精製する工程

を少なくとも含む、方法。

【請求項 11】

少なくとも請求項 1 に記載の 1 つのポリペプチド、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、請求項 6 に記載の一価構築物、又は請求項 8 に記載の核酸若しくはヌクレオチドを含む、薬学的組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の 1 つのポリペプチド、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物若しくは構築物、又は請求項 6 に記載の一価構築物、又は請求項 11 に記載の組成物を有効成分とする、敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサングウム増殖性糸球体腎炎、カポジ肉腫、AIDS 関連リンパ腫及び炎症性疾患からなる群から選択される、IL-6 に、IL-6R に、IL-6 / IL-6R 複合体に関連がある疾患及び障害、並びに / 又は、IL-6、IL-6R 及び / 若しくは IL-6 / IL-6R 複合体が関与するシグナル伝達経路及び / 又は生物学的機能及び応答に関連がある疾患及び障害のうちの少なくとも 1 つを予防及び / 又は治療するための薬剤。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、インターロイキン - 6 受容体 ( I L - 6 R ) に指向性を有し及び / 又は ( 本明細書で規定のように ) これと特異的に結合することができるアミノ酸配列に、並びに 1 つ又は複数のこのようなアミノ酸配列を含むか、又はこれから本質的になる化合物又は構築物、特にタンパク質及びポリペプチドに関する ( それぞれ本明細書中で、「本発明のアミノ酸配列」、「本発明の化合物」、「本発明の構築物」及び「本発明のポリペプチド」とも称される )。

## 【0002】

本発明は、このようなアミノ酸配列及びポリペプチドをコードする核酸 ( 本明細書中で「本発明の核酸」又は「本発明のヌクレオチド配列」とも称される ) に、このようなアミノ酸配列及びポリペプチドを調製する方法に、このようなアミノ酸配列又はポリペプチドを発現する、又は発現することができる宿主細胞に、このようなアミノ酸配列、ポリペプチド、核酸及び / 又は宿主細胞を含む組成物、特に薬学的組成物に、並びに特に本明細書で言及する予防目的、治療目的又は診断目的のような予防目的、治療目的又は診断目的のためのこのようなアミノ酸配列若しくはポリペプチド、核酸、宿主細胞及び / 又は組成物の使用にも関する。

## 【0003】

本発明の他の態様、実施の形態、利点及び用途は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

## 【背景技術】

## 【0004】

元々 B 細胞分化因子として同定されたタンパク質である I L - 6 ( 非特許文献 1、特許文献 1 ) と、I L - 6 R ( 非特許文献 2、特許文献 2 ) との相互作用によって、I L - 6 / I L - 6 R 複合体のフォーマット形態がもたらされる。この複合体は、標的細胞上の膜タンパク質である g p 1 3 0 ( 非特許文献 3、特許文献 3 ) と結合し、I L - 6 の様々な生理作用を伝える。現在 I L - 6 は、とりわけ免疫応答の調節、造血、急性期応答、骨代謝、血管形成、及び炎症に関与することが知られている。I L - 6 産生の脱調節は、幾つかの自己免疫疾患プロセス及び慢性炎症増殖性疾患プロセスの病変に関与する ( 非特許文献 4 )。結果として、過去には I L - 6 誘導性シグナル伝達の阻害因子に大きな注目が集まった ( 非特許文献 5 )。I L - 6 ( 非特許文献 6、特許文献 4 )、I L - 6 R ( 特許文献 5 ) 又は g p 1 3 0 ( 非特許文献 7、特許文献 6 ) と特異的に結合するポリペプチドが I L - 6 の機能化に対して効率的な効果を示すことが証明された。

## 【0005】

I L - 6 過剰産生及びシグナル伝達 ( 特にいわゆるトランスシグナル伝達 ( trans-signaling ) ) は、様々な疾患及び障害 ( 例えば敗血症 ( 非特許文献 8 )、及び多発性骨髄腫疾患 ( M M )、腎細胞癌 ( R C C )、形質細胞性白血病 ( 非特許文献 6 )、リンパ腫、B リンパ増殖性障害 ( B L P D ) 及び前立腺がん等の様々な形態のがん ) に関与する。過剰な I L - 6 産生又はシグナル伝達によって引き起こされる他の疾患の非限定的な例としては、骨吸収 ( 骨粗鬆症 ) ( 非特許文献 9、非特許文献 1 0 )、悪液質 ( 非特許文献 1 1 )、乾癬、メサングウム増殖性糸球体腎炎、カポジ肉腫、A I D S 関連リンパ腫 ( 非特許文献 1 2 )、炎症性疾患及び障害 ( 例えば関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症 ) ( 非特許文献 1 3 ) ; クロウン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス ( S L E )、多発性硬化症、キャスルマン病、I g M 免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息 ( 特にアレルギー性喘息 ) 及び自己免疫インスリン依存性糖尿病 ( 非特許文献 1 4 ) が挙げられる。他の I L - 6 関連障害は当業者にとって明らかである。

## 【0006】

例えば上記の参考文献から分かるように、従来技術は、I L - 6 関連障害の予防及び治療のためのヒト I L - 6、ヒト I L - 6 R 及びヒト g p 1 3 0 タンパク質に指向性を有する抗体及び抗体断片を説明している。例は、トシリズマブ ( 非特許文献 1 5、非特許文献

10

20

30

40

50

16、非特許文献17、非特許文献18を参照されたい)、BE8(非特許文献19、非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22を参照されたい)及びCentocorのCNTO-328(非特許文献23、非特許文献24、非特許文献25を参照されたい)である。IL-6関連障害の予防及び治療のための当該技術分野で既知の別の活性成分は、可溶性gp130のFc融合体である(非特許文献26、非特許文献27、非特許文献28、非特許文献29を参照されたい)。IL-6R及びそれを含むポリペプチドに指向性を有するアミノ酸配列及びナノボディは特許文献7に記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

10

【特許文献1】欧州特許第0257406号

【特許文献2】欧州特許第0325474号

【特許文献3】欧州特許第0411946号

【特許文献4】欧州特許第0312996号

【特許文献5】欧州特許第0409607号

【特許文献6】欧州特許第0572118号

【特許文献7】国際公開第08/020079号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Hirano et al.,1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 5490-4

20

【非特許文献2】Yamasaki et al.,1988, Science, 241: 825-8

【非特許文献3】Taga et al., 1989, Cell, 58: 573-81

【非特許文献4】Ishihara and Hirano, 2002, Biochim. Biophys. Acta, 1592: 281-96

【非特許文献5】Hirano et al.,1990, Immunol. Today, 11: 443-9

【非特許文献6】Klein et al.,1991, Blood, 78: 1198-204

【非特許文献7】Saito et al.,1993, J. Immunol. Methods, 163: 217-223

【非特許文献8】Starnes et al., 1999, J. Immunol., 148: 1968

【非特許文献9】Roodman et al., 1992, J. Bone Miner. Res.,7: 475-8

【非特許文献10】Jilka et al.,1992, Science, 257: 88-91

【非特許文献11】Strassman et al., 1992, J. Clin. Invest. 89: 1681-1684

30

【非特許文献12】Emilie et al.,1994, Int. J. Immunopharmacol. 16: 391-6

【非特許文献13】Grau et al.,1990, J. Exp. Med. 172: 1505-8

【非特許文献14】Campbell et al.,1991, J. Clin. Invest. 87: 739-742

【非特許文献15】Woo et al.,2005, Arthritis Res. Ther. 7: 1281-8

【非特許文献16】Nishimoto et al., 2005, Blood 106: 2627-32

【非特許文献17】Ito et al.,2004, Gastroenterology, 126: 989-96

【非特許文献18】Choy et al.,2002, Arthritis Rheum. 46: 3143-50

【非特許文献19】Bataille et al.,1995, Blood 86: 685-91

【非特許文献20】Emilie et al.,1994, Blood 84: 2472-9

【非特許文献21】Beck et al.,1994, N. Engl. J. Med. 330: 602-5

40

【非特許文献22】Wendling et al., 1993, J. Rheumatol. 20:259-62

【非特許文献23】Journal of Clinical Oncology, 2004, 22/14S: 2560

【非特許文献24】Journal of Clinical Oncology, 2004, 22/14S: 2608

【非特許文献25】Int. J. Cancer,2004, 111:592-5

【非特許文献26】Becker et al.2004, Immunity, 21: 491-501

【非特許文献27】Doganci et al.,2005, J. Clin. Invest. 115: 313-25

【非特許文献28】Nowell et al.,2003, J. Immunol. 171: 3202-9

【非特許文献29】Atreya et al.,2000, Nat. Med. 6: 583-8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明の具体的であるが、非限定的な目的は、他の有利な特性（例えば調製のしやすさの改善及び／又は製品コストの削減等）に加えて、従来技術のアミノ酸配列、抗体及びナノボディと比較して改善した治療特性及び／又は薬理特性を有するアミノ酸配列、ポリペプチド、並びに治療用の化合物及び組成物を提供することである。これらの改善された有利な特性は本明細書中のさらなる記載から明らかとなる。限定されるものではないが、本発明により提供されるアミノ酸配列、ポリペプチド、並びに治療用の化合物及び組成物は改善された結合及び／又は親和性、改善された結合活性（avidity：親和力）、改善された有効性及び／又は効力、増大した選択性を有し得る、及び／又はこれらは I L - 6 / I L - 6 R 相互作用を一部又は好ましくは完全に遮断することが可能であり、及び／又は I L - 6、I L - 6 R 及び／又は I L - 6 / I L - 6 R 複合体によるシグナル伝達を阻害する。

10

## 【 0 0 1 0 】

概して本発明の目的は、（本明細書で規定のように）1つ又は複数の I L - 6 R 関連障害の診断、予防及び／又は治療に使用することができる薬理的に活性な作用物質及びそれを含む組成物を提供すること；並びにこのような作用物質及び組成物の投与及び／又は使用を伴うこのような疾患及び／又は障害を診断、予防及び／又は治療する方法を提供することである。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 1 】

20

本発明は、改善された親和性及び／又は結合活性でインターロイキン - 6 受容体（I L - 6 R）に指向性を有し及び／又は（本明細書で規定のように）これと特異的に結合することができ、及び／又は改善された有効性及び／又は効力を有し、I L - 6 / I L - 6 R 相互作用を（一部又は好ましくは完全に）遮断することが可能であり、及び／又は I L - 6、I L - 6 R 及び／又は I L - 6 / I L - 6 R 複合体によるシグナル伝達を阻害する、アミノ酸配列（「本発明のアミノ酸配列（複数可）」とも称される）に関する。より具体的には本発明は、

a) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、若しくは

b) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び／又は

30

c) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、若しくは

d) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び／又は

40

e) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5、若しくは

f) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

から選択されるアミノ酸残基ストレッチを 1 つ又は複数含む、アミノ酸配列を提供する。

## 【 0 0 1 2 】

50

IL-6R上でのそのエピトープとの結合のために、アミノ酸配列は通常、そのアミノ酸配列内に1つ又は複数のアミノ酸残基又は1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチ（本明細書でさらに規定のような、すなわちそれぞれの「ストレッチ」は、互いに隣接しているか、又は互いに近接している（すなわちそのアミノ酸配列の一次構造又は三次構造において）2つ以上のアミノ酸残基を含む）を含有し、それを介して本発明のアミノ酸配列はIL-6R上のエピトープと結合することができる。このようにしてこれらのアミノ酸残基又はアミノ酸残基ストレッチは、IL-6R上のエピトープと結合する「部位」（本明細書でさらに規定のように、本明細書では「抗原結合部位」とも称される）を形成する。

#### 【0013】

本発明はIL-6R上で特異的エピトープと結合するのに特に適した（本明細書で規定のような）多くのアミノ酸残基ストレッチを提供する。これらのアミノ酸残基ストレッチは特に本発明のアミノ酸配列の抗原結合部位（の一部）を形成するように、本発明のアミノ酸配列に存在していても、及び/又は本発明のアミノ酸配列に組み込まれていてもよい。得られたアミノ酸配列自体が、IL-6R上のIL-6結合部位にある、IL-6R上のIL-6結合部位の一部を形成する、又はIL-6R上のIL-6結合部位と重複する（すなわち一次構造又は三次構造で）、又はIL-6R上のIL-6結合部位に近接している（すなわち一次構造又は三次構造で）IL-6R上の特異的エピトープと（例えばIL-6と競合的に）結合する。得られたアミノ酸配列自体がIL-6/IL-6R相互作用の一部又は好ましくは完全に遮断することが可能であり、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体を介したシグナル伝達を阻害する。これに関連して、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドはIL-6受容体との結合に関してIL-6と競合することができるようなものであるのが好ましい。本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドは、例えば実施例11に記載のアッセイにおいて、IL-6受容体との結合に関して、市販のヒト-マウス再構成キメラモノクローナル抗IL-6R抗体であるトシリズマブ（MRA）（Chugai/Roche）又はその抗原結合断片と競合することができるようなもの（例えば国際公開第92/19759号及び対応する欧州特許第0628639号、並びにShinkura et al., 1998, Anticancer Research 18, 1217-1222を参照されたい）；及び/又はIL-6R上のトシリズマブと同じエピトープ若しくは結合部位と、又は上記結合部位に近い及び/又は上記結合部位と重複したエピトープと結合することができるようなものであるのが好ましい。

#### 【0014】

また、本発明のアミノ酸配列は、IL-6受容体との結合に関して配列番号1及び配列番号2により規定のような参照IgG及び/又は配列番号3及び配列番号4により規定のような参照Fabと競合することができるようなもの（実施例1を参照されたい）；及び/又はIL-6R上の上記参照IgG若しくは上記参照Fabと同じエピトープ若しくは結合部位と、又は上記結合部位に近い及び/又は上記結合部位と重複したエピトープと結合することができるようなものであるのが好ましい。上記参照IgG及び参照Fabの調製及び配列に関しては、以下の実施例1、及び配列番号1～配列番号4を参照する。

#### 【0015】

本発明は最も広範な意味で、これらのアミノ酸残基ストレッチにより（本明細書でさらに規定のように）或る特定の親和性及び/又は効力で本発明のアミノ酸配列がIL-6R上の特異的エピトープと結合していれば、これらのアミノ酸残基ストレッチが本発明のアミノ酸配列において有し得る特定の構造的役割又は機能に限定されないことに留意すべきである。このため概して、本発明は最も広範な意味で、IL-6R上で特異的エピトープと結合することが可能であり、かつアミノ酸配列全体がIL-6R上で特異的エピトープと結合することが可能な結合ドメイン及び/又は結合単位を形成するように、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列を介して互いに好適に連結する本明細書に記載のような1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチ（特に2つ以上のこのようなアミノ酸残基ストレッチの好適な組合せ）を含む任意のアミノ酸配列を含む。しかしながら、本発明のアミノ酸配列にこのようなアミノ酸残基ストレッチが1つでも存在していれば、それ自体で既に、IL

10

20

30

40

50

- 6 R上で特異的エピトープと結合することが可能な本発明のアミノ酸配列を提供するのに十分であるといえることにも留意すべきである（例えばここでもまた、国際公開第03/050531号に記載される、いわゆる「促進断片（Expedite fragments）」を参照する）。

【0016】

これらの特異的なアミノ酸残基ストレッチを1つ又は複数含むアミノ酸配列は、IL-6/IL-6 R相互作用を一部又は完全に遮断する、及び/又はIL-6、IL-6 R及び/又はIL-6/IL-6 R複合体を介したシグナル伝達を阻害する能力に加えて、例えば結合及び/又は親和性の改善、結合同活性の改善、有効性及び効力の改善、及び/又は選択性の増大のような特性の改善を示す。

10

【0017】

より具体的には、これらの特異的なアミノ酸残基ストレッチを1つ又は複数含む本発明のアミノ酸配列は、好ましくは

1 nM ~ 1 pM以下、好ましくは500 pM ~ 1 pM以下、より好ましくは100 pM ~ 1 pM以下、又はさらにより好ましくは約50 pM ~ 1 pM以下の解離定数 ( $K_D$ ) でhIL-6 Rと結合するように、及び/又は

1 nM ~ 1 pM以下、好ましくは500 pM ~ 1 pM以下、より好ましくは100 pM ~ 1 pM以下、又はさらにより好ましくは約50 pM ~ 1 pM以下の解離定数 ( $K_D$ ) でカニクイザル (cyno) IL-6 Rと結合するように、及び/又は

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度でhIL-6 Rと結合するように、及び/又は

20

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度でカニクイザルIL-6 Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ) ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度でhIL-6 Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ) ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度でカニクイザルIL-6 Rと結合するように、

30

(さらに本明細書に記載されるような(実際又は見掛けの)  $K_D$  値、(実際又は見掛けの)  $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は  $k_{off}$  速度、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される) 或る親和性でIL-6 Rと結合することができる。

【0018】

本発明のアミノ酸配列とIL-6 Rとの結合に関する幾つかの好ましい  $IC_{50}$  値が本明細書中のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

【0019】

例えばKitamura et al. (1989, J. Cell Physiol., 140: 323) に記載のようなTF-1アッセイにおいて、本発明のアミノ酸配列は、10 nM ~ 50 pM、好ましくは5 nM ~ 50 pM、より好ましくは1 nM ~ 50 pM以下、例えば約750 pM又は500 pM以下の  $IC_{50}$  値 (100 IU/mLのIL-6で) を有し得る。このTF-1アッセイでは、本発明のアミノ酸配列は、50 nM ~ 1 nM、好ましくは25 nM ~ 1 nM、より好ましくは10 nM ~ 1 nM以下、例えば約8 nM以下の  $IC_{50}$  値 (5000 IU/mLのIL-6で) を有し得る。このTF-1アッセイでは、本発明のアミノ酸配列は配列番号1及び配列番号2に規定のような参照IgG又は配列番号3及び配列番号4に規定のような参照Fabに関して得られた  $IC_{50}$  値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましく

40

50

は5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る（実施例1を参照されたい）。このTF-1アッセイでは、本発明のアミノ酸配列はトシリズマブ（MRA）に関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る。

【0020】

IL-6のEC50値での血漿効力アッセイでは（例えば実施例45に記載のような27.29ng/mLのIL-6の存在下で）、本発明のアミノ酸配列は500pM~50pM、好ましくは250pM~50pM、より好ましくは200pM~50pM以下、例えば150pM以下のIC50値を有し得る。IL-6のEC95値での血漿効力アッセイでは（例えば実施例45に記載のような885ng/mLのIL-6の存在下で）、本発明のアミノ酸配列は1000pM~100pM、好ましくは750pM~100pM、より好ましくは500pM~100pM以下、例えば400pM以下のIC50値を有し得る。この血漿効力アッセイでは、本発明のアミノ酸配列は配列番号1及び配列番号2に規定のような参照IgG又は配列番号3及び配列番号4に規定のような参照Fabに関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る（実施例1を参照されたい）。この血漿効力アッセイでは、本発明のアミノ酸配列はトシリズマブ（MRA）に関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る。

【0021】

CHO細胞上での膜IL-6Rとの結合を規定するアッセイでは、本発明のアミノ酸配列は10nM~100pM、好ましくは5nM~100pM、より好ましくは2nM~100pM以下、例えば2nM以下のIC50値を有し得る。

【0022】

好ましい態様において、本発明のアミノ酸配列は、(i)第1のアミノ酸残基ストレッチがa)若しくはb)によるアミノ酸配列のうちの1つに対応する場合、第2のアミノ酸残基ストレッチは、c)、d)、e)若しくはf)によるアミノ酸配列のうちの1つに対応し、(ii)第1のアミノ酸残基ストレッチがc)若しくはd)によるアミノ酸配列のうちの1つに対応する場合、第2のアミノ酸残基ストレッチは、a)、b)、e)若しくはf)によるアミノ酸配列のうちの1つに対応し、又は(iii)第1のアミノ酸残基ストレッチがe)若しくはf)によるアミノ酸配列のうちの1つに対応する場合、第2のアミノ酸残基ストレッチは、a)、b)、c)若しくはd)によるアミノ酸配列のうちの1つに対応するように、

a) 配列番号80~配列番号82、若しくは

b) 配列番号80~配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び/又は

c) 配列番号84~配列番号91、若しくは

d) 配列番号84~配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び/又は

e) 配列番号93~配列番号95、若しくは

f) 配列番号93～配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチから選択されるアミノ酸残基ストレッチを2つ以上含み得る。

【0023】

さらにより好ましくは、本発明のアミノ酸配列は、第1のアミノ酸残基ストレッチが

a) 配列番号80～配列番号82、又は

b) 配列番号80～配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、かつ

第2のアミノ酸残基ストレッチが

c) 配列番号84～配列番号91、又は

d) 配列番号84～配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、かつ

第3のアミノ酸残基ストレッチが

e) 配列番号93～配列番号95、又は

f) 配列番号93～配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される、アミノ酸残基ストレッチを3つ以上含む。

【0024】

本発明が、本発明のアミノ酸配列(又はこれを発現するのに使用される本発明のヌクレオチド配列)の起源に関しても、また本発明のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を生成又は入手する(又は生成若しくは入手した)方法に関しても限定されないことに留意すべきである。したがって本発明のアミノ酸配列は、(任意の好適な種由来の)天然アミノ酸配列、又は合成若しくは半合成のアミノ酸配列であり得る。

【0025】

具体的ではあるが非限定的な一態様では、本発明のアミノ酸配列は、免疫グロブリンフォールドを含むアミノ酸配列、又は好適な条件(例えば生理的条件)下で(すなわちフォールディングによって)免疫グロブリンフォールドを形成することができるアミノ酸配列であり得る。特にHalaby et al. (1999, J. Protein Eng. 12: 563-71)による概説を参照する。好ましくは、免疫グロブリンフォールドを形成するように適切にフォールディングする場合、アミノ酸残基ストレッチは、IL-6R上で特異的エピトープと結合するための抗原結合部位を適切に形成することができ、より好ましくは本明細書に規定のようなものである(さらに本明細書に記載されるような(実際又は見掛けの) $K_D$ 値、(実際又

10

20

30

40

50

は見掛けの)  $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は  $k_{off}$  速度、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される) 或る親和性で IL-6R 上でそれらのエピートープと結合することができる。

【0026】

具体的であるが、非限定的な別の態様において、本発明のアミノ酸配列は免疫グロブリン配列である。具体的であるが、非限定的に、本発明のアミノ酸配列は、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1~FR4)と、3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1~CDR3)とから本質的になるアミノ酸配列、又はIL-6R上で特異的エピートープとさらに結合するこのようなアミノ酸配列の任意の好適な断片であり得る。

【0027】

このような本発明のアミノ酸配列において、フレームワーク配列は任意の好適なフレームワーク配列であってもよく、好適なフレームワーク配列の例は、例えば標準的なハンドブック、並びに本明細書に言及されるさらなる開示及び従来技術に基づいて当業者にとって明らかである。

【0028】

フレームワーク配列は、免疫グロブリンフレームワーク配列、又は(例えばヒト化又はラクダ化のような配列最適化によって)免疫グロブリンフレームワーク配列から誘導されているフレームワーク配列(の好適な組合せ)であるのが好ましい。例えばフレームワーク配列は、軽鎖可変ドメイン(例えば $V_L$ 配列)及び/又は重鎖可変ドメイン(例えば $V_H$ 配列)から誘導されているフレームワーク配列であり得る。本発明のアミノ酸配列が重鎖可変ドメイン配列である場合、従来の4鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列(例えばこれに限定されないが、ヒト抗体由来の $V_H$ 配列)又はいわゆる(本明細書に規定の)「重鎖抗体」由来のいわゆる(本明細書に規定の) $V_{HH}$ 配列であり得る。特に好ましい一態様では、フレームワーク配列は、 $V_{HH}$ 配列(上記フレームワーク配列は任意で、部分又は完全ヒト化し得る)から誘導されているか、又は(本明細書に規定のように)ラクダ化した従来の $V_H$ 配列であるいずれかのフレームワーク配列である。

【0029】

重鎖抗体及びその可変ドメインの概要に関しては、特に本明細書で引用される従来技術、並びに特許文献7の59頁に言及される従来技術、及び国際出願の国際公開第06/040153号の41頁~43頁に言及される参考文献一覧を参照する(従来技術及び参考文献は参照により本明細書に援用される)。

【0030】

本発明のアミノ酸配列は特に、ドメイン抗体(又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、単ドメイン抗体(又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、「dAb」(又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列)若しくはナノボディ(本明細書に規定のように、 $V_{HH}$ 配列を含むが、これに限定されない)、他の単可変ドメイン、又はそれらのいずれか1つの任意の好適な断片であり得る。

【0031】

特に本発明のアミノ酸配列は、(本明細書で規定のような)ナノボディ(登録商標)又はその好適な断片であり得る(備考:ナノボディ(Nanobody)(登録商標)、ナノボディ(Nanobodies)(登録商標)及びナノクローン(登録商標)は、Ablynx N. V.の登録商標である)。IL-6Rに指向性を有するこのようなナノボディは、本明細書中で「本発明のナノボディ」とも称される。

【0032】

概して、ナノボディは、(一般)構造:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

(ここで、FR1~FR4はそれぞれフレームワーク領域1~フレームワーク領域4を表し、CDR1~CDR3はそれぞれ相補性決定領域1~相補性決定領域3を表し、1つ又は複数の特徴的な(Hallmark:ホールマーク)残基は特許文献7(表A-3~表A-8)に規定されるようなものである)を有するアミノ酸配列として定義することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 3 】

概して、ナノボディ（特にV<sub>H</sub>H配列及び部分ヒト化ナノボディ）は特に、（例えば特許文献7の61頁24行目から98頁3行目にさらに記載されるような）1つ又は複数のフレームワーク配列における1つ又は複数の「特徴的な残基」の存在を特徴とし得る。

## 【 0 0 3 4 】

これに関して、本発明のアミノ酸配列が、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1～FR4）と、3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1～CDR3）とから本質的になり、ここでCDR1が、

a) 配列番号80～配列番号82、若しくは

b) 配列番号80～配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、及び/又はCDR2が、

c) 配列番号84～配列番号91、若しくは

d) 配列番号84～配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、及び/又はCDR3が、

e) 配列番号93～配列番号95、若しくは

f) 配列番号93～配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される。

## 【 0 0 3 5 】

これらの好ましい相補性決定領域（それぞれ、CDR1～CDR3）は「本発明のCDR（複数可）」とも称される。

## 【 0 0 3 6 】

好ましくは、本発明のアミノ酸配列が、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1～FR4）と、3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1～CDR3）とから本質的になり、ここでCDR1が、

a) 配列番号80～配列番号82、又は

b) 配列番号80～配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、

CDR2が、

10

20

30

40

50

c) 配列番号84～配列番号91、又は

d) 配列番号84～配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、かつ

CDR3が、

e) 配列番号93～配列番号95、又は

f) 配列番号93～配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される。

【0037】

このようなナノボディは、任意で好適な方法で任意の好適な供給源から誘導されてもよく、例えば(すなわち好適なラクダ種由来の)天然V<sub>H</sub>H配列、又は合成若しくは半合成のアミノ酸配列であってもよい。

【0038】

特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号80、又は配列番号80とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディは、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディと比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

【0039】

別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91から選択されるアミノ酸残基ストレッチ、又は配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディは、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディと比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

【0040】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号84、又は配列番号84とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディは、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディと比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

【0041】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号93～配列番号94から選択されるアミノ酸残基ストレッチ、又は配列番号93

10

20

30

40

50

～配列番号94のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディは、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディと比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

【0042】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号93、又は配列番号93とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディは、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列若しくはナノボディと比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

10

【0043】

さらに別の特定の態様では、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも配列番号80及び配列番号84を含む。

【0044】

さらに別の特定の態様では、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも配列番号80及び配列番号93を含む。

20

【0045】

さらに別の特定の態様では、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも配列番号84及び配列番号93を含む。

【0046】

さらに別の特定の態様では、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも配列番号80、配列番号84及び配列番号93を含む。

【0047】

CDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の他の好ましい組合せを表A-1にも示す。

【0048】

本発明の好ましいアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69；そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列；並びに配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列からなる群から選択され得る。

30

40

【0049】

本発明のこのようなアミノ酸配列は好ましくは、IL-6R上で特異的エピトープと特異的に結合することができ、さらにより好ましくは本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）或る親和性でIL-6R上で特異的エピトープと結合することができるものとする。本発明のこのようなアミノ酸配列は好ましくは、本明細書に規

50

定のような細胞ベースの効力及び血漿効力も有するものとする。

【0050】

本発明により提供されるアミノ酸配列及びナノボディは、(本明細書で規定のように)本質的に単離形態であるか、又は本発明のタンパク質若しくはポリペプチド(「本発明のポリペプチド」又は「本発明のタンパク質」とも称される)(1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディを含むか、又はこれから本質的になってもよく、任意でさらに1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列若しくはナノボディ(全て任意で1つ又は複数の好適なリンカーを介して連結される)を含んでもよい)の一部を形成するのが好ましい。

【0051】

したがって別の態様において本発明は、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディ(又はその好適な断片)を含むか、又はこれから本質的になり、任意で1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位をさらに含む、化合物又は構築物、特にタンパク質又はポリペプチド(それぞれ本明細書で「本発明の化合物」又は「本発明のポリペプチド」とも称される)に関する。本明細書中のさらなる開示から当業者にとって明らかになるように、このようなさらなる基、残基、部分、結合単位又はアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列(及び/又はそれが存在する化合物、構築物又はポリペプチド)に対しさらなる機能性を与えても、又は与えなくてもよく、本発明のアミノ酸配列又はナノボディの特性を変えても、又は変えなくてもよい。

【0052】

例えばこのようなさらなる基、残基、部分又は結合単位は、化合物、構築物又はポリペプチドが(融合)タンパク質又は(融合)ポリペプチドになるように、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列であり得る。好ましいが非限定的な態様において、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は免疫グロブリン配列である。さらにより好ましくは、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又はナノボディからなる群から選択される。

【0053】

代替的に、このような基、残基、部分又は結合単位は例えば化学的な基、残基、部分(それ自体が生物学的に及び/又は薬理的に活性であっても、又は活性でなくてもよい)であり得る。例えばこれに限定されないが、このような基は、本明細書にさらに記載されるように、本発明のアミノ酸配列又はポリペプチドの「誘導體」を提供するように、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディと連結し得る。

【0054】

本明細書に記載の1つ又は複数の誘導體を含むか、又はこれから本質的になり、任意で1つ又は複数のリンカーを介して連結した、1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位を任意でさらに含む、化合物、構築物又はポリペプチドも本発明の範囲内である。好ましくは、上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位はアミノ酸配列である。

【0055】

上記の化合物、構築物又はポリペプチドにおいて、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディ、及び1つ又は複数の基、残基、部分又は結合単位は、互いに直接、及び/又は1つ又は複数の好適なリンカー又はスペーサーを介して連結してもよい。例えば1つ又は複数の基、残基、部分又は結合単位がアミノ酸配列である場合、リンカーは、得られる化合物、構築物又はポリペプチドが融合体(タンパク質)又は融合体(ポリペプチド)になるようにアミノ酸配列であってもよい。

【0056】

本発明のアミノ酸配列又はナノボディから本発明の化合物又はポリペプチドを設計/選択、及び/又は調製する方法は、本明細書では上記本発明のアミノ酸配列又はナノボディを「フォーマットすること(formatting)」とも称され、本発明の化合物又はポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの一部を構成する本発明のアミノ酸配列又はナノボディは、「フォーマットされた (formatted)」、又は上記本発明の化合物又はポリペプチド「のフォーマット形態 (in the format of)」であるといわれる。本発明のアミノ酸配列又はナノボディをフォーマットすることができる方法の例及びこのようなフォーマットの例が、本明細書中の開示に基づいて当業者にとって明らかであり、このようなフォーマットされたアミノ酸配列又はナノボディは、本発明のさらなる態様を形成する。

【0057】

例えばこれらに限定されないが、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディは、全て本明細書に記載のような本発明の一価、多価、多重パラトピック又は多重特異性のポリペプチドをそれぞれ提供するために、任意で結合単位として働くことができる1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列を含有し得る（すなわちIL-6R上の別のエピトープに対する及び/又はIL-6R以外の1つ又は複数の抗原、タンパク質又は標的に対する）このようなタンパク質又はポリペプチドにおける結合単位として使用することができる。このため本発明は、本発明のアミノ酸配列又はナノボディを含むか、又はこれから本質的になる一価構築物である化合物、構築物又はポリペプチドにも関する。このため本発明は、多価構築物、例えば二価又は三価の構築物等である化合物、構築物又はポリペプチドにも関する。本発明は多重特異性構築物、例えば二重特異性又は三重特異性の構築物等である化合物、構築物又はポリペプチドにも関する。本発明は多重パラトピック構築物、例えば二重パラトピック又は三重パラトピックの構築物等である化合物、構築物又はポリペプチドにも関する。

【0058】

本発明の特定の一態様において、本発明の化合物、又は本発明のポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディと比較して増大した半減期を有し得る。このような化合物及びポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかとなり、例えばその半減期が増大するように（例えばベグ化によって）化学修飾された本発明のアミノ酸配列、ナノボディ若しくはポリペプチド；血清タンパク質（例えば血清アルブミン）と結合するための少なくとも1つのさらなる結合部位を含む本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディ；又は本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディの半減期を増大させる少なくとも1つの部分（特に少なくとも1つのアミノ酸配列）と連結する少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディを含む本発明のポリペプチドを含む。このような半減期を延長させる部分を含む本発明のポリペプチド、アミノ酸配列又はナノボディの例は、本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかとなり、例えばこれらに限定されないが、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディが、1つ又は複数の血清タンパク質若しくはその断片（例えば（ヒト）血清アルブミン又はその好適な断片）、若しくは血清タンパク質と結合することができる1つ又は複数の結合単位（例えばドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単一ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適なアミノ酸配列、又は血清タンパク質、例えば血清アルブミン（例えばヒト血清アルブミン）、血清免疫グロブリン（例えばIgG）、又はトランスフェリンと結合することができるナノボディ等、さらなる記載及び本明細書で言及される参考文献を参照する）と好適に連結するポリペプチド；本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディがFc部分（例えばヒトFc）若しくはその好適な部分若しくは断片と連結するポリペプチド；又は1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディが、血清タンパク質と結合することができる1つ又は複数の小タンパク質若しくは小ペプチドと好適に連結するポリペプチドを含む（例えばこれに限定されないが、国際公開第91/01743号、国際公開第01/45746号、国際公開第02/076489号に記載のタンパク質及びペプチド）。

【0059】

概して、半減期が増大した本発明の化合物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディ自体の半減期よりも少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも

10

20

30

40

50

2倍（例えば少なくとも5倍）、例えば少なくとも10倍、又は20倍超大きい半減期を有するのが好ましい。

【0060】

好ましいが非限定的な態様において、このような本発明の化合物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディ自体と比較して、1時間超、好ましくは2時間超、より好ましくは6時間超（例えば12時間超）、又はさらに24時間、48時間若しくは72時間超増大した血清半減期を有する。

【0061】

好ましいが非限定的な別の態様において、このような本発明の化合物又はポリペプチドは、少なくとも約12時間、好ましくは少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間、さらにより好ましくは少なくとも72時間以上のヒトにおける血清半減期を示す。例えば本発明の化合物又はポリペプチドは、少なくとも5日（例えば約5日～10日）、好ましくは少なくとも9日（例えば約9日～14日）、より好ましくは少なくとも10日（例えば約10日～15日）、若しくは少なくとも約11日（例えば約11日～16日）、より好ましくは少なくとも約12日（例えば約12日～18日以上）、又は14日超（例えば約14日～19日）の半減期を有し得る。

10

【0062】

このようなタンパク質、ポリペプチド、化合物又は構築物は（本明細書で規定のように）本質的に単離形態であってもよい。

【0063】

本発明の幾つかの好ましい化合物、構築物又はポリペプチドは以下のポリペプチド配列を含む：

20

a) 配列番号70～配列番号72、

b) 本発明のそのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号70～配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、本発明のそのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号70～配列番号72のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列、

30

c) 配列番号70～配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、配列番号70～配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号70～配列番号72のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列。

【0064】

これらの配列を有するポリペプチドは、IL-6/IL-6R相互作用を（一部又は完全に）遮断する、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体を介したシグナル伝達を阻害する能力に加えて、例えば良好な結合特性（高い親和性及び/又は結合活性）、高い有効性及び/又は効力のような薬理学的に活性のある作用物質として使用するのに有利な特性を示す。

40

【0065】

より具体的には、本発明のこれらのポリペプチド及び化合物は、好ましくは1nM～1pM（モル/L）以下、好ましくは500pM～1pM（モル/L）以下、より好ましくは100pM～1pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50pM～1pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でhIL-6Rと結合するように、及び/又は1nM～1pM（モル/L）以下、好ましくは500pM～1pM（モル/L）以下、より好ましくは100pM～1pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50pM～1pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/

50

又は

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度で h I L - 6 R と結合するように、及び/又は

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度でカニクイザル I L - 6 R と結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ )  $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度で h I L - 6 R と結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ )  $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度でカニクイザル I L - 6 R と結合するように、

(さらに本明細書に記載されるような(実際又は見掛けの)  $K_D$  値、(実際又は見掛けの)  $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は  $k_{off}$  速度、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される) 或る親和性で I L - 6 R と結合することができる。

【0066】

本発明のポリペプチド及び化合物と I L - 6 R との結合に関する幾つかの好ましい  $IC_{50}$  値が本明細書中のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

【0067】

例えば Kitamura et al. (J. Cell Physiol. 1989;140: 323) に記載のような T F - 1 アッセイにおいて、本発明のポリペプチド及び化合物は、 $10 \text{ nM} \sim 50 \text{ pM}$ 、好ましくは  $5 \text{ nM} \sim 50 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $1 \text{ nM} \sim 50 \text{ pM}$  以下、例えば約  $750 \text{ pM}$  又は  $500 \text{ pM}$  以下の  $IC_{50}$  値 ( $100 \text{ IU/mL}$  の I L - 6 で) を有し得る。この T F - 1 アッセイでは、本発明のポリペプチド及び化合物は、 $50 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$ 、好ましくは  $25 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$ 、より好ましくは  $10 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$  以下、例えば約  $8 \text{ nM}$  以下の  $IC_{50}$  値 ( $5000 \text{ IU/mL}$  の I L - 6 で) を有し得る。この T F - 1 アッセイでは、本発明のポリペプチド及び化合物は配列番号 1 及び配列番号 2 に規定のような参照 I g G 又は配列番号 3 及び配列番号 4 に規定のような参照 F a b に関して得られた  $IC_{50}$  値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な  $IC_{50}$  値を有し得る (実施例 1 を参照されたい)。この T F - 1 アッセイでは、本発明のアミノ酸配列はトシリズマブ (M R A) に関して得られた  $IC_{50}$  値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な  $IC_{50}$  値を有し得る。

【0068】

I L - 6 の  $EC_{50}$  値での血漿効力アッセイでは (例えば実施例 45 に記載のような  $27.29 \text{ ng/mL}$  の I L - 6 の存在下で)、本発明のポリペプチド及び化合物は  $500 \text{ pM} \sim 50 \text{ pM}$ 、好ましくは  $250 \text{ pM} \sim 50 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $200 \text{ pM} \sim 50 \text{ pM}$  以下、例えば  $150 \text{ pM}$  以下の  $IC_{50}$  値を有し得る。I L - 6 の  $EC_{95}$  値での血漿効力アッセイでは (例えば実施例 45 に記載のような  $885 \text{ ng/mL}$  の I L - 6 の存在下で)、本発明のポリペプチド及び化合物は  $1000 \text{ pM} \sim 100 \text{ pM}$ 、好ましくは  $750 \text{ pM} \sim 100 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $500 \text{ pM} \sim 100 \text{ pM}$  以下、例えば  $400 \text{ pM}$  以下の  $IC_{50}$  値を有し得る。この血漿効力アッセイでは、本発明のポリペプチド及び化合物は配列番号 1 及び配列番号 2 に規定のような参照 I g G 又は配列番号 3 及び配列番号 4 に規定のような参照 F a b に関して得られた  $IC_{50}$  値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な  $IC_{50}$  値を有し得る (実施例 1 を参照されたい)

10

20

30

40

50

)。この血漿効力アッセイでは、本発明のアミノ酸配列はトシリズマブ(MRA)に関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る。

【0069】

CHO細胞上での膜IL-6Rとの結合を規定するアッセイでは、本発明のポリペプチド及び化合物は10nM~100pM、好ましくは5nM~100pM、より好ましくは2nM~10pM以下、例えば2nM以下のIC50値を有し得る。

【0070】

別の特定の態様では、本発明のポリペプチド、化合物又は構築物は配列番号70のアミノ酸配列から本質的になる。

10

【0071】

別の特定の態様では、本発明のポリペプチド、化合物又は構築物は配列番号71のアミノ酸配列から本質的になる。

【0072】

本発明の化合物又はポリペプチドは概して、本発明の化合物又はポリペプチドを提供するために、任意で1つ又は複数の好適なリンカーを介して、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物を1つ又は複数のさらなる基、残基、部分又は結合単位に好適に連結させる工程を少なくとも含む方法により調製することができる。本発明のポリペプチドは概して、本発明のポリペプチドをコードする核酸を用意する工程、好適に上記核酸を発現する工程、及び発現された本発明のポリペプチドを回収する工程を少なくとも含む方法によっても調製することができる。このような方法はそれ自体が既知のやり方で行うことができ、例えば本明細書にさらに記載の方法及び技法に基づいて当業者にとって明らかである。

20

【0073】

したがって本発明は、多価の化合物、構築物又はポリペプチドの調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物の使用にも関する。多価の化合物、構築物又はポリペプチドを調製する方法は、任意で1つ又は複数のリンカーを介して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物を少なくとも1つの他の基、残基、部分又は結合単位と連結させることを含む。

30

【0074】

概して、本発明のアミノ酸配列又はナノボディ(又はこれを含む化合物、構築物若しくはポリペプチド)が(例えば本明細書に記載のような治療目的及び/又は診断目的で)被験体への投与を意図する場合、上記被験体で自然発生的ではないアミノ酸配列若しくはナノボディであるか、又は上記被験体で自然発生的である場合、(本明細書で規定のように)本質的に単離形態であるのが好ましい。

【0075】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び化合物はヒト由来のIL-6Rに指向性を有する。しかしながら、これらは好ましくはカニクイザル(マカク・ファシクラリス(Macaca fascicularis))由来のIL-6Rとも交差反応性であるものとし、このことはこれらのアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び化合物がカニクイザル(マカク・ファシクラリス)由来のIL-6R「に指向性を有し」(本明細書で規定のように)、及び/又はカニクイザル(マカク・ファシクラリス)由来のIL-6Rと特異的に結合することが可能でもある(本明細書で規定のように)ことを意味する。このような交差反応性は、ヒトIL-6Rに対するアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び化合物をカニクイザル疾患モデルで試験することを可能とするので、薬剤開発の観点から利点を有し得る。

40

【0076】

本発明のアミノ酸配列又はナノボディ(並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド)がヒト由来及びカニクイザル由来のIL-6Rと「交差反応性である」ということ

50

は、本発明のアミノ酸配列又はナノボディ（並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド）がヒト由来のIL-6Rと結合する親和性と同じ又はその親和性の少なくとも70%（好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%）の（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）或る親和性で、本発明の上記アミノ酸配列又はナノボディ（並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド）がカニクイザル由来のIL-6Rと結合することを意味する。カニクイザルのIL-6R配列及び対応するcDNA配列に関しては、"Receptor for interleukin-6 (IL-6) from *Macaca fascicularis*"と題された2008年7月16日付けでAblynx N.V.により出願された国際公開第09/010539号も参照し、cDNA配列に関しては配列番号3及び図1B、並びにアミノ酸配列に関しては配列番号4及び図3Bを参照されたい）。

10

**【0077】**

本明細書で想定される使用に好適である限り、本発明のアミノ酸配列及びポリペプチドの部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体を使用すること、及び/又はこのような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体を1つ又は複数含むか、又はこれから本質的になるタンパク質又はポリペプチドを使用することも本発明の範囲内である。このような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体は通常、IL-6R上の特異的エピトープとの結合に機能的な抗原結合部位（の少なくとも一部）を含有し、より好ましくはIL-6R上の特異的エピトープと特異的に結合することができ、さらにより好ましくは本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）或る親和性でIL-6R上の特異的エピトープと結合することができる。このような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体は通常、本明細書に規定のような細胞ベースの効力及び血漿効力も有する。このような部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、誘導体、タンパク質及び/又はポリペプチドの幾つかの非限定的な例は、本明細書のさらなる記載から明らかになる。また本発明のさらなる断片又はポリペプチドは、本明細書に記載のように1つ又は複数の（より小さい）部分又は断片を好適に組み合わせることによって（すなわち連結又は遺伝子融合によって）提供され得る。

20

30

**【0078】**

別の態様において、本発明は、本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ又は本発明のポリペプチド（又はその好適な断片）をコードする核酸又はヌクレオチド配列にも関する。このような核酸は、本明細書中で「本発明の核酸」とも称され、例えば本明細書中でさらに記載されるように遺伝子構築物の形態であり得る。したがって本発明は遺伝子構築物の形態である核酸又はヌクレオチド配列にも関する。

**【0079】**

本発明のヌクレオチド配列は、天然ヌクレオチド配列、又は合成若しくは半合成の配列であってもよく、例えばPCRによって好適な天然鋳型から単離される配列（例えば細胞から単離されるDNA又はRNA）、ライブラリ（特に発現ライブラリ）から単離されたヌクレオチド配列、（それ自体が既知の任意の好適な技法（例えばミスマッチPCR）を使用して）天然ヌクレオチド配列に突然変異を導入することによって調製されたヌクレオチド配列、重複プライマーを使用してPCRによって調製されたヌクレオチド配列、又はそれ自体が既知のDNA合成のための技法を使用して調製されたヌクレオチド配列であり得る。

40

**【0080】**

別の態様において本発明は、本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ及び/又は本発明のポリペプチドを発現し（又は好適な環境下で発現することができ）、及び/又は本発明の核酸を含有する、宿主又は宿主細胞に関する。このような宿主又は宿主細胞の幾つ

50

かの好ましいが非限定的な例は本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0081】

本発明はさらに、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列（又はその好適な断片）、少なくとも1つの本発明のナノボディ、少なくとも1つの本発明のポリペプチド、少なくとも1つの本発明の化合物又は構築物、少なくとも1つの本発明の一価構築物、及び/又は少なくとも1つの本発明の核酸、及び任意で（すなわち組成物の目的とする用途に応じて）それ自体が既知のこのような組成物の1つ又は複数のさらなる成分を含有するか又は含む生成物又は組成物に関する。このような生成物又は組成物は例えば（本明細書に記載の）薬学的組成物、獣医学的組成物又は（本明細書にも記載の）診断用途のための生成物又は組成物であり得る。このような生成物又は組成物の幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

10

【0082】

本発明はさらに、本明細書に記載のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物を調製する方法に関する。本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド又は本発明の一価構築物を産生する方法は、

a) 好適な宿主細胞若しくは宿主生物において又は別の好適な発現系において、本発明の核酸若しくはヌクレオチド配列、又は本発明の遺伝子構築物を発現する工程、任意でその後

b) このようにして得られた、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド又は一価構築物を単離及び/又は精製する工程

20

を含み得る。

【0083】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド又は一価構築物を産生する方法は、

a) 本発明の宿主又は宿主細胞が、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド又は一価構築物を発現及び/又は産生するような条件下で、上記宿主又は宿主細胞を培養及び/又は維持する工程、任意でその後

b) このようにして得られた、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド又は一価構築物を単離及び/又は精製する工程

を含み得る。

【0084】

本発明はさらに、本明細書に記載のアミノ酸配列、ポリペプチド、化合物、構築物、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物の適用及び使用に、並びにIL-6Rに関連する疾患及び障害を予防及び/又は治療する方法に関する。幾つかの好ましいが非限定的な適用及び使用は本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

30

【0085】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は概して、IL-6RとIL-6との結合及び/又はその後のIL-6/IL-6R複合体とgp130との結合を調節（特に阻害及び/又は阻止）するのに、したがってIL-6R、IL-6、IL-6/IL-6R複合体及び/又はgp130によって媒介されるシグナル伝達を調節（特に阻害及び/又は阻止）するのに、IL-6R、IL-6、IL-6/IL-6R複合体及び/又はgp130が関与する生物学的経路を調節するのに、及び/又はこのようなシグナル伝達若しくはこれらの経路に関連する生物学的機構、応答及び作用を調節するのに使用することができる。

40

【0086】

一態様において、本発明は、IL-6Rの、IL-6R媒介性のシグナル伝達の、及び/又はIL-6R及び/又はIL-6R媒介性のシグナル伝達が関与する生物学的経路、機構、応答及び/又は作用のアンタゴニストである、及び/又はアンタゴニストとして使用することができる、アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、構築物及び化合物を提供する。

【0087】

50

これに関して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は、(a) IL-6受容体と(本明細書に規定のように)特異的に結合するようなもの、並びに(b) IL-6受容体を下方調節することができる、及び/又はIL-6受容体のシグナル伝達、及び/又はIL-6若しくはIL-6Rが関与する経路(複数可)、機構(複数可)若しくはシグナル伝達を阻害、低減若しくは下方調節することができるようなものである。当業者にとって明らかなように、概してこのようなアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物を、IL-6の、IL-6受容体の、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体媒介性のシグナル伝達が関与する生物学的経路、機構又は作用のアンタゴニストとして使用することができる。任意のこのような低減又は下方調節(アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物がIL-6受容体と結合しない条件下の同じパラメータと比較して、関連のパラメータで少なくとも1%、例えば少なくとも5%、例えば少なくとも10%若しくは10%超、又は最大50%若しくは100%以上であり得る)は、例えば上記及び/又は実験部部分で使用され、及び/又は本明細書で言及されるアッセイの1つを使用して、それ自体が既知の任意の好適な方法で測定され得る。

10

**【0088】**

より具体的に、上記の(a)及び(b)の他に、このような拮抗的なアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び構築物は、(c)本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの非存在下でのIL-6とその受容体との結合と比較して、IL-6とIL-6Rとの結合が遮断、阻害又は低減されるようにIL-6Rと結合する。

20

**【0089】**

限定されるものではないが、このような拮抗的なアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び構築物はIL-6R上のIL-6相互作用部位に近いIL-6R上の特異的エピトープと結合し得る。

**【0090】**

また上記の(a)及び(b)の他に、及び上記の(c)の他に、このような拮抗的なアミノ酸配列及びポリペプチドは、(d)本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物の非存在下での複合体の形成及び複合体とgp130との結合と比較して、複合体とgp130との結合によって誘導/媒介されるシグナル伝達を調節(例えば低減)するように、gp130に対する複合体の結合(例えばgp130に対する複合体の親和性)を低減する(又は逆に複合体に対するgp130の結合(複合体に対するgp130の親和性)を低減する)ように、IL-6/IL-6R複合体の形成を阻害するか、又はこれに作用する(例えば完全に又は部分的に破壊する)ようにIL-6R(すなわちそれ自体で、又はIL-6/IL-6R複合体で存在する場合に)と結合し得る。

30

**【0091】**

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物が、治療的に関連のある量で哺乳動物(例えばヒト被験体又はカニクイザル等の炎症に好適な動物モデル)に投与する場合、上記哺乳動物において、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物又は組成物を摂取していない哺乳動物と比較してC反応性タンパク質(CRP)の誘導の低減(すなわち少なくとも1%、例えば少なくとも10%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%以上)又は完全阻害をもたらすようなものであるのも好ましい(がこれらに限定されない)。

40

**【0092】**

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物が、治療的に関連のある量で哺乳動物(例えばヒト被験体又はカニクイザル等の炎症に好適な動物モデル)に投与する場合、上記哺乳動物において、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物又は組成物を摂取していない哺乳動物と比較して血小板数の誘導の低減(すなわち少なくとも1%、例えば少なくとも10%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%

50

以上)又は完全阻害をもたらすようなものであるのも好ましい(がこれらに限定されない)。

【0093】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物が、治療的に関連のある量で哺乳動物(例えばヒト被験体又はカニクイザル等の炎症に好適な動物モデル)に投与する場合、上記哺乳動物において、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物又は組成物を摂取していない哺乳動物と比較してフィブリノゲンの誘導の低減(すなわち少なくとも1%、例えば少なくとも10%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%以上)又は完全阻害をもたらすようなものであるのも好ましい(がこれらに限定され

10

【0094】

このように、本発明のアミノ酸配列、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は、IL-6Rに、IL-6に、IL-6/IL-6R複合体(任意でさらにgp130との複合体)に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体(任意でさらにgp130との複合体)が関与するシグナル伝達経路(複数可)及び/又は生物学的機能及び応答に関連する疾患及び障害の予防及び/又は治療のために、並びに特にIL-6R、IL-6に、IL-6/IL-6R複合体(任意でさらにgp130との複合体)に、及び/又はIL-6R、IL-6及び/又はIL-6/IL-6R複合体(任意でさらにgp130との複合体)が関与するシグナル伝達経路(複数可)及び/又は生物学的機能及び応答に関連し、IL-6Rによって又はIL-6Rが関与する経路(複数可)によって媒介される過剰及び/又は不要なシグナル伝達を特徴とする疾患及び障害の予防及び/又は治療のために使用することができる。IL-6Rに、IL-6に、IL-6/IL-6R複合体に、及び/又はIL-6、IL-6R、IL-6/IL-6R複合体が関与するシグナル伝達経路(複数可)及び/又は生物学的機能及び応答に関連するこのような疾患及び障害の例は、本明細書中の開示に基づき、当業者にとって明らかであり、例えば以下の疾患及び障害を含む：敗血症(非特許文献8)及び多発性骨髄腫疾患(MM)、腎細胞癌(RCC)、形質細胞性白血病(非特許文献6)、リンパ腫、B-リンパ増殖性障害(BLPD)及び前立腺がん等の様々な形態のがん。過剰なIL-6産生又はシグナル伝達によって引き起こされる他の疾患の非限定的な例としては、骨吸収(骨粗鬆症)(Roodman et al., 1992, J. Clin. Invest. 89: 45-52、非特許文献10)、悪液質(非特許文献11)、乾癬、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、カポジ肉腫、AIDS関連リンパ腫(非特許文献20)、関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症等の炎症性疾患及び障害(非特許文献13)、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、キャッスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息(特にアレルギー性喘息)及び自己免疫インスリン依存性糖尿病(非特許文献14)が挙げられる。他のIL-6R、IL-6及び/又はIL-6/IL-6R複合体関連障害は当業者にとって明らかである。このような疾患及び障害は概して本明細書中で、「IL-6R関連の疾患及び障害」とも称される。

20

30

【0095】

したがってこれに限定されないが、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は例えばIL-6R媒介性のシグナル伝達を調節することができる活性成分(例えば上記で引用された従来技術で言及されるもの)で現在予防又は治療されている全ての疾患及び障害を予防及び/又は治療するのに使用することができる。本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は、このような活性成分による治療が現在開発中であるか、提案されているか、又は将来提案若しくは開発予定である全ての疾患及び障害を予防及び/又は治療するのに使用することができることも予想される。また、本明細書でさらに記載されるような有利な特性から、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は、これらの既知の活性成分が現在使用中か又は提案若しくは開発予定であるもの以外の疾患及び障害

40

50

の予防及び治療に使用してもよいこと、及び／又は本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物、構築物及び組成物は、本明細書に記載の疾患及び障害を治療する新規の方法及びレジメンを提供し得ることが予想される。

【0096】

したがって本発明は、本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド又は本発明の一価構築物をそれを必要とする被験体に投与することにより予防及び／又は治療することができる少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び／又は治療する方法であって、薬学的に活性のある量の少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、又は本発明の（一価）構築物、又は本発明の組成物をそれを必要とする被験体に投与することを含む、方法にも関する。

10

【0097】

本発明は、IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に及び／又はIL-6、IL-6R及び／又はIL-6/IL-6R複合体が関与するシグナル伝達経路及び／又は生物学的機能及び応答に関連する疾患及び障害のうちの少なくとも1つの予防及び／又は治療のための、及び／又は本明細書に記載の方法の1つ又は複数における使用のための薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、又は本発明の（一価）構築物の使用にも関する。

【0098】

本発明はさらに、IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に及び／又はIL-6、IL-6R及び／又はIL-6/IL-6R複合体が関与するシグナル伝達経路及び／又は生物学的機能及び応答に関連する疾患及び障害のうちの少なくとも1つの予防及び／又は治療における使用のための、及び／又は本明細書に記載の方法の1つ又は複数における使用のための本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、又は本発明の（一価）構築物に関する。

20

【0099】

具体的には本発明は、温血動物、具体的に哺乳動物、より具体的にヒトにおいて予防的用途、治療的用途及び／又は診断的用途に好適なアミノ酸配列、ナノボディ、タンパク質、ポリペプチド、化合物及び／又は構築物を提供する。

【0100】

より具体的には本発明は、温血動物、具体的に哺乳動物、より具体的にヒトにおいて1つ又は複数のIL-6R関連の障害（本明細書で規定されるような）の予防、治療、緩和及び／又は診断に使用することができるようなアミノ酸配列、ナノボディ、タンパク質、ポリペプチド、化合物及び／又は構築物を提供する。

30

【0101】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び化合物の他の適用及び使用は、本明細書のさらなる開示から当業者にとって明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】実施例2に記載のようなELISAによるラマ81及びラマ82における免疫応答分析を示す図である。

40

【図2】実施例2に記載のようなFACSによるラマ81及びラマ82における免疫応答分析を示す図である。脚注：L181 pre：ラマ81由来の免疫前血清；L181 PBL1：ラマ81から28日目に回収した血清；L182 pre：ラマ82由来の免疫前血清；L182 PBL2：ラマ82から43日目に回収した血清。

【図2A】実施例2に記載のようなFACSによるラマ81及びラマ82における免疫応答分析を示す図である。脚注：L181 pre：ラマ81由来の免疫前血清；L181 PBL1：ラマ81から28日目に回収した血清；L182 pre：ラマ82由来の免疫前血清；L182 PBL2：ラマ82から43日目に回収した血清。

【図2B】実施例2に記載のようなFACSによるラマ81及びラマ82における免疫応答分析を示す図である。脚注：L181 pre：ラマ81由来の免疫前血清；L181

50

P B L 1 : ラマ 8 1 から 2 8 日目に回収した血清 ; L 1 8 2 p r e : ラマ 8 2 由来の免疫前血清 ; L 1 8 2 P B L 2 : ラマ 8 2 から 4 3 日目に回収した血清。

【図 3】 I L - 6 R 上の I L - 6 結合部位に対するナノボディを同定するのに使用されるアルファスクリーンアッセイの概略図である。

【図 4】 抗 I L - 6 R ナノボディのアミノ酸配列を示す図である。

【図 5】 実施例 6 に記載のように得られた精製ナノボディの S D S - P A G E を示す図である。

【図 6 A】 アルファスクリーンで測定されるような選択ナノボディによる I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。モノクローナル抗体 B R - 6 を対照として使用した。

10

【図 6 B】 アルファスクリーンで測定されるような選択ナノボディによる I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。モノクローナル抗体 B R - 6 を対照として使用した。

【図 6 C】 アルファスクリーンで測定されるような選択ナノボディによる I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。参照 F a b 断片 ( 実施例 1 に記載 ) を対照として使用した。

【図 7】 F A C S により分析された抗 I L - 6 R ナノボディと U 2 6 6 細胞との結合を示す図である。

【図 8】 ヒト血漿の非存在 ( 上部 ) 及び存在 ( 下部 ) 下での抗 I L - 6 R ナノボディと U 2 6 6 細胞との結合を示す図である。

20

【図 9】 1 m g / k g ( )、5 m g / k g ( )、1 0 m g / k g ( + )、2 5 m g / k g ( x ) 及び 1 0 0 m g / k g ( ) で静脈内投与した後のカニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の個々で観察される ( 記号 ) 及びモデル予測される ( 実線 ) 血漿濃度 - 時間プロファイルを示す図である。

【図 1 0】 ナノボディとマウス及びヒトの I L - 6 R との結合を示す図である。3 つの棒グラフのそれぞれの群において、左側の棒グラフはヒト I L 6 R を示し、中央の棒グラフはマウス I L 6 R を示し、右側の棒グラフはブランクを示す。

【図 1 1】 精製された二重特異性ナノボディの S D S - P A G E を示す図である。

【図 1 2】 アルファスクリーンで測定されるような二重特異性ナノボディによる I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。

30

【図 1 3】 U 2 6 6 細胞との二価ナノボディ結合の F A C S 分析を示す図である。

【図 1 4】 U 2 6 6 細胞との三価ナノボディ結合の F A C S 分析を示す図である。

【図 1 5】 5 つの最も相同なヒト生殖系列との I L 6 R 0 3 配列、I L 6 R 0 4 配列及び I L 6 R 1 3 配列のアラインメントを示す図である。さらなる説明に関しては、実施例 2 3 を参照されたい。

【図 1 6 A】 I L 6 R 0 3 及び I L 6 R 0 4 の配列を最適化した変異体のアミノ酸配列を示す図である。さらなる説明に関しては、実施例 2 3 を参照されたい。

【図 1 6 B】 I L 6 R 1 3 の配列を最適化した変異体のアミノ酸配列を示す図である。さらなる説明に関しては、実施例 2 3 を参照されたい。

【図 1 7】 I L 6 R 0 3 の配列を最適化した変異体による I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。

40

【図 1 8】 I L 6 R 0 4 の配列を最適化した変異体による I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。

【図 1 9】 I L 6 R 1 3 の配列を最適化した変異体による I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。

【図 2 0】 I L 6 R 1 3 の配列を最適化した変異体による I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。

【図 2 1】 野生型の抗 I L - 6 R ナノボディ及び配列を最適化した抗 I L - 6 R ナノボディによる I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害を示す図である。

【図 2 2 A】 配列を最適化したナノボディ対野生型ナノボディの細胞ベースの効力を示す

50

図である。

【図22B】配列を最適化したナノボディ対野生型ナノボディの細胞ベースの効力を示す図である。

【図22C】配列を最適化したナノボディ対野生型ナノボディの細胞ベースの効力を示す図である。

【図23】ヒト(A)及びカニクイザル(B)の血漿における配列を最適化したナノボディの血漿効力ELISAを示す図である。

【図24】IL-6のEC50(左側)及びEC95(右側)での配列を最適化したナノボディの血漿効力ELISAを示す図である。

【図25】実施例29に記載のようなIL-6Rナノボディのエピトープマッピングを示す図である: IL-6Rコーティングチップ(A~C)又はIL-6コーティングチップ上での競合アッセイ。

10

【図26】親和性成熟を行ったIL6R65変異体のアミノ酸配列を示す図である。

【図27】ナノボディIL6R65(親ナノボディと称される)及びその親和性成熟を行った変異体の結合曲線を示す図である。

【図28A】ヒト及びカニクイザルの血漿効力アッセイにおけるIL6R65及び5つの親和性成熟を行った変異体の評価を示す図である。

【図28B】ヒトの血漿効力アッセイにおけるIL6R65及び5つの親和性成熟を行った変異体の評価を示す図である。

【図29】親和性成熟を行ったナノボディによるTF-1細胞のIL-6依存性の増殖の阻害を示す図である。細胞を2ng/mlのヒトIL-6及び様々な濃度のナノボディの存在下で成長させた。増殖を3H-チミジンの取り込みにより測定した。

20

【図30A】Biacoreで測定したようにIL6R65とIL-6との競合(A)と比較した2つの親和性成熟を行ったナノボディとIL-6との競合(B~C)を示す図である。

【図30B】Biacoreで測定したようにIL6R65とIL-6との競合(A)と比較した2つの親和性成熟を行ったナノボディとIL-6との競合(B~C)を示す図である。

【図30C】Biacoreで測定したようにIL6R65とIL-6との競合(A)と比較した2つの親和性成熟を行ったナノボディとIL-6との競合(B~C)を示す図である。

30

【図31】2回目の親和性成熟後のIL-6R結合ナノボディの配列(コンビナトリアルライブラリCDR1/2+CDR3)を示す図である。

【図32】TF-1細胞のIL-6依存性の増殖の阻害を示す図である。細胞を2ng/mlのヒトIL-6及び様々な濃度のナノボディの存在下で成長させた。増殖を3H-チミジンの取り込みにより測定した。

【図33A】ヒト及びカニクイザルの血漿効力アッセイにおけるIL6R65及び2回目の親和性成熟を行った変異体の評価を示す図である。親=IL6R65。

【図33B】ヒトの血漿効力アッセイにおけるIL6R65及び2回目の親和性成熟を行った変異体の評価を示す図である。親=IL6R65。

40

【図34】全血におけるIL6R65及びPMP20A11とヒトPBMCとの結合を示す図である。

【図35】フォーマットされたナノボディ及び参照IgGによる膜IL-6R活性の阻害を示す図である。TF-1細胞を希釈系列のIL6R304( )、IL6R305( )、IL6R306( )又は参照IgG( )とプレインキュベートし、その後増殖を100IU/mlのIL-6で誘導した。72時間のインキュベーション後、細胞増殖を<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みにより評価した。三連の測定値の平均±標準誤差を示す。

【図36】高レベルのIL-6でのフォーマットされたナノボディ及び参照IgGによる膜IL-6Rの阻害を示す図である。TF-1細胞を希釈系列の20A11( )、IL6R304( )、IL6R305( )、IL6R306( )又は参照IgG( )

50

とプレインキュベートし、その後増殖を5000 IU/mLのIL-6で誘導した。72時間のインキュベーション後、細胞増殖を<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みにより評価した。三連の測定値の平均±標準誤差を示す。

【図37】TF-1細胞の増殖に対するIL6R304及びIL6R305の効果を示す図である。TF-1細胞を12500細胞/ウェルの密度で播種し、50 nMのIL6R304又はIL6R305の存在下又は非存在下でインキュベートした。増殖を100 IU/mLのIL-6で誘導し、又は細胞を成長因子の非存在下でインキュベートした。72時間のインキュベーション後、細胞増殖を<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みにより評価した。それぞれのデータ点を30回測定した。平均±標準誤差を示す。

【図38】ヒト血漿における血漿効力ELISAを示す図である。参照IgG( )、IL6R20A11( )、IL6R304( )、IL6R305( )、IL6R306( )又は無関連のナノボディ(x)によるヒトIL-6と血漿sIL-6Rとの結合の中和を示す。二連の測定値の平均±標準誤差を示す。A、B: 25 ng/mLのIL-6との競合( EC50)。C、D: 885 ng/mLのIL-6との競合( EC95)。

10

【図39】IL6R20A11及びフォーマットされた変異体とCHO細胞との結合を示す図である。IL-6Rを発現するCHO細胞(A)又は陰性CHO細胞(B)をIL6R20A11( )、IL6R304( )、IL6R305( )又はIL6R306( )とインキュベートした。結合したナノボディをモノクローナル抗体c1.5.3.1及び抗マウスPEを用いて検出した。

【図40】全血におけるヒトPBL上でのIL-6Rナノボディの結合を示す図である。左側: FSC/SSC特性に基づきリンパ球(L、黒色)、単球(M、暗灰色)及び顆粒球(G、薄灰色)をゲーティングした。中央: 3つのゲーティングした集団のバックグラウンドPE蛍光。右側: 1 μMのIL6R305とのインキュベーション後のPE蛍光。

20

【図41】IL-6RナノボディとヒトPBLとの結合を示す図である。2つのドナー由来のEDTAで処理した血液をIL6R20A11( )、IL6R304( )、IL6R305( )又はIL6R306( )とインキュベートした。結合したナノボディをモノクローナル抗体c1.5.3.1及び抗マウスPEを用いて検出した。A: リンパ球、B: 単球、C: 顆粒球。

【図42】ヒト及びカニクイザルの血清アルブミン上でのフォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディの結合曲線を示す図である。

30

【図43】フォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディとヒト及びカニクイザルのIL-6Rとの結合曲線を示す図である。

【図44】カニクイザル血漿における血漿効力ELISAを示す図である。参照IgG( )、IL6R20A11( )、IL6R304( )、IL6R305( )、IL6R306( )又は無関連のナノボディ(x)によるヒトIL-6とカニクイザル血漿sIL-6Rとの結合の中和を示す。

【図45】IL6R20A11と他の種由来のsIL-6Rとの交差反応性を示す図である。左側: ヒト( )、カニクイザル( )又はマウス( )由来の組換えsIL-6Rとのプレインキュベーション後のプレート上でのIL6R20A11とヒトsIL-6Rとの結合。右側: ヒト( )、カニクイザル( )、マウス( )又はモルモット( )の血漿とのプレインキュベーション後のIL6R20A11とヒトsIL-6Rとの結合。

40

【図46】競合結合ELISAを示す図である。IL6R20A11(0.05 nM)を様々な濃度のIL-6R( )、LIF-R( )、CNTF-R( )、OSM-R( )又はIL-11R/Fc( )とプレインキュベートした。遊離IL6R20A11をsIL-6R上で捕捉し、抗Hisにより検出した。

【図47】IL6R304及びIL6R305のin vivoでのPK/PD分析に関する研究設計を示す図である。

【図48】個々のカニクイザルにおけるhIL-6により増大したCRPレベルに対する参照IgG、IL6R304及びIL6R305の効果を示す図である。(A)動物27

50

、動物 28 及び動物 29 は陰性対照の役割を果たし、h I L - 6 のみが投与された。参照 I g G ( B、黒色の ( closed black ) 記号 )、様々な用量の I L 6 R 3 0 4 ( C、青色の記号 ) 及び様々な用量の I L 6 R 3 0 5 ( D、赤色の記号 ) を静脈内投与した後、7 日間 1 日 1 回、 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量で h I L - 6 を皮下注射した。

【図 48 A】個々のカニクイザルにおける h I L - 6 により増大した C R P レベルに対する参照 I g G、I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の効果を示す図である。( A ) 動物 27、動物 28 及び動物 29 は陰性対照の役割を果たし、h I L - 6 のみが投与された。参照 I g G ( B、黒色の ( closed black ) 記号 )、様々な用量の I L 6 R 3 0 4 ( C、青色の記号 ) 及び様々な用量の I L 6 R 3 0 5 ( D、赤色の記号 ) を静脈内投与した後、7 日間 1 日 1 回、 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量で h I L - 6 を皮下注射した。

10

【図 49】I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 を用いる *in vivo* での P K / P D 研究で得られた全ての群に関する平均 C R P レベルを示す図である。

【図 50】個々のカニクイザルにおける h I L - 6 により増大したフィブリノゲンレベルに対する参照 I g G、I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の効果を示す図である。( A ) 動物 27、動物 28 及び動物 29 は陰性対照の役割を果たし、h I L - 6 のみが投与された。参照 I g G ( B、黒色の記号 )、様々な用量の I L 6 R 3 0 4 ( C、青色の記号 ) 及び様々な用量の I L 6 R 3 0 5 ( D、赤色の記号 ) を静脈内投与した後、7 日間 1 日 1 回、 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量で h I L - 6 を皮下注射した。結果を基礎レベルに正規化した。

【図 50 A】個々のカニクイザルにおける h I L - 6 により増大したフィブリノゲンレベルに対する参照 I g G、I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の効果を示す図である。( A ) 動物 27、動物 28 及び動物 29 は陰性対照の役割を果たし、h I L - 6 のみが投与された。参照 I g G ( B、黒色の記号 )、様々な用量の I L 6 R 3 0 4 ( C、青色の記号 ) 及び様々な用量の I L 6 R 3 0 5 ( D、赤色の記号 ) を静脈内投与した後、7 日間 1 日 1 回、 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量で h I L - 6 を皮下注射した。結果を基礎レベルに正規化した。

20

【図 51】I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 を用いる *in vivo* での P K / P D 研究で得られた全ての群に関する平均フィブリノゲンレベルを示す図である。

【図 52】個々のカニクイザルにおける h I L - 6 により増大した血小板数に対する参照 I g G、I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の効果を示す図である。( A ) 動物 27、動物 28 及び動物 29 は陰性対照の役割を果たし、h I L - 6 のみが投与された。参照 I g G ( A、黒色の記号 )、様々な用量の I L 6 R 3 0 4 ( B、青色の記号 ) 及び様々な用量の I L 6 R 3 0 5 ( C、赤色の記号 ) を静脈内投与した後、7 日間 1 日 1 回、 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量で h I L - 6 を皮下注射した。結果を基礎レベルに正規化した。

30

【図 52 A】個々のカニクイザルにおける h I L - 6 により増大した血小板数に対する参照 I g G、I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の効果を示す図である。( A ) 動物 27、動物 28 及び動物 29 は陰性対照の役割を果たし、h I L - 6 のみが投与された。参照 I g G ( A、黒色の記号 )、様々な用量の I L 6 R 3 0 4 ( B、青色の記号 ) 及び様々な用量の I L 6 R 3 0 5 ( C、赤色の記号 ) を静脈内投与した後、7 日間 1 日 1 回、 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量で h I L - 6 を皮下注射した。結果を基礎レベルに正規化した。

【図 53】I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 を用いる *in vivo* での P K / P D 研究で得られた全ての群に関する平均血小板数を示す図である。

40

【図 54】カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の静脈内ボラス投与 ( $0.4 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $10 \text{mg} / \text{kg}$ ) 後の個々で観察される血漿濃度 - 時間プロットを示す図である。11 m、12 m 及び 13 f は左側の 3 つのグラフである。17 m、18 f 及び 14 m は中央のグラフであり、15 m 及び 16 f は右側のグラフである。

【図 55】カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 5 の静脈内ボラス投与 ( $0.4 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $10 \text{mg} / \text{kg}$ ) 後の個々で観察される血漿濃度 - 時間プロットを示す図である。19 m、20 f 及び 21 f は左側の 3 つのグラフである。25 m、26 f 及び 22 m は中央のグラフであり、23 m 及び 24 f は右側のグラフである。

【図 56】カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 ( $0.4 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $10 \text{mg} / \text{kg}$ ) 及び I L 6 R 2 0 2 ( $2 \text{mg} / \text{kg}$ ;  $0.4 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $10 \text{mg} / \text{kg}$ )

50

に用量を正規化した)の静脈内ボラス投与後の観察された血漿濃度の平均値対時間プロットを示す図である。

【図57】IL6R304の投与前、及び静脈内投与後様々な日数での抗IL6R304抗体の免疫検出を示す図である。ELISAプレートをIL6R304でコーティングした。それぞれの図の脚注は左から右への棒グラフのグループ分けに対応する。

【図58】IL6R304の投与前、及び静脈内投与後様々な日数での抗IL6R304抗体の免疫検出を示す図である。ELISAプレートをIL6R300でコーティングした。それぞれの図の脚注は左から右への棒グラフのグループ分けに対応する。

【図59】IL6R304の投与前、及び静脈内投与後様々な日数での抗IL6R304抗体の免疫検出を示す図である。ELISAプレートをALB8でコーティングした。それぞれの図の脚注は左から右への棒グラフのグループ分けに対応する。

10

【図60】IL6R305の投与前、及び静脈内投与後様々な日数での抗IL6R305抗体の免疫検出を示す図である。ELISAプレートをIL6R305でコーティングした。それぞれの図の脚注は左から右への棒グラフのグループ分けに対応する。

【図61】IL6R305の投与前、及び静脈内投与後様々な日数での抗IL6R305抗体の免疫検出を示す図である。ELISAプレートをIL6R300でコーティングした。それぞれの図の脚注は左から右への棒グラフのグループ分けに対応する。

【図62】IL6R305の投与前、及び静脈内投与後様々な日数での抗IL6R305抗体の免疫検出を示す図である。ELISAプレートをALB8でコーティングした。それぞれの図の脚注は左から右への棒グラフのグループ分けに対応する。

20

【図63】IL6Rナノボディの単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける血漿sIL-6Rレベルを示す図である。A：2匹の動物を5mg/kgの参照IgGで処理し(、)、又は1匹の動物をビヒクルで処理した( )。B：3匹の動物を0.04mg/kgのIL6R304で処理した。C：3匹の動物を0.04mg/kgのIL6R305で処理した。

【図64A】IL6Rナノボディの単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける総血漿sIL-6Rレベルを示す図である。動物をIL6R304(、)、参照IgG( )又はビヒクル( )で処理した。群ごとに平均±標準誤差を示す。

【図64B】IL6Rナノボディの単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける総血漿sIL-6Rレベルを示す図である。動物をIL6R305(、)、参照IgG( )又はビヒクル( )で処理した。群ごとに平均±標準誤差を示す。

30

【図65A】IL6Rナノボディの単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける総血漿IL-6レベルを示す図である。内因性のカニクイザルIL-6及び注射したヒトIL-6の両方の総血漿IL-6濃度をGyroLabプラットフォームで測定した。定量限界未満の試料を9.6pg/mLと表す。投与したものはIL6R304である。処理群ごとに平均±標準誤差(0.4mg/kg及び2mg/kgではn=3、10mg/kgではn=2)を示す。

【図65B】IL6Rナノボディの単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける総血漿IL-6レベルを示す図である。内因性のカニクイザルIL-6及び注射したヒトIL-6の両方の総血漿IL-6濃度をGyroLabプラットフォームで測定した。定量限界未満の試料を9.6pg/mLと表す。投与したものはIL6R305である。処理群ごとに平均±標準誤差(0.4mg/kg及び2mg/kgではn=3、10mg/kgではn=2)を示す。

40

【図65C】IL6Rナノボディの単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける総血漿IL-6レベルを示す図である。内因性のカニクイザルIL-6及び注射したヒトIL-6の両方の総血漿IL-6濃度をGyroLabプラットフォームで測定した。定量限界未満の試料を9.6pg/mLと表す。投与したものは陽性対照(参照IgG)及び陰性対照(バッファー)である。処理群ごとに平均±標準誤差を示す。

【図65D】10mg/kgのIL6R304(、)、IL6R305(、)又は無関連のナノボディ(、・)の静脈内ボラス注射後の個々の動物における内因性の

50

カニクイザル I L - 6 の血漿濃度を示す図である。2つの測定値の平均 ± 標準誤差を示す。

【図 6 6 A】様々な用量の I L 6 R 3 0 4 の単回静脈内投与後のカニクイザルにおける総 s I L 6 R 血漿レベルを示す図である。群ごとにいずれかのバイオマーカーの平均血漿濃度 ± 標準偏差を示す。所定の用量のビヒクル又は I L 6 R 3 0 4 を時点 0 で投与した。脚注に関しては、図 6 6 B を参照されたい。

【図 6 6 B】様々な用量の I L 6 R 3 0 4 の単回静脈内投与後のカニクイザルにおける遊離 s I L 6 R 血漿レベルを示す図である。群ごとにいずれかのバイオマーカーの平均血漿濃度 ± 標準偏差を示す。所定の用量のビヒクル又は I L 6 R 3 0 4 を時点 0 で投与した。

【図 6 7】25 mg / kg の I L 6 R 3 0 4 の単回静脈内投与後のカニクイザルにおける総 s I L 6 R 血漿レベル及び遊離 s I L 6 R 血漿レベル、並びに I L 6 R 3 0 4 濃度を示す図である。特定の用量群に関して平均 ± 標準偏差を示す。総 s I L 6 R (実線、四角記号)、遊離 s I L 6 R (実線、丸記号) 及び I L 6 R 3 0 4 濃度 (点線、デルタ型 (delta)) を時間 (日) に対してプロットする。

【図 6 8】1 mg / kg ( )、5 mg / kg ( )、10 mg / kg (+)、25 mg / kg (x) 及び 100 mg / kg ( ) の I L 6 R 3 0 4 を静脈内投与した後の個々で観察される (記号) 及びモデル予測される (実線) 総 s I L 6 R 濃度 - 時間プロットを示す図である。

【図 6 9】1 mg / kg、5 mg / kg、10 mg / kg、25 mg / kg 又は 100 mg / kg の I L 6 R 3 0 4 を静脈内ボラス注射した後のカニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の平均血漿濃度 - 時間プロファイルを示す図である。

【図 7 0】中央のコンパートメントからの線形クリアランス及び非線形クリアランスを伴う開放型の 3 コンパートメント薬物動態モデルを示す図である。C L<sub>NON-I L 6 R</sub> は非 I L 6 R 媒介性の線形クリアランスであり、V<sub>c</sub> は中央のコンパートメントの容量であり、V<sub>d</sub> は深部の周辺コンパートメントの容量であり、C L<sub>d</sub> は中央のコンパートメントと深部コンパートメントとの間のコンパートメント間の流れであり、V<sub>s</sub> は浅部の周辺コンパートメントの容量であり、C L<sub>s</sub> は中央のコンパートメントと浅部コンパートメントとの間のコンパートメント間の流れであり、C L<sub>I L 6 R</sub> は I L 6 R 媒介性の非線形クリアランスである (V<sub>max</sub> は最大代謝速度であり、K<sub>m</sub> は V<sub>max</sub> の 50% に対応する I L 6 R 3 0 4 濃度である)。

【発明を実施するための形態】

【0103】

本明細書、実施例及び特許請求の範囲において：

a) 特に他に指示又は規定がなければ、使用される全ての用語は、当業者にとって明らかな、当該技術分野における通常の意味を有する。例えば標準的なハンドブック (例えば Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2<sup>nd</sup> 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, 10<sup>th</sup> Ed. Blackwell Publishing, UK (2001)、及び Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005))、並びに本明細書で言及される一般的な背景技術を参照する。

【0104】

b) 特に他に指示がなければ、「免疫グロブリン配列」という用語は、本明細書で重鎖抗体に言及するのに使用されるのか又は従来 of 4 鎖抗体に言及するのに使用されるのに関係なく、完全長抗体、その個々の鎖、及びその全ての部分、ドメイン又は断片 (これらに限定されないが、それぞれ V<sub>H H</sub> ドメイン又は V<sub>H</sub> / V<sub>L</sub> ドメイン等の抗原結合ドメイン又

10

20

30

40

50

は断片を含む)の両方を含む一般的な用語として使用される。さらに(例えば「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「V<sub>H</sub>H配列」又は「タンパク質配列」等の用語で)本明細書で使用される「配列」という用語は一般的に、文脈上さらなる限定的な解釈が要求される場合を除き、関連のアミノ酸配列と、これをコードする核酸配列又はヌクレオチド配列との両方を含むと理解されるべきである。また、「ヌクレオチド配列」という用語は本明細書で使用される場合、上記ヌクレオチド配列を有する核酸分子も包含し、そのため「ヌクレオチド配列」及び「核酸」という用語は同義であると見なすものとし、本明細書中では区別なく使用される。

【0105】

c)特に他に指示がなければ、具体的に詳しく説明されていない全ての方法、工程、技法及び操作を当業者にとって明らかなそれ自体が既知の方法で実施することができ、そのように実施されている。また例えば標準的なハンドブック及び本明細書で言及される一般的な背景技術、並びにそれらに言及されるさらなる参考文献、並びに例えば以下の総説、Presta, 2006, Adv. Drug Deliv. Rev., 58 (5-6): 640-56、Levin and Weiss, 2006, Mol. Biosyst., 2 (1): 49-57、Irving et al., 2001, J. Immunol. Methods, 248 (1-2): 31-45、Schmitzet al., 2000, Placenta, 21 Suppl. A, S106-12、Gonzaleset al., 2005, Tumour Biol., 26 (1), 31-43(これらは、親和性成熟等のタンパク質工学技法及び免疫グロブリン等のタンパク質の特異性及び他の所望の特性を改善する他の技法を記載している)を参照する。

10

【0106】

d)アミノ酸残基は、表A-2に言及されるように標準的な3文字アミノ酸コード又は1文字アミノ酸コードに従って示す。

20

【0107】

表A-2: 1文字アミノ酸コード及び3文字アミノ酸コード

【表 1】

非極性非荷電 (pH 6.0~7.0で) <sup>(3)</sup>	アラニン	A l a	A
	バリン	V a l	V
	ロイシン	L e u	L
	イソロイシン	I l e	I
	フェニルアラニン	P h e	F
	メチオニン <sup>(1)</sup>	M e t	M
	トリプトファン	T r p	W
	プロリン	P r o	P
極性非荷電 (pH 6.0~7.0で)	グリシン <sup>(2)</sup>	G l y	G
	セリン	S e r	S
	スレオニン	T h r	T
	システイン	C y s	C
	アスパラギン	A s n	N
	グルタミン	G l n	Q
	チロシン	T y r	Y
極性荷電 (pH 6.0~7.0で)	リシン	L y s	K
	アルギニン	A r g	R
	ヒスチジン <sup>(4)</sup>	H i s	H
	アスパラギン酸	A s p	D
	グルタミン酸	G l u	E
脚注： (1) 極性非荷電アミノ酸と見なされる場合もある。 (2) 非極性非荷電アミノ酸と見なされる場合もある。 (3) 当業者にとって明らかであるように、アミノ酸残基が、pH 6.0~7.0で荷電又は非荷電のいずれかであるとしてこの表で示されていることは、該アミノ酸残基が6.0未満のpH及び/又は7.0より高いpHで有し得る電荷を全く考慮に入れない。当業者にとって明らかであるように、この表で言及されたアミノ酸残基はこのようなより高い又はより低いpHでも荷電及び/又は非荷電のいずれかであり得る。 (4) 当該技術分野で既知のようにH i s残基の電荷は、pHのほんのわずかな移行にも強く依存するが、一般的にH i s残基は約6.5のpHで本質的に非荷電であるとみなすことができる。			

10

20

## 【0108】

e) 2つ以上のヌクレオチド配列を比較するために、[第2のヌクレオチド配列における対応する位置のヌクレオチドと同一な第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの数]を[第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチド総数]で除算し、[100%]で乗算することによって、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間の「配列同一性」のパーセントを算出することができ、この場合、第1のヌクレオチド配列に比べた、第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの欠失、挿入、置換又は付加のそれぞれは、単一ヌクレオチド(位置)での差異と考えられる。

30

## 【0109】

代替的に、標準的な設定を用いて、NCBI Blast v2.0等の配列アラインメント用の既知のコンピュータアルゴリズムを使用して、2つ以上のヌクレオチド配列間の配列同一性の程度を算出することができる。

40

## 【0110】

配列同一性の程度を決定するための幾つかの他の技法、コンピュータアルゴリズム及び設定は例えば国際公開第04/037999号、欧州特許第0967284号、欧州特許第1085089号、国際公開第00/55318号、国際公開第00/78972号、国際公開第98/49185号及び英国特許出願公開第2357768号に記載されている。

## 【0111】

通常、上述で概説された算出方法に従って、2つのヌクレオチド配列間の「配列同一性」のパーセントを決定するために、最も多くのヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を「第1の」ヌクレオチド配列とし、他のヌクレオチド配列を「第2の」ヌクレオチド配列

50

とする。

【0112】

f) 2つ以上のアミノ酸配列を比較するために、[第2のアミノ酸配列における対応する位置のアミノ酸残基と同一な第1のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の数]を[第1のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基総数]で除算し、[100%]で乗算することによって、この場合、第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列との間の「配列同一性」(本明細書で「アミノ酸同一性」とも称される)のパーセントを算出することができ、この場合、第1のアミノ酸配列に比した、第2のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の欠失、挿入、置換又は付加のそれぞれは、単一アミノ酸残基(位置)での差異、すなわち本明細書に規定の「アミノ酸差異」と考えられる。

10

【0113】

代替的に、ここでもまた標準的な設定を用いて、既知のコンピュータアルゴリズム(例えばヌクレオチド配列に関する配列同一性の程度を決定するのに上記で言及されるもの)を使用して、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を算出することができる。

【0114】

通常、上述で概説された算出方法に従って、2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」のパーセントを決定するために、最も多くのアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を「第1の」アミノ酸配列とし、他のアミノ酸配列を「第2の」アミノ酸配列とする。

【0115】

また、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を決定する際、当業者は、いわゆる「保存的な」アミノ酸置換を考慮してもよく、これは一般的に、アミノ酸残基が同様の化学構造を有する別のアミノ酸残基に置き換わり、かつポリペプチドの機能、活性又は他の生物学的特性への影響がほとんど、又は本質的に全くないアミノ酸置換と説明することができる。このような保存的なアミノ酸置換は、例えば国際公開第04/037999号、英国特許出願公開第335768号、国際公開第98/49185号、国際公開第00/46383号及び国際公開第01/09300号から当該技術分野において既知であり、このような置換の(好ましい)種類及び/又は組合せは、関連の教示に基づいて国際公開第04/037999号及び国際公開第98/49185号、並びにそれらに言及されるさらなる参考文献から選択することができる。

20

【0116】

このような保存的な置換は、好ましくは以下の(a)群~(e)群内の或るアミノ酸が、同じ群内の別のアミノ酸残基に置換される置換である:(a)低分子の脂肪族で非極性又はわずかに極性の残基:Ala、Ser、Thr、Pro及びGly、(b)極性で負に荷電した残基及びこの(非荷電)アミド:Asp、Asn、Glu及びGln、(c)極性で正に荷電した残基:His、Arg及びLys、(d)巨大な脂肪族で非極性の残基:Met、Leu、Ile、Val及びCys、並びに(e)芳香族残基:Phe、Tyr及びTrp。

30

【0117】

特に好ましい保存的置換は以下のようなものである:AlaをGlyに又はSerに、ArgをLysに、AsnをGlnに又はHisに、AspをGluに、CysをSerに、GlnをAsnに、GluをAspに、GlyをAlaに又はProに、HisをAsn又はGlnに、IleをLeuに又はValに、LeuをIleに又はValに、LysをArgに、Glnに又はGluに、MetをLeuに、Tyrに又はIleに、PheをMetに、Leuに又はTyrに、SerをThrに、ThrをSerに、TrpをTyrに、TyrをTrpに、及び/又はPheをValに、Ileに又はLeuに。

40

【0118】

本明細書に記載のポリペプチドに適用される任意のアミノ酸置換はまた、Schulz et al. (1978, "Principles of Protein Structure", Springer-Verlag)によって開発された異なる種の相同タンパク質間のアミノ酸変異頻度の解析、Chou and Fasman (1974, Biochemistry 13: 211及び1978, Adv. Enzymol., 47: 45-149)によって開発された構造形成可能

50

性 (structure forming potentials) の解析、並びに Eisenberger et al. (1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144)、Kyte and Doolittle (1981, J. Molec. Biol. 157: 105-132)、及び Goldman et al. (1986, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353) によって開発されたタンパク質における疎水性パターンの解析に基づき得る (全て全体が参照により本明細書に援用される)。ナノボディの一次構造、二次構造、及び三次構造に関する情報は、本明細書中の記載及び上記で言及された一般的な背景技術で与えられる。またこのため、ラマ由来の  $V_{HH}$  ドメインの結晶構造は例えば Desmyter et al. (1996, Nature Structural Biology, 3 (9): 803)、Spinelli et al. (1996, Natural Structural Biology, 3: 752-757)、及び Decanniere et al. (1999, Structure, 7 (4): 361) によって与えられる。従来の  $V_{HD}$  ドメインにおいてこれらの位置で  $V_{HH} / V_{L}$  界面及び潜在的なラクダ置換を形成する幾つかのアミノ酸残基に関するさらなる情報は、上記で言及された従来技術で見出すことができる。

【 0 1 1 9 】

g) アミノ酸配列及び核酸配列は、その全長にわたって (本明細書に規定のように) 100% の配列同一性を有する場合、「全く同じ」であるといえる。

【 0 1 2 0 】

h) 2つのアミノ酸配列を比較するとき、「アミノ酸差異」という用語は、第2の配列に比べて第1の配列の位置での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表し、2つのアミノ酸配列は、1つ又は2つ以上のこのようなアミノ酸差異を含有し得ることが理解される。

【 0 1 2 1 】

i) ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列が、それぞれ別のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を「を含む」、又は別のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列「から本質的になる」というとき、これは、後者のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列がそれぞれ、初めに言及されたヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に組み込まれていることを意味し得るが、より一般的に概してこれは、初めに言及されたヌクレオチド配列又はアミノ酸配列がそれぞれ、実際にどのように初めに言及された配列を生成又は入手したか (例えば本明細書に記載の任意の好適な方法によるものであり得る) に関係なく、その配列内にそれぞれ後者の配列と同じヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を有するヌクレオチド又はアミノ酸残基のストレッチを含むことを意味する。非限定的な例によって、本発明のアミノ酸配列がアミノ酸残基ストレッチを含むというとき、これは、上記アミノ酸残基ストレッチが、本発明のアミノ酸配列に組み込まれていることを意味し得るが、より一般的に概してこれは、本発明のアミノ酸配列が、どのように上記本発明のアミノ酸配列を生成又は入手するかに関係なく、その配列内にアミノ酸残基ストレッチを含むことを意味する。本発明のナノボディが CDR 配列を含むというとき、これは、上記 CDR 配列が、本発明のナノボディに組み込まれていることを意味し得るが、より一般的に概してこれは、本発明のナノボディが、どのように上記本発明のナノボディを生成又は入手したかに関係なく、その配列内に上記 CDR 配列と同じアミノ酸配列を有するアミノ酸残基ストレッチを含むことを意味する。後者のアミノ酸配列は、特異的な生物学的又は構造的な機能を有する場合、初めに言及されたアミノ酸配列において本質的に同じ、類似の又は同等の生物学的又は構造的な機能を有するのが好ましい (言い換えれば、初めに言及されたアミノ酸配列は、後者の配列が本質的に同じ、類似の又は同等の生物学的又は構造的な機能を果たすことができるようなものであるのが好ましい) ということにも留意すべきである。例えば本発明のナノボディがそれぞれ、CDR 配列又はフレームワーク配列を含むというとき、CDR 配列及びフレームワークはそれぞれ、上記ナノボディで CDR 配列又はフレームワーク配列として機能することができるのが好ましい。また、ヌクレオチド配列が別のヌクレオチド配列を含むというとき、初めに言及されたヌクレオチド配列は、発現産物 (例えばポリペプチド) へと発現する場合、後者のヌクレオチド配列でコードされるアミノ酸配列が上記発現産物の一部を形成するようなもの (言い換えれば後者のヌクレオチド配列が、初めに言及されたより大きなヌクレオチド配列と同じリーディングフレーム内にあるようなもの) であるのが好

10

20

30

40

50

ましい。

【0122】

j) 核酸配列又はアミノ酸配列は、通常その供給源又は媒体に関連がある少なくとも1つの他の成分(例えば別の核酸、別のタンパク質/ポリペプチド、別の生物学的成分、又は巨大分子)、又は少なくとも1つの汚染物質、不純物若しくは微量成分から分離されている場合、(例えばその天然の生物学的供給源及び/又はそれが得られる反応媒体又は培養媒体に比べて)「本質的な単離(形態)(で)」あると見なされる。特に、核酸配列又はアミノ酸配列は、少なくとも2倍、具体的に少なくとも10倍、より具体的に少なくとも100倍、及び最大1000倍以上精製されている場合に、「本質的に単離された」と考えられる。「本質的に単離形態である」核酸配列又はアミノ酸配列は、好適な技法、例えば好適なクロマトグラフィ技法(例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動法)を使用して決定されたものと、本質的に相同であるのが好ましい。

10

【0123】

k) 本明細書で使用される「ドメイン」という用語は概して、アミノ酸配列の球状領域(例えば抗体鎖、特に重鎖抗体の球状領域)又はこのような球状領域から本質的になるポリペプチドを表す。通常、このようなドメインは、例えばシートとして、又はジスルフィド結合によって安定化されたペプチドループ(例えば3つ又は4つのペプチドループ)を含む。「結合ドメイン」という用語は(本明細書で規定されるように)抗原決定基に指向性を有するようなドメインを表す。

20

【0124】

l) 「抗原決定基」という用語は、抗原結合分子(例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチド)によって、及びより具体的には上記分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープを表す。「抗原決定基」及び「エピトープ」という用語は、本明細書で区別なく使用することもできる。

【0125】

m) 特定の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質(又はその少なくとも1つの部分、断片若しくはエピトープに関して)と(特異的に)結合することができる、特定の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質に対する親和性を有する、及び/又は特定の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質に対する特異性を有するアミノ酸配列(例えば本発明のナノボディ、抗体、ポリペプチド、又は概して抗原結合タンパク質若しくはポリペプチド、又はその断片)は、上記の抗原決定基、エピトープ、抗原又はタンパク質「に対する」、又は「に指向性を有する」といわれる。

30

【0126】

n) 「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子又は抗原結合タンパク質(例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチド)分子が結合することができる、様々な種類の抗原又は抗原決定基の数を表す。抗原結合タンパク質の特異性は、親和性及び/又は結合活性に基づき決定することができる。親和性(抗原と抗原結合タンパク質との解離に関する平衡定数( $K_D$ )によって表される)は、抗原結合タンパク質上の抗原決定基と抗原結合部位との間の結合力に関する評価基準であり、 $K_D$ 値が小さくなれば、抗原決定基と抗原結合分子との間の結合力が大きくなる(代替的に、親和性は、 $1/K_D$ である親和定数( $K_A$ )としても表すことができる)。(例えば本明細書中のさらなる開示に基づき)当業者にとって明らかなように、対象となる特異的な抗原に応じて、それ自体が既知の方法で親和性を決定することができる。結合活性は、抗原結合分子(例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチド)と関連抗原との間の結合力の測定基準である。結合活性は、抗原結合分子上での抗原決定基とその抗原結合部位との間の親和性、及び抗原結合分子上に存在する関連結合部位の数の両方に関係する。典型的には、抗原結合タンパク質は、 $10^{-5}$ モル/L $\sim 10^{-12}$ モル/L以下、及び好ましくは $10^{-7}$ モル/L $\sim 10^{-12}$ モル/L以下、及びより好ましくは $10^{-8}$ モル/L $\sim 10^{-12}$ モル/Lの解離定数( $K_D$ )で(すなわち $10^5$ L/モル $\sim 10^{12}$ L/モル以上、及び好ましくは $10^7$ L/モル $\sim 10^{12}$ L/モル以上、及びより好ましくは $10^8$ L/モル $\sim 1$

40

50

0.1<sup>2</sup> L / モルの結合定数 ( $K_A$ ) で) これらの抗原と結合する。10<sup>4</sup> モル / L より大きい任意の  $K_D$  値 (すなわち 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> (L / モル) よりも小さい任意の  $K_A$  値) は一般的に非特異的な結合を示すと考えられる。好ましくは、本発明の一価の免疫グロブリン配列は、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満、例えば 500 pM 未満の親和性で所望の抗原と結合する。抗原結合タンパク質と抗原又は抗原決定基との特異的な結合は、それ自体が既知の任意の好適な方法 (例えばスクッチャード解析及び / 又は競合的結合アッセイ (例えばラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ (EIA) 及びサンドイッチ競合アッセイ) を含む) 及び当該技術分野でそれ自体が既知の様々なその変更方法、並びに本明細書で言及される他の技法で求めることができる。

10

## 【0127】

当業者にとって明らかなように、解離定数は実際又は見掛けの解離定数であってもよい。解離定数を決定する方法は、当業者にとって明らかであり、例えば本明細書で言及される技法が含まれる。これに関して、10<sup>-4</sup> モル / L 又は 10<sup>-3</sup> モル / L より大きい (例えば 10<sup>-2</sup> モル / L の) 解離定数を測定することが不可能であり得ることも明らかである。任意で、また当業者にとって明らかなように、(実際又は見掛けの) 解離定数は、その関係性 [ $K_D = 1 / K_A$ ] から (実際又は見掛けの) 結合定数 ( $K_A$ ) に基づき算出することができる。

## 【0128】

親和性は、分子相互作用の強さ又は安定性を示す。一般的に親和性は  $K_D$  すなわち解離定数として与えられ、その単位はモル / L (又は M) である。親和性は、 $1 / K_D$  に等しい結合定数  $K_A$  とも表すことができ、その単位は (モル / L)<sup>-1</sup> (又は M<sup>-1</sup>) である。本明細書では、2つの分子 (例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドと、その目的標的との) 間の相互作用の安定性は主に、これらの相互作用の  $K_D$  値で表され、 $K_A = 1 / K_D$  の関係性を考慮して、 $K_D$  値で分子相互作用の強さを特定することを、対応する  $K_A$  値を算出するのに利用することもできることは、当業者にとって明らかである。 $K_D$  値は、 $ΔG = RT \cdot \ln(K_D)$  (等しくは  $ΔG = -RT \cdot \ln(K_A)$ ) (式中、R は気体定数に等しく、T は絶対温度に等しく、 $\ln$  は自然対数を示す) の既知の関係性から、結合の自由エネルギー ( $ΔG$ ) と関連するので、熱力学的意味でも分子相互作用の強さを特徴付ける。

20

30

## 【0129】

有意 (例えば特異的) と見なされる、生物学的相互作用に関する  $K_D$  は典型的に、10<sup>-10</sup> M (0.1 nM) ~ 10<sup>-5</sup> M (10000 nM) の範囲内である。相互作用が強くなれば、 $K_D$  は低くなる。

## 【0130】

$K_D$  は、( $K_D = k_{off} / k_{on}$  及び  $K_A = k_{on} / k_{off}$  のように) 複合体の解離速度定数 ( $k_{off}$  と称される) と、その結合速度 ( $k_{on}$  と称される) との比としても表すことができる。解離速度 (off-rate)  $k_{off}$  の単位は s<sup>-1</sup> である (s は秒の SI 単位表記である)。結合速度 (on-rate)  $k_{on}$  の単位は M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> である。結合速度は、10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> ~ 約 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> の間で変化し、二分子相互作用に関する拡散律速結合速度定数に近づき得る。解離速度は、 $t_{1/2} = \ln(2) / k_{off}$  の関係性から所定の分子相互作用の半減期に関連する。解離速度は、10<sup>-6</sup> s<sup>-1</sup> ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体) ~ 1 s<sup>-1</sup> ( $t_{1/2} = 0.69$  s) の間で変化し得る。

40

## 【0131】

2つの分子間の分子相互作用の親和性は、それ自体が既知の様々な技法 (例えば既知の表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサ技法 (例えば Ober et al., Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001 を参照されたい) (ここで、1つの分子がバイオセンサーチップ上に固定され、もう1つの分子が、 $k_{on}$  測定値、 $k_{off}$  測定値、及びしたがって  $K_D$  (又は  $K_A$ ) 値が得られるフロー条件下で固定分子上を通る) で測定することができる

50

。例えば既知のB I A C O R Eの機器を使用してこれを実施することができる。

【 0 1 3 2 】

測定プロセスが、例えば1つの分子のバイオセンサ上でのコーティングに関するアーチファクト (artefact : 人工産物) によって、示唆した分子の固有の結合親和性に幾らか影響を与える場合、測定された $K_D$ は見掛けの $K_D$ に対応し得ることも、当業者にとって明らかである。また、1つの分子が、もう1つの分子に対して2つ以上の認識部位を含有する場合、見掛けの $K_D$ が測定され得る。このような状況下で、測定された親和性は、2つの分子による相互作用の結合活性により影響され得る。

【 0 1 3 3 】

親和性を評価するのに使用することができる別のアプローチは、Friguet et al. (1985, J. Immunol. Methods, 77, 305-19) の2段階E L I S A (酵素免疫吸着アッセイ) 法である。この方法によって、溶液相の結合平衡測定が確立され、プラスチック等の支持体上での1つの分子の吸着に関連すると考えられ得るアーチファクトが避けられる。

【 0 1 3 4 】

しかし、 $K_D$ の正確な測定はかなりの労働集約型である可能性があり、結果として2つの分子の結合力を評価するのに、見掛けの $K_D$ 値を求めることが多い。全ての測定が一貫して(例えばアッセイ条件を一定にして)行われていれば、見掛けの $K_D$ 測定値は真の $K_D$ の近似値として使用することができ、したがって本明細書で、 $K_D$ 及び見掛けの $K_D$ は、等しい重要性又は関連性があるとして扱われるべきであることに留意すべきである。

【 0 1 3 5 】

最後に、多くの状況下で経験豊かな科学者は、幾つかの参照分子に関して結合親和性を決定することが都合がいいと判断し得ることに留意すべきである。例えば分子Aと分子Bとの間の結合力を評価するために、例えば分子Bと結合することが知られており、かつE L I S A又はF A C S (蛍光活性化細胞選別)での検出を容易にするためのフルオロフォア群若しくはクロモフォア群、又は他の化学部分(例えばビオチン)、又は他のフォーマット(蛍光検出用フルオロフォア、吸光検出用クロモフォア、ストレプトアビジン媒介性E L I S A検出用ビオチン)で好適に標識される参照分子Cを使用することができる。典型的に、参照分子Cは固定濃度に維持され、分子Aの濃度は、分子Bの所定の濃度又は量に対して変化する。結果として、分子Aの非存在下で分子Cについて測定されたシグナルが半分になる分子Aの濃度に対応して、 $I C_{50}$ 値が得られる。参照分子の $K_D$ である $K_{D \text{ ref}}$ 及び参照分子の総濃度 $c_{\text{ref}}$ が既知であれば、以下の式： $K_D = I C_{50} / (1 + c_{\text{ref}} / K_{D \text{ ref}})$ からA-B相互作用に対する見掛けの $K_D$ を得ることができる。 $c_{\text{ref}} < K_{D \text{ ref}}$ の場合、 $K_D \approx I C_{50}$ であることに留意されたい。 $I C_{50}$ の測定が、比較用の結合因子に関して一貫して(例えば $c_{\text{ref}}$ を一定にして)実施されれば、 $I C_{50}$ によって分子相互作用の強さ又は安定性を評価することができ、この測定値は、本明細書を通して $K_D$ 又は見掛けの $K_D$ と同等であると判断される。

【 0 1 3 6 】

o) 本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの半減期は概して、例えば自然機構による配列若しくは化合物の分解及び/又は配列若しくは化合物のクリアランス (clearance) 若しくは捕捉 (sequestration) のために、*in vivo*でアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの血清濃度が50%低減するのにかかる時間と定義することができる。本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの*in vivo*半減期は、それ自体が既知の任意の方法(例えば薬物動態解析)で求めることができる。好適な技法は当業者にとって明らかであり、例えば概して、好適な用量の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを温血動物(すなわち、ヒト又は別の好適な哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ラット、ブタ、イヌ又は霊長類(例えばマカク属のサル(例えば特にカニクイザル(マカク・ファシクラリス)及び/又はアカゲザル(マカク・ムラッタ(Macaca mulatta)))及びヒヒ(パピオ・ウルジヌス(Papio ursinus)))に好適に投与する工程と、血液サンプル又は他のサンプルを上記動物から採取する工程と、上記血液サンプル中の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物

10

20

30

40

50

又はポリペプチドのレベル又は濃度を求める工程と、このようにして得られたデータ（の  
プロット）から本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドのレベル又  
は濃度が投与時の最初のレベルに比べて50%低減するまでの時間を算出する工程とを伴  
い得る。例えば以下の実験部、及び標準的なハンドブック（例えばKenneth, A et al. (C  
hemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists) 及びPeters et al  
. (1996, Pharmacokinete analysis: A Practical Approach)）を参照する。Gibaldi M  
and Perron D (1982, "Pharmacokinetics", published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edit  
ion) も参照する。

【0137】

また当業者にとって明らかなように（例えば国際公開第04/003019号の6頁及  
び7頁とそこに言及されたさらなる参考文献とを参照されたい）、半減期は、 $t_{1/2}$  -  
、 $t_{1/2}$  - 及び曲線下面積（AUC）等のパラメータを利用して表すことができる  
。本明細書において、「半減期の増大」は、これらのパラメータのいずれか1つ、例えば  
これらのパラメータのいずれか2つ、又は本質的に3つ全てのこれらのパラメータの増大  
を表す。本明細書で使用される「半減期の増大」又は「増大した半減期」は特に $t_{1/2}$  -  
の増大を表し、 $t_{1/2}$  - 及び/又はAUC又はその両方は増大しても又は増大し  
なくてもよい。

【0138】

p) 本発明に関して、「調節すること ("modulating" or "to modulate")」は一般的に  
、好適な *in vitro* アッセイ、細胞アッセイ又は *in vivo* アッセイを使用し  
て測定するような標的又は抗原の活性の低減若しくは阻害のいずれか、又は代替的に活性  
の増大を意味する。特に「調節すること」は、好適な *in vitro* アッセイ、細胞ア  
ッセイ、又は *in vivo* アッセイ（通常関与する標的又は抗原によって変わる）を用  
いて測定するような、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構  
築物が存在しない以外は同じ条件下での同じアッセイにおける標的又は抗原の活性に比べ  
て、少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%若しくは少な  
くとも25%、例えば少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少な  
くとも80%、又は90%以上標的又は抗原の活性を低減又は阻害すること、又は代替的に  
（関連又は対象の）生物学的活性を増大させることを意味し得る。

【0139】

当業者にとって明らかなように、「調節すること」は、本発明のアミノ酸配列、ナノボ  
ディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が存在しない以外は同じ条件下に比べて、そのリ  
ガンド、結合パートナー、ホモ多量体形態若しくはヘテロ多量体形態で結び付くパート  
ナー又は基質の1つ又は複数に対する標的又は抗原の親和性、結合活性、特異性及び/又は  
選択性を変化させること（増大又は減少のいずれであってもよい）、及び/又は標的又は  
抗原が存在する媒体又は環境における1つ又は複数の条件（例えばpH、イオン強度、補  
因子の存在）に対する標的又は抗原の感度を変化させること（増大又は減少のいずれであ  
ってもよい）も伴い得る。当業者にとって明らかなように、関与する標的又は抗原に応じ  
て、任意の好適な方法で、及び/又はそれ自体が既知の任意の好適なアッセイを用いてさ  
らにこれを求めてもよい。

【0140】

「調節すること」は、標的又は抗原が関与する（又はその基質（複数可）、リガンド（  
複数可）若しくは経路（複数可）が関与する、シグナル伝達経路若しくは代謝経路及び関  
連の生物学的作用若しくは生理学的作用のような）1つ又は複数の生物学的な若しくは生  
理学的な機構、作用、応答、機能、経路又は活性に関して変化させる（すなわち標的又は  
抗原及び所望の生物学的作用若しくは生理学的作用に応じて、それぞれ、アゴニスト、ア  
ンタゴニスト、又は逆アゴニストとしての活性を与える）ことも意味し得る。ここでも同  
様に、当業者にとって明らかなように、関与する標的又は抗原に応じて、任意の好適な方  
法で、及び/又はそれ自体が既知の任意の好適な（*in vitro* 及び通常は細胞アッ  
セイ、又は *in vivo* アッセイで）アッセイを使用して、アゴニスト又はアンタゴニ

10

20

30

40

50

ストとしてのこのような作用を求めてもよい。特に、アゴニスト又はアンタゴニストとしての作用は、対象の生物学的活性又は生理学的活性をそれぞれ、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が存在しない以外は同じ条件下での同じアッセイにおける生物学的活性又は生理学的活性に比べて少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%若しくは少なくとも25%、例えば少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は90%以上増大又は低減させるようなものであり得る。

【0141】

調節することは例えば標的又は抗原のアロステリック調節、及び/又は標的又は抗原とその基質又はリガンドの1つとの結合の低減又は阻害及び/又は標的又は抗原との結合に対する基質である天然リガンドとの競合も伴い得る。調節することは、例えば標的若しくは抗原、又はそれが関与する機構若しくは経路を活性化することも伴い得る。調節することは例えば、標的若しくは抗原のフォールディング若しくは立体構造に関して、又は標的若しくは抗原がフォールディングする能力、(例えばリガンドの結合の際に)その立体構造を変更する能力、他の(サブ)ユニットと結び付く能力、又は解離する能力に関して変化させることも伴い得る。調節することは例えば標的若しくは抗原が、他の化合物を移動させる能力、又は他の化合物(例えばイオン)に対するチャンネルとして働く能力を変化させることも伴い得る。

10

【0142】

調節することは、可逆であっても又は不可逆であってもよいが、薬学的及び薬理学的目的では通常、可逆的である。

20

【0143】

本発明に関して、「調節すること」は概して、IL-6、IL-6R、及び/又はIL-6及び/又はIL-6Rが関与する生物学的経路、応答、シグナル伝達、機構又は作用に関して、それぞれアゴニスト作用又は拮抗作用を及ぼすことを意味する。特に「調節すること」は、好適な*in vitro*アッセイ、細胞アッセイ、又は*in vivo*アッセイ(例えば本明細書で言及されるもの)を用いて測定されるように、アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が存在しない以外は同じ条件下で同じアッセイでの同じパラメータに比べて、関連のパラメータが少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%若しくは少なくとも25%、少なくとも50%等、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は90%以上変化するようなアゴニスト作用又は拮抗作用(すなわちそれぞれ、完全又は部分的なアゴニスト作用又は拮抗作用)のいずれかを意味し得る。

30

【0144】

本発明に関して、「IL-6/IL-6R複合体とgp130との結合を調節、阻害及び/又は阻止すること」は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物の非存在下での複合体の形成及び複合体とgp130との結合に比べて、IL-6/IL-6R複合体の形成に作用する、IL-6/IL-6R複合体の形成を阻害及び/又は予防する(例えば完全に又は一部破壊する)ように、gp130に対する複合体の結合(例えばgp130に対する複合体の親和性)を低減、阻害及び/又は阻止する(又は逆に複合体に対するgp130の結合(例えば複合体に対するgp130の親和性)を低減、阻害及び/又は阻止する)ように、複合体とgp130との結合によって誘導/媒介されるシグナル伝達を調節(例えば低減、阻害及び/又は阻止)するように、IL-6R(すなわちそれ自体又はIL-6/IL-6R複合体で存在する)上の特異的エピトープと結合することを意味する。

40

【0145】

q) 標的又は抗原に関して、標的又は抗原上の「相互作用部位」という用語は、リガンド、受容体若しくは他の結合パートナーとの結合に関する部位、触媒部位、切断部位、アロステリック相互作用に関する部位、標的又は抗原の多量体化(ホモマー化又はヘテロ二量

50

体化等)に關与する部位である、標的又は抗原上のアミノ酸残基の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメイン若しくはストレッチ、又は標的若しくは抗原の生物学的作用又は機構に關与する標的又は抗原上のアミノ酸残基の任意の他の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメイン又はストレッチを意味する。より一般的には、「相互作用部位」は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が、(本明細書中に規定のように)標的又は抗原(及び/又は標的又は抗原が關与する任意の経路、相互作用、シグナル伝達、生物学的機構又は生物学的作用)を調節するように結合することができる、標的又は抗原上のアミノ酸残基の任意の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメイン又はストレッチであり得る。

【0146】

r)「アミノ酸残基ストレッチ」は、互いに隣接しているか、又は互いにごく近接している(すなわちそのアミノ酸配列の一次構造又は三次構造における)2つ以上のアミノ酸残基を意味する。本発明に關して、「アミノ酸残基ストレッチ」は本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物とIL-6R上のその特異的エピトープとの結合に(少なくとも部分的に)關与する。

【0147】

s)アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物は、上記アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が第2の標的又はポリペプチドと結合する親和性よりも少なくとも10倍、例えば少なくとも100倍、好ましくは少なくとも1000倍、及び最大10,000倍以上良好な親和性(上記のように、好適に $K_D$ 値、 $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度と表す)で第1の抗原と結合する場合、第2の標的又は抗原と比べて、第1の標的又は抗原「に特異的」であるといえる。例えば第1のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物は、上記アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が第2の標的又はポリペプチドと結合する $K_D$ よりも少なくとも10分の1、例えば少なくとも100分の1、及び好ましくは少なくとも1000分の1、例えば10,000分の1以下の $K_D$ 値で標的又は抗原と結合し得る。好ましくは、アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物が、第2の標的又は抗原に比べて第1の標的又は抗原「に特異的」である場合、そのアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物は、(本明細書中に規定のように)上記第1の標的又は抗原に指向性を有するが、上記第2の標的又は抗原に対しては指向性を有しない。

【0148】

t)本発明のアミノ酸配列又はナノボディ(並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド)は2つの異なる種(すなわち第1の種及び第2の種)由来のIL-6Rと「交差反応性」であるということは、本発明のアミノ酸配列又はナノボディ(並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド)が、上記の本発明のアミノ酸配列又はナノボディ(並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド)が第1の種由来のIL-6Rと結合する親和性と同じ又はその少なくとも70%(好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、又はさらにより好ましくは少なくとも95%)の(さらに本明細書に記載されるような(実際又は見掛けの) $K_D$ 値、(実際又は見掛けの) $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される)親和性で第2の種由来のIL-6Rと結合することを意味する。

【0149】

u)本明細書でさらに記載されるように、ナノボディにおけるアミノ酸残基の総数は、110~120、好ましくは112~115の範囲内、及び最も好ましくは113であり得る。しかし、ナノボディの部分、断片、類似体又は誘導体(本明細書中にさらに記載される)は、本明細書に概説されるさらなる要求を満たし、また好ましくは本明細書に記載の目的に好適であれば、その長さ及び/又はサイズに特に限定されないことに留意すべきである。

【0150】

10

20

30

40

50

v) ナノボディのアミノ酸残基は、Riechmann and Muyldermans (2000, J. Immunol. Meth ods 240 (1-2):185-195の論文(例えばこの論文の図2を参照されたい)においてラクダ科動物由来のV<sub>H H</sub>ドメインに適用されるように、又は本明細書で言及されるように、Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)によって与えられたV<sub>H</sub>ドメインに関する一般的なナンバリングに従って数字が付けられる。このナンバリングに従って、ナノボディのFR1は1位~30位のアミノ酸残基を含み、ナノボディのCDR1は31位~35位のアミノ酸残基を含み、ナノボディのFR2は36位~49位のアミノ酸残基を含み、ナノボディのCDR2は50位~65位のアミノ酸残基を含み、ナノボディのFR3は66位~94位のアミノ酸残基を含み、ナノボディのCDR3は95位~102位のアミノ酸残基を含み、ナノボディのFR4は103位~113位のアミノ酸残基を含む。[これに関して、V<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>H H</sub>ドメインに関して当該技術分野で既知のように、CDRそれぞれにおけるアミノ酸残基の総数は変わる可能性があり、カバットナンバリングで示されるアミノ酸残基の総数に対応していてもよい(すなわちカバットナンバリングによる1つ又は複数の位置が実際の配列で占められていなくてもよく、又は実際の配列が、カバットナンバリングにより割り当てられた数より多くのアミノ酸残基を含んでいてもよい)ことに留意すべきである。このことは、概してカバットによるナンバリングは、実際の配列におけるアミノ酸残基の実際のナンバリングに対応していても、又は対応していてもよいことを意味する。しかし一般的に、CDRにおけるアミノ酸残基の数に関係なく、カバットナンバリングに従うと、カバットナンバリングによる1位は、FR1の出発点に対応し(逆もまた同様)、カバットナンバリングによる36位は、FR2の出発点に対応し(逆もまた同様)、カバットナンバリングによる66位は、FR3の出発点に対応し(逆もまた同様)、カバットナンバリングによる103位は、FR4の出発点に対応する(逆もまた同様)ことがいえる]。

#### 【0151】

V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸残基の数字を付ける代替方法(この方法は、類似の方法でラクダ科動物由来のV<sub>H H</sub>ドメイン及びナノボディに適用することができる)は、Chothia et al. (1989, Nature 342: 877-883)によって説明される方法、いわゆる「AbM定義」及びいわゆる「接触定義」である。しかし本明細書、特許請求の範囲及び図面では、特に他に指示がなければ、Riechmann and MuyldermansによってV<sub>H H</sub>ドメインに適用されるようなカバットによるナンバリングに従う。

#### 【0152】

w) 図面、配列表及び実験部/実施例は、本発明をさらに説明するためだけに与えられ、特に他にはっきりと本明細書中に指示がなければ、本発明の範囲及び/又は添付の特許請求の範囲を限定するものとしては決して解釈すべきではない。

#### 【0153】

本発明は、IL-6Rとの結合に特に適したアミノ酸残基ストレッチ(配列番号80~配列番号82、配列番号84~配列番号91及び配列番号93~配列番号95)を提供する。これらのアミノ酸残基ストレッチは、特に本発明のアミノ酸配列の抗原結合部位(の一部)を形成するように本発明のアミノ酸配列に存在し得る、及び/又は組み込まれ得る。これらのアミノ酸残基ストレッチは、IL-6Rに対して産生され、かつIL-6/IL-6R相互作用を一部又は完全に遮断する、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体を介したシグナル伝達を阻害する能力に加えて、IL-6Rとの結合に関する親和性、並びに有効性及び/又は効力、及び/又は選択性等の他の特性をさらに増大させるようにさらに親和性成熟を行った(実施例の項を参照されたい)重鎖抗体のCDR配列又はV<sub>H H</sub>配列として生成されている。これらのアミノ酸残基ストレッチは本明細書中で「本発明のCDR配列」(すなわちそれぞれ、「本発明のCDR1配列」、「本発明のCDR2配列」及び「本発明のCDR3配列」とも称される。

#### 【0154】

しかしながら、本発明は最も広範な意味で、これらのアミノ酸残基ストレッチが本発明

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列を I L - 6 R に結合させることが可能であれば、これらのアミノ酸残基ストレッチが本発明のアミノ酸配列において有し得る特定の構造的役割又は機能に限定されないことに留意すべきである。このため概して本発明は最も広範な意味で、I L - 6 / I L - 6 R 相互作用を一部又は完全に遮断する、及び / 又は I L - 6、I L - 6 R 及び / 又は I L - 6 / I L - 6 R 複合体を介したシグナル伝達を阻害する能力に加えて、或る特定の親和性、結合活性、有効性及び / 又は効力で I L - 6 R と結合することが可能であり、かつアミノ酸配列全体が I L - 6 R と結合することが可能な結合ドメイン及び / 又は結合単位を形成するように、1 つ又は複数のさらなるアミノ酸配列を介して互いに好適に連結する、1 つ又は複数の本明細書に記載のような C D R 配列、特に 2 つ以上のこのような C D R 配列の好適な組合せを含む、アミノ酸配列を提供する。しかしながら、本発明のアミノ酸配列にこのような C D R 配列が 1 つでも存在していれば、本発明のアミノ酸配列に I L - 6 R と結合する能力を与えるのに十分であるといえることにも留意すべきである（例えばここでもまた、国際公開第 0 3 / 0 5 0 5 3 1 号に記載される、いわゆる「促進断片」を参照する）。

10

**【 0 1 5 5 】**

このため具体的であるが、非限定的な一態様において、本発明のアミノ酸配列は、C D R 1 配列：

a ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、又は

b ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び / 又は

20

C D R 2 配列：

c ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、又は

d ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び / 又は

30

C D R 3 配列：

e ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5、又は

f ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

40

からなる群から選択されるアミノ酸残基ストレッチを少なくとも 1 つ含む得る。

**【 0 1 5 6 】**

特に本発明のアミノ酸配列は、上記のような C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基ストレッチ（又はそれらの任意の好適な組合せ）を含む抗原結合部位を少なくとも 1 つ含むアミノ酸配列であり得る。しかしながら好ましい態様では、本発明のアミノ酸配列は、本発明の C D R 1 配列、本発明の C D R 2 配列及び / 又は本発明の C D R 3 配列からなる群から選択されるアミノ酸残基ストレッチを 1 つ超、例えば 2 つ以上（more than one, such as two or more）含む。

**【 0 1 5 7 】**

50

したがって本発明は、( i ) 第 1 のアミノ酸残基ストレッチが a ) 若しくは b ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応する場合、第 2 のアミノ酸残基ストレッチは、c )、d )、e ) 若しくは f ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応し、( i i ) 第 1 のアミノ酸残基ストレッチが c ) 若しくは d ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応する場合、第 2 のアミノ酸残基ストレッチは、a )、b )、e ) 若しくは f ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応し、又は( i i i ) 第 1 のアミノ酸残基ストレッチが e ) 若しくは f ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応する場合、第 2 のアミノ酸残基ストレッチは、a )、b )、c ) 若しくは d ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応するように、

C D R 1 配列：

a ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、又は

10

b ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び/又は

C D R 2 配列：

c ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、又は

d ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ、及び/又は

20

C D R 3 配列：

e ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5、又は

f ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

30

から選択されるアミノ酸残基ストレッチを 2 つ以上含むアミノ酸配列にも関する。

【 0 1 5 8 】

特定の態様において、本発明は、第 1 のアミノ酸残基ストレッチが以下の C D R 1 配列：

a ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、又は

b ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

40

から選択され、

第 2 のアミノ酸残基ストレッチが以下の C D R 2 配列：

c ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、又は

d ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表

50

面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチから選択され、かつ

第3のアミノ酸残基ストレッチが以下のCDR3配列:

e) 配列番号93~配列番号95、又は

f) 配列番号93~配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチから選択される、アミノ酸残基ストレッチを3つ以上含むアミノ酸配列にも関する。

【0159】

本明細書に記載のように、本発明は、a)、c)及び/又はe)で規定のアミノ酸残基ストレッチの1つと、すなわち規定のCDR1配列の1つと(すなわち配列番号80~配列番号82の1つと)、規定のCDR2配列の1つと(すなわち配列番号84~配列番号91の1つと)、及び/又は規定のCDR3配列の1つと(すなわち配列番号93~配列番号95の1つと)わずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを1つ又は複数含むアミノ酸配列も包含する。

【0160】

「アミノ酸差異」という用語は、それぞれa)、c)又はe)のアミノ酸残基ストレッチ(又はCDR配列)と比較してb)、d)又はf)に規定のアミノ酸残基ストレッチ(又はCDR配列)の位置での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表す。b)、d)及びf)のアミノ酸残基ストレッチ(又はCDR配列)はそれぞれa)、c)又はe)のアミノ酸残基ストレッチと比較して1つ又は最大で2つのこのようなアミノ酸差異を含有することができることを理解されたい。

【0161】

「アミノ酸差異」は、本発明のアミノ酸配列の特性を改善させるか、又は本発明のアミノ酸配列の所望の特性又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、任意の1つ又は最大で2つの置換、欠失若しくは挿入、又はそれらの任意の組合せであり得る。これに関して、得られる本発明のアミノ酸配列は少なくとも、1つ又は最大で2つの置換、欠失又は挿入を有しない1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする。

【0162】

例えば当業者の能力の範囲内で、本発明のアミノ酸配列を発現するために使用される宿主生物に応じて、このような欠失及び/又は置換を、翻訳後修飾に関する1つ又は複数の部位(例えば1つ又は複数のグリコシル化部位)を除去するように設計してもよい。

【0163】

本発明の好ましい態様では、「アミノ酸差異」はアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、本発明のアミノ酸配列の特性を改善させるか、又は本発明のアミノ酸配列の所望の特性又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、任意の1つ又は最大で2つの置換であり得る。これに関して、得られる本発明のアミノ酸配列は少なくとも、1つ又は最大で2つの置換を有しない1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする。

【0164】

1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチにおけるアミノ酸置換は保存的なアミノ酸置換であり得る。「保存的な」アミノ酸置換は一般的に、アミノ酸残基が同様の化学構造の別のアミノ酸残基に置き換わり、かつ得られるアミノ酸配列の機能、活性又は他の生物学的

10

20

30

40

50

特性にほとんど又は本質的に全く影響を与えないアミノ酸置換である。このような保存的なアミノ酸置換は、例えば国際公開第04/037999号、英国特許出願公開第3357768号、国際公開第98/49185号、国際公開第00/46383号及び国際公開第01/09300号から当該技術分野において既知であり、このような置換の(好ましい)種類及び/又は組合せは、関連の教示に基づいて国際公開第04/037999号及び国際公開第98/49185号、並びにそれらに言及されるさらなる参考文献から選択することができる。

【0165】

このような保存的な置換は、好ましくは以下の(a)群~(e)群内の或るアミノ酸が、同じ群内の別のアミノ酸残基に置換される置換である：(a)低分子の脂肪族で非極性又はわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro及びGly、(b)極性で負に荷電した残基及びこの(非荷電)アミド：Asp、Asn、Glu及びGln、(c)極性で正に荷電した残基：His、Arg及びLys、(d)巨大な脂肪族で非極性の残基：Met、Leu、Ile、Val及びCys、並びに(e)芳香族残基：Phe、Tyr及びTrp。

10

【0166】

特に好ましい保存的置換は以下のようなものである：AlaをGlyに又はSerに、ArgをLysに、AsnをGlnに又はHisに、AspをGluに、CysをSerに、GlnをAsnに、GluをAspに、GlyをAlaに又はProに、HisをAsn又はGlnに、IleをLeuに又はValに、LeuをIleに又はValに、LysをArgに、Glnに又はGluに、MetをLeuに、Tyrに又はIleに、PheをMetに、Leuに又はTyrに、SerをThrに、ThrをSerに、TrpをTyrに、TyrをTrpに、及び/又はPheをValに、Ileに又はLeuに。

20

【0167】

本発明の別の態様において、1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチにおけるアミノ酸置換はIL-6Rとの結合に関する親和性が増大したアミノ酸配列を提供し得る。これは、ランダム突然変異誘発法又は部位特異的変異誘発法等の技法、及び/又は例えば国際公開第09/004065号、国際公開第2009/004066号、国際公開第05/003345号、国際公開第06/023144号、欧州特許第527809号、欧州特許第397834号等に記載のそれ自体が既知の親和性成熟に関する他の技法により行うことができる。

30

【0168】

これらに限定されないが、CDRにおけるアミノ酸残基の置換に関する規則(一部又は完全に従う)は以下の通りであり得る(すなわち同様の側鎖の化学的性質を有するアミノ酸による置換)：

- KをRに置換し、
- RをKに置換し、
- AをS又はTに置換し、
- SをA又はTに置換し、
- TをA又はSに置換し、
- IをL又はVに置換し、
- LをI又はVに置換し、
- VをI又はLに置換し、
- FをYに置換し、
- YをFに置換し、
- NをDに置換し、
- DをNに置換し、
- QをEに置換し、
- EをQに置換し、
- GをAに置換し、

40

50

MをLに置換し、  
H、C、W及びPは一定に保つ。

【0169】

さらには、同様にこれらに限定されないが、CDRにおけるアミノ酸残基の置換に関する規則（一部又は完全に従う）は代替的に、27位～35位及び50位～58位（カバットナンバリングシステムを使用する）の置換に関しては以下の通りであり得る、

27位～35位に関しては、

27位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をF；G；R；S；F、G、R、Sのうちの2つ；F、G、R、Sのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

10

28位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をA；I；S；T；A、I、S、Tのうちの2つ；A、I、S、Tのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

29位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をF；G；L；S；F、G、L、Sのうちの2つ；F、G、L、Sのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

30位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をD；G；S；T；D、G、S、Tのうちの2つ；D、G、S、Tのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

31位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をD；I；N；S；T；D、I、N、S、Tのうちの2つ；D、I、N、S、Tのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

20

32位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をD；N；Y；D、N、Yのうちの2つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

33位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をA；G；T；V；A、G、T、Vのうちの2つ；A、G、T、Vのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

34位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をI；M；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

35位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をA；G；S；A、G、Sのうちの2つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

30

元のアミノ酸配列が52a位（カバットナンバリングを使用する）にアミノ酸配列を有する場合、50位～58位に関しては、

50位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をA；C；G；S；T；A、C、G、S、Tのうちの2つ；A、C、G、S、Tのうちの3つ；A、C、G、S、Tのうちの4つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

51位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をIに置換し、

52位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をN；R；S；T；N、R、S、Tのうちの2つ；N、R、S、Tのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

40

52a位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をR；S；T；W；R、S、T、Wのうちの2つ；R、S、T、Wのうちの3つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

53位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をD；G；N；S；T；D、G、N、S、Tのうちの2つ；D、G、N、S、Tのうちの3つ；D、G、N、S、Tのうちの4つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

54位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をD；G；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

55位（カバットナンバリングを使用する）の元のアミノ酸残基をD；G；S；D、G、Sのうちの2つ；又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

50

56位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をI;N;R;S;T;I、N、R、S、Tのうち2つ;I、N、R、S、Tのうち3つ;I、N、R、S、Tのうち4つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

57位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をTに置換し、

58位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をD;H;N;S;Y;D、H、N、S、Yのうち2つ;D、H、N、S、Yのうち3つ;D、H、N、S、Yのうち4つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

元のアミノ酸配列が52a位(カバットナンバリングを使用する)にアミノ酸配列を有しない場合、50位~58位に関しては、

50位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をA;G;R;S;T;A、G、R、S、Tのうち2つ;A、G、R、S、Tのうち3つ;A、G、R、S、Tのうち4つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

51位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をIに置換し、

52位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をN;S;T;N、S、Tのうち2つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

53位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をN;R;S;T;Y;N、R、S、T、Yのうち2つ;N、R、S、T、Yのうち3つ;N、R、S、T、Yのうち4つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

54位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をD;G;R;S;D、G、R、Sのうち2つ;D、G、R、Sのうち3つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

55位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をGに置換し、

56位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をG;N;R;S;T;D、N、R、S、Tのうち2つ;D、N、R、S、Tのうち3つ;D、N、R、S、Tのうち4つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

57位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をTに置換し、

58位(カバットナンバリングを使用する)の元のアミノ酸残基をD;N;T;Y;D、N、T、Yのうち2つ;D、N、T、Yのうち3つ;又はこれらの全て、好ましくはこれらの全てに置換し、

その後(本明細書中にさらに記載のように、それ自体が既知の任意の方法で)このようにして求めた、潜在的に有用な置換(又はその組合せ)の1つ又は複数を上記CDR配列に導入することができ、IL-6Rに対する親和性、及び/又はIL-6/IL-6R相互作用を(一部又は好ましくは完全に)遮断する、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体を介したシグナル伝達を阻害する能力等の他の所望の特性に関して、得られたアミノ酸配列(複数可)を試験することができる。このようにして、当業者は本明細書中の開示に基づき限定的な試行錯誤によって、CDRにおける他の好適な置換(又はその好適な組合せ)を求めることができる。

#### 【0170】

本発明のアミノ酸配列は、少なくとも1つのアミノ酸残基ストレッチ(上記アミノ酸残基ストレッチは、本明細書に記載のCDR配列の少なくとも1つの配列に対応するアミノ酸配列を有する)を含む任意のアミノ酸配列であり得る。このようなアミノ酸配列は、免疫グロブリンフォールドを含んでも、又は含んでいなくてもよい。例えばこれに限定されないが、このようなアミノ酸配列は、少なくとも1つのこのようなCDR配列(上記で規定のような)を含むが、(完全)免疫グロブリンフォールドを形成するのに十分な大きさではない好適な免疫グロブリン配列の断片であり得る(例えばここでもまた、国際公開第03/050531号に記載される、「促進断片」を参照する)。代替的に、このようなアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定されるようなCDR配列に対応する(すなわちその抗原結合部位の一部として)少なくとも1つのアミノ酸残基ストレッチを含む、好適な「タンパク質足場」であり得る。アミノ酸配列を提示するのに好適な足場が当業者にとって明らかであり、例えばこれらに限定されないが、(すなわち本

10

20

30

40

50

明細書に既に記載の免疫グロブリン配列以外の)免疫グロブリンに基づく若しくはこれに由来する結合足場、タンパク質Aドメイン由来のタンパク質足場(例えばアフィボディ(Affibodies)(商標))、テンダミスタット、フィブロネクチン、リボカリン、CTL A-4、T細胞受容体、設計アンキリン反復、アビマー(avimers)及びPDZドメイン(Binz et al., 2005, Nat. Biotech., 23:1257)、並びにDNA又はRNAに基づく結合部分(DNAアダプター又はRNAアダプターを含むが、これに限定されない)(Ulrich et al., 2006, Comb. Chem. High Throughput Screen 9(8): 619-32)が含まれる。

【0171】

また、本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定されるようなCDR配列(すなわち「本発明のCDR」)を1つ又は複数含む、任意の本発明のアミノ酸配列は、IL-6Rと(本明細書に規定のように)特異的に結合することができるようなもの、及びより具体的には本明細書に規定のようなものである(さらに本明細書に記載されるような(実際又は見掛けの) $K_D$ 値、(実際又は見掛けの) $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される)親和性でIL-6Rと結合することができるようなものであるのが好ましい。本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定されるようなCDR配列を1つ又は複数含む、任意の本発明のアミノ酸配列は、本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するようなものであるのが好ましい。

10

【0172】

さらには、本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定されるCDR(すなわち「本発明のCDR」)の1つ又は複数、ヒトの足場又は非免疫グロブリンの足場を含むがこれらに限定されない他の「足場」上に「グラフト化」することが可能であり得ることは、当業者にとって明らかであろう。このようなCDRグラフト化の好適な足場及び技法は当業者にとって明らかであり、当該技術分野において既知である。例えば米国特許第7,180,370号、国際公開第01/27160号、欧州特許第0605522号、欧州特許第0460167号、米国特許第7,054,297号、Nicaise et al. (2004, Protein Science, 13: 1882-1891)、Ewert et al. (2004, Methods, 34(2): 184-199)、Kettleborough et al. (1991, Protein Eng. 4(7): 773-783)、O'Brien and Jones (2003, Methods Mol. Biol. 207: 81-100)、Skerra (2000, J. Mol. Recognit. 13: 167-187)、及びSaerens et al. (2005, J. Mol. Biol. 352(3): 597-607)、及びそれらに引用されるさらなる参考文献を参照されたい。例えばマウス又はラットのCDRをヒトのフレームワーク及び足場上にグラフト化するそれ自体が既知の技法は、本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定されるCDRの1つ又は複数と、1つ又は複数のヒトフレームワーク領域又は配列とを含むキメラタンパク質をもたらすのに同じように使用することができる。

20

30

【0173】

このため特定の態様において、本発明は、(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR1配列、本発明のCDR2配列及び本発明のCDR3配列からなる群から選択されるCDR配列を少なくとも1つ含むキメラアミノ酸配列も包含する。好ましくは、このようなキメラアミノ酸配列は、(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR1配列からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列、及びまた(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR2配列からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列;若しくは(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR1配列からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列及び(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR3配列からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列を含むか;又はこのようなキメラポリペプチドは、(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR2配列からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列、及びまた(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR3配列からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列を含み得る。例えばこのようなキメラポリペプチドは、

40

50

(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR3配列からなる群から選択される1つのCDR配列と、(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR1配列からなる群から選択される1つのCDR配列と、(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR2配列からなる群から選択される1つのCDR配列とを含み得る。本発明のアミノ酸配列に好ましいとして本明細書で言及されるCDRの組合せ(表A-1を参照されたい)は通常これらのキメラポリペプチドにも好ましい。

【0174】

上記キメラポリペプチドでは、CDRをさらなるアミノ酸配列に連結させても、及び/又はアミノ酸配列を介して互いに連結させてもよく、上記アミノ酸配列は、フレームワーク配列であるか、又はフレームワーク配列として働くか、若しくは共にCDRを提示するための足場を形成するアミノ酸配列であるのが好ましい。

10

【0175】

非限定的な一実施形態によれば、キメラアミノ酸配列は、少なくとも1つのフレームワーク配列を介して連結した(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)CDR配列を少なくとも2つ含み、ここで好ましくは2つのCDR配列のうち少なくとも1つがCDR3配列であり、もう1つのCDR配列がCDR1配列又はCDR2配列である。好ましいが、非限定的な一実施形態によれば、キメラアミノ酸配列は、少なくとも2つのフレームワーク配列に連結した(本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の)本発明のCDR配列を少なくとも3つ含み、ここで好ましくは3つのCDR配列のうち少なくとも1つがCDR3配列であり、残りの2つのCDR配列はCDR1配列又はCDR2配列であり、1つがCDR1配列、1つがCDR2配列であるのが好ましい。特に好ましいが、非限定的な一実施形態によれば、キメラアミノ酸配列は構造FR1'-CDR1-FR2'-CDR2-FR3'-CDR3-FR4'(ここでCDR1、CDR2及びCDR3は本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定のようなものであり、FR1'、FR2'、FR3'及びFR4'はフレームワーク配列である)を有する。FR1'、FR2'、FR3'及びFR4'は特にそれぞれ、ヒト抗体のフレームワーク1配列、フレームワーク2配列、フレームワーク3配列及びフレームワーク4配列(例えばV<sub>H</sub>3配列)及び/又はこのようなフレームワーク配列の部分若しくは断片であり得る。構造FR1'-CDR1-FR2'-CDR2-FR3'-CDR3-FR4'を有するキメラポリペプチドの部分又は断片を使用することも可能である。好ましくは、このような部分又は断片は、本発明のアミノ酸配列で設定される基準を満たすようなものである。

20

30

【0176】

本発明のこのようなアミノ酸配列において、フレームワーク配列は任意の好適なフレームワーク配列であり得るが、好適なフレームワーク配列の例は、例えば標準的なハンドブック、並びに本明細書において言及されるさらなる開示及び従来技術に基づき、当業者に明らかである。

【0177】

フレームワーク配列は、免疫グロブリンフレームワーク配列、又は(例えばヒト化又はラクダ化等の配列の最適化によって)免疫グロブリンフレームワーク配列から誘導されているフレームワーク配列(の好適な組合せ)であるのが好ましい。例えばフレームワーク配列は、軽鎖可変ドメイン(例えばV<sub>L</sub>配列)及び/又は重鎖可変ドメイン(例えばV<sub>H</sub>配列)から誘導されているフレームワーク配列であり得る。特に好ましい一態様では、フレームワーク配列は、V<sub>H</sub>H配列(該フレームワーク配列は任意で、部分又は完全ヒト化し得る)から誘導されているか、又は(本明細書に規定のように)ラクダ化した従来のV<sub>H</sub>配列であるいずれかのフレームワーク配列である。

40

【0178】

フレームワーク配列は、本発明のアミノ酸配列が、ドメイン抗体(又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、単ドメイン抗体(又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、「dAb」(又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配

50

列)、又はナノボディ( $V_{HH}$ 配列を含むが、これに限定されない)であるようなものであるのが好ましい。また、好適なフレームワーク配列は、例えば標準的なハンドブック、並びに本明細書に言及されるさらなる開示及び従来技術に基づいて当業者にとって明らかである。

【0179】

特に、本発明のアミノ酸配列に存在するフレームワーク配列は、本発明のアミノ酸配列がナノボディであるように、(特許文献7(表A-3~表A-8)に規定の)特徴的な残基を1つ又は複数含有し得る。このようなフレームワーク配列(の好適な組合せ)の幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる開示から明らかになる(例えば表A-1を参照されたい)。概してナノボディ(特に $V_{HH}$ 配列及び(部分)ヒト化 $V_{HH}$ 配列)は特に、(例えば特許文献7の61頁24行目から98頁3行目にさらに記載されるような)1つ又は複数のフレームワーク配列における1つ又は複数の「特徴的な残基」の存在を特徴とし得る。

10

【0180】

好ましい態様において、本発明のアミノ酸配列は免疫グロブリンフォールドを含むか、又は好適な条件下で免疫グロブリンフォールドを形成することが可能である。好ましくは、本発明のアミノ酸配列は免疫グロブリン配列であり、さらにより好ましくは本発明のアミノ酸配列は、

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

の構造を有する。

20

【0181】

したがって本発明は、4つのフレームワーク領域(それぞれ、FR1~FR4)と、3つの相補性決定領域(それぞれ、CDR1~CDR3)とから本質的になるアミノ酸配列であって、ここでCDR1が、

a) 配列番号80~配列番号82、又は

b) 配列番号80~配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

30

からなる群から選択され、及び/又は

CDR2が、

c) 配列番号84~配列番号91、又は

d) 配列番号84~配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

40

からなる群から選択され、及び/又は

CDR3が、

e) 配列番号93~配列番号95、又は

f) 配列番号93~配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される、アミノ酸配列にも関する。

50

## 【 0 1 8 2 】

この実施形態においてアミノ酸配列は、（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 1 配列、（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 2 配列、又は（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 3 配列からなる群から選択される C D R 配列を少なくとも 1 つ含む。好ましくはアミノ酸配列は、（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 1 配列、（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 2 配列、又は（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 3 配列からなる群から選択される C D R 配列を少なくとも 2 つ、例えば（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 1 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列及び（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 2 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列；若しくは（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 1 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列及び（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 3 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列；若しくは（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 2 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列及び（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 3 配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列を含むか、又はこのようなアミノ酸配列は、（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 1 配列、（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 2 配列、及び（本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定の）本発明の C D R 3 配列からなる群から選択される C D R 配列を 3 つ含む得る。

10

20

## 【 0 1 8 3 】

このため本発明は、4つのフレームワーク領域（それぞれ、F R 1 ~ F R 4）と、3つの相補性決定領域（それぞれ、C D R 1 ~ C D R 3）とから本質的になるアミノ酸配列であって、ここで C D R 1 が、

a) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、又は

b) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

30

からなる群から選択され、かつ

C D R 2 が、

c) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、又は

d) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

40

からなる群から選択され、かつ

C D R 3 が、

e) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5、又は

f) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする

50

る、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される、アミノ酸配列にも関する。

【0184】

本発明のアミノ酸配列に関する好ましいCDR配列の組合せを表A-1に示す。

【0185】

本発明のアミノ酸配列は、従来の4鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列から本質的になり得るか、又は重鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列から本質的になり得る。本発明のアミノ酸配列は、ドメイン抗体（又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、単ドメイン抗体（又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、「dAb」（又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列）若しくはナノボディから本質的になり得る。

10

【0186】

（単一）ドメイン抗体の概説に関しては、上記で言及された従来技術、及び欧州特許第0368684号も参照する。「dAb」という用語に関しては、例えばWard et al. (1989, Nature 341: 544-6)、Holt et al. (2003, Trends Biotechnol, 21:484-490)、並びに例えば国際公開第06/030220号、国際公開第06/003388号、及びDomantisLtd.の他の公開特許出願を参照する。哺乳動物起源ではないため、本発明に関してあまり好ましくはないが、単ドメイン抗体又は単一可変ドメインは、或る特定種のサメ由来である可能性があることにも留意すべきである（例えばいわゆる「IgNARドメイン」、例えば国際公開第05/18629号を参照されたい）。

20

【0187】

特に本発明のアミノ酸配列は、（本明細書で規定の）ナノボディ（登録商標）又はその好適な断片から本質的になるか、又はそれらであり得る（備考：ナノボディ（登録商標）、ナノボディ（登録商標）及びナノクローン（登録商標）は、Ablynx N. V.の登録商標である）。IL-6Rに指向性を有するこのようなナノボディは、本明細書で「本発明のナノボディ」とも称される。

【0188】

ナノボディの概説に関しては、以下のさらなる記載、及び例えば特許文献7（16頁）に記載のような本明細書で言及される従来技術を参照する。

【0189】

特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号80、又は配列番号80とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

30

【0190】

別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91から選択されるアミノ酸残基ストレッチ、又は配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

40

【0191】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号84、又は配列番号84とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配

50

列は、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

【0192】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号93～配列番号94から選択されるアミノ酸残基ストレッチ、又は配列番号93～配列番号94のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

10

【0193】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号93、又は配列番号93とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、若しくはより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む。

20

【0194】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号80；又は配列番号80とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91から選択されるアミノ酸残基ストレッチ；又は配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。

30

【0195】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号80；又は配列番号80とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号84；又は配列番号84とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。

40

【0196】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号80；又は配列番号80とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号93～配列番号94から選択されるアミノ酸残基ストレッチ；又は配列番号93～配列番号94のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1つ又は2つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。

50

## 【 0 1 9 7 】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 8 0 ; 又は配列番号 8 0 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ ; 及び少なくとも配列番号 9 3 ; 又は配列番号 9 3 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする。

## 【 0 1 9 8 】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 8 4、配列番号 8 9 若しくは配列番号 9 1 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ ; 又は配列番号 8 4、配列番号 8 9 若しくは配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ ; 及び少なくとも配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 4 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ ; 又は配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 4 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする。

## 【 0 1 9 9 】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 8 4、配列番号 8 9 若しくは配列番号 9 1 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ ; 又は配列番号 8 4、配列番号 8 9 若しくは配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ ; 及び少なくとも配列番号 9 3 ; 又は配列番号 9 3 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする。

## 【 0 2 0 0 】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 8 4 ; 又は配列番号 8 4 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ ; 及び少なくとも配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 4 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ ; 又は配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 4 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする。

## 【 0 2 0 1 】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 8 4 ; 又は配列番号 8 4 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ ; 及び少なくとも配列番号 9 3 ; 又は配列番号 9 3 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする。

## 【 0 2 0 2 】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 80 及び配列番号 84 を含む。

【0203】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 80 及び配列番号 93 を含む。

【0204】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 84 及び配列番号 93 を含む。

【0205】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 80；又は配列番号 80 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 84、配列番号 89 若しくは配列番号 91 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ；又は配列番号 84、配列番号 89 若しくは配列番号 91 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 93 ~ 配列番号 94 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ；又は配列番号 93 ~ 配列番号 94 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする。

10

20

【0206】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 80；又は配列番号 80 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 84、配列番号 89 若しくは配列番号 91 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ；又は配列番号 84、配列番号 89 若しくは配列番号 91 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 93；又は配列番号 93 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする。

30

【0207】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 80；又は配列番号 80 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 84；又は配列番号 84 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 93 ~ 配列番号 94 から選択されるアミノ酸残基ストレッチ；又は配列番号 93 ~ 配列番号 94 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする。

40

【0208】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号 80；又は配列番号 80 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 84；又は配列番号 84 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチ；及び少なくとも配列番号 93；又は配列番号 93 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ

50

酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチを含み、ここでは上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。

【0209】

さらに別の特定の態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、配列番号80、配列番号84及び配列番号93を含む。

【0210】

本発明のアミノ酸配列に関して本明細書で規定のCDR1配列、CDR2配列、及びCDR3配列の好ましい組合せは表A-1にも示される。

【0211】

好ましい態様において、本発明のアミノ酸配列は、

a) 配列番号60～配列番号69；

b) そのCDR配列の1つ、2つ又は全てにおいて配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列であって、そのCDR配列の1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸配列；並びに

c) 配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列からなる群から選択される。

【0212】

別の好ましい態様において、本発明のアミノ酸配列は、

a) 配列番号65～配列番号69；

b) そのCDR配列の1つ、2つ又は全てにおいて配列番号65～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列であって、そのCDR配列の1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号65～配列番号69のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸配列；並びに

c) 配列番号65～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、配列番号65～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号65～配列番号69のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列からなる群から選択される。

【0213】

さらに別の好ましい態様において、本発明のアミノ酸配列は、

a) 配列番号66、

b) そのCDR配列の1つ、2つ又は全てにおいて配列番号66とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列であって、そのCDR配列の1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号66による結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上

記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸配列、並びに

c) 配列番号66とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、わずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号66による結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、配列

からなる群から選択される。

【0214】

2つのアミノ酸残基ストレッチ(又は2つのCDR配列)を比較する場合、「そのCDRの1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸差異」という用語は、a)に指定する本発明のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基ストレッチ(又はCDR配列)と比較した、b)に指定する本発明のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基ストレッチ(又はCDR配列)の或る位置上での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表す。2つのアミノ酸残基ストレッチ(又はCDR配列)は1つ又は最大で2つのこのようなアミノ酸差異を含有することができることが理解される。

【0215】

「そのCDRの1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸差異」とは、本発明のアミノ酸配列がa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR1、CDR2及び/又はCDR3と比較してそのCDR1においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異及び/又はそのCDR2においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異及び/又はそのCDR3においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異;例えば配列番号60~配列番号69のうちの一つにおけるCDR1と比較してそのCDR1においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異;又はa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR2と比較してそのCDR2においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異;又はa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR3と比較してそのCDR3においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異;又はa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR1と比較してそのCDR1においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR2と比較してそのCDR2においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異;又はa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR1と比較してそのCDR1においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及び配列番号60~配列番号69のうちの一つにおけるCDR3と比較してそのCDR3においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異;又はa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR2と比較してそのCDR2においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR3と比較してそのCDR3においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、a)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR2と比較してそのCDR2においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のアミノ酸配列のうちの一つ(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの一つ)におけるCDR3と比較してそのCDR3においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有し得ることを意味する。

【0216】

10

20

30

40

50

「そのCDRの1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸差異」は、本発明のアミノ酸配列の特性を改善させるか、又は本発明のアミノ酸配列の所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、1つ又は複数のCDRにおける任意の1つ又は最大で2つの置換、欠失若しくは挿入、又はそれらの任意の組合せであり得る。これに関して、得られる本発明のアミノ酸配列は少なくとも、1つ又は最大で2つの置換、欠失又は挿入を有しない1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られるアミノ酸配列は、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でIL-6受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られるアミノ酸配列は本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するの好ましい。

10

## 【0217】

本発明の一態様において、「そのCDRの1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸差異」はアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、本発明のアミノ酸配列の特性を改善させるか、又は本発明のアミノ酸配列の所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、1つ又は複数のCDRにおける任意の1つ又は最大で2つの置換であり得る。これに関して、得られる本発明のアミノ酸配列は少なくとも、1つ又は最大で2つの置換を有しない1つ又は複数のアミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られるアミノ酸配列は、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でIL-6受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られるアミノ酸配列は本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するの好ましい。

20

## 【0218】

上述のように、CDRにおけるアミノ酸置換は、（本明細書に規定のように）「保守的置換」等の任意の可能な置換であっても、（本明細書に規定のように）或る特定の規則により働いても、及び/又は得られるアミノ酸配列に対する特性の改善を誘導してもよい。

30

## 【0219】

本発明は、配列番号60～配列番号69（の完全配列）のうちの1つとのわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列にも関する。

## 【0220】

2つのアミノ酸配列を比較するとき、「アミノ酸差異」という用語は、第2のアミノ酸配列に比べて第1のアミノ酸配列の或る位置上での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表す。2つのアミノ酸配列は、1つ又は最大で2つのこのようなアミノ酸差異を含有し得ることが理解される。

40

## 【0221】

「アミノ酸差異」は、本発明のアミノ酸配列の特性を改善させるか、又は本発明のアミノ酸配列の所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、アミノ酸配列における、すなわち1つ又は複数のフレームワーク領域における又は1つ又は複数のCDR、又はそれらの任意の組合せにおける任意の1つ又は最大で任意の2つの置換、欠失若しくは挿入であり得る。これに関して、得られる本発明のアミノ酸配列は少なくとも、1つ又は最大で2つの置換、欠失又は挿入を有しないアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られるアミノ酸配

50

列は、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性で IL-6 受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られるアミノ酸配列は本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するの好ましい。当業者は概して、好適な置換、欠失若しくは挿入、又はそれらの好適な組合せを求め、選択することができ、またこのようにして得られたアミノ酸配列の特性に対するそれらの影響を求めることができるであろう。

#### 【0222】

本発明の一態様において、「アミノ酸差異」はアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、本発明のアミノ酸配列の特性を改善させるか、又は本発明のアミノ酸配列の所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、1つ又は複数のフレームワーク領域若しくは1つ又は複数のCDR、又はそれらの任意の組合せにおける任意の1つ又は最大で2つの置換であり得る。これに関して、得られる本発明のアミノ酸配列は少なくとも、1つ又は最大で2つの置換を有しないアミノ酸配列と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL-6R と結合するものとする。得られるアミノ酸配列は、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度、又は代替的に $IC_{50}$  値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性で IL-6 受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られるアミノ酸配列は本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するの好ましい。当業者は概して、好適な置換を求め、選択することができ、またこのようにして得られたアミノ酸配列の特性に対するその影響を求めることができるであろう。

#### 【0223】

上記のように、置換、挿入又は欠失は1つ又は複数のフレームワーク領域及び/又は1つ又は複数のCDRにあり得る。上述のように、1つ又は複数のCDRにおけるアミノ酸置換は、（本明細書で規定のように）「保存的置換」等の任意の置換であっても、（本明細書に規定のように）或る特定の規則により働いても、及び/又は得られるアミノ酸配列に対する特性の改善を誘導してもよい。

#### 【0224】

このような置換、挿入又は欠失が1つ又は複数のフレームワーク領域で行われる場合、置換、挿入又は欠失は、（例えば特許文献7、表A-3～表A-8に規定のような）1つ又は複数の特徴的な残基で及び/又はフレームワーク残基における1つ又は複数の他の位置で行われてもよいが、（これらが本明細書に記載のような好適なヒト化置換ではない限り）特徴的な残基での置換、挿入又は欠失は概してあまり好ましくない。非限定的な例により、置換は例えば（本明細書に記載のような）保存的置換であってもよく、及び/又はアミノ酸残基を別の $V_H$  ドメインにおける同じ位置で自然発生する別のアミノ酸残基に置き換えてもよいが（特許文献7、表A-5～表A-8を参照されたい）、本発明は概してそれらに限定されない。

#### 【0225】

（好ましくは）1つ又は複数のフレームワーク領域において行われる置換、挿入又は欠失は、例えばヒト化置換等のフレームワーク領域の配列最適化のための置換であり得る。幾つかの好ましいが、非限定的なヒト化置換（及びそれらの好適な組合せ）は本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかになるであろう。a) に規定の本発明のアミノ酸配列のうちの1つのフレームワーク領域の配列を1つ又は複数の密接に関連したヒト $V_H$  配列の対応するフレームワーク配列と比較することにより、潜在的に有用なヒト化置換を確認し、その後1つ又は複数のこのようにして求められた潜在的に有用なヒト化置換（又はそれらの組合せ）を（本明細書でさらに記載のようにそれ自体が既知の任意の方法で）a) で規定の上記の本発明のアミノ酸配列に導入することができ、IL-6R に対する親

10

20

30

40

50

和性、安定性、発現のし易さ及びレベル、及び/又は本明細書に規定の他の所望の特性に関して、得られたヒト化アミノ酸配列を試験することができる。このようにして、当業者は本明細書中の開示に基づき限定的な試行錯誤によって、他の好適なヒト化置換（又はその好適な組合せ）を求めることができる。

【0226】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを発現するのに使用される宿主生物に応じて、当業者の能力の範囲内で、このような欠失及び/又は置換を、翻訳後修飾に関する1つ又は複数の部位（例えば1つ又は複数のグリコシル化部位）を除去するように設計してもよい。代替的には、置換又は挿入を官能基（本明細書中で説明される）が結合する1つ又は複数の部位を導入する、例えば部位特異的ペグ化（同様に本明細書中で説明される）を可能にするように設計してもよい。

10

【0227】

特許文献7の表A-5～表A-8に示す $V_{HH}$ エントロピー及び $V_{HH}$ 変動性に関するデータから明らかのように、フレームワーク領域内の幾つかのアミノ酸残基は他よりも保存されている。一般に、任意の置換、欠失又は挿入は好ましくは保存されにくい位置で起こるが、本発明は最も広い意味ではこれに限定されない。また、一般に、アミノ酸置換はアミノ酸欠失又はアミノ酸挿入よりも好適である。

【0228】

好ましくは得られる本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは、好ましくは1 nM～1 pM（モル/L）以下、好ましくは500 pM～1 pM（モル/L）以下、より好ましくは100 pM～1 pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50 pM～1 pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でhIL-6Rと結合するように、及び/又は1 nM～1 pM（モル/L）以下、好ましくは500 pM～1 pM（モル/L）以下、より好ましくは100 pM～1 pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50 pM～1 pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/又は

20

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の $k_{on}$ 速度でhIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の $k_{on}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/又は

30

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ）～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度でhIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ）～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと結合するように、

40

（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）或る親和性でIL-6Rと結合するものとする。

【0229】

本発明のアミノ酸配列とIL-6Rとの結合に関する幾つかの好ましい $IC_{50}$ 値が本明細書中のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

【0230】

関与する特定の疾患又は障害に応じて、任意の好適な*in vitro*アッセイ、細胞ベースのアッセイ、*in vivo*アッセイ及び/又はそれ自体が既知の動物モデル、又はそれらの任意の組合せを使用して、本発明のアミノ酸配列及びナノボディ、並びにこれ

50

を含む組成物の効力及び/又は有効性を試験することができる。好適なアッセイ及び動物モデルは当業者にとって明らかであり、例えばIL-6依存性細胞株(TF-1、XG1及び7TD1を含む)を使用する増殖アッセイ及びコラーゲン誘導関節炎モデル、SCIDマウスにおける滑膜組織の移植モデル、様々なヒトのがん(リンパ腫、骨髄腫、前立腺がん及び腎細胞癌を含む)の異種移植モデル、IBDモデル(TNBSを含む)、霊長類モデル(例えばShinkura et al., 1998, Anticancer Research 18: 1217-1222に記載のような)、関節炎疾患の非ヒト霊長類モデル(例えばVierboom et al., 2008, Drug Discov. Today: Dis Model doi:10.1016/j.ddmod. 2008.06.003に記載のような)、並びに以下の実験部及び本明細書で言及される従来技術で使用されるアッセイ及び動物モデル(Peake et al., 2006 Rheumatology 45:1485-9, Wahidet al., 2000, Clin Exp. Immunol., 122: 133-142, Matsuno et al., 1998, Arthritis and rheumatism 41: 2014-2021、特許文献7)が挙げられる。

#### 【0231】

例えばKitamura et al. (1989, J. Cell Physiol. 140:323)に記載のようなTF-1アッセイにおいて、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは、10 nM ~ 50 pM、好ましくは5 nM ~ 50 pM、より好ましくは1 nM ~ 50 pM以下、例えば約750 pM又は500 pM以下のIC50値(100 IU/mLのIL-6で)を有し得る。このTF-1アッセイでは、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは、50 nM ~ 1 nM、好ましくは25 nM ~ 1 nM、より好ましくは10 nM ~ 1 nM以下、例えば約8 nM以下のIC50値(5000 IU/mLのIL-6で)を有し得る。このTF-1アッセイでは、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは配列番号1及び配列番号2に規定のような参照IgG又は配列番号3及び配列番号4に規定のような参照Fabに関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る(実施例1を参照されたい)。このTF-1アッセイでは、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディはトシリズマブ(MRA)に関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る。

#### 【0232】

IL-6のEC50値での血漿効力アッセイでは(例えば実施例45に記載のような27.29 ng/mLのIL-6の存在下で)、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは500 pM ~ 50 pM、好ましくは250 pM ~ 50 pM、より好ましくは200 pM ~ 50 pM以下、例えば150 pM以下のIC50値を有し得る。IL-6のEC95値での血漿効力アッセイでは(例えば実施例45に記載のような885 ng/mLのIL-6の存在下で)、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは1000 pM ~ 100 pM、好ましくは750 pM ~ 100 pM、より好ましくは500 pM ~ 100 pM以下、例えば400 pM以下のIC50値を有し得る。この血漿効力アッセイでは、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは配列番号1及び配列番号2に規定のような参照IgG又は配列番号3及び配列番号4に規定のような参照Fabに関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る(実施例1を参照されたい)。この血漿効力アッセイでは、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディはトシリズマブ(MRA)に関して得られたIC50値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好なIC50値を有し得る。

#### 【0233】

CHO細胞上での膜IL-6Rとの結合を規定するアッセイでは、本発明のアミノ酸配列又は本発明のナノボディは10 nM ~ 100 pM、好ましくは5 nM ~ 100 pM、よ

10

20

30

40

50

り好ましくは  $2 \text{ nM} \sim 10 \text{ pM}$  以下、例えば  $2 \text{ nM}$  以下の  $\text{IC}_{50}$  値を有し得る。

【0234】

本明細書における開示から同様に明らかなように、本明細書で規定されるような本発明のアミノ酸配列又はナノボディの部分又は断片、又は2つ以上の部分又は断片の組合せ、特に配列番号60～配列番号69のアミノ酸配列の部分又は断片の使用もまた本発明の範囲内である。したがって、本発明の一実施形態によれば、「本発明のアミノ酸配列」又は「本発明のナノボディ」という用語は最も広い意味ではこのような部分又は断片も包含する。

【0235】

概して、本発明のアミノ酸配列又はナノボディ（その類似体を含む）のこのような部分又は断片は、対応する本発明の全長アミノ酸配列又はナノボディのアミノ酸配列と比較して、N末端の1つ又は複数のアミノ酸残基、C末端の1つ又は複数のアミノ酸残基、1つ又は複数の連続内部アミノ酸残基、又はその任意の組合せが欠失している、及び/又は除去されたアミノ酸配列を有する。

10

【0236】

部分又は断片は好ましくは、本明細書で規定されるような親和性（本明細書中でさらに記載されるように、（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は $k_{off}$  速度として、又は代替的には $\text{IC}_{50}$  値として適切に測定される、及び/又は表される）でIL-6受容体上で特定のエンベロープに結合することができるようなものである。

20

【0237】

特にアミノ酸配列、ナノボディ及び部分又は断片が好ましくは、  
 $1 \text{ nM} \sim 1 \text{ pM}$ （モル/L）以下、好ましくは $500 \text{ pM} \sim 1 \text{ pM}$ （モル/L）以下、より好ましくは $100 \text{ pM} \sim 1 \text{ pM}$ （モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約 $50 \text{ pM} \sim 1 \text{ pM}$ 以下の解離定数（ $K_D$ ）でhIL-6Rと結合するように、及び/又は  
 $1 \text{ nM} \sim 1 \text{ pM}$ （モル/L）以下、好ましくは $500 \text{ pM} \sim 1 \text{ pM}$ （モル/L）以下、より好ましくは $100 \text{ pM} \sim 1 \text{ pM}$ （モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約 $50 \text{ pM} \sim 1 \text{ pM}$ 以下の解離定数（ $K_D$ ）でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の $k_{on}$ 速度でhIL-6Rと結合するように、及び/又は

30

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の $k_{on}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ） $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度でhIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ） $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと結合するようなものであるのが好ましい。

40

【0238】

IL-6受容体に対する部分又は断片の親和性は、それ自体が既知の方法、例えば本明細書中で説明されるアッセイを用いて求めることができる。

【0239】

任意の部分又は断片は好ましくは、対応する本発明の全長アミノ酸配列又はナノボディのアミノ酸配列の少なくとも10個の連続アミノ酸残基、好ましくは少なくとも20個の連続アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも30個の連続アミノ酸残基、例えば少なく

50

とも40個の連続アミノ酸残基を含むものである。

【0240】

また、任意の部分又は断片は好ましくは、CDR1、CDR2及び/又はCDR3の少なくとも1つ又は少なくともその一部(特に少なくともCDR3又は少なくともその一部)を含むものである。より好ましくは、任意の部分又は断片は、好ましくは適切なフレームワーク配列(複数可)又は少なくともその一部により連結した、CDRの少なくとも1つ(好ましくは少なくともCDR3又はその一部)及び少なくとも1つの他のCDR(すなわち、CDR1又はCDR2)又は少なくともその一部を含むものである。より好ましくは、任意の部分又は断片は、好ましくは同様に適切なフレームワーク配列(複数可)又は少なくともその一部により連結した、CDRの少なくとも1つ(好ましくは少なくともCDR3又はその一部)及び残り2つのCDRの少なくとも一部を含むものである。

10

【0241】

別の特に好ましいが非限定的な実施形態によれば、このような部分又は断片は、対応する本発明の全長ナノボディの少なくともCDR3、例えばFR3、CDR3及びFR4を含む(すなわち、例えば国際出願の国際公開第03/050531号(Lasters et al.)に記載される)。

【0242】

上記で既に述べたように、2つ以上のこのような部分又は断片(すなわち、同一又は別個の本発明のアミノ酸配列又はナノボディに由来する)を組み合わせる、すなわち、本発明のアミノ酸配列又はナノボディのさらなる部分又は断片(本明細書で規定される)を提供することも可能である。例えば本発明のアミノ酸配列又はナノボディの1つ又は複数の部分又は断片を、ヒトV<sub>H</sub>ドメインの1つ又は複数の部分又は断片と組み合わせることもまた可能である。

20

【0243】

好適な一実施形態によれば、部分又は断片は、配列番号60~配列番号69のアミノ酸配列又はナノボディの1つと少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、例えば少なくとも90%、95%又は99%以上の程度の配列同一性を有する。

【0244】

部分及び断片、並びにそれをコードする核酸配列は、任意のそれ自体が既知の方法で準備して任意に組み合わせることができる。例えばこのような部分又は断片は、完全長の本発明のアミノ酸配列又はナノボディをコードする核酸中に終止コドンを挿入すること、及び次にこのようにして得られた核酸をそれ自体が既知の方法(例えば本明細書中で説明される)で発現させることで得ることができる。代替的には、このような部分又は断片をコードする核酸は、完全長の本発明のアミノ酸配列又はナノボディをコードする核酸を適切に制限すること、又はこのような核酸をそれ自体が既知の方法で合成することにより得ることができる。部分又は断片はまた、それ自体が既知のペプチド合成技法を用いて準備してもよい。

30

【0245】

本発明はさらに、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列若しくはナノボディ(又はその好適な断片)を含むか、又はこれから本質的になり、任意で1つ又は複数のリンカーを介して連結した、任意で1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位をさらに含む、化合物又は構築物に関する。好ましい態様では、上記の1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位はアミノ酸配列である。別の好ましい態様では、上記の1つ又は複数のリンカーは1つ又は複数のアミノ酸配列である。このような化合物又は構築物は「本発明のポリペプチド」とも称される。

40

【0246】

本発明のポリペプチドは、そのアミノ末端で、そのカルボキシ末端で、又はそのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方で、少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列と融合する、すなわち上記の本発明のアミノ酸配列又はナノボディと1つ又は複数のさらなるアミノ酸

50

配列とを含む融合タンパク質がもたらされるように本発明のアミノ酸配列又はナノボディを含み得る。

【0247】

1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、任意の好適及び/又は所望のアミノ酸配列であり得る。さらなるアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列又はナノボディの(生物学的)特性を変更するか、改質するか、若しくはさもなければこれに影響を与えても又は与えなくてもよく、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドにさらなる官能基を付加しても又は付加しなくてもよい。好ましくは、さらなるアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドに、1つ又は複数の所望の特性又は官能性を付与する。

10

【0248】

このようなアミノ酸配列の例は当業者にとって明らかであり、一般に、従来の抗体及びその断片に基づきペプチド融合に用いられる全てのアミノ酸配列を含み得る(S c F v及び単一ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない)。例えばHolliger and Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005)による総説を参照する。

【0249】

例えばこのようなアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列又はナノボディ自体に比べて、半減期、溶解性又は吸着を増大させる、免疫原性又は毒性を低減する、望ましくない副作用を排除又は減衰する、及び/又は他の有益な特性を本発明のポリペプチドに付与するか、及び/又は本発明のポリペプチドの望ましくない特性を低減するアミノ酸配列であり得る。このようなアミノ酸配列の幾つかの非限定的な例は、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン(例えば国際公開第00/27435号を参照されたい)又はハプテン分子(例えば循環抗体として認識されるハプテン(例えば国際公開第98/22141号を参照されたい))である。

20

【0250】

さらなるアミノ酸配列はまた、任意の所望のタンパク質、ポリペプチド、抗原、抗原決定基又はエピトープ(本発明のアミノ酸配列又はナノボディが指向性を有する同様のタンパク質、ポリペプチド、抗原、抗原決定基若しくはエピトープ、又は異なるタンパク質、ポリペプチド、抗原、抗原決定基若しくはエピトープが挙げられるが、これらに限定されない)のいずれかに指向性を有し得る第2の結合部位をもたらし得る。例えばさらなるアミノ酸配列は、血清タンパク質(例えばI g G等のヒト血清アルブミン又は別の血清タンパク質等)に指向性を有する第2の結合部位をもたらし得る。このようなアミノ酸配列は例えばナノボディ、並びに国際公開第91/01743号、国際公開第01/45746号及び国際公開第02/076489号に記載の小ペプチド及び結合タンパク質、並びに国際公開第03/002609号及び国際公開第04/003019号に記載のd A bを含む。Harmsen et al. (2005, Vaccine, 23 (41): 4926-42)、並びに欧州特許第0368684号、並びにAblynx N.V.の国際公開第08/028977号、国際公開第08/043821号、国際公開第08/043822号及び国際公開第08/068280号も参照する。

30

【0251】

本発明のアミノ酸配列又はナノボディに半減期の増大をもたらし得る好ましいアミノ酸配列は配列番号97~配列番号99から選択され得る。

40

【0252】

このようなアミノ酸配列は特に、血清アルブミン(より具体的にはヒト血清アルブミン)に及び/又はI g G(より具体的にはヒトI g G)に指向性を有し得る。例えばこのようなアミノ酸配列は、(ヒト)血清アルブミンに指向性を有するアミノ酸配列、及びFc R nへの血清アルブミンの結合に関与しない(ヒト)血清アルブミン上のアミノ酸残基に結合し得るアミノ酸配列(例えば国際公開第06/0122787号を参照されたい)、及び/又は血清アルブミンのドメインI I Iの一部を形成しない血清アルブミン上のアミノ酸残基に結合し得るアミノ酸配列(例えば同様に国際公開第06/0122787号を

50

参照されたい) ; 増大した半減期を有するか又は半減期を増大させ得るアミノ酸配列 (例えば国際公開第 08 / 028977 号を参照されたい) ; 哺乳動物の少なくとも 1 種に由来の血清アルブミンと、特に霊長類の少なくとも 1 種 (例えばこれらに限定されるものではないが、マカク属のサル (例えば特に、カニクイザル (マカク・ファシクラリス) 及び / 又はアカゲザル (マカク・ムラット) ) 及びヒヒ (パピオ・ウルジヌス) と交差反応性であるヒト血清アルブミンに対するアミノ酸配列 (同様に国際公開第 08 / 028977 号を参照する) ; pH 非依存的に血清アルブミンに結合し得るアミノ酸配列 (例えば国際公開第 08 / 043821 号を参照されたい) 、及び / 又は条件付き結合剤 (conditional binders) であるアミノ酸配列 (例えば国際公開第 08 / 043822 号を参照されたい) であり得る。

10

## 【0253】

別の実施形態によれば、1 つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、従来の四本鎖抗体 (特にヒト抗体) 及び / 又は重鎖抗体の 1 つ又は複数の部分、断片、又はドメインを含み得る。例えば通常はあまり好ましくないが、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは、同様に任意でリンカー配列を介して、従来の (好ましくはヒト)  $V_H$  ドメイン若しくは  $V_L$  ドメインに、又は  $V_H$  ドメイン若しくは  $V_L$  ドメインの天然型類似体若しくは合成類似体 (Ward et al. によって説明されている dAb 等の他の (単一) ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない) に連結され得る。

## 【0254】

したがって本発明の化合物又は構築物では、上記の 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単一ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAb としての使用に好適なアミノ酸配列、又はナノボディからなる群から選択され得る。

20

## 【0255】

本発明の特定の一態様において、本発明のアミノ酸配列又はナノボディを少なくとも 1 つ含む本発明の化合物、構築物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディに比べて増大した半減期を有し得る。このような化合物、構築物及びポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は、本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかとなり、例えば半減期が増大するように (例えばペグ化によって) 化学修飾された本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを含む化合物、構築物及びポリペプチド ; 又は本発明のナノボディの半減期を増大させる少なくとも 1 つの部分 (特に少なくとも 1 つのアミノ酸配列) と連結する少なくとも 1 つの本発明のアミノ酸配列又はナノボディを含む本発明のポリペプチドであり得る。このような半減期が延長した部分又はアミノ酸配列を含む本発明の化合物、構築物又はポリペプチドの例は、本明細書中のさらなる開示に基づいて当業者にとって明らかとなり、例えばこれらに限定されないが、1 つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディが、1 つ又は複数の血清タンパク質若しくはその断片 (例えば血清アルブミン又はその好適な断片) 、又は血清タンパク質と結合することができる 1 つ又は複数の結合単位 (例えば血清アルブミン等の血清タンパク質、IgG 等の血清免疫グロブリン又はトランスフェリンと結合することができるナノボディ又は (単一) ドメイン抗体) と好適に連結するポリペプチド ; 本発明のアミノ酸配列又はナノボディが Fc 部分 (例えばヒト Fc) 又はその好適な部分若しくは断片と連結するポリペプチド ; 又は 1 つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディが、血清タンパク質と結合することができる 1 つ又は複数の小タンパク質又は小ペプチドと好適に連結するポリペプチドが含まれる (例えばこれに限定されないが、国際公開第 91 / 01743 号、国際公開第 01 / 45746 号、国際公開第 02 / 076489 号に記載のタンパク質及びペプチド) 。

30

40

## 【0256】

また、少なくとも 1 つのアミノ酸配列又はナノボディは、任意でリンカー配列を介して、1 つ又は複数の (好ましくはヒト)  $C_H1$  ドメイン、 $C_H2$  ドメイン及び / 又は  $C_H3$  ドメインと連結してもよい。例えば好適な  $C_H1$  ドメインと連結するアミノ酸配列又はナ

50

ノボディは、例えば従来のFab断片又はF(ab')<sub>2</sub>断片に類似するが、従来のV<sub>H</sub>ドメインの1つ、又は(F(ab')<sub>2</sub>断片の場合)両方を本発明のアミノ酸配列又はナノボディで置き換えた抗体断片/構造体を生成するように(好適な軽鎖と共に)使用することができる。また、2つのアミノ酸配列又はナノボディは、(任意でリンカーを介して)C<sub>H</sub>3ドメインと連結して*in vivo*で半減期が増大した構築物をもたらすことができる。

【0257】

本発明のポリペプチドの具体的な一態様によれば、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディは、1つ又は複数の定常ドメイン(例えばFc部分の一部として使用する/Fc部分を形成することができる2つ又は3つの定常ドメイン)と、Fc部分と、及び/又は1つ又は複数のエフェクター機能を本発明のポリペプチドに付与し及び/又は1つ又は複数のFc受容体に結合する能力を付与し得る1つ又は複数の抗体部分、断片又はドメインと(任意で好適なリンカー又はヒンジ領域を介して)連結し得る。例えばこの目的で、これらに限定されるものではないが、1つ又は複数のさらなるアミノ酸配列は、重鎖抗体(本明細書中に記載)及びより好ましくは従来のヒト四本鎖抗体に由来するような抗体の1つ又は複数のC<sub>H</sub>2ドメイン及び/又はC<sub>H</sub>3ドメインを含んでいてもよく、及び/又は例えばIgG(例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4)、IgE、又はIgA、IgD若しくはIgM等の別のヒトIgに由来するFc領域(の一部)を形成してもよい。例えば国際公開第94/04678号は、ラクダ科動物V<sub>H</sub>Hドメイン又はそのヒト化誘導体(すなわち、ナノボディ)を含む重鎖抗体を記載しており、ここでは、ラクダ科動物C<sub>H</sub>2ドメイン及び/又はC<sub>H</sub>3ドメインが、ヒトC<sub>H</sub>2ドメイン及びC<sub>H</sub>3ドメインで置き換えられている。それによりナノボディと(C<sub>H</sub>1ドメインは含まないが)ヒトのC<sub>H</sub>2ドメイン及びC<sub>H</sub>3ドメインとをそれぞれ含む2つの重鎖からなる免疫グロブリンがもたらされるが、その免疫グロブリンは、C<sub>H</sub>2ドメイン及びC<sub>H</sub>3ドメインによって付与されるエフェクター機能を有し、如何なる軽鎖の非存在下でも機能することができる。本発明のアミノ酸配列又はナノボディと好適に連結してエフェクター機能をもたらし得る他のアミノ酸配列は当業者にとって明らかであり、所望のエフェクター機能(複数可)に基づき選択され得る。例えば国際公開第04/058820号、国際公開第99/42077号、国際公開第02/056910号、及び国際公開第05/017148号、並びにHolliger and Hudsonの概説(同上)、並びに国際公開第09/068628号)を参照する。本発明のアミノ酸配列又はナノボディとFc部分との共役によっても、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディに比べて半減期の増大が生じ得る。用途によっては、如何なる生物学的に重要なエフェクター機能も含まない半減期の増大を与えるFc部分及び/又は定常ドメイン(すなわち、C<sub>H</sub>2ドメイン及び/又はC<sub>H</sub>3ドメイン)の使用も好適であるか、又は一層好ましい場合がある。1つ又は複数のアミノ酸配列又はナノボディと、*in vivo*で半減期が増大した1つ又は複数の定常ドメインとを含む他の好適な構築物は当業者にとって明らかであり、例えば任意でリンカー配列を介してC<sub>H</sub>3ドメインに連結する2つのアミノ酸配列又はナノボディを含み得る。一般に、半減期が増大した任意の融合タンパク質又は誘導体は好ましくは、50kDを超える分子量、すなわち腎臓吸収のカットオフ値を有する。

【0258】

別の具体的であるが、非限定的な一態様において、本発明のポリペプチドを形成するために、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列は、(すなわち従来の四本鎖抗体で自然発生する定常ドメインに比べて)二量体に自己会合する傾向が低減した(又は本質的にその傾向がない)天然、合成又は半合成の定常ドメイン(又はその類似体、変異体、突然変異体、部分又は断片)と(任意で好適なリンカー又はヒンジ領域を介して)連結し得る。このような単量体の(すなわち自己会合していない)Fc鎖変異体又はその断片は、当業者にとって明らかである。例えばHelm et al. (1996, J. Biol. Chem. 271: 7494)は、本発明のポリペプチド鎖で使用することができる単量体Fc鎖変異体を説明している。

【0259】

10

20

30

40

50

また、このような単量体Fc鎖変異体は、依然として（これらが誘導されるFc部分に応じて）補体又は関連のFc受容体（複数可）に結合することができるようなもの、及び/又は依然としてこれらが誘導されるFc部分のエフェクター機能を幾らか又は全て（又は依然として使用目的に適した低減レベルで）有するようなものであるのが好ましい。代替的に、このような本発明のポリペプチド鎖では、単量体Fc鎖を使用して、ポリペプチド鎖の半減期を増大させることができ、この場合、単量体Fc鎖はエフェクター機能を有しなくても、又は本質的に有しなくてもよい。

#### 【0260】

概して、半減期が増大した、本発明のアミノ酸配列又はナノボディ（又はこれを含む化合物、構築物若しくはポリペプチド）は、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディ自体の半減期よりも少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍（例えば少なくとも5倍）、例えば少なくとも10倍、又は20倍超大きい半減期を有するのが好ましい。例えば半減期が増大した、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物、構築物又はポリペプチドは、対応する本発明のアミノ酸配列又はナノボディ自体に比べて、1時間超、好ましくは2時間超、より好ましくは6時間超（例えば12時間超）、又はさらに24時間、48時間若しくは72時間超増大した血清半減期を有する。

10

#### 【0261】

好ましいが非限定的な態様において、このような本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物、構築物又はポリペプチドは、少なくとも約12時間、好ましくは少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間、さらにより好ましくは少なくとも72時間以上のヒトにおける血清半減期を示す。例えば本発明の化合物又はポリペプチドは、少なくとも5日（例えば約5日～10日）、好ましくは少なくとも9日（例えば約9日～14日）、より好ましくは少なくとも約10日（例えば約10日～15日）、若しくは少なくとも約11日（例えば約11日～16日）、より好ましくは少なくとも約12日（例えば約12日～18日以上）、又は14日超（例えば約14日～19日）の半減期を有し得る。

20

#### 【0262】

また、さらなるアミノ酸配列は、（例えば本発明のポリペプチドを発現するのに用いられる宿主細胞に応じて、本発明のポリペプチドのプレフォーム、プロフォーム又はプレプロフォームをもたらしように）合成の際に宿主細胞からの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの分泌を導くシグナル配列又はリーダー配列を形成し得る。

30

#### 【0263】

また、さらなるアミノ酸配列は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを、特定の器官、組織、細胞、又は細胞の一部若しくはコンパートメントに誘導し、及び/又はそれらに浸透させるか若しくは侵入させ、及び/又は本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを、細胞膜、上皮細胞の層等の細胞層、固形腫瘍等の腫瘍、又は血液脳関門のような生物学的障壁に浸透させるか若しくはそれらに対して横断させる配列又はシグナルを形成し得る。このようなアミノ酸配列の好適な例は当業者にとって明らかであり、例えばこれらに限定されないが、上記の「Peptrians」ペクター、Cardinale et al.によって記載される配列、並びに、例えば国際公開第94/02610号、国際公開第95/22618号、米国特許第7,004,940号、国際公開第03/014960号、国際公開第99/07414号；国際公開第05/01690号；欧州特許第1512696号；及びCattaneo A. and Biocca, S. (1997, Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag) 及びKontermann, (2004, Methods 34:163-170)、これらに記載のさらなる参照文献に記載されるような、いわゆる「細胞内抗体」として本発明のナノボディ及びポリペプチドを発現又は産生するのに使用することができる、それ自体が既知のアミノ酸配列及び抗体断片が挙げられる。

40

#### 【0264】

好ましいが非限定的な実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列又はナノボディは少なくとも、1つのさらなるアミノ酸配列又はナノボディを含み、これにより、少なくとも2つ、例えば2つ、3つ、4つ、5つ以上のアミノ酸配列又はナノボディを含む本発明のポ

50

リペプチドをもたらし、上記のアミノ酸配列又はナノボディは任意で、1つ又は複数のリンカー配列（本明細書中に規定）を介して連結され得る。少なくとも1つが本発明のアミノ酸配列又はナノボディである2つ以上のアミノ酸配列又はナノボディを含む本発明のポリペプチドは、本明細書中で本発明の「多価」ポリペプチドとも称され、このようなポリペプチド中に存在するアミノ酸配列又はナノボディは、本明細書中で「多価フォーマット」であるとも称される。例えば本発明の「二価」ポリペプチドは、任意でリンカー配列を介して連結される2つのアミノ酸配列及び/又はナノボディを含み、本発明の「三価」ポリペプチドは、任意で2つのリンカー配列を介して連結される3つのアミノ酸配列及び/又はナノボディを含む。ポリペプチド中に存在するアミノ酸配列及び/又はナノボディの少なくとも1つ、最大でポリペプチド中に存在する全てのアミノ酸配列及び/又はナノボディが、本発明のアミノ酸配列及び/又はナノボディである。

10

## 【0265】

本発明の多価ポリペプチドでは、2つ以上のアミノ酸配列又はナノボディは、同じであっても異なってもよく、同じ抗原又は抗原決定基（例えば同じ部分（複数可）若しくはエピトープ（複数可）、又は異なる部分若しくはエピトープ）に指向性を有するものであってもよく、又は代替的に異なる抗原若しくは抗原決定基又はそれらの任意の好適な組合せに指向性を有するものであってもよい。例えば本発明の二価ポリペプチドは、(a) 2つの同一のアミノ酸配列若しくはナノボディ、(b) タンパク質若しくは抗原の第1の抗原決定基に指向性を有する第1のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び第1のアミノ酸配列若しくはナノボディと異なる上記タンパク質若しくは抗原の同一抗原決定基に指向性を有する第2のアミノ酸配列若しくはナノボディ、(c) タンパク質若しくは抗原の第1の抗原決定基に指向性を有する第1のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び上記タンパク質若しくは抗原の別の抗原決定基に指向性を有する第2のアミノ酸配列若しくはナノボディ、又は(d) 第1のタンパク質若しくは抗原に指向性を有する第1のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び第2のタンパク質若しくは抗原（すなわち、上記第1の抗原と異なる）に指向性を有する第2のアミノ酸配列若しくはナノボディを含み得る。同様に、本発明の三価ポリペプチドは例えばこれらに限定されるものではないが、(a) 3つの同一のアミノ酸配列若しくはナノボディ、(b) 抗原の第1の抗原決定基に対する2つの同一のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び同一抗原の異なる抗原決定基に指向性を有する第3のアミノ酸配列若しくはナノボディ、(c) 抗原の第1の抗原決定基に対する2つの同一のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び上記第1の抗原と異なる第2の抗原に指向性を有する第3のアミノ酸配列若しくはナノボディ、(d) 第1の抗原の第1の抗原決定基に指向性を有する第1のアミノ酸配列若しくはナノボディ、上記第1の抗原の第2の抗原決定基に指向性を有する第2のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び上記第1の抗原と異なる第2の抗原に指向性を有する第3のアミノ酸配列若しくはナノボディ、又は(e) 第1の抗原に指向性を有する第1のアミノ酸配列若しくはナノボディ、上記第1の抗原と異なる第2の抗原に指向性を有する第2のアミノ酸配列若しくはナノボディ、及び上記第1の抗原及び上記第2の抗原と異なる第3の抗原に指向性を有する第3のアミノ酸配列若しくはナノボディを含み得る。

20

30

## 【0266】

少なくとも1つのアミノ酸配列又はナノボディが第1の抗原に指向性を有する（すなわち、IL-6受容体に対する）ものであり、少なくとも1つのアミノ酸配列又はナノボディが第2の抗原（すなわち、IL-6受容体と異なる抗原）に指向性を有するものである、少なくとも2つのアミノ酸配列及び/又はナノボディを含有する本発明のポリペプチドは、本発明の「多重特異性」ポリペプチドとも称され、このようなポリペプチド中に存在するアミノ酸配列又はナノボディは、本明細書中で「多重特異性フォーマット」であるとも称される。このため例えば本発明の「二重特異性」ポリペプチドは、第1の抗原（すなわちIL-6受容体）に指向性を有する少なくとも1つのアミノ酸配列又はナノボディ及び第2の抗原（すなわち、IL-6受容体と異なる）に指向性を有する少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列又はナノボディを含むポリペプチドであり、本発明の「三重特異性

40

50

」ポリペプチドは、第1の抗原（すなわち、IL-6受容体）に指向性を有する少なくとも1つのアミノ酸配列又はナノボディ、第2の抗原（すなわち、IL-6受容体と異なる抗原）に指向性を有する少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列又はナノボディ、及び第3の抗原（すなわち、IL-6受容体及び第2の抗原の両方と異なる）に指向性を有する少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列又はナノボディを含むポリペプチドである。

【0267】

したがって、その最も単純な形態において、本発明の二重特異性ポリペプチドは、IL-6受容体に指向性を有する第1のアミノ酸配列又はナノボディと、第2の抗原に指向性を有する第2のアミノ酸配列又はナノボディとを含み、上記の第1及び第2のアミノ酸配列又はナノボディが任意でリンカー配列（本明細書中に規定）を介して連結され得る本発明の二価ポリペプチド（本明細書中に規定）であるのに対し、その最も単純な形態の本発明の三重特異性ポリペプチドは、IL-6受容体に指向性を有する第1のアミノ酸配列又はナノボディと、第2の抗原に指向性を有する第2のアミノ酸配列又はナノボディと、第3の抗原に指向性を有する第3のアミノ酸配列又はナノボディとを含み、上記の第1、第2及び第3のアミノ酸配列又はナノボディが、任意で1つ又は複数、特に1つ及び複数、特に2つのリンカー配列を介して連結され得る本発明の三価ポリペプチド（本明細書中に規定）である。

10

【0268】

特定の態様において、本発明のポリペプチドは三価の二重特異性ポリペプチドである。その最も単純な形態の本発明の三価の二重特異性ポリペプチドは、IL-6受容体に対する2つの同一のアミノ酸配列又はナノボディと、別の抗原に指向性を有する第3のアミノ酸配列又はナノボディとを含み、上記の第1、第2及び第3のアミノ酸配列又はナノボディが、任意で1つ又は複数、特に1つ及び複数、特に2つのリンカー配列を介して連結され得る本発明の三価ポリペプチド（本明細書中に規定）であり得る。

20

【0269】

別の特定の態様において、本発明のポリペプチドは二重特異性ポリペプチドである。その最も単純な形態の本発明の二重特異性ポリペプチドは、IL-6受容体に対する第1のアミノ酸配列又はナノボディと、別の抗原に指向性を有する第2のアミノ酸配列又はナノボディとを含み、上記の第1及び第2のアミノ酸配列又はナノボディが任意で、リンカー配列を介して連結され得る本発明の二価ポリペプチド（本明細書中に規定）であり得る。

30

【0270】

好ましいが非限定的な一例において、本発明の多重特異性ポリペプチドは、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列又はナノボディと、半減期の増大をもたらす少なくとも1つのナノボディとを含む。このようなナノボディの好ましいが非限定的な幾つかの例としては、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、チロキシン結合タンパク質、（ヒト）トランスフェリン、フィブリノゲン、IgG、IgE若しくはIgM等の免疫グロブリン、又は国際公開第04/003019号に列挙された他の血清タンパク質の1つに指向性を有するナノボディが挙げられる。

【0271】

例えばマウスにおける実験のためには、マウス血清アルブミン（MSA）に対するナノボディを用いることができ、医薬用途のためには、ヒト血清アルブミンに対するナノボディを用いることができる。

40

【0272】

本発明の別の実施形態は、上記少なくとも1つの（ヒト）血清タンパク質が、（ヒト）血清アルブミン、（ヒト）血清免疫グロブリン、（ヒト）チロキシン結合タンパク質、（ヒト）トランスフェリン、（ヒト）フィブリノゲン等のいずれかである、上記のポリペプチド構築物である。

【0273】

したがって特定の態様において、本発明のポリペプチドは、IL-6受容体に対する2つの同一のアミノ酸配列又はナノボディと、（ヒト）血清アルブミンに指向性を有する第

50

3のアミノ酸配列又はナノボディとを含み、上記の第1、第2及び第3のアミノ酸配列又はナノボディが、任意で1つ又は複数、特に1つ及び複数、特に2つのリンカー配列を介して連結され得る三価の二重特異性ポリペプチドである。

【0274】

別の特定の態様において、本発明のポリペプチドは、IL-6受容体に対する第1のアミノ酸配列又はナノボディと、(ヒト)血清アルブミンに指向性を有する第2のアミノ酸配列又はナノボディとを含み、上記の第1及び第2のアミノ酸配列又はナノボディが任意で、リンカー配列を介して連結され得る二重特異性ポリペプチドである。

【0275】

具体的であるが非限定的な本発明の態様によれば、本発明のポリペプチドは、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列又はナノボディ以外に、少なくとも1つのヒト血清アルブミンに対するナノボディを含有する。ヒト血清アルブミンに対するこれらのナノボディは、上記で引用したAblynx N. V.による出願(例えば国際公開第04/062551号を参照されたい)に包括的に記載されているものであってもよいが、特に好ましいが非限定的な実施形態によれば、ヒト血清アルブミンに対する上記ナノボディは、配列番号97~配列番号99から選択されるアミノ酸配列から本質的になる。

【0276】

IL-6Rに対する少なくとも1つのアミノ酸配列又はナノボディと、半減期の増大をもたらす少なくとも1つのアミノ酸配列又はナノボディとを含む、本発明のポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は以下の通りである：

a) 配列番号70~配列番号72、

b) 本発明のそのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号70~配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、本発明のそのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号70~配列番号72のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列、並びに

c) 配列番号70~配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、配列番号70~配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号70~配列番号72のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列。

【0277】

本発明の三価の二重特異性ポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は以下の通りである：

a) 配列番号71~配列番号72、

b) 本発明のそのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号71~配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、本発明のそのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号71~配列番号72のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列、並びに

c) 配列番号71~配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、配列番号71~配列番号72のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号71~配列番号72のうちの1つによる結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL

10

20

30

40

50

- 6 R と結合するものとする、ポリペプチド配列。

【 0 2 7 8 】

I L - 6 R に対するアミノ酸配列又はナノボディと、半減期の増大をもたらすアミノ酸配列又はナノボディを含む、本発明の二重特異性ポリペプチドの幾つかの好ましいが非限定的な例は以下の通りである：

a ) 配列番号 7 0 、

b ) 本発明のその C D R の 1 つ、 2 つ又は全てにおいて配列番号 7 0 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、本発明のその C D R の 1 つ、 2 つ又は全てにおいてわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号 7 0 による結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ポリペプチド配列、並びに

c ) 配列番号 7 0 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、配列番号 7 0 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号 7 0 による結合と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ポリペプチド配列。

【 0 2 7 9 】

2 つのアミノ酸残基ストレッチ（又は 2 つの C D R 配列）を比較する場合、「本発明のその C D R の 1 つ、 2 つ又は全てにおけるアミノ酸差異」という用語は、 a ) に指定する本発明のポリペプチドに含まれる本発明のアミノ酸残基ストレッチ（又は C D R 配列）と比較した、 b ) に指定する本発明のポリペプチドに含まれる本発明のアミノ酸残基ストレッチ（又は C D R 配列）の或る位置上での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表す。 2 つの本発明のアミノ酸残基ストレッチ（又は C D R 配列）は 1 つ又は最大で 2 つのこのようなアミノ酸差異を含有することができることが理解される。

【 0 2 8 0 】

「本発明のその C D R の 1 つ、 2 つ又は全てにおけるアミノ酸差異」とは、本発明のポリペプチドに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディが a ) のポリペプチドのうちの 1 つ（すなわち配列番号 6 0 ~ 配列番号 6 9 のうちの 1 つ）に含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおける C D R 1、 C D R 2 及び / 又は C D R 3 と比較してその C D R 1 において（すなわち I L - 6 R 上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成する C D R 1 において）わずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異及び / 又はその C D R 2 において（すなわち I L - 6 R 上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成する C D R 2 において）わずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異及び / 又はその C D R 3 において（すなわち I L - 6 R 上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成する C D R 3 において）わずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異；例えば a ) のポリペプチドのうちの 1 つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおける C D R 1（すなわち配列番号 6 0 ~ 配列番号 6 9 のうちの 1 つにおける C D R 1）と比較してその C D R 1（すなわち I L - 6 R 上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成する C D R 1）においてわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異；又は a ) のポリペプチドのうちの 1 つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおける C D R 2（すなわち配列番号 6 0 ~ 配列番号 6 9 のうちの 1 つにおける C D R 2）と比較してその C D R 2（すなわち I L - 6 R 上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成する C D R 2）においてわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異；又は a ) のポリペプチドのうちの 1 つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおける C D R 3（すなわち配列番号 6 0 ~ 配列番号 6 9 のうちの 1 つにおける C D R 3）と比較してその C D R 3（すなわち I L - 6 R 上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペ

チドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR3)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異；又はa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR1(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR1)と比較してそのCDR1(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR1)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR2(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR2)と比較してそのCDR2(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR2)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異；又はa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR1(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR1)と比較してそのCDR1(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR1)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR3(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR3)と比較してそのCDR3(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR3)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異；又はa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR2(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR2)と比較してそのCDR2(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR2)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR3(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR3)と比較してそのCDR3(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR3)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異；又はa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR1(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR1)と比較してそのCDR1(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR1)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR2(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR2)と比較してそのCDR2(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR2)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異、及びa)のポリペプチドのうちの1つに含まれる本発明のアミノ酸配列又はナノボディにおけるCDR3(すなわち配列番号60~配列番号69のうちの1つにおけるCDR3)と比較してそのCDR3(すなわちIL-6R上での特異的エピトープへの本発明の化合物又はポリペプチドによる結合に関する抗原結合部位を形成するCDR3)においてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有し得ることを意味する。

【0281】

「そのCDRの1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸差異」は、本発明の化合物若しくはポリペプチドの特性を改善させるか、又は本発明の化合物若しくはポリペプチドの所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、1つ又は複数の本発明のCDRにおける任意の1つ又は最大で任意の2つの置換、欠失若しくは挿入、又はそれらの任意の組合せであり得る。これに関して、得られる本発明の化合物又はポリペプチドは少なくとも、1つ又は最大で2つの置換、欠失又は挿入を有しない1つ

10

20

30

40

50

又は複数の本発明のCDRを含む化合物又はポリペプチドと比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られる化合物又はポリペプチドは、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でIL-6受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られる化合物又はポリペプチドは本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するの好ましい。

#### 【0282】

本発明の一態様において、「そのCDRの1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸差異」はアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、本発明の化合物若しくはポリペプチドの特性を改善させるか、又は本発明の化合物若しくは構築物の所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、1つ又は複数の本発明のCDRにおける任意の1つ又は最大で任意の2つの置換であり得る。これに関して、得られる本発明の化合物又はポリペプチドは少なくとも、1つ又は最大で2つの置換を有しない本発明のCDRを1つ又は複数含む化合物又は構築物と比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られる化合物又はポリペプチドは、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でIL-6受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られる化合物又はポリペプチドは本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するの好ましい。当業者は概して、本明細書中の開示に基づき、任意で例えば限られた数の可能な置換を導入すること、及びこのようにして得られた化合物又はポリペプチドの特性に対する影響を求め、それを伴い得る限られた程度の日常実験後に好適な置換を求め、それを選択することができるであろう。

#### 【0283】

本発明のCDRのうちの1つ又は複数におけるアミノ酸置換は、（本明細書に規定のように）「保存的置換」等の任意の可能な置換であっても、（本明細書に規定のように）或る特定の規則により働いても、及び/又は得られる化合物又はポリペプチド（本明細書でさらに規定のようなもの）に対する特性の改善を誘導してもよい。

#### 【0284】

本発明は、配列番号70～配列番号72（の完全配列）のうちの1つとのわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する化合物又はポリペプチドにも関する。

#### 【0285】

2つの化合物又はポリペプチドを比較するとき、「アミノ酸差異」という用語は、第2の化合物又はポリペプチドに比べて第1の化合物又はポリペプチドの或る位置上での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を表す。2つの化合物又はポリペプチドは、1つ又は最大で2つのこのようなアミノ酸差異を含有し得ることが理解される。

#### 【0286】

「アミノ酸差異」は、本発明の化合物又はポリペプチドの特性を改善させるか、又は本発明の化合物若しくはポリペプチドの所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損なわない、化合物又はポリペプチドにおける、すなわち1つ又は複数のフレームワーク領域における、又は1つ又は複数のCDR（本発明の（すなわち本発明のアミノ酸配列又はナノボディに存在する）CDRであっても、又は別の（すなわち配列番号98に存在する）CDRであってもよい）における、リンカー配列、又はそれらの任意の組合せにおける任意の1つ又は最大で2つの置換、欠失若しくは挿入であり得る。これに関して、得られる本発明の化合物又はポリペプチドは少なくとも、1つ又は最

10

20

30

40

50

大で2つの置換、欠失又は挿入を有しない化合物又はポリペプチドと比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られる化合物又はポリペプチドは、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でIL-6受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られる化合物又はポリペプチドは本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するものも好ましい。

【0287】

本発明の一態様において、「アミノ酸差異」はアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、本発明の化合物又はポリペプチドの特性を改善させるか、又は本発明の化合物又はポリペプチドの所望の特性を又は所望の特性のバランス若しくは組合せを少なくとも過度に損わない、フレームワーク領域における、又は1つ又は複数のCDR（本発明の（すなわち本発明のアミノ酸配列又はナノボディに存在する）CDRであっても、又は別の（すなわち配列番号98に存在する）CDRであってもよい）における、リンカー配列、又はそれらの任意の組合せにおける任意の1つ又は最大で任意の2つの置換であり得る。これに関して、得られる本発明の化合物又はポリペプチドは少なくとも、1つ又は最大で2つの置換を有しない化合物又はポリペプチドと比較して同じ、ほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする。得られる化合物又はポリペプチドは、本明細書に規定のようなものである（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）親和性でIL-6受容体上で特異的エピトープと結合することができるようなものが好ましい。得られる化合物又はポリペプチドは本明細書で規定のように細胞ベースの効力及び血漿効力を有するものも好ましい。

【0288】

上記のように、置換、挿入又は欠失は1つ又は複数のフレームワーク領域に、1つ又は複数のCDRに、及び/又は1つ又は複数のリンカー配列にあり得る。CDRにおける置換、挿入又は欠失は、（本明細書で規定のように）「保存的置換」等の任意の可能な置換、挿入又は欠失であっても、（本明細書に規定のように）或る特定の規則により働いても、及び/又は得られる化合物又はポリペプチドに対する特性の改善を誘導してもよい。

【0289】

このような置換、挿入又は欠失が1つ又は複数のフレームワーク領域で行われる場合、任意の可能な置換、挿入又は欠失であってもよい。このような置換、挿入又は欠失は、（例えば特許文献7、表A-3～表A-8に規定のような）1つ又は複数の特徴的な残基及び/又はフレームワーク残基における1つ又は複数の他の位置で行われてもよいが、（これらが本明細書に記載のような好適なヒト化置換ではない限り）特徴的な残基での置換、挿入又は欠失は概してあまり好ましくない。非限定的な例により、置換は（本明細書に記載のような）保存的置換であってもよく、及び/又はアミノ酸残基を別の $V_{HH}$ ドメインにおける同じ位置で自然発生する別のアミノ酸残基に置き換えてもよいが（特許文献7、表A-5～表A-8を参照されたい）、本発明は概してそれらに限定されない。

【0290】

（好ましくは）1つ又は複数のフレームワーク領域において行われる置換、挿入又は欠失は、例えばヒト化置換等の配列を最適化する置換であり得る。幾つかの好ましいが、非限定的なヒト化置換（及びそれらの好適な組合せ）は本明細書中での開示に基づき当業者にとって明らかになるであろう。a)に規定の本発明のポリペプチドのうちの1つに含まれるアミノ酸配列又はナノボディのうちの1つのフレームワーク領域の配列を1つ又は複数の密接に関連したヒト $V_H$ 配列の対応するフレームワーク配列と比較することにより、潜在的に有用なヒト化置換を確認し、その後1つ又は複数のこのようにして求められた潜

10

20

30

40

50

在的に有用なヒト化置換（又はそれらの組合せ）を（本明細書でさらに記載のようにそれ自体が既知の任意の方法で）a）に規定の本発明のポリペプチドのうちの1つに含まれる上記のアミノ酸配列又はナノボディに導入することができ、IL-6Rに対する親和性、安定性、発現のし易さ及びレベル、及び/又は本明細書に規定の他の所望の特性に関して、得られたヒト化ポリペプチドを試験することができる。このようにして、当業者は本明細書中の開示に基づき限定的な試行錯誤によって、他の好適なヒト化置換（又はその好適な組合せ）を求めることができる。

【0291】

本発明の化合物又はポリペプチドを発現するのに使用される宿主生物に応じて、当業者の能力の範囲内で、欠失及び/又は置換を、翻訳後修飾に関する1つ又は複数の部位（例えば1つ又は複数のグリコシル化部位）を除去するように設計してもよい。代替的には、置換又は挿入を官能基（本明細書中で説明される）が結合する1つ又は複数の部位を導入する、例えば部位特異的ペグ化（同様に本明細書中で説明される）を可能にするように設計してもよい。

10

【0292】

特許文献7の表A-5～表A-8に示す $V_{HH}$ エントロピー及び $V_{HH}$ 変動性に関するデータから明らかのように、フレームワーク領域内の幾つかのアミノ酸残基は他よりも強く保存されている。一般に、任意の置換、欠失又は挿入は好ましくは保存されにくい位置で起こるが、本発明は最も広い意味ではこれに限定されない。また、一般に、アミノ酸置換はアミノ酸欠失又はアミノ酸挿入よりも好適である。

20

【0293】

好ましくは得られる本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは、好ましくは1 nM～1 pM（モル/L）以下、好ましくは500 pM～1 pM（モル/L）以下、より好ましくは100 pM～1 pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50 pM～1 pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でhIL-6Rと結合するように、及び/又は1 nM～1 pM（モル/L）以下、好ましくは500 pM～1 pM（モル/L）以下、より好ましくは100 pM～1 pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50 pM～1 pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ～約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ～ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の $k_{on}$ 速度でhIL-6Rと結合するように、及び/又は

30

$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ～約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ～ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上の $k_{on}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ）～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度でhIL-6Rと結合するように、及び/又は

$10^{-3} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ）～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ （ $t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合）、好ましくは $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ～ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の $k_{off}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと結合するように、

40

（さらに本明細書に記載されるような（実際又は見掛けの） $K_D$ 値、（実際又は見掛けの） $K_A$ 値、 $k_{on}$ 速度及び/又は $k_{off}$ 速度、又は代替的に $IC_{50}$ 値として好適に測定される、及び/又は表される）或る親和性でIL-6Rと結合するものとする。

【0294】

本発明の化合物又はポリペプチドとIL-6Rとの結合に関する幾つかの好ましい $IC_{50}$ 値が本明細書中のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

【0295】

50

関与する特定の疾患又は障害に応じて、任意の好適な *in vitro* アッセイ、細胞ベースのアッセイ、*in vivo* アッセイ及び/又はそれ自体が既知の動物モデル、又はそれらの任意の組合せを使用して、本発明のポリペプチド及び化合物、並びにこれを含む組成物の効力及び/又は有効性を試験することができる。好適なアッセイ及び動物モデルは当業者にとって明らかであり、例えば IL-6 依存性細胞株 (TF-1、XG1 及び 7TD1 を含む) を使用する増殖アッセイ及びコラーゲン誘導関節炎モデル、SCID マウスにおける滑膜組織の移植モデル、様々なヒトのがん (リンパ腫、骨髄腫、前立腺がん及び腎細胞癌を含む) の異種移植モデル、IBD モデル (TNBS を含む)、霊長類モデル (例えば Shinkura et al., 1998, Anticancer Research 18: 1217-1222 に記載のような)、関節炎疾患の非ヒト霊長類モデル (例えば Vierboom et al., 2008, Drug Discov. Today: Dis Model doi:10.1016/j.ddmod. 2008.06.003 に記載のような)、並びに以下の実験部及び本明細書で言及される従来技術で使用されるアッセイ及び動物モデル (Peake et al., 2006 Rheumatology 45: 1485-9, Wahidet al., 2000, Clin. Exp. Immunol., 122: 133-142, Matsuno et al., 1998, Arthritis and rheumatism 41: 2014-2021、特許文献 7) が挙げられる。

#### 【0296】

例えば Kitamura et al. (1989, J. Cell Physiol. 140:323) に記載のような TF-1 アッセイにおいて、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは、10 nM ~ 50 pM、好ましくは 5 nM ~ 50 pM、より好ましくは 1 nM ~ 50 pM 以下、例えば約 750 pM 又は 500 pM 以下の IC50 値 (100 IU/mL の IL-6 で) を有し得る。この TF-1 アッセイでは、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは、50 nM ~ 1 nM、好ましくは 25 nM ~ 1 nM、より好ましくは 10 nM ~ 1 nM 以下、例えば約 8 nM 以下の IC50 値 (5000 IU/mL の IL-6 で) を有し得る。この TF-1 アッセイでは、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは配列番号 1 及び配列番号 2 に規定のような参照 IgG 又は配列番号 3 及び配列番号 4 に規定のような参照 Fab に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有し得る (実施例 1 を参照されたい)。この TF-1 アッセイでは、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドはトシリズマブ (MRA) に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有し得る。

#### 【0297】

IL-6 の EC50 値での血漿効力アッセイでは (例えば実施例 45 に記載のような 27.29 ng/mL の IL-6 の存在下で)、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは 500 pM ~ 50 pM、好ましくは 250 pM ~ 50 pM、より好ましくは 200 pM ~ 50 pM 以下、例えば 150 pM 以下の IC50 値を有し得る。IL-6 の EC95 値での血漿効力アッセイでは (例えば実施例 45 に記載のような 885 ng/mL の IL-6 の存在下で)、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは 1000 pM ~ 100 pM、好ましくは 750 pM ~ 100 pM、より好ましくは 500 pM ~ 100 pM 以下、例えば 400 pM 以下の IC50 値を有し得る。この血漿効力アッセイでは、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは配列番号 1 及び配列番号 2 に規定のような参照 IgG 又は配列番号 3 及び配列番号 4 に規定のような参照 Fab に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有し得る (実施例 1 を参照されたい)。この血漿効力アッセイでは、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドはトシリズマブ (MRA) に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有し得る。

#### 【0298】

CHO細胞上での膜IL-6Rとの結合を規定するアッセイでは、本発明の化合物又は本発明のポリペプチドは10nM~100pM、好ましくは5nM~100pM、より好ましくは2nM~10pM以下、例えば2nM以下のIC50値を有し得る。

【0299】

好ましい態様において、本発明の化合物又はポリペプチドは配列番号70のアミノ酸配列を有するか、又はこれから本質的になる。別の好ましい態様では、本発明の化合物又はポリペプチドは配列番号71のアミノ酸配列を有するか、又はこれから本質的になる。これらのアミノ酸配列を有するポリペプチドは、IL-6/IL-6R相互作用を一部又は完全に遮断する、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体を介したシグナル伝達を阻害する能力に加えて、例えば結合及び/又は親和性の改善、結合活性の改善、有効性及び効力の改善、及び/又は選択性の増大のような特性の改善を示す。

10

【0300】

本発明は1つの本発明のアミノ酸配列又はナノボディを含むか、又はこれから本質的になる一価構築物(「本発明の一価構築物」とも称される)にも関する。本発明の好ましい一価構築物は配列番号60~配列番号69、例えば配列番号65~配列番号69、例えば配列番号66等を含むか、又はこれから本質的になる。このような一価構築物、並びに本発明のアミノ酸配列及びナノボディを、例えば本発明の多価及び/又は多重特異性の化合物又はポリペプチドのような本発明の化合物又はポリペプチドを調製するのに使用することができる。

20

【0301】

したがって本発明は、本発明の化合物、構築物又はポリペプチドを調製するための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物の使用にも関する。本発明はさらに、本発明の化合物、構築物又はポリペプチドを調製する方法であって、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物と1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位とを連結することを含む、方法に関する。このような方法は1つ又は複数のリンカーを介して本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物と1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位とを連結することを含み得る。

【0302】

好ましい態様において、1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位は、結合単位、例えばアミノ酸配列又はナノボディである。したがって本発明は、本発明の多価及び/又は多重特異性の化合物、構築物又はポリペプチドの調製のための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物の使用にも関する。本発明はさらに、本発明の多価及び/又は多重特異性の化合物、構築物又はポリペプチドを調製する方法であって、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物と1つ又は複数の他の結合単位、例えばアミノ酸配列又はナノボディとを連結することを含む、方法に関する。このような方法は1つ又は複数のリンカーを介して本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又は一価構築物と1つ又は複数の結合単位とを連結することを含み得る。

30

【0303】

特定の態様において、本発明は、本発明の多価及び/又は多重特異性の化合物、構築物又はポリペプチドを調製するための配列番号60~配列番号69(好ましくは配列番号65~配列番号69、より好ましくは配列番号66)のうちの1つを含むか、又はこれから本質的になる一価構築物の使用にも関する。本発明はさらに、本発明の多価及び/又は多重特異性の化合物、構築物又はポリペプチドを調製する方法であって、配列番号60~配列番号69(好ましくは配列番号65~配列番号69、より好ましくは配列番号66)のうちの1つを含むか、又はこれから本質的になる一価構築物と1つ又は複数の他の結合単位とを1つ又は複数のリンカーを介して連結することを含み得る

40

50

## 【0304】

別の特定の態様において、本発明は、配列番号70～配列番号72（好ましくは配列番号70～配列番号71、より好ましくは配列番号70又は配列番号71）を含むか、又はこれから本質的になる多価及び／又は多重特異性の化合物、構築物又はポリペプチドを調製するための配列番号60～配列番号69（好ましくは配列番号65～配列番号69、より好ましくは配列番号66）のうちの1つを含むか、又はこれから本質的になる一価構築物の使用に関する。本発明はさらに、配列番号70～配列番号72（好ましくは配列番号70～配列番号71、より好ましくは配列番号70又は配列番号71）を含むか、又はこれから本質的になる多価及び／又は多重特異性の化合物、構築物又はポリペプチドを調製する方法であって、配列番号60～配列番号69（好ましくは配列番号65～配列番号69、より好ましくは配列番号66）のうちの1つを含むか、又はこれから本質的になる一価構築物と配列番号98を含むか、又はこれから本質的になるアミノ酸配列とを1つ又は複数のリンカーを介して連結することを含む、方法に関する。

10

## 【0305】

多価及び／又は多重特異性のポリペプチドに使用するのに好適なスペーサー又はリンカーは当業者にとって明らかであり、一般に、アミノ酸配列を連結させるのに当該技術分野で使用する任意のリンカー又はスペーサーであってもよい。好ましくは、上記リンカー又はスペーサーは、医薬用途で意図されるタンパク質又はポリペプチドを構築する上での使用に好適である。

20

## 【0306】

幾つかの特に好ましいスペーサーとしては、抗体断片又は抗体ドメインを連結させるのに当該技術分野で使用されるスペーサー及びリンカーが挙げられる。これらは、上記で引用した一般的な背景技術に記載したリンカーと共に、例えばダイアボディ又はScFv断片を構築するのに当該技術分野で使用するリンカーを含む（しかし、この点で、ダイアボディ及びScFv断片では、使用するリンカー配列が、関連するV<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインが一体となって、完全な抗原結合部位を形成することができるような長さ、柔軟性の程度、及び他の性質を有している必要があるが、それぞれのアミノ酸配列又はナノボディは単独で完全な抗原結合部位を形成するため、本発明のポリペプチドに使用するリンカーの長さ又は柔軟性に関しては特に制限がないことに留意されたい）。

30

## 【0307】

例えばリンカーは、好適なアミノ酸配列、具体的には1個～50個、好ましくは1個～30個、例えば1個～20個又は1個～10個のアミノ酸残基のアミノ酸配列であってもよい。このようなアミノ酸配列の幾つかの好ましい例としては、国際公開第99/42077号に記載の例えば(gly<sub>4</sub>ser)<sub>3</sub>又は(gly<sub>3</sub>ser<sub>2</sub>)<sub>3</sub>等の例えば(gly<sub>x</sub>ser<sub>y</sub>)<sub>z</sub>型のgly-serリンカー、及び天然型重鎖抗体のヒンジ領域等のヒンジ様領域、又は（国際公開第94/04678号に記載のもののような）同様の配列が挙げられる。

## 【0308】

幾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）、並びに表B-8で言及されるリンカーであり、その中でもAAA、GS-7及びGS-9が特に好ましい。

40

## 【0309】

他の好適なリンカーは一般に、有機化合物又はポリマー、特に医薬用途のタンパク質に使用するのに好適な有機化合物又はポリマーを含む。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させるのに使用されており、例えば国際公開第04/081026号を参照されたい。

## 【0310】

使用するリンカー（複数可）の長さ、柔軟性の程度及び／又は他の性質（重要ではないが、通常はScFv断片に使用されるリンカーの場合と同様である）は、IL-6受容体

50

又は1つ又は複数の他の抗原に対する親和性、特異性又は結合活性を含むがこれらに限定されない、最終的な本発明のポリペプチドの性質に何らかの影響を及ぼし得る点が、本発明の範囲内に包含される。当業者であれば本明細書中での開示に基づき、任意で、限定された日常実験を幾つか実施した後に、本発明の特定のポリペプチドに使用するために最適なリンカー（複数可）を決定することができるであろう。

#### 【0311】

使用するリンカー（複数可）が、本発明のポリペプチドに、1つ又は複数の他の有利な性質又は機能性を付与し、及び/又は（例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物及びポリペプチドの誘導体について本明細書中に記載の）誘導体の形成及び/又は官能基の結合のための1つ又は複数の部位をもたらすことも本発明の範囲内に包含される。例えば1つ又は複数の荷電アミノ酸残基を含有するリンカーは、親水性の改善をもたらすことができるのに対し、小エピトープ又はタグを形成するか又はこれら含有するリンカーは、検出、同定及び/又は精製の目的で使用することができる。この場合でも、当業者であれば本明細書中での開示に基づき、任意で、限定された日常実験を幾つか実施した後に、本発明の特定のポリペプチドに使用するために最適なリンカーを決定することができるであろう。

10

#### 【0312】

最終的に、本発明のポリペプチドに2つ以上のリンカーを使用する場合、これらのリンカーは同一であっても異なってもよい。この場合でも、当業者であれば本明細書中での開示に基づき、任意で、限定された日常実験を幾つか実施した後に、本発明の特定のポリペプチドに使用するのに最適なリンカーを決定することができるであろう。

20

#### 【0313】

通常、発現及び産生を容易にするため、本発明のポリペプチドは直鎖ポリペプチドである。しかしながら、本発明は、最も広い意味ではこれに限定されない。例えば本発明のポリペプチドが3つ以上のアミノ酸配列又はナノボディを含む場合、「星型」の構築物を得るために、各「アーム」がアミノ酸配列又はナノボディに連結する3つ以上の「アーム」を有するリンカーを使用することによってこれらを連結させることが可能である。通常あまり好ましくないが、環状の構築物を使用することも可能である。

#### 【0314】

本発明は最も広い意味では本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの誘導体も含む。このような誘導体は概して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチド及び/又は本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを形成する1つ又は複数のアミノ酸残基の修飾、特に化学的及び/又は生物学的（例えば酵素的）修飾により得ることができる。

30

#### 【0315】

このような修飾の例、並びにこのような形（すなわち、タンパク質骨格、又は（but）好ましくは側鎖のいずれか）で修飾することができるアミノ酸配列、ナノボディ配列、化合物又はポリペプチド配列中のアミノ酸残基の例、このような修飾の導入のために使用することができる方法及び技法、並びにこのような修飾の潜在的な使用及び利点は当業者に明らかである。

40

#### 【0316】

例えばこのような修飾は、1つ又は複数の官能基、残基又は部分、特に1つ又は複数の所望の特性又は官能性を本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドに付与する1つ又は複数の官能基、残基又は部分を本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチド中に又は上に（例えば共有結合によるか、又は他の任意の適切な形で）導入することを含み得る。このような官能基の例は当業者に明らかである。

#### 【0317】

例えばこのような修飾は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの半減期、溶解性及び/又は吸収性を増大する、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの免疫原性及び/又は毒性を低減する、本発明のアミノ酸配列、

50

ナノボディ、化合物又はポリペプチドの任意の望ましくない副作用を排除若しくは減衰する、及び/又は本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドに他の有益な特性を付与する、及び/又は本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの不要な特性を低減する、又は上記の2つ以上の任意の組合せである1つ又は複数の官能基を(例えば共有結合によるか、又は他の任意の適切な形で)導入することを含み得る。このような官能基及びこれらを導入する技法の例は当業者に明らかであり、概して、上記で引用される一般的な背景技術で述べた全ての官能基及び技法、並びに医薬用タンパク質の修飾、特に抗体又は抗体断片(S c F v及び単一ドメイン抗体を含む)の修飾に関するそれ自体が既知の官能基及び技法を含み得る。これに関しては例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (1980, 16thed., Mack Publishing Co., Easton, PA)を参照する。同様に当業者に明らかなように、このような官能基は、例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドに直接(例えば共有結合的に)連結し得るか、又は任意に適切なリンカー又はスペーサーを介して連結し得る。

10

## 【0318】

医薬用タンパク質の半減期を増大する、及び/又はその免疫原性を低減するために最も広く使用される技法の1つは、適切な薬理的に許容可能なポリマー、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体(例えばメトキシポリ(エチレングリコール)すなわちmPEG)の結合を含む。概して、任意の適切な形のペグ化、例えば当該技術分野で抗体及び抗体断片((単一)ドメイン抗体及びS c F vを含むが、これらに限定されない)に対して使用されるペグ化を使用することができる。例えばChapman (2002, Nat. Biotechnol., 54:531-545)、Veronese and Harris (2003, Adv. Drug Deliv. Rev.54:453-456)、Harris and Chess (2003, Nat. Rev. Drug. Discov., 2: 214-21)及び国際公開第04/060965号を参照する。タンパク質のペグ化に関する多様な試薬も、例えばNektar Therapeutics, USAより市販されている。

20

## 【0319】

好ましくは、特にシステイン残基を介した部位特異的ペグ化を使用する(例えばYang et al. (2003, Protein Engineering, 16(10):761-770)を参照されたい)。例えばそのために、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドにおいて自然発生するシステイン残基にPEGを結合してもよく、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを、PEGに結合する1つ又は複数のシステイン残基を適切に導入するように修飾してもよく、又はPEGに結合する1つ又は複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列を、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドのN末端及び/又はC末端と融合してもよい(全て、それ自体が当業者に既知であるタンパク質工学の技法を使用する)。

30

## 【0320】

好ましくは、PEGは、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドに対して5000を超える(例えば10000を超える)かつ20000未満(例えば100000未満)の分子量、例えば20000~80000の範囲の分子量で使用する。

## 【0321】

別の、通常あまり好ましくない修飾は、一般的に翻訳時及び/又は翻訳後の修飾の一部として、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを発現するのに用いられる宿主細胞に応じてN結合型又はO結合型のグリコシル化を含む。

40

## 【0322】

さらに別の修飾は、標識した本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの用途に応じて、1つ又は複数の検出可能な標識、又は他のシグナル生成基若しくはシグナル生成部分の導入を含んでいてもよい。それらを結合、使用及び検出するのに好適な標識及び技法は当業者にとって明らかであり、例としては、蛍光標識(例えばフルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、及びフルオレサミン、並びに<sup>152</sup>Eu等の蛍光金

50

属、又はランタニド種からの他の金属)、リン光標識、化学発光標識又は生物発光標識(例えばルミナル、イソルミナル、セロマティックアクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩、シュウ酸エステル、及びジオキセタン又はGFP、並びにその類似体)、放射性同位体(例えば $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、及び $^{75}\text{Se}$ )、金属、金属キレート又は金属カチオン(例えば $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、及び $^{68}\text{Ga}$ 等の金属カチオン)、若しくは*in vivo*、*in vitro*若しくは*in situ*診断及びイメージングに特に適した他の金属若しくは金属カチオン、例えば( $^{157}\text{Gd}$ 、 $^{55}\text{Mn}$ 、 $^{162}\text{Dy}$ 、 $^{52}\text{Cr}$ 、及び $^{56}\text{Fe}$ )、並びに、発色団及び酵素(例えばリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、 $\alpha$ -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 $\alpha$ -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ピオチンアビジンペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼ)が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な標識は当業者にとって明らかであり、例としては、NMR分光法又はESR分光法を用いて検出することができる部分が挙げられる。

10

### 【0323】

本発明のこのような標識したアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドは、例えば特異的標識の選択に応じて、(ELISA、RIA、EIA及び他の「サンドイッチアッセイ」等のそれ自体が既知のイムノアッセイを含む)*in vitro*、*in vivo*又は*in situ*のアッセイに、並びに*in vivo*診断及びイメージングの目的で使用され得る。

20

### 【0324】

当業者にとって明らかであるように、別の修飾は、例えば上記の金属又は金属カチオンの1つをキレート化するキレート基(chelating group)の導入を含んでいてもよい。例えば好適なキレート官能基としては、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)又はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)が挙げられるが、これらに限定されない。

### 【0325】

さらに別の修飾は、ピオチン-(ストレプト)アビジン結合対等の特異的結合対の一部である官能基の導入を含んでいてもよい。このような官能基は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを別のタンパク質、ポリペプチド、又は結合対の残り半分と結合する化合物に連結させるのに(すなわち、結合対の形成を介して)使用され得る。例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドは、ピオチンと結合し、アビジン又はストレプトアビジンと結合する別のタンパク質、ポリペプチド、化合物又は担体に連結し得る。例えばこのような結合した本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドは、例えば検出可能なシグナル生成剤がアビジン又はストレプトアビジンに結合する診断系のレポーターとして使用され得る。このような結合対は、例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを、医薬目的に好適な担体を含む担体に結合させるのにも使用することができる。非限定的な一例は、Cao and Suresh (2000, Journal of Drug Targeting, 8 (4):257)によって記載のリポソーム製剤である。このような結合対はまた、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドに治療的に活性のある作用物質を連結させるのに使用することができる。

30

40

### 【0326】

他の潜在的な化学修飾及び酵素修飾は当業者にとって明らかであろう。このような修飾を、(例えば機能-活性関係性を研究するために)調査目的で導入してもよい。例えばLundblad and Bradshaw (1997, Biotechnol. Appl. Biochem., 26:143-151)を参照する。

### 【0327】

好ましくは、この誘導体は、本明細書中に規定されるような(本明細書中にさらに記載

50

の（実際又は見掛けの） $K_D$  値、（実際又は見掛けの） $K_A$  値、 $k_{on}$  速度及び/又は  $k_{off}$  速度として、又は代替的に  $IC_{50}$  値として好適に測定及び/又は表される）親和性で、IL-6 受容体上で特異的エピトープと結合するようなものである。

【0328】

特に本発明のこのような誘導体が、

1 nM ~ 1 pM (モル/L) 以下、好ましくは 500 pM ~ 1 pM (モル/L) 以下、より好ましくは 100 pM ~ 1 pM (モル/L) 以下、又はさらにより好ましくは約 50 pM ~ 1 pM 以下の解離定数 ( $K_D$ ) で hIL-6R と結合する、及び/又は

1 nM ~ 1 pM (モル/L) 以下、好ましくは 500 pM ~ 1 pM (モル/L) 以下、より好ましくは 100 pM ~ 1 pM (モル/L) 以下、又はさらにより好ましくは約 50 pM ~ 1 pM 以下の解離定数 ( $K_D$ ) でカニクイザル IL-6R と結合する、及び/又は

$10^4 M^{-1} s^{-1}$  ~ 約  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 M^{-1} s^{-1}$  ~  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 M^{-1} s^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度で hIL-6R と結合する、及び/又は

$10^4 M^{-1} s^{-1}$  ~ 約  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 M^{-1} s^{-1}$  ~  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 M^{-1} s^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度でカニクイザル IL-6R と結合する、及び/又は

$10^{-3} s^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 s$ ) ~  $10^{-6} s^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} s^{-1}$  ~  $10^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} s^{-1}$  ~  $10^{-6} s^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} s^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度で hIL-6R と結合する、及び/又は

$10^{-3} s^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 s$ ) ~  $10^{-6} s^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} s^{-1}$  ~  $10^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} s^{-1}$  ~  $10^{-6} s^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} s^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度でカニクイザル IL-6R と結合するようなものであるのが好ましい。

【0329】

上述のように、本発明はまた、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドから本質的になるか又はこれを含む、タンパク質又はポリペプチドに関する。「から本質的になる」とは、本発明のタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列のいずれもが、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドと厳密に同じであるか、又は1個~20個のアミノ酸残基、例えば1個~10個のアミノ酸残基、及び好ましくは1個~6個のアミノ酸残基（例えば1個、2個、3個、4個、5個又は6個のアミノ酸残基）のような限定数のアミノ酸残基をアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドのアミノ末端、カルボキシ末端、又はアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に付加させた本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドに対応することを意味する。

【0330】

上記のアミノ酸残基は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの（生物学的）特性を変更するか、改質するか、又はさもなければこれに影響を与えることもあり又は与えない場合もあり、アミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドにさらなる機能性を付加することもあり又は付加しない場合もある。例えばこのようなアミノ酸残基は、

a) 例えば異種宿主細胞又は異種宿主生物において発現した結果得られるN末端Met残基を含み得る。

b) 合成の際に宿主細胞からのアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドの分泌を導く、シグナル配列又はリーダー配列を形成してもよい。好適な分泌リーダーペプチドは当業者にとって明らかであり、本明細書中にさらに記載される通りであり得る。通常、このようなリーダー配列は、アミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドのN末端に連結されるが、本発明は最も広い意味では、これに限定されるものではない。

c) アミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドが、特定の器官、組織、細胞

、又は細胞の一部若しくはコンパートメントに指向性を有し、及び/又はそれらに浸透するか若しくは侵入することを可能にし、及び/又はアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドが、細胞膜、上皮細胞の層等の細胞層、固形腫瘍を含む腫瘍、又は血液脳関門のような生物学的障壁に浸透するか若しくはそれらを横断することを可能にする、配列又はシグナルを形成し得る。このようなアミノ酸配列の例は当業者にとって明らかであろう。幾つかの非限定的な例は、国際公開第03/026700号、並びにTemsamani et al., Expert Opin. Biol. Ther., 1, 773 (2001)、Temsamani and Vidal, Drug Discov. Today, 9, 1012 (004) 及びRousselle, J. Pharmacol. Exp. Ther., 296, 124-131 (2001) に記載されている小さいペプチドベクター(「Pept-transベクター」)、並びにZhao et al., Apoptosis, 8, 631-637 (2003) によって記載されている膜輸送体配列である。抗体断片の細胞内標的のためのC末端アミノ酸配列及びN末端アミノ酸配列は、例えばCardinale et al., Methods, 34, 171 (2004) によって記載されている。細胞内標的化の他の好適な技法は、以下に記述されるような、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチドを含むいわゆる「細胞内抗体」の発現及び/又は使用を伴う。

10

d) 「タグ」、例えばアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくはポリペプチドの精製を、例えばその配列又は残基を対象とする親和性技法を用いて可能にするか又は容易にする、アミノ酸配列又は残基を形成し得る。その後、(例えば化学的又は酵素学的な切断によって)上記の配列又は残基を除去して、アミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチド配列をもたらし得る(この目的のために、タグは任意で、切断可能なリンカー配列を介してアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくはポリペプチドに連結されてもよく、又は切断可能なモチーフを含有していてもよい)。このような残基の好ましいが非限定的な幾つかの例は、複数のヒスチジン残基、グルタチオン残基、及びAAAEQKLI SEEDLNAA (配列番号100)等のmycタグである。

20

e) 官能基化した及び/又は官能基の結合部位として機能することができる1つ又は複数のアミノ酸残基であり得る。好適なアミノ酸残基及び官能基は当業者にとって明らかであり、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物又はポリペプチド配列の誘導体について本明細書中に記述されたアミノ酸残基及び官能基が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0331】

30

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び核酸は、本明細書中のさらなる説明により当業者にとって明らかであるように、それ自体が既知の方法で調製することができる。例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、抗体の調製、特に抗体断片(単一)ドメイン抗体及びScFv断片が挙げられるが、これらに限定されない)の調製のためのそれ自体が既知の任意の方法で調製することができる。アミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及び核酸を調製するための、好ましいが非限定的な幾つかの方法としては、本明細書中に記載の方法及び技法が挙げられる。

#### 【0332】

当業者にとって明らかであるように、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び/又はポリペプチドの調製に特に有用な一方法は通常、好適な宿主細胞又は宿主生物(本明細書中では「本発明の宿主」とも称される)において、又は上記の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドをコードする核酸(本明細書中では「本発明の核酸」とも称される)に別の適切な発現系において、発現する工程と、場合によってはその後、このようにして得られる本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを単離及び/又は精製する工程とを含む。

40

#### 【0333】

特に、このような方法は、本発明の宿主が少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び/又はポリペプチドを発現及び/又は産生するような条件下で、上記の本発明の宿主を培養及び/又は維

50

持する工程と、場合によってはその後、  
このようにして得られる本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを単離及び  
/又は精製する工程とを含み得る。

【0334】

したがって本発明は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド又は一価構築物をコードする核酸又はヌクレオチド配列（「本発明の核酸」又は「本発明のヌクレオチド配列」とも称される）にも関する。本発明の核酸は、一本鎖又は二本鎖のDNA又はRNAの形態を取ることができ、好ましくは二本鎖DNAの形態をとる。例えば本発明のヌクレオチド配列はゲノムDNA、cDNA又は合成DNA（対象となる宿主細胞又は宿主生物内の発現に特異的に適合したコドン使用頻度を有するDNA等）であってもよい。

10

【0335】

本発明の一実施形態によれば、本発明の核酸は、本明細書中に規定したように、本質的に単離形態である。本発明の核酸は、例えばプラスミド、コスミド又はYAC等のベクターの形態をとり、ベクターに存在し、及び/又はその一部であってもよく、これもまた本質的に単離形態であってもよい。

【0336】

本発明の核酸は、本明細書中に記載の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及び/又はポリペプチドに関する情報に基づき、それ自体が既知の方法で調製されるか又は得ることができ、及び/又は好適な天然資源から単離することができる。また、当業者にとって明らかであるように、本発明の核酸を調製するために、例えばアミノ酸配列又はナノボディを

20

【0337】

コードする少なくとも1つのヌクレオチド配列、及び例えば1つ又は複数のリンカーをコードする核酸等の幾つかのヌクレオチド配列を好適な方法で共に連結することができる。

本発明の核酸を生成するための技法は当業者にとって明らかであり、例えば自動DNA合成、部位特異的突然変異誘発、2つ以上の天然型配列及び/又は合成型配列（又はこれらの2つ以上の部分）の組合せ、切断された発現産物を発現させる突然変異の導入、（例えば好適な制限酵素を用いて容易に消化及び/又はライゲーションすることができるカセット及び/又は領域を生成するための）1つ又は複数の制限部位の導入、及び/又は1つ又は複数の「ミスマッチ」プライマーを使用したPCR反応による突然変異の導入が挙げられるが、これらに限定されない。これらの技法及び他の技法は当業者にとって明らかであり、同様に上記のSambrook et al.及びAusubel et al.の文献等の標準的なハンドブック、及び以下の実施例を参照する。

30

【0338】

本発明の核酸はまた、当業者にとって明らかであるように、遺伝子構築物の形態をとり、遺伝子構築物に存在し、及び/又はその一部であってもよい。このような遺伝子構築物は一般に、例えば1つ又は複数の好適な調節要素（好適なプロモーター（複数可）、エンハンサー（複数可）、ターミネーター（複数可）等）、及び本明細書中に述べられている遺伝子構築物のさらなる要素等といった、それ自体が既知の遺伝子構築物の1つ又は複数の要素に、場合によっては連結する少なくとも1つの本発明の核酸を含む。少なくとも1つの本発明の核酸を含むこのような遺伝子構築物は、本明細書中において「本発明の遺伝子構築物」とも称される。

40

【0339】

本発明の遺伝子構築物は、DNA又はRNAであってもよく、好ましくは二本鎖DNAである。また、本発明の遺伝子構築物は、対象となる宿主細胞又は宿主生物の形質転換に好適な形態、対象となる宿主細胞のゲノムDNAへの組込みに好適な形態、又は目的とする宿主生物における独立した複製、維持及び/又は遺伝に好適な形態をとり得る。例えば本発明の遺伝子構築物は、例えばプラスミド、コスミド、YAC、ウイルスベクター又はトランスポゾン等のベクターの形態をとることができる。特に、ベクターは、発現ベクター、すなわち*in vitro*及び/又は*in vivo*（例えば好適な宿主細胞、宿主生物及び/又は発現系）での発現を提供し得るベクターであってもよい。

50

## 【0340】

好ましいが非限定的な一実施形態では、本発明の遺伝子構築物は、

a) b) と作用可能に結合している少なくとも1つの本発明の核酸と、

b) プロモーター、及び場合によっては好適なターミネーター等の1つ又は複数の調節要素と、場合によってはさらに

c) それ自体が既知の遺伝子構築物の1つ又は複数のさらなる要素とを含み、ここで、用語「調節要素」、「プロモーター」、「ターミネーター」、及び「作用可能に結合した」は、当該技術分野における(本明細書中に詳述するような)通常の意味を有しており、遺伝子構築物中に存在する上記「さらなる要素」とは、例えば3' - 又は5' - UTR配列、リーダー配列、選択マーカー、発現マーカー/レポーター遺伝子、及び/又は形質転換若しくは組込み(の効率)を促進又は増大させ得る要素であってもよい。このような遺伝子構築物に好適なこれら及び他の要素は当業者にとって明らかであり、例えば使用する構築物の種類、対象となる宿主細胞又は宿主生物、対象の本発明のヌクレオチド配列を発現させる方法(例えば構成的発現、一時的発現、又は誘導性発現等を介するもの)、及び/又は使用する形質転換法に応じて決定することができる。例えば抗体及び抗体断片(単一)ドメイン抗体及びScFv断片が挙げられるが、これらに限定されない)の発現及び産生のための、それ自体が既知の調節配列、プロモーター、及びターミネーターを、本質的に類似の方法で使用してもよい。

10

## 【0341】

好ましくは、本発明の遺伝子構築物において、上記少なくとも1つの本発明の核酸、及び上記調節要素、及び場合によっては上記1つ又は複数のさらなる要素は、互いに「作用可能に連結」しており、これは通常、これらが互いに機能的な関係にあることを意味する。例えばプロモーターが、コーディング配列の転写及び/又は発現を、開始又は他の方法により制御/調節することができる場合(ここで、上記コーディング配列は、上記プロモーター「の制御下である」ものとする)、コーディング配列に「作用可能に連結」していると考えられる。一般に、2つのヌクレオチド配列が作用可能に連結している場合、これらは同一の配向を有し、通常同一リーディングフレーム内にある。通常、それらは本質的に連続しているが、これは必ず要求されるものではない。

20

## 【0342】

好ましくは、本発明の遺伝子構築物の調節要素及びさらなる要素は、対象となる宿主細胞又は宿主生物において対象となる生物学的機能を付与することができるほどのものである。

30

## 【0343】

例えばプロモーター、エンハンサー又はターミネーターは、対象となる宿主細胞又は宿主生物において「作用可能」でなければならず、このことは(例えば)、上記プロモーターが、(上記で規定したように)作用可能に連結したヌクレオチド配列(例えばコーディング配列)の転写及び/又は発現を、開始、又は他の方法により制御/調節することができるものであることを意味する。

## 【0344】

特に好ましい幾つかのプロモーターとしては、本明細書中に述べた宿主細胞における発現のためのそれ自体が既知のプロモーター、特に本明細書中に述べたもの及び/又は実施例において使用されるもののような細菌細胞における発現のためのプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0345】

選択マーカーは、(すなわち、適切な選択条件下で)本発明のヌクレオチド配列による形質転換が(首尾良く)起こった宿主細胞及び/又は宿主生物を、形質転換が(首尾良く)起こらなかった宿主細胞及び/又は宿主生物と区別することができるようなものでなければならない。このようなマーカーの幾つかの好ましいが非限定的な例は、抗生物質(例えばカナマイシン又はアンピシリン)に対する耐性を付与する遺伝子、温度耐性を付与する遺伝子、又は形質転換されていない細胞若しくは生物が生存する上で不可欠な、培地中

50

の或る種の因子、化合物及び／又は（食品）成分がない状態で宿主細胞若しくは宿主生物を維持させる遺伝子である。

【0346】

リーダー配列は、（対象となる宿主細胞又は宿主生物において）所望の翻訳後修飾を可能にし、及び／又は転写されたmRNAを細胞の所望の部分又はオルガネラに配向させるような配列であるものとする。またリーダー配列は、上記細胞から発現生成物を分泌させてもよい。そのようなものとして、リーダー配列は、宿主細胞又は宿主生物中で作用可能な任意のプロ配列、プレ配列、又はプレプロ配列であってもよい。リーダー配列は、細菌細胞中での発現に必要とされない。例えば抗体及び抗体断片（単ドメイン抗体及びScFv断片が挙げられるが、これらに限定されない）の発現及び産生のための、それ自体が既知であるリーダー配列を、本質的に類似の方法で使用することができる。

10

【0347】

発現マーカー又はレポーター遺伝子は、（宿主細胞又は宿主生物中で）遺伝子構築物（に存在する遺伝子又はヌクレオチド配列）の発現を検出できるようなものでなければならない。発現マーカーは、場合によっては、発現産物を、例えば細胞の特定の部分又はオルガネラ、及び／又は多細胞生物の特定の細胞（複数可）、組織（複数可）、器官（複数可）、又は部分（複数可）に局在化させてもよい。このようなレポーター遺伝子は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドとのタンパク質融合として発現されてもよい。幾つかの好ましいが非限定的な例としては、GFP等の蛍光タンパク質が挙げられる。

20

【0348】

好適なプロモーター、ターミネーター、及びさらなる要素の幾つかの好ましいが非限定的な例としては、本明細書中に言及した宿主細胞における発現に使用することができるもの、及び具体的には本明細書中に言及されたもの、及び／又は下記の実施例で用いられているもののような細菌細胞における発現に好適であるものが挙げられる。ターミネーター、転写及び／又は翻訳エンハンサー、及び／又は組み込み因子等の、本発明の遺伝子構築物中に存在／使用し得るプロモーター、選択マーカー、リーダー配列、発現マーカー及びさらなる要素についての幾つかの（さらなる）非限定的な例については、上記のSambrook et al.、及びAusubel et al.の文献による概説ハンドブック、並びに国際公開第95/07463号、国際公開第96/23810号、国際公開第95/07463号、国際公開第95/21191号、国際公開第97/11094号、国際公開第97/42320号、国際公開第98/06737号、国際公開第98/21355号、米国特許第7,207,410号、米国特許第5,693,492号、及び欧州特許第1085089号に示された例を参照する。他の例は当業者にとって明らかであろう。上記で引用された一般的な背景技術に関する参考文献及び本明細書中に引用したさらなる参考文献も参照する。

30

【0349】

本発明の遺伝子構築物は、通常例えば上記のSambrook et al.、及びAusubel et al.の文献による概説ハンドブックに記載の技法を用いて、本発明のヌクレオチド配列（複数可）を、1つ又は複数の上記さらなる要素と適切に連結させることにより得ることができる。

40

【0350】

多くの場合、本発明の遺伝子構築物は、本発明のヌクレオチド配列を、それ自体が既知の好適な（発現）ベクターに挿入することによって得られる。好適な発現ベクターの幾つかの好ましいが非限定的な例は、以下の実施例において使用されるもの、及び本明細書中に言及されたものである。

【0351】

本発明の核酸及び／又は本発明の遺伝子構築物は、宿主細胞又は宿主生物を形質転換させるため、すなわち本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを発現及び／又は産生させるために使用することができる。好適な宿主又は宿主細胞は当業者にとって明らかであり、例えば任意の好適な真菌、原核、又は真核の細胞若しくは細胞株又は任意の

50

好適な真菌、原核、又は真核生物、例えば：

細菌株（大腸菌の株、ミラピリス変形菌等のプロテウス属の株、蛍光菌等のシュードモナス属の株等のグラム陰性株；及び枯草菌又はブレビス菌等のバチルス属の株、ストレプトミセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）等のストレプトミセス属の株、スタフィロコッカス・カルノサス（*Staphylococcus carnosus*）等のブドウ球菌の株、及び乳酸連鎖球菌等のラクトコッカス属の株等のグラム陽性株が挙げられるがこれらに限定されない）、

真菌細胞（トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）等のトリコデルマ属、アカパンカビ等のニューロスポラ属、ソルダリア・マクロスポラ（*Sordaria macrospora*）等のソルダリア属、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）又はショウユコウジカビ等のアスペルギルス属、又は他の糸状菌由来の細胞が挙げられるがこれらに限定されない）

酵母細胞（出芽酵母等のサッカロミセス属、シゾサッカロミセス・ボンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）等のシゾサッカロミセス属、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）又はピキア・メタノリカ（*Pichia methanolica*）等のピキア属、ハンセヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）等のハンセヌラ属、クレイベロミセス・ラクティス（*Kluyveromyces lactis*）等のクレイベロミセス属、アークスラ・アデニニボランズ（*Arxula adenivorans*）等のアークスラ属、ヤロウリア・リポリチカ（*Yarrowialipolytica*）等のヤロウリア属由来の細胞が挙げられるがこれらに限定されない）、

アフリカツメガエル卵母細胞等の両生類細胞又は細胞株、

昆虫に由来する細胞又は細胞株、例えばシロイチモンジヨトウ S F 9 及び S f 2 1 細胞を含むがこれらに限定されない鱗翅目に由来する細胞／細胞株、又はシュナイダー細胞及び K c 細胞等のショウジョウバエに由来する細胞／細胞株、

植物又は植物細胞、例えばタバコ植物、及び／又は

哺乳類細胞又は細胞株、例えば C H O 細胞、B H K 細胞（例えば B H K - 2 1 細胞）、並びに H e L a 細胞、C O S 細胞（例えば C O S - 7 細胞）、及び P E R . C 6 細胞等のヒト細胞又は細胞株が挙げられるがこれらに限定されない、ヒトに由来する細胞又は細胞株、哺乳動物に由来する細胞又は細胞株、並びに

抗体及び抗体断片（（単一）ドメイン抗体及び S c F v 断片が挙げられるがこれらに限定されない）の発現及び産生に関してそれ自体が既知の他の全ての宿主又は宿主細胞であってもよく、これらは当業者に明らかであろう。上記で引用した一般的な背景技術に関する文献、及び例えば国際公開第 9 4 / 2 9 4 5 7 号、国際公開第 9 6 / 3 4 1 0 3 号、国際公開第 9 9 / 4 2 0 7 7 号、Frenken et al. (1998, Res. Immunol. 149 (6) : 589-99)、Riechmann and Muylderms (1999, J. Immunol. Methods, 231 (1-2) : 25-38)、van der Linden (2000, J. Biotechnol. 80 (3) : 261-70)、Joosten et al. (2003, Microb. Cell Fact. 2 (1) : 1)、Joosten et al. (2005, Appl. Microbiol. Biotechnol. 66 (4) : 384-92) 及び本明細書中に引用したさらなる文献を参照する。

#### 【 0 3 5 2 】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、例えば予防目的及び／又は治療目的（遺伝子治療等）のために、多細胞生物の 1 つ又は複数の細胞、組織又は器官に導入し、発現させることもできる。このために、本発明のヌクレオチド配列を、例えばこのように（例えばリポソームを用いて）、又は好適な（例えばアデノウイルス等のレトロウイルス、アデノ随伴ウイルス等のパルボウイルスに由来する）遺伝子治療用ベクターに挿入後、任意の好適な方法を用いて細胞又は組織に導入することができる。当業者にとって明らかであるように、このような遺伝子治療は、本発明の核酸又は本発明の核酸をコードする好適な遺伝子治療用ベクターを、患者又は患者の特定の細胞又は特定の組織若しくは器官に投与することにより患者の体内において、*in vivo* 及び／又は *in situ* で行うことができ、又は好適な（多くの場合、外植リンパ球、骨髄吸引物又は組織生検試料等の、治療対象となる患者の身体より採取された）細胞は、本発明のヌクレオチド配列を用いて *in vitro* で処理した後、患者の体内に好適に（再）導入することがで

きる。これらは全て、例えばCulver, K. W. (1994, "Gene Therapy", p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N.Y.)、Giordano (1996, Nature F Medicine 2: 534-539)、Schaper (1996, Circ. Res. 79: 911-919)、Anderson (1992, Science 256: 808-813)、Verma (1994, Nature 389: 239)、Isner (1996, Lancet 348: 370-374)、Muhlhauser (1995, Circ. Res. 77: 1077-1086)、Onodera (1998, Blood 91: 30-36)、Verma (1998, Gene Ther. 5: 692-699)、Nabel (1997, Ann. N.Y. Acad. Sci., 811: 289-292)、Verzeletti (1998, Hum. Gene Ther. 9: 2243-51)、Wang (1996, Nature Medicine 2: 714-716)、国際公開第94/29469号、国際公開第97/00957号、米国特許第5,580,859号、又はSchaper (1996, Current Opinion in Biotechnology 7: 635-640)に記載の当業者に既知の遺伝子治療用ベクター、技法、及び送達システムを用いて行うことができる。例えばScFv断片(Afnasieva et al. (2003, Gene Ther., 10: 1850-1859))及びダイアボディ(Blanco et al., 2003, J. Immunol., 171: 1070-1077)の*in situ*発現は当該技術分野に記述されている。

10

## 【0353】

細胞中でのアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの発現のために、これらは、例えば国際公開第94/02610号、国際公開第95/22618号、米国特許第7,004,940号、国際公開第03/014960号、Cattaneo A. and Biocca S. (1997, Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag)、及びKontermann (2004, Methods 34: 163-170)に記載の、いわゆる「細胞内抗体」として発現させることもできる。

20

## 【0354】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを、例えばウサギ、ウシ、ヤギ又はヒツジの母乳等のトランスジェニック哺乳動物の母乳中(トランス遺伝子を哺乳動物に導入する一般的な技法については、例えば米国特許第6,741,957号、米国特許第6,304,489号、及び米国特許第6,849,992号を参照されたい)、植物、又は葉、花、果実、種、根、塊茎を含むがこれらに限定されない植物の一部中(例えばタバコ、トウモロコシ、大豆、又はアルファルファ)、又は、例えばカイコガの蛹中で産生することもできる。

## 【0355】

さらに、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを、細胞を含まない発現系で発現及び/又は産生してもよく、このような系の好適な例は当業者にとって明らかであろう。幾つかの好ましいが非限定的な例としては、小麦麦芽系、ウサギ網状赤血球溶解物、又はZubayの方法による大腸菌を用いた系での発現が挙げられる。

30

## 【0356】

上記のように、ナノボディを使用する利点の1つは、それに基づくポリペプチドを、好適な細菌系における発現によって調製することができる点であり、及び好適な細菌発現系、ベクター、宿主細胞、調節要素等は、例えば上述した参考文献によって当業者にとって明らかであろう。しかしながら、本発明は、最も広い意味では細菌系における発現に限定されないことに留意されたい。

## 【0357】

好ましくは、本発明では、本発明のポリペプチドを医薬用途に適した形態で提供する細菌発現系等の(*in vivo*又は*in vitro*)発現系を使用するが、このような発現系も当業者にとって明らかであろう。当業者にとって明らかであるように、医薬用途に適した本発明のポリペプチドは、ペプチド合成法を用いて調製することもできる。

40

## 【0358】

工業規模の製造において、ナノボディ又はナノボディを含有するタンパク質治療剤の(工業的)製造のために好ましい異種宿主としては、大規模の発現/産生/培養、特に大規模の医薬用途での発現/産生/培養に適した大腸菌、ピキア・パストリス、出芽酵母の株が挙げられる。このような株の好適な例は当業者にとって明らかであろう。このような株及び産生/発現系は、Biovitrum (Uppsala, Sweden)等の企業から入手可能である。

50

## 【0359】

代替的に、哺乳動物細胞株、特にチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を、大規模の発現／産生／培養、特に大規模の医薬用途での発現／産生／培養のために用いることができる。このような発現／産生系も、上記企業の幾つかから入手可能である。

## 【0360】

特定の発現系の選択は、或る特定の翻訳後修飾、より具体的にはグリコシル化の必要条件に一部依存している。グリコシル化が望ましいか又は必要とされるナノボディを含有する組換えタンパク質の産生には、発現したタンパク質をグリコシル化する能力を有する哺乳動物の発現用宿主の使用が必要である。これに関連して、得られるグリコシル化パターン（すなわち、結合する残基の種類、数及び位置）が、発現に用いられる細胞又は細胞株に依存することは、当業者にとって明らかであろう。好ましくは、ヒト（すなわち、本質的にヒトのグリコシル化パターンを有するタンパク質を与える）細胞若しくは細胞株、又は、本質的に及び／又は機能的にヒトのグリコシル化と同一であるか、又は少なくともヒトのグリコシル化を模倣したグリコシル化パターンを与えることができる別の哺乳動物の細胞株が用いられる。一般に、大腸菌等の原核生物の宿主はタンパク質をグリコシル化する能力を有しておらず、酵母等の下等真核細胞を使用すると、通常、ヒトのグリコシル化と異なるグリコシル化パターンがもたらされる。それにもかかわらず、上記宿主細胞及び発現系の全てを、得ようとする所望のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドに応じて、本発明に用いることができることを理解されたい。

## 【0361】

したがって、本発明の非限定的な一実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドはグリコシル化されている。本発明の別の非限定的な実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドはグリコシル化されていない。

## 【0362】

本発明の好ましいが非限定的な一実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、細菌細胞、具体的には大規模の医薬品製造に適した細菌細胞、例えば上記の株の細胞で産生する。

## 【0363】

本発明の別の好ましいが非限定的な実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、酵母細胞、具体的には大規模の医薬品製造に適した酵母細胞、例えば上記の種の細胞で産生する。

## 【0364】

本発明のさらに別の好ましいが非限定的な実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、哺乳動物細胞で、具体的にはヒト細胞又はヒト細胞株の細胞で、さらに具体的には大規模の医薬品製造に適したヒト細胞又はヒト細胞株、例えば上記の細胞株の細胞で産生する。

## 【0365】

宿主細胞中での発現が、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの製造に用いられる場合、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、細胞内（例えば細胞質中、ペリプラズム中、又は封入体中）で産生し、次いで宿主細胞から単離し、場合によってはさらに精製してもよく、又は細胞外（例えば宿主細胞を培養する培地中）で産生し、次いで培地から単離し、場合によってはさらに精製してもよい。真核宿主細胞を使用する場合、得られるアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド及びタンパク質のさらなる単離及び下流工程での処理が大幅に容易になるため、通常、細胞外で産生されることが好ましい。通常、上記で言及された大腸菌の株等の細菌細胞は、毒素及び血液毒等の数種のタンパク質を除き、タンパク質を細胞外に分泌せず、大腸菌において分泌物を産生することは、内膜を通してペリプラズム空間へタンパク質を移行させることを意味する。ペリプラズムでの産生は、細胞質での産生に対して幾つかの利点がある。例えば分泌産物のN末端のアミノ酸配列は、特異的シグナルペプチダーゼによる分泌シグナル配列の切断後

の天然遺伝子産物と同一であってもよい。また、ペリプラズム中では、細胞質中よりもプロテアーゼ活性はるかに低いと思われる。さらに、ペリプラズム中では、混入するタンパク質が少ないため、タンパク質の精製がより容易である。別の利点は、ペリプラズムが細胞質よりも酸化環境をもたらすため、正しい位置にジスルフィド結合が形成される可能性があるという点である。大腸菌中で過剰発現されたタンパク質は、封入体と呼ばれる不溶性の凝集物中に見られることが多い。これらの封入体は、細胞質中にも又はペリプラズム中にも存在させることができ、これらの封入体からの生物学的に活性のあるタンパク質の回収は、変性/リフォールディングプロセスを必要とする。治療用タンパク質を含む多くの組換えタンパク質は封入体から回収される。代替的には、当業者に明らかであるように、所望のタンパク質、特に本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを分泌するように遺伝的に修飾された細菌の組換え株を用いることができる。

10

## 【0366】

したがって、本発明の非限定的な一実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、細胞内で産生され、宿主細胞から、特に細菌細胞又は細菌細胞中の封入体から単離したアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドである。本発明の非限定的な別の実施形態によれば、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、細胞外で産生され、宿主細胞を培養する培地から単離されたアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドである。

## 【0367】

これらの宿主細胞と共に用いる好ましいが非限定的な幾つかのプロモーターとしては、大腸菌における発現のための、*lac*プロモーター（及び*lacUV5*プロモーター等のこれらの誘導体）、アラビノースプロモーター、ファージの左側（*PL*）及び右側（*PR*）プロモーター、*trp*オペロンのプロモーター、ハイブリッド*lac/trp*プロモーター（*tac*及び*trc*）、*T7*-プロモーター（より具体的には*T7*-ファージ遺伝子10のプロモーター）、及び他の*T*-ファージプロモーター、*Tn10*テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター、外来制御オペレーター配列の1つ又は複数を含む上記プロモーターの組換え変異体；

20

出芽酵母における発現のための、*ADH1*（アルコール脱水素酵素1）、*ENO*（エノラーゼ）、*CYC1*（チトクローム *c iso-1*）、*GAPDH*（グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）、*PGK1*（ホスホグリセリン酸キナーゼ）、*PYK1*（ピルビン酸キナーゼ）の構成的プロモーター；*GAL1*、*10*、*7*（ガラクトース代謝酵素）、*ADH2*（アルコール脱水素酵素2）、*PHO5*（酸ホスファターゼ）、*CUP1*（銅メタロチオネイン）の制御的プロモーター、*CaMV*（カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター）の外来プロモーター；

30

ピキア・パストリスにおける発現のための、*AOX1*プロモーター（アルコール酸化酵素I）；

哺乳動物細胞における発現のための、ヒトサイトメガロウイルス（*hCMV*）前初期エンハンサー/プロモーター、プロモーターが*Tet*リプレッサーによって制御可能なように2個のテトラサイクリンオペレーター配列を含有するヒトサイトメガロウイルス（*hCMV*）前初期プロモーター変異体、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（*TK*）プロモーター、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復配列（*RSV LTR*）エンハンサー/プロモーター、ヒト、チンパンジー、マウス、又はラット由来の伸長因子1（*hEF-1*）プロモーター、*SV40*初期プロモーター、*HIV-1*の長末端反復配列プロモーター、アクチンプロモーターが挙げられる。

40

## 【0368】

これらの宿主細胞と共に用いる好ましいが非限定的な幾つかのベクターとしては、哺乳動物細胞における発現のためのベクター：*pMAMneo*（Clontech）、*pcDNA3*（Invitrogen）、*pMC1neo*（Stratagene）、*pSG5*（Stratagene）、*EBO-pSV2-neo*（*ATCC 37593*）、*pBPV-1*（*8-2*）（*ATCC 37110*）、*pdBPV-MMTneo*（*342-12*）（*ATCC 37224*）、*pR*

50

S V g p t ( A T C C 3 7 1 9 9 )、p R S V n e o ( A T C C 3 7 1 9 8 )、p S V 2 - d h f r ( A T C C 3 7 1 4 6 )、p U C T a g ( A T C C 3 7 4 6 0 ) 及び 1 Z D 3 5 ( A T C C 3 7 5 6 5 )、並びにアデノウイルスに基づくもの等のウイルスに基づく発現系；

細菌細胞における発現のためのベクター：p E T ベクター (Novagen) 及び p Q E ベクター (Qiagen) ；

酵母又は別の真菌細胞における発現のためのベクター：p Y E S 2 (Invitrogen) 及びピキア発現ベクター (Invitrogen) ；

昆虫細胞における発現のためのベクター：p B l u e B a c I I (Invitrogen) 及び他のバキュロウイルスベクター；

植物又は植物細胞における発現のためのベクター：例えばカリフラワーモザイクウイルス又はタバコモザイクウイルス、アグロバクテリウムの好適な株に基づくベクター、又は T i - プラスミドベースのベクターが挙げられる。

#### 【 0 3 6 9 】

これらの宿主細胞と共に用いる好ましいが非限定的な幾つかの分泌配列としては、大腸菌等の細菌細胞における使用のため、P e l B、B l a、O m p A、O m p C、O m p F、O m p T、S t I I、P h o A、P h o E、M a l E、L p p、L a m B 等；T A T シグナルペプチド、ヘモリシン C - 末端分泌シグナル；

酵母における使用のため、- 接合因子プレプロ配列、ホスファターゼ ( p h o 1 )、インペルターゼ ( S u c ) 等；

哺乳動物細胞における使用のため、標的タンパク質が真核細胞起源である場合には、固有シグナル、マウス I g 鎖 V - J 2 - C シグナルペプチド等が挙げられる。

#### 【 0 3 7 0 】

本発明の宿主又は宿主細胞を形質転換するのに好適な技法は、当業者にとって明らかであり、対象となる宿主細胞 / 宿主生物及び使用する遺伝子構築物に依存することもある。同様に、上記ハンドブック及び特許出願を参照する。

#### 【 0 3 7 1 】

形質転換後、本発明のヌクレオチド配列 / 遺伝子構築物によってうまく形質転換された宿主細胞又は宿主生物を検出及び選択する工程を実行することができる。この工程は、例えば本発明の遺伝子構築物に存在する選択可能なマーカーに基づいて選択する工程、又は、例えば特異的抗体を使用する本発明のアミノ酸配列の検出を含む工程であってもよい。

#### 【 0 3 7 2 】

形質転換された宿主細胞 ( 安定な細胞株の形態を取ることができる ) 又は宿主生物 ( 安定な突然変異細胞系又は株の形態を取ることができる ) は、本発明のさらなる態様をなす。

#### 【 0 3 7 3 】

好ましくは、これらの宿主細胞又は宿主生物は、( 宿主生物の場合には、その少なくとも 1 つの細胞、部分、組織又は器官において ) 本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを発現し、又は ( 少なくとも ) ( 例えば好適な条件下で ) 発現することができるようなものである。本発明はまた、本発明の宿主細胞又は宿主生物のさらなる世代、後代及び / 又は子孫を含んでおり、それらは、例えば細胞分裂又は有性若しくは無性生殖により得られるものであってよい。

#### 【 0 3 7 4 】

本発明のアミノ酸配列を発現させ / その発現を得るために、形質転換された宿主細胞又は形質転換された宿主生物は一般に、( 所望の ) 本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドが発現 / 産生されるような条件下で保持、維持及び / 又は培養される。好適な条件は当業者にとって明らかであり、通常、使用する宿主細胞 / 宿主生物、及び ( 関連する ) 本発明のヌクレオチド配列の発現を制御する制御因子に依存する。この場合にも、本発明の遺伝子構築物に関する上記の段落に言及したハンドブック及び特許出願を参照する。

10

20

30

40

50

## 【0375】

概して、好適な条件には、好適な培地の使用、好適な食餌及び／又は好適な栄養源の存在、好適な温度の使用、及び場合によっては好適な誘導因子又は化合物の存在（例えば本発明のヌクレオチド配列が誘導性プロモーターにより制御下にある場合）が含まれ、これらは全て当業者が選択することができる。この場合にも、このような条件下で、本発明のアミノ酸配列は、連続的、一時的、又は適切に誘導された場合にのみ発現することができる。

## 【0376】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、（まず）未成熟型（上記）で産生され、次いで、使用する宿主細胞／宿主生物に応じて翻訳後修飾されてもよいことも、当業者にとって明らかであろう。また、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、この場合にも、使用する宿主細胞／宿主生物に応じてグリコシル化されてもよい。

10

## 【0377】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドは、次いで、宿主細胞／宿主生物から、及び／又は上記宿主細胞若しくは宿主生物を培養した培地から、（分取）クロマトグラフィ法、及び／又は電気泳動法、分別沈殿法、アフィニティー法（例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドに融合した特定の切断可能なアミノ酸配列を用いる）、及び／又は分取免疫法（すなわち単離対象のアミノ酸配列に対する抗体を用いる）等の、それ自体が既知のタンパク質の単離技法及び／又は精製技法を用いて単離することができる。

20

## 【0378】

概して、医薬用途のために、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドと、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤及び／又はアジュバントとを含み、場合によっては1つ又は複数のさらなる薬理的に活性のあるポリペプチド及び／又は化合物を含む薬学的調製物又は薬学的組成物として製剤化することができる。非限定的な例により、このような製剤は、経口投与のため、非経口投与（静脈内、筋内若しくは皮下注射、又は静脈内点滴等による）のため、局所投与のため、吸入、経皮パッチ、インプラント、坐剤等による投与のために適した形態を取ることができる。このような好適な投与形態は、投与の方法、及びその調製物で用いるための方法及び担体に応じて、固体、半固体又は液体であってよく、当業者にとって明らかであり、本明細書でさらに記述する。

30

## 【0379】

したがって、さらなる態様において、本発明は、少なくとも1つの本発明のアミノ酸配列、少なくとも1つの本発明のナノボディ又は少なくとも1つの本発明のポリペプチドと、少なくとも1つの好適な（すなわち医薬用途に好適な）担体、希釈剤又は賦形剤と、場合によっては1つ又は複数のさらなる活性物質とを含有する薬学的組成物に関する。特定の態様では、本発明は配列番号70と、少なくとも1つの好適な（すなわち医薬用途に好適な）担体、希釈剤又は賦形剤と、場合によっては1つ又は複数のさらなる活性物質とを含有する薬学的組成物に関する。別の特定の態様では、本発明は配列番号71と、少なくとも1つの好適な（すなわち医薬用途に好適な）担体、希釈剤又は賦形剤と、場合によっては1つ又は複数のさらなる活性物質とを含有する薬学的組成物に関する。

40

## 【0380】

概して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、それ自体が既知の任意の好適な方法により製剤化及び投与することができ、これらについては、例えば上記で引用した一般的な背景技術（特に、国際公開第04/041862号、国際公開第04/041863号、国際公開第04/041865号及び国際公開第04/041867号）、及びRemington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., MackPublishing Company, USA (1990)、又はRemington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005)等の文献の標準的なハンドブックを参照する

50

## 【0381】

例えば本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、従来の抗体及び抗体断片（ScFv及びダイアボディを含む）及び他の薬学的に活性のあるタンパク質のための、それ自体が既知の任意の方法で製剤化及び投与することができる。このような製剤及びそれを調製する方法は当業者にとって明らかであり、例えば非経口（例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋内、管腔内、動脈内又は髄腔内投与）又は局所（経皮又は皮内）投与に好適な調製物が挙げられる。

## 【0382】

非経口投与のための調製物は、例えば点滴又は注射に好適な滅菌液剤、懸濁剤、分散剤又は乳化剤であってもよい。このような調製物に好適な担体又は希釈剤としては、例えばこれらに限定するものではないが、滅菌水及び緩衝水溶液、並びにリン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及びハंकス液等の溶液、水性油、グリセロール、エタノール、プロピレングリコール等のグリコール、又は鉱物油、動物油、及び植物油、例えば落花生油、大豆油、並びに好適なこれらの混合物が挙げられる。通常、水溶液剤又は懸濁剤が好ましい。

## 【0383】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、遺伝子治療の送達方法を使用して投与することもできる。例えば米国特許第5,399,346号（その全体が参照により援用される）を参照されたい。遺伝子治療の送達方法を使用して、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドをコードする遺伝子によりトランスフェクトされた初代細胞を、特定の器官、組織、移植片、腫瘍又は細胞を標的とするための組織特異的プロモーターによりさらにトランスフェクトすることができ、細胞内に局在化した発現のためのシグナル及び安定化配列によりさらにトランスフェクトすることもできる。

## 【0384】

このように、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、不活性希釈剤又は吸収可能な食用の担体等の薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、例えば経口的に全身投与することができる。それらを、ハード又はソフトシェルゼラチンカプセルに封入してもよく、錠剤として打錠してもよく、又は患者の食事の食品に直接加えてもよい。経口治療用の投与のために、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを1つ又は複数の賦形剤と組み合わせ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤、ウェハー剤等の形態で使用することができる。このような組成物及び調製物は、少なくとも0.1%の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドを含有していなければならない。組成物及び調製物中のそれらの割合は、当然ながら変えることができ、便宜上所定の単位投薬形態の重量の約2%～約60%であり得る。このような治療上有用な組成物中の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドの量は、有効な用量レベルが得られるような量である。

## 【0385】

また、錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤等は、トラガカントガム、アラビアゴム、コーンスターチ又はゼラチン等の結着剤；リン酸二カルシウム等の賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；及びスクロース、フルクトース、ラクトース又はアスパルテーム等の甘味料を含有してもよく、又はペパーミント、冬緑油、チェリー香料等の香料を加えてもよい。単位投薬形態がカプセル剤である場合、上記のような種類の物質以外に、植物油又はポリエチレングリコール等の液体担体を含有してもよい。種々の他の物質が、コーティングとして、又は固体の単位投薬形態の物理的形態を他の方法により変化させるために存在してもよい。例えば錠剤、丸剤又はカプセル剤は、ゼラチン、ワックス、シエラック又は砂糖等でコーティングされていてもよい。シロップ剤又はエリキシル剤は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチド、甘味料としてのスクロース又はフルクトース、保存料としてのメチルパラベン又はプロピルパラベン、色素、及びチェリー又はオレンジ香

10

20

30

40

50

料等の香料を含有していてもよい。当然ながら、任意の単位投薬形態の調製に使用される全ての物質は、薬学的に許容され、使用する量において実質的に無毒でなければならない。さらに、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、徐放調製物及び装置中に封入されていてもよい。

【0386】

経口投与のための調製物及び製剤にはまた、本発明の構築物が胃内環境に耐性を有しかつ腸内に入ることを可能にする腸溶コーティングが付与される。より包括的には、経口投与のための調製物及び製剤は、消化管のいずれかの所望部分に送達するのに好適に製剤化され得る。また、好適な坐剤を消化管への送達に使用してもよい。

【0387】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドはまた、点滴又は注射によって静脈内投与又は腹腔内投与してもよい。本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの溶液、又はそれらの塩は、水中で調製することができ、任意で無毒性界面活性剤と混合することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びそれらの混合物中、並びに油中で調製することができる。通常の保存及び使用条件下において、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐための保存料を含有している。

【0388】

注射又は点滴に好適な薬剤投薬形態としては、滅菌注射又は滅菌点滴可能な溶液又は分散液の即時調製に適合し、場合によってはリポソームに封入された活性成分を含む、滅菌の水溶液若しくは分散液又は滅菌粉末が挙げられ得る。全ての場合において、最終的な投薬形態は、滅菌されており、流体であり、製造及び保存条件下で安定でなければならない。液体の担体又はビヒクルは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及びこれらの好適な混合物を含む溶媒又は液体の分散媒であってもよい。例えばリポソームの形成により、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持することにより、又は界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等の種々の抗菌剤及び抗真菌剤により微生物の作用を妨害することができる。多くの場合において、等張剤、例えば糖類、緩衝剤、又は塩化ナトリウムを含んでいることが好ましい。組成物において、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを使用することにより、注射可能な組成物の長時間にわたる吸収をもたらすことができる。

【0389】

滅菌注射可能な溶液は、所望の量の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを、上記に列挙した種々の他の成分を含む適切な溶媒中に組み込んだ後、必要に応じて、滅菌濾過することにより調製される。滅菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、減圧乾燥法及び凍結乾燥法であり、活性成分の粉末、及び予め滅菌濾過された溶液中に存在する任意のさらなる望ましい成分が得られる。

【0390】

局所投与のためには、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドが液体の場合には、純粋な形態で適用することができる。しかし、一般に、それらは、固体であっても液体であってもよい皮膚科学的に許容される担体と共に、組成物又は製剤として皮膚に投与されることが望ましい。

【0391】

有用な固体担体としては、タルク、粘土、微結晶セルロース、シリカ、アルミナ等の微粉碎された固体が挙げられる。有用な液体担体としては、水、ヒドロキシアルキル若しくはグリコール又は水-アルコール/グリコール混合物が挙げられ、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドは、場合によっては非毒性の界面活性剤の作用により、有効な濃度で溶解又は分散することができる。所定用途のための性質を最適化するために、芳香剤及びさらなる抗菌剤等のアジュバントを加えてもよい。得られる液体組成物は、絆創膏及び他の包帯に薬剤を含浸させるのに用いられる吸収パッドによって適用することが

10

20

30

40

50

でき、又はポンプ型若しくはエアロゾルスプレーを使用して患部の上に噴霧することができる。

【0392】

使用者の皮膚に直接塗布するための塗布用ペースト、ゲル、軟膏及び石鹸等を形成するために、合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩及びエステル、脂肪アルコール、修飾セルロース又は修飾無機物質等の増粘剤を液体担体と共に使用することができる。

【0393】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドを皮膚に送達するために使用することができる有用な皮膚科用組成物の例は当該技術分野で既知であり、例えばJacquet et al. (米国特許第4,608,392号)、Geria (米国特許第4,992,478号)、Smith et al. (米国特許第4,559,157号)及びWortzman (米国特許第4,820,508号)を参照されたい。

10

【0394】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの有用な投与量は、それらの *in vitro* 活性、及び動物モデルにおける *in vivo* 活性を比較することにより決定することができる。マウス及び他の動物における有効投与量をヒトに外挿するための方法は当該技術分野で既知であり、例えば米国特許第4,938,949号を参照されたい。

【0395】

概して、ローション等の液体組成物中の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの濃度は、約0.1重量%~25重量%、好ましくは、約0.5重量%~10重量%である。ゲル又は粉末等の半固形又は固形組成物中の濃度は、約0.1重量%~5重量%、好ましくは約0.5重量%~2.5重量%である。

20

【0396】

治療における使用に必要な本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの量は、選択される特定のアミノ酸配列、ナノボディ又はポリペプチドだけでなく、投与経路、治療する症状の性質、並びに患者の年齢及び状態によっても変動し、最終的には担当する医師又は臨床医の判断に委ねられる。また、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ及びポリペプチドの投与量は、標的となる細胞、腫瘍、組織、移植片又は器官によっても変動する。

30

【0397】

望ましい用量は便宜上、単回用量で、又は例えば1日2回、3回、4回以上の部分用量として、適切な間隔での分割用量で示され得る。部分用量自体を、例えば吸入器からの複数回の吸入又は複数滴の点眼投与のように個別で、大まかな間隔の数多くの投与にさらに分割してもよい。投与計画には、長期間の1日処置が含まれ得る。「長期間」とは、少なくとも2週間、好ましくは数週間、数ヶ月、又は数年の期間を意味する。この投与量範囲における必要な改変は、本明細書中で教示される日常実験のみを使用して当業者によって決定され得る。Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E. W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PAを参照されたい。投与量は、何らかの合併症が発症した場合には、個々の医師が調整することもできる。

40

【0398】

別の態様において、本発明は、少なくとも1つのIL-6Rに関連する疾患及び/又は障害を予防及び/又は治療する方法であって、それが必要な被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0399】

本発明の内容において、「予防及び/又は治療」という用語とは、疾患を予防及び/又は治療することを含むだけでなく、概して、疾患の発症を予防すること、疾患の進行を遅延又は退行させること、疾患に関連する1つ又は複数の症状の発症を予防又は遅延させる

50

こと、疾患に関連する1つ又は複数の症状を低減及び/又は軽減すること、疾患及び/又はそれに関連するあらゆる症状の重症度及び/又は期間を低減すること、及び/又は疾患及び/又はそれに関連するあらゆる症状の重症度のさらなる増大を予防すること、疾患によって生じるあらゆる生理学的損傷を予防、低減又は退行させること、及び概して治療対象の患者に有益なあらゆる薬理作用も含む。

【0400】

治療対象の被験体とは、任意の温血動物であり得るが、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒトである。当業者にとって明らかであるように、治療対象の被験体は、特に本明細書中に言及される疾患及び障害を患っているか又はそれらの危険性のあるヒトであり得る。

10

【0401】

本発明は、IL-6に、IL-6Rに及び/又はIL-6/IL-6R複合体に、その生物活性若しくは薬理活性に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する生物学的経路若しくはシグナル伝達に関連がある少なくとも1つの疾患及び/又は障害を予防及び/又は治療する方法であって、それが必要な被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。特に、本発明は、IL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体、その生物活性若しくは薬理活性、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する生物学的経路若しくはシグナル伝達を調節することによって予防及び/又は治療することができる少なくとも1つの疾患及び/又は障害を予防及び/又は治療する方法であって、それが必要な被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、ポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。特に、上記の薬学的に活性のある量とは、IL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体、その生物活性若しくは薬理活性、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する生物学的経路又はシグナル伝達を調節するのに十分な量である。

20

【0402】

本発明は、本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ又は本発明のポリペプチドを患者に投与することによって予防及び/又は治療することができる少なくとも1つの疾患及び/又は障害を予防及び/又は治療する方法であって、それが必要な被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法にも関する。

30

【0403】

より具体的には、本発明は、本明細書中に列挙される疾患及び障害からなる群から選択される少なくとも1つの疾患及び/又は障害を予防及び/又は治療する方法であって、それが必要な被験体に薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。

40

【0404】

特に本発明は、敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、カポジ肉腫、AIDS関連リンパ腫及び炎症性疾患を予防及び/又は治療する方法であって、薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。様々な形態のがんは、多発性骨髄腫疾患(MM)、腎細胞癌(RCC)、形質細胞性白血病、リンパ腫、Bリンパ増殖性障害(BLPD)及び前立腺がんからなる群から選択され得る。炎症性疾患は、関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス(

50

SLE)、多発性硬化症、キャッスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息、アレルギー性喘息及び自己免疫インスリン依存性糖尿病からなる群から選択され得る。

【0405】

別の特定の態様において、本発明は、敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサングウム増殖性糸球体腎炎、カポジ肉腫、AIDS関連リンパ腫及び炎症性疾患を予防及び/又は治療する方法であって、薬学的に活性のある量の配列番号70、及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。別の特定の態様では、本発明は、敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサングウム増殖性糸球体腎炎、カポジ肉腫、AIDS関連リンパ腫及び炎症性疾患を予防及び/又は治療する方法であって、薬学的に活性のある量の配列番号71、及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。様々な形態のがんは、多発性骨髄腫疾患(MM)、腎細胞癌(RCC)、形質細胞性白血病、リンパ腫、Bリンパ増殖性障害(BLPD)及び前立腺がんからなる群から選択され得る。炎症性疾患は、関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、キャッスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息、アレルギー性喘息及び自己免疫インスリン依存性糖尿病からなる群から選択され得る。

10

【0406】

別の態様では、本発明は、免疫療法、特に受動免疫療法に関する方法であって、本明細書中に記載の疾患及び障害を患っているか又はそれらの危険性のある被験体に、薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、本発明の化合物、本発明の構築物及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、方法に関する。

20

【0407】

上記の方法において、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び/又は構築物、及び/又はこれを含む組成物は、使用される特定の薬学的製剤又は薬学的組成物に応じて任意の好適な方法で投与することができる。したがって、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び/又は構築物、及び/又はこれを含む組成物は、例えばこの場合にも使用される特定の薬学的製剤又は薬学的組成物に応じて経口的、腹腔内(例えば静脈内、皮下、筋内、又は消化管を回避した任意の他の投与経路を介して)、鼻腔内、経皮、局所的に、坐剤を用いて、吸入によって投与することができる。臨床医は、予防又は治療すべき疾患及び/又は障害、及び臨床医に既知の他の因子に応じて、好適な投与経路、及びこのような投与に使用される好適な薬学的製剤又は薬学的組成物を選択することができるであろう。

30

【0408】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び/又は構築物及び/又はこれを含む組成物は、予防又は治療対象の疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療に好適な治療計画に従って投与される。臨床医は一般的に、予防又は治療対象の疾患又は障害、治療対象の疾患の重症度及び/又はその症状の重症度、使用される本発明の特定の

40

【0409】

概して、治療計画には、1つ又は複数の薬学的に活性のある量又は用量における1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び/又は構築物、又はこれを含む1つ又は複数の組成物の投与が含まれるであろう。投与される具体的な量(複数可)又は用量はこの場合でも上記の因子に基づき臨床医によって決定することができる。

【0410】

50

概して、本明細書中に言及された疾患及び障害の予防及び／又は治療に関して、また治療対象の特定の疾患又は障害、使用される本発明の特定のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び構築物の効力、特定の投与経路、及び使用される特定の薬学的製剤又は薬学的組成物に応じて、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び構築物は概して、 $1\text{ g} / \text{kg}$  (体重) / 日  $\sim 0.01\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) / 日、好ましくは、 $0.1\text{ g} / \text{kg}$  (体重) / 日  $\sim 0.1\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) / 日、例えば約  $1\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) / 日、 $10\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) / 日、 $100\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) / 日又は  $1000\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$  (体重) / 日の量で、連続して(例えば点滴によって)、日々の単回用量として、又は1日の中の複数回の分割用量として投与されるであろう。臨床医は一般的に、本明細書中で言及される因子に応じて好適な日用量を決定することができるであろう。特定の場合には、例えば上記の因子及び臨床医の専門的判断に基づきこれらの量から外れるように臨床医が選択することもあることが明らかであろう。一般的に、親和性/結合活性、有効性、体内分布、半減期及び当業者に既知の同様の因子の差異は考慮するものの、本質的に同様の経路を介して投与される、同様の標的に対する比較可能な従来の抗体又は抗体断片に関して通常投与される量から、投与量に関する指針を幾らか得ることができる。

10

#### 【0411】

通常上記の方法では、本発明の単一のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物を使用するであろう。しかしながら、2つ以上の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び／又は構築物を組み合わせて使用することも本発明の範囲内である。

20

#### 【0412】

本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び構築物は、1つ又は複数のさらなる薬学的に活性のある化合物又は成分と組み合わせて、すなわち複合治療計画(相乗効果をもたらすことも又はもたらさないこともある)として使用することもできる。この場合でも、臨床医は、上記の因子及び臨床医の専門的判断に基づき、このようなさらなる化合物又は成分、並びに好適な複合治療計画を選択することができるであろう。

#### 【0413】

特に、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物及び構築物は、本明細書中に記載の疾患及び障害の予防及び／又は治療に用いられるか又は用いることができる他の薬学的に活性のある化合物又は成分と組み合わせて使用してもよく、その結果、相乗効果が得られることも又は得られないこともある。このような化合物及び成分、並びにそれらを投与するための経路、方法及び薬学的製剤又は薬学的組成物は臨床医にとって明らかであろう。

30

#### 【0414】

2つ以上の物質又は成分を複合治療計画の一環として使用する場合、それらは、同様の投与経路を介して又は種々の投与経路を介して、本質的に同じ時点で又は種々の時点で(例えば本質的に同時に、連続して、又は交互に)投与することができる。物質又は成分を、同様の投与経路を介して同時に投与しようとする場合、当業者にとって明らかであるような、種々の薬学的製剤又は薬学的組成物、又は併せた薬学的製剤又は薬学的組成物の一部として投与してもよい。

40

#### 【0415】

また、2つ以上の活性物質又は活性成分を複合治療計画の一環として使用しようとする場合、化合物又は成分を単独で使用する場合に用いられるものと同様の量で、また同様の計画に従って、物質又は成分の各々を投与してもよく、このような併用によって、相乗効果をもたらされることも又はもたらされないこともある。しかしながら、2つ以上の活性物質又は活性成分の併用によって相乗効果をもたらされる場合には、所望の治療作用を達成しつつも、投与される物質又は成分の1つ、複数又は全ての量を低減することができる可能性がある。これは、例えば所望の薬学的効果又は治療効果を依然として得ながら、一般的な量で使用される場合の物質又は成分の1つ又は複数の使用に関連するあらゆる望ま

50

しくない副作用を回避、制限又は低減するのに有用であり得る。

【0416】

本発明に従って使用される治療計画の有効性は、臨床医にとって明らかであるように、関与する疾患及び/又は障害についてそれ自体が既知の任意の方法で決定及び/又は追跡され得る。臨床医はまた、必要に応じて及びケースバイケースで、特定の治療計画を変更又は改変し、それにより、所望の治療効果を達成し、望ましくない副作用を回避、制限又は低減し、及び/又は一方で所望の治療効果を達成することと、他方で望ましくない副作用を回避、制限又は低減することとの適切な均衡を達成することができる。

【0417】

概して、所望の治療効果が達成されるまで、及び/又は所望の治療効果が維持されている限り、治療計画は続けられる。また、これは臨床医が決定することができるものである。

10

【0418】

別の態様において、本発明は、少なくとも1つのIL-6R関連障害を予防及び/又は治療するための薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は(一価)構築物の使用に関する。

【0419】

本発明は、IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する、シグナル伝達経路及び/又は生物学的機能及び応答に関連がある疾患及び障害のうちの少なくとも1つを

20

【0420】

予防及び/又は治療するための、及び/又は本明細書に記載される1つ又は複数の方法において使用するための薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は(一価)構築物の使用にも関する。

30

【0421】

本発明は、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物を患者に投与することにより予防及び/又は治療することができる少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び/又は治療するための薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物の使用にも関する。

【0422】

より具体的には、本発明は、IL-6R関連障害を予防及び/又は治療するため、特に敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、カボジ肉腫、AIDS関連リンパ腫及び炎症性疾患を予防及び治療するための薬学的組成物の調製における本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物の使用であって、上記方法が薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、使用にも関する。様々な形態のがんは、多発性骨髄腫疾患(MM)、腎細胞癌(RCC)、形質細胞性白血病、リンパ腫、Bリンパ増殖性障害(BLPD)及び前立腺がんからなる群から選択され得る。炎症性疾患は、関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、キャッスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息、アレルギー性喘息及び自己免疫インスリン依存性糖尿病からなる群から選択され得る。

40

【0423】

50

本発明はさらに、少なくとも1つのIL-6R関連疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療に使用するための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくは構築物、ポリペプチド、一価構築物、又はこれを含む薬学的組成物に関する。

【0424】

本発明はさらに、IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に、その生物学的若しくは薬理的な活性に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する生物学的経路若しくはシグナル伝達に関連する少なくとも1つの疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療に使用するための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくは構築物、ポリペプチド、一価構築物、又はこれを含む薬学的組成物に関する。

10

【0425】

本発明はさらに、IL-6、IL-6R、IL-6/IL-6R複合体、その生物学的若しくは薬理的な活性、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する生物学的経路若しくはシグナル伝達を調節することにより予防及び/又は治療することができる少なくとも1つの疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療に使用するための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくは構築物、ポリペプチド、一価構築物、又はこれを含む薬学的組成物に関する。

【0426】

本発明はさらに、本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ又は本発明のポリペプチドを患者に投与することにより予防及び/又は治療することができる少なくとも1つの疾患及び/又は障害の予防及び/又は治療に使用するための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくは構築物、ポリペプチド、一価構築物、又はこれを含む薬学的組成物に関する。

20

【0427】

本発明はさらに、敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサングウム増殖性糸球体腎炎、カボジ肉腫、AIDS関連リンパ腫及び炎症性疾患の予防及び/又は治療に使用するための本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくは構築物、ポリペプチド、一価構築物、又はこれを含む薬学的組成物であって、上記方法が薬学的に活性のある量の本発明のアミノ酸配列、本発明のナノボディ、本発明のポリペプチド、及び/又はこれを含む薬学的組成物を投与することを含む、本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、化合物若しくは構築物、ポリペプチド、一価構築物、又はこれを含む薬学的組成物に関する。様々な形態のがんは、多発性骨髄腫疾患(MM)、腎細胞癌(RCC)、形質細胞性白血病、リンパ腫、Bリンパ増殖性障害(BLPD)及び前立腺がんからなる群から選択され得る。炎症性疾患は、関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、キャスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息、アレルギー性喘息及び自己免疫インスリン依存性糖尿病からなる群から選択され得る。

30

【0428】

治療対象の被験体とは、任意の温血動物であり得るが、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒトである。当業者にとって明らかであるように、治療対象の被験体は、特に本明細書中に言及される疾患及び障害を患っているか又はそれらの危険性のあるヒトであり得る。

40

【0429】

同様にこのような薬学的組成物において、1つ又は複数の本発明のアミノ酸配列、ナノボディ、ポリペプチド、化合物又は構築物を1つ又は複数の他の活性成分、例えば本明細書で言及されるものと好適に組み合わせることもできる。

【0430】

本発明は以下の実施例でさらに説明されるが、さらなる限定とは決して解釈されないものとする。本願全体で引用された全ての引例(参考文献、交付済み特許、公開特許出願、及び同時係属特許出願を含む)の内容全体が参照により特に上記で言及された教示に関し

50

て明示的に援用される。

【 0 4 3 1 】

態様

態様 1 . I L - 6 R に指向性を有するアミノ酸配列であって、

a ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、若しくは

b ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ア

10

c ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、若しくは

d ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ア

e ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5、若しくは

f ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1 つ又は 2 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ア

20

ミノ酸残基ストレッチ、及び / 又は

から選択されるアミノ酸残基ストレッチを 1 つ又は複数含む、アミノ酸配列。

態様 2 . ( i ) 第 1 のアミノ酸残基ストレッチが a ) 若しくは b ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応する場合、第 2 のアミノ酸残基ストレッチは、c )、d )、e ) 若しくは f ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応し、( i i ) 第 1 のアミノ酸残基ストレッチが c ) 若しくは d ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応する場合、第 2 のア

30

ミノ酸残基ストレッチは、a )、b )、e ) 若しくは f ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応し、又は ( i i i ) 第 1 のアミノ酸残基ストレッチが e ) 若しくは f ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応する場合、第 2 のアミノ酸残基ストレッチは、a )、b )、c ) 若しくは d ) によるアミノ酸配列のうちの 1 つに対応するように、

a ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2、若しくは

b ) 配列番号 8 0 ~ 配列番号 8 2 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ア

40

c ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1、若しくは

d ) 配列番号 8 4 ~ 配列番号 9 1 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で I L - 6 R と結合するものとする、ア

e ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5、若しくは

f ) 配列番号 9 3 ~ 配列番号 9 5 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つの

50

アミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1つ又は2つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

から選択されるアミノ酸残基ストレッチを2つ以上含む、態様1に記載のアミノ酸配列。

態様3. 第1のアミノ酸残基ストレッチが

a) 配列番号80～配列番号82、又は

b) 配列番号80～配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

10

からなる群から選択され、

第2のアミノ酸残基ストレッチが

c) 配列番号84～配列番号91、又は

d) 配列番号84～配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

20

からなる群から選択され、かつ

第3のアミノ酸残基ストレッチが

e) 配列番号93～配列番号95、又は

f) 配列番号93～配列番号95のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1つ又は2つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

30

からなる群から選択される、アミノ酸残基ストレッチを3つ以上含む、態様1又は2に記載のアミノ酸配列。

態様4. 免疫グロブリンフォールドを含むか、又は好適な条件下で免疫グロブリンフォールドを形成することが可能である、態様1～3のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様5. 免疫グロブリン配列である、態様1～4のいずれか一つに記載のアミノ酸配列

。

態様6. 4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR1～FR4）と、3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR1～CDR3）とから本質的になり、ここでCDR1が、

40

a) 配列番号80～配列番号82、又は

b) 配列番号80～配列番号82のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、及び/又は

CDR2が、

c) 配列番号84～配列番号91、又は

50

d) 配列番号 84 ~ 配列番号 91 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、及び / 又は

CDR 3 が、

e) 配列番号 93 ~ 配列番号 95、又は

f) 配列番号 93 ~ 配列番号 95 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1 つ又は 2 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される、態様 1 ~ 5 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 7 . 4 つのフレームワーク領域（それぞれ、FR 1 ~ FR 4）と、3 つの相補性決定領域（それぞれ、CDR 1 ~ CDR 3）とから本質的になり、ここで CDR 1 が、

a) 配列番号 80 ~ 配列番号 82、又は

b) 配列番号 80 ~ 配列番号 82 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、かつ

CDR 2 が、

c) 配列番号 84 ~ 配列番号 91、又は

d) 配列番号 84 ~ 配列番号 91 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択され、かつ

CDR 3 が、

e) 配列番号 93 ~ 配列番号 95、又は

f) 配列番号 93 ~ 配列番号 95 のうちの 1 つとわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1 つ又は 2 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）で IL - 6 R と結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチ

からなる群から選択される、態様 6 に記載のアミノ酸配列。

態様 8 . 少なくとも、

a) 配列番号 80、又は

b) 配列番号 80 とわずか 2 つ、好ましくはわずか 1 つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定される

10

20

30

40

50

ようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む、態様1~7のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様9. 少なくとも、

a) 配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91、又は

b) 配列番号84、配列番号89若しくは配列番号91のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1つ又は2つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチから選択されるアミノ酸残基ストレッチを含む、態様1~8のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

10

態様10. 少なくとも、

a) 配列番号84、又は

b) 配列番号84とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む、態様1~9のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

20

態様11. 少なくとも、

a) 配列番号93~配列番号94、又は

b) 配列番号93~配列番号94のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、1つ又は2つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチから選択されるアミノ酸残基ストレッチを含む、態様1~10のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

30

態様12. 少なくとも、

a) 配列番号93、又は

b) 配列番号93とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸残基ストレッチであって、上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列は、2つ又は1つのアミノ酸差異を有しない上記アミノ酸残基ストレッチを含むアミノ酸配列と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性(上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである)でIL-6Rと結合するものとする、アミノ酸残基ストレッチを含む、態様1~11のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様13.

a) 配列番号80及び配列番号84、

b) 配列番号80及び配列番号93、又は

c) 配列番号84及び配列番号93

から選択されるアミノ酸残基ストレッチを少なくとも2つ含む、態様1~12のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

40

態様14. 配列番号80、配列番号84及び配列番号93を含む、態様1~13のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様15. 従来の4鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列から本質的になるか、又は重鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、態様1~14のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様16. ドメイン抗体(又はドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列)、単

50

ードメイン抗体（又は単ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、「dAb」（又はdAbとしての使用に好適なアミノ酸配列）又はナノボディから本質的になる、態様1～15のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様17.

a) 配列番号60～配列番号69、

b) そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69のうちの1つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列、

c) 配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、配列番号60～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号60～配列番号69のうちの1つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列

からなる群から選択される、態様1～16のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様18.

a) 配列番号65～配列番号69、

b) そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号65～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号65～配列番号69のうちの1つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列、

c) 配列番号65～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、配列番号65～配列番号69のうちの1つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号65～配列番号69のうちの1つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列

からなる群から選択される、態様17に記載のアミノ酸配列。

態様19.

a) 配列番号66、

b) そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいて配列番号66とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、そのCDRの1つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号66による結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列、

c) 配列番号66とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有する配列であって、配列番号66とわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号66による結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、配列

からなる群から選択される、態様18に記載のアミノ酸配列。

態様20. 1 nM～1 pM（モル/L）以下、好ましくは500 pM～1 pM（モル/L）以下、より好ましくは100 pM～1 pM（モル/L）以下、又はさらにより好ましくは約50 pM～1 pM以下の解離定数（ $K_D$ ）でhIL-6Rと特異的に結合する、態様1～19のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

態様 21 . 1 nM ~ 1 pM 以下、好ましくは 500 pM ~ 1 pM 以下、より好ましくは 100 pM ~ 1 pM 以下、又はさらにより好ましくは約 50 pM ~ 1 pM 以下の解離定数 ( $K_D$ ) でカニクイザル IL-6R と特異的に結合する、態様 1 ~ 20 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 22 .  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度で hIL-6R と特異的に結合する、態様 1 ~ 21 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 23 .  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  以上の  $k_{on}$  速度でカニクイザル IL-6R と特異的に結合する、態様 1 ~ 22 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

10

態様 24 .  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ) ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度で hIL-6R と特異的に結合する、態様 1 ~ 23 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 25 .  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ ) ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ~  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度でカニクイザル IL-6R と特異的に結合する、態様 1 ~ 24 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

20

態様 26 . TF-1 アッセイにおいて 10 nM ~ 50 pM、好ましくは 5 nM ~ 50 pM、より好ましくは 1 nM ~ 50 pM 以下、例えば約 750 pM 又は 500 pM 以下の IC50 値 (100 IU/mL の IL-6 で) を有する、態様 1 ~ 25 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 27 . TF-1 アッセイにおいて 50 nM ~ 1 nM、好ましくは 25 nM ~ 1 nM、より好ましくは 10 nM ~ 1 nM 以下、例えば約 8 nM 以下の IC50 (5000 IU/mL の IL-6 で) を有する、態様 1 ~ 26 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 28 . TF-1 アッセイにおいて配列番号 1 及び配列番号 2 に規定のような参照 IgG 又は配列番号 3 及び配列番号 4 に規定のような参照 Fab に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有する、態様 1 ~ 27 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

30

態様 29 . TF-1 アッセイにおいてトシリズマブ (MRA) に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有する、態様 1 ~ 28 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 30 . IL-6 の EC50 値での血漿効力アッセイにおいて 500 pM ~ 50 pM、好ましくは 250 pM ~ 50 pM、より好ましくは 200 pM ~ 50 pM 以下、例えば 150 pM 以下の IC50 値を有する、態様 1 ~ 29 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

40

態様 31 . IL-6 の EC95 値での血漿効力アッセイにおいて 1000 pM ~ 100 pM、好ましくは 750 pM ~ 100 pM、より好ましくは 500 pM ~ 100 pM 以下、例えば 400 pM 以下の IC50 値を有する、態様 1 ~ 30 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 32 . 態様 30 又は 31 の血漿効力アッセイにおいて配列番号 1 及び配列番号 2 に規定のような参照 IgG 又は配列番号 3 及び配列番号 4 に規定のような参照 Fab に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有する、態様 1 ~ 31 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

50

態様 33 . 態様 30 又は 31 の血漿効力アッセイにおいてトシリズマブ (MRA) に関して得られた IC50 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも 2 倍、好ましくは 3 倍、より好ましくは 4 倍、さらにより好ましくは 5 倍、7 倍又は 7 倍超良好な IC50 値を有する、態様 1 ~ 32 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 34 . CHO 細胞上での膜 IL-6R との結合に関して 10 nM ~ 100 pM、好ましくは 5 nM ~ 100 pM、より好ましくは 2 nM ~ 10 pM 以下、例えば 2 nM 以下の IC50 値を有する、態様 1 ~ 33 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列。

態様 35 . 化合物又は構築物であって、1つ又は複数の態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列を含むか、又はこれから本質的になり、任意で 1つ又は複数のリンカーを介して連結した、1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位を任意でさらに含む、化合物又は構築物。

10

態様 36 . 上記 1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単一ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAb としての使用に好適なアミノ酸配列又はナノボディからなる群から選択される、態様 35 に記載の化合物又は構築物。

態様 37 . 多価構築物、例えば二価又は三価の構築物である、態様 35 又は 36 に記載の化合物又は構築物。

態様 38 . 多重特異性構築物、例えば二重特異性又は三重特異性の構築物である、態様 35 ~ 37 のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様 39 . 態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載の対応するアミノ酸配列自体と比較して増大した半減期を有する、態様 35 ~ 38 のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

20

態様 40 . 上記 1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、態様 1 ~ 20 のいずれか一つに記載の対応するアミノ酸配列と比較して増大した半減期を有する化合物又は構築物を提供する、態様 39 に記載の化合物又は構築物。

態様 41 . 増大した半減期を有する化合物又は構築物を提供する上記 1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、血清タンパク質又はその断片、血清タンパク質と結合することができる結合単位、Fc 部分、及び血清タンパク質と結合することができる小タンパク質又は小ペプチドからなる群から選択される、態様 39 に記載の化合物又は構築物。

態様 42 . 増大した半減期を有する化合物又は構築物を提供する上記 1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、ヒト血清アルブミン又はその断片からなる群から選択される、態様 39 に記載の化合物又は構築物。

30

態様 43 . 増大した半減期を有する化合物又は構築物を提供する上記 1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、血清アルブミン (例えばヒト血清アルブミン) 又は血清免疫グロブリン (例えば IgG) と結合することができる結合単位からなる群から選択される、態様 39 に記載の化合物又は構築物。

態様 44 . 増大した半減期を有する化合物又は構築物を提供する上記 1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、単一ドメイン抗体、単一ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列、「dAb」、dAb としての使用に好適なアミノ酸配列、又は血清アルブミン (例えばヒト血清アルブミン) 若しくは血清免疫グロブリン (例えば IgG) と結合することができるナノボディからなる群から選択される、態様 39 に記載の化合物又は構築物。

40

態様 45 . 増大した半減期を有する化合物又は構築物を提供する上記 1つ又は複数の他の結合単位が、配列番号 97 ~ 配列番号 99 から選択される、態様 39 に記載の化合物又は構築物。

態様 46 . 以下のポリペプチド配列 :

a) 配列番号 70 ~ 配列番号 72、

b) 本発明のその CDR の 1つ、2つ又は全てにおいて配列番号 70 ~ 配列番号 72 のうちの 1つとわずか 2つ、好ましくはわずか 1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、本発明のその CDR の 1つ、2つ又は全てにおいてわずか 2つ、好ましくは

50

わずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号70～配列番号72のうちの一つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列、

c) 配列番号70～配列番号72のうちの一つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、配列番号70～配列番号72のうちの一つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号70～配列番号72のうちの一つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列

10

から選択される、態様35～45のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様47. 以下のポリペプチド配列：

a) 配列番号70～配列番号71、

b) 本発明のそのCDRの一つ、2つ又は全てにおいて配列番号70～配列番号71のうちの一つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、本発明のそのCDRの一つ、2つ又は全てにおいてわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列は、配列番号70～配列番号71のうちの一つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列、

20

c) 配列番号70～配列番号71のうちの一つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するポリペプチド配列であって、配列番号70～配列番号71のうちの一つとわずか2つ、好ましくはわずか1つのアミノ酸差異を有するアミノ酸配列は、配列番号70～配列番号71のうちの一つによる結合と比較してほぼ同じ、又はより高い親和性（上記親和性は表面プラズモン共鳴により測定されるようなものである）でIL-6Rと結合するものとする、ポリペプチド配列

から選択される、態様35～46のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様48. 配列番号70のアミノ酸配列を有するか、又はこれから本質的になる、態様35～47のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様49. 配列番号71のアミノ酸配列を有するか、又はこれから本質的になる、態様35～47のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

30

態様50.  $1\text{ nM} \sim 1\text{ pM}$  (モル/L) 以下、好ましくは $500\text{ pM} \sim 1\text{ pM}$  (モル/L) 以下、より好ましくは $100\text{ pM} \sim 1\text{ pM}$  (モル/L) 以下、又はさらにより好ましくは約 $50\text{ pM} \sim 1\text{ pM}$  以下の解離定数 ( $K_D$ ) でhIL-6Rと特異的に結合する、態様35～49のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様51.  $1\text{ nM} \sim 1\text{ pM}$  以下、好ましくは $500\text{ pM} \sim 1\text{ pM}$  以下、より好ましくは $100\text{ pM} \sim 1\text{ pM}$  以下、又はさらにより好ましくは約 $50\text{ pM} \sim 1\text{ pM}$  以下の解離定数 ( $K_D$ ) でカニクイザルIL-6Rと特異的に結合する、態様35～50のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様52.  $10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1} \sim \text{約}10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1} \sim 10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$  以上の $k_{on}$ 速度でhIL-6Rと特異的に結合する、態様35～51のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

40

態様53.  $10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1} \sim \text{約}10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1} \sim 10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$  以上の $k_{on}$ 速度でカニクイザルIL-6Rと特異的に結合する、態様35～52のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様54.  $10^{-3}\text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69\text{ s}$ )  $\sim 10^{-6}\text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは $10^{-4}\text{ s}^{-1} \sim 10^{-6}\text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5}\text{ s}^{-1} \sim 10^{-6}\text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $10^{-5}\text{ s}^{-1}$  以下の $k_{off}$

50

速度でh I L - 6 Rと特異的に結合する、態様35～53のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様55.  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$ )  $\sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは  $10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは  $10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下の  $k_{off}$  速度でカニクイザル I L - 6 R と特異的に結合する、態様35～54のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様56. T F - 1 アッセイにおいて  $10 \text{ nM} \sim 50 \text{ pM}$ 、好ましくは  $5 \text{ nM} \sim 50 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $1 \text{ nM} \sim 50 \text{ pM}$  以下、例えば約  $750 \text{ pM}$  又は  $500 \text{ pM}$  以下の I C 5 0 値 ( $100 \text{ IU/mL}$  の I L - 6 で) を有する、態様35～55のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

10

態様57. T F - 1 アッセイにおいて  $50 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$ 、好ましくは  $25 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$ 、より好ましくは  $10 \text{ nM} \sim 1 \text{ nM}$  以下、例えば約  $8 \text{ nM}$  以下の I C 5 0 ( $5000 \text{ IU/mL}$  の I L - 6 で) を有する、態様35～56のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様58. T F - 1 アッセイにおいて配列番号1及び配列番号2に規定のような参照 I g G 又は配列番号3及び配列番号4に規定のような参照 F a b に関して得られた I C 5 0 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好な I C 5 0 値を有する、態様35～57のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

20

態様59. T F - 1 アッセイにおいてトシリズマブ ( M R A ) に関して得られた I C 5 0 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好な I C 5 0 値を有する、態様35～58のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様60. I L - 6 の E C 5 0 値での血漿効力アッセイにおいて  $500 \text{ pM} \sim 50 \text{ pM}$ 、好ましくは  $250 \text{ pM} \sim 50 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $200 \text{ pM} \sim 50 \text{ pM}$  以下、例えば  $150 \text{ pM}$  以下の I C 5 0 値を有する、態様35～59のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様61. I L - 6 の E C 9 5 値での血漿効力アッセイにおいて  $1000 \text{ pM} \sim 100 \text{ pM}$ 、好ましくは  $750 \text{ pM} \sim 100 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $500 \text{ pM} \sim 100 \text{ pM}$  以下、例えば  $400 \text{ pM}$  以下の I C 5 0 値を有する、態様35～60のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

30

態様62. 態様60又は61の血漿効力アッセイにおいて配列番号1及び配列番号2に規定のような参照 I g G 又は配列番号3及び配列番号4に規定のような参照 F a b に関して得られた I C 5 0 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好な I C 5 0 値を有する、態様35～61のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様63. 態様60又は61の血漿効力アッセイにおいてトシリズマブ ( M R A ) に関して得られた I C 5 0 値と比較して少なくとも同じ、好ましくはより良好な、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは4倍、さらにより好ましくは5倍、7倍又は7倍超良好な I C 5 0 値を有する、態様35～62のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

40

態様64. C H O 細胞上での膜 I L - 6 R との結合に関して  $10 \text{ nM} \sim 100 \text{ pM}$ 、好ましくは  $5 \text{ nM} \sim 100 \text{ pM}$ 、より好ましくは  $2 \text{ nM} \sim 10 \text{ pM}$  以下、例えば  $2 \text{ nM}$  以下の I C 5 0 値を有する、態様35～63のいずれか一つに記載の化合物又は構築物。

態様65. 一つの態様1～34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列を含むか、又はこれから本質的になる一価構築物。

態様66. 態様37～64のいずれか一つに記載の多価の化合物又は構築物の調製における態様1～34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列又は態様65に記載の一価構築物の使用。

50

態様 67 . 態様 37 ~ 64 のいずれか一つに記載の多価の化合物又は構築物を調製する方法であって、態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列又は態様 65 に記載の一価構築物と、1つ又は複数の基、残基、部分又は結合単位とを連結することを含む、方法。

態様 68 . 1つ又は複数のリンカーを介して、態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列又は態様 65 に記載の一価構築物と、他の基、残基、部分又は結合単位とを連結することを含む、態様 67 に記載の、態様 37 ~ 64 のいずれか一つに記載の多価の化合物又は構築物を調製する方法。

態様 69 . 態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物をコードする核酸又はヌクレオチド配列。

10

態様 70 . 遺伝子構築物の形態である、態様 69 に記載の核酸又はヌクレオチド配列。

態様 71 . 態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物を発現し、又は好適な環境下で発現することができ、及び/又は態様 69 に記載の核酸若しくはヌクレオチド配列又は態様 70 に記載の遺伝子構築物を含む、宿主又は宿主細胞。

態様 72 . 態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物を産生する方法であって、

20

a) 好適な宿主細胞若しくは宿主生物において又は別の好適な発現系において、態様 69 に記載の核酸若しくはヌクレオチド配列又は態様 70 に記載の遺伝子構築物を発現する工程、任意でその後

b) このようにして得られた、態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物を単離及び/又は精製する工程を少なくとも含む、方法。

30

態様 73 . 態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物を産生する方法であって、

a) 態様 71 に記載の宿主又は宿主細胞が、少なくとも1つの態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物を発現及び/又は産生するような条件下で、上記宿主又は宿主細胞を培養及び/又は維持する工程、任意でその後

b) このようにして得られた、態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、これをコードする核酸若しくはヌクレオチド配列の発現により得ることができるような態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 65 に記載の一価構築物を単離及び/又は精製する工程を少なくとも含む、方法。

40

態様 74 . 少なくとも1つの態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、態様 65 に記載の一価構築物、又は態様 69 若しくは 70 に記載の核酸若しくはヌクレオチド配列を含む、組成物。

態様 75 . 薬学的組成物である、態様 74 に記載の組成物。

態様 76 . 少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤、又は賦形剤及び/又はアジュバントをさらに含み、かつ任意で1つ又は複数のさらなる薬学的に活性のあるポリ

50

ペプチド及び/又は化合物を含む薬学的組成物である、態様74に記載の組成物。

態様77. IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する、シグナル伝達経路及び/又は生物学的機能及び応答に関連がある疾患及び障害のうちの少なくとも1つを予防及び/又は治療する方法であって、薬学的に活性のある量の少なくとも1つの態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、態様65に記載の一価構築物、又は態様75若しくは76に記載の組成物をこれを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

態様78. IL-6Rに及び/又はIL-6/IL-6R複合体に、及び/又はIL-6及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する、シグナル伝達経路及び/又は生物学的機能及び応答に関連がある上記の疾患及び障害が、敗血症、様々な形態のがん、骨吸収、骨粗鬆症、悪液質、乾癬、メサングウム増殖性糸球体腎炎、カボジ肉腫、AIDS関連リンパ腫及び炎症性疾患からなる群から選択される、態様77に記載の方法。

態様79. 上記様々な形態のがんが、多発性骨髄腫疾患(MM)、腎細胞癌(RCC)、形質細胞性白血病、リンパ腫、Bリンパ増殖性障害(BLPD)及び前立腺がんからなる群から選択される、態様78に記載の方法。

態様80. 上記炎症性疾患が、関節リウマチ、全身性発症若年性特発性関節炎、高ガンマグロブリン血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、キャッスルマン病、IgM免疫グロブリン血症、心臓粘液腫、喘息、アレルギー性喘息及び自己免疫インスリン依存性糖尿病からなる群から選択される、態様78に記載の方法。

態様81. 態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様65に記載の一価構築物をこれを必要とする被験体に投与することにより予防及び/又は治療することができる少なくとも1つの疾患又は障害を予防及び/又は治療する方法であって、薬学的に活性のある量の少なくとも1つの態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、態様65に記載の一価構築物、又は態様75若しくは76に記載の組成物をこれを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

態様82. IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する、シグナル伝達経路及び/又は生物学的機能及び応答に関連がある疾患及び障害のうちの少なくとも1つを予防及び/又は治療するための、及び/又は1つ又は複数の態様77~81に記載の方法における使用のための薬学的組成物の調製における態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様65に記載の一価構築物の使用。

態様83. IL-6に、IL-6Rに、IL-6/IL-6R複合体に、及び/又はIL-6、IL-6R及び/又はIL-6/IL-6R複合体が関与する、シグナル伝達経路及び/又は生物学的機能及び応答に関連がある疾患及び障害のうちの少なくとも1つの予防及び/又は治療における使用のための、及び/又は1つ又は複数の態様77~81に記載の方法における使用のための態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様65に記載の一価構築物。

態様84. 態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物、又は態様65に記載の一価構築物の誘導体。

態様85. IL-6Rと特異的に結合することができる、態様84に記載の誘導体。

態様86. 態様1~34のいずれか一つに記載のアミノ酸配列自体、態様35~64のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物自体、又は態様65に記載の一価構築物自体の半減期よりも少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍(例えば少なくとも5倍)、例えば少なくとも10倍、又は20倍超大きい血清半減期を有する、態様84又は85に記載の誘導体。

10

20

30

40

50

態様 87 . 対応する態様 1 ~ 34 のいずれか一つに記載のアミノ酸配列自体、態様 35 ~ 64 のいずれか一つに記載の化合物若しくは構築物自体、又は態様 65 に記載の一価構築物自体と比較して、1 時間超、好ましくは 2 時間超、より好ましくは 6 時間超（例えば 12 時間超）、又はさらに 24 時間、48 時間若しくは 72 時間超増大した血清半減期を有する、態様 84 ~ 86 のいずれか一つに記載の誘導体。

態様 88 . 少なくとも約 12 時間、好ましくは少なくとも 24 時間、より好ましくは少なくとも 48 時間、さらにより好ましくは少なくとも 72 時間以上；例えば少なくとも 5 日（例えば約 5 日 ~ 10 日）、好ましくは少なくとも 9 日（例えば約 9 日 ~ 14 日）、より好ましくは少なくとも約 10 日（例えば約 10 日 ~ 15 日）、若しくは少なくとも約 11 日（例えば約 11 日 ~ 16 日）、より好ましくは少なくとも約 12 日（例えば約 12 日 ~ 18 日以上）、又は 14 日超（例えば約 14 日 ~ 19 日）のヒトにおける血清半減期を有する、態様 84 ~ 87 のいずれか一つに記載の誘導体。

態様 89 . ペグ化誘導体である、態様 84 ~ 88 のいずれか一つに記載の誘導体。

態様 90 . 態様 84 ~ 89 のいずれか一つに記載の誘導体を少なくとも 1 つ含む組成物。

#### 【実施例】

#### 【0432】

I . IL - 6 R と結合するナノボディの単離

実施例 1 : 材料

IL - 6 R と結合するナノボディの単離に用いられる材料を表 C - 1 に示す。

#### 【0433】

欧州特許第 0628639 号に記載の 2 つの代表的な抗ヒト IL - 6 R 免疫グロブリン（Fab 断片及び完全長 IgG）を産生し、参照化合物として使用した。Fab 断片及び完全長 IgG は「RV<sub>L</sub>a」と呼ばれる L 鎖（欧州特許第 0628639 号、表 2、バージョン（a）を参照されたい）及び「RV<sub>H</sub>f」と呼ばれる H 鎖（欧州特許第 0628639 号、表 3、バージョン（f）を参照されたい）に基づき構築されていた。欧州特許第 0628639 号（例えば 0074 段落を参照されたい）に従って、これらの特定の L 鎖及び H 鎖を含む再形成されたヒト抗体がヒト IL - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体である PM1 と同じレベルでヒト IL - 6 R と結合する能力を示したため（これについても欧州特許第 0628639 号、009 段落及びそこで引用されたさらなる引例を参照されたい）、参照化合物を構築するために上記 L 鎖及び上記 H 鎖が選択された。

#### 【0434】

全長の参照 IgG は配列番号 1（重鎖）及び配列番号 2（軽鎖）のアミノ酸配列からなっていた。Fab 断片は配列番号 3（ヒト IgG1 の CH1 領域に融合した重鎖領域 V<sub>L</sub>b 及び V<sub>H</sub>f）及び配列番号 4（ヒト C<sub>1</sub> に融合した再形成されたヒト PM - 1 可変軽鎖）のアミノ酸配列からなっていた。

#### 【0435】

コーディング DNA 断片を、一部重複したオリゴヌクレオチドを用いたアセンブリ PCR により産生した。PCR 産物を単一の 2 シストロン性の（bi-cistronic）ベクターにクローニングしたが、それにより大腸菌のペリプラズムにおいて機能的なジスルフィド結合した Fab 断片を発現させることが可能となる。全長の IgG を、軽鎖及び重鎖に関する遺伝子を含む 2 つの発現ベクターでトランスフェクトした CHO 細胞で産生した。重鎖をコードする遺伝子は、V<sub>H</sub>f をヒト IgG1 の定常領域と融合することにより作出した。軽鎖は欧州特許第 0628639 号に記載のようなものであった。

#### 【0436】

実施例 2 : 免疫付与

2 頭のラマ（81 及び 82）を表 C - 2 に記載の免疫付与スケジュールに従って、ヒト IL - 6 R（Peprtech）で免疫付与した。

#### 【0437】

免疫付与スケジュールの終了後、各動物における免疫応答を ELISA により分析した

10

20

30

40

50

。そのために、ビオチン化 I L - 6 R ( 2  $\mu$  g / m l ) をニュートラアビジンコーティングマイクロタイタープレートに捕捉させた。0 日目、2 8 日目、3 9 日目及び 4 3 日目に回収した血清試料の段階希釈物 ( 開始希釈率 : 1 / 5 0 0 ) を添加し、結合したラマ I g G を H R P で標識したヤギ抗ラマ I g G の添加により検出した。T M B を基質として使用した。結果を図 1 に示す。

#### 【 0 4 3 8 】

免疫応答は F A C S によっても分析した : 0 日目、2 8 日目及び 4 3 日目に回収した血清試料の段階希釈物 ( 開始希釈率 : 1 / 1 0 0 ) を、U 2 6 6 細胞 ( ヒト骨髄腫 ) とインキュベートした。結合したラマ I g G を F I T C で標識したヤギ抗ラマ I g G により検出した。結果を図 2 に示す。

#### 【 0 4 3 9 】

これらのデータをまとめると、両方の動物が I L - 6 R に対して良好な免疫応答を生じたこと、及びラマ I g G の少なくとも一部が U 2 6 6 細胞の表面上で I L - 6 R を認識することが示される。

#### 【 0 4 4 0 】

##### 実施例 3 : ライブラリ構築

P B L 及びリンパ節から抽出した R N A を、R T - P C R の出発物質として使用して、ナノボディをコードする遺伝子断片を増幅した。これらの断片を L a c Z プロモーター、大腸菌ファージ p I I I タンパク質コード配列、アンピシリン又はカルベニシリンに対する耐性遺伝子、マルチクローニング部位及び g e n 3 リーダー配列を含有する p U C 1 1 9 に由来する発現ベクターにクローニングした。ナノボディコード配列とインフレーションで、ベクターは C 末端 c - m y c タグ及び ( H i s ) 6 タグをコードしていた。ファージは標準的プロトコルに従って調製し、滅菌濾過の後、さらなる使用のために 4 で保管した。構築されたライブラリの特徴を表 C - 3 に示す。

#### 【 0 4 4 1 】

##### 実施例 4 : 選別 ( Selections : セレクション )

表 C - 4 に要約されるような様々な条件を用いて、上記ライブラリにより選別を実行した。

#### 【 0 4 4 2 】

全条件について選別を 1 回だけ行なった。各々の選別のアウトプットを濃縮係数 ( 対照と比べた溶出液中に存在するファージの数 )、多様性 ( H i n f I プロファイリング ) 及び I L - 6 R 陽性クローンの割合 ( E L I S A ) について分析した。これらのパラメータに基づき、さらなる分析のために最良の選別を選択した。そのために、各々の選別からのアウトプットを、L a c Z プロモーター、アンピシリン又はカルベニシリンに対する耐性遺伝子、マルチクローニング部位及び g e n 3 リーダー配列を含有する p U C 1 1 9 に由来する発現ベクターにプールとして再クローニングした。ナノボディコード配列とインフレーションで、ベクターは C 末端 c - m y c タグ及び ( H i s ) 6 タグをコードしていた。コロニーを採取して 9 6 ディープウェルプレート ( 1 m l 容 ) で培養し、I P T G を添加することによりナノボディ発現を誘導した。ペリプラズム抽出液を、標準的プロトコルに従って調製した。

#### 【 0 4 4 3 】

##### 実施例 5 : スクリーニング

ペリプラズム抽出液はまず、I L - 6 - I L - 6 R 相互作用を阻害する能力について分析した。そのために、図 3 に概略的に示される 2 つの独立したアルファスクリーンアッセイを設定した。アッセイ 1 では、ペリプラズム抽出液を可溶性 I L - 6 受容体 ( 1 n M )、ビオチン化 I L - 6 ( 3 n M )、ストレプトアビジンコーティングドナービーズ及びモノクローナル抗体 B N - 1 2 コーティングアクセプタービーズ ( 2 0  $\mu$  g / m l ) とインキュベートした。このアッセイで陽性のナノボディは I L - 6 / I L - 6 R 相互作用、又は I L - 6 R - モノクローナル抗体 B N - 1 2 相互作用のいずれかを阻害することができた。これら 2 つの可能性を区別するために、第 2 のアッセイを設定した ( アッセイ 2 ) 。

10

20

30

40

50

このアッセイでは、ペリプラズム抽出液を  $bio-IL-6R$  ( $0.3 nM$ )、ストレプトアビジンコーティングドナービーズ及びモノクローナル抗体  $BN-12$  コーティングアクセプタービーズ ( $10 \mu g/ml$ ) とインキュベートした。アッセイ 1 では陽性であるがアッセイ 2 では陰性のナノボディは、 $IL-6-IL-6R$  阻害因子であると考えられた。

#### 【0444】

両アッセイではペリプラズム抽出液を、最終濃度の  $40 nM$  にほぼ一致する 25 倍に希釈した。スクリーニング試行 (effort) の統計的概要を以下の表 C-5 に示す。最も強い阻害を示すナノボディを  $Biacore$  及び  $DNA$  シークエンシングでの解離速度に関する分析のために選択した。図 4 は細胞ベースのアッセイにおけるさらなる分析のために選択された阻害ナノボディのタンパク質配列を示す。表 C-6 はこれらの阻害ナノボディの  $k_{off}$  値を示す。

10

#### 【0445】

##### 実施例 6：ナノボディの発現及び精製

選択されたナノボディを大腸菌において、 $c-myc$ 、( $His$ ) 6 タグ付けタンパク質として  $50 ml$  又は  $250 ml$  の培養物量で発現させた。発現を  $1 mM$  の  $IPTG$  の添加により誘導し、 $37^\circ C$  で 4 時間継続させた。細胞培養物の遠沈 (spinning) 後、ペリプラズム抽出液を沈殿物を凍結融解することにより調製した。これらの抽出液を出発物質として固定化金属アフィニティークロマトグラフィ ( $IMAC$ ) に使用した。ナノボディを  $150 mM$  のイミダゾールでカラムから溶出させ、続いて  $PBS$  に対して透析した。全収率及び細胞培養物 1 リットル当たりの収率を表 C-7 に挙げる。精製ナノボディ ( $PMP28E11$  を除く) の  $SDS-PAGE$  を図 5 に示す。

20

#### 【0446】

##### 実施例 7：タンパク質ベースの競合アッセイ

14 個の精製ナノボディを、 $IL-6/IL-6R$  相互作用の阻害に関してアルファスクリーンで試験した。精製タンパク質の段階希釈物 (濃度範囲:  $500 nM \sim 10 pM$ ) を  $IL-6R$  ( $0.3 nM$ ) に添加し、15 分間インキュベートした。続いて、 $3 nM$  の  $bio-IL-6$  及び  $BN-12$  コーティングアクセプタービーズを添加し、この混合物を 1 時間インキュベートした。最後に、ストレプトアビジンドナービーズを添加し、1 時間のインキュベート後、プレートを  $Envision$  マイクロプレートリーダーで読み取った。 $BR-6$  及び実施例 1 に記載の  $Fab$  断片は参照として含まれていた。結果を図 6 に示す。

30

#### 【0447】

用量応答曲線を 14 個のナノボディ全てについて観察したが、 $IC_{50}$  値は  $48 pM \sim 1.7 nM$  の範囲であった (表 C-8)。このアッセイで最も強力なナノボディは  $PMP32C9$  及び  $PMP35H4$  であった。 $PMP33A3$  に関しては、 $IL-6/IL-6R$  相互作用の部分的な (約 50% の) 阻害しか達成できなかった。

#### 【0448】

##### 実施例 8：得られたナノボディの親和性決定

個々のナノボディ及び実施例 1 に記載の参照  $Fab$  断片の親和定数 ( $K_d$ ) を  $Biacore 3000$  機器による表面プラズモン共鳴 ( $SPR$ ) により求めた。簡潔に述べると、 $IL-6R$  を  $800 RU \sim 1000 RU$  の密度で  $CM5$  センサーチップにアミンカップリングさせた。ナノボディを  $1 nM \sim 50 nM$  の 5 つの種々の濃度で注入した。流速は全ての実験で  $45 \mu l/分$  であった。結合期及び解離期はそれぞれ 3 分及び 10 分であった。チップをグリシン/ $HCl$  ( $pH 1.5$ ) を用いて再生させた。種々の濃度のナノボディでの結合曲線を、動態パラメータ  $k_{on}$ 、 $k_{off}$  及び  $K_d$  を算出するのに使用した (表 C-9)。

40

#### 【0449】

##### 実施例 9：XG1 アッセイにおけるナノボディの細胞ベースの効力

全ての精製ナノボディを  $XG1$  アッセイで試験した。 $XG1$  は  $IL-6$  依存性のヒト骨

50

髄腫細胞株である。最大半減増殖は約 20 pg/ml の IL-6 で達成される。アッセイは原則的に Zhang et al. (1994, Blood 83: 3654-3663) により記載のように行った。実施例 1 に記載のような参照 Fab 断片は参照として含まれていた。IC50 値は表 C-10 に挙げられるように 90 pM ~ 50 nM の範囲であった。ナノボディの小さいサブセットをこのアッセイにおいて 1 mg/ml の HSA の存在下でも試験した。

#### 【0450】

実施例 10：TF1 アッセイにおけるナノボディの細胞ベースの効力

ナノボディを細胞表面上での IL-6R との IL-6 の結合の遮断による TF-1 細胞 (ECCC 番号 93022307; 1989, J. Cell Physiol., 140: 323; 1993, Exp. Cell Res., 208: 35) の IL-6 依存性の増殖を阻害する能力に関して試験した。このため、ナノボディの段階希釈物を固定量の TF-1 細胞と 37 で 2 時間プレインキュベートした。続いて IL-6 を最終濃度が 2 ng/ml になるまで添加した。IL-6 依存性の細胞増殖を 72 時間継続させ、トリチウムで標識されたチミジンの取り込みにより測定した。IC50 値を表 C-11 に挙げている。

10

#### 【0451】

実施例 11：IL-6R との結合に関する参照 Fab との競合

14 個のナノボディ全てを、アルファスクリーンをベースにしたアッセイにおいて実施例 1 に記載のような参照 Fab と IL-6R との結合を阻害する能力に関して分析した。このアッセイでは、100 nM の精製ナノボディを 0.4 nM のビオチン化 IL-6 とインキュベートした。参照 Fab コーティングアクセプタービーズ及びストレプトアビジンコーティングドナービーズを添加し、参照 Fab / IL-6R 複合体の濃度を測定した。ナノボディの存在下で得られた値をナノボディを加えなかった対照と比較し、% で表される 2 つの値の間の比を表 C-12 に挙げている。IL6R03 を除く全てのナノボディは、IL-6R と参照 Fab との結合の阻害を全く又は一部だけしか示さず、これによりそれらのエピトープが参照 Fab のエピトープと全く又は一部だけしか重複しないことが示唆される。

20

#### 【0452】

実施例 12：ナノボディと U266 細胞との結合

ナノボディと U266 細胞上で発現する膜結合 IL-6R との結合を FACS で分析した。この分析は選別されたクローン由来の精製ナノボディ (IL6R04、IL6R09、IL6R11、IL6R13 及び IL6R14) に対して行った。結果を図 7 に示す。全てのナノボディが細胞表面で発現するヒト IL-6R と結合することが可能であった。

30

#### 【0453】

実施例 13：ナノボディと血漿由来のヒト IL-6R との結合

可溶性の IL-6R が 80 ng/ml ~ 400 ng/ml の濃度でヒト血漿に存在する。ナノボディ IL6R03、IL6R04 及び IL6R13 が血漿由来の IL-6R と結合することが可能であることを決定するために、U266 細胞に結合するナノボディに対するヒト血漿の影響を評価した。ヒト血漿は U266 細胞との結合を阻害したが、これは 3 つのナノボディ全てが血漿由来のヒト IL-6R と結合することが可能であることを示している (図 8 を参照されたい)。

40

#### 【0454】

実施例 14：ナノボディとマウス IL-6R との交差反応性

ナノボディとマウス IL-6R との交差反応性を ELISA で分析した。このため、500 nM のナノボディを 1 µg/ml のマウス及びヒトの IL-6R でコーティングしたマイクロタイタープレートに適用した。一次抗体及び二次抗体としてそれぞれ抗 myc 及び抗マウス HRP を用いて検出を行った。光学密度を図 10 に示す。マウス IL-6R との結合は試験したナノボディのいずれでも観察されなかった。

#### 【0455】

実施例 15：IL-6R と結合するナノボディの単離に関する要約

組換え IL-6R による 2 匹のラマの免疫付与により IL-6 と IL-6R との相互作用

50

用を遮断することができた14個の特有のナノボディのパネルが得られた。このパネルを詳細に分析し、全ての実験データに基づき、ナノボディIL6R03、IL6R04及びIL6R13をさらなる開発のために選別した。最も重要なナノボディ特性を表C-13に要約する。

#### 【0456】

II. 抗IL-6Rナノボディのフォーマット

実施例16：多価構築物の調製

先の段落に記載の抗IL-6RナノボディはC末端の抗SAナノボディ(ALB1)、9アミノ酸のGly/Serリンカー及びN末端の抗IL-6Rナノボディからなる二重特異性構築物としても発現された。さらに、C末端及びN末端の抗IL-6Rナノボディ、中央の抗SAナノボディ(ALB1)(全て9アミノ酸のGly/Serリンカーを介して連結した)からなる4個の三価の二重特異性ナノボディを構築した。これらのナノボディ番号を表C-14に挙げている。

10

#### 【0457】

実施例17：二重特異性抗IL-6Rナノボディの発現

二重特異性ナノボディ構築物は、大腸菌においてc-myc、(His)6タグ付けタンパク質として発現し、続いて固定化金属アフィニティークロマトグラフィ(IMAC)及びサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)により培養培地から精製した。全収率及び細胞培養物1リットル当たりの収率を表C-15に挙げている。精製ナノボディのSDS-PAGEを図11に示す。

20

#### 【0458】

実施例18：タンパク質ベースの競合アッセイ

精製した二重特異性ナノボディを、IL-6/IL-6R相互作用の阻害に関してアルファスクリーンで試験した。精製タンパク質の段階希釈物(濃度範囲:250nM~5pM)をIL-6R(0.3nM)に添加し、15分間インキュベートした。続いて、3nMのbio-IL-6及びBN-12コーティングアクセプタービーズを添加し、この混合物を1時間インキュベートした。最後に、ストレプトアビジンドナービーズを添加し、1時間のインキュベート後、プレートをEnvisionマイクロプレートリーダーで読み取った。BR-6及び実施例1に記載のFab断片は参照として含まれていた。結果を図12に示す。

30

#### 【0459】

用量応答曲線を全てのナノボディについて観察したが、IC<sub>50</sub>値は123pM~1.67nMの範囲であった(表C-16)。

#### 【0460】

実施例19：XG1アッセイにおけるナノボディの細胞ベースの効力

二重特異性ナノボディをXG1増殖アッセイで試験した。IC<sub>50</sub>値は60pM~65nMの範囲であった。ナノボディをこのアッセイにおいて1mg/mLのヒト血清アルブミンの存在下でも分析した。二重特異性ナノボディに関しては、IC<sub>50</sub>値は190pM~90nMの範囲である。実施例1に記載のような参照IgGは参照として含まれていた。IC<sub>50</sub>値を表C-17に挙げている。

40

#### 【0461】

フォーマットされたナノボディをXG1アッセイにおいてアルブミンの存在下で試験した場合、効力の喪失が観察された。フォーマットされたナノボディIL6R24、IL6R44及びIL6R49の効力は血清アルブミンの存在下での参照IgGよりも優れているか、又は参照IgGと同じ範囲であった。

#### 【0462】

実施例20：IL-6Rに対する親和性の決定

二重特異性ナノボディとIL-6Rとの結合を表面プラズモン共鳴により分析した。動態パラメータを求め、表C-18に挙げている。IL-6Rに対する親和性の顕著な喪失は二価フォーマットのナノボディ(IL6R23、IL6R24、IL6R33)では観

50

察されなかった。

【0463】

実施例21：血清アルブミンに対する親和性の決定

フォーマットされたナノボディと血清アルブミンとの結合を表面プラズモン共鳴により分析した。親和定数 (Kd) を求め、表C-19に挙げている。アルブミンと結合するナノボディAlb-1 (配列番号97) は比較用に含まれていた。親和性は同じ抗血清アルブミン構成要素を含有するこれまでにフォーマットされたナノボディの範囲内であったが、概ねより低い親和性が観察された。このことは特にマウス血清アルブミンの親和性の場合で顕著であった。

【0464】

実施例22：フォーマットされたナノボディとU266細胞との結合

選択されたクローン由来のフォーマットされたナノボディ (IL6R23、IL6R24、IL6R29、IL6R33、IL6R44及びIL6R53) とU266細胞との結合をFACSにより分析した。結果を図13及び図14に示す。二価ナノボディIL6R23、IL6R24、IL6R29及びIL6R33は一価構成要素と比較して結合の低減を示すが、同様の結合は三価ナノボディIL6R44及びIL6R53で観察された。

【0465】

III. 抗IL-6Rナノボディの配列最適化

実施例23：配列最適化戦略

ナノボディIL6R03、IL6R04及びIL6R13のタンパク質配列を各々、最大の相同性を共有する5つの最も近縁なヒト生殖系列とアラインメントした (図15)。ヒト生殖系列のコンセンサス配列と比べたフレームワーク領域のアミノ酸差異を色分けする。薄灰色で強調したアミノ酸差異はヒトの対応物 (counterpart) に変換するために選択したが、暗灰色で強調したアミノ酸はそのままにした (untouched)。初めに配列を最適化した4つの変異体のパネルを3つのナノボディそれぞれで作製した (段階1)。これらの変異体を多くのパラメータに関して分析し、得られた結果を、第2のセットのナノボディを設計するのに使用した (段階2)。配列を最適化した全ての変異体のタンパク質配列を図16に示す。

【0466】

実施例24：配列最適化段階1

配列最適化プロセスの段階1では、以下の12個の変異体を作製し、分析した：

IL6R03：IL6R61、IL6R62、IL6R63及びIL6R64

IL6R04：IL6R71、IL6R72、IL6R73及びIL6R74

IL6R13：IL6R81、IL6R82、IL6R83及びIL6R84

これらの様々な変異体のアミノ酸配列を図16に示す。

【0467】

IL-6/IL-6R競合アッセイにおける配列を最適化したナノボディの評価

IL6R03、IL6R04及びIL6R13の配列を最適化したクローンをアルファスクリーンにおいてIL-6/IL-6R相互作用の阻害に関して試験した。精製ナノボディの段階希釈物をIL-6R (0.3 nM) に添加し、15分間インキュベートした。続いて3 nMのbio-IL-6及びBN-12コーティングアクセプタービーズを添加し、この混合物を1時間インキュベートした。最後にストレプトアビジンドナービーズを添加し、1時間のインキュベーション後、プレートをEnvisionマイクロプレートリーダーで読み取った。親クローンは参照として含まれていた。結果を図17、図18及び図19に示す。

【0468】

IL6R03の配列を最適化した変異体 (IL6R61、IL6R62及びIL6R64) は全て、IL6R03のIC50値の2倍以内のIC50値を有するが、IL6R63は約4倍低いIC50値を示している。

10

20

30

40

50

## 【0469】

IL6R04の配列を最適化した変異体に関して、IL6R04と配列を最適化した4つの変異体との間でIC50値の有意差は観察されなかった。

## 【0470】

IL6R13の配列を最適化した変異体に関して、IL6R81及びIL6R83のIC50値はIL6R13のものと同様であったが、フレームワーク2においてRATKGL突然変異を保有する2つの変異体(IL6R82及びIL6R84)の効力は低下した。

## 【0471】

親和性決定

IL6R03、IL6R04及びIL6R13の配列を最適化した変異体をBiacoreでもIL-6Rとの結合に関して分析した。動態パラメータを表C-20に挙げている。

## 【0472】

IL6R03の配列を最適化した変異体に関して、IL6R61、IL6R62及びIL6R63の $K_d$ 値は全てIL6R03の $K_d$ 値の2倍以内であった。IL6R64の $K_d$ は求めなかった。

## 【0473】

IL6R04の配列を最適化した変異体に関して、IL6R04と配列を最適化した4つの変異体との間で $K_d$ 値の有意差は観察されなかった。

## 【0474】

IL6R13の配列を最適化した変異体に関して、IL6R81及びIL6R83の $K_d$ 値はIL6R13の $K_d$ 値と非常に類似しているが、フレームワーク2においてRATKGL突然変異を保有する2つの変異体(IL6R82及びIL6R84)の親和性は大きな低下を示した。

## 【0475】

全体として、これらの観察結果はアルファスクリーンをベースにした競合アッセイで得られた結果に完全に一致する。

## 【0476】

実施例25：配列最適化段階2

段階1の親和性及び効力データに基づき、以下のセットの変異体を作製することを決めた。

IL6R03に関しては、変異体IL6R61、IL6R62、IL6R63及びIL6R64に存在する全ての突然変異を組み合わせ、IL6R65を得た。

IL6R04に関しては、変異体IL6R71、IL6R72、IL6R73及びIL6R74に存在する全ての突然変異を組み合わせ、IL6R75を得た。

IL6R13に関しては、FR2においてRAT配列で異なる突然変異(の組合せ)を保有する6つの新規の変異体セット(IL6R85~IL6R90)を作製した。この配列を最適化した変異体は親和性及び効力のどちらでもIL6R13とは区別することはできなかったため、これらの突然変異はIL6R83バックグラウンドに導入された。

## 【0477】

配列を最適化したIL6R13変異体の解離速度分析

配列を最適化した変異体IL6R85~IL6R90をBiacoreでペリプラズム抽出液として分析した。解離曲線を $k_{off}$ 値を算出するのに用いた(表C-21)。ナノボディIL6R87~IL6R89の解離速度はIL6R13のものと同様であったが、ナノボディIL6R85、IL6R86及びIL6R90は10倍高い解離速度を有していた。

## 【0478】

IL-6/IL-6R競合アッセイにおける配列を最適化したナノボディの評価

配列を最適化した変異体IL6R85~IL6R90をアルファスクリーンにおいてI

10

20

30

40

50

L - 6 / I L - 6 R 相互作用を遮断する能力に関してペリプラズム抽出液として試験した。結果を図 2 0 に示す。

【 0 4 7 9 】

ナノボディ I L 6 R 8 7、I L 6 R 8 8 及び I L 6 R 8 9 は I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の遮断において I L 6 R 1 3 変異体 I L 6 R 8 5、I L 6 R 8 6 及び I L 6 R 9 0 よりも強力であった。これらの結果は B i a c o r e での観察結果と完全に一致する。配列を最適化した I L 6 R 1 3 変異体のアミノ酸配列の比較により、突然変異 T 4 5 L が解離速度及び効力の低減に参与することが明らかとなった。そのため T 4 5 L 突然変異を有しない最も有望なヒト変異体、すなわち I L 6 R 8 8 をさらなる特性評価のために選択した。

10

【 0 4 8 0 】

この変異体を発現させ、精製し、精製クローン I L 6 R 6 5 及び I L 6 R 7 5 と併せて I L - 6 / I L - 6 R 相互作用の阻害に関して分析した。配列を最適化した様々なクローン ( I L 6 R 6 5、I L 6 R 7 5 及び I L 6 R 8 8 ) と対応する配列を最適化していないバージョン (それぞれ、I L 6 R 0 3、I L 6 R 0 4 及び I L 6 R 1 3 ) との間の有意差は観察されなかった (図 2 1 )。

【 0 4 8 1 】

親和性決定

I L 6 R 6 5、I L 6 R 7 5 及び I L 6 R 8 8 の配列を最適化したクローンのヒト I L - 6 R に関する親和定数 (  $K_d$  ) を、B i a c o r e 3 0 0 0 機器で表面プラズモン共鳴により求めた。簡潔に述べると、ヒト I L - 6 R を C M 5 センサーチップに 8 0 0 R U ~ 1 0 0 0 R U の密度でアミンカップリングを行った。残存する反応基を不活化した。ナノボディ結合を 0 . 5 n M ~ 5 0 n M の範囲の様々な濃度で評価した。各々の試料を 4 5  $\mu$  l / 分の流速で 4 分間注入して、チップに結合した抗原に結合させた。次に、ナノボディを含まない結合バッファーを同じ流速でチップに送り、結合したナノボディを解離させた。I L 6 R 0 3、I L 6 R 0 4 及び I L 6 R 1 3 の配列を最適化した変異体の動態パラメータを表 C - 2 2 に示す。

20

【 0 4 8 2 】

親ナノボディと配列を最適化したナノボディの間では親和定数に大きな差異は観察されなかった。

30

【 0 4 8 3 】

細胞ベースの効力アッセイ

配列を最適化したナノボディを X G - 1 アッセイで分析した。結果を図 2 2 に示す。I C 5 0 値を表 C - 2 3 に要約する。配列最適化は、細胞ベースのアッセイにおいて I L - 6 誘導性の増殖を中和する効力に対して有意な効果を有していなかった。

【 0 4 8 4 】

I V . 配列を最適化したナノボディのさらなる特性評価

実施例 2 6 : カニクイザル I L - 6 R に対する親和性決定

I L 6 R 0 3 - I L 6 R 6 5、I L 6 R 0 4 - I L 6 R 7 5 及び I L 6 R 1 3 - I L - 6 R 8 8 のカニクイザル I L - 6 R に対する親和性を、B i a c o r e 3 0 0 0 機器で S P R により求めた。簡潔に述べると、カニクイザル I L - 6 R を C M 5 センサーチップに 7 6 0 R U の密度でアミンカップリングを行った。残存する反応基を不活化した。ナノボディ結合を 1 . 2 5 n M ~ 1 0 0 n M の範囲の様々な濃度で評価した。各々の試料を 4 5  $\mu$  l / 分の流速で 4 分間注入して、チップに結合した抗原に結合させた。次に、ナノボディを含まない結合バッファーを同じ流速でチップに送り、結合したナノボディを解離させた。動態パラメータを表 C - 2 4 に要約する。

40

【 0 4 8 5 】

I L 6 R 0 4 及び I L 6 R 7 5 の親和定数の間にはかなりの差異があったが、この実験からカニクイザル I L - 6 R に対する両方の分子の親和性はヒトに対するものよりもずっと低いことが明らかであった。これに対して、カニクイザル I L - 6 R に対する I L 6 R

50

03及びIL6R65の親和定数はヒトIL-6Rに対するものと同じ範囲内であった。顕著には、IL-6/IL-6R/gp130複合体の結晶構造(Boulanger et al.)はIL-6R上のIL-6結合部位がヒトとカニクイザルとの間で完全に保存されることを明らかにしており、このことはIL6R04が異なるエピトープと結合していることを示唆している。

#### 【0486】

実施例27：ヒト及びカニクイザルの血漿を用いる血漿効力アッセイにおける配列を最適化したナノボディの試験

カニクイザルIL-6RとのIL6R65及びIL6R75の交差反応性を評価するために、sIL-6Rの供給源としてヒト又はカニクイザルの血漿のいずれかを用いて血漿効力ELISAを行った。このアッセイでは、希釈系列のナノボディを血漿及びヒトIL-6(50ng/mL)とプレインキュベートした。続いて、血漿sIL-6RをBN-12コーティングプレート上で捕捉し、ビオチン化ポリクローナル抗体及びストレプトアビジン-HRPを用いて結合したIL-6を検出した。

10

#### 【0487】

図23Aで観察することができるように、IL6R201及びIL6R65の両方がIL-6とヒトsIL-6Rとの結合を完全に遮断することができたが、IL6R65はIL6R201よりも、並びに実施例1に記載の参照IgG及び参照Fabよりも効力が低いと思われた。図23Bで観察することができるように、IL6R65は、実施例1に記載の参照Fabと同程度の効力でIL-6とカニクイザルsIL-6Rとの結合を完全に遮断することができた。

20

#### 【0488】

実施例28：高いIL-6濃度での血漿効力アッセイにおける配列を最適化したナノボディの試験

ヒト血漿における血漿効力アッセイを、ナノボディが高濃度のIL-6を遮断する能力を試験するのにも使用した。IL6R04、IL6R65及び実施例1に記載の参照FabをIL-6のEC50(50ng/mL)で及びIL-6のEC95(885ng/mL)で試験した。結果を図24に示す。明らかに、IL6R04はIL-6のEC50で最も強力な化合物であると思われた。EC95では、参照Fab及びIL6R65はより高濃度ではあるものの依然として血漿sIL-6Rを完全に遮断することができ、このことはこれら2つの分子がIL-6結合部位と重複するエピトープと結合することを示している。参照FabのIC50は0.55nMから8.47nMへと増大し、IL6R65のIC50は2.61nMから66.25nMへと増大した。

30

#### 【0489】

実施例29：Biacore競合研究

IL-6及びIL6R65がIL-6Rと同時に結合することができるかを調べるためにBiacore実験を行った。参照Fab(図25A)、IL6R201/75(図25B)又はIL6R65(図25C)をIL-6R上で捕捉し、その後IL-6を複合体に結合させた。参照Fab及びIL6R65では、IL-6の結合をほとんど観察することはできなかった。IL-6をIL-6R上で捕捉し、ナノボディを注入した場合、3つのナノボディ全てが複合体と結合することができたようであった。しかしながら、参照Fab及びIL-6R65の場合、このことはおそらくIL-6Rに対してIL-6の親和性がより低いことによりIL-6が取って代わられたためであった。

40

#### 【0490】

最後に、IL-6Rをナノボディの存在下又は非存在下でIL-6コーティングチップに結合させた(図25D)。このことにより、先の結果が確認された、すなわち参照Fab又はIL6R65の存在下ではIL-6Rを捕捉することができなかった。

#### 【0491】

結論として、Biacoreエピトープマッピング実験は、参照Fab及びIL6R65の両方がIL-6と同じエピトープを標的とすることを示した。IL6R65及び参照

50

F a bはI L - 6とI L - 6 Rとの結合を完全に遮断することができたが、I L 6 R 2 0 1は、このナノボディが受容体と結合している場合、I L - 6とI L - 6 Rとの結合を妨げることができなかった。

【 0 4 9 2 】

V . I L 6 R 6 5 の親和性成熟

実施例 3 0 : 親和性成熟のための多様化戦略

ナノボディ I L 6 R 6 5 の C D R 領域を 2 つの以下の戦略を用いてランダム化した :

1 . 各 C D R 残基を類似の側鎖化学構造を有する残基のセットに置き換えた。

K R

A S T

I L V

F Y

N D

Q E

G A

M L

H、C、W、P は一定に保つ。

2 . 各 C D R 残基をその位置で自然発生するアミノ酸のパネルに置き換えた。1 つの位置当たりの多様性を制限するために、各位置で最も高い頻度で発生するアミノ酸だけを導入した。このアプローチは C D R 1 及び C D R 2 のランダム化だけに使用した。

【 0 4 9 3 】

上記の 2 つの戦略を用いて C D R 1 及び C D R 2 の同時ランダム化を行い、戦略 1 に従って別々に C D R 3 をランダム化し、合計で 3 つのライブラリを得た。縮重オリゴ (oligos) を用いた P C R 重複伸長により 3 つ全てのライブラリを自家 (in-house) 作製した。各々のライブラリの理論的多様性はおよそ  $1 \times 10^6$  であった。ナノボディ変異体をコードする断片をファージ提示ベクターにクローニングした。3 つ全てのライブラリの実際のサイズはおよそ  $1 \times 10^8$  であった (理論的多様性の範囲の 100 倍)。溶液中における種々の濃度のピオチン化 I L - 6 R (0 pM、1 pM、10 pM 及び 100 pM) を用いて 1 回の選別を行った。これらの条件下で C D R 3 ライブラリに関して濃縮は観察されなかったが、C D R 1 / C D R 2 ライブラリの両方では用量依存的な濃縮が観察された。C D R 1 / C D R 2 ライブラリのアウトプットを E L I S A においてペリプラズム抽出液として分析し、続いてシグナルが最も高いクローンを B i a c o r e で試験した。E L I S A における上位 30 個のクローンは  $2.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \sim 2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  の解離速度を示した。解離速度が最も緩やかな 5 つのナノボディをシーケンシングし、発現させ、精製した (図 26)。

【 0 4 9 4 】

実施例 3 1 : ナノボディの発現及び精製

親和性成熟を行ったナノボディを大腸菌において、c - m y c、( H i s ) 6 タグ付けタンパク質として 250 ml の培養物量で発現させた。発現を 1 mM の I P T G の添加により誘導し、37 °C で 4 時間継続させた。細胞培養物の遠沈後、ペリプラズム抽出液を沈殿物を凍結融解することにより調製した。これらの抽出液を出発物質として固定化金属アフィニティークロマトグラフィ ( I M A C ) に使用した。ナノボディを 150 mM のイミダゾールでカラムから溶出させ、続いて H i p r e p 26 / 10 カラムで脱塩した。

【 0 4 9 5 】

実施例 3 2 : B i a c o r e での親和性成熟を行った変異体の親和性決定

ナノボディ I L 6 R 6 5 (配列を最適化した) 及び 5 つの親和性成熟を行った変異体を B i a c o r e で分析した。種々の濃度の精製ナノボディの結合曲線を記録し、親和定数を算出するのに用いた。これらの 5 つのクローンに関する K d 値は 0.34 nM ~ 0.95 nM であったが、これは最良の変異体での I L 6 R 6 5 (親ナノボディ) と比べて 1.3 倍の改善に相当する (図 27)。

10

20

30

40

50

## 【0496】

実施例33：血漿効力アッセイにおける親和性成熟を行った変異体の評価

5つ全ての親和性成熟を行ったナノボディ及び配列を最適化したナノボディを血漿効力アッセイでも試験した。このアッセイでは、様々な濃度のナノボディをヒト又はカニクイザルのいずれかに由来する血漿を含有する可溶性のIL-6R及び固定濃度のヒトIL-6(2.4 nM又は42 nM)と混合した。1時間のインキュベーション後、混合物を抗IL-6Rモノクローナル抗体BN-12(Diaclone)でコーティングしたMaxisorpプレートに移した。結合したIL-6の量を続くビオチン化抗IL-6ポリクローナル抗体(R&D Systems)及びストレプトアビジン-HRPの添加により求めた。TMBは基質として用いた。基質変換は450 nmで測定した(図28)。

10

## 【0497】

実施例34：TF-1アッセイにおける親和性成熟を行った変異体の評価

親和性成熟を行ったナノボディを、細胞表面上のIL-6RとのIL-6結合の遮断によるTF-1細胞(ECACC番号93022307;1989, J. Cell Physiol. 140: 323; 1993, Exp. Cell Res. 208: 35)のIL-6依存性の増殖を阻害する能力に関して試験した。このため、ナノボディの段階希釈物を固定量のTF-1細胞と37°Cで2時間プレインキュベートした。続いてIL-6を2 ng/mlの最終濃度まで添加した。IL-6依存性の細胞増殖を72時間継続させ、トリチウムで標識したチミジンの取り込みにより測定した(図29)。

## 【0498】

親和性成熟を行ったナノボディのIC50値はIL6R65のものよりも最大で17倍良好であったが、全ての変異体は依然として参照IgGより効力が低かった。

20

## 【0499】

実施例35：Biacore競合研究

IL-6がIL6R65及びその親和性成熟を行った変異体のうちの2つ(7D6及び7C4)と同時にIL-6Rと結合することができるかを調べるために、Biacore実験を行った。これらの実験では、IL-6RをBN-12コーティングチップ上で捕捉し、ナノボディIL6R65(図30A)、7D6(図30B)又は7C4(図30C)を用いて飽和状態にした。次に、IL-6とIL-6R-ナノボディ複合体との結合を100 nMの濃度でサイトカインを注入することにより評価した。さらに、3つのナノボディとIL-6と複合体形成したIL-6Rとの結合も求めた。

30

## 【0500】

IL6R65に関する結果(図30A)はこれまでに観察された結果と同等のものであり、IL6R65及びIL-6がIL-6R上で同じエピトープを認識することを確認する。予想通り、IL6R65の親和性成熟を行った変異体及びIL-6もIL-6R上で同じエピトープを認識した(図30B、図30C)。

## 【0501】

実施例36：さらなる親和性成熟

次に、CDR1/CDR2及びCDR3における有益な突然変異の様々な組合せを含有する47個のナノボディのパネルを作製した。これらの突然変異をCDRランダム化ライブラリから単離された全てのナノボディクローンのタンパク質配列及び解離速度の徹底分析により同定した。これらの第2世代のクローンの解離速度は $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 4.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の範囲であった。最も緩やかな解離速度を示す5つのクローンをさらなる分析のために選択した(20F6、20A11、20E10、21A10、21D11)。配列を図31に挙げている。

40

## 【0502】

実施例37：2回親和性成熟を行った変異体のナノボディの発現及び精製

親和性成熟を行ったナノボディを大腸菌において、c-myc、(His)6タグ付けタンパク質として250 mlの培養物量で発現させた。発現を1 mMのIPTGの添加により誘導し、37°Cで4時間継続させた。細胞培養物の遠沈後、ペリプラズム抽出液を沈

50

殿物を凍結融解することにより調製した。これらの抽出液を出発物質として固定化金属アフィニティークロマトグラフィ (IMAC) に使用した。ナノボディを 150 mM のイミダゾールでカラムから溶出させ、続いて HiPrep 26/10 カラムで脱塩した。

【0503】

実施例 38：融解温度の決定

ナノボディの温度安定性を熱転移アッセイで分析した。T<sub>m</sub> 値は全ての親和性成熟を行ったナノボディで同程度であり、IL6R65 と比較してわずかに高かった。T<sub>m</sub> 値は表 C-25 に挙げられている。

【0504】

実施例 39：Biacore での 2 回親和性成熟を行った変異体の親和性決定

ナノボディ IL6R65 (配列を最適化した) 及び 5 つの親和性成熟を行った変異体に関する動態パラメータを Biacore T100 で求めた。結合速度 (k<sub>a</sub>) を 2 つの異なる濃度の精製ナノボディ及びモノクローナル抗体 BN-12 を介してチップ上で捕捉された固定濃度の IL-6R での結合曲線から求めた。解離速度をチップと共有結合した IL-6R を用いて単一のナノボディ濃度で求めた。k<sub>a</sub>、k<sub>d</sub> 及び K<sub>d</sub> に関する値を表 C-26 に挙げている。

【0505】

実施例 40：TF-1 アッセイにおける 2 回親和性成熟を行った変異体の評価

2 回親和性成熟を行った変異体の生物学的活性を TF-1 アッセイで評価し、データを図 32 に提示する。2 回親和性成熟を行ったクローンは 1 回親和性成熟を行ったクローン 7C4 よりも 5 倍～8 倍高い効力を有しており、実施例 1 に記載のベンチマーク (benchmark) 参照 IgG よりも 2.5 倍～4 倍強力であった。最良のクローンは IC50 が 0.4 nM である (ベンチマークと比較して 4 倍強力な) 20A11 であった。

【0506】

実施例 41：血漿効力アッセイにおける 2 回親和性成熟を行った変異体の評価

可溶性 IL-6R の阻害を血漿効力アッセイにおいて高い及び低い IL-6 濃度で分析した。2 回親和性成熟を行った変異体は血漿効力アッセイにおいて参照 IgG と少なくとも同じくらい強力であり (0.1 nM～0.2 nM)、これはこのアッセイの感度限界であった。高い IL-6 濃度 (EC95) では、親和性突然変異体は依然として IL-6 と sIL-6R との結合を遮断することができ、参照 IgG より 3 倍～4 倍強力であると考えられた。このアッセイで 1 回親和性成熟を行った変異体と 2 回親和性成熟を行った変異体との間で差異は観察することができなかった。予想通り、試験したクローンは全てカニクイザル交差反応性であった (図 33)。

【0507】

実施例 42：全血におけるヒト PBMC との結合

精製ナノボディ IL6R65 及び PMP20A11 をヒト PBMC との結合に関して FACS で試験した。ピオチン化抗 His モノクローナル抗体及び PE 標識したストレプトアビジンを用いて細胞結合を検出した (図 34)。IL6R65 及び親和性成熟を行った変異体 PMP20A11 の両方が好中球、単球及びリンパ球の亜集団と結合することができた。これは IL-6R の発現プロファイルに一致する。

【0508】

VI. 親和性成熟を行ったナノボディのフォーマット

実施例 43：多価構築物の調製

PMP20A11 をアルブミンと結合するナノボディ ALB8 を有する二価及び三価のナノボディとしてフォーマットした。様々なナノボディの概要を表 C-27 に提示する。

【0509】

実施例 44：TF-1 アッセイにおける膜 IL-6R の中和

第 1 の実験において、モデル系として TF-1 細胞株を用いて、フォーマットされたナノボディが IL-6R によるシグナル伝達を阻害するかを検証した。ナノボディ 20A11、IL6R304、IL6R305 及び IL6R306 は膜 IL-6R により媒介され

10

20

30

40

50

るTF-1細胞のIL-6誘導性の増殖を用量依存的にかつ完全に遮断する(図35、表C-28)。

【0510】

これらの結果は、フォーマットされたナノボディが全て膜IL-6R活性の阻害に関して実施例1に記載のような参照IgGと比較してより強力であることを実証している。その一価等価物IL6R304と比較して、IL6R305は約7倍強力にIL-6媒介性の応答を阻害し、それによりIL6R305と膜IL-6Rとの強い(avid)相互作用が実証される。IL6R306はIL6R305よりも効力が低く、IL6R304よりも2倍良好な効力しか示さない。このことはIL6R306のフォーマットがあまり有益ではないことを実証しており、さらにIL6R306の強い結合が考えにくいことを示している。

10

【0511】

次に、フォーマットされたナノボディが依然として病理学的な濃度のIL-6でIL-6Rによるシグナル伝達を完全に阻害できたかを検証した。実際、20A11、IL6R304、IL6R305及びIL6R306は、5000IU/mLのIL-6により誘導されるTF-1細胞の増殖を用量依存的にかつ完全に遮断した(図36、表C-29)。予想通り、IC50は100IU/mLで行われた実験と比較して変わらなかった。先の結果と一致して、IL6R305は膜IL-6Rを介したIL-6誘導性のシグナル伝達の遮断において最も効力が高かった。

【0512】

20

ナノボディがIL-6Rと相互作用する場合、ナノボディとこの受容体との結合が細胞増殖をもたらす細胞活性化を誘導する可能性があるかを検証した。TF-1細胞を100IU/mLのIL-6の存在下又は非存在下で過剰量のナノボディとインキュベートした(図37)。予想通り、IL6R304及びIL6R305の両方がIL-6媒介性の増殖を完全に阻止した。実際に、IL6R304及びIL6R305がバックグラウンド(成長因子の非存在下で測定された<sup>3</sup>H-チミジン取り込み)と同じレベルまでIL-6増殖を阻害し、これによりIL6R304及びIL6R305がIL-6の効果を完全に遮断することが実証された。

【0513】

IL6R304及びIL6R305は成長因子の非存在下ではTF-1細胞の増殖を誘導せず、これによりこれらの化合物がTF-1細胞に対するアゴニスト効果を有しないことが示唆された。

30

【0514】

実施例45：ELISAにおけるフォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディによるsIL-6Rの中和

構成要素IL6R20A11及びそのフォーマットされた変異体がヒトIL-6と血漿sIL-6Rとの結合を阻止する能力を血漿効力ELISAで分析した。血漿sIL-6Rの濃度は変化し得るので、ナノボディの効力を比較するために異なるアッセイ全体にわたり同じ血漿を使用する必要があった。また初めに、滴定したIL-6(titration of IL-6)を血漿中でインキュベートし、ナノボディと共に使用するIL-6の濃度を求めた。

40

ヒト血漿におけるIL-6のEC50値及びEC95値をそれぞれ27.29ng/mL及び885ng/mLと求めた。続いてこれらの濃度を通常濃度及び高濃度のIL-6でのナノボディの効力を試験するのに用いた。

【0515】

IL6R20A11及びフォーマットされた変異体を実施例1に記載のような参照IgGと比較した。様々なナノボディで得られたIC50値を表C-30に要約する。IL-6のEC50では(図38A、図38B)、一価及び二価のIL-6Rナノボディの両方が参照IgGと同じ範囲内であった。IL6R304は1つだけしか結合部位を有していないが、参照IgGと同程度のIC50を有していた(0.229nM対0.258nM)。IL6R305はIL6R304の2倍の効力を有するようであったが(0.137

50

nMのIC<sub>50</sub>)、このことはそれが2つの結合部位を有していることと一致している。しかしながら、IL6R306はIL6R304及び参照IgGよりも効力が低いようであり、0.412 nMのIC<sub>50</sub>を有していた。

#### 【0516】

最も考えられることとしては、感度がアッセイ限界に達したということであった。実際、血漿sIL-6Rの濃度は約30 ng/mL又は0.6 nMであった。そのため、0.3 nMのsIL-6Rしかナノボディにより遮断する必要がなく(50%血漿)、このことは得ることのできる最小IC<sub>50</sub>が0.15 nMであることを意味している。これは得られたIC<sub>50</sub>値に相当する。しかしながら、IL-6濃度が885 ng/mLまで増大したなら、ナノボディがIL-6と競合することがより困難となり、より大きな効力の差異を検出することができるだろう。実際、高いIL-6濃度では、IL6R20A11、IL6R304及びIL6R305は参照IgGよりも明らかに効力が高かったが、IL6R306はそうではなかった(図38C、図38D)。高濃度及び低い濃度のIL-6でのIC<sub>50</sub>の比率を表C-30に示す。明らかなことに、参照IgG及びIL6R306は他のナノボディよりもIL-6の増大による影響が大きかった。このことはTF-1アッセイでも観察された(実施例44を参照されたい)。

10

#### 【0517】

実施例46：フォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディと膜IL-6Rとの結合  
IL-6のシグナル伝達を遮断するために、可溶性IL-6R及び膜IL-6Rの両方をナノボディにより中和する必要がある。そのため、様々なフォーマットされたナノボディとIL-6Rを発現する細胞との結合をフローサイトメトリにより分析した。

20

#### 【0518】

IL-6Rを発現するCHO細胞との結合

ヒトIL-6Rを発現する安定にトランスフェクトされたCHO細胞を、抗IL-6Rナノボディと膜IL-6Rとの結合を分析するのに使用した(図39A)。IL-6R陰性CHO細胞を陰性対照として使用した(図39B)。4つ全てのナノボディがIL-6Rを発現する細胞との結合の飽和を示したが、IL-6R陰性細胞では高いナノボディ濃度でも非常に低いシグナルしか検出されなかった。

#### 【0519】

中央値のPE蛍光をGraphPadにエクスポートし、4PL曲線を適合させ、EC<sub>50</sub>値を求めた。これらを表C-31に要約する。TF-1アッセイとは対照的に、IL6R305はこの設定では結合活性効果から利益を受けないと考えられた：IL6R305はIL6R304よりもわずかに2倍効力が高いだけであった(0.8984 nM対1.939 nM)。TF-1及び血漿ELISAの場合とも同様に、IL6R306はIL-6R陽性細胞にあまり結合しなかった。

30

#### 【0520】

末梢血白血球との結合

ヒトPBLを、生理的条件下でのナノボディと膜IL-6Rとの結合を実証するのに使用した。このマトリクスはHSA(約50 mg/mL)、sIL-6R(約30 ng/mL)、膜IL-6Rを発現する細胞(CD4<sup>+</sup>T細胞、単球、顆粒球)及びIL-6R陰性細胞(ほとんどが循環性B細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞)を含有しているため、*in vivo*状況と関連性が高い。ナノボディを2つのドナー由来のEDTAで処理した血液中でインキュベートし、結合したナノボディをフローサイトメトリにより検出した。リンパ球、単球及び顆粒球をFSC/SSC特性に基づきゲーティングし(図40)、結合したナノボディをPEチャンネルで検出した。

40

#### 【0521】

図40(右側)で観察することができるように、顆粒球及び単球をナノボディにより均一に染色した。これに対して、リンパ球は一部だけ染色した。これはPEヒストグラムにおいて2重のピークとして見ることができる。様々な濃度のナノボディとインキュベートした後の3つのゲーティングされた集団の平均蛍光を図41に示し、得られたEC<sub>50</sub>値

50

を表 C - 3 2 に要約する。

【 0 5 2 2 】

実施例 4 7 : ヒト及びカニクイザルの血清アルブミンに対するフォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディの親和性

ヒト及びカニクイザルの血清アルブミンに対する二重特異性、二価及び三価のナノボディ I L 6 R 3 0 4、I L 6 R 3 0 5 及び I L 6 R 3 0 6 の動態分析を B i a c o r e 3 0 0 0 機器で S P R により行った。結果を図 4 2 に示し、表 C - 3 3 に要約した。ナノボディ I L 6 R 3 0 4、I L 6 R 3 0 5 及び I L 6 R 3 0 6 はヒト及びカニクイザルの S A に対して同程度の動態速度定数及び親和性 ( 1 7 n M ~ 2 3 n M ) を示した。S A に対するフォーマットされた I L - 6 R ナノボディの親和性は、結合速度の 2 . 5 倍の低減及び解離速度の 2 . 5 倍の増大により一価抗 S A ナノボディ A L B 1 1 と比較して 6 . 5 倍低かった。

10

【 0 5 2 3 】

実施例 4 8 : ヒト及びカニクイザルの I L - 6 R に対する親和性

ヒト及びカニクイザルの I L - 6 R に対する動態分析を B i a c o r e T 1 0 0 機器で S P R により行った。チップに直接固定化した場合の I L - 6 R の立体構造変化の示唆により、結合速度を B N - 1 2 により捕捉された I L - 6 R で測定した。ナノボディ - I L - 6 R 相互作用より解離速度が低いために捕捉ツールの可用性が喪失するので、解離速度を直接固定化した I L - 6 R で測定した。結果を表 C - 3 4 及び図 4 3 に示す。

【 0 5 2 4 】

2 0 A 1 1 ( I L 6 R 3 0 0 ; 配列番号 6 6 ) の結合速度は抗 S A 構成要素によるフォーマッティング ( I L 6 R 3 0 4 ) により 2 倍未満低減した。ヒト I L - 6 R に対する I L 6 R 3 0 4 に関する解離速度は B i a c o r e 機器の検出限界以下であった。カニクイザル I L - 6 R での解離速度はヒト I L - 6 R でのものより 2 倍以上高かったが、依然として検出限界付近であった。I L 6 R 3 0 4 で算出された親和性はヒト I L - 6 R で 1 4 p M 以下、及びカニクイザル I L - 6 R で 2 5 p M であった。

20

【 0 5 2 5 】

実施例 4 9 : I L 6 R 2 0 A 1 1 の種交差反応性

I L 6 R 2 0 A 1 1 及びそのフォーマットされた変異体とカニクイザル s I L - 6 R との交差反応性をカニクイザル血漿を用いた血漿効力 E L I S A で分析した。また、競合 E L I S A を用いて、I L 6 R 2 0 A 1 1 とカニクイザル及びマウスの s I L - 6 R との交差反応性を求めた。

30

【 0 5 2 6 】

血漿効力 E L I S A

初めに、滴定した I L - 6 をカニクイザル血漿中でインキュベートし、I L - 6 の E C 5 0 値を 5 0 . 1 1 n g / m L と求めた。続いてこの濃度の I L - 6 をナノボディとカニクイザル血漿 s I L - 6 R との交差反応性を試験するのに使用した。図 4 4 で観察することができるように、I L 6 R 2 0 A 1 1 及びフォーマットされた変異体は明らかにカニクイザル s I L - 6 R と交差反応性であった。同じ傾向 ( ranking ) をヒト血漿でも見ることができ、ヒト血漿対カニクイザル血漿の I C 5 0 値の比率は全ての化合物で同様であった ( 表 C - 3 5 ) 。

40

【 0 5 2 7 】

競合 E L I S A

血漿効力 E L I S A は B N - 1 2 がこの特定の種由来の血漿 s I L - 6 R を捕捉することができる、かつ I L - 6 と s I L - 6 R との結合を検出することができる場合にしか使用することができない。そのため、より包括的な ( generic ) 競合 E L I S A を開発した。このアッセイは I L 6 R 2 0 A 1 1 とニュートラアビジンで捕捉された I L - 6 R - b i o との結合に基づいていた。簡単に言うと、0 . 4 n M の I L 6 R 2 0 A 1 1 を内因性の s I L - 6 R を含有する様々な種由来の滴定系列の血漿とプレインキュベートし、その後遊離 I L 6 R 2 0 A 1 1 をニュートラアビジンコーティングプレート上で固定化されたビ

50

オチン化ヒト s I L - 6 R で捕捉し、抗 V H H モノクローナル抗体：F I T C 及び抗 F I T C - H R P により検出した。0.4 nM の I L 6 R 2 0 A 1 1 濃度は最大シグナルの 50% をもたらす濃度に相当する (0.35 ± 0.021 nM の E C<sub>50</sub>; n = 4)。

#### 【0528】

図 45 で観察することができるように、I L 6 R 2 0 A 1 1 は明らかにカニクイザル s I L - 6 R と交差反応性であり、このことが B i a c o r e による結果を確認している。これに対して、マウス s I L - 6 R との結合は観察することができなかつた。ヒト及びカニクイザルの血漿は I L 6 R 2 0 A 1 1 と組換え s I L - 6 R との結合とも競合したが、マウス血漿は競合しなかつた。実際、高濃度のマウス血漿でシグナルの増大が観察されたが、これはおそらくはこのアッセイでのマウス免疫グロブリンの検出によるものであった。

10

#### 【0529】

実施例 50：I L - 6 R に対する I L 6 R 2 0 A 1 1 の特異性

I L - 6 R は I 型サイトカイン受容体ファミリーに属する。これらの受容体のサイトカイン結合領域は保存されているので、I L - 6 R に対する I L 6 R 2 0 A 1 1 の特異性を I L - 6 R に関連する受容体との結合を分析することにより分析した。I L 6 R 2 0 A 1 1 と L I F - R、C N T F - R、O S M - R 及び I L - 1 1 R / F c との結合を競合結合 E L I S A で分析した。図 46 で観察することができるように、陽性対照 s I L - 6 R は I L 6 R 2 0 A 1 1 とプレートとの結合を阻害した。s I L - 6 R に対する I C 50 (0.03 nM) は用いられた I L 6 R 2 0 A 1 1 の量に基づき予測された I C 50 に一致していた (0.025 nM 対 0.05 nM)。I L - 6 R 関連タンパク質は、100 倍モル過剰 (5 nM) であっても I L 6 R 2 0 A 1 1 と s I L - 6 R との結合に競合しないと考えられた。同様の設定で、C L F - 1 / C L C、I L 1 2 - p 4 0、I L - 2 7 B 及び g p 1 3 0 / F c も、100 nM と高濃度であっても 0.05 nM の I L 6 R 2 0 A 1 1 と相互作用しないことが示された (結果は示さない)。

20

#### 【0530】

V I I . I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の i n v i v o での P K / P D 分析

この研究の目的は単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける配列を最適化した親和性成熟を行った 2 つの抗インターロイキン 6 受容体 (I L - 6 R) ナノボディ、すなわち I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の血漿薬物動態 (P K)、薬効 (pharmacodynamics) (P D) 及び免疫原性を分析することであった。ナノボディの投与後に、ナノボディ投与の 24 時間後から始めて 7 日間毎日組換えヒト (h) I L - 6 を皮下注射した。この i n v i v o 有効性研究の最終的な目的はこれらの抗 I L - 6 R ナノボディが h I L - 6 誘導性のパラメータを阻害する能力を評価し、互いに及び実施例 1 のベンチマーク参照とそれらの有効性を比較することであった。

30

#### 【0531】

非ヒト霊長類及びヒトでは、組換え h I L - 6 は急性期タンパク質の合成を誘導すると報告されている。急性期タンパク質は、その血漿濃度が主に肝細胞による産生の変化により炎症に反応して少なくとも 25% 増減する或る種類の血漿タンパク質、例えば C 反応性タンパク質 (C R P)、血清アミロイド A、ハプトグロビン、フィブリノゲン、アルブミン及びトランスフェリンと規定される。サイトカイン産生パターン及び急性期反応は様々な炎症条件で異なる。そのため、急性期変化は炎症の存在及び強度を反映し、それらを診断に関連のあるものにする。急性期タンパク質の産生の主な刺激因子は炎症関連サイトカインであり、これは炎症プロセス中に産生される：I L - 6、I L - 1、腫瘍壊死因子 - (T N F -)、インターフェロン - (I N F -)、形質転換成長因子 (T G F -) 及び可能性としては I L - 8。

40

#### 【0532】

実施例 51：研究設計

この研究では、2 ~ 3 匹の動物の 6 つの群 (群 6 ~ 群 11、表 C - 36) に I L 6 R 3 0 4 又は I L 6 R 3 0 5 の単回静脈内注射を行った。両方のナノボディで、3 つの異なる

50

用量、すなわち  $0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $2 \text{ mg/kg}$  又は  $10 \text{ mg/kg}$  を試験した。さらに、群 12 の動物 ( $n = 3$ ) はビヒクルを投与され、陰性対照の役割を果たすが、群 13 の動物 ( $n = 3$ ) には  $5 \text{ mg/kg}$  の参照 IgG を注射した (表 C - 36)。

【0533】

T D 1、すなわち試験項目投与の 24 時間後から始めて、全ての動物に h I L - 6 ( $5 \mu\text{g/kg}$ ; 図 47) を 1 日 1 回 7 日間注射した。

【0534】

血液試料を所定の時点での h I L - 6 の注射の前後で橈側皮静脈又は大伏在静脈を介して回収した (図 47 を参照されたい)。P K 分析のためにさらに血液試料を T D 0 で採取した (表 C - 37 を参照されたい)。

【0535】

実施例 52: h I L - 6 誘導性の急性期応答 (第 2 相) に対するナノボディの効果

h I L - 6 の 7 日間連続した毎日の注射により急性期応答の誘導に対するナノボディ及び陽性参照 IgG の効果を分析した。読み取り項目 (Read-outs) は C R P レベル、フィブリノゲンレベル及び血小板数であった。

【0536】

陰性対照群 (群 12) では、C R P レベルは 1 回目の h I L - 6 の注射直後に上昇し、2 日目で既に最大レベルに達した。達成された最大レベルは  $0.2 \text{ mg/mL} \sim 0.8 \text{ mg/mL}$  であり、このプラトーは最後の h I L - 6 注射日の翌日である 8 日目まで維持された (図 48 A)。

【0537】

これらの変化は  $5 \text{ mg/kg}$  の参照 IgG による前処理により完全に阻害された (図 48 B)。また同程度の用量 ( $2 \text{ mg/kg}$ ) 又は 5 倍用量 ( $10 \text{ mg/kg}$ ) のナノボディ I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 による単回の前処理により、実験の全経過中に C R P 誘導のほぼ完全な阻害がもたらされた (図 48 C 及び図 48 D)。I L 6 R 3 0 4 の最高用量群における番号 18 の動物だけが幾らかの誘導を示し、最大血清 C R P レベルが  $0.1 \text{ mg/mL}$  付近に達した。最低用量群 ( $0.4 \text{ mg/kg}$ ) では、両方のナノボディが 7 日間完全な阻害をもたらした。C R P レベルは 8 日目でのみ陰性対照群と同程度のレベルまで増大した (図 48)。全ての群の平均 C R P レベルは図 49 に見ることができる。

【0538】

フィブリノゲンレベルは陰性対照群において基礎レベルの 5 倍の平均最大値までゆっくりと増大した (図 50 A)。この最大値には 6 日目で到達し、さらに 2 日間維持された。14 日目では、フィブリノゲンレベルは基礎レベルに戻った。参照 IgG はフィブリノゲンの誘導を完全に阻害することができた (図 50 B)。両方のナノボディはフィブリノゲン誘導の用量依存的な阻害を示した (図 50 C 及び図 50 D)。最高用量群では、阻害は I L 6 R 3 0 4 で前処理した両方の動物で、及び I L 6 R 3 0 5 で前処理した 2 匹の動物のうちの 1 匹でほぼ完全であった。番号 25 の動物 ( $10 \text{ mg/kg}$  の I L 6 R 3 0 5) と両方のナノボディの中程度の用量群及び最低用量群の全ての動物とのフィブリノゲンレベルの増大はほんのわずかであった。しかしながらこれらの動物では、フィブリノゲンレベルは基礎レベルの 2 ~ 3 倍を決して超えなかった。全ての群の平均フィブリノゲンレベルを図 51 に見ることができる。

【0539】

陰性対照群における全ての動物で、血小板数は 5 日目からゆっくりと増大した。最大レベルには 8 日目 ~ 14 日目に到達し、基礎レベルの  $160\% \sim 190\%$  であった。血小板数に対する h I L - 6 の効果は  $5 \text{ mg/kg}$  の参照 IgG 又は  $2 \text{ mg/kg}$  以上のナノボディによる単回の前処理により完全に遮断された。血小板数の誘導はナノボディの最低用量群でのみ観察され、8 日目には全ての動物で開始された。I L 6 R 3 0 4 では最大誘導は基礎レベルのおよそ  $120\% \sim 150\%$  であったが、I L 6 R 3 0 5 では最大の血小板数は基礎レベルの  $160\% \sim 180\%$  であった (図 52 及び図 53)。

## 【0540】

結論として、IL6R304及びIL6R305は3つ全ての急性期応答パラメータの同様の用量依存的かつ完全な阻害を示した。

## 【0541】

実施例53：カニクイザルにおけるIL6R304又はIL6R305（0.4mg/kg、2mg/kg、10mg/kg）の静脈内投与後の血漿濃度

血漿薬物動態（PK）分析、ELISA試料分析のための血液試料をIL6R304又はIL6R305の投与前、及び以下の投与後の時点で採取した：5分及び30分、3時間及び8時間、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、8日目、14日目、21日目及び29日目。

10

## 【0542】

IL6R304（0.4mg/kg、2mg/kg、10mg/kg）及びIL6R305（0.4mg/kg、2mg/kg、10mg/kg）のカニクイザルへの静脈内投与後の個々で観察された血漿濃度 - 時間プロットをそれぞれ図54及び図55に示す。

## 【0543】

実施例54：カニクイザルにおけるIL6R304及びIL6R305（0.4mg/kg、2mg/kg、10mg/kg）の非コンパートメント薬物動態分析

カニクイザルにおけるIL6R304（0.4mg/kg、2mg/kg、10mg/kg）及びIL6R305（0.4mg/kg、2mg/kg、10mg/kg）の非コンパートメントPK分析により得られた基礎PKパラメータの概要を表C-38、表C-39、表C-40、表C-41、表C-42及び表C-43に示す。本明細書で論じられているPKパラメータはWinNonlin Professional Software Version 5.1（Pharsight Corp）を用いた非コンパートメント分析（NCA）により得られる。幾つかの動物に関する最終的なパラメータは2つのデータ点のみで算出した（デフォルト設定で $R^2$ は1である）。

20

## 【0544】

カニクイザルで静脈内投与された両方のナノボディでは、血漿濃度は三段階で低下しているように思われた。投与後最初の2日間で、最初の体内動態（disposition）相があり、その後より緩やかな優位相が続いた。より低い濃度での段階的低下により、短い半減期を特徴とする終末相が生じた。

30

## 【0545】

抗薬物抗体がほとんどのカニクイザルの血漿試料で検出されたので、より低い濃度での最終半減期の変化は免疫媒介性のクリアランス機構と結び付いている可能性がある。しかしながら、これはPKプロファイルの検査で起こりそうもないことである：免疫原性が検出されない時点において最低用量で最も短い半減期が観察されている。さらに、より高い用量で検出可能な力価が存在するにもかかわらず、依然として半減期がより長くなる傾向がある（例えば10mg/kgのIL6R304（静脈内））。

## 【0546】

PKプロファイル観察結果に基づき、両方のナノボディが少なくとも2つの機構を介して循環血液から除去されることが予測される。このような状況において、線形不飽和クリアランス機構は化合物の非特異的な分解を表す。第2の飽和クリアランス機構は標的により媒介される（例えば膜結合IL-6Rとの薬物結合の内在化、及び続くクリアランス）。より高いナノボディ濃度で、第2のクリアランス機構は線形不飽和クリアランスと比較して飽和しており、かつ無視できる程度のものであることが予測される：線形クリアランスが優位である（優位な半減期をもたらす）。しかしながらより低い濃度では、代謝の速度は所与のナノボディ濃度でより高く、それにより最終傾き（terminal slope）が変化する。

40

## 【0547】

標的により媒介されるクリアランスのために、クリアランス及び半減期のようなNCA分析で得られるPKパラメータは用量依存的及び時間依存的であると考えられる。総クリ

50

アランスは最低用量で最も高い：より高い用量での I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 での 1 0 . 4 m L / 日 / k g ~ 9 . 0 0 m L / 日 / k g 及び 5 . 9 3 m L / 日 / k g ~ 7 . 7 6 m L / 日 / k g と比較した 0 . 4 m g / k g の静脈内投与後の I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 での 2 4 . 8 m L / 日 / k g 及び 3 5 m L / 日 / k g 。それに対応して、用量を正規化した曝露は最低用量でより低くなる (用量 = C L × A U C ) 。

#### 【 0 5 4 8 】

I L 6 R 3 0 4 の優位半減期は 1 0 m g / k g 、 2 m g / k g 及び 0 . 4 m g / k g の静脈内投与後に 6 . 6 1 日から 5 . 0 0 日及び 1 . 7 3 日まで低減した。I L 6 R 3 0 5 の優位半減期は 1 0 m g / k g 、 2 m g / k g 及び 0 . 4 m g / k g の静脈内投与後に 7 . 3 7 日から 4 . 2 9 日及び 1 . 6 4 日まで低減した。より早い時点ではより多くのデータ点が利用可能であるために、終末相は最低用量で最も十分に特徴付けられた： 0 . 4 m g / k g の I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の静脈内投与後に、それぞれ 0 . 5 3 0 日及び 0 . 4 7 0 日の短い最終半減期が観察された。

10

#### 【 0 5 4 9 】

これらの P K 所見に基づくと、I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の薬物動態特性は同様のものであると考えられる。

#### 【 0 5 5 0 】

サル 1 4 m 及びサル 1 5 f ( 2 m g / k g ( 静脈内 ) ) では試験 2 9 日目で、低い I L 6 R 3 0 4 濃度レベルが依然として検出可能であった。他のサルの P K プロファイルに基づき、これらの観察結果は予期せぬものであった。これは、非常に低い濃度でのみ現れる、第 2 のタイプの飽和型の標的結合を示している可能性がある。しかしながら、これらの観察結果は P K E L I S A 試料分析の人為的な結果 ( artifact ) である可能性もある。

20

#### 【 0 5 5 1 】

N C A 分析を介して算出した報告された分布体積は両方のナノボディでのおよそ 4 0 m L / k g の血漿体積の 1 倍 ~ 2 倍の範囲と低いものであり、これにより血管空間外での分布の制限が示唆される。しかしながら、真の V s s は N C A と結び付いた方法論的誤差のために過小評価され得る ( 例えば周辺空間でのナノボディ分布及び続く分解は分布期間ではなく、総全身クリアランスに起因する ) 。 V s s は様々な用量レベルでほぼ一定であると思われる。

#### 【 0 5 5 2 】

P K プロファイルに対する標的結合の可能性のある効果を示すために、図 5 6 では I L 6 R 3 0 4 ( 0 . 4 m g / k g 、 2 m g / k g 、 1 0 m g / k g ( 静脈内 ) ) 及び I L 6 R 2 0 2 ( 2 m g / k g ( 静脈内 ) 、 配列番号 7 3 ) の平均 P K プロファイルと比較している。例示目的で、I L 6 R 2 0 2 ( 2 m g / k g ( 静脈内 ) ) の P K プロファイルを 0 . 4 m g / k g 及び 1 0 m g / k g 用量にも正規化した。I L 6 R 3 0 4 はカニクイザルでは I L - 6 R と結合することが示されたが、I L 6 R 2 0 2 ではカニクイザルでは標的結合が喪失した ( 国際公開第 0 9 / 0 1 0 5 3 9 号 ) 。これに対応して、線形クリアランスが優位な高濃度では、両方のナノボディのプロファイル ( 及び対応する半減期 ) は同様なものである。より低い濃度では、I L 6 R 3 0 4 ではおそらく標的媒介性のクリアランスにより傾きの段階的变化が観察されるが、I L 6 R 2 0 2 では最終傾きは変化しない。しかしながら、より低い濃度の I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 は、特に高い I L - 6 R レベルが存在する場合、P K E L I S A での I L - 6 R 干渉により幾らか過小評価される可能性もある。

30

40

#### 【 0 5 5 3 】

実施例 5 5 : 抗 I L 6 R 3 0 4 抗体及び抗 I L 6 R 3 0 5 抗体の検出

I L 6 R 3 0 4 又は I L 6 R 3 0 5 の投与前及び投与後様々な日数で採取された一連の血漿試料を、ナノボディ又はその 1 つ又は複数の構成要素と結合することが可能であるサル抗体 ( I g G アイソタイプ ) の存在に関してスクリーニングした。I L 6 R 3 0 4 を投与した動物由来の試料を、I L 6 R 3 0 4 ( 図 5 7 ) 、 I L 6 R 3 0 0 ( 図 5 8 ) 又は A L B 8 ( 図 5 9 ) のいずれかでコーティングしたプレート上で分析した。I L 6 R 3 0 5

50

を投与した動物由来の試料を、IL6R305 (図60)、IL6R300 (図61)又はALB8 (図62)のいずれかでコーティングしたプレート上で分析した。

【0554】

完全なナノボディ (IL6R304及びIL6R305)に対する抗薬物抗体 (ADA)発生 (appearance)の概要を表C-44に示す。IL6R300及びALB8に対してはより低い応答しか又は全く応答が見られなかった。結論として、IL6R304の静脈内注射後、ADAは全てのサルで検出可能であった (投与前の値が高いためにADAを決定することができなかった16番の動物を除く)。0.4mg/kgで投与したサルでの投与の1週間後、並びに2mg/kg及び10mg/kgで投与したサルでの投与の2週間後、抗体が発生した。最も高いADA力価は番号11及び番号13の動物で得られた (両方とも0.4mg/kgの用量)。IL6R305の静脈内注射後、ADAは全てのサルで検出可能であった (ADAが検出されなかった23番の動物を除く)。0.4mg/kgでの投与したサルでの投与の1週間後、並びに2mg/kg及び10mg/kgでの投与したサルで投与の2週間後、抗体が発生した。最も高いADA力価は番号22及び番号24の動物 (両方とも2mg/kgの用量)並びに番号25及び番号26の動物 (両方とも10mg/kgの用量)で得られた。

10

【0555】

実施例56: sIL-6Rレベルに対するナノボディの効果

公的に利用可能なデータ (Nishimoto et al., 2008, Blood 112 (10):3959-64)に基づき予想されるように、参照IgGによる処理により血漿sIL-6Rの増大がもたらされるが、ビヒクルによる処理では増大しなかった (図63A)。同様に、低用量のIL6R304は3匹のサル全てでsIL-6Rレベルの迅速な増大を誘導した (図63B)。IL6R305で処理した動物では、血漿sIL-6Rも増大したが、他の処理群ほど顕著ではなかった (図63C)。

20

【0556】

VIII. IL6R304の有効性

実施例57: 有効性研究におけるsIL-6Rレベルに対するナノボディの効果

血漿における総sIL-6Rレベル (遊離型、ナノボディ結合型及びIL-6結合型)をELISAで測定した。公開データ (Nishimoto et al., 2008, Blood 112 (10): 3959-64)に基づき予想されるように、参照IgGによる処理により血漿sIL-6Rの増大がもたらされたが、ビヒクルによる処理では増大しなかった (図64A)。同様に、ナノボディで処理した動物全てがsIL-6Rレベルの迅速な増大を示した。これは遊離sIL-6Rと比較した参照IgG-sIL-6R複合体又はナノボディ-sIL-6R複合体のより緩やかなクリアランスにより説明することができる。

30

【0557】

最大sIL-6Rレベル及び効果持続期間は明らかに用量依存的であった。また、ナノボディの効果は参照IgGのものよりも顕著であると考えられる (図64において2mg/kgの用量のナノボディと参照IgGとを比較されたい)。これはおそらく抗体免疫複合体のより迅速なFc媒介性の除去により説明することができる。しかしながら驚くべきことに、sIL-6R及び効果持続期間の増大はIL6R305 (図64B)と比較してIL6R304 (図64A)でより顕著であった。

40

【0558】

実施例58: 有効性研究におけるIL-6レベルに対するナノボディの効果

血漿における総IL-6レベル (遊離型、sIL-6R結合型)をGyroLabプラットフォームにより測定した。このアッセイでは、ビオチン化ラット抗ヒトIL-6モノクローナル抗体をIL-6を捕捉するのに使用し、Alexaで標識したマウス抗ヒトIL-6モノクローナル抗体を検出するのに使用した。このアッセイは、内因性カニクイザルIL-6及び1日目~8日目に毎日注射した組換えヒトIL-6の両方を測定する。このため、1日目までに測定することができるIL-6 (=内因性のカニクイザルIL-6のみ)と2日目~29日目のIL-6 (=投与されたヒトIL-6+内因性のカニクイザ

50

ル I L - 6 ) とを区別する必要がある。

【 0 5 5 9 】

図 6 5 で観察することができるように、I L 6 R 3 0 4、I L 6 R 3 0 5、参照 I g G 及びわずかにプラシーボの投与により、投与後 8 時間でピークに達した I L - 6 の一時的な増大がもたらされた。しかしながら、この増大はナノボディで処理した群で顕著に高かった。無関連のナノボディの投与によっても一時的に I L - 6 応答がもたらされた ( 図 6 5 D ) ため、I L - 6 に対する効果は I L - 6 R を標的とするナノボディに特異的なものではないと考えられた。I L - 6 の初期増大はおそらく動物の取扱いによるストレス、及び可能性としてはナノボディ調製物中の微量のエンドトキシンによる I L - 6 産生のさらなる増大により説明することができる。

10

【 0 5 6 0 】

I L - 6 処理期間中、毎日 I L - 6 を注射する前に毎回血液をサンプリングした。ナノボディ又は参照 I g G ではなく I L - 6 を投与したプラシーボ群では、ほとんど I L - 6 が検出されなかった ( 図 6 5 C ) 。このことは皮下注射後のヒト I L - 6 の短い半減期と一致している ( Tsigos, et al., 1997, J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4167-70 ) 。しかしながら、2 m g / k g ~ 1 0 m g / k g の参照 I g G、I L 6 R 3 0 4 又は I L 6 R 3 0 5 で処理した全ての動物で、2 日目 ~ 8 日目で I L - 6 を検出した。このことは I L - 6 の受容体媒介性のクリアランスの遮断、それによるその半減期の長期化により説明することができる ( Nishimoto et al., 2008, Blood 112 ( 10 ) : 3959-64 ) 。したがって、循環する I L - 6 は I L - 6 R の中和に関する薬力学的バイオマーカーの機能を果たし

20

【 0 5 6 1 】

I X . I L 6 R 3 0 4 の薬効

実施例 5 9 : カニクイザルにおける単回投与後の薬力学的効果

s I L 6 R 血漿濃度の変化を、健全な ( すなわち非刺激 ) カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の単回静脈内投与後でも測定した。この単回投与 P K / P D 研究では、用量は 1 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k g の範囲であった。血液サンプリングを薬力学的分析、免疫原性分析及び薬効分析のために行った。E L I S A ベースのアッセイを総 s I L 6 R レベルを測定するのに使用し、G y r o l a b ( 商標 ) プラットフォームを用いたリガンド結合アッセイを遊離 s I L 6 R レベルを測定するのに使用した。総 s I L 6 R アッセイのために、非中和抗 I L 6 R モノクローナル抗体を s I L 6 R ( 遊離型 + 複合体 ) を捕捉するのに、ストレプトアビジン - H R P と組み合わせたビオチン化ポリクローナル抗 I L 6 R ツールを検出のために使用した。遊離 s I L 6 R アッセイのために、ビオチン化 2 0 A 1 1 構成要素を遊離 s I L 6 R を捕捉するのに、A l e x a で標識した非中和抗 I L 6 R モノクローナル抗体を検出のために使用した。

30

【 0 5 6 2 】

単回投与 P K / P D 研究の結果により、( i ) 最大の総 s I L 6 R 濃度 ( 図 6 6 A )、( i i ) ( 総 s I L 6 R の増大の持続期間 ( 図 6 6 A ) 及び ( i i i ) 遊離 s I L 6 R の抑制の持続期間 ( 図 6 6 B ) に対する I L 6 R 3 0 4 の用量依存的な効果が確認された。概して、総 s I L 6 R 濃度及び遊離 s I L 6 R 濃度は所定の時間後ベースラインレベルまで戻った ( 用量依存的に ; 最も長い上昇及び抑制が最大用量で見られる ) 。1 m g / k g と低用量の I L 6 R 3 0 4 の投与後の遊離 s I L 6 R の濃度はおよそ 8 日間減少し、それからビヒクルで処理した動物のものを超える濃度まで増大した。

40

【 0 5 6 3 】

総 s I L 6 R レベルと、遊離 s I L 6 R レベル ( P D ) と、I L 6 R 3 0 4 濃度との間で良好な逆相関が観察され、これにより s I L 6 R を活性薬物の存在に関するバイオマーカーとして使用することができることが確認された。図 6 7 は 3 つのパラメータ間の相互作用 ( interplay ) を明らかにする 1 つの例を示す ( 中程度の用量群でベースラインレベルへの回復を実証することができるので、この群を選択した ) : I L 6 R 3 0 4 の投与により総 s I L 6 R 濃度の増大がもたらされ、安定化された薬物 - s I L 6 R 複合体が形成

50

された。IL6R304 血漿濃度が低減すると、同時に複合体形成した受容体から構成されるほとんどの総 sIL6R と同様、総 sIL6R の濃度も低減した。このことは循環血液から IL6R304 が排除される際に基礎レベルへと回復する低い遊離 sIL6R 濃度により確認される。低い遊離 sIL6R 濃度により、測定された総 sIL6R が実際に不活性であり、IL6R304 と複合体形成していることが確認される (図 67)。

【0564】

実施例 60 : PK/PD モデリングによる薬力学的効果の説明

総 sIL6R レベルに対する IL6R304 投与の影響は IL6R304 と受容体との直接結合により説明することができ、複合体は IL6R304 の半減期延長部分 (すなわちアルブミン結合) を介して循環血液中に留まる。総 sIL6R 濃度の測定可能な変化は時間遅延動態に従うので、間接的な応答モデルは、PK/PD 関係性を最も良く説明しており、sIL6R - IL6R304 複合体レベルの集積に対する静脈内投与した IL6R304 の効果を説明するのに使用された。このモデルは、IL6R304 と結合する場合の sIL6R の排除の阻害に起因する薬物応答を説明している。この間接的な応答モデルでは、総 sIL6R - IL6R304 複合体の変化速度 (応答 R) は、

【数 1】

$$\frac{dR}{dt} = K_{in} - K_{out} * \left[ 1 - I_{max} * \frac{C^n}{IC_{50}^n + C^n} \right] * R$$

( $K_{in}$ 、ゼロ次合成速度;  $R$ 、総 sIL6R;  $I_{max}$ 、最大阻害;  $C$ 、IL6R304 血漿濃度;  $n$ 、用量応答形状因子; 及び  $K_{out}$ 、sIL6R の一次排除速度定数) により説明される。

【0565】

単回投与 PK/PD 研究による利用可能な静脈内の総 sIL6R データを全て、間接的な応答 PK/PD モデルの入力関数として実施例 61 に記載のような薬物動態関数を用いたモデル (WinNonlin Professional Software Version 5.1, Pharsight Corporation, Mountain View California, USA) に同時に適合させた。

【0566】

図 68 は 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、25 mg/kg 又は 100 mg/kg の静脈内投与後のカニクイザルにおける個々の観察された及びモデル予測された総 sIL6R 濃度 - 時間データを示す。カニクイザルにおける IL6R304 の推定薬力学的パラメータを表 C-45 に挙げている。全てのパラメータを 50% 未満の CV% 値により示されるように十分な精度で推定した。

【0567】

単回投与 PK/PD 研究による静脈内投与後のデータを全て、sIL6R、IL6R304、及び sIL6R - IL6R304 の複合体の挙動を説明する間接的な応答モデルに同時に適合させた。

【0568】

sIL6R の平均半減期はおよそ 5.8 時間 ( $= \ln 2 / K_{out}$  ( $K_{out} = K_{in} / R_0$ )) であると推定され、推定産生速度は 2.49 ng/mL/時間であった。IL6R304 は一次経路により sIL6R の排除をほぼ完全に阻害することができた ( $I_{max} = 97\%$ )。そのため排除速度はカニクイザル血清アルブミンのものと相関関係にある新たな最大減少した  $k_{out}$  まで変化した。続いて総 sIL6R の新たな基礎レベルが確立された。推定  $IC_{50}$  が 125 ng/mL すなわち 4.48 nM であるので、IL6R304 はカニクイザルにおける複合体形成していない sIL6R の排除の強力な阻害因

子であることが示された。

【0569】

X . I L 6 R 3 0 4 の薬物動態

実施例 6 1 : カニクイザルにおける薬物動態

この項は 1 つの交差反応種 ( カニクイザル ) における静脈内投与した I L 6 R 3 0 4 の薬物動態挙動を特性決定するデータを要約する。

【0570】

健常な ( 非誘導性 ) カニクイザルでは、正規の ( qualified ) D E L F I A ( 解離増強ランタニド蛍光免疫測定 ( dissociation enhanced lanthanide fluoro-immunoassay ) ) 法を用いて I L 6 R 3 0 4 の濃度を測定した。活性のある I L 6 R 3 0 4 の総濃度を I L 6 R 依存アッセイにより測定した。

10

【0571】

単回投与 P K / P D 研究では、I L 6 R 3 0 4 を健常な雄カニクイザルに 0 m g / k g 、 1 m g / k g 、 5 m g / k g 、 1 0 m g / k g 、 2 5 m g / k g 及び 1 0 0 m g / k g の単回静脈内ボラスとして投与した。P K、A D A ( 抗薬物抗体 ) 及び P D の分析目的で血液試料を投与前及び投与後の選択された時点で全ての動物から回収した。P K、P D 及び A D A のために試料を分析した ( 実施例 6 2 も参照されたい ) 。

【0572】

有効な電気化学発光 ( E C L ) 架橋スクリーニング及び立体構造アッセイを抗 I L 6 R 3 0 4 抗体を検出するのに使用した。簡単に言うと、I L 6 R 3 0 4 を M S D S e c t o r I m a g e r 2 4 0 0 を用いて同種のアッセイフォーマットで抗薬物抗体 ( A D A ) を捕捉及び検出するのに使用した。

20

【0573】

P K 分析のために、I L 6 R 3 0 4 をストレプトアビジンコーティングプレート上でピオチン化抗ナノボディツール ( 3 E 8 b i v - b i o ) により捕捉した。標的 I L 6 R との複合体形成工程後、I L 6 R に対するユーロピウムで標識したモノクローナル抗体を増強溶液中で蛍光シグナルを発生させるのに使用した。

【0574】

I L 6 R 3 0 4 の平均血漿濃度 - 時間プロファイルを図 6 9 に示す。1 m g / k g 、 5 m g / k g 、 1 0 m g / k g 、 2 5 m g / k g 又は 1 0 0 m g / k g の単回静脈内ボラス投与後の I L 6 R 3 0 4 の重要な薬物動態パラメータの要約を表 C - 4 6 に示す。

30

【0575】

静脈内投与後の薬物動態プロファイルは三段階の低下を示した。投与後最初の 2 日間で、分布相が観察され、その後より緩やかな優位相及びより迅速な終末相が続いた。分布相は迅速な分布 ( 浅部コンパートメント ) 及び緩やかな分布 ( 深部コンパートメント ) にさらに分けることができる。排除相に基づき、I L 6 R 3 0 4 は 2 つの機構、すなわち線形不飽和型クリアランス機構 ( 非特異的な排除すなわち C L N O N - I L 6 R ) 及び非線形飽和型クリアランス機構 ( 標的媒介性の又は特異的な排除すなわち C L I L 6 R ) により除去されると推測される。非線形飽和型クリアランス機構は膜結合 I L 6 R に結合した I L 6 R 3 0 4 の内在化、及び続く I L 6 R 3 0 4 - m I L 6 R 複合体のクリアランスの結果であり得る。

40

【0576】

I L 6 R 3 0 4 のクリアランスは飽和型経路と不飽和型経路との組合せであるので、カニクイザルにおける血漿中の動態は用量依存性のかつ所与の用量レベルで時間依存性でもある半減期を伴う非線形的な挙動を示した。

【0577】

C L I L 6 R が飽和状態である場合、C L 全体は主に C L N O N - I L 6 R により求められ、カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の報告された半減期は 5 . 8 日 ~ 8 . 9 日の範囲であり、カニクイザル血清アルブミンで報告されたものと同程度であった ( Nguyen e t a l . , 2006, Protein Eng. Des. Sel. 19: 291 ) 。このことは I L 6 R 3 0 4 のアルブ

50

ミン結合部分とカニクイザルアルブミンとの期待された及び確認された交差反応性に一致していた。

【0578】

単回投与後の平均曝露は、 $1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の間及び $10\text{ mg/kg} \sim 25\text{ mg/kg}$ の間では用量に比例する場合に比べ幾らか大きく増大し、 $5\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ の間では用量に比例して増大した。 $100\text{ mg/kg}$ の用量群には1匹の動物しか含まれていなかったため、この用量群の結果は注意して扱わなければならない。全体として、1つの用量群当たりのサルの数には限りがあるため、用量比例評価は予備的なものだった。

【0579】

IL6R304とsIL6Rとの結合により、sIL6RとsIL6R-IL6R304複合体とで構成されるsIL6Rの測定される総濃度が増大したが、この増大はsIL6R単独と比較して複合体のクリアランスがより緩やかであることによると考えられる。

【0580】

利用可能な免疫原性、PK及びPDデータに基づき、新たに出現するADAが最高用量群由来の2匹の動物(動物15及び動物17)においてIL6R304のPK/PDプロファイルに影響を与えられると結論付けた。両方の動物が測定可能なADAの出現と同時に起こり、薬力学的効果の低減を伴うIL6R304血漿レベルの予期せぬ低減を示した。そのため、これらの動物はPK/PD分析では検討に入れなかった。他の動物で新たに出現するADAはPK/PDプロファイルに対して明らかな効果を有しないと思われたので、これらのデータはこの分析に含められた。

【0581】

$1\text{ mg/kg}$ の用量群における1匹の動物(動物3)では、標的媒介性のクリアランスは観察されなかったが、このことはこの低用量では予測されるものだった。 $5\text{ mg/kg}$ の用量群における1匹の動物(動物6)では、用量がより高く、かつこの経路の飽和が予測されるにもかかわらず、標的媒介性のクリアランスが依然として観察された。動物間の内因性IL6R濃度の変動性が高い可能性があるため、標的媒介性のクリアランスは個体間の高い変動性の影響を受ける可能性がある。さらに、IL6R304濃度が推定KM値(ここでは $0.718\text{ }\mu\text{g/mL}$ )に近い場合、IL6R304濃度の小さい変化により非線形クリアランスが大きく変化する。両方の組合せにより、最終半減期値の高い変動性に反映される、より低い用量群での標的又は非標的媒介性のクリアランスの兆候を測定することができる。生物学的変動性により適用した方法の精度の有意な評価が排除されるため、動物3及び動物6のPKパラメータは記述統計から排除した(表C-46)。

【0582】

プラーボ群由来の動物はIL6R304に全身的に曝露させなかった。IL6R304で処理した動物の投与前試料は全て定量下限(LLoQ)未満であった。活性処理群由来の動物は用量レベルの増大に伴いIL6R304の血漿濃度の増大を示した。最大平均総曝露( $AUC_{inf}$ )は最高用量群( $100\text{ mg/kg}$ )で観察され、 $540612\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{時間/mL}$ であった。

【0583】

平均の用量で正規化した $AUC_{inf}$ 値は $5\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ の間の用量範囲にわたり用量に比例して増大し、 $1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の間及び $10\text{ mg/kg} \sim 25\text{ mg/kg}$ の間で用量に比例する場合に比べ幾らか大きく増大した(それぞれ1.3倍及び1.4倍)。最高用量群には1匹の動物しか含まれていなかったため、 $25\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ の間での用量に比例する場合に比べ大きな増大は注意して扱わなければならない。全体として、1つの用量群当たりのサルの数には限りがあるため、用量比例評価は予備的なものだった。

【0584】

特に、非コンパートメント分析のデータは、試験されたより高い用量レベルと比較した際 $1\text{ mg/kg}$ の用量レベルで半減期の差異を示した。このことは非飽和型の機構が主で

10

20

30

40

50

あるより高い用量と比較して飽和型の標的媒介性のクリアランス機構の寄与がより高いことに起因する。

【0585】

排除相に基づくと、IL6R304は2つの機構、すなわち線形クリアランス機構及び非線形クリアランス機構により除去されると推測される。線形クリアランス機構はIL6R304の非飽和型の非IL6R媒介性の除去に関連すると考えられ、IL6R304の緩やかなかつ非特異的なタンパク質分解に対応する。非線形のIL6R媒介性クリアランスプロセスは、おそらくはIL6R304と膜結合IL6Rとの結合、並びに続く内在化及びクリアランスを示す飽和型のクリアランス機構である。

【0586】

カニクイザルにおけるIL6R304の非線形薬物動態挙動を、中央のコンパートメントからの線形クリアランス及び非線形クリアランスを伴う開放型の(open)3コンパートメント薬物動態モデルにデータを適合させることにより把握した。構造モデルを図70に示す。

【0587】

単回投与PK/PD研究による利用可能な個々の静脈内の血漿濃度データを全て、反復的再重み付け(re-weighting)( $1/y \times y$ )(式中、 $y$ は予測血漿濃度である)を用いたモデル(WinNonlin Professional Software Version 5.1 (Pharsight Corporation, Mountain View California, USA))に同時に適合させた。図71は1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg又は100mg/kgの静脈内投与後のカニクイザルにおけるIL6R304の個々で観察された及びモデル予測した血漿濃度-時間プロットを示す。IL6R304の推定薬物動態パラメータを表C-47に挙げている。

【0588】

単回投与PK/PD研究によるデータを全て、中央のコンパートメントからの線形クリアランス( $CL_{NON-IL6R}$ )及び非線形クリアランス( $CL_{IL6R}$ )を伴う開放型の3コンパートメントモデルに同時に適合させた。低いIL6R304濃度( $C \ll K_m$ )では、IL6R媒介性のクリアランス( $CL_{IL6R}$ )の寄与が優位であり、 $V_{max}/K_m$ に等しい。高いIL6R304濃度( $C \gg K_m$ )では、IL6R媒介性のクリアランス経路は飽和状態になり、最大質量代謝回転(maximum mass turnover)(すなわち $V_{max}$ )で進行する。結果として、総クリアランス( $CL$ )は線形の非IL6R媒介性経路( $CL_{NON-IL6R}$ )が優位となる。

【0589】

クリアランスにおける非線形のIL6R媒介性の構成要素はカニクイザルにおけるIL6R304の半減期の時間依存性及び用量依存性の両方を説明する。

【0590】

表A-1: CDR配列の好ましい組合せ

10

20

30

【 表 2 】

Nanobody	SEQ ID	FR1	SEQ ID	CDR 1	SEQ ID	FR2	SEQ ID	CDR 2	SEQ ID	FR3	SEQ ID	CDR 3	SEQ ID	FR4	SEQ ID
PMP7F4	60	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTTFK	74	VNVMA	81	WYRQAPGKG RELVA	83	GIINGGSTITYAD SVKKG	90	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	VTTNSDYD LGRDY	95	WGGGT LVTVSS	96
PMP7C4	61	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTTFR	75	INVMA	81	WYRQAPGKG RELVA	83	GIIFNGSTSYAD SVKKG	85	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	VTTNSDYD LGRDY	95	WGGGT LVTVSS	96
PMP7D6	62	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSIFR	76	VNVMA	81	WYRQAPGKG RELVA	83	AVINGGTTTYA DSVKG	86	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	VTTNSDYD LGRDY	95	WGGGT LVTVSS	96
PMP7G7	63	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTTFK	74	INVMA	82	WYRQAPGKG RELVA	83	GVTGGNITTYA DSVKG	87	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	VTTNSDYD LGRDY	95	WGGGT LVTVSS	96
PMP7G8	64	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSIFR	77	INVMA	80	WYRQAPGKG RELVA	83	GVINDDGSTITYA DSVKG	88	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	VTTNSDYD LGRDY	95	WGGGT LVTVSS	96
PMP20F6	65	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSVFK	78	INVMA	80	WYRQAPGKG RELVA	83	GIVSGGSTSYA DSVKG	89	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	ITTNSDYDL GRRY	94	WGGGT LVTVSS	96
PMP20A11	66	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSVFK	78	INVMA	80	WYRQAPGKG RELVA	83	GIISGGSTSYAD SVKKG	84	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	ITTESDYDL GRRY	93	WGGGT LVTVSS	96
PMP20E10	67	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSVFK	78	INVMA	80	WYRQAPGKG RELVA	83	GIVSGGSTSYA DSVKG	89	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	ITTESDYDL GRRY	93	WGGGT LVTVSS	96
PMP21A10	68	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSIFK	79	INVMA	80	WYRQAPGKG RELVA	83	GIVTGGSTSYA DSVKG	91	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	ITTESDYDL GRRY	93	WGGGT LVTVSS	96
PMP21D11	69	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSVFK	78	INVMA	80	WYRQAPGKG RELVA	83	GIVTGGSTSYA DSVKG	91	RFTISRDNAKNTLYLOM NSLRPEDTAVYYCAF	92	ITTESDYDL GRRY	93	WGGGT LVTVSS	96

10

20

30

40

【 0 5 9 1 】

表 B - 1 : 参照化合物を構成するアミノ酸配列

## 【表 3】

<p>REFERENCE IGG HEAVY CHAIN, SEQ ID NO: 1  QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKSRV  TMLRDTSKNQFSLRRLSSVTAADTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV  NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>REFERENCE IGG LIGHT CHAIN, SEQ ID NO: 2  DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFRSGSGG  TDFTFITISLQPEDIAITYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  VTKSFNRGEC</p>	10
<p>REFERENCE FAB HEAVY CHAIN, SEQ ID NO: 3  QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKSRV  TMLRDTSKNQFSLRRLSSVTAADTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV  NHKPSNTKVDKKEPKSC</p>	
<p>REFERENCE FAB LIGHT CHAIN, SEQ ID NO: 4  DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFRSGSGG  TDFTFITISLQPEDIAITYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  VTKSFNRGEC</p>	

## 【 0 5 9 2 】

表 B - 2: 抗 I L - 6 R ナノボディのタンパク質配列

20

【表4】

PMP40H5, SEQ ID NO: 5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCMDSSSGTTSTYYSDSVKGRFTISRDDAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAADGHLNWGQRYVPCSQISWRGWNDYWGQGTQVTVSS	
PMP35E11, SEQ ID NO: 6 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIIGWFRQAPGKEHEGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAAERDVPARSLCGSYWYDYRGQGTQVTVSS	
PMP32C9/IL6R04, SEQ ID NO: 7 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKEREGVSGISSSDGNTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGTQVTVSS	
PMP35H4/IL6R13, SEQ ID NO: 8 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYDGMWVRQAPGRATEWVSAISWNGNNTYYTESMKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCVKGSTAIVGVPTYPDEYDYWGQGTQVTVSS	10
PMP32E10, SEQ ID NO: 9 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYDMSWVRQAPGKGPWVSAINSGGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCATDWRYSYDLDLPLPPGDYWGQGTQVTVSS	
PMP30C11, SEQ ID NO: 10 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYDMGWYRQAPGKEREFVAVISRSGSSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAEVVAGDYDYWGQGTQVTVSS	
PMP35C10, SEQ ID NO: 11 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYDMGWYRQAPGKEREFVAVIHWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAFLPGPEGFHDYWGQGTQVTVSS	
PMP34G9, SEQ ID NO: 12 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSSSYDMTWYRQVPGKEREFVAVISWGGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCNAAYTGGDDYWGQGTQVTVSS	
PMP31A4/IL6R03, SEQ ID NO: 13 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKQRELVAIIISGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGTQVTVSS	20
PMP32E2, SEQ ID NO: 14 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNI FDDNTMGWTTWRQPPGKQRELVAIIATDGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCNLFLSLRLGRDYWGQGTQVTVSS	
PMP33A3, SEQ ID NO: 15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYGAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSTGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAADKMWSPCLVAANEALFEYDYWGQGTQVTVSS	
PMP34A12, SEQ ID NO: 16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTSLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAADLLRTPFCVDSAPYDYWGQGTQVTVSS	
PMP28E11, SEQ ID NO: 17 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYGAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCALVHTTAQATGVPQREYEEYEWGQGTQVTVSS	
PMP35F4, SEQ ID NO: 18 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYDMGWYRQAPGKEREFVAIITWNSSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYIQMNSLKPEDTAVYYCAQYGLGYAEDYWGQGTQVTVSS	30

【0593】

表B-3: 多価抗IL-6Rナノボディのタンパク質配列

【表 5】

IL6R22, SEQ ID NO: 19 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRTFSSYDMGWYRQAPGKEREFVAVISRSGSSTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCKAEVAVAGDYDYGQGTQVTVSSGGGGSG GGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	
IL6R23, SEQ ID NO: 20 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKQRELVAGIISGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGTQVTVSSGGG GGGGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	
IL6R24, SEQ ID NO: 21 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKEREGVSGISSSDGNTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAABPDSSWYLDGSPFFKYWGQGTQVT VSSGGGGSGGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	10
IL6R25, SEQ ID NO: 22 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFGSYDMSWVRQAPGKGPPEWVSAINSGGGSTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCATDWRYSYDYLPLPPPGDYWGQGTQVT SSGGGGSGGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	
IL6R26, SEQ ID NO: 23 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGNI FDDNTMGWTWNRQPPGKQRELVAI IATDGSTNYA DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNLFLSLRGRDYWGQGTQVTVSSGGGGG GSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	
IL6R28, SEQ ID NO: 24 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCVASGFSLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADLLRTPFCVDSAPYDYGQGTQVTV SSGGGGSGGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTV SS	20
IL6R29, SEQ ID NO: 25 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRTSSSYDMTWYRQVPGKEREFVAVIWSGGSTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCNAYTGGDDYWGQGTQVTVSSGGGGSGG GSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTL ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	
IL6R30, SEQ ID NO: 26 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRTFSSYDMGWYRQAPGKEREFVAVIHWSSGSTYYAD PVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCNAFLPPEGFHDYWGQGTQVTVSSGGGG GGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	
IL6R31, SEQ ID NO: 27 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEHEGVSCISSSDGSTYYAD SVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAERDVPARSLCGSYWYDYGQGTQVT VSSGGGGSGGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	30
IL6R32, SEQ ID NO: 28 EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLSCAASGRTFSSYDMGWYRQAPGKEREFVAIITWNSSTYYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCNAQYGLGYAEDYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	

<p>IL6R33, SEQ ID NO: 29  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGRATEWVSAISWNGNNTYYTE  SMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVKGSTAIVGVPPTYPDYDYWGQGTQVT  VSSGGGSGGGS AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSS  ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS</p>	
<p>IL6R34, SEQ ID NO: 30  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLDYAIGWFRQAPGKEREGVSCMDSSSGTTSTYY  SDSVKGRFTISRDDAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADGHLNWGQRYPVPCSQISWRGWNDY  WGQGTQVTVSSGGGSGGGS AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG  KEPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR  SSQGTQVTVSS</p>	
<p>IL6R43, SEQ ID NO: 31  EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKQRELVAGIISGGSTNYADS  VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGTQVTVSSGGG  GSGGSAVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGS  DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSEVQ  LVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKQRELVAGIISGGSTNYADSVK  RLTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGTQVTVSS</p>	10
<p>IL6R44, SEQ ID NO: 32  EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKEREGVSGISSSDGNTYYAD  SVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSP EFFKYWGQGTQVT  VSSGGGSGGGS AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSS  ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVT  VSSGGGSGGGS EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKEREGVSG  ISSSDGNTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSP  EFFKYWGQGTQVTVSS</p>	
<p>IL6R49, SEQ ID NO: 33  EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSSSYDMTWYRQVPGKEREFVAVISWGGSTYYAD  SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCNAITGGGDDYWGQGTQVTVSSGGGSGG  GSAVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLY  ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSGGGSGG  GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSSSYDMTWYRQVPGKEREFVAVISWGGSTYY  ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCNAITGGGDDYWGQGTQVTVSS</p>	20
<p>IL6R53, SEQ ID NO: 34  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGRATEWVSAISWNGNNTYYTE  SMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVKGSTAIVGVPPTYPDYDYWGQGTQVT  VSSGGGSGGGS AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSS  ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVT  VSSGGGSGGGS EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGRATEWVSA  ISWNGNNTYYTESMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVKGSTAIVGVPPTYPD  EYDYWGQGTQVTVSS</p>	

【 0 5 9 4 】

表 B - 4 : 配列を最適化したナノボディのタンパク質配列

10

20

30

【表 6】

IL6R61, SEQ ID NO: 40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTNYADS VKGRLTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R62, SEQ ID NO: 41 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R63, SEQ ID NO: 42 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTNYADS VKGRLTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCSFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R64, SEQ ID NO: 43 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTNYADS VKGRLTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R65, SEQ ID NO: 44 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FKVNAMGWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTIVTVSS	10
IL6R71, SEQ ID NO: 45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKREGVSGISSSDGNTYYAD SVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGLTIVTVSS	
IL6R72, SEQ ID NO: 46 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIGWFRQAPGKREGVSGISSSDGNTYYAD SVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGLTIVTVSS	
IL6R73, SEQ ID NO: 47 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKREGVSGISSSDGNTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGLTIVTVSS	
IL6R74, SEQ ID NO: 48 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKREGVSGISSSDGNTYYAD SVKGRFTISSDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGLTIVTVSS	20
IL6R75, SEQ ID NO: 49 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIGWFRQAPGKREGVSGISSSDGNTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGLTIVTVSS	
IL6R81, SEQ ID NO: 50 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGRATEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R82, SEQ ID NO: 51 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGKLEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R83, SEQ ID NO: 52 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGRATEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R84, SEQ ID NO: 53 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGKLEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	30
IL6R85, SEQ ID NO: 54 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGRGLEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R86, SEQ ID NO: 55 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGRALEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R87, SEQ ID NO: 56 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGKATEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R88, SEQ ID NO: 57 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGKTEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	
IL6R89, SEQ ID NO: 58 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGRGTEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	40
IL6R90, SEQ ID NO: 59 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMMSWVRQAPGKALEWVSAISWNGNNTYYTE SMKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVKGSTAI VGPPTYPDEYDYWGQGLTIVTVSS	

【 0 5 9 5 】

表 B - 5 : 親和性成熟を行ったナノボディのタンパク質配列

【表 7】

PMP7F4, SEQ ID NO: 60 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTTFKVNVMAWYRQAPGKGRELVAGIINGSTTYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTLTVSS	
PMP7C4, SEQ ID NO: 61 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTTFRINVMWYRQAPGKGRELVAGIITNGSTSYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTLTVSS	
PMP7D6, SEQ ID NO: 62 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNVMAWYRQAPGKGRELVAAVINGGTTTYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTLTVSS	
PMP7G7, SEQ ID NO: 63 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTTFKINIMAWYRQAPGKGRELVAGVITGGNTTYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTLTVSS	
PMP7G8, SEQ ID NO: 64 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFRINVMWYRQAPGKGRELVAGVINDGSTTYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFVTTNSDYDLGRDYWGQGLTLTVSS	
PMP20F6, SEQ ID NO: 65 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIVSGGSTSYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTSNDYDLGRRYWGQGLTLTVSS	
PMP20A11, IL6R300, SEQ ID NO: 66 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSS	
PMP20E10, SEQ ID NO: 67 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIVSGGSTSYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSS	
PMP21A10, SEQ ID NO: 68 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIVTGGSTSYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSS	
PMP21D11, SEQ ID NO: 69 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIVTGGSTSYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSS	

10

20

【 0 5 9 6 】

表 B - 6 : フォーマットされた親和性成熟を行ったノ配列を最適化したナノボディのタンパク質配列

【表 8】

IL6R304, SEQ ID NO: 70 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSSG GGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTLTVSS	
IL6R305, SEQ ID NO: 71 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSSG GGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIIS GGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQ GLTLTVSSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGLTLTVSS	
IL6R306, SEQ ID NO: 72 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTLTVSSG GGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTLTVS SGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGI ISGGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWG QGLTLTVSS	
IL6R202, SEQ ID NO: 73 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDIGWFRQAPGKGRELVGSGISSSDGNTYYA DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAABPPDSSWYLDGSPPEFFKYWGQGL TVTVSSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GLTLTVSS	

30

40

【 0 5 9 7 】

表 B - 7 : アルブミンと結合するナノボディの好ましいが、非限定的な例

## 【表 9】

ALB-1, SEQ ID NO: 97 AVQLVESGGGLVQPGLNSLRRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB-8(humanized ALB-1), SEQ ID NO: 98 EVQLVESGGGLVQPGLNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
ALB-2, SEQ ID NO: 99 AVQLVESGGGLVQGGSLRLACAASERIFDLNIMGWYRQGPGERELVATCITVGDSTNYADSVK GRFTISMDYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS

10

## 【 0 5 9 8 】

表 B - 8 : リンカーの配列リスト

## 【表 10】

GS30, SEQ ID NO: 101 GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
GS15, SEQ ID NO: 102 GGGGSGGGSGGGGS
GS9, SEQ ID NO: 103 GGGGSGGGGS
GS7, SEQ ID NO: 104 SGGSGGS
ラマ上方鎖ヒンジ領域, SEQ ID NO: 105 EPKTPKPQPAAA

20

## 【 0 5 9 9 】

表 C - 1 : IL - 6 R と結合するナノボディの単離に使用した材料

## 【表 11】

	供給業者	説明
ヒト IL-6	Diaclone	大腸菌で産生された組換えタンパク質
ヒト bio-IL-6	Diaclone/PE	PEによりビオチン化したDiaclone社製のヒト IL-6 (6 ビオチン/分子)
ヒト可溶性 IL-6R	Peprtech	HEK 293 細胞で産生された組換えタンパク質 (カタログ番号 200-06R)
ヒト可溶性 IL-6R	R&D Systems	Sf 21 細胞で産生された組換えタンパク質 (カタログ番号 227-SR)
BR-6 モノクローナル抗体	Diaclone	中和抗 IL-6 R モノクローナル抗体
BN-12 モノクローナル抗体	Diaclone	非中和抗 IL-6 R モノクローナル抗体
M182 モノクローナル抗体	BD Biosciences	ビオチン化抗 IL-6 R モノクローナル抗体
HRP と結合した ラマ IgG (h & i) 抗体	Bethyl Labs	ヤギで産生されたラマ IgG に対するポリクローナル抗体
TF-1 細胞株	ECACC no.93022307	J Cell Physiol 1989;140:323; Exp Cell Res 1993:208:35

30

40

## 【 0 6 0 0 】

表 C - 2 : 免疫付与スケジュール

【表 1 2】

日	ラマ 081	ラマ 082	組織回収
0	100 µg	100 µg	10 ml 免疫前血液
7	100 µg	100 µg	-
14	50 µg	50 µg	-
21	50 µg	50 µg	-
28	50 µg	50 µg	10 ml 免疫血液
35	50 µg	50 µg	-
39			150 ml 免疫血液 PBL1 リンパ節弓生検
43			150 ml 免疫血液 PBL2
52	50 µg	50 µg	
59			100 ml 免疫血液 NC1

10

【 0 6 0 1】

表 C - 3 : 免疫付与ラマから得られたナノボディライブラリの特徴

【表 1 3】

	ライブラリの大きさ	挿入率 (%)
ラマ 81	$6 \times 10^7$	87
ラマ 82	$5 \times 10^7$	78

20

【 0 6 0 2】

表 C - 4 : ナノボディの選択に用いられる条件

【表 1 4】

方法	固定化/捕捉	抗原	濃度/量	溶出
磁性ビーズ	ストレプトアビジン	bio-IL-6R	0, 1, 10, 100 ng	トリプシン
溶液	ストレプトアビジンビーズ	bio-IL-6R	0, 0.01, 0.1, 1 nM	トリプシン
プレート	BN-12	IL-6R (Peprotech)	0, 1, 10, 100 nM	トリプシン
プレート	BN-12	IL-6R (R&D)	0, 1, 10, 100 nM	トリプシン

30

【 0 6 0 3】

表 C - 5 : スクリーニング統計

【表 1 5】

アッセイ	スクリーニングしたクローンの数	阻害因子の数 (%)	シーケンシングしたクローンの数	特有の配列の数
IL-6-IL-6R	1536	72 (4.7%)	46	14

40

【 0 6 0 4】

表 C - 6 : 阻害ナノボディの  $k_{off}$  値

【表 1 6】

ナノボディ ID	ナノボディ ID	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	ナノボディ ID	ナノボディ ID	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )
PMP40H5	IL6R14	$1.14E-04$	PMP34G9	IL6R09	$1.39E-03$
PMP35E11	IL6R11	$4.17E-04$	PMP31A4	IL6R03	$1.60E-03$
PMP32C9	IL6R04	$1.50E-04$	PMP32E2	IL6R06	$8.86E-04$
PMP35H4	IL6R13	$1.78E-04$	PMP33A3	IL6R07	$2.42E-04$
PMP32E10	IL6R05	$1.27E-03$	PMP34A12	IL6R08	ND
PMP30C11	IL6R02	$2.94E-03$	PMP28E11	IL6R01	ND
PMP35C10	IL6R10	$5.09E-04$	PMP35F4	IL6R12	$8.96E-04$

50

【 0 6 0 5 】

表 C - 7 : ナノボディ細胞培養物の収率

【表 1 7】

ナノボディ ID	収率 (mg)	収率 (mg/l)	ナノボディ ID	収率 (mg)	収率 (mg/l)
PMP40H5	0.14	0.6	PMP34G9	0.09	1.8
PMP35E11	0.65	2.6	PMP31A4	1.06	4.2
PMP32C9	0.33	6.5	PMP32E2	1.57	6.3
PMP35H4	0.49	9.8	PMP33A3	0.33	1.3
PMP32E10	0.78	3.1	PMP34A12	0.57	2.3
PMP30C11	0.63	2.5	PMP28E11	0.08	1.6
PMP35C10	0.53	2.1	PMP35F4	0.24	1.0

10

【 0 6 0 6 】

表 C - 8 : 選択されたナノボディの IC50 値

【表 1 8】

ナノボディ ID	試料	IC50 (M)
IL6R01	PMP28E11	7.26E-10
IL6R02	PMP30C11	1.69E-09
IL6R03	PMP31A4	7.16E-10
IL6R04	PMP32C9	9.30E-11
IL6R05	PMP32E10	6.26E-10
IL6R06	PMP32E2	1.21E-09
IL6R07	PMP33A3	1.44E-09
IL6R08	PMP34A12	1.18E-09
IL6R09	PMP34G9	2.38E-10
IL6R10	PMP35C10	5.96E-10
IL6R11	PMP35E11	1.58E-10
IL6R12	PMP35F4	5.17E-10
IL6R13	PMP35H4	4.77E-11
IL6R14	PMP40H5	2.22E-10

20

30

40

【 0 6 0 7 】

表 C - 9 : 選択された 14 個の阻害抗 IL - 6 R ナノボディサブセットに関する動態パラメータ

【表 19】

ナノボディ ID	ナノボディ ID	$k_{off} (s^{-1})$	$k_{on} (1/Ms)$	$K_d (nM)$
IL6R01	PMP28E11	1.10E-04	2.62E+05	0.4
IL6R02	PMP30C11	2.94E-03 4.95E-03	8.40E+05	5.9
IL6R03	PMP31A4	1.47E-03 1.60E-03	4.84E+05	3.0
IL6R04	PMP32C9	9.42E-05 1.50E-04	3.65E+05	0.3
IL6R05	PMP32E10	1.41E-03 1.27E-03	1.44E+05	9.8
IL6R06	PMP32E2	8.86E-04 7.57E-03	1.07E+06	7.1
IL6R07	PMP33A3	2.42E-04	ND	ND
IL6R08	PMP34A12	1.97E-03	1.94E+05	10.2
IL6R09	PMP34G9	1.29E-03 1.30E-03 1.39E-03	6.41E+05 1.11E+06	2.0 1.2
IL6R10	PMP35C10	5.26E-04 5.09E-04	4.14E+05	1.3
IL6R11	PMP35E11	3.40E-04 3.96E-04 4.17E-04	3.91E+05 2.15E+05	0.9 1.9
IL6R12	PMP35F4	1.16E-03 8.96E-04	6.78E+05	1.7
IL6R13	PMP35H4	1.21E-04 1.09E-04 1.78E-04	2.31E+05 1.37E+05	0.5 0.8
IL6R14	PMP40H5	1.00E-04 1.14E-04	4.02E+05	0.3

10

20

30

【0608】

表 C - 10 : XG - 1 細胞増殖のナノボディ阻害に関する IC50 値

【表 2 0】

ナノボディ ID	IC50 (nM)	IC50 (nM) + HSA
IL6R01	ND	
IL6R02	31.0	
IL6R03	16.2	17.5
IL6R04	0.1	0.1
IL6R05	7.3	
IL6R06	42.1	
IL6R07	50.5	
IL6R08	36.6	
IL6R09	2.7	3.0
IL6R10	2.5	
IL6R11	5.4	
IL6R12	2.8	
IL6R13	1.4	1.3
IL6R14	0.6	0.8
参照 Fab	6.0	

10

【 0 6 0 9】

表 C - 11 : T F 1 細胞増殖のナノボディ阻害に関する I C 5 0 値

20

【表 2 1】

ナノボディ ID	IC50 (nM)
IL6R01	ND
IL6R02	94.7
IL6R03	62.1
IL6R04	0.4
IL6R05	38.0
IL6R06	137.9
IL6R07	374.9
IL6R08	24.3
IL6R09	8.7
IL6R10	9.9
IL6R11	9.9
IL6R12	6.8
IL6R13	5.2
IL6R14	1.5
参照 Fab	9.2

30

40

50

【 0 6 1 0 】

表 C - 1 2 : アルファスクリーンアッセイで決定されるような I L - 6 R との結合に関する参照 F a b との競合

【 表 2 2 】

ナノボディ ID	I L - 6 R との残りの参照 F a b の結合 (%)
IL6R01	49
IL6R02	86
IL6R03	5
IL6R04	50
IL6R05	64
IL6R06	36
IL6R07	80
IL6R08	99
IL6R09	62
IL6R10	102
IL6R11	40
IL6R12	103
IL6R13	25
IL6R14	96

10

20

30

【 0 6 1 1 】

表 C - 1 3 : ナノボディ特性の概要

【表 2 3】

ID	$K_d$ (nM)	IC50 (nM) (IL-6/IL-6R)	IC50 (nM) XG-1	IC50 (nM) TF-1	参照 Fab との競合 (%) (%)
IL6R01	0.4	0.73	ND	ND	49
IL6R02	5.9	1.69	31.0	94.7	86
IL6R03	3.0	0.72	16.2	62.1	5
IL6R04	0.3	0.09	0.1	0.4	50
IL6R05	9.8	0.63	7.3	38.0	64
IL6R06	7.1	1.21	42.1	137.9	36
IL6R07	ND	1.44	50.5	374.9	80
IL6R08	10.2	1.18	36.6	24.3	99
IL6R09	2.0	0.24	2.7	8.7	62
IL6R10	1.3	0.60	2.5	9.9	102
IL6R11	0.9	0.16	5.4	9.9	40
IL6R12	1.7	0.52	2.8	6.8	103
IL6R13	0.5	0.05	1.4	5.2	25
IL6R14	0.3	0.22	0.6	1.5	96

【 0 6 1 2 】

表 C - 1 4 : フォーマットされたナノボディの番号付け (Nomenclature) (番号)

【表 2 4】

ID	フォーマット	配列番号
IL6R22	PMP30C11-9GS-ALB1	19
IL6R23	PMP31A4-9GS-ALB1	20
IL6R24	PMP32C9-9GS-ALB1	21
IL6R25	PMP32E10-9GS-ALB1	22
IL6R26	PMP32E2-9GS-ALB1	23
IL6R28	PMP34A12-9GS-ALB1	24
IL6R29	PMP34G9-9GS-ALB1	25
IL6R30	PMP35C10-9GS-ALB1	26
IL6R31	PMP35E11-9GS-ALB1	27
IL6R32	PMP35F4-9GS-ALB1	28
IL6R33	PMP35H4-9GS-ALB1	29
IL6R34	PMP40H5-9GS-ALB1	30
IL6R43	PMP31A4-9GS-ALB1-9GS-31A4	31
IL6R44	PMP32C9-9GS-ALB1-9GS-32C9	32
IL6R49	PMP34G9-9GS-ALB1-9GS-34G9	33
IL6R53	PMP35H4-9GS-ALB1-9GS-35H4	34

【 0 6 1 3 】

表 C - 1 5 : 二重特異性の抗 IL - 6 R ナノボディの発現収率

【表 2 5】

ナノボディ ID	ID	収率 (mg)	収率 (mg/l)	ナノボディ ID	ID	収率 (mg)	収率 (mg/l)
PMP30C11	IL6R22	1.1	4.2	PMP34G9	IL6R29	3.3	13.2
PMP31A4	IL6R23	0.3	0.6	PMP35C10	IL6R30	0.9	3.7
PMP32C9	IL6R24	0.5	2.0	PMP35E11	IL6R31	1.8	7.3
PMP32E10	IL6R25	1.3	5.0	PMP35F4	IL6R32	0.5	1.1
PMP32E2	IL6R26	1.1	4.2	PMP35H4	IL6R33	1.9	7.5
PMP34A12	IL6R28	2.1	8.4	PMP40H5	IL6R34	0.4	0.9

10

【0614】

表 C - 16 : アルファスクリーン競合アッセイにおける二価ナノボディの IC50 値

【表 2 6】

ナノボディ ID	IC50 (M)
IL6R22	5.59E-10
IL6R24	1.45E-10
IL6R25	6.43E-10
IL6R26	1.67E-09
IL6R28	3.26E-10
IL6R29	1.23E-10
IL6R30	3.43E-10
IL6R31	1.31E-10
IL6R32	2.68E-10
IL6R33	1.39E-10
IL6R34	1.46E-10
参照 -Fab	5.92E-10

20

30

【0615】

表 C - 17 : XG - 1 増殖アッセイにおけるフォーマットされたナノボディの IC50 値

40

【表 27】

ID	IC50 (nM)	IC50 (nM) + HSA
IL6R22	50.2	
IL6R23	16.9	90.4
IL6R24	0.2	0.5
IL6R25	8.4	
IL6R26	65.3	
IL6R28	4.4	
IL6R29	3.6	13.4
IL6R30	27.2	
IL6R31	4.6	
IL6R32	1.6	
IL6R33	2.6	15.4
IL6R34	0.8	2.5
IL6R44	0.07	0.17
IL6R49	0.06	0.19
IL6R53	0.13	0.61
参照-IgG		0.47

10

20

【0616】

表 C - 18 : I L - 6 R 結合の動態パラメータ

30

【表 2 8】

ナノボディ ID	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$k_a$ (1/Ms)	$K_d$ (nM)
IL6R22	5.7E-03	3.3E+05	16.9
IL6R23	1.5E-03	3.2E+05	4.6
IL6R24	1.1E-04	3.7E+05	0.3
IL6R25	1.2E-03	1.2E+05	10.3
IL6R26	6.9E-03	4.5E+05	15.5
IL6R28	5.3E-04	2.4E+05	2.2
IL6R29	1.5E-03	7.1E+05	2.1
IL6R30	1.2E-03	1.6E+05	7.5
IL6R31	3.8E-04	1.6E+05	2.3
IL6R32	1.3E-03	1.0E+06	1.3
IL6R33	1.25E-04	1.1E+05	1.1
IL6R34	1.1E-04	2.6E+05	0.4

10

20

【 0 6 1 7】

表 C - 19 : 様々な種由来の血清アルブミンとの結合に関するフォーマットされたナノボディの  $K_d$  値

【表 2 9】

ID	ヒト	マウス	カニクイザル	アカゲザル	ヒビ
	$K_d$ (nM)				
IL6R22	11.1	108			
IL6R23	16	275	27.6	23.8	23.2
IL6R24	15	122	28.3	28.3	40.3
IL6R25	13.9	122			
IL6R26	9.4	73			
IL6R28	10.6	180			
IL6R29	10.8	83	19	20.6	26.8
IL6R30	12.1	113			
IL6R31	13.4	86.8			
IL6R32	10	179			
IL6R33	27.3	98.6	24.5	24.6	32.3
IL6R34	9.2	111	15	14.7	18.9
IL6R44	51.4	993	43		
IL6R53	35	497			
ALB-1	0.6	6.5			

30

40

【 0 6 1 8】

表 C - 20 : IL6R03、IL6R04及びIL6R13の配列を最適化した変異体の動態パラメータ

50

【表 3 0】

IL6R03 (3.0 nM)	IL6R61	KD (nM)	<b>2</b>	10
		ka (1/Ms)	8.50E+05	
		kd (1/s)	1.70E-03	
	IL6R62	KD (nM)	<b>2.2</b>	
	ka (1/Ms)	9.29E+05	20	
	kd (1/s)	2.07E-03		
IL6R63	KD (nM)	<b>3.7</b>		
	ka (1/Ms)	9.90E+05		
		kd (1/s)	3.65E-03	
IL6R04 (0.3 nM)	IL6R64	KD (nM)	<b>ND</b>	20
		ka (1/Ms)	ND	
		kd (1/s)	1.00E-03	
	IL6R71	KD (nM)	<b>0.2</b>	
	ka (1/Ms)	7.03E+05	30	
	kd (1/s)	1.53E-04		
IL6R72	KD (nM)	<b>0.3</b>		
	ka (1/Ms)	5.43E+05		
		kd (1/s)	1.80E-04	
IL6R13 (0.7 nM)	IL6R73	KD (nM)	<b>0.3</b>	30
		ka (1/Ms)	6.98E+05	
		kd (1/s)	2.33E-04	
	IL6R74	KD (nM)	<b>0.2</b>	
	ka (1/Ms)	7.67E+05	40	
	kd (1/s)	1.22E-04		
IL6R81	KD (nM)	<b>0.4</b>		
	ka (1/Ms)	3.20E+05		
		kd (1/s)	1.28E-04	
IL6R13 (0.7 nM)	IL6R82	KD (nM)	<b>5.1</b>	40
		ka (1/Ms)	6.19E+05	
		kd (1/s)	3.14E-03	
	IL6R83	KD (nM)	<b>0.3</b>	
	ka (1/Ms)	3.50E+05	40	
	kd (1/s)	1.20E-04		
IL6R84	KD (nM)	<b>5.4</b>		
	ka (1/Ms)	7.62E+05		
		kd (1/s)	4.09E-03	

【 0 6 1 9】

表 C - 2 1 : I L 6 R 1 3 の配列を最適化した変異体の  $k_{off}$  値

10

20

30

40

【表 3 1】

ID	$k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$
IL6R13	2,1E-04
IL6R85	2,1E-03
IL6R86	1,7E-03
IL6R87	1,1E-04
IL6R88	2,6E-04
IL6R89	1,9E-04
IL6R90	1,9E-03

10

【0620】

表 C - 22 : IL6R03、IL6R04 及び IL6R13 の配列を最適化した変異体の動態パラメータ

【表 3 2】

IL6R03 (3.0 nM)	IL6R65	KD (nM) ka (1/Ms) kd (1/s)	4 6,00E+05 2,35E-03
IL6R04 (0.3 nM)	IL6R75	KD (nM) ka (1/Ms) kd (1/s)	0,1 1,00E+06 1E-04
IL6R13 (0.7 nM)	IL6R88	KD (nM) ka (1/Ms) kd (1/s)	0,9 2,30E+05 2,13E-04

20

30

【0621】

表 C - 23 : XG - 1 アッセイにおける配列を最適化したナノボディ及び野生型ナノボディの IC50 値

【表 3 3】

IC50 値 (nM)			
親		配列を最適化した	
IL6R03	17	IL6R65	26
IL6R04	0.1	IL6R75	0.04
IL6R13	1.4	IL6R88	3.3

40

【0622】

表 C - 24 : カニクイザル IL - 6 R とのナノボディ結合の動態パラメータ

【表 3 4】

ID	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
IL6R03	3.70E+05	1.64E-03	4.4
IL6R65	1.65E+05	1.97E-03	12
IL6R04	5.86E+04	1.00E-02	171
IL6R201*	2.18E+05	6.11E-03	28.1

\* IL6R201はIL6R75のタグのないバージョンである。

【0623】

表 C - 25 : ILR65 及び親和性成熟を行った IL - 6 R ナノボディの Tm 値

【表 3 5】

	1回目の Tm		2回目の Tm		平均 Tm
IL6R65	70,44	70,64	70,54	71,07	70,67
PMP7F4	76,68	76,55	76,58	76,44	76,56
21A10	74,56	74,22	74,39	74,39	74,39
20E10	75,29	75,22	75,31	75,38	75,30
20A11	74,42	74,03	74,12	74,19	74,19
21D11	74,03	74,29	74,45	74,25	74,26
20F6	74,36	74,29	74,45	74,32	74,36

【0624】

表 C - 26 : IL6R65 及び親和性成熟を行った変異体の親和性に関する動態パラメータ

【表 3 6】

ナノボディ	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (pM)
IL6R65	1.0E+06	3.8E-03	3800
20E10	1.0E+06*	3.3E-05	33
21D11	1.0E+06*	3.5E-05	35
21A10	1.0E+06*	1.2E-05	12
20F6	1.0E+06*	3.3E-05	33
20A11	1.0E+06	1.9E-05	19

\* 推定値

【0625】

表 C - 27 : 親和性成熟を行った抗 IL6R ナノボディのフォーマット

10

20

30

40

【表 3 7】

フォーマット	配列を最適化したナノボディ	名称
抗-IL6R  抗-HSA	20A11 - 9GS - ALB8	IL6R304
抗-IL6R  抗-HSA 抗-IL6R	20A11 - 9GS - 20A11 - 9GS - ALB8	IL6R305
抗-IL6R  抗-HSA 抗-IL6R	20A11 - 9GS - ALB8 - 9GS - 20A11	IL6R306

10

【0626】

表 C - 28 : 100 IU/mL の IL - 6 での TF - 1 増殖アッセイにおけるフォーマットされたナノボディ対参照の効力

20

【表 3 8】

化合物	IC50 (nM)	標準偏差 (nM)	繰返し回数
20A11	0.283	0.256	3
IL6R304	0.715	0.390	2
IL6R305	0.098	0.046	4
IL6R306	0.341	0.162	3
参照 Fab	6.262	0.706	2
参照 IgG	0.921	0.275	4

30

【0627】

表 C - 29 : 5000 IU/mL の IL - 6 での TF - 1 増殖アッセイにおけるフォーマットされたナノボディの効力

【表 3 9】

化合物	IC50 (nM)
20A11	15.22
IL6R304	15.48
IL6R305	5.49
IL6R306	23.19
参照 IgG	144.5

40

【0628】

表 C - 30 : ヒト血漿における sIL - 6 R との IL - 6 結合の中和に関するフォーマットされたナノボディの IC50 値 (nM)

【表 4 0】

化合物	通常の IL-6 での IC50	高 IL-6 での IC50	比 (高/低)
参照 IgG	0.258	1.69	6.54
IL6R20A11	0.198	0.356	1.80
IL6R304	0.229	0.634	2.77
IL6R305	0.137	0.335	2.44
IL6R306	0.412	2.39	5.80

【 0 6 2 9】

表 C - 3 1 : フォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディと CHO 4 D 5 ( 4 P L ) との結合に関する EC 5 0 値 ( n M )

【表 4 1】

化合物	EC50 (nM)
IL6R20A11	1.396
IL6R304	1.939
IL6R305	0.8984
IL6R306	6.154

20

【 0 6 3 0】

表 C - 3 2 : フォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディと 2 つのドナー由来の P B L との結合に関する EC 5 0 値 ( n M )

【表 4 2】

化合物	L1	L2	M1	M2	G1	G2
IL6R20A11	3.65	2.924	3.621	4.777	2.415	5.614
IL6R304	9.273	20.68	8.241	14.17	5.985	17.32
IL6R305	4.282	25.79	2.906	4.262	2.434	4.927
IL6R306	60	49.59	49.38	59.34	53.99	77.68

L:リンパ球, M:単球, G:顆粒球

30

【 0 6 3 1】

表 C - 3 3 : フォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディとヒト及びカニクイザルの血清アルブミンとの結合に関する動態パラメータ

【表 4 3】

ナノボディ	ヒト血清アルブミン			カニクイザル血清アルブミン		
	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
ALB11	5.45E+05	1.68E-03	3.08	5.11E+05	1.53E-06	2.99
IL6R304	2.15E+05	4.75E-03	22.1	1.95E+05	4.56E-03	23.4
IL6R305	2.01E+05	4.07E-03	20.3	2.03E+05	3.87E-03	19.1
IL6R306	2.25E+05	3.83E-03	17.1	2.12E+05	3.70E-03	17.4

40

【 0 6 3 2】

表 C - 3 4 : フォーマットされた親和性成熟を行ったナノボディとヒト及びカニクイザルの IL - 6 R との結合に関する動態パラメータ

【表 4 4】

ナノボディ	ヒト IL-6R			カニクイザル IL-6R		
	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
IL6R300	1E+06	ND	ND	1E+06	ND	ND
IL6R304	7E+05	$\leq 1E-05$ *	$\leq 14$	8E+05	2E-05	25

\*機器の検出限界

【 0 6 3 3】

50

表 C - 35 : カニクイザル及びヒトの血漿における h I L - 6 と血漿 s I L - 6 R との結合の中和に関する I C 5 0 値 ( n M ) の比較

【表 4 5】

試験項目	ヒトにおけるIC50	カニクイザルにおけるIC50	比(ヒト/カニクイザル)
参照IgG	0.258	0.166	1.55
IL6R20A11	0.198	0.117	1.69
IL6R304	0.229	0.137	1.67
IL6R305	0.137	0.0791	1.73
IL6R306	0.412	0.321	1.29

【 0 6 3 4】

表 C - 36 : I L 6 R 3 0 4 及び I L 6 R 3 0 5 の i n v i v o での P K / P D 分析のための投与群

【表 4 6】

群	試験項目	ナノボディ用量 (mg/kg b.w., i.v.)	IL-6用量 (µg/kg b.w., s.c.)	動物の数及び性別	参照番号	
6	IL6R304	0.4	5 µg/kg, 7日間1日1回、ナノボディ投与の24時間後から開始	2 m, 1 f	11, 12, 13	
7		2		1 m, 2 f	14, 15, 16	
8		10		1 m, 1 f	17, 18	
9	IL6R305	0.4		1 m, 2 f	19, 20, 21	
10		2		2 m, 1 f	22, 23, 24	
11		10		1 m, 1 f	25, 26	
12	陰性対照	0			2 m, 1 f	27, 28, 29
13	陽性対照	5 mg/kg 参照IgG			1 m, 2 f	30, 31, 32

【 0 6 3 5】

表 C - 37 : P K 分析のためのサンプリング時間

【表 4 7】

群	動物当たりのサンプリング時間	試料数
群6~群13	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0日目: ナノボディ注射前、ナノボディ注射後5分、30分、3時間及び8時間</li> <li>- 1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目: IL-6注射前</li> <li>- 8日目、14日目、21日目及び29日目</li> </ul>	352

【 0 6 3 6】

表 C - 38 : カニクイザルにおける 0 . 4 m g / k g での単回静脈内ボラス投与後の I L 6 R 3 0 4 の基礎 P K パラメータ

【表 4 8】

IL6R304: 静脈内 0.4 mg/kg						
パラメータ	単位	11m	12m	13f	平均	CV %
Vss	mL/kg	45.1	44.6	38.8	42.8	8
CL	mL/日/kg	24.8	28.2	21.5	24.8	14
MRT	日	1.81	1.58	1.80	1.73	8
t <sub>1/2</sub> λ <sub>z1</sub>	日	1.92	1.54	1.72	1.73	11
λ <sub>z1</sub> 下位	日	1	1	1	1.00	0
λ <sub>z1</sub> 上位	日	4	4	5	4.33	13
R <sup>2</sup> t <sub>1/2</sub> λ <sub>z1</sub>		0.998	0.997	0.999	0.998	0
t <sub>1/2</sub> λ <sub>z2</sub>	日	0.566	0.504	0.521	0.530	6
λ <sub>z2</sub> Lower	日	5	4	5	4.67	12
λ <sub>z2</sub> Upper	日	7	6	7	6.67	9
R <sup>2</sup> t <sub>1/2</sub> λ <sub>z2</sub>		0.967	1.00	0.938	0.968	3
AUC <sub>clast</sub>	日 * μg/mL	16.0	14.1	18.6	16.2	14
AUC <sub>extrap</sub>	%	0.372	0.365	0.325	0.354	7
AUC <sub>inf</sub>	日 * μg/mL	16.1	14.2	18.6	16.3	14
AUC <sub>inf/D</sub>	日 * kg/mL	0.040	0.036	0.047	0.041	14

10

20

【0637】

表 C - 39 : カニクイザルにおける 2 mg / kg での単回静脈内ボラス投与後の IL 6 R 3 0 4 の基礎 PK パラメータ。幾つかの動物に関する最終パラメータを 2 つのデータ点のみで算出した (デフォルト設定で R<sup>2</sup> は 1 である)。

【表 4 9】

IL6R304: 静脈内 2 mg/kg						
パラメータ	単位	14m	15f	16f	平均	CV %
Vss	mL/kg	56.0	55.9	49.3	53.7	7
CL	mL/日/kg	9.99	11.0	10.1	10.4	6
MRT	日	5.60	5.06	4.86	5.17	7
$t_{1/2} \lambda z1$	日	5.79	4.34	4.87	5.00	15
$\lambda z1$ 下位	日	2	2	2	2	0
$\lambda z1$ 上位	日	14	14	14	14	0
$R^2 t_{1/2} \lambda z1$		0.994	0.979	0.991	0.988	1
$t_{1/2} \lambda z2$	日	1.51	1.52	1.30	1.44	9
$\lambda z2$ Lower	日	14	14	14	14	0
$\lambda z2$ Upper	日	21	21	21	21	0
$R^2 t_{1/2} \lambda z2$		1.00	1.00	1.00	1.00	0
$t_{1/2} \lambda z3$	日	5.61	5.95	-	5.78	4
$\lambda z3$ Lower	日	21	21	-	21	0
$\lambda z3$ Upper	日	29	29	-	29	0
$R^2 t_{1/2} \lambda z3$		1.00	1.00	1.00	1.00	0
AUClast	日 * $\mu$ g/mL	200	181	197	192	5
AUCextrap	%	0.295	0.247	0.090	0.211	51
AUCinf	日 * $\mu$ g/mL	200	181	197	193	5
AUCinf/D	日 *kg/mL	0.100	0.091	0.099	0.096	5

【 0 6 3 8】

表 C - 4 0 : カニクイザルにおける 1 0 m g / k g での単回静脈内ボラス投与後の I L 6 R 3 0 4 の基礎 P K パラメータ

【表 5 0】

IL6R304: 静脈内 10 mg/kg					
パラメータ	単位	17m	18f	平均	CV %
Vss	mL/kg	76.5	88.8	82.7	10
CL	mL/日/kg	7.66	10.35	9.00	21
MRT	日	10.0	8.57	9.29	11
$t_{1/2} \lambda z1$	日	7.15	6.08	6.61	11
$\lambda z1$ 下位	日	1	1	1	0
$\lambda z1$ 上位	日	29	29	29	0
$R^2 t_{1/2} \lambda z1$		0.990	0.990	0.990	0
AUClast	日 * $\mu$ g/mL	1230	932	1081	19
AUCextrap	%	5.79	3.50	4.64	35
AUCinf	日 * $\mu$ g/mL	1306	966	1136	21
AUCinf/D	日 *kg/mL	0.131	0.097	0.114	21

【 0 6 3 9】

表 C - 4 1 : カニクイザルにおける 0 . 4 m g / k g での単回静脈内ボラス投与後の I

IL6R305の基礎PKパラメータ。幾つかの動物に関する最終パラメータを2つのデータ点のみで算出した(デフォルト設定で $R^2$ は1である)。

【表51】

IL6R305: 静脈内 0.4 mg/kg						
パラメータ	単位	19m	20f	21f	平均	CV%
Vss	mL/kg	59.2	72.5	63.9	65.2	10
CL	mL/日/kg	33.5	38.0	36.0	35.8	6
MRT	日	1.77	1.91	1.77	1.82	4
$t_{1/2} \lambda_1$	日	1.79	1.25	1.89	1.64	21
$\lambda_1$ 下位	日	1	1	1	1	0
$\lambda_1$ 上位	日	5	5	4	4.67	12
$R^2 t_{1/2} \lambda_1$		0.997	0.981	0.997	0.992	1
$t_{1/2} \lambda_2$	日	0.446	-	0.495	0.470	7
$\lambda_2$ 下位	日	5	-	5	5	0
$\lambda_2$ 上位	日	6	-	6	6	0
$R^2 t_{1/2} \lambda_2$		1.00	-	1.00	1.00	0
AUClast	日 * $\mu$ g/mL	11.84	9.84	11.02	10.9	9
AUCextrap	%	0.765	6.58	0.855	2.73	122
AUCinf	日 * $\mu$ g/mL	11.9	10.5	11.1	11.2	6
AUCinf/D	日 *kg/mL	0.030	0.026	0.028	0.028	6

【0640】

表C-42: カニクイザルにおける2mg/kgでの単回静脈内ボラス投与後のIL6R305の基礎PKパラメータ。幾つかの動物に関する最終パラメータを2つのデータ点のみで算出した(デフォルト設定で $R^2$ は1である)。

10

20

【表 5 2】

IL6R305: 静脈内 2 mg/kg						
パラメータ	単位	22m	23m	24f	平均	CV %
Vss	mL/kg	27.5	28.0	30.4	28.6	5
CL	mL/日/kg	5.81	5.30	6.68	5.93	12
MRT	日	4.73	5.28	4.55	4.85	8 <sup>10</sup>
$t_{1/2} \lambda_1$	日	4.26	4.56	4.04	4.29	6
$\lambda_1$ 下位	日	2	2	2	2	0
$\lambda_1$ 上位	日	14	14	14	14	0
$R^2 t_{1/2} \lambda_1$		0.985	0.954	0.986	0.975	2
$t_{1/2} \lambda_2$	日	1.33	2.34	1.16	1.61	40
$\lambda_2$ 下位	日	14	14	14	14	0
$\lambda_2$ 上位	日	21	21	21	21	0
$R^2 t_{1/2} \lambda_2$		1	1	1	1	0 <sup>20</sup>
AUClast	日 * $\mu$ g/mL	344	374	299	339	11
AUCextrap	%	0.089	0.791	0.041	0.307	137
AUCinf	日 * $\mu$ g/mL	344	377	299	340	11
AUCinf/D	日 *kg/mL	0.172	0.189	0.150	0.170	11

【 0 6 4 1 】

表 C - 4 3 : カニクイザルにおける 1 0 m g / k g での単回静脈内ボラス投与後の I L 6 R 3 0 5 の基礎 P K パラメータ。幾つかの動物に関する最終パラメータを 2 つのデータ点のみで算出した ( デフォルト設定で  $R^2$  は 1 である ) 。

【表 5 3】

IL6R305: 静脈内 10 mg/kg					
パラメータ	単位	25m	26f	平均	CV %
Vss	mL/kg	38.3	59.2	48.7	30
CL	mL/日/kg	6.91	8.60	7.76	15
MRT	日	5.54	6.88	6.21	15 <sup>10</sup>
$t_{1/2} \lambda_1$	日	5.63	9.10	7.37	33
$\lambda_1$ 下位	日	2	2	2	0
$\lambda_1$ 上位	日	14	14	14	0
$R^2 t_{1/2} \lambda_1$		0.941	0.968	0.955	2
$t_{1/2} \lambda_2$	日	1.26	1.16	1.21	6
$\lambda_2$ 下位	日	21	21	21	0
$\lambda_2$ 上位	日	29	29	29	0
$R^2 t_{1/2} \lambda_2$		1.00	1.00	1.00	0 <sup>20</sup>
AUClast	日 * $\mu$ g/mL	1447	1162	1305	15
AUCextrap	%	0.008	0.009	0.008	11
AUCinf	日 * $\mu$ g/mL	1447	1162	1305	15
AUCinf/D	日 *kg/mL	0.145	0.116	0.130	15

【 0 6 4 2 】

表 C - 4 4 : 完全なナノボディに対する抗 I L 6 R 3 0 4 抗体及び抗 I L 6 R 3 0 5 抗体の発生の概要

【表 5 4】

IL6R304	カニクイザル	ADA陽性*	IL6R305	カニクイザル	ADA陽性*
0,4 mg/kg	11m	> 7 日	0,4 mg/kg	19m	> 7 日
	12m	> 7 日		20f	> 7 日
	13f	> 7 日		21f	> 7 日
2 mg/kg	14m	> 7 日	2 mg/kg	22m	> 14 日
	15f	> 14 日		23m	ADA検出されず
	16f	投与前の値が高いため結果なし		24f	> 14 日
10 mg/kg	17m	> 14 日	10 mg/kg	25m	> 14 日
	18f	> 14 日		26f	> 14 日

\*7日超:TD7で陰性、TD14以上で陽性;14日超:TD14で陰性、TD21以上で陽性

【 0 6 4 3 】

表 C - 4 5 : カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の薬力学的パラメータ

【表 5 5】

パラメータ	推定値	%CV
$K_{in}$ (ng/mL/h)	2.40	7.37
$R_0$ (ng/mL)	21.4	5.23
$I_{max}$ (%)	0.970	0.34
$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	0.146	15.8
$IC_{50}$ (nM)	5.23	
n	1.43	15.3

【 0 6 4 4 】

表 C - 4 6 : 1 mg / k g、5 mg / k g、1 0 mg / k g、2 5 mg / k g 又は 1 0 0 mg / k g での単回静脈内ボラス投与後のカニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の平均 ( ± 標準偏差 ) の重要な P K パラメータの概要

10

20

30

【 表 5 6 】

パラメータ	単位	1 mg/kg			5 mg/kg			10 mg/kg			25 mg/kg		
		n	平均	標準偏差	n	平均	標準偏差	n	平均	標準偏差	n	平均	標準偏差
C <sub>0</sub>	µg/mL	3	26.2	3.8	3	108.7	24.0	3	196.5	30.8	3	562.3	66.4
AUC <sub>inf</sub>	µg·h/mL	2 <sup>a</sup>	2015	190	2 <sup>b</sup>	12338	768	2	25983	440	3	89526	28466
t <sub>1/2</sub>	d	2 <sup>a</sup>	1.81	0.00	2 <sup>b</sup>	5.01	0.76	2	6.37	0.19	3	6.24	0.76
CL	mL/h/kg	2 <sup>a</sup>	0.50	0.04	2 <sup>b</sup>	0.41	0.02	2	0.39	0.01	3	0.30	0.11
Vz	mL/kg	2 <sup>a</sup>	46.5	3.0	2 <sup>b</sup>	67.3	18.5	2	82.3	1.7	3	72.6	18.1
DN AUC <sub>inf</sub>	µg·h/mL	2 <sup>a</sup>	2015	-	2 <sup>b</sup>	2468	-	2	2598	-	3	3581	-

パラメータ	単位	100 mg/kg	
		n	標準偏差
C <sub>0</sub>	µg/mL	1	2840.5
AUC <sub>inf</sub>	µg·h/mL	1	540612
t <sub>1/2</sub>	d	1	8.9
CL	mL/d/kg	1	0.18
Vz	mL/kg	1	57.6
DN AUC <sub>inf</sub>	µg·h/mL	1	5406

DN: 1mg/kgへの用量正規化

<sup>a</sup> 標的媒介性のクリアランスが観察されなかったため記述統計から動物を排除した: t 1/2=4.3日

<sup>b</sup> 標的媒介性のクリアランスが観察されたため記述統計から動物を排除した: t 1/2=2.2日

【 0 6 4 5 】

表 C - 4 7 : カニクイザルにおける I L 6 R 3 0 4 の薬物動態パラメータ

10

20

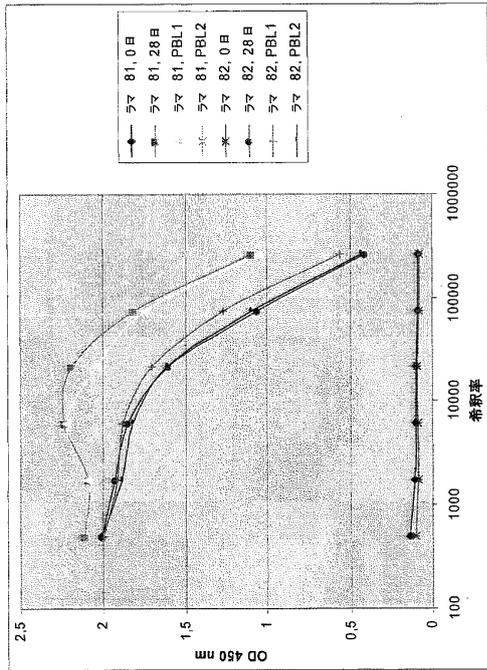
30

40

【表 5 7】

パラメータ	推定値	%CV	
$V_c$ (mL/kg)	45.6	5.23	
$V_d$ (mL/kg)	14.8	15.2	
$V_s$ (mL/kg)	24.9	16.1	10
$V_{dss}$ (mL/kg)	85.3		
$CL_{NON-IL6R}$ (mL/h/kg)	0.237	3.39	10
$CL_d$ (mL/h/kg)	0.0475	29.9	
$CL_s$ (mL/h/kg)	2.86	40.4	
$V_{max}$ ( $\mu$ g/h/kg)	1.971	11.2	20
$K_m$ ( $\mu$ g/mL)	0.714	30.4	
$CL_{IL6R}$ (mL/h/kg)	2.76		

【 図 1 】



【 図 2 】

Figure 2  
U266B1

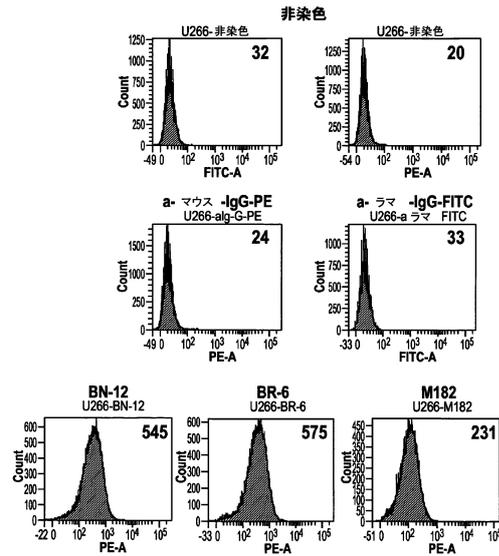
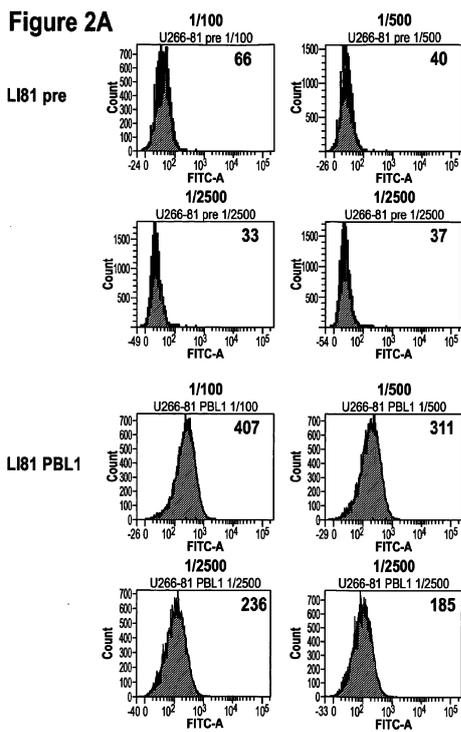


Figure 1

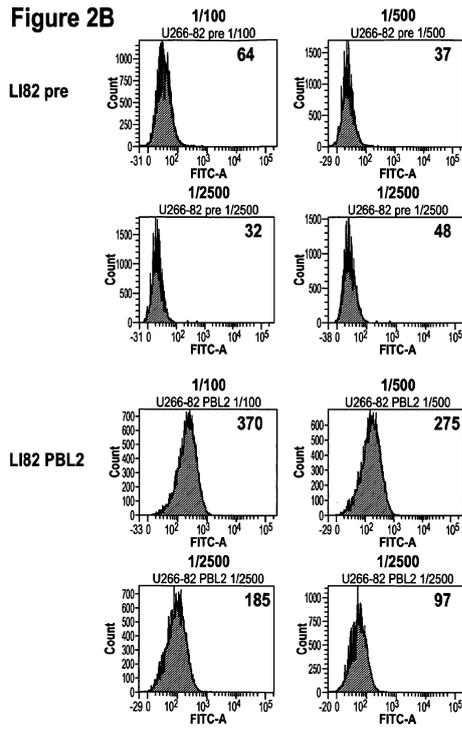
【 図 2 A 】

Figure 2A



【 図 2 B 】

Figure 2B





【 図 6 B 】

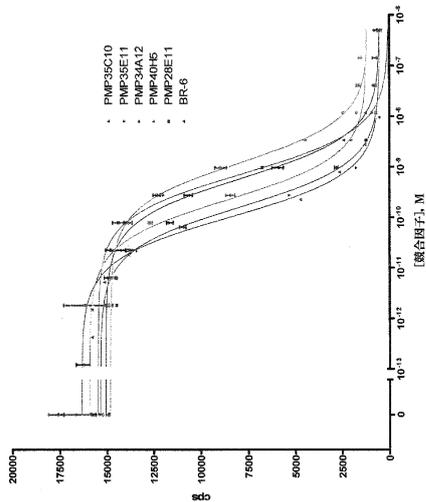


Figure 6B

【 図 6 C 】

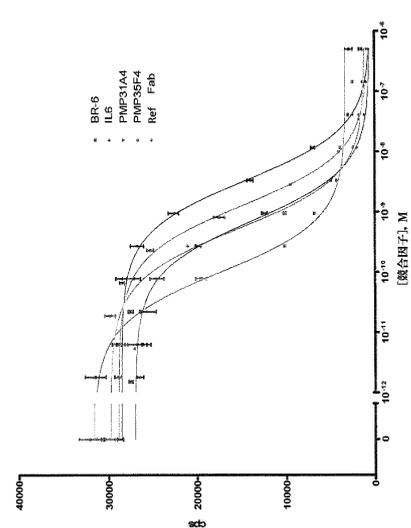


Figure 6C

【 図 7 】

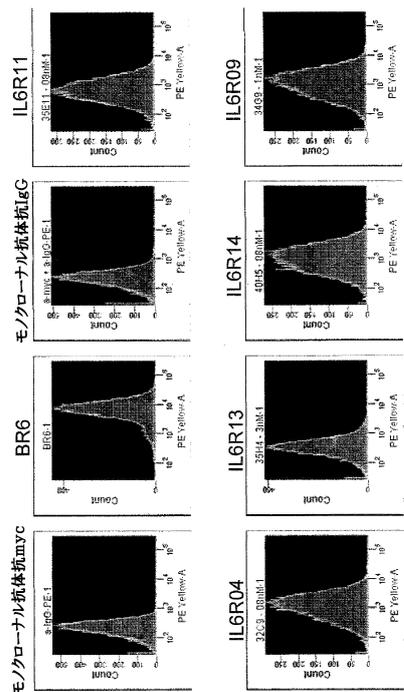


Figure 7

【 図 8 】

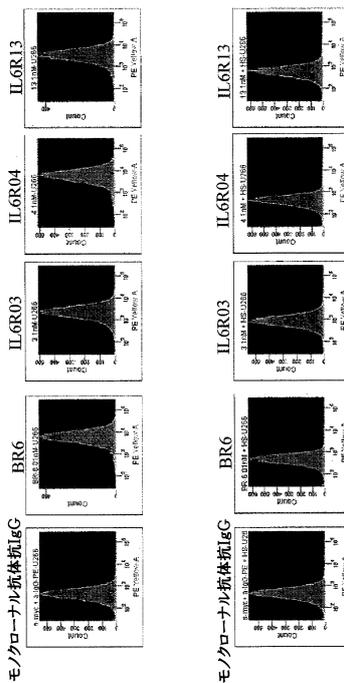


Figure 8

【 図 9 】

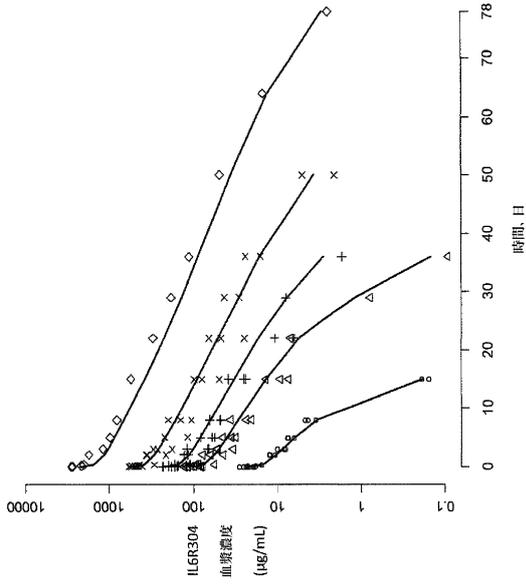


Figure 9

【 図 10 】

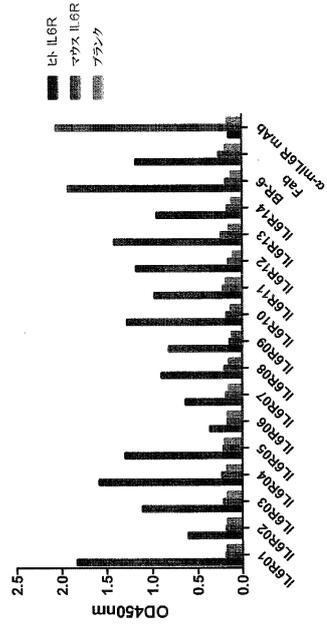


Figure 10

【 図 11 】

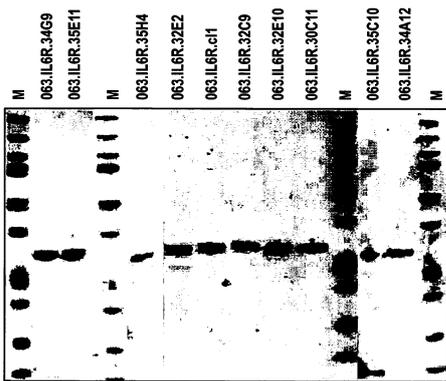


Figure 11

【 図 12 】

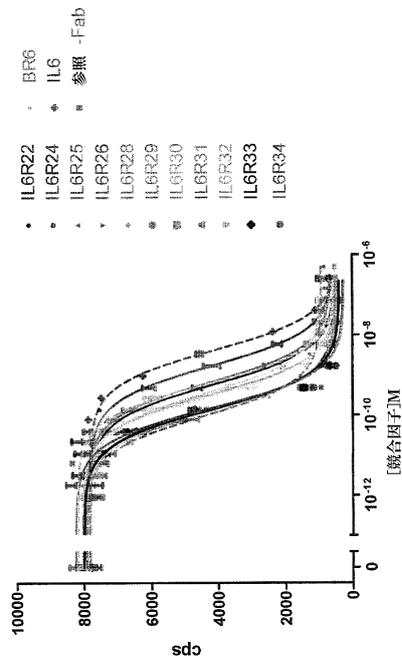


Figure 12

【 1 3 】

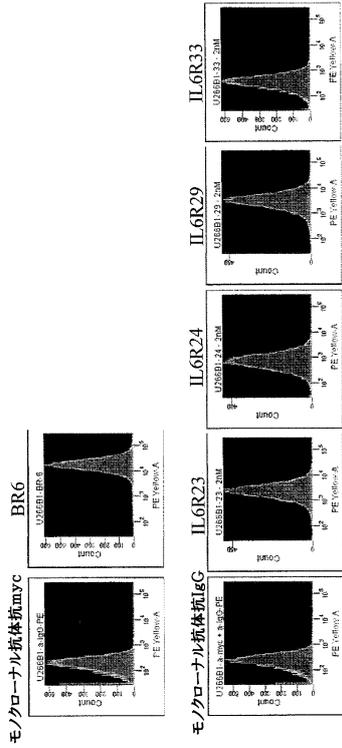


Figure 13

【 1 4 】

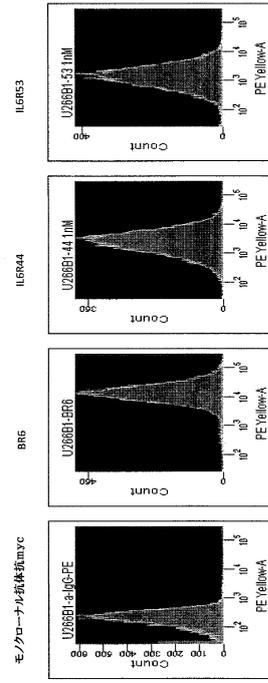


Figure 14

【 1 5 】

IL6R03 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 (880 ID NO: 35)  
 DP47 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 (880 ID NO: 36)  
 DP51 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 (880 ID NO: 37)  
 DP53 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 (880 ID NO: 38)  
 DP54 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 (880 ID NO: 39)  
 IL6R04 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP51 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP53 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP54 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R13 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP29 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP47 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP51 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP53 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 DP54 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS

Figure 15

【 1 6 A 】

IL6R03 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R61 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R62 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R63 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R64 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R65 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R66 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R67 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R68 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R69 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R70 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R71 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R72 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R73 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R74 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS  
 IL6R75 EVLVVSSGGLVQPSGALALSCASG...STNANVSGWRTIIRNANVTYLOMS...GDTAVVY...FTNSVLDVLDVWQDVTYSS

Figure 16A



【 20 】

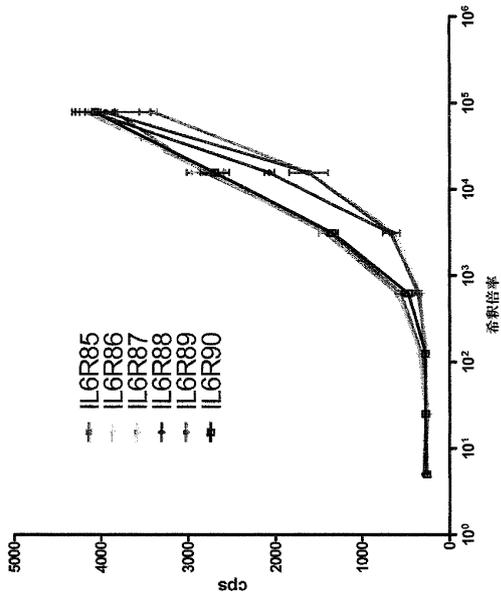


Figure 20

【 21 】

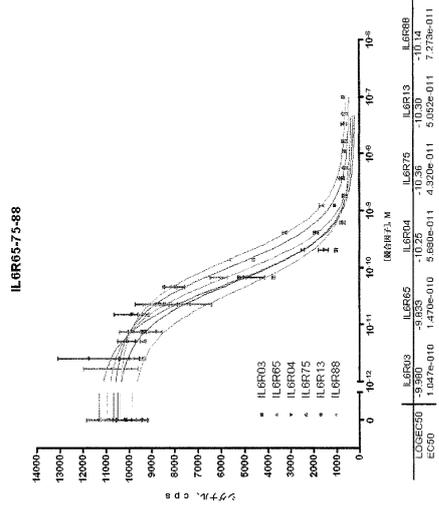


Figure 21

【 22 A 】

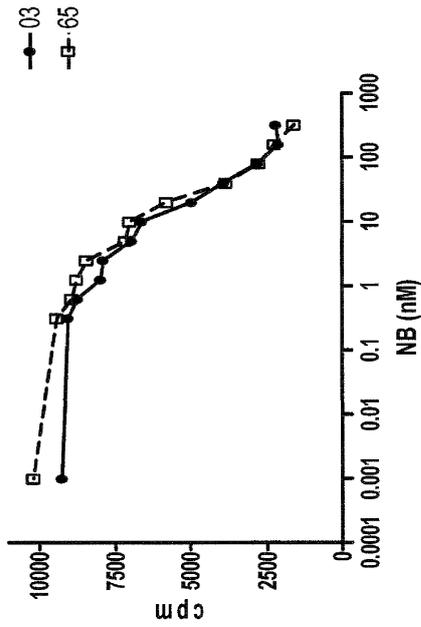


Figure 22A

【 22 B 】

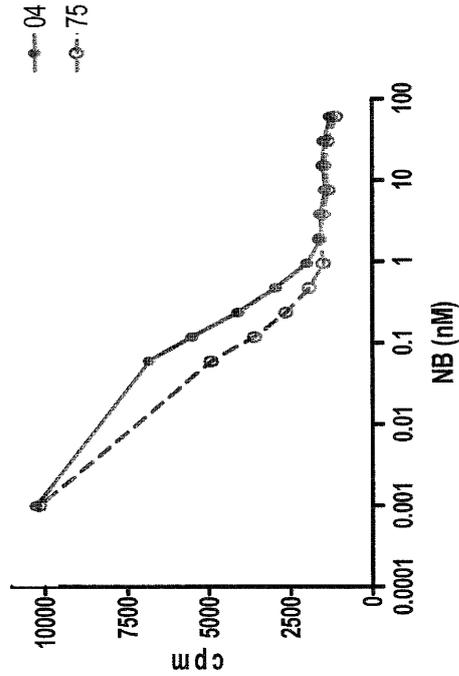


Figure 22B

【 2 2 C 】

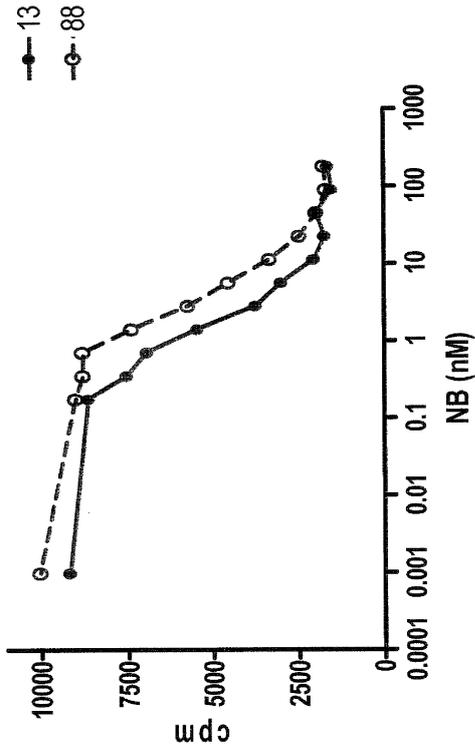


Figure 22C

【 2 3 】

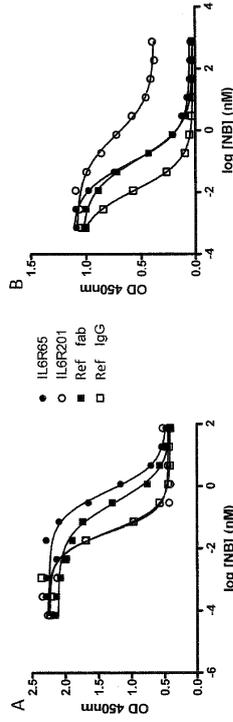


Figure 23

【 2 4 】

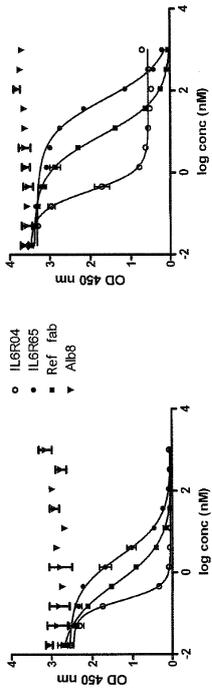


Figure 24

【 2 5 】

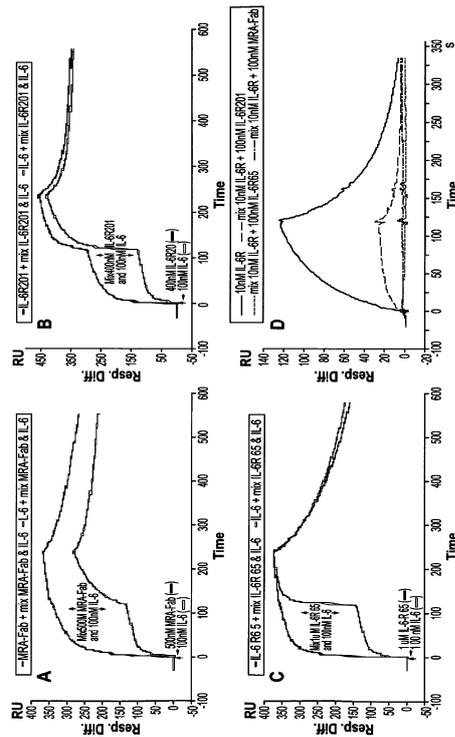


Figure 25

【 26 】

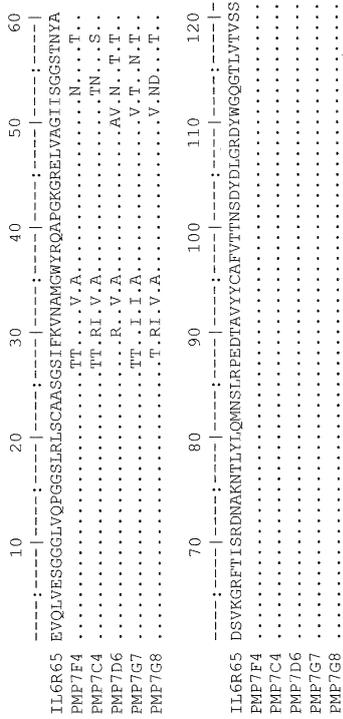


Figure 26

【 27 】

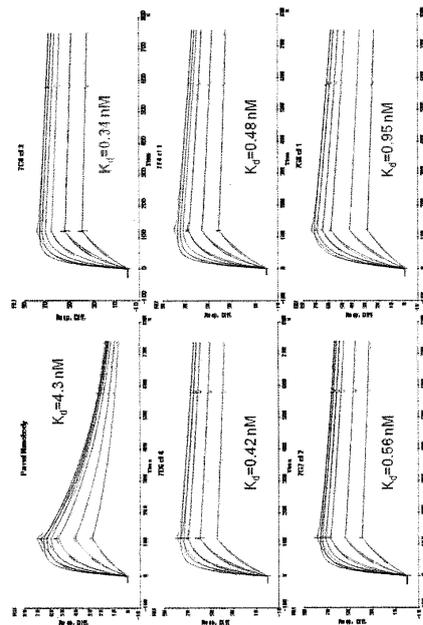


Figure 27

【 28 A 】

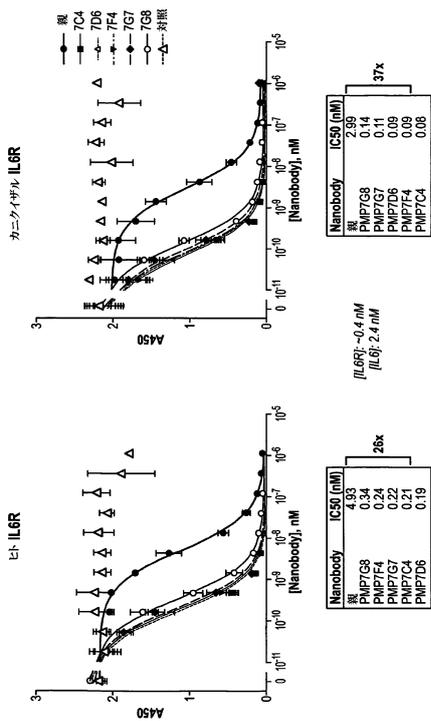


Figure 28A

【 28 B 】

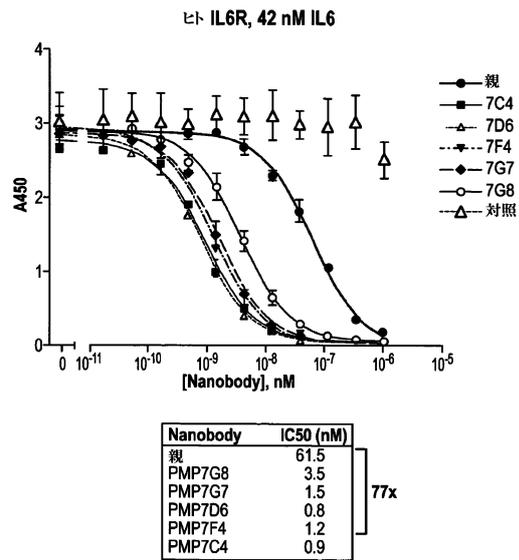


Figure 28B

【 29 】

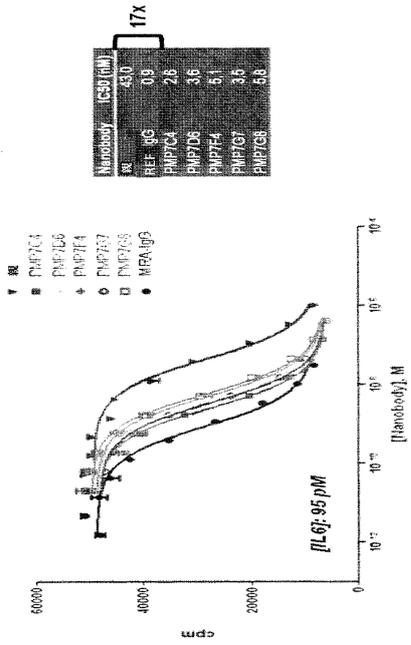


Figure 29

【 30 A 】

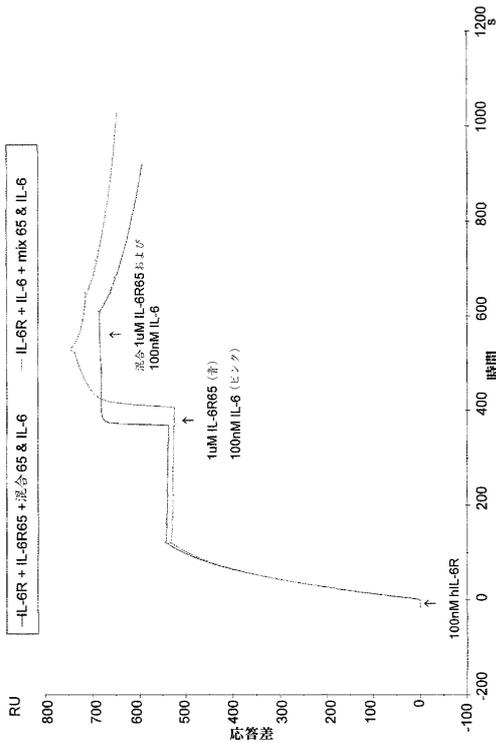


Figure 30A

【 30 B 】

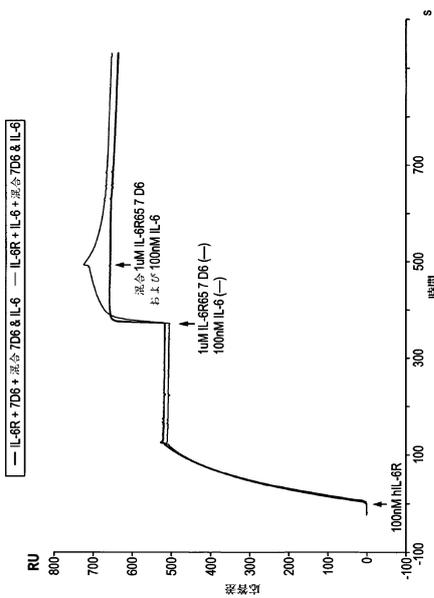


Figure 30B

【 30 C 】

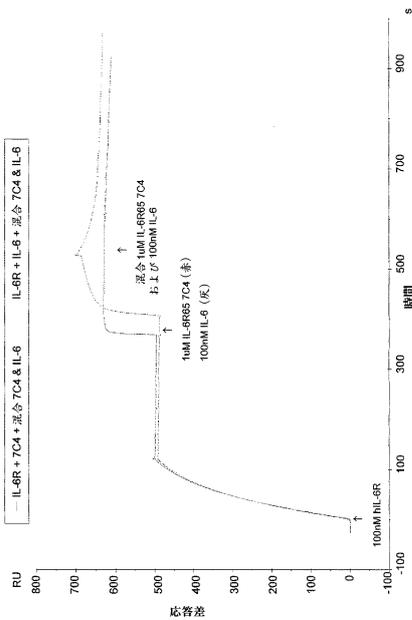


Figure 30C

【 3 1 】

IL6R65 EVQLVESGGGLVQFGGSLRLSAAASGSIKFKVNAWGVRQAPGKGRHELIVAGIISGGSTNYADSVKQ  
 PMP20F6 .....V..I..V..A.....V.....S.....  
 PMP20A11 .....V..I..V..A.....S.....  
 PMP20E10 .....V..I..V..A.....S.....  
 PMP21A10 .....I..V..A.....VT..S.....  
 PMP21D11 .....V..I..V..A.....VT..S.....  
 IL6R65 RFTLISRONAKNTLYIQMNSLRPEPTAVYICAFVTTNSDYDLGRDYWGQGTIVTVSS  
 PMP20F6 .....I.....R.....  
 PMP20A11 .....I..E.....R.....  
 PMP20E10 .....I..E.....R.....  
 PMP21A10 .....I..E.....R.....  
 PMP21D11 .....I..E.....R.....

Figure 31

【 3 2 】

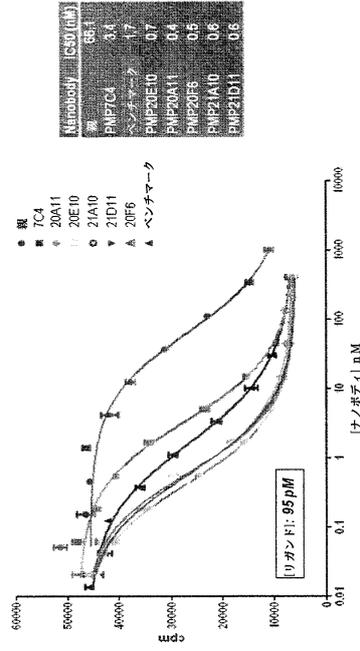


Figure 32

【 3 3 A 】

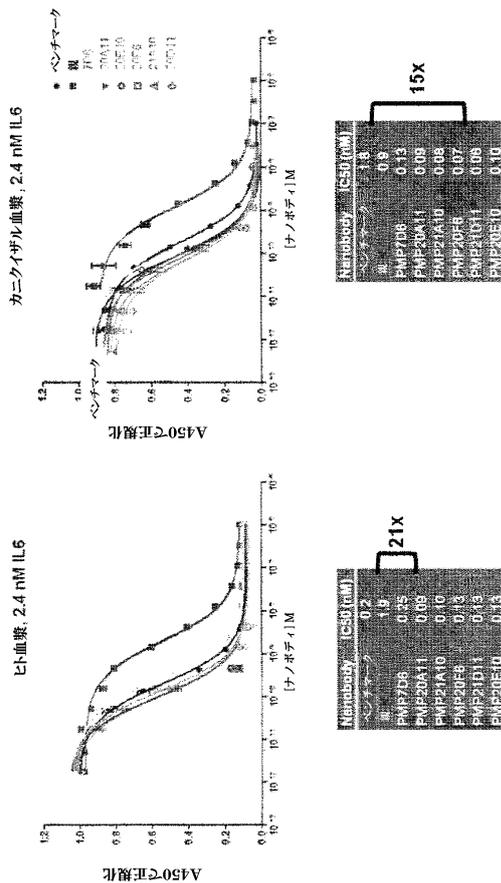


Figure 33A

【 3 3 B 】

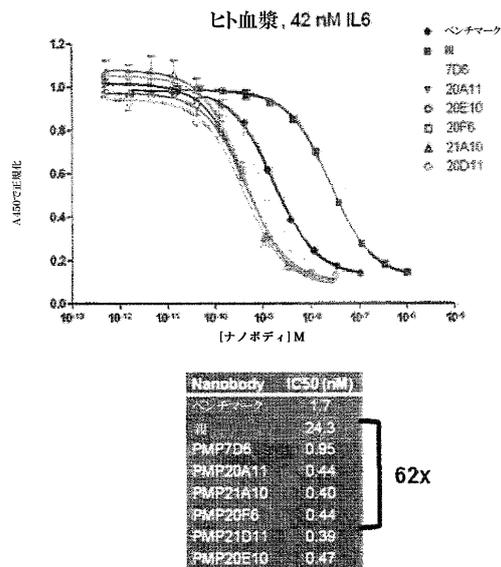


Figure 33B

【 3 4 】

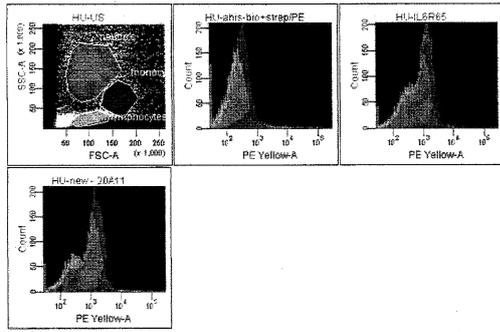


Figure 34

【 3 5 】

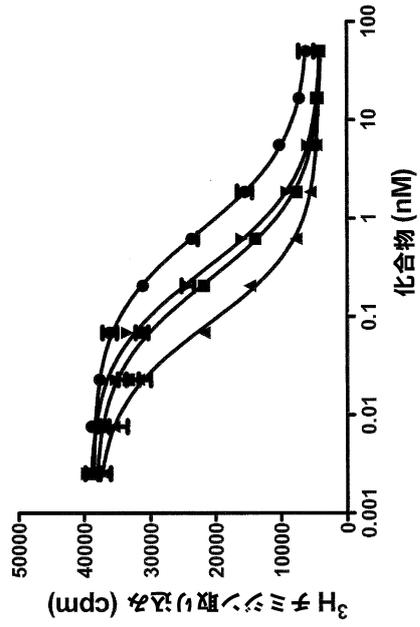


Figure 35

【 3 6 】

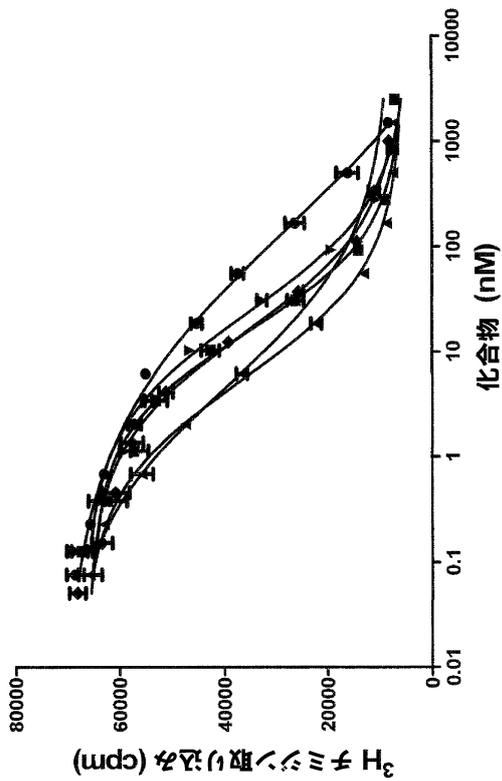


Figure 36

【 3 7 】

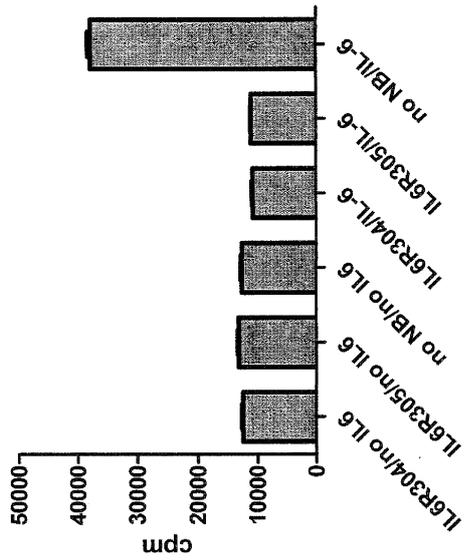


Figure 37

【 図 38 】

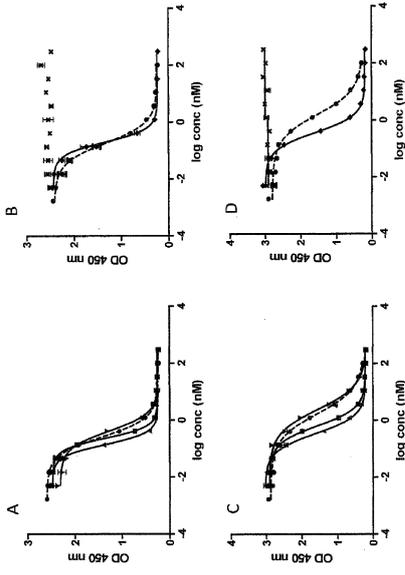


Figure 38

【 図 39 】

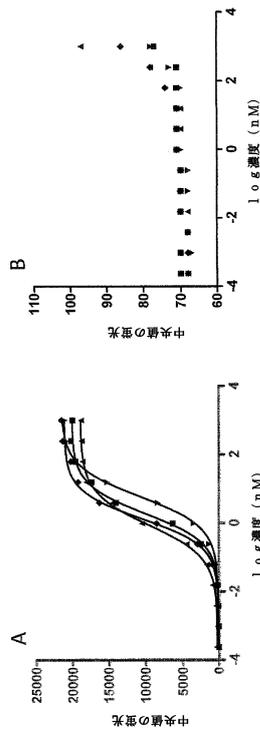


Figure 39

【 図 40 】

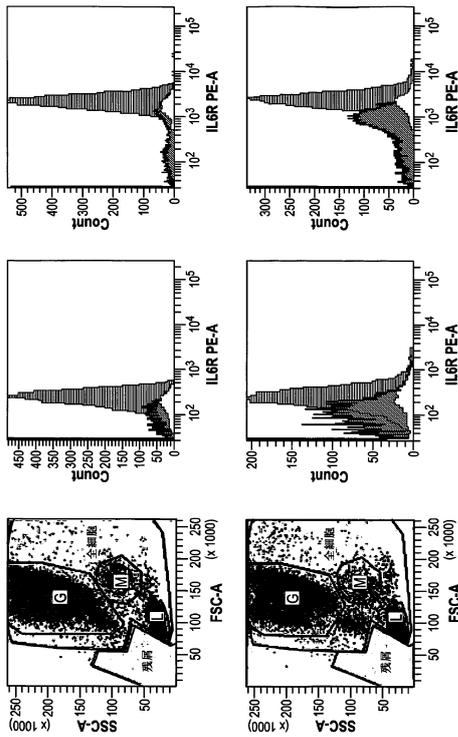


Figure 40

【 図 41 】

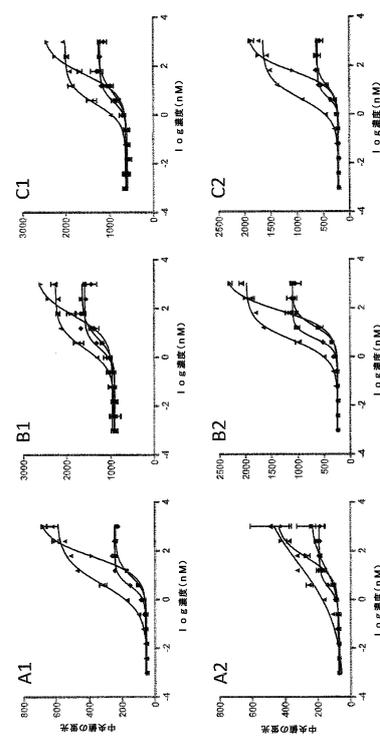


Figure 41

【 4 2 】

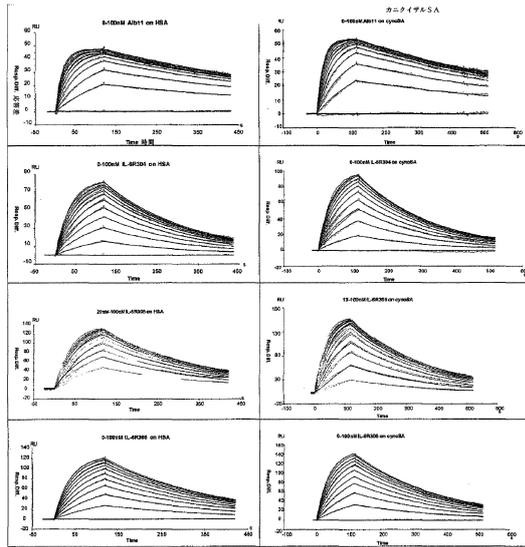


Figure 42

【 4 3 】

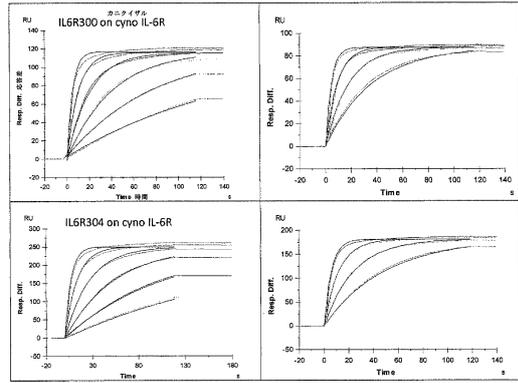


Figure 43

【 4 4 】

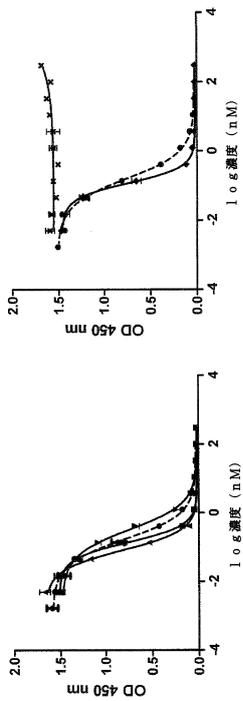


Figure 44

【 4 5 】

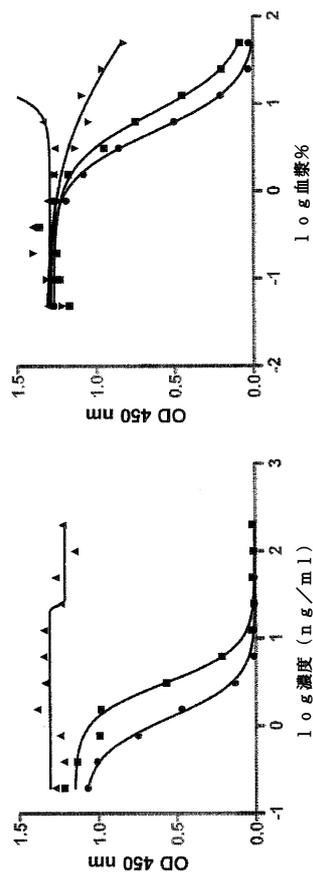


Figure 45

【 図 46 】

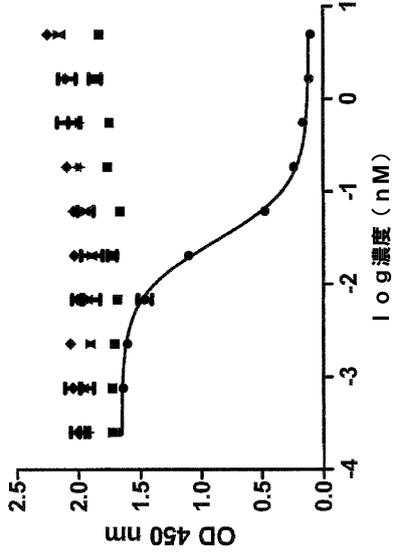


Figure 46

【 図 47 】

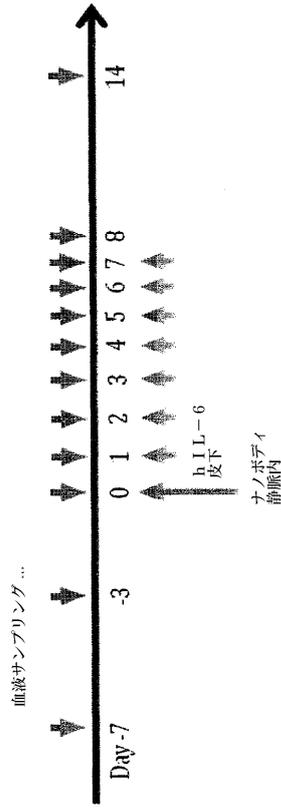


Figure 47

【 図 48 】

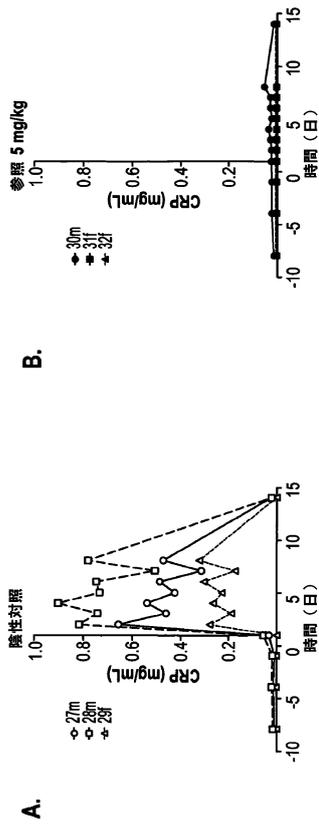


Figure 48

【 図 48 A 】

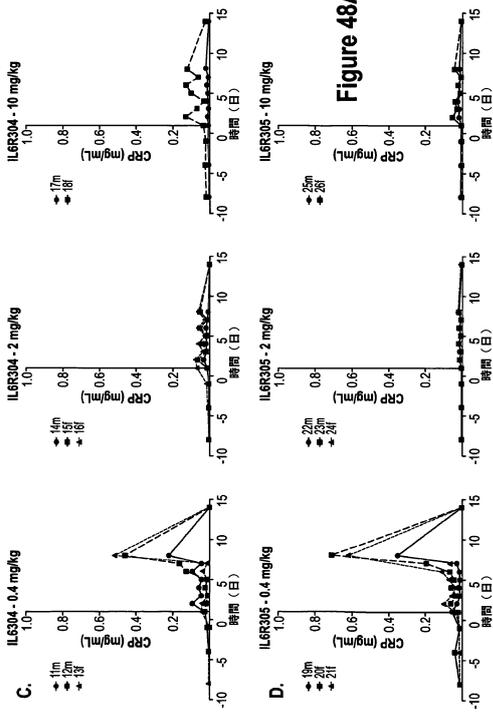


Figure 48A

【 図 49 】

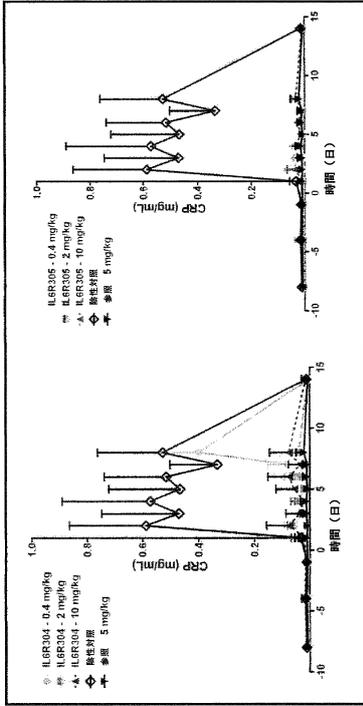


Figure 49

【 図 50 】

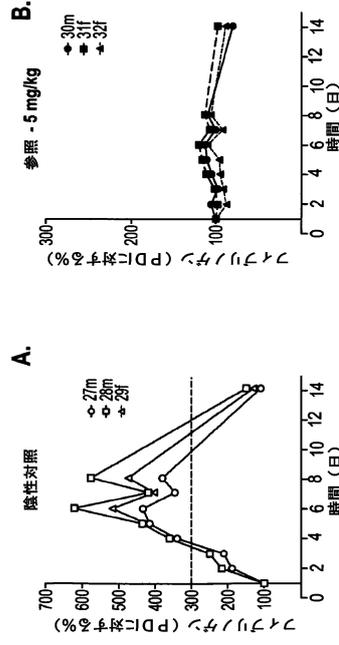


Figure 50

【 図 50 A 】

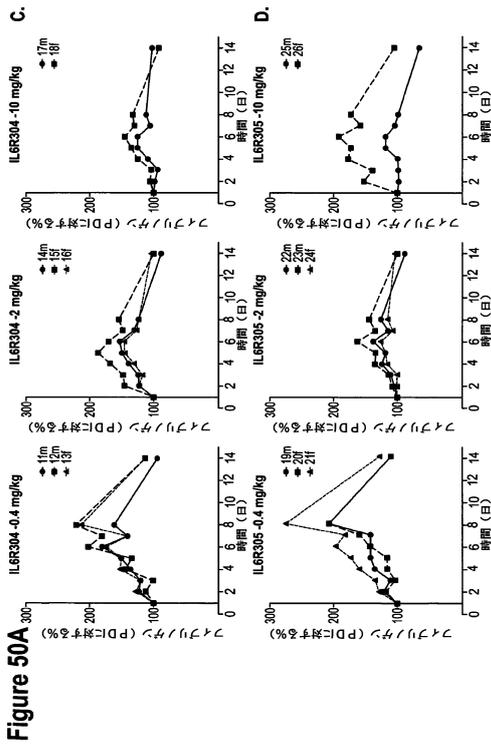


Figure 50A

【 図 51 】

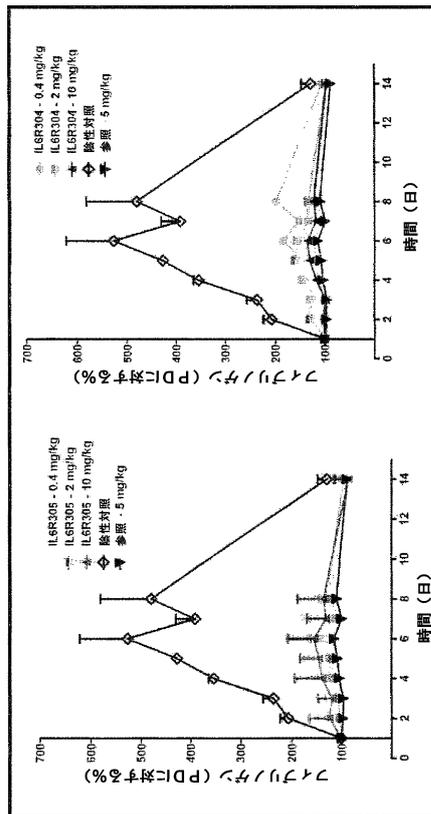
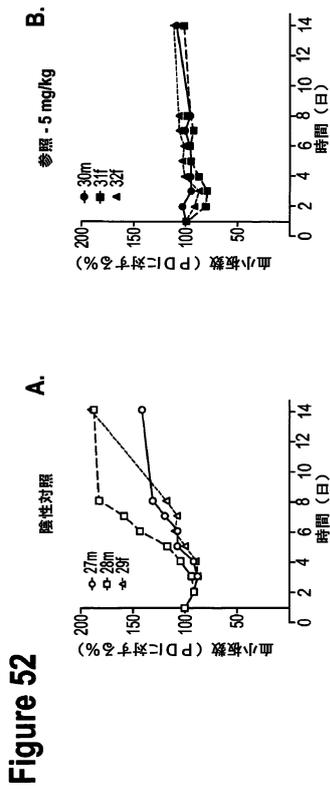


Figure 51

【 図 5 2 】



【 図 5 2 A 】

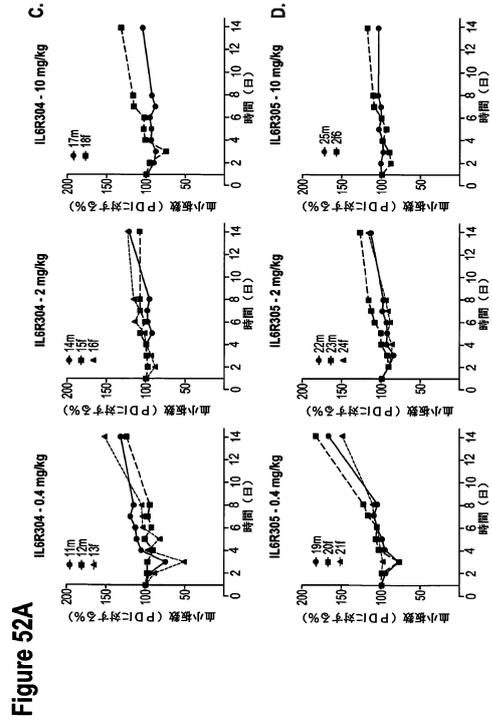


Figure 52A

【 図 5 3 】

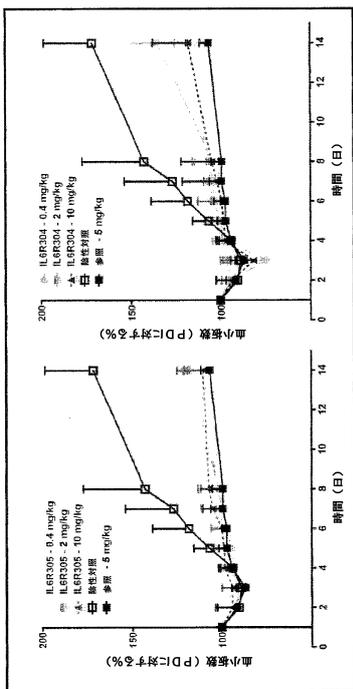


Figure 53

【 図 5 4 】

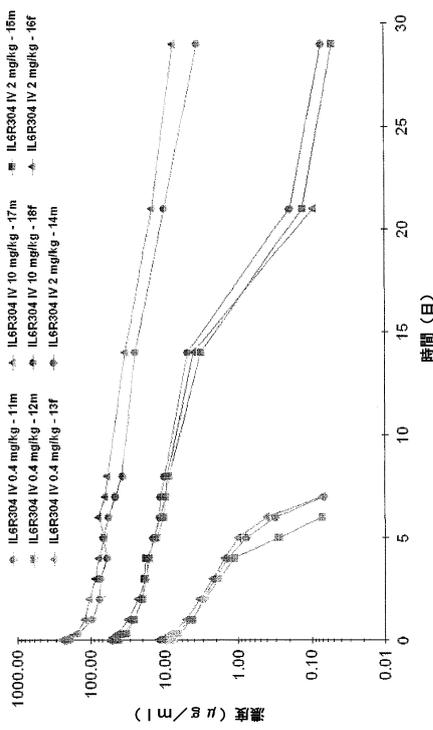


Figure 54

【 5 5 】

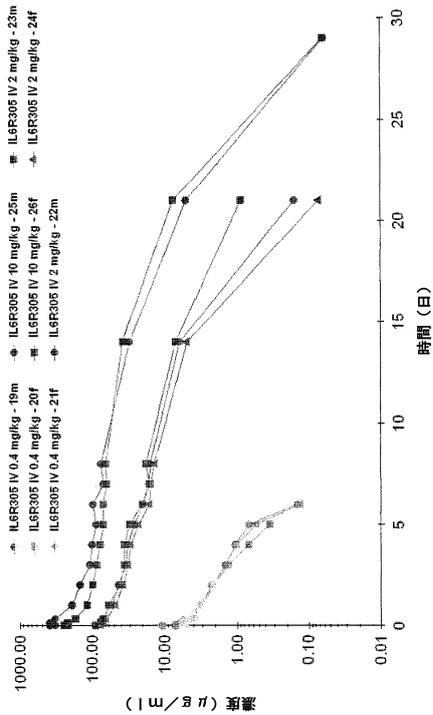


Figure 55

【 5 6 】

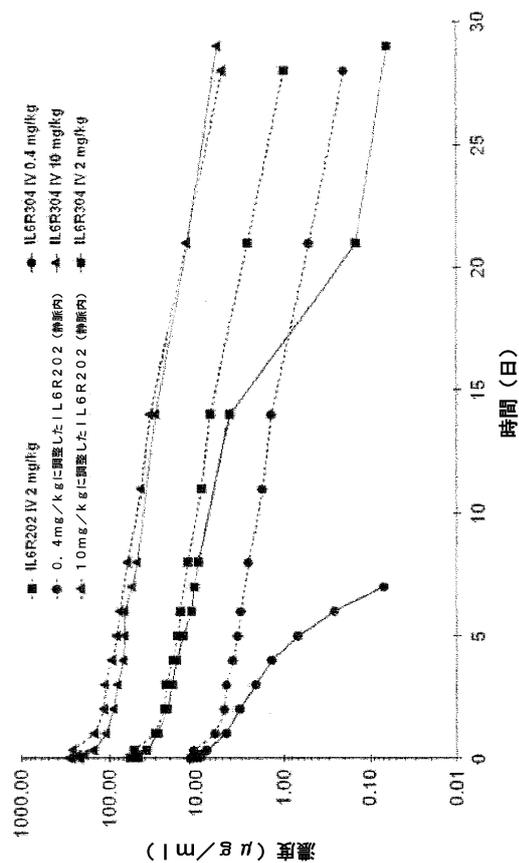


Figure 56

【 5 7 】

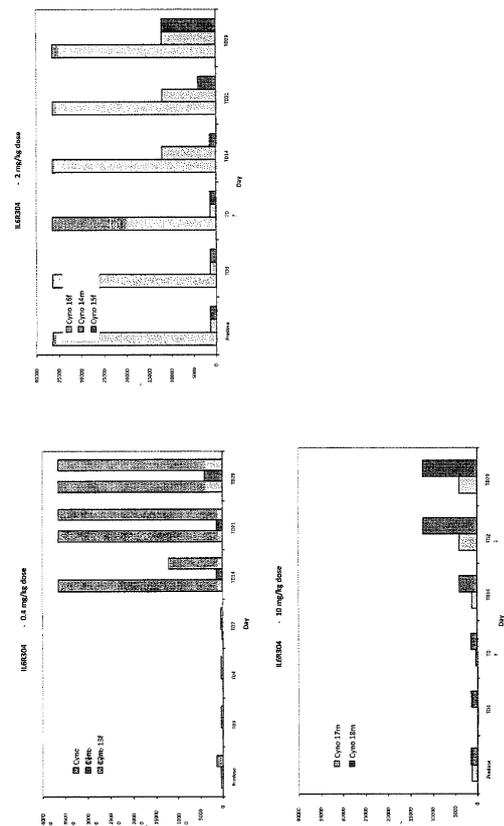


Figure 57

【 5 8 】

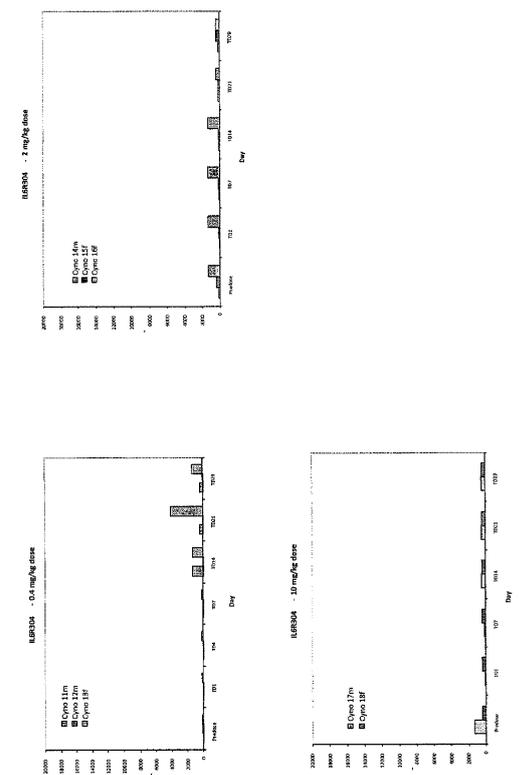


Figure 58

【 59 】

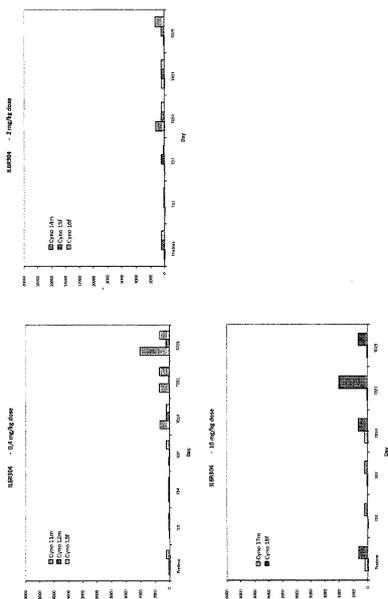


Figure 59

【 60 】

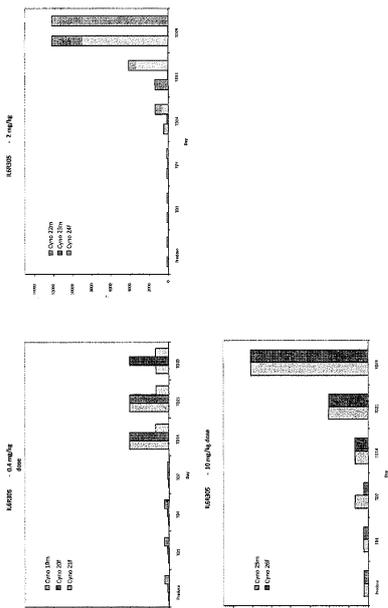


Figure 60

【 61 】

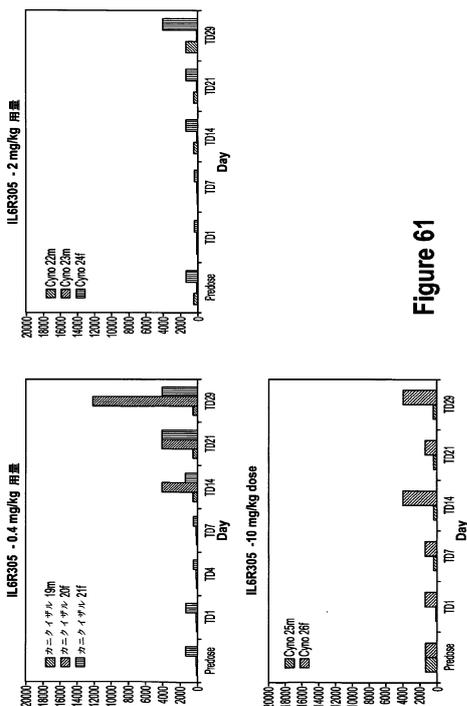


Figure 61

【 62 】

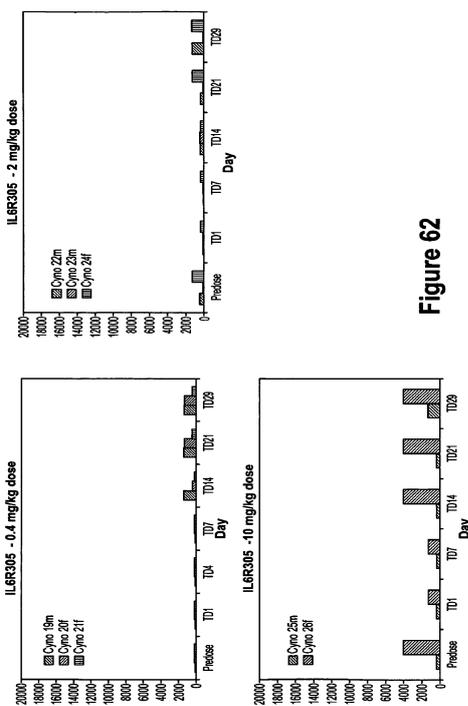


Figure 62

【 図 6 3 】

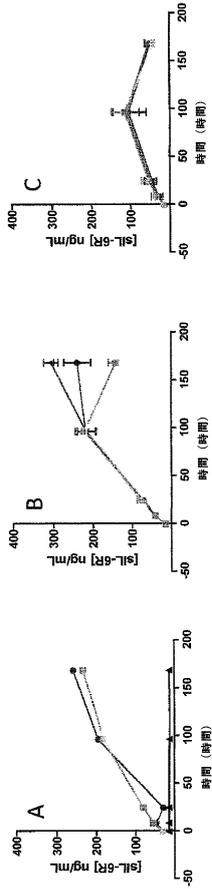


Figure 63

【 図 6 4 B 】

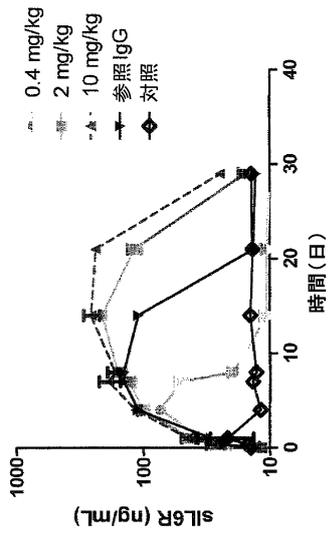


Figure 64B

【 図 6 4 A 】

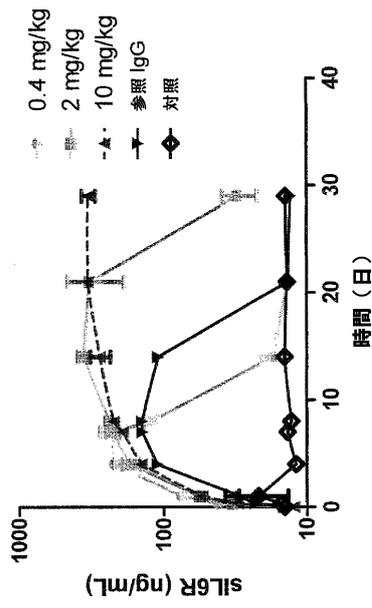


Figure 64A

【 図 6 5 A 】

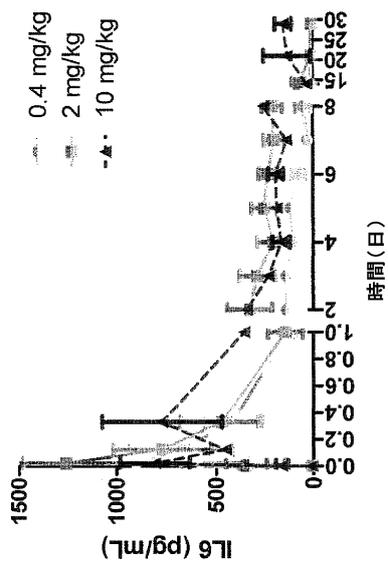


Figure 65A

【 図 6 5 B 】

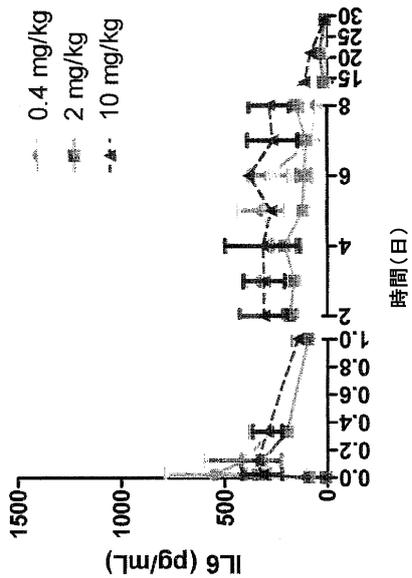


Figure 65B

【 図 6 5 C 】

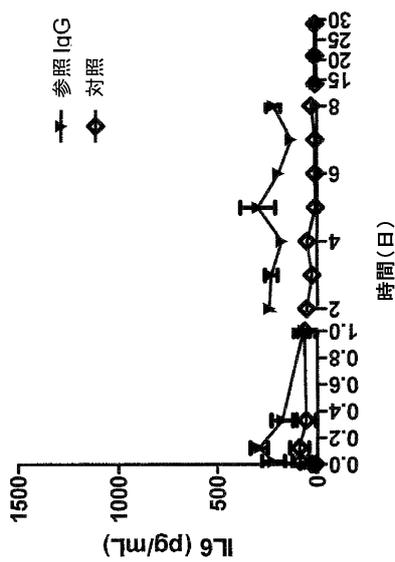


Figure 65C

【 図 6 5 D 】

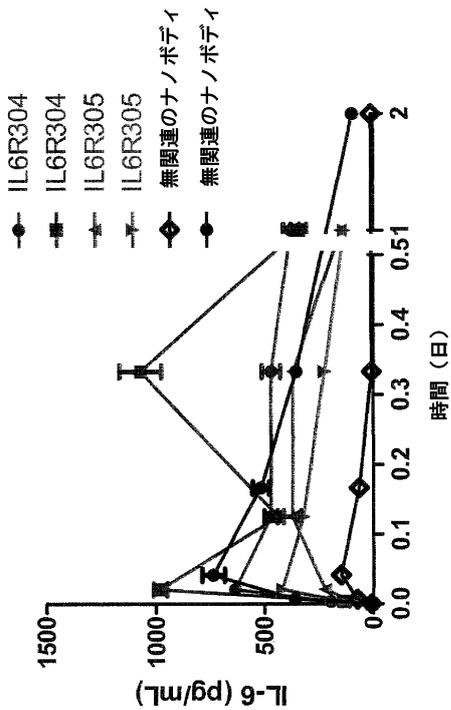


Figure 65D

【 図 6 6 A 】

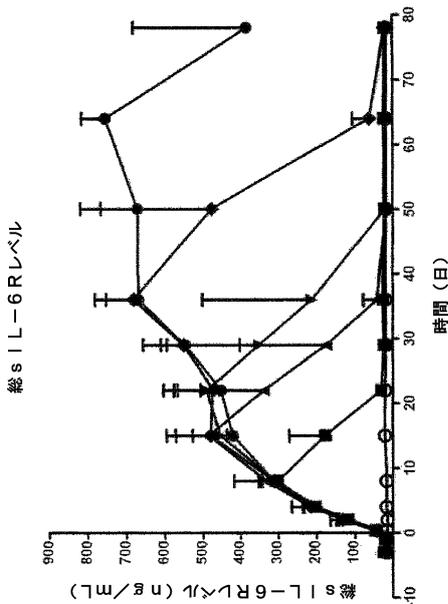


Figure 66A

【 図 66 B 】

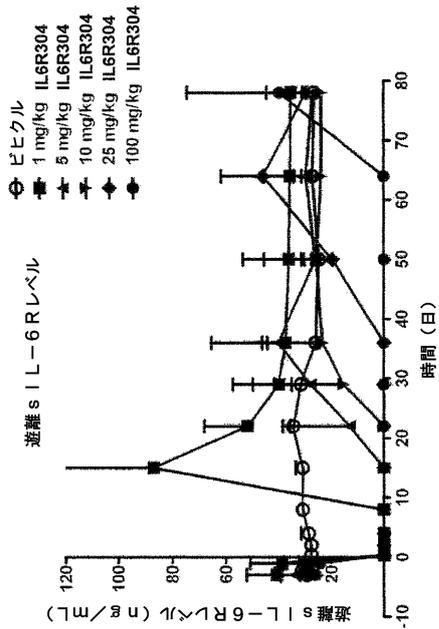


Figure 66B

【 図 67 】

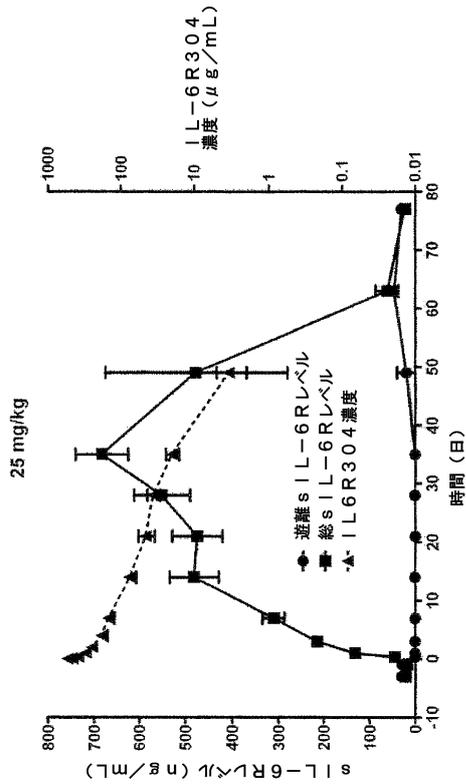


Figure 67

【 図 68 】

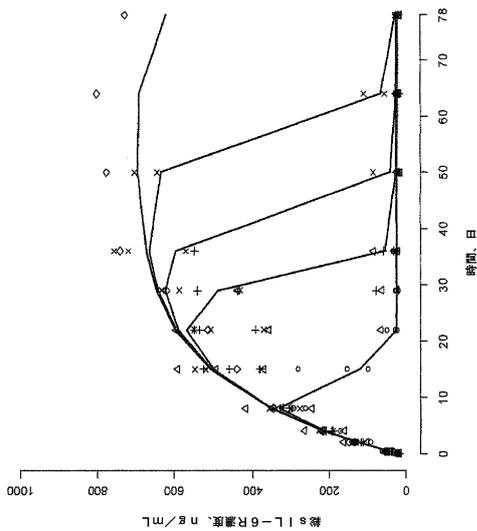


Figure 68

【 図 69 】

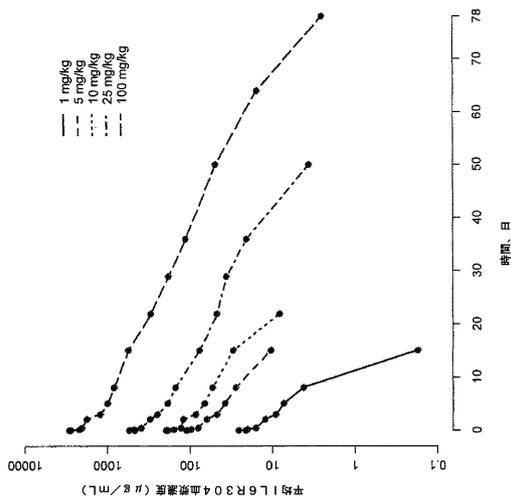


Figure 69

【 図 70 】

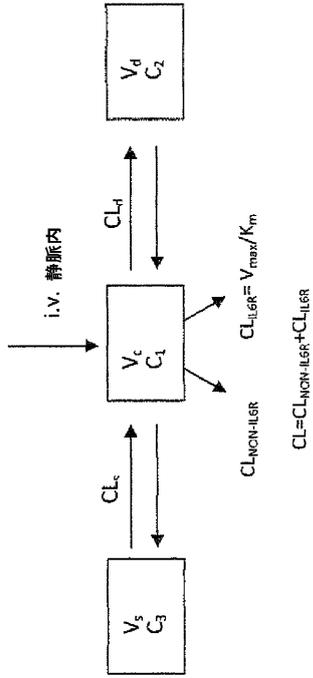


Figure 70

【 配列表 】

0005647222000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146422

弁理士 田中 聖

(72)発明者 バイラーナエール, エルス, アンナ アリス

ベルギー, ベー - 9 8 8 1 ベレム, マルケッテストラート 2 0 - アー

(72)発明者 フェルフェルケン, セドリック ジョセフ ネオテレ

ベルギー, ベー - 9 8 2 0 メレルベーケ, ズヴェイナールゼステーンウエグ 7 9

(72)発明者 コルクマン, ヨースト アレクサンドル

オランダ, エンエム - 3 9 5 1 イクスヴェー マールン, ベルケンラーン 7

(72)発明者 ファン ロイ, マールテン

ベルギー, ベー - 9 8 2 0 メレルベーケ, レンベルグセステーンウエフ 2 6

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2008/020079 (WO, A1)

国際公開第2009/004065 (WO, A2)

Mol. Cancer Ther., 2008年, vol.7, no.8, pp.2288-2297

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed